T.C.

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BESLENME VE DİYETETİK

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

BETANİNİN SAOS-2 OSTEOSARKOMA HÜCRE HATTINDA WNT/β-KATENİN VE PI3K/AKT/mTOR SİNYAL YOLAKLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

FATİME ALKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Esra ÖRENLİLİ YAYLAGÜL

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SBF-23004 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN–2024

KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı, Beslenme ve Diyetetik Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Fatime ALKAYA tarafından hazırlanan "Betaninin Saos-2 Osteosarkoma Hücre Hattında Wnt/β-Katenin ve PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolakları Üzerindeki Etkisinin Araştırılması" başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:11/11/2024

Üye (T.D.)	Dr. Öğr. Üyesi Esra ÖRENLİLİ YAYLAGÜL	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye	Doç. Dr. Mehmet SARIMAHMUT	Bursa Uludağ Üniversitesi
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Ayçıl ÖZTURAN ŞİRİN	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün …… tarih ve …… sayılı oturumunda alınan …… nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü V.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans sürecimde bilgi birikimini, ilgisini, yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Esra ÖRENLİLİ YAYLAGÜL'e,

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan laboratuvar ve cihaz paylaşımları için Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a ve Doç Dr. Özlem Sultan ASLANTÜRK'e,

Hayatımın her anında olduğu gibi yüksek lisans sürecimde de desteklerini her zaman hissettiğim dedem Zeki ALKAYA'ya, annem Ümmüsün ALKAYA, babam Bayram ALKAYA, kardeşlerim Fulya ve Aysu ALKAYA'ya,

Lise yıllarımızdan itibaren manevi desteğini ve yardımlarını esirgemeyen canım arkadaşım, meslektaşım Uzm. Dyt. Hilal TURNA'ya,

Yüksek lisansımın son döneminde tanıştığım ve bana hem evini hem de güzel kalbini açan değerli ablam Bilge SEVEROĞLU'na,

SBF-23004 numaralı "Betaninin Osteosarkoma Hücreleri Üzerine Etkileri" adlı proje kapsamında yapmış olduğum tezi desteklemelerinden dolayı Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Birimi'ne,

Yüksek Lisans eğitimim süresince 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında bana destek olan TÜBİTAK BİDEP'e

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY i

TEŞEKKÜR ii

İÇİNDEKİLER iii

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ v

ŞEKİLLER DİZİNİ vii

TABLOLAR DİZİNİ viii

ÖZET ix

ABSTRACT x

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 2

2.1. Kanser 2

2.1.1. Osteosarkoma 3

2.2. Kırmızı Pancar (*Beta vulgaris L.*) 5

2.3. Betanin 7

2.4. PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolağı 10

2.5. Wnt/ β-Katenin Sinyal Yolağı 14

2.6. Proliferasyon 16

2.7. Apoptoz 17

2.8. Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) 18

3. GEREÇ VE YÖNTEM 21

3.1. Hücre Hattı Kültür Koşulları 21

3.2. Betanin Hazırlanması 22

3.3. Hücre Canlılığının MTT Yöntemiyle Saptanması 22

3.4. Apoptoz Saptanması 23

3.5. Total RNA İzolasyonu 24

3.6. cDNA Sentezi 25

3.7. Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) 26

3.8. İstatistiksel Değerlendirme 28

3.9. Çalışmanın Sınırlılıkları 28

4. BULGULAR 29

4.1. Hücre Canlılık Testi 29

4.2. Apoptoz Testi 30

4.3. Betanin Uygulaması Sonrası İlgili Genlerin mRNA İfadeleri 31

4.3.1. PI3K 31

4.3.2. AKT 32

4.3.3. mTOR 33

4.3.4 β-katenin 34

4.3.5 GSK-3β 35

5. TARTIŞMA 36

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 42

KAYNAKLAR 44

BİLİMSEL ETİK BEYANI 55

ÖZ GEÇMİŞ 56

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C:	: Derece Celsius
µg:	: Mikro gram
µM:	: Mikro molar
ACS	: American Cancer Society
AKT	: Protein kinaz B – Serin/threonin kinaz
ATP	: Adenozin trifosfat
CO_2	: Karbondioksit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksirbonükleik asit
FAS	: Hücre yüzey ölüm reseptörü
FBS	: Fetal Sığır Serumu
GSK-3ß	: Glikojen sentaz kinaz-3ß
GTP	: Guanozin trifosfat
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
HepG2	: Karaciğer kanseri hücre hattı
IARC	: International Agency for Research on Cancer
IC_{50}	: Yarı maksimal inhibitör konsantrasyonu
IR	: İskemireperfüzyon
ml	: Mililitre
mTOR	: Rapamisin Kinazın Mekanik Hedefi
mTORC1	: Rapamisin Kinazın Mekanik Hedef Kompleksi 1
mTORC2	: Rapamisin Kinazın Mekanik Hedef Kompleksi 2
MTT	: 3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
Myc	: Miyolostomatoz onkogeni
NCI	: National Cancer Instıtute
nm	: Nanometre (dalga boyu birimi)
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PDK1	: Fosfoinositid bağımlı protein kinaz 1

PI3K	: Fosfotidilinositol-3-kinazlar
PIP2	: Fosfotidilinositol-4,5 bifosfat
PIP3	: Fosfotidilinositol-3,4,5 trifosfat
PTEN	: Fosfotaz Tensin Homoloğu
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RTK	: Reseptör Tirozin Kinazlar
RT-PCR	: Real time – Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Tripsin-EDTA	: Tripsin Etilendiamin tetraasetik asit
UV	: Ultraviyole
WHO	: World Health Organization -Dünya Sağlık Örgütü
Wnt	: Wingless-related integration side

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı …… 12

Şekil 2. Wnt sinyal yolağı ……..……..……..……. 15

Şekil 3. Artan floresana karşı PCR döngüsü sayısı ……. 19

Şekil 4. Muse Annexin V ölçümünde elde edilen hücre profilleri…….. 23

Şekil 5. Betaninin Saos-2 hücrelerinin canlılığına etkileri…… 29

Şekil 6. Uygulanan betanin konsantrasyonlarına ait 24. ve 48. saatlerdeki apoptotik hücre yüzdelerindeki değişim……. 30

Şekil 7. Betanin uygulamasından sonra PI3K mRNA ifadesi…… 31

Şekil 8. Betanin uygulamasından sonra AKT mRNA ifadesi…….. 32

Şekil 9. Betanin uygulamasından sonra mTOR mRNA ifadesi…… 33

Şekil 10. Betanin uygulamasından sonra β-katenin mRNA ifadesi…… 34

Şekil 11. Betanin uygulamasından sonra GSK-3β mRNA ifadesi……. 35

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. cDNA sentezi reaksiyon karışımı içeriği……...…… 26
Tablo 2. cDNA sentezi reaksiyon koşulları…….. 26
Tablo 3. Real-Time PCR için kullanılan primerler ……. 27
Tablo 4. Real-Time PCR için reaksiyon karışımları …… 27
Tablo 5. Real-Time PCR reaksiyon koşulları……..……..…….. 27

ÖZET

BETANİNİN SAOS-2 OSTEOSARKOMA HÜCRE HATTINDA WNT/β-KATENİN VE PI3K/AKT/mTOR SİNYAL YOLAKLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Alkaya F. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Beslenme ve Diyetetik Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2024.

Amaç: Bu araştırmada kırmızı pancar (*Beta vulgaris*) bileşeni betaninin Saos-2 insan osteosarkoma hücrelerinde Wnt/β-katenin ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolakları üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Araştırmada osteosarkoma hücre hattı Saos-2 kullanılmıştır. Betaninin hücre canlılığına olan etkisini belirlemek amacıyla 25-400 µM doz aralığında uygulama yapılarak, 24-48. saat sonunda MTT hücre canlılık testi ile etkinliği belirlenmiştir. Süre ve doza bağlı olarak elde edilen proliferasyon grafiğinden apoptoz ve RT-PCR çalışmaları için uygun doz belirlenmiştir. Bu dozlarda uygulama yapılarak Muse hücre analiz cihazında Muse Annexin V kiti ile apoptoz tespit edilmiştir. Gerçek zamanlı PCR yöntemi ile PI3K/AKT/mTOR ve Wnt/β-katenin sinyal yolaklarında bulunan genlerinin ifadeleri mRNA düzeyinde belirlenmiştir. İstatistiksel analizler IBM SPSS (v25) programında bağımsız örneklem t-testi kullanılarak yapılmıştır ($p<0,05$).

Bulgular: Saos-2 hücrelerinin %50'sini inhibe eden betanin dozunun 330 µM olduğu hesaplanmıştır. Ayrıca, betanin uygulamasıyla Saos-2 hücrelerinde apoptozun doza bağlı olarak arttığı bulunmuştur. Aynı zamanda betanin uygulamasının PI3K, AKT, mTOR ve β-katenin mRNA ifadelerini azaltırken, GSK-3β mRNA ifadesini anlamlı olarak arttırdığı belirlenmiştir.

Sonuç: Betaninin osteosarkoma hücrelerinde proliferasyonu baskılayıp apoptozu indüklediği, aynı zamanda da Wnt/β-katenin ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolları aracılığı ile *in vitro* tümör baskılanmasını sağlayabileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: Betanin, Osteosarkom, Apoptoz, RT-PCR, PI3K/AKT/mTOR, Wnt/β-katenin.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF BETANIN ON WNT/β-CATENIN AND PI3K/AKT/mTOR SIGNALLING PATHWAYS IN SAOS-2 OSTEOSARCOMA CELL LINE

Alkaya F. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Nutrition and Dietetic Program, Master Thesis, Aydın, 2024.

Objective: This study aimed to determine the effect of red beet (*Beta vulgaris*) component betanin on Wnt/β-catenin and PI3K/AKT/mTOR signaling pathways in Saos-2 human osteosarcoma cells.

Material and Methods: The osteosarcoma cell line Saos-2 was used in this study. In order to determine the effect of betanin on cell viability, a dose range of 25- 400 µM was applied and the cell viability was evaluated after 24- 48 hours using the MTT assay. The proliferation curve obtained as a function of time and dose was analysed to determine the appropriate dose for apoptosis and RT-PCR studies. Apoptosis was detected at these selected doses using the Muse Cell Analyzer with the Muse Annexin V Kit. Expression of genes in the PI3K/AKT/mTOR and Wnt/β-catenin signalling pathways was measured at the mRNA level using real-time PCR. Statistical analyses were performed using the independent sample t-test ($p<0,05$) in the IBM SPSS software (v25).

Results: The dose of betanin that inhibited 50% of Saos-2 cells was 330 µM. Furthermore, betanin treatment was found to increase apoptosis in Saos-2 cells in a dose-dependent manner. In addition, betanin treatment significantly decreased PI3K, AKT, mTOR and β-catenin mRNA expression while significantly increasing GSK-3β mRNA expression.

Conclusion: Betanine suppresses proliferation and induces apoptosis in osteosarcoma cells and may also induce tumour suppression *in vitro* via the Wnt/β-catenin and PI3K/AKT/mTOR signalling pathways.

Keywords: Betanin, Osteosarcoma, Apoptosis, RT-PCR, PI3K/AKT/mTOR, Wnt/β-catenin.

1. GİRİŞ

Kanser türleri içerisinde kemik kanserleri, çocukluk çağı kanserlerinin %3-5'ini yetişkinlik çağı kanserlerinin %1'inden azını oluşturmaktadır. Bunlardan osteosarkoma en sık teşhis edilen, genellikle çocuklar ve genç ergenlerde görülen primer malign kemik tümörüdür (Hız, M., 2014; Göktürk, D.,2018; Özdemir, A., 2022). Osteosarkoma tedavisi, cerrahi işlem ile tümörlü kısmın uzaklaştırılmasına ve histopatolojik değerlendirmeye göre kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi uygulamalarına dayanmaktadır (Hız, M., 2014; Zhou ve diğerleri, 2022).

Osteosarkomanın çocuklarda ve gençlerde yaygın görülmesi, teşhisinin zor, metastaz riskinin yüksek olması ve mevcut tedavi yöntemlerinin yan etkilerinin fazla olması sağ kalım oranlarını düşürmektedir (Liu ve diğerleri, 2023; Zhou ve diğerleri, 2022). Bu durum kanser araştırmacılarını sağlıklı hücrelerde sitotoksik etki göstermeyen antikanserojen özellikleri tespit edilen doğal biyoaktif bileşiklere yönlendirmiştir (Li ve diğerleri, 2020; Liu ve diğerleri, 2023; Qui ve diğerleri, 2019; Rakshanaa ve diğerleri, 2022; Wang ve diğerleri, 2023; Xu ve diğerleri, 2023). Kırmızı pancarda (*Beta vulgaris*) en fazla bulunan ve karakteristik kırmızı rengini veren biyoaktif bileşik betaninin meme, kolon, karaciğer, yumurtalık, pankreas, akciğer, prostat, oral skuamöz hücreli karsinom, rahim ağzı kanseri hücre hatlarında apoptozu indükleyerek antikanserojen etkiler gösterdiği bulunmuştur (Chandrasekaran ve diğerleri, 2021; Kapadia ve diğerleri, 2013; Lee ve diğerleri, 2014; Rakshanaa ve diğerleri, 2022; Romero ve diğerleri, 2021; Saber ve diğerleri, 2023; Zou ve diğerleri, 2022). Betaninin osteosarkoma üzerindeki etkisini Liu ve diğerleri (2023) MG-63 osteosarkoma hücre hattı üzerinden araştırmışlar ve betaninin kemik karsinomu terapötiklerinde potansiyel olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Bu çalışma ile, tedavisi zorlu ve sağ kalım oranları düşük osteosarkomada doğal bir biyoaktif bileşen olan betaninin Saos-2 osteosarkoma hücre hattında PI3K/AKT/mTOR ve Wnt/β-katenin sinyal yolakları üzerine etkisinin araştırılması, aynı zamanda küresel bir halk sağlığı sorunu haline gelmiş olan kanserin önlenmesi ve tedavisinde beslenmenin etkinliğinin gözlemlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde hızla büyümesi ve vücudun diğer bölgelerine yayılmasıyla hemen hemen her organda veya dokuda oluşabilen yaygın bir hastalıktır (Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI), 2021). Kanser kelimesinin kökeni, 'Tıbbın Babası' olarak kabul edilen Hipokrat'ın bir tümörün kesit yüzeyindeki damarları yengece benzeterek Yunanca 'Karkinos' Carsinus' terimini kullanmasına, Romalı hekim Celsus'un bu terimi Latince 'cancer' kelimesine çevirmesine dayanmaktadır (American Cancer Society (ACS), 2018). Tarihte en erken kanser tarifinin MÖ 3000'li yıllarda Eski Mısır mumyalarında veya papirüslerinde bulunduğu, sırasıyla kemik tümörü ve meme kanseri için yapıldığı belirtilmiştir (American Cancer Society (ACS), 2018). Oluştuğu doku veya organa bağlı olarak 100'den fazla kanser türü saptanmıştır. Belirli hücre tiplerine göre bazı kanser türleri aşağıdaki gibidir:

- Karsinoma: Epitel hücrelerden köken alan meme, kolon, mide, prostat, akciğer, böbrek gibi neredeyse tüm kanser türlerini kapsayan alt gruptur.
- Sarkoma: Kemik ve yumuşak doku tümörleri olup mezenkimal hücrelerden köken alırlar. En yaygın kemik tümörü Osteosarkoma, en yaygın yumuşak doku tümörü ise Leiomyosarkomadır.
- Lenfoma: Bağışıklık sistemi hücreleri olan T ve B hücrelerinde başlayan kanserlerdir. Temelde Hodgkin ve Non-Hodgking şeklinde iki ana grupta sınıflandırılırlar.
- Lösemi: Kemik iliğinin kan yapıcı dokusunda başlar. Hastalığın ilerlemesine (akut veya kronik) ve kanserin köken aldığı kan hücresi (Lenfoblastik veya myeloid) tipine bağlı olarak dört yaygın türü vardır.
- Multipl miyelom: Aynı zamanda Kahler hastalığı olarakta bilinen miyelomlar bağışıklık hücresi olan plazma hücrelerinde oluşurlar. Kemik iliğinde birikerek vücuttaki tüm kemiklere yayılım gösterebilirler.
- Melanoma: Melanin pigmenti (cilde rengini veren) üreten melanositlerde başlayan kanser türüdür.

- Germ Hücreli Tümör: Germ hücreleri (sperm ve yumurta) üreten dokularda (testis ve yumurtalık) başlayan tümörlerdir (National Cancer Institute (NCI), 2021).

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı'nın (IARC) Global Cancer Observatory (Globocan 2022) araştırmasının verilerine göre, 2022 yılında 19,97 milyon yeni kanser vakası tespit edilmiş; akciğer, meme ve kolorektum kanserleri sırasıyla en fazla görülen kanser türleri olup kanser kaynaklı ölümlere ise sırasıyla akciğer, kolorektum ve karaciğer kanserlerinin neden olduğu ve 2022 yılı için bu sayının 9,7 milyon olduğu belirtilmiştir (Ferlay ve diğerleri, 2024). 2050 yılında 35,3 milyon yeni kanser vakasının olacağı ve kanser sebepli ölümlerin 18,5 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), 2022).

Geçmişten günümüze kanser tanı, tedavi ve yönetiminde çok önemli gelişmeler olmasına rağmen yukarıda verilen oran ve rakamlar kanserin küresel halk sağlığı sorunu olduğunu ve dünyadaki kanser yükünün arttığını göstermektedir. Kanser tedavisinde, sahip olunan kanserin türü ve ilerleme seviyesine bağlı olarak genelde cerrahi işlem, kemoterapi ve/veya radyoterapi kombinasyonları uygulanmaktadır ancak bu tedavilerin istenmeyen yan etkilerinin olduğu ve tedavi sürecini olumsuz etkilediği de bilinmektedir. Kanserin oluşumunu önlemek ve hayatta kalma oranı yüksek tedaviler geliştirmek amacıyla kanser gelişim mekanizmalarında etkili genler, yolaklar, metastaz süreci, apoptozdan kaçma ve anjiyogenez gibi belirli karakteristik özelliklerde etkili olabilecek yan etkisi az yeni ilaçlar veya bileşenler elde etmek için çalışmalar yürütülmektedir (National Cancer Institute (NCI), 2021).

2.1.1. Osteosarkoma

Yunanca sarkos (et) ve sarkōma (et çıkıntısı) kelimelerinden türeyen "sarkomalar" kemik (osteosarkom (OS), kondrosarkom, Ewig sarkomu) ve yumuşak doku (kas, yağ, kan damarları, fibröz bağ dokusu ve periferik sinirler) mezenkimal hücrelerinde oluşan nadir görülen kötü huylu katı tümörlerdir (Rothzerg ve diğerleri, 2023). En çok görülen sarkoma türü olan olgunlaşmamış kemik veya osteoid doku üreten osteoblastlarla karakterize osteosarkoma primer malign (kötü huylu) kemik tümörü olarak tanımlanmaktadır (Beird ve diğerleri, 2022). Osteosarkomalar yetişkinlerde nadir görülen bir kanser türü olup yer yıl Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) teşhis edilen yaklaşık 1000 yeni vakanın yarısının çocuk ve ergenler

olduğu bildirilmiştir (Beird ve diğerleri, 2022). Osteosarkoma insidansının bölgesel olarak Güney Amerika ve Afrika'da etnik olarak ise siyahı bireylerde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Cole ve diğerleri, 2022).

Osteosarkoma risk faktörleri, kemik döngüsü, yaş, cinsiyet, çevre (kemiğe radyasyon, kemoterapi) ve genetik eğilim olarak belirtilmiştir (Kansara ve diğerleri, 2014). Vücuttaki herhangi bir kemikte oluşabilirler ancak yaygın olarak uyluk, kaval ve kol kemiklerinin metafizyal büyüme plakası yakınında meydana gelen osteosarkomalar, genellikle etkilenen kemiğin yakınında ağrı, şişlik, hassasiyet, iltihaplanma ve hastada ateş, yorgunluk, kilo kaybı, halsizlik gibi sendromlarla karakterizedirler (Kansara ve diğerleri, 2014; Rothzerg ve diğerleri, 2023).

Hastalığın kesin tanısı biyopsi ile alınan dokunun histopatolojik değerlendirmesiyle yapılmaktadır. Osteosarkomalar, tümörün histolojisine, genetik özelliklerine, konumuna göre farklı alt tiplerde sınıflandırılmışlardır. Bu kapsamda Dünya Sağlık Örgütü (WHO) osteosarkomayı histolojik olarak merkezi (medüller) ve yüzeysel (periferik) olmak üzere iki kategoride değerlendirmiştir. Merkezi (medüller) osteosarkoma alt tipleri: konvansiyonel, telenjiektatik, düşük dereceli ve küçük hücreli; yüzeyel(periferik) osteosarkoma alt tipleri: Parosteol, periosteol, yüksek dereceli osteosarkomalardır. (Choi ve diğerleri, 2021; Rothzerg ve diğerleri, 2023). Osteosarkomanın geleneksel tedavisi cerrahi işlem, neoadjuvan ve adjuvan kemoterapi kombinasyonu olup tümörün konumu, büyüklüğü, türü ve metastaz durumuna göre tedavi şekillenmektedir (Misaghi ve diğerleri, 2018). Genellikle uyluk, kaval ve kol kemikleri gibi uzun kemiklerin orta kısımlarında oluşan, cinsel bezlerin aktif çalışmasıyla birlikte ergenlikte daha sık, erkeklerde kızlardan iki kat fazla görülen osteosarkomalar agresif, lokalde tahrip edici ve aynı zamanda yüksek metastaz potansiyeline sahiptirler (Hız, M., 2014; Göktürk, D.,2018; Özdemir, A., 2022).

Kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi gibi kanser tedavi yöntemlerinin tedavinin yanı sıra istenmeyen yan etkilerinin de olduğu ve bunların tedavi sürecini olumsuz etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle son yıllarda yan etkisi olmayan antikanserojen etki gösterdiği belirtilen biyoaktif bileşenlere ilgi artmış ve bu alanda çalışmalar yapılmıştır.

2.2.Kırmızı Pancar (*Beta vulgaris L.*)

Kırmızı pancar (*Beta vulgaris L.*) *Chenopodiacae* ailesine mensup, anavatanı Akdeniz bölgesi olan son zamanlarda Avrupa, Asya ve Amerika'da yaygın olarak yetiştirilen, yenilebilir kazık kök içeren otsu, çiçekli, iki yıllık bir bitkidir (Kaynak ve diğerleri, 2024; Punia Bangar ve diğerleri, 2022; Skezely ve Mate, 2022). 15. Yüzyılda Romalılar tarafından yaprakları için yetiştirilen kırmızı pancar günümüzde çiğ veya pişmiş olarak turşu, salata, meyve suyu, reçel yapımında kullanılmakla birlikte içeriğindeki suda çözünebilen nitratlar sayesinde kırmızı rengi vermesi nedeniyle gıda sanayisinde E162 koduyla doğal renklendirici olarak da kullanılmaktadır (Punia Bangar ve diğerleri, 2022). Kırmızı pancar gıda sanayisinde renklendirici özelliğinin yanı sıra antioksidan, antimikrobiyal özelliklerinden dolayı da gıdaların zenginleştirilmesini, raf ömürlerinin uzatılmasını ve yenilebilir akıllı filmlerin üretilmesini sağlamaktadır (Bakırcı,2024).

USDA'ya göre %87'si su, %9,56'sı karbonhidrat, %1,61'i protein, %0,17'si yağ olan kırmızı pancarın 100 gramı 43 kaloridir ve potasyum (325 mg), fosfor (40 mg), kalsiyum, (16 mg), demir (0,8 mg), C vitamini (4,9 mg), B12 hariç diğer B vitaminlerinden zengin bir besindir (U.S. Department of Agriculture (USDA), 2019). Suda çözünür pigmentler olarak bilinen betalainlerin en zengin kaynağı olan kırmızı pancar, flavonoidler, kumarinler, karotenoidler, triterpenler, fitosteroller, askorbik asit, fenolik bileşikler gibi güçlü antioksidan özellik gösteren biyoaktif bileşenleri büyük miktarda içermektedir (Hadipour ve diğerleri, 2020; Punia Bangar ve diğerleri, 2022).

Kanser hastalarının diyetinde kırmızı pancarın etkinliğinin araştırıldığı klinik çalışmalar yetersiz olmasına rağmen, kanser hastaları tarafından kullanılan bitkisel ilaçlar ve fonksiyonel gıdaların araştırıldığı bir çalışmaya göre; katılımcıların %29'unun fonksiyonel gıda olarak kırmızı pancar (suyu sıkılmış veya tozu suyla karıştırılmış olarak) tercih ettiği belirtilmiştir. Ayrıca bu hastaların %39'unun bitkisel ilaç ve fonksiyonel gıda kullanımına diğer hastaların tavsiyesiyle başladığı ve %47'sinin bitkisel ilaç ve fonksiyonel gıda takviyelerinin durumlarının yönetimine faydalı olduğuna inandıkları belirtilmiştir (Clement ve diğerleri, 2016). Kanser çalışmalarında kırmızı pancarın (*Beta vulgaris L.*) kullanımına ilişkin yapılan literatür araştırmalarımız sonucunda çalışmaların öncelikli olarak kanser hücre hatlarında kırmızı pancarın antikanser ve kemopreventif özelliklerinin değerlendirilmesine odaklandığı tespit edilmiştir (Swartz ve diğerleri, 2019).

Kırmızı pancarın genç sürgünlerinden ve tam olgunluktaki köklerinden elde edilen meyve suları *in vitro* model bir gastrointestinal sistemde sindirim ve emilim sürecine tabi tutularak MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bu çalışmada genç sürgünlerden elde edilen meyve suyunun kökten elde edilen meyve suyuna kıyasla toplam polifenol içeriğinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Kanser hücre hatlarının her ikisinde de genç sürgünlerden elde edilmiş sindirilmiş meyve suyunun (%27,8) kökten elde edilen sindirilmiş meyve suyuna (%22,9) oranla hücre çoğalmasını daha fazla engellediği ve apoptozda da benzer şekilde etkili olduğu belirtilmiştir (Piasna-Słupecka ve diğerleri, 2023).

Kırmızı pancar suyunun doksorubusin kaynaklı kardiyositotoksisiteye karşı koruyucu etkisini ve meme kanseri hücre hattında (MDA-MB-231) kırmızı pancar suyu+doksorubusin kombinasyonunun kanser hücresi proliferasyonuna etkileri Das ve diğerleri (2016) tarafından araştırılmıştır. Çalışmaları sonucunda kırmızı pancar suyunun doksorubusin kaynaklı kardiyositotoksisiteye karşı koruyucu olduğunu ve kırmızı pancar suyu+doksorubusin kombinasyonunun kontrol ve sadece doksorobusin uygulamalarına kıyasla kanserli hücre ölümünü önemli ölçüde arttırdığını bulmuşlardır. Antikanser çalışmalarında genellikle kırmızı pancarın suyu, özütü ve kurutulmuş formları kullanılmaktadır.

Kırmızı pancarın gıda sanayisinde kullanılan işlem görmüş formunu değerlendirmek amacıyla kırmızı pancar kabuğundan elde edilen un su ve alkolde çözülerek biyoaktif bileşen içerikleri ve antioksidan, antikanser özellikleri araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda kırmızı pancar kabuğundan elde edilen unun sulu çözeltisinin MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerinde etkili olduğunu ve hücre canlılığını doz ve zamana bağlı olarak azalttığını, MCF-7 hücrelerinin (östrojen reseptör pozitif) canlılığını doza bağlı olarak azalttığı bulunmuştur. Kısaca kırmızı pancar kabuğunun un elde etmek için işlenmesiyle oluşan termal bozunmaya rağmen hala ilgili antioksidan ve antikanser aktiviteleri gösterdiği ve genellikikle atık olarak değerlendirilen kırmızı pancar kabuğunun gıda sanayisinde alternatif ürün olarak kullanımının desteklendiği belirtilmiştir (Coimbra ve diğerleri, 2023).

Kırmızı pancarın antikanser özellikleri üzerine yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde pancarın yaprak, kök, kabuk gibi birçok parçasının biyoaktif bileşenlerinin incelendiği, kırmızı pancarın polifenol, nitrat, flavonol ve betalainlerin zengin kaynağı olduğu, bu biyoaktif bileşenlerin etkisiyle güçlü antioksidan, antikanser, kemopreventif etkilere sahip olduğu bulunmuştur (Coimbra ve diğerleri, 2023; Das ve diğerleri, 2016; Piasna-Słupecka ve diğerleri, 2023). Ancak araştırmacılar bu antioksidan, antikanser etkilerin daha çok hangi biyoaktif

bileşen sayesinde gösterildiğini belirlemek amacıyla kırmızı pancar da en fazla bulunan bileşik olan betalainlere odaklanmışlardır (Szekely ve Mate, 2022).

Kırmızı pancarda yüksek konsantrasyonda bulunan betalainler, betalamik asit [4-(2-oksoetiliden)-1,2,3,4-tetrahidropiridin-2,6-dikarboksilik asit] olarak adlandırılan azotlu bir çekirdek yapısından oluşan suda çözünür, tirozin türevli heterosiklik bileşiklerdir (Baião ve diğerleri, 2017; Polturak ve Aharoni, 2019; Rahimi ve diğerleri, 2019). Betalainler, kimyasal yapılarına göre sarı-turuncu renk oluşumunu sağlayan betaksantinler (vulgaksantin I ve II, indikaksantin), ve kırmızı-mor renk oluşumunu sağalayan betasiyaninler (betanin, izobetanin, prebetanin, amaranthine) şeklinde iki alt sınıfa ayrılırlar. (Baião ve diğerleri, 2017; Şimşek, A., 2019). Betaksantinler ve betasiyaninlerin görünür ışığı yapısal farklılıklarından dolayı sırasıyla 480 ve 586 dalga boylarında (λm) absorbe edebildikleri belirtilmiştir (Baião ve diğerleri, 2017; Özyurt ve diğerleri, 2019)

Gıdanın üretimi ve depolanması sırasında gıdanın renginin stabil olması önemli bir durum olduğu için renklendirmede kullanılan betalainin stabilitesi de önemlidir. Betalainlerin stabilitesi sıcaklık, pH değeri, oksijen, su aktivitesi, ışık gibi eksojen ve betalain türü, konsantrasyonu gibi endojen etmenlerden etkilenebilir. Ayrıca antioksidanlar ve şelatlayıcı ajanların stabilizör etki göstererek betalainlerin stabilizasyonuna katkı sağladıkları bildirilmiştir (Esatbeyoğlu ve diğerleri, 2015; Özyurt ve diğerleri, 2019).

Taze kırmızı pancar 100 gramında 380 mg betalain içermektedir. Pancarın mevcut renginin %75-90'ını oluşturan betanin, kırmızı pancarda bulunan en yoğun betalain pigmentidir (Akan ve diğerleri, 2019). Kırmızı pancarın bu biyoaktif bileşenlerin zengin kaynağı olması sayesinde güçlü antioksidan, antiinflamatuar aktivitelere sahip olduğu ve diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, karaciğer hasarı ve kanser gibi hastalıklara karşı koruyucu özellikler gösterdiği belirtilmektedir (Ceclu ve Nistar, 2020). Antikanser özelliklerinin araştırıldığı çalışmalar genellikle en yoğun bulunan pigment olan betanine odaklanmıştır.

2.3.Betanin

Kırmızı pancara (*Beta vulgaris*) karakteristik kırmızı rengini veren, betalainlerin glukozillenmiş alt grubu betasiyaninlerin en yaygını olan betanin (betanidin 5- *O* -β- d - glukozit) E162 koduyla gıda renklendiricisi olarak kullanılan biyoaktif bir bileşendir (Calva-

Estrada ve diğerleri, 2022; Silva ve diğerleri, 2019). Betanin gıda endüstrisinde; domates sosları, çorbalar, tatlılar, reçeller, jöleler, dondurma ve kahvaltılık gevreklerde, salata soslarında, toz içecek, krema, puding, alkolsüz içeceklerde doğal gıda boyası olarak kullanılmaktadır (Özyurt ve diğerleri, 2019; Şimşek, A., 2019).

Betaninin gıdalarda bu kadar geniş bir yelpazede kullanılmasında renklendirme özelliğinin yanı sıra antioksidan (Silva ve diğerleri, 2019; Swarna ve diğerleri, 2013; Turp ve diğerleri, 2016), antimikrobiyal (Schneider-Teixeira ve diğerleri, 2022) ve antiproliferatif (Toth ve diğerleri, 2019) biyolojik özelliklere sahip olması da önemli bir rol oynamaktadır (Özyurt ve diğerleri, 2019). Örneğin kırmızı pancar tozunun sosis üretiminde hem doğal renklendirici hem de antioksidan olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Turp ve diğerleri, 2016). Bu özellikleri dikkate alınarak gıda endüstrisinde gıda ambalajlama alanında da kullanılabileceği düşünülüp yenilenebilir filmlerde betanin uygulamaları değerlendirilmiştir.

Kurkumin (E-100), betanin (E-162) ve antosiyanin (E-163) gibi doğal renklendiricilerin jelatin film özellikleri üzerindeki etkileri Etxabide ve diğerleri (2021) tarafından incelenmiştir. Çalışma sonuçları doğal renklendiricilerle hazırlanan filmlerin homojen, şeffaf ve gıda paketleme uygulamaları için arzu edilen özellikler olan UV (ultraviyole) ışığa karşı yüksek direnç gösterdiklerini, renklendiricilerin farklı konsantrasyonlarda eklenmesinin filmlerin renk ve ıslanabilirlik özelliklerini etkilediğini, ışığa karşı koruyuculuğu arttırdığını göstermiştir. Ek olarak betanin içeren filmden gıdaya renklendirici madde salınımının diğerlerinden daha az olduğu yani betaninin daha iyi renk tutma kapasitesi gösterdiği belirtilmiştir. Bunu destekleyen birçok çalışma betaninin yenilebilir akıllı filmlerde kullanılabileceğini ancak yine de daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu bildirmektedir (Jambroz ve diğerleri, 2019; Qin ve diğerleri, 2020; Yao ve diğerleri, 2020).

Betaninin gıda endüstrisindeki kullanımından farklı olarak sağlık üzerinde antioksidan (Silva ve diğerleri, 2019; Swarna ve diğerleri, 2013; Turp ve diğerleri, 2016;), antilipidemik (Amjadi ve diğerleri, 2019), antidiyabetik (Sutariya ve Saraf, 2017), antienflamatuar (Toth ve diğerleri (2019), antikardiyovasküler (Mahami ve diğerleri (2022), antikanser (Toth ve diğerleri, 2019) antikemoterapatik (Lechner ve Stoner, 2019) etkilerinin olduğu bilinmektedir.

Betaninin radikal süpürücü etkisi, insan karaciğer-kolon kanserli hücre hattı kültürlerinde DNA (deoksiribonükleik asit) hasarını önleyici yetenekleri değerlendirilmiştir. Betaninin doza bağlı olarak sırasıyla 2,2 difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)> galvinoksil> süperoksit>hidroksil radikallerini süpürdüğü, 25 µM H_2O_2 (hidrojen peroksit) uygulanan kolon kanseri hücre

hatlarında DNA hasarı oluştuğu ve bunun 15 µM betanin uygulanmasıyla bir kısmının önlenebildiği belirtilmiştir. Karaciğer hepatoma hücre kültürlerine artan konsantrasyonda (1-15 µM) betanin uygulandığında antioksidan savunmada önemli olan proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olan Nrf2'nin (nükleer faktör eritrosit-2 ile ilişkili faktör 2) önemli ölçüde indüklendiği bildirilmiştir (Esatbeyoğlu ve diğerleri, 2015).

Bir başka çalışmada N-nitrozometilamin (NMBA) ile indüklenmiş özofagus tümörlü ratlara oral yolla betanin (E162) içeren su verilmiş ve NMBA'nın neden olduğu özofagus papillomlarının %45 azaldığı tespit edilmiştir. Etkili olan kemopreventive (kanser önleyici) mekanizmayı belirlemek için özofagus doku örneklerinde çeşitli boyama yöntemleriyle anjiyogenez, apoptoz ve inflamasyon değerlendirmesi yapmılmıştır. Betanin tüketen sıçanlarda anjiyogenez ve inflamasyon seviyelerinin azaldığı apoptik oranın arttığı belirtilmiştir (Lechner ve diğerleri, 2010).

Betaninin parenteral ön tedavisinin, jejunal iskemireperfüzyon (IR) hasarı sonrası inflamatuar yanıtı ve jejunal-pulmoner dokuların histolojik yapısı üzerine etkisini incelendiği bir çalışmada, IR öncesi betanin uygulamasının jejunal mukozayı ve akciğer parankimini koruduğunu ayrıca intestinal IR hasarından sonra inflamatuar hücre yoğunluğunu azalttığı bulunmuştur (Toth ve diğerleri, 2019).

Betaninden zengin kırmızı pancar özü, meme kanseri hücrelerine (MCF-7) uygulanarak apoptoz ve otofajik hücre ölümü üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. 25 µM betanin/izobetanin konsantresinin kanser hücresi proliferasyonunu önemli ölçüde azalttığı, apoptoz ile ilişkili proteinlerin (Bad (hücre ölümünün Bcl2 ile ilişkili antogonisti), TRAILR4 (TNF ilişkili apoptoz indükleyen ligand reseptörü 4), FAS (hücre yüzey ölüm reseptörü), p53 (protein 53)) ekpsresyonunu arttırdığı ve mitokondriyal membran potansiyelini değiştirdiği böylece hem içsel hem de dışsal apoptik yolların dahil olduğu, MCF-7 hücrelerinde otofagozom veziküllerin gözlendiği dolayısıyla otofajik hücre ölümünün düşünüldüğü belirtilmiştir. Ayrıca bu uygulama da betanin/izobetaninin ekstraktının normal hücre hatlarında belirgin bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir (Nowacki ve diğerleri, 2015).

Betaninin kanser oluşum ve önleme mekanizmalarındaki etkilerine ek olarak bazı kanser ilaçlarıyla sinerjistik etki gösterdiği, ilacın etkinliğini arttırıp yan etkilerini azalttığını belirten çalışmalar da mevcuttur (Amjadi ve diğerleri, 2019). Bu doğrultuda Kapadia ve diğerleri (2013) insan kaynaklı pankreas (PaCa), meme (MCF7) ve prostat (PC-3) tümör hücrelerinde doksorubisin ile kırmızı pancar özütünün (betaninin) sinerjistik antiproliferatif etkisini

değerlendirmişlerdir. Ulaştıkları sonuç test edilen 3 insan kanser hücresi hattında da betanin+doksorubisin uygulamasında ilaç konsantrasyonunda pozitif azalmaya ulaşıldığı, sinerjistik sitotoksisitenin PaCa hücrelerinde IC50, IC75 ve IC90 doz seviyelerinde 1:5 B:D oranında ve MCF-7 hücrelerinde IC_{90} doz seviyesinde en etkili olduğu şeklindedir (Kapadia ve diğerleri, 2013).

Tüm bu veriler ele alındığında, betaninin hem serbest radikal süpürücü hem de endojen hücresel enzimatik antioksidan savunma mekanizmalarının indükleyicisi olarak hareket ettiği sonucuna varılmıştır.

2.4. PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolağı

Hücreye gelen uyarıları, hücre homeostazını sağlamak için hücresel fonksiyonları düzenleyen hücre içi hedeflere ileten sistem, sinyal iletim yolakları olarak adlandırılmaktadır (Hoxhaj ve Manning, 2020). Hücrenin büyümesi, çoğalması, hayatta kalması, bölünmesi ve ölmesi gibi bütün metabolik süreçlerinin düzenlendiği bu yolakların anormal aktivasyonlarının başta kanser olmak üzere farklı hastalıkların gelişimine neden olduğu bilinmektedir (Fruman ve diğerleri, 2017; Huang ve diğerleri, 2019; Wang ve diğerleri, 2019).

PI3K/AKT sinyal ağı, reseptör tirozin kinazlar (RTK), B ve T hücre reseptörleri, G proteinine bağlı reseptörler (GPRC), sitokin reseptörleri ve çeşitli integridinler tarafından aktive edilebilir (Hoxhaj ve Manning., 2020; Nepstad ve diğerleri, 2020).

Fosfotidilinositol-3-kinazlar (PI3K) yapısal özelliklerine ve substrat özgünlüklerine göre 3 farklı sınıfa ayrılan (sınıf I, II, III), düzenleyici (p85) ve katalitik (p110) alt birimlerden oluşan ve a, β, δ, γ olmak üzere 4 izo formu olan Serin (Ser) / Threonin (Thr) kinaz heterodimerlerdir (Nepstad ve diğerleri, 2020; Zhong ve diğerleri, 2023).

Sınıf IA PI3K'lar farklı genlerden (sırasıyla PIK3CA (fosfotidilinositol-4,5 bifosfat 3-kinaz alt ünitesi alfa), PIK3CB (fosfotidilinositol-4,5 bifosfat 3-kinaz alt ünitesi beta) ve PIK3CD (fosfotidilinositol-4,5 bifosfat 3-kinaz alt ünitesi delta) üretilen p110a, p110β ve p110δ katalitik alt birimlerinden oluşup, reseptör tirozin kinazlar (RTK), GRPC'ler ve küçük G proteini Ras gibi onkogenler tarafından aktive edilirken, sınıf IB PI3K'lar PIK3CG (fosfotidilinositol-4,5 bifosfat 3-kinaz alt ünitesi gamma) geninin ürettiği p110γ katalitik alt

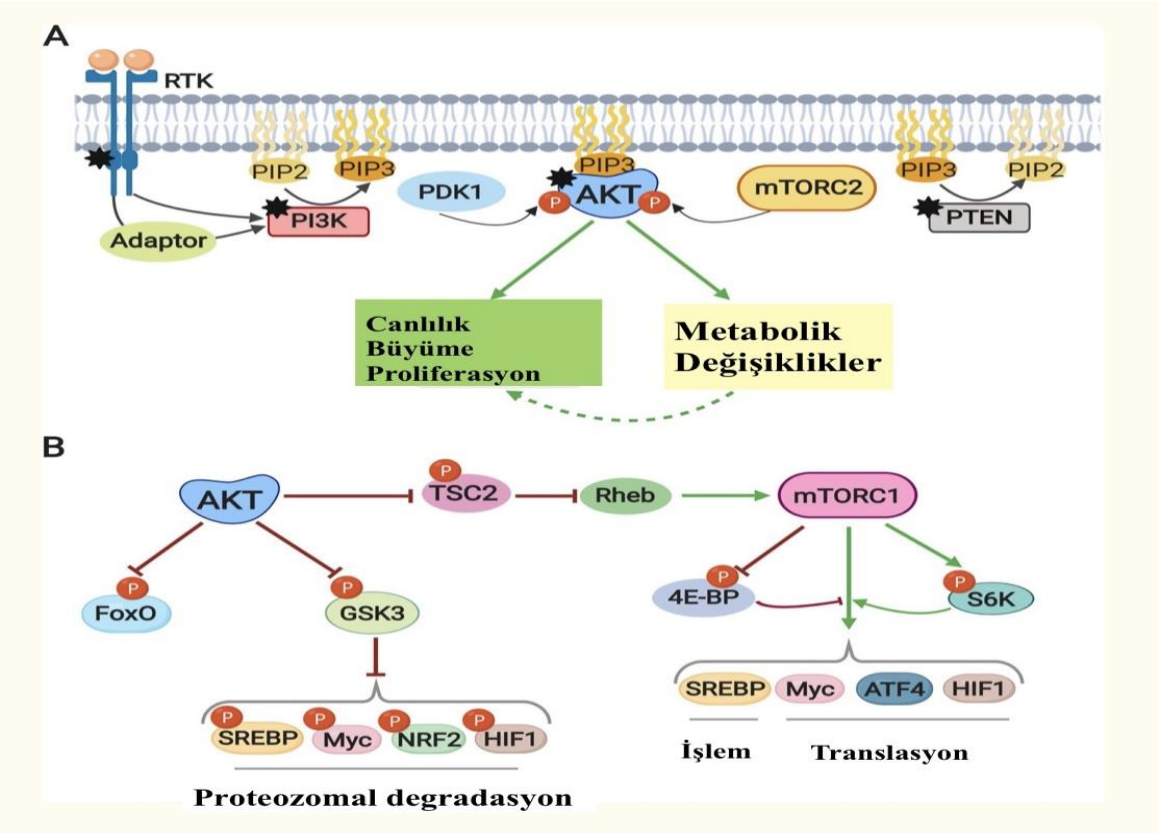
birimine sahiptirler ve sadece GRPC'ler tarafından aktive edilirler (Nepstad ve diğerleri, 2020; Yang ve diğerleri, 2019). Aktive dilen PI3K, fosfolipid substratı 'fosfotidilinositol 4,5 bifosfat'ı (PIP2) uyararak ikincil haberci 'fosfotidilinositol 3,4,5, trifosfat'a (PIP3) dönüşümünü sağlar. PI3K sinyali, PIP2'yi yeniden oluşturmak için PIP3'ü defosforile eden fosfataz ve tensin homologu (PTEN) tarafından zayıflatılır. (Hoxhaj ve Manning, 2020). PIP3, sitoplazmik matrikste aktif olmayan serin/treonin protein kinazın (AKT) hücre zarına translokasyonu için AKT'nin pleckstrin homoloji (ph) bağlanma alanına bağlanır ve ikincil bir haberci işlevi görür. Bu sinyal ile kinaz aktivasyonu için gerekli olan, T308 de PDK1 (fosfoinositide bağımlı protein kinaz 1) ve S473'te rapamisinin mekanik hedefi (mTOR) kompleksi 2 (mTORC2) protein kinazlarının fosforilasyonuyla AKT'nin tam aktivasyonu gerçekleşmektedir (Glaviano ve diğerleri, 2023).

Yapısal olarak benzer olan ve çoğu dokuda ifade edilebilen 3 farklı izoformu bulunan AKT (Serin/threonin protein kinaz ya da protein kinaz B) (AKT1, AKT2, AKT3) hücrede transkripsiyon, translasyon, hücre döngüsü ilerlemesi, apoptoz, otofaji ve metabolizma gibi hücresel süreçleri kontrol etmektedir. Bu işlevler ele alındığında AKT inhibisyonunun antitümör yanıta katkı sağlayacağı belirtilmektedir (Asati ve diğerleri, 2016). AKT yukarıda belirtilen metabolik faaliyetleri temelde 3 aşağı akış substratı TSC2 (TSC-tümör baskılayıcı gen- alt birimi 2), GSK3 (glikojen sentez kinaz) ve FOXO (Forkhead box-O) transkripsiyon faktörleri aracılığıyla kontrol etmektedir (Hoxhaj ve Manning, 2020).

Rapamisinin memeli hedefi (mTOR), fosfoinozitid 3-kinaz ile ilişkili tipik bir serin/treonin protein kinazıdır. Besin ögeleri ve büyüme faktörü reseptörleri tarafından uyarılarak hücre büyümesini kontrol etmektedirler. mTOR kompleksi; mTOR proteini, memeli LST8, prolinden zengin akt1 substratı 40 (PRAS40) ve raptordan oluşan mTORC1 ve mLST8, mSIN1, mTOR proteini, protor ve rictordan oluşan mTORC2'den oluşmaktadır (Asati ve diğerleri, 2016).

Büyüme faktörüyle indüklenen AKT, TSC2'yi fosforile ederek TSC kompleksinin lizozomal membrandan ayrılmasına neden olur ve bu durum TSC kompleksine bağlı GDP (Guanozin difosfat) formundaki Rheb'in GTP (guanozin trifosfat) formuna yüklenmesini sağlar. GTP-Rheb mTORC1'in Rag proteinleri (Ras ile ilişkili GTP bağlayıcı proteinler) (RagA-RagB) ile bağlanarak aktifleşmesini uyarır. Bir diğer yandan aminoasitler tarafından uyarılan mTORC1, lizozom membranında Ragülator ve V-ATPaz (Vokuolar tip ATPaz) ile

etkileşim halindeki Rag heterodimerlerine bağlanarak da aktifleşebilmektedir (Glaviano ve diğerleri, 2023).



Şekil 1. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı (Hoxhaj ve Manning, 2020)

Şekil 1. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı:

Şeklin A kısmında reseptör tiroizin kinazların aktive ettiği PI3K(fosfotidilinositol-3 kiraz) PIP2'nin PIP3'e fosforilasyonunu sağlamıştır. Fosforile olan PIP3 sitoplazmada serbest halde bulunan AKT'ni bağlamıştır. Bu bağlanma ile PDK1 ve MTORC2, AKT'yi fosforile etme sinyali almışlardır, ikisi birlikte AKT'yi fosforile ederek AKT aktivasyonunu tamamlamışlardır. Şeklin B kısmında ise AKT'nin aktivasyonundan sonraki aşamalar açıklanmaktadır. Fosforile olan AKT, TSC2, FOXO ve GSK3 proteinlerini fosforilize ederek hücre metabolizması üzerinde farklı etkiler oluşmasına neden olur. TSC2'yi aktive ederek anabolik metabolizma ve hücre büyümesi süreçlerini kontrol eden genlerin translasyonunu sağlayan mTORC1 protein kinazını aktifleştirmektedir (Hoxhaj ve Manning, 2020)

Strese duyarlı antioksidan proteinlerin üretimini düzenleyen Forkhead box-O (FOXO) transkripsiyon faktörlerinin AKT tarafından fosforlandıklarında nükleustan dışlanarak, tümör

baskılayıcı olan otofajik aktiviteyi teşvik ettikleri belirtilmiştir (Vuranok, N., 2022). Bazal koşullarda aktif halde bulunan GSK-3ß'nın (glikojen sentaz kinaz-3ß) farklı sinyal yolaklarının kesişiminde bulunduğu bu nedenle de hücrede glikojen sentez metabolizmasında, nörotransmitterler üzerindeki etkileriyle duygu durum ve bilişsel fonksiyonlarda ve kanserde hücre büyümesinin negatif düzenleyicisi olarak görev yaptığı bilinmektedir. GSK-3ß'nın bu yolaklardan biri olan PI3K/AKT kaskadındaki AKT tarafından fosforlanarak inaktive edilmesiyle hücre büyümesi ve proliferasyonuna yol açtığı ayrıca hücresel anabolizmayı arttırdığı bulunmuştur (Glaviano ve diğerleri, 2023; Phukan ve diğerleri, 2010). Kansere yol açan farklı sinyal yolları arasında en baskını olan Wnt (Wingless-related integration side) sinyalininde GSK-3ß aracılığıyla mTOR yolağındaki TSC kompleksini aktive ederek translasyonu ve hücre büyümesini uyardığı bildirilmiştir. Bu bağlamda kanser gelişiminde etkili olan iki önemli sinyal yolağının (PI3K/AKT/mTOR ve Wnt/ß-katenin) birbirleriyle çapraz sinyalleşme etkileşimi içinde olduğu belirtilmektedir (Daisy Precilla ve diğerleri, 2022).

PI3K/AKT/mTOR yolağı basamaklarındaki aşırı aktivasyon, inhibisyon ya da mutasyonlar bu yolağı insan kanserlerinde en sık etkilenen sinyal yolaklarından biri haline getirmektedir (Glaviano ve diğerleri, 2023). Çalışmalara göre PIK3CA (p110a katalitik alt birimini kodlayan gen) geninin, mTOR ve AKT proteinlerinin aktivasyon mutasyonları ve PTEN geninin PAM yolağının en sık karşılaşılan mutasyonları olup; meme kanseri, rahim korpus endometriyal karsinomu, safra kesesi karsinomu, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, yumurtalık karsinomu, mide kanseri, kolorektal karsinom, melanom, glioblastoma, sarkoma, baş-boyun skuamöz kanserleri, prostat adenokarsinomu gibi birçok tümör tipinde tanımlanmışlardır (Peng ve diğerleri, 2022;; Zhang ve diğerleri, 2017; Zhong ve diğerleri, 2023). Perry ve diğerleri (2014) osteosarkomanın hayatta kalmasına katkıda bulunan genomik olayları tanımlamışlar ve elde ettikleri genomik taramaların tümünde osteosarkomada PI3K/mTOR yolağı aktivasyonuna bağımlı olunduğunu bulmuşlardır. Çeşitli çalışmalara göre düzensiz PAM yolu aktivasyonu osteosarkoma gibi birçok kanser türünün gelişimine ve anti-kanser tedavilere direnç oluşumuna neden olduğu görülmektedir (Peng ve diğerleri, 2022; Perry ve diğerleri, 2014; Zhang ve diğerleri, 2017; Zhong ve diğerleri, 2023).

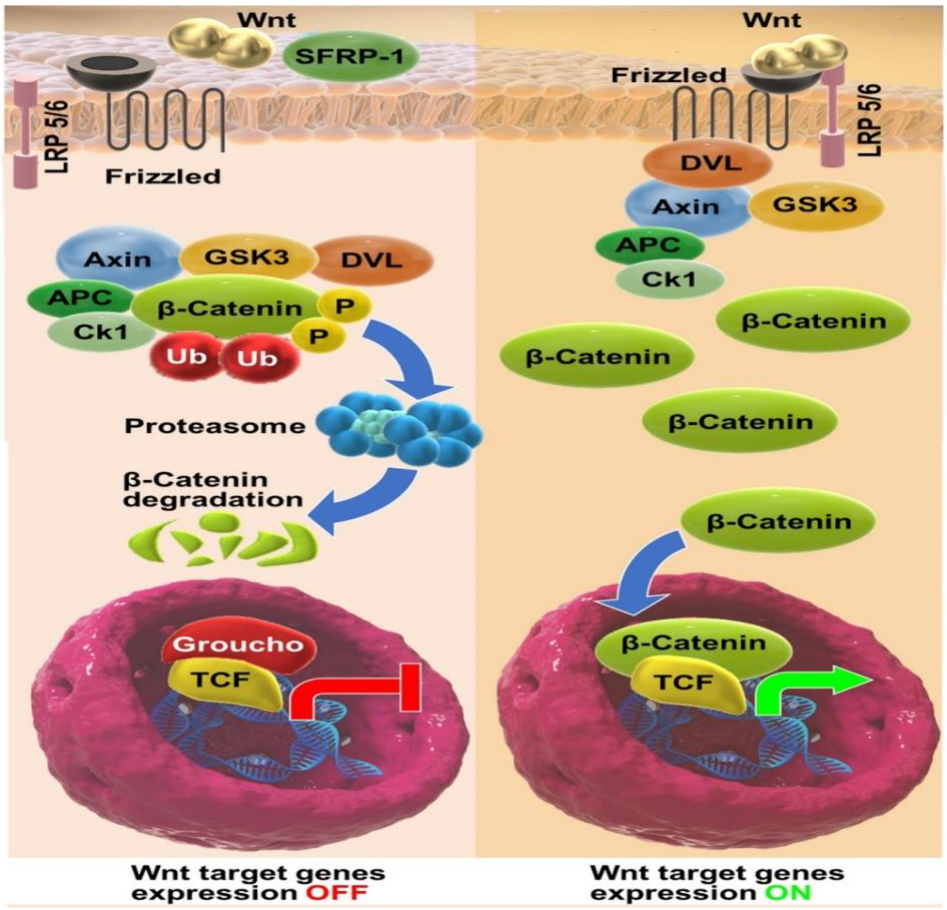
2.5.Wnt/ β-Katenin Sinyal Yolağı

Wnt sinyal yolu kök hücre replikasyonunu, hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını, apoptozunu, gen ekspresyonunu, Ca+2 homeostazını, hücre polaritesini, yetişkin doku homeostazını ve yara iyileşmesini kontrol eden evrimsel olarak korunmuş bir yoldur (Chatterjee ve diğerleri, 2022; Fang ve diğerleri., 2018; Hosseini ve diğerleri., 2021; Zhou ve diğerleri, 2022). Wnt sinyali, temel (kanonik) β-katenin bağımlı Wnt yolu, kanonik olmayan β-katenin bağımsız Wnt/düzlemsel hücre polaritesi (Wnt/PCP) ve Wnt/kalsiyum (Ca+2) yolları olarak sınıflandırılmaktadır (Yaylagül, E.Ö., 2017). Bu yollardan (kanonik) β-katenin bağımlı Wnt sinyal yolunun en iyi anlaşılan yol olup anormal Wnt/β-katenin sinyalinin çeşitli kanserlerle ilişkilendirildiği bildirilmiştir (Chatterjee ve diğerleri., 2022).

Wnt/β-katenin sinyal yolağı, Wnt proteininin wnt transmembran reseptörü Frizzled (FZD) ve düşük-yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili proteinler 5/6 (LRP5/6) koreseptörlerine bağlanmasıyla aktifleşmektedir. Wnt-FZD-LRP-5/6 kompleksi Disheveled (Dsh)'ın aktivasyonunu sağlar. Bu aktivasyon sayesinde Dsh, bir yapı iskelesi proteini (AXIN), bir tümör baskılayıcı (APC), kazein kinaz 1a (CK1a) ve glikojen sentaz kinaz 3β (GSK-3β)] proteinlerini içeren bir yıkım kompleksindeki GSK3β ve CK1a'yı inhibe ederek β-katenin fosforilasyonunu engeller dolayısıyla da ubiquitinasyonu ve proteazomal yolaklar vasıtasıyla β-katenin bozunumunu azaltır. Bu sayede bağlı olduğu protein kompleksinden ayrılan ve sitoplazmada biriken β-katenin çekirdeğe göç eder. Çekirdekteki β-katenin transkripsiyon faktörlerden T-hücre faktörü/Lenfosit çoğaltan faktör (TCF/LEF) kompleksiyle etkileşime girerek kanser hücre proliferasyonu, apoptosis, hücre döngüsü bozulması ve metastaz ile ilişkili olduğu belirtilen survivin, siklin D1, c-Myc, Axin2 ve matriks metallo proteinazlar (MMP'ler) gibi hedef onkogenlerin aktivasyonunu sağlamakta ve ayrıca Wnt'ye yanıt veren genlerin transkripsiyonunu etkilemektedir (Hosseini ve diğerleri., 2021; Zhou ve diğerleri, 2022).

Wnt ligandının yokluğunda Wnt/β-katenin yolu inaktif kalmaktadır. Bu durumda yıkım kompleksinde bulunan CK1α ve GSK-3β proteinleri β-katenini fosforile etmektedir. Fosforlanmış β-katenin, E3 ubikuitin ligaz (β-TrCP) içeren beta-transducin tekrarları tarafından her yerde bulunur ve proteozomal bozunmaya tabi tutulur. Bu işlem, sitoplazmik β-katenin seviyesini düşük tutarak β-kateninin çekirdeğe translokasyonunu önlemekte dolayısıyla da Wnt hedef genlerinin transkribe edilememesine sebep olmaktadır (Chatterjee ve diğerleri., 2022;

Yaylagül, E.Ö, 2017). Wnt/β-katenin sinyal yolağının aktif ve inaktif durumları Şekil 2'de ayrıntılı bir şekilde gösterilmektedir (Chatterjee ve diğerleri., 2022).



Şekil 2. Wnt sinyal yolu (Chatterjee ve diğerleri., 2022)

Çalışmalarda OS hücrelerinde Wnt/β-katenin sinyal yolunun anormal aktivitesinin tümörijenez ve metastazda önemli rol oynadığı, tümörün immün sürveyanstan kaçmasına katkıda bulunduğu ve kemo-immünoterapiyi geçersiz kılarak ve/veya direnç göstererek nüks olasılığını arttırdığı belirtilmektedir (Fong ve diğerleri., 2018; Oi ve diğerleri., 2020).

2.6. Proliferasyon

Hücre proliferasyonu ya da çoğalması, hücrelerin belirli bir büyüklüğe ve olgunluğa ulaştığında gerekli hücre içi ve dışı sinyallerle uyarılmasıyla iki yavru hücreye bölünmesi işlemi olarak adlandırılmaktadır (Terzioğlu ve diğerleri, 2013). Normal dokunun gelişiminin tamamlanmasında ya da dokuda meydana gelen travma, yaralanma, hastalık sonucu hasar gören hücrelerin değiştirilmesinde önemli olup temelde hücre ölümü ile çoğalması arasındaki dengeye bağlıdır. Bu dengenin bozulması halinde 21. Yüzyılın en yaygın ölüm nedenlerinden biri olan kanser ortaya çıkabilir. Proliferasyon, hücre döngüsü içerisinde DNA hasarını izleyen-onaran ve hücre bölünmesi sürecini kontrol eden veya durduran çeşitli kontrol noktaları tarafından düzenlenmektedir (Barbosa ve diğerleri, 2023).

Hücre döngüsü, G1, DNA sentezi (S), G2 ve mitoz (M) olarak adlandırılan 4 farklı aşamadan oluşmaktadır. Mitojenik ortama bağlı olarak G1 fazını geçen hücreler ya hücre bölünmesiyle sonuçlanacak bir programı etkinleştirirler ya da 1.- 4. aşama arasında hareketsiz bir G0 durumuna girerler (Liu ve diğerleri, 2019). Retinoblastoma (Rb), protein 53 (p53) gibi hücre döngüsünü baskılayan düzenleyicilerin kaybı ve sıçan sarkoma onkogeni (Ras), miyelostomatoz onkogeni (Myc) gibi bölünmeyi arttıran düzenleyicilerdeki artışın hücre proliferasyon döngüsünün bozulmasına dolayısıyla da kansere neden olduğu bilinmektedir. Bu nedenle proliferasyon hızının tespiti kanser gelişim riskini değerlendirmek için önemli bir parametredir (Terzioğlu ve diğerleri, 2013).

Proliferasyon ölçüm testleri 4 temel başlıkta ele alınmaktadır.

1. Deoksiribo nükleik asit sentez hızının ölçülmesine dayalı testler: Bu testlerde floresan veya radyoaktif ışıma özelliği gösteren timinin nükleotid analoglarının yeni sentezlenen DNA zincirine eklenme hızları izlenmektedir.
2. Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı testler: Bölünme döngüsünde metabolik aktivitenin arttığı bilindiğinden WST (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum, MTT(3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) gibi tetrazolyum tuzlarının hücreler tarafından metabolize edilme hızları değerlendirilmektedir.
3. Proliferasyon işaretleyicilerin ölçümüne dayalı testler: Prolifere hücre çekirdek antijeni (PCNA) gibi hücre döngüsü ile ilgili belirli proteinlerin hücre içindeki miktarlarının bu proteinlere özgü antikorlar kullanarak belirlenmesi işlemidir.

4. Hücrelerdeki ATP (adenozin trifosfat) miktarının ölçümüne dayalı testler: Hücre bölünmesinin yüksek miktarda ATP gerektiren bir süreç olduğu bilindiği için ATP seviyeleri arttıkça hücre popülasyonun çoğaldığı kabul edilmektedir. Hücre içindeki ATP miktarı ölçülerek hücre proliferasyonu saptanabilmektedir (Yaylagül, E.Ö., 2017).

2.7. Apoptoz

İlk kez 1972'de Kerr ve diğerleri tarafından tanımlanan apoptoz, gen seviyesinde hassas düzenlemelere dayanan, DNA hasarından ya da hücrenin gelişim sürecindeki hatalardan dolayı oluşan hasarlı hücrelerin planlı bir şekilde canlı organizmadan uzaklaştırılması sürecidir (Majtnerova ve Rousar, 2018; Pistritto ve diğerleri, 2016). Apoptoz, embriyonik gelişimden yaşlanmaya kadar hücre popülasyonunu kontrol ederek homeostatik dengeyi sağlamada ve bağışıklık tepkilerine karşı hasarlı hücreleri ortadan kaldırarak savunma mekanizmasında rol oynamaktadır (Kashyap ve diğerleri, 2021).

Apoptotik hücrelerde karakteristik olarak hücre büzülmesi, plazma zarının tomurcuklanması, ekstraselüler tarafta fosfatidilserin (PS) membran maruziyeti, kromatin yoğunlaşması, DNA fragmantasyonu, plazma zarı asimetrisi gibi morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler görülür (Pistritto ve diğerleri, 2016). Apoptoz, kaspazlar (sisteminin, aspartat spesifik proteazlar) olarak bilinen proteaz ailesi tarafından dışsal ve içsel yolaklardan uyarılarak gerçekleşir. Dışsal apoptik yol, hücre dışı protein ölüm ligandlarının apoptotik ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla aktive olmaktadır. İçsel veya mitokondriyal yol ise hipoksi, onarılamaz genetik hasar, yüksek sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonu, şiddetli oksidatif stres, radyoterapi, kemoterapi gibi farklı uyaranların mitokondriyi uyarmasıyla etkinleşmektedir (Pistritto ve diğerleri, 2016; Xu ve diğerleri, 2019).

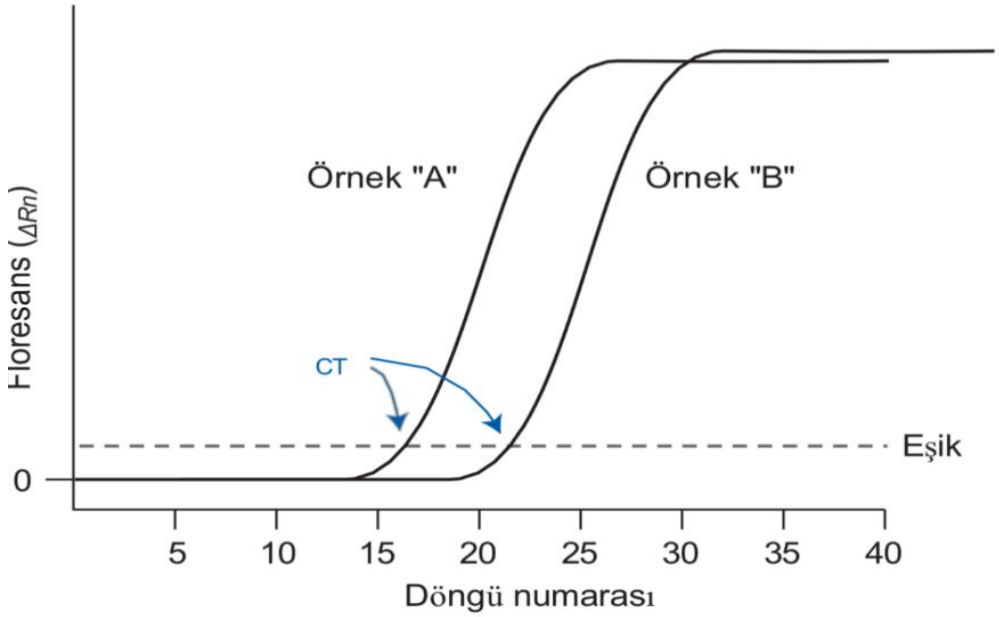
Canlı organizmada savunma ve homeostatik dengeden sorumlu apoptozun bozulması durumunda (aşırı apoptoz ya da azalmış apoptozda) otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, bakteriyel ve viral hastalıklar, kalp hastalıkları ve kanser dahil birçok hastalık ortaya çıkabilmektedir (Xu ve diğerleri, 2019). Son yıllarda kanser hücrelerinde apoptozun moleküler mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalarda, apoptik mekanizmalardaki değişikliklerin apoptozdan kaçışa dolayısıyla tümör gelişimine ve tedaviye dirence neden olduğu bildirilmiştir. Apoptozdan kaçınmanın kanserin ayırt edici bir özelliği olduğu ve apoptozun

serbestleştirilmesine yönelik yaklaşımların kanserin önlenmesi ve tedavisinde etkili olabileceği düşünülmekte bu alanda klinik çalışmalar yapılmaktadır (Pistritto ve diğerleri, 2016).

2.8. Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), termal döngü cihazı kullanılarak denatürasyon, bağlanma ve uzatma işlemleriyle hem orijinal DNA şablonuna hem de tamamlayıcı bölgeye bağlanabilen primer ile DNA'nın bir parçasının çoğaltılması işlemidir. Günümüzde gelişen teknolojiyle birlikte gerçek zamanlı, kantitatif, ters transkriptaz, nested ve multipleks PCR gibi çok sayıda PCR tekniği ortaya çıkmıştır (Çarhan ve diğerleri, 2016).

Sıcaklık değişimini geleneksel termocycerlardan daha hızlı gerçekleştirerek her PCR siklusu sonunda hedef DNA'ya nükleer problar veya floresan boyalar bağlandıktan sonra açığa çıkan floresanı tespit eden yani PCR döngüsündeki amplikon üretimini gerçek zamanında yakalayabilen sistem gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) olarak adlandırılmaktadır (Kahya ve diğerleri, 2013). RT-PCR'da her örneğin döngü sayısına karşılık örnekten gelen floresan sinyaline göre tüm PCR süresince biriken ürünü temsilen bir amplifikasyon grafiği oluşmaktadır (Bilginer, H., ve Çetin, B., 2018). Analiz edilen örneğin başlangıçtaki konsantrasyonu ne kadar fazlaysa PCR'ın başlarında floresan sinyalinde önemli bir artış gözlenir ve belirli sayıda amplifiye ürün elde etmek için daha az döngü gerekir (Green ve Sambrook, 2018).



Şekil 3. Artan floresana karşı PCR döngüsü sayısı (Green ve Sambrook, 2018)

Şekil 3.'te görüldüğü gibi hedef nükleik asitlerin başlangıç konsantrasyonlarının yoğunluklarına göre önceden belirlenmiş bir amplifikasyon değeri olan eşik değerine ulaşıncaya kadar gerçekleşen döngü sayısı ters orantılı olup floresans değişiminin artışı doğru orantılıdır. Bu grafikte A örneği daha yüksek bir başlangıç nükleik asit konsantrasyonu içermekte dolayısıyla daha düşük bir C_T değerine sahiptir (Green ve Sambrook, 2018).

Eşik döngüsü veya C_T değeri, reaksiyonda belirgin bir artışın ilk tespit edildiği döngüdür. C_T parametresi, floresan emisyonunun sabit eşiğin üstünde olduğu döngü sayısı olarak da tanımlanır. Eşik döngüsü, sistem log-lineer faz boyunca PCR ürününün üstel büyümesi ile ilişkili floresan sinyalindeki artışı tespit etmeye başladığında geçerlidir (Yaylagül, E.Ö., 2017). Gerçek zamanlı PCR'da SYBR Green I, TagMan prob, moleküler boncuk ve hibridizasyon prob yöntemleri kullanılabilir. SYBR Green I yönteminde, sıradışı spesifik bir floresan interkalasyon ajanı (SYBR I veya etidyum bromid) kullanılır ve bu boyalar sadece çift zincirli DNA ya bağlanırlar böylelikle DNA miktarındaki artışa paralel olarak cihazda oluşan floresans miktarının eş zamanlı olarak artışı gözlemlenebilir (Green ve Sambrook, 2018; Yaylagül, E. Ö., 2017).

Bağıl gen miktarı karşılaştırması, test numunesindeki hedef nükleik asidin Ct değerinin bir kontrol veya referans numunesinin (genellikle kalibratör olarak adlandırılır) Ct değerine

oranı veya kat farkı olarak açıklanmaktadır. Test numunesi veya kalibratördeki hedef seviyelerinin eş değer miktarda karşılaştırılması için başlangıç hücre sayısına veya toplam RNA (ribonükleik asit) miktarına karşı normalleştirme yapılmalıdır. Hedef genin ifadesini, ifadesi test edilen tüm örneklerde sabit olan bir referans genin (Housekeeping gen olarak adlandırılır) ifadesine normalize edilmesi işlemi ΔCT metodu olarak adlandırılmakta ve farklı örnekler arasında ilgilenilen genin ifadesinin karşılaştırılmasını sağlamaktadır.

Bağıl miktar ölçümünde kullanılan en yaygın yöntem $2^{-\Delta\Delta CT}$ veya livak yöntemi olarak bilinen karşılaştırmalı C_T yöntemidir. Normalizasyon işlemi, $\Delta C_T = C_T$ (hedef gen)-C_T (endojen kontrol) şeklinde formüle edilir. Karşılaştırmalı $\Delta\Delta C_T$ hesaplaması, her bir örneğin ΔC_T değeri ile referans örneğin ΔC_T değeri arasındaki farkı bulmayı amaçlamaktadır.

$\Delta\Delta\ C_T$ = [C_T (hedef gen)- C_T (endojen kontrol)] – [C_T (referans örneğe ait gen)- C_T (referans örneğe ait endojen kontrol)]

Hesaplamada son adım bu değerleri mutlak değerlere dönüştürmektir. Bunun için (her döngüde %100 verimlilik veya ürünün iki katına çıkması varsayılarak):

Karşılaştırmalı ifade seviyesi = $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılarak hesaplanmaktadır (Green ve Sambrook, 2018; Yaylagül, E.Ö, 2017).

Doğal biyoaktif bileşenlerden olan betaninin farklı kanser türlerinde apoptoz yolaklarını etkileyerek anti kanser etkiler gösterdiği birçok çalışmada tespit edilmiştir (Lechner ve diğerleri, 2010; Rakhana ve diğerleri, 2022). Betaninin osteosarkoma üzerindeki etkisiyle ilgili literatürde herhangi bir çalışma olmadığı bulunmuştur. Güçlü bir antioksidan olan ve apoptik yolaklar üzerinde önemli etkileri olan betaninin osteosarkoma hücrelerinde de kanseri önleyici ya da ilerlemesini azaltacağı etkiler gösterebileceği düşünülmektedir. Bu doğrultuda osteosarkoma hücrelerine belirli dozlarda betanin uygulanılarak anti-kanser özelliklerini değerlendirmek ve potansiyel terapötik etkilerini araştırarak kanserde beslenme alanındaki çalışmalara katkı sağlamak hedeflenmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Hattı Kültür Koşulları

Çalışmada primer osteosarkomadan köken alan Saos-2 hücre hattı kullanılmıştır. Saos-2 hücreleri, içerisinde %10 Fetal sığır serumu (FBS) (Gibco, Theron Fisher Scientific) ve %1 Penisilin-Streptomisin eklenmiş DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) besi yeri içerisinde muhafaza edilerek büyümeleri sağlanmıştır. Hücreler 25 ya da 75 cm^2'lik kültür kaplarında 37 °C'de %5 CO_2 ve %96 nem içeren etüvde inkübe edilerek çoğaltılmıştır. Hücrelerin besi yerleri 2 günde bir değiştirilmiş ve hücreler kültür kabının yüzeyini kapladığında pasajlanmıştır. Pasajlama işlemi için kültür kabı içerisindeki besi yeri uzaklaştırılmış ve kültür kabında bulunan hücre yüzeyi 1X PBS (Phosphate-buffered saline) ile yıkanmıştır. 25 cm^2'lik kültür kaplarına 0,75 ml, 75 cm^2'lik kültür kaplarına 1,5 ml Tripsin-EDTA (Tripsin-(EDTA) Etilendiamintetraasetik asit) eklenmiş ve hücreler 3 dakika etüvde bekletilmiştir. Süre sonunda kültür kabının yüzeyinden ayrılan hücrelerin üzerine eklenen Tripsin- EDTA miktarının 5 katı kadar besi yeri (Tripsin-EDTA aktivitesini durdurmak için) eklenerek 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak 2300 rpm'de 4°C'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre peleti besi yeri ile resüspanse edilerek yeni kültür kaplarına aktarılmıştır.

Hücrelerin bir kısmı stok olarak saklanmak üzere %10 dimetilsülfoksit (DMSO) ve %10 FBS (Fetal Sığır Serumu) içeren besi yeri ile 2 ml'lik tüplere aktarılıp önce -20 °C'de daha sonra -80 °C'de muhafaza edilmiş, sonrasında sıvı azot tankına alınarak stok olarak saklanmıştır.

3.2.Betanin Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak betanin (%97, 901266, Sigma-Aldrich) toz halde temin edilmiştir. Betanin saf suda çözdürülerek 50 mM konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlanmış ve besi yeri ile seyreltilerek 24 ve 48 saatlik uygulamalar yapılmıştır.

3.3.Hücre Canlılığının MTT Yöntemiyle Saptanması

Hücre canlılığının saptanması MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) yöntemi de uygulanmıştır. MTT, formazon boyalarının ya da tetrazolyum tuzlarının hücre tarafından metabolize edilme hızlarının kolorimetrik ölçümüne dayanan bir canlılık analizi testidir (Gedikli, S., 2013). Betaninin MTT yöntemiyle sitotoksisite değerlendirmeleri aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

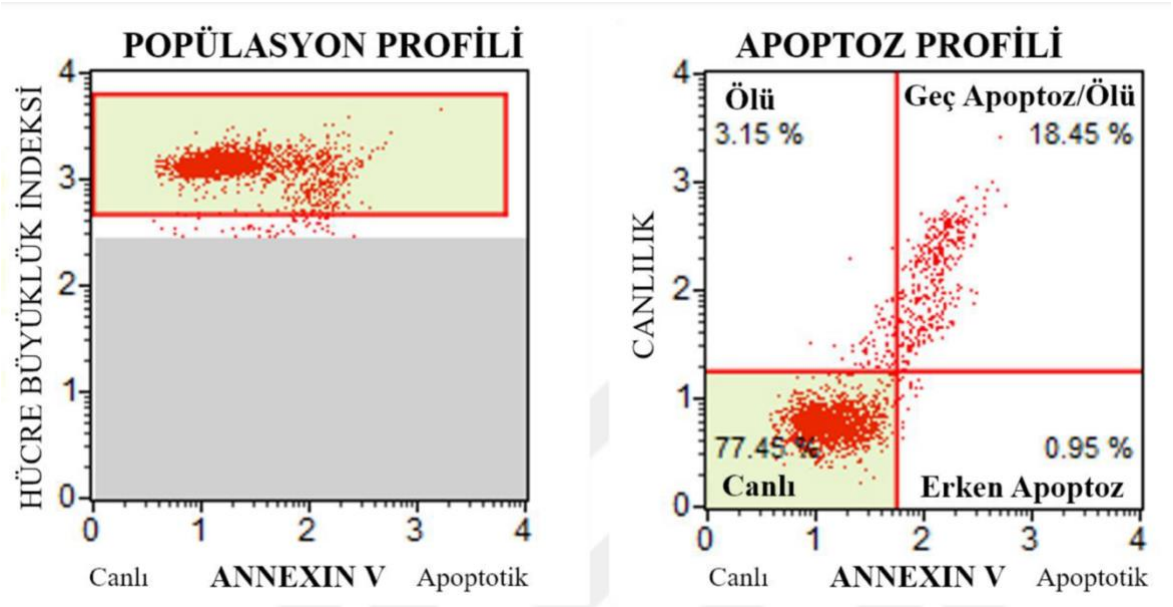
1- 96 kuyucuklu plakların her bir kuyucuğuna $5x10^3$ hücre ekilmiş ve 37 °C'de %5 CO_2 ve %96 nem içeren etüvde 24 saat inkübe edilerek hücrelerin plaklara tutunması sağlanmıştır.
2- Kontrol-Kontrol+çözücü-25-50-100-250-300-400 µM dozlarında betanin uygulanarak 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.
3- 24. ve 48. saatin sonunda canlılığın değerlendirilmesi için uygulama yapılan kuyucuklardaki besi yeri uzaklaştırılmış ve 10 µl (5 mg/ml) MTT + 90 µl besi yeri ile oluşturulan 100 µl'lik çözelti eklenerek 4 saat boyunca inkübe edilmiştir.
4- İnkübasyonu tamamlanan hücrelerin üzerindeki MTT ve besi yeri çekildikten sonra oluşan formazan kristallerini çözmesi için 100 µl DMSO eklenmiş ve 37 °C'de 15 dakika bekletilip mikroplak okuyucu spektofotometre ile 570 nm absorbans değerinde canlılık değerlendirmesi yapılmıştır.
5- Bulunan değerler Microsoft Excel programı yardımıyla uygulanan doz ve % hücre canlılığı eğrisi belirlenerek %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC50) değeri hesaplanmıştır.

3.4.Apoptoz Saptanması

Apoptoz saptanması, Muse hücre analiz cihazında Muse Annexin V Death Cell kiti kullanılarak apoptozun farklı aşamalarındaki hücrelerin tespit edilmesi esasına dayanmaktadır. Hücre büyümesi ve çoğalmasının önemli bir düzenleyicisi olan apoptoz, hücre içi biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerle karakterizedir. Normal hücrelerde sitoplazmik yüzeyde bulunan fosfatidilserinin (PS) hücre içinden dışarıya taşınması ve hücre zarı yüzeyinde olması apoptoza ait ayırt edici bir durumdur. Antikoagülant Annexin V'in PS'ye bağlanma ilgisinin yüksekliği sayesinde apoptotik hücreler tespit edilmektedir (Yaylagül, E.Ö., 2017).

Muse hücre analiz cihazında Annexin V ile yapılan ölçümler sonucunda, canlı hücreler, ölü hücreler (nekroz sonucu ölenler), erken apoptotik ve geç apoptotik hücreler (şekil 4.) tespit edilerek 4 farklı hücre popülasyonu hakkında bilgi elde edilebilmektedir.

Hücreler Annexin V kitiyle muamele edildikten sonra Muse Analiz cihazına yüklenmekte ve 4 farklı hücre popülasyonuna ait veriler grafik olarak raporlanmaktadır.



Şekil 4. Muse Annexin V ölçümünde elde edilen hücre profilleri

Apoptoz belirlemede uygulanan deney protokolü aşamaları aşağıdaki gibi olup bu işlemler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

1. Apoptoz deneyleri için 12 kuyucuklu plaklar içerisine $4x10^4$ Saos-2 hücresi aktarılmıştır.

2. Proliferasyon deneylerinden elde edilen veriler doğrultusunda 250, 330 ve 400 µM dozlarında uygulamalar yapılmış ve uygulama gruplarının yanısıra kontrol grupları da 24 ve 48. saatler için takip edilmiştir.

3. Uygulama saatleri sonunda hücreler Tripsin-EDTA yardımıyla tutundukları yüzeyden kaldırılmış santrifüj işlemiyle hücre peletleri elde edilmiştir.

4. Hücre peletleri uygun miktarda FBS içeren besi yeri ile çözülmüş ve Annexin V kit solüsyonuyla karıştırılarak 20 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.

5. Bu sürenin sonunda kontrol ve uygulama gruplarının 24 ve 48. saatlerdeki apoptotik hücre yüzdelerindeki değişimler saptanmıştır. Annexin-V deneylerinden elde edilen verilerle dağılım grafiği çizilmiştir.

3.5.Total RNA İzolasyonu

Saos-2 hücrelerine betanin (250-330-400 µM) uygulandıktan 48 saat sonra elde edilen hücrelerden Total RNA izolasyonu GeneAll HyperScript RNA sentez kitinin protokolüne göre yapılmıştır.

1. Kültür kabında bulunan kontrol ve uygulama yapılmış hücrelerin üzerindeki besiyeri alınmış, hücreler PBS ile yıkandıktan sonra 750 µl Tripsin-EDTA eklenerek 3 dk 37˚C'de inkübe edilmiş, flask yüzeyinden kalkan hücrelere 3 ml besiyeri eklenmiştir.
2. 15 ml'lik falcon tüplerindeki hücreler 2300 rpm'de 4°C'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüm örneklere 1'er ml Riboex eklenmiş ve pipetaj yapılarak homojenizasyon sağlanmış ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
3. Örneklere 200 µl kloroform eklenmiş 15 saniye hızlıca çalkalanıp 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
4. 12000 G kuvvetinde 15 dakika 4°C'de santrifüj edildikten sonra üst faz yeni tüpe alınmıştır (Alınan üst faz ortalama 500 ml'dir yani eklenen Riboex'in %50'sidir).
5. Alınan üst faz hacminde RB1 buffer eklenip tüp sallanarak karıştırılmıştır.

6. Karışımdan 700 µl Type F kolonuna aktarılmıştır.

7. 10.000 G oda sıcaklığında (25˚C'de) 30 saniye santrifüj edilmiştir. Altta kalan sıvı atılmıştır.

8. 6. Ve 7. Basamaklar tekrarlanmıştır. (Kalan örnek için)

9. Kolona 500 µl SW1 buffer eklenmiştir.

10. 10.000 G oda sıcaklığında (25˚C'de) 30 saniye santrifüj edilmiştir.

11. Kolona 500 µl RNW eklenmiştir.

12. 10.000 G oda sıcaklığınd 30 saniye santrifüj edilmiştir.

13. 10.000 G oda sıcaklığında 1 dakika daha santrifüj edilmiştir

14. Kolon ependorf tüplere aktarılmıştır. Üzerine 30 µl nüklease-free water eklenip 1 dakika bekletilmiş ve 10.000 g'de 1 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.

15. 20 µl daha nüklease-free water eklenip 1 dakika bekletilmiş ve oda sıcaklığında 1 dakika 10.000 g'de santrifüj edilmiştir.

16. Kapaklı ependorflara toplanan örnekler buza koyulmuş ve RNA miktarları ölçülmüştür.

17. Çözünmüş RNA örnekleri -80 ˚C'de saklanmıştır.

3.6.cDNA Sentezi

PI3K/AKT/mTOR ve Wnt/β-katenin sinyal yolaklarındaki genlerin mRNA ifadelerini RT-PCR ile belirlemek için öncelikle EuroClone Wonder RT -cDNA Sentez kiti kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon içeriği Tablo1.'de, cDNA sentezi reaksiyon koşulları ise Tablo 2.'de verilmiştir.

Tablo 1. cDNA sentezi reaksiyon karışımı içeriği

Reaksiyon İçeriği	**cDNA Reaksiyon Karışımı**
Reaction Buffer Mix	4 µL
Revers Transkriptaz (200 U/ µl**)**	1 µL
Total RNA (1 µg) + Nükleaz içermeyen distile su	15 µL
Total hacim	20 µL

Tablo 2. cDNA sentezi reaksiyon koşulları

Zaman	**Sıcaklık**
10 dakika	25 °C
15 dakika	48 °C
5 dakika	85 °C
∞	4 °C

3.7. Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Gerçek zamanlı PCR işlemi SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) ve PI3K, Akt, mTOR, β-katenin, GSK-3β primerleri ve kontrol gen olarak GAPDH (Gliseraldehit-3 fosfat dehidrogenaz) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 3). RT-PCR reaksiyon karışım içeriği Tablo 4'te ve reaksiyonun zaman, sıcaklık koşulları da Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 3. Real Time PCR için kullanılan primerler

Primer	Primer Dizilimi
PI3K	F: GTATCCCGAGAAGCAGGATTTAG R: CAGAGAGAGGATCTCGTGTAGAA
AKT	F: ACCTTCCATGTGGAGACTCCTGAG R: GTCCATCTCCTCCTCCTCCTGC
mTOR	F: TCCGAGAGATGAGTCAAGAGGAGTC R: GCTGGAAACCAATTCAAAAATGTG
β- katenin	F: TTCTGGTGCCACTACCACAGC R: TGCATGCCCTCATCTAATGTC
GSK-3β	F: ATTTCCAGGGGATAGTGGTGT R: CCTGACGAATCCTTAGTCCAAG
GAPDH	F: TGCACCACCAACTGCTTAGC R: GGCATGGACTGTGGTCATGAG

Tablo 4. Real-Time PCR reaksiyon karışımı

Reaksiyon İçeriği	RT-PCR Reaksiyon Karışımı
SYBR Green Master mix	5 µL
Nükleaz içermeyen distile su	3,6 µL
Forward primer (5 µM)	0,2 µL
Revers primer (5µM)	0,2 µL
cDNA	1 µL
Total hacim	10 µL

Tablo 5. Real-Time PCR reaksiyon koşulları

Zaman	Sıcaklık	Döngü
10 dakika	95 °C	
15 saniye	95 °C	40 Döngü
60 saniye	60°C	

3.8. İstatistiksel Değerlendirme

SPSS (v25) paket programı kullanılarak normal dağılım kontrol edilmiş ve buna bağlı olarak normal dağılım gösteren gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırmada Parametrik t-testi kullanılmış, normal dağılım göstermeyen grupların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

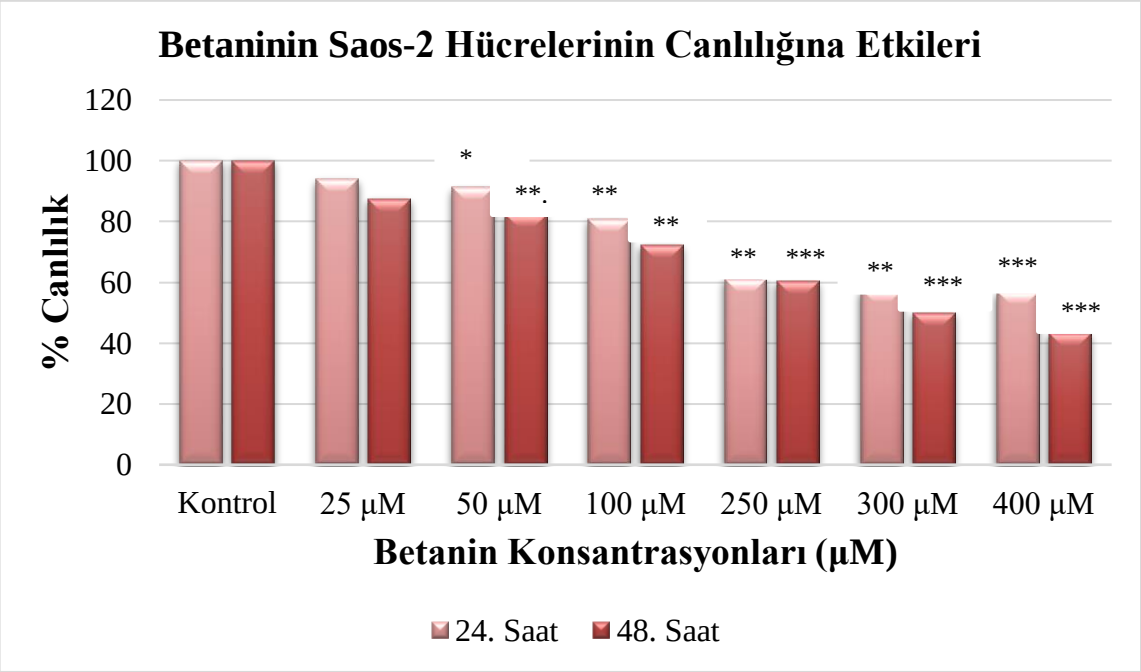
3.9.Çalışmanın Sınırlılıkları

Bu araştırma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Hücre Kültürü ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarlarında yürütülmüştür. Stoktan çözdürülen Saos-2 hücreleri ATCC'e (American Type Culture Collection) göre McCoys5A besiyeri kullanılarak büyütülmeye çalışılmış ancak hücreler tutunmamıştır. Hücreleri temin ettiğimiz araştırmacıların besiyeri olarak DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) tercih ettikleri öğrenilmiş ve besiyeri değiştirilmiştir. Çalışmanın başında sipariş ettiğimiz Betanin kimyasalının renginin ve kokusunun değiştiği ve hücreleri öldürmediği tespit edilmiş bu nedenle farklı bir markadan tekrar sipariş verilmiştir. Betanin (Sigma-Aldrich) ile proliferasyon için uygulamalar yapılmış ve mikroskopta belirgin şekilde hücre ölümü gözlemlenirken Muse Cihazıyla yapılan ölçümde hücre ölümü verileri saptanamamıştır. Bu çelişkili durumun nedeninin betanin kimyasalı ile Muse Canlılık Kiti'nin tepkimeye girmiş olabileceği tahmin edilmektedir. Çünkü Betanin ışıma yapabilen yüksek afiniteye sahip bir bileşendir. Bu nedenle Proliferasyonun MTT yöntemiyle saptanmasına karar verilmiştir. MTT yöntemiyle elde edilen IC_{50} dozuna göre apoptoz ve Real-Time PCR deneyleri planlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1.Hücre Canlılık Testi

Betaninin osteosarkoma (Saos-2) hücrelerinin canlılığına etkileri süreye ve doza bağlı olarak araştırılmış ve MTT yöntemiyle ölçülerek değerlendirilmiştir. Bu deneyde betanin uygulanan dozlar 24. ve 48. saatte kontrol hücreleriyle bağıl olarak kıyaslanmıştır.

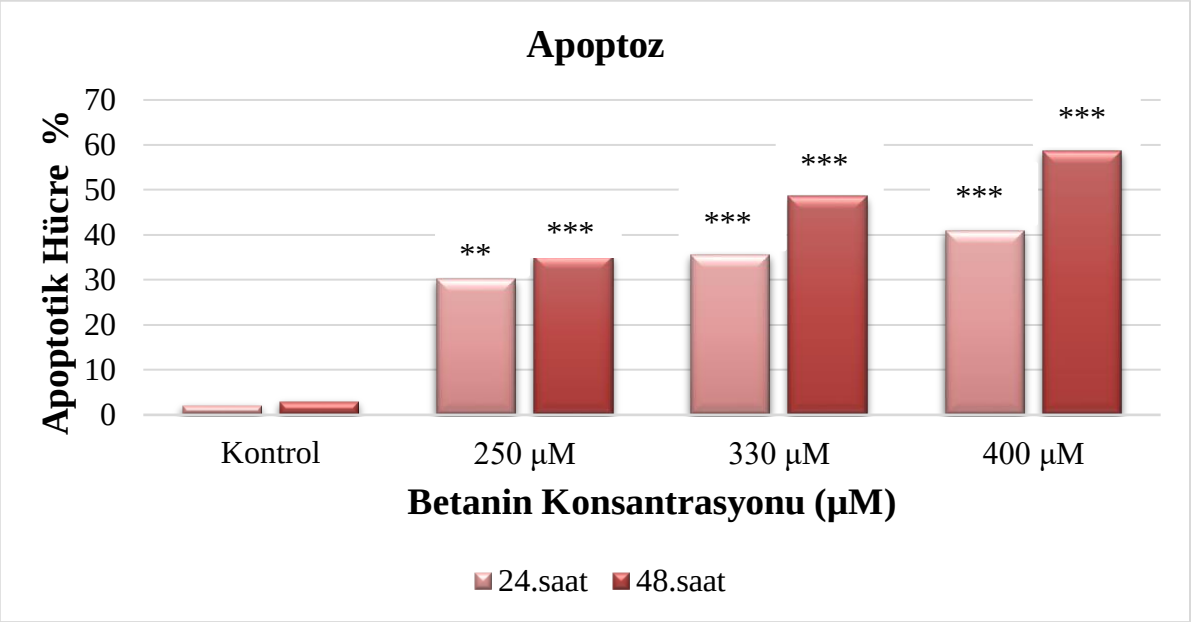


Şekil 5. Betaninin Saos-2 hücrelerinin canlılığına etkileri (*p<0,01; ** p<0,001; *** p<0,0001)

Betanin Saos-2 hücrelerinin canlılığını 24 saatin sonunda 25-100 µM'da %7-20 oranında azaltırken 250 µM'da %39, 300 µM'da %43 400 µM'da %44 oranlarında azaltmıştır. 48. saatlerde 250-400 µM doz aralığında hücre canlılığı %60-47 oranında değişmiştir (Şekil 5). MTT testinin sonuçlarına göre IC_{50} (%50 inhibisyon konsantrasyonu) değeri 330 µM olarak hesaplanmıştır. Bu veriler doğrultusunda 250, 330 ve 400 µM inhibisyon dozları seçilerek apoptoz ve gen ifadesi deneyleri planlanmıştır.

4.2.Apoptoz Testi

Betanin uygulaması sonrası apoptozun saptanması için Muse Annexin V Death Cell kiti kullanılarak Muse hücre analiz cihazında ölçüm yapılmıştır. Yapılan hücre canlılığı deneyinden elde edilen ve etkin olduğu belirlenen 330 µM konsantrasyonunun yanı sıra 250 ve 400 µM betanin dozları da uygulanarak 24 ve 48 saatlik uygulamalar sonucunda apoptik hücre verileri değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda uygulanan dozlardaki apoptotik hücre oranları Şekil 6.'da gösterilmiştir.



Şekil 6. Uygulanan betanin konsantrasyonlarına ait 24. ve 48. saatlerdeki apoptotik hücre yüzdelerindeki değişim (** p<0,001; *** p<0,0001)

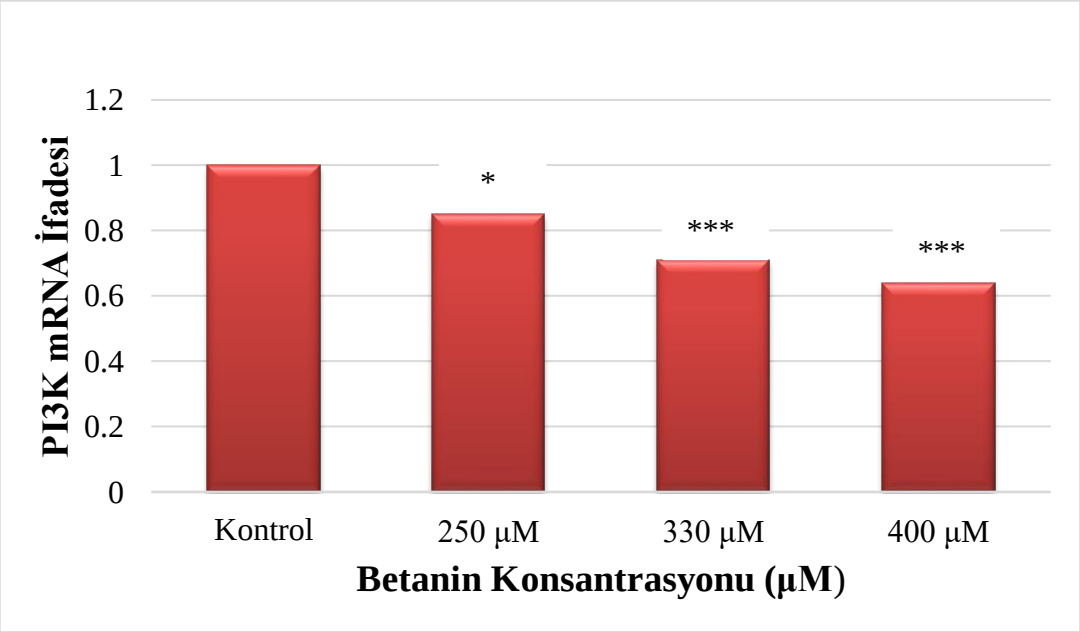
Kontrol grubuna oranla 24. saatin sonunda apoptotik hücre yüzdeleri 250, 330 ve 400 µM için sırasıyla %30, %35 ve %40 oranında, 48. saatteyse %35, %48 ve %58 şeklinde artış göstermiştir. Bu sonuçlara göre betanin doza ve zamana bağlı olarak Saos-2 hücrelerini apoptoza sürüklemiştir.

4.3.Betanin Uygulaması Sonrası İlgili Genlerin mRNA İfadeleri

Betaninin apoptozu indüklediği düşünülen PI3K/AKT/mTOR ve Wnt/β-katenin yolaklarına ait PI3K, AKT, mTOR, β-katenin ve GSK-3β genlerinin mRNA ifadelerini değerlendirmek için Saos-2 hücrelerine 250, 330 ve 400 µM dozlarında betanin uygulanmış ve 48 saatin sonunda Real-time PCR ile analiz edilmiştir. PI3K (Şekil 7), AKT (Şekil 8), mTOR (Şekil 9) ve β-katenin (Şekil 10) genlerinin mRNA ifadelerinin anlamlı olarak azaldığı, Wnt/ β-katenin yolağını baskılayan GSK-3β geninin (Şekil 11) ise mRNA ifadesinin arttığı bulunmuştur.

4.3.1. PI3K

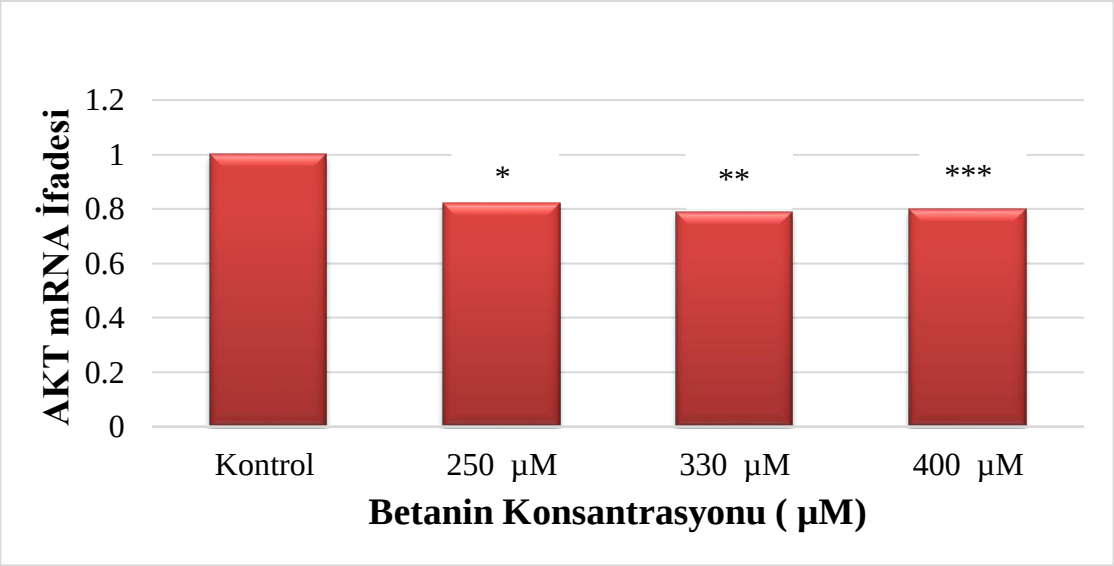
Saos-2 hücrelerine betanin uygulamasından sonraki 48. saatte kontrol grubuna göre PI3K mRNA ifadesinde anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. Betanin uygulamasından sonra PI3K mRNA ifadesi (*p<0,01; *** p<0,0001)

4.3.2. AKT

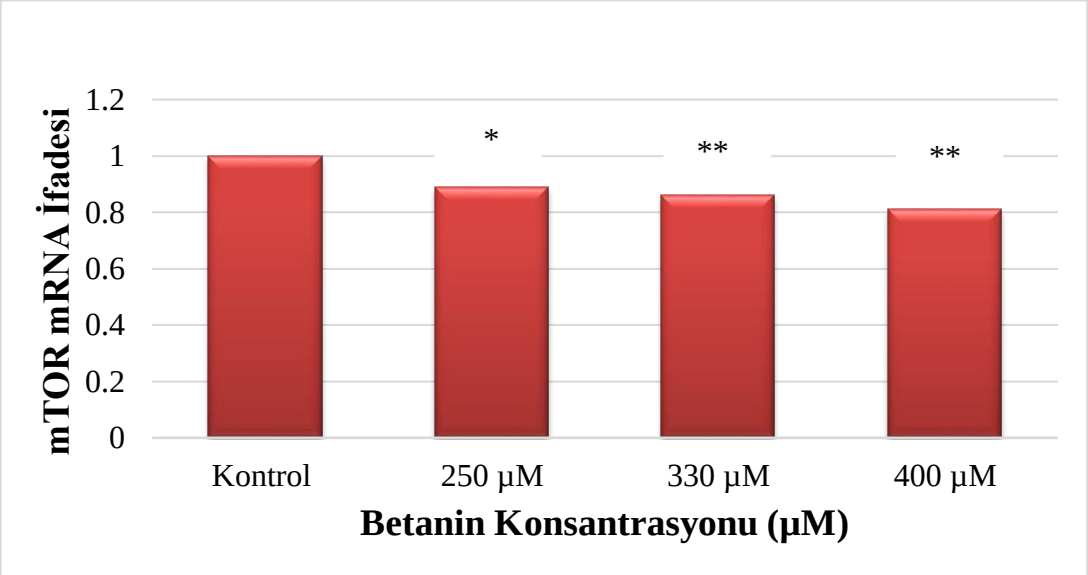
Saos-2 hücrelerine betanin uygulamasından sonraki 48. saatte kontrol grubuna kıyasla AKT mRNA ifadesi anlamlı bir şekilde azalmıştır (Şekil 8).



Şekil 8. Betanin uygulamasından sonra AKT mRNA ifadesi (* p<0,01; ** p<0,001; *** p<0,0001)

4.3.3. mTOR

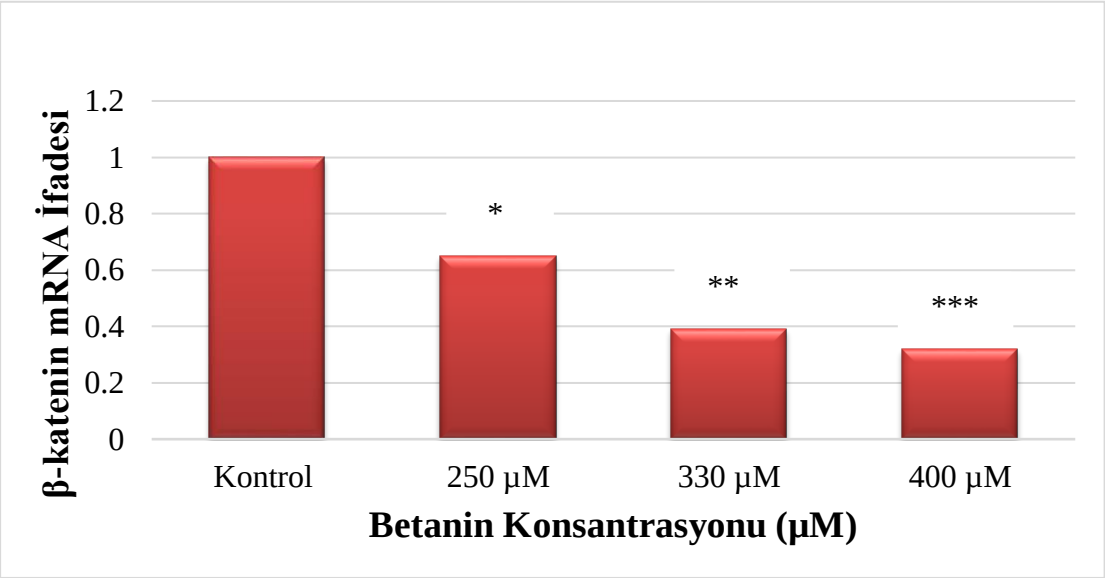
Saos-2 hücrelerine 250, 330 ve 400 µM'lık betanin uygulamasından sonra 48. saatteki mTOR mRNA ifadesinin doza bağlı olarak anlamlı düzeyde azaldığı bulunmuştur (Şekil 9).



Şekil 9. Betanin uygulamasından sonra mTOR mRNA ifadesi (* p<0,01; ** p<0,001)

4.3.4 β-katenin

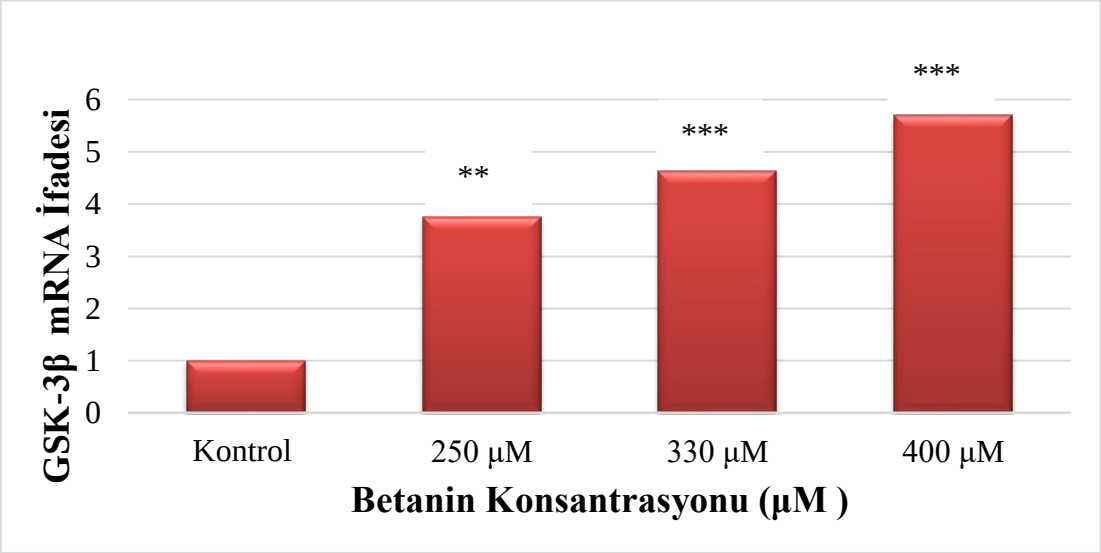
Saos-2 hücrelerine 250, 330 ve 400 µM'lık betanin uygulamasından 48 saat sonra kontrol grubuna kıyasla β-katenin mRNA ifadesinde doza bağlı olarak anlamlı bir azalma olduğu bulunmuştur (Şekil 10).



Şekil 10. Betanin uygulamasından sonra β-katenin mRNA ifadesi (* p<0,01; ** p<0,001; *** p<0,0001)

4.3.5 GSK-3β

Saos-2 hücrelerine 250, 330 ve 400 µM'lık betanin uygulamasından sonra 48. saatteki GSK3-β mRNA ifadesinin doza bağlı olarak anlamlı düzeyde arttığı bulunmuştur (Şekil 11).



Şekil 11. Betanin uygulamasından sonra GSK-3β mRNA ifadesi (** p<0,001; *** p<0,0001)

5. TARTIŞMA

Osteosarkoma, çocuklarda ve genç yetişkinlerde en sık görülen kemik kanseridir. Teşhis edilen kanserlerin %1'inden azını oluştursalar da teşhislerinin zor olması ve metastaz risklerinin yüksek olması osteosarkomaların sağ kalım oranlarını düşürmektedir (Liu ve diğerleri, 2023). Osteosarkoma tedavisi, cerrahi işlem ile tümörlü kısmın uzaklaştırılmasına ve histopatolojik değerlendirmeye göre kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi uygulamalarına dayanmaktadır (Hız, M., 2014; Zhou ve diğerleri, 2022). Kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi gibi kanser tedavi yöntemlerinin tedavinin yanı sıra istenmeyen yan etkilerinin de olduğu ve bunların tedavi sürecini olumsuz etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle son yıllarda yan etkisi olmayan antikanserojen etki gösterdiği belirtilen biyoaktif bileşenlere ilgi artmış ve bu alanda çalışmalar yapılmıştır. (Göktürk, D., 2018; Li ve diğerleri, 2020; Liu ve diğerleri, 2023; Qui ve diğerleri, 2019; Rakshanaa ve diğerleri, 2022; Wang ve diğerleri, 2023; Xu ve diğerleri, 2023; Yaylagül, E.Ö., 2017).

Kırmızı pancarda yüksek oranda bulunan betanin doğal biyoaktif bileşenlerdendir. Betaninin hem serbest radikal süpürücü aktivite göstererek hem de endojen hücresel enzimatik antioksidan savunma mekanizmalarını indükleyerek antioksidan, antikanser, antiinflamatuar ve anti-kemoterapatik etkilere sahip olduğu görülmüştür (Esatbeyoğlu ve diğerleri,2014; Lechner ve diğerleri, 2010; Montazersaheb ve diğerleri, 2023).

Mevcut tez çalışmasının ilk aşamasında, betaninin Saos-2 osteosarkoma hücreleri üzerinde sitotoksisitesi MTT canlılık testi ile araştırılmıştır. Hücrelere 24 -48 saat süresince betanin uygulanmasının doz ve zamana bağımlı bir şekilde OS hücrelerinin çoğalması üzerinde önemli bir inhibitör etkiye sahip olduğu doğrulanmıştır ($p<0,001$). Betaninin 48 saat uygulanmasının sonucunda IC_{50} değeri 330 µM olarak hesaplanmıştır (Şekil 5).

Hücre büyümesi ve çoğalmasının önemli bir düzenleyicisi olan apoptoz, hücre içi biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerle karakterizedir. Normal hücrelerde sitoplazmik yüzeyde bulunan fosfatidilserinin (PS) hücre içinden dışarıya taşınması ve hücre zarı yüzeyinde olması apoptoza ait ayırt edici bir durumdur. Antikoagülant Annexin V'in PS'ye bağlanma ilgisinin yüksekliği sayesinde apoptotik hücreler tespit edilmektedir. Yapılan 24-48 saatlik betanin uygulamalarında doza bağlı olarak Annexin-V pozitif hücrelerin sayısının istatistiksel

olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir (Şekil 6). Literatüre baktığımızda, mevcut tez çalışmasında kullanılan biyoaktif bileşen betaninin apoptoz üzerinden sitotoksik aktiviteye sahip olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir.

Betaninin diğer kanser türlerinden %30 daha ölümcül olduğu belirtilen ovaryum kanseri üzerindeki etkisini belirlemek ve bu etkiyi nasıl sağladığını tespit etmek amacıyla Rakshanaa ve diğerlerinin (2022) yapmış olduğu çalışmada betaninin yumurtalık kanseri PA-1 hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkilerini (IC_{50} dozunu) 40 µg/ml'de gösterdiği bildirilmiştir. Betanin uygulamasından sonra PA-1 hücrelerinde DNA merdivenlenmesi, kromatin yoğunlaşmasıyla membran taşması ve mitokondri membran potansiyelinde azalma gibi tipik apoptoz özelliklerinin gözlemlendiği belirtilmiştir. Ek olarak kontrol grubuna kıyasla betanin uygulanan kanserli hücrelerde ROS üretiminin arttığı böylece apoptik sürecin aktive edildiği ve ROS'ların tümör baskılayıcı protein olan p53'ün ekspresyonunu arttırdığı da bildirilmiştir (Rakshanaa ve diğerleri, 2022). Betanin ve kemoterapi ilacı olan doksorubisinin prostat (PC-3) ve meme (MCF-7) kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri Kapadia ve diğerleri (2011) tarafından değerlendirilmiştir. Betaninin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini 290 µg/mL'de göstermeye başlarken doksorubisinin kanser hücrelerinin 2,9 µg/mL'de %50'sini, 29 µg/mL'de ise %100'ünü öldürdüğünü ve bu dozda sağlıklı normal hücreleride %100 oranında öldürürken betanin için bu oranın %8 olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmaya göre betaninin doksorubisin gibi yan etkisi fazla kemoterapi ilaçlarının sağlıklı hücreler üzerindeki olumsuz etkilerini azaltabileceği sonucuna varılmaktadır (Kapadia ve diğerleri, 2011). Betanin ve doksorubisinin sinerjistik etkisi; pankreas (PaCa), meme (MCF-7), ve prostat (PC-3) kanseri hücre hatlarında 0,29- 290 µg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda ve Betanin: Doksorubisin 1:1, 1:5, 5:1 oranlarında uygulamalar yapılarak değerlendirilmiştir. Tüm hücre hatlarının sitotoksisite profilinde doksorubisinin betaninle birleştirildiğinde ilaç konsantrasyonunda pozitif bir azalma olduğu ve en etkili sinerjistik etkinin B:D 1:5 oranında tespit edildiği bildirilmiştir (Kapadia ve diğerleri, 2013). Betaninin kemoterapi ilaçlarıyla sinerjistik etkisi olduğu gibi kanser tedavisinin bir diğer önemli bileşeni olan radyoterapiyle de sinerjistik etki gösterdiği bulunmuştur (Montazersaheb ve diğerleri, 2023). Çalışmada prostat kanseri hücrelerinde (PC-3) 100µM betanin ve 4 Gy (Gray, radyasyon dozu birimi) radyoterapi, kontrol, tek başına betanin, RT ve betanin+RT kombinasyonu şeklinde uygulanmıştır. Betaninin+RT kombinasyonunun PC-3 kanser hücreleri üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkilerinin olduğu, betaninin RT ile sinerjistik etki gösterdiği için etkili bir radyosensitize edici ajan olabileceği belirtilmiştir.

UV ışın uygulanan insan keratinosid hücrelerine (HaCaT) çeşitli konsantrasyonlarda (0-80 µM) betanin uygulayarak betaninin cilt kanseri kemoprevansiyonu değerlendirilmiştir. Betanin tedavisinin UV ışınlanmış hücrelerde doza bağlı bir iyileşme sağladığı ve betaninin kromatinin hipermetilasyonu (DNMT) ve deasetilasyonundan (HTAC) sorumlu enzimleri etkisizleştirerek oksidatif stres koşullarında DNA hasarını önlediği bulunmuştur (Zand ve diğerleri, 2024).

Kırmızı pancar hidro-alkol ekstraktının ve izole betaninin HT-29 ve Caco-2 kolorektal kanser hücre hatları üzerindeki antikanser ve pro-apoptik etkileri Saber ve diğerleri (2023) tarafından değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda pancar hidro-alkol ekstraktının (BHE) 48. saatte sırasıyla 92 µg/mL ve 107 µg/mL konsantrasyonlarında HT-29 ve Caco-2 hücre hatlarında proliferasyonu inhibe ettiği, betaninin benzer etkiyi daha düşük dozlarda (HT-29 için 64 µg/mL Caco-2 için 90 µg/mL) gösterdiği ve bununla birlikte betanin ve BHE'nin HT-29 ve Caco-2 hücrelerindeki apoptik etkilerinin onaylanmış bir antikanser ilacı olan 5-FU (5-florourasil) ile karşılaştırabilir düzeyde olduğu ve normal KDR-293 (Embriyonik insan böbrek hücre hattı) hücrelerinin apoptozisini antikanser ilacından daha az etkiledikleri bulunmuştur (Saber ve diğerleri, 2023). Betaninin akciğer kanseri (A549 hücre hattı) hücreleri üzerindeki antikanser etkisinin araştırıldığı çalışmaya göre; betaninin hücre canlılığının %50'sini 73,5 µM'da inhibe ettiği ve apoptoz proteinleri olan Bcl-2, Kaspaz-3, CDK-6 ile yüksek afinite göstererek apoptozu indüklediği bulunmuştur (Chandrasekaran ve diğerleri, 2021). Betaninin insan glioma hücrelerindeki (U87MG) IC_{50} dozunun 7 µg/ml iken normal insan lenfositlerinde 16 µg/ml'ye kadar sitotoksik etki göstermediği, Chandrasekaran ve diğerleriyle (2021) benzer şekilde kaspaz-3 aktivasyonuyla apoptozu indüklediği ancak kaspaz-3 aktivasyonunun içsel yolak olan, U87MG hücrelerinin mitokondriyal membran bütünlüğünün bozularak sitokrom c salınımına ve ROS oluşumuna neden olarak sağlandığı belirtilmiştir (Salimi ve diğerleri, 2020).

Betaninden zengin kırmızı pancar özü, meme kanseri hücrelerine (MCF-7) uygulanarak apoptoz ve otofajik hücre ölümü üzerindeki etkisinin değerlendirildiği bir diğer çalışmada 25 µM betanin/izobetanin konsantresinin kanser hücresi proliferasyonunu ve canlılığını önemli ölçüde azalttığı, apoptoz ile ilişkili proteinlerin (Bad (hücre ölümünün Bcl2 ile ilişkili antogonisti), TRAILR4 (TNF ilişkili apoptoz indükleyen ligand reseptörü 4), FAS (hücre yüzey ölüm reseptörü), p53 (protein 53)) ekpsresyonunu arttırdığı ve mitokondriyal membran potansiyelini değiştirdiği, böylece hem içsel hem de dışsal apoptik yolların dahil olduğu, hücre ölümünün indüklendiği belirtilmiştir. Ayrıca bu uygulama da betanin/izobetanin ekstraktının

normal hücre hatlarında belirgin bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir (Nowacki ve diğerleri, 2015). Serada ve tarlada üretilen kırmızı pancarlardan izole edilen betanin ve betain insan karaciğer kanseri hücreleri HepG2'ye uygulanarak kanser hücrelerinin canlılıkları değerlendirilmiştir. Betaninin 200 µg/mL konsantrasyonunda HepG2 hücrelerinin çoğalmasını %49 inhibe ettiği, betainin ise 800 µg/mL'de %25 inhibisyon sağladığı bulunmuştur. Ek olarak tarlada üretilen pancardan elde edilen toplam betalain içeriğinin serada üretilenlere oranla %25 daha fazla olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar kırmızı pancardaki betanin gibi sağlık açısından yararlı bileşiklerin yetiştirme koşullarındaki farklılıklardan etkilendiğini bildirmişlerdir (Lee ve diğerleri, 2014). Kırmızı pancar ekstraktının ve betaninin kolorektal kanser hücre hatlarında (HT-29 ve Caco-2) içsel ve dışsal apoptozis yollarını Bcl-2'nin aşağı regülasyonu, BAD ve Kaspaz-9 genlerinin yukarı regülasyonu ve Fas-R, Kaspaz-3 ve Kaspaz-8'in yukarı regülasyonu yoluyla uyarabileceği belirtilmiştir (Saber ve diğerleri, 2023). Romero ve diğerleri (2021) kırmızı pancarın yaprak ve kökünden elde edilen ekstraktların HeLa hücrelerinde hücre döngüsünde izole betaninden daha düşük dozda etkili olduklarını belirtirken Saber ve diğerleri (2023) koleraktal kanser hücrelerinde izole betaninin ekstraktan daha düşük dozda hücre canlılığını etkilediğini belirtmişlerdir. N-nitrozometilamin (NMBA) ile indüklenmiş özofagus tümörlü ratlara oral yolla 78 µg/ml ticari kırmızı pancar boyası (E162) içeren su verilmiş ve NMBA'nın neden olduğu özofagus papillomlarının %45 azaldığı tespit edilmiştir (Lechner ve diğerleri, 2010). Etkili olan kanser önleyici mekanizmayı belirlemek için özofagus doku örneklerinde çeşitli boyama yöntemleriyle anjiyogenez, apoptoz ve inflamasyon değerlendirmesi yapmışlardır. Kırmızı pancar boyası (162) içeren su tüketen sıçanlarda anjiyogenez ve inflamasyon seviyelerinin azaldığı apoptotik oranın arttığı belirtilmiştir (Lechner ve diğerleri, 2010). Kanser hücre hatları ile yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında mevcut çalışma literatürü destekler niteliktedir ve betanin Saos-2 hücre proliferasyonunu azaltıp, apoptozu teşvik etmektedir.

Betaninin oral skuamöz hücreli karsinom üzerindeki antiproliferatif ve apoptik moleküler mekanizmaları SCC131 ve SCC4 hücre hatları üzerinden araştırılmıştır. Betaninin hücreler üzerindeki IC_{50} değeri 30µM olup 20-30 µM dozlarında hücre çoğalmasını, mitokondriyal membran potansiyelini, inflamasyonu azalttığını apoptotoik aktiviteyi arttırdığı ve NF-KB ve PI3K/AKT sinyal yolağı proteinlerinin fosforilasyonunu azalttığı için bu yolakları inhibe ettiği sonucuna ulaşılmıştır (Zou ve diğerleri, 2022).

Çalışmanın son aşamasında, kanser hücrelerinde önemli rol oynayan PI3K/AKT/mTOR ve Wnt/β-katenin yolaklarında yer alan genlerin mRNA ifadeleri değerlendirilmiştir. Saos-2 hücrelerine 48 saat boyunca betaninin farklı konsantrasyonlarda uygulanmasının doza bağlı olarak yolakta bulunan genlerin ifadelerini değiştirdiği bulunmuştur.

PI3K/AKT/mTOR yolağının kilit genlerinin her birinin (PI3K, AKT, mTOR) kontrol grubuna kıyasla ifadelerinde anlamlı bir düşüş gözlenmiştir (Şekil 7-9). Betaninin osteosarkoma MG-63 hücrelerinde PI3K/AKT/mTOR/S6 yolağı üzerinden antikanser etkileri araştırılmış ve betaninin morfolojik değişiklikleri uyardığı, ROS (reaktif oksijen türleri) oluşturduğu, hücre canlılığını azalttığı ve PI3K, AKT, mTOR proteinlerini etkileyerek PAM yolağını baskıladığı bildirilmiştir (Liu ve diğerleri, 2023). Bir başka çalışmada kırmızı pancar yaprak ve kökünden elde edilen ekstraktlardan 10 ve 100 µg/mL dozlarında ve sırasıyla bunların ana bileşeni olan apigenin ve betaninin HeLa rahim ağzı kanseri hücreleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Pancar ve yaprak özlerinin mTOR yolunu etkili bir şekilde inhibe etmelerine rağmen Akt geri bildirim döngüsünü aktive etmedikleri bildirilmiştir. Her iki ekstraktında kemoterapi ilaçları olan rapamisin ve sisplatinin antiproliferatif etkilerini arttırdıkları, yaprak ve kök ekstraktlarının (10-100 µg/mL) hücre döngüsü analizinde izole edilmiş apigenin (7,8 µg/mL) ve betanin (778,6 µg/mL) bileşiklerinden daha etkili olduklarını bu durumun ekstrakttaki biyoaktif bileşenlerin sinerjistik etkilerinden kaynaklandığını düşündükleri belirtilmiştir (Romero ve diğerleri, 2021). Mancini ve diğerleri benzer bir çalışmayı prostat kanseri PC-3 ve DU-145 hücre hatları üzerinde yaprak ve kök ekstraktları için proliferasyonda 10- 100 µg/mL, apigenini 7,8 µg/mL betaninini 778,6 µg/mL dozlarında uygulayarak yapmışlardır. Romero ve diğerleriyle (2021) benzer şekilde betanin ekstraktının ve izole betaninin DU-145 hücrelerinde mTOR yolağı proteinlerinde ve S6K (Ribozomal protein S6 kinaz) fosforilasyonunda azaltıcı etkileri olduğunu bildirmişlerdir. (Mancini ve diğerleri, 2021). Literatür ile karşılaştırıldığında çalışma sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda, uygulanan betaninin Saos-2 hücrelerinde PI3K/Akt/mTOR yolağı genlerini düzenleyerek hücrelerin proliferasyonunu inhibe edebildiği ve apoptozu arttırdığı sonuçları desteklenmektedir.

Wnt/β-katenin sinyal yolağı hücre çoğalması, farklılaşması, göçü ve apoptozun kontrolü yoluyla gelişimi düzenleyen ve doku homeostazisini koruyan filogenetik olarak eski bir mekanizmadır. Birçok çalışma, Wnt sinyalinin anormal aktivasyonu ve β-kateninin yüksek ekspresyonunun, osteosarkomun anormal histolojik morfolojisi ve hücrelerin anormal

proliferasyonu ve farklılaşmasıyla ilişkili olduğunu ve sonuçta osteosarkom oluşumuna yol açtığını göstermiştir. Bu çalışmada PI3K/AKT/mTOR ve Wnt/β-katenin yolaklarının kesişim geni olan GSK-3β'nın mRNA ifadesinin betanin uygulaması sonucunda artış gösterdiği bulunmuştur (Şekil 11). Aynı zamanda Wnt/β-katenin sinyal yolağının önemli bir bileşeni olan β-kateninin mRNA ifadesinin de betanin dozuna bağlı olarak azaldığı bulunmuştur (Şekil 10). β-katenin'in aşırı ekspresyonu, osteosarkom başlangıcı ve ilaç direnci ile ilişkilendirilmiştir (Song ve diğerleri, 2017). Wnt/β-katenin sinyallemesinde, genel olarak, GSK-3β bir bozunma kompleksi oluşturarak β-katenin bozunmasını kontrol eder. GSK-3β'nın hücrede aktivasyonunun artmasıyla β-kateninin çekirdeğe geçişi inhibe edilir ve dolayısıyla β-kateninin çekirdekte hücre canlılığını uyaran genleri aktifleştirmesi engellenmektedir (Örenlili Yaylagül ve Ülger 2020). GSK-3, genellikle inaktivasyonunu düzenleyen AKT tarafından fosforile edildiğinden, PI3K/PTEN/AKT/GSK-3/mTORC1 yolunun bir bileşeni olarak kabul edilir. GSK-3 ekspresyonu kanserde yer alan apoptoz, hücre döngüsünün durdurulması, hücresel yaşlanma, karsinogenez ve kemoterapi direnci gibi birden fazla biyokimyasal süreci etkileyebilmektedir (Duda ve diğerleri, 2020). GSK-3β ayrıca DNA onarım faktörlerinin fosforilasyonu ve bunların kromatine bağlanmasını etkileyerek DNA onarımında da görev yapmaktadır (Lin ve diğerleri, 2020). GSK-3β'nın, osteosarkoma hücrelerinde Wnt/β-katenin sinyal yolunu inhibe ederek apoptoza ve proliferasyonun inhibisyonuna yol açabildiği bildirilmektedir (Liu ve diğerleri., 2024). Mevcut çalışmamızdaki verilerimiz betaninin Wnt/β-katenin sinyal yolağında yer alan genlerin ifadesini düzenleyerek osteosarkoma proliferasyonu ve apoptozu üzerinde etkili olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, Betaninin Saos-2 osteosarkoma hücre hatlarında anti-tümör etkileri ve ilgili moleküler mekanizmaları değerlendirilmiştir. Sonuçlarımız birlikte ele alındığında, betaninin OS hücrelerinde Wnt/β-katenin ve PI3K/Akt/mTOR sinyal yollarını düzenleyerek *in vitro* osteosarkoma hücrelerinin büyümesini baskılayabileceğini ortaya koymaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Osteosarkoma, çocuklarda ve ergenlerde en sık görülen primer kemik kanseri olarak tanımlanmaktadır. Heterojen yapısı nedeniyle teşhisinin zor olması, ölümcül metastaz gelişiminin fazla olması ve mevcut tedavilere direnç gösterme eğiliminin yüksek olması osteosarkoma sağ kalım oranlarını düşürmektedir. Bu durum kanser araştırmacılarını sağlıklı hücrelerde sitotoksik etki göstermeyen antikanserojen özellikleri tespit edilen doğal biyoaktif bileşiklere yönlendirmiştir. Bu nedenle etkinliği yüksek ve toksisitesi düşük yardımcı anti-osteosarkom doğal ilaçlarının geliştirilmesi gerekmektedir. Kırmızı pancarda (*Beta vulgaris*) en fazla bulunan ve karakteristik kırmızı rengini veren biyoaktif bileşik betaninin meme, kolon, karaciğer, yumurtalık, pankreas, prostat, oral skuamöz hücreli karsinom, rahim ağzı ve osteosarkoma hücre hatlarında apoptozu indükleyerek antikanserojen etkiler gösterdiği bulunmuştur. Mevcut çalışmada Saos-2 hücrelerinin %50'sini inhibe eden betanin dozunun 330 µM olduğu hesaplanmıştır. Ek olarak, betanin uygulamasıyla Saos-2 hücrelerinde apoptozun doza bağlı olarak arttığı bulunmuştur.

PI3K/Akt/mTOR yolu aktivasyonu kanser hücresi çoğalmasını ve metastazını teşvik edebileceği için çok sayıda kötü huylu dokuda düzensizliği söz konusudur. Ek olarak, Wnt/β-katenin sinyal yolunun kanser gelişiminin erken evresinde önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir. Bu da hücre çoğalmasını güçlü bir şekilde uyardığını göstermektedir. Wnt/ β-katenin ve PI3K/AKT/mTOR yollarının karşılıklı olarak kendilerini kontrol etme yeteneği, osteosarkomada seçici inhibitörlere karşı direnç mekanizmalarından birini temsil etmektedir. Özellikle Wnt/β-katenin sinyallemesindeki genetik değişikliklerle yönlendirilen kanserlerde, Wnt/β-katenin ve PI3K/AKT/mTOR yolları arasındaki ilişkiyi ve bunların birer terapötik hedef olarak kabul edilmesi gerektiği hipotezine yol açmaktadır. Çalışmada betanin uygulamasının PI3K/AKT/mTOR ve Wnt/ β-katenin sinyal yolakları genlerinin mRNA ifadelerini anlamlı olarak değiştirdiği belirlenmiştir.

Kırmızı pancarda en yoğun bulunan biyoaktif bileşik betaninin osteosarkomada alternatif bir tedavi aracı olabileceği düşünülmektedir. Kanser tedavilerinde kullanılan kemoterapötik ilaçlar ile birlikte kullanımının ilaç etkinliğini arttırdığı ve sağlıklı hücreler üzerindeki olumsuz etkileri azalttığı bildirilmektedir. Bu çalışmalardan hareketle kemoterapi ilaçlarına direnç

gösterme eğilimi yüksek olan osteosarkomada betaninin ilaç etkinliğini arttırabileceği tahmin edilebilmekte ancak bunun belirlenmesi ve desteklenmesi için bilimsel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Kırmızı pancar bu biyoaktif bileşenleri sayesinde antikanser ve kemopreventif özelliklere sahiptir ve fonksiyonel gıda olarak sağlıklı bireylere önerilebilmektedir. Ancak kanser hastalarında tedavi sırasında tüketimiyle ilgili klinik düzeyde çalışma bulunmadığı için bir öneri verilememektedir. Kırmızı pancarın diyetteki yerinin kanserin önlenmesi ve tedavisindeki etkinliğini belirleyebilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, Betaninin Saos-2 osteosarkoma hücre hatlarında anti-tümör etkileri ve ilgili moleküler mekanizmaları değerlendirilmiştir. Betaninin osteosarkoma hücrelerinde proliferasyonu baskılayıp apoptozu indüklediği, aynı zamanda da Wnt/β-katenin ve PI3K/Akt/mTOR sinyal yolları aracılığı ile *in vitro* tümör baskılanmasının sağlanabileceğini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

Akan, S., Horzum, Ö., Güneş, N. T. (2019, 02-06 Ekim). *Fonksiyonel gıda kaynağı 'kırmızı pancar'.* (Sözlü Bildiri). In Proceedings Book of 5th International Eurasian Congress on Natural Nutrition, Healthy Life & Sport. Ankara, Türkiye.

American Cancer Society, (2018). The History of Cancer. https://www.cancer.org/cancer/understanding-cancer/history-of-cancer/what-is-cancer.html 08.12.2023 tarihinde erişildi.

Amjadi, S., Mesgari Abbasi, M., Shokouhi, B., Ghorbani, M., & Hamishehkar, H. (2019). Enhancement of therapeutic efficacy of betanin for diabetes treatment by liposomal nanocarriers. *Journal of Functional Foods*.

Asati, V., Mahapatra, D. K., & Bharti, S. K., (2016). PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 109, 314–341. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.012

Baião, D. d. S., Silva, D. V. d., & Paschoalin, E. M. D. A. a. M. F. (2017). Nutritional, Bioactive and Physicochemical Characteristics of Different Beetroot Formulations. In D. N. Karunaratne, & G. Pamunuwa (Eds.), *Food Additives. IntechOpen.* https://doi.org/10.5772/intechopen.69301

Barbosa, M.I.A., Belinha, J., Jorge, R.M.N., Carvalho, A.X., (2023). Computationally modelling cell proliferation: A review. *International Journal for Numerical Methods in Biomedical Engineering*; 39(7): e3715. Doi:10.1002/cnm.3715

Bakırcı, Ş. A. (2024). *Fonksiyonel içecek üretiminde kırmızı pancar kabuklarının değerlendirilmesi.* Yüksek Lisans Tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.

Beird, H.C., Bielack, S.S., Flanagan, A.M. et al. Osteosarcoma. *Nature Reviews Disease Primers*,8 77 (2022). https://doi.org/10.1038/s41572-022-00409-y

Calva-Estrada, S. J., Jiménez-Fernández, M., & Lugo-Cervantes, E. (2022). Betalains and their

applications in food: The current state of processing, stability and future opportunities in the industry. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 4, 100089.

Ceclu, L., & Nistor, O. V. (2020). Red beetroot: Composition and health effects—A review. *Journal of Nutritional Medicine and Diet Care*, 6(1), 1-9.

Chandrasekaran, R., Yadav, S. A., Periakaruppan, R., Prabukumar, S., Abomughaid, M. M., Al-Dayan, N., Al-Digi, Y., Dhanasekaran, S. (2021). Augmented cell signaling by betanin insights cancer cell remodeling: A molecular docking and experimental approach. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 3, 3161. https://doi.org/10.33263/BRIAC123.31613172

Chatterjee, A., Paul, S., Bisht, B., Bhattacharya, S., Sivasubramaniam, S., & Paul, M. K. (2022). Advances in targetingthe WNT/βcatenin signaling pathway in cancer. *Drug Discovery Today*, 27(1), 82-101.

Choi, J. & Ro, J. (2021). The 2020 who classification of tumors of bone: an updated review. *Advances In Anatomic Pathology*, 28 (3), 119-138. Doi: 10.1097/PAP.0000000000000293.

Clement, Y. N., Mahase, V., Jagroop, A., Kissoon, K., Maharaj, A., Mathura, P., Quan, C. M., Ramadhin, D., & Mohammed, C. (2016). Herbal remedies and functional foods used by cancer patients attending specialty oncology clinics in Trinidad. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 399. https://doi.org/10.1186/s12906-016-1380-x

Coimbra, P. P. S., Silva-E-Silva, A. C. A. G. D., Antonio, A. D. S., Pereira, H. M. G., Veiga-Junior, V. F. D., Felzenszwalb, I., Araujo-Lima, C. F., & Teodoro, A. J. (2023). Antioxidant capacity, antitumor activity and metabolomic profile of a beetroot peel flour. *Metabolites*, 13(2), 277. https://doi.org/10.3390/metabo13020277

Cole, S., Gianferante, D. M., Zhu, B., & Mirabello, L. (2022). Osteosarcoma: a surveillance, epidemiology, and end results program-based analysis from 1975 to 2017. *Cancer*, 128(11), 2107–2118. https://doi.org/10.1002/cncr.34163

Çarhan, A., Ercan, E., & Yalçınkaya, T. (2016). Dijital PZR ve kullanım alanları. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 73(2), 183-198.

Daisy Precilla, S., Biswas, I., Kuduvalli, S. S., & Anitha, T. S. (2022). Crosstalk between PI3K/AKT/mTOR and WNT/β-Catenin signaling in GBM- Could combination therapy

checkmate the collusion? *Cellular Signalling*, *95*, 110350. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2022.110350

Das, S., Filippone, S.M., Williams, D.S. et al. (2016). Beet root juice protects against doxorubicin toxicity in cardiomyocytes while enhancing apoptosis in breast cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 421, 89–101. https://doi.org/10.1007/s11010-016-2789-8

Duda, P., Akula, S. M., Abrams, S. L., Steelman, L. S., Martelli, A. M., Cocco, L., Ratti, S., Candido, S., Libra, M., Montalto, G., Cervello, M., Gizak, A., Rakus, D., & McCubrey, J. A. (2020). Targeting GSK3 and Associated Signaling Pathways Involved in Cancer. *Cells*, 9(5), 1110. https://doi.org/10.3390/cells9051110

Esatbeyoglu, T., Wagner, A. E., Motafakkerazad, R., Nakajima, Y., Matsugo, S., & Rimbach, G. (2014). Free radical scavenging and antioxidant activity of betanin: electron spin resonance spectroscopy studies and studies in cultured cells. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 73, 119–126. https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.08.007

Esatbeyoglu, T., Wagner, A. E., Schini-Kerth, V. B., & Rimbach, G. (2015). Betanin--a food colorant with biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(1), 36–47. https://doi.org/10.1002/mnfr.201400484

Etxabide, A., Maté, J. I., & Kilmartin, P. A. (2021). Effect of curcumin, betanin and anthocyanin containing colourants addition on gelatin films properties for intelligent films development. *Food Hydrocolloids*, 115, 106593.

Fang, F., VanCleave, A., Helmuth, R., Torres, H., Rickel, K., Wollenzien, H., Sun, H., Zeng, E., Zhao, J., Tao, J., (2018). Targeting the Wnt/βcatenin pathway in human osteosarcoma cells. *Oncotarget*. Dec 4;9(95):36780-36792. Doi: 10.18632/oncotarget.26377. PMID: 30613366; PMCID: PMC6298399.

Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2024). Global cancer observatory: cancer today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from https://gco.iarc.who.int/today Erişim tarihi: 01.08.2024

Fruman, D. A., Chiu, H., Hopkins, B. D., Bagrodia, S., Cantley, L. C., & Abraham, R. T. (2017). The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell*, 170(4), 605–635.

https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.029

Gedikli, S. (2013). *Melatoninin mcf-7 hücre kültüründeki apoptoz aktivasyonunun ve sitotoksisitesinin polimeraz zincir reaksiyonu (pcr), mtt hücre canlılık testi ve immunsitokimya yöntemleriyle araştırılması*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Glaviano, A., Foo, A.S.C., Lam, H.Y. et al. (2023) PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. *Molecular Cancer*, 22, 138. https://doi.org/10.1186/s12943-023-01827-6

Green, M. R., & Sambrook, J. (2018). Analysis and normalization of real-time polymerase chain reaction (pcr) experimental data. *Cold Spring Harbor Protocols*, (10), 10.1101/pdb. Top 095000. https://doi.org/10.1101/pdb.top095000

Hadipour, E., Taleghani, A., Tayarani-Najaran, N., Tayarani-Najaran, Z. (2020). Biological effects of red beetroot and betalains: A review. *Phytotherapy Research*. 34: 1847–1867. https://doi.org/10.1002/ptr.6653

Hız, M. (2014) Osteosarkom, malign fibröz histiyositom–klinik radyoloji, patoloji ve tedavi stratejileri. *TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi,* 13:227–239 doi: 10.14292/totbid.dergisi.2014.25

Hosseini, F., Alemi, F., Malakoti, F., Mahmoodpoor, A., Younesi, S., Yousefi, B., & Asemi, Z. (2021). Targeting Wnt/β-catenin signaling by microRNAs as a therapeutic approach in chemoresistant osteosarcoma. *Biochemical Pharmacology*, 193, 114758. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114758

Hoxhaj, G., & Manning, B. D. (2020). The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nature reviews*. Cancer, 20(2), 74–88. https://doi.org/10.1038/s41568-019-0216-7

International Agency for Research on Cancer (IARC) (2022). Cancer Tomorrow Lyon, France: *International Agency forResearch on Cancer*. Data version: Globocan 2022 (version 1.1) Revision date:08.02.2024 Available from:https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?years=2050&types=1&single_unit=500000 Erişim tarihi:01.08.2024

Kahya, S., Buyukcangaz, E., & Carlı, K. T. (2013). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

optimizasyonu. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 32(1), 31-38.

Kansara, M., Teng, M., Smyth, M. et al., (2014). Translational biology of osteosarcoma. *Nature Reviews Cancer* 14, 722–735. https://doi.org/10.1038/nrc3838

Kapadia, G. J., Azuine, M. A., Rao, G. S., Arai, T., Iida, A., & Tokuda, H. (2011). Cytotoxic effect of the red beetroot (*Beta vulgaris L.*) extract compared to doxorubicin (Adriamycin) in the human prostate (PC-3) and breast (MCF-7) cancer cell lines. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 11(3), 280–284. https://doi.org/10.2174/187152011795347504

Kapadia, G. J., Rao, G. S., Ramachandran, C., Iida, A., Suzuki, N., & Tokuda, H. (2013). Synergistic cytotoxicity of red beetroot (*Beta vulgaris L.*) extract with doxorubicin in human pancreatic, breast and prostate cancer cell lines. *Journal of complementary & integrative medicine*, 10, /j/jcim.2013.10.issue-1/jcim-2013-0007/jcim-2013-0007.xml. https://doi.org/10.1515/jcim-2013-0007

Kashyap, D., Garg, V. K., & Goel, N. (2021). Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Advances in Protein Chemistry And Structural Biology*, 125, 73–120. https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2021.01.003

Kaynak, A., Başkan, Z. N., Satış, B., Doğan, M. (2024). Kırmızı pancar (Beta vulgaris L.): Besinsel bileşimi, antioksidan özellikleri ve sağlık faydaları. *Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences*, 7(1), 52-61. https://doi.org/10.46239/ejbcs.1395054

Lechner, J. F., & Stoner, G. D. (2019). Red beetroot and betalains as cancer chemopreventative agents. *Molecules*, 24(8), 1602.

Lechner, J. F., Wang, L. S., Rocha, C. M., Larue, B., Henry, C., McIntyre, C. M., Riedl, K. M., Schwartz, S. J., & Stoner, G. D. (2010). Drinking water with red beetroot food color antagonizes esophageal carcinogenesis in N-nitrosomethylbenzylamine-treated rats. *Journal Of Medicinal Food*, 13(3), 733–739. https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0280

Lee, E. J., An, D., Nguyen, C. T., Patil, B. S., Kim, J., & Yoo, K. S. (2014). Betalain and betaine composition of greenhouse- or field-produced beetroot (*Beta vulgaris L.*) and inhibition of HepG2 cell proliferation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(6), 1324–1331. https://doi.org/10.1021/jf404648u

Lin, J., Song, T., Li, C., & Mao, W. (2020). GSK-3β in DNA repair, apoptosis, and resistance of chemotherapy, radiotherapy of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-*

Molecular Cell Research, *1867*(5), 118659. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118659

Liu J, Velu P, Vijayalakshmi A, Zareian M, Xi H. (2023). Betanin inhibits PI3K/AKT/mTOR/S6 signaling pathway, cell growth and death in osteosarcoma MG-63 cells. *Environmental Toxicology*. 38(9): 2173-2181. Doi:10.1002/tox.23854

Liu, L., Michowski, W., Kolodziejczyk, A., & Sicinski, P. (2019). The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation. *Nature cell biology*, 21(9), 1060–1067. https://doi.org/10.1038/s41556-019-0384-4

Liu, S., Liu, C., Wang, Y., Chen, J., He, Y., Hu, K., Li, T., Yang, J., Peng, J., & Hao, L. (2024). The role of programmed cell death in osteosarcoma: From pathogenesis to therapy. *Cancer Medicine*, 13(10), e7303. https://doi.org/10.1002/cam4.7303

Mahami, N., Abedimanesh, N., Asghari, S., Mohammadnejad, K., Eskandari, M.R., Nejadebrahimi, Z., Ahangar, H., Nedaei, K., Fathi, M., Noori, E. and Motlagh, B. (2022), Effects of betanin on AMPK, Sirtuin1, and Sirtuin6 gene expression and inflammatory cytokines levels in peripheral blood mononuclear cells of patients with coronary artery disease. *Nutrition & Food Science*, Vol. 52 No. 5, pp. 843-857. https://doi.org/10.1108/NFS-09-2021-0272

Majtnerová, P., Roušar, T., (2018). An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Molecular Biology Reports* 45, 1469–1478. https://doi.org/10.1007/s11033-018-4258-9

Mancini, M. C. S., Ponte, L. G. S., Silva, C. H. R., Fagundes, I., Pavan, I. C. B., Romeiro, S. A., da Silva, L. G. S., Morelli, A. P., Rostagno, M. A., Simabuco, F. M., & Bezerra, R. M. N. (2021). Beetroot and leaf extracts present protective effects against prostate cancer cells, inhibiting cell proliferation, migration, and growth signaling pathways. *Phytotherapy Research*, 35(9), 5241–5258. https://doi.org/10.1002/ptr.7197

Misaghi, A., Goldin, A., Awad, M., & Kulidjian, A. A. (2018). Osteosarcoma: a comprehensive review. *SICOT-J*, 4, 12. https://doi.org/10.1051/sicotj/2017028

Montazersaheb, S., Jafari, S., Aytemir, M. D., Ahmadian, E., Ardalan, M., Zor, M., Nasibova, A., Monirifar, A., & Aghdasi, S. (2023). The synergistic effects of betanin and radiotherapy in a prostate cancer cell line: an in vitro study. *Molecular Biology Reports*, 50(11), 9307–9314. https://doi.org/10.1007/s11033-023-08828-0

National Cancer Institute (NCI),2021, Cancer Statics https://seer.cancer.gov/statfacts/html/nhl.html adresinden 04.09.2022 tarihinde erişildi.

Nepstad, I., Hatfield, K. J., Grønningsæter, I. S., & Reikvam, H. (2020). The PI3K-Akt-mTOR Signaling Pathway in Human Acute Myeloid Leukemia (AML) Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2907. https://doi.org/10.3390/ijms21082907

Nowacki, L., Vigneron, P., Rotellini, L., Cazzola, H., Merlier, F., Prost, E., Ralanairina, R., Gadonna, J.-P., Rossi, C., and Vayssade, M. (2015) Betanin-enriched red beetroot (*beta vulgaris L.*) extract ınduces apoptosis and autophagic cell death in MCF-7 cells. *Phytotherapy. Research*., 29: 1964–1973. doi: 10.1002/ptr.5491

Örenlili Yaylagül, E., & Ülger, C. (2020). The effect of baicalein on Wnt/β-catenin pathway and miR-25 expression in Saos-2 osteosarcoma cell line. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 50(44), 1168–1179. https://doi.org/10.3906/sag-2001-161

Özdemir, A. (2022). *İskelet osteosarkomu tanısı alan hastaların klinikopatolojik özelliklerin retrospektif değerlendirilmesi*. Uzmanlık Tezi, Bursa Uludağ Üniveritesi Tıp Fakültesi, Bursa.

Özyurt, V. H., Saralı, H., & Ötleş, S. (2019). Betalain ekstraktlarının gıdalarda kullanım olanakları. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 25(7), 864-870.

Peng, Y., Wang, Y., Zhou, C., Mei, W., & Zeng, C. (2022). PI3K/AKT/mTOR pathway and ıts role in cancer therapeutics: are we making headway? *Frontiers in Oncology*, 12, 819128. https://doi.org/10.3389/fonc.2022.819128

Perry, J. A., Kiezun, A., Tonzi, P., Van Allen, E. M., Carter, S. L., Baca, S. C., Cowley, G. S., Bhatt, A. S., Rheinbay, E., Pedamallu, C. S., Helman, E., Taylor-Weiner, A., McKenna, A., DeLuca, D. S., Lawrence, M. S., Ambrogio, L., Sougnez, C., Sivachenko, A., Walensky, L. D., Wagle, N., … Janeway, K. A. (2014). Complementary genomic approaches highlight the PI3K/mTOR pathway as a common vulnerability in osteosarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(51), E5564–E5573. https://doi.org/10.1073/pnas.1419260111

Phukan, S., Babu, V. S., Kannoji, A., Hariharan, R., & Balaji, V. N. (2010). GSK3-beta: role in therapeutic landscape and development of modulators. *British Journal of Pharmacology*, *160*(1), 1–19. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00661.x

Piasna-Słupecka, E., Leszczyńska, T., Drozdowska, M., Dziadek, K., Domagała, B., Domagała, D., & Koronowicz, A. (2023). Young shoots of red beet and the root at full maturity ınhibit proliferation and ınduce apoptosis in breast cancer cell lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 6889. https://doi.org/10.3390/ijms24086889

Pistritto, G., Trisciuoglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*, *8*(4), 603–619. https://doi.org/10.18632/aging.100934

Polturak, G., & Aharoni, A. (2019). Advances and future directions in betalain metabolic engineering. *The New Phytologist*, 224(4), 1472–1478. https://doi.org/10.1111/nph.15973

Punia Bangar, S., Singh, A., Chaudhary, V., Sharma, N., & Lorenzo, J. M. (2022). Beetroot as a novel ingredient for its versatile food applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(26), 8403–8427. https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2055529.

Qin, Y., Liu, Y., Zhang, X., & Liu, J. (2020). Development of active and intelligent packaging by incorporating betalains from red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel into starch/polyvinyl alcohol films. *Food Hydrocolloids*, 100, 105410.

Rahimi, P., Abedimanesh, S., Alireza, S., Namin, M., Ostadrahimi, A., (2019) Betalains, the nature-inspired pigments, in health and diseases, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59:18, 2949-2978, DOI: 10.1080/10408398.2018.1479830

Rakshanaa, R., Shafreen, M. & Kumar, N., (2022). Inhibition of proliferation in ovarian cancer cell line (PA-1) by the action of green compound “betanin”. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 194, 71–83 . https://doi.org/10.1007/s12010-021-03744-0

Romero, S. A., Pavan, I. C. B., Morelli, A. P., Mancini, M. C. S., da Silva, L. G. S., Fagundes, I., Silva, C. H. R., Ponte, L. G. S., Rostagno, M. A., Bezerra, R. M. N., & Simabuco, F. M. (2021). Anticancer effects of root and beet leaf extracts (*Beta vulgaris L.*) in cervical cancer cells (HeLa). *Phytotherapy Research*, 35(11), 6191–6203. https://doi.org/10.1002/ptr.7255

Rothzerg, E.; Xu, J.; Wood, D., (2023). Different subtypes of osteosarcoma: histopathological patterns and clinical behaviour. *Journal of Molecular Pathology***.** 4, 99-108. https://doi.org/10.3390/jmp4020011

Saber, A., Abedimanesh, N., Somi, MH. *et al.* (2023). Anticancer properties of red beetroot hydro-alcoholic extract and its main constituent; betanin on colorectal cancer cell lines. *BMC Complementary Medicine and Therapies,* 23, 246 https://doi.org/10.1186/s12906-023-04077-7

Salimi, A., Bahiraei, T., Ahdeno, S., Vatanpour, S., & Pourahmad, J. (2020). Evaluation of cytotoxic activity of betanin against U87MG human glioma cells and normal human lymphocytes and ıts anticancer potential through mitochondrial pathway. *Nutrition and Cancer*, 73(3), 450–459. https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1764068

Schneider-Teixeira, A., Molina-García, A. D., Alvarez, I., Staffolo, M. D., & Deladino, L. (2022). Application of betacyanins pigments from Alternanthera brasiliana as yogurt colorant. *LWT Food Sience and Tecnology*, 159, 113237.

Silva, D. V. T., dos Santos Baião, D., de Oliveira Silva, F., Alves, G., Perrone, D., Del Aguila, E. M., & Paschoalin, V. M. F. (2019). Betanin, a natural food additive: Stability, bioavailability, antioxidant and preservative ability assessments. *Molecules*, 24(3)

Skezely, D. ve Mate, M. (2022) Red Beetroot (*Beta Vulgaris L.*), P. Kaushik (Ed.) *Advances in Root Vegetables Research,* page.1-22, Budapest: IntechOpen. http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.106692

Song, N., Sun, C., & Wang, Y. (2017). Targeted inhibition of miR-340 on β-catenin to potentiate Adriamycin sensitivity of osteosarcoma Saos-2 cells. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology.*, 10, 4587-4594. ISSN:1936-2625/IJCEP0048194

Sutariya, B., & Saraf, M. (2017). Betanin, isolated from fruits of Opuntia elatior Mill attenuates renal fibrosis in diabetic rats through regulating oxidative stress and TGF-β pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, 198, 432–443. https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.12.048

Swarna, J., Lokeswari, T. S., Smita, M., & Ravindhran, R. (2013). Characterisation and determination of in vitro antioxidant potential of betalains from Talinum triangulare (Jacq.) *Willd. Food Chemistry*, 141(4), 4382-4390.

Swartz, M. C., Allen, K., Deer, R. R., Lyons, E. J., Swartz, M. D., & Clifford, T. (2019). A narrative review on the potential of red beetroot as an adjuvant strategy to counter fatigue in children with cancer. *Nutrients*, 11(12), 3003. https://doi.org/10.3390/nu11123003

Şimşek, A. (2019). Kırmızı pancar (Beta vulgaris L.) betalainleri üzerine termal destekli ultrasonik ekstraksiyonun etkisi. *GIDA*, 44 (2): 318-327 doi: 10.15237/gida.GD19027

Terzioğlu, G., Keskin, A. Ü., & Yanıkkaya Demirel, G. (2013). Hücre proliferasyonu ölçüm yöntemleri ve çeşitli ticari proliferasyon kitlerinin karşılaştırılması. *Turkish Journal of Immunology*, 1(3), 74-89.

Toth, S., Jonecova, Z., Maretta, M., Curgali, K., Kalpakidis, T., Pribula, M., ... & Kruzliak, P. (2019). The effect of Betanin parenteral pretreatment on Jejunal and pulmonary tissue histological architecture and inflammatory response after Jejunal ischemia-reperfusion injury. *Experimental and Molecular Pathology*, *110*, 104292.

Turp GY, Kazan H, Ünübol H. (2016). Sosis üretiminde doğal renk maddesi ve antioksidan olarak kırmızı pancar tozu kullanımı". *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 12(2), 303-311.

United State Department of Agriculture (USDA), (2019). USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 25. https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/169145/nutrients(Erişim tarihi:10.10.2024). Üü

Vuranok N. (2022), Hastalıkların tedavisinde umut vadeden yeni hedef: foxo transkripsiyon faktörleri. *Hipokrat Tıp Dergisi/ Hıppocrates Medıcal Journal*, 2(1):25-32.

Wang, R., Song, F., Li, S., Wu, B., Gu, Y., & Yuan, Y. (2019). Salvianolic acid A attenuates CCl_4-induced liver fibrosis by regulating the PI3K/AKT/mTOR, Bcl-2/Bax and caspase-3/cleaved caspase-3 signaling pathways. *Drug Design, Development and Therapy*, 13, 1889–1900. https://doi.org/10.2147/DDDT.S194787

Wang, K.-D., Zhu, M.-L., Qin, C.-J., Dong, R.-F., Xiao, C.-M., Lin, Q., Wei, R.-Y., He, X.-Y., Zang, X., Kong, L.-Y., & Xia, Y.-Z. (2023). Sanguinarine induces apoptosis in osteosarcoma by attenuating the binding of STAT3 to the single-stranded DNA-binding protein 1 (SSBP1) promoter region. *British Journal of Pharmacology*, 180(24), 3175–3193. https://doi.org/10.1111/bph.16202

Xu, G., He, Z., & Liu, Y. (2023). Arctigenin suppresses the proliferation and metastasis, and induces apoptosis and cycle arrest of osteosarcoma cells by inhibiting HMOX1 Expression. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 23(20), 2209–2216. https://doi.org/10.2174/1871520623666230913105845

Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z. C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*, 39(1), BSR20180992. https://doi.org/10.1042/BSR20180992

Yang, J., Nie, J., Ma, X. et al. (2019). Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Molecular Cancer* 18, 26 https://doi.org/10.1186/s12943-019-0954-x

Yaylagül, E.Ö, (2017*). Saos-2 osteosarkoma hücre hattında Baicalein'in WNT/β-Katenin yolağına ve Mir-25 ifadesine etkisi*, Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.

Zand, A., Enkhbilguun, S., Macharia, J. M., Varajti, K., Szabó, I., Gerencsér, G., Tisza, B. B., Raposa, B. L., Gyöngyi, Z., & Varjas, T. (2024). Betanin attenuates epigenetic mechanisms and uv-ınduced dna fragmentation in HaCaT cells: ımplications for skin cancer chemoprevention. *Nutrients*, 16(6), 860. https://doi.org/10.3390/nu16060860

Zhang, Y., Kwok-Shing Ng, P., Kucherlapati, M., Chen, F., Liu, Y., Tsang, Y. H., de , G., Jeong, K. J., Akbani, R., Hadjipanayis, A., Pantazi, A., Bristow, C. A., Lee, E., Mahadeshwar, H. S., Tang, J., Zhang, J., Yang, L., Seth, S., Lee, S., Ren, X., … Creighton, C. J. (2017). A pan-cancer proteogenomic atlas of pı3k/akt/mtor pathway alterations. *Cancer Cell*, 31(6), 820–832.e3. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.04.013

Zhong, J., Ding, S., Zhang, X., Di, W., Wang, X., Zhang, H., Chen, Y., Zhang, Y., & Hu, Y. (2023). To Investigate the Occurrence and Development of Colorectal Cancer Based on the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway. *Frontiers in Bioscience (Landmark edition)*, 28(2), 37. https://doi.org/10.31083/j.fbl2802037

Zhou, Y., Xu, J., Luo, H., Meng, X., Chen, M., & Zhu, D. (2022). Wnt signaling pathway in cancer immunotherapy. *Cancer Letters*, 525, 84-96.

Zou, X., Yu, K., Chu, X., & Yang, L. (2022). Betanin alleviates inflammation and ameliorates apoptosis on human oral squamous cancer cells SCC131 and SCC4 through the NF-κB/PI3K/Akt signaling pathway. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 36(8), e23094. https://doi.org/10.1002/jbt.23094

T.C.

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

"Betaninin Saos-2 Osteosarkoma Hücre Hattında Wnt/β-Katenin ve PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolakları Üzerindeki Etkisinin Araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans tezimdeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Fatime ALKAYA

Öğrencinin Adı ve Soyadı

… / …/ 2024

ÖZ GEÇMİŞ

Soyadı, Adı	: ALKAYA Fatime
Uyruk	: T.C.
Doğum yeri ve tarihi	: Antalya / 09.02.1997
Telefon	: 0 538 442 12 88
E-posta	:fatimealkaya0343@gmail.com
Yabancı dil	: İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	-	-
Y. Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	2021-2024
Lisans	Gazi Üniversitesi	2015-2019

BURSLAR ve ÖDÜLLER

TÜBİTAK BİDEB 2210-A Bursu (2022-2024)

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
-	-	-

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

-

2. PROJELER

"Betaninin Osteosarkoma Hücreleri Üzerine Etkileri" başlıklı Yüksek Lisans Tez Projesi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

3. BİLDİRİLER

A) Uluslarası Kongrelerde Sunulan Bildiriler

Günay, E., Alkaya, F. ve Karaman, A.D., (2022, Şubat 17-1) "*Organik Tarım Gıda Güvenliği Sağlar Mı*?" (Sözel Bildiri), 5th International Congress on Agriculture, Environment and Health, Page 400-414, Online Congress.

Alkaya, F., ve Yaylagül, E.Ö. (2023, Haziran 1-3). *Kırmızı Pancar (Beta Vulgaris) Bileşeni Betaninin Kanser ve Genler Üzerine Etkileri. (Sözel Bildiri).* 5th International Young Researchers Student Congress, Page 389-396, Olimpos, Antalya, Türkiye

B) Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler

-