

**YENİ SENTEZLENMİŞ ARİL (3-METİL-
BENZOFURAN-2-İL) KETON
TÜREVLERİNİN VE VULPİNİK ASİTİN
SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK
ETKİSİNİN NORMAL VE KANSERLİ
HÜCRELERDE *IN VITRO*
ARAŞTIRILMASI**

Oğuzhan Karaosmanoğlu

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Ağustos-2013

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1205F080**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Oğuzhan Karaosmanoğlu'nun “Yeni sentezlenmiş aril (3-metil-benzofuran-2-il) keton türevlerinin ve vulpinik asitin sitotoksik ve apoptotik etkisinin normal ve kanserli hücrelerde *in vitro* araştırılması” başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 26.07.2013 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı): Prof. Dr. HÜLYA SİVAS

.....

Üye

: Doç Dr. SELDA DELİORMAN KABADERE

.....

Üye

: Doç. Dr. AYŞE TANSU KOPARAL

.....

**Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
.....tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.**

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YENİ SENTEZLENMİŞ ARİL (3-METİL-BENZOFURAN-2-İL) KETON TÜREVLERİNİN VE VULPİNİK ASİTİN SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİSİNİN NORMAL VE KANSERLİ HÜCRELERDE *İN VİTRO* ARAŞTIRILMASI

Oğuzhan KARAOSMANOĞLU

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hülya SİVAS
2013, 74 sayfa

Benzofuranlar pek çok doğal bileşende yaygın olarak bulunduğu için ilgi toplamış bileşiklerdendir. Vulpinik asit biyolojik etkisi olduğu bilinen liken metabolitlerindendir. Bu tezde yeni sentezlenmiş üç aril (3-metil-benzofuran-2-il) keton türevlerinin HepG2 ve F2408 hücreleri üzerine sitotoksik, apoptotik ve bazı mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkisi araştırıldı. Sonuçta hücre canlılığını azaltıcı, mikroorganizmal büyümeyi inhibe edici etki gözlenmedi. Vulpinik asitin aynı hücre hatları üzerine sitotoksik, apoptotik ve apoptoz yolağı ile ilgili 84 genin anlatımına olan etkisi araştırıldı. Sonuçta vulpinik asitin her iki hücre hattı üzerinde zamana ve doza bağlı toksik etki gösterdiği bulundu. Hücrelerin 48 saat 200 µM vulpinik asitle muamelesinin AO/EB ikili boyamasıyla belirlenen apoptotik hücre oranını anlamlı düzeyde artırdığı gözlemlendi. Ayrıca vulpinik asitin HepG2’lerde *TP53*, *TNFRSF21*, *TRAF4*, *RIPK2*, *BIRC2*, *TNFRSF10B* genleri anlatımını kontrol grubuna göre 2 ile 4 kat artırdığı *BAK1* geni anlatımını ise yarıdan daha az seviyeye düşürdüğü bulundu. Bu bulgular vulpinik asitin *TP53* geni anlatımını artırarak hücrelerde apoptoza neden olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hepatosellüler karsinom, benzofuran, vulpinik asit, sitotoksisite testleri, apoptotoz, gerçek zamanlı PCR

ABSTRACT

Master of Science Thesis

THE *IN VITRO* INVESTIGATION OF CYTOTOXIC AND APOPTOTIC EFFECTS OF NOVEL SYNTHESIZED ARYL (3-METHYL-BENZOFURAN-2-YL) KETONE DERIVATIVES AND VULPINIC ACID ON NORMAL AND CANCER CELLS

Oğuzhan KARAOSMANOĞLU

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program

Supervisor: Prof. Dr. Hülya SİVAS
2013, 74 pages

Benzofurans are of considerable interest by their widespread occurrence among natural products. Vulpinic acid is the one of the important seconder metabolites in lichens which are known to have many biological properties. In this thesis, the cytotoxic, apoptotic and antimicrobial effects of three newly synthesized aryl (3-methyl- benzofuran-2-yl) ketone derivatives on HepG2, F2408 cells and some microorganisms have been investigated. As a result there was no inhibition of cellular and microorganismal growth. After then the effects of vulpinic acid's cytotoxic, apoptotic and the expression levels of apoptosis related 84 genes on same cell lines were investigated. As a result it has been shown that vulpinic acid has toxic effect on both cells with time and dose dependent manner. The treatment of 200 μ M vulpinic acid significantly increased apoptotic cell ratio on both cell types within 48 hours. Also the treatment of vulpinic acid up regulated of *TP53*, *TNFRSF21*, *TRAF4*, *RIPK2*, *BIRC2*, *TNFRSF10* genes expression and down regulated of *BAK1* gene expression of HepG2 cells. These results imply that vulpinic acid inhibits cell growth by up regulating of *TP53* gene expression.

Key Words: Hepatocellular carcicoma, benzofuran, vulpinic acid, cytotoxicity tests, apoptosis, real time PCR

ÖNSÖZ

Deneysel çalışmalarını Anadolu Üniversitesinde gerçekleştirdiğim bu araştırmanın önsözünü ABD'nin Massashussets eyaletine bağlı Northampton kasabasında yazmayı yurt dışında master yapmayı çok istediğim için en büyük ödülüm olarak addediyor, bu duyguyu bana yaşatan Öğretim Üyesi Yetiştirme Programının bir üyesi olduğum için önemli bir sorumluluk hissiyle mutluluğu bir arada yaşıyorum. Bu mutluluğumu öncelikli olarak büyük Türkiye vatandaşlarıyla paylaşmak isterim ki vergilerini aksatmadan ödeyip, ülkemize katkı sağladılar ve çalışmanın yürütülmesinde maddi destek oluşturdular.

Ayrıca bu araştırmanın projelendirilmesinden, tez olarak yazılmasına kadar tüm aşamalarında yol gösteren, bilimsel metodolojinin ne olduğunu ve akademik hayatta usta ile çırak ilişkisinin nasıl olabileceğini öğrenmekte olduğum ve daha pek çok konuda bilgisine başvurduğum hocam Prof. Dr. Hülya SİVAS'a teşekkürlerimi sunarım. Deneysel çalışmalarda yardımlarını gördüğüm tüm laboratuvar arkadaşlarıma da çok teşekkür ederim.

Aileme ve nişanlıma özellikle teşekkür ederim ki bana her zaman inandılar ve başarabileceğim konusunda benim bile şüpheye düştüğüm anlarda bana olan güvenlerini her zaman yanı başımda hissederek yeniden bir kere daha deneme gücünü kendimde hissettim.

Oğuzhan KARAOSMANOĞLU

Ağustos-2013

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	x
KISALTMALAR DİZİNİ	xi

1 GİRİŞ	1
1.1 Karaciğer Kanseri ve Etiyolojisi.....	1
1.2 Hepatosellüler Karsinom Oluşumuna Neden Olan Faktörler	2
1.3 Hepatosellüler Karsinom’da Genetik ve Epigenetik Değişiklikler.....	6
1.4 Apoptoz.....	14
1.5 Hücre Hatları.....	15
1.6 Benzofuran Türevleri ve Vulpinik Asit	16
1.7 Tezin Amacı.....	17
2 MATERYAL ve METOT	19
2.1 Materyal	19
2.1.1 Hücre kültürü için kullanılan materyaller.....	19
2.1.2 Mikroorganizma kültürü için kullanılan materyaller	22
2.1.3 Kullanılan Cihazlar.....	22
2.1.4 Kullanılan Ticari Kitler	23
2.1.5 Çalışma Çözeltileri	23

2.1.6 Test Maddelerinin Hazırlanışı	25
2.1.7 Hücre Kültürü.....	27
2.2 Metot.....	27
2.2.1 Hücre Canlılığı ve Sitotoksikite Testleri.....	27
2.2.2 Broth Mikrodilüsyon ile Antimikrobiyal Etki Belirlenmesi	30
2.2.3 Apoptoz İnceleme Yöntemleri	32
2.2.4 Deneysel Tasarımlar.....	38
2.2.5 İstatistik Analizi.....	40
3 BULGULAR	42
3.1 Tripan Mavisi Boyama ile Elde Edilen Hücrelerin Büyüme Eğrisi ve Vulpinik Asitin Sitotoksik Etkisi	42
3.2 Benzofuran Türevleri, Vulpinik Asit, Sisplatin ve Siklopaminin MTT Dönüşümüne Olan Etkileri	43
3.3 Benzofuran Türevleri, Vulpinik Asit, Sisplatin ve Siklopaminin Nötral Kırmızısı Alımına Olan Etkileri	47
3.4 Broth Mikrodilüsyon Tekniği ile Antimikrobiyal Etki Bulguları.....	50
3.5 Akridin Oranj / Etidyum Bromit İkili Boyama Bulguları.....	51
3.6 Apoptotik Yolakla İlgili Genlerde Anlatımın Gerçek Zamanlı RT-PCR ile Analizi	54
4 TARTIŞMA ve SONUÇ	58
4.1 Benzofuran Türevlerinin Normal ve Kanserli Hücreler Üzerinde Sitotoksik ve Bazı Mikroorganizmalar Üzerinde Antimikrobiyal Etkisi	58
4.2 Vulpinik Asitin Normal ve Kanserli Hücreler Üzerinde Sitotoksik Etkisi	58
4.3 Sisplatinin ve Siklopaminin Normal ve Kanserli Hücreler Üzerine Sitotoksik Etkisi	59

4.4 Vulpinik Asitin HepG2’lerde Apoptotik Hücre Sayısına ve Apoptoz Yolağı Gen Anlatımına Etkisi.....	60
---	----

KAYNAKLAR	63
------------------------	-----------

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1	Hepatosellüler karsinom gelişiminin şematik sunumu.....	7
2.1	Aril (3-metil-benzofuran-2-il) keton türevlerinin ana formülü ve molekül ağırlıkları	26
2.2	Vulpinik asitin yapı formülü ve molekül ağırlığı	26
2.3	Gerçek zamanlı RT-PCR termal profili.....	36
3.1	F2408 ve HepG2 hücreleri için büyüme eğrisi.....	42
3.2	Vulpinik asitin F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelelerinden sonra tripan mavisi ile belirlenen hücre canlılığı oranı.....	43
3.3	H1 maddesinin F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelelerinden sonra MTT ile belirlenen hücre canlılığı oranı.....	43
3.4	H2 maddesinin F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelelerinden sonra MTT ile belirlenen hücre canlılığı oranı.....	44
3.5	H3 maddesinin F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelelerinden sonra MTT ile belirlenen hücre canlılığı oranı.....	44
3.6	Vulpinik asitin F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelelerinden sonra MTT ile belirlenen hücre canlılığı oranı.....	45
3.7	Sisplatin'in F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelelerinden sonra MTT ile belirlenen hücre canlılığı oranı	46

3.8	Siklopamin'nin H1 maddesinin F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelelerinden sonra MTT ile belirlenen hücre canlılığı oranı.....	46
3.9	H1 maddesinin F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelerinden sonra NR ile belirlenen hücre canlılığı oranı...	47
3.10	H2 maddesinin F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelerinden sonra NR ile belirlenen hücre canlılığı oranı...	47
3.11	H3 maddesinin F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelerinden sonra NR ile belirlenen hücre canlılığı oranı...	48
3.12	Vulpinik asitin F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelerinden sonra NR ile belirlenen hücre canlılığı oranı...	48
3.13	Sisplatin'in F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelelerinden sonra NR ile belirlenen hücre canlılığı oranı	49
3.14	Siklopamin'nin F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelerinden sonra NR ile belirlenen hücre canlılığı oranı...	50
3.15	H1 maddesinin antimikrobiyal etkisinin gözlemlendiği plaka Plakalardaki satır ve sütun düzeni için sayfa 32,33 ve 34'e bakınız	50
3.16	H2 maddesinin antimikrobiyal etkisinin gözlemlendiği plaka. Plakalardaki satır ve sütun düzeni için sayfa 32,33 ve 34'e bakınız	51
3.17	H3 maddesinin antimikrobiyal etkisinin gözlemlendiği plaka. Plakalardaki satır ve sütun düzeni için sayfa 32,33 ve 34'e bakınız	51
3.18	Vulpinik asitle muamele edilen F2408 hücrelerinde AO/EB yöntemiyle incelenen apoptotik morfoloji. Kontrol grubu hücrelerinin ters-faz (A) ve floresan mikroskopi (B) görüntüsü. 200 µM vulpinik asite 48 saat boyunca maruz kalan HepG2 hücrelerinin ters-faz (C) ve floresan mikroskopi (D) görüntüsü	52

3.19	Vulpinik asitle muamele edilen HepG2 hücrelerinde AO/EB yöntemiyle incelenen apoptotik morfoloji. Kontrol grubu hücrelerinin ters-faz (A) ve floresan mikroskopi (B) görüntüsü. 200 µM vulpinik asite 48 saat boyunca maruz kalan HepG2 hücrelerinin ters-faz (C) ve floresan mikroskopi (D) görüntüsü53
3.20	Vulpinik asitle muamele edilen F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerinde AO/EB ikili boyama fotoğraflarının analizi sonucu oluşturulan apoptotik indeks.....54
3.21	Formaldehit agaroz jelde oluşturulan 28S ve 18S rRNA bantları. 1, 3, 5 ve 7 numaralı kuyularda kontrol grubu, 2, 4, 6 ve 8 numaralı kuyularda test grubu hücrelerinden izole edilen RNA'lar bulunmaktadır.....55
3.22	Vulpinik asitle muamele edilmiş HepG2 hücrelerinde apoptotik yolak genleri ifadesinin ısı haritası.....56
3.23	Vulpinik asitle muamele edildiğinde upregule ve down regule olan genlerin plot/plot grafiğiyle sunumu (eşik değeri >2.5).....57
3.24	Kontrol ve test grubu HepG2 hücrelerinde anlatımı değişen apoptotik yolak genleri57

TABLÖLER DİZİNİ

2.1	Antimikrobiyal etkinin araştırıldığı 96 kuyulu plakalarda çalışma düzeni.....	31
3.1	MTT testi verileriyle gerçekleştirilen regresyon, korelasyon analizi sonuçları ve vulpinik asitin IC50 değerleri (C= % Canlılık, D= Derişim).....	45
3.2	NR alımı verileriyle gerçekleştirilen regresyon, korelasyon analizi sonuçları ve vulpinik asitin IC50 değerleri (C= % Canlılık, D= Derişim).....	49
3.3	İzole edilen RNA'ların kalite kontrol sonuçları	54

KISALTMALAR DİZİNİ

ADH	Alkol dehidrogenaz
APAF-1	Apoptotik proteaz faaliyete geçiren faktör
APC	Adenomatous polyposis coli
cccDNA	Kovalent olarak kapalı halkasal DNA
GAP	GTPaz faaliyete geçiren protein
GSK3 β	Glikojen sentaz kinaz 3 beta
HBcAg	Hepatit B çekirdek antijeni
HBeAg	Hepatit B e-antijeni
HBsAg	Hepatit B yüzey antijeni
HBV	Hepatit B virüsü
HNF1 α	Hepatosit nükleer faktör α 1
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
HSK	Hepatosellüler karsinom
HYH	Hepatik yıldız hücre
IGF-II	İnsülin-benzeri büyüme faktörü
IL-6	İnterlökin-6
JAK	Janus kinaz
MAPK	Mitojenlerle etkinleşen protein kinaz
NK	Doğal öldürücü hücreler
Rb1	Retinoblastoma 1
RC-DNA	Relaksed halkasal DNA
pgRNA	pregenomik RNA
PI3K	Fosfatidilinositol-3-kinaz
PLC γ	Fosfolipaz C
RTK	Reseptör tirozin kinaz
SAM	S-adenosil metiyonin
STAT	Sinyal iletici ve transkripsiyon etkinleştirici
SOCS1	Sitokin sinyal baskılayan proteinler
TGF- β	Transforme edici büyüme faktörü
TNF- α	Tümör nekroz faktör- α
TP53	Tümör protein

1 GİRİŞ

Hücrede programlanmış hücre ölümü, apoptoz, tümör gelişimini engelleyen önemli bir mekanizma olup hücre zarında kabarcıklanmalar, hücre büzülmesi, nüklear fragmentasyon, kromatin yoğunlaşması ve kromozomal DNA parçalanması ile karakterize edilir (Tang ve ark., 2012). Kanser terapisi sırasında kanser hücrelerinin apoptozla ölümü genellikle inflamasyon ve immün cevap oluşturmadığından, kanser hücrelerinin apoptoza yönelmelerini sağlayan antikanser özellikli bileşikler günümüz önemli araştırma konularından biridir (Lin ve ark., 2010).

Benzofuran halkası biyolojik olarak aktif olan pek çok doğal ve terapötik bileşiğin ortak yapısal kısmını oluşturmaktadır (De Luca ve ark., 2009). Kimyasal sentezle elde edilen benzofuran halkası içeren üç farklı bileşiğin memeli hücre hatları üzerinde antikanser etkisini ve bazı mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkisini araştırmak bu tezin araştırma konularından birini oluşturmaktadır.

Liken ekstraktlarının eski Mısır'da M.Ö. 18. yy.'da yaralara uygulandığı (Ahmadjian ve Hale, 1973) bilinmektedir. Günümüzde ise bazı hücre hatları üzerinde sitotoksik etkisinin bulunduğu belirtilmiştir (Burlando ve ark., 2009). Likenlerde bulunan ve liken özütlerinden elde edilen doğal bir bileşik olan vulpinik asitin memeli hücre hatları üzerinde antikanser etkisini araştırmak bu çalışmanın bir başka araştırma konusudur.

1.1 Karaciğer Kanseri ve Etiyolojisi

Karaciğerde en sık oluşan malign tümör hepatosellüler karsinomdur (HSK). HSK, kimyasallara karşı kısmen duyarlı olduğu için kemoterapiye olumlu yanıt verme imkanı sınırlıdır. Bu yüzden ilerlemiş bir HSK'ya karşı etkili olduğu gösterilmiş bir kemoterapi ajanı bulunmamaktadır. Ancak bir multikinaz inhibitörü olan Sorafenib'in HSK tedavisi için etkili olduğu gösterilmiştir (Schott ve ark., 2012). Ne var ki, tedavinin ilerleyen zamanlarda Sorafenib'e karşı dirençli tümör gelişiminin saptanması üzerine Sorafenib'i diğer tedavi yaklaşımlarıyla beraber

daha düşük dozda kullanmak gerektiği bildirilmiştir. Sorafenib'e karşı direnç mekanizmalarının nasıl geliştiği günümüzün önemli araştırma konularındandır (Gauthier ve Ho, 2013).

HSK öldürücülüğü bakımından kanserler sıralamasında dünyada üçüncüdür (Ferlay ve ark., 2010). Dünyada karaciğer kanserinin meydana gelmesi bakımından yüksek riskli bölgelerde (Doğu Asya ve Afrika ülkeleri) 20-50 yaş aralığı risk grubunu oluşturmaktayken, Amerika ve çoğu Avrupa ülkelerinde bu risk grubu 75 yaşından sonra oluşmaktadır. Fakat batı toplumlarında HSK sıklığı artan bir eğilim göstermektedir. HSK, erkeklerde kadınlardan daha sık görülmektedir (Parkin ve ark., 2001).

1.2 Hepatosellüler Karsinom Oluşumuna Neden Olan Faktörler

Aflatoksin B₁, aşırı alkol tüketimi ve hepatit virüsleriyle enfeksiyon HSK gelişimine neden olan ana risk faktörleridir (Herceg ve Paliwal, 2011). Bu risk faktörleri hepatositlerde oksidatif stres ve inflamasyon cevabı oluşturarak karaciğerde siroz gelişimine neden olur. Sirozlu dokuda bulunan hücreler oksidatif strese ve karaciğerin kötü şartlara uyum kazandıran genetik ve epigenetik değişiklikler geçirerek hepatosellüler karsinoma dönüşür (Frau ve ark., 2010). Aşağıda iyi tanımlanmış bir risk faktörü olan hemokromatozis hastalığının ve ana risk faktörlerinin HSK gelişimine olan katkıları özetlenmeye çalışılmıştır.

HSK'nın sıklıkla meydana geldiği Güneydoğu Asya'da ve Doğu Afrika'da genellikle *Aspergillus flavus* ile kontamine besinler tüketilmektedir. *Aspergillus flavus*'un ürettiği bir toksin olan aflatoksin B₁ önemli bir tümör baskılayıcı protein olan p53'ün 249. kodonunda AGG→AGT mutasyonu ile proteinde arjinin-serin (R249S) değişimine neden olur. Dünyada her yıl ortaya çıkan 300.000 yeni HSK vakası R249S mutasyonu taşımaktadır ve hepsi tanı aldıktan sonra birkaç hafta/ay içinde ölümle sonuçlanmaktadır (Gouas ve ark., 2009).

HSK gelişiminde aşırı alkol tüketiminin rolü aşağıdaki maddelerle özetlenebilir (Purohit ve ark., 2012).

1. Alkol dehidrogenaz (ADH) ve sitokrom P4502E1 (CYP2E1) enzimleri ile etanol metabolizasyonu sonucu meydana gelen asetaldehitler DNA'ya hasar verir.
2. Sitokrom P4502E1 faaliyetiyle oluşan reaktif oksijen türleri lipid peroksidasyonuna yol açarak malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) oluşumuna neden olur. (4-HNE) p53 proteini 249. kodonunda mutasyona neden olur.
3. Sürekli alkol alımı kupfer hücrelerinde ve hepatositlerde demir birikmesine yol açarak oksidatif strese neden olur. Oksidatif stres inflamasyona neden olduğu gibi hepatositlerde lipid peroksidasyonuna ve p53 mutasyonuna yol açar.
4. Aşırı alkol alımı hepatosit mitokondrilerine glutatyon alımını azaltarak glutatyon eksikliğine yol açar. Glutatyon'un ROS süpürücü etkisinden mahrum kalan hepatositlerde oksidatif stres oluşur.
5. S-adenozilmetiyonin (SAM) gen metilasyonu için biyolojik olarak metil kaynağıdır. Sürekli alkol alımı hepatik SAM düzeyinde azalmaya neden olarak C-MYC seviyesini artırır. Sürekli etanole maruz kalan ratlarda *c-myc* onkogeninde hipometilasyona neden olduğu gösterilmiştir.
6. Retinoik asit, A vitamininin (retinol) enzimatik olarak oksitlenmesi sonucu oluşur ve hücre çoğalması, büyümesi, gelişmesi ve apoptoz ile ilgili genlerin transkripsiyonunu düzenlemekle sorumludur. Alkol ile beslenen ratlarda hepatik retinoik asitin azaldığı buna bağlı olarak aktivatör proteinin (AP-1) up-regule edildiği böylece hepatosit çoğalmasının gerçekleştiği gösterilmiştir.

Hepatit B virüsü (HBV) ile enfeksiyon, HSK gelişiminde önemli rol oynar. HBV yaklaşık 3.3 kb'lık DNA'dan ibaret bir genom taşır. 240 tane hepatit B virüs çekirdek antijenin (HBcAg) birleşmesiyle oluşan ikozahedral kapsit, genomu çevreler. Ayrıca bu ikozahedral yapıyı çevreyeleyen konak endoplazmik retikulumundan kökenlenen bir zar yapısı bu virüslerde yapısal eleman olarak iş görür (Brechot ve ark., 2010).

HBV enfeksiyonunun tamamlanması üç aşamadan oluşur. Enfeksiyon öncesi ikozahedral yapının içinde bulunan kısmi çift zincirli yapıya sahip ve kovalent olmayan etkileşimler sonucu dairesel yapıya sahip olan genom “relaksed-halkasal DNA veya RC-DNA” bulunur. Enfeksiyonun ardından RC-DNA, konakçı hücrede plazmit benzeri kovalent olarak kapalı halkasal DNA’ya “covalently closed circular DNA veya cccDNA” dönüştürülür. cccDNA’dan genomik ve genomik olmayan RNA’lar, hücresel RNA polimeraz II faaliyeti sonucu üretilir. Bu RNA’lardan pregenomik RNA (pgRNA) projen kapsitlerce paketlenir. Kapsitlere eş zamanlı olarak paketlenen P proteini pgRNA’dan ters transkripsiyon ile RC-DNA üretir. Olgun RC-DNA taşıyan nükleokapsit yapı, hücre içi cccDNA sayısını çoğaltmak için kullanılabileceği gibi zarla kaplanarak projen virion olarakta salınabilir (Beck ve Nassal, 2007).

Genomik olmayan RNA’lar hepatit B yüzey antijeni (HBsAg), hepatit B çekirdek antijeni (HBcAg), hepatit B e-antijeni (HBeAg) ve hepatit B X proteini translasyonları için kalıp görevi görür. Viral proteinler yeteri kadar sentezlendikten sonra tamamlanmış virüs partikülleri golgiden salınır. Genellikle HBV hücreleri lize etmez. Enfeksiyon sırasında meydana gelen hücre ölümleri FAS/FAS ligand yolunu faaliyete geçiren sitotoksik lenfosit hücreleri (CD8+, T hücreleri) tarafından gerçekleştirilir. Kronik enfeksiyon sırasında NK hücreleri de harekete geçer. İmmün sistem, viral yüzeye ve çekirdek antijenlerine karşı IgG ürettikçe akut enfeksiyon gelişir ve sonlanır. İmmünitinin gelişimi HBeAg salgılanması ile sağlanır. İmmün sistemi tam gelişmemiş bireylerde etkin bir IgG cevabı oluşturulmaz. Bu bireylerde bazen semptomlar bile gelişmeden siroz hatta HSK gelişir.

Hepatositlerin, hepatit B virüsü (HBV) ile enfeksiyonu hepatosit ölümünü artırarak, inflamasyona neden olur. Buna ilave olarak genomik kararsızlığa ve HBx proteini üretimine neden olarak HSK oluşumuna neden olur. Viral replikasyon için genomik DNA’ya viral genom girişi şart olmasa bile (Brecht ve ark., 2010), HBV ile enfekte olmuş HSK olgularında hastalar genomlarına entegre olmuş HBV DNA’sından kopyalar taşımaktadırlar. Bu kopyalar genellikle tamamlanmamış olup genomda kararsız bölge oluşumuna neden olmakta, yeni kromozom yapılanmasına yol açmaktadır. Ayrıca HBV genomu herhangi bir proto-onkogene

dahil olduğunda aşırı anlatımına yol açmakta, tümör baskılayıcı gene dahil olduğunda ise ürünlerine zarar vermektedir (Schulz, 2005). Hücre çoğalması, canlılığı ve farklılaşması üzerinde etkili olan genlerin civarına viral genom girişi, HBV hepatokarsinogenezinde sıklıkla gözlenen bir mekanizmadır. Özellikle, insan telomerez revers transkriptazını ve inositol 1,4,5 trifosfat reseptörünü kodlayan genlere (*hTERT*, *IPR*) HBV girişi bağımsız tümörlerde gösterilmiştir. Bu durum hepatositlerin yaşam ömrünü artırmalarına ve malignant transformasyona neden olur (Ferber ve ark., 2003; Horikawa ve Barrett, 2003; Kew, 2011). HSK olgularının % 20-40'nın HBV'den kaynaklanan mutasyonlarla oluştuğu düşünülmektedir (Laurent-Puig ve Zucman-Rossi, 2006). Ayrıca, HBV genomu ürünü olan HBx proteini HBV enfeksiyonu sonrası hücrelerde aşırı üretilir. HBx proteini hücre döngüsünün ilerlemesini başlatır, tümör baskılayıcı genlere bağlanarak onların anlatımlarını baskılar. Metil transferazların transkripsiyonlarını düzenleyerek tümör baskılayıcı genlerin bölgesel olarak hipermetilasyonuna neden olur. Yada genomda global olarak hipometilasyon sonucu kromozomal kararsızlığa yol açar (Kew, 2011).

HBV enfeksiyonlarına karşı virüs replikasyonuna ket vuran hücre içi mekanizmaları çalıştıran interferon α ve β kullanıldığında etkili sonuçlar elde edilebilir. Fakat en etkin korunma yöntemi mayanın ürettiği HBsAg proteinini aşı olarak kullanmaktır. Bu aşı hem akut hemde kronik enfeksiyonlar için etkilidir. HBV'nin tek taşıyıcısının insanlar olması hastalığın yok edilmesi için bir avantaj olarak kullanılabilir (Schulz, 2005).

Hemokromatozis çok nadir bir genetik bir kusur olmasına rağmen inflamasyon gelişimine neden olan patofizyolojisi iyi bilindiği için hemokromatozisten daha yaygın olarak inflamasyon cevabı oluşturan fakat daha az anlaşılmış risk faktörlerinin HSK oluşumuna katkısını anlamak için iyi bir örnektir (Schulz, 2005). Hemokromatozis *HFE* geninde yanlış anlamlı mutasyon sonucu ortaya çıkar. Bu gen ürünü bir zar proteini olup demir alımı ve taşımını düzenlemekle sorumludur. HFE proteininin yetersiz fonksiyonu karaciğerde demir birikmesine neden olur. Normalde karaciğerdeki demir ferritin gibi proteinlere bağlı olarak depolanır. Ferritine bağlanmadan dokuda biriken serbest demir iyonları

(Fe⁺²) düşük moleküllü ligandlarla (H₂O₂ gibi) kolayca okside edilerek daha reaktif olan demir iyonlarına (Fe⁺³) dönüşür ve reaktif hidroksil radikali üretilir (Fenton reaksiyonu). Bilindiği gibi reaktif hidroksil radikalleri makromoleküllere zarar vererek nekrotik hücre ölümüne, kronik inflamasyona ve DNA'da çift zincir kırıkları oluşturarak mutasyona neden olur (Jomova ve Valko, 2011).

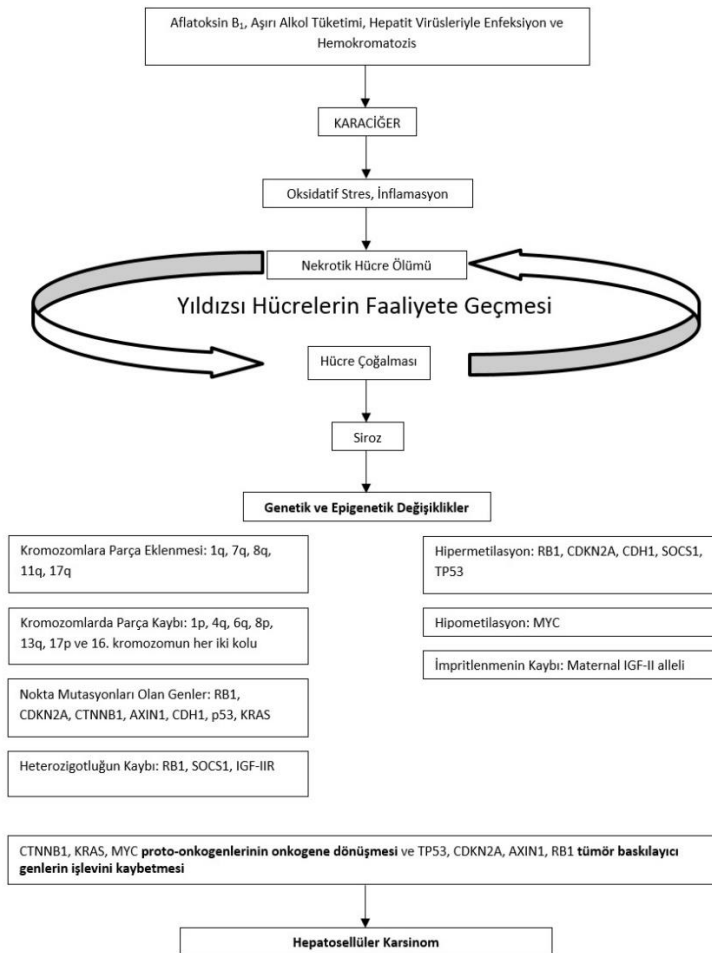
Hepatosellüler Karsinom gelişiminin gösterildiği Şekil 1.1'de de belirtildiği gibi risk faktörleri karaciğerde oksidatif strese ve nekrotik hücre ölümüne neden olur. Karaciğerde hücre ölümünün artması kupfer hücrelerinin faaliyete geçmesine yol açarak sitokin salgılamalarına yol açar. İnterlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktör-alfa gibi (TNF- α) gibi sitokinler ise hepatositleri ve hepatik yıldız hücreleri (HYH) hücre çoğalmasına yönlendirerek siroz gelişimine yol açar (Elsharkawy ve Mann, 2007). Normalde endotel hücre tabakasının altında Disse boşluğuna yerleşmiş olan HYH'ler az sayıda mitokondri taşıyan, yağ depo eden hücrelerdir. HYH ve onlardan türevlenen miyofibroblastlar, ekstrasellüler matriks proteinlerini sentezlemek ve salgılamakla görevlidir (Hautekeete ve Geerts, 1997). HYH'lerin sürekli çoğalması sonucu iyi organize olmuş parankimal doku çevresinde organize olmamış, fonksiyon üstlenmemiş ve kollajen bakımından zengin ekstrasellüler matrikse sahip, fibrotik ve sirozlu doku gelişir (Friedman, 2010). HSK'lı hastaların % 80-90'ının sirozdan da muzdarip olması, sirozun HSK gelişimde en önemli faktör olduğu gerçeğini ortaya koymaktadır. Bu büyük nodül bulunduran sirozlu doku; geniş yenilenme kapasitesine sahip, DNA sentezinin artırıldığı, mutajenlerden birinin hücre döngüsü kontrolünü etkileyerek diğer bir mutajen etkisine olan duyarlılığın arttığı hücre tiplerinden oluşur (Leong ve Leong, 2005).

1.3 Hepatosellüler Karsinom'da Genetik ve Epigenetik Değişiklikler

Hepatosellüler karsinom oluşumu için çok sayıda genetik ve epigenetik değişiklikler bir arada bulunmalıdır. Hepatik kanser hücrelerinin sirozlu karaciğer hücrelerine göre viral enfeksiyonlara daha dirençli olmalarına, sitotoksik T hücreleri aracılığıyla gerçekleştirilen apoptoza daha dirençli olmalarına ve invazyon ve metastaz yapma kabiliyetleri kazanmalarına neden olan genetik ve epigenetik değişikliklerden bazıları Şekil 1.1'de özetlenmeye çalışılmıştır. İlerde

daha geniş ele alınacağı gibi bu genetik değişikliklerden bazıları; kromozomlara parça eklenmesi ve parça kaybı, bazı genlerin nokta mutasyonuna uğraması ve bazılarında da heterozigotluğun kaybıdır. Epigenetik değişikliklerden bazıları ise hipermetilasyon, hipometilasyon ve maternal allelde imprintlenmenin kaybıdır.

RB1 (retinablastoma 1), TP53 (tmör protein 53) ve hepatosit nükleer faktör $\alpha 1$ (*HNF1 α*) etkileşim ağında meydana gelen işlev kaybı; WNT ve Hedgehog yolağının yeniden faaliyete geçmesi; STAT (sinyal iletici ve transkripsiyon etkinleştirici), MAPK (mitojenlerle etkinleşen protein kinaz) yolaklarında ve büyüme faktörleriyle reseptörlerinde meydana gelen onkojenik dönüşümler genetik ve epigenetik değişikliklerin etkilediği etkileşim ağları ve yolaklardan bazılarıdır (Shiraha ve ark., 2013).



Şekil 1.1 Hepatosellüler karsinom gelişiminin şematik sunumu

RB1, hücre döngüsünün G₁'den S evresine geçişi için gerekli proteinlerin transkripsiyon faktörü olan E2F'ye bağlanır böylece hücre döngüsünün S-fazıyla ilgili olan genlerin anlatımını engeller. 13. kromozomun uzun kolunda meydana gelen parça kaybı *RB1* geninin yitirilmesine neden olur. İlginç olanı ise *RB1* geninin nadiren nokta mutasyonu içermesidir. Bu durum araştırmacıları bu genin epigenetik olarak susturulduğu düşüncesine yöneltmektedir (Lin ve ark., 1996). Pek çok HSK'da hücre döngüsünün RB1 aracılığıyla düzenlenmesine aşağıdaki genetik ve epigenetik değişikliklerle zarar verilir (Schulz, 2005).

1. *RB1* geninde heterozigotluğun kaybı veya hipermetilasyon
2. *CDKN2A* geninde hipermetilasyon, mutasyon
3. *CCND1* geninin 11q13'te amplifikasyonu sonucu Cyclin D1'in hücrede aşırı üretilmesidir.

Bir tümör baskılayıcı protein olan TP53 DNA tamirini başlatmak, apoptozu uyarmak ve anti-anjiyogenez faktörlerinin üretimini başlatmak bakımından önemlidir (Bertheau ve ark., 2008). *TP53* bakımından genetik olarak hasarlı doğan bireyler Li-Fraumeni sendromu veya çeşitli kanser tipleri ile karşı karşıya kalırlar. 20 kb'luk *TP53* geni 17p13.1'de bulunmaktadır. 2.2 kb'luk mRNA'sı 11 ekson içerir. Yüzlerce gende transkripsiyonu başlatmakla görevlidir. Bu genlerin pek çoğunda promotör daha azında ise enhansır bölgeye bağlanarak iş görür (Basset-Seguın ve ark., 1994). *TP53* faaliyetiyle hücre döngüsünün tutuklanması, p21^{CIP1} aracılığıyla veya DNA tamirine dahil olan GADD45 faaliyetiyle sağlanır (Taylor ve Stark, 2001). Bir apoptoz inhibitörü olan BCL2 faaliyetleri, *TP53* aracılığıyla anlatımı artırılan ve mitokondriyal apoptoz yolağında iş gören proteinler (APAF1, NOXA, PUMA) tarafından engellenir (Kang ve Reynolds, 2009). İlginç olanı ise HSK'da kemoterapi için kullanılan iki ajanın HepG2'lerde p53 ailesi proteinler aracılığıyla hem proapoptotik hemde antiapoptotik genlerin anlatımını artırdığının gösterilmesidir (Seitz ve ark., 2010). p53 aracılığıyla malignant kanser hücrelerinin apoptoza gitmesi terapi açısından istenilen bir durumken yine p53 aracılığıyla hücre döngüsünün tutuklanmasının ilaç direncine yol açtığı için terapi açısından olumsuzluklar taşıdığı düşünülmektedir (Hopker ve Reinhardt, 2013).

MDM2/HDM2 proteinleri TP53'ün N-uç domenine bağlanarak transkripsiyonel işlevini sonlandırır ve onun çekirdekten taşınarak proteozomal yıkımına neden olur (Hollstein ve Hainaut, 2010). Yersiz veya aşırı hücre çoğalması TP53'ü faaliyete geçiren bir olaydır. Örneğin onkogenik RAS'lar tarafından başlatılan bir hücre çoğalmasında E2F faaliyetinde artma söz konusudur. E2F'ler çoğalma için gerekli olan genlerin yanında *CDKN2A* geninde de transkripsiyonu başlatır. Hücre yersiz ve aşırı olarak çoğalmaya başladığında bu gende alternatif okuma çerçevesi geliştirilerek MDM2/HDM2 proteininin inhibitörü olan p14^{arf} sentezi gerçekleşir. MDM2/HDM2 daha önce belirtildiği gibi TP53 inhibitörü olduğundan hücrelerin yersiz bir şekilde aşırı çoğalması, p14^{arf} sentezini artırdığından dolayı olarak TP53'ün hücrede kalma süresini artıran bir durum meydana gelir (Hollstein ve Hainaut, 2010).

TP53'ün anlatımını etkilediği bir diğer grup gen ise hücrelerin komşuluğunda bulunan endotelial hücrelerle iletişimi için gerekli olan faktörleri üretmektir. Örneğin, TP53 hücrelerde trombospodin-1 (TSP1) üretimini başlatarak komşuluğunda bulunan endotelial hücrelerde büyümenin durmasıyla sonuçlanacak olan angiogenezi durdurur (Ren ve ark., 2006).

HSK'da TP53 nokta mutasyonları Avrupadan Amerikaya, Japonya ve Tayvan da dahil olmak üzere DNA bağlanma yüzeyinde yaygınlaşmıştır. TP53'te 249. kodon mutasyonel bir sıcak noktadır. AGG olan bu kodonun AGT'ye dönüşmesi ile TP53'te Arjinin olması gereken aminoasit Serine dönüşür. Bu mutasyon deneysel olarak aflatoxin B₁ etkisiyle de gösterilmiştir. Dünyada bu mutasyonun yaygın olduğu yerlerde *Aspergillus flavus* ile kontamine edilen yiyecek tüketiminde yaygındır. Pirimidin dimerlerinin UVB etkisiyle ortaya çıkan hasar tanısında kullanılması gibi 249. kodonda meydana gelen G→T mutasyonu özel bir karsinojenin (aflatoxin B₁) etkisini ortaya koymaktadır (Gouas ve ark., 2009). Yeni geliştirilen bilgisayar temelli çalışmalar, R249S mutasyonu taşıyan TP53 geninin bu mutasyona ilave olarak H168R mutasyonu da kazandığında, proteinde DNA ile etkileşen domenin yabani tip TP53'e benzer şekilde esneklik kazandığını göstermektedir (Rauf ve ark., 2010).

Karaciğere özgü pek çok genin anlatımı hepatosit nükleer faktörleri (HNF) tarafından düzenlenir. Karaciğer adenoma olgularının % 60'ında, hepatosit *HNF* genleri için bir transkripsiyon faktörü olarak iş gören TCF1'i kodlayan genin biallelik mutasyonlara uğradığı gösterilmiştir (Bluteau ve ark., 2002). Bu durum β -fibrinojen, albümin ve α 1-antitripsin proteinlerini kodlayan genlerde anlatımın değişmesine neden olduğundan hepatosit gelişimini engeller (Laurent-Puig ve Zucman-Rossi, 2006). miR-124, IL6R, STAT3, miR-24 ve miR-629 'dan oluşan mikroRNA-inflamatör geri besleme döngüsü aracılığıyla HNF4 α 'nın geçici olarak baskılanması sonucu onkojenik dönüşüm başlatılır. Dahası, bu döngü bir kez faaliyete geçtikten sonra HNF4'ü baskılamaya devam eder ve onkogenezi devam ettirir. Hatta bu döngünün düzenleyicisi olan miR-26a anlatım düzeyinde adeno-benzeri virüsleri kullanarak gerçekleştirilen iyileştirmenin, karaciğere özgü MYC transgenik faresinde, karaciğer tümörögenезini herhangi bir sitotoksik etki göstermeden baskıladığı belirtilmiştir (Hatziaepostolou ve ark., 2011).

HSK'da WNT/ β -Catenin yolağının sürekli sinyal üretmesi söz konusudur. *CTNNB1* geninde meydana gelen nokta mutasyonları HSK'da sıkça rastlanılan (% 13-43) genetik değişikliklerdendir (Laurent-Puig ve Zucman-Rossi, 2006). β -Cateninin mutasyona uğrayan kısmı GSK-3 β (glikojen sentaz kinaz) ile tanınmasından sorumludur. Mutant β -Catenin, GSK-3 β ile tanınmadığından fosforillenemez, fosforillenemeyince de β -TrCP ubiquitin ligaz kompleksi tarafından tanınmaz. Bu sayede miktarı artan β -Catenin, TCF/LEF ailesi transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girerek bu transkripsiyon faktörlerinin *C-MYC* ve *CCND1* genlerinde anlatım başlatmasına neden olur (Akiyama, 2000). *C-MYC* bir transkripsiyon faktörü olup sarmal-dönüş-sarmal (helix-loop-helix) motifine sahip DNA bağlanma birimi içerir. *C-MYC* transkripsiyon faktörleri insan genomunda bulunan genlerden % 15'inin anlatımını düzenlemekle sorumludur. Bu genler arasında apoptoz, hücre döngüsünün düzenlenmesi, metabolizma, ribozom biyogenezi, protein sentezi ve mitokondriyal fonksiyonlarla ilgili genler bulunmaktadır (Wilkins ve Sansom, 2008).

Ayrıca APC/GSK-3 β / β -Catenin kompleksi oluşumuna yardımcı olan proteini üreten *AXIN1* geninde meydana gelen mutasyonlar (bu durum, HSK

olgularının % 5'inde gerçekleşir) veya daha yaygın olarak gerçekleşen *AXIN1* geninin yer aldığı 16p13'de heterozigotluğun kaybına neden olan parça kaybı hücrede β -Catenin miktarında artmaya neden olduğu için önemlidir. Pek çok HSK'da 16. kromozomun uzun kolunun kaybı sonrası *CDH1* geni kaybedilir veya E-Cadherinin daha az faaliyet göstermesiyle sonuçlanacak olan *CDH1* geni promotöründe hipermetilasyon ve gende mutasyon gözlemlenir. Bu proteinin hücre zarından kaybı hücrelerin komşu epiteliyal hücrelere daha az yapışmasına neden olduğundan invazyon ve metastazı artırır. Dahası hücre zarının sitoplazmik bölgesinde E-Cadherin, hücre iskeleti yapı bileşenleri olan α -Catenin ve β -Catenin proteinlerine demirlemekle görevlidir. HSK'de E-Cadherin kaybı hücre içi β -Catenin düzeyinin artmasına katkı sağlar (Schulz, 2005).

Gelişim dönemi ile ilgili yolaklardan biri olan Hedgehog'un da HSK gelişimde rol oynadığı ve yeniden faaliyete geçerek bir transkripsiyon faktörü olan Gli proteinlerinin hücre büyümesi ve apoptozdan kaçışı ile ilgili genlerde anlatımı tetiklemesine neden olduğu bildirilmiştir (Shiraha ve ark., 2013).

STAT yolağının sürekli sinyal iletmesi HSK'nın % 50'sinde ortaktır. STAT yolağı IL6 sitokininin reseptörlerde algılanmasıyla faaliyete geçer ve bir kere tetiklendikten sonra sitokin yokluğunda bile saatlerce faaliyet kaybetmez. JAK'lar (Janus kinazlar) tarafından hücre zarında fosforillenen STAT proteinleri çekirdeğe gider ve kanserli hücrenin immun sistemden ve apoptozdan kaçışına olanak sağlayan genlerin anlatımında değişikliklere neden olur. SOCS1 (sitokin sinyal baskılayan protein 1), JAK2'nin bir feed-back inhibitörüdür. SOCS1'in olmadığı durumlarda STAT yolağı uzun süre sinyal iletir, apoptoza karşı daha kuvvetli direnç oluşumuna yol açar. Bu durumun nedeni ise *SOCS1* gen promotöründe hipermetilasyon ve 16p13'te heterozigotluğun kaybıdır (Subramaniam ve ark., 2013).

İnsan kanserleri için kritik olan bir diğer olay da hücrede reseptör tirozin kinazların (RTK) faaliyetidir. RTK'lar büyüme faktörlerine karşı hücrel cevap oluşumunda rol alan büyüme faktörü reseptörleridir. EGFR, ERK1/2, HER gibi RTK'lar yapı ve işlev olarak benzeyen özellikler gösterir. Bir büyüme faktörünün RTK'ların hücre dışı domenine bağlanması sonucu RTK'larda reseptör dimerleri

yada heterodimerleri meydana gelir. Ardından dimerlerde bulunan hücre içi tirozin kinaz domenleri faaliyete geçerek birbirlerine veya kendilerine fosfat grupları ekler. Tümör hücrelerinde aşırı RTK üretimi dimer oluşumunu kolaylaştırdığı için büyüme faktörü yokluğunda bile dimer oluşturarak sürekli faaliyet gösteren RTK oluşumuna neden olur. RTK'ların, faaliyetlerini düzenleyen bölgelerinde meydana gelen nokta mutasyonları da tümörlü hücrelerde sürekli RTK faaliyeti gelişimine yol açar (Ledda ve Paratcha, 2007). RTK'ların tirozin bakiyelerinden fosforillenmesi özellikle fosfolipaz C γ (PLC γ), fosfatidilinositol-3-kinazın düzenleyici alt birimi (PI3K), GTPaz faaliyete geçirici protein (GAP) ve GRB2 gibi adaptör proteinleriyle sinyalin hücre içi çoğaltılmasına yol açar. PLC γ , zarda bulunan fosfatidilinositol bifosfatın enzimatik olarak kesimini katalizleyerek diaçilgliserol ve inositoltrifosfat üretir (Alberts ve ark., 2008). Bir adaptör protein olarak reseptörlerde fosforillenmiş tirozin bakiyesine bağlanan GRB2 ise, C-ucuyla hücre zarına bağlanmış ve translasyon sonrası düzenlemeler geçirmiş olan RAS proteinlerine (HRAS, KRAS, NRAS) GTP yüklemesi gerçekleştirmesi için SOS proteinine bağlanır. SOS'un faaliyeti sonucu GTP ile yüklenen RAS hücre içinde mitojenlerle faaliyete geçen protein kinaz (MAPK) yolağını tetikler (Reinmuth ve ark., 2006). İlginç olanı ise RAS faaliyetini düzenlemekle sorumlu olan GAP'ların aynı reseptör tirozin kinaz yolağıyla faaliyete geçerek RAS'larda bulunan GTP'yi GDP'ye dönüştürmesidir (Pamonsinlapatham ve ark., 2009). Bu durum RAS'ların faaliyete geçmesinin hemen ardından faaliyetlerinin sonlandırılmasına olanak tanır. Fakat 12, 13 veya 61 aminoasitlerinde nokta mutasyonu taşıyan bir RAS proteini, GAP erişimine engel olduğundan onkogenik karakter kazanır (Edkins ve ark., 2006).

İnsan karaciğer kanserlerinin yaklaşık % 7'si *KRAS* onkogenini sürekli faaliyete geçiren mutasyonlar taşır. Bu oran karaciğer kanseri için *HRAS* ve *NRAS* mutasyonlarından yüksek bir orandır (Karnoub ve Weinberg, 2008). Vinil kloridden kaynaklanan 18 HSK olgusunun % 33'ünde *KRAS*'ın mutasyon taşıması araştırmacıları vinil kloride maruz kalmanın *KRAS* mutasyonuna neden olduğu için HSK gelişimine yol açtığı düşüncesine yöneltmektedir (Laurent-Puig ve Zucman-Rossi, 2006). RAS'ların faaliyete geçmesi ile sitoplazmada bulunan ve bir serin/triyonin kinaz olan RAF proteini düzenleyici domeninin RAF faaliyetini

durdurucu etkisinden kurtulur. Ayrıca diacylglycerollerin bağlanarak faaliyete geçirdiği protein kinaz C'ler (PKC) de RAF faaliyetini düzenlemekle sorumlu olan protein bölgesinin fosforillenerek düzenlemenin ortadan kalkmasına, RAF'ın faaliyete geçmesine neden olur. Bu yüzden düzenleyici bölgesinde mutasyon taşıyan bir RAF proteini MAPK yolağında sürekli faaliyete neden olarak onkojenik transformasyona yol açar. RAF proteinleri MEK (MAPKK) proteinlerini, MEK'ler ise ERK (MAPK) faaliyete geçirir (Liebmann, 2001). *In vitro* çalışmalara göre MAPK yolağının büyüme faktörleri tarafından uyarılmasının ardından G₀ hücrelerinde ilk önce, erken cevap genleri (*FOS*, *JUN*, *MYC*) anlatımında değişiklikler meydana getirir (Lotfi ve ark., 2000). ERK'ler ise çekirdek, hücre zarı, mitokondri, endozom, hücre iskeleti ve golgi cisimciğinde değişiklikler meydana getirerek kanser, diyabet ve gelişimsel hastalıkların oluşumunda önemli rol oynar (Wortzel ve Seger, 2011). ERK'ler tarafından fosforillenen RSK faktörlerinin epitelial hücrelerinde invazif gen programı oluşturmaktan sorumlu olduğu gösterilmiştir (Doehn ve ark., 2009).

Büyüme faktörleri ve reseptörleri arasında HSK için özellikle önemli olanları karaciğerin normal büyümesi ve yenilenmesini yönlendirenlerdir. Bunlar; MET reseptörü üzerinde etkili olan hepatosit büyüme faktörü (HGF), EGFR (ERBB1) reseptörü üzerinde etkili olan transforme edici büyüme faktörü β (TGF- β) ve insülin-benzeri büyüme faktörü 2 (IGF-II) ve onun reseptörüdür (IGF-IIR) (Nalesnik ve Michalopoulos, 2012).

HGF, tümör stromasında bulunan fibroblastlarca üretilir. Fakat bir tirozin kinaz olan MET reseptörü epitelial kökenli kanser hücrelerinde bulunarak hücre çoğalmasında iş görür (Huang ve ark., 2012). EGFR ve MET proteinlerini kodlayan genler 7. kromozomda yerleşmiştir. Bu kromozom diğer karsinomlarda olduğu gibi HSK'da da parça eklenmesine maruz kalmıştır. Hepatoma hücrelerinde MET reseptörünün aşırı üretimiyle HGF etkisi artırılır (Tavian ve ark., 2000).

TGF- β 'nın hepatositlerde hücre çoğalmasını düzenleyerek tümör baskılama işlevine karşın kanser invazyonunu artırıcı etkisi bulunmaktadır. Fakat bu iki zıt işlevin mekanizması henüz bilinmemektedir. Bu durumu açıklamaya yönelik pek çok görüş bildirilse de genel düşünce kanser hücrelerinin TGF- β 'nın tümör

baskılayıcı etkisinden kaçınıp tümör oluşumunu başlatıcı etkisine karşı hassasiyetlerini koruyabildikleri yönündedir (Giannelli ve ark., 2011).

İnsülin-benzeri büyüme faktörleri (IGF) ve onların reseptörleri hücre büyümesi, farklılaşması, apoptoz gibi önemli fizyolojik işlemlerde görev alırlar (Xue ve ark., 2012). Hepatositlerin çoğalmasında ve faaliyet göstermesinde insülin ve insülin-benzeri büyüme faktörleri gereklidir (Nalesnik ve Michalopoulos, 2012). IGF-I ve IGF-II karaciğer kanserinin de dahil olduğu pek çok kanser türleri için kuvvetli mitojenlerdir. HSK'da IGF-II çeşitli mekanizmalarla aşırı üretilebilir. Bazı durumlarda imprintlenmenin (epigenetik olarak maternal *IGF-II* allelinin imprintlenmesi gereklidir) kaybı IGF-II'nin aşırı üretimine sebep olabilir. Daha karmaşık mekanizmalarda *IGF-II* geninde anlatımı düzenlemekle sorumlu olan dört promotörün kullanımı (up regülasyonu veya down regülasyonu) devreye girmektedir. IGF'lerin, reseptör tirozin kinaz olan IGF-IR reseptörlerine bağlanması hücre canlılığının devamını sağlamak için MAPK ve PI3K yolağını faaliyete geçirir. *In vitro* çalışmalar *IGF-IR*'nin anlatımının baskılanması sonucu hücre transformasyonunun ortadan kalktığını göstermektedir. IGF-IIR bir reseptör tirozin kinaz olmadığı için IGF-II'nin IGF-IIR'ye bağlanması hücre için bir yaşam sinyali veya çoğalma sinyali değildir. Bunun yerine IGF-II'nin lizozomal degradasyona neden olur. IGF-IIR reseptörü IGF-II'nin büyümeyi başlatıcı etkisini sınırlayan bir etki başlatır. Dolayısıyla IGF-IIR tümör gelişimin baskılayan molekül olarak çalışır (Yu ve Rohan, 2000). IGF-IR ve IGF-IIR reseptörlerinin hücrede anlatım düzeyi IGF-II'ye verilen hücrel cevapta etkilidir. *IGF-IIR* geni HSK'da yaygın olarak heterozigotluk kaybının gözlemlendiği 6q27 bölgesinde yerleşmiştir (Kishnani ve ark., 2009). 10 farklı HSK hücre hattında aşırı miktarda IGF-IR mRNA'sı belirlendiğinden IGF-IR'nin HSK için önemi, net bir şekilde ortaya konulmuştur (Wu ve Zhu, 2011).

1.4 Apoptoz

Programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptoz, çok hücreli organizmalarda hücre yapım/yıkımını (turnover) dengeleyen mekanizmadır. Apoptoz ayrıca beyin gelişiminden immün cevaba kadar organizmanın hücre seçiminde rol oynayan temel mekanizmasıdır. Apoptoz, tıpkı hücre çoğalmasını

sağlamakla görevli olan mitoz gibi önemli düzenlemelere sahiptir. Bazı proteinler apoptozun uyarılması aşamasında iş görmekteyken diğerleri engellenmesi için faaliyet göstermektedir. Hücrelerde apoptoz iki ana mekanizma ile uyarılır. Bunlardan biri dışsal yolak olarak bilinir ve kaspaz-8 ve ölüm reseptörleri bu yolda iş görür. Diğer ise içsel yolak yada mitokondriyal yolak olarak bilinir ve kaspaz-9 ve mitokondri iş görür. Her iki yolak da, zimojen prokaspaz olan kaspaz-3'ün faaliyete geçmesini sağlar. Kaspaz-3 faaliyeti ise hücrelerde; DNA fragmentasyonuna, hücre iskeleti ve çekirdeği proteinlerinin degradasyonuna, apoptotik cisimlerin (bodies) oluşumuna, fagositik hücre reseptörlerinin algılayabileceği ligand üretimine ve son olarak fagositik hücrelerce fagositoza neden olur (Martinez ve ark., 2010).

Antikanser ilaçları ve iyonize edici radyasyon tümör hücrelerini apoptoza sevk etmek için içsel yolağı kullanır. Bu yolak mitokondriyal dış zarın geçirgenliğinin artması sonucu sitoplazmaya sitokrom c gibi pro-apoptotik faktör salınımını içerir. Sitokrom c sitoplazmada APAF-1 (apoptotik proteaz faaliyete geçiren faktör-1), ATP, prokaspaz-9 ile birlikte apoptozu oluşturarak kaspaz-9'u faaliyete geçirir. Kaspaz-9 ise kaspaz-3,-6,-7 silsilesini tetikleyerek DNA'ya hasar verir bu sayede onun çoğalma kapasitesini ortadan kaldırır (Yang ve ark., 2012).

1.5 Hücre Hatları

HepG2 hücreleri pek çok biyokimyasal özellikleri bakımından iyi karakterize edilmişlerdir. Çoğu plazma proteinlerini üretebilen, normal hepatositlere benzeyen biyokimyasal karaktere sahip, hücre yüzeyi reseptörlerini muhafaza eden, IL-6 gibi sitokinlere cevap oluşturabilen, VLDL ve HDL gibi lipoproteinleri sentezleyebilen ve salgılayabilen ve serumsuz kültür ortamında karaciğere özgü serum proteinlerini salgılayabilen hücrelerdir. Ayrıca sitokrom P450'ye bağımlı monooksijenaz enzimini ürettiği de gösterildiğinden HepG2'lerin detoksifikasyon işlemi için gerekli olan biyotransformasyonları katalizleyebilme özellikleri de vardır. HepG2'lerin sitokrom P450 faaliyeti sonucu dioksin ve dibenzofurana verildikleri metabolik cevapla primer insan karaciğer hücrelerinin

cevabı aynıdır. Bu yüzden HepG2'ler toksikoloji testleri için önemli bir model teşkil etmektedir (Dehn ve ark., 2004).

Sıçan embriyonal fibroblast hücre hattı olan F2408'ler çok sayıda sitotoksisite çalışmalarında kontrol hücre hattı olarak kullanılmıştır (Incesu ve ark., 2004; Unlu ve ark., 2010).

1.6 Benzofuran Türevleri ve Vulpinik Asit

Furan halkasının monobenzen türevleri 2,3-benzofuran ve 3,4-benzofurandır. Benzofuran türevleri doğal bileşiklerde sıklıkla bulunduğu için önemli düzeyde ilgi toplamış bileşiklerdendir (Cho ve ark., 2008). Aril benzofuran içeren kimyasallar günümüzde ilaç öncül maddeleri olarak sentezlenmekte olup birçoğunun tıbbi açıdan çeşitli biyolojik işlevlere sahip olduğu gösterilmiştir. Örneğin; 2-fenilbenzo[b]furanların protein fosfataz 1B inhibitörü (Malamas ve ark., 2000), 1-[(benzofuran-2-il)(fenilmetil) piridin türevlerinin ise aromataz inhibitörü (Saber ve ark., 2006), yine benzofuranların farneziltransferaz inhibitörü (Asoh ve ark., 2009) ve önemli bir grubunun ise antibakteriyal (Jiang ve ark., 2011) etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca aril (3-metil-benzofuran-2-il) keton (Benkli ve ark., 2003) ve aril [3-(imidazol-1-il/triazol-1-il metil) benzofuran-2-il] ketoksim türevleriyle yapılan çalışmalarda (Gundogdu-Karaburun ve ark., 2006) antifungal etkiler tespit edilmiştir.

Benzofuranların antikanser özellikleri hakkında günümüzde çok az çalışma bulunmaktadır. Benzo[b]furan halkası içeren bazı bileşiklerin antitümör etkiye sahip olduğu ileri sürülmüştür (Erber ve ark., 1991; Lee ve ark., 1998). (Z)-2-((4-benzil-piperazin-1-il)metilen)benzofuran-3(2H) ve (Z)-2-((4-(bis(4-florometil)metil)piperazin-1-il)metilen)benzofuran-3(2H) maddelerinin Hep-2 hücrelerinde 4-13 µM IC50 değeriyle önemli sitotoksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Huang ve ark., 2007). Diğer bir benzofuran içeren bileşiğin (1-[benzofuran-2-il-(4-alkil/aril-fenil)-metil]-1H-triazol)'ün MCF-7 meme kanseri hücrelerinde CYP26A1 enzim faaliyetini baskıladığı rapor edilmiştir (Pautus ve ark., 2006).

Likenler, fungus ve algler arasında kurulan simbiyotik yaşam birliğidir. Likenler taşlar üzerinde, kaya parçalarında, ağaç gövdelerinde gelişebilir. Liken bileşikleri primer metabolitler ve sekonder metabolitler olarak ikiye ayrılır. Primer metabolitleri proteinler, yağlar, karbonhidratlar, vitaminler ve karotenoidlerdir (Muller, 2001). Liken sekonder metabolitlerinin miktarı tallusun kuru ağırlığının % 0,1-10'u arasında değişmektedir (Galun, 1988). Likenlerin biyolojik olarak önemli olduğu düşünülen sekonder metabolitleri ürettiği uzun zamandır bilinmesine rağmen bu metabolitlerin tamamının biyolojik işlevleri henüz karakterize edilmemiştir. Kültüre alınmalarının çok zor olması, doğadan toplanmalarının ticari boyutlardaki ihtiyacı karşılayamayacak kadar az olması bu durumun nedenlerindendir (Burlando ve ark., 2009).

Liken sekonder metabolitleri, hiflerin dışına sert kristaller olarak salınan liken asitleridir. Bu sekonder metabolitlerden usnik asitin antitümör; atranorin, giroforik asit, lekanorik asit, fisodik asit, protosetrarik asit, stiktik asit ve usnik asitin antimikrobiyal, salazinik asit, stiktik asit ve usnik asitin antioksidant etkisinin olduğu belirtilmiştir (Molnar ve Farkas, 2010). Literatürde vulpinik asitin antimikrobiyal etkisinin incelendiği sonuçta farklı mikroorganizmalar için 3,8-31,5 µg/ml arasında değişen MİK değerlerinin tespit edildiği çalışmada bulunmaktadır (Nadir ve ark., 1992). Ayrıca vulpinik asitin bitki patojeni olan fungus büyümesini total liken ekstraktlarından daha fazla etkilediği gösterilmiştir (Kowalski ve ark., 2011). MM98 malignant mezotelyoma, A431 karsinom ve HaCaT hücreleriyle gerçekleştirilen çalışmada nötral red alım testi sonucu sırasıyla 503, 76 ve 160 µM derişimlerdeki vulpinik asitin 24 saatlik muamelesinin IC₅₀ değeri olduğu belirtilmiştir (Burlando ve ark., 2009).

1.7 Tezin Amacı

Bu çalışmanın amacı, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde ilaç öncül maddesi olarak yeni sentezlenen üç farklı aril (3-metil-benzofuran-2-il) keton türevinin (Şekil 2.1) ve Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde kromatografik yöntemlerle saflaştırılan vulpinik asitin (Şekil 2.2) insan karaciğer kanser (hepatokarsinoma) hücreleri olan HepG2'ler ile rat embriyonal fibroblast hücre hattı olan F2408 üzerine olası sitotoksik ve apoptotik etkisini *in vitro*

koşullarda araştırmaktır. Ayrıca benzofuran türevlerinin *Bacillus subtilis* (NRS 744), *Pseudomonas aeruginosa* (LMG 6395), *Staphylococcus aureus* (NRRL B-767), *Salmonella typhimurium* (NRRL B-4420), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Saccharomyces cerevisiae* (NRRL Y-12632), *Candida utilis* (NRRL Y-900) mikroorganizmaları üzerine büyümeyi inhibe edici etkisini araştırmaktır.

2 MATERYAL ve METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Hücre kültürü için kullanılan materyaller

2.1.1.1 Hücre kültürü materyalleri

FBS fetal sığır serumu (Sigma)

DMEM, L-glutamin ve yüksek glukoz içeren (Sigma)

Sodyum bikarbonat (Applichem)

Penisilin-Streptomisin (100x) (PAA)

Hidroklorik asit (Sigma)

2.1.1.2 Hücre hatları

Çalışmada insan hepatosellüler karsinom hücreleri olan HepG2'ler [HepG2] (ATCC® 77400™) ve “Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank” JRCB'den temin edilen normal rat embriyonal fibroblastlar (F2408) kullanıldı.

2.1.1.3 PBS ve PBS/EDTA için kullanılan kimyasallar

PBS tablet (Amresco)

KCl (Sigma)

NaCl (Sigma)

KH₂PO₄ (Sigma)

Na₂HPO₄ (Sigma)

EDTA (Sigma)

2.1.1.4 Hücre kryoprezervasyonu için kullanılan materyaller

Kryotüp (Greinger)

Hücre dondurma kabı (Mr. Frosty)

İzopropil alkol (Sigma)

2.1.1.5 Hücre büyötmek, saymak için kullanılan materyaller

Hücre kültürü flaskaları 25 ve 75 cm²'lik (Cell star)

Plakalar 6, 12, 24 ve 96 kuyulu (Cell star)

Petri kapları 8,5 cm²'lik (Orange scientific)

Hücre sayım cihazında kullanılan tek kullanımlık sayım lamalar (Cedex)

Thoma lamı (Marienfeld)

2.1.1.6 Sıvı aktarmak, saklamak için kullanılan materyaller

Otomatik pipet uçları 10, 100 ve 1000 µl'lik

Cam pipetler 1, 5 ve 10 ml'lik

Duran şişeler 50, 100 ve 500 ml'lik

Santrifüj tüpleri 15 ve 50 ml'lik

Mikrofüj tüpleri 1,5 ve 2 ml'lik

Plastik pastör pipetleri

Cam pipet kutuları

Pastör pipeti kutuları

2.1.1.7 Sterilizasyon için kullanılan materyaller

Filtreler, 0,22 µm por çaplı (Whatman)

Zefiran (Zefirolum)

Parafilm (Parafilm M)

Eldiven (Aloe mate)

Şeffaf bant (Scotch)

2.1.1.8 Sitotoksisite belirlemek için kullanılan kimyasallar

Nötral red (Sigma)

MTT (Sigma)

Tripan mavisi (Thermo)

Glasiyal asetik asit (Sigma)

Etanol (Sigma)

Dimetilsülfoksit (Appllichem)

2.1.1.9 Pozitif kontrol olarak kullanılan kimyasallar

Siklopamin (Santa cruz)

Sisplatin (cis-diammineplatinum(II) dichloride) (Sigma)

2.1.1.10 Test maddesi olarak kullanılan kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan benzofuran türevleri Prof. Dr. Kadriye Benkli'den (Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi) vulpinik asit ise Doç Dr. Turgay Tay'dan (Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü) cömert bir armağan olarak temin edilmiştir.

2.1.1.11 Akridin oranj / etidyum bromid ikili boyama için kullanılan kimyasallar

Akridine orange (Sigma)

Etidyum bromit (Sigma)

2.1.1.12 Gen anlatımının analizi için kullanılan materyaller

B-Merkaptoetanol (Sigma)

DEPC (Sigma)

NaOH (Sigma)

EDTA (Appllichem)

Sodyum asetat (Sigma)

MOPS (Appllichem)

Agaroz (Sigma)

Gliserol (Sigma)

Bromfenol Blue (Sigma)

Ksilen cyanol (Sigma)

Etidyum Bromid (Sigma)

Formamit (Merck)

Formaldehit (Merck)

Elektroforez sistemi

2.1.2 Mikroorganizma kültürü için kullanılan materyaller

2.2.1.1 Mikrobiyal Suşlar

Bu çalışmada kullanılan mikrobiyal suşlar *Bacillus subtilis* (NRS 744), *Pseudomonas aeruginosa* (LMG 6395), *Staphylococcus aureus* (NRRL B-767), *Salmonella typhimurium* (NRRL B-4420), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Saccharomyces cerevisiae* (NRRL Y-12632), *Candida utilis* (NRRL Y-900)'dır. Bu suşlar, Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ'tan (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi) cömert bir armağan olarak temin edilmiştir.

2.2.1.2 Kullanılan besiyerleri

Mueller-Hinton Broth (Fluka)

Sabouraud Dextroz Agar (Difco)

2.2.1.3 Broth Mikrodilüsyon için kullanılan kimyasallar

2,3,5-Triphenyltetrazolium klorit (TTC) tuzu (Sigma)

Kloramfenikol (Santa cruz)

2.1.3 Kullanılan Cihazlar

Santrifüj (Heraeus)

Hücre sayıcı (Cedex XS)

Elisa Reader (Biotech ELx 808 Ultramicroplate reader)

Otoklav (Sanyo MLS 3780)

Ters-faz mikroskop (Olympus IX70)

Floresan ataçmana sahip ışık mikroskobu (Olympus IX70)

Etüv (Nüve EN 500)

+4 °C buzdolabı (Liebherr LKUexv1610 index21/001)

-20 °C buzdolabı (Sanyo MPR 414F)

pH metre (Inolab wtw)

Steril kabin (Thermo KS12)

CO₂ İnkübatörü (Heracell 150)

Sterilizatör (Nüve FN 120)

Sıvı azot tankı (Thermo 8038)
Tartı (OHAUS AP250D)
Ultrasoniksonikatör (SONOREX DK 1028P)
Distile su cihazı (NÜVE)
Real-Time QPCR Sistem (Stratagene, Mx3005P)

2.1.4 Kullanılan Ticari Kitler

RNeasy Mini Kit (Qiagen)
RNase-Free DNase Set (Qiagen)
QIAshredder (Qiagen)
RT² First Strand Kit (SABiosciences)
RT² SYBR Green qPCR Master Mix (SABiosciences)
RT² Profiler Human Apoptosis PCR Array (PAHS-012) (SABiosciences)

2.1.5 Çalışma Çözeltileri

1. NaHCO₃ (% 9.2'lik): 9,2 g NaHCO₃, 100 ml su ile çözüldükten sonra filtre ile steril edildi. 4 °C'de saklandı.
2. Hücre medyumı: 6,68 gr DMEM 425 ml steril saf su ile çözüldükten sonra filtre ile steril edildi. Ardından % 9,2 lik NaHCO₃'ten 20 ml, FBS'den 50 ml, 10000 ünite/ml Penisilin/Streptomisin'den 5 ml ilave edildi. 4 °C'de saklandı.
3. PBS: 0,2 g KCl, 8 g NaCl, 0,2 g KH₂PO₄, 1,14 g NaHPO₄ bir miktar steril distile su ile çözüldü. pH 7.4'e ayarlandı. Son hacim steril distile su ile 1000 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavlandı. Oda sıcaklığında saklandı.
4. PBS/EDTA: 0,2 g KCl, 8 g NaCl, 0,2 g KH₂PO₄, 1,14 g NaHPO₄, 0,378 g EDTA bir miktar steril distile su ile çözüldü. pH 7.4'e ayarlandı. Son hacim steril distile su ile 1000 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavlandı. Oda sıcaklığında saklandı.
5. D-PBS: 0,2 g KCl, 8 g NaCl, 0,2 g KH₂PO₄, 2,2 g NaHPO₄ bir miktar steril distile su ile çözüldü. pH 7.4'e ayarlandı. Son hacim steril distile su ile 1000 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavlandı. Oda sıcaklığında saklandı.
6. Trypsin/EDTA (5x): % 0,5'lik ana tripsin çözeltisi (10x), PBS/EDTA ile eşit hacimde karıştırıldı. 4 °C'de saklandı.

7. HCl (1N): 8,4 ml % 37'lik HCl, steril distile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve filtre ile steril edildikten sonra 4 °C'de saklandı.
8. MTT Çalışma Çözeltisi (5 g/l): 0,25 g MTT, 50 ml PBS ile çözüldükten sonra filtre ile steril edildi. Ardından mikrofüj tüplerine bölündü. Çalışma zamanına kadar ışık almayacak şekilde -20 °C'de saklandı.
9. Nötral Kırmızısı Çalışma Çözeltisi (3,3 g/l): 0,33 gr Nötral kırmızısı 100 ml steril distile su ile çözüldükten sonra filtre ile steril edildi. Ardından mikrofüj tüplerine bölündü. Çalışma zamanına kadar ışık almayacak şekilde 4 °C'de en fazla 3 ay saklandı.
10. Desorb çözeltisi: Glasiyal asetik asit: Etanol: Distile su (1:50:49) hacim oranlarında karıştırıldı. Taze olarak hazırlanarak kullanıldı.
11. Mueller-Hinton Broth: Ticari besiyeri 38 g/l olacak şekilde saf suda çözüldükten sonra 121 °C'de otoklav edilerek bakteri kültürlerinde antimikrobiyal etki belirleme için kullanıldı.
12. Sabouraud Dekstroz Agar: Ticari besiyeri 65 g/l olacak şekilde saf suda çözüldükten sonra 121 °C'de otoklav edilerek maya kültürlerinde antimikrobiyal aktivite belirleme çalışmaları için kullanıldı.
13. BaSO₄ 0,5 Mc Farland çözeltisi: 0,048 M BaCl₂'den 0,5 ml ve 0,18 M H₂SO₄'ten 99,5 ml karıştırıldı ve 625 nm'de 0,08-0,13 absorbans verip vermediği kontrol edildi. Taze hazırlanarak kullanıldı.
14. 2,3,5-Trifeniltetrazolyum klorit (10 g/l): 1 g 2,3,5-Trifeniltetrazolyum klorit tuzu 100 ml suda çözüldü. Taze hazırlanarak kullanıldı.
15. Akridin oranj (100 g/l): 100 mg akridin oranj 1 ml distile su ile çözüldü filtre ile steril edilerek 4 °C'de saklandı.
16. Etidyum bromit (100 g/l): 100 mg etidyum bromit 1 ml distile su ile çözüldü filtre ile steril edilerek 4 °C'de saklandı.
17. NaOH (2 N): 8 gr NaOH 100 ml DEPC ile muamele edilmiş suda çözülerek hazırlandı.
18. EDTA (0,5 M): 7,3 gr EDTA önce 30 ml DEPC ile muamele edilmiş su ile çözüldü. Ardından pH DEPC'li su ile hazırlanan NaOH ile 8,00'e ayarlandı. Son hacim DEPC'li su ile 50 ml'ye tamamlandı.

19. Sodyum asetat (0,05 M): 0,41 g sodyum asetatın 100 ml DEPC ile muamele edilmiş suda çözülmesiyle hazırlandı.

20. Formaldehit jel yürütme tamponu (FJRB 5x): 2 gr MOPS 80 ml sodyum asetatı çözöldü sonra 1 ml EDTA eklendi. NaOH ile pH 7,00'a ayarlandı. Son hacim DEPC ile muamele edilmiş su ile 100 ml'ye tamamlandı. Alimunyum folyo ile kaplı bir şişeye filtrelendi. Oda sıcaklığında ışıktan koruyarak saklandı.

21. Agaroj jel (% 1,4'lük): Agaroj 0,3 gr agaroj 19 ml DEPC'li suya ilave edildi. Mikrodalga fırında ara ara çalkalayarak ısıtılarak çözöldü. El dokunabileceği kadar soğuduktan sonra 6 ml formaldehit jel yürütme tamponu eklendi. Ardından %37'lik formaldehitten 5,5 ml eklendi. Plastik takozlarla kapatılmış elektroforez tablasına dökölerek donması için beklendi.

22. Jel yükleme tamponu: Son hacimde %50 gliserol, 0,5 mM EDTA, % 0.25 bromofenol mavisi, % 0,25 ksilen siyanol olacak şekilde hazırlandı.

23. Etidyum bromid (1 mg/ml): 0,001 gr etidyum bromid 1000 µl DEPC ile muamele edilmiş suda çözöldü.

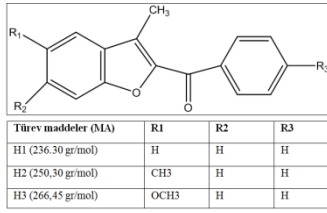
24. RNA örneklerinin hazırlanması:

5x FJRB	2 µl
%37'lik formaldehit	3,5 µl
Eth. Bromid	1 µl
Formamid	10 µl
Jel yükleme tamponu	1,5 µl
RNA (3-5 µg olacak şekilde)	
RNasız su (son hacim 24 µl'ye tamamlanır)	

Örnekler hazırlanırken etidyum bromid ve jel yükleme tamponu hariç diğer bileşenler PCR tüpünde birleştirildi. 60 °C'lik su banyosunda 15 dk. inkübe edildi. 10 saniye santrifüjlendi. Buz üzerinde 1-2 dk bekletildikten sonra etidyum bromid ve jel yükleme tamponu eklendi.

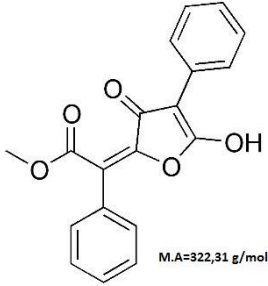
2.1.6 Test Maddelerinin Hazırlanışı

Yapı formülleri ve molekül ağırlıkları Şekil 2.1'de belirtilen benzofuran türevleri (H1, H2, H3) steril distile suda çözöldü, filtreyle süzölerek ana stok çözeltileri hazırlandı. Ana stoklar ışık görmeyecek şekilde 4 °C'de saklandı. Benzofuran derişimleri (0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1000, 10.000 µM) ana stoğun hücre medyumunu içinde uygun oranda seri seyreltilmeleriyle elde edildi.



Şekil 2.1 Aril (3-metil-benzofuran-2-il) keton türevlerinin ana formülü ve molekül ağırlıkları

Yapı formülü Şekil 2.2’de belirtilen vulpinik asit DMSO’da çözüldü, filtreyle süzülerek ana stok çözeltisi hazırlandı. Ana stok ışık görmeyecek şekilde 4 °C’de saklandı. Vulpinik asit derişimleri (50, 100, 150, 200, 300 µM) ana stoğun hücre medyumuna içinde uygun oranda seri seyreltilmeleriyle elde edildi.



Şekil 2.2 Vulpinik asitin yapı formülü ve molekül ağırlığı

HepG2’lere uygulanacak sisplatin derişimi literatür araştırmasından sonra 100 µM olarak belirlendi (Chen ve ark., 2011). F2408’lere uygulanacak sisplatin derişimi ise daha önce literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmadığından deneysel olarak 10 µM belirlendi. Sisplatin stok çözeltisi, 100 mM olacak şekilde DMSO’da çözümlenerek hazırlandı. Işık görmeyecek şekilde 4 °C’de en fazla 1 ay saklandı. Stok çözeltinin steril saf suyla 10 kat seyreltilmesi sonucu oluşturulan ara stok çözelti taze olarak her deney öncesi hazırlandı ve filtre ile steril edildi. Hücrelere muamele edilen 10 ve 100 µM’lık sisplatin ise ara stok çözeltinin 1000 ve 100 kat seyreltilmesiyle elde edildi.

Her iki hücre hattına uygulanacak siklopamin konsantrasyonu 9,7 µM deneysel olarak belirlendi. Bunun için siklopamin stok çözeltisi, 9,7 mM olacak şekilde DMSO’da çözümlenerek hazırlandı. Işık görmeyecek şekilde -20 °C’de saklandı. Stok çözeltinin steril saf suyla 10 kat seyreltilmesi sonucu oluşturulan ara

stok çözelti taze olarak her deney öncesi hazırlandı ve filtre ile steril edildi. Hücrelere muamele edilen 9,7 µM'lık siklopamin ise ara stok çözeltinin 100 kat seyreltilmesiyle elde edildi.

2.1.7 Hücre Kültürü

HepG2 ve F2408 hücreleri % 10 fötal sıgır serumu (FBS), 100 ünite/ml penisilin-streptomisin ve % 1 glutamin içeren Dulbecco's Modified Eagle's medyumunu (DMEM) kullanılarak, % 5 CO₂ ve % 95 hava bulunduran 37°C'deki CO₂ inkübatöründe büyütüldü. Hücreler tripsin-EDTA çözeltisiyle muamele edilerek pasajlandı.

2.2 Metot

2.2.1 Hücre Canlılığı ve Sitotoksosite Testleri

Sitotoksosite testleri herhangi bir kimyasalın hücre morfolojisine, büyümesine, zar bütünlüğüne, metabolizmasına ve bazı organellerinin yapı bakımından bütünlüklerine olan etkisini ortaya koymayı amaçlar. *In vitro* sitotoksosite testlerinin önemli bir avantajı, hayvan kesimine ihtiyaç duymadan ilgilenilen kimyasalın çalışılan hücre hattı üzerindeki etkisini net olarak ortaya koymasıdır. Ayrıca kimyasal derişimi ve muamele süresi bakımından *in vivo* sonuçlardan daha güvenilir sonuçlar üretir. Özellikle hücre büyümesinin hızlı olduğu, sürekli bölünen hücre hatları için hücre büyümesinin engellemesi, bir kimyasalın etkisine karşı hassas bir şekilde ölçülebilen hücre cevabıdır. Dahası metabolizmayı ölçen testlerle pekiştirilen canlılık testleri kimyasalın etki mekanizmasıyla ilgili oldukça ikna edici veriler oluşturmaktadır. Pek çok toksik ajan öncelikli olarak hücre içi değışikliklere yol açarak hücreyi ölüme götürürken hücre zarı geçirgenliğinde herhangi bir değışikliğe yol açmamaktadır. Bu yüzden hücre canlılığının *in vitro* koşullarda belirlenmeye çalışıldığı çalışmalarda birden fazla test kullanılarak sonuçların güvenilirliği artırılmalıdır (Fotakis ve Timbrell, 2006). Sitotoksosite test sonuçlarının birbirleriyle kıyaslanması için test protokolünün oturmuş olması, iyi karakterize edilmiş hücreler kullanılması

gereklidir. Standardize edilmiş bir sitotoksosite test protokolünden elde edilen veriler istatistiki bakımdan oldukça güvenilirdir (Barile, 1994).

2.2.2.1 Tripan Mavisi Boyama ile Büyüme Eğrisi ve Sitotoksosite Belirlenmesi

Ucuz ve kolay bir yöntem olan tripan mavisi testi ile hızlı bir şekilde canlı hücre sayısı belirlenir. Canlı hücreler tripan mavisini hücre dışında tutarak berrak, boyanmamış bir görüntü ortaya koyarken ölü hücreler zar bütünlüklerini kaybettikleri için tripan mavisıyla koyu mavi renkte boyanır (Celis, 2006). Günümüz teknolojisinde Cedex (Roche Innovatis, Almanya) gibi otomatik sistemler aracılığıyla hücre canlılığı hızlı ve güvenilir olarak analiz edilebilmektedir.

Hücrelerin 24,48 ve 72 saatte büyüme eğrisini belirlemek için 8,5 cm²'lik petrilerde HepG2'ler 300.000 hücre/3 ml ve F2408'ler 120.000 hücre/3 ml olacak şekilde ekildi. Her 24 saatte Tripsin/EDTA ile hücreler kaldırılıp 10 µl'si 10 µl tripan mavisıyla boyandı ve hemen özel sayım lamına aktarılarak hücre sayıcı cihazında Cedex (Roche Innovatis, Almanya) sayım gerçekleştirildi. Elde edilen veriler IBM SPSS Statistics 20 programında temel betimsel istatistik bakımından değerlendirildi.

300 µM'lık Vulpinik asitin 24,48 ve 72 saatte her iki hücreye olan sitotoksik etkisini belirlemek için 8,5 cm²'lik petrilerde HepG2'ler 300.000 hücre/3 ml ve F2408'ler 120.000 hücre/3 ml olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra test grubu hücrelerine 300 µM Vulpinik asit içeren hücre medyumuna uygulandı. Kontrol grubu hücrelerine ise %0,1'lik DMSO içeren hücre medyumuna uygulandı. Hücreler her 24 saatte sayıldı. Elde edilen veriler IBM SPSS Statistics 20 programında istatistik analizi ile değerlendirildi.

2.2.2.2 MTT ile Sitotoksosite Belirlenmesi

Tetrazolyum tuzunun metabolik olarak indirgenmesine dayalı bir yöntem olan MTT testi hücre canlılığını değerlendirmek amacıyla yapılır. Mitokondriyal zarın iç yüzeyinde bulunan süksinat dehidrogenaz enzimi aktivitesiyle sarı renkli

(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) tuzu suda çözünmeyen mavi renkli formazan kristallerine dönüşür. Daha sonra formazan kristallerinin DMSO gibi organik çözücülerde çözünmesi sonucu spektrofotometre ile kolorimetrik olarak ölçülür. Bu yüzden MTT testi herhangi bir kimyasalın hücre canlılığına olan etkisinin mitokondriyal etkinlik aracılığıyla ölçüldüğü araştırmalarda sıklıkla kullanılan bir testtir (Mosmann, 1983).

MTT yönteminde, 96-kuyulu plakaların her bir kuyucuğuna HepG2'ler için 10^5 hücre/100µl, F2408'ler için ise 4×10^4 hücre/100µl olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat inkübasyondan sonra hücreler aril benzofuran türevlerinin 0,001-10000 µM arasındaki bir seri derişimlerle 24, 48 ve 72 saat muamele edildi. İnkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 25 µl MTT çalışma çözeltisi eklenerek 37°C'de 2 saat inkübasyona tabi tutuldular. Süre sonunda, plakalardaki sıvılar uzaklaştırıldıktan sonra her bir kuyucuğa 100 µl DMSO eklenip oluşan renk değişimi bir mikropilaka okuyucu cihazında (ELx808) 570 nm dalga boyunda ölçüldü. Bu işlemler, en az her deneyde 8 kuyucuk olmak üzere 3 kez tekrarlandı. Sisplatin, Siklopamin, H1, H2, H3 ve Vulpinik asitin hücrelere muamelesi sonucu elde edilen veriler IBM SPSS Statistics 20 programında istatistik analizi ile değerlendirilerek vulpinik asit için IC50 değeri lineer interpolasyonla hesaplandı (Andreotti ve ark., 1995).

2.2.2.3 Nötral Kırmızısı Alımı ile Sitotoksosite Belirlenmesi

Düşük katyonik bir boya olan nötral kırmızısı (NR) canlı hücrelerin lizozomlarında birikir. Toksik kimyasallar, hücre zarı geçirgenliğini artırdığı için hücrelere NR alımında spektrofotometrik olarak ölçülebilen azalmaya neden olurlar. Buna göre, test edilen kimyasalın derişimine bağlı olarak hücrelerde meydana gelen NR alımındaki azalma, kimyasal sitotoksitesinin bir ölçüsü olarak ifade edilir. Bu yüzden NR alımı hem hücre bütünlüğünü hem de hücre çoğalmasının engellenmesini ölçen duyarlı bir belirteç görevi görür (Borenfreund ve Puerner, 1985). Pek çok toksik ajan öncelikli olarak hücre içi değişikliklere yol açarak hücreyi ölüme götürürken hücre zarı geçirgenliğinde herhangi bir değişikliğe yol açmamaktadır. Bu yüzden hücre canlılığının *in vitro* koşullarda belirlenmeye çalışıldığı çalışmalarda birden fazla test kullanılarak sonuçların güvenilirliği artırılmalıdır (Fotakis ve Timbrell, 2006).

Nötral kırmızısı (NK) alımı yöntemi (NICEATM, 2003) tarafından geliştirilen yönteme göre yapıldı. 96-kuyulu plakalara yukarıdaki belirtildiği gibi ekimleri yapıldıktan sonra 24 saat inkübasyona bırakıldı. Sonra aril (3-metil-benzofuran-2-il) keton türevlerinin belirlenen derişimleriyle hücreler 24, 48 ve 72 saat süreyle muamele edildi. İnkübasyon sonrasında her bir kuyucuğa 250 µl NK  alışma çözeltisi, hücre medyumunu içinde % 1 olacak şekilde hücrelere muamele edildi. 3 saat boyunca 37  C de plakalar inkübe edildikten sonra, kuyucuklar 100 µl D-PBS ile yıkandı, sonra 100 µl Desorb çözeltisinde (% 1 glasiyal asetik asit, % 50 etanol) meydana gelen renk değişimi 540 nm dalga boyunda mikroparka okuyucu cihazında (Ultra microplate reader Biotech ELx808)     ld . Bu işlemler, en az her deneyde 8 kuyucuk olmak üzere 3 kez tekrarlandı. Sisplatin, Siklopamin, H1, H2, H3 ve Vulpinik asitin hücrelere muamelesi sonucu elde edilen veriler IBM SPSS Statistics 20 programında istatistik analizi ile değerlendirilerek vulpinik asit için IC50 değerine lineer interpolasyonla hesaplandı (Andreotti ve ark., 1995).

2.2.2 Broth Mikrodilüsyon ile Antimikrobiyal Etki Belirlenmesi

Günümüzde kullanılan antimikrobiyal ajanların çoğu sentetik olarak elde edilmektedir. Bu ajanlardan bazıları bakteri üremesini engellerken diğerleri onlar üzerinde öldürücü etki göstermektedir. Çeşitli kimyasalların mikrobiyal canlılara karşı *in vitro* etkinliğini belirlemede kullanılan kriterlerden biri minimum inhibisyon konsantrasyonudur (M K veya MIC). M K; antimikrobiyal maddenin patojen gelişimine engel olduğu en düşük derişimidir. Mikroorganizmaların antimikrobiyal maddelere karşı hassasiyetlerinin saptanmasında yaygın olarak disk difüzyon tekniği, agar dilüsyon tekniği ve broth dilüsyon teknikleri kullanılmaktadır. Bu tezde broth mikrodilüsyon tekniği kullanılarak antimikrobiyal etki araştırılmıştır (Institute, 2006).

Benzofuran türevleri 1000 µg/ml olacak şekilde steril distile suda çözülerek stok çözelti hazırlandı. Mc Farland 0,5 yoğunluklu test organizmalarını içeren uygun besi ortamları -bakteriler için Mueller-Hinton Broth (MHB), mayalar için Sabouraud Dextroz Agar (SDA)- kuyulara dağıtıldı. Ardından stok çözelti mikroparkalarda 2 katlı seyreltmeleri oluşturuldu. Böylece giderek azalan seyreltme serileri (500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,25 µg/ml, 15,625 µg/ml,

7,8 µg/ml, 3,9 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml) elde edildi. Daha sonra plakalar 37 °C’de 24 saat inkübe edildi. Süre sonunda plakaların üzerine % 1’lik 2,3,5-Triphenyltetrazolium klorit (TTC) tuzu püskürtülerek 30 dakika bekletildi. Büyümenin engellendiği kuyular bulanıklığa göre ayırt edildi. Plakalarda oluşturulan düzen Tablo 2.1’de belirtildiği gibidir.

Tablo 2.1 Antimikrobiyal etkinin araştırıldığı 96 kuyulu plakalarda çalışma düzeni

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												

Plakalarda satırların düzeni:

- A. *Bacillus subtilis* (NRS 744)
- B. *Pseudomonas aeruginosa* (LMG 6395),
- C. *Staphylococcus aureus* (NRRL B-767),
- D. *Salmonella typhimurium* (NRRL B-4420),
- E. *Escherichia coli* (ATCC 25922),
- F. *Saccharomyces cerevisiae* (NRRL Y-12632),
- G. *Candida utilis* (NRRL Y-900).

Plakalarda sütunların düzeni:

1. H2 plakaları için pozitif kontrol grubu, H1 ve H3 plakası için büyümede inhibisyonun beklenmediği negatif kontrol grubu
2. H2 plakaları için 500 µg/ml, H1 ve H3 plakası için 1 µg/ml’lik H1 ve H3 derişimi içeren grup
3. H2 plakaları için 250 µg/ml, H1 ve H3 plakası için 2 µg/ml’lik H1 ve H3 derişimi içeren grup

4. H2 plakaları için 128 µg/ml, H1 ve H3 plakası için 3,9 µg/ml'lik H1 ve H3 derişimi içeren grup
5. H2 plakaları için 62,5 µg/ml, H1 ve H3 plakası için 7,8 µg/ml'lik H1 ve H3 derişimi içeren grup
6. H2 plakaları için 31,25 µg/ml, H1 ve H3 plakası için 15,625 µg/ml'lik H1 ve H3 derişimi içeren grup
7. H2 plakaları için 15,625 µg/ml, H1 ve H3 plakası için 31,25 µg/ml'lik H1 ve H3 derişimi içeren grup
8. H2 plakaları için 7,8 µg/ml, H1 ve H3 plakası için 62,5 µg/ml'lik H1 ve H3 derişimi içeren grup
9. H2 plakaları için 3,9 µg/ml, H1 ve H3 plakası için 128 µg/ml'lik H1 ve H3 derişimi içeren grup
10. H2 plakaları için 2 µg/ml, H1 ve H3 plakası için 250 µg/ml'lik H1 ve H3 derişimi içeren grup
11. H2 plakaları için 1 µg/ml, H3 plakası için 500 µg/ml'lik H3 derişimi içeren grup
12. H2 plakaları için büyümede inhibisyonun beklenmediği negatif kontrol grubu, H1 ve H3 plakası için pozitif kontrol grubudur.

2.2.3 Apoptoz İnceleme Yöntemleri

Bu tezde bir floresan boyama olan akridin oranj/etidyum bromit ikili boyama yöntemi ve moleküler biyolojide kullanılan bir yöntem olan gerçek-zamanlı RT-PCR ile vulpinik asitin olası apoptotik etkisi araştırılmıştır.

2.2.3.1 Akridin Oranj / Etidyum Bromit İkili Boyama ile Apoptotik Hücre Morfolojisinin Belirlenmesi

Akridin oranj/etidyum bromit (AO/EB) boyama ile apoptoza uğrayan hücreler floresan mikroskopuyla morfolojik olarak incelenir. Bu yöntemde ikili boya ile muamele edilen hücreler arasından canlı olanları homojen yeşil bir görünüme sahiptir. Erken apoptotik hücreler de yeşil renkte gözüktür fakat kromotin yoğunlaşması ve nükleer fragmentasyon sonucu çekirdeklerinde parlak yeşil noktalar bulundurur. Zar bütünlüğünü kaybetmiş nekrotik ve geç apoptotik hücreler

etidyum bromitle kırmızı renkte boyanır. Geç apoptotik hücreler yoğunlaşmış ve fragmentasyona uğramış çekirdek bulundurmaları yönüyle nekrotik hücrelerden ayrılır. Nekrotik hücrelerde kromatin yapı canlı hücrelere benzer ve herhangi bir yoğunlaşma içermez (Kasibhatla ve ark., 2006).

AO/EB yöntemi (Kasibhatla ve ark., 2006)'a göre uygulandı. Hücreler 8,5 cm²'lik petrilere 3 x 10⁵ HepG2 / 3 ml ve 1,2 x 10⁵ F2408 / 3 ml olacak şekilde ekildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından test grubu hücreleri 200 µM vulpinik asitle kontrol grubu hücreleri ise % 0,1 DMSO içeren medyum ile 48 saat daha inkübe edildi. Süre sonrasında hücreler 1 ml medyum içerisinde toplanarak 1250 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant vakumla çekilerek uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 30 µl medyum ile süspanse edildi. Hücreleri boyamak için hazırlanan her biri 100 mg/ml olan akridin oranj ve etidyum bromit çözeltilerinden 10'ar µl'si karıştırıldı. Bu karışım 1:60 oranında medyumla seyreltikten sonra 1 µl'si hücrelere muamele edildi. Lam üzerine 10 µl hücre/boya karışımı damlatılıp lamelle kapatıldıktan sonra karanlık ortamda, WB filtresi kullanılarak floresan ataçmana sahip ışık mikroskobu (Olympus BX50) altında hızlı bir şekilde yaklaşık 300 hücreden görüntü alındıktan sonra yeni preperat hazırlandı. Bu işlemler her iki hücre tipinde test ve kontrol grupları olmak üzere 3'er defa tekrarlandı. Elde edilen görüntüler incelendikten sonra her iki hücre için canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre sayısı belirlendi. Her fotoğraftaki apoptotik ve normal hücre sayısı %'ye çevrilerek kontrol ve test gruplarındaki apoptotik hücrelerin yüzdesi grafik halinde sunuldu. Kontrol grubuna göre test grubu hücrelerinin anlamlı düzeyde apoptotik hücreye sahip olup olmadığı istatistik analizi ile değerlendirildi.

2.2.3.2 Apoptotik Yolakla İlgili Genlerin Anlatımının Gerçek Zamanlı RT-PCR ile Analizi

Gen anlatımını incelemek için gerçek zamanlı RT-PCR uygulandı. Bunun için HepG2 hücreleri 25 cm²'lik petrilere 7,5 x 10⁵ HepG2 / 5 ml olacak şekilde ekildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından test grubu hücreleri 100 µM vulpinik asitle kontrol grubu hücreleri ise % 0,1 DMSO içeren medyum ile 48 saat daha inkübe edildi. Süre sonrasında hücreler 1250 rpm'de 5 dk santrifüj

edildi ve süpernatant vakumla çekilerek uzaklaştırıldıktan sonra RNeasy Mini kiti kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen RNA'ların kalitesini belirlemek amacıyla formaldehit jel elektroforezi uygulandı. Jel görüntüsüyle kaliteli olduğu belirlenen RNA'lardan 500 ng'ı kullanılarak RT² First Strand Kiti ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bu cDNA'lar apoptoz yolağında hangi genlerin anlatımının değiştiğini belirlemek için insan apoptoz RT² profiler PCR arraylerinde (PAHS-012) kullanıldı.

2.2.3.2.1 RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu RNeasy Mini Kit direktiflerine göre şu şekilde gerçekleştirildi. Hücreler tripsinlendi ve 1250 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası hücre medyumunu uzaklaştırıldı. Ardından 350 µl RLT tamponu eklendi. Pipetleme veya vorteksleme ile pelletin tamamen RLT'de çözünmesi sağlandı. Hücrelerin parçalandığından emin olduğunda lizat QIAshredder denilen hücre lizatı homojenizatörüne aktarıldı. Dönme hızı maksimuma getirilerek 2 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonucu elde edilen toplama tüpündeki lizatın hacmine eşit hacimde %70'lik etanol eklendi. Etanolle muamele edilmiş lizatta herhangi bir çökeltme oluştuysa bu çökeltiyi de içeren en fazla 700 µl'lik sıvı RNeasy spin kolona aktarıldı. 12.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Ardından kolon üzerine 350 µl RW1 tamponu eklendi. 5 dk. bekletildi. Süre bitiminde 12.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. 80 µl'lik DNaz tamponu kolon membranına eklendi ve 20-30°C 'de 15 dk. bekletildi. Sonra kolon üzerine 350 µl RW1 tamponu eklendi ve 12.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Daha sonra kolona 500 µl RPE eklendi ve 15 sn. 12.000 rpm'de santrifüj edildi. Ardından kolona 500 µl RPE eklendikten sonra 2 dakika 12.000 rpm'de santrifüj edildi. Son olarak RNeasy spin kolonu yeni bir 1.5'lik mikrosantrifüj tüpe alındı. Protokol boyunca tek tüp değişimi bu aşamada gerçekleştirildi. 30 µl RNazsız su ilave edildi ve 12.000 rpm'de 1dk. santrifüj edilerek RNA'lar 30 µl RNazsız suda toplandı. Nanodropta miktar ve saflık tayini için RNA'lardan 4 µl'lik örnekler küçük PCR tüplerine alındı ve ölçümleri yapıldı.

2.2.3.2.2 Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi

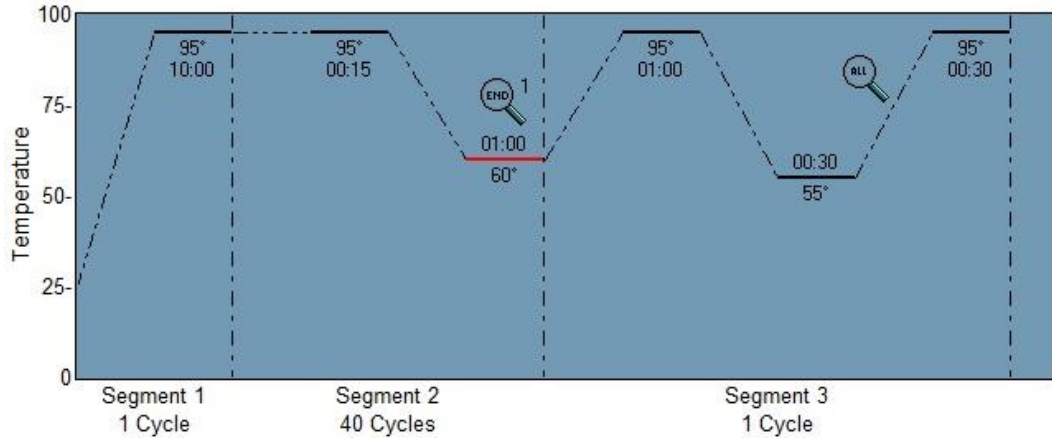
Formaldehit agaroz jel elektroforezinde kullanılacak tüm cam malzemeler deterjan ile yıkandıktan sonra % 0,1'lik DEPC içeren distile su ile 37 °C'de 12 saat bekletildi. Ardından DEPC kalıntılarını gidermek için 15 dk. otoklavlanarak kullanıldı. Tüm protokolde DEPC ile 37 °C'de 12 saat muamele edildikten sonra otoklavlanan distile su kullanıldı. 5x lik Formaldehit Jel Yürütme Tamponu (FJRB) tamponundan 1x'lik hazırlandı ve jel tablasına döküldü. Jele 5 dakika kadar ön koşu yaptırılarak porların açılması sağlandı. RNA örnekleri kuyulara dikkatli bir şekilde yüklendi. 67 V'da 1,5-2 saat yürütüldü. İnsan HepG2 hücrelerinden izole edilen parçalanmamış total RNA, formaldehit agaroz jel elektroforezi sonucu oldukça belirgin 28S ve 18S bantları oluşturur. 28S rRNA bandı 18S rRNA bandının yaklaşık 2 katı kadar daha yoğun parlaklıktadır. Parçalanmış RNA örneklerinde 28S ve 18S'lik rRNA bantları net değildir. Net olsa bile parlaklıkta 2:1 oran korunmamıştır (Sambrook ve Russell, 2001).

2.2.3.2.3 cDNA Sentezi ve Gerçek Zamanlı PCR

Jel görüntüsünde 28s ve 18S parlaklık oranı 2'ye yakın ve nanodrop ölçümü sonucu 260/230 oranı 1,7'den yüksek ve 260/280 oranı 1,9-2,1 arasında olan RNA örneklerinden cDNA sentezi RT² First Strand Kit ile şu işlemler sonucu gerçekleştirilmiştir. RNA örnekleri 500 ng/8 µl RNazsız suda olacak şekilde hazırlandı ve üzerine 2 µl GE ilave edildi. 42°C'de 5 dk. bekletildi. Ardından hemen buz üzerine alındı ve en az 1 dk bekletilerek RT kokteyli hazırlandı. Bu kokteyl tek reaksiyon için 5x'lik revers transkripsiyon reaksiyonu tamponundan olan 4 µl, RNazsız sudan 3 µl, primer ve eksternal kontrol karışımından 1 µl ve revers transkriptaz enzim karışımından 2 µl içerecek şekilde oluşturuldu.

Buzla muamele edilmiş 10 µl GE'li RNA örneğine 10 µl RT kokteyli eklendikten sonra 42°C'de tam 15 dk. daha sonra 95°C'de 5 dk. inkübasyon sonucu cDNA sentezlendi. Reaksiyon sonucu ürünlere 91 µl H₂O eklendi. Ardından 1350 µl master mix, 102 µl dilue cDNA ve 1248 µl RNazsız ve DNazsız H₂O rezervuarda birleştirildi.

Bu karışım her kuyuya 25 µl olacak şekilde pipet ucu sürekli değiştirilerek insan apoptoz RT² profiler PCR arrayi plakasına yüklendi. Kuyulardaki baloncukları gidermek amacıyla plaka 25000 rpm’de 1 dk. santrifüjlendi. MxPro programda ROX ve SYBR green filtreleri seçilerek termal profil Şekil 2.3’te belirtildiği gibi ayarlandı.



Şekil 2.3 Gerçek zamanlı RT-PCR termal profili

İnsan apoptoz RT² Profiler PCR arrayi, programlanmış hücre ölümüyle ilgili 84 önemli gen profilini ortaya koymayı sağlar. Bu array; TNF ligandları ve reseptörleri, bcl-2, kaspaz, IAP (apoptoz inhibitör protein), TRAF (TNF associated factors), CARD (Caspase recruitment domeins), ölüm domeni, ölüm efektör domeni ve CIDE (cell death-inducing DNA fragmentation factor 45-like effector) ailesi genleri ile p53 ve DNA hasar yolları ile ilgili genlerde anlatım profili geliştirmek için kullanılır. Anlatımı incelenen 84 genler işlevlerine göre düzenlendi ve aşağıda liste halinde verildi.

Apoptozun Tetiklenmesi:

Ölüm Domeni Reseptörleri: CRADD, FADD, TNF, TNFRSF10B (DR5).

DNA Hasarı: ABL1, CIDEA, CIDEB, TP53, TP73.

Ekstrasellüler Sinyaller: CFLAR (CASPER), DAPK1, TNFRSF25 (DR3).

Diğer: BAD, BAK1, BAX, BCL10, BCL2L11, BCLAF1, BID, BIK, BNIP1, BNIP3, BNIP3L, CASP1 (ICE), CASP10 (MCH4), CASP14, CASP2, CASP3, CASP4, CASP6, CASP8, CD27 (TNFRSF7), CD70 (TNFSF7), DFFA, FAS (TNFRSF6), FASLG (TNFSF6), GADD45A, HRK, LTA (TNFB), NOD1

(CARD4), PYCARD (TMS1/ASC), TNFRSF10A, TNFRSF9, TNFSF10 (TRAIL), TNFSF8, TP53BP2, TRADD, TRAF3.

Anti-Apoptoz: AKT1, BAG1, BAG3, BAG4, BAX, BCL2, BCL2A1 (Bfl-1/A1), BCL2L1 (BCL-X), BCL2L10, BCL2L2, BFAR, BIRC3 (c-IAP1), BIRC6, BIRC8, BNIP1, BNIP2, BNIP3, BNIP3L, BRAF, CD27 (TNFRSF7), CD40LG (TNFSF5), CFLAR (CASPER), DAPK1, FAS (TNFRSF6), HRK, IGF1R, MCL1, NAIP (BIRC1), NOL3, RIPK2, TNF, XIAP (BIRC4).

Apoptozun Düzenlenmesi:

Negatif Düzenleme: BAG1, BAG3, BAG4, BCL10, BCL2, BCL2A1 (Bfl-1/A1), BCL2L1 (BCL-X), BCL2L10, BCL2L2, BFAR, BIRC3 (c-IAP1), BIRC6, BIRC8, BNIP1, BNIP2, BNIP3, BNIP3L, BRAF, CASP3, CD27 (TNFRSF7), CD40LG (TNFSF5), CFLAR (CASPER), CIDEA, DAPK1, DFFA, FAS (TNFRSF6), IGF1R, MCL1, NAIP (BIRC1), NOL3, TP53, TP73, XIAP (BIRC4).

Pozitif Düzenleme: ABL1, AKT1, BAD, BAK1, BAX, BCL2L11, BCLAF1, BID, BIK, BNIP3, BNIP3L, CASP1 (ICE), CASP10 (MCH4), CASP14, CASP2, CASP4, CASP6, CASP8, CD70 (TNFSF7), CIDEB, CRADD, FADD, FASLG (TNFSF6), HRK, LTA (TNFB), NOD1 (CARD4), PYCARD (TMS1/ASC), RIPK2, TNF, TNFRSF10A, TNFRSF10B (DR5), TNFRSF25 (DR3), TNFRSF9, TNFSF10 (TRAIL), TNFSF8, TP53, TP53BP2, TRADD, TRAF2, TRAF3, TRAF4.

TNF/TNFR Domain Proteinler: CD27 (TNFRSF7), CD40 (TNFRSF5), FAS (TNFRSF6), FASLG (TNFSF6), LTA (TNFB), LTBR, TNF, TNFSF10 (TRAIL), TNFSF8, TNFRSF10A, TNFRSF10B (DR5), TNFRSF11B, TNFRSF21, TNFRSF25 (DR3), TNFRSF9.

BCL2 ve BAG Domain Proteinleri: BAG1, BAG3, BAG4, BAX, BCL2, BCL2A1 (Bfl-1/A1), BCL2L1 (BCL-X), BCL2L10, BCL2L11, BCL2L2, MCL1.

BIR Domain Proteinleri: BIRC2 (c-IAP2), BIRC3 (c-IAP1), BIRC6, BIRC8, NAIP (BIRC1), XIAP (BIRC4).

CARD Domain Proteinleri: APAF1, BCL10, BIRC2 (c-IAP2), BIRC3 (c-IAP1), CARD6, CARD8, CASP1 (ICE), CASP2, CASP4, CASP5, CASP9, CRADD, NOD1 (CARD4), NOL3, PYCARD (TMS1/ASC), RIPK2.

DEATH Domain Proteinleri: CRADD, DAPK1, FADD, TNFRSF10A, TNFRSF10B (DR5), TNFRSF11B, TNFRSF1A, TNFRSF21, TNFRSF25 (DR3), TRADD.

TRAF Domain Proteinleri: TRAF2, TRAF3, TRAF4.

Kaspazlar ve Düzenleyicileri:

Kaspazlar: CASP1 (ICE), CASP10 (MCH4), CASP14, CASP2, CASP3, CASP4, CASP5, CASP6, CASP7, CASP8, CASP9, CFLAR (CASPER), CRADD, PYCARD (TMS1/ASC).

Kaspaz Aktivatörleri: APAF1, BAX, BCL2L10, CARD8, CASP1 (ICE), CASP9, NOD1 (CARD4), PYCARD (TMS1/ASC), TNFRSF10A, TNFRSF10B (DR5), TP53.

Kaspaz İnhibitörleri: CD27 (TNFRSF7), XIAP (BIRC4).

2.2.4 Deneysel Tasarımlar

2.2.4.1 Tripan Mavisi Deneyleri Tasarımı

Tripan mavisi testi hem hücrelerin büyüme eğrilerini oluşturmak için hemde 300 μM 'lık vulpinik asitin her iki hücre sayısına olan etkisini belirlemek için kullanıldı. Büyüme eğrisi oluşturmak için 8,5 cm^2 'lik petrilere ekilen hücreler 72 saat boyunca 24 saat arayla sayıldı.

300 μM 'lık vulpinik asitin her iki hücre sayısına olan etkisini belirlemek için 8,5 cm^2 'lik petrilere ekilen hücrelerden test grubu hücreleri 24 saat sonra Vulpinik asitle kontrol grubu hücreleri ise % 0,1'lik DMSO ile muamele edildi. Ardından her iki grup hücre de 72 saat boyunca 24 saat arayla sayıldı.

2.2.4.2 MTT ve NR Deneyleri Tasarımı

MTT ve NR deneyleri 96 kuyulu plakalarda gerçekleştirildi. Test grubu hücreleri, benzofuran türevlerinin ve vulpinik asitin belirli seyreltmelerini içeren taze medyumla 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edildi.

Kontrol grubu hücreleri aşağıda anlatıldığı gibi oluşturularak 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edildi.

1. Hücre ve hücre medyumunun bulunduğu benzofuran testleri için % 100 canlılığın gözlemlenmek istendiği negatif kontrol grubu,
2. Hücre ve % 0,1'lik DMSO içeren medyumun bulunduğu, DMSO'da çözülen maddeler için (sisplatin, siklopamin ve vulpinik asit) % 100 canlılığın gözlemlenmek istendiği negatif kontrol grubu,
3. HepG2 hücrelerinin çalışıldığı plakalarda 100 µM'lık sisplatin içeren medyumun uygulandığı ve hücre çoğalmasında inhibisyonun gözlemlenmek istendiği pozitif kontrol grubu,
4. F2408 hücrelerinin çalışıldığı plakalarda 10 µM'lık sisplatin içeren medyumun uygulandığı ve hücre çoğalmasında inhibisyonun gözlemlenmek istendiği pozitif kontrol grubu,
5. Her iki hücre hattı için 9,7 µM'lık siklopamin içeren medyumun uygulandığı ve hücre çoğalmasında inhibisyonun gözlemlenmek istendiği pozitif kontrol grubu,
6. Çözücünden kaynaklanan absorbansı gidermek için çözücünün (MTT için DMSO, NR için Desorb çözeltisi) bulunduğu kör kuyuları ile çalışıldı.

Elde edilen veriler absorbans cinsinden olup bunları % Canlılığa çevirmek için denklem 2.1 kullanıldı.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{(Test-Kör)}{(Negatif Kontrol-Kör)} \times 100 \quad (2.1)$$

2.2.4.3 Broth Mikrodilüsyon Deneyi Tasarımı

Antimikrobiyal etkinin belirlendiği broth mikrodilüsyon tekniği için benzofuran türevlerinin 10 farklı derişimlerinin yanında pozitif kontrol olarak 1 mg/ml’lik kloramfenikol ve çözücünden kaynaklanan herhangi bir etkiyi belirlemek için negatif kontrol (distile su) kullanıldı.

2.2.4.4 AO/EB İkili Boyama Deneyi Tasarımı

Her iki hücre hattının 48 saat süreyle 200 µM Vulpinik asit muamelesi sonucu oluşturulan test grubu ve % 0,1’lik DMSO ile muamele edilen kontrol grubu hücreleriyle çalışıldı.

2.2.4.5 Apoptotik Yolakla İlgili Genlerin Anlatımının Gerçek Zamanlı RT-PCR ile Analizi

HepG2 hücrelerinin 48 saat süreyle 100 µM vulpinik asit muamelesi sonucu oluşturulan test grubu ve % 0,1’lik DMSO ile muamele edilen kontrol grubu hücreleriyle çalışıldı.

2.2.5 İstatistik Analizi

Sisplatin, siklopamin, benzofuran türevleri ve vulpinik asit ile gerçekleştirilen tüm sitotoksiste deneylerde kimyasalların her derişimi için 8 ölçüm alındı ve bütün deneyler en az üç defa tekrarlandı. Elde edilen veriler IBM SPSS Statistics 20 programında analiz edildi.

Hücrelerin büyüme eğrilerinin belirlenmesi deneyinden elde edilen veriler temel betimsel istatistik bakımından değerlendirilerek saat ve hücre sayısı grafiği halinde sunuldu. Grafiklerde bulunan hata çubukları ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

Tripan mavisi testinde test grubunun negatif kontrol grubundan anlamlı düzeyde farklılık içerip içermediğini belirlemek için “independent samples t test” kullanıldı. $p < 0,001$ istatistiki olarak anlamlı kabul edildi. Analiz sonucu, kimyasal derişimi ve hücre sayısı grafiği oluşturularak sunuldu. Grafiklerde bulunan hata çubukları ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

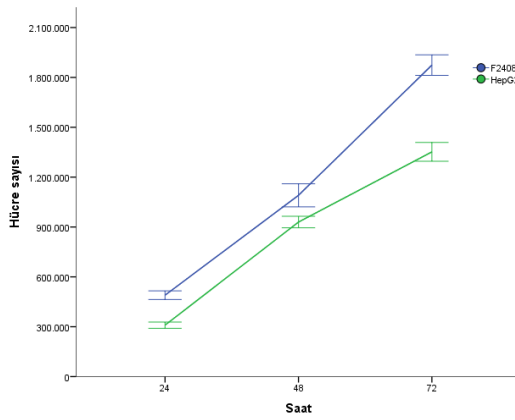
MTT ve NR testlerinde test gruplarının negatif kontrol gruplarından anlamlı düzeyde farklılıklar içerip içermediğini belirlemek için “one-way anova” sonrası Tukey testi gerçekleştirildi. $p<0,001$ istatistiki olarak anlamlı kabul edildi. Analiz sonucu, kimyasal derişimi ve % Canlılık grafiğı oluşturularak sunuldu. Grafiklerde bulunan hata çubukları ortalamanın standart hatasını göstermektedir. Her iki hücre hattında vulpinik asitin IC50 değerleri istatistiki hesaplamayla tespit edildi. Bu hesaplama hücre canlılığının istatistiki olarak belirlenen lineer regresyon eşitliğinde derişime bağılı olarak açıklandığı fomulasyon kullanılarak MTT ve NR için ayrı ayrı gerçekleştirildi. MTT testi ile NR testi arasındaki korelasyon spearman testi ile incelendi regresyon ve korelasyon analizi sonuçları bir tablo halinde sunuldu.

AO/EB ikili boyasıyla elde edilen negatif kontrol grubu apoptotik hücre yüzdesinin test grubu hücre yüzdesinden anlamlı düzeyde farklılık içerip içermediğini belirlemek için “independent samples t test” kullanıldı. $p<0,001$ istatistiki olarak anlamlı kabul edildi. Analiz sonucu, kontrol ve test gruplarında sayılan apoptotik hücre yüzdesi çubuk grafiğı şeklinde sunuldu. Grafiklerde bulunan hata çubukları ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

3 BULGULAR

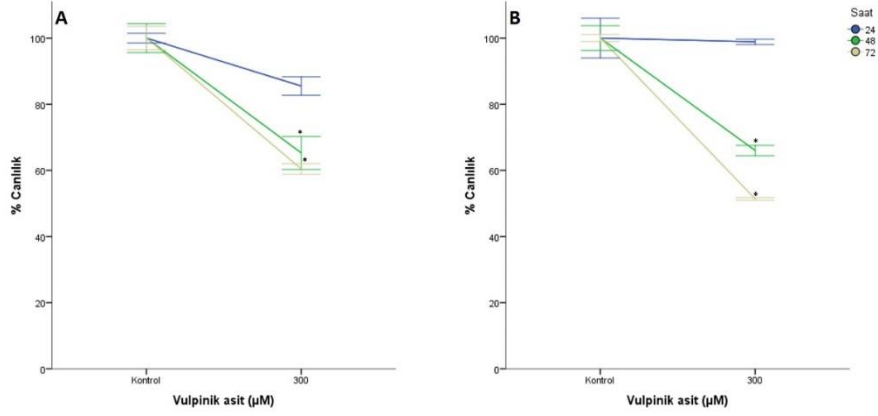
3.1 Tripan Mavisi Boyama ile Elde Edilen Hücrelerin Büyüme Eğrisi ve Vulpinik Asitin Sitotoksik Etkisi

F2408 ve HepG2 hücreleri normal besi ortamlarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra canlı hücreler tripan mavisiyle sayıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.1’de verildiği gibi hücrelerin 72 saatte 24 saattekenden 4 katına ulaştıkları bulundu (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 F2408 ve HepG2 hücreleri için büyüme eğrisi

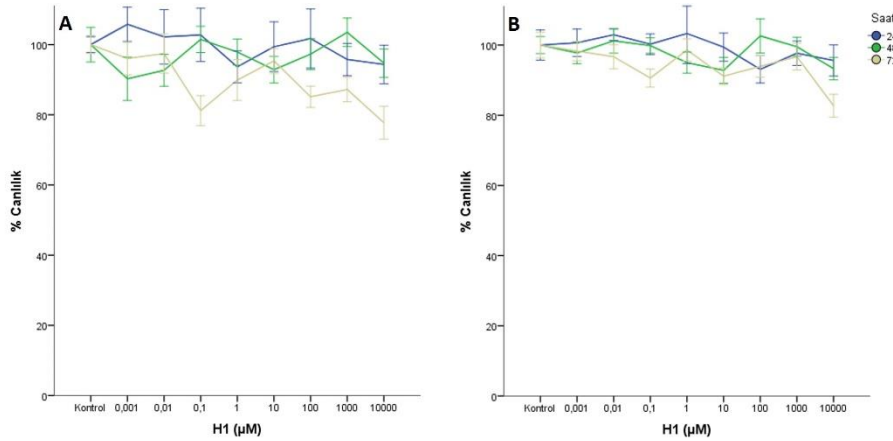
F2408 ve HepG2 hücreleri vulpinik asit içeren besi ortamlarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra canlı hücreler tripan mavisiyle sayıldı. Elde edilen verilere göre 300 μ M vulpinik asit kontrol grubunda % 100 olan canlı hücre yüzdesini 24, 48 ve 72 saatte sırasıyla F2408’ler için % 85, % 65 ve % 60’a ve HepG2’lerde % 98, % 65 ve % 51’e düşürmektedir. Verilerin istatistiki analizine göre 300 μ M vulpinik asit her iki hücre hattında 48 ve 72 saatte hücre canlılığında kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde farklılığa yol açmaktadır (Şekil 3.2).



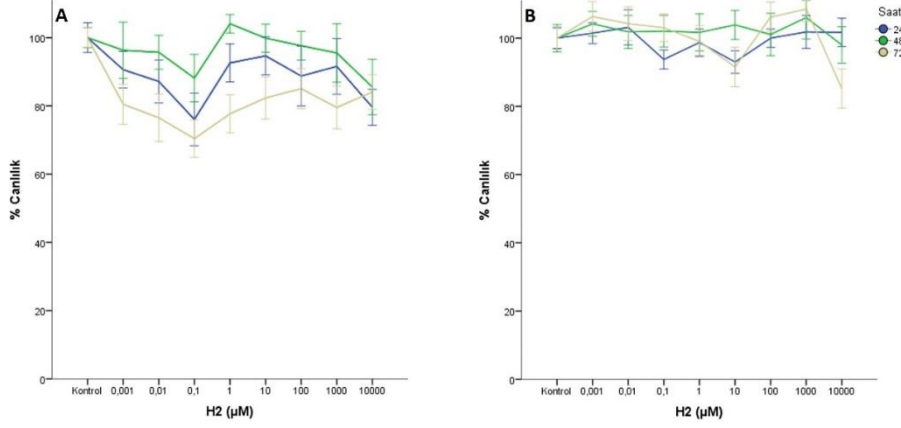
Şekil 3.2 Vulpinik asitin F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelelerinden sonra tripan mavisi ile belirlenen hücre canlılığı oranı

3.2 Benzofuran Türevleri, Vulpinik Asit, Sisplatin ve Siklopaminin MTT Dönüşümüne Olan Etkileri

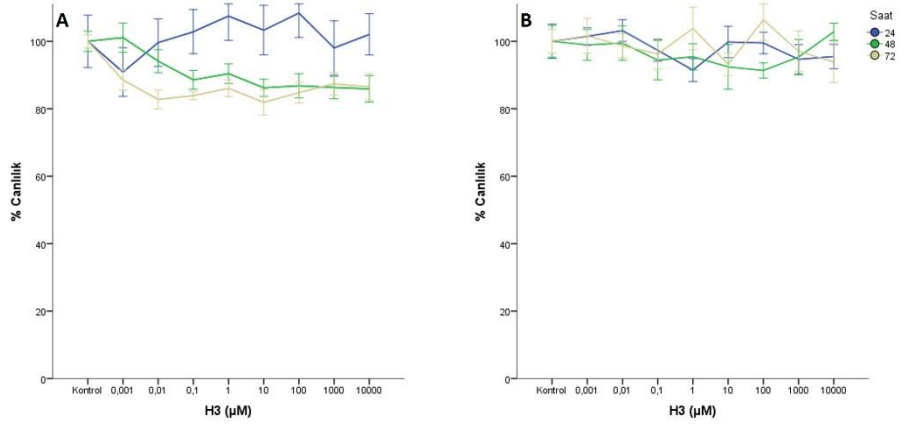
MTT testi üç benzofuran türevinin de 10.000 µM'a kadar her iki hücre tipi için anlamlı bir sitotoksik etkiye sahip olmadığını göstermektedir (Şekil 3.3, Şekil 3.4, Şekil 3.5).



Şekil 3.3 H1 maddesinin F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelelerinden sonra MTT ile belirlenen hücre canlılığı oranı

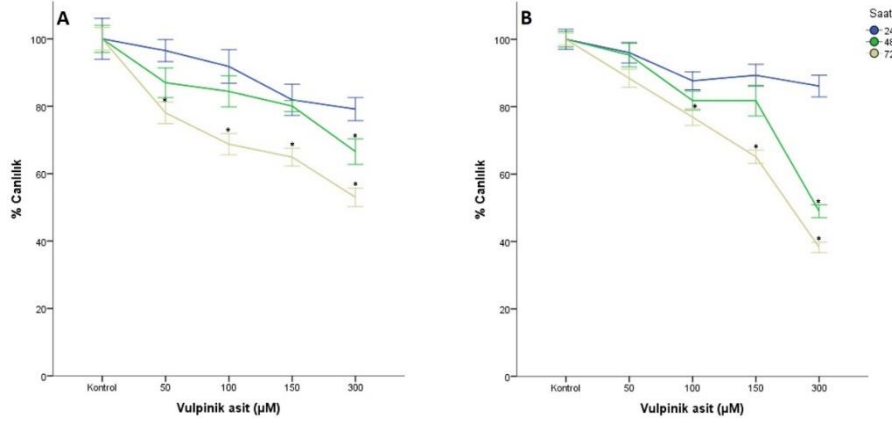


Şekil 3.4 H2 maddesinin F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelelerinden sonra MTT ile belirlenen hücre canlılığı oranı



Şekil 3.5 H3 maddesinin F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelelerinden sonra MTT ile belirlenen hücre canlılığı oranı

MTT testine göre vulpinik asitin 48 saat 300 μM 'da % 66 ve 72 saat 50 μM 'da % 78, 100 μM 'da % 68, 150 μM 'da % 64, 300 μM 'da % 52 olan F2408 hücre canlılığı kontrol grubundan anlamlı ölçüde farklıdır (Şekil 3.6A). Vulpinik asitin 48 saat 300 μM 'da % 48 ve 72 saat 100 μM 'da % 76, 150 μM 'da % 65, 300 μM 'da % 38 olan HepG2 hücre canlılığı kontrol grubundan anlamlı ölçüde farklıdır (Şekil 3.6B).



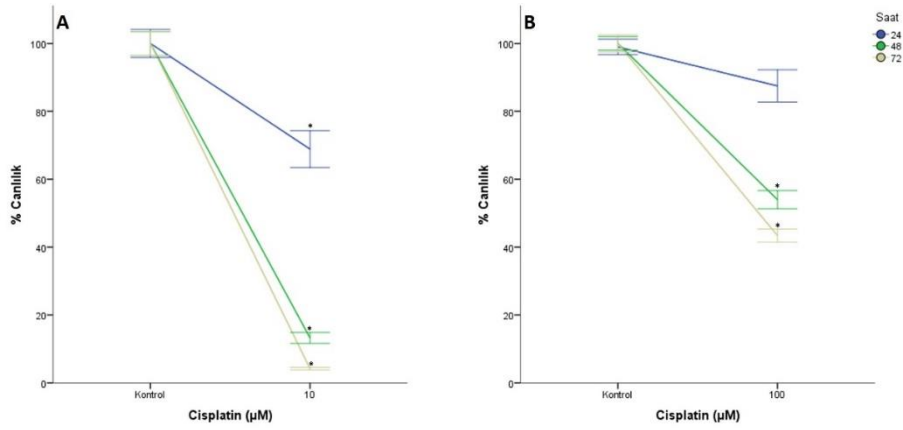
Şekil 3.6 Vulpinik asitin F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelelerinden sonra MTT ile belirlenen hücre canlılığı oranı

MTT testine göre vulpinik asitin F2408 hücreleri için IC50 değeri 48 ve 72 saatlerde sırasıyla 455,1 ve 282,5 μM 'dır. HepG2 hücreleri için IC50 değeri 48 ve 72 saatlerde sırasıyla 298,8 ve 235,9 μM 'dır. Her iki hücre hattında da 24 saatte anlamlı bir sitotoksik etki tespit edilmemiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 MTT testi verileriyle gerçekleştirilen regresyon, korelasyon analizi sonuçları ve vulpinik asitin IC50 değerleri (C= % Canlılık, D= Derişim)

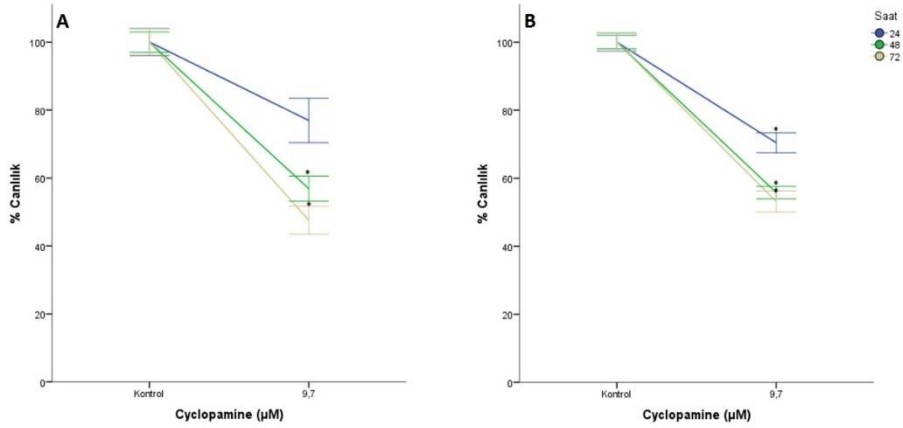
Hücre Hattı	Saat	F	Anlamlılık Değeri	R ²	Lineer regresyon eşitliği	IC50 (μM)	NR ile korelasyon katsayısı	Anlamlılık değeri
F2408	48	41,139	0,000	0,411	C=95,966-D*0,101	455,1	0,288	0,030
F2408	72	81,462	0,000	0,486	C=89,268-D*0,139	282,5	0,519	0,000
HepG2	48	233,798	0,000	0,731	C=102,003-D*0,174	298,8	0,690	0,000
HepG2	72	496,706	0,000	0,809	C=98,362-D*0,205	235,9	0,791	0,000

F2408 hücreleri için pozitif kontrol olarak kullanılan 10 μM sisplatinin 24,48 ve 72 saatte sırasıyla % 68, % 13, % 4 olan canlılıklarının kontrol grubundan anlamlı ölçüde farklı olduğu bulundu (Şekil 3.7A). HepG2 hücreleri için pozitif kontrol olarak kullanılan 100 μM sisplatinin 48 ve 72 saatte sırasıyla % 58 ve %43 olan canlılıklarının kontrol grubundan anlamlı ölçüde farklı olduğu bulundu (Şekil 3.7B).



Şekil 3.7 Sisplatin'in F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelelerinden sonra MTT ile belirlenen hücre canlılığı oranı

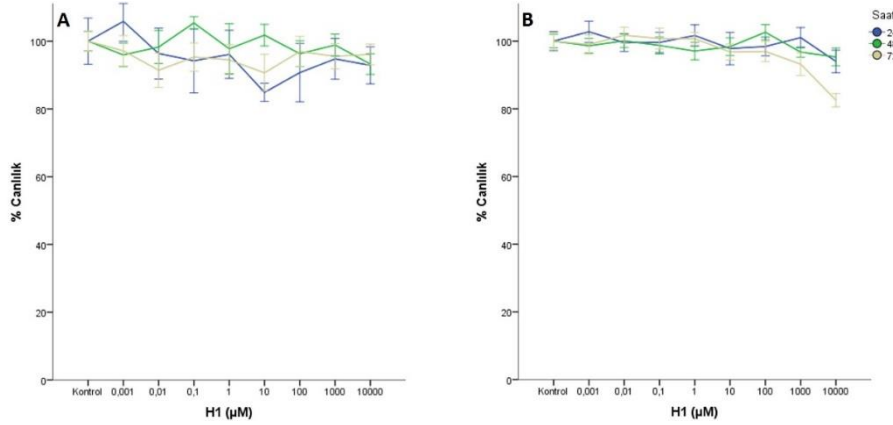
Her iki hücre hattı için pozitif kontrol olarak kullanılan 9,7 µM siklopamin'nin F2408'ler üzerinde 48 ve 72 saatte sırasıyla % 56 ve % 47 olan hücre canlılıklarının kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde farklı olduğu bulundu (Şekil 3.8A). HepG2'ler üzerinde ise 24, 48 ve 72 saatte sırasıyla % 70, % 55, % 53 olan hücre canlılıklarının kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde farklı olduğu bulundu (Şekil 3.8B).



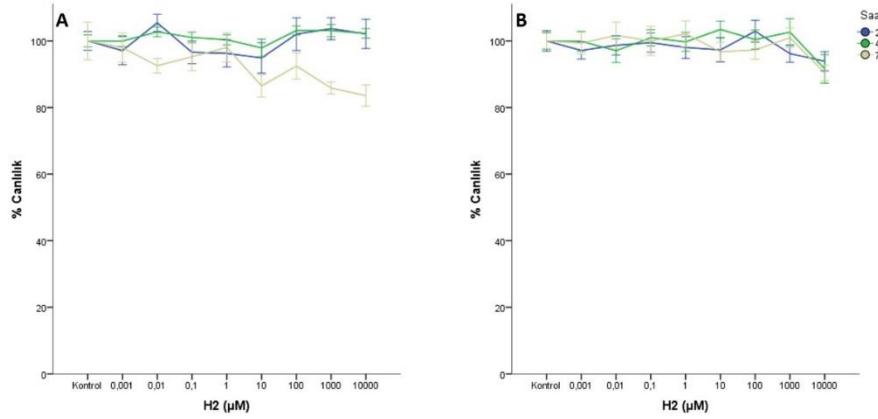
Şekil 3.8 Siklopamin'nin H1 maddesinin F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelelerinden sonra MTT ile belirlenen hücre canlılığı oranı

3.3 Benzofuran Türevleri, Vulpinik Asit, Sisplatin ve Siklopaminin Nötral Kırmızısı Alımına Olan Etkileri

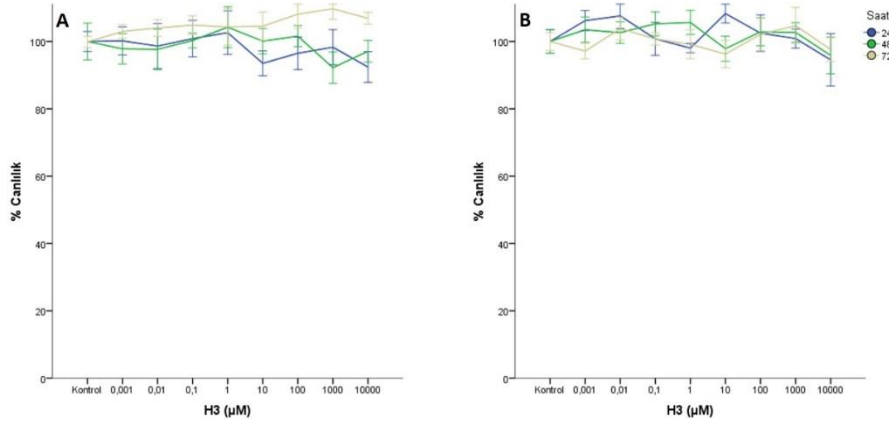
NR testi üç benzofuran türevinin de 10.000 μM 'a kadar her iki hücre tipi için anlamlı bir sitotoksik etkiye sahip olmadığını göstermektedir (Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11).



Şekil 3.9 H1 maddesinin F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelelerinden sonra NR ile belirlenen hücre canlılığı oranı

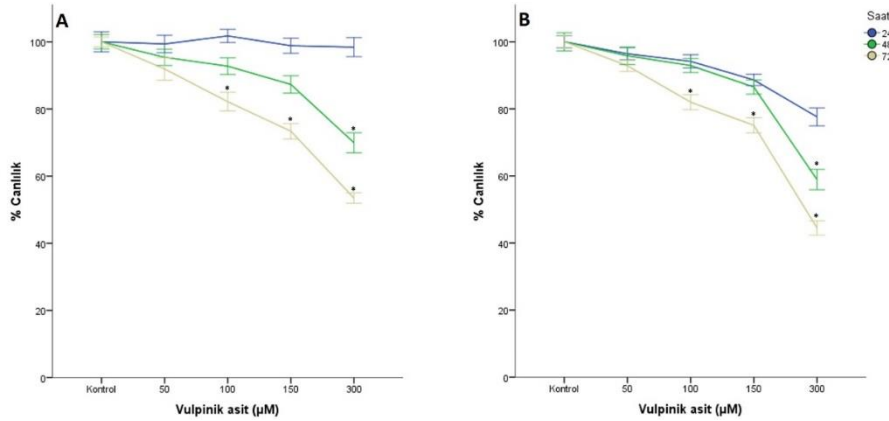


Şekil 3.10 H2 maddesinin F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelelerinden sonra NR ile belirlenen hücre canlılığı oranı



Şekil 3.11 H3 maddesinin F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelelerinden sonra NR ile belirlenen hücre canlılığı oranı

NR testine göre vulpinik asitin 48 saat 300 μM 'da % 69 ve 72 saat 100 μM 'da % 82, 150 μM 'da % 73, 300 μM μM 'da % 53 olan F2408 hücre canlılıkları kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde farklıdır (Şekil 3.12A). Vulpinik asitin 48 saat 300 μM 'da % 58 ve 72 saat 100 μM 'da % 81, 150 μM 'da % 77, 300 μM μM 'da % 48 olan HepG2 hücre canlılıkları kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde farklıdır (Şekil 3.12B).



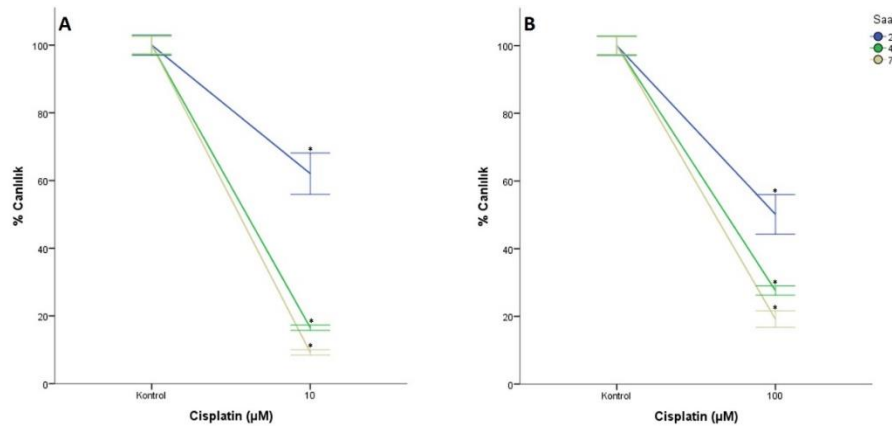
Şekil 3.12 Vulpinik asitin F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelelerinden sonra NR ile belirlenen hücre canlılığı oranı

NR testine göre vulpinik asitin F2408 hücreleri için IC50 değeri 48 ve 72 saatlerde sırasıyla 515,2 ve 313 μM 'dır. HepG2 hücreleri için IC50 değeri 48 ve 72 saatlerde sırasıyla 413,7 ve 297,8 μM 'dır. Her iki hücre hattında da 24 saatte anlamlı bir sitotoksik etki tespit edilmemiştir (Tablo 3.2).

Tablo 3.2 NR alımı verileriyle gerçekleştirilen regresyon, korelasyon analizi sonuçları ve vulpinik asitin IC50 değerleri (C= % Canlılık, D= Derişim)

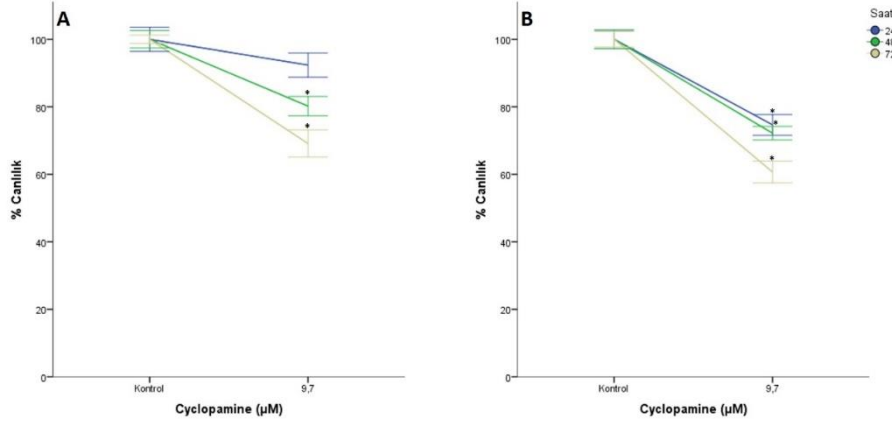
Hücre Hattı	Saat	F	Anlamlılık Değeri	R ²	Lineer regresyon eşitliği	IC50 (µM)	MTT ile korelasyon katsayısı	Anlamlılık değeri
F2408	48	75,407	0,000	0,373	C=101,005-D*0,099	515,2	0,288	0,030
F2408	72	227,526	0,000	0,662	C=98,835-D*0,156	313	0,519	0,000
HepG2	48	86,068	0,000	0,538	C=102,965-D*0,128	413,7	0,690	0,000
HepG2	72	565,745	0,000	0,800	C=100,934-D*0,171	297,8	0,791	0,000

F2408 hücreleri için pozitif kontrol olarak kullanılan 10 µM sisplatinin 24,48 ve 72 saatte sırasıyla % 62, % 16 ve % 9 olan canlılıklarının kontrol grubundan anlamlı ölçüde farklı olduğu bulundu (Şekil 3.13A). HepG2 hücreleri için pozitif kontrol olarak kullanılan 100 µM sisplatinin 24, 48 ve 72 saatte sırasıyla % 50, %27 ve % 19 olan canlılıklarının kontrol grubundan anlamlı ölçüde farklı olduğu bulundu (Şekil 3.13B).



Şekil 3.13 Sisplatin'in F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelelerinden sonra NR ile belirlenen hücre canlılığı oranı

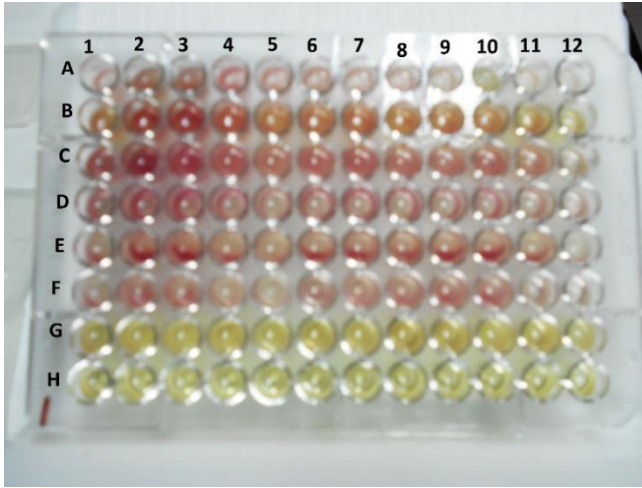
Her iki hücre hattı için pozitif kontrol olarak kullanılan 9,7 µM siklopamin'nin F2408'ler üzerinde 48 ve 72 saatte sırasıyla % 80 ve % 69, canlılıklarının kontrol grubundan anlamlı ölçüde farklı olduğu bulundu (Şekil 3.14A). HepG2'ler üzerinde ise 24, 48 ve 72 saatte sırasıyla % 74 % 72 ve % 60 olan canlılıklarının kontrol grubundan anlamlı ölçüde farklı olduğu bulundu (Şekil 3.14B).



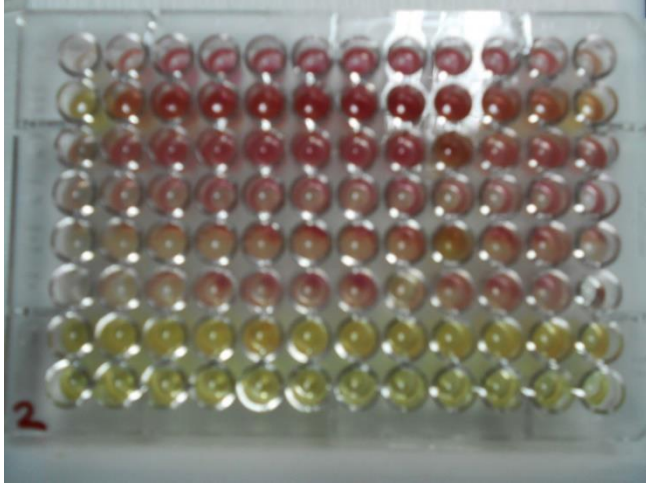
Şekil 3.14 Siklopamin’in F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerine 24, 48 ve 72 saat muamelelerinden sonra NR ile belirlenen hücre canlılığı oranı

3.4 Broth Mikrodilüsyon Tekniği ile Antimikrobiyal Etki Bulguları

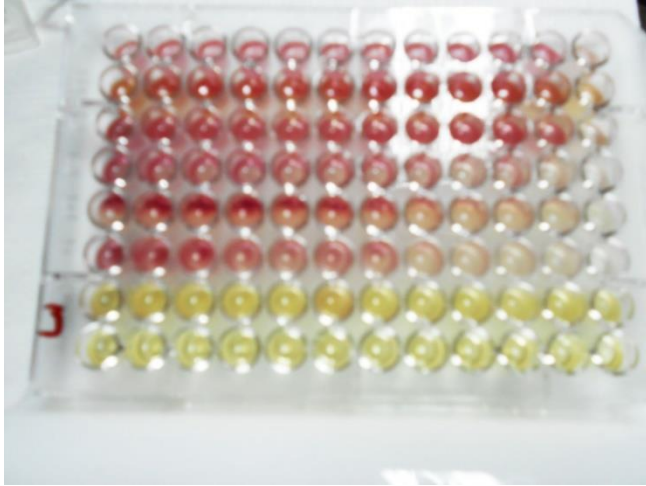
Test gruplarından elde edilen sonuçlar, üç benzofuran türevinin de 500 µg/ml’ye kadar hem bakteriler hem de mayalar üzerinde herhangi bir antimikrobiyal etkiye sahip olmadığını, fakat pozitif kontrol maddesi olarak kullanılan kloramfenikol’ün ise beklediği gibi mikrobiyal gelişimi engellediğini göstermektedir (Şekil 3.15, Şekil 3.16, Şekil 3.17).



Şekil 3.15 H1 maddesinin antimikrobiyal etkisinin gözlemlendiği plaka
Plakalardaki satır ve sütun düzeni için sayfa 32,33 ve 34’e bakınız



Şekil 3.16 H2 maddesinin antimikrobiyal etkisinin gözlemlendiği plaka.
Plakalardaki satır ve sütun düzeni için sayfa 32,33 ve 34'e bakınız

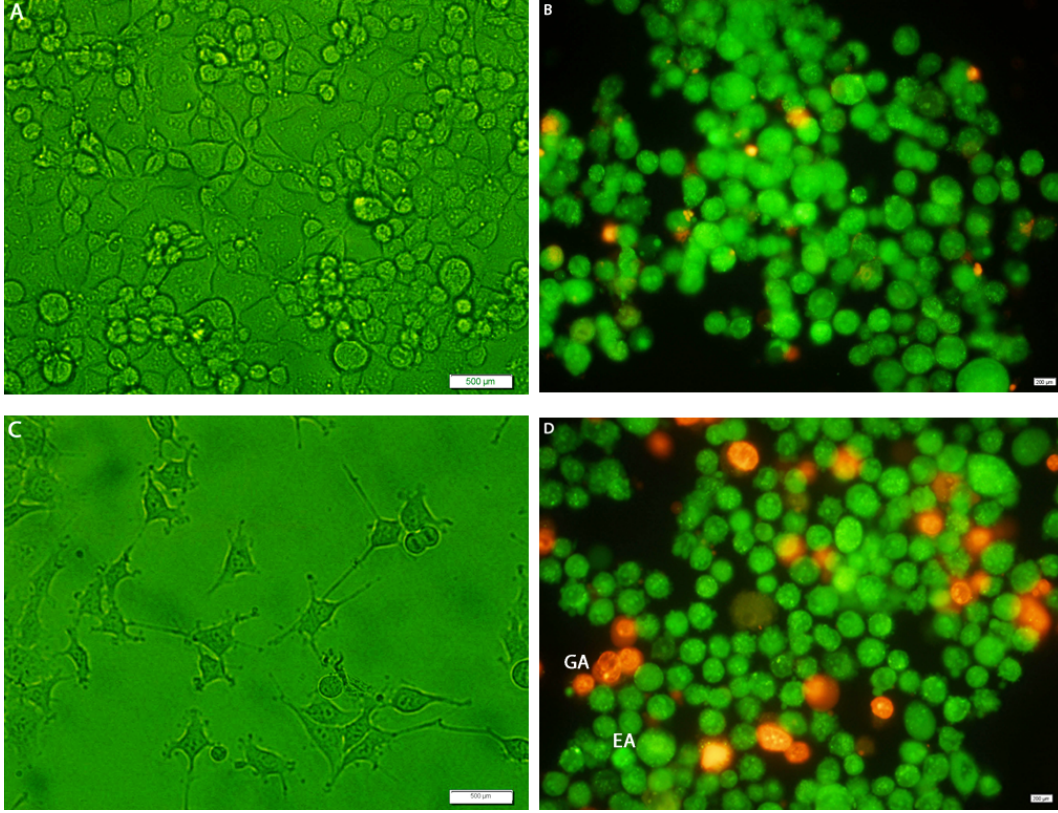


Şekil 3.17 H3 maddesinin antimikrobiyal etkisinin gözlemlendiği plaka.
Plakalardaki satır ve sütun düzeni için sayfa 32,33 ve 34'e bakınız

3.5 Akridin Oranj / Etidyum Bromit İkili Boyama Bulguları

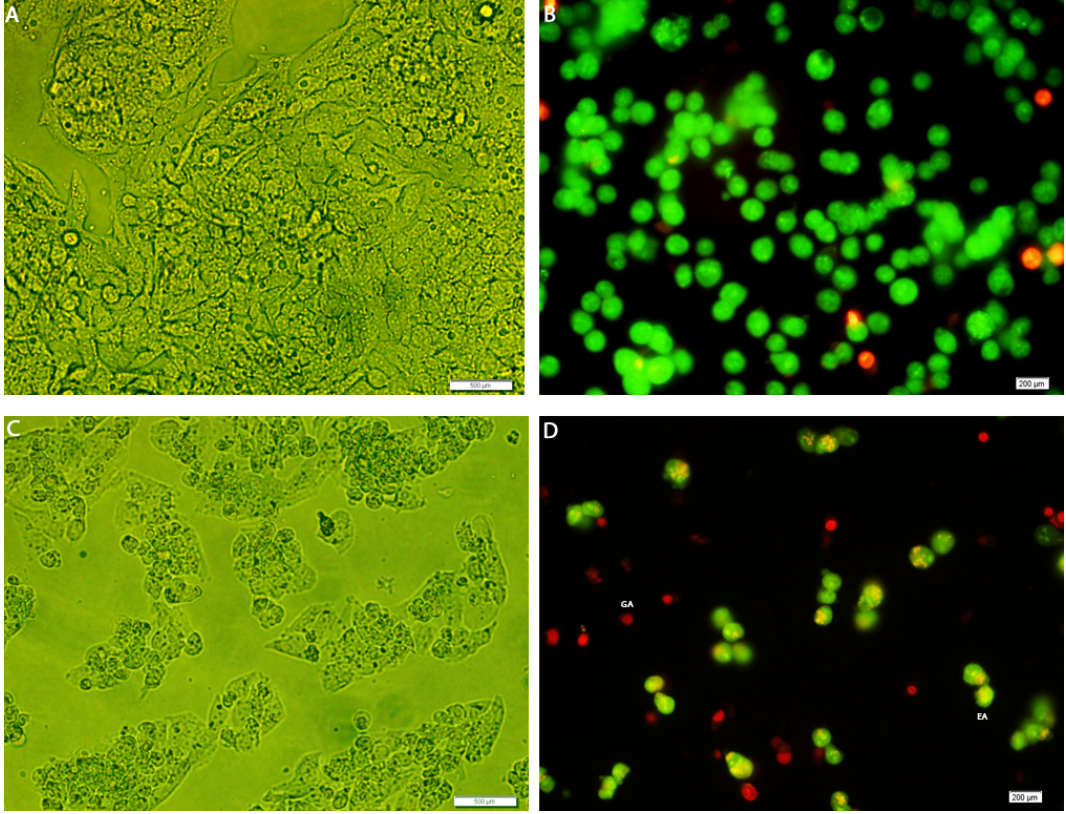
Şekil 3.18A'da negatif kontrol grubu F2408 hücrelerinin ters-faz mikroskopi görüntüsü bulunmaktadır. Bu fotoğrafta mitoz geçiren yuvarlak hücrelerin yanı sıra fibroblast-benzeri düz morfolojiye sahip F2408 hücreleri görülmektedir. 200 μ M vulpinik asitle 48 saat muamele edilen F2408'lerin azalarak morfolojilerini kaybettiği gözlemlendi (Şekil 3.18C). AO/EB ikili boyama sonucu kontrol grubu F2408 hücrelerinin canlı hücre morfolojilerinin beklendiği gibi homojen yeşil görünüme sahip olduğu ama bazı apoptotik hücreleri de bulundurduğu gözlemlendi (Şekil 3.18B). Test grubu hücrelerinde ise erken

apoptotik (EA) ve geç apoptotik (GA) morfoloji gösteren hücrelerin arttığı gözlemlendi (Şekil 3.18D).



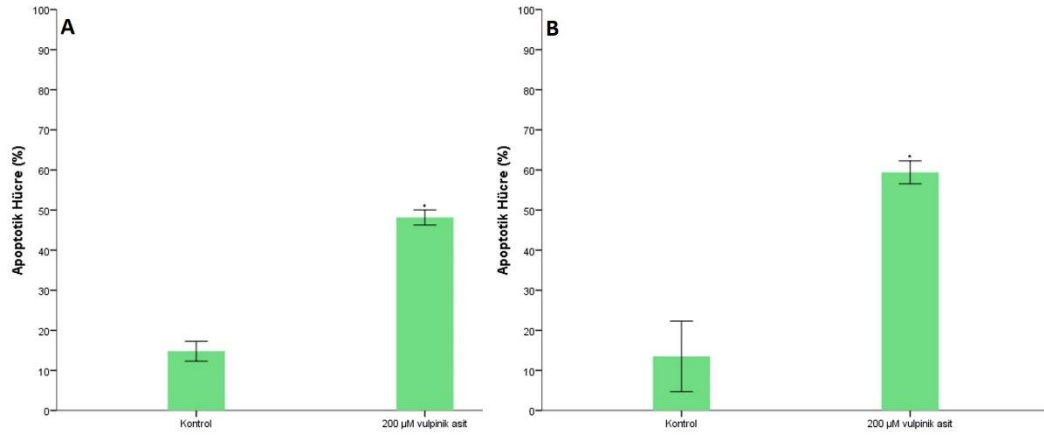
Şekil 3.18 Vulpinik asitle muamele edilen F2408 hücrelerinde AO/EB yöntemiyle incelenen apoptotik morfoloji. Kontrol grubu hücrelerinin ters-faz (A) ve floresan mikroskopi (B) görüntüsü. 200 µM vulpinik asite 48 saat boyunca maruz kalan HepG2 hücrelerinin ters-faz (C) ve floresan mikroskopi (D) görüntüsü

Şekil 19A’da negatif kontrol grubu HepG2 hücrelerinin ters-faz mikroskopi görüntüsü bulunmaktadır. 200 µM vulpinik asitle 48 saat muamele edilen HepG2’lerin azalarak morfolojilerini kaybettiği gözlemlendi (Şekil 3.19C). AO/EB ikili boyama sonucu kontrol grubu HepG2 hücrelerinin canlı hücre morfolojilerinin beklendiği gibi homojen yeşil görünüme sahip olduğu ama bazı apoptotik hücreleri de bulundurduğu gözlemlendi (Şekil 3.19B). Test grubu hücrelerinde ise erken apoptotik (EA) ve geç apoptotik (GA) morfoloji gösteren hücrelerin arttığı gözlemlendi (Şekil 3.19D).



Şekil 3.19 Vulpinik asitle muamele edilen HepG2 hücrelerinde AO/EB yöntemiyle incelenen apoptotik morfoloji. Kontrol grubu hücrelerinin ters-faz (A) ve floresan mikroskopi (B) görüntüsü. 200 μ M vulpinik asite 48 saat boyunca maruz kalan HepG2 hücrelerinin ters-faz (C) ve floresan mikroskopi (D) görüntüsü

AO/EB boyama sonucu elde edilen fotoğraflarda, hücreler morfolojilerine göre incelenerek canlı ve apoptotik hücre sayısı belirlendi. Buna göre 48 saat boyunca 200 μ M vulpinik asitle muamele edilen her iki hücre hattının da kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde farklı oranda apoptotik hücre bulundurduğu belirlendi (Şekil 3.20).



Şekil 3.20 Vulpinik asitle muamele edilen F2408 (A) ve HepG2 (B) hücrelerinde AO/EB ikili boyama fotoğraflarının analizi sonucu oluşturulan apoptotik indeks

3.6 Apoptotik Yolakla İlgili Genlerde Anlatımın Gerçek Zamanlı RT-PCR ile Analizi

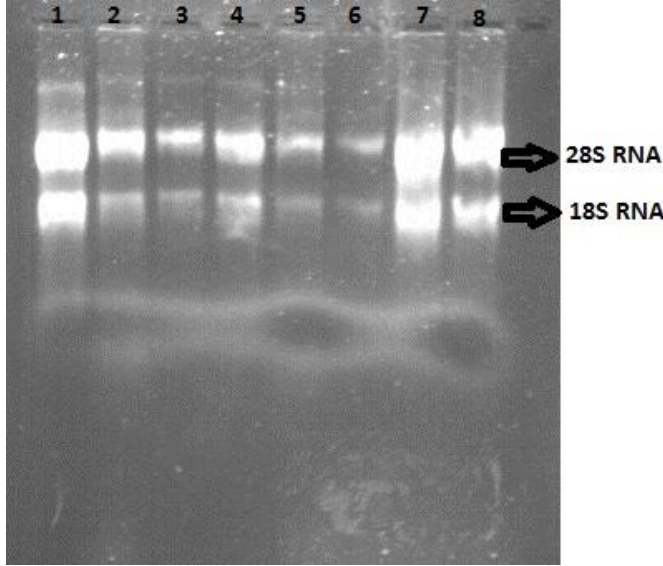
Kontrol ve vulpinik asitle muamele edilen HepG2 hücrelerinden RNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra kontrol grubu RNA'ları tek sayıyla deney grubu ise çift sayıyla kodlandı. Örneklerdeki RNA miktarı nanodropta ölçüldü ve sonuçları Tablo 3.3'te verilmektedir. Tüm RNA örnekleri 260/230 oranının 1,7'den büyük olma şartını karşıladığı ve 3 ve 4 numaralı örneklerin 260/280 oranının 1,9-2,1 arasında olma gerekliliğini karşılamadığı saptandı.

Tablo 3.3 İzole edilen RNA'ların kalite kontrol sonuçları

	1	2	3	4	5	6	7	8
260/280	2,09	2,10	2,12	2,13	1,97	2,05	2,08	2,10
260/230	1,81	1,95	1,91	2,04	2,04	1,96	2,09	2,06
ng/µl	951	603,9	450	961,6	441	470	1918,9	652

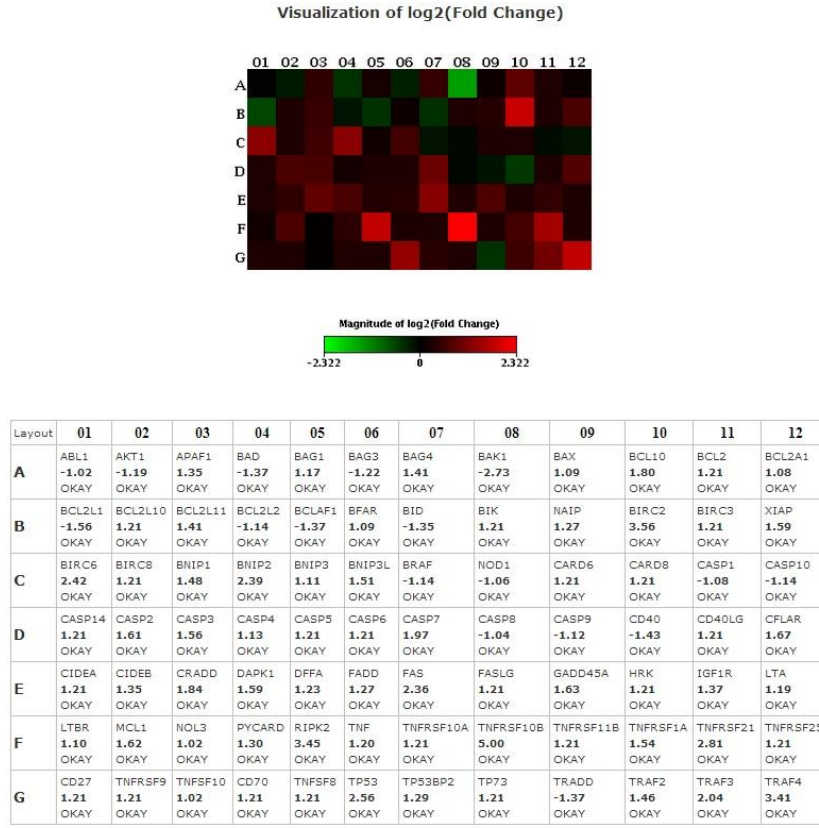
RNA'ların formaldehit agaroz jel elektroforezinden elde edilen görüntüsü Şekil 3.21'de verilmektedir. Jel fotoğrafı 28S ve 18S bantlarının korunduğunu toplam RNA'larda herhangi bir yıkım olmadığını göstermektedir. RNA parlaklıklarının farklı olması kuyulara eşit miktarın yerine eşit hacimde RNA yüklenmesinden kaynaklanmaktadır. Fakat 1.,2.,3. ve 4. kuyularda DNA kontaminasyonundan şüphelenildiği için bu örnekler cDNA sentezi için

kullanılmadı 5., 6., 7. ve 8. kuyulardaki RNA örneklerinin cDNA sentezi için aday olabileceğine karar verilerek 7. ve 8. kuyularda bulunan örneklerle cDNA sentezi gerçekleştirilerek gerçek zamanlı PCR yapıldı.



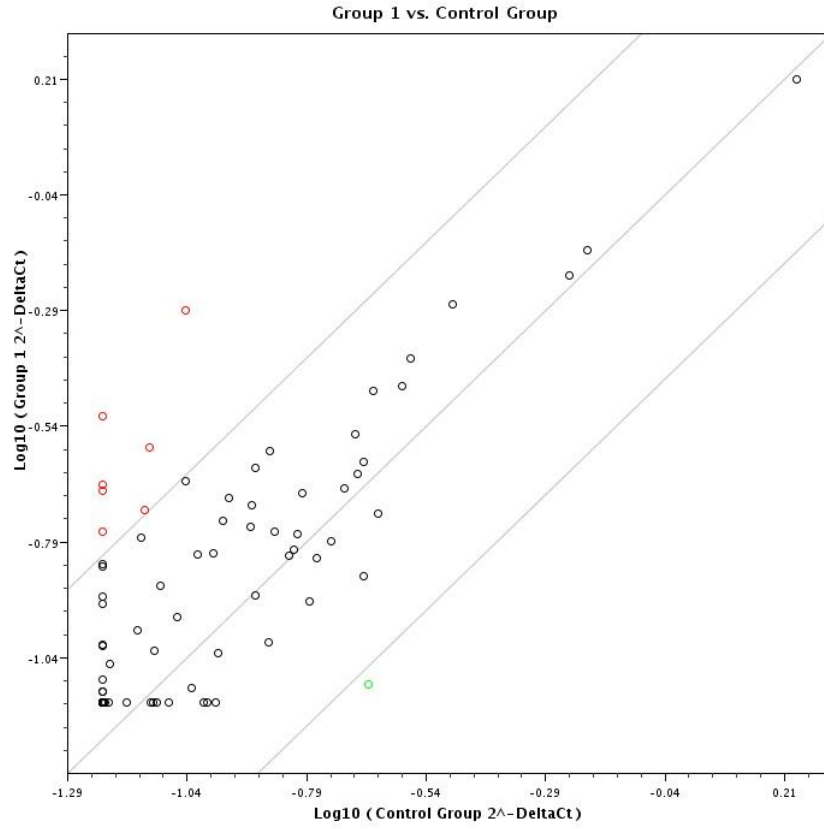
Şekil 3.21 Formaldehit agaroz jelde oluşturulan 28S ve 18S rRNA bantları. 1, 3, 5 ve 7 numaralı kuyularda kontrol grubu, 2, 4, 6 ve 8 numaralı kuyularda test grubu hücrelerinden izole edilen RNA'lar bulunmaktadır.

Vulpinik asitle muamele edilen HepG2 hücrelerinde apoptotik yolda iş gören genlerin isimleri 96 kuyulu plakada bulunduğu yerleri ve anlatım seviyelerindeki değişimin sayısal değerleri Şekil 3.22'de ısı haritasında verilmektedir.

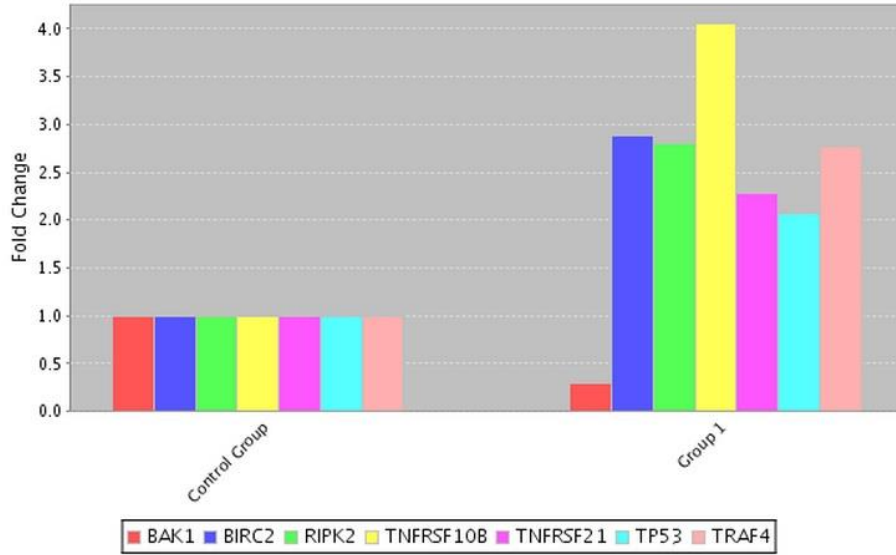


Şekil 3.22 Vulpinik asitle muamele edilmiş HepG2 hücrelerinde apoptotik yolak genleri ifadesinin ısı haritası

Şekil 3.23'te 2,5 kat değişimin eşik değeri olarak alındığında upregule/down regule olan genler plot/plot grafiğiyle elde edilmiştir. Bu genlerden apoptozla ilgili olanlarından *TP53*, *TNFRSF21*, *TRAF4*, *RIPK2*, *BIRC2*, *TNFRSF10B* genlerinin anlatımını kontrol grubuna göre 2 ile 4 kat arttırdığını *BAK1* anlatımını ise yarıdan daha az seviyeye düştüğü saptandı. Apoptozla ilgili olmayan ve 'housekeeping' geni olarak bilinen gerçek zamanlı PCR'da pozitif kontrol olarak kullanılan *ACTB* de de anlatımın kontrole göre arttığı belirlendi. Şekil 3.24'te ise bu genlerden apoptotik yolakla ilgili olanları kontrol ve test gruplarındaki anlatımseviyeleri göreceli olarak verilmektedir.



Şekil 3.23 Vulpinik asitle muamele edildiğinde upregule ve down regule olan genlerin plot/plot grafiğiyle sunumu (eşik değeri >2.5)



Şekil 3.24 Kontrol ve test grubu HepG2 hücrelerinde anlatımı değişen apoptotik yolak genleri

4 TARTIŞMA ve SONUÇ

4.1 Benzofuran Türevlerinin Normal ve Kanserli Hücreler Üzerinde Sitotoksik ve Bazı Mikroorganizmalar Üzerinde Antimikrobiyal Etkisi

MTT ve NK alımı testleri, benzofuran türevlerinin suda çözündüğünde yüksek derişimlerde bile (10000 μM) sitotoksik etkisinin olmadığını ve 500 $\mu\text{g/ml}$ 'ye kadar herhangi antimikrobiyal etkisinin olmadığını gösteren birbirini destekler bulgular verdi. Fakat başka benzofuran türevlerinin DMSO ile çözüldüğünde Hep-2 hücrelerine 72 saat muamelesinin 4-13 μM olan IC50 değeriyle önemli sitotoksik etkiye sahip olduğu bulunması bunun yanısıra (Huang ve ark., 2007), antibakteriyal (Jiang ve ark., 2011) ve antifungal (Gundogdu-Karaburun ve ark., 2006) etkilerinin de bulunması çözücünün toksisite üzerindeki etkisini ortaya koymaktadır. Literatürde benzofuran türevlerinin floresan özelliklerinin de bulunduğu belirtildiğinden (Sun ve ark., 2006; Yarasir ve ark., 2012; Ma ve ark., 2013) suda çözüldüğünde toksik olmadığı belirlenen aril (3-metil-benzofuran-2-il) keton türevlerinin difüzyon ve fotokimyasal özellikleri araştırıldıktan sonra hücre biyolojisi çalışmaları için kullanılabilirliği test edilebilir.

4.2 Vulpinik Asitin Normal ve Kanserli Hücreler Üzerinde Sitotoksik Etkisi

Vulpinik asitin her iki hücre hattına da benzer derecede toksik olduğu bulunmuştur. Tablo 3.1 ve 3.2'den anlaşıldığı gibi MTT testi ile NR alımı testi arasında önemli düzeyde korelasyon bulunmaktadır. Vulpinik asitin F2408'ler üzerinde MTT ve NR testleriyle tespit edilen IC50 değerleri sırasıyla 48 saatte 455,1 ve 515,2 μM seviyesindeyken 72 saatte 285,2 ve 313 μM 'dir. Literatüde 280 $\mu\text{g/ml}$ 'lik *Cetraria aculeata* liken ekstraktının F2408 hücrelerine 48 saat muamelesinin MTT ile belirlenen IC₅₀ değeri olduğu belirtilmiştir (Zeytinoglu ve ark., 2008). Vulpinik asit ile *Cetraria aculeata* liken ekstraktının IC50 değerleri karşılaştırıldığında vulpinik asitin F2408 hücreleri üzerine daha toksik olduğu gözükmetedir.

HepG2'ler üzerinde MTT ve NR testleriyle tespit edilen IC₅₀ değerleri sırasıyla 48 saatte 298,8 ve 413,7 µM seviyesindeyken 72 saatte 235,9 ve 297,8 µM'dır. HepG2'ler üzerinde vulpinik asitin ve liken ekstraktlarının etkisini belirlemeye yönelik bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Ancak MM98 malignant mezotelyoma, A431 karsinom ve HaCaT hücreleriyle gerçekleştirilen çalışmada nötral red alım testi sonucu sırasıyla 503, 76 ve 160 µM derişimlerdeki vulpinik asitin 24 saatlik muamelesinin IC₅₀ değeri olduğu belirtilmiştir (Burlando ve ark., 2009). Bu çalışmada 24 saatte anlamlı bir toksik etki gözlenmediği için HepG2 ve F2408 hücrelerinin MM98 malignant mezotelyoma, A431 karsinom ve HaCaT hücrelerine göre vulpinik asit sitotoksitesine daha dirençli olduğu ortaya çıkmaktadır.

Literatürde vulpinik asitin antimikrobiyal etkisinin incelendiği sonuçta farklı mikroorganizmalar için 3,8-31,5 µg/ml arasında değişen MİK değerlerinin tespit edildiği çalışmada bulunmaktadır (Nadir ve ark., 1992). Ayrıca vulpinik asitin bitki patojeni olan fungus büyümesini total liken ekstraktlarından daha fazla etkilediği gösterilmiştir (Kowalski ve ark., 2011).

4.3 Sisplatinin ve Siklopaminin Normal ve Kanserli Hücreler Üzerine Sitotoksik Etkisi

Pozitif kontrol olarak test edilen anti-kanser ajan olan sisplatinin HepG2 ve F2408 hücrelerindeki etkisi MTT ve NR testleri karşılaştırılarak incelendiğinde mitokondriyal faaliyete göre lizozomal zara daha çok zarar verdiği gözlemlenmiştir. Bu durum sisplatinin önce protein sentezine ardından NR alımına daha sonra da MTT dönüşümüne etkide bulunduğunu belirten önceki çalışmayla da (Leibbrandt ve ark., 1995) uyumludur.

Pozitif kontrol olarak test edilen diğer bir anti-kanser ajan olan siklopamin her iki hücre hattına da benzer şekilde toksik etki göstermektedir. Siklopamin toksisitesinin NR alımı veya MTT dönüşümü bakımından herhangi bir farklılık göstermediği her iki hücre hattında da gözlemlenen bir sonuçtur. Literatür araştırmasında siklopamin bu açıdan yaklaşan bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Vulpinik asitin her iki MTT dönüşümü ve NR alımı ile belirlenen toksisitesi arasında anlamlı bir fark olmadığından vulpinik asitin, sisplatin benzeri toksisiteden ziyade siklopamin gibi benzer etki gösterdiği düşünülmektedir.

4.4 Vulpinik Asitin HepG2’lerde Apoptotik Hücre Sayısına ve Apoptoz Yolağı Gen Anlatımına Etkisi

Her iki hücre hattına 48 saat boyunca uygulanan 200 µM’lık vulpinik asitin apoptotik hücre oranını % 50’ye çıkarması vulpinik asitin apoptotik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Gerçek zamanlı RT-PCR sonucu, HepG2 hücrelerine 48 saat uygulanan 100 µM vulpinik asitin *TP53*, *TNFRSF21*, *TRAF4*, *RIPK2*, *BIRC2*, *TNFRSF10B* genlerinde anlatımı kontrol grubuna göre 2 ile 4 kat arttığı *BAK1* geni anlatımını ise yarıdan daha az seviyeye düştüğü saptandı. Anlatımı değişen genlerin NCBI (National Centre For Biotechnology Information)’dan elde edilen bilgiler şunlardır

TNFRSF10B (tumor nekroz faktör reseptör süperaillesinin 10b üyesi, Gene ID:8795) gen ürünü TNF-reseptör süper ailesi üyelerindendir. Hücre içi ölüm domeni içeren bu gen ürünü TNSFF10/TRAIL/APO-2L gibi ligandlarla faaliyete geçer. DR5 olarakta bilinir. Apoptozun bu yolla tetiklenmesi için hücre içi FADD adaptör proteinine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu genin üç farklı transkriptinin ikisi farklı izoformlarda reseptör kodlarken üçüncü varyant kodlama yapmaz.

TNFRSF21 (tumor nekroz faktör reseptör süperaillesinin 21 üyesi, Gene ID:27242) gen ürünü TNF-reseptör süper ailesi üyelerindendir. DR6 olarakta bilinir. Bu reseptör NF-kappaB ve MAPK8/JNK’yı faaliyete geçirir ve apoptozu tetikler. Bu reseptör hücre içinde TRADD adaptör proteiniyle etkileşim kurar. Bu gen ürününün yardımcı T hücrelerinin faaliyete geçmesinde ve inflamasyon ile immün düzenlemede rol oynayabileceği düşünülmektedir.

TRAF4 (TNF reseptörleriyle ilişkili faktör 4, Gene ID:9618) gen ürünü TNF reseptörleriyle ilişkili faktörlerden biridir. TRAF proteinleri TNF reseptör süper ailesi proteinlerinden aldıkları sinyalin taşınmasına aracılık eder. Bu proteinin p75’e (NTR/NTSR1, nörotrofin reseptörü) bağlanarak NTR ile uyarılmış hücre

ölümünü ve NFkappa B faaliyete geçişine olumsuz etkide bulunduğu gösterilmiştir. Bu proteinin MAPK8/JNK'nın oksidatif faaliyete geçmesinde rol oynadığı düşünülmektedir.

RIPK2 (reseptörle etkileşen serin-triyonin kinaz 2, Gene ID:8767) gen ürünü serin-triyonin protein kinazların reseptörle etkileşen protein ailesi üyelerindendir. Bu gen ürünü C-uç bölgesinde CARD domeni içerir. NFkappaB etkinleştirici ve değişik etkenlere cevap olarak apoptozu uyarıcı rolü vardır.

BIRC2 (baculaviral IAP tekrarı içeren 2, Gene ID:329) geninin kodladığı protein TNF reseptörleriyle ilişkili faktörlere (TRAF1, TRAF2) bağlanır ve onları inhibe ederek apoptozu engeller. Bu protein serum yokluğunda ve serbest radikal artırıcı menadione varlığında indüklenerek apoptozu engeller.

TP53 (tumor protein p53, Gene ID:7157) gen ürünü transkripsiyon başlatıcı, DNA bağlanma ve oligomerizasyon domenlerine sahip tümör baskılayıcı protein üretir. Bu protein çeşitli hücrel streslere karşı hedef genlerin anlatımını düzenleyerek hücre döngüsünün tutklanması, apoptoz, senescence, DNA tamiri veya metabolik değişim gibi olayları tetikler.

BAK1 (BCL2-antagonist/killer 1, Gene ID:578) gen ürünü BCL2 protein ailesine aittir. Bu protein mitokondriye yerleşerek apoptozu tetiklemede iş görür. Mitokondriyal voltaj bağımlı anyon kanallarıyla etkileşerek zar potansiyelinin kaybına ve sitokrom c salınımına neden olur. Hücrelerde strese bağlı olarak bu proteinin P53'le etkileştiği bilinmektedir.

Liken asiti olan vicanicin ve protolichesterinik asitin LNCaP ve DU-145 hücrelerinde BAX/BCL-2 protein oranını artırarak hücrelerde apoptozu neden olduğu gösterilmiştir (Russo ve ark., 2012). Ayrıca diğer bir liken asiti olan retigerik asit B'nin prostat kanseri hücre hatlarında *BCL-2* gen anlatımını azaltarak apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (Liu ve ark., 2010). Literatürde liken asitlerinin yukarıda belirtildiği gibi *BAX* ve *BCL-2* gen anlatımlarında değişiklikler yaparak hücreleri apoptozu yönelttiği belirtilirken bu çalışmada vulpinik asitin *BAX* ve *BCL-2* gen anlatımlarında herhangi bir değişiklik yapmaması, dahası önemli bir apoptoz

tetikleyicisi olan *BAK1* geni anlatımını azaltmış olması literatürle çelişmektedir. Fakat vulpinik asit muamelesiyle *p53*, *TNFRSF10B*, *TNFRSF21*, *TRAF4* genleri anlatımında meydana gelen artış apoptozun moleküler sebeplerinden olabilir. Literatürde liken ekstraktlarının bu genlerdeki anlatım düzeyini inceleyen bir çalışmaya rastlanmadığı için bu konu ancak sonraki çalışmalarla netleşecektir.

Vulpinik asit muamelesiyle hücrelerde anlatımı değişen genler dikkate alındığında HepG2'lerde hem dışsal yolak aracılığıyla gerçekleşen apoptoz *TNFRSF10B*, *TNFRSF21*, *TRAF4*, gen anlatımını artırdığı hem de bu yolağın negatif düzenleyicilerinden olan *RIPK2*, *BIRC2* geninde anlatımı artırdığı bulunmuştur. Ayrıca önemli bir tümör baskılayıcı protein olan TP53 anlatımının arttığı fakat bu proteinin transkripsiyon faktörü olarak çalıştığı bilinen (Graupner ve ark., 2011) *BAK1* geninde anlatımın azaldığı belirlenmiştir. Bu bulguların protein düzeyindeki çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak bu bulgulara göre vulpinik asitin HepG2 hücreleri için apoptozu TP53 geninde anlatımı artırarak tetiklediği söylenebilir. Fakat bundan daha ilginç olanı vulpinik asitin dışsal apoptoz yolağında iş gören proteinlerin anlatımını da artırmasıdır. Bu durumun nasıl gerçekleştiği ve vulpinik asitle birlikte *TNFRSF10B*, *TNFRSF21* agonistlerinin birlikte kullanımının karaciğer kanserinde apoptozu daha çok etkinleştirebilecek bir yaklaşım olup olmadığı sonraki çalışmalarla belirlenebilecek araştırmaya değer bir konudur.

KAYNAKLAR

- Ahmadjian, V. ve Hale, M. E. (1973), *The lichens*, New York, Academic Press.
- Akiyama, T. (2000), "Wnt/beta-catenin signaling" *Cytokine Growth Factor Rev* **11**(4): 273-282.
- Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts ve Walter (2008), *Molecular Biology of the Cell*.
- Andreotti, P. E., Cree, I. A., Kurbacher, C. M., Hartmann, D. M., Linder, D., Harel, G., Gleiberman, I., Caruso, P. A., Ricks, S. H., Untch, M. ve et al. (1995), "Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma" *Cancer Res* **55**(22): 5276-5282.
- Asoh, K., Kohchi, M., Hyoudoh, I., Ohtsuka, T., Masubuchi, M., Kawasaki, K., Ebike, H., Shiratori, Y., Fukami, T. A., Kondoh, O., Tsukaguchi, T., Ishii, N., Aoki, Y., Shimma, N. ve Sakaitani, M. (2009), "Synthesis and structure-activity relationships of novel benzofuran farnesyltransferase inhibitors" *Bioorg Med Chem Lett* **19**(6): 1753-1757.
- Barile, F. A. (1994), "Introduction to In Vitro Cytotoxicology Mechanisms and Methods", Boca Raton, FL CRC Press: 34-48.
- Basset-Seguin, N., Moles, J. P., Mils, V., Dereure, O. ve Guilhou, J. J. (1994), "TP53 tumor suppressor gene and skin carcinogenesis" *J Invest Dermatol* **103**(5 Suppl): 102S-106S.
- Beck, J. ve Nassal, M. (2007), "Hepatitis B virus replication" *World J Gastroenterol* **13**(1): 48-64.
- Benkli, K., Gundogdu-Karaburun, N., Karaburun, A. C., Ucucu, U., Demirayak, S. ve Kiraz, N. (2003), "Synthesis and antifungal activities of some aryl (3-methyl-benzofuran-2-yl) ketoximes" *Arch Pharm Res* **26**(3): 202-206.

- Bertheau, P., Espie, M., Turpin, E., Lehmann, J., Plassa, L. F., Varna, M., Janin, A. ve de The, H. (2008), "TP53 status and response to chemotherapy in breast cancer" *Pathobiology* **75**(2): 132-139.
- Bluteau, O., Jeannot, E., Bioulac-Sage, P., Marques, J. M., Blanc, J. F., Bui, H., Beaudoin, J. C., Franco, D., Balabaud, C., Laurent-Puig, P. ve Zucman-Rossi, J. (2002), "Bi-allelic inactivation of TCF1 in hepatic adenomas" *Nat Genet* **32**(2): 312-315.
- Borenfreund, E. ve Puerner, J. A. (1985), "Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption" *Toxicol Lett* **24**(2-3): 119-124.
- Brechot, C., Kremsdorf, D., Soussan, P., Pineau, P., Dejean, A., Paterlini-Brechot, P. ve Tiollais, P. (2010), "Hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC): molecular mechanisms and novel paradigms" *Pathol Biol (Paris)* **58**(4): 278-287.
- Burlando, B., Ranzato, E., Volante, A., Appendino, G., Pollastro, F. ve Verotta, L. (2009), "Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds" *Planta Med* **75**(6): 607-613.
- Celis, J. E. (2006), *Cell biology: a laboratory handbook*, Elsevier Academic.
- Chen, Z. F., Mao, L., Liu, L. M., Liu, Y. C., Peng, Y., Hong, X., Wang, H. H., Liu, H. G. ve Liang, H. (2011), "Potential new inorganic antitumour agents from combining the anticancer traditional Chinese medicine (TCM) matrine with Ga(III), Au(III), Sn(IV) ions, and DNA binding studies" *J Inorg Biochem* **105**(2): 171-180.
- Cho, C. H., Neuenswander, B., Lushington, G. H. ve Larock, R. C. (2008), "Parallel synthesis of a multi-substituted benzo[b]furan library" *J Comb Chem* **10**(6): 941-947.

- De Luca, L., Nieddu, G., Porcheddu, A. ve Giacomelli, G. (2009), "Some recent approaches to the synthesis of 2-substituted benzofurans" *Curr Med Chem* **16**(1): 1-20.
- Dehn, P. F., White, C. M., Conners, D. E., Shipkey, G. ve Cumbo, T. A. (2004), "Characterization of the human hepatocellular carcinoma (hepg2) cell line as an in vitro model for cadmium toxicity studies" *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **40**(5-6): 172-182.
- Doehn, U., Hauge, C., Frank, S. R., Jensen, C. J., Duda, K., Nielsen, J. V., Cohen, M. S., Johansen, J. V., Winther, B. R., Lund, L. R., Winther, O., Taunton, J., Hansen, S. H. ve Frodin, M. (2009), "RSK is a principal effector of the RAS-ERK pathway for eliciting a coordinate promotile/invasive gene program and phenotype in epithelial cells" *Mol Cell* **35**(4): 511-522.
- Edkins, S., O'Meara, S., Parker, A., Stevens, C., Reis, M., Jones, S., Greenman, C., Davies, H., Dalgliesh, G., Forbes, S., Hunter, C., Smith, R., Stephens, P., Goldstraw, P., Nicholson, A., Chan, T. L., Velculescu, V. E., Yuen, S. T., Leung, S. Y., Stratton, M. R. ve Futreal, P. A. (2006), "Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer" *Cancer Biol Ther* **5**(8): 928-932.
- Elsharkawy, A. M. ve Mann, D. A. (2007), "Nuclear factor-kappaB and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis" *Hepatology* **46**(2): 590-597.
- Erber, S., Ringshandl, R. ve von Angerer, E. (1991), "2-Phenylbenzo[b]furans: relationship between structure, estrogen receptor affinity and cytostatic activity against mammary tumor cells" *Anticancer Drug Des* **6**(5): 417-426.
- Ferber, M. J., Montoya, D. P., Yu, C., Aderca, I., McGee, A., Thorland, E. C., Nagorney, D. M., Gostout, B. S., Burgart, L. J., Boix, L., Bruix, J., McMahon, B. J., Cheung, T. H., Chung, T. K. H., Wong, Y. F., Smith, D. I. ve Roberts, L. R. (2003), "Integrations of the hepatitis B virus (HBV) and human papillomavirus (HPV) into the human telomerase reverse

transcriptase (hTERT) gene in liver and cervical cancers" *Oncogene* **22**(24): 3813-3820.

Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. ve Parkin, D. M. (2010), "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008" *Int J Cancer* **127**(12): 2893-2917.

Fotakis, G. ve Timbrell, J. A. (2006), "In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride" *Toxicol Lett* **160**(2): 171-177.

Frau, M., Biasi, F., Feo, F. ve Pascale, R. M. (2010), "Prognostic markers and putative therapeutic targets for hepatocellular carcinoma" *Mol Aspects Med* **31**(2): 179-193.

Friedman, S. L. (2010), "Evolving challenges in hepatic fibrosis" *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **7**(8): 425-436.

Galun, M. (1988), *CRC Handbook of Lichenology*, Florida, CRC Press.

Gauthier, A. ve Ho, M. (2013), "Role of sorafenib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: An update" *Hepatol Res* **43**(2): 147-154.

Giannelli, G., Mazzocca, A., Fransvea, E., Lahn, M. ve Antonaci, S. (2011), "Inhibiting TGF-beta signaling in hepatocellular carcinoma" *Biochim Biophys Acta* **1815**(2): 214-223.

Gouas, D., Shi, H. ve Hainaut, P. (2009), "The aflatoxin-induced TP53 mutation at codon 249 (R249S): biomarker of exposure, early detection and target for therapy" *Cancer Lett* **286**(1): 29-37.

Graupner, V., Alexander, E., Overkamp, T., Rothfuss, O., De Laurenzi, V., Gillissen, B. F., Daniel, P. T., Schulze-Osthoff, K. ve Essmann, F. (2011), "Differential regulation of the proapoptotic multidomain protein Bak by p53 and p73 at the promoter level" *Cell Death Differ* **18**(7): 1130-1139.

- Gundogdu-Karaburun, N., Benkli, K., Tunali, Y., Ucucu, U. ve Demirayak, S. (2006), "Synthesis and antifungal activities of some aryl [3-(imidazol-1-yl/triazol-1-ylmethyl) benzofuran-2-yl] ketoximes" *Eur J Med Chem* **41**(5): 651-656.
- Hatzia Apostolou, M., Polytarchou, C., Aggelidou, E., Drakaki, A., Poultides, G. A., Jaeger, S. A., Ogata, H., Karin, M., Struhl, K., Hadzopoulou-Cladaras, M. ve Iliopoulos, D. (2011), "An HNF4alpha-miRNA inflammatory feedback circuit regulates hepatocellular oncogenesis" *Cell* **147**(6): 1233-1247.
- Hautekeete, M. L. ve Geerts, A. (1997), "The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease" *Virchows Arch* **430**(3): 195-207.
- Herceg, Z. ve Paliwal, A. (2011), "Epigenetic mechanisms in hepatocellular carcinoma: how environmental factors influence the epigenome" *Mutat Res* **727**(3): 55-61.
- Hollstein, M. ve Hainaut, P. (2010), "Massively regulated genes: the example of TP53" *J Pathol* **220**(2): 164-173.
- Hopker, K. ve Reinhardt, H. C. (2013), "[p53-regulating pathways as targets for personalized cancer therapy]" *Dtsch Med Wochenschr* **138**(3): 82-86.
- Horikawa, I. ve Barrett, J. C. (2003), "Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms" *Carcinogenesis* **24**(7): 1167-1176.
- Huang, F. I., Chen, Y. L., Chang, C. N., Yuan, R. H. ve Jeng, Y. M. (2012), "Hepatocyte growth factor activates Wnt pathway by transcriptional activation of LEF1 to facilitate tumor invasion" *Carcinogenesis* **33**(6): 1142-1148.
- Huang, W., Liu, M. Z., Li, Y., Tan, Y. ve Yang, G. F. (2007), "Design, syntheses, and antitumor activity of novel chromone and aurone derivatives" *Bioorg Med Chem* **15**(15): 5191-5197.

- Incesu, Z., Benkli, K., Akalin, G. ve Kaplancikli, Z. A. (2004), "Modification of intracellular free calcium in cultured F2408 embryo fibroblasts by 3-substituted-2-thiohydantoin derivatives" *Cell Biol Int* **28**(4): 267-272.
- Institute, C. a. L. S. (2006) *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard*.
- Jiang, X., Liu, W., Zhang, W., Jiang, F., Gao, Z., Zhuang, H. ve Fu, L. (2011), "Synthesis and antimicrobial evaluation of new benzofuran derivatives" *Eur J Med Chem* **46**(8): 3526-3530.
- Jomova, K. ve Valko, M. (2011), "Importance of iron chelation in free radical-induced oxidative stress and human disease" *Curr Pharm Des* **17**(31): 3460-3473.
- Kang, M. H. ve Reynolds, C. P. (2009), "Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy" *Clin Cancer Res* **15**(4): 1126-1132.
- Karnoub, A. E. ve Weinberg, R. A. (2008), "Ras oncogenes: split personalities" *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(7): 517-531.
- Kasibhatla, S., Amarante-Mendes, G. P., Finucane, D., Brunner, T., Bossy-Wetzel, E. ve Green, D. R. (2006), *Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis*.
- Kew, M. C. (2011), "Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma" *J Gastroenterol Hepatol* **26 Suppl 1**: 144-152.
- Kishnani, P. S., Chuang, T. P., Bali, D., Koeberl, D., Austin, S., Weinstein, D. A., Murphy, E., Chen, Y. T., Boyette, K., Liu, C. H. ve Li, L. H. (2009), "Chromosomal and genetic alterations in human hepatocellular adenomas associated with type Ia glycogen storage disease" *Hum Mol Genet* **18**(24): 4781-4790.

- Kowalski, M., Hausner, G. ve Piercey-Normore, M. D. (2011), "Bioactivity of secondary metabolites and thallus extracts from lichen fungi" *Mycoscience* **52**(6): 413-418.
- Laurent-Puig, P. ve Zucman-Rossi, J. (2006), "Genetics of hepatocellular tumors" *Oncogene* **25**(27): 3778-3786.
- Ledda, F. ve Paratcha, G. (2007), "Negative Regulation of Receptor Tyrosine Kinase (RTK) Signaling: A Developing Field" *Biomark Insights* **2**: 45-58.
- Lee, S. K., Cui, B., Mehta, R. R., Kinghorn, A. D. ve Pezzuto, J. M. (1998), "Cytostatic mechanism and antitumor potential of novel 1H-cyclopenta[b]benzofuran lignans isolated from *Aglaia elliptica*" *Chem Biol Interact* **115**(3): 215-228.
- Leibbrandt, M. E., Wolfgang, G. H., Metz, A. L., Ozobia, A. A. ve Haskins, J. R. (1995), "Critical subcellular targets of cisplatin and related platinum analogs in rat renal proximal tubule cells" *Kidney Int* **48**(3): 761-770.
- Leong, T. Y. ve Leong, A. S. (2005), "Epidemiology and carcinogenesis of hepatocellular carcinoma" *HPB (Oxford)* **7**(1): 5-15.
- Liebmann, C. (2001), "Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity" *Cell Signal* **13**(11): 777-785.
- Lin, X., Liu, M., Hu, C. ve Liao, D. J. (2010), "Targeting cellular proapoptotic molecules for developing anticancer agents from marine sources" *Curr Drug Targets* **11**(6): 708-715.
- Lin, Y., Shi, C. Y., Li, B., Soo, B. H., Mohammed-Ali, S., Wee, A., Oon, C. J., Mack, P. O. ve Chan, S. H. (1996), "Tumour suppressor p53 and Rb genes in human hepatocellular carcinoma" *Ann Acad Med Singapore* **25**(1): 22-30.

- Liu, H., Liu, Y., Xu, A. ve HQ., Y. (2010), "A novel anticancer agent, retigeric acid B, displays proliferation inhibition, S phase arrest and apoptosis activation in human prostate cancer cells" *Chem Biol Interact* **188**: 598-606.
- Lotfi, C. F., Lepique, A. P., Forti, F. L., Schwindt, T. T., Eichler, C. B., Santos, M. O., Rebustini, I. T., Hajj, G. N., Juliano, L. ve Armelin, H. A. (2000), "Proliferative signaling initiated in ACTH receptors" *Braz J Med Biol Res* **33**(10): 1133-1140.
- Ma, L., Sun, Y., Cao, D., Chen, H., Liu, Z. ve Fang, Q. (2013), "Synthesis, crystal structure and two-photon excited fluorescence properties of three aurone derivatives" *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **103**: 120-124.
- Malamas, M. S., Sredy, J., Moxham, C., Katz, A., Xu, W., McDevitt, R., Adebayo, F. O., Sawicki, D. R., Seestaller, L., Sullivan, D. ve Taylor, J. R. (2000), "Novel benzofuran and benzothiophene biphenyls as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B with antihyperglycemic properties" *J Med Chem* **43**(7): 1293-1310.
- Martinez, M. M., Reif, R. D. ve Pappas, D. (2010), "Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques" *Analytical Methods* **2**(8): 996-1004.
- Molnar, K. ve Farkas, E. (2010), "Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review" *Z Naturforsch C* **65**(3-4): 157-173.
- Mosmann, T. (1983), "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays" *J Immunol Methods* **65**(1-2): 55-63.
- Muller, K. (2001), "Pharmaceutically relevant metabolites from lichens" *Appl Microbiol Biotechnol* **56**(1-2): 9-16.
- Nadir, M. T., Rashan, L. J., Ayoub, M. T. ve Awni, L. T. (1992), "Antibacterial and antiproliferative activities of vulpinic acids in vitro" *Farmaco* **47**(5): 643-647.

- Nalesnik, M. A. ve Michalopoulos, G. K. (2012), "Growth factor pathways in development and progression of hepatocellular carcinoma" *Front Biosci (Schol Ed)* **4**: 1487-1515.
- NCBI, National Centre For Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nih.gov/>
- NICEATM. (2003). *Test Method Protocol for the NHK Neutral Red uptake Cytotoxicity Test. A Test for Basal Cytotoxicity for an In Vitro Validation Study* Phase III. <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/invidocs/phIIIprot/nhkphIII.pdf>.
- Pamonsinlapatham, P., Hadj-Slimane, R., Lepelletier, Y., Allain, B., Toccafondi, M., Garbay, C. ve Raynaud, F. (2009), "p120-Ras GTPase activating protein (RasGAP): a multi-interacting protein in downstream signaling" *Biochimie* **91**(3): 320-328.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. ve Pisani, P. (2001), "Estimating the world cancer burden: GLOBOCAN 2000" *International Journal of Cancer* **94**(2): 153-156.
- Pautus, S., Yee, S. W., Jayne, M., Coogan, M. P. ve Simons, C. (2006), "Synthesis and CYP26A1 inhibitory activity of 1-[benzofuran-2-yl-(4-alkyl/aryl-phenyl)-methyl]-1H-triazoles" *Bioorg Med Chem* **14**(11): 3643-3653.
- Purohit, V., Rapaka, R., Kwon, O. S. ve Song, B. J. (2012), "Roles of alcohol and tobacco exposure in the development of hepatocellular carcinoma" *Life Sci.*
- Rauf, S. M., Ismael, M., Sahu, K. K., Suzuki, A., Koyama, M., Tsuboi, H., Hatakeyama, N., Endou, A., Takaba, H., Del Carpio, C. A., Kubo, M. ve Miyamoto, A. (2010), "The effect of R249S carcinogenic and H168R-R249S suppressor mutations on p53-DNA interaction, a multi scale computational study" *Comput Biol Med* **40**(5): 498-508.
- Reinmuth, N., Meister, M., Muley, T., Steins, M., Kreuter, M., Herth, F. J., Hoffmann, H., Dienemann, H. ve Thomas, M. (2006), "Molecular

determinants of response to RTK-targeting agents in nonsmall cell lung cancer" *Int J Cancer* **119**(4): 727-734.

Ren, B., Yee, K. O., Lawler, J. ve Khosravi-Far, R. (2006), "Regulation of tumor angiogenesis by thrombospondin-1" *Biochim Biophys Acta* **1765**(2): 178-188.

Russo, A., Caggia, S., Piovano, M., Garbarino, J. ve Cardile, V. (2012), "Effect of vicanicin and protolichesterinic acid on human prostate cancer cells: role of Hsp70 protein" *Chem Biol Interact* **195**(1): 1-10.

Saberi, M. R., Vinh, T. K., Yee, S. W., Griffiths, B. J., Evans, P. J. ve Simons, C. (2006), "Potent CYP19 (aromatase) 1-[(benzofuran-2-yl)(phenylmethyl)pyridine, -imidazole, and -triazole inhibitors: synthesis and biological evaluation" *J Med Chem* **49**(3): 1016-1022.

Sambrook, J. J. ve Russell, D. D. W. (2001), *Molecular cloning: a laboratory manual. Vol. 2*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schott, E., Ebert, M. P. ve Trojan, J. (2012), "Treatment of hepatocellular carcinoma with sorafenib - focus on special populations and adverse event management" *Z Gastroenterol* **50**(9): 1018-1027.

Schulz, W. A. (2005), "Molecular biology of human cancers: an advanced student's textbook", Springer: 328-339.

Seitz, S. J., Schleithoff, E. S., Koch, A., Schuster, A., Teufel, A., Staib, F., Stremmel, W., Melino, G., Krammer, P. H., Schilling, T. ve Muller, M. (2010), "Chemotherapy-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves the p53 family and is mediated via the extrinsic and the intrinsic pathway" *Int J Cancer* **126**(9): 2049-2066.

Shiraha, H., Yamamoto, K. ve Namba, M. (2013), "Human hepatocyte carcinogenesis (review)" *Int J Oncol* **42**(4): 1133-1138.

- Subramaniam, A., Shanmugam, M. K., Perumal, E., Li, F., Nachiyappan, A., Dai, X., Swamy, S. N., Ahn, K. S., Kumar, A. P., Tan, B. K., Hui, K. M. ve Sethi, G. (2013), "Potential role of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 signaling pathway in inflammation, survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma" *Biochim Biophys Acta* **1835**(1): 46-60.
- Sun, Y. Y., Liao, J. H., Fang, J. M., Chou, P. T., Shen, C. H., Hsu, C. W. ve Chen, L. C. (2006), "Fluorescent organic nanoparticles of benzofuran-naphthylidine linked molecules: formation and fluorescence enhancement in aqueous media" *Org Lett* **8**(17): 3713-3716.
- Tang, W. M., Chan, E., Kwok, C. Y., Lee, Y. K., Wu, J. H., Wan, C. W., Chan, R. Y., Yu, P. H. ve Chan, S. W. (2012), "A review of the anticancer and immunomodulatory effects of *Lycium barbarum* fruit" *Inflammopharmacology* **20**(6): 307-314.
- Tavian, D., De Petro, G., Benetti, A., Portolani, N., Giulini, S. M. ve Barlati, S. (2000), "u-PA and c-MET mRNA expression is co-ordinately enhanced while hepatocyte growth factor mRNA is down-regulated in human hepatocellular carcinoma" *Int J Cancer* **87**(5): 644-649.
- Taylor, W. R. ve Stark, G. R. (2001), "Regulation of the G2/M transition by p53" *Oncogene* **20**(15): 1803-1815.
- Unlu, M., Ergene, E., Unlu, G. V., Zeytinoglu, H. S. ve Vural, N. (2010), "Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae)" *Food Chem Toxicol* **48**(11): 3274-3280.
- Wilkins, J. A. ve Sansom, O. J. (2008), "C-Myc is a critical mediator of the phenotypes of Apc loss in the intestine" *Cancer Res* **68**(13): 4963-4966.
- Wortzel, I. ve Seger, R. (2011), "The ERK Cascade: Distinct functions within various subcellular organelles" *Genes Cancer* **2**(3): 195-209.

- Wu, J. ve Zhu, A. X. (2011), "Targeting insulin-like growth factor axis in hepatocellular carcinoma" *J Hematol Oncol* **4**: 30.
- Xue, M., Cao, X., Zhong, Y., Kuang, D., Liu, X., Zhao, Z. ve Li, H. (2012), "Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) kinase inhibitors in cancer therapy: advances and perspectives" *Curr Pharm Des* **18**(20): 2901-2913.
- Yang, T. J., Haimovitz-Friedman, A. ve Verheij, M. (2012), "Anticancer therapy and apoptosis imaging" *Exp Oncol* **34**(3): 269-276.
- Yarasir, M. N., Kandaz, M., Guney, O. ve Salih, B. (2012), "Synthesis and photophysical properties of metallophthalocyanines substituted with a benzofuran based fluoroprobe" *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **93C**: 379-383.
- Yu, H. ve Rohan, T. (2000), "Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression" *J Natl Cancer Inst* **92**(18): 1472-1489.
- Zeytinoglu, H., Incesu, Z., Tuylu, B. A., Turk, A. O. ve Barutca, B. (2008), "Determination of genotoxic, antigenotoxic and cytotoxic potential of the extract from lichen *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr. in vitro" *Phytotherapy Research* **22**(1): 118-123.