

**KEKİK YAĞI VE BİLEŞENİ OLAN KARVAKROLÜN
ANTİKANSER ETKİSİNİN HepG2
HEPATOSELÜLER KARSİNOMA HÜCRELERİNDE
İN VİTRO ARAŞTIRILMASI**

Özlem TOMSUK
Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
Ağustos, 2011

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No:1002F61

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KEKİK YAĞI VE BİLEŞENİ OLAN KARVAKROLÜN ANTİKANSER ETKİSİNİN HepG2 HEPATOSSELÜLER KARSİNOMA HÜCRELERİNDE *İN VİTRO* ARAŞTIRILMASI

Özlem TOMSUK

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hülya SİVAS

2011, 108 sayfa

Origanum onites L. uçucu yağı ve fenolik bileşeni olan karvakrolün insan hepatoselüler karsinoma (HepG2) hücrelerinde apoptotik, sitotoksik ve hepatotoksik etkileri araştırılmıştır. Bu maddelerin sitotoksik etkileri WST-1 ve nötral kırmızısı alımı ile olası apoptotik etkileri ise akrinin oranj/etidyum bromür boyama ile araştırılmıştır. Kekik yağının ve karvakrolün hepatotoksik etkisi ise RT-PCR array yöntemiyle hepatotoksisite yolağındaki genlerin ifade edilmesi seviyesinde araştırılmıştır. Sonuçlar HepG2 hücrelerinde kekik yağı ve karvakrolün önemli derecede sitotoksik ve apoptotik olduğunu göstermiştir. Yağın ve karvakrolün IC50 değerleri sırasıyla %0,009 (v/v) ve 500 µM bulunmuştur. Hücrelerin yağ ve karvakrol ile inkübasyonundan sonra büzüşme, sitoplazmik tomurcuk oluşumu ve kromatin yoğunlaşması gibi apoptotik karakteristikler gözlenmiştir. Hepatotoksisite yolağındaki genlerin RT-PCR array analizleri, %0,008 (v/v)'lik yağının hücrelerde *GCLC*, *HYOU1*, *MAOB* ve *TXNRD1* genlerinin ifadesi artırdığını ve *BHMT*, *DNAJB11*, *FABP1*, *HAO2*, *HPN*, *IGFALS*, *LGR5*, *MBL2*, *MCM10*, *OSTalpha*, *SERPINA3*, *SLC2A3*, *THRSP* genlerinininkini ise azalttığını göstermiştir. 300 µM karvakrol ise *DNAJB11*, *SKIL* ve *TXNRD1* genlerinin ifadesinin artmasına neden olurken *ABCB1*, *CYP1A2*, *IPO4* ve *RLP13A* genlerinin ifadesinin azalmasına neden olmuştur. Etkilenen genlerden bazıları hepatotoksisite ve bazıları hepatokarsinogenezele ilgili genlerdir. Hepatotoksisite ile ilgili genlerin büyük bir kısmında hücrelerin bu maddelerle muamelesi sonucu herhangi bir etkilenme olmamıştır. Genotoksik olmayan hepatokarsinogenezele ilgili dokuz adet genin ifadesi ise hem kekik yağı hem de karvakrol ile muamele edilen hücrelerde baskılanmıştır. Sonuç olarak, hepatoselüler karsinoma hücrelerinde kekik yağı ve ana bileşeni olan karvakrol hepatotoksik olmamasına rağmen önemli derecede apoptotik ve sitotoksik aktivite göstermiştir. Bundan dolayı *Origanum* uçucu yağı bileşenlerinin bir antikanser ajan olarak en azından hepatoselüler karsinoma tedavisi için potansiyele sahip olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: HepG2, sitotoksisite, kekik uçucu yağı, karvakrol, apoptoz, hepatotoksisite.

ABSTRACT
Master of Science Thesis

**IN VITRO INVESTIGATED OF ANTICANCER EFFECTS OF ESSENTIAL OIL
OF ORIGANUM ONITES AND ITS CONSTITUENT CARVACROL IN
HEPATOCELLULAR CARCINOMA HepG2 CELLS**

Özlem TOMSUK
Anadolu University
Graduate School of Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoct. Prof.Dr. Hülya SIVAS
2011, 108 pages

Essential oil of *Origanum onites* L. and its phenolic constituent carvacrol were investigated for their cytotoxic, apoptotic and hepatotoxic effects in a human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. Cytotoxic effects of these substances were investigated by WST-1 and neutral red uptake and possible apoptotic effects by acridine orange/ethidium bromide staining. Hepatotoxic effects of the oregano oil and carvacrol were also investigated in the expression level of genes involved in hepatotoxicity pathway using RT-PCR array method. Results showed that the oregano oil and carvacrol was significantly cytotoxic and apoptotic in HepG2 cells. IC₅₀ values of the oil and carvacrol was found 0,009% (v/v) and 500 µM, respectively. After incubation of the cells with the oil and carvacrol, characteristics of apoptotic morphology such as shrinkage, cytoplasmic blebbing and chromatin condensation was observed. RT-PCR array analysis of the genes involved in hepatotoxicity pathway showed that 0,008% (v/v) the oil elevated the expression level of *GCLC*, *HYOU1*, *MAOB*, *TXNRD1* genes and diminished the expression level of *BHMT*, *DNAJB11*, *FABP1*, *HAO2*, *HPN*, *IGFALS*, *LGR5*, *MBL2*, *MCM10*, *OSTalpha*, *SERPINA3*, *SLC2A3*, *THRSP*. 300 µM carvacrol also caused an increase in the expression level of *DNAJB11*, *SKIL*, *TXNRD1* genes while a decrease in the expression level of *ABCB1*, *CYP1A2*, *IPO4*, *RLP13A*. Some of affected genes are involved in hepatotoxicity and some of them are involved hepatocarcinogenesis. Majority of genes related with hepatotoxicity were not affected after treatment of the cells with these substances. Expression of nine genes involved in nongenotoxic hepatocarcinogenesis was suppressed in cells either treated with the oil or carvacrol. In conclusion, both origano oil and its major constituent carvacrol significantly exhibited cytotoxic and apoptotic activities in hepatocellular carcinoma cells although they were not hepatotoxic. Therefore, we suggest that constituents of *Origanum* essential oil may have a potential as an anticancer agent at least for treatment of hepatocellular carcinoma.

Keywords: HepG2, *Origanum* oil, carvacrol, apoptosis, hepatotoxicity, cytotoxicity.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca gerek bilgi ve deneyimleriyle gerekse manevi desteği ve neşesiyle her konuda her zaman yanımda olan, desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen ve de hayata dair de kelimelere sığdıramayacağım birçok şeyi bana öğreten değerli danışmanım Sayın Doç.Dr. Hülya SİVAS'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım esnasında her türlü deneyimleriyle destek olan Sayın Yard.Doç.Dr. Emel ERGENE'ye, manevi destekleriyle her zaman yanımda olan laboratuvar arkadaşlarım Reyhan VAROL, Yıldız BODURLAR ve Handan EMİŞOĞLU'na teşekkür ederim.

Tezimin gerçekleştirilmesi için gerekli maddi desteği sağlayan ve çalışmamı uluslararası bir kongrede sunmamı destekleyen Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi Başkanlığına teşekkürü borç bilirim.

Her zaman çalışmalarımda maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen çok değerli Ailem'e ve değerli sevgili müstakbel eşim Ahmet TERZİOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Özlem TOMSUK

Ağustos, 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii

1.GİRİŞ	1
1.1.KANSER	4
1.1.1. Kanserde Onkogenlerin Rolü	6
1.1.2. Kanserde Tümör Baskılayıcı Genlerin Rolü.....	8
1.1.3. Hücre Döngüsü ve Kontrol Noktaları	9
1.1.3.1. Hücre döngüsünü düzenleyen proteinler	11
1.1.3.1.1. <i>Siklinler ve siklin bağımlı kinazlar</i>	12
1.1.3.1.2. <i>Büyüme faktörleri ve D tipi siklinler</i>	14
1.1.4. Apoptosis	14
1.1.4.1. Kaspazlar	15
1.1.4.2. Hücre ölüm reseptörleri ve kaspazlar	18
1.2. KARACİĞER KANSERİ (HEPATOSELÜLER KARSİNOMA)	19

1.2.1. Hepatoselüler Karsinoma'nın Moleküler Mekanizması	20
1.2.1.1. Wnt/ β -katenin yolağının rolü	21
1.2.1.2. p53 sinyal yolağının rolü	22
1.2.1.3. Retinoblastoma (pRb) sinyal yolağı	23
1.2.1.4. MAPK yolağının (mitojen aktive eden Protein kinaz) rolü	24
1.2.1.5. Ras yolağının rolü	25
1.2.1.7. Epidermal büyüme faktörü reseptörü ve transforme büyüme faktörü- β yolağının rolü	26
1.2.2. Hepatoselüler Karsinoma'nın Önlenmesi ve Tedavi Yaklaşımları	26
1.3. HEPATOTOKSİSİTE	27
1.3.1. İlaça Bağlı Hepatotoksisite	27
1.3.1.1. İlaç biyoaktivasyonunun bir sonucu olarak hücre toksisitesi	28
1.3.1.2. İlaça bağlı hücre ölümü: nekroz ve apoptoz	29
1.3.2. Hepatotoksisitenin Moleküler Mekanizması	31
1.3.2.1. Glutatyon rolü	31
1.3.2.2. Mitokondri fonksiyonundaki değişiklikler	31
1.3.2.3. Sitokrom P450 fonksiyonu	34
1.3.2.4. Lipid peroksidasyonu	36
1.4. <i>Origanum</i> Uçucu Yağı ve Karvakrol	36

2. MATERYAL VE YÖNTEM	41
2.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER.....	41
2.2. TEST MADDELERİNİN HAZIRLANMASI	41
2.2.1. Kekik Uçucu Yağının Dozlarının Hazırlanması.....	41
2.2.2. Karvarolun Dozlarının Hazırlanması.....	42
2.3. YÖNTEM	42
2.3.1. Hücre Kültürü	42
2.3.2. Hücrelerin Uygulamalar İçin Hazırlanması.....	42
2.3.3. Hücre Canlılığının Belirlenmesi	43
2.3.3.1. Nötral kırmızısı alımı (NR) analizi ile lizozomal aktivite yoluyla canlılığın belirlenmesi	43
2.3.3.2. WST-1 analizi ile mitokondriyal yolla canlılığın belirlenmesi	43
2.3.3.3. Tripan mavisi ile hücre canlılığının tespiti.....	44
2.3.4. BrdU ile DNA Sentezinin Belirlenmesi	44
2.3.5. AkridinOranj/ Etidyum Bromür (AO/EB) Floresan Boyama ile Apoptotik Morfolojinin İncelenmesi	45
2.3.6. RT-PZR Array ile Hepatotoksisite'nin Tespiti.....	46
2.3.6.1. RNA izolasyonu	46
2.3.6.1.1. Spektrofotometrik olarak RNA miktarının ve saflığının tayini.....	47
2.3.6.1.2. Agaroz jel elektroforezi ile RNA kalitesinin ve saflığının tayini.....	47
2.3.6.1.3. RT ² RNA QC PZR array ile RNA kalite kontrolünün tespiti	48

2.3.6.2. Tamamlayıcı DNA'nın (cDNA) sentezi	50
2.3.6.3. RT ² PZR array insan hepatotoksisite plakalarının hazırlanması ve RT-PZR	51
2.3.6.4. RT-PZR array sonuçlarının analizi	52
2.3.7. İstatistiksel Değerlendirme	53
3. BULGULAR	54
3.1. KEKİK UÇUCU YAĞI VE KARVAKROL	54
3.2. KEKİK UÇUCU YAĞININ HepG2 HÜCRELERİNİN CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ	54
3.3. KARVAKROLÜN HepG2 HÜCRELERİNİN CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ	57
3.4. KEKİK UÇUCU YAĞI VE KARVAKROLÜN DNA SENTEZİNE ETKİSİ	60
3.5. KEKİK UÇUCU YAĞI İLE MUAMELE EDİLMİŞ HÜCRELERDE APOPTOTİK MORFOLOJİ.....	62
3.6. KARVAKROL İLE MUAMELE EDİLMİŞ HÜCRELERDE APOPTOTİK MORFOLOJİ.....	64
3.7. HEPATOTOKSİSİTE YOLAĞINDAKİ GENLERİN İFADE ANALİZİ SONUÇLARI.....	67
3.7.1. mRNA'ların Kalite Kontrolü	67
3.7.2. Kekik Uçucu Yağının Hepatotoksisite RT-PZR Array Analizi	69
3.7.3. Karvakrolün Hepatotoksisite Yolağındaki Genlerin İfadesine Etkisi	73

4. TARTIŞMA VE SONUÇ	78
4.1. KEKİK UÇUCU YAĞININ HepG2 HÜCRELERİNİN CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ.....	78
4.2. KARVAKROLÜN HepG2 HÜCRELERİNİN CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ	80
4.3. KEKİK UÇUCU YAĞI VE KARVAKROLÜN HepG2 HÜCRELERİNDE DNA SENTEZİNE ETKİSİ	82
4.4. KEKİK UÇUCU YAĞI VE KARVAKROL İLE MUAMELE EDİLMİŞ HepG2 HÜCRELERİNDE APOPTOTİK ETKİ	82
4.5. KEKİK UÇUCU YAĞININ HEPATOTOKSİSİTE YOLAĞINDAKİ GENLERİN İFADESİNE ETKİSİ	84
4.6. KARVAKROLÜN HEPATOTOKSİSİTE YOLAĞINDAKİ GENLERİN İFADESİNE ETKİSİ	87
KAYNAKLAR.....	91

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Hepatotoksisiteye neden olduğu rapor edilen tıbbi bitkilerin gösterimi	3
1.2. HCC'ye neden olan farklı risk faktörlerinden etkilenen hücrel sinyal yolları	21
2.1. RT ² RNA QC PZR array plakasının gösterimi	49
2.2. RT ² PZR array insan hepatotoksisite plakasının gösterimi.....	52
3.1. <i>Origanum onites</i> L. uçuğu yağının ana bileşenlerinin GC analizi ile yapılmış sonuçları (A) ve karvakrolün kimyasal formülü (B) gösterimi	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Hepatoselüler karsinomanın Dünya çapındaki her 100000 kişide değerlendirilen yaşa bağlı yoğunluğu	1
1.2. Hücre döngüsü kontrol noktaları	10
1.3. Hücre döngüsünde siklin bağımlı kinazların ve siklinlerin rolü	13
1.4. Apoptozda yer alan kaspaz silsilesi	16
1.5. Apoptozun hücre içi uyaranlarla uyarılması	17
1.6. Apoptozun hücre dışı uyaranlarla uyarılması	18
1.7. Rb/E2F kompleksinin hücre döngüsündeki etkinliği	24
3.1. Kekik uçucu yağının HepG2 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisinin NR alımı, WST-1 ve tripan mavisi boyaması ile değerlendirilmesi	56
3.2. Karvakrolün HepG2 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisinin NR alımı, WST-1 ve tripan mavisi boyaması ile değerlendirilmesi	58
3.3. Kekik uçucu yağı ve karvakrolün BrdU ile DNA sentezine etkisinin değerlendirilmesi	60
3.4. Kekik uçucu yağı ile muamele edilmiş HepG2 hücrelerinin morfolojisi.....	62
3.5. Kekik uçucu yağı ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde AO/EB boyama yöntemine göre çıkarılan apoptotik indeks değerlendirilmesi	64
3.6. Karvakrol ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde AO/EB boyama yöntemine göre belirlenen apoptotik morfolojinin görüntülenmesi	65

3.7. Karvakrol ile muamele edilmiş HepG2 hücrelerinde AO/EB yöntemine göre çıkarılan apoptotik indeks.....	66
3.8. Toplam RNA'nın formaldehit agaroz jel elektroforezi ile elde edilen bandların görüntüsü	67
3.9. RNA örneklerinin kalitesini kontrol amacıyla yapılan RT ² RNA QC PZR array reaksiyonlarının plakada gösterilmesi.....	68
3.10. Kekik uçucu yağının HepG2 hücrelerinde gen ifadesi üzerine etkisi. RT ² PZR array insan hepatotoksisite sonuçları 1.5 kat değişim baz alınarak scatter blot (yayma noktaları) grafiği ile gösterilmesi.....	70
3.11. Kekik yağı ile muamele edilmiş HepG2 hücrelerinde gen ifadesinin insan hepatotoksisite RT ² PZR array sonuçlarının ısı haritası, gen isimleri ve gen ifade seviyesindeki katlanmanın sayısal değerleri	71
3.12. Kekik uçucu yağı muamelesi sonucu ifade seviyesi 1.5 kat ve üzeri değişen genlerin kontrolleri ile karşılaştırmalı olarak çoklu sütun grafiğinde gösterilmesi	72
3.13. Kekik yağı ile muamelesiyle elde edilen insan hepatotoksisite RT ² PZR array sonuçlarına göre gen ifade seviyesindeki benzerliklerin clustergram diagramı ile gösterilmesi	73
3.14. Karvakrolün HepG2 hücrelerinde gen ifadesi üzerine etkisinin 1.5 kat değişim baz alınarak scatter blot (yayma noktaları) grafiği ile gösterilmesi	74
3.15. Karvakrol ile muamele edilmiş HepG2 hücrelerinde gen ifadesinin insan hepatotoksisite RT ² PZR array sonuçlarının ısı haritası, gen isimleri ve gen ifade seviyesindeki katlanmanın sayısal değerleri	75

3.16. Karvakrol ile HepG2 hücrelerinin muamelesi sonucu ifade seviyesi 1.5 kat ve üzeri değişen genlerin kontrolleri ile karşılaştırmalı olarak çoklu sütun grafiğinde gösterilmesi	76
3.17. Karvakrol ile yapılan insan hepatotoksisite RT ² PZR array sonuçlarına göre gen ifade seviyesindeki benzerliklerin clustergram diagramı ile gösterilmesi.....	77

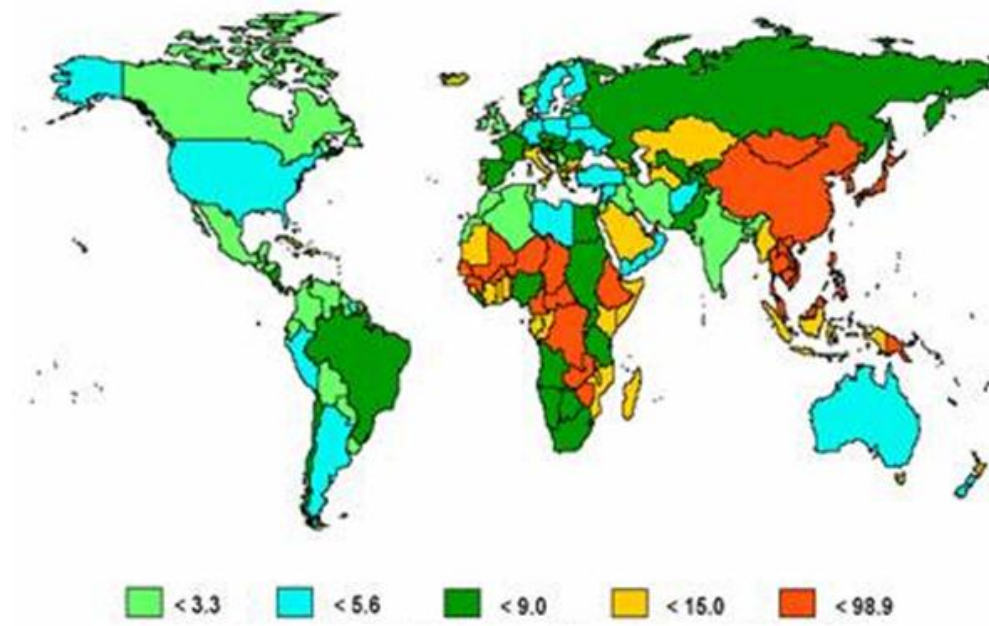
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

AP-1	: Activating protein-1
APAF	: Apoptotic peptidase activating factor
APC	: Adenomatous polyposis coli
CAK	: CDK activating kinase
CDK	: Cyclin-dependent kinase
CYP450	: Cytochrome p450
DEPC	: Diethyl-pyrocarbonate
DILI	: Drug induced liver injury
ERK	: Extracellular signal-related kinases
GC	: Gaschromatography
HCC	: Hepatocellular carcinoma.
MAPK	: Mitogen-activated protein (MAP)kinases
MOPS	: 3-(N-morpholino) propane sulfonic acid
PI-3	: Phosphoinositide 3-kinase
PTEN	: Phosphatase and tensin homolog
QC	: Quality control
RT² PCR	:Reverse transcription real time polymerase chain reaction
TGF-β	: Transforming growth factor beta
TNF	: Tumor necrosis factor

1. GİRİŞ

Son yarım yüzyılda, hızla artan araştırmalar kanserin moleküler mekanizmaları hakkında çok fazla ve bir o kadarda karmaşık bilgiler ortaya koymuştur. Günümüzde kanser genomdaki dinamik değişiklikleri de içeren çok sayıdaki mutasyonun birikmesi sonucu ortaya çıkan genetik bir hastalık olarak kabul edilmektedir (Hanahan ve ark. 2000; Cooper ve ark. 2006). Bir bireyin yaşamı sırasında bir somatik hücresindeki DNA'sında artan genetik değişikliklerin artarak kanser gelişimine neden olmaktadır. Bu genetik değişikliklerden dolayı sağlıklı dokuların etrafını sararak istila eden kötü huylu tümörleri üreten kanser hücreleri, kontrolsüz bir şekilde çoğalmakta ve sonra tüm vücuda yayılmaktadırlar (Karp 2004).

Temel karaciğer kanserlerinin %80-90'nı oluşturan hepatoselüler karsinoma (HCC) en yaygın beşinci kanserdir. Asya, Afrika, Irak, İran, Hindistan ile birlikte Batı Avrupa ve Kuzey Amerika da yoğun şekilde görülmektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Hepatoselüler karsinomanın Dünya çapındaki her 100000 kişide değerlendirilen yaşa bağlı yoğunluğu (Blum ve ark. 2007).

Kuzey Amerika'da, hepatit C oranının artması ve siroz hastalarında HCC gelişiminin yılda %1–4 oranında artmasından dolayı, önümüzdeki 10 yılda HCC

yoğunluğunun daha da yükselmesi beklenmektedir. Hastalığın seyri ile ilgili tahminler özgül bir tedavi olmadığı için oldukça zordur. Erken ve ilerleyen tümörlerde hastaların hayatta kalması, sırasıyla 6–9 ay ve 1–2 ay arasında değişmektedir (Ma ve ark. 2010). Hepatit B, hepatit C, alkol, obezite, kronik karaciğer hastalıkları, aflatoksin ve nitrosamini içeren besinsel karsinojenler HCC riskini artırmaktadır (Bishayee ve ark. 2009; Cho ve ark. 2010). HCC için mevcut tedavi seçenekleri kemoterapi, kemoembolizasyon (tümörü besleyen damarın tıkanması), interven terapisi ve karaciğer transplantasyonudur. (Bishayee ve ark. 2009; Zhang ve ark. 2007). Bununla birlikte HCC tedavisi oldukça zordur ve kemoterapötik ajanlara karşı yüksek düzeyde duyarsızdır. HCC hücreleri yüksek düzeyde bir hücre döngüsü kontrol proteini olan siklin bağımlı kinaz aktivitesi ile karakterize edilmektedir. Siklin bağımlı kinazların aktif olarak bulunması hücre döngüsünü durduran bazı proteinleri kodlayan genlerin baskılanmasına neden olabilmektedir. Bundan dolayı bu aktif proteinlerin inhibitörleri HCC tedavisi için uygun olabilmektedir ve bununla ilgili bazı klinik testler yapılmıştır (Cho ve ark. 2010; Huo ve ark. 2009).

Karaciğer oksidatif stres, ksenobiyotikler ve ilaç toksisitesinin hedefi konumunda olan önemli bir organdır (Jaeschke ve ark. 2002). İlaçlar, hücrel stres, özgül immün reaksiyonlar, hücre içi iyon dengesinin bozulması, mitokondrinin fonksiyonunu nispeten kaybetmesi, apoptoz ve safra asitleri aracılığıyla meydana gelen apoptoz gibi yollarla karaciğer hasarı meydana gelebilmektedir (Eren ve ark. 2004; Russmann ve ark. 2009). Karaciğer hasarı **hepatotoksisite** olarak isimlendirilir. Hepatotoksisite, direk hücrel strese ve hücre içi yollar ile mitokondri zar geçirgenliğinin değişmesine neden olarak sırasıyla; pro-apoptotik proteinlerin aktivasyonu, hücre içi stres oluşturan kendine özgü yolların aktivasyonu ve ölüm reseptörleri aracılığıyla gerçekleşen yollarının aktivasyonunu içeren mekanizmalarla meydana gelmektedir (Jaeschke ve ark. 2002). Kanser kemoterapisinin hepatotoksisiteye neden olduğu bilinmektedir. Hepatotoksik anti-kanser ilaçlarının yanı sıra antibiyotikler, ağrı kesiciler, mide bulantısı ve kusmaya karşı kullanılan ilaçlar ve diğer tedavi amacıyla kullanılan bazı ilaçlar da hepatotoksisiteye neden olabilmektedir (King 2001; Zorzi ve ark. 2006).

Bazı bitkilerin hepatotoksik olabileceği çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur (Çizelge 1.1). Bu sebeplerden dolayı karaciğer ve bitkisel ilaçlar arasındaki etkileşimin anlaşılması önem kazanmış ve bu alanda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bununla birlikte botanik ilaçların riskleri ve potansiyelleri hakkındaki bilgiler hala sınırlıdır ve bunların aydınlatılmasına yönelik yoğun bir çaba vardır (Stickel ve ark. 2005). Buna rağmen karaciğer hastalıklarının tedavisinde bitkisel kaynaklı bileşiklerin daha uygun olduğu düşünülmektedir. Bitkisel ilaçlar oldukça yaygın ve popüleritesini de giderek artırmaktadır. Bitkisel tıpy çekici kılan birçok faktör vardır. Hastalıkların hem önlenmesi hem de tedavisinde kullanılabiliyor olması en büyük etkeni oluşturmaktadır. Doğal olarak elde edildiği için hastalıkların tedavisinde daha güvenle kullanılabilir. Ayrıca geleneksel tıpa göre oldukça zararsız ve ucuz olmaları bir başka tercih nedenini oluşturmaktadır (Stickel ve ark. 2005; Stickel ve Schuppan 2007; Seeff 2009). Son birkaç yılda ise Avrupa ve Amerika’da yapılan çalışmalar, botanik ilaçlarının kullanımında yüksek bir artış olduğunu göstermiştir ve bitkisel ilaçları kullanan karaciğer hastaları % 65’e ulaşmıştır. Çeşitli bitkilerden elde edilen ekstre ve maddelerin, hücre kültürü, hayvan deneyleri ve klinik etkilerine yönelik yapılan çalışmalardan umut verici sonuçlar elde edilmektedir (Stickel ve ark. 2007).

Çizelge. 1.1 Hepatotoksisiteye neden olduğu rapor edilen tıbbi bitkiler (Larrey 1997)

Hepatotoksisiteye neden olan bitkiler	Hepatotoksik olduğundan şüphelenilen bitkiler
<i>Pirolizidin alkaloid içeren bitkiler</i>	
- <i>Crotalaria</i>	<i>Viscum album</i> (ökse otu)
- <i>Senecio</i>	<i>Scutellaria</i>
- <i>Heliotropium</i>	<i>Valeriana officinalis</i> (kedi otu)
- <i>Symphytum officinale</i>	<i>Teucrium polium</i>
<i>Atractylis gummifera</i> L	<i>Mentha pulegioides</i>
<i>Callilepis laureola</i>	<i>Berberis vulgaris</i>
<i>Teucrium chamaedrys</i>	<i>Hedeoma pulegioides</i>
<i>Larrea tridentata</i> (gür çalılık)	<i>Azadirachta indica</i>
<i>Cassia angustifolia</i> (sinameki yaprakları)	<i>Sassafras albidum</i> (Amerika’da yetişen ilaç ve yemek yapımında kullanılan bir bitki yağı)
Çin bitkileri	
Jin Bu Huan (Çin bitkisel ürünleri)	

Bunlara rağmen bitkisel ürünler insanlar tarafından bilimsel ölçütlere dayanmadan yaygın olarak kullanılmakta ve çeşitli riskler oluşturmaktadır. Bitki ekstraktları ve bileşenlerinin hepatotoksitesi üzerine yapılan bazı çalışmalar bulunmasına rağmen bu konudaki çalışmalar oldukça yetersizdir. Özellikle de pirolizin türevlerini içeren bitkilerin kullanılması hepatotoksiteyi uyarmanın yanı sıra venooklüzif hastalıklara da neden olmaktadır (Larrey 1997). Teschke ve arkadaşlarının (2011) yapmış oldukları bir çalışmaya göre, Kava (*Piper methysticum*) olarak bilinen ve yıllardır antidepresan ilaçların üretiminde kullanılan bitki hepatotoksik olarak bulunmuştur. Bir başka çalışma da piyasada bulunan bitkisel kaynaklı Herbalife® ürünlerinin bazılarının da hepatotoksik olduğunu rapor etmiştir (Stickel 2007). Çok yeni bir derlemede ise bazı herbal bileşenlerin bioaktivasyonları sonucu hepatotoksiteye neden oldukları ileri sürülmektedir (Chen ve ark. 2011).

Bu çalışmada, çeşitli biyolojik etkileri bilinen, tıbbi aromatik bitkilerden *Origanum onites*'den elde edilen uçucu yağın ve major bileşeni olan karvakrolun önemli bir kanser tipi olan hepatoselüler karsinoma hücrelerindeki olası antikanser ve hepatotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.1. KANSER

Kanser genellikle hücrelerin çoğalmasını ve büyümesini kontrol eden mekanizmalardaki hatalardan dolayı meydana gelmektedir. Yaşam boyunca ve gelişim esnasında oluşan ölüm sinyalleri, büyümeyi engelleyen sinyaller ve büyüme sinyallerine cevap olarak ölümle doğum arasındaki dengenin düzenlenmesi ve bunun genetik kontrolü oldukça karmaşıktır (Lodish ve ark. 2003).

Kansere neden olan hücresel kontrol kayıpları genetik hasarlardan kaynaklanır. İki gen sınıfında, **proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler**, meydana gelen mutasyonlar kanserlerin gelişimine neden oluşturmaktadır. Her iki sınıftaki genlerin birçoğu hücre döngüsünün düzenlenmesine katılan proteinleri kodlar. Aynı zamanda apoptoz yoluyla hücre ölümünde görev alan ve hasarlı

DNA'nın tamirine katılan proteinleri de kodlamaktadırlar (Lodish ve ark. 2003; Hanahan ve Weinberg 2000).

Kansere neden olan mutasyonlar, genel olarak belirli kimyasalları ve radyasyonu da içine alan karsinojenlere yaşam boyu maruz kalınmasından kaynaklanmaktadır. Bundan dolayı onkogeneze ve tümörögeneze olarak isimlendirilen kanserin şekillenme süreci, genetik ve çevre arasındaki bir etkileşimdir. Kansere neden olan mutasyonlar eşey hücre hatlarından ziyade somatik hücre hatlarında meydana gelmektedir ve somatik hücre mutasyonları gelecek nesillere aktarılmamaktadır (Lodish ve ark. 2003; Weber 2008).

Genetik hasar sadece bir somatik hücrede meydana gelmiş olsa bile bu hücrenin çoğalması sonucu kardeş hücrelere de geçecektir ve değişen hücrelerden oluşan bir koloninin (klon) gelişmesine neden olacaktır. Sonuçta hücrelerin klonu büyür ve bir tümör haline gelir. Bazı durumlarda primer tümörlerden (iyi huylu ya da selim) köken alan hücreler kan ya da lenfatik sistem aracılığıyla vücutta yeni bölgelere göç ederler (metastaz) ve sekonder tümörleri (kötü huylu ya da malin) oluşturarak daha büyük sağlık sorununa neden olurlar. Bu sebeple sadece malin tümörler kanser olarak tanımlanmaktadır (Lodish ve ark. 2003; Cooper ve ark. 2006; Ashe ve Berry 2003).

Tümörler üredikleri hücrelere göre sınıflandırılmaktadır. Buna göre 3 grupta toplanır: 1) Karsinomlar, 2) Lenfoma ve lösemi ve de 3) Sarkomlar. Epitel hücrelerinden kaynaklanan karsinomlar insan kanserlerinin yaklaşık %90'nı oluşturur. Sarkomlar, kıkırdak, kemik, kas, fibröz doku ve bağ dokusundan gelişmektedir. Lösemi ve lenfomalar kan ve immün sistemden gelişmektedir (Cooper ve ark. 2006).

Malin tümörlerin neden olduğu metastaz çok karmaşık bir süreçtir. Yeni dokunun yayılması, hem yayılan dokunun hem de metastatik hücrenin doğasına bağlı olarak rastgele olarak gerçekleşmektedir. Hareketli, yayılabilen, kümeler oluşturan ve deforme hücreler çok tehlikelidir. Eğer tümör hücreleri anjiogeneze ve büyüme faktörlerini üretirse metastaz kolaylaşır ve istila durumunda olan doku savunmasız kalır. Doku çoğalma-baskılayıcı faktörleri, proteolitik enzim inhibitörleri ve anti-anjiogeneze faktörlerini üretirse o zaman direnç kazanır Malin tümörleri oluşturan hücreler telomerlerinin boyunu muhafaza ederek sınırsız

büyüyebilirler (Lodish ve ark. 2003; Weber 2008). Telomeraz sentezleyen bir tümördeki herhangi bir hücre, enzim ifadesi düşük olan diğer hücreler üzerinde büyük büyüme avantajına sahiptir. Zamanla telomeraz sentezleyemeyen hücreler ölürken, telomerazı olan hücreler gelişecek ve tümördeki hücrelerin tamamı telomeraz içerecektir. Telomeraz ifadesi tümör gelişim sürecinde diğer önemli bir özellik olarak karşımıza çıkmaktadır (Karp 2004).

Kanserin çok aşamalı bir süreç olduğunu görüyoruz. Bundan ötürü de ilerleyen yaşlarda daha fazla görülüyor. Buna en iyi örnek olarak barsak kanseri verilmektedir. 50 ila 70 yaşları arasında çok daha fazla görülmektedir. Kalıtsal faktörlerden ziyade sporadik (%95) faktörler daha etkilidir. Barsak kanserlerinde tümör gelişiminin ilk evrelerinde epitel hücrelerin hızı artar. Çoğalan bu hücrelerden küçük ve iyi huylu neoplazi (adenom veya polip) meydana gelir. Bunlardan daha büyük ve daha hızlı çoğalan kloniler seçilerek adenomlar oluşur. Sonra çoğalmaya devam eden hücreler bazal zarı geçerek, kolonun iç duvarına ilerleyip bağ dokusuna ulaşır. Bunun sonucunda bu selim tümörler malin karsinomlara dönüşür. Kanser kolon duvarı içeri doğru daha derinlere yayılmıştır. Kanser hücreleri kanserleşmenin devam etmesiyle ince barsak veya mesane gibi organlarla birlikte kan damarları ve lenf yoluyla yayılarak metastazı gerçekleştirmektedir (Cooper ve ark. 2006; Labianca ve ark. 2004).

1.1.1. Kanserde Onkogenlerin Rolü

Onkogenlerin varlığı ilk kez RNA tümör virüslerinin araştırılması esnasında keşfedildi. 1976 yılında keşfedilen ve RNA tümör virüsleri tarafından taşınan bu onkogen *v-src* (sarkoma virüsü) olarak isimlendirildi. Daha sonra yapılan çalışmalarla bu onkogenin gerçekte bir viral gen olmadığı ve bir enfeksiyon esnasında viral genoma katılmış olan hücresel bir gen olduğu ortaya çıkarıldı. Daha sonra mutasyonlarla değişerek onkogen haline dönüşen, yani kanser yapıcı özellik kazanma potansiyeline sahip **proto-onkogenler** bulunmuştur. Proto-onkogenler hücrelerin normal gelişimi için gerekli olan ve genellikle mitotik yolda işlevi olan ürünleri kodlarlar ve aktif-inaktif durumları

hücrenin özelliğine göre kontrol edilir (Wang ve Wong 1997; Othuki ve ark. 2003; Lodish ve ark. 2003; Cooper ve ark. 2006).

Proto-onkogenlerin onkogen haline dönüşmesini sağlayan bazı mekanizmalar bulunmaktadır:

1. Nokta mutasyonları (kolorektal ve pankreatik kanserlerde *ras* mutasyonunun olması).
2. Gen amplifikasyonu (Nöroblastoma da *N-myc* onkogeni).
3. Kromozomlarda translokasyonlar ile genlerin yeniden organizasyonu (kronik miyeloid lökomi da translokasyon sonucu *bcr-abl* onkogeni).
4. Delesyonlar (*erbB-2*, *src*, *raf* ve *abl* gibi tirozin kinazları kodlayan genler).

Büyüme faktörlerine az duyarlı olan normal bir hücre, bu genetik değişimler sonucunda malin haline dönüşebilir (Karp 2004, Kevin 2007).

Proto-onkogen proteinlerinin büyük bir kısmı büyüme faktörlerinin uyarılarına cevap olarak görev yapar. Büyüme faktörleri ve reseptörleri, transkripsiyon faktörleri ve hücre içi sinyal yollarında görev alan proteinler bunlar arasında sayılabilir. Büyüme faktörlerinin ifadesi arttığında bir onkogen gibi davranabilmektedir. Örneğin; Epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptör geni *c-erbB1* özellikle akciğerin skuamöz hücreli karsinomunda ifadesi artmıştır. EGF reseptör ailesinin ikinci üyesi *c-erbB2* ise meme, akciğer, mide ve tükrük bezi tümörlerinde ifadesi artmıştır (Prober ve Edgar 2001).

Proto-onkogenlerin bir kısmı tirozin kinaz reseptörlerini kodlamaktadır. Bu reseptörlerin genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu kodladıkları proteinin amino uçlarında değişiklik meydana getirir ve onkogenik aktivasyon kazandırır. Bunun sonucunda reseptörün hücre içindeki kinaz kısmı sürekli durumda aktif kalır ve sürekli çoğalma sinyalleri üretir. *erbB-2*, *src* ve *abl* gibi tirozin kinazları kodlayan genler delesyon gibi mutasyonlar ve gen amplifikasyonu yoluyla aktiveleşebilir (Cooper ve ark. 2006; Borrello ve ark. 2008).

Birçok kanser türünün mutasyona uğradığı tespit edilen *ras* geni de önemli görevler üstlenmiştir. Hücresel sürecinde Ras proteini Raf serin/tirozin kinazların aktivasyonu yoluyla ERK MAPK'ların aktivasyonunu başlatır. Mutasyonlarla *ras*

proto-onkogeni onkogene dönüştüğünde Ras sürekli uyarılır ve ERK sinyal yolağı aktif durumda kalır. Ayrıca *raf* geni de delesyonlarla onkogene dönüşerek ERK yolağını aktifleştirebilmektedir.

Transkripsiyon faktör olan bazı protoonkogenlerin mutasyonları sonucu sürekli olarak aktivasyonları artar ve kontrol ettikleri genlerin ifadesini etkilerler. Örneğin *fos* ile Jun birlikte bir transkripsiyon faktör olan AP-1'i oluştururlar. Fos ya da Jun proteinlerinin kontrolsüz ifadeleri sonucunda AP-1 sürekli aktif halde kalır ve hücre sürekli çoğalır. Myc proteinleri de MAPK yolaklarında rol oynar. *myc* onkogeninin ifadesinin artması tümör gelişimini tetikleyici unsurdur (Cooper ve ark. 2006; Proper ve Edgar 2001; Luo ve ark. 2009; Lee 2011).

1.1.2. Kanserde Tümör Baskılayıcı Genlerin Rolü

Tümör baskılayıcı genler hücrenin freni olarak hareket ederek hücre büyümesini sınırlayan proteinleri kodlar ve hücreleri kanserden korur. Tümör baskılayıcı genlerin varlığını gösteren kanıtlar, kanser hücre tiplerinde kromozomların belirli özel bölgelerinin kendiliğinden yok olduğunun görülmesiyle toplanmıştır. Tümör oluşumunun normal olarak baskılanması bu genlerin varlığıyla mümkündür (Karp 2004). Tümör baskılayıcı genler tarafından hücre döngüsünde görev alan DNA hasarı gibi durumlarda hücre döngüsünü engelleyen, apoptozu düzenleyen ve DNA tamirine katılan proteinler görev alabilmektedir (Lodish ve ark. 2003).

Tümör baskılayıcı genler olarak *Rb*, *p53*, *APC*, *INK4a/ARF* lokusu (*p16*), *TGF-β*, *NF-1*, *NF-2*, *VHL*, *PTEN*, *WT-1* ve kaderinler bilinmektedir. Tümör baskılayıcı genler ilk olarak hem kalıtsal hem sporadik olarak meydana gelen tümör retinoblastoma da bulunmuştur. pRb olarak isimlendirilen fosfoprotein, çocukluk çağı göz tümörü olan retinoblastomadan sorumlu *Rb* genin ürünü olarak tanımlanmıştır. Rb ile ilgili yapılan araştırmalar onun DNA sentezi ve hücre döngüsünün devam etmesinde görev alan genlerin ifadesinde kritik bir rol üstlendiğini ortaya koymuştur. *Rb* geninin iki allelinin de mutasyona uğramasıyla fonksiyonunu kaybetmesi sonucunda tümör gelişimi gözlenmiştir. Yapılan araştırmalar doğrultusunda meme, mesane, akciğer kanserleri ve glioblastomlarda

Rb geninin inaktif durumda olduğu tespit edilmiştir (Silva ve Weinberg 1997; Cooper ve ark. 2006).

Bir diğer tümör baskılayıcı gen olan ve birçok genin transkripsiyonundan sorumlu olan *p53* geninde meydana gelen mutasyonların insan kanserlerinin %50'sinde etkili olduğu bulunmuştur. *p53* sonucunda fonksiyonunu kaybetmesiyle meme, barsak ve akciğer karsinomlarıyla, lösemi, lenfoma, sarkom ve beyin tümörleri meydana gelmektedir. *p53* proteini *pRb* gibi SV40, adenovirüsler, papilloma virüsleri ve herpes virüsü gibi onkogenik proteinlerinde hedefi konumundadır. *p53* gen ürünü hem hücre döngüsünde hem apoptozun düzenlenmesinde görev alır. DNA hasarı meydana gelen geldiğinde *p53* uyarılır ve replikasyonun veya döngünün durması için ilgili proteinlerin (*p21* gibi Cdk inhibitörleri) aktivasyonunu başlatarak etki gösterir (Cooper ve ark. 2006; Yu ve Zang 2005; Jiang ve Milner 2003).

INK4 ve *PTEN* tümör baskılayıcı genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda akciğer ve prostat kanseri görülmüştür. *APC* (Adenomatöz Polipozis Koli) genindeki mutasyonlar adenom ve kolon karsinomları ile sonuçlanmaktadır. *APC* geni büyüme sinyallerinin azalması sonucunda fonksiyonel durumda çalışan bir tümör baskılayıcı gendir. *APC* proteini normal olarak çekirdekte büyümeyi uyaran genlerin transkripsiyonunu başlatan β -katenine bağlanır ve onu parçalar. *APC* geni mutasyona uğrarsa β -katenin kontrolü olmayacağı için hücre çoğalması ile ilgili genler transkribe olmaktadır (Sieber ve ark. 2000; Jaiswal ve Narayan 2008; Cooper ve ark. 2006). Özetle tümör baskılayıcı proteinler onkogenlerin aktive ettiği sinyalleri ve yolları inaktif hale getirerek fonksiyonlarını gösterir. (Chow ve Baker 2006; Backman ve ark. 2002).

1.1.3. Hücre Döngüsü ve Kontrol Noktaları

Sağlıklı dokularda hücrelerin çoğalma sayısı organizmanın ihtiyacına bağlı olarak kontrol edilen bir işlevdir. Bütün hücreler bir hücre döngüsü adı verilen bir sürecin sonunda, bir ana hücreden iki yavru hücre oluşturmak için önce ikiye bölünürler. Bir hücre döngüsü içinde 4 süreç yer alır: 1) Hücre büyümesi, 2) DNA'nın kendini eşlemesi (replikasyon), 3) İki katına çıkan kromozomların yavru

hücrelere eşit şekilde dağılması ve 4) Hücrenin bölünmesi. Tüm bu süreçler interfaz ve mitoz olmak üzere iki ana safhada gerçekleşir. Hücre döngüsünün %95'ini kapsayan interfazda kromozomlar yoğunluğunu kaybeder ve çekirdek içine yayılır. Moleküler düzeyde interfaz hücre büyümesi ve DNA'nın kendini eşlemesinin gerçekleştiği hazırlık evresidir. Mitozu takip eden interfazın ilk evresi G1'de (gap 1) hücre aktiftir ve sürekli büyümeye devam eder. G1 evresinden sonra DNA'nın kendini eşlediği S (sentez) evresi gelir. Daha sonra bunu DNA sentezinin tamamlandığı ve mitoz hazırlık için proteinlerin sentezinin yapıldığı G2 evresi (gap 2) izler. Bunu mitoz takip eder ve bilinen evreleriyle aynı genetik materyale sahip iki yavru hücreye bölünme (sitokinez) gerçekleşir (Sherr 1996; Cooper ve ark. 2006; Güneş 2003).

Hücre döngüsü boyunca safhaların tam ve doğru olarak tamamlanması ve bir sonrakine geçişin sağlanması G1, S, G2 ve M evrelerinde bulunan “kontrol noktaları”nda kontrol edilir. Replikasyonun tamamlanması ya da onarımı ile hücre döngüsünü yönlendirir (Sherr 1996; Campbell 2006; Cooper ve ark. 2006).



Şekil 1.2. Hücre döngüsü kontrol noktaları (Arican, 2010).

Hücrenin büyümesi ve DNA sentezi için gerekli proteinlerin yoğun olarak sentezlendiği G1 evresidir. Fakat DNA sentezi yapılmaz. Bu evre temel olarak

mitojenler (sitokinler, hormonlar, büyüme faktörleri vs.) ve adezyon molekülleri gibi hücre dışı uyaranlar tarafından düzenlenir. Hücre G1 evresinde devam et sinyalini alırsa döngüyü tamamlar (Şekil 1.2). G1 evresindeki karar verme noktası **R noktası (restriksiyon noktası)** olarak adlandırılır. Eğer sinyal gelmezse G1 de hücre döngüsü duraklatılır. Devam sinyali gelene kadar hücre Go denilen durağan evrede kalır. S evresinde DNA iki katına çıkar ve sentrioller kendini eşlemeye başlar. G2 evresinde DNA sentezi durur. Fakat mitoz için gerekli olan protein ve RNA sentezi devam etmektedir. Bu noktanın ana görevi; M fazı için gerekli işlemleri uyarmak, S fazında hatalı, eksik olan DNA'yı tanımak ve döngüyü durduracak sinyal üretmektir (Lewin 2004; Cooper ve ark. 2006; Başaran 2002; Proper ve Edgar 2001; Novak ve Tyson 2004).

Hücre döngüsünün bir diğer önemli kontrol noktası mitoz sonlarında bulunmaktadır. Bu nokta mitoz döngüsüne giren hücrenin metafazdan anafaza geçişini sağlar. İğ kontrol noktaları olarak isimlendirilen bu kontrol noktası, kromozom takımlarının bölünen hücrelere homojen ve doğru şekilde dağılması için, kromozomların mitotik iğ üzerindeki dizilimlerini kontrol eder. Kromozomun mitotik iğciğe bağlanma noktası olan kinetokorlarda bir hata olursa veya iğ üzerinde kromozomlar uygun yerleşemezse M kontrol noktası mitozu metafazda durdurmaktadır Böylelikle iğ kontrol noktası, yavru hücrelere kromozomların organize bir Şekilde ayrılmasını sağlamış olur (Cooper ve ark. 2006; Başaran 2002; Ruscetti ve Bartelmez 2004).

G1, S ve G2 noktalarında hücre döngüsünün durması DNA'ya bağlanan protein kompleksleriyle gerçekleşir. Bu proteinler sadece DNA hasarını algılayarak hücre döngüsünü durduran sinyal yollarının aktivasyonunu sağlamaz, aynı zamanda DNA onarım ve programlı hücre ölümü (apoptozis) mekanizmalarını da harekete geçirir (Lewin 2004).

1.1.3.1. Hücre döngüsünü düzenleyen proteinler

Hücrede meydana gelen farklılaşma, büyüme ve hücre döngüsü gibi olaylarda çeşitli sinyal mekanizmaları ve protein kinazlar, fosfatazlar gibi özelleşmiş proteinler görev alır. Bunların içinden protein kinazlar serin, treonin

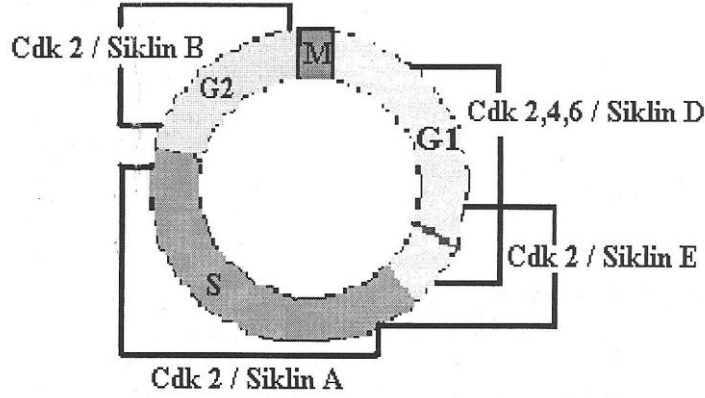
veya tirozin gibi aminoasitlere fosfor bağlayarak aktifleşmesini sağlar. Protein fosfatazlar da bu aktifleşip görevini yerine getirmiş olan aminoasitlerin uçlarından fosfor kopararak inaktif hale geçmesini sağlar. Protein kinazlar fosfor bağladıkları aminoasit rezidülerine göre isimlendirilir. Örneğin, tirozin rezidülerine fosfor bağlanmışsa protein tirozin kinaz adını alır. Büyüme faktörleri, insülin reseptörleri ve hücre kontrol döngüsünde görev alan Cdk proteinleri de örnek olarak verilebilir (Başaran 2002; Güneş 2003). Hücre döngüsünün kontrolü için özelleşmiş proteinler kinazlardan siklin bağımlı kinazlar (Cdk) ve siklinler bulunur.

1.1.3.1.1. Siklinler ve siklin bağımlı kinazlar

Hücre döngüsünü kontrol eden moleküllerin miktarı ve aktivitesi hücre döngüsündeki olaylar dizisinin hızını belirler. Bu moleküllerden bazıları proteinleri fosforile ederek, onları aktif ya da inaktif hale getiren ve böylece G1 ve G2 evresinde devam et sinyalini veren protein kinaz enzimleridir. Aktifleşmeleri için bir siklin proteinine bağlanmaları gerekir. Bu nedenle bu kinazlara siklin bağımlı kinazlar (Cdk'lar) adı verilir. Cdk proteinleri serin, tirozin gibi aminoasit rezidülerini fosforlayarak onları aktifleştirir. Bunu yapabilmek için özgül bir siklin ile birleşip Cdk/siklin kompleksini oluştururlar ve hücre döngüsünün gerçekleşmesini sağlamaktadır (Lodish ve ark. 2003; Başaran 2002; Kapuy ve ark. 2009).

Cdk ailesinin üyeleri hücre döngüsünün farklı basamakları boyunca özgül siklinlerine bağlanır (Şekil 1.3). G1 evresinden S evresine geçiş, siklin D ve E ile bağlanan Cdk2, Cdk4 ve Cdk6 tarafından düzenlenmektedir. Cdk6'nın D tipi siklinlerle oluşturduğu kompleks G1 evresinde kesilme noktasında geçişte büyük öneme sahiptir. G1'in ilerleyen evresinde ifade olan Siklin E, Cdk2/siklin E kompleksi G1'den S'ye geçiş ve DNA sentezi başlaması için gereklidir. Cdk2/siklin A kompleksi ise S sürecinin tamamlanıp G2 evresine geçmesini sağlar. G2'den M evresine geçişi Cdk2/siklin B kompleksi yapmaktadır (Cooper ve ark. 2006; Karp 2004; Güneş 2003). Mitozun anafaz evresi kromozomlar iğ ipliklerine tutunana kadar başlamaz. Bazı proteinler, anafazı hızlandıran kompleks

(APC) proteini inaktif halde tutan sinyal yolunu uyarır. Kinetokorların tamamı iğ ipliklerine tutunduktan sonra dur sinyali ortadan kalkar ve APC aktif hale gelmiş olur. Böylece APC hem siklin yıkımını hem de kardeş kromatitleri bir arada tutan proteinleri engellemiş olur (Campbell 2006; Martinsson ve ark. 2005).



Şekil 1.3. Hücre döngüsünde siklin bağımlı kinazların ve siklinlerin rolü (Güneş 2003).

Cdk'ların aktivitesi en az 4 mekanizma ile düzenlenir. Bunlardan birincisi; Cdk'ların özgül siklinlerle bağlanmasını içerir. Oluşan özgül Cdk/siklin kompleksleri, siklin sentezi ve parçalanması yoluyla kontrol edilir. İkinci bir mekanizma Cdk/siklin komplekslerinin aktivasyonu için Cdk üzerindeki, 161. pozisyondaki korunmuş treonin aminoasidinin fosforlanması gerektirir. Cdk'ların fosforilasyonu CAK (Cdk-aktifleştiren kinaz) denilen enzim ile katalizlenir (Cooper ve ark. 2006; Lodish ve ark. 2003; Güneş 2003). Cdk'ların aktiviteleri üçüncü bir mekanizmada **Cdk İnhibitörlerinin (CKI)** Cdk/siklin komplekslerine bağlanması yoluyla da kontrol edilir. Her Cdk inhibitör ailesi farklı Cdk/siklin kompleksinin düzenlenmesinden sorumludur (Cooper ve ark. 2006). Cip/Kip ve INK4/ARF olmak üzere iki CKI tipi bulunmaktadır. Cip/Kip ailesi; p21,p27,p57 tüm Cdk'lar üzerinde etkilidir. INK4/ARF ailesi; p15, p16, p18, p19 (INK4 proteinleri)'dir. Bu proteinler Cdk4 ve Cdk6 proteinlerini engelleyerek etki gösterir (Güneş 2003; Başaran 2002; Kapuy ve ark. 2009).

1.1.3.1.2. Büyüme faktörleri ve D tipi siklinler

G1 evresinin R noktasında çeşitli hücre-dışı büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Büyüme faktörü olmadığında hücreler R noktasını geçemediklerinden G0 evresinde kalır. Uyarı geldiğinde hücre bölünmeye başlar. Büyüme faktörleri ile uyarılan sinyal iletim mekanizmaları ve hücre döngüsünün işleyişi arasındaki ilişki D-tipi siklinlerle sağlanmaktadır. Büyüme faktörlerinin uyarısına cevap olarak Ras/Raf/ERK yolağı aracılığıyla siklin D sentezi başlar ve büyüme faktörlerinin varlığı süresince sentez devam eder. G1 evresinde büyüme faktörleri bulunduğu zaman Cdk4-6/siklin D kompleksi hücrelerin restriksiyon noktasından geçişini sağlar. Eğer büyüme faktörleri ortamdan uzaklaşırsa siklin D miktarı azalacağı için hücre G0 fazına geçerek durağan halde kalır. Siklin D büyüme faktörleri tarafından tetiklenen sinyal yolağının önemli bir hedefi konumundadır. Bu sebeple siklin D regülasyonu ile ilgili bir bozukluk, kanserleşmeyi meydana getirmektedir. Örneğin siklin D1 paratiroid ve B lenfosit tümörlerde bir onkogen olarak keşfedilmiştir (Cooper ve ark. 2006; Prober ve Edgar 2001; Güneş 2003).

1.1.4. Apoptoz

Çok hücreli bir organizmanın gelişiminde embriyogenez, morfogenez ve doku dönüşümü esnasında istenmeyen hücreler elemine edilir. Bu süreç programlı hücre ölümü ya da apoptoz olarak da tanımlanır. Örneğin, amfibi gelişimi esnasında larval dokunun, el ve ayak parmaklarının oluşumu esnasındaki perdenin ortadan kaldırılmasında apoptoz sorumludur. Memeli sinir sisteminin gelişiminde de apoptoz devrededir. Fazla üretilen nöronların ortadan kaldırılması apoptoz aracılığıyla gerçekleşir. Sağ kalan hücreler, hedef hücrelerle doğru bağlantı yapma durumlarına göre seçilir ve sağ kalım sinyali olarak büyüme faktörleri salgılar. Apoptoz birçok farklı sinyal yollarıyla bütünleşmiş şekilde meydana gelmektedir (Lewin 2004; Lodish ve ark. 2003; Alberts ve ark. 2007).

Tipik bir apoptotik hücre büzüşür, yoğunlaşır ve sonra parçalanmaya başlar. Plazma zarında genellikle diğer hücreler tarafından yutulacak olan küçük apoptotik çıkıntılar oluşturur. Çekirdek yoğunlaşır ve DNA parçalara ayrılır.

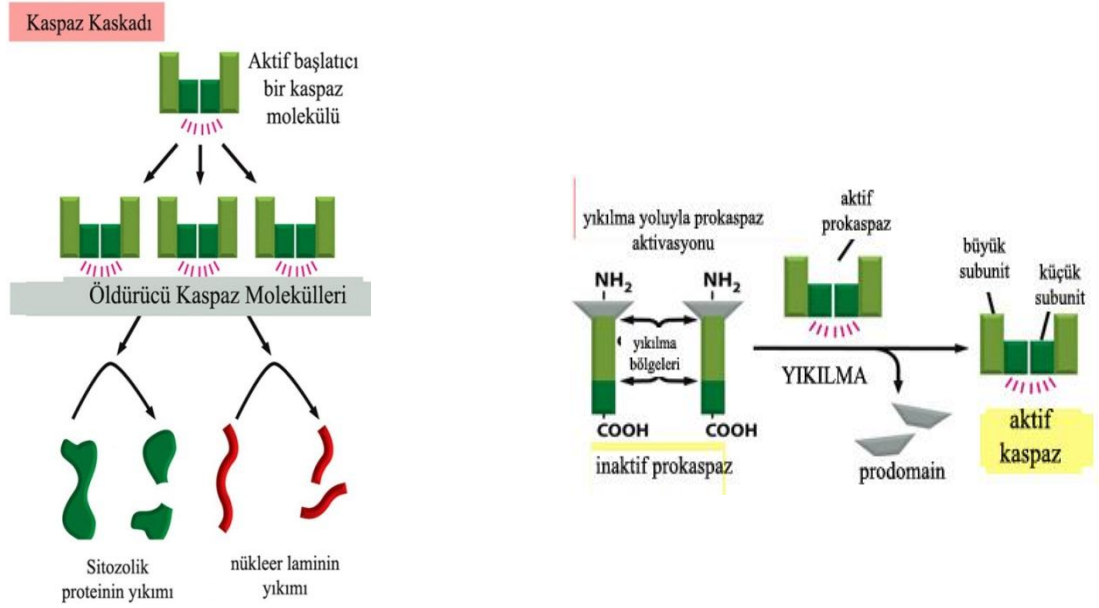
Apoptozda önemli bir özellikte hücre içeriğinin, komşu hücrelerde zararlı etkilere neden olabilecek yerler olan hücre dışına salıverilmemesidir. Apoptoza eşlik eden ve onu kontrol program hem embriyonik hem yetişkin yaşam esnasında hücre sayısının kompozisyonunun (hemostas) muhafazası için çok kritiktir (Lodish ve ark. 2003).

Apoptoz organizmanın iyiliği için hasarlı ve tehlikeli potansiyele sahip olan hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayarak savunma mekanizmasında da yer alır. Örneğin virüsle enfekte olan hücreler apoptoza gönderilir (Cooper ve ark. 2006). Yine bağışıklık sisteminde görev alan anormal veya enfekte hedef hücrelerin ölümünü sağlayan T-lenfositleri örnek verilebilir. Bu hedef hücreler, T-lenfositlerinin yüzeyinde var olan özgül reseptörler tarafından teşhis edilir. Vücut içerisinde, normal hücrelerinde yüzeyinde bulunan proteinlere sıkı şekilde bağlanabilecek reseptörlere sahip olan T-lenfositler üretilir. Bu etkilerinden dolayı apoptoz, Alzheimer, Parkinson, Huntington gibi nörodejeneratif hastalıkları ile ilgili de görülmektedir. DNA hasarı gibi saldırılarda da apoptoz devrededir. Kanser gelişimine neden olabilecek onkogenik mutasyonlara uğramış hücre apoptoz programını aktive edemez (Karp 2004; Hanahan ve Weinberg 2000).

1.1.4.1. Kaspazlar (intraselüler proteazlar)

Bir hücrenin apoptoz sürecinde geçirdiği biyokimyasal ve morfolojik değişimler Kaspaz (Cysteine Aspartate Specific ProteASes) adı verilen bir proteaz ailesi tarafından kontrol edilir. Kaspazlar, aktif dimerden oluşan otokırılma ile inaktif prokaspazlardan meydana gelir (Lewin, 2004). Kaspazlar aracılığıyla hücre içi kaskadlar aktive olarak, proteinlerin sindirimi, kromozomal DNA'nın yıkımı ve hücrenin fagosite edilmesi sağlanmaktadır (Miller 1997; Yüksel ve ark. 2009; Blanc 2003).

Her bir intihar proteazı, sıklıkla kaspaz ailesinin bir diğer üyesi tarafından proteolizle yarıma yoluyla etkinleştirilen, etkin olmayan bir ön enzim (prokaspaz) olarak yapılır. Şekil 1.4 de görüldüğü gibi kopan parçalardan ikisi kaspazın etkin yerini oluşturmak üzere bir araya gelir. Etkin enzimin, bu ikili birimlerin bir tetrameri olduğu düşünülmektedir.

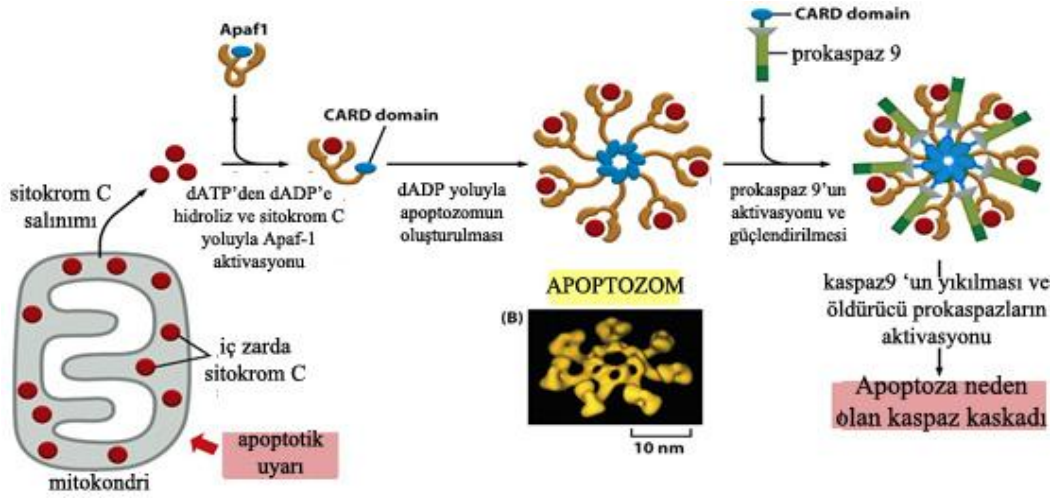


Şekil 1.4. Apoptozda yer alan kaspaz silsilesi (Alberts ve ark. 2003).

Etkinleşen her kaspaz molekülü birçok önkaspazı yaparak etkinleştirebilir ve bunlar daha sonra çok fazla önkaspaz molekülünü etkinleştirir. Bu yolla, başlangıçta az sayıda önkaspaz molekülünün etkinleşmesi, zincirleme büyüyen bir tepkimeyle (bir silsile), çok sayıda önkaspaz molekülünün patlayan etkinleşmesine yol açar. Bundan sonra, etkinleşen kaspazlardan etken kaspazlar özgül sitoplazma proteinleriyle, çekirdek lamellerini de içeren, hücre içindeki çok sayıda anahtar proteini kesip ayırarak, hücrenin denetimli ölümüne yol açar (Alberts ve ark. 2003; Zhang ve ark. 2003; Ashe ve Berry 2003).

Memeli hücresindeki başlatıcı kaspazlardan kaspaz 9 aktive edilerek Apaf-1 ile kompleks oluşturulur (Şekil 1.5). Bu kompleksin oluşumu, apoptozu uyaran uyarılar ile mitokondriden salınan sitokrom c'ye de ihtiyaç duyar. Sitokrom C mitokondri zarları arasında, Apaf-1 ve kaspaz 9 sitozolde bulunur ve böylelikle kaspaz 9 inaktif halde kalır. DNA hasarı, büyüme faktörü yoksunluğu gibi birçok uyarı, mitokondriye hasar verebilir ve bu durumda sitokrom sitozole salınabilir. Hücre stres durumunda mitokondriden sitokrom c ile Apaf-1 salınarak kaspaz 9'a bağlanır, Apaf-1'de konformasyonel bir değişiklik meydana gelir ve **apoptozom** adı verilen alt üniteleri olan Apaf-1/kaspaz 9 kompleksinin oluşumunu tetikler ve kaspaz 9 aktive olur. Kaspaz 9 da aşağı yöndeki kaspaz 3

gibi diğer efektör kaspazları aktive eder. Böyle bir yolla proteinlerin sindirimi, kromozomal DNA'nın yıkılması, hücre fagositozu ve hücre ölümü meydana gelir (Chowdhury ve ark. 2008; Boatright ve Salvesen 2003; Wang ve ark. 2005; Wang 2001).



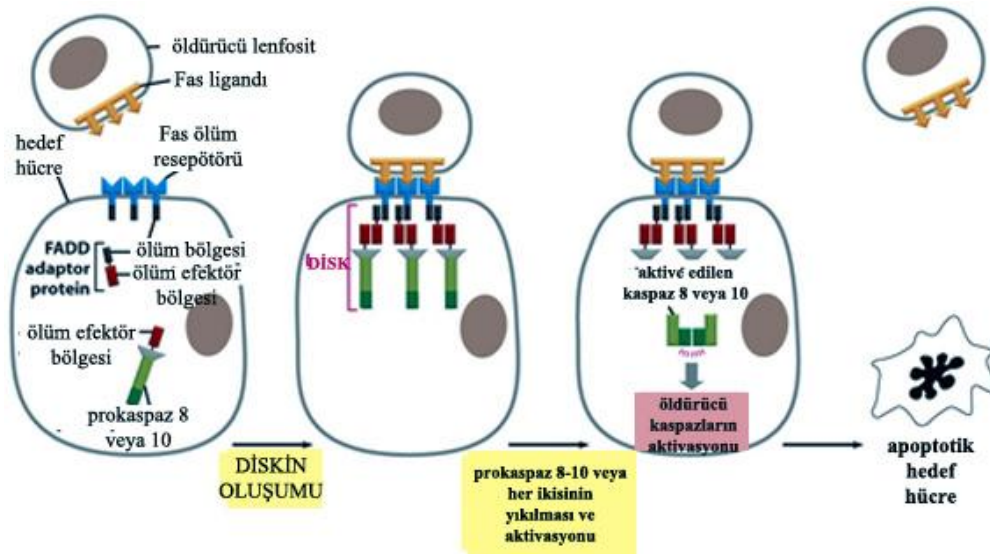
Şekil 1.5. Apoptozun hücre içi uyarılarla uyarılması (Alberts ve ark. 2003).

Mitokondrinin bütünlüğünü ve sitokrom c salınımını düzenleyen 20 üyeye sahip bir Bcl-2 protein ailesidir. Bunların bir kısmı Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Boo, Mcl-1 gibi apoptoz inhibitörüdür. Bazıları ise apoptozu uyarır ve proapoptotik genler olarak isimlendirilir. Proapoptotik genler iki alt aileye sahiptir: *Bax* (*Bax*, *Bak* ve *Bok*) ve *BH3* (*Bik*, *Blk*, *Hrk*, *BNIP3*, *Bad*, *Bid*). *Bcl-2* gen ailesinin ürünleri, mitokondri, çekirdek ve endoplazmik retikulum zarında yer alır. Ayrıca homodimer veya heterodimer olarak kompleks oluşturarak çalışırlar. Bcl-2 ailesinin apoptozu baskılayan üyeleri sitokrom c salınımını engeller. Buna karşılık, Bcl-2'nin apoptozu uyarıcı üyeleri, mitokondri hasarını, sitokrom c salınımını ve kaspaz aktivasyonunu uyararak etki gösterirler. Mitokondri hasarı yalnızca sitokrom c'nin değil aynı zamanda apoptozu uyarıcı diğer moleküllerin de salınımı ile sonuçlanabilir. Bu moleküller, Smac/Diablo adı verilen IAP'lerin etkisini engeller ve kaspaz aktivitesini uyarıcı bir proteini içerir. Kaspazlar, Bcl-2 ailesi ve IAP'ler hücrede sağ kalımı kontrol eden sinyal yollarının hedefleridir (Gross ve ark. 1999; Borner 2003; Breckenridge ve Xue 2004; Cooper ve ark. 2006; Yüksel 2009).

1.1.4.2. Hücre ölüm reseptörleri ve kaspazlar

Aktif reseptörler tarafında salgılanan hedef hücrelerde apoptozu direk olarak uyaran bazı polipeptidler, örneğin tümör nekroz faktör (TNF) ailesi üyelerine bağlanırlar ve çok çeşitli hücre tiplerinde apoptozu uyarır. TNF, kanser kemoterapisi gibi toksik kimyasal ajanlar, viral enfeksiyonlar, yüksek sıcaklık ve iyonize radyasyona maruz kalmak gibi çevresel etkenlere cevap olarak bağışıklık sisteminin belirli hücreleri tarafından üretilir. TNF reseptör ailesinin üyesi olan ve bir hücre yüzey reseptörü olan Fas, bağışıklık sisteminde hücre ölümünü kontrol eder. Örneğin, Fas aktivasyonu sonucu kaspaz 8'in uyarılmasıyla başlayan apoptoz, bağışık yanıtın sonunda arta kalan lenfositlerin ortadan kaldırılmasından, kanser hücreleri veya virüs ile enfekte hücrelerin ölümüne kadar bağışıklık sistemi hedef hücrelerinin ölümünden sorumludur. (Karp 2004; Cooper ve ark. 2006; Yüksel 2009).

Şekil 1.6'da görüldüğü gibi hücre dışı etkinleşme; Fas ligandı taşıyan bir öldürücü lenfosit, hedef hücre yüzeyindeki Fas proteinlerine bağlanarak onları aktifleştirir. Uyarılmış proteinler kümelenmiş Fas proteinlerinin hücre içi bölgesine bağlanarak ön kaspaz 8 moleküllerinin topaklanmasına neden olur. Bunlar da daha sonra birbirlerini keserek kaspaz silsilesini başlatırlar (Alberts ve ark. 2003; Schmitz ve ark. 2000).



Şekil 1.6. Apoptozun hücre dışı uyarılarla uyarılması (Alberts ve ark. 2003).

1.2. KARACİĞER KANSERİ (HEPATOSELÜLER KARSİNOMA)

Hepatoselüler karsinoma primer karaciğer kanseri olarak bilinmektedir. Dünyada kanserden dolayı ölümlerin üçüncü nedenini oluşturmaktadır. Sağ kalım oranının yılda %9'un altında olduğu yapılan araştırmalar doğrultusunda rapor edilmiştir. HCC yoğunluğu Asya-Pasifik, Sahra altı Afrika, Güney Avrupa ile Kuzey Amerika'yı da içine alan coğrafik bölgelerde artmaktadır. ABD'de HCC meydana gelme oranı son 25 yılda %70'den daha fazla artış göstermiştir. İlerleyen yıllarda, HCC'den dolayı aşağı yukarı 18,000 ölüm ve 22,000 yeni vaka olabileceği tahmin edilmektedir ve ABD'de kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %4'ü karaciğer kanseri nedeniyle olmaktadır (Bishayee ve ark. 2009; Cha ve Dematteo 2005).

Hepatit B (HBV) veya Hepatit C (HCV) kronik infeksiyonları karaciğer kanserlerinin %75'den sorumluyken, alkol, sigara dumanına maruz kalınması (Wang ve ark. 2002), genetik veya hemokromatozis (demirin aşırı yüklenmesi ile oluşur), porfiri (hem biyosentezindeki enzimlerden birinin azalması), α -antitripsin eksikliğini (Wang ve ark. 2002) de içeren metabolik hastalıklar gibi viral olmayan nedenler vakaların %25'den daha azını temsil etmektedir (Merle ve Trepo 2009). Ayrıca kahve, sigara, doğum kontrol hapları, vinil klorit, karaciğer yağlanması, obezite, aflatoksin B1 (AFB1) ile kontamine olan gıda maddeleri, diyet de HCC ile ilişkili risk faktörlerini oluşturmaktadır (Aravalli ve ark. 2008; Cha ve Dematteo 2005; Pang ve ark. 2006).

HCC için standart bir kemoterapi tedavisi uygun değildir ve radyoterapiye de dirençlidir. Birçok vakada, cerrahi müdahale ve karaciğer transplantasyonu tek iyileştirici çözüm seçeneği olarak görülür (Aravalli ve ark. 2008). Fakat tümör boyutu, multifokalite, vasküler invazyon veya hepatik dekompanseasyon gibi nedenlerden dolayı, sadece %10–20 HCC hastası cerrahi için adaydır (Bishayee ve ark. 2009; Thomas ve Zhu 2005; Stiff ve ark. 2008).

HCC'nin patofizyolojisi açık şekilde anlaşılamamıştır. Karaciğerin fonksiyonunu nipten kaybetmesi, özellikle siroz zemin hazırlayan bir durumdur. Hepatokarsinogenez hastalığın başlaması, gelişmesi ve devamlılığını meydana

getiren epigenetik ve genetik birikimlerle kompleks olarak ilişkili bir süreçtir. Hücre döngüsünün düzenlenmesi ve apoptozisin baskılanmasıyla, kanserli hücrelerin hayatta kalmasını etkileyen birçok faktörün artan ifadesi, hücrel olaylara eşlik etmektedir. Retinoblastoma ve p53 gibi tümör baskılayıcı genlerin rolü ve onkogenlerin aktivasyonu da iyi rapor edilmiştir. HCC yoğunluğunun artması ile yeni tedavi stratejilerinin gelişmesi umuduyla, hücrel, fizyolojik ve hastalığın moleküler mekanizmasının anlaşılması için araştırmalar yoğun şekilde sürmektedir (Aravalli ve ark. 2008; Okuda 2000; Wang ve ark. 2002; Cho ve ark. 2010).

Geçtiğimiz son on yıl içerisindeki geniş kapsamlı çalışmalar, karaciğer kanserinde hücrel ağlar ve sinyal yollarının etkileriyle birlikte birçok moleküler biyomarkerler belirlenmiştir. Biyoinformatik, kombinasyonel kimya, mikro RNA çalışmaları ve omik teknolojilerinin kombinasyonunun kullanılmasıyla yapılan son çalışmalar, hastalığın değişken evreleri esnasında protein profilleri ve gen ifadesine yeni bakış açıları sağlamıştır (Aravalli ve ark. 2008; Malenstein ve Verslype 2011).

1.2.1. Hepatoselüler Karsinoma'nın Moleküler Mekanizması

HCC'nin ana risk faktörleri yıllarca yoğun şekilde çalışılarak tayin edilmiş ve HCC patogenezisini anlamak için birçok ilerleme kaydedilmiştir (Çizelge 1.1). Bununla birlikte, karsinogeneze neden olan moleküler mekanizmalar az bilinmektedir. Viral enfeksiyon veya hepatotoksik ajanlara maruz kalınmasından dolayı, karaciğer dokusunda ani değişimler meydana gelir. Bunun sonucunda, hücrel sinyal yolları ve tümör formasyonu ile sonuçlanan gen ifadesinde önemli değişiklikler olur. Bu nedenle, HCC'nin belirlenmesi ve tedavisi için, sinyal iletim yolları çalışılarak potansiyel biyomarkerler ve moleküler hedefler belirlenmeye çalışılmaktadır (Aravalli ve ark. 2008; Pang ve ark. 2006; Lachenmayer ve ark. 2010).

Çizelge 1.1. HCC'ye neden olan farklı risk faktörlerinden etkilenen hücresel sinyal yolları (Aravalli ve ark. 2008).

RİSK FAKTÖRÜ	ETKİLENEN YOLAK
Aflatoksin	Wnt/ β -katenin p53
Alkol	Wnt/ β -katenin
HBV	Wnt/ β -katenin p53 pRb MAPK Sitokin sinyali
Hemokromatoz	p53
Kimyasal karsinogen	Ras

1.2.1.1. Wnt/ β -katenin yolağının rolü

Wnt sinyal yolağı, diğer kanserlerde olduğu gibi HCC'de de sıklıkla aktive edilir. Bu yolak, alkole bağlı meydana gelen siroz ve HBV/HCV enfeksiyonlarından kaynaklanan HCC'i içerir. Wnt yolağının özgül reseptörleri Frizzled reseptörleridir. Wnt/Frizzled sinyal ağı, kanonikal Wnt/ β -katenin sinyal kaskadı ya da kanonikal olmayan JNK (c-Jun N-terminal kinaz) ve protein kinaz C'nin aktivasyonunu kontrol eder. Wnt ligandları, koreseptörlerle veya koreseptörler olmaksızın özgül Frizzled (FZD) reseptörlerini uyarır (Merle ve Trepo 2009; Aravalli ve ark. 2008).

β -katenin molekülü, hücre iskeletinde kaderin- β -katenin arasındaki bağlantının güçlendirilmesiyle hücre-hücre adezyonunu içeren önemli bir multifaktöriyel proteindir. β -katenin de meydana gelen mutasyonlar Wnt/ β -katenin sinyalinin aktivasyonunu uyarabilir. Üstelik, β -katenindeki mutasyonlar, aflatoksin ve HCV enfeksiyonuna maruz kalınmasıyla HCC hastalarında artar. B-katenindeki bu mutasyonlara ek olarak, Wnt yolağının negatif düzenleyicileri olan *aksin 1* ve *aksin 2* de meydana gelen mutasyonlar da HCC de gösterilmiştir. Farelerde, karaciğere özgül APC geninin bozulmasının Wnt yolağının

aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Bundan dolayı, Wnt/ β -katenin yolağı HCC de önemli bir sinyal yolağı olarak görülmektedir (Merle ve Trepo 2009; Aravalli ve ark. 2008; Pang ve ark 2006).

Çoğu durumda, tümör baskılayıcı gen APC inaktivasyonu veya proto-onkogen β -katenin mutasyonu sonucunda Wnt sinyalinin aktivasyonu gözlenmiştir. Frizzled proteinin yukarı düzenlenmesi ve β -kateninin defosforilasyonu, HCC’de sıklıkla gözlenmektedir. Bundan dolayı, kanser için Wnt yolağının amaçlanan inaktivasyonu, potansiyel bir terapötik amaç olarak görülmektedir (Merle ve Trepo 2009; Lachenmayer ve ark. 2010; Aravalli ve ark. 2008).

1.2.1.2. p53 sinyal yolağının rolü

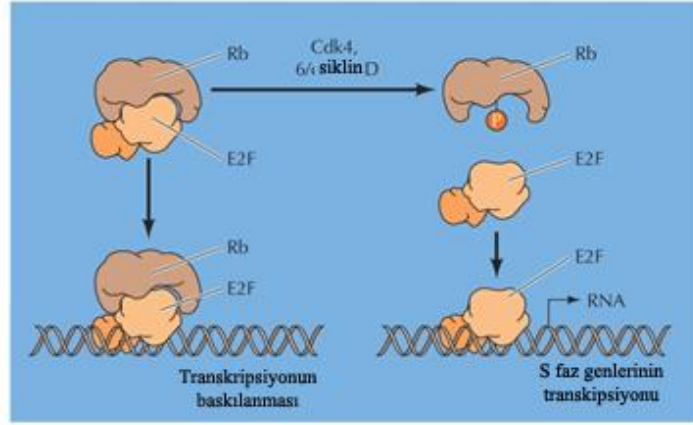
İnsan tümörlerinin yaklaşık yarısında, p53 geni tek bir nokta mutasyonu ile inaktive edilir. Genellikle, normal olarak p53’ün hücresele seviyeleri düşüktür. Ancak, intraselüler ve ekstraselüler stres sinyallerine cevap olarak, p53 ifadesi artar (Aravalli ve ark. 2008; Jiang ve Milner 2003).

p53 mutasyonu HCC hastalarının %30–60 oranında görülür. En yaygın p53 değişikliği, bir allelin nokta mutasyonu ve diğerinin bir delesyonudur. Bir nokta mutasyonu, gen üzerinde 100’den fazla bölgede ortaya çıkabilir. p53 mutasyonları daha çok aflatoksin B1 uyarılmış HCC’de meydana gelmektedir. Aflatoksin B1 (AFB) *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus flavus* fungusları tarafından üretilir ve mutajenik bir ürüne dönüştürülerek metabolize edilir. AFB ile kontamine gıdaların tüketilmesiyle HCC gelişiminin orantılı olarak arttığı gösterilmiştir. Özellikle Güney Afrika ve Çin AFB’ye yüksek düzeyde maruz kalan bölgeler olarak tanımlanmıştır. Bu bölgelerdeki HCC’li hastaların kodon 249 da özgül p53 mutasyonlarına sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu bölgelerdeki hastaların gelişen tümörlerinin %50-100’ünde bu özgül mutasyon tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada p53 mutasyonlarının HCC’nin sadece başlamasında değil, ilerlemesinde de etkili olduğu bulgulanmıştır. p53 mutasyonları yaygın olarak, iyi farklılaşmış tümörlerde değil basit şekilde farklılaşmış tümörlerde görülmüş ve mutasyonlar multifokal HCC’li hastalarda

tüm tümörlerde eşit olarak dağılmamıştır. HCC'nin büyük bir kısmında ise bir onkoprotein olan ve pRb ve p53 kontrol noktasının fonksiyonunu inhibe eden gankrin proteininin yüksek düzeyde ifade olduğu görülmüştür. Kromozomların stabilizasyonunun bozulması, HCC'nin başlaması ve telomerin fonksiyonunu kaybetmesiyle hepatositlerin büyümesine neden olan siroz aşamasında da p53 kontrol noktasının fonksiyonunu kaybettiği benzer şekilde görülmüştür (Cha ve ark. 2005; Merle ve Treppe 2009; Cha ve Dematteo 2005).

1.2.1.3. Retinoblastoma (pRb) sinyal yolağı

Tümör baskılayıcı retinoblastoma protein pRb1, kanser gelişimine büyük hücresel bir bariyer oluşturur. E2F transkripsiyon faktör ailesi proteinlerinin baskılanması yoluyla hücre döngüsü sürecini kontrol eder (Şekil 1.7). G1/S hücre döngüsü geçişi ve siklin bağımlı kinazların aktivitesi pRb fosforilasyonunun başlaması ile paralellik gösterir. E2F pRb proteinine bağlı olsun ya da olmasın ifade olup hedef gene bağlanır. pRb ise baskılayıcı rol üstlenir. pRb/E2F kompleksi gen transkripsiyonunu baskılar. Hücre döngüsünde G1 evresinin R noktasından geçerken pRb proteini Cdk4/Siklin D ile fosforlanır ve pRb E2F'den ayrılır. Ayrılan E2F hedef genin transkripsiyonunu başlatır ve hücre döngüsü S evresine geçebilir. *Rb* geninde bir mutasyon meydana gelirse E2F'yi inaktive edemez ve bu durumda hücre sürekli olarak çoğalmaya başlar. Rb1 allellerinin mutasyonal inaktivasyonu pediatrik kanser retinoblastomaya neden olan temel moleküler değişimdir. Tümör odakları, somatik retinal hücrelerde her iki Rb1 allellerinin inaktive olabileceği sporadik retinoblastomadan çok daha fazla ve büyüktür. Ayrıca, pRb kaybı ile fonksiyonel p53 eksikliği arasındaki paralellik, insan tümörlerinde iyi bilinmektedir (Aravalli ve ark. 2008; Martinsson ve ark. 2005; Sherr 1996).



Şekil 1.7. Rb/E2F kompleksinin hücre döngüsündeki etkinliği (Cooper ve ark. 2000).

HCC vakalarının yaklaşık %90'da karsinogeneze katılan CDK inhibitörleri olan *p16^{INK4}*, *p21^{WAF1}* ve *p27*'nin bir veya daha fazlasının ifade edilmesiyle meydana gelen değişiklikler birbirinden bağımsız olarak görülmüştür. *p16* hastalığın süreciyle birlikte hepatokarsinogenezin erken safhaları esnasında predominant olarak aktifleşir. HCC'de, *p53* gen mutasyonlarıyla temel olarak ilişkili olan *p21* ifadesindeki düşüş de hepatokarsinogenezise katılır. Birkaç çalışma HCC hastalarında pRb yolağının ciddi şekilde bozulduğunu göstermiştir. Histokimyasal boyama kullanılarak, HBV yoluyla meydana gelmiş HCC ile 25 hastada pRb ifadesi analiz edildiği zaman, 8 hastada pRb ifadesindeki değişimler bulunmuştur. Bunlar arasında 3 kişide çekirdek pRb %1 boyanırken, 5 vaka da hasarlı değildir. Diğer bir çalışmaya göre HCC örneklerinde 47 kişide *p16*, siklin D1, pRb ifadesi analiz edilmiş ve 38 kişide pRb veya *p16* ifadesinin inaktive edildiği bulunmuştur. Sadece 5 kişide siklin D1 yüksek düzeyde ifade olmuştur. HCC'de, pRb yolağındaki bozukluk farklı kanser türlerindeki gözlemlere benzerdir ve bu durum, karsinogenez de pRb'nin kritik bir öneme sahip olduğunu göstermektedir (Aravalli ve ark. 2008; Cha ve Dematteo 2005).

1.2.1.4. MAPK yolağının (mitojen aktive eden Protein kinaz) rolü

MAPK (Mitojen aktive eden protein kinaz) ailesi, hücre canlılığı, farklılaşma, adezyon ve çoğalma gibi farklı hücresel süreçlere karışmaktadır. MAPK ailesi, 5 alt aileye sahiptir: 1)Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz

homologları 1 ve 2 (ERK1/2), 2) büyük MAPK-1 (BMK/ERK5), 3) c-jun N-terminal kinaz homologları 1,2, ve 3 (JNK1/2/3), 4) stres aktive eden protein kinaz 2 (SAPK-2) homologları α , β ve δ (p38 α / β / δ) ve 5) ERK6 (p38 γ olarak da bilinir). Bu kinazlar aktivasyonu, aktivasyon loplarında lokalize olan T ve Y bölgelerinin fosforilasyonu ile aktive olurlar. (Cuenda ve Rousseau 2007).

Genellikle MAPK yolağı kanserli hücrelerde düzenli değildir. Bu yolağın anahtar düzenleyicilerindeki mutasyonlar HCC’de nadiren meydana gelir ve aktivatör olarak rol oynadıkları gözlenmiştir (Lachenmayer ve ark. 2010). HBV, HCV ve hepatit E virüsünün proteinleri, sinyal yolları boyunca birçok basamağı hedefleyerek MAPK sinyalini modüle eder. Örneğin, HCV E2 proteini insan hepatoma Huh-7 hücrelerinde MAPK yolağını aktive eder ve hücre çoğalmasını uyarır. Ras/Raf-1/ERK yolağının bir inhibitörü olan Spred (Sprouty-related protein with Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein homology-1 domain) proteininin ifade seviyesi düzenli değildir. Spred proteini kanser hücrelerinin çoğalmasını azaltır ve ERK yolağının inhibisyonuna neden olmaktadır. Bu bulgu, HCC’nin MAPK/ERK yolağının aktivasyonu ile direkt olarak ilgili olduğunu göstermektedir ve Spred proteininin insan HCC’de, terapötik bir amaca hizmet edebileceği düşünülmektedir (Lachenmayer ve ark. 2010; Merle ve Treppe 2009; Aravalli ve ark. 2008).

1.2.1.5. Ras yolağının rolü

İnsan Ras proteinleri (H-Ras, N-Ras, K-Ras4A ve K-Ras4B) apoptoz, hücre büyümesi ve farklılaşmayı etkileyen moleküler bir anahtar olarak işlev gösteren küçük GTP bağımlı proteinlerdir. Çeşitli kimyasallar nedeniyle tek bir nokta mutasyonu, *H-ras*’ın 13. kodon, *N-ras*’ın 12. kodon ve *K-ras*’ın 61. kodon, meydana geldiği gözlenmiştir (Aravalli ve ark. 2008). Fakat bu mutasyonlar hepatokarsinogenezde çok yaygın değildir (Merle ve Treppe 2009).

p21 gibi Ras yolağı proteinlerinin ifadesi ve Ras aktivasyonu, hücre hatlarıyla birlikte solid tümörlerde rapor edilmiştir. p21^{ras} HCC ve sirozda sıklıkla ifade edilen bir proteindir. *In vitro* koşullarda, mutant *ras*’ın ektopik ifadesi, güçlü bir onkogenik stres faktörüdür ve p53/p21 ve p16/pRb kontrol noktaları inhibe

edildiği zaman kanser transformasyonuna neden olur. Ayrıca bu durumda telomeraz yeniden aktive olmaktadır. (Merle ve Treppe 2009; Aravalli ve ark. 2008) Antisens RNA teknolojileri kullanılarak Ras ifadesinin baskılanması ve birkaç kinazın inhibisyon stratejisi, hayvan modellerinde ve hücre hatlarında başarılı şekilde uygulanmaya başlanarak tedavi yöntemleri geliştirilmektedir (Merle ve Treppe 2009; Lachenmayer ve ark 2010).

1.2.1.7. Epidermal büyüme faktörü reseptörü ve transforme büyüme faktörü- β yolağının rolü

HCC'nin moleküler dinamikleri, diğer sinyal yollarının hücresel faktörleri ve proteinleriyle de ilgilidir. Örneğin, vasküler endotelial büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörü, HCC gelişiminde önemli rol oynar. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla inflamasyonun kanserle ilişkili olduğu ve sitokinlerin birçoğunun özellikle hepatit virüslerinin enfeksiyonu esnasında, HCC gelişimi ve sürecinin uyarılmasında etkili olduğu ortaya konulmuştur. Sitokinlerin ifadesinin modülasyonu ve inflamator sitokin inhibitörlerinin kullanılmasının HCC sürecinin hafifletilmesinde kritik olabileceği ileri sürülmüştür. Yapılan bir çalışmada ise, transforme büyüme faktörü beta ve epidermal büyüme faktörü inhibitörlerinin kullanımının rat karaciğerinde HCC gelişimini önlediği gösterilmiştir (Merle ve Treppe 2009; Lachenmayer ve ark. 2010; Aravalli ve ark. 2008).

1.2.2. Hepatoselüler Karsinoma'nın Önlenmesi ve Tedavi Yaklaşımları

Son yıllardaki epidemiyolojik bilgiler, hepatoselüler karsinomanın yaygınlığının endişe verici düzeyde olduğunu göstermiştir. Eksik ve yanlış tedavi yöntemlerinden dolayı hastalığın ölüm oranının yüksek olduğu kaydedilmiştir. Araştırmacılar tedavi için alternatif yollar aramanın yanı sıra, önlenmesine yönelik yaklaşımları da incelemek için çaba sarf etmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar doğrultusunda, potansiyel kanser önleyicileri ve terapötik ajanlar olarak meyve, sebze ve bitkileri içeren, doğal olarak meydana gelen

bileşenlerin kullanılması olağanüstü bir strateji olarak görülmektedir (Bishayee ve ark. 2009).

Hepatoselüler karsinomaya yönelik birçok tedavi yaklaşımı mevcuttur. Bunlar 4 kategoride toplanmaktadır: 1) Cerrahi girişimler (tümör rezeksiyonu ve karaciğer transplantasyonu), 2) Perkütan girişimler (etanol injeksiyonu ve radyofrekans ısı ablasyonu), 3) Transarteryel girişimler (embolizasyon, kemoperfüzyon, kemoembolizasyon) ve 4) İlaçları da içine alan gen ve immüno terapiler. Potansiyel olarak tedavi edici terapiler tümör rezeksiyonu, karaciğer transplantasyonu ve hastalığa tam cevap oluşturabilen perkütan girişimlerdir ve birçok hastada sağ kalım gelişebilir. Bazı vakalarda, transarteryel girişimler iyi cevap oranlarıyla hastalıkta azalma meydana getirebilir ve bazı durumlarda sağ kalım gerçekleşebilir. Geleneksel radyoterapi ile birlikte ilaçların etkisi kanıtlanmış değildir (Blum ve Spangenberg 2007; Katzenellenbogen ve ark. 2007; Holt ve Ju 2006 Blum 2005).

1.3. HEPATOTOKSİSİTE

1.3.1. İlaç Uyarılmış Hepatotoksisite

Karaciğer sistemik dögünün ve emilimin yapıldığı, yabancı maddelerin elemine edildiği ve metabolizmanın ana bölgesi konumundadır. Ama bir taraftan da böylesi merkezi bir fonksiyona sahip olduğu için ilaç toksisitesinin de meydana geldiği bir konumdur. Bir ilacın direk hepatotoksik etkisi veya reaktif metaboliti yoluyla ilaca bağlı hepatotoksisite (DILI) başlayabilmektedir. DILI farmasötik endüstrisi ve ilaç acenteleri başta olmak üzere sağlık alanındaki uzmanlara meydan okuyan bir sağlık sorunu haline gelmiştir. ABD akut karaciğer yetmezliği çalışma grubuna göre, yüksek doz ilaca bağlı hepatotoksisiteyi de içeren karaciğer yetmezliği %50'den daha fazladır. DILI ile ilişkili olarak meydana gelen hastalık ve ölümlerden dolayı ebrotidine, bromfenac ve troglitazone gibi birçok ilaç piyasadan çekilmiştir (Russmann ve ark. 2009; Mayhew 2009; Horii ve Yamada 2007; Holt ve Ju 2005; Eren ve ark. 2004; Luster ve ark. 2001).

Karaciğer hasarını ve özellikle de hepatosit hasarını üretebilen maddeler hepatotoksin olarak bilinmektedir. Hepatotoksinler iki şekilde sınıflandırılır: intrinsik ve idiosentratik. İntrinsik hepatotoksinler doza bağlı tarzda etki gösterir ve bu yolla meydana gelen hepatotoksisite intrinsik hepatotoksisite olarak isimlendirilir. Doza bağlı olmayan tarzda etki gösteren hepatotoksinler idiosentratiktir ve bu yolla meydana gelen hepatotoksisite idiosentratik hepatotoksisite adını alır. Karaciğer yetmezliğine büyük oranda neden olan hepatotoksisite intrinsiktir ve buna en güzel örnek olarak asetaminofen (APAP ya da parasetamol) verilmektedir. İdiosentratik hepatotoksinlere maruz kalan hasta sayısı 10000'de 1'dir. 1000'den fazla ilaç ve bitkisel ürünler ise idiosentratik hepatotoksiktir ve akut karaciğer yetmezliğinin %10'undan fazlasını oluşturur (Russmann ve ark. 2009; Castell ve ark. 1996).

1.3.1.1. İlaç biyoaktivasyonunun bir sonucu olarak hücre toksisitesi

İlaçların büyük bir kısmı emilimlerinin kolaylaşması adına suda daha fazla çözünebilecek şekilde bir yapıya sahip olmak için biyotransformasyona ihtiyaç duymaktadır. Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonu organizmadaki eliminasyonlarını kolaylaştırmak için kimyasal modifikasyonlar içermektedir. Bunların birçoğu sitokrom P450 bağımlı mono oksijenazlar adı verilen haemoprotein ailesi tarafından katalizlenen redoks tepkimeleridir. Biyotransformasyonda meydana gelen reaksiyonlar zinciri faz I ve faz II olarak toplanmaktadır. Faz I reaksiyonları oksidasyon, redüksiyon ve hidrolizdir. Bu reaksiyonlarla substrata aktif gruplar eklenmektedir. Faz II reaksiyonları ise endojen maddelerle yapılan konjugasyondur. Temel reaksiyon; bir taraftan moleküler oksijen atomlarından biri tarafından ksenobiyotiklerin oksidasyonu gerçekleşirken, diğer taraftan sitokrom p450 tarafından dağıtılan elektronlar aracılığıyla diğer bir atom indirgenmektedir. Bunun sonucu olarak genellikle daha az toksik ve daha fazla suda çözünebilir yan ürünler üretebilmek için endojen moleküllerle (glukuronik asit, glutatyon, sülfat, aminoasitler vs) konjuge olabilen, daha polar ve esas bileşenlerden daha reaktif yeni metabolitler üretilir. Böylelikle bazı ilaçlar hem aktif olabilir hem de idrar ve safra yoluyla atılabilir hale gelir.

Fakat bunun sonucu olarak oluşan bu reaktif metabolitler enerji üretiminin kaybı ve mitokondrinin fonksiyonunu nispeten kaybetmesiyle sonuçlanan intraselüler kalsiyum stoklarının ve iyonik gradientin bozulmasına neden olabilir ve toksisite meydana gelebilir. Hücresel fonksiyonun bu şekilde bozulmasıyla hücre ölümü ve karaciğer yetmezliğı meydana gelebilir. Bu metabolitlerin bazıları güçlü elektrofillerdir veya karbon merkezli radikallerdir. Makromoleküllerle (proteinler, DNA) kovalent olarak bağlanan nükleofillerle reaksiyona girebilir ve radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilir (lipid peroksidasyonu) veya oksidatif strese neden olabilir. Bunlara karşılık hepatositlerin potansiyel zararlara karşı kendi savunma mekanizmaları (enzimler, glutatyonun indirgenmesi, DNA ve protein tamir mekanizmaları vs.) vardır. Bu mekanizmalarla biyoaktivasyon, detoksifikasyon ve savunma mekanizmaları arasında denge kurulmaktadır (Castell ve ark. 1996; Holt ve Ju 2005; Eren ve ark. 2004; Kulkarni ve Khanna 2006).

1.3.1.2. İlaça bağı hücre ölümü: nekroz ve apoptozis

Hücre ölümü mekanizmaları iki farklı tipte kategorize edilir: Nekroz ve apoptoz. Apoptozun programlı hücre ölümü olduğundan söz etmiştik. Nekroz hücrenin iç dengesinin hızlı bir şekilde yıkılmasıyla meydana gelen fizyolojik bir hücre ölümüdür. Hücresel içeriğın salınması, zar parçalanmasına neden olan hücre şişmesi ve sitoplazmik organellerdeki değışimler nekrozun en büyük göstergesidir (Castell ve ark. 1996; Eren ve ark. 2004).

Hepatotoksik mekanizmalarla ilgili yapılan çalışmalar nekrozun daha yaygın olarak görüldüğünü ortaya koymuştur. Karaciğerin belirli bir bölgesinde daha baskın şekilde etkili olduğundan ve o bölgede görev alan ilaç metabolizmasına karışan enzimler bu durumda etkilidir. Bununla birlikte yaygın olan nekrozla birlikte kimyasal olarak karaciğer hasarında apoptozunda bulunması, ksenobiyotik karaciğer hasarındaki mekanizmalarda apoptozun katılımıyla ilgili soruları artırmaktadır. Apoptozun bu mekanizmaya dahil olması daha çok toksik ajanların konsantrasyonu ile ilişkili görünmektedir. Yüksek düzeydeki konsantrasyonlar da hücre nekroza uğrarken, orta düzeydeki konsantrasyonlarda apoptoz uyarılır. Yalnız bu her zaman doğru olmayabilir.

Örneğin, thioasetamitin hem yüksek hem düşük dozlarında apoptotik hücreler gözlenmektedir. Sonra apoptoz güçlü bir şekilde inflamatuvar cevapla ilişkili olan nekroz tarafından takip edilir. Bu iki mekanizmayı bu süreçte birbirinden ayırmak çok zordur. Aynı hepatotoksin birine veya diğerine neden olabilir. Hepatositlerin önceden varolan herhangi bir savunmasız durumuna bağlı olarak veya ilacın dozuna bağlı olarak her ikisinin de meydana gelmesi de muhtemeldir. Yani karaciğer hücre ölümüne neden olan ajanların çoğu hem apoptozu hem nekrozu uyatabilmektedir (Castell ve ark. 1996; Holt ve Ju 2006; Brind 2006).

Enerji üretiminin ve mitokondri fonksiyonunun bozulması apoptotik veya nekrotik hücre ölümüne neden olmaktadır. Mitokondrinin fonksiyonunu nispeten kaybetmesi mitokondri geçirgenliğini değiştirmektedir. Mitokondri geçirgenliğinin değişmesiyle mitokondrideki ATP sentezini durduran iç mitokondri zarı yoluyla proton akışı meydana gelir. Bunun sonucu olarak meydana gelen mitokondrial ATP tüketimi, matriksin genişlemesine ve mitokondriyal dış zarın geçirgenliğinin değişmesine neden olur. Sitozoldeki iç zardan mitokondrial proapoptotik proteinlerin ve sitokrom c'nin salınmasıyla zar geçirgenliği tamamen bozulur. Sonrasında sinyal kaskadları harekete geçer ve apoptotik süreç meydana gelir (Russmann ve ark. 2009; Brind 2006).

Hepatotoksisite de yaşamın ve ölümün merkezinde mitokondrinin durduğu açıktır. Başlangıç toksisitesinde direk olarak hedef konumunda kalabilmektedir. Mitokondri geçirgenliğinin değişmesi iç ve dış sinyal yollarında anahtar rol oynamaktadır. Çünkü hücrenin ATP ihtiyacının birçoğu mitokondri aracılığıyla sağlanır ve oksijen ve nitrojen serbest radikallerinin de ana intraselüler kaynağıdır. Sonuç olarak mitokondriyal hasarın kapsamı hepatositlerde apoptotik veya nekrotik ölüme karar vermektedir (Russmann ve ark. 2009; Höschele ve ark. 2008; Vrenken ve ark. 2008; Ji ve ark. 2008; Brind 2006).

1.3.2. Hepatotoksisitenin Moleküler Mekanizması

1.3.2.1. Glutatyonun rolü

Hücreesel glutatyon (GSH) canlı hücrelerde güçlü bir nükleofildir ve birçok elektrofil (serbest radikaller, oksidantlar vs.) tarafından üretilen hasara karşı hücreleri korumaktadır. Ek olarak glutatyon peroksidaz enziminin bir kofaktörü olarak hizmet eder. Aynı zamanda aminositlerin transportu ve proteinlerin sülfidril gruplarının indirgenmiş halde kalmasını da sağlar. GSH da içeren tamir sistemleri reaktif metabolitlerin inaktivasyonu ve konjugasyonu yoluyla etkili olur. Bu reaktif metabolitler glutatyon S-transferazlar tarafından yabancı bileşenlerin sitokrom p450 bağımlı oksidasyonu esnasında üretilmektedir (Begriche ve ark. 2009; Castell ve ark. 1996; Yuan ve Kaplowitz 2009).

Hücreesel glutatyon birkaç nedenden dolayı azalabilir: 1) Glutatyon disülfide (GSSG) oksidasyonu, 2) endojen proteinler veya metabolitlerle konjugasyonu, 3) de novo (yeniden) sentezinin indirgenmesi. Okside glutatyon, glutatyon redüktaz yolağı aracılığıyla GSH'a geri indirgenir. Bu süreç NADPH tüketimini gerektirir. Dolaylı olarak da NADH gerektirir. GSSG intraselüler ortam için toksiktir. GSSG kritik düzeyde biriktiği ve glutatyon redüktaz baskısı arttığı zaman dışarıya salınır ve hücreden kaybedilir. GSH da metabolitlere konjuge olarak hücreden kaybedilebilir. Özellikle ilaç toksisitesinde GSH tüketimi oldukça yaygındır (Castell ve ark. 1996; Masubuchi ve ark. 2006; Yuan ve Kaplowitz 2009).

1.3.2.2. Mitokondri fonksiyonundaki değişiklikler

Hepatositlerin yüksek enerji talebine cevap veren organelidir. Hepatik hasarın başlangıcında da ATP üretimi kritik bir rol üstlenir. Mitokondride meydana gelen hasarın nekrozun erken gelişme sürecinde kritik bir öneme sahip olduğu ortaya konulmuştur. Mitokondriyal hasar birkaç mekanizmayı içine almaktadır: 1) oksidatif fosforilasyon ve elektron transportunu da içine alan mitokondriyal metabolizmanın direk inhibisyonu, 2) oksidatif hasarın (GSH tüketimi, lipid peroksidasyonu vs.) bir sonucu olarak mitokondri zarının

fizikokimyasal özelliklerinin değişmesi, 3) zarın fizikokimyasal özelliklerini değiştiren lipid bileşenlerinin araya eklenmesi ve bunun sonucu olarak zar potansiyeli azalır, ATP üretimi güçleşir ve 4) Mitokondriyal DNA'nın hasara uğraması (Castell ve ark. 1996; Jaeschke ve ark. 2002).

Hücresin enerjik dengesinde mitokondrinin fonksiyonunu kaybetmesi hızlı etkileri ortaya koyabilir. Oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP üretimindeki azalma laktik asit üretimi ve glikolizinin artmasıyla dengelenmeye çalışılır. Bu mekanizmaya en tipik örnek, karaciğer toksisitesinde früktozun koruyucu etkisidir. Birçok hepatotoksin hücrenin enerji dengesini indirek yolla değiştirerek hareket eder. Enerji talebini dramatik bir şekilde artırabilir, ATP üretimini azaltabilir veya her ikisini de meydana getirebilir. Aslında ATP tüketimi hücre hasarının dönüştürülemeyen aşamalarına yol açan yollarla yaygın şekilde meydana gelmektedir. Eğer hepatositler için glikolitik substratlar sağlanırsa dönüştürülmeyen hücre hasarı veya ölümü önlenmiş olur. Ksenobiyotikler normal bir hücre döngüsünü değiştirebilir ve hücrenin enerjinin önemli derecede tüketimi ile faydasız bir döngüye dönüşmesine neden olabilir. Zarda lokalize olan iyon pompası ATPaz enzimleri aracılığıyla, ATP tüketiminin önemli derecede iyonoforlarda artması ve hücrenin zarlara karşı iyon konsantrasyonu gradientinin dönüşmesi ile bu süreci gerçekleştirebilirler (Kim ve ark. 2004; Xua ve ark. 2004; Holt ve Ju 2006; Castell ve ark. 1996).

Mitokondri lipid β -oksidasyon enzim kompleksleri ve kreps döngüsünün bir kısmını da içeren birçok katabolik yolların merkezi konumundadır. Ürojenazın ilk reaksiyonları ve karbamil fosfat sentezi gibi hepatositlerin anabolik fonksiyonları da mitokondri de gerçekleşmektedir. Makro ve mikroveziküler yağlanma (steatoz) nedeniyle hepatositlerde katabolize lipid birikimi meydana gelir. Bunun sonucu olarak hücre canlılığı azalır ve mitokondriyal hasar meydana gelir. Bazı ilaçlarda (aspirin, tetrasiklin, valproik asit vs.) hepatik fonksiyonun kaybolmasına neden olabilmektedir. Bu etkenlerden birisi de yine mitokondride bileşenlerin birikmesi ve mitokondriyal DNA'da meydana gelen hasardır. Buna bağlı olarak mitokondriyal gen ifadesinin dereceli olarak azalması, dönüştürülemez mitokondriyal hasar ve hepatosit fonksiyonunun bozulması ile sonuçlanır. Ayrıca serbest yağ asitleri metabolizasyonu gerçekleşmediğinde laktat

ve reaktif oksijen radikalleri birikir ve bu radikaller de mitokondri DNA'sını zarara uğratar (Boelsterli ve Lim 2007; Begriche ve ark. 2011; Jaeschke ve ark. 2002).

Reaktif metabolitler mitokondriyal fonksiyonu da hedef alarak hücrel strese neden olabilir. Reaktif metabolitler nükleik asitler, lipitler, enzimler veya diğer hücrel bileşenlere bağlanarak veya glutatyonun azalmasını da içeren birçok mekanizma aracılığıyla hücrel stresi meydana getirir. Reaktif metabolitler veya ana ilaçlar kanaliküler safra asiti akış pompasının bozulması (*BSEP*, *ABCB11* geni) gibi belirli hepatoselüler fonksiyonları da engelleyebilir. Bunun sonucu olarak da substratların intraselüler olarak birikmesi, ikincil toksik hepatosit hasara neden olabilmektedir. Ayrıca reaktif metabolitler glutatyon tüketimi, protein tiyol oksidasyonu ve sitozolik kalsiyumun artmasıyla birlikte *p53* ve *bax*'ın yüksek düzeyde ifade olmasına ve DNA hasarına neden olabilmektedir. *bax* ifadenin artması, disülfid formasyonu ve mitokondriyal kalsiyumun artması yolu ile hücre ölümü ve mitokondriyal geçirgenliği değişimi (MPT) meydana gelmektedir (Begriche ve ark. 2011; Xua ve ark. 2004).

Hücrel stres ve özgül immün reaksiyonlar sonucunda MPT meydana gelmektedir. Eğer mitokondri fonksiyonu bozulursa, bu durum iki tip yolağı harekete geçirir. Bunlardan birisi şiddetli hücrel strese karşı başlatılan intrinsik yolaklardır. Diğer ise hücrel stres veya özgül immün reaksiyonlar yoluyla, dolaylı olarak harekete geçirilen ölüm reseptörleri aracılığıyla olan ekstrinsik yolaklardır. Güçlü intraselüler stres yoluyla, intraselüler yolaklar, endoplazmik retikulum yolağı, lizozomal permeabilizasyonu ve JNK yolağı aktive olur. Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xL vs.) proteinlerinin inhibisyonu ve pro-apoptotik proteinlerin aktivasyonu MPT'yi aktive eder (Ji ve ark. 2008; Russmann ve ark. 2009; Masubuchi ve ark. 2006).

Karaciğer hasarının başlamasında ekstrinsik yolak inflamatuvar bir uyarı geldiğinde uyarılmaktadır. Uyarılan (IL-12) veya önlenen (IL-4, IL-10, IL-13, MCP-1) hasarın iyi şekilde dengelendiği yer olan immün sistemi modüle eden ek faktörler ve hafif stres faktörleri aracılığıyla sinyaller meydana gelmektedir. Sonuç olarak da karaciğer hücreleri interferon gama, FasL ve tümör nekroz faktör alfanın (TNF- α) ölümcül etkisine daha duyarlı halde olmaktadır. TNF- α ve FasL

aktive eden hücresel strese sürekli olarak maruz kalan detoksifikasyon organı karaciğer için özellikle bu durum önemlidir. Başlangıçta özgül immün reaksiyon meydana gelirse, ana doku uyumu kompleksi (MHC)-bağımlı antijenler, sitotoksik T-hücreleri ve kuffer hücrelerinden (hepatik makrofajlar) TNF- α ve FasL salınımını aktive edecektir. Reaktif metabolitler direk hücresel strese neden olursa veya inflamatuvar hastalıklar meydana getirirse zararlı sitokinlerin salınımına eşlik eden tehlikeli sinyaller oluşabilir. Bunun sonucu olarak hepatositler incinme için daha uygun hale gelmiş olur ve böylelikle otoimmün hepatotoksiste uyarılmış olur (Luster ve ark. 2001; Wang ve Cederbaum 2008).

1.3.2.3. Sitokrom p450 fonksiyonu

Sitokrom p450 (CYP450) enzim sistemleri çeşitli bileşiklerin oksidasyonunuz katalizleyen protein ailesidir. Organizmada sentezlenen birçok bileşik CYP450 için substrat görevi görür. İlaçların biyotransformasyonu ve metabolizmasında da görev aldıklarından söz etmiştik. Tıpta da çok önemli işlevleri vardır: Terapötiklerin aktivasyonu ve inaktivasyonu, kimyasal maddelerin dönüştürülmesi sırasında istenmeyen hücre hasarı, hücre ölümü veya mutasyon gibi olayların meydana gelmesine neden olma, steroid hormon sentezine katılma, yağ asitleri ve bunlardan türevlenen mekanizmalarda görev alma gibi mekanizmalar sayılabilir (Jaescke ve ark. 2002; Westerink ve Schoonen 2007; Özerol 1996).

CYP450 faz I reaksiyonları için en önemli enzim grubu olarak sayılır. Bu enzim ailesi endojen (prostoglandinler, vitaminler, steroidler, yağ asitleri, lökotrenler vs.) ve eksojen (ensektisidler, kimyasal maddeler, petrol ürünleri, hava yoluyla alınan maddeler vs) substratların metabolizmasında görevlidir. Bu enzimler hepatositlerde yoğun şekilde bulunur. Karaciğer dışında barsaklar, akciğer, beyin ve böbreklerde de yer alırlar. CYP450 enzimleri ortalama 500 aminoasitten meydana gelir. Baz dizilimlerindeki benzerliklere göre sınıflandırılır. Örneğin; CYP2 grubundaki aminoasit dizilimindeki benzerlik ortalama %40 iken CYP 2D grubunda %55'tir. Bazı enzimlerin aminoasit sırasındaki benzerlikler nedeniyle ayırt etmek zordur. İnsanlarda bu enzimleri kodlayan 32 adet gen tayin edilmiştir. Her doku için p450 enzimlerinin dağılımı ve gen ifadeleri özgüdür.

Yani genetik polimorfizm vardır. CYP gen ifadeleri endojen kaynaklı maddelerle değişebileceği gibi açlık ve diabet gibi durumlarda da değişebilmektedir. Bu şekilde ilaç metabolizmasındaki etkileşimleri değişir. İlaç metabolizmasında üç adet p450 gen ailesi işe karışmaktadır: CYP1, CYP2, CYP3. Bu grupta yer alan enzimler oksidasyon merkezi olarak görev alan “hem” protezinden meydana gelir ve ayrıca NADPH ile beraber işleve sahiptirler (Russmann ve ark. 2009; Özerol 1996; Yüksel 2001; Arici 2008).

İnsan p450 enzimlerini kodlayan gen ailesi (Cypalleles):

CYP1 ailesi; *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*.

CYP2 ailesi; *CYP2A6*, *CYP2A13*, *CYP2B6*, *CYP2C8*, *CYP2C9*,
CYP2C19, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *CYP2F1*, *CYP2J2*,
CYP2R1, *CYP2S1*, *CYP2W1*.

CYP3 ailesi; *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7*, *CYP3A43*.

CYP4 ailesi; *CYP4A11*, *CYP4A22*, *CYP4B1*, *CYP4F2*.

CYP> 4 aileleri; *CYP5A1*, *CYP8A1*, *CYP19A1*, *CYP21A2*, *CYP26A1*.

CYP1 gen ailesinde bulunan *CYP1A1* karaciğerde bulunmaz. *CYP1A2* ise karaciğer yoğun olarak bulunur. *CYP1A2* karsinojenik ve mutajenik maddelerin oluşumunda etkili olur, bu işe karışır. Hepatotoksik etki *CYP1A2* enzimi ile etkileşime girerek oluşan metabolitler yoluyla meydana gelmektedir. *CYP2* gen ailesinde bulunan *CYP2B* de ilaç metabolizmasına katılır. *CYP2D6* farklı enzimatik görevlere sahiptir ve ilaç metabolizmasına aktif olarak katılır. Karaciğerin dışında da bulunabilir. Var olup olmama durumuna göre Parkinson hastalığı, çeşitli kanserler, Alzheimer gibi bazı hastalıklarda duyarlılığı değişerek hastalık sürecini etkiler. Yine *CYP2* gen ailesinin kodladığı enzimlerden *CYP2E1* alkol metabolizmasında görev alır. *CYP2E1* bağımlı alkol metabolizması ROS üretimi yoluyla oksidatif stres meydana gelir. Bunun sonucunda hepatotoksisite meydana gelebilmektedir. *CYP2E1* ifadesinin artmasıyla hepatoselüler karsinoma hücreleri olan HepG2 hücrelerinde toksik etkiyi meydana getirdiği ortaya konulmuştur. Asetaminofen toksisitesinin uyarımında da görev alan bir enzimdir. N-nitrozamin gibi karsinojen bazı maddelerde de bu enzim aktive olmaktadır

(Begriche ve ark. 2011; Özerol 1996; Yüksel 2001; Arici 2008; Eren ve ark. 2004).

Sonuç olarak CYP450 sistemi birçok mekanizmada rol almaktadır. Steroid hormon sentezinden ilaçların düzenlenmesine, vücutta depolanmaya yatkın kimyasal maddelerin vücuttan atılmasından toksik metabolitlerin DNA da meydana getirdiği hasarlara kadar birçok oluşumda yer almaktadır (Yüksel 2001).

1.3.2.4. Lipid peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu toksik bir fenomen olarak bilinmektedir. Hücre zarındaki (fosfolipitler, trigliseritler, kolesterol vs.) lipitlerin oksidatif degradasyonuna neden olan serbest radikaller aracılığıyla gerçekleşen bir süreçtir. Hücre kontrolü olmadığı durumlarda CYP450 enzimleri aracılığıyla ksenobiyotik metabolizması ve dış faktörler (UV ışığı, iyonize radyasyon vs.) bu süreci artırır. Ortamda oksijen olduğu zaman lipit peroksidasyonu doymamış moleküllere kolay bir şekilde yayılmaktadır. Lipitler tamamen degrede olana kadar ve degradasyon ürünlerinin (hidroperoksit, aldehitler, ketonlar vs.) geniş bir zinciri ile birlikte lipitlerin oksidasyonu devam eder. Bu sürecin ilk sonucu, zarda lokalize enzim aktivitesinin fonksiyonu ve zarın fizikokimyasal özelliklerindeki değişimdir. Lipit degradasyon ürünleriyle birlikte lipid radikalleri kimyasal olarak çok reaktiftir. Eğer detoksifiye edilmezse veya endojen mekanizmalarla hücreden uzaklaştırılmazsa enzim inaktivasyonu, protein-protein çapraz bağlanması ve DNA hasarı gibi ek hücrel hasarlara neden olmaktadır (Gelb ve ark. 1995; Castell ve ark. 1996; Park ve ark. 2005; Pratico ve ark. 2004; Dülger ve ark. 2002).

1.4. *Origanum* Uçucu Yağı ve Karvakrol

Origanum çok sayıda tür içeren *Labiatae* ailesine ait ülkemizde yaygın olarak lokalize olan bir bitki cinsidir. Çeşitli türlerinden elde edilen uçucu yağları çok eski zamanlardan bu yana yiyeceklerde tat vermede, alkollü içeceklerde, yara ve yanıklarda yaygın olarak kullanılmıştır (Sivropoulou ve ark. 1996; Aligiannis

ve ark. 2001; Şahin ve ark. 2004). Ana bileşeni karvakrol olan *Origanum* cinsine ait uçucu yağların bilimsel olarak antioksidan, analjezik, antifungal, antibakteriyel, insektisidal, antimelanojenik, anti-inflamatuar ve yara iyileştirici etkileri gibi birçok özgül biyolojik etkisi ortaya koyulmuştur (Aydin ve ark. 1998; Vincenzi ve ark. 2004; Chorianopoulos ve ark. 2004; Bakkali ve ark. 2008; Aslim ve ark. 2008; Kordali ve ark. 2008; Karpouhtsis ve ark. 2008; Aydin ve ark. 2009; Govaris ve ark. 2010; Ding ve ark. 2010; Fuentes ve ark. 2010; Rivas ve ark. 2010). Terenina ve arkadaşları (2011). *Origanum* uçucu yağının yüksek yağ asit oksidasyonunun bir inhibitörü olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Tavuk embriyolarında *O. minutiflorum* uçucu yağının anjiogenik etkisi araştırılmış olup kan damarlarını genişlettiği ve yeni kan damarlarını oluşturduğu gösterilmiştir (Goze ve ark. 2010). *Origanum* türlerinden elde edilen ekstrakt ve uçucu yağların antikanser ve apoptotik etkileri göğüs adenokarsinoma hücreleri, lökomik hücreleri ve trombositleri de içeren bazı hücre tiplerinde ortaya koyulmuştur (Chinou ve ark. 2007; Al-Kaladeh ve ark. 2010; Roula ve ark. 2010). *Origanum onites* uçucu yağının ve ana bileşeni olan karvakrolün güçlü antimitojenik etkisi *S. typhimurium* ait TA98 ve TA100 suşları ile belirlenmiştir (Ipek ve ark. 2005).

Labiatae familyasının uçucu yağları içinde monoterpenik fenolik bir bileşen olan karvakrolün de farklı organizmalarda uçucu yağın etkilerine paralel bir şekilde antibakteriyel, antioksidan, analjezik, antifungal, insektisidal, fitotoksik, antiviral, antiparazital ve antiinflamatuar etkileri bilinmektedir (Guarda ve ark. 2011; Monzote ve ark. 2009; Ündeğer ve ark. 2009; Ghomi ve ark. 2009; Landa ve ark. 2009; Kordali ve ark. 2008; Burt ve ark. 2007; Tepe ve ark. 2005; Yanishlieva ve ark. 1999; Ultee ve ark. 1998; Aydin ve ark. 1998; Aeschbach ve ark. 1994; Didry ve ark. 1994). İnsan ve köpek miyositleri üzerinde yapılan bir araştırma karvakrolün kalsiyum kanallarını inhibe ettiğini ortaya koymuştur (Magyar ve ark. 2004). Arkan ve Aydın (2008) yaptıkları bir çalışmada sıçan atriumun uyarılması ile oluşturulan kasılmalar üzerinde karvakrol ve *Origanum*'un diğer bileşenlerinden olan timolün etkisini araştırmıştır. Karvakrolün kasılmaları inhibe ettiği ve buna göre kardiyoprotektif olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür. Yine Aydın ve arkadaşları (2007) izole edilen sıçan aortu ve anestezi sıçanlarda karvakrolün kardiyovasküler fonksiyonlarını

araştırmıştır. Bu çalışmaya göre karvakrol, hipertansiyonu meydana getiren N(omega)-nitro-L-arginin metil esteri inhibe etmekte ve hipotansiyonu meydana getirmektedir. Kardiyak L-tip kalsiyum kanalları blokaj aksiyonundan dolayı karvakrolün hipotensif etki gösterdiği ileri sürülmektedir. Bir başka çalışmada sıçan karaciğerinde iskemi-reperfüzyon defektlerine karşı karvakrolün koruyucu bir etkiye sahip olduğu ve hepatotoksik olmadığı ortaya konulmuştur (Canbek ve ark. 2008). Karvakrolün karaciğer yenilenmesini hızlandığı bir başka çalışma ile ortaya konulmuştur (Uyanoğlu ve ark. 2008). Karvakrol ile beslenen dişi sıçanlarla yapılan bir araştırma ile karvakrolün nörodavranış ve nörokimyasal etkileri araştırılmıştır. Buna göre yüksek dozlarda dişi sıçanların pro-depresif özellikler sergilediği rapor edilmiştir (Trabace ve ark. 2011). Karvakrolün farelerde anti-depresan benzeri özellikler gösterdiği bir başka çalışma ile gösterilmiştir (Melo ve ark. 2010).

Aydın ve arkadaşlarının (2005) insan lenfositlerinde yapmış oldukları bir çalışmada ise karvakrol ve timol yüksek dozlarda DNA hasarını uyarmıştır. Timol ile benzer yapıya sahip olan karvakrolün daha fazla genotoksik etki gösterdiği bulunmuştur. Bir başka çalışmada da karvakrolün Çin hamster akciğer fibroblast hücrelerinde genotoksik olduğu bulunmuştur (Ündeğer ve ark. 2009). Karvakrolün genotoksik etkisi sıçan kemik iliği hücrelerinde yapılan *in vivo* bir çalışmayla da kromozom anomalileri seviyesinde ortaya konulmuştur (Azırak ve ark. 2008). Memeli hücrelerinde *Chenopodium* yağından elde edilen karvakrolün mitokondrideki etkisine yönelik bir çalışma mitokondriyal elektron-transfer kompleks I aracılığıyla mitokondri taşıma sistemini inhibe ettiğini ortaya koymuştur (Monzote ve ark. 2009). Aristatle ve arkadaşları (2011) d-galaktozamin (d-GaIN) uyarılmış hepatotoksitenin hepatik mitokondriyal enzimlerin aktivitesi ve DNA hasarı üzerine karvakrolün farmakolojik etkisini sıçanlarda (Wistar, erkek) araştırmıştır. Buna göre d-GaIN hepatotoksik sıçanlarda hepatik mitokondriyal enzimlerin (izositrat, alfa-ketoglutarat, süksinat, malat, NADPH dehidrojenazlar ve sitokrom c oksidaz) aktivitesinin önemli derecede azaldığı, karvakrol uygulanması sonucunda enzimlerin normal parametrelerine döndüğü tespit edilmiştir. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlarında normal seviyeye döndüğü belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre karvakrol d-GaIN

uyarılmış sıçanlarda DNA hasarı ve mitokondriyal enzimlere karşı koruyucu bir etkiye sahiptir ve karaciğer mitokondriyal antioksidan özellikler göstermektedir.

Bu etkilerinden başka, karvakrolün anti-kanser etkisi üzerine bazı kanser tiplerinde *in vivo* ve *in vitro* koşullarda yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Kronik miyeloid lökomi hücreleri, N-ras transforme fare miyoblast hücreleri, murin melanoma hücreleri, insan servikal, akciğer ve meme kanser hücrelerinin büyümesi ve tumörögenez karvakrol tarafından inhibe edildiği bilinmektedir (He ve ark. 1997; Stamatia ve ark. 1999; Zeytinoglu ve ark. 2003; Koparal ve Zeytinoglu 2003; Karkabounas ve ark. 2006; Lampronti ve ark. 2006; Horvathov ve ark. 2007; Arunasree 2010; Mehdi ve ark. 2011).

Karvakrolün etki mekanizmasıyla ilgili çok az bilgi bulunmaktadır. Yapılan iki çalışmayla karvakrolün özgül olarak sitoplazmik zar yüzeyini ve geçirgenliğini değiştirdiği ve bu yolla hücreleri etkilediği bildirilmiştir (Ultee ve ark. 1998; Stora ve ark. 2011). Son zamanlarda yapılan bir çalışmayla karvakrole karşı *S. cerevisiae*'de transkripsiyonel cevap meydana geldiği genomik profil yoluyla ortaya konulmuştur. RNA metabolizması ve ribozom biyogenezine aracılık eden genler baskılanırken, strese cevap olarak belirgin bir şekilde genler uyarılmış ve ifadeleri artmıştır (Rao ve ark. 2010). *S. cerevisiae* 'nin timöl ile muamele sonucunda da transkripsiyonel bir cevap verdiği ve bunun yanı sıra hücrelerin fizyolojik değişimleri yoluyla genetik düzenlemede birkaç değişiklik meydana geldiği doğrulanmıştır. *S. cerevisiae* hücreleri ile karvakrol ve timölün muamele sonucunda genomda meydana gelen bu değişiklikler güçlü bir antifungal ajan olabileceklerini ortaya koymaktadır (Bi ve ark. 2009). Kim ve arkadaşları (2010) karvakrol yedirilen tavukların barsak intraepitel lenfositlerinde metabolik yollarla ilişkili 74 genin ifadesinin değiştiğini rapor etmiştir.

Yüksek yağlı diyet ile beslenen farelerle yapılan bir çalışmaya göre karvakrolün adipogenez ve inflamasyonu içeren genleri düzenleyerek diyetle bağlı olarak gerçekleşen obeziteyi önlediği ortaya koyulmuştur. Çalışmaya göre karvakrol kemik morfogenezik proteini, fibroblast büyüme faktörü-1 ve galanın aracılığıyla gerçekleşen sinyali baskılayarak visseral adipogenezini engellediği görülmüş ve ayrıca TLR2 (inhibiting toll like receptor 2) ve TLR4-aracılı sinyal yoluyla visseral adipoz dokuda proinflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltmıştır

(Cho ve ark. 2010). Lee ve arkadaşları (2008) karvakrolün kollajen üretimini uyardığı bazı moleküler mekanizmalar ileri sürmüştür. Buna göre karvakrol MAPK ailesinden JNK ve ERK1/2'nin fosforilasyonunu ve AP-1 promotorunun aktivasyonunu uyarmıştır. Ayrıca karvakrol fosfolipaz C gamma1 (PLCgamma1)'in fosforilasyonunu ve dolayısıyla intraselüler Ca^{+2} mobilizasyonunu uyarırken PLCgamma1 inhibitörünün etkisini azaltmıştır. Bu çalışmalara rağmen karvakrolün özellikle kanserli hücrelerindeki etkisine yönelik moleküler düzeydeki araştırmalar günümüzde yeterli değildir ve anti-kanser etki mekanizmasının araştırılması önemlidir.

2.MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

RNeasy Mini Kit, QIAshredder Homojenizer, DNase I seti, RT² Profiler™ Human Hepatotoxicity PCR Array, RT² RNA QC PCR Array, RT² qPCR Master Mix ve RT² First Strand Kiti bir Qiagen şirketi olan SABioscience™ firmasından alınmıştır. Karvakrol, Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), dimethyl sulfoxide (DMSO), sodyum bikarbonat ve KCl Sigma Aldrich firması aracılığıyla temin edilmiştir. PAA Laboratories GmbH firmasının Feotal Bovine Serum (FBS), Penicilin-Streptomycin ve (%0.5) Tripsin-EDTA ürünleri kullanılmıştır. Roche Applied Science firmasından WST-1 ve BrdU Proliferasyon Testi Kiti (Cell Proliferation ELISA, BrdU calorimetric) ürünleri temin edilmiştir. CaCl₂, EDTA, NaCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄ ve NaOH kimyasalları Merck firmasından temin edilmiştir. Sodyum asetat (Amresco), β-mercapto ethanol, glasiyal asetik asit (Carlo Erba), absolute ethanol (Riedel de Haen), DEPC (Diethyl pyrocarbonate) (Applichem) ve MOPS (Applichem) firmalarından temin edilmiştir.

2.2. TEST MADDELERİNİN HAZIRLANMASI

2.2.1. Kekik Uçucu Yağının Dozlarının Hazırlanması

Kekik uçucu yağı (*Origanum onites*) DMSO içerisinde çözülerek, %0.002, %0.003, %0.004, %0.005, %0.006, %0.007, %0.008, %0.009, %0.01, %0.02 (v/v) olmak üzere dozlar hazırlanmıştır. Dozlar her deney için taze olarak hazırlanıp taze besiyeri kullanılarak dilüsyonlar yapılmıştır. DMSO'nun miktarı %0,1'in altındadır. Kekik uçucu yağı +4 °C 'de saklanmıştır.

2.2.2. Karvakrolun Dozlarının Hazırlanması

Karvakrol DMSO içerisinde çözülerek ana stok solüsyonu (100 mM) hazırlanmış ve taze kültür vasatı ile ara stok solüsyonu (10 mM) kullanılarak dozlar hazırlanmıştır. 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M, 400 μ M, 500 μ M, 600 μ M, 700 μ M, 800 μ M olmak üzere taze besiyeri kullanılarak dozlar hazırlanmıştır. DMSO'nun miktarı %0,1'in altında olacak şekilde dozlar hazırlanmıştır. Karvakrol ana stok solüsyonu +4 °C 'de saklanmıştır.

2.3. YÖNTEM

2.3.1. Hücre Kültürü

HepG2 hepatoselüler karsinoma hücreleri %10 (v/v) FBS, 100 unite/ml penisilin/streptomisin, 2 mM L-glutamin içeren ve %9,2 NaHCO₃ DMEM içeren besiyeri içinde, 37° C'de %5 CO₂ içeren atmosfer nemi altında kültüre edilmiştir. Hücreler ılık (%1) tripsin/EDTA ile toplanarak transferi gerçekleştirilmiştir. Normal ortamda %80 yoğunlukta büyütülmüş hücreler deney için karvakrol ve uçucu yağın belirlenmiş dozları ile 24, 48 ve 72 saat süreler inkübe edilmiştir.

2.3.2. Hücrelerin Uygulamalar İçin Hazırlanması

Hücreler 25 cm²'lik flasklarda büyütülmüştür ve sonra %80 oranında yoğunluğa ulaştıkları zaman ılık tripsin/EDTA ile flask yüzeyinden kaldırılarak taze besiyerine toplanmıştır. Thoma lamında en az 3 kez tripan mavisini ile hücre sayısı tespit edilmiştir. 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına, her kuyucukta 1 x 10⁴ hücre olacak şekilde besiyeri ile süspansiyon haline getirildikten sonra her bir kuyucuğa 100 μ l hücre süspansiyonu aktarılmıştır. Hücrelerin yapışması ve adaptasyonu için 37 °C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi sonunda besiyerleri kuyucuklardan uzaklaştırılıp, test maddesi içeren besiyerinden 200 μ l/kuyucuk konularak 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Her bir dozda

hücre morfolojisinde meydana gelen değişikler Olympus DP71 mikroskobu ile fotoğraflanmıştır.

2.3.3. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

2.3.3.1. Nötral kırmızısı alımı (NR) analizi ile lizozomal aktivite yoluyla canlılığın belirlenmesi

Nötral red analizi, NICEATM (The National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, 2003) tarafından hazırlanan yönteme göre yapılmıştır. Hücreler 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilip, 24 saat büyütüldükten sonra hazırlanan test madde dozlarından eklenerek 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Kekik yağı için dozlar; %0.002, %0.003, %0.004, %0.006, %0.007, %0.008, %0.009, %0.01, %0.02'dir. Karvakrol için belirlenen dozlar; 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M, 400 μ M, 500 μ M, 600 μ M, 700 μ M, 800 μ M'dir. İnkübasyon sonunda hücreler 100 μ l/kuyucuk DPBS-A ile yıkandıktan sonra %1 oranındaki NR boyası ile 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda besiyeri uzaklaştırılıp hücreler tekrar DPBS-A ile yıkandıktan sonra kuyucuklara formazan tuzlarının çözülmesi için 100 μ l DESORB (%1 glacial asetik asit, %49 etanol) aktarılıp, ELISA (ELx808-IU) cihazında 540 nm dalga boyunda OD değerleri okunmuştur. Her doz için en az 4 kuyucuk içeren en az 3 ayrı deney gerçekleştirilmiştir.

2.3.3.2. WST-1 analizi ile mitokondriyal yolla canlılığın belirlenmesi

WST-1 (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium) analizi kitin alındığı firmanın (Roche Applied Science) yöntemine göre uygulanmıştır. Hücreler uygun koşullarda 96 kuyucuklu plakalara ekildikten sonra 24, 48 ve 72 saat test maddelerinin farklı dozlarıyla muamele edilmiştir. WST-1 testinde kekik uçucu yağı için belirlenen dozlar; %0.002, %0.004, %0.006, %0.008, %0.009, %0.01, %0.02 (v/v)'dir. Karvakrolün belirlenen

dozları; 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M, 500 μ M ve 800 μ M'dır. İnkübasyon sonunda besiyeri uzaklaştırılıp, final konsantrasyonu 10 μ M olacak şekilde WST-1 boyası besiyeriyle seyreltilerek hücrelere aktarılıp 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 2 dakika çalkalayıcı tablada çevrildikten sonra 490 nm dalga boyunda ELISA cihazında okutulmuştur. Her doz için en az 4 kuyucuk içeren en az 3 ayrı deney gerçekleştirilmiştir.

2.3.3.3. Tripan mavisi ile hücre canlılığının tespiti

Tripa n mavisi ile hücre canlılığının tespiti Warren Strober (1997) tarafından geliştirilen yöntem e göre gerçekleştirilmiştir. Hücreler uygun koşullarda yetiştirildikten sonra 6 kuyucuklu plakalara 3×10^5 hücre olacak şekilde ekilerek, 24, 48, 72 ve 96 saat test maddelerinin dozlarıyla muamele edilmiştir. Kekik uçucu yağı için dozlar; %0.008, %0.009, %0.01 (v/v)'dir. Karvakrol için dozlar; 300 μ M ve 500 μ M'dir. İnkübasyon süreleri sonunda tripsin/EDTA ile hücreler plakadan uzaklaştırılarak, taze besiyerine toplanmıştır. Daha sonra %0,04 tripan mavisi ile hücre süspansiyonu 1:1 oranında muamele edilip, Thoma lamında sayılarak hücre sayısı tespit edilmiştir. Thoma lamında bulunan 400 küçük karedeki hücreler sayılarak seyreltme faktörü ve 10000 ile çarpılarak hücre sayısı tespiti yapılır.

2.3.4. BrdU ile DNA Sentezinin Belirlenmesi

BrdU ile DNA sentezinin belirlenmesi kitin alındığı firmanın (Roche Applied Science) yöntemine göre yapılmıştır. Bunun için hücreler 96 kuyucuklu kültür plakalarına 1×10^4 hücre/kuyucuk ekilerek, 24 saat sonra hazırlanan test maddesinin dozlarıyla muamele edilip 48 saat inkübe edilmiştir. Kekik uçucu yağı için dozlar %0.002, %0.004, %0.005, %0.006, %0.007, %0.008, %0.009, %0.01 (v/v)'dir. Karvakrol için dozlar; 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M, 400 μ M, 500 μ M, 600 μ M, 700 μ M'dir. İnkübasyon sonrasında 10 μ M BrdU içeren taze besiyeri her bir kuyucuğa aktarılmış ve 2 saat inkübe edilerek işaretlenmiştir. Süre sonunda plaka ters çevrilmek suretiyle boşaltılarak, her bir kuyucuğa 200 μ l

FixDenat solüsyonu ilave edilip 30 dakika oda sıcaklığında denatürasyon gerçekleştirilmiştir. Bu esnada anti-BrdU-POD stok solüsyonu, antikor seyreltme solüsyonuyla 1:100 oranında seyreltilerek anti-BrdU-POD çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. FixDenat uzaklaştırıldıktan sonra her bir kuyucuğa 100 µl anti-BrdU-POD çalışma solüsyonu konarak 90 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda, anti-BrdU-POD çalışma solüsyonunun uzaklaştırılması için, her bir kuyucuk 100 µl PBS ile 3 kez yıkanmıştır. Son olarak her bir kuyucuğa 100 µl substrat reaksiyonu konarak, 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra ELISA cihazında 490 nm dalga boyunda OD değerleri ölçülmüştür. Her doz için en az 4 kuyucuk içeren en az 3 ayrı deney gerçekleştirilmiştir.

2.3.5. AkridinOranj/ Etidyum Bromür (AO/EB) Floresan Boyama ile Apoptotik Morfolojinin İncelenmesi

AO/EB yöntemi Hisham ve arkadaşlarının (2009) kullandığı yöntem geliştirilerek uygulanmıştır. Hücreler 6 kuyucuklu plakalara 3×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilerek 24 saat büyümeye bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler, test maddelerinin belirli dozlarıyla 48 saat muamele edildikten sonra tripsin/EDTA ile santrifüj tüplerine toplanarak, 1250 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Besiyeri aspirasyon ile uzaklaştırılıp 25 µl taze besiyeri eklenerek hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Kekik uçucu yağı için dozlar; %0.008, %0.009 (v/v)'dir. Karvakrol için dozlar; 300 µM ve 500 µM'dir. AO/EB karışımı 1:1 oranında (100 mg/ml: 100 mg/ml) PBS içinde hazırlanmış ve sonra bu karışım 1:10 oranında besiyeri ile seyreltilmiştir. Bundan 1 µl alınıp 25 µl hücre süspansiyonuna eklenmiş ve hemen preparat hazırlanmıştır. Olympos BX50 mikroskobu ile fotoğraflama gerçekleştirilmiştir.

Duke (Apoptosis methods and protocols, vol.282. 2004) tarafından belirtilen yönetime göre apoptotik indeks çıkarılmıştır. Buna göre:

$$\text{Apoptotik Hücrelerin Yüzdesi} = \frac{LA + DA}{LN + LA + DN + DA} \times 100$$

LN: Normal çekirdeğe sahip parlak yeşil canlı hücreler

LA: Apoptotik çekirdeğe sahip parlak yeşil canlı hücreler

DN: Normal çekirdeğe sahip parlak turuncu ölü hücreler

DA: Apoptotik çekirdeğe sahip parlak turuncu ölü hücreler

2.3.6. RT-PZR Array ile Hepatotoksisite'nin Tespiti

2.3.6.1. RNA izolasyonu

Tüm araç ve gereçler RNaz ve DNaz içermeyecek şekilde hazırlanmıştır. Bu amaç için, cam ve plastik malzemeler %0,1 DEPC'li su ile gece boyu muamele edilmiş ve sonra ultra saf su ile yıkanarak otoklav ile steril edilmiştir. RNA izolasyonu kitin alındığı firmanın (Qiagen) önerdiği yöntemle göre gerçekleştirilmiştir.

Hücreler 25 cm²'lik bir flaskta 2.5 x 10⁶ olacak şekilde ve 24 saat inkübe edilmiştir. Sonra IC50 değerlerinin bir alt dozları olan, karvakrol için 300 µM ve kekik uçucu yağı için % 0.008 dozu ile hücreler 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tripsin/EDTA ile toplanan hücreler Thoma lamında sayılmıştır. Her bir örnekten RNA izolasyonu için 3.4 x 10⁶ hücre, mikrosantrifüj tüplerinde toplandıktan sonra her bir tüpe 350 µl RLT liziz tamponu aktarılmıştır. HepG2 hücreleri RNA açısından zengin olduğundan RLT liziz tamponu içeren her bir tüpe 1:100 oranında β-merkapt etanol eklenip pipetlenerek liziz işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücre lizatının homojenizasyonu için QIAshredder homojenizer spin kolona hücre lizatı aktararak, 2 dakika maksimum hızda santrifüj edilmiştir. Toplama tüpünde bulunan hücre lizatına 1:1 oranında %70 etanol aktararak, dikkatli bir şekilde pipetlendikten sonra lizat RNeasy spin kolona bağlanarak, 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Alta inen sıvı dikkatli bir şekilde atık kabına boşaltıldıktan sonra RNeasy spin kolon üzerine 350 µl RW1 yıkama tamponu eklenerek, 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne inen sıvı kolon zarına temas etmeyecek şekilde boşaltıldıktan sonra DNase I seti içerisindeki 70 µl RDD tamponu 10 µl DNase I stok solüsyonu eklenip, yavaşça karıştırıldıktan sonra spin kolon üzerine doğrudan aktarılıp benç üzerinde 15 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda spin kolon üzerine tekrar 350 µl RW1 yıkama tamponu aktarılıp 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne inen sıvı boşaltıldıktan sonra spin kolona 500 µl RPE yıkama tamponu aktararak 10000 rpm'de 15 saniye santrifüj

edilmiştir. Toplama tüpü boşaltılıp tekrar 500 µl RPE yıkama tamponu aktarılıp, 10000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilerek yıkama aşaması tamamlanmıştır. Santrifüj sonunda toplama tüpü değiştirilerek 1 dakika maksimumda hızda santrifüj edilip kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak spin kolon 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilerek 50 µl Rnaz-DNaz içermeyen su aktarılıp 10000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. 30 µl Rnaz-DNaz içermeyen su eklenerek aynı aşama tekrarlanarak RNA’nın spin kolondan tüpe aktarımı gerçekleştirilmiştir. RNA miktarının ve saflığının tayini için spektrofotometrede ölçüm yapılmış, elektroforezde yürütülerek kalitesi kontrol edilmiştir.

2.3.6.1.1. Spektrofotometrik olarak RNA miktarının ve saflığının tayini

Spektrofotometrik olarak RNA miktarının tayini NanoDrop cihazı aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Öncelikle NanoDrop temizlenmiştir. Bunun için NanoDrop probunun üzerine 2 ml distile su konarak NanoDrop programı ile işlem onayı yapılmıştır. NanoDrop programında RNA-40 olarak RNA ölçümü için gerekli ayarlamalar yapıldıktan sonra prob üzerine 2 ml RNaz ve DNaz içermeyen su konarak blank işlemi yapılmıştır. Sıfırlama işlemi olunca 2 µl RNA aktararak ölçüm yapılmış ve RNA miktarı tayin edilmiştir. 260/280 ve 260/230 absorban değerleri kaydedilmiştir. Bu değerler RNA saflığının göstergesi olarak kullanılmaktadır. 260/280 absorban değeri 1.9-2.1 arasında ise örnek RNA’nın saf olduğunu göstermektedir. 260/230 absorbansı 2.1-2.5 değerleri arasında olmalıdır.

2.3.6.1.2. Agaroz jel elektroforezi ile RNA kalitesinin ve saflığının tayini

Agaroz jel elektroforezi, RNA izolasyon kiti firmasının önermiş olduğu Sambrook ve arkadaşlarının (1989) yöntemine göre yapılmıştır. RNA degradasyonu olmaması için steril kabinde ve steril şartlarda çalışılmıştır. Tüm malzemeler RNaz ve DNaz içermeyecek şekilde bir gün önceden hazırlanarak deney için hazır hale getirilmiştir. Pudrasız eldiven ve maske kullanılmasına dikkat edilmiştir. Tüm solüsyonlar da DEPC ile muamele edilmiş su kullanılmıştır.

Öncelikle 5 x formaldehid jel yürütme tamponu (0.1 M MOPS, 40 mM sodyum asetat, 5 mM EDTA) hazırlanmıştır. Sonra steril bir santrifüj tüpüne jele yüklenecek olan örnek karışımı hazırlanmıştır. Bunun için 15 µg RNA, 2 µl jel yürütme tamponu (5X), 3.5 µl formaldehid ve 10 µl formamid alınarak karıştırılmıştır. Karışım 15 dakika 65 °C’de su banyosunda inkübe edilmiştir. Bu esnada %1’lik agaroz jel hazırlanmıştır. Agaroz jel; 35 ml agaroz, 11 ml 5 x jel yürütme tamponu ve 10 ml formaldehid kullanılarak hazırlanmıştır. Öncelikle agaroz DEPC ile muamele edilmiş su içerisinde, mikrodalga aracılığıyla çözülmüştür. Biraz soğuduktan sonra yavaş bir şekilde ve çalkalanarak agaroz içerisine diğer solüsyonlar eklenerek tanka yavaş bir şekilde dökülmüş ve donmaya bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler buza alınıp 1-2 dakika bekletildikten sonra 5 saniye santrifüj edilmiştir. Daha sonra örnekler tekrar buza alınarak 2 µl formaldehit jel yükleme tamponu (%50 gliserol, 1mM EDTA, %0.25 bromofenol mavisi, %0.25 ksilen siyanol) konulmuştur. Jel elektroforez tankına konularak 1 x formaldehit jel yürütme tamponu içinde örnekler kuyucuklara yüklenmiştir. Cihaz 70 V ayarlanarak 2 saat süresince RNA yürütülmüştür. Süre sonunda 0.1 M amonyum asetat içerisinde bulunan 0.5 µg/ml etidyum bromür ile 40 dakika boyanmıştır. Daha sonra sadece amonyum asetat ile 3 kere 2 dakika agaroz jel yıkanmış ve transimülatör de fotoğraflanarak incelenmiştir.

2.3.6.1.3. *RT² RNA QC PZR array ile RNA kalite kontrolünün tespiti*

RT² RNA QC PZR Array ile PZR temelli gen ifadesi analizleri için 12 adet RNA örneğinin eş zamanlı olarak kalitesinin değerlendirilmesi için geliştirilmiş bir yöntemdir. Bu array ile RNA bütünlüğü, reverz transkripsiyon inhibitörü, PZR çoğaltma inhibitörü ve genomik DNA kontaminasyonu, yanlış pozitif sinyal ve çoklu pik yarılma eğrileri tespit edilmektedir. RT² RNA QC PZR Array ile RNA kalite kontrolü arrayin alındığı Qiagen firmasının yöntemine göre uygulanmıştır. Firmanın hazırlamış olduğu array plakasına göre kontrol ifadeleri Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. RT² RNA QC PZR array plakasının gösterimi.

SAMPLE	96-well →		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
	384-well ↓		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
cDNA template	A	A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
		B	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1
	B	C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
		D	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2
	C	E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
		F	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC
	D	G	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
		H	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC
RNA	F	I	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
		J	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC
H ₂ O	G	K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
		L	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT
	H	M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
		N	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC
H ₂ O	H	O	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
		P	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC

Plakada bulunan kontrol tiplerinin özellikleri aşağıdaki açıklandığı gibidir:

A satırı: Yüksek ifade edilen house keeping genler (HK1)

B satırı: Düşük ifade edilen house keeping genler (HK2).

C satırı: Revers transkripsiyon kontrolü (RTC).

D satırı: Pozitif PZR kontrolü (PPC).

G satırı: Deney bir kalıp olmadan PZR kontrolü (PPC).

E satırı: Genomik DNA kontaminasyonu kontrolü (GDC).

F satırı: Reverz transkripsiyon yokluğunun kontrolü (NRC).

H satırı: Kalıp yokluğunun kontrolü (NTC).

RT² RNA QC PZR array plakasına yüklenmek üzere her bir RNA örneği için 1.5 ml santrifüj tüpü içinde 3 farklı kokteyl hazırlanmıştır. Örnekler array plakasına aktarılırken her bir kuyucuk da filtreli uç değiştirilmiştir. Aşağıda 96 kuyucuğun tamamının kullanılacağı yani 12 RNA örneği için hazırlanan kokteyl oranları belirtilmiştir.

Kokteyl 1: Master karışımı ve cDNA kalıbı.

2 x SABioscience™ PZR master karışımı	75 µl
Seyreltilmiş cDNA sentez reaksiyonu	6 µl
RNase-DNase içermeyen su	69 µl
	150 µl

Kokteyl 1, 96 kuyucuklu array plakasındaki A satırından E satırına kadar olan satırlara 25 µl/kuyucuk olarak aktarılmıştır.

Kokteyl 2: Sadece master karışımı.

2 x SABioscience™ PZR master karışımı	45 µl
RNase-DNase içermeyen H ₂ O	45 µl
	90 µl

G ve H satırlarına 25 µl/kuyucuk aktararak kullanılmıştır

Kokteyl 3: Örnek RNA'lar master karışımı.

2 x SABioscience™ PZR master karışımı	13 µl
1:100 seyreltilmiş örnek RNA	1 µl
RNase-DNase içermeyen H ₂ O	13 µl
	27 µl

RNA'lar 1:100 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. 25 µl/kuyucuk olarak F satırına aktarılmıştır. Kokteyller array plakasına aktarıldıktan sonra plaka stripple kapatılmış ve santrifüj edildikten sonra RT-PZR cihazına yerleştirilmiştir. Termal profil aşağıda verildiği şekilde programlanmıştır:

Segment 1 (1 döngü); 95 °C 10 dakika,

Segment 2 (40 döngü); 95 °C 15 saniye, 60 °C 1 dakika,

Segment 3 (1 döngü); 95 °C 1 dakika, 55 °C 30 saniye, 95 °C de 30 saniye.

2.3.6.2. Tamamlayıcı DNA'nın (cDNA) sentezi

cDNA sentezi kullanılan kitin (Qiagen, RT² First Strand Kit) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için 2 µg RNA kullanılmıştır. Önce genomik DNA eliminasyon solüsyonu, 2 µl GE (5 x gDNA eliminasyon buffer) ve 2 µg RNA'nın RNase-DNase içermeyen su ile toplam 10 µl'ye tamamlanmasıyla hazırlanarak 42°C de 5 dakika inkübe edilmiştir. Bu esnada RT kokteyli, 8 µl BC3 (5 x RT buffer 3), 2µl P2 (Primer & Dış Kontrol Karışımı), 4 µl RE3 (RT Enzim Karışımı 3) ve 6 µl RNase-DNase içermeyen su ile hazırlanmıştır. İnkübe edilen RNA örnekleri en az 1 dakika buzda tutulmuştur. Sonrasında RT kokteyli eklenerek 42° C de 15 dakika ve hemen arkasından 95 °C de 5 dakika daha inkübe

edilerek reverz transkripsiyon gerçekleştirilmiştir. cDNA buzda bekletilerek hemen array plakalarına yüklenmiştir.

2.3.6.3. RT² PZR array insan hepatotoksisite plakalarının hazırlanması ve RT-PZR

İnsan hepatotoksisite RT² PZR array plakalarının (Çizelge 2.2) analizleri firmanın önermiş olduğu yönteme göre yapılmıştır. Buna göre her plaka array için; 102 µl cDNA sentez reaksiyonu, 1350 µl RT² qPCR SYBR green master karışımı ve 1248 µl Rnaz-DNaz içermeyen su kullanılarak deney kokteyli hazırlanmış ve rezervuara aktarılmıştır. -20 °C de saklanan insan hepatotoksisite array 96 plakası oda sıcaklığına getirildikten sonra her bir kuyucuğa dikkatli bir şekilde multikanallı pipetör yardımıyla 25 µl kokteylden aktarılmıştır. Plaka kuyucukları tek tek stripp ile kapatıldıktan sonra plaka 25000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiş ve RT-PZR (Stratagene, Mx3005P) cihazına yerleştirilmiştir. Her bir kuyucuk için filtreli yeni uç kullanılmıştır.

RT² PZR insan hepatotoksisite array ile incelenmiş olan 84 adet genin ifadeleri aşağıdaki gibidir:

Hepatotoksisite: Uyarılan; *ALDOA, APEX1, BTG2, CASP3, CCNG1, CRYL1, DDIT4L, DNAJB11, DNAJC3, GADD45A, GCLC, GSR, HMOX1, HYOU1, KRT18, KRT8, NQO1, PLA2G12A, SLC17A3, TXNRD1, YRDC*. Baskılanan; *AVPR1A, BHMT, CA3, CXCL12, CYP1A2, FADS1, FMO1, HAO2, IGFALS, MBL2, RB1, THRSP*. Kontrol edilen; *ABCB11, FXC1, MAOB, PYGL*

Fosfolipidozis: Uyarılan: *ASAH1, FABP1, HPN, LSS, MRPS18B, S100A8, SERPINA3, WIPI1*. Baskılanan: *SLC2A3, TAGLN*. Kontrol edilen: *ABCB1, FXC1*.

Steatozis: Uyarılan: *CD36, FASN, LPL, SCD*. Baskılanan: *PPARA, SREBF1*.

Genotoksik olmayan hepatokarsinogenez: *ALDOA, APEX1, BTG2, CCNG1, CDKN1A, DDX39, KRT8, KRT18, MRPS18B, TXNRD1*

Kolestazis: *ABCB1, ABCB4, ABCC2, ABCC3, ATP8B1, ICAM1, OSTALPHA, PDYN, RDX*.

Nekroz: Uyarılan: *CD68, COL4A1, IL6ST, IPO4, MAP3K6, NUS1, OSMR, PSME3, SERPINE1, SKIL, SLC39A6, TMEM2*. Baskılanan: *CDC14B, FAM158A, KIAA1370, L2HGDH, LGR5, MCM10, MLXIPL, RHBG*. Kontrol edilen: *CDKN1A, DDX39*.

Çizelge 2. 2. RT² PZR array insan hepatotoksisite plakasının gösterimi.

ABCB1 A01	ABCB11 A02	ABCB4 A03	ABCC2 A04	ABCC3 A05	ALDOA A06	APEX1 A07	ASAHI A08	ATP8B1 A09	AVPR1A A10	BHMT A11	BTG2 A12
CA3 B01	CASP3 B02	CCNG1 B03	CD36 B04	CD68 B05	CDC14B B06	CDKN1 A B07	COL4A 1 B08	CRYL1 B09	CXCL12 B10	CYP1A 2 B11	DDIT4L B12
DDX39 C01	DNAJB1 1 C02	DNAJC3 C03	FABP1 C04	FADS1 C05	FAM158 A C06	FASN C07	FMO1 C08	FXC1 C09	GADD45 A C10	GCLC C11	GSR C12
HAO2 D01	HMOX1 D02	HPN D03	HYOU 1 D04	ICAM1 D05	IGFALS D06	IL6ST D07	IPO4 D08	KIAA137 0 D09	KRT18 D10	KRT8 D11	L2HGDH D12
LGR5 E01	LPL E02	LSS E03	MAOB E04	MAP3K 6 E05	MBL2 E06	MCM10 E07	MLXIP L E08	MRPS18 B E09	NQO1 E10	NUS1 E11	OSMR E12
OSTalpha F01	PDYN F02	PLA2G12 A F03	PPARA F04	PSME3 F05	PYGL F06	RB1 F07	RDX F08	RHBG F09	S100A8 F10	SCD F11	SERPINA 3 F12
SERPINE 1 G01	SKIL G02	SLC17A3 G03	SLC2A 3 G04	SLC39A 6 G05	SREBF1 G06	TAGLN G07	THRSP G08	TMEM2 G09	TXNRD1 G10	WIPI1 G11	YRDC G12
B2M H01	HPRT1 H02	RPL13A H03	GAPD H H04	ACTB H05	HGDC H06	RTC H07	RTC H08	RTC H09	PPC H10	PPC H11	PPC H12

Plaka RT-PZR cihazına yerleştirildikten sonra MxPro programı aracılığıyla firmanın belirtmiş olduğu düzenleme yapılmıştır. Tüm kuyucuklar işaretlenerek, SYBR green ve ROX boyasına ait filtreler seçilip termal profil düzenlenmiştir.

Termal profil:

Segment 1 (1 döngü); 95 °C 10 dakika,

Segment 2 (40 döngü); 95 °C 15 saniye, 60 °C 1 dakika,

Segment 3 (1 döngü); 95 °C 1 dakika, 55 °C 30 saniye, 95 °C de 30 saniye.

2.3.6.4. RT-PZR array sonuçlarının analizi

Real Time PZR array sonuçlarının analizi www.sabioscience.com adresi üzerinden gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar analiz edilmeden önce bazı işlemler RT PZR cihazının programı olan MxPro ile yapılmıştır. Bu işlemler sırasıyla şöyledir:

- 1) Önce “Analysis Selection/Setup” sayfasında bulunan “Adaptive Baseline” işareti kaldırılır.
- 2) “Results” sayfanın üzerine iki kez tıklanır ve “OK” butonuna basılarak kapatılır.
- 3) “Toolbar”ın “Options” seçeneğinden “Analysis Term Settings” tıklanarak açılır ve “start cycle 2” olarak değiştirilir. “Through” döngüsü reaksiyonun başladığı döngüden 2 önceki döngü sayısı olarak değiştirilir ve “OK” butonuna basılır.
- 4) SYBR green boyası kullanıldığından sadece SYBR green boyası aktif halde bırakılır.
- 5) Sonuçların bulunduğu sayfanın üzerine çift tıklanarak “Y axis –log” olarak değiştirilip “OK” lenir.
- 6) Doz ve kontroldeki “threshold” değerlerinin eşitlenmesi gerektiğinden 1:3 oranında olacak şekilde threshold ayarlanır.
- 7) “Text reports” işlemine gelinir. “Well name” işareti kaldırılır. “Tm product 1 (-R'(T))” işaretlenir.
- 8) Dosyaya gelinir ve “export text report” seçeneğinden sonuçlar “excele” aktarılır.

Doz ve kontrol sonuçları excel sayfasında yan yana toplanır. <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php> adresi üzerinden array plaka kodu seçilir ve sonra excel ile toplamış olduğunuz sonuçlar yüklenir. Daha sonra kontrol ve doz grubu seçilerek sonuçların analizi tamamlanır. İstenilen tüm dökümler bu sayfa üzerinden ulaşılmaktadır.

2.3.7. İstatistiki Değerlendirme

NR, WST-1, BrdU ve tripan mavisi deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesinde (Statistical Package for the Social Sciences) SPSS 11.5 programı kullanılmış ve elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Dunnet testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.001$ kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

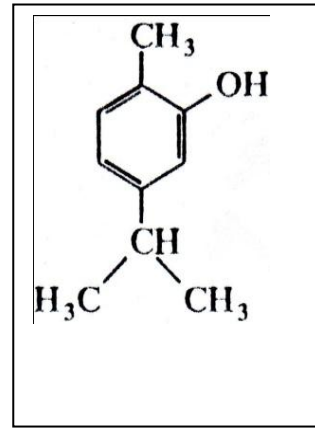
3.1. KEKİK UÇUCU YAĞI VE KARVAKROL

Deneyde kullanılan kekik uçucu yağı *Origanum onites* L. den hazırlanmıştır ve daha önce yapılan bir çalışmada yayınlandığı gibi GC analizi yapılmıştır (Ipek ve ark. 2005). GC analizinin sonuçlarına göre Çizelge 3.1A’da görüldüğü gibi major bileşen olarak %74’ü karvakrol (Çizelge 3.1B) olan en az 6 bileşik belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. *Origanum onites* L. uçucu yağının ana bileşenlerinin GC analizi ile yapılmış sonuçları (A) ve karvakrolün kimyasal formülü (B).

BİLEŞENLER	%
Karvakrol	74.0
Linalool	7.2
Timol	4.4
p-cymen	3.0
b-bisabolen	1.4
Karyofilen oksit	1.3

A



B

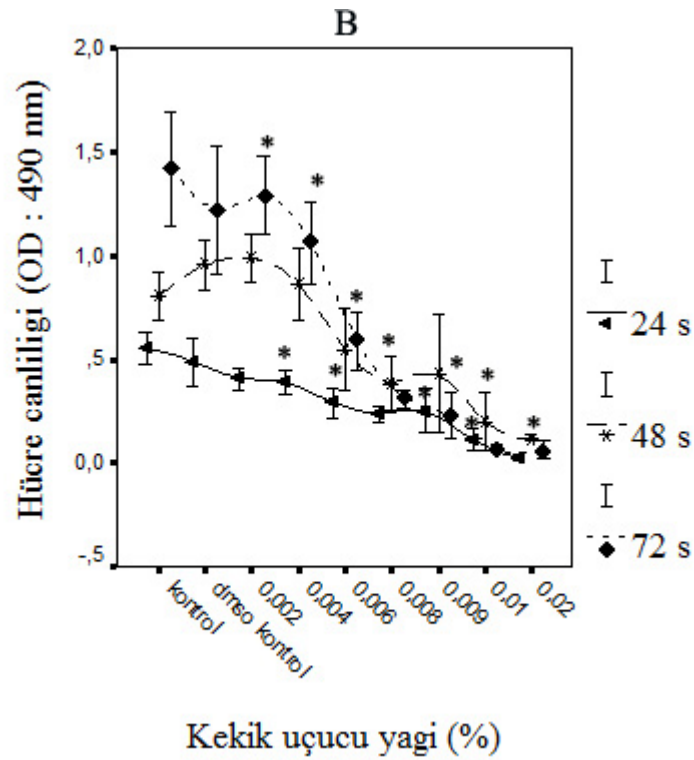
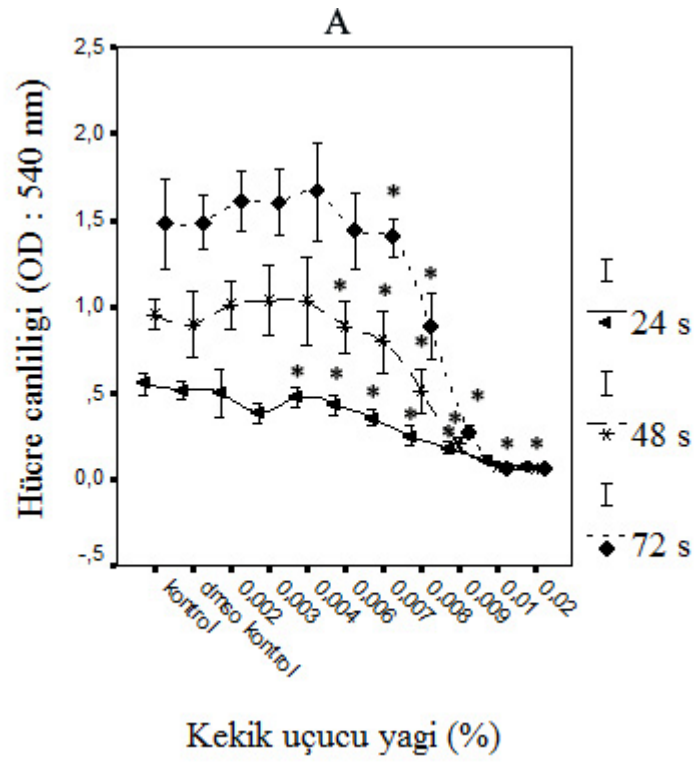
3.2. KEKİK UÇUCU YAĞININ HEPG2 HÜCRELERİNİN CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ

Kekik uçucu yağının HepG2 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi NR alınımı, WST-1 ve tripan mavisi boyaması olarak üç farklı yöntemle belirlenmiştir. Kekik uçucu yağının çeşitli dozlarına 24, 48 ve 72 saat sürelerle maruz bırakılan hücrelerde canlılık oranı sonuçları Şekil 3.1A, B ve C’de verilmiştir. Grafikte görüldüğü gibi kekik uçucu yağı ile hücrelerin 24 saat

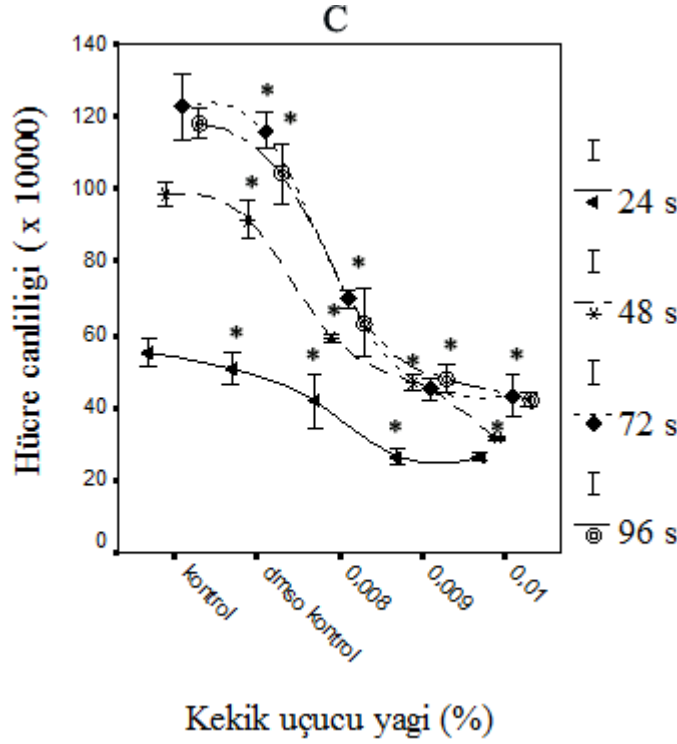
inkübasyonundan sonra NR alan canlı hücrelerin oranı %0.006 dozundan itibaren azalmaya başlamıştır (Şekil 3.1A). IC50 değeri de % 0.009 olarak bulunmuştur. 48 ve 72 saat inkübasyon sonunda % 0.004 dozundan itibaren maddenin etkinliği görülmektedir. Belirlenen inkübasyon sürelerinde hücre canlılığı %0.01 dozundan itibaren bazal seviyeye düşmektedir. 48 ve 72 saatteki IC50 değeri %0.009 dozuna yakın bir değer görülmektedir.

Şekil 3.1B’de görüldüğü gibi kekik uçucu yağı ile hücrelerin 24 saat muamelesi sonunda WST-1 canlılık testi ile %0.002 dozundan itibaren hücre canlılığının azalmaya başlamıştır. IC50 değeri %0.01 dozuna daha yakın olarak bulunmuştur. 48 saat inkübasyon sonunda %0.004 dozundan itibaren hücre canlılığında önemli derecede azalma başlamıştır. 72 saat sonunda ise %0.002 dozundan itibaren canlılık azalmaya başlamış, 24 ve 48 saate göre maddenin etkinliği önemli ölçüde artarak devam etmiştir. 48 ve 72 saatte IC50 değeri aşağı yukarı %0.009 dozu olarak görülmektedir.

Tripan mavisi boyaması ile canlılık testi için kullanılacak dozlar nötral kırmızısı ve WST-1 analizlerinin sonuçlarına göre seçilmiştir. Buna göre IC50 değeri olarak belirlenen %0.009 ile % 0.01 dozları ve IC50 değerinin altındaki % 0.008 dozu belirlenmiştir. Materyal ve yöntemde anlatıldığı gibi hücreler belirlenen dozlarla 24, 48, 72 ve 96 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kekik yağı ile 24 saat inkübasyon sonrasında, canlı hücre sayısı % 0.008 dozunda 5.2×10^5 hücreden 4.1×10^5 hücreye, %0.009 dozunda 2.5×10^5 hücreye ve %0.01 dozunda 2.2×10^5 hücreye düştüğü görülmektedir (Şekil 3.1C). 48 saat sonunda, 1×10^6 ulaşan kontrol canlı hücre sayısı % 0.008 dozunda 6×10^5 , %0.009 dozunda 4.8×10^5 ve %0.01 dozunda 3.2×10^5 hücreye düşmektedir. 72 saat sonunda ise kekik uçuğu yağının etkinliğinin artan etkisi devam etmekte ve %0.009 dozunda 1.2×10^6 hücreden 4.5×10^5 hücreye düşmektedir. 96 saatte kalan canlı hücre sayısının önemli ölçüde artmadığı, kekik uçucu yağının etkinliğinin 72 saat ile paralel olarak devam ettiği belirlenmiştir. Sonuç itibarıyla 24 ve 48 saat sonundaki IC50 değeri %0.009 olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Kekik uçucu yağının HepG2 hücre canlılığı üzerine etkisinin NR alınımlı (A), WST-1 (B) ve tripan mavisi boyaması (C) ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,001$.



Şekil 3.1. (Devam) Kekik uçucu yağının HepG2 hücre canlılığı üzerine etkisinin NR alınımı (A), WST-1 (B) ve tripan mavisi boyaması (C) ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,001$.

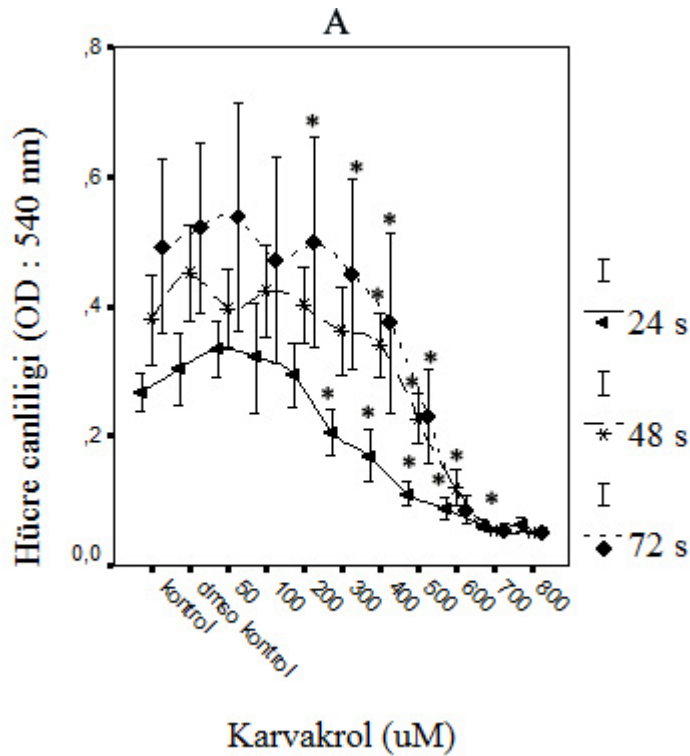
3.3. KARVAKROLÜN HepG2 HÜCRELERİNİN CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ

Karvakrolün HepG2 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi NR, WST-1 ve tripan mavisi olarak üç farklı yöntemle araştırılmıştır. Karvakrolün çeşitli dozlarına 24, 48 ve 72 saat sürelerle maruz bırakılan hücrelerde canlılık oranı sonuçları Şekil 3.2A, B ve C’de gösterilmiştir. Grafikte görüldüğü gibi karvakrol ile hücrelerin 24 saat inkübasyonundan sonra NR alan canlı hücrelerin oranı 300 μM dozundan itibaren azalmaya başlamıştır (Şekil 3.2A). IC₅₀ değeri de 500 μM olarak bulunmuştur. 48 saat sonunda 200 μM dozundan itibaren canlılık azalmaya başlamış ve 700 μM ’da önemli ölçüde bazal seviyeye düşmüştür. 72 saat inkübasyon süresinde ise 300 μM dozundan itibaren azalma başlamıştır. 48 ve 72 saatteki IC₅₀ değerleri de önemli ölçüde 500 μM olarak NR yöntemine göre tespit edilmiştir.

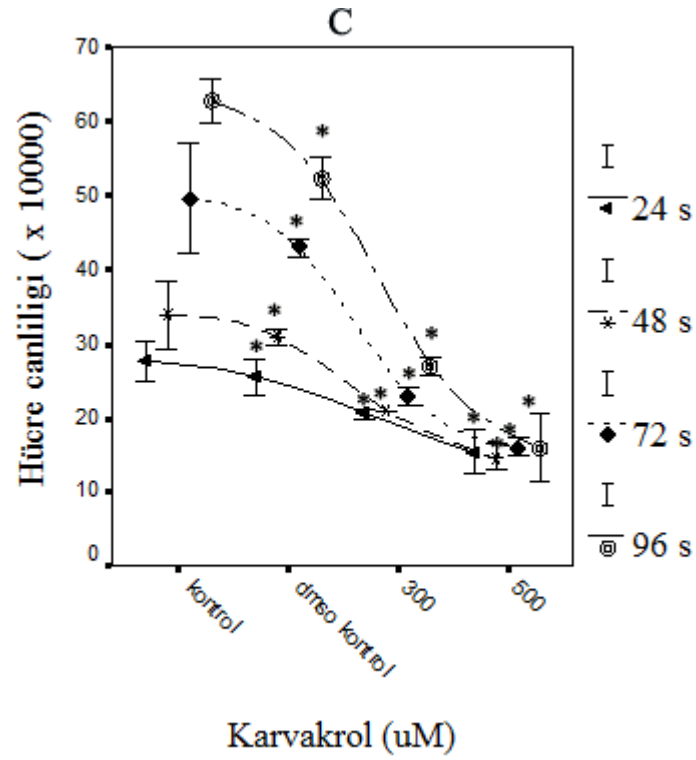
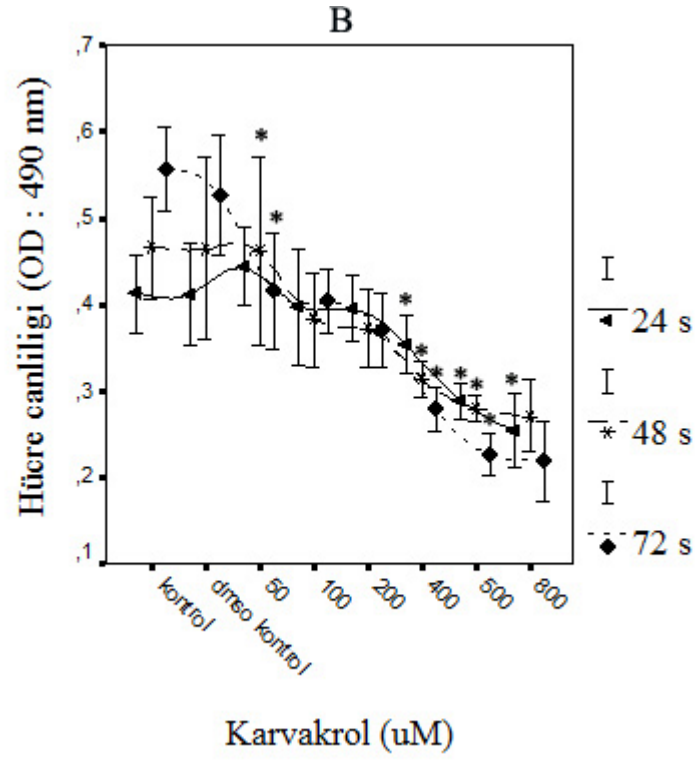
Karvakrol ile hücrelerin 24 saat muamelesi sonunda WST-1 canlılık testi ile 200 μM dozundan itibaren hücre canlılığının azalmaya başladığı görülmüştür

(Şekil 3.2B). 48 ve 72 saat inkübasyon sonunda 50 μM dozundan itibaren hücre canlılığında azalma başlamış ve 200 μM 'da azalarak karvakrolün etkinliği devam etmiştir. 24, 48 ve 72 saatte IC50 değeri 500 μM dozu olarak bulunmuştur.

Tripan mavisi ile canlılık testi için dozların tespiti nötral kırmızısı ve WST-1 testi sonuçlarına göre seçilmiştir. Buna göre IC50 değeri 500 μM ve bir düşük doz olarak 300 μM olarak belirlenmiştir. 24 saat sonunda hücre canlılığındaki azalmanın 300 μM dozunda 3×10^5 hücreden 2×10^5 , 500 μM dozunda 1.5×10^5 hücreye düştüğü görülmektedir (Şekil 3.2C). 48 saat sonunda 500 μM dozunda hücre sayısının kontrole göre yarıya düştüğü belirlenmiştir. 72 saat inkübasyon sonunda 4.4×10^5 ulaşan hücre sayısı 300 μM dozunda 2.4×10^5 , 500 μM dozunda 1.6×10^5 hücreye düştüğü tespit edilmiştir. 96 saatte karvakrolün artan etkisi devam ederek, 5×10^5 hücre 300 μM 'da 2.6×10^5 , 500 μM 'da 1.8×10^5 hücreye düşmüştür. IC50 değeri 24, 48 saatte 500 μM , 72 ve 96 saatte karvakrolün artan etkisiyle 300 μM dozuna daha yakın bir değer olarak görülmektedir.



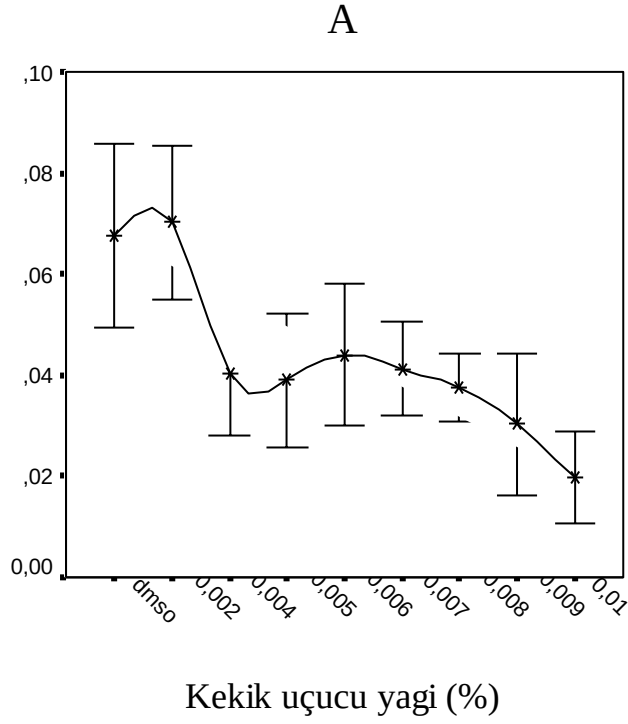
Şekil 3.2. Karvakrolün HepG2 hücre canlılığı üzerine etkisinin NR alınımları (A), WST-1 (B) ve tripan mavisi boyaması (C) ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,001$.



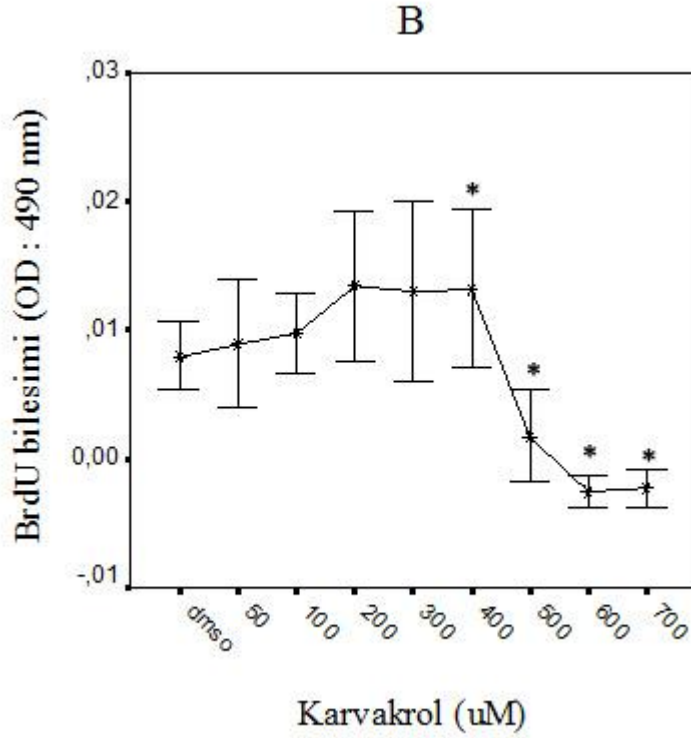
Şekil 3.2. (Devam) Karvakrolün HepG2 hücre canlılığı üzerine etkisinin NR alınımı (A), WST-1 (B) ve tripan mavisi boyaması (C) ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,001$.

3.4. KEKİK UÇUCU YAĞI VE KARVAKROLÜN DNA SENTEZİNE ETKİSİ

Kekik yağı ve karvakrolün hazırlanan bir seri dozuna 48 saat maruz bırakılan HepG2 hücrelerinde DNA sentezi materyal yöntemde anlatıldığı gibi BrdU'nun zincir yapısına eklenmesi yoluyla araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.3'de verilmiştir.



Şekil 3.3. Kekik uçucu yağı (A) ve karvakrolün (B) BrdU yöntemiyle DNA sentezine etkisi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,001$.

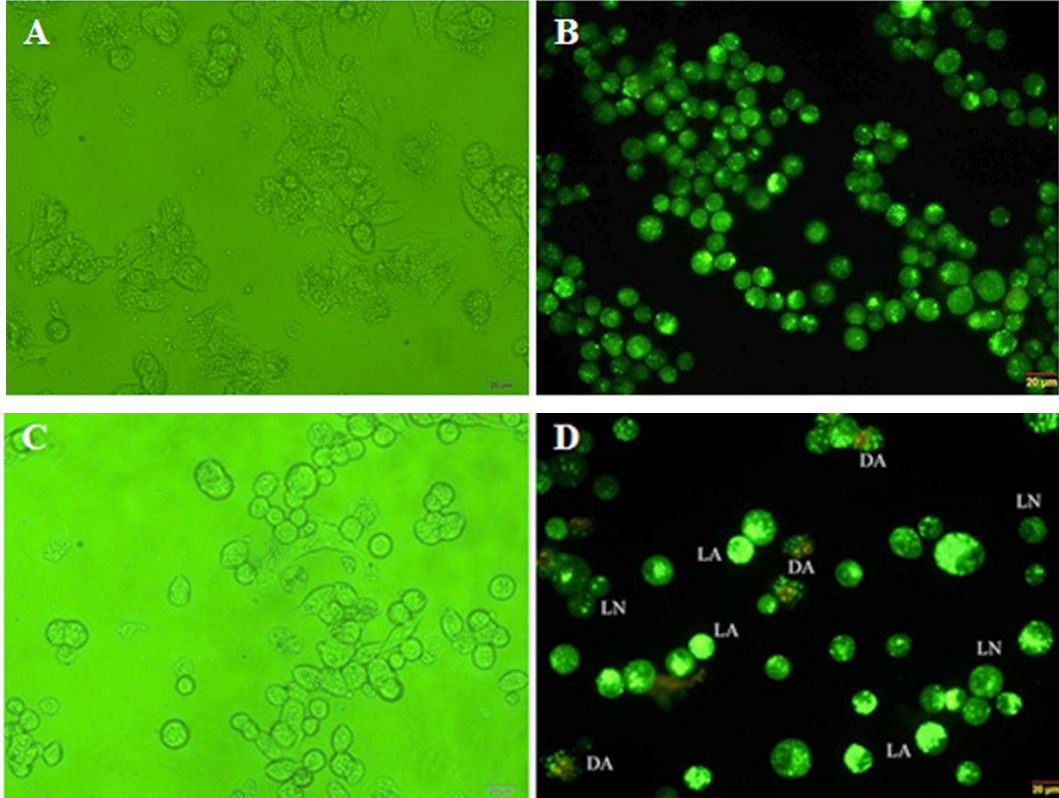


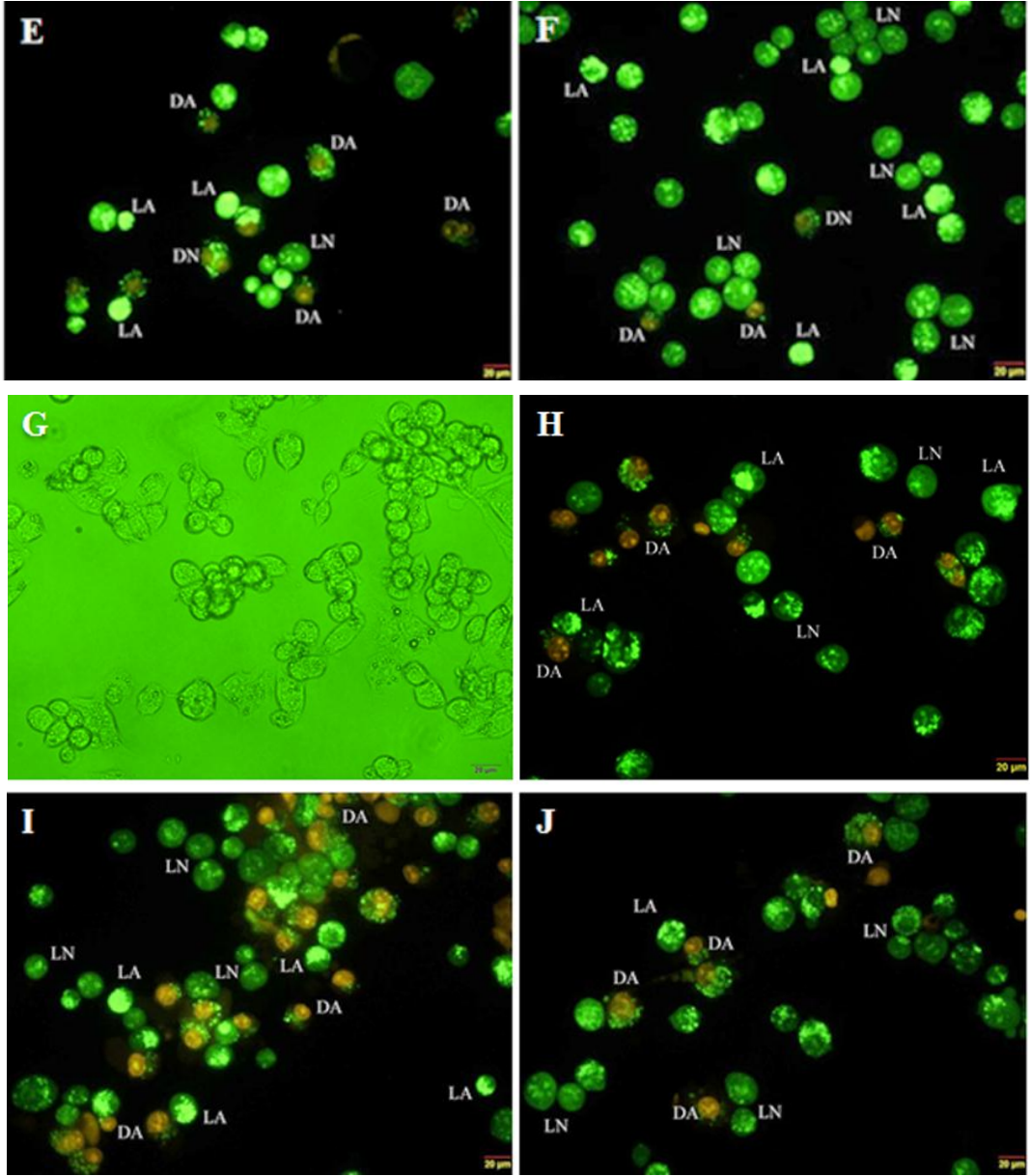
Şekil 3.3. (Devam) Kekik uçucu yağı (A) ve karvakrolün (B) BrdU yöntemiyle DNA sentezine etkisi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,001$.

Görüldüğü gibi her iki madde doz artışına bağlı olarak kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede DNA sentezinde azalmaya neden olmuştur. Kekik uçucu yağı ile muamele edilmiş hücreler %0.004 dozundan itibaren azalmaya başlamış, %0.006 dozuna kadar bir artış göstermiş ve sonra %0.007 dozundan itibaren önemli derecede DNA sentezi inhibisyonu gerçekleşmiştir (Şekil 3.3A). Karvakrol ile muamele edilmiş hücrelerde ise 50 µM dozundan 200 µM dozuna kadar artış göstermiş, 300 µM dozuna kadar sabit olarak devam etmiş ve 400 µM dozundan itibaren önemli derecede DNA sentezi azalmış ve 600 µM dozundan itibaren bazal seviyeye inmiştir (Şekil 3.3B).

3.5. KEKİK UÇUCU YAĞI İLE MUAMELE EDİLMİŞ HÜCRELERDE APOPTOTİK MORFOLOJİ

Kekik uçucu yağı ile muamele edilmiş hücreler ilk olarak ters-faz mikroskop altında incelenmiştir (Şekil 3.4A, C ve G) Apoptotik morfoloji AO/EB boyama yöntemiyle flüoresan mikroskop altında incelenmiştir. Hücre canlılık testlerinin sonuçlarına göre belirlenen IC50 ve altındaki doz hücrelerde olası apoptotik morfolojiyi araştırmak için kullanılmıştır. Kekik uçucu yağının %0.008 ve %0.009 (v/v) dozları ile 48 saat muamele edilen hücreler materyal ve yöntemde anlatıldığı gibi AO/EB ile boyanmış ve fotoğraflanmıştır (Şekil 3.4B, D, E, F, H, I ve J). Erken apoptotik canlı hücreler yoğunlaşmış veya fragmente olmuş kromatine sahip parlak yeşil renkte (LA) görülmektedir. Geç apoptotik ölü hücreler yoğunlaşmış kromatine sahip parlak turuncu veya kırmızı renktedir (DA). Normal çekirdeğe sahip olan nekrotik veya ölü hücreler parlak turuncu renkte (DN) olmaktadır. Normal koşullar altındaki hücreler kromatini homojen olarak dağılmış ve homojen yeşil renge sahip hücrelerdir (LN).

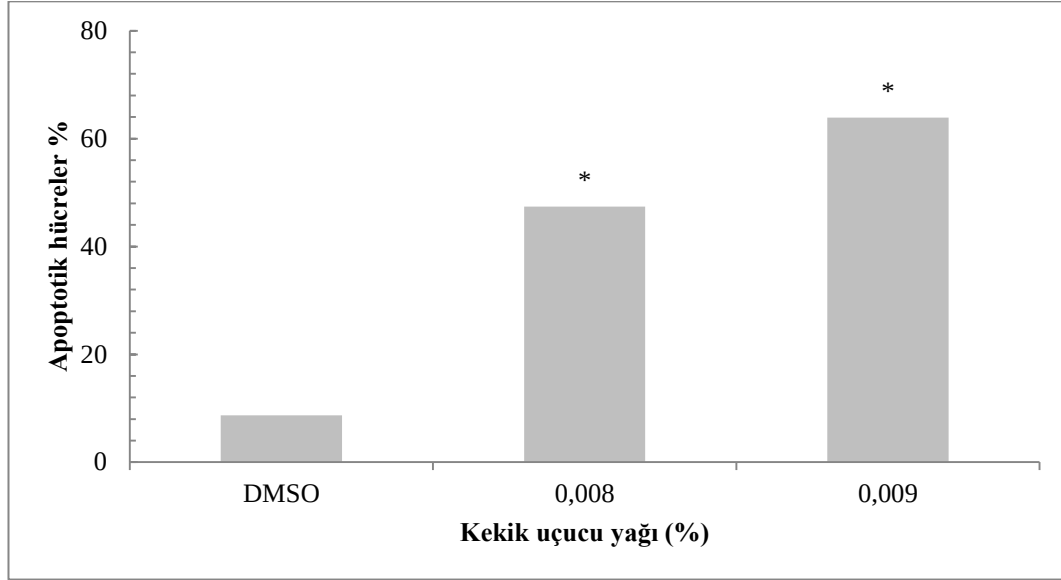




Şekil 3.4. Kekik uçucu yağı ile muamele edilmiş HepG2 hücrelerinin morfolojisi. (A) DMSO muamele edilmiş kontrol hücrelerin ters-faz ve (B) AO/EB boyama ile flüoresan mikroskop görüntüsü. (C) % 0.008 kekik yağı ile muamele edilmiş hücrelerin ters-faz ve (D, E, F) % AO/EB boyama ile flüoresan mikroskoptaki görüntüsü. (G) % 0.009 kekik yağı ile muamele edilmiş hücrelerin ters-faz ve (H, I, J) AO/EB boyama ile flüoresan mikroskoptaki görüntüsü. Büyütme çizgisi: 20 µM.

Duke (2004) yöntemine göre apoptotik indeks şu şekilde formüle edilmiştir: Apoptotik hücre yüzdesi = $\frac{LA + DA}{LN + LA + DN + DA} \times 100$. Apoptotik indeks ortalama 1500 hücre ile iki deneyin ortalaması alınarak ortaya

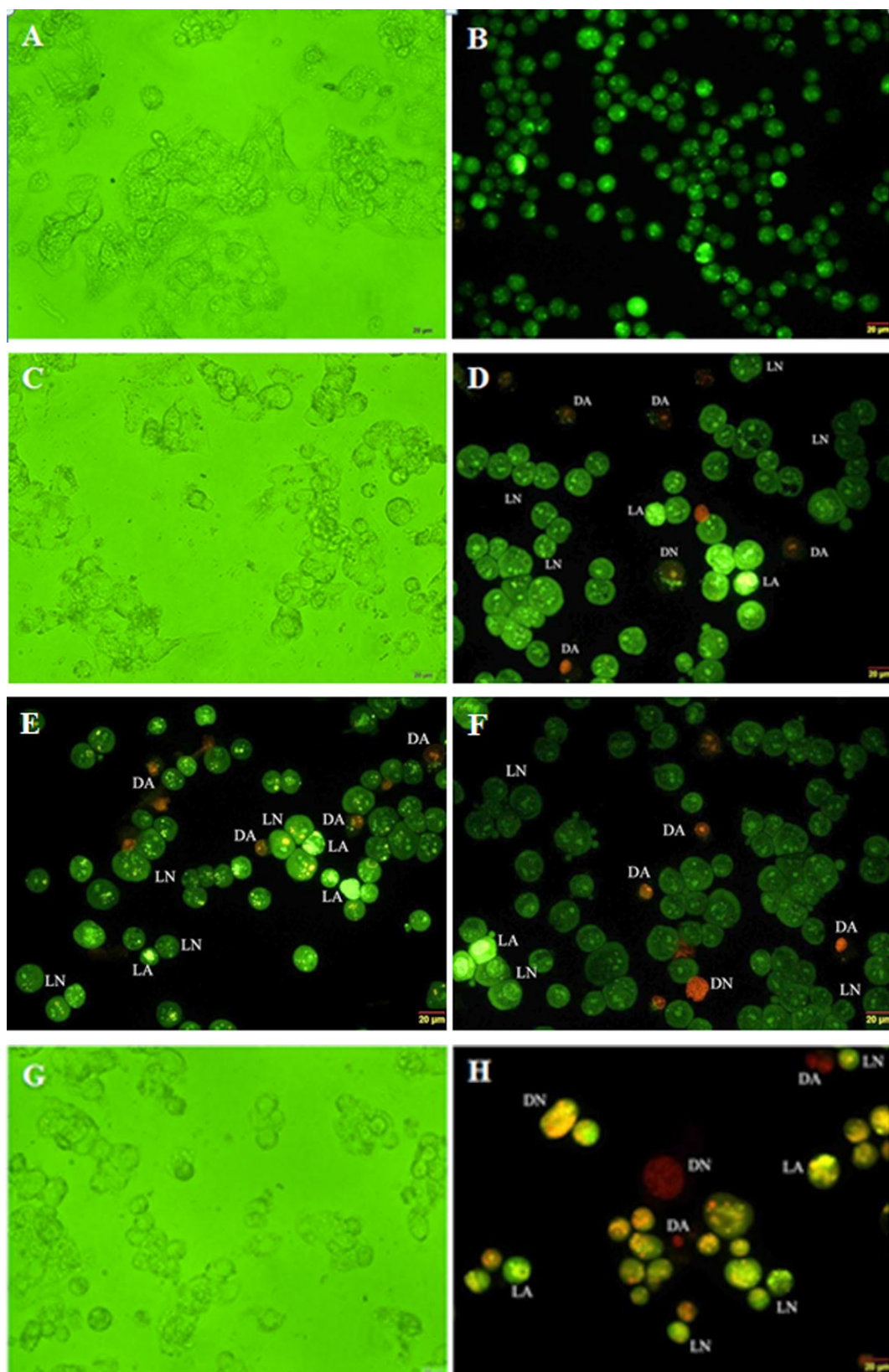
konulmuştur. Buna göre; % 0.008 dozunda % 47 oranında, % 0.009 dozunda % 65 oranında apoptotik morfoloji sahip hücre tespit edilmiştir (Şekil 3.5).

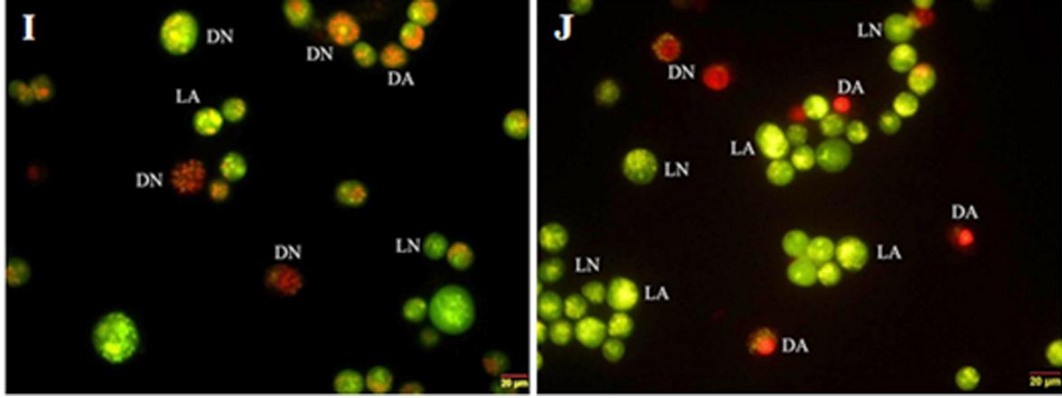


Şekil 3.5. Kekik uçucu yağı ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde AO/EB boyama yöntemine göre çıkarılan apoptotik indeks.

3.6. KARVAKROL İLE MUAMELE EDİLMİŞ HÜCRELERDE APOPTOTİK MORFOLOJİ

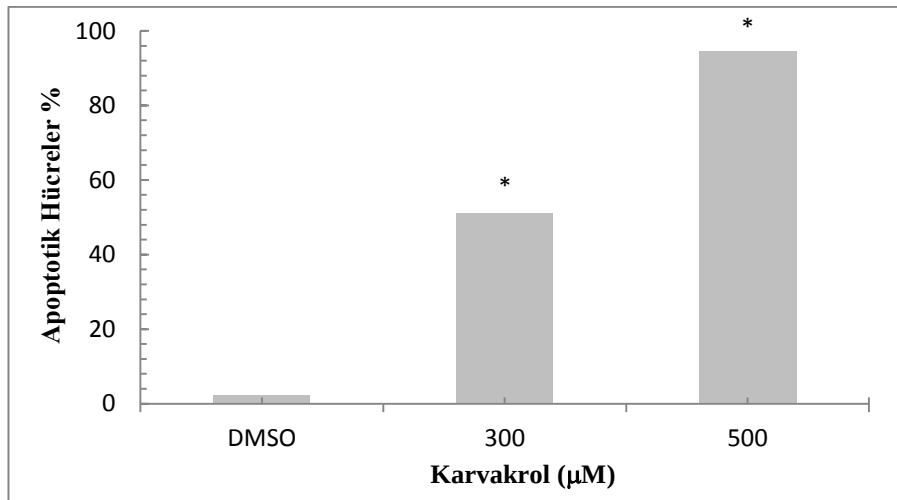
Karvakrol ile muamele edilen hücrelerin inverted mikroskop altındaki görüntüleri Şekil 3.6A, C, ve G’de verilmiştir. AO/EB boyama yöntemiyle belirlenen apoptotik morfoloji flüoresan mikroskop altında incelenmiş ve fotoğraflanmıştır (Şekil 3.6B, D, E, F, H, I ve J). Hücreler 48 saat inkübe edildikten sonra karvakrolün 300 ve 500 μ M dozlarıyla muamele edilmiştir. Erken apoptotik canlı hücreler yoğunlaşmış veya fragmente olmuş kromatine sahip parlak yeşil renkte (LA) görülmektedir. Geç apoptotik ölü hücreler yoğunlaşmış kromatine sahip parlak turuncu veya kırmızı renktedir (DA). Normal çekirdeğe sahip olan nekrotik veya ölü hücreler parlak turuncu renkte (DN) olmaktadır. Normal koşullar altındaki hücreler kromatini homojen olarak dağılmış ve homojen yeşil renge sahip hücrelerdir (LN).





Şekil 3.6. Karvakrol ile muamele edilmiş HepG2 hücrelerinde AO/EB yöntemine göre belirlenen apoptotik morfolojinin görüntülenmesi. (A) DMSO kontrolün ters-faz ve (B) AO/EB ile boyanmış flüoresan mikroskoptaki görüntüsü. (C) 300 µM karvakrol ile muamele edilmiş hücrelerin ters-faz ve (D, E, F) AO/EB boyama ile flüoresan mikroskoptaki görüntüsü. (G) 500 µM karvakrol ile muamele edilmiş hücrelerin ters-faz ve (H, I, J) AO/EB boyama ile flüoresan mikroskoptaki görüntüsü. Büyütme çizgisi: 20 µM.

Duke (2004) yöntemine göre apoptotik indeks şu şekilde formüle edilmiştir: $\text{Apoptotik hücre yüzdesi} = \frac{\text{LA} + \text{DA}}{\text{LN} + \text{LA} + \text{DN} + \text{DA}} \times 100$. Apoptotik indeks ortalama 1500 hücre ile iki deneyin ortalaması alınarak ortaya konulmuştur. Buna formüle göre; karvakrolün 300 µM dozunda % 50 oranında, 500 µM dozunda % 95 oranında apoptotik morfolojiye sahip hücre tespit edilmiştir (Şekil 3.7).

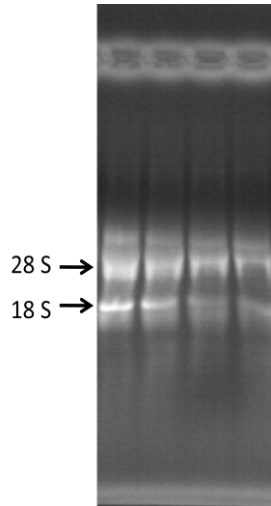


Şekil 3.7. Karvakrol ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde AO/EB boyama yöntemine göre çıkarılan apoptotik indeks.

3.7. HEPATOTOKSİSİTE YOLAĞINDAKİ GENLERİN İFADE ANALİZİ SONUÇLARI

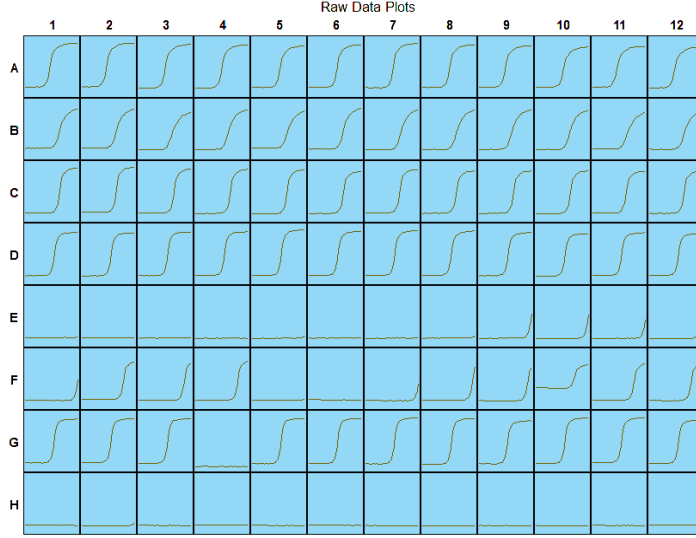
3.7.1. mRNA'ların Kalite Kontrolü

Hücre canlılık testlerinin ve morfolojik deneylerin sonuçları değerlendirilmiş ve IC50 değerinin altındaki bir doz seçilerek karvakrolun hepatotoksisite yolağındaki genlerin ifadesi üzerine etkisini araştırmak için kullanılmıştır. Bunun için materyal yöntemde anlatıldığı gibi 300 µM karvakrol ile 24 saat inkübe edilen hücrelerden RNA izole edilmiştir. Deneye devam edilmeden önce RNA'nın miktarı spektrofotometrik olarak bulunmuştur. Daha sonra RNA örneklerinin saflığı üç farklı yöntemle test edilmiştir. Birinci yöntem spektrofotometrik olarak RNA'ların 260/280 nm absorbans oranının belirlenmesidir. Buna göre oranların 1.9-2.1 arasında olmasına dikkat edilmiştir. İkinci yöntem agaroz jel elektroforezinde gözlenen ribozomal RNA'ların oranına bakılmıştır. Şekil 3.8'de görüldüğü gibi agaroz jel elektroforezinde 28S ribozomal RNA'nın yaklaşık 18 S ribozomal RNA'dan iki kat olduğu örnekler ile array deneylerine devam edilmiştir.



Şekil 3.8. Toplam RNA'nın formaldehit agaroz jel elektroforezi ile elde edilen bandların görüntüsü.

Üçüncü yöntem olarak RNA örneklerinin saflığı ve kalitesi RT² RNA QC PZR array ile test edilmiştir (Şekil 3.9). Şekildeki plakada 5, 6, 7 ve 8 sütunlardaki RNA örnekleri tezde kullanılan örneklerdir. Genellikle RNA izolasyonları başarılı olmuş ve genomik DNA kontaminasyonu olmayan degede olmamış kaliteli toplam RNA örnekleri hazırlanmıştır.



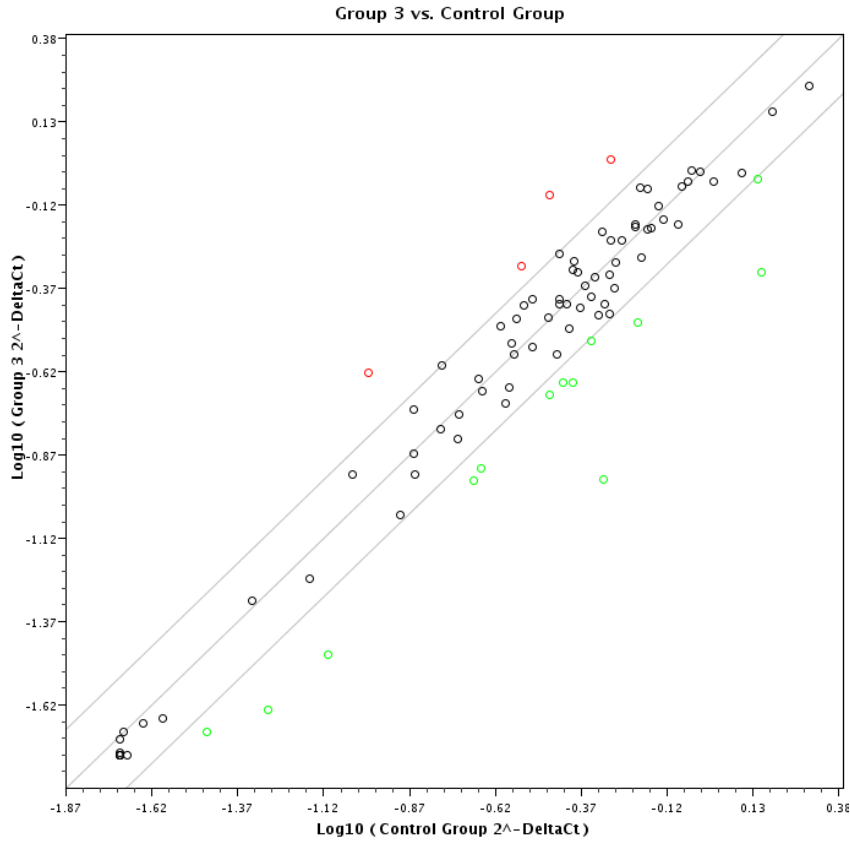
Şekil 3.9. RNA örneklerinin kalitesini kontrol amacıyla yapılan RT² RNA QC PZR array reaksiyonlarının plakada gösterilmesi.

Şekil 3.9’da görüldüğü gibi A ve B sırasında house keeping genler (HK1 ve HK2) beklenildiği gibi reaksiyon eğrisi vermiştir. C sırası reverz transkripsiyon kontrolü (RTC) olup beklenildiği gibi reaksiyon vermiştir. Burada cDNA sentezinin etkinliğini kontrol edilir. Kitin sağladığı eksternal RNA kontrolünden kalıpları tespit edecek primerler bu görevi üstlenmektedir. D sırası pozitif PZR kontrolü (PPC) olup istenilen reaksiyonlar gerçekleşmiştir. E sırası insan genomik DNA kontaminasyonu kontrol (GDC) etmek amacıyla oluşturulmuş olup beklenildiği gibi örneklerin hiçbirisinde reaksiyon olmamıştır. F sırası ise reverz transkripsiyon yokluğunun kontrolü (NRC) olup genel genomik DNA kontaminasyonunu RNA örneklerinden direk olarak bir house keeping geni çoğaltarak tespit etmektedir. F sırasında beklenildiği gibi örneklerin hiçbirisinde reaksiyon olmamıştır. G sırası kullanılan örneklerle ilgili bir kalıp olmadan Yapay DNA sekansların bulunduğu PZR kontrolüdür (PPC). Yapay DNA sekansları ve

onları tespit etmek için hazırlanmış primerler kullanılarak PZR reaksiyonu inhibitörlerini tespit etmektedir. Beklenildiği gibi burada da reaksiyon olmamıştır. Son olarak H sırası ise kalıp DNA yokluğunun kontrolü (NTC) olup su kontrolü de denilmektedir. Plakanın hazırlanması sırasında meydana gelebilecek genel DNA kontaminasyonunu ölçmektedir. Beklenildiği gibi burada da reaksiyon gözlenmemiştir. Tüm bu analizler bittikten sonra RT-PZR array çalışmalarına devam edilmiştir.

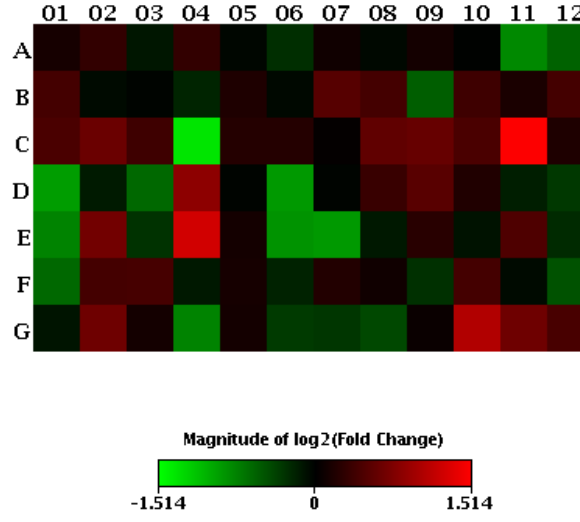
3.7.2. Kekik Uçucu Yağının Hepatotoksisite RT-PZR Array Analizi

Kekik uçucu yağının HepG2 hücrelerinde, hepatotoksisite yolağındaki 84 genin ifadesine etkisi RT-PZR array yöntemi ile araştırılmıştır. Kontrol ve kekik yağı muamele edilmiş hücrelerden elde edilen aynı RNA örneğinden ikişer kez olmak üzere yapılan dört RT-PZR arrayi yapılmıştır. Şekil 3.10'da yapılan arrayin sonuçları 1.5 kat değişimler göz önüne alınarak scatter blot olarak verilmektedir. Grafikten görüldüğü gibi 4 adet gen (*GCLC*, *HYOU1*, *MAOB*, *TXNRD1*) ifadesi yüksek seviyede artmış (kırmızı renkli olanlar) ve 13 adet genin (*BHMT*, *DNAJB11*, *FABP1*, *HAO2*, *HPN*, *IGFALS*, *LGR5*, *MBL2*, *MCM10*, *OSTalpha*, *SERPINA3*, *SLC2A3*, *THRSP*) ifadesi azalmıştır. Kalan 67 adet genin ifadesinde önemli bir değişiklik olmamıştır.



Şekil 3.10. Kekik uçucu yağının HepG2 hücrelerinde gen ifadesi üzerine etkisi. RT² PZR array insan hepatotoksisite sonuçları 1.5 kat değişim baz alınarak scatter blot (yayma noktaları) grafiği ile gösterilmektedir. Her bir nokta aynı RNA örneğinden kontrol ve deney olmak üzere dört RT-PZR arrayi sonuçlarının ortalama değeridir.

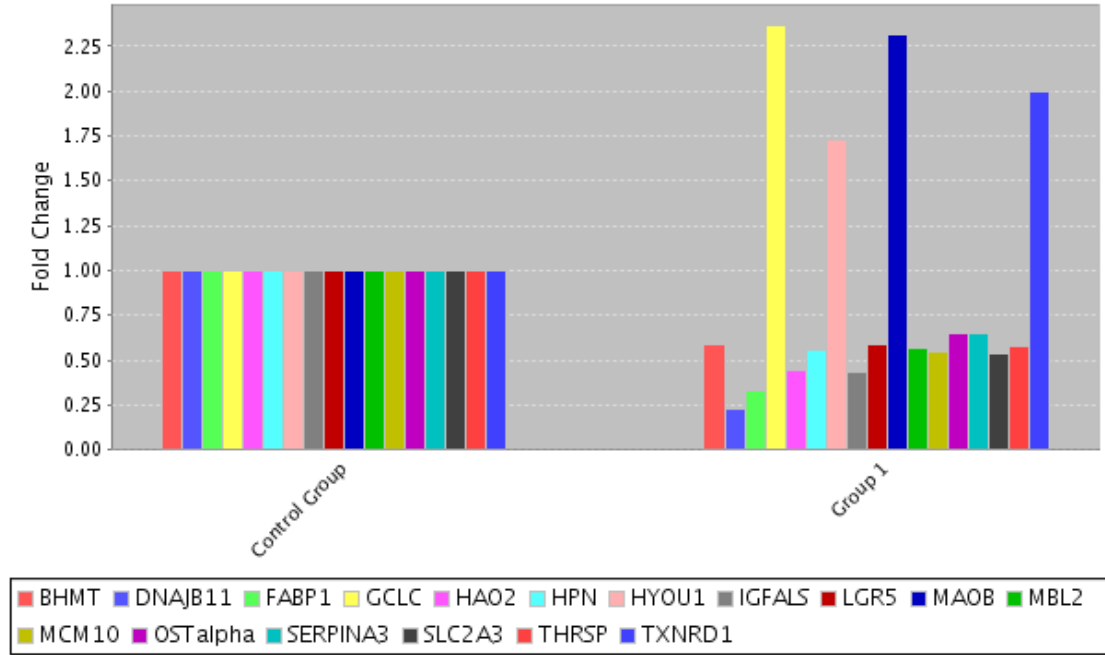
Hepatotoksisite array plakasındaki genlerin ifade seviyesindeki farklılıklar aynı zamanda RT-PZR array plakasındaki yerleşimlerine göre ısı haritası (heat map) ve onun altında gen isimleri ile sayısal değerleri Şekil 3.11’de gösterilmiştir. Fold change olarak belirtilen **“katlanma değişikliği”** arttıkça kırmızı rengin, azaldıkça yeşil rengin tonlarına dönüşerek genlerin ifade seviyelerindeki değişiklikler gösterilmektedir. Buna göre katlanma değişikliği 1.50’in üzerinde olan 8 adet gen (*FXC1*, *GCLC*, *HYOU1*, *LPL*, *SKIL*, *TXNRD1*, *MAOB*, *WIP1*), 1.00–1.50 arasında 36 adet gen bulunmaktadır. Kalan 40 adet genin katlanma değişikliği sayısal değer olarak -1.00’in altındadır.



Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ABCB1 1.10	ABCB11 1.23	ABCB4 -1.10	ABCC2 1.23	ABCC3 -1.03	ALDOA -1.20	APEX1 1.06	ASAH1 -1.03	ATP8B1 1.09	AVPR1A -1.01	BHMT -1.77	BTG2 -1.50
B	CA3 1.32	CASP3 -1.04	CCNG1 -1.01	CD36 -1.16	CD68 1.13	CDC14B -1.03	CDKN1A 1.42	COL4A1 1.33	CRYL1 -1.47	CXCL12 1.29	CYP1A2 1.11	DDIT4L 1.33
C	DDX39 1.35	DNAJB11 1.54	DNAJC3 1.29	FABP1 -2.57	FADS1 1.16	FAM158A 1.16	FASN 1.01	FMO1 1.49	FXC1 1.52	GADD45A 1.36	GCLC 2.86	GSR 1.13
D	HAO2 -1.91	HMOX1 -1.11	HPN -1.53	HYOU1 1.80	ICAM1 -1.02	IGFALS -1.89	IL6ST -1.02	IPO4 1.26	KIAA1370 1.44	KRT18 1.14	KRT8 -1.13	L2HGDH -1.26
E	LGR5 -1.72	LPL 1.61	LSS -1.23	MAOB 2.37	MAP3K6 1.09	MBL2 -1.83	MCM10 -1.88	MLXIPL -1.11	MRPS18B 1.18	NQO1 -1.08	NUS1 1.38	OSMR -1.19
F	OSTalpha -1.54	PDYN 1.33	PLA2G12A 1.33	PPARA -1.10	PSME3 1.09	PYGL -1.15	RB1 1.15	RDX 1.06	RHBG -1.22	S100A8 1.33	SCD -1.04	SERPINA3 -1.40
G	SERPINE1 -1.08	SKIL 1.57	SLC17A3 1.09	SLC2A3 -1.72	SLC39A6 1.09	SREBF1 -1.27	TAGLN -1.25	THRSP -1.35	TMEM2 1.04	TXNRD1 2.08	WIP1 1.57	YRDC 1.35

Şekil 3.11. Kekik yağı ile muamele edilmiş HepG2 hücrelerinde gen ifadesinin insan hepatotoksisite RT² PZR array sonuçlarının ısı haritası, gen isimleri ve gen ifade seviyesindeki katlanmanın sayısal değerleri.

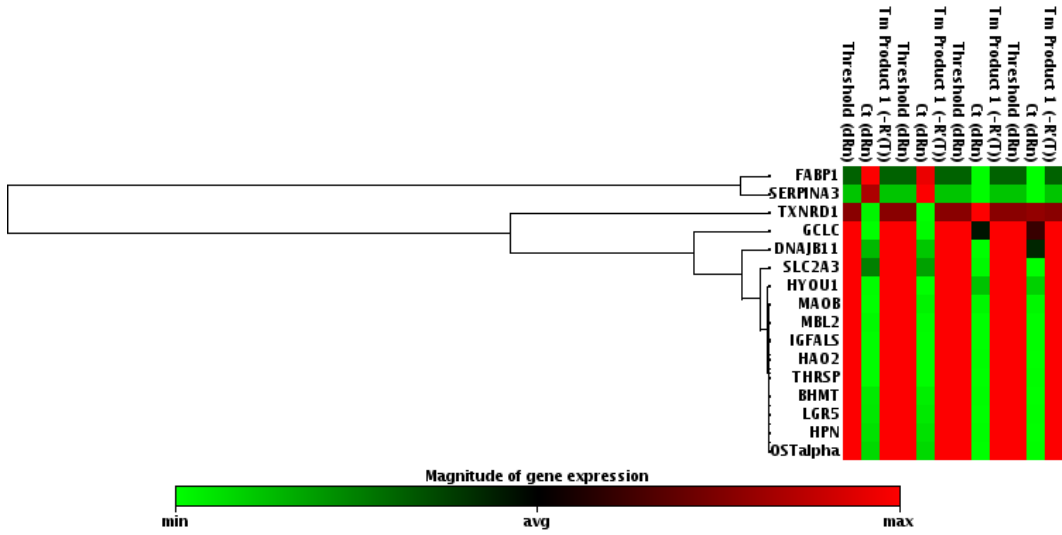
Yukarıda verilen aynı sonuçlardan yalnızca ifade seviyesi 1.5 kat ve üzeri değişen genler seçilmiş ve her birinin kontrol değerleri 1 kabul edilerek çoklu sütun grafiğinde gösterilmiştir (Şekil 3.12). Yalnızca ifade seviyesi etkilenen genler daha net bir şekilde görülmektedir.



Şekil 3.12. Kekik uçucu yağı muamelesi sonucu ifade seviyesi 1.5 kat ve üzeri değişen genlerin kontrolleri ile karşılaştırmalı olarak çoklu sütun grafiğinde gösterilmesi.

RT² PZR array sonuçlarında insan hepatotoksisite yolağındaki genler ifade edilme seviyeleri bakımından karşılaştırılmış ve benzerliklerine göre organize edilerek Şekil 3.13’de clustergram diagramı olarak verilmiştir. Bu diagram korelasyon katsayısı benzerliğini ifade etmek için kullanılmaktadır. Deneyler arasındaki gen ifadesindeki değişimler, gen ifadesi benzerliklerindeki öneme göre kırmızıya ve yeşile doğru değişen renk skalası olarak gösterilmiştir. Renk skalasının en sol uzaktaki yeşil renk minimal değere karşılık gelmektedir. En sağ uzaktaki kırmızı renk maksimum değeri, siyah renk ise averaj (ortalama) değeri göstermektedir. Şekil 3.13’de görülen diagram averaj yöntemine göre yapılmıştır. Gen ifade seviyesindeki 1.5 kat değişim baz alınarak çıkarılan diagrama göre *FABP1* ve *SERPINA2* gen ifade seviyelerinin kontrollerde benzer olduğu, kekik uçucu yağı ile muamelesi sonucunda azalan gen ifade seviyesi ile minimal

düzeyde benzerlik gösterdiği görülmektedir. Bunun yanı sıra iki genin ifade seviyesi maksimum benzerlik düzeyine göre birbirine benzer olarak görülmektedir. *TXNRD1* ve *GCLC* genlerinin artan ifade seviyesinin yanı sıra iki deney arasındaki benzerliklerinin kısmende olsa farklı olduğu görülmektedir. *DNAJB11* geninin azalan ifade seviyesindeki benzerlik iki deney arasında farklılık göstermektedir. Kalan 11 adet genin ifade seviyelerindeki benzerlik deneylerle paralellik göstermektedir ve minimal benzerlik düzeyinde birbirine benzer olarak görülmektedir. Gen ifadelerindeki benzerliklerin ortaya konulması genlerin görev aldığı yolların belirlenmesi açısından önem taşımaktadır.

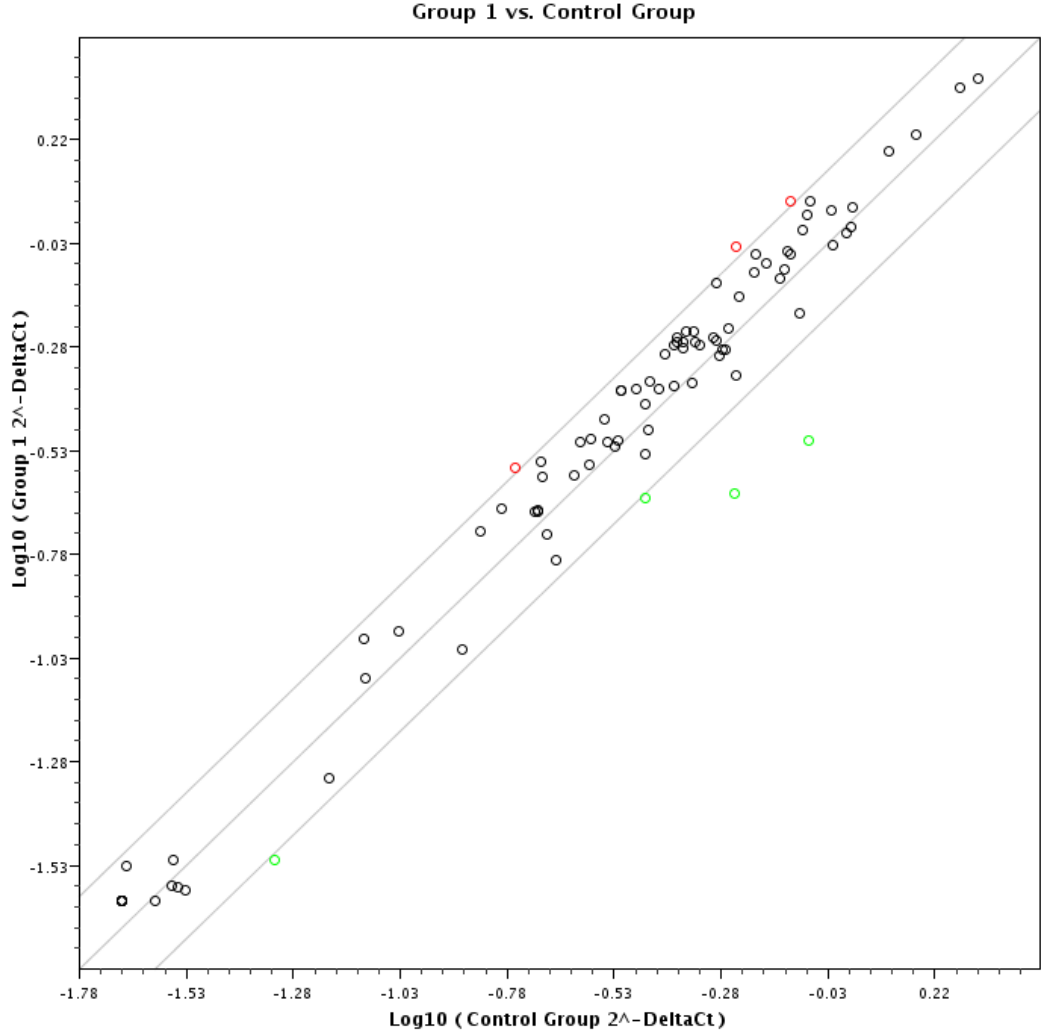


Şekil 3.13. Kekik yağı ile muamelesiyle elde edilen insan hepatotoksisite RT² PZR array sonuçlarına göre gen ifade seviyesindeki benzerliklerin clustergram diagramı ile gösterilmesi.

3.7.3 Karvakrolün Hepatotoksisite Yolağındaki Genlerin İfadesine Etkisi

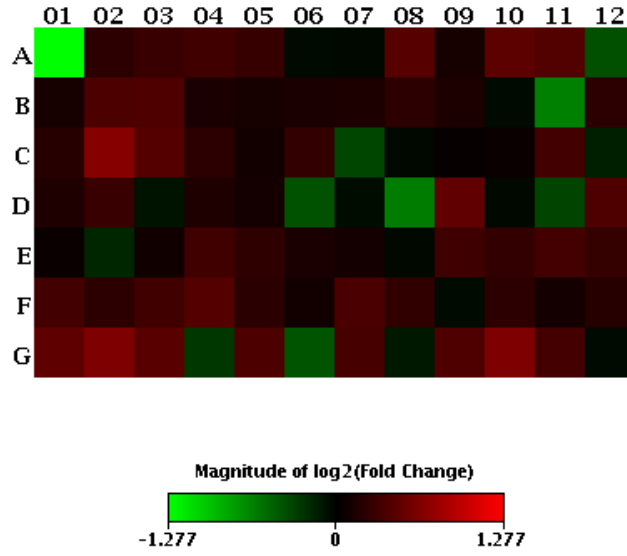
HepG2 hücrelerinde hepatotoksisite yolağındaki 84 genin ifadesine karvakrolün etkisi RT-PZR array yöntemi ile araştırılmıştır. Kontrol ve karvakrol ile muamele edilmiş hücrelerden elde edilen iki farklı RNA örneğinden üçer kez olmak üzere yapılan altı RT-PZR arrayi yapılmıştır. Şekil 3.14 scatter blot grafiği 1.5 kat değişimler göz önüne alınarak yapılmıştır. Grafiğe göre 3 adet gen (*DNAJB11*, *SKIL*, *TXNRD1*) ifade seviyesi artmış (kırmızı renkli olanlar) ve 4

adet genin (*ABCB1*, *CYP1A2*, *IPO4*, *RLP13A*) ifadesi azalmıştır. Kalan 77 adet genin ifadesinde önemli bir değişiklik olmamıştır.



Şekil 3.14. Karvakrolün HepG2 hücrelerinde gen ifadesi üzerine etkisinin 1.5 kat değişim baz alınarak scatter blot (yayma noktaları) grafiği ile gösterilmesi. Her bir nokta iki farklı RNA örneğinden kontrol ve deney olmak üzere altı RT-PZR arrayi sonuçlarının ortalama değeridir.

İnsan hepatotoksisite array plakasındaki genlerin ifade seviyesindeki farklılıklar aynı zamanda Şekil 3.15’de verildiği gibi plakasındaki yerleşimlerine göre ısı haritası (heat map) ve hemen altında gen isimleri ile sayısal değerleri gösterilmiştir.

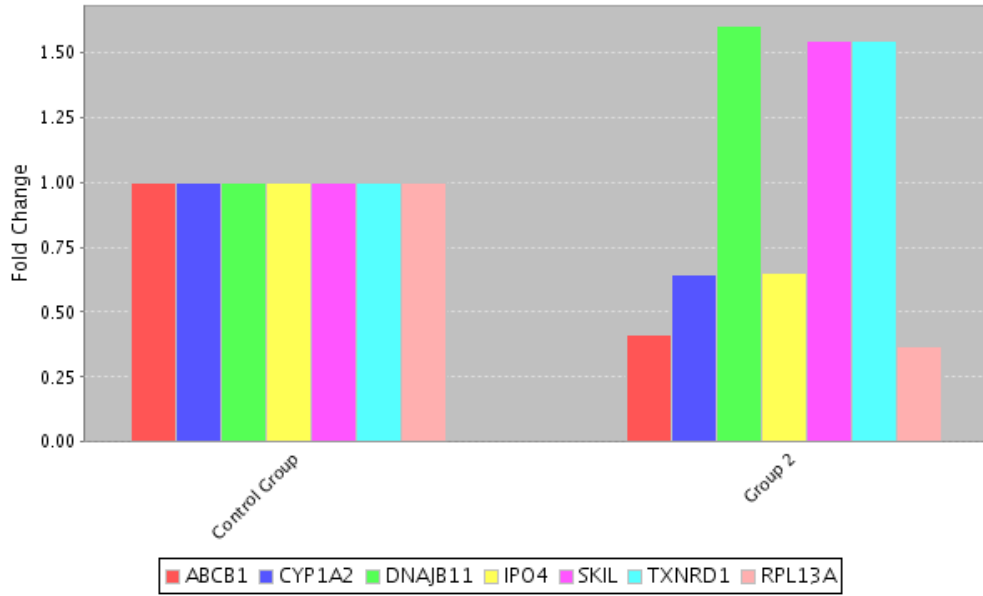


Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ABCB1 -2.42	ABCB11 1.16	ABCB4 1.21	ABCC2 1.25	ABCC3 1.21	ALDOA -1.04	APEX1 -1.03	ASAH1 1.35	ATP8B1 1.08	AVPR1A 1.38	BHMT 1.33	BTG2 -1.32
B	CA3 1.08	CASP3 1.30	CCNG1 1.31	CD36 1.09	CD68 1.08	CDC14B 1.09	CDKN1A 1.10	COL4A1 1.16	CRYL1 1.10	CXCL12 -1.03	CYP1A2 -1.55	DDIT4L 1.16
C	DDX39 1.14	DNAJB11 1.60	DNAJC3 1.34	FABP1 1.17	FADS1 1.06	FAM158A 1.19	FASN -1.27	FMO1 -1.03	FXC1 1.02	GADD45A 1.03	GCLC 1.26	GSR -1.11
D	HAO2 1.11	HMOX1 1.22	HPN -1.07	HYOU1 1.11	ICAM1 1.07	IGFALS -1.33	IL6ST -1.04	IPO4 -1.53	KIAA1370 1.39	KRT18 -1.03	KRT8 -1.26	L2HGDH 1.31
E	LGR5 1.04	LPL -1.14	LSS 1.06	MAOB 1.25	MAP3K6 1.17	MBL2 1.09	MCM10 1.07	MLXIPL -1.03	MRPS18B 1.24	NQO1 1.19	NUS1 1.27	OSMR 1.20
F	OSTalp ha 1.26	PDYN 1.16	PLA2G12A 1.25	PPARA 1.34	PSME3 1.15	PYGL 1.06	RB1 1.29	RDX 1.18	RHBG -1.03	S100A8 1.16	SCD 1.07	SERPINA3 1.14
G	SERPINE1 1.39	SKIL 1.55	SLC17A3 1.36	SLC2A3 -1.20	SLC39A6 1.30	SREBF1 -1.33	TAGLN 1.27	THRSP -1.09	TMEM2 1.31	TXNRD1 1.55	WIP1 1.26	YRDC -1.04

Şekil 3.15. Karvakrol ile muamele edilmiş HepG2 hücrelerinde gen ifadesinin insan hepatotoksisite RT² PZR array sonuçlarının ısı haritası, gen isimleri ve gen ifade seviyesindeki katlanmanın sayısal değerleri.

Katlanma değışikliği arttıkça kırmızı rengin, azaldıkça yeşil rengin tonlarına dönüşerek genlerin ifade seviyelerindeki değışikler görölmektedir. Buna göre katlanma değışikliği 1.50'in üzerinde olan 3 adet gen (*DNAJB11*, *SKIL*, *TXNRD1*), 1.00–1.50 arasında 20 adet gen bulunmaktadır. Kalan 61 adet genin katlanma değışikliği sayısal değeri olarak -1.00'in altındadır.

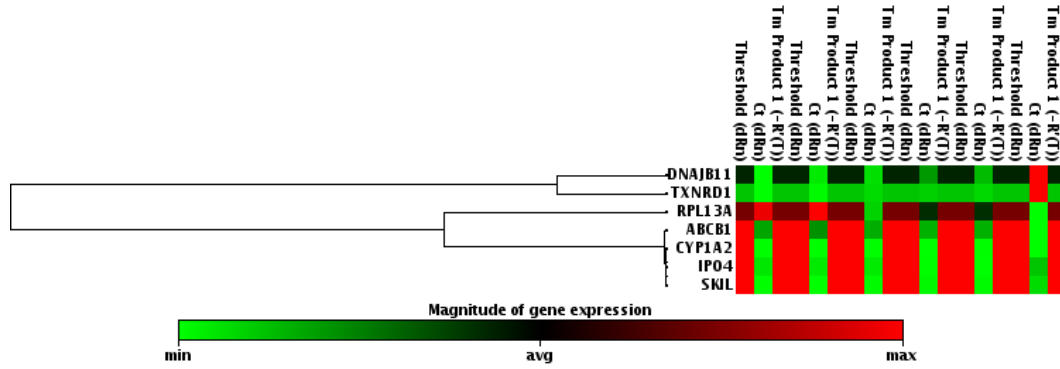
Yayma noktaları ve ısı haritası ile verilen sonuçların yalnızca ifade seviyesi 1.5 kat ve üzeri değışen genler seçilerek çoklu sütun grafiğinde verilmiştir (Şekil.3.16). Kontrol değeri 1 kabul edilerek kontrole göre gen ifade seviyesindeki değışimler gösterilmiştir. Yalnızca ifade seviyesi etkilenen genler daha net bir şekilde görölmektedir.



Şekil 3.16. Karvakrol ile HepG2 hücrelerinin muamelesi sonucu ifade seviyesi 1.5 kat ve üzeri değışen genlerin kontrolleri ile karşılaştırmalı olarak çoklu sütun grafiğinde gösterilmesi.

Karvakrol ile HepG2 hücrelerinin muamelesi sonucunda elde edilen insan hepatotoksisite yolağındaki genlerin ifade edilme seviyeleri karşılaştırılmış ve benzer ifade seviyesindeki genler ortalama yöntemine göre clustergram diagramı olarak verilmiştir (Şekil 3.17). Deneyler arasındaki gen ifadesindeki değışikler, gen ifadesi benzerliklerindeki öneme göre kırmızıya ve yeşile doğru değışen renk skalası olarak gösterilmiştir. Gen ifade seviyesindeki 1.5 kat değışim baz alınarak çıkarılan diagrama göre *DNAJB11* ve *TXNRD1* genlerinin ifade seviyeleri hem

birbirleriyle hem de deneyler arasında maksimum benzerlik düzeyinde benzer olduğu görülmektedir. *RPL1A3* geninin ifade seviyesi deneyler arasında farklılık göstermekte ve diğer genlerle ortak bir benzerliği diagrama göre bulunmamaktadır. Diğer dört genin ifade seviyeleri arasında önemli bir benzerlik farkı görülmemektedir.



Şekil 3.17. Karvakrol ile yapılan insan hepatotoksosite RT² PZR array sonuçlarına göre gen ifade seviyesindeki benzerliklerin clustergram diagramı ile gösterilmesi.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde HCC önemli bir sorun olarak artan bir hızla devam etmektedir (Lachenmayer ve ark. 2010; Bishayee ve ark. 2010; Aravalli ve ark. 2008; Okuda 2007). Mevcut tedavi yöntemlerinin etkinliği hala tartışılmakta ve geliştirilmeye çalışılmaktadır. Buna bağlı olarak da alternatif tedavi seçeneği olarak görülen tıbbi aromatik bitkiler tercih edilmektedir. Nitekim HCC’de kemoterapötik ilaçların etkinliğinin çok fazla olmadığı ve ayrıca bu ilaçların hepatotoksisiteye neden olarak hastalığı iyiden iyiye kötüleştirdiği ileri sürülmektedir (Xua ve ark. 2004; King ve Perry 2001; Thomas ve ark. 2005; Horii ve Yamada 2007; Russmann ve ark. 2009). Bitkisel ilaçlar ve karaciğer arasındaki etkileşimin ortaya konulmasıyla bitkisel tıpta önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Tıpta kullanılan ve pirolizin içeren bitkiler ve Kava gibi bitkilerden hazırlanan ilaçların kullanılması hepatotoksisiteyi uyarmaktadır (Larrey 1997; Teschke ve ark. 2011). Piyasada bulunan bitkisel kaynaklı Herbalife® ürünlerinin bazılarının hepatotoksik olduğu rapor edilmiştir (Stickel 2007). Bu bilgiler ışığında bitkilerin ve bitkisel türevli ürünlerin veya ilaçların dikkatli bir şekilde kullanılması ve araştırılması gerekmektedir. Bu nedenle, bu çalışma da kekik uçucu yağının ve ana bileşeni olan karvakrolün hepatoselüler karsinoma hücreleri olan HepG2 hücrelerinde antikanser etkisini *in vitro* koşullarda araştırıp ve ayrıca hepatotoksik etkiye sahip olup olmadıklarını moleküler düzeyde ortaya koymayı amaçladık. Kekik uçucu yağı ve karvakrolün antikanser etkisinin farklı hücre tiplerinde moleküler düzeyde araştırılması bir başka proje kapsamında sürdürülmektedir.

4.1. KEKİK UÇUCU YAĞININ HepG2 HÜCRELERİNİN CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ

Kekik uçucu yağının farklı dozlarına Materyal ve Yöntemde belirtildiği gibi maruz bırakılan HepG2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi WST-1, NR alımı ve tripan mavisi boyaması yöntemleriyle araştırılmış ve IC50 değeri belirlenerek karşılaştırılmıştır.

Sitotoksikite testlerinden nötral kırmızısı alımı kolorimetrik bir yöntemdir. Supravital boya NR canlı hücrelerin lizozomlarında birikmektedir. Katyonik olan

NR iyonik olmayan difüzyon yoluyla hücre zarından geçer ve lizozomal sitoplazmadaki anyonik kısımlara bağlanır. Hücre yüzeyinde veya lizozomal zarda bir hasar olduğunda NR boyasının alımı ve bağlanması azalmaktadır. Yani ölü ya da hasarlı hücreler NR boyasına bağlanamamaktadır (Chiba ve ark. 1998; Jones ve ark. 1999; Babich ve Borenfreund 1991; Valentin ve ark. 2001). NR alımı yönteminin tetrazolyum temelli bir diğer test olan MTT'ye oranla çok daha duyarlı bir yöntem olduğu ileri sürülmektedir (Jones ve ark. 1999; Babich ve Borenfreund 1991; Valentin ve ark. 2001).

NR alımı materyal ve yöntemde anlatıldığı gibi uygulanarak kekik uçucu yağının çeşitli dozlarına 24, 48 ve 72 saat sürelerle maruz bırakılan hücrelerde canlılık oranı tespit edilmiştir. Buna göre kekik uçucu yağının hücreler için IC50 değeri 24 saat inkübasyon sonunda % 0.009 ve 48 ile 72 saat sonunda ise yine % 0.009 dozuna yakın bir değerde bulunmuştur. 48 ve 72 saatlerde yağ etkinliğinin zamana bağlı olarak çok az da olsa arttığı ve % 0.01 dozunda canlılığın bazal seviyeye indiği görülmektedir.

HepG2 hücrelerinde kekik uçucu yağının sitotoksik ya da canlılığı üzerine etkisinin belirlendiği bir diğer test WST-1'dir. Mitokondriyal dehidrojenazlardan olan redüktazlar tarafından kromojenik formazan içinde tetrazolyum tuzunun yıkılması temeline dayanır. İndirgenmiş olan WST-1 tuzunun suda çözünebilir olması, diğer tetrazolyum tuzu (Mossmann 1983) yöntemlerine göre onu daha güvenilir hale getirmektedir (Tan ve Berridge 1999; Weir ve ark. 2011). Materyal ve Yöntemde anlatıldığı gibi hücrelerin yağ ile 24 saat muamelesi sonunda uygulanan WST-1 testi ile IC50 değeri % 0.01 civarında bulunmuştur. Hücrelerin 48 ve 72 saat yağ ile inkübasyonu sonunda ise IC50 değerinin daha düşük doz olan % 0.009 civarında olduğu görülmektedir. Ancak 72 saat sonunda hücre sayısının oldukça arttığı düşünüldüğünde yağın etkinliğinin 24 ve 48 saate göre arttığı söylenebilir.

NR alımı ve WST-1 yöntemleri 24 saat için elde edilen sonuçlar dışında oldukça benzer sonuçlar vermiştir. Bu farklılık çok önemli olmamasına rağmen nedeni lizozomal aktivitenin ölçüldüğü NR alımı yönteminde deneyin uygulanışı itibariyle kristal kaybı olasılığı ve buna karşın mitokondriyal aktivitenin ölçüldüğü WST-1 testinde formazan kaybı olasılığı bulunmadığından olabilir. Bu

nedenle de NR alımı ve WST-1 testlerinin sonuçlarının değerlendirilmesi açısından IC50 değeri olması muhtemel % 0.009 ile % 0.01 dozu ve IC50 değerinin altı bir doz olarak % 0.008 belirlenerek tripan mavisi boyaması yapılmıştır. Tripan mavisi süspansiyon haldeki canlı hücrelerin sayısını tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir. Canlı hücreler zar bütünlüğüne sahip olduklarından tripan mavisini hücre içine almaz. Böylece ölü veya zar bütünlüğü bozulmuş olan hücrelerin sitoplazması mavi renkte görünür (Strober 1997; Baskic ve ark. 2006). HepG2 hücrelerinin 24, 48, 72 ve 96 saat kekik uçucu yağının belirlenen dozlarına maruz bırakılmaları sonunda da IC50 değeri benzer şekilde istatistiksel olarak % 0.009 dozu tespit edilmiştir. Ayrıca 96 saatte etkinin devam etmesi maddenin yarılanma ömrünün de uzun olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak NR, WST-1 ve tripan mavisi ile elde edilen bulgulara göre kekik uçucu yağı oldukça düşük dozlarda HepG2 hücreleri üzerinde istatistiksel olarak önemli derecede sitotoksik bir etkiye sahiptir. *Origanum* türlerinden elde edilen birkaç ekstre ve uçucu yağın anti-proliferatif etkisi, göğüs adenokarsinoma hücreleri, lökosit hücreler ve trombositleri de içeren değişik hücre tiplerinde de ortaya koyulmuştur (Chinou ve ark. 2007; Jelmar ve ark. 2009; Massih ve ark. 2010; Al-Kaladeh ve ark. 2010).

4.2. KARVAKROLÜN HepG2 HÜCRELERİNİN CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ

Karvakrolün HepG2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi NR alımı, WST-1 ve tripan mavisi yöntemleriyle araştırılmıştır. Karvakrolün çeşitli dozlarına 24 saat maruz bırakılan HepG2 hücrelerinde, NR alımı 300 µM dozundan itibaren azalmaya başlamış ve istatistiksel olarak IC50 değeri de 500 µM olarak bulunmuştur. 48 saatte 200 µM dozundan hücreler azalmaya başlamış ve 700 µM da önemli ölçüde bazal seviyeye düşmüştür. 72 saat inkübasyon süresinde ise 300 µM dozundan itibaren azalma başlamıştır. 48 ve 72 saatteki IC50 değerleri de önemli ölçüde 500 µM olarak NR alımı yöntemine göre tespit edilmiştir. NR alımı yöntemine göre karvakrol de HepG2 hücreleri üzerinde sitotoksik bir etkiye sahiptir.

WST-1 testine göre karvakrol ile hücrelerin 24 saat muamelesi sonunda 200 μM dozundan itibaren canlılığının azalmaya başlamıştır. 24 saat sonundaki IC50 değeri önemli ölçüde 500 μM dozu olarak görülmektedir. 48 ve 72 saatte 50 μM dozundan itibaren hücreler azalmıştır. 48 ve 72 saatte IC50 değeri de 500 μM dozu olarak görülmüştür. Karvakrolün de zamana bağlı olarak etkisi WST-1 testinde 72 saat inkübasyon süresinde görülmüştür. WST-1 ile NR alımı analizi birbirine paralellik göstererek karvakrol HepG2 hücrelerinde istatistiksel olarak sitotoksik etki göstermiştir. WST-1 ve NR alımı sonuçlarına göre IC50 değeri ve altında bir doz seçilerek sonuçlar tripan mavisi canlılık testi ile de değerlendirilmiştir. Buna göre IC50 değeri tripan mavisi yöntemine göre 24 ve 48 saatte 500 μM , 72 ve 96 saatte 300 μM a daha yakın bir değer olarak bulunmuştur. Diğer canlılık testlerinde IC50 değeri 500 μM olarak görüldüğünden karvakrol için IC50 değeri olarak kabul edilmiştir. 72 ve 96 saatteki böylesi bir değişim zamana bağlı olarak karvakrolün etkisinin arttığını göstermektedir. Ayrıca kekik uçucu yağında olduğu gibi karvakrolünde 96 saat inkübasyon süresinde etkisi devam etmiştir.

Sonuç itibariyle karvakrol de HepG2 hücreleri üzerinde istatistiksel olarak önemli derecede sitotoksik bir etkiye sahiptir. Ayrıca karvakrolün kronik miyeloid lökomi hücreleri, N-transforme fare miyoblast hücreleri, insan akciğer kanser hücreleri, insan göğüs kanser hücreleri ve murin melanoma hücrelerinin büyümesini de engellediği ortaya konulmuştur (He ve ark. 1997; Stamatia ve ark. 1999; Zeytinoglu ve ark. 2003; Karkabounas ve ark. 2006; Lampronti ve ark. 2006; Horvathov ve ark. 2007; Arunasree 2010). İnsan göğüs kanser hücreleri ile karvakrolün muamelesi sonucu IC50 değeri 100 μM olarak bulunmuştur. İnsan akciğer kanser hücrelerinde karvakrolün ortalama 250 μM dozunda canlılığı yarı yarıya düşürdüğü tespit edilmiştir. Buna göre karvakrolün HepG2 hücreleri üzerinde daha yüksek dozlarda etkili olduğu görülmektedir.

4.3. KEKİK UÇUCU YAĞI VE KARVAKROLÜN HepG2 HÜCRELERİNDE DNA SENTEZİNE ETKİSİ

Kekik yağı ve karvakrolün HepG2 hücrelerinde DNA sentezine etkileri farklı süreler sonunda BrdU inkorporasyon testi ile ortaya konulmuştur. DNA sentezi Materyal ve Yöntemde anlatıldığı gibi BrdU'nun zincir yapısına eklenmesi prensibine dayanır. Bir kimyasal timin analogu olan BrdU (5'-bromo-2'-deoxyuridine) hem *in vivo* hem *in vitro* koşullarda kullanılabilen, anti-BrdU monoklonal antikorlar kullanılarak DNA sentezini ölçmek için dizaynedilen ELISA ile ölçülebilen oldukça kolay ve güvenli bir yöntemdir (Maghni ve ark. 1998; James ve Hawker 2003).

Her iki madde ile muamele edilen hücrelerde, maddelerin artan dozlarına paralel olarak DNA sentezinin inhibisyonu sitotoksosite testleri ile elde edilen sonuçları desteklemektedir. Aynı zamanda her iki maddenin etkisi de paralellik gösterdiğinden kekik uçucu yağının etkisinin, içerdiği major bileşen olan karvakrol nedeniyle olabileceği ileri sürülebilir. *Origanum onites* uçucu yağının DNA sentezini inhibe ettiği daha önce yapılan bir çalışmayla N-ras transform miyoblast hücrelerinde de gösterilmiştir (Zeytinoğlu ve ark. 2003) ve bizim bulgularımızı desteklemektedir. Bunun yanı sıra Aydın ve arkadaşlarının (2005) insan lenfositlerinde yaptıkları bir çalışmaya göre karvakrolün DNA hasarı üzerine etkisi araştırılmış ve karvakrolün artan dozlarında (0.1, 0.2, 0.5, 1 ve 2mM) DNA hasarını uyardığı tespit edilmiştir ve bu sonuca göre bulgularımız desteklenmektedir. Ayrıca *Origanum onites* uçucu yağının ve ana bileşeni olan karvakrolün *S. typhimurium*'daki güçlü antimutajenik etkisi de bilinmektedir (İpek ve ark. 2005).

4.4. KEKİK UÇUCU YAĞI VE KARVAKROL İLE MUAMELE EDİLMİŞ HepG2 HÜCRELERİNDE APOPTOTİK ETKİ

Kekik uçucu yağı ve karvakrolün apoptotik etkisi AO/EB boyama yöntemine göre araştırılmıştır. Apoptotik morfoloji flüoresan mikroskop altında incelenmiştir. Bunun için ilk olarak Hisham ve arkadaşlarına göre (2009) 100

mg/ml AO/EB uygulanmış, ancak kontrol dahil tüm hücreler bu dozdan fazlasıyla etkilendiği için 10 mg/ml AO/EB ile deneylere devam edilmiştir. Hücre canlılık testlerinin sonuçlarına göre belirlenen IC50 ve altındaki doz hücrelerde olası apoptotik morfolojiyi araştırmak için kullanılmıştır. Hücrelerin en çok etkilendiği kekik uçucu yağı (%0.008 ve %0.009) ve karvakrol dozları (300 ve 500 µM) ile 48 saat muamele süresi uygulanmış ve hücreler Materyal ve Yöntemde belirtildiği gibi AO/EB ile boyanmıştır.

Akridin oranj ve etidyum bromür floresan boyalar apoptotik hücrelerin çekirdek morfolojisini incelemek için kullanılmaktadır. Akridin oranj hem canlı hem ölü hücreleri boyayabilen vital bir boyadır. Etidyum bromür ise hücre zar bütünlüğünü kaybetmiş olan hücreleri boyamaktadır. Akridin oranj DNA ile etkileşime girerek bağlanır ve yeşil renkte görünür. Sitoplazmadaki RNA'ya bağlandığında kırmızı rengi vermektedir. EB ise DNA'ya bağlanır ve turuncu-kırmızı renginde görünür. AO/EB floresan boyamada parlak yeşil renkte kromatine sahip hücreler erken apoptotik hücrelerdir. Geç apoptotik hücreler büzüşerek turuncu ya da kırmızı renkte görülmektedir (Ariffin ve ark. 2009; Brady 2004).

Hücre morfolojisi göz önünde bulundurularak ortalama 1500 hücrede sayım yapılmış ve apoptotik indeks çıkarılmıştır. Bulgulara göre kekik uçucu yağı ve karvakrolün her ikisi de %50 oranı üzerinde doza-bağımlı olarak HepG2 hücrelerini apoptoza uğratmaktadır. Kekik uçucu yağının ana bileşeni olan karvakrolün IC50 değeri olan 500 µM dozunda apoptotik yüzdenin daha fazla olduğunu görüyoruz. Bu sonuç kekik uçucu yağının diğer bileşenlerinin apoptozu baskılayabilecek bir etki yapabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca dozlar arasındaki etkinliğe bağlı korelasyonla da ilgili olabilir. Sonuç itibariyle kekik uçucu yağı ve karvakrol antikanser ajan olma potansiyeline sahiptir diyebiliriz. *Origanum* türlerinden elde edilen birkaç ekstrakt ve uçucu yağlarının apoptotik ve antikanser etkisi yine göğüs adenokarsinoma hücreleri, lökosit hücreleri ve trombositleri de içeren değişik hücre tiplerinde ortaya konulmuştur (Chinou ve ark. 2007; Jelner ve ark. 2009; Roula ve ark. 2010; Al-Kaladeh ve ark. 2010). Yine karvakrolünde kronik miyeloid lökemia hücreleri, N-ras transform fare miyoblast hücreleri, insan göğüs kanser hücreleri ve kemirgen melanom gibi değişik hücre tiplerinde

tümörögenezi engellediği bulunmuştur (He ve ark. 1997; Stamatia ve ark. 1999; Zeytinoglu ve ark. 2003; Karkabounas ve ark. 2006; Lampronti ve ark. 2006; Horvathov ve ark. 2007; Arunasree 2010).

4.5. KEKİK UÇUCU YAĞININ HEPATOTOKSİSİTE YOLAĞINDAKİ GENLERİN İFADESİNE ETKİSİ

Kekik uçucu yağı ve karvakrolün HepG2 hücrelerindeki olası hepatotoksik etkisi 96 adet gen içeren RT² PCR insan hepatotoksisite array ile araştırılmıştır. Bir Qiagen firması olan SABioscience™ firmasının internet üzerindeki analiz programı kullanılarak analiz edilmiş ve buna göre sonuçlar yorumlanmıştır.

Array analizlerinden önce RNA örneklerinin kalite ve kantitesi agaroz jel elektroforezi, RT² RNA QC PZR array ve spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Buna göre RNA örneklerinde degradasyon, kontaminasyon veya kırılma mevcut değildir. Kalitesi bu şekilde test edilmiş olan RNA örnekleri ile çalışılmıştır.

Array analizlerinin Scatter blot ile 1.50 kat değişimler göz önünde bulundurularak yapılan değerlendirmesine göre kekik uçucu yağı ile inkübe elden hücrelerde *GCLC*, *HYOU1*, *MAOB* ve *TXNRD1* genlerinin ifadesi artmıştır. Isı haritasına göre yapılan katlanma değişikliği analizine göre bu genlerin yanı sıra *FXC1*, *LPL* ve *SKIL* genlerinin seviyeside 1.50 katın üzerinde görülmektedir.

İfadesi önemli derecede artmış olan *TXNRD1* geni hücre çoğalması ve apoptoz inhibisyonu ile ilişkili selenosistein içeren proteinleri kodlar (NCBI, Gen ID: 7296). Yapılan mikroarray çalışmalarına göre *TXNRD1* geninin primer tümörlerde arttığı görülmüş ve gen ontoloji analizlerinde önemli derecede kanserle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Iwasawa ve ark. 2011; Arner 2009). İnsan hepatotoksisite yolağı arrayine (İHYA) göre de hepatotoksisite ve genotoksik olmayan hepatokarsinogenez durumunda *TXNRD1* geninin ifadesinin arttığı belirtilmiştir. Bu nedenle bu genin artan ifadesi hepatotoksisteden ziyade HepG2 hücreleriyle ilgili olabilir. Bu durumda kekik uçucu yağının anti-kanser etkinliğiyle ilgili bir değerlendirme yapılabilir.

GCLC ve *HYOU1* geninin ifadesi İHYA için verilen bilgilerde açıklandığı gibi hepatotoksisite durumunda artmaktadır. *GCLC* geninin aktivitesi oksidatif stres esnasında GSH bağımlı detoksifikasyonda ve hücrel GSH'ın dengelenmesinde önemli derecede etkilidir (NCBI, Gen ID: 2729; Backos ve ark. 2010). Yapılan bir araştırmaya göre *MYCN* onkogeninin insan nöroblastoma hücrelerinde amplifiye olmasıyla *GCL*'nin (*GCLC*'nin katalitik subuniti) ifadesinin artarak oksidatif strese karşı direnç sağladığı ortaya konulmuştur (Tudela ve ark. 2010). Buna göre *GCLC*'nin artan ifadesi oksidatif bir stresin meydana geldiği ve bu yolla hepatotoksisite mekanizmalarında rol oynadığı düşünülebilir. Ayrıca *GCLC* ifadesinin GSH metabolizmasıyla ilgili hastalıkların patogenezinde etkili olduğu da ileri sürülmektedir (Butticaz ve ark. 2009). *HYOU1* geni alternatif transkripsiyon başlama bölgesi olarak kullanılır. Tümörlerde bu genin ifadesinin arttığı görülmüştür. Bununla bağlantılı olarak tümör invazyonuyla ilişkili olduğu bulunmuştur (NCBI, Gen ID: 10525). Buna göre *HYOU1* geni de HepG2 hücreleriyle ilişkili olarak artmış olabilir. Kekik uçucu yağı karsinogeneizde ifadesi artmış olan bu genin ifadesini de baskılayamamıştır. Fakat İHYA'a göre genotoksik olmayan hepatokarsinogeneiz durumunda ifadesi artmış olan kalan 9 adet genin ifadesi kekik uçucu yağı ile baskılanmıştır. Bu nedenle hepatokarsinogeneizde büyük oranda etkili olabileceği bu şekilde de değerlendirilebilir.

MAOB (NCBI, Gene ID: 4129) geni flavin mono amin oksidaz ailesine ait proteinleri kodlayan, mitokondri dış zarında lokalize olan bir enzimdir. Biyogenik ve ksenobiyonik oksidatif aminlerin deaminasyonunu katalizlemektedir. Merkezi sinir sisteminde ve periferik dokularda vazoaktif ve nöroaktif aminlerin de metabolizmasında önemli rol oynar. *MAOB* geni hepatotoksisite durumunda İHYA için verilen bilgilerde açıklandığı gibi kontrol edilen gendir. Bu nedenle *MAOB* geninin artan ifadesi hepatotoksisiteye işaret etmeyebilir.

HepG2 hücrelerinin kekik uçucu yağı ile muamelesi sonucunda elde edilen sonuca göre ortaya konulan scatter blot grafiğinde ifadesi azalmış olan 13 adet gen bulunmaktadır (*BHMT*, *DNAJB11*, *FABP1*, *HAO2*, *HPN*, *IGFALS*, *LGR5*, *MBL2*, *MCM10*, *OSTalpha*, *SERPINA3*, *SLC2A3*, *THRSP*). İHYA'ya göre; *BHMT* (Gen ID: 635) , *HAO2* (Gen ID: 51179), *IGFALS* (Gene ID: 3483), *MBL2* (Gene

ID: 4153) ve *THRSP* (Gene ID: 7069) genlerinin ifadesi hepatotoksisite durumunda, *LGR5* (Gen ID: 8549) ve *MCM10* (Gen ID: 55388) genlerinin ifadesi hepatik nekrozda azalmaktadır. Hepatotoksisitede artması beklenen *DNAJB11* (Gen ID: 51726) geninin ifadesi ise azalmıştır. Bu sonuca göre kekik uçucu yağının HepG2 hücrelerinde hepatotoksisite de rol oynayabileceği düşünülebilir. Fakat hepatotoksisite yolağında etki sonucu ifadesi arttığı bilinen 20 adet gen ile ifadesinin azalmadığı bilinen 7 adet genin ifadesinin değişmediği tespit edilmiştir. İHYA'ya göre fosfolipidozda *FABP1* (Gen ID: 2168), *HPN* (Gen ID: 3249) ve *SERPINA3* (Gen ID: 12) geninin ifadesi artmaktadır, ancak HepG2 hücrelerinin kekik uçucu yağı ile muamelesi sonucunda azaldığı tespit edilmiştir. Kekik uçucu yağının fosfolipidozda ifadesi artmış olan genlerin ifadesini baskılaması ve söz konusu 3 genin ifadesini daha da azaltmış olması fosfolipidozda etkili olabileceği şeklinde değerlendirilebilir. Isı haritasında göre *FXC1* (Gene ID: 26515), *LPL* (Gene ID: 4023) ve *SKIL* (Gene ID: 6498) genlerinin katlanma değişikliğinin >1.50 kat üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Fakat önemli bir farklılık görülmediğinden değerlendirilmemiştir. Bu farklılık katlanma değişikliğinin farklı şekilde hesaplanmasıyla ilgili olabileceği düşünülmektedir. Katlanma değişiklikleri gen ifadesindeki farklılıkları gösteren başka bir parametredir. Son değer ile ilk değer oranlanarak hesaplanmaktadır. Fakat hesaplanma şekli deneye ve araştırmacıdan araştırmacıya değişebilmektedir (Tibshirani 2007).

Scatter blot ile elde edilen veriler clustergram (küme adı) diagramı ile de değerlendirilmiştir. Arraydeki genlerin korelasyonu hesaplanarak bir diagram çıkarılmıştır. Bu diagram korelasyon katsayısı benzerliğini ifade etmek için kullanılmaktadır. Clustergram diagramında renkler genlere göre kodlandığı için renk değişimleri genlerin benzerliklerindeki önemi ifade etmektedir. Ayrıca deneyler arasındaki gen ifadesindeki benzerliklerde hem genlerin kendi içinde hem de genler arasında görülebilmektedir. Maksimum, minimum ve averaj olarak ifade edilen üç bağlantı yöntemi bir ağaç oluşturmak için kullanılmaktadır. Minimum bağlantı yöntemi ile uzun zincirli ağaçlar üretilerek benzerlikler gösterilir. Maksimum bağlantı yönteminde kümelerle birlikte ağaçlar oluşmaktadır. Averaj yöntemi ise uzun zincirler ya da kısa zincir yığınları ile verilerin benzerliklerini göstermektedir. Buna göre *FABP1* ve *SERPINA3*

genlerinin azalan ifade seviyelerinin büyük oranda benzerlik gösterdiği minimal bağlantı yöntemiyle görülmektedir. Buna göre bu iki gen birlikte değerlendirilerek ilgili mekanizmalar yorumlanabilir. Fosfolipidozda artan ifadeye sahip olan *FABP1* ve *SERPINA3* genlerinin yüksek düzeyde baskılandığı clustergramda görülmekte ve fosfolipidozda kekik uçucu yağının bu genler üzerindeki büyük bir etkiye sahip olduğu anlaşılmaktadır. *TXNRD1* geninin artan ifadesi diğer genlerden tamamen farklılık göstermektedir. Ayrıca deneyler arasında da farklı ifade seviyelerine sahip olduğu maksimum bağlantı yöntemiyle dallandırılmıştır. *GCLC* geninin ifade seviyesinde deneyler arasında az da olsa benzerliklerinin farklılığı da görülmektedir. Ayrıca *DNAJB11* geni ile bir array sonucuna göre benzer ifade seviyesine sahiptir. Bunun dışında diğer genlerin ifade seviyelerinin birbirine büyük oranda benzer olduğu ve genlerin kendi içinde de deneyler arasında paralel ifade benzerliğine sahip olduğu görülmektedir. Kalan genlerin yakın benzerlik seviyesinde olması ayrıca değerlendirilebilir. Çoklu sütun grafiği ile de benzer bir değerlendirme yapılmıştır. Katlanma değerleri 1.00 kabul edilerek, bunun üzerinden gen ifadelerinin kontrole ve birbirine yönelik artan azalan kat sayıları gösterilmiştir. Buna göre *GCLC*, *MAOB* ve *TXNRD1* genlerinin katlanmalarının kontrole göre iki kat fazla olduğu görülmektedir.

4.6. KARVAKROLÜN HEPATOTOKSİSİTE YOLAĞINDAKİ GENLERİN İFADESİNE ETKİSİ

Array analizlerinin scatter blot ile 1.50 kat değişimler göz önünde bulundurularak yapılan değerlendirmesine göre karvakrol ile inkübe elden hücrelerde *DNAJB11*, *SKIL* ve *TXNRD1* genlerinin ifadesi artmış ve *ABCB1*, *CYP1A2*, *IPO4* ve *RLP13A* genlerinin ifadesi azalmıştır. Isı haritasına göre de bu sonuçlar paralel görünmektedir. *DNAJB11* geni, ATPaz aktivitesinin uyarılmasıyla moleküler şaperonların aktivitesini düzenleyen ve evrimsel olarak korunmuş DNAJ/HSP40 protein ailesinin bir üyesidir. İHYA'ya göre bu gen hepatotoksiste durumunda artmaktadır.

Bir başka ifadesi artan gen olan *SKIL* (Gene ID: 6498) geni daha çok *SNoN* olarak da bilinmektedir. *SKI* proto-onkogen ailesinin bir üyesini

kodlamaktadır. Tümörögenез, gelişim ve hücrelerin büyümesinin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Derinin skuamoz hücre karsinomu, bazal hücre karsinomu ve keratoz gelişiminde ve normal insan derisinde SnoN proteini önemi ve ifadesi araştırılmıştır. Buna göre SnoN metaztatik olmayan tümörlerde ve normal deride farklılaşmış olarak bulunabileceği ve farklılaşmamış şekilde proto-onkogen olarak rol oynayabileceği ileri sürülmektedir (Zhang ve ark. 2009). SnoN aynı zaman da TGF- β 'nın önemli bir negatif düzenleyicisidir. Tavuk embriyonik fibroblastlarda bir onkogen olarak davrandığı ortaya konulmuştur. Fakat memeli tümörögenезinde pro-onkogenik bir rol oynadığı ileri sürülmüştür. Ayrıca geç gebeliklerde ifadesinin arttığı tespit edilmiştir (Jahchan ve ark. 2010). İHYA *SKIL* geninin hepatik nekrozda ifadesinin arttığını belirtmiştir. Fakat hepatik nekrozda artması beklenen 10 genin ifadesinde önemli bir değişiklik olmamış, hepatik nekrozda rol oynayan *IPO4* (Gene ID: 79711) geninin ifadesi azalmıştır. *SKIL* geninin hepatik nekrozdaki ifadesi değerlendirilemeyebilir.

TXNRD1 geninin ifadesi kekik yağı ile muamele edilmiş hücrelerde de olduğu gibi artmıştır ve yukarıda bahsedildiği gibi bu artış HepG2 hücreleri ile ilişkili olarak artmış olabilir.

İfadesi azalan genlerden *ABCB1* geni zar ilişkili proteinleri kodlamaktadır. ABC proteinleri ekstra ve intraselüler zarlara çeşitli molekülleri transfer etmektedir. Bu genin kodladığı protein ksenobiyotik bileşenleri için ATP-bağımlı ilaç atılımı pompasıdır. Çoklu ilaç dirençli hücrelerde ilaç birikimini azaltmakta görev alır ve antikanser ilaçları için direnç gelişimine sıklıkla aracılık eder. Kan-beyin bariyerinde de transporter olarak görev yapar (Gene ID: 5243). Bu genin ifadesinin azalmış olması karvakrolün antikanser ilaçlarına yönelik direnç gelişimini engelleyebileceği ile ilgili bir kanıt olabilir. İHYA' ya göre kolestaz durumunda bu genin ifade edildiği belirtilmiştir. Fakat ifade edilmesi beklenen 8 adet gende herhangi bir değişiklik bulunmamaktadır.

İfadesi azalan bir başka gen *CYP1A2* genidir. Bu gen sitokrom P450 ailesinin bir üyesini kodlamaktadır. İlaç metabolizması, kolesterol, lipid ve steroid sentezi gibi birçok reaksiyon CYP ailesi tarafından katalizlenmektedir. İHYA'ya göre *CYP1A2* geninin ifadesi hepatotoksisitede azalmaktadır. Bir diğer ifadesi azalan gen *RLP13A* housekeeping genidir. Housekeeping gen ifadelerinin bazı

hücre ya da doku tiplerinde farklı olabileceği ve metodoloji için doğru genin seçilmesi gerektiği Silver ve arkadaşlarının (2006) yaptığı bir çalışma ilede ileri sürülmüştür. Bundan dolayı çalışmamızda kullanılan array birden fazla housekeeping gen için primer içermektedir.

Clustergram diagramına göre *DNAJB11* ve *TXNRD1* genleri maksimum benzerlik düzeyinde deneyler arasında benzer görünmektedir. *RLP13A* geninin kontroller ve deneyler arasındaki ifadesi büyük oranda farklılık göstermiştir. Diğer genlerin ifadeleri büyük oranda benzerlik göstermiş ve *RLP13A* ile ortalama düzeyde benzerliğe sahip olmuştur. Çoklu sütun grafiğine göre de bu sonuçlar doğrulanmaktadır.

TXNRD1 geninin ifadesi hem kekik uçucu yağında hem de karvakrolde artmıştır. Primer tümörlerde ifadesinin arttığı bildirilen bu genin HepG2 hücreleri ile ilişkili olarak arttığı, hepatotoksisiteyle bağlantılı olmadığı düşünülmektedir. Anti-kanser etkinliği açısından bu genin ifadesi baskılanamıştır. Fakat genotoksik olmayan hepatokarsinogenezde görev alan kalan 9 adet genin ifadesi hem kekik uçucu yağında hem de karvakrolde baskılanmıştır. Bu sonuç kekik uçucu yağı ve karvakrolün hepatoselüler karsinoma için de önemli bir antikanser ajanı olarak kullanılabileceğini moleküler düzeyde göstermektedir. Bunun dışında kekik uçucu yağı muamelesi ile ifadesi azalmış genlerle karvakrol muamelesi sonucu ifadesi azalmış genler arasında herhangi bir benzerlik bulunmamaktadır. Bu durum kekik uçucu yağının diğer bileşenlerinin de önemli derecede moleküler düzeyde etkili olduğunu göstermekte ve bu bileşenlerin farklı kombinasyonlarıyla birlikte araştırılması gerektiğini vurgulamaktadır. *Origanum* yağının ana bileşeni olan karvakrolün gen ifadesine etkisi farklı çalışmalarla da gösterilmiştir (Lee ve ark. 2008; Bi ve ark. 2009; Rao ve ark. 2010; Kim ve ark. 2010; Cho ve ark. 2011). Fakat moleküler düzeydeki bu araştırmalar yeterli değildir.

Sonuç olarak kekik uçucu yağının ve karvakrolün HepG2 hücrelerinde moleküler düzeyde hepatotoksik olmadığı söylenebilir. Fakat hepatotoksik olduğu bilinen bir madde kullanılarak sonuçlar doğrulanmalıdır. Bunun yanı sıra sağlıklı karaciğer hücreleri ile de hepatotoksisite yolağı arrayi ve yapılan diğer çalışmalar incelenmelidir. Sağlıklı karaciğer hücresinin de kanserli bir hücre kadar dayanıklı olabileceği düşünülürse kekik uçucu yağı ve karvakrolün hepatotoksik olmaması

ve ayrıca anti-kanser ve sitotoksik etkinliğinin bulunması istenen bir sonuç olarak değerlendirilebilir. Belirli gruplar amaçlanan gen ifadesindeki değişikliklerle karşılaştırılarak sonuç değerlendirilmiştir. Yani bir standart eğri kullanılarak kantitatif bir sonuç ortaya konulmadığı için bu sonuçlar rölatif olarak ele alınabilir. *Origanum* yağı ve karvakrol ile hepatoselüler karsinoma tedavisi için umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca diğer kanser tipleriyle de etkinliğinin bilinmesi terapötik ajan olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Aeschbach, R., Löliger, J., Scott, B.C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B. ve Aruoma, O.I. (1994), "Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol," *Food and Chemical Toxicology*, **26**, 31-36.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. ve Walter, P. (2007), *Molecular Biology of The Cell*, Garland Science, Fifth Edition, Newyork, ABD, 1412-1421.
- Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S. ve Chinou, I.B. (2001), "Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 4168-4170.
- Aravalli, N.R., Steer, C.J. ve Cressman, E.N.K. (2008), "Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma," *Hepatology*, **48**, 2047–2063.
- Arıcı, S. (2008), "Toxic hepatitis," *Pamukkale Tıp Dergisi*, **1(2)**, 113–119.
- Aristatile, B., Al-Numair, K.S., Al-Assaf, A.H. ve Pugalandi, K.V. (2011), "Pharmacological effect of carvacrol on d-galactosamine-induced mitochondrial enzymes and DNA damage by single-cell gel electrophoresis," *Journal of Natural Medicines*, **65**, 568–577.
- Arkan, S. ve Aydın, Y. (2008), *Karvakrol ve timol'un izole sıçan kalp kası üzerine etkiler*, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Arner, E.S.J. (2009), "Focus on mammalian thioredoxin reductases — Important selenoproteins with versatile functions," *Biochimica et Biophysica Acta*, **1790**, 495–526.
- Arunasree, K.M. (2010), "Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line MDA-MB 231," *Phytomedicine*, **17(8–9)**, 581–588.
- Ashe, P.C. ve Berry, M.D. (2003), "Apoptotic signaling cascades," *Neuro-Psychopharmacology ve Biological Psychiatry*, **27**, 199–214.

- Aslim, B. ve Yucel, N. (2008), "In vitro antimicrobial activity of essential oil from endemic *Origanum minutiflorum* on ciprofloxacin-resistant *Campylobacter spp.*," *Food and Chemical*, **107**, 602–606.
- Aydin, S., Başaran, A.A. ve Başaran, N. (2005), "The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C," *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **581**, 43-53.
- Aydin, S., Öztürk, Y., Beis, R. ve Başer, K.H.C. (1998), "Investigation of *Origanum onites*, *Sideritis congesta*, *Satureja cuneifolia* essential oils for analgesic activity," *Phytotherapy Research*, **10**, 342-344.
- Aydin, S., Cakmak, A. ve Arslan, R. (2009), "Role of carvacrol on the analgesic actions of natural products," *Journal of Physiological Sciences*, **59**, 381–381.
- Aydin, Y., Kutlay, O., Ari, S., Duman, S., Uzuner, K. ve Aydin, S. (2007), "Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats," *Planta Medica*, **73**, 1365-1371.
- Azırak, S. ve Rencuzoğulları, E. (2008), "The in vivo genotoxic effects of carvacrol and thymol in rat bone marrow cells," *Environmental Toxicology*, **23**, 728-735.
- Babich, H. ve Borenfreund, E. (1991), "Cytotoxicity of t-2 toxin and its metabolites determined with the neutral red cell viability assay," *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, 2101-2103.
- Backman, S.A., Stambolic, V. ve Mak, T.W. (2002), "PTEN function in mammalian cell size regulation," *Current Opinion in Neurobiology*, **12**, 516–522.
- Backos, D.S., Fritz, K.S., Roede, H.R., Petersen, D.R. ve Franklin, C.C. (2011), "Posttranslational modification and regulation of glutamate-cysteine ligase by the α,β -unsaturated aldehyde 4-hydroxy-2-nonenal," *Free Radical Biology and Medicine*, **50(1)**, 14-26.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. ve Idaomar, M. (2008), "Biological effects of essential oils – A review," *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 446–475.

- Başaran, A. (2002), *Tıbbi Biyoloji Ders Kitabı*, Nobel Tıp Kitabevleri, Altıncı Baskı, Eskişehir.
- Begriche, K., Knockaert, L., Massart, J., Robin, M.A. ve Fromenty, B. (2009), “Mitochondrial dysfunction in nonalcoholic steatohepatitis (NASH): are there drugs able to improve it?” *Disease Mechanisms*, **6**, 1–4.
- Begriche, K., Massart, J., Robin, M.A., Sanchez, A.B. ve Fromenty, B. (2011), “Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: Mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver,” *Journal of Hepatology*, **54**, 773–794.
- Bi, X., Guo, N., Jin, J., Liu, J., Feng, H., Shi, J., Xiang, H., Wu, X., Dong, J., Hu, H., Yan, S., Yu, C., Wang, X., Deng, X. ve Yu, L. (2009), “The global gene expression profile of the model fungus *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol,” *Journal of Applied Microbiology*, **108**, 1364-5072.
- Bishayee, A., Politis, T. ve Darvesh, S.A. (2009), “Resveratrol in the chemoprevention and treatment of hepatocellular carcinoma,” *Cancer Treatment Reviews*, **36**, 43-53.
- Blanc, A.C. (2003), “Natural cellular inhibitors of caspases,” *Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, **27**, 215– 229.
- Blum, H.E. (2005), “Hepatocellular carcinoma: Therapy and prevention,” *World Gastroenterology*, **11(47)**, 7391-7400.
- Blum, H.E. ve Spangenberg, H.C. (2007), “Hepatocellular carcinoma: An update,” *Archives of Iranian Medicine*, **10**, 361 – 371.
- Boatright, K.M. ve Salvesen, G.S. (2003), “Mechanisms of caspase activation,” *Current Opinion in Cell Biology*, **15**, 725–731.
- Boelsterli, U.A. ve Lim, P.L.K. (2007), “Mitochondrial abnormalities—A link to idiosyncratic drug hepatotoxicity?” *Toxicology and Applied Pharmacology*, **220**, 92–107.
- Borner, C. (2003), “The Bcl-2 protein family: Sensors and checkpoints for life-or-death decisions,” *Molecular Immunology*, **39**, 615–647.
- Borrello, M.G., Innocenti, D.D. ve Pierotti, M.A. (2008), “Inflammation and cancer: The oncogene-driven connectio,” *Cancer Letters*, **267**, 262–270.

- Brady, A.J., Kearney, P. ve Tunney, M.M. (2007), "Comparative evaluation of 2,3-bis XTT [2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide and 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium,monosodium salt (WST-8) rapid colorimetric assays for antimicrobial susceptibility testing of staphylococci and ESBL-producing clinical isolates," *Journal of Microbiological Methods*, **71**, 305–311.
- Breckenridge, D.G. ve Xue, D. (2004), "Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by bcl-2 family proteins and caspases," *Current Opinion in Cell Biology*, **16**, 647–652.
- Brind, M.A. (2006), " Drugs that damage the liver," *Medicine*, **35**, 26-30.
- Burt, S.A., Fledderman, M.J., Haagsman, H.P., Knapen, F. ve Veldhuizen, E.J.A. (2007), "Inhibition of *Salmonella enterica* serotype enteritidis on agar and raw chicken by carvacrol vapour," *International Journal of Food Microbiology*, **119**, 346–350.
- Butticaz, C., Gysin, R., Cuénod, M. ve Do, K.Q. (2009), "Interaction of GAG trinucleotide repeat and C-129T polymorphisms impairs expression of the glutamate-cysteine ligase catalytic subunit gene," *International Journal of Dermatology*, **48(6)**, 579-583.
- Camphell, N.A. ve Reece, J.B. (2006), *Biyoloji*, Palme Yayıncılık, Altıncı Baskı, Ankara.
- Canbek, M., Uyanoglu, M., Bayramoglu, G., Senturk, H., Erkasap, N., Koken, T., Uslud, S., Demirustu, C., Aral, E. ve Başer, H.C.K. (2008), "Effects of carvacrol on defects of ischemia-reperfusion in the rat liver," *Phytomedicine*, **15**, 447–452.
- Castell, J.V., Jose, M., Ponsoda, X. ve Bort, R. (1996), "In vitro investigation of the molecular mechanisms of hepatotoxicity," *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*, **13**, 376-389.
- Cha, C. ve DeMatteo, P.R. (2005), "Molecular mechanisms in hepatocellular carcinoma development," *Best Practice ve Research Clinical Gastroenterology*, **19**, 25–37.

- Chen, X.W., Serag, E.S., Sneed, K.B. ve Zhou, S.F. (2011), “Herbal bioactivation, molecular target and the toxicity relevance,” *Chemico Biological Interactions*, **192**, 161-176.
- Chiba, K., Kawakami, K. ve Tohyama, K. (1998), “Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, mtt and crystal violet staining assays of the same cells,” *Toxicology In Vitro*, **12**, 251-258.
- Chinou, I., Liolios, C., Moreau, D. ve Roussakis, C. (2007), “Cytotoxic activity of *Origanum dictamnus*,” *Fitoterapia*, **78**, 342–344.
- Cho, S., Choi, Y., Park, S. ve Park, T. (2010), “Carvacrol prevents diet-induced obesity by modulating gene expressions involved in adipogenesis and inflammation in mice fed with high-fat diet,” *Journal of Nutritional Biochemistry*, **10**, 11-16.
- Cho, S.J., Lee, S.S., Kim, Y.J., Park, B.D., Choi, J.S., Liu, L., Hama, Y.M., Kim, B.M. ve Lee, S.K. (2010), “Xylocyline, a novel Cdk inhibitor, is an effective inducer of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo,” *Cancer Letters*, **287**, 196–206.
- Choriannopoulos, N., Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mitaku, N., Nychas, G.J. ve Haroutounian, S.A. (2004), “Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 8261-8267.
- Chow, L.M.L. ve Baker, S.J. (2006), “PTEN function in normal and neoplastic growth,” *Cancer Letters*, **241**, 184–196.
- Chowdhury, I., Tharakan, B. ve Bhat, G.K. (2008), “Caspases — An update,” *Comparative Biochemistry and Physiology*, **151**, 10–27.
- Cooper, M.G. ve Hausman, E.R. (2006), *Hücre Moleküler Yaklaşım*, İzmir Tıp Kitabevi, Üçüncü Baskı, İzmir.
- Cuenda, A. ve Rousseau, S. (2007), “p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases,” *Biochimica et Biophysica Acta*, **1773**, 1358–1375.
- Cypalleles, *Home Page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee*.

<http://www.cypalleles.ki.se/>

- Didry, N., Dubreuil, L. ve Pinkas, M. (1994), "Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria," *Pharmaceutica Acta Helveticae*, **69**, 25–28.
- Ding, H.Y., Chou, T.H. ve Liang, C.H. (2010), "Antioxidant and antimelanogenic properties of rosmarinic acid methyl ester from *Origanum vulgare*," *Food Chemistry*, **123**, 254–262.
- Duke, R.C. (2004), *Methods of analysing chromatin changes accompanying apoptosis of target cells in killer cell assays*, Methods in Molecular Biology, Apoptosis Methods and Protocols, Ed.: Brady, H.J.M., 282, Humana Press, Totowa.
- Dülger, H., Alıcı, S., Şekeroğlu, M.R., Noyan, T. ve Yalçınkaya, A. (2002), *Kanserli hastalarda kemoterapinin lipid peroksidasyonu üzerine etkisi*, 17. Ulusal Biyokimya Kongresi, Van.
- Eren, M., Saltık, N.İ. ve Koçak, N. (2004), "İlaça bağlı hepatotoksisite," *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, **47**, 222–227.
- Fuentes, A.O., Gutiérrez, E.A., Señorans, F.J. ve Reglero, G. (2010), "Supercritical fluid extraction of oregano (*Origanum vulgare*) essentials oils: Anti-inflammatory properties based on cytokine response on THP-1 macrophages," *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 1568–1575.
- Gelb, M.H., Tamanoil, F., Yokoyama, K., Ghomashchi, F., Esson, K. ve Gould, M.N. (1995), "The inhibition of protein prenyltransferases by oxygenated metabolites of limonene and perillyl alcohol," *Cancer Letters*, **91**, 169–175.
- Gene home, Genes and mapped phenotypes, *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>
- Ghomi, J.S., Ebrahimabadi, A.H., Bidgoli, Z.D. ve Batooli, H. (2009), "GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus jalas* and its main constituent carvacrol," *Food Chemistry*, **115**, 1524–1528.

- Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A. ve Chatzopoulou, P.S. (2010), "The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage," *International Journal of Food Microbiology*, **137**, 175–180.
- Goze, I., Cetin, A. ve Goze, A. (2010), "Investigation of effects of essential oils of *Origanum minutiflorum* and *Cyclotrichium niveum* (Labiatae) plants on angiogenesis in shell-less chick embryo culture," *African Journal of Biotechnology*, **9(14)**, 2156–2160.
- Gross, A., McDonnell, J.M. ve Korsmeyer, S.J. (1999), "Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis," *Genes ve Development*, **13**, 1899-1911.
- Guarda, A., Rubilar, J.F., Miltz, J. ve Galotto, M.J. (2011), "The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol," *International Journal of Food Microbiology*, **146**, 144–150.
- Güneş, H.V. (2003), *Moleküler Hücre Biyolojisi*, Kaan Kitabevi, Birinci Baskı, Eskişehir.
- Hanahan, D. ve Weinberg, R.A. (2000), "The Hallmarks of cancer," *Cell Press*, **100**, 57–70.
- Hawker, J.R. (2003), "Chemiluminescence-based BrdU ELISA to measure DNA synthesis," *Journal of Immunological Methods*, **274**, 77– 82.
- He, L., Mo, H., Hadisusilo, S., Qureshi, A.A. ve Elson, C.E. (1997), "Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas *in vitro* and *in vivo*," *Journal of Nutrition*, **127**, 668–674.
- Hisham, Z.A.S., Omar, W.H.H.W., Ariffin, Z.Z., Safian, M.F., Senafi, S. ve Wahab, R.M.A. (2009), "Intrinsic anticarcinogenic effects of *Piper sarmentosum* ethanolic extract on a human hepatoma cell line," *Cancer Cell International*, **9**, 6.
- Holt, M.P. ve Ju, C. (2006), "Mechanisms of Drug-Induced Liver Injury," *The AAPS Journal*, **8**, 1.
- Horii, I. ve Yamada, H. (2007), "In vitro hepatotoxicity testing in the early phase of drug discovery," *Alternatives and Animal Use in the Life Sciences*, **14**, 437-441.

- Horvathova, E., Turcaniova, V. ve Slamenova, D. (2007), "Comparative study of DNA-damaging and DNA-protective effects of selected components of essential plant oils in human leukemic cells K56," *Neoplasma*, **54**, 478–483.
- Hörschele, D., Wiertz, M. ve Moreno, I.G. (2008), "A duplex real-time PCR assay for detection of drug-induced mitochondrial DNA depletion in HepG2 cells," *Analytical Biochemistry*, **379**, 70–72.
- Huo, T., Huang, Y.H. ve Wu J.C. (2005), "Percutaneous ablation therapy for hepatocellular carcinoma: Current practice and future perspectives," *Journal of the Chinese Medical Association*, **68**, 4.
- Ipek, E., Zeytinoglu, H., Okay, S., Tuylu, B.A., Kurkcuoglu, M. ve Baser, H.C.K. (2005), "Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test," *Food Chemistry*, **93**, 551–556.
- Jaeschke, H., Gores, J.G., Cederbaum, I.A., Hinson, A.J., Pessayre, D. ve Lemasters, J.J. (2002), "Mechanism of hepatotoxicity," *Toxicological Sciences*, **65**, 166–176.
- Jaiswal, A.S. ve Narayan, S. (2008), "A novel function of adenomatous polyposis coli (APC) in regulating DNA repair," *Cancer Letters*, **271**, 272–280.
- James, R. ve Hawker, J. (2003), "Chemiluminescence-based BrdU ELISA to measure DNA synthesis," *Journal of Immunological Methods*, **274**, 77–82.
- Ji, L., Chen, Y., Liu, T. ve Wang, Z. (2008), "Involvement of Bcl-xL degradation and mitochondrial-mediated apoptotic pathway in pyrrolizidine alkaloids-induced apoptosis in hepatocytes," *Toxicology and Applied Pharmacology*, **231**, 393–400.
- Jiang, M. ve Milner, J. (2003), "Bcl-2 constitutively suppresses p53-dependent apoptosis in colorectal cancer cells," *Genes and Development*, **17**, 832–837.
- Jones, P. A., Bracher, M., Marenus, K. ve Kojima, H. (1999), "Performance of the neutral red uptake assay in the COLIPA international validation study

- on alternatives to the rabbit eye irritation test,” *Toxicology in Vitro*, **13**, 325-33.
- Kalaldehy, J.Z., Dahab, R.A. ve Afifi, F.U. (2010), “Volatile oil composition and antiproliferative activity of *Laurus nobilis*, *Origanum syriacum*, *Origanum vulgare*, and *Salvia triloba* against human breast adenocarcinoma cells,” *Nutrition Research*, **30**, 271–278.
- Kapuy, O., He, E., Avilés, S., Uhlmann, F., Tyson, J. J. ve Novák, B. (2009), “System-level feedbacks control cell cycle progression,” *FEBS Letters*, **583**, 3992–3998.
- Karkabounas, S., Kostoula, O.K., Daskalou, T., Veltsistas, P., Karamouzis, M., Zelovitis, I., Metsios, A., Lekkas, P., Evangelou, A.M., Kotsis, N. ve Skoufos, I. (2006), “Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol,” *Experimental Oncology*, **28**, 121–125.
- Karp, G. (2004), *Cell and Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Fifth Edition, Californiya, 660-678.
- Karpouhtsis, I., Pardali, E., Feggou, E., Kokkini, S., Scouras, Z.G. ve Tsipidou, P.M. (1998), “Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 1111-1115.
- Katzenellenbogen, M., Mizrahi, L., Pappo, O., Klopstock, N., Olam, D., Barash, H., Domany, E., Galun, E. ve Goldenberg, D. (2007), “Molecular mechanisms of the chemopreventive effect on hepatocellular carcinoma development in Mdr2 knockout mice,” *American Association for Cancer Research*, **10**, 1158-1170.
- Kevin, H. (2007), “Biology of cancer,” *Cancer Biology and Imaging Medicine*, **36**,1.
- Kim, D.K., Lillehoj, H.S., Lee, S.H., Jang, S.I. ve Bravo, D. (2010), “High-throughput gene expression analysis of intestinal intraepithelial lymphocytes after oral feeding of carvacrol, *Cinnamaldehyde*, or *Capsicum oleoresi*,” *Poultry Science*, **89**(1), 68-81.
- Kim, S.H., Hong, K.O., Chung, W.Y.,H., Wang, J.K. ve Parka, K.K. (2004), “Abrogation of cisplatin-induced hepatotoxicity in mice by xanthorrhizol

- is related to its effect on the regulation of gene transcription,” *Toxicology and Applied Pharmacology*, **196**, 346– 355.
- King, P.D. ve Perry, M.C. (2001), “Hepatotoxicity of chemotherapy,” *The Oncologist*, **6**, 162-176.
- Koparal, A.T. ve Zeytinoglu, M. (2003), “Effects of carvacrol on a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line, A549,” *Cytotechnology*, **43**, 149–154.
- Kordali, S., Cakir , A., Ozer, H., Cakmakci, R. ve Kesdek, M. (2008), “Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene,” *Bioresource Technology*, **99**, 8788–8795.
- Kulkarni, J.S. ve Khanna, A. (2006), “Functional hepatocyte-like cells derived from mouse embryonic stem cells: A novel in vitro hepatotoxicity model for drug screening,” *Toxicology In Vitro*, **20**, 1014–1022.
- Labianca, R., Beretta, G., Gatta, G., Braud, F. ve Wils, J. (2004), “Colon cancer,” *Critical Reviews in Oncology and Hematology*, **51**, 145–170.
- Lachenmayer, A., Alsinet, C., Changa, Y. ve Llovet J.M. (2010), “Molecular approaches to treatment of hepatocellular carcinoma,” *Digestive and Liver Disease*, **42**, 264–272.
- Lampronti, I., Saab, A.M. ve Gambari, R. (2006), “Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the *Magnoliophyta* division,” *International Journal of Oncology*, **29**, 989–995.
- Landa, P., Kokoska, L., Pribylova, M., Vanek, T., ve Marsik, P. (2009), “In vitro anti-inflammatory activity of carvacrol: Inhibitory effect on COX-2 catalyzed prostaglandin E2 biosynthesis,” *Archives of Pharmacal Research*, **32**, 75-78.
- Larrey, D. (1997), “Hepatotoxicity of herbal remedies,” *Journal of Hepatology*, **26**, 47–51.
- Lee, J., Jung, E., Yu, H., Kim, Y., Ha, J., Kim, Y.S. ve Park, D. (2008), “Mechanisms of carvacrol-induced expression of *type I collagen gene*,” *Journal of Dermatological Science*, **52**, 160—169.

- Lee, M.J. (2011), “The good oncogene: When bad genes identify good outcome in cancer,” *Medical Hypotheses*, **76**, 259–263.
- Lewin, B. (2004), *Genes VIII*, Pearson Prentice Hall, Pearson Education Inc., London, 884-889.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaire, P., Kaiser, A.C., Krieger, M., Scott, P.M., Zipursky, L.S. ve Darnell, J. (2003), *Molecular Cell Biology*, W.H. Freeman and Company, Fifth Edition, Newyork, ABD, 924-946.
- Luo, J., Solimini, N.L. ve Elledge, S.J. (2009), “Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction,” *Cell*, **136**, 823-837.
- Luster, M.I., Simeonova, P.P., Gallucci, R.M., Bruccoleri, A., Blazka M.E. ve Yucesoy, B. (2001), “Role of inflammation in chemical-induced hepatotoxicity,” *Toxicology Letters*, **120**, 317–321.
- Maa, S., Jiao, B., Liu, X., Yi, H., Kong, D., Gao, L., Zhao, G., Yang, Y. ve Liu, X. (2010), “Approach to radiation therapy in hepatocellular carcinoma,” *Cancer Treatment Reviews*, **36**, 157–163.
- Maghni, K., Nicolescu, O.M. ve Martin, J.G. (1999), “Suitability of cell metabolic colorimetric assays for assessment of CD4q T cell proliferation: comparison to 5-bromo-2-deoxyuridine BrdU/ELISA,” *Journal of Immunological Methods*, **223**, 185–194.
- Magyar, J., Szentandrassy, N., Banyasz, T., Fülöp, L., Varro, A. ve Nanasi, P. (2004), “Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocyte,” *European Journal of Pharmacology*, **487**, 29-36.
- Malenstein, H., Pelt, J. ve Verslype, C. (2011), “Molecular classification of hepatocellular carcinoma anno 2011,” *European Journal of Cancer*, **47**, 1287-1298.
- Martinsson, H.S., Starborg, M., Erlandsson, F. ve Zetterberg A. (2005), “Single cell analysis of G1 check points—The relationship between the restriction point and phosphorylation of pRb,” *Experimental Cell Research*, **1**, 305– 391.

- Massih, R.M., Faresa, R., Bazzia, S., Chamib, N. ve Baydoun, E. (2010), "The apoptotic and anti-proliferative activity of *Origanum majorana* extracts on human leukemic cell line," *Leukemia Research*, **34**, 1052–1056.
- Masubuchi, Y., Kanob, S. ve Horie, T. (2006), "Mitochondrial permeability transition as a potential determinant of hepatotoxicity of antidiabetic thiazolidinediones," *Toxicology*, **222**, 233–239.
- Mayhew, M.S. (2009), "Drug-Induced Liver Injury," *American College of Nurse Practitioners*, **5**, 685–686.
- Mehdi, S.J., Ahmad, A., Irshad, M., Manzoor, N. ve Rizvi, M.M.A. (2011), "Cytotoxic effects of carvacrol on human cervical cancer cells," *Biology and Medicine*, **3(2)**, 307-312.
- Melo, F.H.C., Moura, B.A., Sousa, D.P., Vasconcelos, S.M.M., Macedo, D.S., Fonteles, M.M.D., Viana, G.S.D. ve Sousa, F.C.F. (2010), "Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system," *Fundamental & Clinical Pharmacology*, **25**, 362-367.
- Merle, P. ve Trepo, C. (2009), "Molecular mechanisms underlying hepatocellular carcinoma," *Viruses*, **1**, 852–872.
- Monzote, L., Stamberg, W., Staniek, K. ve Gille, L. (2009), "Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria," *Toxicology and Applied Pharmacology*, **240**, 337–347.
- Mosmann, T. (1983), "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *Journal of Immunology Methods*, **65**, 55–63.
- Novak, B. ve Tyson, J.J. (2004), "A model for restriction point control of the mammalian cell cycle," *Journal of Theoretical Biology*, **230**, 563–579.
- Okuda, H. (2007), "Hepatocellular carcinoma development in cirrhosis," *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, **21**, 161-173.
- Okuda, K. (2000), "Hepatocellular carcinoma," *Journal of Hepatology*, **32**, 225–231.

- Otsuki, Y., Li, Z. ve Shibata, M.A. (2003), "Apoptotic detection methods from morphology to gen," *Polish Histochemical and Cytochemical Society*, **38**, 275-340.
- Özerol, E. (1996), "Sitokrom p450 monooksijenaz enzim sistemleri," *Journal of Turgut Özal Medical Center*, **3(3)**, 257-275
- Pang, R., Tsea, E. ve Poon, R.T. (2006), "Molecular pathways in hepatocellular carcinoma," *Cancer Letters*, **240**, 157-169.
- Park, J.C., Han, W.D., Park, J.R., Choi, S.H. ve Choi, J.W. (2005), "Changes in hepatic drug metabolizing enzymes and lipid peroxidation by methanol extract and major compound of *Orostachys japonicus*," *Journal of Ethnopharmacology*, **102**, 313-318.
- Praticò, D., Rokach, J., Lawsons, J. ve FitzGerald, G.A. (2004), "F2-isoprostanes as indices of lipid peroxidation in inflammatory diseases," *Chemistry and Physics of Lipids*, **128**, 165-171.
- Prober, D.A. ve Edgar, B.A. (2001), "Growth regulation by oncogenes — new insights from model organism," *Current Opinion in Genetics and Development*, **11**, 19-26.
- Rao, A., Zhang, Y.Q., Muend, S. ve Rao, R. (2010), "Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **54**, 5062-5069.
- Rivas, L., McDonnell, M.J., Burgess, C.M., O'Brien, M., Villa, A.N., Fanning, S. ve Duffy, G. (2010), "Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol," *International Journal of Food Microbiology*, **139**, 70-78.
- Ruscetti, W.F. ve Bartelmez, S.H. (2004), "Cell cycle control and check points in hematopoietic stem cells," *Handbook of Stem Cells*, **2**, 115-126.
- Russmann, S., Ulick, A.G. ve Grattagliano, I. (2009), "Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity," *Current Medicinal Chemistry*, **16**, 2041-3053.
- Sahin, F., Gulluce, M., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., Polissiou, M., Agar, G. ve Ozer, H. (2003), "Biological activities of the essential oils

- and methanol extract of *Origanum vulgare ssp. vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey,” *Food Control*, **15**, 549–557.
- Schmitz, I., Kirchhoff, S. ve Krammer, P.H. (2000), “Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways,” *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **32**, 1123–1136.
- Seeff, L.B. (2009), “Are herbals as safe as their advocates believe?” *Journal of Hepatology*, **50**, 13–16.
- Sherr, J.C. (1996), “Cancer Cell Cycles,” *Science*, **274**, 1672-1677
- Sieber, O.M., Tomlinson, I.P. ve Lamlum, H. (2000), “The *adenomatous polyposis coli (APC)* tumour suppressor – genetics, function and disease,” *Molecular Medicine Today*, **6**, 462-469.
- Silva, M.D. ve Weinberg, R.A. (1997), “The restriction point and control of cell proliferation,” *Current Opinion in Cell Biology*, **9**, 768-772.
- Silver, N., Best, S., Jiang, J. ve Thein, S.L. (2006), “Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR,” *BMC Molecular Biology*, **7**, 33.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T. ve Arsenakis, M. (1996), “Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 1202-1205.
- Stammati, A., Bonsi, P., Zucco, F., Moezelaar, R., Alakomi, H.L. ve Wright, A. (1999), “Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays,” *Food and Chemical Toxicology*, **37**, 813–823.
- Stickel, F. (2007), “Slimming at all costs: Herbalife® -induced liver injury,” *Journal of Hepatology*, **47**, 444–446.
- Stickel, F., Patsenker, E., ve Schuppan, D. (2005), “Herbal hepatotoxicity,” *Journal of Hepatology*, **43**, 901–910.
- Stickel, F., ve Schuppan, D. (2007), “Herbal medicine in the treatment of liver diseases,” *Digestive and Liver Disease*, **39**, 293–304.
- Stiff, G.M., Gomez, D., Carino, N., ve Prasad, K.R. (2009), “Surgical management of hepatocellular carcinoma: Is the jury still out?” *Surgical Oncology*, **18**, 298-321.

- Storia, A., Ercolini, D., Marinello, F., Pasqua, R., Villani, F. ve Mauriello, G. (2011), "Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cell," *Research in Microbiology*, **162**, 164-172.
- Strober, W. (1997), *Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability*, Current Protocols in Immunology. Wiley & Sons, New York, A.3B1–A.3B2.
- Tan, A.S. ve Berridge, M.V. (2000), "Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents," *Journal of Immunological Methods*, **238**, 59–68.
- Tepe, B., Sökmen, M., Akpulat, H.A., Daferera, D., Polissiou, M. ve Sökmen, A. (2005), "Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *Sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*," *Journal of Food Engineering*, **66**, 447–454,
- Terenina, M.B., Misharina, T.A., Krikunova, N.I., Alinkina, E.S., Fatkulina, L.D. ve Vorob'yova, A.K. (2011), "Oregano essential oil as an inhibitor of higher fatty acid oxidatio," *Applied Biochemistry and Microbiology*, **47**, 445-449.
- Teschke, R., Qiu, S.X. ve Lebot, V. (2011), "Herbal hepatotoxicity by kava:Update on pipermethystine, flavokavain B, and mould hepatotoxins asprimarily assumed culprits," *Digestive and LiverDisease*, **43(9)**, 676–81
- The National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) (2003), *Test Method Protocol for the NHK Neutral Red Uptake Cytotoxicity Test*, A Test for Basal Cytotoxicity for an In Vitro Validation Study Phase III.
- Thomas, M.B. ve Zhu, A.X. (2005), "Hepatocellular Carcinoma: The Need for Progress," *Journal of Clinical Oncology*, **23**, 2892-2899.
- Tibshirani, R. ve Witten, D.M. (2007), *A comparison of fold-change and the t-statistic for microarray data analysis*, Department of Health Research and Policy and Department of Statistics, Stanford University, 1-5.

- Trabace, L., Zotti, M., Morgese, M.G., Tucci, P., Colaianna, M., Schiavone, S., Avato, P. ve Cuomo, V. (2011), "Estrous cycle affects the neurochemical and neurobehavioral profile of carvacrol-treated female rats," *Toxicology and Applied Pharmacology*, **46(6)**, 569-73.
- Tudela, M.V., Delgado E.M., Cuende, J., Bolaños, J.P. ve Almeida, A. (2010), "Human neuroblastoma cells with MYCN amplification are selectively resistant to oxidative stress by transcriptionally up-regulating glutamate cysteine ligase," *Journal of Neurochemistry*, **113(4)**, 819-25.
- Ultee, A., Gorris, L.G.M. ve Smid, E.J. (1998), "Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*," *Journal of Applied Microbiology*, **85**, 211–218.
- Uyanoglu, M., Canbek, M., Aral, E., Başer H.C.K. (2008), "Effects of carvacrol upon the liver of rats undergoing partial hepatectomy," *Phytomedicine*, **15**, 226–229.
- Ündeger, Ü., Basaran, A., Degen, G.H. ve Basaran, N. (2009), "Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol," *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 2037–2043.
- Valentin, I., Philippe, M., Lhuguenot, J.C., Chagnon, M.C. (2001), "Uridine uptake inhibition as a cytotoxicity test for a human hepatoma cell line (HepG2 cells): Comparison with the neutral red assay," *Toxicology*, **158**, 127–139.
- Vincenzi, M.D., Stammati, A., Vincenzic, A.D. ve Silanoa, M. (2004), "Constituents of aromatic plants: Carvacrol," *Fitoterapia*, **75**, 801– 804.
- Vrenken, T.E., Homan, M.B., Kalsbeek, A.J., Faber, K.N. ve Moshage, H. (2008), "The active metabolite of leflunomide, A77 1726, protects rat hepatocytes against bile acid-induced apoptosis," *Journal of Hepatology*, **49**, 799–809.
- Wang, X. (2001), "The expanding role of mitochondria in apoptosis," *Genes and Development*, **15**, 2922–2933.
- Wang, X. ve Cederbaum, A.I. (2008), "S-adenosyl-L-methionine decreases the elevated hepatotoxicity induced by Fas agonistic antibody plus acute

- ethanol pretreatment in mice,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **477**, 1–11.
- Wang, X.W., Hussain, S.P., Huo, T., Wu, C.G., Forgues, M. ve Hofseth, L.J. (2002), “Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma,” *Toxicology*, **181**, 43–47.
- Wang, Y.Z. ve Wong, Y.C. (1997), “Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Prostate Cancer: A Review,” *Urologic Oncology*, **3**, 41-460.
- Wang, Z.B., Liu, Y.Q. ve Cui, Y.F. (2005), “Pathways to caspase activation,” *Cell Biology International*, **29**, 489-496.
- Warren, S. (1997), “Trypan blue exclusion test of cell viability,” *Current Protocols in Immunology*, **2**, 129.
- Weber, F.G. (2008), “Molecular mechanisms of metastasis,” *Cancer Letters*, **270**, 181–190.
- Weir, L., Robertson, D., Leigh, I.M. ve Panteleyev, A.A. (2011), “The reduction of water-soluble tetrazolium salt reagent on the plasma membrane of epidermal keratinocytes is oxygen dependent,” *Analytical Biochemistry*, **414**, 31–37.
- Westerink, W.M.A. ve Schoonen, W.G.E.J. (2007), “Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells,” *Toxicology in Vitro*, **21**, 1581–1591.
- Xua, J.J., Diaz, D. ve O’Brien, P.J. (2004), “Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential,” *Chemico Biological Interactions*, **150**, 115–128.
- Yanishlieva, N.V., Marinova, E.M., Gordon, M.H., Raneva, V.G. (1999), “Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems,” *Food Chemistry*, **64**, 59-66.
- Yu, J. ve Zhang, L. (2005), “The transcriptional targets of p53 in apoptosis control,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **331**, 851–858.
- Yuan, L. ve Kaplowitz, N. (2009), “Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity,” *Molecular Aspects of Medicine*, **30**, 29–41.

- Yüksel, N. (2001), "Sitokrom p450 enzim sistemi ve ilaç etkileşimleri," 35. *Ulusal Psikiyatri Kongresi (Trabzon), Klinik Psikiyatri*, **1**, 5-16.
- Zeytinoğlu, H., İncesu, Z. ve Başer, K.H.C. (2003), "Inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human N-RAS oncogene," *Phytomedicine*, **10**, 292-299.
- Zhang , J.F., Liu, J.J., Lu, M.Q., Cai, C.J., Yang, Y., Li, H., Xu, C. ve Chen, G.H. (2007), "Rapamycin inhibits cell growth by induction of apoptosis on hepatocellular carcinoma cells *in vitro*," *Transplant Immunology*, **17**, 162–168.
- Zhang, J.H., Zhang, Y. ve Herman, B. (2003), "Caspases, apoptosis and aging," *Ageing Research Reviews*, **2**, 357–366.
- Zhang, X., Egawa, K., Xie, Y. ve Ihn, H. (2009), "The expression of SnoN in normal human skin and cutaneous keratinous neoplasms," *International Journal of Dermatology*, **48**, 579–583.
- Zorzi, D., Laurent, A., Pawlik, T.M., Lauwers, G.Y., Vauthey, J.N. ve Abdalla, E.K. (2006), "Chemotherapy-associated hepatotoxicity and surgery for colorectal liver metastases," *British Journal of Surgery*, **94**, 274–286.