

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SORAFENİB VE *CYNARA SCOLYMUS* L. YAPRAK
EKSTRAKTININ HEPATOSELLÜLER KARSİNOM
ÜZERİNDEKİ SİNERJİSTİK ANTİKANSER ETKİLERİNİN *IN*
VITRO ANALİZİ**

Uğur DURMUŞ

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KUZUCU

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**ERZİNCAN
2021
Her Hakkı Saklıdır.**

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SORAFENİB VE *CYNARA SCOLYMUS* L. YAPRAK EKSTRAKTININ HEPATOSELLÜLER KARSİNOM ÜZERİNDEKİ SİNERJİSTİK ANTİKANSER ETKİLERİNİN IN VITRO ANALİZİ

Uğur DURMUŞ

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KUZUCU

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2020 verilerine göre, birincil karaciğer kanseri, dünya çapında en yaygın beşinci kanserdir ve kanser ölümlerinin ikinci önde gelen nedenidir. Hepatosellüler karsinom, birincil karaciğer kanserinin en yaygın histolojik türüdür ve bu malignitelerin %85 ila %90'ını oluşturur. Karaciğer kanseri olan hastaların genel prognozu zayıftır (mortalitenin insidansa oranı 0.95). Sistemik kemoterapi; cerrahi rezeksiyon, karaciğer transplantasyonu veya lokalize tümör ablasyonu için uygun olmayan ilerlemiş hepatosellüler karsinom hastaları için tedavinin temel dayanağı olmaya devam etmektedir. Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi tarafından 2005 yılında onaylanmış Sorafenib 2007 yılında hepatosellüler karsinom tedavisi için kullanılmaya başlanmış çoklu tirozin kinaz inhibitörüdür.

Sağlık profesyonellerinin tüm kanser türlerinde tedavi süresince alternatif tıp tekniklerinin de kullanılması yaygınlaşmıştır. Tedavileri devam eden hastalar, ilaçların yan etkilerinin azaltılması veya tedaviyi desteklemek amacıyla birçok bitki türünün ekstraktını veya içeriğindeki aktif maddeleri denetimli veya denetimsiz kullanılmaktadır. *Cynara scolymus* (Enginar), Asteraceae ailesine mensup, cynarin aktif maddesini içeren bir bitki türüdür. Karaciğer rahatsızlıklarında halk arasında kullanımı yaygın olan *Cynara scolymus*, karaciğer kanseri hastaları tarafından kemoterapinin yan etkilerinin azaltılması amacıyla kullanılmaktadır.

Tez kapsamında hepatosellüler karsinom tedavisinde kullanılan Sorafenib ve *Cynara scolymus* L. yaprak ekstraktının kombinasyonel etkisi incelenmiştir. Hepatosellüler karsinom hücre hattı (HepG2) üzerine Sorafenib ve *Cynara scolymus* L. yaprak ekstraktının farklı konsantrasyon kombinasyonlarının anti-kanser ve anti-proliferatif sinerjistik etkisi; hücre canlılık testi (XTT), RT-qPCR yöntemi ile bazı genlerin (*TNF-α*, *Bax*, *Caspase 3* ve *Bcl2*) ifade düzeylerinin belirlenmesi ve ELISA metodu ile aynı genlerin protein seviyeleri belirlenerek yorumlanmıştır. Ayrıca Katalaz, Karbonik anhidraz ve Gutatyon peroksidaz enzimlerinin aktiviteleri ölçülerek biyokimyasal değerlendirmeler yapılmıştır.

2021, 60 Sayfa

Anahtar Kelimeler: *Cynara scolymus* L., Hepatosellüler karsinoma, Sorafenib

ABSTRACT

Master Thesis

IN VITRO ANALYSIS OF SYNERGISTIC ANTI-CANCER EFFECTS OF SORAFENIB AND *CYNARA SCOLYMUS* L. LEAF EXTRACT ON HEPATOCELLULAR CARCINOMA

Uğur DURMUŞ

Erzincan Binali Yıldırım University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology.

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Mehmet KUZUCU

According to the 2020 data of the World Health Organization, primary liver cancer is the fifth most common cancer worldwide and the second leading cause of cancer mortality. Hepatocellular carcinoma is the most common histologic type of primary liver cancer and it accounts for between 85% and 90% of these malignancies. The overall prognosis of patients with liver cancer is poor (ratio of mortality to incidence 0.95). Systemic chemotherapy remains the mainstay of therapy for patients with advanced HCC who are not candidates for surgical resection, liver transplantation, or localized tumor ablation. Approved by the US Food and Drug Administration in 2005, Sorafenib is a multiple tyrosine kinase inhibitor that was used in the treatment of hepatocellular carcinoma in 2007.

It has become widespread for healthcare professionals to use alternative medicine techniques during treatment for all cancer types. Patients who continue their treatment are using the extracts of many plant species or their active ingredients under supervision or uncontrolled to reduce the side effects of the drugs or to support the treatment. *Cynara scolymus* (Artichoke) is a plant species belonging to the Asteraceae family, containing the active ingredient cynarin. *Cynara scolymus*, which is widely used in people with liver diseases, is used by liver cancer patients to reduce the side effects of chemotherapy.

The combination effect of Sorafenib and *Cynara scolymus* L. leaf extract used in the treatment of hepatocellular carcinoma was investigated within the scope of the thesis. Anti-cancer and anti-proliferative synergistic effect of different concentration combinations of Sorafenib and *Cynara scolymus* L. leaf extract on hepatocellular carcinoma cell line (HepG2); cell viability test (XTT), determination of expression levels of some genes (TNF- α , Bax, Caspase 3 and Bcl2) by RT-qPCR method and determination of protein levels of the same genes by ELISA method. In addition, biochemical evaluations were made by measuring the activities of Catalase, Carbonic anhydrase and Glutathione peroxidase enzymes.

2021,60 Pages

Keywords: *Cynara scolymus* L., Hepatocellular carcinoma, Sorafenib

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam da yardımlarını hiç esirgemeyen, bilgi, tecrübe ve donanımından her zaman yararlanabildiğim çok değerli danışman hocam, sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KUZUCU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez süresince benden desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Murat ÇANKAYA'ya teşekkürü bir borç bilirim. Hücre kültürü çalışmalarının her aşamasında teorik ve pratik destekler veren sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Aykut ÖZGÜR ve Dr. Ahmet ÇETİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü eğitimim boyunca beni her zaman destekleyen sevgili babam Emin DURMUŞ'a ve her daim yanımda olan sevgili annem Fatma DURMUŞ'a sabır ve anlayışlarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca FYL-2019-645 nolu proje ile bana maddi kaynak sağlayarak tezimi tamamlamamı sağlayan Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri yönetimine teşekkürlerimi sunarım.

Uğur DURMUŞ

Ocak, 2021

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZETİ

ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Karaciğer Kanseri Tanımı ve Sınıflandırılması	3
2.2. Hepatosellüler Karsinom	4
2.2.1. Hepatosellüler karsinomda tanı ve tedavi yöntemleri	7
2.2.2. Cerrahi rezeksiyon	7
2.2.3. Karaciğer nakli	7
2.2.4. İmmunoterapi	8
2.2.5. Hepatosellüler karsinomda sorafenib ile yapılan kombinasyon çalışmaları	8
2.3. Sorafenib	10
2.4. Hepatosellüler Karsinomda Genetik ve Epigenetik.....	13
2.5. Apoptoz.....	13
2.6. Kaspazlar.....	14
2.7. Bcl-2 Protein Ailesi.....	15
2.8. Tümör Nekrozis Faktör (TNF) Protein Ailesi	16
2.9. Bitkisel Yöntemlerin Kanser Tedavilerinde Kullanımı	17
2.9.1. <i>Cynara scolymus</i>	18
2.10. Kombinasyonel İlaç Çalışmaları.....	19
2.11. Hepatosellüler Karsinomda Katalaz, Glutatyon Peroksidaz ve Karbonik Anhidraz	21
3. MATERYAL ve YÖNTEM	23
3.1. Materyal	23
3.1.1. Kullanılan aletler ve cihazlar	23

3.1.2. Hücre hattı	24
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler	24
3.2. Yöntem.....	25
3.2.1. Hücre kültürasyonu.....	25
3.2.1.1. Hücre kültürü koşulları	25
3.2.1.2. Hücre hattının pasajlanması	26
3.2.1.3. Hücre hattı stoklarının oluşturulması	27
3.2.1.4. Hücre çözündürme	27
3.2.1.5. Hücre sayımı	28
3.2.1.6. <i>Cynara scolymus</i> L. yaprak ekstraksiyonu.....	29
3.2.2. Sitotoksikite çalışmaları	29
3.2.2.1. Uygulanacak kimyasalların hazırlanması	29
3.2.2.2. Hücre canlılık testi	30
3.2.3. Kombinasyon indeksinin hesaplanması	31
3.2.4. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi	31
3.2.5. RT-qPCR ile gen ifade düzeylerinin analizi.....	33
3.2.6. Gen konsantrasyonu ve saflığının belirlenmesi.....	34
3.2.7. Protein ekstraksiyonu	35
3.2.8. İstatistiksel hesaplamalar	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. Canlılık Testi.....	37
4.2. Kombinasyonel Etki Değeri.....	38
4.3. Gen İfade Düzeyleri	40
4.4. Protein Seviyeleri.....	42
4.5. Enzim aktiviteleri.....	44
5. SONUÇ ve TARTIŞMA	48
KAYNAKLAR	56

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1.	Dünyada tüm yaş gruplarındaki ve cinsiyetlerdeki en sık görülen bazı kanser türlerinin yüzdece dağılımları. (Globocan, 2020).....	4
Şekil 2.2.	Dünyada tüm yaş grupları ve cinsiyetlerdeki en yüksek mortaliteye sahip kanser türlerinin oranları. (Globocan, 2020).....	5
Şekil 2.3.	Benign ve Malign tümörler	6
Şekil 2.4.	Sorafenibin Kimyasal Yapısı (Web_3)	11
Şekil 2.5.	SOR' un farmakodinamik yolları. (Gong vd., 2017)	12
Şekil 2.6.	Normal hücre ve apoptoza uğramış hücre. (Vorster ve Joubert, 2010)	14
Şekil 2.7.	Kaspazların aktivasyonu. (Hui vd., 2004).....	15
Şekil 2.8.	TNF ailesinin hücre proliferasyonu ve apoptoz mekanizmasındaki işlevleri. (Van Horssen vd., 2006)	17
Şekil 2.9.	Organizmalarda reaktif oksijen oluşumunun basitleştirilmiş şeması ve katalaz gibi enzimler tarafından alınan karşı önlemler.	21
Şekil 3.1.	HepG2 karaciğer kanseri hücre hattı mikroskopik görüntüsü.....	25
Şekil 4.1.	24. saat HepG2 üzerine <i>C. scolymus</i> L. yaprak Ekstraktı, Sorafenib ve C+S'nin anti-kanser aktivitesi.....	37
Şekil 4.2.	48. saat HepG2 üzerine <i>C. scolymus</i> L. yaprak Ekstraktı, Sorafenib ve C+S'nin anti-kanser aktivitesi.....	37
Şekil 4.3.	24. saat HepG2 üzerine <i>C. scolymus</i> L. yaprak Ekstraktı, Sorafenib ve C+S'nin oluşturduğu logaritmik CI grafiği.....	39
Şekil 4.4.	48. saat HepG2 üzerine <i>C. scolymus</i> L. yaprak ekstraktı, Sorafenib ve C+S'nin oluşturduğu logaritmik CI grafiği.....	39
Şekil 4.5.	HepG2 üzerine <i>C. scolymus</i> L. yaprak ekstraktı ve Sorafenib' in <i>Bax</i> geni ifade düzeyine etkisi.....	40
Şekil 4.7.	HepG2 üzerine <i>C. scolymus</i> L. yaprak ekstraktı ve Sorafenib' in ve kombinasyonlarının <i>Caspaz-3</i> geni ifade düzeyine etkisi.....	41
Şekil 4.8.	HepG2 üzerine <i>C. scolymus</i> L. yaprak ekstraktı ve Sorafenib' in ve kombinasyonlarının <i>TNF α</i> geni ifade düzeyine etkisi	42

Şekil 4.9.	<i>C. scolymus</i> L. yaprak ekstraktı ve Sorafenib' in, kombinasyonlarının <i>BAX</i> proteini miktarı üzerine etkisi	42
Şekil 4.10.	<i>C. scolymus</i> L. yaprak ekstraktı ve Sorafenib'in, kombinasyonlarının <i>Bcl-2</i> proteini miktarı üzerine etkisi	43
Şekil 4.11.	<i>C. scolymus</i> L. yaprak ekstraktı ve Sorafenib'in kombinasyonlarının <i>Caspase-3</i> proteini miktarı üzerine etkisi	43
Şekil 4.12.	<i>C. scolymus</i> L. yaprak ekstraktı ve Sorafenib'in kombinasyonlarının <i>TNFα</i> proteini miktarı üzerine etkisi	44
Şekil 4.13.	<i>C. scolymus</i> L. yaprak ekstraktı ve Sorafenib'in kombinasyonlarının Katalaz enziminin aktivite grafiği.....	45
Şekil 4.14.	<i>C. scolymus</i> L. yaprak ekstraktı ve Sorafenib'in kombinasyonlarının Karbonik Anhidraz enziminin aktivite grafiği	46
Şekil 4.15.	<i>C. scolymus</i> L. yaprak ekstraktı ve Sorafenib'in kombinasyonlarının Glutasyon peroksidaz enziminin aktivite grafiği.....	47

TABLolar LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. HSK tedavisinde sorafenib ile kombine tedavi için araştırmaları devam eden inhibitörler	10
Tablo 3.1. Hücrelere uygulanan maddeler ve konsantrasyonları.	30
Tablo 3.2. Kombinasyon İndeksi (CI) değerleri	31
Tablo 3.3. RNA izolasyonu için petrilere uygulanan kimyasal maddeler ve deşişimleri. 32	
Tablo3.4. İfade düzeyleri belirlenen genler ve primer dizileri.	34
Tablo 3.5. RT-qPCR sıcaklık siklusu	35
Tablo 3.6. Protein ekstraksiyonu için deney seti	35
Tablo 4.1. 24. saat HepG2 üzerine <i>Cynara scolymus</i> Ekstraktı, Sorafenib ve C+S'nin uygulaması sonucu hesaplanan CI değerleri	38
Tablo 4.2. 48. saat HepG2 üzerine <i>Cynara scolymus</i> Ekstraktı, Sorafenib ve C+S'nin uygulaması sonucu hesaplanan CI değerleri	39
Tablo 4.3. <i>BAX</i> , <i>Bcl2</i> , <i>TNF α</i> ve <i>Caspase-3</i> protein seviyeleri	44
Tablo 4.4. Katalaz enziminin, 48. saat madde uygulanan HepG2 hücre hattında aktivite değerleri.....	45
Tablo 4.5. Karbonik Anhidraz, 48. saat madde uygulanan HepG2 hücre hattında aktivite değerleri.....	46
Tablo 4.6. Glutasyon Peroksidaz, 48. saat madde uygulanan HepG2 hücre hattında aktivite değerleri.....	46

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
°C	Celsius
µg	Mikro gram
µl	Mikro litre
µM	Mikro molar
dk	Dakika
L	Litre
M	Molar
ml	Mili litre
ng	Nano gram
nm	Nano metre

Kısaltmalar

cDNA	Komplementer DNA
CI	Kombinasyon İndeksi
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
HepG2	Hepatosellüler karsinom Hücre Hattı
HKS	Hepatosellüler Karsinoma
HSGM	Halk Sağlığı Genel Merkezi
MDR	Çoklu İlaç Direnci
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-qPCR	Ters Transkriptaz Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SC	<i>Cynara scolymus</i> L. Yaprak Ekstraktı
SHARP	The Sorafenib Hepatocellular Carcinoma Assessment Randomized Protocol
SOR	Sorafenib
TERT	Telomeraz reverse transkriptaz
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Hepatosellüler karsinom (HKS) yetişkinlerde görülen primer karaciğer kanserinin en sık görülen ve beş yıllık sağ kalım oranı %9' un altında olan bir malignitedir. Siroza neden olarak mortalite bakımından erkekler ve kadınlarda en çok görülen üçüncü kanser türüdür. HKS, dünya genelinde her yıl yaklaşık 700.000 insanın ölümüne sebep olmakta ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen üçüncü nedeni olmaya devam etmektedir. HKS insidansı, özellikle Sahra altı Afrika'nın yanı sıra özellikle Çin gibi gelişmekte olan ülkelerde, dünya çapında çarpıcı bir artış göstermektedir. Kuzey Amerika kıtasının yanı sıra Orta ve Güney Avrupa bölgelerinde de HKS vakalarındaki artışta önemli bir ivmelenme yaşanmaktadır. Her ne kadar HKS vakalarının çoğunluğu hepatit B ve C virüslerine bağlı enfeksiyonlardan kaynaklı ise de obezite, aşırı demir yükü, alkol kullanımı, aflatoksin ve nitrosoaminler gibi risk faktörleride HKS'ye sebep olabilmektedir. HKS tedavisinde kullanılabilen cerrahi yöntemler sınırlı olmak ile birlikte %50 oranında nüksetmeyi arttırdığı bilinmektedir.

HKS hastalarına tedavi olarak kullanılan temel ilaç Sorafenib (Nexavar®) dir. Anti-proliferatif ve anti-anjiyogenik aktiviteye sahip bir multikinaz inhibitörü olan Sorafenib (SOR), ileri HKS tanısı olan hastalar için Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanan ilk sistemik tedavidir. SHARP (The Sorafenib Hepatocellular Carcinoma Assessment Randomized Protocol) ve Asya Pasifik denemeleri, SOR kullanımının plaseboya kıyasla genel sağ kalımı üç ay artırabileceğini göstermiştir.

Sorafenib'in çok ciddi yan etkileri bulunmaktadır. Bunlardan en önemli etkiler arasında kalp kası iskemisi ya da enfarktüsüdür. Ayrıca sindirim ile ilgili organların (mide, bağırsak, safra) ağır tahrişine, ilacın etkisiyle de hepatit ve hipertansiyona sebep olmaktadır. İlacın etkilerini yaygın ya da daha az görülen olarak ikiye ayırmak mümkündür. İnsanlarda görülen en yaygın Sorafenib etkileri yorgun hissetme, alopesi, el ve ayaklarda görülen deri lezyonları, deride döküntü, iştahın kapanmasıyla birlikte kilo verme, mide bulantısı, sindirim organlarında şiddetli ağrı ve kan basınçlarında ani değişimlerdir.

Bu nedenle HKS hastaları alternatif olarak bazı doğal besinleri kullanmaya yönelmişlerdir. *Cynara scolymus*, Asteraceae familyasının çok eski bilinen, kapitula

denilen olgunlaşmamış enginar başı, yenilebilir etli yaprakları ve tablasından oluşan dünya çapında yetiştirilen bir bitki türüdür. Aynı zamanda posa, vitamin, fenolik bileşikler, inülin ve mineralce zengindir. *Cynara scolymus*'un mineral içeriği yetiştirildikleri bölgeye, mevsim farklılıklarına ve genotiplerine göre değişkenlik göstermektedir. Geçmişten günümüze alternatif tıpta kullanılan, etnobotanik açıdan önemli bir yere sahip olan *Cynara scolymus*, karaciğer sağlığı için en çok tercih edilen besin kaynağıdır. Karaciğerde detoksifikasyon mekanizmasına olan faydaları bilinmesine rağmen HKS hastaları için nasıl bir etki oluşturduğu henüz bilinmemektedir. *Cynara scolymus*'un dispeptik, antioksidatif, koloretik, kolesterol düşürücü ve antikarsinojenik etkileri olduğu bildirilmiştir. *Cynara scolymus*'da bulunan önemli bir polifenol olan sinarin maddesi oksidatif strese karşı koruyucu etkisinin yanı sıra kanser hücrelerinde apoptozisi indüklediği de bilinmektedir.

Tez çalışmasında, Sorafenib ve *Cynara scolymus* L. yaprak ekstraktı'nın bir HSK hücre hattı olan HepG2 üzerine sinerjistik anti kanser etkisi in vitro olarak incelenmiştir. Öncelikle HepG2 hücre hattı üzerinde sinerjistik etki çalışmaları yapılmış ve çıkan sonuçların Compusyn programı ile Kombinasyonel İndeks (CI) değerleri hesaplanmıştır. RT-qPCR ile *Caspase-3*, *Bax*, *Bcl-2* ve *TNF- α* genlerinin ekspresyon analizleri ve ELISA ile yine aynı genlerin protein analizleri yapılmıştır. Katalaz, glutatyon peroksidaz ve karbonik anhidraz enzim aktiviteleri ölçümleri yapılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Karaciğer Kanseri Tanımı ve Sınıflandırılması

Primer karaciğer kanserlerinin çoğu, hepatositlerden veya intrahepatik safra kanalı hücrelerinden, epitelyal hücre kökenlidir. Karaciğerin primer epitel kanserleri, menşei hücrelerine ve histolojik özelliklerine göre 6 tipte sınıflandırılır (Hamilton ve Altonen, 1999). Globocan (2019) verilerine göre dünya genelindeki en çok kanser vakası görülen kıta Asya kıtasıdır, ikinci sırada ise Avrupa gelmektedir. 18,1 milyon vakanın %48,4'ü Asya'da, %23,4'ünde Avrupa'dadır.

Epitelyal olmayan karaciğer kanserleri nadirdir. Karaciğer kanserinin coğrafi dağılımı dünya çapında, belki de diğer tüm kanser türlerinden daha fazla değişkenlik gösterir (Sankaranarayanan vd., 1998).

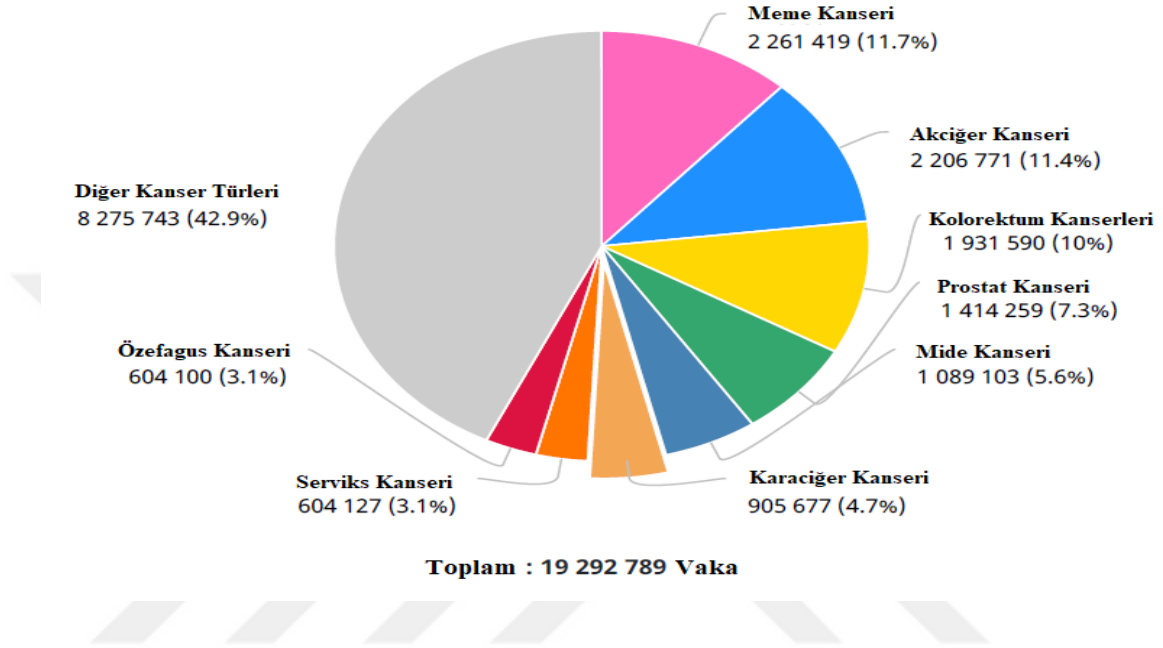
Hepatoblastom çocukluk çaının bir kanseridir (Herzog vd., 1999). Farklılaşma paterni olan malign embriyonal bir tümör olan hepatoblastom, fetal epitel hepatositlerini andıran hücrelerden embriyonik hücrelere kadar değişen ve osteoid hücrelerine benzer lifli bağ dokusu ve çizgili kas liflerini içeren farklılaşmış mezenkimal dokulara etki eden kanser hücreleridir.

İntrahepatik safra kanalı kanserleri katı veya kistik olabilir. Kolanjiyo karsinom (CCA) çoğu popülasyonda nispeten nadirdir, ancak karaciğerin primer kanserleri arasında ikinci sıradadır. İntrahepatik safra kanalına benzeyen hücreleri içerir (Nakanuma vd., 1999).

Safra kanalı kist adeno karsinomu, mukus salgılayan veya daha az sıklıkla siroz yapabilen, papiller katlanmalara sahip epitel ile kaplı kistik bir tümördür. Lezyonlar karaciğerin hilumuna proksimal kanallardan kaynaklanır. Kombine hepatosellüler ve kolanjiyo karsinom, hem Hepatosellüler hem de kolanjiyo karsinomun, kesin olarak karıştırılan kesin unsurlarını içeren nadir bir tümördür (Pichlmayr vd., 1989). Hepatosit çizgisinin kanserleri arasında, hepatosellüler karsinom (HKS) dünya çapında en yaygın bulunan tiptir.

2.2. Hepatosellüler Karsinom

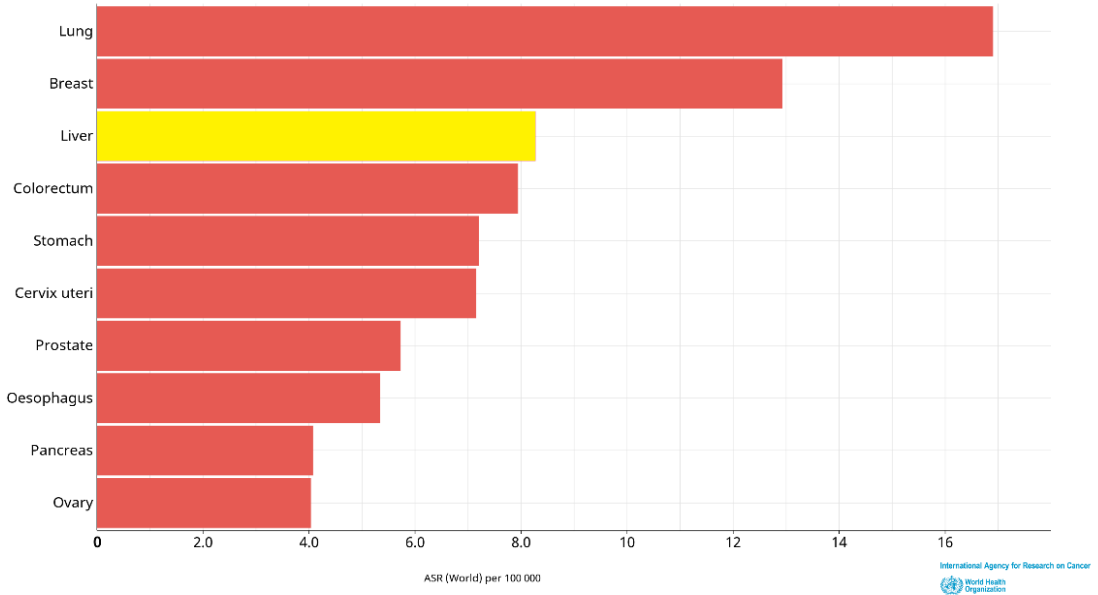
Erkeklerde ve kadınlarda en sık teşhis edilen kanser vakalarını ve ulusal düzeyde kanser ölümünün önde gelen türleri Şekil 2.1 de gösterilmektedir. Bu haritalar önde gelen kanser türlerinde önemli küresel çeşitliliğini ortaya koymaktadır.



Şekil 2.1. Dünyada tüm yaş gruplarındaki ve cinsiyetlerdeki en sık görülen bazı kanser türlerinin yüzde dağılımları. (Globocan, 2020)

Prostat kanseri, 105 ülkede en sık teşhis edilen kanserdir. Bunu takiben 37 ülkede akciğer kanseri ve 13 ülkede karaciğer kanseri izlemiştir. Bazı kanserler, coğrafi olarak heterojen bölgelerde en sık görülen tipi temsil eder ve bunun bariz örneği Karaciğer Kanseridir. Diğerleri ise bazı yüksek riskli bölgelerde kümelenme eğilimindedir (örneğin, Güney Asya'da dudak ve ağız boşluğu kanserleri, Doğu Afrika'da Kaposi sarkoması). Akciğer kanseri, 93 ülkede erkekler arasında en önemli kanser ölüm nedenidir. Ardından prostat kanseri (46 ülke) ve karaciğer kanseri (20 ülke) gelmektedir. Dünyada tüm yaş grupları ve cinsiyetlerdeki en yüksek mortaliteye sahip kanser türlerinin oranları Şekil 2.2.de gösterilmiştir.

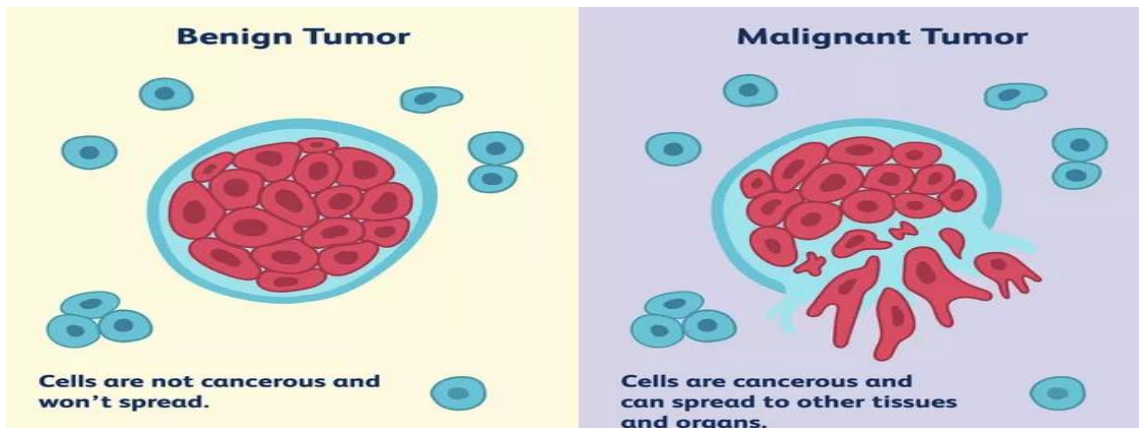
Estimated age-standardized mortality rates (World) in 2020, worldwide, both sexes, ages 0-84



Şekil 2.2. Dünyada tüm yaş grupları ve cinsiyetlerdeki en yüksek mortaliteye sahip kanser türlerinin oranları. (Globocan, 2020)

Primer karaciğer kanseri, hepatosellüler karsinom (HKS) (vakaların %75-85'ini içerir) ve intra hepatik kolanjio karsinomu (vakaların %10-%15' ini içerir) ve diğer nadir görülen bazı türleri içerir. HKS için ana risk faktörleri, hepatit B virüsü (HBV) veya hepatit C virüsü (HCV), aflatoksinle kontamine gıda maddeleri, ağır alkol alımı, obezite, sigara ve tip 2 diyabet gibi kronik enfeksiyonlardır (Chang vd., 1997; Nguyen vd., 2009). Başlıca risk faktörleri bölgeden bölgeye değişmektedir. Çoğu yüksek HKS görülen bölgelerde (Çin, Doğu Afrika), kilit belirleyiciler, kronik HBV enfeksiyonu ve aflatoksin maruziyetleridir. Diğer ülkelerde (Japonya, Mısır) ise, HCV enfeksiyonu kilit belirleyici olmuştur. Moğolistan'da, HBV, HCV virüsü ve HCV veya hepatit δ virüsü ile birlik de alkol kullanımı da yükselen orana katkıda bulunmaktadır. Obezite sıklığının da artması, düşük riskli HKS alanlarında, artan HKS insidansına katkıda bulunan bir faktör olarak kabul edilmektedir (Balogh vd., 2016). 1982'den bu yana, HBV den kaynaklı karaciğer kanseri vakalarının önüne geçebilmek için aşı yoluyla müdahale edilmiştir. Çocukluk da aşılaman genç nesiller karaciğer kanserinin yaygınlaştığı çağlara ulaştığında, daha dirençli bir metabolizmaya sahip olmuşlardır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), bu aşının rutin bebek bağışıklama programlarına dahil edilmesini önermektedir. 2016'nın sonuna kadar, 186 ülke de HPV aşısını ulusal bağışıklama programlarına sunmuş ve birçok ülke, önerilen

tam doz için %80'den fazla katılım sağlamıştır (Liaw vd., 2004). Aşı, yüksek riskli ülkelerde daha genç yaşlarda HBV enfeksiyonu prevalansını ve HKS insidansını önemli ölçüde azaltmıştır. Toplu aşılanmanın ilk kez başlatıldığı bölge Doğu Asya'dır. Bununla birlikte, şu anda, HCV enfeksiyonunu önlemek için hiçbir aşı mevcut değildir. Yüksek oranda riskli ülkelerde HCV bulaşında önemli düşüşler olmasına rağmen, kontamine iğnelerin ve güvenli olmayan transfüzyonların kullanımının devam etmesi, düşük gelirli ülkelerde enfeksiyonun yayılmasına sebep olmaktadır (Yang vd., 2002; Sherman, 2005). HBV ve HCV tedavisinde son gelişmeler, maliyetlerin şu anda yasaklayıcı olmasına rağmen, çok sayıda karaciğer kanseri vakasının önlenebileceğini göstermektedir. Bölünme yeteneğine sahip olan hücrenin herhangi bir nedenle kontrolsüz çoğalmasına tümör adı verilir. Tümörler iyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) olmak üzere ikiye ayrılır (Bknz, Şekil 2.3.). Tüm malign tümörler kanser olarak nitelendirilir. Malign tümörler, metastaz özelliği olan, apoptoz yollarını kapatmış, anjiyogenez özelliği gösteren yaşam süresini kısaltan hatta ölüme sebep olan tümör türleridir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Malign tümörler komşu dokulara girebilmek için matrix bileşenlerini parçalama özelliği olan proteaz enzimi salgırlar (Keleg vd., 2003, Bozzuto vd., 2010). Ayrıca bu hücreler zamanla telomer kısalması sonucu hücre ölümünü engellemek için telomeraz enziminin aşırı ekspresyonunu sağlar, bu sayede sınırsız replikasyon yeteneğine sahip olurlar (Lowe ve Lin, 2000). Malign tümörlerin başka bir önemli özelliği ise besin alımı ve metabolik atıklardan kurtulmak için anjiyogenez (Damar oluşumu) yapmasıdır (Hanahan ve Weinberg, , 2011)



Şekil 2.3. Benign ve Malign tümörler

2.2.1. Hepatosellüler karsinomda tanı ve tedavi yöntemleri

2.2.2. Cerrahi rezeksiyon

Siroz etkisi bulunmayan ve tek lezyonlu yapıya sahip olan hastalar için en uygun tedavi yöntemidir. Fakat bu tedavi HKS hastalarının sadece küçük bir bölümünü kapsar. Bunun nedeni ise tanı konulan HKS hastalarının büyük bir kısmında, tanı anında sirotik olmalarıdır. Bu tedavide sağ kalım oranı ilk yılda ortalama olarak %55-80 iken, üçüncü yılda %42-49, beşinci yılda ise %25-39 olarak bildirilmektedir (Monden vd., 1992). Luminal A tümörleri ile karşılaştırıldığında, luminal B tümörleri bazı daha kötü prognoza yol açan faktörlere sahiptirler (Haque vd., 2012).

2.2.3. Karaciğer nakli

HKS de organ nakli tümörün 5 cm'den küçük olması durumunda veya tümörün 3 cm'den küçük maksimum 3 tümöre sahip hastalarda yapılmaktadır. Karaciğer naklinde asıl amaç kemoterapi için tedaviye yanıt oranını arttırmaktır. Ancak nakil sonrası oluşacak olan immün sistem problemleri maalesef tedavi için sorun teşkil etmektedir (Byam vd., 2013). Bu tedavinin diğer bir olumsuz durumu ise nakil sürelerinin uzun olması ve bu süre zarfından HSK'nın ilerlemesidir (Akyıldız vd., 2011). HSK farklılaşma özelliği yüksek hücrelere sahiptir ve birden fazla kemoterapiye karşı dirençli hale gelmektedirler (Yıldırım, 2007). Günümüze kadar HSK'da sisplatin, doksorubisin, 5-florourasil ve etoposid gibi birçok ilacın etkinliğinin yanıt oranı olarak %8-18 arasında olduğu görülmüştür (Abou-Alfa, 2004). Ayrıca yapılan başka bir çalışmada PIAF (Sisplatin / İnterferon α -2b / Doksorubisin / 5-Fluorourasil, Capecitabine 5-Fluorouracil) ve doksorubisin araştırıldığında bu iki kemoterapötik ilacın yaşam süresini uzattığına dair bulgu bulunamamıştır (Yeo vd., 2005). Başka bir kemoterapide kullanılan Kapesitanibin ise 5-FU'ya yakın oranlarda bir tedaviye yanıt verme oranı vardır (Lozano vd., 2000). Bu sebeplerden dolayı HSK'nın tedavisinde tek ilaç kullanımı yapılmayarak kombin ilaç tedavisi yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak bu tedavi yöntemlerinde kemoterapik ilaçların yan etkileri oldukça fazla olduğundan bu hücrelerin moleküler sinyal yollarının araştırılması ve bu yollara uygun kemoterapik ilaç ve bitkisel etki maddelerin araştırmalarına yönelmiştir (Brown, 2006).

2.2.4. İmmunoterapi

Kanser immünoterapisi, vücut bağışıklık sisteminin kanser hücrelerini tanıma ve yok etme yeteneğini kullanmayı hedefleyen bir tedavi yöntemidir (Grosso, 2013). Bilinen anti-kanser tedavilerinden farklı olarak direkt tümör hücrelerini hedefleme değil, tümör hücrelerini öldürmek üzere aktif hale getirilmiş immün sistem hücrelerini hedeflenmektedir. Bu nedenle aynı immünoterapi tedavisi farklı grup tümörlerde etkili olabilir. İmmünoterapötik tedavileri 2 alt ana grupta incelediğimizde; immün sistemin aktive edilmesi, T-hücreler ve antikorlar ile pasif immünoterapi ile karşılaşırız. İmmün sistemin aktivasyon grubunda, tümör hücreleri ve antijenleri ile aşılama yapılması, NK hücreleri ve T lenfositleri aktivasyonunu sağlayan sitokinlerin kullanılması, immün denetim noktası inhibitörleri bulunur. T-hücreler ve antikorlar ile pasif immünoterapi grubunda ise Anti-tümör etkisi bilinen hücrelerin kültürlerde çoğaltılarak hastaya verilmesi, kanser aşılı ve tümöre özgü monoklonal antikorlar bulunur. Kanser immünoterapisinin hedeflediği hücre grupları, tedaviye yanıt yüzdeleri ve tedaviye yanıtların kalıcılığı, yan etkiler gibi diğer kanser tedavilerden ayıran spesifik özellikler bulunmaktadır. Kemoterapi kullanıldıktan sonra sitotoksik etkiler erkenden belirmeye başlamasına rağmen immünoterapide bu durum daha geç seyreder. Ayrıca bazı oluşan durumlarda progresyonun ardından bile tümör boyutunda küçülme görülebilmektedir (Grazie, 2017).

2.2.5. Hepatosellüler karsinomda sorafenib ile yapılan kombinasyon çalışmaları

Hepatosellüler karsinomun tedavisinde sorafenib ile kombinasyon yapılarak kullanılan birçok kemoterapötik ilaçlar mevcuttur.

Brivanib, VEGFR ve FGFR'nin ikili tirozin kinaz inhibitörü olarak görev yapan küçük bir moleküldür. Oral alımla (günde bir kez 800 mg), başlangıçta ilk basamak tedavi olarak değerlendirilmiştir. Yapılan bazı deneysel çalışmalarda örneğin; BRISK-FL çalışmasında, sorafenib kıyaslanmış ve daha sonra BRISK-PS çalışmasının sorafenibe yanıt vermediği tespit edilmiş ardından intoleransından şikâyet eden hastalarda plaseboya kıyasla ikinci basamak tedavi olarak BRISK-FL çalışması yapılmıştır. Bu çalışmalar, brivanib ve sorafenib arasında genel sağkalım açısından hiçbir farkın göstermediğini ortaya koymuştur (Johnson vd., 2012).

Sunitinib, multikinaz inhibitörü olarak görev yapan ve VEGFR, PDGFR ve c-kit'i hedefleyen başka bir küçük moleküldür. Yalnızca bir faz III çalışma (SUN1170 çalışması), HKS için birinci basamak tedavi olarak ilacın etkinliği araştırılmış, ancak yan etkiler nedeniyle çalışmalar durdurulmuştur. Yine de sunitinib, genel sağkalım açısından sorafenibden daha düşük yüzdede olduğu tespit edilmiştir. Deneylerin tamamlanmamasından kaynaklı ve mevcut kanıtlara göre sunitinib, bir terapötik ilaç alternatifi olarak düşünülmemelidir (Cheng vd., 2013).

Linifanib, VEGFR ve PDGFR'yi hedefleyen ikili bir tirozin kinaz inhibitörüdür. LIGHT faz III çalışmasında, Linifanibi ilk basamak tedavi olarak sorafenib ile karşılaştırmışlardır. Elde edilen sonuçlarda, iki grup arasındaki genel sağkalım oranı benzerlik gösterse de Linifanib grubun daha yüksek oranda yan etkisi olduğu tespit edilmiştir (Cainap vd., 2013).

Erlotinib, SEARCH faz III çalışmasında sorafenib ile tek başına etkisi ile sorafenib kombinasyonunu değerlendiren, EGFR'yi hedefleyen bir tirozin kinaz inhibitörüdür (Zhu vd., 2015). Bu çalışma kombinasyonlarında, genel hayatta kalmada, artışa yol açmadığı ortaya konulmuş ve bu sonucu güçlü toksisite ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Everolimus, rapamisininin memeli hedefini (mTOR) inhibe eder. EVOLVE-1 faz III çalışmasında, sorafenib yokluğu veya intoleransı durumunda plasebo ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilme yapılmış, ancak genel sağkalım oranını artırmadığı tespit edilmiştir (Zhu vd., 2015).

Ramucirumab, VEGFR-2'nin hücre dışı alanına bağlanabilen bir rekombinant IgG1 monoklonal antikordur. REACH çalışması, plaseboya kıyasla ikinci basamak tedavi olarak etkinliğini göstermede başarısız olmuştur. Çünkü genel sağkalım iki grup arasında benzerlik göstermiştir. Ancak alfa-fetoprotein > 400 ng / ml olan hastalarda elde edilen umut verici sonuçlar, bu ilacın bu spesifik popülasyonda yararlılığını doğrulamak için devam eden bir denemeye yol açmıştır (Zhu vd., 2015).

Regorafenib, oral yoldan uygulanan ve sorafenibden türetilen VEGFR1-3, TIE2, c-kit, Ret, yabani tip veya V600-mutasyona uğramış B-RAF, PDGFR ve FGFR'ye etki eden çok hedefli bir inhibitördür. RESORCE çalışması, sorafenibin toleransı veya başarısızlığı

gösteren hastalarda plaseboya kıyasla yakın zamanda ilacı ikinci basamak tedavi olarak değerlendiren faz III, randomize, çift kör bir çalışması yapılmıştır. Regorafenib, genel sağkalım açısından pozitif sonuçlar ortaya koymuştur. Bildirilen yan etkiler hipertansiyon, yorgunluk, ishaldir. Bu deneye dayanarak, sorafenib tedavisindeki ilerleme ile kıyaslayacak olursak ilerlemiş HKS'nin tedavisi için sistemik tedaviye ilişkin şu anda mevcut olan tek alternatifin regorafenib olduğunu doğrulamak mümkündür (Bruix vd., 2017). Sorafenibin diğer terapotik ilaçlarla kullanımı üzerine birçok çalışma yapılmaktadır ve bu çalışmalar Tablo 2.1’ de kısaca gösterilmiştir.

Tablo 2.1. HSK tedavisinde sorafenib ile kombine tedavi için araştırmaları devam eden inhibitörler (Gao vd., 2015)

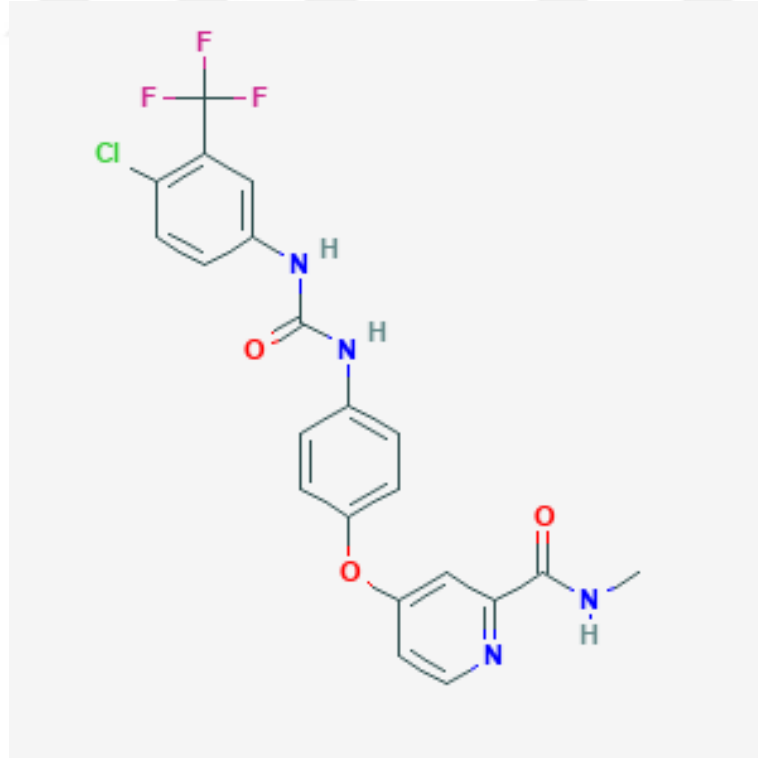
KOMBİN İLAÇLAR	TEDAVİ ŞEKLİ	MEVCUT AŞAMA
ANTIANGİYOGENİK AJANLAR		
Dalantercep	Eş zamanlı	Bekleniyor
Axitinib	Başarısız tedavi sonrası	İleri klinik denemeleri
Apatinib	Başarısız tedavi sonrası	Bekleniyor
MEK/ERK İNHİBİTÖRLERİ		
AZD6244	Eş zamanlı	Bilinmiyor
Refametinib	Eş zamanlı	İleri klinik denemeleri
MTOR İNHİBİTÖRLERİ		
Sirolimus	Eş zamanlı	Sinerjistik
Everolimus	Eş zamanlı	Bekleniyor
Temsirolimus	Eş zamanlı	Bekleniyor
PI-103	Eş zamanlı	Sinerjistik
PIK-587	Eş zamanlı	Sinerjistik
HİSTON DEASETİLİZ İNHİBİTÖRLERİ		
Panobinostat	Eş zamanlı	Faz 2
Vorinostat	Eş zamanlı	İleri klinik denemeleri
Resminostat	Eş zamanlı	Bilinmiyor
MPT0E028	Eş zamanlı	Sinerjistik
EGFR İNHİBİTÖRLERİ		
Erlotinib	Eş zamanlı	Uygun bulunmadı
c-MET İNHİBİTÖRLERİ		
MSC2156119J	Başarısız tedavi sonrası	Bekleniyor
Tivantinib	Başarısız tedavi sonrası	Bekleniyor
DE605	Eş zamanlı	Sinerjistik

2.3. Sorafenib

Sorafenib (Nexavar®), kimyasal formülü $C_{21}H_{16}ClF_3N_4O_3$ (Şekil 2.4) olan birçok farklı kanser türünde etkili bir çoklu kinaz inhibitörüdür (Wilhelm vd 2004). (SOR), ameliyat ile müdahale yapılamayacak durumda olan ileri seviyede HSK hastalarının yaşamlarını

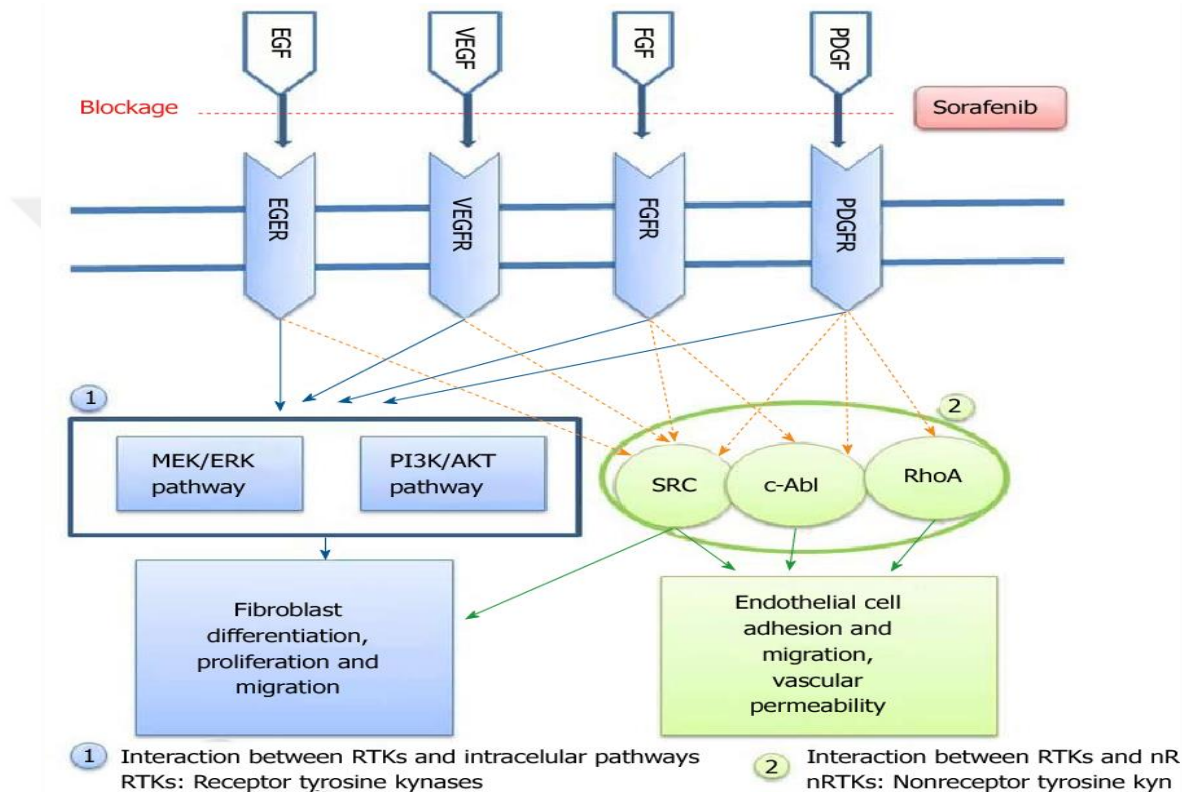
uzatmak ve HSK'nın ilerlemesini önlemek için kullanılmaktadır (Gillian vd., 2009). SOR haricinde HSK tedavisinde FDA onayı almak için çalışmalar yapılan bazı inhibitörler ise şunlardır; erlotinib, bevacizumab, sunitinib, cetuximab.

Assesment Randomized Protocol (SHARP), SOR'un HSK ya etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, 602 yüksek seviye HSK hastalarında, sorafenib için toplam sağkalım süresi 46,3 hafta ve plasebo da ise toplam sağ kalım süresi 34,4 hafta olarak saptanmıştır. HSK'nın ilerlemesine kadar olan süre sorafenib için 24, plasebo için ise 12,3 haftadır. HSK hastalarında tedaviye yüksek oranda cevap vermemesine rağmen sağkalım süresini uzatan tek ilaçtır (Sunar, 2011). SOR kullanımı, HSK hastalarının tümör boyutlarında azalmasına sebep olmuştur (Abdel-Rahman, 2013). Sağ kalım sürelerinin uzatılmasında erken tanı ve cerrahi yöntemlerin yanında SOR kullanımı da çok etkilidir. Erken evrede SOR kullanımı 19-20, orta evrede ise SOR kullanımı 1 yıla kadar sağkalım süresini arttırmaktadır. HSK hastalarının son evrelerinde ise SOR kullanımı tek tedavi yöntemidir ve hastanın sağ kalımını 3-4 ay uzatabilmektedir (El-Serag ve ark, 2008; Llovet vd., 2008).



Şekil 2.4. Sorafenibin Kimyasal Yapısı (Web_3)

SOR'un farmakodinamik yolları incelendiğinde (Şekil 2.5.), kanserin oluşumunda yer alan, PDGFR, KIT, FLT3, RET, VEGFR 1, 2 ve 3 ve FGFR1 hücre yüzey kinazlarını bloke ederek HSK tümörlerinin büyümesini ve HSK'nın ilerlemesini engellediği saptanmıştır. SOR, CRAF ve BRAF kinazlarını da içine alarak RAF/MEK/ERK sinyal yollarını inhibe eden bir inhibitördür. SOR, HSK da hem anjiyogenez hem de tümör hücrelerinin çoğalmasını engellemektedir (Gong vd., 2017).



Şekil 2.5. SOR'un farmakodinamik yolları. (Gong vd., 2017)

HKS hücre hatlarında yapılan çalışmalarda sorafenibin apoptotik yollara etkileri belirlenmiştir (Chen vd., 2010). SOR ile yapılan, HepG2, SK-Hep1, PLC / PRF / 5, Hep 3B hücre hatlarındaki çalışmalarda, SOR'un HKS hücrelerindeki büyüme sinyallerini bloklayarak, HKS hücrelerini apoptotik yolağa soktuğu tespit edilmiştir (Fernando vd., 2012). Zhang ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada ise SOR'un HKS hücrelerinde, her zaman kullanılan nano taşıyıcı sistemlerde kullanılan etken kansorejenlere göre daha fazla apoptozu indüklediği ortaya konmuştur (Zhang vd., 2012). Son yapılan çalışmalarda SOR'un başka bir özelliği, HKS hücrelerinde apoptotik etki haricinde, otofajik ölüme neden olduğu da tespit edilmiştir (Shimizu vd., 2011).

Bir kanser hücresi, proliferatif kapasitesine göre apoptoza karşı dirençli olur ve daha çok oranda diğer hücrelere invaziv yönelim gösterir. Aynı zamanda anjiyogenez potansiyeline sahip olmalarından kanser tedavilerinde elde edilecek başarıyı yüksek oranda etkilemektedirler. Bu yüzden kombin şeklinde tedaviler uygulanarak dezavantajlı durumdan, avantajlı duruma geçmek hedeflenmiştir (Frei ve Eder, 2003).

2.4. Hepatosellüler Karsinomda Genetik ve Epigenetik

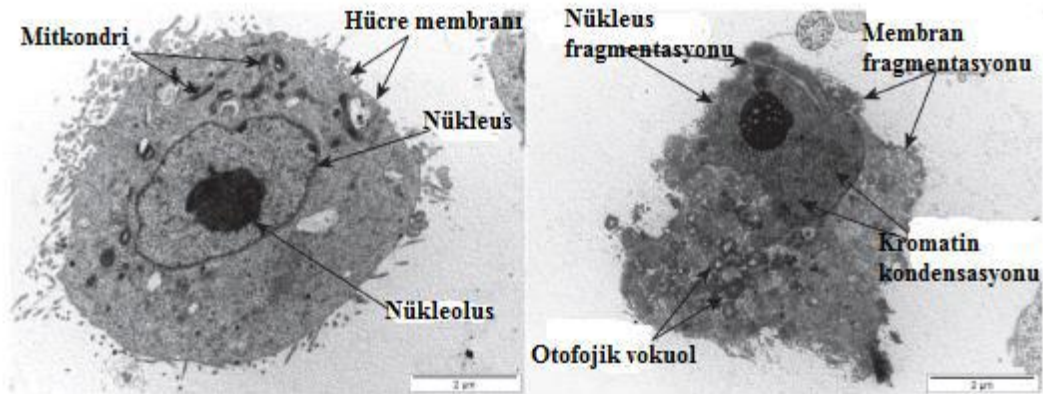
HSK'nın moleküler başlıklarını genetik ve epigenetik değişiklikler oluşturmaktadır. Bir gen bölgesine veya dizilişine viral bir DNA entegre olduğunda, genin ekspresyonuna tamamen etki etmektedir. Viral dizilerin genoma entegre olması, kromozomların yapısal bütünlüğünü bozarak HSK hücrelerinde kromozomal kararsızlığa sebep olmaktadır. Telomeraz enziminin protein alt birimi olan telomeraz revers transkriptaz (TERT) ise telomerazın aktivitesini belirler. Bir hücre içerisinde telomerazın aktivitesi yüksek ise, telomerinin de o kadar uzun olduğu ve böyle olmasının da hücrelerin bölünme kapasitesini artırdığı bildirilmiştir (Griffith vd., 1999). Telomeraz aktivitesi ile insan ve hayvan tümör virüslerinin ilişkisinin incelendiği araştırmalarda hücresel döngü ve karsinogenezisteki telomeraz yolları belirlenmeye çalışılmıştır. Telomeraz fonksiyonlarında kodlanmayan viral RNA'ların (ncRNAs) ve konak hücre ncRNA'larda virüs nedenli farklılıkların destekleyici rol oynadığı tespit edilmiştir (Hartwig vd., 2014). Yapılan bu araştırmalarda Epstein-Barr virüsünün (EBV), Kaposi sarkomaya neden olan herpes virüsün, insan papilloma virüsünün (HPV), hepatit B virüsünün (HBV), hepatit C virüsünün (HCV) ve insan T-hücreli lösemi/lenfoma virüsü tip 1 (HTLV-1)'in telomeraz transkripsiyonunu arttırabildiği görülmüştür (Bellon ve Nicot, 2008). Ayrıca, Hepatit B ve Hepatit C pozitif hastalarından alınan karaciğer doku biyopsileri, normal karaciğer dokusu ile karşılaştırıldığında telomeraz aktivitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Miura vd., 1997).

2.5. Apoptoz

Hasarlı, yaşlı, bozulmuş hücrelerin yıkılması için oluşturulan hücresel sinyal yolları tarafından düzenlenmiş hücre ölümlerine apoptoz yani programlanmış hücre ölümü denir (Edinger ve Thompson, 2004). Normal bir insan vücudunda dengenin sağlanabilmesi için

en az 10 milyar hücrenin programlı ölümüne gitmesi gerekir (Renehan vd., 2001). Bazı hastalıklarda hücresel anormallikler bu ölüm yolağına direkt olarak etki etmektedir. Bu etkiler sonucunda hücre ya apoptoza karşı dirençlidir ya da aşırı apoptotik ölümlere sebep vermektedir.

Apoptozun bazı karakteristik özellikleri vardır. Bu özellikler hücrenin diğer hücreler arası sinyal ve bağlantılarını koparması, çekirdekte kromatin iplikçiklerinin yoğunlaşması, hücre yüzeyindeki mikrovillusların belirginleşmesi olarak sayılabilir (Kerr vd., 1997). Apoptoz başladıktan sonra makrofajlar fagositoya başlarlar. Normal bir hücrenin tamir mekanizmasında DNA da ardı ardına gelen 7 kırılma onarılırken apoptotik yolda 300.000 kırılma meydana gelmektedir (Akşit ve Bildik, 2008). Bu durum onarılamaz DNA hasarına sebep olur. Hücrelerde meydana gelen bu morfolojik değişiklikler, tamir mekanizmasındaki enzimlerin, yapısal proteinlerin ve DNA parçalanmalarında kullanılan kaspazların endonükleaz aktivitesi ile gerçekleşmektedir. Normal hücre ve apoptoza uğramış hücrelerin mikroskopik görüntüsü Şekil 2.6 da gösterilmiştir.

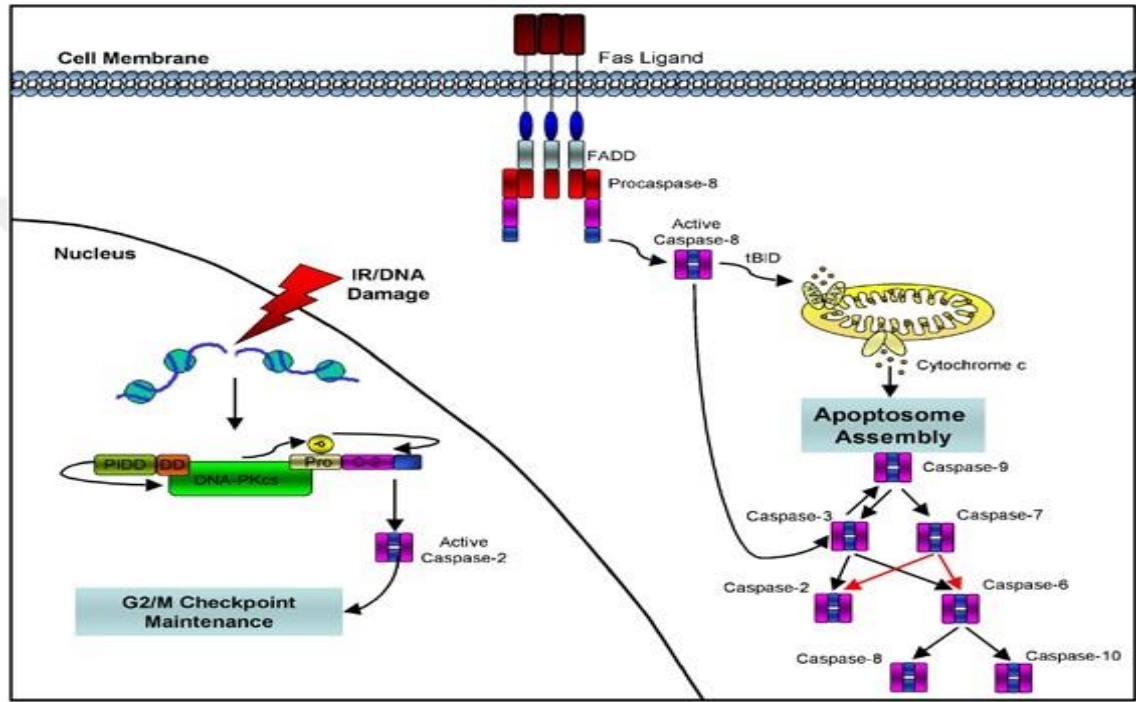


Şekil 2.6. Normal hücre ve apoptoza uğramış hücre. (Vorster ve Joubert, 2010)

2.6. Kaspazlar

İnaktif zimojenler halinde bulunan kaspazlar, prokaspazlar olarak oluşturulduktan sonra bazı bölgeleri kesilip uzaklaştırılıp daha sonra kaspaz formunu alırlar (Chowdhury vd., 2006). Apoptotik yolağın biyokimyasal ve morfolojik özelliklerini kaspazların proteaz aktivitesi belirler (Şekil 2.7.). Kaspazlar, iç yani mitokondrial ve dış yani ölüm reseptörleri şeklindeki iki yolda aktivite sağlarlar. Kaspaz etkisiyle apoptoz regülasyonu yapılarak dış yolda; Fas-L ve TNF ölüm aktivatörlerinin hücre yüzeyine bağlanmasıyla

regülasyonu yapılarak dış yolda; Fas-L ve TNF ölüm aktivatörlerinin hücre yüzeyine bağlanmasıyla sitoplazmaya kaspaz 8'i aktif hale getiren sinyaller yollar. Bu işlemten sonra iç yolda ise mitokondri tarafından regülasyonu sağlanan Apaf-1 apoptotik proteazı aktive ederek, kaspaz-9, sitokrom-C ile Apaf-1 ile kompleks oluşturarak bu kaspaz yolağının aktivasyonunu başlatmış olur. Kaspazlar proteinlerin yıkılmasına ve DNA fragmanların oluşmasına sebep olarak apoptozun oluşunu sağlarlar (Antar, 2005).



Şekil 2.7. Kaspazların aktivasyonu. (Hui vd., 2004)

2.7. Bcl-2 Protein Ailesi

Bcl-2 ailesi, pro-apoptotik ve anti-apoptotik etkisi olup birbirlerinden farklı genlere sahip olan geniş bir aile grubudur. 26 kDa büyüklüğünde olan Bcl-2, çekirdek membranında, mitokondride ve endoplazmik retikulum yerleşmiş proteinlerdir. Hücrelerin canlılığının sürdürülmesinde görev almaktadırlar. En önemli görevleri ise dış etkenlerden gelen hücre ölümlerini baskılamaya çalışmaktadırlar. *Bax* ve *Bcl-2* yapısal olarak aynı ancak işlevsel olarak tersiyer şekilde çalışmaktadırlar. *Bax* proteinleri *Bcl-2*'yi baskılayarak hücrede apoptozu gerçekleştirir (Tilli vd., 2002).

Bcl-2 ailesi üç ana alt grupta toplanmaktadır. Bunlardan birinci alt grubu antiapoptotik Bcl-2 ailesidir. Apoptotik yolağı inhibe ederek, dış etkenlerden gelen farklı ölüm

sinyallerini engeller ve hücrelerin canlılığını korur. Bu ailede Mcl-1, Bcl-w, Bcl-XL VE Bcl-2 yer almaktadır. Bu alt grup ailesinde yer alan Bcl-xl ve Bcl-2, bir proapoptotik proteinler olan Bax ve Bad proteinlerini inhibe ederek apoptozun engellenmesinde önemli rol oynarlar (Keane vd., 2001).

Bu ailenin diğer ikinci alt grubunda ise proapoptotik Bcl-2 ailesi bulunmaktadır. Bu alt grup ailede Mtd, Bak ve Bax proteinleri yer almaktadır. Bu proteinler apoptozun başlamasında görev alırlar. Son olarak üçüncü alt grubumuzda ise apoptozun indüklenmesinde görev alan Bad, Bid, Bim, Bik, Hrk, Bcl-XS Noxa, Bcl-G, Nip3, Bmf ve PUMA proteinler bulunmaktadır.

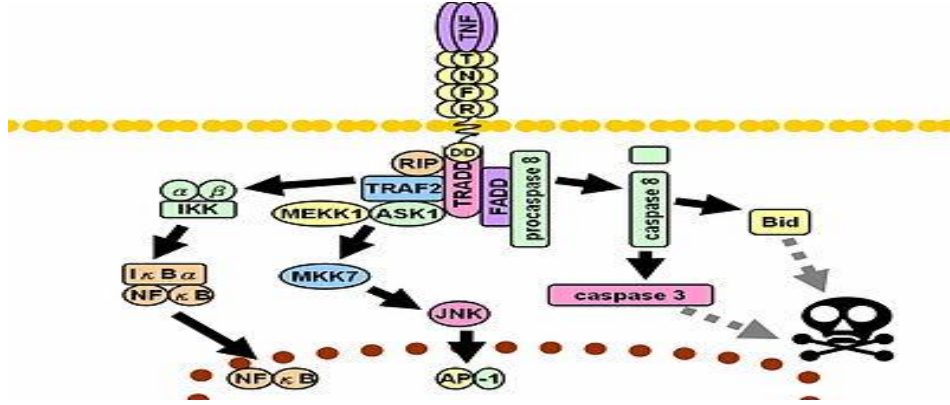
p53 geni apoptotik yolakta iç de ve dış da yer almaktadır. Hücre siklusunu durdurarak hücrede tamir mekanizmaların başlamasını ve ayrıca apoptotik ölüme sebep olur. Böylece iki ayrı şekilde etki gösterir (Çefle, 2003).

Hücre bölünmesi sırasında DNA da herhangi bir hasar meydana geldiğinde hücre siklusunun G1 fazında bölünmeyi durdururarak, hasarlı DNA'nın tamiri için zaman kazandırır ve DNA hasarı tamir edilemez boyutta ise p53 apoptozu indükler. Hücrede Bcl-2/Bax kompleksinin oranı artarak apoptotik ölüm gerçekleşir (Ulukaya, 2001).

2.8. Tümör Nekrozis Faktör (TNF) Protein Ailesi

TNF ailesi birçok otoimmün, alerji, apoptoz ve hücre proliferasyonunda rol alan önemli gen grupları içerir (Şekil 2.8.). Bu aile tip1(TNF-R1) ve tip 2 (TNF-R2) olmak üzere iki gruptan oluşur (Aggarwal, 2000).

Bu iki gen kaspaz aktivasyonun da görev alarak apoptoza neden olmaktadır. TNF ailesi üyeleri, tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR1, p55, CD120a), Fas (CD95, APO-1), DR3 (Apo3, WSL-1, TRAMP, LARD), DR4, DR5 (Apo2, TRAILR2, TRICK2, KILLER), ve DR6'dır.bu gen gruplarının en önemli sayabileceğimiz grubu Fas ve TNFR1 reseptörleridir. Bu genler aktif hale geldiklerinde hücrelerin sitoplazmasında bulunan adaptör proteinlere bağlanıp apoptozu başlatırlar (Van Horssen vd., 2006).



Şekil 2.8. TNF ailesinin hücre proliferasyonu ve apoptoz mekanizmasındaki işlevleri. (Van Horssen vd., 2006)

2.9. Bitkisel Yöntemlerin Kanser Tedavilerinde Kullanımı

Son zamanlarda yapılan çalışmalar bitkisel ürünlere daha ağırlık verildiğini göstermektedir. Kombin kimyasal ilaç tedavilerinde gerçekleşen önemli yan etkilerden dolayı, araştırmalar bitkiler üzerine yoğunlaşmıştır. Halk tarafından da bitkisel ilaçların daha güvenli olduğuna inanılmaktadır. Yapılan bir araştırmada kanser tanısı konmadan önce kullanılan bitkisel ürünler %5,3, kanser tanısı konduktan sonra kullanımı ise %13,9 oranında olduğu bildirilmiştir (Molassiotis vd., 2005). Yine İngiltere’de yapılan başka bir çalışma anketinde, kanser hastalarının yaklaşık olarak %25’inin bitkisel ilaç alımı için danışman tuttukları tespit edilmiştir. Araştırmacıların bu konuyla alakalı doğru bitkisel ürün ve özütlerin toksik etkilerinin olup olmadığı detaylı bir şekilde araştırmaları gerekmektedir (Rees vd., 2000).

Bitkilerle yapılan çalışmalarda izole edilen doğal bileşenler kanser tedavisi için önemli ölçüde terapötik etken içeriği sağlamıştır. Ekstrakte edilen bitkilerde özellikle taksoller, brasinosteroidler ve polifenollerin antikanser özelliğe sahip oldukları belirlenmiştir (Desai vd., 2008). Ancak kanser hücreleri haricinde sağlıklı hücrelerde de elde edilen bitki özütlerinin ne denli yararlı veya yararsız olduğu konusunda araştırmalar sınırlı sayıdadır. HSK tedavisinde kullanılan ilaçların yan etkilerinin fazla olmasından bitkisel ekstraktlardan elde edilen özütlerle yönelim gerçekleşmiştir. Bazı bitkiler Asya’nın birkaç bölgesinde özellikle Çin ve Japonya gibi ülkelerde HSK’nın tedavisinde kullanılmaktadır. Bu kullanılan bitkilerin, (*Spatholobus sub erectus*, *Salvia miltiorriza* ve *Astragalus membranaceus*) HSK tedavisinde fibrozu engellediği bildirilmiştir (Wang vd., 1998). Sonuç olarak, HSK’nın tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçlarının yüksek etkisini daha

düşük konsantrasyonlarda sağlamak amacıyla ve bu ilaçların sebep olduğu yüksek yan etkilerinin azaltılması sebebiyle, bitkilerden elde edilen ekstraktların kemoterapik ilaçlarla kombin edilerek tedavi edilmesi araştırmalarına yoğunlaşmıştır.

2.9.1. *Cynara scolymus*

Cynara scolymus veya enginar Akdeniz bölgesine özgü çok yıllık bir bitkidir (D'Antuono, 2015). Hem yabani formları hem de halk tarafından ekilebilen çeşitler mevcuttur (Pulito, 2015). Bu bitki, kemerli, derin loblu, gümüşü, sarımsı-yeşil yaprakları olan ve 1,4-2 m boyunda büyüyebilir. Enginar geleneksel olarak antik Yunanlılar ve Romalılar arasında bir gıda olarak kullanılmıştır (Red, 2015). Hala yabani halde bulunduğu Kuzey Afrika'da, muhtemelen Roma döneminde ekildiği düşünülen enginar tohumları, Mons Claudianus'un Mısır'daki kazısı sırasında bulunmuştur (Mileo, 2015). *Cynara scolymus*, fenolik asitler ve flavonoidler içeren farmakolojik olarak önemli bir tıbbi bitkidir. Deneysel çalışmalar *C. scolymus*'un antioksidan ve hepatoprotektif etkilerini göstermektedir, ancak karaciğer hastalıklarının terapötik etkileri hakkında bir çalışma yapılmamıştır (Colak ve Ruiz-Aceituno, 2016). *Cynara scolymus* L. (enginar) yaygın olarak sebze olarak yenir ve yaprakları halk hekimliğinde hepatit, hiperlipidemi, obezite ve dispeptik bozuklukların tedavisinde sıklıkla kullanılır. Enginar, biyoaktif ajan olarak apigenin ve luteolinini içerir. Ayrıca Enginarın çiçek başlarının, toplam antioksidan kapasitesi, sebzeler için bildirilen en yükseklerden birisi olduğu bildirilmiştir (Nassar, 2013). Sinarin, *Cynara scolymus*'un kimyasal bir bileşenidir (Boubaker, 2016). *C. scolymus*'un yaprak ekstraktının karbon tetraklorür (CCl₄) ile indüklenen oksidatif stres ve sıçanlarda hepatik yaralanma üzerindeki hepatokürafik etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar *C. scolymus* yaprak ekstraktının lipid peroksidasyonunu azaltarak tetraklorür ile indüklenen oksidatif stres ve hepatik hasar üzerinde hepatokrasif etkileri olduğunu göstermiştir. Ayrıca, CCl₄ ile indüklenen hepatotoksisite üzerindeki DNA hasarının onarımına izin veren düzenleyici mekanizmanın yolu üzerinde de olumlu etkileri olmuştur (Colak, 2016)

Koenzim Q10 (CoQ10) ve *Cynara scolymus* L.'nin (CS) doksorubisin (doks) kaynaklı toksisite üzerindeki koruyucu etkileri değerlendirildiğinde, CoQ10 ve CS ile ön tedavinin, uygun koruyucu enzimlerinin yukarı regülasyonu ve oksidatif stresin aşağı regülasyonu

ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Bu, tedavi edilmeyen hastalara ek tedavi yöntemi olarak önerilmiştir (Mustafa, 2015).

Bu bitkinin fenolik bileşikleri HPLC kullanılarak değerlendirilmiştir. Enginar ekstraktının biyoaktif fonksiyonel bir gıda olarak ve umut verici bir antioksidan fenolik bileşik kaynağı olarak kabul edilebileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Abu-Reidah, 2013)

Kurşun içeren diyetle beslenen sıçanlarda enginarın hidroetanolik ekstraktının değiştirilmiş biyokimyasal parametrelere karşı koruyucu etkileri değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar, kurşun ile zehirlenen sıçanlarda enginar ekstraktının, kan kurşun seviyelerinin azaltılmasında önemli rol oynamıştır (Heidarian, 2013).

Kültürlenmiş insan göbek endotel hücrelerinde (HUVEC'ler) bir enginar ekstraktının uyarılmış reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi üzerindeki etkisi ve indirgeyici özellikleri değerlendirildiğinde, sonuçlar, endotel koruyucu maddeler olarak enginar ekstraktlarının olduğunu göstermiştir (Juzyszyn, 2008)

Enginarın yenilebilir kısmından polifenolik ekstraktların hepatoprotektif özellikleri değerlendirildiğinde, Enginarın hücre canlılığını azalttığı ve bir insan karaciğer kanseri hücre hattı üzerinde apoptotik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Miccadei, 2008). Subhatal konsantrasyonlarda kronik ve düşük dozlarda Enginar tedavisi yapılmıştır. Bulgular, enginar tedavisinin, epigenetik ve ROS aracılı mekanizmalar ile erken yaşlanmanın indüklenmesi yoluyla meme kanseri hücre büyümesini inhibe ettiğini göstermektedir (Mileo vd., 2015)

Cynara scolymus'un yaprak ekstraktının hem in vitro hem de in vivo mezotelyoma hücre hatları üzerindeki antitümöral etkileri araştırılmıştır ve *Cynara scolymus* tedavisinin mezotelyoma hücre dizilerinin hücre büyümesini, migrasyonunu ve tümör aşılmasını güçlü bir şekilde etkilediği bulunmuştur (Pulito vd., 2015).

2.10. Kombinasyonel İlaç Çalışmaları

Araştırması yapılan çoklu ilaç kombinasyonları, birçok metabolik yolları engelleyerek terapötik başarı şansını arttırmaya çalışmışlardır. İlaç kombinasyonları deneylerini

arttırıp sonuçları incelemek için analitik yöntemlere yönelim gösterilmeye başlanmıştır. Bu durumun sebebi biyomedikal araştırmalardaki büyük ilerlemelerin testler için çok fazla sayıda potansiyel ajan sağlamasıdır. Bu çalışmalar, hastalıklar üzerindeki klinik öncesi deneyleri, gelişme süresini, hastalığın karmaşık doğasını ve tedavi sürecindeki maliyeti azaltma ihtiyacı nedeniyle (spesifik olarak kanser) ilaç gelişiminde çok önemli olduğunu göstermektedir (Huang vd., 2018).

Birden fazla kullanılan ilaç ve bu ilaçlara göre uygulanan çeşitli yöntemleri oluşturan kombinasyon tedavisi, herhangi bir hastalığı tedavi etmek için birçok tedavinin kullanılmasını ifade eder ve neredeyse tüm tedaviler farmasötiktir. Kombinasyon tedavisi kullanılan hastalıklar arasında cüzzam, tüberküloz, kanser, HIV/AIDS ve sıtma bulunur. Bu tedavi yönteminin en önemli yararı, herhangi patojen veya tümörün aynı zamanda birden fazla ilaca karşı direncinin çok düşük olma ihtimalinden kaynaklı tedavide sürecinde ciddi ilerlemeler sağlamasıdır. Kombinasyon tedavisinin ilk etapta kısa vadede monoterapiden daha pahalı olması bir dezavantaj görülebilir, fakat uygun bir biçimde kullanıldığında önemli tasarruflar sağlar. Bu duruma örnek olarak; daha az yan etki, ilaçlara direncin yavaş gelişmesi, tedavilerde başarı yüzde oranının daha yüksek olması gösterilebilir. Son yıllarda bu tedavi onkoloji bölümünde de ivme kazanmıştır ve birçok farklı çalışmalarda monoterapilere göre daha yüksek yanıt oranları alan FDA, son zamanlarda terapötik kombinasyon rejimlerini onaylamıştır (Janku vd., 2014; Musgro vd., 2011).

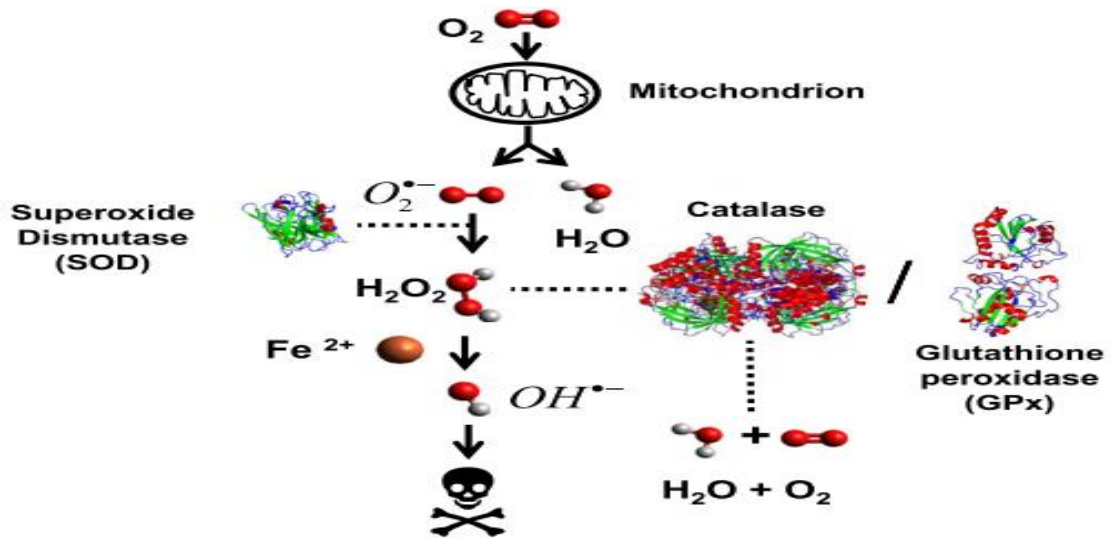
Metastaza yönelimi fazla olan kanserlerin tedavisi çoğunlukla toksik kemoterapi kullanımını gerektirmektedir ve genellikle kullanılan tek ajanlarda direncin sıklıkla görülmesi sebebiyle birden fazla ilaç kullanılmaktadır. Farklı hedeflere ve kimyasal yapılara sahip farklı ilaçlara, çoklu ilaç direnç mekanizmaların açıklanması, son 40 yıl içerisinde kanser biyologlarının ana başlıklarından biri olmuştur (Szakács vd., 2006).

Klinik çalışmalarda, kanserli hücrelere uygulanan yüksek dozajlı ilaçlar bu ilaçların vücut da oluşturduğu yan etkiler ve çoklu ilaç direnci sebebi ile bazı umut verici ilaçlar da olumsuz sonuçlar görülebilmektedir. Bu sebeplerden dolayı, farklı ilaçların kombinasyonları, yüksek dozu azaltma yan etkileri azaltma ve verimliliği artırma potansiyeli ile incelenmektedir. Kombinasyonel ilaç araştırmaları hücresel yollar

üzerindeki etkileri, apoptoz ve otofaji gibi hücresel süreçleri içerir (Al-Attar ve Madihally, 2020).

2.11. Hepatosellüler Karsinomda Katalaz, Glutatyon Peroksidaz ve Karbonik Anhidraz

Katalaz enzimi, karaciğerde, böbreklerde ve eritrositlerde yüksek konsantrasyonla vücudumuzda geniş çapta dağılmıştır ve ekspresyonu çeşitli seviyelerde düzenlenir. Katalaz, türler arasında yüksek oranda korunan tek bir gen tarafından kodlanır. Farelerde Katalaz aktivitesi üzerine yapılan bir çalışmada, karaciğerde (66.100 ünite/g doku), akciğerde (2390 ünite/g doku) ve eritrositlerde (6340 ünite/ml kan) yüksek katalaz aktivitesinin bulunduğunu göstermiştir. Katalaz ayrıca, hidrojen peroksit konsantrasyonunun düzenlenmesinde anahtar rol oynadığı bildirilen eritrositlerdeki sitozolde de bulunur. Karaciğerin katalaz aktivitesinin, konakçıdaki tümör büyümesiyle büyük ölçüde azaldığı, ancak tümörün çıkarılmasıyla normal seviyelere geri döndüğü bildirilmiştir. İnsan rekombinant tümör nekroz faktörü-a'nın tekrarlanan enjeksiyonları, sıçan karaciğerinin katalaz aktivitesini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (P Greenstein vd., 1941). Şekil 2.9.'da gösterildiği gibi katalaz, mitokondri ve peroksizomda yer alan, kloroplastlarda olmayan, H_2O_2 'yi su ve oksijene dönüştürerek vücudu serbest radikallerden arındıran antioksidan bir enzimdir (Singh vd., 2009).



Şekil 2.9. Organizmalarda reaktif oksijen oluşumunun basitleştirilmiş şeması ve katalaz gibi enzimler tarafından alınan karşı önlemler.

Yapılan araştırmalar gösteriyor ki katalaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktiviteleri HKS’de düşük seyretmektedir. Aşırı ekspresyon seviyesine sahip olan kanser hücrelerinin ilk ana hedefleri çoğalmaya yönelik proteinlerin ekspresyonunu sağlamaktır. Bu nedenle katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimlerin inhibisyonunu sağlayacak aktiviteler sergilemektedirler.

Karbonik anhidraz (CA),  inko prostetik grubu bağlı olan ve tek polipeptit zincirinden oluşan ve 29 kDa molekül ağırlığından meydana gelen, hücrede pH dengesini sağlayan enzimdir. Meldrum ve Roughton’un eritrositler üzerine yaptıkları araştırmada 1933 yılında CA’ları bulmuşlardır. CA’lar CO₂ hidrasyonunu ve HCO⁻³’ın dehidrasyonunu çift yönlü bir şekilde katalizleyebilen bir enzimdir (Dökmeci, 1992).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Tez çalışmalarında HepG2 karaciğer kanseri hücre hattı üzerinde Sorafenib ve *Cynara scolymus* L. Yaprak ekstraktı ayrı ayrı ve kombin edilerek sinerjistik etkileri incelenmiş olup, tezle ilgili tüm deneysel çalışmalar Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezinde gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan aletler ve cihazlar

Real-time PCR cihazı	: Qiagen Rotor Gene 6flex
PCR cihazı	: Bio-Rad C1000 Touch
ELISA	: Epoch Biotek
Mikroskop	: Nikon Eclipse Ti2-U Inverted
Kabin	: Bil-ser B2 Class II
CO ₂ inkübatörü	: Nüve EC 160
Santrifüj	: Hanil, Smart R17
Şarjlı otomatik pipet	: Isolab
Otomatik pipet	: Eppendorf Research Plus
Vorteks	: Heidolph Reaxtop
Buzdolabı	: Arçelik
Derin dondurucu (-80 °C)	: Haer Medical
Kar makinesi	: Scotsman AF-20
Su banyosu	: Memmert
Saf su cihazı	: Nüve
Hassas terazi	: Shimadzu ATX224

3.1.2. Hücre hattı

Tez kapsamında kullanılan HepG2 hücre hattı ATCC'den ticari olarak satın alınmıştır.

3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

Eagle's Minimum Essential Medium	: Biological Industries
Sorafenib	: Roche, 150mg
Trypsin-EDTA	: Biological Industries
Cell Proliferation Kit (XTT)	: Biological Industries
Penisilin-Streptomisin	: Biological Industries
Fetal Bovine Serum	: Biological Industries
L-Glutamin	: Biological Industries
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	: Biowest
RNA izolasyon Kiti	: Axygen Axyprep Total RNA Kit
RT-qPCR Kit	: Qiagen SYBR Green PCR Master Mix
cDNA sentez kiti	: Thermofisher High-Capacity cDNA Kit
Bcl2 ELISA kit	Cusabio
TNF- α ELISA kit	: Cusabio
Bax ELISA kit	: Cusabio
Caspase-3 ELISA kit	: Cusabio
Aquaguard-1	: Biological Industries
Aquaguard-2	: Biological Industries

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre kültürasyonu

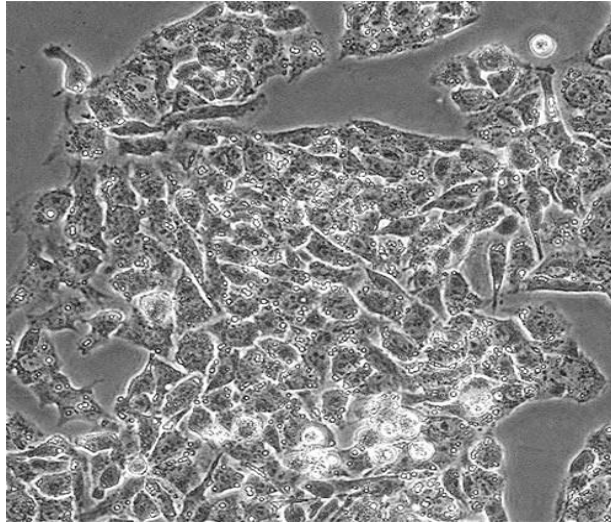
3.2.1.1. Hücre kültürü koşulları

Çalışmada kullanılan HepG2 hücre hattı (Bknz, Şekil 3.1.) için besiyeri olarak Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) kullanıldı. 500 ml EMEM içerisine 10/ml penislin streptomisin, 5 ml L-glutamin ve 50 ml Fetal sığır serumu (FBS) eklenerek hazırlanan besiyeri ile hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır.

Hücre kültür çalışmaları laminar kabinde yapılmıştır. Kabin her kullanımdan önce ve sonra mutlaka ultraviyole ışın ile steril hale getirilip ve kabinin iç yüzeyi çalışma öncesi ve sonrası %70'lik etanol ile silinmiştir.

Karbondioksit inkübatörünün alt haznesinde bulunan çekmeye, steril saf su içerisine %1 oranında Aquaguard-1 eklenerek inkübatörün steril olması ve %95 nem oranının sabit tutulması sağlanmıştır.

Hücre kültürü çalışmaları, Laminar kabin içerisinde yürütülmüştür ve her deney başlangıcında ve sonrasında UV lambası kullanılarak steril hale getirilmiştir. Kabin tezgâhı %70'lik etanol ile dezenfekte edilerek çalışmalar yürütülmüştür.



Şekil 3.1. HepG2 karaciğer kanseri hücre hattı mikroskopik görüntüsü

3.2.1.2. Hücre hattının pasajlanması

Çalışmada kullanılan HepG2 hücre hattı daha önce hazırlanan besi yerinde 75 cm² 'lik flasklarda karbondioksit inkübatörün de inkübe edilmiştir. İnkübasyon koşulları %95 nem, %5 CO₂ ve 37 °C'ye ayarlanmıştır. Kabinin nemli ve steril kalması için otoklavlanarak steril hale getirilmiş saf su içerisine %1 oranında aquaguard-1 ilave edilerek hazırlanan çözelti inkübatörün içerisindeki hazneye doldurulmuştur.

İnkübasyonda bulunan hücre hattının besiyeri önce bir gün ardından iki ya da üç gün sonra değiştirilmiştir. Besi yerinin değiştirilmesi işlemi: Flasktaki besiyerinin çekilmesi, ardından flasktaki hücrelerin yaklaşık 5 ml steril fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkanması, yıkama işleminin ardından PBS'nin tekrar çekilerek alınması ve son olarak 8 ml taze besiyerinin eklenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Besiyeri değiştirme işlemleri, hücrelerin flask yüzeyinin yaklaşık %90'ını kaplayana kadar devam ettirilmiştir.

Işık mikroskopunda, HepG2 hücre hattının yaklaşık bir haftada 75 cm² 'lik flaskın yüzeyinin %90'lık kısmını kapladığı görüldüğünde pasajlama işlemine başlanmıştır. Pasajlanacak olan hücre hattı inkübatörden çıkartılarak steril kabine getirildi ve besiyeri otomatik pipet ile uzaklaştırılmıştır. Ardından hücreler 5 ml PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra flaska, hücrelerin flask yüzeyinden sökülmesi için 6 ml Trypsin/EDTA (Biological Industries) solüsyonu ilave edilerek yaklaşık 5 dakika inkübe edildi. Beş dakika sonra flask inkübatörden alınarak ışık mikroskopunda incelendi ve hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadığı kontrol edildi. Tamamen flask yüzeyinden ayrılmış olan hücrelerin tripsinden zarar görmemesi ve tripsinin uzaklaştırılması için üzerlerine 24 ml besiyeri eklenerek 30 ml'ye seyreltme yapılmıştır. Son durumda flask da bulunan 30 ml'lik sıvı tripsinden arındırılmak üzere 50 ml'lik falkon tüpe konulmuştur ve 800xg de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından falkon tüp içerisindeki süpernetant atılmıştır ve içerisine 12 ml besiyeri ekleyip pipetaj yapılarak hücreler homojenize hale getirilmiştir. Daha sonra 12 ml'lik homojenat, üç ya da dört tane 75cm²'lik flasklara paylaştırılmıştır ve DMEM eklenerek her birinin hacmi 8 ml'ye tamamlanmıştır. Pasajlama işlemi sonunda flasklar 37°C'de ve %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.1.3. Hücre hattı stoklarının oluşturulması

Çalışma için ihtiyaç duyulandan daha fazla pasaj olduğunda hücreler dondurularak daha sonra tekrar kullanılmak üzere stoklanmıştır. Hücre dondurma basamağında flasklar mikroskopta incelenerek hücre yoğunluğunun yaklaşık %80-90 olduğu flaskların içerisindeki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücreler 4 ml PBS ile yıkandıktan sonra PBS ortamdan pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin flaskın yüzeyinden ayrılması için üzerlerine 8 ml 0.25X Trypsin/EDTA solüsyonu ekledikten sonra hücreler 5-10 dakika arasında inkübatörde bekletilmiştir. İnkübatörde bekletilen hücrelerin tamamen yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı mikroskopta kontrol edildikten sonra üzerlerine 32 ml besiyeri eklenmiştir. Otomatik pipet yardımıyla hücreler steril 50 ml'lik falkon tüpüne aktarılmıştır.

Hücreler 800xg de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj süreci tamamlandıktan sonra süpernetant atılmıştır. Daha önce hazırlanan ve kabin içerisinde steril 15 ml'lik falkon tüplerde buz içerisinde bekletilen 100µl DMSO ve 900µl FBS içeren hücre dondurma süspansiyonundan 1 ml alınarak hücrelerin üzerine eklenmiştir. Hücrelerin bulunduğu 50 ml'lik falkon tüpünün hücrelerin yapışmış olduğu kısımlardan ayrılması için pipetaj yapılarak falkon yüzeyinden ayrılması sağlanmıştır. Hücrelerin dondurma süspansiyonunda homojen dağılması için pipetaj yapıldıktan sonra süspansiyon 2 ml'lik kriyo tüplere aktarılıp -80 °C' de buzdolabında gerektiğinde tekrar kullanılmak üzere saklanmıştır. Yapılan bütün işlemler ultraviyole ile steril edilmiş ve yüzeyi %70'lik etanol ile silinmiş kabin içerisinde yapılmıştır.

3.2.1.4. Hücre çözündürme

Tez çalışmamızda hücrelerin kullanılmasına ihtiyaç duyulduğunda stoklanmış hücreler kullanıldı. EMEM besiyeri su banyosunda 37 °C' ye kadar ısıtıldı. Dondurulmuş hücreler su banyosunda tutularak tamamen çözünmesi için bekletilip, besiyerinden alınan steril 50 ml'lik falkon tüpüne kabin içerisinde aktarılan 40 ml besiyerine çözündürülen hücreler pipet ile aktarıldı. Aktarımdan sonra hücreler 800xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüden sonra hücrelerin üzerindeki süpernetant vakumlu pompa yardımıyla uzaklaştırıldı. Hücre peletine şarjlı pipet ile 10 ml besiyeri eklenerek tam homojenizasyon sağlandıktan sonra T75'lik flaska aktarılmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra hücrelerin

üzerindeki besiyeri tekrar uzaklaştırıldı. Flask yüzeyine yapışmış hücreler 4 ml PBS ile yıkandıktan sonra PBS ortamdan uzaklaştırılıp tekrar 10 ml besiyeri eklenip 37 °C, %5 CO₂ ve %95 nemli ortamda inkübasyona bırakıldı. T75'lik flasktaki hücre yoğunluğu %80-90 oranlarına varıncaya kadar hücreler 2-3 gün arayla yıkanıp besiyerleri değiştirilmiştir.

3.2.1.5. Hücre sayımı

İnkübe edilen hücreler mikroskopta incelendikten sonra yeteri yoğunluğa ulaşan flasklardaki hücrelerin üzerindeki büyüme besiyeri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücreler PBS ile yıkanıp ardından hücrelere zarar vermemesi için PBS ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin yapıştıkları flask yüzeyden ayrılması için tripsin-EDTA ile muamele edildi. Yüzeyden ayrılan hücre çözeltisine besiyeri eklenerek tripsinin etkisi nötralize edildi ve steril falkon tüplere aktarılarak santrifüj edildi. Santrifüj edilen hücrelerin üzerindeki süpernetant otomatik pipet yardımıyla atıldı. Hücre peleti üzerine 1 ml besiyeri eklenerek homojenize edildi. Daha sonra hücre içeren süspansiyondan 10 µl alınarak ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine tripan mavisi solüsyonundan 90 µl eklenerek homojen hale gelmesi pipetaj yapıldı. Homojen hale getirilen hücre süspansiyonundan 20 µl hücre/trippan mavisi karışımından çekilerek thoma lamına emdirilerek aktarım sağlandı. Sayım işlemi thoma lamındaki merkez çizgilerin kesiştiği 1 mm²'lik alandaki 16 karenin içindeki parlayan beyaz renkteki hücreler sayıldı. Sayım thoma lamının iki tarafına da emdirilen süspansiyondaki hücreler sayılıp ortalamaları alınarak yapılmıştır.

Hücre sayımında hücre canlılığını belirlemek için tripan mavisi boyayı dışlama testi uygulandı. Canlı hücre sayısını belirlemek için çok kullanışlı ve basit bir yöntemdir. Bu yöntem canlı ve ölmüş hücreleri birbirinden ayırmamıza yardımcı olmaktadır. Mikroskopta incelendiğinde tripan mavisi boyası membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerin içerisine girerek ölmüş hücrelerin koyu mavi renkteki noktalar şeklinde görüntülenmesini sağlamaktadır. Ancak sağlıklı hücreler tripan mavisi boyanın hücre membranından geçişini engellediği için mikroskopta görüntülendiğinde beyaz parlak renkte görüntülendi.

3.2.1.6. *Cynara scolymus* L. yaprak ekstraksiyonu

Enginar yaprakları kirliliklerden arındırılmak için 5 kez distile su ile yıkanmıştır. Ardından yıkanan enginar yaprakları etüvde 60 °C’de kurutularak laboratuvar blenderında toz haline getirilmiştir. Toz halindeki enginar yapraklarından 200 gr tartılarak erlen içinde 1 L metanol ile 24 saat 4 °C’de inkübatörde 150 rpm’de çalkalanmıştır. Sonrasında elde edilen kaba ekstrakt 0.45 µm por çapına sahip Thermo Nalgene™ Rapid-Flow™ filtre ile vakum altında filtrelenmiştir. Elde edilen ekstraktın içerisindeki metanol rotary evaporatörde 40 °C’de uzaklaştırılarak konsantre edilmiştir. Konsantre ekstrakt metanol’de çözülerek Sephadex LH20 kolonundan geçirilerek elde edilen elüatlar tekrar 40 °C’de rotary evaporatörde tamamen kurutulmuştur. Ekstrakt DMSO içinde çözülerek uygun konsantrasyonlarda 4 °C’de en fazla bir hafta süreyle stoklanmıştır.

3.2.2. Sitotoksikite çalışmaları

3.2.2.1. Uygulanacak kimyasalların hazırlanması

Sorafenib’den IC₅₀ değerini belirlemek için 96 kuyucuklu mikro plakaların bütün kuyucuklarına 200 µl besiyeri içerisinde 2x10⁵ tane hücre olacak şekilde hücre ekimi yapılarak 24 saat inkübe edilmiştir. Çalışmamızda zaman ve konsantrasyona bağlı sitotoksik etkilerini belirlemek için *Cynara scolymus* L. yaprak ekstraktı ve Sorafenib konsantrasyonlarının belirlenmesine yönelik araştırması yapılmıştır.

Sorafenib, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,125 µg/ml, 1,5625 µg/ml ve 0,78 µg/ml şeklinde yedi tane konsantrasyon belirlendi.

Cynara scolymus L. yaprak ekstraktı için de 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,125 µg/ml ve 1,56 µg/ml olmak üzere yedi tane konsantrasyon belirlendi.

Hücre ekimini takiben yapılan 24 saatlik inkübasyondan sonra vakumlu pompa yardımıyla plakalardaki besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Sorafenib, *Cynara scolymus* L. yaprak ekstraktı ve kombinasyonları için dörderli olacak şekilde pozitif kontroller oluşturularak (hücrelere sadece 200 µl EMEM besiyeri eklendi) en yüksek konsantrasyondan en düşük konsantrasyona doğru plakalar gruplandırıldı.

Cynara scolymus L. yaprak ekstraktı ve sorafenib maddelerinden belirlenen gruplar şeklinde ayrı ayrı ve kombinasyonları şeklinde hazırlanan dozlardan 12-24-48-72 saatlik sitotoksosite analizleri için 200 µl alınarak hücrelere uygulandı (her deney 4 kez tekrarlandı).

3.2.2.2. Hücre canlılık testi

Hücre canlılık testi, XTT kiti (Biological Industries) kullanılarak yapıldı. XTT, Tetrazolium tuzunun, formazana (turuncu renk) dönüşmesi ile canlı hücrelerin boyanmasını sağlayarak, 450 nm de maksimum absorbans veren bir yöntemdir.

Çalışmalarımızda 96'lık plate kullanılarak, bütün kuyucuklarda 200 µl EMEM ve 5000 hücre olacak şekilde 4 tane plate ekim yapıldı. 12, 24, 48 ve 72 saatler olmak üzere ekim yapılan plateler, inkübatöre konularak bir gün yapışması için bekletildi. Daha sonra Plateler inkübatörden alındı ve PBS ile yıkandı. Her birine belirli konsantrasyonlarda ilaç uygulaması yapıldı (Bkz. Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Hücrelere uygulanan maddeler ve konsantrasyonları.

<i>C. scolymus</i> L. yaprak ekstraktı (µg/ml)	Sorafenib (µM)	Sorafenib (µg/ml) + <i>C. scolymus</i> L. yaprak ekstraktı (µg/ml)
100	50	100+50
50	25	50+25
25	12,5	25+12,5
12,5	6,25	12,5+6,25
6,25	3,125	6,25+3,125
3,125	1,56	3,125+1,56
1,56	0,78	1,56+0,78

12, 24, 48 ve 72. Saatlerde plateler de bulunan hücrelerin 450 nm' de absorbansları ölçüldü ve hücre canlılık yüzdeleri hesaplandı.

3.2.3. Kombinasyon indeksinin hesaplanması

XTT uygulamasından sonra IC₅₀ değerleri CompuSyn programı ile belirlendi. Compusyn programı araştırmak istenilen kimyasal bileşiklerin ve ilaçların tek tek veya kombinasyonlarının sinerjistik etki değerlerini hesaplamak için Chou tarafından geliştirilmiş ortalama etki (median effect) prensibine dayanan bir yazılım programıdır.

Program bir çalışmada kullanılan maddelerin sinerjistik etki değerlerini medyan etki denklemi ve kombinasyon indeksi denklemlerine göre maddelerin sinerjistik, antagonistik veya aditif etki gösterip göstermediğini analiz eder. Bulunan değerlerin karşılaştırmaları için Tablo 3.2. deki IC₅₀ cetvelinden yararlanılmıştır.

Tablo 3.2. Kombinasyon İndeksi (CI) değerleri (Bulut, 2012)

CI (Kombinasyon indeksi)	Anlamı
0,1 <	Çok kuvvetli sinerjizm
0,1- 0,3	Kuvvetli sinerjizm
0,3-0,7	Sinerjizm
0,7-0,9	Hafif Sinerjistik etki
0,9-1,1	Aditif etki
>1,1	Antagonist

3.2.4. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Gen ekspresyon düzey analizleri için CI değerleri hesaplanarak elde edilen, en iyi sinerjistik etkinin 24 saat inkübasyon süresi olduğu belirlendi.

50µg/ml *C. scolymus* L. yaprak ekstraktı, 25µM sorafenib ilaç kombinasyonu kullanılarak HepG2 hücre hattında RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Dört ayrı steril petrinin kullanıldığı çalışmamızda, her bir petrinin içerisine $1,8 \times 10^6$ tane hücre ekimi yapıldı ve petrilere bir gece inkübatörde bekletilerek hücrelerin petriye yapışması sağlandı.

Hücreler PBS ile yıkanarak petrilere ilaç ve ekstrakt uygulaması yapıldı (Bkz. Tablo 3.3).

Tablo 3.3. RNA izolasyonu için petrilere uygulanan kimyasal maddeler ve derişimleri.

	<i>C. scolymus</i> L. yaprak ekstraktı	Sorafenib
Kontrol	Yok	Yok
2	100µg/ml	Yok
3	Yok	50µM
4	100µg/ml	50µM

İlaç ve ekstrakt uygulamasının ardından petrilere 24 saat inkübasyonda bekletildi. Bekletilen hücreler petrilere kazınarak 800xg’ de +4 °C’de 5 dakika santrifüjlendi ve hemen buz içine aktarıldı. RNA bileşimlerinin sabit kalması için her birine RNA Later Reagent (Thermo Fisher) solüsyonu ilave edildi ve Total RNA saflaştırma kiti olan, Axyprep Multi source Total RNA Miniprep Kit (Axygen®) protokolü uygulanarak total RNA saflaştırma işlemi yapılmıştır.

Saflaştırma işlemi şu şekilde gerçekleştirildi:

- Hücreler Tripsin/EDTA solüsyonu kullanılarak kaldırıldı ve steril eppendorf tüpe aktarıldı.
- Eppendorf tüp içerisinde bulunan hücreler +4 °C 2000xg’ de 5 dk santrifüj edildi.
- Daha sonra resüspanse edilmek üzere 1 ml +4 °C eklendi.
- Resüspanse edilmiş hücreler tekrar +4 °C 2000xg’ de 5dk santrifüj edildi.
- Süpernatant kısmı dikkatli bir şekilde tüpten uzaklaştırıldı
- İşlemleri yapılan steril eppendorf tüpler buza yerleştirildi.
- Her bir eppendorf tüpe 400 µl R-I tamponu aktarıldı ve 10 defa dikkatli bir şekilde pipetaj yapıldı.
- Daha sonra 1 ml ve 21 gauj’luk enjektörün ucu Z şeklinde bükülerek yine dikkatli bir şekilde 10 defa pipetaj yapıldı.
- 150 µl R-II tamponu üzerine eklenerek her bir steril eppendorf tüp 30 saniye boyunca Vorteks yapılmıştır.
- Steril eppendorf tüpler +22 °C ve 12000xg’ de 5 dk santrifüj edildi. Bu işlemin amacı protein ve DNA peletlerinin dibeye çökmesidir.

- Protein ve DNA peletlerinin dibe çökmesi ile istenilen RNA üst taraftan yani süpernetant kısmından alınarak yeni bir Eppendorf tüpe aktarıldı.
- Süpernetant kısmının aktarılmış olduğu eppendorf üzerine 250 µl 2-Propanol (izopropanol) eklenerek 10 saniye kadar vorteks yapıldı.
- Spin kolonu Eppendorf tüpe yerleştirildi.
- 800 µl homojenat spin kolonuna aktarılarak +4 °C 6000xg' de 1 dk boyunca santrifüj edildi.
- Eppendorf tüpte biriken sıvı atıldı.
- 500 µl W1A tamponu üzerine aktarılarak +4 °C 12000xg' de 1 dk boyunca santrifüj edildi.
- Altta biriken sıvı atılarak tekrardan eppendorf takıldı.
- 700 µl W2 tamponu üzerine aktarılarak +4 °C 12000xg' de 1 dk boyunca santrifüj edildi.
- Altta biriken sıvı tekrardan dökülerek eppendorf takıldı.
- +4 °C 12000xg' de 1 dk santrifüj yapıldı.
- Spin kolonu 1,5 ml' lik yeni Eppendorf tüpe aktarıldı.
- 100 µl TE tamponu aktarılarak 1dk inkübasyona bırakıldı.
- Oda sıcaklığında +25°C de 12000xg' de 1 dk boyunca santrifüj yapılarak saflaştırma işlemi tamamlandı.

Saflaştırma işlemini bittikten sonra High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Thermo Fisher) içerisinden çıkan protokole göre cDNA sentezi yapıldı. Sentezlenen cDNA' lar PCR çalışmasında kullanılmak üzere -80 °C'de saklandı.

3.2.5. RT-qPCR ile gen ifade düzeylerinin analizi

Yaptığımız çalışmada HepG2 hücrelerinin *Bcl2*, *Bax*, *caspase-3* ve *TNF α* ifade eden gen düzeyleri belirlendi.

Primerler, Primer 3,0 programı kullanılarak tasarlandı ve MacroGen Inc. tarafından Tablo 3.4' de belirtilen sekanslara göre sentezlendi (5' → 3').

Tablo 3.4. İfade düzeyleri belirlenen genler ve primer dizileri.

Gen	Primer dizisi
Bcl-2	F: 5'TATCTGGGCCACAAGTGAAG-3' R: 5'-ATTCGACGTTTTGCCTGAAG-3'
Caspase-3	F: 5'-GCGCTCTGGTTTTTCGTTAAT-3' R: 5'-ACCCATCTCAGGATAATCCATTT-3'
Bax	F: 5'-AGCAGATCATGAAGACAGGG-3' R: 5'-GAAGTTGCCGTCAGAAAACA-3'
TNF α	F: 5'-GACTATCTCGACTTTGCCGA-3' R: 5'-GTTTCGAAGTGGTGGTCTTG-3'

RT-PCR işlemi Tablo 3.5, Tablo 3.6, belirtilen sıcaklık protokolüne göre SYBR Green Master Mix (Qiagen-330500) kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımının içeriğinde: 1 μ l cDNA, 2 μ l primer ve 12,5 μ l SYBR Green Master Mix konularak hazırlandı. Tüm deneyler dört kez gerçekleştirildi (Qiagen Rotor Gene).

3.2.6. Gen konsantrasyonu ve saflığının belirlenmesi

RNA ve DNA'nın konsantrasyonunu ve ne kadar saflıkta olduğunu belirlemek için BIOTEK marka ELISA cihazı kullanılmıştır. Köre karşı, 260 nm, 280 nm, 320 nm dalga boylarında bütün numunelerin absorbans değerleri ölçülmüştür.

$$\text{RNA miktarı (ng/}\mu\text{l)} = (\text{OD}_{260}) \times \text{seyreltme faktörü} \times 40$$

$$\text{DNA miktarı (ng/}\mu\text{l)} = (\text{OD}_{260}) \times \text{seyreltme faktörü} \times 50$$

Aşağıda belirtilen formüller yardımı ile RNA ve DNA'nın saflıkları ölçülmüştür.

$$\text{RNA; } \text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} \geq 2,0$$

$$\text{DNA; } \text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1,8$$

Tablo 3.5. RT-qPCR sıcaklık siklusu

Döngü Adı	Sıcaklık	Zaman	Siklus Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	10 dk.	1
Denatürasyon	95 °C	30 sn.	
Bağlanma	57 °C	30 sn.	45
Uzama (Fluoresans tayin)	72 °C	45 sn.	
Bekleme	4 °C	∞	1

3.2.7. Protein ekstraksiyonu

Çalışmada elde edilen sonuçlara göre HepG2 hücre hattının *BAX*, *BCL2*, *TNF- α* ve *Caspase-3* proteinlerinin miktarları belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada 4 farklı grubun her biri 4 defa tekrar edilerek, steril ortamda TC-treated petrilere 2×10^6 tane hücre olacak şekilde ekimi yapılmıştır. 24 saat sonunda belirlenen konsantrasyonlarda ki ilaçlar ayrı ayrı kombinasyonlarda uygulanarak tekrar 24 saat inkübe edilerek 48. saate ayarlanmıştır.

Tablo 3.6. Protein ekstraksiyonu için deney seti

Petri Kodu	<i>C. scolymus</i> L. yaprak ekstraktı	Sorafenib
Kontrol	-	-
2	100 μ g/ml	-
3	-	50 μ M
4	100 μ g/ml	50 μ M

48 saatlik sürenin sonunda ilaç uygulanan petrillerdeki besiyeri uzaklaştırılarak 4°C’de DPBS ile 3 kez yıkandıktan sonra 4 mL protein lizis tamponu eklendi ve 10 dk buz üzerinde inkübasyona bırakıldı. Hücre kazıyıcı aparat yardımı ile hücreler, yüzeyden kazınıp steril koşulda falkon tüplere eklenmiştir. Daha sonra hücreler karbuz üzerinde 8 ya da 10 defa 21 Gauge’luk steril şırınga yardımıyla, çek-bırak yapılarak lizis işlemi tamamlanmıştır. +4°C, 2000 xg’ de 10 dakika sürecek şekilde santrifüj edilip süpernetant kısmı ayrı steril eppendorf tüplerine aktararak -80°C’de stoklanmıştır.

3.2.8. İstatistiksel hesaplamalar

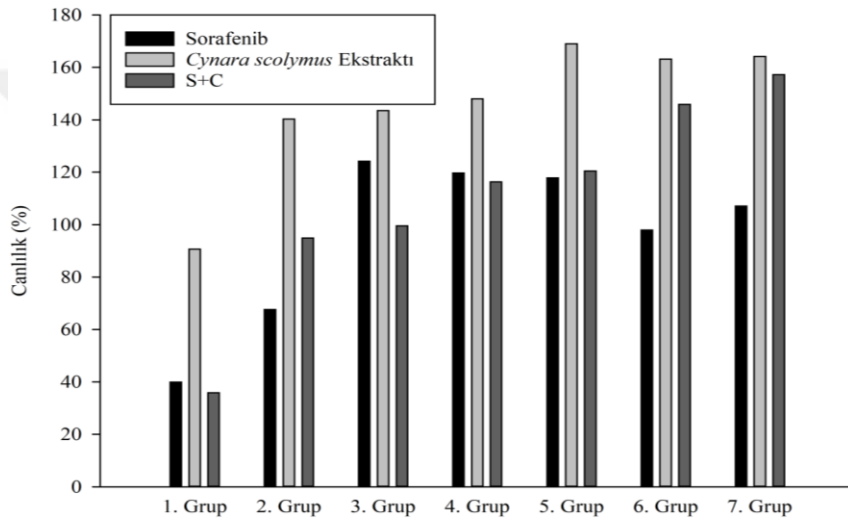
Gen ifade düzeyleri, Livak ve Schmittgen tarafından geliştirilen yöntemle birincil normalizasyonu $2^{-\Delta\Delta CT}$ olarak belirlenmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001). İkincil normalizasyonu ise *ACTB*, referans geni olarak kullanılarak, *Bax*, *TNF- α* , *Bcl2* ve *Caspase-3* genlerinin ifade düzeylerinin karşılaştırılması ile tespit edilmiştir. Sonuçların İstatistiksel analizleri SPSS 17,0 programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçların anlamlılık yüzdesi $p < 0.05$ dir.



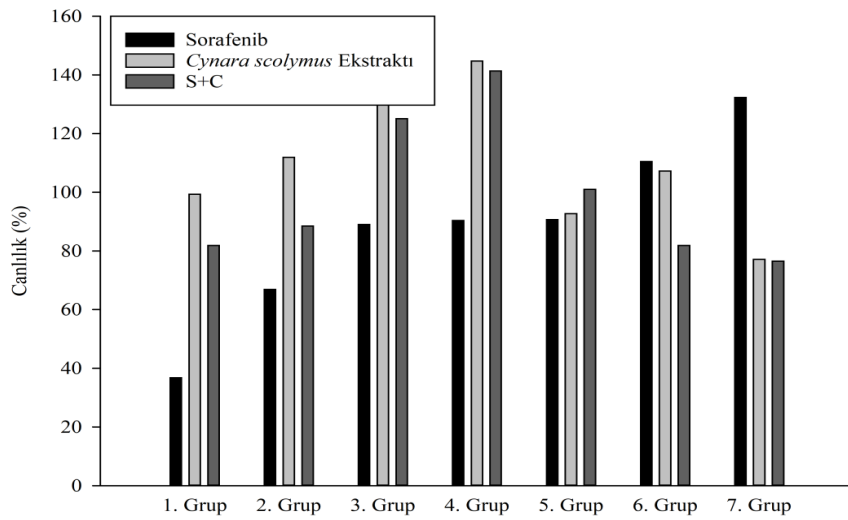
4. BULGULAR

4.1. Canlılık Testi

C. scolymus L. yaprak ekstraktı ve Sorafenib, ayrı ayrı kombinasyonlarda, HepG2 karaciğer kanseri hücre hattı üzerinde, 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde XTT canlılık testi yapılmıştır. 450 nm’de absorbans elde edilen veriler ile “hücre canlılık yüzdeleri” hesaplanmış ve bu hesaplamalar sonucunda Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de gösterilen grafiklerdeki bulgular elde edilmiştir.



Şekil 4.1. 24. saat HepG2 üzerine *C. scolymus* L. yaprak Ekstraktı, Sorafenib ve C+S’nin anti-kanser aktivitesi



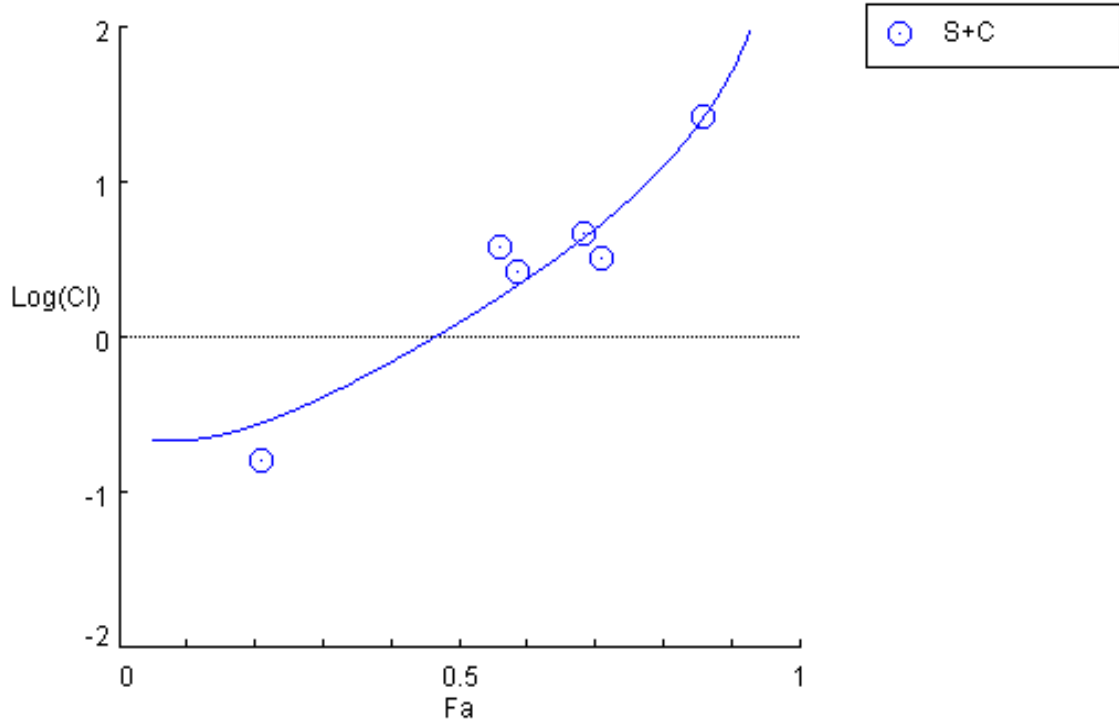
Şekil 4.2. 48. saat HepG2 üzerine *C. scolymus* L. yaprak Ekstraktı, Sorafenib ve C+S’nin anti-kanser aktivitesi

4.2. Kombinasyonel Etki Değeri

C. scolymus L. yaprak ekstraktı, Sorafenib ve kombinasyonları uygulanan HepG2 hücre hattında 24. ve 48. saatler de ölçülen absorbans değerlerinden faydalananarak CompuSyn programı aracılığıyla kombinasyon etki değeri (CI) hesaplanmıştır (Bkz. Tablo 4.1, Bkz. Tablo 4.2).

Tablo 4.1. 24. saat HepG2 üzerine *C. scolymus* L. yaprak Ekstraktı, Sorafenib ve C+S'nin uygulaması sonucu hesaplanan CI değerleri

C+S (µM)	CI	Etki
100+50	0,163	Kuvvetli sinerjizm
50+25	3,812	Antagonist
25+12,5	2,655	Antagonist
12,5+6,25	4,647	Antagonist
6,25+3,125	3,307	Antagonist
3,125+1,56	26,337	Çok güçlü Antagonist
1,56+0,78	118,564	Çok güçlü Antagonist

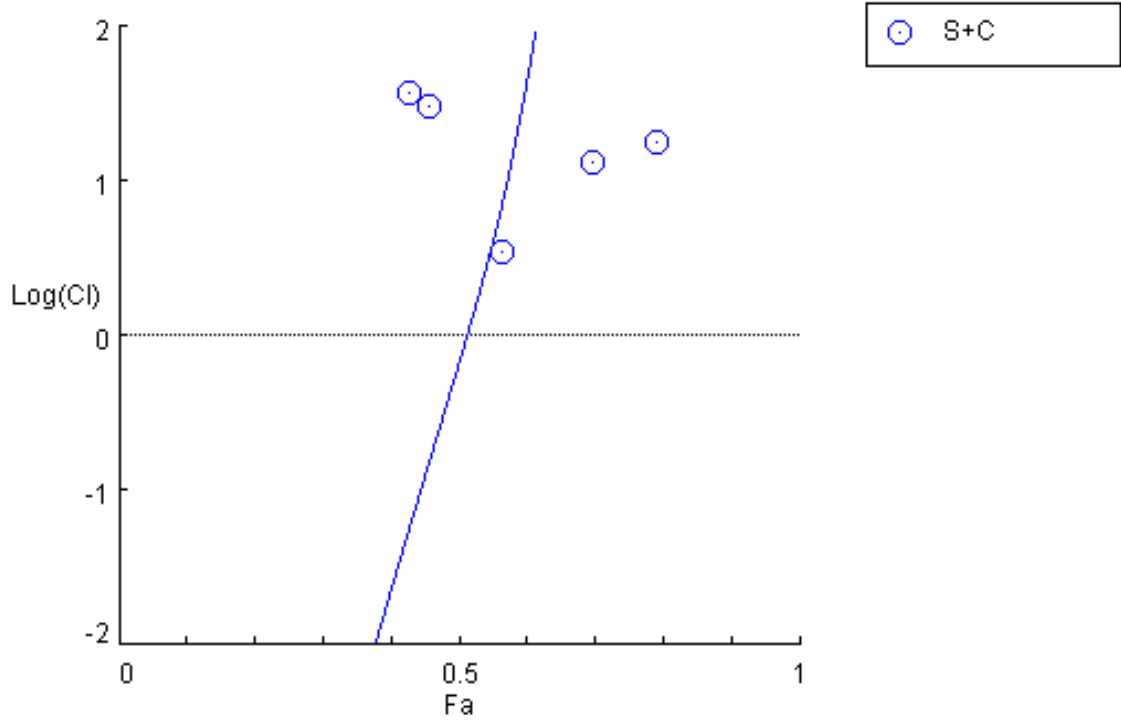


Şekil 4.3. 24. saat HepG2 üzerine *C. scolyms* L. yaprak Ekstraktı, Sorafenib ve C+S'nin oluşturduğu logaritmik CI grafiği

Compusyn programı ile 24. saat HepG2 üzerine *C. scolyms* L. yaprak ekstraktı, Sorafenib ve C+S'nin oluşturduğu logaritmik grafiği oluşturulmuştur (Bkz. Şekil 4.3.)

Tablo 4.2. 48. saat HepG2 üzerine *C. scolyms* L. yaprak ekstraktı, Sorafenib ve C+S'nin uygulaması sonucu hesaplanan CI değerleri

C+S (µM)	CI	Etki
100+50	975,490	Çok Güçlü Antagonistik
50+25	167,007	Güçlü Antagonistik
25+12,5	130,941	Güçlü Antagonistik
12,5+6,25	178,729	Güçlü Antagonistik
6,25+3,125	352,340	Güçlü Antagonistik
3,125+1,56	304,840	Güçlü Antagonistik
1,56+0,78	371,163	Güçlü Antagonistik

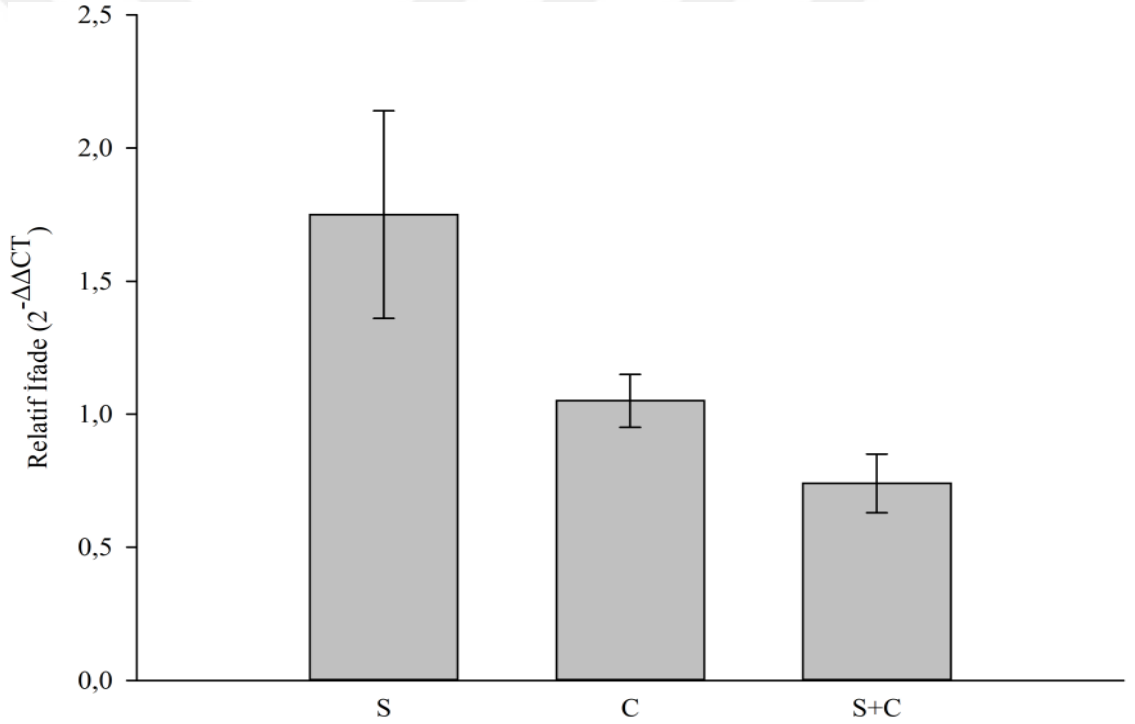


Şekil 4.4. 48. saat HepG2 üzerine *C. scolyms* L. yaprak ekstraktı, Sorafenib ve C+S'nin oluşturduğu logaritmik CI grafiği

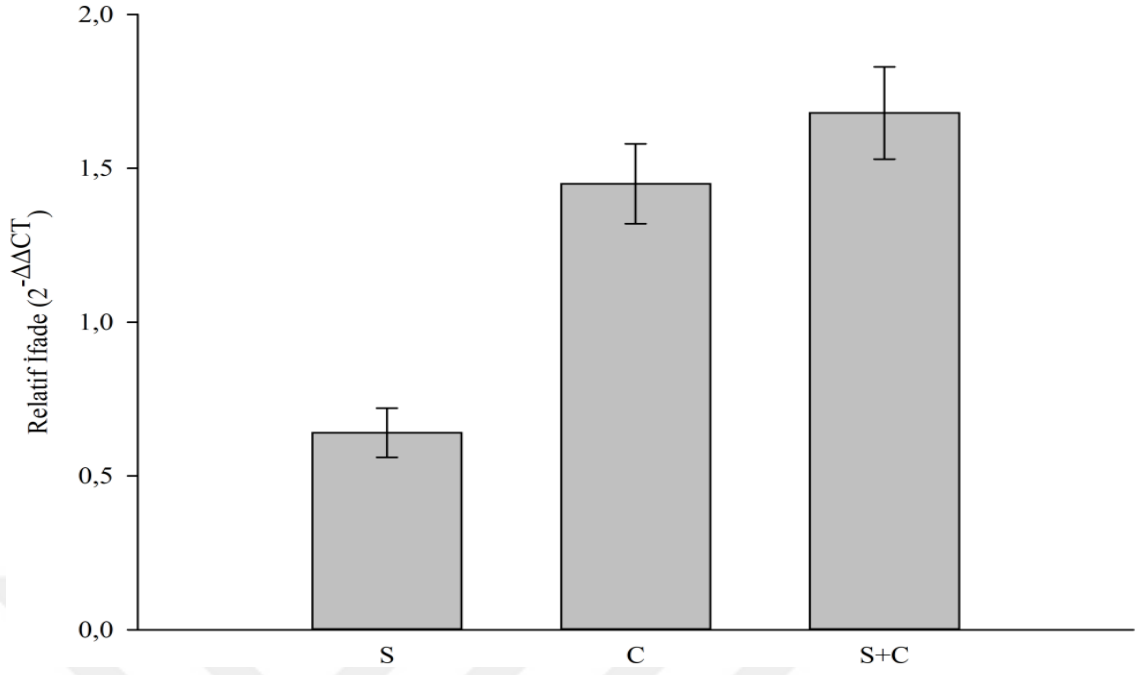
Compusyn programı ile 48. saat HepG2 üzerine *C. scolymus* L. yaprak ekstraktı, Sorafenib ve C+S'nin oluşturduğu logaritmik grafiği oluşturulmuştur (Bkz. Şekil 4.4.)

4.3. Gen İfade Düzeyleri

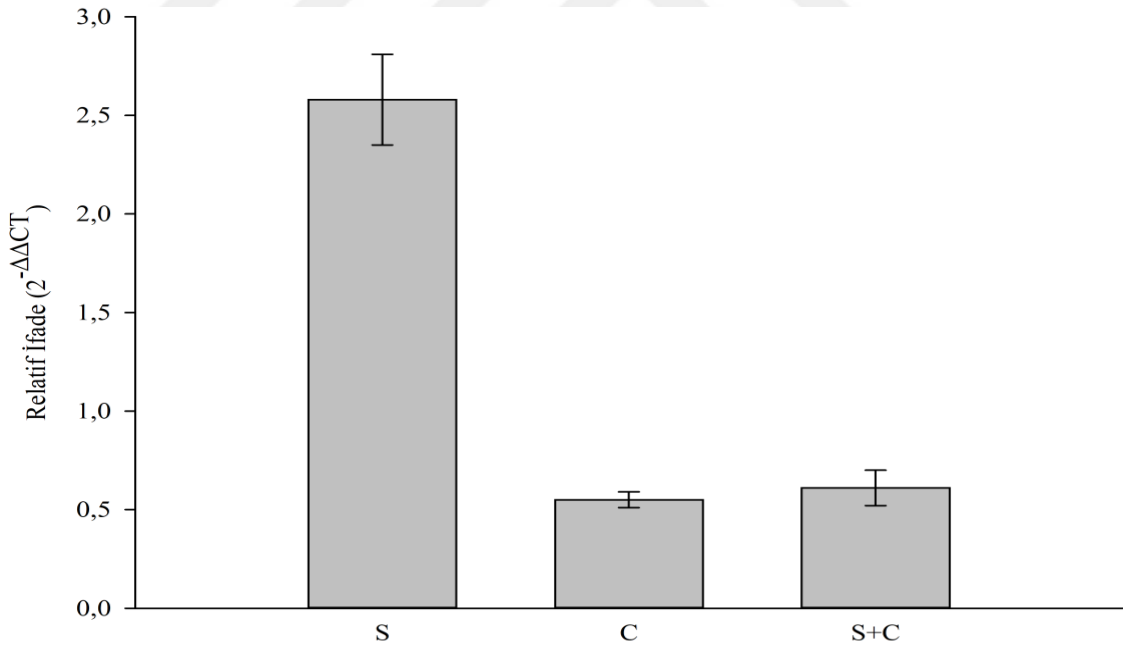
Çalışmada en yüksek antogonistik elde ettiğimiz CI değerinde HepG2 hücre hattının *Bax*, *Bcl2*, *TNF- α* ve *Caspase-3* genlerinin ifade düzeyleri belirlenmiştir. Referans geni olarak *ACTB* (beta-aktin) geni kullanılmıştır. Elde edilen sonuçların grafikleri Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de verildiği şekildedir.



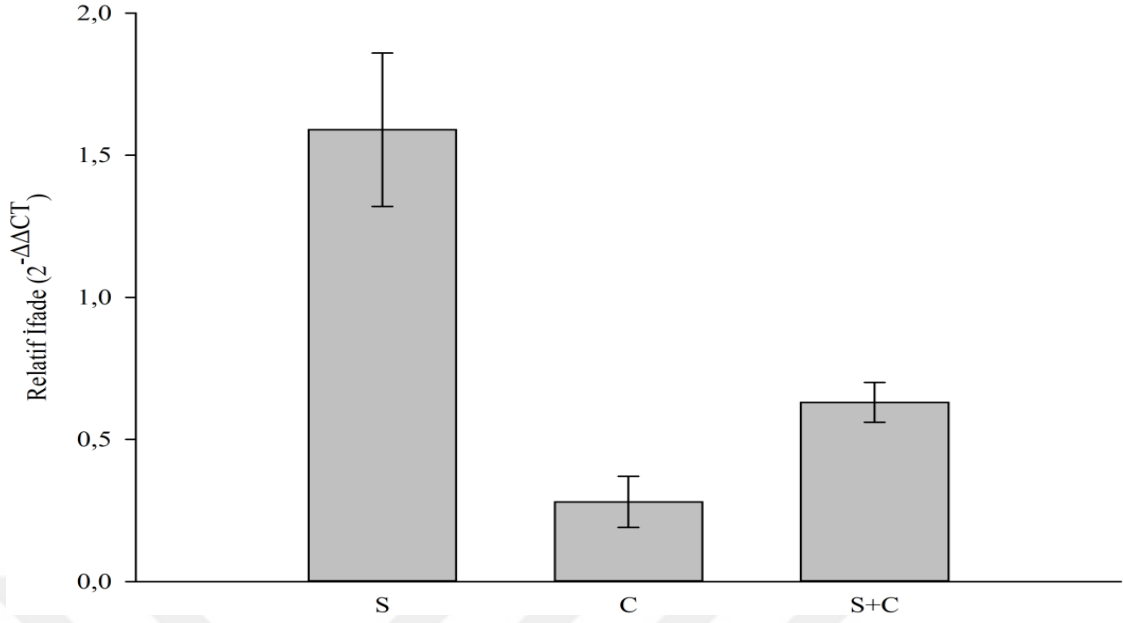
Şekil 4.5. HepG2 üzerine *C. scolymus* L. yaprak ekstraktı ve Sorafenib' in *Bax* geni ifade düzeyine etkisi



Şekil 4.6. HepG2 üzerine *C. scolyumus* L. yaprak ekstraktı ve Sorafenib' in ve kombinasyonlarının *Bcl2* geni ifade düzeyine etkisi



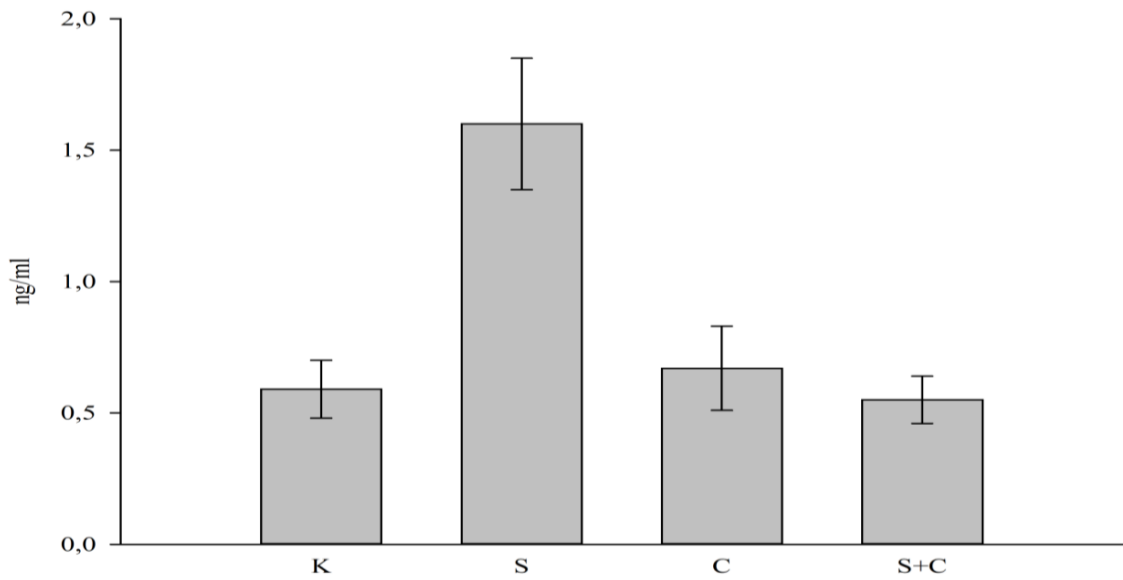
Şekil 4.7. HepG2 üzerine *C. scolyumus* L. yaprak ekstraktı ve Sorafenib' in ve kombinasyonlarının *Caspaz-3* geni ifade düzeyine etkisi



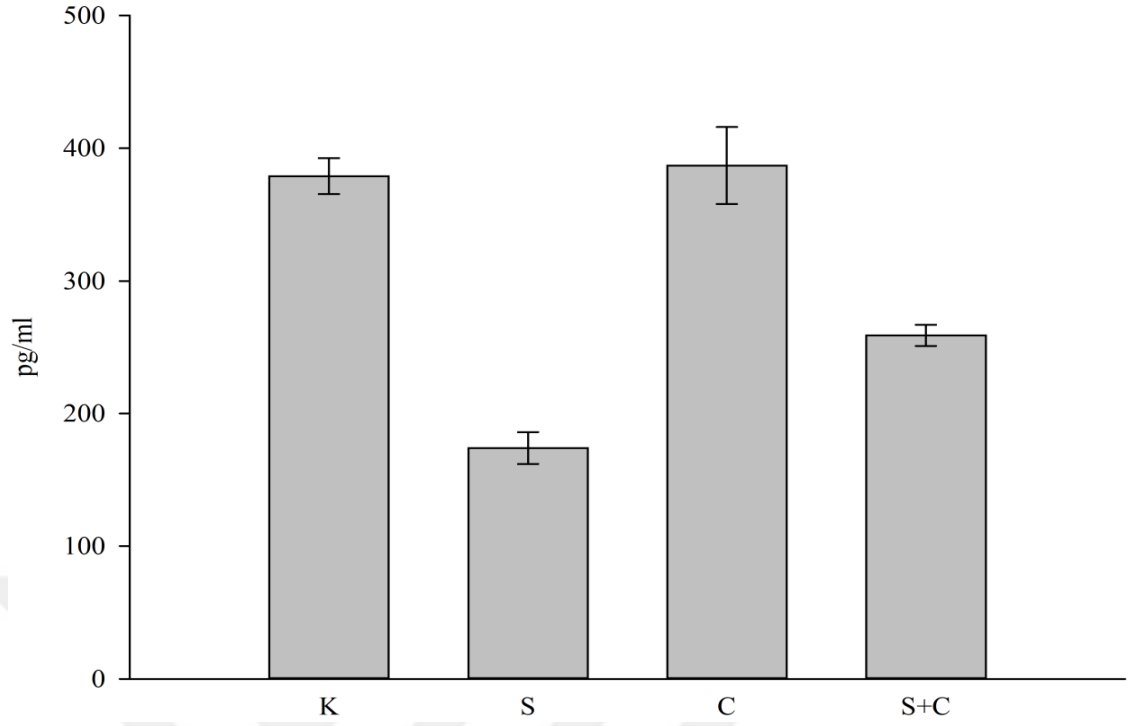
Şekil 4.8. HepG2 üzerine *C. scolymus* L. yaprak ekstraktı ve Sorafenib' in ve kombinasyonlarının *TNF α* geni ifade düzeyine etkisi

4.4. Protein Seviyeleri

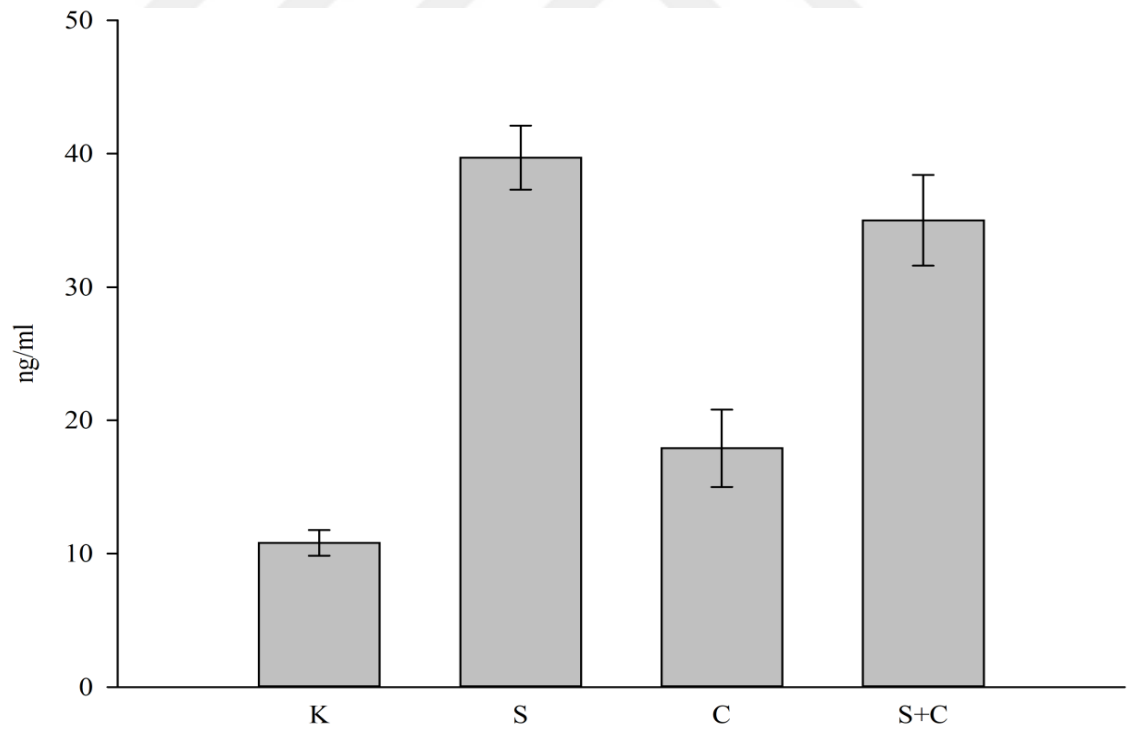
Çalışmada en güçlü antagonistik CI değerinde HepG2 hücre hattının *Bax*, *Bcl2*, *TNF α* ve *Caspase-3* protein miktar düzeylerine etkisi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların grafikleri Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11'de verildiği şekildedir.



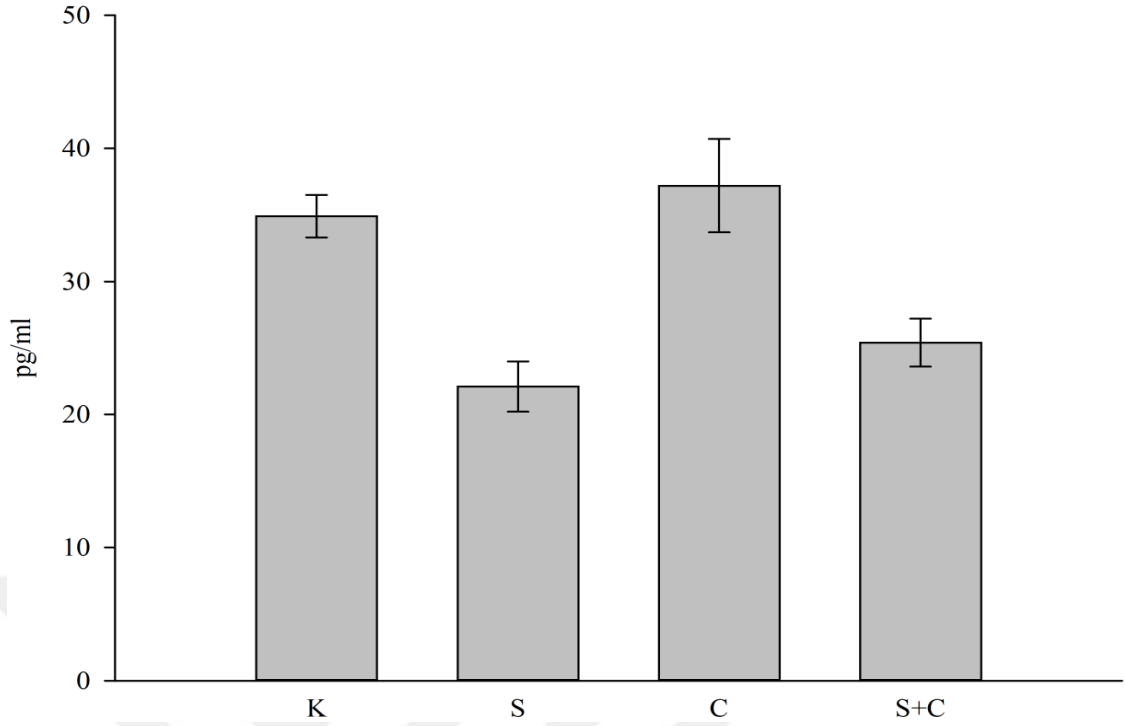
Şekil 4.9. *C. scolymus* L. yaprak ekstraktı ve Sorafenib' in, kombinasyonlarının *BAX* proteini miktarı üzerine etkisi



Şekil 4.10. *C. scolymus* L. yaprak ekstraktı ve Sorafenib'in, kombinasyonlarının *Bcl-2* proteini miktarı üzerine etkisi



Şekil 4.11. *C. scolymus* L. yaprak ekstraktı ve Sorafenib'in kombinasyonlarının *Caspase-3* proteini miktarı üzerine etkisi



Şekil 4.12. *C. scolymus* L. yaprak ekstraktı ve Sorafenib'in kombinasyonlarının *TNFα* proteini miktarı üzerine etkisi

Bax, *Bcl2*, *TNF α* ve *Caspase-3* protein sonuçları Tablo 4.3 de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. *Bax*, *Bcl2*, *TNF α* ve *Caspase-3* protein seviyeleri

	BAX (ng/ml)	BCL2 (pg/ml)	TNFα (pg/ml)	CASP-3 (ng/ml)
Kontrol	0,59±0,11	379±13,5	34,9±1,6	10,8±0,96
Sorafenib	1,6±0,25	174±12	22,1±1,9	39,7±2,4
<i>Cynara scolymus</i>	0,67±0,16	387±29	37,2±3,5	17,9±2,9
S+C	0,55±0,09	259±8	25,4±1,8	35±3,4

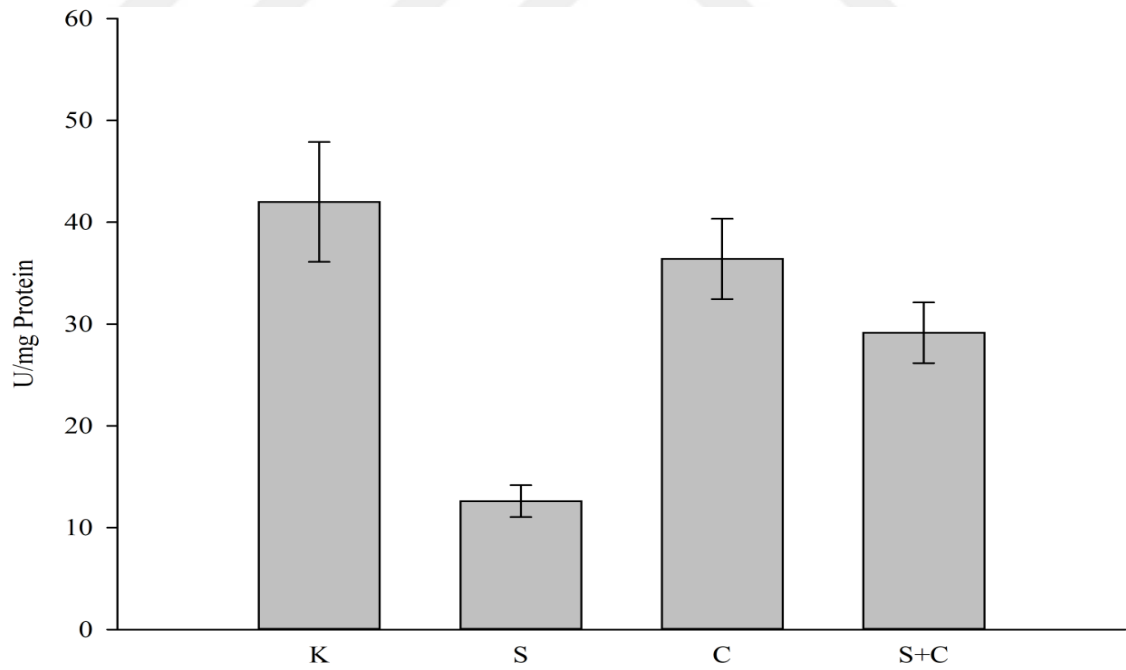
4.5. Enzim aktiviteleri

HepG2 hücre hattına uygulanan *C. scolymus* L. yaprak ekstraktı ve Sorafenib'in kombinasyonları XTT testi kullanılarak sitotoksosite ölçümleri spektrofotometrik olarak absorbans değerleri ölçüldü. Tespit edilen değerlere göre CompuSyn.exe programı ile

CI50 değerleri hesaplandı. Çalışmanın planlamasında dört deney grubu oluşturuldu. Deney grubunda *C. scolymus* L. yaprak Ekstraktı, Sorafenib ve kontrol için petrilere her birinde 10 mL EMEM besiyeri içerisinde 18×10^5 tane hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat uygun koşullarda inkübasyonun ardından hücrelere belirlenen konsantrasyonlarda maddeler aktarılmıştır. 48. saatin en yüksek CI değeri konsantrasyonları alındı ve ardından hücreler parçalanarak, her enzimin belirtilen aktivite yöntemleri kullanılarak, enzim aktivite tayini yapıldı. Katalaz, Karbonik Anhidraz ve Glutasyon Peroksidaz aktivite sonuçları Tablo 4.4, Tablo 4.5. ve Tablo 4.6. da gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Katalaz enziminin, 48. saat madde uygulanan HepG2 hücre hattında aktivite değerleri

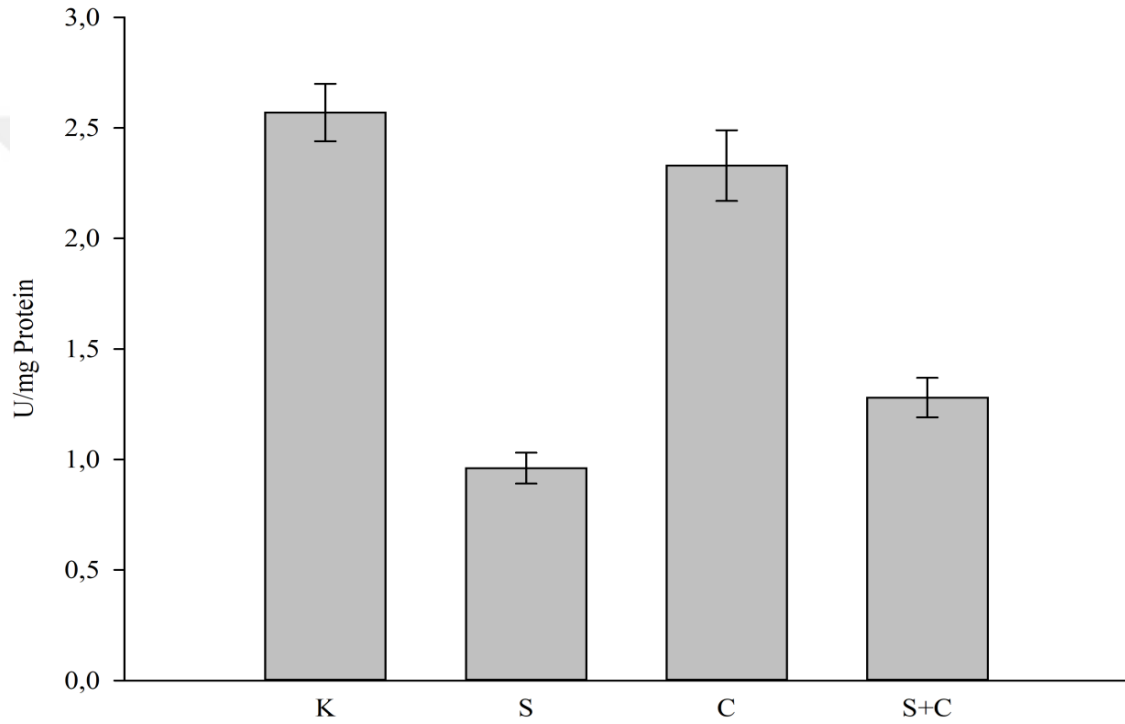
Grup	48 Saat (U/mg)
Kontrol	42,000±5,880
Sorafenib	12,600±1,570
<i>Cynara scolymus</i>	36,400±3,950
S+C	29,1500±2,990



Şekil 4.13. *C. scolymus* L. yaprak ekstraktı ve Sorafenib'in kombinasyonlarının Katalaz enziminin aktivite grafiği

Tablo 4.5. Karbonik Anhidraz, 48. saat madde uygulanan HepG2 hücre hattında aktivite değerleri

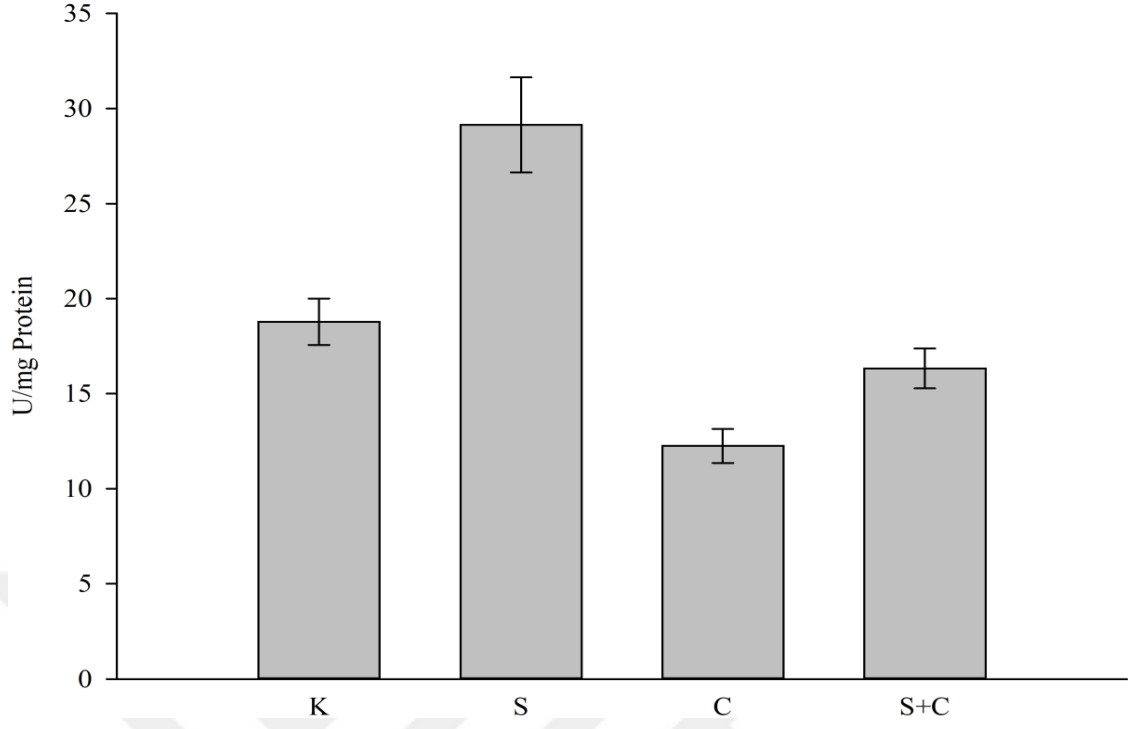
Grup	48 Saat (U/mg)
Kontrol	2,5700±0,130
Sorafenib	0,9600±0,070
<i>Cynara scolymus</i>	2,330±0,160
S+C	1,280±0,090



Şekil 4.14. *C. scolymus* L. yaprak ekstraktı ve Sorafenib'in kombinasyonlarının Karbonik Anhidraz enziminin aktivite grafiği

Tablo 4.6. Glutatyon Peroksidaz, 48. saat madde uygulanan HepG2 hücre hattında aktivite değerleri

Grup	48 Saat (U/mg)
Kontrol	18,790±0,130
Sorafenib	29,140±0,070
<i>Cynara scolymus</i>	12,250±0,160
S+C	16,330±0,090



Şekil 4.15. *C. scolymus* L. yaprak ekstraktı ve Sorafenib'in kombinasyonlarının Glutatyon peroksidaz enziminin aktivite grafiği

Katalaz, Karbonik Anhidraz ve Glutatyon Peroksidaz 48. saat aktivite grafikleri Şekil 4.13, Şekil 4.14. ve Şekil 4.15. de gösterilmiştir.

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Hepatosellüler karsinoma yetişkinlerde görülen primer karaciğer kanserinin en sık görülen ve beş yıllık sağ kalım oranı %9'un altında olan bir malignitedir. Siroza neden olarak mortalite bakımından erkekler ve kadınlarda en çok görülen üçüncü kanser türüdür. HKS, dünya genelinde her yıl yaklaşık 700.000 insanın ölümüne sebep olmakta ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen üçüncü nedeni olmaya devam etmektedir (Hamilton ve Altonen, 1999).

Sorafenib, ameliyat ile müdahale yapılamayacak durumda olan ileri seviyede HSK hastalarının yaşamlarını uzatmak ve HSK'nın ilerlemesini önlemek için kulan FDA onaylı bir multikinaz inhibitörüdür (Gillian vd., 2009).

SOR'un etki mekanizması incelendiğinde, kanserin oluşumunda yer alan, PDGFR, KIT, FLT3, RET, VEGFR ve FGFR1 hücre yüzey kinazlarını bloke ederek HSK tümörlerinin büyümesini ve ilerlemesini engellediği saptanmıştır. SOR, CRAF ve BRAF kinazlarını da içine alarak RAF/MEK/ERK sinyal yollarını inhibe eden bir inhibitördür. Bu yüzden multikinaz inhibitörü olarak literatür de yer almaktadır. SOR, HSK da hem anjiyogenez hem de tümör hücrelerinin çoğalmasını engellemektedir (Gong vd., 2017).

HSK hastalarının tedaviye yüksek oranda cevap vermemelerine rağmen sağkalım süresini uzatan tek ilaç Sorafenib'dir (Sunar, 2011). SOR kullanımı, HSK hastalarının tümör boyutlarında azalmasına sebep olmuştur (Abdel-Rahman, 2013). Sağ kalım sürelerinin uzatılmasında erken tanı ve cerrahi yöntemlerin yanında SOR kullanımının tedavi çok etkili olduğu ispatlanmıştır. Erken evrede SOR kullanımı 19-20 ay, orta evrede ise SOR kullanımı 1 yıla kadar sağkalım süresini arttırmaktadır. HSK hastalarının son evrelerinde ise SOR kullanımı tek tedavi yöntemidir ve hastanın sağ kalımını 3-4 ay uzatabilmektedir (El-Serag vd., 2008; Llovet vd., 2008).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar bitkisel ürünlere daha ağırlık verildiğini göstermektedir. Kombin kimyasal ilaç tedavilerinde gerçekleşen önemli yan etkilerden dolayı, araştırmalar bitkiler üzerine yoğunlaşmıştır. Halk tarafından da bitkisel ilaçların daha güvenli olduğuna inanılmaktadır. Yapılan bir araştırmada kanser tanısı konmadan

önce kullanılan bitkisel ürünler %5,3, kanser tanısı konduktan sonra kullanımı ise %13,9 oranında olduğu bildirilmiştir (Molassiotis vd., 2005).

Cynara scolymus Akdeniz bölgesine özgü çok yıllık bir bitkidir (Antuono, 2015). Deneysel çalışmalar *C. scolymus*'un antioksidan ve hepatoprotektif etkilerini göstermektedir, ancak karaciğer kanser hastalıklarında *C. scolymus*'un terapötik etkileri hakkında bir çalışma yapılmamıştır (Colak ve Ruiz-Aceituno, 2016).

Cynara scolymus L. (Asteraceae) (enginar) yaygın olarak sebze olarak yenir ve yaprakları halk hekimliğinde hepatit, hiperlipidemi, obezite ve dispeptik bozuklukların tedavisinde sıklıkla kullanılır. Enginar, biyoaktif ajan olarak apigenin ve luteolinini içerir. Ayrıca Enginarın çiçek başlarının, toplam antioksidan kapasitesi, sebzeler için bildirilen en yükseklerden birisi olduğu bildirilmiştir (Nassar, 2013).

Mileo ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada *Cynara scolymus* polifenollerinin meme kanserinin kemoterapötik ajanların kombine tedavisinde, kanser hücresi büyümesini inhibe etmede tek başına ilaca kıyasla daha etkili olduğunu göstermişlerdir.

Pereira ve arkadaşları, Enginar infüzyonunun da antitümör aktivite gösterdiğini, ancak normal hücreler için daha yüksek konsantrasyon da toksisite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Bitkilerde üretilen doğal polifenolik bileşikler, antioksidan, kemopreventif ve antikanser özellikler dahil olmak üzere birçok farmakolojik etki sergilerler. Salat ve arkadaşları, doksorubisin, izoliquiritin ve *Cynara scolymus*'un etkin maddesi olan sinarinin tek başına veya farklı kombinasyonlarda sitotoksik etkisini, normal hücre hatlarının yanı sıra kanser hücre hatları üzerinde çalışmaların da hem sinarinin hem de izoliquiritinin, doksorubisinin sitotoksitesini arttırdığını göstermişlerdir. Fakat bu üç bileşiğin birleşik konsantrasyonlarında uyguladıklarında ise doksorubisinden kaynaklı sitotoksiteyi azalttığını saptamışlardır. Aynı zamanda *Cynara scolymus*'un etkin maddesi olan sinarinin, HCT-116 ve HEP-G2 hücre hatlarının büyümesini arttırdığını göstermişlerdir.

Metwally ve arkadaşlarının farelerde yaptığı araştırmalarda, Dietilnitrosamine (DEN), HKS fare modellerinde, ksantin oksidaz (XO), glutatyon, glutatyon-s-transferaz (GST), malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO) seviyelerinde belirgin bir artışa sebep

olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca modelin biyokimyasal analizleri yapıldığında, aspartat amino'da transferaz (AST), alanin amino transferaz (ALT), gama glutamil transferaz (GGT), alkalın fosfataz (ALP) ve toplam bilirubin seviyelerinde önemli derecede azalma olduğunu göstermişlerdir. Bu komplikasyonlardan kaynaklı olarak 25 gün boyunca balık yağı (%5, %10) ve *Cynara scolymus* (0,5, 1 g) ile HKS fare modellerine tedavi uygulandığında, biyokimyasal parametrelerde ve antioksidan seviyelerinde ve DEN'in neden olduğu diğer hücresel değişikliklerin önemli ölçüde iyileşmesine yol açtığını saptamışlardır.

Çeşitli yapılan araştırmalar, enginar (*Cynara scolymus* L.) yaprak özlerinin, antioksidatif, hepatoprotektif, koloretik ve anti kolestatik etkiler gösterdiği ve ayrıca kolesterol biyosentezi ve LDL oksidasyonu üzerinde inhibe edici etkilerinin olduğu kanıtlanmıştır. HKS tedavisinde etkin bir madde olarak kullanılan luteolin, novo kolesterol biyosentezinin inhibisyonu sağlamaktadır. Bu durum yan etki olarak damar sertliğine(arterioskleroz) yol açmaktadır. Enginar yaprağı ekstrelerinin, araştırma verileriyle ilgili olarak, iyi tolerans ve düşük yan etki insidansı ile birlikte lipid düşürücü, antiemetik, spazmolitik, koloretik ve gaz giderici etkilerinin olduğu saptanmıştır. Spesifik etki mekanizmaları nedeniyle, damar sertliğinin (arterioskleroz) önlenmesi için gelecekte *Cynara scolymus*'un kullanılması beklenmektedir (Kraft, 1997).

Metanol ile ekstre edilen enginar tomurcuklarının karaciğer kanseri hücrelerine karşı hem sitotoksik hem de apoptotik etkileri olduğu gösterildiği bildirilmiştir. HepG2 hücre hatlarına muamele edildiğinde, en yüksek konsantrasyon olan 1200 µmol / L'de kanser hücrelerinin canlılığında %80'e varan bir azalmayı saptamışlardır. Bu çalışmanın devamında ise, 400 ve 800 µmol / L enginar özütü ile muamele edilen HepG2 hücre hatlarında, sonuç olarak aktive olan kaspaz-3 proteinin artışı apoptotik bir etki gösterdiğini ve kültürlendiğinde hücre popülasyonunun yaklaşık %50'sinde apoptozis görüldüğünü göstermişlerdir. (Miccadei vd., 2008)

24. saat sonunda yaptığımız tez çalışmasındaki canlılık seviyeleri;

1.grup konsantrasyonlar da: HepG2 hücre hattında yapılan canlılık testinde, hücreye uygulanan 50 µM sorafenibin, 100 µM Sorafenib ve *Cynara scolymus* L. Ekstraktına göre %50 oranında fazla hücre öldürdüğü tespit edilmiştir. Sorafenib, Sorafenib ve *Cynara*

scolymus L. Ekstraktı ile birlikte kombinasyon konsantrasyonlarında 50+100 µg/ml, tek başına sorafenibin etkisinden daha çok hücre ölümüne sebep olmuştur.

2.grup konsantrasyonlar da HepG2 kanser hücre hattında yapılan canlılık testinde, hücreye uygulanan 25 µM sorafenibin, 50 µM Sorafenib ve *Cynara scolymus* L. Ekstraktına göre %50 oranında daha fazla hücre ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir. Sorafenib, Sorafenib ve *Cynara scolymus* L. Ekstraktı ile birlikte kombinasyon konsantrasyonlarında 25+50 µg/ml, tek başına sorafenibin etkisinden yaklaşık %10 oranında daha az hücre öldürdüğü tespit edilmiştir.

3.grup konsantrasyonlar da: HepG2kanser hücre hattında yapılan canlılık testinde hücreye uygulanan 12,5 µM sorafenibin, 25 µM Sorafenib ve *Cynara scolymus* L. Ekstraktına göre %20 oranında daha fazla hücre ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir. Sorafenib, Sorafenib ve *Cynara scolymus* L. Ekstraktı ile birlikte kombinasyon konsantrasyonlarında 12,5+25 µg/ml, tek başına sorafenibin etkisinden %20 oranında daha fazla hücrenin ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir.

4.grup konsantrasyonlarda; HepG2 kanser hücre hattında yapılan canlılık testinde, hücreye uygulanan 6,25 µM sorafenibin, 12,5 µM Sorafenib ve *Cynara scolymus* L. Ekstraktına göre %20 oranında daha fazla hücre ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir. Sorafenib, Sorafenib ve *Cynara scolymus* L. Ekstraktı ile birlikte kombinasyon konsantrasyonlarında 6,25+12,5 µg/ml, tek başına sorafenibin etkisinden %3 oranında daha fazla hücrenin ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir.

5.grup konsantrasyonlarda; HepG2 kanser hücre hattında yapılan canlılık testinde, hücreye uygulanan 3,125 µM sorafenibin, 6,25 µM Sorafenib ve *Cynara scolymus* L. Ekstraktına göre %40 oranında daha fazla hücre ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir. Sorafenib, Sorafenib ve *Cynara scolymus* L. Ekstraktı ile birlikte kombinasyon konsantrasyonlarında 3,125 +6,25 µg/ml, tek başına sorafenibin etkisinden %2 oranında daha fazla hücrenin ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir.

6.grup konsantrasyonlarda; HepG2 kanser hücre hattında yapılan canlılık testinde, hücreye uygulanan 1,56 µM sorafenibin, 3,125 µM Scolymus *Cynara scolymus* L. göre %60 oranında daha fazla hücre ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir. Sorafenib ve

Cynara scolymus L. Ekstraktı ile birlikte kombinasyon konsantrasyonlarında 1,56 + 3,25 µg/ml, tek başına sorafenibin etkisinden %40 oranında daha az hücrenin ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir.

7.grup konsantrasyonlarda; HepG2 kanser hücre hattında yapılan canlılık testinde, hücreye uygulanan 0,78 µM sorafenibin, 1,56 µM *Cynara scolymus* L. Ekstraktına göre %60 oranında daha fazla hücre ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir. Sorafenib ve *Cynara scolymus* L. Ekstraktı ile birlikte kombinasyon konsantrasyonlarında 0,78 + 1,56 µg/ml, tek başına sorafenibin etkisinden %45 oranında daha az hücrenin ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir.

48. saat gen ekspresyonları ve protein aktiviteleri;

1.grup konsantrasyonlarda; HepG2 hücre hattında yapılan canlılık testinde, hücreye uygulanan 50 µM Sorafenibin, 100 µM *Cynara scolymus* L. Ekstraktına göre %60 oranında daha fazla hücre ölümüne sebep olduğu saptanmıştır. Sorafenib ve *Cynara scolymus* L. Ekstraktı ile birlikte kombinasyon konsantrasyonlarında 50 + 100 µg/ml, tek başına sorafenibin etkisinden %40 oranında daha az hücrenin ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir.

RT-qPCR gen ekspresyonları, en yüksek antagonist etki olarak tespit ettiğimiz 48.saatin 100+50 µg/ml (*Cynara scolymus* L. Ekstraktı + Sorafenib) konsantrasyonlarında çalışılmıştır.

50 µg/ml Sorafenib konsantrasyonlarında, *Bcl-2* RT-qPCR ekspresyon seviyelerinde azalma olmuştur. *Bcl-2* ekspresyonunun azalması, apoptozun baskılanmadığını göstermektedir. Ayrıca ELISA sonuçlarına göre, *Bcl-2* protein aktivitelerinin düştüğü de tespit edilmiştir ve bu sonuçlar *Bcl-2* RT-qPCR ekspresyon sonuçlarını desteklemiştir.

100 µg/ml konsantrasyon da *Cynara scolymus* L. Ekstraktı uygulanan HepG2 hücre hattında ise *Bcl-2* RT-qPCR ekspresyon seviyelerinde artış gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre apoptozun baskılandığını ve hücrenin apoptotik yolağa girmediği tespit edilmiştir. Ayrıca ELISA protein aktiviteleri sonuçlarına göre *Bcl-2* protein aktivitelerinin neredeyse kontrole göre eşit kaldığı tespit edilmiştir.

Cynara scolymus L. Ekstraktı + Sorafenib in kombinasyonel bir şekilde 100+50 µg/ml konsantrasyonlarda HepG2 hücre hattına uygulanan *Bcl-2* RT-qPCR gen ekspresyonlarının da artış gözlenmektedir. Bu durum *Cynara scolymus* L. Ekstraktı'nın sorafenibin etkisini inhibe ettiğini göstermektedir. *Bcl-2* protein aktivitelerinin düşmüş olması ise m-RNA ların baskılandığını göstermektedir.

Sorafenibin tek başına (50 µg/ml) uygulanmasında *bax*, *caspase-3* ve *TNF α* gen ekspresyonlarında artış gözlenmiştir. Bu durum SOR uygulanan HepG2 hücre hatlarında apoptozun olduğunu göstermektedir. Ayrıca *bax*, *caspase-3* protein miktarlarının Elisa protein aktivite sonuçlarında yüksek çıkması RT-qPCR gen ekspresyon sonuçlarını desteklemiştir. *Tnfa* protein aktivitesinin düşük olması m-RNA ların baskılandığını göstermiştir.

Cynara scolymus L. Ekstraktı uygulanan hücrelerde ise *bax* ve *caspase-3* gen ekspresyonlarının kontrolle aynı olduğu gözlenmiştir. *TNF α*'nın ise azaldığı tespit edilmiştir. Bu analizler, *Cynara scolymus* L. Ekstraktının, normal HepG2 kanser hücre hattında apoptozu etkilemediğini göstermiştir.

Cynara scolymus L. Ekstraktı + Sorafenib in 100+50 µg/ml kombinasyonel konsantrasyonlarda, HepG2 hücre hattına uygulandıktan sonraki analiz edilen *Bax* gen ekspresyonlarının kontrole göre aynı kaldığı gözlenmiştir. 50 µg/ml sorafenib kullanılan hücrelerde, *bax* gen ekspresyonları artmış, *Caspase-3* ve *TNF α*'da ise kontrole yakın gen ekspresyonları tespit edilmiştir. Bu veriler *Cynara scolymus* L. ekstraktının sorafenibin apoptoz etkisini inhibe ettiğini ya da azalttığını göstermiştir. Kontrol olarak, HepG2 karaciğer kanser hücre hattında normalde bulunan *Bcl*, *bax*, *caspase-3* ve *TNF α* gen ekspresyonları baz alınmıştır.

Enzim aktivite sonuçları, sorafenibin katalaz ve karbonik anhidraz enzimlerini inhibe ettiğini *Cynara scolymus* L. Ekstraktı'nın ise sorafenibin etkisini azalttığını göstermektedir. Bu verilere göre; kanser hücresinde bulunan hidrojen peroksit radikallerinin *Cynara scolymus* L. Ekstraktı tarafından azaltıldığı ve sorafenibin karbonik anhidraz enzimini inhibe etmesini *Cynara scolymus* L. Ekstraktı'nın engellediği yorumu yapılmıştır.

2.grup konsantrasyonlarda; yapılan canlılık testinde, hücreye uygulanan 25 µM sorafenibin, 50 µM Sorafenib ve Scolymus Ekstraktına göre %40 oranında daha fazla hücre ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir. Sorafenib ve *Cynara scolymus* L. Ekstraktı ile birlikte kombinasyon konsantrasyonlarında (25 + 50 µg/ml), tek başına sorafenibin etkisinden %15 oranında daha az hücrenin ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir.

3.grup konsantrasyonlarda; HepG2 hücre hattında yapılan canlılık testinde, hücreye uygulanan 12,5 µM sorafenibin, 25 µM Sorafenib ve *Cynara scolymus* L. Ekstraktı göre %30 oranında daha fazla hücre ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir. Sorafenib ve *Cynara scolymus* L. Ekstraktı ile birlikte kombinasyon konsantrasyonlarında 12,5 + 25 µg/ml, tek başına sorafenibin etkisinden %20 oranında daha az hücrenin ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir.

4.grup konsantrasyonlarda; HepG2 hücre hattında yapılan canlılık testinde, hücreye uygulanan 6,25 µM sorafenibin, 12, µM *Cynara scolymus* L. Ekstraktına göre %50 oranında daha fazla hücre ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir. Sorafenib ve *Cynara scolymus* L. Ekstraktı ile birlikte kombinasyon konsantrasyonlarında 6,25 + 12,5µg/ml, tek başına sorafenibin etkisinden %50 oranında daha az hücrenin ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir.

5.grup konsantrasyonlarda; HepG2 hücre hattında yapılan canlılık testinde, hücreye uygulanan 3,125 µM sorafenibin, 6,25 µM *Cynara scolymus* L. Ekstraktına göre %3 oranında daha fazla hücre ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir. Sorafenib ve *Cynara scolymus* L. Ekstraktı ile birlikte kombinasyon konsantrasyonlarında 3,125 +6,25 µg/ml, tek başına sorafenibin etkisinden %7 oranında daha az hücrenin ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir.

6.grup konsantrasyonlarda; Hep G2 hücre hattında yapılan canlılık testinde, hücreye uygulanan 1,56 µM sorafenibin, 3,125 µM *Cynara scolymus* L. Ekstraktına göre %10 oranında daha az hücre ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir. Sorafenib ve *Cynara scolymus* L. Ekstraktı ile birlikte kombinasyon konsantrasyonlarında 1,56 + 12,5 µg/ml, tek başına sorafenibin etkisinden %30 oranında daha fazla hücrenin ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir.

7.grup konsantrasyonlarda; HepG2 hücre hattında yapılan canlılık testinde, hücreye uygulanan 0,78 µM sorafenibin, 1,56 µM *Cynara scolymus* L. Ekstraktına göre %30 oranında daha az hücre ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir. Sorafenib ve *Cynara scolymus* L. Ekstraktı ile birlikte kombinasyon konsantrasyonlarında 0,78 + 12,5 µg/ml, tek başına sorafenibin etkisinden %50 oranında daha fazla hücrenin ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir.

Bir sonraki çalışmamızda, deney hayvanları üzerinde yapacağımız çalışmalarda, HKS modeli hayvan metabolizması üzerinde, *Cynara scolymus* L. Ekstraktı ve Sorafenib'in oral yolla belli konsantrasyonlarda verilerek, metabolik sinerjistik etkisinin, apoptotik genlere olan etkisinin ve enzimatik etkisinin sonuçlarını, bu tez çalışmasıyla karşılaştırma yapılması hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

- Abu-Reidah IM, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. (2013) “Extensive characterisation of bioactive phenolic constituents from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS” **Food chem.** 141(3):2269-77.
- Balogh J, Victor D, Asham EH et al (2016) “Hepatocellular carcinoma: a review” **J Hepatocell Carcinoma** 3: 41–53.
- Bosch, F.X., Ribes, J.; Díaz, M. Cléries, R. (2004) “Primary liver cancer: worldwide incidence and trends”, **Gastroenterology**, 127, S5-S16.
- Boubaker M, Omri AE, Blecker C, Bouzouita N. (2016) “Fibre concentrate from artichoke (*Cynara scolymus* L.) stem by-products: Characterization and application as a bakery product ingredient” **Food Sci Technol Int.** 22(8):759-768.
- Bruix J, Qin S, Merle P, Granito A., Huang Y, Bodoky G, Pracht M, Yokosuka O, Rosmorduc O, Breder V, Gerolami R, Masi G, Ross PJ, Song T, Bronowicki JP, Ollivier-Hourmand I, Kudo M, Cheng AL, Llovet JM, Finn RS, LeBerre MA, Baumhauer A, Meinhardt G, Han G. (2017) “Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial”, **Lancet**, 389: 56-66
- Cainap C., Qin S, Huang WT, Chung IJ, Pan H, Cheng Y, Kudo M, Kang YK, Chen PJ, Toh HC, Gorbunova V, Eskens FA, Qian J, McKee MD, Ricker JL, Carlson DM, El-Nowiem S. (2015) “Linifanib versus Sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: results of a randomized phase III trial”. **J Clin Oncol**, 33: 172-179
- Chang MH, Chen CJ, Lai MS (1997) “Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group.” **N Engl J Med**; 336:1855–1859
- Chang MH, Chen CJ, Lai MS, et al. (1997) “Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children”. **Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. N Engl J Med**, 336:1855-1859.
- Cheng AL, Kang YK, Lin DY, Park JW, Kudo M, Qin S, Chung HC, Song X, Xu J, Poggi G, Omata M, Pitman Lowenthal S, Lanzaone S, Yang L, Lechuga MJ, Raymond E. (2013) “Sunitinib versus sorafenib in advanced hepatocellular cancer: results of a randomized phase III trial”. **J Clin Oncol**, 31: 4067-4075
- Chimed T, Sandagdorj T, Znaor A, et al. (2017) “Canceer incidence and cancer control in Mongolia” **Int J Cancer**, 140:302-309

- Claudia M. L. J. Tilli Angela J. W. Stavast-Kooy Frans C. S. Ramaekers H. A. Martino Neumann (2002) “Bax expression and growth behavior of basal cell carcinomas” **Cutan Pathol**: 29: 79–87
- Colak E, Ustuner MC, Tekin N, Colak E, Burukoglu D, Degirmenci I, et al. (2016) “The hepatocurative effects of *Cynara scolymus* L. leaf extract on carbon tetrachloride-induced oxidative stress and hepatic injury in rats” **Springer Plus**. 5 216.
- D'Antuono I, Garbetta A, Linsalata V, Minervini F, Cardinali A. (2015) “Polyphenols from artichoke heads (*Cynara cardunculus* (L.) subsp. *Scolymus* Hayek): in vitro bio-accessibility, intestinal uptake and bioavailability” **Food Funct**. 6(4):1268-77.
- D'Antuono I, Garbetta A, Linsalata V, Minervini F, Cardinali A. (2015) “Polyphenols from artichoke heads (*Cynara cardunculus* (L.) subsp. *Scolymus* Hayek): in vitro bio-accessibility, intestinal uptake and bioavailability ”**Food & funct**. 6(4):1268-77.
- Dökmeci, İ., 1992, Farmakoloji. Saray Kitabevleri, 925s., İstanbul.
- Gong, L. Giacomini, Marilyn M., Giacomini, Craig; Maitland, Michael L.f, Altman, Russ B.; Klein, Teri E. (2017) “PharmGKB summary sorafenib pathways” **Pharmacogenetics and Genomics**, 27 240–246
- Griffith DJ, Corneau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Mossus H, De Lange T, (1999) “Mammalian telomeres an in a large duplex loop” **Cell**, 97, 503-514.
- Grosso JF, Jure-Kunkel MN. (2013) “CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research” **Cancer Immun** 13: 5
- Hamilton, S R. Aaltonen L.A (2000) “Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System”**International Agency for Research on Cancer (IARC)** 14(2), 473-485.
- Hartwig FP, Goedert L, Wagner MS, Schultze E, (2014) “Tumor Cell Development: A Role for Viruses and Telomerase Activity” **Advances in Tumor Virology**, 4, 7-16
- Heidarian E, Rafieian-Kopaei M. (2013) “Protective effect of artichoke (*Cynara scolymus*) leaf extract against lead toxicity in rat ” **Pharm Biol**. 51(9):1104-9.
- Herzog CE, Andrassy RJ, Eftekhari F. (2000) “Childhood cancer Hepatoblastoma”. **The Oncologist** 5 445-53.
- Johnson P. Qin S, Park JW, Poon RT, Raoul JL, Philip PA, Hsu CH, Hu TH, Heo J, Xu J, Lu L, Chao Y, Boucher E, Han KH, PaikSW, Robles-Aviña J, Kudo M, Yan L, Sobhonslidsuk A, Komov D, Decaens T, Tak WY, Jeng LB, Liu D, Ezzeddine R, Walters I, Cheng AL (2013) “Brivanib versus sorafenib as first-line therapy

- in patients with unresectable, advanced hepatocellular carcinoma: results from the randomized phase III BRISK-FL study”. *J Clin Oncol*; 31 3517-3524
- Juzyszyn Z, Czerny B, Pawlik A, Drożdżik M. (2008) “The effect of artichoke (*Cynara scolymus* L.) extract on ROS generation in HUVEC cells” *Phytother Res.* 22(9):1159-61
- Kraft K (1997) “Artichoke leaf extract- Recent findings reflecting effects on lipid metabolism, liver and gastrointestinal tracts” *Phytomedicine Vol.* 4 (4), pp. 369-378
- London WT, Petrick JL, McGlynn KA. (2018) “Liver cancer. In: Thun MJ, Linet MS, Cerhan JR, Haiman CA, Schottenfeld D, eds. Cancer Epidemiology and Prevention. 4th ed. New York”, *Oxford University Press*, 635-660.
- M. Le Grazie, Maria Rosa Biagini, Mirko Tarocchi, Simone Polvani, Andrea Galli (2017) “Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: The present and the future” *World J Hepatol* 9(21) 907-920
- Marengo A, Rosso C, Bugianesi E. (2016) “Liver cancer: connections with obesity, fatty liver, and cirrhosis”, *Annu Rev Med*, 67 103-117.
- McGlynn, K.A. Tsao, L. Hsing, A.W.; Devasa, S.S.; Fraumeni, J (2001) “International trends and patterns of primary liver cancer” *Int. J. Cancer*, 94, 290-296.
- McGlynn, K.A. Tsao, L., Hsing, A.W.; Devasa, S.S., Fraumeni, J. (2001) “International trends and patterns of primary liver cancer”, *Int. J. Cancer*, 94, 290-296.
- Miccadei S, Di Venere D, Cardinali A et al (2008) “Antioxidative and apoptotic properties of polyphenolic extracts from edible part of artichoke (*Cynara scolymus* L.) on cultured rat hepatocytes and on human hepatoma cells” *Nutr Cancer* 60 276–283.
- Mileo AM, Di Venere D, Abbruzzese C, Miccadei S. Oxid (2015) “Long Term Exposure to Polyphenols of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Exerts Induction of Senescence Driven Growth Arrest in the MDA-MB231 Human Breast Cancer Cell Line” *Med Cell Longev.* 363827.
- Miura N, Horikawa I, Nishimoto A, Ohmura H, Ito H, Hirohashi S, Shay JW, Oshimura M, (1997) “Progressive telomere shortening and telomerase reactivation during hepatocellular carcinogenesis” *Cancer Genet Cytogenet*, 93, 56-62
- Mustafa HN, El Awdan SA, Hegazy GA, Jaleel GAA. (2015) “Prophylactic role of coenzyme Q10 and *Cynara scolymus* L on doxorubicin-induced toxicity in rats: Biochemical and immunohistochemical study” *Indian J Pharmacol.* 47(6):649.
- Nakanuma Y. Harada K. Katayanagi K. Tsuneyama K Sasaki M (1999). “Definition and pathology of primary sclerosing cholangitis” *Primary Sclerosing Cholangitis* 6, 333–342

- Nassar MI, Mohamed TK, Elshamy AI, El-Toumy SA, Abdel Lateef AM, Farrag AR. J (2013) "Chemical constituents and anti-ulcerogenic potential of the scales of *Cynara scolymus* (artichoke) heads" **Sci Food Agric**. 93(10):2494-501.
- P Greenstein, W.V. Jenrette, J. White (1941) "The liver catalase activity of tumor-bearing rats and the effect of extirpation of the tumors" **J. Natl. Cancer Inst.**, 2, pp. 283-291
- Parkin, D.M. Bray, F. Ferlay, J. Pisani, P. (2005) "Global cancer statistics,2002". **CA Cancer J. Clin.** 55, 74-108.
- Parkin, D.M.; Bray, F.; Ferlay, J; Pisani, P. (2002) "Global cancer statistics" **CA Cancer J. Clin.** 55, 74-108
- Pichlmayr R, Ringe B, Wittekind C. (1989) "Liver grafting for malignant liver tumors" **Transplant Proc** 21 2403-2405.
- Pulito C, Mori F, Sacconi A, Casadei L, Ferraiuolo M, Valerio MC, et al. (2015). "Dropwort-induced metabolic reprogramming restrains YAP/TAZ/TEAD oncogenic axis in mesothelioma" **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**. 6(20):18134-50.
- Red. (2015) "Artichoke extract with prokinetic effect". **MMW Fortschritte der Medizin**. 157(14):73.
- Ruiz-Aceituno L, Garcia-Sarrio MJ, Alonso-Rodriguez B, Ramos L, Sanz ML (2016) "Extraction of bioactive carbohydrates from artichoke (*Cynara scolymus* L.) external bracts using microwave assisted extraction and pressurized liquid extraction" **Food chem**. 196:1156-62.
- Sankaranarayanan R, Masuyer E, Swaminathan R, Ferlay J, Whelan S (1998) "Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis" **Anticancer Research**, 18(6B):4779-478
- Schütte, K. Bornschein, J. Malfertheiner, P. (2009) "Hepatocellular carcinoma–epidemiological trends and risk factors", **Dig. Dis**, 27, 80-92.
- Sherman, M. (2005) "Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and screening", **Semin. Liver Dis**, 25, 143-154.
- Sherman, M. (2005) "Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and screening" **Semin. Liver Dis**. 25, 143-154.
- Thursz M, Fontanet A. "HCV transmission in industrialized countries and resource-constrained areas", **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, 11:28-35.
- Zhu A. Park J. Ryoo B., Yen CJ, Poon R, Pastorelli D, Blanc JF, Chung HC, Baron AD, Pfiffer TE, Okusaka T, Kubackova K, Trojan J, Sastre J, Chau I, Chang SC, Abada PB, Yang L, Schwartz JD, Kudo M. (2015) "Ramucirumab versus placebo as second-line treatment in patients with advanced hepatocellular

carcinoma following first-line therapy with sorafenib (REACH): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 trial”, ***Lancet Oncol***; 16: 859-870

Zhu AX, Kudo M, Assenat E, Cattani S, Kang YK, Lim HY, Poon RT, Blanc JF, Vogel A, Chen CL, Dorval E, Peck-Radosavljevic M, Santoro A, Daniele B, Furuse J, Jappe A, Perraud K, Anak O, Sellami DB, Chen LT. (2014) “Effect of everolimus on survival in advanced hepatocellular carcinoma after failure of sorafenib: the EVOLVE-1 randomized clinical trial”. ***JAMA***, 312: 57-67

Zhu AX, Rosmorduc O, Evans TR, Ross PJ, Santoro A, Carrilho FJ, Bruix J, Qin S, Thuluvath PJ, Llovet JM, Leberre MA, Jensen M, Meinhardt G, Kang YK. (2015) “SEARCH: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of sorafenib plus erlotinib in patients with advanced hepatocellular carcinoma”, ***J Clin Oncol***, 33: 559-566