

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA HÜCRE HATTINDA
SB203580 VE *GİNNALİN A*'NIN ANTİKANSER ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Pınar ÖZDEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman

Doç. Dr. Hasibe VURAL

KONYA-2018

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA HÜCRE HATTINDA
SB203580 VE GİNNALİN A'NIN ANTİKANSER ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Pınar ÖZDEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman

Doç. Dr. Hasibe VURAL


Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 171318001 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2018

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi 'PINAR ÖZDEN' in "Hepatosellüler Karsinoma Hücre Hattında SB203580 ve Ginnalin A'nın Antikanser Etkisinin Araştırılması" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya, Türkiye / 27.06.2018



Tez Danışmanı

Doç. Dr. Hasibe VURAL

N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İmzası

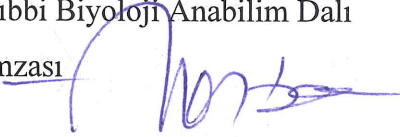
Jüri Üyesi

Doç. Dr. Ercan KURAR

N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İmzası



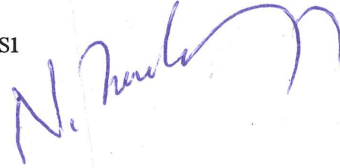
Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Nesrin TURAÇLAR

S.Ü. Sağlık Hizmetleri Meslek

Yüksek Okulu

İmzası



Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 5./07/2018 tarih ve 14./06. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü

İmzası



APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled "*Investigation of Anticancer Effect SB203580 and Ginnalin A on Hepatocellular Carcinoma (HCC) Cell Line*" by "*Pınar ÖZDEN*" that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of *Master of Science* in the Department of "**Medical Biology**", Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan

Konya, Turkey / 27.06.2018

Principal Advisor

Doç. Dr. Hasibe VURAL

N.E.Ü. Meram Faculty of Medical, Department of Medical Biology

Signature

Examination Committee Member

Doç. Dr. Ercan KURAR

N.E.Ü. Meram Faculty of Medical

Department of Medical Biology

Signature

Examination Committee Member

Dr. Öğr. Üyesi Nesrin TURAÇLAR

S.Ü. Health Services Vocational Department of

High School

Signature

This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of Health Sciences.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Director of Institute of Health Sciences

Date and Signature

BEYANAT

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih: 27.06.2018

Öğrencinin Adı Soyadı: Pınar ÖZDEN

İmzası:

[Ödevler](#)
[Öğrenciler](#)
[Not Defteri](#)
[Kütüphaneler](#)
[Takvim](#)
[Tartışma](#)
[Tercihler](#)

Bu sayfa hakkında

Bu sizin ödev kutunuzdur. Bir yazılı ödevi görüntülemek için yazılı ödevin başlığını seçin. Bir Benzerlik Raporunu görüntülemek için yazılı ödevin benzerlik sütunundaki Benzerlik Raporu ikonunu seçin. Tıklanabilir durumda olmayan bir ikon Benzerlik Raporunun henüz oluşturulmadığını gösterir.

HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA HÜCRE HATTINDA SB203580 V...

Gelen Kutusu | Görüntüleniyor: yeni ödevler ▼

Dosyayı Gönder Çevrimiçi Derecelendirme Raporu | Ödev ayarlarını düzenle | E-posta bildirmeyenler

Sil İndir Şuraya taşı...

<input type="checkbox"/>	Yazar	Başlık	Benzerlik	web	yayın	student papers	Puanla	cevap	Dosya	Ödev Numarası	Tarih
<input checked="" type="checkbox"/>	Pınar Özden	HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA HÜCRE HATTINDA ...	%8 %8	4%	3%	6%	--	--	ödev indir	972988691	06-Haz-2018

TEŐEKKÜR

Tez çalıőmamın planlanmasında, araőtırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini benden esirgemeyen değerli hocam ve danıőmanım Doç. Dr. Hasibe VURAL'a,

Yüksek lisans eğitimim sürecinde bilgi ve birikimleri ile bana her zaman yol gösteren Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Ercan KURAR'a, Öğretim Üyesi Doç. Dr. Gül DURSUN'a,

Tez çalışmam sırasında tecrübeleri ile bana destek olan Arő. Gör. Ebru AVCI'ya, güler yüzünü ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Arő. Gör. Canan EROĞLU'na ve Arő. Gör. İlknur ÇINAR'a

Araőtırmamızı destekleyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne,

Tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, her zaman yanımda bana destek olduklarını bildiğim sevgili ailem'e,
Sonsuz teőekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karaciğerin yapısı ve özellikleri	3
2.2. Karaciğer kanseri	4
2.2.1. Hepatosellüler karsinomanın epidemiyolojisi ve risk faktörleri	4
2.2.2. Hepatosellüler karsinomanın moleküler patogenezi.....	8
2.2.3. Hepatosellüler karsinoma belirtileri.....	10
2.2.4. Hepatosellüler karsinomanın tanısı	10
2.2.5. Hepatosellüler karsinomanın evrelendirilmesi	11
2.2.6. Hepatosellüler karsinomanın tedavisi	12
2.2.7. Ginnalin A	15
2.2.8. SB203580	17
2.2.9. Apoptoz.....	19
2.2.9.1. İntrinsik yol	21
2.2.9.2. Ekstrinsik yol.....	23
2.2.10. Hücre döngüsü	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Çalışmada kullanılan cihaz ve kimyasallar	28
3.1.1. Çalışmada kullanılan cihazlar	28
3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler	29
3.2. Hücre kültürü	29
3.2.1. Hücre hattının dondurulması	30
3.2.2. Dondurulmuş hücre hatlarının çözündürülmesi	30
3.2.3. Hücre hattının pasajlanması	30
3.3. Ginnalin A stok solüsyonunun hazırlanması.....	31
3.4. SB203580 stok solüsyonunun hazırlanması	31
3.5. Ginnalin A ve SB203580'in sitotoksik etkisinin belirlenmesi	31

3.6. Kaspaz-3 aktivitesi analizi	33
3.7. Apoptoz, nekroz ve hücre döngüsü ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi	34
3.7.1. Hücre hatlarından total RNA izolasyonu	34
3.7.2. cDNA sentezi	35
3.7.3. Primer dizaynı	35
3.7.4. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR).....	37
3.8. İstatistiksel analizler	37
4. BULGULAR	38
4.1. Ginnalin A ve SB203580'in sitotoksik etkisi	38
4.3. GA, SB203580 ve kombinasyonlarının apoptoz, nekroz ve hücre döngüsü ile ilişkili genlerinin ekspresyonları üzerine etkisi.....	40
4.4. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu bulguları	41
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	44
6. EKLER.....	77

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

AFP: Alfafetoprotein

AIF: Apoptoz İndükleyici Faktör

AJCC: Amerikan Birleşik Kanser Komitesi

APAF-1: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adenozin Trifosfat

BAX: BCL2-İlişkili X Protein

BCLC: Barselona Klinik Karaciğer Kanseri

BCL-2: B-hücre CLL/Lenfoma 2

BT: Bilgisayarlı Tomografi

CASP3: Kaspaz 3, Apoptoz-ilişkili Sistein Peptidaz

CASP7: Kaspaz 7, Apoptoz-ilişkili Sistein Peptidaz

CASP8: Kaspaz 8, Apoptoz-ilişkili Sistein Peptidaz

CASP9: Kaspaz 9, Apoptoz-ilişkili Sistein Peptidaz

CCND1: Siklin D1

CCND2: Siklin D2

CCND3: Siklin D3

CDKs: Siklin bağımlı kinazlar

CDK4: Siklin Bağımlı Kinaz 4

CDKN1A: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1A

cDNA: Komplementer Deoksiribonükleik Asit

CYCS: Sitokrom C

CYP2E1: Sitokrom P450 2E1

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik Asit

FAS: Fas (TNF Reseptör Süperailisi, Üye 6)

FASL: Fas Ligand (TNF Süperailisi, Üye 6)

FBS: Fetal Sığır Serumumu

GA: Ginnalin A

HCC: Hepatoselüler Karsinoma

HBV: Hepatit B

HCV: Hepatit C

IC₅₀: Öldürücü Doz 50

IL-2: İnterlökin-2

IL-6: İnterlökin-6

JAK/STAT: Janus protein kinaz/ sinyal iletici ve transkripsiyon aktive ediciler

MAPK: Mitojenle Aktive olan Protein Kinaz

MRI: Manyetik Rezonans Görüntüleme

µg: Mikrogram

µM: Mikromolar

MRG: Manyetik Rezonans Görüntüleme

NAFLD: Alkole Bağlı Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı

ng: Nanogram

PBS: Fosfat Tampon Solüsyonu

PEI: Perkütan Alkol Enjeksiyonu

PET: Pozitron Emisyon Tomografisi

PG: Plazma Glukoz Seviyesi

PKB: Protein Kinaz B

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Rb: Retinoblastom

RFA: Radyo Frekans Ablasyon

RNA: Ribonükleik Asit

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

RPM: Dakikada Devir Sayısı

SOCS: Sitokin Sinyal Supresörleri

TACE: Transarteriyel Kemombolizasyon

TARE: Transarteriyel Radyombolizasyon

TAE: Transarteriyel Embolizasyon

TNM: Tümör-Nod-Metastaz

XTT: 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Karaciğerin anatomik yapısı.....	3
Şekil 2.2. Hepatosellüler karsinoma için risk faktörleri	5
Şekil 2.3. <i>Acer</i> bitkisi ve GA'nın kimyasal yapısı.....	17
Şekil 2.4. MAPK sinyal yolağı ve p38-MAPK inhibitörü SB203580	18
Şekil 2.5. İntrinsik yol	22
Şekil 2.6. Ekstrinsik yol.....	24
Şekil 2.7. Hücre döngüsü	26
Şekil 3.1. Bradford protein standart eğrisi	34
Şekil 4.1. GA'nın Hep-3B hücre canlılığına etkisi	38
Şekil 4.2. SB203580'in Hep-3B hücre canlılığına etkisi	38
Şekil 4.3. SB203580-GA kombinasyonunun Hep-3B hücre canlılığına etkisi	39
Şekil 4.4. GA ve SB203580 kombinasyonunun izoblogramı.....	39
Şekil 4.5. GA, SB203580 ve kombinasyonlarının Kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi.....	40
Şekil 4.6. Çalışmada kullanılan genlerinin melt analiz eğrileri.....	41
Şekil 4.7. Apoptoz primerleri ile çoğaltılan bölgelerin agoroz jel görüntüsü.....	42
Şekil 4.8. Nekroz primerleri ile çoğaltılan bölgelerin agoroz jel görüntüsü.....	42
Şekil 4.9. Hücre döngüsünde önemli olan genler ile çoğaltılan bölgelerin agoroz jel görüntüsü.....	42
Şekil 4.10. GA ve SB203580'in apoptoz, nekroz ve hücre döngüsü ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesine etkisi.....	43

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. HCC için TNM evreleme sistemi ve HCC evreleri	12
Tablo 3.1. Kullanılan cihazlar.....	28
Tablo 3.2. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler	29
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan Hep-3B hücre hattının özellikleri	29
Tablo 3.4. CI değerlerine göre kombinasyon etkileri	32
Tablo 3.5. Çalışmada kullanılan primer dizileri	36

T.C.
NECMETİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÖZET

HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA HÜCRE HATTINDA *SB203580*
VE *GİNNALİN A* 'NİN ANTİKANSER ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Pınar ÖZDEN

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2018

İnsan popülasyonunda en sık görülen kanser tiplerinden biri olan hepatosellüler karsinoma (HCC) klinik olarak kullanılan kemoterapötik ve radyoterapötik ajanlara direncin gözlemlendiği ve tedavi seçeneklerinin kısıtlı olduğu kanser türlerinden biridir. Son yıllarda kullanılan ilaçların büyük bir kısmı bitki türevidir. Düşük toksisiteli doğal ürünlerin antikanserojenik etkilerinin araştırılması, kansere karşı yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde oldukça önemlidir. *Ginnalin A* (GA), *Acer* cinsinin önemli fenolik bileşenlerinden biridir. Çeşitli hücre hatları ile yapılan çalışmalarda GA'nın antikanserojenik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bir primidil imidazolü olan *SB203580*, p38 mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) inhibitörüdür ve çeşitli biyolojik süreçlerde p38-MAPK'ın rolünü aydınlatmak için kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bazı çalışmalarda *SB203580*'in, p38-MAPK'den bağımsız olarak hücre proliferasyonunu inhibe edebildiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada, Hep-3B HCC hücre hattında GA ile *SB203580* kombinasyonunun sitotoksik etkisinin belirlenmesi, Kaspaz-3 aktivitesi analizinin yanı sıra apoptoz, hücre döngüsü ve nekrozda önemli genlerin ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi ile antikanser etkinliğinin araştırılması hedeflenmiştir.

GA ve *SB203580*'nin hücre canlılığına etkisi XTT yöntemi ile belirlenmiştir. Kombinasyon uygulamasının etkinliği CompuSyn Version 1.0 yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir. GA ve *SB203580* uygulamaları sonrasında Kaspaz-3 aktivitesi, Kaspaz-3 analiz kit ile belirlenmiştir. Apoptoz, nekroz ve hücre döngüsü ile ilişkili genlerin ifadesindeki değişiklikler kantitatif gerçek zamanlı PZR (qPZR) ile analiz edilmiştir.

XTT sonuçlarına göre, GA ve *SB203580*'in Hep-3B hücre hattında, 72 saat için IC_{50} değerleri sırasıyla 155 μ M ve 32,5 μ M olarak bulunmuştur. GA ve *SB203580*'in birlikte hücre canlılığının %50'sini inhibe eden konsantrasyonlarda (GA:86,22 μ M, *SB203580*:17,24 μ M) additif etki gösterdiği saptanmıştır (CI=1). *SB203580* ve kombinasyon uygulaması sonrasında Kaspaz-3 aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 7,8 ve 8,2 kat artış tespit edilmiştir. qPZR sonuçlarına göre, GA uygulaması sonrasında *CASP3*, *CASP9* ve *CYCS* gen ekspresyonlarında anlamlı artış, *CCND1* gen ekspresyonunda anlamlı azalış tespit edilmiştir. Hücreler *SB203580* ile muamele edildiğinde ise *CASP3* ve *BAX* gen ekspresyonlarında anlamlı artış, *CCND1* ve *CDK4* gen ekspresyonunda anlamlı bir azalış gözlemlenmiştir. GA ve *SB203580* kombinasyonunun ise *CASP3*, *CASP9*, *BAX* ve *CYCS* gen ekspresyonlarında anlamlı artışa, *BCL2*, *CCND1* ve *CDK4* gen ekspresyonunda anlamlı azalışa neden olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, GA ve *SB203580*'nin hücre canlılığının %50'sini inhibe ettikleri dozlarda kombine kullanımları Hep-3B hücrelerinde additif etkiye neden olmaktadır. Ayrıca, Kaspaz-3 aktivitesinde artışa ek olarak, apoptoz ve hücre döngüsü ile ilişkili önemli genlerin ekspresyonlarını etkileyerek antikanser etki göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Ginnalin A, Hepatosellüler karsinoma, Hücre döngüsü, *SB203580*

REPUBLIC of TURKEY

NECMETTIN ERBAKAN UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE ANTICANCER EFFECT OF *SB203580*
AND *GINNALIN A* IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELL
LINE

PINAR ÖZDEN

DEPARTMENT OF MEDICAL BIOLOGY

MASTER THESIS/ KONYA 2018

Hepatocellular carcinoma (HCC), one of the most common types of cancer in human populations, is one of the cancer types in which chemotherapeutic and radiotherapeutic agents used clinically are resistant and treatment options are limited. Most of the drugs used in recent years are plant derivatives. The search for anticarcinogenic effects of low toxicity natural products is crucial in the development of new treatment strategies for cancer. *Ginnalin A* (GA) is one of the major phenolic components of the *Acer* genus. Studies with various cell lines have shown that GA has anticarcinogenic effect. SB203580, a pyridinyl imidazole, is a p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitor and is used to elucidate the role of p38-MAPK in various biological processes. However, in some studies SB203580 has been reported to be able to inhibit cell proliferation independent of p38-MAPK. In this study, it was aimed to determine the cytotoxic effect of the combination of GA and SB203580 in the Hep-3B HCC cell line, the assay of caspase-3 activity as well as the evaluation of expression levels of important genes in apoptosis, cell cycle and necrosis, and anticancer activity.

The effect of GA and SB203580 on cell viability was determined by the XTT method. The effectiveness of the combination applications was evaluated using CompuSyn Version 1.0 software. After GA and SB203580 applications, the activity of caspaz-3 was determined by the Caspaz-3 assay kit. Changes in the expression of genes associated with apoptosis, necrosis and cell cycle were analyzed by real-time PCR (qPZR).

According to the XTT results, the IC₅₀ values for 72 hours in the Hep-3B cell line of GA and SB203580 were found to be 155 µM and 32.5 µM, respectively. GA and SB203580 showed an additive effect (CI = 1) at concentrations inhibiting 50% of cell viability (GA: 86,22 µM, SB203580: 17,24 µM). After SB203580 and combination applications, Caspase-3 activity was 7.8 and 8.2 fold increased compared to the control group, respectively. qPCR results showed a significant increase in *CASP3*, *CASP9* and *CYCS* gene expressions and a significant decrease in *CCND1* gene expression after GA applications. When cells were treated with SB203580, a significant decrease in *CASP3* and *BAX* gene expression, a significant decrease in *CCND1* and *CDK4* gene expression was observed. GA and SB203580 resulted in a significant increase in *CASP3*, *CASP9*, *BAX* and *CYCS* gene expressions, a significant decrease in *BCL2*, *CCND1* and *CDK4* gene expression.

According to the results of this study, the combined use of GA and SB203580 at doses that inhibited 50% of cell viability caused additive effect in Hep-3B cells. Also, in addition to an increase in Caspase-3 activity, anticancer effects by affecting the expression of important genes associated with apoptosis and cell cycle.

Key words: Apoptosis, Cell cycle, Ginnalin A, Hepatocellular carcinoma, SB203580

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüm dünyada kansere bağlı ölümlerin üçüncü nedeni olan hepatoselüler karsinoma (HCC), %80-90'lık bir oran ile en sık görülen primer karaciğer kanseri türüdür (Tam 2003; Zhu ve ark. 2016). HCC'de kullanılan tipik tedavi yöntemleri karaciğer transplantasyonu, cerrahi rezeksiyon, trans-arteriyel kemoembolizasyon, radyoembolizasyon ve kemoterapidir (Raza ve Sood 2014; Golabi ve ark. 2017). Özellikle karaciğer transplantasyonu, karaciğer rezeksiyonu ve perkütan ablasyon etkili tedavi seçenekleridir. Ancak bu yöntemler sadece hastalığın erken evrelerinde etkili olmaktadır (Gwiasda ve ark. 2017). Ayrıca, hastalığın yavaş gelişmesi ve biyolojik belirteçlerin olmaması nedeniyle, HCC hastalarına genellikle geç tanı konmaktadır (Deng ve ark. 2017, Le ve ark. 2017). Bu nedenle, hastalara ileri evre tedavi yaklaşımı olan kemoterapi yöntemi uygulanmaktadır (Ikeda ve ark. 2018). Özellikle, çoklu kinaz inhibitörü olan *sorafenib*, ileri evre HCC hastalarında antianjiyogenik ajan olarak kullanılmakta ve sağkalım süresini artırabilmektedir (Llovet ve ark. 2008). Ancak, başlangıçta *sorafenib* intibitörüne yanıt veren hastalarda ilaç direnci gelişebilmektedir (Xu ve ark. 2016). Bu nedenle, HCC için yeni terapötik stratejilere ihtiyaç vardır.

Bitki, meyve ve sebze gibi doğal ürünlerde bulunan fenolik bileşiklerin antioksidan özelliklerinin yanı sıra antibakteriyel, antiviral, antiaterosklerotik, antiinflamatuvar ve antikanserojenik etkileri bulunmaktadır. Bu nedenle kansere karşı geliştirilen terapötik stratejilerden biri doğal ürünlerin potansiyel antikanser aktivitelerinden yararlanmaktır (Cai ve ark. 2004; Galati ve O'Brien 2004). *Acer* cinsi üyeleri antikanser etkinlikleri sıklıkla araştırılan önemli bitki gruplarıdır. *Ginnalin A*, *Acer* cinsinin önemli fenolik bileşenlerinden biridir. Yapılan çalışmalarda antioksidan, antibakteriyel, α -glukosidaz enzim inhibisyonu gibi çeşitli farmakolojik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Han ve ark. 2004; Honma ve ark. 2010). Ayrıca, insan meme kanseri ve insan kolorektal kanser hücrelerinde GA'nın antikanserojenik etkilere sahip olduğu belirtilmiştir (González ve ark. 2012; González ve ark. 2013).

Bir primidil imidazolü olan SB203580, p38 mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) inhibitörüdür ve çeşitli biyolojik süreçlerde p38-MAPK'ın rolünü

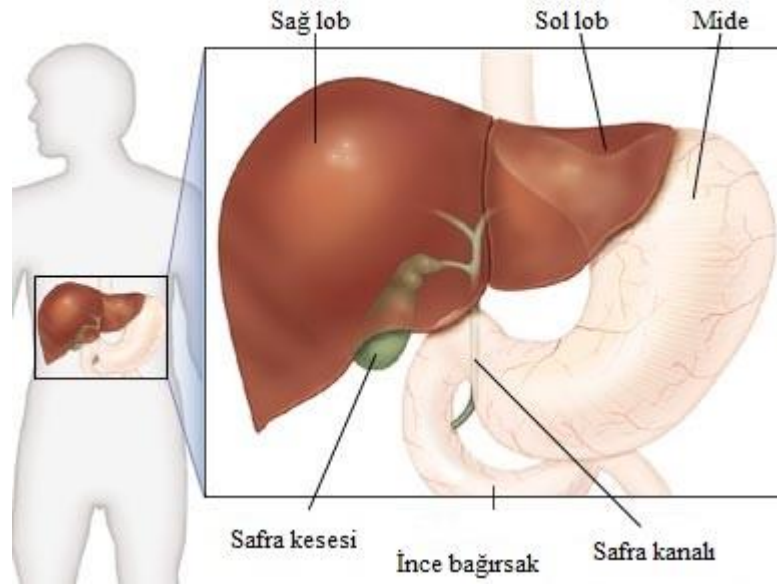
aydınlatmak için kullanılmaktadır (Zhang ve ark. 2012). Ayrıca, SB203580'in, p38-MAPK'den bağımsız olarak hücre proliferasyonunu baskıladığı rapor edilmiştir. SB203580'in bu antiproliferatif aktivitesi, bir protoonkogen olan protein kinaz B'nin (PKB) fosforilasyonunu inhibe etmesi ile ilişkilendirilmektedir (Lali ve ark. 2000).

Kansere karşı geliştirilen terapötik ajanlar sadece kanser hücrelerini değil, normal hücreleri de etkilemektedir. Ayrıca, bu ajanların yüksek dozlarla kullanılması yan etkilere sebep olmaktadır. Çeşitli kombinasyon uygulamaları yan etkileri azaltabilir. Aynı zamanda sinerjistik veya additif etkiye bağlı olarak, daha düşük dozlarda birlikte kullanımları, tek başlarına yüksek dozlarda uygulanmaları ile benzer etkilere sebep olabilir. Buradan yola çıkarak bu çalışmada, çeşitli kanser hücre hatlarında antikarsinojenik etkisi gösterilmiş bir fenolik bileşik olan GA ile p38-MAPK inhibitörü SB203580'in Hep-3B insan HCC hücreleri üzerindeki olası sinerjik veya additif etkisinin moleküler düzeyde araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğerin yapısı ve özellikleri

Erişkinlerde 1400-1700 gr ağırlığında, 25-30 cm uzunluğunda ve 14-16 cm genişliğinde olan karaciğer insan vücudunun en büyük iç organıdır. Karnın üst sağında, diyaframın altında, mide, bağırsak, safra kesesi ve pankreasın üst kısmında bulunmaktadır (Şekil 2.1). İki ön lob ve iki arka lobdan oluşan karaciğer en önemli salgı organlarından biridir (Board 2017).



Şekil 2.1: Karaciğerin anatomik yapısı

(<https://www.pinterest.es/pin/58546863884835236/?autologin=true> 16 Mayıs 2018)

Vücudun diğer bölümleri ile sindirim kanalı arasındaki kesişme noktasında bulunan karaciğer, metabolik homeostazının devam ettirilmesi açısından büyük bir öneme sahiptir (Kumar ve ark. 1994). Birçok proteinin sentezlenmesinde ve depolanmasında, karbonhidrat ve lipit metabolizmasında, kan pıhtılaşma faktörlerinin bazılarının üretilmesinde, ilaçların ve toksinlerin detoksifikasyonunda rol oynamaktadır (Fan 2010). Ayrıca, özellikle sindirim sisteminden gelen kan ilk olarak karaciğerden geçtiği için, mide, pankreas, kalın bağırsak, safra yolları, ince bağırsak gibi kanserlerin karaciğere yüksek oranda metastaz yaptıkları gözlenmektedir. Bunların yanında akciğer ve meme kanserlerinin de karaciğer metastazı oranı yüksektir (Kumar ve ark. 1994; Martinez-Ordoñez ve ark. 2018).

2.2. Karaciğer kanseri

Karaciğer kanseri, primer ve sekonder olmak üzere ikiye ayrılır. İlk olarak karaciğerden köken alan kansere primer karaciğer kanseri denir. Başka bir organdan köken alıp karaciğere sonradan yayılan kanser ise sekonder karaciğer kanseri olarak isimlendirilmektedir. Primer karaciğer kanseri genellikle, karaciğerin ana fonksiyonel hücreleri olan ve %80'ini oluşturan hepatositlerden köken almaktadır. Kolanjiyokarsinoma, anjiosarkom ve hepatosellüler karsinoma olmak üzere üç tür primer karaciğer kanseri vardır.

Kolanjiyokarsinoma: Safra yolu epitel hücrelerinden köken alan malign bir tümördür. Genellikle 50-70 yaşları arasında görülen kolanjiyokarsinomanın hepatosellüler karsinomaya göre görülme insidansı çok düşüktür. BT ve biyopsi ile kesin tanısı kolaylıkla konulurken, tedavisi oldukça zordur. İnsidansı 0,5-1.2/100000'dır.

Anjiosarkom: Karaciğerdeki kan damarlarında başlar ve çok hızlı bir şekilde ilerler. Vinil klorür veya arseniğe maruz kalınması sonucu gelişen bir kan damarı tümörüdür. Genellikle 50-70 yaşları arasında erkeklerde görülür. Olguların %60'ında metastaz olduğu için tedavi seçenekleri yetersizdir.

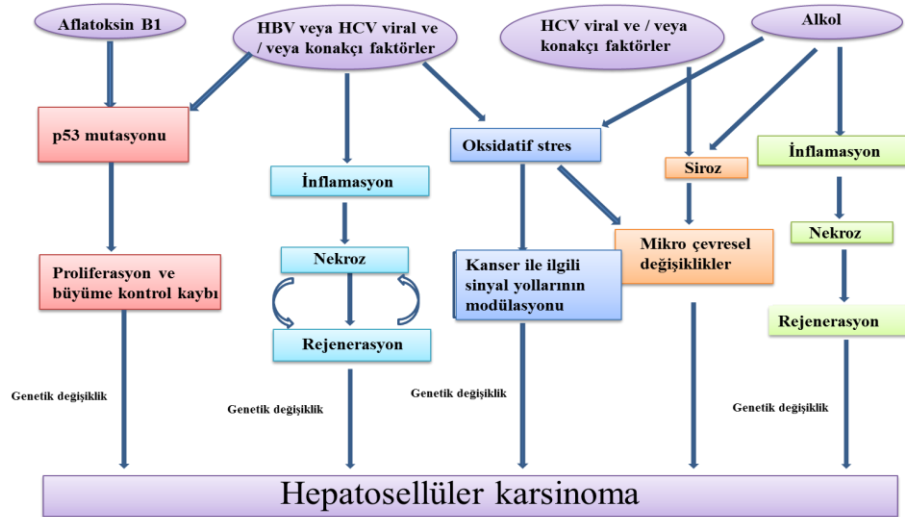
Hepatosellüler Karsinoma (HCC): Hepatosit hücrelerinden köken alan, dünya çapında primer karaciğer kanserlerinin %70-80'ini oluşturan en yaygın karaciğer kanseri türüdür (Gwiasda ve ark. 2017; Zhang ve Xu 2017).

2.2.1. Hepatosellüler karsinomunun epidemiyolojisi ve risk faktörleri

HCC, kadınlarda kansere bağlı ölümlerde sekizinci sırada iken, erkeklerde beşinci sırada yer almaktadır (Siegel ve ark. 2018). Bununla birlikte, HCC insidansı yaşa, cinsiyete, ırka ve özellikle risk faktörlerine bağlı olarak farklı coğrafi bölgelerde değişiklik göstermektedir (El-Serag ve Hasbem 2012; Gwiasda ve ark. 2017). Örneğin HCC, hepatit prevelansının yüksek olduğu Doğu, Güneydoğu ve Orta Asya ile Sahraaltı Afrika'da daha sık görülmektedir. Benzer şekilde, aflatoksin kontaminasyonunun yaygın olduğu Güney Çin'de HCC insidansı yüksektir (Gao ve ark. 2012; Chen 2018). Erkeklerin HCC'ye yakalanma riski kadınlara oranla daha yüksektir. Bunun başlıca nedeni olarak erkeklerde testosteron hormonunun androjen

reseptör sinyalini arttırarak karaciğerde hücre proliferasyonunu teşvik etmesi ve kadınlarda östrojen hormonunun interlökin IL-6 aracılı inflamasyonu baskılayarak karaciğer hasarını azaltması gösterilmektedir (Naugler ve ark. 2007). Yaş ile birlikte HCC'nin görülme oranı da artmaktadır. Altmış beş yaş ve üzeri kişilerde görülme riski daha yüksek olup, ortalama olarak görülme yaşı batıda 50-60 iken Afrika'da 25-30'dur (Mossanen ve Tacke 2013; Kim ve Park 2014). Bununla birlikte, HCC geçen yıllara oranla hızla artan bir insidansa sahiptir. Bu artış, kadınlarda yılda %3 iken erkeklerde %4 şeklindedir. Buna bağlı olarak HCC'nin başlangıç yaşı elli nin altına düşmektedir (Siegel ve ark. 2017).

Yapılan deneysel araştırmalarda HCC oluşumunda pek çok risk faktörünün etkili olabileceği belirtilmektedir (Şekil 2.2). Tedavi seçeneklerinin yetersiz kalması nedeniyle HCC gelişiminde rol oynayabilecek kontrol edilebilir risk faktörlerinin belirlenmesi ve bunlardan kaçınılması HCC insidansının kontrol altına alınmasına katkı sağlayacaktır. Hepatit B (HBV) ve Hepatit C (HCV) enfeksiyonu, alkol kullanımı, aflatoksin-B1 ile kontamine gıda tüketimi, hemen hemen tüm siroz indükleyici koşullar HCC için en önemli risk faktörlerdir. Diğer risk faktörleri ise sigara ve alkol kullanımına bağlı olmayan karaciğer yağlanması, obezite ve diyabet gibi metabolik hastalıklardır (Farazi ve Depinho 2006; Gao ve ark. 2012).



Şekil 2.2: Hepatosellüler karsinoma için risk faktörleri (Farazi ve DePinho 2006)

Viral hepatitler

Viral hepatitler, HCC için en önemli risk faktörleridir. Bu faktörler arasında HBV ve HCV, HCC'lerin %70'inden sorumludur (Farazi ve Depinho 2006; Gao ve ark. 2012). HBV'nin, viral DNA'nın konakçı genomuna entegre olarak genetik kararsızlığa ve onkojenlerin aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca, HBV HBx, PreS2/S, HBSP gibi viral proteinleri sentezleyerek genetik değişime ve onkojenik faktörlerinin transkripsiyonuna sebep olmakta, hücre proliferasyonu ve hücre farklılaşması gibi önemli hücresel yolları etkileyerek hepatokarsinogenezi tetiklemektedir. Özellikle viral proteinlerden HBx'in p53, Fas, TNF ve TGF- β ile indüklenen apoptozu inhibe ederek etki gösterdiği bilinmektedir (Di Bisceglie 2009; Xu ve ark. 2014).

HCV'nin de HCC gelişimi üzerinde benzer bir etkisi bulunmaktadır. HCV viral proteinleri, tümör baskılayıcı genler ve proto-onkogenler aracılığıyla etki göstermektedir. HCV polimeraz NS5B, en kritik tümör supresörlerden biri olan retinoblastoma proteini (RB) ile etkileşime girer ve hücrelerin S fazına ilerlemesini kolaylaştırır. Ayrıca p53 ile de etkileşime giren viral proteinler apoptoz inhibisyonuna sebep olmaktadır. HCV proteinleri ve NS5A proteinleri tarafından anormal şekilde WNT/ β -katenin yolağının aktive edilmesi sonucu siroz ve HCC gelişimi de gözlenebilmektedir (Wang ve ark. 2017). HCV proteinlerinin bir diğer hedefi TGF- β 'dir. HCV NS5A, TGF- β reseptörü ile etkileşime girerek sinyal oluşumunu engeller. Bunun sonucunda hepatositlerin kontrolsüz çoğalması karaciğer hasarına neden olmaktadır (Choi ve Hwang 2006).

Aflatoksin-B1

Aspergillus flavus ve *Aspergillus parasiticus* tarafından üretilen bir mikotoksin olan aflatoksinin B1, B2, G1 ve G2 olmak üzere dört grubu bulunmaktadır. Bunlardan en etkili ve zehirli olan aflatoksin B1'in, kanser gelişiminde etkili olduğu bilinmektedir. Pirinç, mısır ve buğday gibi tahıllar, baharatlar, küflü gıdalar ve kuruyemişler aflatoksinden en fazla etkilenen gıdalardır. Sahra Güneyi Afrika, Güneydoğu Asya ve Çin başta olmak üzere nemli ve sıcak iklime sahip bölgelerde aflatoksin üretiminin yüksek olduğu

bilinmektedir (Fu ve Wang 2018). HCC'yi tetikleyen başlıca risk faktörleri arasında olan aflatoksin, hepatik hücrelerde DNA hasarına sebep olmakta ve tümör baskılayıcı bir gen olan p53'de mutasyona yol açarak HCC gelişiminde rol oynamaktadır (Bressac ve ark. 1991; Kew 2013).

Siroz

Siroz, yapısal olarak fibrozis ve normal karaciğer yapısının anormal nodüllere dönüşmesiyle karakterize olan yaygın bir süreçtir. Kısaca, daha önceki hasar nedeni ile karaciğerin skarlanması anlamına gelen siroz, karaciğerin işleyişi ile ilgili önemli sorunlara neden olabilir. Buna bağlı olarak HCC riskini arttırabilir. Genellikle birçok nedene bağlı olabilen siroz, terminal bir süreçtir. HBV veya HCV, uzun süreli alkol kullanımı, hepatositleri veya safra kanallarını etkileyen otoimmün hastalıklar ve aşırı demir yüklenmesi sirozun başlıca nedenleri arasındadır (Kumar ve ark. 1994). Özellikle, safra kanallarının hasar gördüğü *Primer biliyer siroz* (PBC), HCC için önemli bir risk faktörüdür (Caballería ve ark. 2001).

Alkol tüketimi

Alkole bağlı karaciğer hastalıkları karaciğer yağlanması, alkole bağlı hepatit, siroza ve hepatokarsinogeneze kadar giden bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Alkolün parçalandığı yer karaciğerdir. Ancak, karaciğerin alkolü parçalaması için sınırlı bir kapasitesi vardır. Fazla miktarda alkolü zararsız hale getirme işlemi sırasında karaciğerin diğer fonksiyonları aksayabilir. Ayrıca, alkollü içeceklerin esas maddesi olan etanol reaktif oksijen türlerini (ROS) üreten sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) ile okside olarak hepatokarsinogeneze sebep olur. Bununla birlikte alkolün parçalanması sonucunda oluşan asetaldehit karaciğer için bir zehirdir. Bazı çalışmalarda kronik alkol alımının, pro-inflamatuar sitokinler üreten aktive monositlere neden olan artmış inflamasyon ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Bu sitokinler, kemokinleri üretmek için Kupffer hücrelerini aktive ederek hepatositlerin hayatta kalımını azaltmaktadır. (McKillop ve Schrum 2009; Cornellà ve ark. 2011).

Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD)

NAFLD, alkol kullanımı dışındaki nedenlere bağlı olarak karaciğerde görülen yağlanmadır. Kendi içerisinde non-alkolik steatoz ve non-alkolik steatohepatit (NASH) olarak ikiye ayrılan NAFLD'de hepatositlerin içerisinde lipid birikimi gözlenmektedir. Bu birikim, siroza yol açabilen iltihaplanma ve hasara neden olur. Bu nedenle NAFLD HCC'ye neden olan diğer siroz tetikleyicileri kadar tehlikelidir. Ayrıca, obezite ve metabolik hastalıklarının yüzdesi arttıkça NAFLD insidansı da artmaktadır. Bel çevresinde ekstra ağırlık, tip II diyabet ve yüksek tansiyon gibi metabolik rahatsızlığı bulunan kişilerde NAFLD daha sık görülür. NAFLD sonucu aşırı derecede ortaya çıkan lipid peroksidasyonu ROS kaynaklı mutajenlerin oluşumuna neden olarak hem mutasyon birikimine hem de karaciğer hasarında yol açabilmektedir (Farrell ve Larter 2006).

2.2.2. Hepatoselüler karsinomanın moleküler patogenezi

Hepatokarsinogenez, birçok faktörü içeren çok aşamalı bir süreçtir. Bunlar arasında hücresel proteinlerin anormal ifadesi, onkogenleri (β -katenin, Axin1, PI-3-kinaz, K-ras) aktive eden ve tümör baskılayıcıları (p53, RB1, CDKN2A, IGF2R, PTEN) inhibe eden mutasyonlar gibi çeşitli mekanizmalar yer almaktadır (Aravalli ve ark. 2008; Aravalli 2012).

Viral enfeksiyon veya hepatotoksik ajanlara maruz kalma nedeniyle karaciğer dokularında meydana gelen ani değişimler, hücresel sinyal yolaklarında önemli değişikliklere neden olmakta ve gen ekspresyonunu değiştirerek tümör oluşumunu başlatabilmektedir (Farazi ve DePinho 2006). Ayrıca HCC'de etkili olabilen çeşitli risk faktörlerine de bağlı olarak potansiyel birçok sinyal yolağı kanser gelişimine neden olmaktadır (Aravalli ve ark. 2012). Örneğin HBV, HCV ve HEV proteinlerinin özellikle Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolağını aktive ederek hücre proliferasyonunu uyardıkları bilinmektedir (Zhao ve ark. 2005). Benzer Şekilde, HCV ve alkolik karaciğer sirozunun özellikle β -katenin mutasyonlarına sebep olarak hepatokarsinogenez sürecinde etkili oldukları gösterilmiştir. Bu mutasyon birincil hepatositlerde, karaciğer fibrozu ve HCC gelişiminde rol oynayan inflamasyon ve hücre ölümünün ana düzenleyicisi olarak görev yapan NF-

κB aktivasyonuna yol açmaktadır (de La Coste ve ark. 1998; Anson ve ark.2012). HCC için bir diğer risk faktörü olarak değerlendirilen uzun süreli aflatoksin maruziyeti de tümör baskılayıcı bir gen olan p53'de mutasyona sebep olmaktadır (Elsharkawy ve Mann 2007; Luedde ve Schwabe 2011).

RB bir diğer önemli tümör baskılayıcıdır ve E2F transkripsiyon faktörü ailesinin inhibisyonu aralığı ile hücre döngüsü ilerlemesini kontrol ederek kanser gelişimini önler (Goodrich 2006). Siklin bağımlı kinazlar (CDKs) G1/S hücre döngüsü geçişini indüklemek için RB'yi aktive eder. HCC de dahil olmak üzere birçok kanser türünde RB aktivitesi kaybı ve fonksiyonel p53 eksikliği arasında güçlü bir korelasyon gözlenmiştir. Ayrıca, HCC vakalarının yaklaşık %90'ında, CDK inhibitörleri p16INK4A, p21 (WAF1 / CIP1) ve p27KIP1 inaktive edilir ve bunların ifadesindeki bir değişiklik, hem hepatokarsinogenezin ilk aşamalarında hem de hastalığın ilerlemesi sırasında karsinogeneze katkıda bulunur (Harbour ve Dean 2000).

İnsan Ras proteinleri H-Ras, N-Ras, K-Ras4A ve K-Ras4B, hücre proliferasyonu, farklılaşma ve apoptozu etkileyen küçük GTP bağlayıcı proteinlerdir (Röring ve Brummer 2012). Ras-Raf-MEK-ERK sinyal yolunun integral komponentleri olarak tanımlanan Raf-1'in aktivasyonu Ras tarafından gerçekleştirilir. Raf-1 de proliferasyon ve apoptozu düzenlemek için MAPK kinazların (MEK1 ve MEK2) aktivasyonunu içeren alt sinyalle etkileşime girer, bu şekilde hücre sağ kalımı uyarılır (Calvisi ve ark. 2006; Yam ve ark. 2010). HCC'de Ras inhibitörü olarak görev yapan RASSF ailesi üyeleri RASSF1A ve NORE1A'nın inaktivasyonu ile karşılaşılmaktadır. Ayrıca, Ras/Raf-1/ERK yolunun bir diğer inhibitörü olan *Spred* proteininin ekspresyon düzeyinin düşük olduğu bilinmektedir (Yoshida ve ark. 2006).

JAK/STAT (Janus protein kinaz/ sinyal iletici ve transkripsiyon aktive ediciler) çeşitli sitokinler, hormonlar ve büyüme faktörleri tarafından aktive edilen, inaktif durumda sitoplazmada bulunan bir transkripsiyon faktörü ailesidir (Harrison 2012). JAK/STAT yolağı, patojenlere karşı savunma, hücre proliferasyonu, migrasyon, hücre farklılaşması, apoptoz gibi birçok hücresel sürecin yönetilmesinde rol oynamaktadır (O'Shea ve ark. 2015). Sitokin

reseptörlerine bağlanan sitokinler, reseptörlerde konformasyonel değişikliğe yol açarak JAK'ları aktive eder. JAK'lar seçici olarak STAT'ların aktivasyonuna (fosforilasyonuna) yol açar. Fosforillenen STAT'lar, JAK'dan ayrılarak dimerize olurlar ve çekirdeğe yönelirler. Daha sonra hedef genin promotor bölgesine bağlanarak gen ekspresyonunda değişikliklere neden olmaktadır. Devamlı olarak aktif olan STAT proteinleri antiapoptotik yolları uyararak karsinogenezde etkili olur. Sağlıklı hücrelerde kısa süreli aktif olan JAK/STAT yolağı, kanser hücrelerinde bu özelliğini yitirerek sürekli aktif hale gelir. STAT aktif hale gelince, sitokin yanıtının şiddetini ve süresini sınırlandıran negatif regülatörlerden biri olan sitokin sinyal supresörleri (SOCS) aktive eder. SOCS, STAT'ların negatif düzenleyicisi olarak JAK kinaz reseptörlerine bağlanıp STAT aktivasyonunu baskılar. SOCS inaktivasyonu, HCC de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklar üzerinde önemli bir rol oynar (Calvisi ve ark. 2006; Park ve ark. 2010).

2.2.3. Hepatosellüler karsinoma belirtileri

HCC'nin erken evrelerinde belirti ve semptomlar mevcut değildir. Hastalık, belirtiler ortaya çıktığında genellikle ileri evreye ulaşmıştır. İleri evre HCC belirtileri karında şişlik, karnın sağ üst kısmında sırta vuran ağrı, anoreksi, yorgunluk, aşırı kilo kaybı, idrar renginde koyulaşma, ciltte sararma ve diğer klinik semptomlar olarak kendini göstermektedir. Belirtileri sirozla hemen hemen aynı olan HCC, ciddi vakalarda, komaya ve sistematik bir soruna sebep olabilmektedir (Zhang ve Xu 2017).

2.2.4. Hepatosellüler karsinomanın tanısı

Hastalığın yavaş gelişim göstermesine bağlı olarak HCC tanısı genellikle ileri evrelerde konulmaktadır. Kanda alfafetoprotein (AFP) seviyesinin ölçülmesi, bilgisayarlı tomografi (BT), pozitron emisyon tomografisi (PET) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG) HCC tanısında en sık kullanılan yöntemlerdir. AFP, HCC'nin tanısında en yaygın kullanılan serolojik testtir. Sağlıklı bireylerde düşük olan AFP proteini karaciğer ile ilişkili hastalıklarda yükselmektedir. Dolayısıyla, karaciğer tümörü bulunan bir kişide AFP miktarının yüksek çıkması bu kanseri işaret edebilir.

Ancak, düşük bir hassasiyete sahip olduğu için kesin sonuç vermemektedir. Bu açıdan, tümörün yerini, boyutunu ve yayılıp yayılmadığını gösteren görüntüleme teknikleri daha etkili tanı yöntemleridir (Kinkel ve ark. 2002; Lan ve ark. 2012; Cristea ve ark. 2015).

Malign bir karaciğer lezyonundan şüphelenildiğinde sıklıkla kullanılan ilk diyagnostik tekniklerden biri BT'dir. Vücudun bir dilimini ya da kesitini gösteren BT, organ ve yumuşak dokuyu daha net gösterir. 3 cm'den büyük (>3 cm) lezyonların tespit edilmesinde kullanılır. BT taraması ile tümörün şekli, büyüklüğü, yerleşim yeri, tümörü besleyen kan damarları tespit edilir. Ayrıca bu görüntüleme tekniği ile hastalardan biyopsi alınmasına gerek kalmayabilir (Baron ve Brancatelli 2004).

HCC tanısında en sık kullanılan yöntemlerden biri olan MR ile manyetik alan ve radyofrekans dalgaları kullanılarak karaciğer ve karaciğere yakın damarların daha ayrıntılı görüntülenmesi sağlanır. MR, sağlıklı ve hastalıklı dokular arasındaki farklılıkları saptamak için sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir (Nael ve ark. 2014; Maurer 2018).

Radyoaktif partiküller kullanılarak yapılan PET yöntemi ise primer tümörlerin tespiti, kanserin evrenmesi ve metastatik alanları belirlemek için kullanılır. HCC tanısında BT ve MR'ye göre daha az tercih edilmektedir (Lan ve ark. 2012; Ehman ve ark. 2017).

Tüm bunlara ek olarak kesin bir tanı için biyopsi örnekleri alınmalı ve patolojik olarak incelenmelidir. Yapılan biyopsi sonucunda HCC tanısı konulur ise, hastalığın yaygınlığının ve uygulanacak tedavi yöntemlerinin belirlenmesi için evreleme yapılması gerekmektedir (Maharaj ve ark. 1986; Obuz 2015; Board 2017)

2.2.5. Hepatosellüler karsinomanın evrelendirilmesi

HCC'nin evrelendirilmesinde, Tümör-Nod-Metastaz (TNM) evreleme sistemi, Barselona Klinik Karaciğer Kanseri (BCLC) evreleme sistemi ve Child-Pugh sistemi başta olmak üzere birçok sistem kullanılmaktadır (Hiraoka ve ark. 2016).

BCLC evreleme sistemi ile tümörlerin sayısı ve boyutu belirlenir. Child-Pugh sistemi ise karaciğer kanseri hastaları genellikle siroz oldukları için, bu hastalarda karaciğer fonksiyonlarının seviyesini belirler. Bunun için, gözde ve ciltte sarılığa yol açan kandaki bilirubinin seviyesi, karaciğer tarafından üretilen ana protein albüminin seviyesi, karında toplanan suyun miktarı ve karaciğer hastalığının beyin fonksiyonlarına olan etkisi incelenir (Daniele ve Perrone 2005; Hiraoka ve ark. 2016).

HCC evrelendirilmesinde yaygın olarak Amerikan Birleşik Kanser Komitesi (AJCC) evrelendirilme sistemi kullanılmaktadır. Bu sistemde tümörün yayılımı, nodal metastaz ve uzak metastazların belirtilmesi için TNM tanımlaması kullanılır (Tablo 2.1) (Edge ve Compton 2010).

Tablo 2.1: HCC için TNM evreleme sistemi ve HCC evreleri (Kinoshita ve ark. 2015)

T1 T2	Vasküler invazyon olmayan tek bir tümör Tek tümör veya çoklu tümörler ile vasküler invazyon<5cm
T3A T3B	Birden fazla tümör> 5 cm Portal veya hepatik damara yayılım gösteren en az bir tümör
T4	Tümör yakındaki organlara yayılım göstermiş
N	Bölgesel Lenf Nodları
NX	Bölgesel lenf nodu değerlendirilemedi
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Bölgesel lenf nodu metastazı var
M	Uzak Metastaz
MX	Uzak metastaz değerlendirilemedi
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var
Evre	TNM
Evre I	T1, N0, M0
Evre II	T2, N0, M0
Evre IIIA	T3a, N0, M0
Evre IIIB	T3b, N0, M0
Evre IIIC	T4, N0, M0
Evre IVA	T1-4, N1, M0
Evre IVB	T1-4, N, M1

2.2.6. Hepatosellüler karsinomanın tedavisi

Cerrahi operasyon (karaciğer transplantasyonu ve rezeksiyon), perkutan girişimsel işlemler, radyo frekans ablasyonu (RFA) ve perkütan alkol enjeksiyonu

(PEI), transarteriyel girişimler (TAE) (embolizasyon, kemoembolizasyon, radyoembolizasyon), kemoterapi ve radyoterapi uygulamaları HCC tedavisinde kullanılan temel yöntemlerdir (Obuz 2015). Bu tedavi yöntemleri içerisinde en etkili olanları tümörün cerrahi rezeksiyonu, karaciğer transplantasyonu ve ablasyondur. Ancak bu tedavi seçenekleri sadece erken evre hastalara uygulanabilmektedir (Daher ve ark. 2018).

HCC tedavisinde en etkili yöntem karaciğer rezeksiyonudur. Bu yöntemin başarı ise, tümörün evresine, yayılımına ve çapına bağlıdır. Kanser sadece karaciğer ile sınırlı ise, kan damarları içerisine girmeyen tek bir tümör bulunuyorsa ve karaciğerin geri kalan kısmı sağlıklıysa cerrahi yöntemler uygulanabilir. Tümörün boyutu küçük olsa bile ilerlemiş siroz bulunuyorsa rezeksiyon uygun bir tedavi değildir. 5cm çapında veya daha az olan tek bir karaciğer tümörü, 3 cm çapında veya daha az olan tümör, 5 ile 7 cm boyutlarında ve en az altı ay büyümeyen tek bir tümör bulunuyorsa ve ilerlemiş siroz bulunmuyorsa karaciğer transplantasyonu diğer bir tedavi seçeneğidir. Karaciğer transplantasyonu gibi iyileştirici tedaviler, beş yılda %50'den fazla sağ kalım sağlayabilir, fakat erken evre HCC'li hastaların sadece küçük bir grubu bu tedaviler için uygundur (Daher ve ark. 2018).

Cerrahinin mümkün olmadığı durumlarda RFA ve PEI, kemoembolizasyon, radyoembolizasyon gibi tedavi seçenekleri uygulanmaktadır. RFA ile 3 cm'den büyük olmayan tümörleri yok etmek için radyasyondan gelen ısı kullanılır. Bu tedavi aynı zamanda termal ablasyon olarak da isimlendirilmektedir. PEI yönteminde kanser hücrelerini yok etmek için alkol doğrudan tümöre enjekte edilir. 3 cm'den daha küçük tümörler için kullanılmaktadır (Gwiasda ve ark. 2017).

Embolizasyon tedavi yönteminde ise tümör hücrelerinin beslediği hepatik arteri bloke eden maddeler enjekte edilerek kanser hücrelerinin öldürülmesi amaçlanmaktadır. Transarteriyel embolizasyon (TAE) olarak da isimlendirilen bu yöntem transarteriyel kemoembolizasyon (TACE) ve transarteriyel radyoembolizasyon (TARE) olmak üzere iki çeşittir (Board 2017). Kemoembolizasyon tedavisinde hepatik arter, katater yoluyla verilen antikanser ilaç ile bloke edilir. Radyoembolizasyonda ise radyoaktif izotop içeren boncuklar (mikro küreler) hepatik arter içerisine yerleştirilir ve bu bölgeye doğrudan radyasyon

gönderilerek kanser hücrelerinin yok edilmesi sağlanır. Embolizasyon tedavileri genellikle 5 cm'den büyük (>5 cm), cerrahi müdahale ile alınamayan tümörler için uygulanmaktadır (Gwiasda ve ark. 2017; Fohlen ve ark. 2018).

Daha ileri evre HCC tedavisinde kemoterapi ve radyoterapi yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler ile tümörün büyümesinin yavaşlatılması ve semptomların kontrol altına alınması amaçlanmaktadır. Ancak, özellikle sirozlu kişilerde ciddi yan etkilere sebep olabilen bu tedavi yaklaşımlarının uygulanabilirliği sınırlıdır. HCC tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanlardan biri 2007 yılında FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanan *sorafenib* (*Nexavar*)'dir. *Sorafenib*, tümörün yeni kan damarları oluşturmasını engelleyen çoklu kinaz inhibitörüdür (Llovet ve ark. 2008; Bruix ve ark. 2016; Daher ve ark. 2018). Bir diğer protein kinaz inhibitörü *regorafenib* (*Stivarga*) ise, 2017 yılında FDA tarafından onaylanmış ve *sorafenibin* yararlı olmadığı durumlarda, ileri evre HCC tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Refolo ve ark. 2018; Sherman 2018; Tovoli ve ark. 2018). Son yıllarda HCC tedavisinde immüterapi yöntemleri de uygulanmaktadır. Bunun için 2017'de FDA tarafından onaylanmış PD-1 adlı hücre yüzey reseptörünü bağlayarak bağışıklık sistemini kanser hücrelerine karşı aktifleştiren bir immünoterapi ilacı olan *nivolumab* (*Opdivo*) ileri evre HCC tedavisinde kullanılmaktadır (Brown ve ark. 2017; El-Khoueiry ve ark. 2017; Mazzolini ve Malvicini 2018).

Tüm bu tedavi seçeneklerine rağmen hastalığın yavaş ilerlemesine bağlı olarak geç teşhis edilmesi, hastalığın başlangıcını algılayabilen biyolojik belirteçlerin eksikliği ve tedavide kullanılan kemoterapötik ve radyoterapötik ajanlara karşı direnç gözlenmesi nedeniyle HCC'de ölüm oranı her geçen yıl artmaktadır (El-Serag ve Rudolph 2007; Zhao ve ark. 2017). Erken evrelerde tanı alan HCC hastalarının %43'ü için, beş yıllık sağ kalım oranı %31'dir. Tümör çevredeki dokulara veya organlara, bölgesel lenf düğümlerine yayılmış ise bu oran %11'e düşmektedir. Uzak metastaz olması durumunda ise beş yıllık sağ kalım oranı %3'e kadar inmektedir. Bu düşük hayatta kalma oranının sebeplerinden biri olarak HCC olan birçok kişinin siroz gibi başka sağlık sorunlarına sahip olması gösterilmektedir (Kim ve ark. 2016). Bu nedenle HCC için daha etkili tedavi yöntemlerimin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2.7. Ginnalin A

Kansere karşı geliştirilen terapötik stratejilerden biri doğal ürünlerin potansiyel antikanser aktivitelerinden yararlanmaktır. Bu ürünlerin antikanser aktiviteleri içerdikleri fenolik bileşikler ile ilişkilendirilmektedir. Fenolik bileşikler, bir veya daha fazla hidroksil grubuna sahip bir veya daha fazla aromatik halka içeren ikincil metabolitlerdir. Bitki, meyve ve sebze gibi doğal ürünlerde bulunan bu bileşiklerin antioksidan, antibakteriyel, antiviral, antiaterosklerotik, antiinflamatuvar ve antikanserojenik etkileri bulunmaktadır. Bugüne kadar 8000'den fazla doğal fenolik bileşik tanımlanmış olup bunlar; fenolik asitler ve benzerleri, flavonoidler, tanenler, stilbenler, curcuminoidler, kumarinler, lignanlar, kutanlar ve diğerleri olarak sınıflandırılır (Cai ve ark. 2004; Galati ve O'Brien 2004; Huang ve ark. 2010).

Önemli farmakolojik etkilere sahip olan fenolik bileşikler, özellikle antioksidan kapasiteleri nedeniyle kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklar üzerinde olumlu sonuçlar göstermektedir. Fenolik bileşikler sahip oldukları antioksidan özellikler ile serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonu engelleyerek kanser oluşumuna sebep olabilecek molekülleri etkisiz hale getirebilmektedir. Ayrıca, hücre döngüsünün durdurulması, hücre proliferasyonu, anjiyogenez ve apoptozu kontrol eden onkogenik sinyal kaskadlarının inhibe edilmesi, ROS seviyelerinin düzenlenmesi, p53 gibi tümör baskılayıcı proteinlerin uyarılması ve normal hücrelere farklılaşma ve dönüşme yeteneğinin artırılması fenolik bileşiklerin antikarsinojenik etkilerinin temeli olarak gösterilmektedir (Fulda 2010; Cardin ve ark. 2014; Attar ve ark. 2015; Anantharaju ve ark. 2016)

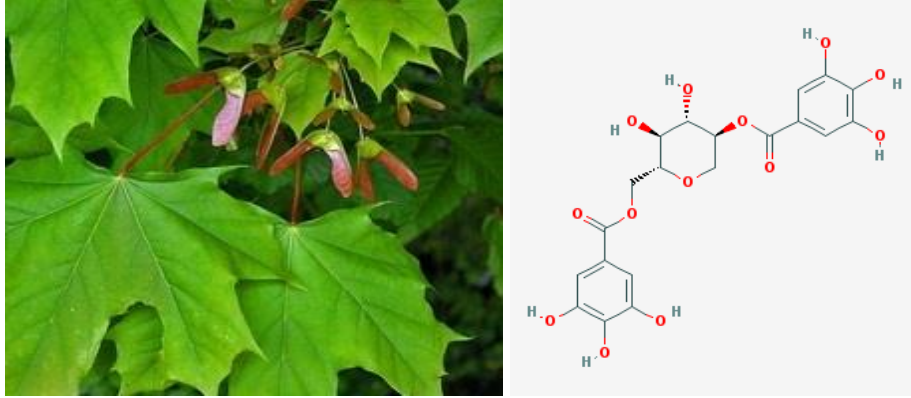
Fenolik bileşik içeriği bakımından zengin olan tanenler, suda çözünen polifenollerdir. Birçok bitkisel gıdada bulunan tanenler, hidrolize edilebilir ve hidrolize olmayan yoğun formda tanenler olarak iki gruba ayrılır. Hidrolize edilebilir tanenler, glikoz gibi polihidrik alkolden bir merkezi çekirdek ve hidroksil grupları içerir. Bunlar kısmen ya da tamamen gallotannin veya ellagitannin tarafından esterlenmiştir. Gallotanninler asitler, bazlar veya belirli enzimler tarafından hidrolize edildikten sonra glikoz ve gallik asitleri verir. Ellagitaninlerin laktonize olması sonucunda ellagik asit üretilir (Chung ve ark. 1998).

Çin tanenleri, *Türk tanenleri*, *Tara tanenleri*, *Acer tanen* ve *Hamamelis tanenleri* gallotanninlerin önemli örnekleridir. *Acer tanen*, yaygın olarak akçaağaç olarak bilinen *Acer* cinsinden elde edilmektedir. Özellikle akçaağaç şurubu/maple şurup yapımında kullanılan bu bitkinin hem kendi ekstraktlarının hem de şurubunun önemli farmakolojik etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar akçaağaç şurubunun *ilgnans*, *coumarin*, *qebacol*, *ginnalin* gibi çeşitli fenolik bileşikler içerdiğini göstermiş; *Acer rubrum*, *Acer tataricum*, *Acer saccharum* gibi *Acer* türlerinin yaprak kısımlarında da başta *Ginnalin A* (GA) olmak üzere önemli fenolik bileşiklerin varlığını ortaya konmuştur (Chung ve ark. 1998; Honma ve ark. 2010; Li ve Seeram 2010; González-Sarrías ve ark. 2013;).

Çeşitli çalışmalarda akçaağaç şurubunda bulunan fenolik bileşiklerin kan şekeri seviyesini düşürme ve antikanser etkisi gibi önemli biyolojik aktivitelere sahip oldukları ortaya konmuştur. *In vitro* bir çalışmada, akçaağaç şurubundan elde edilen bütanol özütünün α -glukozidaz enzimi üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Yamamoto ve ark. 2015). Etil asetat özütleri ise, kanser hücre hatlarında antioksidan ve antiproliferatif etki göstermiştir (Legault ve ark. 2010). Tip II diyabet için model olarak kullanılan Otsuka Long-Evans Tokushima Yağlı (OLETF) sıçanları ile yapılan bir çalışmada sukroz veya akçaağaç şurubu oral yol ile verildikten sonra sıçanların plazma glukoz (PG) seviyelerindeki değişiklikleri karşılaştırılmıştır. Akçaağaç şurubunun oral yoldan verilmesini takiben PG'deki artışın sukroz uygulamasından daha düşük olduğu bulunmuş ve bu bulgular, tip II diyabet tedavisinde akçaağaç şurubunun potansiyel bir tatlandırıcı olarak kullanılabilceğini yönünden önemli bilgiler sağlamıştır (Nagai ve ark. 2013). *Acertannin* olarak da bilinen GA, akçaağaç şurubunun yanı sıra *Acer* cinsinin çeşitli ekstraktlarında da varlığı gösterilmiş, en önemli fenolik bileşiklerinden biridir (Bi ve ark. 2017) (Şekil 2.3).

GA'nın polifenol özellikte olması ile ilişkili olarak antioksidan, antibakteriyel, α -glukosidaz enzim inhibisyonu gibi çeşitli farmakolojik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Han ve ark. 2004; Honma ve ark. 2010; González-Sarrías ve ark. 2013). Ayrıca kolon kanser hücre hattında büyümeyi inhibe ettiği belirtilmiştir (González ve ark. 2012). Kolon ve meme kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada ise GA'nın hücre döngüsünü Siklin A ve D1 seviyesindeki azalmaya

bağlı olarak S, G2/M evrelerinde durdurduğu gösterilmiştir (González-Sarrías ve ark. 2013).



Şekil 2.3: *Acer* bitkisi ve GA'nın kimyasal yapısı

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5318457#section=2D-Structure> 26 Nisan 2017;

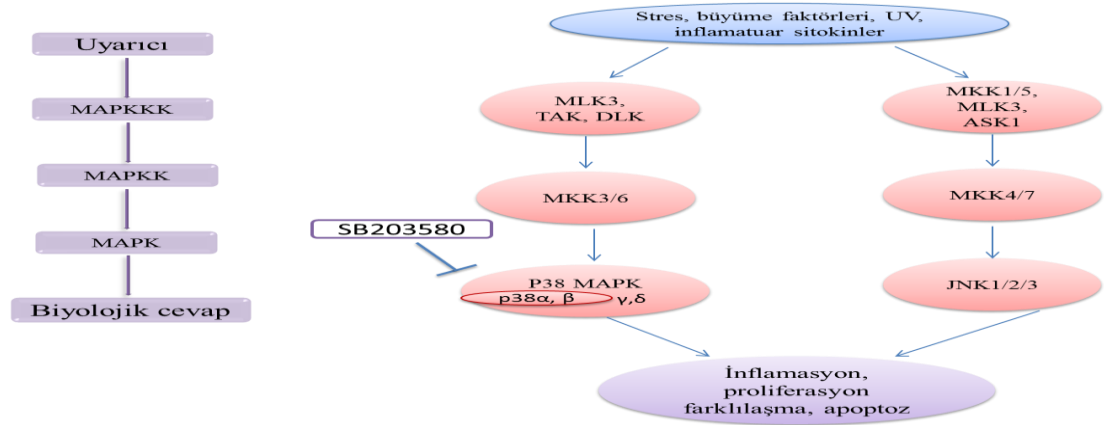
<http://www.threetreefarm.com/maple-ginnala-flame-amur> 9 Kasım 2017)

2.2.8. SB203580

Kanser tedavisinde kullanılan en önemli stratejilerden biri, özellikle kanser gelişimi ile ilişkili olan sinyal yollarının hedeflenmesidir. Bu amaçla, sinyal yollarında yer alan proteinlerin rolünü belirlemek için çeşitli inhibitör moleküller kullanılmaktadır. Bir primidil imidazol olan SB203580, çeşitli biyolojik süreçlerde p38-MAPK rolünü aydınlatmak için kullanılan p38-MAPK inhibitörüdür (Zhang ve ark. 2012).

p38-MAPK inflamasyon, hücre proliferasyonu, farklılaşma, apoptoz ve hücre siklusunun düzenlenmesi gibi hücresel yanıtlarda önemli bir rol oynamakta ve ultraviyole ışığı, ısı, ozmotik şok, mitojenik uyarım, interlökinler ve TNF- α gibi pro-inflamatuvar sitokinler ve stresli uyarılar tarafından aktive edilmektedir. p38-MAPK, stres koşulları altında apoptozu indükleyerek tümör baskılayıcı olarak işlev görürken, aktif olduğu durumda kanseri tetiklemesi tartışmalı bir rolü olduğunu ortaya koymaktadır (Cano ve Mahadevan 1995; Jiang ve ark. 1997; Alonso ve ark. 2000; Bradham ve McClay 2006; Young ve ark. 2009; Chen ve ark. 2009). Bu tartışmalı rolü aydınlatmak amacıyla p38-MAPK'nın oldukça seçici bir inhibitörü olan SB203580 kullanılmaktadır (Şekil 2.4). SB203580, p38 in ATP bağlayıcı cebine bağlanıp ATP'nin bağlanmasını bloke ederek p38 aktivitesini inhibe

edebilmektedir (Tong ve ark. 1997; Chen ve ark. 2009; Xiao ve ark. 2017). Karaciğer hücreleri ile yapılan bir çalışmada da, SB203580'in p38-MAPK, ERK ve JNK sinyal yolları üzerindeki etkileri araştırılmış ve SB203580'in p38-MAPK inhibitörü olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, SB203580'in p38-MAPK üzerindeki inhibe edici etkisi, p38'in katalitik aktivitesini engellemesinin yanı sıra Akt'nin fosforilasyonu ve aktivasyonunu bozması ile de açıklanmıştır (Henklova ve ark. 2008).



Şekil 2.4: MAPK sinyal yolağı ve p38-MAPK inhibitörü SB203580

(<http://www.myvisiontest.com/printme.php?idx=889> 11 Mayıs 2018)

Tüm bunların yanında çeşitli çalışmalarda SB203580'in p38-MAPK'dan bağımsız bir şekilde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği de gösterilmiştir. Sitokinle aktive olan lenfositler üzerinde yapılan bir çalışmada SB203580'in, antiproliferatif etkiye sahip olduğu ve bu etkiyi hücre döngüsünün düzenleyici molekülü RB proteinin fosforilasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan bir protoonkogen olan PI 3-kinaz/protein kinaz B'nin (PKB) fosforilasyonunu inhibe ederek gösterdiği bildirilmiştir (Lali ve ark. 2000). RB'un siklin bağımlı kinazlarla fosforilasyonu, hücre döngüsünün ilerlemesine neden olan E2F'nin salınmasına yol açar. Bir tümör baskılayıcı olan RB, hipofosforile halde E2F transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini inhibe ederek hücre döngüsünün ilerlemesini baskılar (Stone ve ark. 2011). Yapılan başka bir çalışmada ise SB203580'in, HCC hücrelerinde antiproliferatif etkisinden dolayı adenosin monofosfatla aktive olan protein kinaz (AMPK)'ı ve ölümle ilişkili protein kinaz (DAPK)'ı aktive ederek otofajiyi indüklediği belirtilmiştir (Zhang ve ark. 2012).

2.2.9. Apoptoz

Hücre ölümü apoptoz (fizyolojik hücre ölümü) ve nekroz (patolojik hücre ölümü) olmak üzere iki şekilde gerçekleşir (Coşkun ve Özgür 2011). Eski Yunan dilinde sararmış yaprakların dökülmesi anlamına gelen apoptoz, programlanmış bir hücre ölümü tipidir (Kartlaşmış ve ark. 2016). Organizmanın dengede kalabilmesi için yeni hücreler oluşurken bazı hücrelerinde ölmesi gerekir. Hücre ölümü ile hücre proliferasyonu arasında kontrollü bir denge bulunur. Apoptoz, çok hücreli organizmaların, hücre proliferasyonunu kontrol etmeleri ve doku homeostazını sürdürmelerinin yanı sıra bir organizmadan gelen zararlı veya gereksiz hücreleri elimine etmeleri için çok önemli bir mekanizmadır (Norbury ve Hickson 2001; Goldar ve ark. 2015).

Apoptoz süreci, hücre ölümü için sinyallerin alınması, kaspazların aktivasyonu, hücre ölümünün meydana gelmesi, parçalanma ve fagositoz aşamaları ile gerçekleşir. Bu süreç genellikle farklı morfolojik özellikler ve enerjiye bağlı biyokimyasal mekanizmalarla karakterizedir. Apoptoz, normal hücre döngüsü, bağışıklık sisteminin düzgün gelişimi ve işleyişi, embriyonik gelişme ve kimyasal kaynaklı hücre ölümü gibi çeşitli işlemlerin yaşamsal bir bileşeni olarak görev yapar. Apoptotik sinyaller genomik bütünlüğün korunmasına katkıda bulunurken, kusurlu apoptoz karsinogenezi teşvik edebilir (Elmore 2007; Hassan ve ark. 2014).

Büyüme faktörlerinin eksikliği, oksidatif stres, X-ışınları, hücre içi kalsiyum düzeyindeki artış, hipoksi, DNA hasarına sebep olan bazı faktörler veya çeşitli ilaçlar gibi farklı etkenler altında kalarak zarar gören hücrelerin yok edilebilmesi için apoptoz devreye girer. Apoptoz ile uyarılan hücre birçok morfolojik ve biyokimyasal değişikliğe uğrar. Hücre küçülmeye başlar, büzülür ve nükleusta kromatin yoğunlaşması görülerek piknotik bir görüntü oluşur. Hücre pH'ı apoptotik süreç boyunca hızla düşer, kalsiyum pompası yetersizliği sonucu hücre içerisinde sürekli bir kalsiyum artışı olur. Komşu hücrelerle bağlantı kesilir, hücre iskeleti dağılır ve çekirdek zarı eriyerek DNA fregmantasyonu meydana gelir. Ancak, hücre organelleri yapısal bütünlüğünü korur (Kerr ve ark. 1972; Hacker 2000). Daha sonra plazma membranında tomurcuklanmalar meydana gelerek hücre, sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimlere ayrılır ve son olarak da

makrofajlar tarafından apoptotik cisimler tanınarak fagosite edilir (Kurosaka ve ark. 2003; Elmore 2007).

Apoptoz mekanizmasının düzenlenmesinde kalsiyum, seramid, c-myc ve p53 geni, kaspazlar, Bcl-2 ailesi, endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi organeller görev alır (Dinçel 2016). Apoptoz mekanizmasında etkili olan proteinler kaspazlar (Caspase: Cysteine-Containing Aspartate Specific Proteases)'dır. Kaspaz ailesi, proteolitik basamaklarda birlikte çalışan hücre içi sistein proteazlarından oluşan enzim gruplarıdır. Bu proteinler normal koşullarda hücre sitoplazmasında zimojen (prokaspaz) yani inaktif olarak bulunurlar (Cohen 1997). Kaspazlar birbirlerini harekete geçirerek kaspaz aktivasyonunu oluştururlar. Hücreye ölüm talimatını veren spesifik sinyaller geldikten sonra, hücrede belirgin değişiklikler meydana gelerek prokaspazlar aktif kaspazlara dönüşür. Proteolitik kaskadlar içinde kaspazlar, apoptozun yukarı başlatıcıları veya aşağı akış efektörleri olarak konumlandırılabilir. Kaspazlar temel olarak, başlatıcı kaspazlar (Kaspaz-2, -8, -9 ve -10), efektör kaspazlar (Kaspaz-3, 6 ve 7), inflamatuvar kaspazlar (Kaspaz -1, -4, -5, -11, -12, -13 ve -14) olarak 3 gruba ayrılır (Hassan ve ark. 2014; Dinçel 2016).

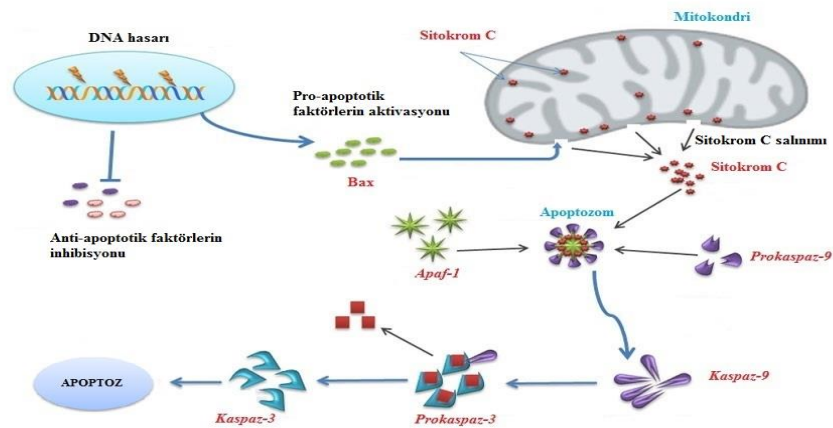
Bazı kanserlerin gelişimi ve ilerlemesinde karsinogenez sırasında apoptozun bastırılmasının merkezi bir rol oynadığı belirtilmiştir (King ve Cidlowski 1998). Tümör hücreleri apoptozu baskılamak ve apoptotik ajanlara direnç kazanmak için, proapoptotik proteinlerden BAX'ın baskılanması veya antiapoptotik proteinlerden Bcl-2'nin ekspresyonunun arttırılması gibi bazı moleküler mekanizmaları kullanabilir (Hassan ve ark. 2014). Apoptoz mekanizmasını ve bunun efektör proteinlerini ve aynı zamanda apoptozdan sorumlu genleri tanımlamak, kanser hücrelerinin apoptozu karşı duyarlılığını arttıracak veya apoptotik eşiğini sıfırlayabilecek yeni ajanlar keşfetmek ve geliştirmek için yeni bir fırsat sağlamıştır. Bu yeni hedefe yönelik tedaviler, antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri, p53, apoptoz inhibitörü (IAP) proteinleri ve kaspazları hedef alan terapileri içerir (Goldar ve ark. 2015). Birçok molekül tarafından düzenlenen apoptoz mekanizması, hücre içinde oluşturulan sinyallerle tetiklenen intrinsik ve hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanan ölüm aktivatörleri tarafından tetiklenen ekstrinsik yol üzerinden ilerler (Igney ve Krammer 2002; Coşkun ve Özgür 2011).

2.2.9.1.İntrinsik yol

Mitokondriye bağımlı apoptozdur. Apoptoz indüksiyonu için en önemli yollardan biridir. Apoptozom sisteminin aktifleşmesi ile uyarılır. İntrinsik apoptotik yol DNA hasarı, oksidatif stres, UV radyasyon, onkojenik faktörlerin aktivasyonu gibi hücre içinde oluşan uyarılar ile gerçekleşmektedir. Mitokondrinin dış membranına etki eden Bcl-2 ailesi proteinleri bu yolağın merkezi regülatörleridir. Bcl-2 ailesi mitokondriyal zarın geçirgenliğine aracılık ederek bir ‘apoptotik anahtar’ olarak işlev görür (Saelens ve ark. 2004). Bcl-2 proteini mitokondri dış membranında bulunur ve sitokrom-C (CYCS) başta olmak üzere çeşitli apoptotik proteinlerin salınması için gerekli olan mitokondriyal membran geçirgenliğindeki değişiklikleri düzenler (Hassan ve ark. 2014). İyon transportunun (membran potansiyelinin) düzenlenmesinde görev alır ve zarın parçalanmasına karşı koruyucu görevi görürler (Dinçel 2016). Mitokondriyal yollu apoptozun kontrolü ve regülasyonu, Bcl-2 protein ailesinin üyeleri aracılığı ile gerçekleşir (Schuler ve Green 2001).

Bcl-2 ailesi intrinsik apoptotik yolağın hem pro-apoptotik hemde antiapoptotik düzenleyicileri içerir. Ölüm aktivatörleri olarak görev yapan apoptozu ilerleten pro-apoptotik proteinler BAX, BID, BAD, BCLXs, BIM, NOXA ve PUMA’dır. Antiapoptotik proteinlerin neredeyse tamamı ölüm sinyali gelmeden önce hücre iskeleti veya sitozelde bulunur. Bu proteinler mitokondriden CYCS ve CYCS’ye benzer bir flavoprotein olan apoptoz indükleyici faktör (AIF) salınımını arttırarak apoptozu indükler. Apoptozu engelleyen yaşam aktivatörleri olarak görev yapan antiapoptotik proteinler ise BCL-2, BCL-X1 ve MCL-1’dir (Li ve ark. 1998; Esposti 2002). Antiapoptotik proteinler endoplazmik retikulum (ER), çekirdek zarı ve mitokondride bulunan integral zar proteinleridir. Bu proteinler AIF ve CYCS salınımını engelleyerek apoptozu baskılar. Bu proteinler hücredeki kalsiyum oranını kontrol ettiklerinden dolayı oldukça önemlidirler. Apoptozun başlayabilmesi için BCL-2 ve BAX dengesinin kurulması gerekir. Sitozolde bulunan BAX proteini apoptotik uyarı ile mitokondriye doğru yönelir. Kalpain (kalsiyum bağımlı proteolitik enzim) tarafından uyarılarak CYCS salınımını indükler. BCL-2 proteininin aşırı ekspresyonu apoptozun baskılanmasına sebep olurken, BAX proteininin aşırı ekspresyonu ise apoptozu indükler (Plati ve ark. 2011; Kartlaşmış ve ark. 2016).

Mitokondrinin zarları arasında bulunan CYCS'nin sitozole geçmesi ile apoptoz başlar (Chinnaiyan 1999; Hill ve ark. 2004). Hücre içi sinyaller alındıktan sonra pro-apoptotik BID proteinini, antiapoptotik BCL-2 proteinini inaktive etmek ve pro-apoptotik BAX'ı aktive etmek için mitokondriye doğru yönelir. Apoptotik sinyal alındıktan sonra mitokondri membranında porlar (PT porları) oluşmasıyla membran geçirgenliği bozulur. Bu porlardan mitokondri zarı içerisinde bulunan CYCS ve AIF sitozole geçer. CYCS, bir sitoplazma proteini olan APAF-1 (Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1)'in aktivatörüdür. CYCS APAF-1'e bağlanır ve bu yapıya prokaspaz-9 da bağlanmasıyla apoptozom meydana gelir. Apoptozom içerisinde prokaspaz-9 aktif forma dönüşür. Kaspaz-9 da prokaspaz-3'ü aktif Kaspaz-3 haline getirerek apoptoz başlatılır. Kaspaz-3, yürütücü kaspazların en önemlisi olarak kabul edilir. Spesifik olarak endonükleaz CAD (Kaspaz Aktive edici DNaz)'ı aktive eder. Prolifere olan hücrelerde CAD, inhibitörü ICAD (İnaktif Kaspaz Aktive edici DNaz) ile kompleks halindedir. Apoptotik hücrelerde aktive edilmiş Kaspaz-3, ICAD'ı inaktifleştirerek CAD'ı serbestleştirir. CAD daha sonra çekirdek içinde kromozomal DNA'yı bozarak kromatin yoğunlaşmasına neden olur. Kaspaz-3 ayrıca hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesine ve hücrenin apoptotik cisimlere ayrışmasına neden olur (Şekil 2.5). Ayrıca, intrinsik ve ekstrinsik yolun her ikisi de Kaspaz-3'ü aktive etmektedir (Tomatır 2003; Elmore 2007; Plati ve ark. 2011).

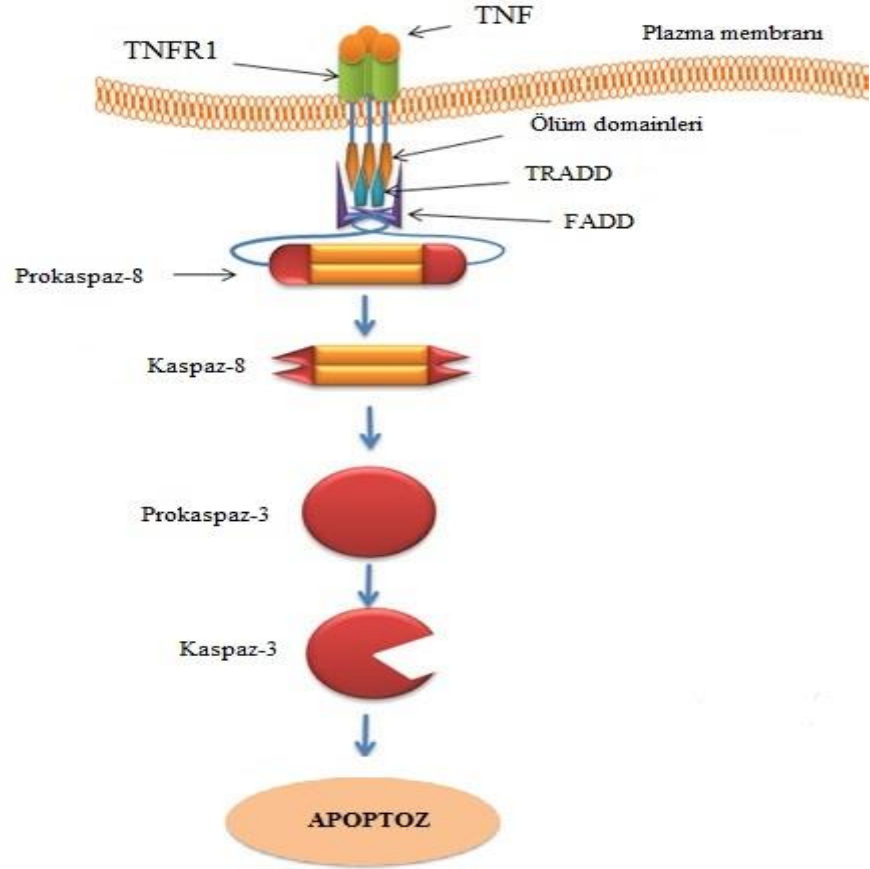


Şekil 2.5: İntrinsik yol (<http://www.easybiologyclass.com/intrinsic-pathway-of-apoptosis-apoptosis-molecular-mechanism-part-1/> 17 mayıs 2018)

2.2.9.2. Ekstrinsik yol

Ekstrinsik apoptotik yolun uyarılması, hücre zarı üzerinde bulunan ölüm reseptörlerinin aktif olması ile bağlantılıdır. Ölüm reseptörleri tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) süper ailesinin üyelerini içerisinde bulundurur (Locksley ve ark. 2001). TNFR1 ve Fas, TNFR ailesi içerisinde apoptozu uyaran en önemli reseptörlerdir. FasL / FasR, TNF-a / TNFR1, Apo3L / DR3, Apo2L / DR4 ve Apo2L / DR5 bugüne kadar, en iyi karakterize edilmiş ligandlar ve bunlara karşılık gelen ölüm reseptörleri arasında bulunur (Elmore 2007; Kartlaşmış ve ark. 2016). Fas (CD95), TNF ailesinin bir üyesi ve hücre yüzey reseptörüdür. Fas ligandının (FasL) Fas reseptörüne (FasR) ve TNF'in TNFR-1'e bağlanması ile apoptotik işlem başlar (Şekil 2.6). Fas ve TNFR-1'in sitoplazmik uzantıları ölüm domainleri içerir. FasL/FasR birleşmesi sonucunda, aktive hale gelen reseptörler Fas adaptör proteini (FADD) ile birleşerek ölüm indükleyici sinyal iletimi (DISC) oluşumuna sebep olur. Bunun sonucunda başlatıcı kaspazlardan Kaspaz-8 direk aktif hale gelir. Fas'ın sitoplazmik kısmı FADD ve RIP (reseptör etkileşimli protein) ile etkileşimdedir (Hsu ve ark. 1995; Kischkel ve ark. 1995; Wajant 2002; Pistritto ve ark. 2016).

Reseptör etkileşimli protein (RIP) serin-treonin kinaz ailesinin bir üyesi olan RIPK1, TNFR1'in çoklu akış aşağı sinyal yollarını kontrol ederek, bu yolların akış yukarısında anahtar bir regülatör görevi görmektedir. Apoptoz, kinaz aktivitesinden bağımsız olarak RIPK1'in, Kaspaz-8 için protein olan FADD ile bağlanması yolu ile sağlanır ve bu da Kaspaz-8'in aktivasyonunu destekler. Bu durum mitokondriyal hasarı tetikleyerek apoptozu gerçekleştirir ve bu şekilde Kaspaz-3 gibi kaspazların aktivasyonu tetiklenir. Adaptör protein olan TRADD ve RIP proteinleri prokaspaz-8'in aktivasyonu ile apoptozu doğrudan uyarır. Aktif hale gelen Kaspaz-8'de diğer kaspazları (Kaspaz-3, -6 ve -7) aktif hale getirerek apoptoz başlar. Apoptozun gerçekleşmediği koşullar altında, RIPK1, nekroptozun ilerlemesine aracılık ederek, MLKL'nin fosforilasyonunu hızlandıran RIPK3 ile etkileşerek nekroptozu aktive edebilir (Tomatır 2003; Geng ve ark. 2017).

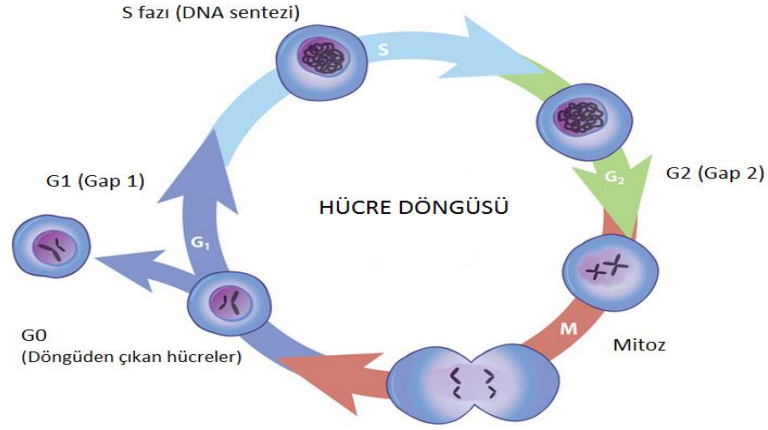


Şekil 2.6: Ekstrinsik yol (<https://www.pinterest.es/pin/295056213077750432/?lp=true> 17 mayıs 2018)

2.2.10. Hücre döngüsü

Bölünebilme yeteneğine sahip olan hücreler, büyüme faktörleri ve hücre dışı sinyaller tarafından uyarıldığı zaman büyüebilir ve bölünebilir. Hücrelerin büyümesi ve çoğalması, organizmaların gelişimi, apoptoz, DNA hasarı onarımının düzenlenmesi, ölü ve hasar görmüş dokuların yenilenebilmesi için hücre döngüsü hayati bir öneme sahiptir. Organları ve dokuların bütünlüğünün sağlanması için hücrelerin büyüme ve farklılaşmasının düzenlenmesi gereklidir (Schafer 1998). Hücre döngüsü, doğrudan hücre proliferasyonunu ve hücre bölünmesini sağlayan birçok gen tarafından kontrol edilir. Kansersiz hücrelerde bu genler mutasyona uğradığı için kontrolsüz hücre proliferasyonuna neden olur (Vermeulen ve ark. 2003).

Bir hücrenin oluşup bölünmeye başlamasından itibaren onu takip eden sonraki hücre bölünmesine kadar geçen zamanda hücrede meydana gelen geçici biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerin gözlemlendiği olaylar zinciri hücre döngüsüdür. Genetik olarak birbirine tıpa tıpa benzeyen iki hücrenin oluşması ile döngü tamamlanır. Hücre döngüsü temel olarak interfaz ve mitoz olmak üzere iki bölüme ayrılır (Şekil 2.5). Hücrelerin mitoz girmeden önce bir hazırlık aşamasına ihtiyaç vardır. Bu hazırlık aşaması interfaz olarak bilinir. İnterfaz da G1, S ve G2 olarak 3 evreye ayrılır (Aktuğ 2014; Canpolat 2016). S ve M (mitoz) evresine geçilmeden önce içsel ve dışsal çevrenin düzenlenmesi gerekir. G1 fazı bu aşamada çok önemlidir. RNA ve protein sentezi yapılır, metabolizma en yüksek seviyede olur, büyüme faktörleri gibi hücreyi bölünmek için uyaran proteinler aktif hale gelir ve ribozom, mitokondri, lizozomlar gibi hücre içeriği iki katına çıkar. En uzun evredir. Bu evrenin uzunluğu dış koşullar ve diğer hücrelerden gelen sinyallerin uzunluğuna bağlıdır. Hücrenin sentez evresine girebilmesi için G1 evresinin sonuna doğru DNA replikasyonu için gerekli enzimler sentezlenir (Cooper 2000).



Şekil 2.7: Hücre döngüsü (<https://trabalhosparaescola.com.br/ciclo-da-mitose/> 8 Eylül 2017)

Hücrenin büyümesi için gerekli koşullar sağlandığında hücre S evresine geçebilir. Hücre dışı koşullar sağlanamadığında hücreler G1'deki ilerlemeyi geciktirir ve G0 adı verilen istirahat evresine girer. Bu fazda döngü içinde bulunmayan hücrelerin bulunduğu fazdır. Hücreler bu fazda metabolik olarak aktif olmalarına rağmen uygun sinyaller tarafından uyarılmadığı sürece çoğalmazlar. Hücreler bu fazda günlerce, haftalarca hatta yıllarca bekleyebilir (Heuvel 2005; Canpolat 2016; Fischer ve Müller 2017).

İnterfazın en önemli kısmı G1 fazından sonra gerçekleşen S fazıdır. Bu fazda, çekirdekte replikasyon gerçekleşir ve DNA miktarı iki katına çıkar. Sentrozom kendini eşlemeye başlar. DNA replikasyonu tamamlandıktan sonra hücreler G2 fazına geçer (Cooper 2000). G2 evresi hücrenin bölünmeden önce yoğun protein sentezi yaptığı son basamaktır. Hücreler G2 fazını da tamamladıktan sonra hücre döngüsünün son aşaması olan M fazına girer. Bu evreden çoğalmış kromozomlar yoğunlaşarak kardeş kromatidler kutuplara ayrılıp hücre bölünür ve siklus tamamlanmış olur (Vermeulen ve ark. 2003; Fischer ve Müller 2017).

Hücreler bir bölünme sinyali tarafından uyarılmadığı sürece döngünün aktif fazlarına giremezler. Büyüme faktörleri, sitokinler veya mutajenler hücreyi bölünme için uyaran çeşitli sinyaller arasındadır. Hücreler bölünme sinyalini aldıklarında Protein kinaz C, JAK/STAT yolları/pathways veya MAPK gibi sinyal ileti mekanizmaları devreye girer. Bu ileti mekanizmaları, transkripsiyonu, hücre döngüsünü veya hücre iskeletini kontrol eden bir substratı fosforiller veya direk

nükleusa ulaşarak doğrudan transkripsiyonu uyarır. Bu sayede, hücre siklusa sokularak mitozu sevk edilmiş olur. Hücre proliferasyonu, yüksek derecede korunmuş bir siklin bağımlı serin treonin protein kinaz (CDKs) ailesinin ardışık aktivasyonu ve inaktivasyonu ile kontrol edilir. CDK'lar, DNA hasar kontrol noktasının ve onarım yollarının ana düzenleyicisidir. Düzenleyici proteinlerin, siklinlerin bağlanması, CDK faaliyetlerini düzenler (Sclafani ve Holzen 2007). Hem G1/S hem de S fazı geçişi, sırasıyla siklin E ve siklin A ile ilişkili olarak CDK2'nin aktivasyonunu gerektirir. Geç G2 ve erken M evresinde, siklin A, CDKI ile kompleks oluşturur. CDK aktivitelerini düzenleyen iki ayrı CDK inhibe edici protein ailesi bilinmektedir. Bunlar, CDK/Siklin komplekslerinin düzenlenmesinde rol oynayan INK4 (p15, p16, p18 ve p19) ve Cip/ Kip (p21 ve p27) aileleridir. CDK'ların aktivasyonu, substrat proteinlerinin fosforilasyonunu tetikleyerek hücre döngüsünün ilerlemesini etkileyen değişiklikler meydana getirir. Aktive edilmiş CDK kompleksleri için iyi bilinen bir substrat RB tümör süpresörüdür. CDK9, spesifik olarak RB proteinini fosforile eder. RB'nin hiperfosforilasyonu G1-S geçişi sırasında oluşur ve hipofosforile RB, DNA sentezini engeller (Cooper 2000; Bhattacharya ve ark. 2014).

DNA hasar kontrol noktası ve onarım yollarının ana düzenleyicileri olarak görev alan CDK'ların transkripsiyonel düzenlemede ve apoptozda önemli rolleri vardır. Hücre DNA'sında hasar olduğu durumlarda hasarın giderilmesi için döngü G1 evresinde durdurulur. G1 noktasında durma, proliferasyon ve apoptotik sinyallerin önemli bir koordinatörü olan p53 tümör baskılayıcı genin proteini ile sağlanır. p53 proteinin miktarı DNA hasarı arttıkça artar ve hücre döngüsünün G1 kontrol noktasında durmasını sağlar. p53 geni mutasyona uğradığında hasarlı DNA G1 kontrol noktasında bekletilemediği için tamir edilmeden S evresine geçer. Bu durumda p53, DNA hasarına karşı hücre döngüsünü durdurmak için CDKN1A (p21)'i uyardıktan sonra transkripsiyonel olarak DNA onarım enzimlerini aktive eder. Tüm tümörlerin yaklaşık %50'sinde p53 geninin mutasyona uğradığı bilinmektedir (Ambrosino ve Nebreda 2001; Bhattacharya ve ark. 2014)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada kullanılan cihaz ve kimyasallar

3.1.1.Çalışmada kullanılan cihazlar

Tablo 3.1: Kullanılan cihazlar

Cihaz/Malzeme	Marka
ELISA okuyucu	Epoch
-80°C Dondurucu	Symphony
Mikrodalga Fırın	Arçelik MD554
-20 °C Derin Dondurucu	Arçelik
Hassas Terazı	KERN-Sohn GmbH
Laminer Hava Kabini Class 2	Scanlaf
96 kuyucuklu hücre kültür kabı	Nest
Steril kültür kapları (Petri) (100x20mm)	Nest
Işık Mikroskopu	Olympus
Otomatik mikropipetler (10, 20, 100, 200, 1000 µl'lik)	VWR, Eppendorf
Real time PZR	Biorad CFX Connect
Santrifüj	Hettich
Elektroforez	Thermo
Nanodrop	Maestro
Kırık Buz Makinesi	Scotsman
CO ₂ 'li inkübatör	Thermo HERA cell 150
İnverted mikroskop	Olympus
Mikro santrifüj	Nüve
Jel görüntüleme sistemi	G:Sox-Syngene
Vorteks	VWR (Nüve)
Yatay Elektroforez Seti	Cleaver
pH Metre	Wtw-Inolab
Otoklav	Vwr
Thermal Cycler	Peqlab (Primus 96)
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
Orbital Karıştırıcı	Biosan

3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

Tablo 3.2: Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

Kimyasal/sarf	Marka
Ginnalin A	Carbosynth
SB203580	Cayman Chemical Company
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	BioRad
XTT Reagent-Cell Proliferation Kit	Biological Industries
EvaGreen qPCR Master	BioRad
Trizol	Sigma
Hücre kazıyıcı	SPL
Fetal Sığır Serumu	Capricorn
Penisilin/Streptomisin	BI (Biological Industries)
EMEM Medyum	Multicell
DNAaz/RNase free su	BioShop
Tripan Mavisi Boyası	BI (Biological Industries)
PBS	Multicell
Dimetil sülfoksit (DMSO)	ApliChem
Tripsin/EDTA	Multicell
Caspase-3 Assay Kit	BioVision

3.2. Hücre kültürü

Çalışmada kullanılan insan hepatoselüler karsinoma hücre hattı olan Hep-3B (ATCC no: HB 8064TM) ATCC'den temin edilmiştir. Hep-3B hücreleri %10 fetal sığır serumu ve %1 Penisilin-Streptomisin içeren EMEM besiyerinde kendileri için uygun kültür ortamı olan 37 °C'de %95 nem ve %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi.

Tablo 3.3:Çalışmada kullanılan Hep-3B hücre hattının özellikleri

Hep-3B hücre hattı (ATCC no: HB 8064 TM)	
Organizma	Homo sapiens, insan
Doku	Karaciğer
Hastalık	HCC
Morfoloji	Epitelyal
Cinsiyet	Erkek
Yaş	8
Büyüme özelliği	Yapışarak çoğalan (adherent)

3.2.1. Hücre hattının dondurulması

Petri yüzeyine yapışarak çoğalan hücreler, yapıştıkları yüzeyden kaldırmak için Tripsin-EDTA ile muamele edildi ve 37 °C'de %95 nem ve %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından inverted mikroskop ile hücrelerin kalktığı gözlemlenerek petri üzerine taze besiyeri eklendi. Hücre-besiyeri içeriği falkon tüpe alınarak 4 dakika boyunca 1500 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Tüp içerisine 9:1 oranında DMSO (Dimetil sülfoksit) ve besiyerinden oluşan dondurma çözeltisi eklenerek hücreler kriyotüplere alındı. Kriyotüpler -20 °C'de dondurulduktan sonra -80 °C'de muhafaza edildi.

3.2.2. Dondurulmuş hücre hatlarının çözülmesi

%10 DMSO ile dondurulmuş kriyotüp içerisinde bulunan hücreler hızlı bir şekilde çözülmesi için -80 °C'den 37 °C'ye alındı. İçerisinde 5ml EMEM besiyeri bulunan falkon tüpe 1 ml hücre damla damla eklendi. 1500 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Uygun miktarda besiyeri ile pellet homojenize edildi. Hücreler petriye alınarak 37 °C'de CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Hücreler petri yüzeyinin yaklaşık %80'ini doldurana kadar iki günde bir besiyeri değiştirilerek çoğaltıldı. Petri yüzeyi dolduğunda hücrelerin canlılığının korumak amacı ile pasajlama işlemi yapıldı.

3.2.3. Hücre hattının pasajlanması

Petride %80-90 yoğunluğuna ulaşan hücrelerinin pasajlama işlemi için ilk olarak eski besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Hücreleri flask yüzeyinden kaldırmak için 1-2 ml Tripsin-EDTA eklendi ve 3-4 dakika 37 °C'de %95 nem ve %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında hücrelerin inverted mikroskopta kalktığı gözlemlendi. Flaska, Tripsin-EDTA miktarının yaklaşık iki katı taze besiyeri eklendi, hücre besiyeri içeriği pipet ile homojenize edildikten sonra bir falkon tüpe alındı. 1500 rpm'de 4 dakika santrifüj edilerek süpernatant boşaltıldı. Uygun miktarda besiyeri ile pellet homojenize edildi. Hücrenin yoğunluğuna göre petrilere hücre ekimi yapıldı ve çoğalmaları için 37 °C'de %95 nem ve %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı.

3.3. *Ginnalin A* stok solüsyonun hazırlanması

Çalışmada kullanılan *Ginnalin A* (GA) (Carbosynth, Katolog No: FG65656) ticari olarak satın alındı. $C_{20}H_{20}O_{13}$ kimyasal formülüne ve 468,37 g/mol molekül ağırlığına sahip GA, katı halde $-20^{\circ}C$ 'de muhafaza edildi. GA %0,1 DMSO içeren PBS'de çözülerek stok solüsyon olarak hazırlandı. Daha sonra hazırlanan stok solüsyondan seyreltmeler yapılarak çalışma için uygun konsantrasyonlar hazırlandı.

3.4. SB203580 stok solüsyonun hazırlanması

Çalışmada kullanılan p38-MAPK inhibitörü SB203580 (Cayman Chemical, Katolog No:152121-47-6) ticari olarak satın alındı. $C_{21}H_{16}FN_3OS$ kimyasal formülüne ve 377,43 g/mol molekül ağırlığına sahip SB203580, katı halde ışıktan korunarak $-20^{\circ}C$ 'de muhafaza edildi. SB203580 %0.1 DMSO içeren PBS'de çözülerek stok solüsyon olarak hazırlandı. Daha sonra hazırlanan stok solüsyondan seyreltmeler yapılarak çalışma için uygun konsantrasyonlar hazırlandı.

3.5. *Ginnalin A* ve SB203580'in sitotoksik etkisinin belirlenmesi

Ginnalin A ve SB203580'in Hep-3B hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi için XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) testi kullanıldı. XTT sarı renkte, suda eriyebilen tetrazolyum tuzudur. Canlı hücrelerce turuncu renkli formazan bileşenlerine indirgenmektedir. Hücresel efektörlerin karışımı ile çözünür, parlak turuncu renk türevine indirgenir. Metabolik aktif hücrelerin sayısı ile orantılı olan boya yoğunluğu, belirli bir dalga boyunda bir spektrofotometre ile okunabilir.

GA ve SB203580'in sırası ile 0-500 μM ve 0-100 μM aralığındaki çalışma konsantrasyonları EMEM besiyeri ile hazırlandı. Petrilere ekilen ve petri yüzeyini kaplayan hücreler tripsinizasyon işlemi ile petri yüzeyinden kaldırıldı. Tripsin-EDTA miktarının yaklaşık iki katı taze besiyeri eklenerek homojenize edildikten sonra bir falkon tüpe alındı. 1500 rpm'de 4 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant boşaltıldı. Uygun miktarda besiyeri ile pellet homojenize edildi. Bir ependorfta, 100 μl hücre ve 100 μl tripan mavisi karıştırıldı. Ardından bu karışımdan 10 μl alınarak Thoma lamı ile ışık mikroskobu altında hücreler sayıldı. Elde edilen hücre sayılarına göre 96 kuyucuklu plate'in her bir kuyucukta 5×10^3 hücre olacak şekilde 100 μl

hücre-besiyeri içeriği platelere ekildi. Hücreler yüzeye yapışmaları için 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılarak kontrol grupları dışındaki kuyucuklara 10, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 75, 80 ve 100 μM SB203580 ile 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 ve 500 μM *Ginnalin A* eklendi. Hücreler 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda kuyucuklardaki besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 50 μL XTT solüsyonu (49 μL reagent solüsyonu+ 1 μL aktivatör slüsyonu) eklendi ve hücreler 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatin sonunda çalışılan grupların absorbans değerleri (OD) ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda 630 nm referans aralığında okundu. XTT deneyi sonucunda GA ve SB203580'in IC_{50} değeri belirlendi. IC_{50} değerleri göz önünde bulundurularak Hep-3B hücrelerine 5:1 oranında GA ve SB203580 24, 48 ve 72 saat uygulandı ve tekrar XTT analizi gerçekleştirildi. Hep-3B hücreleri üzerinde GA ve SB203580 kombinasyonun etkili olup olmadığını değerlendirmek için Ting-Chao Chou ve Nick Martin tarafından bulunan CompuSyn Version 1.0 yazılımı ile kombinasyon indeksinin (CI) hesaplanması yapıldı. Medyan etki analizine dayananan bu program ile, kombinasyonun her bir ajandan ayrı olarak daha etkili olduğu sinerjistik (CI <1), tekli ajanların kombinasyona göre etkili olduğu antogonistik (CI >1) ve IC_{50} değerleri yarıya düşürülerek kullanıldığında kombinasyonun tekli ajanlardan daha etkili olduğunu belirten additif (CI=1) etki gösterip göstermediğini hesaplamak için büyüme inhibisyon eğrisinin tüm şekilleri dikkate alınarak hesaplama yapılmıştır.

Tablo 3.4: CI değerlerine göre kombinasyon etkileri

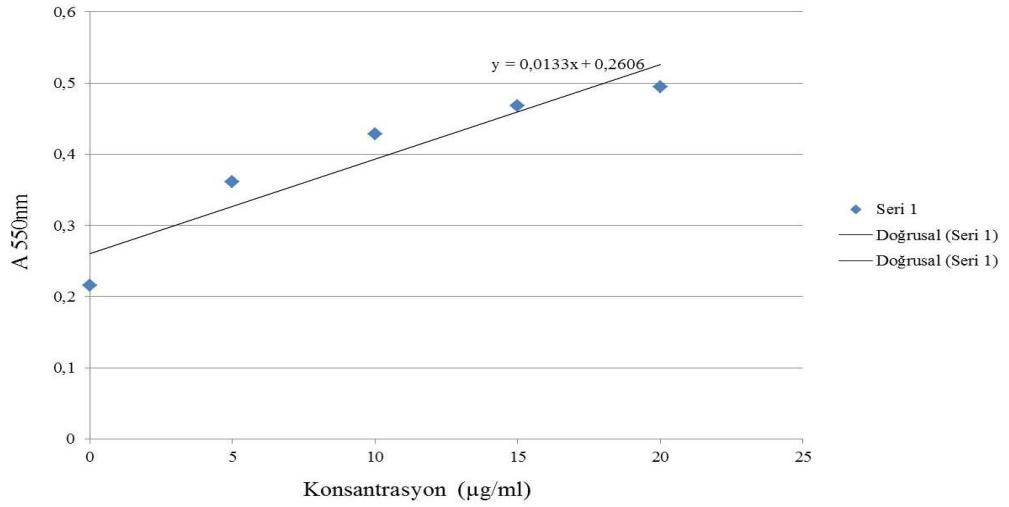
CI	Etki
<0,1	Çok güçlü sinerjistik etki
0,1-0,3	Güçlü sinerjistik etki
0,3-0,7	Sinerjistik etki
0,7-0,85	İlımlı sinerjistik etki
0,85-0,9	Hafif sinerjistik etki
0,90-1,1	Additif etki
1,1-1,2	Hafif antogonistik etki
1,20-1,45	İlımlı antogonistik etki
1,45-3,3	Antogonistik etki
3,3-10	Güçlü antogonistik etki
>10	Çok güçlü antogonistik etki

Sonraki analizlerde GA ve SB hücrelere IC₅₀ dozlarında (GA: 155 µM SB: 32,5 µM) ya da additif etki gösterdikleri kombinasyon dozlarında (GA 86,22 µM: SB203580 17,24 µM) 72 saat süresince uygulandı.

3.6. Kaspaz-3 aktivitesi analizi

Ginnalin A ve SB203580'in Kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkileri “Caspase-3 Assay Kit” kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. 6 kuyucuklu plate'lere ekimi yapılan hücreler 24 saat yüzeye tutunmaları için inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 155 µM *Ginnalin-A*, 32,5 µM SB203580 ve *Ginnalin A*/SB203580 kombinasyonu uygulanarak 72. saat sonunda kit içeriğinde bulunan uygun solüsyonlar ile analiz gerçekleştirildi. Kısaca; pelletde 150,000 hücre sayıldı. Pellet üzerine 50 µl lysis buffer eklenip iyice süspanse edilerek 10 dakika inkübasyona bırakıldı. 10,000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı yeni bir tüpe aktararak analizler için -80 °C'de muhafaza edildi. Proteinlerin konsantrasyonları, protein tayininde yaygın olarak kullanılan Bradford yöntemi ile ölçüldü. Ölçüm, boyanın (Coomassie Blue) proteine bağlanmasıyla oluşan kompleksin molar absorpsansı arttırmasına dayanmaktadır. 465-595 nm arasında ölçüm gerçekleştirilir. Bradford yöntemi ile konsantrasyonu hakkında fikir sahibi olunmayan örnekler ile deneme yapılabilir. Rengin koyu mavi olması yüksek konsantrasyona, açık kahverengi olması ise düşük konsantrasyona işaret etmektedir. Protokole göre deneye başlamadan önce Bradford çözeltisi hafifçe çalkalandı. Uygun aralıklarda BSA standartları hazırlandı (5 µg/30 µl; 10 µg/30 µl; 15 µg/30 µl; 20 µg/30 µl) ve örnekler standart eğrinin uygun alanında olacak şekilde ayarlandı. Her bir ependorfa 30 µl örnek/standart pipetlendi. Her bir ependorfa 90 µl Bradford ayırıcı pipetlenerek eklendi ve hızlıca vortekslendi. Tüm örnekler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilip A₅₉₅ nm'de okundu. Örneklerin protein düzeyi (Şekil 3.1)' de gösterildiği gibi standart grafik eğrisi kullanılarak hesaplandı. Kaspaz-3 aktivitesi için her protein 100 µg olacak şekilde ayarlandı. 100 µg protein 50 µl lysis buffer ile sulandırıldı. Her örneğe 10 mM DTT (dithiothreitol) içeren 50 µl 2X reaksiyon buffer eklendi. Son olarak her tüpe 4 mM DEVD-*p*NA substratın 5 µl'si ilave edilerek 2 saat 37 °C'de inkübe edildi. Kaspaz-3 aktivitesi, işaretlenmiş DEVD-*p*NA substratının aktif Kaspaz-3 tarafından parçalanması ile oluşan kromofor p-nitroanilin

(p-NA)'in 400 nm dalga boyunda bir mikropate okuyucu ile ölçülmesi sonucunda belirlenmiştir.



Şekil 3.1: Bradford protein standart eğrisi

3.7. Apoptoz, nekroz ve hücre döngüsü ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi

Kontrol ve doz gruplarında apoptoz, nekroz ve hücre döngüsünde önemli genlerin mRNA düzeyinde ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı kantitatif PZR (qPZR) kullanılarak yapılmıştır. Bunun için hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, ardından cDNA sentezlenmiştir.

3.7. 1. Hücre hatlarından total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu Trizol solüsyonu kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler 6 kuyucuklu plate'lere ekilerek hücrelerin yüzeye yapışması için 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından uygun dozlarda *Ginnalin A* ve SB203580 uygulanarak hücreler 72 saat inkübasyona bırakıldı. 72 saatin sonunda her bir kuyucuğa 500 µl Trizol eklenerek kuyucuklar hücre kazıyıcı ile kazınıp her bir kuyucuk ayrı bir ependorfa aktarıldı. Her bir ependorf içerisine 200 µl kloroform eklenerek vorteks yapıldı. Beş dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 12000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir ependorfa alınarak üzerine 250 µl 2-propanol damla damla eklendikten sonra 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 12000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 1 ml

%70'lik etanol eklendi. 12000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak RNA pelleti yeni bir ependorfa alındı. Etanol uzaklaştırılana kadar RNA pelleti kurumaya bırakıldı. 30 µl nükleaz içermeyen su (NFW) ile RNA pelleti çözdürüldü. İzole edilen RNA örneklerinin ölçümü nanodrop spektrometre cihazı ile yapıldı. 260/280 nm UV'de Nanodrop cihazına 1 µl RNA örneği konularak ng/µl cinsinden RNA örneklerinin konsantrasyonları ölçüldü. RNA örnekleri cDNA'ya çevrilmeden önce %1'lik agaroz jelde 90 voltta 70 dakika yürütüldü. cDNA için 1 µg RNA kullanıldı. Kalan örnekler -80 °C'de muhafaza edildi.

3.7.2. cDNA sentezi

Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi, cDNA Synthesis kiti kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. cDNA sentezi için 1 µg RNA, 4 µl 5x İScript reaksiyon miksi, 1 µl İScript revers transkriptaz bir tüp içerisine eklenip karışımın hacmi NFW ile 20 µl'ye tamamlandı. Ardından tüpler 25 °C'de 5 dakika, 46 °C'de 20 dakika, 95 °C'de 1 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında edilen cDNA'lar qPZR analizlerinde kullanılmak için -20 °C'de muhafaza edildi.

3.7.3. Primer dizaynı

Gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılan, *CASP3*, *CASP9*, *BCL2*, *BAX*, *CYCS*, *TNF*, *TNFR1*, *RIPK1*, *TRADD*, *CDKN1A (P21)*, *CCND1*, *CCND2*, *CCND3* ve *CDK4* genleri ile referans gen olarak belirlenen *ACTB* ve *CYPA* genlerine yönelik primerler, IDT PrimerQuest (<https://eu.idtdna.com/site>) programı kullanılarak tasarlandı. Çalışmada kullanılan primer dizileri Tablo 3.5'de gösterilmiştir.

Tablo 3.5: Çalışmada kullanılan primer dizileri

Gen	Primer dizisi	Uzunluk (bp)
<i>ACTB</i>	F:5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3'	178
	R:5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	
<i>CYP4</i>	F:5'-TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG-3'	126
	R:5'-CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC-3'	
<i>BAX</i>	F:5'-GGAGCTGCAGAGGATGATTG-3'	151
	R:5'-GGCCTTGAGCACCAGTTT-3'	
<i>BCL2</i>	F:5'-GTGGATGACTGAGTACCTGAAC-3'	125
	R:5'-GAGACAGCCAGGAGAAATCAA-3'	
<i>CASP3</i>	F:5'-GAGCCATGGTGAAGAAGGAATA-3'	162
	R:5'-TCAATGCCACAGTCCAGTTC-3'	
<i>CASP9</i>	F:5'-CGACCTGACTGCCAAGAAA-3'	153
	R:5'-CATCCATCTGTGCCGTAGAC-3'	
<i>CYCS</i>	F:5'-GGAGAGGATACTGATGGAGTA-3'	102
	R:5'-GTCTGCCCTTTCTTCCTTCTT-3'	
<i>RIPK1</i>	F:5'-GGCTTCACACAGTCTCAGAT-3'	103
	R:5'-AAAGTGGGTGATGAGGGAAG-3'	
<i>TNF</i>	F:5'-CCTCCTCTCTGCCATCAAG-3'	86
	R:5'-CCAGATAGATGGGCTCATAACC-3'	
<i>TNFR1</i>	F:5'-CGAGATCGATCGGCTGGAG-3'	139
	R:5'-GTCCATGTCGCGGAGCA-3'	
<i>TRADD</i>	F:5'-TTTCTGTTCCAGGGTCAGC-3'	88
	R:5'-GCCATTTGAGACCCACAGA-3'	
<i>CCND1</i>	F:5'-GTTTCGTGGCCTCTAAGATGAA-3'	135
	R:5'-AGGTTCCACTTGAGCTTGTT-3'	
<i>CCND2</i>	F:5'-GAAGGACATCCAACCCTACAT-3'	155
	R:5'-AGAAGTGCGAAGAAGAGGTC-3'	
<i>CCND3</i>	F:5'-GACCTGGCTGCTGTGATT-3'	104
	R:5'-AAGGTCTGGCATGCTTT-3'	
<i>CDK4</i>	F:5'-ATTGGTGTGGTGCCTATG-3'	129
	R:5'-AACTGTGCTGATGGGAAGG-3'	
<i>CDKN1A</i>	F:5'-TGGACCTGTCAGTGTCTTGTA-3'	120
	R:5'-AGAAATCTGTCATGCTGGTCTG-3'	

3.7.4. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR)

Hedef ve referans genlerin ekspresyon analizleri, gerçek zamanlı kantitatif qPZR kullanılarak gerçekleştirildi. qPZR analizlerinde çift iplikli DNA'ya bağlanarak ortama ışığı veren EvaGreen boyası kullanıldı. Reaksiyon için, 10 µl 2X EvaGreen (ABM) master miks, 5 pMol forward primer, 5 pMol reverse primer ve 2 µl cDNA toplam hacim 20 µl olacak şekilde ddH₂O ile tamamlanarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi. Denatürasyon (95 °C 10 dk), amplifikasyon 40 döngü (95 °C 30 sn, 60 °C 30 sn, 72 °C 30 sn) ve soğuma (40 °C'de 30 sn) basamaklarından oluşan qPZR protokolü uygulandı. Ayrıca 95°C 1 dakika ısıtılıp, 65°C'a düşürülen ısı 95°C'a kadar tekrar kademeli olarak arttırılarak melting curve (erime eğrisi) analizi gerçekleştirildi. Gen ifadeleri düzeyleri Ct (eşik döngüsü) değerleri üzerinden değerlendirildi. Reaksiyon sonucunda elde ürünlerin doğru ürün olduğunu teyit etmek için reaksiyon ürünleri %2'lik agaroz jelde 110 voltta 45 dakika yürütüldü.

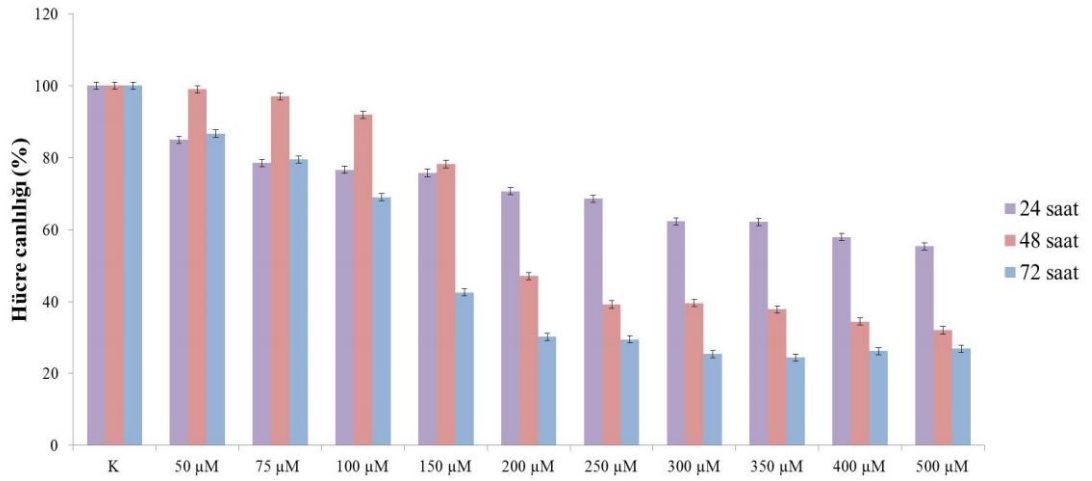
3.8. İstatistiksel analizler

Kaspaz-3 aktivitesi verileri, IBM SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılarak tek yönlü ANOVA testi ile analiz edildi. Kontrol ve doz grupları arasında gen ifadesi düzeyindeki farklılıklar $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak "RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis" isimli web tabanlı program ile belirlendi. Gruplar arası karşılaştırma "RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis" programında bulunan "Student t-testi" analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. p<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

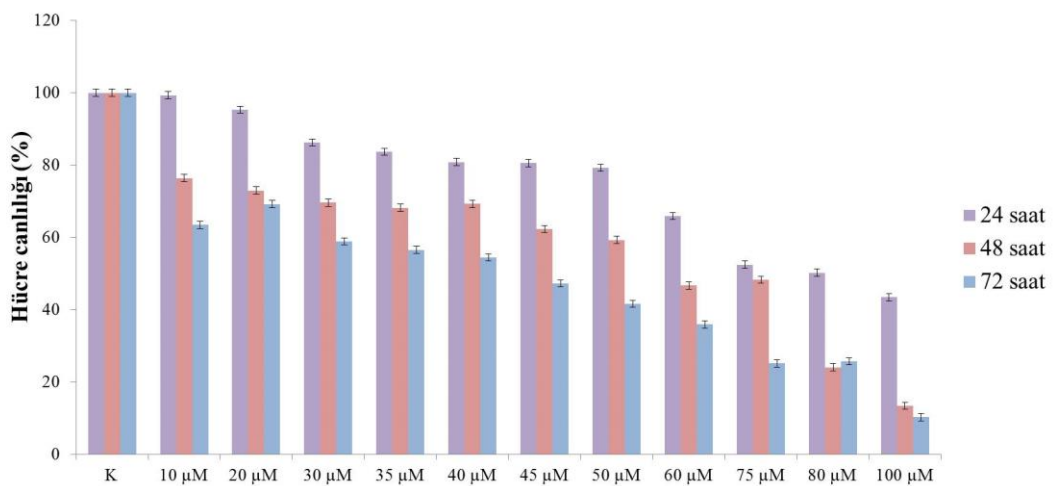
4. BULGULAR

4.1. Ginnalin A ve SB203580'in sitotoksik etkisi

Hep-3B hücre hattında GA ve SB203580'in sırasıyla 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 ve 500 μM ile 0, 10, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 75, 80 ve 100 μM doz aralıklarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası sitotoksitesi XTT testi ile üçlü tekrarlar şeklinde gerçekleştirildi. GA ve SB203580'in konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını inhibe ettiği gözlemlendi. Hep-3B hücre hattında 72. saat sonunda GA'nın IC_{50} dozu 155 μM , SB203580'in IC_{50} dozu 32,5 μM olarak belirlendi (Şekil 4.1; Şekil 4.2)

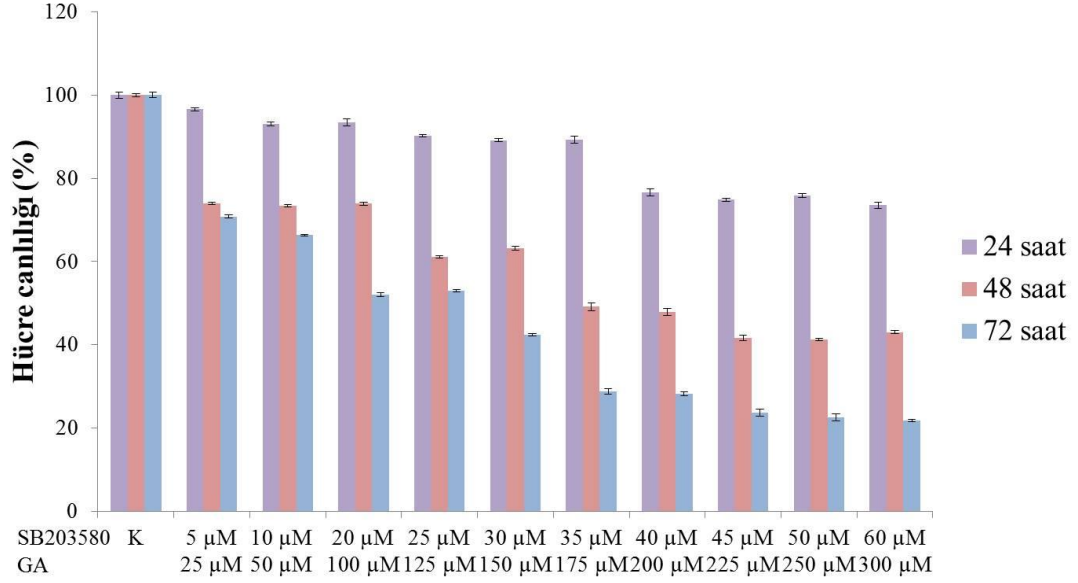


Şekil 4.1: GA'nın Hep-3B hücre canlılığına etkisi

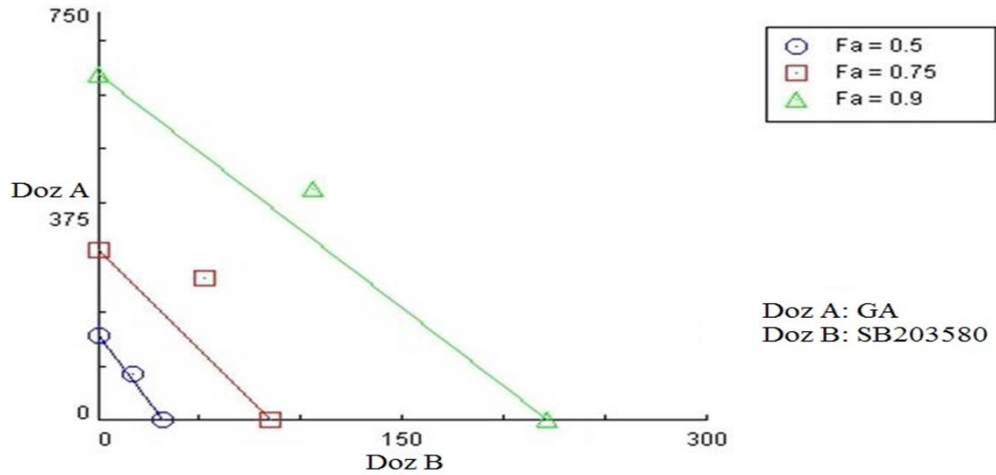


Şekil 4.2: SB203580'in Hep-3B hücre canlılığına etkisi

IC₅₀ dozu belirlendikten sonra GA ve SB203580, 72 saat boyunca hücelere 5:1 oranında uygulandı (Şekil 4.3). CompuSyn Version 1.0 yazılımı kullanılarak yapılan CI analizlerine göre, Hep-3B hücrelerinde GA ve SB203580 kombinasyonunun hücre canlılığının %50'sini inhibe eden konsantrasyonlarda additif etki gösterdiği (GA: 86,22 µM, SB203580: 17,24 µM) (CI=1), fakat hücre inhibisyonu %50'yi geçerse antagonistik etkiye sebep olduğu saptandı (Şekil 4.4).



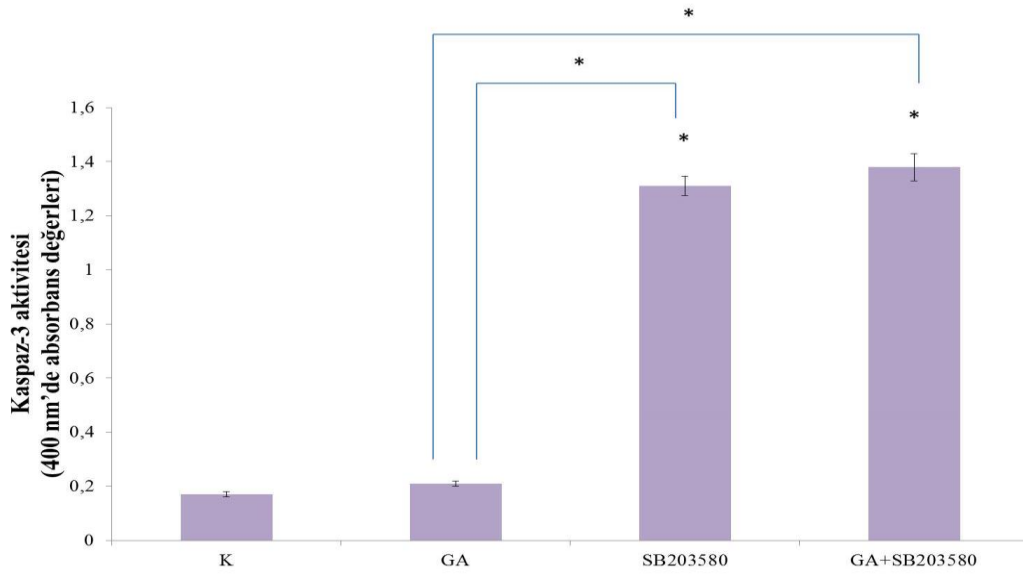
Şekil 4.3: SB203580-GA kombinasyonunun Hep-3B hücre canlılığına etkisi



Şekil 4.4: GA ve SB203580 kombinasyonunun izobologramı. İzobologram CompuSyn Version 1.0 yazılımı kullanılarak oluşturuldu ve CI değerleri hesaplandı. Hücre büyüme inhibisyonunun yüzdesi, Fa olarak ifade edilmiştir. Fa = 0,5, Fa = 0,75 ve Fa = 0,90 sırasıyla % 50,% 75 ve% 90 inhibisyonu ifade eder. Çizginin altındaki veri noktası sinerjistik, çizginin üstündeki antagonistik ve çizgi üzerindeki ise additif etkiyi göstermektedir

4.2. GA, SB203580 ve kombinasyonlarının Kaspaz-3 aktivitesi üzerindeki etkisi

Ginnalin A ve SB203580'in Kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkileri Kaspaz-3 aktivite testi ile gerçekleştirilmiştir. Kaspaz-3 aktivitesi analizi sonuçlarına göre, Hep-3B hücrelerinde, SB203580 ve GA-SB203580 kombinasyonu uygulaması Kaspaz-3 aktivitesini kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 7,8 ve 8,2 kat oranında anlamlı olarak arttırmıştır ($p < 0,05$). Ayrıca, bu artışların GA uygulanan gruba kıyasla anlamlı olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$). Bununla birlikte, SB203580 uygulanan grup ile kombinasyon grubu arasında Kaspaz-3 aktivitesi açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$) (Şekil 4.5). GA uygulaması sonrasında Kaspaz-3 aktivitesinde gözlenen 1,23 oranındaki artış ise istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$).



Şekil 4.5: GA, SB203580 ve kombinasyonlarının Kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi (* $> 0,05$)

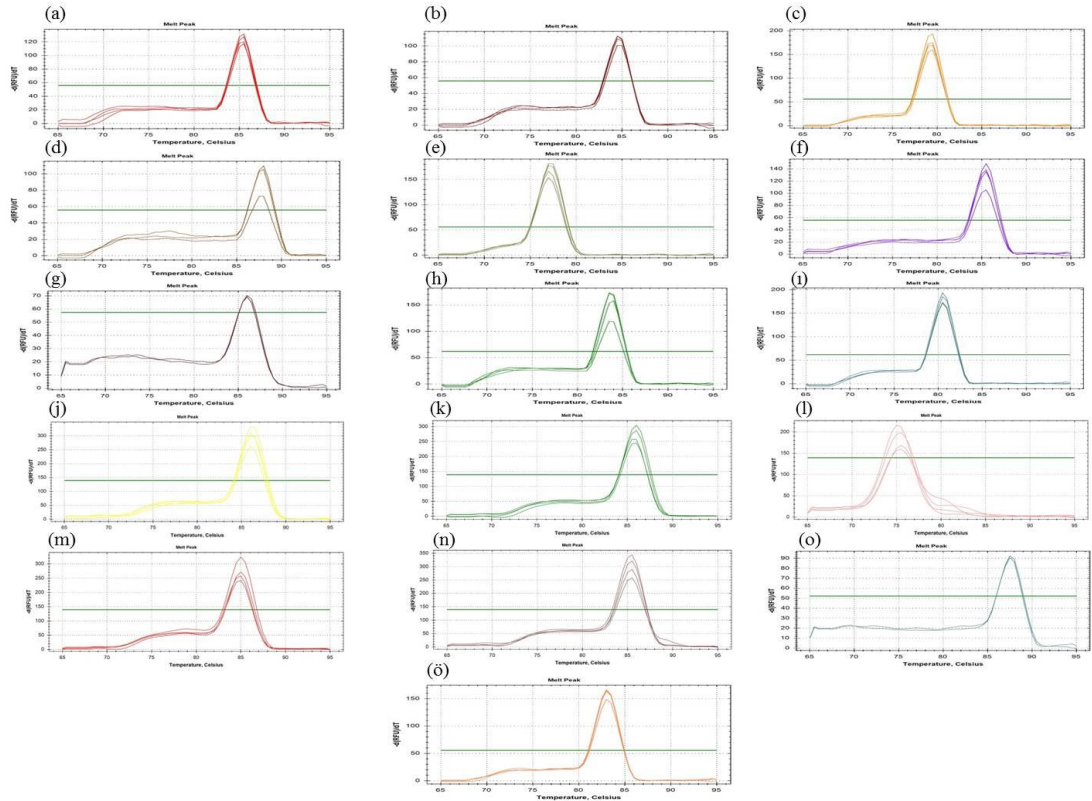
4.3. GA, SB203580 ve kombinasyonlarının apoptoz, nekroz ve hücre döngüsü ile ilişkili genlerinin ekspresyonları üzerine etkisi

Hep-3B kontrol ve Hep-3B doz gruplarından total RNA Trizol solüsyonu kullanılarak izole edilmiştir. Hücre hattında uygun miktarda ve saflıkta RNA'ların elde edildiği gözlenmiştir. Synthesis Kit (Bio-Rad) kullanılarak cDNA sentezleri

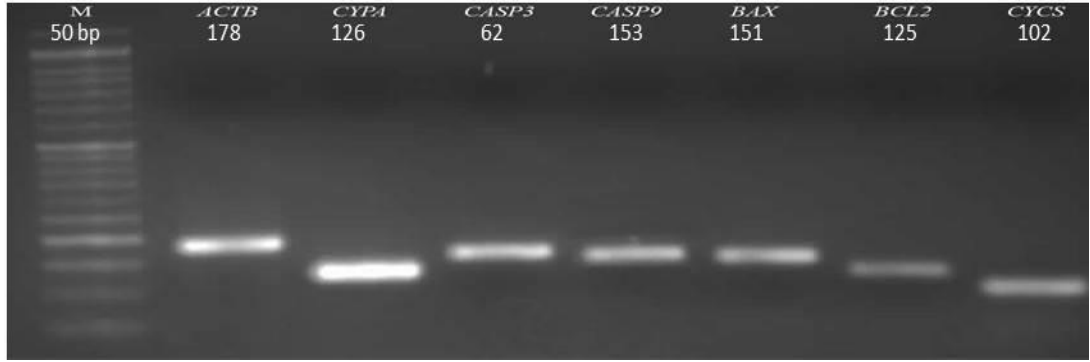
gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'lar uygun karışımlarla striplere aktarılmış ve qPZR'de hücre döngüsü, nekroz ve apoptozda görev alan genlerin ekspresyonu kontrol ve doz gruplarında kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

4.4. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu bulguları

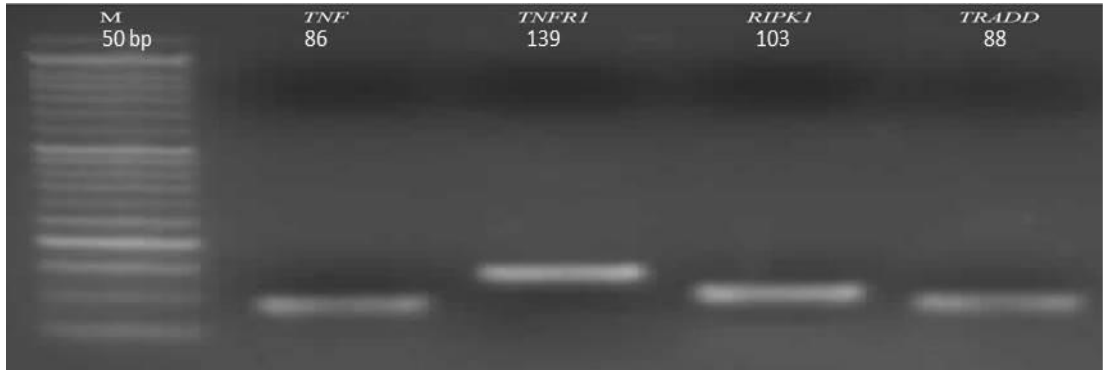
Gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılarak apoptoz biyobelirteçleri olan *CASP3*, *CASP9*, *BCL2*, *BAX*, *CYCS* genleri; nekrozda önemli *TNF*, *TNFR1*, *RIPK1*, *TRADD* genleri ile hücre döngüsünde önemli *CDKN1A*, *CCND1*, *CCND2*, *CCND3*, *CDK4* genlerinin ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir. Ayrıca internal kontrol ve referans gen olarak *ACTB* ve *CYPA* genleri kullanılmıştır. Referans genlerin ve apoptoz, nekroz ve hücre döngüsü hedef genlerinin amplifikasyon sonuçlarına yönelik melting curve yazılım görüntüleri Şekil 4.6'de verilmiştir. PZR ürünlerin agaroz jel görüntüsü Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9 'da gösterilmiştir. Melting curve ve agaroz jel elektroforez sonuçları, çalışmada kullanılan tüm primerlerin spesifik olarak ilgili gen bölgesini çoğalttığını göstermektedir.



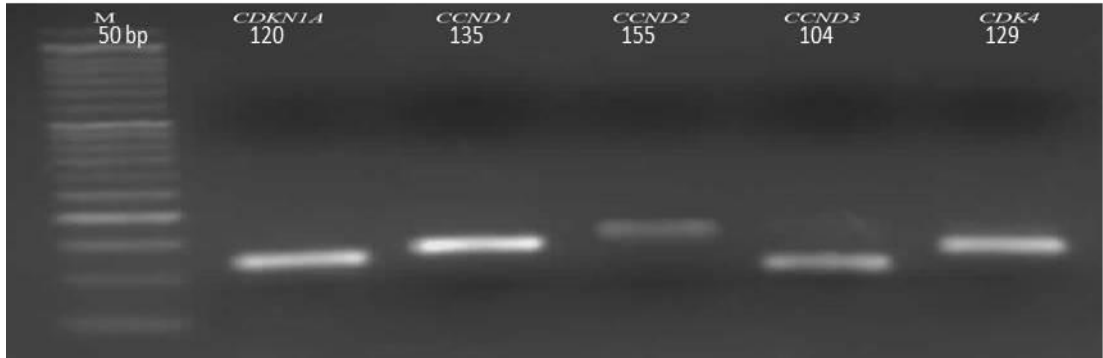
Şekil 4.6: Çalışmada kullanılan *BAX* (a), *BCL2* (b), *CASP3* (c), *CASP9* (d), *CYCS* (e), *TNF* (f), *TNFR1* (g), *RIPK1* (h), *TRADD* (i), *CDKN1A* (j), *CCND1* (k), *CCND2* (l), *CCND3* (m), *CDK4* (n), *ACTB* (o) ve *CYPA* (ö) genlerinin melt analiz eğrileri



Şekil 4.7: Apoptoz yolağında önemli olan genlerin agoroz jel görüntüsü (M: 50 bç DNA marker, bç: baz çifti)



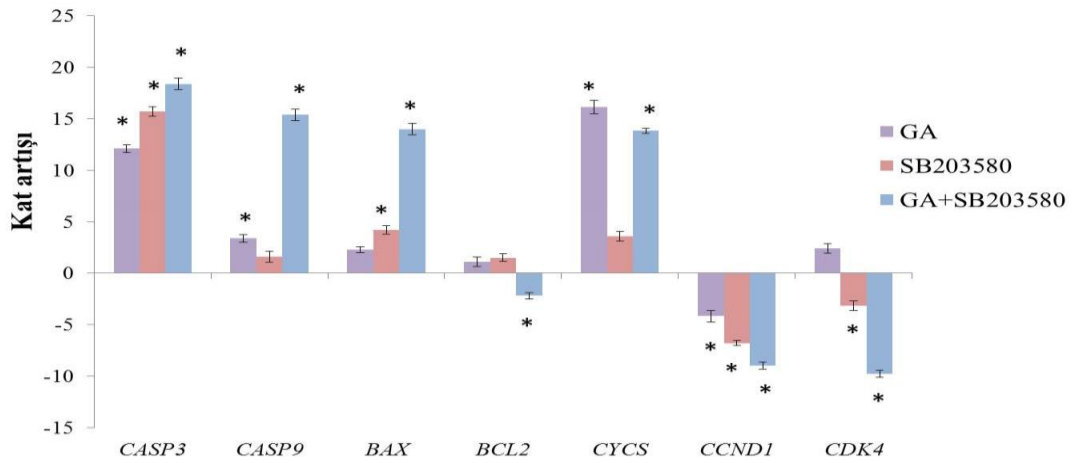
Şekil 4.8: Nekroz yolağında önemli olan genlerin agoroz jel görüntüsü (M: 50 bç DNA marker, bç: baz çifti)



Şekil 4.9: Hücre döngüsünde önemli olan genlerin agoroz jel görüntüsü (M: 50 bç DNA marker, bç: baz çifti)

qPZR sonuçlarına göre, Hep-3B hücre hattında GA, apoptoz ile ilişkili *CASP3*, *CASP9* ve *CYCS* genlerinin ekspresyon seviyelerini kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 12,09, 3,37 ve 16,15 kat arttırmıştır. Hücre döngüsü genlerinden *CCND1*'in ekspresyon seviyesinde ise 4,16 kat azalma tespit edilmiştir. Hücreler IC_{50} dozunda SB203580 ile muamele edildiğinde *CASP3* ve *BAX* genlerinin ekspresyon

seviyelerinde sırasıyla 15,7 ve 4,2 kat artış; *CCND1* ve *CDK4* genlerinin ekspresyon seviyelerinde ise sırasıyla 6,75 ve 3,15 kat azalış saptanmıştır. GA ve SB203580 kombinasyonunun ise, *CASP3*, *CASP9*, *BAX* ve *CYCS* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 18,38, 15,37, 14 ve 13,82 kat anlamlı bir artışa neden olduğu, *BCL2*, *CCND1* ve *CDK4* genlerinin ekspresyon seviyelerinde ise 2,19, 8,96 ve 9,78 kat azalmaya yol açtığı gözlemlenmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 4.10). Diğer genlerde anlamlı bir değişiklik bulunamamıştır (Ek-1).



Şekil 4.10: GA ve SB203580'in apoptoz, nekroz ve hücre döngüsü ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesine etkisi. Grafikte herhangi bir grup için ekspresyon seviyesinde anlamlı değişim gözlenen genler sunulmuştur. Tüm genlere ait sonuçlar Ek-1'de gösterilmiştir. * $p < 0.05$

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Primer karaciğer kanseri, dünya çapında kansere bağlı ölümlerin en yaygın ikinci nedenidir. Sürekli artan insidansa sahip olması nedeni ile büyük bir halk sağlığı problemidir. Karaciğer kanseri, farklı histolojik özelliklere sahip heterojen bir malign tümör grubudur. Karaciğer kanseri arasında en sık görülen primer karaciğer kanseri hepatoselüler karsinoma (HCC)'dir. HCC tek başına tüm karaciğer kanserleri vakalarının yaklaşık %75-80'ini oluşturmaktadır (Sia ve ark. 2017; Pedersen ve ark. 2017). Karaciğer transplantasyonu, karaciğer rezeksiyonu, kemoterapi ve radyofrekans ablasyonu gibi yeni ve gelişmiş tedavilerin geliştirilmesi ile hastaların sağkalım sonuçları iyileşmiştir. Bununla birlikte, karaciğer kanseri olan hastalar için beş yıllık sağkalım oranı %18'dir, bu da diğer birçok kansere göre daha düşüktür. Hastalığın yavaş gelişim göstermesine bağlı olarak geç teşhis edilmesi ve klinikte kullanılan kemoterapötik ve radyoterapötik ajanlara direcin gözlenmesi HCC'de yüksek ölüm oranını da beraberinde getirmektedir. Bu nedenle hastalıktan korunmada ve tedavide yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Gao ve ark. 2012).

Doğal ürünler son 30 yıldır kanser kemoterapisinin temel dayanağı olmuştur. Taxol, topotecan, irinotecan, vinblastin ve vinkristin gibi klinikte kullanılan birçok antikanser ajan doğal orjinlidir. Doğal ürünler veya yapısal akrabaları kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçların yaklaşık %50'sini oluşturur. Bunu yanısıra bitkisel ekstraktlar farklı çalışmalarda, özellikle de kanser hastalarının tedavisinde alternatif tıp/tamamlayıcı tıp ajanı olarak kullanılmasının yanı sıra hastalığın tedavi edilmesinde antioksidan, antimitotik, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar etkiler yaratması için kullanılmaktadır. Doğal olarak oluşan bileşiklerin çeşitli mekanizmalarla tümör oluşumunu önlediği ve aynı zamanda yerleşik tümörlerin büyümesini baskıladığı, standart kemoterapötik ajanlarla kombine kullanımları ek ya da sinerjik etkiler ortaya koyabildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Mann 2002; Newman ve ark. 2003; Fulda 2010). Günümüzde kanser çalışmalarında bitki türevli doğal bileşenlerin antikanser ajan olma potansiyellerinin *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda araştırılması geniş yer bulmakta ve sonuçlar umut vaat etmektedir.

Dünya çapında bitkisel türevli ekstraktların kullanımı gibi doğal tedaviler, kanser tedavisinde olumsuz yan etkileri azaltabilirken, birçoğu henüz potansiyel etki mekanizmaları açısından değerlendirilmemiştir. Flavonoidler ve tanenler dahil olmak üzere polifenollerin antioksidan, antiinflamatuvar ve antitümör etkilerine sahip olduğu bilinmektedir (Lee ve ark. 2011). *Acer tanen* olarak da isimlendirilen GA, genellikle akçaağaç olarak bilinen *Acer* cinsinin çeşitli üyelerinden ekstrakte edilen bir polifenoldür. GA, antioksidan, antibakteriyel, a-glukosidaz enzim inhibisyonu gibi çeşitli farmakolojik özelliklere sahip olduğu yapılan çalışmalarla rapor edilmiştir (Chung ve ark. 1998). *Acer* türlerinden *Acer ginnala* (AG)'dan bugüne kadar birkaç gallotannin, flavonoid ve terpenoid izole edilmiştir. AG'nin STZ-indüklü deneysel diyabetik sıçanlarda iki hafta süreyle oral uygulaması sonucu diyabetik sıçanlarda serbest radikalleri yok ederek güçlü antioksidatif aktivite sergilediği, açlık kan şekeri ve serum GOT / GPT seviyelerini önemli ölçüde düşürdüğü gözlemlenmiştir. Yüksek glikoz seviyesi serbest radikal üretimini uyarabileceği için, oksidatif stres diyabet yaratabilecek yollardan biridir. Antioksidatif ve antiinflamatuvar aktiviteler diyabet tedavisi için önemli yollardır. Bu sonuçlar doğrultusunda AG'nin aktif bileşenlerinden *acertannin* antioksidan ve antiinflamatuvar ajanlar olduğu, antidiyabetik aktivite sergileyerek diabetes mellitus tedavisinde yararlı olabileceğini düşünülmektedir (Park ve ark. 2017).

HCT-116, Caco-2 ve HT-29 kolon kanseri hücre hatlarının kullanıldığı diğer bir çalışmada, fenolik bileşik içeriği bakımından zengin olan akçaağaç türlerinden *Acer saccharum marsh* ve *A. rubrum*'ın kabuk, gövde ve yapraklarının fenol bakımından zenginleştirilmiş ekstreleri karşılaştırılarak hücre döngüsü, proliferasyon ve apoptoz üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu iki akçaağaç türünün kabuk, gövde ve yaprak kısımlarından elde edilen ekstraktların *Ginnalin A, B* ve *C* bakımından değerlendirilmesi HPLC ile yapılmış ve GA baskın bileşen olarak belirlenmiştir. Ekstraktlar arasında, *A. rubrum*'un yaprak ekstresi, %45 oranında en yüksek GA içeriğine sahip olduğu saptanmıştır. Bu çalışma *Ginnalin-A*'nın, kolon kanseri hücre hatlarında S-fazında hücre döngüsünün ilerlemesini bloke ederek zamana ve konsantrasyona bağlı olarak kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunu engellediğini göstermektedir (González-Sarrías 2012).

Ginnalinler akçaağaç türlerinin özü ve diğer kısımlarında bulunan polifenollerdir. González-Sarrías ve ark. (2013) yaptıkları bir çalışmada, *Ginnalin A-C*'nin Kolon (HCT-116) ve meme (MCF-7) kanseri hücre hatları üzerinde antiproliferatif etkisini incelemişlerdir. Sitotoksik etkinliği belirlemek için kullanılan MTS analizlerine göre GA'nın IC₅₀ değeri 72. Saatte 50 uM olarak belirlenmiştir. Zamana ve konsantrasyona bağımlı olarak hücre proliferasyonunun baskılanmasında GA, GB ve GC'ye göre daha etkili olmuştur. GA'nın, HCT-116 ve MCF-7 hücre hatlarında AnnexinV/PI sonuçlarına göre apoptozu indüklediği ancak, western blot analizlerine göre hücre döngüsü düzenleyici proteinlerinden Siklin A ve D1 protein seviyesindeki azalmaya bağlı olarak S, G2/M evrelerinde hücre döngüsünü durdurduğu belirtilmiştir. Bu çalışma, akçaağaç polifenollerinin potansiyel kanser kemopreventif etkilerine sahip olabileceğini göstermektedir (González-Sarrías ve ark. 2013).

Bi ve ark. (2017) insan kolon kanseri hücrelerinde yaptığı çalışmada ilk kez GA'nın, qPZR analizi ile Nrf2 ilişkili antioksidan genler Nrf2, HO-1 ve NQO1'in mRNA ifade seviyelerini düzenleyerek Nrf2 sinyal yolağının bir aktivatörü olduğunu göstermişlerdir. *Acer tataricum* subsp. yapraklarından izole edilen GA'nın HCT116, SW480 ve SW620 hücrelerinde 24,8 µM, 22 µM ve 39,7 µM IC₅₀ değerleri ile koruyucu aktivite göstererek bu hücrelerin koloni oluşumunu önemli ölçüde azalttığı ve akım sitometrisi analizi ile S fazında hücre döngüsünü durdurarak kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Bi ve ark. 2017).

Yenilebilir bitkilerde mevcut olan antioksidan bileşikler daha güvenli ve toksik olmayan yan etkiler sergiledikleri için yaygın olarak kullanılmaktadır. *Acer ginnala max*'in da içerisinde bulunduğu kırk beş bitkinin yapraklarının antioksidan aktivitesinin değerlendirildiği bir çalışmada, diğer bitkilerin ve *Acertannin*'in DPPH methodu kullanılarak serbest radikal süpürücü aktivitesi değerlendirilmiştir. DPPH nin kalibrasyon grafiğinden faydalanılarak IC₅₀ değeri 15 µg/mL olarak belirlenen *Acertannin*'in serbest radikal süpürücü etkisinin diğer bitkilere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Daha sonra HPLC yöntemi ile *Acertannin*'in de içerisinde bulunduğu *Acer ginnala Max*'in bileşenleri ayrılmış ve DPPH methodu ile IC₅₀ değeri 3,5 µg/mL olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda *Acertannin*'in serbest

radikal süpürücü etkisinin diğer bileşenlere göre daha yüksek olduğu ve en güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Han ve ark. 2004).

HCC gelişiminde önemli moleküler mekanizmalardan biri olan p38-MAPK inflamasyon, hücre proliferasyonu, farklılaşma, apoptoz ve hücre siklusunun düzenlenmesi gibi hücresel yanıtlarda önemli bir rol oynamaktadır. p38-MAPK ultraviyole ışığı, ısı, ozmotik şok, mitojenik uyarım, interlökinler ve TNF- α gibi pro-inflamatuvar sitokinler ve stresli uyarılar tarafından uyarılmaktadır. p38-MAPK aktive edildiğinde, yüzden fazla protein doğrudan p38 α tarafından fosforile edilebilir. MAPK ile aktive olmuş protein kinaz 2 (MK-2) p38'in ilk tanımlanmış alt sınıf substratıdır. MK-2'nin *in vitro* aktivasyonu, p38 α ve β izoformlarının spesifik önleyicileri olarak bilinen SB203580 tarafından baskılanır (Enslen ve ark. 1998; Ono ve Han 2000; Bradham ve ark. 2006; Li ve ark. 2006; Mayer ve Callahan 2006). p38-MAPK'nın seçici inhibitörü SB203580, p38 in ATP bağlayıcı cebine bağlanıp ATP'nin bağlanmasını bloke ederek p38 aktivitesini inhibe edebilmektedir (Henklova ve ark. 2008). p38-MAPK inhibitörleri, sitokin-baskılayıcı antiinflamatuvar ilaçlar (CSAID) adı verilen farmakolojik moleküllerdir. SB203580'in p38-MAPK, ERK ve JNK sinyal yolları üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, SB203580'in p38-MAPK inhibitörü olduğu gösterilmiştir. SB203580'in p38-MAPK üzerindeki bu inhibe edici etkisi, p38'in katalitik aktivitesini engellemesinin yanı sıra Akt'nin fosforilasyonu ve aktivasyonunu bozması ile de açıklanmıştır (Henklova ve ark. 2008).

p38-MAPK'nın kanser üzerinde tartışmalı bir rolü bulunmaktadır. Bu tartışmalı rolü aydınlatmak için kullanılan SB203580, p38-MAPK'nın en iyi bilinen inhibitörüdür ve hücre ölümünü düzenleyen bir antiapoptotik bir ajan olarak işlev görmektedir. Çeşitli çalışmalarda SB203580'in p38-MAPK'dan bağımsız bir şekilde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği de bazı çalışmalarla gösterilmiştir.

Sitokinle aktive olan lenfositler üzerinde yapılan bir çalışmada SB203580'in, antiproliferatif etkiye sahip olduğu ve bu etkiyi hücre döngüsünün düzenleyici molekülü RB proteinin fosforilasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan bir protoonkogen olan PI 3-kinaz/protein kinaz B'nin (PKB) fosforilasyonunu inhibe ederek gösterdiği bildirilmiştir (Lali ve ark. 2000). RB'unsiklin bağımlı kinazlarla

fosforilasyonu, hücre döngüsünün ilerlemesine neden olan E2F'nin salınmasına yol açar. Bir tümör baskılayıcı olan RB, hipofosforile halde E2F transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini inhibe ederek hücre döngüsünün ilerlemesini baskılar (Stone ve ark. 2011). Yapılan başka bir çalışmada ise SB203580'in, HCC hücrelerinde antiproliferatif etkisinden dolayı adenosin monofosfatla aktive olan protein kinaz (AMPK)'ı ve ölümle ilişkili protein kinaz (DAPK)'ı aktive ederek otofajiyi indüklediği belirtilmiştir (Zhang ve ark. 2012).

Bu çalışmada, *Ginnalin A* ve SB203580'in Hep-3B hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi için XTT analizi yapılmıştır. XTT analizlerine göre Hep-3B hücre hattında 72. saat sonunda GA'nın IC₅₀ değeri 155 µM, SB203580'in IC₅₀ değeri 32,5 µM olarak belirlenmiştir. IC₅₀ dozu belirlendikten sonra GA ve SB203580, 72 saat boyunca hücrelere 5:1 oranında uygulanmıştır. CompuSyn Version 1.0 yazılımı kullanılarak yapılan kombinasyon indeksi (CI) analizlerine göre, GA ve SB203580 kombinasyonunun Hep-3B hücrelerinde hücre canlılığının %50 sini inhibe eden konsantrasyonlarda (GA: 86,22 µM, SB203580: 17,24 µM) additif etki gösterdiği saptanmıştır (CI=1). GA, SB203580 ve kombinasyonlarının apoptotik etkileri Kaspaz-3 aktivite testi ve gen ekspresyonu analizi ile değerlendirilmiştir. Hep-3B hücrelerinde, Kaspaz-3 aktivitesini SB203580 ve GA ile SB203580 kombinasyonu sırasıyla 7,8 ve 8,2 kat arttırmış (p<0,05) ancak, GA tek başına uygulandığında Kaspaz-3 aktivitesi açısından anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Kombinasyon halinde daha düşük konsantrasyonlarda uygulandıklarında Kaspaz-3 aktivitesinde gözlemlenen 8,2 kat oranındaki anlamlı artış, sitotoksikite analizinde saptanan additif etkiyi doğrulamaktadır.

GA, SB203580 ve kombinasyonlarının apoptoz, nekroz ve hücre döngüsünde önemli genlerin ekspresyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı qPCR sonuçlarına göre, Hep-3B hücre hattında GA, apoptoz ile ilişkili *CASP3*, *CASP9* ve *CYCS* genlerinin ekspresyon seviyelerini kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 12,09, 3,37 ve 16,15 kat arttırmıştır. Hücre döngüsü genlerinden *CCND1*'in ekspresyon seviyesinde ise 4,16 kat azalma tespit edilmiştir. Hücreler IC₅₀ dozunda SB203580 ile muamele edildiğinde *CASP3* ve *BAX* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 15,7 ve 4,2 kat artış; *CCND1* ve *CDK4* genlerinin ekspresyon seviyelerinde ise sırasıyla 6,75 ve 3,15 kat azalış saptanmıştır. GA ve SB203580 kombinasyonunun ise, *CASP3*,

CASP9, *BAX* ve *CYCS* genlerinin ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 18,38, 15,37, 14 ve 13,82 kat anlamlı bir artışa neden olduğu, *BCL2*, *CCND1* ve *CDK4* genlerinin ekspresyon seviyelerinde ise 2,19, 8,96 ve 9,78 kat azalmaya yol açtığı gözlemlenmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 4.10). Diğer genlerde anlamlı bir değişiklik bulunamamıştır.

Sitokrom c'nin mitokondriden sitozole salınması apoptotik protein *Bax* aracılığıyla, antiapoptotik protein *Bcl-2*, apoptozun intrinsik yolundaki sitokrom c salınmasını bloke eder. Ayrıca, Kaspaz-9 ve Kaspaz-3'ün aktivasyonu sitokrom c salınımı ile gerçekleşir. *CASP3* geni tarafından kodlanan Kaspaz-3, aktive edildiğinde apoptoz süreci geri dönüşümsüz olarak başladığı için Kaspaz kaskadında en önemli efektör proteindir. qPCR sonuçlarına göre, sitokrom c proteinini kodlayan *CYCS* geninin ekspresyonunda anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Bu sonucun *BCL2* genindeki azalma ve *BAX* genindeki artış ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, *CASP3* ve *CASP9* genlerinin ekspresyonundaki artış göz önüne alındığında, GA ve SB'nin apoptozun intrinsik yolunu indüklediği ileri sürülebilir. Ancak bunun için daha kapsamlı ve gelişmiş analizlere ihtiyaç vardır. GA ve SB203580, HCC hücrelerine tek başına uygulandığında, apoptoz indüksiyonundan sorumlu olan önemli genlerin ekspresyonu da etkilenmiştir. Bununla birlikte, GA ve SB203580 kombinasyonunun apoptozda önemli olan genlerin ekspresyonu üzerinde daha büyük bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir.

GA, SB203580 ve kombinasyonlarının hücre döngüsü genlerinin qPCR sonuçları doğrultusunda, kombinasyon grubunda *CCND1*, *CDK4* ve *CDK6* genlerinin ekspresyonunda anlamlı bir düşüş gözlemlendi. Ayrıca, GA ve SB203580, HCC hücrelerine tek başına uygulandığında, bu genlerin ifadesi de etkilenmiştir. *CCND1,2,3 / CDK4,6* kompleksi, hücre döngüsündeki G1 fazının ilerlemesinden sorumludur. Kompleksin bu üyelerini kodlayan *CCND1*, *CDK4* ve *CDK6* genlerinin ekspresyonundaki azalmalar, GA ve SB203580'in G1 fazındaki hücre döngüsünü bloke edebileceğini gösteren önemli bir veri olarak düşünülebilir.

Bu sonuçlar doğrultusunda, Hep-3B hücrelerinde GA ve SB203580 kombinasyonunun apoptozda önemli olan genlerin ekspresyonu üzerinde tek başlarına kullanımlarına göre daha büyük bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Kanser tedavisinde kullanılan ajanların yüksek dozlarda kullanılması yan etkilere sebep olmaktadır. Çeşitli kombinasyon uygulamaları ile kemoterapötik ajanların sinerjistik veya additif etkiye bağlı olarak, daha düşük dozlarda kombine kullanımları, tek başlarına yüksek dozlarda uygulanmaları ile benzer etkilere sebep olabilir ve yan etkileri azaltabilir.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, GA ve SB203580'nin hücre canlılığının %50'sini inhibe ettikleri dozlarda kombine kullanımları Hep-3B hücrelerinde additif etkiye neden olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, GA ve SB203580'in HCC'de yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde etkili olabileceğini göstermektedir.

Projede kullanılmak üzere sentetik olarak temin edilen GA'nın ilgili genler ve protein düzeyindeki etkinliğinin tanımlanması için farklı methotlara da ihtiyaç vardır. Özellikle farklı hücre kültür hatlarında her bir hücrenin sağkalımı, apoptotik ve nekrotik farklılaşmaların tanımlanmasında akım sitometrisi analizine dayalı teknikler kullanılmalıdır. Araştırmada etken madde ve ilgili yolaktaki endojen ajan olan p38-MAPK inhibitörü SB203580'inde hücre proliferasyonunu inhibe eden özelliğinden dolayı Hep-3B kanser hücre hattında kullanılmış ve GA'nın bu ajana eş değer olup olmadığını göstermek amaçlanmıştır. Bu tez çalışmasında HCC hücre hattında akım sitometrisi analizi ve eksprese olan genlerin protein düzeyinde tanımlama yapılması amaçlanmamıştır. Sadece GA ve SB203580'in her birinin tek tek ve kombinasyonlarının doza bağlı etkinlikleri tespit edilmiştir. Bu etkiler sinerjistik, antagonistik ve additif etki şeklinde olup tez proje çalışması sonucunda, GA:86,22 μ M, SB203580:17,24 μ M dozlarında kombine kullanımlarının additif etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Hep-3B kanser hücre hattı üzerinde, fizyolojik bir ölüm olan apoptotik mekanizmaların takip edilmesi ve patolojik süreç olan nekrotik gelişimin önlenmesi, hücresel yollardaki protein kinazlar gibi düzenleyici sistemlerin önemli olduğu ve özellikle de p38-MAPK sinyal yolağındaki etkinliği kemoterapötik ajanların uygulanmasında da önemlidir. Tez projesi çoğunlukla kanser biyolojisi ve patolojisinde tedavi amaçlı olarak homeopatların önerdiği akçaağaç şurubunun spesifik etkeni olan antikanser ajan GA'nın doza bağlı etkinliği üzerine kurgulanmasından dolayı western blot uygulanmamıştır. Çünkü araştırma, protein miktarı ve hedef protein üzerine planlanmış bir çalışma değildir. Bu konuda ileride öncelikli olarak, hücre sağ kalımı ve üzerine yapılacak çalışmalar ile ilgili yolaktaki

eksprese olan genlerin protein düzeyinde çalışmaları yapılarak tamamlayıcı tıp alanında doğal bileşiklerle sentetik bileşiklerin toksik ve tedavi düzeylerinin karşılaştırılarak araştırılmasına da yön verebilir.

Bu çalışmanın verilerinden yola çıkılarak *in vitro* alışmalar geliştirilmekle birlikte *in vivo* alışmalar içinde temel oluşturabilir. Epidemiyolojik yaklaşımlarla meta analizleri yapılabilir. FDA'nın envanterlerine kanser gibi ciddi vakalarda homeopatik ilaçların düzenleyici rolüne yönelik yeni yaklaşımlarla yeni veriler eklenebilir. Bireye özğü tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde etnabotanik açıdan da önemli olan ve özellikle de epidemiyolojik olarak ilgili gen kaynaklarının sürdürülebilir kullanılmasının sağlanması ve gen erozyonunun önlenmesi amaçlanmalıdır. Ayrıca tez projesi, OMİK'ler (genomiks, farmakogenomiks, metabolomiks vs.) teknolojilerinin de geliştirilmesine ivme kazandıracaktır.

6. KAYNAKLAR

- Aktuğ, H. Apoptozis ve hücre döngüsü. *Ege Tıp Dergisi*. 2014; 53(1), 60-64.
- Alonso G, Ambrosino C, Jones M, Nebreda AR. Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms depending on signal strength. *J Biol Chem*. 2000;275(51):40641-8.
- Ambrosino C, Nebreda AR. Cell cycle regulation by p38 MAP kinases. *Biol Cell*. 2001;93(1-2):47-51.
- Anantharaju PG, Gowda PC, Vimalambike MG, Madhunapantula SV. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutr J*. 2016;15(1):99.
- Anson M, Crain-Denoyelle AM, Baud V, Chereau F, Gougelet A, Terris B, Yamagoe S, Colnot S, Viguiet M, Perret C, Couty JP. Oncogenic β catenin triggers an inflammatory response that determines the aggressiveness of hepatocellular carcinoma in mice. *J Clin Invest*. 2012;122(2):586-99.
- Attar R, Tabassum S, Fayyaz S, Ahmad MS, Nogueira DR, Yaylim I, Timirci-Kahraman O, Kucukhuseyin O, Cacina C, Farooqi AA, Ismail M. Natural products are the future of anticancer therapy: Preclinical and clinical advancements of *Viscum album* phytometabolites. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2015;61(6):62-8.
- Baron RL, Brancatelli G. Computed tomographic imaging of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127(5):S133-43.
- Bhattacharya S, Ray RM, Johnson LR. Cyclin-dependent kinases regulate apoptosis of intestinal epithelial cells. *Apoptosis*. 2014;19(3):451-66.
- Bi W, Liu H, Shen J, Zhang LH, Li P, Peng B, Cao L, Zhang P, He C, Xiao P. Chemopreventive effects of Ku-jin tea against AOM-induced precancerous colorectal lesions in rats and metabolomic analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):15893.
- Board, PDQ Adult Treatment Editorial. Adult Soft Tissue Sarcoma Treatment (PDQ®). 2017.
- Bradham C, McClay DR. p38 MAPK in development and cancer. *Cell Cycle*. 2006;5(8):824-8.
- Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*. 1991;350(6317):429-31.
- Brown ZJ, Heinrich B, Steinberg SM, Yu SJ, Greten TF. Safety in treatment of hepatocellular carcinoma with immune checkpoint inhibitors as compared to melanoma and non-small cell lung cancer. *J Immunother Cancer*. 2017;5(1):93.
- Bruix J, Reig M, Sherman M. Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2016;150(4):835-53.
- Caballería L, Parés A, Castells A, Ginés A, Bru C, Rodés J. Hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis: similar incidence to that in hepatitis C virus-related cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(4):1160-3.
- Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci*. 2004; 74(17):2157-84.
- Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Conner EA, Lee JS, Factor VM, Thorgeirsson SS. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology*. 2006;130(4):1117-28.
- Cano E, Mahadevan LC. Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci*. 1995; 20(3):117-22.
- Canpolat F. Hücre Siklusu ve Apoptoz. *Güncel Dermatoloji Dergisi*. 2016; 1 (11-17) 1.
- Cardin R, Picciocchi M, Bortolami M, Kotsafti A, Barzon L, Lavezzo E, Sinigaglia A, Rodriguez-Castro KI, Rugge M, Farinati F. Oxidative damage in the progression of chronic liver disease to hepatocellular carcinoma: an intricate pathway. *World J Gastroenterol*. 2014;20(12):3078-86.

- Chen CJ. Global elimination of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma: opportunities and challenges. *Gut*. 2018;67(4):595-598.
- Chen L, Mayer JA, Krisko TI, Speers CW, Wang T, Hilsenbeck SG, Brown PH. Inhibition of the p38 kinase suppresses the proliferation of human ER-negative breast cancer cells. *Cancer Res*. 2009;69(23):8853-61.
- Chinnaiyan AM. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia*. 1999;1(1):5-15.
- Choi SH, Hwang SB. Modulation of the transforming growth factor-beta signal transduction pathway by hepatitis C virus nonstructural 5A protein. *J Biol Chem*. 2006;281(11):7468-78.
- Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y. Tannins and human health: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1998; 38(6):421-64.
- Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997;326(1):1-16.
- Cornellà H, Alsinet C, Villanueva A. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011;35(5):821-5.
- Coşkun G, Özgür H. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2011; 20(3).
- Cristea CG, Gheonea IA, Săndulescu LD, Gheonea DI, Ciurea T, Purcarea MR. Considerations regarding current diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *J Med Life*. 2015;8(2):120-8.
- Daher S, Massarwa M, Benson AA, Khoury T. Current and Future Treatment of Hepatocellular Carcinoma: An Updated Comprehensive Review. *J Clin Transl Hepatol*. 2018;6(1):69-78.
- D'Alessandro R, Refolo MG, Lippolis C, Messa C, Cavallini A, Rossi R, Resta L, Di Carlo A, Carr BI. Reversibility of regorafenib effects in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013;72(4):869-77.
- Daniele B, Perrone F. Staging for liver cancer. *Clinics in liver disease*. 2005;9(2), 213-223.
- de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, Fabre M, Chelly J, Beldjord C, Kahn A, Perret C. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(15):8847-51.
- Deng G, Zeng S, Ma J, Zhang Y, Qu Y, Han Y, Yin L, Cai C, Guo C, Shen H. The anti-tumor activities of Neferine on cell invasion and oxaliplatin sensitivity regulated by EMT via Snail signaling in hepatocellular carcinoma. *Sci Rep*. 2017;7:41616.
- Di Bisceglie AM. Hepatitis B and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2009;49(5):S56-60.
- Diñçel GÇ, Kul O. Patolojik Apoptozis ve Tanı Yöntemleri. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2016;5(1).
- Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(6):1471-4.
- Ehman EC, Johnson GB, Villanueva-Meyer JE, Cha S, Leynes AP, Larson PEZ, Hope TA. PET/MRI: Where might it replace PET/CT? *J Magn Reson Imaging*. 2017;46(5):1247-1262.
- El-Khoueiry AB, Sangro B, Yau T, Crocenzi TS, Kudo M, Hsu C, Kim TY, Choo SP, Trojan J, Welling TH Rd, Meyer T, Kang YK, Yeo W, Chopra A, Anderson J, Dela Cruz C, Lang L, Neely J, Tang H, Dastani HB, Melero I. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet*. 2017;389(10088):2492-2502.
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35(4):495-516.
- El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2557-76.
- El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2012;142(6):1264-1273.e1.

- Elsharkawy AM, Mann DA. Nuclear factor-kappaB and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis. *Hepatology*. 2007;46(2):590-7.
- Esposti MD. The roles of Bid. *Apoptosis*.2002; 7: 433–40.
- Enslen H, Raingeaud J, Davis RJ. Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J BiolChem*. 1998;273(3):1741-8.
- Fan ST. Liver functional reserve estimation: state of the art and relevance for local treatments: the Eastern perspective. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2010;17(4):380-4.
- Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(9):674-87
- Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*.2006;43(1):S99-S112.
- Fischer M, Müller GA. Cell cycle transcription control: DREAM/MuvB and RB-E2F complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2017 ;52(6):638-662.
- Fohlen A, Tasu JP, Kobeiter H, Bartoli JM, Pelage JP, Guiu B. Transarterial chemoembolization (TACE) in the management of hepatocellular carcinoma: Results of a French national survey on current practices. *Diagn Interv Imaging*. 2018;S2211-5684(18)30070-6.
- Fu J, Wang H. Precision diagnosis and treatment of liver cancer in China. *Cancer Lett*. 2018 Jan 1;412:283-288.
- Fulda S. Modulation of apoptosis by natural products for cancer therapy. *Planta Med*. 2010;76(11):1075-9.
- Galati G, O'Brien PJ. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic Biol Med* 2004; 37(3):287-303.
- Gao J, Xie L, Yang WS, Zhang W, Gao S, Wang J, Xiang YB. Risk factors of hepatocellular carcinoma--current status and perspectives. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(3):743-52.
- Geng J, Ito Y, Shi L, Amin P, Chu J, Ouchida AT, Mookhtiar AK, Zhao H, Xu D, Shan B, Najafov A, Gao G, Akira S, Yuan J. Regulation of RIPK1 activation by TAK1-mediated phosphorylation dictates apoptosis and necroptosis. *Nat Commun*. 2017;8(1):359.
- Golabi P, Fazel S, Otgonsuren M, Sayiner M, Locklear CT, Younossi ZM. Mortality assessment of patients with hepatocellular carcinoma according to underlying disease and treatment modalities. *Medicine (Baltimore)*. 2017; 96(9):e5904.
- Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*.2015;16(6):2129-44.
- González-Sarrías A, Li L, Seeram NP. Effects of maple (*Acer*) plant part extracts on proliferation, apoptosis and cell cycle arrest of human tumorigenic and non-tumorigenic colon cells. *Phytother Res* 2012; 26(7):995-1002.
- González-Sarrías A, Ma H, Edmonds ME, Seeram NP. Maple polyphenols, ginnalins A-C, induce S- and G2/M-cell cycle arrest in colon and breast cancer cells mediated by decreasing cyclins A and D1 levels. *Food Chem* 2013; 136(2):636-42.
- Goodrich DW. The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule. *Oncogene*. 2006;25(38):5233-43.
- Gwiasda J, Schulte A, Kaltenborn A, Ramackers W, Kleine M, Beetz O, Klempnauer J, Emmanouilidis N, Schrem H. Identification of the resection severity index as a significant independent prognostic factor for early mortality and observed survival >5 and >10 years after liver resection for hepatocellular carcinoma. *Surg Oncol*. 2017;26(2):178-187.
- Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*.2000;301:5–17.
- Han SS, Lo SC, Choi YW, Kim JH, Baek, SH. Antioxidant activity of crude extract and pure compounds of *Acer ginnala* Max. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 2004; 25:389–391.

Harbour JW, Dean DC. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* 2000;14(19):2393-409.

Harrison DA. The Jak/STAT pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(3).

Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int.* 2014;2014:150845.

Henklova P, Vrzal R, Papouskova B, Bednar P, Jancova P, Anzenbacherova E, Ulrichova J, Maurel P, Pavek P, Dvorak Z. SB203580, a pharmacological inhibitor of p38 MAP kinase transduction pathway activates ERK and JNK MAP kinases in primary cultures of human hepatocytes. *Eur J Pharmacol.* 2008;593(1-3):16-23.

Heuvel S. The *C. elegans* cell cycle: overview of molecules and mechanisms. *Methods Mol Biol.* 2005;296:51-67.

Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo J.* 2004;23:2134-45.

Hiraoka A, Kumada T, Michitaka K, Toyoda H, Tada T, Ueki H, Kaneto M, Aibiki T, Okudaira T, Kawakami T, Kawamura T, Yamago H, Suga Y, Miyamoto Y, Tomida H, Azemoto N, Mori K, Miyata H, Ninomiya T, Kawasaki H. Usefulness of albumin-bilirubin grade for evaluation of prognosis of 2584 Japanese patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2016;31(5):1031-6.

Honma A, Koyama T, Yazawa K. Anti-hyperglycemic of sugar maple *Acer saccharum* and its constituent acertannin. *Food Chemistry.* 2010;123:390-394.

Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell.* 1995;81:495-504.

Huang WY, Cai YZ, Zhang Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutr Cancer.* 2010;62(1):1-20.

Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(4):277-88.

Ikeda M, Morizane C, Ueno M, Okusaka T, Ishii H, Furuse J. Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: current status and future perspectives. *Jpn J Clin Oncol.* 2018; 48(2):103-114.

Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, Di Padova F, Ulevitch RJ, Han J. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J Biol Chem.* 1997;272(48):30122-8.

Kartlaşmış K, Kökbaş U, Kayrın L. Apoptozisin Biyokimyası. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi.* 2016; 25(1):52-69

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57.

Kew MC. Aflatoxins as a cause of hepatocellular carcinoma. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2013;22(3):305-10.

Kim HY, Park JW. Clinical trials of combined molecular targeted therapy and locoregional therapy in hepatocellular carcinoma: past, present, and future. *Liver Cancer.* 2014;3(1):9-17.

Kim KM, Sinn DH, Jung SH, Gwak GY, Paik YH, Choi MS, Lee JH, Koh KC, Paik SW. The recommended treatment algorithms of the BCLC and HKLC staging systems: does following these always improve survival rates for HCC patients? *Liver Int.* 2016;36(10):1490-7.

King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol.* 1998;60:601-17.

Kinkel K, Lu Y, Both M, Warren RS, Thoeni RF. Detection of hepatic metastases from cancers of the gastrointestinal tract by using noninvasive imaging methods (US, CT, MR imaging, PET): a meta-analysis. *Radiology.* 2002;224(3):748-56.

Kinoshita A, Onoda H, Fushiya N, Koike K, Nishino H, Tajiri H. Staging systems for hepatocellular carcinoma: Current status and future perspectives. *World J Hepatol.* 2015;7(3):406-24.

- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J*. 1995;14:5579–88.
- Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, Çevikbaş U. *Temel patoloji*. Nobel Tıp Kitabevleri. 1994.
- Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol*. 2003;171:4672–9.
- Lali FV, Hunt AE, Turner SJ, Foxwell BM. The pyridinyl imidazole inhibitor SB203580 blocks phosphoinositide-dependent protein kinase activity, protein kinase B phosphorylation, and retinoblastoma hyperphosphorylation in interleukin-2-stimulated T cells independently of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 2000;275:7395–7402.
- Lan BY, Kwee SA, Wong LL. Positron emission tomography in hepatobiliary and pancreatic malignancies: a review. *Am J Surg*. 2012;204(2):232-41.
- Lee CS, Jang ER, Kim YJ, Seo SJ, Choi SE, Lee MW. Polyphenol acertannin prevents TRAIL-induced apoptosis in human keratinocytes by suppressing apoptosis-related protein activation. *Chem Biol Interact*. 2011;189(1-2):52-9.
- Legault J, Girard-Lalancette K, Grenon C, Dussault C, Pichette A. Antioxidant activity, inhibition of nitric oxide overproduction, and in vitro antiproliferative effect of maple sap and syrup from *Acer saccharum*. *J Med Food*. 2010;13(2):460-8.
- Le Grazie M, Biagini MR, Tarocchi M, Polvani S, Galli A. Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: The present and the future. *World J Hepatol*. 2017;9(21):907-920.
- Li L, Seeram NP. Maple syrup phytochemicals include lignans, coumarins, a stilbene, and other previously unreported antioxidant phenolic compounds. *J Agric Food Chem*. 2010;58(22):11673-9.
- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J; SHARP Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008; 359(4):378-90.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104:487–501.
- Luedde T, Schwabe RF. NF- κ B in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;8(2):108-18.
- Maharaj B, Maharaj RJ, Leary WP, Cooppan RM, Naran AD, Pirie D, Pudifin DJ. Sampling variability and its influence on the diagnostic yield of percutaneous needle biopsy of the liver. *Lancet*. 1986;1(8480):523-5.
- Mann J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(2):143-8.
- Martinez-Ordoñez A, Seoane S, Cabezas P, Eiro N, Sendon-Lago J, Macia M, Garcia-Caballero T, Gonzalez LO, Sanchez L, Vizoso F, Perez-Fernandez R. Breast cancer metastasis to liver and lung is facilitated by Pit-1-CXCL12-CXCR4 axis. *Oncogene*. 2018;37(11):1430-1444.
- Maurer MH. Diagnosis of hepatocellular carcinoma with MRI. *Gut*. 2018.pii: gutjnl-2018-315999.
- Mayer RJ, Callahan JF. p38 MAP kinase inhibitors: a future therapy for inflammatory diseases. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*. 2006;3(1), 49-54.
- Mazzolini GD, Malvicini M. Immunostimulatory monoclonal antibodies for hepatocellular carcinoma therapy. *Trends and perspectives. Medicina (B Aires)*. 2018;78(1):29-32.
- McKillop IH, Schrum LW. Role of alcohol in liver carcinogenesis. *Semin Liver Dis*. 2009;29(2):222-32.

- Mossanen JC, Tacke F. Role of lymphocytes in liver cancer. *Oncoimmunology*. 2013;2(11):e26468.
- Nael K, Khan R, Choudhary G, Meshksar A, Villablanca P, Tay J, Drake K, Coull BM, Kidwell CS. Six-minute magnetic resonance imaging protocol for evaluation of acute ischemic stroke: pushing the boundaries. *Stroke*. 2014;45(7):1985-91.
- Nagai N, Ito Y, & Taga. Comparison of the enhancement of plasma glucose levels in type 2 diabetes Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats by oral administration of sucrose or maple syrup. *Journal of oleo science*. 2013; 62(9), 737-743.
- Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM, Karin M. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science*. 2007;317(5834):121-4.
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod*. 2003;66(7):1022-37.
- Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:367-401.
- Obuz F. Hepatosellüler Karsinomda Radyolojik Tanı ve Evreleme. *Türk Radyoloji Derneği*. 2015; 3: 437-60.
- Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*. 2000;12(1):1-13.
- O'Shea JJ, Schwartz DM, Villarino AV, Gadina M, McInnes IB, Laurence A. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu Rev Med*. 2015;66:311-28.
- Park EJ, Lee JH, Yu GY, He G, Ali SR, Holzer RG, Osterreicher CH, Takahashi H, Karin M. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell*. 2010;140(2):197-208.
- Park KH, Yoon KH, Yin J, Le TT, Ahn HS, Yoon SH, Lee MW. Antioxidative and Anti-Inflammatory Activities of Galloyl Derivatives and Antidiabetic Activities of *Acer ginnala*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2017;2017:6945912.
- Pedersen M, Andersen ZJ, Stafoggia M, Weinmayr G, Galassi C, Sørensen M, Eriksen KT, Tjønneland A, Loft S, Jaensch A, Nagel G, Concin H, Tsai MY, Grioni S, Marcon A, Krogh V, Ricceri F, Sacerdote C, Ranzi A, Sokhi R, Vermeulen R, Hoogh K, Wang M, Beelen R, Vineis P, Brunekreef B, Hoek G, Raaschou-Nielsen O. Ambient air pollution and primary liver cancer incidence in four European cohorts within the ESCAPE project. *Environ Res*. 2017;154:226-233.
- Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*. 2016;8(4):603-19.
- Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr Biol (Camb)*. 2011;3(4):279-96.
- Raza A, Sood GK. Hepatocellular carcinoma review: current treatment, and evidence-based medicine. *World J Gastroenterol*. 2014;20(15):4115-27.
- Refolo MG, Lippolis C, Carella N, Cavallini A, Messa C, D'Alessandro R. Chlorogenic Acid Improves the Regorafenib Effects in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Int J Mol Sci*. 2018;19(5).
- Röring M, Brummer T. Aberrant B-Raf signaling in human cancer – 10 years from bench to bedside. *Crit Rev Oncog*. 2012;17(1):97-121.
- Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 2004;23:2861-74.
- Schafer KA. The cell cycle: a review. *Vet Pathol*. 1998;35(6):461-78.
- Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans*. 2001;29:684-8.

- Sclafani RA, Holzen TM. Cell cycle regulation of DNA replication. *Annu Rev Genet.* 2007;41:237-80.
- Sherman M. Regorafenib for treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2018;67(3):1162-1165.
- Sia D, Villanueva A, Friedman SL, Llovet JM. Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. *Gastroenterology.* 2017;152(4):745-761.
- Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(3):177-193.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):7-30.
- Stone JG, Siedlak SL, Tabaton M, Hirano A, Castellani RJ, Santocanale C, Perry G, Smith MA, Zhu X, Lee HG. The cell cycle regulator phosphorylated retinoblastoma protein is associated with tau pathology in several tauopathies. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2011; 70(7):578-87.
- Tam K. The roles of doxorubicin in hepatocellular carcinoma. *ADMET & DMPK.* 2003;1: 29–44.
- Tong L, Pav S, White DM, Rogers S, Crane KM, Cywin CL, Brown ML, Pargellis CA. A highly specific inhibitor of human p38 MAP kinase binds in the ATP pocket. *Nat Struct Biol.* 1997;4(4):311-6.
- Tomatır AG. Apoptoz: Programlı hücre ölümü. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences.* 2003; 23(6), 499-508.
- Tovoli F, Granito A, De Lorenzo S, Bolondi L. Regorafenib for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Drugs Today (Barc).* 2018;54(1):5-13.
- Xiao YT, Yan WH, Cao Y, Yan JK, Cai W. P38 MAPK Pharmacological Inhibitor SB203580 Alleviates Total Parenteral Nutrition-Induced Loss of Intestinal Barrier Function but Promotes Hepatocyte Lipoapoptosis. *Cell Physiol Biochem.* 2017;41(2):623-634.
- Xu C, Zhou W, Wang Y, Qiao L. Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2014;345(2):216-22.
- Xu Y, Huang J, Ma L, Shan J, Shen J, Yang Z, Liu L, Luo Y, Yao C, Qian C. MicroRNA-122 confers sorafenib resistance to hepatocellular carcinoma cells by targeting IGF-1R to regulate RAS/RAF/ERK signaling pathways. *Cancer Lett.* 2016; 371(2):171-81.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003;36(3):131-49.
- Yamamoto T, Uemura K, Moriyama K, Mitamura K, Taga A. Inhibitory effect of maple syrup on the cell growth and invasion of human colorectal cancer cells. *Oncol Rep.* 2015;33(4):1579-84.
- Yong HY, Koh MS, Moon A. The p38 MAPK inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer. *Expert Opin Investig Drugs.* 2009;18(12):1893-905.
- Yoshida T, Hisamoto T, Akiba J, Koga H, Nakamura K, Tokunaga Y, Hanada S, Kumemura H, Maeyama M, Harada M, Ogata H, Yano H, Kojiro M, Ueno T, Yoshimura A, Sata M. Spreads, inhibitors of the Ras/ERK signal transduction, are dysregulated in human hepatocellular carcinoma and linked to the malignant phenotype of tumors. *Oncogene.* 2006;25(45):6056-66.
- Zhang D, Xu A. Application of dual-source CT perfusion imaging and MRI for the diagnosis of primary liver cancer. *Oncol Lett.* 2017;14(5):5753-5758.
- Zhang H, Chen GG, Zhang Z, Chun S, Leung BC, Lai PB. Induction of autophagy in hepatocellular carcinoma cells by SB203580 requires activation of AMPK and DAPK but not p38 MAPK. *Apoptosis.* 2012;17(4):325-34.
- Zhao LJ, Wang L, Ren H, Cao J, Li L, Ke JS, Qi ZT. Hepatitis C virus E2 protein promotes human hepatoma cell proliferation through the MAPK/ERK signaling pathway via cellular receptors. *Exp Cell Res.* 2005;305(1):23-32.
- Zhao P, Wu S, Cheng Y, You J, Chen Y, Li M & Lee R J. MiR-375 delivered by lipid-coated doxorubicin-calcium carbonate nanoparticles overcomes chemoresistance in hepatocellular carcinoma. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 2017; 13(8), 2507-2516.

Zhu RX, Seto WK, Lai CL, Yuen MF. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in the Asia-Pacific Region. *Gut Liver*. 2016;10(3):332-9.

Wang W, Pan Q, Fuhler GM, Smits R, Peppelenbosch MP. Action and function of Wnt/ β -catenin signaling in the progression from chronic hepatitis C to hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 2017;52(4):419-431.

Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*. 2002;296:1635–6.

<https://www.pinterest.es/pin/58546863884835236/?autologin=true> 16 Mayıs 2018

<http://www.myvisiontest.com/printme.php?idx=889> 11 Mayıs 2018

<http://www.easybiologyclass.com/intrinsic-pathway-of-apoptosis-apoptosis-molecular-mechanism-part-1/> 17 Mayıs 2018

<https://www.pinterest.es/pin/295056213077750432/?lp=true> 17 Mayıs 2018

<https://trabalhosparaescola.com.br/ciclo-da-mitose/> 8 Eylül 2017

EK-1. GA, SB203580 ve kombinasyon uygulamaları sonrasında apoptoz, nekroz ve hücre döngüsü ile ilişkili genlerin ekspresyonlarında gözlenen kat artışı ve azalışları (* p<0,05)

Gen	GA	SB203580	GA+SB203580
<i>BAX</i>	2,3	4,2*	14*
<i>BCL2</i>	1,1	1,5	-2,19*
<i>CASP3</i>	12,09*	15,7*	18,38*
<i>CASP9</i>	3,37*	1,6	15,37*
<i>CYCS</i>	16,15*	3,6	13,82*
<i>RIPK1</i>	1,38	1,76	1,73
<i>TNF</i>	1,88	-1,21	3,3
<i>TNFR1</i>	1,26	-1,02	-1,91
<i>TRADD</i>	1,85	2,52	1,01
<i>CCND1</i>	-4,16*	-6,75*	-8,96*
<i>CCND2</i>	1,05	-1,65	2,02
<i>CCND3</i>	1,7	3,09	-2,23
<i>CDK4</i>	2,4	-3,15*	-9,78*
<i>CDKN1A</i>	3,23	1,8	3,34

U.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Toplantı Sayısı: 43

Toplantı Tarihi: 06.01.2017

Karar Sayısı: 2017/770; Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Hasibe VURAL'ın "Hepatovellüler karsinoma hücre hattında SB203580 ve Giunalin A'nın antikanser etkisinin araştırılması" başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili 02.01.2017 tarihli dilekçesi ve ekleri görüldü, Pınar ÖZDEN'in yüksek lisans tez çalışmasının Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Hasibe VURAL'ın sorumluluğunda hibe desteğinin sağlanmasına dair belgenin İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Sorumlu Araştırmacı: Doç. Dr. Hasibe VURAL
Yardımcı Araştırmacı: Pınar ÖZDEN

ASLI GİBİDİR
06.01.2017

Prof. Dr. Saim AÇIKÖZGEN
İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkanı