T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

İSHİKAWA ENDOMETRİUM EPİTELİ HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE PROPOLİSİN KARBOPLATİN SİTOTOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

BİO. NURSEL İŞCİ

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ ELİF KERVANCIOĞLU DEMİRCİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2022

İTHAF

Hayatın bana sunduğu en kıymetli hediyelerime; babam Gazanfer İşci'ye, annem Cansen İşci'ye, kardeşim Taner İşci'ye ve minik patilerime ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda benimle tüm bilgi ve tecrübesini paylaşan danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Elif Kervancıoğlu Demirci'ye, yüksek lisans eğitim sürecimde üzerimde emeği geçen hocalarım Prof. Dr. Seyhun Solakoğlu'na, Doç. Dr. Sibel Köktürk'e, Doç. Dr. Tuğba Kotil'e teşekkür ederim.

Hücre kültürü çalışmalarımda tecrübesini ve manevi desteğini benden esirgemeyen Biyolog Sibel Doğan'a; elektron mikroskop çalışmalarımda yardımcı olan Biyolog Ebru Karabulut Akyön'e, Biyolog Fadime Aktar'a, Biyolog Funda Onar'a; Araştırma Görevlisi arkadaşlarım Emel Usta'ya, Erva Seviç'e, Merve Keskin'e, Serpil Telci'ye, Şahika Yardım'a; İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji Ve Embriyoloji ailesine ve İstanbul Cerrahpaşa Üniversitesi Histoloji Ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı'na teşekkür ederim.

Analizlerimde yardımcı olan Prof. Dr. Günnur Deniz'e ve Araş. Gör. İlhan Tahralı'ya teşekkür ederim.

Tez istatistiğimin planlanması ve değerlendirilmesinde yardımcı olan Prof. Dr. Gülnaz Nural Bekiroğlu'na teşekkür ederim.

Bana her zaman inanan, benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37221

İÇİNDEKİLER

İTHAF ..... İİ
TEŞEKKÜR ..... İİİ
İÇİNDEKİLER ..... İV
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... XİV
ÖZET XV
ABSTRACT ..... XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Endometriyum Histolojisi 3
2.2. Endometriyum Kanseri 6
2.3. İshikawa Hücre Hattı 8
2.4. 3T3 Fibroblast Hücre Hattı 9
2.5. Endometriyal Adenokanser Tedavileri 9
2.5.1. Karboplatin 11
2.6. Propolis 12
2.7. Apoptoz 15
2.7.1. Sitokrom-c 16
2.8. Apoptozun Laboratuvarda Değerlendirilmesi 17
2.9. Hücre Döngüsü 17
2.9.1. p27 18
2.10. Hücre Döngüsünün Değerlendirilmesi 19
3. GEREÇ VE YÖNTEM 20
3.1. Çalışma Öncesi Laboratuvar Hazırlığı 20
3.2. Çalışmada Kullanılan Gereçler 20
3.3. Çalışmada Kullanılan Maddeler 21
3.3.1. Gıda Eki 21
3.3.2. Kemoterapötik İlaç 21
3.3.3. Kitler 21

3.3.4. Antikorlar 21
3.3.5. Histokimyasal Boyalar ve Kromojenler 22
3.3.6. Diğer Maddeler 22
3.4. Çalışma Takvimi 22
3.5. Çalışmada Kullanılan Yöntemler 22
3.5.1. Hücre Kültürü 22
3.5.2. Hücrelerin Proliferasyonu 23
3.5.3. Hücrelerin Pasajlanması 24
3.5.4. Hücre Sayısının Belirlenmesi 24
3.5.5. Canlılık Deneyi 25
3.5.6. Doz Belirleme Deneyi 26
3.5.7. Propolis ve Karboplatin Dozlarının Hücre Hatlarına Uygulanması 27
3.5.8. Akım Sitometri Analizleri 27
3.5.8.1. Apoptozun İncelenmesi 27
3.5.8.2. Hücre Döngüsünün İncelenmesi 28
3.5.9. Migrasyon Testi 29
3.5.10. İmmünositokimyal Boyama 30
3.5.11. Hücrelerin İnce Yapısal Değişikliklerinin Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile İncelenmesi 31
3.6. İstatistiksel Analiz 32
4. BULGULAR 33
4.1. Propolis ve Karboplatin Dozlarının Hücre Hatlarına Uygulanması 33
4.2. Canlılık Deneyi 35
4.3. Akım Sitometri Analizleri 40
4.3.1. Apoptozun İncelenmesi 40
4.3.2. Hücre Döngüsünün İncelenmesi 48
4.4. Migrasyon Testi 50
4.5. Hücrelerin Sitokrom-c ile İmmünositokimyasal Olarak Boyanması 65
4.6. Hücrelerin p27 ile İmmünositokimyasal Olarak Boyanması 71
4.7. Hücrelerin İnce Yapısal Değişikliklerinin Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile İncelenmesi 74
5. TARTIŞMA 92
KAYNAKLAR 98

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....104

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Endometriyal Karsinomun Dünya Sağlık Örgütü Histolojik Sınıflandırması ve Dağılımı [25]. 6
Tablo 2-2: Antikanser İlaçların Klasik Sınıflandırılması [37], [38]. 10
Tablo 2-3: Propolis içeriğindeki fenolik bileşikler ve bildirilen etkileri. 15
Tablo 4-1: İshikawa ve 3T3 hücre hattında ilaçların 24. saatteki canlılık üzerine etkileri. 35
Tablo 4-2: İshikawa ve 3T3 hücre hattında ilaçların 72. saatteki canlılık üzerine etkileri. 37
Tablo 4-3: İshikawa ve 3T3 hücre hattı deney gruplarında 24. ile 72. saatlerdeki canlılık oranları. 40
Tablo 4-5: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saat apoptoz oranları. 41
Tablo 4-6: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 72. saat apoptoz oranları. 43
Tablo 4-7: İshikawa ve 3T3 hücreleri 24. ile 72. saatlerdeki apoptoz oranları. 46
Tablo 4-8: İshikawa ve 3T3 hücreleri 24. ile 72. saatlerdeki hücre döngüsü faz dağılımları. 48
Tablo 4-9: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saat migrasyon oranları. 51
Tablo 4-10: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 48. saat migrasyon oranları. 53
Tablo 4-11: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. ile 48. saat migrasyon oranları. 56
Tablo 4-12: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saat migrasyon hızları. 57
Tablo 4-13: İshikawa ve 3T3 fibroblast hücre hattı 48. saat migrasyon hızları. 59
Tablo 4-14: İshikawa ve 3T3 hücreleri 24. ile 48. saatlerdeki migrasyon hızları. 62
Tablo 4-18: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saat sitokrom-c oranları. 65
Tablo 4-19: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 48. saat p27 oranları. 72

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: İnsan uterus anatomisi [21] (Modifiye edildi). 3
Şekil 2-2: Uterus tabakaları. BV: kan damarları [20]. 4
Şekil 2-3: İshikawa hücreleri faz kontrast mikroskobu görüntüleri. A) 10x büyütme B) 20x büyütme 8
Şekil 2-4: 3T3 fibroblast hücreleri faz kontrast mikroskobu görüntüleri. A) 10x büyütme B) 20x büyütme 9
Şekil 2-5: Karboplatin kimyasal yapı [41]. 11
Şekil 2-6: Karboplati'nin DNA'ya bağlanma görseli [46]. 12
Şekil 2-7: Ham propolis görseli [49]. 13
Şekil 2-8: Hücrelerde meydana gelen apoptoz süreci [77]. 16
Şekil 3-1: Hücre sayımında kullanılan Neubauer lamı. 24
Şekil 3-2: Deney gruplarının tripan mavisi boyası ile boyanma aşaması. 25
Şekil 3-3: Propolis doz belirleme grupları. 26
Şekil 3-4: Propolis ve karboplatin doz belirleme grupları. 27
Şekil 4-1: İshikawa hücreleri propolis ve karboplatin dozları uygulanmış deney grupları inverted mikroskop görüntüleri. A) Kontrol B) Propolis C) Karboplatin ve D) Propolis+karboplatin deney grupları. Siyah ok: hücre çoğalmasının az olduğu (B) ve olmadığı açıklıkları (D) göstermektedir. 20x büyütme. Bar: 10 µm 34
Şekil 4-2: 3T3 fibroblast hücre hattı propolis ve karboplatin dozları uygulanmış deney grupları inverted mikroskop görüntüleri. A)Kontrol B)Propolis C)Karboplatin ve D)Propolis+karboplatin deney grupları. Deney gruplarındaki hücre çoğalmasında bir farklılık görülmemektedir. 20x büyütme. Bar: 10 µm 34
Şekil 4-3: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saatteki ortalama canlılık yüzdeleri. *p<0,05 ns: anlamlı değil 36
Şekil 4-4: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 72. saatteki ortalama canlılık yüzdeleri. **p<0,01 ns: anlamlı değil 37
Şekil 4-5: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saatteki ortalama canlılık yüzdeleri gruplar arası karşılaştırma. **p<0,01 *p<0,05 ns: anlamlı değil 38
Şekil 4-6: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 72. saatteki ortalama canlılık yüzdeleri gruplar arası karşılaştırma. **p<0,01 ns: anlamlı değil 39

Şekil 4-7: A) İshikawa hücreleri ve B) 3T3 hücreleri tripan mavisi canlılık testi inverted mikroskop görüntüleri. Siyah ok: canlı hücre, kırmızı ok: ölü hücre. Büyütme 10x. Bar: 50 μm 40
Şekil 4-8: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saat hücrelerdeki ortalama apoptoz oranları. ***p<0,001 *p<0,05 ns: anlamlı değil 42
Şekil 4-9: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 72. saat ortalama apoptoz oranları. ***p<0,001 **p<0,01 ns: anlamlı değil..... 43
Şekil 4-10: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saat gruplar arası ortalama apoptoz oranları karşılaştırılması. ***p<0,001 **p<0,01 44
Şekil 4-11: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 72. saat gruplar arası ortalama apoptoz oranı karşılaştırılması. **p<0,01..... 45
Şekil 4-12: İshikawa ve 3T3 hücreleri apoptoz sonuçları. a) Kontrol b) Propolis c) Karboplatin d) Propolis+karboplatin deney grupları. Q2-1: nekroz Q2-2: erken apoptoz Q2-3: canlı hücre Q2-4: geç apoptoz yüzlerini göstermektedir. Konumuz apoptoz olduğu için erken ve geç apoptoz oranları toplamları alınmıştır ve nekroz oranları çalışmaya dahil edilmemiştir. 47
Şekil 4-13: İshikawa ve 3T3 hücreleri hücre döngüsü sonuçları. a) Kontrol b) Propolis c) Karboplatin d) Propolis+karboplatin deney grupları. Kırmızı: G1 Mavi: G2 Yeşil: S fazlarını Sarı: bozulmuş hücre Turkuaz: yığılmış hücre oranlarını göstermektedir. 49
Şekil 4-14: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saat medyan migrasyon oranları. ***p<0,001 **p<0,01 *p<0,05..... 52
Şekil 4-15: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 48. saat medyan migrasyon oranları. **p<0,01 ns: anlamlı değil..... 54
Şekil 4-16: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saat medyan migrasyon oranları gruplar arası karşılaştırması. **p<0,01 55
Şekil 4-17: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 48. saat gruplar arası medyan migrasyon oranları karşılaştırılması. **p<0,01 56
Şekil 4-18: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saat ortalama migrasyon hızları. **p<0,01 ns: anlamlı değil..... 58
Şekil 4-19: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 48. saat ortalama migrasyon hızları. **p<0,01 *p<0,05 ns: anlamlı değil..... 59
Şekil 4-20: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saat gruplar arası ortalama migrasyon hızı karşılaştırılması. **p<0,01 ns: anlamlı değil 60

Şekil 4-21: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 48. saat ortalama migrasyon hızı gruplar arası karşılaştırılması. **p<0,01 ns: anlamlı değil 61
Şekil 4-22: İshikawa hücre hattı 0, 24 ve 48. saat hücre migrasyonu deneyi faz kontrast mikroskobu görüntüleri. Tüm deney gruplarındaki migrasyon oranı kontrol grubuna göre daha azdı. En belirgin etki propolis+karboplatin grubunda görüldü. 10x büyütme. Bar: 100 µm 63
Şekil 4-23: 3T3 hücre hattı 0, 24 ve 48. saat hücre migrasyonu deneyi faz kontrast mikroskobu görüntüleri. Deney gruplarında kontrol grubuna göre hücre göçünde bir fark görülmedi. 10x büyütme. Bar: 100 µm 64
Şekil 4-24: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saat ortalama sitokrom-c yüzdeleri. 66
Şekil 4-25: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saatteki ortalama sitokrom-c yüzdeleri gruplar arası karşılaştırma. ***p<0,001 *p<0,05 ns: anlamlı değil 67
Şekil 4-26: İshikawa hücreleri 24. saat sitokrom-c boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü. A) Kontrol B) Propolis C) Karboplatin ve D) Propolis+karboplatin deney grupları. Tüm deney gruplarındaki sitokrom-c boyanma şiddeti kontrol grubuna göre arttığı görülmektedir. Karboplatin grubu kontrol grubuna yakın bir boyanmaya sahipken, propolis ve propolis+karboplatin gruplarındaki artışın daha fazla olduğu ve en fazla artışın propolis+karboplatin grubunda olduğu dikkat çekmektedir. Sitoplazma sitokrom-c pozitif (ok) ve sitokrom-c negatif (ok başı) hücreler görülmektedir. 10x büyütme. Bar: 100 µm 68
Şekil 4-27: İshikawa hücreleri 24. saat sitokrom-c boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü. A) Kontrol B) Propolis C) Karboplatin ve D) Propolis+karboplatin deney grupları. Tüm gruplarda sitokrom-c boyanması görülürken, en şiddetli boyanmanın propolis+karboplatin grubunda olduğu dikkat çekmektedir. Sitoplazma sitokrom-c pozitif (ok) ve sitokrom-c negatif (ok başı) hücreler görülmektedir. 40x büyütme. Bar: 100 µm 69
Şekil 4-28: 3T3 hücreleri 24. saat sitokrom-c boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü. A) Kontrol B) Propolis C) Karboplatin ve D) Propolis+karboplatin. Deney gruplarında sitokrom-c boyanma şiddeti birbirine yakın görülmektedir. Sitoplazma sitokrom-c pozitif (ok) ve sitokrom-c negatif (ok başı) hücreler gösterilmiştir. 10x büyütme. Bar: 100 µm 70
Şekil 4-29: 3T3 hücreleri 24. saat sitokrom-c boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü. A) Kontrol B) Propolis C) Karboplatin ve D) Propolis+karboplatin. Sitokrom-c

boyanması deney gruplarında fark görülmemiştir. Sitoplazma sitokrom-c pozitif (ok) ve sitokrom-c negatif (ok başı) hücreler gösterilmiştir. 40x büyütme. Bar: 100 µm 71
Şekil 4-30: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 48. saat ortalama p27 yüzdeleri. **p<0,01 ns: anlamlı değil 72
Şekil 4-31: İshikawa hücreleri 48. saat p27 ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü. A) Kontrol B) Propolis C) Karboplatin ve D) Propolis+karboplatin deney grupları. Tüm deney gruplarında p27 boyanma şiddeti kontrol grubuna göre fazlaydı. En şiddetli boyanmanın propolis+karboplatin grubunda olduğu dikkat çekmektedir.Nukleus p27 pozitif (ok) ve p27 negatif (ok başı) hücreler görülmektedir. 40x büyütme. Bar: 100 µm 73
Şekil 4-32: 3T3 hücreleri 48. saat p27 ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü. A) Kontrol B) Propolis, C) Karboplatin ve D) Propolis+karboplatin deney grupları. p27 boyanması gruplarda farklılık göstermemektedir. Nukleus p27 pozitif (ok) ve p27 negatif (ok başı) hücreler görülmektedir. 40x büyütme. Bar: 100 µm 74
Şekil 4-33: İshikawa hücreleri 24. saat kontrol grubu elektron mikrografı. Normal yapıda nukleus (N) ve nukleolus (Nu), intakt yapıda nukleus membranı (siyah ok başı) ve hücre membranı (beyaz ok başı) ve düzgün mikrovilluslar (siyah ok) görülmektedir. 5000x büyütme. Bar: 5 µm 75
Şekil 4-34: İshikawa hücreleri 72. saat kontrol grubu elektron mikrografı. Nukleus (N), normal morfolojide mitokondri (Mi) ve endoplazmik retikulum (ER) ve mikrovillus (siyah ok başı) görülmektedir. 12000x büyütme. Bar: 2 µm 76
Şekil 4-35: İshikawa hücreleri 72. saat kontrol grubu elektron mikrografı. Normal yapıda mitokondri (Mi), endoplazmik retikulum (ER), az sayıda vakuol (V), düzgün morfolojide filopod (siyah ok) ve mikrovillus (siyah ok başı) görülmektedir. 6000x büyütme. Bar: 5 µm 76
Şekil 4-36: İshikawa hücreleri 24. saat propolis grubu elektron mikrografı. Vakuollerin sayısında artış (V), hücre tomurcuklanmaları (siyah ok başı), apoptotik cisimler (siyah ok) ve mikrovillus kaybı (beyaz ok başı) görülmektedir. 5000x büyütme. Bar: 5 µm... 77
Şekil 4-37: İshikawa hücreleri 72. saat propolis grubu elektron mikrografı. İnvajinasyonlu nukleus (N), vakuoller (V), yaygın hücre tomurcuklanmaları (siyah ok başı) ve içerisinde endoplazmik retikulum bulunan apoptotik cisimler (siyah ok) görülmektedir. 20000 büyütme. Bar: 1 µm 78

Şekil 4-38: İshikawa hücreleri 72. saat propolis grubu elektron mikrografı. Nukleus (N), çok sayıda vakuol (V), yaygın tomurcuklanmaları (siyah ok), apoptotik cisimler (siyah ok başı) ve dejeneratif bir hücre (siyah asterisk) görülmektedir. 5000x büyütme. Bar: 5 µm 78
Şekil 4-39: İshikawa hücreleri 24. saat karboplatin grubu elektron mikrografı. İnvajinasyonlu nukleus (N), normal morfolojide mitokondri (Mi), dejenere endoplazmik retikulum (ER), vakuoller (V), hücre tomurcuklanması (siyah ok), mikrovillus kaybı (siyah ok başı), apoptotik cisim (beyaz ok başı) ve migrazom benzeri yapı (beyaz ok) görülmektedir. 7500x büyütme. Bar: 5 µm 79
Şekil 4-40: İshikawa hücreleri 24. saat karboplatin grubu elektron mikrografı. Çoğunda invajinasyon gözlenen nukleuslar (N), nukleolus (Nu), vakuol (V), dejenere mitokondriler (Mi) ve hücre tomurcuklanması (siyah ok başı) görülmektedir. 5000x büyütme. Bar: 5 µm 80
Şekil 4-41: İshikawa hücreleri 72. saat karboplatin grubu elektron mikrografı. Nukleus (N), vakuoller (V), dejenere olmuş mitokondri (Mi) ve endoplazmik retikulumu (ER) bulunan bir hücrenin içinde apoptotik başka bir hücre görülmektedir. 12000x büyütme. Bar: 2 µm 80
Şekil 4-42: İshikawa hücreleri 72. saat karboplatin grubu elektron mikrografı. Nukleus (N), nukleolus (Nu), çok sayıda vakuol (V), hücre tomurcuklanması (siyah ok) ve ileri apoptotik dejenere olmuş hücre yapısı (asterisk) görülmektedir. 6000x büyütme. Bar: 5 µm 81
Şekil 4-43: İshikawa hücreleri 24. saat propolis+karboplatin grubu elektron mikrografı. İnvajinasyonlu nukleus (N), vakuol (siyah ok başı), apoptotik cisimler (beyaz ok başı) ve organellerini kaybetmiş, nükleer parçalanması gerçekleşmiş apoptotik hücre kalıntısı (asterisk) görülmektedir. 5000x büyütme. Bar: 5 µm..... 82
Şekil 4-44: İshikawa hücreleri 24. saat propolis+karboplatin grubu elektron mikrografı. Nukleusta artan invajinasyonlar (N), çok sayıda apoptotik cisimler (beyaz ok başı), bol vakuol (siyah ok başı) ve apoptotik hücre kalıntısı (asterisk) görülmektedir. 4000x büyütme. Bar: 5 µm 83
Şekil 4-45: İshikawa hücreleri 72. saat propolis+karboplatin grubu elektron mikrografı. Hasarlı mitokondriler (Mi) ve endoplazmik retikulum sisternası (ER), yaygın vakuoller (V) ve hücreler arası boşluk (asteriks) görülmektedir. 25000x büyütme. Bar: 1 µm 83

Şekil 4-46: İshikawa hücreleri 72. saat propolis+karboplatin grubu elektron mikrografı. Nukleus (N), hücre tomurcuklanması (siyah ok), apoptotik cisimler (siyah ok başı), vakuolizasyon artışı olan hücre (siyah asterisk) ve hücre büzüşmesi olan apoptotik hücre (beyaz asterisk) görülmektedir. 5000x büyütme. Bar: 5 µm 84
Şekil 4-47: 3T3 hücreleri 24. saat kontrol grubu elektron mikrografı. Genel olarak nukleus (N), nukleolus (Nu), normal morfolojide mikrovilluslar (siyah ok başı) ve filopodu (siyah ok) olan düzgün morfolojide hücrelere rastlanmakla birlikte, nadiren az vakuollü (V), yer yer hücre tomurcuklanan (beyaz ok) ve apoptotik cisme (beyaz ok başı) sahip hücreler görülmektedir. 5000x büyütme 85
Şekil 4-48: 3T3 hücreleri 72. saat kontrol grubu elektron mikrografı. Nukleus (N) ve nukleolus (Nu) olan genel olarak normal morfolojili birçok hücre görülmektedir. 5000x büyütme. Bar: 5 µm 85
Şekil 4-49: 3T3 hücreleri 24. saat propolis grubu elektron mikrografı. Düzgün yapılı nukleus (N), nukleolus (Nu), az nükleer invajinasyon (siyah ok başı), yer yer vakuoller (siyah ok) ve nadiren apoptotik cisimler (beyaz ok başı) olmakla birlikte genel olarak düzgün morfolojiye sahip hücreler dikkati çekmektedir. 5000x büyütme. Bar: 5 µm .. 86
Şekil 4-50: 3T3 hücreleri 72. saat propolis grubu elektron mikrografı. Nukleus (N), yer yer apoptotik cisimler (ok başı) ve hücre tomurcuklanması (ok) görülmektedir. 5000x büyütme. Bar: 5 µm 87
Şekil 4-51: 3T3 hücreleri 24. saat karboplatin grubu elektron mikrografı. Nukleus (N), hasarlı endoplazmik retikulum sisternaları (ER), vakuoller (V) ve az sayıda hücre tomurcuklanması (ok başı) görülmektedir. 10000x büyütme. Bar: 2 µm..... 88
Şekil 4-52: 3T3 hücreleri 72. saat karboplatin grubu elektron mikrografı. Hafif invajinasyonlu nukleus (N), mitokondriler (Mi), endoplazmik retikulum (ER) ve apoptotik cisimler (ok başı) görülmektedir. 10000x büyütme. Bar: 2 µm 88
Şekil 4-53: 3T3 hücreleri 24. saat propolis+karboplatin grubu elektron mikrografı. Normal morfolojide nukleus (N), nukleolus (Nu), mikrovilluslar (ok başı) ve filopod (ok) görülmektedir. 5000x büyütme. Bar: 5 µm 89
Şekil 4-54: 3T3 hücreleri 72. saat propolis+karboplatin grubu elektron mikrografı. Nukleusları (N) ile birlikte birçok genel olarak düzgün morfolojili hücre görülmektedir. 5000x büyütme. Bar: 5 µm 90

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

CAPE: Kafeik asit fenetil ester

Cm^2 : Santimetre kare

CTNNB1: Beta-katenin proteinini kodlayan gen

CO_2 : Karbondioksit

DMEM/F-12: Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle medyumu ve F-12 besleyici takviyesi

DNA: Deoksiribo nükleik asit

FBS: Fetal bovine serum

FITC/PI: Floresein izotiyosiyanat/propidyum iyodür

g: Santrifüj kuvveti

IL-10: İnterlökin-10

ISC: İshikawa endometrium kanseri hücre hattı

IU: İnternasyonel-uluslararası ünite

MEM: Modifiye edilmiş Eagle medyumu

µg: Mikrogram

ml: Mililitre

µl: Mikrolitre

µM: Mikromolar

TEM: Geçirimli elektron mikroskobu

3T3: Fibroblast hücre hattı

TGF-β: Dönüştürücü büyüme faktörü-β

TNF: Tümör nekroz faktör

TRAIL: Ligand reseptörü

PBS: Fosfat tamponu

ÖZET

İşci N. İshikawa Endometrium Epiteli Hücre Kültürlerinde Propolisin Karboplatin Sitotoksisitesi Üzerine Etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji Ve Embriyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2022.

Endometriyum kanseri, dünyada en sık görülen jinekolojik kanser türlerinden biridir.

Çalışmamızda antitümoral, antibakteriyel, antiviral, antioksidan özelliği ile bilinen propolisin ve endometriyal adenokanserde sıklıkla kullanılan kemoterapötik ajanlardan olan karboplatinin etkileri, endometriyal adenokarsinom hücre hattı İshikawa (Isc) ve fibroblast hücre hattı 3T3 kullanılarak araştırıldı.

Kontrol Isc, Isc+propolis, Isc+karboplatin, Isc+propolis+karboplatin, kontrol 3T3, 3T3+propolis, 3T3+karboplatin, 3T3+propolis+karboplatin grupları çalışıldı. 24, 48 ve 72. saatlerde örneklerdeki etkiler için testler uygulandı. Deneyler üçer kez tekrar edildi.

Hücre sayısı, canlılığı ve migrasyonu sitolojik yöntemlerle araştırıldı. Sitokrom-c ve p27 immünositokimyasal olarak çalışıldı. Apoptoz ve hücre döngüsü akım sitometri kullanılarak değerlendirildi. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) 24. ve 72. saatlerdeki ince yapısal değişiklikleri gösterdi.

Karboplatin ve propolis tek veya kombine uygulandıklarında kontrol grubuna göre tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etki gözlendi. Canlı hücre sayısında ve migrasyonda azalmaya yol açtılar. Bu etkilerin kombine uygulandıklarında daha çok olduğu görüldü. Apoptozu artırdıkları ve bunu intrinsik yolak üzerinden yaptıklarını sonucunu elde ettik. Hücre döngüsünde p27 boyamalarında ajanlar tek verildiklerinde etki görülmezken, kombine verildiklerinde G_1 fazında istatistiksel olarak anlamlı bir durmaya yol açtıkları görüldü ancak bu veriler akım sitometri ile doğrulanamadı. TEM incelemelerinde hem propolis hem de karboplatin apoptoza giden hücrelerin özelliklerini gösterdiler ve kombine olarak verildiklerinde daha şiddetli olarak hücre tomurcuklanmalarının, apoptotik cisimlerin ve vakuolizasyonun varlığı dikkati çekti. 3T3 hücrelerinin immunositokimya, akım sitometri ve TEM sonuçları incelendiğinde, her iki ajanın etkilerinin minimal olduğu gözlendi.

Sonuç olarak, bir gıda takviyesi propolis, sinerjik etkisi ile endometrial adenokarsinom tedavisine karboplatine katkıda bulunabilir. Bu çalışma, daha detaylı hayvan ve insan çalışmaları için veriler ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler : Propolis, İshikawa, Karboplatin, Endometriyum, Hücre kültürü

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37221

ABSTRACT

Işci N. Effect of Propolis on Carboplatin Cytotoxicity in Ishikawa Endometrial Epithelium Cell Cultures. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Histology and Embryology. Master Thesis . Istanbul. 2022.

Endometrial cancer is one of the most common types of gynecological cancer worldwide.

The effects of propolis, known for its antitumoral, antibacterial, antiviral, and antioxidant properties, and carboplatin, one of the chemotherapeutic agents frequently used in endometrial adenocancer, were investigated in our study using endometrial adenocarcinoma cell line Ishikawa (Isc) and fibroblast cell line 3T3.

The study groups were as follows: Control Isc, Isc+propolis, Isc+carboplatin, Isc+propolis+carboplatin, control 3T3, 3T3+propolis, 3T3+carboplatin, 3T3+propolis+carboplatin. Tests were performed for the effects on the samples at 24^{th}, 48^{th}, and 72^{th} hours. Experiments were repeated three times.

Cell number, viability, and migration were investigated by using cytological methods. Cytochrome-c and p27 were studied immunocytochemically. Apoptosis, and cell cycle were examined by using flow cytometry. Transmission electron microscopy showed changes in the ultrastructure at 24^{th} and 72^{th} hours.

Cytotoxic effects were observed on tumor cells when compared with the control group as carboplatin and propolis were administered single or combined. They caused a decrease in migration and viable cell count. These effects were more severe in combined group. They exert their apoptotic effects through the intrinsic pathway of apoptosis. When p27 was examined in the cell cycle, no significant effect was seen with single agent. Yet, combined administration led to a significant arrest in the G_1 phase. On the other hand, these data could not be confirmed by flow cytometry. The single administrations of propolis or carboplatin showed in TEM examinations both the properties of cells going to apoptosis. When given combined, the presence of cell budding, apoptotic bodies, and vacuolization was noted more severely. The immunocytochemistry, flow cytometry, and TEM examinations of 3T3 cells showed minimal effects for both agents.

In conclusion, a food supplement propolis can contribute to the treatment of endometrial adenocarcinoma with its synergestic effect to carboplatin. This study provided data for further detailed animal and human studies.

Key Words: Propolis, Ishikawa, Carboplatin, Endometrium, Cell cultures

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 37221

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya genelinde gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki kanser vakalarına göre endometriyum kanseri ilk sıralarda yer almaktadır [1]. Bu kanser türünün postmenopozal dönem hastalığı olduğu [2], fakat % 3-5 oranında 40 yaş altı kadınlarda görüldüğü [3], [4], infertiliteye yol açabildiği ve ileri evrelerinde ölümle de sonuçlanabildiği bildirilmiştir [5].

İshikawa endometrium epiteli devamlı hücre hattı; hem östrojen hem de progesteron reseptörü içeren, endometriyum adenokanserini çalışmak için en elverişli hücre hatlarından biridir [5], [6].

3T3 fibroblast hücre hattı, sağlıklı fare embriyonik fibroblast hücreleri kaynaklı olup birçok başka çalışmada kullanılabildiği gibi, in vitro kanser çalışmalarında da kontrol grubu olarak kullanılabilmektedir [7].

Karboplatin, endometriyum kanseri ve ovaryum kanserinde tercih edilen platin grubundan kemoterapötik bir ajandır [8], [9].

Karboplatin tedavisine eklenebilecek çeşitli maddelerin, İshikawa endometrium epiteli devamlı hücre kültürlerinde karboplatin sitotoksisitesi üzerinde etkisi olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir [10], [11]. Bu noktada verilecek tedaviye ek olarak hastaya önerilecek gıda ekine veya maddeye hastaların erişim kolaylığı olması da önemlidir.

Propolis, bal arılarının bitkilerden topladığı reçinemsi bir maddedir [12]. Birçok çalışmada propolisin antikarsinojenik, antioksidan, antifungal ve antibakteriyel etkileri bildirilmiştir [13].

Propolisin; karaciğer, meme, serviks ve prostat kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi [14], insan akciğer kanseri hücre hattı üzerindeki antiproliferatif ve proapoptotik aktivitesi olduğu gösterilmiştir [15]. Literatürde propolisin endometriyum kanserine etkisini yapısal ve ince yapısal olarak gösteren ve mekanizmasını açıklayan bir çalışma mevcut değildir.

Karboplatinin sentez fazına [16], propolisin ise S, G_0/G_1, G_1, G_2 ve G_2/M fazlarına etki ettiği çalışmalarda bildirilmiştir [17], [18], [19].

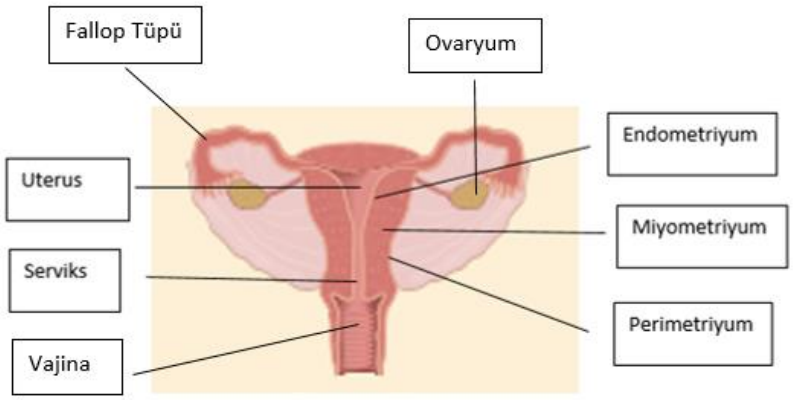
Çalışmamızda propolisin, endometriyum adenokanserinde antineoplastik ilaç olarak kullanılan karboplatinin sitotoksik, apoptotik ve antitümoral etkilerine katkısının olup olmayacağı propolis ekstratı ve İshikawa endometrium epiteli devamlı hücre hattı kullanılarak histolojik yöntemler ile araştırılacaktır. Ayrıca propolis ve karboplatinin sağlıklı hücreler üzerindeki etkisi, 3T3 fibroblast hücre hattı kullanılarak incelenecektir. Böylelikle uygulanan kanser kemoterapilerinin başarısını arttırmak amacıyla; uterus yapı ve fonksiyon bozukluklarına, bunun sonucunda da infertiliteye sebep olan endometriyum adenokanserinde yapılan tedaviye katkısı olabilecek bir gıda ekinin denenmesi sonucu yeni bir uygulama seçeneği sunarak tedavi prognozunu iyileştirmeyi ve bu esnada mekanizmayı da açıklayarak sunmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endometriyum Histolojisi

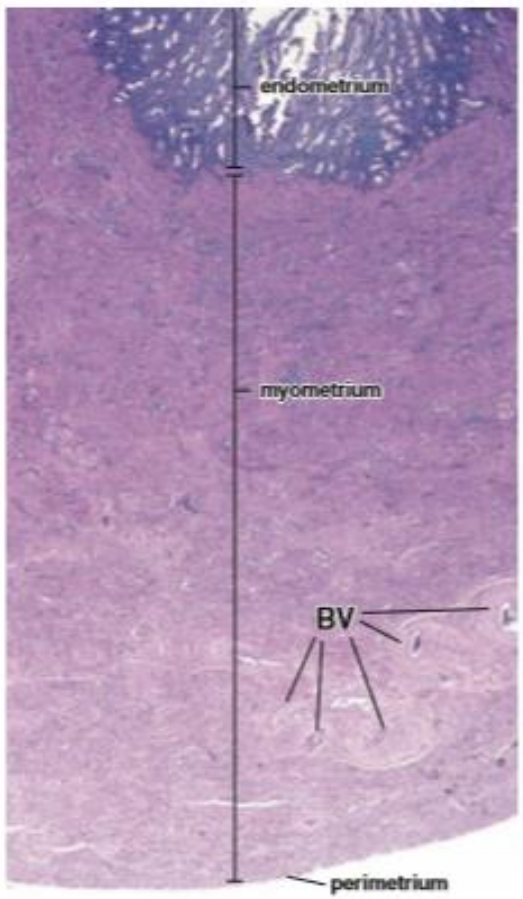
Dişi üreme organları; ovaryumlar, fallop tüpleri, uterus, vajina ve dış genital yapılardan oluşmaktadır (Şekil 2-1). Embriyolojik olarak uterus, fallop tüpleri ve vajinanın 1/3'ü gonadlardan gelişir, mezoderm kökenlidir [20].

İnsanda uterus, armut şeklinde bir organdır ve bulunduğu yer rektum ile mesane arasındadır. Yetişkin bir kadında yaklaşık olarak 30-40 g ağırlığında bir organdır. Uterus; fundus, korpus, isthmus ve serviks olarak dört kısımdan oluşmaktadır [20].



Şekil 2-1: İnsan uterus anatomisi [21] (Modifiye edildi).

İnsan uterus duvarı üç tabakadan oluşmaktadır (Şekil 2-1 ve Şekil 2-2). Bu tabakalar dıştan içe doğru perimetriyum, miyometriyum ve endometriyumdur. Seröz bir tabaka olan perimetriyum en dıştadır. Miyometriyum, bol düz kas demetlerinden oluşan en kalın olan ve ortada bulunan tabakadır. Endometriyum en iç tabakası ve uterusun mukozasıdır. Endometriyum her ay, miyometriyum ise gebelikte siklik değişikliğe uğrar ve böylece uterusu embriyo transplantasyonuna hazırlarlar [20].



Şekil 2-2: Uterus tabakaları. BV: kan damarları [20].

Endometriyum üreme çağında farklı yapı ve görevlere sahip iki tabakadan oluşmaktadır. Bunlar endometriyumun en kalın parçası olan ve menstruasyonda dökülen, tabakanın 2/3'ne sahip fonksiyonel tabaka ile menstruasyonda korunan ve prolifere olarak 1/3'ne sahip fonksiyonel tabakasının yenilenmesine kaynak oluşturan, bazal tabakalarıdır [20].

Endometriyum salgı ve silyumlu hücreler içeren tek katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Yüzey epiteli lamina propriya tabakasına yani endometriyal stroma içine girerek invajine olur ve böylece uterus bezleri oluşur. Stroma çok miktarda fibroblast, demet yapmamış tip III kolajen lifler ve ara madde bulundurur [20], [22].

Endometriyum geniş kan damarı ağına sahiptir. Uterin arterden çıkan arkuat arterlerin dalları olan radial arterler, endometriyumun bazal tabakasında burayı besleyen daha küçük düz arterleri oluşturur. Radial arterin ana kolu sarmal hale gelerek lümene prolifere olur ve bu oluşan damarlara spiral arter denir. Spiral arterler daha ileri uzanan

tüm fonksiyonel tabakaya kan getiren, uzun damarlardır ve progesterona duyarlıdırlar. Bu arterler, endometriyumu drene eden ince duvarlı çok sayıda vasküler lakünayı içeren, kapiller yatağı besleyen arteriyollere dallanır. Endometriyumun damarları her menstrual döngüde prolifere ve dejenere olur [20], [22].

Fonksiyonel tabakadaki gonadotropinlerin etkisiyle, meydana gelen değişimler menstrual siklus ya da döngü olarak adlandırılır ve 28 günde bir tekrar eder. Siklus morfolojik, fonksiyonel değişikliklerden oluşan; proliferasyon, sekretuar ve menstrual olmak üzere üç fazdan oluşur. Bu fazlar gerçekleşirken endometriyum kalınlığı 1-6 mm arasında değişir [20], [22].

Proliferasyon fazı, ovaryan etki ile fonksiyonel tabakadaki stromal, endotelyal ve epitelyal hücrelerin prolifere olması ile başlar. Stromal hücreler, kolajen ile ara maddeyi salgılarken; epitelyal hücreler, bezleri yapılandırır ve endometriyum yeniden yapılanırken spiral arterler uzar. Bu faz ovulasyondan 1 gün sonrasına kadar sürer ve proliferasyon fazının sonunda endometriyum 3 mm kalınlığa ulaşır. Bezler dar lümenli ve düz görünüme sahiptir [20], [22].

Sekretuar faz, progesteronun etkisi altında ovulasyondan 1 ya da 2 gün sonra gerçekleşerek, fonksiyonel tabakada belirgin değişimlere sebep olur. Bezler büyür, lümenleri genişler ve kıvrımlı hale gelir. Endometriyum ödemli olur ve kalınlığı 5-6 mm'ye ulaşır. Spiral arterler daha da uzar [20], [22].

Ovaryumdan progesteron ve östrojen salgıların azalması ile menstrual faz başlar. Fonksiyonel tabakadaki küçük spiral arterlerde kasılma kan akışını bozar ve menstrual kanama ile son bulur. Eğer gebelik gerçekleşirse, endometriyum gerilemesi doğum gerçekleşene kadar durur ve menstrual faz yerine, siklus gebelik fazına geçer [20], [22].

Gebelik sırasında endometriyum birçok morfolojik değişikliğie uğrar ve bu bölge "desidua" olarak adlandırılır. Büyük ve yuvarlak şekilli olan desidua hücreleri, stromal hücrelerden farklılaşır. Desidua, endometriyumun en derin tabakası dışında tamamını içerir. Gebelik sırasında sarmal hale gelen uterus bezleri daha da büyür, gelişim devam ettikçe bezler incelir ve yassılaşır. Doğum sırasında desidua, plasenta ile atılır [20], [22].

Ovaryum aktivitelerinin kaybedilmesi sonucu ve menstrual kanamanın kesilmesi "menopoz" olarak adlandırılır. Menopoz ve sonrasında endometriyum bazı değişimlere

uğrar. Normal endometriyum kalınlığı 7-14 mm iken, bu durum menopoz sonrasında 4 mm' den küçük ya da eşit olmalıdır. Eğer kalınlık 5 mm'ye eşit ya da büyük olursa bu hiperplaziye işaret eder, kanser riski taşır ve takip edilmelidir. Menopoz sonrası endometriyum atrofik ve hiperplastik yapılar gösterebilir. Ayrıca vasküler dağılımda da azalma dikkat çeker. Endometriyal stromada orta derecede fibrozis görülebilir. Proliferatif aktivite stromal hücrelerde, hormon konsantrasyonlarındaki düşüş sebebiyle hemen hemen yoktur. Postmenopozal dönemdeki endometriyumun stromal ve epitelyal hücrelerinde östrojen ve progesteron reseptörleri varlığını sürdürdüğü immünohistokimyasal yöntemlerle literatürde gösterilmiştir [23], [24].

2.2. Endometriyum Kanseri

Endometriyum kanseri, sıklıkla postmenopozal dönemde görülen bir kanser türüdür [2]. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde kanser vakaları arasında ilk sıralarda yer almaktadır [1]. % 3-5'lik kesimin 40 yaş altı kadınlarda da görüldüğü [3],[4] ve infertiliteye yol açabildiği gibi ileri evrelerinde ölümle de sonuçlanabilmektedir [5].

Tablo 2-1: Endometriyal Karsinomun Dünya Sağlık Örgütü Histolojik Sınıflandırması ve Dağılımı [25].

Histolojik Tip	**Yüzde Dağılımı**
Endometrioid Adenokarsinom	% 80
Müsinöz Karsinom	% 10' dan az
Seröz Karsinom	% 5' den az
Berrak Hücreli Karsinom	% 5' den az
Squamöz Hücreli Karsinom	% 1' den az
Transizyonel Hücreli Karsinom	% 1' den az
Mikst Hücreli Karsinom	% 1' den az
Küçük Hücreli Karsinom	% 1' den az
Andiferansiye Karsinom	% 1' den az

Adenokarsinom, müsin salgılarıyla papiller veya glandüler yapılar oluşturarak toplanan ve sitoplazmalarında salgı granülleri ile dikkat çeken, sınırları tek tek belli olan kanser hücreleridir [5].

Endometrial adenokarsinom histolojik tiplendirmede iki alt ana gruba ayrılır. Bunlardan biri endometrioid karsinomdur ve tip I olarak adlandırılmaktadır. Diğeri ise papiller seröz karsinomdur ve tip II olarak adlandırılmaktadır. Tip I tümörler östrojenle ilişkilidir ve vakaların % 70-80'ini oluştururlar. Tip II tümörler östrojenle ilişkili değildirler ve vakaların % 20'sini oluştururlar [26]. Dünya Sağlık Örgütü de görülme sıklıklarına göre benzer bir sınıflandırma yapmaktadır (Tablo 2-1).

Çalışmalarda tip I için İshikawa, HEC-1-A, HEC-1-B, ECC-1 hücre hatları tip II için ise; SPAC-1-L ve SPAC-1-S hücre hatları tercih edilir [27], [28].

Endometriyum kanseri riskini arttıran faktörler şöyle sıralanabilir; hipertansiyon, diyabet, infertilite, fazla kilo, nulliparite, ileri yaş, hormon replasman tedavisi, ailede endometrial kanser öyküsü, erken yaşta menarş, meme kanseri öyküsü, uzun süreli tamoksifen kullanımı, polikistik over sendromu ve geç menopoz yaşı'dır. Riski azaltan faktörler; fiziksel aktivite, sigara içme, oral kontraseptif kullanımı, bazı özel diyetler (bitkisel ağırlıklı), hamileliği isteyerek sonlandırma, ilk doğumun küçük yaşta olmaması, doğum yapmak ve fito-östrojen tüketimidir [25], [29], [30].

Tip I' e, endometrial hiperplazi eşlik eder ve histolojik incelemede önemli bir belirteçtir. Düşük dereceli ve olumlu bir prognoza sahiptirler. Tip II, atrofik endometriyum yapısına sahiptir. Bu tümörler endometrioid olmayan farklılaşma gösterirler. Yüksek dereceli ve agresif bir prognoz ile karakterizedir [31].

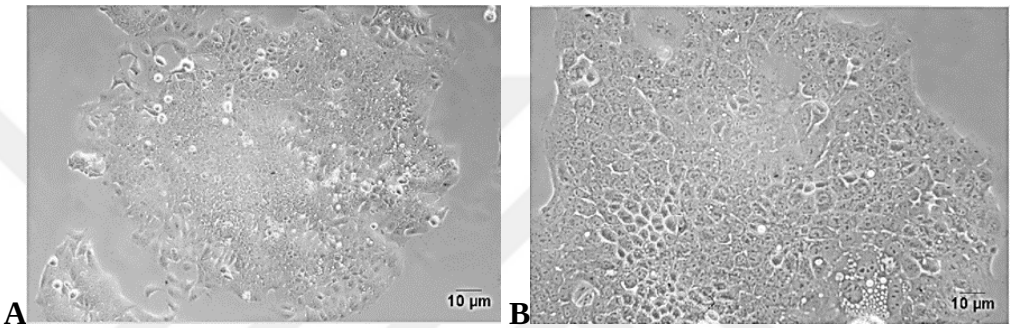
Endometriyum kanserine ait bu iki alt ana tipin farklı genetik ve moleküler özelliklere sahip olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Tip I; PTEN (protein tirozin fosfataz ve tensin homoloğu), K-ras, CTNNB1 ve beta-katenin proteinindeki mutasyonlarla, tip II; p53 genindeki mutasyon, Ki-67 ekspresyonu ve p16 pozitifliği ile tanınırlar [31].

Endometrioid adenokarsinom, çoğunlukla menopoz öncesi ve menopozal dönemde gelişen ve kadınlarda görülen endometriyum kanserinin en çok rastlanılan tipidir. Bu tümör hücrelerinde görülen beta-katenini kodlayan gendeki (CTNNB1) mutasyon ve beta-katenin proteininin neden olduğu düzensizlik uterusta hiperplaziye ve

metaplaziye sebebiyet verir. Bunun sonucunda da uterus yapı, fonksiyon bozuklukları ve infertilite meydana gelir [32].

2.3. İshikawa Hücre Hattı

Kanser türlerinin in vitro olarak çalışılması için birçok kanser hücre hattı oluşturulur. Bu hücre hatları deneysel destek sağlayarak kanser tedavi prognozlarını iyileştirmek adına büyük katkıda bulunurlar. İshikawa insan kaynaklı endometrial hücre hattı da bu amaçla üretilmiştir [5].



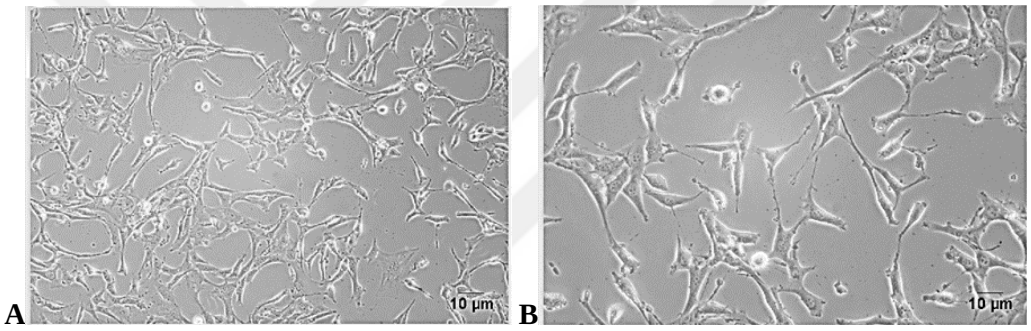
Şekil 2-3: İshikawa hücreleri faz kontrast mikroskobu görüntüleri. A) 10x büyütme B) 20x büyütme

Endometriyal adenokanser tanısı konan 39 yaşında, daha önce doğum yapmış, Asyalı bir kadının ameliyatı sırasında, rahminden alınan numuneden primer kültür oluşturulmuş ve böylece bu hücre hattı üretilmiştir. Bu süreçte İshikawa kültürünü saf olarak elde etmek için diğer kalıntı hücrelerin uzaklaştırılma aşaması, antibiyotik ile yıkanarak ve tripsin içeren PBS (-) ile oda sıcaklığında karıştırılarak tamamlanmıştır. Santrifüj işleminin ardından, hücreler tekrar süspanse edilerek fetal bovine serum (FBS) ilaveli Eagle'ın minimum medyumu (MEM) içeren steril flasklara eklenerek, % 5 CO_2 içeren 37 ^{o}C inkübatör ortamında inkübe edilmiştir. Medyum değişikliği haftada iki kez yapılmış ve İshikawa hücreleri çoğaltılmıştır. Bu hücrelerin ilk alt kültürü altıncı gün yapılmış ve günümüze kadar kesintisiz olarak büyütülmüştür. Bu tümör hücreleri kültür ortamında tek katmanlı, birleşmeye meyilli, çokgen şekilli, belirgin kubbe yapıları olan, salkım üzüm görüntüsünde, hücre sınırları belirgin, içlerinde vakuol ve müsin gibi karakteristik yapıları ile tanınmıştır [5].

İshikawa hücre kültürü, insan endometriyum epitelinden alınmış hücrelerden kökenlenir ve tip I endometrial adenokanser hücreleridir [33]. Bu hücre soyu; progesteron ve östrojen reseptörlerine sahip olduğundan, bu hücreler üreme biyolojisi gibi birçok araştırma alanında kullanılmıştır. Günümüzde İshikawa endometrium epiteli devamlı hücre hattı, endometriyum kanserini çalışmak için en elverişli hücre hattıdır [5], [6].

2.4. 3T3 Fibroblast Hücre Hattı

3T3 fibroblast hücre hattı, fare embriyonik fibroblast hücrelerinden üretilmiştir. Hücre hattının morfolojisi; adherent ve iğsi (fibroblastik) yapıdadır. 3T3 hücre hattı, sağlıklı ve normal yapıda hücrelerden oluşmaktadır [7].



Şekil 2-4: 3T3 fibroblast hücreleri faz kontrast mikroskobu görüntüleri. A) 10x büyütme B) 20x büyütme

Fibroblastlar, bağ dokusunun ana hücreleridir. Bu hücreler ara madde ile lifleri sentezler. Bağ, kan, kıkırdak ve kemik gibi vücudu oluşturan dokuların farklılaşmasında önemlidir. Hücreler mezenkim kökenlidir. Ayrıca sitokin-kemokin salgıları üreterek bağışıklığa ve dokularda oluşan yaraların iyileşmesi gibi birçok hayati fonksiyonda görev almaktadır [34].

Bu hücreler, in vitro kanser çalışmalarında kontrol grubu olarak veya vücut fonksiyon bozukluklarının düzeltilmesi konusunda veri elde etmek vb. gibi birçok araştırma için kullanılmaktadır [7], [35].

2.5. Endometriyal Adenokanser Tedavileri

Endometriyal kanser tanısı konduktan sonra tedavi seçenekleri tek ajan ya da çoklu ajan kombinasyonları veya çoklu yöntemler kullanılarak değerlendirilir. Bu

seçenekler cerrahi müdahale, radyoterapi, hormonal tedavi, kemoterapi ve kombinasyonlarıdır. Cerrahi müdahale, tümörlü bölgenin ya da tüm yapıların alınmasıdır. Radyoterapi ve kemoterapi adjuvan tedavi olarak tercih edilir ve bölgesel nüks oranlarını düşürmek için kullanılır. Hormonal tedavi ise progesteron ve benzeri ilaçlar kullanılarak östrojenin baskılanması ve kanser hücrelerinin gerilemesi amaçlanır. Farklı tedavi kombinasyonlarının hastalarda sağkalımı arttırdığı görülmüştür. Kemoterapi ve radyoterapinin beraber kullanımının terapötik yararının olduğu görülmüş, nüksü azaltmış ve sağkalım oranını arttırmıştır [36] (Tablo 2-2).

Tablo 2-2: Antikanser İlaçların Klasik Sınıflandırılması [37], [38].

Kemoterapi	Alkilleyiciler, Antibiyotikler, Antimetabolitler, Topoizomeraz İnhibitörleri, Mitoz İnhibitörleri, Diğerleri
Hormonal Tedavi	Steroidler, Antiöstrojenler, Antiandrojenler, LH-RH Anologları, Antiaromataz Ajanlar
İmmün Terapi	İnterferon, İnterlökin-2, Aşılar

DNA'ya bağlanarak ya da bağlanma yetenekleri olmayan iki ana grupla tedavilerde tümör hücrelerini hedef alan ilaçlar kullanılmaktadır [37], [38].

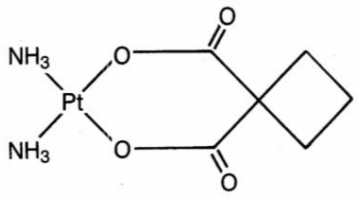
Tümör DNA'sını hedef alan kemoterapötik ajanlar ya sarmalın kendisine hasar vererek ya da ilgili proteinlerine müdahale ederek etkilerini gösterirler. Kanser tedavisinde faydalı olduğu bilinen ilk bileşikler alkilleyici ajanlardır. DNA'nın yapı ve işlevini değiştiren birçok zincirler arası çapraz bağlar kurarlar. Alkilleyici ajanlar; platin bileşikler (karboplatin, sisplatin, oksaliplatin), mustard ajanlar (siklofosfamid, ifosfamid, melfalan), nitrozüreler (karmustin, semustin), triazenler (dakarbazin, temozolomid) ve antibiyotikler (bleomisin, mitomisin)'dir [37], [38].

Doğrudan DNA'ya bağlanma yetenekleri olmayan topoizomeraz I (topotekan, irinotekan) ve II inhibitörleri, antimetabolitler (antifolatlar: trimetresat, metotresat;

sitarabin, gemsitabin), podofillotoksinler (etoposid), antibiyotikler (antraksinler: doksorubisin, epurubisin, mitosantron) ve diğerleri içine dahil edilen ekteinasidin'dir. Bu gruptaki ilaçlar, protein-DNA komplekslerine yönelik olarak aktivite gösterirler. Bu ilaçlar topoizomerazları inhibe ederek, serbest radikaller oluşturabilir ve DNA sentezini kontrol eden enzimlere müdahale edebilirler [37], [38].

2.5.1. Karboplatin

Karboplatin; cis-diamin-1,1-siklobütan dikarboksilat platinyum (II) kimyasal yapısına sahip (Şekil 2-5); endometriyum kanseri, ovaryum kanseri, meme kanseri ve beyin kanseri gibi birçok kanserin tedavisinde kullanılan platinyum içerikli güncel ve temel kemoterapötik ikinci nesil bir ajandır [8], [9], [39], [40]. Yapılan çalışmalarda karboplatinin hücre döngüsü S fazına etki ettiği bildirilmiştir [16].

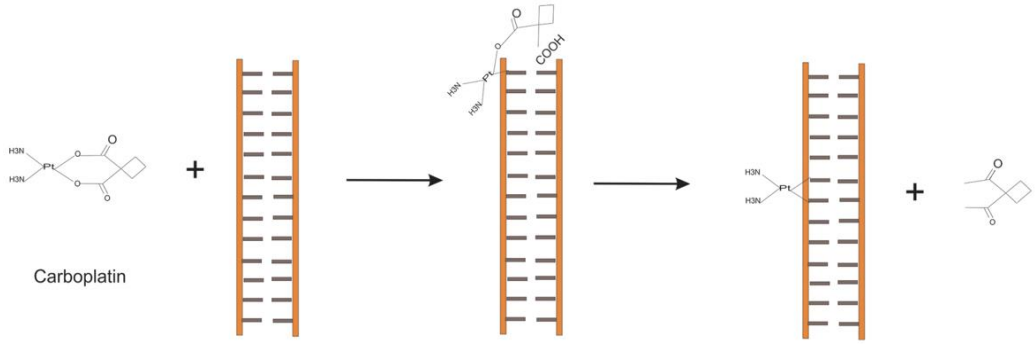


Şekil 2-5: Karboplatin kimyasal yapı [41].

Karboplatin diğer platin bazlı antikanser ilaçları ile benzer özelliklere sahiptir. Fakat, birinci nesil platin içerikli olan ve geleneksel olarak tercih edilen cisplatin'den daha güvenlidir. Bu özelliği ile karboplatin; dünya genelinde onay alıp, kullanımı kabul görmüştür [42]. Çünkü diğer kemoterapötik ajanlardan daha az nefrotoksik ve ototoksik, böbrekten atılımı daha hızlı, doza bağlı bulantı ve kusma meydana gelme olasılığı daha düşük, zorunlu hidrasyon gerektirmediği için ayakta tedavisi uygundur [43], [44], [45].

Karboplatinin aktive olabilmesi için hücre zarını geçmesi gerekir. Molekül 1,1-siklobütan dikarboksilat hücre içinde pozitif yüklü hale gelebilmesi için hidrolize uğrar. Bu olay karboplatinin DNA, RNA ve proteinlerin de dahil olduğu nükleofilik moleküller ile etkileşime girmesine olanak tanır ve platin içerikli eklentilerin oluşumunu sağlar (Şekil 2-6). Bunun sonucunda, molekülün pürin bazlarının N7 bölgesine kovalent bağlanması, DNA-DNA ya da DNA-protein etkileşimleri

gerçekleşir. Eklentilerin oluşturulması ile meydana gelen bu olaylar çeşitli sinyal yolaklarını aktive ederek; hücre döngüsü durması, DNA hasarı ve hücresel apoptoza sebep olarak sitotoksik etkisini gösterir [42], [46].



Şekil 2-6: Karboplati'nin DNA'ya bağlanma görseli [46].

Karboplatinin anti-tümoral yeteneği DNA'ya bağlanma aktivitesinden köken alır, DNA'ya bağlanması ile DNA sentez ve hücre bölünmesini bloke etmesi ile sonuçlanır [42].

2.6. Propolis

Günümüzde bir gıda eki olarak kullanılan ve çeşitli hastalıkların tedavisinde ek olarak bilimsel araştırmalarda çalışılan propolis, "pro" ; girişteki ve "polis" ; topluluk kelimelerinden oluşur ve eski Yunanca'dan gelen bu kelime "savunma" anlamı taşır [12].

"Arı tutkalı" ya da "arı macunu" isimleriyle de bilinen propolis; bal arılarının (Apis Mellifera L.) ağaçlardan ve diğer bitkilerin dal, yaprak gibi kısımlarından topladığı reçineden ve bunu da balmumu ile tükürük bezlerinden salgılanan enzim yönünden zengin salgılarıyla birleştirerek oluşturdukları bir maddedir [47], [48].



Şekil 2-7: Ham propolis görseli [49].

İçeriği bal arılarının reçineyi topladığı kaynağa, toplanan propolisin bulunduğu coğrafi bölgenin bitki örtüsüne, bal arılarının türlerine ve toplanma mevsimine göre değişmektedir. Genel standartlara göre % 50'si reçine ve balzam, % 30'u mum, % 10'u aromatik bileşikler ile uçucu yağlar, % 5'i polen ve geri kalan % 5'i ise diğer maddelerden oluşmaktadır [50], [51], [13]. Ana kimyasal bileşenleri şöyle özetlenebilir; flavonoidler, alkoller, alifatik ve aromatik bileşikler, esterler, eser elementler ve bunlara fenolik bileşiklerinde dahil edildiği çeşitli birçok madde içerir [52]. Propolisin içeriğinde; krisin, kuersetin, galangin, luteolin, kaemferol, naringenin, apigenin, pinosembrin, kafeik asit, sinnamik asit ve kafeik asit fenetil ester (CAPE) gibi birçok fenolik bileşik bulunmaktadır [53], [54] (Tablo 2-3). Tüm etkilerinin içeriğindeki bu bileşiklere kaynaklandığı kabul görmüştür [55]. Propolis içeriğindeki fenolik bileşiklerin kanser tedavisinde ilave destek olarak hizmet edebileceği çalışmalarda gösterilmiştir [56], [57]. Fenolik bileşikler dışında vitaminler ve çeşitli mineraller de içermektedir. Propolis B1, B2, B6, C, E vitaminlerini ve kalsiyum, sodyum, çinko, bakır gibi değerli mineralleri de yapısında içermektedir [58].

Propolisin kanser başta olmak üzere diyabet, kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalıkta hastalar için uygun bir farmasötik yeteneğe sahip olduğunu kanıtlamıştır [59], [60], [61]. Yaraların iyileştirilmesinde, ülserin tedavisinde, soğuk algınlığında, antiseptik ve lokal anestezik olarak kullanılmıştır. Antitümör, antibakteriyel, immünomodülatör, antioksidan ve antiinflamatuar özellikleri bakımından tamamlayıcı tıpta kullanılmıştır [62].

Bu gıda eki ve içeriğindeki bileşiklerinin kanser tedavisindeki olumlu etkisini, kanser hücrelerindeki apoptotik süreçleri uyararak apoptozu başlatma yeteneğinde gösterilmektedir [63]. Kanser hücrelerinde apoptotik ve sitotoksik etkisinin olduğu

birçok çalışmada gösterilmiştir. Propolisin; karaciğer, meme, serviks ve prostat kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi [64], insan akciğer kanseri hücre hattı üzerindeki antiproliferatif ve proapoptotik aktivitesi [15], kolon kanseri hücre hattı üzerine antiproliferatif etkisi [65] ve insan meme kanseri olan çeşitli hücre hatlarında antitümör aktivitesi olduğu gösterilmiştir [66]. Ayrıca kanser hücrelerindeki antimetastatik etkisi çeşitli çalışmalarda ortaya koyulmuştur [66], [56].

Propolisin terapötik etkisini ortaya koyan en önemli mekanizma apoptoz indüksiyonudur [67]. Antitümoral etkisini apoptozun hem iç kaynaklı hem de dış kaynaklı apoptotik yolakları uyararak kanser hücrelerini apoptoza gönderdiğini ortaya koyan kanser hücre hatlarıyla yapılmış birçok çalışma literatürde mevcuttur [68], [69]. Sebep olduğu apoptoz çalışılan kanser hücre hatlarının tipinden bağımsızdır, fakat propolisin kullanılan konsantrasyonuna bağlıdır. Propolis apoptoz mekanizmasını hem sitokrom-c'nin mitokondriden sitozole salınmasıyla kaspaz kaskadını uyarması hem de TRAIL sinyal yoluyla uyarmasıyla kanser hücrelerinin ölümüne sebep olur [68], [69], [70].

İçeriğindeki fenolik bileşikler ve propolis kanser hücrelerini hedef alırlar, ancak normal hücrelere zarar vermezler ya da düşük toksisite gösterirler. Propolis ile yapılan bir çalışmada, normal HUVEC hücrelerine belli doza kadar hiç sitotoksisite göstermezken, belli bir dozdan sonra çok az sitotoksisiteye sebep olduğu gösterilmiştir [66].

Propolis içeriğindeki birçok fenolik bileşiklerin farklı kanser hücre hatları üzerindeki antitümör etkisi ve kanser hücrelerine karşı olan sitotoksik etkisi farklı çalışmalarla desteklenmiştir: Kafeik asit fenetil ester'in (CAPE) oral kanser hücre hatlarında çok güçlü antitümoral etki sergilediği [71], krisin'in; kanser hücre hatlarında apoptotik etkisini [72], kuersetin'in in vitro çalışmalarda melanom hücre hattı kullanılarak kanser hücrelerinde çoğalmayı inhibi edici özelliğini ortaya koymuştur [73].

Propolisin yapılan çalışmalarda hücre döngüsünde; S, G_0/G_1, G_1, G_2 ve G_2/M fazlarında tutuklamaya/durdurmaya sebep olarak kanser hücrelerine karşı antiproliferatif etkisi olduğu literatürde mevcuttur. Tüm bu hücre döngüsü süreçleri, siklin/sikline bağlı kinaz protein ve inhibitörleri sayesinde düzgün ilerler. Çalışmalarda

incelenen bu proteinlerden bazıları; siklin D1, siklin B1, p21, CDK4, siklin A ve p27‘dir [17], [18], [19], [74].

Tablo 2-3: Propolis içeriğindeki fenolik bileşikler ve bildirilen etkileri.

PROPOLİS	
Antitümoral Etki	Kafeik asit fenetil ester, Kafeik asit, Sinnamik asit, Gallik asit, Apigenin, Kuersetin, Galangin, Krisin, Kaemferol, Naringenin
Antibakteriyel Etki	Kafeik asit fenetil ester, Kafeik asit, Sinnamik asit, Apigenin, Kuersetin, Pinosembrin, Kaemferol, Galangin, Naringenin
İmmünomodülatör Etki	Kafeik asit fenetil ester
Antifungal Etki	Galangin, Pinosembrin
Antiinflamatuar Etki	Pinosembrin, Apigenin, Kuersetin, Kaemferol, Krisin, Naringenin

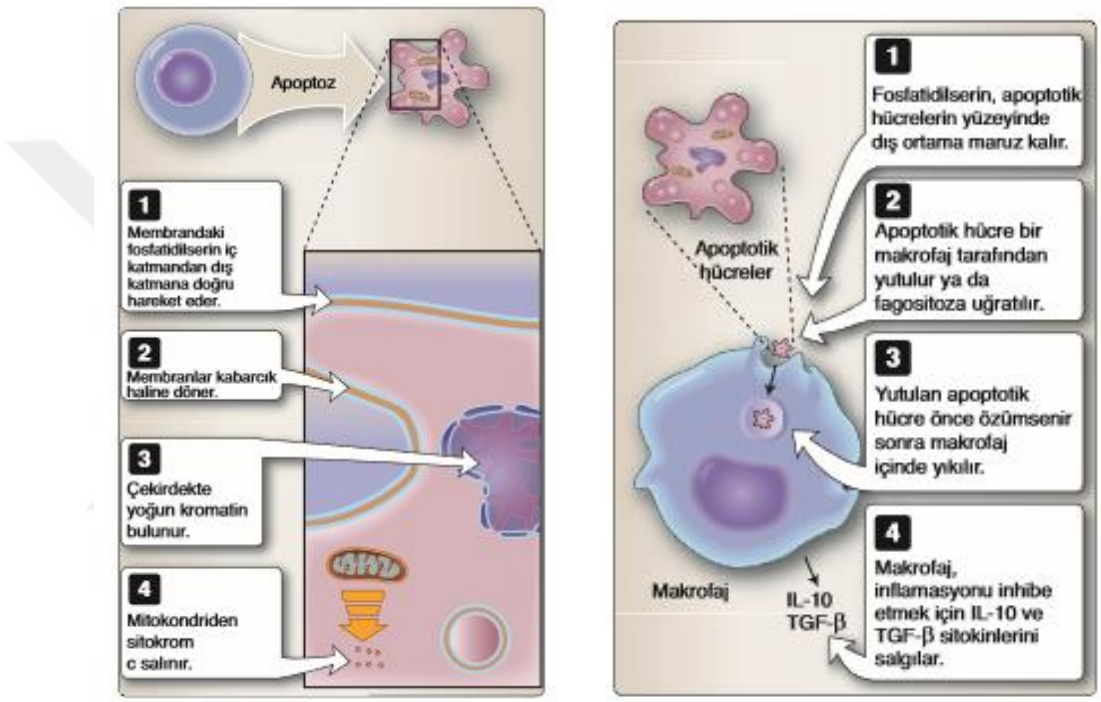
2.7. Apoptoz

Apoptoz, genetik olarak programlanmış hücre ölümüdür ve iki ana yolak ile meydana gelir: Ekstrinsik apoptotik yolak, tümör nekroz faktörünün (TNF) reseptörleri tarafından uyarılır. Bu reseptörler Fas, TRAIL-R1 ve TRAIL-R2’dir. İntrinsik apoptotik yolak (mitokondriyal yolak), Bcl-2 ailesi tarafından kontrol edilir. Bu yolağın düzenlenmesi mitokondriden salınan sitokrom-c ile olur [75], [76].

Apoptoz hücre membranındaki blebler (kabarcık) ile karakterizedir. Apoptoz canlılığın devam etmesi için gereken temel ve fizyolojik bir süreçtir. Bu sürecin düzenlenmesinde küçük bir aksaklık kanser başta olmak üzere birçok patoloji ile sonuçlanabilmektedir [77].

Apoptoz sürecindeki hücrelerin membran bütünlükleri korunur fakat boyut olarak küçülür. İç katmanda bulunan fosfotidilserin fosfolipidi membranda ters dönerek

dış katmanda yerleşim gösterir. Apoptoz ATP bağımlıdır. Apoptotik hücreler mitokondrilerinden sitokrom-c salgılar ve kromatini yoğunlaşır. Ardında bu hücreler fagositozda görevli makrofajlar tarafından yok edilir. Apoptotik süreçte inflamasyonun olmaması komşu hücrelere hasar vermez ve bu durumun engellenmesi interlökin-10 (IL-10) ve dönüştürücü büyüme faktörü-β (TGF-β) salgılamaları ile olur [77] (Şekil 2-8).



Şekil 2-8: Hücrelerde meydana gelen apoptoz süreci [77].

2.7.1. Sitokrom-c

Sitokrom-c mitokondrinin iç zarında bulunan ve apoptozun iç yolağında etkili olan bir proteindir. Mitokondriden sitokrom-c' nin salınması; kaspaz kaskadının uyarılması ve bu da hücrelerin apoptoza gitmesi anlamına gelmektedir [78], [79].

Bcl-2 apoptozun iç yoloğını ve mitokondriyal membran geçirgenliğini kontrol eden protein ailesidir. Bcl-2 mitokondrinin dış zarında bulunan protein olup, proapoptotik (Bax, Bak, Bid) ve antiapoptotik (Bcl-2, Bcl-X_1) etkilere sahip ailenin üyesidir. Hücrenin apoptoza gitmesi bu üyelerin konsantrasyonuna bağlıdır. Proapoptotik üyelerin konsantrasyonlarının artması apoptozun meydana gelmesi,

antiapoptotik üyelerin konsantrasyonlarının artması apoptozun engellenmesi sonucunu verir [78], [79].

Apoptotik uyarım ile sitokrom-c sitoplazmaya salınır, ATP varlığında Apaf-1' e (apoptoz-proteaz aktive edici faktör-1) bağlanır ve apoptozom oluşur. Prokaspaz-9 apoptozomla etkileşerek, aktif kaspaz-9' a dönüşür. Kaspaz-9 ise prokaspaz-3' ü uyararak, kaspaz-3' ün aktivasyonunu sağlar ve kaspaz kaskadı üzerinden hücrelerde apoptozun başlaması sağlanmış olur [80], [81], [82].

2.8. Apoptozun Laboratuvarda Değerlendirilmesi

Apoptoz değerlendirilmesi DNA merdiveni, TUNEL, Annexin V ve akış sitometrisi (Flow Cytometry) gibi belirteçler ile incelenebilmektedir [77].

Annexinler, hücre membranının iç yaprağında bulunan fosfotidilserine bağlanan protein ailesidir. Apoptotik süreçte fosfotidilserin iç yapraktan dış yaprağa geçer ve böylelikle apoptotik hücreler ayırt edilir. Annexin V immünohistokimyasal veya akış sitometrisi gibi yöntemlerle gösterilebilmektedir. Bu yöntem hücre boyutu ve taneli olma durumlarına göre sonuç verir. Apoptotik hücrelerin boyutları küçüktür ve taneli olma miktarı normal hücrelerden fazladır [77].

2.9. Hücre Döngüsü

Canlılarda doğal büyüme sürecinin düzgün ilerlemesi hücre bölünmesi ile olur. Hücre büyüme ve bölünme mekanizmalarını kontrol eden olaylar dizisi "hücre döngüsü" (hücre siklusu) olarak adlandırılır ve interfaz, mitoz, sitokinez olmak üzere üç safhaya ayrılır [83], [84].

İnterfaz, hücresel büyümenin ve DNA sentezinin meydana geldiği safhadır. Hücrelerin birbirini takip eden bölünme aşamalarının geçtiği ve hayatlarının uzun bir bölümünü geçirdikleri, hücre siklusunun önemli bir parçasıdır. İnterfaz sonucunda, genetik materyal kopyalanır ve iki yavru hücrenin yeterli materyali sağlanmış olur. İnterfaz kendi içinde G_1, S ve G_2 olmak üzere üç fazdan oluşur. G_1 fazı, hem RNA hem de protein sentezinin gerçekleştiği, hücre içi yapıların kopyalandığı, hücrelerin büyüdüğü ve S fazında DNA sentezi için yapılan bir hazırlık zamanıdır. G_1 fazı uzunluğu hücre türleri arasında farklılık gösterir. Embriyonik hücreler çok hızlı bölündüğünden G_1 fazları çok kısa sürer. Diğer yandan aktif olmayan olgun hücreler sürekli olarak bu fazda kalırlar. G_1 fazında olup hiç DNA sentez aşamasına geçememiş

hücreler dinlenme safhası olan G_0 fazında kalırlar. G_0 fazında bir uyaranla karşılaşan aktif olmayan hücreler tekrardan hücre siklusunun normal akışına katılabilirler. G_1 fazının içinde yer alan sınırlama noktasını geçen bir hücre olursa, S fazındaki DNA sentez fazına doğru bir yol izleyebilir. S fazı, DNA replikasyonunun gerçekleştiği aşamadır. Bu fazın süresi tüm hücre türleri arasında neredeyse aynıdır ve 6 saat sürer. G_2 fazı, hücrenin büyümeye devam ettiği ve nükleer bölünmeye hazırlandığı zamandır. DNA sentezinin başarılı olarak gerçekleştiğinin onaylandığı güvenlik boşluğudur. Nükleer bütünlüğün takip edildiği bir kontrol noktasına sahiptir. Tüm hücrelerde yaklaşık 4 saat süren bir fazdır [83], [84].

Mitoz, nükleer bölünmenin gerçekleştiği safhadır. Profaz, prometafaz, metafaz, anafaz ve telofaz olmak üzere hücrenin çeşitli değişimlere uğradığı beş fazdan oluşur. Hücreler bu safhada 1 saat harcarlar [83], [84].

Sitokinez, sitoplazmik bölünme aşamasıdır ve bunun sonucunda iki yavru hücre oluşur. Hücre döngüsünün sağlıklı ve düzgün ilerlemesini sağlayan bu mekanizma kontrol noktaları tarafından denetlenir. Kontrol noktalarındaki fonksiyon bozukluğu ya da aksaklık tümör hücresi oluşumuna ve hücre ölümüne sebep olmaktadır. Hücre döngüsünün tüm düzenlenmesi siklik proteinleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu proteinler, hücrelerin hücre döngüsü boyunca olan kontrol noktalarından geçişlerini denetleyip destek olan, siklin ve siklin-bağımlı kinazdan oluşan iki proteinli kompleks yapıdır [83], [84].

2.9.1. p27

p27, siklin bağımlı kinaz inhibitörüdür ve önemli bir hücre döngüsü düzenleyicisidir. Hücre döngüsü; siklin bağımlı kinazlar (CDK) bunların alt birimleri olan siklinler ve inhibitör proteinler aracılığıyla sağlıklı olarak ilerler. p27 proteini, siklinA/CDK2 ve siklinE/CDK2' den oluşan komplekslerin inhibitörüdür. Bu komplekslere bağlanarak kinaz aktivasyonlarını kaybetmelerine sebep olur ve hücre döngüsünün G_1 fazında durmasını sağlar. p27' nin tümör baskılayıcı özelliği, siklinE/CDK2 kompleksiyle ilişkisine ve çekirdek yerleşimine bağlıdır [85], [86].

Çalışmalarda siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin, siklin bağımlı kinaz komplekslerinin aşağı regülasyonunu sağlayarak, hücre döngüsü proliferasyonunu önlediği bildirilmiştir [85], [86]. Ayrıca p27' nin aşırı ekspresyonunun hücre döngüsü

proliferasyonunu G_1 fazında durdurduğu, böylelikle hücrelerin S fazına geçişini engellediği ve sonuçta hücreleri apoptoza indüklediği de kanıtlanmıştır [87].

2.10. Hücre Döngüsünün Değerlendirilmesi

Hücre döngüsü BrdU, p27, siklin D1, siklin B1, p21, CDK4, siklin A gibi markerlarla immünohistokimyasal veya akış sitometrisi kullanılarak değerlendirilir [17], [18], [19], [84].

Hücre döngüsünün ya da hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi kanser başta olmak üzere birçok hastalığın ilerlemesi hakkında bilgi vermesi hem klinik açıdan hem de ilaç araştırma-geliştirme açısından önemlidir. Bu aşamada hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi ve hücre döngüsü analizi olmak üzere iki ana metod kullanılır [84].

Hücre proliferasyonunun analizi, DNA sentezi ve sitoplazmik prob dilüsyonu yöntemleri kullanılarak yapılır. Hücre döngüsü analizi, çalışmalarda seçilen hücre populasyonlarının hücre döngüsü faz dağılımlarını araştırmada kullanılan, DNA'yı işaretlemek için nükleik asit bağlayan çeşitli floresan boyalar ile ölçülmesine olanak sağlayan bir yöntemdir. Kanser araştırmalarında önemli bir araçtır [84].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

İn vitro koşullarda gerçekleştirilen bu deneysel çalışma İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalında hücre laboratuvarı, doku kültürü laboratuvarı, ışık mikroskobu laboratuvarı, elektron mikroskobu laboratuvarı ve cihazları ile ışık mikroskobu ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak gerçekleştirildi. Hücre döngüsü proliferasyonu ve apoptoz için hücre kültürü ve işaretleme protokolü anabilim dalında olup, son aşaması olan analiz işlemleri İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı'na ait Akım Sitometri (Flow Cytometer) cihazı kullanılarak, programlı hücre ölümü ve hücre döngüsü analizlerinin incelenmesi ile yapıldı.

3.1. Çalışma Öncesi Laboratuvar Hazırlığı

Hücre kültürü çalışmalarına başlamadan kontaminasyon riskine karşı önce laboratuvar ortamının sterilizasyonu gerçekleştirildi. Hücre kültürü laboratuvarına ait çeker ocak, inkübatör gibi çeşitli cihazlar, deneyde kullanılacak cam ve plastik ürünler ile tüm yüzeyler % 70'lik alkol ile silindi. Daha sonra tüm ortamın sterilizasyonu için laboratuvar UV ışık altında bekletildi.

3.2. Çalışmada Kullanılan Gereçler

Gereçler	**Kullanım Amacı**
Laminar Akım Kabini	Pasaj yapmak, hücrelere ilaç ve propolis dozlarını uygulamak
İnkübatör	Hücreler muhafaza etmek
Santrifüj Cihazı	Örnekleri karıştırmak ve hücreleri kolay ayırmak
Buzdolabı	Kimyasalları saklamak
Derin Dondurucu	Kimyasalları saklamak
Etüv	Sterilizasyon yapmak

Ultra Mikrotom	Hücre kesitleri almak
Çeker Ocak	Elektron takiplerini yapmak
Akım Sitometri Cihazı	Apoptoz ve proliferasyon analizlerini incelemek
Hassas Terazi	Kimyasalları tartmak
Manyetik Karıştırıcı	Sıvıların homojenizasyonunu sağlamak
Faz-Kontrast Mikroskobu	Rutin hücre kontrolleri ve migrasyon takibi yapmak
Işık Mikroskobu	İnce kesit öncesi hücre kontrolleri yapmak
Geçirimli Elektron Mikroskobu	Hücrelerdeki ince yapısal değişiklikleri incelemek

3.3. Çalışmada Kullanılan Maddeler

3.3.1. Gıda Eki

Propolis (Ticari marka)

3.3.2. Kemoterapötik İlaç

Karboplatin (150 mg/15 ml) (KOÇAK)

3.3.3. Kitler

Annexin V-FITC Apoptosis Staining/Detection Kit (Abcam-14085)

Cycletest^{TM} Plus DNA Reagent Kit (BD-340242)

3.3.4. Antikorlar

Sitokrom-c (mouse anti-human) (Primer Antikor) (Santa Cruz-13560)

p27 (rabbit anti-human) (Primer Antikor) (Santa Cruz-528)

Biotinylated Goat Anti-Polyvalent (Sekonder Antikor) (Thermo Scientific)

3.3.5. Histokimyasal Boyalar ve Kromojenler

Tripan Mavisi, Uranil Asetat, Kurşun nitrat, Toluidin Mavisi, Mayer'in Hematoksileni, AEC Kromojen, FITC, PI (propidyum iyodür)

3.3.6. Diğer Maddeler

Fetal bovine serum, DMEM/F-12 medyum, streptomisin, penisilin, glutamin, PBS, osmiyum tetroksit, propilen oksit, epon, gluteraldehit, etil alkol, paraformaldehit, hidrojen peroksit (H_2O_2), distile su, su bazlı kapama maddesi

3.4. Çalışma Takvimi

Gün 0	Gün 1	Gün 2	Gün 3	Gün 4
Hücre ekimi	1.Karboplatin ve propolis dozlarının hücrelere uygulanması 2.Migrasyon testi	1.Canlılık testi 2.Akım sitometri analizleri 3.Migrasyon testi 4.İmmünositokimyasal boyama (sitokrom-c) (1.gün) 5.TEM takibi başlangıç	1.Migrasyon testi 2.İmmünositokimyasal boyama (sitokrom-c) (2.gün) 3.İmmünositokimyasal boyama (p27) (1.gün)	1.Canlılık testi 2.Akım sitometri analizleri 3.TEM incelemesi 4.İmmünositokimyasal boyama (p27) (2.gün)

3.5. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

3.5.1. Hücre Kültürü

Çalışmamız deneysel bir çalışma olup in vitro koşullarda gerçekleştirildi. Propolis ve karboplatinin ayrı ve beraber kullanıldığında endometriyal adenokanserdeki etkileri İshikawa endometrium epiteli devamlı hücre hattı ve sağlıklı hücreler üzerindeki etkisi ise 3T3 fibroblast hücre hattı kullanılarak araştırıldı.

İshikawa ve 3T3 hücre hattına, ön çalışmaları yapıldıktan sonra kemoterapötik ilaç olarak 0,5 µl doz karboplatin ve 5 µl doz propolis verildi.

8 grup olarak çalışıldı :

Grup 1 : Kontrol grubu İshikawa,

Grup 2 : İshikawa + Propolis,

Grup 3 : İshikawa + Karboplatin,

Grup 4 : İshikawa + Propolis + Karboplatin,

Grup 5 : Kontrol grubu 3T3 fibroblast,

Grup 6 : 3T3 fibroblast + Propolis,

Grup 7 : 3T3 fibroblast + Karboplatin,

Grup 8 : 3T3 fibroblast + Propolis + Karboplatin

şeklindedir.

Hücreler ekildikten bir gün sonra tutunmaları kontrol edilerek deneye başlandı. Karboplatin ve propolis olmak üzere deney maddeleri hücre kültürüne eklendikten sonra 24, 48 ve 72. saatlerde örneklerdeki etkiler için testler uygulandı. Bütün deneyler üçer defa tekrarlandı.

Hücre sayısı, canlılığı ve migrasyon; tripan mavisi ve yara iyileşme modeli olmak üzere sitolojik yöntemlerle; sitokrom-c ve p27 immünositokimyasal yöntemle ışık mikroskobunda iki histolog tarafından çift kör olarak incelendi.

Hücreler 24 ve 72 saat sonunda elektron mikroskobu için takibe alındı. Geçirimli elektron mikroskobu için gerekli takip işlemleri gerçekleştirildi. TEM ile incelenmesi iki histolog tarafından gözlemsel olarak yapıldı.

3.5.2. Hücrelerin Proliferasyonu

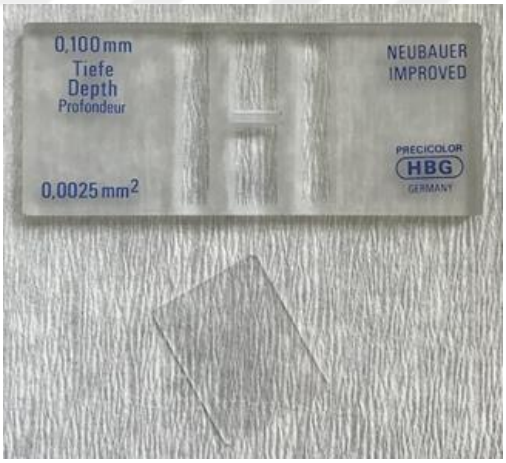
Çalışmamızda -80 ve -196 ^{o}C de dondurularak muhafaza edilen İshikawa ve 3T3 hücre hattı kullanıldı. İshikawa ve 3T3 hücre hattı hücrelerinin proliferasyonu için 25 ve 75 cm^2 'lik steril flasklar kullanıldı. Hücreler için steril edilmiş DMEM/F-12 medyumuna %10'luk fetal bovine serum, 100 µg/ml streptomisin, 100 IU/ml penisilin ve 0.2 µM glutamin filtre edilerek konuldu. Proliferasyonu istenen hücreler medyumun bulunduğu flasklara eklendi. Böylece İshikawa ve 3T3 hücre hattı hücrelerinin steril flask zeminine tutunması sağlandı. İshikawa ve 3T3 hücreleri % 95 hava ve % 5 CO_2 içeren, 37 ^{o}C'li nemli inkübatörde prolifere olması için 72 saat bekletildi.

3.5.3. Hücrelerin Pasajlanması

İshikawa ve 3T3 hücreleri % 80 konfluent olunca pasajlama işlemine başlandı. Flasklardaki medyum mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldı ve flaskdaki mevcut hücreler kalsiyum ve magnezyum içermeyen fosfat tamponu ile yıkandı. Daha sonra flask zeminine tutunan hücreler, % 2'lik tripsin eklendi ve kontrollü olarak İshikawa hücreleri için 6 dakika, 3T3 hücreleri için ise 1 dakika bekletilerek flask zemininden kaldırıldı. Eklenen tripsin miktarı kadar flaska medyum ilave edildi. İshikawa ve 3T3 hücreleri flasktan yapılan pipetajın ardından toplanarak, steril santrifüj tüpüne aktarıldı. Hücreler santrifüj cihazında 400 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Bu işlemin ardından santrifüj tüpüne 2 ml medyum eklendi ve hücreler yapılan pipetajdan sonra medyum konulmuş steril flasklara ekilerek inkübatöre kaldırıldı. Hücreler haftada iki kez olmak üzere pasajlanarak çoğaltıldı.

3.5.4. Hücre Sayısının Belirlenmesi

Steril flasklarda bulunan İshikawa ve 3T3 hücreleri pasajdakine benzer şekilde tripsin ile zeminden kaldırıldı.



Şekil 3-1: Hücre sayımında kullanılan Neubauer lamı.

Hücre sayımı, Neubauer lamı ile yapıldı (Şekil 3-1). Hücreler Neubauer lamının zerrinde bulunan çukurdan içeri bırakıldı ve üzerine lamel kapatılarak inverted mikroskop altında sayım yapıldı. Görülen 4 büyük karedeki hücreler sayıldı, 4'e bölündü, 10^4 ile çarpıldı ve dilüsyon miktarının çarpımı ile kullanacağımız hücre sayısı

belirlendi. Minimum hücre sayısı $1x10^5$ şeklinde her bir kuyucuğa eklendi. Çalışmadaki her grup için sayımlar yapıldı.

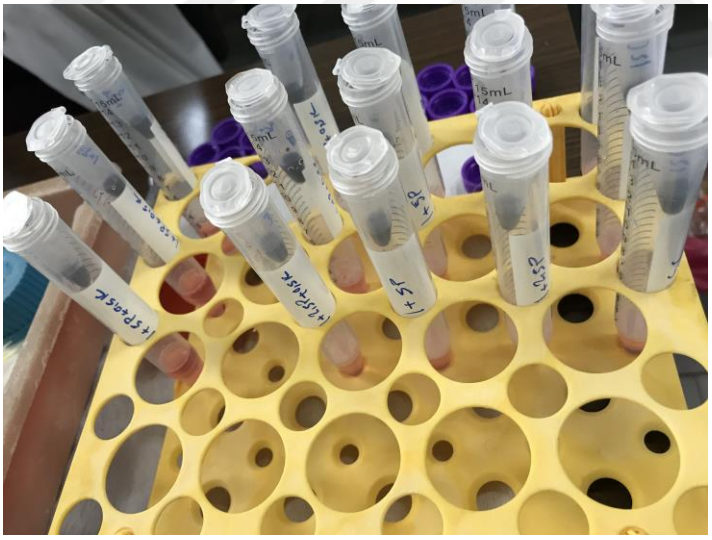
Toplam Hücre Sayısı / ml = Sayılan Hücrelerin Ortalaması x 10^4 x Medyum Miktarı

formülü kullanıldı.

3.5.5. Canlılık Deneyi

Canlı hücre sayısını belirlemek için tripan mavisi testi uygulandı [88]. Tripan mavisi testinde canlı hücreler mikroskop altında boyanmadan şeffaf, ölü hücreler ise membran bütünlükleri bozulduğundan boyayı alıp mavi göründüler.

$1x10^5$ hücre/mL olan süspansiyondan 100 µl alınarak başka bir ependorf tüpüne kondu ve üzerine 100 µl % 4'lük tripan mavisi solüsyonu eklendi ve 5 dakika bekletildi (Şekil 3-2). Daha sonra bu karışımdan 10 µl alınarak Neubauer lamında sayım yapılması için inverted ışık mikroskobu altında hücreler incelendi ve fotoğraflandı.



Şekil 3-2: Deney gruplarının tripan mavisi boyası ile boyanma aşaması.

Canlı hücre oranı (%) = Boya Almamış Hücrelerin Sayısı / Toplam Hücre Sayısı x 100

formülü ile hesaplandı.

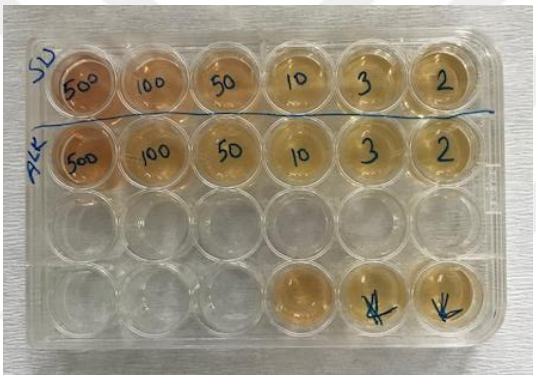
24 ve 72. saatler arasındaki değişim,

% of change = - (24. saat değeri – 72. saat değeri) / 24. saat değeri x 100

formülü ile hesaplandı.

3.5.6. Doz Belirleme Deneyi

İshikawa ve 3T3 hücre hattı üzerinde yapılacak olan çalışmamız için, karboplatin dozuna eklenecek olan su veya alkol bazlı propolisin kullanılacak uygun dozu için deney düzeneği kurularak literatürdeki düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda 2, 3, 10, 50, 100 ve 500 µl dozlar denenerek ön çalışma gerçekleştirildi [89], [90], [68] (Şekil 3-3). Ön çalışma doz belirleme deneyinde, 72 saat sonunda hücrelerdeki canlılık ve morfolojik özellikler mikroskop altında incelendi.



Şekil 3-3: Propolis doz belirleme grupları.

Karboplatin için uygulanacak karboplatin dozu 0,1 , 0,5 ve 5 µl olarak literatüre göre, İshikawa hücre hattı kullanılarak ön çalışma gerçekleştirildi [91], [92] (Şekil 3-4). 72 saat sonunda hücre sayımı ve tripan mavisi ile canlılık testi yapılarak uygun karboplatin dozu belirlendi.



Şekil 3-4: Propolis ve karboplatin doz belirleme grupları.

İshikawa hücreleri için uygun alkol bazlı propolis dozu 5 µl olarak belirlendi. Kemoterapötik olarak kullanılacak olan karboplatin dozu da 0,5 µl olarak belirlendi.

3.5.7. Propolis ve Karboplatin Dozlarının Hücre Hatlarına Uygulanması

İshikawa ve 3T3 hücreleri % 80 konfluente ulaştıklarında sayma kamarasında sayılarak gerekli hücre sayısı elde edildi. Çalışmada 12 kuyucuklu hücre kültürü kapları kullanıldı. 8 grup ve bu grupların 24. ve 72. saatlerdeki üçer tekrarı için kuyucuklara 2 ml DMEM-F12 taze medyum konuldu. Canlılık oranı % 100 olan $1x10^5$ adet İshikawa ve 3T3 hücresi ekildi. 24 saat sonra kuyucuklardan eski medyum uzaklaştırıldı. Çalışmada kullanılacak olan propolis ve karboplatin eklendi ve taze medyum takviyesinin ardından, hücreler % 5 CO_2 ve % 95 hava içeren 37 ^oC'lik inkübatörde 24 ve 72 saat bekletildi. Her iki saat diliminde de hücreler % 4'lük tripan mavisi boyası ile boyanarak sayma kamarasında sayıldı ve canlı hücre sayısı belirlendi.

3.5.8. Akım Sitometri Analizleri

3.5.8.1. Apoptozun İncelenmesi

Akım sitometride Annexin V-FITC /PI ile hücrelerdeki apoptozun incelenmesi esası, normalde plazma mebranının iç katmanında yer alan fosfotidilserin'in apoptoz ile membranda fosfolipid asimetrisi kaybına sebep olarak plazma mebranın dış katmanına geçerek burada Annexin V-FITC'nin fosfotidilserin'e bağlanması ile renkli floresans yaymasına dayanır [93].

Çalışmada propolis ve karboplatin'in dozları 24. ve 72. saatlerde incelenmek üzere, kuyucuklarda bulunan $1x10^5$ adet % 100 canlı İshikawa ve 3T3 hücreleri üzerine

eklenerek inkübatöre kaldırıldı. Hücreler Annexin V-FITC/PI kiti ile inkübasyondan önce tutundukları zeminden tripsin ile kaldırıldı ve ardından bir kez serumla yıkandı. Daha sonra üreticinin önerdiği üzerine (Ab14085) 500 µl Annexin V bağlama tamponu eklendi ve tekrar süspanse edildi. Bu işlemin ardından 5 µl Annexin V-FITC ve 5 µl PI (propidyum iyodür) eklenerek, oda sıcaklığında karanlık ortamda 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra hücrelerdeki apoptozun araştırılması için akım sitometri cihazında ölçüm ve incelemeler yapıldı. Hücre hatlarının popülasyon karakterini belirlemek için öncelikle boyanmamış İshikawa ve 3T3 hücrelerinin bulunduğu flow tüpler cihaza okutuldu. Daha sonra sırasıyla kontrol, propolis, karboplatin ve propolis+karboplatin grubu okutularak sonuçlar karşılaştırıldı.

3.5.8.2. Hücre Döngüsünün İncelenmesi

İshikawa ve 3T3 hücrelerinde propolis ve karboplatinin ayrı ve birlikte uygulandığında hücre döngüsünün hangi fazlarında etkili olduğunun incelenmesi akım sitometri cihazı ile gerçekleştirildi. Çalışmada 12 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına $2x10^5$ hücre ekilerek, belirlenen propolis ve karboplatin dozları eklendi ve 24, 72. saatlerde incelemeler üçer defa tekrarlandı. Hücre süspansiyonu oda sıcaklığında 5 dakika 300 g'de santrifüj edildi. Tüpte yaklaşık 50 µl kalacak şekilde süpernatant aspire edildi. Daha sonra peletin üzerine 1 ml tampon çözelti eklenerek, düşük hızda vorteks işleminin ardından hücreler tekrar süspanse edildi ve bu işlem 3 kez gerçekleştirildi. Hücreler daha sonra oda sıcaklığında 5 dakika 400 g'de santrifüj edilerek, tüm süpernatat tüpten uzaklaştırıldı. Bu işlemlerin ardından hücrelere 50 µl solüsyon A (tripsin tamponu) eklenerek, elde hafifçe karıştırıldı. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi ve solüsyon A aspire edilmeden hücrelere 40 µl solüsyon B (tripsin inhibitörü ve RNaz tamponu) eklenerek, elle hafifçe çalkalandı ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra 40 µl solüsyon C (PI boyama solüsyonu) eklenerek, çalkalandı ve buzdolabında 10 dakika inkübe edildi. Hazırlanan numuneler 35 µm'lık filtrelerden süzüldü ve incelenmeleri için akım sitometri cihazına uygun hale getirildi. İlk olarak İshikawa ve 3T3 hücrelerinin bulunduğu boyasız flow tüpler okutuldu ve hücre karakterleri belirlendi. Daha sonra sırasıyla tüm deney grupları tek tek cihaza okutuldu.



Şekil 3-5 : Çalışmada kullanılan akım sitometri cihazı.

3.5.9. Migrasyon Testi

Migrasyon testi için yara iyileşme modeli ile hücrelerin göçü izlendi [66]. $2x10^5$ hücre/ml hücre süspansiyonu kullanıldı. Flask tabanına mavi cam kalemi kullanılarak 15 yatay doğru çizildi ve sonrasında bu doğrulara dik olacak şekilde 3 çizgi çekildi. İshikawa ve 3T3 hücreleri 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına ekilerek zemine tutunup tüm alanı kaplaması için 48 saat bekletildi. Daha sonra hücrelerin ekildiği kuyucuklara pipet ucu ile 3 paralel çizik oluşturuldu (Şekil 3-6). Hücre kalıntılarının giderilmesi için kuyucuklar 2 kez medyum ile yıkandı ve taze medyum eklenip, dozları verildi. Hücreler 0, 24 ve 48. saatlerde çizgi kesişmelerindeki 45 farklı noktada bulunan çizik genişliği inverted mikroskop altında 10x'luk büyütmede takip edildi ve fotoğraflandı. Sonuçlar Image J programı ile ölçüldü.

Süreler arasındaki değişim,

% of change = - (0. saatte ölçülen mesafe – 24. saatte ölçülen mesafe) / 0. saatte ölçülen mesafe x 100

% of change = - (0. saatte ölçülen mesafe – 48. saatte ölçülen mesafe) / 24. saatte ölçülen mesafe x 100

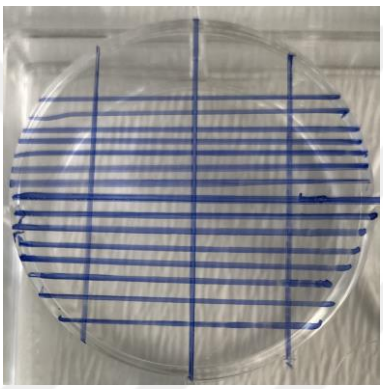
formülleri ile hesaplandı.

Hız değişimleri,

migrasyon hızı = 24. saatte ölçülen mesafe – 0. saatte ölçülen mesafe / 24 saat

migrasyon hızı = 48. saatte ölçülen mesafe – 0. saatte ölçülen mesafe / 48 saat

formülleri ile hesaplandı.



Şekil 3-6: Migrasyon testi fotoğraflanan alanların çizimi.

3.5.10. İmmünositokimyal Boyama

İmmünositokimyasal yöntem sitokrom-c ve p27 antikorları uygulanarak kullanıldı [94], [95]. 24 kuyucuklu hücre kültürü flasklarına steril yuvarlak lameller yerleştirildi. Lameller üzerine $3x10^4$ sayıda İshikawa ve 3T3 hücreleri ekildi. Ekilen hücreler zemine tutunmaları için 1 saat inkübatörde bekletildi. Üzelerine 2 ml taze medyum ilave edilerek, 24 saat inkübatörde bekletildi. Kontrol, propolis, karboplatin ve propolis-karboplatin deney grupları oluşturularak, 5 µl propolis ve 0,5 µl karboplatin dozları hücrelere uygulandı. Hücreler 37 ºC ‘de % 5 CO_2 olan 24 saatlik grup sitokrom-c için ve 48 saatlik grup p27 için hazırlandı. Süre sonunda kuyucuklardaki medyum uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Yuvarlak lamelde bulunan hücreler üzerine % 4’ lük paraformaldehit eklenerek tespit edildi. Boyama işlemine kadar PBS’ de bekletildi.

Yuvarlak lameller kuyucuklardan çıkarılarak 3 kez 2 dakika parafilm üzerindeki distile suda, ardından 3 kez 5 dakika PBS ile yıkandı. Daha sonra hidrojen peroksitte (H_2O_2) 5 dakika bekletilerek, endojen peroksidaz bloklaması sağlandı. 3 kez 5 dakika PBS ile yıkandı ve ardından 5 dakika blok serumda bekletilerek nonspesifik antikor bağlanması engellendi.

İmmünositokimya işlemleri için primer antikorlar (sitokrom-c, 1:100 ; p27, 1:100) uygulanarak, bir gece +4 ºC' de inkübe edildi. Süre sonunda hücreler 2 kez 2 dakika PBS' de bekletildi. Daha sonra hücreler sekonder antikorda (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent) 1 saat bekletildi ve ardından 2 kez 2 dakika PBS' den geçirildi. Lamellere streptavidin damlatılarak 30 dakika bekletildi. Süre sonunda lameller 2 kez 2 dakika PBS ile yıkandı. Hücreler AEC kromojen ile boyandı ve distile su ile yıkandı. Zıt boyama için Mayer' in hematoksileni (sitokrom-c için) kullanıldı ve hücreler çeşme suyu ile yıkandı. İşlemler sonunda hücreler su bazlı kapatıcı ile kapatılarak, ışık mikroskobunda incelendi, sayımları yapıldı ve fotoğraflandı.

Boyanan Hücre Oranı (%) = Boyanan Hücre Sayısı / Toplam Hücre Sayısı x 100

formülü ile hesaplandı.

3.5.11. Hücrelerin İnce Yapısal Değişikliklerinin Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile İncelenmesi

Çalışmada kullanılan İshikawa ve 3T3 hücre hattı kuyucuklara $5x10^5$ canlı hücre olarak ekildi. 8 grubun 24 ve 72. saat örnekleri TEM için takibe alındı.

İshikawa ve 3T3 hücre hattı medyumları uzaklaştırıldı ve tripsinle kaldırılarak 15 ml'lik steril santrifüj tüpüne aktarıldı. 400 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve üst medyum uzaklaştırılarak işleme alındı.

Hücreler primer fiksasyon için % 2,5'luk gluteraldehit solüsyonunda +4 ºC'de 30 dakika bekletilerek tespit edildi. Bütün işlemler çeker ocak altında gerçekleştirildi. Hücreler daha sonra PBS ile yıkandı ve +4 ºC'de 10 dakika bekletildi. Hücre süspansiyonu santrifüj cihazında 400 g'de 5 dakika santrifüj edilerek süspansiyondaki PBS uzaklaştırıldı.

Sekonder fiksasyon için % 1'lik osmik asit hücrelere eklenerek, +4 ºC'de 1 saat bekletilerek ikinci tespit işlemi yapıldı. Daha sonra osmik asit uzaklaştırıldı ve ara

yıkamaların ardından, % 1'lik uranil asetatta 20 dakika buzdolabında bekletildi. Hücreler 400 g'de 5 dakika santrifüj edilerek uranil asetat uzaklaştırıldı.

Hücreler yumurta akı ile muamele edildi. Ardından % 30'luk ve % 50'lik etil alkolde 10 dakika bekletildi. Hücreler artan konsantrasyonlarda etil alkol serilerinden geçirildi. % 90 , % 96 ve 2 kez % 100'lük etil alkolde bekletildi. Bu işlemlerin sonunda dehidratasyon işlemi tamamlanmış oldu.

Hücreler 1/1 oranında hazırlanmış propilen oksit/epon karışımında 1 saat, 1/3 oranında hazırlanmış propilen oksit/epon karışımında 1 saat ve son aşamada saf eponda 1 saat bekletildi. Daha sonra hücreler içerisinde saf epona gömüldü. 60 ºC'lik etüvde 18 saat polimerize edildi.

Ultramikrotomla önce cam bıçakla 1 µm yarı ince kesitler alındı ve toluidin mavisi ile boyandı. Işık mikroskobunda incelendi ve ince kesit için alanlar belirlendi. Ardından ultramikrotomda elmas bıçakla 60 nm kalınlığında ince kesitler alındı ve 100 meşlik bakır gridlere aktarıldı. Son olarak bakır gride alınan kesitlere % 5'lik uranil asetat ve kurşun nitrat ile kontrastlama yapıldı ve TEM ile incelemeye uygun hale getirildi.

Hücrelerin TEM ile incelenmesi iki histolog tarafından gözlemsel olarak yapıldı.

3.6. İstatistiksel Analiz

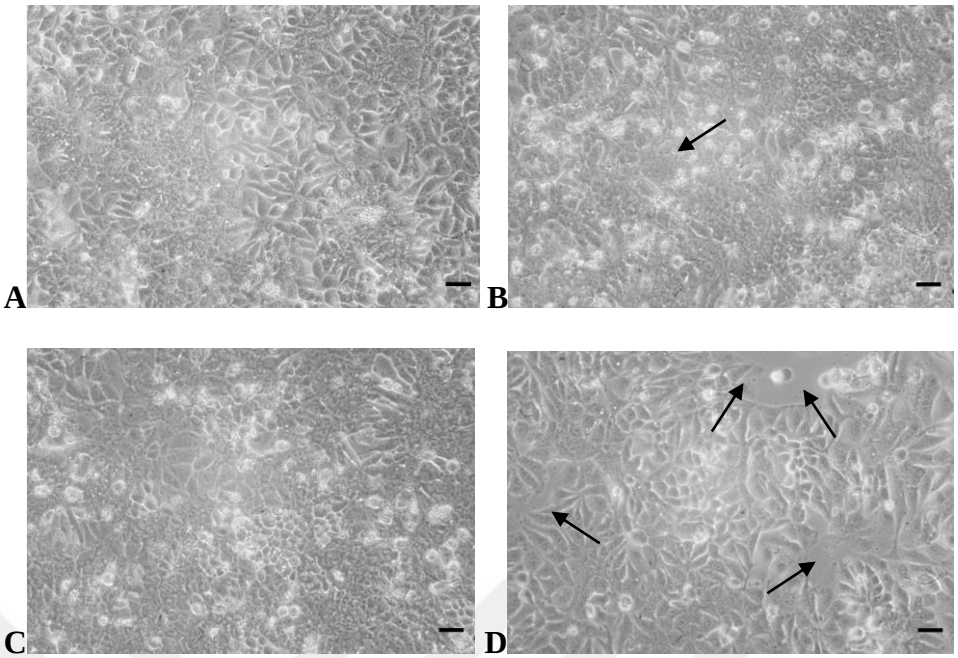
Çalışmanın istatiksel analizlerinde GraphPad Prism 9.2.0 (Software, California, ABD) programı ve MS-Excel 2013 kullanıldı. Tüm verilerde Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri ile normal dağılım kontrol edildi. Grup içi değerlendirmeler normal dağılım gösteren gruplarda, One-way ANOVA testi ve post-hoc Tukey testleri, normal dağılım göstermeyen gruplarda ise, Kruskal-Wallis ve post-hoc Dunn's testleri yapıldı. Gruplar arası değerlendirmeler, ise Student's t testi ve Mann-Whitney U testi uygulandı. 24. ile 72. saat karşılaştırmaları Paired t-testi ile yapıldı. İstatiksel sonuçlarda $p<0,05$ güven aralığı anlamlı kabul edildi. Normal dağılım gösteren gruplarda ortalama ± standart sapma şeklinde, normal dağılım göstermeyen gruplarda medyan şeklinde gösterildi. Çalışmada yapılan üçlü tekrarların ortalaması alındı. Canlılık ve migrasyon deneylerinde zaman dilimi değişimleri % of change formülü ile hesaplandı. Apoptoz verileri flow sitometri analiz programı ile yapıldı. Hücre döngüsü analizleri ModFit analiz programı ile yapıldı.

4. BULGULAR

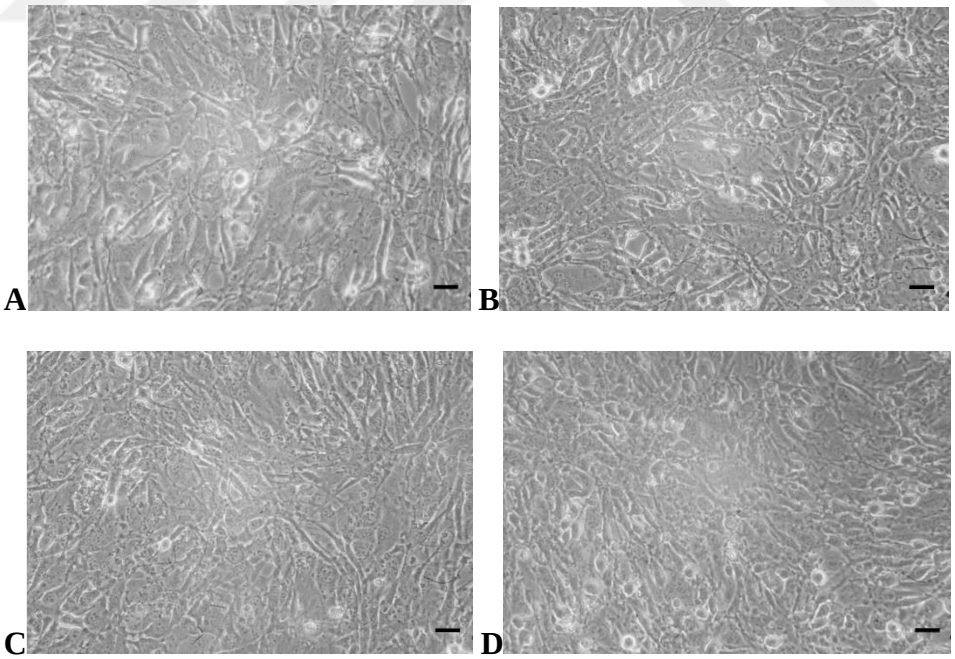
4.1. Propolis ve Karboplatin Dozlarının Hücre Hatlarına Uygulanması

İshikawa hücre hattı deney grupları, kontrol grubuyla gözlemsel olarak ışık mikroskobu ile karşılaştırıldığında tüm deney gruplarında hücre proliferasyonunun daha az olduğu gözlendi ve propolis+karboplatin deney grubunda en fazla olduğu görüldü (Şekil 4-1).

3T3 hücre hattı deney grupları incelendiğinde propolis ve karboplatin dozları uygunan gruplarda böyle bir etki gözlenmedi (Şekil 4-2).



Şekil 4-1: İshikawa hücreleri propolis ve karboplatin dozları uygulanmış deney grupları inverted mikroskop görüntüleri. A) Kontrol B) Propolis C) Karboplatin ve D) Propolis+karboplatin deney grupları. Siyah ok: hücre çoğalmasının az olduğu (B) ve olmadığı açıklıkları (D) göstermektedir. 20x büyütme. Bar: 10 µm



Şekil 4-2: 3T3 fibroblast hücre hattı propolis ve karboplatin dozları uygulanmış deney grupları inverted mikroskop görüntüleri. A)Kontrol B)Propolis C)Karboplatin ve D)Propolis+karboplatin deney grupları. Deney gruplarındaki hücre çoğalmasında bir farklılık görülmemektedir. 20x büyütme. Bar: 10 µm

4.2. Canlılık Deneyi

İshikawa ve 3T3 hücre hattı, 24. ve 72. saatlerde incelenmek üzere, deney grupları oluşturuldu ve tripan mavisi boyası ile boyanarak değişimler karşılaştırıldı. Veriler normal dağılımlıydı. Her deney grubu üçer kez tekrar edildi. Üç ölçümün ortalaması alındı ve tek değer elde edildi.

İshikawa 24. saat sonuçları

İshikawa hücre hattı deney grupları kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, tüm gruplarda fark vardı ve canlılıkta istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu saptandı ($p<0,05$) (Tablo 4-1 ve Şekil 4-3).

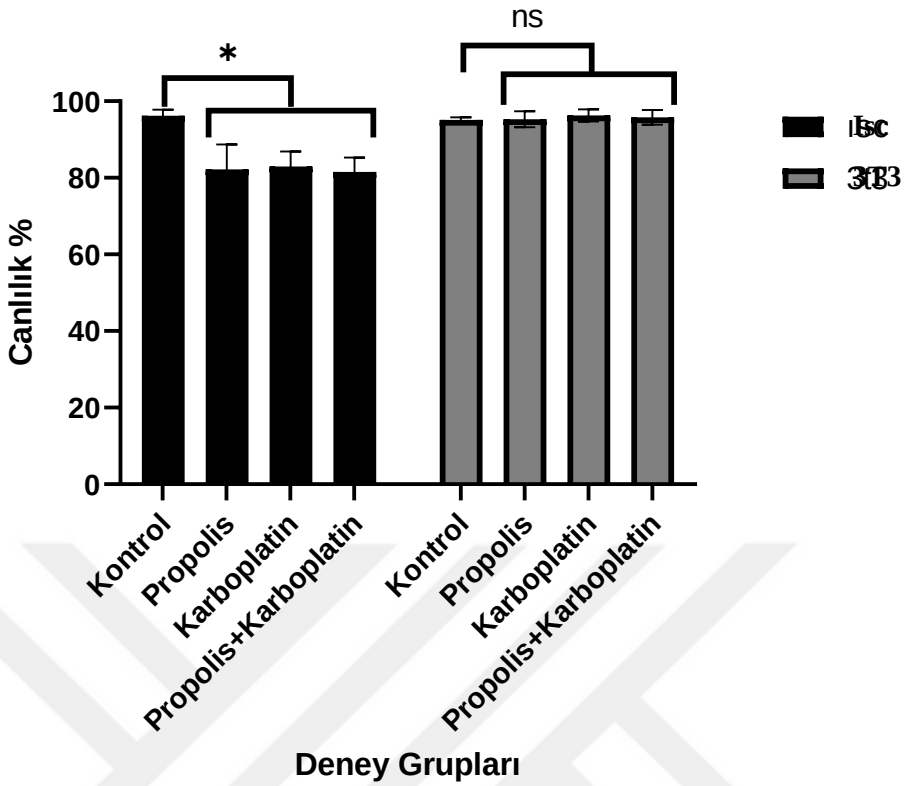
3T3 24. saat sonuçları

3T3 hücre hattı deney grupları kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, tüm deney gruplarındaki canlılıkta bir fark bulunmadı ($p>0,05$) (Tablo 4-1 ve Şekil 4-3).

Tablo 4-1: İshikawa ve 3T3 hücre hattında ilaçların 24. saatteki canlılık üzerine etkileri.

% Canlılık	Kontrol n=3	Propolis n=3	Karboplatin n=3	Propolis+Karboplatin n=3	*p*
Isc	96,23 ± 1,6	82,24 ± 6,5*	83 ± 3,9*	81,53 ± 3,8*	p<0,01
3T3	95,15 ± 0,7	95,30 ± 2,1	96,30 ± 1,6	95,79 ± 2,0	p>0,05

*Hücre hatları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *p<0,05 Isc:İshikawa*



Şekil 4-3: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saatteki ortalama canlılık yüzdeleri. *p<0,05 ns: anlamlı değil

İshikawa 72. saat sonuçları

İshikawa hücre hattı propolis ve propolis+karboplatin grupları, kontrol grubuna göre fark anlamlıydı ve canlılıkların daha düşük olduğu saptandı (p<0,01). Propolis ve propolis+karboplatin gruplarındaki azalmaların karboplatin grubuna göre daha fazla olduğu görüldü (p<0,01) (Tablo 4-2 ve Şekil 4-4).

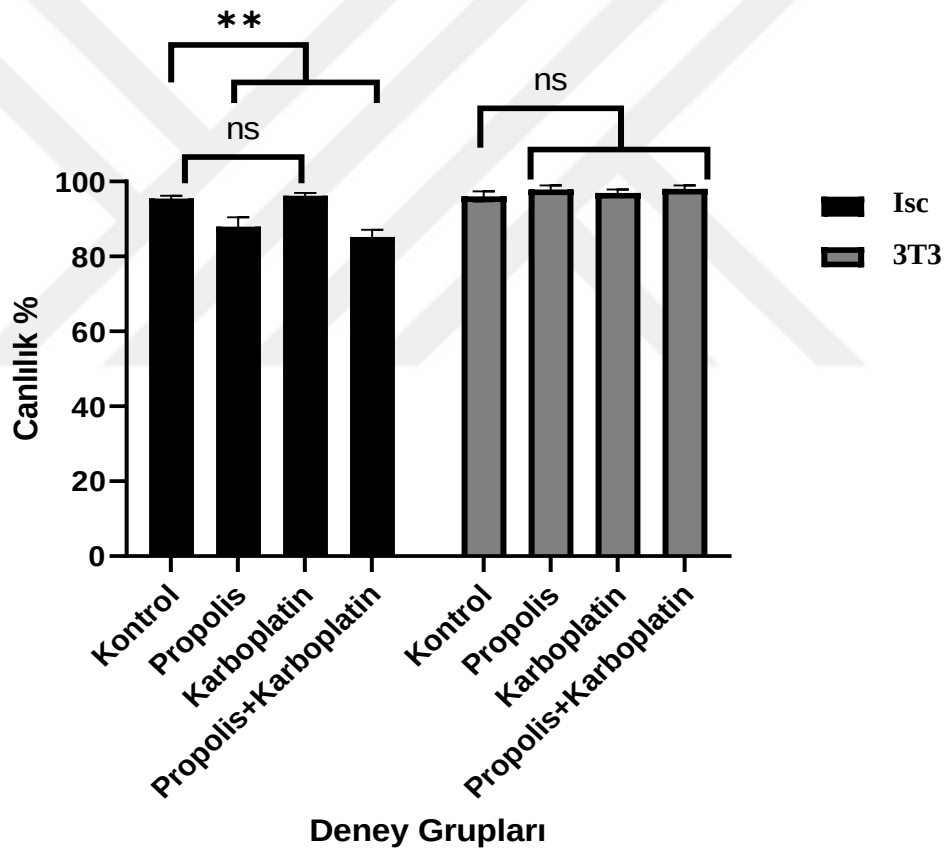
3T3 72. saat sonuçları

3T3 hücre hattı kontrol grubuna göre karşılaştırıdığında, deney gruplarında fark bulunmadı (p>0,05) (Tablo 4-2 ve Şekil 4-4).

Tablo 4-2: İshikawa ve 3T3 hücre hattında ilaçların 72. saatteki canlılık üzerine etkileri.

% Canlılık	Kontrol n=3	Propolis n=3	Karboplatin n=3	Propolis+Karboplatin n=3	*p*
Isc	95,46 ± 0,8	87,95 ± 2,5**	96,20 ± 0,8	85,24 ± 1,9**	p<0,001
3T3	96,03 ± 1,4	97,91 ± 1,0	96,96 ± 0,9	98,02 ± 0,9	p>0,05

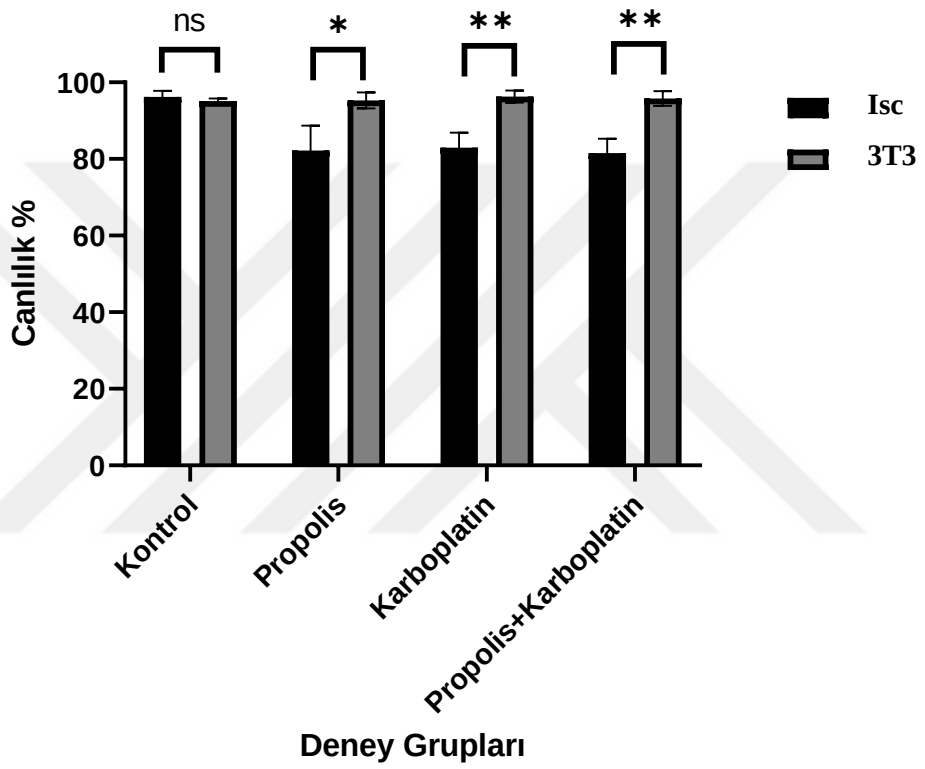
*Hücre hatları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında **p<0,01 Isc:İshikawa*



Şekil 4-4: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 72. saatteki ortalama canlılık yüzdeleri. **p<0,01 ns: anlamlı değil

İshikawa ve 3T3 24. saat gruplar arası karşılaştırma sonuçları

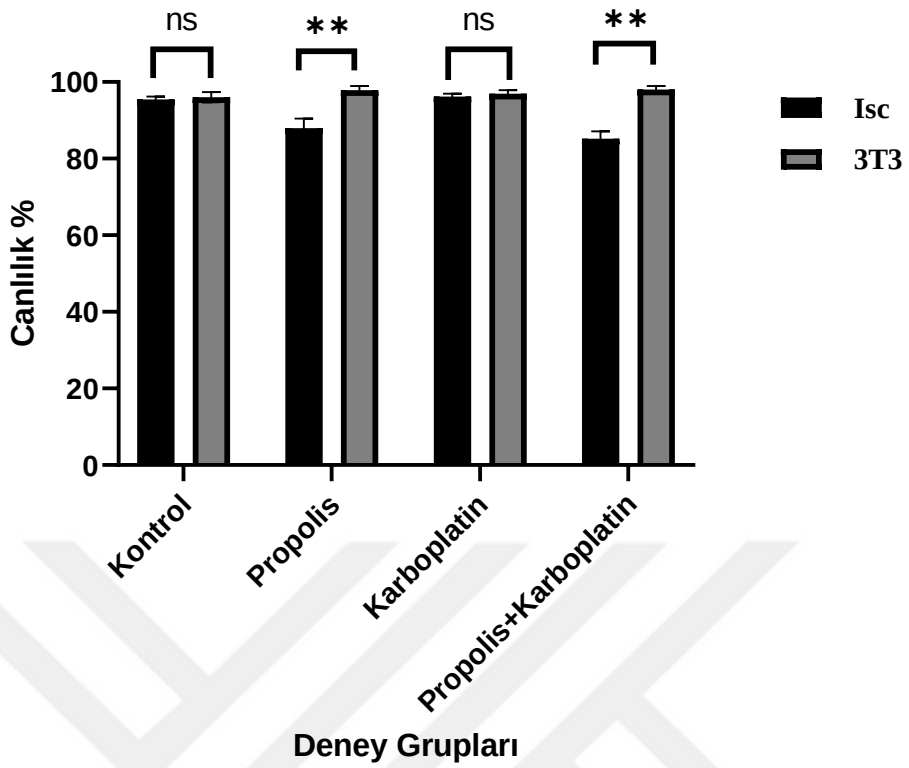
Gruplar karşılıklı olarak karşılaştırıldığında, İshikawa ve 3T3 hattı deney grupları 24. saatteki canlılık verileri propolis grupları ($p<0,05$), karboplatin grupları ($p<0,01$) ve propolis+karboplatin grupları ($p<0,01$) arasındaki fark anlamlıydı. Kontrol grupları arasında bir fark görülmedi ($p>0,05$) (Şekil 4-5).



Şekil 4-5: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saatteki ortalama canlılık yüzdeleri gruplar arası karşılaştırma. **p<0,01 *p<0,05 ns: anlamlı değil

İshikawa ve 3T3 72. saat gruplar arası karşılaştırma sonuçları

Gruplar karşılıklı olarak karşılaştırıldığında, İshikawa ve 3T3 hattı deney grupları 72. saatteki canlılık verileri propolis grupları ve propolis+karboplatin grupları arasındaki fark anlamlıydı ($p<0,01$). Kontrol grupları ve karboplatin grupları arasında fark anlamlı değildi ($p>0,05$) (Şekil 4-6).



Şekil 4-6: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 72. saatteki ortalama canlılık yüzdeleri gruplar arası karşılaştırma. **p<0,01 ns: anlamlı değil

İshikawa 24 ve 72. saat değişim sonuçları

Zaman dilimleri arasındaki geçiş % of change formülü ile hesaplandı. İshikawa hücre hattı deney gruplarındaki canlılıkta istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcut değildi (p>0,05).

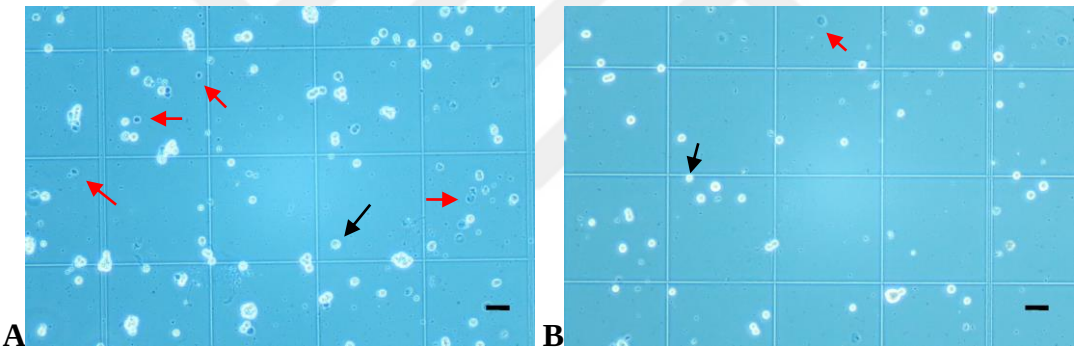
3T3 24 ve 72. saat değişim sonuçları

Zaman dilimleri arasındaki geçiş % of change formülü ile hesaplandı. 3T3 hücre hattı deney gruplarındaki canlılık oranları anlamlı farka sahip değildi (p>0,05).

Tablo 4-3: İshikawa ve 3T3 hücre hattı deney gruplarında 24. ile 72. saatlerdeki canlılık oranları.

% Canlılık	Kontrol n=3	Propolis n=3	Karboplatin n=3	Propolis+Karboplatin n=3	*p*
Isc 24	96,23 ± 1,6	82,24 ± 6,5*	83 ± 3,9*	81,53 ± 3,8*	p<0,01
3T3 24	95,15 ± 0,7	95,30 ± 2,1	96,30 ± 1,6	95,79 ± 2,0	p>0,05
Isc 72	95,46 ± 0,8	87,95 ± 2,5**	96,20 ± 0,8	85,24 ± 1,9**	p<0,001
3T3 72	96,03 ± 1,4	97,91 ± 1,0	96,96 ± 0,9	98,02 ± 0,9	p>0,05

*Hücre hatları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *p<0,05 **p<0,01 Isc:İshikawa*



A **B**

Şekil 4-7: A) İshikawa hücreleri ve B) 3T3 hücreleri tripan mavisi canlılık testi inverted mikroskop görüntüleri. Siyah ok: canlı hücre, kırmızı ok: ölü hücre. Büyütme 10x. Bar: 50 µm

4.3. Akım Sitometri Analizleri

4.3.1. Apoptozun İncelenmesi

Hücrelerdeki apoptozun incelenmesi için, tüm gruplar Anneksin-V-FITC/PI boyası ile boyanarak akım sitometride incelendi. Her iki hücre hattı için 24. ve 72. saatlerdeki etkileri karşılaştırıldı. Veriler normal dağılımlıydı. Her deney grubu üçer kez tekrar edildi. Üç ölçümün ortalaması alındı ve tek değer elde edildi.

İshikawa 24. saat sonuçları

Propolis ($p<0,001$), karboplatin ($p<0,05$) ve propolis+karboplatin ($p<0,001$) grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında apoptoz değerlerinde anlamlı fark görüldü. Propolis ve propolis+karboplatin deney grupları karboplatin grubu ile karşılaştırıldığında apoptozun arttığı saptandı ($p<0,001$) (Tablo 4-5 ve Şekil 4-8).

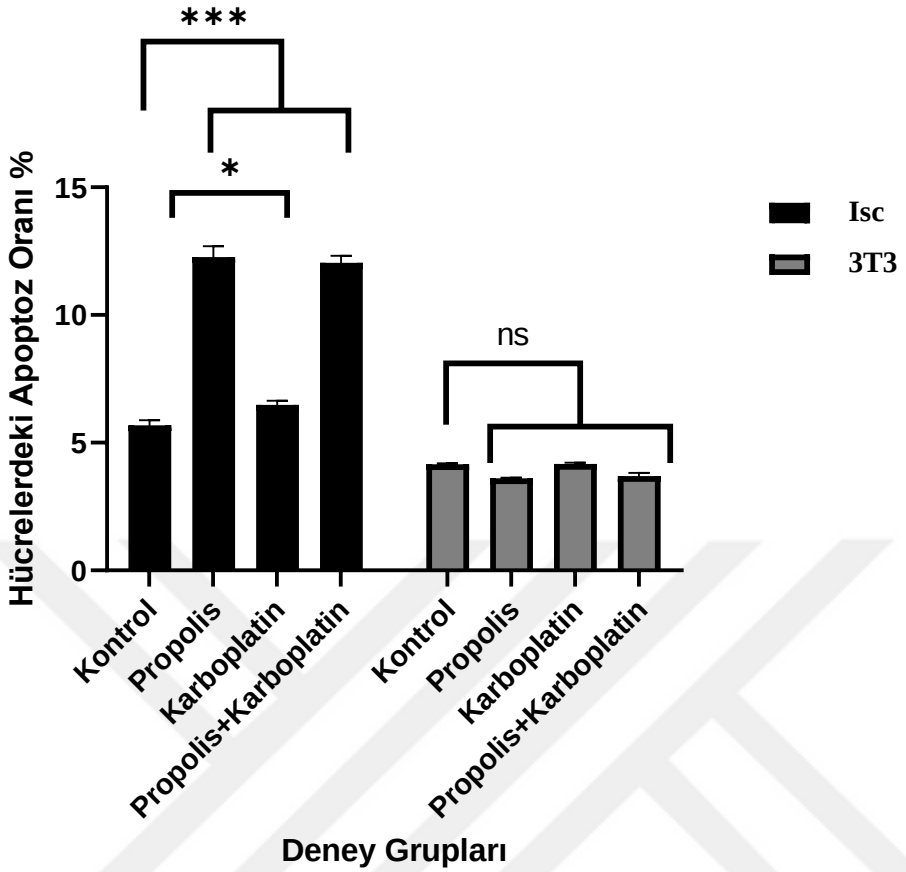
3T3 24. saat sonuçları

Deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında apoptoz oranlarında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo 4-5 ve Şekil 4-8).

Tablo 4-4: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saat apoptoz oranları.

Apoptoz Oranı %	Kontrol n=3	Propolis n=3	Karboplatin n=3	Propolis+Karboplatin n=3	*p*
Isc	5,68 ± 0,2	12,26 ± 0,4***	6,47 ± 0,2*	12,04 ± 0,3***	p<0,001
3T3	4,15 ± 0,4	3,61 ± 0,02	4,16 ± 0,05	3,69 ± 0,1	p>0,05

*Hücre hatları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *p<0,05 ***p<0,001 Isc:İshikawa*



Şekil 4-8: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saat hücrelerdeki ortalama apoptoz oranları. ***p<0,001 *p<0,05 ns: anlamlı değil

İshikawa 72. saat sonuçları

Propolis ve karboplatin grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, fark anlamlıydı ve apoptozun arttığı saptandı ($p<0,001$). Fakat propolis+karboplatin grubundaki apoptoz artışı anlamlı değildi ($p>0,05$). (Tablo 4-6 ve Şekil 4-9).

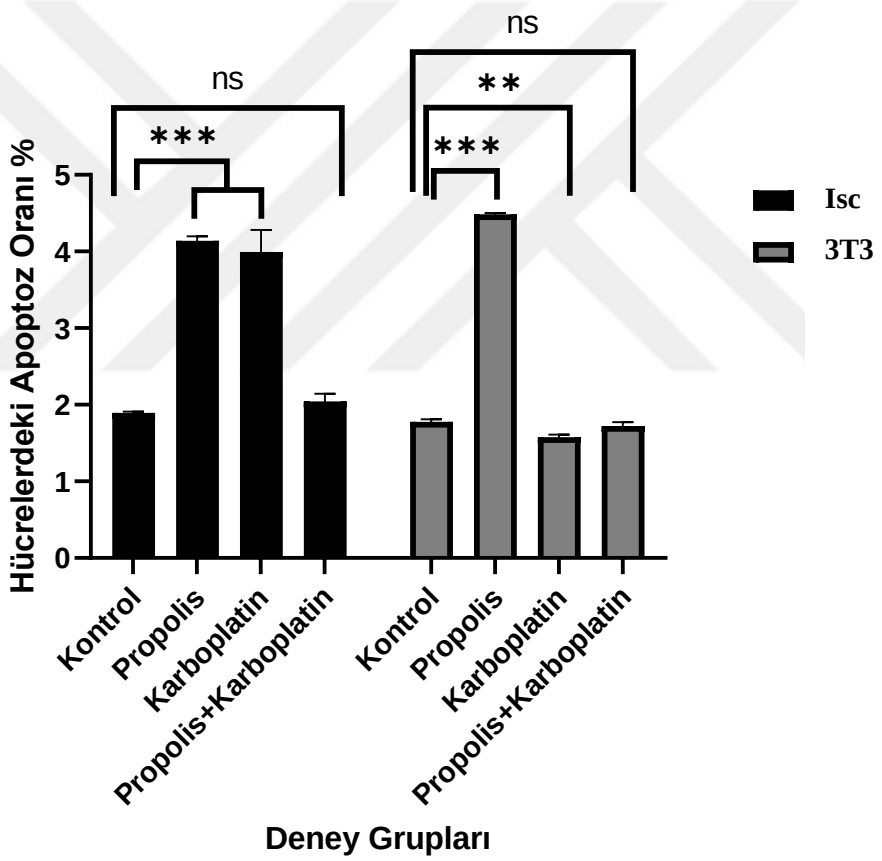
3T3 72. saat sonuçları

Propolis ($p<0,001$) ve karboplatin grubu ($p<0,01$) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bir fark saptandı. Propolis+karboplatin grubunda anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$). Propolis grubu propolis+karboplatin grubu ile karşılaştırıldığında, fark anlamlıydı ($p<0,001$) (Tablo 4-6 ve Şekil 4-9).

Tablo 4-5: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 72. saat apoptoz oranları.

Apoptoz Oranı %	Kontrol n=3	Propolis n=3	Karboplatin n=3	Propolis+Karboplatin n=3	*p*
Isc	1,89 ± 0,02	4,14 ± 0,06***	4,0 ± 0,3***	2,04 ± 0,1	p<0,001
3T3	1,78 ± 0,03	4,48 ± 0,02***	1,58 ± 0,03**	1,72 ± 0,05	p<0,001

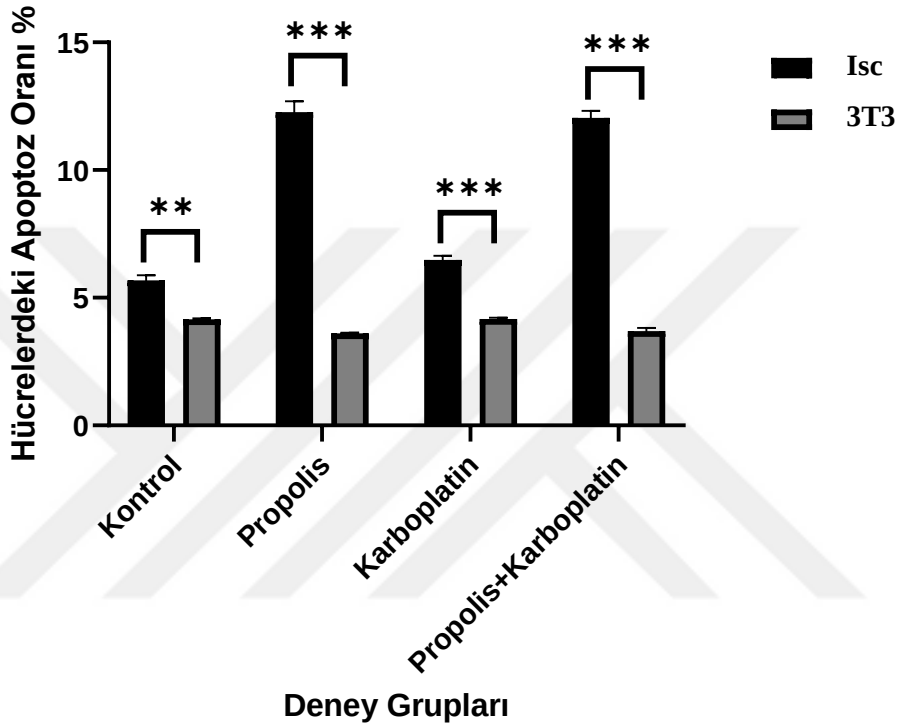
*Hücre hatları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında **p<0,01 ***p<0,001 Isc:İshikawa*



Şekil 4-9: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 72. saat ortalama apoptoz oranları. ***p<0,001 **p<0,01 ns: anlamlı değil

İshikawa ve 3T3 24. saat gruplar arası karşılaştırma sonuçları

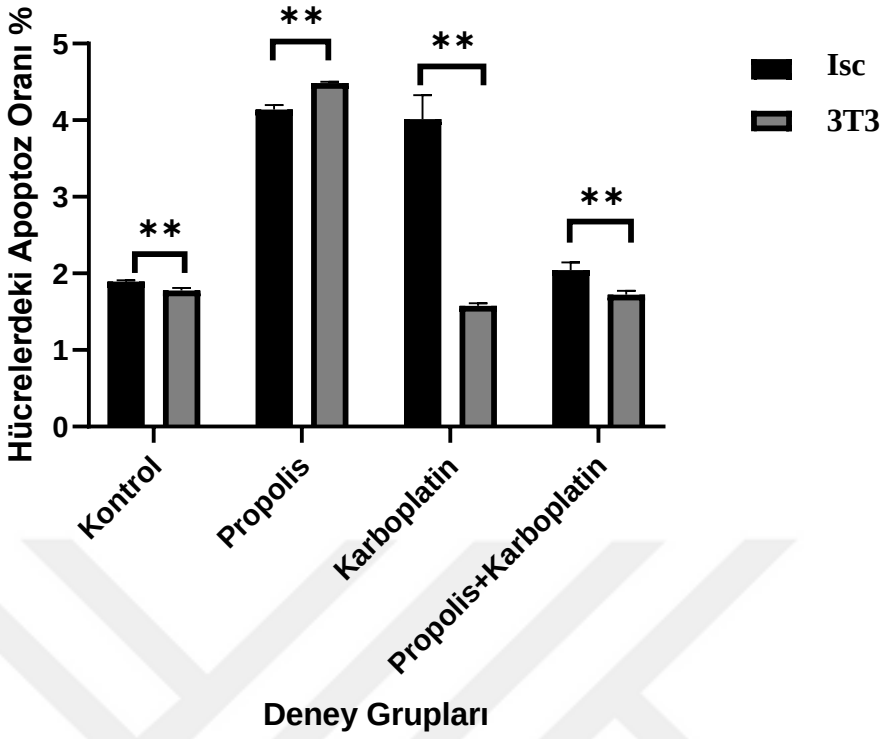
Kontrol grupları ($p<0,01$), propolis grupları, karboplatin grupları ve propolis+karboplatin ($p<0,001$) grupları arasında, fark anlamlıydı ve İshikawa hücre hattında apoptozun istatistiksel olarak arttığı görüldü (Şekil 4-10).



Şekil 4-10: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saat gruplar arası ortalama apoptoz oranları karşılaştırılması. ***p<0,001 **p<0,01

İshikawa ve 3T3 72. saat gruplar arası karşılaştırma sonuçları

Kontrol grupları, karboplatin grupları ve propolis+karboplatin grupları arasında, fark anlamlıydı ve İshikawa hücre hattında apoptozun istatistiksel olarak arttığı görüldü ($p<0,01$). Propolis grupları arasında fark anlamlıydı ($p<0,01$) (Şekil 4-11).



Şekil 4-11: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 72. saat gruplar arası ortalama apoptoz oranı karşılaştırılması. **p<0,01

İshikawa 24 ve 72. saat değişim sonuçları

Tüm deney gruplarında 24. saate göre apoptoz oranında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma mevcuttu (p<0,001).

3T3 24 ve 72. saat değişim sonuçları

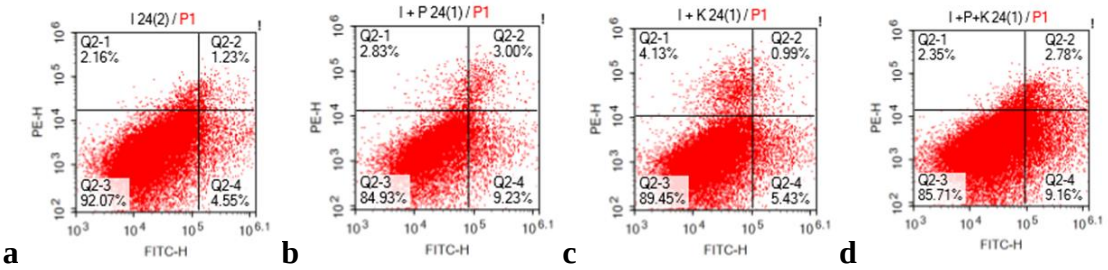
Propolis grubu dışındaki tüm deney gruplarında 24. saate göre apoptoz oranında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı (p<0,001).

Tablo 4-6: İshikawa ve 3T3 hücreleri 24. ile 72. saatlerdeki apoptoz oranları.

Apoptoz Oranı %	Kontrol n=3	Propolis n=3	Karboplatin n=3	Propolis+Karboplatin n=3	*p*
Isc 24	5,68 ± 0,2	12,26 ± 0,4***	6,47 ± 0,2*	12,04 ± 0,3***	p<0,001
3T3 24	4,15 ± 0,4	3,61 ± 0,02	4,16 ± 0,05	3,69 ± 0,1	p>0,05
Isc 72	1,89 ± 0,02	4,14 ± 0,06***	4,0 ± 0,3***	2,04 ± 0,1	p<0,001
3T3 72	1,78 ± 0,03	4,48 ± 0,02***	1,58 ± 0,03**	1,72 ± 0,05	p<0,001

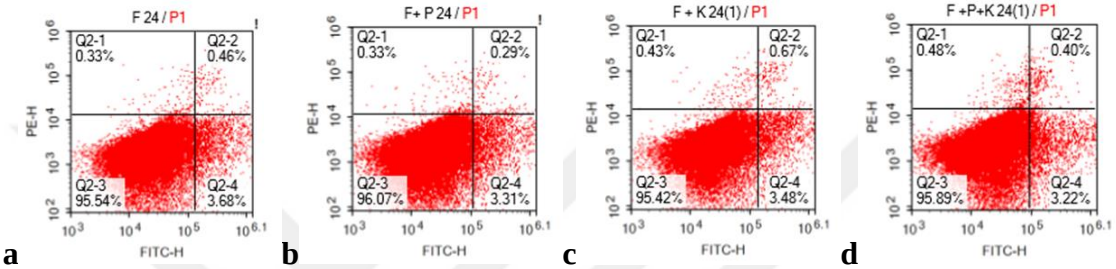
*Hücre hatları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001*
Isc:İshikawa

İshikawa hücreleri 24.saat apoptoz sonuçları



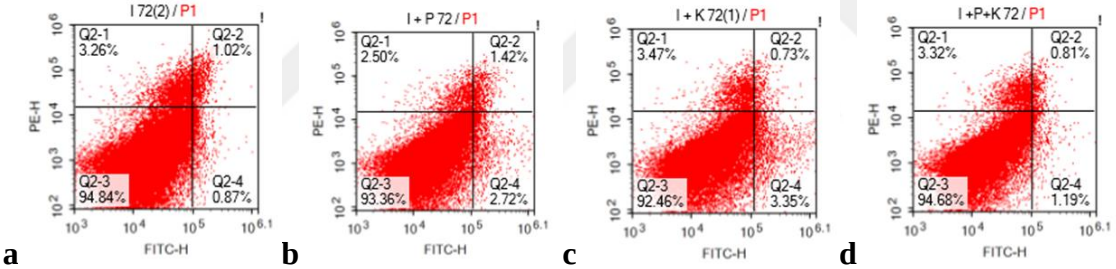
a **b** **c** **d**

3T3 hücreleri 24.saat apoptoz sonuçları



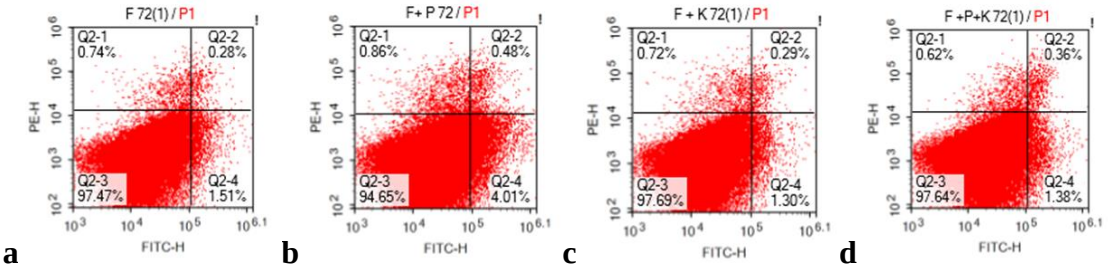
a **b** **c** **d**

İshikawa hücreleri 72.saat apoptoz sonuçları



a **b** **c** **d**

3T3 hücreleri 72.saat apoptoz sonuçları



a **b** **c** **d**

Şekil 4-12: İshikawa ve 3T3 hücreleri apoptoz sonuçları. a) Kontrol b) Propolis c) Karboplatin d) Propolis+karboplatin deney grupları. Q2-1: nekroz Q2-2: erken apoptoz Q2-3: canlı hücre Q2-4: geç apoptoz yüzlerini göstermektedir. Konumuz apoptoz olduğu için erken ve geç apoptoz oranları toplamları alınmıştır ve nekroz oranları çalışmaya dahil edilmemiştir.

4.3.2. Hücre Döngüsünün İncelenmesi

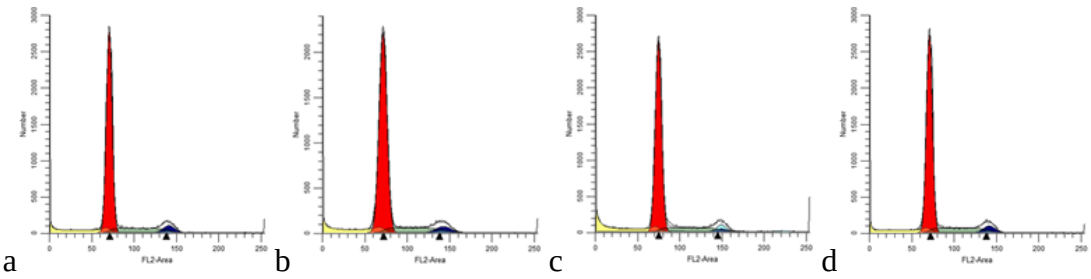
Üç tekrar ile çalışılan deney gruplarının ortalamaları karşılaştırıldığında hücre döngüsü verilerinde anlamlı fark bulunmadı (p>0,05) (Tablo 4-8 ve Şekil 4-13).

Tablo 4-7: İshikawa ve 3T3 hücreleri 24. ile 72. saatlerdeki hücre döngüsü faz dağılımları.

	%	Kontrol n=3	Propolis n=3	Karboplatin n=3	Propolis+Karboplatin n=3
Isc 24	G1	81,14 ± 0,4	82,52 ± 1,2	82,12 ± 0,5	82,15 ± 1,5
	S	13,43 ± 0,3	13,06 ± 0,7	12,79 ± 0,6	13,43 ± 0,7
	G2	5,42 ± 0,3	4,42 ± 1,6	5,08 ± 0,1	4,42 ± 0,9
3T3 24	G1	68,79 ± 3,4	62,88 ± 7,5	65,54 ± 4,4	69,46 ± 3,1
	S	24,56 ± 0,2	30,69 ± 4,5	26,95 ± 0,9	27,09 ± 1,4
	G2	6,65 ± 3,3	6,43 ± 3,0	7,51 ± 4,5	3,45 ± 2,3
Isc 72	G1	72,11 ± 0,8	70,06 ± 3,0	70,73 ± 1,5	69,31 ± 2,0
	S	22,96 ± 0,4	24,99 ± 2,8	24,73 ± 1,3	25,43 ± 2,6
	G2	4,93 ± 0,5	4,95 ± 0,5	4,54 ± 0,3	5,26 ± 0,8
3T3 72	G1	69,30 ± 1,7	69,23 ± 1,7	70,16 ± 1,0	70,04 ± 0,7
	S	24,38 ± 1,0	24,33 ± 3,0	23,19 ± 2,0	24,28 ± 0,3
	G2	6,33 ± 0,8	6,44 ± 1,4	6,66 ± 1,4	5,68 ± 0,9

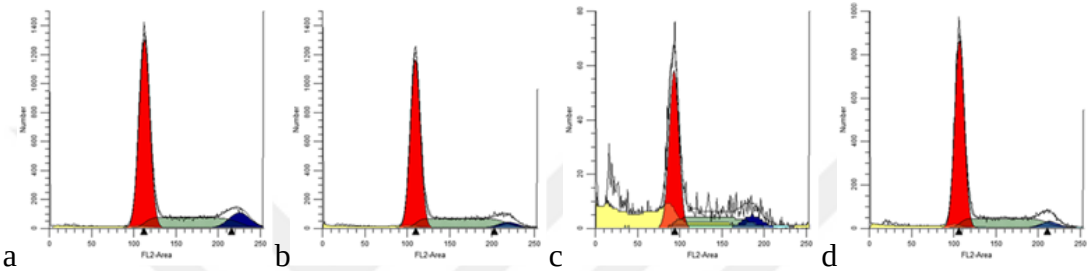
p>0,05 Isc:İshikawa

İshikawa hücreleri 24.saat hücre döngüsü sonuçları



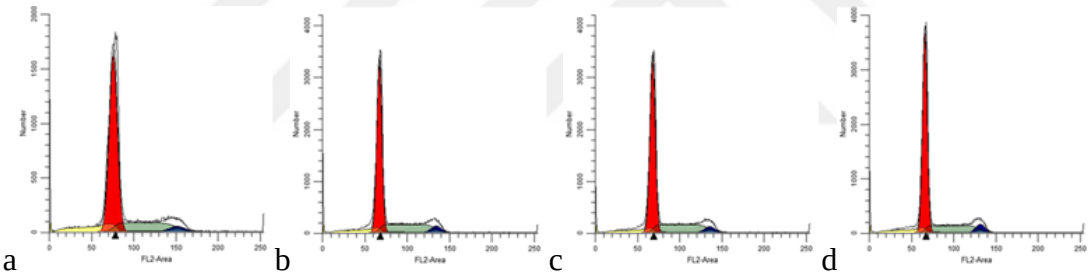
a b c d

3T3 hücreleri 24.saat hücre döngüsü sonuçları



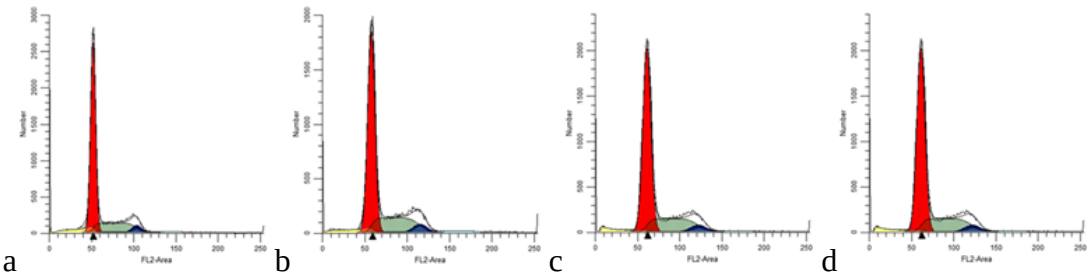
a b c d

İshikawa hücreleri 72.saat hücre döngüsü sonuçları



a b c d

3T3 hücreleri 72.saat hücre döngüsü sonuçları



a b c d

Şekil 4-13: İshikawa ve 3T3 hücreleri hücre döngüsü sonuçları. a) Kontrol b) Propolis c) Karboplatin d) Propolis+karboplatin deney grupları. Kırmızı: G1 Mavi: G2 Yeşil: S fazlarını Sarı: bozulmuş hücre Turkuaz: yığılmış hücre oranlarını göstermektedir.

4.4. Migrasyon Testi

Deney grupları migrasyon oranları % of change formülü ile hesaplandı ve veriler normal dağılımlı değildi. Migrasyon hızı verileri normal dağılım sergiledi ve hız formülü ile hesaplandı. Ölçümlerin ortalaması, medyanı alındı ve tek değer elde edildi.

İshikawa 24. saat sonuçları

Tüm deney gruplarındaki migrasyonda kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcuttu ve migrasyonun daha düşük olduğu görüldü ($p<0,01$). Propolis+karboplatin deney grubu propolis grubu ile karşılaştırıldığında, migrasyonun daha az olduğu saptandı ($p<0,01$) (Tablo 4-9 ve Şekil 4-14).

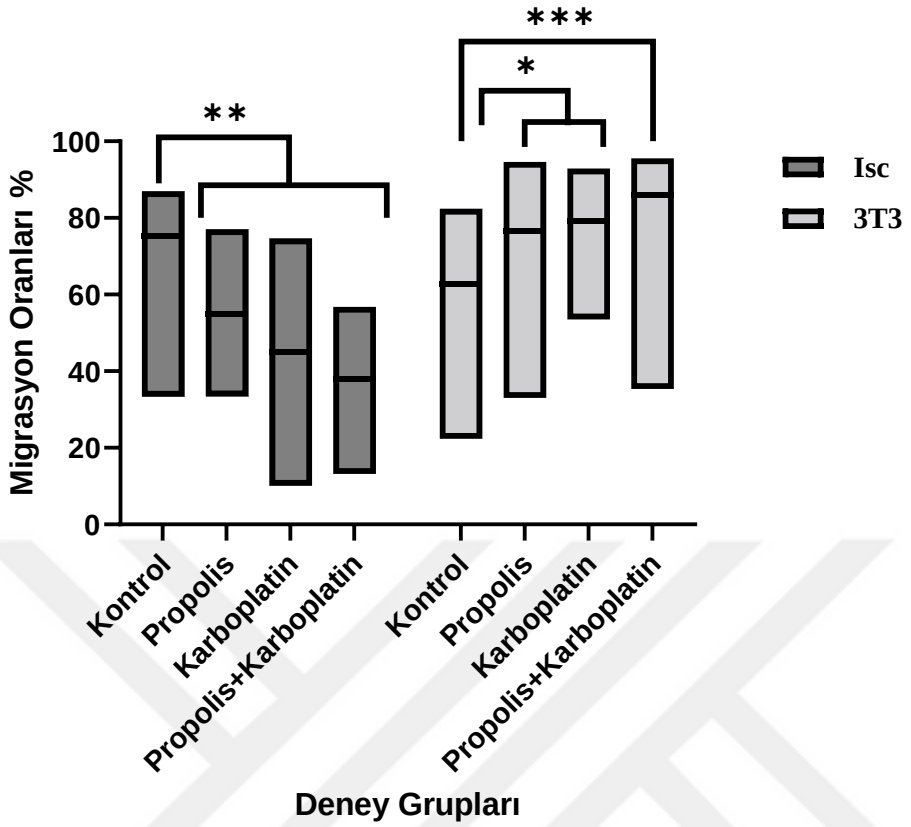
3T3 24. saat sonuçları

Tüm deney gruplarındaki migrasyonda kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcuttu ve migrasyonun daha fazla olduğu görüldü ($p<0,05$), ($p<0,001$) (Tablo 4-9 ve Şekil 4-14).

Tablo 4-8: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saat migrasyon oranları.

Migrasyon Oranı %	Kontrol n=30	Propolis n=30	Karboplatin n=30	Propolis+Karboplatin n=30	*p*
Isc					
Ortalama	72,3349	55,9982	45,5329	37,9827	
Medyan	75,2703	54,9470**	44,9562**	38,0616**	p<0,01
En Küçük Değer	33,34552	33,4221	10,15786	13,20287	
En Büyük Değer	86,9955	77,04941	74,63028	56,76441	
3T3					
Ortalama	62,6371	72,5880	75,8069	81,5884	
Medyan	62,6737	76,7040*	79,2648*	86,0154***	p<0,001
En Küçük Değer	22,36703	33,03601	53,52427	35,38843	
En Büyük Değer	82,38997	94,62383	92,89593	95,51865	

*Hücre hatları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 Isc:İshikawa*



Şekil 4-14: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saat medyan migrasyon oranları. ***p<0,001 **p<0,01 *p<0,05

İshikawa 48. saat sonuçları

Tüm deney gruplarındaki migrasyon oranları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcuttu ve migrasyonun daha az olduğu görüldü ($p<0,01$) (Tablo 4-10 ve Şekil 4-15).

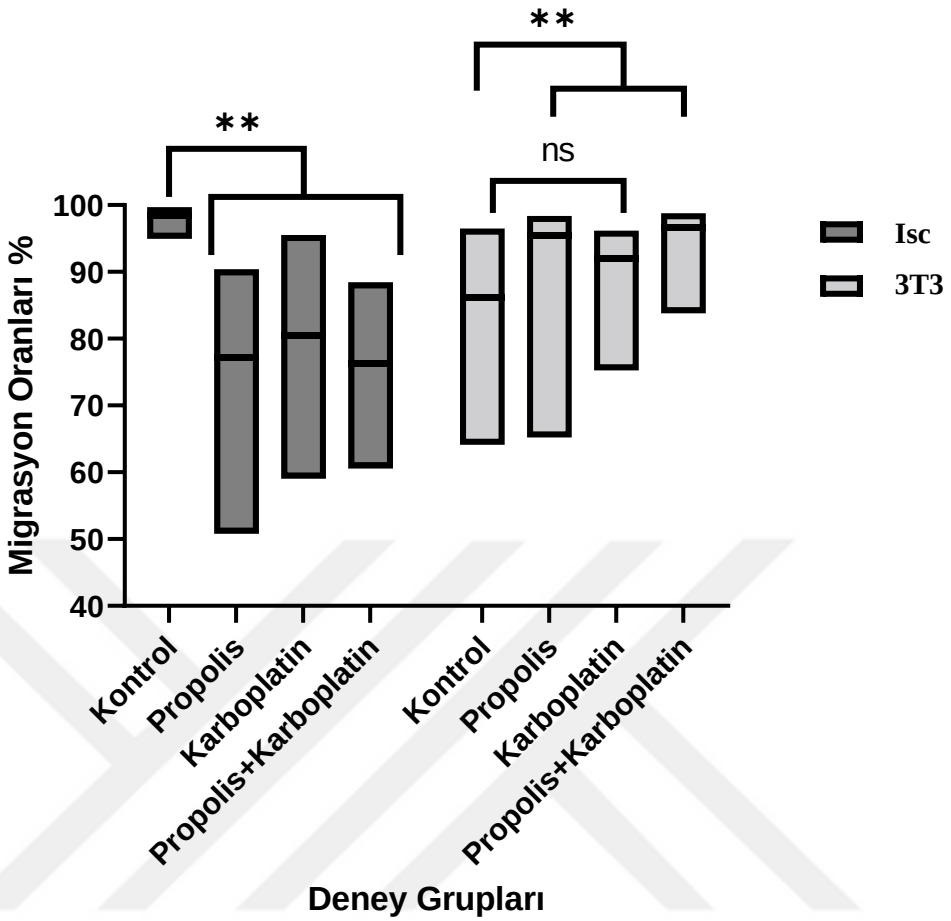
3T3 48. saat sonuçları

Propolis ve propolis+karboplatin grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı ve migrasyonun daha fazla olduğu saptandı ($p<0,01$). Propolis ($p<0,05$) ve propolis+karboplatin ($p<0,01$) deney grupları karboplatin grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı bir farka rastlandı ve migrasyonun daha yüksek olduğu görüldü (Tablo 4-10 ve Şekil 4-15).

Tablo 4-9: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 48. saat migrasyon oranları.

Migrasyon Oranı %	Kontrol n=30	Propolis n=30	Karboplatin n=30	Propolis+Karboplatin n=30	*p*
Isc					
Ortalama	98,1755	76,6060	78,6543	74,2704	
Medyan	98,4695	77,1819**	80,5124**	76,3472**	p<0,01
En Küçük Değer	94,9506	50,80256	59,06596	60,64688	
En Büyük Değer	99,67639	90,38304	95,52038	88,40271	
3T3					
Ortalama	84,4087	92,8528	90,5239	95,8884	
Medyan	86,1165	95,4811**	91,9896	96,6288**	p<0,01
En Küçük Değer	64,10646	65,24663	75,26288	83,83199	
En Büyük Değer	96,49815	98,39698	96,18598	98,77284	

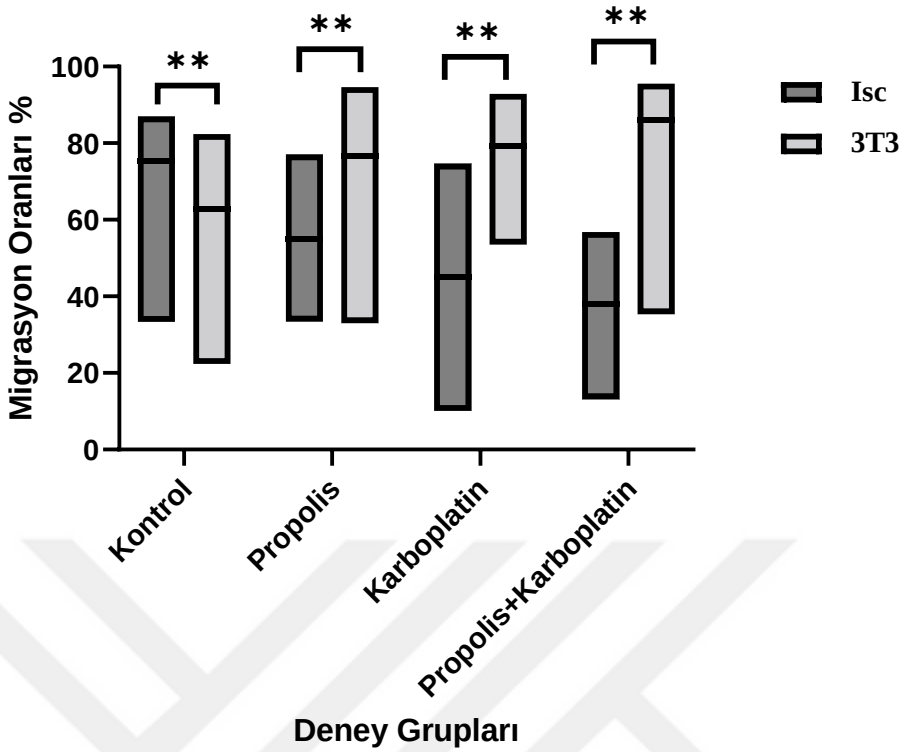
*Hücre hatları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında **p<0,01 Isc:İshikawa*



Şekil 4-15: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 48. saat medyan migrasyon oranları. **p<0,01 ns: anlamlı değil

<u>İshikawa ve 3T3 24. saat gruplar arası karşılaştırma sonuçları</u>

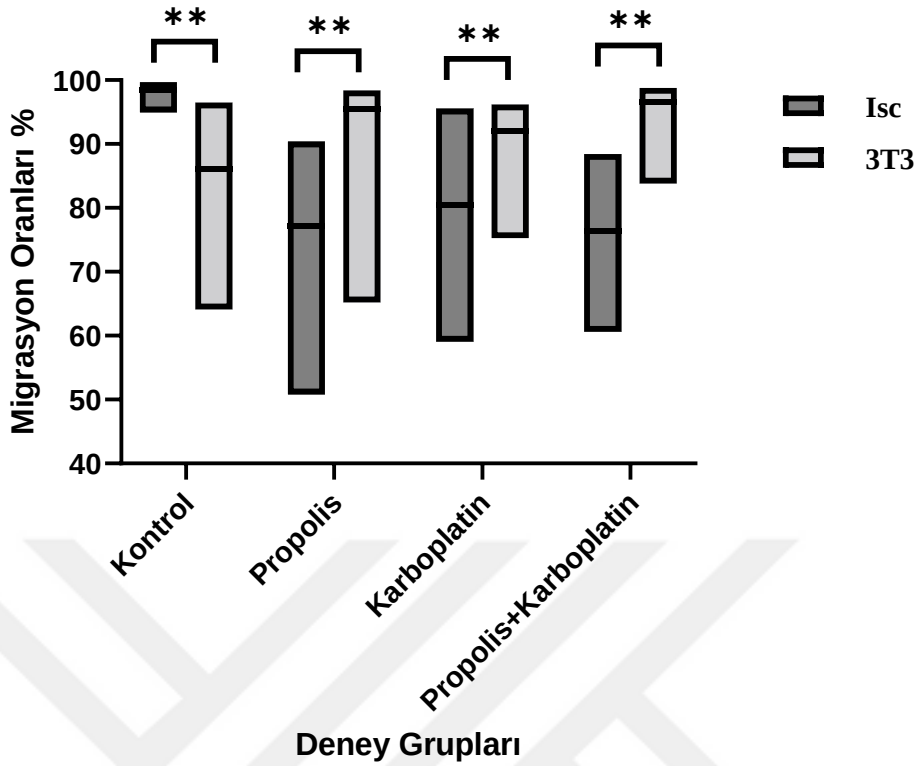
Propolis grupları, karboplatin grupları ve propolis+karboplatin grupları arasında, fark anlamlıydı ve İshikawa hücre hattında migrasyonun anlamlı olarak daha az olduğu saptandı ($p<0,01$). Kontrol grupları arasında, fark anlamlıydı ve 3T3 hücre hattında migrasyonun istatistiksel olarak daha düşük olduğu görüldü ($p<0,01$) (Şekil 4-16).



Şekil 4-16: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saat medyan migrasyon oranları gruplar arası karşılaştırması. **p<0,01

<u>İshikawa ve 3T3 48. saat gruplar arası karşılaştırma sonuçları</u>

Propolis grupları, karboplatin grupları ve propolis+karboplatin grupları arasında, fark anlamlıydı ve İshikawa hücre hattında migrasyonun anlamlı olarak daha az olduğu saptandı ($p<0,01$). Kontrol grupları arasında, fark anlamlıydı ve 3T3 hücre hattında migrasyonun istatistiksel olarak daha düşük olduğu görüldü ($p<0,01$) (Şekil 4-17).



Şekil 4-17: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 48. saat gruplar arası medyan migrasyon oranları karşılaştırılması. **p<0,01

Tablo 4-10: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. ile 48. saat migrasyon oranları.

Migrasyon Oranı %	Kontrol n=30	Propolis n=30	Karboplatin n=30	Propolis+Karboplatin n=30	*p*
Isc 24	75,27	54,95**	44,96**	38,06**	p<0,01
Isc 48	98,47	77,18**	80,51**	76,35**	p<0,01
3T3 24	62,67	76,70*	79,26*	86,01***	p<0,001
3T3 48	86,11	95,48**	91,99	96,63**	p<0,01

*Hücre hatları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 Isc:İshikawa*

İshikawa 24. saat migrasyon hızı sonuçları

Tüm deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında migrasyon hızında istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcuttu ve düşüş görüldü ($p<0,01$) (Tablo 4-12 ve Şekil 4-18).

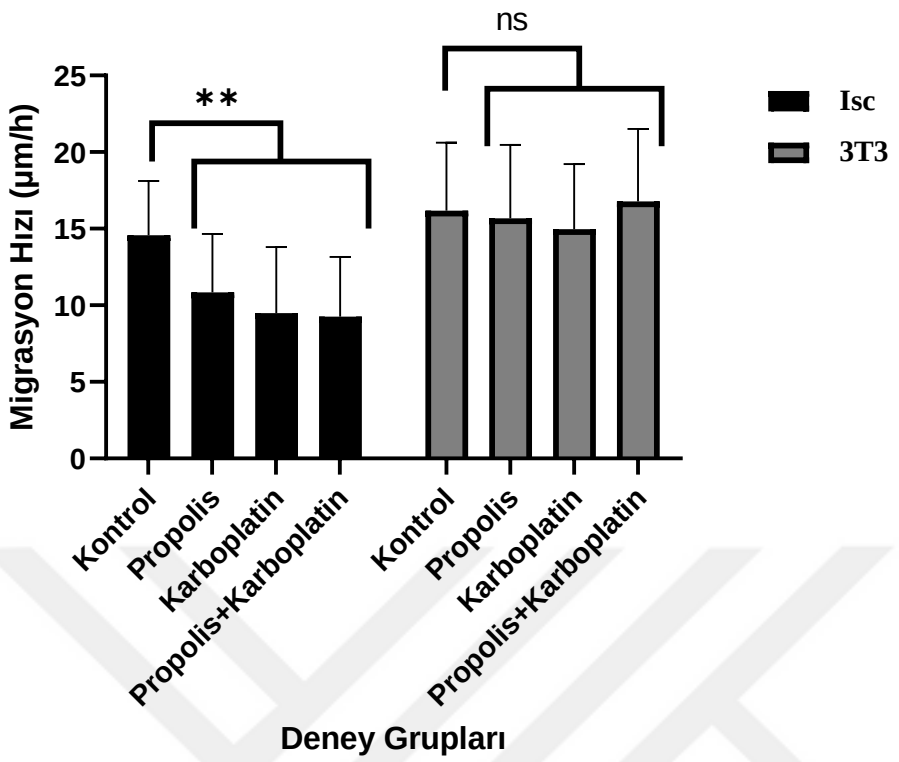
3T3 24. saat migrasyon hızı sonuçları

Deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, migrasyon hızında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo 4-12 ve Şekil 4-18).

Tablo 4-11: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saat migrasyon hızları.

Migrasyon Hızı (μm/h)	Kontrol n=30	Propolis n=30	Karboplatin n=30	Propolis+Karboplatin n=30	*p*
Isc	14,57 ± 3,55	10,85 ± 3,81**	9,49 ± 4,30**	9,25 ± 3,91**	p<0,01
3T3	16,17 ± 4,44	15,69 ± 4,77	14,97 ± 4,25	16,79 ± 4,72	p>0,05

*Hücre hatları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında **p<0,01 Isc:İshikawa*



Şekil 4-18: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saat ortalama migrasyon hızları. **p<0,01 ns: anlamlı değil

İshikawa 48. saat migrasyon hızı sonuçları

Propolis ve karboplatin deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, migrasyon hızında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görüldü ve düşüş mevcuttu ($p<0,01$). Propolis deney grubu propolis+karboplatin grubu ile karşılaştırıldığında, migrasyon hızında anlamlı bir değişim saptandı ve düşüş görüldü ($p<0,01$) (Tablo 4-13 ve Şekil 4-19).

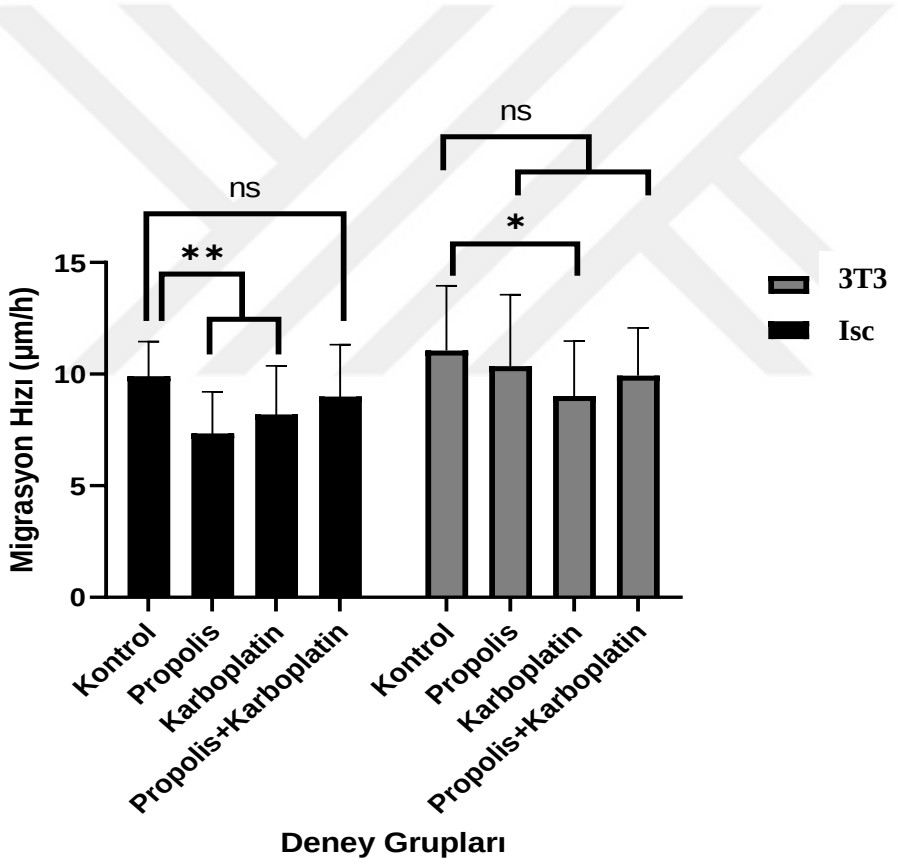
3T3 48. saat migrasyon hızı sonuçları

Karboplatin deney grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, migrasyon hızında anlamlı bir farka rastlandı ve düşüş saptandı ($p<0,05$) (Tablo 4-13 ve Şekil 4-19).

Tablo 4-12: İshikawa ve 3T3 fibroblast hücre hattı 48. saat migrasyon hızları.

Migrasyon Hızı (µm/h)	Kontrol	Propolis	Karboplatin	Propolis+Karboplatin	*p*
Isc	9,91 ± 1,55	7,34 ± 1,87**	8,19 ± 2,18**	9,00 ± 2,32	p<0,01
3T3	11,05 ± 2,91	10,35 ± 3,20	9,02 ± 2,46*	9,93 ± 2,14	p<0,05

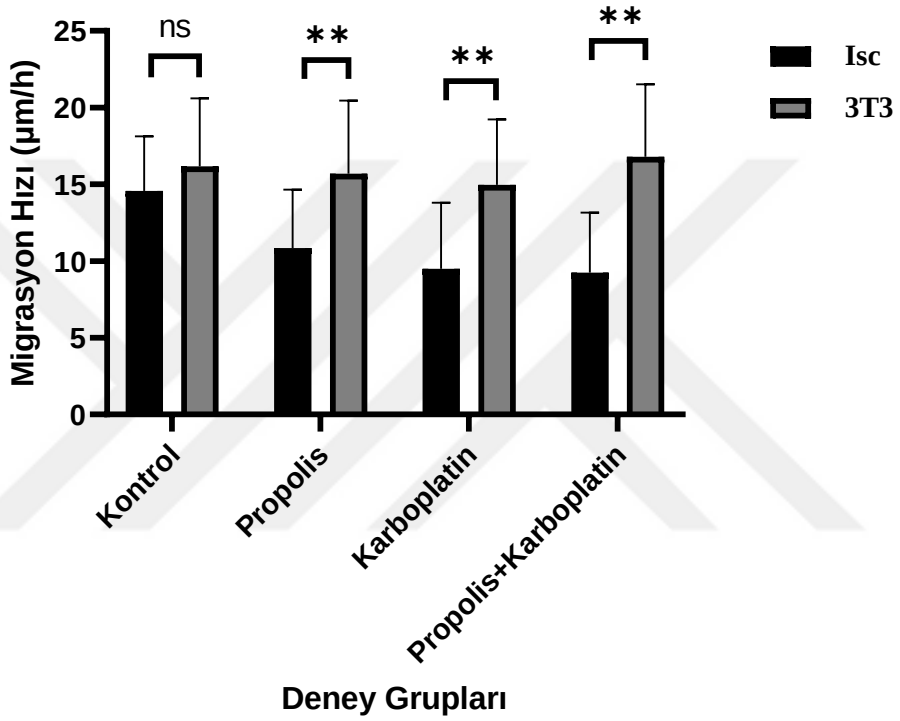
*Hücre hatları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *p<0,05 **p<0,01 Isc:İshikawa*



Şekil 4-19: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 48. saat ortalama migrasyon hızları. **p<0,01 *p<0,05 ns: anlamlı değil

İshikawa ve 3T3 24. saat gruplar arası karşılaştırma sonuçları

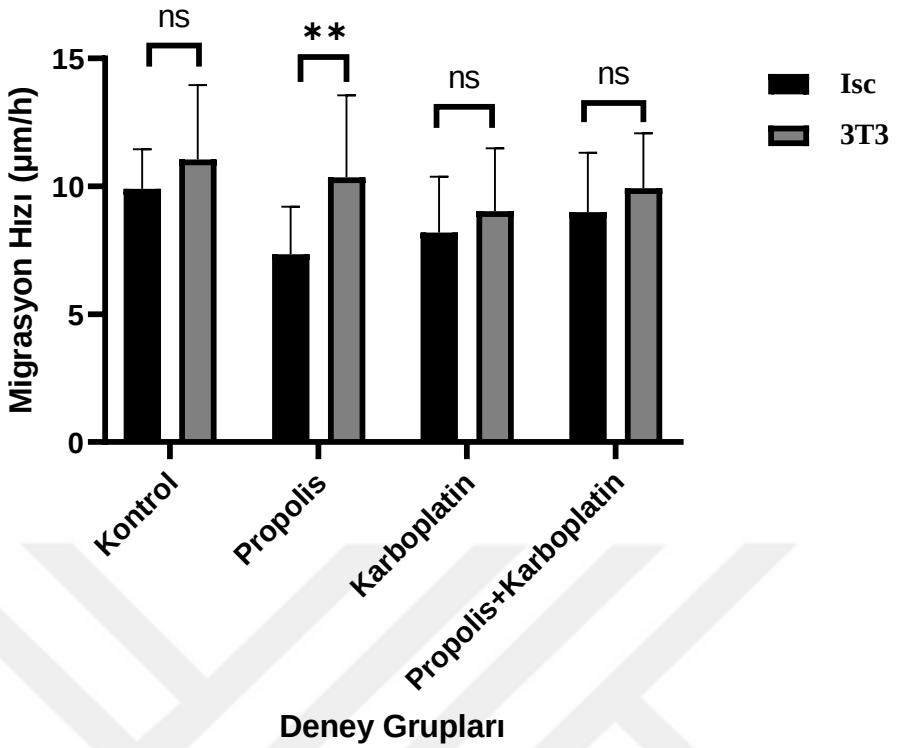
Propolis grupları, karboplatin grupları ve propolis+karboplatin deney grupları arasında, fark anlamlıydı ve İshikawa hücre hattında migrasyon hızının anlamlı olarak düştüğü saptandı ($p<0,01$). Fakat kontrol grupları arasında anlamlı bir farka rastlanmadı ($p>0,05$) (Şekil 4-20).



Şekil 4-20: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saat gruplar arası ortalama migrasyon hızı karşılaştırılması. **p<0,01 ns: anlamlı değil

İshikawa ve 3T3 48. saat gruplar arası karşılaştırma sonuçları

Propolis grupları arasında, fark anlamlıydı ve İshikawa hücre hattında migrasyon hızının anlamlı olarak düştüğü saptandı ($p<0,01$). Ancak diğer tüm deney gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 4-21).



Şekil 4-21: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 48. saat ortalama migrasyon hızı gruplar arası karşılaştırılması. **p<0,01 ns: anlamlı değil

İshikawa 24 ve 72. saat migrasyon hızı değişim sonuçları

Tüm deney gruplarında migrasyon hızının 48. saatte göreceli olarak düştüğü saptandı. Kontrol ve propolis deney gruplarındaki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,01$).

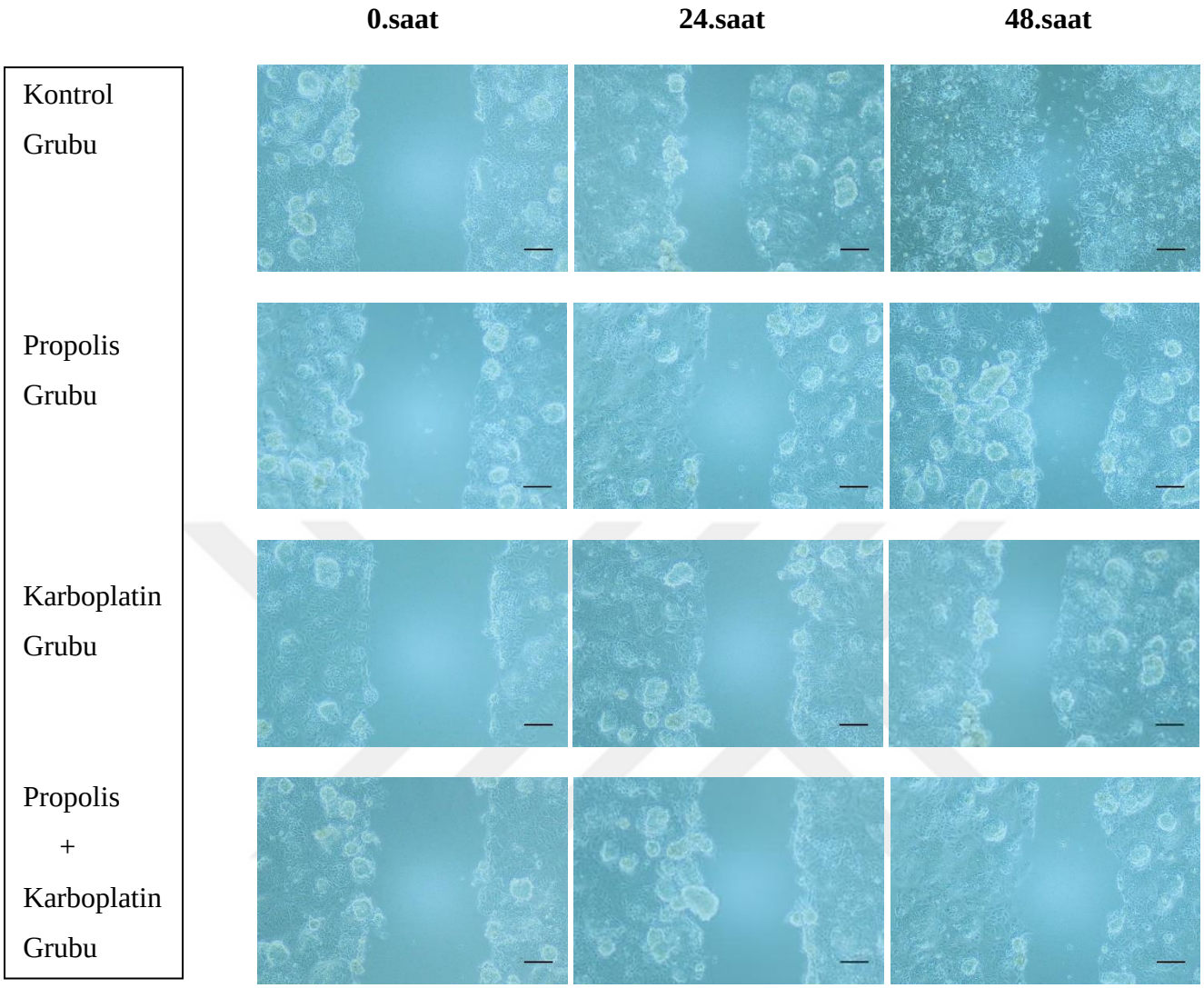
3T3 24 ve 72. saat migrasyon hızı değişim sonuçları

Tüm deney gruplarındaki migrasyon hızının 48. saatte düştüğü istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,01$).

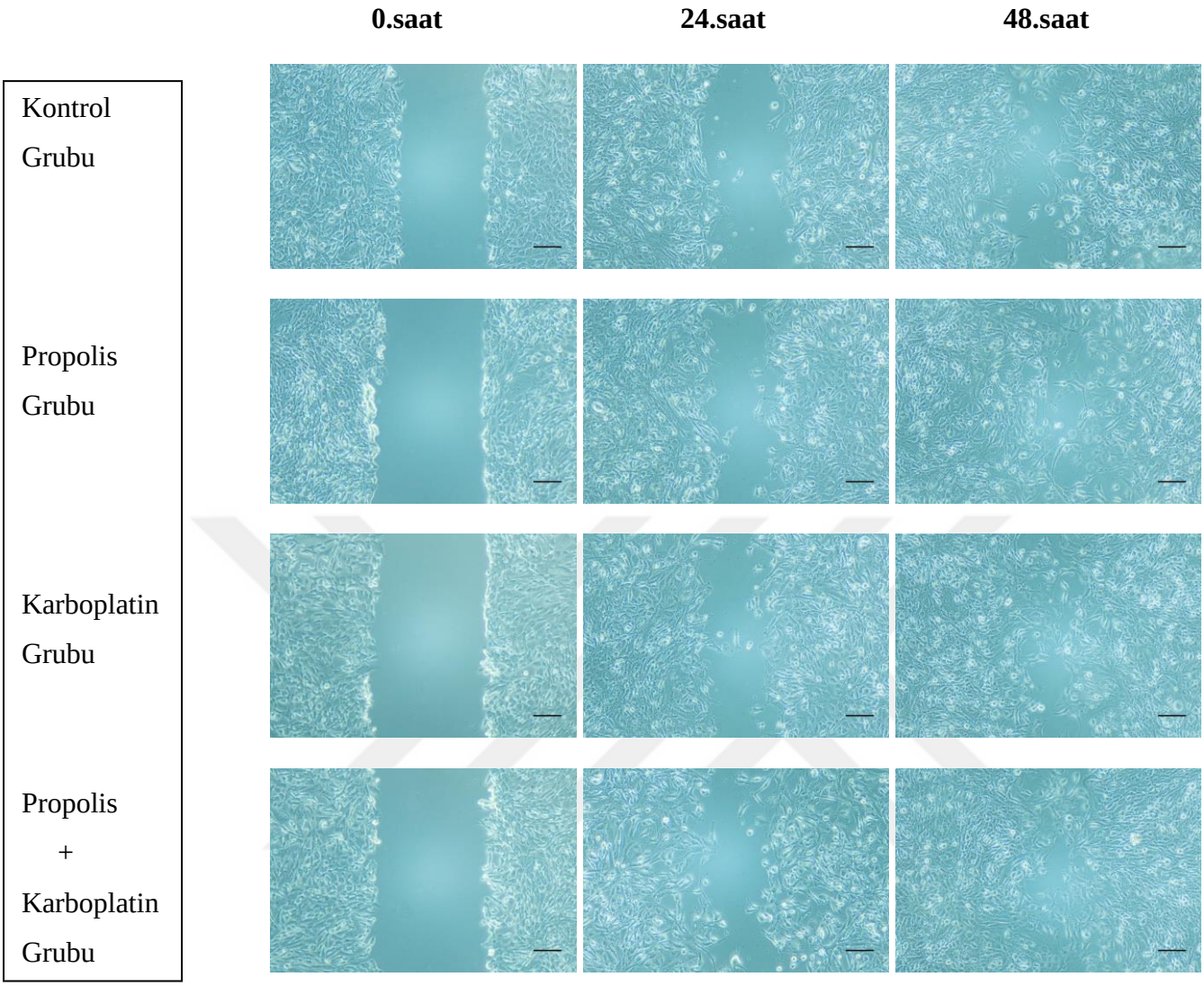
Tablo 4-13: İshikawa ve 3T3 hücreleri 24. ile 48. saatlerdeki migrasyon hızları.

Migrasyon Hızı (μm/h)	Kontrol n=30	Propolis n=30	Karboplatin n=30	Propolis+Karboplatin n=30	*p*
Isc 24	14,57 ± 3,55	10,85 ± 3,81**	9,49 ± 4,30**	9,25 ± 3,91**	p<0,01
3T3 24	16,17 ± 4,44	15,69 ± 4,77	14,97 ± 4,25	16,79 ± 4,72	p>0,05
Isc 48	9,91 ± 1,55	7,34 ± 1,87**	8,19 ± 2,18**	9,00 ± 2,32	p<0,01
3T3 48	11,05 ± 2,91	10,35 ± 3,20	9,02 ± 2,46*	9,93 ± 2,14	p<0,05

*Hücre hatları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *p<0,05 **p<0,01 Isc:İshikawa*



Şekil 4-22: İshikawa hücre hattı 0, 24 ve 48. saat hücre migrasyonu deneyi faz kontrast mikroskobu görüntüleri. Tüm deney gruplarındaki migrasyon oranı kontrol grubuna göre daha azdı. En belirgin etki propolis+karboplatin grubunda görüldü. 10x büyütme. Bar: 100 µm



Şekil 4-23: 3T3 hücre hattı 0, 24 ve 48. saat hücre migrasyonu deneyi faz kontrast mikroskobu görüntüleri. Deney gruplarında kontrol grubuna göre hücre göçünde bir fark görülmedi. 10x büyütme. Bar: 100 µm

4.5. Hücrelerin Sitokrom-c ile İmmünositokimyasal Olarak Boyanması

İshikawa ve 3T3 hücreleri 24. saatte incelenmek üzere, deney grupları oluşturuldu; ardından sitokrom-c antikoru uygulandı, ışık mikroskobunda sayımları yapıldı ve fotoğraflandı. Veriler normal dağılımlıydı. Her deney grubunda ~ 400 hücre sayıldı ve ortalama alındı.

İshikawa 24. saat sonuçları

Tüm deney grupları kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, sitokrom-c oranında göreceli bir artış saptandı. Propolis ve propolis+karboplatin deney gruplarındaki artış istatistiksel olarak anlamlıyken ($p<0,001$), karboplatin grubundaki artış anlamlı değildi ($p>0,05$) (Tablo 4-18 ve Şekil 4-24).

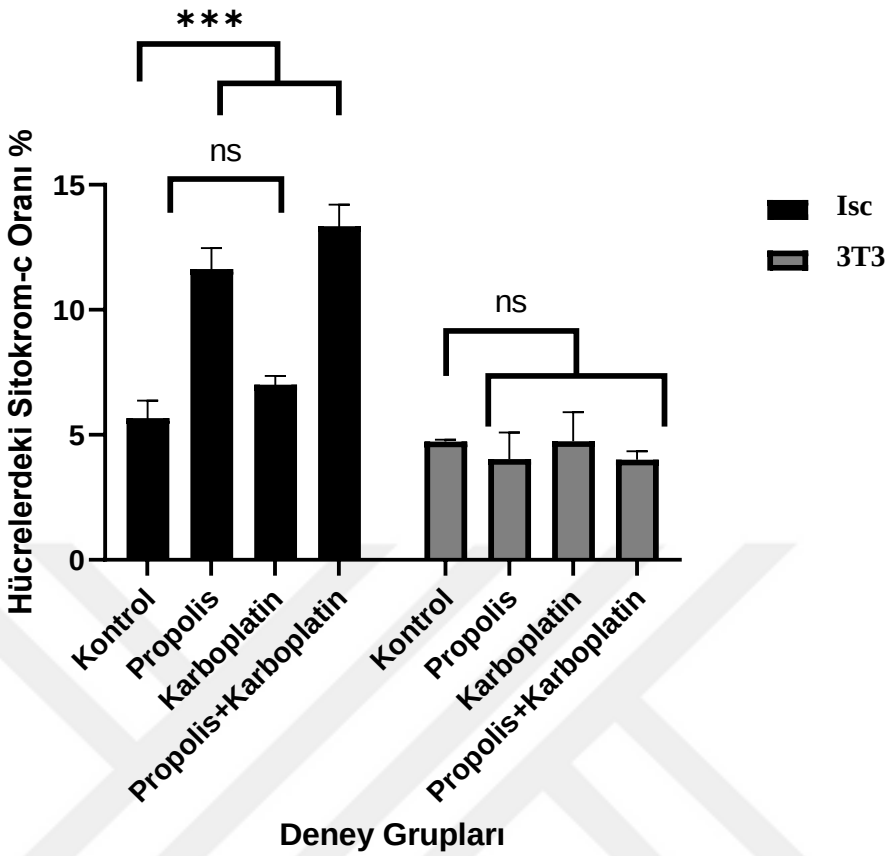
3T3 24. saat sonuçları

Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, deney gruplarındaki değişim anlamlı değildi ($p>0,05$) (Tablo 4-18 ve Şekil 4-24).

Tablo 4-14: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saat sitokrom-c oranları.

% Sitokrom-c	Kontrol	Propolis	Karboplatin	Propolis+Karboplatin	*p*
Isc	5,67 ± 0,7	11,63 ± 0,8***	7,01 ± 0,3	13,34 ± 0,9***	p<0,001
3T3	4,73 ± 0,1	3,91 ± 1,3	4,74 ± 1,2	4,00 ± 0,3	p>0,05

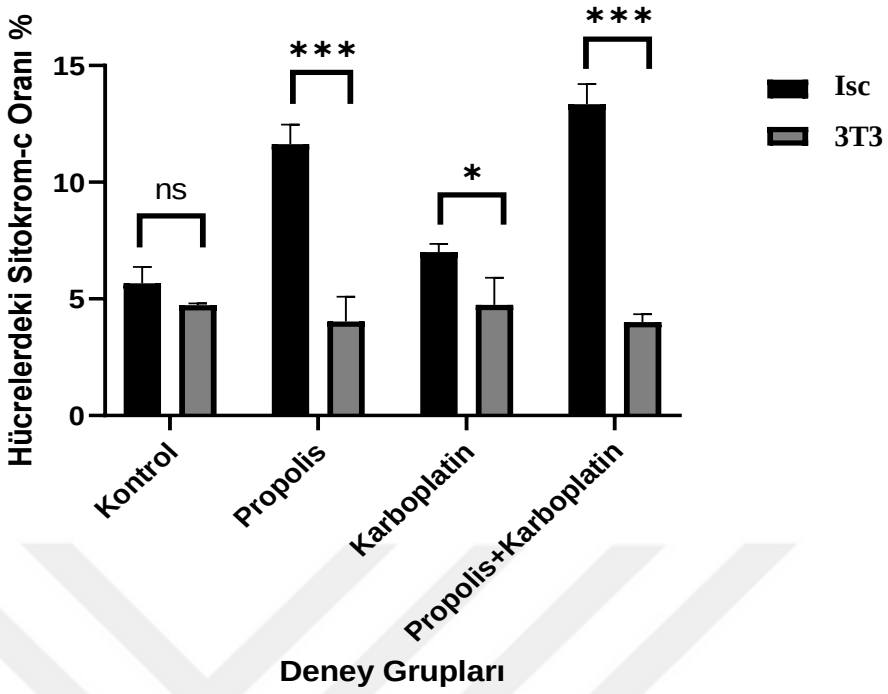
*Hücre hatları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ***p<0,001 Isc:İshikawa*



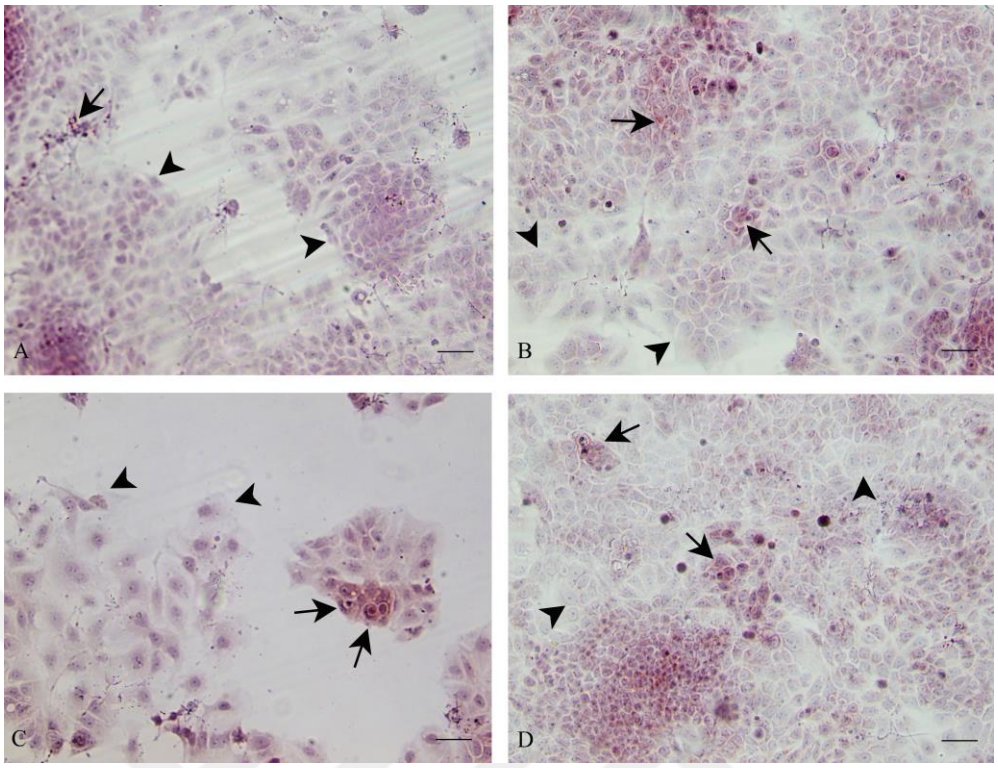
Şekil 4-24: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saat ortalama sitokrom-c yüzdeleri.

<u>İshikawa ve 3T3 24. saat gruplar arası karşılaştırma sonuçları</u>

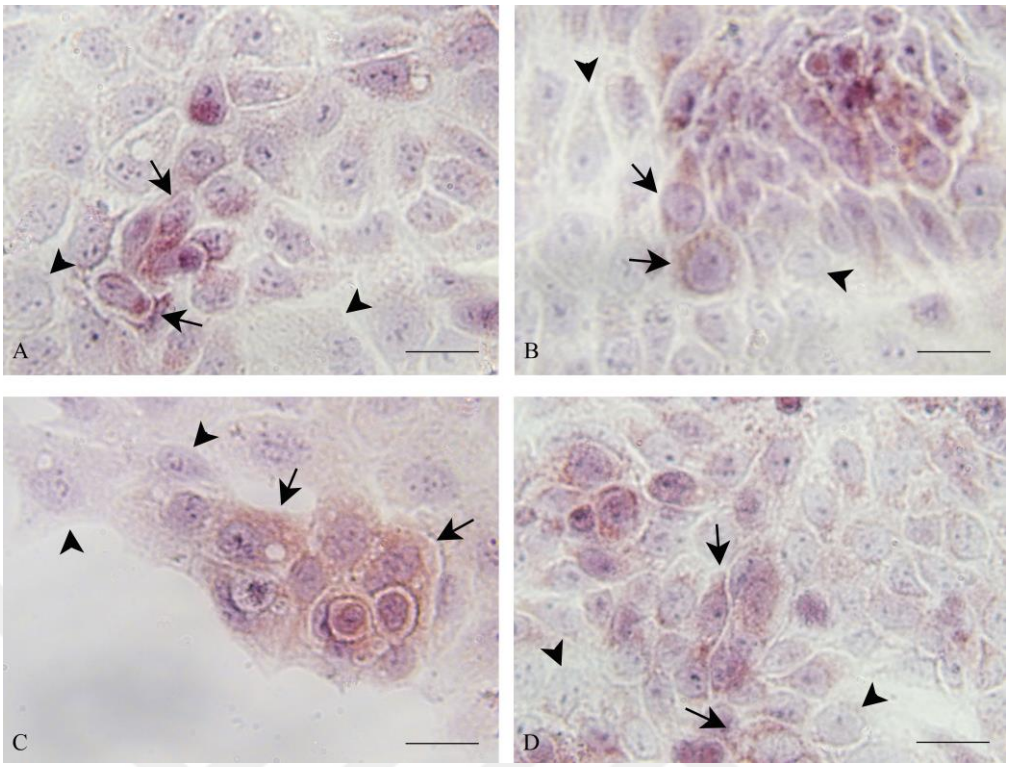
Propolis grupları ($p<0,001$), karboplatin grupları ($p<0,05$) ve propolis+karboplatin deney grupları ($p<0,001$) arasında, fark anlamlıydı ve İshikawa hücre hattında sitokrom-c oranının istatistiksel olarak arttığı saptandı. Ancak kontrol grupları arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$) (Şekil 4-25).



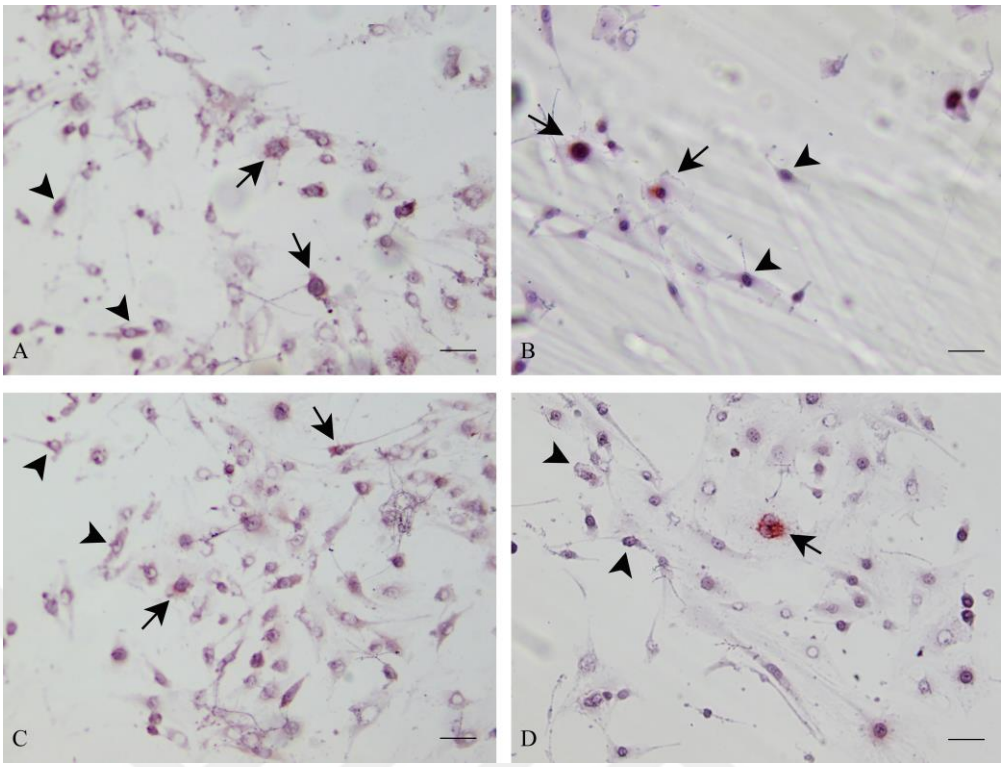
Şekil 4-25: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 24. saatteki ortalama sitokrom-c yüzdeleri gruplar arası karşılaştırma. ***p<0,001 *p<0,05 ns: anlamlı değil



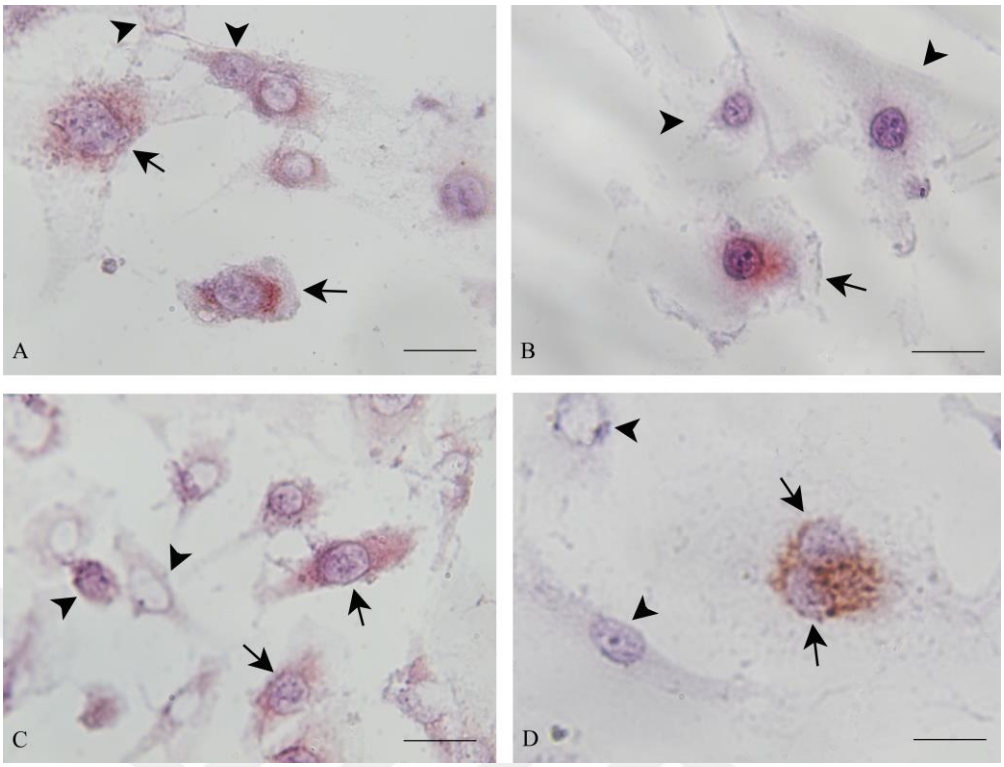
Şekil 4-26: İshikawa hücreleri 24. saat sitokrom-c boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü. A) Kontrol B) Propolis C) Karboplatin ve D) Propolis+karboplatin deney grupları. Tüm deney gruplarındaki sitokrom-c boyanma şiddeti kontrol grubuna göre arttığı görülmektedir. Karboplatin grubu kontrol grubuna yakın bir boyanmaya sahipken, propolis ve propolis+karboplatin gruplarındaki artışın daha fazla olduğu ve en fazla artışın propolis+karboplatin grubunda olduğu dikkat çekmektedir. Sitoplazma sitokrom-c pozitif (ok) ve sitokrom-c negatif (ok başı) hücreler görülmektedir. 10x büyütme. Bar: 100 µm



Şekil 4-27: İshikawa hücreleri 24. saat sitokrom-c boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü. A) Kontrol B) Propolis C) Karboplatin ve D) Propolis+karboplatin deney grupları. Tüm gruplarda sitokrom-c boyanması görülürken, en şiddetli boyanmanın propolis+karboplatin grubunda olduğu dikkat çekmektedir. Sitoplazma sitokrom-c pozitif (ok) ve sitokrom-c negatif (ok başı) hücreler görülmektedir. 40x büyütme. Bar: 100 µm



Şekil 4-28: 3T3 hücreleri 24. saat sitokrom-c boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü. A) Kontrol B) Propolis C) Karboplatin ve D) Propolis+karboplatin. Deney gruplarında sitokrom-c boyanma şiddeti birbirine yakın görülmektedir. Sitoplazma sitokrom-c pozitif (ok) ve sitokrom-c negatif (ok başı) hücreler gösterilmiştir. 10x büyütme. Bar: 100 µm



Şekil 4-29: 3T3 hücreleri 24. saat sitokrom-c boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü. A) Kontrol B) Propolis C) Karboplatin ve D) Propolis+karboplatin. Sitokrom-c boyanması deney gruplarında fark görülmemiştir. Sitoplazma sitokrom-c pozitif (ok) ve sitokrom-c negatif (ok başı) hücreler gösterilmiştir. 40x büyütme. Bar: 100 µm

4.6. Hücrelerin p27 ile İmmünositokimyasal Olarak Boyanması

İshikawa ve 3T3 hücreleri 48. saatte incelenmek üzere, deney grupları oluşturuldu; ardından p27 antikoru uygulandı, ışık mikroskobunda sayımları yapıldı ve fotoğraflandı. Veriler normal dağılımlıydı. Her deney grubunda ~ 400 hücre sayıldı ve ortalama alındı.

İshikawa 48. saat sonuçları

Deney grupları kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, p27 oranında göreceli bir artış saptandı. Yalnızca propolis+karboplatin deney grubunda istatistiksel olarak fark anlamlıydı ve artış görüldü ($p<0,01$) (Tablo 4-19 ve Şekil 4-30).

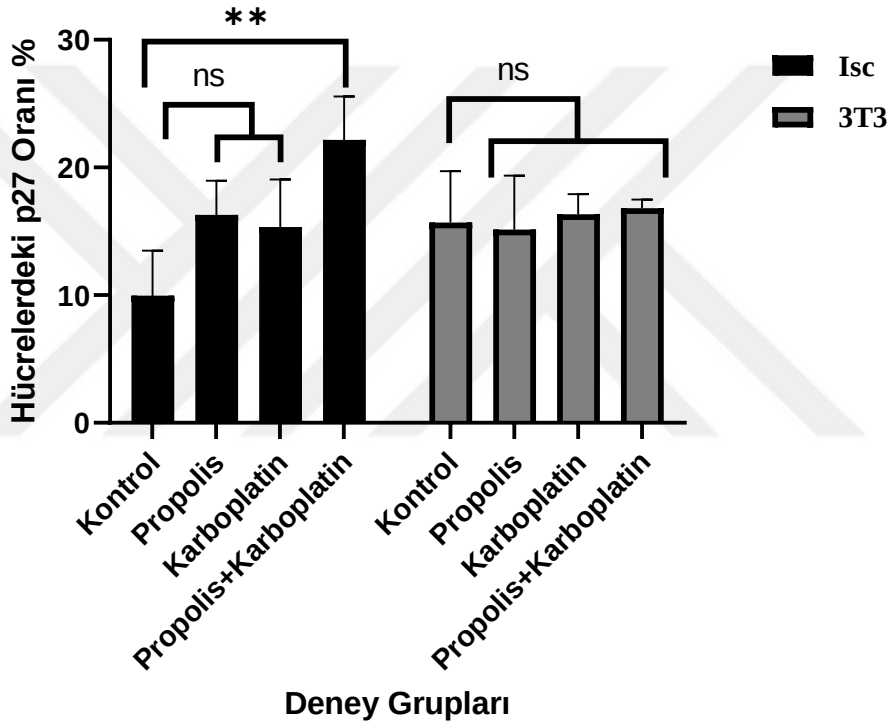
3T3 48. saat sonuçları

Tüm deney grupları kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, p27 oranında anlamlı bir değİşim mevcut değildi ($p>0,05$) (Tablo 4-19 ve Şekil 4-30).

Tablo 4-15: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 48. saat p27 oranları.

% p27	Kontrol	Propolis	Karboplatin	Propolis+Karboplatin	*p*
Isc	9,96 ± 3,5	16,30 ± 2,7	15,33 ± 3,7	22,15 ± 3,4**	p<0,05
3T3	15,68 ± 4,0	15,15 ± 4,2	16,35 ± 1,6	16,80 ± 0,7	p>0,05

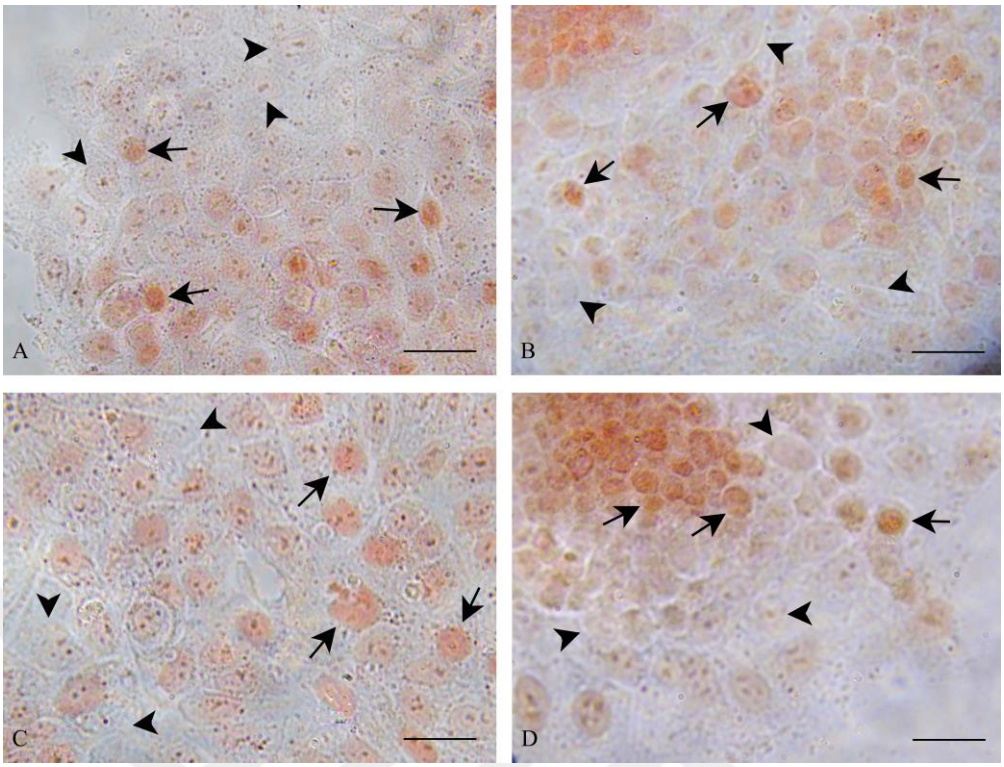
*Hücre hatları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında **p<0,01 Isc:İshikawa*



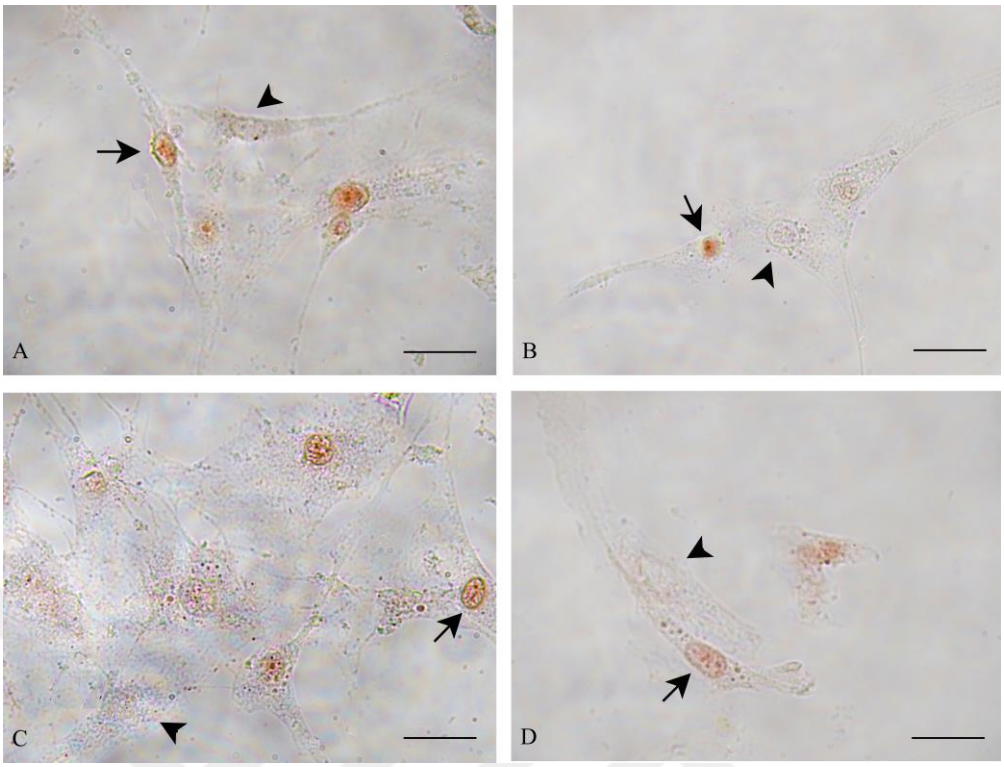
Şekil 4-30: İshikawa ve 3T3 hücre hattı 48. saat ortalama p27 yüzdeleri. **p<0,01 ns: anlamlı değil

<u>İshikawa ve 3T3 48. saat gruplar arası karşılaştırma sonuçları</u>

Propolis grupları ve propolis+karboplatin deney gruplarında p27 oranında, İshikawa hücre hattında istatistiksel olmayan göreceli bir artış vardı (p>0,05). Kontrol grupları arasındaki p27 oranlarında, 3T3 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan göreceli bir artış görüldü (p>0,05).



Şekil 4-31: İshikawa hücreleri 48. saat p27 ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü. A) Kontrol B) Propolis C) Karboplatin ve D) Propolis+karboplatin deney grupları. Tüm deney gruplarında p27 boyanma şiddeti kontrol grubuna göre fazlaydı. En şiddetli boyanmanın propolis+karboplatin grubunda olduğu dikkat çekmektedir.Nukleus p27 pozitif (ok) ve p27 negatif (ok başı) hücreler görülmektedir. 40x büyütme. Bar: 100 µm

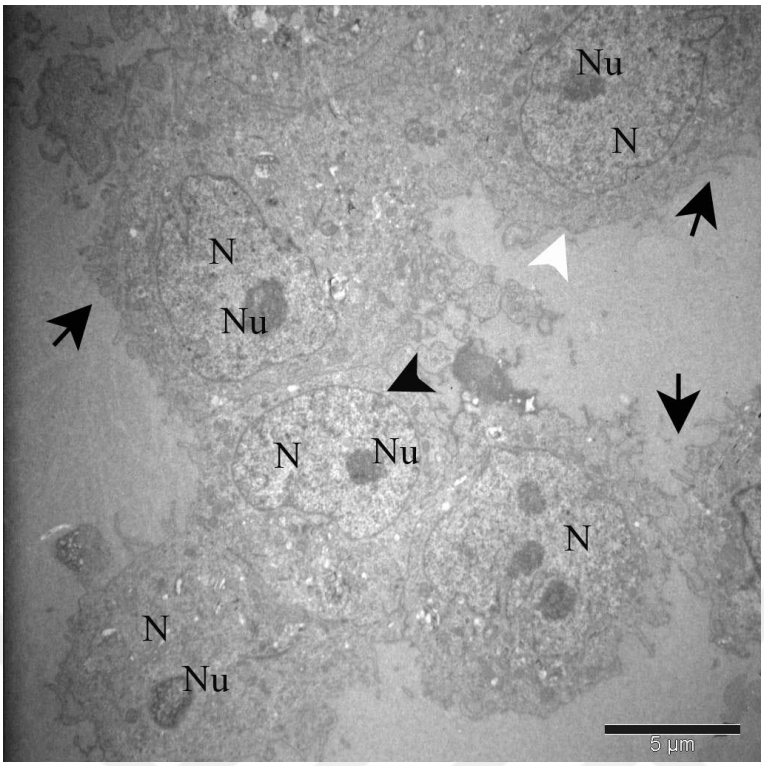


Şekil 4-32: 3T3 hücreleri 48. saat p27 ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü. A) Kontrol B) Propolis, C) Karboplatin ve D) Propolis+karboplatin deney grupları. p27 boyanması gruplarda farklılık göstermemektedir. Nukleus p27 pozitif (ok) ve p27 negatif (ok başı) hücreler görülmektedir. 40x büyütme. Bar: 100 µm

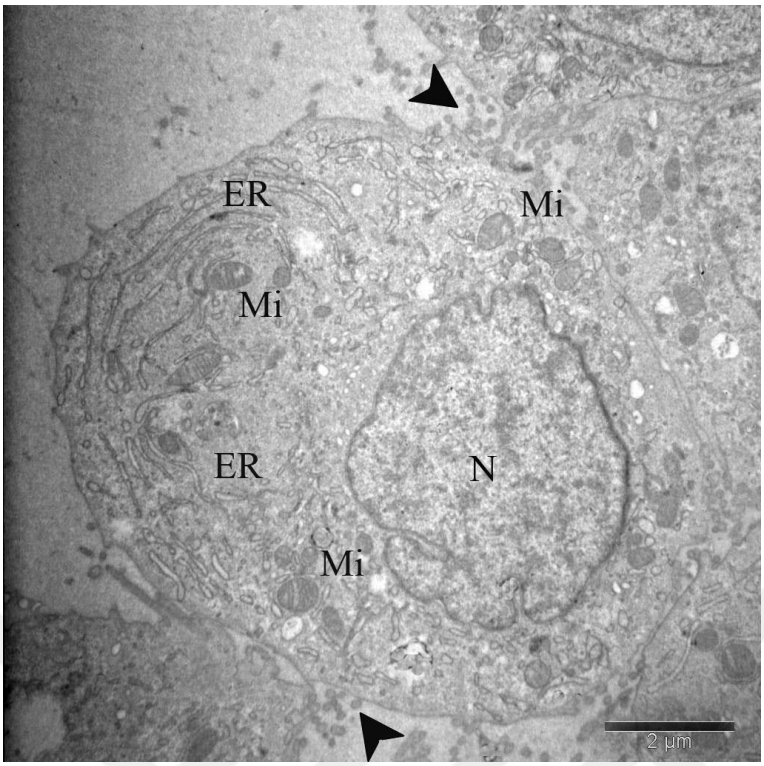
4.7. Hücrelerin İnce Yapısal Değişikliklerinin Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile İncelenmesi

İshikawa ve 3T3 hücreleri 24. ve 72. saatlerde incelenmek üzere, deney grupları oluşturuldu ve değişimler TEM ile gözlemsel olarak karşılaştırıldı.

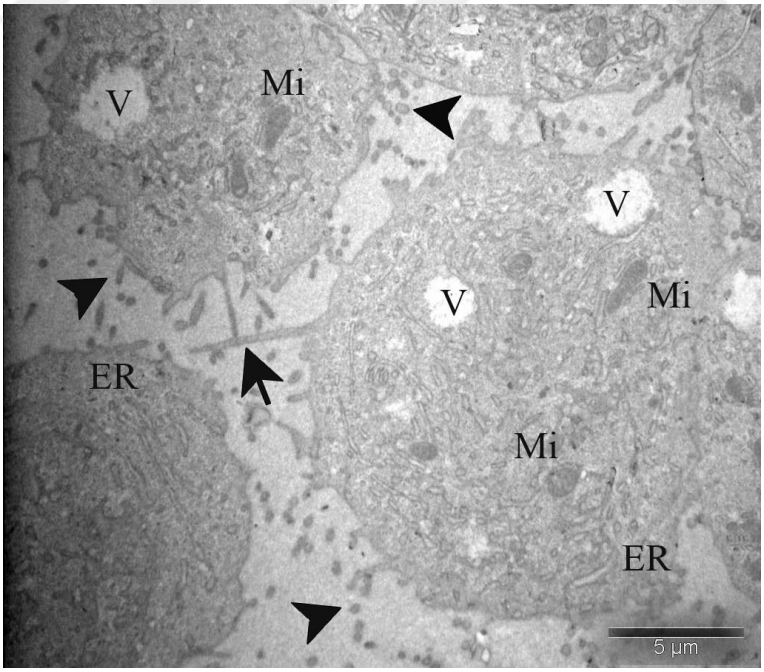
İshikawa hücreleri 24. ve 72. saat kontrol grupları elektron mikrografları incelendiğinde; hücre ve nukleus membranlarının intakt yapıda olduğu gözlendi. Hücrelerin ökromatik nukleuslara sahip olduğu, normal yapıda endoplazmik retikulum ve mitokondrilerin mevcut olduğu görüldü. Hücre yüzeyinde düzgün yapıda mikrovilluslar ve diğer hücrelere uzattıkları filopodların olduğu gözlendi. Tipik İshikawa hücre morfolojisi gösteren hücrelerin yanında minimal sayıda vakuole sahip hücrelerin varlığı saptandı (Şekil 4-33, Şekil 4-34, Şekil 4-35).



Şekil 4-33: İshikawa hücreleri 24. saat kontrol grubu elektron mikrografı. Normal yapıda nukleus (N) ve nukleolus (Nu), intakt yapıda nukleus membranı (siyah ok başı) ve hücre membranı (beyaz ok başı) ve düzgün mikrovilluslar (siyah ok) görülmektedir. 5000x büyütme. Bar: 5 µm

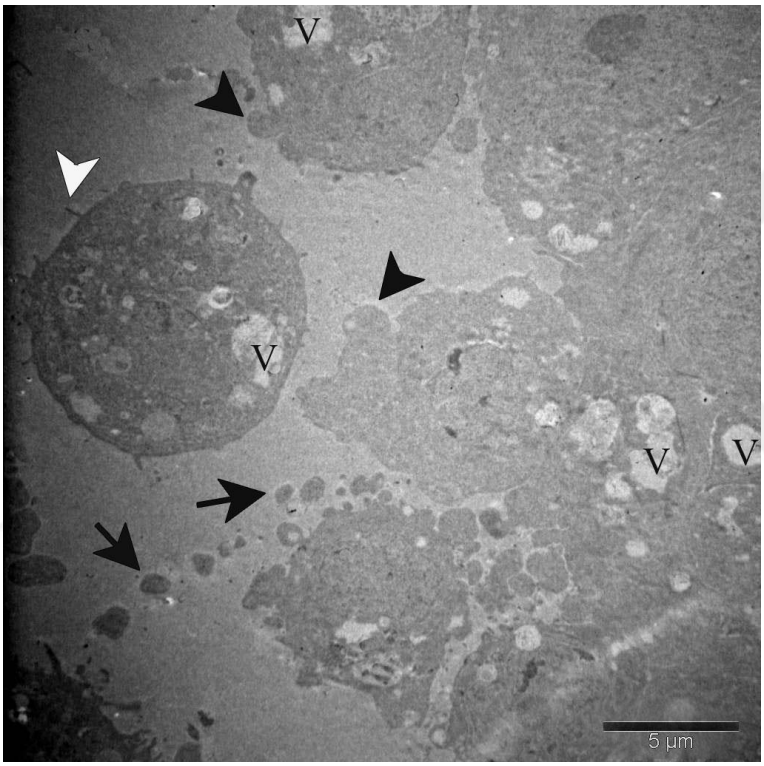


Şekil 4-34: İshikawa hücreleri 72. saat kontrol grubu elektron mikrografı. Nukleus (N), normal morfolojide mitokondri (Mi) ve endoplazmik retikulum (ER) ve mikrovillus (siyah ok başı) görülmektedir. 12000x büyütme. Bar: 2 µm

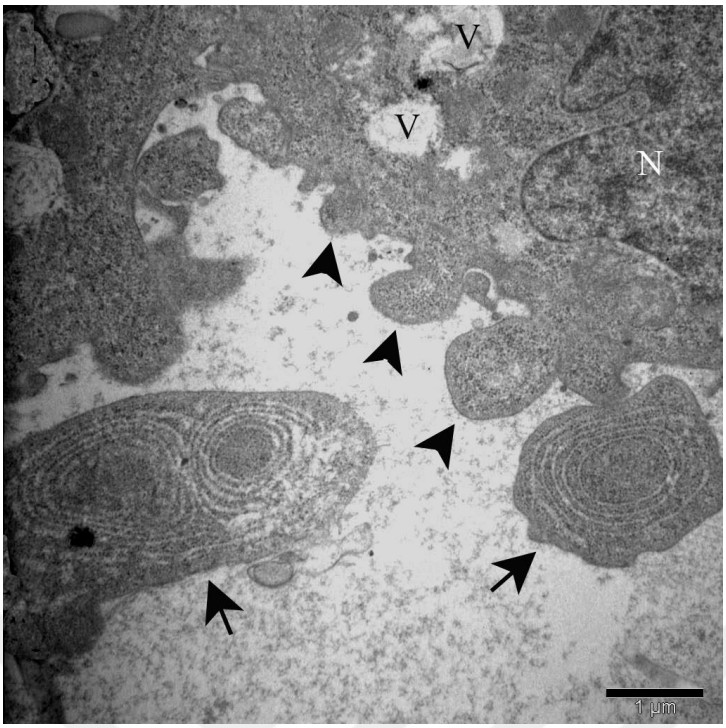


Şekil 4-35: İshikawa hücreleri 72. saat kontrol grubu elektron mikrografı. Normal yapıda mitokondri (Mi), endoplazmik retikulum (ER), az sayıda vakuol (V), düzgün morfolojide filopod (siyah ok) ve mikrovillus (siyah ok başı) görülmektedir. 6000x büyütme. Bar: 5 µm

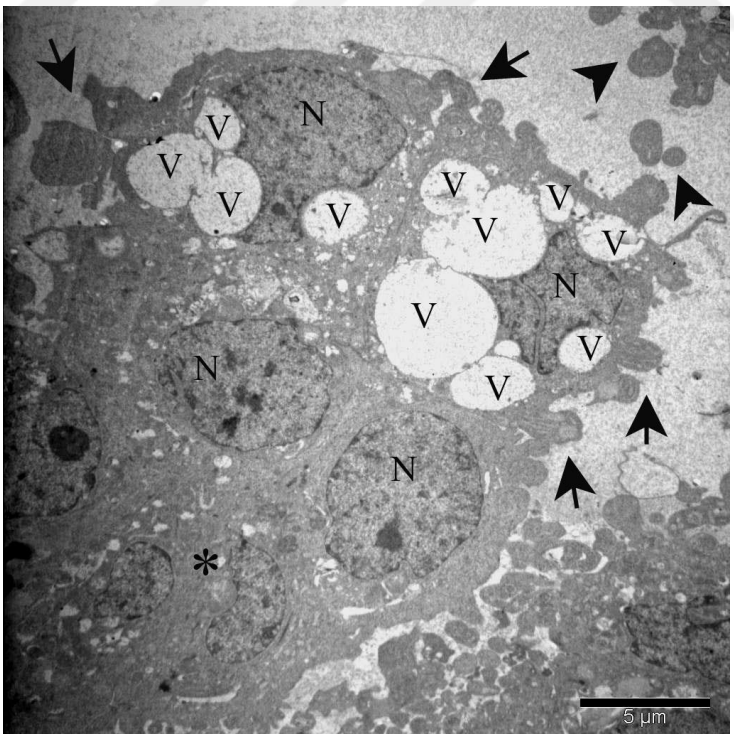
İshikawa hücreleri 24. ve 72. saat propolis grupları elektron mikrografları incelendiğinde; bazı hücrelerdeki vakuol boyutlarının ve sayısının arttığı, apoptozun tipik morfolojik özellliklerinden olan hücre tomurcuklanmalarının mevcut olduğu görüldü. Çok sayıda apoptotik cismin varlığı ve hücre yüzeyinde mikrovillus kaybı olduğu gözlendi. Apoptotik etkinin 72. saatte şiddetinin arttığı görüldü (Şekil 4-36, Şekil 4-37 ve Şekil 4-38).



Şekil 4-36: İshikawa hücreleri 24. saat propolis grubu elektron mikrografı. Vakuollerin sayısında artış (V), hücre tomurcuklanmaları (siyah ok başı), apoptotik cisimler (siyah ok) ve mikrovillus kaybı (beyaz ok başı) görülmektedir. 5000x büyütme. Bar: 5 µm

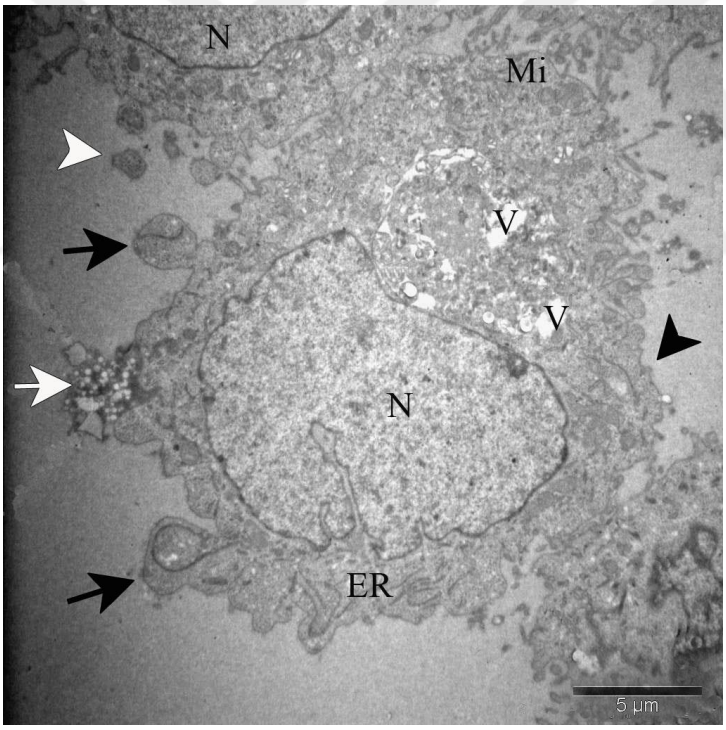


Şekil 4-37: İshikawa hücreleri 72. saat propolis grubu elektron mikrografı. İnvajinasyonlu nukleus (N), vakuoller (V), yaygın hücre tomurcuklanmaları (siyah ok başı) ve içerisinde endoplazmik retikulum bulunan apoptotik cisimler (siyah ok) görülmektedir. 20000 büyütme. Bar: 1 µm

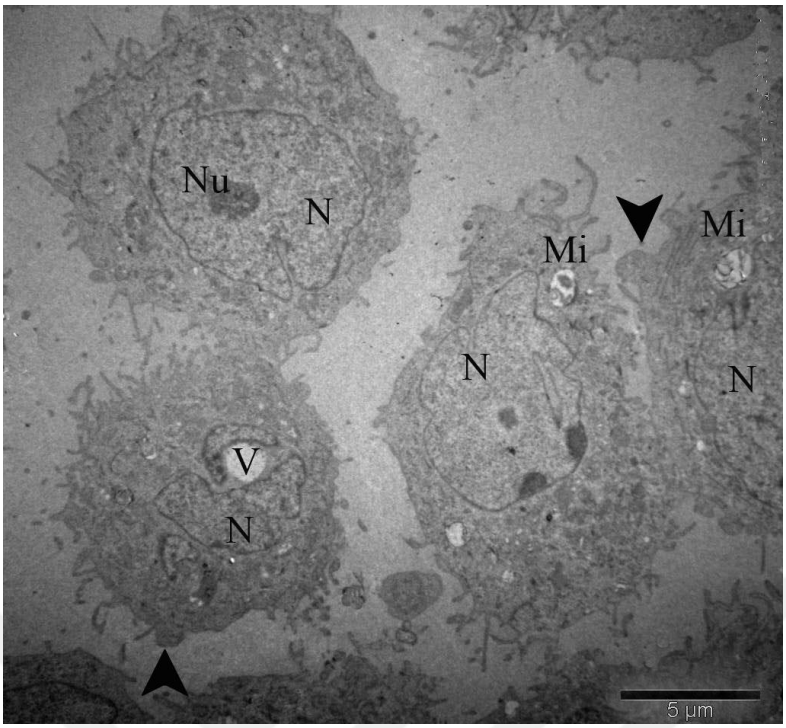


Şekil 4-38: İshikawa hücreleri 72. saat propolis grubu elektron mikrografı. Nukleus (N), çok sayıda vakuol (V), yaygın tomurcuklanmaları (siyah ok), apoptotik cisimler (siyah ok başı) ve dejeneratif bir hücre (siyah asterisk) görülmektedir. 5000x büyütme. Bar: 5 µm

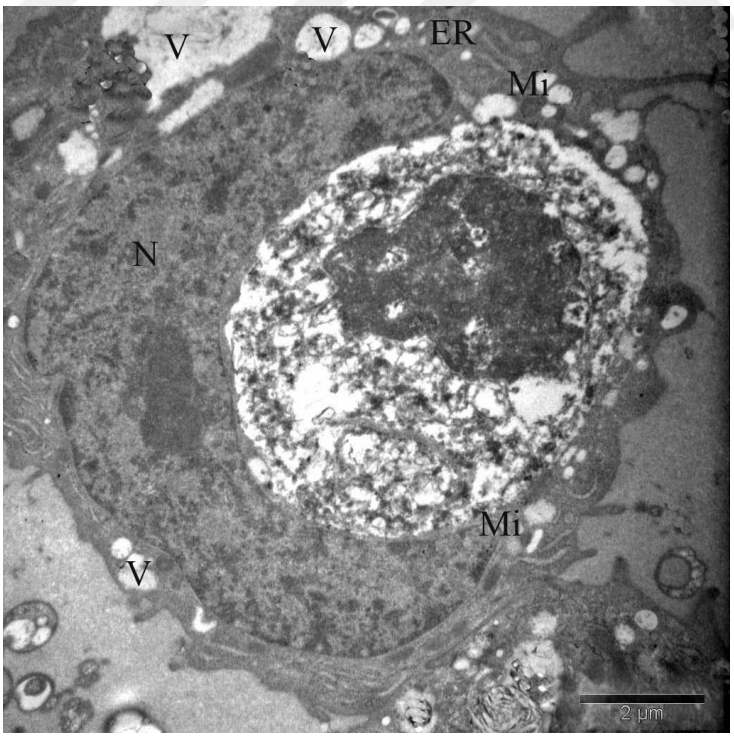
İshikawa hücreleri 24. ve 72. saat karboplatin grupları elektron mikrografları incelendiğinde; bazı hücrelerin yüzeyinde mikrovillus kaybı olduğu gözlendi (Şekil 4-39). Nukleusun yer yer kondense olduğu ve hücre membranın iç yüzeyine itilerek "C" şekli aldığı görüldü (Şekil 4-41 ve Şekil 4-42). Endoplazmik retikulum ve mitokondride dejenerasyon mevcuttu. Endoplazmik retikulum sisternalarının yer yer parçalandığı ve şişmeler olduğu görüldü (Şekil 4-39, Şekil 4-40 ve Şekil 4-41). Ayrıca bazı hücrelerde migrazom benzeri yapılar saptandı (Şekil 4-39). Hücre tomurcuklanmalarında, apoptotik cisim miktarlarında ve farklı boyutlarda vakuollerin sayısında artış olduğu gözlendi. İleri apoptotik dejenere olmuş hücre yapısı ve apoptoza uğramış hücrenin başka hücrelerce yutulduğu gözlendi (Şekil 4-39 ve Şekil 4-42). 72. saatteki etkinin 24. saate göre daha fazla olduğu görüldü.



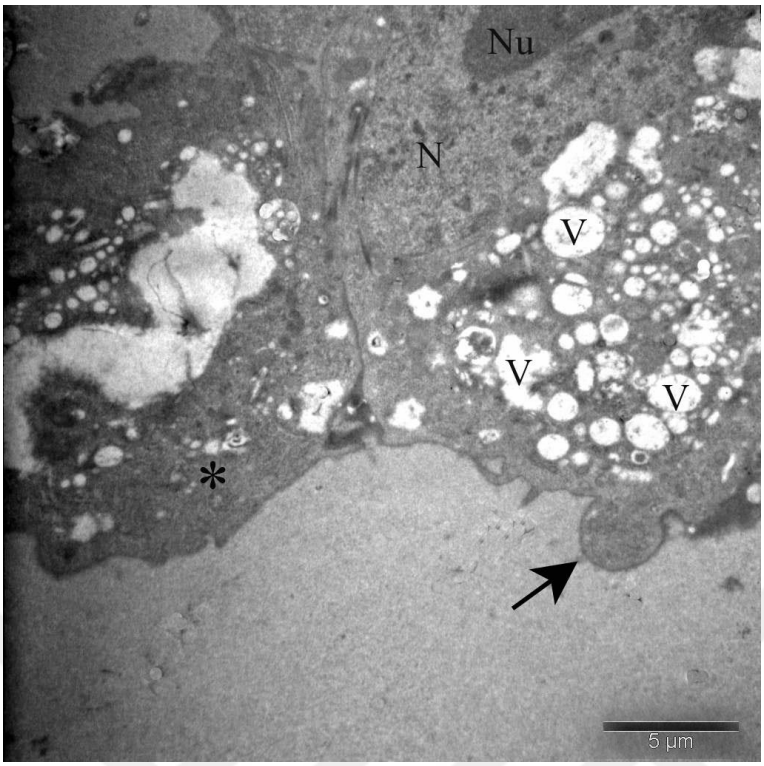
Şekil 4-39: İshikawa hücreleri 24. saat karboplatin grubu elektron mikrografı. İnvajinasyonlu nukleus (N), normal morfolojide mitokondri (Mi), dejenere endoplazmik retikulum (ER), vakuoller (V), hücre tomurcuklanması (siyah ok), mikrovillus kaybı (siyah ok başı), apoptotik cisim (beyaz ok başı) ve migrazom benzeri yapı (beyaz ok) görülmektedir. 7500x büyütme. Bar: 5 µm



Şekil 4-40: İshikawa hücreleri 24. saat karboplatin grubu elektron mikrografı. Çoğunda invajinasyon gözlenen nukleuslar (N), nukleolus (Nu), vakuol (V), dejenere mitokondriler (Mi) ve hücre tomurcuklanması (siyah ok başı) görülmektedir. 5000x büyütme. Bar: 5 µm

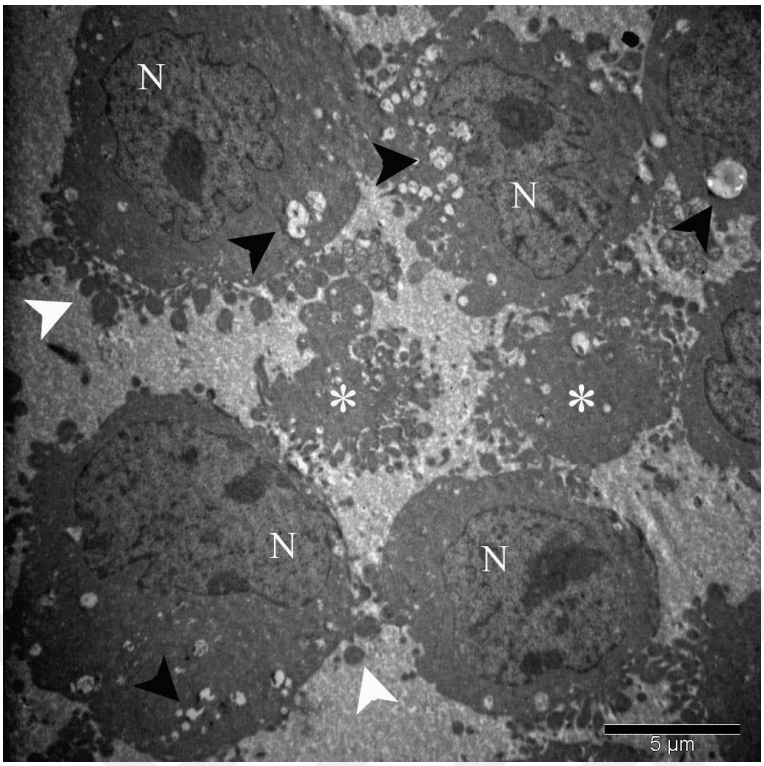


Şekil 4-41: İshikawa hücreleri 72. saat karboplatin grubu elektron mikrografı. Nukleus (N), vakuoller (V), dejenere olmuş mitokondri (Mi) ve endoplazmik retikulumu (ER) bulunan bir hücrenin içinde apoptotik başka bir hücre görülmektedir. 12000x büyütme. Bar: 2 µm

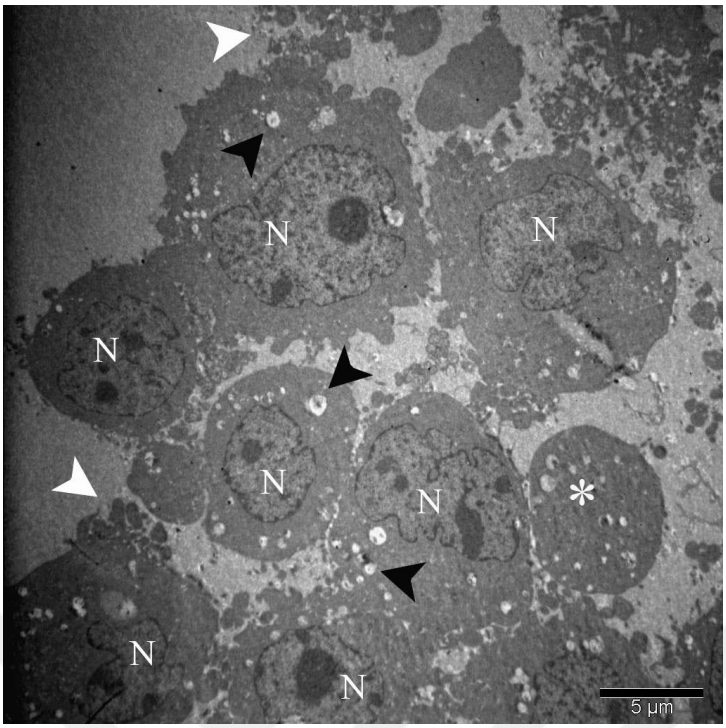


Şekil 4-42: İshikawa hücreleri 72. saat karboplatin grubu elektron mikrografı. Nukleus (N), nukleolus (Nu), çok sayıda vakuol (V), hücre tomurcuklanması (siyah ok) ve ileri apoptotik dejenere olmuş hücre yapısı (asterisk) görülmektedir. 6000x büyütme. Bar: 5 µm

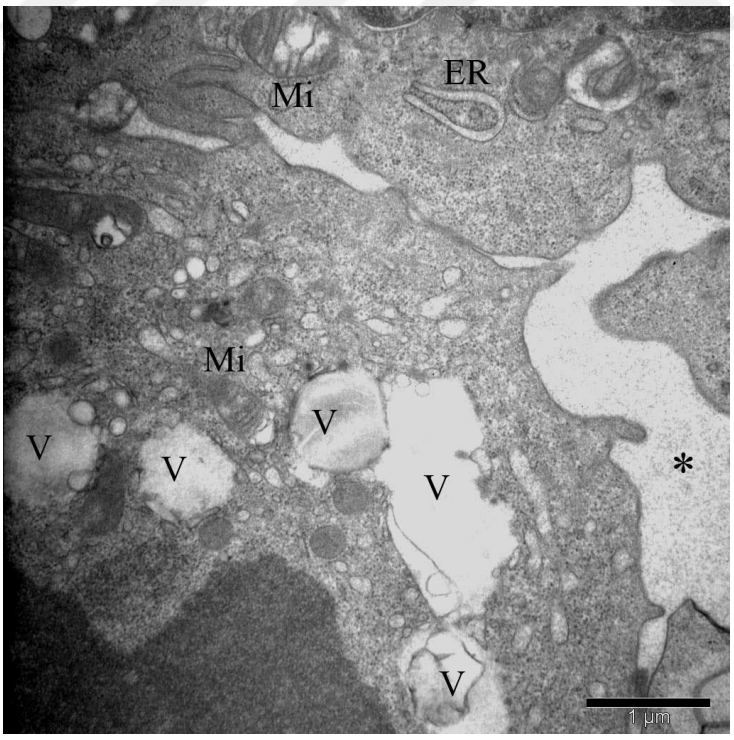
İshikawa hücreleri 24. ve 72. saat propolis+karboplatin grupları elektron mikrografı incelendiğinde; vakuol boyut ve sayısında artış, mikrovillus sayısında azalma gözlendi. Nukleusun yer yer kondense olduğu, boyutlarının küçüldüğü ve invajinasyonlar görüldü. Hücrelerin büzüştüğü, boyutlarının küçüldüğü ve birbirinden uzaklaşarak hücreler arası boşlukların yaygınlaştığı görüldü. Bazı mitokondri ve endoplazmik retikulum yapılarında dejenerasyon artışları dikkat çekti. Endoplazmik retikulum sisternalarında aşırı şişmelerin yaygınlaştığı görüldü (Şekil 4-45). Hücre tomurcuklanmalarında, apoptotik cisimlerde ve dejeneratif hücre sayısında artış mevcuttu. Organellerini kaybetmiş ve nükleer parçalanması gerçekleşmiş ileri apoptotik hücre kalıntılarında artış olduğu görüldü. Apoptotik etkinin propolis+karboplatin grubunda, diğer tüm deney gruplarından daha şiddetli olduğu ve bu etkinin 72. saatte gözlemsel olarak daha güçlü olduğu gözlendi (Şekil 4-43, Şekil 4-44, Şekil 4-45 ve Şekil 4-46).



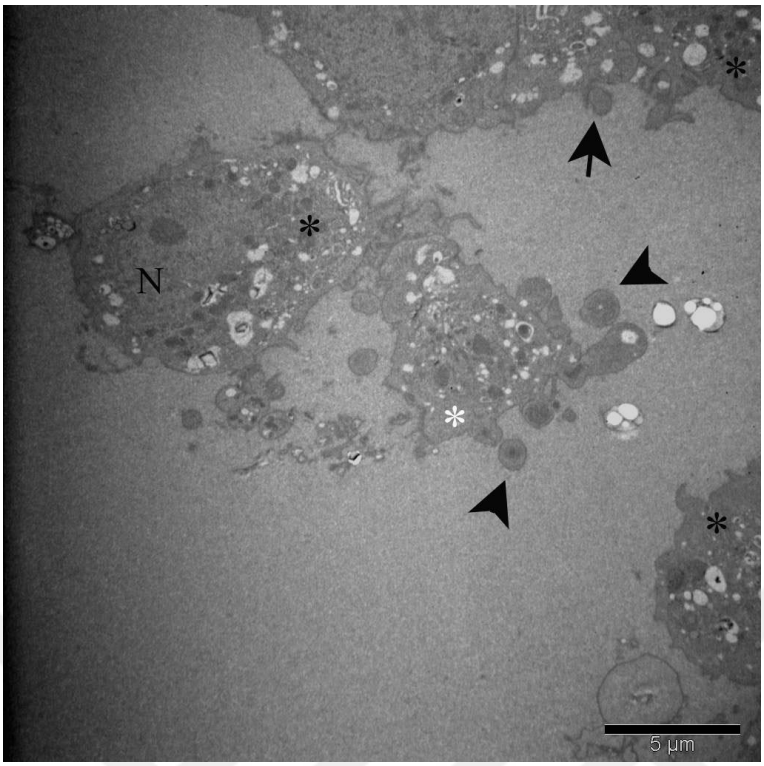
Şekil 4-43: İshikawa hücreleri 24. saat propolis+karboplatin grubu elektron mikrografı. İnvajinasyonlu nukleus (N), vakuol (siyah ok başı), apoptotik cisimler (beyaz ok başı) ve organellerini kaybetmiş, nükleer parçalanması gerçekleşmiş apoptotik hücre kalıntısı (asterisk) görülmektedir. 5000x büyütme. Bar: 5 µm



Şekil 4-44: İshikawa hücreleri 24. saat propolis+karboplatin grubu elektron mikrografı. Nukleusta artan invajinasyonlar (N), çok sayıda apoptotik cisimler (beyaz ok başı), bol vakuol (siyah ok başı) ve apoptotik hücre kalıntısı (asterisk) görülmektedir. 4000x büyütme. Bar: 5 µm

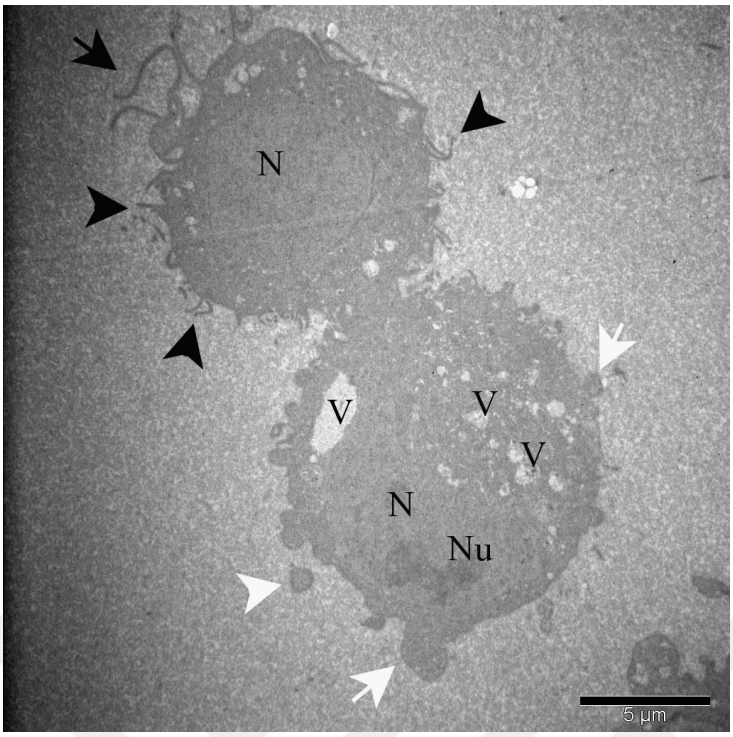


Şekil 4-45: İshikawa hücreleri 72. saat propolis+karboplatin grubu elektron mikrografı. Hasarlı mitokondriler (Mi) ve endoplazmik retikulum sisternası (ER), yaygın vakuoller (V) ve hücreler arası boşluk (asteriks) görülmektedir. 25000x büyütme. Bar: 1 µm

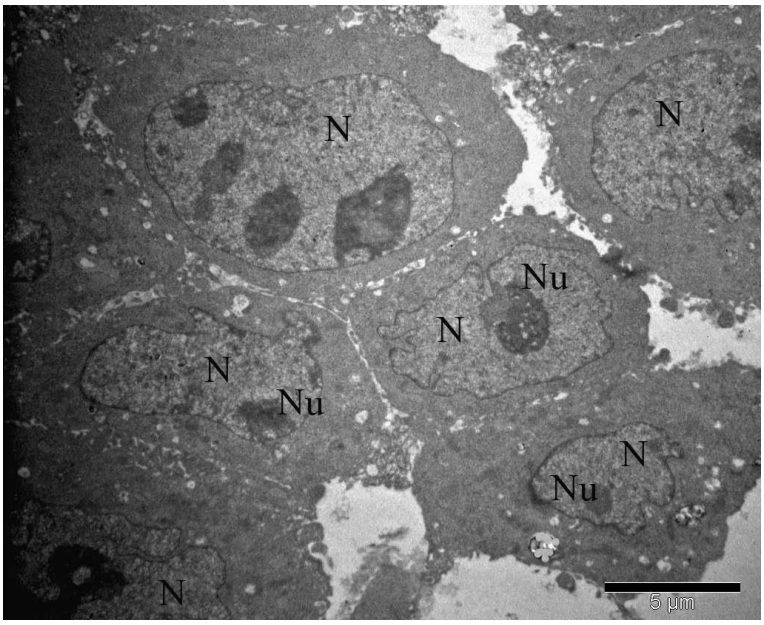


Şekil 4-46: İshikawa hücreleri 72. saat propolis+karboplatin grubu elektron mikrografı. Nukleus (N), hücre tomurcuklanması (siyah ok), apoptotik cisimler (siyah ok başı), vakuolizasyon artışı olan hücre (siyah asterisk) ve hücre büzüşmesi olan apoptotik hücre (beyaz asterisk) görülmektedir. 5000x büyütme. Bar: 5 µm

3T3 hücreleri 24. ve 72. saat kontrol grupları elektron mikrografı incelendiğinde; hücreler arasında boşlukların yaygın olmadığı, hücrelerde hem ökromatik hem de heterokromatik nukleusların bulunduğu görüldü. Nükleer invajinasyonun hücrelerde yer yer olduğu gözlendi. Hücrelerde az sayıda vakuollere rastlandı. Nadiren hücreler arası alanda apoptotik cisim mevcuttu (Şekil 4-47 ve Şekil 4-48).

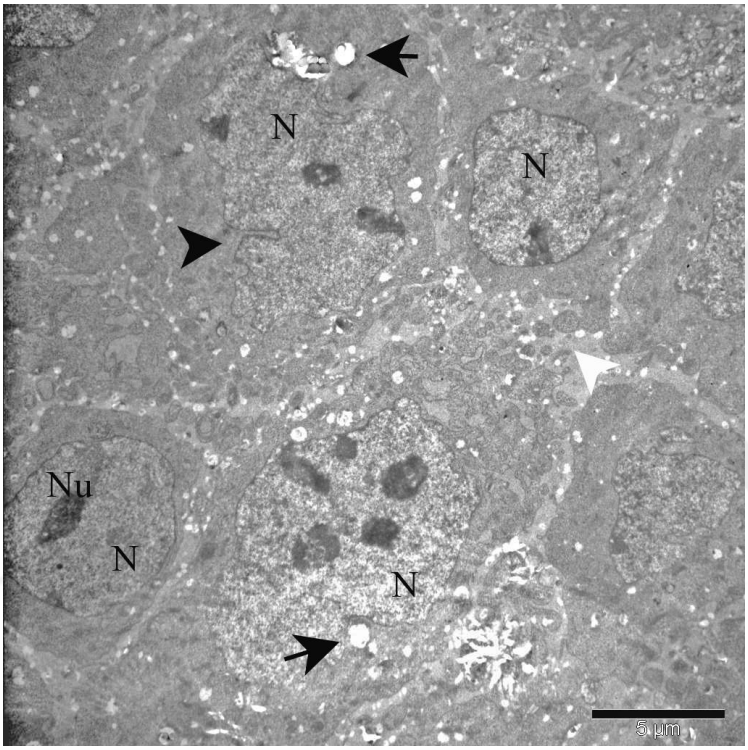


Şekil 4-47: 3T3 hücreleri 24. saat kontrol grubu elektron mikrografı. Genel olarak nukleus (N), nukleolus (Nu), normal morfolojide mikrovilluslar (siyah ok başı) ve filopodu (siyah ok) olan düzgün morfolojide hücrelere rastlanmakla birlikte, nadiren az vakuollü (V), yer yer hücre tomurcuklanan (beyaz ok) ve apoptotik cisme (beyaz ok başı) sahip hücreler görülmektedir. 5000x büyütme

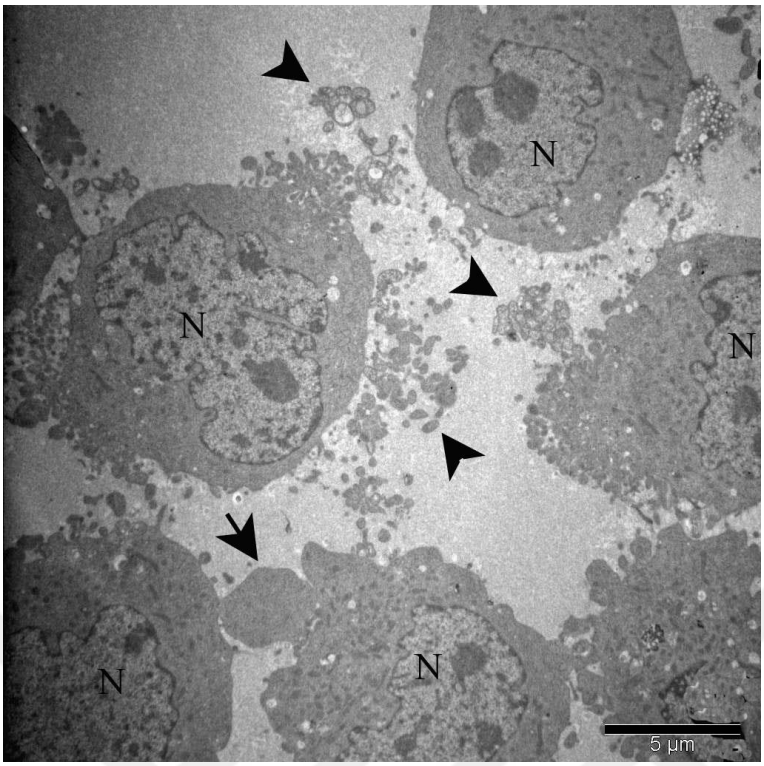


Şekil 4-48: 3T3 hücreleri 72. saat kontrol grubu elektron mikrografı. Nukleus (N) ve nukleolus (Nu) olan genel olarak normal morfolojili birçok hücre görülmektedir. 5000x büyütme. Bar: 5 µm

3T3 hücreleri 24. ve 72. saat propolis grupları elektron mikrografı incelendiğinde; normal morfolojideki hücrelerin yanında az sayıda hasarlı yapılara rastlandı. Küçük boyutlarda ve az sayıda vakuoller izlendi. Hücre tomurcuklanmaları, apoptotik cisimler az sayıdaydı. Saat dilimleri arasındaki etki değişimlerinin birbirine benzer olduğu görüldü (Şekil 4-49 ve Şekil 4-50).

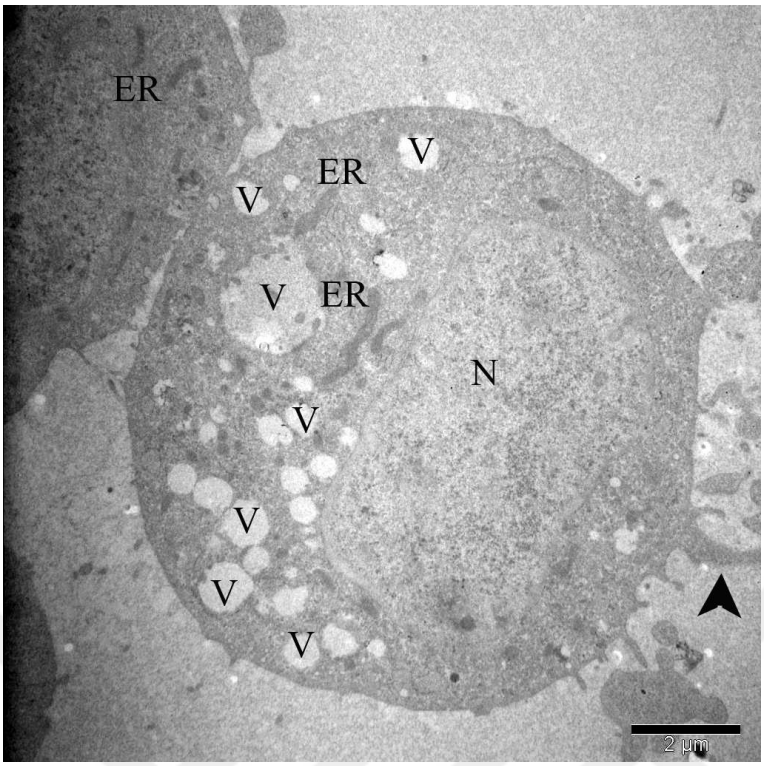


Şekil 4-49: 3T3 hücreleri 24. saat propolis grubu elektron mikrografı. Düzgün yapılı nukleus (N), nukleolus (Nu), az nükleer invajinasyon (siyah ok başı), yer yer vakuoller (siyah ok) ve nadiren apoptotik cisimler (beyaz ok başı) olmakla birlikte genel olarak düzgün morfolojiye sahip hücreler dikkati çekmektedir. 5000x büyütme. Bar: 5 µm

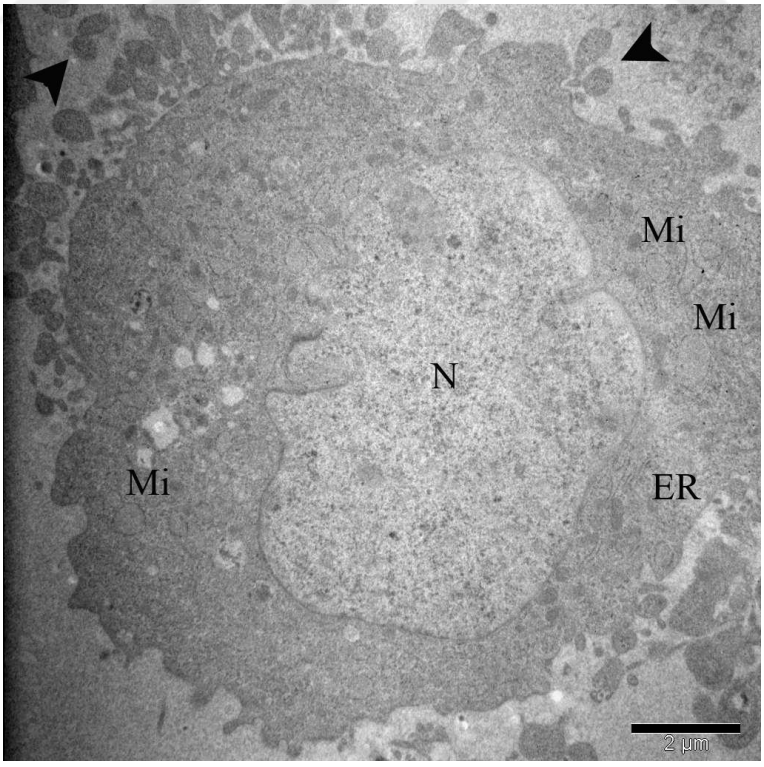


Şekil 4-50: 3T3 hücreleri 72. saat propolis grubu elektron mikrografı. Nukleus (N), yer yer apoptotik cisimler (ok başı) ve hücre tomurcuklanması (ok) görülmektedir. 5000x büyütme. Bar: 5 µm

3T3 hücreleri 24. ve 72. saat karboplatin grupları elektron mikrografı incelendiğinde; ökromatik yapıda nukleuslara sahip hücreler gözlendi. Normal morfolojide nukleusların yanında az sayıda fragmente ve invajinasyonlu nukleusların olduğu görüldü. Normal morfolojide mitokondri ve endoplazmik retikulumların yanı sıra sisternalarında şişmelerin olduğu endoplazmik retikulumlara rastlandı. Az sayıda hücre tomurcuklanması ve apoptotik cisim görüldü. Vakuol boyut ve sayısında 24. saatte bir artışın olduğu fakat 72. saatte tekrar azaldığı görüldü. Etkinin saat dilimleri arasındaki geçiş karşılaştırıldığında, 24. saatte daha şiddetli olduğu gözlendi. 3T3 hücreleri deney gruplarında, en şiddetli etkinin bu grupta olduğu görüldü (Şekil 4-51 ve Şekil 4-52).

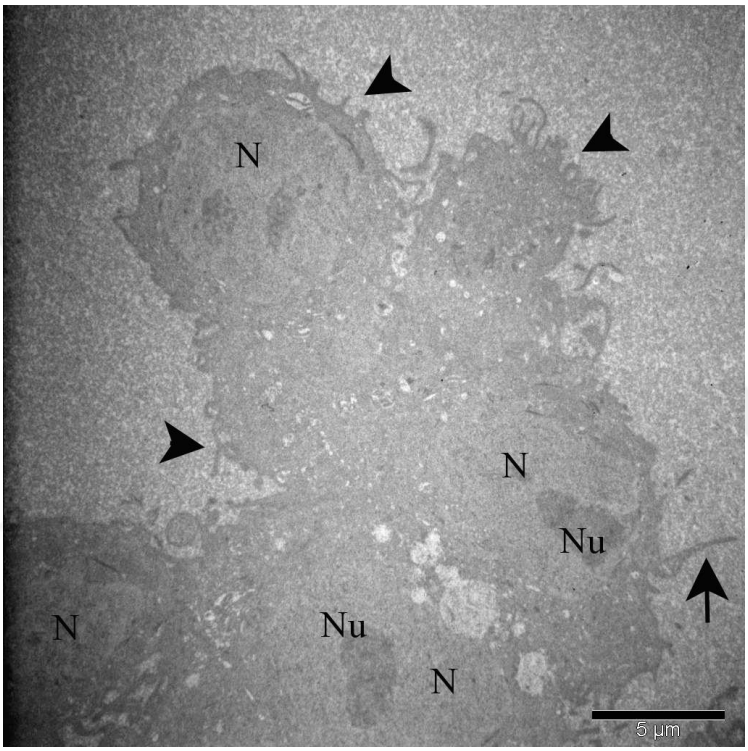


Şekil 4-51: 3T3 hücreleri 24. saat karboplatin grubu elektron mikrografı. Nukleus (N), hasarlı endoplazmik retikulum sisternaları (ER), vakuoller (V) ve az sayıda hücre tomurcuklanması (ok başı) görülmektedir. 10000x büyütme. Bar: 2 µm

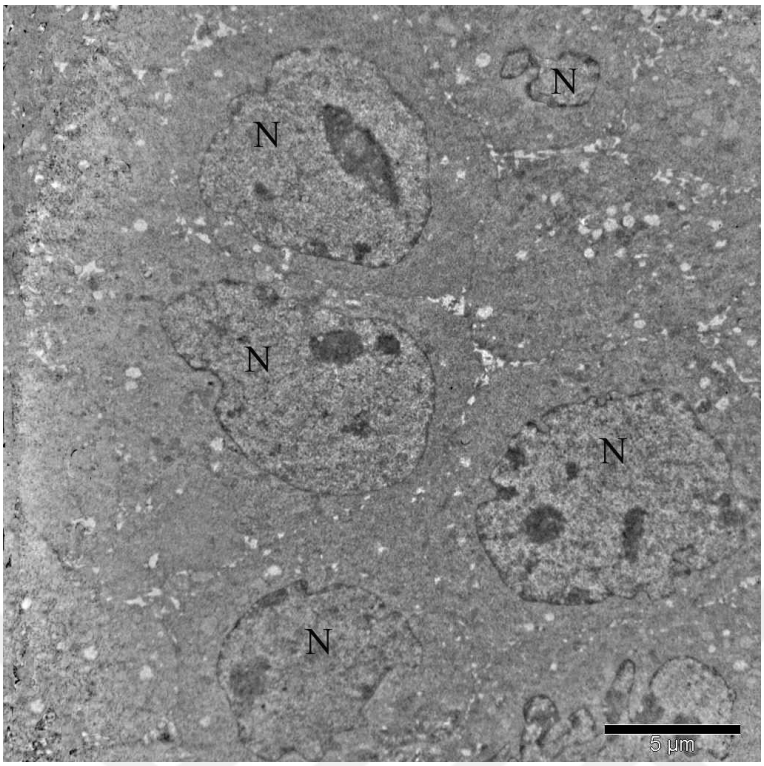


Şekil 4-52: 3T3 hücreleri 72. saat karboplatin grubu elektron mikrografı. Hafif invajinasyonlu nukleus (N), mitokondriler (Mi), endoplazmik retikulum (ER) ve apoptotik cisimler (ok başı) görülmektedir. 10000x büyütme. Bar: 2 µm

3T3 hücreleri 24. ve 72. saat propolis+karboplatin grupları elektron mikrografı incelendiğinde; mikrovillus ve filopod yapılarının normal morfolojide ve sayıda olduğu görüldü. Düzgün yapıda nukleuslara rastlandı. Hücre nukleuslarının hücreden hücreye değişiklik göstererek, ökromatik ve yer yer heterokromatik yapıda olduğu gözlendi. Hücreler arası boşlukların yaygın olmadığı ve az sayıda vakuol gözlendi. 24. ve 72. saatlerdeki etkinin benzer olduğu görüldü (Şekil 4-53 ve Şekil 4-54).



Şekil 4-53: 3T3 hücreleri 24. saat propolis+karboplatin grubu elektron mikrografı. Normal morfolojide nukleus (N), nukleolus (Nu), mikrovilluslar (ok başı) ve filopod (ok) görülmektedir. 5000x büyütme. Bar: 5 µm



Şekil 4-54: 3T3 hücreleri 72. saat propolis+karboplatin grubu elektron mikrografı. Nukleusları (N) ile birlikte birçok genel olarak düzgün morfolojili hücre görülmektedir. 5000x büyütme. Bar: 5 µm

İshikawa ve 3T3 hücreleri 24. ile 72. saatlerde gruplar arası elektron mikrografları incelendiğinde:

İshikawa hücreleri deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tüm deney gruplarında apoptotik etkinin 72. saatte şiddetinin arttığı görüldü. Bu etkinin hem kontrol hem de tüm deney gruplarına göre, propolis+karboplatin grubunda daha fazla olduğu görüldü.

3T3 hücreleri deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; tüm deney gruplarında 24. ve 72. saat değişimlerinin hemen hemen aynı olduğu ve kontrol grubuna kıyasla, morfolojinin yakın olduğu gözlendi. Fakat karboplatin grubunda diğer deney gruplarından farklı olarak, 24. saatte az apoptoz ile uyumlu bulgular görülmekle birlikte 72. saatte tekrar normale döndüğü ve kontrol grubuna yakın bir ince yapının olduğu izlendi.

3T3 hücrelerinde hasarlı hücreler olsa da, tüm deney gruplarında bu etkinin minimal olduğu ve kontrol grubuna yakın özellikler sergilediği görüldü. Fakat İshikawa

hücrelerinde apoptotik etkinin hem kontrol grubundan hem de 3T3 deney gruplarından daha şiddetli olduğu ve propolis+karboplatin grubunda bu etkinin en fazla olduğu gözlendi.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda propolisin endometriyal adenokarsinomdaki etkisini hücre kültürü ve standart tedavide uygulanan karboplatin kemoterapötiği ile araştırdık. Her iki ajan da literatürde birçok kanser hücre hattında çalışılmıştır. Propolisin, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında canlılığı doza ve zamana bağlı olarak düşürdüğü bildirilmiştir [66]. Karboplatinin, endometrial kanseri hücre hattında hücre büyüme ve çoğalmasını inhibe ederek, canlı hücre sayısını azaltarak sitotoksik etkisi kanıtlanmıştır [92]. Rutin tedavi protokollerinde kullanılmaktadır [96]. Propolis ve karboplatinin birlikte etkileri ise köpek osteosarkom hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada araştırılmış ve propolis tek başına kanser hücreleri üzerine sitotoksik etki yaratmazken, birlikte kullanıldıklarında kanser hücrelerine apoptotik ve sitotoksik etki gösterdikleri, sağlıklı hücrelerde ise bu etkinin olmadığı bildirilmiştir [97]. Ancak literatür taramamızda insan endometriyum kanseri üzerinde veya İshikawa hücre hattında propolis ve karboplatinin beraber uygulandığı hücre kültürü, hayvan veya insan kullanılan bir çalışmaya rastlamadık.

Karboplatin, platin grubundan bir kemoterapötiktir. Organlarda daha az toksik olduğu için diğer kemoterapi ajanlarından daha güvenlidir [90], [91]. Her ne kadar karboplatinin DNA sentezinde çift fonksiyonlu kovalent bağ oluşturması ile S fazına etki ediyor olsa da, esasen hücre siklusuna spesifik değildir. Alkilleyici ajan olması sebebiyle hücre içinde DNA moleküllerinin zincir içi ve zincirler arası reaktif platin kompleksleri meydana getirerek çapraz bağlar yapar. Bu da DNA yapısını değiştirir ve DNA sentezini inhibe eder. Bu durum hücrenin siklusunu her fazında etkileyebilir [98], [99], [42], [46]. Sağlıklı hücrelerde düşük dozlarda sitotoksik etkisi bulunmadığı bildirilmiştir [100]. Endometrial kanser hücrelerinde; büyüme baskılanması ve hücre çoğalmasını engellemektedir [92]. Farklı beyin kanseri hücre hatlarında canlı hücre sayısını düşürerek sitotoksik etki göstermiştir [40]. İnsan over kanseri hücrelerinde sitoplazmada sitokrom-c salınımını [101] ve servikal karsinom hücrelerinde apoptozu arttırdığı bildirilmiştir [102]. Laringeal karsinom hücre hattında antimetastaz etki yaparak etkinliği kanıtlanmıştır [103]. Çalışmamızda İshikawa hücrelerinde; akım sitometri hücre döngüsü faz dağılımlarını etkilemese de, apoptoz oranlarını hem 24. hem de 72. saatlerde arttırdığı; hücre göçünü ve hızını incelenen zaman dilimlerinde

azalttığı; sitokrom-c oranındaki göreceli artış ile apoptozun intrinksik yolağında etkili olabileceği görüldü. p27 oranındaki göreceli artış ile hücre döngüsünü G_1 fazında inhibe edebileceği tespit edildi. TEM incelememizde hücre tomurcuklanması, artan vakuolizasyon, apoptotik cisimlerin varlığı, mikrovillus kaybı, nukleusların yer yer kondense olması, olası migrazom yapıları ve organellerdeki dejenerasyonlar dikkat çekti. Sağlıklı hücrelerden meydana gelen 3T3 hattında, tüm etkilerinin minimal düzeyde olduğu gözlendi. Sonuçlarımız literatür ile uyumluydu.

TEM incelemesi sırasında İshikawa hücre hattı karboplatin deney grubunda yer yer migrazom benzeri yapılara rastlandı. Migrazomlar, 0,5-3 μm boyutlarında hücre membranına bağlı birçok küçük vezikülden oluşan ve hücre göçüyle ilişkili organeller olarak tanımlanmıştır. Sitozolik içeriklerin migrazomlarla taşındığı ve daha sonra hücrelerden salındığı bildirilmiştir. Bu olayın yeni bir hücresel süreç olduğu ve hücre-hücre iletişiminde önemli rol oynayabilecek organeller olduğu keşfedilmiştir. Ayrıca insan ve fare hücrelerinin çoğunun migrazom oluşturabildiği bildirilmiştir [104]. Literatür taramamız sonucu, çalışmamız karboplatinin İshikawa hücrelerine etki ederek, migrazom veya migrazoma benzer yapının oluşumuna sebep olduğunu bildiren literatürdeki ilk rapordur. Hücre dışı veziküller sınıflandırılmasında olan migrazomlar, istenmeyen moleküllerin hücrelerden atılmasında ve kargo moleküllerini başka alıcı hücrelere aktararak hücreler arası iletişime aracılık ederler. Migrazom organellerinin keşfedilmiş özelliklerinin yanında hala açıklığa kavuşturulamamış özelliklerinin olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda migrazomların kullanılarak tümör hücrelerinde kanser ilaçlarına karşı olan direncin engellenmesi için çalışmalar devam etmektedir. Hücre kültürü çalışmalarında, hücre filopodlarının ileri ve geri çekilim hareketleri sırasında hücre dışına küçük partiküller saldığı da çalışmalarla ortaya koyulmuştur [105], [106], [107], [108]. Migrazom yapılarına yalnızca İshikawa hücreleri karboplatin deney grubunda rastlanmasının sebebi; tümör hücrelerinin kemoterapötik ajana karşı direnç göstererek hücre dışına atılması, filopod yapılarının diğer deney gruplarından daha düzgün yapıda ve sayıda olması, migrasyon oranının ve migrasyon hızının yüksek olması olabilir. Ayrıca İshikawa hücreleri propolis+karboplatin deney grubunda migrazom benzeri yapılara rastlanmaması; propolisin, kemoterapötik ajan olan karboplatinin tümör hücrelerince atılmasını engelleyen olası bir mekanizmada rol oynayabileceğini düşündürdü. Gözlemlediğimiz yapıların migrazom olduğunu TEM ile

görüntüleyerek yorumlamış olsak da ikinci bir yöntemle de doğrulanması gerekmektedir.

Propolis, günümüzde bir gıda eki olarak çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Antitümoral, antifungal ve antibakteriyel gibi etkileri olduğu birçok çalışma ve derlemeler ile ortaya koyulmuştur [62], [13]. Biyolojik etkilerinin çalışmalarda yapılan analizler doğrultusunda mevcut içeriğindeki fenolik bileşiklere dayandığı sonucuna varılmıştır [55]. Kafeik asit, kafeik asit fenetil ester, sinnamik asit, kuersetin, krisin, gallik asit başta olmak üzere bu fenolik bileşiklerin kanser tedavisinde sıklıkla başvurulan radyoterapi ve kemoterapiye kuvvetli bir ilave destek olarak hizmet edebileceği hipotezi çalışmalarla doğrulanmıştır [56], [57]. Krisinin; insan karaciğer kanser hücrelerinde ve insan nazofarengeal karsinom hücrelerinde intrinsik apoptoz yolağını uyararak antitümoral etkisi ortaya koyulmuştur [72]. Kuersetinin İshikawa hücreleri üzerinde etki ederek, kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği bildirilmiştir [109].

Çalışmamızda Mersin bölgesi kaynaklı analiz sonuçları erişime açık ticari bir propolis kullandık. Ancak ileriki çalışmalarda bölgesel farklılıkların içeriği değişebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Hücre döngüsü analizi, kanser başta olmak üzere birçok hastalığın seyri konusunda bilgi veren önemli bir parametredir. Propolis insan prostat kanseri hücrelerinde S, insan mide kanseri hücrelerinde G_0/G_1, insan meme kanseri hücrelerinde G_1 fazında hücre döngüsünü durdurmaktadır [17], [18], [74]. Biz de hücre döngüsü faz dağılımlarını hem akım sitometri hem de p27 antikoru immunositokimyası kullanarak araştırdık. p27, siklin bağımlı kinaz inhibitörüdür ve siklin bağımlı kinaz komplekslerinin aşağı regülasyonunu sağlayarak, hücre döngüsü proliferasyonunu önlediği [85], [86], ayrıca p27' nin aşırı ekspresyonunun hücre döngüsünü G_1 fazında durdurarak hücreleri apoptoza indüklediği kanıtlanmıştır [87]. Çalışmamız sonucunda akım sitometri verileri anlamlı çıkmasa da, İshikawa hücrelerindeki p27 oranında istatistiksel olarak anlamlı olmayan ancak göreceli bir artış mevcuttu. Bu da propolisin farklı dozlarının denenebileceğini ve hücre döngüsünü literatürdeki kaynaklarla uyumlu olarak G_1 fazında durdurabileceğini düşündürttü.

Propolis apoptoz mekanizmasını hem sitokrom-c'nin mitokondriden sitozole salınmasıyla kaspaz kaskadını uyarması (mitokondriyal yolak veya intrinsik yolak) hem

de TRAIL sinyal yoluyla (ekstrinsik yolak) uyarmasıyla sağlar [68], [69], [70]. Sitoplazmada sitokrom-c oranının artması, hücrelerin apoptoza gitmesi anlamına gelmektedir [78], [79]. İnsan lösemi kanseri hücre hattı olan U937 üzerindeki apoptotik etkisi, Annexin V ile akım sitometri ile ve floresan mikroskopla gösterilmiştir [19]. Propolisin insan lösemi HL-60 hücreleri üzerinde etkisinin; sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması ve kanser hücreleri üzerinde proliferasyonu azaltarak mitokondriyal yolağı uyarıp apoptozu indüklemesi olduğu bildirilmiştir [110]. Sitokrom-c mitokondrinin iç zarında bulunan ve apoptozun iç yolağında etkili olan bir proteindir. Çalışmamızda akım sitometri ile propolisin İshikawa hücre hattı üzerinde apoptotik etkisinin hem kısa (24. saat) hem de uzun vadede (72. saat) olduğunu ve bunun da sitokrom-c immünositokimyasal boyama sonuçlarımız ile intrinsik yolakla gerçekleştiğini gördük. TEM incelemelerinde propolis eklenen İshikawa hücrelerinde; hücre tomurcuklanması, apoptotik cisimler ve vakuol artışı, propolisin apoptotik etkisi olarak dikkatimizi çekti. Apoptoz değerlendirmesi için akım sitometri yaptığımız 3T3 hücre hattı deney gruplarında genel olarak propolisin apoptotik etki görülmezken, yalnızca 72. saat verilerinde propolis grubunda apoptozun kontrol grubuna göre arttığı sonucu ile karşılaşıldı. Çalışmamız in vitro olduğu için, 72 saatte medyumda biriken atık maddeler vb. etkenlerin apoptoz artışına neden olabileceğini düşünmekteyiz. Kısa dönemde 3T3 hücrelerine zarar vermediğinden, propolisin deney protokolleri veya tedavi denemelerinde kısa dönemli olarak ara ara verilmesinin daha iyi etkileri olabileceğini ve uygulamada bunların göz önünde bulundurulması gerektiğini önermekteyiz.

Meme kanseri hücreleri üzerinde propolisin, 48 saatte doza bağlı olarak hücre göçünü inhibe ettiği bildirilmiştir [66]. Metastazı engellemek için, kanser tedavisine eklenebilecek yenilikler kanser hastaları için bir uygulama seçeneği sunar. Çalışmamızda kanser hücrelerinin metastaz özelliğini, literatüre uygun olarak migrasyon testi kullanılarak araştırdık [111]. Propolisin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hem 24. hem de 72. saatlerde İshikawa hücrelerinin hücre göçünü ve göç hızını yavaşlatma etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gördük.

İnsan dermal fibroblast hücrelerinde propolisin, sitotoksik etki yaratmadığı; canlılığı, hücre göçünü ve migrasyon hızını arttırdığı bildirilmiştir [35]. Karboplatinin de 3T3 fibroblast hücre hattında canlılığı etkilemediği ve sitotoksik etki yaratmadığı

kanıtlanmıştır [100]. Bizim çalışmamızda da propolis ve karboplatinin beraber uygulandığında sağlıklı hücrelerden oluşan 3T3 hattında canlılığa anlamlı etkisinin olmadığını gördük. Kombinasyon grubunun migrasyon oranı ve hızını arttırmasının, literatürde propolisin yara iyileşmesine olumlu etkisini bildiren çalışmalarla paralellik göstererek özellikle propolisten kaynaklandığını düşündük [35]. TEM incelemelerimizde 3T3 hücrelerine propolis ve karboplatin birlikte verildiklerinde sitotoksik bir etkiyi düşündürecek bulgu gözlemlemedik.

Çalışmamız ile propolis ve karboplatinin kombine kullanıldığında sinerjistik etkilerinin olduğunu düşünmekteyiz. İshikawa hücrelerinde, hücre döngüsü faz dağılımlarında ve apoptoz sonuçlarında bir farklılığa rastlanmadı. p27 oranındaki artış ile hücre döngüsü inhibe ederek G_1 fazında durdurduğu ve hücrelerin apoptozuna neden oldu. Sitokrom-c oranlarındaki artış ile apoptozun intrinsik yolak ile gerçekleştiğini düşündürdü. Hem kısa hem de uzun dönemde migrasyon oranında düşüşle ve kısa dönemde migrasyon hızı üzerindeki azalmayla kanser hücrelerinin göçüne engel oluşturdu. Hem kısa hem uzun vade de canlılık oranlarındaki düşüşle ve canlı hücre sayısında azalmayla kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği görüldü. TEM ile inceleme sonucunda İshikawa hücrelerine kombine uygulandıklarında kontrol grubundan farklı olarak; vakuol boyut ve sayılarında, hücre tomurcuklanmalarında, apoptotik cisimlerde artış olduğu gözlendi. Nukleusun kenara itilerek kondense olduğu, mikrovillus ve filopod sayısının azaldığı, hücrelerin birbirinden uzaklaştığı, hücre boyutlarının küçüldüğü, sitoplazmik organellerde dejenerasyonların olduğu, ileri apoptotik dejeneratif hücre sayısında artış olduğu saptandı. Bu etkilerin akım sitometri sonuçlarının aksine 72. saatte daha şiddetli olduğu ve sinerjistik etkileri görüldü. Kombine uygulandıklarında 3T3 hücreleri üzerinde sitotoksik, apoptotik etkilerinin olmadığı ve kontrol grubuyla benzerlik göstermesi TEM ayrıntılı incelememiz sonucunda doğrulandı.

Çalışmamızda; propolisin karboplatin sitotoksisitesi üzerindeki etkisi sonucu İshikawa hücre hattında canlılık yüzdesi ve canlı hücre sayısı düştü yani hücre proliferasyonu inhibe oldu. Propolis, apoptoz oranını arttırarak, migrasyon oranı ve migrasyon hızını düşürerek, ayrıca hücre döngüsünü G_1 fazında durdurarak bu etkiye yol açtı. Propolis ve karboplatinin birlikte kullanıldığında da sinerjik etkilerinin olduğu görüldü. Ayrıca 3T3 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi yoktu. TEM incelemeleri

sırasında tüm bulguların propolis ve karboplatinin izole ve kombine kullanıldığında apoptotik ve sitototoksik etkisinin olduğu bütün sonuçlarımızda tutarlıydı. Tüm bu sonuçlar gıda eki olan propolisin; kanser kemoterapilerinin başarısı arttırarak, infertiliteye sebep olan ve ölümle sonuçlanabilen endometriyal adenokanserin tedavi prognozunu iyileştirecek tedavilere yardımcı olarak eklenebileceğini düşündürdü. Bu çalışma daha fazla örnek sayısı, farklı dozlar ve farklı zaman dilimlerinin araştırılması için yapılacak in vivo ve klinik araştırmalar için anlamlı in vitro veriler sunmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics.* CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
2. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2016.* CA Cancer J Clin, 2016. **66**(1): p. 7-30.
3. Crissman, J.D., et al., *Endometrial carcinoma in women 40 years of age or younger.* Obstet Gynecol, 1981. **57**(6): p. 699-704.
4. Gallup, D.G. and R.J. Stock, *Adenocarcinoma of the endometrium in women 40 years of age or younger.* Obstet Gynecol, 1984. **64**(3): p. 417-20.
5. Nishida, M., *The Ishikawa cells from birth to the present.* Hum Cell, 2002. **15**(3): p. 104-17.
6. Naciff, J.M., et al., *The genomic response of a human uterine endometrial adenocarcinoma cell line to 17alpha-ethynyl estradiol.* Toxicol Sci, 2009. **107**(1): p. 40-55.
7. Woodford-Thomas, T.A., J.D. Rhodes, and J.E. Dixon, *Expression of a protein tyrosine phosphatase in normal and v-src-transformed mouse 3T3 fibroblasts.* J Cell Biol, 1992. **117**(2): p. 401-14.
8. Zagouri, F., et al., *Endometrial cancer: what is new in adjuvant and molecularly targeted therapy?* Obstet Gynecol Int, 2010. **2010**: p. 749579.
9. Unger, F.T., et al., *DNA damage induced by cis- and carboplatin as indicator for in vitro sensitivity of ovarian carcinoma cells.* BMC Cancer, 2009. **9**: p. 359.
10. Jia, N., et al., *Synergistic effects of a combined treatment of PI3K/mTOR dual inhibitor LY3023414 and carboplatin on human endometrial carcinoma.* Gynecol Oncol, 2021. **162**(3): p. 788-796.
11. Hoekstra, A.V., et al., *Chemosensitization of endometrial cancer cells through AKT inhibition involves FOXO1.* Gynecol Oncol, 2008. **108**(3): p. 609-18.
12. Castaldo, S. and F. Capasso, *Propolis, an old remedy used in modern medicine.* Fitoterapia, 2002. **73 Suppl 1**: p. S1-6.
13. Burdock, G.A., *Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis).* Food Chem Toxicol, 1998. **36**(4): p. 347-63.
14. Turan, I., et al., *Cytotoxic effect of Turkish propolis on liver, colon, breast, cervix and prostate cancer cell lines.* Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2015. **14**(5): p. 777-782.
15. Demir, S., et al., *Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell line.* Nutr Cancer, 2016. **68**(1): p. 165-72.
16. Cruet-Hennequart, S., et al., *Characterization of the effects of cisplatin and carboplatin on cell cycle progression and DNA damage response activation in DNA polymerase eta-deficient human cells.* Cell Cycle, 2009. **8**(18): p. 3039-50.
17. Desamero, M.J., et al., *Tumor-suppressing potential of stingless bee propolis in in vitro and in vivo models of differentiated-type gastric adenocarcinoma.* Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 19635.
18. Li, H., et al., *Antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin.* Int J Oncol, 2007. **31**(3): p. 601-6.
19. Motomura, M., et al., *Propolis induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemic U937 cells through Bcl-2/Bax regulation.* Environ Toxicol Pharmacol, 2008. **26**(1): p. 61-7.

20. Ross, M.H. and W. Pawlina, *Histoloji Konu Anlatımı Ve Atlas*, ed. 6. 2017, Ankara: Palme Yayıncılık. 830-853.
21. Chandar, N. and S. Viselli, *Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Hücre ve Moleküler Biyoloji*. 2012: Nobel Tıp Kitabevleri. 180.
22. MESCHER, A.L., *Junqueira's Temel Histoloji Atlas Kitap*, ed. 13. 2015, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 449-467.
23. Noci, I., et al., *Uterus and endometrium: Morphological and functional aspects of the endometrium of asymptomatic post-menopausal women: does the endometrium really age?* Human reproduction, 1996. **11**(10): p. 2246-2250.
24. Epstein, E. and L. Valentin, *Managing women with post-menopausal bleeding.* Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2004. **18**(1): p. 125-43.
25. Amant, F., et al., *Endometrial cancer.* Lancet, 2005. **366**(9484): p. 491-505.
26. Liu, F.S., *Molecular carcinogenesis of endometrial cancer.* Taiwan J Obstet Gynecol, 2007. **46**(1): p. 26-32.
27. Weigelt, B., et al., *PI3K pathway dependencies in endometrioid endometrial cancer cell lines.* Clinical Cancer Research, 2013. **19**(13): p. 3533-3544.
28. Hirai, Y., et al., *Establishment and characterization of human cell lines from a serous papillary adenocarcinoma of the endometrium.* Gynecologic oncology, 1994. **54**(2): p. 184-195.
29. Parslov, M., et al., *Risk factors among young women with endometrial cancer: a Danish case-control study.* Am J Obstet Gynecol, 2000. **182**(1 Pt 1): p. 23-9.
30. Purdie, D.M. and A.C. Green, *Epidemiology of endometrial cancer.* Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2001. **15**(3): p. 341-54.
31. Park, H.M., et al., *Endometrioid adenocarcinoma arising from endometriosis of the uterine cervix: a case report.* J Korean Med Sci, 2009. **24**(4): p. 767-71.
32. Jeong, J.W., et al., *beta-catenin mediates glandular formation and dysregulation of beta-catenin induces hyperplasia formation in the murine uterus.* Oncogene, 2009. **28**(1): p. 31-40.
33. Castelbaum, A.J., et al., *Characterization of integrin expression in a well differentiated endometrial adenocarcinoma cell line (Ishikawa).* J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(1): p. 136-42.
34. Kalluri, R., *The biology and function of fibroblasts in cancer.* Nat Rev Cancer, 2016. **16**(9): p. 582-98.
35. Ebadi, P. and M. Fazeli, *Evaluation of the potential in vitro effects of propolis and honey on wound healing in human dermal fibroblast cells.* South African Journal of Botany, 2021. **137**: p. 414-422.
36. Burke, W.M., et al., *Endometrial cancer: a review and current management strategies: part II.* Gynecologic oncology, 2014. **134**(2): p. 393-402.
37. Hurley, L.H., *DNA and its associated processes as targets for cancer therapy.* Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(3): p. 188-200.
38. Espinosa, E., et al., *Classification of anticancer drugs—a new system based on therapeutic targets.* Cancer treatment reviews, 2003. **29**(6): p. 515-523.
39. von Minckwitz, G., et al., *Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial.* Lancet Oncol, 2014. **15**(7): p. 747-56.
40. Hassanzadeganroudsari, M., et al., *In vitro investigation of anticancer efficacy of carboplatin-loaded PEGylated nanoliposome particles on brain cancer cell lines.* Journal of Nanoparticle Research, 2019. **21**(6): p. 1-12.

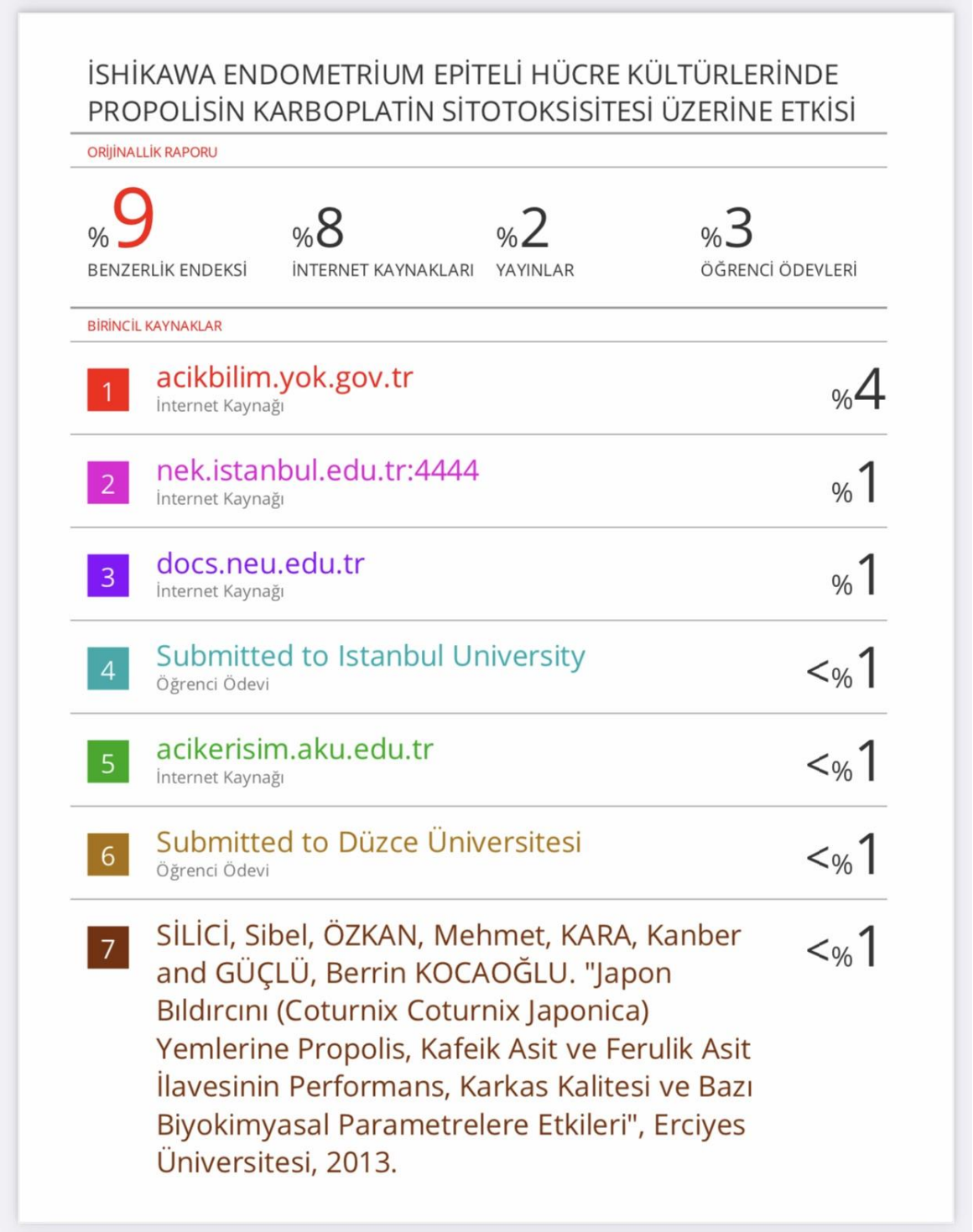
41. Wagstaff, A.J., et al., *Carboplatin. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the treatment of cancer.* Drugs, 1989. **37**(2): p. 162-90.
42. Kelland, L., *The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy.* Nat Rev Cancer, 2007. **7**(8): p. 573-84.
43. Rose, W.C. and J.E. Schurig, *Preclinical antitumor and toxicologic profile of carboplatin.* Cancer Treat Rev, 1985. **12 Suppl A**: p. 1-19.
44. Siddik, Z.H., et al., *Comparative distribution and excretion of carboplatin and cisplatin in mice.* Cancer Chemother Pharmacol, 1988. **21**(1): p. 19-24.
45. Curt, G.A., et al., *A phase I and pharmacokinetic study of diamminecyclobutane-dicarboxylatoplatinum (NSC 241240).* Cancer Res, 1983. **43**(9): p. 4470-3.
46. Sousa, G.F.d., S.R. Wlodarczyk, and G. Monteiro, *Carboplatin: molecular mechanisms of action associated with chemoresistance.* Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014. **50**: p. 693-701.
47. Pietta, P.G., C. Gardana, and A.M. Pietta, *Analytical methods for quality control of propolis.* Fitoterapia, 2002. **73 Suppl 1**: p. S7-20.
48. Zaccaria, V., et al., *Effect of Green and Brown Propolis Extracts on the Expression Levels of microRNAs, mRNAs and Proteins, Related to Oxidative Stress and Inflammation.* Nutrients, 2017. **9**(10).
49. Pobiega, K., K. Krasniewska, and M. Gniewosz, *Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality-A review.* Trends in food science & technology, 2019. **83**: p. 53-62.
50. Selvan, A. and T. Prabhu, *Extraction of propolis from beehives and characterization of its constituens and medicinal properties: A review.* International Journal of Advanced Engineering Technology, 2010. **1**(3): p. 50-3.
51. Popova, M., et al., *Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition.* Phytomedicine, 2005. **12**(3): p. 221-8.
52. Ghisalberti, E.L., *Propolis: a review.* Bee world, 1979. **60**(2): p. 59-84.
53. Volpi, N., *Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis.* Electrophoresis, 2004. **25**(12): p. 1872-8.
54. Omene, C., et al., *Propolis and its Active Component, Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE), Modulate Breast Cancer Therapeutic Targets via an Epigenetically Mediated Mechanism of Action.* J Cancer Sci Ther, 2013. **5**(10): p. 334-342.
55. Viuda-Martos, M., et al., *Functional properties of honey, propolis, and royal jelly.* J Food Sci, 2008. **73**(9): p. R117-24.
56. Orsolic, N., et al., *Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds.* J Ethnopharmacol, 2004. **94**(2-3): p. 307-15.
57. Lamoral-Theys, D., et al., *Natural polyphenols that display anticancer properties through inhibition of kinase activity.* Curr Med Chem, 2010. **17**(9): p. 812-25.
58. Khalil, M.L., *Biological activity of bee propolis in health and disease.* Asian Pac J Cancer Prev, 2006. **7**(1): p. 22-31.
59. Nagai, T., et al., *Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis.* Food chemistry, 2003. **80**(1): p. 29-33.
60. Pujirahayu, N., H. Ritonga, and Z. Uslinawaty, *Properties and flavonoids content in propolis of some extraction method of raw propolis.* International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2014. **6**(6): p. 338-40.

61. Netikova, L., P. Bogusch, and P. Heneberg, *Czech ethanol-free propolis extract displays inhibitory activity against a broad spectrum of bacterial and fungal pathogens.* J Food Sci, 2013. **78**(9): p. M1421-9.
62. Ghisalberti, E., *Propolis: a review.* Bee world, 1979. **60**(2): p. 59-84.
63. Reed, J.C., *Mechanisms of apoptosis.* Am J Pathol, 2000. **157**(5): p. 1415-30.
64. Turan, I., et al., *Cytototoxic effect of Turkish propolis on liver, colon, breast, cervix and prostate cancer cell lines.* Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2015. **14**(5): p. 777-782.
65. Pratsinis, H., et al., *Antiproliferative activity of Greek propolis.* J Med Food, 2010. **13**(2): p. 286-90.
66. Xuan, H., et al., *Antitumor Activity of Chinese Propolis in Human Breast Cancer MCF-7 and MDA-MB-231 Cells.* Evid Based Complement Alternat Med, 2014. **2014**: p. 280120.
67. Aso, K., et al., *Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937.* Biol Pharm Bull, 2004. **27**(5): p. 727-30.
68. Seda Vatansever, H., et al., *Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines.* Acta Histochem, 2010. **112**(6): p. 546-56.
69. Szliszka, E., et al., *Ethanolic extract of propolis (EEP) enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in cancer cells.* Molecules, 2009. **14**(2): p. 738-54.
70. Sawicka, D., et al., *The anticancer activity of propolis.* Folia Histochem Cytobiol, 2012. **50**(1): p. 25-37.
71. Lee, Y.J., et al., *Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells.* Cancer Lett, 2000. **153**(1-2): p. 51-6.
72. Li, X., et al., *Chrysin sensitizes tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in human tumor cells via suppression of nuclear factor-kappaB.* Cancer Lett, 2010. **293**(1): p. 109-16.
73. Piantelli, M., et al., *Tamoxifen and quercetin interact with type II estrogen binding sites and inhibit the growth of human melanoma cells.* J Invest Dermatol, 1995. **105**(2): p. 248-53.
74. Misir, S., et al., *Effect of Turkish Propolis on miRNA Expression, Cell Cycle, and Apoptosis in Human Breast Cancer (MCF-7) Cells.* Nutr Cancer, 2020. **72**(1): p. 133-145.
75. Shimizu, S., M. Narita, and Y. Tsujimoto, *Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC.* Nature, 1999. **399**(6735): p. 483-7.
76. Puthalakath, H. and A. Strasser, *Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins.* Cell Death Differ, 2002. **9**(5): p. 505-12.
77. Chandar, N. and S. Viselli, *Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Hücre ve Moleküler Biyoloji*. 2012: Nobel Tıp Kitabevleri. 215-224.
78. Desagher, S., et al., *Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis.* J Cell Biol, 1999. **144**(5): p. 891-901.
79. Chao, D.T. and S.J. Korsmeyer, *BCL-2 family: regulators of cell death.* Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 395-419.
80. Garrido, C., et al., *Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria.* Cell Death Differ, 2006. **13**(9): p. 1423-33.

81. Ott, M., et al., *Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1259-63.
82. Acehan, D., et al., *Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation.* Mol Cell, 2002. **9**(2): p. 423-32.
83. Ross, M.H. and W. Pawlina, *Histoloji Konu Anlatımı Ve Atlas*, ed. 6. 2017, Ankara: Palme Yayıncılık. 86-88.
84. Chandar, N. and S. Viselli, *Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Hücre ve Moleküler Biyoloji*. 2012: Nobel Tıp Kitabevleri. 188-194.
85. Sheaff, R.J., et al., *Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1*. Genes & development, 1997. **11**(11): p. 1464-1478.
86. Polyak, K., et al., *Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals.* Cell, 1994. **78**(1): p. 59-66.
87. Katayose, Y., et al., *Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor p27*. Cancer Res, 1997. **57**(24): p. 5441-5.
88. Strober, W., *Trypan blue exclusion test of cell viability*. Current protocols in immunology, 1997. **21**(1): p. A. 3B. 1-A. 3B. 2.
89. Markiewicz-Zukowska, R., et al., *Propolis changes the anticancer activity of temozolomide in U87MG human glioblastoma cell line.* BMC Complement Altern Med, 2013. **13**: p. 50.
90. Kubina, R., et al., *The Ethanol Extract of Polish Propolis Exhibits Anti-Proliferative and/or Pro-Apoptotic Effect on HCT 116 Colon Cancer and Me45 Malignant Melanoma Cells In Vitro Conditions.* Adv Clin Exp Med, 2015. **24**(2): p. 203-12.
91. Rantanen, V., et al., *Comparative evaluation of cisplatin and carboplatin sensitivity in endometrial adenocarcinoma cell lines.* Br J Cancer, 1994. **69**(3): p. 482-6.
92. Kuittinen, T., et al., *Paclitaxel, Carboplatin and 1,25-D3 Inhibit Proliferation of Endometrial Cancer Cells In Vitro.* Anticancer Res, 2017. **37**(12): p. 6575-6581.
93. Koopman, G., et al., *Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis.* Blood, 1994. **84**(5): p. 1415-20.
94. Hashimoto, K., et al., *Effect of SCCA1 and SCCA2 on the suppression of TNF-alpha-induced cell death by impeding the release of mitochondrial cytochrome c in an oral squamous cell carcinoma cell line.* Tumour Biol, 2005. **26**(4): p. 165-72.
95. Ferrer, B., et al., *Paraffin-embedded cell line microarray (PECLIMA): development and validation of a high-throughput method for antigen profiling of cell lines.* Pathobiology, 2005. **72**(5): p. 225-32.
96. Aghajanian, C., et al., *A randomized phase II study of paclitaxel/carboplatin/bevacizumab, paclitaxel/carboplatin/temsirolimus and ixabepilone/carboplatin/bevacizumab as initial therapy for measurable stage III or IVA, stage IVB or recurrent endometrial cancer, GOG-86P*. J Clin Oncol, 2015. **33**(suppl): p. abstr 5500.
97. Bernardino, P.N., et al., *Positive effects of antitumor drugs in combination with propolis on canine osteosarcoma cells (spOS-2) and mesenchymal stem cells.* Biomed Pharmacother, 2018. **104**: p. 268-274.

98. Coleman, S.C., et al., *Analysis of cell-cycle checkpoint pathways in head and neck cancer cell lines: implications for therapeutic strategies.* Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery, 2002. **128**(2): p. 167-176.
99. Wang, S., et al., *Analysis of the cytotoxic activity of carboplatin and gemcitabine combination.* Anticancer research, 2010. **30**(11): p. 4573-4578.
100. Pravin, N. and N. Raman, *Investigation of in vitro anticancer and DNA strap interactions in live cells using carboplatin type Cu(II) and Zn(II) metalloinsertors.* Eur J Med Chem, 2014. **85**: p. 675-87.
101. Lee, C.S., et al., *Akt inhibitor enhances apoptotic effect of carboplatin on human epithelial ovarian carcinoma cell lines.* Eur J Pharmacol, 2010. **632**(1-3): p. 7-13.
102. Singh, S., et al., *p53 regulates ERK activation in carboplatin induced apoptosis in cervical carcinoma: a novel target of p53 in apoptosis.* FEBS Lett, 2007. **581**(2): p. 289-95.
103. He, P.J., et al., *Oxidative stress induced by carboplatin promotes apoptosis and inhibits migration of HN-3 cells.* Oncol Lett, 2018. **16**(6): p. 7131-7138.
104. Ma, L., et al., *Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration.* Cell Res, 2015. **25**(1): p. 24-38.
105. Eguchi, T., et al., *A Novel Model of Cancer Drug Resistance: Oncosomal Release of Cytotoxic and Antibody-Based Drugs.* Biology (Basel), 2020. **9**(3).
106. Eguchi, T., et al., *Exosome Release of Drugs: Coupling with Epithelial-Mesenchymal Transition* Preprints, 2019.
107. Zhao, X., et al., *Knockdown of TGF-beta1 expression in human umbilical cord mesenchymal stem cells reverts their exosome-mediated EMT promoting effect on lung cancer cells.* Cancer Lett, 2018. **428**: p. 34-44.
108. Hu, X., et al., *Release of cholesterol-rich particles from the macrophage plasma membrane during movement of filopodia and lamellipodia.* Elife, 2019. **8**.
109. Kaneuchi, M., et al., *Quercetin regulates growth of Ishikawa cells through the suppression of EGF and cyclin D1.* International journal of oncology, 2003. **22**(1): p. 159-164.
110. Eom, H.S., et al., *Propolis inhibits the proliferation of human leukaemia HL-60 cells by inducing apoptosis through the mitochondrial pathway.* Nat Prod Res, 2010. **24**(4): p. 375-86.
111. Xuan, H., et al., *Antitumor activity of Chinese propolis in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells.* Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014. **2014**.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



İSHİKAWA ENDOMETRİUM EPİTELİ HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE PROPOLİSİN KARBOPLATİN SİTOTOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%9	%8	%2	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%4
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%1
3	docs.neu.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
4	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<%1
5	acikerisim.aku.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	Submitted to Düzce Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
7	SİLİCİ, Sibel, ÖZKAN, Mehmet, KARA, Kanber and GÜÇLÜ, Berrin KOCAOĞLU. "Japon Bıldırcını (Coturnix Coturnix Japonica) Yemlerine Propolis, Kafeik Asit ve Ferulik Asit İlavesinin Performans, Karkas Kalitesi ve Bazı Biyokimyasal Parametrelere Etkileri", Erciyes Üniversitesi, 2013.	<%1