T.C.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ

PROJE BAŞLIĞI

KOLOREKTAL KARSİNOGENEZİSTE MİKRO RNA'LARIN EKSPRESYONU ÜZERİNE *inula viscosa* L. EKSTRAKTININ ETKİSİ

Proje No: TCD-2019-7446

Çok Disiplinli Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Betül APAYDIN YILDIRIM

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi/Biyokimya AD

Araştırmacının

Prof. Dr. Şaban KORDALİ

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Ziraat Fakültesi/Bitki Koruma Bölümü

Dr. Öğr. Üyesi Semin GEDİKLİ

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi/Histoloji ve Embriyoloji AD

ATATÜRK
ÜNİVERSİTESİ

ÖNSÖZ

Projemiz kapsamında yapılan çalışmada; HCT 116 kolorektal kanser hücre hattı kullanılarak miRNA'nın ekspresyonu üzerine halk arasında kolorektal kanser hastalarını tedavi ettiği düşünülen *Inula viscosa* L. su ekstraktının etkisi araştırıldı. Bu bitkinin 100, 200 ve 300 µg/mL doz aralığı 3, 24 ve 48 saat süre ile HCT 116 hücrelerine muamele edilerek takip edildi. Muamele işlemi sonucunda kolorektal kanserle ilişkisi olabilecek miR-145, miR-21, miR-31 ve miR-135a1 ekspresyon düzeyleri, apoptoz düzeyleri belirlendi. Bu doğrultuda bitkinin son yıllarda giderek artan kolorektal kanser hastalarında tedavide etkili olup olmadıkları araştırıldı. Bu proje Atatürk Üniversitesi BAP Birimi (Proje No: TCD-2019-7446) tarafından desteklenerek gerçekleştirildi.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TABLO ve ŞEKİL LİSTESİ	5
ÖZET	6
ABSTRACT	7
1. GİRİŞ	8
2.MATERYAL VE METOD	11
3. BULGULAR	26
4. SONUÇ	
5. KAYNAKLAR	

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ

TABLO ve ŞEKİLLER

	Sayfa No
Şekil 1. *Inula viscosa* L. bitkisinin toprak üstü aksamı	12
Şekil 2. *Inula viscosa* L. bitkisinin toplanarak laboratuvarda kurutulması	13
Şekil 3. Santrifüj sonrası falkonun dip kısmında biriken hücrelerin görüntüsü	14
Şekil 4. Hücre içeren besi yerinin T-25 flaska adlandırılarak konulması	15
Şekil 5. Hücrelerin incelendiği invert mikroskop	15
Şekil 6. Hücrelerin inkübasyona bırakıldığı Co^{2}'li etüv (inkübatör)	16
Şekil 7. MTT analizi	19
Şekil 8 . IVE'nin 3., 24. Ve 48. saatlerde MTT HCT-116 hücrelerindeki apoptotik etkisi	27
Şekil 9. MTT testi için 24.saat için IC50= 201.61, 48.saat için IC50= 242.37 olarak hesaplandı.	27
Şekil 10. IVE'nin 3., 24. ve 48. saatlerde Tripan Blue HCT-116 hücrelerindeki apoptotik etkisi	28
Şekil 11. Tripan Blue testi için 24.saat için IC50= 202.51, 48.saat için IC50= 244.98 olarak hesaplandı	28
Şekil 12: IVE'nin 24. Ve 48. saatlerde HCT-116 hücrelerindeki apoptotik etkisi	29
Şekil 13: 24 ve 48 saatlik *Inula viscosa* L. ekstraktı uygulamasının ardından gruplarda gözlenen apoptotik hücre dağılımı. Oklar TUNEL pozitif hücreleri göstermektedir	30
Şekil 14. HCT 116 hücrelerinde *Inula viscosa* L. ekstraktının 24 saatlik uygulamalarının ardından gözlenen apoptotik indeks	30
Şekil 15. HCT 116 hücrelerinde *Inula viscosa* L. ekstraktının 48 saatlik uygulamalarının ardından gözlenen apoptotik indeks	31
Tablo 1. 3.saatte miRNA fold change ifadesi	32
Şekil 16. 3.saat clustergram görüntüsü	32
Tablo 2. 24.saatte miRNA fold change ifadesi	32
Şekil 17. 24.saat clustergram görüntüsü	33
Şekil 18. 48.saat clustergram görüntüsü	33
Tablo 3. 48.saatte miRNA fold change ifadesi	34
SONUÇ	35
KAYNAKLAR	36

ÖZET

Kolorektal kanser kolon ve rektumu etkileyen genellikle kolondaki poliplerin yayılmasıyla gelişen çok yaygın görülen bir kanser türüdür. Kolorektal kanser vakalarında kullanılan ilaçların ciddi yan etkilere sahip olması, insanları yeni tedavilerin geliştirilmesine yönlendirmektedir. *İnula viscosa* L. farklı tıbbi etkilere sahip bir bitkidir. Yapılan çalışmada, *İnula viscosa* L. *su* ekstraktının HCT 116 insan kolorektal kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif, apoptotik etkileri incelenerek bu hastalığın patogenezinde rol oynayabilecek miRNA'ların ifadelerindeki değişim incelendi. Hücre canlılığı MTT ve Tripan blue analizi ile belirlendi. TUNEL ve Cell Death Detection ELISA yöntemiyle kolorimetrik olarak kantitatif apoptoz tayini yapıldı. Ayrıca, hücrelerin 24 ve 48 saat boyunca IC50 değerleri belirlenerek gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile miR-21, miR-31, miR-135a ve miR-145 ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler belirlendi.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgulara göre kolorektal kanserde onkogenik miRNA olan miR-21, miR-31 ve miR-135a1'in HCT 116 kanser hücrelerinde ekspresyon seviyeleri artmış, tümör supresör olan miR-145'in ise ekspresyon seviyesi azalmıştır. *I. viscosa* L. su ekstraktlarınının kolorektal kanser hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azalttığını ve hücreleri apoptoza yönlendirdiği, miR21, miR31 ve miR135a1 ekspresyonlarını azalttığı, miR145 ekspresyonunu ise arttırdığı tespit edildi.

Tüm bu sonuçlar, miR-21, miR-31 ve miR-145'in kolorectal kanserde aday biyobelirteç olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: HCT 116, *Inula viscosa*, kolorektal kanser, miRNA, MTT

ABSTRACT

Colorectal cancer is a very common type of cancer affecting the colon and rectum, which usually develops with the spread of polyps in the colon. The serious side effects of drugs used in colorectal cancer cases direct people to develop new treatments. *Inula viscosa* L. is a plant with different medicinal effects. In this study, the antiproliferative and apoptotic effects of *Inula viscosa* L. water extract on HCT 116 human colorectal cancer cells will be examined, and the change in the expression of miRNAs that may play a role in the pathogenesis of this disease will be examined. Cell viability was determined by MTT and trypan blue analysis. Quantitative determination of apoptosis was performed colorimetrically using TUNEL and Cell Death Detection ELISA method. In addition, IC50 values of the cells were determined during 24 and 48 hours and changes in miR-21, miR-31, miR-135a1 and miR-145 expression levels were determined by real time polymerase chain reaction (qRT-PCR).

According to the findings of our study, the expression levels of miR-21, miR-31 and miR-135a1, which are oncogenic miRNAs in colorectal cancer, increased in HCT 116 cancer cells, and the expression level of miR-145, which is a tumor suppressor, decreased. It was determined that I. viscosa L. water extracts significantly reduced the viability of colorectal cancer cells and directed the cells to apoptosis, decreased miR21, miR31 and miR135a1 expressions, and increased miR145 expression.

All these results show that miR-21, miR-31 and miR-145 may be candidate biomarkers in colorectal cancer.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ

Keywords: HCT 116, *Inula viscosa*, colorectal cancer, miRNA, MTT

1. GİRİŞ

Inula viscosa L. diüretik, topical antiinflamatuar, hemostatic, antiseptic, antifilojistik, antidiyabetik vb gibi farklı terapotik amaçlarla kullanılır. *Inula viscosa* L. bitkisinin farklı kısımlarından ve farklı çözücüler ile yapılan ekstraktları ile ilgili birkaç çalışmaya rastlanmıştır. Yapısında bulunan polifenoller ve sesquiterpenler (CQA, diCQA) kanser tedavisinde kullanılır.

MikroRNA (miRNA)'lar, yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda, proteine translasyonu gerçekleşmeyen yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanan biyolojik ve patolojik durumlarda düzenleyici fonksiyona sahip küçük RNA molekülleridir (Saydam ve ark, 2011). miRNA'ların transkripsiyonel ve post transkripsiyonel seviyeden hücresel gen ekspresyonunu düzenlediği düşünülmektedir (Jackson, 2007). Özellikle hücre farklılaşması ve hücre tipinin belirlenmesi gibi birçok fizyolojik olaylarda rol alırlar (Çelik ve ark, 2013).

Anormal olarak hücreler çoğaldığı zaman ve apoptoz fonksiyonlarını kaybettikleri zaman hücreler kanserleşirler. miRNA'ların kanserleşme sürecine katkılarını Calin ve arkadaşları 2001 yılında Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) hastalığı ile ilişkilendirmişlerdir. Kanser ve normal doku arasındaki ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi, miRNA'ların kanser patogenezindeki rollerini güçlendirmiştir.

Calin ve arkadaşları, 2004 yılında yayınladıkları diğer bir çalışmada, insan miRNA genlerinin kanser ile ilişkisini araştırmak için, 186 adet miRNA geninin DNA üzerindeki pozisyonunu haritalandırmışlardır (Wijnhoven ve ark, 2007). Bu genlerin kromozomal pozisyonlarını, daha önceden rapor edilen belirli kanser türlerinin gelişimi ile ilişkili olduğu bilinen genetik değişiklikler ile karşılaştırmışlardır. miRNA genlerinin çoğunlukla, heterozigotenin kaybolduğu bölgeler olan kırılgan kısımlara yerleşik

olduğunu göstermişlerdir. Bu kırılgan kısımlar amplifikasyonun minimal olduğu bölgeler veya genel kromozomal kırılma noktası bölgeleridir. Bu moleküler lezyonlar sonucu oluşan genetik hasar spesifik kanserlere neden olmaktadır (Saydam ve ark, 2011; Wijnhoven ve ark, 2007).

Michael M.Z. ve ark., 2003; ilk olarak insanlardaki kolonik ve rektal adenom karsinomlarında normal dokular ile karşılaştırıldığında miRNA ekspresyon seviyelerinde değişiklik olduğunu saptamışlar (Michael ve ark, 2003). Daha sonraki yıllarda değişikliğe uğramış miRNA seviyeleri meme kanserinde (Quesne ve Caldas, 2010), Burkitt's lenfomada (Metzler ve ark, 2004), tiroid kanserinde (He ve ark, 2005), beyin kanserinde (Chan ve ark, 2005), akciğer kanserinde (Hayashita ve ark, 2005), prostat kanserinde (Sevli ve ark, 2010) ve hepatosellüler karsinomda (Murakami ve ark, 2006) keşfedilmiştir.

miRNA'lar, hedefledikleri mRNA'nın moleküler yolaklardaki özelliğine göre onkogenik veya tümörsüpresör özellik kazanabilir. Normal dokularda, miRNA'ların bazılarının protoonkogenlerin translasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir. Fonksiyonları bir onkogenin ekspresyonunu kontrol etmek olan bu miRNA'lar "tümör supresör miRNA'lar" (TS-mir) olarak ifade edilmektedir. Dolayısıyla tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonunun azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına ve tümör oluşumuna sebep olur. Bunun tersi olarak, "onko-mir" olarak ifade edilen bazı miRNA'ların kanserin gelişimini arttırdığı görülmektedir. Bu miRNA'lar bir tümör supresörün baskılanmasını sağlarlar. miRNA'lar, onkogen ve tümör supresör mRNA'ların her ikisini de potansiyel hedef olarak görebilir. Bu yüzden, belirli bir miRNA'nın gerçek fonksiyonu ya TSmiR'in veya onko-miR'in hücresel içeriğine bağlıdır (Cowland ve ark, 2007).

İnsanlar uzun yıllardır, bitkisel ilaçlara, sağlıklı olmak ve sağlıklı yaşamaya doğal yollardan ulaşmak amacıyla merak duymuşlardır. Bu amaçla en çok ve en yaygın olarak kullanılan bitkiler nane, adaçayı, kekik ve ısırgan otudur. Bu bitkiler doğrudan değil ekstraktlar halinde kullanılmaktadır. Dünyanın dikkati alternatif doğal ilaçlar olarak etkili yeni yöntemler bulmaya ve bitkisel ekstraktları kullanmaya odaklanmış durumdadır. Bitkisel ekstraktlar, alkoloidleri, glikozidleri, yağ asitlerini, vitaminleri ve çeşitli reçineleri içermektedir (Li J. ve ark., 2016). Bu çalışmada miR-433'ün kolorektal kanserle ilişkisini araştırmışlardır. miR-433'ü metastatik kolon kanseri 1 (MACC1) kolon kanserli hücrelerden PCR ve Western blotting yöntemi kullanılarak ayırmışlardır. Apoptozu incelemek için akım sitometri ve MTT ölçümleri kullanılarak kolorektal kanser hücrelerini görünür hale getirmişlerdir. Western blot yöntemi ile MACC1 üzerindeki miR-433 düzenleyici mekanizmasına bakmışlardır. Hücre hatlarında ve kolorektal kanser dokularında miR-433 ekspresyonunun azaldığını göstererek kanserli hücrelerin azaldığını kanıtlamışlardır. Bütün bu veriler doğrultusunda miR-433'ün kolorektal kanser hücrelerinde önemli bir rol oynadığını kanıtlamışlardır.

Ye J. ve ark., 2017; Çalışmalarında kolorektal kanser (CRC) hücreleri ve sağlıklı kolorektal hücreleri karşılaştırılarak miR-141'in CRC hücrelerinde daha az düzenlendiği belirlemişlerdir. miR-141'in CRC hücrelerinin hücre yenilenmesini ve hücrelerin yaşamını sürdürebilmesini inhibe edebileceğini düşünmüşler ve bunun ilaç yapımında kullanılabileceğini önermişlerdir. Buna ek olarak bu çalışmada D2 döngüsünü belirlemişler ve bunun miR-141 hedef geni olduğunu bu sayede miR-141'in potansiyel tedavi ajanı olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Bu doğrultuda da uzun yıllardır yararlı etkileri bilinen sentetik ve bitkisel olan antioksidan maddelerin etkileri araştırılmaya başlanmıştır. Bu amaçla kolorektal kanser üzerine *Inula viscosa* L. su ekstresinin kullanılabilirliği araştırılmıştır.

2. MATERYAL ve METOT

Kimyasallar

Bu çalışmada, analitik saflıkta kimyasallar kullanıldı. Hücre kültürü aşamasında Mccoy's Besi yeri, tripsin, fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) kullanıldı. RNA eldesinde QIAzol, kloroform, isopropanol, SYBR Green PCR master mix; miScript Primer Assay, miScript Universal Primer kullanıldı.

Araç ve Gereçler

Bu çalışmada manyetik karıştırıcı, rotary evaporator, su banyosu, inkübatör, santrifüj, invert mikroskop, vortex ve QIAGEN ROTOR GENE Q marka RT-PCR cihazları kullanım talimatlarına göre kullanıldı.

Bu çalışmada, bitki ekstraktının hazırlanmasında kullanılan yöntem seçilirken kanserle ilişkili olduğu öngörülen bitki ekstraksiyon çalışmaları incelendi ve bu bilgiler doğrultusunda çalışmaya en uygun yöntemler belirlendi.

Inula viscosa L. Bitkisinin Ekstraktının Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak *İnula viscosa* çiçeklenme döneminde toprak üstü aksamı ile birlikte Manisa bölgesinden toplanarak güneş ışığına maruz kalmadan oda ısısında laboratuvarda kurutularak değirmende öğütüldü (Şekil 1-2). Öğütülen bitkilerden 1:8 (w/v) oranında distile sui le IKA ultraturrax ile homojenize edildi. Whathman filtre kağıdı ile (No:1) süzülerek 10.000 rpm de 20 dk santrifüj edildi. Elde edilen supernatant çalışmada belirlenen konsantrasyonlarda uygulandı.

Şekil 1. *Inula viscosa* L. bitkisinin toprak üstü aksamı

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ

Şekil 2. *Inula viscosa* L. bitkisinin toplanarak laboratuvarda kurutulması

Hücre Kültürü

Human HCT116 colorectal kanser hücre hattı American Type of Culture Collection (ATCC, Bethesda, MD, USA) CCL-247 LOT: 70009735 satın alındı. Hücreler 2mM L- glutamine, %10 fetal sığır serumu (FBS), 100 unit/mL penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren McCoy's 5A besi yerinde çoğaltılarak 37°C'de, %5'lik CO2 içeren CO2 'li etüvde inkübe edildi.

Hücre Pasajlanması

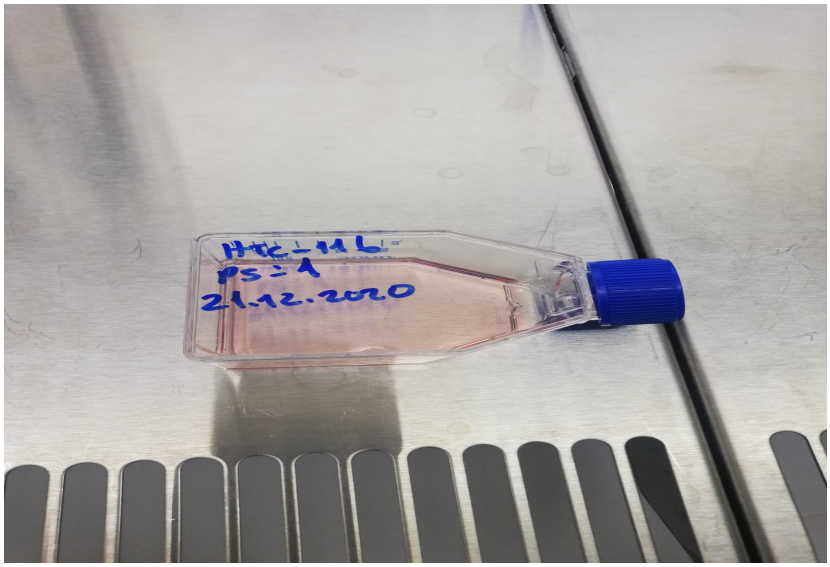
ATCC'den gelen içinde hücre bulunan cryo vial 37°C'ye ayarlı su banyosunda hızlıca sallanarak çözülerek 15 mL'lik falkona aktarılarak üzerine 5 mL besi yeri

eklenerek 1200 rpmde 4 dk santrifüj edildi. Falkonun dibinde hücre içeren pıhtı görülmüştür (Şekil 3).

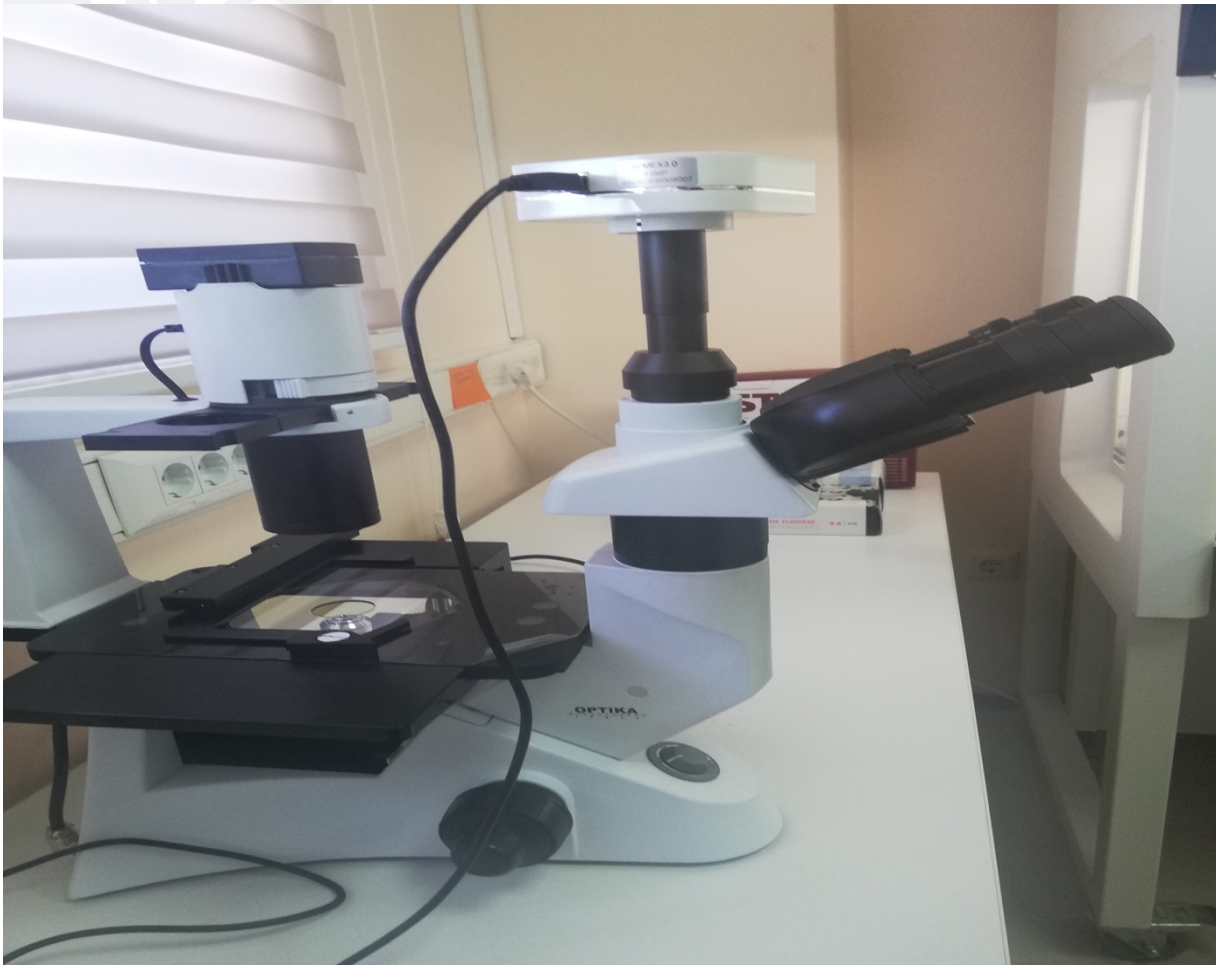
Şekil 3. Santrifüj sonrası falkonun dip kısmında biriken hücrelerin görüntüsü.

Falkonun dibinde bulunan HCT 116 kolorektal kanser hücreleri, boyutu T-25 cm olan hücre kültür flasklarına aktarılarak (Şekil 4) invert mikroskobunda incelenerek (Şekil 5) 37°C'de, %5'lik CO2 içeren CO2 'li etüvde inkübe edildi (Şekil 6).

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ



Şekil 4. Hücre içeren besi yerinin T-25 flaska adlandırılarak konulması.



Şekil 5. Hücrelerin incelendiği invert mikroskop

Şekil 6. Hücrelerin inkübasyona bırakıldığı Co^{2}'li etüv (inkübatör)

Flaskın tabanı %80 olduğu zaman flasktaki besi yeri uzaklaştırıldı. Serumdan hücreleri arındırılmak için PBS kullanıldı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra 2 mL %0.25 tripsin EDTA eklenerek inkübatörde 5 dakika bekletildi. Bu süre sonunda flaska yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı invert mikroskop ile kontrol edilerek flaska hafifçe vurularak hücrelerin tamamen tabandan ayrılması sağlanmıştır. 5mL besi yeri eklenerek 15 mL'lik falkon tüpünün içine alınarak 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve üstte kalan sıvı dökülerek uzaklaştırıldı. Üzerine 1 mL besi yeri eklenerek hafifçe pipetaj yapıldı. Yeni flaska 4 mL besi yeri eklenerek falkondaki hücreli besi yeri flaska aktarıldı. İnvert mikroskopta hücreler takip edilerek CO_2 'li etüvde 24 saat inkübe edildi.

Tripan Mavisi ile Hücre Sayısının Belirlenmesi

Ölü hücreler tripan mavisiyle boyama yönteminde boyanırken, canlı hücrelerin hücre zarları sağlam olduğu için canlı hücreler boya ile boyanmayıp invert mikroskopta

şeffaf görülmektedir. Hücreler flask tabanını %80 oranında kapladıktan sonra hücrelerin besiyeri pipet yardımıyla çekilerek atıldı. Daha sonra flasklar Ca2+ ve Mg2+ içermeyen PBS ile yıkanarak flaskta kalan proteinler uzaklaştırıldı. Flasklarda kalan hücreler % 0.25 tripsin EDTA ile 5 dakika etüvde inkübe edilerek üzerine 4 mL besi yeri eklenerek +4 ^{o}C'de 1200 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek üstte kalan kısım uzaklaştırıldı. Üzerine 1 mL besi yeri eklenerek pipetaj yapıldı. Ependorftan 50 µl hücre süspansiyonu ayrı bir 1.5 ml'lik ependorfa alındı, üzerine aynı hacimde (eşit hacimde olmalı 50 µl) tripan mavisi'nden (%0.4) ilave edilerek homojen hale gelecek şeklide pipetaj yapıldı. 10 µl hücre/tripan mavi karışımı pipetle çekildi ve Thoma lamının tam ortasına damlatıldı. Thoma lamının üzeri hava kabarcığı kalmayacak şekilde lamel ile kapatıldı. Mikroskoba yerleştirilen Thoma lamının sayım çizgileri 40x objectifte mikroskop ile sayıldı. Sadece merkezde çizgilerin keşiştiği 1 mm2 'lik alandaki 16 karenin içindeki maviye boyanmamış canlı hücreler sayıldı (Ölü hücrelerin her tarafı mavidir). Bu işlem 5 defa yapılarak ortalaması alındı. Aşağıdaki formüle göre 1 mL''deki canlı hücre sayısı hesaplandı.

Canlı hücre sayısı (hücre/mL) = Ortalama hücre sayısı x 2 x 10^5

Ortalama hücre sayısı: 5 defa 1 mm^2 'lik alandaki 16 kare sayıldıktan sonra, toplam hücre sayısının 5'e bölünmesiyle elde edilir.

10^5 : her 1 mm^2 alan hacim olarak 0.1 mm^3 'e, bu da 10^5 mL'ye eşit olduğu için, mL'deki hücre sayısını bulmak için 10^5 ile çarpılır.

2: Alınan örnek hacmine eşit miktarda tripan mavisi konulduğu için 2 kat seyreltilmiş olur, bu

nedenle 2 ile çarpılır (Sayım için alınan örnek seyreltildiyse, bulunan sonuç en son seyreltme faktörü ile çarpılır).

Hücre Proliferasyon Analizi

MTT Yöntemi

MTT azalmasına bağlı olarak enzimatik aktivitenin veya formazon boyalarının kolorimetrik ölçümüne dayanan hücre çoğalma miktarının tespit edildiği bir yöntemolan MTT ile herhangi bir terapotik ajanın hücre üzerindeki proliferatif veya sitotoksik etkileri belirlenmektedir. Deneyin kimyasal olarak temeli, MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür]'nin indirgenmesine dayanmaktadır (Şekil 2.4.). MTT'nin belirgin sarı rengi, kimyasal indirgenme sonucunda mavi formazan rengi oluşturmaktadır.

HCT 116 hücre hattı üzerine *Inula viscosa L.* nin sitotoksik etkisi, ticari olarak temin edilen MTT kitinde belirtilen (Abcam ab211091) kullanım talimatına göre uygulandı. Yöntem MTT ajanı ile inkübe edilen hücrelerde meydana gelen renk değişiminin kolorimetrik olarak belirlenmesi prensibine dayanmaktadır. Oluşan renk değişikliği sarı ile renklendirilmiş formazon tuzlarının aktif hücre mitokondrilerinde tetrazolyum tuzunun azalması sonucunda oluşmaktadır. Bu bileşiklerin absorbans değeri metabolik olarak aktivitelerinin belirlenebilmesi ile orantılıdır.

Yapılış Yöntemi;

MTT yönteminin uygulamasından 1 gün önce 96'lık plak içerisine sayımı yapılan 5000 hücre (5000/kuyu) ile 100 µl medyum hazırlandı ve kuyulara ekimi yapıldı. Mikroplak 24 saat 37°C ve %5 CO_2 ayarlı inkübatörde bekletilerek hücrelerin yüzeye yapışmaları sağlandı. Bunun nedeni tripsin enziminin hücre membran proteinleri ve büyüme faktör reseptörleri üzerinde oluşturduğu zararların ortadan kaldırılabilmesi, bu proteinlerin ve büyüme faktörlerinin yeniden sentezlenebilmesi için 24 saatlik bir sürenin gerekmesi ve bu yolla medyum içerisindeki terapotik ajanların hücreyle muamelesinden önce hücrelerin metabolik aktivite kazanmaları da sağlanmaktadır.

24 saatlik inkübasyondan sonra belirlenen konsantrasyonlarda uygulama yapılarak belirlenen süreler sonunda MTT analizi yapıldı (Şekil 7).

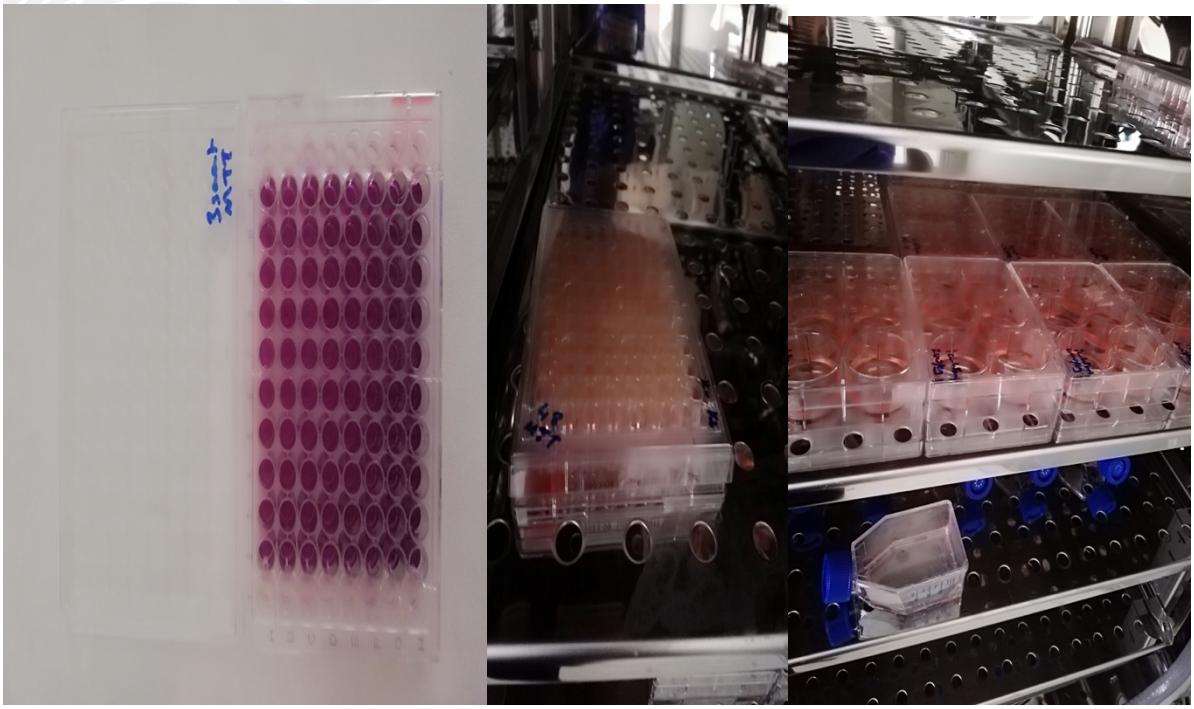
MTT analizi;

1- 96'lık plak kuyucuklarında bulunan medium dikkatli bir şekilde boşaltılır ve serum free 50 µl medium ve 50 µl MTT reagent her kuyucuğa eklenir. 37 ^{0}C'de 3 saat inkübatörde inkübe edildi.

2- Üç saatlik inkübasyonun ardından 150 µl MTT solventinden her kuyucuğa eklendi. Folyo ile sarılarak orbital shaker da 15 dakika karıştırıldı.

3- İnkübasyon sonunda mikroplak okuyucu spektrofotometre (µ-Quant, Epoch BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA) ile 590 nm absorbans değerinde ölçüm yapıldı. Microsoft Excel programı yardımı ile uygulanan doz ve % hücre viabilite eğrisi belirlenerek %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC50) değeri logaritmik eğim grafiği ile hesaplandı.

% Sitotoksisite: 100X(Kontrol-Örnek))/Kontrol



Şekil 7. MTT analizi

Inula viscosa L. su ekstraktının (IVE) hücrelere uygulanması,

Flasklarda 24 saat inkübasyonda bekleyen hücreler aynı işlemler tekrarlanarak hcre peleti elde edildi. 6'lık platelere her kuyucuğa 400.000 hücre olacak şekilde ekim yapılarak bitki ekstraktlarıyla muamele işlemine hazır hale getirildi. Her bitki örneğinden derişimi 100, 200 ve 300 µg/mL olacak şekilde 3, 24 ve 48 saat muamele edilerek RNA izolasyonuna hazır hale getirildi. Bitki ekstraktlarıyla muamele işlemi sırasında her derişim ve saat için ayrı ayrı platelere hücre ekimi yapıldı. Kontrol adını verdiğimiz ve içerisine bitki ekstraktı koymadığımız bir grup oluşturuldu. Bu grup da 3, 24 ,48 saatler için ayrı ayrı hazırlandı. Şekil 8' deki gibi bitki ekstraktları uygulandıktan sonra hücreler mikroskopla incelendi ve renklerinde de gözle görülür bir değişimin olduğu belirlendi.

Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (CDD) Kolorimetrik Apoptoz Tayini

Farklı konsantrasyonlardaki IVE'nin HCT-116 hücrelerinde neden olduğu hücre ölüm tipinin belirlenmesinde kullanıldı. Apoptozun değerlendirmesinde TUNEL boyamayı desteklemek amacıyla ROCHE firmasından proje bütçesi dışında besi yerleriyle birlikte satın alındı. Hücrelerin sitoplazmik lizatlarındaki mono- ve oligo-nükleozom içeriklerini CDD (Cell Death Detection ELISA^{PLUS}) kiti ile karşılaştırarak gruplar arası oransal apoptoz değerlendirmesi yapıldı. Anti-Histon-Biyotin antikoru histon proteinleri üzerinden, apoptoz sırasında oluşan, sitoplazmadaki fragmante DNA parçalarına ve streptavidin kaplı plağa bağlanır. Böylece mono- ve oligo-nükleozomlar plak yüzeyine bağlanır. Anti-DNA-Peroksidaz antikoru ise plağa bağlanan fragmante DNA'ya bağlanır. ABST (2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt) susbstratı aracılığıyla Anti-DNA-Peroksidaz aktivitesi kolorimetrik olarak tayin edilebilir böylece her bir örnekteki mono-, oligo-nükleozom miktarı belirlenmiş olur.

Reaktifler

Anti-Histon-Biyotin, Anti-DNA-PODve Pozitif kontrol: Liyofilizat 450µL bidistile su içerisinde 10 dakika boyunca karıştırılarak çözüldü.

Substrat tamponu, inkübasyon tamponu ve Lizis tamponu: Kullanıma hazırdı.

ABTS tabletleri: Örnek sayısına göre 1 tablet 5mL, 2 tablet 10 mL, 3 tablet 15 mL, substrat tamponu içerisinde çözüldü.

ABTS stop solüsyonu: Solüsyon berrak hale gelene kadar karıştırılarak 37^0C'ye kadar ısıtıldı.

İmmünoreaktifin hazırlanması: İmmünoreaktif, 1:20 hacimde Anti-DNA-POD, 1:20 hacminde Anti-Histon-Biyotin ve 18:20 hacminde inkübasyon tamponunun karıştırılması ile elde edildi. Elde edilen solüsyon deneme öncesi hazırlandıktan sonra tüketildi, saklanmaz.

Deney Protokolü

96'lık platelere tripsinize edilip sayılan hücrelerden her bir kuyucuğa $5x10^3$ 100µL besi yeri ile birlikte ekildi (3 tekerrür yapıldı). 24 saat inkübatörde bekletildi. 24 saat sonunda kuyucuklardaki besi yeri uzaklaştırılıp IVE 100, 200ve 300µg/mL konsantrasyonları uygulandı. 3, 24 ve 48 saat inkübatörde bekletildi. Plate 200g'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Plate dibinde oluşan peletler 200 µL lizis tamponuyla süspanse edilip 30 dk oda sıcaklığında peletlerin erimesi sağlandı. Tekrar plate 200g'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatanttan 20 µL dikkatlice alınıp streptavidin kaplı kitin içinden çıkan plağa plağı sarsmadan aktarıldı. Kitin içinde bulunan pozitif kontrolden 20 şer µL, negatif kontrol (uygulama yapılmayyan HCT116 hücre lizatlarının süpernatanları) ve kör (inkübasyon tamponu) streptavidin kaplı kuyucuklara 20 µL kuyucukların tam ortasına denk gelecek şekilde aktarıldı. Bütün kuyucugklara 80 µL immünoreaktif ilave edilerek plate yapışkan bant ile kapatılarak oda sıcaklığında 300 rpmde shakerda 2 saat karıştırılarak inkübe edildi.

Süre sonunda kuyucuklardaki solüsyon dikkatlice uzaklaştırılarak kuyucuklar 250-300 µL inkübasyon tamponu ile 3 kez yıkanarak solüsyon dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Bütün kuyucuklara 100 µL ABTS solüsyonu eklendi. 10-20 dk 250 rpm shakerda karıştırılarak istenen renk oluşumu sağlandı. Süre sonunda bütün kuyucuklara 100 µL ABTS stop solüsyonu ilave edilerek Epoch BioTek Take3 plate reader ile 405 ve 490 nm dalga boyuna karşı okundu. Negatif kontrolün zenginleşme faktörü 1 olarak kabul edildi. Tüm absorbans değerlerinden körün absorbans değeri çıkartıldı. Örneklerin ortalama absorbans değerleri negatif kontrol hücrelerinden elde edilen ortalama absorbans değerine bölündü. Elde edilen relative absorbans değeri zenginleşme faktörü olarak adlandırılarak her örnekteki mono- ve oligo-nükleozom miktarının kontroldekine oranını ifadesi olarak belirtildi.

Zenginleşme Faktörü (Enrichment Factor)=ABS_{ort}(her bir örnek)/ABS_{or}(kontrol)

TUNEL Metodu

Tunel metodunda (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) amaç apoptozise uğrayan hücreyi tespit edebilmektir. Bu yöntemde apoptozisin ileri evrelerinde olan apoptotik hücrelerdeki nüklear kromatin fragmentasyonu saptanmaktadır. Tunel testi, DNA kırıklarının ucuna polimeraz terminal deoksinükleotidil transferaz eklenerek işaretlenmesi prensibine dayanan bir testtir. Bu test sayesinde apoptotik hücrelerdeki DNA sarmal kırıklarında serbest kalan 3`-OH uçları enzimatik bir reaksiyon ile tespit edilerek apoptozise giden hücrelerin görüntülenmesi sağlanmaktadır (Lockshin ve Zakeri, 2004).

Çalışmamızda *Inula viscosa* L. ekstraktının, HCT 116 kolorektal kanser hücreleri üzerinde apoptotik etkiye sahip olup olmadığı, bu kanser hücrelerini apoptoza yönlendirip yönlendirmediği TUNEL testi ile değerlendirildi. DNA parçalanması ve apoptotik hücre ölümünün belirlenebilmesi için In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) kullanıldı.

Hücrelerin Tünel Boyama için Lamda Üretilmesi

1. Hücre ekimi yapılmadan önce 10 cm çapındaki petri kutularına poly-L-lysine kaplı lamlar (Thermo Fisher Scientific, USA) yerleştirilerek biyogüvenlik kabini içerisinde 4 saat süreyle UV altında sterilize edildi.

2. UV ışık altında steril edilen petrilerdeki lamların üst yüzeylerine 25 cm^2'lik flasklarda çoğaltılan hücrelerden 100 µL (yaklaşık 5000) ekim yapıldı.

3. Co_2'li inkübatörde lam üzerine hücrelerin yapışması için 1 saat bekledikten sonra 10 mL medyum petriye ilave edilip ortalama 24 saat inkübatörde beklendi.

4. Petriler ekstre uygulanan ve kontrol grupları oluşturuldu. Kontrol gruplarına medyum uygulanırken, ekstre gruplarına belirlenen konsantrasyonlarda uygulama yapılarak 3, 24 ve 48 saat inkübasyon uygulandı.

5. İnkübasyon sonunda petri içindeki lamlar alınarak şale içinde PBS ile yıkama işlemi yapıldı.

Fikzasyon İşlemi

PBS ile yıkama işlemi yapılan lamlar şale içerisine konulan (-20°C'de soğutulan) metanol ile 10 dakika tespit edildi. Tespit edilen lamlar tekrar PBS ile yıkandı, kurutuldu ve tünel boyama yapılıncaya kadar lam saklama kutusuna konularak -20°C'de muhafaza edildi.

%0,1'lik Triton-X100 solüsyonu ile 15 dk inkübasyon işleminden sonra tekrar PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Endojen peroksitlerin bloklanması için lam üzerindeki hücreler %3'lük H2O2 solüsyonuda 10 dk nemlendirici kap içerisinde bekletildi. Daha sonra 3 defa 5'er dk PBS ile yıkama işleminin ardından, her bir lamın üzerine yaklaşık 100 µL TUNEL solüsyonu ilave edilerek nemli ortamda 60 dk boyunca 37 °C'de bekleme aşamasına geçildi. Süre sonunda 2 kez 5 dk PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Sonra lamların üzerine 100 µL Converter-POD solüsyonundan

konularak nemli ortamda 30 dk bekletildi. Bu işlemin ardından DAB (Sigma, Germany) ile boyama yapıldı ve art alan boyaması Mayer's hematoksilen ile yapıldı. Apoptotik hücreler ışık mikroskobu (Nikon eclipse i50, Tokyo, Japan) altında incelenerek sayma işlemine geçildi. TUNEL pozitif ve negatif hücreler rastgele seçilen 10 alanda en az 500 hücre sayılarak hesaplandı ve her bir grup için,

Apoptotik İndeks= (apoptotik hücre sayısı/total hücre sayısı) x 100 formülü ile belirlendi (Pourheydar ve ark., 2016).

miRNA ve Toplam RNA Saflaştırması

Hücrelerin Homojenize Edilmesi

1) Hücre örnekleri 300g devirde 15 dakika santrifüj edildi.

2) Üzerlerindeki süpernatant atıldı.

3) Altta kalan hücre peleti üzerine 700 µl QIAzol eklendi.

4) 1 dk Qiagen Tissue Lyser LT de homojenize edildi.

Fazların Ayrılması

1) Homojenize edilen hücreler 5 dakika oda koşullarında bekletildi. 12000 xg devirde 4 ^{0}C'de 15 dakika santrifüj edildi.

6) Üstte kalan pembe kısım atıldı. Altta kalan berrak kısım içerisinde RNA olan kısım olup RNA izolasyon işlemine başlandı.

RNA İzolasyonu

1) Altta kalan sıvı miktarı kadar 100% lük izopropanol eklenerek 10 dakika oda koşullarında bekletildi.

2) 12000 xg devirde 10 dakika 4^{0}C'de santrifüj edildi.

3) Supernatant kısmı ayırdıktan sonra altta kalan RNA her 600 µl QIAzol için 1 mL 75 % lik etanol ile yıkandı.

4) Örneklere vorteks işlemi uygulandıktan sonra 75000 xg devirde 4^{0}C'de 5 dakika santrifüj edildi.

5) RNA içeren örnekler 5-10 dakika vakumdan geçirilecek.

6) RNA örnekleri RNaz içermeyen su ile yıkandı.

2) Her 600 µl QIAzol için 0.2 mL kloroform eklendi.

3) 15 saniye boyunca yavaşça elde çalkalandı.

4) 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

cDNA Eldesi

cDNA eldesi miScript II RT kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

1) 10 x miScript nükleik karışımı ve 5x miScript HiSpec Tamponu veya 5x miScript HiFlex tamponu oda sıcaklığına getirildi (15-25^{0}C). Her karışım tüplere yavaşça vurularak karıştırıldı. Tüpün kenarındaki sıvı artıklarını toplamak için santrifüj edildi ve buzun üzerine alındı.

2) Ters transkript ana karışımı buz üzerinde hazırlandı.

3)Ana karışımı içeren bütün tüplere kalıp RNA eklenerek santrifüj edildi ve buz üzerine alındı.

4) 37^{0}C' de 60 dakika inkübe edildi.

5) Miscript ters transkripsiyon karışımını inaktive etmek için 95^{0}C de 5 dakika inkübe edilerek buz üzerine alındı ve PCR işlemlerine başlandı.

miRNA PCR

miRNA PCR yöntemi için miRNA PCR kiti kullanılacak. Kit içeriğinde ters transkripsiyon ve gerçek zamanlı PCR için gerekli kimyasallar (ters transkripsiyon karışımı, gerekli tamponlar, SYBR Green PCR master karışımı ve RNaz-free su), normalizasyon için PCR kontrolleri ve örnek primerler mevcuttu.

1) Reaksiyon karışımı hazırlandı. PCR karışımına Kalıp cDNA eklendi.
2) Oda sıcaklığında (15-25^0 C) 1000g devirde 1 dakika santrifüj edildi.

Pelletler PCR cihazına yerleştirilerek ve döngü programı başlatıldı.

miRNA PCR Array Data Analizi

Gerçek zamanlı PCR çalışması sonrası QIAGEN veri analiz sitesinden yararlanılarak elde edilen CT değerleri aracılığıyla ΔΔCT metodu ile relatif miktar belirleme yapıldı ve

ekspresyon düzeyleri hesaplandı. Veriler SPSS 22 paket programıyla analiz edildi ve $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak belirlendi.

miRNA'ların ekspresyon düzeyleri 2-ΔΔCt (hedef gen-referans gen) yöntemi kullanılarak hesaplandı (Livak KJ ve ark. 2001).

Yöntemin formülü;

ΔCT = CT(hedef) – CT(referans)

ΔΔCT= [CT(hedef) – CT(referans)]hücre hattı – [CT(hedef) –CT(referans)]kontrol

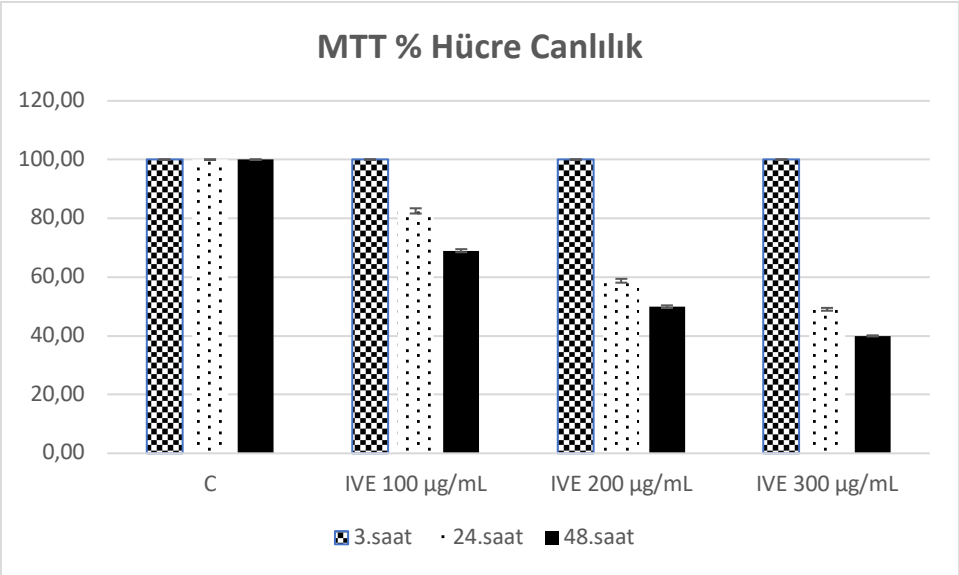
2 -ΔΔCT = Ürün miktarı oranı (ΔCT değeri hedef ve referans genler için belirlenen döngü sayısı farkını ifade etmektedir).

Kantitatif Real Time sonrası elde ettiğimiz veriler Qiagen Gene Globe Data Analysis Center (https://geneglobe.qiagen.com/tr/analyze) analiz programına yüklenerek analiz edilmiştir.

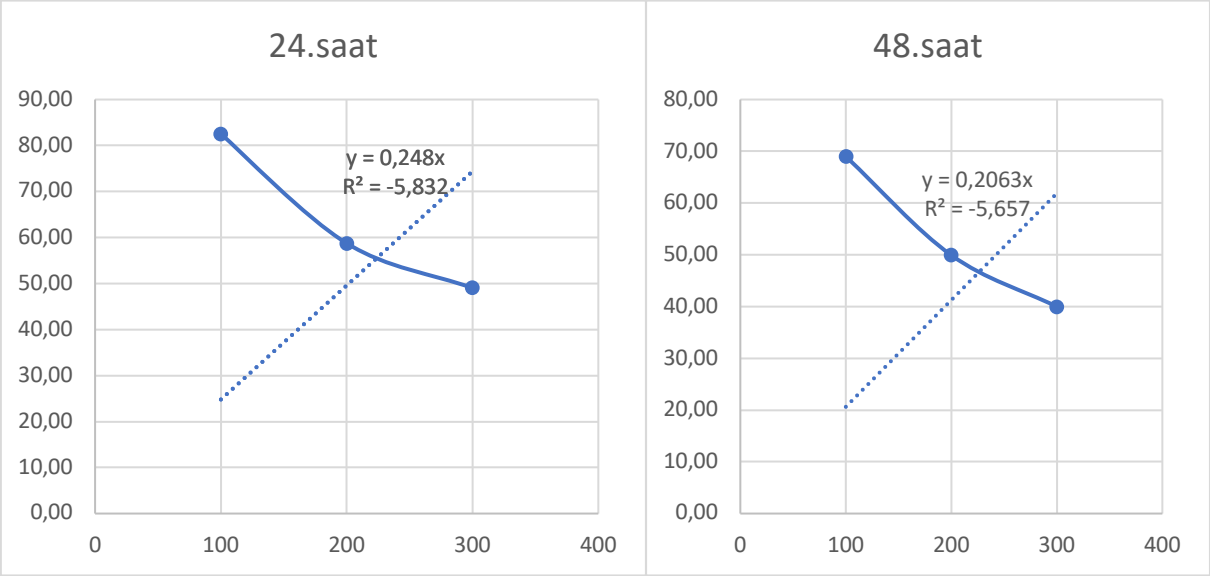
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ

4.BULGULAR

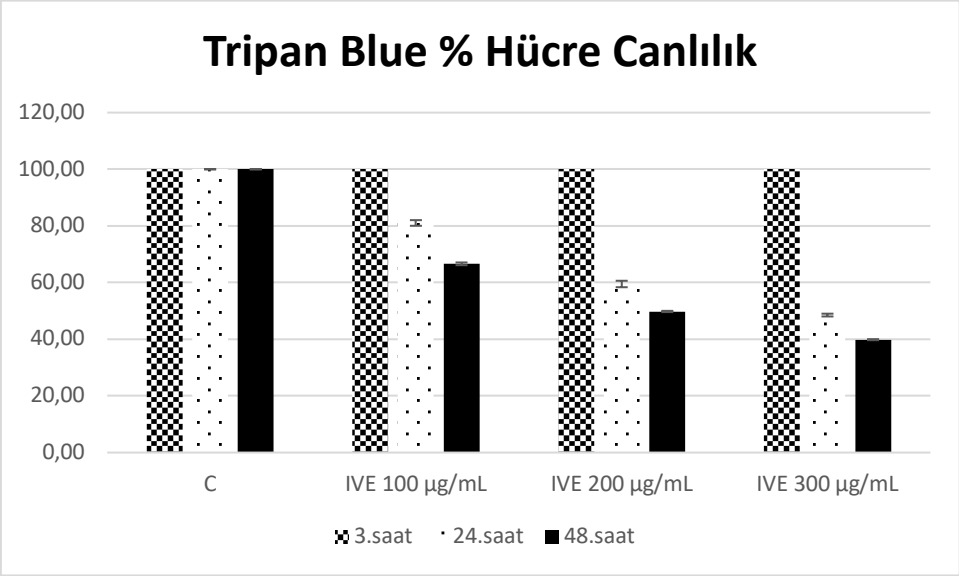
Çalışma sonucunda elde edilen MTT ve Tripan blue canlılık testlerinin verilerinin istatistikleri yapılarak Şekil 8-11'de sunuldu.



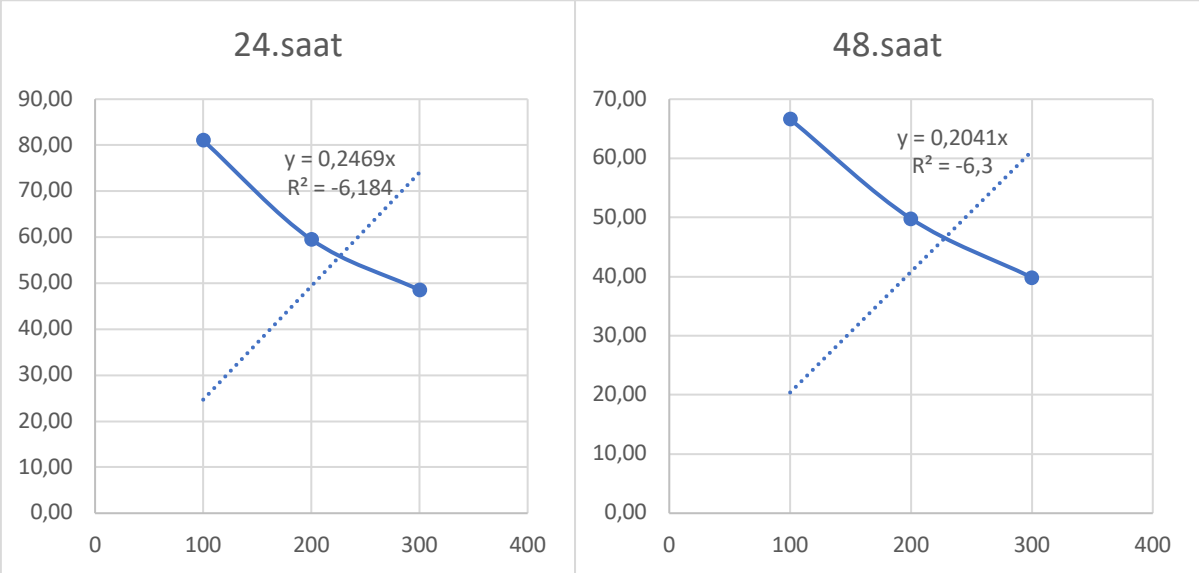
Şekil 8 . IVE'nin 3., 24. ve 48. saatlerde MTT HCT-116 hücrelerindeki apoptotik etkisi



Şekil 9. MTT testi için 24.saat için IC50= 201.61, 48.saat için IC50= 242.37 olarak hesaplandı.



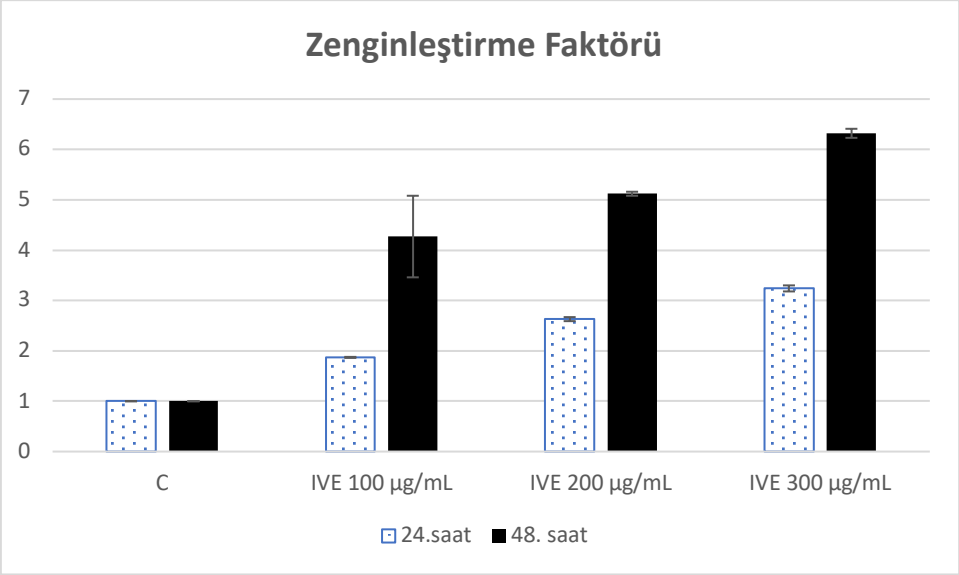
Şekil 10. IVE'nin 3., 24. ve 48. saatlerde Tripan Blue HCT-116 hücrelerindeki apoptotik etkisi



Şekil 11. Tripan Blue testi için 24.saat için IC50= 202.51, 48.saat için IC50= 244.98 olarak hesaplandı.

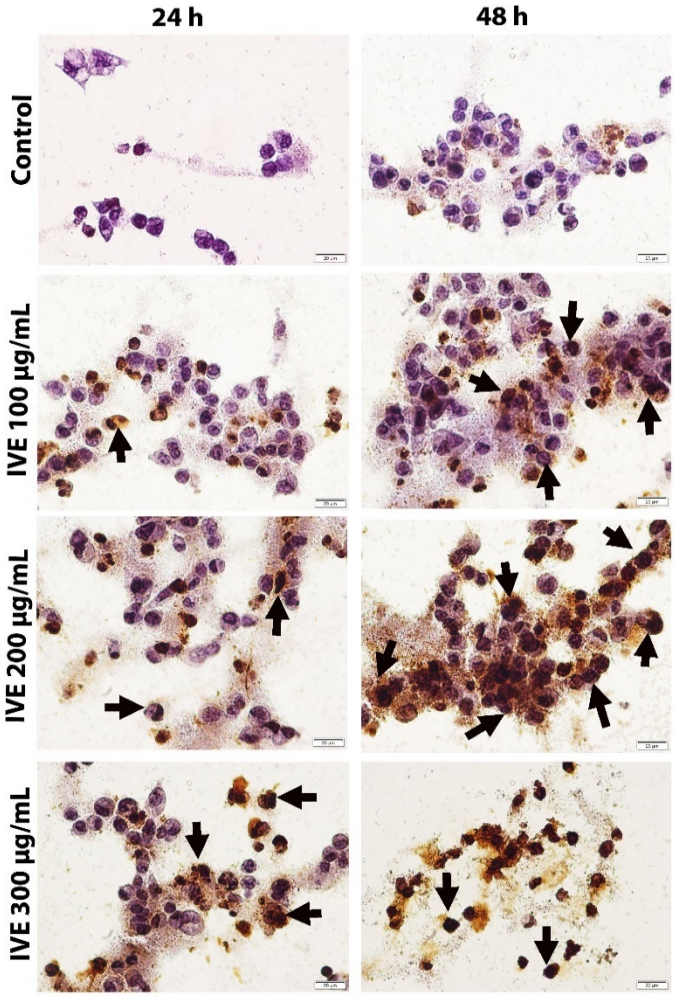
100, 200 ve 300µg/mL IVE ile 24. saatte sırasıyla 1.87, 2.63 ve 3.24 olan zenginleşme faktörü 48. saatte 4.27, 5.12 ve 6.32 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler IVE uygulanan HCT-116 hücrelerindeki mono- ve oligo-nükleozom miktarının kontrol

hücrelerindekine oranını ifade etmektedir. HCT 116 (Kontrol)'ya göre IVE uygulamasının apoptozu tetiklendiği belirlenmiştir. Elde edilen veriler MTT, Tripan Blue canlılık teslerindeki veriler ile TUNEL metodundaki apoptotik indeks ile uyumludur (Şekil 12).

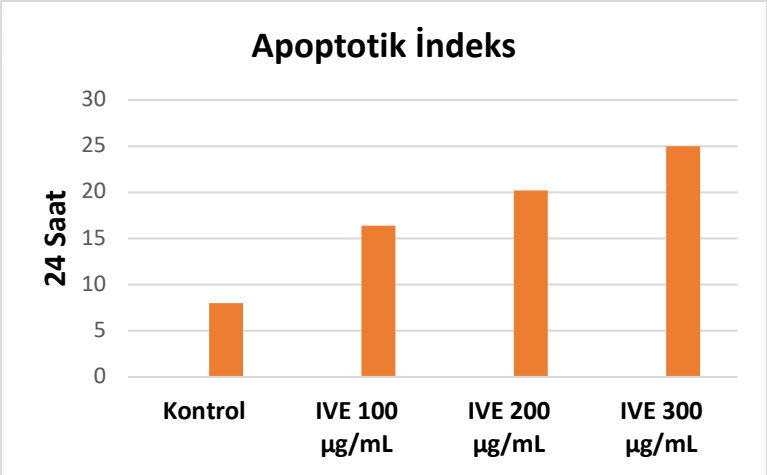


Şekil 12. IVE'nin 24. Ve 48. saatlerde HCT-116 hücrelerindeki apoptotik etkisi.

HCT 116 kolorektal kanser hücre hattına *Inula viscosa* L. ekstraktının farklı dozlarda uygulanması ile meydana gelen apoptotik hücreler TUNEL metodu ile belirlendi. 24 saatlik uygulamalar sonucunda ortalama TUNEL pozitif hücre sayıları kontrol grubunda 4±1.33, IVE 100 µg/mL grubunda 8.2±1.32, IVE 200µg/mL grubunda 10.1±1.2 ve IVE 300 µg/mL grubunda 12.5±1.72 olarak tespit edildi. TUNEL pozitif hücrelerin apoptotik indeksi ise kontrol grubunda %8, IVE 100 grubunda %16.4, IVE 200 grubunda %20.2, IVE 300 grubunda ise %25 olarak belirlendi. Yani *Inula viscosa* L. ekstraktının 24 saatlik uygulamaları sonucunda doza bağımlı olarak apoptotik indekste artışa neden olduğu tespit edildi (Şekil 13-14).

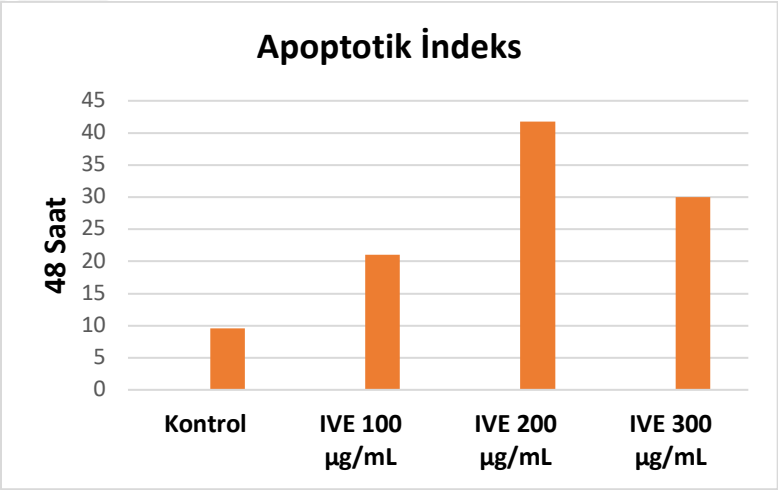


Şekil 13. 24 ve 48 saatlik *Inula viscosa* L. ekstraktı uygulamasının ardından gruplarda gözlenen apoptotik hücre dağılımı. Oklar TUNEL pozitif hücreleri göstermektedir.



Şekil 14. HCT 116 hücrelerinde *Inula viscosa* L. ekstraktının 24 saatlik uygulamalarının ardından gözlenen apoptotik indeks.

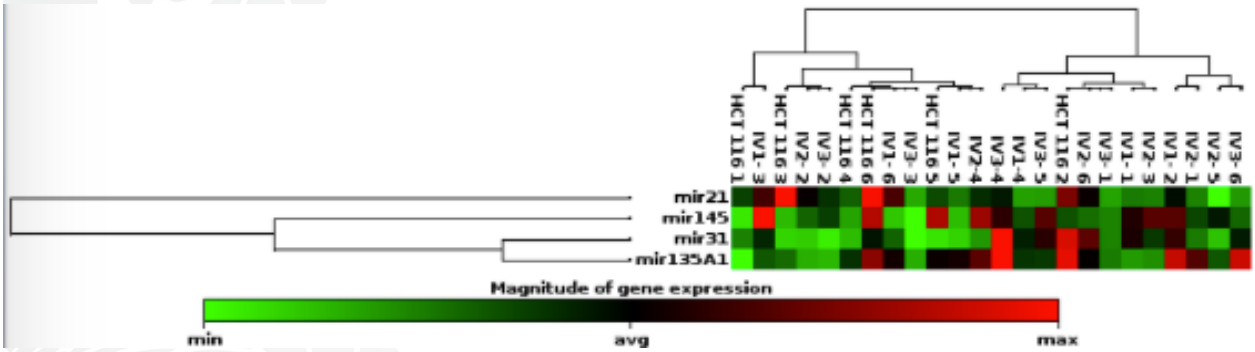
48 saatlik uygulamalar sonucunda ortalama TUNEL pozitif hücre sayıları kontrol grubunda 4.8±1.03, IVE 100 grubunda 10.5±1.78, IVE 200 grubunda 20.9±2.38, IVE 300 grubunda 15±1.83 olarak tespit edildi. TUNEL pozitif hücrelerin apoptotik indeksi ise kontrol grubunda %9.6, IVE 100 grubunda %21, IVE 200 grubunda %41.8, IVE 300 grubunda %30 olarak belirlendi. *Inula viscosa* L. ekstraktının 48 saatlik uygulamaları sonucunda IVE 100 ve IVE 200 gruplarında kontrol grubuna kıyasla apoptotik indekste artışa neden olduğu görüldü. Ancak IVE 300 grubunda *Inula viscosa* L. ekstraktının konsantrasyonundaki artışla orantılı olarak lamdaki hücre sayısında azalmaya neden olduğu ve dolayısıyla apoptotik indekste de bir azalmanın olduğu tespit edildi (Şekil 13, Şekil 15).



Şekil 15. HCT 116 hücrelerinde *Inula viscosa* L. ekstraktının 48 saatlik uygulamalarının ardından gözlenen apoptotik indeks.

Tablo 1. 3.saatte miRNA fold change ifadesi.

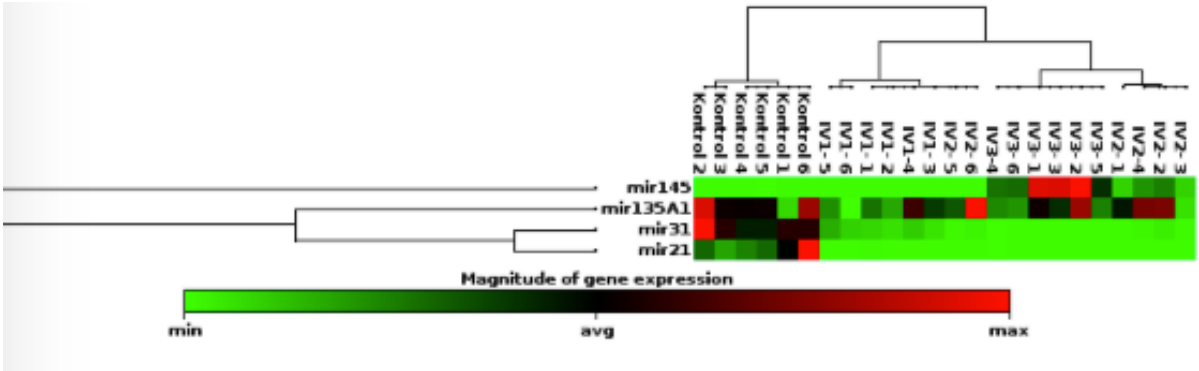
	Group 1		Group 2		Group 3	
	Fold Change	95% CI	Fold Change	95% CI	Fold Change	95% CI
mir31	1.2628	(0.61, 1.91)	1.0246	(0.48, 1.57)	1.0855	(0.35, 1.82)
mir21	0.7492	(0.44, 1.06)	0.6191	(0.31, 0.93)	0.5817	(0.36, 0.80)
mir145	1.2128	(0.22, 2.21)	1.4044	(0.45, 2.36)	0.9908	(0.14, 1.84)
mir135A1	1.1851	(0.19, 2.18)	1.0485	(0.15, 1.95)	1.0281	(0.05, 2.00)
RNU6-6P	1	(1.00, 1.00)	1	(1.00, 1.00)	1	(1.00, 1.00)



Şekil 16. 3.saat clustergram görüntüsü

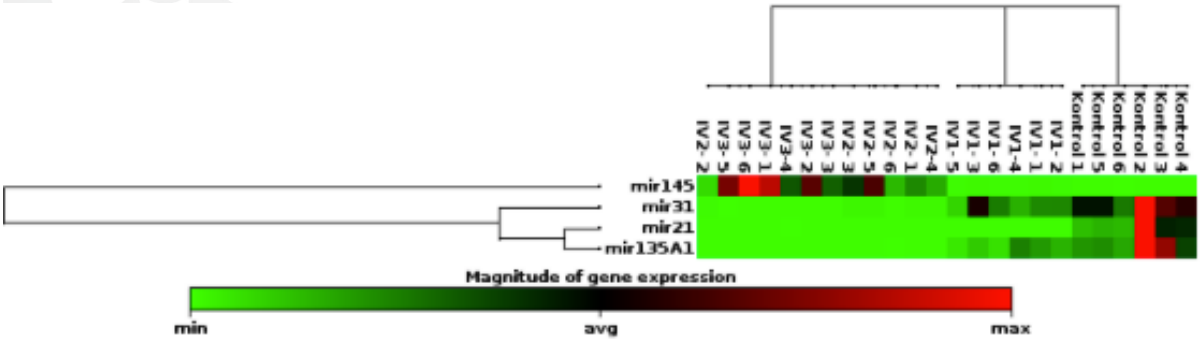
Tablo 2. 24.saatte miRNA fold change ifadesi.

	Group 1		Group 2		Group 3	
	Fold Change	95% CI	Fold Change	95% CI	Fold Change	95% CI
mir31	0.141	(0.08, 0.20)	0.0218	(0.01, 0.03)	0.0037	(0.00, 0.01)
mir21	0.0081	(0.00, 0.01)	0.0004	(0.00, 0.00)	0.0002	(0.00, 0.00) A
mir145	1.0867	(0.32, 1.86)	18.3368	(0.00001, 51.72)	280.1392	(54.41, 505.87)
mir135A1	0.6822	(0.38, 0.98)	0.976	(0.50, 1.45)	0.8409	(0.50, 1.18)
RNU6-6P	1	(1.00, 1.00)	1	(1.00, 1.00)	1	(1.00, 1.00)



Şekil 17. 24.saat clustergram görüntüsü

Şekil 18. 48.saat clustergram görüntüsü



Tablo 3. 48.saatte miRNA fold change ifadesi.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ

	Group 1		Group 2		Group 3	
	Fold Change	95% CI	Fold Change	95% CI	Fold Change	95% CI
mir31	0.4024	(0.16, 0.65)	0.016	(0.01, 0.02)	0.0008	(0.00, 0.00)A
mir21	0.0035	(0.00, 0.01)	0.0005	(0.00, 0.00)	0	(0.00, 0.00)A
mir145	42.4198	(3.48, 81.36)	1282.7284	(0.00001, 2685.28)	3607.2074	(97.57, 7116.85)
mir135A1	0.3039	(0.06, 0.55)	0.0023	(0.00, 0.00)A	0.0025	(0.00, 0.00)A
RNU6-6P	1	(1.00, 1.00)	1	(1.00, 1.00)	1	(1.00, 1.00)

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ

SONUÇ

Kanser hücrelerinin çoğalma, anjiogenez ve apoptozis mekanizmaları tam olarak aydınlatılmadığı için kanserin tedavisi komplike süreçlerden oluşur. Bu çalısmada doza ve zamana bağlı olarak *Inula viscosa* L. su ekstraktının HCT116 kolorektal kanser hücrelerinde apoptozu uyardığı, hücre çoğalmasını ve anjiogenezi baskıladığı, miR21, miR31 ve miR135a1 ekspresyonlarını azalttığı, miR145 ekspresyonunu ise arttırdığı belirlendi. Ayrıca miR-21, miR-31 ve miR-145'in kolorectal kanserde aday biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızdan elde edilen bu olumlu sonuçlar bundan sonra yapılacak çalışmalar için de yol gösterici olabilecektir.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ

Kaynaklar

Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., ve ark, 2001. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci, USA, 99, 15524-15529.

Calin, G.A., Ferracin, M., Cimmino, A., ve ark, 2004. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med, 353, 1793–801.

Çelik, D., Koşar, P., Özçelik, N., 2013. MikroRNA'lar ve Kanser İle İlişkisi. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi, Isparta, 20 (3).

Chan, J.A,. Krichevsky, A. M., Kosik, K.S., 2005. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. Cancer Res, 65, 6029–6033.

Cowland, J.B., Hother, C., Gronbaek, K., 2007. MicroRNAs and cancer. APMIS, 115, 1090–1106.

Hayashita, Y., Osada, H., Tatematsu, Y., ve ark, 2005. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. Cancer Res, 65, 9628–9632.

He, H., Jazdzewski, K., Li, W., ve ark, 2005. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. Proc Natl Acad Sci, USA, 102, 19075–19080.

He, L., Thomson, J. M., Hemann, M. T., ve ark, 2005. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. Nature, 435, 828–833.

Jackson, R.J., 2007. Standart N. How do microRNAs regulate gene expression. Sci STKE. 1:367.

Li, J., Mao, X., Wang, X., 2016. miR-433 reduces cell viability and promotes cell apoptosis by regulating MACC1 in colorectal cancer. Genes Dev, 13(1), 81–88.

Livak KJ, Schmittgen TD., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitive PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods; 25 (4): 402-8.

Lockshin R.A, Zakerı Z.i 2004. Apoptosis, autophagy, and more. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology; 36: 2405-19.

Metzler, M., Wilda, M., Busch, K., ve ark,2004. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. Genes Chromosomes Cancer, 39, 167–169.

Michael, M.Z., O'Connor, S.M., van Holst Pellekaan, N.G., ve ark, 2003. Reduced accumulation of specific mi- croRNAs in colorectal neoplasia. Mol Cancer Res, 1, 882–891.

Murakami, Y., Yasuda, T., Saigo, K., ve ark, 2006. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and nontumorous tissues. Oncogene, 25, 2537–2545.

Pourheydar, B., Soleimani Asl, S., Azimzadeh, M., Rezaei Moghadam, A., Marzban, A., Mehdizadeh, M., 2016. Neuroprotective Effects of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on Bilateral Common Carotid Arteries Occlusion Model of Cerebral Ischemia in Rat. Behavioural Neurology, 2964712.

Quesne, J. L., Caldas, C., 2010. Micro RNAs and breast cancer. Moleculer Oncology, 4, 230-241.

Saydam, F., Değirmenci, İ., Güneş, H. V., 2011. MikroRNA'lar ve kanser. Dicle Tıp Dergisi, 38 (1), 113-120.

Sevli, S., Uzumcu, A., Solak, M., ve ark, 2010. The function microR- NAs, small potent molecules in human prostate cancer. Prostate Cancer, 13, 208-217.

Wijnhoven, B.P., Michael, M.Z., Watson, D.I., 2007. MicroRNAs and cancer. Br J Surg., 94, 23–30.

Ye J., Wang Z., Zhao J., ve ark. 2017. MicroRNA-141 inhibits tumor growth and minimizes therapy resistance in colorectal cancer. Mol Med. Rep., 15(3),1037-1042.

ATATÜRK
ÜNİVERSİTESİ