



**BİLECİK  
ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ**

**Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**U87G KANSER HÜCRESİNDE KUDRET NARI (*Momordica  
charantia*) ÖZÜTÜNÜN Sparc ve Src-1 PROTEİN  
EKSPRESYON SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN  
İNCELENMESİ**

**Kübra ERDOĞAN  
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Onur EROĞLU**

**BİLECİK, 2020  
Ref. No: 10349813**



**BİLECİK  
ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ**

**Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**U87G KANSER HÜCRESİNDE KUDRET NARI (*Momordica  
charantia*) ÖZÜTÜNÜN Sparc ve Src-1 PROTEİN  
EKSPRESYON SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN  
İNCELENMESİ**

**Kübra ERDOĞAN  
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Onur EROĞLU**

**BİLECİK, 2020**



**BİLECİK  
SEYH EDEBALI UNIVERSITY**

**Graduate School of Sciences  
Department of Biotechnology**

**INVESTIGATION OF THE EFFECT OF *Momordica  
charantia* EXTRACT ON Sparc AND Src-1 PROTEIN  
EXPRESSION IN U87G CANCER CELL**

**Kubra ERDOĞAN  
Master's Thesis**

**Thesis Advisor  
Assoc. Prof. Onur EROGLU**

**BİLECİK, 2020**

## TEŞEKKÜR

Akademik açıdan yetişmemi sağlayan, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren ve bu çalışmayı gerçekleştirmeme imkan sağlayan değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Onur EROĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Tez aşamasında desteklerini esirgemeyen Dr. Öğretim Üyesi Sema LEBLECİ ve Dr. Öğretim Üyesi Rafiq GURBANOV hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmada kullanılan hücre hattı temininde desteğini esirgemeyen Yeditepe Üniversitesi öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN ve Safa AYDIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmamın uygulama aşamasında bana yol gösteren ve zor zamanlarımda bana bir abla samimiyetiyle destek olan Arş. Gör. Hacer KAYA'ya; tez dönemim boyunca gerek motivasyon açısından destek olan gerekse zor anlarımda sabırla ve içtenlikle yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Derya SAĞRAÇ, Sevinç KARAÇAM ve Alican BEKTAŞ'a teşekkür ederim.

Eğitim-öğretim hayatım boyunca maddi-manevi daima yanımda olan, yaşamım boyunca attığım her adımda beni sabırla destekleyen ve cesaret veren, bugünlere gelmemi sağlayan ve fedakarlıklarını hiçbir zaman esirgemeyen, benim için çabalayan babam Ünal ERDOĞAN, annem Sedef ERDOĞAN ve kız kardeşlerime yürekten teşekkür ederim.

## **BEYANNAME**

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tez içindeki tüm verileri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun olarak sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

**10/08/2020**

**Kübra ERDOĞAN**

**U87G KANSER HÜCRESİNDE KUDRET NARI (*Momordica charantia*)  
ÖZÜTÜNÜN Sparc ve Src-1 PROTEİN EKSPRESYON SEVİYELERİ ÜZERİNE  
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**ÖZET**

Glioblastoma multiforme cerrahi rezeksiyon, radyasyon tedavisi ve yüksek doz kemoterapi gibi yaklaşımlarla sınırlı bir başarı elde edilmiş olsa da ölümcül beyin tümörleri arasında yerini halen korumaktadır.

Son zamanlardaki araştırmalar, geleneksel tıpta özellikle başta diyabet olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde popüler olarak kullanılan, ekvatorial bir bitki olan *Momordica charantia* (MC) üzerine yoğunlaşmıştır. Türk halkının ‘Kudret Nari’ olarak adlandırdığı MC, farmakolojik aktiviteleri ve beslenme özellikleriyle bilinen *Cucurbitaceae* familyasına ait bir bitkidir. Bu bitki ile yapılan bazı çalışmalar, MC’nin yapısındaki hipoglisemik etki gösteren, anti-tümör ve anti-viral ajanlar olarak hareket eden protein ve metabolitlerin varlığını doğrulamaktadır. Bunun yanısıra yapılan birçok çalışmada MC’nin normal hücreler üzerinde çok az sitotoksik etki gösterdiği ya da hiçbir sitotoksik etkiye sahip olmadığı gösterilmiştir.

Bu çalışmada, MC özütünün U87G hücre hattında sitotoksisite, hücre canlılığı ve migrasyon üzerine etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi amaçlanmıştır. MTT analizi sonucu U87G hücrelerinde MC özütünün IC<sub>50</sub> değeri 700 µg/ml olarak belirlenmiştir (\*\**p*<0.001). Sağkalım analizinde özütün 24, 48, 72 ve 96. saatlerde sırasıyla %16,6, %42,6 %79,3 ve % 91,6 oranlarında artan bir öldürücü etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Yara iyileşmesi deneyi sonucuna göre ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kontrol grubundaki yara genişliğinin 24. saatte kapandığı gözlemlenirken; özüt uygulanan grupta 24. ve 48. saatlerde zamana bağlı olarak yara genişliğinin arttığı ve hücre canlılığında azalma olduğu gözlemlenmiştir. Western Blot analizi, glioblastoma hücrelerinin 24 saat boyunca MC özütü ile tedavisinin Sparc ve Src-1 protein ekspresyon seviyelerini inhibe ettiğini göstermiştir. Bu sonuçlar göstermiştir ki, MC özütü U87G hücre hattı üzerinde sitotoksik bir etkiye ve önemli derecede anti-proliferatif ve anti-invaziv özelliğe sahiptir.

**Anahtar kelimeler:** *Momordica charantia*; glioblastoma; migrasyon; sparc; src-1

## INVESTIGATION OF THE EFFECT OF *Momordica charantia* EXTRACT ON Sparc AND Src-1 PROTEIN EXPRESSION IN U87G CANCER CELL

### ABSTRACT

Glioblastoma multiforme still maintains its place among the deadly brain tumors, even though approaches such as surgical resection, radiation therapy and high-dose chemotherapy have had limited success.

Recent research has focused on *Momordica charantia* (MC), an equatorial plant that has been used in traditional medicine for the treatment of many diseases, particularly diabetes. MC, which is called 'Kudret Nari' by Turkish people, is a plant belonging to *Cucurbitaceae* family which is known for its pharmacological activities and nutritional properties. Some studies with this plant confirm the presence of proteins and metabolites that act as anti-tumor and anti-viral agents with hypoglycemic effects in the structure of MC. In addition, many studies have shown that MC has little or no cytotoxic effect on normal cells.

In this study, it was aimed to investigate the effects of MC extract on cytotoxicity, cell viability and migration in U87G cell line *in vitro*. As a result of MTT analysis, IC<sub>50</sub> value of MC extract was determined as 700 µg / ml in U87G cells (\*\**p* < 0.001). Survival analysis showed that the extract had an increasing lethal effect at 24, 48, 72 and 96 hours at 16.6%, 42.6%, 79.3% and 91.6%, respectively (\**p* < 0.001). According to the wound-healing analysis, the wound closed at 24h in the control group and the wound gradually increased depending on time in the extract treated group (\*\**p* < 0.001). Western blot analysis showed that treatment of glioblastoma cells with MC extract for 24 hours inhibited Sparc and Src-1 protein expression levels. According to the results, MC extract has a cytotoxic and a significant anti-proliferative and anti-invasive effect on U87G cell line.

**Key words:** *Momordica charantia*; glioblastoma; migration, sparc, src-1

## İÇİNDEKİLER

Sayfa No

|   |              |
|---|--------------|
| <b>TEŞEKKÜR .....</b>                             | <b>.....</b> |
| <b>BEYANNAME .....</b>                            | <b>.....</b> |
| <b>ÖZET.....</b>                                  | <b>i</b>     |
| <b>ABSTRACT .....</b>                             | <b>ii</b>    |
| <b>İÇİNDEKİLER .....</b>                          | <b>iii</b>   |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ .....</b>                      | <b>v</b>     |
| <b>ÇİZELGELER DİZİNİ .....</b>                    | <b>vi</b>    |
| <b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....</b>       | <b>vii</b>   |
| <b>1.GİRİŞ .....</b>                              | <b>1</b>     |
| <b>2.GENEL BİLGİLER.....</b>                      | <b>2</b>     |
| 2.1. Beyin Tümörleri .....                        | 2            |
| 2.2. Beyin Tümörlerinin Sınıflandırılması .....   | 3            |
| 2.2.1. Glioblastoma Multiforme (GBM).....         | 5            |
| 2.2.2. GBM insidansı.....                         | 6            |
| 2.2.3. GBM Oluşumunda Rol Oynayan Faktörler ..... | 6            |
| 2.3. Src-1 .....                                  | 9            |
| 2.4. Sparc.....                                   | 12           |
| 2.5. <i>Momordica charantia</i> (MC).....         | 14           |
| <b>3.MATERYAL-METOT .....</b>                     | <b>16</b>    |
| 3.1. Materyaller .....                            | 16           |
| 3.1.1. Kullanılan Cihazlar .....                  | 16           |
| 3.1.2. Kullanılan Kimyasallar .....               | 17           |
| 3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler.....            | 18           |
| 3.1.4. Kullanılan Tamponlar .....                 | 18           |
| 3.2. Yöntemler .....                              | 22           |
| 3.2.1. Ekstraksiyon İşlemi .....                  | 22           |
| 3.2.2. Hücre Kültürü .....                        | 22           |
| 3.2.3. Hücre Canlılığının Belirlenmesi .....      | 22           |

|   |              |
|---|--------------|
| 3.2.4. Hücre Sağkalım Analizi.....  | 23           |
| 3.2.5. Yara İyileşmesi Deneyi.....  | 24           |
| 3.2.6. İmmunblot Analizi.....   | 25           |
| 3.2.7. İstatistiksel Analiz .....   | 27           |
| <b>4. BULGULAR .....</b>  | <b>28</b>    |
| 4.1. U87G Hücrelerinin Morfolojik Görüntüsü.....  | 28           |
| 4.2. MC Özütünün U87G Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....                                | 28           |
| 4.3. MC Özütünün U87G Hücre Hattında Hücre Sağkalımına Etkisi.....                                      | 29           |
| 4.4. MC Özütünün U87G Hücre Hattında Migrasyon üzerine Etkisi .....                                     | 31           |
| 4.5.MC Özütünün U87G Hücre Hattında Sparc ve Src-1 Protein Ekspresyon<br>Seviyeleri Üzerine Etkisi..... | 32           |
| <b>5. TARTIŞMA .....</b>  | <b>33</b>    |
| <b>6.SONUÇ.....</b>   | <b>47</b>    |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>  | <b>48</b>    |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>  | <b>.....</b> |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|   | <b>Sayfa No</b> |
|---|-----------------|
| <b>Şekil 2.1:</b> Primer Beyin ve Diğer MSS Gliomalarının Dağılımı.....   | 5               |
| <b>Şekil 2.2:</b> Src-1 proteinin sinyalizasyonu .....  | 10              |
| <b>Şekil 2.3:</b> Sparc proteinin yapısı.....   | 13              |
| <b>Şekil 2.4:</b> MC'nin farmakolojik etkilerinin ana mekanizmaları.....  | 15              |
| <b>Şekil 4.1:</b> U87G hücrelerinin morfolojik görüntüsü.....   | 28              |
| <b>Şekil 4.2:</b> U87G hücrelerinde MC özütünün hücre canlılığı üzerine doza bağlı etkisi .....                                       | 29              |
| <b>Şekil 4.3:</b> U87G hücrelerinde MC özütünün zamana bağlı olarak hücre morfolojisi üzerine etkisinin mikroskobik görüntüsü .....   | 29              |
| <b>Şekil 4.4:</b> MC özütü uygulanması sonucu U87G hücrelerinin zamana bağlı hücre grafiği .....                                      | 30              |
| <b>Şekil 4.5:</b> Kontrol grubu ve MC özütü uygulanmış U87G hücrelerinin bağlı hücre canlılığı ve ölümünün zamana bağlı grafiği ..... | 30              |
| <b>Şekil 4.6:</b> MC özütünün U87G hücrelerinde zamana bağlı olarak migrasyon üzerine etkisinin morfolojik görüntüsü.....             | 31              |
| <b>Şekil 4.7:</b> MC özütünün U87G hücrelerinde zamana bağlı olarak yara kapanma hızı üzerine etkisi .....                            | 32              |
| <b>Şekil 4.8:</b> MC özütünün U87G hücrelerinde Sparc ve Src-1 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi.....               | 32              |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|   | <b>Sayfa No</b> |
|---|-----------------|
| <b>Çizelge 2.1:</b> Seçilen MSS tümörlerinin WHO'ya göre 2016 yılı derecelendirilmesi .....   | 4               |
| <b>Çizelge 3.1:</b> Laboratuvarında kullanılan cihazlar .....                                 | 16              |
| <b>Çizelge 3.2:</b> Laboratuvarında kullanılan kimyasal malzemeler.....                       | 17              |
| <b>Çizelge 3.3:</b> Laboratuvarında kullanılan sarf malzemeler .....                          | 18              |
| <b>Çizelge 3.4:</b> Coommasie Brilliant Blue içeriği.....                                     | 18              |
| <b>Çizelge 3.5:</b> Destaining solüsyon içeriği .....   | 19              |
| <b>Çizelge 3.6:</b> 1X PBS tampon içeriği.....  | 19              |
| <b>Çizelge 3.7:</b> Ayırıcı tampon içeriği .....  | 19              |
| <b>Çizelge 3.8:</b> Yükleme tamponu içeriği .....   | 20              |
| <b>Çizelge 3.9:</b> %4'lük SDS poliakrilamid jel içeriği .....                                | 20              |
| <b>Çizelge 3.10:</b> %8'lik SDS poliakrilamid jel içeriği .....                               | 20              |
| <b>Çizelge 3.11:</b> %12,5'lük SDS poliakrilamid jel içeriği .....                            | 20              |
| <b>Çizelge 3.12:</b> 10X Transfer Tamponu içeriği .....                                       | 21              |
| <b>Çizelge 5.1:</b> MC Özütünün Farklı Kanserler Üzerine Etkileri .....                       | 39              |
| <b>Çizelge 5.2:</b> MC Özütü Bileşenlerinin Farklı Kanserler Üzerine Etkileri.....            | 42              |
| <b>Çizelge 5.3:</b> MC Özüt İçeriğindeki Proteinlerin Farklı Kanserler Üzerine Etkileri ..... | 44              |

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

|                   |                                       |
|-------------------|---------------------------------------|
| %                 | : Yüzde                               |
| <sup>0</sup> C    | : Santigrat derece                    |
| Acr/Bis           | : Akrilamid/Bisakrilamid              |
| AKT               | : Protein Kinaz B                     |
| APS               | : Amonyum persülfat                   |
| Asp               | : Asparajin                           |
| ATP               | : Adenozin trifosfat                  |
| Bax               | : Bcl-2-ilişkili protein X            |
| Bcl-2             | : B-hücreli lenfoma 2                 |
| BSA               | : Sığır serum albümin                 |
| Ca <sup>+2</sup>  | : Kalsiyum iyonu                      |
| CDKN              | : Siklin bağımlı kinaz inhibitörü     |
| CO <sub>2</sub>   | : Karbondioksit                       |
| dH <sub>2</sub> O | : Distile su                          |
| dk                | : Dakika                              |
| DMEM              | : Dulbecco's Modified Eagle Medium    |
| DMSO              | : Dimetil sülfoksit                   |
| DNA               | : Deoksiribonükleik asit              |
| ECL               | : Güçlendirilmiş kemilüminesans       |
| ECM               | : Hücre dışı matriks                  |
| EDTA              | : Etilen diamin tetra asetik asit     |
| EGFR              | : Epidermal büyüme faktör reseptörü   |
| EMT               | : Epitel-mezenkimal geçiş             |
| ERK               | : Hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz |
| FAK               | : Fokal adezyon kinaz                 |
| FBS               | : Fetal sığır serumu                  |
| FDA               | : ABD Gıda ve İlaç İdaresi            |
| FGFR              | : Fibroblast büyüme faktörü reseptörü |
| FS                | : Follistatin                         |
| g                 | : Gram                                |
| GBM               | : Glioblastoma multiforme             |

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| Glu                              | : Glutamat  |
| Gly                              | : Glisin  |
| GSC                              | : Glioblastoma kök hücresi                                    |
| HA                               | : Hidroksiapatit  |
| HCl                              | : Hidroklorik asit  |
| HER2                             | : İnsan epidermal büyüme faktörü reseptör 2                   |
| HGFR                             | : Hepatosit büyüme faktörü reseptörü                          |
| IC <sub>50</sub>                 | : Yarı-maksimal inhibitör konsantrasyon                       |
| IDH                              | : İzositrat dehidrojenaz                                      |
| IL                               | : İnterlökin  |
| JAK                              | : Janus kinaz   |
| JNK                              | : c-Jun N-terminal kinaz                                      |
| KCl                              | : Potasyum klorür   |
| kDa                              | : Kilodalton  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | : Potasyum dihidrojen fosfat                                  |
| LOH                              | : Heterozigosite kaybı  |
| M                                | : Molar   |
| MAPK                             | : Mitojen aktive edici protein kinaz                          |
| MC                               | : <i>Momordica charantia</i>                                  |
| ml                               | : Mililitre   |
| MMP                              | : Matriks metalloproteinaz                                    |
| MSS                              | : Merkezi sinir sistemi                                       |
| MTT                              | : 3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | : Disodyum hidrojen fosfat                                    |
| NaCl                             | : Sodyum klorür   |
| NF1                              | : Nörofibromatoz Tip 1  |
| nm                               | : Nanometre   |
| PBS                              | : Fosfat tamponlu tuz çözeltisi                               |
| PDGFR                            | : Trombosit türevli büyüme faktörü reseptörü                  |
| PI3K                             | : Fosfatidilinositol 3-kinaz                                  |
| PIP2                             | : Fosfatidil-inositol-3,4-bisfosfat                           |
| PIP3                             | : Fosfatidilinositol-3,4,5-bisfosfat                          |

|              |   |
|--------------|---|
| PMSF         | : Fenil metil sülfonil florid                       |
| PTEN         | : Fosfataz ve tensin homologu                       |
| RAC-1        | : RAS ile ilişkili C3 botulinum toksin substrat 1   |
| RB           | : Retinoblastoma                                    |
| RhoA         | : Ras homolog aile üyesi A                          |
| RIP          | : Ribozomal inaktive edici protein                  |
| RIPA         | : Radyoimmünopresipitasyon deney tamponu            |
| RNA          | : Ribonükleik asit                                  |
| Rpm          | : Dakikadaki devir sayısı                           |
| RTK          | : Reseptör tirozin kinaz                            |
| s            | : Saniye  |
| sa           | : Saat  |
| SDS          | : Sodyum dodesil sülfat                             |
| SFK:         | : Src ailesi kinazlar                               |
| Sparc        | : Sistein ve asit bakımından zengin protein         |
| Src          | : Src proto-onkogen, reseptör olmayan tirozin kinaz |
| STAT         | : Sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü   |
| TACC         | : Transforme asidik sarmal-bobin içeren proteinler  |
| TBS          | : Tris- tamponlu tuz çözeltisi                      |
| TBS-T        | : Tween 20 içeren tris- tamponlu tuz çözeltisi      |
| TEMED        | : Tetrametilendiamin                                |
| TERTp        | : Telomeraz transkriptaz promotörü                  |
| TGF          | : Transforme edici büyüme faktörü                   |
| TMZ          | : Temozolomid                                       |
| TP53         | : Tümör protein 53                                  |
| V:           | : Volt  |
| VEGFR        | : Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü      |
| WHO          | : Dünya Sağlık Örgütü                               |
| $\alpha$ -KG | : Alfa ketoglutat                                   |
| $\mu$ g      | : Mikrogram   |
| $\mu$ l      | : Mikrolitre  |
| $\mu$ m      | : Mikronmetre                                       |

## 1.GİRİŞ

Merkezi sinir sistemi (MSS) tümörleri, nadir görülmelerine rağmen önemli bir morbitide ve mortalite nedenidir (Ohgaki, 2009). Tüm beyin tümörleri arasında, glioblastoma multiforme (GBM) yetişkinlerde en sık görülen (Gleeson vd., 2019), Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre IV. derece astrositom sınıfına ait, prognozu en kötü olan primer beyin tümörüdür (Tamimi ve Juweid, 2017). Tümörün ortalama sağkalım süresi 12-18 aydır (Neamati ve Asemi, 2019). GBM tedavisi, tümörün görüntülenmesini, nörolojik hasara neden olmadan cerrahi rezeksiyonunu ve rezeksiyon sonrası yaklaşık 6 hafta boyunca radyoterapi ile eş zamanlı kemoterapi alınımını içerir (Belousov vd., 2019). Cerrahi rezeksiyon, radyasyon tedavisi ve yüksek doz kemoterapi gibi yaklaşımlarla sınırlı bir başarı elde edilmiş olsa da GBM, ölümcül beyin tümörleri arasında yerini halen korumaktadır (Sampson vd., 2019).

Günümüzde bitkiler ve bitkilerden türetilen bileşikler kanser tedavisinde kullanılmaktadır ve bitki türevli bileşikler, klinik olarak faydalı birçok kanser önleyici ajanın önemli bir kaynağı olmuştur (Cragg ve Newman, 2005). Yeni tekniklerin ortaya çıkmasıyla birlikte doğal bileşiklerle ilgili engeller azaltılmaktadır ve bu doğal bileşenlerin ilaç endüstrisinde kullanımına ilgi de giderek artmaktadır. Bununla birlikte, bitkisel bileşikler ilaç olarak düşünüldüğünde, güvenlik ve yan etkiler açısından herhangi bir sorunlarının bulunmadığına inanılmaktadır. Yapılan testlere dayanarak anti-kanser özellik taşıyan bitkilerin kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkilere neden olduğu kanıtlanmıştır (Khan vd., 2020).

Gerçekleştirilen bu çalışmada çeşitli kanser türlerinde terapötik etki gösterdiği kanıtlanmış *Momordica charantia* (MC) özütünün, karakteristik olarak son derece invaziv, radyo-kemoterapiye dirençli ve anjiyogenik özellik gösteren GBM hücrelerinde, çoklu kanser gelişimi ve ilerlemesinde etkin bir yere sahip Src-1 proteininin ekspresyonu ve ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalarla anjiyogenez mekanizmasında hem pro-anjiyogenik hem de anti-anjiyogenik etkisi bakımından kritik bir rol üstlenen Sparc proteininin ekspresyonu üzerindeki etkisinin *in vitro* olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Beyin Tümörleri

Beyin tümörü terimi, beyindeki hücrelerden ya da beyne metastaz yapan sistemik tümörlerden kaynaklanan farklı hücrelerin oluşturduğu tümör tiplerini ifade etmektedir (Ohgaki, 2009). Primer beyin tümörleri, beyin parankimi ve çevresindeki yapılardan kaynaklanan heterojen bir tümör grubudur (De Robles vd., 2015). Sekonder beyin tümörleri ise erişkinlerde malign tümörün vücudun herhangi bir yerinden -en sık akciğer, cilt, böbrek, meme veya kolon- yayılmasıyla oluşmaktadır (Salomon vd., 2018).

MSS tümörleri nadir görülmektedir fakat kanser için önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Bu tümörler özellikle çocuklarda kansere bağlı ölümlerin %30'unu oluştururken; genç erişkinlerde %20'sini oluşturmaktadır (Ohgaki, 2009). Globocan 2018 verilerine göre; beyin tümörleri insidansı erkeklerde ve kadınlarda yüz binde sırasıyla 3.9 ve 3.1 iken; mortalite yüz binde 3.2 ve 2.3 oranındadır. Yine bu verilere göre Türkiye'de beyin tümörleri insidansı erkeklerde ve kadınlarda yüz binde sırasıyla 7.7 ve 5.6 iken; mortalite yüz binde 6.8 ve 4.4'tür.

MSS tümörleri zihinsel değişikliklere ve nörolojik eksikliklere neden olabilmektedir ve sosyal yükü diğer tümörlere oranla oldukça daha fazladır (Lee vd., 2010). Sinir sistemi tümörleri, onları vücudun herhangi bir yerindeki neoplastik süreçlerden ayıran benzersiz özelliklere sahiptir.

- ❖ Morfolojik olarak belirgin premalign veya karsinomları ile karşılaştırılabilir *in situ* aşamaları yoktur.
- ❖ Düşük dereceli lezyonlar nedeniyle bile beynin diğer bölgelerine yayılım göstererek klinik olarak kötü prognoza neden olabilirler.
- ❖ Neoplazmanın anatomik bölgesi, lokal etkiler nedeniyle histolojik sınıflandırmadan bağımsız olarak sonucu etkileyebilir (örneğin, iyi huylu bir menenjiyoma, medullanın sıkıştırılmasından dolayı kardiyorespiratuar durmaya neden olabilir).
- ❖ En yüksek derecede kötü huylu alt tipleri bile MSS dışına nadiren yayılım gösterir (Kumar vd., 2017).

## 2.2. Beyin Tümörlerinin Sınıflandırılması

MSS tümörlerinin sınıflandırılması 2007 yılında WHO tarafından tümörün histolojik özelliklerine, hücre tipine, hücrelerde nöroglial fibrillerin varlığına/yokluğuna, büyümenin makroskopik özelliklerine ve hüresel atipi derecesine göre yapılmıştır; 2016 yılında histoloji ve moleküler patolojiyi birleştirmeye dayalı bir sınıflandırma sistemi geliştirilmiştir. Bu sınıflandırma 4 evreden oluşmaktadır; (1) Entegre tanı; sadece bütün evreler için mevcut bilgi yeterli ise uygulanabilmektedir. (2) Histolojik tanı (örneğin, astrositoma, oligodendroglioma vs.). (3) WHO derecelendirme ve (4) Moleküler bilgi (örneğin, IDH-mut, 1p/19q-codel) (Banan ve Hartmann, 2017).

WHO, beyin tümörlerinin derecelendirilmesini de yine tümörlerin histopatolojik özelliklerini dikkate alarak değerlendirmiştir. Bu derecelendirme sistemi çeşitli histopatolojik özelliklere sahip beyin tümörlerinin malignansi ölçütüdür (TND, 2008).

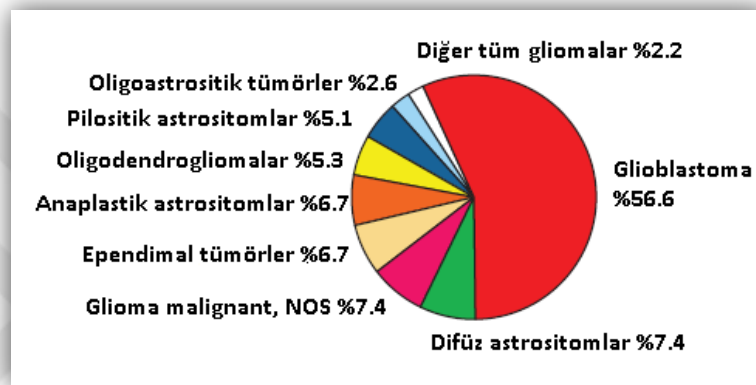
- **Derece 1:** Düşük proliferasyon potansiyeline sahip tümörlerdir ve cerrahi olarak buldukları bölgeden çıkarılabilirler. Cerrahi işlemin ardından tedavi şansı olan tümör grubudur.
- **Derece 2:** Genel olarak infiltratif (yayılma) özellik gösterirler. Düşük proliferasyon potansiyeline sahip olmalarına rağmen; sıklıkla tekrar eden tümörlerdir. Bu grup içerisindeki bazı tümörler, yüksek dereceli tümörlere dönme eğilimi de gösterebilmektedir.
- **Derece 3:** Histolojik olarak malignansi özellik gösteren tümörlerdir. Derece 3 tümöre sahip hastalar genellikle adjuvan radyo- ve/veya kemoterapi olarak tedavi edilmektedir.
- **Derece 4:** Sitolojik olarak malign, mitotik olarak oldukça aktif ve nekroz eğilimi gösteren tümör grubudur. Bu tip tümörlerde hızlı bir hastalık gelişimi söz konusudur ve klinik olarak ölümcül bir seyir gösterirler (TND, 2008).

**Çizelge 2.1.** Seçilen MSS tümörlerinin WHO'ya göre 2016 yılı derecelendirilmesi (Louis vd, 2016'dan değiştirilerek alınmıştır.)

| <b>Difüz Astroitik ve Oligodendroglial Tümörler</b>   |           | <b>Diğer Gliomalar</b>                            |           |
|---|-----------|---|-----------|
| Difüz astrositom, IDH-mutant                          | II        | Anjiosentrik glioma                               | I         |
| Anaplastik astrositom, IDH-mutant                     | III       | Astroblastoma                                     | II        |
| <b>Glioblastoma, IDH-wild tip</b>                     | <b>IV</b> | <b>Nörönel ve Miks Nörönel-Glial Tümörler</b>     |           |
| Glioblastoma, IDH-mutant                              | IV        | Desmoplastik nöroepitelyal tümör                  | I         |
| Difüz midline glioma, H3 K27M-mutant                  | IV        | Gangliositoma                                     | I         |
| Oligodendroglioma, IDH-mutant ve 1p/19q-codel         | II        | Ganglioglioma                                     | I         |
| Anaplastik oligodendroglioma, IDH-mutant 1p/19q-codel | III       | Anaplastik ganglioglioma                          | III       |
| <b>Diğer Astroitik Tümörler</b>                       |           | Serebellum displastik gangliositoma               | I         |
| Pilositik astrositom                                  | I         | Desmoplastik infantil astrositom ve gangliositoma | I         |
| Subependimal dev hücreli astrositom                   | I         | Papiller glionöronal tümör                        | I         |
| Pleomorfik ksantoastroitom                            | II        | Santral nörositoma                                | II        |
| Anaplastik pleomorfik ksantoastroitom                 | III       | Ekstraventriküler nörositoma                      | II        |
| <b>Ependimal Tümörler</b>                             |           | Serebellar liponörositoma                         | II        |
| Subependimoma   | I         | <b>Pineal Bölge Tümörleri</b>                     |           |
| Miksopapiller   | I         | Pineositoma                                       | I         |
| Ependimoma  | II        | İntermediyer farklılık gösteren pineal            | II/III    |
| Ependimoma, RELA-füzyon pozitif                       | II/III    | Pineoblastoma                                     | IV        |
| Anaplastik Ependimoma                                 | III       | Pineal bölge papiller tümörü                      | II/III    |
| <b>Embriyonal Tümörler</b>                            |           | <b>Kranial ve Paraspinal Sinir Tümörleri</b>      |           |
| Medulloblastoma (tüm alt tipleri)                     | IV        | Scwannom  | I         |
| Çok katmanlı embriyonal tümör, C19MC-değiştirilmiş    | IV        | Nörofibroma                                       | I         |
| Medullo epitelioma                                    | IV        | Perinoroma  | I         |
| CNS embriyonal tümör, NOS                             | IV        | Malignant periferik sinir kılıfı tümörleri        | II/III/IV |
| Atipikal teratoid/raptoid tümör                       | IV        | <b>Menenjiomalar</b>                              |           |
| Raptoid özellikle CNS embriyonal tümör                | IV        | Menenjioma  | I         |
| <b>Mezenkimal, Meningoepitelyal Olmayan Tümörler</b>  |           | Atipikal menenjioma                               | II        |
| Solid fibröz tümör, hemanjioperisitoma                | I/II/III  | Anaplastik (malignant) menenjioma                 | III       |
| Hemanjioblastoma                                      | I         | <b>Koroid Pleksus Tümörleri</b>                   |           |
| <b>Sellar Bölge Tümörleri</b>                         |           | Koroid pleksus papillomu                          | I         |
| Kraniofarengiom                                       | I         | Atipik koroid pleksus papilloma                   | II        |
| Granüler hücreli tümör                                | I         | Koroid pleksus karsinomu                          | III       |

### 2.2.1. Glioblastoma Multiforme (GBM)

GBM, astrositik soy ağacının en agresif difüze gliomasıdır ve WHO sınıflandırılmasına dayanan derece IV glioma olarak kabul edilmektedir (Tamimi ve Juweid, 2017). Erişkinlerde MSS'nin en sık görülen ve en yüksek ölüm oranına sahip primer beyin tümörlerinden biridir (Gleeson vd., 2019; Tomar vd., 2019). Tüm gliomaların %56.6'sını (Tamimi ve Juweid, 2017) ve tüm primer beyin tümörlerinin %16'sını oluşturmaktadır (Binabaj vd., 2018; Zhao vd., 2016).



**Şekil 2.1.** Primer Beyin ve Diğer MSS Gliomalarının Dağılımı (Ostrom vd., 2018'den değiştirilerek alınmıştır)

GBM nöroglial kök hücre veya projenitör kök hücrelerden kaynaklandığı düşünülen intrinsik bir beyin tümörüdür (Weller vd., 2019; Abdelmaksoud, 2016). Günümüzde GBM, histolojik açıdan benzer olup farklı genetik yollardan gelişerek farklı yaşlarda hastaları etkileyen; prognoz ve tedaviye yanıt konusunda farklı davranışlar sergileyen primer ve sekonder tiplerden oluşmaktadır (Delgado-Lo'pez1 ve Corrales-García, 2016). Primer GBM, hastaların %90'undan sorumludur ve *de novo* olarak ortaya çıkmaktadır (Li vd., 2016). En sık 60 yaşın üzerindeki hastalarda gözlenir ve kısa bir klinik öykü ile karakterizedir (Jawhari vd., 2016). Sekonder GBM ise düşük dereceli veya anaplastik astrositomlardan gelişir ve hastaların %10'undan sorumludur. Bu tip GBM, 45 yaş hastalarında daha yaygın görülmektedir (Corsi vd., 2019). Daha uzun bir klinik öykü ve ile karakterizedir ve primer GBM'den daha iyi bir prognoza sahiptir (Jawhari vd., 2016).

### 2.2.2. GBM insidansı

GBM insidansı oldukça değişkendir (Tamimi ve Juweid, 2017) ve 100.000 kişide 10 kişiden azdır (Taylor vd., 2019). GBM hastalarında 1 yıllık sağkalım oranı %37,2 ve 5 yıllık sağkalım oranı %5.1'dir (Tykocki ve Eltayeb, 2018). İnsidansı yaşla birlikte sürekli artış göstermektedir (Weller vd., 2019; Abdelmaksoud, 2016) ve erkeklerde kadınlara oranla %40 daha sık görülmektedir (Delgado-Lo'pez1 ve Corrales-Garcı'a, 2016). Ortalama yaşam süresi 14 aydır (Lu vd., 2018). Küresel olarak her yıl 100.000'den fazla hasta bu tür beyin kanseri nedeniyle ölmektedir (Marta vd., 2019).

### 2.2.3. GBM Oluşumunda Rol Oynayan Faktörler

GBM histolojik özelliklerine ek olarak, çeşitli genetik ve epigenetik değişiklikler ile karakterize bir hastalıktır ve bu nedenle 'multiforme' kanserin çok yönlü özelliklerine atıfta bulunmaktadır (Marta vd., 2019). Primer ve sekonder glioblastomaların alt tipleri morfolojik olarak ayrılmayıp benzerdir fakat farklı genetik değişikliklere sahiptir (Jawhari vd., 2016).

**EGFR:** İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) geni, bir transmembran tirozin kinaz reseptörünü kodlar (Soomro vd., 2017). Hücre bölünmesi, migrasyon, adezyon, farklılaşma ve apoptoz gibi önemli olaylarda merkezi bir rol oynayan EGFR geninin amplifikasyonu, primer GBM hastalarının %57.4'ünde, sekonder GBM hastalarının ise %8'inde görülmektedir. Buna ek olarak, nokta mutasyonları veya delesyonları da GBM'de sıklıkla görülmektedir (An vd., 2018).

**FGFR:** Fibroblast büyüme faktörü reseptörü (FGFR), hücre çoğalması, sağkalım ve hücre iskeleti regülasyonu dahil olmak üzere birçok biyolojik fonksiyonu kontrol eden membrana bağlı bir reseptör tirozin kinazdır. FGFR sinyali MSS'nin embriyonel gelişimi sırasında, yetişkin nöronlar ve astrositler için bir sağkalım mekanizması olarak önemlidir. GBM hastalarının %3'ünde FGFR ve TACC (transforme asidik sarmal-bobin içeren proteinler) genleri arasında füzyon görülmektedir (Li vd., 2016).

**IDH:** İzositrat dehidrojenaz (IDH) geni, sitrik asit döngüsünde izositratı  $\alpha$ -ketoglütata ( $\alpha$ -KG) dönüştüren izositrat dehidrojenazı kodlar (Park ve Turcan, 2019). GBM'nin %12'sinde IDH1 kodon 132'de ve mitokondriyal IDH2 kodon 172'de nokta mutasyonları tanımlanmıştır (Li vd., 2016). IDH1/IDH2'deki mutasyonlar glial bir tümörün doğrulanmasında, derece II gliomalar ile pilositik astrositomlar arasındaki

ayrımında gerçek tanı değerine sahiptir. Primer GBM'nin sadece % 5'inde ve sekonder GBM'nin % 80'inde IDH1 mutasyonu görülür (Agnihotri vd., 2012).

**PTEN:** Fosfotaz ve tensin homoloğu (PTEN), protein tirozin fosfataz gen ailesine ait bir tümör baskılayıcı gendir. PIP<sub>3</sub>'ü PIP<sub>2</sub>'ye defosforile ederek PI3K/AKT sinyalini negatif olarak düzenler ve böylece hücre çoğalması engellenir (Carrasco-García vd., 2014). EGFR veya PTEN mutasyonu, PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının sürekli aktivasyonuna neden olarak tümör oluşumu ve kanser tedavisi direncine katkıda bulunmaktadır (Li vd., 2016). PTEN mutasyonları primer GBM'nin %25'inde ve sekonder GBM'nin %4'ünde görülmektedir (Jawhari vd., 2016).

**BRAF:** RAF kinaz ailesinin bir üyesi olan BRAF, çoğalmayı teşvik eden MAPK/ERK sinyal yolağında görev alır. Aktive edici BRAF mutasyonları, özellikle BRAFV600E, çeşitli tümör tiplerinde bulunur ve onkogen olarak işlev görür (Rhun vd., 2019; Schreck vd., 2019). BRAF gen değişiklikleri yetişkinlerde kötü prognoz ile ilişkilidir ve BRAFV600E mutasyonları GBM'nin %50'sinden fazlasında görülmüştür (Behling ve Schittenhelm, 2019).

**NF1:** GBM hastalarının %18'inde Nörofibromatoz Tip 1 (NF1) geninde mutasyon veya delesyon görülmektedir (An vd., 2018). NF1 genindeki mutasyon ve delesyonlar sonucunda Stat3 proteini mTORC1 ve Ras ile ilişkili C3 botulinum toksin substrat 1 (Rac1) proteinleri tarafından düzenlenir ve Siklin D1'in ekspresyon seviyesinde artış gözlemlenir. Bu artış aşırı hücre çoğalması ve tümör oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Soomro vd., 2017).

**MET:** Hepatosit büyüme faktörü reseptörü (HGFR), epitelyal ve endotelyal hücrelerin yüzeyinde eksprese edilen bir tirozin kinaz reseptörüdür ve MET proto-onkogeni tarafından kodlanır. HGF, vasküler endotelyal hücreler üzerinde MET'nin aktivasyonu ile anjiyogenezi düzenleyerek hücre çoğalmasını, migrasyonunu, sağkalımı ve hücre dışı matris degradasyonunu destekler. MET, GBM kök hücrelerinde (GSC'ler) önemli bir sinyal yolağıdır. Yüksek MET ekspresyonuna sahip primer GBM hücreleri daha fazla sayıda GSC içerir ve daha yüksek tümör oluşumu gösterir. GSC'lerin kendi kendini yenileme özelliğinden sorumlu olan HGF ve GSC'lerin fonksiyonel bir markeri olan MET, GSC'lerin yaklaşık %40'ında mevcuttur (Cruickshanks vd., 2017).

**RB/CDKN2A/p16<sup>INK4a</sup>**: Retinoblastoma (RB) geni, E2F'ye bağılı hipofosforile bir durumda (aktif) olup, mitoz için önemli genlerin transkripsiyonunu önleyerek G1/S hücre döngüsü kontrol noktasından ilerlemeyi engeller (Crespo vd., 2015). CDKN2A/2B, RB yolunun hücre döngüsü düzenleyicisi olan bir tümör baskılayıcı genidir (Park vd., 2017) ve hem CDKN2A-p14<sup>ARF</sup> hem de CDKN2A-p16<sup>INK4a</sup> üretir. p16<sup>INK4a</sup>, CDK4'ü negatif olarak düzenlediğinden ve p14<sup>ARF</sup> MDM2'yi inhibe ettiğinden, her iki genin aynı anda inaktivasyonu hem RB hem de P53 sinyal yolağını düzensizleştirir (Crespo vd., 2015). Glioblastomaların yaklaşık %80'inde RB sinyal yolağında genetik değişiklikler görülmektedir (Venkatesan vd., 2016).

**P53/MDM2/MDM4/CDKN2A-p14<sup>ARF</sup>**: P53, DNA hasarı, genotoksisite, onkogen aktivasyonu, anormal büyüme sinyalleri ve hipoksiye yanıt olarak aktive edilen önemli bir tümör baskılayıcı genidir (Zhang vd., 2018). MDM2 proto-onkogeni ise P53'ün negatif düzenlenmesinde görev alır (Ahmed vd., 2018). MDM2'nin aşırı ekspresyonu ve/veya CDKN2A-p14<sup>ARF</sup>'nin ekspresyon kaybı nedeniyle P53 aktivitesinin engellenmesi, GBM'de kontrolsüz hücre çoğalması ve tümör oluşumuna yol açar. İnsan gliomalarında, P53 mutasyonları missense mutasyonlarıdır (Crespo. vd., 2015) ve primer GBM'de %35'ten az görülürken; sekonder GBM'de %90'dan fazla görülmektedir (Venkatesan vd., 2016).

**TERTp mutasyonları**: Telomeraz ters transkriptaz (TERT) geni, kromozomların 3' ucuna heksamer tekrarları ekleyerek telomeraz aktivitesinin artmasına neden olur (Ranjit vd., 2015). TERT promotör mutasyonları IDH-wild tip glioblastomaların en yaygın moleküler işaretidir (Rhun vd., 2019) ve %80-96'sından fazlasında meydana gelir (Karsy vd., 2017), ancak derece II ve III astrositomlarda %38.5'lik bir oranla daha az bulunur (Li vd., 2016).

**LOH**: Heterozigosite kaybı (LOH), germ hattında bir genin veya kromozomal segmentin "çift vuruş" mutasyonu olarak tanımlanır (Karsy, 2014). Primer GBM'ler, EGFR amplifikasyonu ile bağlantılı olarak sıklıkla kromozom 10 kaybı gösterir ki bu durum GBM'nin agresif özelliklerine katkıda bulunur. Kromozom 13q (tipik olarak RB lokusu dahil), kromozom 19q (ortak bir silinen bölge 19q13.3) ve kromozom 22q (TIMP-3 varsayılan tümör baskılayıcı gen dahil 22q12.3'te) sekonder GBM'de primer GBM'ye kıyasla daha sık saptanmıştır (Crespo vd., 2015).

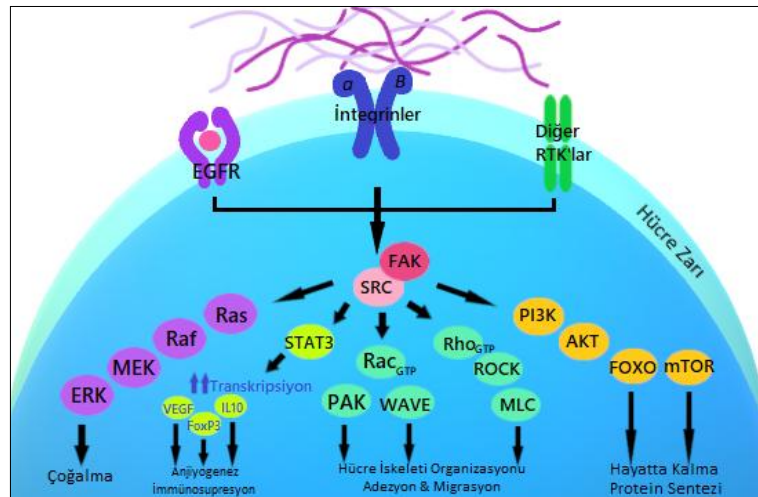
### 2.3. Src-1 (ASV1; THC6; c-SRC; p60-Src)

Src ailesi kinazlar (SFK), sitozol içerisinde yer alan ve fizyolojik şartlar altında hücre içi ara sinyal iletim proteinleri olarak işlev gören yüksek derecede korunmuş halde bulunan bir grup homolog reseptör olmayan tirozin kinaz ailesidir (De Groot ve Milano, 2009; Ahluwalia vd., 2010). SFK'lar; (1) Miristile edilebilen ve plazma membranı ile etkileşimi uyaraabilen Src homolojisi (SH) alanı adı verilen benzersiz N-terminal bölgesi (2) Hem molekül içi hem de moleküller arası etkileşimlere aracılık etmek için prolin bakımından zengin dizilere bağlanabilen bir SH3 alanı (3) Src'nin kendisi veya diğer proteinler üzerinde fosforile tirozin kalıntılarını bağlayabilen bir SH2 alanı (4) Katalitik kinaz alanı olan SH1 ve (5) C-terminal bölgesinden oluşmaktadır (Cirotti vd., 2020). SFK ailesi üyelerinden sekizi olan Src, Fyn, Yes, Lyn, Lck, Hck, Blk ve Fgr insanlarda eksprese edilir ve Src, Fyn ve Yes özellikle beyin dokusu, osteoklastlar ve trombositlerde yüksek düzeylerde bulunur (Wadhawan vd., 2011). SFK'lar adenosin trifostatın (ATP) terminal fosfat grubunu, protein substratları üzerinde mevcut olan spesifik tirozin kalıntılarına transferini katalize ederek hücre içi biyokimyasal yollarda nükleer faktörleri aktive ederler veya hücre iskeletini yeniden yapılandırmaya neden olurlar (Guarino, 2009). Bu kinazlar özellikle kanser sürecinde olmak üzere birçok patolojik durumda aşırı eksprese edilmektedir (Musumeci vd., 2017) ve kanser oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (Patel vd., 2016).

SFK'lar arasında Src-1, hücre çoğalması, adezyonu, migrasyonu, invazyonu ve anjiyogenezi kontrol eden yollarda görev alan en iyi karakterize edilmiş izoformdur (Patel vd., 2016; Musumeci vd., 2017). 1970'lerde keşfedilen bu gen (Zhang ve Yu, 2012), normal memeli hücrelerinde tanımlanan ilk proto-onkogendir (Cirotti vd., 2020). Src-1'in temel işlevi, dış sinyalleri hücre içine iletmektir. Bu görevi esas olarak reseptör tirozin kinazlar (RTK) ve integrinler üzerinden gerçekleştirir (Guarino, 2009; Liu vd., 2014). Normal hücre homeostazının korunması, hücre çoğalması ve sağkalımı, hücre iskeletinin düzenlenmesi, hücre şeklinin kontrolü, normal hücreler arası temasların korunması, hücre-matriks yapışma dinamiği, hareketlilik ve hücre göçü gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonlara katılsa da (Guarino, 2009), RTK ve integrinler üzerinden tümör mikroçevresinin düzenlenmesinde rol oynayarak tümör başlangıcı ve büyümesinden ziyade neoplastik fenotip, tümör invazyonu ve ilerlemesine neden olmaktadır (Zhang ve Yu, 2012; Guarino, 2009). Bu bağlamda, Src-1'in moleküler

ortakları ve potansiyel substratları ile birlikte hücre altı lokalizasyonu Src-1 fonksiyonunun düzenlenmesinde önemli bir mekanizmadır (Guarino, 2009).

Src-1 çoklu kanser gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkilidir. Meme kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri, lösemi ve kolon kanseri gibi tümörlerde yüksek düzeyde aktif olarak tanımlanmıştır (De Groot ve Milano, 2009). Son zamanlarda, Src-1 yüksek derecede hücre çoğalması, anjiyogenez, nekroz ve invazivlik ile karakterize GBM hücrelerinde aşırı eksprese edilmektedir (Musumeci vd., 2017). Literatür bilgilerine göre, kendiliğinden v-Src eksprese eden transgenik fareler, moleküler biyolojisi insan formuna çok yakın olan glioblastoma tümörleri geliştirmiştir (De Groot ve Milano, 2009). Src-1'in inhibisyonu ise GBM hücrelerinin büyümesini, canlılığını ve migrasyonunu hem *in vivo* hem de *in vitro* modellerde azaltmıştır. Bu bulgu Src-1'in glioblastoma gelişimi ve ilerlemesindeki merkezi rolüne işaret etmektedir (Musumeci vd., 2017). Src-1'in aktivasyonunda tirozin kinaz büyüme faktörü reseptörleri (örneğin, EGFR, HER2, HGFR, PDGFR, VEGFR gibi), hücre içi proteinler (örneğin fokal adezyon kinaz (Fak), p130, E-kaderin, Ras homolog aile üyesi (RhoA) gibi) ve integrinler gibi çeşitli faktörler yer alır (Torrise vd., 2020). Src-1 ve bu proteinler arasındaki etkileşim, Src-1 içindeki molekül içi inhibitör etkileşimlerini bozarak aktivasyonuna neden olur (Ahluwalia vd., 2010).



**Şekil 2.2:** Src-1 proteinin sinyalizasyonu (Parkin vd., 2019'dan değiştirilerek alınmıştır.)

Src-1 aktivitesinin inhibe edilmesinin hücre çoğalmasını engelleyici rolünün meme kanseri, prostat kanseri ve GBM hücrelerinde olması Src-1'in tümör hücresi proliferasyonunun uyarılmasında önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir (Ahluwalia vd., 2010). Büyüme faktörleri ile etkileşimi sonucu Src-1, RTK sinyallerini entegre ederek düzenler (Zhang ve Yu, 2012). Bu sayede sağkalım sinyallerini RAS/MAPK, PI3K, AKT ve STAT3 gibi downstream yolakta görev alan moleküler ortaklarına doğrudan iletir. Sonuç olarak bu sinyal iletimi yoluyla hayatta kalmayı ve tümör hücrelerinin büyümesi uyarır (Cioti vd., 2020).

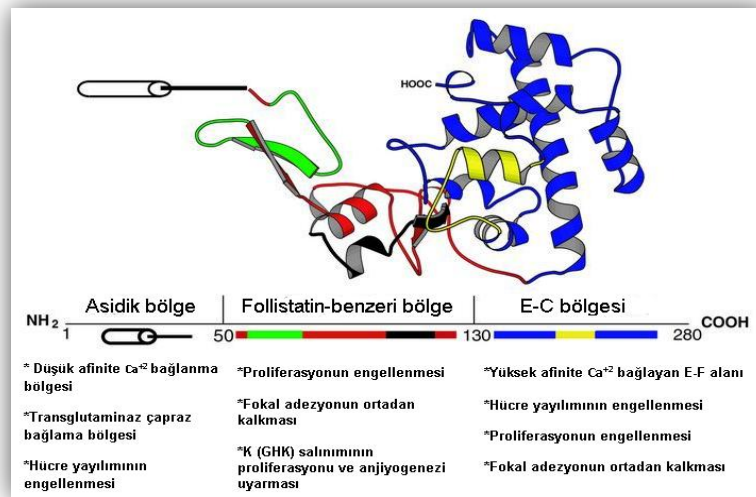
Src-1, hücre çoğalmasını düzenlemedeki rolüne ek olarak, hücre adezyonu, migrasyonu ve invazyonunu da etkiler. Src-1 aracılı hücre adezyonunda azalma, fokal adezyon yeniden bileşenlerinin dağılımı, integrin sinyalizasyonunun değiştirilmiş düzenlemesi ve hücre dışı matriks (ECM) proteinlerinin birikiminin azaltılması dahil olmak üzere birçok mekanizmadan kaynaklanmaktadır (Cioti vd., 2020). Bu bağlamda FAK ile Src-1'in etkileşimi p130, integrin ve paxillin ile anahtar komplekslerin oluşumuna yol açarak PI3K'yı aktive eder. Src-1 ekspresyonu, fokal adezyonların ve stres liflerinin bozulmasına yol açarak ECM'de adezyon kaybına neden olur. Bu durum hücre migrasyonu ve invazyonunun merkezinde önemli bir süreçtir. Tümör migrasyonu, klinikte GBM'nin olumsuz prognozu için önem arz etmektedir. Kötü prognozlu bir glioblastoma histolojik olarak endotelial hücre çoğalması ile karakterize edilir. Endotel hücrelerinde VEGF'nin yol açtığı sinyalleşme Src-1 aracılı FAK aktivasyonuna bağlıdır ve bu da, Src-1'in endotel hücre migrasyonu ve invazyonunun düzenlenmesi yoluyla anjiyogenezde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (De Groot ve Milano, 2009). Ayrıca hipoksi durumu da tümör mikroçevresinde anjiyogenezin uyarılmasına neden olan SRC/STAT3/VEGF yolağını uyararak invaziv büyüme ve malign ilerlemeyi destekleyebilmektedir (Guarino, 2009).

#### 2.4. Sparc (BM-40, OI17, ON, ONT)

Osteonektin ve/veya BM-40 (bazal membran 40) olarak da bilinen sistein açısından zengin ve salgılanan protein (Sparc), 32 kDa'dan oluşan çok fonksiyonlu, kalsiyum bağlayıcı (Vaz vd., 2015) follistatin (FS) ailesine ait bir glikoproteindir (Chlenski vd., 2004). Sparc post-translasyonel glikolize edilir ve glikolizasyon yapısı, eksprese olduğu dokuya bağlı olarak değişir. Glikolizasyondan sonra Sparc'nin moleküler ağırlığı 43 kDa'dur (Scavelli vd., 2015).

SPARC geni, kromozom 5q31.3-q32 üzerinde bulunur ve transkripsiyonu sonucu 3 farklı yapısal alan içeren tek bir polipeptit (285 amino asit) oluşur. (1) NH<sub>2</sub>-terminal ucu, asparajin (Asp) ve glutamattan (Glu) zengin oldukça asidik yapıdadır. Kalsiyum iyonlarını düşük afinite ile bağlar ve hidroksiapatit (HA) ile etkileşime girer. (2) Follastatin benzeri bölge, sistein bakımından zengin bir yapıdır. Sistein yapılarını bağlayan disülfür bağları ile yüksek oranda bükülmüş bir saç tokası yapısındadır. SPARC'nin bu bölgesi, yüksek derecede yapısal homolojiye sahiptir (Chlenski vd., 2004). (3) Sarmal-ilmek-sarmal yapısına (FS-E motifi) sahip C-terminal ucu, hücre dışı kalsiyum iyonu için bağlanma alanını oluşturur (Rosset ve Bradshaw, 2016). Disülfür bağları ile katlanan FS-E, endotel hücre göçü ve anjiyogenezin güçlü bir inhibitörüdür. Bakır bağlayıcı bölgesi ise anjiyogenezi uyarmaktadır (Chlenski ve Cohn, 2010).

Sparc, hücre çoğalması, sağkalım, adezyon ve hücre migrasyonu gibi çeşitli biyolojik fonksiyonları etkileyen hücre-matris etkileşimlerine aracılık eden bir proteindir. Embriyonik gelişim sırasında eksprese edilir ve yetişkin dokulardaki ekspresyonu, yara iyileşmesi veya doğal süreçler nedeniyle onarım veya yeniden modelleme yapılan dokularla sınırlıdır (Yunker vd., 2008). Sparc çok fonksiyonlu kalsiyum bağlayıcı bir glikoprotein olarak, doku yeniden modelleme, morfogenez ve kemik mineralizasyonunda görev alır. Osteoblastlar, fibroblastlar, endotel hücreleri ve trombositler gibi birçok farklı hücre türü tarafından salgılanır (Ribeiro vd., 2014).



**Şekil 2.3.** Sparc proteinin yapısı (Bradshaw ve Sage, 2001'den değiştirilerek alınmıştır).

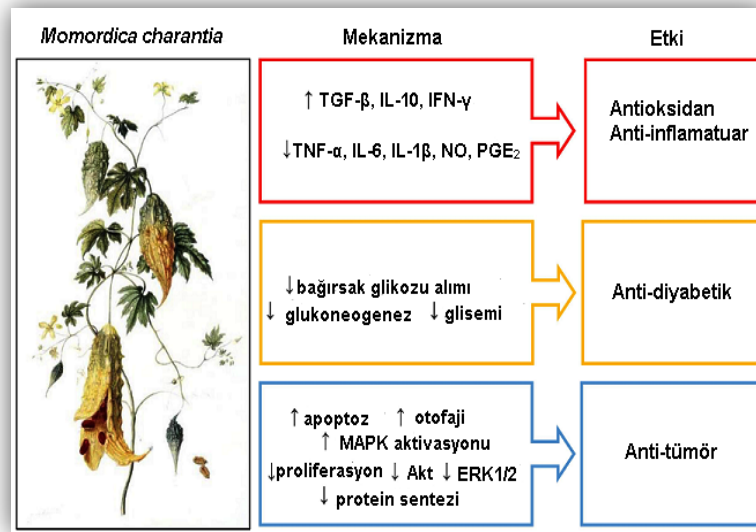
Sparc, kanser gelişimi ve ilerlemesi ile ilgili önemli mekanizmalar olan ECM, apoptoz, anjiyogenez ve ayrıca enflamatuar yanıtın düzenlenmesini kontrol eder (Ribeiro vd., 2014). Sparc'nin tümör gelişimindeki rolü ikilik göstermektedir (Boyineni vd., 2016). Çeşitli kanserlerde Sparc'nin önemli bir rol üstlendiğine dair kanıtlar artsa da; işlevinin tüm yönlerini ve kanserin gelişimine ve ilerlemesine katkısını açıklayan birleştirici bir model henüz yoktur (Tai ve Tang, 2008). Sparc'nin tümör gelişimi ve metastazındaki rolü hücre tipine, belirli bir hücre tipinde hücre altı lokalizasyonuna, ECM'nin bileşimine, tümörün evresine ve tümör mikroçevresindeki biyolojik olarak aktif moleküller ile etkileşimine bağlı olarak kanser hücreleri veya çevreleyen stromal hücreler tarafından üretilip üretilmediğine de bağlıdır (Rivera vd., 2011). Bu bağlamda, ekspresyon paterninin değiştiği, tümör ilerlemesini desteklediği ya da inhibe ettiği gösterilmiştir (Rossi vd., 2016). Meme, yumurtalık ve mide kanserleri gibi bazı kanser türlerinde, yüksek ekspresyon düzeylerinin hastalık progresyonu ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Buna karşın, prostat, akut miyeloid lösemi ve nöroblastoma gibi diğer kanser türlerinde bir tümör baskılayıcı olarak işlev görür. Bu sonuçlar Sparc'yi hem pro- hem de anti-onkojenik bir molekül yapmaktadır (Boyineni vd., 2016). Sparc'nin tümör büyümesi üzerine olumsuz etkileri, Sparc'nin endotel hücre çoğalması üzerindeki negatif etkisiyle açıklanmaktadır. Bu durum, anjiyogeneze önemli katkıda bulunan VEGF tarafından düzenlenme de dahil olmak üzere büyüme faktörü sinyal yollarının inhibe edilmesiyle gerçekleşebilmektedir (Yunker vd., 2008).

### 2.5. *Momordica charantia* (MC)

Farklı ülkelerde acı kavun, acı kabak, balsam armut veya korela olarak bilinen *Momordica charantia* (MC), tropikal veya subtropikal bölgelerde yaygın olarak yetiştirilen *Cucurbitaceae* familyasına ait popüler bir bitkidir (Fang vd., 2019). Kolay yetiştirilen bu bitki, uzun zamandır bilinmektedir ve birçok toplumda geleneksel olarak hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Yue vd., 2019).

Tohum, kök, yaprak ve meyvelerinin yapısında triterpenoidler, polipeptitler, flavonoidler, polisakkaritler ve steroller gibi çeşitli biyoaktif bileşenleri içerdiğinden dolayı (Yue vd., 2019), obezite (Juan vd., 2017), hipertansiyon (Shodehinde vd., 2016), diyabet (Ebrahim vd., 2019), bakteriyal ve viral enfeksiyon (Fang, ve Ng, 2011) gibi çeşitli tıbbi uygulamalar için kullanılmıştır. Ayrıca hücresel protein sentezini, RNA sentezini ve DNA konfigürasyonlarını inhibe ederek anti-kanser aktiviteye neden olduğuna dair çalışmalar da vardır (Puri vd., 2009). Geleneksel Türk tıbbında, acı kavun meyveleri güneşte ılık zeytinyağında bekletilmiştir ve bu zeytinyağı bal ile karıştırılarak mide ülserlerinin önlenmesinde ve iyileştirilmesinde kullanılmıştır. Afrika halk tıbbında ise çoğunlukla solucan enfeksiyonları, iltihaplanma (meyve, tohum ve yapraklarının suyu), ateş, romatizma ve cilt hastalıklarında (kökleri) kullanılmaktadır. Karayipler bölgesinde ise yaprakları kaynatılarak; diyabet, yüksek tansiyon, rahim enfeksiyonları, sıtma ve dizanteri tedavisinde kullanılmaktadır (Bortolotti vd., 2019).

MC özütlerinin inflamatuvar ve anti-oksidan aktivitelerine bağlı olarak iltihaplanmayı NF-kB sinyal yolağı inhibisyonu ile düzenlediği bulunmuştur. MC'nin, TNF- $\alpha$ , IL-1a ve IL-1b enflamatuvar genlerinin ekspresyonunu ve NF-kB DNA bağlanma aktivitesini, p38, JNK'lar ve ERK'lerin yanı sıra MAPK'lerin fosforilasyonunu da azalttığı görülmüştür. MC özütlerinin anti-kanser özelliklerini, farklı kanser türlerinde MAPK, Wnt/ $\beta$ -katenin ve AKT/mTOR/p70S6K gibi birkaç düzensiz sinyal yolağını modüle ederek göstermektedir. Böylece apoptozu ve diğer hücre ölüm yollarını indükleyerek hücre döngüsünün durdurulmasını ve hücre çoğalmasının engellenmesini sağlamaktadır (Bortolotti vd., 2019).



**Şekil 2.4:** MC'nin farmakolojik etkilerinin ana mekanizmaları (Bortolotti vd., 2019'dan değiştirilerek alınmıştır).

Doğal ürünlerin herhangi bir ciddi yan etkisi olmadan kanser tedavisi için daha iyi bir alternatif olduğu düşünülmektedir (Thiagarajan vd., 2019). Bu nedenle MC özütleri, yapısındaki biyoaktif bileşenlerin, kanserin ilerlemesini önleme yeteneklerinden dolayı geleneksel anti-kanser tedavilerde adjuvanlar olarak umut verici potansiyellere sahip olabilirler (Bortolotti vd., 2019).

### 3.MATERYAL-METOT

#### 3.1. Materyaller

##### 3.1.1. Kullanılan Cihazlar

**Çizelge 3.1.** Laboratuvarda kullanılan cihazlar

| Cihaz adı                        | Cihaz markası                  |
|----------------------------------|--------------------------------|
| Buz Makinası                     | Biobase                        |
| Buzdolabı (+4 °C/-20 °C /-80 °C) | Regal/Bosch/Panasonic          |
| CO <sub>2</sub> 'li İnkübatör    | Memmert                        |
| Dikey Elektroforez Sistemi       | Cleaver                        |
| Distile Su Cihazı                | Mes                            |
| ELISA                            | ThermoFisher Scientific        |
| Etüv                             | Jeio Tech-IB-E                 |
| Hassas Terazı                    | Ohaus                          |
| Invert Mikroskop                 | Nikon Eclipse TS100            |
| Jel Görüntüleme Sistemi          | Gel Logic-212 Pro              |
| Laminar Flow (Steril Kabin)      | Scanlaf-Mars Safety Classe 2   |
| Manyetik Karıştırıcı             | Mtops MS300Hs                  |
| Neubauer Tip Thoma Lamı          | Marienfeld Superior            |
| Otoklav Cihazı                   | HMC Hiclave HG-80              |
| Otomatik Pipet/Pipet Seti        | Nichiryo/ Thermo Scientific    |
| Pasteur Fırını                   | Jeio Tech-ON-12                |
| pH Metre                         | İnolab-PH 7110                 |
| Rotatör                          | BioSan Multi Bio RS-24         |
| Yatay çalkalayıcı (Shaker)       | Lab Companion SK-300           |
| Soğutmalı Santrifüj Cihazı       | Thermo Scientific-Micro CL 21R |
| Soxhlet Ekstraksiyon Cihazı      | Neos Essential Oils System     |
| Su Banyosu                       | Nüve- NF-800                   |
| Ultrasonic Su Banyosu            | Daihan Scientific              |
| Vorteks                          | Jeio Tech, Lab Companion       |
| Western Transfer Sistemi         | Biorad                         |

### 3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

**Çizelge 3.2.** Laboratuvarda kullanılan kimyasal malzemeler

| Kimyasal adı                     | Markası                 |
|----------------------------------|-------------------------|
| %5'lik Yağsız Süt                | CST                     |
| 10X TBS/10X TBS-T                | CST                     |
| 10X Tris-Gly-SDS Yürütme T.      | CST                     |
| 2- Propanol                      | Merck Millopore         |
| 2X Laemmli                       | Sigma                   |
| Acr/Bisacrilamid                 | Sigma                   |
| APS                              | Thermo Scientific       |
| Broadford Reagent                | Sigma                   |
| BSA                              | Carlo Erba              |
| Protein Marker (11-250 kDa)      | Invitrogen              |
| Coommasie Brilliant Blue         | Sigma                   |
| DMEM (Yüksek Glikozlu)           | Gibco                   |
| DMSO                             | Merck Millopore         |
| ECL                              | Thermo Scientific       |
| EDTA                             | Carlo Erba              |
| FBS                              | Biological Industries   |
| Glasiyal Asetik Asit             | Sigma                   |
| Glisin                           | Fisher Bioreagents      |
| Hidroklorik Asit                 | Merck Millipore         |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | Merck Millopore         |
| Metanol                          | Sigma                   |
| <i>M.charantia</i> Meyve Tozu    |                         |
| MTT Reagent                      | (Glentham Life Sciences |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | Merck Millopore         |
| Penicilin/Streptomycin           | Biological Industries   |
| PMSF                             | CST                     |
| Ponceau Red                      | Merck Millopore         |
| Potasyum Klorür                  | Merck Millopore         |
| RIPA Buffer                      | CST                     |
| SDS                              | Sigma                   |
| Sekonder Antikor-Fare            | CST                     |
| Sodyum Klorür                    | CalbioChem              |
| Sparc/Src-1 Primer Antikor       | Santa Cruz              |
| TEMED                            | TCI                     |
| Tripan Blue Solüsyonu (%0,4)     | Amresco                 |
| Tripsin-EDTA                     | Sigma                   |
| Tris Base                        | Sigma                   |
| β-aktin Primer Antikor           | CST                     |

### 3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

**Çizelge 3.3.**Laboratuvarda kullanılan sarf malzemeler

| Sarf adı                  | Markası           |
|---------------------------|-------------------|
| 1,5 ml Toplama Tüpü       | Isolab            |
| 2 ml Toplama Tüpü         | Isolab            |
| 5 ml Serolojik Pipet      | Euro clone        |
| 10 ml Serolojik Pipet     | Euro clone        |
| 15 ml Falkon              | Euro clone        |
| 50 ml Falkon              | Euro clone        |
| 6 Kuyucuklu Petri         | SPL               |
| 96 Kuyucuklu Petri        | Biologix          |
| Beher                     | S&H Labware       |
| Cam Şişe                  | Isolab            |
| Cryo Tüp (2 ml)           | Isolab            |
| Enjektör (10 ml)          | Ayset             |
| Erlen                     | S&H Labware       |
| Filtre (0,20 µM)          | Sarstedt          |
| Mezür                     | S&H Labware       |
| Pipet Ucu                 | Isolab            |
| PVDF Membran              | Merk Millopore    |
| Scraper                   | SPL               |
| T25 cm <sup>2</sup> Flask | Thermo Scientific |
| T75 cm <sup>2</sup> Flask | Thermo Scientific |
| Whatman Kağıdı            | Biorad            |

### 3.1.4. Kullanılan Tamponlar

#### **Coommasie Brilliant Blue**

Çizelge 3.4'te verilen kimyasallar toplam hacim 250 ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

**Çizelge 3.4.** Coommasie Brilliant Blue içeriği

| İçerik               | Miktar |
|----------------------|--------|
| Coommasie            | 0,25 g |
| dH <sub>2</sub> O    | 125 ml |
| Glasiyal asetik asit | 25 ml  |
| Metanol              | 100 ml |

### **Destaining Solüsyonu**

Çizelge 3.5'te verilen kimyasallar toplam hacim 100 ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

**Çizelge 3.5.** Destaining solüsyon içeriği

| İçerik               | Miktar |
|----------------------|--------|
| dH <sub>2</sub> O    | 50 ml  |
| Glasiyal asetik asit | 10 ml  |
| Metanol              | 90 ml  |

### **PBS tamponu (1X)**

Çizelge 3.6'da verilen kimyasallar 800 ml dH<sub>2</sub>O'da çözdürüldükten sonra pH:7,4'e ayarlanıp toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

**Çizelge 3.6.** 1X PBS tampon içeriği

| İçerik                           | Miktar |
|----------------------------------|--------|
| NaCl                             | 8 g    |
| KCl                              | 0,2 g  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1,44 g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 0,24 g |

### **Ayırıcı Tampon (1,5 M)**

Çizelge 3.7'de verilen kimyasallar 800 ml dH<sub>2</sub>O'da çözdürüldükten sonra pH:8,8'e ayarlanıp toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

**Çizelge 3.7.** Ayırıcı tampon içeriği

| İçerik | Miktar  |
|--------|---------|
| Tris   | 181,5 g |
| SDS    | 4 g     |

**Yükleme Tamponu (0,5 M)**

Çizelge 3.8'de verilen kimyasallar 800 ml dH<sub>2</sub>O'da çözündürüldükten sonra pH:6,8'e ayarlanıp toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

**Çizelge 3.8.**Yükleme tamponu içeriği

| İçerik | Miktar |
|--------|--------|
| Tris   | 60,5 g |
| SDS    | 4 g    |

**SDS poliakrilamid jel**

Çizelge 3.9-3.10-3.11'de verilen bileşenlerden belirtilen miktarlarda hazırlanmıştır.

**Çizelge 3.9.** %4'lük SDS poliakrilamid yükleme jeli içeriği

| İçerik                  | Miktar                 |
|-------------------------|------------------------|
| dH <sub>2</sub> O       | 1,15 ml                |
| Tris-HCl-SDS            | 290 µl (0,5 M pH: 6,8) |
| Acr/Bis (%30, %0,8 w/v) | 300 µl                 |
| APS                     | 11,25 µl               |
| TEMED                   | 3,75 µl                |

**Çizelge 3.10.** %8'lik SDS poliakrilamid ayırma jeli içeriği

| İçerik                  | Miktar                 |
|-------------------------|------------------------|
| dH <sub>2</sub> O       | 2,625 ml               |
| Tris-HCl-SDS            | 1,445 ml (1,5M pH:8,8) |
| Acr/Bis (%30, %0,8 w/v) | 1,500 ml               |
| APS                     | 32 µl                  |
| TEMED                   | 9,5 µl                 |

**Çizelge 3.11.** %12,5'lük SDS poliakrilamid ayırma jeli içeriği

| İçerik                  | Miktar                 |
|-------------------------|------------------------|
| dH <sub>2</sub> O       | 1,78 ml                |
| Tris-HCl-SDS            | 1,445 ml (1,5M pH:8,8) |
| Acr/Bis (%30, %0,8 w/v) | 2,340 ml               |
| APS                     | 32 µl                  |
| TEMED                   | 9,5 µl                 |

**Transfer (Towbin) Tamponu (10X)**

Çizelge 3.12'de verilen kimyasallar 800 ml dH<sub>2</sub>O'da çözdürüldükten sonra pH:8,3'e ayarlanıp toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

**Çizelge 3.12.** 10X Transfer Tamponu içeriği

| İçerik      | Miktar  |
|-------------|---------|
| Tris        | 30,25 g |
| Glisin      | 144 g   |
| Total hacim | 100 ml  |

**APS (%10):** 100 mg amonyum persülfat 1 ml dH<sub>2</sub>O'da çözdürülerek hazırlanmıştır.

**EDTA (0,1 M/pH:8):** 0,292 g EDTA 8 ml dH<sub>2</sub>O'da çözdürüldükten sonra pH:8'e ayarlanmıştır. Üzeri dH<sub>2</sub>O ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.

**Hücre dondurma ortamı:** 9 ml filtreden geçirilmiş fetal sığır serumu (FBS) ve 1 ml dimetilsülfoksit (DMSO) karıştırılarak hazırlanmıştır.

**MTT Solüsyonu:** 0,05 g MTT kimyasalı 10 ml PBS içerisinde homojen hale getirildikten sonra filtreden geçirilerek -20 °C'de karanlık ortamda saklanmıştır.

**Ponceau Red:** 0,1 g Ponceau red 100 ml dH<sub>2</sub>O'da çözdürülmüştür. Kullanılmadan önce 49 (ponceau):1 (asetik asit) oranda karıştırılmıştır.

**RIPA tamponu (1X):** 10X RIPA tampondan 100 µl alınıp, 900 µl dH<sub>2</sub>O ile 1 ml'ye tamamlanmıştır. 1ml RIPA içerisine 5 µl PMSF eklenmiştir.

**TBS/TBS-T (1X):** 10X TBS/TBS-T tamponundan 100 ml alınıp, 900 ml dH<sub>2</sub>O ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

**Transfer (Towbin) Tamponu (1X):** 10X Transfer tamponundan 100 ml alınıp üzerine 200 ml metanol ve 700 ml dH<sub>2</sub>O eklenerek 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

**Tris-HCl (10 mM/pH:8):** 0,0121 g Tris 8 ml dH<sub>2</sub>O'da çözdürüldükten sonra pH:8'e ayarlanmıştır. Üzeri dH<sub>2</sub>O ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.

**Yağsız süt (%5):** 5 g yağsız süt tozu 100 ml TBS-T (1X) tamponunda çözdürülerek hazırlanmıştır

## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1. Ekstraksiyon İşlemi

Toz haline getirilmiş *Momordica charantia* (MC) meyvesi, hassas terazi aracılığıyla 50 g tartılmıştır ve Soxhlet cihazına konularak 6-8 saat boyunca 150 ml %96'lık etanol ile ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Özüt, -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Etanolü uzaklaştırmak için özüt konulan beherin üzeri, küçük delikler açılmış parafinle kapatılmıştır ve oda sıcaklığında bırakılmıştır. Etanolün uzaklaşmasının ardından MC özütü, dH<sub>2</sub>O ile çözdürülmüştür ve 0.2 µm'lik filtreden süzülerek kullanılmıştır.

### 3.2.2. Hücre Kültürü

U87G hücre hattı Yeditepe Üniversitesi'nde görev yapan Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN'den temin edilmiştir. U87G hücreleri %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren yüksek glikozlu DMEM besiyerinde 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde çoğaltılmıştır. T25/75 flasklara ekimi yapılan hücrelerin %80-90 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlama işlemleri gerçekleştirilmiştir.

- Pasajlama sırasında flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırılmıştır.
- Hücreler üzerine 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) eklenip yıkanmıştır.
- PBS ortamdan uzaklaştırılıp 2 ml Tripsin-EDTA çözeltisi eklenip inkübatörde 3 dk bekletilmiştir.
- İnkübasyonun ardından hücrelerin üzerine tripsin inaktivasyonunun sağlanması için 1:1 oranında besiyeri eklenmiştir.
- Hücreler bir falkon içerisine toplanmıştır ve 1500 rpm'de 5 dk santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Süpernatant uzaklaştırılmıştır ve pelet 1 ml taze besiyerinde süspanse hale getirilmiştir.
- Hemositometrede hücrelerin sayımı gerçekleştirilmiştir.
- Sayımı yapılan hücrelerin yapılacak deneye göre tekrardan T25/T75 flasklara ekimi yapılarak pasaj işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.3. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Sitotoksik etkiler, sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik test yöntemlerinden biri olan Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) testi ile

belirlenmiştir. MTT canlı hücelere aktif olarak absorbe olur ve bu reaksiyon mitokondriyal süksinat dehidrojenaz enzimi tarafından katalizlenerek mavi-mor renkli suda çözünmeyen formazan tuzlarına indirgenir. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülür.

- 96 kuyucuklu petri içerisine  $5 \times 10^3$  hücre 100 µl besiyeri ile hazırlanıp kuyucuklara ekimi yapılmıştır.
- 24 sa. 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde inkübe edilerek hücrelerin yüzeye yapışmaları sağlanmıştır.
- İnkübasyonun ardından kuyucuklar içerisindeki besiyeri pipetle uzaklaştırılmıştır.
- Hücelere seri solüsyonlar halinde MC özütü (100-1000 µg/ml) uygulanmıştır. Negatif kontrol grubuna sadece besiyeri eklenirken; pozitif kontrol grubuna %20 DMSO ile hazırlanmış besiyeri ve vehicle grubuna çözücü (dH<sub>2</sub>O) ile hazırlanmış besiyeri uygulanmıştır.
- Hücreler 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 24 sa inkübasyona bırakılmıştır.
- Ardından üzerine 10 µl MTT eklenmiş ve hücreler 4 sa boyunca 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrası MTT eklenen besiyeri uzaklaştırılarak hücreler üzerine 100 µl DMSO eklenmiştir ve 5 dk karanlık ortamda bekletilmiştir.
- Hücrelerin 570 nm'de ELISA cihazında ölçümü yapılmıştır.
- Microsoft Excel programı yardımı ile uygulanan doz ve % hücre canlılık eğrisi  $Y = mx + C$  formülü ( $Y =$  inhibisyon,  $x =$  konsantrasyon,  $C =$  sabit,  $m =$  katsayı) kullanılarak hesaplanmıştır (Eroğlu vd., 2019).
- Deneyler üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

#### 3.2.4. Hücre Sağkalım Analizi

Uygulanan özütün hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla tripan mavisi ile hücreler boyanarak hücre sağkalım deneyleri gerçekleştirilmiştir.

- 6 kuyucuklu petri içerisine  $5 \times 10^4$  hücre 2 ml besiyeri ile hazırlanıp kuyucuklara ekimi yapılmıştır.

- 24 sa. 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde inkübe edilerek hücrelerin yüzeye yapışmaları sağlanmıştır.
- İnkübasyonun ardından kuyucuklar içerisindeki besiyeri pipetle uzaklaştırılmıştır.
- MTT testi sonucunda belirlenen IC<sub>50</sub> değerinde hücrelere MC özütü (700 µg/ml) uygulanmıştır.
- Hücreler 24, 48, 72 ve 96. saatlerde sayımları yapılacak şekilde özüt ile inkübe edilmiştir.
- Belirlenen saatlerde hücrelere tripsin-EDTA eklenmiştir ve hücreler 37°C %5 CO<sub>2</sub>'li ortamında 2-3 dk inkübe edilmiştir.
- Ardından 1:1 oranında DMEM eklenip hücreler 1,5 ml toplama tüplerine alınmıştır.
- 2000 rpm'de +4°C'de 5 dk santrifüj yapılmıştır ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Pelet üzerine 50 µl besiyeri ve 50 µl tripan mavi boyası eklenmiştir.
- Hücreler homojen hale getirilmiştir ve hemositometrede sayımları gerçekleştirilmiştir.
- Deneysel üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

### 3.2.5. Yara İyileşmesi Deneyi

MC özütünün lateral hücre göçü ve hücre-hücre etkileşimlerinin üzerine etkilerinin incelenmesi için yara iyileşmesi deneyi gerçekleştirilmiştir.

- 6 kuyucuklu petri içerisinde 5x10<sup>5</sup> hücre 2 ml besiyeri ile hazırlanıp kuyucuklara ekimi yapılmıştır.
- 24 sa. 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde inkübe edilerek hücrelerin yüzeye yapışmaları sağlanmıştır.
- Yapışan hücreler üzerinde düz bir hatta olacak şekilde her kuyucuğun tam ortasından 200 µl'lik pipet ucu yardımıyla yara açılmıştır.
- Hücre artıklarını temizlemek amacıyla 1X PBS ile yıkama yapılmıştır.
- Yıkama sonrası kontrol grubuna sadece besiyeri eklenirken; diğer kuyucuklara özüt uygulaması yapılmıştır.
- 24. ve 48. saatlerde hücrelerin hareketleri izlenmiştir ve görüntüleri invert mikroskop ile kayıt edilmiştir.

- Yara kapanma yüzdeleri  $(A_{0h}-A_{24h/48h})/A_{0h} \times 100$  formülü kullanılarak hesaplanmıştır ( $A_{0h}$ : 0. sa. genişliği;  $A_{24h}$ : 24. sa yara genişliği ve  $A_{48h}$ : 48 sa. yara genişliği) (Aktürk vd., 2016).
- Deneyle üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

### **3.2.6. İmmunblot Analizi**

Hücrelere, özütün  $IC_{50}$  doz uygulamasının proteinler üzerine etkisinin gösterilebilmesi amacıyla total protein izolasyonu yapılarak hedef proteinlerin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir.

#### **3.2.6.1. Total protein izolasyonu**

- T25 flask içerisine  $1 \times 10^6$  hücre besiyeri ile hazırlanıp ekilmiştir.
- 24 sa.  $37^{\circ}C$  %5  $CO_2$ 'li inkübatörde inkübe edilerek hücrelerin yüzeye yapışması sağlanmıştır.
- Kontrol grubuna sadece besiyeri eklenirken; diğer gruba özüt uygulaması yapılmıştır.
- Hücreler 24 saatin ardından sonra soğuk 1X PBS ile yıkanarak scraper yardımıyla kazınmıştır.
- Toplanan hücre kalıntıları, 1X PBS içerisinde  $13200$  rpm'da  $+4^{\circ}C$ 'de 2 dk. santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant kısmı atılarak pelet, uygun miktarlarda RIPA tamponu içerisinde çözdürülmüştür. 5 dk. buz üzerinde bekletildikten sonra karışım 15 dk. boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Ardından hücreler 15 dk. boyunca,  $13200$  rpm'de  $+4^{\circ}C$ ' de santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant kısmında proteinler vardır. Bu kısım yeni 1,5 ml'lik toplama tüplerine alınmıştır.

#### **3.2.6.2. Bradford Yöntemi**

Bradford analizi; içerisinde protein konsantrasyonu ve absorbansını bildiğimiz BSA (Bovine Serum Albumine) değerlerini referans göstererek elde edilen proteinin miktarını belirlemek amacıyla yapılmıştır.

- Her bir kuyucuğa konulan 1, 2, 3, 4, 5'er  $\mu l$  BSA (3 tekrar yapılmıştır) üzerine 200  $\mu l$  bradford reaktifi eklenmiştir.

- Diğer kuyucuklara 1 µl örnekten eklenerek üzerine 200 µl bradford reaktifi eklenmiştir.
- Karanlıkta 5 dk. oda sıcaklığında bekledikten sonra ELISA Reader'da 595 nm'de ölçümü yapılmıştır.
- Kontrol grubu ve özüt uygulanmış grubun verileri Excel'e kayıt edilmiştir.
- Verilerin ortalamaları (AV) alınmıştır.
- Veri ortalamalarına göre  $y=ax$  denklemine ait çizgi grafik çizilmiştir
- Çizgi grafiği üzerinden jele yüklenecek olan protein miktarı hesaplanıp µl cinsinden bulunmuştur.
- Proteinler 1:1 oranında 2X Laemmli ile süspansedilip ardından 96 °C' de 5 dk bekletilerek denatüre edilmiştir.

### **3.2.6.3. Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)**

- Src-1 proteini için %8'lik ayırıcı jel ve %4'lük yükleme jeli; Sparc ve β-aktin proteinleri için ise %12,5'lük ayırıcı jel ve %4'lük yükleme jeli hazırlanmıştır.
- Her bir kuyucuğa 30 µg protein olacak şekilde yükleme yapılmıştır.
- Hazırlanan akrilamid jele yüklenen örnekler 90 V'ta 1 sa. ve 120 V'ta 2 sa. yürütülmüştür.
- Proteinler PVDF membrana wet transfer sistemi ile aktarılmıştır.
- Transfer işlemi 100 V'ta 90 dk. boyunca gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.6.5. Bloklama İşlemi**

- Membran %5'lik yağsız süt içerisinde 1 sa. boyunca shakerda bekletilerek bloklama işlemi yapılmıştır.

### **3.2.6.6. Primer ve Sekonder Antikorlar ile İnkübasyon**

- Bloklamanın ardından membran uygun primer (1:100) ve sekonder antikorlar (1:1000) ile 24 sa. boyunca +4°C'de inkübe edilmiştir.
- Antikorlar ile inkübasyonun ardından membranın TBS-T ve TBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.6.7. Proteinlerin Görüntülenmesi**

- Son olarak membran, kemilüminesans ajanlar ile (ECL) inkübe edildikten sonra görüntüleme cihazında hedef proteinlerin ekspresyonuna ait verilerin görüntüsü alınmıştır.
- Elde edilen sonuçlar Image J programı ile değerlendirilmiştir.

### **3.2.7. İstatistiksel Analiz**

Deneyler üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneylerin ortalamaları alınarak Graph Pad Prism 7.0, Image J programı ve ANOVA ile istatistiksel analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizlerde *bağımsız t-testi* kullanılmıştır. Anlamlılık değerleri;

$p > 0,05$  anlamlı düzeyde farklılık yoktur,

$p < 0,05$  önemli düzeyde farklılık,

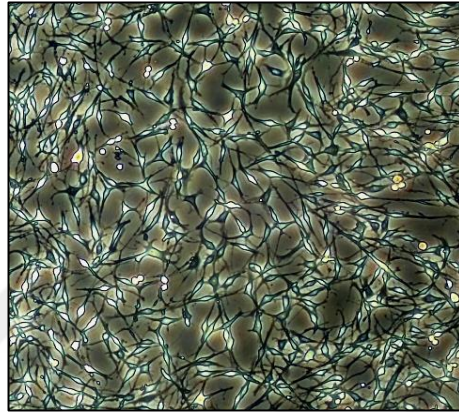
$p < 0,01$  çok önemli düzeyde farklılık,

$p < 0,001$  ileri düzeyde farklılık olarak değerlendirilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. U87G Hücrelerinin Morfolojik Görüntüsü

T75 flasklara ekilerek büyütülen U87G hücreleri, invert mikroskopta 4X büyütme ile morfolojik görüntüleri elde edilmiştir (Şekil 4.1).

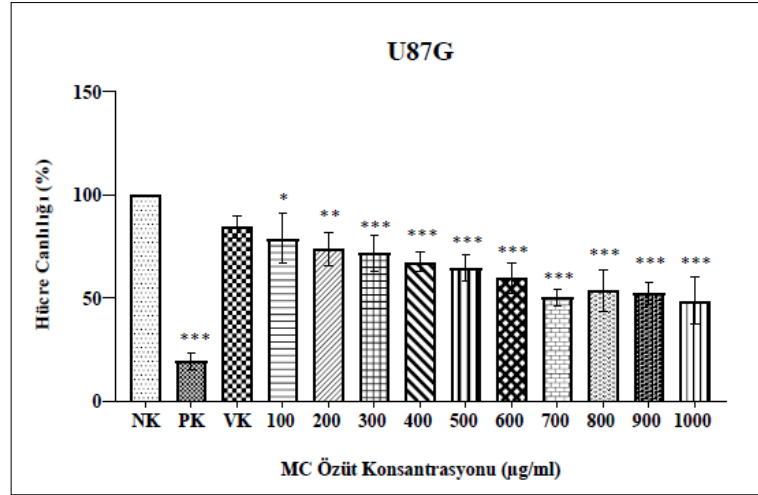


Şekil 4.1. U87G hücrelerinin morfolojik görüntüsü (4X-Nikon Eclipse TS100)

### 4.2. MC Özütünün U87G Hücre Hattında Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

MC özütünün U87G hücrelerinde doza bağlı hücre canlılığı üzerine etkilerinin incelenebilmesi amacıyla MTT deneyi uygulanmıştır. Bu amaç için U87G hücrelerine artan konsantrasyonlarda (100-1000 µg/ml) 24 sa. boyunca MC özüt uygulaması yapılmıştır.

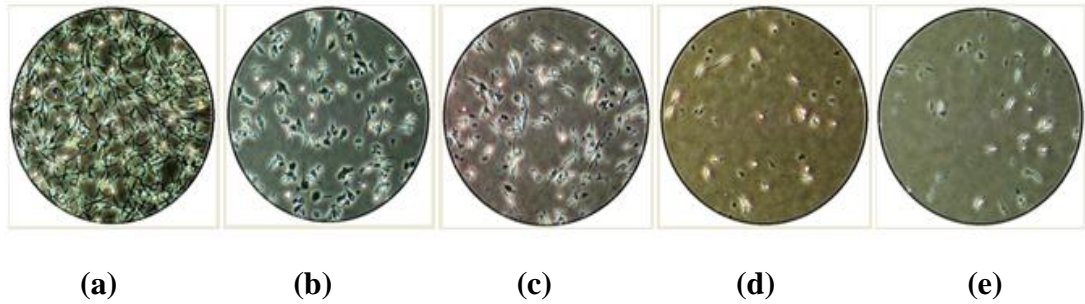
Özüt uygulanmayan negatif kontrol grubu %100 canlılık oranı olarak kabul edilerek diğer konsantrasyonlara ait canlılık oranları ortalama absorbans değerlerinden hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar neticesinde MC özütünün artan dozlarıyla birlikte U87G hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir ve hücrelerin %50'sinin öldüğü değer olan IC<sub>50</sub> değeri 700 µg/ml (\*\*\*) $p < 0,001$ ) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2)



**Şekil 4.2.** U87G hücrelerinde MC özütünün hücre canlılığı üzerine doza bağlı etkisi (NK; Negatif kontrol, PK; Pozitif kontrol, VK; vehicle kontrol)

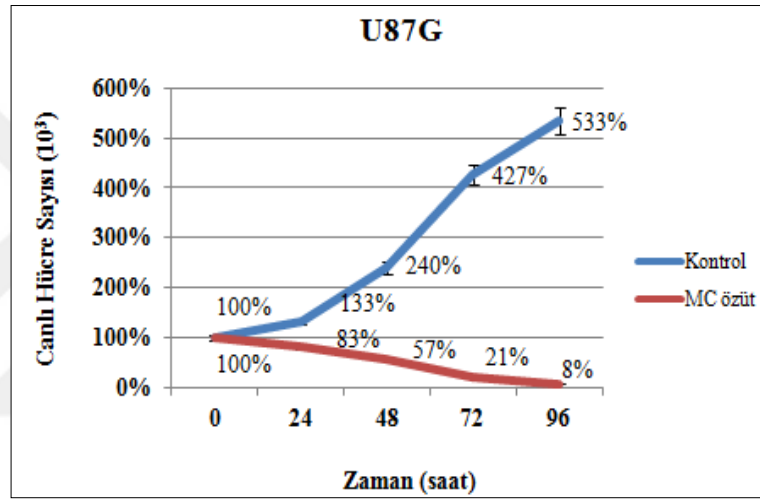
#### 4.3. MC Özütünün U87G Hücre Hattında Hücre Sağkalımına Etkisi

U87G hücre hattı kültüre edildikten sonra 24, 48, 72 ve 96. saatlerde özüt uygulanmış grupların ve özüt uygulanmamış kontrol grubu hücrelerinin morfolojik olarak görüntüleri Şekil 4.3'te gösterilmektedir. Özüt uygulanmış hücre gruplarında zamana bağlı olarak hücre canlılığında önemli bir azalma görülmektedir.

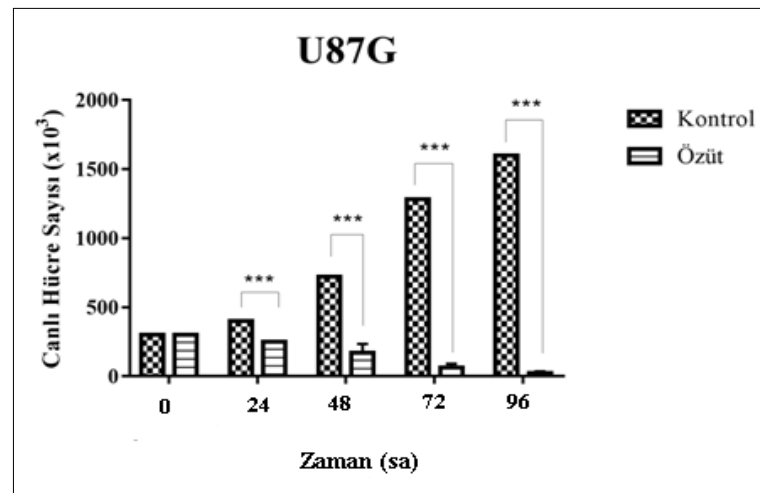


**Şekil 4.3.** U87G hücrelerinde MC özütünün zamana bağlı olarak hücre morfolojisi üzerine etkisinin mikroskopik görüntüsü. a:Kontrol, b:24 sa, c:48 sa, d:72 sa, e: 96 sa. (4X-Nikon Eclipse TS100)

U87G hücrelerinde MC özütünün zamana bağlı etkilerinin incelenmesi için sağkalım deneyi yapılmıştır. MTT deneyi sonucunda belirlenen  $IC_{50}$  değerinde MC özütü uygulanan hücrelerin 24, 48, 72 ve 96. saatlerde tripan mavisi ile boyamaları yapılmıştır ve hemositometre yardımıyla hücre sayımları gerçekleştirilmiştir. Yapılan sayımlar sonucunda ölü ve canlı hücre oranları hesaplanmıştır ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MC özütünün 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca sırasıyla % 16.6, % 42.6, % 79.3 ve % 91.6'da artan bir öldürücü etkiye neden olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5) Bu durum MC özütünün U87G hücreleri için güçlü bir sitotoksik etken olduğunu düşündürmektedir.



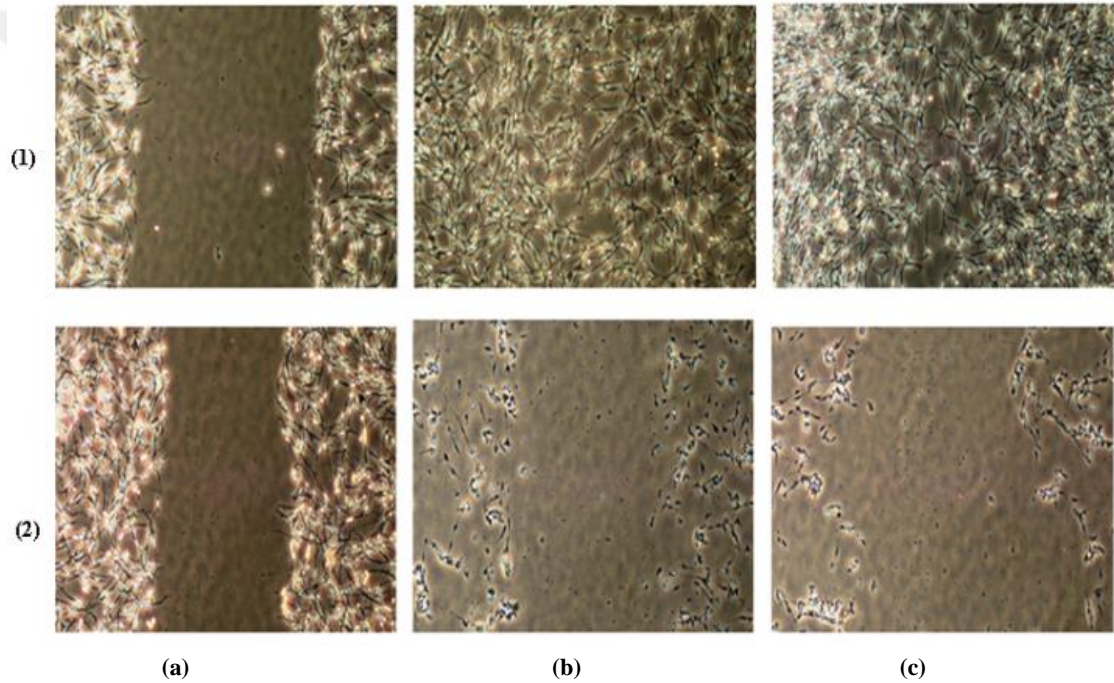
Şekil 4.4. MC özütü uygulanması sonucu U87G hücrelerinin zamana bağlı hücre grafiği



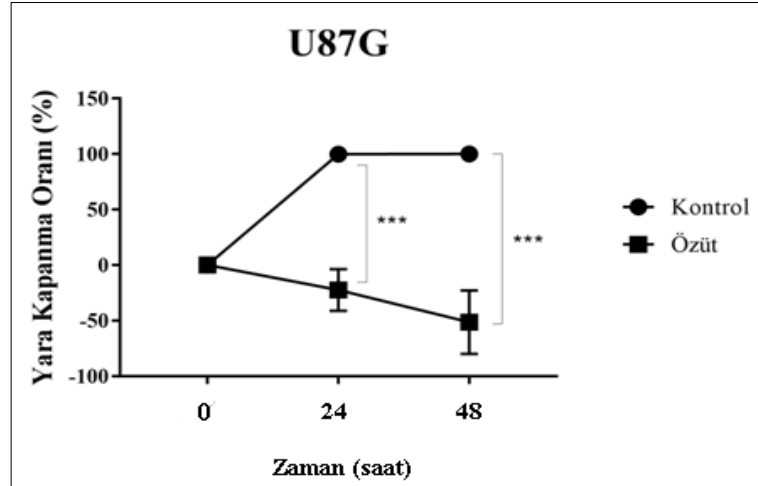
Şekil 4.5. Kontrol grubu ve MC özütü uygulanmış U87G hücrelerinin bağıl hücre canlılığı ve ölümünün zamana bağlı grafiği

#### 4.4. MC Özütünün U87G Hücre Hattında Migrasyon Üzerine Etkisi

Yara iyileşmesi deneyinde kontrol grubunda 0. saatte ortalama 601,64  $\mu\text{m}$  olarak kaydedilen yara genişliğinin 24.saat sonunda tamamen kapandığı gözlenmiştir. MC özütü uygulanan hücrelerde 0. saatte ortalama 497,44  $\mu\text{m}$  olan yara genişliğinin 24. saatte ortalama 601,08.  $\mu\text{m}$  ve 48. saatte ortalama 733,04  $\mu\text{m}$  olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda hücrelere MC özütü uygulanmasıyla hücre canlılığının azaldığı, yara iyileşmesinin engellendiği ve zamana bağlı olarak yara genişliğinin arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).



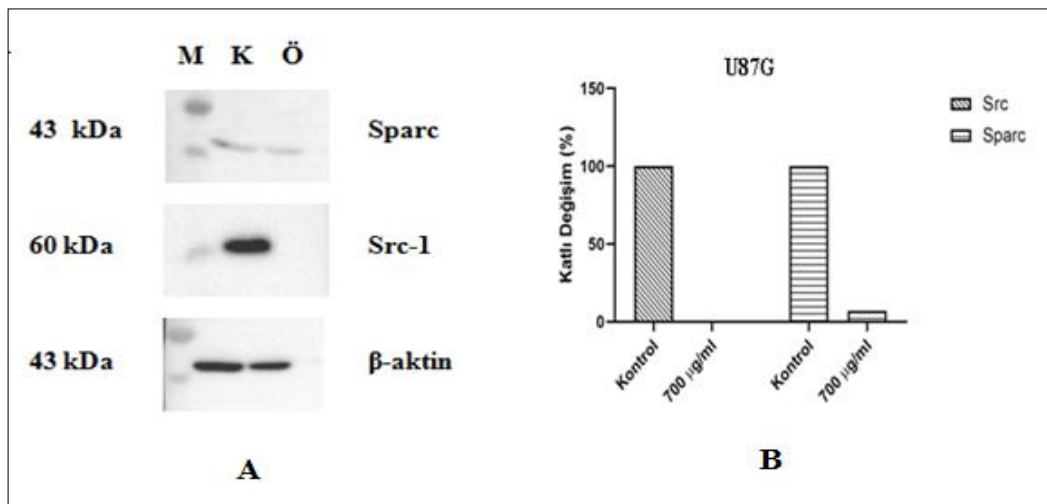
**Şekil 4.6.** MC özütünün U87G hücrelerinde zamana bağlı olarak migrasyon üzerine etkisinin morfolojik görüntüsü.1. Kontrol grubu; 2. Özüt uygulanmış grup; a: 0 sa, b: 24 sa, c:48 sa. (4X-Nikon Eclipse TS100)



**Şekil 4.7.** MC özütünün U87G hücrelerinde zamana bağlı olarak yara kapanma hızı üzerine etkisi

#### 4.5. MC Özütünün U87G Hücre Hattında Sparc ve Src-1 Protein Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisi

MC meyve özütü ile indüklenen U87G hücrelerinde, Src-1'in protein düzeyinde ekspresyon seviyesi üzerine etkisi Western Blot tekniği kullanılarak incelenmiştir. U87G hücrelerinde 700 µg/ml özüt uygulamasının 24 saatin sonunda kontrol grubuna kıyasla Sparc ve Src-1 proteinlerinin ekspresyonunu inhibe ettiği görülmüştür (Şekil 4.8)



**Şekil 4.8:** MC özütünün U87G hücrelerinde Sparc ve Src-1 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi **A.**MC Özütünün U87G Hücrelerinde Protein Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisi (M:marker; K: Özüt uygulanmamış kontrol hücre grubu; Ö: Özüt uygulanmış hücre grubu) **B.** Proteinlerin ekspresyon seviyelerine ait katlı değişimler

## 5. TARTIŞMA

Bitkiler kanser tedavisinde uzun bir kullanım geçmişine sahiptir ve bitki türevli bileşikler, klinik olarak faydalı birçok kanser önleyici ajanın önemli bir kaynağı olmuştur (Cragg ve Newman, 2005). Yeni tekniklerin ortaya çıkmasıyla birlikte doğal bileşiklerle ilgili engeller azaltılmaktadır ve bu doğal bileşenlerin ilaç endüstrisinde kullanımına ilgi de giderek artmaktadır. WHO tarafından dünyanın % 80'inin geleneksel tedavi yöntemlerini kullandığı tahmin edilmektedir. Bununla birlikte, bitkisel bileşikler ilaç olarak düşünüldüğünde, güvenlik ve yan etkiler açısından herhangi bir sorunlarının bulunmadığına inanılmaktadır. Yapılan testlere dayanarak anti-kanser özellik taşıyan bitkilerin kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkilere neden olduğu kanıtlanmıştır (Khan vd., 2020).

Son zamanlardaki araştırmalar, geleneksel tıpta özellikle başta diyabet olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde popüler olarak kullanılan, ekvatorial bir bitki olan *Momordica charantia* üzerine yoğunlaşmıştır. Yapısında bulunan flavonoid, saponin, lektin, protein, steroid, triterpen, fenolik bileşik ve alkaloidlerden dolayı tıbbi olarak kullanılmaktadır (Jha ve Shimpi, 2018). Bu bitki ile yapılan bazı çalışmalar, MC'nin yapısındaki hipoglisemik etki gösteren, anti-tümör ve anti-viral ajanlar olarak hareket eden protein ve metabolitlerin varlığını doğrulamaktadır (Mamoharan vd., 2014; Fang ve Ng, 2011; Li vd., 2009). Örneğin yapısındaki  $\alpha$ -eleostearik asidin MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanserine (Grossman vd., 2009), Kuguasin J'nin LNCaP prostat kanserine (Pitchakarn vd., 2011), Kuguaglikosid C'nin IMR-2 nöroblastoma hücrelerine (Tabata vd., 2012),  $\alpha$ -momorcharinin A549 akciğer kanserine (Fan vd., 2015) karşı etkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Çizelge 5.2 ve Çizelge 5.3). Ayrıca çoklu ilaç direncine sahip KB-V1 servikal karsinoma hücrelerinde MC yaprağı özütü, vinblastinin kanser hücreleri içerisinde birikimini sağlamıştır (Limtrakul vd., 2004). Bunun yanı sıra yapılan birçok çalışmada MC'nin normal hücrelere çok az sitotoksik etki gösterdiği ya da bu hücreler üzerinde hiçbir sitotoksik etkiye sahip olmadığı gösterilmiştir (Ray vd., 2010; Ru vd., 2011; Yung vd., 2015). Bu bulgular, MC'nin yeni bir ilaç geliştirme kaynağı olarak büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Gerçekleştirilen bu çalışmada çeşitli kanser türlerinde terapötik etki gösterdiği kanıtlanmış MC özütünün, karakteristik olarak son derece invaziv, radyo-kemoterapiye dirençli ve anjiyogenik özellik gösteren GBM hücrelerinde, çoklu kanser gelişimi ve

ilerlemesinde etkin bir yere sahip Src-1 proteininin ekspresyonu ve ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalarla anjiyogenez mekanizmasında hem pro-anjiyogenik hem de anti-anjiyogenik etkisi bakımından kritik bir rol üstlenen Sparc proteininin ekspresyonu üzerindeki olası etkilerine odaklanılmıştır.

Elde edilen MTT deneyi sonucu, MC özütünün artan dozlarıyla birlikte U87G hücrelerinin canlılığında azalma gözlemlenmiştir ve MC özütünün  $IC_{50}$  değeri 700  $\mu\text{g/ml}$  olarak belirlenmiştir ( $***p<0.001$ ). U87G hücrelerinde MC özütünün sitotoksik etki göstermesinin, 2012 yılında Wang vd'nin U87G hücrelerinde çalışmış olduğu özüt içeriğindeki özellikle charantagenin D olmak üzere, charantagenin E, momordicaside K, goyaglycoside D ve stismasta-7,25(27)-dien-3 $\beta$ -ol gibi *Cucurbitaceae* ailesine ait triterpen-glikosidlerden (Çizelge 5.2) ve ayrıca Manoharan vd'nin 2014 yılında U87G hücrelerinde çalışmış olduğu özüt içeriğindeki RIP ailesine ait  $\alpha,\beta$ -momorcharin proteininden kaynaklandığı düşünülmektedir (Çizelge 5.3).

Literatürü incelediğimizde, Pitchakarn vd. (2010), PLS-10 prostat kanseri hücrelerinde MC yapraklarından elde ettikleri özütün  $IC_{50}$  aralığını 150-200  $\mu\text{g/ml}$  olarak bulmuşlardır. Kai vd. (2011), yetişkin T hücresi lösemi hücre hatları olan ED, Su9TO1 ve S1T hücrelerinde MC tohumlarından elde ettikleri özütün  $IC_{50}$  değerini sırasıyla 24,5  $\mu\text{g/ml}$ , 0.3  $\mu\text{g/ml}$  ve 85.8  $\mu\text{g/ml}$  olarak bulmuştur. Bir başka çalışmada ise Li vd. (2012), nazofarenks karsinom (Hone-1), gastrik adenokarsinom (AGS), kolon kanseri (HCT-116) ve akciğer kanseri (CL1-0) hücrelerinde MC yapraklarından elde ettikleri özütün  $IC_{50}$  değerini sırasıyla 350  $\mu\text{g/ml}$ , 300  $\mu\text{g/ml}$ , 300  $\mu\text{g/ml}$  ve 250  $\mu\text{g/ml}$  olarak bulmuştur. Yapılan çalışmalarda kanser hücreleri üzerinde öldürücü etkiye sahip olduğu görülen MC özütünün bu çalışmada da U87G hücreleri üzerinde öldürücü etkiye sahip olması literatürle paralel olmakla birlikte mevcut çalışmayı destekler niteliktedir. Literatür ile karşılaştırıldığında belirlenen  $IC_{50}$  değerlerinin farklı olmasının ise, farklı kanser hücrelerinin farklı ortamlarda özüte karşı farklı yanıtlar vermesinden kaynaklanıyor olmasıdır.

Sağkalım analizi sonucunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MC özütünün 24, 48, 72 ve 96 sa. boyunca sırasıyla % 16.6, % 42.6, % 79.3 ve % 91.6'da artan bir öldürücü etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir ( $***p<0.001$ ). Literatürde ise Ray vd. (2010), MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde %2 (v/v)'lik özüt uygulamasının 48. sa. sonunda %80 oranında; Ru vd. (2011), PC3 ve LNCaP prostat

kanseri hücrelerinde %2 (v/v)'lik özüt uygulamasının 96. sa. sonunda %90'dan fazla olacak şekilde ve Dhar vd. (2018), MiaPaCa2 ve PANC1 pankreatik adenokarsinom hücrelerinde 72. saatin sonunda sırasıyla %80-92 ve %69-97 oranında hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini bulmuşlardır. Yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edici etkiye sahip olduğu görülen MC özütünün U87G glioblastoma hücrelerinde de anti-proliferatif etki göstermesi literatür bilgileriyle paraleldir. Bu durum MC özütünün U87G glioblastoma hücreleri için güçlü bir sitotoksik etken olduğunu düşündürmektedir.

Yara iyileşmesi deneyi sonucunda, kontrol grubunda 0. saatte ortalama 601,64 µm olarak kaydedilen yara genişliğinin 24.saat sonunda tamamen kapanırken; MC özütü uygulanan hücrelerde 0. saatte ortalama 497,44 µm olan yara genişliğinin, 24. saatte ortalama 601,08 µm ve 48. saatte ise 733,04 µm olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda hücrelere MC özütü uygulanmasıyla hücre canlılığının azaldığı, yara iyileşmesinin engellendiği ve zamana bağlı olarak yara genişliğinin arttığı tespit edilmiştir ( $***p<0.001$ ) Yara genişliğinin zamana bağlı şekilde artmasının nedeni olarak hücrelerin adeziv özelliklerini kaybetmeleri ve buna bağlı olarak da yüzeyden kolayca kalktıkları düşünülmektedir. Chipps vd. (2012), HCT-116 kolon kanseri ile yaptıkları çalışmada 24 saatin sonunda hücrelerin yüzeyden kalktığını ve total protein kütlelerinde %70 oranında azalma olduğunu gözlemlemiştir. Bu bağlamda, özütün kanser hücrelerine adeziv özellik sağlayan proteinler üzerinde de inhibe edici bir etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir. Pitchakarn vd. (2010), PLS-10 prostat kanseri hücrelerinde 25-50 µg/ml özüt uygulamasının hücrelerin invazyon yeteneğini %49 ile %59 oranında inhibe ettiğini tespit etmiştir. Yung vd. (2015) ise, SKOV3 yumurtalık kanseri hücrelerinde %5 (v/v)'lik özüt uygulamasının yara kapanmasını %40, %10 (v/v)'luk özüt uygulamasının ise yara kapanmasını %50 azalttığını bulmuştur. Yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinde MC özütü zamana bağlı olarak yara genişliğinin açılmasına sebep olmaktadır ve kanser hücrelerinin migrasyon kapasitelerini engellemektedir. Yapılan bu çalışma literatür bilgileriyle paralellik göstermektedir.

Src-1 hücre bölünmesi, hücre hareketi, hücre adezyonu, anjiyogenez ve sağkalım gibi çeşitli fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir yere sahiptir (Calgani vd., 2016). Src-1'in fizyolojik süreçlerde görevli sinyal yollarına doğrudan katılımı ve bu yollar üzerinde moleküler ortakları ile doğrudan ve/veya dolaylı olarak iletişim

kurduğu düşünüldüğünde, kanser tedavisi için kilit bir hedef olarak ortaya çıkmaktadır (Nesoviç vd., 2020). Bu çalışmada MC meyve özütü ile indüklenen U87G hücrelerinde, Src-1'in protein düzeyinde ekspresyon seviyesi üzerine etkisi incelenmiştir. U87G hücrelerinde 700 µg/ml özüt uygulamasının 24 saatin sonunda kontrol grubuna kıyasla Src-1 protein ekspresyonunu tamamen inhibe ettiği görülmüştür. 2012 yılında Hsu-HY vd. 0,6 mg/ml ve 1,25 mg/ml konsantrasyonlarda MC yaprak özütünün CL1-0 ve CL1-5 akciğer kanseri hücreleri üzerinde Src-1 ekspresyonunu ve buna bağlı olarak da hücre invazyonunu azalttığını göstermiştir. Bu durumun Src-1'in invazyondaki moleküler ortağı olan FAK proteinin de ekspresyon seviyesindeki azalmaya bağlı olarak gerçekleştiğini vurgulamışlardır (Çizelge 5.1).

U87G hücrelerinde MC özütünün yara iyileşmesi deneyinde migrasyonu azaltıcı etkisinin literatür bilgilerinin ışığında, Src-1'in sinyal yolları üzerinde moleküler iletişimi sağladığı FAK, PI3K, Akt ve JNK gibi hücre migrasyonu ve invazyonunda görev alan kilit proteinlerle ilgili olabileceği düşünülmektedir. Glioblastoma hücreleri üzerinde MC özütünün başta Src-1 olmak üzere migrasyon ve invazyonda görevli hücre iskeleti düzenleyici proteinler, adezyon proteinleri, ECM ilişki diğer birçok proteinler ile yapılan çalışmaları oldukça kısıtlıdır. Bu bağlamda, MC özütü, glioblastoma ve farklı kanser hücreleri üzerinde hücre migrasyonu ve invazyonunda görevli sinyal yollarında, Src-1 ilişkili proteinlerle yapılacak olan birçok çalışmaya açıktır. Src-1'in inflamasyon ve metabolizma dahil hücre bölünmesi, hücre hareketi, hücre adezyonu, anjiyogenez ve sağkalım olmak üzere tümör mikroçevresi ve tümör gelişiminin ilerlemesinde katkıda bulunduğu moleküler ağları yeniden düzenlemesindeki önemli rolü, Src-1'i kanser ile tedavide ilgi çekici bir stratejik moleküler hedef olarak düşündürmektedir.

Sparc hücre farklılaşması, hücre çoğalması, migrasyon ve ECM ile ilişkili hücrel etkileşimleri modüle etmek gibi birçok biyolojik süreçte çok fonksiyonlu bir proteindir (Gangliano vd., 2006). Sparc, insan glioblastoma hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir ve hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamla hücre invazyonunu uyararak tümör büyümesini geciktiren bir glikoproteindir (Kunigal vd., 2006). Glioblastoma hücrelerinin besin kısıtlaması, hipoksi ve genomik dengesizlik gibi tümörü çevreleyen stres koşulları altında tümör hücresinin hayatta kalmasını kolaylaştırabilir (Gangliano vd., 2006). Bu nedenle, komşu beyin dokusunun tümör hücresi invazyonunda işlevsel

bir role sahip olabilir (Gangliano vd., 2005). U87G hücrelerinde 700 µg/ml özüt uygulaması, 24 saatin sonunda kontrol grubuna kıyasla Sparc'nin protein ekspresyonunu inhibe etmiştir. Yapılan bu çalışma ile Sparc'nin glioblastoma hücrelerinin invazyonuna sağladığı katkının MC özüt uygulaması ile negatif yönde etkilendiği düşünülmektedir. Literatür bilgilerine dayanarak MC özütünün glioblastoma dahil olmak üzere herhangi bir kanser hücresinde Sparc proteininin ekspresyonu üzerine etkisi daha önce araştırılmamıştır. Bu nedenle mevcut çalışma literatüre MC özütü ve Sparc'nin protein ekspresyonu üzerine ilk veriyi sunarak ilerideki çalışmalar için bir ön veri oluşturacaktır.

Kunigal vd., 2006 yılında yapmış oldukları çalışmada, U87G hücreleri üzerinde artırılmış SPARC ekspresyonunun hücre çoğalması üzerinde etkisi olmadığını fakat kontrol hücrelerine kıyasla güçlü bir anjiyogenik yanıtı neden olduğunu göstermişlerdir. Gangliano vd.'nin 2006 yılındaki çalışmalarında, glioblastoma hücrelerinde tümör invazyonu ile ilişkili ECM yeniden şekillenmesinde yer alan MMP-2 ve MMP-9 proteinlerin ekspresyonlarındaki azalmaya bağlı olarak SPARC geninin downregüle olarak düzenlenmesi tümör invazyonunu azaltıcı yönde etkilemiştir. Yine Gangliano vd. 2005 yılında, glioblastoma hücrelerinde Resveratrol etkisiyle MMP-2 ve SPARC ekspresyonunun downregüle düzenlendiğini göstererek SPARC'nin hücre invazyonunu azaltıcı rolünü incelemiştir.

Literatür çalışmaları göz önünde bulundurulduğunda glioblastoma hücrelerinde SPARC geninin ekspresyonunun artması ECM ile ilişkili olarak hücre adezyonunu azaltıcı ve tümör invazyonunu artıcı yöndedir. Bu bağlamda, yapılan bu çalışma ele alındığında yara iyileşmesi deneyinde hücre göçünün azalması ve hücrelerin adeziv özelliklerini kaybedip zamana bağlı olarak yara genişliğinin açılması durumunun MC özütünün Sparc ekspresyonu üzerindeki etkisinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Buna ek olarak literatür verilerinde MMP proteinleri ile Sparc ilişkisi tartışılmıştır. Çizelge 5.1 ve Çizelge 5.2'de verilen literatür özetine göre bazı kanser türlerinde bu proteinler üzerine çalışmalar mevcuttur. Literatür bilgileri incelendiğinde, yapılan mevcut çalışmada Sparc'nin özüt etkisiyle hücre migrasyonu ve invazyonu üzerindeki etkisini bu proteinler üzerinden de gerçekleştirebileceği düşünülmektedir. Bu bağlamda MC özütü başta glioblastoma olmak üzere diğer kanser hücrelerinde Sparc ve ECM ilişkili proteinlerle yapılacak olan birçok çalışmaya açıktır.

Ayrıca Sparc'nin glioblastoma hücrelerinde besinsiz ve hipoksik ortamda dahi hücre sağkalımını indüklemesi, hücrelerin apoptotik hızında azalma ve hücre ölümüne direnç gösterme mekanizmalarını etkilemesinden dolayı Sparc, kanser tedavi stratejilerinin tasarlanması için önemli bir hedef olarak göze çarpmaktadır.



**Çizelge 5.1: MC Özütünün Farklı Kanserler Üzerine Etkileri**

| KANSER TİPİ           | ÖZÜT                   | KANSER MODELİ           | ANTİ-KANSER ETKİ  | HEDEF PROTEİNLER/GENLER  | REFERANS                                    |                        |
|-----------------------|------------------------|-------------------------|---|--|---|------------------------|
| <b>Adrenokortikal</b> | Meyve suyu özütü       | H295R<br>YL-1           | Hücre canlılığında azalma   | cleavage PARP ↑<br>cas3 aktivasyonu ↑<br>p-AKT (Ser473) ↓<br>cleavage cas9 ↑ | p-CDK7 ↓<br>p-ERK1/2 ↓<br>P53 ↑<br>CDNK1A ↑ | Brennan vd., 2012.     |
| <b>Akciğer</b>        | Yaprak özütü (Metanol) | A-549<br>CL1-0<br>CL1-5 | Hücre canlılığında azalma<br>Hücre migrasyonunda azalma   | p-Src ↓<br>p-FAK ↓<br>B-katenin ↓  | AKT ↓<br>Wnt-2 ↑                            | Hsu vd., 2012.         |
|                       | Yaprak özütü (Metanol) | CL1-0                   | Hücre canlılığında azalma<br>Hücre döngüsünü durdurma<br>DNA hasarı                                   | pro-cas3 ↓<br>PARP (85) ↑  | Bax ↑<br>Bcl-2 ↓                            | Li vd., 2012.          |
|                       | Meyve özütü (AgNp)     | A-549                   | Hücre canlılığında azalma   |  |   | Jha ve Shimpi, 2018.   |
|                       | Sulu özüt              | A-549<br>MRC-5          | Hücre canlılığında azalma   | cas3/7 aktivitesi ↑<br>ROS aktivitesi ↑<br>P53 ekspresyonu ↑                 |   | Thiagarajan vd., 2019. |
| <b>Kolon</b>          | Metanol ve sulu özüt   | Caco-2                  | Hücre içerisine ilaç alımının artması<br>Hücre içinden ilaç akışının azalması<br>P-gp'nin inhibisyonu |  |   | Konishi vd., 2004.     |
|                       | Yaprak özütü (Metanol) | HCT-116                 | Hücre canlılığında azalma<br>Hücre döngüsünü durdurma<br>DNA hasarı                                   | pro-cas3 ↓<br>PARP (85) ↑  | Bax ↑<br>Bcl-2 ↓                            | Li vd., 2012.          |

**Çizelge 5.1:** Devam Ediyor

| KANSER TİPİ         | ÖZÜT                    | KANSER MODELİ             | ANTI-KANSER ETKİ   | HEDEF PROTEİNLER/GENLER                          | REFERANS                              |  |                       |
|---------------------|-------------------------|---------------------------|--|--|---------------------------------------|--|-----------------------|
| <b>Lösem</b>        | Çekirdek özütü (Etanol) | Su9T01<br>HU102<br>Jurkat | Hücre canlılığında azalma  |  | Kai vd., 2011.                        |  |                       |
| <b>Meme kanseri</b> | Meyve suyu özütü        | MCF-7<br>MDA-MB-231       | Hücre canlılığında azalma<br>Hücre döngüsünün tutuklanması           | cleavage PARP ↑<br>cas3 ↑<br>cas7 ↑<br>Claspin ↓ | Bax ↑<br>Bcl-2 ↓<br>cIAP-I ↓<br>P21 ↑ | Siklin B1 ↓<br>Siklin D1 ↓<br>P53 ↑<br>P27 ↑ | Ray vd., 2010.        |
| <b>Mide</b>         | Yaprak özütü (Metanol)  | AGS                       | Hücre canlılığında azalma<br>Hücre döngüsünü durdurma<br>DNA hasarı  | pro-cas3 ↓<br>PARP (85) ↑                        | Bax ↑<br>Bcl-2 ↓                      |  | Li vd., 2012.         |
| <b>Nazofaringal</b> | Yaprak özütü (Metanol)  | Hone-1                    | Hücre canlılığında azalma<br>Hücre döngüsünü durdurma<br>DNA hasarı  | pro-cas3 ↓<br>PARP (85) ↑                        | Bax ↑<br>Bcl-2 ↓                      |  | Li vd., 2012.         |
| <b>Pankreas</b>     | Meyve suyu özütü        | AsPC-1<br>MiaPaCa2        | Hücre canlılığında azalma  | p-AKT ↓<br>p-PTEN ↓                              | p-PI3K ↓<br>p-ERK1/2                  |  | Somasagara vd., 2015. |
| <b>Prostat</b>      | Yaprak özütü (Etanol)   | PLS-10                    | Hücre canlılığında azalma<br>Hücre migrasyonu ve invazyonunda azalma | MMP-2 ↓<br>MMP-9 ↓                               | TIMP-2 ↑<br>Kolajenaz IV ↓            |  | Pitchakarn vd., 2010  |

**Çizelge 5.1: Devam Ediyor**

| KANSER TİPİ       | ÖZÜT                         | KANSER MODELİ                       | ANTI-KANSER ETKİ  | HEDEF PROTEİNLER/GENLER   | REFERANS  |                       |
|-------------------|------------------------------|-------------------------------------|---|---|---|-----------------------|
| <b>Servikal</b>   | Yaprak, meyve ve saçak özütü | KB-V1<br>KB-3-1                     | İlaç direncini inhibe ederek tersine çevirme<br>P-gp'ye bağlanma<br>İlaç birikiminin hücre içerisinde artması                   |   | Pitchakarn vd., 2012b.; Limtrakul vd., 2004.                                      |                       |
| <b>Yumurtalık</b> | Meyve suyu özütü (Etanol)    | PC-3<br>LNCaP                       | Hücre canlılığında azalma<br>Hücre döngüsünü durdurma   | Siklin E ↓<br>Siklin D1 ↓<br>p-p38MAPK ↑<br>P21 ↑<br>p-ERK1/2 ↑             | cleavage PARP ↑<br>cleavage cas3 ↑<br>cleavage cas7 ↑<br>cleavage cas9 ↑<br>Bax ↑ | Ru vd., 2011.         |
|                   | Yaprak özütü (Etanol)        | LNCaP<br>PNT1A                      | Hücre döngüsünün durdurulması<br>Apoptotik hücre yoğunluğunun artması<br>Normal hücrelerde daha az sitotoksik etki              | AR ↓<br>P53 ↑<br>PCNA ↓<br>Bcl-2 ↓<br>cleavage cas3 ↑                       | PSA ↓<br>Siklin D1 ↓  | Pitchakarn vd., 2011. |
|                   | Meyve suyu özü               | A2780cp<br>A2780s<br>C13*<br>OV2008 | Hücre canlılığında azalma<br>Tümör koloni oluşumunda azalma<br>Hücre döngüsünü durdurma<br>Migrasyon ve invazyon hızını azaltma | cleavage PARP ↑<br>cleavage cas-3 ↑<br>p-SAPK/JNK ↑<br>p-c-Jun ↑<br>p-p38 ↑ | p-mTOR ↓<br>p-AKT ↓<br>p-ERK ↓<br>p-70S6K ↓<br>p-HSP27 ↑                          | Yung vd., 2015.       |

**Çizelge 5.2. MC Özütü Bileşenlerinin Farklı Kanseler Üzerine Etkileri**

| BİLEŞENLER  | KANSER TİPİ                  | ANTİKANSER ETKİ             | HEDEF PROTEİNLER   | REFERANS  |                      |
|---|------------------------------|-----------------------------|--|---|----------------------|
| <b>3β,7β-dihydroxy-25-methoxycucurbita-5,23-diene-19-al (DMC)</b> | MCF-7<br>MDA-MB-231          | Hücre canlılığının azalması | Cleavage PARP ↑<br>Cas-9 aktivasyonu ↑<br>Bcl-2 ↓<br>Beclin1 ↑<br>p-AKT (Thr308)↓<br>p-AKT (Ser473)↓                           | Siklin D1 ↓<br>p-mTOR ↓<br>NF-kβ (p65)↓<br>ERα ↓<br>XIAP ↓<br>HIF1α ↑         | Weng vd., 2013.      |
| <b>3β,7β,25-trihidroksicucurbita-5,23(E)-dien-19-al (TCD)</b>     | MCF-7                        | Hücre canlılığının azalması | Cleavage PARP ↑<br>Cleavage cas-3 ↑<br>Cleavage cas-9 ↑<br>p-AKT (Thr308)↓<br>p-AKT (Ser473)↓<br>NF-kβ ↓<br>p-ERK↓<br>p-MDM2 ↓ | p-P38 ↑<br>p-P53 ↑<br>HDAC1 ↓<br>HDAC2 ↓<br>HDAC3 ↓<br>HDAC4 ↓<br>Asetil H3 ↑ | Bai vd., 2016.       |
| <b>5β,19-epoxy-19-methoxycucurbita-6,23-dien-3β,25-diol</b>       | PC-3<br>SCC2095<br>MCF-7     | Hücre canlılığının azalması | MCF-7 hücrelerinde;<br>Siklin D1 ↓<br>CDK-6 ↓<br>p-P53 ↑   | HDAC1 ↓<br>Asetil Histon H3 ↑   | Weng vd., 2017.      |
| <b>α-Eleostearic acid</b>   | HL-60<br>HT-29<br>CaCo-2     | Hücre canlılığının azalması |  |   | Kobori vd., 2008.    |
|   | MDA-MB-231<br>MDA-MB-231-ERα | Hücre canlılığının azalması |  |   | Grossmann vd., 2009. |

**Çizelge 5.2: Devam Ediyor**

| BİLEŞENLER  | KANSER TİPİ           | ANTİKANSER ETKİ  | HEDEF PROTEİNLER  | REFERANS  |                           |
|---|-----------------------|--|---|---|---------------------------|
| <b>Kuguacin J</b>   | LNCaP<br>PNT1A        | Hücre döngüsünün durdurulması<br>Apoptotik hücre yoğunluğunun artması<br>Normal hücrelere daha düşük sitotoksik etki     | Cleavege cas3 ↑<br>Survivin ↓<br>Cleavege PARP↑<br>Siklin D1 ↓<br>Siklin E ↓<br>Bad ↑ | P21 ↑<br>P27 ↑<br>Cdk2 ↓<br>Cdk4 ↓<br>P53 ↑<br>Bcl-xL ↓ | Pitchakarn vd.,<br>2011.  |
|   | PC-3                  | Hücre döngüsünün durdurulması<br>Apoptotik hücre yoğunluğunun artması<br>Hücre migrasyon ve invazyonunun inhibe edilmesi | Survivin ↓<br>Cleavege cas3 ↑<br>Cleavege PARP ↑<br>Siklin D1 ↓                       | Cdk2 ↓<br>Cdk4 ↓<br>MMP-2 ↓<br>MMP-9 ↓                  | Pitchakarn vd.,<br>2012a. |
|   | KB-V1 (MDR)<br>KB-3-1 | İlaç direncini inhibe etme<br>P-gp'ye bağlanma<br>Radyoaktif işaretli ilaç birikiminin hücre içerisinde artması          |   |   | Pitchakarn vd.,<br>2012b. |
|   | SKOV3<br>A2780        | İlaç direncini inhibe etme<br>Apoptotik hücre yoğunluğunun artması   | Survivin ↓<br>Cleavege cas3 ↑<br>Cleavege PARP ↑                                      |   | Pitchakarn vd.,<br>2017.  |
| <b>Kuguaglycoside C</b>   | IMR-2                 | Hücre canlılığının azalması  | TRADD ↑<br>RIP ↓  | Survivin ↓<br>DFF45 ↑                                   | Tabata vd., 2012          |
| <b>Charantagenin D</b><br><b>Charantagenin E</b><br><b>Kuguaglycoside C</b><br><b>Momordicoside K</b> | A-549<br>U87G         | Hücre canlılığının azalması  |   |   | Wang , 2012.              |

**Çizelge 5.3: MC Özüt İçeriğindeki Proteinlerin Farklı Kanseler Üzerine Etkileri**

| PROTEİNLER  | KANSER TİPİ  | ANTİKANSER ETKİ  | HEDEF PROTEİNLER   | REFERANS   |                |
|---|--|--|--|--|----------------|
| <b>A-momorcharin</b>  | CNE-2<br>HONE-1<br>NP69                                | Hücre büyümesinin azalması<br>Hücre döngüsü durdurulması<br>Tümör koloni oluşumunun azalması | HIF1 $\alpha$ ↓<br>VEGF ↓<br>p-ERK ↓<br>RIP1 ↓<br>CHOP ↓ | Cleavege cas3 ↑<br>Cleavege cas8 ↑<br>Cleavege cas9 ↑<br>p-GSK3 $\alpha$ (Ser 21) ↓<br>p-GSK3 $\beta$ (Ser9) ↓ | Pan vd., 2014. |
|   | MDA-MB-231<br>MCF-7<br>MDA-MB-453                      | Hücre büyümesinin azalması<br>Hücre döngüsü durdurulması                                     | Cas3 aktivitesi ↑  | Cao vd., 2015.   |                |
|   | A-549<br>HEPG2   | Hücre büyümesinin azalması<br>Hücre döngüsü durdurulması<br>DNA hasarı                       |  | Fan vd., 2015.   |                |
| <b>A-<math>\beta</math>-momorcharin</b>                         | A549<br>1321N1<br>Gos-3<br>U87G<br>Sk Mel<br>Weri Rb-1 | Hücre büyümesinin azalması   | Cas3 ↑<br>Cas9 ↑<br>Sitokrom c salınımı ↑                | Manoharan. vd.,<br>2014.   |                |
| <b>BG-4</b>   | HCT-116<br>HT-29                                       | Hücre büyümesinin azalması<br>Tümör koloni oluşumunun azalması                               | Bax ↑<br>Cas3 ↑<br>Bcl-2 ↓<br>XIAP ↓<br>CDK2 ↓           | Dia. ve Krishnan,<br>2016.   |                |
| <b>Protein P-B ve pentatrikopeptid tekrar içeren proteinler</b> | SGC-7901   | Hücre büyümesinin azalması   |  | Li Y. vd., 2012.   |                |

**Çizelge 5.3:** Devam ediyor

| PROTEİNLER    | KANSER TİPİ                               | ANTİKANSER ETKİ  | HEDEF PROTEİNLER  | REFERANS   |                  |
|---------------|---|--|---|--|------------------|
| <b>Lektin</b> | CNE-1<br>CNE-2                            | Hücre büyümesinin azalması<br>Hücre döngüsü durdurulması<br>NO üretiminde artış  | Siklin D1 ↓<br>p-RB ↓<br>p-p38MAPK ↑<br>Cleavege PARP ↑                                 | cas3 ↑<br>cas8 ↑<br>cas9 ↑<br>cyto c ↑             | Fang vd., 2011b  |
|               | HEPG2<br>PLC/PRF/5                        | Hücre büyümesinin azalması<br>Hücre döngüsü durdurulması<br>Tümör koloni oluşumunda azalma<br>DNA hasarı                           | P21 ↓<br>P53 ↓<br>LC3-II ↑<br>Cleavege PARP ↑<br>p-p38MAPK ↑                            | cas3 ↑<br>cas8 ↑<br>cas9 ↑<br>p-JNK ↑              | Zhang vd., 2014. |
| <b>MAP-30</b> | LoVo                                      | Hücre büyümesinin azalması<br>Hücre döngüsü durdurulması<br>DNA hasarında artış<br>Apoptotik hücre yoğunluğunda artış              | Bcl-2 ↓<br>Bax ↑  |  | Fan vd., 2008.   |
|               | LNCaP<br>PC-3<br>PIN<br>RWPE-1            | Hücre büyümesinin azalması<br>Hücre döngüsü durdurulması<br>Apoptozun indüklenmesi<br>Normal prostat hücreleri üzerinde etkisi yok | Cleavege cas3 ↑<br>Cleavege cas 8 ↑<br>Cleavege PARP ↑<br>c-Myc ↓                       | p-AKT ↓<br>p-GSK3β ↓<br>p-β-katenin ↑<br>PTEN ↑    | Xiong vd., 2009. |
|               | A-549<br>HEPG2                            | Hücre büyümesinin azalması<br>Hücre döngüsü durdurulması<br>DNA hasarı   |   |  | Fan vd., 2015.   |
|               | HL-60<br>THP-1<br>Primer AML<br>hücreleri | Hücre büyümesinin azalması<br>Apoptozun indüklenmesi<br>Otofajinin inhibisyonu   | Cleavege cas3 ↑<br>Cleavege cas 8 ↑<br>Cleavege cas9 ↑<br>Cleavege PARP ↑<br>Survivin ↓ | P62 ↑<br>Beclin1 ↓<br>LC3-II ↓<br>Bax ↑<br>Bcl-2 ↓ | Qian vd., 2016.  |

**Çizelge 5.3:** Devam ediyor

| PROTEİNLER      | KANSER TİPİ | ANTİKANSER ETKİ   | HEDEF PROTEİNLER   | REFERANS         |
|-----------------|-------------|---|--|------------------|
| <b>MAP-30</b>   | HEPG2       | Hücre büyümesinin azalması<br>Hücre döngüsünün durdurulması<br>Tümör koloni oluşumunda azalma<br>DNA hasarı | P53 ↓<br>Cas3/8/9 ↑<br>Cleavege PARP ↑<br>Bcl-2 ↓<br>p-AKT ↑<br>p-ERK ↑<br>p-p38MAPK ↑               | Fang vd., 2012a. |
| <b>Rnaz MC2</b> | MCF-7       | Hücre büyümesinin azalması  | p-AKT ↑<br>p-JNK1 ↑<br>Bak ↑<br>Clavege cas3/7/8/9 ↑<br>Clavege PARP ↑                               | Fang vd., 2011a. |
|                 | HEPG2       | Hücre büyümesinin azalması<br>Hücre döngüsü durdurulması<br>Tümör koloni oluşumunda azalma<br>DNA hasarı    | P53 ↓<br>P21 ↓<br>Cas3/8/9 ↑<br>Cleavege PARP ↑<br>Bcl-2 ↓<br>Bak ↑<br>p-AKT ↑<br>p-ERK ↑<br>p-JNK ↑ | Fang vd., 2012b. |

## 6. SONUÇ

Yapısındaki birçok bileşikten dolayı geleneksel tıpta uzun yıllar boyunca kullanılan *Momordica charantia*, yapılan çalışmada U87G hücreleri üzerinde anti-tümör etki göstermiş olup; kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahiptir ve hücre çoğalmasını doza bağlı olarak azaltmıştır. Ayrıca hücre çoğalması, migrasyon, invazyon ve anjiyogenez dahil olmak üzere birçok biyolojik süreçte görev alan Src-1 ve Sparc proteinlerinin ekspresyon seviyelerini inhibe ederek hücrelerin yapışkan özelliklerini kaybetmesini sağlamış ve hücre invazyonunu da azaltıcı yönde etki göstermiştir.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışmada ve literatür çalışmalarında MC özütleri yapısındaki birçok aktif bileşenlerden dolayı umut verici etkiler sergilemiştir. Bununla birlikte, birçok durumda bu benzersiz özelliklere katkıda bulunan çoğu aktif moleküller halen tam olarak araştırılmamış ve kanser hücreleri üzerindeki olası etkileri çalışılmamıştır. MC özütü içerisindeki aktif bileşenlerin tamamen tanımlanması, daha iyi ve etkili ilaçların geliştirilmesine yol açabilecek farmakokinetik, toksisite, metabolizma ve maliyet açısından da düşük izolasyon ve sentezlerinin daha net bir şekilde anlaşılmasına yol açacaktır. Ayrıca MC'nin *in vivo* tümör aktivitelerini değerlendirmek ve altta yatan etki mekanizmalarını anlayabilmek için daha fazla farmakolojik çalışmalara da ihtiyaç vardır.

Sparc'nin bakır bağlayıcı bölgesi ile kanser hücrelerinde anjiyogenik etki göstermesinden dolayı, MC özütünün bakır bağlayıcı proteinler üzerindeki etkisinin ve bu proteinler ile Sparc arasındaki ilişkiyi nasıl etkilediğinin ortaya konulması gerekmektedir. Bunlara ek olarak hücre yapışkanlığı, hücre hareketi, migrasyon ve invazyon gibi fizyolojik süreçlerde rol oynayan Sparc ve Src-1 proteinlerinin bu süreçlerde sinyal yolları üzerinden moleküler ortağı olabilecek hedef protein ve/veya genler ile ilişkisinin ortaya konması da gerekmektedir. Bu nedenle daha fazla *in vitro* çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bununla birlikte GBM üzerinde tedavi edici yönden gerek özütün gerekse özüt içerisindeki bileşenlerin avantajlarının daha net ortaya konulması açısından günümüzde GBM tedavisinde mevcut olarak kullanılan FDA onaylı Temozolomide (TMZ) ile karşılaştırmalı çalışılması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abdelmaksoud, B.A. (2016). Updates in Genetic Molecular Targeted Therapy for Glioblastoma. *Cancer and Oncology Research*, 4(1): 1-15.
- Agnihotri, S., Burrell, K. E., Wolf, A., Jalali, S., Hawkins, C., Rutka, J. T., & Zadeh, G. (2012). Glioblastoma, a Brief Review of History, Molecular Genetics, Animal Models and Novel Therapeutic Strategies. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 61(1).
- Ahluwalia, M. S., Groot, J. de, Liu, W. ve Gladson, C. L. (2010). Targeting SRC in glioblastoma tumors and brain metastases: Rationale and preclinical studies. *Cancer Letters*, 298(2), 139–149.
- Ahmed, S. I., Bareeqa, B. S. ve Samar, S. S.(2018). Re-expression of the p53 Gene by Inhibiting the Mdm-2 Receptor in Wildtype p53 Tumors for the Treatment of Glioblastoma: A Mini Review. *Cureus.*, 10(7).
- Akturk, O., Kismet, K., Yasti, A. C., Kuru, S., Duymus, M. E., Kaya, F., Caydere, M., Hucumenoğlu, S. ve Keskin, D. (2016). Wet electrospun silk fibroin/gold nanoparticle 3D matrices for wound healing applications. *RSC Advances*, 16:13234–13250.
- An, Z., Aksoy, O., Zheng, T., Fan, Q.-W., & Weiss, W. A. (2018). Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: signaling pathways and targeted therapies. *Oncogene*, 37(12), 1561–1575.
- Bai, L.-Y., Chiu, C.-F., Chu, P.-C., Lin, W.-Y., Chiu, S.-J., & Weng, J.-R. (2016). A triterpenoid from wild bitter melon inhibits breast cancer cells. *Scientific Reports*, 6(1).
- Banan, R. ve Hartmann, C. (2017). The new WHO 2016 classification of brain tumors- what neurosurgeons need to know. *Acta Neurochirurgica*, 159(3), 403–418.
- Behling, F. ve Schittenhelm J. (2019). Oncogenic BRAF Alterations and Their Role in Brain Tumors. *Cancers*, 11(6), 794.
- Belousov, A., Titov, S., Shved, N., Garbuz, M., Malykin, G., Gulaia, V., Kumeiko, V. (2019). The Extracellular Matrix and Biocompatible Materials in Glioblastoma Treatment. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7.

### KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Binabaj, M. M., Bahrami, A., ShahidSales, S., Joodi, M., Joudi Mashhad, M., Hassanian, S. M., Anvari K. ve Avan, A. (2017). The prognostic value of MGMT promoter methylation in glioblastoma: A meta-analysis of clinical trials. *Journal of Cellular Physiology*, 233(1), 378–386.
- Bortolotti, M., Mercatelli, D. ve Polito, L. (2019). *Momordica charantia*, a Nutraceutical Approach for Inflammatory Related Diseases *Front Pharmacol.*, 10: 486.
- Boyineni, J., Tanpure, S., Gnanamony, M., Antony, R., Fernández, K.S., Lin, J., Pinson, D., Gondi, C. S. (2016). SPARC overexpression combined with radiation retards angiogenesis by suppressing VEGF-A via miR-410 in human neuroblastoma cells. *International Journal Of Oncology* , 1394-1406.
- Bradshaw, A.D. ve Sage, E. H. (2001) SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *Clin Invest.* 107(9):1049-054.
- Brennan, V. C., Wang, C.-M., & Yang, W.-H. (2012). Bitter Melon (*Momordica charantia*) Extract Suppresses Adrenocortical Cancer Cell Proliferation Through Modulation of the Apoptotic Pathway, Steroidogenesis, and Insulin-Like Growth Factor Type 1 Receptor/RAC- $\alpha$  Serine/Threonine-Protein Kinase Signaling. *Journal of Medicinal Food*, 15(4), 325–334.
- Calgani, A., Vignaroli, G., Zamperini, C., Coniglio, F., Festuccia, C., Dicesare, E., Gravina, G.L., Mattei, C., Vitale, F., Schenone, S., Botta, M. ve Angelucci A.(2016). Suppression of SRC Signaling Is Effective in Reducing Synergy between Glioblastoma and Stromal Cells. *Mol Cancer Ther*, 15(7):1535-44.
- Cao, D., Sun, Y., Wang, L., He, Q., Zheng, J., Deng, F., Deng, S., Chang, S., Yu, X., Li, M., Meng, Y., Jin, J. ve Shen, F. (2015). Alpha-momorcharin ( $\alpha$ -MMC) exerts effective anti-human breast tumor activities but has a narrow therapeutic window in vivo. *Fitoterapia*, 100. 139–149.
- Carrasco-García, E., Saceda, M., & Martínez-Lacaci, I. (2014). Role of Receptor Tyrosine Kinases and Their Ligands in Glioblastoma. *Cells*, 3(2), 199–235.

### KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Chipps, E. S., Jayini, R., Ando, S., Protzman, A. D., Muhi, M. Z., Mottaleb, M.A., Malkawi, A. ve Islam R. (2012). Cytotoxicity Analysis of Active Components in Bitter Melon (*Momordica Charantia*) Seed Extracts Using Human Embryonic Kidney and Colon Tumor Cells. *Nat. Prot. Common*, 7 (9), 1203-8.
- Chlenski, A., Liu, S., Baker, L. J., Yang, Q., Tian, Y., Salwen, H. R., & Cohn, S. L. (2004). Neuroblastoma Angiogenesis Is Inhibited with a Folded Synthetic Molecule Corresponding to the Epidermal Growth Factor-Like Module of the Follistatin Domain of SPARC. *Cancer Research*, 64(20), 7420–7425.
- Chlenski, A., & Cohn, S. L. (2010). Modulation of matrix remodeling by SPARC in neoplastic progression. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21(1), 55–65.
- Cirotti, C., Contadini, C., & Barilà, D. (2020). SRC Kinase in Glioblastoma: News from an Old Acquaintance. *Cancers*, 12(6), 1558.
- Corsi, L., Mescola, A., & Alessandrini, A. (2019). Glutamate Receptors and Glioblastoma Multiforme: An Old “Route” for New Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1796.
- Cragg, G., M. ve Newman, D. J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 72–79.
- Crespo, I., Vital, A. L., Gonzalez-Tablas, M., Patino, M. del C., Otero, A., Lopes, M. C., Oliveria C., Domingues P., Orfao A. ve Tabernero, M. D. (2015). Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. *The American Journal of Pathology*, 185(7), 1820–1833.
- Cruickshanks, N., Zhang, Y., Yuan, F., Pahuski, M., Gibert, M., & Abounader, R. (2017). Role and Therapeutic Targeting of the HGF/MET Pathway in Glioblastoma. *Cancers*, 9(12), 87.
- De Groot, J., & Milano, V. (2009). Improving the prognosis for patients with glioblastoma: the rationale for targeting Src. *Journal of Neuro-Oncology*, 95(2), 151–163.

**KAYNAKLAR (Devam Ediyor)**

- Delgado-Lo'pez<sup>1</sup>, P. D. ve Corrales-García, E. M. (2016). Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment. *Clin Transl Oncol*, 18: 1062–1071.
- De Robles, P., Fiest, K. M., Frolkis, A. D., Pringsheim, T., Atta, C., St. Germaine-Smith, C., Day L, Lam D. ve Jette, N. (2014). The worldwide incidence and prevalence of primary brain tumors: a systematic review and meta-analysis. *Neuro-Oncology*, 17(6), 776–783.
- Dhar, D., Deep, G., Kumar, S., Wempe, M. F., Raina, K., Agarwal, C., & Agarwal, R. (2018). Bitter melon juice exerts its efficacy against pancreatic cancer via targeting both bulk and cancer stem cells. *Molecular Carcinogenesis*, 57(9), 1166–1180.
- Dia, V. P. ve Krishnan, H. B. (2016). BG-4, a novel anticancer peptide from bitter gourd (*Momordica charantia*), promotes apoptosis in human colon cancer cells. *Scientific Reports*, 6(1).
- Ebrahim, A. M., Alnajjar, A. O., Mohammed, M. E., Idris, A. M., Mohammed, M. E. A., & Michalke, B. (2019). Investigation of total zinc contents and zinc-protein profile in medicinal plants traditionally used for diabetes treatment. *BioMetals*.
- Eroğlu, O., Kaya, H., Çelik, E., Korkut, E. ve Nizam N. (2019). Triple Effect of Doxorubicin, 5-Fluorouracil, Propranolol on Cell Survival on MCF-7 Breast Cancer Cell Line. *Journal of Biosciences and Medicines*, 7:74-85.
- Fan, J.-M., Luo, J., Xu, J., Zhu, S., Zhang, Q., Gao, D.-F., Xu, Y. ve Zhang, G.-P. (2008). Effects of Recombinant MAP30 on Cell Proliferation and Apoptosis of Human Colorectal Carcinoma LoVo Cells. *Molecular Biotechnology*, 39(1), 79–86.
- Fan, X., He, L., Meng, Y., Li, G., Li, L. (2015).  $\alpha$ -MMC and MAP30, two ribosome-inactivating proteins extracted from *Momordica charantia*, induce cell cycle arrest and apoptosis in A549 human lung carcinoma cells. *Molecular Medicine Reports*, 11(5), 3553–3558.

### KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Fang, E. F. ve Ng, T. (2011). Bitter Gourd (*Momordica charantia*) is a Cornucopia of Health: A Review of its Credited Antidiabetic, Anti-HIV, and Anti-tumor Properties. *Current Molecular Medicine*, 11(5), 417–436.
- Fang, E. F., Zhang, C. Z. Y., Fong, W. P., & Ng, T. B. (2011a). RNase MC2: a new *Momordica charantia* ribonuclease that induces apoptosis in breast cancer cells associated with activation of MAPKs and induction of caspase pathways. *Apoptosis*, 17(4), 377–387.
- Fang, E. F., Zhang, C. Z. Y., Ng, T. B., Wong, J. H., Pan, W. L., Ye, X. J., Chan, Y. ve Fong, W. P. (2011b). *Momordica Charantia* Lectin, a Type II Ribosome Inactivating Protein, Exhibits Antitumor Activity toward Human Nasopharyngeal Carcinoma Cells In Vitro and In Vivo. *Cancer Prevention Research*, 5(1), 109–121.
- Fang, E. F., Zhang, C. Z. Y., Wong, J. H., Shen, J. Y., Li, C. H., & Ng, T. B. (2012a). The MAP30 protein from bitter gourd (*Momordica charantia*) seeds promotes apoptosis in liver cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Letters*, 324(1), 66–74
- Fang, E. F., Zhang, C. Z. Y., Zhang, L., Fong, W. P., & Ng, T. B. (2012b). *In vitro* and *in vivo* anticarcinogenic effects of RNase MC2, a ribonuclease isolated from dietary bitter gourd, toward human liver cancer cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(8), 1351–1360.
- Fang E. F., Froetscher L., Scheibye-Knudsen M., Bohr V. A., Wong J. ve Ng T. B .(2019). Emerging Antitumor Activities of the Bitter Melon (*Momordica Charantia*). *Curr Protein Pept Sci.*, 20(3): 296-301.
- Gleeson, J. P., Keane, F., Keegan, N. M., Mammadov, E., Harrold, E., Alhusaini, A., Harte J., Eakin-Love A., O'Halloran P., MaNally S., Hennessy B:, Breathnach O., Grogan L. ve Morris, P. G. (2019). Similar overall survival with reduced vs. standard dose bevacizumab monotherapy in progressive glioblastoma. *Cancer Medicine*.

**KAYNAKLAR (Devam Ediyor)**

- Gagliano, N., Moscheni, C., Torri, C., Magnani, I., Bertelli, A. A., & Gioia, M. (2005). Effect of resveratrol on matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) on human cultured glioblastoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 59(7), 359–364.
- Gagliano, N., Moscheni, C., Torri, C., Magnani, I., Bertelli, A. A. E., Nowicky, W., & Gioia, M. (2006). Effect of Ukrain on matrix metalloproteinase-2 and Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) expression in human glioblastoma cells. *Anti-Cancer Drugs*, 17(2), 189–194.
- Guarino, M. (2009). Src signaling in cancer invasion. *Journal of Cellular Physiology*, 15-26.
- Grossmann, M. E., Mizuno, N. K., Dammen, M. L., Schuster, T., Ray, A., & Cleary, M. P. (2009). Eleostearic Acid Inhibits Breast Cancer Proliferation by Means of an Oxidation-Dependent Mechanism. *Cancer Prevention Research*, 2(10), 879–886.
- Hsu, H.-Y., Lin, J.-H., Li, C.-J., Tsang, S.-F., Tsai, C.-H., Chyuan, J.-H., Chiu, S. ve Chuang, S.-E. (2012). Antimigratory Effects of the Methanol Extract from *Momordica charantia* on Human Lung Adenocarcinoma CL1 Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1–12.
- Jawhari, S., Ratinaud, M.-H., & Verdier, M. (2016). Glioblastoma, hypoxia and autophagy: a survival-prone “ménage-à-trois.” *Cell Death & Disease*, 7(10).
- Jha, M., & Shimpi, N. G. (2018). Green synthesis of zero valent colloidal nanosilver targeting A549 lung cancer cell: *in vitro* cytotoxicity. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(1), 115–124.
- Juan, B., Ying Z. ve Ying D.(2017). Bitter Melon Powder Protects Against Obesity-associated Fatty Liver Disease by Improving Colonic Microenvironment in Rats With High-fat Diet-induced Obesity. *Biomedical and Environmental Sciences*, 30(8): 611-615.

**KAYNAKLAR (Devam Ediyor)**

- Kai, H., Akamatsu, E., Torii, E., Kodama, H., Yukizaki, C., Sakakibara, Y., Suiko, M., Morishita, K., Kataoka, H. ve Matsuno, K. (2011). Inhibition of proliferation by agricultural plant extracts in seven human adult T-cell leukaemia (ATL)-related cell lines. *Journal of Natural Medicines*, 65(3-4), 651–655.
- Karsy, M. (2014). Molecular, histopathological, and genomic variants of glioblastoma. *Frontiers in Bioscience*, 19(7), 1065.
- Karsy, M., Guan, J., Cohen, A. L., Jensen, R. L., & Colman, H. (2017). New Molecular Considerations for Glioma: IDH, ATRX, BRAF, TERT, H3 K27M. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 17(2).
- Khan, T., Ali M., Khan A., Nisar P., Jan S. A., Afridi S. ve Shinwari Z. (2020). Anticancer Plants: A Review of the Active Phytochemicals, Applications in Animal Models, and Regulatory Aspects. *Biomolecules*, 10(1), 47.
- Kobori, M., Ohnishi-Kameyama, M., Akimoto, Y., Yukizaki, C., & Yoshida, M. (2008).  $\alpha$ -Eleostearic Acid and Its Dihydroxy Derivative Are Major Apoptosis-Inducing Components of Bitter Gourd. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10515–10520.
- Konishi, T., Satsu, H., Hatsugai, Y., Aizawa, K., Inakuma, T., Nagata, S., Sakuda, D., Nagasawa, H. ve Shimizu, M. (2004). Inhibitory effect of a bitter melon extract on the P-glycoprotein activity in intestinal Caco-2 cells. *British Journal of Pharmacology*, 143(3), 379–387.
- Kumar, V., Abul K., Abbas J.C.A. (2017). Robbins Basic Pathology Elsevier.
- Kunigal, S., Gondi, C., Gujrati, M., Lakka, S., Dinh, D., Olivero, W., & Rao, J. (2006). SPARC-induced migration of glioblastoma cell lines via uPA-uPAR signaling and activation of small GTPase RhoA. *International Journal of Oncology*.
- Lee, C.H., Jung, K.-W., Yoo, H., Park, S., & Lee, S. H. (2010). Epidemiology of Primary Brain and Central Nervous System Tumors in Korea. *Journal of Korean Neurosurgical Society*, 48(2), 145.

### KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Li, C.J., Tsang, S.-F., Tsai, C.-H., Tsai, H.-Y., Chyuan, J.-H., & Hsu, H.-Y. (2012). *Momordica charantia* Extract Induces Apoptosis in Human Cancer Cells through Caspase- and Mitochondria-Dependent Pathways. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1–11.
- Li, C.-Y., Li, Q.-J., & Cai, J.-Q. (2016). Evolving Molecular Genetics of Glioblastoma. *Chinese Medical Journal*, 129(4), 464.
- Li, M., Chen, Y., Liu, Z., Shen, F., Bian, X., & Meng, Y. (2009). Anti-tumor activity and immunological modification of ribosome-inactivating protein (RIP) from *Momordica charantia* by covalent attachment of polyethylene glycol. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 41(9), 792–799.
- Li, X., Wu C., Chen N., Gu H., Yen A., Cao L., Wang E. ve Wang L. (2016). PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for Glioblastoma. *Oncotarget*, 7(22): 33440-33450.
- Limtrakul, P., Khantamat, O., & Pintha, K. (2004). Inhibition of P-glycoprotein activity and reversal of cancer multidrug resistance by *Momordica charantia* extract. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 54(6), 525–530.
- Liu, S.T., Pham, H., Pandol, S.J. ve Ptasznik A. (2014). Src as the link between inflammation and cancer. *Front. Physiology*.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., Von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki H., Wiestler O. D., Kleuhies P. ve Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820.
- Lu, V. M., Jue, T. R., McDonald, K. L., & Rovin, R. A. (2018). The Survival Effect of Repeat Surgery at Glioblastoma Recurrence and its Trend: A Systematic Review and Meta-Analysis. *World Neurosurgery*, 115, 453–459.e3.
- Manoharan, G., Jaiswal, S. R., & Singh, J. (2014). Effect of  $\alpha$ ,  $\beta$  momorcharin on viability, caspase activity, cytochrome c release and on cytosolic calcium levels in different cancer cell lines. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 388(1-2), 233–240.

### KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Marta C., Valentino M., Belia S., Sforza L., Rosa P., Ronchetti S., D'Adamo M. C., Pessia M. (2019). Dexamethasone in Glioblastoma Multiforme Therapy: Mechanisms and Controversies *Front. Mol. Neuroscience*.
- Musumeci, F., Fallacara, A. L., Brullo, C., Grossi, G., Botta, L., Calandro, P., Chiariello, M., Kissova, M., Crespan, E., Maga, G. ve Schenone, S. (2017). Identification of new pyrrolo[2,3- d] pyrimidines as Src tyrosine kinase inhibitors *in vitro* active against Glioblastoma. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 127, 369–378.
- Neamati, F., & Asemi, Z. (2019). The effects of melatonin on signaling pathways and molecules involved in glioma. *Fundamental & Clinical Pharmacology*.
- Nesovic, M., Rankov, A.D., Podolski-Renic, A., Nikolic, I., Tasic, G., Mancini, A., Schenone, S., Pesic, M., ve Dinic, J. (2020).Src Inhibitors Pyrazolo[3,4- d]pyrimidines, Si306 and Pro-Si306, Inhibit Focal Adhesion Kinase and Suppress Human Glioblastoma Invasion *In Vitro* and *In Vivo*. *Cancers*, 14;12(6).
- Ohgaki, H. (2009). Epidemiology of Brain Tumors. *Cancer Epidemiology*, 323–342.
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Truitt, G., Boscia, A., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2018). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011–2015. *Neuro-Oncology*, 20.
- Pan, W. L., Wong, J. H., Fang, E. F., Chan, Y. S., Ng, T. B., & Cheung, R. C. F. (2014). Preferential cytotoxicity of the type I ribosome inactivating protein alpha-momorcharin on human nasopharyngeal carcinoma cells under normoxia and hypoxia. *Biochemical Pharmacology*, 89(3), 329–339.
- Park, S.-H., Won, J., Kim, S.-I., Lee, Y., Park, C.-K., Kim, S.-K., & Choi, S.-H. (2017). Molecular Testing of Brain Tumor. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, 51(3), 205–223.
- Park, J.-W., & Turcan, Ş. (2019). Epigenetic Reprogramming for Targeting IDH-Mutant Malignant Gliomas. *Cancers*, 11(10), 1616.

**KAYNAKLAR (Devam Ediyor)**

- Parkin, A., Man, J., Timpson, P., & Pajic, M. (2019). Targeting the complexity of Src signalling in the tumour microenvironment of pancreatic cancer: from mechanism to therapy. *The FEBS Journal*.
- Patel, A., Sabbineni, H., Clarke, A., & Somanath, P. R. (2016). Novel roles of Src in cancer cell epithelial-to-mesenchymal transition, vascular permeability, microinvasion and metastasis. *Life Sciences*, 157, 52–61.
- Pitchakarn, P., Ogawa, K., Suzuki, S., Takahashi, S., Asamoto, M., Chewonarin, T., Limtrakul, P. ve Shirai, T. (2010). *Momordica charantia* leaf extract suppresses rat prostate cancer progression *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Science*, 101(10), 2234–2240.
- Pitchakarn, P., Suzuki, S., Ogawa, K., Pompimon, W., Takahashi, S., Asamoto, M., Limtrakul P. ve Shirai, T. (2011). Induction of G1 arrest and apoptosis in androgen-dependent human prostate cancer by Kuguacin J, a triterpenoid from *Momordica charantia* leaf. *Cancer Letters*, 306(2), 142–150.
- Pitchakarn, P., Suzuki, S., Ogawa, K., Pompimon, W., Takahashi, S., Asamoto, M., Limtrakul, P. ve Shirai, T. (2012a). Kuguacin J, a triterpenoid from *Momordica charantia* leaf, modulates the progression of androgen-independent human prostate cancer cell line, PC3. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3-4), 840–847.
- Pitchakarn, P., Ohnuma, S., Pintha, K., Pompimon, W., Ambudkar, S.V. ve Limtrakul P. (2012b). Kuguacin J isolated from *Momordica charantia* leaves inhibits P-glycoprotein (ABCB1)-mediated multidrug resistance. *Journal of Nutritional Biochemistry* 23: 76–84.
- Pitchakarn, P., Umsumarng, S., Mapoung, S., Ting, P., Temviriyankul, P., Punfa, W., Pompimon, W. ve Limtrakul, P. (2017). Kuguacin J isolated from bitter melon leaves modulates paclitaxel sensitivity in drug-resistant human ovarian cancer cells. *Journal of Natural Medicines*, 71(4),
- Puri, M., Kaur, I., Kanwar, R., Gupta, R., Chauhan, A., & Kanwar, J. (2009). Ribosome Inactivating Proteins (RIPs) from *Momordica charantia* for Anti Viral Therapy. *Current Molecular Medicine*, 9(9), 1080–1094.

### KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Qian, S., Sun, L., Li, J., Wu, J., Hu, G., Han, Y., Yu, K. ve Zhang, S. (2016). MAP30 inhibits autophagy through enhancing acetyltransferase p300 and induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *Oncology Reports*, 35(6), 3705–3713.
- Ranjit, M., Motomura, K., Ohka, F., Wakabayashi, T., & Natsume, A. (2015). Applicable advances in the molecular pathology of glioblastoma. *Brain Tumor Pathology*, 32(3), 153–162.
- Ray, R. B., Raychoudhuri, A., Steele, R., & Nerurkar, P. (2010). Bitter Melon (*Momordica charantia*) Extract Inhibits Breast Cancer Cell Proliferation by Modulating Cell Cycle Regulatory Genes and Promotes Apoptosis. *Cancer Research*, 70(5), 1925–1931.
- Rhun, E. L., Preusser, M., Roth, P., Reardon, D. A., van den Bent, M., Wen, P., Reifenberger G, Weller, M. (2019). Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treatment Reviews*, 101896.
- Ribeiro, N., Sousa, S. R., Brekken, R. A., & Monteiro, F. J. (2014). Role of SPARC in Bone Remodeling and Cancer-Related Bone Metastasis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115(1), 17–26.
- Rivera, L. B., Bradshaw, A. D., & Brekken, R. A. (2011). The regulatory function of SPARC in vascular biology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(19), 3165–3173.
- Rosset, E. M., & Bradshaw, A. D. (2016). SPARC/osteonectin in mineralized tissue. *Matrix Biology*, 52-54, 78–87.
- Rossi, M. K., Gnanamony, M., & Gondi, C. S. (2016). The “SPARC” of life: Analysis of the role of osteonectin/SPARC in pancreatic cancer (Review). *International Journal of Oncology*, 48(5), 1765–1771.
- Ru, P., Steele, R., Nerurkar, P. V., Phillips, N., & Ray, R. B. (2011). Bitter Melon Extract Impairs Prostate Cancer Cell-Cycle Progression and Delays Prostatic Intraepithelial Neoplasia in TRAMP Model. *Cancer Prevention Research*, 4(12), 2122–2130.

### KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Salomon, M.P., Orozco, J., Wilmott, J.S., Hothi, P., Manughian-Peter, A.O., Cobbs, C.S., Scolyer, R.A., Hoon, D.S. ve Marzese, D.M. (2018). Brain metastasis DNA methylomes, a novel resource for the identification of biological and clinical features. *Nature*, 5:180245.
- Sampson, J. H., Gunn, M. D., Fecci, P. E., & Ashley, D. M. (2019). Brain immunology and immunotherapy in brain tumours. *Nature Reviews Cancer*.
- Scavelli, K., Chatterjee, A., & Rhee, D. J. (2015). Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine in Ocular Tissue. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 31(7), 396–405.
- Schreck, K. C., Grossman, S. A., & Pratilas, C. A. (2019). BRAF Mutations and the Utility of RAF and MEK Inhibitors in Primary Brain Tumors. *Cancers*, 11(9), 1262.
- Shodehinde, S. A., Adefegha, S. A., Oboh, G., Oyeleye, S. I., Olasehinde, T. A., Nwanna, E. E., Adedayo, B. ve Boligon, A. A. (2016). Phenolic Composition and Evaluation of Methanol and Aqueous Extracts of Bitter Gourd (*Momordica charantia L*) Leaves on Angiotensin-I-Converting Enzyme and Some Pro-oxidant-Induced Lipid Peroxidation *In vitro*. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 21(4).
- Somasagara, R. R., Deep, G., Shrotriya, S., Patel, M., Agarwal, C., & Agarwal, R. (2015). Bitter melon juice targets molecular mechanisms underlying gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells. *International Journal of Oncology*, 46(4), 1849–1857.
- Soomro, S. H., Ting, L. R. ve Qing Y. Y. (2017). Mingxin Ren Molecular biology of glioblastoma: Classification and mutational locations. *Pak Med Assoc*, 67(9).
- Tabata, K., Hamano, A., Akihisa, T., & Suzuki, T. (2012). Kuguaglycoside C, a constituent of *Momordica charantia*, induces caspase-independent cell death of neuroblastoma cells. *Cancer Science*, 103(12), 2153–2158.
- Tai, I. T., & Tang, M. J. (2008). SPARC in cancer biology: Its role in cancer progression and potential for therapy. *Drug Resistance Updates*, 11(6), 231–246.

### KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Tamimi, A. F. ve Malik, J. (2017). Epidemiology and Outcome of Glioblastoma *Codon Publications*, 143-153.
- Taylor, O. G., Brzozowski, J. S., & Skelding, K. A. (2019). Glioblastoma Multiforme: An Overview of Emerging Therapeutic Targets. *Frontiers in Oncology*, 9.
- Thiagarajan, S., Arapoc, D. J., Husna Shafie, N., Keong, Y. Y., Bahari, H., Adam, Z., & Ei, T. (2019). *Momordica charantia* (Indian and Chinese Bitter Melon) Extracts Inducing Apoptosis in Human Lung Cancer Cell Line A549 via ROS-Mediated Mitochondria Injury. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019, 1–9.
- TND Nöroonkolojik Cerrahi Öğretim ve Eğitim Grubu Bülteni (2008). *Nörolojik Cerrahide Yaklaşımlar*. İstanbul.
- Tomar, V. S., Patil V. ve Somasundaram K. (2019). Temozolomide induces activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in glioma cells via PI3K/Akt pathway: implications in glioma therapy. *Cell Biol Toxicol*
- Torrisi, F., Minafra, L., Cammarata, F. P., Savoca, G., Calvaruso, M., Vicario, N., Maccari, L., Peres, E., Özçelik, H., Bernaudin, M., Botta, L., Russo, G., Parenti, R. ve Valable, S. (2020). SRC Tyrosine Kinase Inhibitor and X-rays Combined Effect on Glioblastoma Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 3917
- Tykocki, T., & Eltayeb, M. (2018). Ten-year survival in glioblastoma. A systematic review. *Journal of Clinical Neuroscience*, 54, 7–13.
- Vaz, J., Ansari, D., Sasor, A., & Andersson, R. (2015). SPARC. *Pancreas*, 44(7), 1024–1035.
- Venkatesan, S., Lamfers, M. L., Dirven, C. M., & Leenstra, S. (2016). Genetic biomarkers of drug response for small-molecule therapeutics targeting the RTK/Ras/PI3K, p53 or Rb pathway in glioblastoma. *CNS Oncology*, 5(2), 77–90.

**KAYNAKLAR (Devam Ediyor)**

- Wadhawan, A., Smith, C., Nicholson, R. I., Barrett-Lee, P., & Hiscox, S. (2011). Src-mediated regulation of homotypic cell adhesion: implications for cancer progression and opportunities for therapeutic intervention. *Cancer Treatment Reviews*, 37(3), 234–241.
- Wang, X., Sun, W., Cao, J., Qu, H., Bi, X., & Zhao, Y. (2012). Structures of New Triterpenoids and Cytotoxicity Activities of the Isolated Major Compounds from the Fruit of *Momordica charantia* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(15), 3927–3933.
- Weller, M., Rhun E. R., Preusser M., Tonn, J. ve Roth, P. (2019). How we treat glioblastoma, *ESMO Open*.
- Weng, J.-R., Bai, L.-Y., Chiu, C.-F., Hu, J.-L., Chiu, S.-J., & Wu, C.-Y. (2013). *Cucurbitane* Triterpenoid from *Momordica charantia* Induces Apoptosis and Autophagy in Breast Cancer Cells, in Part, through Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Activation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Weng, J.-R., Bai, L.-Y., & Lin, W.-Y. (2017). Identification of a Triterpenoid as a Novel PPAR $\gamma$  Activator Derived from Formosan Plants. *Phytotherapy Research*, 31(11), 1722–1730.
- Xiong, S. D., Yu, K., Liu, X. H., Yin, L. H., Kirschenbaum, A., Yao, S., Narla, G., Difeo, A., Wu, J., Yuan, Y., Ho, S., Lam, Y. ve Levine, A. C. (2009). Ribosome-inactivating proteins isolated from dietary bitter melon induce apoptosis and inhibit histone deacetylase-1 selectively in premalignant and malignant prostate cancer cells. *International Journal of Cancer*, 125(4), 774–782.
- Yue, J., Sun, Y., Xu, J., Cao, J., Chen, G., Zhang, H., zhang, X. ve Zhao, Y. (2019). *Cucurbitane* triterpenoids from the fruit of *Momordica charantia* L. and their anti-hepatic fibrosis and anti-hepatoma activities. *Phytochemistry*, 157, 21–27.

### KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Yung, M. M. H., Ross, F. A., Hardie, D. G., Leung, T. H. Y., Zhan, J., Ngan, H. Y. S., & Chan, D. W. (2015). Bitter Melon (*Momordica charantia*) Extract Inhibits Tumorigenicity and Overcomes Cisplatin-Resistance in Ovarian Cancer Cells Through Targeting AMPK Signaling Cascade. *Integrative Cancer Therapies*, 15(3), 376–389.
- Yunker, C. K., Golembieski, W., Lemke, N., Schultz, C. R., Cazacu, S., Brodie, C., & Rempel, S. A. (2008). SPARC-induced increase in glioma matrix and decrease in vascularity are associated with reduced VEGF expression and secretion. *International Journal of Cancer*, 122(12), 2735–2743.
- Zhang, S., & Yu, D. (2012). Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: turning promise into triumph. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(3), 122–128.
- Zhang, C. Z., Fang, E. F., Zhang, H.-T., Liu, L.-L. ve Yun, J.-P. (2014). *Momordica Charantia* lectin exhibits antitumor activity towards hepatocellular carcinoma. *Investigational New Drugs*, 33(1).
- Zhang, Y., Dube, C., Gibert, M., Cruickshanks, N., Wang, B., Coughlan, M., Yang, Y., Setiady, I., Deveau, C., Saoud, K., Cassandra, G., Oxford, M., Yuan, F. ve Abounader, R. (2018). The p53 Pathway in Glioblastoma. *Cancers*, 10(9), 297.
- Zhao, H., Wang, S., Song, C., Zha, Y., & Li, L. (2016). The prognostic value of MGMT promoter status by pyrosequencing assay for glioblastoma patients' survival: a meta-analysis. *World Journal of Surgical Oncology*, 14(1).
- <https://gco.iarc.fr/today> (28.12.2019).

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**İsim ve Soyisim:** Kübra ERDOĞAN

**Doğum Yeri ve Tarihi:** Üsküdar-13/05/1994



### EĞİTİM DURUMU

**Lisans Öğrenimi:**

04.09.2012 - 27.06.2016

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi/Fen Edebiyat Fakültesi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü 3,48 /4

ALES 2018 Sonbahar Dönemi 73,79/100

YÖKDİL 2019 İlkbahar Dönemi sınavı 75.00 /100

### AKADEMİK ÇALIŞMALAR

- 18/12/2019-20/12/2020 Investigation of the Effects of *Momordica charantia* extract on Cell Survival and Migration in U87G Glioblastoma Cell. Line 3<sup>th</sup> International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy (NPCPT)  
Erdogan Kübra, Eroglu Onur
- 19/10/2017-21/10/2017 Comparative effects of monotherapy and polytherapy with CAPE and Cisplatin on SKBR3 Breast cancer cell line. 5th BAU Drug Design Congress  
Eroglu Onur, Güvenir Çelik Esin, Kaya Hacer, Erdogan Kübra, Sevim Büşra, Başol Merve
- 19/10/2017-21/10/2017 Investigation of the Effects of 5-Fluorouracil and Temozolomide Combinations on Cell Survival in SKBR3 Human Breast Cancer Cell Line 5th Bahçeşehir University Drug Design Congress  
Eroglu Onur, Güvenir Çelik Esin, Kaya Hacer, Erdoğan Kübra, Sevim Büşra, Başol Merve
- 13/10/2016-15/10/2016 Investigation of Cytotoxic and anti proliferative effects of Doxorubicin DOX and Caffeic Acid Phenethyl Ester CAPE on MDA MB 231 breast cancer cell line 4th International Bau Drug Design Congress  
Eroglu Onur, Güvenir Çelik Esin, Çelen Merve, Kaya Hacer, Nalbant Ali, Sağraç Derya, Erdoğan Kübra

### STAJLAR

- Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Lab. (Stajyer Moleküler Biyolog)

### İLETİŞİM

E Posta Adresi: erdgnn.kbr@gmail.com

**Tarih: 10/08/2020**