

**T.C.**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KOMBİNE OLARAK UYGULANAN SİYANİDİN,  
SİSPLATİN VE DAKARBAZİNİN MELANOMA HÜCRELERİ  
ÜZERİNE OLAN ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ**  
**DR. GİZEM KABASAKAL**

**DANIŞMAN**  
**DR. ÖĞR. ÜYESİ MURAT SERKANT ÜNAL**

**DENİZLİ – 2022**

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KOMBİNE OLARAK UYGULANAN SİYANİDİN,  
SİSPLATİN VE DAKARBAZİNİN MELANOMA HÜCRELERİ  
ÜZERİNE OLAN ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ  
DR. GİZEM KABASAKAL**

**DANIŞMAN  
DR. ÖĞR. ÜYESİ MURAT SERKANT ÜNAL**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 18.10.2021 tarih ve 2021TIPF025 nolu kararı ile desteklenmiştir.

**DENİZLİ – 2022**

## TEŞEKKÜR

Pamukkale Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalındaki eğitimim boyunca kıymetli bilgi ve tecrübeleri ile akademik çalışmalarında ve tez sürecimde beni yönlendiren tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi M. Serkant ÜNAL'a,

Uzmanlık eğitimim ve Üremeye Yardımcı Teknikler Eğitimi rotasyonum boyunca değerli emeklerini, katkı ve tecrübelerini benden esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Gülçin METE'ye ve Doç. Dr. Nazlı ÇİL'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca deneyim ve bilgilerini cömertçe paylaşarak ile eğitimime katkı sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Hülya ÇETİN, Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR, Doç. Dr. Nazan KESKİN'e,

Tez deneylerim sırasında desteğini esirgemeyen Mücahit SEÇME, Şiyzen ÇOBAN ve Elif ÖNDER'e ve her aşamada yanımda olan Ayşe Nur DAMAR'a,

Her zaman bir telefon uzağında olan ve desteğini hissettiren canım arkadaşlarım Emine TURAL, Vasfiye ÖZEK ve Ayşe Betül DEMİRCİLER'e,

Tez aşamasındaki katkılarından dolayı hekim arkadaşlarım Fatih ALTINTAŞ ve Mehmet DEMİRCİ'ye,

Asistanlığımın başlangıcından bugüne kadar, COVID saha görevleri ve rotasyonlar dahil olmak üzere, beraber çalışmış olduğum tüm hekim arkadaşlarım ve sağlık çalışanlarına,

Her zaman yanımda olan canım annem Ülfer ve canım babam Burhan KABASAKAL'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Dr. Gizem KABASAKAL

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	III
TEŞEKKÜR .....	IV
İÇİNDEKİLER .....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	IX
TABLolar DİZİNİ .....	XI
ÖZET.....	XII
SUMMARY .....	XIII
GİRİŞ .....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
DERİ.....	3
Deri Embriyolojisi .....	3
<i>Epidermis Embriyolojisi</i> .....	3
<i>Dermis Embriyolojisi</i> .....	4
<i>Deri Ekleri Embriyolojisi</i> .....	4
Deri Anatomisi .....	6
Deri Histolojisi .....	6
<i>Epidermis Histolojisi</i> .....	6
<i>Melanositler</i> .....	7
<i>Dermis Histolojisi</i> .....	8
<i>Deri Ekleri Histolojisi</i> .....	9
MALİGN MELANOMA .....	10
Tanım.....	10
Etiyoloji .....	10
Epidemiyoloji .....	11
Risk Faktörleri.....	11
Sınıflandırma ve Alt Tipler.....	11
Klinik ve Histopatolojik Tanı .....	12
Evreleme .....	13
Tedavi .....	13
SİYANİDİN.....	14
KEMOTERÖPATİK AJANLAR .....	15
Sisplatin .....	15
Dakarbazin.....	15
Melanomada Kemoteröpatik Hedefler.....	16
<i>Hücre Döngüsü Kontrolü</i> .....	16
<i>Apoptotik Yolaklar</i> .....	16
<i>Metastaz Gelişimi Basamakları</i> .....	17
<i>miRNA'ların Rolü</i> .....	18

<b>GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>20</b>
<b>ÇALIŞMALARDA KULLANILAN KİMYASALLAR VE SARF</b>	
<b>MALZEMELERİ.....</b>	<b>20</b>
<b>ÇALIŞMALARDA KULLANILAN CİHAZLAR .....</b>	<b>20</b>
<b>ÇALIŞMALARDA KULLANILAN KİTLER .....</b>	<b>20</b>
<b>A375 HÜCRE HATTININ TEMİNİ VE HÜCRE KÜLTÜRÜ .....</b>	<b>21</b>
<b>XTT TESTİ (HÜCRE CANLILIĞI TESTİ) .....</b>	<b>22</b>
<b>TRİZOL REAGENT İLE TOTAL RNA İZOLASYONU .....</b>	<b>24</b>
<b>cDNA SENTEZİ .....</b>	<b>25</b>
<b>GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU ( RT-</b>	
<b>PCR) .....</b>	<b>26</b>
<b>İNVAZYON KAPASİTESİNİN BELİRLENMESİ (MATRİGEL-</b>	
<b>İNVAZYON TESTİ) .....</b>	<b>28</b>
<b>YARA İYİLEŞME (WOUND HEALİNG) DENEYİ .....</b>	<b>29</b>
<b>TAS VE TOS DENEYİ.....</b>	<b>29</b>
<b>TAS Deneyi.....</b>	<b>29</b>
<i>TAS Deney Prosedürü.....</i>	<b>29</b>
<b>TOS Deneyi .....</b>	<b>30</b>
<i>TOS Deney Prosedürü .....</i>	<b>30</b>
<b>TUNEL TESTİ İLE APOPTOZ TAYİNİ.....</b>	<b>30</b>
<b>VERİLERİN İSTATİSTİKSEL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ..</b>	<b>32</b>
<b>BULGULAR .....</b>	<b>33</b>
<b>XTT TESTİ (HÜCRE CANLILIĞI TESTİ) SONUÇLARI .....</b>	<b>33</b>
<b>TRİZOL REAGENT İLE TOTAL RNA İZOLASYONU SONUÇLARI</b>	
<b>.....</b>	<b>35</b>
<b>GERÇEK-ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-</b>	
<b>PCR) SONUÇLARI .....</b>	<b>36</b>
<b>MATRİGEL İNVAZYON DENEYİ SONUÇLARI .....</b>	<b>38</b>
<b>WOUND HEALİNG DENEYİ SONUÇLARI.....</b>	<b>41</b>
<b>OKSİDATİF STRES DÜZEYİNİN TOTAL OKSİDAN VE TOTAL</b>	
<b>ANTIOKSİDAN SEVİYE ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ İLE</b>	
<b>BELİRLENMESİ.....</b>	<b>42</b>
<b>TUNEL TESTİ İLE APOPTOZ TAYİNİ.....</b>	<b>44</b>
<b>TARTIŞMA .....</b>	<b>47</b>
<b>SONUÇLAR .....</b>	<b>55</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>56</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

IC <sub>50</sub>	: Hücrelerin yarısını öldüren doz
TAS	: Total antioksidan seviye
TOS	: Total oksidan seviye
miRNA	: Mikro ribonükleik asit
MM	: Malign melanoma
DNA	: Deoksiribonükleik asit
UV	: Ultraviyole
MITF	: Mikroftalmi transkripsiyon faktörü
EMU	: Epidermal melanin birimi
UVA	: Ultraviyole A ışık
UVB	: Ultraviyole B ışık
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
AJCC	: Amerikan Kanser Birliği Komitesi
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
C3G	: Siyanidin 3-O-glukozit
BCL-2	: B Hücreli Lenfoma-2
NADPH	: İndirgenmiş nicotinamid adenin dinükleotid fosfat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit
CDK	: Sikline bağımlı kinazlar
TP53, p53	: Tümör Protein 53
BAX	: Bcl-2 ilişkili X apoptoz regülatörü
NF- κB	: Nükleer faktör kappa beta
TIMP	: Matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri
FBS	: Fötal bovin serum
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
XTT	: 2,3-bis(2-methoxy-4 nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide
CO <sub>2</sub>	: Karbondioksit
μM	: Mikromolar

$\mu$ l	: Mikrolitre
nm	: Nanometre
dk	: Dakika
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
ng	: Nanogram
cDNA	: Komplementer DNA
RT-PCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
mRNA	: Mesajcı RNA
Cq	: Eşik değer döngüsü
pmol	: Pikomolar
PBS	: Fosfatlı tamponize serum
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SSC	: Sodyum sitrat tamponu
BSA	: Sığır serum albümini
OSI	: Oksidatif stres indeksi
5-FU	: 5-florourasil

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

<b>Şekil 1.</b> Deri gelişimindeki evreler; A: 4 haftalık, B: 7 haftalık (17). .....	3
<b>Şekil 2.</b> Deri ve eklerinin gelişim evrelerini gösteren çizim (17) .....	5
<b>Şekil 3.</b> Çalışmamızda kullandığımız A375 hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (4X). .....	21
<b>Şekil 4.</b> Siyanidin'in çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi .....	33
<b>Şekil 5.</b> Sisplatin'in çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi .....	34
<b>Şekil 6.</b> Dakarbazin'in çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi. ....	34
<b>Şekil 7.</b> Kombine dozların zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi.....	35
<b>Şekil 8.</b> mRNA genlerinin RT-PCR sonuçları. p-değerlerindeki istatistiksel olarak anlamlı olanlar kırmızı renk ile gösterilmiştir (p değeri <0,05). (Kırmızı renk: Housekeeping gene göre kat değişiminde artış; Mavi Renk: Housekeeping gene göre kat değişiminde azalış; Siyah Renk: Anlamlı olmayan artış ya da azalmayı ifade eder.) .....	36
<b>Şekil 9.</b> miRNA genlerinin RT-PCR sonuçları. p-değerlerindeki istatistiksel olarak anlamlı olanlar kırmızı renk ile gösterilmiştir (p değeri <0,05). (Kırmızı renk: Housekeeping gene göre kat değişiminde artış; Mavi Renk: Housekeeping gene göre kat değişiminde azalış; Siyah Renk: Anlamlı olmayan artış ya da azalmayı ifade eder.) .....	37
<b>Şekil 10.</b> Kontrol grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X) .....	39
<b>Şekil 11.</b> Siyanidin IC <sub>50</sub> grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X) .....	39
<b>Şekil 12.</b> Sisplatin IC <sub>50</sub> grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X) .....	39
<b>Şekil 13.</b> Dakarbazin IC <sub>50</sub> grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X) .....	39



<b>Şekil 14.</b> Siyanidin IC <sub>50</sub> + Sisplatin IC <sub>50</sub> grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X) .....	40
<b>Şekil 15.</b> Siyanidin IC <sub>50</sub> + Dakarbazin IC <sub>50</sub> grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X) .....	40
<b>Şekil 16.</b> Siyanidin IC <sub>50</sub> + Sisplatin IC <sub>50</sub> + Dakarbazin IC <sub>50</sub> grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X).....	40
<b>Şekil 17.</b> Wound healing deneyi 0. Saat sonuçları (4X) .....	41
<b>Şekil 18.</b> Wound healing deneyi 16. Saat sonuçları (4X).....	41
<b>Şekil 19.</b> Wound healing deneyi 24. Saat sonuçları (4X).....	42
<b>Şekil 20.</b> A375 hücrelerinde kontrol grubuna göre kontrol ve doz gruplarında TAS, TOS, OSİ değerleri.....	43
<b>Şekil 21.</b> Kontrol grubuna ait hücrelerin TUNEL boyaması sonrası ışık mikroskop görüntüleri (A. 20X büyütme, B. 40X büyütme).....	44
<b>Şekil 22.</b> Siyanidin IC <sub>50</sub> grubuna ait hücrelerin TUNEL boyaması sonrası ışık mikroskop görüntüleri (A. 20X büyütme, B. 40X büyütme).....	44
<b>Şekil 23.</b> Sisplatin IC <sub>50</sub> grubuna ait hücrelerin TUNEL boyaması sonrası ışık mikroskop görüntüleri (A. 20X büyütme, B. 40X büyütme).....	44
<b>Şekil 24.</b> Dakarbazin IC <sub>50</sub> grubuna ait hücrelerin TUNEL boyaması sonrası ışık mikroskop görüntüleri (A. 20X büyütme, B. 40X büyütme).....	45
<b>Şekil 25.</b> Siyanidin IC <sub>50</sub> + Sisplatin IC <sub>50</sub> grubuna ait hücrelerin TUNEL boyaması sonrası ışık mikroskop görüntüleri (A. 20X büyütme, B. 40X büyütme).....	45
<b>Şekil 26.</b> Siyanidin IC <sub>50</sub> + Dakarbazin IC <sub>50</sub> grubuna ait hücrelerin TUNEL boyaması sonrası ışık mikroskop görüntüleri (A. 20X büyütme, B. 40X büyütme).....	45
<b>Şekil 27.</b> Siyanidin IC <sub>50</sub> + Sisplatin IC <sub>50</sub> + Dakarbazin IC <sub>50</sub> grubuna ait hücrelerin TUNEL boyaması sonrası ışık mikroskop görüntüleri (A. 20X büyütme, B. 40X büyütme). .....	46

## TABLÖLAR DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1</b>	Dünya Sağlık Örgütü'nün 2018 yılı MM sınıflaması (36)..... 12
<b>Tablo 2</b>	RT-PCR'da mRNA için analiz edilen genlerin primer listesi..... 26
<b>Tablo 3</b>	RT-PCR'da miRNA için analiz edilen genlerin primer listesi ..... 27
<b>Tablo 4</b>	RT-PCR Reaksiyon Karışımı..... 28
<b>Tablo 5</b>	Kit Bileşenleri ..... 30
<b>Tablo 6</b>	İzole edilen RNA'lara ait konsantrasyon ve saflık değerleri ..... 35
<b>Tablo 7</b>	A375 hücrelerinde kontrol ve doz gruplarının TAS, TOS ve OSİ değerleri..... 43

## ÖZET

### **Kombine olarak uygulanan siyanidin, sisplatin ve dakarbazinin melanoma hücreleri üzerine olan antiproliferatif etkileri**

Dr. Gizem KABASAKAL

Melanoma, en malign deri kanseridir. Genellikle tedavilere dirençlidir ve ileri evrelerde sağ kalımı oldukça düşüktür. Tedavisi için farklı terapötik yaklaşımlar araştırılmaktadır. Son dönemlerde kombine tedavilere eklenmek üzere kemopreventif maddeler ilgi çekmektedir. Bu çalışmadaki amacımız, kemopreventif özelliği olan siyanidin, sisplatin ve dakarbazinle tekli ve kombine dozlarının, melanomadaki antiproliferatif, antiapoptotik, antioksidan etkilerini in vitro değerlendirmektir.

Çalışmamızda hücre canlılığı testi ile hücrelerin yarısını öldüren dozu (IC<sub>50</sub>) bulduk ve deneylerimizde bu dozları kullandık. Siyanidin ve kombine dozların; proliferasyon, apoptoz, migrasyon ve invazyon süreçlerine etkilerini değerlendirdik. Moleküler düzeyde incelemek için; kontrol ve doz gruplarından RNA izole edip, RT-PCR yöntemi ile mRNA ve miRNA seviyelerini ölçtük. Hücre kültürü düzeyinde incelemek için in vitro koşullarda; matrigel-invazyon, wound-healing ve TUNEL deneylerini yaptık. Oksidatif süreçlere etkisini, total oksidan (TOS) ve total antioksidan (TAS) seviyelerini ölçüp oksidatif stres düzeyini hesaplayarak inceledik.

Bulgularımız siyanidin tek başına ve/veya kombine dozlarda antiproliferatif, apoptotik ve antimetastatik etkinliğini destekler niteliktedir. Özellikle dakarbazinle kombinasyonlarında, dakarbazinin etkisini antiproliferatif ve antimetastatik yönde desteklemiştir.

Siyanidin melanoma için umut vaat eden kemopreventif bir maddedir. Sonuçlarımız yeni araştırmalar için yol gösterici olmakla birlikte, etkinliğinin gösterilmesi ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Siyanidin, malign melanoma, kemoprevensiyon, miRNA

## SUMMARY

### **Antiproliferative effects of combined cyanidin, cisplatin and dacarbazine on melanoma cells**

Dr. Gizem KABASAKAL

Melanoma is the most malignant skin cancer. It is usually resistant to treatments and the survival rate of the disease is very low in advanced stages. Different therapeutic approaches are being investigated for its treatment. Recently, chemopreventive agents have attracted attention to be added to combined treatments. Our aim in this study is to evaluate the antiproliferative, antiapoptotic and antioxidant effects of single and combined doses of cyanidin, which has chemopreventive properties, with cisplatin and dacarbazine in melanoma in vitro.

In our study, we found the dose that killed half of the cells (IC<sub>50</sub>) with the cell viability test and we used these doses in our experiments. Cyanidin and combined doses; We evaluated their effects on proliferation, apoptosis, migration and invasion processes. To examine at the molecular level; we isolated RNA from control and dose groups and measured mRNA and miRNA levels by RT-PCR method. In vitro conditions to study at the cell culture level; we performed matrigel-invasion, wound healing and TUNEL experiments. We examined its effect on oxidative processes by measuring total oxidant (TOS) and total antioxidant (TAS) levels and calculating oxidative stress level.

Our findings support the antiproliferative, apoptotic and antimetastatic efficacy of cyanidin alone and/or in combined doses. Especially in combination with dacarbazine, it supported the effect of dacarbazine in antiproliferative and antimetastatic ways.

Cyanidin is a promising chemopreventive agent for melanoma. Although our results are guiding for new research, further studies are needed to demonstrate its effectiveness.

Key words: cyanidin, malignant melanoma, chemoprevention, miRNA

## GİRİŞ

Melanomalar, melanositlerden kaynaklanan malignitelere (1). Genelde deri olmak üzere; solunum, gastrointestinal ve genitoüriner sistemdeki mukozada da gelişebilirler (1). Melanomalar, en malign deri kanserleridir ve deri kanserine bağlı ölümlerin %80'i ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (2). Melanoma tedavisinde farklı terapötik yaklaşımlar değerlendirilmiştir. Cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, fotodinamik terapi ve immunoterapi gibi tek başına veya kombine tedaviler uygulanmaktadır (3, 4). Kemoterapi, ileri evre (Evre IV) melanoma için standart tedavidir. Dakarbazin, sisplatin, diğer platin bileşikleri ve taksanlar gibi kemoterapötik ajanların tedavideki etkinlikleri sınırlı olmuştur (4).

Modern moleküler çalışmalarla, kanser patogeneğinde birden fazla genin düzensizliği olduğu gösterilmiştir. Oysa hala çoğu ilacın hedefi bir molekül veya tek yolaktır (5). Tek bir gen, protein veya sinyal yolağını hedefleyerek başarıya ulaşmak çok mümkün değildir. Bu doğrultuda kanser için kombinasyon tedavileri geliştirilmeye başlanmış ve bu süreç uzun zaman almıştır. Kombine tedavilerin, ilaçların farklı etki mekanizmalarına ve yan etkilerine sahip olmasına dikkat edilerek seçilmesi önemlidir (6). Uzun süreli sağ kalımda kombine tedavilerin önemi çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Ancak, malign melanoma (MM) tedavisindeki temel sorunlardan biri kemoterapiye direnç gelişmesidir. Direnç mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılammıştır (3). Çeşitli direnç mekanizmalarının oluşmasıyla tedavi etkinliğini azalabilir (7).

Son yıllardaki çalışmalarda doğal bileşiklerin, kanser oluşumu ve progresyonundaki farklı sinyal yollarını ve moleküllerini spesifik olarak hedeflemesi dikkat çekmiştir. Bu bileşiklerin birçoğu in vitro, klinik öncesi ve klinik çalışmalarda tek başına veya bilinen kemoterapötikler ile kombine edilerek denenmiştir (8). Karsinogenez sürecini yavaşlatan, durduran ve hatta süreci geri döndürebilen ilaçlar veya doğal maddeler kemopreventif ajanlar olarak adlandırılırlar (9). Kemoprevensiyona uygun bir ajanın; kanser riskini azaltması, güvenli, etkin maliyetli, iyi tolere edilebilir, kullanımını kolay ve standardize edilmiş olması gerekir (10).

Melanoma kemoprevensiyonu ile hem morbiditeyi azaltma hem de yüksek maliyetleri düşürme sağlanabilir. Melanomada, kemopreventif ajanların potansiyel etki mekanizmaları; foto koruma, apoptozun teşvik edilmesi, anjiyogenezin baskılanması, hasarlı DNA onarımı ve antioksidan, antiproliferatif, anti-inflamatuar, immünomodülatör etkiler şeklinde sıralanabilir (10).

Siyanidinler kemopreventif ajanlar olarak kabul edilmişlerdir (11). Siyanidinlerin çeşitli kanserlerdeki antiproliferatif, antiapoptotik, antioksidan özellikleri çeşitli çalışmalarla aydınlatılmıştır (8). Araştırmalar, siyanidinlerin ve diğer bazı doğal bileşiklerin melanoma patogenezinde önemli bir rolü olabileceğini göstermiştir (12).

Çalışmamızda amacımız A375 melanoma kanser hücrelerinde, siyanidinin etkilerini hücre kültürü ortamında ve moleküler düzeyde araştırmaktır. Sisplatin ve dakarbazinle birlikte tekli ve kombine dozlarla uyguladığımız deneylerde; siyanidinin antiproliferatif, antiapoptotik, antioksidan özelliklerini, yara iyileşmesine ve invazyona olan etkilerini in vitro şartlarda değerlendirdik.

## GENEL BİLGİLER

### DERİ

Deri (kutis, integument) vücudun en büyük organı olup bütün vücut yüzeyini kaplar. Erişkinlerde toplam kütleinin %15-20'si kadar olup yaklaşık 5 kg ağırlığındadır (13). Yüzey alanı 1-2 metrekaredir (14). Derinin birçok fonksiyonu vardır. Dış ortamın etkilerine karşı fiziksel ve mekanik bariyer görevi görür (13, 15). Ultraviyole (UV) ışınların zararlı etkilerine karşı koruyucudur (13). Somatik duyuların algılanmasından sorumludur. Terleme ile vücut sıcaklığı ve elektrolitlerin düzenlenmesini sağlayarak homeostazda rol alır ve boşaltıma yardımcı olur (15). Aynı zamanda immün sistem için de önemli bir organdır. Doğal ve humoral bağışıklıkta aktif rol oynar (13). Salgıladıkları sitokin, büyüme faktörleri ve hormonlara ek olarak örneğin D vitamini metabolizmasındaki rolleri gibi endokrinolojik özellikleri de mevcuttur (15).

### Deri Embriyolojisi

Deri, iki farklı germ yaprağından köken alan 2 tabakadan oluşur (16). Bu tabakalar: epidermis ve dermistir (17). Hipodermis ise dermisin derinlerinde bulunan subkutan dokudur. Makroskopik anatomide subkutan fasya eş değeridir (15). Epidermis ve deri ekleri ektoderm; dermis ve subkutan doku mezoderm kökenlidir (17).

### *Epidermis Embriyolojisi*

Embriyonik gelişimde 3. haftada gerçekleşen gastrulasyon sonrasında, yüzey ektoderminden gelişmeye başlar (Şekil 1A). Yüzey ektodermine 7. haftada iki tabaka ayırt edilmeye başlar. Tek katlı yassı epitel hücreleri üstte periderm tabakasını oluşturur, altta bazal tabaka meydana gelir (Şekil 1B) (17).



**Şekil 1.** Deri gelişimindeki evreler; A: 4 haftalık, B: 7 haftalık (17).

Periderm hücreleri sürekli keratinize olur ve amniyon sıvısına dökülür. Bu süreçte bazalden devamlı yenilenir. Dökülen hücreler, fetal deride “verniks kazeosa” olarak adlandırılan beyaz bir tabaka oluşumuna katılır. Bu tabaka ile yağ bezlerinin salgıladığı sebum; amniyon sıvısındaki idrar, safra ve ölü hücrelerden fetüsü korur. Doğumu kolaylaştırıcı etkisi de mevcuttur. Epidermal çıkıntılar 10. haftada, dermal papillalar şekillenmeye başlar. Stratum korneum 21. haftadan sonra oluşur. Epiderminin tabakaları 4. aydan sonra ayırt edilebilmektedir. Bu tabakalar; yeni hücrelerin yapımından sorumlu stratum germinativum, stratum spinosum, keratohiyalin granüller içeren stratum granulosum, sıkı bağlanmış keratinize stratum korneum tabakasıdır. Yeni hücrelerin yapımını sağlayan stratum germinativum parmak, el avuç içleri ve ayak tabanları yüzeyindeki girintileri ve parmakların oluşumunu sağlar. Bu süreçler üst ekstremitede, alt ekstremiteden daha erken başladığı için el ve ayak parmaklarında boyut farklılıkları meydana gelir (17).

Epiderminin hücreleri; keratinosit, melanositler, Langerhans hücreleri, Merkel hücreleridir. Epidermisteki hücrelerin %90-95’ini keratinositler oluşturur. Keratinosit dışındaki hücreler embriyoda 8-10. haftada görülür (17).

### ***Dermis Embriyolojisi***

Dermis de epidermikle eş zamanlı olarak, hemen altındaki mezoderm kökenli mezenkim dokudan gelişir (Bkz: Şekil 1A ve 1B). Bağ dokusunun çoğu, lateral mezodermin somatik yaprağından, az bir bölümü ise somitlerden farklılaşan dermatomlardan köken alır. Mezenkimal hücrelerde 11. haftada kollajen ve elastik fibrillerin sentezi başlar. Epidermal ve dermal çıkıntılar gözlenir. Oluşan dermal papillalarda epidermis beslenmesini sağlamak üzere kapiller damarlar gelişir. Bazı papillalarda ise duyu sinir sonlanmaları oluşur. Ekstremitelerin gelişimi ile birlikte spinal sinirlerin deri dağılımları gerçekleşir (17).

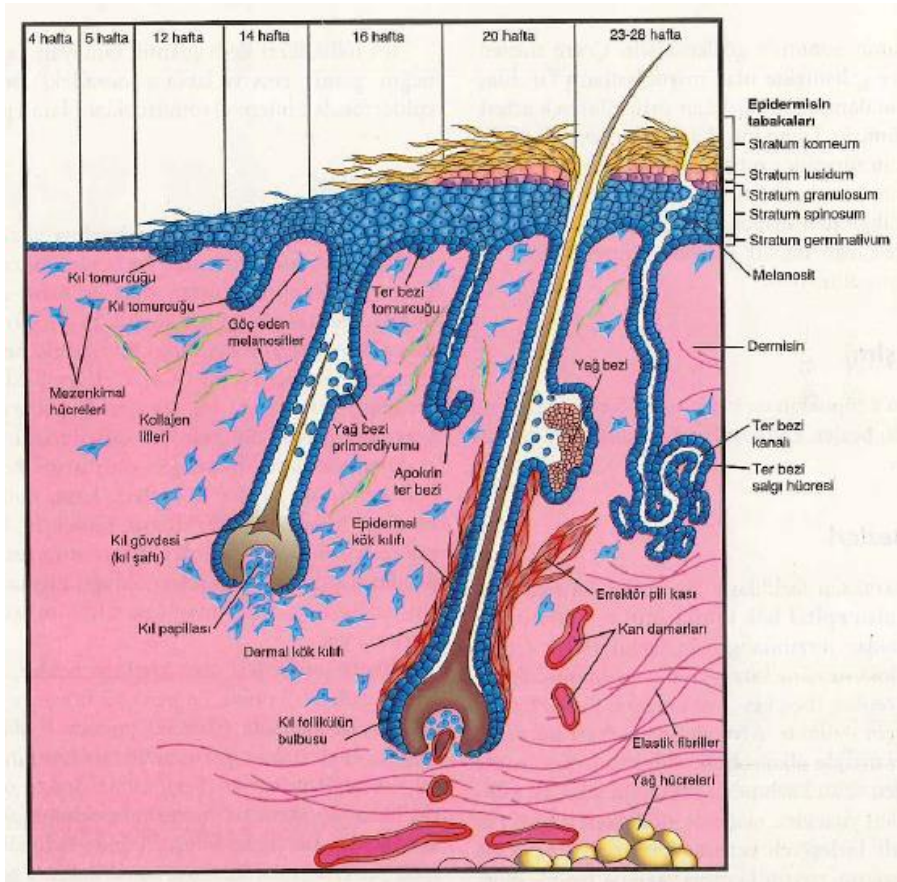
### ***Deri Ekleri Embriyolojisi***

Kıl gelişimi, erken fetal dönemde (9-12. hafta) gelişmeye başlar. Germinatif tabakadan dermise doğru proliferasyon gösterir. Ancak 20. haftaya kadar seçilemezler. Dermisteki terminal uçları invajine olur ve kıl papillası oluşur. Bu papilla mezenkimle doldurulur, daha sonra içinde damar ve sinir yapıları gelişir. Kıl tomurcuğunda; merkezde, keratinize olan çok katlı epitel, kıl gövdesini; periferde, küboidal şekli alan epitelyal kıl kılıfı oluşturur. Dermisteki mezenşimden köken alan düz kas yapısında



erektör pili kası, kök kılıfına yapışır. Kıl tabanındaki epitelyal hücre proliferasyonu, kılı yukarı iter. Fetüsteki ilk kıllar 12. haftanın sonunda belirir. Dudak üstü ve kaş bölgesinde görülen, lanugo kılları adı verilen bu kıllar ince, yumuşak ve açık renklidir. 17.-20. haftada sayıca artmış durumdadır. Ayrıca lanugolar verniks kazeozanın deride tutunmasını sağlar. Lanugo kılları doğumdan sonra dökülür (17, 18).

Yağ ve ter bezleri, epidermisten farklılaşarak dermise doğru gelişmektedir. Yağ bezlerinin genelde kıl foliküllerinin yan kısımlarında tomurcuk halinde oluşmaya başlar. Bu yapılar büyüyerek birkaç alveol ve kanalları oluşturmak için dallanır. Alveol yapılarındaki hücreler salgı maddeleri ile dolar ve dejenere olurlar. Sebum adı verilen bu salgı kıl foliküllerinden deriye ulaşır. Sebum, periderm hücreleri ile verniks kazeoza yapımına katılır. Doğrudan epidermise açılan ter bezleri ise epidermisten dermise proliferen olan tomurcuk yapılarından oluşur. Ekrin tiptedirler. Tomurcuklar şeklinde uzayan glandüler yapılar gelişir, son kısımları salgı yapacaktır. Bezlerin düz kasları da epidermal tomurcuktan gelişir. Ter bezleri 14-16 haftalık embriyoda gelişmeye başlar ve 24 haftaya kadar tamamlanır (17, 19).



Şekil 2. Deri ve eklerinin gelişim evrelerini gösteren çizim (17)

Tırnak, keratinize olmuş bir yapılardır. El ve ayak tırnakları parmakların dorsal ucundan büyür ve 10. haftada gelişmeye başlar. Tırnağın yapısı; proksimal tırnak katlantısı, tırnak matriksi, tırnak yeri, hipokondrium'dan oluşur. Epidermis katlantı yaparak tırnakları sarar. Proksimal kıvrımından gelen hücreler, tırnak alanının üzerine doğru büyür. Keratinize tırnak plağını meydana getirir ve bu ömür boyu sürecektir (17).

### **Deri Anatomisi**

İnsan derisi, kalınlık ve kıl içerme özelliklerine göre farklı başlıklar altında sınıflandırılır. Kalın ve ince deri ayrımı için, epidermis tabakasının kalınlığı dikkate alınır. Kalın deri, avuç içi ve ayak tabanını döşer. Sıkı ve kalın bir stratum korneum bulunur. Bu bölgelerde ter bezleri olmakla birlikte; kıl folikülü, erekör pili kası ve yağ bezleri bulunmaz. İnce deri, vücudun geri kalan kısmının büyük bir bölümünü kaplar. Kıl folikülü, erekör pili kası, yağ ve ter bezlerini içerir (20).

Deri temel olarak, kıl içerme durumuna göre ikiye ayrılır. Avuç içi ve ayak tabanı kıl içermeyen deriden oluşur. Dudak, glans penis, klitoris ve labia minora da kıl içermeyen deri kısımlarıdır. Kılsız deri, kalın deri özellikleri gösterir. Dermiste kapsüllü duyu organlarını içerir. Kıllı deri ise ince deri niteliğinde olup, kapsüllü duyu organları içermez. Kıl folikül boyutu, yapısı ve yoğunluğu farklı vücut alanlarında farklılık gösterir. Saçlı derideki büyük kıl folikülleri deri altı yağ dokuya kadar uzanırken, alın bölgesinde ise küçük vellus kılı üreten foliküller mevcuttur. Orta yaşa kadar kıl folikül sayısı değişmez, ancak terminal kıllar ve vellus kılları arasındaki denge değişir. Yağ bezleri yenidoğanda aktiftir (20).

### **Deri Histolojisi**

#### ***Epidermis Histolojisi***

Epidermis, çok katlı ve keratinize skuamöz epitelden oluşur. Sürekli olarak kendini yenileme özelliği vardır. Bazaldan yüzeye doğru olan bu yenileme sürecinde en üst keratinize tabakanın deskuamasyonu ile epitel kalınlığı sabit tutulur. Epiderminin tabakaları; bazal tabaka (stratum bazale, stratum germinativum), spinöz tabaka (stratum spinosum), granüler tabaka (stratum granulosum, "Prickle" tabaka), korneal tabaka (stratum korneum) olarak temelde dört tanedir. Ancak, avuç içi ve ayak

tabanında; granüler tabaka ile korneal tabaka arasında ek olarak lusidum tabakası (stratum lucidum) olarak adlandırılan şeffaf bir tabaka daha görülür. Epidermiste kan damarları bulunmaz. Kanlanması dermisteki vasküler ağlardan sağlanır (15, 21).

Bazal tabaka, en derin ve dermise en yakın olan tabakadır. Bazofilik sitoplazmalı iri nükleuslu, belirgin nükleollü, kuboidal veya kolumnar hücrelerden oluşur. Melanosit, keratinosit ve kök hücreleri içerir. Melanositlerin, şeffaf sitoplazmalı yuvarlak hücre gövdeleri vardır. Bazal tabaka hücreleri birbirlerine ve diğer keratinositlere desmozomlar ile bağlanırken, bazal tabakaya hemidesmozomlar aracılığı ile tutunur (14, 15).

Spinöz tabaka, dikensi görüntüsü nedeniyle bu ismi almıştır. Bu tabakada; poligonal şekilli, geniş eozinofilik sitoplazmalı, oval veziküler nükleuslu, nükleolleri belirgin keratinositler, Langerhans hücresi, Merkel hücresi, melanosit ve Meissner cisimcikleri bulunur. Hücreler arasında desmozom tipi bağlantılar mevcuttur. Desmozomların transmembranöz bileşenlerini desmoglein, desmokollin; sitoplazmik bileşenlerini desmoplakin, plakogloblin ve plakofilin oluşturur. Langerhans hücreleri, monosit kökenli hücrelerdir ve antijen sunarlar. Merkel hücreleri mekanoreseptör hücreleridir. Hafif dokunmaya duyusundan sorumludurlar. Oldukça duyarlı deri bölgesi olan parmak uçlarında ve bazı kıl folikülü bazalinde yoğunlaşır (14, 15).

Granüloz tabaka, yoğun, oval ve bazofilik, lipid açısından zengin keratohyalin granüller içeren keratinosit katmanları içerir. Keratinositlerde temel proteinler sentezlenir ve keratohyalin granüllerinde depolanır. Deri bütünlüğünde görevli bu proteinler, hücrel maturasyonla korneal tabakaya geçerken bariyer yapılarında görev alacaklardır (14, 15).

Lusidum tabakası, sadece ayak tabanlarının ve avuç içlerinin kalın derisinde bulunur ve ince homojen bir eozinofilik bölge ile karakterizedir (21).

Korneal tabaka, granüler tabaka hücrelerin, maturasyonla nükleus ve hücre organellerini kaybederek, keratin filamentleri ile korneum tabaka hücrelerine dönüşmesiyle oluşur. Bu keratinize tabaka epidermisen en dış tabakasıdır (14, 15).

### ***Melanositler***

Melanositler ektoderm germ tabakasından farklılaşan nöral krista kökenli olup, deriye rengini veren hücrelerdir (1). Deride epidermis ve saç foliküllerinde bulunurlar (15). Melanositler embriyonik göç sırasında iç kulak, göz, kalp, yağ doku ve beyin gibi

bazı organlara da yerleşirler. Embriyonik deride, nöral krestten hücre göçü sonrasındaki 40-50. günlerde melanositlerin ortaya çıktığı belirlenmiştir (18).

Erken melanoblastlar için mikroftalmi transkripsiyon faktörü (MITF) ve Sox10 belirteç olarak kullanılır. MITF, melanositik fenotipin ana düzenleyicisidir. Embriyogenezi takiben, melanoblast epidermal bazal tabakaya göç eder. Bu hücreler kendini yenileyen kök hücrelerdir. Unipotent melanoblastlardan, transkripsiyon faktörü Sox10 ve diğer faktörlerin kontrolüyle MITF aktive edilir ve melanositler üretilir. Farklılaşmış melanositler yaklaşık 4-10 haftalık fetal hayatta ortaya çıkarlar. Bu aşamadaki önemli gen ekspresyonlarından bazıları HOX ve WNT lokuslarıdır. Gestasyonun ikinci ayının sonunda epidermiste yerleşirler. Melanin üretimi ilk önce göz kapaklarında, dış kulak yolunda ve dudak mukozasında başlar. 3. ve 5. aylara kadar melanosit sayısı yaklaşık üç kat artar ve fetüste deri pigment sentezi başlar (22).

Melanositlerde, golgi aygıtından köken alan lizozom benzeri, melanozom adı verilen özel organeller bulunur. Melanozomlar melanin üretilmesi için gereken özel enzimleri içerir. Bu organellerin çevre keratinositlere aktarılmasıyla deri pigmentasyonu gerçekleştirilir (23). Melanositler ve dentritleriyle bağlantı kurdukları 30-40 adet keratinosit epidermal melanin birimi (EMU) olarak adlandırılır. Epidermin bütünlüğünü korumak ve pigmentasyonu sağlamak için EMU'lar çok önemlidir (24).

Deri pigmentasyonu için melaninin melanozomlarda üretimi, keratinositlere transferi ve işlenmesi süreçleri tamamlanmalıdır (25). Melanin sentezi, ilk ve en önemli basamak olan tirozinin tirozinaz enzimiyle L-DOPA'ya dönüşmesiyle başlar. Bir dizi reaksiyon sonucunda kahverengi-siyah, çözünmeyen ömelanin ve sarımsı, alkali, çözünür olan feomelanin oluşur (26). Melanin pigmenti UV ışınlarının potansiyel toksik ve karsinojenik etkilerinden korunmayı sağlar (27).

Melanositler anatomik dağılımları, klinik özellikleri, histopatolojileri ile çeşitli benign ve malign neoplazmalara yol açabilirler (28).

### ***Dermis Histolojisi***

Dermis, epidermisi destekleyen bağ dokusu tabakasıdır. Aynı zamanda subkutan dokuya (hipodermis) bağlar. Dermis kalınlığı, çeşitli bölgelerinde farklılıklar gösterir. Sırtta 4 mm'ye ulaşarak maksimum kalınlıktadır. Dermiste elastik liflerin sayısı ve dizilimi bölgesel farklılık gösterir. Örneğin, perianal deride daha fazlayken, skrotumda

elastik lif yoktur. Dermis papillar ve retiküler dermis olmak üzere iki tabakadan oluşur (15, 21).

Epidermin hemen altındaki papillar dermis tabakasının, yüzeyi oldukça düzensizdir. Epidermal çıkıntı ve girintilere (reteler) sahip olan bu tabaka epidermisteki keratinositlerin beslenmesini sağlar. Bu tabaka tip I, tip III kollajen ve ince elastik lif ağdan zengin gevşek bağ dokudur. Ayrıca, yoğun ekstraselüler matriks, fibroblastlar, mast hücreleri, dendritik hücreler, yüzeysel arteriyel ve venöz kapiller ağ içerir. Dermoepidermal bileşkedeki hemidesmozomal bağlayıcı filamentlerin sayısı bölgesel farklılık gösterir. Örneğin bacaklardaki sayısı kollardakilerden daha fazladır (14, 15).

Retiküler dermis, papiller dermise göre daha kalındır. Çoğunlukla tip I kollajenden oluşur. Birbirine paralel dizilen, yoğun düzensiz bağ dokudan oluşur. Kalın elastik liflerden oluşan lif ağı mevcuttur. Bu ağ ile deriye elastikiyet sağlar (14).

Deri altı doku, hipodermis veya subkutan doku olarak adlandırılır. Lobüllere ayrılmış olup içeri yağdan zengin olgun adipositlerden oluşur. (14)

Deriyi besleyen arterler, hipodermisin altındadır. Arterlerden gelen dallar dermise kadar çıkarak, derin ve yüzeysel bir pleksus olmak üzere iki ark oluştururlar. Yüzeysel subpapiller pleksus, papiller ve retiküler dermisin arasında bulunur. Dermal papillardaki zengin kılcal damar ağını besler. Deri, bu pleksusun venüllerinde görülen kandan dolayı pembe renkte görülür. Derin kutanöz pleksus ise retiküler dermis ve hipodermis arasındadır. Hipodermisin yağ dokusunu ve kıl foliküllerini, yağ ve ter bezleri dahil dermisin daha derin kısımlarını besler. Deri lenfatikleri de venüllere eşlik eder. Sinir demetleri, hipodermis ve derin retiküler dermiste görülür. Daha küçük sinir lifleri papiller dermise kadar ulaşabilirler ve tüm deri boyunca mevcuttur (15).

Avuç içi ve ayak tabanında, duyardan sorumlu bazı özelleşmiş sinir sonlanmaları bulunur. Meissner cisimcikleri, papiller dermiste izlenen, dokunma duyusu için hızlı mekanik reseptördürler. Derin basınç ve titreşim duyusu reseptörü Pacini cisimcikleri, derin dermis ve hipodermis yerleşimlidirler (15, 21).

### ***Deri Ekleri Histolojisi***

Pilar ünite; kıl folikülü, yağ bezi, erekteör pili kası ve varsa ter bezlerinden oluşur. Kılılı deri bölgeleri değişken miktarda kıl içerir. Kozmetik özellikler dışında; kılların ısısı düzenlenmesi, dokunma hissi ve UV koruma gibi görevleri vardır. Kıl folikülü bağ

dokudan, dermal kılıf (bazal lamina) ile ayrılır. Kıl folikülü; infundibulum, istmus ve inferior segment bölümlerinden oluşur (29).

Yağ bezleri, avuç içi ve ayak tabanı dışında tüm deri bölgelerinde bulunur. Kıl folikülüyle ilişkili holokrin bezlerdir. Özellikle yüz bölgesinde; bukkal mukoza, dudakta vermilion sınırında (Fordyce spotu) yoğun olarak görülür. Meme başını çevreleyen areola bölgesi (Montgomery tüberkülü) ve labia minörde de görülür. Baş boyun bölgesinde birkaç asinüsün birleşmesiyle lobül şeklindedir, göğüs bölgesinde ise tek asinüsten oluşur. Yağ bezinin periferi küboidal, iri nükleuslu, bazofilik sitoplazmalı, lipid damlacığı içermeyen germinatif hücrelerden oluşur. Merkeze doğru vakuol içeren sitoplazmalı hücreler olan sebositler yer alır.

Gerçek ter bezleri ekrin yapıdadır ve ısı düzenlemesinden sorumludur. Avuç içi, ayak tabanı, alın ve aksillada daha fazla miktarlarda olmakla birlikte tüm deri bölgelerinde bulunurlar. Histolojik olarak lümeni olan kıvrımlı duktuslardır, çift sıra kuboidal epitelle döşelidir. Lümendeki hücreler yuvarlak nükleuslu, granüler ve eozinofilik sitoplazmalı özellikleriyle ayrılırlar. Miyoepitelyal hücreler bulunmaz. Apokrin bezler özel bir kokuları olan dallı alveoler bezlerdir. Yağ bezleri gibi kıl foliküllerine açılırlar. Koltuk altı, meme ucu, genital bölgelerde bulunurlar (13-15).

## **MALİGN MELANOMA**

### **Tanım**

Malign melanoma (MM), melanositlerden kaynaklanan malign kanserlerdir (1). Çoğu deri kaynaklı olmakla birlikte, solunum, gastrointestinal ve genitoüriner sistemindeki mukozada da gelişebilirler (30).

### **Etiyoloji**

Melaninlerin görevi UV ışınlarından korumaktır fakat sağlıksız işleyen süreçlerde, UV radyasyonu DNA'ya doğrudan zarar verebilir. Bu hasar normal şartlarda DNA onarım mekanizmaları tarafından onarılabılır ancak genetik veya çevre kaynaklı sebeplerle bu basamakta yaşanan sorunlar malignite oluşumuna yol açabilir (13).

## **Epidemiyoloji**

Melanoma insidansı tüm dünyada hızla artmaktadır. İnsidans artışında; yaşlanan nüfus, toplumsal alışkanlıklar ile iklimsel ve çevresel koşulların değişimleri dahil birçok etmen vardır (31).

2020'de Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından yayınlanan 'Küresel Kanser İstatistikleri 2020: 185 Ülkedeki 36 Kanser İçin Dünya Çapında İnsidans ve Mortalite GLOBOCAN Tahminleri'ne göre MM yeni vaka sayısı 324,635 (tüm kanserlerin %1.7si) ve ölüm sayısı 57,043 (tüm kanserlerin %0.6sı) olarak raporlanmıştır (32). MM kadınlarda ve erkeklerde oldukça sık görülen bir malignitedir (33). Amerika'da her iki cinsiyette de en sık görülen 5. kanserdir (32).

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nün 2017 yılında yayınladığı 'Türkiye Kanser İstatistikleri' raporuna göre 2017'de 687 kişiye yeni tanı koyulmuştur. Görülme sıklığı erkeklerde 1,7/100.000 ve kadınlarda 0,4/100.000 olarak raporlanmıştır (34).

MM'nin derideki lokalizasyonu cinsiyete ve toplumlara göre farklılık göstermektedir. Beyaz ırkta erkeklerde en sık sırt ve omuz bölgesinde, kadınlarda ise en sık alt ekstremitelerde ortaya çıkmaktadır. Avustralyalı kadın ve erkeklerde en sık baş ve boyun bölgesinden gelişmektedir. Deride, birim alanda MM gelişimi riski en yüksek bölge, her iki cinsiyette de yüzdür (35).

MM mortalitesi oldukça yüksektir. Deri kanserlerinin %1-4'ü MM olmakla birlikte deri kanserine bağlı ölümlerin %80'i ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (2).

## **Risk Faktörleri**

MM gelişiminde çevresel ve genetik faktörlerin etkileri mevcuttur. Hastaların %5 ile %10'unda aile öyküsü pozitifdir. Açık renk göz, saç, ten rengi, kolay çillenme gibi fenotipik özellikler MM riskini artırır. En önemli risk faktörü yüksek UVB ve UVA radyasyonu maruziyetidir, solaryum kullanımı da MM riskini oldukça artırır. Benign veya displastik melanositik nevüs ve immünosupresif durumların varlığı da olası risk faktörlerindedir (1, 27).

## **Sınıflandırma ve Alt Tipler**

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2018 yılında yayınladığı MM sınıflandırması Tablo 1'de verilmiştir (36).

**Tablo 1: Dünya Sağlık Örgütü'nün 2018 yılı MM sınıflaması (36)**

ULTRAVİYOLE HASARININ DERECEŚİ	ALT TİPLER
Düşük kümülatif güneş hasarı sonucu deride görülen melanomalar	Yüzeyel yayılan malign melanoma
Yüksek kümülatif güneş hasarı sonucu deride görülen melanomalar	Lentigo malign melanoma
	Dezmoplastik malign melanoma
Güneş maruziyeti olmadan veya etiyojisinde güneş maruziyetinin var olup olmadığı bilinmeyen melanomalar	Malign spitz tümör (Spitz melanoma)
	Akral lentiginöz malign melanoma
	Mukozal malign melanoma
	Konjenital nevüs zemininde gelişen malign melanoma
	Blue nevüs zemininde gelişen malign melanoma
	Uveal malign melanoma
Değişken güneş maruziyeti	Nodüler malign melanoma
	Nevoid malign melanoma

### **Klinik ve Histopatolojik Tanı**

Erken tanı, MM'de sağ kalımı artırmak açısından çok önemlidir. Klinik tanıda, dermoskopik bakı ile muayenede bir standart yakalayabilmek için MM'e spesifik ABCDE kriterleri oluşturulmuştur.

Bu kriterler;

- A (Asymetry): Lezyonun bir yarısının diğer tarafının ayna görüntüsü olmaması
- B (Border irregularity): Lezyon sınırlarında düzensizlik
- C (Colour): Homojen olmayan, birden fazla renk değişikliği
- D (Diameter): Lezyon çapının 6 mm'den büyük olması
- E (Evolution): Var olan lezyonun boyut, şekil ve renk gibi özelliklerinde değişiklik göstermesi

'ABCD' kriterlerini karşılamayan, klinik olarak daha agresif seyirli olan nodüler melanomalarda 'EFG (elevated, firm, growing)' kriterleri eklenmiştir. Tümsek, sert ve son 1 ay içinde büyüme gösteren lezyonlar da klinikte melanoma şüphesiyle değerlendirilmelidir (37, 38).



Klinik şüphenin ardından histopatolojik incelemeyle tanı konur. MM tanısındaki önemli temel histolojik ve sitolojik özellikleri; epidermiste melanositik komponentin iyi sınırlanmamış olması, tümör tabanının net olmaması, lenfositlerin asimetrik dağılımı, intraepidermal melanosit yerleşimlerinin asimetrik olması, değişik büyüklükte melanosit varlığı, bazı melanositlerin birbiriyle birleşmesi, melanositlerin matürasyonunda bozulma ve sitomorfolojik olarak pleomorfik nükleuslu, belirgin eozinofilik nükleollü atipik veya nekrotik melanositlerin varlığı şeklinde sıralayabiliriz (39).

### **Evreleme**

TNM sınıflamasına göre yapılır. T boyut, N lenf nodu metastazı ve M uzak metastazı temsil eder. Geçerli olan evreleme sistemi Amerikan Kanser Birliği Komitesi (AJCC) tarafından 2018 yılında (8. Baskı) güncellenmiştir. Metastaz varlığında, boyuta ve lenf nodu durumuna bakılmaksızın, ileri evre (Evre IV) kabul edilir (40).

### **Tedavi**

MM tedavisinde farklı terapötik yaklaşımlar değerlendirilmiştir. Cerrahi, kriyocerrahi (41), kemoterapi, radyoterapi, fotodinamik terapi (4), immunoterapi (3), biyokemoterapi ve hedefe yönelik tedavi (7) gibi tedaviler tek başına veya kombine olarak uygulanmaktadır. Erken evrelerdeki (Evre I-IIIb) hastalar için cerrahi ilk tedavidir (7). Kemoterapi, ileri evre (Evre IV) melanoma için standart tedavidir (4). Dakarbazin, ilk Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayı alan ve yaygın kullanılan kemoterapötik ajandır. FDA tarafından ilerleyen yıllarda; interferon  $\alpha$ -2b, interlökin-2, ontak, seçici inhibitörler, antikörler ve kombine hedefli tedaviler de onaylanmıştır (7). Dakarbazin, platin bileşikleri (sisplatin, karboplatin) ve taksanlar (paklitaksel, doketaksel) gibi kemoterapötik ajanların tedavideki etkinlikleri sınırlı olmuştu (4). MM için farklı tedavi protokolleri mevcuttur, ancak çoklu ilaç direnci, deri ve gastrointestinal toksisitesi oluşturan yan etkiler ciddi bir sorundur. Bu da tedavinin başarı oranlarını düşürmektedir (7).

## SIYANİDİN

Flavonoidler, 5000'den fazla üyesi olan polifenolik bileşiklerdir (42). Antosiyaninler, flavonoidlerin büyük bir grubudur (43). Antosiyaninlerin glikozile veya aglikon formları antosiyanidinler olarak bilinir (44). En yaygın antosiyanidinler; siyanidin, delphinidin, malvidin, peonidin, petunidin ve pelargonidindir (45). Doğada en çok siyanidin 3-O-glukozit (C3G) ve siyanidin 3-O-rutinosit formunda bulunurlar (44).

Siyanidinlerin doğal kaynakları kırmızı-mor meyve ve sebzelerdir (43). Işığı absorbe eden bu pigmentler sayesinde bitkiler, UV ışınlarının oluşturduğu hasardan ve soğuk stresinden korunabilirler. Bu bileşiklerin antikanserojen, antialerjik, antiinflamatuvar, antifungal, antiviral ve antioksidan fonksiyonları çeşitli çalışmalarla gözlenmiştir (42). Farklı çalışmalarda; antiproliferatif etkileri ve reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini azaltabildiği gösterilmiştir (43). Bu nedenle, kemopreventif ajanlar olarak kabul edilmişlerdir (11). Kemoprevensiyon, karsinogenez sürecini yavaşlatmak, durdurmak ve hatta süreci geri döndürmek için ilaçların veya doğal maddelerin kullanılmasıdır (9).

Siyanidinlerin çeşitli çalışmalarla melanoma hücreleri üzerindeki anti-proliferatif, apoptoza etkileri ve metastatik potansiyelini inhibe ettiği gösterilmiştir (46, 47). G2/M hücre döngüsünü durdurabildiği ve apoptozu indüklediği gösterilen çalışmalarda sonuç olarak kanser hücrelerinin büyümesini baskılamıştır (12). Apoptozdaki önemli proteinler; Kaspaz-3, Kaspaz-9 ve tümör protein 53 (TP53, p53)'ün ekspresyonunu artırdığı, B hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (48, 49). Farklı kanserlerde de matriks metalloproteinaz (MMP) 2 ve 9'un C3G tedavisiyle azaldığı bulunmuştur (50).

Siyanidinler keratinosit hücrelerini zararlı UVA radyasyonu ve serbest radikallerin neden olduğu DNA hasarından koruyabilirler (51). Antioksidan enzimlerin artışı ve aktivite olmasını indükleyerek glutasyon seviyelerini artırabilirler. Hücreyi hasardan koruyarak serbest radikallerin ve reaktif türlerin oluşumunu azaltabilirler. Bu etkilerini indirgenmiş nicotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve ksantin oksidazları inhibe ederek, araşidonik asit metabolizmasını ve mitokondriyal aktiviteyi düzenleyerek yapabilir. Hücre içine de girebilir. Oksidatif hasara karşı direnç sağlar ve antioksidan savunmayı artırır. Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )

salınımını önleyerek doz bağımlı antioksidan etkileri olabileceği de gösterilmiştir. Bununla birlikte bazı koşullarda pro-oksidanlar olarak hareket edebilecekleri belirtilmiştir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda herhangi bir toksisite raporlanmamış olsa da, güvenli dozun belirlenmesi için daha fazla in vivo çalışma yapılması zorunludur (12).

## **KEMOTERÖPATİK AJANLAR**

Kemoterapi, kanser malignitesi için geleneksel tedavi yöntemlerinden biridir. Hedefe yönelik tedavinin ortaya çıkmasıyla birlikte, kemoterapi ile ilişkili sınırlamalar ortadan kaldırılmıştır (52).

### **Sisplatin**

Sisplatin, platin bazlı ve birçok kanseri tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan bir ilaçtır. Anti-kanser aktivitesini, nükleer DNA etkileşimi ile apoptozu indükleyerek, replikasyon ve transkripsiyon olaylarını inhibe ederek gösterdiği kabul edilmektedir. Sisplatin, germ hücreli tümörler, sarkomlar, karsinomlar ve lenfomalar gibi çeşitli kanserlere etkinliği gösterilmiştir. Bununla birlikte birçok organ toksisitesine yol açtığı bilimektedir. Başlıca yan etkileri kardiyotoksisite, nörotoksisite, hepatotoksisite, nefrotoksisite şeklinde sıralanabilir (52).

### **Dakarbazin**

Dakarbazin, hücre döngüsüne özgü olmayan bir alkilleyici ajandır. Yaygın kullanılan kemoterapötiklerdendir ve melanoma tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır. Dakarbazinin antikanser etki mekanizmaları; nükleik asit metilasyonu veya doğrudan DNA hasarı yoluyla büyümenin durması ve apoptozun indüklenmesidir (3). Dakarbazin, Hodgkin lenfoma, melanoma, nöroblastom ve daha birçok sarkom tedavisinde kullanılır (53). Tek başına kullanıldığında düşük oranlarda kür sağlama, tam yanıt alınamama gibi olumsuzluklar nedeniyle genellikle kombine tedavilerde kullanılır (3).

## **Melanomada Kemoteröpatik Hedefler**

### ***Hücre Döngüsü Kontrolü***

Normal hücre gelişiminde; metabolizma, çoğalma, farklılaşma ve hücre ölümü çeşitli sinyallerle kontrol edilir. Bu sinyaller arasına dinamik bir etkileşim vardır. DNA replikasyonu ve hücre proliferasyonunun sağlıklı ilerlemesini sağlayan G1, G2 ve M kontrol noktaları bulunur. Hücre döngüsündeki bu kontrol noktaları hasar görmesi; plansız çoğalma, genomik kararsızlık ve kanserogenez ile sonuçlanabilir (54). Bu kontrol noktaları üzerindeki etkileriyle hücre döngüsü ve transkripsiyon gibi birçok hücreyel olayda rol alan üç ana protein ailesi; siklinler, sikline bağımlı kinazlar ve sikline bağımlı kinaz inhibitörleridir. Sikline bağımlı kinazlar (CDK'ler), siklinlerle kompleks yaparlar. Anormal kinaz aktivasyonu kontrolsüz hücre proliferasyonuna sebep olur (55).

Melanomagenез sürecinde hücre döngüsü kontrolünün bozulması önemli bir basamaktır (56). CDK'lerin kanserin başlaması ve progresyonundaki etkileri, bir terapötik hedef haline getirmiştir (55). CDK4, bir onkogendir ve mutasyonunda; siklin D1 amplifikasyonu ile melanoma riskini artırır (7). CDK4/6 ve Siklin-D1 kompleksinin hiperaktivasyonu melanoma vakalarının yaklaşık % 90'ında gözlenir (57). G1-S ve G2-M kontrol noktalarını hedefleyen ajanlar, melanoma tedavi stratejileri için potansiyel adaylar olarak düşünülebilir (56).

### ***Apoptotik Yolaklar***

Apoptoz, ölüm reseptörleri ya da mitokondri aracılı olarak kaspazların aktivasyonu ile gelişen bir süreçtir (58). Bu süreçte birçok apoptotik protein rol oynar. Siyanidin kaynaklı apoptozun, kaspaz ailesi, p53, Bcl-2 ilişkili X apoptoz regülatörü (Bax) , Bcl-2 gibi moleküllerin seviyeleri ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (48). Kanser gelişiminde apoptotik (p53, Bax, Bid, TNF, Noxa, PUMA) ve anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, NF-κB) moleküllerin etkileşimlerinin anlaşılması kemoterapi direncinin anlaşılmasının için de önemlidir (58).

Apoptoz indüksiyonunda; intirinsik ve ekstrinsik yolak olmak üzere iki ana sinyal yolağı rol alır. İntirinsik veya mitokondriyal yolak hücreyel stres veya kemoterapötikler gibi dış etkilerin Kaspaz-9'un aktive etmesiyle ile başlar. Ekstrinsik veya ölüm respötörü aracılı yolak, apoptotik reseptörlerin uyarılması ve Kaspaz-8 ve Kaspaz-10'un aktivasyonunu ile başlar. Her iki yolağında ortak ve sonraki aşaması,

apoptozu geri dönüşümsüz olarak tetikleyen Kaspaz-3'ün aktivasyonudur. İntirinsik yolla ilişkili apoptozda, hem proapoptotik hem de antiapoptotik fonksiyonlara sahip olan BCL-2 protein ailesi önemli rol oynar. BAX, aynı aileden olup, apoptozu indükler (59). Nükleer faktör kappa beta (NF- $\kappa$ B), bir transkripsiyon modülatörüdür. Transkripsiyonunu düzenlediği bazı proteinler çok önemli yollarda rol alır. NF- $\kappa$ B'nin, çeşitli kanserlerde ve kanser hücre hattı çalışmalarında anormal seviyede olduğu gösterilmiştir (60). p53 tümör baskılayıcı bir proteindir. Hücre döngüsü sürecini ve apoptotik yolları düzenleyen genlerin transkripsiyonunu direkt aktive ettiği gösterilmiştir. p53'ün azalması veya işlevinde sorun olması durumunda, anormal hücre proliferasyonuna ve kanserleşmeye yol açar. Bilinen deri kanserlerinin çoğunda p53'teki azalma veya fonksiyon kaybı çalışmalarla gösterilmiştir (61).

### ***Metastaz Gelişimi Basamakları***

Melanoma oldukça invaziv ve metastatik bir tümördür. Bazal membranların ve hücre dışı matrisin bozulması, invazyon ve metastaz oluşumunda önemli bir basamaktır. MMP ve matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri (TIMP) aileleri bu süreçte önemli roller oynar (62).

MMP'ler, hücre dışı matriks bileşenlerini parçalayabilen, hücre dışı çinko bağımlı endoproteazlardır (63,64). MMP ailesinin; kolajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, MT-MMP'ler ve yeni MMP'ler gibi alt grupları mevcuttur. Fibriller yapıdan jelatinöz yapıya denatüre edilmiş matrisin daha çok parçalanmasında jelatinaz A (MMP2) ve jelatinaz B (MMP9) görev alır (64). MMP2, tip IV kollajenin parçalanmasında önemli bir roledir (63). MMP9, göç eden keratinositler gibi epitel hücreleri tarafından üretilir. Ek olarak anjiyogenez için de önemli bir faktördür (64). Birçok kanser türünde, metastaz varlığında seviyeleri oldukça artan MMP'ler gösterilmiştir. Evreden bağımsız olarak prognoz hakkında fikir verebilirler (11).

TIMP1 ve TIMP2, dört üyeden oluşan MMP inhibitörleri ailesinin üyeleridir. İşlevleri hücre dışı matris bozulmasını engellemektir. Buna ek olarak TIMP1'in MMP inhibitör aktivitesinden bağımsız olarak hücre proliferasyonu, apoptoz ve farklılaşma gibi biyolojik süreçlere etkileri olduğu bilinmektedir. TIMP1 ekspresyonunun artması MM'de malign progresyon ve kötü prognoz ile ilişkilendirmiştir (65).

### ***miRNA'ların Rolü***

Son yıllarda, kanser gelişiminde mikroRNA'ların (miRNA, miRNA) rolü dikkat çekmiştir. miRNA'lar, 18-25 nükleotid içeren endojen, tek sarmallı, kodlanmayan küçük RNA'lardır (66, 67). miRNA'lar kanserlerde, hedefledikleri çeşitli genlerle onkogen veya tümör baskılayıcı olarak görev yapabilirler (68). miRNA'nın hücre proliferasyonu, farklılaşma ve apoptoz gibi çeşitli kanserleşme basamaklarındaki etkinlikleri çalışmalarla gösterilmiştir (67). Hücre migrasyonu, invazyonu ve metastazını düzenleyen spesifik miRNA'lar, metastamiRNA'ler olarak isimlendirilmiştir. miRNA'ların bu etkinlikleri MM dahil birçok kanserde raporlanmıştır (69).

Melanomalardaki miRNA profili incelendiğinde, benign ve malign melanomalarda farklı ekspresyon modelleri sergiledikleri görülmüştür. miRNA'ların düzensizliğinde MM'de malign ilerlemesinde etkili olabileceği bildirilmiştir. miRNA'lar sinyal yollarındaki genlerinin ekspresyonunu modüle edebilmeleri, bir kanserin başlamasını ve ilerlemesini düzenleyebilmelerinden dolayı MM tedavisi için yeni hedefler olarak görülür (67). Son dönemdeki çalışmalar, miRNA'ların kanser hücrelerinin kemoterapötik ajanlara duyarlılığını artırabileceği ve kemoterapi direncinin ortadan kaldırılmasında etkin olabileceğini düşündürmektedir (70).

miRNA-211 geni, bir tümör supresör gen olan TRPM1 altıncı intronunda yer alır. TRPM1'in melanoma metastazı inhibitör etkileri olduğu bilinmektedir. miRNA-211'nin hedef mRNA'sı olan KCNMA1, ekspresyon seviyelerinin melanoma hücrelerinde yükseldiğini ve ikisinin ters orantılı olduğunu gösterilmiştir. KCNMA1 geni, Ca<sup>++</sup> iyonu tarafından düzenlenen bir K<sup>+</sup> kanal proteinini kodlar ve melanomanın yüksek hücre proliferasyon hızı ve invazivliğinden kısmen sorumlu olduğu düşünülmektedir. miRNA-211 ekspresyonlarındaki azalmanın, KCNMA1 transkriptinin artışıyla kanser gelişimi ve invazyonu artırabileceği çalışmalarla gösterilmiştir (68).

miRNA-10b'nin onkojenik özellikler gösteren bir RNA'dır. MM'de önemli ölçüde arttığı ve hastalarının genel sağ kalımı ile ilişkili olduğu bulunmuştur. miRNA-10b miktarı yıkımla azaltıldığında, MM hücre proliferasyonunun, migrasyonunun ve invazyonunun in vitro inhibe edildiği çalışmalarla gösterilmiştir. Mekanizma olarak da melanogenezde önemli olduğunu gösterilen WNT/ $\beta$ -katenin yolağının düzenlenmesi

öne sürülmüştür. miRNA-10b'nin azalmasıyla artan ITCH ekspresyonunun, WNT/ $\beta$ -katenin yolağını ve in vivo tümör büyümesini baskılayabileceği gösterilmiştir (67).

miRNA-18a-5p'nin, farklı kanserlerde önemli bir genetik düzenleyici olduğu gösterilmiştir. Kanser hücrelerinde proliferasyonu ve migrasyonu artırır. Normal insan epidermal melanositleri ile karşılaştırıldığında MM'de önemli ölçüde arttığı raporlanmıştır. Bu sonuç miRNA-18a-5p'nin MM progresyonunda patojenik etkileri olduğunu düşündürür (71).

miRNA-146a'nın çeşitli kanserlerde hem tümör baskılayıcı hem de onkogen olarak rol alabildiği görülmüştür. Hepatoselüler karsinomda, meme kanserinde düşük ekspresyona sahipken, kolorektal kanserde ve oral karsinomda ise yüksek ekspresyonu bulunmuştur. MM hücre hatlarındaki çalışmalarda ise, miRNA-146a'nın artışının hücre migrasyonunu ve invazyonunu arttırdığını şeklinde raporlanmıştır. Melanogenezde SMAD4'ü hedefleyerek bir onkogen rolü oynadığı deneylerle gösterilmiştir (66).

miRNA-7-5p'nin, çeşitli onkogenlerin ekspresyonunu inhibe ederek, kanser hücresi proliferasyonunu, hücre büyümesini, migrasyonu ve invazyonu azalttığı bulunmuştur. Aynı zamanda apoptozu ve kemosenzitiviteyi arttırdığı bildirilmiştir. miRNA-7-5p'in MM'de yeni bir tümör baskılayıcı miRNA olabileceğini rapor edilmiştir (69).

Bu çalışmada; siyanidinin, sisplatin ve dakarbazinle birlikte tekli ve kombine dozlarının, A375 melanoma hücre hattı üzerindeki antiproliferatif, antiapoptotik, antioksidan özelliklerini, yara iyileşmesine ve invazyona olan etkilerini in vitro şartlarda incelemeyi hedefledik.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### ÇALIŞMALARDA KULLANILAN KİMYASALLAR VE SARF MALZEMELERİ

Dulbecco's Modified Eagle Medium-High Glucose (DMEM) (Biological Industries), Fetal Bovin Serum (FBS) (Gibco), Penicillin-Streptomisin (Wisent Bioproducts), Phosphate Buffered Saline (PBS) (Hyclone), Trypsin-EDTA (Wisent Bioproducts), Trizol (Ambion), İsoopropanol (Sigma), Etanol (Riedel), Metanol (Merck), Primerler (Sentebiolab), Kristal Viyole (Bioshop), Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Roche), Dnaaz/Rnase Free Water (Invitrogen), Steril Kültür Kapları (Petri), 6, 12, 24, 96 Kuyucuklu Hücre Kültür Plağı (Corning), 96- Kuyucuklu PCR Array Plak (Thermo), T25 Flask Ve T75 Flask (Cellstar), Falcon Tüpü (Cellstar), RIPA (Milipor), Siyanidin (BioBasic), Sisplatin (Bldpharm), Dakarbazin (Bldpharm).

Çalışmada kullanılan diğer tüm kimyasal maddeler analitik derecede ve yüksek saflıkta olacak şekilde ticari kaynaklardan elde edilmiştir.

### ÇALIŞMALARDA KULLANILAN CİHAZLAR

CO<sub>2</sub>'li İnkübatör (Nuaire), Biological Safety Cabinets Class II Laminar Flow (Nuaire), İnverted Mikroskop (Olympus), Otomatik Mikropipetler (10, 20, 100, 200, 1000µl'lik) (Biohit), Hassas Terazi (Denver Instrument), Nanodrop Spectrophotometer ND-1000 (Thermo), Santrifüj (Hettich Zentrifugen), Mikro Santrifüj (Hettich Zentrifugen), Soğutmalı Santrifüj (Hettich Zentrifugen), RT- PCR (Thermo Scientific Pikoreal 96), -20 Derin Dondurucu (BEKO), No Frost Buzdolabı (BEKO), Otoklav (Nuve), Vorteks (IKA Yellow Line), -80°C Dondurucu (Nuaire), Güç Kaynağı (Bio-Rad), Thermal Cycle (Techne TC3000)

### ÇALIŞMALARDA KULLANILAN KİTLER

Cell Proliferation Kit (XTT) (Biological Industries), Matrigel Invasion Chamber (Corning), WizScripttm Complementer DNA (cDNA) Synthesis Kit (High Capacity) with Rnase Inhibitor (Wizbiosolutions), BrightGreen 2X qPCR MasterMix-ROX (ABM).



### A375 HÜCRE HATTININ TEMİNİ VE HÜCRE KÜLTÜRÜ

A375 insan MM kanser hücre hattıdır (Şekil 3). Kullanılan hücreler kendi stoklarımızdandır. Deneyler Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı hücre kültürü laboratuvarında yapılmıştır.



**Şekil 3.** Çalışmamızda kullandığımız A375 hücrelerinin inverted mikroskop görüntüsü (4X).

A375 hücreleri kültür ortamında çoğaltma, pasajlama, ekim için sayılma, kullanılacak kültür plakalarına ekilme, dondurulma ve çözülme gibi çeşitli kültür basamaklarından geçirilmiştir. Bu basamaklar inverted mikroskop altında takip edilmiştir.

Çalışmamızda hücrelerin in vitro koşullarda yaşamasını ve çoğalmasını sağlayabilecek besi ortamı %10 FBS, %1 L-glutamin, penisilin (100 U/ml) + streptomisin (100 µg/ml) içeren DMEM-High Glucose besi yeri ile sağlandı. Hücreler 37°C’de, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub>’li inkübatörde takip edilmişlerdir.

Hücreler çoğaltma ve pasajlama işlemi için; DMEM-High Glucose besi yeri ile T25 flasklara ekilmiştir. Uygun koşullarda inkübe edilip iki günde bir besi yerleri yenilenerek takip edilmiştir. Monolayer kültürde adheziv hücrelerin pasajlanması için ilk olarak yüzeyden ayrılmaları gerekir. Flasklar ilk önce PBS ile yıkanıp ölü hücrelerden ve hücre artıklarından temizlendi. Tripsin eklenerek hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlandı. Hücrelerin yüzeyden ayrılmasını takiben tripsin etkisini nötralize etmek için eklediğimiz tripsin miktarının en az 2 katı olacak şekilde besi yeri eklendi. Pipetaj yapılarak flasktaki karışım 15ml’lik falkonlara toplandı ve

1300 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden süpernatant uzaklaştırıldı. Pelettteki hücreler 5 ml taze besi yeri ile homojenize edilip sayılarak, flasklara uygun miktarlarda ekildi. Hücreler pasajlanma işleminin ardından kültür için tekrar inkübasyona bırakıldı.

Canlı hücrelerin sayımı için tripan mavisi kullanıldı.. Pasajlama aşamasında elde edilen 5 ml’lik hücre süspansiyonundan ve tripan mavisinden 50’şer µl alınarak 200 µl’lük santrifüj tüpünde karıştırıldı. Böylece hücre süspansiyonu 2 kat dilüe edildi. Bu karışımdan 10 µl alınarak Neubauer lamına eklendi. Lamdaki 4 büyük kare alan sayılarak ortalaması alındı, dilüsyon katsayısı ile çarpılarak canlı hücre sayımı gerçekleştirildi. Yapılan her deney için ayrı ayrı hücre sayımı yapıldı. Deneyler için gereken miktarlarda hücre ekildi.

Hücreler kriyotüpler içerisinde dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılarak donduruldu ve saklandı. Tripsinizasyon ve santrifüj basamaklarından sonra besi yeri ile homojenize edilen hücreler 90:10 oranında DMSO ile karıştırılarak 1,5 ml’lik kriyotüplere konuldu. Kriyotüpler önce 20 dakika -20°C’de bekletilip, ardından -80°C’ye kaldırıldı. Kriyotüplere konulan hücreler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C’de muhafaza edildi.

Dondurulmuş hücreleri tekrar kültüre edebilmek için, kriyotüpteki hücreler 37°C’de su banyosunda hızlıca eritildi, taze besi yeri eklenerek falkona alındı ve santrifüj edildi. Böylece DMSO içeren besi yeri uzaklaştırıldı. Ardından taze besi yeri ile homojenize edilerek kültür plakalarına ekildi.

### **HÜCRE CANLILIĞI TESTİ (XTT)**

A375 hücrelerine siyanidin, sisplatin ve dakarbazin farklı konsantrasyonlardaki dozları uygulandı. Zamana ve doza bağımlı olarak hücrelerin yüzde ellisini (%50) öldüren dozu (IC<sub>50</sub>) bulmak için XTT hücre proliferasyon testi kullanıldı. Çalışmada kullanılan siyanidin ve dakarbazin BLDPHARM’dan, sisplatin ise Bio Basic’ten temin edildi.

Kullandığımız maddelerin sitotoksitesisi ve doz ile zamana bağlı etkisi “SARTORIUS Cell Proliferation Kit XTT based Colourimetric Assay (REF: 20-300-1000, LOT: 22146072)” ile yapıldı. Toz halinde bulunan en az binde bir oranında olmak üzere DMSO içinde çözüldü ve değişik konsantrasyonlarda ana stoklar

hazırlandı. Bu ana stoklardan % 10 serumlu tam besi ortamında değişik dozlar seçilerek etkileri araştırıldı. Seçilen konsantrasyon aralığı literatür bilgileri dikkate alınarak belirlenip, test kit protokolüne göre gerçekleştirildi.

Hücreler 96 kuyucuklu hücre kültürü plakaları içine  $1 \times 10^4$ /kuyucuk A375 hücresi olacak şekilde 100  $\mu$ l DMEM içinde ekildi. Hücreler yüzeye yapışmaları için  $37^\circ\text{C}$ 'de %5 karbondioksit ( $\text{CO}_2$ ) içeren inkübatörde 24 saat bekletildi. 24 saatin sonunda besi yeri aspire edildi. Ardından siyanidin için, 2,5 mikromolar ( $\mu\text{M}$ ), 5  $\mu\text{M}$ , 7.5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 550  $\mu\text{M}$ , 700  $\mu\text{M}$ , 800  $\mu\text{M}$ ; sisplatin için, 0,125  $\mu\text{M}$ , 0.25  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ , 8  $\mu\text{M}$ , 16  $\mu\text{M}$ , 32  $\mu\text{M}$ ; dakarbazin için, 2.5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 160  $\mu\text{M}$ , 320  $\mu\text{M}$ , 640  $\mu\text{M}$  konsantrasyon dozları %10 serumlu tam besi ortamı içinde hazırlandı. Hazırlanan dozlar 100  $\mu$ l besi yeri ortamı içinde kontrol kuyucukları dışındaki kuyucuklara uygulandı. Ayrıca zamana bağlı etkiyi de araştırmak için 96 kuyucuklu plakalardan her biri ayrı bir saat dilimine ayrıldı. 24-48 ve 72 saat için 3 farklı plakaya ekim yapıldı. 24 saat sonunda kit protokolüne göre; her kuyucuk için önce 50 mikrolitre ( $\mu$ l) XTT reagent solution A, 1  $\mu$ l XTT activator solution karıştırıldı. Sonra bu karışıma 100  $\mu$ l besiyeri eklenip vorteks ile karıştırıldıktan sonra kuyucuk başına ilave edildi. Ardından hücreler  $37^\circ\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde 4 saat inkübe edilip çalışılan grupların absorbans değerleri ELİSA cihazında 450 nanometre (nm) dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında okutuldu. Bu işlem 48 ve 72 saat için hazırlanan plakaları belirlenen saat sonunda aynı şekilde uygulandı. Hücre canlılığı yüzdesi her bir kuyucukta ölçülen optik dansite değerinin kontrol optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılması ile hesaplanarak  $\text{IC}_{50}$  oranı belirlendi. Hücre canlılığı (%) = (Madde uygulanan grubun absorbans değeri / Kontrol grubunun absorbans değeri)  $\times 100$  formülü ile hesaplandı. 24, 48 ve 72. saat değerlerine göre çıkan sonuçlara göre <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator> sitesinden AAT Bioquest programı kullanılarak  $\text{IC}_{50}$  değerleri hesaplandı.

Ardından elde edilen  $\text{IC}_{50}$  dozları ile kombine dozlar için XTT deneyleri 24, 48, 72 saat için tekrar edildi. Kombine XTT için seçilen gruplar aşığıdaki gibidir;

- Kontrol
- Siyanidin  $\text{IC}_{50}$  + Sisplatin  $\text{IC}_{50}$
- Siyanidin  $\text{IC}_{50}$  + Dakarbazin  $\text{IC}_{50}$
- Siyanidin  $\text{IC}_{50}$  + Sisplatin  $\text{IC}_{50}$  + Dakarbazin  $\text{IC}_{50}$

## TRİZOL REAGENT İLE TOTAL RNA İZOLASYONU

Gen düzeyinde ekspresyon değerlendirmesi için kontrol ve doz gruplarında RNA izolasyonu yapıldı.

1. Her kuyucuk başına  $3 \times 10^5$  hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plaklara hücreler ekildi. Hücreler yapıştıktan sonra XTT ile tespit edilen  $IC_{50}$  dozları uygulandı, yine XTT ile bulunan 48 saatlik  $IC_{50}$  süresi kadar inkübe edildi. Gruplar aşağıdaki gibi seçildi.

- Kontrol
- Siyanidin  $IC_{50}$
- Sisplatin  $IC_{50}$
- Dakarbazin  $IC_{50}$
- Siyanidin  $IC_{50}$  + Sisplatin  $IC_{50}$
- Siyanidin  $IC_{50}$  + Dakarbazin  $IC_{50}$
- Siyanidin  $IC_{50}$  + Sisplatin  $IC_{50}$  + Dakarbazin  $IC_{50}$

2. Hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarından, bir kuyucuk başına 500  $\mu$ l Trizol ilave edilip scraper ile kazınarak tamamen kaldırıldı. Ependorf tüplere aktarıldı.

3. Hücreleri parçalamak için her bir ependorf tüpe 100  $\mu$ l kloroform eklendi. İyi vorteks yapıldıktan sonra tekrar oda sıcaklığında 15 dakika (dk) inkübe edildi.

4. Soğutmalı santrifüj ile  $+4^{\circ}C$ ' de 15.000 devirde (rpm) 15 dk santrifüj edilip renksiz olan üst faz toplandı ve yeni ependorf tüplere alındı. Bu üst faz RNA içermektedir

5. Toplanan üst fazın üzerine 250  $\mu$ l izopropanol eklenip pipetaj yapıldı ve ependorflar kapatılıp alt üst edildikten sonra santrifüj cihazına dizildi.

6. Soğutmalı santrifüjde  $+4^{\circ}C$ 'de 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi.

7. Supernatant döküldü. Peletin üzerine 250  $\mu$ l moleküler biyolojik grade %70'lik etanol eklendi. Bu alkol moleküler grade steril water kullanılarak %70 olarak hazırlandı.

8. Soğutmalı santrifüjde  $+4^{\circ}C$ 'de 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj yapıldı.

9. Süpernatant atılıp pelletin üstünde kalan alkol pipetle alındı.

10. Pellet üzerine 30  $\mu$ l RNase-DNase free water eklendi ve pellet çözdürüldü.

11. RNA elde edildi.

12. Elde edilen RNA'lar ependorf içinde  $-20^{\circ}C$ 'de saklandı.

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop cihazı (Thermo) yardımıyla belirlendi. Ölçüm yapılmadan önce 1µl Nüclease free water Nanodrop cihaz kaidesi üzerine damlatıldı. Bilgisayardaki program analizi (ND1000 V3.6.0) ile körleme yapıldı. Sonrasında RNA örneklerinden 1µl olacak şekilde yine cihazın kaidesi üzerine damlatılarak 260, 280 nm'de okuma yapıldı.

Nanodrop cihazında 260-280 dalga boyundaki RNA saflık derecesi ve konsantrasyonuna ng/µl olarak bakıldı.

### **cDNA SENTEZİ**

İzole edilen RNA'lardan, cDNA sentezi için ABM OneScript<sup>R</sup> Plus cDNA Syntehesis Kit ile oligo d(T) primeri ve Revers Transkriptaz enzimi (RT) kullanılarak üretici firmanın protokolü doğrultusunda gerçekleştirildi.

Kit içeriği:

1. OneScript<sup>R</sup> Plus RTase (100 µl)
2. 5X RT Buffer
3. Oligo(dT) (10 µM)
4. Random Primers (10 µM)
5. dNTP (10mM)
6. Nuclease-Free H<sub>2</sub>O

Protokol:

1. Kullanmadan önce tek tek bileşenleri iyice çözüldü ve karıştırıldı.
2. Rt buffer, dNTP, primerler ve enzimden bir ependorfta mix hazırlandı. Kısaca santrifüj edildi.
3. RNA'lar kit protokolüne göre en yüksek konsantrasyondan hesaplanıp etiketlenen ependorflara konuldu.
4. İçinde RNA olan ependorflara hazırladığımız mix eşit olarak dağıtıldı.
5. En son hacim 10 µl olacak şekilde nükleaz-free water ile tamamlandı.
6. Protokole uygun olarak 50-55°C'de 15 dakika inkübe ederek cDNA sentezini gerçekleştirildi.

## GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU ( RT-PCR)

Çalışmamızda 96 kuyucuklu mikrolaka okuyabilen RT-PCR sistemi kullanıldı. Hücrelere siyanidin, sisplatin ve dakarbazin IC<sub>50</sub> dozlarının uygulaması sonrasında RNA izolasyonu yapıldı ve bunu takiben elde edilen RNA'ların miktar ve saflık dereceleri tespit edildi. Sonrasında, total RNA'lardan ABM OneScript<sup>R</sup> Plus cDNA Syntehesis Kit ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. Sonrasında Thermo Scientific PikoReal 96 cihazıyla PCR yapıldı. Çalışmamızda hem mesajcı RNA (mRNA) hem de miRNA için PCR yapıldı. Her panelde referans–housekeeping genler (mRNA için GAPDH; miRNA için U6) PCR kontrol grubunda yer aldı ve hedef genlerdeki rölatif değişikliği analiz etme imkanı sundu. PCR sırasında elde edilen ampliconlar (çoğaltılan gen ürünü), doğrudan logaritmik artışa geçtikleri döngü sayısına göre değerlendirildi. Önce konsantrasyonu bildiğimiz housekeeping genlere göre standart amplifikasyon eğrisi oluşturuldu ardından çalışılan örnekteki geçiş noktasına göre cDNA'nın rölatif miktarı kantitasyon software tarafından belirlendi. Elde edilen veriler eşik değer döngüsü (Cq) olarak kaydedildi. Analizi gerçekleştirilen genlerin ve referans gen olarak normalizasyonda kullanılan housekeeping genlerin primer dizileri Tablo 2 ve 3'te gösterildi.

**Tablo 2.** RT-PCR'da mRNA için analiz edilen genlerin primer listesi

Genler	Primer Dizisi
<b>GAPDH</b>	F: GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG R: ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA
<b>CDK4</b>	F: CCATCAGCACAGTTCGTGAGGT R: TCAGTTCGGGATGTGGCACAGA
<b>CDK8</b>	F: GCTGATAGGAAGGTGTGGCTTC R: CCGAGGTAAGTGAAGTGGCTTC
<b>SİKLİN-D1</b>	F: TCTACACCGACAAGTCCATCCG R: TCTGGCATTGTTGGAGAGGAAGTG
<b>KASPAZ-3</b>	F: GGAAGCGAATCAATGGACTCTGG R: GCATCGACATCTGTACCAGACC
<b>KASPAZ-8</b>	F: AGAAGAGGGTCATCCTGGGAGA R: TCAGGACTTCCTTCAAGGCTGC
<b>KASPAZ-9</b>	F: GTTTGAGGACCTTCGACCAGCT R: CAACGTACCAGGAGCCACTCTT

<b>BAX</b>	F: TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG R: TGTGTCCACGGCGGCAATCATC
<b>BCL-2</b>	F: ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT R: GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC
<b>NF-κB</b>	F: TGAACCGAAACTCTGGCAGCTG R: CATCAGCTTGCGAAAAGGAGCC
<b>MMP2</b>	F: AGCGAGTGGATGCCGCCTTTAA R: CATTCCAGGCATCTGCGATGAG
<b>MMP9</b>	F: GCCACTACTGTGCCTTTGAGTC R: CCCTCAGAGAATCGCCAGTACT
<b>TIMP1</b>	F: GGAGAGTGTCTGCGGATACTTC R: GCAGGTAGTGATGTGCAAGAGTC
<b>TIMP2</b>	F: ACCCTCTGTGACTTCATCGTGC R: GGAGATGTAGCACGGGATCATG
<b>KASPAZ-10</b>	F: CCAGGCTATGTATCCTTTTCGGC R: TCGTTGACAGCAGTGAGGATGG
<b>p53</b>	F: ATCTACAAGCAGTCACAGCACAT R: GTGGTACAGTCAGAGCCAACC

**Tablo 3.** RT-PCR’da miRNA için analiz edilen genlerin primer listesi

<b>Genler</b>	<b>Primer Dizisi</b>
<b>U6</b>	F: CTCGCTTCGGCAGCACA R: AACGCTTACGAATTTGCGT
<b>miRNA-10b</b>	F: CCTGTAGAACCGAATTTG R: GAACATGTCTGCGTATCTC
<b>miRNA-7-5-p</b>	F: ACACTCCAGCTGGGTGGACTAGTGATTT R: TGGTGTCGTGGAGTCG
<b>miRNA-18a-5p</b>	F: TCGCC TAAGGTGCATCTAGTGC R: CTCAACTGGTGTCTGCGTGGAGTCGGC
<b>miRNA-211</b>	F: CCTTTGTCATCCTTCGC R: GAACATGTCTGCGTATCTC
<b>miRNA-146a</b>	F: GAGAACTGAATTCCATGG R: GAACATGTCTGCGTATCTC

Gerçek zamanlı RT-PCR ile kontrol grubu ve dozların uygulanmış olduğu gruplar arasındaki genlerin ekspresyonlarının nasıl değiştiği custom olarak dizayn edilen plaka ile belirlenmiştir (Sentebiolab). Primerlerin gömülü olduğu plakalar için Real-Time PCR’da reaksiyon karışımı oranı, kite göre hazırlanıp çoklu mikropipet yardımıyla plakalara yüklenmiştir. (Tablo 4)

**Tablo 4. RT-PCR Reaksiyon Karışımı**

<b>Gerçek Zamanlı PCR Reaksiyon Karışımı (96 kuyucuklu plaka için; bir reaksiyon)</b>	
Master Mix	5 µl
cDNA	1 µl
Nüklease Free Water	3,4 µl
F-R Mix	0,6 µl
Son Hacim	10 µl

(Kuyucuk başına 10 µl karışım konuldu.)

Firmanın belirtmiş olduğu (Sentebiolab) sulandırma miktarları doğrultusunda 100 pmol'luk reverse ve forward ana stokları oluşturuldu. Sonrasında 10 pmol'luk PCR stokları hazırlandı. Bu stoklar 10 µl Forward, 10 µl Reverse, 80 µl Nüklease Free Water'dan alınarak hazırlandı. Sonuçta 100 µl'lik 10 pikomolar'lık (pmol) stoklarımız oldu. Hepsi deney zamanına kadar -20°C de muhafaza edildi.

### **İNVAZYON KAPASİTESİNİN BELİRLENMESİ (MATRİGEL-İNVAZYON TESTİ)**

Hücrelerin invazyon kapasitesi “matrigel invasion chamber” invazyon kapları (Corning) kullanılarak araştırıldı.

Deneyde; 24 kuyucuklu plakaya, matrigel membran yerleştirilmeden önce invazyon kuyucuğunun alt kısmına 750 µl serumlu besiyeri eklendi. Bu sayede membranın alt kısmı kemoaktraktan özellik gösterdi. Matrigel membranın üst kısmına ise totalde 500 µl olacak şekilde, serumsuz besiyeri ile hazırlanan IC<sub>50</sub> dozları uygulanmış A375 hücreleri eklendi. Bu serumsuz besiyerine penisilin-streptomisin eklendi ancak FBS eklenmedi. Her invazyon odasında 50 bin hücre olacak şekilde, 500 µl serumsuz besiyeri içinde IC<sub>50</sub> dozları hazırlandı. Hücreler, IC<sub>50</sub> süresi olan 48 saat boyunca, 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde bekletildi.

İnkübasyon saatinin sonunda invazyon odacığının içindeki besi yeri ve iç yüzeyindeki hücreler “cell scraper” ile kazınarak uzaklaştırıldı. İnkübasyonu takiben membranın üst kısmında kalan invaze olmamış hücreler kulak pamuğu çubuğu ile silinerek temizlendi. İnvaziv olan dış yüzeydeki hücreler, önce 500 µl metanol ile fikse edildi, ardından da 500 µl kristal viyole ile boyanarak ışık mikroskopunda sayılarak değerlendirildi. 48 saat sonra;



1. Kuyucuklardaki besi yerleri döküldü.
2. 2 defa PBS ile yıkandı.
3. 500 µl chamber içine ve dışına daha önceden -20°C'ye soğuması için bıraktığımız metanol uygulandı.
4. -20°C'de 10 dk inkübe edildi.
5. Metanol pipetle çekildi.
6. 500 µl kristal viyole boyası konuldu ve 3-5 dk arasında kabin içinde bekletildi.
7. PBS ile boyadan arınana kadar yıkandı.
8. Işık mikroskopunda fotoğrafları çekildi.

### **YARA İYİLEŞME (WOUND HEALİNG) DENEYİ**

. Bu deney A375 hücrelerinde siyanidin, sisplatin ve dakarbazin maddelerinin migrasyon ve hücreler arası etkileşimine etkisini belirlemek için yapıldı. Wound healing deneyi için 12 kuyucuklu plakaya %100 konfluent olacak şekilde hücre ekildi. Hücrelerin plak yüzeyine tutunması için 24 saat beklendi. Sonra besi yeri çekildi ve bir kez PBS ile yıkandı. İkinci kez PBS konularak PBS içindeyken 200 µl'lik pipet ucu yardımı ile "+" şekli plak zeminine çizildi. Bunun amacı, hücrelerin göç etmesini sağlayabilecek hücresiz bir alan oluşturmaktır. Sonrasında PBS ile tekrar yıkanıp doz grupları besi yeri içinde uygulandı. 0, 16 ve 24. saatte inverted mikroskopta 10X büyütme ile resimler çekilip kontrol grubu ile karşılaştırılıp analizi yapıldı.

### **TAS VE TOS DENEYİ**

#### **TAS Deneyi**

TAS deneyinde; antioksidanlar, koyu mavi yeşil renkli ABTS radikalini renksiz ABTS formuna indirger. 660 nm'de absorbans değişimi numunenin toplam antioksidan seviyesi ile ilişkilidir. Rel Assay Diagnostics TAS-TOS kitleri kullanılarak deney yapıldı. Test kiti, geleneksel olarak bir E vitamini analogu Trolox Eşdeğeri olarak adlandırılan stabil bir antioksidan standart solüsyonla kalibre edildi.

#### ***TAS Deney Prosedürü***

Numune/standart veya H<sub>2</sub>O'dan 18 µl alınır, 300 µl reagent 1 ile karıştırıldı. 30 saniye sonra 660 nm dalga boyunda absorbansı okutuldu. Sonra 45 µl reagent 2 eklenip

iyice karıştırıldı. 37°C'de 5 dakika sonra absorbansı (A2) veya oda sıcaklığında 10 dakika sonra absorbansı (A2) yine 660 nm de okutuldu. Hesaplamada  $A2 - A1 = \Delta Abs$  standart/numune/H<sub>2</sub>O olmak üzere, “[ $\Delta Abs$  H<sub>2</sub>O –  $\Delta Abs$  Sample] / [ $\Delta Abs$  H<sub>2</sub>O –  $\Delta Abs$  Standard]” formülü ile bir örneğin toplam antioksidan kapasitesi ölçüldü.

### **TOS Deneyi**

Farklı oksidan moleküllerinin de ayrı ayrı ölçülmesi pratik olmadığı ve oksidan etkilerinin katkılı olduğu için bir numunenin toplam oksidan durumu (TOS) ölçüldü.

. Rel Assay Diagnostics TAS-TOS kitleri kullanılarak deney yapıldı.

### **TOS Deney Prosedürü**

Numune veya Standart veya H<sub>2</sub>O'dan 45 µl alındı, üzerine reagent 1'den 300 µl konuldu. İyice karıştırıldı. 30 saniye sonra 530 nm dalga boyunda absorbansı (A1) okundu. Sonra 7,5 µl reagent 2 konuldu. Oda ısısında 10 dakika beklendikten sonra yine 530 nm dalga boyunda absorbansı (A2) okundu. Hesaplamada  $A2 - A1 = \Delta Abs$  standart/numune olmak üzere, “ $\Delta Abs$  Sample /  $\Delta Abs$  Standard” formülü ile bir örneğin toplam oksidan kapasitesi ölçüldü.

## **TUNEL TESTİ İLE APOPTOZ TAYİNİ**

Çalışmamızda ABP Biosciences TUNEL Chromogenic Apoptosis Detection Kit (Katolog No: A049) kullanılmıştır. Kit bileşenleri Tablo 5'te gösterilmiştir.

**Tablo 5.** Kit Bileşenleri

<b>Materyal</b>	<b>Miktar</b>	<b>Konsantrasyon</b>
TdT reaction buffer (Component A)	8 mL	1X solution
TdT enzyme (Component B)	100 µL	15 U/µL
Biotin-11-dUTP (Component C)	50 µL	50X solution
HRP-Streptavidin (Component D)	50 µL	100X solution
DAB stock solution (Component E)	150 µL	33X solution
DAB diluent (Component F)	5 mL	1X solution
DNase I (Component G)	10 µL	2 U/µL
DNase I buffer (Component H)	1 mL	1X solution

TUNEL testi için hücreler, 8 odacık içeren lamlara (BD Falcon Culture Slides; 8 Chamber Polystyrene Vessel Tissue culture treated Glass Slide) ekildi. Her bir odacığa içine  $2 \times 10^4$  hücre olacak şekilde hücreler ekildi. 24 saat hücrelerin yapışması beklendi. Hücreler yapıştıktan sonra IC50 dozları uygulanıp 48 saat boyunca hücreler gerekli şartlarda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda besi yeri aspire edildi ve PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi.

Kit protokolüne göre;

1. Odacık başına 500 µl olacak şekilde fiksasyon solüsyonu (%4 Paraformaldehit içeren PBS, 7,4 pH) konuldu ve bir saat inkübe edildi.

2. PBS ile yıkandı.

3. Oda sıcaklığında 30 dakika boyunca 200 µl %0,2 Triton X-100 içeren PBS içinde permeabilizasyon yapıldı.

4. PBS ile yıkandı.

5. Endojen peroksidazları etkisiz hale getirmek için %2 hidrojen peroksit ile 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

6. PBS ile yıkandı.

7. Örnekler 100 µL TdT reaksiyon tamponu (Bileşen A) ile 10 dakika inkübe edildi.

8. Kullanmadan hemen önce TdT reaksiyon kokteyli (TdT reaction buffer (Component A) + TdT enzyme (Component B) + Biotin-11-dUTP (Component C)) hazırlandı.

9. TdT reaksiyon tamponunu uzaklaştırıldıktan sonra her numuneye 50 µL TdT reaksiyon kokteyli eklendi ve çözeltinin yüzeye tamamen yayılmasını sağlandı.

10. Işıktan koruyarak 37°C'de 60 dakika nemli ortamda inkübe edildi.

11. 2X sodyum sitrat tamponunda (SSC) numuneleri 2 x 10 dakika inkübe ederek reaksiyonu durduruldu.

12. PBS içinde %3 sığır serum albümini (BSA) ile numuneler 2 x 10 dakika yıkandı.

13. HRP-Streptavidin boyama solüsyonunu HRP-Streptavidin (Component D) + HRP-Streptavidin (Component D) hazırlandı.

14. Her numuneye 100 µL HRP-Streptavidin boyama solüsyonu eklenir ve ışıktan koruyarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.

15. PBS içinde %3 BSA ile numuneler 2 x 5 dakika yıkandı.

16. DAB boyama solüsyonu DAB stock solution (Component E) + DAB stock solution (Component E) hazırlandı.

17. Her numuneye 100 µL DAB boyama solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında inkübe edildi. İstenilen düzeyde boyama elde edilene kadar renk gelişimini izlendi (tipik olarak 10-60 dakika). PBS ile durulayarak reaksiyonu durduruldu.

18. Numunelere hematoksilin ile zıt boyama yapıldı.

### **VERİLERİN İSTATİSTİKSEL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Verilerin analizi  $\Delta\Delta CT$  metodu kullanılarak bilgisayar programı ile kantitasyonu yapıldı, web tabanlı "RT<sup>2</sup> Profiler<sup>®</sup>; PCR Array Data Analysis" programında bulunan Volcano Plot analizleri kullanıldı. Metodun amacı, iki ekspresyon sonucunun  $\pm 3SD$  karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Böylelikle, gen ekspresyonunun karşılaştırılması yapılan durumlarda kontrol ve doz grubu ilgili genlerin ekspresyon değerleri rölatif olarak belirlendi. Grupların karşılaştırılması "RT<sup>2</sup> Profiler<sup>®</sup>; PCR Array Data Analysis" programında bulunan "Student t-testi" analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

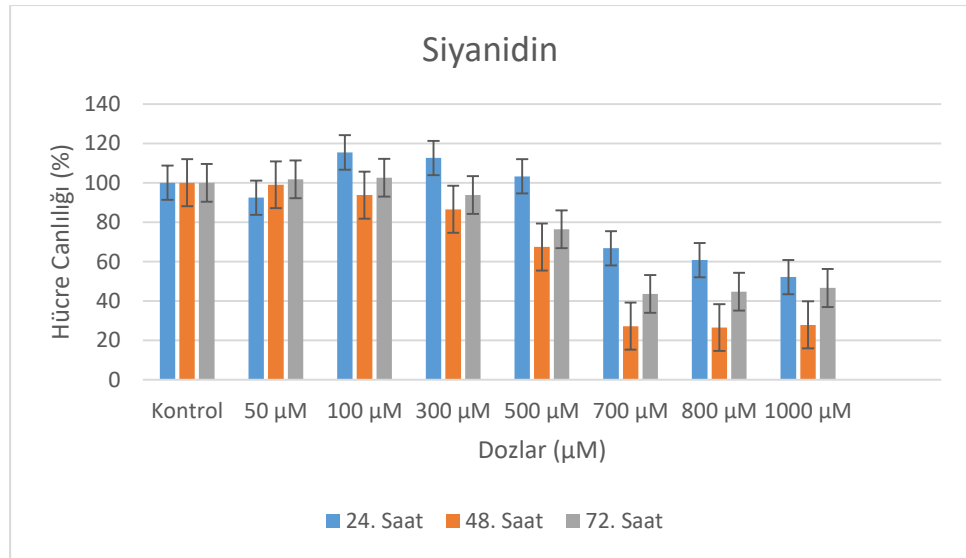
Eliza okuyucusundan alınan optik dansite değerlerinin, boş kuyucukta okunan değerler ile normalizasyonu sağlandı. Standartların OD değerleri bilinen konsantrasyonları ile %95 anlamlılık düzeyinde standart eğrisi grafinin formulasyonu aracılığıyla kalibre edildi. Veriler Graphpad Prism versiyon 8.0.2 (GraphPad Software, Inc. La Jolla California, USA) programıyla analiz edildi. Sürekli değişkenler ortalama  $\pm$  standart sapma, ortanca (en küçük- en büyük değerler) olarak ifade edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk ve Kolmogrov Smirnov testi ile incelendi. Parametrik test varsayımları sağlandığında bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi (Bonferroni's multiple comparisons test) kullanıldı. Tüm incelemelerde  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

### XTT TESTİ (HÜCRE CANLILIĞI TESTİ) SONUÇLARI

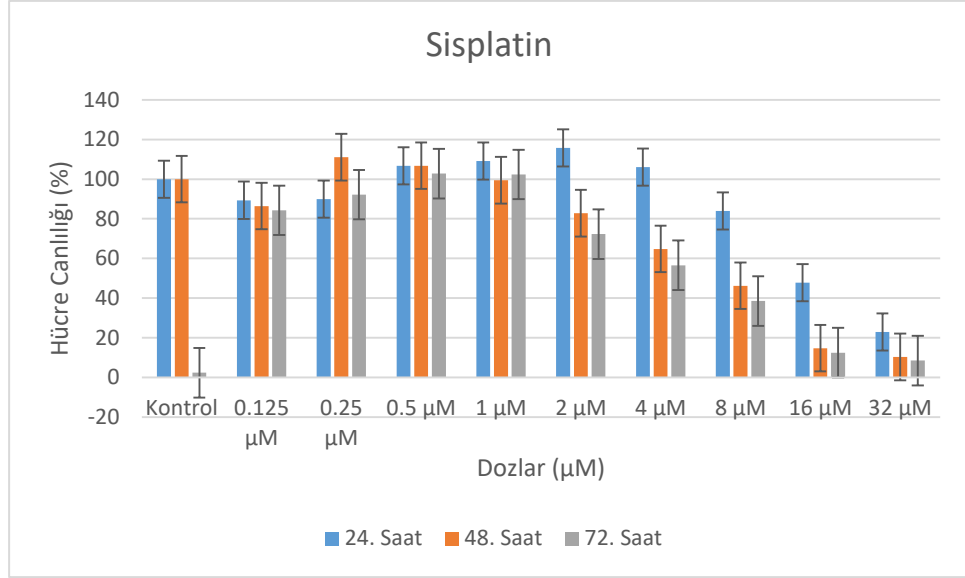
Deneyde her üç maddenin de 24. saatte hücre proliferasyonunu %50'in altına düşürememesi sebebiyle, 48. saatteki doz oranları IC<sub>50</sub> olarak kabul edildi.

Siyanidin'in 50 µM ile 1000 µM arasında 7 farklı doz konsantrasyonunda 24., 48. ve 72. Saatlerdeki etkinliği araştırıldı. Çalışma sonucuna göre Siyanidin'in IC<sub>50</sub> dozu 48. saatte 592,77 µM olarak saptandı. Siyanidin'in değişen doz aralıkları ve zamana göre etkisi Şekil 4'te görülmektedir.



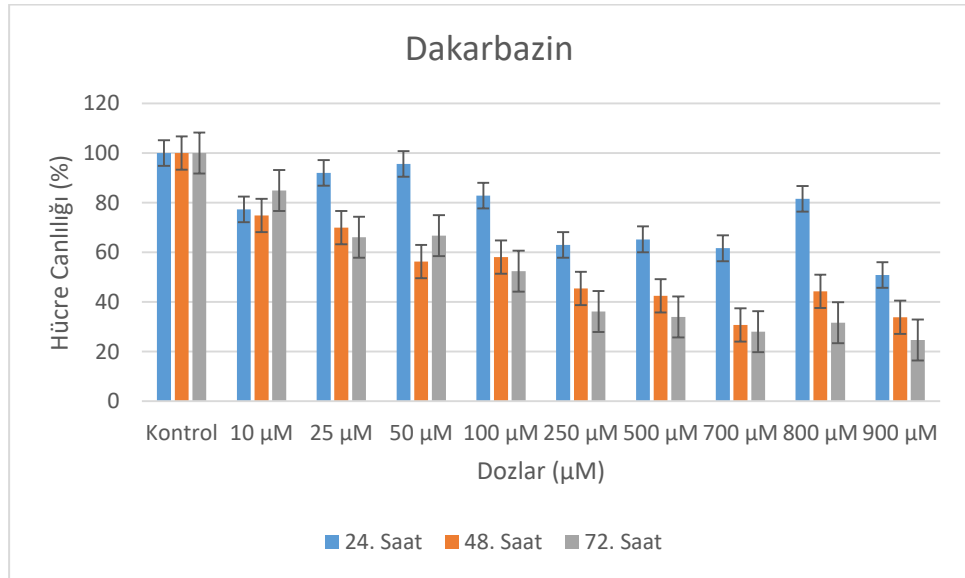
**Şekil 4.** Siyanidin'in çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi

Sisplatin'in 0.125 µM ile 32 µM arasında 9 farklı doz konsantrasyonunda 24., 48. ve 72. Saatlerdeki etkinliği araştırıldı. Çalışma sonucuna göre Sisplatin'in IC<sub>50</sub> dozu 48. saatte 6,843 µM olarak saptandı. Sisplatin'in değişen doz aralıkları ve zamana göre etkisi Şekil 5'te görülmektedir.



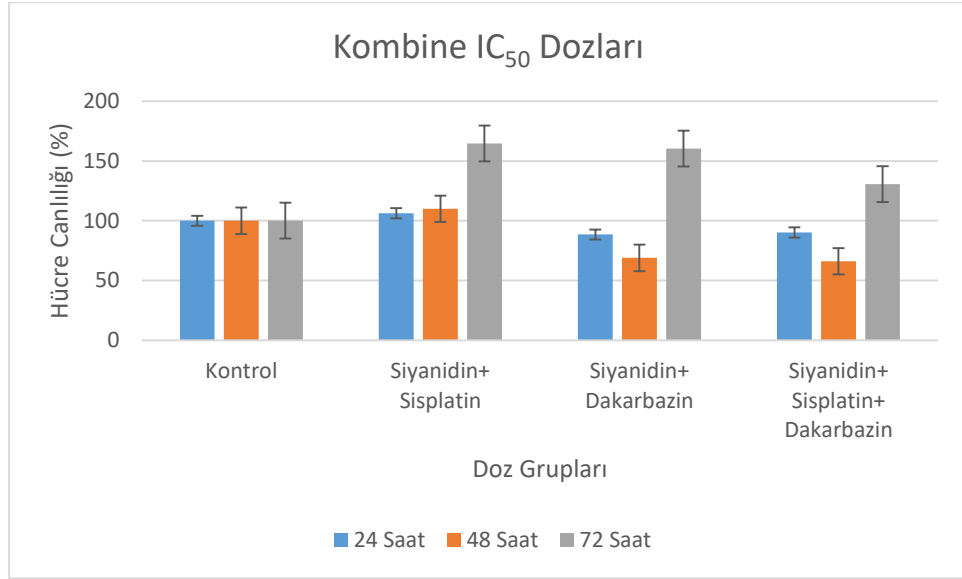
**Şekil 5.** Sisplatin'in çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi

Dakarbazin'in 10 µM ile 900 µM arasında 9 farklı doz konsantrasyonunda 24., 48. ve 72. Saatlerdeki etkinliği araştırıldı. Çalışma sonucuna göre Dakarbazin'in IC<sub>50</sub> dozu 48. saatte 168,87 µM olarak saptandı. Dakarbazin'in değişen doz aralıkları ve zamana göre etkisi Şekil 6'da görülmektedir.



**Şekil 6.** Dakarbazin'in çeşitli konsantrasyonlarda zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi.

Ardından bu dozların IC<sub>50</sub> kombinasyonları ile XTT deneyi yapıldı. Kombine dozlar; Siyanidin IC<sub>50</sub>+ Sisplatin IC<sub>50</sub>, Siyanidin IC<sub>50</sub> + Dakarbazin IC<sub>50</sub>, Siyanidin IC<sub>50</sub> + Sisplatin IC<sub>50</sub> + Dakarbazin IC<sub>50</sub> olarak seçildi. Kombine dozların da etkili zamanı 48. saat olarak tespit edildi. Doz aralıkları ve zamana göre etkisi Şekil 7’de gösterilmiştir.



**Şekil 7.** Kombine dozların zamana göre hücre canlılığına etkisinin sütun grafiği gösterimi

### TRİZOL REAGENT İLE TOTAL RNA İZOLASYONU SONUÇLARI

Trizol Reagent yardımı ile kontrol grubu ve doz grubu A375 hücrelerinden RNA izolasyonu yapıldı. Nanodrop cihazı ile RNA'ların konsantrasyon ve saflık oranları değerlendirildi. Sonuçlar Tablo 6'daki gibidir.

**Tablo 6.** İzole edilen RNA'lara ait konsantrasyon ve saflık değerleri

Grup	Konsantrasyon (ng/μl)	260/280 nm (OD)
Kontrol	631,9	1,66
Siyanidin IC <sub>50</sub>	787,1	1,78
Sisplatin IC <sub>50</sub>	3297,7	1,75
Dakarbazin IC <sub>50</sub>	207,3	1,62
Siyanidin IC <sub>50</sub> + Sisplatin IC <sub>50</sub>	2213,4	1,72
Siyanidin IC <sub>50</sub> + Dakarbazin IC <sub>50</sub>	1519,1	1,66
Siyanidin IC <sub>50</sub> + Sisplatin IC <sub>50</sub> + Dakarbazin IC <sub>50</sub>	3142,2	1,78

## GERÇEK-ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR) SONUÇLARI

Çalışmamızda incelediğimiz mRNA genlerinin değişim durumları Şekil 8'de ayrıntılı olarak verildi.

		Siyanidin IC <sub>50</sub>		Sisplatin IC <sub>50</sub>		Dakarbazin IC <sub>50</sub>		Siyanidin IC <sub>50</sub> + Sisplatin IC <sub>50</sub>		Siyanidin IC <sub>50</sub> + Dakarbazin IC <sub>50</sub>		Siyanidin IC <sub>50</sub> + Sisplatin IC <sub>50</sub> + Dakarbazin IC <sub>50</sub>	
		Fold Regulation	p-Value	Fold Regulation	p-Value	Fold Regulation	p-Value	Fold Regulation	p-Value	Fold Regulation	p-Value	Fold Regulation	p-Value
1	GAPDH	1.00	nan	1.00	nan	1.00	nan	1.00	nan	1.00	nan	1.00	nan
2	CDK4	0.20	0.052660	-263.81	0.043482	-64.00	0.044838	-288.68	0.044123	-78.98	0.044756	-21.91	0.048591
3	CDK6	-2.00	0.007231	-27.67	0.003303	-8.34	0.000441	-3.45	0.001031	-5.21	0.000968	-1.28	0.085262
4	SIKLIN D1	3.91	0.036099	258.38	0.043709	32.75	0.047903	17.59	0.055166	35.34	0.373887	1.42	0.396433
5	CASPASE3	15.28	0.330716	2.36	0.229814	8.09	0.321488	3.40	0.081341	-1.91	0.507285	2.16	0.383314
6	CASPASE8	10.56	0.124838	26.97	0.005210	-10.88	0.006634	-75.41	0.004865	22.89	0.009293	24.62	0.003358
7	CASPASE9	-1.18	0.408157	-28.77	0.841739	-29.79	0.020623	-41.36	0.557796	-4.69	0.383712	-13.96	0.456334
8	BAX	-7.57	0.015661	-88.03	0.009591	-33.13	0.010102	-31.49	0.010149	-1.40	0.411835	-4.12	0.022422
9	BCL2	-1.01	0.376909	-262.59	0.010835	-41.55	0.011966	-29.79	0.012366	-5.50	0.021673	-12.58	0.015044
10	NFKB	-5.31	0.703652	-379.16	0.330095	-159.79	0.330604	-215.77	0.330353	-91.99	0.331345	-26.11	0.334813
11	MMP2	-1.03	0.391784	-219.29	0.051441	-55.97	0.059449	-54.82	0.067898	-53.20	0.053576	-32.82	0.630258
12	MMP9	455.09	0.315637	-25.05	0.000030	1.85	0.363345	1.28	0.367665	-3.10	0.034834	12.32	0.372950
13	TIMP1	3.07	0.006534	39.03	0.001977	-3.25	0.659839	8.40	0.003013	-16.00	0.837211	-2.14	0.391663
14	TIMP2	-5.04	0.114102	-101.36	0.000966	-18.21	0.001161	-51.63	0.001002	-18.64	0.002079	380.92	0.000938
15	CASPASE10	9.08	0.121649	27.34	0.000058	-9.23	0.000081	-3.18	0.001069	-5.39	0.000273	2.34	0.004365
16	p53	2.79	0.270816	-3.35	0.577199	-6.23	0.045637	1.84	0.409706	2.43	0.372032	1.99	0.084260

**Şekil 8.** mRNA genlerinin RT-PCR sonuçları. p-değerlerindeki istatistiksel olarak anlamlı olanlar kırmızı renk ile gösterilmiştir (p değeri <0,05). (Kırmızı renk: Housekeeping gene göre kat değişiminde artış; Mavi Renk: Housekeeping gene göre kat değişiminde azalış; Siyah Renk: Anlamlı olmayan artış ya da azalmayı ifade eder.)

mRNA genlerinin RT-PCR sonuçlarına göre;

Siyanidin IC<sub>50</sub> dozu uygulanan grupta, Siklin-D1, TIMP1 genlerinde istatistiksel anlamlı artma (p değeri <0,05), CDK6, BAX genlerinde istatistiksel anlamlı azalma (p değeri <0,05) tespit edildi.

Sisplatin IC<sub>50</sub> dozu uygulanan grupta, CDK4, CDK6, Siklin-D1, Kaspaz-8, BAX, BCL-2, MMP9, TIMP1, TIMP2, Kaspaz-10 genlerinde istatistiksel anlamlı azalma (p değeri <0,05) tespit edildi.

Dakarbazin IC<sub>50</sub> dozu uygulanan grupta, CDK4, CDK6, Siklin-D1, Kaspaz-8, Kaspaz-9, BAX, BCL-2, TIMP2, Kaspaz-10, p53 genlerinde istatistiksel anlamlı azalma (p değeri <0,05) tespit edildi.



Siyanidin IC<sub>50</sub> + Sisplatin IC<sub>50</sub> dozu uygulanan grupta, CDK4, CDK6, Kaspaz-8, BAX, BCL-2, TIMP1, TIMP2, Kaspaz-10 genlerinde istatistiksel anlamlı azalma (p değeri <0,05) tespit edildi.

Siyanidin IC<sub>50</sub> + Dakarbazin IC<sub>50</sub> dozu uygulanan grupta, Kaspaz-8 geninde istatistiksel anlamlı artma (p değeri <0,05), CDK4, CDK6, BCL-2, MMP9, TIMP2, Kaspaz-10 genlerinde istatistiksel anlamlı azalma (p değeri <0,05) tespit edildi.

Siyanidin IC<sub>50</sub> + Sisplatin IC<sub>50</sub> + Dakarbazin IC<sub>50</sub> dozu uygulanan grupta, Kaspaz-10 geninde istatistiksel anlamlı artma (p değeri <0,05), CDK4, Kaspaz-8, BAX, BCL-2 TIMP2 genlerinde istatistiksel anlamlı azalma (p değeri <0,05) tespit edildi.

Çalışmamızda incelediğimiz miRNA genlerinin değişim durumları Şekil 9'da ayrıntılı olarak verildi.

		Siyanidin IC <sub>50</sub>		Sisplatin IC <sub>50</sub>		Dakarbazin IC <sub>50</sub>		Siyanidin IC <sub>50</sub> + Sisplatin IC <sub>50</sub>		Siyanidin IC <sub>50</sub> + Dakarbazin IC <sub>50</sub>		Siyanidin IC <sub>50</sub> + Sisplatin IC <sub>50</sub> + Dakarbazin IC <sub>50</sub>	
		Fold Regulation	p-Value	Fold Regulation	p-Value	Fold Regulation	p-Value	Fold Regulation	p-Value	Fold Regulation	p-Value	Fold Regulation	p-Value
1	U6	1.00	nan	1.00	nan	1.00	nan	1.00	nan	1.00	nan	1.00	nan
2	miRNA- 211	-4.67	0.001988	-127.41	0.000217	-60.13	0.000278	-4.38	0.215467	-1.88	0.057742	-147.03	0.000217
3	miRNA- 10b	2.01	0.069517	-107.63	0.004106	-3.41	0.021331	1.07	0.399158	-3.68	0.014436	-85.43	0.004214
4	miRNA- 18a-5p	-3.06	0.022251	-123.93	0.005464	-41.07	0.005809	-23.43	0.042623	-1.80	0.167281	-835.60	0.005354
5	miRNA- 146a	2.60	0.015278	-4.92	0.000220	-1.19	0.101362	1.84	0.390606	-14.12	0.000152	-1.24	0.065371
6	miRNA- 7-5-p	18.90	0.005402	-183.55	0.000753	2.42	0.001232	8.98	0.309847	14.06	0.007071	-3.19	0.003513

**Şekil 9.** miRNA genlerinin RT-PCR sonuçları. p-değerlerindeki istatistiksel olarak anlamlı olanlar kırmızı renk ile gösterilmiştir (p değeri <0,05). (Kırmızı renk: Housekeeping gene göre kat değişiminde artış; Mavi Renk: Housekeeping gene göre kat değişiminde azalış; Siyah Renk: Anlamlı olmayan artış ya da azalmayı ifade eder.)

Siyanidin IC<sub>50</sub> dozu uygulanan grupta, miRNA-146a, miRNA-7-5-p genlerinde istatistiksel anlamlı artma (p değeri <0,05), miRNA-211, miRNA-18a-5p genlerinde istatistiksel anlamlı azalma (p değeri <0,05) tespit edildi.

Sisplatin IC<sub>50</sub> dozu uygulanan grupta, miRNA-211, miRNA-10b, miRNA-18a-5p, miRNA-146a, miRNA-7-5-p genlerinde istatistiksel anlamlı azalma (p değeri <0,05) tespit edildi.

Dakarbazin IC<sub>50</sub> dozu uygulanan grupta, miRNA-7-5-p geninde istatistiksel anlamlı artma (p değeri <0,05), miRNA-211, miRNA-10b, miRNA-18a-5p genlerinde istatistiksel anlamlı azalma (p değeri <0,05) tespit edildi.

Siyanidin IC<sub>50</sub> + Sisplatin IC<sub>50</sub> dozu uygulanan grupta, miRNA-18a-5p geninde istatistiksel anlamlı azalma (p değeri <0,05) tespit edildi.

Siyanidin IC<sub>50</sub> + Dakarbazin IC<sub>50</sub> dozu uygulanan grupta, miRNA-7-5-p geninde istatistiksel anlamlı artma (p değeri <0,05), miRNA-10b, miRNA-146a genlerinde istatistiksel anlamlı azalma (p değeri <0,05) tespit edildi.

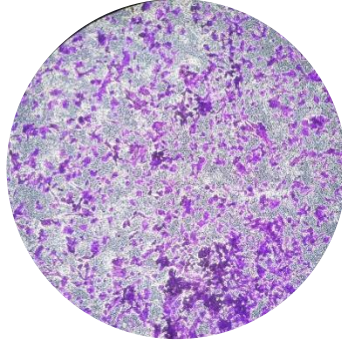
Siyanidin IC<sub>50</sub> + Sisplatin IC<sub>50</sub> + Dakarbazin IC<sub>50</sub> dozu uygulanan grupta, miRNA-211, miRNA-10b, miRNA-18a-5p, miRNA-7-5-p istatistiksel anlamlı azalma (p değeri <0,05) tespit edildi.

### **MATRİGEL İNVAZYON DENEYİ SONUÇLARI**

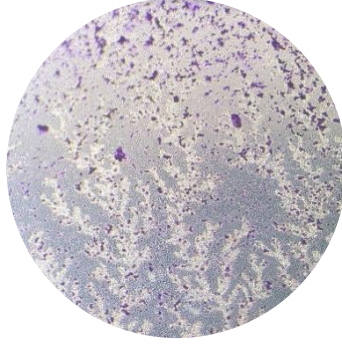
Deney sonucunda:

- Kontrol grubu hücrelerinden ortalama 649,33±21,75 hücre
- Siyanidin IC<sub>50</sub> uygulanan hücrelerden de ortalama olarak 175,33±29,41 hücre
- Sisplatin IC<sub>50</sub> uygulanan hücrelerden de ortalama olarak 168,67±6,24 hücre
- Dakarbazin IC<sub>50</sub> uygulanan hücrelerden de ortalama olarak 537,33±44,4 hücre
- Siyanidin IC<sub>50</sub> + Sisplatin IC<sub>50</sub> uygulanan hücrelerden de ortalama olarak 112,67±12,3 hücre
- Siyanidin IC<sub>50</sub> + Dakarbazin IC<sub>50</sub> uygulanan hücrelerden de ortalama olarak 42±9,42 hücre
- Siyanidin IC<sub>50</sub> + Sisplatin IC<sub>50</sub> + Dakarbazin IC<sub>50</sub> uygulanan hücrelerden de ortalama olarak 59,67±13,2 hücre

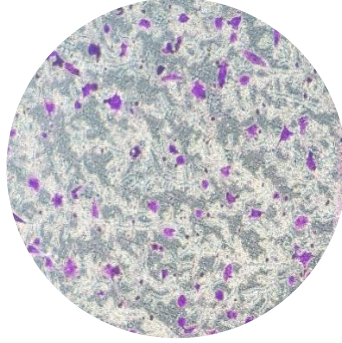
invaze oldu. Siyanidin IC<sub>50</sub> tek başına kontrole kıyasla önemli ölçüde invazyon miktarını düşürdü. Dakarbazin IC<sub>50</sub> dozunun invazyon miktarı kontrole yakın olmakla birlikte, Siyanidin IC<sub>50</sub> ile kombine dozda kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde azaldı. Siyanidin IC<sub>50</sub>'nın tüm kombine dozlarında, kontrole ve tekli ilaç dozu gruplarına göre invazyonda belirgin azalma gözlemlendi. Kontrol, tekli ve kombine ilaç dozlarının inverted mikroskoptaki 10x görüntüleri Şekil 10-16'da gösterilmiştir.



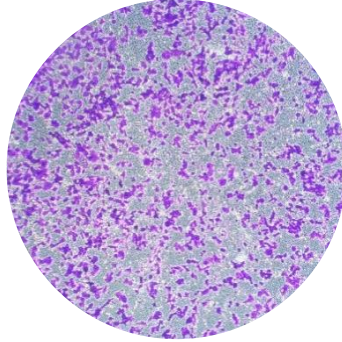
**Şekil 10.** Kontrol grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)



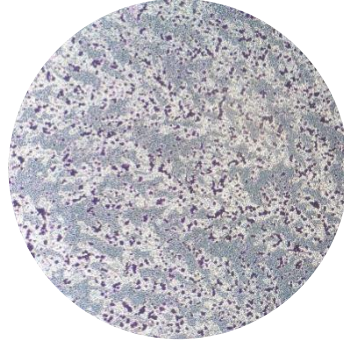
**Şekil 11.** Siyanidin  $IC_{50}$  grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)



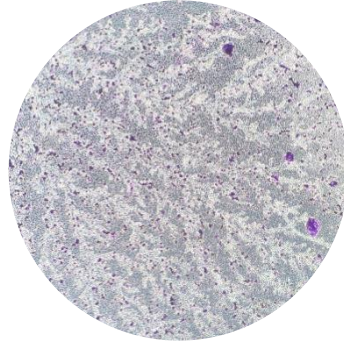
**Şekil 12.** Sisplatin  $IC_{50}$  grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)



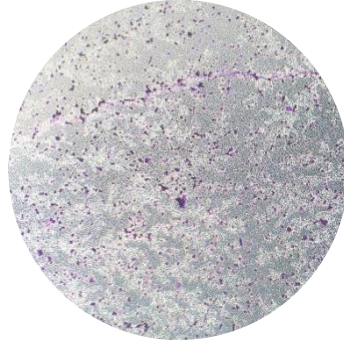
**Şekil 13.** Dakarbazin  $IC_{50}$  grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)



**Şekil 14.** Siyanidin  $IC_{50}$  + Sisplatin  $IC_{50}$  grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)



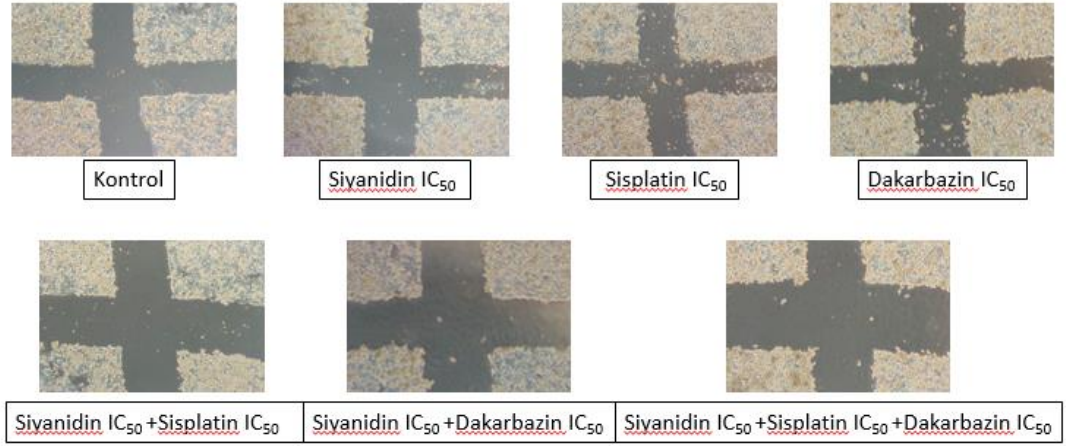
**Şekil 15.** Siyanidin  $IC_{50}$  + Dakarbazin  $IC_{50}$  grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)



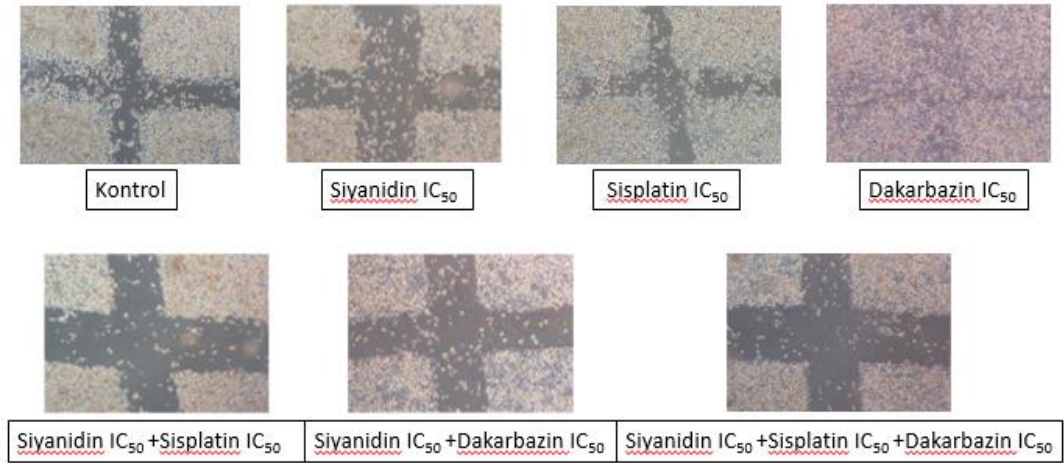
**Şekil 16.** Siyanidin  $IC_{50}$  + Sisplatin  $IC_{50}$  + Dakarbazin  $IC_{50}$  grubunda invaze olan hücrelerin mikroskop görüntüsü (10X)

## WOUND HEALING DENEYİ SONUÇLARI

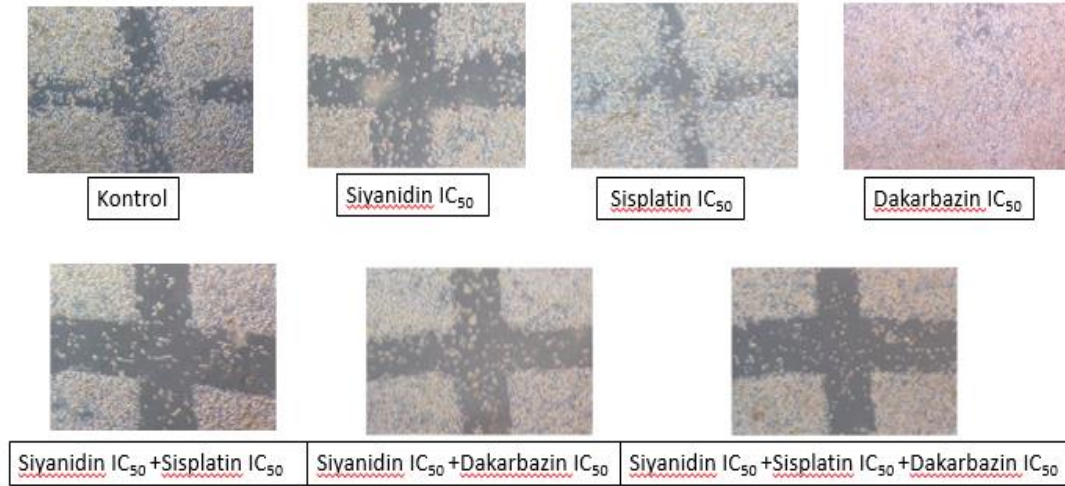
Wound-Healing deneyi sonuçlarının 0, 16 ve 24 saatte 4X büyütme ile fotoğrafları çekilip kontrol grubu ile karşılaştırmalı analiz sonuçları şu şekildedir.. (Şekil 17,18,19)



Şekil 17. Wound healing deneyi 0. Saat sonuçları (4X)



Şekil 18. Wound healing deneyi 16. Saat sonuçları (4X)



**Şekil 19.** Wound healing deneyi 24. Saat sonuçları (4X)

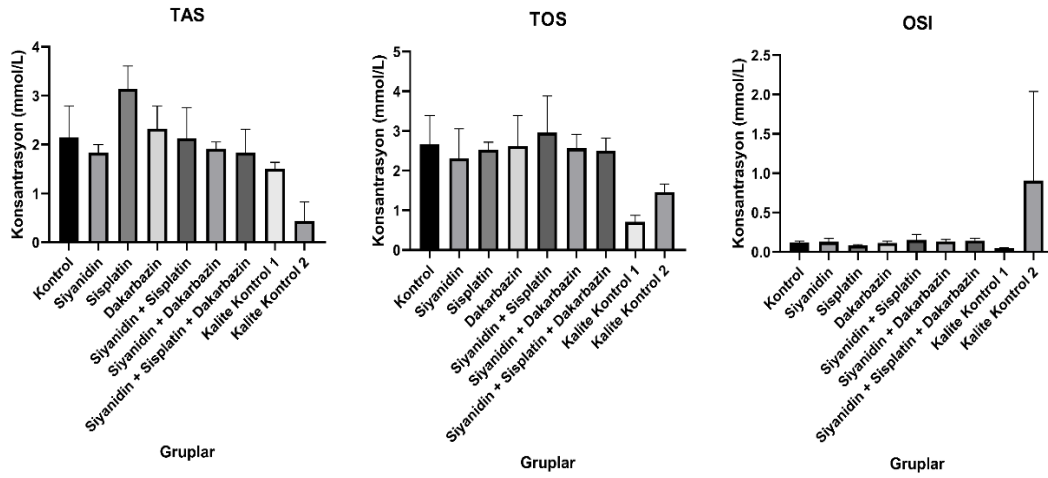
Siyanidin, 16. saat sonunda, kontrol grubuna kıyasla tek başına hücrelerin migrasyonunu artırmada gözle görülür bir farklılık oluşturmadı. Sisplatin ve Dakarbazin'in tekli dozlarda hücre migrasyonunu kontrol grubuna göre daha çok artırdığı gözlemlendi. Kombine dozlar; kontrol ve tekli doz uygulamalarına göre hücre migrasyonunu belirgin olarak daha fazla engelledi.

### **OKSİDATİF STRES DÜZEYİNİN TOTAL OKSİDAN VE TOTAL ANTİOKSİDAN SEVİYE ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ İLE BELİRLENMESİ**

Deney sonuçlarına göre gruplar arasındaki karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. (p değeri >0,05). TAS değeri kontrole kıyasla, Siyanidin grubunda ve tekli ilaç doz gruplarına göre Siyanidin içeren kombinasyonlarda arttı. TOS değeri kontrole kıyasla, Siyanidin, tekli ilaç dozları ile siyanidin + dakarbazin ve siyanidin + sisplatin + dakarbazinle kombinasyonlarında azalmakla birlikte siyanidin + sisplatin kombinasyonu uygulanan grupta arttı. OSİ sonuçlarında, Siyanidin tek başına pek bir fark oluşturmamakla birlikte, kombinasyon gruplarında yükselmeye sebep oldu. Sonuç olarak TAS, TOS ve OSİ değerlerini gösteren tablo ve grafikler aşağıdaki gibidir. (Tablo 7, Şekil 20)

**Tablo 7.** A375 hücrelerinde kontrol ve doz gruplarının TAS, TOS ve OSİ değerleri

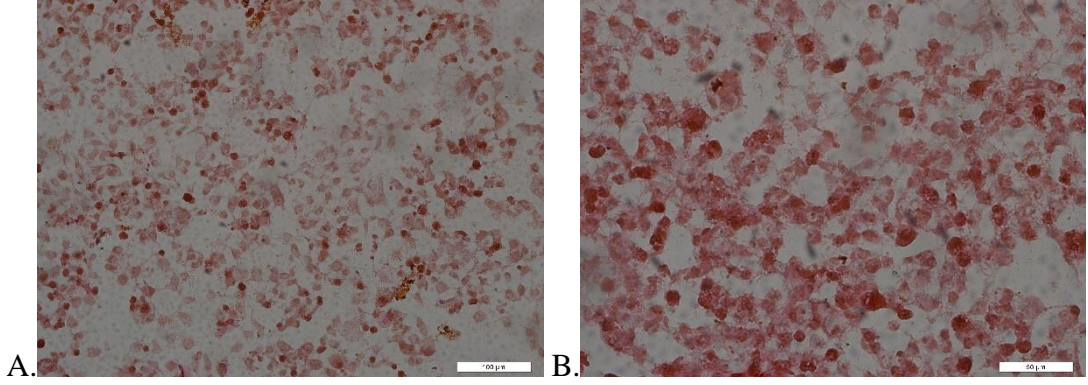
Grup	TAS (mmol/L)	TOS (mmol/L)	OSİ
Kontrol	2,154702±0,51898	2,667869±0,589237	0,1249±0,007526
Siyanidin IC <sub>50</sub>	1,834047±0,130755	2,305555±0,612921	0,127031±0,020028
Sisplatin IC <sub>50</sub>	3,138603±0,382879	2,526327±0,155999	0,081649±0,010942
Dakarbazin IC <sub>50</sub>	2,329924±0,373652	2,61881±0,628376	0,113334±0,00763
Siyanidin IC <sub>50</sub> + Sisplatin IC <sub>50</sub>	2,127902±0,508709	2,961304±0,75	0,150103±0,037124
Siyanidin IC <sub>50</sub> + Dakarbazin IC <sub>50</sub>	1,912389±0,113696	2,565919±0,283213	0,135143±0,009712
Siyanidin IC <sub>50</sub> + Sisplatin IC <sub>50</sub> + Dakarbazin IC <sub>50</sub>	1,83392±0,388857	2,500697±0,254701	0,141323±0,023207



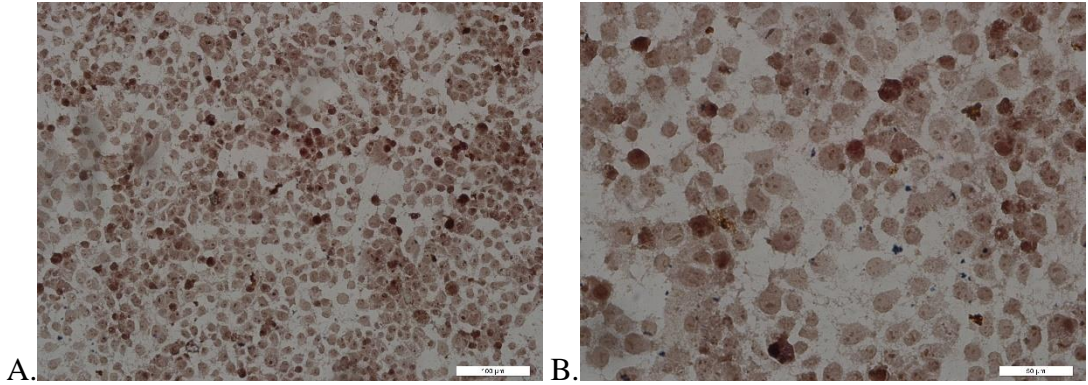
**Şekil 20.** A375 hücrelerinde kontrol grubuna göre kontrol ve doz gruplarında TAS, TOS, OSİ değerleri

## TUNEL TESTİ İLE APOPTOZ TAYİNİ

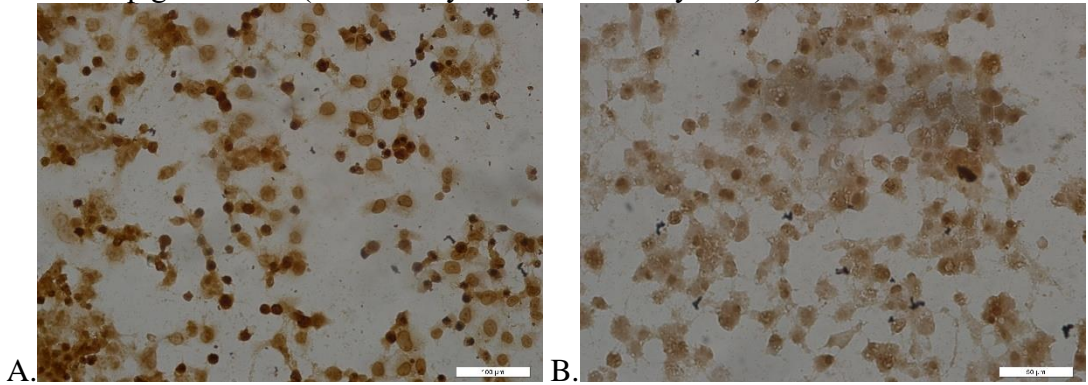
Kontrol ve doz gruplarına ait örnek preparat görüntüleri Şekil 21-27'de gösterildi.



**Şekil 21.** Kontrol grubuna ait hücrelerin TUNEL boyaması sonrası ışık mikroskop görüntüleri (A. 20X büyütme, B. 40X büyütme)

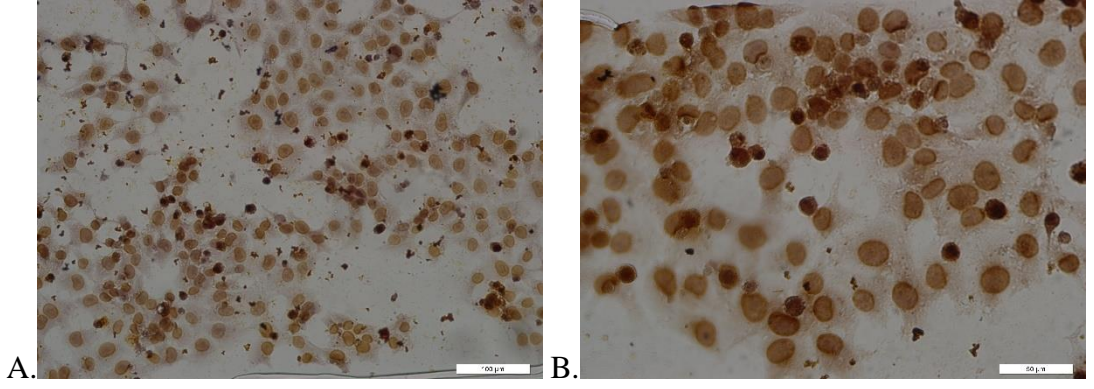


**Şekil 22.** Siyanidin  $IC_{50}$  grubuna ait hücrelerin TUNEL boyaması sonrası ışık mikroskop görüntüleri (A. 20X büyütme, B. 40X büyütme)

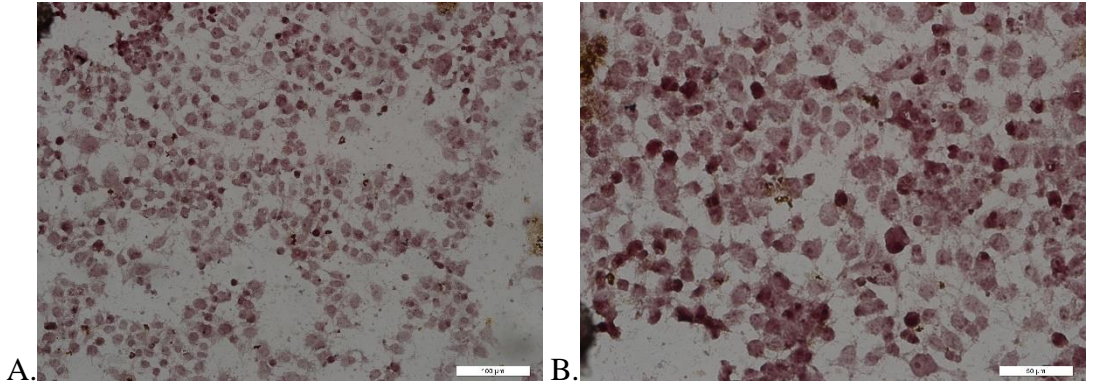


**Şekil 23.** Sisplatin  $IC_{50}$  grubuna ait hücrelerin TUNEL boyaması sonrası ışık mikroskop görüntüleri (A. 20X büyütme, B. 40X büyütme)

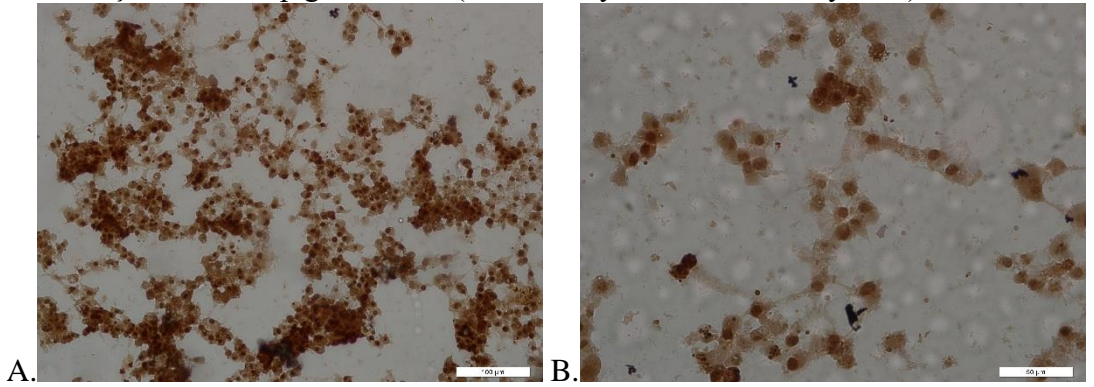




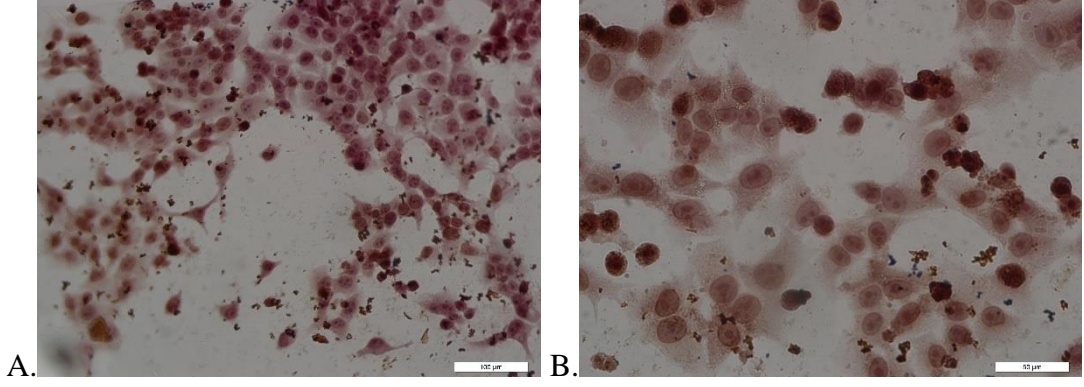
**Şekil 24.** Dakarbazin  $IC_{50}$  grubuna ait hücrelerin TUNEL boyaması sonrası ışık mikroskop görüntüleri (A. 20X büyütme, B. 40X büyütme)



**Şekil 25.** Siyanidin  $IC_{50}$  + Sisplatin  $IC_{50}$  grubuna ait hücrelerin TUNEL boyaması sonrası ışık mikroskop görüntüleri (A. 20X büyütme, B. 40X büyütme)



**Şekil 26.** Siyanidin  $IC_{50}$  + Dakarbazine  $IC_{50}$  grubuna ait hücrelerin TUNEL boyaması sonrası ışık mikroskop görüntüleri (A. 20X büyütme, B. 40X büyütme)



**Şekil 27.** Siyanidin IC<sub>50</sub> + Sisplatin IC<sub>50</sub> + Dakarbazin IC<sub>50</sub> grubuna ait hücrelerin TUNEL boyaması sonrası ışık mikroskop görüntüleri (A. 20X büyütme, B. 40X büyütme).

Kontrol grubu hücrelerinde ortalama apoptotik hücre oranı %29,33 iken; Siyanidin IC<sub>50</sub>'de ortalama apoptotik hücre yüzdesi %29,60, Sisplatin IC<sub>50</sub> doz grubunda %50,68, Dakarbazin IC<sub>50</sub> doz grubunda %33,63, Siyanidin IC<sub>50</sub> + Sisplatin IC<sub>50</sub> doz grubunda %45,99, Siyanidin IC<sub>50</sub> + Dakarbazin IC<sub>50</sub> doz grubunda %,67,20, Siyanidin IC<sub>50</sub> + Sisplatin IC<sub>50</sub> + Dakarbazin IC<sub>50</sub> doz grubunda %38.01 olarak belirledik.

MM hücreleri normalde daha iğsi yapıda olmalarına rağmen, bazı gruplarda hücrelerin morfolojilerinin farklı olduğunu gözlemledik. Morfolojideki bu bozukluğun; madde uygulanması, plaka değişikliği ve metanolle muamele safhasındaki stresten kaynaklanmış olabileceğini düşünüyoruz.

## TARTIŞMA

Melanogenez sürecinde hücre döngüsü kontrolünün bozulması önemli bir basamaktır. G1-S ve G2-M kontrol noktalarını hedefleyen ajanlar, melanoma tedavi stratejileri için potansiyel adaylar olarak düşünülebilir (56). Siyanidin'in G0/G1 ve G2/M fazında hücre döngüsünü durdurabildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. CDK4/6 ve Siklin-D1 kompleksinin hiperaktivasyonu melanoma vakalarının yaklaşık %90'ında gözlenir (48,57). Bu oran dikkat çekici olduğu için çalışmamızda araştırmaya karar verdik.

Wang E. ve arkadaşları, 2017 yılında yaptıkları çalışmada, antosiyanidin ekstratlarının B16-F10 melanoma hücrelerindeki antiproliferatif ve proapoptotik etkilerini araştırmışlar; siyanidinlerin hücre döngüsünü bloke ederek ve apoptotozu indükleyerek antiproliferatif etki gösterdiğini rapor etmişlerdir (48). Hücre döngüsünde görevli molekülerin düzeylerini flow sitometri ile değerlendirmişler ve Siklin-D1'in, antosiyanidin ile tedavi edilen gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığını gözlemlemişlerdir ( $p<0.05$ ). Pratheeshkumar P. ve arkadaşları tarafından 2014 yılında yapılan çalışmada, UVB kaynaklı deri kanseri için bir model olan SKH-1 tüysüz fareleri denek olarak kullanmışlar, bir siyanidin bileşiği olan C3G'nin topikal uygulama ile antiinflamatuvar ve fotokarsinogeneze karşı koruyucu etkilerini araştırmışlardır (72). Hücre proliferasyonu değerlendirmek için PCNA ve Siklin-D1 biyobelirteçleri RT-PCR ve immünofloresan boyama ile ölçmüşlerdir. Bu çalışmada, C3G uygulanmasının, UVB ile indüklenen epidermal kalınlaşmayı ve PCNA ile Siklin-D1'in mRNA ve protein ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığını rapor etmişlerdir. LNCaP androjene bağımlı prostat kanserinde yapılan çalışmalarda; Yeewa R. ve arkadaşlarının 2020'de mor pirinçten, Long N. ve arkadaşlarının 2013'te mor mısırdan elde ettikleri aktif komponenti C3G olan siyanidin ekstratlarının inhibitör etkilerini in vivo ve in vitro olarak araştırmışlardır (73,74). Siyanidinlerin hücre proliferasyonunu anlamlı olarak azalttığı; G0/G1 fazındaki hücrelerin oranını artırıp ve S ile G2/M fazlarındaki hücrelerin oranını azalttığını göstermişlerdir ( $p<0.05$ ). Siklin-D1, hem RT-PCR hem de Western Blot yöntemiyle incelenmiş, her iki çalışmada da seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir (73, 74). CDK-4'nin RT-PCR yöntemiyle azaldığını göstermişlerdir (73).

Biz de çalışmamızda, siyanidin verilen grupta; CDK4'te belirgin ve CDK6'da anlamlı olarak azalma ( $p < 0.05$ ), Siklin-D1 seviyelerinde anlamlı artma ( $p < 0.05$ ) görüldü. Tekli ilaç dozlarında CDK4, CDK6 ve Siklin-D1 anlamlı olarak azalırken, kombine dozlarda CDK4 ve CDK6 anlamlı olarak azaldı. Siyanidin A375 hücre hattı üzerinde, CDK4 ve CDK6 üzerindeki azaltıcı, Siklin-D1 üzerindeki artırıcı etkisiyle kısıtlı bir etkinliğe sahip gibi görünmektedir. Ancak CDK4/6 ve Siklin-D1 bir kompleks olarak çalışmaktadır ve net etkiyi tayin edebilmek için ileri incelemeler yapılmalıdır.

Apoptoz, ölüm reseptörleri ya da mitokondri aracılı olarak kaspazların aktivasyonu ile gelişen bir süreçtir (58). Bu süreçte birçok apoptotik protein rol oynar. Siyanidin kaynaklı apoptozun, kaspaz ailesi, p53, Bax, Bcl-2 gibi moleküllerin seviyeleri ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (48). Kansere gelişiminde apoptotik (p53, Bax, Bid, TNF, PUMA) ve anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, NF- $\kappa$ B) moleküllerin etkileşimlerinin anlaşılması kemoterapi direncinin anlaşılmasını için de önemlidir (58).

Wang E. ve arkadaşları, siyanidin ekstratları uygulanmış B16-F10 melanoma hücrelerindeki proapoptotik moleküller mekanizmaları araştırmışlardır (48). Apoptozdaki iki önemli protein Kaspaz-3 ve p53'ü, immüno Floresan yöntemle analiz etmişlerdir. Kaspaz-3 ve p53'ün ekspresyonunu anlamlı miktarda artırdığını göstermişlerdir ( $p < 0.05$ ). Bu sonuç siyanidin apoptozu indükleyebileceği lehinedir. Sorrenti V. ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmada; DU145 ve LNCaP insan prostat kanseri hücrelerinde C3G'nin antiproliferatif özelliklerini ve hücreler farklılaşmaya etkilerini incelemişlerdir (75). Western Blot analizi ile Kaspaz-3'ün aktivasyonunu göstermişlerdir. Cho E. Ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptıkları çalışmayla in vitro meme apokrin karsinom modelinde C3G'nin etkilerini araştırmışlardır(49). Apoptoz kaskadının moleküllerini Western Blot ile belirlemişler; C3G'nin Kaspaz-3 aktivasyonunu artırdığını ve Bcl-2 ekspresyonunu azalttığını göstermişlerdir. C3G'nin apoptotik yolakla kanser büyümesini önleyebileceğini kanıtlamışlardır. Reddivari L. ve arkadaşlarının 2007'de yaptıkları çalışmada, LNCaP (androjene bağımlı) ve PC-3 (androjenden bağımsız) prostat kanseri hücrelerinde patatesten elde edilen siyanidin ve fenolik bileşiklerinin etkilerini incelemişlerdir (76). Siyanidin bileşiklerinin, intrinsik apoptotik yolları indüklediğine dair sonuçlar elde

etmişlerdir. Western Blot deneyi ile Siyanidin uygulanan gruplardaki Kaspaz-3, Kaspaz-9 ve Bax seviyelerindeki artışı göstermişlerdir. Wu C. ve arkadaşlarının 2022 yılında fareler üzerinde büyük hücreli akciğer kanser modeli oluşturarak yaptıkları çalışmada; C3G ve 5-florourasil (5-FU) tekli ve kombine tedavilerin etkinliklerini incelemişlerdir (77). C3G'nin tek başına, antiproliferatif ve antikanser etkilerini göstermekle birlikte, 5-FU ile de sinerjistik antikanser etkilere sahip olduğunu göstermişlerdir. Western Blot deneyi ile tüm tedavi gruplarında kaspaz 3'ün arttığını, Bcl-2 ekspresyonunun azaldığını bulmuşlardır. Pratheeshkumar P. ve arkadaşları 2014 yılında UVB ile indüklenen deri karsinogenezini araştırmışlar, UVB maruziyeti oluşturdukları fare modellerindeki kronik inflamatuvar yanıtlara, C3G'nin in vivo etkilerini incelemişlerdir (72). NF-κB'nin anormal, sürekli aktivasyonu çok sayıda tümörde rapor edilmiştir. Elisa ve immunflorasan boyamalarla NF-κB'nin aktivasyonun doza bağlı olarak azaldığını göstermişlerdir. Sonuç olarak C3G, UVB kaynaklı NF-κB aktivasyonunu inhibe etmiştir. Wang Y. ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları çalışmada, Siyanidinlerin antitümör etkisini araştırmak için fareler üzerinde SGC-7901 mide kanseri ksenograft modeli kurmuşlar; Siyanidin doza bağlı olarak hücre döngüsünü inhibe ettiği ve tümör ksenograftlarının büyümesini önemli ölçüde baskılayabildiğini göstermişlerdir (78). Apoptozda p53, p21'i artırarak hücre çoğalmasını durdurur. Western Blot deneyinin sonuçlarında p53 ekspresyonunun belirgin şekilde değişmediğini ancak p21 seviyelerinin arttığını tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda, siyanidin verilen grupta; BAX'ta anlamlı olarak azalma görüldü ( $p < 0.05$ ). Tekli ilaç dozlarında Kaspaz-8, Kaspaz-9, BAX, BCL-2, TIMP2, Kaspaz-10 ve p53 anlamlı olarak azaldı ( $p < 0.05$ ). Kombine dozlarda, Siyanidin ve sisplatin grubunda Kaspaz-8 ve Kaspaz-10 anlamlı olarak azaldı; Siyanidin ve dakarbazin grubunda Kaspaz-8 anlamlı seviyede artarken, Kaspaz-10 anlamlı olarak azaldı, her üç maddenin uygulandığı grupta ise Kaspaz-10 anlamlı seviyede artarken, Kaspaz-8 anlamlı olarak azaldı ( $p < 0.05$ ). BAX, BCL-2 tekli ve kombine dozlarda anlamlı olarak azaldı ( $p < 0.05$ ). Tümör baskılayıcı gen olan p53, Siyanidin grubunda belirgin seviyede artarken, tekli ilaç dozlarında azaldı. Siyanidin'in dakarbazin ile kombinasyonunda da belirgin p53 artışı sağladığını gözledik. Siyanidin'in A375 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkilerine ve kısıtlı da olsa ekstrinsik yolağın aktivasyonuna işaret etmektedir.

Melanoma oldukça invaziv ve metastatik bir tümördür. Bazal membranların ve hücre dışı matrisin bozulması, invazyon ve metastaz oluşumunda önemli bir basamaktır. Hücre dışı matris bileşenlerini bozan MMP ve bunların doku inhibitörleri olan TIMP ailesi bu süreçlerde önemli roller oynar (62).

Sun C. ve arkadaşlarının 2012'de yaptıkları çalışmada, C3G ile tedavi edilen SGC7901, AGS ve BGC823 mide hücrelerinin, doz bağımlı olarak, hücre proliferasyonu ve adezyonunda azalma ve apoptoz sırasında anormal morfolojik değişimlerini raporlamışlardır (63). Kanser invazyonu ve metastazı yolaklarını araştırmışlar, Western blot deneyi ile MMP2'nin anlamlı olarak azaldığı tespit etmişlerdir. Tsubaki M. ve arkadaşlarının 2019'da yaptıkları çalışmada, MM modeli geliştirilen farelerde dakarbazin ve statinlerin tekli ve kombine tedavilerinin, kanser proliferasyonu ve metastazı üzerindeki etkilerini araştırmışlardır (79). RT-PCR yöntemi ile dakarbazinin, tek başına uygulandığı grupta, MMP2 ve MMP9 seviyelerini artırdığını göstermişlerdir. Chen P. ve arkadaşlarının 2006'da yaptığı çalışmada, C3G'nin A549 insan akciğer kanseri hücre hattındaki invazyonu önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir (50). Jelatin-zimogram proteaz deneyleri ile MMP2 ve MMP9'un RT-PCR ile MMP2'nin C3G tedavisiyle azaldığını; Western Blot deneyi ve RT-PCR ile TIMP2 seviyelerinin C3G tedavisiyle arttığını bulmuşlardır. Toricelli M. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, metastaz gelişimi ile ilişkili olduğu bilinen anoikis direnci ile ilgili yolakları, laboratuvar şartlarında MM modelleyerek araştırmışlardır (65). Western Blot deneyi ile belirlenen sonuçlarda, TIMP1 ve CD63 transkript seviyelerinin arttığını; TIMP1'in artan ekspresyonunun metastaz gelişimi ve kötü prognoz ile ilişkilendirilebileceğini raporlamışlardır.

Bizim çalışmamızda. Siyanidin verilen grupta; TIMP1 seviyelerinde anlamlı artma ( $p<0.05$ ), TIMP2 genlerinde belirgin azalma tespit edildi. Tekli ilaç dozlarından sisplatin grubunda TIMP1 ve TIMP2, dakarbazin grubunda TIMP2 anlamlı olarak azaldı. ( $p<0.05$ ) Kombine dozlarda, Siyanidin ve sisplatin grubunda TIMP1 ve TIMP2 anlamlı olarak azalırken ( $p<0.05$ ); MMP2 genlerinde belirgin azalma tespit edildi. Siyanidin ve dakarbazin grubunda MMP9 ve TIMP2 anlamlı seviyede azalırken ( $p<0.05$ ); MMP2, TIMP1 genlerinde belirgin azalma tespit edildi. Her üç maddenin uygulandığı grupta ise TIMP2 anlamlı olarak azalırken ( $p<0.05$ ); MMP2, TIMP1 genlerinde belirgin azalma tespit edildi. Siyanidin'in tek başına metastatik süreçlere

etkinliği kısıtlı olsa da; kombine tedavilerle, ilaçların antimetastatik etkinliklerini artırabildiğini gösterdik.

Son yıllarda, çeşitli kanserlerde ve özellikle melanomada miRNA'ların rolü dikkat çekmiştir (66). miRNA'ların tümör baskılayıcı veya onkogen olarak görev yaparak kanser gelişimini etkilediği çalışmalarla gösterilmiştir (68). Mazar ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, miRNA'ların melanoma hücre hatlarında ve klinik melanoma örneklerinde ekspresyon seviyelerini incelemişlerdir (68). Hücre dizilerinde ve klinik örneklerde miRNA-211'in ekspresyonunda azalma raporlamışlardır. miRNA-211'nin hedef mRNA'sı KCNMA1'in, ekspresyon seviyelerinin melanoma hücrelerinde yükseldiğini ve ikisinin ters orantılı olduğunu göstermişlerdir. KCNMA1 geni, Ca<sup>++</sup> iyonu tarafından düzenlenen bir K<sup>+</sup> kanal proteinini kodlar ve melanomanın yüksek hücre proliferasyon hızı ve invazivliğinden kısmen sorumlu olduğu düşünölmektedir. TRPM1 geni, kodlamasında miRNA-211 dizileri içeren bir melanoma metastazı baskılayıcıdır. miRNA ekspresyonlarındaki azalmanın, bu mekanizmalarla onkogenez ve invazyonu artırabileceğini raporlamışlardır. Biz de çalışmamızda miRNA-211 seviyelerinin Siyanidin, üçlü doz grubunda anlamlı olarak azaldığını gözlemledik, ayrıca sisplatin ve dakarbazinin tekli ilaç dozları gruplarında da miRNA-211 seviyeleri anlamlı olarak azaldı.

Wang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, miRNA-10b'nin onkojenik özelliklerini göstermişlerdir (67). miRNA-10b miktarı yıkımla azaltıldığında, melanoma hücre proliferasyonun, migrasyonun ve invazyonun in vitro inhibe edildiği raporlanmıştır. Mekanizma olarak da melanomanın gelişimi ve ilerlemesi için çok önemli olduğunu gösterilen WNT/β-katenin yolağının düzenlenmesi öne sürölmüştür. miRNA-10b'nin azalmasıyla artan ITCH ekspresyonun, WNT/β-katenin yolağını ve in vivo tümör büyümesini baskılayabileceğini göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda miRNA-10b seviyelerinin siyanidin+dakarbazin kombinasyonu ve üçlü doz grubunda anlamlı olarak azaldığını gözlemledik, ayrıca sisplatin ve dakarbazinin tekli ilaç dozları gruplarında da miRNA-10b seviyeleri anlamlı olarak azaldı.

Guo ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, melanoma hücrelerinde miRNA-18a-5p'nin hücre proliferasyonu, apoptoz ve otofajideki düzenleyici rollerini araştırmışlardır (71). miRNA-18a-5p'in inhibe edilmesiyle, proliferasyon azalmış ve melanoma hücrelerinde apoptoz ve otofajinin tetiklendiği gözlenmiştir. miRNA-18a-

5p ekspresyon seviyelerinin en çok A375 hücre hatlarında arttığı raporlanmıştır. Çalışmamızda, miRNA-18a-5p seviyelerinin siyanidin+dakarbazin kombinasyonu hariç tüm doz gruplarında anlamlı olarak azaldığını gözlemledik.

Pu ve arkadaşları, miRNA-146a'nın MM'deki moleküler mekanizmalarını araştırmışlar ve bir onkogen olabileceğini raporlamışlardır (66). miRNA-146a ekspresyonun MM'de arttığı ve hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu artırdığı gözlenmiştir. SMAD4, bir tümör baskılayıcıdır ve akciğer, kolon, meme ve mide kanserleri gibi kanserlerde SMAD4 kaybının meydana geldiğini önceki araştırmalarda gösterilmiştir. MM'de SMAD4'ün protein ekspresyon seviyesinin miRNA-146a ile ters orantılı olduğu tespit edilmiştir. miRNA-146a'nın SMAD4'ü hedefleyerek bir onkogen rolü oynadığı deneylerle gösterilmiştir. Sonuçlarımızdaki miRNA-146a seviyelerini incelersek; Siyanidin grubunda anlamlı olarak artma; ancak siyanidin + dakarbazin kombinasyonunda anlamlı olarak azalma mevcuttu. Ayrıca sisplatin tekli ilaç dozu grubunda da miRNA-146a seviyeleri anlamlı olarak azaldı.

Giles ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, miRNA-7-5p'nin melanomadaki fonksiyonel rolünü araştırmışlar ve miRNA-7-5p, melanomada yeni bir tümör baskılayıcı miRNA olabileceğini rapor etmişlerdir (69). miRNA-7-5p'nin hücre migrasyonunu ve invazyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. miRNA-7-5p'nin artışının, tedavide yararlı olabileceği görüşüne ulaşmışlardır. Bizim bulgularımızı inceleyecek olursak Siyanidin, siyanidin+dakarbazin kombinasyonu ve dakarbazin tekli ilaç dozu grubunda miRNA-7-5p seviyelerinde anlamlı olarak artma saptadık. Ancak sisplatin tekli ilaç dozu ve üçlü doz grubunda anlamlı olarak azalma gördük.

Kanserlerde metastazın en önemli özelliği hücrelerinin göç etme yetenekleridir (11).

Tsubaki M. ve arkadaşlarının 2019'da MM modeli geliştirilen farelerde yaptıkları çalışmada, A375 hücrelerinde tek başına dakarbazinin hücre migrasyonunu etkilemediğini deneylerle göstermişlerdir (79). Huang H. ve arkadaşlarının (11) 2008'de yaptıkları çalışmada, siyanidinlerin B16-F1 fare melanoması hücrelerindeki etkilerini incelemişlerdir. Wound-healing ve Boyden chamber deneyi ile siyanidinlerin, migrasyonunu doza bağlı azalttığını, kanserin metastatik etkilerini azaltarak güçlü antikanser etkilerine sahip olduğunu raporlamışlardır.



Matrigel invazyon deneyinde, siyanidin kontrol grubuna göre migrasyon kabiliyetini önemli ölçüde azalttı. Ayrıca kombine dozlarda da, tekli ilaç dozlarına göre önemli bir migrasyon inhibisyonu gözlemledik. Wound-healing deneyinde, Siyanidin kontrol grubuna göre migrasyon kabiliyetini önemli bir değişiklik yapmadı. Sisplatin ve dakarbazin, tekli dozlarda hücre migrasyonunu kontrol grubuna göre daha çok artırdı. Kombine dozlar; kontrol ve tekli doz uygulamalarına göre hücre migrasyonunu belirgin olarak daha fazla engelledi. Bulgularımıza göre siyanidin tekli veya kombine dozlarda melanomada migrasyonunu azaltarak A375 hücreleri üzerinde antimetastatik etkinlik gösterdi.

Siyanidinlerin oksidatif hasara karşı direnç sağladığı ve antioksidan savunmayı arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (80). Bununla birlikte bazı koşullarda pro-oksidanlar olarak hareket edebildikleri için, siyanidinlerin güvenli dozunu bulma amaçlı daha fazla çalışma yapılması gereklidir (81). Tarozzi A. ve arkadaşları yaptığı çalışmada; UVA radyasyonunun, HaCaT insan keratinosit hücre hattındaki etkilerine karşı, C3G'nin koruyuculuk özelliklerini değerlendirmişler, UVA'nın apoptotik dozlarında ROS oluşumuna karşı C3G'nin antioksidan özelliklerini araştırmışlardır (51). C3G, UVA radyasyonundan sonra hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) salınımını inhibe ettiğini göstererek ROS oluşumuna karşı koruyucu olduğunu ispatlamışlardır. Pratheeshkumar P. ve arkadaşları (72) tarafından 2014 yılında yapılan çalışmada, UVB kaynaklı deri kanseri için bir model olan SKH-1 tüysüz fareleri denek olarak kullanmışlar, bir siyanidin bileşiği olan siyanidin-3-glukozit (C3G)'in topikal uygulama ile antiinflamatuvar ve fotokarsinogeneze karşı koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada, oksidatif stresin ana belirtilerinden biri olan LPO'nun yan ürünü olan kısa zincirli aldehit MDA'nın konsantrasyonunu ölçerek, C3G'nin topikal uygulamasının fare derisinde, UV maruziyeti sonrası etkisini değerlendirmişlerdir. C3G tedavisinin, UVB grubuna kıyasla, oksidatif ara ürünlerin artışıını inhibe ettiğini göstererek, antioksidan etkinliği raporlamışlardır.

Bulgularımız, istatistiksel olarak anlamlı olarak sonuçlanmasa da; total antioksidan değerleri kontrole kıyasla, siyanidin grubunda ve tekli ilaç doz gruplarına göre siyanidin içeren kombinasyonlarda arttı, total oksidan değerleri ise kontrole kıyasla, siyanidin + sisplatin kombinasyonu hariç tüm tekli ve siyanidinle kombine

dozlarda azaldı. Bu sonuçların ilerideki çalışmalardaki doz taramaları için bir fikir verebileceğini düşünürüz.

Rugina D. ve arkadaşlarının 2017’de yaptıkları çalışmada, Siyanidin ekstratlarının MM hücreleri üzerindeki antiapoptotik etkileri araştırmışlardır. TUNEL deneylerinde, kontrol hücrelerine kıyasla TUNEL pozitif hücrelerde önemli bir artış sağladığını göstermişlerdir (46). Reddivari L. ve arkadaşlarının 2007’de yaptıkları çalışmada, LNCaP (androjene bağımlı) ve PC-3 (androjenden bağımsız) prostat kanseri hücrelerinde patatesten elde edilen Siyanidin ve fenolik bileşiklerinin etkilerini incelemişlerdir. Siyanidin bileşiklerinin, intrinsik apoptotik yolları indüklediğine dair sonuçlar elde etmişlerdir. TUNEL deneyi ile siyanidin tedaviden sonra LNCaP ve PC-3 hücrelerinde önemli bir apoptoz indüksiyonu olduğunu göstermişlerdir (76). Wu C. ve arkadaşlarının 2022 yılında fareler üzerinde büyük hücreli akciğer kanser modeli oluşturarak yaptıkları çalışmada; C3G ve 5-florourasil (5-FU) tekli ve kombine tedavilerin etkinliklerini incelemişlerdir. C3G’nin tek başına, antiproliferatif ve antikanser etkilerini göstermekle birlikte, 5-FU ile de sinerjistik antikanser etkilere sahip olduğunu göstermişlerdir. TUNEL deneyinde, kontrol grubuna göre, C3G ile tedavi edilen farelerde pozitif hücrelerin önemli ölçüde yükseldiğini göstermişlerdir (77).

TUNEL deneyimiz sonucunda, Siyanidin tek başına kontrole kıyasla bir fark oluşturmamakla birlikte, kombine grubunda dakarbazinin apoptotik etkinliğini önemli ölçüde artırdığını gözlemledik. Siplatinin apoptotik etkinliği çok yüksekti, kombine dozlarda etkinliği biraz azalmakla birlikte hala oldukça fazla miktarda hücreyi apoptoza uğrattığını saptadık.

## SONUÇLAR

Siyanidinin tek başına ve/veya kombine dozlarda antiproliferatif, apoptotik ve antimetastatik etkinliğini destekleyen bulgularımız önceki çalışmalarla benzer niteliktedir. Özellikle dakarbazinle kombinasyonlarında, dakarbazinin etkisini antiproliferatif ve antimetastatik yönde desteklemiştir.

Sonuçlarımız yeni araştırmalar için yol gösterici olmakla birlikte, etkinliğinin gösterilmesi ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

1. Heistein JB, Acharya U, Mukkamalla SKR. Malignant Melanoma. StatPearls. Treasure Island (FL)2022.
2. Piotrowska A, Wierzbicka J, Rybarczyk A, Tuckey RC, Slominski AT, Żmijewski MA. Vitamin D and its low calcemic analogs modulate the anticancer properties of cisplatin and dacarbazine in the human melanoma A375 cell line. *International journal of oncology*. 2019;54(4):1481-95.
3. Zigler M, Villares GJ, Lev DC, Melnikova VO, Bar-Eli M. Tumor Immunotherapy in Melanoma. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2008;9(5):307-11.
4. Dumitraş D-A, Andrei S. Recent Advances in the Antiproliferative and Proapoptotic Activity of Various Plant Extracts and Constituents against Murine Malignant Melanoma. 2022;27(8):2585.
5. Pandey MK, Gupta SC, Nabavizadeh A, Aggarwal BB. Regulation of cell signaling pathways by dietary agents for cancer prevention and treatment. *Seminars in Cancer Biology*. 2017;46:158-81.
6. Kummar S, Chen HX, Wright J, Holbeck S, Millin MD, Tomaszewski J, et al. Utilizing targeted cancer therapeutic agents in combination: novel approaches and urgent requirements. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010;9(11):843-56.
7. Domingues B, Lopes JM, Soares P, Pópulo H. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets and therapy*. 2018;7:35-49.
8. Fontana F, Raimondi M, Di Domizio A, Moretti RM, Montagnani Marelli M, Limonta P. Unraveling the molecular mechanisms and the potential chemopreventive/therapeutic properties of natural compounds in melanoma. *Seminars in Cancer Biology*. 2019;59:266-82.
9. Ding M, Feng R, Wang SY, Bowman L, Lu Y, Qian Y, et al. Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(25):17359-68.
10. Jeter JM, Bowles TL, Curiel-Lewandrowski C, Swetter SM, Filipp FV, Abdel-Malek ZA, et al. Chemoprevention agents for melanoma: A path forward into phase 3 clinical trials. 2019;125(1):18-44.
11. Huang H-P, Shih Y-W, Chang Y-C, Hung C-N, Wang C-J. Chemoinhibitory Effect of Mulberry Anthocyanins on Melanoma Metastasis Involved in the Ras/PI3K Pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56(19):9286-93.
12. Gonçalves AC, Nunes AR, Falcão A, Alves G, Silva LR. Dietary Effects of Anthocyanins in Human Health: A Comprehensive Review. 2021;14(7):690.

- 13.Kumar V AA, Aster J eds. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Tenth ed: Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2020.
- 14.Junqueira LC CJ. Basic Histology. Tenth Ed. ed: Nobel Tıp Kitapevleri; 2003.
- 15.Ross MH PW. Histology: A Text and Atlas 6/E. 6th ed. ed: Ankara; Palme Yayıncılık; 2014.
- 16.Kierszenbaum AL TL. Histology and cell biology: An introduction to pathology. . 4th ed. ed: Elsevier Health Sciences; 2015.
- 17.Moore KL PT. The Developing Human: Clinically Oriented Embryology. 7. ed ed: Philadelphia: Saunders Elsevier; 2003.
- 18.TW. S. Langman Medikal Embriyoloji. . Başaklar C, Çev.Ed, 7. Baskı ed: Ankara: Palme Yayıncılık; 2005.
- 19.Y. S. Textbook of Human Embryology with Clinical Cases and 3D Illustrations: New Delhi: CBS Publishers; 2019.
- 20.FH N. Atlas of Human Anatomy. 5th ed. ed2010.
- 21.VP E. DiFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations. 9th ed. ed: Palme Yayıncılık; 2001.
- 22.Lai-Cheong JE, McGrath JA. Structure and function of skin, hair and nails. Medicine. 2013;41(6):317-20.
- 23.Van Den Bossche K, Naeyaert J-M, Lambert J. The Quest for the Mechanism of Melanin Transfer. 2006;7(7):769-78.
- 24.Casalou C, Moreiras H, Mayatra JM, Fabre A, Tobin DJ. Loss of 'Epidermal Melanin Unit' Integrity in Human Skin During Melanoma-Genesis. Frontiers in oncology. 2022;12:878336.
- 25.Moreiras H, Seabra MC, Barral DC. Melanin Transfer in the Epidermis: The Pursuit of Skin Pigmentation Control Mechanisms. International journal of molecular sciences. 2021;22(9).
- 26.Busam KJ, Barnhill RL, Piepkorn MW. Melanocytes. In: Barnhill RL, Piepkorn MW, Busam KJ, editors. Pathology of Melanocytic Nevi and Melanoma. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 1-11.
- 27.RL B. Pathology of Malignant Melanoma. 1st ed. ed: Springer New York; 2004.
- 28.Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. Nature Reviews Cancer. 2016;16(6):345-58.
- 29.Brown TM KK. Histology, Hair and Follicle. In: StatPearls [Internet]: Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.

30. Yde SS, Sjoegren P, Heje M, Stolle LB. Mucosal Melanoma: a Literature Review. *Current Oncology Reports*. 2018;20(3):28.
31. Kodet O, Kučera J, Strnadová K, Dvořánková B, Štork J, Lacina L, et al. Cutaneous melanoma dissemination is dependent on the malignant cell properties and factors of intercellular crosstalk in the cancer microenvironment (Review). *International journal of oncology*. 2020;57(3):619-30.
32. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. 2021;71(3):209-49.
33. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. 2020;70(1):7-30.
34. KARA F KB. TÜRKİYE KANSER İSTATİSTİKLERİ 2017. 2021.
35. Sabarimurugan S, Madurantakam Royam M, Das A, Das S, K M G, Jayaraj R. Systematic Review and Meta-analysis of the Prognostic Significance of miRNAs in Melanoma Patients. *Molecular Diagnosis & Therapy*. 2018;22(6):653-69.
36. Elder DE MD, Scolyer R, Willemze R. WHO Classification of Skin Tumours. 4th ed. ed: World Health Organization; 2018.
37. Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, McWilliams RR, Kottschade LA, Creagan ET, et al. Malignant Melanoma in the 21st Century, Part 1: Epidemiology, Risk Factors, Screening, Prevention, and Diagnosis. *Mayo Clinic Proceedings*. 2007;82(3):364-80.
38. Elder DE ER, Rosenbach M, Murphy GF, Rubin AI, Xu X. *Lever's Histopathology of the Skin*. 11th ed. ed: Philadelphia : Wolters Kluwer; 2015.
39. Massi G, LeBoit PE. Criteria for the Diagnosis of Melanoma. In: Massi G, LeBoit PE, editors. *Histological Diagnosis of Nevi and Melanoma*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 415-9.
40. Keung EZ, Gershenwald JE. The eighth edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma staging system: implications for melanoma treatment and care. *Expert review of anticancer therapy*. 2018;18(8):775-84.
41. Chinembiri TN, du Plessis LH, Gerber M, Hamman JH, du Plessis J. Review of natural compounds for potential skin cancer treatment. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2014;19(8):11679-721.
42. Liu-Smith F, Meyskens FL. Molecular mechanisms of flavonoids in melanin synthesis and the potential for the prevention and treatment of melanoma. 2016;60(6):1264-74.
43. Mattioli R, Francioso A, Mosca L, Silva P. Anthocyanins: A Comprehensive Review of Their Chemical Properties and Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. 2020;25(17):3809.

44. Bunea A, Rugină D, Sconța Z, Pop RM, Pinteș A, Socaciu C, et al. Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells. *Phytochemistry*. 2013;95:436-44.
45. Kähkönen MP, Heinonen M. Antioxidant Activity of Anthocyanins and Their Aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003;51(3):628-33.
46. Rugină D, Hanganu D, Diaconeasa Z, Tăbăran F, Coman C, Leopold L, et al. Antiproliferative and Apoptotic Potential of Cyanidin-Based Anthocyanins on Melanoma Cells. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(5).
47. Liu M, Du Y, Li H, Wang L, Ponikwicka-Tyszko D, Lebedzinska W, et al. Cyanidin-3-o-Glucoside Pharmacologically Inhibits Tumorigenesis via Estrogen Receptor  $\beta$  in Melanoma Mice. *Frontiers in oncology*. 2019;9:1110.
48. Wang E, Liu Y, Xu C, Liu J. Antiproliferative and proapoptotic activities of anthocyanin and anthocyanidin extracts from blueberry fruits on B16-F10 melanoma cells. *Food & Nutrition Research*. 2017;61(0).
49. Cho E, Chung EY, Jang HY, Hong OY, Chae HS, Jeong YJ, et al. Anti-cancer Effect of Cyanidin-3-glucoside from Mulberry via Caspase-3 Cleavage and DNA Fragmentation in vitro and in vivo. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2017;17(11):1519-25.
50. Chen P-N, Chu S-C, Chiou H-L, Kuo W-H, Chiang C-L, Hsieh Y-S. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. *Cancer Letters*. 2006;235(2):248-59.
51. Tarozzi A, Marchesi A, Hrelia S, Angeloni C, Andrisano V, Fiori J, et al. Protective effects of cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside against UVA-induced oxidative stress in human keratinocytes. *Photochemistry and photobiology*. 2005;81(3):623-9.
52. Dasari S, Njiki S, Mbemi A, Yedjou CG, Tchounwou PB. Pharmacological Effects of Cisplatin Combination with Natural Products in Cancer Chemotherapy. 2022;23(3):1532.
53. Torcka P, Przespolewski E, Evens AM. Treatment Strategies for Advanced Classical Hodgkin Lymphoma in the Times of Dacarbazine Shortage. *JCO oncology practice*. 2022;18(7):491-7.
54. Miller DM, Flaherty KT. Cyclin-dependent kinases as therapeutic targets in melanoma. 2014;27(3):351-65.
55. Nebenfuhr S, Kollmann K, Sexl V. The role of CDK6 in cancer. *International journal of cancer*. 2020;147(11):2988-95.

56. Xu W, McArthur G. Cell Cycle Regulation and Melanoma. *Current Oncology Reports*. 2016;18(6):34.
57. Garutti M, Targato G, Buriolla S, Palmero L, Minisini AM, Puglisi F. CDK4/6 Inhibitors in Melanoma: A Comprehensive Review. *Cells*. 2021;10(6).
58. Hussein MR, Haemel AK, Wood GS. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. 2003;199(3):275-88.
59. Quast S-A, Steinhorst K, Plötz M, Eberle J. Sensitization of Melanoma Cells for Death Ligand TRAIL Is Based on Cell Cycle Arrest, ROS Production, and Activation of Proapoptotic Bcl-2 Proteins. *Journal of Investigative Dermatology*. 2015;135(11):2794-804.
60. Madonna G, Ullman CD, Gentilcore G, Palmieri G, Ascierto PA. NF- $\kappa$ B as potential target in the treatment of melanoma. *Journal of Translational Medicine*. 2012;10(1):53.
61. Frey LM, Houben R, Bröcker EB. Pigmentation, Melanocyte Colonization, and p53 Status in Basal Cell Carcinoma. *Journal of skin cancer*. 2011;2011:349726.
62. Poudel B, Lee Y-M, Kim D-K. DDR2 inhibition reduces migration and invasion of murine metastatic melanoma cells by suppressing MMP2/9 expression through ERK/NF- $\kappa$ B pathway. 2015;47(1672-9145):292.
63. Sun C, Zheng Y, Chen Q, Tang X, Jiang M, Zhang J, et al. Purification and anti-tumour activity of cyanidin-3-O-glucoside from Chinese bayberry fruit. *Food Chemistry*. 2012;131(4):1287-94.
64. Nikkola J, Vihinen P, Vuoristo M-S, Kellokumpu-Lehtinen P, Kähäri V-M, Pyrhönen S. High Serum Levels of Matrix Metalloproteinase-9 and Matrix Metalloproteinase-1 Are Associated with Rapid Progression in Patients with Metastatic Melanoma. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(14):5158-66.
65. Toricelli M, Melo FHM, Peres GB, Silva DCP, Jasiulionis MG. Timp1 interacts with beta-1 integrin and CD63 along melanoma genesis and confers anoikis resistance by activating PI3-K signaling pathway independently of Akt phosphorylation. *Molecular Cancer*. 2013;12(1):1095.
66. Pu W, Shang Y, Shao Q, Yuan X. miRNA-146a promotes cell migration and invasion in melanoma by directly targeting SMAD4. *Oncology letters*. 2018;15(5):7111-7.
67. Wang S, Wu Y, Xu Y, Tang X. miRNA-10b promoted melanoma progression through Wnt/ $\beta$ -catenin pathway by repressing ITCH expression. *Gene*. 2019;710:39-47.
68. Mazar J, DeYoung K, Khaitan D, Meister E, Almodovar A, Goydos J, et al. The Regulation of miRNA-211 Expression and Its Role in Melanoma Cell Invasiveness. *PLOS ONE*. 2010;5(11):e13779.



69. Giles KM, Brown RAM, Epis MR, Kalinowski FC, Leedman PJ. miRNA-7-5p inhibits melanoma cell migration and invasion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013;430(2):706-10.
70. Pogribny IP, Filkowski JN, Tryndyak VP, Golubov A, Shpileva SI, Kovalchuk O. Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin. 2010;127(8):1785-94.
71. Guo Y, Shi W, Fang R. miRNA-18a-5p promotes melanoma cell proliferation and inhibits apoptosis and autophagy by targeting EPHA7 signaling. *Mol Med Rep*. 2021;23(1):79.
72. Pratheeshkumar P, Son Y-O, Wang X, Divya SP, Joseph B, Hitron JA, et al. Cyanidin-3-glucoside inhibits UVB-induced oxidative damage and inflammation by regulating MAP kinase and NF- $\kappa$ B signaling pathways in SKH-1 hairless mice skin. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2014;280(1):127-37.
73. Yeewa R, Naiki-Ito A, Naiki T, Kato H, Suzuki S, Chewonarin T, et al. Hexane Insoluble Fraction from Purple Rice Extract Retards Carcinogenesis and Castration-Resistant Cancer Growth of Prostate Through Suppression of Androgen Receptor Mediated Cell Proliferation and Metabolism. 2020;12(2):558.
74. Long N, Suzuki S, Sato S, Naiki-Ito A, Sakatani K, Shirai T, et al. Purple corn color inhibition of prostate carcinogenesis by targeting cell growth pathways. 2013;104(3):298-303.
75. Sorrenti V, Vanella L, Acquaviva R, Cardile V, Giofrè S, Di Giacomo C. Cyanidin induces apoptosis and differentiation in prostate cancer cells. *International journal of oncology*. 2015;47(4):1303-10.
76. Reddivari L, Vanamala J, Chintharlapalli S, Safe SH, Miller JC, Jr. Anthocyanin fraction from potato extracts is cytotoxic to prostate cancer cells through activation of caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Carcinogenesis*. 2007;28(10):2227-35.
77. Wu C-F, Wu C-Y, Lin C-F, Liu Y-W, Lin T-C, Liao H-J, et al. The anticancer effects of cyanidin 3-O-glucoside combined with 5-fluorouracil on lung large-cell carcinoma in nude mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;151:113128.
78. Wang Y, Zhang X-n, Xie W-h, Zheng Y-x, Cao J-p, Cao P-r, et al. The Growth of SGC-7901 Tumor Xenografts Was Suppressed by Chinese Bayberry Anthocyanin Extract through Upregulating KLF6 Gene Expression. 2016;8(10):599.
79. Tsubaki M, Takeda T, Obata N, Kawashima K, Tabata M, Imano M, et al. Combination therapy with dacarbazine and statins improved the survival rate in mice with metastatic melanoma. 2019;234(10):17975-89.
80. Jiang T, Zhou J, Liu W, Tao W, He J, Jin W, et al. The anti-inflammatory potential of protein-bound anthocyanin compounds from purple sweet potato in LPS-induced RAW264.7 macrophages. *Food Research International*. 2020;137:109647.

81. Fernandez-Panchon MS, Villano D, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds: From In Vitro Results to In Vivo Evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2008;48(7):649-71.