T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BEYİN GLİOBLASTOMA HÜCRE HATTI ÜZERİNDE HESPERİDİN'İN ANTİKARSİNOJENİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ

CAN ENGİN

DANIŞMAN
PROF.DR. BEDİA ÇAKMAKOĞLU

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI

İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Can ENGİN tarafından hazırlanan "Beyin Glioblastoma Hücre Hattı Üzerinde Hesperidinin Antikarsinojenik Etkisinin İncelenmesi" başlıklı Yülsek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

15 / 12 / 2015

Tez Sınav Jürisi

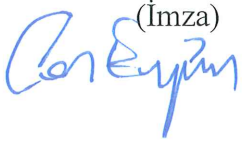
Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)		İmzası
1.Prof. Dr. İlhan YAYLIM	İ.Ü DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı	
2.Prof. Dr. Turgay İSBİR	Yeditepe Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	
3.Prof. Dr. Bedia ÇAKMAKOĞLU	İ.Ü. DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı	
4.Prof. Dr. H.Arzu ERGEN	İ.Ü.DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı	
5.Yard. Doç Dr. E. Sinem BİRELLER	İstanbul Yeni Yüzyıl Ü. Ecz. Fak. Farma. Mikrobi. AD.	

BEYAN

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

CAN ENGİN

(İmza)



ITHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen ve benden desteğini, iyi niyetini hiçbir zaman esirgemeyen, sadece akademik konularda değil aynı zamanda her zaman yol gösterici olan ve varlığıyla her zaman kendimi güvende hissettiren değerli hocam İstanbul Üniversitesi Moleküler Tıp Öğretim Üyesi Prof. Dr. Bedia ÇAKMAKOĞLU' na teşekkür ederim.

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı kurucusu, emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Turgay İSBİR' e,

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlhan YAYLIM'a ve tüm Moleküler Tıp Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve çalışanlarına,

Tezimin yapımı ve yazımı sırasındaki eşsiz yardımları, destekleri ve sağladıkları motivasyon için çok değerli arkadaşlarım, Yrd. Doç. Dr. Elif Sinem BİRELLER' e, Msc. Çağla RENCÜZOĞULLARI' na, Msc. Ayça DİREN' e, Msc. Tolga ÇATMAKAŞ' a çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans sürecim boyunca ve son dönemde çalışmanın hazırlanmasında bana hep destek olan, tüm bu yükün altına benimle beraber giren değerli arkadaşım Başak ARU' ya, bana hayata her açıdan bakmamı sağlayan ve her zaman desteklerini arkamda hissettiğim değerli anne ve babam Nedret ENGİN ve Harun ENGİN' e sonsuz saygı ve sevgilerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 41919

IÇINDEKILER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ X
ÖZET ..... Xİ
ABSTRACT ..... Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. GLİOMA 3
2.2. GLİOBLASTOMA 4
2.2.1. GLİOBLASTOMA RİSK FAKTÖRLERİ 5
2.2.2. GLİOBLASTOMANIN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ 6
2.2.3. GLİOBLASTOMA VE APOPTOZ İLİŞKİSİ 9
2.3. FLAVONOİDLER 11
2.3.1. FLAVONOİDLERİN BİYOLOJİK ETKİLERİ 11
2.3.1.1. Flavonoidlerin Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri 11
2.3.1.2. Flavonoidlerin Sinir Sistemi Üzerine Etkileri 12
2.3.1.3. Flavonoidlerin Antikarsinojenik Etkileri 12
2.3.2. HESPERİDİN 13
2.3.2.1. HESPERİDİN'İN BİYOLOJİK ETKİLERİ 14
2.3.2.2. Hesperidin ve Hesperetin' in Nörofarmakolojisi 14
2.3.2.3. Hesperidinin Anksiolitik, Sedatif ve Antikonvülzan Etkileri 15
2.3.2.4. Hesperidinin Antinosiseptik Özellikleri 16
3. GEREÇ VE YÖNTEM 17
3.1. Kullanılan Materyaller 17
3.1.1. Kimyasal Malzemeler 17

3.1.2. Cihazlar 17
3.2. Yöntem 17
3.2.1. U-87 Hücre Hattı 17
3.2.2. Hücre Ekimi 18
3.2.3. Alt Kültür 18
3.2.4. Hücre Dondurma 18
3.2.5. Hesperidin Solüsyonunun Hazırlanması 19
3.2.6. WST-1 Hücre Canlılık Testi 19
3.2.7. Kaspaz-3 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi 19
3.2.8. Mitokondri Zar Potansiyelinin Belirlenmesi 20
3.2.9. Hücre Deney Verilerinin İstatistiksel Analizi 21
4. BULGULAR 22
4.1. Hesperidinin Beyin Glioblastoma Hücre Canlılığı Üzerinde Doz ve Zaman Bağımlı Etkisi 22
4.2. Canlılığı Etkileyen Hücre Ölüm Tipinin Belirlenmesi 23
4.2.1. Kaspaz 3/BCA Aktivitesinin İncelenmesi 23
4.2.2. Mitokondri Zar Potansiyelinin Belirlenmesi 24
5. TARTIŞMA 26
KAYNAKLAR 29
ÖZGEÇMİŞ 40

TABLOLAR LISTESI

Tablo 1: TNM Sistemine Göre Kanser Evreleri (18, 21)……..Syf 3

ŞEKILLER LISTESI

Şekil: 1 Transforme Olmuş Astrositlerin Sınıflandırılması **(54)**……...**Syf 7**

Şekil: 2 DNA metilasyon modelleri baz alınarak hazırlanan glioblastoma alt grupları **(61)**…….....**Syf 8**

Şekil: 3 İntrinsik ve Ekstrinsik Apoptoz Yolakları **(75)**…… **Syf 10**

Şekil : 4 Farklı Flavonoidlerin Kimyasal Yapıları **(79)**…… **Syf 11**

Şekil: 5 Hesperidin ve Hesperetinin Kimyasal Yapısı) **(103)**……...**Syf 13**

Şekil: 6 Hesperidin' in Merkezi Sinir Sistemi Üzerine Etkisi **(103)**…….**Syf 15**

Şekil: 7 Hesperidin' in U-87 Beyin Glioblastoma Hücre Canlılığı Üzerinde Doz ve Zaman Bağımlı Etkisi……..**Syf 22**

Şekil: 8 Hesperidin' in U-87 Beyin Glioblastoma Hücreleri Üzerinde Kaspaz-3 Aktivitesinin Etkisi…….**Syf 23**

Şekil: 9 Hesperidin' in MRC-5 Sağlıklı Akciğer Hücreleri Üzerinde Kaspaz-3 Aktivitesinin Etkisi…… **Syf 24**

Şekil: 10 Hesperidin' in U-87 Beyin Glioblastoma Hücreleri Üzerinde Mitokondri Zar Potansiyelinin Belirlenmesi…….**Syf 25**

Şekil: 11 Hesperidin' in MRC-5 Sağlıklı Akciğer Hücreleri Üzerinde Mitokondri Zar Potansiyelinin Belirlenmesi…… **Syf 25**

SEMBOLLER / KISALTMALAR LISTESI

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
HO-1	Hemeoksijenaz-1
NO	Nitrik Oksit
FBS	Fetal Bovine Serum
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
TGF	Dönüştürücü Büyüme Faktörü
TNF	Tümör Nekroz Faktör
PI3K	Fosfoinozitol-3-Kinaz
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
CO_2	Karbondioksit
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
Ca^{+2}	Kalsiyum
Mg^{+2}	Magnezyum
NF- kB	Nükleer Faktör kappa B
NF	Nörofibramatozi
PTEN	Fosfat ve Tensin Homoloğu Gen
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
G-CSF	Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör

ÖZET

Engin, C. (2015). Beyin Glioblastoma Hücre Hattı üzerinde Hesperidin'in Antikarsinojenik Etkisinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Yüksek Lisans. İstanbul.

Glioblastoma insanlardaki en yaygın ve en agresif primer beyin tümörleri olup tedavi uygulanmadığı durumlarda sağ kalım süresi ortalama 4,5 aydır. Bu kanser türünün ilerleme sürecinde rol oynayan moleküler mekanizmaların anlaşılması, hedefe yönelik tedavi için daha etkili stratejilerin belirlenmesine öncülük edilebilecektir.

Hesperidin bitkisel bir flavonoid olup farklı deneysel modellerde anti-inflammatuar ve antioksidatif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, literatürde, glioblastoma tümörlerinde hesperidinin olası antiproliferatif ve antiapoptotik etkisini gösteren herhangi bir çalışma yoktur.

Bu çalışmada, hesperidinin beyin glioblastoma tümörlerinde yeni bir tedavi yaklaşımı olasılığı U-87 hücre hattı kullanılarak incelenmiştir. Hesperidin'in U-87 hücre proliferasyonu ve canlılığı üzerinde doza bağımlı etkisi WST-1, mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkisi için JC-1 yöntemleri kullanılmıştır. Bununla birlikte Kaspaz 3/BCA aktivitesi de ölçülmüştür. Mitokondri membran potansiyelindeki kayıp sonrası efektör kaspazların devreye girmesi ve bunun sonucu hücresel apoptoz sürecinin tetiklendiği tespit edilmiştir.

Literatürde ilk kez, beyin glioblastoma tümörlerinde hesperidinin antiapoptotik ve antiproliferatif etkisi ayrıntılı olarak incelendiği için çalışmamız orijinal bir değer taşımaktadır. Elde ettiğimiz veriler, özellikle kanser tedavisi için yeni çalışma alanları doğuracak ve çalışmamız beyin glioblastoma tümörleri için yeni tedavi seçeneklerinin arasında yer alarak bilime katkıda bulunacaktır.

Anahtar Kelimeler : Glioblastoma, Hesperidin, Kanser, Proliferasyon, Apoptoz

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 41919

ABSTRACT

Engin, C. (2015). Investigation of Potential Anticarcinogenic Effects by Hesperidin in Glioblastoma Cell Lines. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Molecular Medicine. İstanbul. 2015

Eventhough the rate of brain glioblastoma tumors increase at the ages between 50 and 60, these tumors may occur at any age. Understanding of the molecular mechanisms which play role in the progress of this cancer type may lead to develop more effective strategies for a target driven therapy.

Hesperidin is a herbal flavonoid which has anti-inflammatory and anti-oxidant effects that have been proven by different experiments. Also, there is no research in the literature that shows hesperidin's anti-proliferative and anti-apoptotic effect on glioblastoma tumors.

In this study, hesperidin's potential effects on brain glioblastoma tumor treatment will be studied by using U-87 cell line. Hesperidin`s dosage effects on cell proliferation and vitality measured by WST-1, and mitochondrial membrane potential measured by JC-1. Also Caspase 3/BCA activity measured. We found out that cellular apoptosis is triggered due to activation of effector caspases after the lost of mitochondrial membrane potential.

Our study, which will be the first one in the literature that indicates hesperidin's anti-apoptotic and anti-proliferative effect has an original value. The values we will obtain will create new work fields, especially for cancer treatment and will contribute to science by becoming a new treatment option for brain glioblastoma tumors.

Key Words: Glioblastoma, Hesperidin, Cancer, Proliferation, Apoptose

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No:41919

1. GIRIŞ VE AMAÇ

Glioblastomalar astrosit kaynaklı tümörlerdir. İnsanlardaki en yaygın ve en agresif primer beyin tümörleridir. Tüm fonksiyonel doku beyin tümörlerinin %25'i, tüm intrakranyal tümörlerin ise %20'si glioblastomadır. Geniş bir kan ağı ile çevrili olmaları ve hızlı çoğalmaları sebebiyle genellikle malign özellik gösterirler. Daha çok erkeklerde görülürler.

Çocukluk çağı beyin tümörlerinin yalnızca %3'ü glioblastoma'dır. Tümör farklı hücre tiplerini içerir, bu sebeple tedavi süreci zorludur; bazı hücre tipleri tedaviye cevap verirken diğer hücreler etkilenmeyecektir. Çoğu ilaç tümöre etki etmek üzere kan-beyin bariyerini geçemez. Tümör hücreleri konvansiyonel terapilere oldukça dirençlidir, ayrıca beyin de konvansiyonel tedaviye karşı oldukça hassastır (**1**).

Tedavi uygulanmadığı durumlarda sağ kalım süresi ortalama 4,5 aydır. Standart olarak radyasyon tedavisi, kemoterapi ve temozolomid kullanımı ile ortalama sağ kalım süresi 15 aya uzayabilmektedir (**2**).

Hesperidin, sıklıkla turunçgil meyvelerde bulunan bir flavonoiddir (**3**). Antioksidan etkisi in vitro çalışmalarla gösterilmiştir (**4**). Ayrıca yapılan araştırmalarla hesperidinin antienflamatuar, analjezik, antimikrobiyal, anti-hipertensif ve diüretik etkileri kanıtlanmıştır (**5, 6, 7**).

Yapılan bir çalışma, hesperidinin anti-lipidemik, kardiyoprotektif, antihipertensif ve antidiyabetik etkilerinin olduğunu, bunların da genellikle bir antioksidan defans mekanizması ile pro-enflamatuar sitokin üretiminin baskılanmasıyla alakalı olduğunu göstermiştir (**8**).

Rong vd.'nin yaptığı bir araştırmaya göre neonatal sıçanlara hesperidin uygulandıktan sonra beynin hipoksi-iskemiden korunduğu gösterilmiş olup yine aynı araştırmada primer nöron kültürüne uygulanan hesperidinin nöronları oksijen-glukoz deprivasyonundan koruduğu gösterilmektedir (**9**).

Bir başka araştırmada Cisplatin tedavisi gören kanser hastalarında sıklıkla görülen, histopatolojik değişimlerin meydana geldiği, kanda yüksek üre ve yüksek serum kreatinin seviyeleri ile belirlenen nefrotoksisite modelinin oluşturulduğu sıçanlarda hesperidin kullanımının koruyucu etkisi olabileceği belirtilmiştir (**10**). Selveraj ve Pugalendi'nin yaptığı araştırmada, sıçanlarda subkutan izoproterenol enjeksiyonu ile oluşturulan miyokard hasarında hesperidin kullanımının plazma, kalp ve karaciğer dokusundaki lipid miktarını azalttığı izlenmiştir (**11**).

Hepatosellüler karsinoma hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada hesperidinin, tümör hücrelerinin invaziv davranışlarını aktivatör ptorein-1 ve NF-kB'yi baskılayarak engellediği görülmüştür (**12**).

İnsan meme kanseri hücre hattı MCF-7 üzerinde, Naratajan vd. tarafından yapılan bir çalışmada ise hesperidinin, kanser hücrelerinde apoptozunu indüklediği gösterilmiştir (**13**).

Ayrıca fare makrofaj hücre hattında siklooksijenaz ve nitrik oksit sentaz enzimlerinin indüklenebilir izoformları hesperidin kullanımı ile inhibe edilebildiği gösterilmiştir (**14**). Hesperidinin diazepam ile sinerjistik etkisi olduğu belirlenmiştir (**15**). Hesperidinin sedatif ve antinosiseptif etkilerinden opioid reseptörler sorumludur (**16**). Ayrıca gut tipi ağrı modeli oluşturulan sıçanlarda Ketoroloc ile sinerjistik etkisi olduğu gösterilmiştir (**17**).

Tez çalışmamızda, hesperidinin glioblastoma kanserlerinde yeni bir tedavi yaklaşımı olasılığı U-87 hücre hattı kullanılarak incelenmiştir. Hesperidin'in U-87 hücre proliferasyonu ve canlılığı üzerine doza bağımlı etkisi WST-1 hücre proliferasyon testi, mitokondriyel membran potansiyeli JC-1 ve kaspaz-3 testi yöntemleri kullanılarak incelenmiştir.

2. GENEL BILGILER

2.1. GLİOMA

Kanser, tedavi seçeneklerinin oldukça kısıtlı olduğu ve geniş bir araştırma alanına sahip heterojen bir rahatsızlıktır. Primer beyin tümörlerinin arasında en yaygın olanları malignant gliomalar olarak gösterilmiştir. Klinik uygulamaya ilişkin glioma heterojenitesi, patolojisi ve bu tip tümörlerin tedaviye verdiği yanıtlar ilgi çekici bir araştırma alanı oluşturmaktadır. Baş ağrısı ve sinir krizi gibi klinik semptomlar direkt olarak bu hastalığa ilişkin olmadığından hastalığın erken evrelerde teşhisi oldukça zordur. Şimdiye değin bu hastalığa ilişkin bilinen ve genetik olarak kalıtılan bir durumun varlığı tespit edilmemiştir (**18**).

İlk glioma sınıflandırması Bailey ve Cushing tarafından yapılmıştır (**19**).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılan sınflandırmaya göre gliomalar; astrositomalar, oligodendrogliomalar, ependimomalar ve oligoastrositomalar olmak üzere 4 başlık altında incelenebilir.Durumu daha da netleştirmek adına tümörler; evrelerine,boyutuna, penetrasyon derecesine ve lenf nodları ile diğer uzak organlara yayılma derecesine göre alt gruplara ayırılabilinir (**20**).

TNM adı verilen bir evrelendirme sistemini örnek verecek olursak, bu isimlendirmenin baş harflerinden yola çıkarak “T” tümörü, “N” lenf nodlarını ve “M” metastazı ifade eder. Bu evrelendirme sistemi göz önüne alınarak 5 evre tespit edilmektedir (**21**).

Tablo 1: TNM Sistemine Göre Kanser Evreleri (18, 21)

	Evre Tanımları
0	Karsinoma in situ
I	Kanser Vücudun Belirli Bir Bölgesinde Lokalize
II	Kanser Bölgesel Olarak İlerlemiş
III	Kanserin İleri Evresi
IV	Kanser Diğer Doku ve Organlara Metastaz Yapmış
T,N,M	(Tümör, Nod Metastaz)

Malignansi derecelerine göre oligodendrogliomalar ve oligoastrositomalar seviye II ve seviye III olarak ayrılırken astrositomalar da pilositik (seviye I) , difüz (seviye II) , anaplastik (seviye III) ve glioblastoma multiform (seviye IV) olarak alt başlıklara ayırılabilinir (**22, 23**).

2.2. GLİOBLASTOMA

Gliblastomalar, tüm gliomaların % 60-70' ini, anaplastik astrositomaların %10-15' ini, anaplastik oligodendrogliomalar ve anaplastik oligoastrositomaların % 10' unu ve kalan anaplastik ependimomas ve anaplastik gangliomaların % 5-20' sini oluşturur (**24**). Multiform terimi bu tümörün klinik durumu, patolojisi, genetik özgünlüğü ve tedaviye verilen cevaplar dikkate alınarak belirlenmiştir (**25**). Glioblastoma multiform primer (kendiliğinden) ve sekonder (düşük seviyeli bir tümörden) gelişerek oluşabilmektedir (**26**). Primer glioblastomalar daha yaygın bir şekilde 50 yaşın üzerinde görülürler ve fosfataz ile tensin homoloğu genlerin kromozom 10 ve p16 delesyonu ve de kromozom 10q ile 17p üzerinde heterozigote kaybı ile karakterizedirler (**27**).

Sekonder glioblastomalar ise daha çok genç hastalar arasında yaygın bir şekilde görülmektedir. Düşük seviyeli tümörlerden meydana gelirler ve yıllar geçtikçe glioblastomalara dönüşürler. P53 tümör süpressör geni mutasyonu p16 ve retinoblastoma yolaklarındaki anormallikler ve DNA kopya sayısının bozulmasıyla karakterizedirler.Malignant gliomaların yolaklarındaki bu değişimlerin detayları Wen ve Kesari (**24**) tarafından ve primer ile sekonder glioblastoma multiformun başlangıç ve ilerleme aşamasındaki ana genetik değişiklikler Li ve arkadaşları (**28**) tarafından gösterilmiştir.

Sekonder glioblastomalarla ilgili olarak beyin metastatik lezyonlarının temeli olduğu söylenebilir ve bu lezyonlar % 65 ihtimalle akciğer kanserinden (**29**) , %10-40 ihtimalle cilt kanserinden kaynaklanmaktadır (**30**).

Moleküler farklılıklarına rağmen bu iki tümör tipi morfolojik olarak tam ayırt edilememektedir ve geleneksel tedavi yöntemlerine aynı şekilde cevap vermektedirler (**18**).

Günümüzde glioblastoma tedavisinde cerrahi operasyon ve bunu takiben radyoterapi ve kemoterapi uygulamaları gerçekleştirilmektedir (**18**).

Anjiyogenez inhibitörlerinin kemoterapötik ve gen/antikor terapileriyle bileşimleri olarak uygulanan pasif ve aktif immünoterapi deneysel prosedürler olarak ek tedavi seçenekleri arasında yer almaktadır. Ancak beyine ulaşmak o kadar kolay değildir. Kan-beyin bariyeri sözkonusu olduğundan yukarıda bahsedilen bu tür terapiler hastalığın tedavisi için başarılı sonuçlar vermemektedir. Glioblastomaların gelişimi ve ilerleyişinin altında yatan

mekanizmalara dair bilginin yetersizliği de bu hastalığın tedavisini daha da zorlaştırmaktadır (**18**).

Günümüzde araştırmalar bu hastalığın yaratmış olduğu durumu hafifletmeye çalışan yeni metodlara yoğunlaşmıştır. Ancak geniş çaplı yürütülen araştırmalara rağmen glioblastoma multiform hastalarının % 88'i 3 yıl içinde hayatlarını kaybetmektedir. Glioblastoma multiform bu sebeple dünya çapında en ciddi malignitelerden biridir (**18**).

Her yıl 11 milyonun üzerinde kişiye kanser teşhisi konmakta ve bu sayının 2020 yılına kadar 16 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (**31, 32**).

Malign gliomalar yıllık görülme olasılığı 5/100.000 olan en yaygın primer beyin tümörleridir (**20, 24**).

Glioblastoma multiform hastalarının çoğuluğu (%87'si) 55-87 yaşları arasındaki kişilerden oluşmaktadır (**33**). Bu hastalık erkeklerde kadınlara oranla ve beyaz ırkta siyahi ırka oranla daha fazla görülmektedir (**24, 34**).

2.2.1. GLİOBLASTOMA RİSK FAKTÖRLERİ

Glioblastoma multiform risk faktörleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.Gliomaların tıbbi gelişim öykülerinin kişiye bağlı olmasına rağmen, glioblastomanın ise ortada olası bir sebep yokken gelişen bir tümör olduğuna inanılmaktadır (**35**).

Bu tümörün ailesel formu tüm vakaların % 1'i olarak tanımlanmıştır (**36**). Ancak bu tip glioblastomanın gelişiminin genetik arka planı ortada sebep yok iken ani bir şekilde oluşanlardan farklıdır (**37**).

Glioblastoma multiform bazı genetik hastalıkların seyri sırasında meydana gelebilmektedir.Bu hastalıklar Tuberoz Skleroz, Turcot Sendromu, Çoklu Endokrin Neoplazi tip II A ve Nörofibromatozi tip I (NF1) (**38**) olarak gösterilebilir.Bunlara ek olarak kafa travması sonucu oluşabilecek herhangi bir fiziksel deformasyon, glioblastoma başlangıcı için risk oluşturabilmektedir (**39**, **40**).

Glioblastoma multiformun gelişimi hücre döngüsündeki G1-S kontrol noktasının yanlış düzenlenmesi ve glioma hücrelerindeki genetik bozukluklar (kromozom 10q'daki genetik materyal kaybı, EGFR, FGFR 2, IRS 2 ve AKT 3 amplifikasyonu, PTEN, TP16, TP53, PARK2, PTPRD ve NF1 genlerindeki mutasyonlar) ile alakalıdır (**41**, **42**).

Seks hormonlarının glioblastoma gelişimindeki etkisi kadınlar arasında menopoz sonrası dönemde oldukça fazladır (**43**). Boy ve vücut kitle endeksi gibi özelliklerin normal sınırlardan daha yüksek olması bu hastalığın görülme sıklığını arttırmaktadır (**44**).

Virüsler, örneğin insan Sitomegalovirüs (HCMV) glioma gelişimindeki etiyolojik ajanlar arasında gösterilebilir. HCMV kongenital ensefaliti ve çoklu organ değişimlerini bağışıklık sistemi zayıflamış yetişkinlerde tetikleyebilmektedir.İnsan Sitomegalovirüs glial hücreler için yönelim göstermektedir. Bu virüs IE1, US28, GB gibi proteinleri kodlamaktadır.Bu proteinler de mitogenez, mutagenez, apoptoz, inflamasyon ve anjiyogenezin hücre içi sinyal yolaklarını aktive etmektedir. Bu genlerin ürünleri PDGFR, AKT, STAT 3 gibi anahtar rol oynayan sinyal yolaklarının yanlış düzenlenmesine ve ayrıca monosit ve glial hücre fonksiyonlarının bozulmasına yol açmaktadır (**45**, **46**).

Granülosit-Koloni Uyarıcı Faktör (G-CSF) glioblastoma gelişimiyle alakalıdır. Bu glikoproteinin ve reseptörünün (G-CSFR) yüksek miktarda oluşu glioblastoma malignitesinin farklı seviyelerinde gösterilmiştir. Granülosit-Koloni Uyarıcı Faktör ticari olarak elde edilen glioblastoma hücre hattında proliferasyon ve migrasyonu uyarmaktadır. Granülosit-Koloni Uyarıcı Faktör reseptörünün antikor ile bloklanması hücre büyümesinin ve in vitro koşullardaki hücre hareketinin inhibisyonuyla sonuçlanmaktadır (**47**).

İyonize radyasyon bu tip tümörlerin gelişme olasılığını arttıran fiziksel faktörlerden biridir. Pestisitler, polisiklik aromatik bileşikler ve çözeltiler potansiyel zararlı kimyasallar olarak gösterilmiştir. Elektromanyetik alanlara ve belirli metallere maruz kalınması glioma gelişimini etkilemektedir (**48**).

Cep telefonu kullanımının glioblastoma gelişimine direkt etkisi yoktur fakat uzun süreli kullanımın etkisi hala tam olarak tespit edilememiştir. Petrokimya endüstrisinde çalışan bireyler için glioblastoma multiform sıklığı oldukça fazladır. Bu sebeple mesleki bir rahatsızlık sayılabilir (**49**).

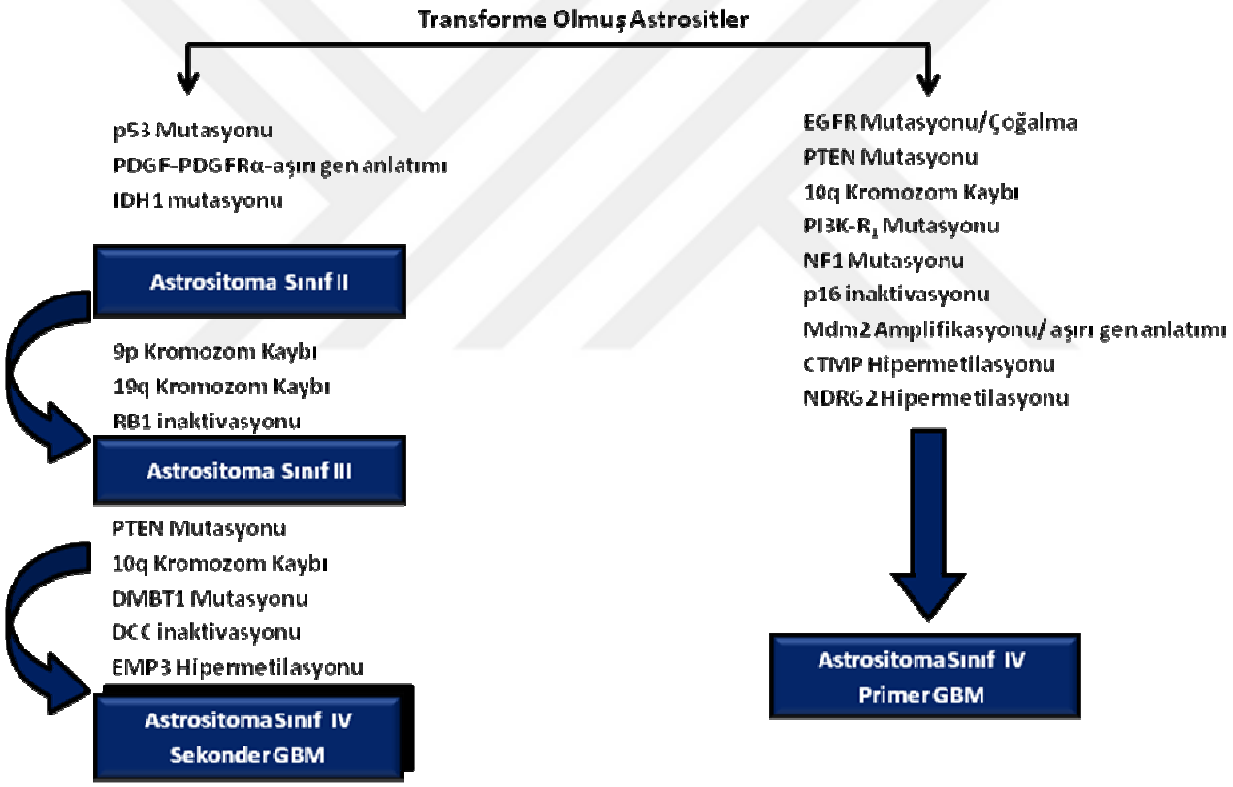
2.2.2. GLİOBLASTOMANIN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ

Primer ve sekonder glioblastomalar, hastalığın birbirinden farklı alt tiplerini ifade etmekte olup gelişimlerinde birbirlerinden farklı yolaklar izlenmektedir. Vakaların %90'dan fazlası de novo gelişen primer glioblastomalar olup genelde yaşlı bireyleri etkiler. Primer glioblastomalarda vakaların %70'inde 10q'da kayıp ya da heterozigosite, %36'sında EGFR amplifikasyonu, %31'inde p16INK4a delesyonu ve %25'inde PTEN mutasyonları ile karakterize olup genelde yaşlı bireyleri etkiler.

Sekonder glioblastomalar ise low-grade difüz astrositoma veya anaplastik astrositomaların ilerlemesi sonucu meydana gelip genelde genç bireylerde görülür. Sekonder glioblastomalarda en sık TP53 mutasyonlarına rastlanmaktadır. Mutasyon patterni genelde CpG bölgelerindeki sık G:C→A:T mutasyonları ile karakterize edilir. Glioblastomanın ilerlemesi sırasında farklı mutasyonların birikimlerine de rastlanır (**50**).

Beyin tümörleri arasında en malignant tip olan glioblastoma genellikle serebral hemisferde, nadiren de talamus ve bazal gangliada görülürler (**51**). Bu tümörün familyal formu vakaların yalnızca %1'ini oluşturmaktadır (**36**). Ancak familyal tümörün gelişim sürecinin genetik arka planı, spontan gelişen formdan farkıdır (**37**).

Glioblastoma gelişimi, hücre döngüsünde G1/S kontrol noktasındaki deregülasyon (**52**) ve glioma hücrelerindeki çeşitli değişimler (kromozom 10q'da genetik materyal kaybı, EGFR, FGFR2, IRS2 ve AKT3 genlerinde mutasyonlar) ile PTEN, TP16, TP53, PARK2, PTPRD ve NF1 genlerindeki mutasyonlar ile ilgilidir (**41**, **42**). İnsan Sitomegalovirüsü gibi bazı virüslerin de glioma gelişimine sebep olan etyolojik ajanlar olduklarına inanılmaktadır (**53**).

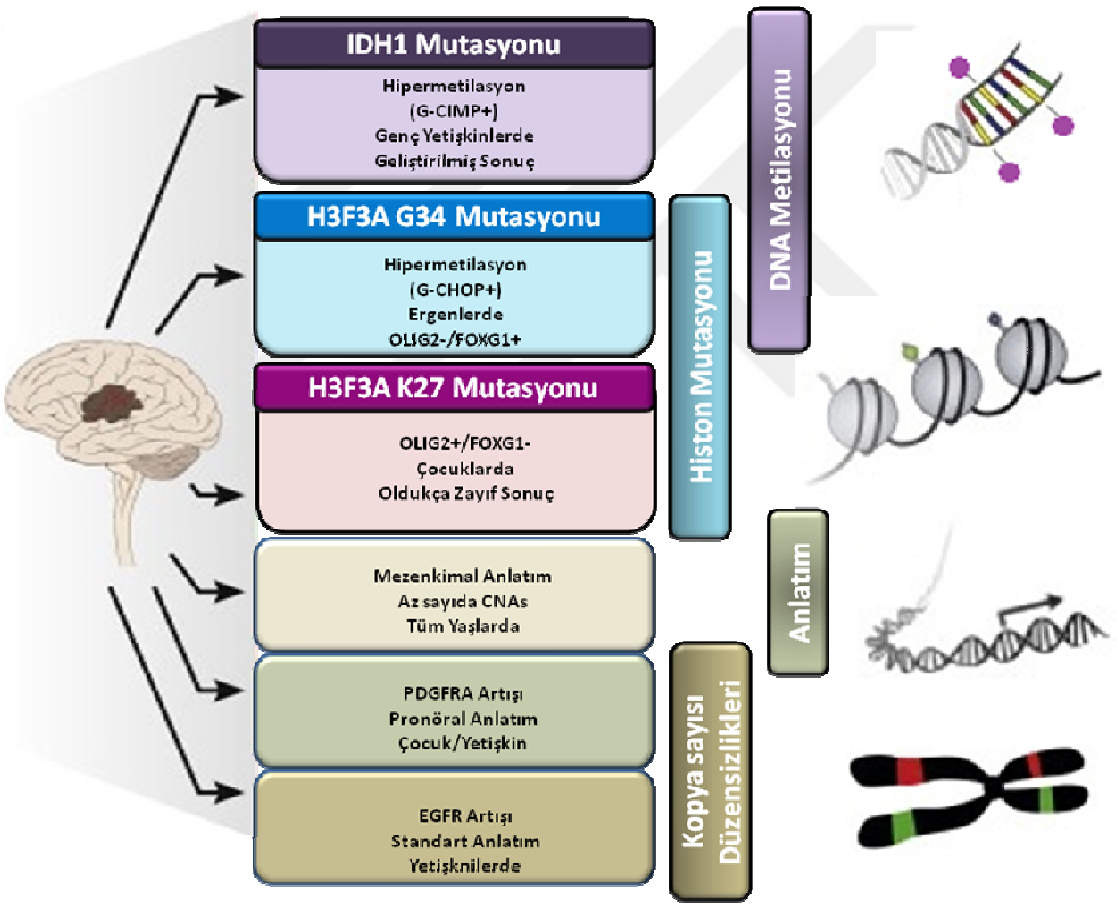


Şekil 1: Transforme Olmuş Astrositlerin Sınıflandırılması (54)

Glioblastomaların farklı alt tiplerini oluşturan moleküler yolaklar şekildeki gibidir. Sekonder glioblastoma astrositoma sınıf II veya III kökenli olup genetik ve epigenetik değişimlerin birikimi sonucu meydana gelir. Bunun aksine primer glioblastoma herhangi bir prekürsör olmaksızın (de novo) oluşur (**Şekil 1**) (**54**).

Glioblastomaları gruplamada en geçerli yöntem, neredeyse aynı tümörde asla bir arada görülmeyen iki farklı genetik değişime; TP53 ve EGFR mutasyonlarına göre yapılan sınıflandırmadır. Yaklaşık olarak glioblastomaların 1/3'inde TP53 mutasyonu görülürken

1/3'ünde EGFR mutasyonu görülür, kalanında ise ikisine de rastlanmaz. Tümör progresyonuna göre bir gruplama yapılması gerektiğinde, sekonder glioblastomalarda TP53 mutasyonuna rastlanma oranı çok daha yüksektir. Gruplama yaşa göre yapıldığında ise genç yetişkinlerde TP53 mutasyonlarına rastlanma oranı daha fazladır. Şu ana dek tümör lokasyonu ile genetik değişimler arasında bir ilişki saptanamamıştır (**51**). Pediatrik glioblastomalar ile ilgili yapılan güncel çalışmalara göre talamik glioblastomada TP53 mutasyonu, diğer glioblastoma tiplerine göre daha yaygındır (**55**-**58**). Ayrıca yine ağırlıklı olarak çocuklarda görülen beyin sapı glioblastomalarında EGFR amplifikasyonuna rastlanmazken TP53 mutasyonları daha sık izlenmektedir (**59**, **60**).



Şekil 2: DNA metilasyon modelleri baz alınarak hazırlanan glioblastoma alt grupları (61)

Global DNA metilasyon modelleri baz alınarak altı farklı glioblastoma alt grubu oluşturulmuştur (**Şekil 2**) (**61**).

Sitrik asit döngüsünde görevli olan izositrat dehidrojenaz 1'i kodlayan IDH1 geninin tüm glioblastoma olgularının %12'sinde mutasyona uğradığı bilinmektedir **(62)**. çeşitli histolojik ve davranışsal özelliklere sahip 321 glioma olgusunda yaptıkları çalışmada, IDH1 mutasyonlarından 130'unda mutasyon tespit etmiş ve bu mutasyonların tümünün 132. aminoasit

rezidüsünde olduğunu göstermişlerdir. Bu mutasyonların %91'i G→A mutasyonlarıdır (Arg→His).

IDH1 mutasyonları low-grade difüz astrositomalarda %88, low-grade difüz veya anaplastik astrositomalardan gelişen sekonder glioblastomalarda ise %82 oranında görülmektedir. Benzer olarak IDH1 mutasyonlarına oligodendrogliomalarda %79, oligoastrositomalarda ise %94 oranında rastlanmaktadır. IDH1 mutasyonları ile TP53 mutasyonları low-grade difüz astrositomaların %63'ünde, 1p/19q heterozigotisesinin kaybı ile birlikte oligodendrogliomaların %64'ünde izlenmektedir. Pilositik astrositomalarda (%10) ve primer glioblastomalarda (%5) nadir görülürler (**62**).

Sturm vd. tarafından yapılan bir araştırmaya göre, H3F3A geninde oluşan her mutasyon farklı bir global metilasyon patterni göstererek epigenetik bir glioblastoma alt grubu tanımlar ve H3F3A geni mutasyonları, IDH3 mutasyonları ile birlikte görülmektedir ki bu da mutasyona bağlı üçüncü bir alt gruba işaret eder. Aynı zamanda, transkripsiyon faktörleri OLIG1, OLIG2 ve FOXG1 regülasyonunda değişimin görüldüğü, farklı anatomik kompartmanlardaki GMB'e sebep olan iki H3F3A mutasyonlarının farklı hücresel kökenleri gösterdiği düşünülmektedir. Pediatrik glioblastoma vakalarının 1/3'inde H3F3A mutasyonlarının H3.3 histonunun iki kritik aminoasitini (K27 ve G34) etkilediği gösterilmiştir (**61**).

2.2.3. GLİOBLASTOMA VE APOPTOZ İLİŞKİSİ

Apoptoz çok hücreli organizmalarda genetik olarak kontrol edilen ve doku homeostazının sağlanmasında etkili olan bir hücre ölüm şeklidir (**63, 64**).

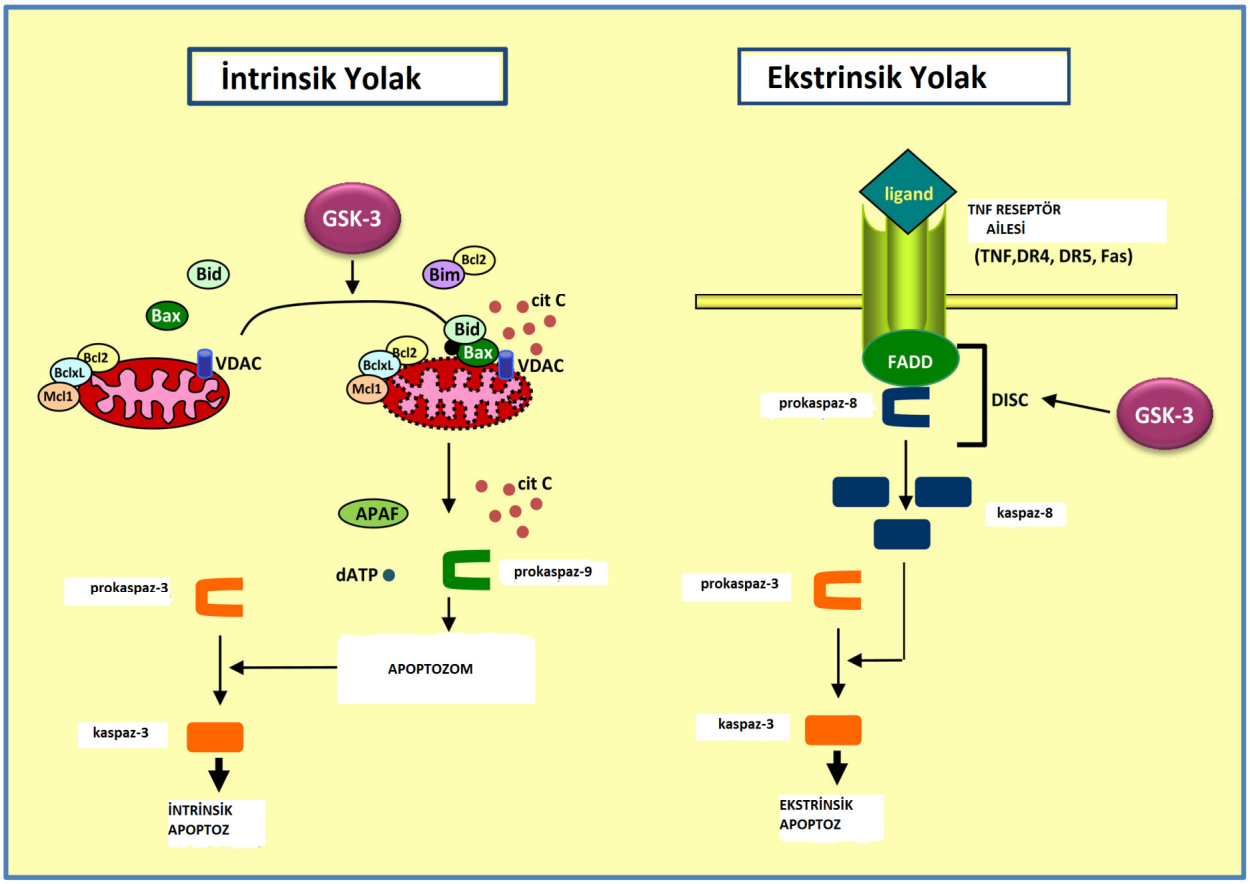
Hücre bir ölüm şekli olarak apoptoza karar verdiğinde hücre içinde bir dizi biyokimyasal ve morfolojik değişim gözlenir. Çekirdek zarı erimeye başlar, çekirdek DNA'sı parçalanır, hücre küçülür ve iskeleti dağılır (**65**, **66**).

Hücrenin apoptoz denilen bu kontrol mekanizmasının zarar görmesi kanser oluşumu, otoimmün rahatsızlıklar ve nörodejeneratif hastalıklar gibi pek çok sürece sebebiyet verir (**67**).

Hücrelerde apoptoz süreci 2 temel mekanizma ile karakterizedir. Bunlardan biri mitokondri diğeri ise hücre ölüm reseptörleri aracılığıyla gerçekleşir. Mitokondriye bağlı olan yolak hücre içi ölüm sinyalleri ortaya çıktıktan sonra BH3 domaini içeren Bcl-2 ailesi tarafından gerçekleştirilir (**68**). Bcl-2 ailesi proteinleri mitokondriyal apoptozun gerçekleşmesinde fonksiyoneldir (**69**, **70**). Bcl-2 proteinleri Bax ve Bak adı verilen proapoptotik proteinlerle birleşerek kaspaz yolağını aktive ederler (**71**).

Ölüm reseptörlerine bağlı olan yolak ise plazma membranında lokalize olmuş TNF reseptör ailesi aracılığıyla gerçekleşir. Bu reseptör ailesine TNF-R, Fas, DR4, DR5 örnek verilebilir (**72**).

Bu reseptörlerin her biri kendisine özgü ligand ile aktive olsa bile aynı etki mekanizmasını kullanır. Ligand ile uyarım sonucunda Fas ilişkili ölüm domaininin trimerizasyonu gerçekleşir ve bu yapıya prokaspaz-8 bağlanabilir hale gelir. Bu süreç hücre ölüm sinyalinin oluşmasını sağlar (**73**). Kaspaz-8'in kendisini aktiflemesi ile efektör mekanizmalar devreye girerek apoptoz tamamlanır (**74**). İntrinsik ve ekstrinsik yolak üzerinden efektör mekanizmaların devreye girmesi Şekil 3 te gösterilmiştir **(75)**.



Şekil : 3 İntrinsik ve Ekstrinsik Apoptoz Yolakları (75)

Yapılan geçmiş çalışmalar DNA'ya zarar veren kimi ajanların hücresel apoptozu tetikleyebildiğini göstermiştir. Potansiyel antikanser etkiye sahip olan Etoposid bunlardan birisidir ve ayrıca DNA Topoizomeraz II' nin inhibitörüdür. Bu yüzden malignant beyin tümörlerinin tedavisi için hem tek başına hem de diğer kemoterapötik ilaçlarla kombine olarak kullanılabilmektedir (**76**).

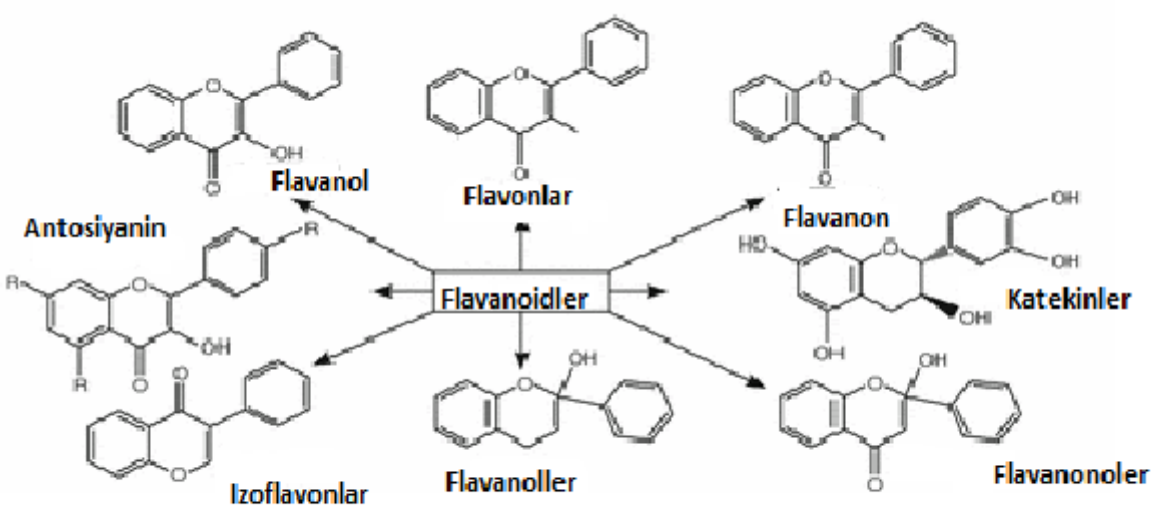
2.3. FLAVONOİDLER

Flavonoidler şimdiye değin 10.000 i aşkın çeşidi bulunmuş bitkisel metabolitlerdir. Ancak bu metabolitlerden yalnızca birkaçı detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Bitkileri zararlı ultraviyole ışınlardan koruma veya bitkisel pigmentasyon gibi farklı görevleri vardır. Ek olarak antioksidan, antiviral ve antibakteriyel etkilere sahiptirler. Gen ekspresyonunu ve enzimatik reaksiyonları düzenlemede etkilidirler (**77**).

Üç karbon atomuna bağlanan 2 aromatik halkadan oluşurlar. Böylece heterosiklik oksijenaz yapısı meydana gelir (**78**).

Flavonoidler benzopiron yapısıyla karakterize çok sayıda polifenolik bileşikten oluşurlar.

4000'in üzerinde farklı flavonoid grubu tanımlanmış ve flavonoller, flavonlar, flavononlar, isoflavonlar, katekinler ve antosiyaninler olarak ayrılmıştır (**79**).



Şekil 4: Farklı Flavonoidlerin Kimyasal Yapıları (79)

2.3.1. FLAVONOİDLERİN BİYOLOJİK ETKİLERİ

2.3.1.1. Flavonoidlerin Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri

Flavonoidlerin antioksidan etkilerinin ortaya konulması onları kardiyovasküler sistem hastalıklarına karşı potansiyel birer madde haline getirmiştir (**80**). Örneğin önceki yapılan çalışmalar flavonoid alımının kardiyovasküler sisteme bağlı ölümleri azalttığını yetişkin Amerikan populasyonlarında göstermiştir (**81**).

Yüksek miktarda flavonoid alan kadın ve erkeklerin kardiyovasküler hastalıklara bağlı ölüm riskleri daha azdır (**82**). Yine başka bir çalışmada yüksek flavonoid alımının hipertansiyona karşı bireyleri koruduğu gösterilmiştir (**83**).

Ateroskleroz multifaktöriyel bir hastalık olup oksitlenmiş olan düşük yoğunluklu lipoproteinler bu hastalık riskini arttırır. Diğer sebepler ise kan damarlarının inflamasyonu ve koagülasyon sonucu oluşan durumlardır (**80**, **84**). Antioksidan ve serbest oksijen radikallerini yakalama özelliklerinden dolayı flavonoidler reaktif oksijen türlerini yok ederek plazma LDL oksidasyonunu ve kan damarı endotelyumunun inflamasyonunu giderirler. Ayrıca flavonoidler reaktif oksijen türlerinin artışına sebep olan NADPH oksidaz, lipojenaz ve ksantin oksidaz gibi enzimlerin etkinliğini azaltmaktadırlar (**80**).

2.3.1.2. Flavonoidlerin Sinir Sistemi Üzerine Etkileri

Flavonoidlerin yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıkları önleme konusundaki etkileri geçtiğimiz yıllardaki araştırmaların anahtar konularından birini oluşturmuştur. Alzheimer, Parkinson ve demans bu rahatsızlıklara örnek olarak verilebilir. Flavonoidlerin nöronal fonksiyonu düzenlediği ve bu rahatsızlıkları pozitif anlamda etkilediği gösterilmiştir (**85**-**88**).

Fazla flavonoid alımının kognitif fonksiyonların düzgün işleyişini, nöronları ve onların fonksiyonlarını koruyarak sağladığı ortaya konulmuştur (**88**). Yine flavonoidlerce oldukça zengin olan Ginko biloba bitkisinden elde edilen ekstraktın yaşa bağlı bunamayı ve Alzheimer hastalığını tedavide etkili olduğu gösterilmiştir (**89**).

Flavon alt sınıfına ait Tangeretin adlı flavonoidin Parkinson Hastalığı'ndan korunmada etkili olduğu belirtilmiştir. Nörotoksik bir madde olan 6-hidroksidopaminin olumsuz etkisi hayvan modelleme deneylerinde telensefelonun striatum bölgesinde gösterilmiştir. Parkinson hastalığının kaynağında yatan nörolojik hasar bu yöndedir. Tangeretin, uygulanan farelerde kan-beyin bariyerinden geçerek bu bölgedeki hasarı giderebilmiştir (**90**).

2.3.1.3. Flavonoidlerin Antikarsinojenik Etkileri

Kanser araştırmalarında flavonoidlerin koruyucu etkilerine odaklanmak gerekmektedir (**91**-**97**). Çünkü kimyasal koruma, doğal ve sentetik maddeler kullanılarak karsinogenezin oluşumunu ve nüksetmesini engellemeyi amaç edinen bir yaklaşımdır (**98**).

Epidemiyolojik ve klinik çalışmalar bu bileşiklerin birtakım gen ve enzimlerle etkileşerek kanseri önlemede etkili olduklarını göstermiştir (**91**).

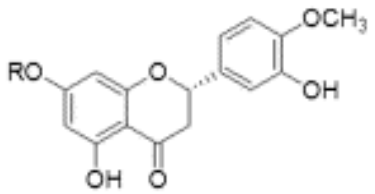
Flavonoidlerin birçok hücresel mekanizmada etkili olduğu bilinmektedir. Kanserleşmenin erken evrelerinde; hücre proliferasyonunun inhibisyonundan, DNA tamirinden ve oksidatif stresin azaltılmasından sorumludurlar. Eğer kanserleşme ilerleme evresinde ise flavonoidler apoptozu indükleyebilir, anjiyogenezi inhibe edebilir. Bununla beraber antioksidan aktiviteyi de arttırabilirler (**91**, **95**, **98**, **99**).

Flavonoidlerin antikanser etkileri hücre döngüsünün inhibisyonu ile de ortaya çıkmaktadır. Hücre döngüsünün düzenlenmesinde etkili olan siklin ve siklin bağımlı kinazların kontrolden çıkmış olan işlevleri yine flavonoidler tarafından düzenlenmektedir (**93**, **100**, **101**).

2.3.2. HESPERİDİN

Hesperidin turunçgillerde bolca bulunan ve flavanoidlerin alt grubuna ait bir flavanon glikozidtir. Bu glikozidin aglikon formu ise Hesperetin olarak adlandırılmaktadır. Hesperidin ilk olarak Fransız kimyacı Lebreton tarafından turunçgil meyvelerin kabuklarından izole edilmiştir (**102**).

Çeşitli biyolojik akvitelerinden dolayı hesperidin ayrıca bir biyo-flavanoid olarak tanımlanmaktadır. Hesperidin, hesperetinin B-7-rutinozid formudur. Hesperetin ise bir aglikondur **(103)**.



R = H, Hesperetin
R = Rutinose (glikoz + rhamnose), Hesperidin

Şekil: 5 Hesperidin ve Hesperetinin Kimyasal Yapısı (103)

Hesperidin ve onun aglikonu hesperetin çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir. Örneğin hesperidin vitamin benzeri bir etkiye sahiptir ve kapillerlerin geçirgenliğini azaltabilmektedir (Vitamin P). Ayrıca bunlarla birlikte hesperidin antioksidan, antiinflamatuar, antikarsinojenik ve antialerjik özelliklere sahiptir (**102**).

Ancak yapılan çok sayıda çalışma yeni farmakolojik etkilerin ve moleküler hedeflerin olduğunu göstermektedir. Örneğin daha önce araştırılmamış olan hesperidinin merkezi sinir sistemi üzerine etkisi geçtiğimiz 10 yıl içerisinde ana araştırma konularından biri haline gelmiştir (**104**, **105**).

Yeni bulgular hesperidinin sadece oluşan serbest oksijen radikallerini uzaklaştırmaya değil aynı zamanda hücresel antioksidan savunma mekanizmasını ERK / NRF 2 sinyal yolağı aracılığıyla arttırdığını göstermiştir (**106**, **107**). Beyinden köken alan Nörotropik Faktörün artışı hesperidin ve hesperetin içeren flavanoidlerin öğrenme ve hafıza yetisini arttırdığını göstermektedir (**108**, **109**).

2.3.2.1. HESPERİDİN'İN BİYOLOJİK ETKİLERİ

2.3.2.2. Hesperidin ve Hesperetin' in Nörofarmakolojisi

Hesperidin ve hesperetinin kan-beyin bariyerini geçebilme özelliği onları merkezi sinir sistemi tedavileri için ideal birer madde yapmaktadır (**110**). Bu iki bileşiğin merkezi sinir sistemi üzerindeki etkisi onları bu yönde yapılan bazı çalışmaların odağı haline getirmiştir (**103**).

Genelde yapılan çalışmalar düşük miktardaki bazı flavanoid alımlarının Parkinson hastalığı riskini arttırdığını belirtmektedir (**111**). Ek olarak flavanoidlerin düşük seviyeleri bunama ile ilişkilidir. Her 4 Alzheimer hastasından 1'inde flavanoid eksikliği gösterilmiştir (**112**).

Turunçgillerden elde edilen hesperidin, hesperetin ve neohesperidinin nöroprotektif etki gösterdiği ve PC-12 hücrelerini H_2O_2 indüklü sitotoksisiteden koruduğu ve bunu da oluşan radikalleri temizleyerek, kalsiyum seviyelerini ve kaspaz-3 aktivitelerini arttırarak yaptığı gösterilmiştir (**113**).

Huang ve grubunun bulguları hesperidin ve hesperetinin, amiloid-B indüklü otofajiyi inhibe ettiğini ve Nöro-2A hücrelerinde glikoz yararlanımını arttırdığını göstermiştir. Bu olgu nöronal hücrelerdeki glikoz kontrol mekanizması dolayısıyla Alzheimer hastalığından korunmada önemli bir belirteçtir (**114**).

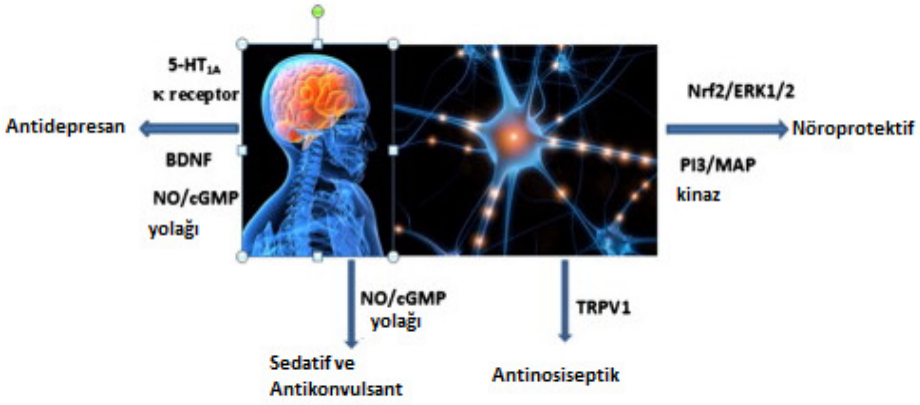
Yapılan önceki çalışmalar hesperidinin in-vivo ve in-vitro da nöroprotektif etkisinin olduğunu göstermiştir. Örneğin amiloid-B üzerinde (**114**), 3-nitropropionik asit indüklü (**115**) ve H_2O_2 indüklü nörotoksisite üzerinde nöroprotektif etkileri vardır (**116**).

Ancak hesperetinin nöronları eksitotoksik nöronal hasardan korumada hesperidinden daha etkili olduğu sıçanların korteks hücrelerinden yapılan primer kültür deneylerinden anlaşılmıştır (**117**).

Hesperidinin nöroprotektif etkisi başlıca antioksidan aktivitesi ve antiinflamatuar aktivitesidir (**115**). Ancak bununla birlikte kaspaz-3 aktivitesinin artması, kalsiyum-iyon regülasyonu (**116**), nöronal enerji metabolizmasının gelişimi (**114**) ve mitakondriyal disfonksiyonun dönüşümü (**118**) de nöroprotektif etki olarak gösterilebilir. Bu flavanoidler nitrosatif stres ve nitrerjik yolak inhibisyonu üzerinden sinir sistemi üzerine pozitif olarak etkilidirler (**103**).

Hesperidinin inhibe edici bu özelliğiyle lipopolisakkaritler serumdaki nitrit seviyesini 10 kata kadar arttırmaktadır (**119**). Ayrıca L-NAME adı verilen nitrik oksit sentaz inhibitörü hesperidin karşısında akut immobilizasyon-stres indüklü anksiyete benzeri davranışlara ve mitokondriyal disfonksiyona karşı nöroprotektif etkilere sahiptir (**103**).

Hesperidinin PI3 ve MAP Kinaz yolağı aracılığıyla nöronları ölümden koruduğu gösterilmiştir (**120**). Ek olarak hesperidin ve hesperetin, hemoksijenaz-1 indüksiyonu ERK / NRF 2 sinyal yolağı aracılığıyla hücresel antioksidan savunma kapasitesini arttırmaktadır. Bu indüksiyon ayrıca CAT, SOD ve GST (**106**) gibi antioksidan enzimlerinin seviyelerini yükseltmektedir. Hücresel savunma mekanizmasının gelişmesiyle hücresel hasar azalmaktadır. Bu mekanizma hesperetin ve hesperidinin nöroprotektif etkisine örnek olarak gösterilebilir.



Şekil: 6 Hesperidin' in Merkezi Sinir Sistemi Üzerine Etkisi (103)

2.3.2.3. Hesperidinin Anksiolitik, Sedatif ve Antikonvülzan Etkileri

Hesperidinin sakinleştirici etkisi farklı çalışmalarla ortaya konulmuştur (**121,16,122,123,124**). Ayrıca hesperidin ve diazepam arasındaki sinerjistik etkileşimin de

sakinleştirici etki yarattığı gösterilmiştir (**15**). Ancak hesperidinin asıl sakinleştirici ve anksiolitik etkisi intraperitonal ve oral uygulamaya bağlıdır (**124**).

Hesperidin, glutatyon, SOD, CAT ve mitokondriyal kompleks I, II, IV aktivitelerini arttırmış ve PTZ konrol gruplarıyla karşılaştırıldığında MDA ve nitrit seviyelerini azaltmıştır (**125**). Araştırmacılar ayrıca hesperidinin nitrik oksit yolağı aracılığıyla antikonsülvant etkisini göstermiştir (**108**). Ayrıca düşük doz hesperidin ile diazepam veya gabapentinin birlikte uygulanması bu ilaçların nöroprotektif etkisini arttırmaktadır (**125**).

2.3.2.4. Hesperidinin Antinosiseptik Özellikleri

Ekstremitelerdeki ağrı durumu organizmadaki hesperidin ile ilgilidir (**126**). Bu sebeple hesperidin doğal bir ağrı kesici olarak önerilebilir. Bu tür sonuçlar hayvan modellerinde gösterilmiştir (**103**).

Hesperidin benzodiazepin bir ilaç olan alprozam ile birlite uygulanışı antinosiseptik etkiyi arttırmıştır (**16**). Yapılan başka bir çalışma hesperidinin antinosiseptik etkisini eklemlerle ilgili gut tipi rahatsızlıklarda göstermiştir (**17**). Bu etki antinosiseptik ve anksiolitik ilaçlarda yeni hedefler olarak ortaya çıkan TRPV 1 reseptörleriyle kısmen alakalıdır (**127**).

Literatürde daha önce, glioblastoma üzerinde hesperidinin antiapoptotik ve antiproliferatif etkisinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, hesperidinin olası antikarsinojenik etkileri U-87 Beyin Glioblastoma Hücre Soyu kullanılarak araştırılmıştır. Elde ettiğimiz veriler, özellikle kanser tedavisi için yeni çalışma alanları doğuracak ve çalışmamız beyin kanserleri için yeni tedavi seçeneklerinin arasında yer alarak bilime katkıda bulunacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Materyaller

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

Hesperidin, Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiş olup, stok solüsyonları 100mg/ml olacak şekilde dimetilsülfoksit (DMSO) içinde hazırlanmıştır.Bütün stoklar küçük hacimlere bölünerek -20°C de saklanmıştır.

U-87 Glioblastoma Hücrelerini büyütmek amacı ile ATCC modifikasyonlu fenol kırmızısı DMEM (Gibco, 41965, Glikoz, L-Glutamin) içeren besiyeri ve MRC-5 sağlıklı akciğer hücrelerini büyütmek için RPMI 1640 (Lonza BE12-918F L-Glutamin ve fenolredsiz) içeren besiyeri kullanılmıştır.

Bu besiyerlerine ilk kullanımdan önce Fetal Bovin Serum (FBS, sıcaklık inaktif, Gibco 10437028) ve penisilin/streptomisin (Gibco, 15140122) eklenmiştir. Hücre alt kültürü esnasında % 0.25 Tripsin-EDTA (Gibco, 25200072) ve Ca^{+2}/Mg^{+2} içermeyen DPBS(Gibco, 14190367) solüsyonları kullanılmıştır.

Hücre canlılık deneyi için sırasıyla WST-1 (Roche, 11644807001) kiti kullanılmıştır. Hesperidin kaynaklı apoptotik etkinin incelenmesi için sırası ile, kaspaz-3(kolorimetrik, Biovision, K106-100) ve JC-1(mitokondriyel membran deteksiyon, Cayman Chemicals, 10009172) kitleri kullanılmıştır.

3.1.2. Cihazlar

CO_2 İnkübatörü (New Brunswick), Işık Mikroskopu (Leica), Floid (Life Technologies), Otomatik Hücre Sayıcı (Life Technologies), Laminar Kabin (Fast Safe Elit), Santrifüj (Beckman Coulter), ELISA Okuyucu (ThermoScan,Thermo), iScan (Illumina), Heat Block (Illumina), Bioanalyzer (Agilent), Nanodrop (Roche), Buzdolabı (+4 °C, -20 °C, -80°C derin dondurucu), Sıvı Azot Tankı, Otoklav, Su Banyosu, Vortex, Çalkalayıcı.

3.2. Yöntem

3.2.1. U-87 Hücre Hattı

U-87 Beyin glioblastoma hücre hattı, 1966 yılında 44 yaşında bir erkek hastanın beyin epitelyal karsinoma dokusundan yapılan kültür ile üretilmiştir. Hücreler nemli atmosferde 37°C sıcaklıkta ve %5 CO_2 altında büyütülmüştür. Büyüme ortamı olarak %10-15 Fetal Bovine Serum ve %1 Penicilin Stereptomisin içeren DMEM besiyeri kullanılmıştır.

3.2.2. Hücre Ekimi

Kryotüp, 37°C su banyosunda O-halkası suya değmeyecek şekilde ~ 90 sn süre ile çözdürülmüştür. Çözünen kryotüp, etrafı % 70 etil alkol ile silinerek laminar kabine alınmıştır. 1ml hücre solüsyonu içinden 10uL alınmış ve 1:1 oranında Trypan Blue solüsyonu ile karıştırılarak Countless Cell Counter ile hücre sayısı belirlenmiştir.

Hücre solüsyonu, 5 ml hücre besiyeri içinde süspanse edilerek 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti, belirlenen hücre sayısına göre 75 cm^2 lik flasklara ekilmiştir.

Yukarıda bahsedilen tüm bu işlemler U-87 beyin glioblastoma hücre hattı hücreleri ve sağlıklı MRC-5 akciğer hücreleri için gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Alt Kültür

Hücrelerin besiyerleri 2 günde bir olacak şekilde yenilenmiştir. Hücreler konfluent oldukları durumda alt kültürleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Alt kültürleme işleminde ilk aşama olarak, besiyeri uzaklaştırılmıştır. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra, serum etkisini uzaklaştırmak amacı ile hücreler Ca^{+2} / Mg^{+2} (-) DPBS ile yıkanmıştır. Bu aşamadan sonra DPBS aspire edilmiştir.Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması için % 0.25 Tripsin-EDTA karışımı eklenmiş ve 37°C, % 5 CO_2 koşullar altında 5 dk. inkübe edilmiştir.İnkübasyon süresini takiben hücreler besiyeri ile yıkanmış ve santrifüj tüpüne aktarılmıştır.(Süspanse hücrelerden 10 uL alınmış 1:1 oranında Trypan Blue solüsyonu ile karıştırılarak Countless Cell Counter ile hücre sayısı belirlenmiştir) 5 dk. 1500 rpm' de santrifügasyon yapılmış, süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre pelleti hücre sayısına göre belli ekim oranlarında 75 cm^2' lik flasklara ekilmiştir.

Alt kültürleme işlemleri gerçekleştirilirken beyin glioblastoma hücre hattı için kullanılan DMEM besiyeri içerisine % 15 FBS ve yine alt kültürlemesi yapılan sağlıklı akciğer hücreleri için RPMI 1640 besiyeri içerisine % 10 FBS ve bunların yanısıra her iki hücre tipi için kullanılan besiyerlerinin içerisine hacmen %1 olacak şekilde Penisilin Streptomisin eklenmiştir.

3.2.4. Hücre Dondurma

Hücre dondurulması için, alt kültürleme santrifüj aşamasından sonra pellet üzerine iki hücre tipi için de % 90 büyüme besiyeri ve % 10-15 FBS içeren hücre dondurma medyumu eklenerek kryotüplere 1 ml hücre solüsyonu eklenmiştir. Kryotüpler aşamalı olarak önce -80 °C' ye, 24 saat sonra -196 °C azot tankına aktarılmıştır.

3.2.5. Hesperidin Solüsyonunun Hazırlanması

Hesperidin bileşiği ticari olarak satın alınmış olup, çözücü olarak dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılmıştır. 61.06mg/ml, DMSO ile seyreltilerek 100mg/ml stok konsantrasyon kullanılarak farklı konsantrasyonlarda (0,1,5,7.5,10,25,50 uM) seyreltilmiştir.

3.2.6. WST-1 Hücre Canlılık Testi

Hesperidin bileşiğinin U-87 hücre canlılığı üzerinde doz ve zaman bağımlı etkisi WST-1 Hücre Canlılık Testi ile incelenmiştir. Pozitif kontrol olarak, hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermeyen dozda büyüme medyumu kullanılmıştır.Yöntem metabolik aktif hücrelerde mitokondriyel süksinat dehidrogenaz aktivitesi sonucunda WST-1 tuzunun kolorimetrik olarak tayin edilebilen formazan kristallerine dönüştürülmesi prensibine dayanmaktadır. Her bir örnekten elde edilen absorbans değerleri, örnekteki canlı hücre miktarı ile doğru orantılıdır.

75 cm^2 'lik flasklarda çoğaltılan U-87 hücreleri tripsinazyon aşamasından sonra sayılmış ve 10^4 hücre 100uL büyüme medyumu içinde 96 kuyulu plaklara ekilmiştir. Her bir parametre için 6 ekim yapılmıştır. Plaklar hücrelerin yapışması için 24 saat inkübatörde bekletilmiştir. Bu süreyi takiben kuyucuklardaki büyüme medyumu aspire edilerek 0,1,5,7.5,10,25,50 uM hesperidin ve büyüme medyumu içeren deney ortamları ilave edilmiştir. 0uM hesperidin içeren kuyucuklar kontrol, hücre içermeyen sadece deney ortamı içeren kuyucuklar kör olarak değerlendirilmiştir. Plaklar 24, 48 ve 72 saat inkübatörde bekletilmiştir. Her sürecin sonunda ilgili plaklara 10uL WST-1 çözeltisi eklenmiş ve plaklar 4 saat inkübatörde bekletilmiştir. Plak kuyucuklarının absorbans değerleri plak okuyucuda 450 ve 690 nm dalga boyuna karşı okunmuştur. Kontrol hücrelerinin absorbans değerleri % 100 olarak kabul edilmiş ve diğer örneklerin absorbanslarından rölatif canlılık değerleri hesaplanmıştır.

Tüm absorbans değerlerinden köre ait absorbans değerlerinin ortalaması çıkartılarak asıl absorbans değerleri elde edilmiştir. Her bir örnek için elde edilen 6'lı asıl absorbans değerlerinin ortalaması alınarak ortalama absorbans değerleri (ABSortalama) belirlenmiştir. Örneklerin ortalama absorbans değerleri, kontrol hücrelerinden elde edilen ortalama absorbans değerine bölünerek kontrol hücrelerine karşı rölatif absorbans oranı tespit edilmiş ve bu oran 100 ile çarpılarak her bir örnek için yüzde canlılık değeri hesaplanmıştır.

[Yüzde Canlılık = [Örnek ABSortalama / Kontrol ABSortalama] x 100

3.2.7. Kaspaz-3 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Apoptoz sürecinde önemli bir enzim olan Kaspaz-3'ün enzim aktivitesinin belirlenmesi amacı ile Kaspaz-3 kolorimetrik değerlendirme kiti (BioVision Research Products, California, CA, USA) kullanılmıştır. Bu yöntem total protein eldesinden sonra ortama verilen DEVD-pNA

substratını kesen kaspaz-3' ün, pNA floresan ışıma ile miktar ölçümüne dayanmaktadır. İlk olarak ($5x10^5$) hücre, 6 kuyucuklu kültür kabına (2 ml besiyeri / kuyucuk) ekilmiş ve 48 saat boyunca farklı dozlarda hesperidine maruz bırakılmışlardır.Bu inkübasyon süresinden sonra, hücreler 800 rpm' de 5 dk santrifüj edilerek toplanmış ve süpernatantlar uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, hücrelerin üzerine 100uL soğutulmuş lizis tamponu ilave edilip karıştırılmış, örnekler ependorf tüpe alınıp buzun üzerinde 10 dk bekletilmiştir.10.000 rpm' de 1 dk santrifüj işleminden sonra üst sıvı faz, steril yeni bir ependorf tüpe alınıp 100uL daha lizis tamponu eklenerek protein örnekleri hazırlanmıştır. Kaspaz aktive ölçümü için 96 kuyucuklu düz tabanlı mikro tabaklara ikili olarak her kuyucuğa 50uL protein örneği ve 50uL 2X reaksiyon tamponu eklenmiştir. Daha sonra her kuyucuğa 5uL kaspaz-3 kolorimetrik substratı ilave edilip 37 °C de 2 saat bekletilmiştir. Sonuçlar 405 nm dalga boyunda flow sitometri ile okunmuştur.Bu yöntemle hücrelerde durağan ve hesperidin uygulamaları sonrasında kaspaz-3 enzim aktivitesinde meydana gelen değişim belirlenmiştir.

3.2.8. Mitokondri Zar Potansiyelinin Belirlenmesi

Sağlıklı ve apoptotik hücrelerde mitokondri fonksiyonunun belirlenmesi önemli bir parametredir. Apoptoz esnasında mitokondri membran potansiyeli kaybı JC-1 mitokondri membran potansiyeli belirleme kiti (Cayman Chemicals, MI, USA) kullanılarak flow sitometri aracılığıyla belirlenmiştir. Sağlıklı hücrelerde bir katyonik boya olan JC-1 mitokondride agregatlar şeklinde toplanır ve kırmızı floresan bir renk verir. Apoptotik hücrelerde ise mitokondri membran potansiyeli çökmüş olduğundan JC-1 boyası mitokondri içinde toplanamaz ve sitoplazmada monomerik formda kalarak yeşil floresan bir renk verir. Spektrofotometre ile absorbans değerleri ölçülür ve kırmızı / yeşil absorbans değer oranı hesaplanarak sağlıklı ve apoptotik hücreler arasındaki mitokondri membran potansiyeli farkı elde edilir. Bu amaçla 10^4 hücre, 6 kuyucuklu kültür kabına (2ml besiyeri / kuyucuk) ekilerek, 48 saat boyunca farklı dozlarda hesperidine maruz bırakılmıştır. Hücreler 800 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek toplanmış ve 300uL besiyerinde çözüldükten sonra 30 dakika 30 uL JC-1 boyası eklenerek 37 °C de %5 CO_2 içeren inkübatörde 30 dakika inkübe edilmiştir. 400 g' de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve hücreler 200uL 1X JC-1 tamponunda çözülerek ilk yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Süpernatant 400 g' de 5 dk santrifüjden sonra uzaklaştırılmıştır.JC-1 tamponu ile yıkama işlemi tekrarlandıktan sonra hücre pelleti 300uL JC-1 tamponu ile sulandırılıp her bir örnekten 100uL 96 kuyucuklu plaklara eklenmiştir. Plakalar flow sitometri ile absorbans değerleri, mitokondri zar potansiyeli değişimini değerlendirmek üzere hesaplanmıştır.

3.2.9. Hücre Deney Verilerinin İstatistiksel Analizi

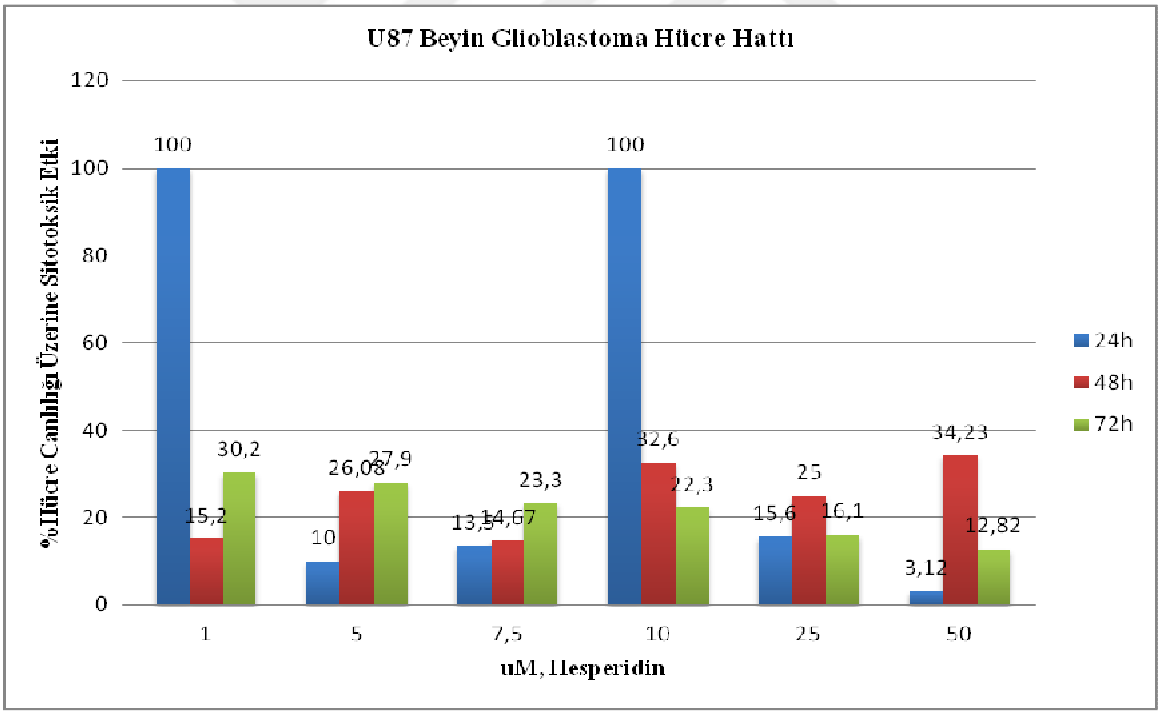
Her deney koşulu için hücreler 6'şar kez ekilerek ve deneyler 3'er kez tekrarlanarak elde edilen veriler Mann-Whitney U SPSS 16.0 programı ile $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde negatif kontrol ve kontrol hücre hattından elde edilen veriler ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hesperidinin Beyin Glioblastoma Hücre Canlılığı Üzerinde Doz ve Zaman Bağımlı Etkisi

Hesperidinin artan doz ve zamana bağımlı sitotoksik etkisi 1, 5, 7.5, 10, 25, 50 uM hesperidin çözeltileri ile 24, 48, 72 saat inkübe edilen U-87 beyin glioblastoma ve sağlıklı akciğer hücreleri MRC-5 üzerinde, 96'lık platelere her bir kuyucuğa 10^4 hücre ekimi 6'şar kez yapılıp 24 saatlik süre içerisinde yapışmaları sağlanarak gerçekleştirilmiştir.

Sitotoksik etkisini incelediğimiz hesperidinin hücre proliferasyonu üzerindeki pozitif veya negatif yöndeki etkisi herhangi bir ilaç vermediğimiz sadece hücre bulunan kuyucukların canlılığı %100 kabul edilerek absorbans değerleri üzerinden oransal olarak hesaplanmıştır. Deney sonuçları hesperidinin U-87 beyin glioblastoma hücreleri üzerinde proliferasyonu kısıtladığı buna karşın MRC-5 sağlıklı akciğer hücreleri üzerinde negatif bir etkisinin bulunmadığı yönündedir.



Şekil: 7 Hesperidin' in U-87 Beyin Glioblastoma Hücre Canlılığı Üzerinde Doz ve Zaman Bağımlı Etkisi

U-87 beyin glioblastoma hücrelerinin 10uM hesperidin ile 48 saat muamele edilmesi sonucunda ilaç vermediğimiz ve kontrol grubu olarak belirttiğimiz hücrelere göre canlılık oranlarında % 67 azalma tespit edilmiştir. Bu oran yine 48 saat için 25uM hesperidin sözkonusu olduğunda % 75 azalma olarak ölçülmüştür. ($p<0.05$) (**şekil 7**)

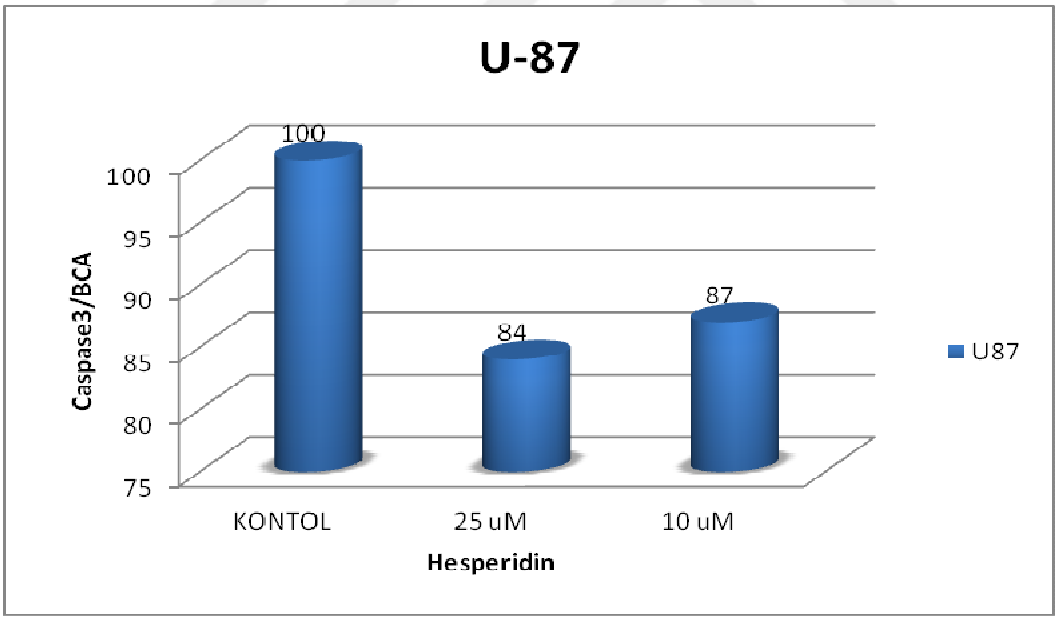
5uM hesperidinin 24 saatlik süre içerisinde MRC-5 sağlıklı akciğer hücre hattı üzerinde yaklaşık %10.5 oranında öldürücü etkisi olduğu bu durumun da hesperidin ilave edilmeyen kontrol grubu hücrelerine göre anlamlı düzeyde olmadığı görülmüştür ($p<0.05$).

4.2. Canlılığı Etkileyen Hücre Ölüm Tipinin Belirlenmesi

Hücre proliferasyon deneylerinde kullanılan 1, 5, 7.5, 10, 25, 50 uM Hesperidin ile üç farklı zaman diliminde inkübe edilen U-87 beyin glioblastoma hücrelerinde gerçekleşen hücre ölümünün ağırlıklı olarak apoptotik hücre ölümü olup olmadığı kaspaz-3 ve JC-1 mitokondriyel membran potansiyel kaybı analizleri kullanılarak incelenmiştir.

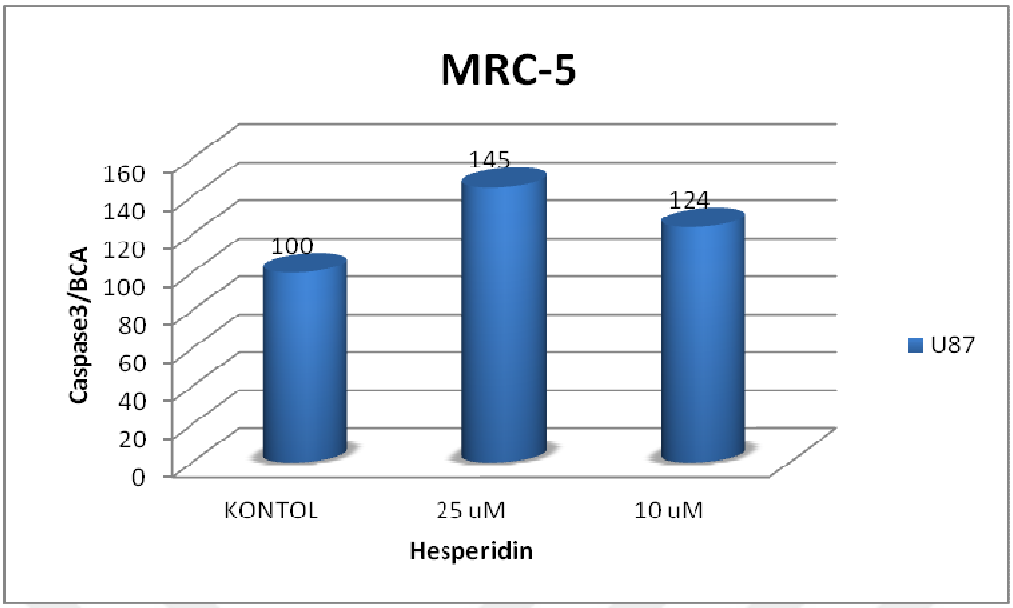
4.2.1. Kaspaz 3/BCA Aktivitesinin İncelenmesi

Beyin Glioblastoma Hücreleri üzerinde 25uM hesperidin 48 saatlik zaman dilimi içerisinde kaspaz aktivitesini % 16 azaltmıştır. Bu oran 10uM hesperidin sözkonusu olduğunda % 13 azalma şeklindedir (**Şekil 8**).



Şekil: 8 Hesperidin' in U-87 Beyin Glioblastoma Hücreleri Üzerinde Kaspaz-3 Aktivitesinin Etkisi

Bununla birlikte 25 ve 10 uM hesperidin 48 saatlik zaman dilimi için MRC-5 sağlıklı akciğer hücreleri üzerine uygulandığında kaspaz aktivitesi düzeylerinde artış sözkonusudur. Bu durum hesperidinin sağlıklı akciğer hücreleri üzerinde kaspaz yolağını tetiklediği ve bu yolak üzerinden hücreleri apoptoza sürüklediği anlamına gelmektedir. (**şekil 9**)



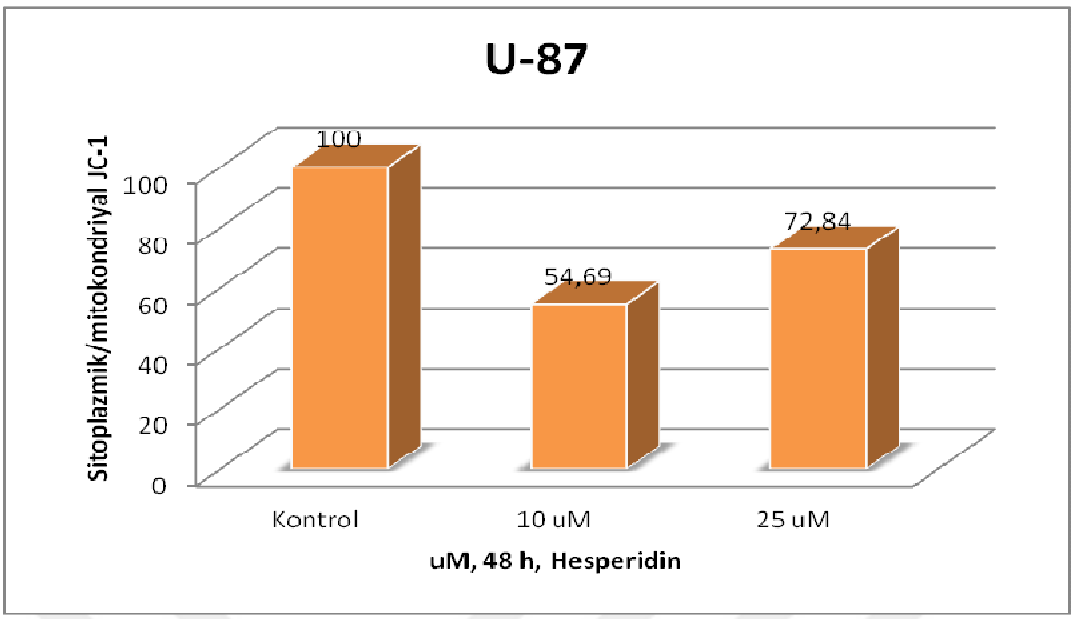
Şekil: 9 (Hesperidin' in MRC-5 Sağlıklı Akciğer Hücreleri Üzerinde Kaspaz-3 Aktivitesinin Etkisi)

4.2.2. Mitokondri Zar Potansiyelinin Belirlenmesi

Mitokondri Zar Potansiyelinin azalması mitokondrideki sitokrom c' nin sitoplazmaya salınarak kaspaz enzimlerini aktifleştirmesiyle karakterize bir durumdur. Zar potansiyelindeki bu değişim hücresel apoptoz mekanizmalarını devreye sokması açısından önemli bir etkiye sahiptir.

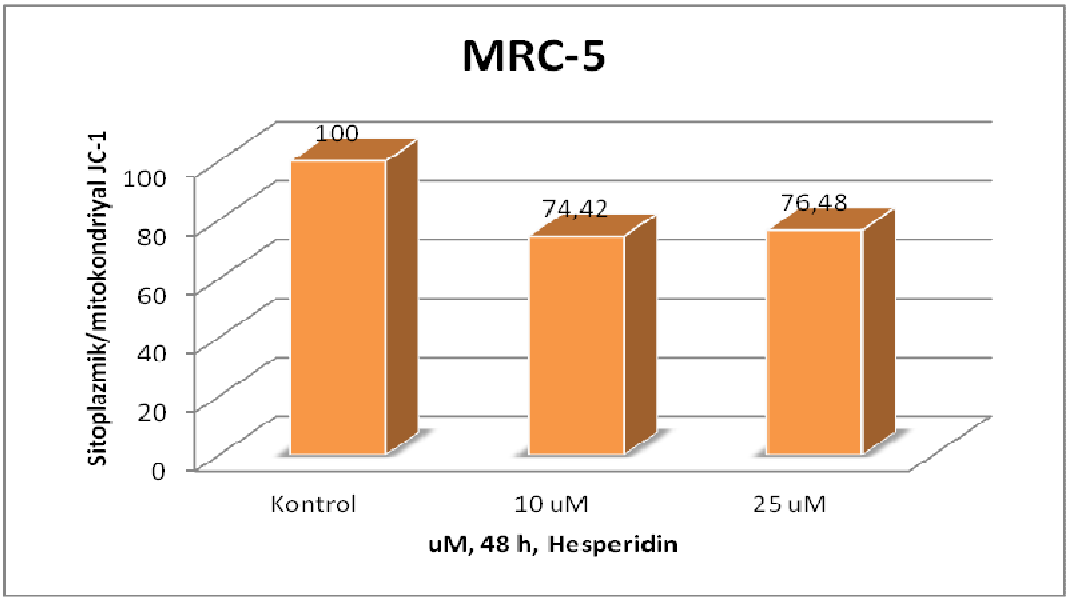
Apoptoz durumundaki mitokondri zar potansiyelindeki kayıp, JC-1 mitokondri membran potansiyeli belirleme kiti (Cayman Chemicals, MI, USA) kullanılarak flow sitometri aracılığıyla değerlendirilmiştir.

Beyin Glioblastoma Hücreleri üzerinde 10uM hesperidin 48 saatlik zaman dilimi içerisinde mitokondri zar potansiyelini % 46 azaltmıştır. Bu oran 25uM hesperidin sözkonusu olduğunda % 28 azalma şeklindedir. (**şekil 10**)



Şekil: 10 Hesperidinin U-87 Beyin Glioblastoma Hücreleri Üzerinde Mitokondri Zar Potansiyelinin Belirlenmesi

Hesperidin'in MRC-5 sağlıklı akciğer hücreleri üzerinde membran potansiyeline olan etkisi ise 48 saatlik zaman dilimi içerisinde 10uM hesperidin uygulaması için % 26, 25uM hesperidin uygulaması için ise % 24 azalma şeklindedir. (**şekil 11**)



Şekil: 11 (Hesperidinin MRC-5 Sağlıklı Akciğer Hücreleri Üzerinde Mitokondri Zar Potansiyelinin Belirlenmesi)

5. TARTIŞMA

Malign gliomalar görülme olasılığı oldukça fazla olan yaygın beyin tümörleridir. Günümüzde cerrahi, kemoterapi ve radyoterapideki gelişmelere rağmen, hücrelerin kemotörapetik ajanlara karşı geliştirdiği ilaç direnci ve sağlıklı hücrelerde gösterdikleri sitotoksik etkiler, uygulanan tedavilerin yetersiz olmasına yol açmaktadır. Bu nedenle araştırmalar kanser hücreleri üzerinde etkili ancak sağlıklı hücrelerde toksik etkisi olmayan doğal ürünlerin tespitine yönelmiştir.

Chen MC. ve arkadaşları hesperidinin H_2O_2 indüklü hücre hasarına karşı, hücresel antioksidan savunma mekanizması kapasitesini insan hepatik L02 hücrelerinde çalışmışlardır (**106**). Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, protein tayini ve enzim aktivite analizi gibi tekniklerin kullanıldığı bu çalışmada hesperidinin heme-oksijenaz-1 (HO-1) ekspresyonunu arttırarak hepatositlerde oksidatif strese karşı koymada etkili olduğu gösterilmiştir. Bunlara ek olarak hesperidinin nükleer translokasyon faktörü Nrf 2 nin artışına sebep olduğu dahası ekstrasellüler sinyal düzenleyici protein kinaz ERK 1/2 yi aktive ettiği gösterilmiştir. Ayrıca ERK 1/2 inhibitörleri belirgin bir şekilde hesperidin aracılı HO-1 artışını ve NRF2 nüklear translokasyonu inhibe etmiştir. Hepsi birden ele alındığında tüm bu bulgular hesperidinin HO-1 indüksiyonunu ERK/ NRF2 sinyal yolağı aracılığıyla arttırdığını ve hücresel antioksidan savunma mekanizması desteklediğini göstermektedir. Bu sebeple Chen MC. ve arkadaşlarına göre hesperidin oksidatif stres aracılı hepatosit hasarında ve karaciğer disfonksiyonlarında potansiyel bir terapötik ajan olarak gösterilmektedir (**106**).

Tamilselvam K. ve arkadaşlarının insan nöroblastoma hücreleriyle yapmış oldukları bir çalışmada rotanon adı verilen ve hücrede mitokondriyal kompleksi hedef alan bir pestisit ile hesperidinin tedavi edici etkisi karşılaştırılmıştır (**128**). Rotanon ile uyarılan hücrelerde mitokondriyal membran potansiyelinde kayıp ve reaktif oksijen türlerinde artış gözlemlenmiştir. Sonrasında yapılan hesperidin uygulaması ile mitokondriyal membran potansiyelinde düzelme ve oluşan reaktif oksijen türlerinde hesperidinin antioksidan sistemi harekete geçirmesinden dolayı azalma gösterilmiştir (**128**).

Park HJ. ve arkadaşlarının insan kolon kanseri hücreleri SNU-C4 üzerinde yapmış olduğu bir çalışmaya göre hesperidinin hücre canlılığını azalttığı ve Bcl-2 ilişkili Bax proteininin ekspresyonunu arttırdığı gözlenmiştir. Ayrıca hesperidin tedavisiyle birlikte temel apoptotik faktörlerden kaspaz-3 ün ekspresyonu ve aktivitesi belirgin ölçüde artmıştır (**129**).

Saiprasad G. ve arkadaşlarının kolon kanseri üzerinde yaptığı araştırmaya göre hesperidinin fosfat-tensin homoloğu (PTEN) üzerinde belirgin bir artışa sebep olduğu gösterilmiştir (**130**). Bununla birlikte hesperidin PTEN artışıyla p-PI3K ve p-Akt yolaklarını da

inhibe etmektedir. Elde edilen bulgular hesperidinin PTEN yolağı üzerinden hücreyi apoptoza götürdüğünü göstermektedir (**130**).

Ghorbani A. ve arkadaşlarının NALM-6 hücreleri üzerinde yaptığı bir çalışmaya göre hesperidinin PPARy nın transkripsiyonel aktivitesini eksprese ettiği ve p53 ü uyardığı gösterilmiştir. Bunlarla birlikte NF-kB nin temel aktivitesinde de azalma gözlenmiştir (**131**).

Nazari M. ve arkadaşlarının Ramos Burkitt's lenfoma hücreleri üzerinde yapmış oldukları çalışmaya göre hesperidinin doksorubiksin indüklü NF-kB aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte Ramos hücrelerinin hesperidin ile birlikte proliferasyonunun inhibe olduğu ve PPARy ya bağlı olmaksızın apoptoza sürüklendiği belirtilmiştir (**132**).

Yong Yang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada inhibitör mekanizması geniş ölçüde bilinmeyen fakat bazal glikoz alınımını azalttığı bilinen hesperetinin MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri kullanılarak hangi hücresel yolakları etkilediği araştırılmıştır (**133**). Sonuçlar göstermiştir ki hücresel glikoz alınımının kısıtlanması glikoz transport 1' in negatif düzenlenmesine sebep olmuştur. Hesperetin ayrıca bozulmuş hücre membranlarındaki glikoz transport 4' lerin insülin indüklü glikoz alımını kısıtlamaktadır. Ek olarak bunlarla birlikte insülin reseptörü beta alt biriminin (IR-beta) fosforilasyonu ve Akt yolağı baskılanmıştır. Yong Yang ve arkadaşlarına göre hesperetin hücresel glikoz alınımını sınırlandırdığından hücresel proliferasyonu da negatif yönde etkilemektedir. Bu durum deneylerimiz sonucunda elde ettiğimiz proliferasyon verileriyle uyuşmaktadır. Kanser hücreleri glikoza ve belirli ölçüde hesperitine duyarlılık gösterdiği için hesperetin potansiyel bir terapötik ajan olarak görülmektedir (**133**).

Yine Yong Yang ve arkadaşlarının HeLa hücreleri üzerinde yaptığı başka bir çalışmaya göre hesperetinin TGF-B sinyal yolağını inhibe ettiği görülmüştür (**134**). Tekli molekül ölçümü ve hücresel görüntüleme teknikleriyle hesperetinin ligand-reseptör etkileşimini engellediği gösterilmiştir. Bu verilerle birlikte TGF-B nın alt efektör mekanizmasının elamanlarından biri olan Smad 3 ün fosforilasyonunun inhibe edildiği anlaşılmıştır. TGF-B ündüklü tümör gelişiminin hesperetin tarafından inhibe edilişi bu molekülü antikarsinojenik çalışmalar için etkili bir belirteç haline getirmiştir (**134**).

Alshatwi AA. ve arkadaşlarının insan servikal kanser hücreleri üzerinde yaptığı bir çalışmaya göre ise hesperidinin aglikonu olan hesperetinin, hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve hücre siklusunun G2/M fazını uyardığı görülmüştür (**135**). Ayrıca hesperetin uygulaması ile mitokondriyel membran potansiyelinde azalma görülürken buna karşın kaspaz 3-8-9 ve p53 ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Çalışma sonucu elde edilen bulgular hesperetinin potansiyel bir antikanser etkiye sahip olduğu yönündedir (**135**).

Literatürde hesperidinin beyin glioblastoma hücreleri üzerinde antiapoptotik ve antiproliferatif etkisinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmamızda, hesperidinin olası antikarsinojenik etkileri U-87 beyin glioblastoma hücre hattı üzerinde incelenmiştir. Hesperidin'in U-87 hücre proliferasyonu ve canlılığı üzerinde doz ve zaman bağımlı etkisi WST-1, mitokondriyel membran potansiyeli JC-1 ve kaspaz-3 testi yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Mitokondri membran potansiyelindeki kayıp sonrası efektör kaspazların devreye girmesi ve bunun sonucu hücresel apoptoz sürecinin tetiklendiği tarafımızca gösterilmiştir.

Chen MC. ve arkadaşlarının (**106**) insan hepatik hücrelerinde ve yine Tamilselvam K. ve arkadaşlarının (**128**) insan nöroblastoma hücreleriyle yaptığı çalışmaların neticesinde hesperidinin bu çalışmalarda mitokondri membran potansiyelinde düzelmeyle birlikte hücresel antioksidan sistemi harekete geçirdiği belirtilmiştir. Fakat bu durum U-87 beyin glioblastoma hücreleri sözkonusu olduğunda hesperidinin kanserli hücrelerde mitokondri membran potansiyelini bozarak kanserli hücre populasyonunun apoptoz ile azalmasını sağladığı tarafımızdan yaptığımız çalışma ile gösterilmiştir.

Park HJ. ve arkadaşlarının (**129**) insan kolon kanseri hücreleri üzerinde yapmış olduğu bir çalışmaya göre hesperidinin kanserli hücrelerin canlılığını azalttığı belirtilmiştir. U-87 beyin glioblastoma hücrelerinin canlılığı üzerine hesperidin uygulamasıyla gerçekleştirdiğimiz çalışmamız, mitokondri membran potansiyelindeki kayıp sonrası efektör kaspazların devreye girmesi ve apoptozu olanaklı kılmasıyla elde ettiğimiz verilerin, Park HJ. ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmayla (**129**) uyumlu olduğu gösterilmiştir.

Yine Saiprasad G. ve arkadaşlarının (**130**) kolon kanseri hücreleriyle ve de Nazari M. ve arkadaşlarının (**132**) lenfoma hücreleriyle yaptıkları çalışmalar sonucu elde edilen veriler deney sonuçlarımızla paralellik gösterecek şekilde hesperidinin apoptoza yol açtığını göstermektedir.

Çalışmamızdan elde edilen veriler, hesperidin indüklü etki mekanizmasının çalışıldığı diğer çalışmalarla uyumlu şekilde hesperidinin beyin glioblastoma hücreleri üzerinde antitümöral etkiye sahip olduğunu ve tedavide antitümoral ilaç olarak kullanılma potansiyeli taşıdığını işaret etmektedir. Yapılacak ileri analizler ile hesperidin indüklü etki mekanizmasının aydınlatılmasının, beyin glioblastoma üzerine hedefe yönelik tedavi gelişimi için önemli bir adım olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Lawson HC, Sampath P, Bohan E, Park MC, Hussain N, Olivi A, Weingart J, Kleinberg L, Brem H. Interstitial chemotherapy for malignant gliomas: the Johns Hopkins experience. J Neurooncol. 2007 May; 83 (1) : 61-70 . Epub 2006 Dec 14. Review.
2. Johnson DR, O'Neill BP. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. J Neurooncol. 2012 Apr;107(2):359-64.
3. Inderjit, Dakshini KM. Hesperetin 7-rutinoside (hesperidin) and taxifolin 3-arabinoside as germination and growth inhibitors in soils associated with the weed, Pluchea lanceolata (DC) C.B. Clarke (Asteraceae). J Chem Ecol. 1991 Aug; 17 (8): 1585-91.
4. Hirata A, Murakami Y, Shoji M, Kadoma Y, Fujisawa S. Kinetics of radical-scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression. Anticancer Res. 2005 Sep-Oct;25(5):3367-74.
5. Galati EM, Monforte MT, Kirjavainen S, Forestieri AM, Trovato A, Tripodo MM. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): antiinflammatory and analgesic activity. Farmaco. 1994 Nov;40(11):709-12.
6. Abuelsaad AS, Mohamed I, Allam G, Al-Solumani AA. Antimicrobial and immunomodulating activities of hesperidin and ellagic acid against diarrheic Aeromonas hydrophila in a murine model. Life Sci. 2013 Nov 6;93(20):714-22.
7. Galati EM, Trovato A, Kirjavainen S, Forestieri AM, Rossitto A, Monforte MT. Biological effects of hesperidin, a Citrus flavonoid. (Note III): antihypertensive and diuretic activity in rat. Farmaco. 1996 Mar;51(3):219-21.
8. Anand A. Zanwar, Sachin L. Badole, Pankaj S. Shende, Mahabaleshwar V. Hegde, Subhash L. Bodhankar. Chapter 76 - Cardiovascular Effects of Hesperidin: A Flavanone Glycoside Polyphenols in Human Health and Disease, 2014, Pages 989-992.
9. Rong Z, Pan R, Xu Y, Zhang C, Cao Y, Liu D. Hesperidin pretreatment protects hypoxia-ischemic brain injury in neonatal rat. Neuroscience. 2013;255:292-9. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.09.030. Epub 2013 Sep 25.
10. Sahu BD, Kuncha M, Sindhura GJ, Sistla R. Hesperidin attenuates cisplatin-induced acute renal injury by decreasing oxidative stress, inflammation and DNA damage. Phytomedicine. 2013 Mar 15;20(5):453-60. doi: 10.1016/j.phymed.2012.12.001. Epub 2013 Jan 23.
11. Selvaraj P, Pugalendi KV. Efficacy of hesperidin on plasma, heart and liver tissue lipids in rats subjected to isoproterenol-induced cardiotoxicity. Exp Toxicol Pathol. 2012 Jul;64(5):449-52.

12. Lee KH, Yeh MH, Kao ST, Hung CM, Liu CJ, Huang YY, Yeh CC. The inhibitory effect of hesperidin on tumor cell invasiveness occurs via suppression of activator protein 1 and nuclear factor-kappaB in human hepatocellular carcinoma cells. Toxicol Lett. 2010 Apr 15;194(1-2):42-9.

13. Nandakumar Natarajan, Rengarajan Thamaraiselvan, Haribabu Lingaiah, Perumal Srinivasan, Balasubramanian Maruthaiveeran Periyasamy Effect of flavonone hesperidin on the apoptosis of human mammary carcinoma cell line MCF. Biomedicine & Preventive Nutrition, Volume 1, Issue 3, July–September 2011, Pages 207-215.

14. Sakata K, Hirose Y, Qiao Z, Tanaka T, Mori H. Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in Mouse macrophage cell line. Cancer Lett. 2003 Sep 25;199(2):139-45. Erratum in: Cancer Lett. 2005 Feb 10;218(2):237.

15. Fernández SP, Wasowski C, Paladini AC, Marder M. Synergistic interaction between hesperidin, a natural flavonoid, and diazepam. Eur J Pharmacol. 2005 Apr 11;512(2-3):189-98.

16. Loscalzo LM, Wasowski C, Paladini AC, Marder M. Opioid receptors are involved in the sedative and antinociceptive effects of hesperidin as well as in its potentiation with benzodiazepines. Eur J Pharmacol. 2008 Feb 12;580(3):306-13. Epub 2007 Nov 13.

17. Martínez AL, González-Trujano ME, Chávez M, Pellicer F, Moreno J, López-Muñoz FJ. Hesperidin produces antinociceptive response and synergistic interaction with ketorolac in an arthritic gout-type pain in rats. Pharmacol Biochem Behav. 2011 Feb;97(4):683-9.

18. Jovčevska I, Kočevar N, Komel R. Glioma and glioblastoma - how much do we (not) know? Mol Clin Oncol. 2013 Nov;1(6):935-941. Epub 2013 Aug 26. Review.

19. Bailey P and Cushing H: A Classification of the Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic Basis with a Correlated Study of Prognosis. JB Lippincott & Co. , Philadelphia, PA, 1926.

20. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathol. 2007 Aug;114(2):97-109. Epub 2007 Jul 6. Review. Erratum in: Acta Neuropathol. 2007 Nov;114(5):547.

21. Galon J, Pagès F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, Zlobec I, Berger A, Bifulco C, Botti G, Tatangelo F, Britten CM, Kreiter S, Chouchane L, Delrio P, Arndt H, Asslaber M, Maio M, Masucci GV, Mihm M, Vidal-Vanaclocha F, Allison JP, Gnjatic S, Hakansson L, Huber C, Singh-Jasuja H, Ottensmeier C, Zwierzina H, Laghi L, Grizzi F, Ohashi PS, Shaw PA, Clarke BA, Wouters BG, Kawakami Y, Hazama S, Okuno K, Wang E, O'Donnell-Tormey J, Lagorce C, Pawelec G, Nishimura MI, Hawkins R, Lapointe R, Lundqvist A, Khleif SN, Ogino S, Gibbs P, Waring P, Sato N, Torigoe T, Itoh K, Patel PS, Shukla SN, Palmqvist R, Nagtegaal ID, Wang Y, D'Arrigo C, Kopetz S, Sinicrope FA, Trinchieri G, Gajewski TF, Ascierto PA, Fox BA.

Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. J TranslMed. 2012 Oct 3;10:205.

22. Louis DN, Holland EC, Cairncross JG. Glioma classification: a molecular reappraisal. Am J Pathol. 2001 Sep;159(3):779-86. Review.

23. Okada H, Kohanbash G, Zhu X, Kastenhuber ER, Hoji A, Ueda R, Fujita M. Immunotherapeutic approaches for glioma. Crit Rev Immunol. 2009;29(1):1-42. Review.

24. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. N Engl J Med. 2008 Jul 31;359(5):492-507. doi: 10.1056/NEJMra0708126. Review. Erratum in: N Engl J Med. 2008 Aug 21;359(8):877.

25. Iacob G, Dinca EB. Current data and strategy in glioblastoma multiforme. J Med Life. 2009 Oct-Dec;2(4):386-93. Review.

26. Bralten LB, French PJ. Genetic alterations in glioma. Cancers (Basel). 2011 Mar 7;3(1):1129-40.

27. Yoshida J. Molecular neurosurgery using gene therapy to treat malignant glioma. Nagoya J Med Sci. 1996 Dec;59(3-4):97-105. Review.

28. Li J, Di C, Mattox AK, Wu L, Adamson DC. The future role of personalized medicine in the treatment of glioblastoma multiforme. Pharmgenomics Pers Med. 2010;3:111-27.

29. Chi A, Komaki R. Treatment of brain metastasis from lung cancer. Cancers (Basel). 2010 Dec 15;2(4):2100-37.

30. Mathieu D, Kondziolka D, Cooper PB, Flickinger JC, Niranjan A, Agarwala S, Kirkwood J, Lunsford LD. Gamma knife radiosurgery in the management of malignant melanoma brain metastases. Neurosurgery. 2007 Mar;60(3):471-81; discussion 481-2.

31. Bhatt AN, Mathur R, Farooque A, Verma A, Dwarakanath BS. Cancer biomarkers - current perspectives. Indian J Med Res. 2010 Aug;132:129-49. Review.

32. Cho WC. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. Mol Cancer. 2007 Apr 2;6:25. Review.

33. Daga A, Bottino C, Castriconi R, Gangemi R, Ferrini S. New perspectives in glioma immunotherapy. Curr Pharm Des. 2011;17(23):2439-67. Review.

34. Ali SA, McHayleh WM, Ahmad A, Sehgal R, Braffet M, Rahman M, Bejjani G, Friedland DM. Bevacizumab and irinotecan therapy in glioblastoma multiforme: a series of 13 cases. J Neurosurg. 2008 Aug;109(2):268-72.

35. Houben MP, van Duijn CM, Coebergh JW, Tijssen CC. [Gliomas: the role of environmental risk factors and genetic predisposition]. Ned Tijdschr Geneeskd. 2005 Oct 8;149(41):2268-72. Review. Dutch.

36. Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. Nat Clin Pract Neurol. 2006 Sep;2(9):494-503; quiz 1 p following 516. Review.

37. Daniels LB, Shaya M, Nordberg ML, Shorter CD, Fowler M, Nanda A. Glioblastoma multiforme in two non-nuclear family members. J La State Med Soc. 2007 Jul-Aug;159(4):215-22.

38. Broekman ML, Risselada R, Engelen-Lee J, Spliet WG, Verweij BH. Glioblastoma multiforme in the posterior cranial fossa in a patient with neurofibromatosis type I. Case Rep Med. 2009;2009:757898.

39. Zhen L, Yufeng C, Zhenyu S, Lei X. Multiple extracranial metastases from secondary glioblastoma multiforme: a case report and review of the literature. J Neurooncol. 2010 May;97(3):451-7.

40. Moorthy RK, Rajshekhar V. Development of glioblastoma multiforme following traumatic cerebral contusion: case report and review of literature. Surg Neurol. 2004 Feb;61(2):180-4; discussion 184. Review.

41. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. Nature. 2008 Oct 23;455(7216):1061-8.

42. Nayak A, Ralte AM, Sharma MC, Singh VP, Mahapatra AK, Mehta VS, Sarkar C. p53 protein alterations in adult astrocytic tumors and oligodendrogliomas. Neurol India. 2004 Jun;52(2):228-32.

43. Kabat GC, Etgen AM, Rohan TE. Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma? Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2010 Oct;19(10):2421-7.

44. Benson VS, Pirie K, Green J, Casabonne D, Beral V; Million Women Study Collaborators. Lifestyle factors and primary glioma and meningioma tumours in the Million Women Study cohort. Br J Cancer. 2008 Jul 8;99(1):185-90.

45. Cobbs CS. Evolving evidence implicates cytomegalovirus as a promoter of malignant glioma pathogenesis. Herpesviridae. 2011 Oct 26;2(1):10.

46. Cobbs CS, Harkins L, Samanta M, Gillespie GY, Bharara S, King PH, Nabors LB, Cobbs CG, Britt WJ. Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. Cancer Res. 2002 Jun 15;62(12):3347-50.

47. Wang J, Yao L, Zhao S, Zhang X, Yin J, Zhang Y, Chen X, Gao M, Ling EA, Hao A, Li G. Granulocyte-colony stimulating factor promotes proliferation, migration and invasion in glioma cells. Cancer Biol Ther. 2012 Apr;13(6):389-400.

48. Spinelli V, Chinot O, Cabaniols C, Giorgi R, Alla P, Lehucher-Michel MP. Occupational and environmental risk factors for brain cancer: a pilot case-control study in France. Presse Med. 2010 Feb;39(2):e35-44.

49. Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. Neuro Oncol. 2002 Oct;4(4):278-99. Review.

50. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. Am J Pathol. 2007 May;170(5):1445-53. Review.

51. Hayashi Y, Yamashita J, Watanabe T. Molecular genetic analysis of deep-seated glioblastomas. Cancer Genet Cytogenet. 2004 Aug;153(1):64-8. Review.

52. Lam PY, Di Tomaso E, Ng HK, Pang JC, Roussel MF, Hjelm NM. Expression of p19INK4d, CDK4, CDK6 in glioblastoma multiforme. Br J Neurosurg. 2000 Feb;14(1):28-32.

53. Urbańska K, Sokołowska J, Szmidt M, Sysa P. Glioblastoma multiforme – an overview. Contemp Oncol (Pozn). 2014;18(5):307-12.

54. Martinez R, Esteller M. The DNA methylome of glioblastoma multiforme Neurobiol Dis. 2010 Jul;39(1):40-6.

55. Zhang S, Feng X, Koga H, Ichikawa T, Abe S, Kumanishi T. p53 gene mutations in pontine gliomas of juvenile onset. Biochem Biophys Res Commun. 1993 Oct 29;196(2):851-7.

56. Cheng Y, Ng HK, Zhang SF, Ding M, Pang JC, Zheng J, Poon WS. Genetic alterations in pediatric high-grade astrocytomas. Hum Pathol. 1999 Nov;30(11):1284-90.

57. Sure U, Rüedi D, Tachibana O, Yonekawa Y, Ohgaki H, Kleihues P, Hegi ME.Determination of p53 mutations, EGFR overexpression, and loss of p16 expression in pediatric glioblastomas. J Neuropathol Exp Neurol. 1997 Jul;56(7):782-9.

58. Felix CA, Slavc I, Dunn M, Strauss EA, Phillips PC, Rorke LB, Sutton L, Bunin GR, Biegel JA. p53 gene mutations in pediatric brain tumors. Med Pediatr Oncol. 1995 Dec;25(6):431-6.

59. Iwato M, Tachibana O, Tohma Y, Nitta H, Hayashi Y, Yamashita J. Molecular analysis for p53 and mdm2 in intracranial germ cell tumors. Acta Neuropathol. 2000 Jan;99(1):21-5.

60. Waha A, Rollbrocker B, Wiestler OD, von Deimling A. A polymerase chain reaction-based assay for the rapid detection of gene amplification in human tumors. Diagn Mol Pathol. 1996 Jun;5(2):147-50.

61. Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Khuong-Quang DA, Jones DT, Konermann C, Pfaff E, Tönjes M, Sill M, Bender S, Kool M, Zapatka M, Becker N, Zucknick M, Hielscher T, Liu XY, Fontebasso AM, Ryzhova M, Albrecht S, Jacob K, Wolter M, Ebinger M, Schuhmann MU, van Meter T, Frühwald MC, Hauch H, Pekrun A, Radlwimmer B, Niehues T, von Komorowski G, Dürken M, Kulozik AE, Madden J, Donson A, Foreman NK, Drissi R, Fouladi M, Scheurlen W, von Deimling A, Monoranu C, Roggendorf W, Herold-Mende C, Unterberg A, Kramm CM, Felsberg J, Hartmann C, Wiestler B, Wick W, Milde T, Witt O, Lindroth AM, Schwartzentruber J, Faury D, Fleming A, Zakrzewska M, Liberski PP, Zakrzewski K, Hauser P, Garami M, Klekner A, Bognar L, Morrissy S, Cavalli F, Taylor MD, van Sluis P, Koster J, Versteeg R, Volckmann R, Mikkelsen T, Aldape K, Reifenberger G, Collins VP, Majewski J, Korshunov A, Lichter P, Plass C, Jabado N, Pfister SM. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. Cancer Cell. 2012 Oct 16;22(4):425-37.

62. Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. Am J Pathol. 2009 Apr;174(4):1149-53.

63. Wyllie AH. Apoptosis: an overview. Br Med Bull. 1997;53(3):451-65. Review.

64. Webb SJ, Harrison DJ, Wyllie AH. Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease. Adv Pharmacol. 1997;41:1-34. Review.

65. Cohen JJ. Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. Chest. 1993 Feb;103(2 Suppl):99S-101S. Review.

66. Squìer MK, Miller AC, Malkinson AM, Cohen JJ. Calpain activation in apoptosis. J Cell Physiol. 1994 May;159(2):229-37.

67. Dickens LS, Boyd RS, Jukes-Jones R, Hughes MA, Robinson GL, Fairall L, Schwabe JW, Cain K, Macfarlane M. A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death. Mol Cell. 2012 Jul 27;47(2):291-305.

68. Estaquier, J. ; Vallette, F. The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2012, *942*, 157–183.

69. Su J, Zhou L, Xia MH, Xu Y, Xiang XY, Sun LK. Bcl-2 family proteins are involved in the signal crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction in tumor chemotherapy resistance. Biomed Res Int. 2014;2014:234370.

70. Renault TT, Teijido O, Antonsson B, Dejean LM, Manon S. Regulation of Bax mitochondrial localization by Bcl-2 and Bcl-x(L): keep your friends close but your enemies closer. Int J Biochem Cell Biol. 2013 Jan;45(1):64-7.

71. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. Nat Rev Cancer. 2002 Sep;2(9):647-56. Review.

72. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. Science. 1998 Aug 28;281(5381):1305-8. Review.

73. Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. Cell Death Differ. 2003 Jan;10(1):26-35. Review.

74. Beurel E, Jope RS. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. Prog Neurobiol. 2006 Jul;79(4):173-89. Epub 2006 Aug 28. Review.

75. Gómez-Sintes R, Hernández F, Lucas JJ, Avila J. GSK-3 Mouse Models to Study Neuronal Apoptosis and Neurodegeneration. Front Mol Neurosci. 2011 Nov 16; 4:45.

76. Sawada M, Nakashima S, Banno Y, Yamakawa H, Hayashi K, Takenaka K, Nishimura Y, Sakai N, Nozawa Y. Ordering of ceramide formation, caspase activation, and Bax/Bcl-2 expression during etoposide-induced apoptosis in C6 glioma cells. Cell Death Differ. 2000 Sep;7(9):761-72.

77. Pollastri S, Tattini M. Flavonols: old compounds for old roles. Ann Bot. 2011 Nov;108(7):1225-33. doi: 10.1093/aob/mcr234. Epub 2011 Aug 31. Review.

78. Verbeek R, Plomp AC, van Tol EA, van Noort JM. The flavones luteolin and apigenin inhibit in vitro antigen-specific proliferation and interferon-gamma production by murine and human autoimmune T cells. Biochem Pharmacol. 2004 Aug 15;68(4):621-9.

79. Patel K, Singh GK, Patel DK. A review on pharmacological and analytical aspects of naringenin. Chin J Integr Med. 2014 Dec 10.

80. Majewska-Wierzbicka M, Czeczot H. [Flavonoids in the prevention and treatment of cardiovascular diseases]. Pol Merkur Lekarski. 2012 Jan;32(187):50-4. Review. Polish.

81. McCullough ML, Peterson JJ, Patel R, Jacques PF, Shah R, Dwyer JT. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults. Am J Clin Nutr. 2012 Feb;95(2):454-64.

82. Kozłowska A, Szostak-Wegierek D. Flavonoids--food sources and health benefits. Rocz Panstw Zakl Hig. 2014;65(2):79-85. Review.

83. Cassidy A, O'Reilly ÉJ, Kay C, Sampson L, Franz M, Forman JP, Curhan G, Rimm EB. Habitual intake of flavonoid subclasses and incident hypertension in adults. Am J Clin Nutr. 2011 Feb;93(2):338-47.

84. Szostak-Wegierek D. : The role of flavonoids in the prevention of atherosclerosis. Med Metabol 1999;3(2): 28-40 (in Polish).

85. Macready AL, Kennedy OB, Ellis JA, Williams CM, Spencer JP, Butler LT. Flavonoids and cognitive function: a review of human randomized controlled trial studies and recommendations for future studies. Genes Nutr. 2009 Dec;4(4):227-42.

86. Prasain JK, Carlson SH, Wyss JM. Flavonoids and age-related disease: risk, benefits and critical windows. Maturitas. 2010 Jun;66(2):163-71. doi : 10.1016/j.maturitas.2010.01.010. Epub 2010 Feb 23. Review.

87. Vauzour D, Vafeiadou K, Rodriguez-Mateos A, Rendeiro C, Spencer JP. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. Genes Nutr. 2008 Dec;3(3-4):115-26.

88. Youdim KA, Joseph JA. A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects. Free Radic Biol Med. 2001 Mar 15;30(6):583-94. Review.

89. Bastianetto S, Zheng WH, Quirion R. The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: involvement of its flavonoid constituents and protein kinase C. J Neurochem. 2000 Jun;74(6):2268-77.

90. Datla KP, Christidou M, Widmer WW, Rooprai HK, Dexter DT. Tissue distribution and neuroprotective effects of citrus flavonoid tangeretin in a rat model of Parkinson's disease. Neuroreport. 2001 Dec 4;12(17):3871-5.

91. Chahar MK, Sharma N, Dobhal MP, Joshi YC. Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. Pharmacogn Rev. 2011 Jan;5(9):1-12.

92. Cutler GJ, Nettleton JA, Ross JA, Harnack LJ, Jacobs DR Jr, Scrafford CG, Barraj LM, Mink PJ, Robien K. Dietary flavonoid intake and risk of cancer in postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study. Int J Cancer. 2008 Aug 1;123(3):664-71.

93. Dong H, Lin W, Wu J, Chen T. Flavonoids activate pregnane x receptor-mediated CYP3A4 gene expression by inhibiting cyclin-dependent kinases in HepG2 liver carcinoma cells. BMC Biochem. 2010 Jun 16;11:23.

94. Hui C, Qi X, Qianyong Z, Xiaoli P, Jundong Z, Mantian M. Flavonoids, flavonoid subclasses and breast cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. PLoS One. 2013;8(1):e54318.

95. Majewski G., Lubecka-Pietruszewska K., Kaufman-Szymczak A., Fabianowska-Majewska K. : Anticarcinogenic capabilities of plant polyphenols: flavonoids and stilbene. Pol J Public Health 2012; 122(4):434-439.

96. Samuel T, Fadlalla K, Mosley L, Katkoori V, Turner T, Manne U. Dual-mode interaction between quercetin and DNA-damaging drugs in cancer cells. Anticancer Res. 2012 Jan;32(1):61-71.

97. Wang L, Lee IM, Zhang SM, Blumberg JB, Buring JE, Sesso HD. Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women. Am J Clin Nutr. 2009 Mar;89(3):905-12.

98. Olejnik A, Tomczyk J, Kowalska K, Grajek W. [The role of natural dietary compounds in colorectal cancer chemoprevention]. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2010 Apr 7;64:175-87. Review. Polish.

99. Zalega J., Szostak-Wegierek D.; Nutrition in cancer prevention. Part I. Plant polyphenols, carotenoids, dietary fiber. Probl Hig Epidemiol 2013; 94:41-49 (in Polish).

100. Siess MH, Le Bon AM, Canivenc-Lavier MC, Suschetet M. Mechanisms involved in the chemoprevention of flavonoids. Biofactors. 2000;12(1-4):193-9.

101. Yang CS, Chung JY, Yang G, Chhabra SK, Lee MJ. Tea and tea polyphenols in cancer prevention. J Nutr. 2000 Feb;130(2S Suppl):472S-478S. Review.

102. Garg A, Garg S, Zaneveld LJ, Singla AK. Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin. Phytother Res. 2001 Dec;15(8):655-69. Review.

103. Roohbakhsh A, Parhiz H, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Neuropharmacological properties and pharmacokinetics of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin--a mini-review. Life Sci. 2014 Sep 15;113(1-2):1-6.

104. Filho CB, Del Fabbro L, de Gomes MG, Goes AT, Souza LC, Boeira SP, Jesse CR. Kappa-opioid receptors mediate the antidepressant-like activity of hesperidin in the mouse forced swimming test. Eur J Pharmacol. 2013 Jan 5;698(1-3):286-91.

105. Souza LC, de Gomes MG, Goes AT, Del Fabbro L, Filho CB, Boeira SP, Jesse CR. Evidence for the involvement of the serotonergic 5-HT(1A) receptors in the antidepressant-like effect caused by hesperidin in mice. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2013 Jan 10;40:103-9.

106. Chen MC, Ye YY, Ji G, Liu JW. Hesperidin upregulates heme oxygenase-1 to attenuate hydrogen peroxide-induced cell damage in hepatic L02 cells. J Agric Food Chem. 2010 Mar 24;58(6):3330-5.

107. Elavarasan J, Velusamy P, Ganesan T, Ramakrishnan SK, Rajasekaran D, Periandavan K. Hesperidin-mediated expression of Nrf2 and upregulation of antioxidant status in senescent rat heart. J Pharm Pharmacol. 2012 Oct;64(10):1472-82.

108. Gaur V, Kumar A. Hesperidin pre-treatment attenuates NO-mediated cerebral ischemic reperfusion injury and memory dysfunction. Pharmacol Rep. 2010 Jul-Aug;62(4):635-48.

109. Oztanir MN, Ciftci O, Cetin A, Aladag MA. Hesperidin attenuates oxidative and neuronal damage caused by global cerebral ischemia/reperfusion in a C57BL/J6 mouse model. Neurol Sci. 2014 Sep;35(9):1393-9.

110. Dimpfel W. Different anticonvulsive effects of hesperidin and its aglycone hesperetin on electrical activity in the rat hippocampus in-vitro. J Pharm Pharmacol. 2006 Mar; 58(3):375-9.

111. Gao X, Cassidy A, Schwarzschild MA, Rimm EB, Ascherio A. Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. Neurology. 2012 Apr 10;78(15):1138-45.

112. Gil Gregorio P, Ramirez Diaz SP, Ribera Casado JM; DEMENU group. Dementia and Nutrition. Intervention study in institutionalized patients with Alzheimer disease. J Nutr Health Aging. 2003;7(5):304-8.

113. Hwang SL, Yen GC. Neuroprotective effects of the citrus flavanones against H2O2-induced cytotoxicity in PC12 cells. J Agric Food Chem. 2008 Feb 13;56(3):859-64.

114. Huang SM, Tsai SY, Lin JA, Wu CH, Yen GC. Cytoprotective effects of hesperetin and hesperidin against amyloid β-induced impairment of glucose transport through downregulation of neuronal autophagy. Mol Nutr Food Res. 2012 Apr;56(4):601-9.

115. Menze ET, Tadros MG, Abdel-Tawab AM, Khalifa AE. Potential neuroprotective effects of hesperidin on 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity in rats. Neurotoxicology. 2012 Oct;33(5):1265-75.

116. Choi EJ, Ahn WS. Neuroprotective effects of chronic hesperetin administration in mice. Arch Pharm Res. 2008 Nov;31(11):1457-62.

117. Cho J. Antioxidant and neuroprotective effects of hesperidin and its aglycone hesperetin. Arch Pharm Res. 2006 Aug;29(8):699-706.

118. Wang DM, Li SQ, Zhu XY, Wang Y, Wu WL, Zhang XJ. Protective effects of hesperidin against amyloid-β (Aβ) induced neurotoxicity through the voltage dependent anion channel 1 (VDAC1)-mediated mitochondrial apoptotic pathway in PC12 cells. Neurochem Res. 2013 May;38(5):1034-44.

119. Kaur G, Tirkey N, Chopra K. Beneficial effect of hesperidin on lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity. Toxicology. 2006 Sep 21;226(2-3):152-60.

120. Nones J, E Spohr TC, Gomes FC. Hesperidin, a flavone glycoside, as mediator of neuronal survival. Neurochem Res. 2011 Oct;36(10):1776-84.

121. Guzmán-Gutiérrez SL, Navarrete A. Pharmacological exploration of the sedative mechanism of hesperidin identified as the active principle of Citrus sinensis flowers. Planta Med. 2009 Mar;75(4):295-301.

122. Marder M, Viola H, Wasowski C, Fernández S, Medina JH, Paladini AC. 6-methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. Pharmacol Biochem Behav. 2003 Jun;75(3):537-45.

123. Martínez MC, Fernandez SP, Loscalzo LM, Wasowski C, Paladini AC, Marder M, Medina JH, Viola H. Hesperidin, a flavonoid glycoside with sedative effect, decreases brain pERK1/2 levels in mice. Pharmacol Biochem Behav. 2009 Apr;92(2):291-6.

124. Wasowski C, Loscalzo LM, Higgs J, Marder M. Chronic intraperitoneal and oral treatments with hesperidin induce central nervous system effects in mice. Phytother Res. 2012 Feb;26(2):308-12. doi: 10.1002/ptr.3560. Epub 2011 Jun 30.

125. Kumar A, Lalitha S, Mishra J. Hesperidin potentiates the neuroprotective effects of diazepam and gabapentin against pentylenetetrazole-induced convulsions in mice: Possible behavioral, biochemical and mitochondrial alterations. Indian J Pharmacol. 2014 May-Jun;46(3):309-15.

126. Loscalzo LM, Yow TT, Wasowski C, Chebib M, Marder M. Hesperidin induces antinociceptive effect in mice and its aglycone, hesperetin, binds to μ-opioid receptor and inhibits GIRK1/2 currents. Pharmacol Biochem Behav. 2011 Sep;99(3):333-41.

127. Hakimizadeh E, Oryan S, Hajizadeh Moghaddam A, Shamsizadeh A, Roohbakhsh A. Endocannabinoid System and TRPV1 Receptors in the Dorsal Hippocampus of the Rats Modulate Anxiety-like Behaviors. Iran J Basic Med Sci. 2012 May;15(3):795-802.

128. Tamilselvam K, Braidy N, Manivasagam T, Essa MM, Prasad NR, Karthikeyan S, Thenmozhi AJ, Selvaraju S, Guillemin GJ. Neuroprotective effects of hesperidin, a plant flavanone, on rotenone-induced oxidative stress and apoptosis in a cellular model for Parkinson's disease. Oxid Med Cell Longev. 2013;2013:102741.

129. Park HJ, Kim MJ, Ha E, Chung JH. Apoptotic effect of hesperidin through caspase3 activation in human colon cancer cells, SNU-C4. Phytomedicine. 2008 Jan;15(1-2):147-51.

130. Saiprasad G, Chitra P, Manikandan R, Sudhandiran G. Hesperidin induces apoptosis and triggers autophagic markers through inhibition of Aurora-A mediated phosphoinositide-3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase-3 beta signalling cascades in experimental colon carcinogenesis. Eur J Cancer. 2014 Sep;50(14):2489-507.

131. Ghorbani A, Nazari M, Jeddi-Tehrani M, Zand H. The citrus flavonoid hesperidin induces p53 and inhibits NF-κB activation in order to trigger apoptosis in NALM-6 cells: involvement of PPARγ-dependent mechanism. Eur J Nutr. 2012 Feb;51(1):39-46.

132. Nazari M, Ghorbani A, Hekmat-Doost A, Jeddi-Tehrani M, Zand H. Inactivation of nuclear factor-κB by citrus flavanone hesperidin contributes to apoptosis and chemo-sensitizing effect in Ramos cells. Eur J Pharmacol. 2011 Jan 15;650(2-3):526-33.

133. Yang Y, Wolfram J, Boom K, Fang X, Shen H, Ferrari M. Hesperetin impairs glucose uptake and inhibits proliferation of breast cancer cells. Cell Biochem Funct. 2013 Jul;31(5):374-9.

134. Yang Y, Wolfram J, Shen H, Fang X, Ferrari M. Hesperetin: an inhibitor of the transforming growth factor-β (TGF-β) signaling pathway. Eur J Med Chem. 2012 Dec;58:390-5.

135. Alshatwi AA, Ramesh E, Periasamy VS, Subash-Babu P. The apoptotic effect of hesperetin on human cervical cancer cells is mediated through cell cycle arrest, death receptor, and mitochondrial pathways. Fundam Clin Pharmacol. 2013 Dec;27(6):581-92.

ÖZGEÇMIŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	CAN	**Soyadı**	ENGİN
Doğ.Yeri	ÇAN/ÇANAKKALE	**Doğ.Tar.**	19.03.1989
Uyruğu	TC	**TC Kim No**	31078306794
Email	canengin89@gmail.com	**Tel**	05067086797

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi	2015
Lisans	İstanbul Üniversitesi	2012
Lise	Çan İbrahim Bodur Anadolu Lisesi	2007

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	İYİ	İYİ	İYİ	68.75(YDS)	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı	72		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Office,Windows 7-8	Çok İyi
Photoshop	İyi
Microsoft Frontpage	Çok İyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Satranç