ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Spirulina platensis'ten Elde Edilen Ham Ekstraktın ve C-Phycocyanin Molekülünün Kanser Yolakları Üzerine Etkisinin Moleküler Yöntemlerle Kanser Hücre Hatlarında Değerlendirilmesi

Olfa TAHRI

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Mayıs, 2023

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Spirulina platensis'ten Elde Edilen Ham Ekstraktın ve C-Phycocyanin Molekülünün Kanser Yolakları Üzerine Etkisinin Moleküler Yöntemlerle Kanser Hücre Hatlarında Değerlendirilmesi

Olfa TAHRI

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bu Yüksek Lisans Tezi 30/05/2023 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Değerlendirilmiş ve Oy Birliği / ~~Oy Çokluğu~~ ile Kabul Edilmiştir.

Jüri : Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ (Danışman) ……

: Prof. Dr. Oya IŞIK ……

: Dr. Öğr. Üyesi Özgür Cem ERKİN ……

Bu Tez Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Tez No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜR V
ÇİZELGELER DİZİNİ VI
ŞEKİLLER DİZİNİ VII
SİMGELER VE KISALTMALAR IX
1. GİRİŞ 1
1.1. Kanser 1
1.2. Meme kanseri 2
1.3. Apoptoz 3
1.2.1. Apoptozun Düzenlenmesi 3
1.2.2. Apoptozun Mekanizmaları 9
1.3. Kanser ve Apoptoz 12
1.4. Kanser ve *Spirulina platensis* 12
1.4.1. *Spirulina platensis* 13
1.4.2. *Spirulina*'nın Alg Sistematiğindeki Yeri 15
1.4.3. *Spirulina*'nın Kültürü 15
1.4.4 *Spirulina*'nın Önemi ve Kullanım Alanları 16
1.5. C-phycocyanin 17
1.5.1. C-phycocyanin Tanımı ve Kullanımı 17
1.5.2. C-phycocyanin'in Kanserde Moleküler Hedefleri 18
1.6. MCF7 Hücre Hattı 20
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 21
3. MATERYAL VE METOD 23
3.1. Materyal 23
3.1.1. Kullanılan Cihazlar 23
3.1.2. Kullanılan Malzemeler 23
3.2. Metod 24
3.2.1. Algal Ekstraktların Hazırlanması 24
3.2.2. GC-MS ile *Spirulina*'nın Uçucu Bileşikleri Analizi 26
3.2.3. ICP-OES ile *Spirulina* Mineral Analizi 26
3.2.4. Floresans Spektrofotometre ile C-phycocyanin'in Analizi 26
3.2.5. Hücre Kültürü 27
3.2.6. Hücre Canlılık Testi: MTT testi 28

3.2.7. MCF7 Hücre Hattında C-phycocyanin Muamelesi 30
3.2.8. RNA İzolasyonu 31
3.2.9. cDNA Sentezi 32
3.2.10. RT-PCR 33
3.2.11. İstatistiksel Analiz 34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 35
4.1. Bulgular 35
4.1.1. GC-MS Sonuçları 35
4.1.2. ICP-OES Sonuçları 37
4.1.3. Floresans Spektrofotometre Sonuçları 37
4.1.4. MTT Sonuçları 38
4.1.5. RT-PCR Sonuçları 42
4.2. Tartışma 45
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 53
KAYNAKLAR 55
ÖZGEÇMİŞ 65

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Spirulina platensis'ten Elde Edilen Ham Ekstraktın ve C-Phycocyanin Molekülünün Kanser Yolakları Üzerine Etkisinin Moleküler Yöntemlerle Kanser Hücre Hatlarında Değerlendirilmesi

Olfa TAHRI

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
İkinci Danışman: Öğr. Gör. Dr. Sabriye KOCATÜRK SEL

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

ÖZ

Spirulina platensis (*Cyanophyceae*) veya *Arthrospira platensis, Spirulina* olarak ta bilinir, ipliksi mavi-yeşil bir mikroalgdir ve siyanobakteriler grubuna aittir. *Spirulina*, proteinler; vitaminler, mineraller ve lipitler içermektedir. Bunlara ek olarak *Spirulina* pigmentler (klorofil α, ksantofil, β-karoten, zeaksantin ve phycocyanin) açısından zengindir. Phycocyaninler, hem C-phycocyanin (C-PC) hem de Allo-phycocyanin (APC) içerir. Çok hücreli ve filament yapıda bir Siyanobakteri olan *Spirulina*'nın total proteininin %20-40 kadarı C-PCdir. *Spirulina*'dan ekstrakte edilebilen C-PC, mavi pigmenttir, gıda sektöründe ve kozmetik endüstrisinde doğal renklendirici olarak kullanılabilmektedir. Ayrıca, C-PC'in in vitro ve in vivo olarak çeşitli kanser türleri (meme kanseri, karaciğer kanseri, akciğer kanseri, kolon kanseri, lösemi ve kemik iliği kanseri gibi) üzerinde güçlü bir kanser önleyici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Yaptığımız çalışmada Çukurova Üniversitesi'nde üretilen *Spirulina*'dan elde edilen C-PC'in kanserle mücadele ve önlemedeki terapötik etkisi test edilmiştir. Bu çalışmada insan meme kanseri hücre hattı MCF7 kullanılmıştır. İlk olarak, hem *Spirulina* sulu ekstraktı hemde onun etken maddesi olan C-PC'in, NIH3T3 ve MCF7 hücrelerinin canlılıkları üzerine etkileri MTT testi ile değerlendirilmiştir. Sonrasında MCF7, 24 saat boyunca C-PC'in farklı dozlarına maruz bırakılıp apoptotik etkisini incelenmiştir. MCF7 hücrelerinin RNA izolasyonu yapılıp cDNA eldesinden sonra apoptozda görev alan kaspaz-3, -8, -9, Bid, Bax, Apaf-1 ve p53 genlerinin ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir. Sonuç olarak C-PC'i uyguladıktan sonra, MCF7 hücrelerinde apoptotik genlerin anlamlı bir şekilde ifade oldukları gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Spirulina platensis*, C-phycocyanin, Kanser, MCF7, NIH3T3, Apoptoz

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

MASTER OF SCIENCE THESIS

Evaluation of the Effect of Crude Extract And C-Phycocyanin Molecule Obtained from *Spirulina platensis* on Cancer Pathways by Molecular Methods in Cancer Cell Lines

Olfa TAHRI

Advisor: Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ
Co-Advisor: Lec. Dr. Sabriye KOCATÜRK SEL

Department of Biotechnology

ABSTRACT

Spirulina platensis (*Cyanophyceae*) or *Arthrospira platensis*, also known as *Spirulina*, is a filamentous blue-green microalga and belongs to the cyanobacteria group. *Spirulina* contains proteins; vitamins, minerals and lipids. In addition, *Spirulina* is rich in pigments (chlorophyll α, xanthophyll, β-carotene, zeaxanthin and phycocyanin). Phycocyanins include both C-phycocyanin (C-PC) and Allo-Phycocyanin (APC). In *Spirulina*, a multicellular and filamentous Cyanobacterium, 20-40% of its total protein is C-PC. C-PC, which can be extracted from *Spirulina*, is a blue pigment and can be used as a natural colorant in the food and cosmetics industry. In addition, C-PC has been shown to have a strong anti-cancer effect on various cancer types (such as breast cancer, liver cancer, lung cancer, colon cancer, leukemia and bone marrow cancer) in vitro and in vivo. In our study, we tested the therapeutic power of C-PC derived from *Spirulina* produced in Çukurova University in fighting and preventing cancer. In this study, the human breast cancer cell line MCF7 was used. Firstly, we evaluated the effects of both *Spirulina* aqueous extract and its active ingredient C-PC on the viability of NIH3T3 and MCF7 cells by MTT assay. Then, we exposed MCF7 to different doses of C-PC for 24 hours and examined its apoptotic effect. After RNA isolation of MCF7 cells and cDNA extraction, we evaluated the expression levels of caspase-3, -8, -9, Bid, Bax, Apaf-1 and p53 genes involved in apoptosis. As a result, we observed that apoptotic genes were significantly expressed in MCF7 cells after C-PC treatment.

Keywords: *Spirulina platensis*, C-phycocyanin, cancer, MCF7, NIH3T3, apoptosis

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Dünya Sağlık Örgütü - Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) 2020 dünya kanser istatistikleri dünya çapında tahmini 19,3 milyon yeni kanser vakası ve yaklaşık 10 milyon kanser ölümünün meydana geldiğini rapor etmektedir. Bu rakamlar 2018 yılındaki 18,1 milyon vaka ve 9,6 milyon ölüm oranlarıyla kıyaslanınca dünyadaki kanser yükünün her geçen gün arttığını göstermektedir. 2020 istatistiklerine göre kadın meme kanseri (%11,7), en sık teşhis edilen kanser olarak akciğer kanserini (%11,4) geride bırakmıştır (Ferlay ve ark., 2020; DSÖ ve IARC, 2020).

Kanser, tedavisi en zor hastalıklardan biri olup, hücrelerin hızla, kontrolsüz olarak bölünmesi ve diğer doku ve organlara yayılması olarak tanımlanır. Tümörün klinik formuna, histolojik tipine, evresine ve konumuna bağlı olarak tedavi edilir. Kanserin üç ana tedavi metodu vardır: kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi. Kemoterapiden sonra hastalarda kas ve eklemlerde ağrılar olur. Kemoterapinin kas-iskelet sistemi üzerine yan etkileri olabilir ki bu kendini kaslarda güçsüzlük, kol ve bacaklarda uyuşma şeklinde gösterir. Ayrıca, kemoterapiden 2-3 hafta sonra saç dökülmeye başlar. Dolayısıyla bu ve benzeri yan etkileri azaltarak yeni, güçlü ve etkili tedavi modalitelerinin bulunmasına ihtiyaç vardır. Günümüzde kanser konusunda yapılan araştırmalar, klasik olanlardan farklı yeni tedavi stratejilerinin keşfine dayanmaktadır. Kanserin önlenmesi ve tedavisinde birçok doğal veya sentetik ajan hali hazırda çalışılmakta olup günümüz tıp ve sağlık alanında özellikle yan etkilerinin azlığı ve insan fizyolojisi ile uyumu sebebiyle daha çok doğal çözümlere odaklanılmaktadır. Örneğin, meme kanserinin tedavisi için kemoterapötik etki gösterebilecek doğal ve sentetik maddelerin sayısı her geçen gün artmaktadır. Bitkilerden elde edilen ve kanserin tedavisi için kullanılan bileşikler ve türevleri içeren pek çok çalışma literatüre girmiştir (Özay ve ark., 2019).

Bu alanda özellikle, *Spirulina platensis* ekstraktının antikanser çalışmalarında kullanımı oldukça dikkat çekicidir. *Spirulina platensis* diğer adıyla *Arthrospira platensis*, yaygın olarak *Spirulina* olarak bilinir, güçlü besin, fitoantioksidan ve antikanser özelliklerine sahip, filamentli mavi-yeşil bir mikroalgdir (Siyanobakteri) (Ismail ve ark., 2019; Ouhtit ve ark., 2014).

Birçok çalışma, Spirulina'nın zengin bir protein kaynağı (kuru ağırlığın %55-70'i) olarak bilindiğini göstermektedir. Aynı zamanda bu alg, lipidler (%5-6; örneğin γ-linolenik, linoleik, oleik, stearidonik, eikosapentaenoik, dokosaheksaenoik ve araşidonik asitler), vitaminler (B, D, E, askorbik asit), mineraller (öncelikle potasyum) ve ayrıca kalsiyum, krom, bakır, demir, magnezyum, manganez, fosfor, selenyum, sodyum ve çinko) içermektedir. *Spirulina platensis*, yeni kan hücrelerinin üretimini arttırmaktadır, makrofajların fagositik aktivitesini geliştirmektedir, ve hümoral sistem elemanlarının (antikorlar ve sitokinler) üretimini hızlandırmaktadır. Spirulina'nın anti-oksidan, anti-bakteriyel, anti-fungal ve anti-kanser etkileri bulunmaktadır (Dillon ve ark., 1995). Ayrıca, *Spirulina* pigmentler (klorofil a, ksantofil, β-karoten, zeaksantin ve phycocyaninler) açısından zengindir (Parvin ve ark., 2008).

Phycocyaninler phycobiliproteindir, hem C-phycocyanin hem de allophycocyanin içerir (Chen ve ark., 2014). Çok hücreli ve filament yapıda bir Syanobakteri olan *Spirulina platensis*'in total proteininin %20-40 kadarı C-phycocyaninler (C-PC) dir (Silveira ve ark., 2007). Spirulina'dan ekstrakte edilebilen C-phycocyanin, mavi pigmenttir, gıda sektöründe ve kozmetik endüstrisinde doğal renklendirici olarak kullanılabilmektedir (Ichimura ve ark., 2001). Spirulina'nın ana pigmenti C-phycocyanin'in in vitro ve in vivo olarak çeşitli kanser türleri (meme kanseri, karaciğer kanseri, akciğer kanseri, kolon kanseri, lösemi ve kemik iliği kanseri gibi) üzerinde güçlü bir kanser önleyici etkiye sahip olduğu gösterilmektedir (Braune ve ark., 2021).

Bu çalışmada *Spirulina platensis*'in kanserle mücadele ve önlemedeki terapötik etkisini test etmeyi hedefledik. Çalışmamızda, *Spirulina platensis*'in sulu ekstraktı ve C-phycocyanin molekülünün anti-tümör etkisinin moleküler yöntemlerle kanser hücre hatlarında değerlendirilmesini amaçladık. NIH3T3 ve MCF7 hücre hatlarında MTT testleri ve MCF-7 hücre hattında *Spirulina* ham ektrasktı ve C-phycocyanin farklı dozları ile muamele edilmesi sonrasında RNA izolasyonu yapıldı. Sonrasında, apoptozda görev alan genler: Kaspaz 3, kaspaz 8, kaspaz 9, Bid, Bax, Apaf-1 ve p53 kullanılarak Real-Time PCR (RT-PCR) çalışıldı ve ekspresyon düzeylerine bakıldı.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sırasında bilgi ve deneyimler ile bana rehberlik eden ve yol gösteren, her konuda destekleri hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışmanlarım Sayın Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ ve Sayın Öğr. Gör. Dr. Sabriye KOCATÜRK SEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda kullanılan *Spirulina platensis* ve C-phycocyanin'in temininde katkıda bulunan Sayın Prof. Dr. Oya IŞIK hocam ve arkadaşım doktora öğrencisi Choubaila REDDAD'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca yanımda olan, her türlü yardımı gösteren ve sürekli beni motive eden değerli arkadaşlarım Rihab KSOURI, Aymen RAHMENI, Buket KALFA, Ezgi Damla YILMAZ, Hale ÖKSÜZ, Mehmet Önsan KÜTÜKOĞLU, Mehmet Alperen ÖZDEMİR, Göksu ŞENER, Gamze GİZİR ve Arş. Gör. Dr. Seda ILGAZ hoca'ya çok teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında ve her anında yanımda olan, her adımda maddi ve manevi destekleyen, sonsuz sevgi ve desteklerini hissettiren aileme çok teşekkür ederim.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Kaspazların sınıflandırılması 4
Çizelge 1.2. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri 6
Çizelge 1.3. *Spirulina*'nın alg sistematiğindeki yeri 15
Çizelge 3.1. RNA konsantrasyonları (ng/µl) 32
Çizelge 3.2. cDNA sentez karışım oranları 32
Çizelge 3.3. cDNA eldesinde ısı döngüleri ve süreleri 33
Çizelge 3.4. RT-PCR için kullanılan gen dizileri 33
Çizelge 3.5. RT-PCR döngüleri ve süreleri 34
Çizelge 4.1. *Spirulina* tozunun uçucu bileşenleri (GC-MS) 36
Çizelge 4.2. *Spirulina* sulu ekstraktının uçucu bileşenleri (GC-MS) 36
Çizelge 4.3. *S.platensis*'in mineral konsantrasyonları (mg/L) 37
Çizelge 4.4. *S.platensis*'in mineral konsantrasyonları (mg/kg) 37

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Kanser vaka sayısı 2
Şekil 1.2. Kaspazların yapısı ve domain organizasyonu 4
Şekil 1.3. Bcl-2 protein ailesine şematik genel bakış 6
Şekil 1.4. Stressiz koşullarda ve stres altında p53 işlevi 8
Şekil 1.5. p53-p21-RB sinyalizasyonu 9
Şekil 1.6. Kaspaz 8 aktivasyonu 11
Şekil 1.7. Apoptozun intrinsik ve ekstrinsik yolakları 12
Şekil 1.8. *Spirulina*'nın mikroskoptaki görünümü (10x) 15
Şekil 1.9. Phycocyanin'in anti-kanser etkisinin moleküler mekanizmalarına genel bakış 19
Şekil 1.10. C-phycocyanin'in potansiyel terapötik uygulamaları 20
Şekil 3.1. Elde edilen C-phycocyanin ekstraktı 24
Şekil 3.2. *Spirulina* sulu ekstraktın hazırlanmasının aşamaları) 25
Şekil 3.3. MCF7 hücre hattının mikroskopla görünümü (10x) 27
Şekil 3.4. NIH3T3 hücre hattının mikroskopla görünümü (10x) 28
Şekil 3.5. MCF7 ve NIH3T3 hücre hatlarına uygulanan *Spirulina* ve C-PC dozları 29
Şekil 3.6. MTT testi plate dizaynı 29
Şekil 3.7. NIH3T3 hücrelerine DMSO ekledikten 24 saat sonraki görüntü 30
Şekil 3.8. MCF7 hücrelerine DMSO ekledikten 24, 48 ve 72 saat sonraki görüntü 30
Şekil 3.9. MCF7 hücre hattına uygulanan C-PC'in 5, 25 ve 45 µg/ml dozları 31
Şekil 3.10. MCF7 hücre hattına farklı dozlarda (5, 25 ve 45 µg/ml) uygulanan C- PC'in plate dizaynı 31
Şekil 4.1. *Spirulina* tozu ve sulu ekstraktına ait HS-SPME-GC-MS 35
Şekil 4.2. C-phycocyanin'a ait eksitasyon-emisyon kromatogramları 38
Şekil 4.3. *Spirulina*'nın (50, 100, 150, 200 ve 250 µg/ml) FBS'li ve FBS'siz medyum ortamlarında NIH3T3 hücre canlılığı üzerine etkisi 38
Şekil 4.4. C-phycocyanin'in (100, 150, 200, 250 ve 300 µg/ml) FBS'li ve FBS'siz medyum ortamlarında NIH3T3 hücre canlılığı üzerine etkisi 39
Şekil 4.5. *Spirulina*'nın (50, 100, 150, 200 ve 250 µg/ml) FBS'li ve FBS'siz medyum ortamlarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi (24 saat) 39
Şekil 4.6. *Spirulina*'nın (50, 100, 150, 200 ve 250 µg/ml) FBS'li ve FBS'siz medyum ortamlarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi (48 saat) 40
Şekil 4.7. *Spirılina*'nın (50, 100, 150, 200 ve 250 µg/ml) FBS'li ve FBS'siz medyum ortamlarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi (72 saat) 40
Şekil 4.8. C-phycocyanin'in (100, 150, 200, 250 ve 300 µg/ml) FBS'li ve FBS'siz medyum ortamlarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi (24 saat) 41

Şekil 4.9. C-phycocyanin'in (100, 150, 200, 250 ve 300 µg/ml) FBS'li ve FBS'siz medyum ortamlarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi (48 saat) 41
Şekil 4.10. C-phycocyanin'in (100, 150, 200, 250 ve 300 µg/ml) FBS'li ve FBS'siz medyum ortamlarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi (72 saat) 41
Şekil 4.11. MCF7 hücrelerinde C-phycocyanin'in kaspaz 3 gen ekspresyonu üzerine etkisi 42
Şekil 4.12. MCF7 hücrelerinde C-phycocyanin'in kaspaz 8 gen ekspresyonu üzerine etkisi 43
Şekil 4.13. MCF7 hücrelerinde C-phycocyanin'in kaspaz 9 gen ekspresyonu üzerine etkisi 43
Şekil 4.14. MCF7 hücrelerinde C-phycocyanin'in Bid gen ekspresyonu üzerine etkisi 44
Şekil 4.15. MCF7 hücrelerinde C-phycocyanin'in Bax gen ekspresyonu üzerine etkisi 44
Şekil 4.16. MCF7 hücrelerinde C-phycocyanin'in Apaf-1 gen ekspresyonu üzerine etkisi.....45
Şekil 4.17. MCF7 hücrelerinde C-phycocyanin'in p53 gen ekspresyonu üzerine etkisi.....45

SİMGELER VE KISALTMALAR

SP : *Spirulina platensis*
C-PC : C-phycocyanin
APC : Allo-phycocyanin
MCF7 : Michigan Cancer Foundation-7 (Meme kanseri hücre hattı)
NIH3T3 : Fare embriyo fibroblast hücre hattı
Bax : Bcl-2 ile ilişkili X proteini
Bad : Bcl-2 ile ilişkili hücre ölümü agonisti
Bak : Bcl-2 homolog antagonist öldürücü
Bid : BH3 etkileşimli-domain ölüm agonisti
tBid : Kesilmiş Bid
Bim : Bcl-2 benzeri protein 11
Apaf-1 : Apoptotik Proteaz Aktive edici Faktör 1
TP53 : Tümör baskılayıcı protein 53
Bcl-2 : B-hücreli lenfoma 2
Bcl-XL : B-hücreli lenfoma-extra-large
Bcl-W : Bcl-2 benzeri protein 2
Mcl-1 : Miyeloid hücre lösemi-1
BH : Bcl-2 homoloji bölgeleri
CASP3 : Kaspaz 3
CASP8 : Kaspaz 8
CASP9 : Kaspaz 9
ACTB : β-Aktin
IARC : Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü
RT-PCR : Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time-Polymerase Chain Reaction)
Ct :Eşik siklüs değeri
CARD : Kaspazı aktive eden domain (Caspase Recruitment Domain)
DED : Ölüm oluşturan domain (Death Effector Domain)
CAD : Kaspaz ile aktive edilen DNaz (Caspase Activated DNase)
ICAD : CAD inhibitörü (The inhibitor of caspase 3– activated DNase)
ER : Endoplazmik retikulum
MBR : Membran bağlayıcı bölge
MOMP : Mitokondriyal dış membran permeabilizasyonu
MDM 2 : Murine Double Minute 2
MDM 4 : Murine Double Minute 4

CKI : Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri

Cdk : Siklin bağımlı kinazlar

pRB : Retinoblastoma tümör baskılayıcı proteini

FAS : Apoptoz Antijeni 1

TNF : Tümör Nekroz Faktörü

TNFR : Tümör Nekroz Faktör Reseptörü

TRADD : TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı (TNF Receptor-Associated Death Domain)

TRAIL : TNF ile ilişkili Apoptozu Uyaran Bağ

FADD : Fas-ilişkili ölüm-domain proteini (Fas-Associated Death-Domain protein)

RIP : Reseptörle etkileşen protein (Receptor-interacting protein)

DISC : Death Inducing Signaling Complex

Cyt C : Sitokrom C

AIF : Apoptoz İndükleyici Faktör

SMAC : Second Mitochondria-drived Activator of Caspase

ENDO-G : Endonükleaz G

FDA : Gıda ve İlaç İdaresi

GRAS : Genel olarak güvenli (Generally Recognized As Safe)

NASA : Ulusal Havacılık ve Uzay Dairesi

ESA : Avrupa Uzay Ajansı

DSI-EC : Diyet takviyeleri bilgi uzmanı komitesi

ROS : Reaktif oksijen türleri

PARP-1 : Poli (ADP-riboz) polimeraz-1

MMP : Mitokondriyal Membran Potansiyeli

TGFβ : Dönüştürücü büyüme faktörü beta

EMT : Epitelyal-mezenkimal geçişi

GC-MS : Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi (Gas Chromatography Mass Spectrometry)

HS-SPME : katı faz mikroekstraksiyon yöntemi (Headspace-Solid Phase Micro Extraction)

ICP-OES : İndükatif Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektrometresi (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry)

CO_2 : Karbondioksit

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

RPMI-1640 : Roswell Park Memorial Institute-1640

FBS : Fetal Bovin Serum

PBS : Phosphate Buffered Saline

DMSO : Dimetil sülfoksit

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

µl : Mikrolitre (1/1000ml)

ml : Mililitre (1/1000 L)

L : Litre

µg : Mikrogram (1/1000mg)

mg : Miligram (1/1000g)

g : Gram

Kg : Kilogram

dk : Dakika

1. GİRİŞ

1.1. Kanser

Vücudumuzdaki sağlıklı hücreler bölünebilme yeteneğine sahiptirler. Kanser, kontrolsüz çoğalma ve anormal hücre yayılımı özelliği gösteren bir hastalıktır. Bu hücrelerin hepsi aynı klondan türetilmiştir, kanser başlatıcı hücre, süresiz olarak çoğalmasına ve kolonize olabilmesine izin veren belirli özellikler kazanmıştır. Kanser, tedavisi en zor hastalıklardan biri olup, hücrelerin hızla, kontrolsüz olarak bölünmesi ve diğer doku ve organlara yayılması olarak tanımlanır (Lévy ve ark., 1997; Hood ve Cherech, 2002).

Bir hücre her bölündüğünde, DNA replikasyonu sırasındaki hatalar, yavru hücrelerin genomlarına yeni mutasyonların dahil edildiği anlamına gelir. Kanser hücrelerinin oluşumu sağlıklı hücrelerin DNA'sında meydana gelen mutasyonlarla olur (Graham ve Sottoriva, 2016). Bu mutasyonlar kanserojenik mutajenik ajanlara, UV radyasyonlara, kimyasallara maruziyet gibi fiziksel veya çevresel etkenleri kapsamasının yanında kişinin yaşam tarzı, genetik mirası, yaş ve serbest radikallerin bulunması sonucu oluşur. Diğer önemli bir risk faktörü hücre bölünme sırasında oluşabilecek DNA'nın kendini eşlerken ki hatalarda mutasyona neden olabilmektedir (Hyndman, 2016).

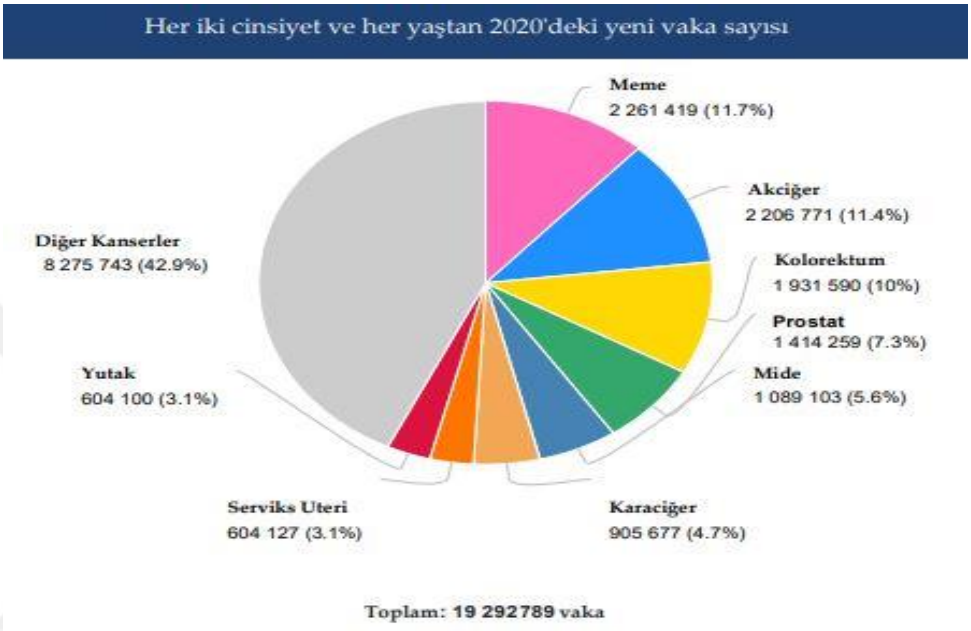
Bu kontrolsüz çoğalmalar sonucunda meydana gelen hücre kitlesi tümör olarak isimlendirilirler. Bir tümörün oluşması için gerekli mutasyonların birikimi karsinogenezi çok basamaklı bir süreç haline getirir. Tümör hücreleri, oluştukları dokularda kalabilir ya da dokuyu tahrip ederek kan veya lenf aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine yayılabilirler. Vücut dolaşımına katılan bu kanser hücreleri gittikleri bölgelerde büyüyüp çoğalmaya devam ederek metastaz adı verilen yayılımı meydana getirirler (Öztecik, 2019). Tümörler ancak komşu dokuları istila ettiği (invazyon) veya kan dolaşımına geçerek uzak dokulara yayıldığı zaman (metastaz) öldürücü olabilmektedir (Cooper, 2019).

Kanserler kötü huylu veya iyi huylu olabilir. İkincisi, yaşamı tehdit eden nadir bir formdur. Vücudun diğer bölgelerine yayılmadan yavaş büyüme ve tek bir yerde kalma eğilimindedir. Ameliyatla çıkarıldıktan sonra, genellikle tekrar ortaya çıkmaz. Malign tümör kanserli iken genellikle hızla büyür ve yakındaki dokuları, kan damarlarını veya lenfatik damarları istila edebilir. Kanser hücreleri tümörden ayrılarak metastatik potansiyel kazanabilir ve çıkarıldıktan sonra yeniden ortaya çıkabilir (Biyi ve ark., 2001).

Kanser, anormal hücrelerin hızla bölünmesi ve diğer doku ve organlara yayılmasıdır. Kanser türleri genelde kanserlerin oluştuğu organla isimlendirilmektedir. Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser tiplerinden biridir. Meme kanserinin akciğer kanserinden sonra ikinci sırada ölüme sebep olduğu gösterilmiştir (Özay ve ark., 2019).

1.2. Meme kanseri

Meme kanseri, dünya çapındaki kadınlarda en yaygın görülen malignitedir (Comşa ve ark., 2015). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı 2020 istatistiklerine göre kadın meme kanseri (%11,7), en sık teşhis edilen kanser olarak akciğer kanserini (%11,4) geride bırakmıştır (DSÖ ve IARC, 2020 ; Ferlay ve ark., 2020). Şekil 1.1.'de Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı 2020 istatistiklerine göre kanser vaka sayıları gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Kanser vaka sayısı (DSÖ ve IARC, 2020)

Meme kanseri, meme dokusu hücrelerinde meydana gelen; hücre büyümesi, sağlıklı kalması ve bölünmesinin kontrolünden sorumlu genlerde meydana gelen mutasyonlar ve anormal değişimler sonucu oluşmaktadır. Meme kanseri multifaktöriyel bir hastalıktır ve kalıtsal ya da çevresel faktörler etkilidir. Meme kanserlerinin çoğu, ya süt üretimi için loblar denilen bezlerden oluşan meme dokusunda ya da lobülleri meme ucuna bağlayan kanallarda başlar (Öztecik, 2019).

Meme kanseri en çok lobül ile terminal duktus birleşme yerindeki epitelden köken alan bir adenokanserdir. Bugünkü bilgilere göre meme kanseri (invaziv duktal kanser) gelişmeden önce duktus epiteli, atipik duktal hiperplazi, duktal karsinoma insitu gibi evrelerden geçer ve sonunda meme kanseri gelişir. Başlangıçta süt aktaran kanal sistemi (duktus) içinde sınırlı olan kanser hücreleri sonradan kendi bazal membranlarından ilerleyip bağ dokusu içine geçerler. Bu aşamada tümör hücreleri kan damarları ve lenfatiklerle karşılaşarak metastaz yapma yeteneğine sahip olurlar (Aydıntuğ, 2004).

1.3. Apoptoz

Apoptoz ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından tanımlanmış ve adlandırılmıştır benzersiz bir morfolojik tepki olarak birçok farklı türde hücre stresine karşı nekrozdan farklıdır (Kerr ve ark., 1972).

Vücudumuzdaki her hücre belli bir süre yaşar sonra ölür. Hücre ölümüyle hücre çoğalması arasında kontrollü bir denge vardır. Apoptoz programlı hücre ölümü olarak kabul edilmektedir (Özay ve ark., 2019). Apoptoz, gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan, fonksiyonları bozulan hücrelerin ve biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış olan hücrelerin çevreye zarar vermeden ve inflamasyon oluşturmadan programlı ölümüdür (Öktem ve ark., 2001). Bu programlı hücre ölümü, hücrelerin elimine edilmesi için etkili bir mekanizma sağlamaktadır.

Apoptoz hücrenin kendini yok etmek için bir takım metabolik ve fizyolojik işlemleri devreye soktuğu bir olaydır. Apoptoza girmiş bir hücre, önce bulunduğu ortamdan uzaklaşır, komşu hücrelerle bağlantısını koparır, büzüşmeye başlar ve kromatinlerin yoğunlaşması gibi morfolojik değişiklikler ile başlar, sonucunda ise hücre iskeleti ve DNA'nın yıkımı gibi biyokimyasal olaylar gerçekleşir. Apoptoza giden hücreler apoptotik cisimcikler adı verilen küçük parçacık oluşur ve makrofajlar tarafından tanınıp fagosite edilirler ancak hücre organelleri yapısal bütünlükleri korunur ve enflamasyon görülmez (Kerr ve ark., 1972; Bellamy ve ark., 1995; Green ve Fibzgeral, 2016; Wyllie ve ark., 1980).

1.2.1. Apoptozun Düzenlenmesi

Genel olarak apoptozun düzenlenmesinde kaspazlar, tümör protein 53 (p53), sitokrom-c, Bcl-2 ailesi gibi proteinler ve mitokondriler rol oynar.

kaspazlar

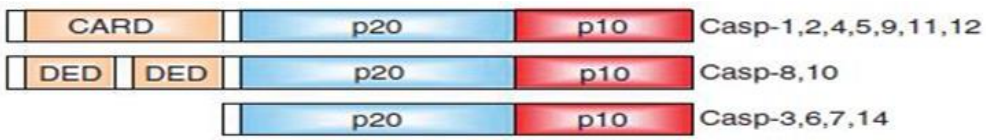
Kaspazlar (Caspase: Cysteine aspartyl protease), sistein aspartat proteaz ailesinin bir üyesidir. Kaspazlar, proteinleri aspartik rezidülerinin ardından parçalayan sistein proteazlardır. Bütün apoptotik ölümlerin ortak noktası kaspaz aktivasyonudur. Zimojen olarak üretilip proteolitik parçalanma ile aktiflenirler (Chowdhury, 2008 ; Fuentes-Prior ve Salvesen, 2004; Orning ve Lien, 2020; Cooper, 2019; Radosevich, 2018).

Bilinen ana fonksiyonları temelinde kaspazlar, pro-inflamatuar ve pro-apoptotik alt grup olmak üzere iki alt aileye ayrılır. Pro-apoptotik kaspazların (kaspaz 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10) esas olarak hücre ölümü sinyal iletimine aracılık ettiği bilinirken, proinflamatuar kaspazların (kaspaz 1, 4, 5, 11, 12) iltihaplanma sırasında sitokin olgunlaşmasını düzenler. Apoptozda görev alan kaspazlar ayrıca başlatıcı (kaspaz 2, 8, 9 ve 10) ve efektör (kaspaz 3, 6 ve 7) kaspazlar olarak iki alt gruba ayrılır (Li ve Yuan, 2008; Bose, 2015; Slee ve ark., 1999; Elmore, 2007; Man ve Kanneganti, 2016). Çizelge 1.1.'de kaspazların sınıflandırılması gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Kaspazların sınıflandırılması

Proapoptotik Kaspazlar		**Proinflamatuar Kaspazlar**
Başlatıcı Kaspazlar	**Efektör Kaspazlar**	
Kaspaz-2	Kaspaz-3	Kaspaz-1
Kaspaz-8	Kaspaz-6	Kaspaz-4
Kaspaz-9	Kaspaz-7	Kaspaz-5
Kaspaz-10		Kaspaz-11
		Kaspaz-12

Bütün apoptotik ölümlerin ortak noktası kaspaz aktivasyonudur. Zimojen olarak üretilip proteolitik parçalanma ile aktiflenirler. Kaspazlar, diğer proteazlardan ayırt edilebilen bir dizi özelliği paylaşır. Pro-kaspazlar bir prodomain, bir p20 büyük alt birim ve bir p10 küçük alt birim olarak adlandırılan 3 farklı bölge içeren inaktif zimojenler olarak sentezlenir. Pro-kaspazların farklı alt birimleri ayıran bölünme bölgeleri vardır. Kaspazın aktivasyonu için bu bölgelerin ya başka bir proteaz ya da kaspazın kendisi tarafından bölünmesi gerekir. Ayrıca, prodomain, kaspazı sinyal komplekslerine veya yolu başlatan adaptör moleküllere bağlayan bağlanma bölgeleri içerebilir. Kaspaz 1, 2, 9, 11 ve 12 bir Caspase Recruitment Domain (CARD) içerirken, kaspaz 8 ve 10 bir Death Effector Domain (DED) içermektedir. Zimojenlerin proteolitik bölünmelerle aktivasyonu büyük ve küçük alt birimleri ayırır ve prodomaini ortadan kaldırır (Li ve Yuan, 2008; Orning ve Lien, 2020). Şekil 1.2.'de kaspazların yapısı ve domain organizasyonu gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Kaspazların yapısı ve domain organizasyonu (Orning ve Lien, 2020)

Başlatıcı kaspazlar (Kaspaz 8 ve 9), apoptozun ilk evrelerinde aktif hale geçerler. Hücre hasarı tespit edildiğinde, başlatıcı kaspazlar aktif olmayan prokaspazlardan aktive edilir ve efektör kaspazları (kaspaz 3, 6 ve 7) aktive etmeye devam eder. Kaspazların aktive edildiğinde temel hedeflerinden biri, nükleer DNA'nın parçalanmasından sorumlu olan bir DNaz inhibitörünü (ICAD) inhibe etmektir. Efektör kaspazlardan en önemlisi olarak bilinen ve apoptozdaki rollerinden biri de endonükleaz enzim olan kaspaz aktive edici Dnaz'ın (CAD: Caspase Activated DNase) aktivasyonunu sağlayan Kaspaz 3'tür. Sağlıklı hücrelerde, kaspaz 3 ile aktive edilen DNaz inhibitörü (ICAD: The inhibitor of caspase 3– activated DNase) ile bağlanmış bir şekilde inaktif halde bulunan CAD, Kaspaz 3'ün proteolitik aktivitesi ile ICAD'dan ayrılarak DNA parçalanması, kromatin kondansasyonu ve apoptotik cisimciklerin oluşumunu başlatır (Behzadi ve ark., 2015 ; Poon, 2014 ; Cooper, 2019).

Kaspaz 8 aktivasyonu, hücre ölümüne yol açan ve ekstrinsik yolu başlatan ana özellik olarak kabul edilir. Nükleer düzeyde, endonükleazların ve ekzonükleazların DNA'yı küçük parçalara (200 baz çifti (bp)) hidrolize edebileceği iyi bilinmektedir. Nükleer olaylar kaspaz aktivasyonuna bağlıdır. Kaspaz 3, efektör kaspazlardan en önemlisi olarak kabul edilir ve farklı başlatıcı kaspazlar tarafından aktive edilir. Örneğin, kaspaz 8 ölüm reseptöründen aktive olur, kaspaz 9 mitokondriyal apoptotik süreçte yer alır ve kaspaz 10 perforin/granzim yolaklarında yer alır. Aktive olmuş kaspaz 3, CAD'ı aktive ederek DNA'yı küçük parçalara ayrır (~50-300 kb). Daha sonra DNA'nın ekzonükleazlar ve endonükleazlar tarafından işlenmesi 200 bp fragmentlerin oluşmasına yol açar (Radosevich, 2018).

Bcl-2 Ailesi

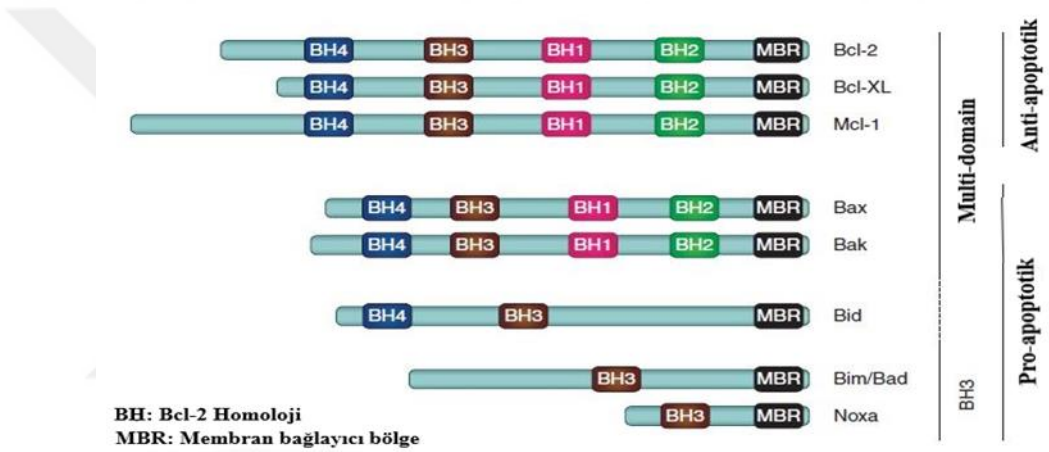
Bcl-2 ailesi (B-hücreli lenfoma 2) apoptozda çok önemli bir rol oynar. Bcl-2'nin keşfi, Fukuhara ve Rowley tarafından kromozomal translokasyonların t(14;18) insan foliküler lenfoması ile ilişkilendirilmesi ile başlamıştır (Fukuhara ve Rowley, 1978). Bu, diğer araştırmacılarının kromozomal kırılma noktasını ve ardından kromozom 18 üzerindeki bir genin cDNA'sını klonlamasını sağlamış ve bu gen, B hücreli lösemi veya lenfoma Bcl-2 olarak adlandırılmıştır (Delbridge ve ark., 2016).

Bcl-2 ailesi, apoptozu uyaran (pro-apoptotik) ve apoptozu inhibe eden (anti-apoptotik) proteinler olarak iki alt sınıfa ayrılır ve bu ailenin üyeleri apoptozun intrinsik yolağını regüle ederler ve bu ailenin yaklaşık 20 üyesi tanımlanmıştır (Nagata, 1997). Hücrede pro-apoptotik proteinler daha fazla ise hücre apoptoza gider. Anti-apoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoza daha az eğilimlidir (Adams ve Cory, 2001).

Bcl-2 protein ailesinin anti-apoptotik üyeleri; Bcl-2 (B-hücreli lenfoma 2), Bcl-XL (B-hücreli lenfoma-extra-large), Bcl-W (B-hücreli lenfoma-w) ve Mcl-1 (miyeloid hücre lösemi-1)'dir (Pascual-Pasto ve ark., 2023). Bu proteinler mitokondri dış membranında, çekirdek zarında ve endoplazmik retikülumda bulunur. Pro-apoptotik üyeler Bax, Bad, Bcl-xs, Bid, Bak, Puma, Noxa ve Bim'dir. Bu proteinler de sitozolde yer almaktadır (Coşkun ve Özgür, 2011). Ayrıca, proapoptotik üyeler tüm BH domainlerini (Bcl-2 homoloji bölgeleri BH1-BH4) içeren Bax ailesi (Bax, Bak ve Bok) ve sadece bir BH3 bölgesine sahip olan grup (Bid, Bik, Bad, Bim, Bak, Bcl-xs, Puma, Noxa, Hrk) olmak üzere iki alt kategoriye ayrılır (Inoue-Yamauchi ve ark., 2017; Shamas-Din ve ark., 2013).

Bcl-2 ailesinin proteinleri BH domainlerine (Bcl-2 homoloji bölgeleri BH1-BH4) sahiptir (Czabotar ve ark., 2013). Bcl-2 ailesinin prosurvival üyeleri: Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, MCL1, A1 ve BOO/DIVA, dört Bcl-2 homoloji bölgesine sahiptir. Proapoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri sadece işlev bakımından değil, aynı zamanda Bcl-2 homoloji bölgelerinin sayısı bakımından da farklılık gösterir. Üç Bcl-2 homoloji bölgesine sahip olan Bax ve Bak, mitokondriyal membranların geçirgenliğini artırmak ve kaspaz 9'u aktive eden sitokrom c salınımı için kritik öneme sahiptir.

Diğer proapoptotik proteinler sadece Bcl-2 homoloji 3 (BH3) alanına sahiptir. Bu BH3-only proteinleri antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerine bağlanır ve onları inhibe eder, böylece mitokondriyal membran geçirgenliğinin kaybına ve ardından hücre ölümüne neden olan proapoptotik Bax ve Bak proteinlerini serbest bırakır. Bcl-2 ailesi proteinlerinin çoğu üyesi, karboksil terminallerinde bir kuyruk çapası, mitokondriyal hedefleme dizisi veya bu proteinlerin mitokondriyal dış membranı (MOM)'a veya endoplazmik retikulum (ER) membranına bağlanmasını ve lokalizasyonunu kolaylaştıran hidrofobik bir amino asit dizisi şeklinde bir membran bağlayıcı bölge (MBR) içerir. Proapoptotik BH3-only proteinleri ile antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri arasındaki denge, bir hücrenin yaşamını ya da ölümünü belirler (Hotchkis ve ark., 2009; Shamas-Din ve ark., 2013). Şekil 1.3. Bcl-2 protein ailesine şematik genel bakış, çizelge 1.2'de ise Bcl-2 protein ailesi üyeleri gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Bcl-2 protein ailesine şematik genel bakış (Shamas-Din ve ark., 2013)

Anti-apoptotik ve pro-apoptotik arasındaki denge Bcl-2 protein ailesi üyeleri içsel (mitokondriyal) apoptotik yolu kontrol eder (Hotchkis ve ark., 2009).

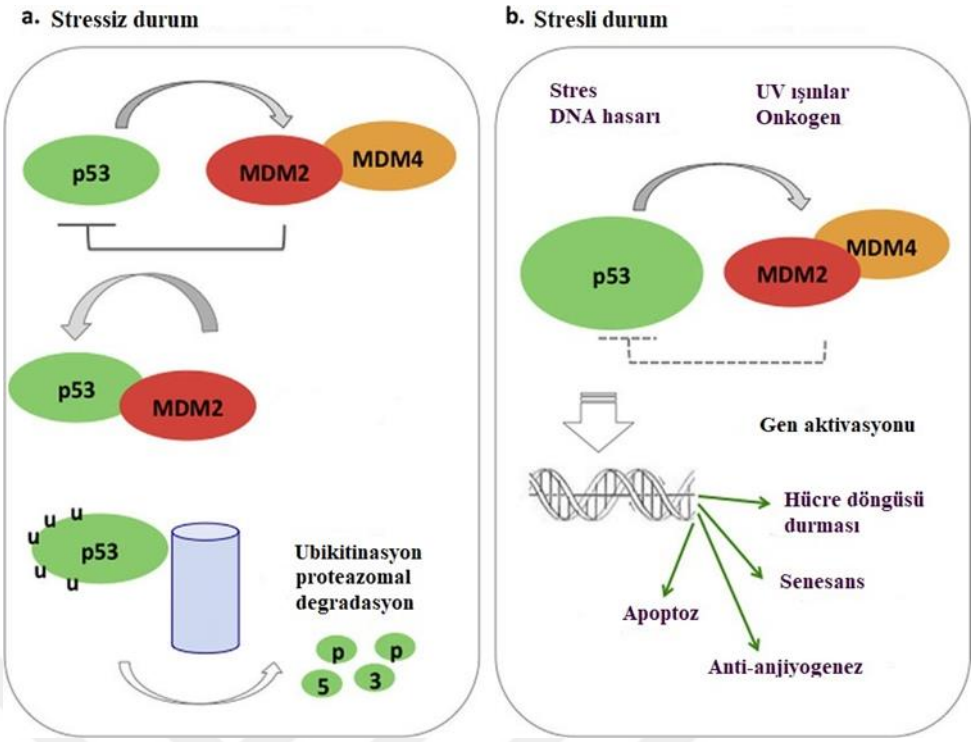
Çizelge 1.2. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri (Öktem ve ark., 2001; Pascual-Pasto ve ark., 2023 ; Bruckheimer ve ark., 1998)

Pro-apoptotik üyeler		**Anti-apoptotik üyeler**
Multi-domain	**BH3-only protein**	
Bax	Bid	Bcl-xl
Bak	Bad	Bcl-w
Bok	Bik	Mcl-1
Bcl-xs	Puma	BHRL-1
	Noxa	Bfl-1/ A1
	Hrk	Brag-1

Bcl-2 protein ailesi, mitokondriyal dış membranın permeabilizasyonunu (MOMP) düzenleyerek apoptozu kontrol eder. Bcl-2 ailesi üyeleri arasındaki etkileşim membranlarda olduğu kadar sitoplazmada da gerçekleşir. Ayrıca, bu dinamik etkileşimler Bcl-2 proteinlerinde apoptotik işlevlerini modüle eden konformasyonel değişikliklere neden olur (Shamas-Din ve ark., 2013). Bcl-2 ailesi proteinleri, mitokondriyal dış membran permeabilizasyonunu (MOMP) kontrol ederek intrinsik apoptozun düzenlenmesinde merkezi bir rol oynamaktadır. Pro-apoptotik Bax sağlıklı hücrelerde sitozolde lokalize olur ve apoptotik uyaranları takiben mitokondriyal dış membrana (MOM) çevrilir. Mitokondriyal Bax, Bcl-xLtarafından doğrudan inhibe edilebilen MOMP ve sonraki apoptotik olaylar serisini tetiklemek için homo-oligomerler oluşturur. Şu anda hem Bax hem de Bcl-xL'nin sitozol ve mitokondri arasında dinamik bir denge içinde ileri geri mekik dokuduğu düşünülmektedir (Mai ve ark., 2022).

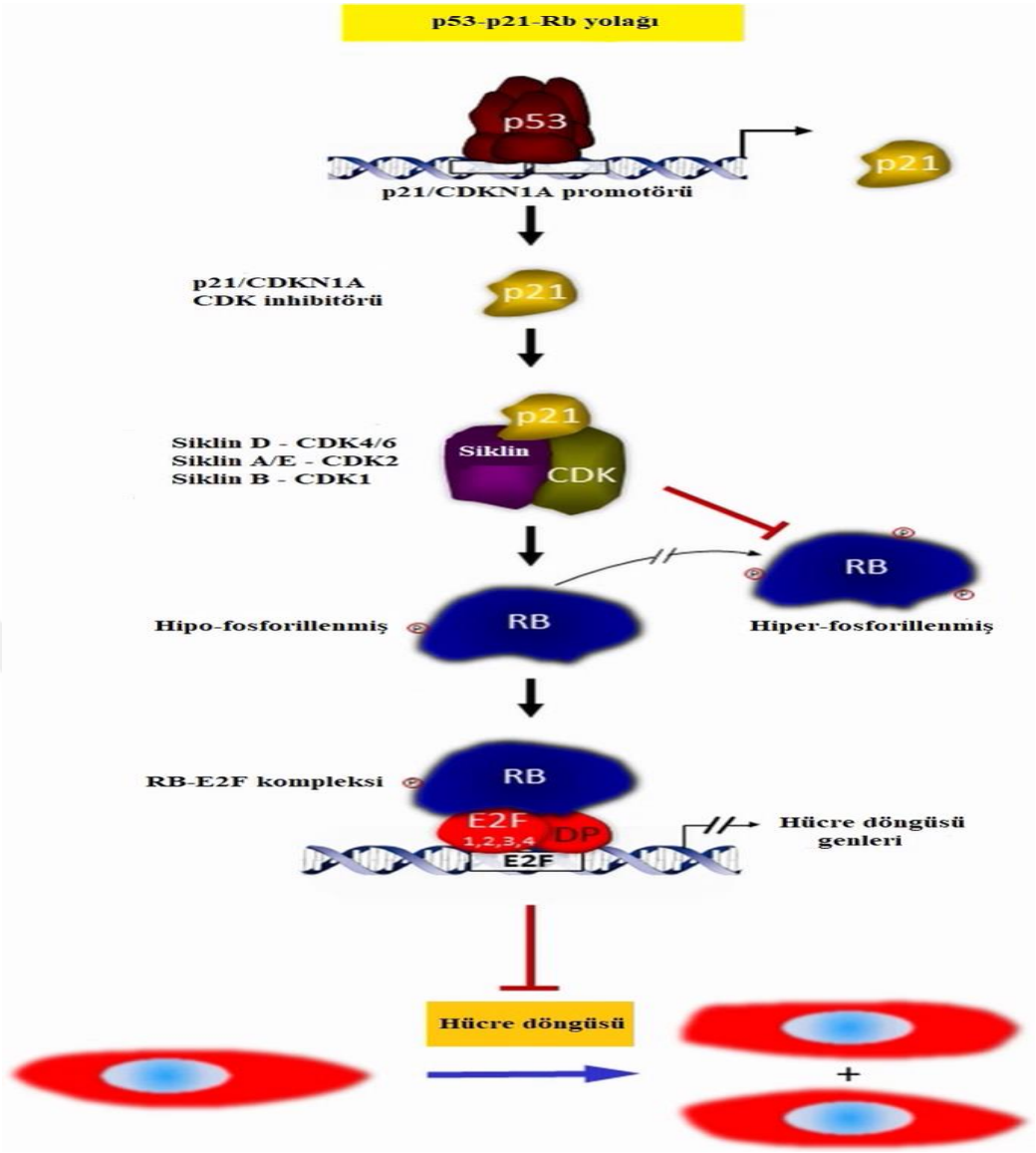
Tümör Protein 53 (p53)

İnsan proteini p53 (393 amino asit) bir transkripsiyon faktörüdür. Tümör baskılayıcı p53, DNA onarımı, metabolizma, hücre döngüsünün durdurulması, apoptoz ve yaşlanma ile ilgili genleri düzenler. Murine Double Minute 2 ve 4 (MDM2-MDM4) gibi negatif düzenleyicilerin aşırı ekspresyonu nedeniyle p53 işlevi kaybolabilir. Stres altında olmayan hücrelerde p53 inaktiftir; onkoprotein MDM2 ile ilişkisi sayesinde düşük seviyede tutulur, bu da çekirdekten sitoplazmaya taşınmasına ve ubikitin bağımlı yolla parçalanmasına neden olur. MDM2 inhibitörleri aracılığıyla p53 reaktivasyonu, p53 kanser hücrelerini apoptoza duyarlı hale getirir. DNA hasarı p53'ün bolluğunu artırarak p53'ü modifiye eden kinazların hızlı aktivasyonuna neden olabilir. Bu da p53 ve MDM2 arasındaki ilişkinin bozulmasına neden olur. UV veya iyonize radyasyon gibi genotoksik stresler, p53 proteininin stabilizasyonuyla sonuçlanan sinyal yollarını tetikleyerek çekirdekte birikmesine ve bir transkripsiyon faktörü olarak aktivasyonuna neden olur. Bu aktivasyon büyümenin durmasına veya apoptozun indüklenmesine yol açar. Tümör baskılayıcı p53, hücre büyümesinin düzenlenmesinde ve hücrelerin tümör büyümesinden korunmasında rol oynayan en önemli moleküllerden biridir. Genotoksik strese karşı hücresel yanıtta merkezi bir rol oynar ve bu "genom koruyucusunun" kaybı karsinogenezde önemli bir adımı temsil eder. İnsan tümörlerinin %50'sinden fazlasında p53'te inaktive edici mutasyonlar gözlenmiştir. p53, çok çeşitli hücresel streslere (DNA'ya zarar veren ajanlara maruz kalma, hipoksi, nükleotid eksikliği, uygunsuz onkojenik aktivasyon, vb.) yanıt olarak hücre büyümesinin durmasını veya apoptozu indükleyerek bir tümör baskılayıcı görevi görür. Bu tepkiler hasarlı DNA'ya ve onkojenik potansiyele sahip hücrelerin yayılmasını önleyecektir (Leblanc ve May, 2002; Urso ve ark., 2016; Vogelstein ve ark., 2000; Hoe ve ark., 2014).



Şekil 1.4. Stressiz koşullarda ve stres altında p53 işlevi (Urso ve ark., 2016)

Hücre döngüsünün p53 tarafından durdurulmasında p21'in transkripsiyonel aktivasyonu önemlidir (El- Deiry ve ark., 1993; Harper ve ark., 1993). p53'ün aktivasyonu G1/S veya G2/M noktalarında hücre döngüsünün durmasına yol açabilir. p21 gen ifadesinin aktivasyonu, hücre döngüsünün G1/S noktasında durmasından büyük ölçüde sorumludur (North ve Hainaut, 2000). p21, siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin (CKI'ler) Cip/Kip ailesinin bir üyesidir ve hücre döngüsünün p53 bağımlı ana inhibitörlerinden biridir (Lodygin ve ark., 2002). Bu gen, siklin D/Cdk4, D/Cdk6, E/Cdk2 ve A/Cdk2 dahil olmak üzere neredeyse tüm komplekslerin inhibitörü olan p21 proteinini kodlar (North ve Hainaut, 2000). DNA hasarı ile p53 aktive olduğunda, p21 artar ve siklin E/Cdk2 ve siklin D/Cdk4 komplekslerine bağlanıp hücre döngüsünde G1'de durmasına neden olur (Harper ve ark., 1993). Cdk2 ve Cdk4'ün p21 tarafından inhibisyonu; retinoblastoma tümör baskılayıcı proteininin (pRb) fosforilasyonunu bloke eder, pRb'nin E2F1'e bağlanmasını teşvik eder ve DNA replikasyonu ve hücre döngüsü ilerlemesi için kritik olan E2F1 transkripsiyon hedeflerinin susturmasını destekler (Chen, 2016). Şekil 1.5.'te p53-p21-RB sinyalizasyonu gösterilmiştir.



Şekil 1.5. p53-p21-RB sinyalizasyonu (Engeland, 2022)

Aktive olmuş p53, hücrede DNA hasarı oluştuğunda hücre siklusunu G1 fazında durdurup hücreye DNA tamiri için zaman veren bir transkripsiyon faktörüdür. Hasar tamir edilemeyecek durumda ise Bax, Apaf-1 ve Fas yapımını artırıp Bcl-2 ve Bcl-xL'yi baskılar ve apoptozu indükler.

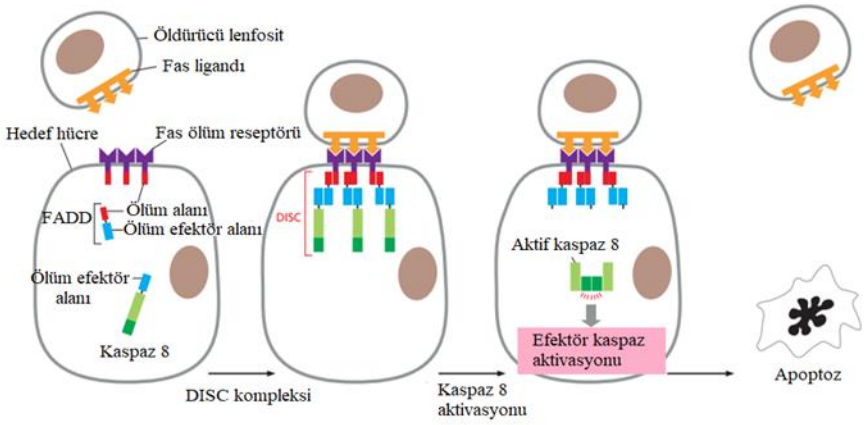
1.2.2. Apoptozun Mekanizmaları

Apoptoz, hücre ölümünü başlatan sinyalin nereden kaynaklandığına bağlı olarak intrinsik veya ekstrinsik apoptoz olarak kategorize edilebilir. Apoptoz, bu iki mekanizma tarafından aktifleştirilmektedir. Ölüm reseptörlerine ölüm ligandlarının bağlanması ile aktifleştirilen 'ekstrinsik yolak', hücre içi sinyaller sonucu aktive olan yolak ise 'intrinsik yolak'tır.

Ektrinsik Yolak

Apoptotik yolaklardan biri ekstrinsik veya ölüm reseptörü yolağıdır. Bu yolağın aktivasyonu bir ölüm reseptörüne ve bir ölüm ligandına bağlıdır. Ligand, efektör yolağının hücre içi sinyalizasyonuna yol açan dışarıdan gelen ölüm sinyalini temsil eder. Ölüm reseptörleri; Fas ile ilişkili ölüm domain proteini (FADD), TNF reseptörü ile ilişkili ölüm domain (TRADD) ve reseptörle etkileşen protein (RIP) gibi adaptör proteinleri, bunlara da ek olarak pro-kaspaz 8 gibi diğer molekülleri tetikler. Ekstrinsik apoptoz, hücre yüzeyi reseptörleri aracılığıyla hücre dışı sinyalizasyon ile başlatılır. Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine (örneğin: Fas, DR4, DR5, TNFR) ölüm sinyallerinin (örneğin: FasL, TRAIL, TNF-α) bağlanmasıyla reseptörler trimerik yapı kazanır. Trimerik yapı kazanan reseptör adaptör proteinleri ve pro-kaspaz 8 ile birleşerek ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC: Death inducing signaling complex) adı verilen yapıyı oluşturarak inaktif durumdaki pro-kaspaz 8'in aktivasyonuna yol açar. Kaspaz 8 aktivasyonu (Şekil 1.6.), hücre ölümüne yol açan ekstrinsik yolu başlatan ana özellik olarak kabul edilir. Aktive olmuş kaspaz 8 doğrudan ve dolaylı olmak üzere 2 yolla kaspaz 3'ü aktive eder. Ya direkt kaspaz 8 kaspaz 3'ü aktive eder ya da kaspaz 8, Bid'i keserek aktif kesilmiş form olan tBid'i oluşturur. Böylece ve dolaylı olarak intrinsik yolağında tBid, anti-apoptotik Bcl-2'ye bağlanarak onu inhibe etmekle beraber pro-apoptotik Bak ve Bax'ı aktifleştirir.

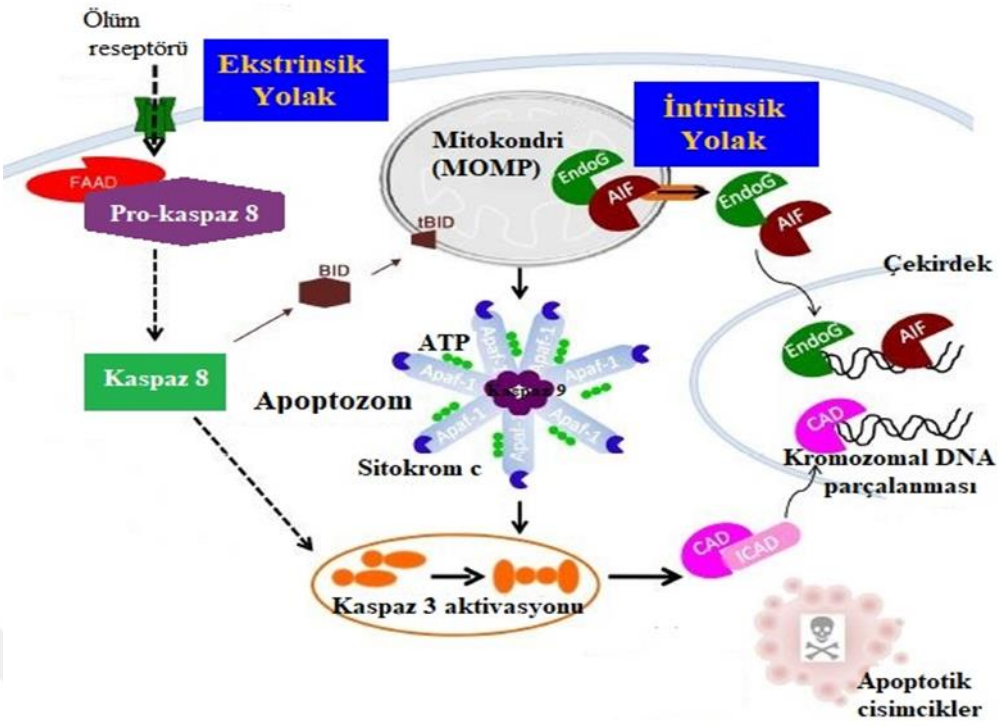
Aktifleşen Bax ve Bak proteinleri mitokondri membranında por oluşumunu gerçekleştirip mitokondriyal dış zar geçirgenliğini (MOMP) degiştirir. Bu durumda, mitokondrideki oluşan porlardan sitokrom c (cyt c), apoptoz indükleyici faktör (AIF), Mitokondri kaynaklı İkinci Kaspaz Aktivatörü (SMAC: Second Mitochondria-drived Activator of Caspase) ve endonükleaz G (endo-G) adlı DNAz enzim, sitoplazmaya dağılır. Sitoplazmada sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) ve ATP ile birleşerek sitozolde 'apoptozom' adı verilen bir kompleks oluşturur. Apoptozom inaktif durumdaki pro-kaspaz 9'u aktifleştirir. Aktive olmuş kaspaz 9 da pro-kaspaz 3'ü aktifleştirir. Aktif kaspaz 3'ün proteolitik aktivitesi ile, ICAD'ı inhibe ederek CAD'ı serbestleştirir. Her iki yolla da aktif halde bulunan CAD, DNA fragmente olmasına, çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına ve apoptotik cisimciklerin oluşmasına yol açar (Radosevich, 2018; Orning ve Lien, 2020; Coşkun ve Özgür, 2011; Delbridge ve ark., 2016; Cooper, 2019).



Şekil 1.6. Kaspaz 8 aktivasyonu (Alberts ve ark., 2002)

İntrinsik Yolak

İntrinsik yolak apoptozun mitokondriyal yolu olarak da bilinir (Igney ve Krammer, 2002). İntrinsik apoptoz, DNA hasarı, besin yoksunluğu, endoplazmik retikulum (ER) stresi, hipoksi veya serbest radikaller gibi hücre içi stresler tarafından tetiklenir (Orning ve Lien, 2020). Proapoptotik ve antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin arasındaki etkileşim mitokondriyal yolağını kontrol ederler. Hücre içi sinyal ile uyarı aldıktan sonra pro-apoptotik Bid, anit-apoptotik Bcl-2'yi inaktive eder, pro-apoptotik Bax ve Bak'ı aktive edip mitokondriyal dış membran permeabilizasyonuna (MOMP) ve ardından sitokrom c, endo-G, AIF, SMAC'in salınımına yol açarak başlatıcı kaspaz 9'un aktivasyonuna neden olur. Sitokrom c, Apaf-1, ATP ve pro-kaspaz 9'dan multimoleküler bir protein kompleksi olan apoptozom oluşturulur. Kaspaz 9 bu komplekste bölünüp aktifleştirilir. Aktif kaspaz 9, kaspaz 3'ü aktifleştirir. Aktif Kaspaz 3, ICAD'ı inaktifleştirerek CAD'ı serbestleştirir. CAD ise DNA fragmente olmasına neden olur (Hotchkis ve ark., 2009; Orning ve Lien, 2020; Coşkun ve Özgür, 2011).



Şekil 1.7. Apoptozun intrinsik ve ekstrinsik yolakları (Radosevich, 2018)

1.3. Kanser ve Apoptoz

Kanserin hücre proliferasyonunda artış ve apoptozda azalmaya bağlı olarak geliştiği bilinmektedir. Hücre ölümü inhibe olduğunda hasarlı hücreler birikmekte ve dokuda hasara neden olmaktadır. Kemoterapi ile etkin tedavinin sonucunda hücrelerde apoptoz meydana gelmektedir. Birçok antikanser ilaç, tümör hücre DNA sentezine ve hücre bölünmesine etki ederek apoptoz indüksiyonuna neden olmaktadır. İlaç tedavisinden sonra hücrenin apoptoza duyarlılığının değişmesinin, edinilmiş ilaç direncinde önemli bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında, kanserde ilaç tedavisinin en önemli hedeflerinden birinin, neoplastik hücrelerde apoptozu hızlandırmak olduğu düşünülmektedir (Kaya ve ark., 2012).

1.4. Kanser ve *Spirulina platensis*

Kanser tümörün klinik formuna, histolojik tipine, evresine ve konumuna bağlı olarak tedavi edilir. Kanserin üç ana tedavi metodu vardır: kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi (Wang, 2018). Her yöntemin kendine özgü avantj ve dezavantajlarının bulunması, kanserin kişiye özgü bir hastalık olaması, tedavilerin kişiden kişiye farklılık gösterebilmesi nedeniyle tek bir kesin tedavi yönteminin varlığından bahsetmek imkansızdır. Ayrıca geleneksel tedavilerinin yan etkileri vardır. Dolayısıyla bu yan etkileri azaltarak yeni, güçlü ve etkili tedavi modalitelerinin bulunmasına ihityaç vardır. Kanserin önlenmesi ve tedavisinde birçok doğal veya sentetik ajan hali hazırda çalışmakta olup günümüz tıp ve sağlık alanında özellikle yan etkilerinin azlığı ve insan fizyolojisi

ile uyumu sebebiyle daha çok doğal çözümlere odaklanılmaktadır. Bu alanda özellikle, *Spirulina platensis* ekstraktının antikanser çalışmalarında kullanımı oldukça dikkat çekicidir.

1.4.1. *Spirulina platensis*

Spirulina platensis (*Arthrospira platensis* olarak da bilinir), yaygın olarak *Spirulina,* ipliksi mavi-yeşil bir mikroalgdir (Siyanobakteri) (Ismail ve ark., 2009; Ross ve Dominy, 1990). Siyanobakteriler filumuna ait olan *Arthrospira platensis* fotosentetik bir canlıdır (Slizewska ve ark., 2021; Kumar ve ark., 2021; Potnis ve ark., 2021; Soo ve ark. 2014). *Spirulina*, çok hücreli, ipliksi, prokaryotik bir mikroalgdir (Jaeschke ve ark., 2019; Wang ve ark., 2022). Mavi-yeşil algler olarak tanınan *Cyanophyta* filumuna ait *Spirulina*'da, mitokondri, çekirdek, golgi cisimciği, endoplazmik retikulum ve kofulları hücre içinde dağınık halde bulunmaları nedeniyle prokoryatik olarak tanımlanmakta ve benzer hücre çeperine sahip olmaları nedeniyle bakterilere benzetilmektedir (Oğuz, 2008).

Mikroalgler içermiş oldukları yüksek düzeyde protein, vitamin, mineral, yağ asitleri, karbonhidratlar, amino asitler ve pigmentler nedeniyle son zamanlarda üzerinde en çok durulan organizma gruplarından biridir. Siyanobakteri sınıfına ait olan *Spirulina,* en önemli alg türlerinden biridir. Filamentleri birbirinden bağımsız, serbest olarak bulunur ve kayma hareketi gösterirler. İsmini filamentlerinin spiral yapısından alır (Ali ve Saleh, 2012; Rout ve ark., 2015; Pawar ve ark., 2020; Kumar ve ark., 2022). Her bir filament, ince bir kılıfla sarılmış trikom adı verilen ipliksi yapılar halindedir. Trikomların genişliği yaklaşık 6-12 mikrometre olmakla birlikte türden türe değişiklik göstermektedir. *Spirulina platensis* hücrelerine mikroskopta bakıldığında tipik prokaryotik organizmalar olduğu, morfolojik olarak çekirdek ve plastidlerden yoksun olduğu görülmektedir. Siyanobakterilerde çekirdek materyali bir kılıf ya da zar ile çevrili değildir, genetik yapı sitoplazma ile fotosentetik membran arasında serbest olarak bulunur. *Spirulina*'da organeller bir zarla çevrili değildirler (Richmond, 1986).

Spirulina'da hücre duvarı bakterilerde olduğu gibi 4 katlı tabakadan oluşur. Müsilaj yapıdaki hücre duvarı çok ince olup yaklaşık 40-60 nanometre kalınlığındadır. Hücre duvarını oluşturan tabakaların başlıca yapısını peptidoglikan (mürein) tabakası oluşturur. Hücre duvarının en dış tarafı lipopolisakkarit tabakadan oluşur. Hücre duvarında selülozun eksikliğinden dolayı yüksek oranda sindirilme özelliğine sahiptir. Hücre duvarının altında sitoplazmayı çevreleyen plasma membranı (plasmalemma) yer almaktadır. Plasmalemma çok ince olup yaklaşık 8 nanometre kalınlığındadır. Hücrenin kenar bölgeleri çoğunlukla polyglukan ve gaz vakuollerinin yer aldığı, düşük elektron yoğunluğuna sahip sitoplazma ile karakteristiktir. Sitoplazmada glikojen granülleri, cyanofisin granülleri, fibriller ve yağ damlacıkları da bulunmaktadır (Oğuz, 2008).

Spirulina platensis, dış ortamda başlıca ışık ve sıcaklık gibi fiziksel koşullardaki değişimlere karşı dirençli olması nedeniyle siyanobakteriler arasında öne çıkan türler arasındadır (Monaselidze ve ark., 2022). *Spirulina platensis*'in bileşimi benzersizdir, proteinler (Aouir ve ark.,

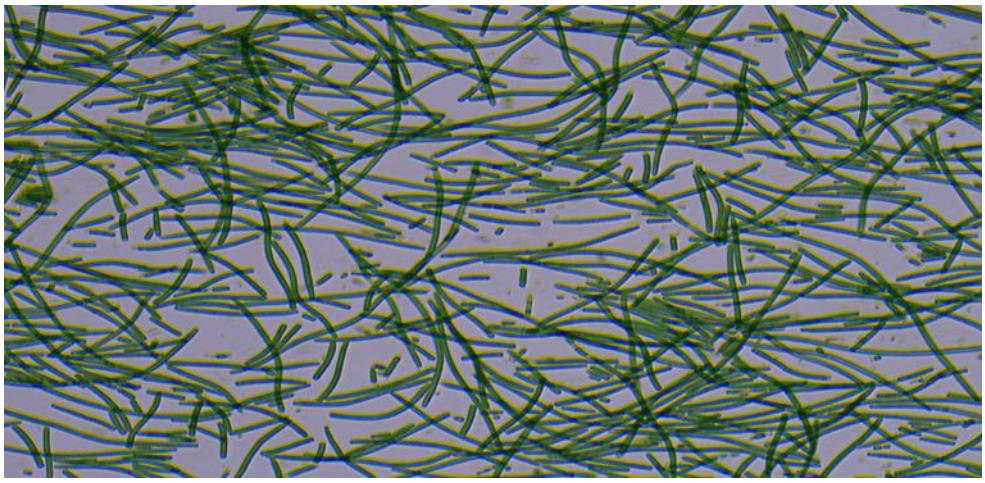
2017; Coca ve ark., 2015), vitaminler (Watanabe ve ark., 1999), mineraller (Grosshangaver ve ark., 2020; Carcea ve ark., 2015) ve lipitlerden oluşurlar (Grosshangaver ve ark., 2020; El Baky ve ark., 2020; Shabana ve ark., 2017). *Spirulina* pigmentler (klorofil α, ksantofil, β-karoten, zeaksantin ve phycobiliproteinler) açısından zengindir (Parvin ve ark., 2008). *Spirulina platensis*'ten kaynaklı phycobiliproteinler; phycoerythrin (PE) ve phycocyanin (PC) içerir ve toplam proteinlerin %20-45'i phycobilinlerdir (Stadnichuk ve ark., 2015). Phycocyaninler, hem C-phycocyanin (C-PC) hem de allophycocyanin (APC) içermektedir. C-phycocyanin, phycobiliproteinlerin en önemli ve en baskın grubudur ve ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından sertifikasyondan muaf olarak onaylanan bir renk katkı maddesidir. Et, yumurta ve süt kadar zengin protein kaynağıdır (Chen ve ark., 2014; Khandual ve ark., 2021; Wang ve ark., 2022).

Spirulina platensis doğal olarak yeşil renk veren klorofil α, nükleik asitler, vitaminler, mineraller ve amino asitler içerir. *Spirulina*'nın kuru maddenin %68'ine ulaşabilen yüksek protein içerir (Babadzhanov ve ark., 2004). *Spirulina* tozunun amino asit bileşimine , 26.29-47.03 mg/g kuru maddede glutamik asit hakimdir (Marrez ve ark., 2014). Baskın bir amino asit olarak glutamik asit ile *spirulina* tozunun yüksek protein içeriği, umami bileşenlerinin geliştirilmesi için yüksek potansiyel kaynağı gösterir (Pratama ve ark., 2022).

Spirulina platensis, FDA tarafından güvenli gıda olarak kabul edilmektedir Spirulina, Kanada, Çin, AB, Hindistan ve Japonya'da tüketilmesi güvenli kabul edilen bir gıdadır (Palanisamy ve ark., 2019; Torres-Tiji ve ark., 2020). Bu nedenle fonksiyonel uygulamaları ile bitki bazlı gıdalarda parlak bir geleceğe sahiptir (Guo ve ark., 2022).

Şimdiye kadar, *Arthrospira platensis*'nin in vivo toksikoloji çalışmaları, akut veya kronik dozların uygulanması sırasında veya sonrasında böbrek, karaciğer, üreme sistemi veya vücut fizyolojisi üzerinde herhangi bir toksik etki göstermemiştir (Braune ve ark., 2021). ABD Farmakopesi tarafından 1966-2009 PUBMED literatür incelemesine dayanan bir güvenlik değerlendirmesi ve FDA'nın olumsuz olay raporları, *Spirulina*''nın A Sınıfı bir güvenliğe sahip olduğu sonucuna varmıştır (Marles ve ark., 2011). Ayrıca, kurutulmuş *Arthrospira platensis* FDA tarafından "genel olarak güvenli" ("generally recognized as safe" (GRAS)) olarak kategorize edilmiştir. Yetişkinler için önerilen doz genellikle günde 3-10 g *Spirulina* aralığındadır. Maksimum uygulanan 30 g/gün *Spirulina* dozları herhangi bir olumsuz yan etkiyi göstermemiştir (Mysliwa-Kurdziel, 2017).

Spirulina platensis'in yüksek nütrisyonel değeri, kimyasal bileşimi ve biyokütlenin güvenliği nedeniyle başarılı ticari kullanımı, onu endüstriyel olarak yetiştirilen en önemli mikroalglerden biri haline getirmiştir.



Şekil 1.8. *Spirulina*'nın mikroskoptaki görünümü (10x)

1.4.2. *Spirulina*'nın Alg Sistematiğindeki Yeri

Mavi-yeşil bir alg olan *Spirulina platensis*'in sistematikteki yeri çizelge 1.3.'te belirtilmiştir (Sili ve ark., 2012; Yıldız, 2001; Kendirli, 2010):

Çizelge 1.3. *Spirulina*'nın alg sistematiğindeki yeri

Filum	*Cyanophyta*
Sınıf	*Cyanopyceae*
Takım	*Nostocales (Oscillatoriales)*
Aile	*Oscillatoriaceae*
Cins	*Spirulina*
Tür	*Spirulina platensis*

1.4.3. *Spirulina*'nın Kültürü

Spirulina, tropikal ve subtropikal bölgelerde doğal alkali ortamlarda yetişir (Zarouk, 1966; Richmond, 1988; Kumar ve ark., 2022). Mikroalglerin üretimi için birçok element kullanılmaktadır. Buradaki amaç bir alg türünü, yüksek konsantrasyonlarda ve yüksek kalitede üretmektir.

Spirulina'nın çoğalmasını kontrol eden esas faktörlerden biri sıcaklıktır. *Spirulina*'nın büyümesi için en uygun sıcaklık aralığı 30-35°C'dir. *Spirulina* beslenmesi için Zarouk (1966) 'un hazırladığı bir büyüme ortamı kullanılmaktadır. *Spirulina*, çoğu siyanobakteri gibi zorunlu fotoototroftur, organik karbon kaynakları içeren karanlık ortamda büyüyemez. *Spirulina* alkali ortamlarda yaşar. *Spirulina* için optimum pH değerleri 8.3-11.0 arasındadır (Zarouk, 1966; Richmond, 1988).

Çukurova Bölgesi güneşli gün sayısının fazlalığı (ortalama 300 gün/yıl) ve ılıman iklimi ile *Spirulina* üretimi için son derece uygundur. *Spirulina* ortalama 20-30 cm derinliğe sahip sığ ve özel havuzlarda yetiştirilir. Bu özel havuzlarda besin ve karbondioksit girdisi ile güneşle birlikte

fotosentez yapmaları sağlanmaktadır. Üretilen *Spirulina*, olgunlaştıktan sonra hasat edilir, yıkanıp, kurutulur hiçbir kimyasal işleme tabi tutulmadan toz haline getirilip kullanıma sunulmaktadır.

1.4.4 *Spirulina*'nın Önemi ve Kullanım Alanları

Spirulina platensis, dünyada en fazla kültürü yapılan, kozmetikte, tıpta, insan ve hayvan gıdası olarak çeşitli sanayi alanlarında kullanılan mavi-yeşil algler sınıfından ipliksi formda siyonabakteridir. *Spirulina* zengin besin içeriği nedeniyle farklı alanlarda kullanılmaktadır. *Spirulina platensis*'in içerdiği bileşenlerin biyoaktif özellikleri sayesinde, sağlık üzerindeki yararları etkileri; antikanser, antioksidan, antiviral, antibakteryal, antidiyabetik, antifungal, bağışıklık sistemi güçlendiricisi ve benzeri etkiler sıralanabilir. Bunların yanında endüstriyel açıdan değerli olan birçok bileşiğin özellikle pigmentlerin elde edilmesinde, gıda endüstrisinde, kozmetik alanında cilt kremi, pigment üretimi gibi kullanımları da bulunmaktadır.

Geçmişte, çeşitli hastalıkları önlemek veya kontrol etmek ve enerji alternatifleri sağlamak için nutrasötikler ve fonksiyonel gıdalar geliştirmek için büyük çabalar ve kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. *Spirulina*, yüksek protein içeriği (kuru ağırlıkça %60-70) ve vitaminler (B_{12} ve E), mineraller, esansiyel yağ asitleri, karotenoidler, antioksidanlar ve phycocyanin açısından zenginliği nedeniyle en sağlıklı gıdalardan biri olarak kabul edilmektedie. *Spirulina*, 1970'lerin ortalarından beri açlığa ve yetersiz beslenmeye karşı mücadele etmek için; annelerdeki açlık ve yetersiz beslenme ile mücadelede araştırmalar yapan Intergovernmental Institution for Microalgae *Spirulina* Against Malnutrition (IIMSAM) adlı hükümetlerarası bir kuruluş tarafından yüksek bir besin olarak tanıtılmaktadır. Nütrasötik bir gıda olarak *Spirulina*'nın birçok hastalık için etkili olduğu kanıtlanmıştır. Bir besin takviyesi olarak *Spirulina*'nın hiperkolesterolemiyi, bazı enflamatuar hastalıkları, alerjileri, kanseri, çevresel toksik maddeler ve ilaçların neden olduğu toksisiteleri ve kardiyovasküler hastalıkları ve diyabeti önleyebildiği ve kontrol edebildiği bildirilmiştir. Ayrıca *Spirulina*, konsantre makro ve mikro besinleri nedeniyle hem Ulusal Havacılık ve Uzay Dairesi (NASA) hem de Avrupa Uzay Ajansı (ESA) tarafından en iyi ve en sürdürülebilir uzay yiyeceği olarak önerilmiştir. FDA ve diyet takviyeleri bilgi uzmanı komitesi (DSI-EC) *Spirulina*'yı insan tüketimi için güvenli olarak sınıflandırır. *Spirulina,* kolesterol düşürücü özellikleri, bağışıklık sistemi modülasyonu ve antioksidan özellikleri nedeniyle son zamanlarda fonksiyonel bir gıda olarak daha fazla dikkat çekmiştir. Yenilebilir yeşil bitkilerde bulunan çeşitli antioksidan bileşiklerin, hücresel veya metabolik hasara, hızlandırılmış yaşlanmaya, veya kansere neden olabilir. *Spirulina* ayrıca sağlık yararları ve besleyici bileşenleri nedeniyle daha önce bilimsel ilgi görmüştür. Tam bir protein kaynağı olarak *Spirulina* ve özellikleri, yetersiz beslenmeden antioksidan potansiyeline kadar çeşitli insan sağlığı sorunlarını olumlu yönde etkiler. Ekstrelerinin kontrollü çalışmalarda kanseri önlediği gösterilmiştir ve bu anti-apoptotik aktivite, antioksidan potansiyeli ile ilişkilendirilmiştir. Biyoaktif antioksidanlar, organizmalar üzerinde çeşitli olumsuz etkileri olan serbest radikalleri ve kararsız molekülleri etkisiz hale getirir. Bir oksidatif patlama

sırasında, antioksidanlar reaktif oksijen türlerini (ROS) inhibe eder. Antioksidanların hücresel bileşenleri koruduğu iyi bilinmektedir. Klorofil, beta-karoten, phycoerythrin ve phycocyanin gibi doğal pigmentler içerdiğinden, S. platensis antioksidan aktivitesi gösterilmiştir (Kumar ve ark., 2022).

Alternatif olarak *Spirulina* gibi geleneksel olmayan ve yeni bir antioksidan kaynağına ihtiyaç duyulmaktadır ve bu konuda Agam Kumar ve arkadaşları (2022), çalışmasında *Spirulina platensis*'in önemli miktarda antioksidan ve fitobesin potansiyeli sergilediği sonucunu bulunmuştur. Sulu ekstraktta yüksek antioksidan aktivite gözlenmiştir. *Spirulina platensis*, ekstraktlarında gözlenen kayda değer antioksidan ve fitobesin içerikleri, ilaç, gıda katkı maddeleri ve kozmetik endüstrilerinde ticari kullanım için kullanımını kolaylaştırabilir. Gelecekte çeşitli hastalıkları tedavi etmek için yeni farmasötik bileşiklerin tanımlanmasına da yol açabilir (Kumar ve ark., 2022).

Spirulina platensis, gıdalarda protein açısından zengin bir kaynak olarak kullanılmıştır. *Spirulina*, acı ve alkali sularda yaşayan ve kültüre alınan fotosentetik, ipliksi yapıda mavi-yeşil bir mikroalgdir. Kurutulmuş *Spirulina*, et ürünü, unlu mamul, makarna ve ekstrüzyon ürünü gibi gıda ürünlerinde %10 ila 50 seviyelerinde bir gıda bileşeni olarak uygulama için kullanılmıştır (Pratama ve ark., 2022). *Spirulina* (aynı zamanda phycocyanin) düzenli tüketiminin bağırsak iltihabını azalttığı, bağırsak dokusunun geçirgenliğini iyileştirdiği ve bağırsak mikrobiyotasının çeşitliliğini arttırdığı gösterilmiştir (Hu ve ark., 2019; Yu ve ark., 2020 ; Xie ve ark., 2019 ; Li ve ark., 2020).

Mevcut pazarda, atıştırmalıklar, şekerler, sakızlar, erişteler, şaraplar, içecekler, kahvaltılık tahıllar ve et analogları gibi ürünlere dahil edilirler (Palanisamy ve ark., 2019). Ve *Spirulina platensis* et ürünlerindeki (710-760 g/kg) ve soya fasulyesindeki (yaklaşık 400 g/kg) protein içeriği ile karşılaştırılabilir ve uzun süre zengin olan mikrobiyal kaynaklı (460-630 g/kg) en bol protein kaynaklarından biridir. Büyük besin değeri ve fizyolojik aktiviteye sahip zincirli çoklu doymamış yağ asitleri (Uribe-Wandurraga ve ark., 2021). Bu nedenle fonksiyonel uygulamaları ile bitki bazlı gıdalarda parlak bir geleceğe sahiptir (Guo ve ark., 2022).

1.5. C-phycocyanin

1.5.1. C-phycocyanin Tanımı ve Kullanımı

Spirulina, pigmentler (klorofil α, ksantofil, β-karoten, zeaksantin ve phycocyaninler) açısından zengindir (Parvin ve ark., 2008). Phycocyaninler phycobiliproteindir, *Spirulina* hem C-phycocyanin hem de allophycocyanin içerir (Chen ve ark., 2014). C-phycocyanin, phycobiliproteinlerin en önemli ve en baskın grubudur ve FDA tarafından sertifikasyondan muaf olarak onaylanan bir renk katkı maddesidir. Et, yumurta ve süt kadar zengin protein kaynağıdır (Khandual ve ark., 2021; Subhashini ve ark., 2004). Çok hücreli ve filament yapıda bir Siyanobakteri olan *Spirulina platensis*'in total proteininin %20-40 kadarı C-phycocyanin (C-PC) dir (Silveira ve ark., 2007).

C-PC; mavi renkli, floresan özelliğine sahip, suda çözünen ve toksik olmayan bir biliprotein pigmentidir (Wu ve ark., 2018; Eriksen, 2008; Braune ve ark., 2021; Jiang ve ark., 2017). *Spirulina platensis*'in ana etken maddesi olduğu bildirilmektedir (Subhashini ve ark., 2004). Phycocyanin, ışık enerjisini verimli bir şekilde yakalayabilen bir tür fotosentetik yardımcı proteindir (Leganes ve ark., 2014). C-PC, nispeten homolog iki alt birimden α ve β alt birimleri (sırasıyla yaklaşık 18 ve 21 kDa moleküler ağırlığa sahip) oluşan bir oligomerik proteindir (Hao ve ark., 2018 ; Adir ve Lerner, 2003). Alt birimlerden α sistein 84'e bağlıyken β alt birimi hem sistein 84'e hem de 155'e bağlıdır. C-PC pigmenti çoğunlukla α ve β alt birimlerinin trimer (αβ)3 veya hekzamer (αβ)6 oluşturmasıyla oluşur (Eriksen, 2008).

Spirulina'dan ekstrakte edilebilen C-phycocyanin; gıda, kozmetik, biyoteknoloji ve tıp gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Erikson, 2008). C-phycocyanin, mavi pigmenttir, gıda sektöründe ve kozmetik endüstrisinde doğal renklendirici olarak kullanılabilmektedir (Ichimura ve ark., 2001). C-PC'nin tıbbi uygulamaları, anti-enflamatuar, anti-kanser, anti-diyabetik (Prabakaran ve ark., 2020), anti-viral, immün sistemi uyarıcı ve antioksidan özelliklerinden dolayı ilgi çekicidir (Kumar ve ark., 2022). Son yirmi yılda, *Spirulina platensis*'e ve onun ana bileşeni C-phycocyanin'e olan ilgi, sağlığı iyileştiren beslenme ve besin takviyesi özellikleri, anti-kanserojen özelliği nedeniyle eczane ve tıpta kullanılabilirliği nedeniyle önemli ölçüde artmıştır (Monaseldize ve ark., 2022).

1.5.2. C-phycocyanin'in Kanserde Moleküler Hedefleri

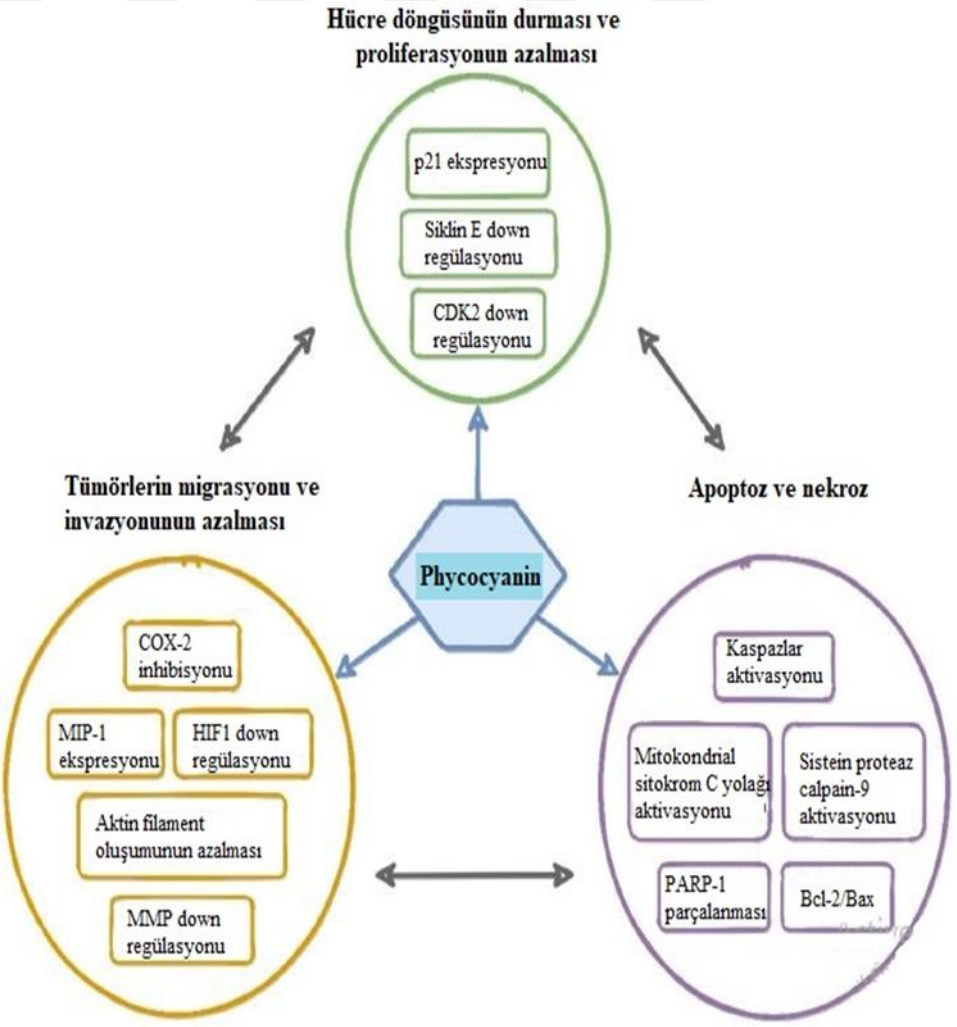
Spirulina'nın ana pigmenti C-phycocyanin'in in vitro ve in vivo olarak çeşitli kanser türleri (Li ve ark., 2009; Chen ve Wong, 2008), karaciğer kanseri (Arunasree ve ark., 2007), akciğer kanseri (Bingula ve ark., 2016; Li ve ark, 2015), kolon kanseri (Wang ve ark., 2007), lösemi (Subhashini ve ark., 2004) ve kemik iliği kanseri (Gardeva ve ark., 2014) gibi) üzerinde güçlü bir kanser önleyici etkiye sahip olduğu gösterilmektedir (Braune ve ark., 2021).

C-PC'in hem kanser karşıtı hemde terapötik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Son dönemlerde yapılan anti-kanser kanserojenik çalışmalar C-PC'in, kanser hücrelerinin büyümesi üzerinde önemli bir inhibitör olduğunu ortaya çıkarmıştır. Apoptozun indüklenmesi, hücre döngüsünün durdurulması, DNA replikasyonunun inhibisyonu ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesi dahil olmak üzere birçok mekanizma bulunmuştur. Kanserli hücrelerde apoptoz önemli ölçüde artarken, C-PC'in sağlıklı dokulardan alınan hücreler üzerinde önemli ölçüde daha düşük bir toksisiteye sahip olması onu kemoterapötik uygulamalar için uygun bir aday yapmaktadır (Braune ve ark., 2021).

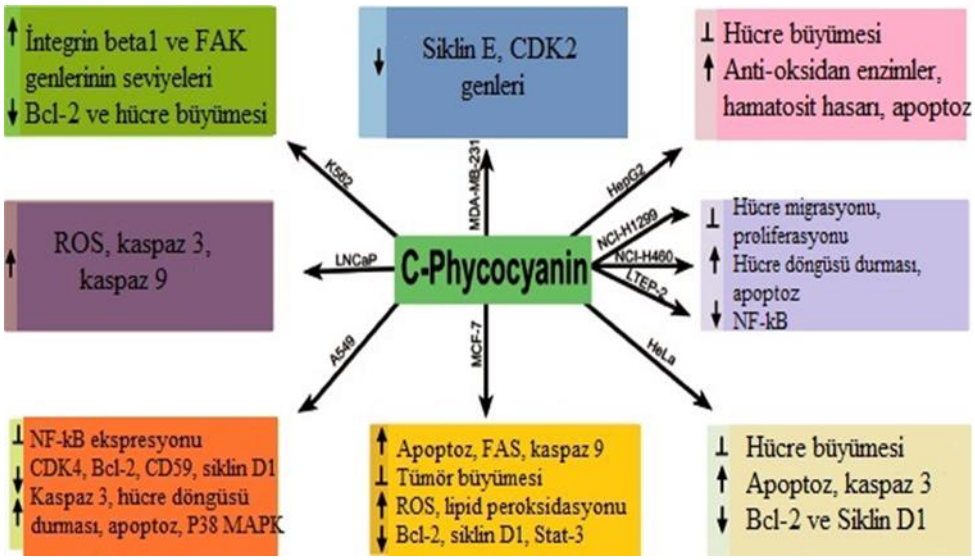
Tümörleri yok etmek için, hücre apoptozunun indüklenmesi en önemli mekanizmadır. Phycocyanin, hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu azaltarak apoptozu ve ayrıca hücre döngüsü durmasını indükleyerek anti-kanser etkisini gerçekleştirmektedir. Şekil 1.9.'da phycocyanin'in anti-kanser etkisinin moleküler mekanizmaları gösterilmiştir. Phycocyanin, kanser hücre döngüsü ilerlemesini etkileyerek hücre döngüsü durmasına yol açabilmektedir. G0/G1 fazında meme kanseri

MDA-MB-231 ve kolon kanseri HT29, kolon kanseri HT29 ve adenokarsinoma A549 hücrelerinde hücre döngüsünün durduğu görülmüştür. Phycocyanin, p21'in ekspresyonunu artırabilmektedir ve MDA-MB-231 hücrelerinde siklin E ve CDK2'nin ifadesini azaltabilmektedir. Phycocyanin, mitokondriyal/ sitokrom C intrinsik apoptotik yolağını aktive ederek Bcl-2/Bax oranını değiştirebilir (Bcl-2, anti-apoptotik protein; Bax, pro-apoptotik protein; Bcl-2/Bax oranı apoptoz derecesini temsil eder) ve kaspazların aktive edilmesin ve poli (ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP-1) bölünmesini indükleyebilir. Ek olarak, C-PC, sitokrom c salınımını uyarabilen ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu teşvik edebilen ve sonuçta kanser hücresi apoptozuna yol açabilen mitokondriyal membran potansiyelini (MMP) değiştirebilir (Jiang ve ark., 2017).

Tümör hücrelerinin süpernatanına CPC ilavesinden sonra hücre büzülmesi, zar kabarcıklarının oluşumu, nükleer ve sitoplazmik yoğunlaşması, DNA'nın küçük parçalara bölünmesi ve apoptotik cisimlerin oluşumu gibi morfolojik değişiklikler gözlenmiştir (Braune ve ark., 2021).



Şekil 1.9. Phycocyanin'in anti-kanser etkisinin moleküler mekanizmalarına genel bakış (Braune ve ark., 2021)



Şekil 1.10. C-phycocyanin'in potansiyel terapötik uygulamaları (Bannu ve ark., 2019)

Phycobiliproteinler, anti-oksidatif, anti-kanser ve anti-inflamatuar aktivitelere sahiptir ve işlevleri nedeniyle pazarda, endüstride ve bilimsel alanlarda giderek daha fazla araştırılmaktadır. Phycobiliproteinler, *Arthrospira platensis* ve *Synechococcus* gibi çeşitli alglerden ekstrakte edilmiştir. Bunların arasında *Spirulina platensis*'in ucuz ve bol miktarda phycobiliprotein kaynağı olduğu düşünülmektedir (Tavanandi ve Raghavarao, 2020).

1.6. MCF7 Hücre Hattı

Meme kanseri araştırmalarında yaygın olarak kullanılan hücre hatlarının sayısı son derece azdır; MCF7, T47D ve MDAMB231 gibi hücre hatları kullanılmaktadır (Lacroix ve ark., 2004).

MCF7 hücreleri, 1970 yılında 69 yaşındaki bir kadından izole edilmiş bir meme kanseri hücre dizisidir (Lee ve ark., 2015). MCF7, Michigan Cancer Foundation-7'nin kısaltmasıdır ve hücre hattının 1973'te Herbert Soule ve çalışma arkadaşları tarafından kurulduğu Detroit'teki enstitüye atıfta bulunmaktadır (Soule ve ark.,1973).

MCF7 hücre hattı, antikanser ilaçlarla ilgili olanlar da dahil olmak üzere dünya çapında meme kanseri araştırmaları için uygun bir model hücre hattı olduğunu kanıtlamaktadır (Shirazi, 2011). MCF7 ER-pozitif ve progesteron reseptörü-(PR)-pozitiftir ve luminal A moleküler alt tipine aittir (Done, 2011). MCF7, düşük metastatik potansiyele ve zayıf agresiviteye sahip olduğu düşünülen invaziv olmayan bir hücre hattıdır (Gest ve ark., 2013).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Spirulina'nın ana pigmenti C-phycocyanin'in in vitro ve in vivo olarak çeşitli kanser türleri (meme kanseri, karaciğer kanseri, akciğer kanseri, kolon kanseri, lösemi ve kemik iliği kanseri gibi) üzerinde güçlü bir kanser önleyici etkiye sahip olduğu gösterilmektedir (Braune ve ark., 2021).

Czerwonka ve arkadaşları (2018), çalışmasında test edilen *Spirulina* ekstraktının A549 kanser hücresi (akciğer kanseri) inhibe ettiğini, hücre döngüsünü bozduğunu ve kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü indüklediğini göstermiştir. *Spirulina*'nın çok umut verici bir kemopreventif ajan olduğu gösterilmektedir (Czerwonka ve ark., 2018).

Jiang ve arkadaşları (2018), çalışmasında C-phycocyanin'in hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve MDA-MB-231 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğini azalttığını göstermiştir (Jiang ve ark., 2018).

Konícková ve arkadaşları (2014), çalışmasında *Spirulina* ve tetrapirrolik bileşenlerinin anti-proliferatif etkileri, insan pankreas kanseri hücre hattı ve ksenotransplante edilmiş fareler üzerinde test etmiştir. Sonuç olarak, *Spirulina* ve tetrapirrolik bileşenleri, pankreas kanserinin proliferasyonunu önemli ölçüde azaltmıştır (Konikova ve ark., 2014).

Mahmoud ve arkadaşlarına (2020) göre, *Spirulina* mikroalgi, çeşitli kanser hücre hatlarına anti-proliferatif bir etkiye sahip olan zengin bir besinsel ve biyoaktif elementler ve potansiyel farmasötik kaynağıdır. Aynı zamanda, hepatosellüler karsinom dahil olmak üzere bazı kanser modellerinin erken evrelerine karşı profilaktik bir etkiye sahiptir (Mahmoud ve ark., 2020).

Najem ve arkadaşları (2021) çalışmasında, beş farklı konsantrasyonda S. platensis alkollü ekstraktının meme kanseri hücrelerine karşı yüksek bir inhibitör etkisi olduğunu ve bu genin tamamen inaktive edildikten sonra ekspresyon seviyesini artırarak p-53 geninin dikkat çekici bir şekilde uyarıldığını göstermektedir (Najem ve ark., 2021).

Yapılan çalışmalarda meme kanseri hücre hattı olan MCF-7, C-phycocyanin ile muamele edildiğinde Kaspaz-9 aktivasyonu, sitokrom c salınımı, Bcl-2 seviyesinde azalma, Fas'ın up regülasyonu, Mitokondriyal Membran Potansiyeli'nin (MMP'nin) bozulması ve NF-KB, P53 ve CD44'ün down regülasyonu ile bağışıklık sistemini uyardığı ve apoptotik yolu aktive ettiği bulunmuştur (Li ve ark., 2010; Chen ve ark., 2008).

Metastaz, dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGFβ) sinyal yolu tarafından düzenlenen epitelyal-mezenkimal geçişin (EMT) yüksek nüks riskini ve kötü prognozunu açıklayan agresif endometriyal kanser tedavisinde bir zorluktur ve tümör metastazını kolaylaştırır. *Spirulina platensis*'ten elde edilen ve saflaştırılmış bileşenleri allophycocyanin ve C-phycocyanin, tümör büyümesini ve metastazını önleme yeteneğine sahip bir nutrasötik bileşik olarak kabul edilebilir. Chen ve arkadaşları (2022) çalışmasında, in vitro sonuçlar, *Spirulina* ve saflaştırılmış ürünleri APC ve C-PC'nin hücre migrasyonu inhibe ettiğini ve TGFβ/SMADs sinyal yolunu tersine çevirerek

EMT ile ilgili fenotiplerin ekspresyonunu değiştirdiğini göstermiştir. İn vivo sonuçlar, *Spirulina*''nın, EMT ile ilişkili belirteçlerin ifadesini modüle ederek HEC-1A-LUC hücrelerinin metastazını baskıladığını göstermiştir. Bu çalışmada, Spirulna ve etkili bileşenleri APC ve C-PC, TGFβ/SMADs sinyal yolunu hedefleyerek EMT'yi tersine çevirdiği ve metastatik endometriyal kanser için etkili bir terapötik strateji olduğu önerilmiştir (Chen ve ark., 2022).

Son anti-kanser çalışmaları, C-phycocyanin'in, kanser hücrelerinin büyümesi üzerinde önemli bir inhibe edici etkiye sahip oldoğunu ortaya çıkarmıştır. Apoptozun indüksiyonu, hücre döngüsü durması, DNA replikasyonunun inhibisyonu ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi dahil olmak üzere birçok mekanizma bulunmuştur. Kanserli hücrelerde apoptoz önemli ölçüde artarken, PC'nin sağlıklı dokulardan alınan hücreler üzerinde önemli ölçüde daha düşük toksisitesi vardı, bu da onu kemoterapötik uygulamalar için uygun bir aday haline getirmektedir (Braune ve ark., 2021).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında, hücre kültürü laboratuvarında laminar flow kabin, CO2 inkübatörü, ışık mikroskobu, invert mikroskop, santrifüj, vorteks, sıcak su banyosu, buzdolabı-derin dondurucu (+4°C, -20°C, -80°C), *Spirulina* ve C-phycocyanin'in analizlerinde; Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) (Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi), Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) (İndükatif Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektrometresi) ve Floresans Spektrofotometre cihazları Ç.Ü. Merkezi Araştırma Laboratuvarında (ÇÜMERLAB) kullanılmıştır.

Algal ekstraktlarının hazırlanmasında; manyetik karıştırıcı, sonikatör ve santrifüj Su Ürünleri Fakültesinde Algal Biyoteknoloji Laboratuvarında kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Malzemeler

Bu çalışmada *Spirulina platensis* ve etken maddesi C-phycocyanin Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Oya IŞIK'ın Algal Biyoteknoloji Laboratuvarından temin edilmiştir.

Çalışmamızda NIH3T3 ve MCF-7 hücre hattları, laminar flow kabin, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Cytiva, HyClone, Utah, USA), Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640) (HyClone, Utah, USA), Fetal Bovine Serum (FBS) (Cytiva, Hyclone, Austria), Penisilin-Streptomisin (HyClone, Austria), Phosphate Buffered Saline (PBS) (Cytiva, Utah, USA), 0.25% Tripsin-EDTA (1X) (Life Technologies, Gibco, Canada), Dimetil sülfoksit (DMSO), 25 cm2 flasklar (TPP, Switzerland), 75 cm2 flasklar (CELLSTAR, Kremsmünster, Austria), 96 well plate (Thermo Fisher Scientific, Rochester NY, USA), 6 well plate (Orange Scientific, Belgium), 5 mL serolojik pipet (CELLSTAR, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria), 10 mL serolojik pipet (CELLSTAR, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria), Pastör pipet 3ml (BTR, Ankara), 50 ml Falkon tüp (CELLSTAR, Kremsmünster, Austria), 15 ml Falkon tüp (CELLSTAR, Kremsmünster, Austria), 0.1-10µl pipet ucu DNase/RNase Free (Kirgen, China), 1-200µl pipet ucu DNase/RNase Free (Kirgen, China), 100-1000µl pipet ucu DNase/RNase Free (Kirgen, China), Tripure (ELK Biotechnologie, USA), High Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (Applied Biosystems, CA, USA), HOT FIREPol® SolisGreen® qPCR Mix 1ml (Solis Biodyne, Tartu, Estonia), CASP3, CASP8, CASP9, Bid, Bax, Apaf-1, TP53 ve ACTB primerler kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Algal Ekstraktların Hazırlanması

C-phycocyanin

C-phycocyanin'in ham ekstraktı, Su Ürünleri Fakültesinde Öğr. Üyesi Prof. Dr. Oya IŞIK'ın Algal Biyoteknoloji Laboratuvarında doktora öğrencisi Choubaila REDDAD tarafından 17 Şubat 2022'de ekstrakte edilmiştir.

C-PC, homojenizasyon ve dondurma-çözme ile ultra sonikasyon yöntemiyle ekstrakte edilmiştir. 5 g liyofilize Spirulina pH 6.8 olan 0.1 M fosfat tamponuna 1:12 S/L oranında eklenmiştir. Süspansiyon oda sıcaklığında 4 saat boyunca aralıklı karıştırılarak bekletilmiş, ardından 6 dakika boyunca ultra-sonikleştirme, -20°C'de 4 saat boyunca dondurma ve 4°C'de 12 saat boyunca çözdürme (maserasyon) işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bundan sonra, numuneler -20°C'de 4 saat dondurulmuş ve ardından 4°C'de 4 saat çözdürülmüştür. Süspansiyon santrifüj edilmiş (4°C'de ve 6000 rpm'de 20 dakika) ve her numuneden elde edilen süpernatant spektrofotometrik analiz ile C-PC içeriğinin tahmini için toplanmıştır.

Kullanmadan önce C-phycocyanin ekstraktı, Beckman Coulter marka ultarsantrifüj ile santrifüjlendi (25000 rpm, 20 dk).



Şekil 3.1. Elde edilen C-phycocyanin ekstraktı

Spirulina Sulu Ekstraktı

Spirulina sulu ekstraktını elde etmek için aşağıdaki adımlar takip edildi:

- 2 g liyofilize *Spirulina* 60 ml ultra saf su içinde çözüldü.
- Süspansiyon 24 saat manyetik karıştırıcı üzerinde bırakıldı.
- 24 saat sonra süspansiyon 15 dk sonikasyona tutulup oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi.
- Çözelti 10 dk boyunca 6000 rpm'de santrifüjlendi.

- Süpernatant kurutma kağıdından süzüldü.
- Ekstraktın tortusu olduğu için bir daha santrifüjlendi.
- Süpernatant Whatman kağıdından süzüldü.
- Son olarak *Spirulina* ekstraktı 4°C'de saklandı.



Şekil 3.2. *Spirulina* sulu ekstraktın hazırlanmasının aşamaları (**A.** *Spirulina* tozu ultra saf su içinde çözülmesi **B.** Manyetik karıştırıcı **C.** Sonikasyon **D.** Santrifüj **E.** Birinci filtrasyon **F.** İkinci filtrasyon **G.** *Spirulina* sulu ekstraktı)

3.2.2. GC-MS ile *Spirulina*'nın Uçucu Bileşikleri Analizi

Uçucu bileşen analizi Agilent Marka 7890B GC, 7010B MS sistemi ile belirlenmiştir. Solid Phase Micro-Extraction (SPME) (Katı Faz Mikro Ekstraksiyon) yöntemiyle, 20 mL'lik vial içine katı numuneden 2 g (*Spirulina* tozu), sıvı numuneden 3 mL (*Spirulina* sulu ekstraktı) konularak 15 dakika boyunca 60 °C'de bekletildikten sonra SPME aparatı 50/30 µm'lik Divinilbenzen/Karboksen/Polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS) kaplı fiber ile uçucu bileşenler 30 dk boyunca adsorbe edildi. Daha sonra DB-Wax (60 m x 0.25mm i.dx 0.25 µm, J&W Scientific-Folsom, USA) kapiler kolonuna 5 dk boyunca desorbe edilerek enjekte edilmiştir. Enjeksiyon sıcaklığı 250 °C, kolon sıcaklığı 40 °C'de 4 dakika beklemeden sonra dakikada 3 °C artırılarak 90 °C'ye, sonra dakika da 4 °C artırılarak 130 °C'ye çıkarılmış bu sıcaklıkta 4 dakika bekledikten sonra da dakikada 5°C artırılarak sıcaklık 240 °C'ye ayarlanmış ve bu sıcaklıkta 8 dakika bekletilmiştir. Taşıyıcı gaz olarak He kullanılmıştır. Elektron enerjisi 70 eV ve kütle aralığı ise 30-600 m/z'dir. Split oranı 1:10 dir. Kütüphane olarak NIST14.L kullanılmıştır.

3.2.3. ICP-OES ile *Spirulina* Mineral Analizi

Spirulina mineral analizi Perkin Elmer Marka, Optima 2100 DV sistemi ile yapılmıştır. İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon spektroskopisi (ICP-OES), bir numunede belirli elementlerin ne kadar olduğunu belirlemek için kullanılan analitik bir tekniktir. ICP-OES prensibi, atomların ve iyonların elektronları temel durumdan uyarılmış bir duruma taşımak için enerji absorbe edebileceği gerçeğini kullanır. ICP-OES'de bu enerjinin kaynağı, 10.000 kelvin'de çalışan bir argon plazmasından gelen ısıdır. ICP-OES, hem Plazma oluşumu için hem de soğutma için Argon gazı kullanır. Numunenin yüksek sıcaklıktaki plazmaya püskürtülmesiyle gaz fazına geçerek uyarılan atomların yaptıkları emisyon ölçümü söz konusudur. Analiz edilmek istenen örnekteki elementler ICP ile iyonlaştırıldıktan sonra optik emisyon spektrometresine gönderilir.

3.2.4. Floresans Spektrofotometre ile C-phycocyanin'in Analizi

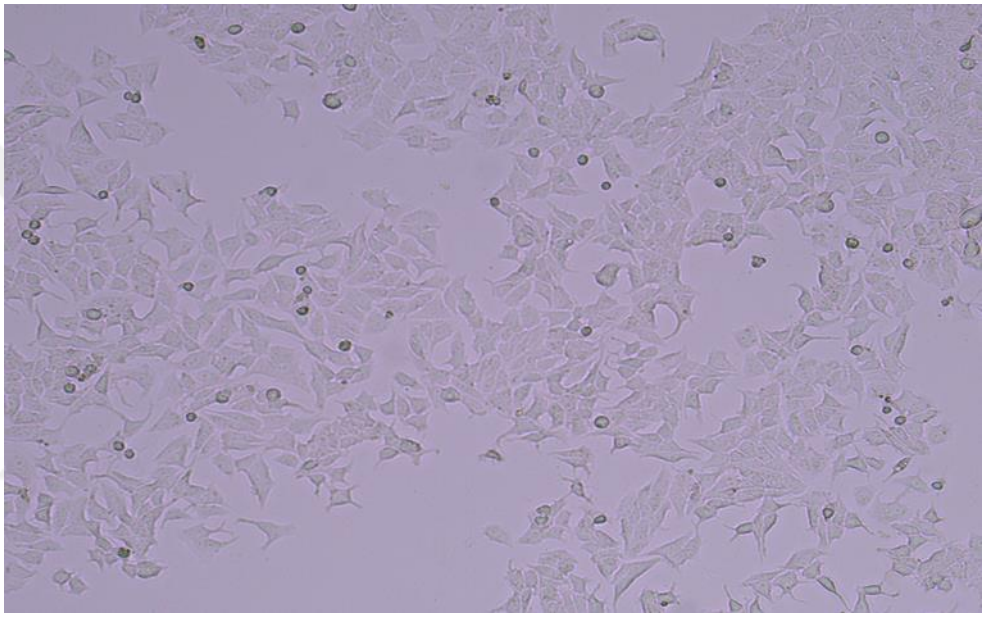
C-phycocyanin'in floresans özelliğini Agilent marka, Cary Eclipse Floresans Spektrofotometre ile belirlenmiştir. Cary Eclipse Spektorofotometre üstün hassasiyet, yüksek sinyal gürültü oranı ve hızlı kinetik için bir Xe flaş lamba kullanır. Floresans, bazı moleküllerin bir foton tarafından vurulduklarında, uyarılmış bir duruma geçmek için bu fotonun enerjisini emebilmeleri özelliğine dayanır. Bu uyarılmış durumdan çıktıktan sonra aynı molekül bir foton salgılar: floresan emisyonu. Salınan fotonun enerjisi her zaman emilen fotonun enerjisinden daha düşüktür. Yani molekülü uyaran foton her zaman yayılan fotondan daha küçük bir dalga boyuna sahiptir.

3.2.5. Hücre Kültürü

MCF7 ve NIH3T3 hücre hatları, Ç.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D. Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ'dan temin edilmiştir ve hücre kültürü yöntemleri ATCC (The American Type Culture Collection) tarafından belirlenen standartlar doğrultusunda uygulanmıştır.

MCF7 Hücre Kültürü Medyumun Hazırlanması

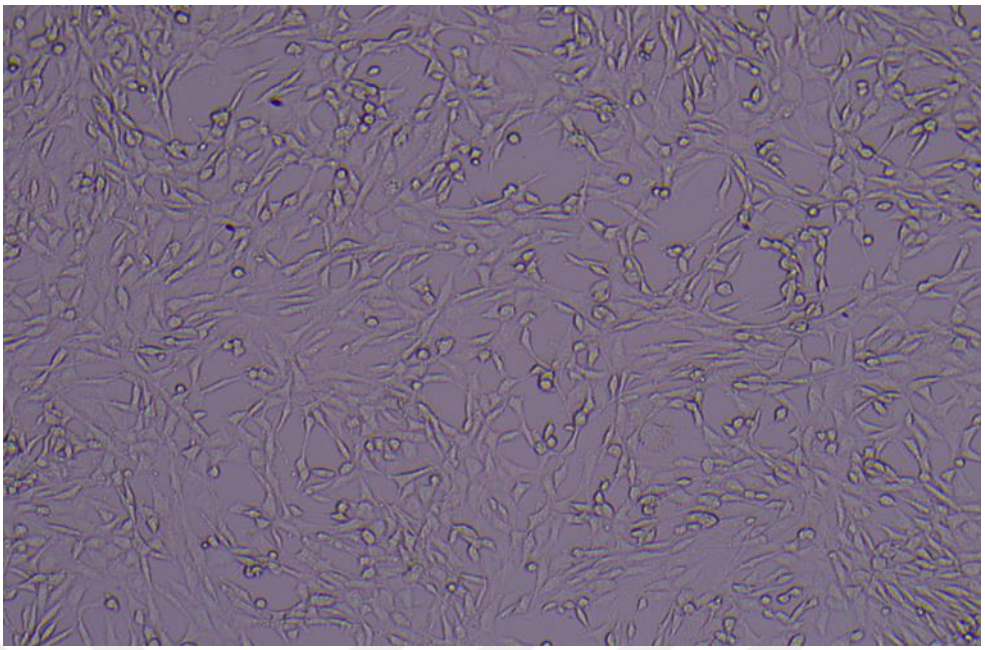
MCF7 hücre hattı %10 Fetal Bovin Serumu (FBS) (Cytiva, Hyclone, Austria) ve %1 penisilin (10000 units/ml)-streptomisin (10000 µg/ml) (Cytiva, Hyclone, Austria) içeren RPMI-1640 (HyClone, Utah, USA) besiyerinde 37°C ve %5 CO2'li ortamda inkübe edildi.



Şekil 3.3. MCF7 hücre hattının mikroskopla görünümü (10x)

NIH3T3 Hücre Kültürü Medyumun Hazırlanması

MCF7 hücre hattı %10 Fetal Bovin Serumu (FBS) (Cytiva, Hyclone, Austria) ve %1 penisilin (10000 units/ml)-streptomisin (10000 µg/ml) (HyClone, Austria) içeren Dulbecco's modification of Eagle's medium High Glucose (DMEM) (Cytiva, HyClone, Utah, USA) besiyerinde 37°C ve %5 CO2'li ortamda inkübe edildi.



Şekil 3.4. NIH3T3 hücre hattının mikroskopla görünümü (10x)

Devam eden kültürlerde besiyeri 2-3 gün aralıklarla taze besiyeri ile değiştirilmelidir. Hücreler % 70 ve üzeri yayılım gösterdiğinde, hücreleri flask yüzeyinden kaldırmak için tripsin kullanıldı. Flaskta çoğalan hücrelerden besiyeri uzaklaştırılıp PBS ile yıkandıktan sonra 1,5 ml tripsin eklendi. Tripsinin etkinliği sıcaklık ile arttığından, hücreler 3-4 dakika, 37°C'de inkübe edildi. Hücreler flask yüzeyinden ayrıldıktan sonra, tripsinin en az 3 katı kadar medium eklendi.

Tripsin ile toplanan hücreler, medium ile seyreltilerek homojenize olmaları sağlandı ve Thoma lamında sayıldı. Hücreleri saydıktan sonra; MTT testi için 96 kuyucuklu platelere, 100 µl besiyeri içerisine 1×104 hücre olacak şekilde ekildi.

3.2.6. Hücre Canlılık Testi: MTT testi

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-il]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) testi, hücre canlılığı ve proliferasyonunun belirlenmesini sağlayan bir uygulamadır (Konícková ve ark., 2014). Bu yöntemde MTT formazana indirgenir, bu esnada oluşan renk kolorimetrik olarak ölçülür. Oluşan formazan miktarı canlı hücre sayısını verir.

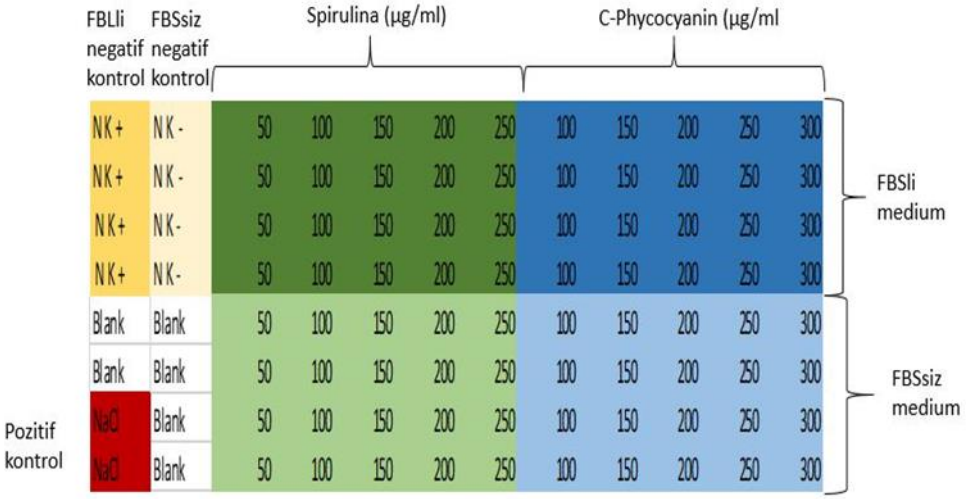
Hücreler, 96 kuyucuklu platelere her bir kuyucukta 1x104 hücre olacak şekilde ekildi (Şekil 3.6.). Kontrol grubu hücre, medium ve su olarak tanımlandı. Her bir hücre hattı için hem FBS'li hem FBS'siz iki ayrı grup oluşturuldu. Ekim sırasında her bir hücre hattı için hücrelere özgü besiyeri kullanılarak 100 µl (hücre + besiyeri) kuyucuklara eklendi. Hücreler %5 CO2 ve 37 ºC sağlayan inkübatör koşullarında 24 saat inkübe edildi. Hücreler 24 saat sonunda 96 kuyucuklu plate yüzeyini %70-80 oranında kapladıktan sonra *Spirulina*'nın 50, 100, 150, 200, 250 µg/ml ve C-phycocyanin'in 100, 150, 200, 250, 300 µg/ml dozları ile madde muamelesi yapıldı. NIH3T3 hücre

hattı 24 saat ve MCF7 24, 48 ve 72 saatlik süreler sonunda MTT analizi yapmak için aşağıdaki aşamalar takip edildi:

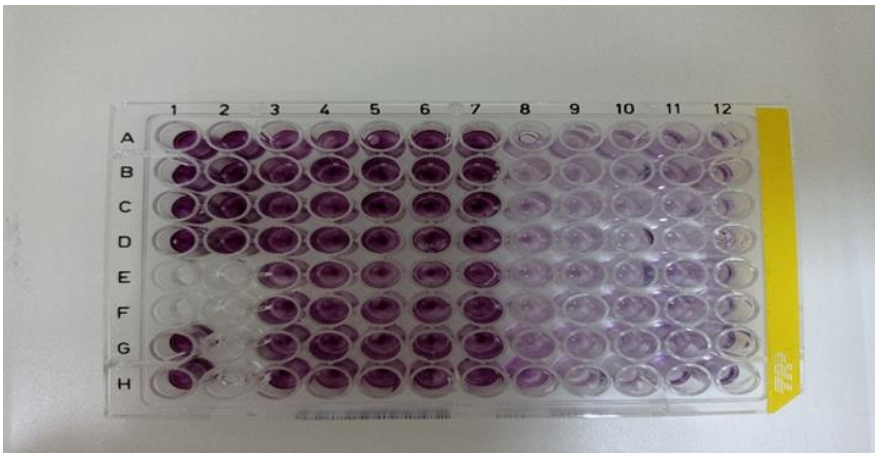
1) 96 kuyucuklu plağa her kuyuya 104 hücre gelecek şekilde ekim yapıldı.
2) Yükleme işlemi bittikten sonra plate 37oC'de %5 CO2 içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi.
3) İnkübasyondan sonra kuyulardaki medyum boşaltılıp *Spirulina* ve C-phycocyanin'in farklı dozlarını içeren besiyeri uygulandı.
4) İnkübasyonun tamamlanmasına 4 saat kala kuyulara MTT ilave edildi.
5) 4 saat sonunda kuyular dikkatli bir şekilde boşaltıldı ve DMSO eklenerek 20 dk beklendi.
6) Sonuçlar 570 nm de, 620 nm referans alınarak okuma yapıldı.



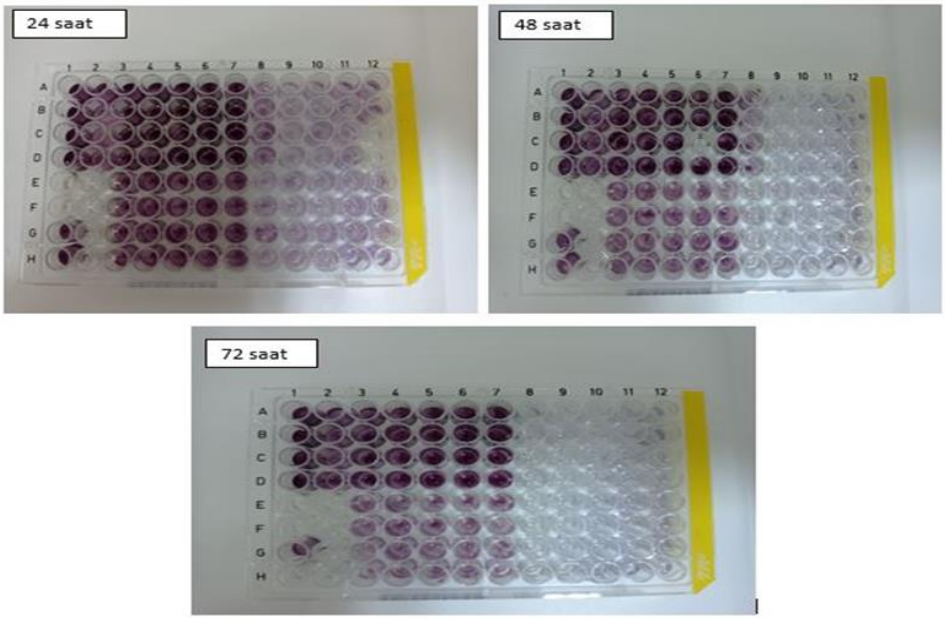
Şekil 3.5. MCF7 ve NIH3T3 hücre hatlarına uygulanan *Spirulina* ve C-PC dozları



Şekil 3.6. MTT testi plate dizaynı (**Blank:** Hücre içermeyen medium. **Negatif kontrol (NK):** Hücre, medium ve su içeren kuyular. **Pozitif kontrol (PK):** Hücre, medium ve sodyum hipoklorür içeren kuyular)



Şekil 3.7. NIH3T3 hücrelerine DMSO ekledikten 24 saat sonraki görüntü



Şekil 3.8. MCF7 hücrelerine DMSO ekledikten 24, 48 ve 72 saat sonraki görüntü

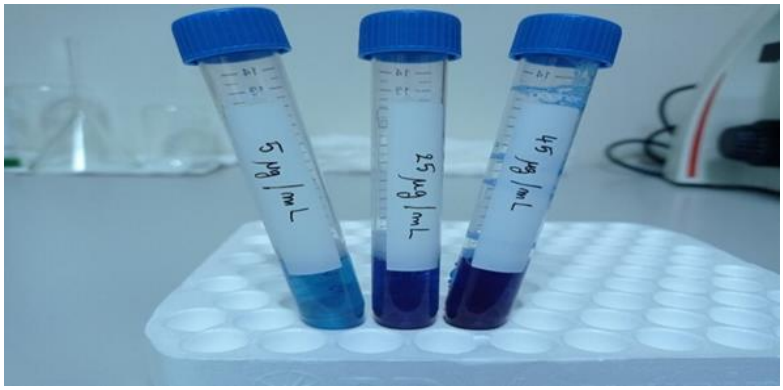
3.2.7. MCF7 Hücre Hattında C-phycocyanin Muamelesi

RNA izolasyonu için MCF7 hücreleri 6 kuyucuklu platelere RPMI-1640 içeren besi ortamında kuyu başına 5x105 hücre/ml olacak şekilde ekildi ve 37°C'de %5 CO2 koşullarında 24 saat boyunca inkübe edildi. Hücreler bulundukları kültür kaplarının yüzeyini %70-80 oranında 5, 25 ve 45 µg/ml dozlarda C-phycocyanin ile 24 saatlik süre için muamele edildi.

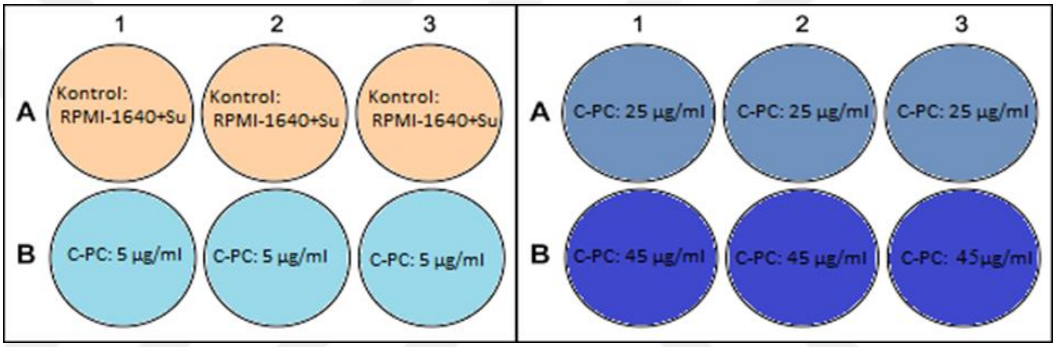
İnkübasyondan sonra:

1) Kuyucuklarda bulunan besiyeri uzaklaştırıldı.
2) Hücreler PBS ile yıkandı.
3) Hücrelerin yapışık olduğu plate yüzeyinden ayrılması için her kuyucuğa 350 µl Tripure eklendi.
4) Tripue ile homojenize edilen hücreler ependorflara aktarıldı (Her doz ayrı bir ependorfa aktarıldı).

Not: Örnekler kısa süreli çalışmalar için -20°C, uzun süreli çalışmalar için ise -80°C'de saklanır.



Şekil 3.9. MCF7 hücre hattına uygulanan C-PC'in 5, 25 ve 45 µg/ml dozları



Şekil 3.10. MCF7 hücre hattına farklı dozlarda (5, 25 ve 45 µg/ml) uygulanan C- PC'in plate dizaynı

3.2.8. RNA İzolasyonu

Total RNA, TRIpure reaktifi ile üreticinin talimatlarına göre hücrelerden izole edildi (ELK Biotechnology).

1) MCF7 hücrelerin üzerine 350 µl TRIpure eklendi.
2) Örnekler vorteksle iyice homojenize edilip 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
3) 12000 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüjlendi.
4) Süpernatant başka bir ependorfa aktırıldı. Üzerine 200 µl kloroform eklendi.
5) 15 saniye vortekslenip 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
6) 12000 rpm'de 10°C'de 15 dakika santrifüjlendi.
7) Santrifüj sonunda 3 faz oluştu. RNA en üst fazda toplandı. RNA başka bir ependorfa aktarılıdı.
8) RNA miktarı kadar izopropanol eklenip vertekslendi. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
9) 12000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi.

10) Pelleti gördükten sonra süpernatant atıldı.

11) Pelletin üzerine 1 ml %75'lik etanol eklendi.

12) 12000 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi ve süpernatant atıldı.

13) 2-3 dakika oda sıcaklığında kapakları açık bir şekilde inkübe edildi.

14) Ependorfa 50 µl DEPC su eklendi.

15) Örnekler pipetajlanıp pellet tamamen çözündükten sonra -80°C'de saklandı.

RNA izolasyonundan sonra elde edilen total RNA miktarları 260/280 nm absorbans değerinde spektrofotometrik ölçümleri IMPLEN NanoPhotometer cihazı kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar ng/µl olarak bulundu.

Çizelge 3.1. RNA konsantrasyonları (ng/µl)

Örnek (MCF7-24 saat)	**RNA konsantrasyonu (ng/µl)**
Kontrol	756
5 µg/ml	52,4
25 µg/ml	804
45 µg/ml	880

3.2.9. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'lardan cDNA sentez kiti (High Capacity cDNA, Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, USA) ile cDNA elde edildi. cDNA sentezinin eldesinde kullanılan karışım aşağıdaki tabloda verilmiştir (Çizelge 3.2.). RNA hariç diğer malzemeler eklenip bir mix hazırlanıp vortexlendi en son tüplere RNA eklendi. Daha sonra örnekler termal cycler cihazına yüklendi.

Çizelge 3.2. cDNA sentez karışım oranları

10X RT Random Primer	2 µl	
10X RT Buffer	2 µl	
dNTP	0,8 µl	
Enzim	1 µl	
Steril su	Kontrol	13,2 µl
	5 µg/ml	4,2 µl
	25 µg/ml	13,2 µl
	45 µg/ml	13,2 µl
RNA	Kontrol	1 µl
	5 µg/ml	10 µl
	25 µg/ml	1 µl
	45 µg/ml	1 µl
Total	**20 µl**	

Çizelge 3.3. cDNA eldesinde ısı döngüleri ve süreleri

Ayarlar	Aşama 1	Aşama 2	Aşama 3	Aşama 4
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Zaman	10 dk	120 dk	5 dk	∞

3.2.10. RT-PCR

Real-Time-PCR 20 µl reaksiyon total hacminde iki µl cDNA ile Solis BioDyne (HOT FIREPol® SolisGreen qPCR Mix, 5x) master mixi kullanılarak Qiagen Rotor Gene Q cihazında çizelge 3.4.'te belirtilen primerler ve çizelge 3.5.'teki döngüler ve süreler takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda β-Aktin (ACTB) referans geni normalizasyon amaçlı kullanıldı. Eşik siklüs değeri (Ct) elde ettikten sonra Real time sonuçları aşağdaki formül ile hesaplanarak grafikler elde edildi:

ΔCt = Ct hedef gen-Ct referans gen

ΔCt = Ct muamele edilen-Ct kontrol

Ekspresyon oranı = $2^{\Delta\Delta Ct}$

Çizelge 3.4. RT-PCR için kullanılan gen dizileri

Gen	Gen Dizileri
ACTB_F	5'-CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3'
ACTB_R	5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3'
CASP3_F	5'-GGAAGCGAATCAATGGACTCTGG-3'
CASP3_R	5'-GCATCGACATCTGTACCAGACC-3'
CASP8_F	5'-AGAAGAGGGTCATCCTGGGAGA-3'
CASP8_R	5'-TCAGGACTTCCTTCAAGGCTGC-3'
CASP9_F	5'-GTTTGAGGACCTTCGACCAGCT-3'
CASP9_R	5'-CAACGTACCAGGAGCCACTCTT-3'
TP53_F	5'-CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG-3'
TP53_R	5'-TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC-3'
BID_F	5'-TGGGACACTGTGAACCAGGAGT-3'
BID_R	5'-GAGGAAGCCAAACACCAGTAGG-3'
BAX_F	5'-TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG-3'
BAX_R	5'-TGTGTCCACGGCGGCAATCATC-3'
APAF-1_F	5'-GCCAAGCAGGAGGTCGATAATG-3'
APAF-1_R	5'-GACCATCCTCAGAAAAGCAGGC-3'

Çizelge 3.5. RT-PCR döngüleri ve süreleri

	Sıcaklık	**Zaman**	**Döngü sayısı**
Başlangıç (Initiation)	95°C	10 dk	1
Denatürasyon (Denaturation)	95°C	10 s	40
Yapışma (Annealing)	60°C	20 s	
Uzama (Extention)	72°C	20 s	
Erime (Melt)	72°C	3 dk	1

3.2.11. İstatistiksel Analiz

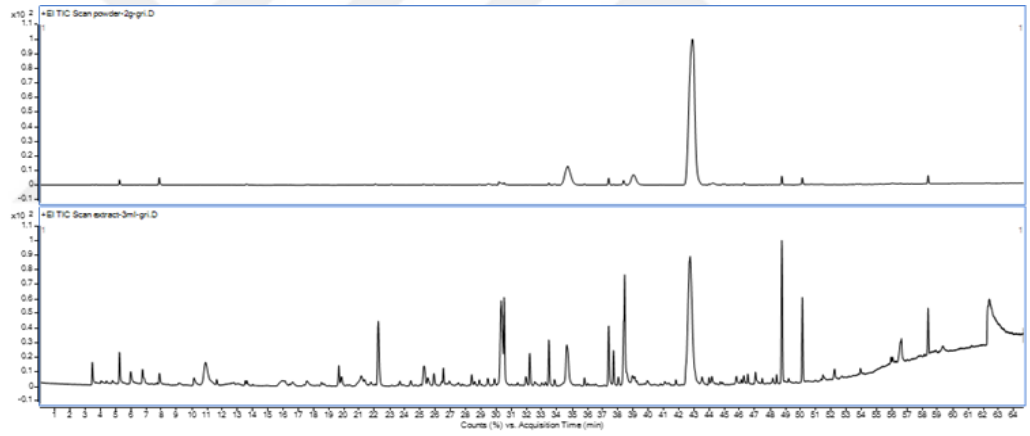
İstatistiksel analizde SPSS 20 bilgisayar programı kullanıldı. Gen ekspresyonu verilerinin istatistiksel analizleri Kruskal Wallis ve Anova testleri ile gerçekleştirilmiştir. Normal dağılım gösteren parametreler Anova, göstermeyenler ise Kruskal Wallis ve Man Whitney U testleri ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p< 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. GC-MS Sonuçları

Spirulina uçucu bileşiklerinin bileşimini belirlemek için GC-MS yöntemi kullanılmıştır. *Spirulina* kullanılarak elde edilen sulu ekstraktın ve *Spirulina*'nın GC-MS analizi sonucu oluşan kromatogamlar Şekil 4.1.'de gösterilmiştir. Bu kromatogramda oluşan her bir pik bir bileşene aittir. Bu piklerin hangi bileşenlere ait olduğunu anlamak için yapılan kütüphane taraması sonucu çizelge 4.1. ve 4.2. elde edilmiştir. Örneklerin analizinde katı faz mikroekstraksiyon yöntemi (SPME) kullanılmıştır. SPME, uçucu bileşiklerin profilinin belirlenmesinde basit, hızlı, ekonomik ve çözücüsüz bir ekstraksiyon yöntemidir. SPME tek basamakta örnekten maddeyi zenginleştirme, matriksten ayırma ve de tayin etme işlemidir. Bu yöntem işlem kolaylığı ve hızlı olmasından ötürü analizlerimizde tercih edilmiştir. *Spirulina*'nın ana bileşeni heptadekandır (%79.179). Heptadekanın diğer birçok siyanobakteri türünde ortak bir ana uçucu bileşen olduğu bildirilmiştir (Rezanka ve ark., 1982; Aguero ve ark., 2003; Özdemir ve ark., 2004).



Şekil 4.1. *Spirulina* tozu ve sulu ekstraktına ait HS-SPME-GC-MS

Çizelge 4.1. *Spirulina* tozunun uçucu bileşenleri (GC-MS)

Bileşenin adı	**RT (dk)**	**Alan (%)**
Acetone	5,257	0,462
Acetic acid	30,19042	0,754
Pentadecane	34,69963	10,056
3,4-Dimethylcyclohexanol	37,39162	0,752
Beta-Cyclocitral	38,37078	0,590
Hexadecane	39,0123	4,694
Heptadecane	42,87063	**79,179**
Cis-9-Tetradecan-1-ol	44,24877	0,551
Trans-beta-lonone	48,76692	0,880
Beta-lonone epoxide	50,11438	0,624
2(4H)-Benzofuranone,5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-, (R)-	58,37769	0,766

Çizelge 4.2. *Spirulina* sulu ekstraktının uçucu bileşenleri (GC-MS)

Bileşenin adı	**RT (dk)**	**Alan (%)**
Acetone	5,25155	1,485
2,4-Dimethylhept-1-ene	6,76495	1,096
Decane	10,90612	4,388
2-Octen-1-ol, (E)-	21,13775	1,351
3-Octanone	22,25822	4,569
Benzene, 1,3-bis(1,1-dimethyethyl)-	30,3531	8,226
1-Octen-3-ol	30,52807	4,286
1-Hexanol, 2-ethyl-	32,20717	1,629
Benzaldehyde	33,46265	2,248
3,4-Dimethylcyclohexanol	37,39064	3,183
2-Octen-1-ol, (Z)-	37,70487	1,488
Beta-Cyclocitral	38,4	2,609
Heptadecane	42,74503	**23,570**
Trans-beta-lonone	48,76735	6,805
Beta-lonone epoxide	50,1179	3,786
1-Nitro-2-acetamido-1,2-dideoxy-d-glucitol	56,62517	1,101
2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-, (R)-	58,37478	1,932

4.1.2. ICP-OES Sonuçları

Spirulina'nın mineral analizi İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon spektroskopisi (ICP-OES) ile yapılmıştır. Başlangıç materyal olark 2 g (0.002 kg) liyofilize *Spirulina* 60 ml (0.06 L) ultra saf su içinde çözülmüştür. Bu çalışma için Çukurova Üniversitesindeki Su Ürünleri Fakültesinden aldığımız *Spirulina*'da Kalsiyum (Ca), Magnezyum (Mg), Potasyum (K), Sodyum (Na) ve Demir (Fe) bulunmuştur. Bu minerallerin konsantrasyonu mg/L (Çizelge 4.3.) cinsinden analiz edilmiş ve aşağıdaki formül kullanılarak mg/kg (Çizelge 4.4.) numuneye dönüştürülmüştür:

$$\text{Mineral (mg/kg)} = \frac{X*K*0.06}{0.002} \qquad (4.3.)$$

Çizelge 4.3. *S.platensis*'in mineral konsantrasyonları (mg/L)

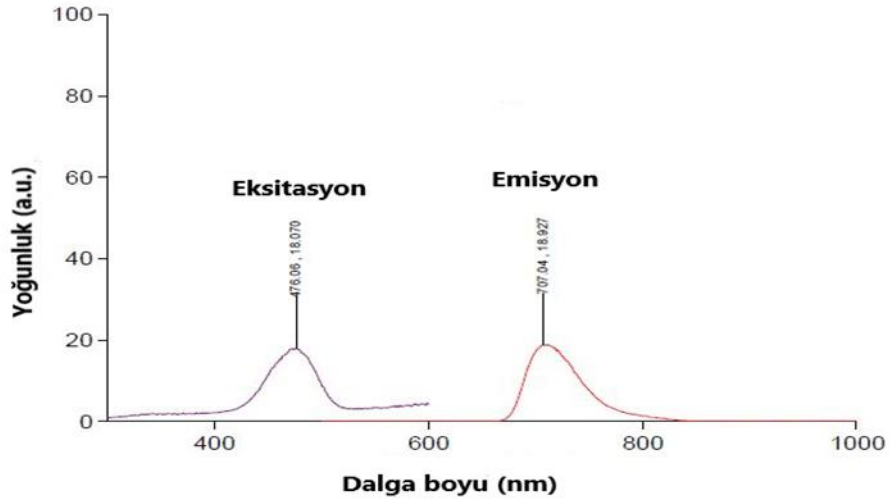
Mineral	K	X (mg/L)
Kalsiyum (Ca)	50	1,711
Magnezyum (Mg)	50	1,541
Potasyum (K)	200	1,458
Sodyum (Na)	50	2,242
Demir (Fe)	10	0,668

Çizelge 4.4. *S.platensis*'in mineral konsantrasyonları (mg/kg)

Mineral	mg/kg
Kalsiyum (Ca)	2566,6
Magnezyum (Mg)	2311,5
Potasyum (K)	8748
Sodyum (Na)	3363
Demir (Fe)	200,4

4.1.3. Floresans Spektrofotometre Sonuçları

C-phycocyanin'in floresans özelliğini Agilent Marka, Cary Eclipse Floresans Spektrofotometre ile belirlenmiştir. *Spirulina platensis*'ten elde edilen C-PC'in ham ekstraktının spektral özellikleri şekil 4.2.'te gösterilmiştir. C-PC 'in 476 nm'de uyarılması sonucu floresan emisyon spektrumu 707 nm'de görülmüştür.

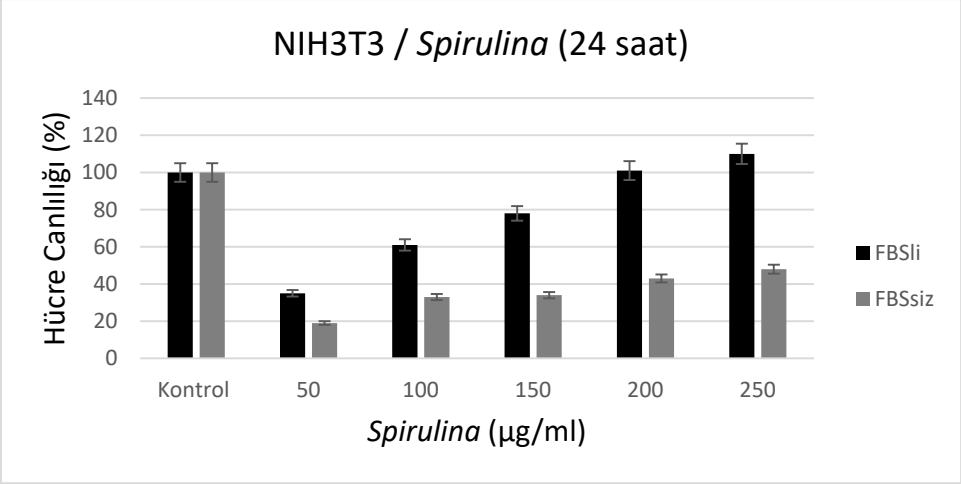


Şekil 4.2. C-phycocyanin'a ait eksitasyon-emisyon kromatogramları

4.1.4. MTT Sonuçları

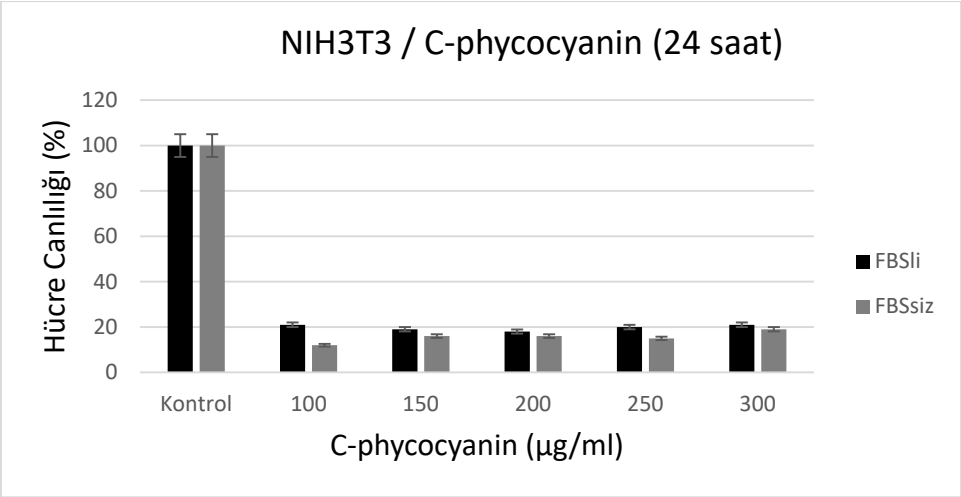
Spirulina ve C-phycocyanin'in NIH3T3 Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

NIH3T3 hücrelerine *Spirulina*'nın 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml ve 250 µg/ml'lik, C-phycocyanin'in ise 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml, 250 µg/ml ve 300 µg/ml'lik farklı dozları FBS'li ve FBS'siz medyum ortamlarında uygulandı. 24 saatlik inkübasyon sonunda MTT yöntemi ile sonuçlar alındı. Kantifikasyon, 570 nm'de optik yoğunluk (OD) ölçülerek gerçekleştirildi.



Şekil 4.3. *Spirulina*'nın (50, 100, 150, 200 ve 250 µg/ml) FBS'li ve FBS'siz medyum ortamlarında NIH3T3 hücre canlılığı üzerine etkisi

24 saatlik muamele sonunda, FBS'li medyumda *Spirulina*'nın artan konsantrasyonlarında hücre canlılığının giderek arttığı, 200 ve 250 µg/ml dozlarda ise kontrole yakın bir oranda arttığı görülmüştür. (Şekil 4.3.). Bu sonuçlara göre *Spirulina*'nın kontrol ile karşılaştırıldığında artan dozlarında metabolik aktiviteyi azaltmadığı görülmüştür.

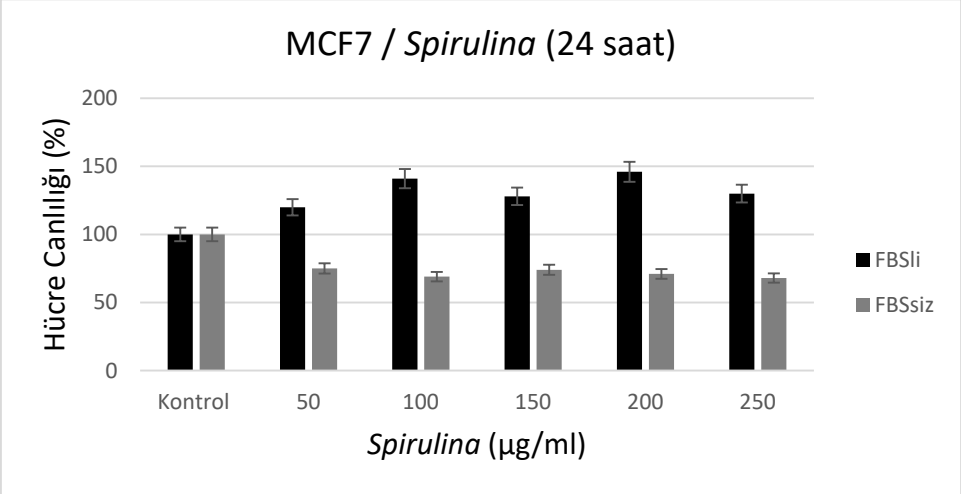


Şekil 4.4. C-phycocyanin'in (100, 150, 200, 250 ve 300 µg/ml) FBS'li ve FBS'siz medyum ortamlarında NIH3T3 hücre canlılığı üzerine etkisi

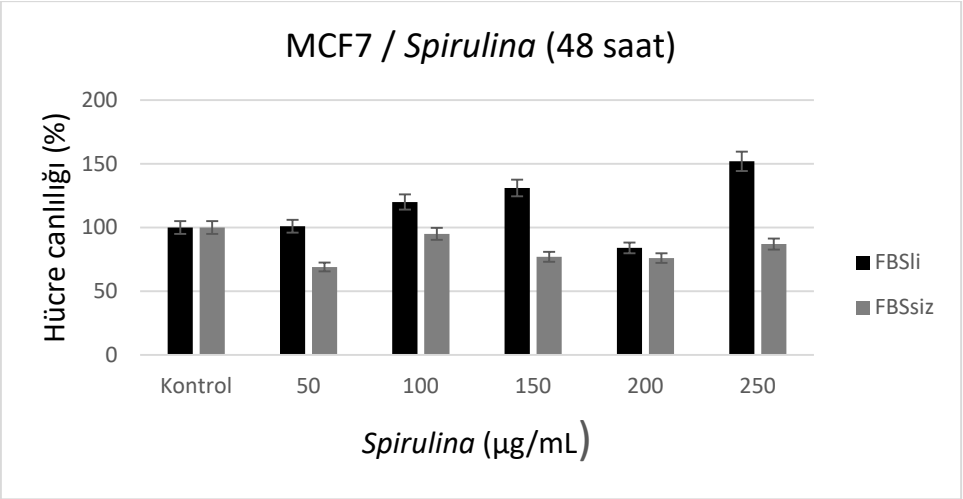
24 saat muamele sonunda, C-phycocyanin'in NIH3T3 hücre hattının canlılığı üzerine etkisine bakıldığında hem FBS'li hemde FBS'siz medyum ortamlarında ve bütün konsantrasyonlarda oldukça göze çarpan bir azalma gözlemlenmiştir.

Spirulina ve C-phycocyanin'in MCF7 Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

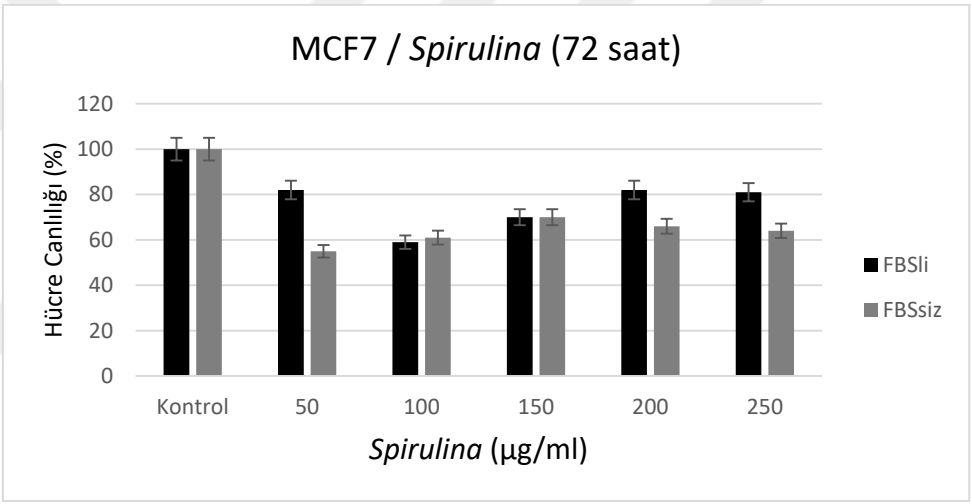
Spirulina'nın 50, 100, 150, 200 ve 250 µg/ml'lik konsantrasyonları ve onun etken meddesi C-phycocyanin'in 100, 150, 200, 250 ve 300 µg/ml'lik konsantrasyonları FBS'li ve FBS'siz medyum ortamlarında MCF7 hücrelerine uygulanıp 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonunda MTT yöntemi ile sonuçlar alındı.



Şekil 4.5. *Spirulina*'nın (50, 100, 150, 200 ve 250 µg/ml) FBS'li ve FBS'siz medyum ortamlarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi (24 saat)

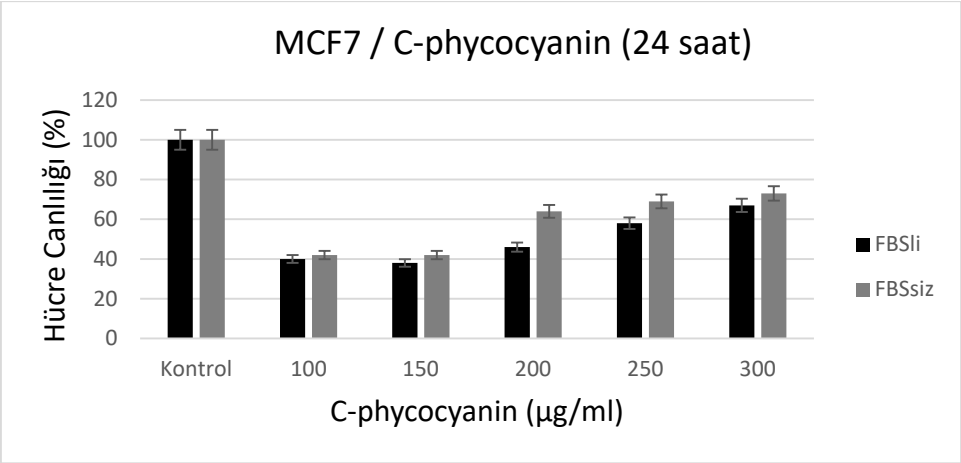


Şekil 4.6. *Spirulina*'nın (50, 100, 150, 200 ve 250 µg/ml) FBS'li ve FBS'siz medyum ortamlarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi (48 saat)

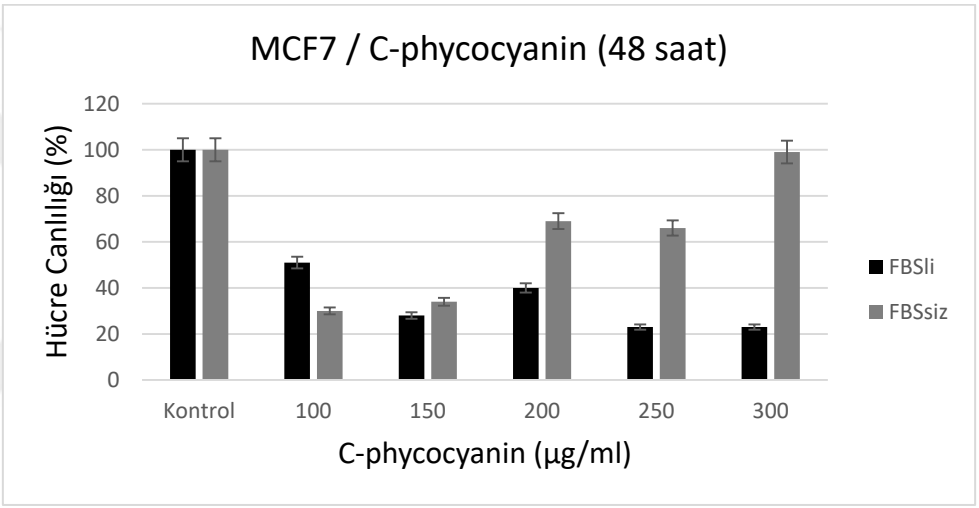


Şekil 4.7. Spirılina'nın (50, 100, 150, 200 ve 250 µg/ml) FBS'li ve FBS'siz medyum ortamlarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi (72 saat)

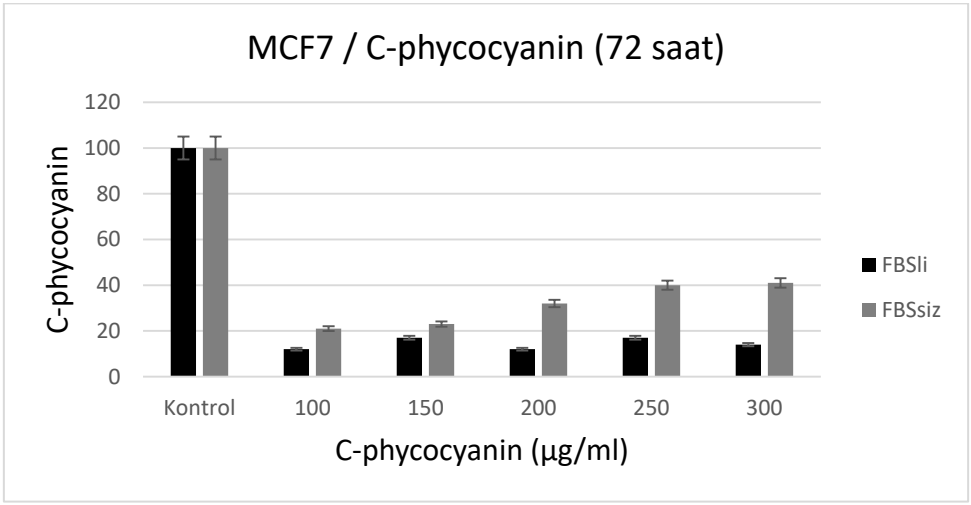
Spirulina'nın FBS'siz medyum ortamında 24, 48 ve 72 saatlik muamele sonunda farklı dozlarda hücre canlılığını azalttığı FBS'li medyum ortamında ise sadece 72 saatlik muamele sonunda hücre canlılığını azalttığı görülmüştür (Şekil 4.7.).



Şekil 4.8. C-phycocyanin'in (100, 150, 200, 250 ve 300 µg/ml) FBS'li ve FBS'siz medyum ortamlarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi (24 saat)



Şekil 4.9. C-phycocyanin'in (100, 150, 200, 250 ve 300 µg/ml) FBS'li ve FBS'siz medyum ortamlarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi (48 saat)



Şekil 4.10. C-phycocyanin'in (100, 150, 200, 250 ve 300 µg/ml) FBS'li ve FBS'siz medyum ortamlarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi (72 saat)

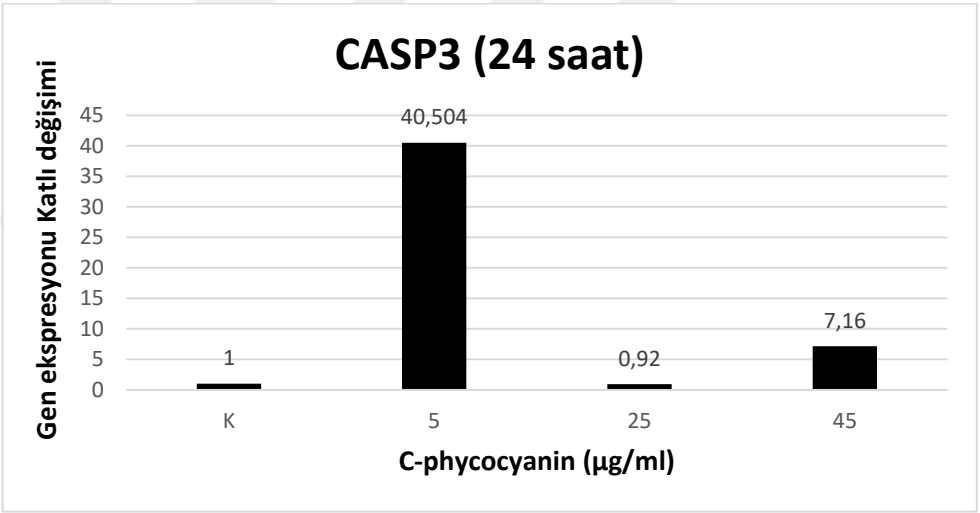
C-phycocyanin uygulamasının hem FBS'siz hem FBS'li medyum ortamlarında 24, 48 ve 72 saatlik süre sonunda 5 farklı dozlarında hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalttığı görülmüştür (Şekil 4.10.).

4.1.5. RT-PCR Sonuçları

MCF7 hücrelerine *Spirulina*'nın etken maddesi/ana pigmenti olan C-phycocyanin'in farklı dozları (5, 25 ve 45 µg/ml) ile 24 saatlik inkübasyonun apoptoz yolaklarına nasıl bir etkisi olduğunu anlamak için kaspaz 3, kaspaz 8, kapsaz 9, Bid, Bax, Apaf-1 ve p53 genlerinin ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemiyle değerlendirildi.

MCF7 Hücre Hattında C-phycocyanin'in Kaspaz 3 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

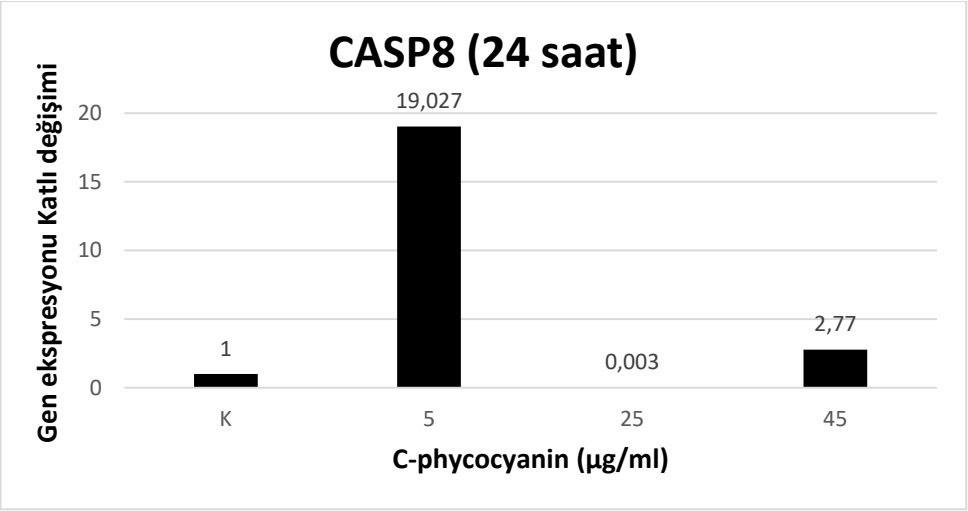
Kaspaz 3'ün ifadesinde 25 ve 45 µg/ml dozlar için belirgin bir artış olmamasına rağmen 5 µg/ml uygulamasında diğer dozlar üzerine anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.11.). Bu doz kaspaz 3'ün ekspresyonunu önemli ölçüde arttırmıştır (40,504 kat).



Şekil 4.11. MCF7 hücrelerinde C-phycocyanin'in kaspaz 3 gen ekspresyonu üzerine etkisi

MCF7 Hücre Hattında C-phycocyanin'in Kaspaz 8 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

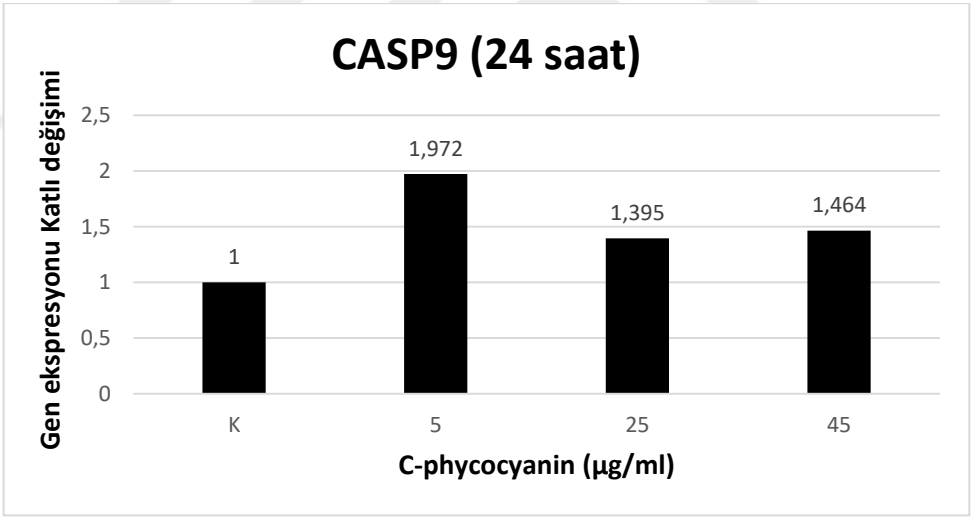
5 µg/ml C-phycocyanin ile muamele edilen MCF7 hücreleri 24 saatte kontrol grubu ile karılaştırıldığında kaspaz 8 gen ekspresyon seviyesinin anlamlı bir şekilde 19,027 kat arttığı görülürken, 25 µg/ml doz uygulamasında gen ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişim olmadığı görülmüştür (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. MCF7 hücrelerinde C-phycocyanin'in kaspaz 8 gen ekspresyonu üzerine etkisi

MCF7 Hücre Hattında C-phycocyanin'in Kaspaz 9 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

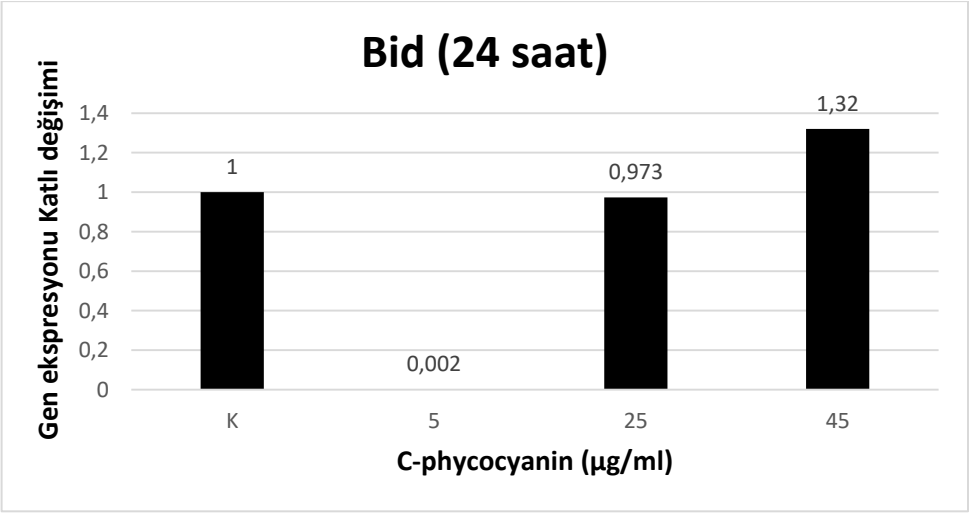
5, 25 ve 45 µg/ml C-phycocyanin ile muamele edilen MCF7 hücreleri 24 saatte kontrol grubu ile karşılaştırldığında kaspaz 9 gen ekspresyonu seviyesinin sırasıyla 1,972; 1,395 ve 1,464 kat arttığı görülmüştür (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. MCF7 hücrelerinde C-phycocyanin'in kaspaz 9 gen ekspresyonu üzerine etkisi

MCF7 Hücre Hattında C-phycocyanin'in Bid Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

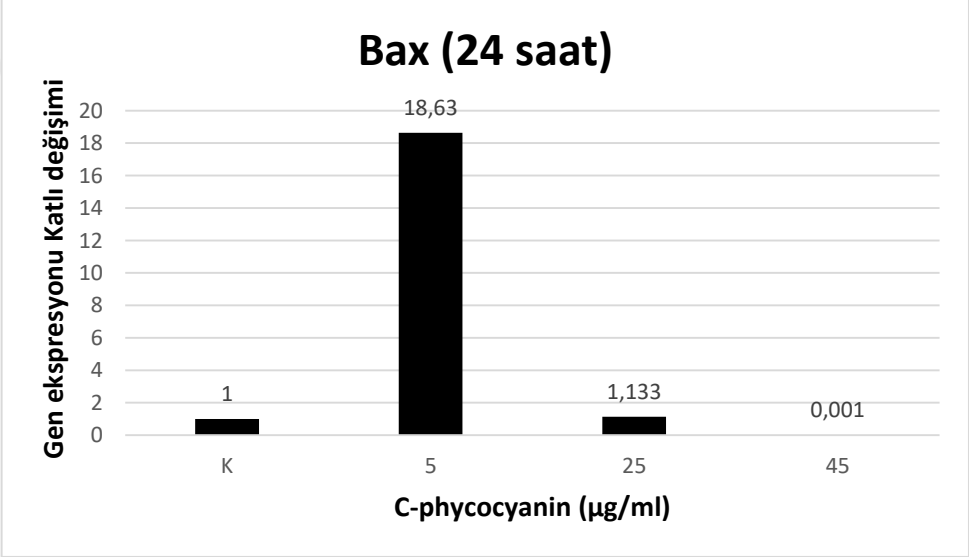
Bid'in ekspresyon seviyesinin kontrole göre 5 µg/ml C-PC uygulamasında baskılandığı (0,002), 25 µg/ml (0,973) ve 45 µg/ml (1,320 kat) dozlarında ise kontrole yakın katlı değişim verdiği görülmüştür. (Şekil 4.14.).



Şekil 4.14. MCF7 hücrelerinde C-phycocyanin'in Bid gen ekspresyonu üzerine etkisi

MCF7 Hücre Hattında C-phycocyanin'in Bax Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

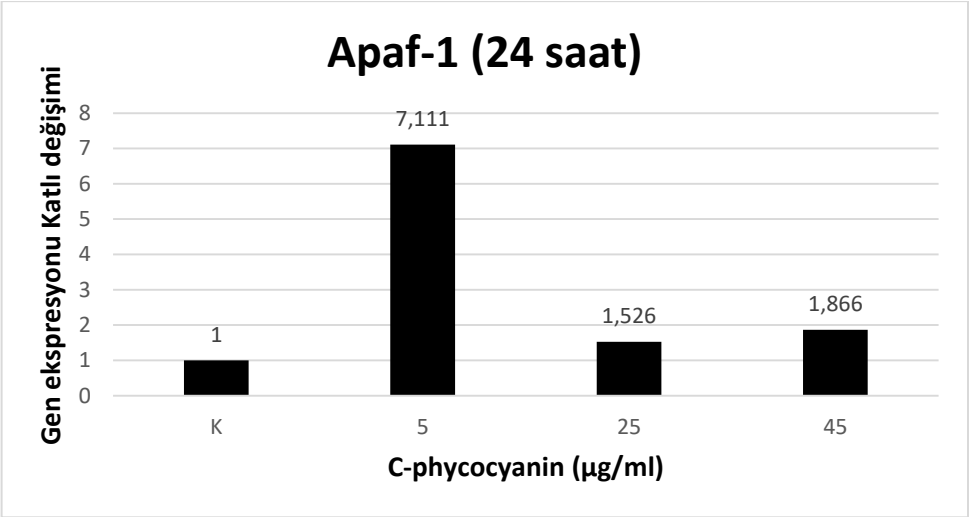
5 µg/ml C-phycocyanin ile muamele edilen MCF7 hücreleri 24 saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Bax gen ifade düzeyinin anlamlı bir şekilde 18,63 kat arttığı saptandı. 25 µg/ml C-PC uygulamasında kontrole göre farklı olmadığı görülmüştür (1,133). 45 µg/ml doz uygulamasında ise gen ekspresyonunun olmadığı görülmüştür (0,001) (Şekil 4.15.).



Şekil 4.15. MCF7 hücrelerinde C-phycocyanin'in Bax gen ekspresyonu üzerine etkisi

MCF7 Hücre Hattında C-phycocyanin'in Apaf-1 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

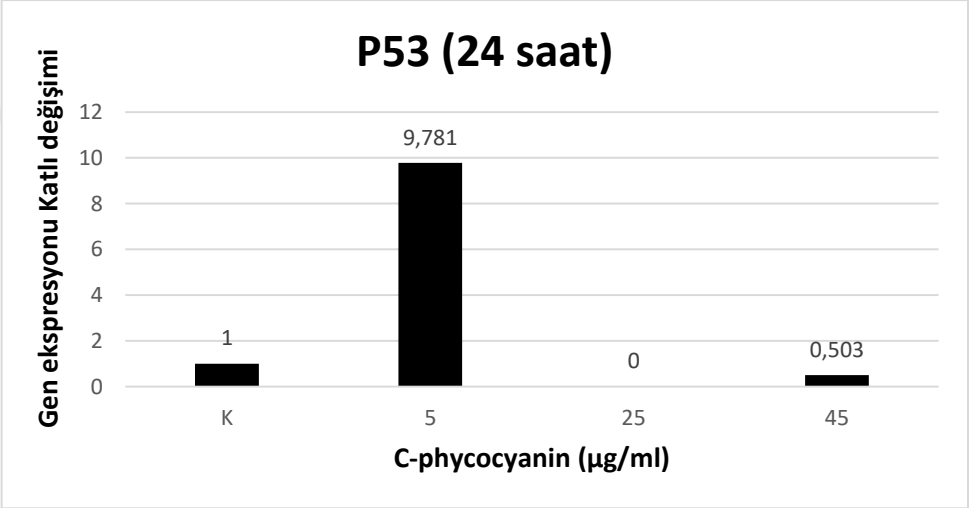
5 µg/ml C-phycocyanin ile muamele edilen MCF7 hücre hattı 24 saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Apaf-1 gen ekspresyon seviyesinin 7,111 kat arttığı görülmüştür. Diğer dozlarda ise anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.16. MCF7 hücrelerinde C-phycocyanin'in Apaf-1 gen ekspresyonu üzerine etkisi

MCF7 Hücre Hattında C-phycocyanin'in P53 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

5 µg/ml C-phycocyanin ile muamele edilen MCF7 hücre hattı 24 saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p53 gen ekspresyon seviyesinin 9,781 kat arttığı görülmüştür. Diğer dozlarda ise gen ekspresyon seviyesinin azaldığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.17. MCF7 hücrelerinde C-phycocyanin'in p53 gen ekspresyonu üzerine etkisi

4.2. Tartışma

Kanser potansiyel olarak ölümcül bir kronik hastalıktır. Kontrolsüz hücre proliferasyonu ile karakterizedir. Hücrelerin apoptoz fonksiyonlarını kaybederek kontrolsüz çoğalmaları kanser oluşumuna neden olur. Bu aşırı büyüme, orijinal dokunun tahrip olmasına ve kanserli dokunun gelişmesine katkıda bulunmaktadır. Son yıllarda kanser tedavisine ve önlenmesine alternatif yöntemler üzerinde durulmaktadır. Meme kanserinin tedavisi için kemoterapötik etki gösterebilecek doğal ve sentetik maddelerin sayısı her geçen gün artmaktadır. Bitkilerden elde edilen ve kanserin tedavisi için kullanılan bileşikler ve türevleri içeren pek çok çalışma literatüre

girmiştir (Özay ve ark., 2019). Örneğin, *Spirulina platensis* antikanser çalışmalarında kullanımı oldukça dikkat çekicidir.

Bu çalışmada *Spirulina platensis* ve *Spirulina platensis*'ten elde edilen C-phycocyanin'in insan meme kanseri MCF7 hücre hattında hücre canlılığı ve hücre apoptoz yolaklarına olan etkisi değerlendirilmiştir. *Spirulina* ve etken maddesi olan C-phycocyanin'in hücreler için hangi dozlarda sitotoksik olup olmadığını tespit etmek için hem NIH3T3 hemde MCF7 hücre hattı üzerinde MTT testi ile sitotoksitite testleri yapıldı. Tedavi edici özelliğe sahip konsantrasyon belirlendikten sonra C-phycocyanin'in apoptoz yolaklarına etkisini anlamak için MCF7 hücre hattında Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9, Bid, Bax, Apaf-1 ve p53 genlerinin ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemi uygulanarak incelendi. C-phycocyanin'in 5, 25 ve 45 µg/ml dozlarının bu yedi proteinin ifadeleri üzerindeki etkileri referans gen olan ACTB (β-actin) ile karşılaştırılarak belirlendi. Ayrıca, Çukurova Üniversitesi'nde üretilen *Spirulina platensis*'i karakterize etmek amacıyla uçucu bileşen ve mineral analizi yapıldı. Buna ek olarak C-phycoyanin'in floresan olup olmadığını tespit etmek için floresans spektrofotometre kullanıldı.

Spirulina platensis ya da *Arthrospira platensis* proteinler (Aouir ve ark., 2017; Coca ve ark., 2015), vitaminler (Watanabe ve ark., 1999), mineraller (Grosshangaver ve ark., 2020; Carcea ve ark., 2015) ve lipitler (Grosshangaver ve ark., 2020; El Baky ve ark., 2020; Shabana ve ark., 2017) açısından benzersiz bir bileşime sahiptir. *Spirulina*, pigmentler (klorofil, ksantofil, β-karoten, zeaksantin ve phycocyaninler) açısından zengindir (Parvin ve ark., 2008). *Spirulina* zengin besin içeriği nedeniyle farklı alanlarda kullanılmaktadır ve son zamanlarda üzerinde en çok durulan mikroalglardan biridir. *Spirulina platensis*'in içerdikleri bileşenlerin biyoaktif özellikleri sayesinde, sağlık üzerindeki yararları; antikanser, antioksidan, antiviral, antibakteryal, antidiyabetik, antifungal, bağışıklık sistemi güçlendiricisi ve benzeri etkiler olarak sıralanabilir. Bunların yanında endüstriyel açıdan değerli olan birçok bileşiğin özellikle pigmentlerin elde edilmesinde, gıda endüstrisinde, cilt kremi, pigment üretimi gibi kullanımları da bulunmaktadır. ABD Farmakopesi tarafından 1966-2009 PUBMED literatür incelemesine dayanan bir güvenlik değerlendirmesi *Spirulina*''nın A Sınıfı bir güvenliğe sahip olduğu sonucuna varmıştır (Marles ve ark., 2011). Ayrıca, kurutulmuş *Arthrospira platensis* FDA tarafından "genel olarak güvenli" ("generally recognized as safe" (GRAS)) olarak kategorize edilmiştir. Şimdiye kadar, *Arthrospira platensis*'nin in vivo toksikoloji çalışmaları, akut veya kronik dozların uygulanması sırasında veya sonrasında böbrek, karaciğer, üreme sistemi veya vücut fizyolojisi üzerinde herhangi bir toksik etki göstermemiştir (Braune ve ark., 2021). C-phycocyanin, phycobiliproteinlerin en önemli ve en baskın grubudur ve FDA tarafından sertifikasyondan muaf olarak onaylanan bir renk katkı maddesidir. Et, yumurta ve süt kadar zengin protein kaynağıdır (Chen ve ark., 2014; Khandual ve ark., 2021; Wang ve ark., 2022). Çok hücreli ve filament yapıda bir Siyanobakteri olan *Spirulina platensis*'in total proteininin %20-40 kadarı C-phycocyanin (C-PC)'dir (Silveira ve ark., 2007). C-PC, mavi floresan, suda çözünür, toksik olmayan bir biliprotein pigmentidir (Wu ve ark., 2018;

Eriksen, 2008; Braune ve ark., 2021; Jiang ve ark., 2017). *Spirulina*'dan ekstrakte edilebilen C-phycocyanin; gıda, kozmetik, biyoteknoloji ve tıp gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Erikson, 2008). *Spirulina*'nın ana pigmenti ve etken maddesi olan C-phycocyanin'in in vitro ve in vivo olarak çeşitli kanser türleri (meme kanseri (Li ve ark., 2010; Chen ve Wong, 2008), karaciğer kanseri (Arunasree ve ark., 2007), akciğer kanseri (Bingula ve ark., 2016; Li ve ark, 2015), kolon kanseri (Wang ve ark., 2007), lösemi (Subhashini ve ark., 2004) ve kemik iliği kanseri (Gardeva ve ark., 2014) gibi) üzerinde güçlü bir kanser önleyici etkiye sahip olduğu gösterilmektedir (Braune ve ark., 2021).

Tezin ilk aşamasında, Çukurova Üniversitesi'ndeki Su Ürünleri Fakültesinde üretilen *Spirulina platensis*'in bileşenlerini belirlemek amacıyla uçucu bileşik ve mineral analizi yapıldı. *Spirulina* uçucu bileşiklerinin bileşimini belirlemek için GC-MS yöntemi kullanılmıştır. *Spirulina* kullanılarak elde edilen sulu ekstraktın ve *Spirulina*'nın GC-MS analizi sonucu oluşan kromatogamlarda oluşan her bir pik bir bileşene aittir. Sonuçlara göre toz *Spirulina*'nın ana uçucu bileşeni heptadekandır (%79.179). *Spirulina* sulu ekstraktının içerisinde ise toz formuna göre heptadekan oranının (%23.570) diğer uçucu bileşenlere göre yinede daha baskın olduğu görülmektedir. Heptadekanın diğer birçok siyanobakteri türünde ortak bir ana uçucu bileşen olduğu bildirilmiştir (Rezanka ve ark., 1982; Aguero ve ark., 2003; Özdemir ve ark., 2004). *Spirulina*'nın uçucu bileşenleri ile ilgili yapılan daha önceki bir çalışmada en baskın bileşenin heptadekanın olduğu bildirilmiştir. Özdemir ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, Ege Üniversitesi'nde üretilen *Spirulina* kullanılmıştır. Çalışmalarında en baskın uçucu bileşen olarak heptadekan (%39.70) olarak tespit edilmiştir (Özdemir ve ark., 2004). Sonuçlar karşılaştırıldığında bizim çalışmamızda kullanılan *Spirulina*'daki heptadekanın oranının daha yüksek olduğu görülmüştür. Kullandığımız toz *Spirulina*'da alkan bileşenlerinin varlığı fazla iken sulu ekstraktında alkanların yanısıra daha fazla çeşitte bileşenlerin elde edildiği söylenebilmektedir. Ayrıca *Spirulina*'nın mineral analizi ICP-OES yöntemi ile yapıldı. *Spirulina platensis*'in mineralleri ile ilgili yapılan bir çalışmada Teksas'ta yetiştirilen *Spirulina platensis*'teki makro ve mikro elementler İndüktif Çift Plazma-Kütle Spektometresi (ICPMS) Perkin Elmer (Elan 6000) kullanılarak analiz edilmiştir. Sodyum (Na), Magnezyum (Mg), Potasyum (K), Kalsiyum (Ca), Bor (B), Titanyum (Ti), Vanadyum (V), Krom (Cr), Demir (Fe), Mangan (Mn), Nikel (Ni), Kobalt (Co), Bakır (Co), Çinko (Zn) ve Selenyum (Se) gibi her bir elementin konsantrasyonu µg/L olarak analiz edilmiş ve µg/g numuneye dönüştürülmüştür. Sukumaran ve arkadaşlarının yaptıkları bu çalışmada tatlı suda kültüre edilen *Spirulina* önemli ölçüde daha yüksek mikro elementler içermektedir (88,88 µg/g). Demir (Fe) ve Mn miktarı sırasıyla 82.864 ve 4.073 µg/g önemli ölçüde daha yüksektir. Ayrıca Zn ve Se sırasıyla 1.208 ve 2.311 µg/g bulunmaktadır (Sukumaran ve ark., 2014). Benzer şekilde Carcea ve arkadaşlarının çalışmasında mineraller bir ICP-Plazma cihazı (Perkin Elmer) ile belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan *Spirulina* Afrika'daki Çad gölü bölgesinden alınmıştır. Analizler Dihé üzerinde yapılmıştır. Dihé, Çad'da *Spirulina*'dan yapılan ve tüketilen doğal bir gıda ürünüdür. On

dört dihé örneği 2006 ve 2009 yılları arasında analiz edilmiştir. Örnekler Çad Gölü çevresindeki 6 farklı göletten alınmış ve farklı yıllarda ve hasat mevsimlerinde üretilmiştir. Sonuç olarak Ca (213-1290 mg/100g), Fe (112-884 mg/100g), Mn (2,6-10,6 mg/100g), P (595-776 mg/100g), Zn (0,54-78,9 mg/100g), Na (12,349-2923 mg/100g), K (1629-3094 mg/100g), Mg (231-478 mg/100g) ve Cu (0,01-0,12 mg/100g) bulundukları bildirilmiştir (Carcea ve ark., 2015). Bizim yaptığımız çalışmada ise, potasyum (8748 mg/kg), sodyum (3363 mg/kg), kalsiyum (2566,6 mg/kg), magnezyum (2311,5 mg/kg), ve demir (200,4 mg/kg) elementelrinin daha az yoğunlukta bulunan diğer elementleri (Manganez, çinko ve bakır) baskıladığını bulduk. Bunlara ek olarak C-phycocyanin'in floresan özelliğinin olup olmadığını belirlemek amacıyla Floresans Spektrofotometre kullanıldı. Sobiechowska-Sasim ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada C-PC'in 590 nm'de uyarılması sonucu floresan emisyon spektrumu elde edilmiştir. Elde edilen emisyon spektrumu 644 nm'de bir pik göstermiştir (Sobiechowska-Sasim ve ark., 2014). Biz çalışmamızda C-PC'in 476 nm'de uyarılması sonucu floresan emisyon spektrumu 707 nm'de elde ettik.

Tezin ikinci aşamasında, materyal ve metod kısmında anlatıldığı gibi NIH3T3 ve MCF7 hücreleri 96 kuyucuklu platelere ekilip ve her bir hücre hattına *Spirulina*'nın 50, 100, 150, 200 ve 250 µg/ml ve C-phycocyanin'in 100, 150, 200, 250 ve 300 µg/ml dozlarının muamelesi yapıldı. Hücre metabolik aktivitesini incelemek için MTT sitotoksisite testi yapıldı. *Spirulina*'nın NIH3T3 hücrelerin canlılıkları üzerine etkisini değerlendirdiğimizde; 24 saatlik süre sonunda, FBS'li medyum kullanınca dozları arttırırken hücre canlılığı da artmıştır. 50, 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarında canlılık üzerinde küçük bir artışa neden oluşmuşken, 200 ve 250 µg/ml konsantrasyonlarında artan bir canlılığa neden olmuştur. FBS'siz medyumda ise tüm dozlarda NIH3T3 hücrelerin canlılıkları üzerine toksik bir etki görüldü. C-PC'in NIH3T3 hücre hattının canlılığı üzerine etkisine bakıldığında hem FBS'li hemde FBS'siz medyumlarda ve bütün konsantrasyonlarda ki toksisitede oldukça göze çarpan bir artış gözlemlendi. MTT testi ile belirlenen sonuçlara göre; 24 ve 48 saatlik süre sonunda MCF7 hücrelerinde 50, 100, 150, 200 ve 250 µg/ml *Spirulina* ekstraktının dozlarının uygulanmasında; FBS'siz medyumda bir azalış gözlenirken, FBS'li medyumda hücrelerin canlılığı artmıştır. Ancak 72 saatlik süre sonunda hem FBS'siz hem FBS'li medyumlarda canlılık üzerinde küçük bir azalış olmuştur. C-PC uygulayınca ise 24 ve 48 saatlik süre sonunda bütün dozlarında canlılık üzerinde bir azalış görülken 72 saat sonra hücre canlılığının anlamlı bir şekilde baskıladığı saptandı.

MTT testi sonuçları ışığında; *Spirulina*'nın meme kanseri hücrelerine (MCF7) pek etkisi olmadığını gördük. Bu sonuçlara göre teze, *Spirulina*'nın etken maddesi olan C-PC'nin azaltılmış dozları ile devam edildi. C-PC'in yüksek doz (100, 200 ve 300 µg/ml) uygulaması hücre ölümüne sebep olduğu için konsantrasyonları 5, 25 ve 45 µg/ml'ye düşürüldü.

Tezin üçüncü aşamasında, apoptozda görev alan proteinler olan, kaspaz 3, kaspaz 8, kaspaz 9, Bid, Bax, Apaf-1 ve p53 proteinleri kullanıldı. Bu kısımda, 24 saatlik sürede 5, 25 ve 45 µg/ml dozlarında C-phycocyanin ile muamele edilen MCF7 hücre hattından izole edilen RNA

örneklerinden cDNA sentezi yapıldı ve sentezlenen cDNA'lar RT-PCR yöntemi ile gen ekspresyon düzeylerinin değerlendirilmesi amacıyla kullanıldı. Çalışmamızda apoptoz mekanizmasının ekstrinsik ve intrinsik yolaklarında görev alan ve Bcl-2 ailesi üyelerinden pro-apoptotik iki gen olan Bax ve Bid, apoptozom kompleksinin oluşumunda görev alan Apaf-1, başlatıcı kaspazlar olan Kaspaz 8 ve kaspaz 9, efektör kaspaz ve apoptozu gerçekleştiren kaspaz 3 ve tümör baskılayıcı protein olan p53 genlerinin ekspresyon düzeyleri housekeeping bir gen olan ve tüm hücrelerde ekspresyon seviyeleri her koşulda hemen hemen aynı kalan ACTB referans geni ile karşılaştırıldı.

Başlatıcı bir kaspaz olan kaspaz 8, apoptozda görev alan sistein proteazlarının bir üyesidir. Ekstrinsik yolak için başlatıcı bir kaspazdır ve efektör Kaspaz 3'ü doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki yolla aktive etmektedir. Gen ekspresyonu ile belirlenen apoptoz sonuçlarımıza göre 24 saat sonunda 25 µg/ml C-PC uygulanan MCF7 hücrelerinde kaspaz 8 geninin ekspresyon düzeyinde anlamlı bir değişim görülmezken, 5 ve 45 µg/ml dozlarında kaspaz 8'in ekspresyon seviyesinde sırasıyla 19,027 ve 2,77 kat artış görüldü. İntrinsik apoptozun başlatıcı kaspazı olan kaspaz 9 geninin MCF7 hücrelerinde ekspresyon düzeyine bakıldığında, 5, 25 ve 45 µg/ml dozlarında kaspaz 9'un ekspresyon seviyesinde sırasıyla 1,972; 1,395 ve 1,464 kat artış gözlemlendi. Efektör bir kaspaz olan kaspaz 3 başlatıcı kaspazlar tarafından aktive edilir ve apoptoz sırasında oluşan hücrelerdeki morfolojik değişikliklerden ve DNA parçalanmasından sorumludur. Sonuçlara göre 25 µg/ml dozu uygulayınca, bu genin MCF7 hücrelerinde ekspresyon düzeyinde anlamlı bir değişim görülmezken (0,92 kat), 5 ve 45 µg/ml uygulamalarında daha belirgin bir artış gözlenmiştir (sırasıyla 40,504 ve 7,160 kat artış saptandı). En düşük doz olan 5 µg/ml'nin kaspaz 3'ün ifadesini önemli ölçüde arttırdığı görülmüştür.

İnsanlarda Bcl-2 protein ailesi, apoptozu indükleyerek veya inhibe ederek hücre ölümü düzenlemektedir. Bu çalışmada Bcl-2 ailesi üyelerinden pro-apoptotik genlerden Bax ve Bid çalışıldı. MCF7 hücrelerine uygulanan C-PC'nin artan dozlarında Bid geninin ekspresyonuna bakıldığında 5 µg/ml dozunda kontrole kıyasla neredeyse ekspresyon olmadığı görülürken (0,002 kat), 25 ve 45µg/ml dozlarında kontrole kıyasla sırasıyla 0,973 ve 1,320 kat artış olduğu saptandı.

Bid geninin ekspresyonunun azalmasına rağmen apoptozom kompleksinin oluşmasında yer alan fakat bu çalışmada bakılmayan bir proteinin veya yolağın yer aldığı düşünülmektedir.

Bid'in ekspresyon düzeyinde gözlenenin aksine Bax geninin ifadesinin 5 µg/ml C-PC muamelesi ile 18,636 kat arttığı gözlemlenirken, 25 µg/ml dozunda 1,133 kat artış, 45 µg/ml dozunda ise anlamlı bir değişim olmadığı saptandı.

Apaf-1, apoptozom kompleksinin oluşumunda yer alan bir gendir. Bulduğumuz sonuçlara göre, 24 saatlik süre sonunda 5 µg/ml C-PC uygulanan MCF7 hücrelerinde Apaf-1 geninin ekspresyon düzeyi 7,111 kat artış gösterirken, 25 ve 45 µg/ml C-PC uygulamalarında sırasıyla 1,526 ve 1,866 kat artış olduğu görüldü.

Tümör baskılayıcı protein p53 bir transkripsiyon faktörüdür. p53, çok çeşitli hücresel streslere yanıt olarak hücre büyümesinin durmasını veya apoptozun indüklemesinde kilit rol oynayan bir gendir. 25 µg/ml C-PC uygulanan MCF7 hücrelerinde bu genin eksprese olmamasına rağmen 5 µg/ml dozun uygulamasının ardından ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 9,781 kat artış gözlemlendi.

Birçok araştırma, C-phycocyanin'in çeşitli insan kanser hücreleri üzerindeki pro-apoptotik etkisini bildirmiştir (Jiang ve ark., 2017). Yapılan liteartür taramasına göre, Li ve arkadaşlarının (2010) yaptıkları bir çalışmada C-PC uygulamasından sonra MCF7 meme kanseri hücre hattında kaspaz 9 geninin ifadesinin arttığı, sitokrom c salımının indüklediği ve Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik üyelerinden olan Bcl-2 geninin ifadesinin ise azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, MCF7 hücre proliferasyonunun inhibe ettiği, apoptotik cisimciklerin oluşumunu ve kromatin yoğunlaşmasını tespit edilmiştir (Li ve ark., 2010). Li ve arkadaşlarının (2006) yaptığı bir diğer araştırmada ise C-PC'nin HeLa hücrelerinde apoptozun kaspaz bağımlı olduğunu bulunmuştur. Kaspaz-2, -3, -4, -6, -8, -9 ve -10'un aktivasyonunu gösterilmiştir (Li ve ark., 2006). Benzer şekilde Ying ve arkadaşlarının (2015) yaptıkları çalışmada C-PC uygylamasından sonra Hep-2 hücrelerinde kaspaz-3, -8 ve -9 aktivasyonunu görülmüştür. Buna ek olarak Bax, Fas ve p53 genlerinin ekspresyon düzeyleri artarken anti-apoptotik Bcl-2 geninin ekspresyon seviyesinin azaldığı gösterilmiştir (Ying ve ark., 2015). Bharathiraja ve arkdaşlarının (2016) yaptığı bir başka çalışmada da C-PC'in MBA-MD-231 meme kanseri hücre hattında ROS oluşturarak, p21 proteinini aşırı eksprese ederek ve Bcl-2/Bax seviyelerini düşürerek apoptozu tetiklediğini bildirmiştir (Bharathiraja ve ark., (2016). Literatür taramasından sonra elde edilen verilere göre, Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik üyelerinden olan Bcl-2 geninin ifadesinin hep azaldığı tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda da, Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerinden olan Bid ve Bax genlerin ifadesinin arttığı gösterilmiştir. Benzer şekilde literatür taramasından sonra ve bizim yaptığımız çalışma karşılaştırıldığında, başlatıcı kaspazlar olan kaspaz 8 ve kaspaz 9 ile beraber efektör kaspaz 3 genlerinin ifadesinin arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca Ying ve arkadaşlarının bulduğu gibi tümör baskılayıcı p53'ün ifadesinin arttığı saptanmıştır.

Proapoptotik ve antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin arasındaki etkileşim apoptozun mitokondriyal yolağını kontrol ederler. Hücre içi sinyal ile uyarı aldıktan sonra pro-apoptotik Bid, anti-apoptotik Bcl-2'yi inaktive eder, pro-apoptotik Bax ve Bak'ı aktive edip mitokondriyal dış membran permeabilizasyonuna (MOMP) ve ardından sitokrom c, endo-G, AIF, SMAC'in salınımına yol açarak başlatıcı kaspaz 9'un aktivasyonuna neden olur. Sitokrom c, Apaf-1, ATP ve pro-kaspaz 9'dan multimoleküler bir protein kompleksi olan apoptozom oluşturulur. Kaspaz 9 bu komplekste bölünüp aktifleştirilir. Aktif kaspaz 9, kaspaz 3'ü aktifleştirir. Kaspaz 3'de ICAD'ı inaktifleştirerek CAD'ı serbestleştirir. CAD ise DNA fragmente olmasına neden olur (Hotchkis ve ark., 2009; Orning ve Lien, 2020; Coşkun ve Özgür, 2011).

Sonuç olarak ve bu bulgular ışığında, bu tez çalışmasında NIH3T3 ve MCF7 hücre hatlarında *Spirulina* ve etken maddesi C-PC uygulaması sonucunda canlılık düzeylerine bakılmıştır. MTT testi sonuçlarına göre etken madde, doz ve süre (C-PC, 5, 25 ve 45 µg/ml, 24 saat) belirlenmiştir. Tezin sonraki aşamasında sadece MCF7 hücre hattında apoptozda görev alan kaspaz 3, kaspaz 8, kaspaz 9, p53, Bid, Bax ve Apaf-1 genlerinin ekspresyon düzeylerine bakıldığında C-PC'in MCF7 hücre hattında apoptozu indüklediği tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar verileri ve elde ettiğimiz bulgular karşılaştırıldığında, apoptotik etkiye sahip olan C-PC'in meme kanseri tedavisinde umut verici olduğunu söylenebilmektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmada:

1) Çukurova Üniversitesi'nde üretilen *Spirulina platensis*'ten C-PC'i elde edildi.
2) İlk olarak, *Spirulina* ve C-PC'in NIH3T3 ve MCF7 hücrelerinin canlılıkları üzerine etkilerine bakıldı.
3) *Spirulina*'nın 50, 100, 150, 200 ve 250 µg/ml konsantrasyonları 24 saatte, NIH3T3 hücreleri için toksisite gözlenmedi.
4) Benzer şekilde *Spirulina*'nın dozları 24 ve 48 saatte, MCF7 hücre hattı için toksiste gözlenmedi ancak 72 saatte hücre canlılığı azalmaya başladı.
5) C-PC'in 100, 150, 200, 250 ve 300 µg/ml konsantrasyonları hem NIH3T3 hem de MCF7 için *Spirulina*'ya kıyasla daha fazla toksik etki oluşturdu.
6) MTT testi sonuçlara göre; *Spirulina*'nın MCF7 hücrelerinde pek etkisi olmadığı dolayısıyla RT-PCR çalışmalarına C-PC ile devam ettik. Ayrıca C-PC'in yüksek doz (100, 200 ve 300 µg/ml) uygulaması hücre ölümüne sebep olduğu için, konsantrasyonları (5, 25 ve 45 µg/ml) düşürüldü.
7) C-PC'in, apoptozda görev alan kaspaz-3, -8, -9, Bid, Bax, Apaf-1 ve p53 genlerinin ekspresyon düzeylerinde oldukça anlamalı artışlara neden olduğunu tespit edildi.
8) Elde edilen verilere göre en düşük dozun (5 µg/ml) en etkin doz olduğu görüldü.
9) MCF7 hücrelerinde 5 µg/ml C-PC muamelesi ile ve kontrol (Sadece medium) ile karşılaştırıldığında kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 genlerinin ekspresyon seviyelerinin sırasıyla 40,50; 19,02 ve 1,97 kat arttığı gözlemlendi.
10) Bax, Apaf-1 ve p53 genlerinin ekspresyon düzeylerinin ise sırasıyla 18,63; 7,11 ve 9,78 kat arttığı saptandı.
11) Bu genlerde gözlenen artışın aksine Bid geninin ifadesi 5 µg/ml C-PC uygulamasında baskılandığı (0,002 kat), 25 µg/ml (0,973) ve 45 µg/ml (1,320 kat) dozlarında ise kontrole yakın katlı değişim verdiği saptandı. Bid geninin ekspresyonunun azalmasına rağmen apoptozom kompleksinin oluşmasında yer alan fakat bu çalışmada bakılmayan farklı proteinlerin veya apoptotik yolağın yer alabileceği ve ilerleyen çalışmalarda bu proteinlere bakılması gerektiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bizim çalışmamız ve daha önce yapılan diğer çalışmalar göz önüne alındığında *Spirulina platensis*'in etken maddesi C-PC'in apoptotik etkisinin kanser tedavisinde doğal ve alternatif terapötik ajan olabileceği düşünülmektedir.

Ayrıca *Spirulina*'nın ana uçucu bileşeni heptadekandır (%79.179). Bunun ışığında heptadekan'ın etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi ve daha net sonuçlar elde edebilmek için çalışmamızın devam etmesi ve ek analizlerin yapılması planmaktadır. Buna ek olarak *Spirulina* ve etken maddesi/ana pigmenti olan C-phycocyanin'in sağlıklı hücrelerde etkisine bakmak için de kök hücre kullanılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

Adams, J.M., Cory, S., 2001. Life or death decions by the Bcl-2 family. Trends. Biochem Sci, 26:61-6.

Adir, N., Lerner, N., 2003. The Crystal Structure of a Novel Unmethylated Form of C-phycocyanin, a Possible Connector between Cores and Rods in Phycobilisomes. J. Biol. Chem., 278, 25926–25932.

Aguero, J., Lora, J., Estrada, K., Concepcion, F., Nunez, A., Rodriguez, A., and Pino, J.A., 1982. Volatile Components of a Commercial Sample of the Blue-Green Algae *Spirulina platensis*. Journal of Essential Oil Research, 15,114-117 (March-April).

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., et al., 2002. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science. Programmed Cell Death (Apoptosis).

Ali, S.K., Saleh, A.M., 2012. *Spirulina* - An overview, Int J Pharm Pharm Sci 4 (SUPPL.3) (2012) 9–15.

Aouir, A., Amiali, M., Bitam, A., Benchabane, A., Raghavan, V.G., 2017. Comparison of the biochemical composition of different *Arthrospira platensis* strains from Algeria, Chad and the USA. J. Food Meas Charact., 11, 913−23.

Arunasree, K.M., Roy, K.R., Reddy, N.P., Dheeraj, B., Reddy, G.V., Reddanna, P., 2007. Alteration of mitochondrial membrane potential by *Spirulina platensis* C-phycocyanin induces apoptosis in the doxorubicinresistant human hepatocellular-carcinoma cell line HepG2. Biotechnol. Appl. Biochem., 47, 159–167.

Aydıntuğ, S., 2004. Meme Kanserinde Erken Tanı. Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi AD, Ankara. STED dergisi, cilt 13, sayı 6, 226s.

Babadzhanov, A.S., Abdusamatova, N., Yusupova, F.M., Faizullaeva, N. Mezhlumyan, L.G., Malikova, M.Kh., 2004. Chemical composition of *Spirulina platensis* cultivated in Uzbekistan, Chem. Nat. Compd. 40 (2004) 232–234.

Bannu, S.M., Lomada, D., Gulla, S., Chandrasekhar, T., Reddanna, P., Reddy, M.C., 2019. Potential Therapeutic Applications of C-phycocyanin. Curr Drug Metab., 20(12):967-976.

Bellamy, C.O., et al., 1995. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. Seminars in cancer biology, Elsevier.

Behzadi, P., Ranjbar, R., 2015. Caspases and Apoptosis. IMedPub Journals, 1, 22-30.

Bingula, R., Dupuis, C., Pichon, C., Berthon, J.Y., Filaire, M., Pigeon, L., Filaire, E., 2016. Study of the Effects of Betaine and/or C-phycocyanin on the Growth of Lung Cancer A549 Cells In Vitroand In Vivo. J. Oncol., 8162952.

Biyi, A., Doudouh, A., Zekri, A., Caoui, M., Benrais, N., 2001. Le processus métastatique ; médecine du Maghreb, n°90.

Bose, K., 2015. Proteases in apoptosis: Pathways, protocols and translational advances. 2015. 1–237 p.

Braune, S., Krüger-Genge, A., Kammerer, S., Jung, F., Küpper, JH. 2021. Phycocyanin from *Arthrospira platensis* as Potential Anti-Cancer Drug: Review of In Vitro and In Vivo Studies. Life 2021, 11, 91.

Bruckheimer, E.M., Cho, S.H., Sarkiss, M., Herrmann, J., McDonnell, T.J., 1998. The Bcl-2 gene family and apoptosis. Adv Biochem Eng Biotechnol, 62:75-105.

Carcea, M., Sorto, M., Batello, C., Narducci, V., Aguzzi, A., Azzini, E., Fantauzzi, P., Finotti, E., Gabrielli, P., Galli, V., Gambelli, L., Maintha, K.M., Namba, F., Ruggeri, S., Turfani, V., 2015. Nutritional characterization of traditional and improved dihé, alimentary bluegreen algae from the lake Chad region in Africa. LWT - Food Sci. Technol. 2015, 62, 753−63.

Chen, H.Y., Chiang, Y.F., Huang, C.Y., Shieh, T.M., Kao, C., Chang, F.K., Huang, T.C., Ali, M., Chang, H.Y., Hong, Y.H., Hsia, S.M., 2022. *Spirulina* phycocyanin extract and its active components suppress epithelial-mesenchymal transition process in endometrial cancer via targeting TGF-beta1/SMAD4 signaling pathway. Biomed Pharmacother, Aug;152:113219.

Chen, H.W., Yang, T.S., Chen, M.J., Chang, Y.C., Wang Eugene I., et al. 2014. Purification and immunomodulating activity of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* cultured using power plant flue gas. J. Process Biochem., 49, 1337–1344.

Chen, J., 2016. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. Cold Spring Harb Perspect Med. Mar 1;6(3):a026104.

Chen, T., Wong, Y.S., 2008. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of selenium-containing phycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis*. J Agric Food Chem., Jun 25;56(12):4352-8.

Chowdhury, I., Tharakan, B., Bhat, G.K.,2008. Caspases — An update. Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol ;151(1):10–27.

Coca, M., Barrocal, V.M., Lucas, S., González-Benito, G., García-Cubero, M.T., 2015. Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media, Food and Bioproducts Processing. Food and Bioproducts Processing Volume 94, April, Pages 306-312.

Comşa, Ş., Cîmpean, A.M., Raica, M., 2015. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. Anticancer Res. Jun;35(6):3147-54.

Cooper, G.M., 2019. The Cell A Molecular Approach. Oxford University Press USA, 813s.

Coşkun, G., Özgür, H., 2011. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Adana, arşiv, 20: 145.

Czabotar, P.E., Westphal, D, Dewson, G., Ma, S., Hockings, C., Fairlie, W.D., Lee, E.F., Yao, S., Robin, A.Y., Smith, B.J., Huang, D.C., Kluck, R.M., Adams, J.M., Colman, P.M., 2013. Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis. Cell. Jan 31;152(3):519-31.

Czerwonka, A., Kaławaj, K., Sławińska-Brych, A., Marta, K., Lemieszek, Bartnik, M., Krzysztof, K., Wojtanowski, Zdzisińska, B., Rzeski, W. 2018. Anticancer effect of the water extract of a commercial *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) product on the human lung cancer A549 cell line. Biomedicine & Pharmacotherapy 106 (2018) 292–302.

Delbridge, A.R., et al. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. Nature reviews Cancer. 2016;16(2): 99.

Dillon, J.C.,1995. Nutritional value of the alga *Spirulina*. Phuc AP, Dubacq JP. World Rev Nutr Diet. 1995;77:32-46.

Done, S.J., 2011. In Breast Cancer - Recent Advances in Biology, Imaging and Therapeutics. Rijeka, InTech, p IX.

Dünya Sağlık Örgütü - Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), Aralık 2020. https://www.losante.com.tr/Content/brosur/DS%C3%96%20Kanser%20Verileri%20Tablo%20%C3%87 evirisi.pdf Son erişim tarihi: 30 Aralık 2020.

El Baky, H.H.A., El Baroty, G.S., Mostafa, E.M., 2020. Optimization Growth of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* in Photobioreactor Under Varied Nitrogen Concentration for Maximized Biomass, Carotenoids and Lipid Contents. Recent Pat Food Nutr Agric., 11(1):40-48.

El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell. Nov 19;75(4):817-25.

Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicologic pathology, 35(4), 495-516.

Engeland, K., 2022. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. Cell Death Differ. May;29(5):946-960. doi: 10.1038/s41418-022-00988-z. Epub 2022 Mar 31.

Eriksen, N.T., 2008. Production of phycocyanin-A pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. Appl. Microbiol. Biotechnol., 80, 1–14.

Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., et al., 2020. Observatoire mondial du cancer : « Cancer Today », Lyon : Centre international de recherche sur le cancer, (https://gco.iarc.fr/today, consulté en février 2021).

Fuentes-Prior, P., Salvesen, G.S., 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. Biochem J 384: 201–232.

Fukuhara, S. & Rowley, J. D., 1978. Chromosome 14 translocations in non-Burkitt lymphomas. Int. J. Cancer 22, 14–21.

Gardeva, E., Toshkova, R., Yossifova, L., Minkova, K., Ivanova, N., Gigova, L., 2014. Antitumor activity of C-phycocyanin from Arthronema africanum (Cyanophyceae). Braz. Arch. Biol. Technol., 57, 675–684.

Gest, C., Joimel, U., Huang, L., Pritchard, L.L., Petit, A., Dulong, C., Buquet, C., Hu, C.Q., Mirshahi, P., Lauren, M., Fauvel-Lafève, F., Cazin, L., Vannier, J.P., Lu, H., Soria, J., Li, H., Varin, R. and Soria, C., 2013. Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. BMC Cancer 13: 63.

Graham, T.A., Sottoriva, A., 2017. Measuring cancer evolution from the genome. J Pathol. Jan;241(2):183-191.

Green, D.R., Fitzgerald, P., 2016. Just So Stories about the Evolution of Apoptosis. Curr Biol., 26(13): R620–R627.

Grosshagauer, S., Kraemer, K., Somoza, V., 2020. The True Value of *Spirulina*. J Agric Food Chem., Apr 8;68(14):4109-4115.

Guo, J., Cui, L., Huang, Y., Meng, Z., 2022. *Spirulina platensis* protein isolate nanoparticle stabilized O/W Pickering emulsions: Interfacial adsorption and bulk aggregation. Food Res Int. Nov;161:111815.

Hao, S., Yan, Y., Li, S., Zhao, L., Zhang, C., Liu, L., Wang, C., 2018. The In Vitro Anti-Tumor Activity of Phycocyanin against Non-Small Cell Lung Cancer Cells. Mar. Drugs, 16, 178.

Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S. J., 1993. The p21 cdk-interacting protein Cipl is a potent inhibitor of Gl cyclin-dependent kinases. Cell 75, this issue.

Hoe, K.K., Verma, C.S., Lane, D.P., 2014. Drugging the p53 pathway: understandingthe route to clinical efficacy. Nat. Rev. Drug Discov. 13, 217–236.

Hood, J.K., and Cheresh, D.A., 2002. ‘’Role of integrins in cell invasion and migration’’. J.Nat Rev Cancer 2, pp: 91-100.

Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J,E,, Swanson, P.E., 2099. Cell death. N Engl J Med. Oct 15;361(16):1570-83.

Hu, J., Li, Y., Pakpour, S., Wang, S., Pan, Z., Liu, J., Wei, Q., She, J., Cang, H., Zhang, R., 2019. Dose Effects of Orally Administered *Spirulina* Suspension on Colonic Microbiota in Healthy Mice. Front. Cell. Infect. Microbiol, 9, 243.

Hyndman, I.J., 2016. The Contribution of both Nature and Nurture to Carcinogenesis and Progression in Solid Tumours. Cancer Microenviron, 9 (1), 63-69.

Ichimura, M., Kato, S., Tsuneyama, K., Matsutake, S., Kamogawa, M., et al., 2001. Phycocyanin prevents hypertension and low serum adiponectin level in a rat model of metabolic syndrome, J. Nutr. Res. 33, 397–405.

Igney, F.H., Krammer, P.H., 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. Nat Rev Cancer, Apr;2(4):277-88.

Inoue-Yamauchi, A., Jeng, P.S., Kim, K., Chen, H.C., Han, S., Ganesan, Y.T., Ishizawa, K., Jebiwott, S., Dong, Y., Pietanza, M.C., Hellmann, M.D., Kris, M.G., Hsieh, J.J., Cheng, E.H., 2017. Targeting the differential addiction to anti-apoptotic BCL-2 family for cancer therapy. Nat Commun, Jul 17;8:16078.

Ismail, MF., Alı, DA., Fernando, A., Abdraboh, ME., Gaur, RL., Ibrahim, WM., Raj, MH., Ouhtit, A., 2009. Chemoprevention of rat liver toxicity and carcinogenesis by *Spirulina*. Int J Biol Sci, 5:377e387.

Jaeschke, D.P., Mercali, G.D., Marczak, L.D.F., Müller, G., Frey, W., & Gusbeth, C., 2019. Extraction of valuable compounds from *Arthrospira platensis* using pulsed electric field treatment. Bioresource Technology, 283, 207–212.

Jiang, L.,Wang, Y., Yin, Q., Liu, G., Liu, H., Huang, Y., Liangqian, J., 2017. Phycocyanin: A Potential Drug for Cancer Treatment. J. Cancer, 8, 3416–3429.

Jiang, L., Wang, Y, Liu, G., Liu, H., Zhu, F., Ji, H., Li, B., 2018. C-Phycocyanin exerts anti-cancer effects via the MAPK signaling pathway in MDA-MB-231 cells. Cancer Cell Int., 25; 18:12.

Khandual, S., Sanchez, E.O.L., Andrews, H.E., & de la Rosa, J.D.P., 2021. Phycocyanin content and nutritional profile of *Arthrospira platensis* from Mexico: Efficient extraction process and stability evaluation of phycocyanin. BMC Chemistry, 15(1), 24.

Kaya, C., Çalışkan, Y., Yönden, Z. 2012. Apoptozis. Mustafa Kemal Üniv.Tıp Dergi, Cilt 3, Sayı 11.

Kendirli, k., 2010. *Spirulina* kültürlerinde besin elementlerinin farklı Oranlarda kullanımının kurumadde, protein ve Klorofil-a düzeyine etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Biyoteknoloji Anabilim Dalı. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, ADANA.

Kerr, J.F., et al., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. British journal of cancer. 1972;26(4): 239.

Konícková, R., Vanková, K., Vaníková, J., Vánová, K., Lucie, M., Subhanová, I., Zadinová, M., Zelenka, J., Dvorák, A., Kolár, M., Strnad, H., Rimpelová, S., Ruml, T., Ronald, J., Wong L.V., 2014. Anti-cancer effects of blue-green alga *Spirulina platensis*, a natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds. Annals of hepatology. March-April, Vol. 13 No. 2, 2014: 273-283.

Kumar, A., Ramamoorthy, D., Verma, D.K. et al., 2022. Antioxidant and phytonutrient activities of *Spirulina platensis*. İndia, Energy Nexus 6 (2022) 100070.

Lacroix, M., Haibe-Kains, B., Hennuy, B., Laes, JF., Lallemand, F., Gonze, I. et al., 2004. Gene regulation by phorbol 12-myristate 13-acetate in MCF-7 and MDA-MB-231, two breast cancer cell lines exhibiting highly different phenotypes. Oncology reports;12:701–7.

Leblanc, V. and May, P., 2002. Activation et modifications post-traductionnelles de p53 après dommage de l'ADN. Med Sci (Paris). Fontenay-aux-Roses Cedex,France. May; 18(5): 577–584.

Lee, Adrıan, V., et al., 2015. MCF-7 Cells—Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. Journal of the National Cancer Institute. Julay, 107 (7): djv073.

Lévy, R., Andrİeu, J.M., Colonna, P., 1997. Cancers : guide pratique d'évolution de traitement et de surveillance : De la cellule normale au cancer clinique. pp 2-17 (142p).

Li, J. And Yuan, J., 2008. Caspases in apoptosis and beyond. Oncogene, 2008 Oct 20;27(48):6194-206.

Li, B., Chu, X., Gao, M., Li,W., 2009. Apoptotic mechanism of MCF-7 breast cells in vivo and in vitro induced by photodynamic therapy with C-phycocyanin. Acta Biochim. Biophys. Sin., 42, 80–89.

Li, B., Gao, M., Chu, X.M., Teng, L., Lv, C.-Y., Yang, P., Yin, Q.F., 2015. The synergistic antitumor effects of all-trans retinoic acid and C-phycocyanin on the lung cancer A549 cells in vitro and in vivo. Eur. J. Pharmacol., 749, 107–114.

Li, B., Gao, M.H., Zhang, X.C., Chu, X.M.,2006. Molecular immune mechanism of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* induces apoptosis in HeLa cells in vitro. Biotechnology and applied biochemistry, 43: 155-64.

Li, Y., Zhang, Z., Paciulli, M., & Abbaspourrad, A., 2020. Extraction of phycocyanin a natural blue colorant from dried *spirulina* biomass: Influence of processing parameters and extraction techniques. Journal of Food Science, 85(3), 727–735.

Liu, Q., Huang, Y., Zhang, R., Cai, T., Cai, Y., 2016. Medical Application of *Spirulina platensis* Derived C-phycocyanin. Evid Based Complement Alternat Med, 2016:7803846.

Lodygin, D., Menssen, A., Hermeking, H., 2002. Induction of the Cdk inhibitor p21by LY83583 inhibits tumor cell proliferation in a p53-independent manner. J.Clin. Invest. 110, 1717–1727.

Mahmoud, Y.I., Shehata, A.M.M., Fares, N.H., Mahmoud, A.A., 2021. *Spirulina* inhibits hepatocellular carcinoma through activating p53 and apoptosis and suppressing oxidative stress and angiogenesis. Life Sciences 265 (2021) 118827.

Man, S.M., Kanneganti, T.D., 2016. Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. Nat Rev Immunol; 16:7-21.

Marles, R.J., Barrett, M.L., Barnes, J., Chavez, M.L., Gardiner, P., Ko, R., Mahady, G.B., Dog, T.L., Sarma, N.D., Giancaspro, G.I., et al., 2011. United States Pharmacopeia Safety Evaluation of *Spirulina*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2011, 51, 593–604.

Marrez, D.A., Naguib, M.M., Sultan, Y.Y., Daw, Z.Y., Higazy., A.M., 2014. Evaluation of chemical composition for *Spirulina platensis* in different culture media, Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci. 5 (2014) 1161–1171.

Monaselidze, J., Gelagutashvili, E., Gogebashvili, M., Gorgoshidze, M., Gongadze, A., Bagdavadze, N., Kiziria, E., 2022. Survival and growth of *Spirulina platensis* cells and thermodynamic stability of their main proteins after recultivation following irradiation with Cs137 γ doses of 0 to 400 kGy. Algal Research, Volume 68, November, 102900.

Mysliwa-Kurdziel, B., 2017. Phycobilins and Phycobiliproteins Used in Food Industry andMedicine. Mini-Rev. Med. Chem, 17, 1173–1193.

Nagata, S., 1997. Apoptosis by death factor. Cell. Feb 7;88(3):355-65.

Najem, A.M., Abed, I.J., Fadhel, L.Z., 2021. Assessment the Activity of *Spirulina platensis* Alcoholic Extract in MCF-7 Breast Cancer Cells Inhibition and P-53 gene induction. Annals of Tropical Medicine & Public Health, ASRO.2021.24450.

North, S. and Hainaut, P., 2000. p53 and cell-cycle control: a finger in every pie. Pathol Biol; 48 : 255-70.

Oğuz, H., 2008. Çukurova iklim koşullarının *Spirulina platensis* (*cyanophyta*)'deki fikosiyanin miktarına etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Biyoteknoloji Anabilim Dalı. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, ADANA.

Orning, P., Lien, E., 2020. Multiple roles of caspase-8 in cell death, inflammation, and innate immunity. J Leukoc Biol. 2021 Jan;109(1):121-141.

Ouhtit, A., Ismail, M.F., Othman, A., Fernando, A., Abdraboh, M,E,, El-Kott, A.F., Azab, Y.A., Abdeen, S.H., Gaur, R.L., Gupta, I., Shanmuganathan, S., Al-Farsi, Y.M., Al-Riyami, H., Raj, M.H., 2014. Chemoprevention of rat mammary carcinogenesis by *Spirulina*. Am J Pathol. Jan;184(1):296-303.

Öktem, S., Özhan, MH., Özol, D., 2001. Apoptozisin Önemi. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir. Toraks Dergisi, 2(1):91-95, nisan 2001.

Özay, Y., Yıldız, A., Güven, C., Albenız, I., Türker Şener, L., Aydogan Ahbab, M., Bozgeyık, İ., güzel, S., bagış, H., Yumrutaş, Ö., 2019. MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerine Verbascum inulifolium'un antiproliferatif ve apoptoz indükleme aktivitelerinin değerlendirilmesi. Lokman Hekim Dergisi, 9 (2): 203-210.

Özdemir, G., Karabay, N.U., Dalay, M.C., Pazarbaşı, B., 2004. Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. Phytother Res. Sep;18(9):754-7.

Öztecik, F.E., 2019. Omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinin insan meme kanseri MCF7 hücre hattındaki apoptoz ilişkili genler üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Biyoteknoloji Anabilim Dalı. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, ADANA.

Palanisamy, M., Töpfl, S., Berger, R.G., & Hertel, C., 2019. Physico-chemical and nutritional properties of meat analogues based on *Spirulina*/lupin protein mixtures. European Food Research and Technology, 245(9), 1889–1898.

Parvin, M., Habib, MA., Huntington, T., Hasan, M., 2008. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish, Aquaculture. p. 33pp. doi:ISBN 978-92-5-106106-0.

Pascual-Pasto, G., Resa-Pares, C., Castillo-Ecija, H., Aschero, R., Baulenas-Farres, M., Vila-Ubach, M., Burgueño, V., Balaguer-Lluna, L., et al., 2023 Low Bcl-2 is a robust biomarker of sensitivity to nab-paclitaxel in Ewing sarcoma. Biochem Pharmacol., Feb;208:115408.

Pawar, A.R., Rao, P.S., Jadhav, RS., 2020. Nutraceutical Value of *Spirulina* (*Arthrospira*): A Review, World Joural Pharm Res 9 (5) 315–328.

Rezanka, T., Zahradník, J., Podojil, M., 1982. Hydrocarbons in green and blue-green algae. Folia Microbiol (Praha), 27(6):450-4.

Poon, I.K., Lucas, C.D., Rossi, A.G. and Ravichandran, K.S., 2014. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. Nature reviews. Immunology, 14(3), p.166.

Potnis, A.A., Raghavan, P.S., Rajaram, H., 2021 Overview on cyanobacterial exopolysaccharides and biofilms: role in bioremediation, Rev Environ Sci Biotechnol 20 (3) 781–794 .

Prabakaran, G., Sampathkumar, P., Kavısrı, M., Moovendhan, M., 2020. Extraction and characterization of phycocyanin from *Spirulina platensis* and evaluation of its anticancer, antidiabetic and antiinflammatory effect. International Journal of Biological Macromolecules 153 (2020) 256–263.

Pratama, A.I., Nuryani Lioe, H.N., Dewi Yuliana, N., Ogawa, M., 2022. Umami compounds present in umami fraction of acid-hydrolyzed *Spirulina* (*Spirulina platensis*). Algal Research 66 (2022) 102764.

Radosevich, J.A., 2018. Apoptosis and Beyond: the many ways cells die. John Wiley & Sons Inc, USA, 767s.

Richmond, A., 1986. Outdoor Mass Cultures of Microlagae. (A. Richmond Editör). Handbook of Microlagal Mass Cultures of Microalgae. CRC Press, INC. Boca Raton, Florida. 285-329.

_____, 1988. Micro-Algal Biotechnology, *Spirulina*. Cambrige university press.

Ross, E., Dominy, W., 1990. The nutritional value of dehydrated, blue-green algae (*Spirulina platensis*) for poultry, Poult Sci 69 (5) 794–800 .

Rout, N.P., Khandual, S., Gutierrez-Mora, A., Ibarra-Montoya, J.L., Vega-Valero, G., 2015. Divergence in three newly identified *Arthrospira* species from Mexico, World J Microbiol Biotechnol 31 (7) 1157–1165 .

Shabana, E.F., Gabr, M.A., Moussa, H.R., El-Shaer, E.A., Ismaiel, M.M.S., 2017. Biochemical composition and antioxidant activities of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* in response to gamma irradiation. Food Chem. Jan 1;214:550-555.

Shamas-Din, A., Bindner, S., Zhu, W., Zaltsman, Y., Campbell, C., Gross, A., Leber, B., et al., 2013. tBid undergoes multiple conformational changes at the membrane required for Bax activation. J Biol Chem; 288(30):22111–27.

Shirazi, F.H., 2011. Remarks in Successful Cellular Investigations for Fighting Breast Cancer Using Novel Synthetic Compounds. In: Breast Cancer – Focusing Tumor Microenvironment, Stem Cells and Metastasis (Gunduz M, Gunduz E (eds.). Rijeka, InTech, pp. 85-102.

Sili, C., Torzillo, G. and Vonshak, A., 2012. *Arthrospira* (*Spirulina*). B.A. Whitton (ed.), Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time, © Springer Science+Business Media B.V. 677-705.

Silveira, S.T., Burkert, J.F., Costa, J.A.V., Burkert, C.A.V., Kalil, S.J., 2007. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design, Bioresour. Technol. 98, 1629–1634.

Slee, E.A., et al., 1999. Ordering the cytochrome c–initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2,-3,-6,-7,-8, and-10 in a caspase-9–dependent manner. The Journal of cell biology; 144(2): 281-292.

Śliżewska, A., Żymańczyk-Duda, E., 2021. Cyanobacteria as valuable tool in biotechnology, Catalysts 11 (1259)1–16 .

Sobiechowska-Sasim, M., Stoń-Egiert, J., Kosakowska, A., 2014. Quantitative analysis of extracted phycobilin pigments in cyanobacteria-an assessment of spectrophotometric and spectrofluorometric methods. J Appl Phycol. 2014;26(5):2065-2074.

Soo, R.M., Skennerton, C.T., Sekiguchi, Y., Imelfort, M., Paech, S.J., Dennis, P.G. et al., 2014. An expanded genomic representation of the phylum yanobacteria, Genome Biol Evol 6 (5) 1031–1045 .

Soule, HD., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M., 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. Journal of the National Cancer Institute. 51 (5): 1409–1416.

Stadnichuk, I.N., Krasil'nikov, P.M., Zlenko, D.V., 2015. Cyanobacterial Phycobilisomes and Phycobiliproteins. Mikrobiologiia. Mar-Apr; 84(2):131-43. Russian.

Subhashini, J., Mahipal, S.V., Reddy, M.C., Reddy, M.M., Rachamallu, A., Reddanna, P., 2004. Molecular mechanisms in C-phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. Biochem. Pharmacol., 68, 453–462.

Sukumaran, P., Dahlan, F.L., Omar, H., Ismail, A., 2014. Macro – and micronutrients status in *Arthrospira platensis* grown in fresh water and brackish water medium. Inernational J. Curr. Microbiol Appl. Sci. 2014, 3, 384−391.

Tavanandi, H.A., and Raghavarao, K.S.M.S., 2020. Ultrasound-assisted enzymatic extraction of natural food colorant C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*. LWT, 118, Article 108802.

Torres-Tiji, Y., Fields, F. J., & Mayfield, S. P., 2020. Microalgae as a future food source. Biotechnology Advances, 41, Article 107536.

Uribe-Wandurraga, Z.N., Martinez-Sanchez, I., Savall, C., Garcia-Segovia, P., & Martinez-Monzo, J., 2021. Microalgae fortification of low-fat oil-in-water food emulsions: An evaluation of the physicochemical and rheological properties Journal of Food Science and Technology, 58(10), 3701–3711.

Urso, L., Calabrese, F., Favaretto, A., Conte, P., Pasello, G., 2016. Critical review about MDM2 in cancer: Possible role in malignant mesothelioma and implications for treatment. Crit Rev Oncol Hematol. Jan;97:220-30.

Wang, F., Yu, X., Cui, Y., Xu, L., Huo, S., Ding, Z., Hu, Q., Xie, W., Xiao, H., Zhang, D., 2022. Efficient extraction of phycobiliproteins from dry biomass of *Spirulina platensis* using sodium chloride as extraction enhancer. Food Chem, Apr 16;406:135005.

Wang, H., Liu, Y., Gao, X., Carter, C.L., Liu, Z.R., 2007. The recombinant subunit of C-phycocyanin inhibits cell proliferation and induces apoptosis. Cancer Lett., 247, 150–158.

Wang J.J., Lei K F., Han F., 2018. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. Eur Rev Med Pharmacol Sci, Jun; 22(12):3855-3864. doi: 10.26355/eurrev_201806_15270. PMID: 29949179.

Watanabe, F., Katsura, H., Takenaka, S., Fujita, T., Abe, K., Tamura, Y., Nakatsuka, T., Nakano, Y., 1999. Pseudovitamin B(12) is the predominant cobamide of an algal health food, *spirulina* tablets. J. Agric. Food Chem., 47, 4736−41.

Wu, X.J., Yang, H., Sheng, Y., Zhu, Y., Li, P.P., 2018. Fluorescence Properties of a Novel Cyanobacteriochrome GAF Domain from *Spirulina* that Exhibits Moderate Dark Reversion. Int. J. Mol. Sci., 19, 2253.

Wyllie, A.H., Kerr, J.F., Currie, A.R., 1980. Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol 68: 251–306.

Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A.J., 2000. Surfing the p53 network. Nature 408,307–310.

Xie, Y., Li, W., Zhu, L., Zhai, S., Qin, S., Du, Z., 2019. Effects of phycocyanin in modulating the intestinal microbiota of mice. MicrobiologyOpen, 8, e00825.

Ying, J., Pan, R.W., Wang, M.F., Chen, J.S., Liu, Q., Zhang, H.Q., et al. Effects of phycocyanin on apoptosis of human laryngeal cancer HEP-2 cells. 2015; 31.

Yıldız, G., 2001. *Spirulina* sp. (*Cyanophyceae*) Kültürü Üzerine Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi. Su Ürünleri Anabilim Dalı. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İZMİR.

Yu, T., Wang, Y., Chen, X., Xiong, W., Tang, Y., Lin, L., 2020. *Spirulina platensis* alleviates chronic inflammation with modulation of gut microbiota and intestinal permeability in rats fed a high-fat diet. J. Cell. Mol. Med., 24, 8603–8613.

Zarouk, C., 1966. Contribution á l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthése de *Spirulina maxima* (Setch. et gardner) Geitler. Ph. D. Thesis, University of Paris, France.

ÖZGEÇMİŞ

Olfa TAHRI, Lise eğitimini Sers lisesinde tamamladı. Üniversite eğitimini Mannouba üniversitesi Institut Supérieur de Biotechnologie de Sidi Thabet (ISBST) Biyoteknoloji bölümünde 2017 yılında tamamladı. 2020 yılı güz döneminde Adana Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans başladı.