

## ÖZET

Rahim ağzı kanseri serviksten kaynaklanmaktadır. Hücrelerin anormal çoğalması sebebi ile vücudun diğer kısımlarına yayılma söz konusudur. İnsanlarda bu hastalığın % 90 ında sebep papillomavirus enfeksiyonudur (HPV), çoğu insanda HPV enfeksiyonu olmakla birlikte serviks kanseri görülmez. Diğer risk faktörleri, sigara içmek, zayıf bağışıklık sistemi, doğum kontrol ilaçları, genç yaşta cinsel yaşama başlama ve çok eşlilik fakat bunlar hastalık gelişiminde daha az önem taşımaktadır. Tüm dünyada ölüm nedenlerinin serviks kanseri kadınlarda dördüncü sırada yer almaktadır.

Celastrol *Tripterygium wilfordii* bitkisinin köklerinden izole edilen bir kimyasaldır ve pentasiklik triterpenoiddir. Terpenoidler terapötik yönden aktif bitkisel kökenli maddelerdir ve kansere, kardiyovaskular ve nörodejeneratif rahatsızlıklara karşı kullanılmaktadır. Celastrol'ün hücrede sinyal yollarını modifiye etmesine ilişkin pek çok çalışma yapılmıştır. Celastrol'ün hücre çoğalmasını engellediği bulunmuş ve bu etkisi pro-apoptotik, anti-anjiyogenik, anti-metastatik ve anti-enflamatuvar aktivitelerle uyumluluk içindedir.

Bu çalışmanın amacı Celastrol'ün HeLa servikal kanseri hücre hatlarında yağ aside sentezi yolağına olan etkisini belirleyebilmektir. Bu nedenle önce Celastrol'ün hücre canlılığına olan etkisi doz ve zamana bağlı olarak belirlendi. Daha sonra Celastrol'ün apoptotik ve sağkalım yolaklarına olan etkileri moleküler düzeyde belirlendi ve bu veriler mikroskopik düzeyde elde edilen verilerle teyit edildi. Ayrıca Celastrol'ün reaktif oksijen türlerinin oluşumuna, hücre döngüsünün çalışmasına, yara iyileşmesine ve lipid sentez yolağına olan etkileri de araştırıldı.

Celastrol 0.01-1.0  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında HeLa servikal kanser hücrelerine uygulandığında doza bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı belirlendi ve bu araştırmada 0.075  $\mu\text{M}$  ve 1  $\mu\text{M}$  dozları kullanılarak sitotoksik veya sitostatik etkiye aracılık ettiği saptandı. Celastrol'ün farklı dozlarına 24 saat maruz bırakılan hücrelerin 1  $\mu\text{M}$  uygulamasında koloni oluşumunun kayda değer bir şekilde engellendiği görüldü.

HeLa hücrelerine Celestrol ilacı uygulandığında ilaç dozuna bağlı olarak kontrol hücreleri ile kıyaslandığında hücre canlılığının azaldığı bulundu, en fazla azalmanın 1 µM Celestrol uygulanan hücrelerde olduğu belirlendi. Daha sonra Dioc6 boyama yapılarak fluoresan mikroskopta aynı bulgular doğrulandı. Bunu ardışık DNA kırıklarının, dolayısı ile apoptotik hücreleri belirlemek amacı ile HeLa servikal kanser hücrelerine DAPI boyama yapıldı ve 1µM Celestrol uygulanan hücrelerde apoptozun teşvik olduğu gözlemlendi. Daha sonra reaktif oksijen türlerinin aktivitesini belirleyebilmek amacı ile DCFDA2H boyama yapılarak ilaç uygulandıktan 24 saat sonra Celestrol'ün doza bağlı olarak (1 µM), reaktif oksijen türlerini arttırdığı gözlemlendi. Buna ilave olarak 1 µM Celestrol'e maruz kalan hücrelerde p27 ve siklin E2 engellendiği belirlendi bu bulgu da hücre döngüsünde G1/S fazının aktivasyonunun önlenmesi anlamına gelmektedir. Öte yandan CDK 6, CDK 4, CDK 2 de doza bağlı olarak daha az etkilenme olduğu görüldü. Celestrol'ün siklin A1 üzerinde doza ve zamana bağlı olarak etkisinin olmadığı da saptandı. Celestrol'un lipid metabolizmasına olan etkisini servikal kanser hücrelerinde belirlemek amacı ile yağ asidi bağlayıcı protein 4 ün Celestrol'ün dozuna bağlı olarak arttığı saptandı. Perilipin ise en iyi karakterize edilmiş lipid damlacıkları ile uyumlu bir proteindir ve lipoliz regülasyonunda kritik rol oynamaktadır ve bu çalışmada kayda değer bir etkisi belirlenmedi; C/EBPα ve Asetil CoA miktarında ise ilacın dozuna bağlı olarak kayda değer olmamakla birlikte bir artışa neden olduğu saptandı. Celestrol'ün invaziv ve metastatik karakterlerinin belirleyebilmek için yara kapanma deneyi yapıldı ve 24 saat 1 µM Celestrol uygulaması yapıldığında yara iyileşmesi görülmedi ve zamanla yara açılması arttı, çünkü hücreler ilaç etkisiyle apoptoza eğilim göstermişlerdir ve 48 saat sonra 1 µM ilaçlı hücrelerde hücrelerin çok azaldığı görülmektedir. HeLa hücrelerine Celestrol ilacı uygulandığında ilaç dozuna bağlı olarak kontrol hücreleri ile kıyaslandığında hücre canlılığının azaldığı gösterildi, en fazla azalma 1 µM Celestrol uygulanan hücreler olarak belirlendi. Bu bulgulara ek olarak Celestrol HeLa hücreleri üzerinde

doza bağlı olarak lipid damlacıklarının oluşmasında azalmaya neden oluşu da saptandı. 0,075  $\mu\text{M}$  ve 1 $\mu\text{M}$  Celastrol'ün 24 saat uygulamasının hücre döngüsü üzerine olan etkisini göstermek için hücre akış sitometrisi analizi gerçekleştirildi. Kontrol, 0,075  $\mu\text{M}$  Celastrol ve 1 $\mu\text{M}$  Celastrol ile kıyaslandığında G0/G1 fazındaki hücreler arasında kayda değer bir fark belirlenemezken, S fazı hücrelerinde kontrole kıyasla 1  $\mu\text{M}$  Celastrol uygulamasında % 29 oranında bir artış saptandı. G2/M fazındaki hücrelerde de kontrole oranla 0.075 uygulamasında % 25 artış bulunurken, 1  $\mu\text{M}$  uygulamasında % 19 azalış belirlendi. SubG1 analiz edildiğinde ise 0.075 Celastrol uygulandığında 2 kat artış belirlenirken 1  $\mu\text{M}$  uygulandığında kayda değer bir fark belirlenememiştir. Özetle 0.075 Celastrol uygulamasında apoptoz tetiklenmiş, fakat diğer uygulamalarda ise kayda değer bir farklılık olmadığı saptanmıştır.

Sonuç olarak Celastrol servikal kanserin başlamasında, ilerlemesinde kayda değer rol oynamaktadır ve bu nedenle yeni terapötik stratejilerin tasarlanmasında önemli bir hedeftir. Bu alanda daha detaylı araştırmalara gereklilik vardır.

## ABSTRACT

Human papillomavirus infection is the main reason of cervical cancer. Cervical cancer occurs when the cells of the cervix grow abnormally and spread over to the other organs of the body. If it is invasive, this cancer affects the deeper tissues of the cervix. Celastrol isolated from root extracts of *Tripterygium wilfordii* and is a triterpenoid. These chemicals are therapeutically active phytochemicals to treat cancer, cardiovascular and neurodegenerative disorders. It is well estimated that celastrol can regulate different cell signaling pathways. Celastrol causes weight loss in animal models of obesity but the mechanisms of its effects is not clear yet. Celastrol's anti-angiogenic, anti-metastatic and anti-inflammatory activities detected and these affect closely correlated with its anti-proliferative effects.

The purpose of this study is to establish Celastrol effect on fatty acid synthesis pathway in HeLa cell lines. Therefore, first we targeted to reveal the role of Celastrol on cell viability depending on dose and time parameters. Then we established Celastrol effects on apoptotic and survival pathways by molecular and microscopic levels. Besides we tried to survey Celastrol's mode of action on reactive oxygen species formation, cell cycle progression, wound healing and lipid analyses.

Celastrol at 0.01-1.0  $\mu\text{M}$  treatments cell viability decreased depending dose and time applications and we determined the cytotoxic and cytostatic effects by using 0.075  $\mu\text{M}$  and 1  $\mu\text{M}$  doses. Besides 1  $\mu\text{M}$  Celastrol inhibited the colony formation significantly and we confirmed viability inhibition by Dioc6 staining procedure also. Then we applied DAPI staining to be able the DNA ladders that is represent apoptosis and we observed apoptosis stimulation at 1  $\mu\text{M}$  Celastrol treatment. Later we determined the increased ROS formation by DCFDA2H staining after 24-hour Celastrol treatment. P27 and cyclin E inhibited in 1  $\mu\text{M}$  Celastrol treated cells, that means G1/S phase activation of cell cycle prohibited and CDK 6, CDK 4, CDK 2 not effected significantly. Celastrol also was not effective on A1 cyclin depending on dose and time dependent manner. We also searched the Celastrol effect on lipid metabolism in HeLa cervical cell lines and we established increment in fatty acid binding protein 4 in dose-dependent

manner. Perilipin is lipid droplet-associated protein and play a role in lipolysis regulation, did not determined significant difference after Celastrol application, but we found slight stimulation C/EBP $\alpha$  and Acetyl CoA contents. Next step was to apply wound healing procedures to be able to establish the invasive and metastatic characteristic of Celastrol and 1  $\mu$ M Celastrol after 24 hours and we did not found wound healing effect and cells were tend to apoptosis and cell amount were decreased by the Celastrol treatment after 48 hours. Celastrol also caused to decrease lipid droplet formations in HeLa cervical cell lines. We also realized flow cytometry analysis to be able to show 0,075 and 1  $\mu$ M Celastrol effect on cell cycle. There was no difference at G0/G1 cell numbers in 0.075 and 1  $\mu$ M Celastrol treated cells, compare to the control condition. However, we established by 29% increase in S phase cell numbers compare to the control; this ratio was 25% for G2/M phase cells. When we treated 0.075  $\mu$ M Celastrol we found 19% decrease in SubG1 cells and no significant difference by 1  $\mu$ M treatment. In conclusion, Celastrol caused to apoptosis stimulation.

In summary, it is very important to understand Celastrol effect on cervical cancer molecular mechanism to design effective therapeutic strategies therefore, we need further researches.