



T.C.
KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

***Annona muricata* BİTKİ EKSTRAKTININ MEME
KANSERİ HÜCRE HATTINDA VE *Drosophila
melanogaster* MODEL ORGANİZMA ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE
ARAŞTIRILMASI**

FATMA KÜBRA ATA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KIRŞEHİR, 2020



T.C.
KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

***Annona muricata* BİTKİ EKSTRAKTININ MEME
KANSERİ HÜCRE HATTINDA VE *Drosophila
melanogaster* MODEL ORGANİZMA ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE
ARAŞTIRILMASI**

FATMA KÜBRA ATA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

I. DANIŞMAN

Doç.Dr. Fahriye ERCAN

II. DANIŞMAN

Doç.Dr. Serap Yalçın AZARKAN

KIRŞEHİR, 2020

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek yazıldığını, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Fatma Kübra ATA



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.



ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini benden esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın danışman hocam Doç.Dr. Serap Yalçın AZARKAN ve Doç.Dr. Fahriye ERCAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmamda yardımlarını benden esirgemeyen sayın Prof.Dr. Elif SEVİM ve Doç.Dr. Aslıhan GÜNEL'e ve arkadaşım Arş.Gör. Elanur TUYSUZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Beni bu günlere sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştirerek getiren ve benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen bu hayattaki en büyük şansım olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Saygılarımla.

2020, Kasım

Fatma Kübra ATA

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa No |
|--|----------|
| ÖNSÖZ | iv |
| İÇİNDEKİLER..... | v |
| ŞEKİL VE DENKLEM LİSTESİ | viii |
| TABLO LİSTESİ..... | xi |
| SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ..... | xii |
| ÖZET | xiii |
| ABSTRACT | xv |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Amaç | 1 |
| 1.2. Kanser Biyolojisi | 2 |
| 1.3. Meme Kanseri..... | 4 |
| 1.4. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri..... | 6 |
| 1.4.1. Cerrahi Tedavi | 6 |
| 1.4.2. Hormonal Tedavi..... | 6 |
| 1.4.3. Hedefe Yönelik Tedavi..... | 7 |
| 1.4.4. Radyoterapi..... | 7 |
| 1.4.5. Kemoterapi | 7 |
| 1.4.6. Meme Kanseri Tedavi Yöntemlerinin Dezavantajları..... | 8 |
| 1.5. Metastaz ve İnvazivite | 9 |
| 1.6. Meme Kanserinde Metastaz..... | 10 |
| 1.7. <i>Annona muricata</i> | 11 |
| 1.7.1. <i>A. muricata</i> 'nın Kimyasal Bileşenleri | 12 |
| 1.7.2. Annonaceous Asetojenin | 15 |
| 1.7.3. <i>A. muricata</i> 'nın Biyolojik Aktiviteleri | 15 |
| 1.7.3.1. Antiartritik Aktivite..... | 15 |
| 1.7.3.2. Antikonvülzan Aktivite | 15 |
| 1.7.3.3. Antidiyabetik ve Hipolipidemik Aktivite..... | 16 |
| 1.7.3.4. Anti-inflamatuar Aktivite | 16 |
| 1.7.3.5. Antioksidan Aktivite | 16 |
| 1.7.3.6. Antihipertansif Aktivite | 16 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1.7.3.7. | Antiparazitik Aktivite..... | 16 |
| 1.7.3.8. | İnsektisid Aktivite | 17 |
| 1.7.3.9. | Yara İyileştirme Aktivite..... | 17 |
| 1.7.3.10. | Antikanser Aktivite | 17 |
| 1.7.4. | <i>A. muricata</i> 'nın Moleküler Etki Mekanizması ve Toksisitesi..... | 19 |
| 1.7.4.1. | Apoptoz Mekanizması | 20 |
| 1.7.5. | <i>A. muricata</i> 'nın Dünyada Etnomedikal Kullanımı..... | 21 |
| 1.7.6. | Ticari Olarak Satılan <i>A. muricata</i> Ürünleri | 21 |
| 1.8. | İki Boyutlu ve Üç Boyutlu Hücre Kültürü..... | 22 |
| 1.8.1. | Asılı Damla Metodu (<i>ing.</i> Hanging Drop Metod)..... | 24 |
| 1.9. | <i>Drosophila melanogaster</i> Model Organizması..... | 25 |
| 1.10. | Biyoinformatik Programlar | 26 |
| 1.10.1. | Protein Veri Bankası (<i>ing.</i> Protein Data Bank, PDB)..... | 26 |
| 1.10.2. | PubChem Programı | 27 |
| 1.10.3. | Moleküler Kenetlenme (<i>ing.</i> Molecular Docking) Programı | 27 |
| 1.10.4. | İmage J Programı..... | 28 |
| 2. | KAYNAK ARAŞTIRMASI..... | 29 |
| 3. | MATERYAL VE METOD..... | 31 |
| 3.1. | Materyal..... | 31 |
| 3.1.1. | Hücre Hatları | 31 |
| 3.1.2. | Kimyasal ve Reaktifler | 31 |
| 3.1.3. | Makine ve Teçhizat | 32 |
| 3.2. | Metod..... | 33 |
| 3.2.1. | Hücre Kültürü..... | 33 |
| 3.2.1.1. | MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattının İki Boyutlu Geliştirilmesi ... | 33 |
| 3.2.1.2. | Hücrelerin Pasajlanması..... | 33 |
| 3.2.1.3. | Tripan Mavisi ile Hücre Sayımı..... | 34 |
| 3.2.1.4. | MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattının Üç Boyutlu Geliştirilmesi... | 34 |
| 3.2.2. | Hücre Motilitesini ve Hücre İstilâsını Tespit Etmek..... | 35 |
| 3.2.2.1. | MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattı Motilite Testi | 35 |
| 3.2.2.2. | MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattı İstilâ Analizi | 35 |
| 3.2.3. | <i>Annona muricata</i> Bitki Ekstraktının Hazırlanması | 36 |
| 3.2.4. | MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattı Sitotoksosite Analizi..... | 36 |
| 3.2.5. | Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (<i>ing.</i> RT-PCR) | 37 |

| | | |
|------------------|---|-----------|
| 3.2.5.1. | MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattı RNA İzolasyonu | 37 |
| 3.2.5.2. | NanoDrop ile İzole Edilen RNA'ların Ölçülmesi | 37 |
| 3.2.5.3. | RNA Örneklerinin Agaroz Jel Üzerinde Görüntülenmesi | 38 |
| 3.2.5.4. | cDNA Sentezi ve Ekspresyon Analizi | 38 |
| 3.2.6. | <i>A. muricata</i> Bitki Ekstraktının <i>in vivo</i> Ortamda Uygulanması..... | 40 |
| 3.2.6.1. | <i>D. melanogaster</i> Besiyeri Hazırlama ve Aktarma | 40 |
| 3.2.6.2. | <i>A. muricata</i> Bitki Ekstraktını <i>D. melanogaster</i> 'a Uygulama | 41 |
| 3.2.6.3. | <i>D. melanogaster</i> RNA İzolasyonu | 42 |
| 3.2.6.4. | <i>D. melanogaster</i> ve <i>Homo sapiens</i> Ortolog Genlerin Tespiti | 43 |
| 3.2.7. | Hesaplamalar ve İstatistiksel Analiz..... | 44 |
| 3.2.8. | Moleküler Kenetlenme (<i>ing.</i> Molecular Docking) Yöntemi | 45 |
| 3.2.8.1. | Ligandın Hazırlanması | 45 |
| 3.2.8.2. | Proteinin Hazırlanması..... | 45 |
| 3.2.8.3. | Docking Hesaplanması ve Etkileşimin Belirlenmesi | 45 |
| 4. | BULGULAR VE TARTIŞMA | 46 |
| 4.1. | İki Boyutlu MCF-7 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı..... | 46 |
| 4.2. | Üç Boyutlu MCF-7 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı..... | 48 |
| 4.3. | MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattı Motilite Analizi | 50 |
| 4.4. | MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattı İstilâ Analizi | 52 |
| 4.5. | MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattı Sitotoksosite Analizi | 53 |
| 4.6. | MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattı RNA İzolasyonu | 55 |
| 4.7. | MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattı Ekspresyon Analizi | 56 |
| 4.8. | <i>D. melanogaster</i> RNA İzolasyonu..... | 57 |
| 4.9. | <i>D. melanogaster</i> Model Organizma Ekspresyon Analizi | 57 |
| 4.10. | Moleküler Kenetlenme Sonuçları..... | 58 |
| 5. | SONUÇ VE ÖNERİLER..... | 65 |
| EK 1 | | 67 |
| EK 2 | | 68 |
| EK 3 | | 69 |
| EK 4 | | 72 |
| EK 5 | | 74 |
| EK 6 | | 75 |
| KAYNAKLAR | | 78 |
| ÖZGEÇMİŞ | | 87 |

ŞEKİL VE DENKLEM LİSTESİ

| | Sayfa No |
|--|----------|
| Şekil 1.1: Tez Çalışmasının Ana Basamakları..... | 1 |
| Şekil 1.2: Kanserin Nedenleri | 2 |
| Şekil 1.3: İlaç Direncini İndükleyen Hücresel Faktörler | 8 |
| Şekil 1.4: Metastaza Yol Açan Kanser Sürecinin Modeli | 9 |
| Şekil 1.5: H-prune Proteinin Üç Boyutlu Yapısı | 10 |
| Şekil 1.6: <i>A. muricata</i> 'nın Sınıflandırılması | 11 |
| Şekil 1.7: <i>A. muricata</i> ağacı (A) yaprağı (B) çiçeği (C) ve tohumu (D)..... | 11 |
| Şekil 1.8: <i>A. muricata</i> 'dan İzole Edilen Bileşiklerin İki Boyutlu Yapıları..... | 14 |
| Şekil 1.9: Asetojenin Yapısı..... | 15 |
| Şekil 1.10: <i>A. muricata</i> 'nın Kansere Hücrelerine Etkisi | 19 |
| Şekil 1.11: İntrensek ve Ekstrensek Apoptoz Mekanizması..... | 20 |
| Şekil 1.12: <i>A. muricata</i> Ürünleri (Yaprak, Meyve Özütü, Kapsül ve Çay)..... | 21 |
| Şekil 1.13: Üç Boyutlu Hücre Kültür Metodları..... | 23 |
| Şekil 1.14: Asılı Damla Metodu | 24 |
| Şekil 1.15: Üç Boyutlu Hücre Kültür Çalışması..... | 24 |
| Şekil 1.16: <i>D. melanogaster</i> Yaşam Döngüsü | 25 |
| Şekil 1.17: Protein Data Bank İnternet Sayfası..... | 26 |
| Şekil 1.18: PubChem İnternet Sayfası | 27 |
| Şekil 1.19: AutoDock 1.5.6. Programı..... | 28 |
| Şekil 1.20: Visual Molecular Dynamics (VMD) Programı | 28 |
| Şekil 3.1: MDA-MB-231 ve MCF-7 Hücrelerin İki Boyutlu Geliştirilmesi | 33 |
| Şekil 3.2: MDA-MB-231 ve MCF-7 Hücrelerin Üç Boyutlu Geliştirilmesi | 34 |
| Şekil 3.3: Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyon Basamakları | 39 |
| Şekil 3.4: <i>D. melanogaster</i> Dişi ve Erkek Tayini | 40 |
| Şekil 3.5: <i>D. melanogaster</i> larvalarına <i>A. muricata</i> Bitki Ekstraktı Uygulaması..... | 41 |
| Şekil 3.6: <i>D. melanogaster</i> ve <i>H. sapiens</i> Ortolog Genler..... | 43 |
| Şekil 4.1: İki Boyutlu Geliştirilen Kontrol MCF-7 Hücre Hattı..... | 46 |
| Şekil 4.2: 0.00348 g/mL <i>A. muricata</i> verilmiş İki Boyutlu MCF-7 Hücre Hattı..... | 46 |
| Şekil 4.3: İki Boyutlu Geliştirilen Kontrol MDA-MB-231 Hücre Hattı..... | 47 |
| Şekil 4.4: 0.00396 g/mL <i>A. muricata</i> verilmiş İki Boyutlu MDA-MB-231 Hücre Hattı ... | 47 |

| | |
|--|----|
| Şekil 4.5: Üç Boyutlu Geliştirilen Kontrol MCF-7 Hücre Hattı..... | 48 |
| Şekil 4.6: 0.005 g/mL <i>A. muricata</i> verilmiş Üç Boyutlu MCF-7 Hücre Hattı..... | 48 |
| Şekil 4.7: Üç Boyutlu Geliştirilen Kontrol MDA-MB-231 Hücre Hattı | 49 |
| Şekil 4.8: 0.005 g/mL <i>A. muricata</i> verilmiş Üç Boyutlu MDA-MB-231 Hücre Hattı | 49 |
| Şekil 4.9: Kontrol MDA-MB-231 Motilite Analizi | 50 |
| Şekil 4.10: 0.00396 g/mL <i>A. muricata</i> verilmiş MDA-MB-231 Motilite Analizi..... | 50 |
| Şekil 4.11: Kontrol MCF-7 Motilite Analizi | 51 |
| Şekil 4.12: 0.00348 g/mL <i>A. muricata</i> verilmiş MCF-7 Motilite Analizi | 51 |
| Şekil 4.13: MCF-7 Hücre Hattı İnvazyon Analizi | 52 |
| Şekil 4.14: MDA-MB-231 Hücre Hattı İnvazyon Analizi..... | 52 |
| Şekil 4.15: <i>A. muricata</i> verilmiş MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattı..... | 52 |
| Şekil 4.16: MCF-7 Kanser Hücre Hattı Sitotoksisite Analizi..... | 53 |
| Şekil 4.17: MCF-7 Kanser Hücreleri Üzerinde <i>A. muricata</i> Sitotoksisitesi | 53 |
| Şekil 4.18: MDA-MB-231 Kanser Hücre Hattı Sitotoksisite Analizi | 54 |
| Şekil 4.19: MDA-MB-231 Kanser Hücreleri Üzerinde <i>A. muricata</i> Sitotoksisitesi..... | 54 |
| Şekil 4.20: MDA-MB-231 ve MCF-7 Hücre Hattı Agaroz Jel Görüntüsü..... | 55 |
| Şekil 4.21: MDA-MB-231 IC ₅₀ Uygulaması Sonucu Genlerdeki İfade Değişimi..... | 56 |
| Şekil 4.22: MCF-7 IC ₅₀ Uygulaması Sonucu Genlerdeki İfade Değişimi | 56 |
| Şekil 4.23: <i>D. melanogaster</i> Agaroz Jel Görüntüsü..... | 57 |
| Şekil 4.24: <i>D. melanogaster</i> LD ₅₀ Uygulaması Sonucu Genlerdeki İfade Değişimi..... | 57 |
| Şekil 4.25: Isoquercetin İki Boyutlu Yapı | 58 |
| Şekil 4.26: Roseoside İki Boyutlu Yapı..... | 58 |
| Şekil 4.27: Coreximine İki Boyutlu Yapı | 59 |
| Şekil 4.28: Anonaine İki Boyutlu Yapı..... | 59 |
| Şekil 4.29: Bcl-2 Üç Boyutlu Yapı | 60 |
| Şekil 4.30: Bad Üç Boyutlu Yapı..... | 60 |
| Şekil 4.31: AKT1 Üç Boyutlu Yapı..... | 60 |
| Şekil 4.32: Isoquercetin ve Bcl-2 Moleküler Docking Etkileşimi | 61 |
| Şekil 4.33: Roseoside ve Bcl-2 Moleküler Docking Etkileşimi | 61 |
| Şekil 4.34: Coreximine ve Bcl-2 Moleküler Docking Etkileşimi | 61 |
| Şekil 4.35: Isoquercetin ve AKT1 Moleküler Docking Etkileşimi..... | 62 |
| Şekil 4.36: Anonaine ve AKT1 Moleküler Docking Etkileşimi | 62 |
| Şekil 4.37: Roseoside ve AKT1 Moleküler Docking Etkileşimi | 62 |
| Şekil 4.38: Isoquercetin ve Bad Moleküler Docking Etkileşimi | 63 |

Şekil 4.39: Roseoside ve Bad Moleküler Docking Etkileşimi..... 63

Şekil 4.40: Coreximine ve Bad Moleküler Docking Etkileşimi 63

Denklem 3.1: Tripan Mavisi ile Hücre Sayımı..... 34

Denklem 3.2: Toplam RNA Saflığının Nicelleştirilmesi 37

Denklem 3.3: Gen İfade Düzeylerinin Nicelleştirilmesi 45



TABLO LİSTESİ

| | Sayfa No |
|--|-----------------|
| Tablo 1.1: En Sık Görülen Kanser Çeşitleri | 3 |
| Tablo 1.2: Meme Kanseri Moleküler Alt Tiplerinin Sınıflandırılması | 4 |
| Tablo 1.3: Meme Kanseri Hücre Hatları | 5 |
| Tablo 1.4: Kanslerle İlişkili <i>A. muricata</i> 'dan İzole Edilen Kimyasal Bileşikler..... | 12 |
| Tablo 1.5: <i>A. muricata</i> Bitkisi Üzerinde Yapılan Antikanser Çalışmalar | 17 |
| Tablo 1.6: <i>A. muricata</i> 'nın Etnomedikal Kullanımı..... | 21 |
| Tablo 2.1: Tez ile İlişkili Olduğu Düşünülen Makale Sayısı | 30 |
| Tablo 3.1: Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Reaktifler..... | 31 |
| Tablo 3.2: Çalışmada Kullanılan Makine ve Teçhizat | 32 |
| Tablo 3.3: Amplifikasyon Koşulları..... | 39 |
| Tablo 4.1: Meme Kanseri Hücre Hattı RNA Konsantrasyon Ölçüm Sonuçları..... | 55 |
| Tablo 4.2: <i>D. melanogaster</i> RNA Konsantrasyon Ölçüm Sonuçları | 57 |
| Tablo 4.3: Protein-Ligand Moleküler Docking Sonuçları..... | 64 |

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar Açıklama

| | |
|---|---|
| ABK | : Adenozin Trifosfat Binding Kaset |
| ACF | : Aberrant Crypt Foci |
| AGE | : Annonaceous Acetogenin |
| ATCC | : The Global Bioresource Center |
| ATP | : Adenozin Trifosfat |
| BRCA | : Breast Cancer Gene |
| cDNA | : Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit |
| DHH | : Asparajin-Histidin-Histidin |
| DMBA | : Dimethyl-2,3-benzphenanthrene |
| DMH | : 1,2-dimetilhydrazine |
| DMSO | : Dimetil Sülfoksit |
| DNA | : Deoksiribo Nükleik Asit |
| ECM | : Ekstrasellüler Matriks, Hücre Dışı Matriks |
| EDTA | : Etilen Diaminetetraasetik Asit |
| ER | : Österojen Reseptör |
| FBS | : Fetal Bovin Serum |
| HER2 | : Human Epidermal Growth Factor Receptör 2 |
| H-Prune | : Prune Exopolyphatase |
| Hsp70 | : Heat Shock Protein 70 |
| IL1β | : Interleukin-1 Beta |
| K₆₇ | : Tümör İçerisindeki Antikor Miktarı |
| LD₅₀, IC₅₀ | : Ortalama Öldürücü Doz, Inhibition Concentration % 50 |
| MCF-7 | : Michigan Cancer Foundation-7 |
| NAD | : Nikotinamid Adenin Dinükleotit |
| NCBI | : National Center for Biotechnology Information |
| PBS | : Phosphate Buffered Saline |
| PDB | : Protein Data Bank |
| pH | : Power of Hidrogen |
| PR | : Progesteron Reseptör |
| RNA | : Ribonükleik Asit |
| RPMI-1640 | : Roswell Park Memorial Institute-1640 |
| TAE | : Tris Asetat Etilen Diaminetetraasetik Asit |
| TNFα | : Tümör Negroz Faktör Alfa |
| XTT | : 2,3-Bis (2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil) 2H-tetrazolyum |
| v/v | : volume per volume, hacim başına hacim |
| ing. | : İngilizce Anlamı |
| 2B, 2D | : İki Boyutlu, Two Dimensional |
| 3B, 3D | : Üç Boyutlu, Three Dimensional |

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Annona muricata BİTKİ EKSTRAKTININ MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA VE *Drosophila melanogaster* MODEL ORGANİZMA ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI

Fatma Kübra ATA

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Genetik ve Biyomühendislik Anabilim Dalı

I. Danışman: Doç.Dr. Fahriye ERCAN

II. Danışman: Doç.Dr. Serap Yalçın AZARKAN

Meme kanseri de dâhil olmak üzere kanser, dünya genelinde önemli bir sağlık sorunu hâline gelmiştir. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ve radyoterapi yöntemlerinde büyük ilerlemeler olsa da, kısıtlamaları ve belirgin yan etkileri nedeniyle çoğu kanser hastası, modern tıbbî tedavi kapsamı dışında kalan alternatif tıp metodlarını denemektedir. Alternatif tıp kapsamında yer alan, dünyada tropikal bölgelerde yaygın olarak bulunan *Annona muricata* bitkisi, kansere karşı etkili olan bileşikler içermektedir.

Bu çalışma, ülkemizde tarçın elması olarak bilinen *Annona muricata* bitkisinin, antikanser biyolojik aktivitesini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Toksikite analizi sonucunda LD₅₀ değeri; iki boyutlu MCF-7 hücrelerinde **290 µg.m⁻¹**, iki boyutlu MDA-MB-231 hücrelerinde **330 µg.m⁻¹**, üç boyutlu MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde **0.005 g.m⁻¹** ve *Drosophila melanogaster* model organizmasında **0.118 g.m⁻¹** olarak belirlenmiştir. Uygulama yapıldıktan sonra MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında, Bcl-2, Bad, AKT1 ve H-prune genlerinin ifade seviyeleri; *Drosophila melanogaster*'da; Pn, Buffy, CG₁₅₅₃₀ ve Akt1 genlerinin ifade seviyeleri, ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu

ile belirlenmiştir. Gen ifade analizinde; H-prune ve AKT1 genlerin ifadelerinde azalma, *Drosophila melanogaster* CG₁₅₅₃₀ proapoptotik genin ifadesinde artış olduğu gözlenmiştir. Çalışmanın son aşamasında, *Annona muricata* bitki ekstraktında bulunan isoquercetin, roseoside, coreximine, anonaine ve arianacin asetojenlerin insan Bcl-2, Bad ve AKT1 proteinleri ile olan bağlanma enerji seviyeleri moleküler kenetlenme yöntemi ile hesaplanmıştır. Ön klinik ilaç olarak kullanılan abemaciclib'e kıyasla isoquercetin molekülün Bcl-2, Bad ve AKT1 proteinleri ile **yüksek ilgiye** sahip olduğu gözlemlenmiştir. *In vivo*, *in vitro* ve biyoinformatik analizler sonucunda *Annona muricata* bitki ekstraktının meme kanserine karşı etkili olduğu ve potansiyel bir ilaç olabileceği görülmüştür.

Kasım 2020, 106 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Annona muricata*, 2B-3B Hücre Kültürü, *Drosophila melanogaster*, Meme Kanseri, Moleküler Kenetlenme

ABSTRACT

MASTER THESIS

MOLECULAR INVESTIGATION OF THE EFFECT OF *Annona muricata* PLANT EXTRACT ON THE BREAST CANCER CELL LINE AND *Drosophila melanogaster* MODEL ORGANISM

Fatma Kübra ATA

Kırsehir Ahi Evran University
Science and Engineering Institute
Genetics and Bioengineering Department

I. Advisor: Assoc.Dr. Fahriye ERCAN

II. Advisor: Assoc.Dr. Serap Yalçın AZARKAN

Cancer, including breast cancer, has become a major health problem worldwide. Although there are great advances in chemotherapy and radiotherapy methods used in cancer treatment, most cancer patients use alternative medicine methods which are out of the scope of modern medical treatment due to their limitations and obvious side effects. Within the scope of alternative medicine, *Annona muricata*, that is widely available in tropical regions around the world, contains compounds that are effective against cancer.

This study was carried out to investigate the anticancer biological activity of *Annona muricata* plant known as the cinnamon apple in our country. As a result of toxicity analysis, IC₅₀ value; in two-dimensional MCF-7 cells was **290 µg.mL⁻¹**, in two-dimensional MDA-MB-231 cells was **330 µg.mL⁻¹**, in three-dimensional MCF-7 and MDA-MB-231 cells were **0.005 g.mL⁻¹**, and in *Drosophila melanogaster* model organism was determined as **0.118 g.mL⁻¹**. After application, in the MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines, expression levels of Bcl-2, Bad, AKT1, and H-prune genes; in *Drosophila melanogaster*; expression levels of Pn, Buffy, CG₁₅₅₃₀ and Akt1 genes were determined by reverse transcription polymerase chain reaction. In gene expression analysis was observed that the expression of

H-prune and AKT1 genes decreased and *Drosophila melanogaster* CG15530 proapoptotic gene expression increased. In the last stage of the study; isoquercetin, roseoside, coreximine, anonaine, and arianacin acetogenins which are present in *Annona muricata*, the binding energy level with human Bcl-2, Bad and AKT1 proteins was calculated by molecular docking method. Compared with abemaciclib, which is used as a preclinical drug, has been observed that the isoquercetin molecule has **high affinity** with Bcl-2, Bad and AKT1 proteins.

As a result of the analysis *in vivo*, *in vitro* and bioinformatics; *Annona muricata* plant extract has been observed to be effective against breast cancer and likely to be a potential drug.

November 2020, 106 pages

Keywords: *Annona muricata*, 2D-3D Cell Culture, *Drosophila melanogaster*, Breast Cancer, Molecular Docking

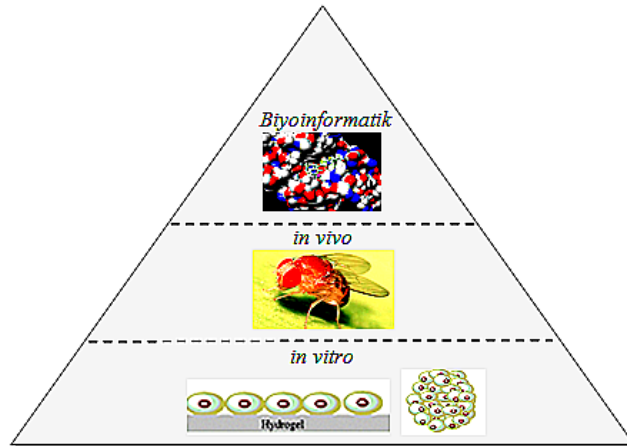
1. GİRİŞ

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçları, sağlıklı hücreler üzerinde toksik etki göstermekte ve çok sayıda yan etkileye neden olmaktadır. Bu etki göz önüne alındığında artık kanser tedavisi için doğanın bize sunduğu şifalı bitkilerden faydalanmamız gerekir. Kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkisi son birkaç yılda keşfedilen, kanserin metabolizmasında önemli bir etkiye sahip olan graviola yani bilimsel adı *Annona muricata*, kanser tedavisi için umut verici bir çözüm niteliğindedir. Son beş yıl içerisinde yapılan çalışmalar *A. muricata*'nın; meme, kolon, prostat, karaciğer ve akciğer gibi birçok kanser tipinde habis hücrelerini öldürdüğünü göstermiştir. (Soheil ve diğ., 2015a)

1.1. Amaç

Çalışmamızın üç ana amacı bulunmaktadır:

- *A. muricata* bitki ekstraktının, iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) geliştirilen meme kanseri hücrelerinde etkisinin, moleküler düzeyde incelenmesi. (*in vitro*)
- *A. muricata* bitki ekstraktının, ergin ve larval dönemdeki *Drosophila melanogaster* model organizmasında etkisinin, moleküler düzeyde incelenmesi. (*in vivo*)
- *A. muricata* bitki ekstraktının moleküler kenetlenme programı ile muhtemel ilaç olma potansiyelinin incelenmesi. (*biyoinformatik*)

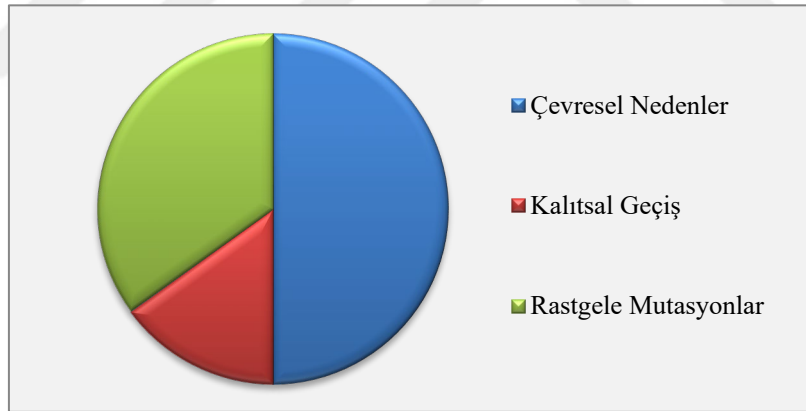


Şekil 1.1: Tez Çalışmasının Ana Basamakları

1.2. Kanser Biyolojisi

Merkezi Cenevre’de bulunan Birleşmiş Milletler Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılan bir rapora göre: ‘‘Dünya da her yıl 14 milyondan fazla insana kanser teşhisi konuluyor. Bu rakamın 2030 yılına kadar 21 milyona çıkması bekleniyor.’’ Bu örgütün istatistikî verilerine göre dünyada kanser nedeniyle hayatını kaybedenlerin sayısı son 15 yıl içerisinde % 27.5’lik bir artış göstererek, 8.8 milyon olduğu bildirilmiştir. (**Birleşmiş Milletler Dünya Sağlık Örgütü, 2018**)

Kanser, genellikle hücrelerin büyümesi ve çoğalmasını kontrol eden mekanizmaların hatalarından kaynaklanır. Normal gelişme ve yetişkinlik dönemi boyunca karmaşık genetik kontrol sistemleri büyüme sinyallerini, büyümeyi engelleyici sinyalleri ve ölüm sinyallerine yanıt olarak hücre oluşumu ve ölümü arasındaki dengeyi düzenler. Bu normal büyüme oranlarını kontrol altında tutan mekanizmalarda meydana gelen bozukluklar, aşırı hücre bölünmesine neden olur ve kanser oluşur. Birçok kanser olgusuna neden olan hücresel düzenlemenin kaybı genellikle tümör oluşturuvcu kimyasallar, hormonlar ve bazen virüslerin etkisi ile birlikte yürüyen genetik bozulmaların sonucudur.



Şekil 1.2: Kanserin Nedenleri

Kanserleşme iki geniş gen grubundaki mutasyonlarla ilişkilidir: **proto-onkogenler** ve **tümör baskılayıcı** (*ing.* suppressor) **genler**. Proto-onkogenler normalde hücre büyümesini teşvik eder; bu genler mutasyonlarla **onkogenlere** dönüşerek büyümenin teşvik edilmesinde genin aşırı aktif olmasına neden olurlar. Tümör baskılayıcı genler ise normalde büyümeyi sınırlar. Eğer bunlar mutasyon ile inaktive olurlarsa, bunu olağan dışı hücre bölünmesi takip eder. Kanser, genellikle yaşam boyu çevremizde karşılaştığımız bazı kimyasallar, morötesi radyasyon gibi **karsinojenlere** maruz kalma sonucunda oluşan mutasyonlardan da kaynaklanabilmektedir.

Normal hayvan hücreleri embriyonik dönemde köken aldıkları dokulara göre sınıflandırılırlar. Tümörlerin sınıflandırılması da benzer şekilde yapılır. **Kötü huylu** (*ing. malignant*) tümörler endoderimde (bağırsak epiteli) ya da ektoderimde (deri ve sinir epiteli) olduğu gibi eğer epitel dokudan köken alıyorsa *karsinomalar*, eğer mezodermden (kas, kan ve bağ doku öncülleri gibi) kaynaklanıyorsa *sarkomalar* olarak sınıflandırılırlar. Karsinomalar bilinen en yaygın kötü huylu tümör tipleridir. Sarkomaların özel bir sınıfı olan *lösemiler* kanda bireysel hücreler olarak çoğalırken, diğer tümörlerin çoğu sert kitleler şeklinde büyürler. Kötü huylu sarkomanın bir diğer tipi olan *lenfomalar* lenfositlerin ve plazma hücrelerinin oluşturduğu katı tümörlerdir. *Glioblastomalar* ise, beyindeki ana hücre tipi olan glia hücrelerinin tümörleridir.

Tümörler özellikle yaşlı bireylerde sıklıkla ortaya çıkar fakat çoğu bölgesel ve küçük boyutlu olduklarından konakçı için küçük risk oluştururlar. Bu tip tümörler **iyi huylu** (*ing. benign*) tümör olarak adlandırılır. Buna bir örnek iyi huylu deri tümörü olan siğillerdir.

Kötü huylu bir tümör veya **kanser** hücresi genellikle normal hücrelerden daha hızlı büyür ve bölünürler ve genellikle normal bir ölüm seyri göstermezler. Kötü huylu hücrelerin kilit bir özelliği, yakın dokuları istilâ edebilme yetenekleri olup, hücreler çoğalmaya devam ettikçe yayılır ve yeni tümörlere kaynak oluştururlar. Rahim ya da göğüs tümörlerinde olduğu gibi bazı kötü huylu tümörler en azından bir süre kapsülle çevrili olarak sınırlandırılırlar ve belli bir bölgede kalırlar. Bu tümör hücreleri zaman geçtikçe dokuları istilâ eder ve **metastaza** uğrarlar. (**Lodish ve diğ., 2011**)

Şimdiye kadar 100'e yakın kanser türü olduğu bildirilmiş ve her biri bozulmuş hücre tipine göre sınıflandırılmıştır. (**Türkiye Kanserle Savaş Vakfı, 2018**)

Tablo 1.1: En Sık Görülen Kanser Çeşitleri

| | | | |
|-------------------|---------------------|----------------------|--------------------|
| Akciğer Kanseri | Meme Kanseri | Nöroendokrin Kanseri | Prostat Kanseri |
| Beyin Kanseri | Mesane Kanseri | Kemik Kanseri | Safra Yolu Kanseri |
| Böbrek Kanseri | Üst Yutak Kanseri | Yemek Borusu Kanseri | Yumurtalık Kanseri |
| Karaciğer Kanseri | Cild Kanseri | Pankreas Kanseri | Testis Kanseri |
| Kolon Kanseri | Mide Kanseri | Rahim Kanseri | Tiroid Kanseri |

1.3. Meme Kanseri

Birçok kanser türü bilinmesine karşın akciğer kanserinden sonra ikinci olarak en sık ölüme sebep olan ve Dünya Sağlık Sıralaması'na göre (**World Health Rankings, 2018**) ülkemizde kadınlarda 13.84 oranında olduğu saptanan meme kanseri, kötü seyreden bir kanser türüdür. Genellikle meme kanseri, süt üreten lobulların hücrelerinde veya memenin yağlı ve lifli bağ dokularını içeren stromal dokularda görülebilir. Meme kanserinin % 80'i invaziv duktal karsinomdur ve kanser süt kanallarında ortaya çıkar, % 20'si invaziv lobüler karsinomdur ve kanser süt bezlerinde gelişir. Göğüs kanserleri vakalarının % 5-10'unun, göğüs kanseri ile ilgili olduğu tespit edilen BRCA1 ve BRCA2 genlerinde meydana gelen bir mutasyon sonucu olduğu raporlanmıştır. Bu mutasyonlu genin kalıtım yoluyla çocuğa aktarılma olasılığı % 50'dir. Bu yüzden BRCA geninde meydana gelen bir mutasyon bir sonraki nesle aktarılmayabilir. Kalıtımın yanı sıra beslenme şekli, sosyo-ekonomik durum, doğumlar, aşırı kilo ve diğer faktörlerde meme kanserine neden olabilmektedir.

21.yüzyılın başlarına kadar hastada meme tümörü olduğunun bilinmesi yeterli bir kanıttı ve meme kanser hastalarının tümüne tek tip tedavi uygulanmaktaydı. Zamanla aynı tip kanser tanısı alan hastaların farklı prognoz gösterdiğinin gözlemlenmesi ve patoloğların farklı morfolojik varyantlar tanımlaması, meme kanseri sınıflamasının tartışılır olmasına neden olmuştur. Perou ve arkadaşları 2000 yılında **östrojen reseptör** taşıyan hücreleri baz alarak meme kanserini moleküler alt tiplerine ayırdılar. (**Perou ve diğ., 2000**) Hâlâ geçerliliğini koruyan bu sınıflamada meme kanserini; hormon reseptör ekspresyonu (pozitif veya negatif) ve epiteliyal sellüler origin (luminal veya basal) olarak 2 temel grup ve luminal A, luminal B, üçlü negatif ve HER2 olan 4 alt gruba ayırmışlardır.

Tablo 1.2: Meme Kanseri Moleküler Alt Tiplerinin Sınıflandırılması

| | |
|---|--|
| Luminal A | ER veya PR (+) ve HER2 (-) Ki67 < % 14 |
| Luminal B | ER veya PR (+) ve HER2 (-) Ki67 ≥ % 14 |
| Bazal Benzeri, Üçlü (Triple) Negatif | ER/PR/HER2 (-) |
| HER2 | ER/PR (-) ve HER2 (+) |
| Normal Meme Benzeri | Eptelyal Olmayan Hücre Gen Ekspresyonu (+) |

ER: Östrojen Reseptör **PR:** Progesteron Reseptör **HER2:** Human Epidermal Growth Factor Reseptör 2 **Ki67:** Tümör İçerisindeki Antikor Miktarı

Birçok insan meme kanseri hücre hattı vardır ve her bir meme kanseri hücre hattı kendine özgü besiyeri (*ing. medium*) ortamında çoğalır. **[Tablo 1.3:1]**'de yer almayan Hs578T, HCC-38, ZR-751 gibi daha birçok meme kanseri hücre hattı mevcuttur. (ATCC, 2018)

Tablo 1.3: Meme Kanseri Hücre Hatları

| Hücre Hattı (Soyu) | Birincil Tümör | Alt Tipi | ER | PR | HER2 |
|--------------------|--------------------------------|----------------|----|----|------|
| BT-474 | İnvaziv Duktal Karsinom | Luminal | + | + | + |
| MCF-7 | İnvaziv Duktal Karsinom | Luminal | + | + | - |
| SKBR-3 | İnvaziv Duktal Karsinom | Luminal | - | - | + |
| MDA-MB-231 | İnvaziv Duktal Karsinom | Bazal B | - | - | - |
| T47D | İnvaziv Duktal Karsinom | Luminal | + | + | - |

ER: Österojen Reseptör PR: Progesteron Reseptör HER2: Human Epidermal Growth Factor Reseptör 2

MCF-7 (*ing. Michigan Cancer Foundation 7*) hücre soyu 1970 yılında, Kafkas bölgesinde yaşayan 69 yaşında meme kanseri bir kadının meme dokusundan izole edilen epitel hücre hattıdır. Hastadan alınan ilk dokunun iyi huylu olduğu, daha sonra alınan MCF-7 hücre soyuna yol açacak olan dokudan alınan bir plevral efüzyonda bir malign adenokarsinom olduğu ortaya çıktı. Meme kanseri olan hasta, radyoterapi ve hormonterapi ile tedavi edildi. (Fagan ve diğ., 2017) (Venugopal ve diğ., 2017)

MCF-7 Hücre Hattı:

- Österojen reseptör pozitif (ER⁺) ve progesteron reseptör pozitif (PR⁺) özellik gösterir.
- Bu hücrelerin büyümesi *in vitro* olarak TNF α ve anti-österojen ile inhibe edilebilir.
- MCF-7 hücrelerinin yayılması kolaydır fakat genelde yavaş büyüyen bir popülasyon eğilimindedir. Bu hücreler adherent özellik göstererek tabana matriks bileşenleri yardımıyla yapışır.

MDA-MB-231 hücre soyu; 1973 yılında meme kanseri hastalarından alınan plevral efüzyonlarda 3 yeni epitelyal tümör hattı izole edildi. Bu hücre hatları; ortalama kromozom sayısı 43 olan MDA-MB-134, ortalama kromozom sayısı 49 olan MDA-MB-175 ve ortalama kromozom sayısı 65-69 olan MDA-MB-231'dir. (Cailleau ve diğ., 1974)

MDA-MB-231 Hücre Hattı:

- Österojen reseptör negatif (ER⁻) ve progesteron reseptör negatif (PR⁻) özellik gösterdiği için agresif, invaziv ve kötü diferansiye üçlü negatif meme kanseri hücre hattıdır.
- Üç boyutlu kültüründe, hücre dizisi endotelial morfolojiyi gösterir ve yıldız şeklindeki çıkıntılara sahip olan invaziv fenotipiyle ayırt edilebilir. **(Harrell ve diğ., 2014)**

1.4. Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri

Meme kanserini diğer kanser türlerinden ayıran en önemli fark, teşhisinin hasta tarafından kolay yapılabilir olmasıdır. Diğer birçok kanserde olduğu gibi meme kanserinde de erken teşhis çok önemlidir. Erken teşhis edilen meme kanserinin tedavi edilmesi hem kolay hem de başarı şansı çok yüksektir. Fakat erken teşhis yapılmadığı takdirde lenf ve kan yoluyla diğer organlara çok hızlı bir şekilde metastaz yapabilir, bu yüzden ki dünyada akciğer kanserinden sonra en sık ölüme sebep olan ikinci kanser türüdür.

Cerrahi, hormonal tedavi, hedefe yönelik tedavi, radyoterapi ve kemoterapi gibi birçok meme kanseri tedavi yöntemleri vardır. Bu tedaviler birçok avantaj ve dezavantajlara sahiptir.

1.4.1. Cerrahi Tedavi

Meme kanseri hastalarında ilk yapılan tedavi yöntemidir. Bu tedavideki amaç, tümörün geride kalmayacak şekilde çıkarılması ve yayılım göstermeden müdahâle edilmesidir. Bu tedavi yönteminde kullanılan üç ameliyat türü vardır. Meme uçları dâhil tüm memenin alınıp koltuk altı lenf bezlerinin alınmadığı *mastektomi* cerrahisi, sadece memedeki kitle ve etrafındaki dokuların alındığı *lumpektomi* cerrahisi ve memenin dörtte birinin alındığı *kadronektomi* cerrahisidir. 2002 yılında Fisher ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma sonucunda lumpektomi ile tedavi edilen hastalar ile mastektomi ile tedavi edilen hastalar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı gözlemlenmiştir. **(Fisher ve diğ., 2002)**

1.4.2. Hormonal Tedavi

Bu tedavinin amacı hormon reseptör pozitif meme kanserlerini, österojen hormon etkisini bloke ederek ve miktarını azaltarak kanserin gelişmesini engellemektir. Meme kanseri hastalarının sağkalımını artırdığı gözlenen hormonal tedavide en çok kullanılan ilaç olan Tamoksifen, steroid olmayan bir österojen antagonistidir. **(Gradishar ve diğ., 2000)**

Uzun süre Tamoksifen kullanımı kadınlarda endometriyum kanseri (rahim iç zarı kanseri) oluşturma riski taşıdığı gözlenmiştir. Bu etkiyi azaltmak adına menopoz öncesi kadınlarda kombinasyon kemoterapisi ile birleştirmişlerdir. **(Elifel ve diğ., 2001)**

1.4.3. Hedefe Yönelik Tedavi

Hedefe yönelik tedavi yöntemi, kanser hücre büyümesini ve bölünmesini bireye ve tümöre özgü formda tedavi etmeyi planlayan bir yöntemdir. Bu tedavide genellikle Avastin, Herceptin, Iressa ve Tykerb gibi ilaçlar kullanılır. Bu ilaçların kanser hücreleri üzerinde belirli etkileri vardır. 2004 yılında Ross ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada kemoterapi ile kombine edilmiş Trastuzumab'in (ticari adı Herceptin) epidermal büyüme faktör reseptörü ve onkojenin bir üyesi olan HER2/neu'nun pozitif meme kanseri tedavisinde başarılı olduğunu gözlemlemişlerdir. **(Ross ve diğ., 2004)**

1.4.4. Radyoterapi

Bu tedavi yöntemi tümör hücrelerini küçültmek ve kanser hücrelerini öldürmek için yüksek enerjili X ışınları veya gama ışınları kullanılarak tedavi edilmesidir. Radyoterapi veya diğer adıyla radyasyon tedavisi çoğunlukla lumpektomi sonrası memenin kalan dokusunu korumak amacıyla yapılır. Genellikle sağlıklı hücrelerin DNA'sı üzerinde etkili olan ve hücre bölünmesini olumsuz yönde etkileyen bir tedavi olması, radyoterapinin en büyük dezavantajıdır. **(Baba ve Catoi, 2007)**

1.4.5. Kemoterapi

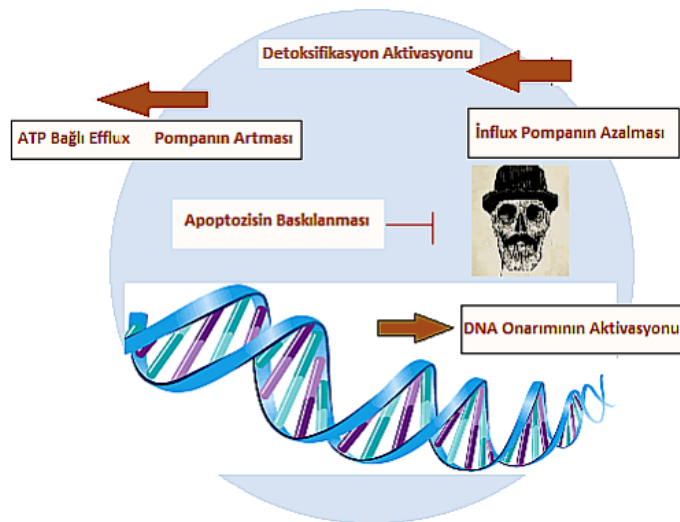
Kemoterapi, hızlı bir şekilde çoğalan meme kanserini ortadan kaldırmak için birçok güçlü ilaçların kullanıldığı tedavi yöntemidir. Meme kanseri hastalarında kemoterapi yöntemi genellikle cerrahi tedavi yöntemi ile birlikte kullanılsa da, cerrahi bir seçenek olmadığı zaman birincil tedavi yöntemi olarak kemoterapi kullanılır. Meme kanserini tedavi etmek için çeşitli kemoterapi ilaçları geliştirilmiştir. Bunlar: Tamoksifen, Paklitaksel, Docetaxel, Doksorubisin, Siklofosfamid, Methotrexate, 5-Florourasil, Vinblastine, Gemsitabin ve Epirubicin'dir.

Bu ilaçlardaki tedavi etkinliğini artırmak için; sadece kemoterapi uygulanabilir, adjuvan kemoterapi, cerrahi, radyasyon tedavisi gibi kombinasyon hâlinde kemoterapi uygulanabilir veya neoadjuvan kemoterapi uygulanabilir. **(De Vita ve Chu, 2008)**

1.4.6. Meme Kanseri Tedavi Yöntemlerinin Dezavantajları

Cerrahi yöntemde meme dokusunun alınması hasta üzerinde psikolojik bir travmaya yol açabilir. Hormonal tedavi yönteminde Tamoksifen gibi kuvvetli ilaçların kullanımı kadınlarda endometriyum kanseri oluşturma riskini artırabilir. Radyasyon tedavi yönteminde yüksek enerjili X ışınlarının ve gama ışınlarının kullanılması hedef bölge içerisindeki kanser hücrelerini yok ederken çevre dokularda bulunan sağlıklı hücreler üzerinde olumsuz etkilere yol açabilir. Kemoterapi yönteminde güçlü ilaçların kullanılması bulantı, kusma, saç dökülmesi, hâlsizlik, enfeksiyon ve kanama gibi çok sayıda yan etkileye sebep olabilir.

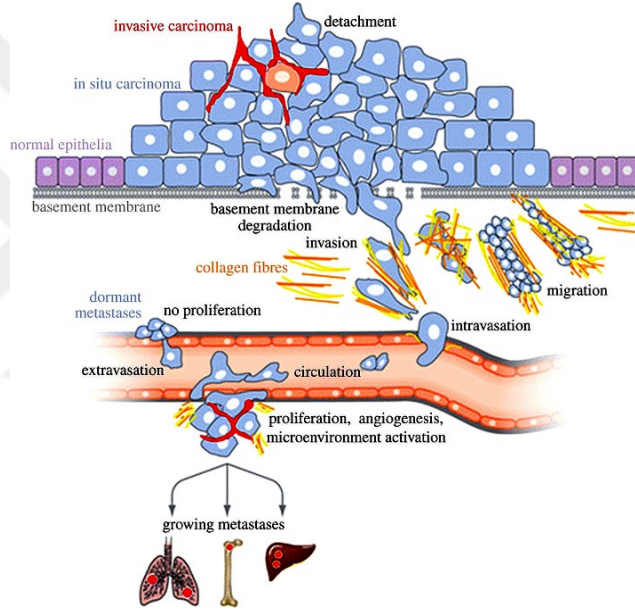
Kanser hastaları için cerrahi, hormonal tedavi, kemoterapi ve radyoterapi gibi çeşitli tedavi stratejileri mevcuttur, fakat bazı hastalarda bu yaklaşımlar tarafından tedavi edilebileceği, diğer hastalarda bu tedavi yöntemlerinin eksik yanıt vermesi büyük bir sorun teşkil eder. Özellikle kanserli hücrelerin, kemoterapötik ilaçların etkinliğini sınırlayan karmaşık **kanser direnç mekanizmalarına** sahip olması antikanser ilaçlarına dirençli olmasına sebep olmaktadır. Antikanser ilaçlarına dirençli olmak genellikle bir ATP (Adenozin Trifosfat) Binding Kaseti (ABK) taşıyıcılarına ait olan ATP'ye bağlı effluks pompalarının ifadesinden kaynaklanır. Kanser hücrelerinde bu pompaların aşırı ekspresyonu ile ilaç dışarı akışının artmasına bağlı olarak direnç oluşur ve bu da hücre içi ilaç konsantrasyon oranının azalmasına sebep olur. (Gottesman ve diğ., 2002) İlaç direncini indükleyen diğer hücresel faktörler ise; detoksifikasyon aktivasyonu, influx pompanın azalması ve apoptozisin baskılanması şeklindedir. **[Şekil 1.3:]**



Şekil 1.3: İlaç Direncini İndükleyen Hücresel Faktörler

1.5. Metastaz ve İnvazivite

Kanser hücreleri hücre dışı matriks ve kaâde (*zemin*) zarı ile karmaşık bir ilişki içerisinde. Kanser hücresi bir aktin hücre iskeleti olan ve "invadopodium" olarak adlandırılan hücre çıkıntısını kullanarak matrikse girebilir. Hücreler kaâde zarına girip metastaz yapmak için **plazminojen aktivatör** olarak adlandırılan bir protein salgılayarak kaâde zarını parçalar ve metastaza ve invazyona sebep olur. İnvazyon ve metastaz iyi huylu tümörü kötü huylu tümörden ayıran, kanser hastaları için en tehlikeli ve en ölümcül bir aşamadır. Bir tümör eğer invaziv özellik kazanırsa hızlı bir şekilde vücuda yayılabilir. Bu durum kanser hastalarında cerrahi tedavi yöntemini bloke edebilir ve antikanser ilaç etkinliğini sınırlayabilir.



Şekil 1.4: Metastaza Yol Açan Kanser Sürecinin Modeli (Djamgoz ve diğ., 2014)

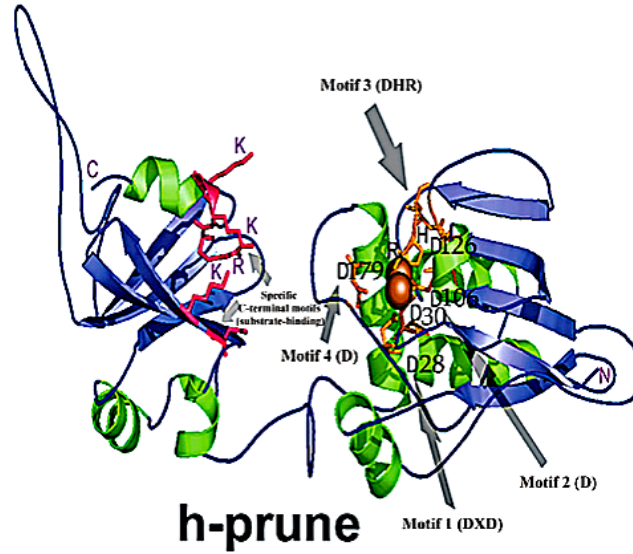
Meme kanserinin metastatik duruma geçişi;

- Karsinoma *in situ* denile Evre 0 fazında anormal hücrelerin varlığını işaret eder.
- Meme kanserinin başlangıç fazı olan Evre I fazında tümörün 2 cm'den fazla geniş olmadığı ve diğer organlara yayılmadığı evredir.
- Evre II fazında tümör 2 cm'den büyük 5 cm'den küçük ve koltuk altı lenf bezlerine yayılmış durumdadır.
- Evre III fazında tümör komşu dokulara yayılmış durumdadır.
- Evre IV fazı metastatik kanser durumu da denilen, artık kanserin vücudun tüm bölgelerine sıçramış olduğu durumdur.

1.6. Meme Kanserinde Metastaz

Bir grup bilim insanı, meme kanseri hastalarında metastaza neden olan, kötü huylu hücrelerin çoğalmasında başlıca rolü olduğu ve aşırı eksprese edildiği düşünülen **H-prune** (prune exopolyphosphatase) genini keşfettiler. (Diğer adı: Dres17, HTCD37) Araştırmacılar bu genin; Rhesus maymunu, köpek, sıçan, tavuk, *Zebrafish*, *Saccharomyces cerevisia* ve *Drosophila melanogaster* gibi birçok model organizma canlılarında mevcut olduğunu tespit ettiler. 8 ekzon ve 7 introndan oluşan yaklaşık 1.4 kb (kilobaz) uzunluğundaki bu gen *D. melanogaster* canlısında 1q21.3 (kromozom bandına bağlantılı 1q21) bölgesinde yer alır. Ayrıca bu gen bölgesinin mide, tiroid, kalp, testis, yumurtalık gibi doku ve organlarda aşırı eksprese olduğu da gözlenmiştir. (D'Angelo ve diğ., 2004)

62 kDa (kiloDalton) ağırlığında olan h-prune proteini, DHH (Asparajin-Histidin-Histidin) süper enzim ailesine aittir ve 4 motife (I-IV) ve iki domaini gösteren iki ayrı alt familyaya ayrılır. Turuncu toplar potansiyel kofaktör iyonlarını (Mg^{+2}) ve motif III'e bağlanma bölgesini göstermektedir. Gri oklar ise aspartik asitleri (D) göstermektedir. Dört adet DHH motifin aspartik asidi vardır. **[Sekil 1.5:]**

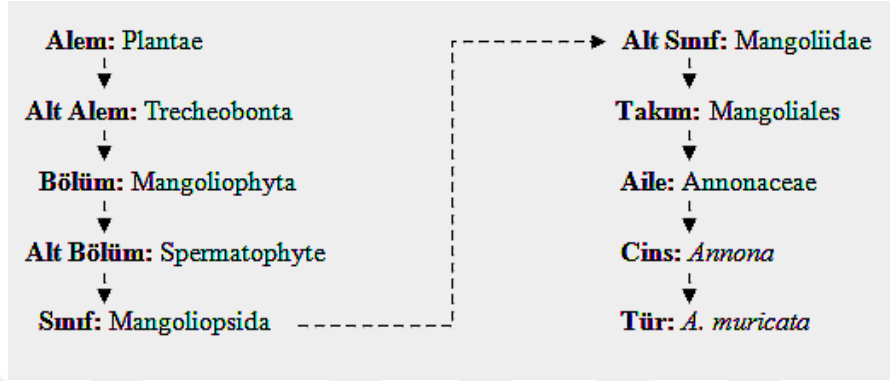


Şekil 1.5: H-prune Proteinin Üç Boyutlu Yapısı (D'Angelo ve diğ., 2004)

Bu gen bölgesinin keşfiyle şimdi bilim insanları h-prune gen bölgesinin ifadesini baskılayacak yeni umut verici bir ilacın peşindeler. Bizde tez çalışmamızda *A. muricata* bitki ekstraktının, hem insan hem de *D. melanogaster* h-prune gen bölgesi üzerindeki etkisini araştırmayı hedefledik.

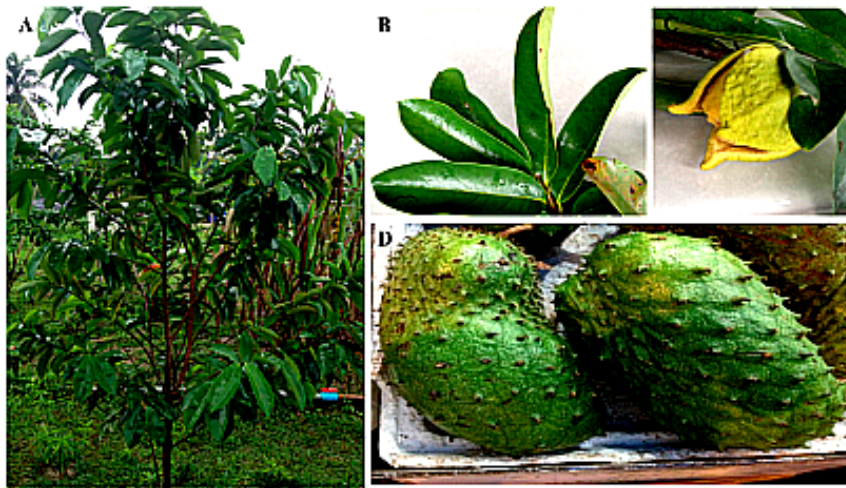
1.7. *Annona muricata*

Yaygın olarak soursop, graviola, guanabana, pençe ve sirsak olarak da bilinen *Annona muricata*, yaklaşık 130 cins ve 2300 tür içeren Annonaceae familyasının bir üyesidir. (Mishra ve diğ., 2013) (Leboeuf ve diğ., 1980)



Şekil 1.6: *A. muricata*'nın Sınıflandırılması (De Souza ve diğ., 2009)

A. muricata, Güney ve Kuzey Amerika, Hindistan, Malezya ve Nijerya dâhil olmak üzere dünyada tropikal ve subtropikal bölgelerinde yaygın olarak bulunan bir bitki türüdür. (Adewole ve Caxton, 2006) Bu bitki; 5-8 metre yüksekliğe ulaşan, geniş, parlak, koyu yeşil yaprakları olan açık, yuvarlak bir kanopiye sahip karasal bir ağaçtır. Ağacın yenilebilir meyveleri büyük, kalp şeklinde ve yeşil renklidir ve çapı 15 ilâ 20 cm arasında değişmektedir. (De Souza ve diğ., 2009)



Şekil 1.7: *A. muricata* ağacı (A) yaprağı (B) çiçeği (C) ve tohumu (D) (De Souza ve diğ., 2009)

1.7.1. *A. muricata*'nın Kimyasal Bileşenleri

A. muricata bitkisinin tohum, yaprak, kök ve meyvesi üzerindeki geniş çaptaki fitokimyasal değerlendirmeler sonucunda; alkaloidler (Leboeuf ve diğ., 1980) (Yang ve diğ., 2015) megastigmanlar (Matsushige ve diğ., 2012), flavonol triglikozidler (Nawwar ve diğ., 2012), fenolikler (Jiménez ve diğ., 2014) dâhil çeşitli fitobileşenleri, siklopeptidler ve uçucu yağlar (Pélissier ve diğ., 1994) (Kossouoh ve diğ., 2007) gibi birçok bileşiklerin varlığı tespit edilmiştir.

Ayrıca *A. muricata* dâhil olmak üzere *Annona* türlerinin genel olarak zengin bir asetojenik bileşik kaynağı olduğu da gözlemlenmiştir. (Rupprecht ve diğ., 1990)

Tablo 1.4: Kanslerle İlişkili *A. muricata*'dan İzole Edilen Kimyasal Bileşikler

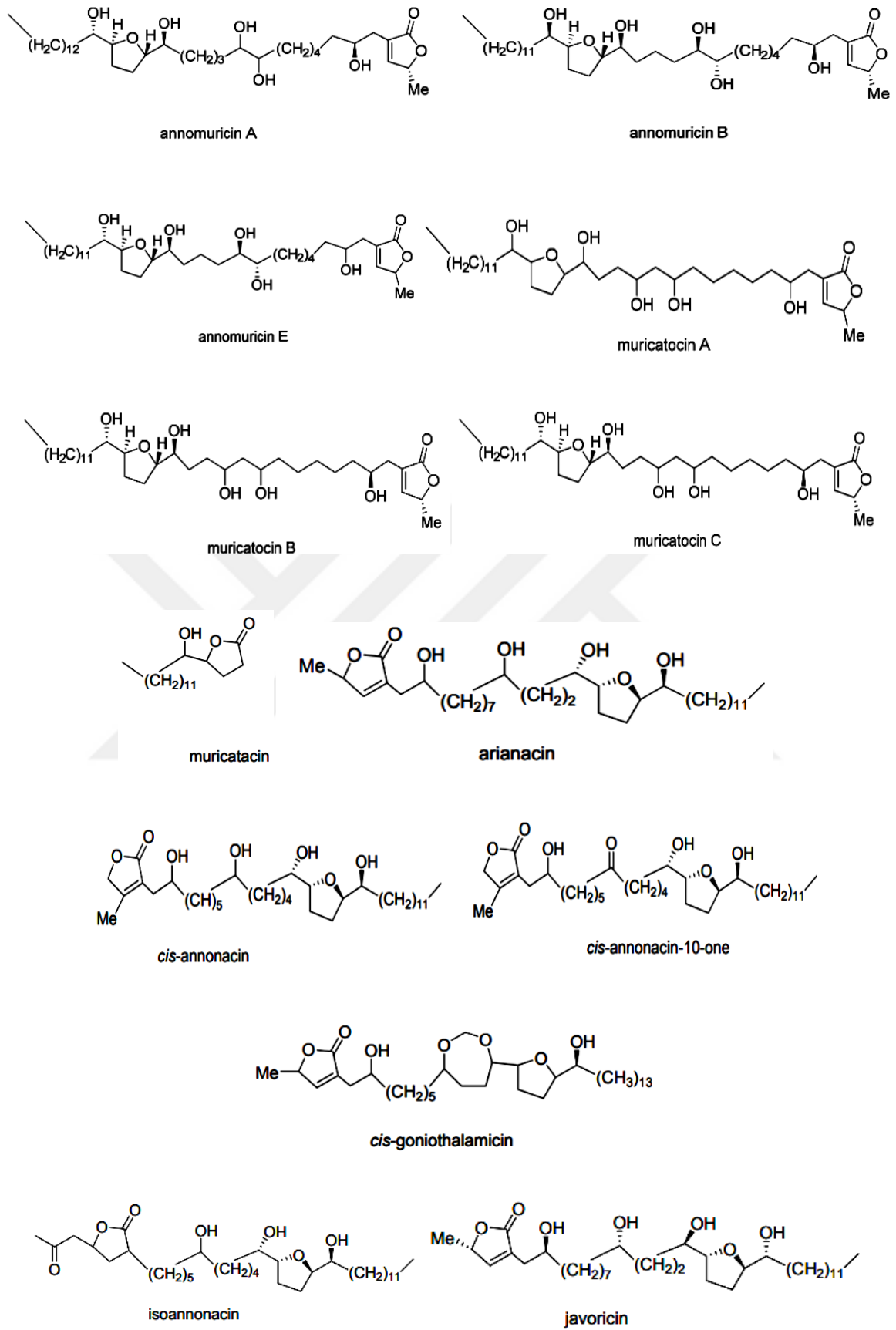
| Bölgesi | İçeriği | Sınıfı | Biyolojik Aktivitesi | Kaynak |
|---------|-----------------------|--------|---|------------------------|
| Yaprağı | Annomuricin A | AGE | Akciğer A549, Meme MCF-7, Kolon HT-29 kanser hücreleri | (Wu ve diğ., 1995) |
| Yaprağı | Annomuricin B | AGE | Akciğer A549, Meme MCF-7, Kolon HT-29 kanser hücreleri | (Wu ve diğ., 1995) |
| Yaprağı | Annomuricin C | AGE | Akciğer A549, Meme MCF-7, Kolon HT-29 kanser hücreleri | (Wu ve diğ., 1995) |
| Yaprağı | Annomuricin E | AGE | Akciğer A549, Meme MCF-7, Kolon HT-29 kanser hücreleri | (Kim ve diğ., 1998) |
| Yaprağı | Muricatocin C | AGE | Akciğer A549, Meme MCF-7, Kolon HT-29 kanser hücreleri | (Wu ve diğ., 1995) |
| Tohumu | Muricatacin | AGE | Akciğer A549, Meme MCF-7, Kolon HT-29 kanser hücreleri | (Rieser ve diğ., 1991) |
| Tohumu | <i>cis</i> -Annonacin | AGE | Akciğer A549, Meme MCF-7, Kolon HT-29 kanser hücreleri | (Rieser ve diğ., 1996) |

Tablo 1.4 (devam): Kanslerle İlişkili *A. muricata*' dan İzole Edilen Kimyasal Bileşikler

| | | | | |
|---------|-----------------------------|-----|---|------------------------|
| Tohumu | <i>cis</i> -Annonacin 10 | AGE | Akciğer A549, Meme MCF-7, Kolon HT-29 kanser hücreleri | (Rieser ve diğ., 1996) |
| Tohumu | <i>cis</i> -Goniothalamycin | AGE | Akciğer A549, Meme MCF-7, Kolon HT-29 kanser hücreleri | (Rieser ve diğ., 1996) |
| Tohumu | Arianacin | AGE | Akciğer A549, Meme MCF-7, Kolon HT-29 kanser hücreleri | (Rieser ve diğ., 1996) |
| Tohumu | Javoricin | AGE | Akciğer A549, Meme MCF-7, Kolon HT-29 kanser hücreleri | (Rieser ve diğ., 1996) |
| Tohumu | İsoannonacin | AGE | Antikanser | (Rieser ve diğ., 1993) |
| Tohumu | Muricin A, B, C, D | AGE | İnsan hepatoma hücrelerine karşı toksikite | (Chang ve Wu, 2001) |
| Tohumu | Muricin E, F, G, H, I | AGE | İnsan hepatoma hücrelerine karşı toksikite | (Chang ve Wu, 2001) |
| Yaprağı | Murihexocin A, B, C | AGE | Farklı kanser hücrelerine karşı toksikite | (Zeng ve diğ., 1995) |
| Meyvesi | Muricin J, K, L | AGE | Prostat PC-3 kanser hücrelerine karşı toksikite | (Sun ve diğ., 2014) |

AGE: Annonaceous Acetogenin

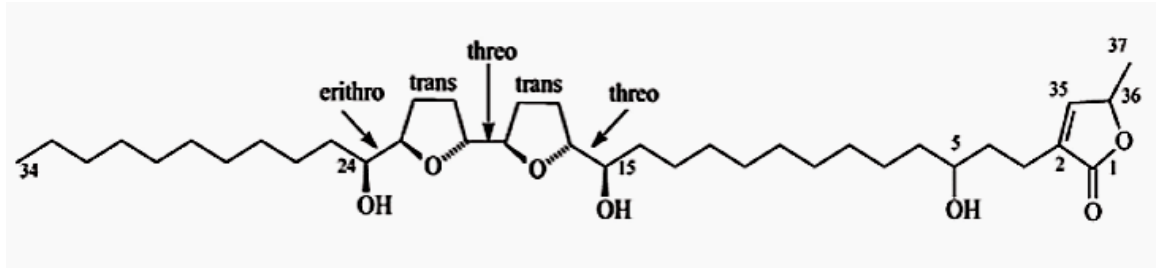
[**Tablo 1.4:**]’de yer almayan anonaine, nornuciferine, asimilobine, isoquercetin, coreximine, coclaurine, reticuline, sabadelin, muricatocin A, muricatocin B, muricatocin C, epomusenin A, epomusenin B, epomurinin A, epomurinin B, dihydrokaempferol hexoside, 5-caffeoylquinic asit, annopentocin A, annopentocin B, annopentocin C, xylopine, gallic asit, annonamine, annoionol A, annoionol B, annoionol C, cohibin A, cohibin B, solamin, *cis*-corosolone, epicatechine, kaempferol 3-*O*-rutinoside, kaempferol 3-*O*-robinobioside, reticulatacin, muricatetrocin A, epomuricenin A, epomuricenin B, epoxy murin A, epoxy murin B, blumenol C, turpinionoside A, roseoside ve vomifoliol gibi 200’den fazla annonaceous asetojenin bileşeni tespit edilmiştir. (Soheil ve diğ., 2015a)



Şekil 1.8: *A. muricata*'dan İzole Edilen Bileşiklerin İki Boyutlu Yapıları (Soheil ve diğ., 2015a)

1.7.2. Annonaceous Asetojenin

Annonaceous asetojenler poliketid yolundaki (*ing.* polyketide pathway) uzun zincirli yağ asitlerinden türetilen bir C₃₅/C₃₇ (C: Karbon) sekonder metabolit sınıfıdır. Bu yapı genellikle, C₂'de bir metile bağlanmış α, β doymamış γ laktonu oluşturan, bir 2-propanol ünitesinin yağ asitlerinin birleşimi ile karakterizedir. (Soheil ve diğ., 2015a)



Şekil 1.9: Asetojenin Yapısı (Marta ve diğ., 2008)

1.7.3. *A. muricata*'nın Biyolojik Aktiviteleri

A. muricata bitkisi protein, kalsiyum, fruktoz, yağ asidi, A ve B vitaminleri ve benzeri birçok bileşik açısından zengindir ve bu durum bitkiye mükemmel şifalı özellikler katmaktadır. Antiartritik aktiviteden antikanser aktiviteye kadar birçok faydasının olması, bu bitkiye olan ilgiyi artırmıştır.

1.7.3.1. Antiartritik Aktivite

2010 yılında Chan ve arkadaşlarının *A. muricata* yapraklarının farklı dozlarda (3, 10, 30 ve 100 mg/kg) etanolik ekstrakt üzerinde yaptığı *in vivo* bir çalışma:

Sıçanlarda iki hafta uygulama sonucunda ödemin (*ödem*: eklemlerde meydana gelen iltihabik durum) doza bağımlı bir şekilde azaltılmasını sağlamıştır. Daha yüksek dozlarda ise ekstral lokal dokuda TNFα ve IL1β ekspresyonunu önemli ölçüde baskılamış ve bu bitkinin proinflamatuvar sitokinlerin baskılanmasına katkıda bulunduğunu gözlemlemişlerdir. (Chan ve diğ., 2010)

1.7.3.2. Antikonvülzan Aktivite

1997 yılında N'Gouemo ve arkadaşları *A. muricata* yapraklarının farklı dozlarda (100 ve 300 mg/kg) etanolik ekstrakt üzerinde yaptığı *in vivo* bir çalışma:

Farelerde konvulsif nöbetlerin (*konvulsif*: geçici nörolojik işlev bozukluğu) insidansını ve mortalite oranını önemli ölçüde azalttığını gözlemlemişlerdir. (N'Gouemo ve diğ., 1997)

1.7.3.3. Antidiyabetik ve Hipolipidemik Aktivite

2009 yılında Adeyemi ve arkadaşları *A. muricata* yaprağının 100 mg/kg dozda etanolik ekstrakt üzerinde yaptığı *in vivo* bir çalışma:

Wistar sıçanların kan glukoz konsantrasyonunun 21.64 mmol/L'den 4.22 mmol/L'ye düştüğünü, serum total kolestrol ve lipoprotein kolestrolünde önemli bir düşüş meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. (Adeyemi ve diğ., 2009)

1.7.3.4. Anti-inflamatuar Aktivite

2010 yılında Roslida ve arkadaşları *A. muricata* yapraklarının farklı dozlarda (10, 30, 100 ve 300 mg/kg) etanolik ekstrakt üzerinde yaptığı *in vivo* bir çalışma:

Sıçan pençelerinde karrageenan kaynaklı ödemi, % 79 oranında azalttığını ve anti inflamatuar aktivite sergilediğini ve bu inflamatuar etkinin lökosit migrasyonu ve eksüda volümündeki azalmalar ile birlikte olduğunu gözlemlemişlerdir. (Roslida ve diğ., 2010)

1.7.3.5. Antioksidan Aktivite

2001 ve 1997 yılında Padma ve arkadaşları *A. muricata* kök kabuğunun 200 mg/kg dozundaki etanolik ekstrakt üzerinde yaptığı *in vivo* bir çalışma:

Sıçan karaciğerin, lipid peroksidasyonunda bir azalma olduğunu ve adaptojenik potansiyel özellik gösterdiğini gözlemlemişlerdir. (Padma ve diğ., 1997) (Padma ve diğ., 2001)

1.7.3.6. Antihipertansif Aktivite

2012 yılında Nwokocha ve arkadaşları *A. muricata* yaprağın farklı dozlarda (9 - 48 mg/kg) etanolik ekstrakt üzerinde yaptığı *in vivo* bir çalışma:

Sprague Dawley sıçanlarında kalp hızlarını etkilemeksizin, doza bağlı bir şekilde kan basıncını önemli ölçüde azalttığını gözlemlemişlerdir. (Nwokocha ve diğ., 2012)

1.7.3.7. Antiparazitik Aktivite

2013 yılında Ferreira ve arkadaşları *A. muricata* sulu yaprak ekstraktı üzerinde yaptığı *in vivo* bir çalışma:

Bir gastrointestinal parazit olan *Haemonchus contortus* larvalarında % 89.08 ve % 84.91 oranında toksisite gösterdiği ve ümit verici bir antelmintik aktiviteye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. (Ferreira ve diğ., 2013)

1.7.3.8. İnkstisid Aktivite

A. muricata bitkisi; *Trichoplusia* larvalarında (Ribeiro ve diğ., 2014) *Sitophilus zeamais* canlısında (Llanos ve diğ., 2008) *Aedes albopictus* ve *Culex quinquefasciatus* larvalarında (Raveloson ve diğ., 2014) *Anastrepha ludens* larvalarında (González ve diğ., 2012) ve muhtelif birçok böcek türünde denenmiş, ümit vadeden böcek öldürücü aktivite sergilediği gözlemlenmiştir.

1.7.3.9. Yara İyileştirme Aktivite

2015 yılında Soheil ve arkadaşları *A. muricata* yaprağının farklı dozlarda (%5 ve %10 v/v) etil asetat ekstresi üzerinde yaptığı *in vivo* bir çalışma:

Sıçanlarda 15 gün boyunca, Hsp70'in yukarı regülasyonu ile belirgin yara iyileşme potansiyelini gösterdiğini gözlemlemişlerdir. (Soheil ve diğ., 2015b)

1.7.3.10. Antikanser Aktivite

Son zamanlarda *A. muricata* bitkisi üzerinde yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar; A549 akciğer kanser hücresi, HT-29 ve HCT-116 kolon kanser hücreleri, BPH1 prostat kanser hücresi, K562 miyeloid lösemik ve MCF-7 ve MDA-MB-231 metastatik meme kanseri hücrelerinde *A. muricata*'nın önemli antikanser ve antitümör aktivitelere sahip olduğunu, kanser adjuvan terapisi olarak asetojeninlerin kullanılabilceğini tespit ettiler.

Tablo 1.5: *A. muricata* Bitkisi Üzerinde Yapılan Antikanser Çalışmalar

| Bitki Muamelesi | Çalışmanın Konusu | Etki Mekanizması | Kaynak |
|--------------------------|---------------------------------------|---|------------------------|
| Yaprak + Etil Asetat Özü | A549 Akciğer kanser hücresi | Mitokondriyal apoptoz, G ₁ fazında hücre döngüsü tutuklaması | (Soheil ve diğ., 2014) |
| Yaprak + Su Özü | Sıçan prostatı | Prostat büyüklüğünde azalma | (Asare ve diğ., 2015) |
| Yaprak + Etanolik Özü | K562 Kronik miyeloid lösemi hücreleri | Apoptoz indüksiyonu | (Ezirim ve diğ., 2013) |

DMH: 1,2-dimetilhidrazine DMBA: Dimethyl-2,3-benzphenanthrene ACF: Aberrant Crypt Foci

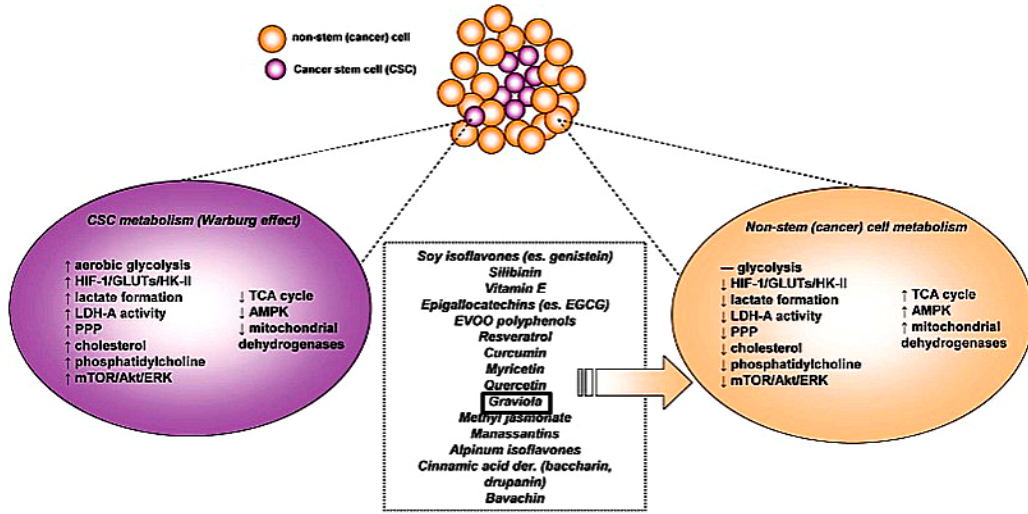
Tablo 1.5 (devam): *A. muricata* Bitkisi Üzerinde Yapılan Antikanser Çalışmalar

| | | | |
|---|---|---|------------------------------|
| Yaprak + Etil Asetat Özü | HT-29 ve HCT-116 Kolon kanser hücreleri | Mitokondriyal apoptoz, Migrasyon ve invazyon baskılanması | (Soheil ve diğ., 2014) |
| Yaprak + Etanolik Özü | Farenin meme dokusu | DMBA kaynaklı DNA hasarının önlenmesi | (Minari ve Okeke, 2014) |
| Yaprak + Etanolik Özü | DMBA ve kroton yağı ile indüklenen farelerin deri papillomagezezi | Tümör başlama ve ilerlemesinin baskılanması | (Hamizah ve diğ., 2012) |
| Yaprak + Etanolik Özü | DMH kaynaklı kolon kanseri | ACF oluşumunun azaltılması | (Eggadi ve diğ., 2014) |
| Suda Haşlanmış Yaprak | Metastatik meme kanseri | Hastalığın stabilizasyonu | (Hansra ve diğ., 2014) |
| Yaprak + Etil Asetatı | Azoksimetan kaynaklı kolon kanseri | ACF oluşumunun azaltılması | (Soheil ve diğ., 2015c) |
| Yaprak + Etil Asetatı | HT-29 Kolon kanseri | Apoptoz indüksiyonu | (Soheil ve diğ., 2015c) |
| Yaprak + Su Özü | MCF-7 ve MDA-MB-231 Meme kanseri hücre hattı | Apoptoz indüksiyonu, Tümör boyut ve ağırlığında azalma | (Najmuddin ve diğ., 2016) |
| Yaprak + Etanolik Özü | HepG2 Karaciğer kanser hücreleri | Endoplazmik retikulum stres yoluyla apoptozis indüksiyonu | (Liu ve diğ., 2016) |
| Yapraktan İzole Edilen Endofitik Mantar + Etil Asetat | MCF-7 Meme kanseri hücre hattı | Antikanser kaynağı | (Minarni ve diğ., 2017) |
| Yaprak + Etanolik Özü | <i>In vitro</i> fibroblast hücreleri ve Ehrlich tümör hücreleri | T3T hücrelerinde sitotoksosite artışı | (Torres ve diğ., 2018) |

NCBI/PubMed veri tabanında 2020 verilerine göre *A. muricata*'nın kanser üzerinde etkisini inceleyen 61 çalışma bulunmaktadır. (NCBI PubMed, 2020)

A. muricata üzerinde yapılan tüm çalışmalar gösteriyor ki:

- Kanser hücrelerinin sitotoksitesini uyardığı,
- Kanser hücre metabolizmasını engellediği,
- Kanser hücre apoptozunu indüklediği,
- Kanser hücrelerinin tümör büyümesini ve metastazını inhibe ettiği gözlenmiştir.



Şekil 1.10: *A. muricata*'nın Kanser Hüresine Etkisi (Francesca ve diğ., 2015)

A. muricata; hepatoprotektif ve bilirubin düşürücü aktivite, antiplazmodyal aktivite, gastroprotektif aktivite ve molluscicidal aktivite gibi daha birçok biyolojik aktiviteye sahiptir. (Soheil ve diğ., 2015a)

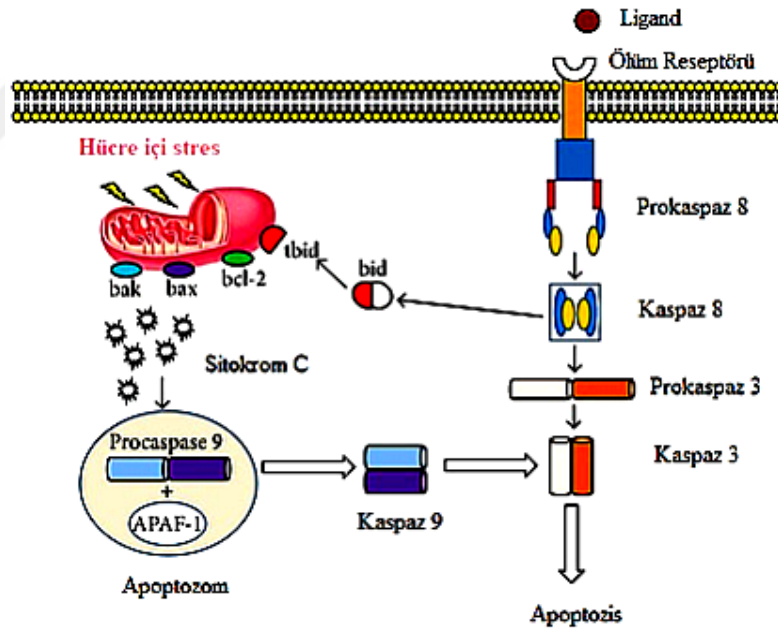
1.7.4. *A. muricata*'nın Moleküler Etki Mekanizması ve Toksisitesi

1999 yılında Lancet Journal'da yayınlanan bir çalışma, tropik meyvelerin tüketimi ile atipik Parkinsonizm insidansı arasında olası bir ilişkinin olduğunu ve asetojenin tüketiminin nörodejeneratif bozukluklardan sorumlu çevresel bir nörotoksine sebep olabileceğini ileri sürdü. (Caparros ve diğ., 1999) (Bonneau ve diğ., 2012)

A. muricata kanser hücrelerinde hüresel büyüme, migrasyon, apoptoz ve anjiyogenez süresini ilerletebilecek sinyal iletim yolağı olan mTOR/AKT/ERK yolağında düşüşe sebep olduğu gözlenmiştir. (Francesca ve diğ., 2015)

1.7.4.1. Apoptoz Mekanizması

Ökaryotik ve prokaryotik organizmalar doğarlar, belli bir süre içinde yaşarlar ve ölürlür. Yaşamın bu şekilde sürdürülmesi organizmayı oluşturan hücrelerin sayısal dengesi için çok önemlidir. Organizmada yeni hücreler meydana gelirken, varolan hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kaldırılmakta, böylelikle organizma içerisinde homeostazi yani denge sağlanmaktadır. Hücre ölümünün üç çeşidi vardır. Bunlar; Apoptoz, Nekroz ve Otofajik hücre ölümüdür. İlk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından kullanılan apoptozis terimi; hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, programlı, organizmada homeostaziyi koruyan bir hücre ölüm tipidir. **(Kerr ve diğ., 1972)** Programlanmış hücre ölümü veya fizyolojik hücre ölümü de denilen apoptozis mekanizmasının düzenlenmesinde; kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküller, p53, kaspazlar, sitokrom-c gibi proteinler ve mitokondriyonlar rol oynar. Bcl-2 ailesi; *proapoptotik üyeler* (Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Noxa) ve *antiapoptotik üyeler* (Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1) olarak iki kısma ayrılır.



Şekil 1.11: İntrensek ve Ekstresek Apoptoz Mekanizması (Loreto ve diğ., 2014)

Apoptozise gidemeyen ve genetik olarak değişmiş hücreler ise kanser gelişimine neden olur. Öyleki kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelerden farkı; apoptozisten kaçması, kontrolsüz bir şekilde bölünerek dokuyu istilâ etmesidir. **(Adrain ve Martin, 2001)** Apoptotik yolda *A. muricata*'nın moleküler etkisi; Bax genini yukarı ekprese ederken, Bcl-2 genini aşağı ekprese ettiği gözlenmiştir. **(Priya ve Ranjit, 2016)**

1.7.5. *A. muricata*'nın Dünyada Etnomedikal Kullanımı

Toplam dünya nüfusunun % 80'inden fazlası, temel sağlık ihtiyaçlarını karşılamak için geleneksel ilaçlara bağımlıdır. Bir ilacın gelişmesi ve piyasaya sürülmesi firmaların milyon dolarlık bütçeleri ile mümkündür ve maalesef başta kendi ülkemiz olmak üzere birçok ülke bu ilaçları temin etmek için büyük ekonomik sorunlar ile karşı karşıya kalabiliyor. Bunun için alternatif tedavi yöntemlerin geliştirilmesi ve şifalı bitkilerin ekimi ve korunması gerekmektedir. Dünya genelinde *A. muricata* bitkisi çeşitli amaçlar için kullanılmaya başlandı, ülkemizde de bu bitki kullanımının yaygınlaştırılması için bitki üzerinde tedaylı çalışmalar yapılmalıdır.

Tablo 1.6: *A. muricata*'nın Etnomedikal Kullanımı (Soheil ve diğ., 2015a)

| | |
|------------------------------------|---|
| Amerika Birleşik Devletleri | Kanser, Depresyon, Mantar Enfeksiyonları, Hipertansiyon, Bağırsak Parazitleri, Tümörler. |
| Brezilya | Apse, Bronşit, Göğüs Problemleri, Öksürük, Diyabet, İshâl, Dizanteri, Ödem, Ateş, Bağırsak Kolik, Bağırsak Parazitleri, Karaciğer Sorunları, Nevralji, Sinirlilik, Ağrı, Romatizma, Spazmlar. |
| Meksika | İshâl, Dizanteri, Ateş, Göğüste Soğuk Algınlığı. |
| Diğer Ülkeler | Artrit, Astım, Safra Yetmezliği, Doğum, Kanser, Dizanteri, Ateş, Kalp Problemleri, Böbrek Problemleri, Karaciğer Bozuklukları, Sıtma, Saçkıran ve Mide Problemleri. |

1.7.6. Ticari Olarak Satılan *A. muricata* Ürünleri



Şekil 1.12: *A. muricata* Ürünleri (Yaprak, Meyve Özü, Kapsül ve Çay)

1.8. İki Boyutlu ve Üç Boyutlu Hücre Kültürü

Hücre kültürü, canlı hücrelerin ait oldukları organizma dışında yani laboratuvar ortamında (*in vitro*) kültüre edilmesi işlemidir. Kültüre alınmış hücrelerin normal işlevlerini ve canlılıklarını sürdürebilmeleri için sıcaklık, pH, iyonik güç ve esansiyel besinlerin girişi tam bir organizmadaki şartlara mümkün olduğunca yakın olması gerekir. Kültürler sıcaklığın, atmosferin ve nemin kontrol altında tutulduğu inkübatörlerde saklanır. Hücre kültür laboratuvarında en sık karşılaşılan bakteri ve fungal kontaminasyon riskini azaltmak için genellikle kültür ortamına Gentamisin, Penisilin ve Streptomisin gibi antibiyotikler eklenir. Bir kültür ortamının temel bileşenleri; inorganik tuzlar, karbonhidratlar, aminoasitler, vitaminler, yağ asitleri, lipidler, proteinler, peptidler ve serumdur. Serum olarak hücre kültür ortamında hücrelerin çoğalması için kullanılan, hormon, enzim ve büyüme faktörleri içeren Fetal Bovin Serum (FBS) kullanılır. Aminoasit olarak temel bir aminoasit olan L-Glutamin; NAD, NADPH ve nükleotidler için azot sağlar ve metabolizma için ikincil bir enerji kaynağıdır.

Hücre kültürü ilk kez Harisson tarafından 1907 yılında, kurbağa sinir hücrelerinin incelemesinde kullanılmıştır. **(Harrison ve diğ., 1907)** Harisson'dan sonra hücre kültürü fare, maymun, insan gibi birçok farklı organizma üzerinde denenmiş ve çalışılmıştır.

İki boyutlu (2B) kültür sistemi hücre kültür çalışmalarında pek çok araştırmacı tarafından kullanılan bir sistem olmak ile birlikte *in vivo* ortamı iyi bir şekilde yansıtamamaktadır. İki boyutlu sistemlerde hücrenin tutunduğu yüzeye bağlı olarak tepkileri, salgılanan maddeler ve eksprese ettiği genler farklılık göstermektedir. Bununla birlikte kontrol edilebilir, tekrarlanabilir ve ekonomik olması iki boyutlu kültür sisteminin avantajları arasındadır.

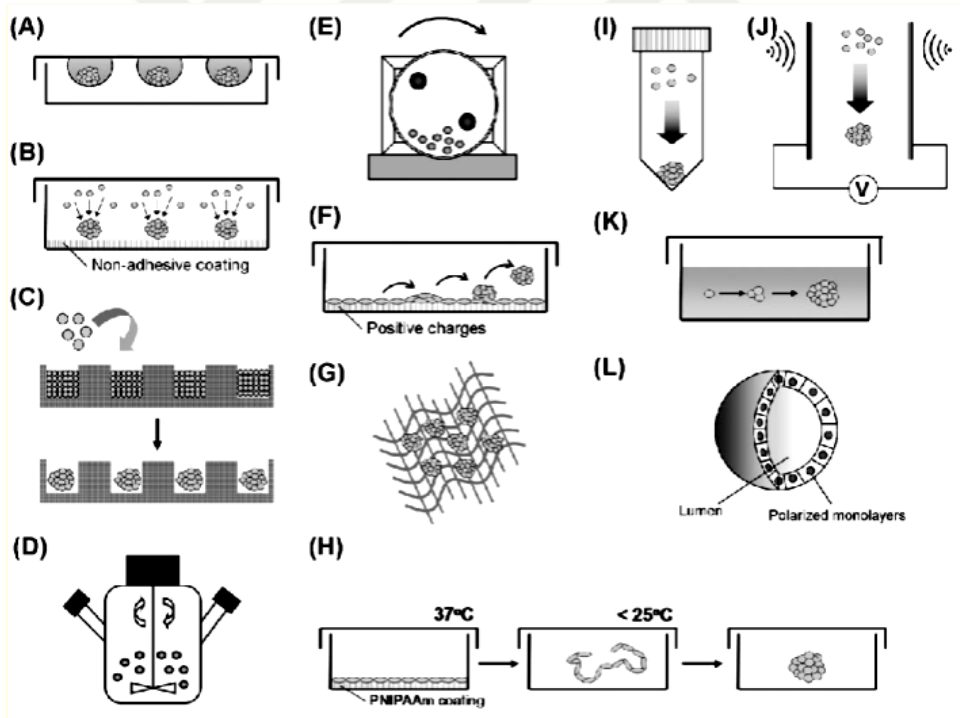
İki Boyutlu Hücre Kültürünün Dezavantajları:

1. Kimyasal maddelerin davranışlar üzerine olan karmaşık etkileri incelenemez ve bu yüzden manipülasyon hataları gözlenir.
2. Hücreleri uzun süre dondurmak, biyokimyasal ve genetik değişikliklere sebep olabilir. Ayrıca normal dokulardan elde edilen hücre soyları yavaş yavaş çoğalma potansiyellerini kaybederler.
3. *In vivo* koşullarında sahip oldukları ekstrasellüler matriks (*ing.* ECM) etkileşimlerinin ve bazal lamina bileşenlerinin yoksunluğu, tamamlanmamış farklılaşmaya sebep olarak tam morfolojilerini sergileyemezler.

İki boyutlu hücrelerin rutin bakımında ortamın pH durumu ve hücrelerin durumuna göre; beslenmeli, bölünmeli (pasajlanmalı) ve sonraki çalışmaların devamı için dondurulmalıdır.

Son 20 yılda iki boyutlu kültür sistemine kıyasla artan üç boyutlu (3B) kültür sistemi, iki boyutlu kültür sistemine göre *in vivo* sisteme daha yakın olabilmektedir. Üç boyutlu kültür sistemlerinde, salgılanan hücre yüzey reseptörleri, çoğalma özellikleri, hücre yoğunluğu ve metabolik fonksiyonlar iki boyutlu kültür sistemleri ile karşılaştırıldığında farklılıklar göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, insan yumurtalık kanser hücrelerinin üç boyutlu kültürde Taksole karşı gösterdikleri dayanıklılık iki boyutlu kültüre göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. (Demiray ve diğ., 2011)

Üç boyutlu hücrelerde küre (*ing.* spheroid) yapısının oluşma hızı, küre yapısının büyüklüğü ve canlılığın iyi korunması gibi faktörler göz önüne alınarak en uygun yöntem seçilir. [Şekil 1.13:]

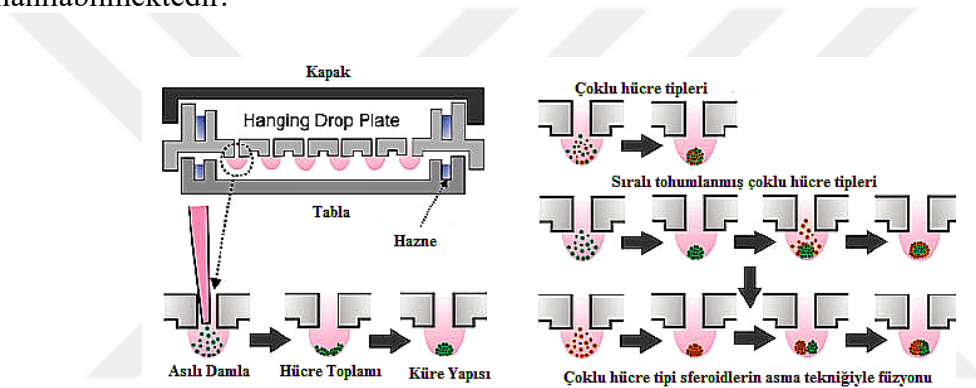


Şekil 1.13: Üç Boyutlu Hücre Kültür Metodları (Passamai ve diğ., 2016)

(A) Asılı Damla Kültürü (B) Yapışmayan Yüzeyde Tek Hücre Kültürü (C) Mikrokalıplama Teknik (D) Dönen Flask Kültür (E) Dönerek Çalışan Hücre Kültürü (F) Primaria Kapları Üzerinde Hepatosit Toplama (G) Gözenekli 3Boyutlu İskeleler (H) PNIPAA Bazlı Hücre Tabakalarının Kullanımı (I) Santrifüleme Pelet Kültür (J) Elektrik, Manyetik veya Akustik Kuvvet Hücreleri Agregasyon Artışı (K, L) Tümör Sferoidlerinin ve Polarize Epitelyal Kistlerin Monoklonal Büyümesi

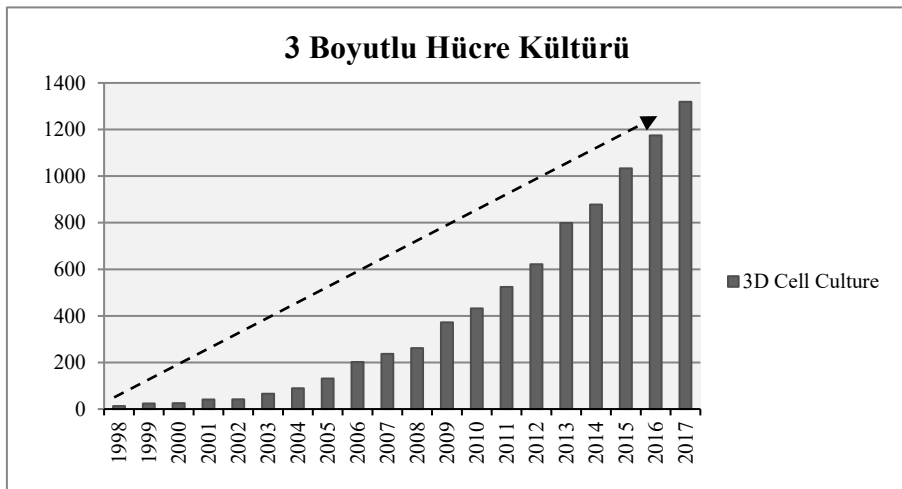
1.8.1. Asılı Damla Metodu (*ing.* Hanging Drop Metod)

Diğer birçok üç boyutlu kültür sistemlerine kıyasla maliyeti düşük ve herhangi bir özel ekipman gerektirmeyen asılı damla metodunda, hücre-hücre veya hücre-ekstrasellüler matriks (*ing.* ECM) etkileşimi üzerindeki etkileri ortaya çıkarır ve çok küçük miktarlarda herhangi bir biyolojik maddenin eklenmesini kapsayacak şekilde uyarlanabilir. Yöntem ayrıca hücreler arasındaki ilişkileri belirlerken hücre-hücre veya hücre-ECM etkileşimlerinin rolünü açıklığa kavuşturmak için iki ve/veya daha fazla farklı hücre popülasyonunu birlikte kültürlenmek içinde kullanılabilir. Ko-kültür (*ing.* co-culture) de denilen iki ve/veya daha fazla farklı hücre popülasyonlarının hücreleri arasındaki mekansal ilişkileri belirterek, hücrelerin diğer hücrelere karşı rolünü aydınlatmak için kullanılabilir.



Şekil 1.14: Asılı Damla Metodu (Asghar ve diğ., 2013)

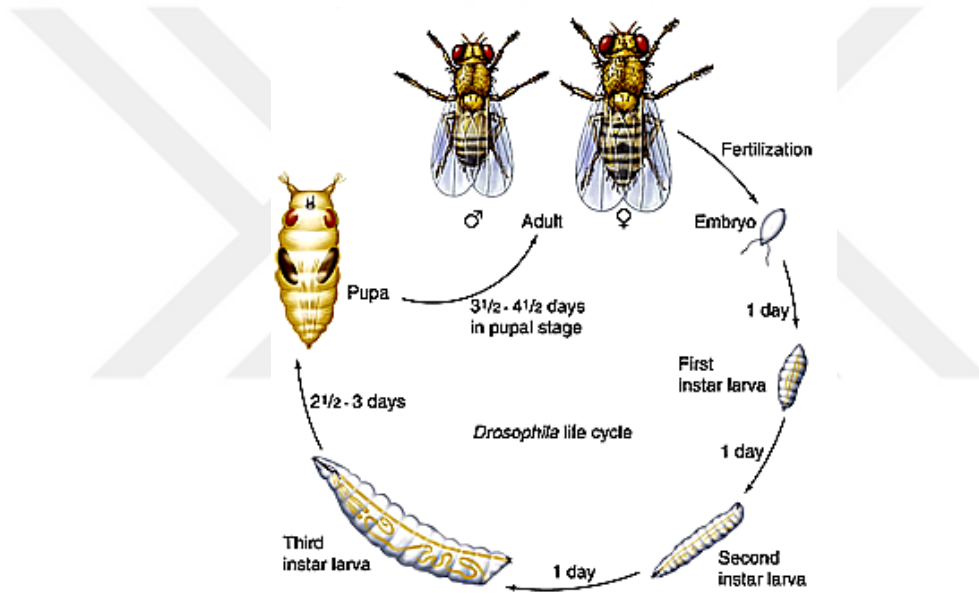
1998 ve 2017 yılları arasında yapılan üç boyutlu hücre kültürü NCBI/PubMed çalışmaları aşağıdaki grafikte gösterildiği gibidir. 1998 yılında 13 çalışma yapılmışken, 2017 yılında 1319 çalışma yapılmıştır. **[Şekil 1.15:]**



Şekil 1.15: Üç Boyutlu Hücre Kültür Çalışması

1.9. *Drosophila melanogaster* Model Organizması

Meyve sineği veya sirke sineği olarak da bilinen *Drosophila melanogaster*, Diptera takımına ait bir böcek türüdür. İlk kez 1909 yılında Thomas Hunt Morgan tarafından genetik çalışmalarda kullanılan bu model organizma, dokular ve genler arasındaki ayrıntılı etkileşimleri inceleme olanağı sunmaktadır. Laboratuvar ortamında yaklaşık 25 °C sıcaklıkta ve % 60 nem oranında yaşamakta, değişen sıcaklık koşullarında ise yaşam döngüsünün süresinde değişiklik meydana gelmektedir. Bir *D. melanogaster* canlısı, yaşam döngüsünde tam metamorfoz geçirir ve yaşamını 4 aşamada tamamlar. Bu evreler; embriyo, larva, pupa ve yetişkin evreleridir. (William ve diğ., 2011)



Şekil 1.16: *D. melanogaster* Yaşam Döngüsü (Yazıcı, 2017)

Laboratuvar ortamında bakımının ve yetiştirilmesinin kolay olması, çok fazla döl verebilen bir tür olması, kısa yaşam döngüsüne sahip olması, herhangi bir etik kaygı içermemesi ve genom diziliminin tamamlanmış olması bu canlının en büyük avantajları arasındadır.

D. melanogaster canlısının tüm genomu dizilenmiş olup yaklaşık 13.600 gen olduğu tespit edilmiştir. (Rand, 2010) 2001 yılında açıklanan İnsan Genom Projesi ile, genetik şifremizin çözülmesi kanser, alzheimer, parkinson gibi genetik temelli olan bazı hastalıkların tedavi edilebileceğini gözler önüne sermiştir. Başta kanser olmak üzere birçok hastalığın genetik temeline bakıldığında, % 75-77 civarında insan ile *D. melanogaster*'ın benzer olduğu gözlenmiştir. (Bernards ve Hariharan, 2001)

1.10. Biyoinformatik Programlar

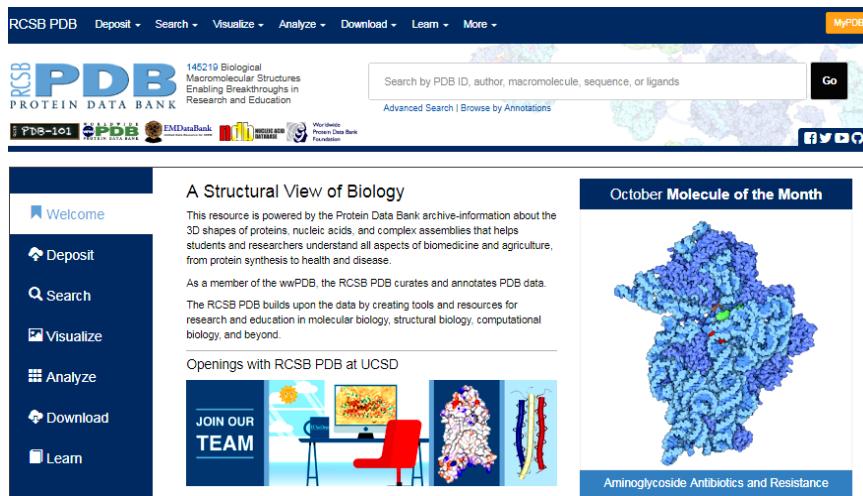
Moleküler biyoloji, tıbbî biyoloji, genetik ve biyokimya laboratuvarlarında yapılan çalışmalar sonucunda pek çok sayıda genomik bilgi elde edilmiş, elde edilen bilgilerin bir araya getirilip kullanılır hâle getirilmesi için bilim insanları yeni ve multidisipliner bir bilim dalı olan biyoinformatik bilimine ihtiyaç duymuştur. Biyoinformatik bilimi, biyolojik bilgilerin saklanması için veritabanlarının oluşturulması ve biyolojik olayların moleküler düzeyde açıklanmasına yardımcı olmaktadır. (Polat ve Karahan, 2009)

Biyoinformatikte en sık kullanılan veritabanları:

- Nükleotid Dizilim Veritabanları (Ensembl ve NCBI)
- Protein Veritabanları (UniProt, InterPro ve PDB)
- Veri Madenciliği (BioMart)
- Dizi Hizalama ve Karşılaştırma (Clustal ve Blast)

1.10.1. Protein Veri Bankası (*ing.* Protein Data Bank, PDB)

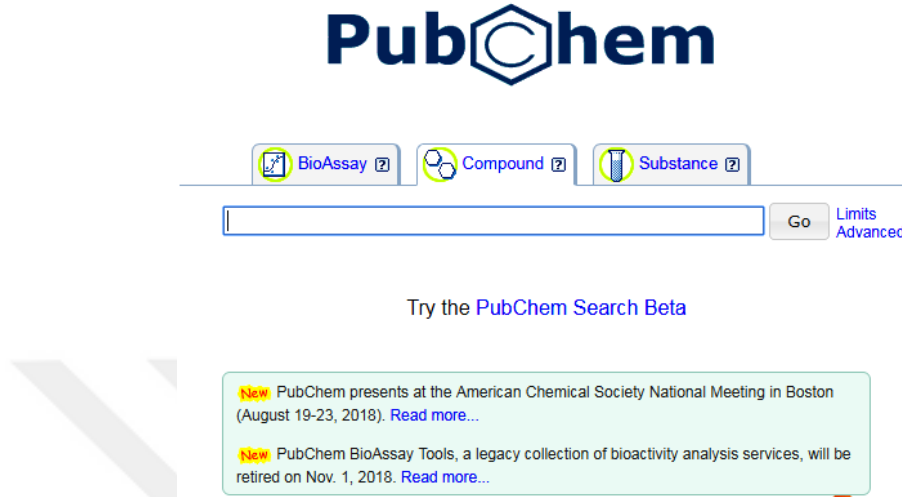
1971 yılında kurulan Avrupa tabanlı protein veri bankası ve Amerika tabanlı protein veri bankası; protein, RNA ve DNA gibi biyolojik moleküllerin üç boyutlu yapılarını *[.pdb]* dosya formatı biçiminde gösteren veritabanıdır. Bu veritabanında yer alan bilgiler X ışını kristalografisi veya nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi yöntemleriyle sağlanmaktadır. Resmi internet sitesinde Haziran 2020 verilerine göre 163141 makromolekül yapıya ulaşılmıştır. (PDB, 2020)



Şekil 1.17: Protein Data Bank İnternet Sayfası

1.10.2. PubChem Programı

2004 yılında kurulan, Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Dairesi'ne bağlı kimyasal moleküllerin veri bankasıdır.



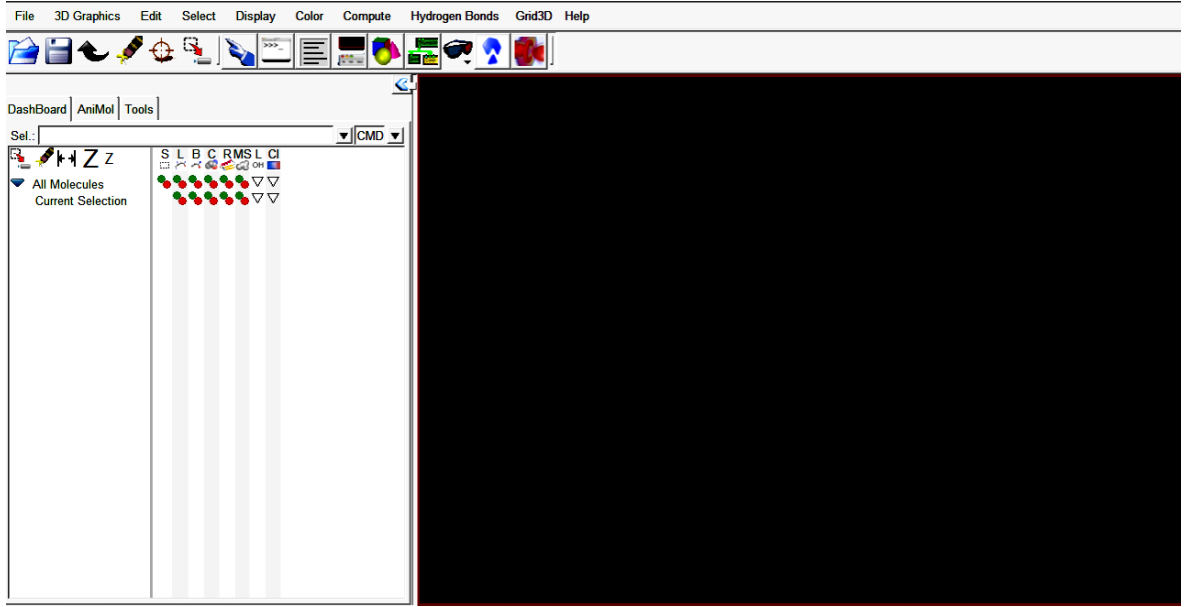
Şekil 1.18: PubChem İnternet Sayfası

1.10.3. Moleküler Kenetlenme (*ing. Molecular Docking*) Programı

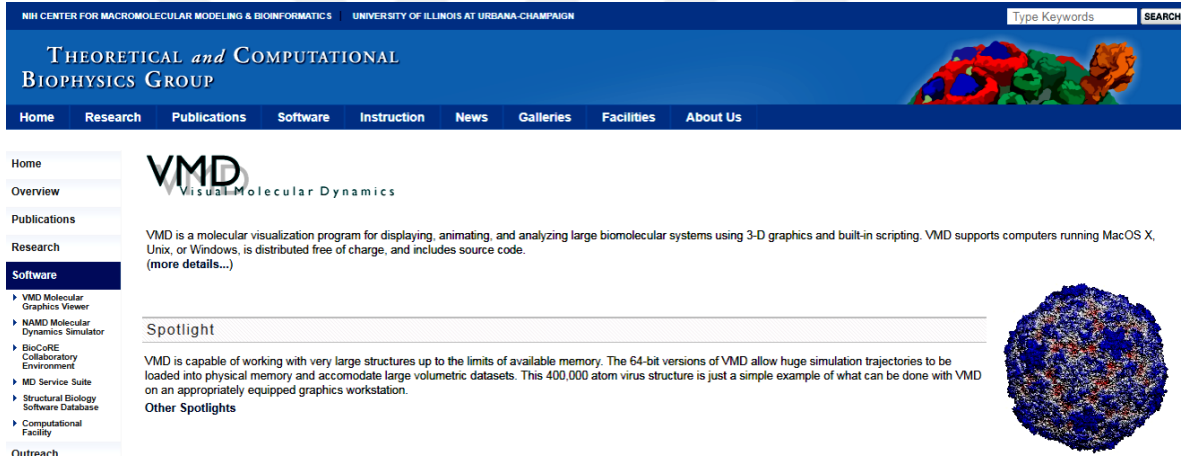
20. yüzyıl ortalarında bilim insanları, yeni ilaç etken maddesi bileşiklere ulaşabilmek için kimyasal bileşiklerin moleküler yapıları ile biyolojik etkileri tanımlama adına bilgisayar destekli ilaç tasarım programları geliştirdiler. Burada temel amaç belirlenen molekülün (yani *ligandın*) hedef bölgeye (yani *proteine*) bağlanıp bağlanmadığının tespit edilmesi ve molekülün muhtemel bir ilaç olma potansiyelini araştırmayı amaçlamaktadır. Moleküler docking yöntemi üç boyutlu yapısı belli olan, reseptör-ligand bağlanma enerjilerini belirleyebilmekte ve reseptörün bağlanma bölgesinde ligandın pozisyonunu canlandırabilmektedir. Docking hesaplama işlemi üç ana basamakta gerçekleşmektedir:

- Bir hedef protein ve ligandın üç boyutlu yapısının belirlenmesi.
- Hedef protein-ligand bağlanma enerjilerinin skorlanması.
- Bağlanma enerji skorlarının sınıflandırılması ve aminoasit bağlanma bölgelerinin görüntülenmesidir.

Bu amaçla kullanılan **AutoDock** programı protein-ligand bağlanma enerji düzeyleri hakkında bize bilgi verirken, **VMD** programı protein-ligand görüntüsü ve hangi aminoasit bölgelerinden bağlandığı hakkında bizi bilgilendirir. (Forli ve diğ., 2016)



Şekil 1.19: AutoDock 1.5.6. Programı



Şekil 1.20: Visual Molecular Dynamics (VMD) Programı

1.10.4. İmage J Programı

Java temelli olarak üretilmiş bir program olan İmage J programı; JPEG, BMP, GIF ve TIF gibi birçok formatta resimleri düzenlemeye yarayan programdır. Bu programı kullanarak resimlerin boyutları, renkleri ve parlaklığı değiştirilebilir. 1970 yılında Wayne Rasband'ın ilk görüntüleme programı olan İmage, 1987 yılında II. Mac'in kullanıma sunulması ile birlikte NIH İmage olarak kullanılmaya başlandı. (<https://imagej.nih.gov/>)

Tez çalışmasında, mikroskop görüntülerin renklendirilmesi ve üç boyutlu hücre alanların belirlenmesinde İmage J programı kullanılmıştır. (İmage J 1.52a, Java 1.8.0_112 (64Bit))

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

“*Annona muricata* bitkisinin meme kanseri hücre hattında ve *Drosophila melanogaster* model organizmasındaki moleküler etkisinin incelenmesi” adlı tez çalışmasında 100’e yakın kaynak araştırması yapılmıştır. Bu kaynakların 5 tanesi, tez çalışmasının şekillenmesinde kilit rol oynamıştır.

“Molecular Docking Studies of Bioactive Compounds from *Annona muricata* Linn as Potential Inhibitors for Bcl-2, Bcl-W and Mcl-1 Antiapoptotic Proteins“

2018 yılında Apoptosis dergisinde yayınlanan bir çalışmada, *A. muricata*’da bulunan 10 fitokimyasal madde (bullatakin, annokatalin, annomuricin A, annomuricin B, annonacin anonain, coreximin, annonacinone, murisolin ve sinpharin) ligand olarak seçilmiş, Bcl-2, Bcl-W ve Mcl-1 reseptörleri ile olan bağ enerjileri AutoDock 4.2 yazılımı kullanılarak docking hesaplama yapılmıştır. Ön klinik ilaç olarak kullanılan obatoksine kıyasla, özellikle Bcl-2 ve Mcl-1’e karşı *A. muricata*’nın yüksek afiniteye sahip olduğu gözlenmiştir. **(Mohamad ve diğ., 2018)**

“*Annona muricata* Leaf Extract Triggered Intrinsic Apoptotic Pathway to Attenuate Cancerous Features of Triple Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cells“

2018 yılında yapılan bir çalışmada, *A. muricata* yaprak özünün üçlü negatif meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücreleri üzerinde ve kontrol grubu olarak MCF-7 hücreleri üzerindeki apoptotik mekanizmaları aydınlatılmıştır. Çalışmada *A. muricata*’da bulunan aktif bileşenlerin mitokondriyal apoptozu ve hücre proliferasyonunu bastırdığı ve hücre motilitesini azalttığı tespit edilmiştir. **(Kim ve diğ., 2018)**

“Prune cAMP Phosphodiesterase Binds nm23-H1 and Promotes Cancer Metastasis“

2004 yılında Cancer Cell’de yayınlanan bir çalışmada, 59 metastatik meme kanseri hastasının 22’sinde (% 37) aşırı eksprese olan bir gen tespit ettiler. Bu gen bölgesi bakterilerdeki DNA onarım proteini olan RecJ nükleaz gibi birçok fosfoesterazı içeren DHH süper ailesine ait h-prune geniydi. Bu genin tespit edilmesinde model organizma olarak *Drosophila melanogaster* canlısını kullandılar. Çalışmanın sonucunda h-prune geni metastatik meme kanseri hastalarında yukarı eksprese (*ing.* upregulated) olurken, nm-23 geni aşağı eksprese (*ing.* downregulated) olduğu gözlenmiştir. **(D’Angelo ve diğ., 2004)**

“*Annona muricata*: A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities”

2015 yılında Soheil ve arkadaşlarının hazırlamış olduğu derlemede, *A. muricata* bitkisinin geleneksel kullanımından, yapısındaki izole asetojenlerden ve bu bitkinin biyolojik aktivitelerinden bahsedilmiştir. (Soheil ve diğ., 2015a)

“Acetogenins from *Annona muricata* as Potential Inhibitors of Antiapoptotic Proteins: A Molecular Modeling Study”

2016 yılında bir grup bilim adamı, *A. muricata*'dan elde edilen asetojenlerin moleküler modelleme çalışması olan moleküler docking hesaplaması yapmıştır. Çalışmada antiapoptotik protein olarak Bcl-X1 ve Bcl-2 reseptörleri kullanılmış, hedef molekül olarak ise annomuricin A, annoheksosin, muricatocin A, annomuricin D ve muricatetrocin A/B gibi ligandlar kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda annomuricin A, annoheksosin, muricatocin A, annomuricin D ve muricatetrocin A/B gibi asetojenlerin, Bcl-2 ve Mcl-1 ile karşılaştırıldığında Bcl-X1 ile güçlü bağlanma etkileşimleri sergilediği gözlenmiştir. (Priya ve Ranjit, 2016)

Tablo 2.1: Tez ile İlişkili Olduğu Düşünülen Makale Sayısı (NCBI PubMed, 2020)

| Konu | Makale Sayısı |
|--|---------------|
| <i>A. muricata</i> | 247 |
| <i>A. muricata</i> and cancer | 61 |
| <i>A. muricata</i> and molecular docking | 5 |
| <i>D. melanogaster</i> and cancer | 3678 |
| <i>D. melanogaster</i> and molecular docking | 138 |
| <i>A. muricata</i> and <i>D. melanogaster</i> | 0 |
| <i>A. muricata</i> and <i>D. melanogaster</i> and cancer and molecular docking | 0 |

A. muricata bitkisinin meme kanseri hücre hattında ve *D. melanogaster* model organizmasında moleküler etkisinin incelenmesine ait bir çalışma bulunmamaktadır. Bu yüzden tez çalışmamız literatüre **özgün** bir değer katacaktır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Hücre Hatları

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hattı Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Kanser ve Kök Hücre laboratuvarında temin edilen bir tür meme kanseri hücre dizisidir.

3.1.2. Kimyasal ve Reaktifler

Tablo 3.1: Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Reaktifler

| Kullanım Amacı | Kimyasal ve Reaktif | Ürün Firma Adı |
|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| Hücrelerin Rutin Bakımı | RPMI-1640 Medium | Biological Industries, İsrail |
| | Fetal Bovin Serum (FBS) | Biological Industries, İsrail |
| | Gentamisin | Biological Industries, İsrail |
| | Tripsin-EDTA | Biological Industries, İsrail |
| | Phosphate Buffered Saline (PBS) | Biological Industries, İsrail |
| | Dimetil Sülfoksit (DMSO) | Amresco®, ABD |
| Hücre İnvazyon Analizi | Matrigel | BD Biosciences, ABD |
| | Giemsa Çözeltisi | Merck, Almanya |
| | Metanol (% 100), Formaldehit (% 37) | Tekkim, Türkiye |
| | Memeli Hücresi RNA İzolasyon Kiti | GeneAll®, Kore |
| Ticari Kitler | XTT Analiz Kiti | Biological Industries, İsrail |
| | cDNA Sentez Kiti | GeneAll®, Kore |
| | Meyve Sineği RNA İzolasyon Kiti | Zymo Research, ABD |
| Meyve Sineği Bakımı | Agar | Oxoid™, İngiltere |
| | Yeast Ekstrakt | Himedia, Hindistan |

3.1.3. Makine ve Teçhizat

Tablo 3.2: Çalışmada Kullanılan Makine ve Teçhizat

| Kullanım Amacı | Makine ve Teçhizat | Ürün Firma Adı |
|------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| Hücreyel Çalışma | CO ₂ İnkübatör | Nüve EC 160, Türkiye |
| | Laminar Akımlı Kabin | Nüve MN 090, Türkiye |
| | İnverted Mikroskop | BAB, Türkiye |
| | Mikroskop Kamerası | Leica, Almanya |
| | Stereo Mikroskop | Leica, Almanya |
| Moleküler Çalışma | PCR Cihazı | Thermo Hybaid, ABD |
| | Vorteks | IKA® Vortex, ABD |
| | Mini Santrifüj Cihazı | Nüve NF 024, Türkiye |
| | Santrifüj Cihazı | Nüve NF 400, Türkiye |
| | Nanodrop Cihazı | Mecasys Obtizen NanoQ, Kore |
| | ELISA Okuyucusu | BIOTEK ELX808, ABD |
| | Jel Yükleme Cihazı | Thermo Scientific, ABD |
| | Jel Görüntüleme Cihazı | BIO-RAD, ABD |
| Meyve Sineği Çalışması | Sinek İlaç Deneme Sistemi | Marangozda yapıldı. |
| | Hassas Terazi | KERN, Almanya |
| Malzeme Depolanması | Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı | IKA®C - MAG HS 7, ABD |
| | Buzdolabı (+4 °C) | Vestel, Türkiye |
| | Buzdolabı (-20 °C) | Vestel, Türkiye |
| | Derin Dondurucu (-80 °C) | ARCTIKO, Danimarka |
| Diğer Cihazlar | Masa Üstü Bilgisayar | Hewlett Packard (Hp), ABD |
| | Dizüstü Bilgisayar | Hewlett Packard (Hp), ABD |
| | Dizüstü Bilgisayar | Lenova core i5, Hong Kong |

3.2. Metod

3.2.1. Hücre Kültürü

3.2.1.1. MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattının İki Boyutlu Geliştirilmesi

MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücre hattı % 10 (v/v) Fetal Bovin Serum ve % 1 (v/v) Gentamisin antibiyotiği eklenmiş % 88 (v/v) RPMI-1640 **[Ek 1]** besiyerinde 37 °C'de % 5 karbondioksit inkübatöründe ve 75 cm²'lik flasklarda üretilmiştir. Flask içerisine 12 mL taze medium ilave edilmiştir. **[Şekil 3.1:]** Flask yüzeyinin % 80'i hücreler tarafından kaplandıkça, hücreler tripsin-EDTA kullanılarak pasajlanmıştır.



Şekil 3.1: MDA-MB-231 ve MCF-7 Hücrelerin İki Boyutlu Geliştirilmesi

3.2.1.2. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler flask tabanında sıkışık bir duruma gelince besi ortamından yeterince faydalanamaz ve **kontakt inhibisyon** adı verilen mekanizma ile çoğalmaları durur. Bu durumda hücrelerin pasajlanması gerekir. Hücre pasajı, hücrelerin yüzey alanından substrat ile ayrılması ve yeni kültür şişesine aktarılması anlamına gelir. Hücreler kültür şişesinin yüzey alanını büyük ölçüde kapladıklarında, laminer akış kabininin içerisinde *tripsinizasyon* yoluyla kaldırılır.

Bu işlem göz önüne alınarak, öncelikle hücreler mikroskop altında incelenmiştir ve % 80 flask tabanını kapladığı (*ing.* konfluent) gözlenmiştir. Flask içerisindeki 12 mL hücre mediumu çekilip, 5 mL Fosfat Tamponlu Salin (*ing.* PBS) ile yıkanmıştır. Hücrelerin üzerine 2 mL tripsin-EDTA ilave edilip hücreler flask tabanından ayrılana kadar 37 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Flask tabanından kalkmış olan hücreler mikroskopta gözlenmiştir. Tripsinin hücreler üzerindeki toksik etkisini inhibe etmek için 4 mL hücre mediumu ilave edilip gerekli sayıda hücre yeni bir kültür şişesine aktarılmıştır.

3.2.1.3. Tripan Mavisi ile Hücre Sayımı

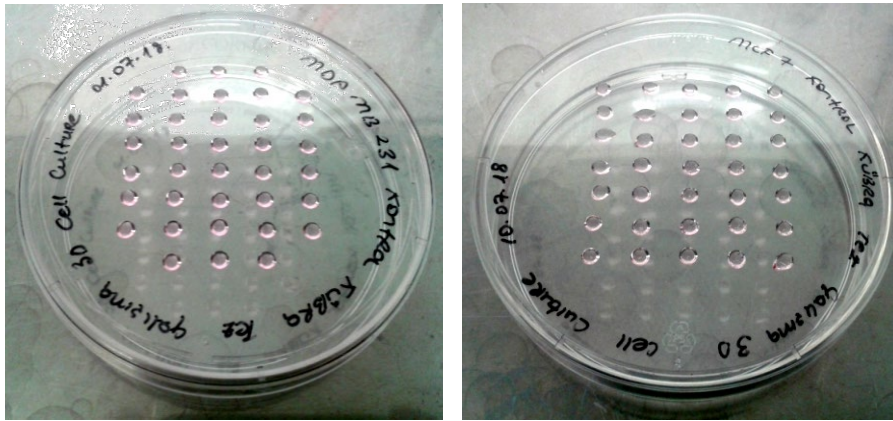
Tripan mavisi boyasının aktivitesi, kromoforun negatif yüklü olduğu ve membran hasar görmediği sürece hücre ile etkileşime girmediği duruma bağlıdır. (Freshney, 1987) Bu nedenle ölü hücreler maviye boyanır ve ölü olmayan hücreler tripan boyası ile boyanmaz. Tripsin-EDTA ile kaldırılan hücre solüsyonu tripan mavisi solüsyonu ile 10:1 oranı kullanılarak karıştırılır. Bu oran baz alınarak 250 µL hücre solüsyonu, 25 µL tripan mavisi solüsyonu ile karıştırılıp hemositometri (thoma lamı) üzerinde hücreler sayılmıştır.

Denklem 3.1: Tripan Mavisi ile Hücre Sayımı

$$1\text{mL}'deki\ Hücre\ Sayısı = Karelerdeki\ Hücre\ Sayısı \times Seyreltme\ Faktörü \times 4 \times 10^6$$

3.2.1.4. MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattının Üç Boyutlu Geliştirilmesi

Hücre hatları üç boyutlu *asılı damla yöntemi* kullanılarak küresel (*ing. sferoid*) olarak çoğaltılmıştır. Hücre süspansiyonu hazırlandıktan sonra **[Şekil 3.2:1]**'de gösterildiği gibi pipet yardımıyla 10 µL (≈ 10.000 hücre) hücre süspansiyonu petrinin üst tabanına bırakılmıştır. Nem kontrolünü sağlamak için petrinin alt tabanına 5 mL PBS eklenmiştir. Ardından hücreler 37 °C'de % 5 karbondioksitli inkübatörde üretilmiştir. (Foty, 2011)



Şekil 3.2: MDA-MB-231 ve MCF-7 Hücrelerin Üç Boyutlu Geliştirilmesi

Hücre hatlarının asılı damla yönteminde küresel olarak etkin bir şekilde büyüme sağlaması için her gün kuyucuklara 5 µL taze besiyeri dikkatlice eklenmiştir. MCF-7 hücre hattı üç gün, MDA-MB-231 hücre hattı bir günün sonunda küresel şekil alıp 200-300 mikron boyutuna ulaşmıştır. (İmage J, 2018) Hücrelerin morfolojik karakterizasyonu mikroskop yardımıyla 5 gün boyunca kontrollü olarak incelenip fotoğraflanmıştır.

3.2.2. Hücre Motilitesini ve Hücre İstilâsını Tespit Etmek

3.2.2.1. MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattı Motilite Testi

Metastatik kabiliyeti belirlemek için *hücre göç analizi* yapılmıştır. (Kim ve diğ., 2018) İlk olarak, 6'lı kuyucuklu bir plaka içerisinde her kuyucuğa yaklaşık 2×10^5 hücre ilave edilmiştir. Bir günün sonunda, hücrelerin % 80 flask tabanını kapladığı gözlenmiştir. 10 µL pipet ucu (beyaz renkte) yardımıyla, tek tabaka halinde hızlı bir şekilde dikey bir yara oluşturulmuştur. İçerisi taze medium ile aspire edildikten sonra 0., 6., 12. ve 24. saat aralıklarında inverted mikroskop altında dikey olarak çizilen yaranın fotoğrafı çekilmiştir.

3.2.2.2. MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattı İstilâ Analizi

İnvazyon yeteneğinin belirlenmesi metastatik fenotip için çok önemli bir konudur. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin invazyon kabiliyetini belirleyebilmek için *matrigel ile boyden oda hücreleri invazyon analizi* yapılmıştır. Matrigel; Engelbreth Holm Swarm (EHS) fare sarkoma hücreleri tarafından salgılanan, entaktin, kolojen ve laminin gibi yapısal proteinlerden oluşan bir protein karışımıdır. (Tezcan, 2013)

İlk olarak, 24 kuyucuklu plakalara invazyon matrigeller [Ek 2] yerleştirilip her bir matrigel bölmesi içerisine 200 µL medium (*serumsuz*) ve yaklaşık 2×10^5 hücre ilave edilmiştir. Matrigel bulunmayan alt bölme kuyucuklara 750 µL medium (*serumlu*) ilave edilip matrigeller alt bölme kuyucuklara yerleştirilmiştir. 37 °C'de % 5 CO₂ inkübatör içerisinde 24 saat bekletilmiştir. Matrigeller medium içerisinden çıkartılıp matrigel içerisindeki medium aspire edilmiştir. Her bir matrigel 2 defa PBS ile yıkanmıştır. Hücreleri sabitlemek için 2 mL formaldehit (% 3.7 PBS'de) ilave edilmiştir ve 2 dakika kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Formaldehit uzaklaştırılıp 2 defa PBS ile yıkanmıştır. Hücre geçirgenliğinin sağlanması için 2 mL metanol (% 100) ilave edilip 20 dakika kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Metanol uzaklaştırılıp 2 defa PBS ile yıkanmıştır. Hücrelerin görünürlüğü ve boyanması için 1 mL giemsa boyası ilave edilip plaka alimünyum folyo ile kapatılmıştır ve 15 dakika kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Giemsa boyası uzaklaştırılıp 2 defa PBS ile yıkanmıştır. Matrigel içi, hassas bir şekilde tıbbî pamuk ile temizlendikten sonra, inverted mikroskop altında hücrelerin fotoğrafı çekilmiştir. İkinci invazyon analizinde; 6'lı kuyucuk plakalara 200.000 hücre ekimi yapıp 24 saat bekletilmiştir. Hücreler 2 mL formaldehit (% 3.7 PBS'de) ile sabitlendikten sonra 1 mL giemsa boyası ile boyanmıştır ve 6'lı kuyucuk plakanın fotoğrafı çekilmiştir. (Kim ve diğ., 2018)

3.2.3. *Annona muricata* Bitki Ekstraktının Hazırlanması

Ticari olarak temin edilmiş *Annona muricata* kapsülleri (Best Naturals®, USA) % 100 saf *A. muricata* yaprağından oluşmaktadır. *A. muricata* kapsülü hassas terazide, belirlenen doz miktarınca tartılmıştır ve % 0.1 DMSO içerisinde çözülmüştür. **[Ek 2]** Bir orbital çalkalayıcı kullanılarak 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra santrifüj edilerek süpernatant filtrelenmiştir. (Mohamad ve diğ., 2015)

3.2.4. MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattı Sitotoksosite Analizi

İki boyutlu ve üç boyutlu hücre kültüründe büyütülen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hattında, *A. muricata*'nın hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini ve hücrelere uygulanacak *A. muricata* bitki ekstrakt dozunu belirlemek için *sitotoksosite analizi* yapılmıştır.

A. muricata özlü iki boyutlu olarak geliştirilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin sitotoksitesini, Cell Proliferation XTT (2,3-Bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfenil)2H-tetrazolyum) temelli sitotoksosite analiz kiti kullanılarak yapılmıştır. Kuyucuk başına 8×10^3 hücre gelecek şekilde hücreler 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Plakanın bir kolonu besi yeri kontrolü olarak ayrılıp buraya hücre ekilmemiştir. Ekimden bir süre sonra ilgili bitki özü seri dilüsyonlar hâlinde kuyucuklara verilmiştir ve 72 saat sonra formazan boyası eklenmiş XTT kimyasalı (Her 96 kuyucuklu plaka için 1 şişe XTT Reagent A ve 100 µL XTT Reagent B) her bir kuyucuğa eklenerek 5 saat inkübatörde bekletilmiştir ve 450 absorbans aralığında ELISA okuyucusu kullanılarak optik yoğunluklar hesaplanmıştır. Bitki özü verilmemiş kuyularda % 100 büyüme varsayılmıştır ve farklı miktarda bitki özü içeren kuyulardaki büyüme buna oranlanarak tespit edilmiştir. Sonunda her bir bitki özü konsantrasyonuna denk gelen büyüme oranı saptanıp bitki özü dirençliliğinin ölçüsü olan IC₅₀ değeri hesaplanmıştır.

Üç boyutlu geliştirilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerin sitotoksosite analizini belirlemek için; küre şeklindeki hücrelerin morfolojileri mikroskop altında kontrol edilmiştir ve belirlenen konsantrasyon aralıklarında bitki ekstraktı hücrelerin üzerine eklenmiştir. Görüntüler İmage J v.1.8.0 programı ile işlenip morfolojik değişim tablosu oluşturulmuştur. Kontrol grubuna göre % 50 değişim oranı, üç boyutlu hücreler için uygun doz (IC₅₀) olarak belirlenmiştir. **[Ek 4]**

Belirlenen doz miktarı, iki boyutlu ve üç boyutlu MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine uygulanmıştır ve belirli saat aralıklarında hücreler fotoğraflanmıştır.

3.2.5. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (*ing.* RT-PCR)

3.2.5.1. MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattı RNA İzolasyonu

RNaz inaktivasyonu için tüm materyaller, dietil karbonat (DEPC) ile işlenmiş damıtılmış su ile muamele edilmiştir. **[Ek 2]** Üreticinin protokolüne göre toplam RNA izolasyonu için GeneAll®Hybrid-R™ RNA izolasyon kiti kullanılmıştır. Yaklaşık 1×10^6 ilâ 5×10^6 arasında değişen iki boyutlu ve üç boyutlu MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin üzerine 1 mL RiboEx™ ilave edilip 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Hücreler liziz olduğunda üzerine 200 µL kloroform eklenip 12.000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. (+4 °C) Kolonun üst fazındaki 500µL şeffaf süpernatant temiz bir ependorfa alınmıştır ve 500 µL RBI Tampon ilave edilmiştir. Pipetaj yapıldıktan sonra karışım spin kolona (yeşil) aktarılmıştır ve 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Santrifüj tüp yenisi ile değiştirilmiştir. Spin kolon üzerine 500 µL SWI Tampon ilave edilip 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Santrifüj tüp yenisi ile değiştirilmiştir. Spin kolon üzerine 500 µL RNW Tampon ilave edilip 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. İçerisinde herhangi bir tampon kalmaması için 10.000 g'de 1 dakika boş santrifüj yapılmıştır. 1,5 mL etiketlenmiş ependorflara spin kolonlar aktarılmıştır. Son olarak 50 µL DNaz ve RNaz içermeyen distile su ilave edilip 10.000 g'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.

İzole edilen RNA'nın saflığı ve konsantrasyon durumu NanoDrop ve agaroz jelde belirlendikten sonra cDNA sentezi ile deneye devam edilmiştir.

3.2.5.2. NanoDrop ile İzole Edilen RNA'ların Ölçülmesi

Optik yoğunlukta, izole edilmiş toplam DNA ve RNA örneklerin konsantrasyonunun ve saflığının belirlenmesi için 260 nm ve 280 nm'de verdiği absorbans değerleri oranlanır. (A_{260}/A_{280}) 260 nm'de DNA ve RNA maksimum absorbans değeri (veya dalga boyu) gösterecektir. İdeal DNA saflık oranı yaklaşık 1.8 ve ideal RNA saflık oranı ise yaklaşık 2.0 olmalıdır. Toplam RNA saflığının nicelleştirilmesi için kullanılan denklem:

Denklem 3.2: Toplam RNA Saflığının Nicelleştirilmesi

$$[RNA] = A_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü} \times \text{RNA'nın Ortalama Ekstinksiyon Katsayısı (40.0)}$$

RNA saflığı ve konsantrasyon değeri NanoDrop cihazı kullanılarak ölçülmüştür. İzole edilen iki boyutlu ve üç boyutlu MCF-7 ve MDA-MB-231 RNA örneklerinden 2 µL kadar alınıp cihaza yüklenmiştir. Cihazın verdiği konsantrasyon ve saflık değerleri gözlenmiştir.

3.2.5.3. RNA Örneklerinin Agaroz Jel Üzerinde Görüntülenmesi

RNA örneklerinin kalitesi için DNA ve protein kontaminasyonun olup olmadığını gözlemek önemlidir. İzole edilen RNA içerisinde DNA ve protein kontaminasyonunu öğrenmek için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. En iyi sonuçlara sahip olmak için % 1 agaroz jel hazırlanmıştır. (Tezcan, 2013) Bu oran baz alınarak 0.5 gram agar hassas terazide tartılmıştır. İçerisine 50 mL 1xTAE Tamponu [Ek 2] ilave edilip 3 dakika kadar mikrodalga fırında çözdürülmüştür. Erimiş agaroz jel karışımı 2 dakika soğumaya bırakılıp 2 µL Etidyum Bromür (EtBr) çözeltisi ilave edilmiştir. EtBr kanserojen bir özelliğe sahip olduğu için bu aşamada dikkat edilir. Agaroz jel çözeltisi elektroforez aparatına dökülüp dikkatlice tarak yerleştirilmiştir. Bu aşamada herhangi bir kabarcığın oluşmaması önemlidir. Jel katıldıktan sonra tarak çıkarılmıştır. 3µL RNA örneği ve 1 µL RNA yükleme boyası karıştırılıp kuyucuklara yüklenmiştir. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra RNA örnekleri 150 Volt ayarında 30 dakika yürütülmüştür. UV ışığı altında jel görüntüleme cihazında RNA örnekleri fotoğraflanmıştır.

3.2.5.4. cDNA Sentezi ve Ekspresyon Analizi

İzole edilen tek zincirli mRNA'nın, çift zincirli komplementer DNA'ya yani cDNA'ya çevrilmesi gerekmektedir. Bunun için cDNA sentezi yapılır. Üreticinin protokolüne göre toplam cDNA sentezi için GeneAll® HyperScript™ cDNA sentez kiti kullanılmıştır. Bütün cDNA sentezi süreci boyunca kullanılan malzemeler DEPC'li ve otoklavlıdır. [Ek 2]

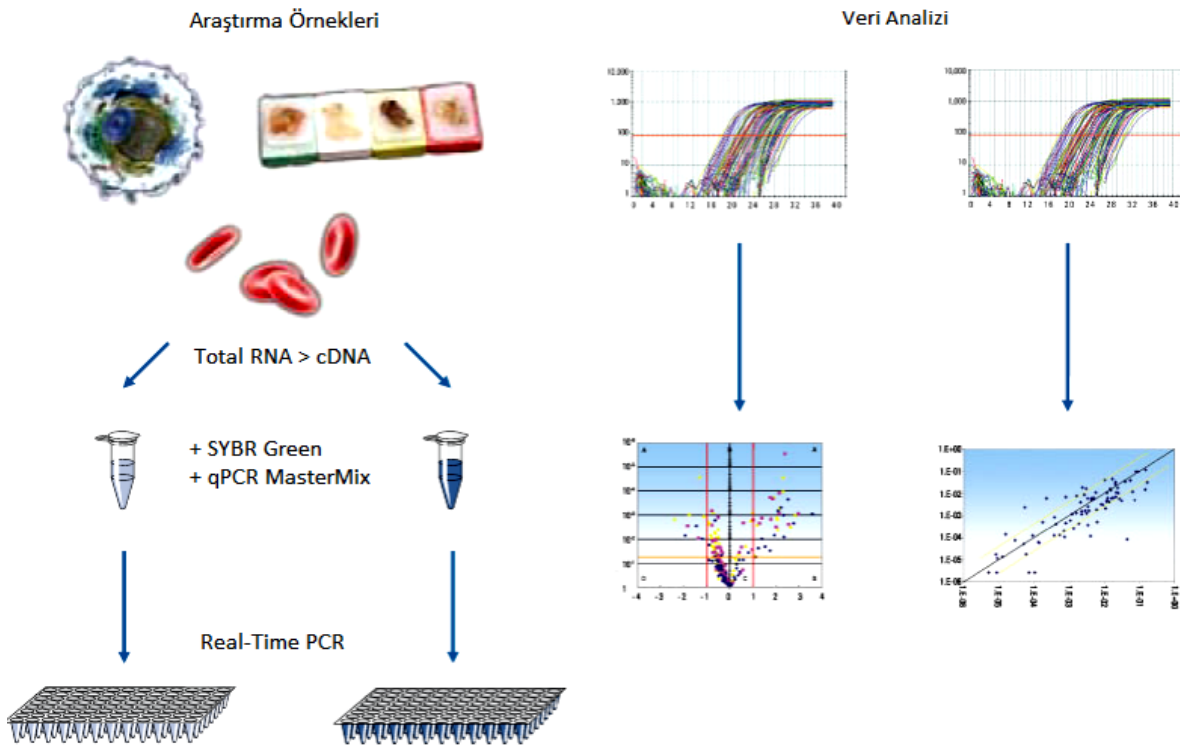
10 pg ve 500 ng arasında total RNA için gerekli hacimler kit protokolü çerçevesinde hesaplanmıştır. Bu hesaplara her bir örnek için; 1 µL dNTP ve 1 µL Oligo DT primer karışımı hazırlanmıştır. Belirlenen RNA hacimleri üzerine bu karışım ilave edilmiştir ve üzerine nükleaz free water (DNA ve RNA içermeyen su) ilave edilmiştir. PCR cihazında 5 dakika 65 °C'de inkübe edilip ardından 1 dakika buz blok üzerinde bekletilmiştir. Böylece cDNA ilk zincir sentezi gerçekleşmiştir.

cDNA ikinci zincir sentezi için ayrı bir ependorf içerisinde; 2 µL RTaz Reaksiyon Tamponu (10x), 2 µL DTT (0.1 M), 1 µL HyperScript™ Reverse Transkriptaz ve 1 µL ZymAll™ RNaz inhibitör karışımı hazırlanmıştır. Bu karışım cDNA ilk zincir sentezinde elde edilen karışım ile birleştirilmiştir. PCR cihazında; 55 °C'de 60 dakika, 85 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. [Tablo 3.3:] Nihai inkübasyondan sonra cDNA ürünleri ekspresyon analizi için -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.3: Amplifikasyon Koşulları

| | |
|--|--------------|
| Pre-inkübasyon | 65 °C, 5 dk |
| Bağlanma (<i>ing.</i> Annealing) | 55 °C, 60 dk |
| Uzama (<i>ing.</i> Extension) | 85 °C, 5 dk |
| Döngü Sayısı (<i>ing.</i> Cycle number) | 40 |

Elde edilen cDNA'ların gen ifade düzeyini (*ing.* ekspresyon analysis) belirlemek için hizmet alımı kapsamında revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyon (RT-PCR) düzeneği kurulmuştur. (Atlas Biyoteknoloji, Ankara) Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu yardımıyla mRNA ekspresyonunun kantitasyonu; kompetitif polimeraz zincir reaksiyonu ve real-time polimeraz zincir reaksiyonu olarak iki ana basamakta gerçekleşmiştir. Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyon muhtemel basamakları **[Şekil 3.3:]** düzeneğinde gösterilmiştir.



Şekil 3.3: Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyon Basamakları (Qiagen Protocol, 2020)

3.2.6. *A. muricata* Bitki Ekstraktının *in vivo* Ortamda Uygulanması

Carolina Biyolojik Tedarik Şirketi'nden (ing. Carolina® Biological Supply, USA) temin edilen yaklaşık 50 adet Oregon-R soyu yabanıl tip (ing. wild type) *Drosophila melanogaster* ergin bireyler 25 °C sıcaklık ve % 60 nem ortamında yetiştirilmiştir.

3.2.6.1. *D. melanogaster* Besiyeri Hazırlama ve Aktarma

Model organizma olarak kullanılan, daha çok sirke sineği veya meyve sineği olarak da bilinen *D. melanogaster* için kültür ortamı hazırlanmıştır. (Yazıcı, 2017)

600 mL distile su (dH₂O) manyetik ısıtıcılı blok üzerinde kaynatılmıştır. Kaynayan su içerisine hassas terazide tartılmış 3.5 gram agar ve 2 gram yeast ekstrakt (maya özütü) eklenmiştir. Topaklanma olmaması için sık sık karıştırılmıştır ve karışımın üzerine 50 gram mısır unu ve 50 gram toz şeker eklenmiştir. Homojen kıvama dikkat ederek yaklaşık 15 dakika kaynatılmıştır. Kaynama işlemi tamamlandıktan sonra besiyeri, cam şişelere pay edilip, 15 dakika soğumaya bırakılmıştır. Besiyeri ortamının küflenmemesi için 3.5 mL propiyonik asit (veya sirke) eklenmiştir. Eterizasyon tekniği kullanılarak sinekler bayıltılmıştır ve mikroskop altında belirlenen dişi ve erkek sinekler besiyeri ortamına aktarılmıştır. **[Ek 3]** Besiyeri kabının üzerine steril, hava alan bir kapak kapatılmıştır.

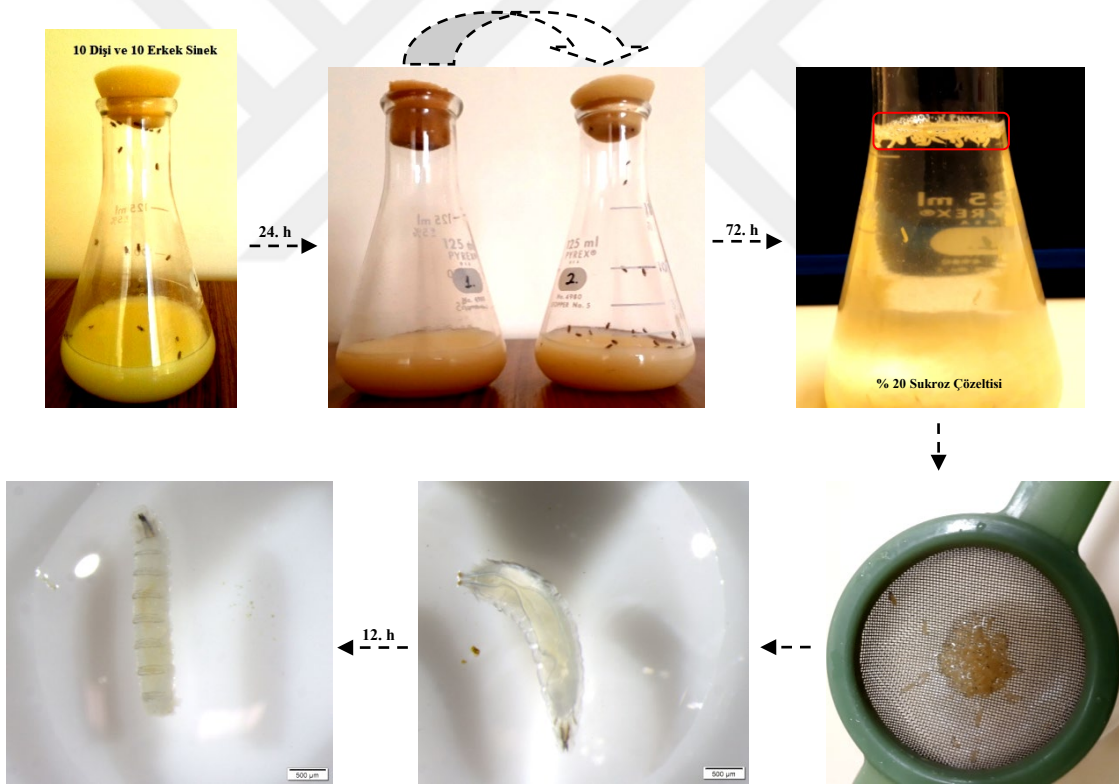


Şekil 3.4: *D. melanogaster* Dişi ve Erkek Tayini

Bir ay içerisinde çoğalan yaklaşık 100 adet kontrol *D. melanogaster* model organizması stereo mikroskop altında genel dış morfolojisi (boyu, genel yapısı, rengi, başın durumu) incelenmiştir. 60 adet kontrol *D. melanogaster*'a (larva ve ergin) *A. muricata* bitki ekstraktı doz denemesi yapılmıştır. **[Ek 3]** 40 adet kontrol *D. melanogaster*'a (larva) ise RNA izolasyonu yapılarak deneye devam edilmiştir.

3.2.6.2. *A. muricata* Bitki Ekstraktını *D. melanogaster*'a Uygulama

A. muricata bitki ekstraktı yabanıl tip *D. melanogaster* III. instar larvalarına uygulanmıştır. (Nichols, 2012) Mikroskop altında belirlenen 10 dişi ve 10 erkek sinek taze besiyerine aktarılmıştır. 25 °C sıcaklık ve % 60 nem ortamında 24 saat sinekler inkübe edilmiştir. Sineklerin yumurta bırakması gerçekleştikten sonra ergin sinekler taze besiyerinden uzaklaştırılmıştır. Taze besiyerinde bulunan yumurtalar III. instar larvaları oluşturana kadar bekletilmiştir. (72 h) 100 mL % 20 sukroz çözeltisi instar larvaları üzerine eklenmiştir. Ucu kesilmiş serolojik pipet yardımıyla larvalar toplanmıştır ve bir örgü sepet içerisine aktarılmıştır. Örgü sepet içerisindeki larvalar 2 defa distile su (dH₂O) ile yıkanmıştır. Yıkanan larvalar % 5 sukroz ve 0.01 g/mL ilâ 1 g/mL arasında değişen *A. muricata* bitki ekstraktı içeren beherler içerisine aktarılmıştır ve 12 saat bekletilmiştir. Beher içerisindeki larvalar toplanmıştır ve RNA izolasyonu yapılarak deneye devam edilmiştir.



Şekil 3.5: *D. melanogaster* larvalarına *A. muricata* Bitki Ekstraktı Uygulaması

Larvalardaki uygulamaya ek olarak 0.5 g/mL ilâ 2 g/mL arasında değişen *A. muricata* bitki ekstraktı, [Şekil Ek 3.2:] düzeneğinde ortam koşulları aynı olacak şekilde aynı zaman diliminde, *D. melanogaster* erginlerin mamasına homojen kıvamda zerk edilmiştir ve belirli saat aralıklarında ergin sineklerin durumu takip edilmiştir.

3.2.6.3. *D. melanogaster* RNA İzolasyonu

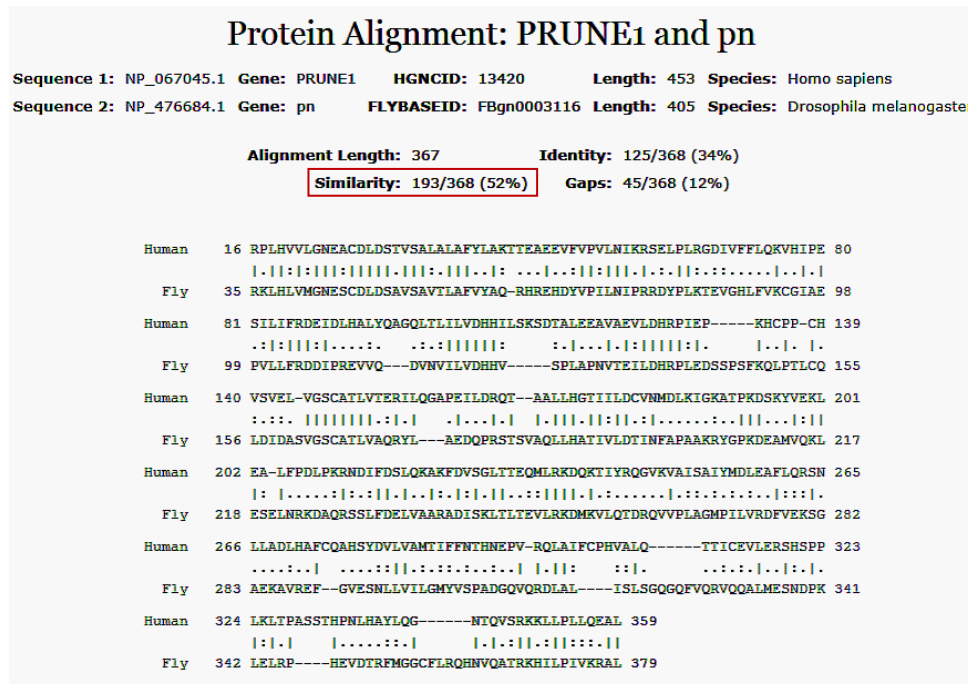
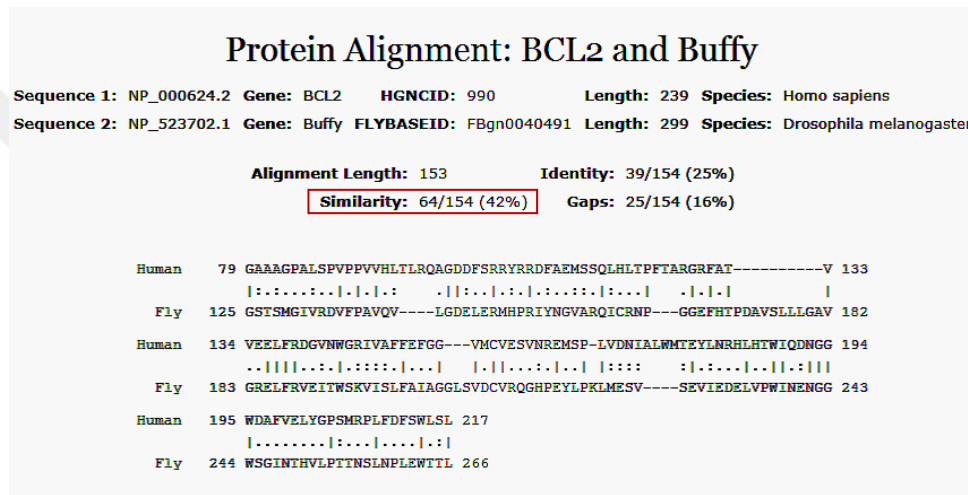
D. melanogaster model organizmasında *A. muricata* bitki ekstraktı doz miktarı belirlendikten sonra, ilaç muamelesi görmüş 40 adet *D. melanogaster* III. instar larvası steril bir aparat yardımıyla toplanmıştır ve dietil karbonat ile muamele edilmiş **[Ek 2]** ependorflara aktarılmıştır. Aynı şekilde herhangi bir ilaç muamelesi görmemiş 40 adet kontrol *D. melanogaster* III. instar larvası steril aparat yardımıyla toplanmıştır ve ependorflara aktarılmıştır. Üreticinin protokolüne göre toplam RNA izolasyonu için Zymo Quick-RNA™ izolasyon kiti kullanılmıştır.

D. melanogaster'da yer alan dış yapı homojenizatör (Pestle Mixer Motor, Argos) kullanılarak parçalanmıştır. Örneği parçalamak için, 500 µL RNA Liziz Buffer (≤ 50 mg doku) eklenip, 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Şeffaf hâle gelmiş süpernatant kısım alınıp, Spin Away™ Filtre (Sarı) tüp içerisine aktarılmıştır ve 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Santrifüj tüp yenisi ile değiştirilmeden üzerine 500 µL etanol (% 95) ilave edilmiştir ve iyice karıştırılmıştır. Karışım bir toplama tüp içinde Zymo Spin IIICG (Yeşil) kolonuna aktarılmıştır ve 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Santrifüj tüp yenisi ile değiştirilmiştir. Spin kolon üzerine 400 µL RNA Wash Buffer (Yıkama Tamponu) eklenmiştir ve 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Santrifüj tüp yenisi ile değiştirilmiştir. Spin kolon üzerine her bir örnek için 5 µL DNaz I ve 75 µL DNA Digestion Buffer (Sindirim Tamponu) karışımı hazırlanıp, kolona aktarılmıştır. 15 dakika kadar oda sıcaklığında inkübe edilip, 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Santrifüj tüp yenisi ile değiştirilmiştir. Spin kolon üzerine 400 µL RNA Preb Buffer (Hazırlık Tamponu) eklenmiştir ve 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Santrifüj tüp yenisi ile değiştirilmiştir. Spin kolon üzerine 700 µL RNA Wash Buffer (Yıkama Tamponu) eklenmiştir ve 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Santrifüj tüp yenisi ile değiştirilmiştir. Tekrar spin kolon üzerine 400 µL RNA Wash Buffer eklenmiştir ve 10.000 g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Spin kolon dikkatli bir şekilde DNaz ve RNaz içermeyen bir tüpe aktarılmıştır. Son olarak kolondan RNA'yı ayırmak için 50 µL RNaz ve DNaz içermeyen distile su ilave edilip 10.000 g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.

İzole edilen RNA'nın saflığı ve konsantrasyon durumu NanoDrop ve agaroz jelde belirlendikten sonra cDNA sentezi ile deneye devam edilmiştir. NanoDrop ve agaroz jelde belirleme **[3.2.5.2.]** ve **[3.2.5.3.]** nolu metod baz alınarak yapılmıştır. cDNA sentezi ise **[3.2.5.4.]** nolu metod baz alınarak yapılmıştır.

3.2.6.4. *D. melanogaster* ve *Homo sapiens* Ortolog Genlerin Tespiti

Bir organizmada bulunan genler başka bir organizmada bulunan genlere yapısal ve işlevsel olarak çok benzer olabilir, bu tür genlere **ortolog genler** denir. İlk kez 1970 yılında Walter M. Fitch tarafından ortaya atılan bu terim günümüz filogenetik yaklaşımlarda sıklıkla kullanılan bir olgudur. (Walter, 1970) *Drosophila melanogaster* ve *Homo sapiens* ortolog genlerin tespitinde: Giriş türü: *H.sapiens* ve Çıkış türü: *D. melanogaster* tercih edilmiştir. Öncelikle meme kanseri ile ilgili çalışılacak Bcl-2, Bad, H-prune ve AKT1 genler belirlenmiştir. (Qiagen.com) Bu genlerin *D. melanogaster* canlısındaki Buffy, CG₁₅₅₃₀, Pn ve Akt1 ortolog genleri tespit edilmiştir. (Flybase.org)



Şekil 3.6: *D. melanogaster* ve *H. sapiens* Ortolog Genler

Protein Alignment: BAD and CG15530

Sequence 1: NP_004313.1 Gene: BAD HGNCID: 936 Length: 168 Species: Homo sapiens
 Sequence 2: NP_651777.1 Gene: CG15530 FLYBASEID: FBgn0039752 Length: 494 Species: Drosophila melanogaster

Alignment Length: 158 Identity: 37/159 (23%)
 Similarity: 64/159 (40%) Gaps: 28/159 (18%)

```

Human 11 EQEDSSSAERGLGSPAGDGPSSGSKHHRQAPGLLDASH---QEQPTSS--SHHGAGAVEIR 70
:::.....|.|.|.....|.|.|. |.:.| :||:| :||:|..|
Fly 161 QEEENRRGRGRGHSARQESQDTRKRRRERPN--WRSVHSDIEREQPSTSKKAHGGSSGGESR 223
Human 71 S-----RHSSYPAGTEDEDEGMGEE-----PSPFRGRSRSAAPPNLWAAQRYGRELRMSDEFV 122
:.....|.|.|.....|.|.|. |.:.| :||:| :||:|..|
Fly 224 RMSNVVKTPITISGMVDTRRLSNVTRDQLKRLPNITSGESRRTAKEAGANNFKLHHITSGELT 288
Human 123 DSFKKGLPRPKSAGTAT-----QMRQS 144
:| :|:|..|.: :|:|
Fly 289 ES--RRIPRITSNTTESRWLPRGEMKES 314
    
```

Protein Alignment: AKT1 and Akt1

Sequence 1: XP_016876564.1 Gene: AKT1 HGNCID: 391 Length: 530 Species: Homo sapiens
 Sequence 2: NP_732113.3 Gene: Akt1 FLYBASEID: FBgn0010379 Length: 611 Species: Drosophila melanogaster

Alignment Length: 438 Identity: 268/439 (61%)
 Similarity: 334/439 (76%) Gaps: 30/439 (7%)

```

Human 6 IVKEGWLHKRGEYIKTWPRYFLLKNDGTFIGYKERPOVDQREAP---LNNFSVAQCQLMKTE 66
:|||||.||||:|.|.||||:|.:|.:|:|:|. |.....| |||:|.:|:|:|:|
Fly 107 VVKEGWLKRGHEHIKRWQRYFVLSHSDGRMLMGYRSKP--ADSASTPSDFLLNFTVRGQIMTV 169
Human 67 RPRNPTFIIRCLQWTTVIERTFHVETPEEREWNTAIQTVADGLKQEEEEEMDFRSGSPSDNSGA 131
|:|.:|||||.||||:|.|.||||:|.:|.:|:|:|. |.:|.:|.:|.:|.:|.:|.:|.:|
Fly 170 RPKPFTFIIRGLQWTTVIERTFAVESELERQWTEAIRNVSSRLIDVGEVAM-----TPSEQ 229
Human 132 EEMEV-SLAKPK-----HRVIMNEFEYLKLLGKGTFGKVILVKEKATGRYYAM 178
.:|.:|.:|.:|.:|.:|.:|.:|.:|.:|.:|.:|.:|.:|.:|.:|.:|.:|.:|.:|.:|.:|
Fly 230 TQVDMATIAEDELSEQFSVQGTTCNSSGVKVTLENFELKVLGKGTFGKVILCREKATAKLYAI 294
Human 179 KILKKEVIVAKDEVAHTLLENRVLQNSRRHFFLTALKYSFQTHDRLCFVMEYANGGELFFHLSRER 243
||||:|.:|||||.||||:|.|.||||:|.:|.:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
Fly 295 KILKKEVIQKDEVAHTLLESRVLKSTNHFFLISLKYSFQTHDRLCFVMQVNGGELFWHLSHER 359
Human 244 VFSEDRARFYGAETVSALDYHSEKVVVYRDLKLENLMDKDGHIKIDFGLCCKEIKDGATMKT 308
:|:|:|.:|||||.||||:|.|.||||:|.:|.:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
Fly 360 IFTEDRTRFYGAETISALGYLHSG-GIYRDLKLENLLDKDGHIKVADFGLCCKEDITYGRITKT 423
Human 309 FCGTPEYLAPLEVLDNDYGRAVDNNGLVVMYEMCGRLPFYNDQHEKLFELIIMEEIRFPRTLG 373
||||:|.:|||||.||||:|.|.||||:|.:|.:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
Fly 424 FCGTPEYLAPLEVLDNDYQAVDNGVVMYEMICGRLPFYNRDHDVFLTLILVEEVKFPNIT 488
Human 374 PEAKSLLSGLLKKDPKQRLGGSEDAKEIMQHRFFAGIVWQHVVEKKV 421
.:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
Fly 489 DEARNLLAGLLAKDPKRLGGKDDVKEIQAHPPFASINWTLDLVKKI 536
    
```

Şekil 3.6 (devam): *D. melanogaster* ve *H. sapiens* Ortolog Genler

3.2.7. Hesaplamalar ve İstatistiksel Analiz

Analizler sonucunda *D. melanogaster* ve *H. sapiens* için H-prune, Bcl-2, Bad ve Akt1 geni ortalama Cp değerleri alınmıştır. Ortalama kontrol gen Cp değerine oranlanıp göreceli gen ifade düzeyi hesaplanmıştır. *A. muricata* ile tedavi edilmiş hücrelerdeki genin, kontrol gene göre Ct değerinden; aynı genin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hattındaki kontrol gene göre Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) değerinin çıkarılmasıyla $\Delta\Delta Ct$ değeri elde edilmiştir. Gen ifade düzeyindeki değişimler $\Delta\Delta Ct$ değeri ile belirlenmiştir. (Livak ve Schmittgen, 2001) Gen ifade düzeylerinin nicelleştirilmesi için kullanılan denklem:

Denklem 3.3: Gen İfade Düzeylerinin Nicelleştirilmesi

$$\text{Kat Değişikliği (ing. Fold Change)} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = (C_{T \text{ Hedef}} - C_{T \text{ İç Kontrol}})_{\text{Tedavi edilmiş}} - (C_{T \text{ Hedef}} - C_{T \text{ İç Kontrol}})_{\text{Tedavi edilmemiş}}$$

İki tekrar ile elde edilen sonuçlar SPSS 22.0 yazılımı (SPSS Inc., ABD) ile değerlendirilmiştir ve p değeri 0.05'ten küçük veya ona eşit değerler istatistiksel olarak "anlamlı" kabul edilmiştir. ($p \leq 0.05$, p: Significance)

3.2.8. Moleküler Kenetlenme (ing. Molecular Docking) Yöntemi

Moleküler Kenetlenme yöntemi için uygun programların deneme sürümleri dizüstü bilgisayara (Lenova core i5(64Bit)) indirilmiştir. Yöntem 3 ayrı kalemde gerçekleştirilmiştir.

3.2.8.1. Ligandın Hazırlanması

A. muricata bitkisinde bulunan isoquercetin, roseoside, coreximine, anonaine ve arianacin asetojeninlerin ve kontrol grubu olarak seçilen abemaciclib (verzenio) molekülün üç boyutlu yapısı PubChem veri bankasından elde edilmiştir ve PubChem kodları (CID) kaydedilmiştir. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

3.2.8.2. Proteinin Hazırlanması

İnsan Bcl-2, Bad ve AKT1 genlerin üç boyutlu yapısı protein veri bankasından elde edilmiştir. [*pdb*] dosya formatında üç boyutlu yapı indirilmiştir ve protein veri bankası kodları (PID) kaydedilmiştir. (<https://www.rcsb.org>)

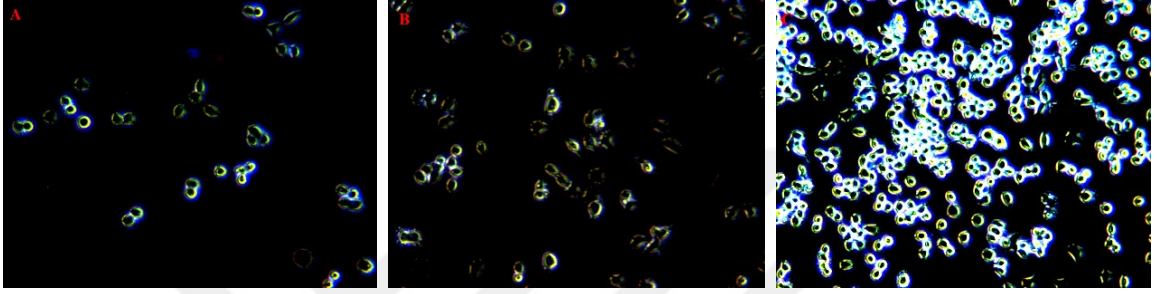
3.2.8.3. Docking Hesaplanması ve Etkileşimin Belirlenmesi

AutoDock Tools 1.5.6. programın Windows sürümü Lenovo dizüstü bilgisayara indirilmiştir. (<http://mgltools.scripps.edu/downloads>) Protein veri bankasından elde edilen reseptör ve PubChem veri bankasından elde edilen ligand, [*pdb*] dosya formatında yerel diske (C:) kaydedilmiştir. Reseptör ve ligandın saf hâle gelmesi için AutoDock programında bu yapılar düzenlenmiştir ve [*pdbqt*] formatında kaydedilmiştir. Girid Box sekmesinde Spacing (angstrom) ve X-Y-Z koordinatları belirlenmiştir. Belirlenen koordinatlar Config dosyasına kaydedilmiştir ve cmd programına komut verilmiştir. Programın bize verdiği bağ enerji skorları gözlenmiştir. [*pdbqt*] formatında kaydedilen reseptör ve ligand VMD programında görselleştirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. İki Boyutlu MCF-7 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı

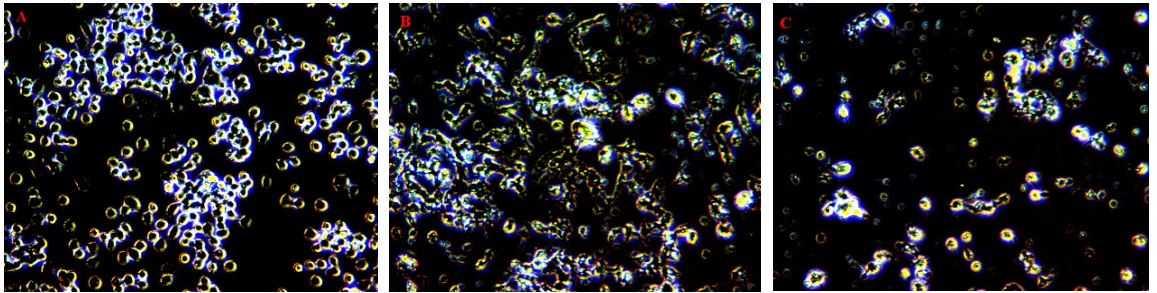
Yaklaşık 500.000 kontrol MCF-7 meme kanseri hücre hattı, 3 gün boyunca 20x mikroskop lensi altında incelenmiştir. Kontrol MCF-7 hücreleri 72. saatte % 80 flask tabanını kapladığı anda, Tripsin-EDTA ile kaldırılıp RNA izolasyonu yapılmıştır.



Şekil 4.1: İki Boyutlu Geliştirilen Kontrol MCF-7 Hücre Hattı

A: MCF-7 Kontrol 24.saat B: MCF-7 Kontrol 48.saat C: MCF-7 Kontrol 72.saat

MCF-7 hücreleri 72. saatte % 80 flask tabanını kapladığı anda, XTT analizinde belirlenen **0.00348 g/mL** *A. muricata* bitki ekstraktından 1 mL kadar alınıp ve hücrelerin üzerine eklenmiştir. 24. ve 48. saat aralıklarında hücreler 20x mikroskop lensi altında incelenmiştir ve 6. saat aralığında RNA izolasyonu yapılmıştır.

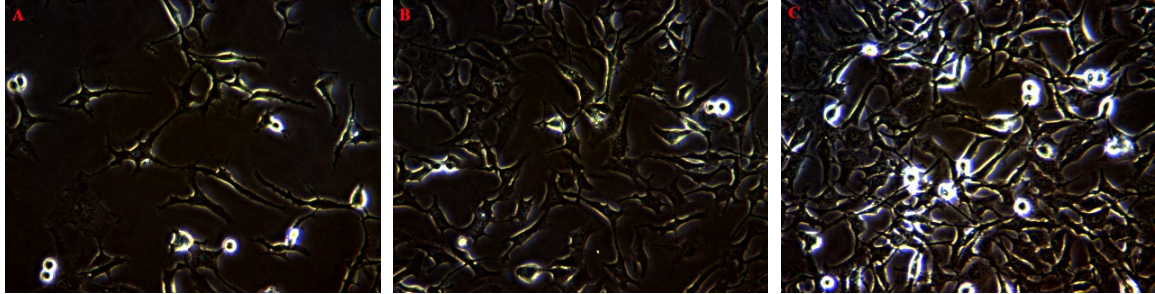


Şekil 4.2: 0.00348 g/mL *A. muricata* verilmiş İki Boyutlu MCF-7 Hücre Hattı

A: MCF-7 - 0.00348 g/mL *A. muricata* 0. saat B: MCF-7 - 0.00348 g/mL *A. muricata* 24. saat

C: MCF-7 - 0.00348 g/mL *A. muricata* 48. saat

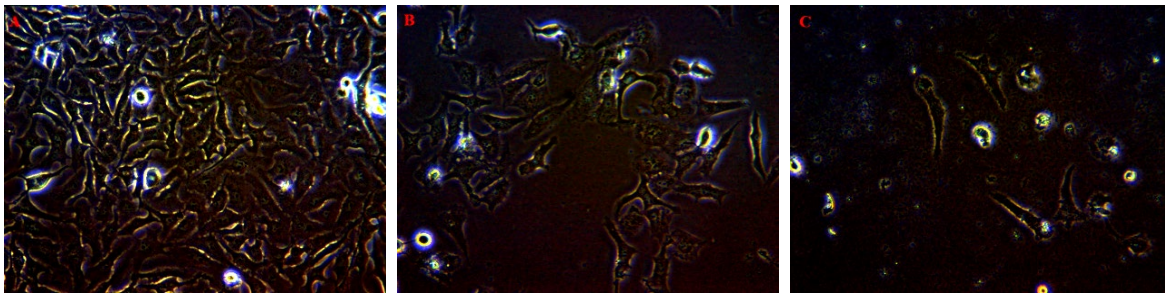
Yaklaşık 500.000 kontrol MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı, 4 gün boyunca 20x mikroskop lensi altında incelenmiştir. Kontrol MDA-MB-231 hücreleri 96. saatte % 80 flask tabanını kapladığı anda, Tripsin-EDTA ile kaldırılıp RNA izolasyonu yapılmıştır.



Şekil 4.3: İki Boyutlu Geliştirilen Kontrol MDA-MB-231 Hücre Hattı

A: MDA-MB-231 Kontrol 24. saat B: MDA-MB-231 Kontrol 48. saat C: MDA-MB-231 Kontrol 96. saat

MDA-MB-231 hücreleri 96. saatte % 80 flask tabanını kapladığı anda, XTT analizinde belirlenen **0.00396 g/mL** *A. muricata* bitki ekstraktından 1 mL kadar alınıp ve hücrelerin üzerine eklenmiştir. 24. ve 48. saat aralıklarında hücreler 20x mikroskop lensi altında incelenmiştir ve 6. saat aralığında RNA izolasyonu yapılmıştır.



Şekil 4.4: 0.00396 g/mL *A. muricata* verilmiş İki Boyutlu MDA-MB-231 Hücre Hattı

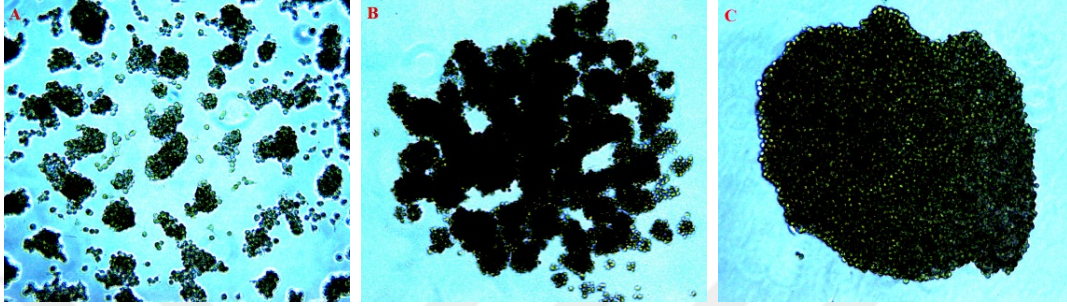
A: MDA-MB-231 - 0.00396 g/mL *A. muricata* 0. saat B: MDA-MB-231 - 0.00396 g/mL *A. muricata* 24. saat

C: MDA-MB-231 - 0.00396 g/mL *A. muricata* 48. saat

Annona muricata bitki ekstraktı iki boyutlu geliştirilen MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının morfolojisinde (*ing. morphologic*) ve sayısında gözle görülür bir değişime neden olmuştur. [Şekil 4.2:] [Şekil 4.4:]

4.2. Üç Boyutlu MCF-7 ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı

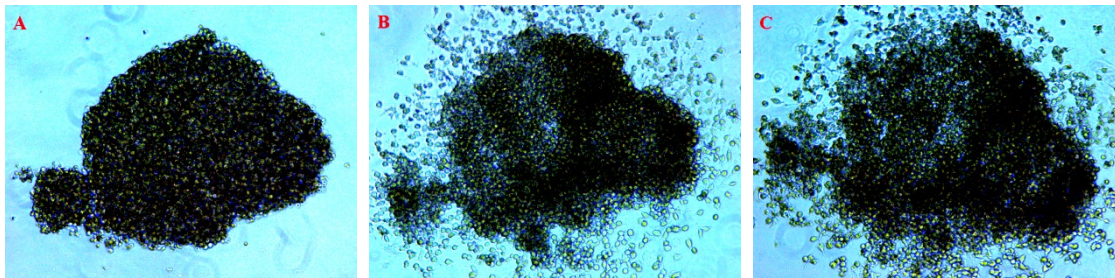
Yaklaşık 10.000 kontrol MCF-7 kanser hücre hattı, 3 gün boyunca 10x mikroskop lensi altında incelenmiştir. MCF-7 hücreleri 72. saatte üç boyutlu kümelenmiş yapı oluşmaya başladığında RNA izolasyonu yapılarak deneye devam edilmiştir.



Şekil 4.5: Üç Boyutlu Geliştirilen Kontrol MCF-7 Hücre Hattı

A: MCF-7 Kontrol 24. saat B: MCF-7 Kontrol 48. saat C: MCF-7 Kontrol 72. saat

MCF-7 kanser hücreleri 72. saatte üç boyutlu yapı oluşturduğu anda, **[Ek 4]**'de belirlenen **0.005 g/mL** *A. muricata* bitki ekstraktından 10 µL kadar alınmıştır ve hücrelerin üzerine eklenmiştir. 0., 24. ve 48. saat aralıklarında hücreler 10x mikroskop lensi altında incelenmiştir. Üç boyutlu kümelenmiş yapı 24. saatte parçalanmaya başladığında RNA izolasyonu yapılarak deneye devam edilmiştir.

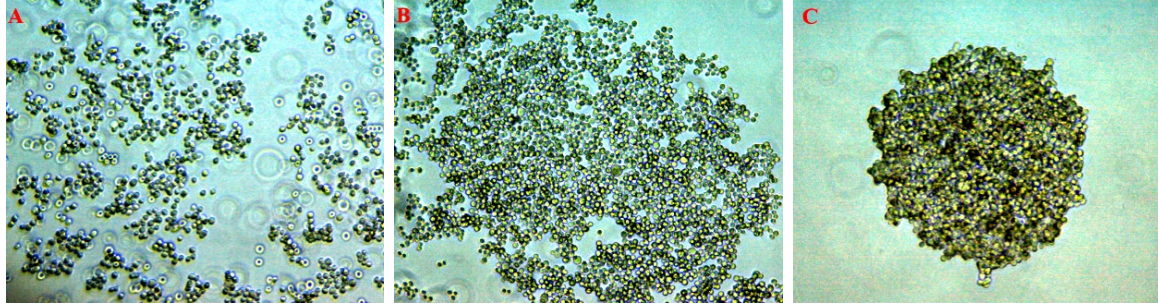


Şekil 4.6: 0.005 g/mL *A. muricata* verilmiş Üç Boyutlu MCF-7 Hücre Hattı

A: MCF-7 - 0.005 g/mL *A. muricata* 0. saat B: MCF-7 - 0.005 g/mL *A. muricata* 24. saat

C: MCF-7 - 0.005 g/mL *A. muricata* 48. saat

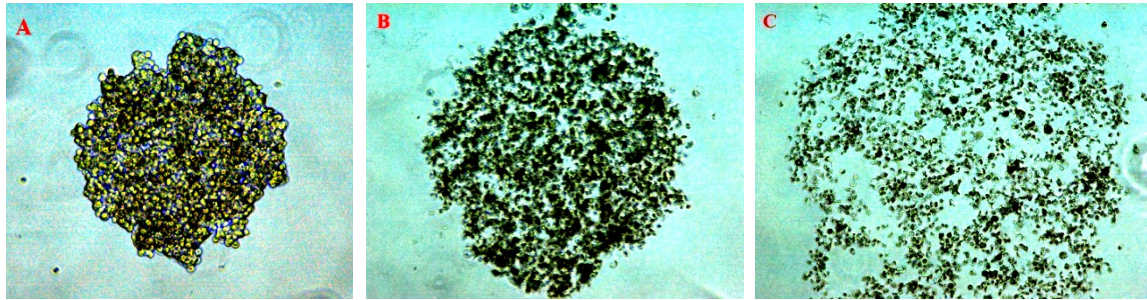
Yaklaşık 10.000 kontrol MDA-MB-231 kanser hücre hattı, 3 gün boyunca 10x mikroskop lensi altında incelenmiştir. MDA-MB-231 hücreleri 24. saatte üç boyutlu kümelenmiş yapı oluşmaya başladığında RNA izolasyonu yapılarak deneye devam edilmiştir.



Şekil 4.7: Üç Boyutlu Geliştirilen Kontrol MDA-MB-231 Hücre Hattı

A: MDA-MB-231 Kontrol 0. saat B: MDA-MB-231 Kontrol 12. saat C: MDA-MB-231 Kontrol 24. saat

MDA-MB-231 kanser hücreleri 24. saatte üç boyutlu yapı oluşturduğu anda, **[Ek 4]**'de belirlenen **0.005 g/mL** *A. muricata* bitki ekstraktından 10 µL kadar alınmıştır ve hücrelerin üzerine eklenmiştir. 0., 24. ve 48. saat aralıklarında hücreler 10x mikroskop lensi altında incelenmiştir. Üç boyutlu kümelenmiş yapı 24. saatte parçalanmaya başladığında RNA izolasyonu yapılarak deneye devam edilmiştir.



Şekil 4.8: 0.005 g/mL *A. muricata* verilmiş Üç Boyutlu MDA-MB-231 Hücre Hattı

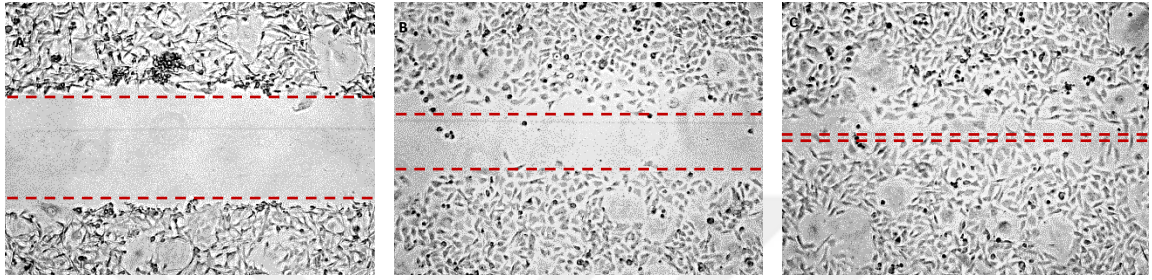
A: MDA-MB-231- 0.005 g/mL *A. muricata* 0. saat B: MDA-MB-231- 0.005 g/mL *A. muricata* 24. saat

C: MDA-MB-231 - 0.005 g/mL *A. muricata* 48. saat

Annona muricata bitki ekstraktı, üç boyutlu geliştirilen MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinin küresel (*ing. sferoid*) yapısında gözle görülür bir değişime neden olmuştur. **[Şekil 4.6:] [Şekil 4.8:]**

4.3. MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattı Motilite Analizi

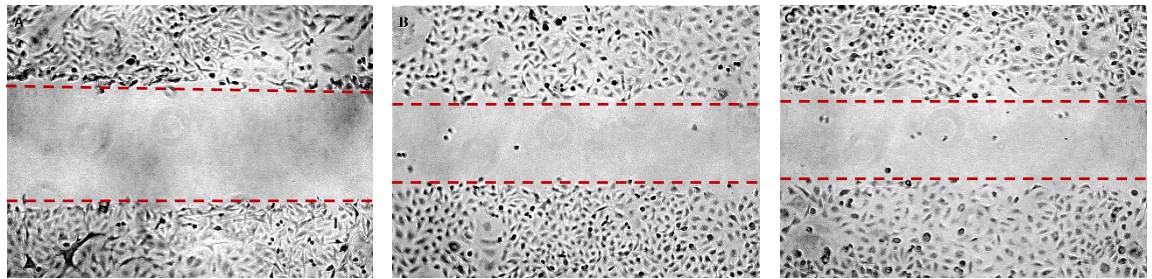
Yaklaşık 200.000 kontrol MDA-MB-231 kanser hücre hattı, 24 saat sonra % 80 oranında 6'lı kuyucuk plaka tabanını kapladığı gözlenmiştir ve yara açılmıştır. Yaranın açıldığı an 0. saat olarak belirlenmiştir. Daha sonra 6. ve 12. saat aralıklarında 10x mikroskop lensi altında aynı bölgedeki yara fotoğraflanmıştır. Kontrol MDA-MB-231 kanser hücre hattı 12. saatte, % 96 oranında yarayı kapattığı gözlenmiştir. **[Ek 5]**



Şekil 4.9: Kontrol MDA-MB-231 Motilite Analizi

A: MDA-MB-231 Kontrol 0. saat B: MDA-MB-231 Kontrol 6. saat C: MDA-MB-231 Kontrol 12. saat

Yaklaşık 200.000 kontrol MDA-MB-231 kanser hücre hattı, 24 saat sonra % 80 oranında 6'lı kuyucuk plaka tabanını kapladığı gözlenmiştir ve yara açılmıştır. XTT analizinde belirlenen **0.00396 g/mL** *A. muricata* bitki ekstraktından 1 mL alınıp hücrelerin üzerine eklenmiştir. Daha sonra 6. ve 12. saat aralıklarında 10x mikroskop lensi altında aynı bölgedeki yara fotoğraflanmıştır. *A. muricata* bitki ekstraktı verilmiş MDA-MB-231 kanser hücre hattı 12. saatte, % 21 oranında yarayı kapattığı gözlenmiştir. **[Ek 5]**

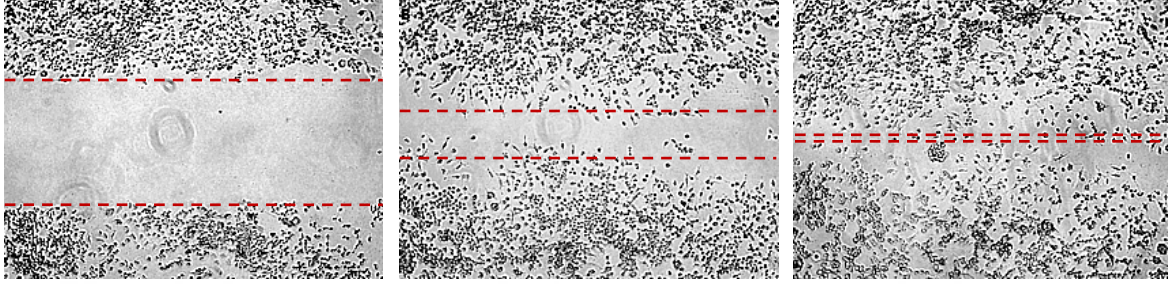


Şekil 4.10: 0.00396 g/mL *A. muricata* verilmiş MDA-MB-231 Motilite Analizi

A: MDA-MB-231 - 0.00396 g/mL *A. muricata* 0. saat B: MDA-MB-231 - 0.00396 g/mL *A. muricata* 6. saat

C: MDA-MB-231 - 0.00396 g/mL *A. muricata* 12. saat

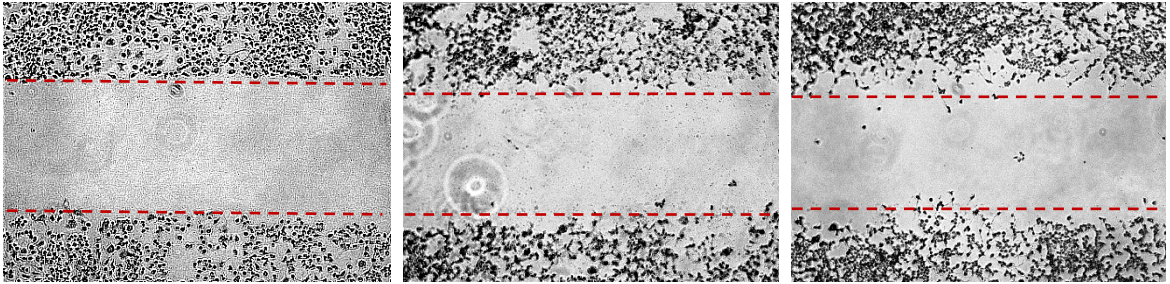
Yaklaşık 200.000 kontrol MCF-7 kanser hücre hattı, 24 saat sonra % 80 oranında 6'lı kuyucuk plaka tabanını kapladığı gözlenmiştir ve yara açılmıştır. Yaranın açıldığı an 0. saat olarak belirlenmiştir. 12. ve 24. saat aralıklarında 10x mikroskop lensi altında aynı bölgedeki yara fotoğraflanmıştır. Kontrol MCF-7 kanser hücre hattı 24. saatte, yarayı % 93 oranında kapattığı gözlenmiştir. **[Ek 5]**



Şekil 4.11: Kontrol MCF-7 Motilite Analizi

A: MCF-7 Kontrol 0. saat B: MCF-7 Kontrol 12. saat C: MCF-7 Kontrol 24. saat

Yaklaşık 200.000 kontrol MCF-7 kanser hücre hattı, 24 saat sonra % 80 oranında 6'lı kuyucuk plaka tabanını kapladığı gözlenmiştir ve yara açılmıştır. XTT analizinde belirlenen **0.00348 g/mL** *A. muricata* bitki ekstraktından 1 mL alınıp hücrelerin üzerine eklenmiştir. Daha sonra sırasıyla 0., 12. ve 24. saat aralıklarında 10x mikroskop lensi altında aynı bölgedeki yara fotoğraflanmıştır. *A. muricata* bitki ekstraktı verilmiş MCF-7 kanser hücre hattı 24. saatte, yarayı % 23 oranında kapattığı gözlenmiştir. **[Ek 5]**



Şekil 4.12: 0.00348 g/mL *A. muricata* verilmiş MCF-7 Motilite Analizi

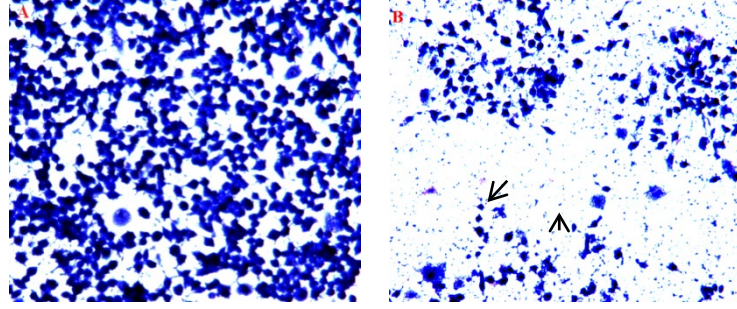
A: MCF-7 - 0.00348 g/mL *A. muricata* 0. saat B: MCF-7 - 0.00348 g/mL *A. muricata* 12. saat

C: MCF-7 - 0.00348 g/mL *A. muricata* 24. saat

Annona muricata* bitki ekstraktı, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin anjiyogenez ve metastaz sürecinde önemli bir basamak olan migrasyon-motilite özelliğini anlamlı bir şekilde baskılamıştır. **[Şekil 4.10:] [Şekil 4.12:]*

4.4. MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattı İstilâ Analizi

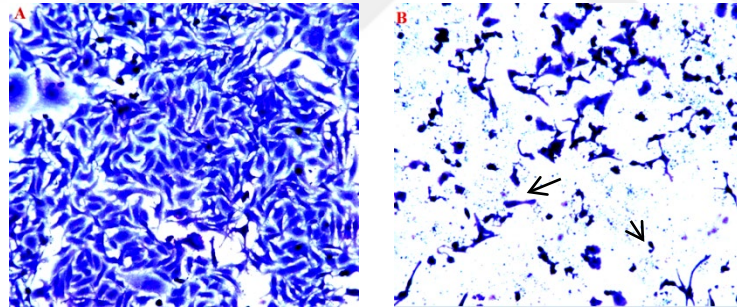
MCF-7 hücre hattı % 80 oranında matrigel bölmelerin tabanını kapladığında **0.00348 g/mL** *A. muricata* bitki ekstraktı verilmiştir ve boyama işlemi yapılmıştır. Boyama işleminden hemen sonra 10x mikroskop lensi altında hücreler fotoğraflanmıştır.



Şekil 4.13: MCF-7 Hücre Hattı İnvazyon Analizi

A: MCF-7 - Kontrol 24. saat B: MCF-7 - 0.00348 g/mL *A. muricata* 24. saat

MDA-MB-231 hücre hattı % 80 oranında matrigel bölmelerin tabanını kapladığında **0.00396 g/mL** *A. muricata* bitki ekstraktı verilmiştir ve boyama işlemi yapılmıştır. Boyama işleminden hemen sonra 10x mikroskop lensi altında hücreler fotoğraflanmıştır.



Şekil 4.14: MDA-MB-231 Hücre Hattı İnvazyon Analizi

A: MDA-MB-231 - Kontrol 24. saat B: MDA-MB-231 - 0.00396 g/mL *A. muricata* 24. saat

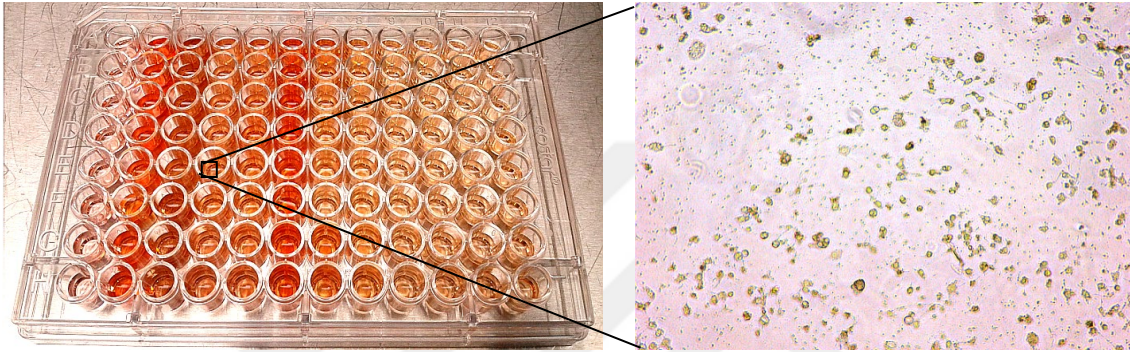


Şekil 4.15: *A. muricata* verilmiş MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattı

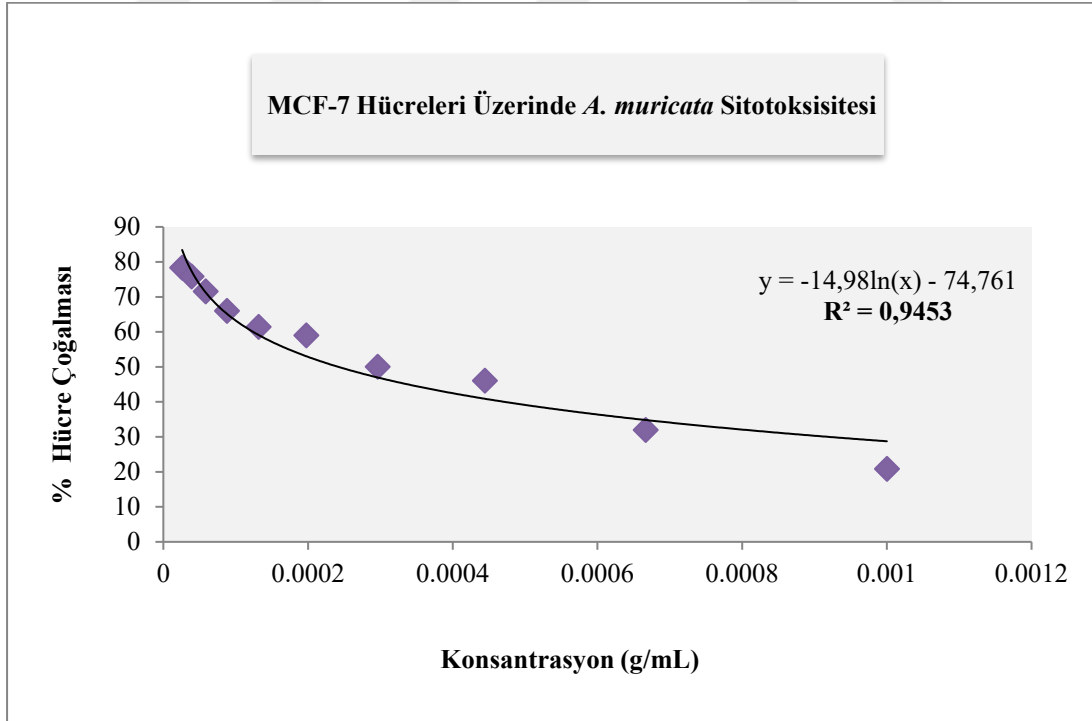
4.5. MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattı Sitotoksosite Analizi

MCF-7 kanser hücre hattı, 24 saat sonra % 80 oranında 96'lı kuyucuk plaka tabanını kapladığı gözlenmiştir ve *A. muricata* bitki ekstraktı seri dilüsyonlar hâlinde verilmiştir. 72 saat sonra 450 absorbans aralığında ELISA okuyucusunda okutulmuştur.

İki boyutlu MCF-7 hücreler için IC₅₀ değeri; **290 µg/mL** *A. muricata* bitki ekstraktı olduğu belirlenmiştir. (290 µg/mL x 12 = 3480 µg/mL = 0.00348 g/mL)



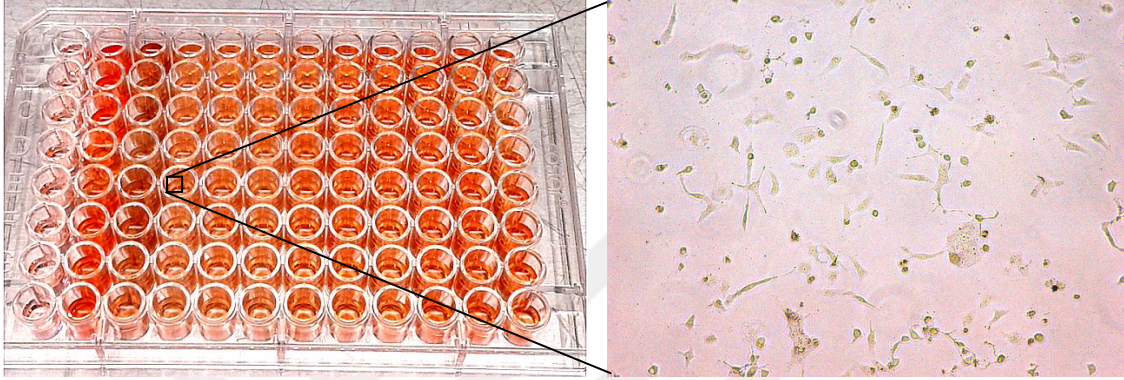
Şekil 4.16: MCF-7 Kanser Hücre Hattı Sitotoksosite Analizi



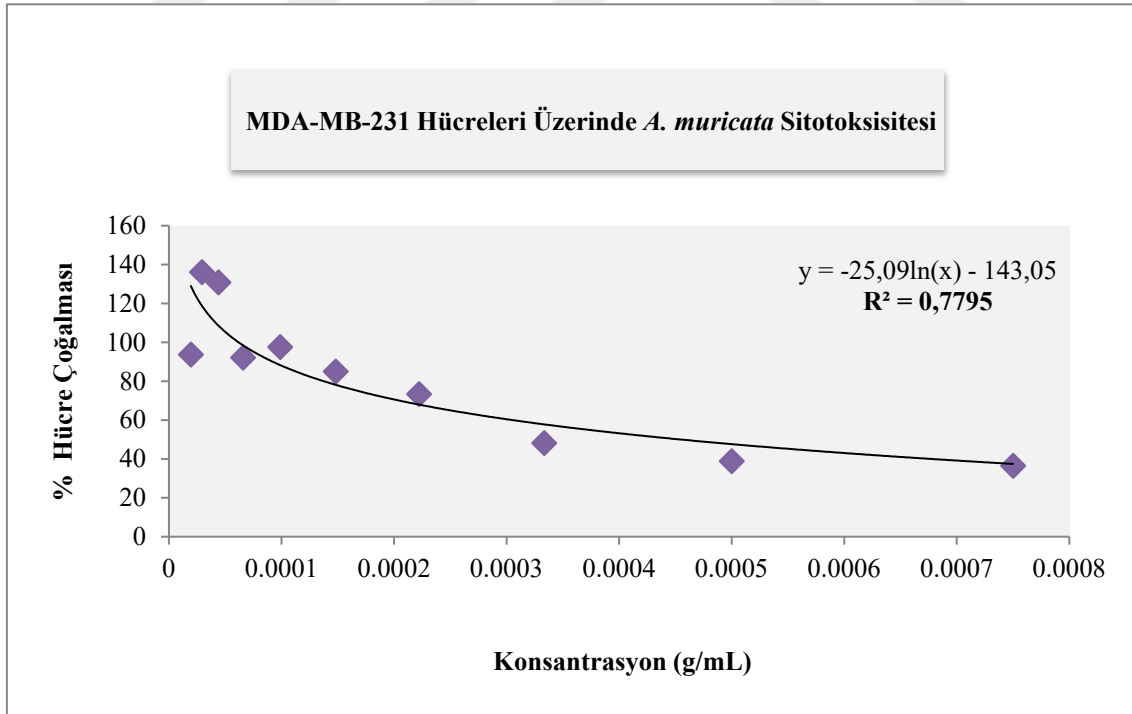
Şekil 4.17: MCF-7 Kanser Hücreleri Üzerinde *A. muricata* Sitotoksitesisi

MDA-MB-231 kanser hücre hattı, 24 saat sonra % 80 oranında 96'lı kuyucuk plaka tabanını kapladığı gözlenmiştir ve *A. muricata* bitki ekstraktı seri dilüsyonlar hâlinde verilmiştir. 72 saat sonra 450 absorbans aralığında ELISA okuyucusunda okutulmuştur.

İki boyutlu MDA-MB-231 hücreler için IC₅₀ değeri; **330 µg/mL** *A. muricata* bitki ekstraktı olduğu belirlenmiştir. (330 µg/mL x 12 = 3960 µg/mL = 0.00396 g/mL)

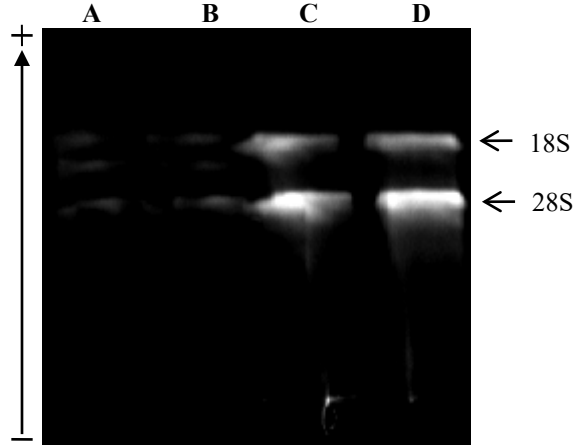


Şekil 4.18: MDA-MB-231 Kanser Hücre Hattı Sitotoksosite Analizi



Şekil 4.19: MDA-MB-231 Kanser Hücreleri Üzerinde *A. muricata* Sitotoksitesisi

4.6. MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattı RNA İzolasyonu



Şekil 4.20: MDA-MB-231 ve MCF-7 Hücre Hattı Agaroz Jel Görüntüsü

(A: üç boyutlu kontrol B: üç boyutlu tedavi edilmiş C: iki boyutlu kontrol D: iki boyutlu tedavi edilmiş)

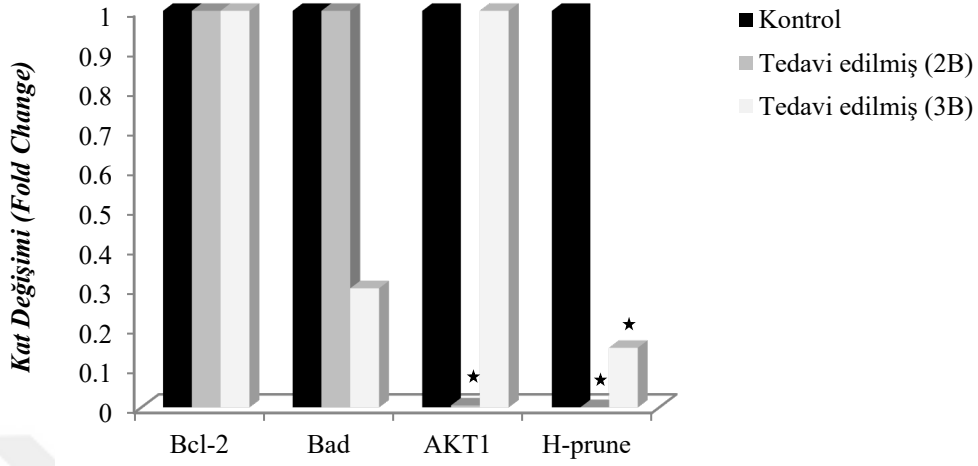
MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinden izole edilen RNA'ların saflık ve konsantrasyon durumu NanoDrop cihazı ile belirlenmiştir. RNA'ların $A_{260/280}$ oranı 2.0-2.2 değerleri arasında olduğu gözlenmiştir. **[Tablo 4.1:]**

Tablo 4.1: Meme Kanseri Hücre Hattı RNA Konsantrasyon Ölçüm Sonuçları

| Hücre Hattı | RNA Konsantrasyonu (ng/ μ L) | $A_{260/280}$ | A_{360} |
|--------------------------------------|----------------------------------|---------------|-----------|
| (2B) MDA-MB-231 / Kontrol | 775.0 | 2.01 | 0.150 |
| (2B) MDA-MB-231 / <i>A. muricata</i> | 850.0 | 2.02 | 0.024 |
| (3B) MDA-MB-231 / Kontrol | 185.0 | 2.05 | 0.010 |
| (3B) MDA-MB-231 / <i>A. muricata</i> | 330.0 | 2.10 | 0.028 |
| (2B) MCF-7 / Kontrol | 1000.0 | 2.09 | 0.007 |
| (2B) MCF-7 / <i>A. muricata</i> | 710.0 | 2.03 | 0.019 |
| (3B) MCF-7 / Kontrol | 700.0 | 2.04 | 0.006 |
| (3B) MCF-7 / <i>A. muricata</i> | 200.0 | 2.15 | 0.012 |

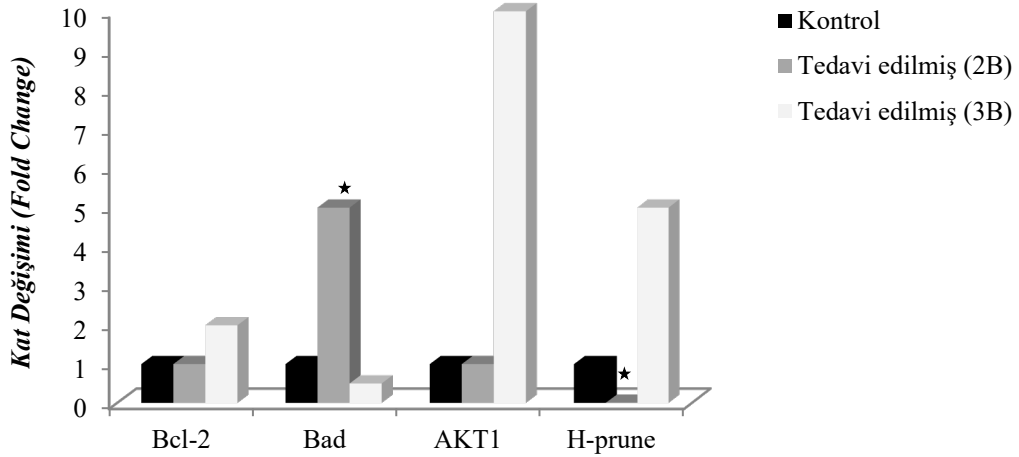
A: Absorbans 2B: İki Boyutlu 3B: Üç Boyutlu RNA: Ribonükleik Asit

4.7. MCF-7 ve MDA-MB-231 Hücre Hattı Ekspresyon Analizi



Şekil 4.21: MDA-MB-231 IC₅₀ Uygulaması Sonucu Genlerdeki İfade Değişimi

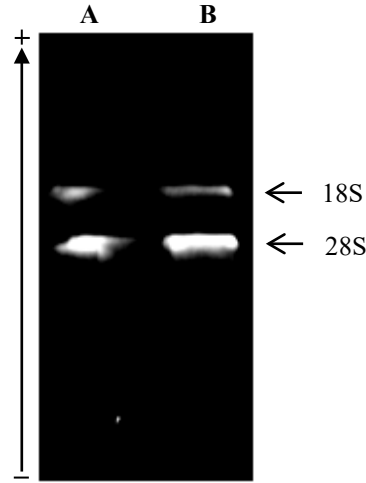
A. muricata bitki ekstraktı iki boyutlu geliştirilen MDA-MB-231 hücrelerin H-prune ve AKT1 gen ifade seviyesini azaltmıştır. Bu bitki ekstraktı; Bad gen ifade seviyesini üç boyutlu MDA-MB-231 hücrelerinde azaltırken, iki boyutlu MDA-MB-231 hücrelerinde anlamlı bir değişim göstermemiştir.



Şekil 4.22: MCF-7 IC₅₀ Uygulaması Sonucu Genlerdeki İfade Değişimi

A. muricata bitki ekstraktı iki boyutlu geliştirilen MCF-7 hücrelerin H-prune gen ifade seviyesini azaltırken, Bad gen ifade seviyesini artırmıştır. Bununla beraber, bu bitki ekstraktı üç boyutlu geliştirilen MCF-7 hücrelerin H-prune gen ifade seviyesini artırırken, Bad gen ifade seviyesini azaltmıştır.

4.8. *D. melanogaster* RNA İzolasyonu



Şekil 4.23: *D. melanogaster* Agaroz Jel Görüntüsü

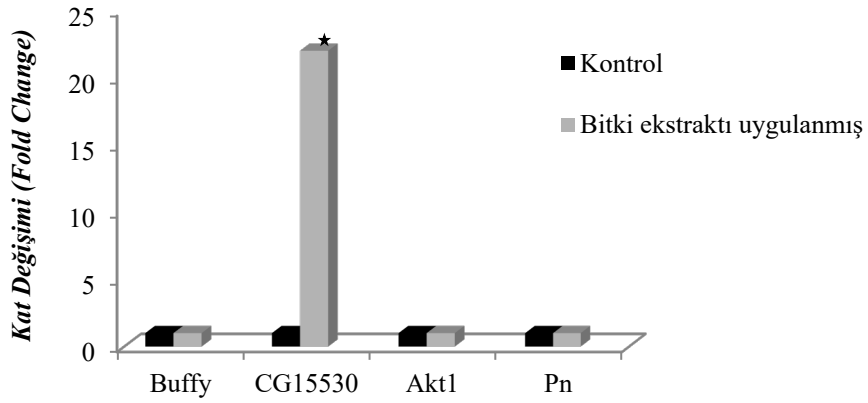
(A: kontrol B: bitki ekstraktı uygulanmış)

Tablo 4.2: *D. melanogaster* RNA Konsantrasyon Ölçüm Sonuçları

| Hücre Hattı | RNA Konsantrasyonu (ng/ μ L) | A _{260/280} | A ₃₆₀ |
|---|----------------------------------|----------------------|------------------|
| <i>D. melanogaster</i> / Kontrol | 985.0 | 2.03 | 0.600 |
| <i>D. melanogaster</i> / <i>A. muricata</i> | 950.0 | 2.15 | 0.041 |

A: Absorbans RNA: Ribonükleik Asit

4.9. *D. melanogaster* Model Organizma Ekspresyon Analizi

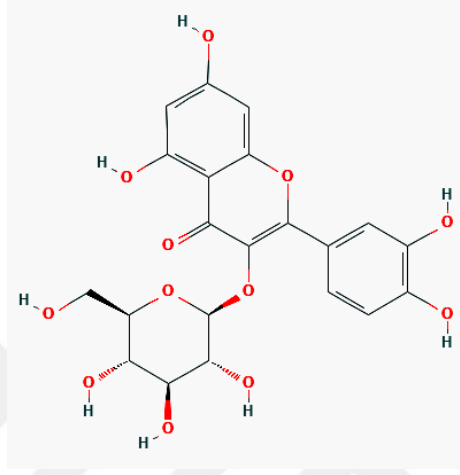


Şekil 4.24: *D. melanogaster* LD₅₀ Uygulaması Sonucu Genlerdeki İfade Değişimi

4.10. Moleküler Kenetlenme Sonuçları

PubChem veri bankasından isoquercetin asetojenin hakkında elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir. (**PubChem ID Kodu: 5280804**)

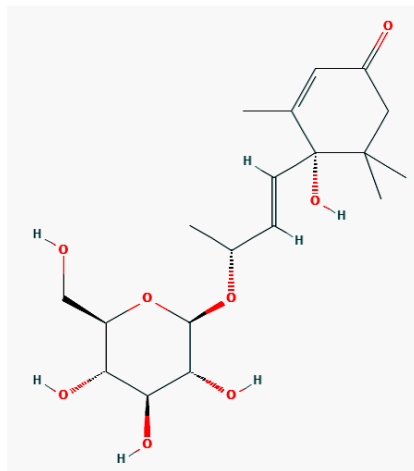
- o Molekül Formülü: $C_{21}H_{20}O_{12}$
- o Molekül Ağırlığı: 464.379 g/mol



Şekil 4.25: Isoquercetin İki Boyutlu Yapı

PubChem veri bankasından roseoside asetojenin hakkında elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir. (**PubChem ID Kodu: 9930064**)

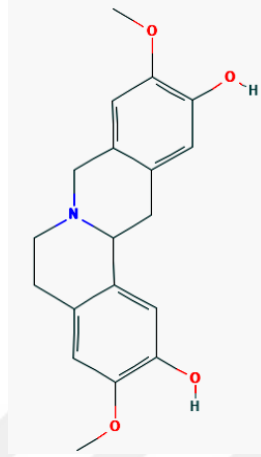
- o Molekül Formülü: $C_{19}H_{30}O_8$
- o Molekül Ağırlığı: 386.441 g/mol



Şekil 4.26: Roseoside İki Boyutlu Yapı

PubChem veri bankasından coreximine asetojenin hakkında elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir. (**PubChem ID Kodu: 601259**)

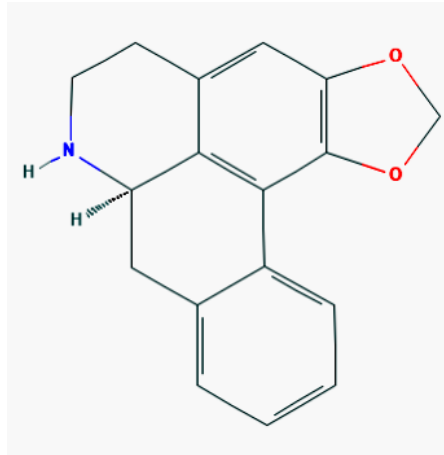
- o Molekül Formülü: $C_{19}H_{21}NO_4$
- o Molekül Ağırlığı: 327.38 g/mol



Şekil 4.27: Coreximine İki Boyutlu Yapı

PubChem veri bankasından anonaine asetojenin hakkında elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir. (**PubChem ID Kodu: 160597**)

- o Molekül Formülü: $C_{17}H_{15}NO_2$
- o Molekül Ağırlığı: 265.312 g/mol



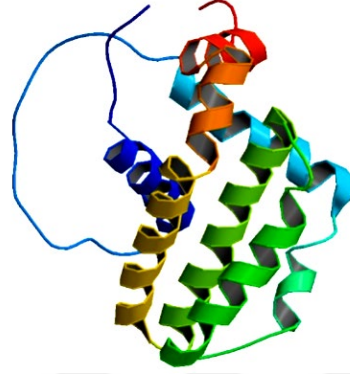
Şekil 4.28: Anonaine İki Boyutlu Yapı

PubChem veri bankasından arianacin asetojenin hakkında elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir. (**PubChem ID Kodu: 10698768**)

- o Molekül Formülü: $C_{35}H_{64}O_7$
- o Molekül Ağırlığı: 596.89 g/mol

Protein Veri Bankası'ndan Bcl-2 proteini hakkında elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.
(PDB ID Kodu: 1G5M)

- o Sınıflandırma: Apoptoz
- o Organizma: *Homo sapiens*



Şekil 4.29: Bcl-2 Üç Boyutlu Yapı

Protein Veri Bankası'ndan Bad proteini hakkında elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.
(PDB ID Kodu: 1G5J)

- o Sınıflandırma: Apoptoz
- o Organizma: *Homo sapiens*



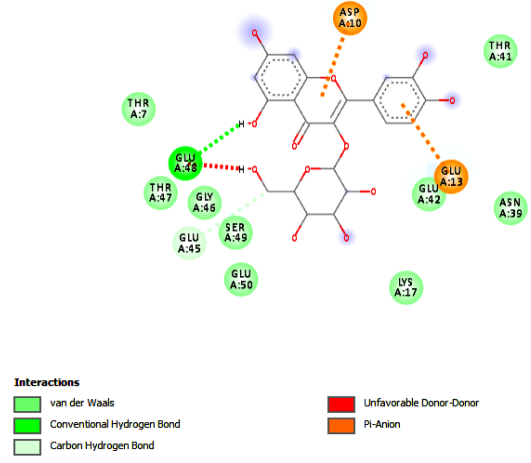
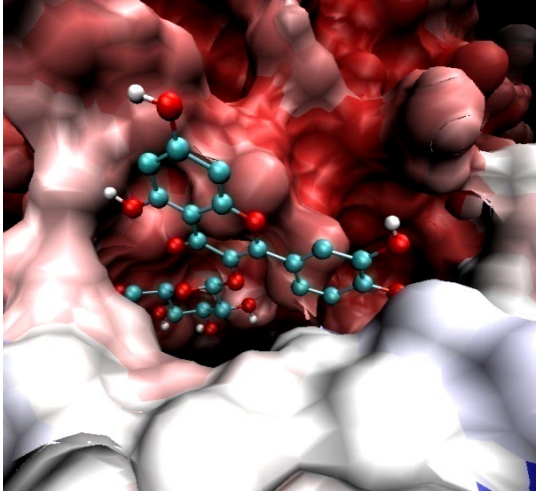
Şekil 4.30: Bad Üç Boyutlu Yapı

Protein Veri Bankası'ndan AKT1 proteini hakkında elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir. **(PDB ID Kodu: 1GV1)**

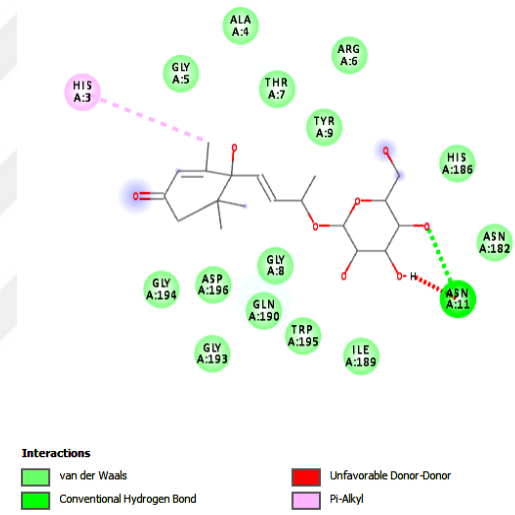
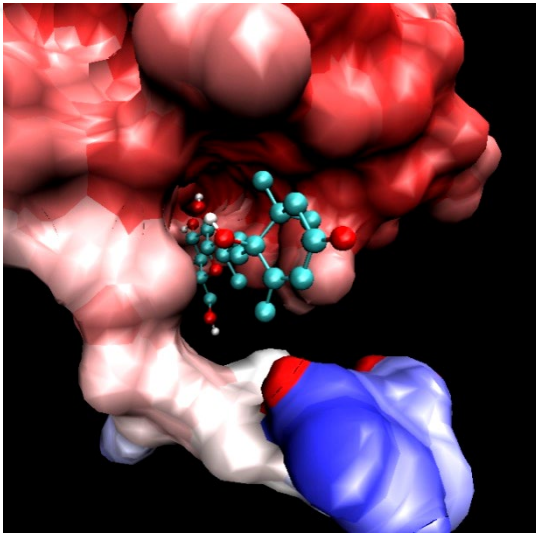
- o Sınıflandırma: Transferaz İnhibitörü
- o Organizma: *Homo sapiens*



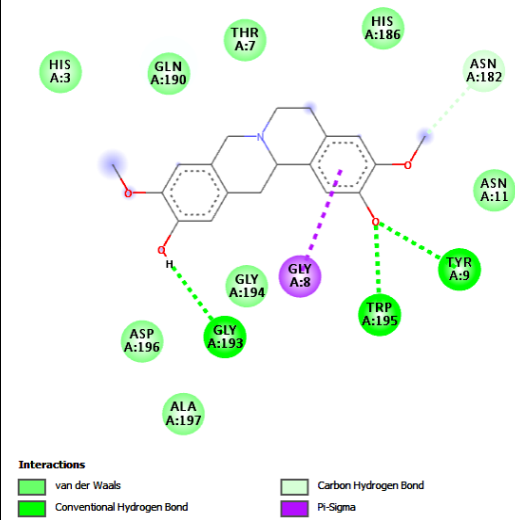
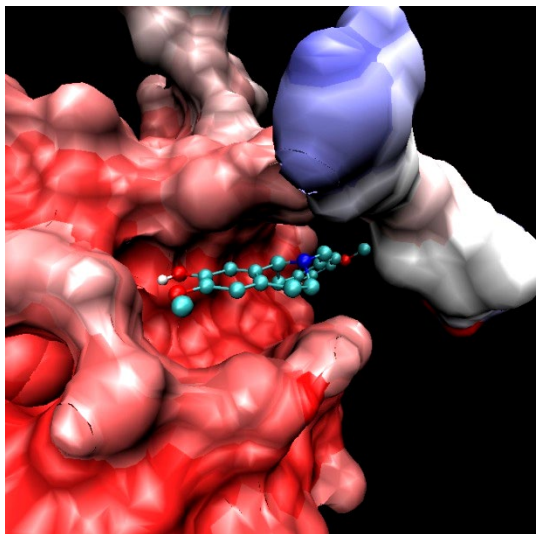
Şekil 4.31: AKT1 Üç Boyutlu Yapı



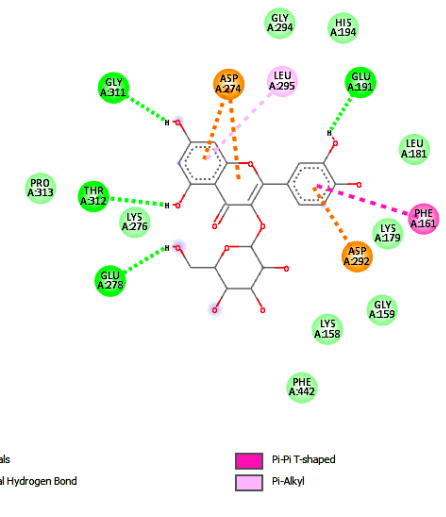
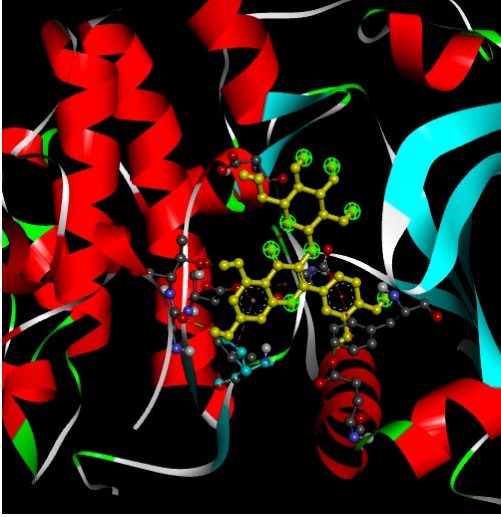
Şekil 4.32: Isoquercetin ve Bcl-2 Moleküler Docking Etkileşimi



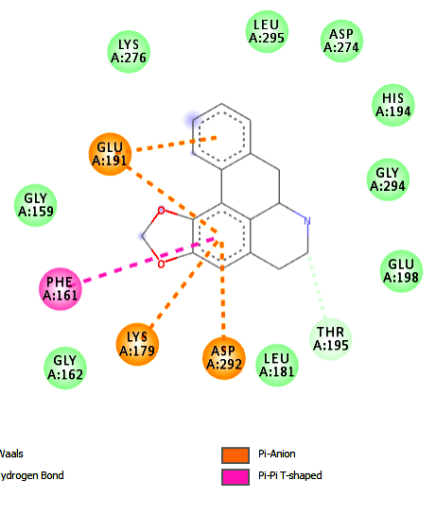
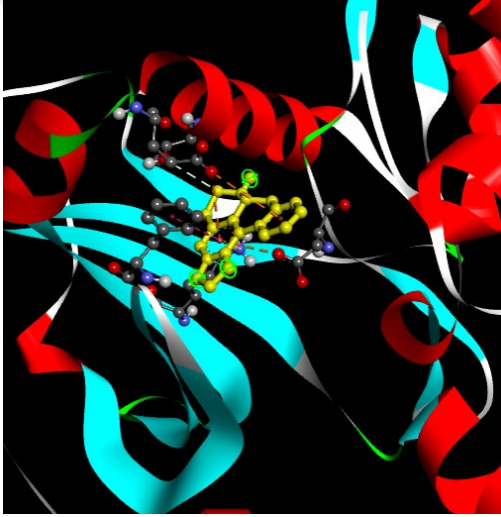
Şekil 4.33: Roseoside ve Bcl-2 Moleküler Docking Etkileşimi



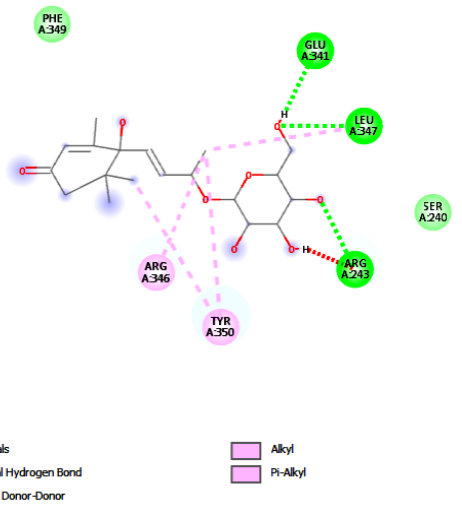
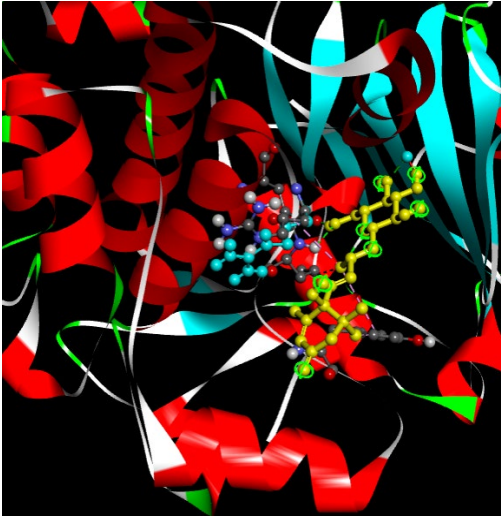
Şekil 4.34: Coreximine ve Bcl-2 Moleküler Docking Etkileşimi



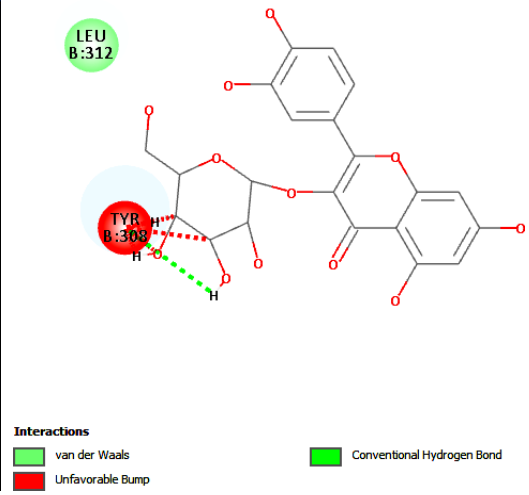
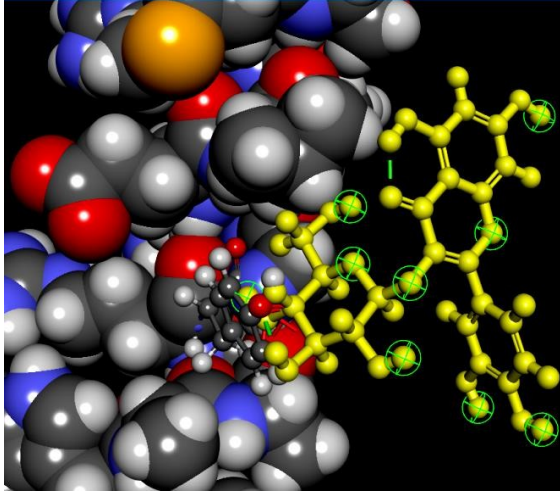
Şekil 4.35: Isoquercetin ve AKT1 Moleküler Docking Etkileşimi



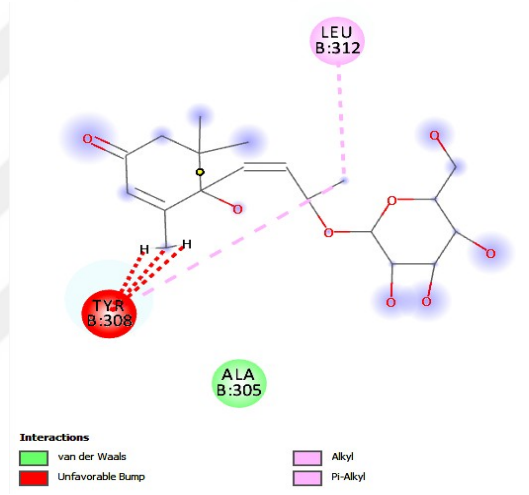
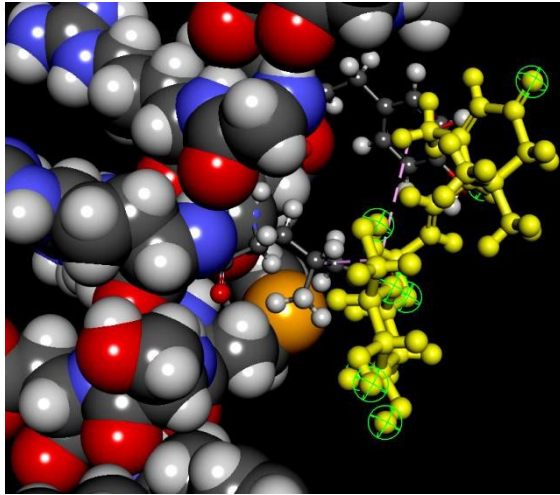
Şekil 4.36: Anonaine ve AKT1 Moleküler Docking Etkileşimi



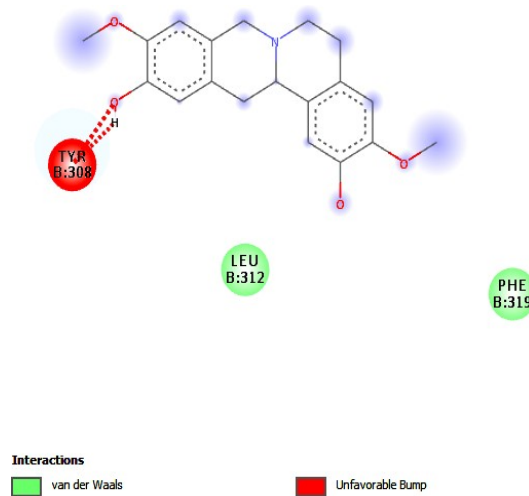
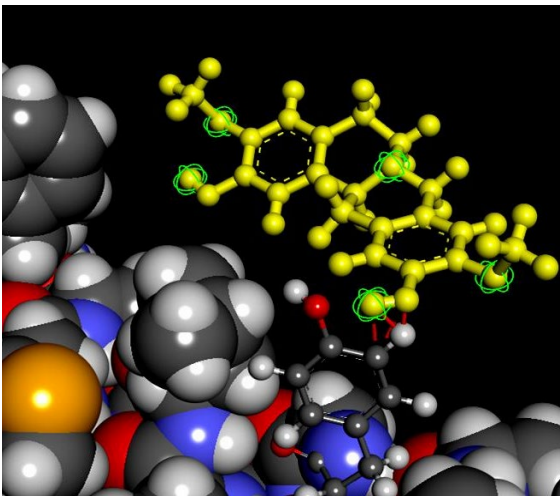
Şekil 4.37: Roseoside ve AKT1 Moleküler Docking Etkileşimi



Şekil 4.38: Isoquercetin ve Bad Moleküler Docking Etkileşimi



Şekil 4.39: Roseoside ve Bad Moleküler Docking Etkileşimi



Şekil 4.40: Coreximine ve Bad Moleküler Docking Etkileşimi

Tablo 4.3: Protein-Ligand Moleküler Docking Sonuçları

| Protein | Ligand | Bağlanma Enerjisi (kkal/mol) | Etkileşime Girdiği Rezidüller (aminoasitler) |
|---------|--------------|------------------------------|---|
| | Isoquercetin | -8.8 | Asp ₁₀ , Glu ₁₃ , Glu ₄₈ |
| | Roseoside | -8.5 | His ₃ , Asn ₁₁ |
| Bcl-2 | Coreximine | -7.9 | Asn ₁₈₂ , Tyr ₉ , Trp ₁₉₅ , Gly ₈ , Gly ₁₉₃ |
| | Anonaine | -7.6 | Trp ₁₉₅ , Thr ₇ , His ₁₈₆ , Asn ₁₁ |
| | Arianacin | -7.3 | - |
| | Isoquercetin | -10.0 | Gly ₃₁₁ , Asp ₂₇₄ , Leu ₂₉₅ , Glu ₁₉₁ , Phe ₁₆₁ , Asp ₂₉₂ , Glu ₂₇₈ , Thr ₃₁₂ |
| | Anonaine | -8.8 | Glu ₁₉₁ , Phe ₁₆₁ , Lys ₁₇₉ , Asp ₂₉₂ , Thr ₁₉₅ |
| AKT1 | Roseoside | -8.4 | Glu ₃₄₁ , Leu ₃₄₇ , Arg ₂₄₃ , Tyr ₃₅₀ , Arg ₃₄₆ |
| | Coreximine | -8.0 | Lys ₂₇₆ , Met ₂₈₁ , Ala ₁₇₇ , Thr ₂₉₁ , Val ₁₆₄ |
| | Arianacin | -7.3 | - |
| | Isoquercetin | -7.2 | Leu ₃₁₂ , Tyr ₃₀₈ |
| | Roseoside | -6.3 | Leu ₃₁₂ , Ala ₃₀₅ , Tyr ₃₀₈ |
| Bad | Arianacin | -6.2 | - |
| | Anonaine | -5.9 | Trp ₃₀₃ , Gln ₃₀₆ |
| | Coreximine | -5.7 | Tyr ₃₀₈ , Leu ₃₁₂ , Phe ₃₁₉ |

Ala: Alanin, **Arg:** Arjinin, **Asn:** Asparajin, **Asp:** Aspartat, **Gln:** Glutamin, **Glu:** Glutamat, **Gly:** Glisin, **His:** Histidin, **Leu:** Lösin, **Lys:** Lizin, **Met:** Metiyonin, **Phe:** Fenilalanin, **Thr:** Treonin, **Trp:** Triptofan, **Tyr:** Tirozin, **Val:** Valin

Isoquercetin (ligand₁), roseoside (ligand₁), coreximine (ligand₁), anonaine (ligand₁) ve arianacin (ligand₁) asetojeninlerin Bcl-2, AKT1 ve Bad proteini ile etkileşime girdiği rezidüller ve bağ enerjisi seviyeleri tabloda gösterilmiştir. **[Tablo 4.3:]** Kontrol grubu olarak 2017 yılında FDA (*ing.* Food and Drug Administration) tarafından onaylanan ve meme kanseri hastalarında kullanılan abemaciclib (PubChem ID Kodu: 46220502) molekülü tercih edilmiştir. Bu molekülün Bcl-2 proteini ile yapmış olduğu bağlanma enerjisi **-8.0 kkal/mol**, AKT1 proteini ile bağlanma enerjisi **-9.4 kkal/mol** ve Bad proteini ile bağlanma enerjisi **-6.9 kkal/mol** olduğu gözlenmiştir. (<https://www.fda.gov/>)

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser gerek Türkiye gerek dünyada kalp ve damar hastalıklarının ardından en ölümcül hastalıklar grubunda yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, kanserde ölümlere en sık neden olan beş kanserden biri meme kanseridir ve bu kanser türü ülkemizde en sık görülen on kanser türünden biridir. Meme kanseri tedavisinde kemoterapi ve radyoterapi gibi çeşitli tedavi stratejileri mevcuttur fakat bazı hastalarda bu tedavi yöntemlerinin eksik yanıt vermesi büyük bir sorun teşkil eder. Bu amaçla doğanın bizlere sunduğu şifalı bitkiler çözüm niteliğindedir. Tropikal ve subtropikal bölgelerde yaygın olarak bulunan *A. muricata* bitkisi meme, kolon, karaciğer ve akciğer gibi birçok kanser tipinde çalışılmış ve kanser hücrelerini öldürdüğü gözlenmiştir. (Soheil ve diğ., 2015a)

Tez çalışmasında; *in vitro*, *in vivo* ve biyoinformatik teknikler kullanarak *A. muricata* bitki ekstraktının antikanser biyolojik aktivitesi incelenmiştir. *In vitro* analizde iki boyutlu ve üç boyutlu geliştirdiğimiz MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hattında IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır ve belirlenen dozda Bcl-2, Bad, AKT1 ve H-prune gen ifade seviyeleri incelenmiştir. Gen analizinde, iki boyutlu hücrelerin H-prune ve AKT1 gen ifade seviyelerinde azalma olduğu gözlenmiştir. H-prune geninin meme kanseri metastazında kilit rol üstlenmesi ve *A. muricata* bitki ekstraktı ile baskılanması bizlere bu bitkinin meme kanseri tedavisinde kullanılabileceğini göstermiştir. Ayrıca üç boyutlu hücrelerin küresel yapısı artan *A. muricata* miktarı ile beraber değişmeye başlamıştır. Bununla beraber üç boyutlu hücreler iki boyutlu hücrelere kıyasla daha kompakt ve sıkı bir bağ yapısı oluşturduğu için belirlediğimiz doz gen düzeyinde anlamlı bir değişim göstermemiştir ve iki boyutlu hücrelere kıyasla daha dirençli olduğu gözlenmiştir.

Tez çalışmamıza benzer başka bir çalışmada; üç boyutlu insan yumurtalık kanser hücrelerinin taksole karşı gösterdikleri dayanıklılığın iki boyutlu yumurtalık kanser hücrelerine göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. (Demiray ve diğ., 2011) Bu çalışmaya ek olarak çoklu ilaç direncinin değerlendirilmesi için üç boyutlu insan meme kanseri hücre kültürü geliştiren bir grup bilim insanı; üç boyutlu hücrelerin iki boyutlu hücreler ile kıyaslandığında farklı çoğalma, agregat oluşumu ve direnç metabolizmasına sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. (Ding ve diğ., 2018) Yapmış olduğumuz bu çalışmada üç boyutlu hücrelerde belirlenen doz miktarı gen ifade analizinde tam olarak tespit edilmesede *in vivo* sisteme daha yakın olduğu ve tedavi amaçlı referans olabileceğini göstermiştir.

Kanser ilaçları etkinlik ve güvenlik nedenlerinden ötürü klinik ve prelinik testlerde sıklıkla başarısız olmaktadır. İlk başta ümit verici görünen ancak başarısız olan bu tür vakalarda *D. melanogaster* model organizması ilaç taraması için potansiyel bir modeldir. **(Bernards ve Hariharan, 2001)** Birçok hastalığın genetik temeline bakıldığında insan ile % 75 oranında benzerlik gösteren *D. melanogaster* organizmasında, 0.01 g/mL, 0.05 g/mL, 0.1 g/mL, 0.5 g/mL ve 1 g/mL olmak üzere beş farklı dozda *A. muricata* bitki ekstraktı uygulanıp ölüm oranları belirlenmiştir. Buna göre yapılan probit analizi sonucu LD₅₀ değeri 0.118 g/mL olarak hesaplanmıştır. Tez çalışmasının *in vivo* basamağını oluşturan bu aşamada erginlerde öldürücü bir doz belirlenememiştir. Bununla beraber *D. melanogaster* larvalarında % 50 öldürücü bir doz belirlenmiştir ve erginlerin larvalara kıyasla daha dirençli olduğu gözlenmiştir. Belirlenen dozda Buffy, CG₁₅₅₃₀, Akt1 ve Pn gen ifade seviyeleri incelenmiştir. Gen analizinde, CG₁₅₅₃₀ proapoptotik gen ifadesinde artış olduğu gözlenmiştir. İnsan proapoptotik gen olan Bad ile % 40 benzerlik gösteren CG₁₅₅₃₀ proapoptotik gen ifadesindeki bu artış *in vivo* çalışmalara ışık tutacaktır.

Çalışmanın son aşamasında, *A. muricata* bitki ekstraktında bulunan isoquercetin, roseoside, coreximine, anonaine ve arianacin moleküllerin insan Bcl-2, Bad ve AKT1 proteinleri ile olan bağlanma enerji seviyeleri moleküler kenetlenme yöntemi ile hesaplanmıştır. Kontrol olarak kullanılan abemaciclibe kıyasla isoquercetin molekülün Bcl-2, Bad ve AKT1 proteinleri ile yüksek ilgiye sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Yapmış olduğumuz *in vivo*, *in vitro* ve biyoinformatik analizler sonucunda, *A. muricata* bitki ekstraktının meme kanserine karşı etkili olduğu ve potansiyel bir ilaç olabileceği görülmüştür. Özellikle *A. muricata* bitki ekstraktında bulunan isoquercetin molekülün apoptotik ve proapoptotik proteinlere karşı yüksek bağlanma enerji sergilemesi bu yapının antikanser ilaç olma ihtimalini gözler önüne sermiştir.

EK 1

HÜCRE BESİYERİ

Tablo Ek 1.1: RPMI-1640 Medium Formülasyonu (mg/L) (Biological Industries, Isreal)

| | | | |
|------------------------------|---------|-----------------------------------|--------|
| Kalsiyum Nitrat | 100.00 | L-Asparagin-H₂O | 50.00 |
| Potasyum Klorür (KCl) | 400.00 | L-Aspartik Asit | 20.00 |
| Magnezyum Sülfat | 48.84 | L-Sistin Dihidroklorür | 65.20 |
| Sodyum Klorür (NaCl) | 6000.00 | L-Glutamik Asit | 20.00 |
| Sodyum Fosfat | 800.00 | L-Glutamin | 300.00 |
| Glikoz | 2000.00 | Glisin | 10.00 |
| Glutasyon Azaltıldı | 1.00 | L-Histidin Hidroklorür | 20.96 |
| Fenol Kırmızı | 5.30 | L-Hidroksiprolin | 20.00 |
| L-Arginin Hidroklorür | 241.00 | L-Izolösin | 50.00 |
| L-Lösin | 50.00 | L-Lizin Hidroklorür | 40.00 |
| L-Metionin | 15.00 | L-Fenilalanin | 15.00 |
| L-Prolin | 20.00 | L-Serin | 30.00 |
| L-Triptofan | 5.00 | L-Tirozin Disodyum Tuzu | 28.83 |
| L-Valin | 20.00 | Biyotin | 0.20 |
| D-Ca Pantotenat | 0.25 | Kolin Klorür | 3.00 |
| Folik Asit | 1.00 | I-Inositol | - |
| Niacinamide | 1.00 | P-Aminobenzoik Asit | 1.00 |
| Piridoksin HCl | 1.00 | B2 Vitamini | 0.20 |
| Tiamin HCl | 1.00 | B12 Vitamini | 0.005 |

EK 2

TAMPONLAR ve SOLÜSYONLAR

- ▶ DEPC; 1 mL DEPC üzerine 1 litre dH₂O ilave edilmiştir ve iyice karıştırılmıştır. Gece boyunca inkübe edilmiştir ve sonra otoklavlama yapılmıştır.
- ▶ 1xTAE Tamponu; 1 mL 10x sıvı TAE içerisine 99 mL dH₂O ilave edilmiştir ve karıştırılmıştır. Hazırlanan tampon +4 °C'de muhâfaza edilmiştir.
- ▶ İnvazyon Matrigel; 50 µL BD Biosciences matrigel, 500 µL serumsuz medium içerisinde seyreltilmiştir ve her bir insert içine 100 µL aktarılmıştır. 37 °C'de 5 saat inkübe edilmiştir.
- ▶ % 0.1 DMSO; 1 µL DMSO, 1000 µL serumlu medium içerisinde çözülmüştür.
- ▶ *A. muricata*; 0.001 gram, 0.003 gram, 0.005 gram, 0.01 gram, 0.03 gram, 0.05 gram, 0.1 gram, 0.2 gram, 0.5 gram ve 1 gram olacak şekilde hassas terazide tartılmıştır ve 10 farklı doz hazırlanmıştır.

EK 3

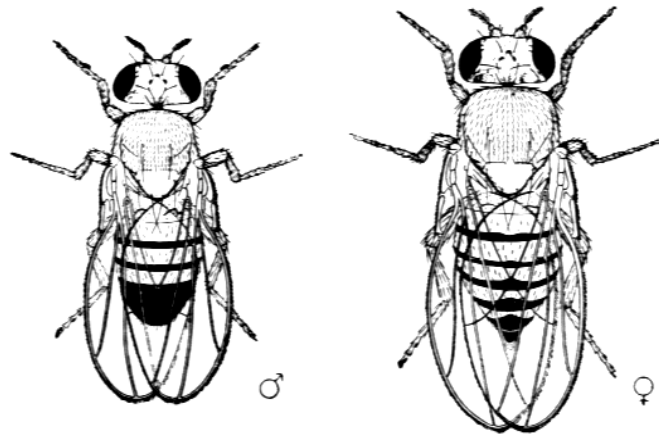
D. melanogaster YETİŞTİRME ve İLAÇ DOZ MİKTARIN BELİRLENMESİ

D. melanogaster Deneylerinde Kullanılan Aktarma Yöntemleri

- a) **Eterizasyon Tekniği:** Laboratuvar ortamında *eter* kullanılarak yapılan bayılma işlemidir. Temel prensip sinekleri bir süre (1-2 dk) kadar eter gazına maruz bırakmaktır. Bu sürenin 1-2 dakikadan fazla olması sineklerin ölmesine neden olabilir.
- b) **Sinekleri Bayılmadan Aktarma:** Sinekler ışığa doğru yönelme eğiliminden faydalanarak aktarmaktır.
- c) **Soğuk Ortamda Sinekleri Aktarma:** *D. melanogaster* -20 °C'de 5-10 dakika kadar bekletildiğinde uyuşma ve hareketsizleşme eğilimi göstermektedir. Bu süre sonunda hareketsizleşen sinekler alınır ve kültür değişimi yapılabilir.

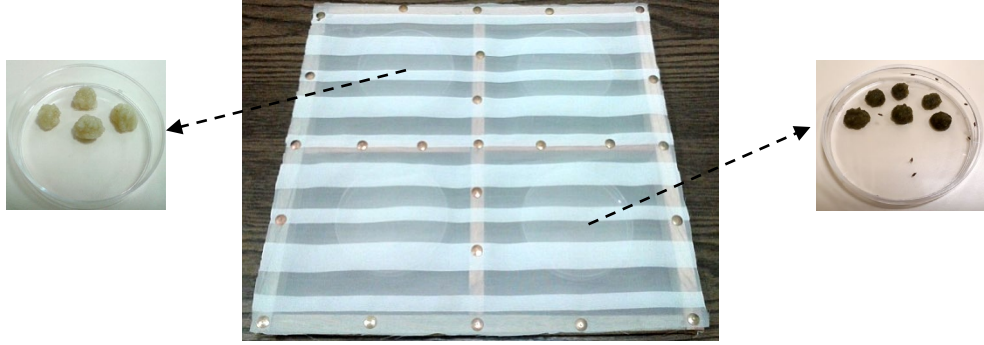
D. melanogaster'da Eşey Ayrımı

D. melanogaster model organizmasında eşey ayrımı yapabilmemiz için; stereo mikroskoptan faydalanılır. Dişi sineklerin vücudu ve kanatları daha büyük, erkeklerin daha küçüktür ve erkeklerin karınları şeritsiz siyah renktedir.



Şekil Ek 3.1: *D. melanogaster* Model Organizmasında Eşey Ayrımı (Yazıcı, 2017)

D. melanogaster Model Organizmasında İlaç Doz Miktarını Belirleme



Şekil Ek 3.2: Ergin Sirke Sineğinde *A. muricata* Bitki Özü Doz Denemesi

A. muricata bitki ekstraktı [Şekil Ek 3.2:] düzeneğinde, ortam koşulları aynı olacak şekilde aynı zaman diliminde, ergin sineğin mamasına homojen kıvamda zerk edilmiştir ve belirli saat aralıklarında ergin sineklerin durumu takip edilmiştir.

Tablo Ek 3.1: Ergin Sirke Sineğinde *A. muricata* Bitki Ekstraktı Doz Denemesi

| ♀/♂ (N) | Yapılan İşlem | Saat Aralığı | Ölüm Oranı |
|---------|------------------------------------|--------------|------------|
| 10 | Mamasız Ortam | 0-24 | % 100 |
| 10 | Mama + % 0.1 DMSO | 0-72 | % 0 |
| 10 | Mama + 0.5 g/mL <i>A. muricata</i> | 0-24 | % 0 |
| 10 | Mama + 0.5 g/mL <i>A. muricata</i> | 24-48 | % 0 |
| 10 | Mama + 0.5 g/mL <i>A. muricata</i> | 48-72 | % 0 |
| 10 | Mama + 1 g/mL <i>A. muricata</i> | 0-24 | % 0 |
| 10 | Mama + 1 g/mL <i>A. muricata</i> | 24-48 | % 0 |
| 10 | Mama + 1 g/mL <i>A. muricata</i> | 48-72 | % 0 |
| 10 | Mama + 2 g/mL <i>A. muricata</i> | 0-24 | % 0 |
| 10 | Mama + 2 g/mL <i>A. muricata</i> | 24-48 | % 0 |
| 10 | Mama + 2 g/mL <i>A. muricata</i> | 48-72 | % 0 |

N: Birey Sayısı ♀: Dişi ♂: Erkek

Tablo Ek 3.2: Larval Sirke Sineğinde *A. muricata* Bitki Ekstraktı Doz Denemesi

| Birey Sayısı (N) | Yapılan İşlem | Saat Aralığı | Ölüm Oranı |
|------------------|-------------------------------------|--------------|------------|
| 15 | Mamasız Ortam | 0-12 | % 100 |
| 15 | Mama + % 0.1 DMSO | 0-12 | % 0 |
| 15 | Mama + 0.01 g/mL <i>A. muricata</i> | 0-12 | % 20 |
| 15 | Mama + 0.05 g/mL <i>A. muricata</i> | 0-12 | % 40 |
| 15 | Mama + 0.1 g/mL <i>A. muricata</i> | 0-12 | % 52 |
| 15 | Mama + 0.5 g/mL <i>A. muricata</i> | 0-12 | % 94 |
| 15 | Mama + 1 g/mL <i>A. muricata</i> | 0-12 | % 100 |

A. muricata bitki ekstraktı ergin ve larva evrelerinde olan *D. melanogaster* model organizmasında denenmiştir ve III. instar larva evresinde olan *D. melanogaster* için LD₅₀ değeri hesaplanmıştır. **[Tablo Ek 3.3:]** Bununla beraber, ergin *D. melanogaster* için öldürücü bir *A. muricata* dozu bulunamamıştır.

Probit Analizi Sonucu (IBM®SPSS Statistics 22)

Yaygın olarak toksikoloji ve farmakoloji gibi alanlarda organizmaların kimyasal rölatif toksisitesini belirlemek için kullanılan **probit analizi** sonucunda, *D. melanogaster* için LD₅₀ değeri, **0.118 g/mL *A. muricata*** bitki ekstraktı olduğu belirlenmiştir.

Tablo Ek 3.3: Sirke Sineği Larvalarına Karşı *A. muricata* Bitki Ekstraktının LD₅₀ Değeri

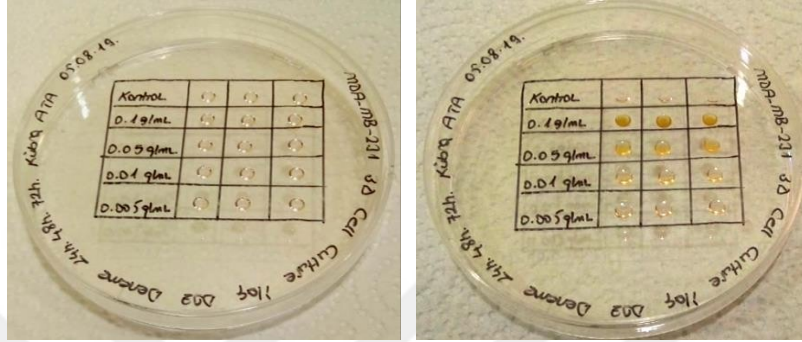
| Zaman (12 h) | Birey Sayısı (N) | LD ₅₀ , mg.ml ⁻¹ | DF | c ² | P |
|------------------------|------------------|--|----------------|----------------|--------------------|
| <i>D. melanogaster</i> | | | | | |
| Larva | 15 | 118.270 | 2 ^a | 0,625 | 0.769 ^b |

a: Bireysel vakalara dayanan istatistikler, toplu durumlara dayanan istatistiklerden farklıdır. **b:** Anlamlılık düzeyi 150'den büyük olduğundan, güven limitlerinin hesaplanmasında heterojenite faktörü kullanılmaz. **P:** Anlamlılık (*ing.* Significance) **c:** Chi-Square

EK 4

ÜÇ BOYUTLU HÜCRELERDE İLAÇ DOZ MİKTARIN BELİRLENMESİ

Üç boyutlu geliştirilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreler için IC₅₀ değerin belirlenmesinde *A. muricata* bitki ekstraktı (filtreli-filtresiz) doz denemesi yapılmıştır.




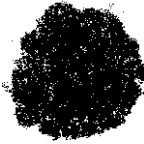










Şekil Ek 4.1: Üç Boyutlu Hücrelerde İlaç Doz Miktarın Belirlenmesi

Anlam ifade eden 0.001 g/mL, 0.003 g/mL ve 0.005 g/mL *A. muricata* bitki ekstraktı verilmiş üç boyutlu hücreler fotoğraflanmıştır ve İmage J programında hücreler işlenmiştir.







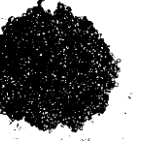

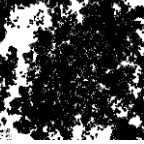
Tablo Ek 4.1: *A. muricata* verilmiş üç boyutlu MDA-MB-231 Kanser Hücresi

| Filtresiz <i>A. muricata</i> | 0.h | 24.h | 48.h | Bozulma Yüzdesi |
|------------------------------|-----|------|------|-----------------|
| 0.001 g/mL | | | | % 10 |
| 0.003 g/mL | | | | % 20 |
| 0.005 g/mL | | | | % 30 |

Tablo Ek 4.1 (devam): *A. muricata* verilmiş üç boyutlu MDA-MB-231 Kanseri Hücreleri

| Filtreli <i>A. muricata</i> | 0.h | 24.h | 48.h | Bozulma Yüzdesi |
|-----------------------------|--|--|--|-----------------|
| 0.001 g/ml |  |  |  | % 5 |
| 0.003 g/ml |  |  |  | % 20 |
| 0.005 g/ml |  |  |  | % 50 |
| 0.1 g/ml |  |  |  | % 70 |

Tablo Ek 4.2: *A. muricata* verilmiş üç boyutlu MCF-7 Kanseri Hücreleri

| Filtreli <i>A. muricata</i> | 0.h | 24.h | 48.h | Bozulma Yüzdesi |
|-----------------------------|---|---|---|-----------------|
| 0.003 g/ml |  |  |  | % 10 |
| 0.005 g/ml |  |  |  | % 50 |
| 0.01 g/ml |  |  |  | % 70 |

EK 5

MİGRASYON ALAN ÖLÇÜMÜ

Migrasyon analizinde; İmage J v.1.8.0. programında migre olan hücrelerin alan hesabı ve pixel ölçümü yapılmıştır. Kontrol MDA-MB-231 meme kanseri hücresi % 96 oranında yarayı kapatırken aynı saat aralığında *A. muricata* ile tedavi edilmiş MDA-MB-231 meme kanseri hücresi % 21 oranında yarayı kapatmıştır.

Bununla beraber yarayı kapatma yüzdesi MDA-MB-231 hücrelerine kıyasla daha yavaş olan kontrol MCF-7 meme kanseri hücresi % 93 oranında yarayı kapatırken, aynı saat aralığında *A. muricata* ile tedavi edilmiş MCF-7 meme kanseri hücresi % 23 oranında yarayı kapatmıştır.

| Results | | | | | Results | | | | |
|--------------------|-------|--------|-----|-----|---------------|-------|---------|-----|-----|
| MDA-MB-231 Kontrol | | | | | MCF-7 Kontrol | | | | |
| | Area | Mean | Min | Max | | Area | Mean | Min | Max |
| 1 | 50941 | 13.221 | 2 | 212 | 1 | 52890 | 160.259 | 0 | 255 |
| 2 | 31006 | 34.121 | 2 | 167 | 2 | 25500 | 38.989 | 0 | 247 |
| 3 | 1680 | 32.173 | 12 | 146 | 3 | 9394 | 18.225 | 5 | 254 |

| Results | | | | | Results | | | | |
|--|-------|--------|-----|-----|-----------------------------------|-------|---------|-----|-----|
| MDA-MB-231 <i>A. muricata</i> verilmiş | | | | | MCF-7 <i>A. muricata</i> verilmiş | | | | |
| | Area | Mean | Min | Max | | Area | Mean | Min | Max |
| 1 | 52794 | 56.120 | 0 | 217 | 1 | 55208 | 160.087 | 0 | 255 |
| 2 | 39615 | 56.892 | 2 | 242 | 2 | 52452 | 39.485 | 0 | 253 |
| 3 | 37800 | 28.756 | 2 | 244 | 3 | 48875 | 14.792 | 5 | 254 |

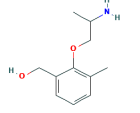
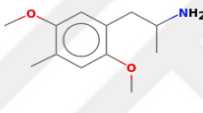
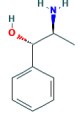

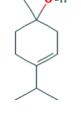
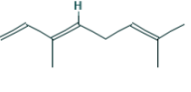

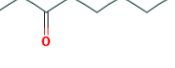
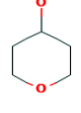
Şekil Ek 5.1: MCF-7 ve MDA-MB-231 Migrasyon Alan Ölçümü

EK 6

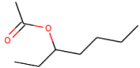
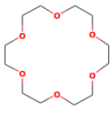
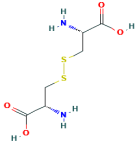
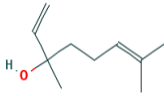
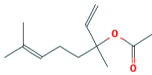
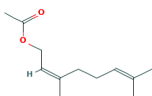
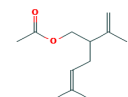
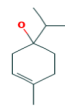
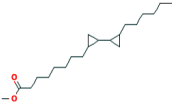
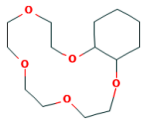
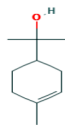
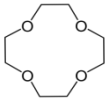
GAZ KROMATOĞRAFİSİ - KÜTLE SPEKTROMETRESİ (GC-MS) ANALİZİ

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı'nda yapılan GC-MS analizi sonucunda; ticari olarak temin edilen *A. muricata* kapsüllerinde bulunan yapılar [Tablo Ek 6.1:]'de gösterilmiştir. Bu yapıların büyük bir kısmı *A. muricata* bitkisinde de olduğu gözlenmiştir.

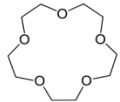
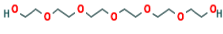

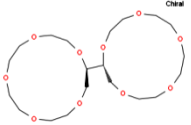
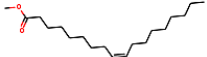

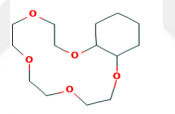
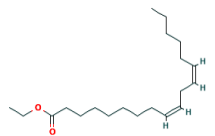
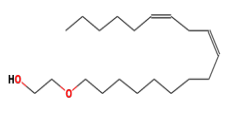
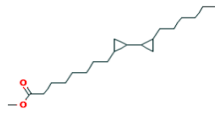
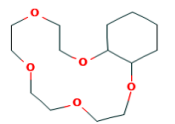
Tablo Ek 6.1: GC-MS Analizi Sonucunda *A. muricata* Bulunan Yapılar

| Bileşik Adı | İki Boyutlu Yapı | Moleküler Formül | Alan (%) |
|---|---|---|----------|
| Benzenemethanol, 2-(2-aminopropoxy)-3-methyl- |  | C ₁₂ H ₁₇ NO ₂ | 0.03 |
| Benzeneethanamine, 2,5-dimethoxy- α ,4-dimethyl- |  | C ₁₂ H ₁₉ NO ₂ | 0.02 |
| Cathine |  | C ₉ H ₁₃ NO | 0.03 |
| 1,8-Cineole/Eucalyptol |  | C ₁₀ H ₁₈ O | 0.13 |
| 1-Terpineol/p-Menth-3-en-1-ol |  | C ₁₀ H ₁₈ O | 0.13 |
| 1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (E)-/ β -Ocimene |  | C ₁₀ H ₁₆ | 0.03 |
| 3-Carene(Terpenes) |  | C ₁₀ H ₁₆ | 0.05 |
| 3-Octanone/Ethyl amyl ketone |  | C ₈ H ₁₆ O | 0.11 |
| Tetrahydro-4H-pyran-4-ol |  | C ₅ H ₁₀ O ₂ | 0.08 |

Tablo Ek 6.1 (devam): GC-MS Analizi Sonucunda *A. muricata* Bulunan Yapılar

| | | | |
|---|---|----------------------|------|
| 1-Ethylpentyl acetate/acetate; Acetic acid |  | $C_9H_{18}O_2$ | 0.08 |
| 1,4,7,10,13,16-Hexaoxacyclooctadecane |  | $C_{12}H_{24}O_6$ | 0.02 |
| L-Cystine |  | $C_6H_{12}N_2O_4S_2$ | 0.02 |
| Linalool |  | $C_{10}H_{18}O$ | 2.87 |
| Linalyl acetate/Bergamol/Linalool acetate |  | $C_{12}H_{20}O_2$ | 1.26 |
| Neryl acetate/3,7-Dimethyl-acetate(2E)-2,6-Octadien-1-ol |  | $C_{12}H_{20}O_2$ | 0.21 |
| Lavandulyl Acetate |  | $C_{12}H_{20}O_2$ | 0.21 |
| 3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)Terpinen 4-ol |  | $C_{10}H_{18}O$ | 0.13 |
| [1,1'-Bicyclopropyl]-2-octanoic acid, 2'-hexyl-, methyl ester |  | $C_{21}H_{38}O_2$ | 0.08 |
| Cyclohexyl-15-crown-5 |  | $C_{14}H_{26}O_5$ | 0.01 |
| α -Terpineol |  | $C_{10}H_{18}O$ | 0.12 |
| 12-Crown-4 |  | $C_8H_{16}O_4$ | 0.03 |

Tablo Ek 6.1 (devam): GC-MS Analizi Sonucunda *A. muricata* Bulunan Yapılar

| | | | |
|---|---|----------------------|-------|
| 15-Crown-5 |  | $C_{10}H_{20}O_5$ | 0.03 |
| Hexaethylene glycol |  | $C_{12}H_{26}O_7$ | 0.03 |
| Pentaethylene glycol |  | $C_{10}H_{22}O_6$ | 0.06 |
| 1,4,7,10,13-pentaoxacyclo pentadecane |  | $C_{20}H_{38}O_{10}$ | 0.05 |
| 9-Octadecenoic Acid (Z) |  | $C_{19}H_{36}O_2$ | 21.22 |
| 9-Octadecenoic Acid (Z)-, Ethyl Ester/Ethyl Oleate |  | $C_{20}H_{38}O_2$ | 15.51 |
| Cyclohexyl-15-crown-5 |  | $C_{14}H_{26}O_5$ | 0.03 |
| Ethyl linoleate/Linoleic acid ethyl ester |  | $C_{20}H_{36}O_2$ | 45.31 |
| Ethanol, 2-(9,12-octadecadienyloxy) |  | $C_{20}H_{38}O_2$ | 45.31 |
| [1,1'-Bicyclopropyl]-2-octanoic acid, 2'-hexyl-, methyl ester |  | $C_{21}H_{38}O_2$ | 1.92 |
| Tetradecahydro-1,4,7,10,13-benzopentaoxacyclopentadecin |  | $C_{14}H_{26}O_5$ | 1.92 |

KAYNAKLAR

Adewole, S.O. ve Caxton, E.A., 2006, Morphological Changes and Hypoglycemic Effects of *Annona muricata* L. Leaf Aqueous Extract on Pancreatic B-Cells of Streptozotocin Treated Diabetic Rats, *Afr. J. Biomed. Res.*, 9, 173-187.

Adeyemi, D.O. ve diğ., 2009, Anti-Hyperglycemic Activities of *Annona muricata*, *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, 6 (1), 62-69.

Adrain, C. ve Martin, S.J., 2001, The Mitochondrial Apoptosome: A Killer Unleashed by The Cytochrome Seas, *Trends Biochem Sci.*, 26, 390-397.

Asare, G.A. ve diğ., 2015, Antiproliferative Activity of Aqueous Leaf Extract of *Annona muricata* L. on The Prostate, BPH1 Cells, and Some Target Genes, *Integr. Cancer Ther.*, 14, 65-74.

Asghar, W. ve diğ., 2013, *In vitro* Three-Dimensional Cancer Culture Models, *Cancer Targeted Drug Delivery: An Elusive Dream*, Chapter 24, 635-665.

Baba, A.I. ve Catoi, C., 2007, Principles of Anticancer Therapy, *In Comparative Oncology*, Chapter 19, Bucharest, ISBN-10: 973-27-1457-3.

Bernards, A. ve Hariharan, I.K., 2001, Of Flies and Men Studying Human Disease in *Drosophila*, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 11 (3), 274-278.

Birleşmiş Milletler Dünya Sağlık Örgütü, www.who.int, [Ziyaret Tarihi: 10.11.2018]

Bonneau, N. ve diğ., 2012, Annonaceous Acetogenins as Environmental Neurotoxins: Human Exposure from Edible *Annona* Fruits, *Planta Med.*, 78.

Cailleau, R. ve diğ., 1974, Breast Tumor Cell Lines From Pleural Effusions, *Journal of the National Cancer Institute*, 53, 661-674.

Caparros, L.D. ve diğ., 1999, Possible Relation of Atypical Parkinsonism in The French West Indies with Consumption of Tropical Plants: A Case-Control Study, *Lancet Journal*, 354, 281-286.

Chan, P. ve diğ., 2010, Anti Arthritic Activities of *Annona muricata* Leaves Extract on Complete Freund's Adjuvant Induced Arthritis in Rats, *Planta Med.*, 76, 166.

Chang, F.R. ve Wu, Y.C., 2001, Novel Cytotoxic Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata*, *J. Nat. Prod.*, 64, 925-931.

D'Angelo, A. ve diğ., 2004, Prune cAMP Phosphodiesterase Binds nm23-H1 and Promotes Cancer Metastasis, *Cancer cell*, 5 (2), 137-149.

Demiray, Ş.B. ve diğ., 2011, MDAH-2774 Over Kanser Kök Hücrelerinde Kemoterapi Sonrası Apoptotik Etkilerin İncelenmesi, *Ege Tıp*, 50 (2), 103-109.

De Souza, R. ve diğ., 2009, Enhanced Extraction Yields and Mobile Phase Separations by Solvent Mixtures for The Analysis of Metabolites in *Annona muricata*, *L. Leaves. J. Sep. Sci.*, 32, 4176-4185.

De Vita, V.T. ve Chu, E., 2008, A History of Cancer Chemotherapy, *Cancer Res.*, 68, 8643-8653.

Djamgoz, M.B. ve diğ., 2014, Ion Transport and Cancer: From Initiation to Metastasis, *Albrecht Schwab*, 19, 369.

Eggadi, V. ve diğ., 2014, Evaluation of Anticancer Activity of *Annona muricata* in 1,2-dimethyl hydrazine Induced Colon Cancer, *World Appl. Sci. J.*, 32, 444-450.

Elifel, P. ve diğ., 2001, Ulusal Sağlık Konsensüs Geliştirme Paneli: Meme Kanseri İçin Adjuvan Tedavi, *J. Natl. Cancer Inst.*, 93 (13), 979-989.

Ezirim, A. ve diğ., 2013, Induction of Apoptosis in Myelogenous Leukemic K562 Cells by Ethanolic Leaf Extract of *Annona muricata*, *Indian Drug Dis.*, 2, 142-151.

Fagan, D.H. ve diğ., 2017, Acquired Tamoxifen Resistance in MCF-7 Breast Cancer Cells Requires Hyperactivation of eIF-4F-Mediated Translation, *Horm Kanseri*, 8 (4), 219-229.

Ferreira, L. ve diğ., 2013, *in vitro* Anthelmintic Activity of Aqueous Leaf Extract of *Annona muricata* against *Haemonchus contortus* from sheep, *Exp. Parasitol.*, 134, 327-332.

Fisher, B. ve diğ., 2002, Twenty-year Follow-up of A Randomized Trial Comparing Total Mastectomy, Lumpectomy and Lumpectomy Plus Irradiation for The Treatment of Invasive Breast Cancer, *N. Engl. J. Med.*, 347, 1233-1241.

Forli, S. ve diğ., 2016, Computational Protein-Ligand Docking and Virtual Drug Screening with The Autodock Suite, *Nat Protoc.*, 11 (5), 905-919.

Foty, R., 2011, A Simple Hanging Drop Method Cell Culture Protocol for Generation 3D Spheroids, *J. Vis. Exp.*, 51, 2720.

Francesca, P. ve diğ., 2015, The Use of Plant-Derived Bioactive Compounds to Target Cancer Stem Cells and Modulate Tumor Microenvironment, *Food Chem. Toxicol.*, 75, 58-70.

Freshney, R.I., 1987, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, Wiley Blackwell, New York, ISBN-10: 9780470528129.

González, E.A.R. ve diğ., 2012, *In vitro* Larvicidal Evaluation of *Annona muricata* L., *Anastrepha diversifolia* and *Anastrepha lutescens* Extracts Against *Anastrepha ludens* larvae *Interciencia*, 37, 284-289.

Gottesman, M.M. ve diğ., 2002, Multidrug Resistance in Cancer: Role of ATP-Dependent Transporters, *Nat. Rev. Cancer*, 2, 48-58.

Gradishar, W. ve diğ., 2000, Effects of High Dose Raloxifene in Selected Patients with Advanced Breast Carcinoma, *Cancer*, 88, 2047-2053.

Hamizah, S. ve diğ., 2012, Chemopreventive Potential of *Annona muricata* Leaves on Chemically Induced Skin Papillomagenesis in Mice, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 13, 2533-2539.

Hanahan, D. ve Weinberg, R., 2011, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*, 144 (5), 646-674.

Hansra, D.M. ve diğ., 2014, Patient with Metastatic Breast Cancer Achieves Stable Disease for 5 Years on Graviola and Xeloda After Progressing on Multiple Lines of Therapy, *Adv. Breast Cancer Res.*, 3, 84-87.

Harrell, J.C. ve diğ., 2014, Endothelial-like Properties of Claudin-Low Breast Cancer Cells Promote Tumor Vascular Permeability and Metastasis., *Clin Exp Metastasis*, 31 (1), 33-45.

Harrison, R.G. ve diğ., 1907, Observations on The Living Developing Nerve Fibers, *Proc Soc Exp Biol Med.*, 4, 140-143.

Humphrey, W., Dalke, A. ve Schulten, K., 1996, VMD-Visual Molecular Dynamics, *J. Molec. Graphics*, 14, 33-38.

Jiménez, V.M. ve diğ., 2014, Identification of Phenolic Compounds in Soursop Pulp by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array and Electrospray Ionization Mass Spectrometric Detection, *Food Res. Int.*, 65, 42-46.

Kerr, J.F. ve diğ., 1972, Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics, *Br. J. Cancer*, 26, 239-257.

Kim, G.S. ve diğ., 1998, Two New Monotetrahydrofuran Ring Acetogenins, Annomuricin-E and Muricapentocin, from The Leaves of *Annona muricata*, *J. Nat. Prod.*, 61, 432-436.

Kim, Y.J. ve diğ., 2018, *Annona muricata* Leaf Extract Triggered Intrinsic Apoptotic Pathway to Attenuate Cancerous Features of Triple Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cells, *Evid Based Complement Alternat Med.*, 10.

Kossouh, C. ve diğ., 2007, Essential Oil Chemical Composition of *Annona muricata* L. Leaves from Benin, *J. Essent. Oil Res.*, 19, 307-309.

Küresel Biyolojik Kaynak Merkezi (ing. ATCC), http://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=tr [Ziyaret Tarihi: 10.11.2018].

Leboeuf, M. ve diğ., 1980, The Phytochemistry of The Annonaceae, *Phytochemistry*, 21, 2783-2813.

Liu, N. ve diğ., 2016, Functional Proteomic Analysis Reveals That The Ethanol Extract of *Annona muricata* L. Induces Liver Cancer Cell Apoptosis Through Endoplasmic Reticulum Stress Pathway, *J. Ethnopharmacol*, 2 (189), 210-217.

Livak, K.J. ve Schmittgen, T.D., 2001, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and The 2^(-Delta Delta C_T) Method, *Methods*, 25, 402-408.

- Llanos, C.A.H. ve diğ., 2008, Actividad Insecticida De Extractos De Semilla De *Annona muricata* sobre *Sitophilus zeamais*, *Rev. Colomb. Entomol.*, 34, 76-82.
- Lodish, H. ve diğ., 2011, *Cancer Biology*, Molecular Cell Biology, In: Freeman W. F., Chapter 10, Palme, New York, 1107-1110, ISBN-10: 0-7167-3136-3.
- Loreto, C. ve diğ., 2014, The Role of Intrinsic Pathway in Apoptosis Activation and Progression in Peyronie's Disease, *Biomed Res. Int.*, 10.
- Marta, M.S.C. ve diğ., 2008, Anthelmintic Acetogenin from *Annona squamosa* L. Seeds, *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 80 (2), 271-277.
- Matsushige, A. ve diğ., 2012, Three New Megastigmanes from The Leaves of *Annona muricata*, *J. Nat. Med.*, 66, 284-291.
- Minari, J. ve Okeke, U., 2014, Chemopreventive Effect of *Annona muricata* on DMBA-Induced Cell Proliferation in The Breast Tissues of Female Albino Mice, *Egypt. J. Med. Hum. Genet.*, 15, 327-334.
- Minarni, I. ve diğ., 2017, Anticancer Activity Test of Ethyl Acetate Extract of Endophytic Fungi Isolated from Soursop Leaf, *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 10 (6), 566-571.
- Mishra, S. ve diğ., 2013, *Annona muricata* (The Cancer Killer), *Glob. J. Pharm. Res.*, 2, 1613-1618.
- Mohamad, R.M.N. ve diğ., 2015, Cytotoxic Effect of *Annona muricata* Linn Leaves Extract on Capan-1 Cells, *Journal of Applied Pharmaceutical Science.*, 5 (5), 45-48.
- Mohamad, R.M.N. ve diğ., 2018, Molecular Docking Studies of Bioactive Compounds from *Annona muricata* Linn as Potential Inhibitors for Bcl-2, Bcl-w and Mcl-1 Antiapoptotic Proteins, *Apoptosis*, 23 (1), 27-40.
- Najmuddin, S.U.F. ve diğ., 2016, Anti Cancer Effect of *Annona muricata* L. Leaves Crude Extract (AMCE) on Breast Cancer Cell Line, *BMC Complement Altern Med.*, 16 (1), 311.

- Nawwar, M. ve diğ., 2012, Flavonol Triglycoside and Investigation of the Antioxidant and Cell Stimulating Activities of *Annona muricata*, *Arch. Pharm. Res.*, 35, 761-767.
- N’Gouemo, P. ve diğ., 1997, Effects of Ethanol Extract of *Annona muricata* on Pentylentetrazol Induced Convulsive Seizures in Mice, *Phytother. Res.*, 11, 243-245.
- Nichols, D.C. ve diğ., 2012, Methods to Assay *Drosophila melanogaster* Behavior, *J. Vis. Exp.*, 61, 3795.
- Nwokocha, C.R. ve diğ., 2012, Possible Mechanisms of Action of The Hypotensive Effect of *Annona muricata* in Normotensive Sprague Dawley Rats, *Pharm. Biol.*, 50, 1436-1441.
- Padma, P. ve diğ., 1997, Effect of Alcohol Extract of *Annona muricata* on Cold Immobilization Stress Induced Tissue Lipid Peroxidation, *Phytother. Res.*, 11, 326-327.
- Padma, P. ve diğ., 2001, Effect of *Annona muricata* and Polyalthia Cerasoides on Brain Neurotransmitters and Enzyme Monoamine Oxidase Following Cold Immobilization Stress, *J. Nat. Rem.*, 1, 144-146.
- Passamai, V.E. ve diğ., 2016, From 3D Bioprinters To A Fully Integrated Organ Biofabrication Line, *Journal of Physics*, Conference Series: 705.
- Pélissier, Y. ve diğ., 1994, Volatile Components of *Annona muricata* L., *J. Essent. Oil Res.*, 6, 411-414.
- Perou, C.M. ve diğ., 2000, Molecular Portraits of Human Breast Tumours, *Nature*, 406, 747-752.
- Polat, M. ve Karahan, A.G., 2009, Multidisipliner Yeni Bir Bilim Dalı: Biyoinformatik ve Tıpta Uygulamaları, *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.*, 16 (3), 41-50.
- Priya, A. ve Ranjit, V., 2016, Acetogenins from *Annona muricata* as Potential Inhibitors of Anti Apoptotic Proteins: A Molecular Modeling Study, *Drug Des. Devel Ther.*, 10, 1399-1410.

Protein Veri Bankası, <https://www.rcsb.org/>, [Ziyaret Tarihi: 01.06.2020].

Qiagen Protocol, RT-PCR Array Services at the Analytical Instrumentation Core Boston University, <http://www.bumc.bu.edu/analytical-core/files/2013/04/Array-Service-Booklet.pdf> [Ziyaret Tarihi: 01.06.2020].

Rand, M.D., 2010, Drosophotoxicology: The Growing Potential for *Drosophila* in Neurotoxicology, *Neurotoxicol. Teratol.*, 32 (1), 74-83.

Raveloson, R.L.H. ve diğ., 2014, Efficacy of Seed Extracts of *Annona squamosa* and *Annona muricata* for The Control of *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus*, *Asian Pac. J. Trop.Biomed.*, 4, 787-795.

Ribeiro, L.P. ve diğ., 2014, Comparative Bioactivity of Selected Seed Extracts from Brazilian *Annona* Species and Acetogenin Based Commercial Bioinsecticide Against *Trichoplusia* and *Myzuspersicae*, *Crop Prot.*, 62, 100-106.

Rieser, M.J. ve diğ., 1991, Muricatacin: A Simple Biologically Active Acetogenin Derivative from The Seeds of *Annona muricata*, *Tetrahedron Lett.*, 32, 1137-1140.

Rieser, M.J. ve diğ., 1993, Bioactive Single Ring Acetogenins from Seed Extracts of *Annona muricata*, *Planta Med.*, 59, 91-92.

Rieser, M.J. ve diğ., 1996, Five Novel Mono-Tetrahydrofuran Ring Acetogenins from The Seeds of *Annona muricata*, *J. Nat. Prod.*, 59, 100-108.

Roslida, A. ve diğ., 2010, Anti-Inflammatory and Anti-Nociceptive Activities of the Ethanolic Extract of *Annona muricata* Leaf, *J. Nat.Rem.*, 10, 97-104.

Ross, J.S. ve diğ., 2004, Targeted Therapy in Breast Cancer: The HER2/neu Gene and Protein, *Mol Cell Proteomics.*, 3, 379-398.

Rupprecht, J.K. ve diğ., 1990, Annonaceous acetogenins, *J. Nat. Prod.*, 53, 237-278.

Soheil, M.Z. ve diğ., 2014, *Annona muricata* Leaves Induced Apoptosis in A549 Cells Through Mitochondrial Mediated Pathway and Involvement of NF- κ B, *BMC Complement. Altern.Med.*, 14, 299.

Soheil, M.Z. ve diğ., 2015a, *Annona muricata*: A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities, *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 15625-15658.

Soheil, M.Z. ve diğ., 2015b, *Annona muricata* Leaves Accelerate Wound Healing in Rats Via Involvement of Hsp70 and Antioxidant Defence, *Int. J. Surg.*, 18, 110-117.

Soheil, M.Z. ve diğ., 2015c, The Chemopotential Effect of *Annona muricata* leaves Against Azoxymethane Induced Colonic Aberrant Crypt Foci in Rats and The Apoptotic Effect of Acetogenin Annonamuricin-E in HT-29 Cells, *PloS One*, 10 (4).

Sun, S. ve diğ., 2014, Three New Anti Proliferative Annonaceous Acetogenins with Mono Tetrahydrofuran Ring from Graviola Fruit, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 24, 2773-2776.

Tezcan, O., 2013, *Metastatic Behaviour Of Doxorubicin Resistant Mcf-7 Breast Cancer Cells After Vimentin Silencing*, Thesis Submitted to The Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University.

Torott, O. ve Olson, A.J., 2010, AutoDock Vina: Improving The Speed and Accuracy of Docking with A New Scoring Function, Efficient Optimization and Multithreading, *Journal of Computational Chemistry*, 31, 455-461.

Torres, C.D.S. ve diğ., 2018, Effect of *Morinda citrifolia* and *Annona muricata* on Ehrlich Tumor Cells Swiss Albino Mice and *in vitro* Fibroblast Cells, *J. Med. Food*.

Türkiye Kanserle Savaş Vakfı, 2018, <http://www.kanservakfi.com>, [Ziyaret Tarihi: 10.11.2018].

US National Library of Medicine National Institutes of Health, NCBI/PubMed, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=annona+muricata+and+cancer> [Ziyaret Tarihi: 01.06.2020].

US National Library of Medicine National Institutes of Health, NCBI/PubMed, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=annona+muricata> [Ziyaret Tarihi: 01.06.2020].

US National Library of Medicine National Institutes of Health, NCBI/PubMed, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Annona+muricata+and+Drosophila+melano+gaster+and+cancer+and+moleküler+docking> [Ziyaret Tarihi: 01.06.2020].

US National Library of Medicine National Institutes of Health, NCBI/PubMed, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Drosophila+melanogaster+and+cancer> [Ziyaret Tarihi: 01.06.2020].

US National Library of Medicine National Institutes of Health, NCBI/PubMed, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Annona+muricata+and+Drosophila+melanogaster> [Ziyaret Tarihi: 01.06.2020].

Venugopal, K. ve diğ., 2017, The Impact of Anticancer Activity Upon Beta Vulgaris Extract Mediated Biosynthesized Silver Nanoparticles Against Human Breast MCF7, Lung (A549) and Pharynx (Hep-2) Cancer Cell Lines, *J. Fotochem*, 173, 99-107.

Walter, F.M., 1970, Distinguishing Homologous from Analogous Proteins Systematic, *Zoology*, 19, 99-113.

William, S.K. ve diğ., 2011, *Genetik Kavramlar*, In: Öner C., Palme, Ankara, ISBN: 9786055829261.

World Health Rankings, <https://www.worldlifeexpectancy.com/world-health-rankings>, [Ziyaret Tarihi: 10.11.2018].

Wu, F. ve diğ., 1995, New Bioactive Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins, Annomuricin-C and Muricatocin-C, from The Leaves of *Annona muricata*, *J. Nat. Prod.*, 58, 909-915.

Yang, C. ve diğ., 2015, Synergistic Interactions Among Flavonoids and Acetogenins in *Annona muricata* Leaves Confer Protection Against Prostate Cancer, *Carcinogenesis*, 36 (6), 656-665.

Yazıcı, A., 2017, Erzurum Teknik Üniversitesi Temel Genetik Laboratuvarı Föyü, "Temel_Genetik_Laboratuvar_Notu17752".

Zeng, L. ve diğ., 1995, Murihexocins-A and Murihexocins-B Two Novel Mono THF Acetogenins with Six Hydroxyls from *Annona muricata*, *Tetrahedron Lett.*, 36, 5291-5294.

ÖZGEÇMİŞ

| <u>Kişisel Bilgiler</u> | |
|--------------------------------|-----------------------------|
| Ad ve Soyadı | Fatma Kübra ATA |
| Doğum Yeri | Kırşehir |
| Doğum Tarihi | 14.08.1994 |
| Telefon | 0545 558 3403 |
| Uyruk | T.C. |
| e-posta Adresi | fatmakubraata1994@gmail.com |

| <u>Eğitim Bilgileri</u> | |
|--------------------------------|-------------------------------|
| Lisans | |
| Üniversite | Yıldız Teknik |
| Fakülte | Fen Edebiyat Fakültesi |
| Bölüm | Moleküler Biyoloji ve Genetik |
| Mezuniyet Yılı | 2016 |
| Ortalama | 3.16 |
| Yüksek Lisans | |
| Üniversite | Ahi Evran |
| Enstitü | Fen Bilimleri Enstitüsü |
| Anabilim Dalı | Genetik ve Biyomühendislik |
| Mezuniyet Yılı | Devam Etmekte |

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

Ata, F.K., Azarkan, S.Y. ve Ercan, F.S., 2018, Molecular docking of anonaine metabolite of *Annona muricata* on human topoisomerase II alpha, *Witam*, Ahi Evran Üniversitesi, Kırşehir, Türkiye, 21-23 Eylül 2018, ss:201-202.

Ata, F.K., Azarkan, S.Y. ve Ercan, F.S., 2018, Molecular screening of anonaine of glutathione s-transferase isozyme 6/7 complex in *Drosophila melanogaster* using docking, *Witam*, Ahi Evran Üniversitesi, Kırşehir, Türkiye, 21-23 Eylül 2018, ss:243-244.

Ata, F.K. ve Azarkan, S.Y., 2018, The evaluation of spheroid formation of 3D cell model culture in cisplatin, 5-fluorouracil and gemcitabine resistant triple negative breast cancer, *Witam*, Ahi Evran Üniversitesi, Kırşehir, Türkiye, 21-23 Eylül 2018, ss:198-200.

Ata, F.K., Azarkan, S.Y. ve Ercan, F.S., 2019, Docking studies of metabolites of *Annona muricata* and abemaciclib on human Bcl-2, Bad and Akt-1 proteins, *IAMHC*, Ahi Evran Üniversitesi, Kırşehir, Türkiye, 11-14 Nisan 2019, ss:126.

Ata, F.K., Azarkan, S.Y. ve Ercan, F.S., 2019, Comparison of *in vivo* and 2D/3D *in vitro* toxicity of *Annona muricata* plant extract, *IAMHC*, Ahi Evran Üniversitesi, Kırşehir, Türkiye, 11-14 Nisan 2019, ss:127.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

Ata, F.K. ve diğ., 2018, Serviks kanserinde sitokrom-c oksidaz-I gen mutasyonlarının protein yapısında meydana getirdiği değişikliklerin *in silico* analizi ve 3D modellemesi, *III.Yaşam Bilimleri Kongresi*, Abdullah Gül Üniversitesi, Kayseri, Türkiye, 23-24 Şubat 2018, ss:120.

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

Ata, F.K. ve Ercan , F.S., 2019, Determination of insecticidal activity of *Annona muricata* plant extract against *Ephestia kuehniella* (Lep: Pyralidae) and its egg parasitoid *Trichogramma evanescens* (Hym: Trichogrammatidae) *Science and Technique in the 21st century*, 6(11), 1-6.