

**DOKSORUBİSİN'İN HEPATOSELLÜLER
KARSİNOMADAKİ ANTİTÜMÖR ETKİSİNDE
KAEMPFEROL'ÜN ROLÜ**

Yüksek Lisans Tezi

EMİNE ERDAĞ
Eskişehir, 2016

**DOKSORUBİSİN'İN HEPATOSELLÜLER
KARSİNOMADAKİ ANTİTÜMÖR ETKİSİNDE
KAEMPFEROL'ÜN ROLÜ**

Emine ERDAĞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Yrd. Doç. Dr. Emel ERGENE

Eskişehir Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
EYLÜL, 2016

*Bu Tez Çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1309F333
no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.*

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Emine ERDAĞ'ın “**Doksorubisin'in** hepatosellüler karsinomadaki antitümör etkisinde **kaempferol'ün rolü**” başlıklı tezi 23/09/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, **Biyoloji** Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı-Adı

Soyadı İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Yrd. Doç. Dr. Emel ERGENE

.....

Üye : Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL

.....

Üye : Doç. Dr. Asuman DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

.....

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DOKSORUBİSİN'İN HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADAKİ ANTİTÜMÖR ETKİSİNDE KAEMPFEROL'ÜN ROLÜ

Emine ERDAĞ

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, Kasım, 2016

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yard.Doç. Dr. Emel ERGENE

Hepatoselülerkarsinoma (HCC), genel olarak kronik karaciğer hastalığında görülen bir tümördür. Dünyada yaygın beşincisi, kansere bağlı ölümlerin üçüncü önemli nedenidir. Günümüzde, antrasiklinler, kanser tedavisinde önemli bir yer tutmaktadır ve alternatifler gibi görünmektedir. HCC gibi çoğu tümörün tedavisinde ve yan etkilerinin azaltılmasına yönelik çalışmalar oldukça önemlidir. Bu çalışmada, bir flavonoid Kaempferol (Kaem)'ün, Doksorubisin'in (Dox) anti-tümör etkisini arttırıcı ve yan etkilerini azaltıcı etkileri Hep-G2 hücre hattında araştırılmıştır. Bu amaçla, Dox, Kaem ve kombinasyonların hücrelerdeki sitotoksik etkileri MTT testiyle belirlenmiştir. Ayrıca, bazı biyolojik aktiviteleri de çeşitli yöntemlerle analiz edilmiştir. Morfolojik apoptotik etkileri Akridin Oranj/Etidium Bromid (AO/EB) çift boyamayla, apoptotik etkiler; erken apoptozda membranda değişiklikleri Annexin V-FITC Flowsitometrik analizle, hücre döngüsü analiz flow sitometrik yöntemle ve Kaspaz 3-9 enzim aktivasyonları da kolorimetrik ölçümle yapılmıştır. Hep-G2 canlılığında doza ve zamana bağlı azalma gözlenmiştir. 48. saatteki IC₅₀ değerleri, Dox için 0,5 µM, Kaempferol için 100 µM olarak belirlenmiştir. Test bileşenlerinin uygulanmasının ardından, her iki bileşen ve kombinasyonun etkisiyle apoptotik indeksde anlamlı artış gözlenmiştir. Hücre döngüsü analizinde, Dox ve Kaempferol tek başına uygulandığında G2'de tutuklu hücre oranı nispeten düşük olmasına karşın kombine uygulandığında, hücrelerin G2 evresinde yüksek oranda tutuklandığı tespit edilmiştir. Annexin sonuçlarında ise 1 µM Dox ve 150 µM Kaempferol kombinasyon dozunda erken apoptotik hücre sayısı oldukça dikkat çekmiştir. Son olarak; kombinasyon dozlarının Kaspaz 3 enzim aktivitesini arttırdığı saptanmıştır. Kaempferol'ün hücreyi Doksorubisin'in yan etkilerinden koruduğu, aynı zamanda anti-tümör etkiyi de arttırdığı düşünülmüştür. Sonuç olarak, HCC'nin etkin tedavisinde Kaempferol potansiyel bir ilaçtır.

Anahtar Kelimeler: Hepatoselüler Karsinoma, Doksorubisin, Kaempferol, sitotoksikite, apoptoz

ABSTRACT

Master of Science Thesis

Emine ERDAĞ

Anadolu University

Graduate School of Sciences, November, 2016

Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Emel ERGENE

Liver cancer or hepatocellular carcinoma (HCC) is primary tumor seen with chronic liver disease in general. The fifth common type of cancer in the world and the third major cause of cancer-related deaths worldwide. Nowadays, there are new developments in treatment of chronic disease and anthracyclines has an important place in the treatment of cancer. Anthracyclines seems to be any alternative in the treatment of many tumors, such as hepatocellular carcinoma and efforts to reduce its side effects are also very important. In this study, we investigated that a flavonoid Kaempferol (Kaem)'s role enhancing anti-tumor effect and educing the side effects of Doxorubicin (Dox) on Hep-G2 cell lines.

The cytotoxic effect of independent and combined of Dox and Kaempferol was determined by MTT assay and also some biological activities were measured with some methods, morphological effects of apoptosis by AO/EB double staining, apoptotic membran by Annexin V-FITC flowcytometer method, cell cycle analysis by flow cytometric analysis, Caspase 3 and -9 activities by colorimetrically. In results, Hep-G2 cell viability was decreased dose and time-dependent. IC₅₀ values were determined in 48 hours, 0,5 and 100 μ M for Kaem and Dox, respectively. After exposure of the test compounds, Dox, Kaem and combinations were caused to increase apoptotic index significantly. In cell cycle analysis, When Dox and Kaempferol applied independently, G2-arrested cell ratio is relatively low. In contrast, when applied in combination, the ratio of G2-arrested cells were found to be very high. According to results of Annexin V-FITC flowcytometer analysis, the number of early apoptotic cells have attracted attention in combination treatment (1 μ M Dox+150 μ M). In another analysis, It was determined that all of the combination doses increased the caspase 3 enzyme activity. Finally, we commented Kaempferol preserved cells against Doxorubicin-dependent side effects also increase anti-tumor effect. Kaempferol is a potential drug both combination and independently for the effective treatment of HCC.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, Doxorubicin, Kaempferol, cytotoxicity, apoptosis.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, bilgi ve tecrübelerini hoşgörü ve sabırla benimle paylaşan, özveri ile her daim desteğini esirgemeyen, değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Emel ERGENE'ye çok teşekkür ederim.

Hücre kültürü laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Hülya SİVAS ve Sayın Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL'a teşekkürü bir borç bilirim.

Akademide Biyolojinin temel eğitimini aldığım, bu yolda yürümeye karar verdiren, üzerimde emeği ve hakkı olan Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümündeki kıymetli lisans hocalarıma gönülden teşekkür ederim.

Labaratuvar çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan, sonsuz destekleri ile güç veren değerli arkadaşlarım Betül MÜJDECİ, Reyhan VAROL, Oğuzhan KARAOSMANOĞLU, Handan EMİŞOĞLU, Banu BARUTCA ve Tülin KORKMAZ'a; flow sitometri çalışmalarında bana yardımcı olan sevgili Şennur GÖRGÜLÜ' ye çok teşekkür ederim.

Ve son olarak, şefkat ve merhamet ile her daim yolumu aydınlatan Annem ve Babama ve de kardeşlerime minnetlerimle...

....../....../20....

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

.....
(İmza)

.....
(Adı-Soyadı)

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI.	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Hepatoselüler Karsinoma ve Risk Faktörleri	3
1.2. Hepatoselüler Karsinomanın Moleküler Mekanizması.....	5
1.3. Hepatosellüler Karsinoma'nın Tedavi Yaklaşımları	9
1.4. Kaempferol ve Biyolojik Özellikleri.....	11
1.5. Dokсорubisin ve Biyolojik Özellikleri	12
1.6. Hücre Ölüm Mekanizmaları.....	15
1.6.1. Kaspazlar	18
1.6.2. Apoptoz Mekanizmaları	20

1.7. Hücre Döngüsü ve Kanser	22
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	25
2.2. Test Maddelerinin Hazırlanması	25
2.3. Yöntem.....	26
2.3.1. Hücre Kültürü.....	26
2.3.2. Hücre canlılığı ve proliferasyonunun belirlenmesi	26
2.3.3. Apoptotik etkinin belirlenmesi.....	27
2.3.3.1. Akridin oranj/etidyum bromid (AO/EB) çift boyama	27
2.3.3.2. Kaspaz 3-9 enzim aktivasyonunun belirlenmesi	28
2.3.3.3. Anneksin V/FITC -PI boyama yöntemi ile apoptoz analizi ...	28
2.3.3.4. Hücre döngüsü analizi	29
2.3.4. İstatistiksel Analiz	30
3. BULGULAR.....	30
3.1. Hücre canlılığı ve Sitotoksite Analizleri	30
3.1.1. Doksorubisin'in Hep-G2 Hücreleri üzerine sitotoksik etkisi	30
3.1.2. Kaempferol'ün Hep-G2 Hücreleri üzerine sitotoksik etkisi	31
3.1.3. Kombinasyonların Hep-G2 Hücreleri üzerine sitotoksik etkisi	32
3.2. Hep-G2 Hücrelerinde Apoptotik Morfoloji	33
3.3. Hep-G2 Hücrelerinde Hücre Döngüsü Analizi	39
3.3.1 Doksorubisin	40
3.3.2. Kaempferol	42
3.3.3. Doksorubisin ve Kaempferol Kombinasyonu	43
3.4. Hep-G2 Hücrelerinde Anneksin V/FITC-PI Analizi	45
3.5. Kaspaz Enzim Aktivasyonlarının Ölçülmesi	50
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	53
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 HCV ile enfekte karaciğerin zamana bağlı değişimi.	5
Şekil 1.2. Kaempferol'ün kimyasal yapısı.	11
Şekil 1.3. Doksorubisin'in kimyasal yapısı.	14
Şekil 1.4. Apoptoz ve nekrozda meydana gelen morfolojik değişiklikler.	16
Şekil 1.5. Apoptoz ve nekroptoz sinyal yolağı.	18
Şekil 1.6. Kaspazların yapısı ve aktifleşme mekanizması.	20
Şekil 1.7. İç ve dış apoptotik yollar.	21
Şekil 1.8. Hücre döngüsünde kontrol noktaları ve CDK/Siklin kompleksleri.	24
Şekil 3.1. Doksorubisin'in Hep-G2 hücre canlılığı üzerine etkisi.	29
Şekil 3.2. Kaempferol'ün Hep-G2 hücre canlılığı üzerine etkisi.	32
Şekil 3.3. Kombinasyonların Hep-G2 hücre canlılığı üzerine etkisi.	31
Şekil 3.4. DMSO'nun Hep-G2 hücrelerinde apoptotik morfolojiye etkisi.	36
Şekil 3.5.A. Doksorubisin'in Hep-G2 hücrelerinde apoptotik morfolojiye etkisi.	39
Şekil 3.5.B. Kaempferol'ün Hep-G2 hücrelerinde apoptotik morfolojiye etkisi.	39
Şekil 3.5.C. Kombinasyonun Hep-G2 hücrelerinde apoptotik morfolojiye etkisi.	39
Şekil 3.6. Doksorubisin, Kaempferol kombinasyonlarında apoptotik indeks.	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

Şekil 3.7. 1 µl/ml DMSO'nun Hep-G2 hücrelerinde hücre döngüsüne etkisi	40
Şekil 3.8. Doxorubisin'in Hep-G2 hücrelerinde hücre döngüsüne etkisi	41
Şekil 3.9. Kaempferol'ün Hep-G2 hücrelerinde hücre döngüsüne etkisi	43
Şekil 3.10. Kombinasyonun Hep-G2 hücrelerinde hücre döngüsüne etkisi	441
Şekil 3.11. Doxorubisin, Kaempferol ve Kombinasyonların Hep-G2 hücreleri üzerindeki döngüsü dağılımına etkisi.....	45
Şekil 3.12. Doksorubisin ve Kaempferol'ün uygulandığı Hep-G2 hücrelerinde annexin V-FITC/PI akım-sitometrik analizi.	43
Şekil 3.13. Doksorubisin ve Kaempferol'ün kombinasyonlarının uygulandığı Hep-G2 hücrelerinde annexin V-FITC/PI akım-sitometrik analizi.	47
Şekil 3.14. Kombainasyonlar uygulanan Hep-G2 hücrelerinde Annexin V-FITC/PI analizi.	50
Şekil 3.15. Doksorubisin, Kaempferol ve Kaempferol-Doksorubisin'nin Hep-G2 hücrelerinde 24 saatlik kaspaz 3 ve 9 aktivitesi üzerine etkisi.	48
Şekil 3.16. Doksorubisin, Kaempferol ve Kaempferol-Doksorubisin'nin Hep-G2 hücrelerinde 24 saatlik kaspaz 3 ve 9 aktivitesi üzerine etkisi.	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Kombinasyonlar için IC50 Değerleri.....	33
Çizelge 3.2. DMSO veDoksorubisin'in Hep-G2 hücre döngüsüne etkisi	39
Çizelge 3.3. DMSO ve Kaempferol'ünHep-G2 hücre döngüsüneetkisi.....	39
Çizelge 3.4. DMSO ve kombinasyonların Hep-G2 hücre döngüsüneetkisi	430
Çizelge 3.5. Doksorubisin veKaempferol uygulanan Hep-G2 hücrelerinde Annexin V-FITC/PI analizi.....	485
Çizelge 3.6. Kombinasyonun uygulanmış Hep-G2 hücrelerinde Annexin V FITC/PI analizi.....	49
Çizelge 3.7. Doksorubisin, Kaempferol ve Kombinasyonun Hep-G2 hücrelerinde kaspaz 3 ve 9 aktivitesine etkisi	47
Çizelge 3.8. Doksorubisin, Kaempferol ve Kaempferol-Doksorubisin'nin Hep-G2 hücrelerinde 24 saatlik kaspaz 3 ve 9 aktivitesi üzerine etkisinin OD değerleri. .	49

KISALTMALAR DİZİNİ

DMSO	:Dimethyl sulfoxide
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
DAPI	: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
APAF-1	: Apoptotik proteaz faaliyete geçiren faktör
Rb	: Retinoblastoma
APC	: Adenomatous polyposis coli
HBV	: Hepatit B virüsü
HCV	: Hepatit C virüsü
HGF	: Hepatosit büyüme faktörü
IGF1R	: İnsülin-benzeri büyüme faktörü
MAP	:Mitojenlerle etkinleşen protein kinaz
PI3K	: Fosfatidilinositol-3-kinaz
TNF-α	:Tümör nekroz faktör- α
TP53	:Tümör protein
AIF	:Apoptosis-inducing factor
CARD	: Caspase-recruitment domain
CDK	:Cyclin-dependent kinase
DED	: Death effector domain
FADD	:Fas-Associated protein with Death Domain
FITC	:Fluorescein isothiocyanate
PIDD	:P53-induced protein with a death domain
TNF	:Tumor necrosis factor
TNFR	:Tumor necrosis factor receptor
TRADD	:Tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein

1. GİRİŞ

Kanser, moleküler hücre biyolojisini etkileyen hücresel davranıştan temel bir sapmanın olduğu, birçok biyolojik karakteristik özelliklere sahip genetik bir hastalıktır (Lodish vd., 2011). Anormal hücre büyümesi ve çoğalması, vücudun diğer bölümlerine yayılmasını engelleyen kontrol mekanizmalarındaki anormallikler kanser hücrelerinin özelliklerindendir. Kanser hücrelerini tehlikeli yapan ise kontrolsüz hücre çoğalması ve diğer doku ve organlara yayılmasıdır (Klug vd., 2009). Kanser gelişiminde tümörler, büyümeyi ve çevre dokulara yayılmayı çok iyi başaran anormal bir organa dönüşürler (Lodish vd., 2011).

Doku homeostazı hücrelerin kendilerini yenileyebilme ve farklılaşabilme kapasitesine bağlıdır. Hücre ölümü ve hücre yenilenmesi arasında bir denge vardır ve bu dengede meydana gelebilecek herhangi bir bozukluk malign dönüşüme sebep olabilmektedir (Perryman ve Sylvester, 2006). Bir hücre, hücre büyümesi üzerindeki genetik kontrolünü kaybederse; hücreler küçük boyutlu bir yığın haline yani iyi huylu tümöre (bening) dönüşürler. Eğer tümördeki hücreler, kan dolaşımına girebilme, diğer dokulara yayılabilme ve ikincil tümörler oluşturabilme (metastaz) özelliği kazanmışsa kötü huylu yani tehlikeli tümör (malignant) olurlar (Klug vd., 2009). Kanser oluşumunun temelinde, hücrenin yaşaması, büyümenin kontrolü ve farklılaşma gibi biyolojik olayları etkileyen mutasyonların aşamalı olarak bir araya gelmesi yer almaktadır. Tümör hücreleri kanserin gelişiminde birçok fenotipik özellik kazanır. Sinyal iletim yolları, tümör baskılayıcı genler ve protoonkogenlerde meydana gelen onkojenik mutasyonlar malign fenotip oluşuma neden olur (Doğan ve Güç). Hanahan ve Weinberg, kanserin on ana ortak özelliğini ve bu özelliklerin moleküler değişimin malign hücre büyümesine katkı yaptığını belirtmişlerdir. Bu özellikler aşağıda sıralanmıştır;

1. Anti büyüme sinyallerine karşı duyarsızlık
2. Tümör baskılayıcı genlerin büyümeyi inhibe edici sinyallerine duyarsızlık
3. Apoptozdan kaçınma
4. Sınırsız replikasyon potansiyeli
5. Anjiogenezin sürdürülmesi

6. Metastaz
7. Enerji metabolizmasının yeniden programlanması
8. İmmun sistemden kaçınma
9. Genom instabilitesi ve mutasyon
10. Tümör gelişimine yardımcı enflamasyon.

Bu özellikler modern antikanser tedavisinin temel hedefiolarak değerlendirilmektedir (Zappia vd., 2014).

Hepatosellüler karsinoma (HCC) gelişiminin altında yatan moleküler mekanizmaların tam anlamıyla çözülebilmesi, bu kanserin oluşumunun önlenmesi ve yeni etkin tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde son derece önemlidir (Wong ve Ng 2007). Mevcut araştırmaların temel hedefi de yine HCC'nin gelişimini önlemek ve tümöre özgü tedavi ajanları bulmak üzerinde yoğunlaşmıştır (Calvisi vd., 2006, Llovet ve Bruix., 2008).

Kanser tedavisinde yeni gelişmelerin yaşandığı günümüzde, antrasiklinler önemli bir yer tutmaktadır. Bu nedenle, çoğu solid tümörlerin ve lösemilerin tedavisinde alternatifsiz gibi görünen antrasiklinlerin yan etkilerinin azaltılmasına yönelik çalışmalar da oldukça önemli ve anlamlı olarak kabul edilmektedir.

Doksorubisin'in karaciğer kanseri üzerindeki toksisitesi ve antitümör aktivite sergilediği, ancak sağlıklı karaciğer hücreleri üzerinde de toksik etkilere sahip olduğu in vitro ve invivo çalışmalar ile bildirilmiştir (Wang vd., 2012). Wang ve arkadaşları, insan hepatoma hücre hatları SMMC7721, QGY7701 ve normal karaciğer hücreleri L-02'de Dox'un farede antitümör etkileri üzerinde quercetin'in rolünü araştırmışlardır. Hepatoma hücrelerinde Quercetin ile kombine edilmiş Dox'un p53 bağımlı olarak ve anti apoptotik Bcl-xl proteinini down regüle ederek apoptozu uyardığını göstermişlerdir. Ayrıca, quercetin'in farelerde Dox'a bağlı hepatotoksositeye karşı koruyucu bir etki gösterdiği de yine bu çalışmayla gösterilmiştir. Quercetin'in normal karaciğer hücrelerini Doksorubisine bağlı yan etkilerden korurken, karaciğer kanseri hücreleri üzerinde anti-tümör etkiye sahip olduğu, quercetin'in karaciğer kanserine karşı terapötik etkinliğini artırmak için Dox ile kombine tedavisinde yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır (Wang vd., 2012). Sharma ve arkadaşları ise insan glioblastoma hücre hatları (LN229, U87MG ve T98G) üzerinde, Kaempferol'ün oksidatif stresi artırarak

Doksorubisin'in toksik etkilerine karşı etkili olup olmadığını araştırmışlar, hücre içi oksidatif stresi artırarak glioma hücrelerinde apoptozu indüklediğini bulmuşlardır. Bu çalışma sonucunda önemli olarak Kaempferol, Doksorubisin'in hücre dışına atılımını azaltarak ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) toksisitesini yükselterek kemoterapötik ajan Doksorubisinin toksik etkisini artırdığını tespit etmişlerdir (Sharma vd., 2007).

Doksorubisin kullanımını kısıtlayan yan etkileri ortadan kaldırmak için bazı ajanlar (Quercetin, 1,25-Dihydroxyvitamin D3, flavonoid türevleri) denenmiş olup (Wang vd., 2012, s.1, Ravid vd., 1999, s. 863) bu konudaki çalışmalara da halen devam edilmektedir. Oluşan yan etkilerin azaltılmasını hedefleyen çalışmalar, bu maddelerin pratikte kullanımlarına yansıtacak düzeylere henüz ulaşabilmiş değildir.

Biz de bu çalışmada; karaciğer kanseri tedavisinin ilk aşamasında kullanılan, kemoterapötik bir ajan Doksorubisinin ilaç konsantrasyonunu düşürecek ikinci bir doğal ajanın birlikte kullanımıyla, yan etkileri azaltılmış ve sağlıklı hücrelerde toksik etkisi en aza indirilmiş bir kombinasyon tedavi protokolü önermeyi amaçladık.

1.1. Hepatoselüler Karsinoma ve Risk Faktörleri

Karaciğer kanseri tüm dünyada önemli bir sağlık sorunudur ve hepatoselüler karsinoma (HCC), birincil karaciğer kanserinin en sık ölüm nedenlerinden biridir ve kronik karaciğer hastalığı veya siroz zemininde gelişen primer karaciğer kanserlerinin % 90'ını oluşturmaktadır (Stagos vd., 2012). Dünya Sağlık Örgütü Globocan veri tabanı doğrultusunda 2012 yılında yapılan araştırmada; kanser vakaları arasında altıncısı ve kansere bağlı ölümlerin ikinci önemli nedeni olarak tespit edilmiştir (Deng vd., 2015).

HCC patogenezi anlamak için epidemiyolojik çalışmalar yapılmış ve başlıca risk faktörleri tespit edilmiştir. Bu faktörler; hepatit virüslerine maruz kalma, vinil klorür, tütün, aflatoksin B1 (AFB1) ile kontamine gıdalar, ağır alkol kullanımı, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı, sağlıksız beslenme, kahve, diyabet, obezite ve hemokromatoz olarak belirlenmiştir. Genel olarak, bu faktörler coğrafi bölgelere göre de değişmektedir. Kronik hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonu,

Asya ülkeleri ve Afrika'da hakim iken Hepatit C virüsü (HCV) Japonya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde daha yaygındır (Aravalli vd., 2008).

HCC, sessiz ve yavaş büyüyen, vakaların çoğunda da geç döneme kadar az belirti gösteren bir hastalıktır.

HCC'nin;

- Kötü diferansiye olmuş histolojisi,
- Fibröz kapsülün bulunmaması,
- Büyük boyutları (>5 cm çapı),
- Vaskülerinvazyon ve erken metastaz,
- Bir biomarker olan α -fetoprotein (AFP) düzeylerinin yüksek olması

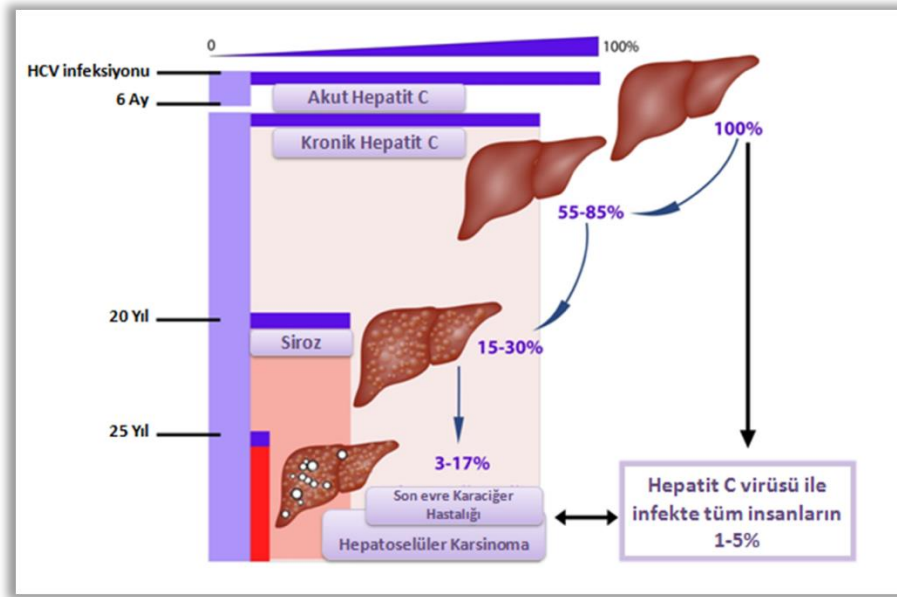
gibi agresif özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Gish, 2006).

Bir DNA virüsü olan Hepatit B virüsü karaciğer hücrelerini enfekte eder ve akut karaciğer hasarı oluşturur. Hepatit virüsü ile enfekte olan canlıların %5-10 kadarında akut enfeksiyon, kronik karaciğer enfeksiyonuna dönüşür ve karaciğer kanseri riski yüz kattan daha fazla artar (Cooper vd., 2006). Kronik Hepatit B ve C virüsü enfeksiyonu başlıca etyolojik faktördür. Asya ve Afrika'daki HCC vakalarının %70-80'inde HBV tespit edilmektedir. Hepatit B virüsü DNA'sı, hepatosellüler karsinom hücrelerininve konak hepatositlerin genomuna integre olmuş şekilde saptanmaktadır (Göksoy ve Kapan, 2002). Hücre transformasyonunda, hepatit B virüsünün viral geni (X geni) sorumludur. X geni, hücre ölümsüzlüğünü ve hücrede anormal çoğalmayı sağlayan birçok genin ekspresyonunu uyarır. Hepatit B virüsünün etkisiyle oluşan kronik doku hasarı ve yangı, hücrelerin sürekli çoğalmasına böylelikle de kanserin gelişimine zemin hazırlar. Hepatit C virusu ise bir RNA virusudur. Hepatit B virusu gibi kanser riskini arttıran karaciğer enfeksiyonlarına neden olur (Şekil 1.1). Kronik enfeksiyonla beraber ortaya çıkan hücre çoğalması, kanser gelişmesinin en önemli nedenidir (Cooper vd., 2006). Hepatit C virüs enfeksiyonu ile enfekte hastaların %60-80'inde kronikleşme görülürken, HCV enfeksiyonu % 0.4-2.5 oranında HCC olarak ilerler (Liang vd., 2000, Colombo, 1999).

HCC olgularının çoğunluğunda HBV ve HCV enfeksiyonu mevcuttur, ancak HCV ile enfekte olan HCC vakalarında genellikle siroz ile ilişkili olmasına

rağmen, HBV ile enfekte olanlarda siroz yokluğunda da HCC gelişebildiği gösterilmiştir (Farazi ve DePinho, 2006).

Hepatit C virüsü Wnt ligandı, inaktive p53 ve transaktifRas gibi hareket edebilir. Buna karşılık; hepatit B virüsünün genom içine entegrasyonu; genomik kararsızlık, onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin susturulması gibi genetik değişiklikleri indükler. Genel olarak, karaciğerde kronik inflamasyona yol açan bir durumdur. Neoplazm gelişimini kolaylaştıran hücrelerde genomik ve mitokondriyal hasara sebep olan otoimmün hepatit ya da kronik alkol kullanımı bu duruma örnektir (Llovet vd, 2003). Ayrıca, Afrika ve Asya'nın bazı bölgelerinde aflatoksin B1'in de p53 nokta mutasyonları ile güçlü bir ilişkisi olduğu ve HCC için önemli bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir (Lachenmayer vd., 2010).



Şekil 1.1 HCV ile enfekte karaciğerin zamana bağlı değişimi
kaynak: <http://www.wfsj.org/hepatitis/biology-basics>

1.2. Hepatoselüler Karsinomanın Moleküler Mekanizması

Hepatokarsinogenez, heterojen moleküler ifade karakterine sebep olan çeşitli onkogenler, tümör baskılayıcı genler, büyüme faktörü genleri ve virolojik faktörlerin sorumlu olduğu birçok sinyal yolağında değişimin meydana geldiği karmaşık çok aşamalı bir süreçtir (Buendia 2000).

HCC moleküler patogenezi, hastalığın biyolojik ve klinik davranışları açısından heterojenliğine sebep olan çoklu sinyal yolaklarında, farklı genetik/epigenetik sapmaları ve değişiklikleri içerir.

HCC'de yaygın olarak;

- Gen ekspresyonunda farklılık,
- Somatik mutasyonlarında artış,
- Genomik kararsızlık,
- Epigenetik değişiklikler

meydana gelir ve bu değişiklikler de potansiyel terapötik hedefler olarak kabul edilirler (Min Lee vd., 2016).

HCC'de; karsinogeneze yol açan moleküler mekanizmalar yani farklı aşamaları sırasında aktive olan onkojenik yollar büyük ölçüde bilinmemektedir ve diğer kanser tipleri ile karşılaştırıldığında, daha heterojen bir yapıda olduğu görülmektedir. Viral enfeksiyonlara ve hepatoksik ajanlara maruziyet, karaciğer dokusunda ani değişikliklere ve böylece hücresel sinyal yolaklarında ve tümör oluşumu ile sonuçlanan gen ifade seviyelerinde önemli değişikliklere sebep olmaktadır (Aravalli vd., 2008, Forner vd., 2012).

HCC gelişiminde en önemli faktörler arasında, hücre çoğalmasının düzenlenmesinde rolü olan Raf/MEK/MAPK yolağı gibi sinyal iletim yolaklarının aşırı aktivasyonu ve tümörün yayılmasında rolü olan anjiogenezin uyarılması gelir (Calvisi ve ark., 2006, Llovet ve Bruix 2008). Diğer bir önemli faktör ise hipoksi bölgelerinin oluşumudur. Tümörün büyümesine bağlı olarak, hücre sayısındaki artış ve yetersiz kan desteği nedeniyle, metabolik bir adaptasyon sonucu, anjiogenez tetiklenmektedir (Wu vd., 2007). Embriyonik karaciğer gelişimi ve yenilenmesi, hücre biyolojisi ve kök hücre farklılaşması için oldukça önemli olan Hedgehog (Hh) sinyal yolağı da diğer kanserler arasında HCC'de açıklanan bir başka önemli yolaktır (Lachenmayer vd., 2010).

Günümüzde HCC tedavisinde ilaç geliştirme çalışmaları iki temel hedefte yoğunlaşmıştır. Bunlardan biri; potansiyel Raf kinaz inhibitörleri kullanarak MAPK yolağının baskılanmasıdır. Diğer hedef ise hücrenin hipoksi koşullara direncini düşürmek suretiyle anjiogenezi ve tümör yayılmasını engelleyerek, HCC

tümörünün geriletilmesi ve hasta sağ kalım oranının arttırılmasıdır (Wilhelm vd., 2004, Llovet vd., 2008).

Kromozomal amplifikasyonlar ve delesyonlar oldukça yaygındır, önemli onkogenleri ve tümör süpressör genleri etkilerler. Yüksek seviyede amplifikasyon, hastaların %5-10'unda VEGFA ve Siklin D1 genlerinde olduğu açıklanmıştır. Epigenetik değişiklikler hepatosellüler karsinomada tanımlanmış ancak tümör baskılayıcı genlerin susturulması ve onkogenlerin reaktivasyonu gösterilememiştir (Farazi ve DePinho, 2006, Villanueva vd., 2007).

Onkogenlerin transkripsiyon seviyelerindeki değişikliği mikro RNA'ların gerçekleştirebileceği düşünülmüştür. Bu değişikliklerin bir sonucu olarak, hücre canlılığı ve çoğalması ile ilgili çeşitli sinyal yolları, klinik öncesi ve erken klinik çalışmalarda hedeflenen tedavilere yanıt olarak aktive edilebilir (Villanueva vd., 2008). Epitel büyüme faktör reseptörü (EGFR) ve ras sinyal yolağı, proliferasyon yolları ile ilgili hepatosellüler karsinomanın % 50'sinden fazlasında aktiftir ve buna karşın, mTOR (Rapamisin memeli hedefi) yolağı, tümör süpressör PTEN geninin inaktivasyonu ya da fosfoinositid-3-kinazın mutasyonunun upstream sinyalizasyonundan dolayı karaciğer kanserlerinin % 40-50'sinde bozulmuştur (Sahin vd., 2004). Benzer şekilde, insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü 1 (IGF1R) sinyalizasyonu, hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve c-MET yolağının deregülasyonu erken hepatosellüler karsinomun % 20'sinde aktif olduğu gösterilmiştir (Villanueva vd., 2008). Ayrıca, HCC anjiyojenik aktivitede önemli rol oynayan VEGFA, ANGPT2 ve fibroblast büyüme faktörünün (FGF) sinyalizasyonu sayesinde oldukça vasküler yapılı bir kanserdir (Forner vd., 2012).

Wnt sinyal yolağı; homeostazi, hücrenin proliferasyonu, farklılaşması, hareketliliği ve apoptozunun da dâhil olduğu pek çok evrimsel yolda yüksek ölçüde korunmuştur. Wnt/ β -katenin yolağı erken karaciğer gelişimi sırasında sıkı bir şekilde düzenlenir. HCC'nin de dâhil olduğu birçok kanser türünde düzenlenme mekanizması bozulmuştur. Çoğu durumda Wnt sinyal yolağı, tümör süpressör gen adenomatöz polipozis kolinin (APC) inaktivasyonu, Wnt reseptörlerinin aşırı ekspresyonu, E-kaderinlerin inaktivasyonu ile transkripsiyon faktörü β kateninde meydana gelen mutasyonların bir sonucu olarak HCC'de aktifleştirilir (Aravalli vd.,2008). Bu yolak, HBV/HCV enfeksiyonları ve alkolik

karaciğer sirozundan kaynaklanan HCC ile de ilişkilidir. Frizzled-7'nin upregülasyonu ve β -katenininde fosforilasyonu HCC'de sık sık gözlenmiştir. Fosforilasyon ve sonraki degradasyonların önlenmesine rağmen β -kateninde meydana gelen mutasyonlar Wnt/ β -katenin sinyal yolunun aktivasyonuna sebep olmaktadır. Mutant protein normalde hücrede birikmektedir ve varlığı HCC'nin düşük insidansı ile ilişkilidir (Merle vd., 2005). Ayrıca HCV enfeksiyonu ve aflatoksin maruziyet sonucunda HCC vakaların β -katenin mutasyonunda artış gözlenmiştir. β -katenin mutasyonuna ek olarak Wnt yolağının negatif düzenleyicileri olan *akşin 1* ve *akşin 2* geninde meydana gelen mutasyonlar da yine HCC'de gözlenmiştir. Bu nedenle, Wnt/ β -katenin yolağı, HCC'de oldukça önemli bir sinyal yolağıdır ve Wnt yolağının inaktivasyonu kanser tedavilerinde potansiyel teröpatik amaç olarak hedeflenmiştir (Aravalli vd., 2008, Forner vd., 2012).

p53 proteinini kodlayan TP53 geni; hücre döngüsü tutuklanması, apoptoz, DNA onarımı ve hücre yaşlanmasının da dâhil olduğu pek çok DNA hasarında oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, TP53 geninde fonksiyonel mutasyonlar ya da allelik delesyonlarının kaybı insan karsinogenezi ile yaygın olarak ilişkilidir ve hasarın derecesine bağlı olarak, p53 DNA onarımını başlatmak için antioksidan gen deaktivasyonu ya da prooksidan gen aktivasyonu yoluyla apoptozu uyarır (Kumar vd., 2011).

p53 yolağı büyük bir tümör baskılayıcı yolaktır; onkojen aktivasyonuna yanıt olarak hücre döngüsü durdurur, telomer kısalmasına yanıt olarak da hücre sağkalım ve proliferasyonu (replikatif yaşlanma) sınırlar ve genom bütünlüğünü korur (Pauklin vd., 2005). p53 yolağı; insan HCC'de birden fazla düzeyde etkilenir. HCC'de aflatoksin kaynaklı p53 mutasyonları % 50 oranındayken aflatoksin ile ilişkili olmayan HCC'de % 20-30 daha düşük sıklıkta ortaya çıkmaktadır. p53 mutant HCC'lerin % 15-20'sinde p14ARF mikrodelesyonları nadiren de olsa meydana gelmektedir. İşlevsel olmayan telomerler, kromozomal kararsızlık ve HCC başlatılmasının hepatositlerde genişlemeye yol açtığı, siroz aşamasında p53 kontrol noktasında fonksiyon kaybına neden olduğu gözlenmiştir. p53 alt hedefi olan p21Cip1 geni de normal karaciğer dokusuna kıyasla sirozda birikmektedir (Merle ve Trepo, 2009).

p53 geninin ekson 7 bölgesinde 249. kodonunun üçüncü baz çiftinde guaninin timine dönüşmesiyle (R249S) meydana gelen mutasyonunun özellikle aflotoksin ile maruziyetle ilişkili olduğu düşünülmektedir ve bu yanlış anlamalı mutasyon, yüksek aflotoksine maruz kalan HCC hastalarında p53 mutasyonunun çok yaygın olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çeşitli in vitro çalışmalarda TP53 mutasyonu üzerine HBV enfeksiyonu ve aflotoksin maruziyeti arasında sinerjik etkiler bulunmuştur (Chittmittrapap vd., 2013). p53 ile indüklenen apoptozu baskılayan ve p53'e bağlanabilen HBx, HBV'nin viral protein enkodur. HBx proteininde meydana gelen mutasyon da R249S mutasyonu ile bağlantılı karsinogeneizde ilişkilendirilmiştir (Kumar vd., 2011, Chittmittrapap vd., 2013).

1.3. Hepatosellüler Karsinoma'nın Tedavi Yaklaşımları

Birincil karaciğer kanserinin en sık ölüm nedenlerinden biri olan HCC; cerrahi olarak çıkarılamayan ya da metastatik olan HCC hastalarında, geleneksel kemoterapi sınırlıdır ya da hiç fayda sağlamamaktadır. Erken tanı konabildiğinde, cerrahi çıkarma veya karaciğer transplantasyonu yoluyla tam tedavi edilebilmektedir. Ancak, HCC hastalarının çoğunluğu kötü prognozlu olup hastalığın oldukça ileri aşamasında teşhis edildiği için genellikle sağkalım oranları 1 yıldan daha azdır (Deng vd., 2015).

Karaciğer kanseri tedavisi, temelde kanser patogenezinin sistemik olarak anlamaya dayanmaktadır. Cerrahi müdahale, girişimsel embolizasyon, kemoterapi ve radyasyon tedavisi hala karaciğer kanseri için ana tedavilerdir. Karaciğer kanserinin moleküler mekanizmasının daha iyi aydınlatılması ile birlikte var olan bilgilerin artması, yeni biyolojik teknolojilerin geliştirilmesi, mevcut tedavi yöntemlerinin yeniden gelişimi kanserin daha iyi tanımlanması ve hastalığın tedavisi için yeni bir umut ışığı olacaktır. Moleküler hedefli tedaviler, karaciğer kanseri tedavisinde gelecekteki gelişim yönünü temsil etmektedir (Chen ve Wang 2015).

HCC'nin klinikte tedavisi; karaciğer rezeksiyonu, karaciğer transplantasyonu, trans arteriyel kemo embolizasyon (TACE), perkütan etanol enjeksiyon tedavisi (PEIT), radyofrekans ablasyon (RFA), transarteriyel müdahaleler (embolizasyon, kemoperfüzyon ve kemoembolizasyon), gen ve

immün terapi için kullanılır ilaçlar ve moleküler hedefli kemoterapi gibi çeşitli yöntemleri içerir (Blum 2005, Meguro vd., 2011). HCC'ye multidisipliner yaklaşımda ilk akla gelen tedavi yöntemi karaciğerin cerrahi çıkarılmasıdır. Sirozu ve karaciğer dışında bir hastalığı olmayan vakalarda ilk seçenektir. Çıkarılamayan küçük lezyonlar için veya başka hastalığı nedeniyle cerrahigirişimin riskli olduğu vakalarda lokal tümör ablasyonu önerilmektedir (Gish 2006).

Karaciğer nakli ile hayatta kalma oranı daha yüksektir ancak uygulama donör organların azlığı nedeniyle ile sınırlıdır. Cerrahi çıkarma ve perkutan ablasyon, yüksek oranda tedaviye yanıt vermektedir ancak uzun dönem prognozu tatmin edici değildir ve 10 yılda % 22-35 düşük genel sağkalım oranına sahiptir. Transarteriyel kemoembolizasyon, radyoterapi ve geleneksel kemoterapi, ileri HCC tedavisinde kullanılmıştır ama bunların etkileri sınırlıdır (Nakagawa ve Maeda 2012). Herhangi bir tedaviden sonra tekrar nüks etme olasılığı önemli bir konudur. Epitel hücrelerinin çoğalması ve artmış arteriyel damarlanma HCC'nin tekrarnüks etme sebeplerindendir. Ayrıca, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve insülin-benzeri büyüme faktörü (IGF) gibi çeşitli büyüme faktörleri, HCC hücrelerinin otokrin bir şekilde hücre proliferasyonunu indükler. Bu büyüme faktörlerinin reseptörleri, Raf/MEK/ERK yolağı ve PI3K/Akt/mTOR yolağı gibi hücre içi sinyalleri aktif hale getirir, böylece hem kanser hem de endotel hücrelerinin proliferasyonu indüklenir. Bu yüzden büyüme faktörleri ve reseptörleri, HCC tedavisi için spesifik bir hedef olarak kabul edilir (Meguro vd., 2011).

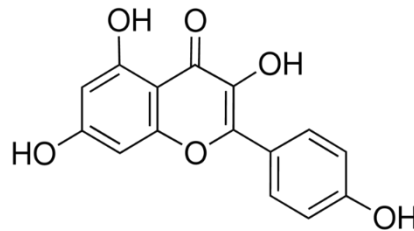
Son zamanlarda, HCC'nin tedavisi için moleküler hedefli tedavi geliştirilmiştir. Sorafenib, Raf serin/treonin kinazları, vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGF)'nü ve trombosit türevli büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) yolağını hedefleyen multikinaz inhibitörüdür ve ileri evre HCC'de kullanılmıştır (Nakagawa ve Maeda 2012).

Günümüzde, kanserin kimyasal tedavisi için çeşitli ilaçlar ve kombinasyonları kullanılmaktadır (Staedler vd., 2011). Tek bir ilaçla tedaviye yanıt alınamaması, ilaçların kombinasyon halinde kullanılması gerekliliğini

doğurmuştur. Kansерli hastalarda toksik etki mekanizmaları ve aktivite bölgeleri farklı olan ilaçlar, daha güçlü ve başarılı bir tedavi sağlamak amacıyla, kombinasyon şeklinde kullanılmaktadırlar. Böylelikle, ilaçların artırılmış sitotoksik etkileri tümörün kontrol altına alınmasını kolaylaştırıp ve daha düşük dozlarda kullanılarak hastadaki toksik yan etkilerin de en aza indirgenmesi sağlanmaktadır. Ayrıca kombinasyon tedavisinin hastanın tolere edebileceği toksisite ile en fazla sayıda malign hücrenin ortadan kaldırılmasını sağlamak, farklı yapıda sahip çok sayıda tümörlere etki edebilmek ve ilaçlara karşı kazanılan direnci önlemek gibi avantajlara sahiptir (Ölgen vd, 2002).

1.4. Kaempferol ve Biyolojik Özellikleri

Bitkisel gıdaların insan sağlığı üzerine koruyucu bir etkiye sahip olduğu çok sayıda çalışmayla ortaya konmuştur. Flavonoidler, biyolojik aktivitesi geniş bir yelpazeye sahip olan doğal polifenolik bileşiklerden oluşmaktadır (Wang vd., 2012, Sadeghi-Aliabadi vd., 2012, Xiao vd., 2012). Kaempferol (3,5,7-trihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4H-1-benzopirran-4-one); düşük molekül ağırlıklı (MA: 286.2 g/mol) sarı bir bileşiktir (Şekil 1.2). Brokoli, lahana, fasulye, hindiba, pırasa, domates, çilek, üzüm ve çay gibi rutin gıdalarla alınan birçok bitkinin ve geleneksel tıpta yaygın kullanılan Ginkgo biloba, Tiliasspp, Equisetum spp, Moringaoleifera, Sophorajaponica ve propolis gibi bitkisel ürünlerin içinde bol miktarda bulunan bir flavonoid'tir (Zhang vd., 2008, Siegelin vd., 2008). Kaempferol içeren besinlerin tüketimi ile başta kanser olmak üzere, kardiyovasküler hastalıklar gibi çok sayıda hastalığın görülme riskinin azalması arasında pozitif bir ilişki olduğu bazı epidemiyolojik çalışmalarda bildirilmiştir (Mandery vd., 2010, Xiao vd., 2012).



Şekil 1.2. Kaempferol'ün kimyasal yapısı
Kaynak: Calderón-Montaña vd., 2011, s.320

Birçok in vitro çalışma; Kaempferol ve Kaempferol glikozitlerinin anti-inflamatuar, antikanser, antimikrobiyal kardiyoprotektif, nöroprotektif, antidiyabetik, antiosteoporotik, östrojenik/antiöstrojenik, anksiyolitik, analjezik, antialerjik aktivite ve antioksidan özelliği dâhil olmak üzere çok geniş farmakolojik aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir (Calderón-Montaña vd. 2011). Kaempferol ve bazı Kaempferol glikozitlerinin akciğer, meme, kolon, prostat, karaciğer, pankreas, kan/lenf, deri, yemek borusu, beyin, rahim, yumurtalık, tiroid ve kemik dâhil olmak üzere farklı kanserlerde hücre ölümüne sebep olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmaların çoğunda, Kaempferol'ünapoptoz yoluyla hücre ölümünü uyardığı vurgulanarak, olası mekanizmalar açıklanmaya çalışılmıştır. (Sharma vd., 2007, Siegelin vd., 2008, Zhang vd., 2008, Bestwick vd., 2007, Nguyen vd., 2003, Luo vd., 2010, Yanqiu vd., 2011, Leung vd., 2007, Filomeni vd., 2010). Yapılan çalışmalar, Kaempferol'ün tedavi edici etkilerini güçlendirmek için çeşitli antikanser ilaçlarla kombine biçimde kullanılabileceğini göstermektedir (Luo vd., 2010, Yanqiu vd., 2011, Filomeni vd., 2010).

HCC hücreleri (Huh7)'nin hipoksi koşullar altında yaşamasını sağlayan HIF-1 (hipoksiya uyaran faktor 1)'in aşırı ifade edilmesinin baskılanması üzerine Kaempferol'ün doza bağlı anti-tümör etkiye sahip olduğu, Mylonis ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Mylonis vd., 2010). Oksijensiz kalmaya adaptasyonda anahtar molekül olan HIF-1 (hipoksi tarafından uyarılabilen faktör-1), hücrenin sağ kalımı, çoğalması, anjiogenez, invazyon ve metastazında görevli genlerin ifadesini başlatan bir transkripsiyon aktivatörüdür (Semenza 2009). HCC'de, HIF-1 α 'nın ifadesi malignant tümörün invazyon ve metastazında miktarı artan VEGF (vasküler endoteleyal büyüme faktörü) salgılanmasıyla bağlantılıdır (Huang vd., 2005, Tanaka vd., 2006, Yao vd., 2009).

1.5. Doksorubisin ve Biyolojik Özellikleri

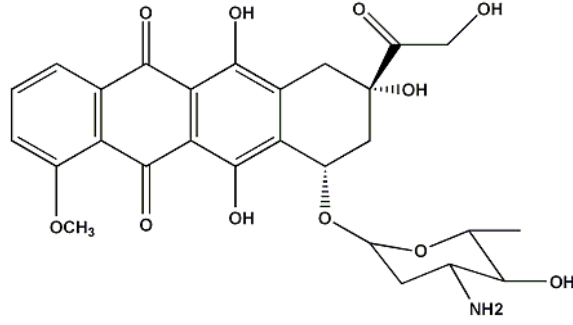
Antrasiklinler, yüksek antineoplastik aktiviteleri nedeniyle kanser tedavisinde en sık kullanılan ajanlardanlardır.

Antineoplastik etkileri ise;

1. DNA yapısına girerek makromoleküllerin sentezinin inhibisyonu,
2. Serbest radikal üretimine yol açarak DNA hasarına neden olması,
3. Direk hücre zarına toksik etkileri,
4. Topoizomeraz II enzim inhibisyonu,
5. DNA hasarı ve P53 geni aktivasyonu ile apoptozu uyarması sonucu

ortaya çıkmaktadır (Durmaz vd., 2009).

Antrasiklin grubu ilaçların kullanımı kardiyotoksik etkileri nedeniyle sınırlıdır ve kardiyovasküler toksisitesi en iyi bilinen ilaç grubudur. Kardiyotoksikite, akut olarak ya da tedaviden sonraki günler, haftalar içinde, hatta tedavi tamamlandıktan yıllar sonra (1-20 yıl) bile ortaya çıkabilmektedir. Antrasiklinkardiyotoksikitesikümülatif ilaç dozu ile artmaktadır. Geri dönüşümsüz miyozit hasarı, miyokard kitlesinde azalma ve ilerleyici fibrozis kardiyak fonksiyon bozukluğunun nedenlerini oluşturmaktadır (Aktürk vd., 2011). Bir antrasiklin antibiyotiği olan Doksorubisin (Dox); *Streptomyces peucetius*'un fermentasyonu ile elde edilmektedir ve karaciğer kanseri başta olmak üzere çeşitli kanser türlerinin tedavisinde sıklıkla kullanılan, anti-tümör potansiyale sahip bir ilaçtır (Xiao vd., 2012, Ayla vd., 2009). Ancak, yapılan çalışmalar Dox-temelli ilaç tedavisinin kalp, karaciğer ve böbrek gibi tümörlü olmayan dokularda şiddetli yan etkilere yol açtığını göstermiştir ve HCC dâhil olmak üzere bazı kanser hücrelerinin Doksorubisin'e direnç kazanması da klinik uygulamaları büyük ölçüde sınırlamaktadır (Wang vd., 2012). Diğer birçok antineoplastik ajanda olduğu gibi yan etkileri açısından klinik bir problem olan Dox'un kanser tedavisindeki etkinliği, kullanılmasından vazgeçilemeyecek kadar önemlidir (Kozluca, 1995). Bu nedenle, Dox ile yeni tedavi protokolleri geliştirmek için daha fazla tümöre özgü Dox-temelli kombinasyon tedavilerine ihtiyaç vardır (Staedler vd. 2011).



Şekil 1.3. Doksorubisin'in kimyasal yapısı

Kaynak: <https://tr.wikipedia.org>

Dox'un sitotoksik etki mekanizması; karmaşık ve hâlâ tamamen anlaşılmamış olmakla beraber DNA hasarına sebep olarak, topoizomerazların inhibe ederek, demire bağlanarak, serbest radikal oluşmasına sebep olarak hücre ölümünü gerçekleştirdiği bilinmektedir (Ravid vd., 1999). **DNA Topoizomerazlar**, tek veya çift iplikli DNA zincirlerinde kırıklar oluşturarak DNA replikasyonu, transkripsiyon, rekombinasyon ve kromatinin yeniden şekillenmesi ile ilişkili topolojik problemleri çözerler. Reaksiyon özellikleri bakımından topoizomeraz I ve topoizomeraz II olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar (Champoux 2001). TOP2A, TOP2B enzimleri bu süreçten sorumlu enzimlerdir. Bu enzimleri kodlayan genlerde oluşacak çeşitli mutasyonların ilaç direnci gelişimi ile ilişkisi bulunmuştur. Bazı antikanser ajanlar için bu genlerin ürünleri olan proteinler hedef olarak kullanılmaktadır (Tsai vd., 2000).

Dox'un DNA hasarı oluşturması, ilacın iyileştirici ve zararlı etkileri konusunda yaygın olarak kabul edilen bir görüş olmasına karşın, son zamanlarda pek çok çalışma grubu serbest radikal hipotezini tekrar gündeme getirmiştir. Doksorubisin, vücuda verildiğinde hücrel demire bağlanmaktadır ve hidrojen peroksidi de içeren serbest radikaller oluşturmaktadır. Bu serbest radikallerin antiapoptotik protein cFLIP'i doğrudan parçaladığına ve bu sebeple de tedavi edilmiş hücrelerin apoptoza karşı daha savunmasız hale geldikleri düşünülmektedir (White 2007). Kanser hücreleri ve normal dokularda Dox-aracılı sitotoksitenin mekanizmaları farklıdır (Wang vd., 2004). Kanser hücrelerinde etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, DNA interkalasyonu ve DNA hasarı şeklinde gözlemlendiği (Howorka vd., 2010) oysa kardiyotoksite ya da

hepatotoksisite de çoğunlukla serbest radikal süpürücüler tarafından inhibe edilen serbest oksijen radikallerin meydana gelmesi yoluyla oluştuğu ileri sürülmüştür (Mukhopadhyay vd., 2009). Kanserli ve normal hücrelerde Dox-temelli toksisitedeki bu farkın sebebinin araştırılması, düşük dozda Dox aracılığıyla, kanserli hücrelerin apoptoz gibi yollarla spesifik olarak ortadan kaldırılması ya da çoğalmalarının durdurulması için kombine tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde önemlidir (Wang vd., 2012).

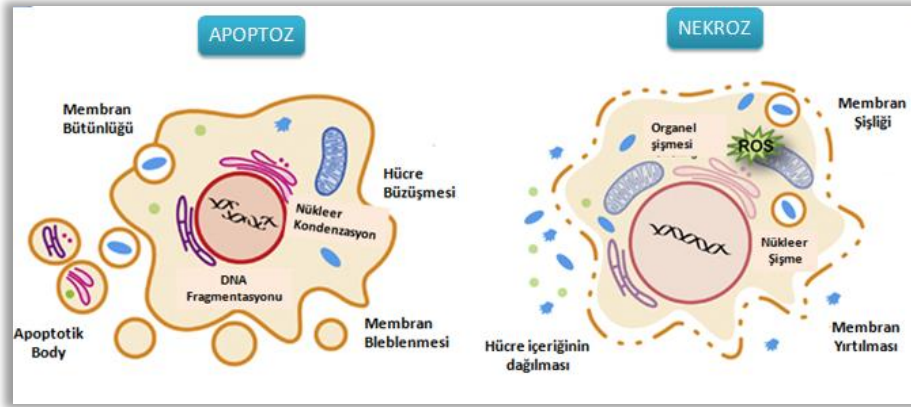
1.6. Hücre Ölüm Mekanizmaları

Kanserin en önemli özelliklerinden biri olan onkojenik dönüşümün ve terapötik direncin de temelini oluşturan, hücrelerin programlanmış hücre ölümüne karşı direncidir (Chen vd., 2016). Programlı hücre ölümü; çeşitli fizyolojik koşulların düzenlenmesinde ve patolojik durumlarda çok önemli rolü olan iç hücresel programdır (Fulda, 2015). Çok hücreli organizmalarda ihtiyaç duyulmayan, hasarlı ya da enfekte hücrelerin homeostazı ve eliminasyonun düzenlenmesi için gereklidir. Programlanmış hücre ölümünün deregülasyonu; kansere, nörodejeneratif ve otoimmün hastalıklara neden olur (Pietkiewicz vd., 2015). Apoptoz; programlanmış hücre ölümünün farklı biçimleri arasında en iyi karakterize edilmiş ve en yoğun olarak araştırılmış şeklidir ve sistein bağımlı, aspartata özgü proteaz-kaspaz aktivasyonuna bağlıdır (Pietkiewicz vd., 2015, Fulda, 2015).

Apoptoz; Hücre içi sinyaller (DNA hasarı, hücre içi Ca^{++} düzeyinde artış, düşük pH, hücre döngüsünde bozukluklar, hipoksi vb), dış etkenler (iskemi, toksinler, UV, kemoterapötik ilaçlar, radyasyon maruziyeti vb) ve hücre dışı sinyaller (büyüme ve üreme faktörlerinin yetersizliği, Fas-Fas ligand ya da TNF aracılığı ölüm reseptörlerinin aktivasyonu vb) tarafından tetiklenir (Çoşkun ve Özgür, 2011).

Apoptoza uğrayan hücrelerde meydana gelen değişimler; lamin ve aktin filamentlerinin kesilmesi sonucunda sitoplazma büzülmeye başlar. Kromotin ve çekirdekte bulunan yapısal proteinlerin kesilmesi sonucu çekirdekte yoğunlaşma başlar. Hücreler makrofajların tanıyabileceği şekilde paketlenerek diğer hücrelere zarar vermeden ortadan kaldırılırlar (Yıldırım vd., 2007). Ayrıca, apoptotik

hücrelerin membranlarında da bazı değişimler gözlenir. Normal hücre membranlarının sitoplazmik yüzeyinde yer alan fosfolipidler, hücre membranlarının dış yüzeyine çıkar. Bir diğer membran değişimi ise hücre içeriklerini içine alan ve membranla çevrili apoptotik body olarak da adlandırılan vesiküller olarak apoptotik hücrelerden kopan tomurcuklardır. Bu değişimler apoptotik sürecin sonlarına doğru görünür (Yıldırım vd., 2007).



Şekil 1.4. Apoptoz ve nekrozda meydana gelen morfolojik değişiklikler

Kaynak: Guo vd., 2014, s.3

Apoptoza alternatif bir diğer bir hücre ölüm şekli **nekroz**dur. Akut doku zedelenmesi ve iskemiye karşı bir reaksiyon olarak ortaya çıkabilir. Hücrede iyon pompası yetersizliği ve hücrenin kendi enerjisinin kaybı nedeniyle, hücre içine osmozla su girer ve hücre patlar, hücre membran bütünlüğü kaybolur, DNA rastgele, düzensiz olarak parçalanır ve hücrenin mitokondrisi şişer. Apoptozdan farklı olarak nekrozda, hücre tarafından yoğun inflamatuvar yanıt verilir ve inflamasyon belirtileri pozitifleşerek yükselir(Gültekin vd., 2008).

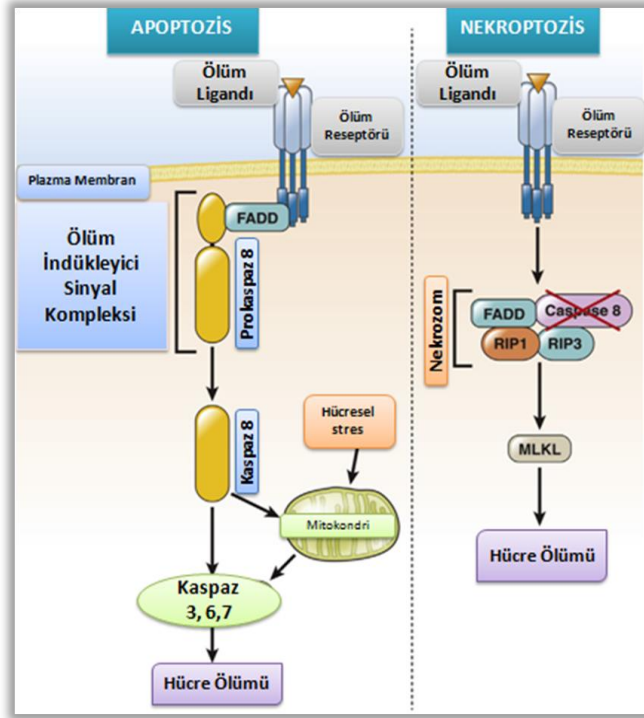
Hipoksi, sitokinler, iskemi, ısı, patojenler ve toksin maruziyeti gibi hücresel stres faktörleri nekroza yol açar. Nekroz sırasında, reaktif oksijen türleri ve hücre içi kalsiyumseviyeleri yükselmektedir. Kalsiyum seviyesi endoplazmik retikulum tarafından düzenlenir ve kalsiyum dengesinin bozulması hücre içi değişikliklere yol açar. Kalsiyum seviyesinde artış mitokondriyal fonksiyonların etkilenmesi ve reaktif oksijen türlerinin üretiminde değişiklikler ile sonuçlanır. Zamanla yüksek kalsiyum seviyesi mitokondri iç zarının bütünlüğünü bozmaya ve

ATP üretmek için yeteneğinin kaybına neden olur ve nihayetinde nekrotik hücre ölümü meydana gelir (Escobar vd., 2015).

Doku homeostazı; hücre büyümesi, hayatta kalması ve proliferasyon arasında hassas bir dengenin sonucudur (Fulda, 2015). Çok uzun zaman apoptoz, homeostazi ve hastalıkların gelişmesi sırasında programlanmış hücre ölümünün bir biçimi olarak düşünüldü, buna karşılık nekroz düzensiz ve kontrolsüz bir süreç olarak kabul edildi. Yapılan çalışmalar nekrozunda düzenli bir şekilde meydana gelebileceğini ortaya koymaktadır. Programlanmış nekroz başlatılması nekroptoz; ölüm reseptörleri tarafından reseptör-etkileşimli protein 1 (RIP1) ve RIP3 (RIP1; RIPK1 ve RIP3; RIPK3 olarakta bilinir) kinaz aktivitesi gereklidir. Ayrıca mitokondrial, lizozomal ve plazma membranının aktif parçalanması da gereklidir. Nekroptoz, iskemik hasar, nörodejeneratif hastalıklar ve viral enfeksiyon dahil olmak üzere pek çok hastalıklığın patojenezine katılır (Vandenabeele vd., 2010).

Son zamanlarda, hücre ölümünün apoptotik olmayan formlarında özellikle programlanmış nekroz yada nekroptoz olarak adlandırılan formlarının da araştırılmasında büyük ilerlemeler kat edilmiştir. Nekroptoz; apoptoz ve nekroza benzer özelliklere sahip yakın zamanda keşfedilen hücre ölüm şeklidir. Apoptoz ile bazı ortak moleküler özellikleri paylaşır, ancak hücresel sızıntı ve organel şişmesi gibi özelliklerinden dolayı daha çok nekroza benzemektedir. Ancak, nekroptotik sinyalizasyonu anlamada çok büyük ilerlemeler olmasına rağmen, hücre ölümünün bu iki tür arasındaki farkı açık bir yöntem ile henüz tam olarak açıklanamamıştır (Pietkiewicz vd., 2015).

Apoptoz ve nekroz geçiren hücreler açıkça belirgin morfolojik özelliklere sahiptir.**Apoptotik yolda;** membran blebilenmesi, nükleer fragmentasyon, hücre hacminin azalması ve apoptotik cisimlerin oluşumunu takip eden apoptozun erken aşamalarında hücre yüzeyinde fosfatidilserin ortaya çıkarken; **programlanmış nekrozda;** erken plazma membranının parçalanması, ani sitoplazmik ve nükleer şişme ve organel bozulması gibi morfolojik özellikler görülmektedir (Pietkiewicz vd., 2015). Nekroptoz, yalnızca kaspaz 8 aktivasyonu inhibe olduğu zamanmeydana gelir ve dolayısıyla fizyolojik bağlamda belirsiz ve son derece tartışmalıdır (Hirsova ve Gores, 2015).



Şekil 1.5. Apoptoz ve nekroptoz sinyal yolağı
Kaynak: Hirsova ve Gores, 2015, s.18

Nekroptoz, RIP1 ve RIP3 kinaz aktivasyonuna bağlıdır. Nekroptotik sinyal yolağının spesifik inhibitörleri olan **nekrostatinler**, RIP1'in kinaz aktivitesini hedeflemek için geliştirilmiştir (Pietkiewicz vd., 2015, s.99). Nekroptoz; kaspaz 8 fonksiyonu inhibe edildiğinde, hücre ölüm reseptörlerinden tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) ve Fas ligand aktivasyonu ile başlatılır. Ölüm reseptörü aktivasyonunu, reseptör-etkileşimli protein kinaz 1 (RIP1), RIP3 ve FADD içeren **nekrozom** adı verilen bir sinyal kompleksi tarafından gerçekleştirir (Şekil 1.5). Bu kompleks, MLKL (mixed lineage kinase domain-like protein)'nin ve diğer medyatörlerin aracılığıyla hücre ölümüne neden olur (Hirsova ve Gores, 2015).

1.6.1. Kaspazlar

Kaspazlar (caspase= cysteine-dependent aspartate specific proteases), sistein bağımlı aspartata özgü proteazların bir grubudur. Sitoplazmada inaktif proenzimler halinde bulunurlar, aktif katalitik bölgesinde sistein içeren ve

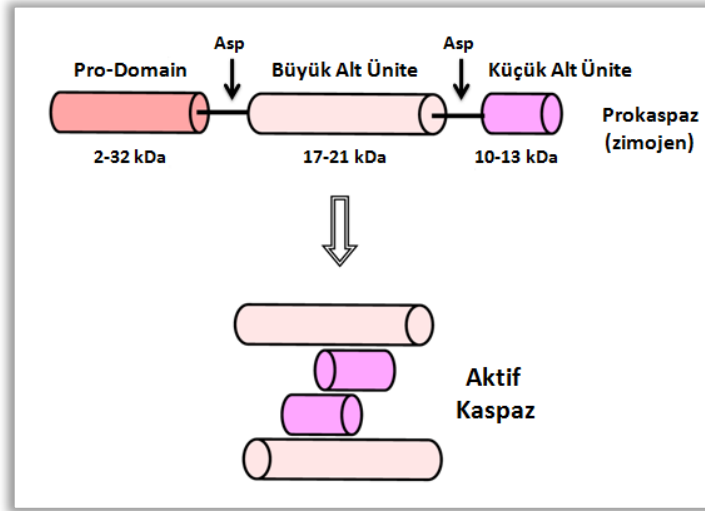
substratlarını aspartat içeren özgül bir bölgeden kesen proteaz enzimlerdir (Solakoğlu, 2009). Bu güne kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu apoptozda rol almaktadır. Programlanmış hücre ölümünün moleküler olarak belirleyici özelliği kaspaz aktivasyonudur. Kaspaz aktivitesi proteolitik kaskad yoluyla olmaktadır. Kaspazlar inaktif zimojenler (Prokaspaz) olarak sentezlenirler ve apoptoz sırasında aktivasyon geçirirler. Kaspazlar inaktif iki prokaspazın hidrolizi, yani uzun ve kısa kolların kendi aralarında yan yana gelmesiyle aktive olurlar. DED ve CARD inhibitör prodomenini içeren uzun kollar yarılarak ortamdan uzaklaşır. Asıl aktif kısım yan yana bir arada bulunan iki kısa koldur. Apoptotik uyarılara karşı başlatıcı kaspazlar, otokatalitik işleme ile aktivasyona uğrarlar. Aktivasyondan sonra, spesifik olarak kesilerek efektör kaspazı aktive ederler (Shi 2004, Gültekin vd., 2008).

Dizi benzerlikleri, substrat özellikleri ve fizyolojik işlevlerine göre, kaspazlar üç alt gruba ayrılmaktadır;

Birinci grup; enflamatuar kaspazlardır (Kaspaz-1, -4, ve -5). Sitokin aktivasyonu ile enflamatuar yanıtlarda rol oynarlar.

İkinci grup; apoptoz başlatıcı kaspazlardır. Uzun N-terminal prodomain bölge, kaspaz aktivasyonuna yol açan protein komplekslerinin oluşturulması için önemli olan kaspaz toplayıcı domainin (CARD) varlığı ile karakterize edilir. Başlatıcı kaspazların pro domainleri (CARD; Kaspaz-2 ve -9) yada ölüm efektör domaini (DED; kaspaz-8 ve -10) içerir. Ayrıca ikinci bir motif diğer adaptör protein olan protein-protein etkileşimleri için çok önemlidir.

Üçüncü grup; efektör veya cellat kaspazlardır (Kaspaz-3, -6 ve -7). Sadece 20-30 amino asitten oluşan kısa prodomaine sahiptirler (Georg Häcker vd., 2011).



Şekil 1.6. Kaspazların yapısı ve aktifleşme mekanizması
Kaynak: Escobar vd., 2015, s.421

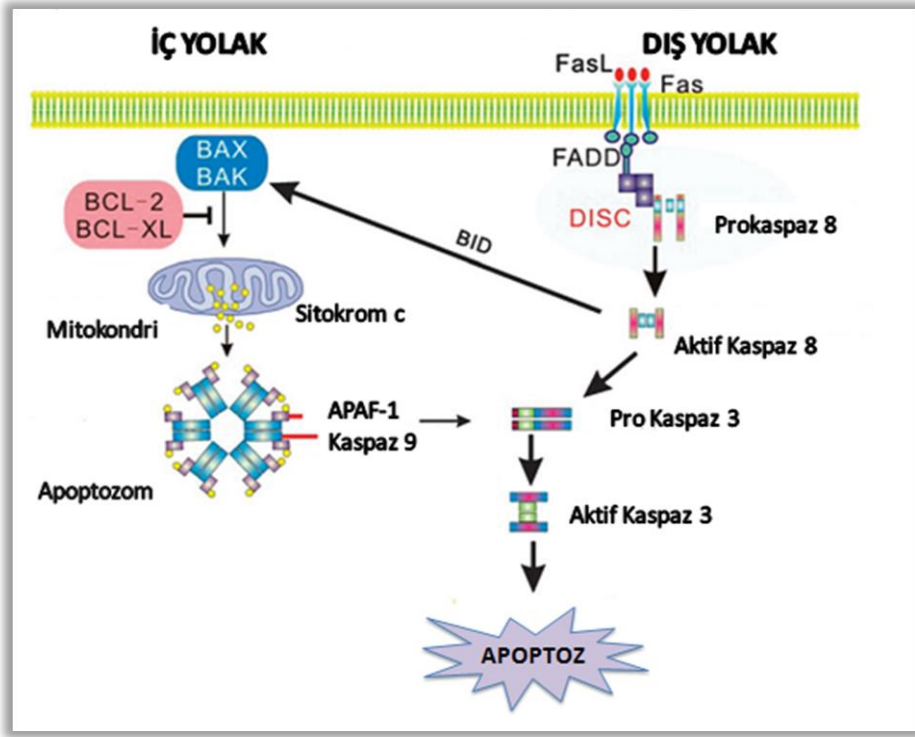
1.6.2. Apoptoz Mekanizmaları

Apoptoz, birden fazla moleküler yolak tarafından tetiklenen ve genetik olarak önceden belirlenmiş bir mekanizmadır. Memelilerde, iki ayrı apoptotik yolak vardır ve her ikisinde kaspaz aktivasyonu ile sona erer. İki ana apoptotik yolak; dış yolak (kaspaz 8 ya da ölüm reseptör aracılı yolak) ve iç veya mitokondriyal yolak (kaspaz 9 yolağı).

Dış yolak; reseptöre özgü pro-apoptotik molekül ya da ligandlar tarafından aktive edilen hücrenin yüzeyinde bulunan pro-apoptotik reseptörler ile başlamaktadır. Hücre yüzeyinde bulunan TNF, Fas/CD95, DR3, DR4/DR5 reseptörlerine TNF alfa veya FasL (Fas ligand)/CD95L, TWEAK ve TRAIL gibi ligandları bağlanarak dış yolağı başlatırlar (Pećina-Šlaus 2010, s.3; O'Brien ve Kirby 2008, Kroemer vd., 2007).

Ölüm reseptörleri arasında en yoğun çalışılan Fas reseptörü, TNFR1 tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör ailesine aittir. Fas reseptörü üzerine bağlanan ölüm ligandı, apoptotik cevabı tam olarak tetiklemek ve gerekli olan apoptotik sinyalleri güçlendirmek için reseptörlerin dimerizasyonunu sağlar. Ligand bağlandıktan sonra, reseptörlerin hücre içi domaininde konformasyonel değişim "**ölüm domaini**"(DD) adı verilen spesifik domainin varlığında meydana gelmektedir. Aktivasyon sonra, FADD yada TRADD gibi sitoplazmik yüzey

adaptör protein reseptörleri ile birleşir. Başlatıcı kaspaz-8, ölüm efektör domaini (DED) adaptör molekülüne bağlanır ve **kaspozom** oluşumu ile sonuçlanır. Kaspozom ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISK) olarak bilinir (Pećina-Šlaus 2010).



Şekil 1.7. İç ve dış apoptotik yollar
Kaynak: Tan vd., 2014 s.980

İç mitokondriyal yolak; DNA hasarı, radikal oksijen türleri, radyasyon, hormon ya da büyüme faktörü yoksunluğu, kemoterapötik maddeler, sitokinler ve glukokortikoidler gibi hücrestreslere cevap olarak hücre içinde başlatılır. Bu yolak, B-hücre lenfoma-2 (Bcl-2) protein ailesi olan pro-apoptotik ve anti-apoptotik elemanları arasındaki aktivitenin dengesine bağlı olarak apoptoz uyarılır (O'Brien ve Kirby 2008). Bcl-2 ailesi proteinleri; anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, A1 ve Mel-1) ve pro-apoptotik (Bax, Bak, Bok, Bid, Bim, Bad, Noxa ve Puma) (Osellame vd. 2012).

Anti-apoptotik üyeler, apoptozu tetikleyen üyelerin aktivasyonunu, mitokondriyal dış membran permeabilizasyonunu inhibe ederek apoptotik

mekanizmanın başlamasını durdururlar (Şimşek ve Vatansever 2014). Sitokrom C salınımı, Bcl-2 ailesi üyeleri tarafından düzenlenir (Chang ve Yang 2000). Elektron taşıma zincirinin önemli bir bileşeni olan sitokrom c, normalde mitokondri iç ve dış zarı arasındaki boşlukta bulunur ve sitoplazmada serbest kalması apoptotik süreci başlatır. Ayrıca, pro-apoptotik düzenleyicilerden Bcl-2 ailesinin bir üyesi olan BID (Bcl-2 etkileşim domaini), aktif kaspaz-8 tarafından parçalanarak Bax'ın hedefi olan mitokondrinin membranı ile oligomerizasyonuna ve sitokrom c salınımına neden olmaktadır (Eröz vd., 2012). Sitokrom c serbest kaldıktan sonra, APAF-1'e (apoptotik proteaz aktive eden faktör) bağlanır. Apaf-1/sitokrom c kompleksine ATP bağlanmasıyla birlikte, apoptozom oligomerizasyonu oluşur bu da prokaspaz 9'u aktif kaspaz 9'a dönüştürür. Aktif kaspaz 9 diğer efektör kaspazları aktive ederek kaspaz kaskadını başlatır (Osellame vd., 2012, Hu 2003).

1.7. Hücre Döngüsü ve Kanser

Hücre döngüsü; **G1**, **S**, **G2** ve **M** olmak üzere dört fazdan oluşur. Bu fazların ikisinde, hücrelerin bölünmesi için iki temel olay gerçekleşir; genetik materyalin üretimi (S fazı) ve iki özdeş yavru hücre arasında tüm hücresel bileşenlerinin paylaşılması (mitoz veya M fazı). Döngünün diğer iki aşaması ise G1 ve G2 fazı; S ve M fazlarının başarıyla tamamlanması için hazırlık aşamasıdır. Hücre çoğalması durduğu zaman, belirli antimitojenik sinyaller varlığında yada uygun mitojenik sinyallerin yokluğunda "**G0**" olarak bilinen durgun faza girerler (Malumbres ve Mariano Barbacid, 2001).

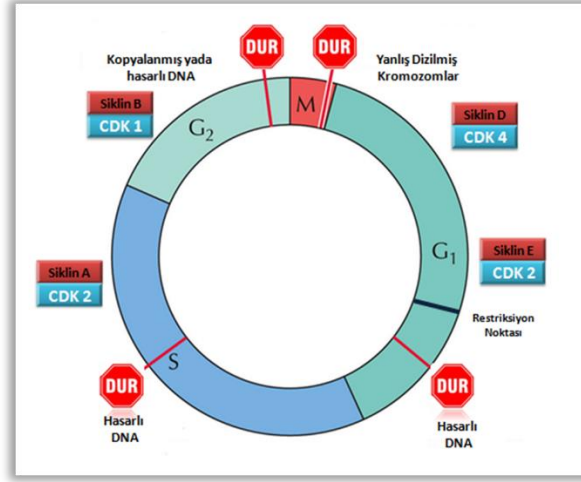
Apoptoz, doku homeostazında, embriyonik gelişim ve immün yanıt gibi birçok fizyolojik süreçte rol oynar. Doku homeostazı, hücre çoğalması, farklılaşması ve hücre ölümü arasındaki dengeye bağlıdır. Bu nedenle, proliferasyon ve apoptoz arasındaki denge oldukça önemlidir ve bu iki süreç arasında oluşan dengesizlik, istenmeyen doku büyümesine neden olmaktadır. Tümör oluşumu da hücre ölümünde azalma ve hücre çoğalmasında bir artışa bağlı olarak oluşur (Perryman ve Sylvester, 2006). Hücre döngüsünde olayların zamanlaması; G1/S faz geçişinde, S'de ve G2/M fazı geçişinde hücre döngüsü kontrol noktaları tarafından düzenlenir. Bu kontrol noktalarıyla, yeni bir faza

geçilmeden önce DNA replikasyonu ve kromozom ayrımı gibi kritik olaylar kontrol edilir ve böylece genetik olarak anormal hücrelerin oluşumu engellenir (King ve Cidlowsk 1998). Hücrelerde DNA'da meydana gelen hasara göre hücre siklusu kontrol noktaları, G1'den S fazına veya G2'den mitozu geçişi engeller. Örneğin; G2 fazında bulunan kontrol noktası replike olmamış DNA'ya hassastır ve eğer DNA tam olarak replike olmamışsa hücre döngüsü durdurulur ve mitozu geçemez. DNA'sı replike olmamış hücrelerde mitozu giriş, kinaz komplekslerinin inaktivasyonu ile engellenir. Replikasyon tam olarak tamamlanıncaya kadar hücreler G2'de kalır. Ayrıca, radyasyon maruziyeti ile hasara uğrayan DNA tamamen tamir oluncaya kadar hücre yine G2 fazında kalır (King ve Cidlowsk 1998).

Kanser gelişimini doğrudan veya dolaylı olarak etkileyen **onkogenler** (*Her 2, lneu, ras, c mycvb*) ve kanser gelişimini baskılayan **tümör baskılayıcı genler** (*p53 ve Rb*) hücre döngüsünde rol oynarlar. DNA hasarına yanıt olarak salınan p53 geni işlevini kaybederse, hücre büyümesinin kontrolü ortadan kalkar ve DNA tamiri olmadan hücre döngüsü kontrolsüz devam eder, böylelikle genomik kararsızlık ve mutasyonlar ortaya çıkar. Normal hücrelerde DNA hasarı olduğunda, p53 geni hücre döngüsünü G1'de durdurur ve hücreye tamir için zaman kazandırır, hasar tamir edilemiyorsa apoptozu gider. Hücre döngüsünün son aşamasında ise mitoz sonundakromozomların iğsi iplikçik üzerinde düzgün dizilmeleri ve kromozomların yavru hücrelere eşit olarak dağılımı da kontrol edilir (Çoğulu vd., 2007, Cabadak, 2008).

Hücre döngüsü serin/treonin protein kinaz ailesinin kontrolü altındadır. Bu kinazlar, Siklin-bağımlı protein kinaz (Cdk), düzenleyici alt birim, Cdk'nın aktifleşmesi için gerekli olan Siklin ve katalitik alt birimden oluşan heterodimerlerdir. Bugüne kadar, insan genomunda Siklinleri kodlayan 29 ve Cdk'ları kodlayan 21 gen bulunmuştur. Bunlardan, Cdk 1, 2, 4, 6 ve A, B, E, D tipi Siklinler hücre döngüsünün en büyük düzenleyicileridir (Bretones vd., 2015). Hücre döngüsü geçişleri Siklin-CDK komplekslerinin çoklu fosforilasyonu ile gerçekleşir. S fazında belirli genlerin aktivasyonu için RB fosforilasyonu ile E2F transkripsiyon faktörü serbest bırakılır. Hücre döngüsünün negatif düzenlenmesi ise p21'in aktivasyonu ile olur (Alenzi, 2004).

Cdk'ların ekspresyonu, hücre döngüsü boyunca nispeten sabit kalırken Siklinler ise hücre döngüsü sırasında periyodik bir şekilde sentezlenir ve yıkılırlar (Şekil 1.8). Aktif Cdk4 ve Cdk6'yatercihen bağlanan D-tipi Siklinlerin (D1, D2 ve D3)ekspresyonu G1 fazının erken aşamasının mitojenik sinyalleridir (Bretones vd., 2015).



Şekil 1.8. Hücre döngüsünde kontrol noktaları ve CDK/Siklin kompleksleri
Kaynak: Alberts vd, 2006

G1'in ilerleyen evresinde, E-tipi Siklinlere (E1 ve E2) bağlanarak Cdk2 aktive edilir. G1 fazında Cdk'ların aktivasyonu, E2F transkripsiyon faktörlerinin birikmesini sağlar bu da retinoblastoma proteininin (Rb) fosforilasyonuna yol açar. E2F transkripsiyonel hedefleri S-fazı için gerekli olan proteinleri kodlayan genleri içerir. (Bretones vd., 2015). Hücre G1'in geç fazındaki sınırlama noktasını geçtiğinde, geri dönüşümsüz olarak S fazına geçer ve DNA'sını replike eder. D tipi Siklinler, Siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve Rb proteini sınırlama noktasının geçişini düzenleyen kontrol sisteminin elemanlarıdır. Rb proteinlerinin fosforillenmesi, aktif Siklin D-CDK4-6 kompleksleri tarafından G1 fazı boyunca ilerlemeyi sağlar. Fosforillenmemiş Rb sitoplazmada E2F transkripsiyon faktörleri DNA sentezi için gerekli proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonlarını düzenler. G1'in geç fazında diğer Siklin CDK kompleksleri tarafından tamamlanan Rb fosforilasyonu E2F transkripsiyon faktörlerinin serbest kalarak aktive olmasına ve G1 fazından S fazına geçişe neden olur. Rb'nin tam

fosforilasyonu ve E2F'den ayrılması hücrenin geri dönüşümsüz olarak DNA sentezine başlamasına neden olur (Lodish vd., 2011). S fazında ise A-tipi Siklinler A1 ve A2 ile Cdk2 kompleksleri vardır. Siklin A, DNA'nın replikasyonu için gereklidir ve S, G2 fazları boyunca ifade edilir. (Bretones vd., 2015).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Dulbecco's Modified Eagle's medyum (DMEM), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT), dimetil sülfoksit (DMSO), ethidyum bromid ve akrinin oranj Sigma Aldrich firmasından sağlanmıştır. Fötal sığır serumu (FBS), penisilin-streptomisin ve Tripsin/EDTA PAA Laboratories GmbH firmasından elde edilmiştir. Kaspaz 3-9 aktivasyon test kiti, Biovision; Hücre döngüsü duraklanması ve Anneksin V test kiti BD firmasından elde edilmiştir. DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) ve NaHCO₃ (sodyum bikarbonat), AppliChem; tripan mavisi solüsyonu, Thermo Scientific; TritonX-100, BDH Prolabo firmasından sağlanmıştır.

2.2. Test Maddelerinin Hazırlanması

Doksorubisin, DMSO içinde çözülerek 100 mM ana stok olarak hazırlanmış ve kullanılan medyum içinde ana stok seyreltilerek 1 mM ara stok elde edilmiştir. Hep-G2 hücrelerine uygulanacak olan 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 ve 100 µM Doksorubisin dozları DMEM medyum içinde seyreltilerek hazırlanmıştır. Diğer test maddesi **Kaempferol**'de DMSO içinde çözülerek 174 mM ana stok olarak hazırlanmış, DMEM medyum içinde ana stok seyreltilerek 1,74 mM, ara stok elde edilmiştir. Hep-G2 hücrelerine uygulanacak olan 0.5, 1, 5, 10, 50, 150 ve 174 µM Kaempferol dozları DMEM medyum içinde seyreltilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan bütün dozlardaki DMSO'nun final oranı %0,1'in altındadır.

2.3. YÖNTEM

2.3.1. Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan Hep-G2 (insan hepatosellüler karsinoma) hücre hattı Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) kapsamında desteklenen bir proje ile Prof. Dr. Hülya Sivas tarafından ATCC hücre bankasından satın alınmıştır ve Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Hücre Kültürü Laboratuvarı koleksiyonundan hediye edilmiştir.

Çalışmada kullanılan Hep-G2 (insan hepatoselüler karsinoma) hücresi, %10 FBS (fötal sıgır serumu), % 0,1 penisilin-streptomisin, L- glutaminli NaHCO₃ içeren DMEM besiyeri içinde içerisinde 37°C’de %5 CO₂içeren ortamda ve atmosfer nemi altında kültür edilmiştir. Hücreler 25 cm² veya 75 cm²’lik flasklarda büyütülmüş, % 70 yoğunluğa ulaştıktan sonra % 1’lik tripsin/EDTA ile muamele edilerek pasajlanmıştır. Hücreler medyum içinde süspanse edilmiş, tripan mavisii ile 8 kuyulu tabakalar kullanılarak Cedex XS hücre sayım cihazında sayılmış ve ml’deki hücre sayısı tespit edilmiştir (Sivas, 2011).

2.3.2. Hücre canlılığı ve proliferasyonunun belirlenmesi

Kolorimetrik bir yöntem olan MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] canlılık testiyle, bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı, hızlı ve nicel olarak saptanabilmektedir. Yöntem, sağlıklı hücrelerin mitokondrilerindeki dehidrogenaz enziminin MTT boyasındaki tetrazolium halkasını parçalayabilmesi esasına dayanmaktadır (Kısmalı ve Sel 2012, s.80, Mosmann 1983, s.56).Hep-G2 hücreleri,10×10³ hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu plakalara ekilmiş ve 24 saat kültür koşullarında inkübe edilmişlerdir. Daha sonra,1 µl/ml DMSO, Dox,Kaempferol ve kombinasyonları ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyona devam edilmiştir. İnkübasyon süreleri sonunda, her bir kuyuya final dilüsyonu 5mg/ml olacak şekilde 125 µl MTT solüsyonundan eklenmiştir. 2 saat inkübasyon süresinin ardından solüsyon uzaklaştırılmış, her bir kuyuya canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözülmesi için

100µl DMSO eklenmiş ve 15 dakika boyunca çalkalayıcı tablada (GFL-3012) bekletilmiştir. Formazan kristallerinin oluşturduğu renk şiddeti, ELISA (ELx808-IU) cihazında 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Mosmann, 1983). MTT deneyleri her bir dilüsyon için 4-8 kuyucuk olmak üzere en az 2 ayrı deney şeklinde gerçekleştirilmiştir.

2.3.3. Apoptotik etkinin belirlenmesi

2.3.3.1. Akridin oranj/etidyum bromid (AO/EB) çift boyama

Akridin oranj (AO) ve etidyum bromür (EB) boya ları floresan boyalardır. AO, nükleik asit boyayan floresan katyonik bir boyadır. Apoptozda gözlenen kromatin değişimlerini ve hücre döngüsünün evrelerini belirlemek için de yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA ile etkileştiğinde yeşil, RNA ile etkileştiğinde kırmızı renk görünür. EB de yine DNA çift zinciri arasına interkalasyonla bağlanabilen ve UV ışığı altında turuncu renk veren bir boyadır. AO canlı hücrelerin yapısına girebilir ve nükleik asitleri yeşil boyar. Sitoplazmik yapılar da sarı-yeşil renkte gözlenir. Ancak, EB sadece ölü hücrelerin zarlarından geçebilir ve hücrenin kırmızı turuncu görünmesine yol açar. Bu prensiple, bu iki boyanın apoptotik hücre belirleme çalışmalarında birlikte kullanılmasıyla ölü canlı hücre ayrımı yapılabilmektedir (Wells, 1988).

Çalışmamızda, test maddesi uygulamasının ardından apoptotik (canlı) ya da nekrotik (ölü) Hep-G2 hücrelerinin belirlenmesi ve görüntülenmesi için AO-EB boyaması yapılmıştır. 6 kuyulu plakaya 3×10^5 /kuyu olacak şekilde ekilen hücreler 24 saat inkübasyonun ardından test maddeleri ile muamele edilmiş ve 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her bir kuyu 1 ml besiyeri içerisinde toplanarak 150 xg'de 5 dakika santrifüj edilmiş, pellet üzerine 25 µl besiyeri ilave edilmiştir. Boyama için 100 mg/ml akridin oranj ve 100 mg/ml etidyum bromid ile 1:1 oranında karıştırılarak ana stok hazırlanmıştır. Ana stok boya 1:9 oranında besiyeri ile seyreltilerek bir ara stok hazırlanmıştır. Hazırlanan ara stok boyadan süspanse hücreler üzerine 1 µl ilave edilerek preperat haline getirilmiştir. Daha sonra floresan mikroskopta (Olympus, BX50) incelenerek fotoğrafları çekilmiştir (Nairs vd., 2011).

2.3.3.2. Kaspaz 3-9 enzim aktivasyonunun belirlenmesi

Hücrelerdeki proteaz kaspaz ailesinden ICE (insan interlekin-1 beta dönüştürücü enzimi)ailesinin aktivasyonu apoptozu başlatır. Kaspaz-3/CPP32 kolorimetrik test kiti DEVD sekansını, Kaspaz-9 kolorimetrik test kiti ise LEHD sekansını tanıyan kaspaz aktivitesini ölçer. Test prensibi; işaretli substrat DEVD-pNA'dan ayrılmanın ardından, kromofor p-nitroanilin (pNA)'ın spektrofotometrik tespitine dayanır.

Kaspaz aktivasyonunun belirlenmesi (BioVision, Caspase3-9 colorimetric assay) kiti kullanılarak, üretici firmanın önerdiği protokole göre uygulanmıştır. Bu amaçla, test maddeleriyle apoptozu uyarılan hücreler 1×10^6 hücre olacak şekilde pellet haline getirilmiştir. Prokolde belirtildiği şekilde, 50µl hücre liziz solüsyonu eklenen hücreler buzda 10 dk bekletilmiştir. Beklemenin ardından 10,000 x g'de 1 dakika santrifüj edilip protein miktarları Nanodrop® cihazı ile ölçülmüştür. Ardından kaspaz aktivasyon ölçümü için, kaspaz 3 ve kaspaz 9 için 100µg protein deney tüplerine alınarak, üzerlerine 10 mM DTT içeren reaksiyon tamponundan 50 µl eklenmiştir. Aktif kaspazların substratlarını parçalaması prensibine dayandığı için kaspaz 3 substratı olarak DEVD-pNA kaspaz 9 için ise; LEHD-pNA eklenerek bu karışım 37°C'de iki saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası, oluşan renk şiddeti 405 nm dalga boyunda ELISA mikroparka okuma cihazında(ELx808-IU) ölçülmüştür (Biovision Caspase 3, 9 Staining Kit data sheets).

2.3.3.3. Anneksin V/FITC -PI boyama yöntemi ile apoptoz analizi

Hep-G2 hücre hatlarında madde maruziyeti sonrasında hücre zarındaki değişimi belirlemek için BD Anneksin V/FITC Apoptoz Belirleme Kit I kullanılmıştır. Yapılan çalışma üretici firmanın protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Hep-G2 hücreleri için $7,5 \times 10^5$ 25'lik flasklara ekilmiş 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonrasında hücrelere 1 µl/ml DMSO, Doksorubisinin 0,5 ve 1 µM Kaempferol'ün 100 ve 150 µM dozu ve kombinasyonları 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından, her kuyudaki hücreler 1X

Trypsin-EDTA ile kaldırılarak 1ml medyum içerisinde toplanmış ve 5 dakika 1250 rpm'de santrifüj edilmiş ve medium pellet üzerinden uzaklaştırılmıştır. Ardından, 2 defa 2 ml soğuk PBS ile yıkanmıştır. Pellet üzerine 100 µl 1X Bağlanma Tamponu eklenmiştir. Ardından karanlık ortamda temiz bir tüp içerisine 5 µl Annexin V/FITC ve 5µl PI (Propidyum İyodür) eklenerek 1X Bağlanma Tamponu ile muamele edilen hücrelerden 100 µl alınarak 5 µl Annexin V/FITC ve 5µl PI boyalarının bulunduğu tüpe aktarılmıştır. 15 dakika oda ısısında ve karanlıkta bekledikten sonra üzerine 1X Bağlanma Tamponundan 400 µl eklenerek her tüpün 500 µl final hacime ulaşması sağlanarak karanlıkta 15 dakika muhafaza edilmiştir. FITC'nin verdiği floresan ışına flow sitometri cihazında (BD FACS Aria) analiz edilmiştir.

2.3.3.4. Hücre döngüsü analizi

Hep-G2 hücreleri madde maruziyetinden sonra G1, S ve G2 hücre döngüsü evrelerinin dağılımına etkisini araştırmak amacıyla hücrelerin DNA içeriği akım sitometride analiz edilmiştir. BD marka Cycle TEST™ Plus DNA reagent kit kullanılmıştır. Analiz, üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Hep-G2 hücreleri $7,5 \times 10^5$ 25'lik flasklara ekilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda, hücrelere serum içermeyen besi yeri ile 24 saat boyunca muamele edilmiş ve bütün hücrelerin G0/G1 evresinde eşitlenmesi amacıyla senkronize edilmiştir. Ardından, hücrelere 1 µl/ml DMSO, 0.5 ve 1 µM Doksorubisin, 100 µM Kaempferol ve ikisinin kombinasyonları 24 saat muamele edilmiştir. Daha sonra, hücreler kaldırılıp 1250 rpm'de 5 dk santrifüj edilip süpernatant kısmı uzaklaştırılarak 1 ml buffer solüsyon eklenmiş ve bu işlem bir kez tekrar edilmiştir. Hücre sayısı her tüp için 1×10^6 olacak şekilde ayarlanıp boyama işlemine geçilmiştir. Boyama işleminden önce, hücreler 400 g'de santrifüj edilip süpernatant kısım tamamiyle uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, 250 µl solüsyon A eklenip oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. Ardından, 200 µl solüsyon B eklenip 10 dk inkübasyonun ardından, son olarak 200 µl solüsyon C eklenip buz üzerinde karanlıkta 10 dk inkübe edilmiş ve akım sitometri cihazında (BD FACS Aria) analiz edilmiştir.

2.3.4. İstatistiksel Analiz

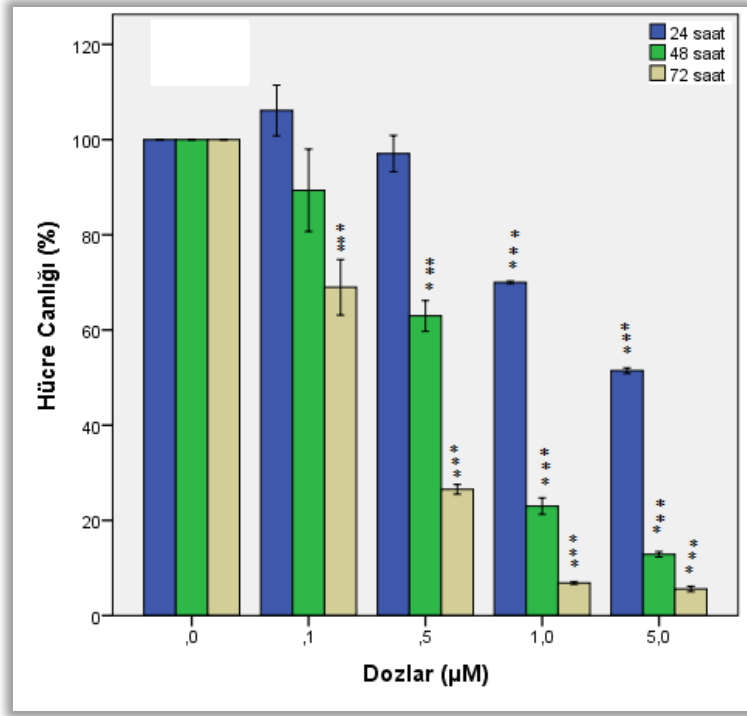
İstatistiksel analiz için SPSS 21 Windows (Statistical Programme for Social Sciences) paket programı kullanılmıştır. MTT, AO/EB boyama yöntemlerinden elde edilen veriler bu programda analiz edilmiştir. SPSS Statistics 21.0 programında Compare Means/One-way ANOVA analizinde Post-Hoc testlerinden Tukey ve Thamhene's T2 testleri uygulanmıştır. Varyans eşleşliği şartı Test of Homogeneity of Variances testi ile belirlenmiştir. Verilerin anlamlılık değerleri $p > 0.05$ ise Tukey, $p < 0.05$ ise Thamhane's T2 testinin sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. ANOVA testi ile belirlenen tüm istatistiksel analizler %95 güven aralığına göre analiz edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Hücre canlılığı ve Sitotoksite Analizleri

3.1.1. Doksorubisin'in Hep-G2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

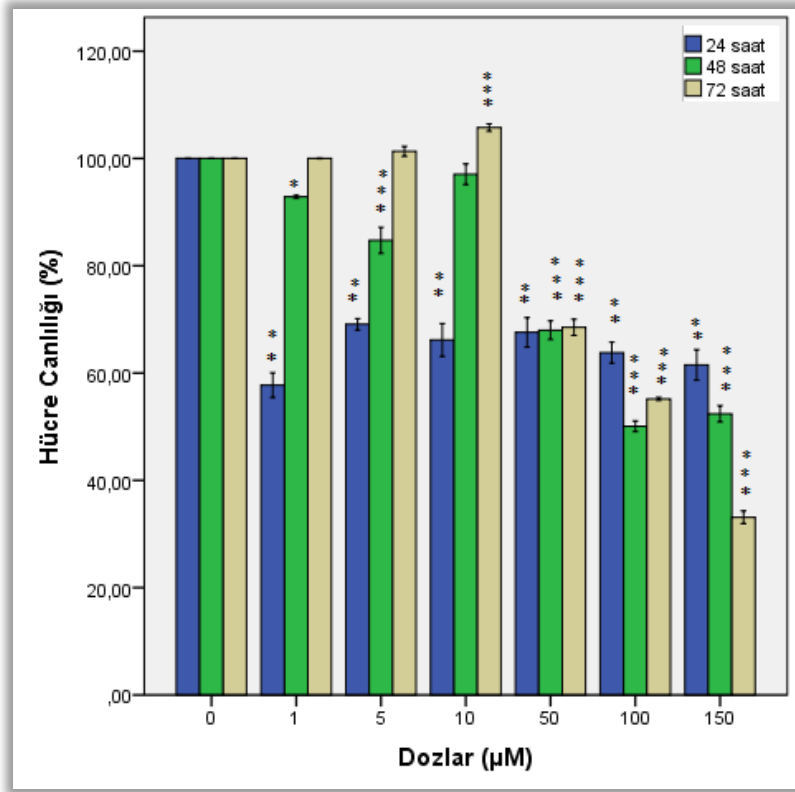
Materyal ve yöntemde belirtildiği gibi hücreler $1 \mu\text{l/ml}$ DMSO ve Doksorubisin'in belirli dozlarına 24, 48 ve 72 saat sürelerle maruz bırakılmıştır. Doksorubisin'in Hep-G2 Hücreleri üzerine sitotoksik etkisi MTT yöntemiyle belirlenmiştir. Bu amaçla; 0.1, 0.5 ve $1 \mu\text{M}$ aralığında dozların hücreler üzerindeki toksik etkileri araştırılmış ve sonuçlar Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde, Doksorubisin dozlarına maruz bırakılan Hep-G2 hücrelerinin canlılığında doza ve zamana bağlı olarak azalma gözlenmiştir. IC_{50} dozu, 48. saatte yaklaşık $0.5 \mu\text{M}$ olarak belirlenmiştir yani $0.5 \mu\text{M}$ Dox uygulanan hücrelerin canlılığı çözücü kontrol DMSO'ya göre % 50 oranında azalmıştır.



Şekil 3.1. Dokсорubisin'in Hep-G2 hücre canlılığı üzerine etkisi. Hücre canlılığı MTT testi ile belirlenmiştir. *** $p < 0.001$

3.1.2 Kaempferol'ün Hep-G2 Hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Dokсорubisin'in değeri belirlendikten sonra Kaempferol'ün Hep-G2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ve IC_{50} dozu da yine MTT yöntemiyle belirlenmiştir. Çalışmalar 1-150 µM Kaempferol doz aralıklarında sürdürülmüş ve sonuçlar Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Kaempferol'ün Hep-G2 hücre canlılığı üzerine etkisi. Hücre canlılığı MTT testi ile belirlenmiştir. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

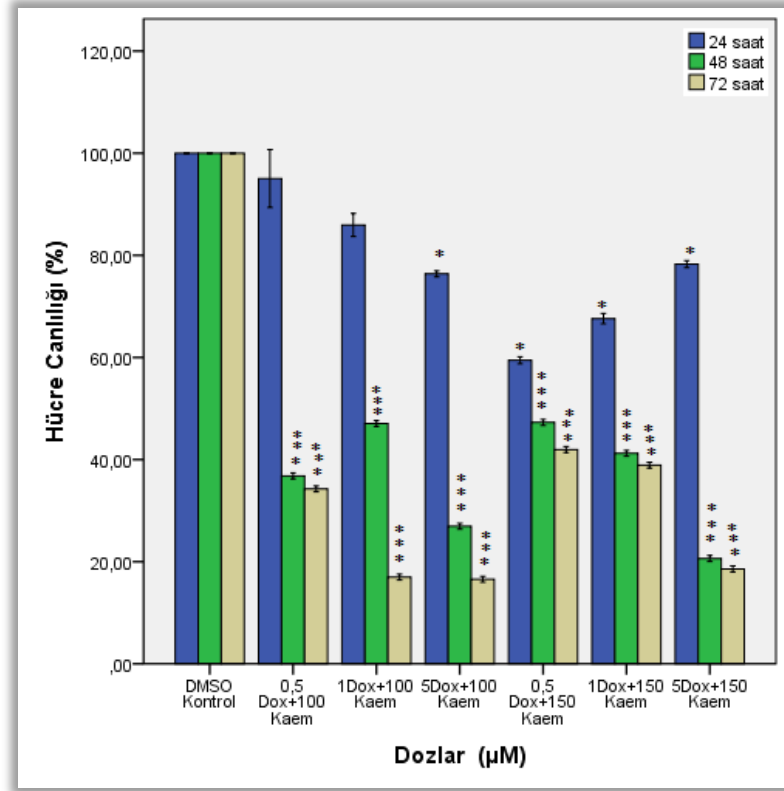
Şekil 3.2 incelendiğinde; Kaempferol'ün farklı dozlarına maruz bırakılan Hep-G2 hücrelerinin canlılığında özellikle 10 µM ve üzeri dozlarda, doza ve zamana bağlı olarak azalma gözlenmiştir. IC₅₀ dozu, hem 48 hem de 72. saatlerde yaklaşık 100 µM olarak belirlenmiştir.

3.1.3. Kombinasyonların Hep-G2 Hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Doksorubisin ve Kaempferol'ün farklı dozlarından yapılmış kombinasyonların Hep-G2 hücrelerindeki toksik etkileri de yine MTT yöntemi ile 24, 48 ve 72 saatlerde araştırılmış ve sonuçlar Şekil 3.3'de gösterilmiştir.

Kombinasyonlarda kullanılmak üzere, Kaempferol'ün tespit edilen IC₅₀ değeri (100 µM) ve bir yüksek dozu olan 150 µM seçilmiştir. Doksorubisin için ise 0.5 ve 1 µM dozları kombinasyonda sırasıyla kullanılmıştır. Şekil 3.3 incelendiğinde, Kaempferol-Dox kombinasyonunun farklı dozlarına maruz

bırakılan Hep-G2 hücrelerinin canlılığında Kaempferol ve Dox'un dozlarına ve zamana bağlı olarak azalma gözlenmiştir.



Şekil 3.3. Kombinasyonların Hep-G2 hücre canlılığı üzerine etkisi. Hücre canlılığı MTT testi ile belirlenmiştir. * $p<0.05$, *** $p<0.001$

Çizelge 3.1. Kombinasyonlar için IC₅₀ Değerleri

24 saat	48 saat	72 saat
100 µM Kaempferol	150 µM Kaempferol	150 µM Kaempferol
5 µM Dox	0.5 µM Dox	1 µM Dox

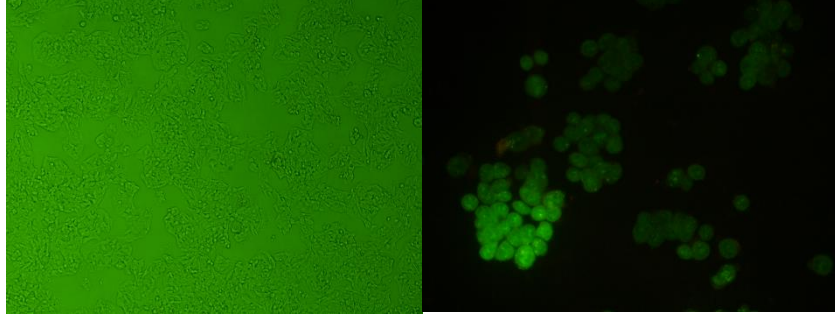
Kombinasyon uygulamasında 48 saatlik IC₅₀ değeri (100 ve 150 µM Kaempferol + 0.5 µM Dox), sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

3.2. Hep-G2 Hücrelerinde Apoptotik Morfoloji

Hep-G2 hücrelerine 1 µl/ml DMSO, Dox, Kaempferol ve kombinasyonları ile 48 saat muamele edilmiştir. Ardından, hücreler önce ters-faz mikroskopta, AO/EB çift boyamadan sonra floresan mikroskopta fotoğraflanmıştır. Fotoğraflar;

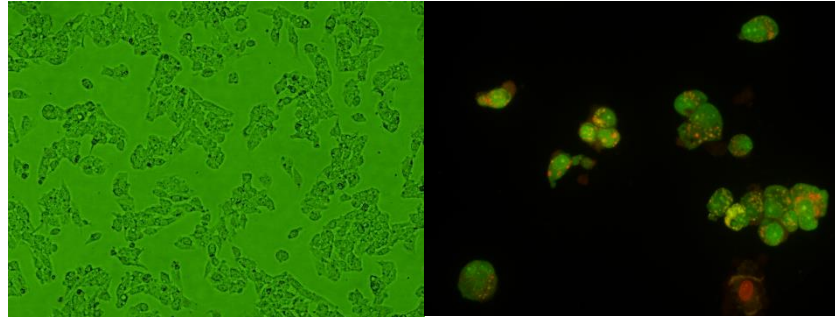
1 $\mu\text{l/ml}$ DMSO için Şekil 3.4.A’da, Dox için Şekil 3.4.B’de, Kaempferol için Şekil 3.4.C’de ve kombinasyon için ise Şekil 3.4.D’de gösterilmiştir.

Ters-Faz MikroskopAO/EB-Floresans Mikroskop
1 $\mu\text{l/ml}$ DMSO

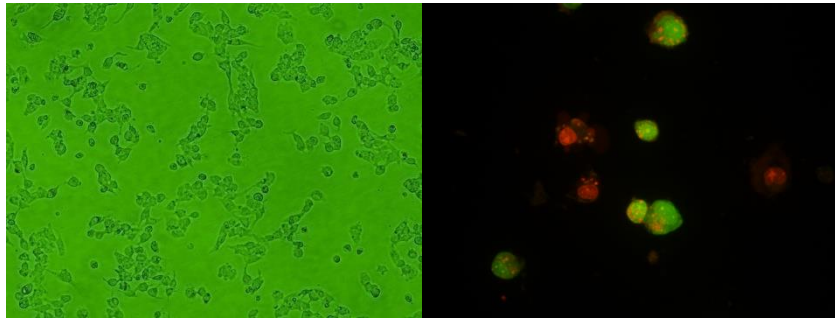


Şekil 3.4. 1 $\mu\text{l/ml}$ DMSO’ya 48 saat maruz bırakılan Hep-G2 hücrelerde meydana gelen apoptotik morfolojik değişimler (Büyütme; 400X).

Ters-Faz MikroskopAO/EB-Floresans Mikroskop
0, 5 μM Dox

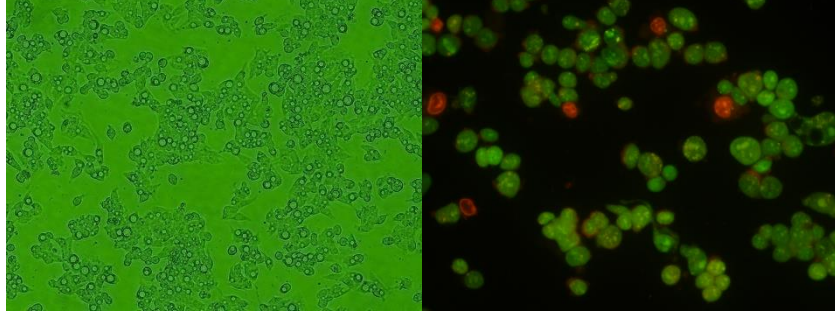


1 μM Dox

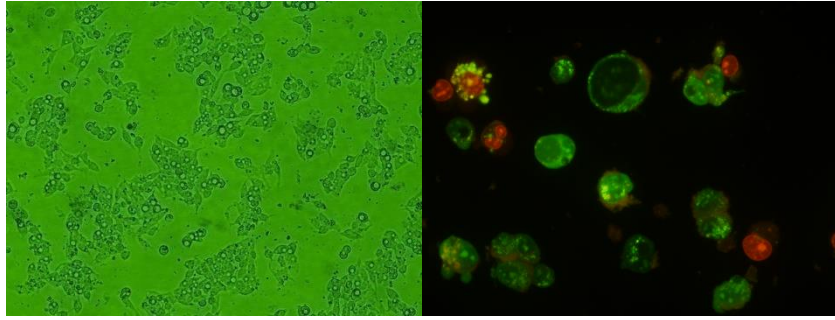


Şekil 3.5.A. Dox’a 48 saat maruz bırakılan Hep-G2 hücrelerde meydana gelen apoptotik morfolojik değişimler (Büyütme; 400X).

Ters-Faz MikroskopAO/EB-Floresans Mikroskop
100µM Kaem

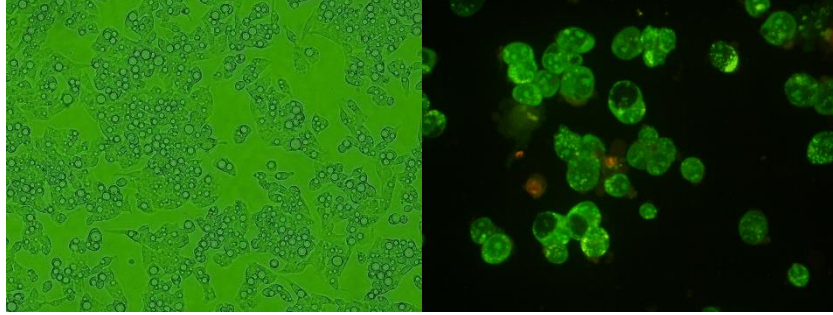


150 µM Kaem

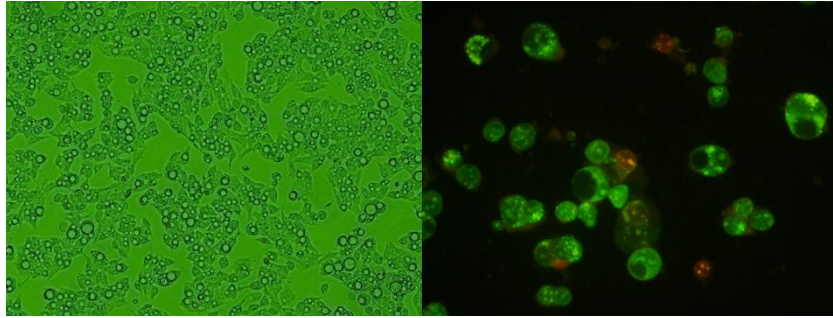


Şekil 3.4.B. Kaempferol'e 48 saat maruz bırakılan Hep-G2 hücrelerde meydana gelen apoptotik morfolojik değişimler (Büyütme; 400X).

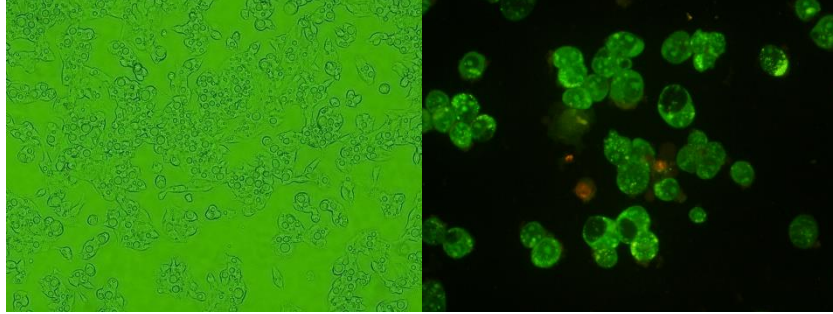
Ters-Faz MikroskopAO/EB-Floresans Mikroskop
0,5 μ M dox+100 μ M Kaem



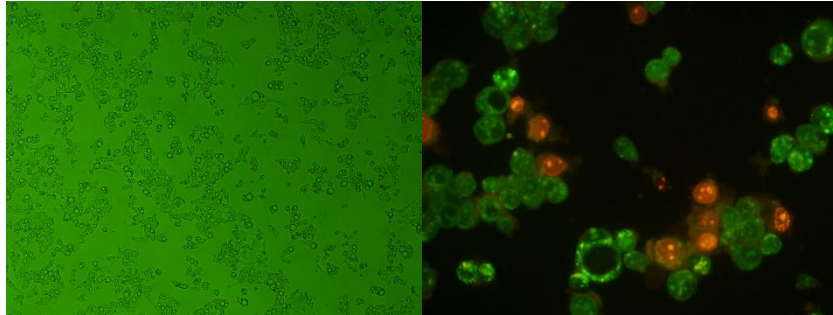
1 μ M dox+100 μ M Kaem



0,5 μ M dox+150 μ M Kaem



1 μ M dox+150 μ M Kaem



Şekil 3.5. C. Kaempferol-Doksorubisin'nin kombinasyonunun farklı dozlarına 48 saat maruz bırakılan Hep-G2 hücrelerinde meydana gelen apoptotik morfolojik değişimler (Büyütme; 400X).

AO/EB çift boyama ile homojen kromotin dağılımı gösteren, normal çekirdeğe sahip ve yeşil renkte görünen hücreler canlı (LN; live cells, normal nüclei), yoğunlaşmış veya fragmente olmuş kromatine sahip apoptotik çekirdekli parlak yeşil renkli hücreler ise erken apoptotik (LA; live cells, apoptotic nuclei) olarak ifade edilmektedir. Ölü (nekrotik) hücreler (DN; dead cells, normal nuclei); normal çekirdeğe sahip, parlak turuncu ya da kırmızı renkte; geç apoptotik hücreler (DA; dead cells, apoptotic nuclei); oldukça yoğunlaşmış ve fragmente bir kromatine sahip, çekirdekleri parçalanmış ya da çekirdek zarı düzensizleşmiş olup parlak kırmızı veya turuncu boyanmaktadır (Duke 2004). Her bir deney en az 2 kez tekrar edilmiş ve toplamda 500-1500 arasında hücre sayılmış ve apoptotik hücre yüzdesi aşağıdaki formülle belirlenmiştir.

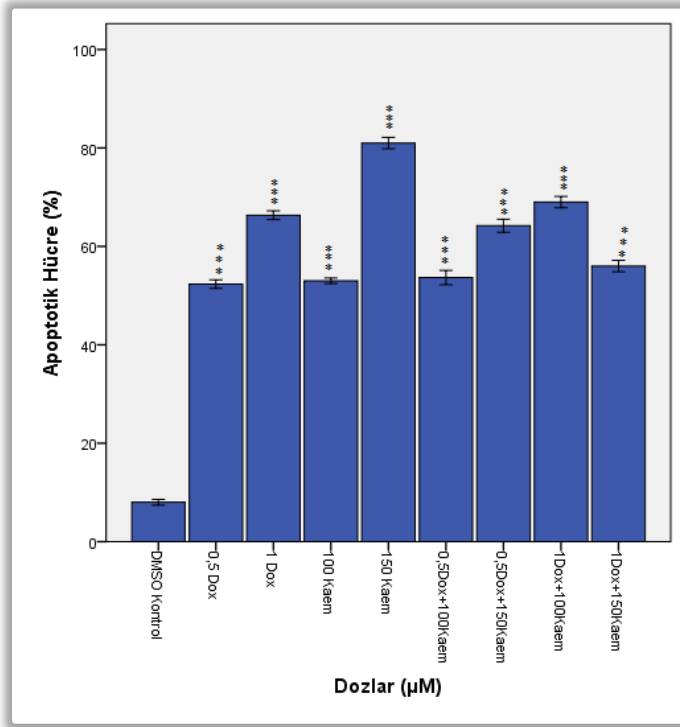
Apoptotik Hücrelerin Yüzdesi: $LA+DA/LN+LA+DN+DA \times 100$

Şekil 3.4'de görüldüğü gibi; kontrol hücrelerinde ve 1 µl/ml DMSO uygulanmış kontrol hücrelerinde, inverted mikroskopta, apoptotik hücre oranı oldukça düşüktür ve canlı hücrelerin plaka yüzeyinde birbiriyle bağlantılı ve homojen bir yerleşim gösterdikleri gözlenmiştir. AO/EB floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde ise; Doksorubisin, Kaempferol ve kombinasyonlarının farklı dozlarına muamele ile birlikte, hücrelerde apoptotik morfoloji gözlenmeye başlamıştır. Kromatin kondensasyonu, apoptotik bleb oluşumu, hücre büzüşmesi, düzensiz hücre şekli gibi morfolojik değişimler gözlenmiştir (Şekil 3.5.A-C). Canlı hücrelerde kromatin normal yeşil renkte, erken apoptotik hücrelerde, kromatin kondensasyonu parlak yeşil renkte gözlenirken, geç apoptotik ve nekrotik hücreler, etidium bromid alımı nedeniyle, turuncu ya da kırmızı çekirdekli, kondense veya fragmente olmuş kromatinler görülmüştür.

100 ve 150 µM arasında Kaempferol verilen hücrelerde, sayısı bakımından bir fark gözlenmezken, apoptoza morfolojisine sahip hücreler her ikisinde de yoğun miktarda gözlenmiştir. 150 µM dozunda diğerine oranla nekrotik hücre sayısında artış dikkati çekmektedir (Şekil 3.5.B). Dox'un 0.5 µM ve 1 µM dozları uygulanan hücrelerde, erken ve geç apoptotik ile nekrotik hücrelerin sayısında belirgin bir artış dikkati çekmektedir (Şekil 3.5.A). Kombinasyonların uygulandığı hücrelerde ise Dox miktarı yine 0.5 µM olmasına rağmen 100 ve 150 µM

Kaempferol ile birlikte verildiğinde, erken apoptotik hücrelerin gözleendiği, Kaempferol miktarı 150 μM 'e çıkarıldığında ise erken apoptotik hücrelerin sayısında bir fark görülmezken nekrotik hücrelerin sayısında belirgin bir artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.5.C).

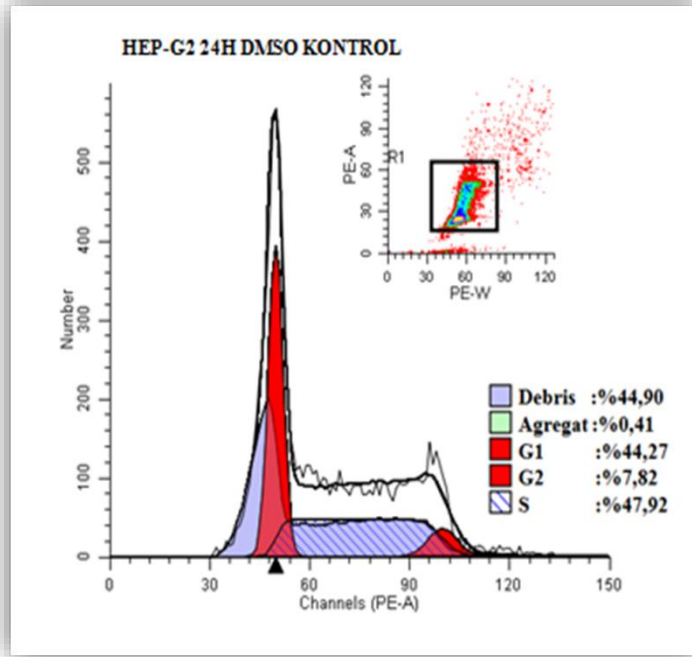
Hep-G2 hücrelerine 1 $\mu\text{l/ml}$ DMSO (çözücü kontrol) ile Doksorubisin, Kaempferol ve kombinasyonlarının farklı ksantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş ve hücreler sayılarak apoptotik hücre yüzdesi (apoptotik indeks) hesaplanarak oluşturulmuş grafik Şekil 3.6'da gösterilmiştir. Bu grafik incelendiğinde; hiçbir test maddesi uygulanmamış kontrol hücrelerinde ve 1 $\mu\text{l/ml}$ DMSO uygulanmış hücrelerde apoptotik hücre oranı %9'dur. 100 μM Kaempferol uygulanan hücrelerde apoptotik hücre oranı %52 iken 150 μM dozunda apoptotik hücre oranı %83'e yükselmiştir. Ayrıca 150 μM dozunda 100 μM dozuna oranla nekrotik hücre sayısında artış gözlenmiştir. Doksorubisin'in IC_{50} değeri (0,5 μM) uygulandığında, apoptotik hücre oranı %54 iken 1 μM Dox uygulanan hücrelerde bu oran %68 olarak belirlenmiştir. 0,5 μM Dox + 100 Kaempferol kombinasyonu uygulandığında ise apoptotik hücre oranı %56, Kaempferol miktarı 150 μM 'e çıkarıldığında ise apoptotik hücre oranı %71 olarak belirlenmiştir. 1 μM Dox + 100 Kaempferol'de apoptotik hücre oranı %66,6 iken Kaempferol miktarı 150 μM 'e çıkarıldığında apoptotik hücre oranı %58 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Doksorubisin,Kaempferol ve kombinasyonlarında apoptotik indeks (***) $p < 0.001$).

3.3. Hep-G2 Hücrelerinde Hücre Döngüsü Analizi

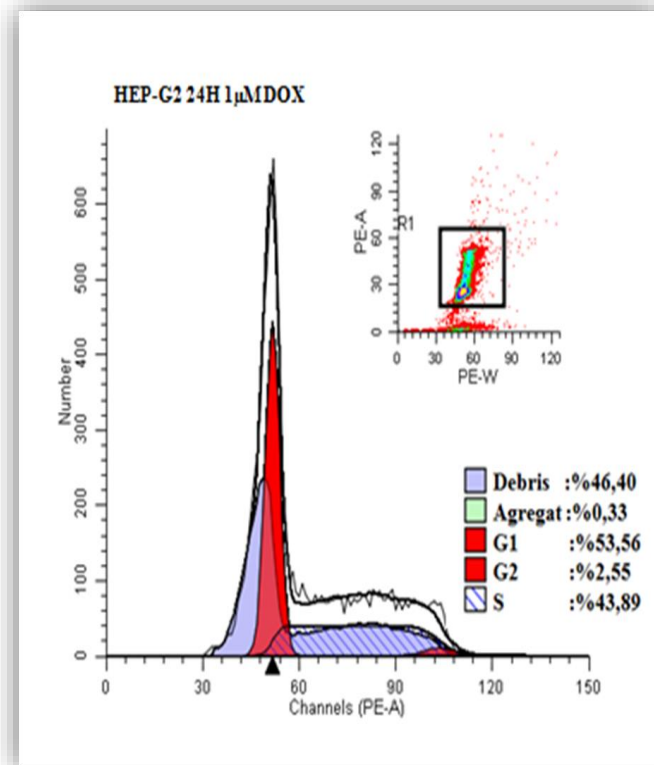
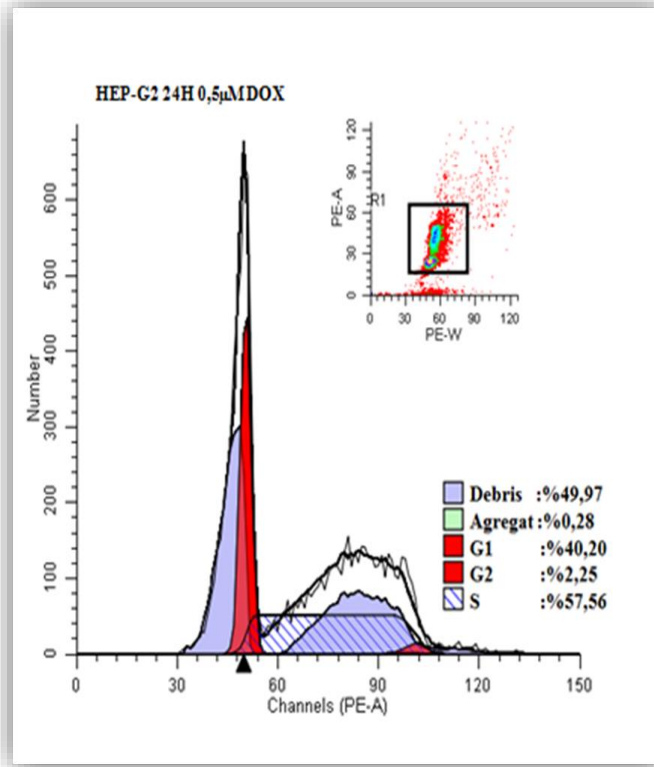
Materyal ve yöntemde anlatıldığı şekilde, Hep-G2 hücreleri 24 saat serum açlığında bırakılarak G0/G1 evresinde eşitlendikten sonra; hücrelere DMSO, Doksorubisin ve Kaempferol'ün belirli dozları 24 saat uygulanmıştır. Hücre döngüsü dağılımı üzerine etkisini belirlemek amacıyla akım sitometri (BD FACS Aria) cihazında analiz gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA içerik histogramında G1, G2 ve S evresindeki hücre değerleri yüzde olarak belirtilmiştir. 1 μl/ml DMSO (çözücü kontrol) ile muamele edilen hücrelerin akım sitometri sonuçları Şekil 3.7'de, Doksorubisin'in Şekil 3.8'de, Kaempferol'ün Şekil 3.9'da ve kombinasyonların ise sonuçları da Şekil 3.10'da verilmiştir.



Şekil 3.7. 1 µl/ml DMSO'nun Hep-G2 hücrelerinde hücre döngüsüne etkisi

3.3.1 Doksorubisin

24 saat uygulanan 0,5µM (IC₅₀) ve 1µM Doksorubisin'inHep-G2hücrelerden elde edilen DNA içerik histogramında G1, G2 ve S evresindeki hücre değerleri yüzde olarak belirtilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Dokсорubisin'in Hep-G2 hücrelerinde hücre döngüsüne etkisi

G1 evresinde; 24 saat inkübasyonda elde edilen değerler DMSO ile karşılaştırıldığında; 0,5 µM Doksorubisin uygulanan hücrelerin %4'ünün G1'de olduğu gözlenmiştir. 1 µM dozunda ise G1'deki hücrelerde yaklaşık %10'luk bir artış olmuştur. **S evresinde;** 24 saat Doksorubisin uygulanan örneklerde, hücre döngüsünün S evresindeki hücrelerin oranı çözücüye oranla, 0,5 µMdozu için % 10 oranında artış 1 µMdozu için ise % 4'lük bir azalış göstermektedir. **G2 evresinde;** 24 saatte Doksorubisin'inher iki dozunda da çözücü kontrole göre kıyasla G2 evresindeki hücrelerin sayısında% 5-6 azalışa neden olduğu tespit edilmiştir. % 0,1 DMSO ile Doksorubisin dozlarının Hep-G2 hücre döngüsü üzerinde yüzde dağılımları Çizelge 3.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. DMSO ve Doksorubisin'in Hep-G2 hücrelerinde hücre döngüsüne etkisi

Test Bileşenleri (µM)	% G1	%G2	%S
% 0.1 DMSO	44,27	7,82	47,92
0.5 Dox	40,20	2,25	57,56
1 Dox	53,56	2,55	43,89

3.3.2. Kaempferol

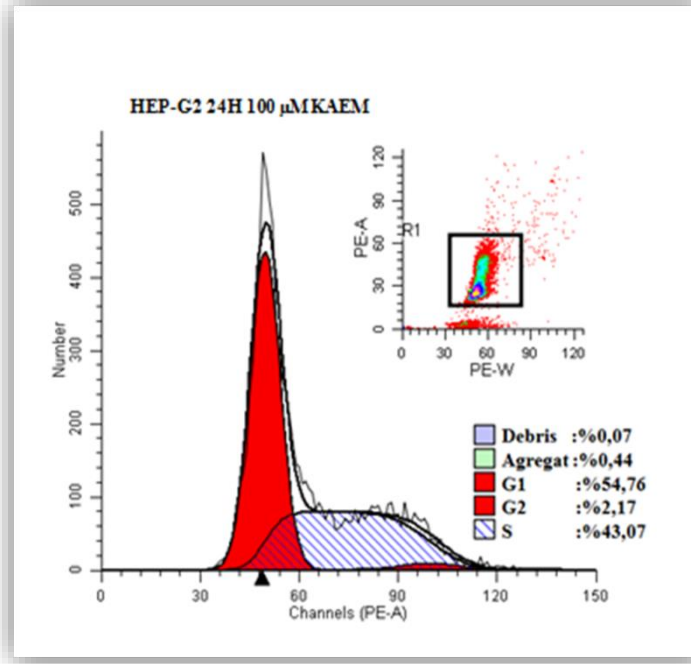
1 µl/ml DMSO ve 100 µM (IC₅₀) Kaempferol ile24 saat muamele edilmiş Hep-G2 hücreleriyle akım sitometri'de DNA analizi gerçekleştirilmiş ve sonuçlar DNA histogramında gösterilmiştir (Şekil 3.9).

Deney sonuçları çözücü kontrolün sonuçlarıyla kıyaslandığında;100 µM (IC₅₀) Kaempferol'ün,**G1 evresinde** tutuklanan hücre sayısında yaklaşık % 10 mış, **S evresinde** bulunan hücrelerin oranı da% 5 azalmıştır. **G2 evresinde** hücre sayısı ise% 6 azalmıştır.

1 µl/ml DMSO ve 100 µMKaempferol'ün 24 saat muamelesi sonucunda tespit edilen hücre döngüsü değerleri Çizelge3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. DMSO veKaempferol'ün Hep-G2 hücrelerinde hücre döngüsüne etkisi

Test Bileşenleri (µM)	% G1	%G2	%S
% 0,1 DMSO	44,27	7,82	47,92
100 Kaem	54,76	2,17	43,07



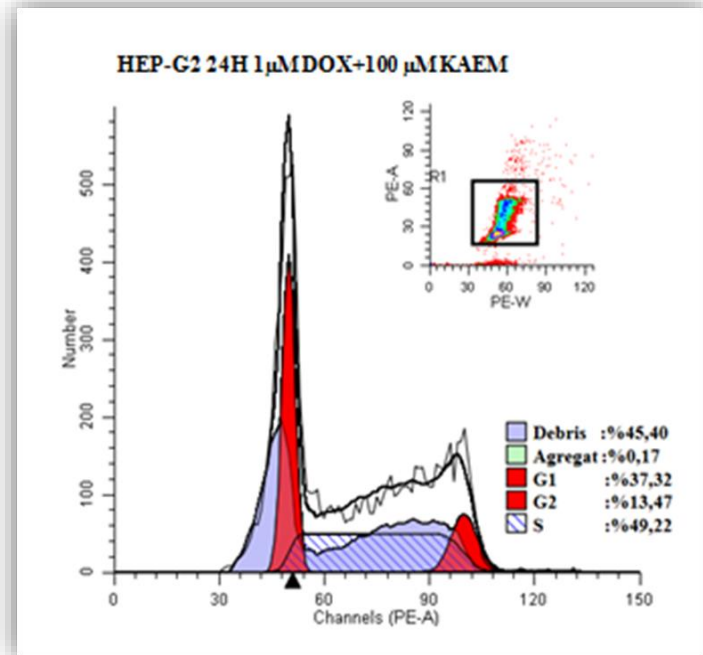
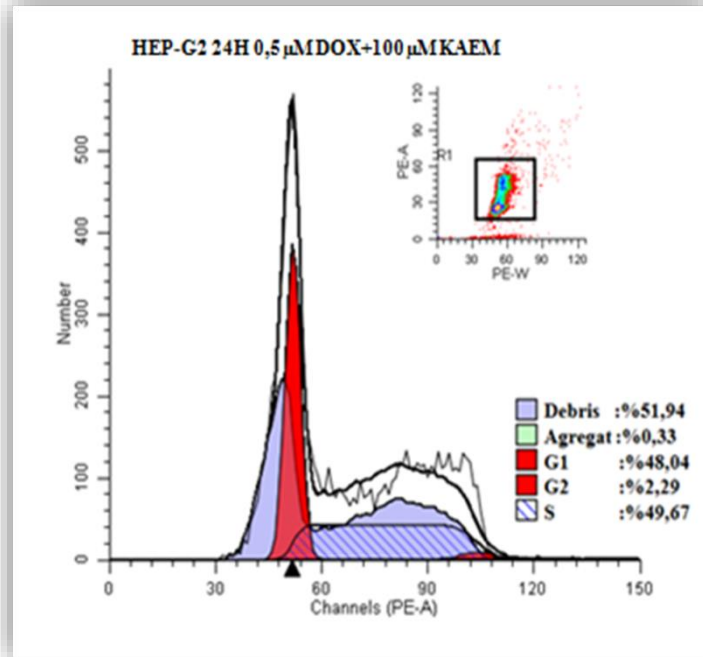
Şekil 3.9. Kaempferol 'ün Hep-G2 hücrelerinde hücre döngüsüne etkisi

3.3.3. Doksorubisin ve Kaempferol Kombinasyonu

Hep-G2 hücreleriyle akım sitometri'de DNA analizi gerçekleştirilmiş ve sonuç DNA histogramında gösterilmiştir (Şekil 3.10). 1 μ l/ml DMSO ile kıyaslandığında, 5 μ M Doksorubisin ve 100 μ M Kaempferol kombinasyonu uygulanan örneklerde, **G1'deki** hücrelerin oranında yaklaşık %4 oranında artış; 1 μ M Doksorubisin ve 100 μ M Kaempferol kombinasyon dozunda ise yaklaşık %7 azalış tespit edilmiştir. Her iki kombinasyon uygulanan örneklerde, hücre döngüsünün **S evresindeki** hücrelerin oranı, çözücüye oranla, zayıf (%2) bir artış göstermiştir. %0,1 DMSO ile 0,5 μ M ve 1 μ M Dox'un, 100 μ M Kaempferol ve kombinasyonlarının Hep-G2 hücre döngüsü üzerine etkisi, Çizelge 3.4'de verilmiştir. Ayrıca bütün örneklerin doza bağlı yüzde grafiği şekil 3.11'da belirtilmiştir.

Çizelge 3.4. DMSO ve kombinasyonların Hep-G2 hücre döngüsüne etkisi

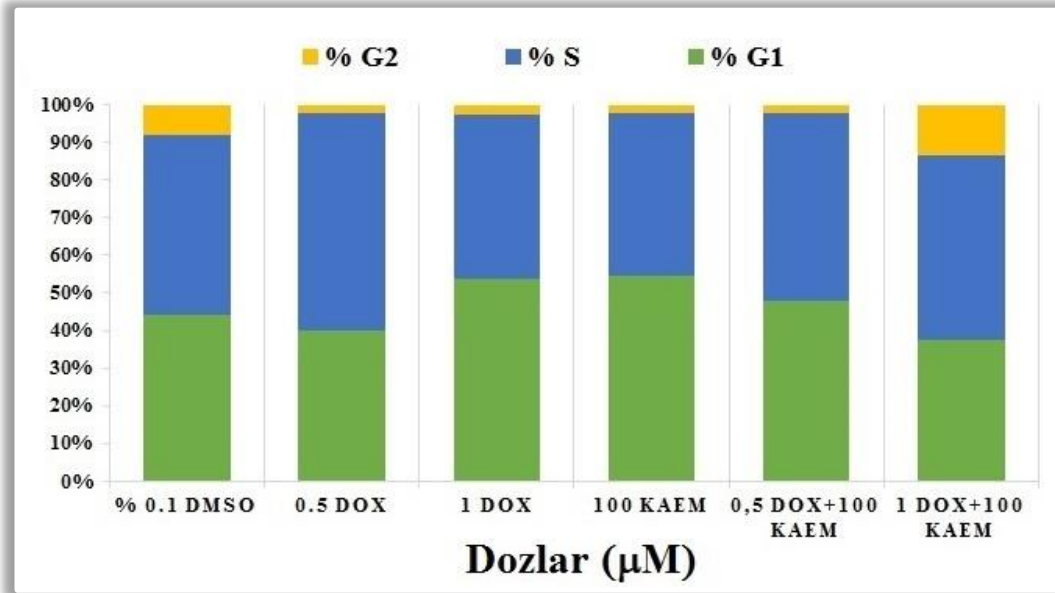
Test Bileşenleri (μ M)	% G1	% G2	% S
% 0,1 DMSO	44,27	7,82	47,92
0,5 Dox+100 Kaem	48,04	2,29	49,67
1 Dox+100 Kaem	37,32	13,47	49,22



Şekil 3.10. Kombinasyonların Hep-G2 hücrelerinde hücre döngüsüne etkisi

0,5 μ M Doksorubisin ve 100 μ M Kaempferol kombinasyonu uygulanan örneklerde, hücre döngüsünün **G1 evresindeki** hücrelerin oranı, çözücüye oranla yaklaşık % 4 oranında artmıştır. **S evresindeki** hücre oranında anlamlı bir değişim gözlenmezken, **G2'deki** hücrelerin oranında % 5'lik bir azalma görülmüştür. 1

μM doksorubisin ve 100 μM Kaempferol kombinasyonu uygulanan örneklerde artış oldukça dikkat çekmektedir. 0,5 μM doksorubisin ve 100 μM Kaempferol kombinasyonu yaklaşık %6 oranında azalmış; 1 μM doksorubisin ve 100 μM Kaempferol kombinasyon dozunda ise yaklaşık % 6 artış tespit edilmiştir.



Şekil 3.11. Doxorubisin, Kaempferol ve Kombinasyonların Hep-G2 hücreleri üzerindeki hücre döngüsü dağılımına etkisi

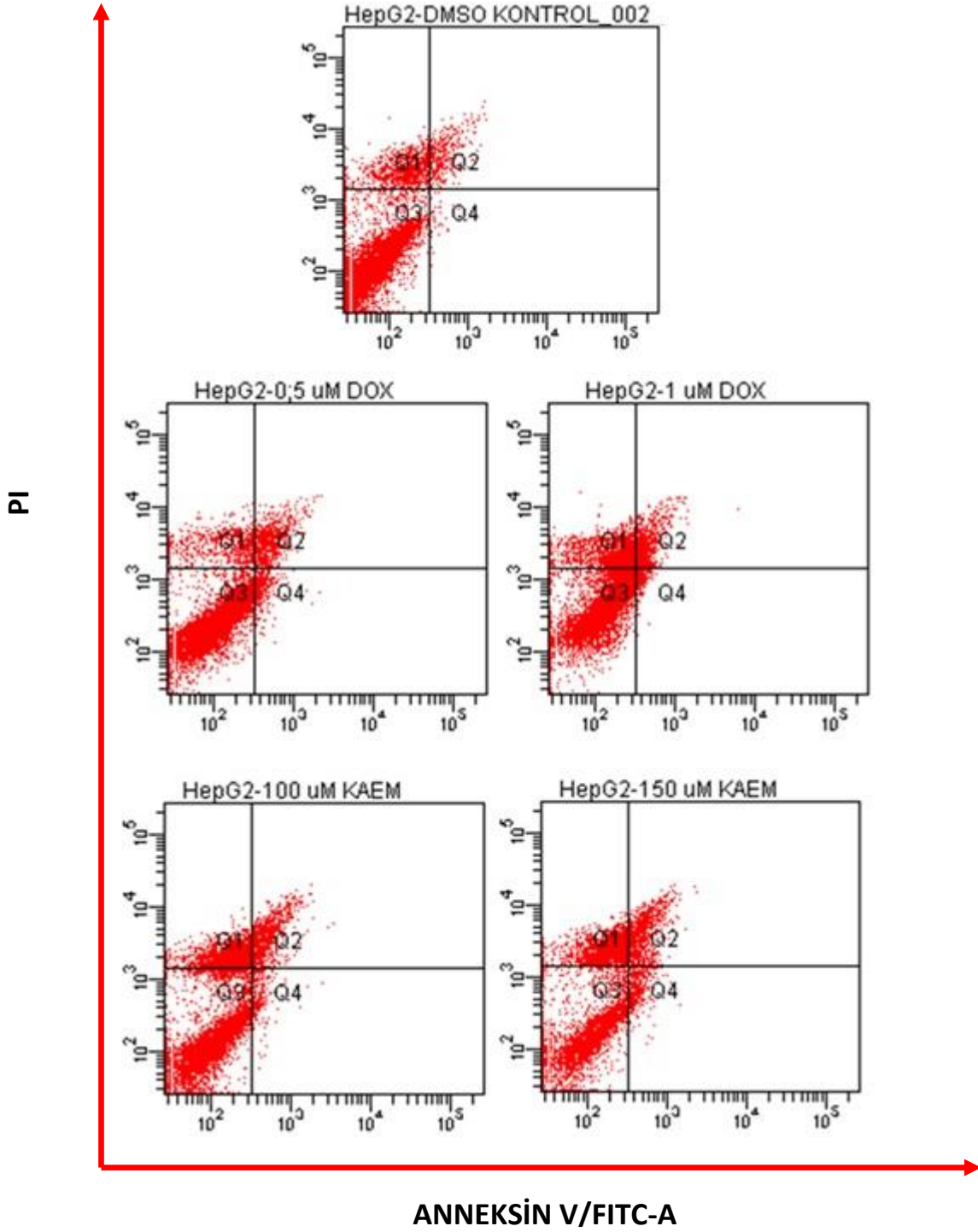
3.4. Hep-G2 Hücrelerinde Anneksin V/FITC-PI Analizi

AnnexinV-FITC-PI ile işaretlenmiş hücreler akım sitometri (BD FACS Aria) cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. 0,5 μM ve 1 μM Doksorubisin, 100 μM ve 150 μM Kaempferol ve kombinasyonları uygulanmıştır. Analiz sonuçları, kadranlı noktasal grafiğe çevrilmiş ve Şekil 3.12 ve Şekil 3.13’de verilmiştir. Kadranlı noktasal grafikte;

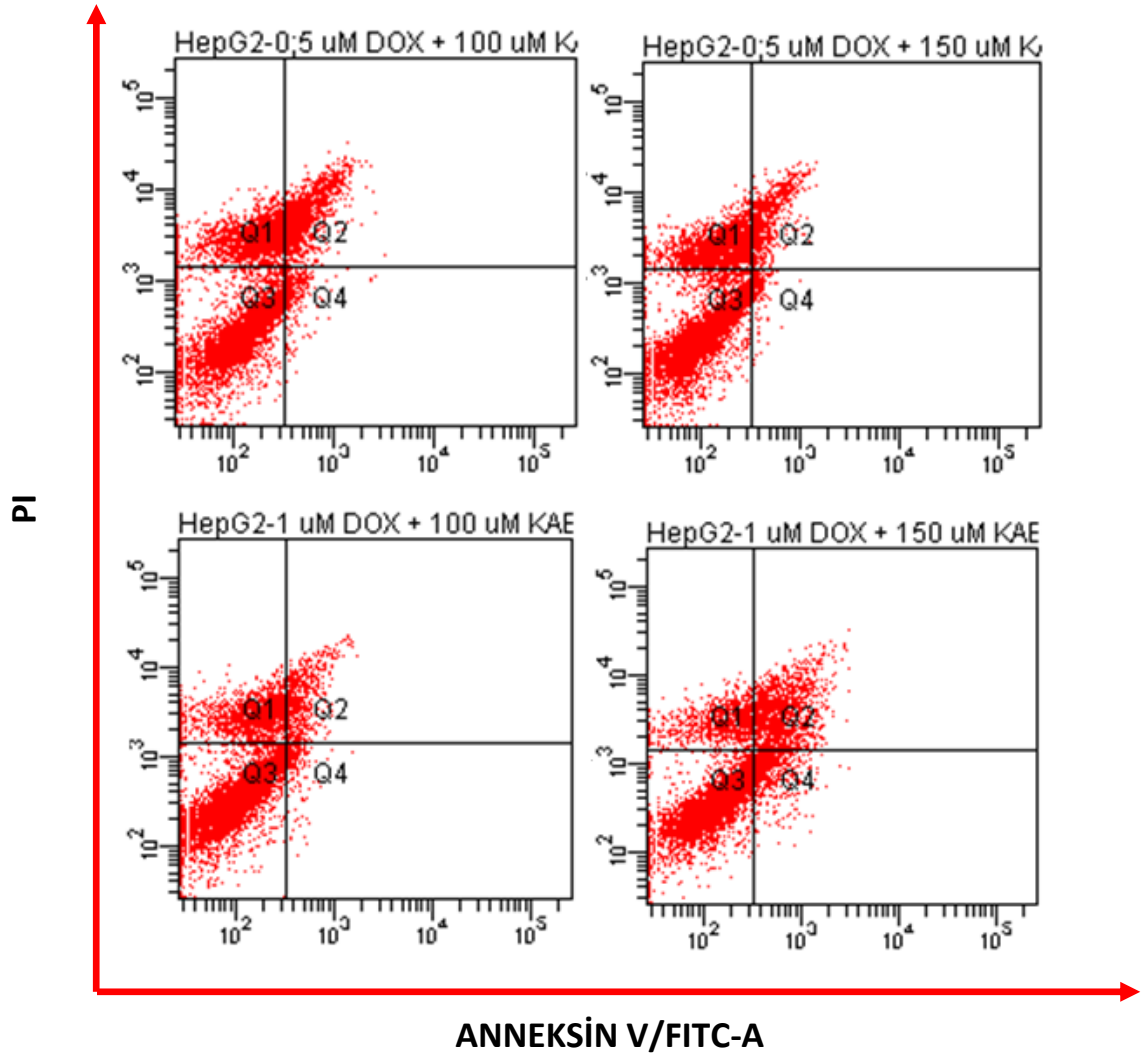
- **Q1;** PI ile boyanan hücreleri;
- **Q2;** Anneksin V/FITC ve PI ile boyanan hücreleri;
- **Q3;** Boyanmayan hücreleri;
- **Q4;** Anneksin V/FITC ile boyanan hücreleri göstermektedir.

Hücre zarının sitoplazmik bölümünde bulunan fosfatidil serin’in erken apoptozda dış yüzeye translokasyonunu belirlemek, yani erken apoptozu

belirlemek amacıyla yapılan bu analizin sayısal verileri Çizelge 3.5ve Çizelge 3.6'da sunulmuştur.



Şekil 3.12. Dokсорubisin ve Kaempferol'ün uygulandığı Hep-G2 hücrelerinde Annexin V-FITC/PI akım-sitometrik analizi.



Şekil 3.13. Kombinasyonların uygulandığı Hep-G2 hücrelerinde Annexin V-FITC/PI akım-sitometrik analizi.

Çözücü kontrol hücrelerinde, hiçbir boyayla boyanmamış sağlıklı hücre oranı %82,6'dır. Annexin V-FITC ile boyanan apoptotik hücre oranı %1, PI ile boyanan nekrotik hücre oranı % 11,6 ve her iki boyayla boyanmış olan geç apoptotik ya da nekrotik hücre oranı da %4,8 dir (Şekil 3.12).

0,5 μ M ve 1 μ M Doksorubisin ile 100 μ M ve 150 μ M Kaempferol uygulanmış Hep-G2 hücrelerinde, kontrol grubuyla kıyaslandığında, Annexin V-FITC ile boyanan yani fosfatidil serin ile reaksiyona giren apoptotik hücrelerin oranı; 0,5 μ M Dox'da %7,6 iken 1 μ M Doksorubisin'de bu oran %3,1 olarak belirlenmiştir. Hem Annexin V-FITC hem de PI ile boyanan geç apoptotik ya da nekrotik hücre de ise bu oranlar 0,5 μ M Doksorubisin için %13,4 iken 1 μ M

Doksorubisin'de bu oran %11.1 olarak tespit edilmiştir. Sadece PI ile boyanan nekrotik hücre oranları ise doza bağlı olarak 2 kattan fazla artış saptanmıştır ve oldukça dikkat çekmektedir. 0.5 μ M Doksorubisin için bu oran %8 iken 1 μ M Doksorubisin'de bu oran % 19.2 bulunmuştur. Doksorubisin artışı hücrelerde toksik etki oluşturmuştur (Çizelge 3.5).

100 ve 150 μ M Kaempferol uygulamasında; geç apoptoz oranları yaklaşık % 13, erken apoptoz oranı ise % 6.5-7,5 olarak hesaplanmıştır. Nekroz oranı 100 μ M için yaklaşık % 18, 150 μ M için ise % 20 dir. Canlı hücre oranı ise 100 μ M Kaempferolde %63 iken 150 μ M'da % 59,5 olarak bulunmuştur. Kaempferol'ün iki dozu da Annexin/FITC-PI boyanma karakteri bakımından benzer bir özellik sergilemiştir. Ancak, Dox ile kıyaslandığında; her iki maddenin de düşük dozlarında toplam apoptoz oranı aynı iken, Kaempferol'ün nekroz oranı Dox'a göre anlamlı şekilde, %10 kadar fazladır (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Doksorubisin ve Kaempferol uygulanmış Hep-G2 hücrelerinde Annexin V-FITC/PI analizi.

Test Bileşenleri (μ M)	Nekrotik Hücre (%Q1)	Geç Apoptotik Hücre (%Q2)	Canlı Hücre (%Q3)	Erken Apoptotik (%Q4)
DMSO Kontrol	11,6	4,8	82,6	1
0,5 Dox	8	13,4	71	7,6
1 Dox	19,2	11,1	66,7	3,1
100Kaem	17,8	12,5	63,2	6,5
150 Kaem	20,2	13	59,5	7,3

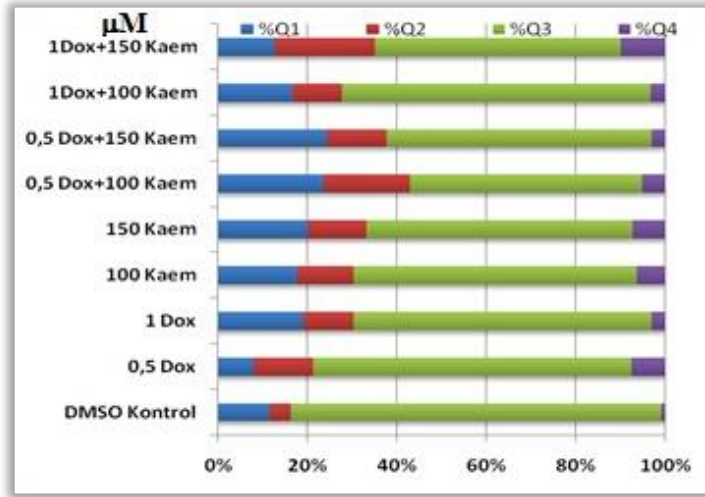
0.5 μ M ve 1 μ M Dox ile 100 μ M ve 150 μ M Kaempferol'ün kombinasyonları uygulanmış Hep-G2 hücrelerinde, kontrol grubuyla kıyaslandığında dikkate değer sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlar; 0.5 μ M Dox 100 μ M Kaempferol için canlı hücre oranı yaklaşık % 52 iken Kaempferol miktarı artırıldığında bu oran %59 olarak belirlenmiştir. 0,5 μ M Dox-100 ve 150 μ M Kaempferol kombinasyon dozlarında nekrotik hücre oranında dikkate değer bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu oranlar, 0.5 μ M Dox-100 μ M Kaempferol için yaklaşık % 23 iken Kaempferol miktarı artırıldığında %24 olarak tespit edilmiştir. Yine bu kombinasyonlarda genel olarak Annexin V-FITC ile boyanan yani

fosfotidil serin ile reaksiyona giren apoptotik hücrelerin oranında Kaempferol miktarına bağlı olarak azalış saptanmıştır. Bununda Kaempferol'ün antioksidan etkisinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Erken apoptotik hücrelerin oranları; 0.5µM Dox-100 µM Kaempferol için yaklaşık % 5 iken Kaempferol miktarı artırıldığında %3; geç apoptotik hücrelerin orası sırası ile %19 ve %13 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.6. Kombinasyon dozları uygulanmış Hep-G2 hücrelerinde Annexin V-FITC/PI analizi.

Test Bileşenleri (µM)	Nekrotik Hücre (%Q1)	Geç Apoptotik Hücre (%Q2)	Canlı Hücre (%Q3)	Erken Apoptotik (%Q4)
DMSO Kontrol	11,6	4,8	82,6	1
0,5 Dox+100 Kaem	23,8	19,1	51,8	5,3
0,5 Dox+150 Kaem	24,3	13,4	59,3	3
1Dox+100 Kaem	16,8	11	68,9	3,3
1Dox+150 Kaem	12,8	22,2	54,9	10

1µM Dox-100 µM Kaempferol için canlı hücre oranı yaklaşık % 69 iken Kaempferol miktarı artırıldığında bu oran %55 olarak belirlenmiştir. 1µM Dox-100µM Kaempferol kombinasyon dozlarında nekrotik hücre oranı yaklaşık % 17 iken Kaempferol miktarı artırıldığında %13 olarak tespit edilmiştir. Bu kombinasyonlarda en çarpıcı değişiklik ise apoptotik hücre sayısında gözlenmiştir. İki kombinasyon kıyaslandığında, Kaempferol miktarının artması apoptotik hücre miktarında 3 kat artışa sebep olurken geç apoptotik oranında ise 2 kat artış saptanmıştır. Erken apoptotik hücrelerin oranları; 1µM Dox-100 µM Kaempferol için yaklaşık % 3 iken Kaempferol miktarı artırıldığında %10; geç apoptotik hücrelerin orası ise sırası ile %11 ve %22 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak; kontrole kıyaslandığında, 1µM Dox-150 µM Kaempferol kombinasyonunda toplam apoptoz oranı yaklaşık 2.5-3 kat artarken nekroz oranı değişmeden kalmış, canlı hücre oranındası ise yaklaşık % 20-25 azalma görülmüştür (Çizelge 3.6 ve Şekil 3.14).



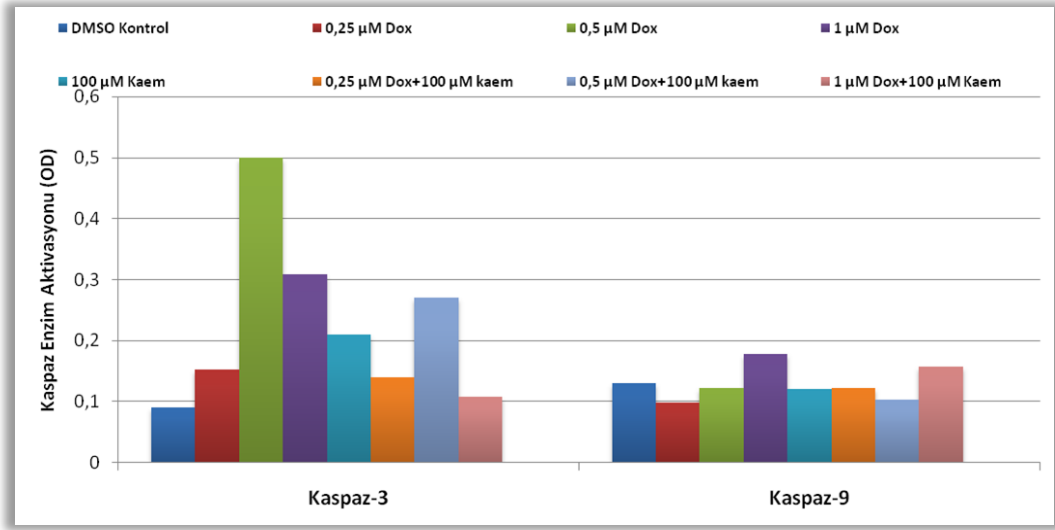
Şekil 3.14. Doksorubisin, Kaempferol ve Kombinasyon uygulanmış Hep-G2 hücrelerinde Annexin V-FITC/PI analizi.

3.5. Kaspaz Enzim Aktivasyonlarının Ölçülmesi

Hep-G2 hücrelerinde Doksorubisin, Kaempferol ve Kaempferol-Doksorubisin'nin aktif Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 enzim seviyeleri üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla; 1 µl/ml DMSO, 0,5 (IC₅₀), 0,25 ve 1 µM Doksorubisin ile 100 µM (IC₅₀) Kaempferol ve kombinasyonlarına 24 saat süresince hücreler maruz bırakılmıştır. Ardından, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 enzim aktivasyon seviyeleri belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 3.15 ve 3.16'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. Doksorubisin, Kaempferol ve Kaempferol-Doksorubisin'nin Hep-G2 hücrelerinde 24 saatlik kaspaz 3 ve 9 aktivitesi üzerine etkisinin OD değerleri

Test bileşenleri (µM)	Kaspaz-3 (OD)	Kaspaz-9 (OD)
DMSO Kontrol	0,09	0,130333
0,25 Dox	0,1535	0,098667
0,5 Dox	0,499	0,123
1 Dox	0,309	0,178667
100 Kaem	0,2105	0,120333
0,25 Dox+100 Kaem	0,1405	0,122333
0,5 Dox+100 Kaem	0,27	0,104
1Dox+100 Kaem	0,108	0,157333



Şekil 3.15. Doksorubisin, Kaempferol ve Kombinasyonun Hep-G2 hücrelerinde kaspaz 3 ve 9 aktivitesi üzerine etkisi.

Elde edilen veriler incelendiğinde (Çizelge 3.7 ve Şekil 3.15); 100 µM Kaempferol'e maruz bırakılan Hep-G2 hücrelerinde,DMSO çözücü kontrol grubuna oranla kaspaz-3 aktivitesi yaklaşık 2 kat arttığı gözlenmiştir.Kaempferol'ün dozu 150 µM yükseldiğinde ise kontrole oranla Kaspaz 3 miktarı yaklaşık 9 kat artmıştır (Çizelge 3.8 ve Şekil 3.16) ve bu oldukça dikkat çekmektedir.

Doksorubisin'in farklı dozlarına maruz bırakılan hücrelerde IC₅₀ dozu olan 0,5 µM'da kontrol ile oranla, Kaspaz 3 aktivitesi yaklaşık 5 kat artmıştır. Diğer yandan, 1 µM Dox dozunda Kaspaz 3 aktivasyonu 0,5'e göre anlamlı oranda azalmıştır.Bunun sebebi olarak, 1 µM Dox uygulanan hücrelerdeki sitotoksik etkinin fazla olması ve hücre ölümünün daha büyük oranda nekrotik yolla gerçekleştiğini düşündürmüştür. Ayrıca, 1 µM Dox'un hücrelerde kaspaz yolağını 24 saatten daha önce başlatmış olabileceği ihtimali de mevcuttur.

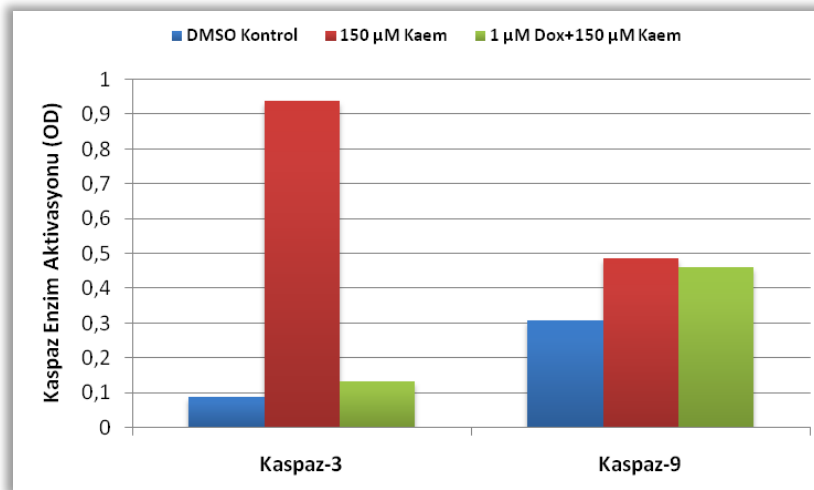
Kaempferol-Doksorubisin'nin kombinasyonlarında ise 100 µM Kaem + 0,5 µM Dox dozunda kontrole oranla Kaspaz 3 aktivitesinde yaklaşık 3 kat artış gözlenmiştir. Kaempferol ile kombinasyonu, 0,5 µM Dox'un tek başınayken ki Kaspaz 3 aktivasyonunu düşürmüştür. Bu sonuç; antioksidan olan Kaempferol bileşiğinin, Dox'un yüksek apoptotik etkisini baskıladığını düşündürmüştür. 150 µM Kaem+1 µM Dox dozunda ise kaspaz 3 aktivasyonu kontrole çok yakın oranda çıkmıştır.Kaspaz 9 aktivasyonlarında, sadece 150 µM Kaempferol ile 150

μM Kaem-1 μM Dox kombinasyonunda kontrole oranla yaklaşık 1,5 kat artış gözlenirken diğer uygulamalarda anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. 1 μM Doksorubisin'nin Kaspaz-9 aktivasyonu ile Kaempferol-Doksorubisin'nin kombinasyon dozu ile kıyaslandığında Kaspaz-9 aktivitesinin azalma meydana gelmiştir.

Sonuçlar incelendiğinde, kaspaz aktivitesinin bütün deney hücrelerinde yaklaşık kontrollere ve birbirine yakın çıkmış olması, Kaspaz 9 aktivasyonunun 24 saatten daha erken süreçte başlama olasılığını ortaya koymuştur.

Çizelge 3.8. Doksorubisin, Kaempferol ve Kaempferol-Doksorubisin'nin Hep-G2 hücrelerinde 24 saatlik kaspaz 3 ve 9 aktivitesi üzerine etkisinin OD değerleri

Test bileşenleri (μM)	Kaspaz-3 (OD)	Kaspaz-9 (OD)
DMSO Kontrol	0,0885	0,307
150 Kaem	0,9375	0,485
1 Dox+150 Kaem	0,132	0,4605



Şekil 3.16. Doksorubisin, Kaempferol ve Kaempferol-Doksorubisin'nin Hep-G2 hücrelerinde 24 saatlik Kaspaz-3 ve 9 aktivitesi üzerine etkisi.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gıdalarda bulunan çok sayıda flavonoid bileşen, polifenolik bitki pigmenti grubundadır (Wang vd., 1999) ve besinlerle düzenli olarak alındığında kansere karşı koruyucu etkiye sahip olduğu (Boege vd., 1994), hatta çeşitli kanser türünde sitotoksik ve apoptotik etki sergilediği birçok çalışmayla gösterilmiştir (Imai vd., 2004, Zhang vd., 1999, Zhang vd., 2009, Chen vd., 2005, Kang vd., 2009). Çeşitli kimyasal tedavi ilaçları kontrolsüz çoğalan kanser hücrelerini öldürürken, aynı zamanda vücudumuzdaki fonksiyonların devamı için çoğalmakta olan normal vücut hücrelerinde de toksik etki göstermektedir. Bu da ilacın yan etkilerinin ortaya çıkmasına ve vücudun normal fonksiyonlarının zarar görmesine neden olmaktadır. Kemoterapi ilaçları, organizma için toksiktir ve ciddi yan etkileri olan ilaçlardır. Bu yan etkilerin azaltıldığı, sağlıklı hücrelerdeki toksisitesi en aza indirilmiş, doğal moleküllerden elde edilmiş kombine tedaviler geliştirmek, ilaç tedavisinin daha etkili ve zararsız hale getirilmesi için bir gerekliliktir.

Bu tez kapsamında;Dox ve Kaempferol'ün bağımsız ve kombine sitotoksikaktiviteleri MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen verilerde,Dox'un farklı dozlarına maruz bırakılan Hep-G2 hücrelerinin canlılığında doza ve zamana bağlı olarak azalma gözlenmiş ve IC₅₀ dozu, 48. saatte yaklaşık 0.5 µM olarak belirlenmiştir. Kaempferol için ise IC₅₀ dozu, hem 48 hem de 72. saattlerde yaklaşık 100 µM olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar Doksorubisin ile kıyaslandığında, Hep-G2 hücrelerinde Kaempferol'ün tek başına sitotoksik etkisinin yaklaşık 100 kat daha zayıf olduğu kanısına varılmıştır. Kombinasyon sonuçlarında ise Dox miktarının sabit tutulup Kaempferol miktarını artırdığımızda gözlemlediğimiz şey, artan Kaem miktarı ile birlikte Dox'unsitotoksik etkisi baskılanmıştır. Bu sonucun Kaempferol'ün antioksidan etkisinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Literatür çalışmalarına baktığımızda,Abou Alfa ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, ameliyat edilemeyen ilerlemiş karaciğer kanserinin Dox ile Sorafenib tedavisinin, tek başına Dox ile tedavi edilen hastalara kıyasla, sağ kalım oranını arttırdığı gösterilmiştir (Abou Alfa vd. 2010). Meme kanserinin tedavisinde kullanılan Doksorubisin'in sağlıklı dokularda gelişen yan etkilerini azaltmak ya da

iyileştirmek amacıyla, Quercetin ile Dox kombine edilerek hücrelere uygulanmış ve kombinasyonun sadece tümör olmayan dokularda oksidatif stres, GST aktivasyonu, DNA hasarı, hücre metabolizmasında ve protein sentezindeki aksaklıklar, hücre iskeletinde hasar ve tümör yayılmasını engellediği, Seadler ve arkadaşları tarafından ortaya konmuştur (Staedler vd, 2011). Ayrıca Du ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada ise Dox'a dirençli ve hipoksi koşullarındaki 4T1 hücrelerinde, hipoksikoşullarına adaptasyonda miktarı artan, anjiogenez ve tümör yayılmasına yol açan HIF-1 α 'nın Quercetin'in düşük dozlarında dahi ifade edilmesinin baskılandığı ve tümörün küçüldüğü gösterilmiştir. Normal koşullardaki sağlıklı hücrelerde sitotoksik etkisinin ise oldukça düşük olduğu da aynı çalışmada bildirilmiştir (Du vd., 2010). Ravid ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada, D vitaminin hormonal formu olan ve tümör dokusunda antitümör etkiye sahip olduğu bilinen 1,25-Dihidroksivitamin D3'ün Dox ile kombinasyonunun MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada, 1,25-Dihidroksivitamin D3 ile ön muamele işleminin meme kanseri hücrelerinin Dox'ün sitotoksik etkisine olan duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir (Ravid vd., 1999).

Hücre döngüsü analizinin sonuçları incelendiğinde; Dox'un 24 saat tek başına inkübasyonu sonrasında, G1 evresinde bekleyen hücrelerin oranındaki kontrole göre %10 artışa neden olduğu gözlenmiştir. Buna karşın, Doksorubisin dozunun artışı ile birlikte S evresinde bekleyen hücrelerde bir azalma gözlenirken G2 evresinde belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Tek başına 100 μ M Kaempferol, G1 evresinde tutuklanan hücre sayısında kontrole oranla bir artışa, S evresinde ise azalmaya neden olmuştur.

Kombinasyon dozları incelendiğinde ise; 0,5 μ M Doksorubisin ve 100 μ M Kaempferol kombinasyonu G1 evresinde bekleyen hücrelerin sayısında artışa neden olurken Doksorubisin doz miktarı artırıldığında azalmaya neden olduğu ve hücrelerin S evresine geçtiği görülmüştür. S evresinde ise her iki kombinasyonunda hücrelerin oranı çözücüye oranla zayıf bir artış göstermiştir. En dikkat çekici sonuç G2 evresinde gözlenmiştir. 1 μ M Doksorubisin ve 100 μ M Kaempferol kombinasyonu uygulanan örneklerde G2 evresinde bekleyen hücre sayısında ciddi bir artış saptanmıştır. Bu evredeki hücrelerin bu denli fazla

olmasının nedeninin Doksorubisin'den kaynaklanan oksidatif stres ile beraber oluşan reaktif oksijen türlerine karşın Kaempferol'ün antioksidan etkisinin daha baskın olduğu düşünülmüştür. Radyoterapi ve bazı kemoterapötikler serbest radikal üreterek hücrel ölümüne neden olmakta, antioksidanlar ise serbest radikalleri ve serbest radikal aracılı oksidatif reaksiyonları nötrleştirmektedir. Kemoterapi alan hastalarda, plazma lipit hidroperoksitleri ve tiyobarbitürik asit (TBA)-reaktif bileşiklerin artması, kemoterapinin oksidatif strese yol açtığına işaret etmektedir. Kemoterapi sonucunda oluşan Reaktif Oksijen Bileşenleri (ROB)'nin; DNA, RNA, protein ve lipid gibi makromoleküllerde hasara neden olabildiği ve sonuçlarının hücre ölümüne kadar gittiği belirtilmektedir (Crohns 2009).

Oksidatif stresin oluşumunda muhtemel bir neden de demir iyonudur. Demir, plazmada serbest radikal reaksiyonları için katalitik etkiye sahiptir. Doksorubisin'in demir iyonu ile oluşturduğu kompleksin, potansiyel pro-oksidan etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu kompleks, glutasyon veya NADPH bağımlı enzimleri azaltabildiği gibi, serbest radikal oluşum reaksiyonlarının bir basamağını başlatabilmektedir. Doksorubisin ile indüklenen oksidatif stresin, bu ilaca bağlı kalp ve beyin toksisitesinin altında yatan asıl neden olduğu ileri sürülmektedir. Doksorubisin varlığında artan ROB, kalpte metabolik yollarla etkileşmekte, demir metabolizmasını bozmakta ve redoks döngüsünü etkilemektedir. Doksorubisinin beyinde de oksidatif stresi artırdığı, lipidperoksidasyon (LPO) oluşumuna ve protein oksidasyonuna neden olduğu ve tümör nekroz faktör (TNF- α) düzeyini artırdığı bildirilmiştir (Sabuncuoğlu ve Özgüneş, 2011). Literatür çalışmalarına bakıldığında, Kaempferol'ün kanser hücrelerini kemoterapik ajanların (Cisplatin, 5-Florourasil, Citarabin, Doksorubisin, Mitoksantron ve Irinotesanin (SN-38) aktif metaboliti sitotoksik etkilerine duyarlı hale getireceği rapor edilmiştir (Luo vd., 2010, Zhang vd., 2008, Sharma vd., 2007, Imai vd., 2004). Bu flavonoid, tümör nekroz faktörüyle ilişkili apoptozisi indükleyen ligandın (TRAIL) sitotoksik etkilerini artırabilir (Yoshida vd., 2008, Siegelin vd., 2008). Bu araştırmalar klinik uygulamalarda Kaempferol'ün bazı kanserlerin tedavisinde destek tedavi olarak kullanılabileceğini öne sürmektedir (Calderón-Montaño vd., 2011).

Kaempferol'ün platin türevi bir kemoterapi ilacı olan Cisplatin'le kombinasyonu sonucunda Kaempferol, ovaryum kanseri (OVCAR-3) hücrelerinde cMyconkogeninin ifadesini baskılayarak hücrede apoptoz sürecini başlatmak suretiyle Cisplatin'in etkisini arttırmıştır (Luo vd., 2010). Kaempferol de aynen Dox'da olduğu gibi, HCC'de HIF-1'in ifadesini baskılayarak hipoksi koşullarında anti-proliferatif bir etki sergilemiştir (Mylonis vd., 2010). Burdan yola çıkarak; sonuçlarımızla kıyasladığımızda, bağımsız Doksorubisin dozlarının, artan Kaempferol miktarına bağlı olarak, kombine dozlarda sitotoksik etkisi azalmış ve proliferasyon oranı artmıştır. Hücre döngüsü analizinde en dramatik nokta, uygulanan en yüksek kombine dozunda, kontrole oranla G2 de bekleyen hücrelerde ciddi derecede artış gözlenmiştir ve bunun Doksorobisin'e bağlı oksidatif hasara karşı Kaempferol'ün reaktif oksijen türlerini süpürücü etkisi ile gerçekleştirdiğini düşündürmüştür. Bu beklenmeyen sonuca göre, uzun vadede Kaempferol'ün Doksorobisin kaynaklı yan etkilerden korunup, aynı zamanda anti-tümör etkiyi de arttırdığı ve böylelikle HCC'nin etkin tedavisinde potansiyel olarak kullanılabileceği kanısına varılmıştır. Diğer yandan, oral kavite (Kang, vd., 2010), karaciğer kanseri (Mylonis vd., 2010), ovaryum kanseri (Luo vd., 2010), lösemi (Bestwick vd., 2007), akciğer kanseri (Nguyen vd., 2003) ve glioma (Siegelin vd., 2008, Sharma vd., 2007) hücreleri üzerindeki anti-proliferatif ve apoptotik etkileri bir çok çalışmayla, gösterilmiş olmasının yanı sıra, Dox'un kemoterapi sonrasında kardiyomiyositler üzerinde sebep olduğu toksik etkilerini azalttığı, hücrelerdeki apoptozu engellediğide in vitro ve in vivo çalışmalarla gösterilmiştir (Xiao vd., 2012). Kaempferolün p53 aracılı mitokondriyal iç yolak üzerinden gerçekleşen apoptozu engelleyerek ve ERK aracılı MAPK yolağının çalışmasını sağlayarak, Dox'a bağlı kardiyotoksisite üzerindeki koruyucu bir etki sergilediği de yine aynı çalışmayla ortaya konmuştur. Kaempferol'ün bu iki yönlü (anti-proapoptotik) etkisi, bu bileşiği kanserli hücreler için potansiyel kanser ilacı yaparken aynı zamanda, kanserli olmayan dokularda oluşan toksik yan etkiden koruyucu bir molekül olduğuna da dikkati çekmektedir (Xiao vd., 2012). Sonuçlarımızla kıyasladığımız da ise Kaempferol antioksidan etkisi ile doksorubisine bağlı sitotoksik etkiyi baskılayarak proliferasyonu artırmıştır. Diğer yandan bağımsız dozlara kıyasla Kaempferol ve doksorubisin kombinasyonu

mitokondriyal yolak aracılığı ile apoptoza sevk ettiğini tespit ettik. Bu aşamada ileri çalışmalarımızda sinyal yollarında meydana gelen değişimleri araştırarak daha aydınlık sonuçlar elde etmeyi planlamaktayız.

Anneksin V/FITC ve PI boyamasından elde edilen sonuçlar incelendiğinde; Hep-G2 hücrelerinde, kontrol grubuyla kıyaslandığında, fosfotidil serin ile reaksiyona giren apoptotik hücrelerin oranı düşük dozlardaki Doksorubisin ve Kaempferol'de hemen hemen aynı sonuçları verirken, Doksorubisin miktarının artması durumunda bu oran da azalmış ancak nekrotik hücre sayısında ise iki kat artış gözlenmiştir. Buradan yola çıkarak, Doksorubisin miktarının artması hücreyi nekrotik ölüme götürmüştür. Kaempferol miktarına bağlı olarak, Annexin V-FITC ile reaksiyona giren ve boyanan apoptotik hücrelerin oranında gözlenen azalmanın da Kaempferol'ün antioksidan etkisinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Kombinasyonlarda en dikkat çeken değişiklik ise en yüksek kombinasyon dozu olan 1µMDox+150 µMKaem dozunda görülen toplam (geç ve erken) apoptotik hücre sayısındaki artıştır.

Literatür çalışmalarına bakıldığında; Doksorubisin etki mekanizmalarından biri olan ROS üretimi vasıtasıyla tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermesidir (Ravid vd.1999). Sharma ve arkadaşları, insan glioblastoma hücre hatları (LN229, U87MG ve T98G) üzerinde Kaempferol'ün, oksidatif stresi artıran Doksorubisin'intoksik etkilerine karşı etkili olup olmadığını araştırmışlar ve bu iki bileşiğin birlikte kullanıldığı glioma hücrelerinde, hücre içi oksidatif stresi artırarak apoptozun indüklendiğini bulmuşlardır. Bu çalışma sonucunda, Kaempferol'ün Doksorubisin'in hücre dışına atılımını azaltarak ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) toksisitesini yükselterek kemoterapötik ajan Doksorubisin'intoksik etkisini artırdığını tespit etmişlerdir (Sharma vd., 2007). Bizim çalışmamızda da Kaempferol'ün aynı mekanizma ile apoptoza uyardığı düşünülmüştür. Wang ve arkadaşları ise insan hepatoma hücre hatları (SMMC7721, QGY7701) ve normal karaciğer hücreleri L-02'de Dox'un farede antitümör etkileri üzerinde Quercetin'in rolünü araştırmışlar ve hepatoma hücrelerinde Quercetin ile kombine edilmiş Dox'un p53 bağımlı olarak ve anti apoptotik Bcl-xl proteinini downregüle ederek apoptoza uyardığını göstermişlerdir. Ayrıca, Quercetin'in farelerde Dox'a bağlı hepatotoksositeye karşı

koruyucu bir etki gösterdiği de yine bu çalışmayla gösterilmiştir. Quercetin normal karaciğer hücrelerini Doksorubisine bağlı yan etkilerden korurken, karaciğer kanseri hücreleri üzerinde anti-tümör etkiye sahip olduğu, Quercetin karaciğer kanserine karşı terapötik etkinliğini artırmak için Dox ile kombine tedavisinde yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır (Wang vd., 2012).

Kaspaz 3-9 sonuçları incelendiğinde; Hep-G2 hücreleri en yüksek Kaspaz 3 aktivitesi, Doksorubisin'in IC₅₀ dozunda gözlenmiştir. Doksorubisin ve Kaempferol kombine kullandığı taktirde ise Kaspaz 3 aktivitesinde bağımsız Doksorubisin'e nazaran azalma saptanmıştır. Kaempferol tek başına uygulandığında ise kontrole oranla Kaspaz aktivitesi kombinasyon dozları ile hemen hemen aynı sonuç elde edilmiştir. Bu sonuçtan yola çıkarak, antioksidan olan Kaempferol bileşiğinin, Dox'un yüksek apoptotik etkisini baskıladığı düşünülmüştür. Diğer yandan, Dox miktarını artırdığımız taktirde hücrelerdeki sitotoksik etkinin fazla olması ve hücre ölümünün daha büyük oranda nekrotik yolla gerçekleştiğini düşündürmüştür. Kaspaz-9 aktivitesine baktığımızda ise Kaempferol-Doksorubisin'in kombinasyonlarından en yüksek dozda kaspaz-9 aktivitesi gözlenmiştir. Kaempferol ve Doksorubisin'in diğer dozlarında kaspaz-9 aktivitesi gözlenmemiştir. Bu sonuç, kaspaz-9 aktivasyonunun 24 saatten daha erken süreçte başladığını düşündürmüştür. Literatür çalışmalarına baktığımızda; Kaempferol'ün kaspaz-3 (Sharma vd., 2007, Leung vd., 2007, Wang vd., 1999, Bestwick vd., 2007, Zhang vd., 2008) Kaspaz-7 (Kang vd., 2009, Nguyen vd., 2003) ve Kaspaz-9 (Kang vd., 2009, Sharma vd., 2007, Zhang vd., 2008, Zhang vd., 2009, Wang vd., 1999) protein aktivasyonunu uyararak apoptotik mekanizmayı etkilediği gözlenmiştir. Ayrıca, bu flavonoidin apoptozun Kaspaz'dan bağımsız yolağının başlatılmasında yer alan, apoptoz indükleyici faktörü de (AIF) aktive ettiği bilinmektedir (Leung vd., 2007). Yapılan çalışmalarda, Kaempferol'ün proapoptotik protein ailesinden Bax ve Bad proteinlerinin miktarında artışa, anti-apoptotik protein ailesinden Bcl-2 ve Bcl-Xl proteinlerinin miktarında ise azalmaya neden olduğu gözlenmiştir (Kang vd., 2009, Nguyen vd., 2003). Ayrıca, Kaempferol'ün anti-apoptotik protein ailesinden XIAP (X'e bağımlı IAP)'nin down regülasyonuna neden olduğu bulunmuştur (Calderón-Montaño vd., 2011). Kaempferol'ün, apoptozun

indüklenmesinde rol oynayan mitokondrial membran potansiyel kaybı, mitokondrial Sitokrom C (Marfe vd., 2009, Sharma vd., 2007, Wang vd., 1999, Li vd., 2009) salınımının indüklenmesi ve PARP aktivasyonunun uyarılması (Marfe vd., 2009, Kim vd., 2008, Wang vd., 1999) olaylarına etki ettiği tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, Dox'un en fazla sitotoksik aktivite gösteren, ancak daha düşük apoptotik etkiye rağmen oldukça yüksek nekrotik ölüme sebep olan dozunun (1 μ M), yine yüksek apoptoz ve nekroz oranına sebep olan Kaempferol dozuyla (150 μ M) birlikte kullanılması sonucunda, her iki bileşiğin de sitotoksik etkisini azaltan, apoptoz oranını sinerjetik biçimde arttırıp, nekrotik ölümün seviyesini kontrol grubuyla benzer orana kadar düşüren bir kombinasyon dozunun belirlendiği düşünülmüştür.

Bu çalışmanın sonucu olarak; Bir antioksidan olan Kaempferol'ün hepatokarsinoma tedavisinde Doksorubisin'in sitotoksik etkiliğini düşüren ve apoptozu uyaran bir kemoterapötik ajan olmasının yanısıra tek başına da en az Doksorubisin kadar etkili ancak sitotoksitesi daha düşük potansiyel bir ilaç öncülü olabilirliği önerilmektedir. Uzun vadede, Kaempferol'ün hücreyi Doksorubisin'in yan etkilerinden koruduğu, aynı zamanda anti-tümör etkiyi de arttırdığı ve böylelikle HCC'nin etkin tedavisinde potansiyel olarak kullanabileceği düşünülmektedir. Kaempferol'ün karaciğer kanseri tedavisinde kullanım potansiyelinin ileri seviye gen ekspresyonu ve protein seviyelerinde araştırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abou-Alfa, G.K., Johnson, P., Knox, J.J., Capanu, M., Davidenko, I., Lacava, J., Leung, T., Gansukh, B., Saltz, L.B. (2010). Doxorubicin Plus Sorafenib vs Doxorubicin Alone in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma, *Jama.*, 304(19), 2154-216.
- Aktürk, E., Kurtoğlu, E. ve Harputluoğlu, H., (2011). Kanser ilaçlarının Kardiyovasküler Yan Etkileri: Bu Yan Etkiler Nasıl Belirlenmeli, Tedavi ve Takip Nasıl Yapılmalı? İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi., 18(2), 137-42.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2007). *Molecular Biology Of The Cell*. Garland Science.
- Alenzi, F.Q.B. (2004). Links between apoptosis, proliferation and the cell cycle, *British Journal of Biomedical Science.*, 61(2).
- Aravalli, N.R., Steer, C.J. and Cressman, E.N.K. (2008). Molecular Mechanisms of Hepatocellular Carcinoma, *Hepatology.*, 48(6), 2057-2063.
- Ayla, Ş., Oktar, H., Tanrıverdi, G., Cengiz, M., Özkılıç, A.Ç., Can, G., Özücer, B., Eser, M., Demirci, S., Batur, Ş. (2009). Doksorubisin nedenli sıçan hepatotoksitesine nikotinaıdın (koruyucu) etkisi, *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi.*, 10(1), 229-238.
- Bestwick, C.S., Milne, L. and Duthie, S.J. (2007). Kaempferol induced inhibition of HL-60 cell growth results from a heterogeneous response, dominated by cell cycle alterations, *Chemico-Biological Interactions.*, 170, 76-85.
- Blum, H. E. (2005). Hepatocellular carcinoma: Therapy and prevention. *World J Gastroenterol.*, 11(47), 7391-7400.
- Boege, F., Straub, T., Kehr, A., Boesenberg, C., Christiansen, K., Andersen, A., Jakob, F., Köhrle, J. (1996). Selected Novel Flavones Inhibit the DNA Binding or the DNA Religation Step of Eukaryotic Topoisomerase, *The Journal of Biological Chemistry.*, 271(4), 2262-2270.
- Bretones, G., Delgado, M.D. and León, J. (2015). Myc and cell cycle control, *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1849, 506-516.
- Buendia, M. A. (2000). Genetics of hepatocellular carcinoma seminars in *Cancer Biology.*, 10, 185-200.

- Cabadak, H. (2008). Hücre siklusu ve kanser, ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi.,9(3), 51-61.
- Calderon-Montao, J.M., Burgos-Moron, E., Perez-Guerrero, C., Lopez-Lazaro, M., A. (2011).Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.,11, 298-344.
- Calvısı, D.F., Ladu, S., Gorden, A., Farina, M., Conner, E.A., Lee, J.S., Factor, V.M., Thorgeirsson, S.S. (2006).Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC Gastroenterology., 130, 1117–1128.
- Chang, H.Y. ve Yang, X. (2000). Proteases for Cell Suicide: functions and Regulation of Caspases. Microbiology and Molecular Biology Reviews., 64(4), 821-846.
- Champoux, J.J. (2001).Dna Topoisomerases: Structure, Function and Mechanism, Annu. Rev. Biochem., 70,369-413.
- Chen, D., Daniel, K.G., Chen, M.S., Kuhn, D.J., Piwowar, K.R.L., Dou Q.P. (2005).Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells, Biochemical Pharmacology., 69, 1421-1432.
- Chen, D., Yu, J., Zhang, L. (2016). Necroptosis: an alternative cell death program defending against cancer, Biochimica et Biophysica Acta., 1865, 228-236.
- Chen, C. and Wang, G.(2015). Mechanisms of hepatocellular carcinoma and challenges and opportunities for molecular targeted therapy, World J Hepatol., 7(15), 1964-1970.
- Chittmittrapap, S., Chieochansin, T., Chaiteerakij, R., Treeprasertsuk, S., Klaikaew, N., Tangkijvanich, P., Komolmit, P., Poovorawan, Y. (2013).Prevalence of Aflatoxin Induced p53 Mutation at Codon 249 (R249s) in Hepatocellular Carcinoma Patients with and without Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg), Asian Pacific Journal of Cancer Prevention., 14(12),7675-9.
- Cooper, M. G. ve Hausman, E.R. (2006). Hücre Moleküler Yaklaşım,İzmir Tıp Kitabevi., Atlas kitapçılık, üçüncü baskı.
- Colombo, M. (1999). Natural history and pathogenesis of hepatitis C virus related hepatocellular carcinoma, J Hepatol.,31(1), 25-30.

- Crohns, M., Liippo, K., Erhola, M., Kankaanranta, H., Moilanen E., Alho H., Lehtinen P.K. (2009). Concurrent decline of several antioxidants and markers of oxidative stress during combination chemotherapy for small cell lung cancer, *Clinical Biochemistry*, 42 ,1236-1245.
- Çoğulu, Ö., Alpman A, Durmaz, B., Özkınay, F. (2007). Mitoz ve Mayozun Moleküler Temelleri, *Türkiye Klinikleri J Med Sci.*, 27,725-737.
- Çoşkun, G. and Özgür, H. (2011). Molecular Mechanism of Apoptosis and Necrosis, *Archives Medical Review Journal.*, 20(3), 145-158.
- Deng, G., Zeng, S. and Shen, H. (2015).Chemotherapy and target therapy for hepatocellular carcinoma: New advances and challenges, *World J Hepatol.*, 7(5), 787-798.
- Du, G., Lin, H., Wang, M., Zhang, S., Wu, X., Lu, L., Ji, L., Yu, L.(2010). Quercetin greatly improved therapeutic index of doxorubicin against 4T1 breast cancer by its opposing effects on HIF-1a in tumor and normal cells, *Cancer Chemother Pharmacol.*, 65, 277-287.
- Duke, R.C. (2004).Methods of analysing chromatin changes accompanying apoptosis of target cells in killer cell assays, *Methods in Molecular Biology.*,282, 43-66.
- Durmaz, T., Özdemir, Ö. ve Bozkurt, E., (2009). Antrasiklin Kardiyotoksitesitesi TGKD., 13(1),25-34.
- Doğan, L. ve Dicle, G.(2004). Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanserHacettepe Tıp Dergisi.,35, 34-42.
- Escobar, M.L., Echeverría, O.M. and Vázquez-Nin, G.H. (2015). Necrosis as Programmed Cell Death, 2236-4.
- Eröz, R., Karataş, A., Alkoç, O.A., Baltacı, D., Oktay, M., Çolakoğlu S. (2012). Apoptozis Hakkında Bilinenler (Literatür Taraması),*Düzce tıp dergisi.*,14(2), 87-101.
- Farazi, P.A and DePinho, R.A. (2006). Hepatocellular carcinoma pathogenesis:from genes to environment, *Nat Rev Cancer.*,6,674-87.
- Filomeni, G., Desideri, E., Cardaci, S., Graziani, I., Piccirillo, S., Rotilio, G., Ciriolo, M.R. (2010).Carcinoma cells activate AMP-activated protein

- kinase-dependent autophagy as survival response to Kaempferol-mediated energetic İmpairment, *Autophagy*., 6(2), 202-216.
- Forner, A., Llovet, J.M. and Bruix, J. (2012). Hepatocellular carcinoma, *Lancet*., 379, 1245-55.
- Fulda, S. (2015). Targeting extrinsic apoptosis in cancer: Challenges and opportunities, *Seminars in Cell & Developmental Biology*., 39, 20-25.
- Gish, R.G. (2006). Hepatosellüler Karsinom: Hastalığın Tedavisinde Zorlukların Asılması *Clinical Gastroenterology and Hepatology Türkçe Baskı*., 1, 61-72.
- Guo, Z.S., Liu, Z. and Bartlett, D.L. Oncolytic immunotherapy: dying the right way is a key to eliciting potent antitumor immunity, *Frontiers in Oncology | Tumor Immunity*., 4(74), 1-11.
- Gültekin, N., Karaoğlu, K. and Küçükateş, E. (2008). Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yani potansiyel tedavi stratejileri, *Türk. KardiyolDern. Arş.*, 36(2), 120-130.
- Göksoy, E. ve Kapan, M. (2002). Karaciğerin Primer Habis Tümörleri, *Hepato-Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları Sempozyum Dizisi*., 28, 159-182.
- Hacker, H.G., Sisay, M.T. and Gütschow, M. (2011). Allosteric modulation of caspases *Pharmacology & Therapeutics*., 132, 180-195.
- Hirsova, P. ve Gores, G.J. (2015). Death Receptor-Mediated Cell Death and Proinflammatory Signaling in Nonalcoholic Steatohepatitis, *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*., 1, 17-27.
- Hovorka, O., Subr, V., Vetvicka, D., Kovar, L., Strohalm, J., Strohalm, M., Benda, A., Hof, M., Ulbrich, K., Rihova, B. (2010). Spectral analysis of doxorubicin accumulation and the indirect quantification of its DNA intercalation., 76(3), 514-24.
- Hu, X. (2003). Proteolytic signaling by TNF α : caspase activation and IjB degradation *Cytokine*., 21, 286-294.
- Huang, G.W., Yang, L.Y., Lu, W.Q. (2005). Expression of hypoxia-inducible factor 1 α and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma: Impact on neovascularization and survival, *World J. Gastroenterol*., 11, 1705-1708.

- Kang, G.Y., Lee, E.R., Kim, J.H., Jung, J.W., Lim, J., Kim S.K., Cho, S.G., Kim, K.P. (2009).Downregulation of PLK-1 expression in Kaempferol-induced apoptosis of MCF-7 cells, *European Journal of Pharmacology.*, 611 ,17-21.
- Kang, J.W., Kim, J.H., Song, K., Kim, S.H., Yoon, J.H. Kim, K.S., (2010).Kaempferol and Quercetin, Components of Ginkgo biloba Extract (EGb 761), Induce Caspase-3-Dependent Apoptosis in Oral Cavity Cancer Cells, *Phytother.*, 24,77-82.
- Kim, B.W., Lee, E.R., Min, H.M., Jeong, H.S., Ahn, J.Y., Kim, J.H., Choi, H.Y., Choi, H., Kim, E.Y., Park, S.P., Cho, S.G, (2008).Sustained ERK activation is involved in the Kaempferol-induced apoptosis of breast cancer cells and is more evident under 3-D culture condition, *Cancer Biology & Therapy.*, 7(7), 1080-1089.
- King, K. L. ve Cidlowski J. A. (1998). Cell Cycle Regulation and Apoptosis, *Annu. Rev. Physiol.*, 60, 601-17.
- Kısmalı, G. ve Sel, T. (2012). Paraquat ile Oluşturulmuş Oksidatif Stresin Hep-G2 Hücrelerinde Apoptozis Üzerine Etkisinin Araştırılması, *F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.*, 26(2), 79-85.
- Klug, W., Cummings, M. A.,Spencer C.E., Sümer, S., Öner, R., Öner, C., Ay öğüş, A., Açık L. (2009). Genetik Kavramlar, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Kumar, M., Zhao, X., Wang, X.W.(2011).Molecular carcinogenesis of hepatocellularcarcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: one step closer to personalized medicine?Cell & Bioscience., 1-5.
- Kozluca, O. (1995). Antraksiklinler ve Kardiyak toksisiteler, *Kartal Eğitim ve Araştırma Klinikleri.*, 566-568.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death, *Physiol Rev.*, 87(1), 99-163.
- Lachenmayer, A., Alsinet, C., Changa, C.Y., Llovet, J.M.(2010). Molecular approaches to treatment of hepatocellular carcinoma, *Digestive and Liver Disease.*, 42, 264-272.
- Leung, H.W.C., Lin, C.J., Hour, M.J., Yang, W.H., Wang, M.Y., Lee, H.Z, (2007).Kaempferol induces apoptosis in human lung non-small carcinoma

- cells accompanied by an induction of antioxidant enzymes, *Food and Chemical Toxicology.*, 45, 2005-2013.
- L1, C.J., Huang, S.Y., Wu, M.V., Chen, Y.C., Tsang, S.F., Chyuan, J.H., Hsu, H.Y.(2012). Induction of Apoptosis by Ethanolic Extract of *Corchorus olitorius* Leaf in Human Hepatocellular Carcinoma (Hep-G2) Cells via a Mitochondria-Dependent Pathway, *Molecules.*, 17, 9348-9360.
- L1, W., Du, B., Wang, T., Wang, S., Zhang J. (2009).Kaempferol induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells via theAtaxia-Telangiectasia Mutated-p53 pathway with the involvement of p53 Upregulated Modulator of Apoptosis, *Chemico-Biological Interactions.*, 177, 121-127.
- Liang, T.J., Reherrmann, B., Seeff, LB., Hoofnagle, J.H. (2000). Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C, *Ann Intern Med.*, 132(4),296-305.
- Luo, H., Daddysman, M.K., Rankin, G.O., Jiang, B.H., Chen, Y.C. (2010).Primary research Kaempferol enhances cisplatin's effect on ovarian cancer cells through promoting apoptosis caused by down regulation of cMyc, *Cancer Cell International.*, 10, 16.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, A., C., Krieger, M., Scott, P., M., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaire, P. (2011). *Moleküler Hücre Biyolojisi*. Palme Yayıncılık, Ankara., 1134-1135.
- Llovet, JM., Burroughs, A. and Bruix, J. (2003).Hepatocellular carcinoma. *Lancet.*, 362,1907-17.
- Llovet, J.M. and Bruix, J. (2008).Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma *Hepatology.*, 48, 1312-1327.
- Malumbres, M.Barbacid. (2001).To Cycle or Not to Cycle: A critical Decision in Cancer M. *Nature Reviews.*, Cancer, 1, 223.
- Mandery, K., Bujok, K., Schmidt, I., Keiser, M., Siegmund, W., Balk, B., Konig, J., Fromm, M.F., Glaeser, H.(2010). Influence of the flavonoids apigenin, Kaempferol, and quercetin on the function of organic anion transporting polypeptides 1A2 and 2B1. *Biochemical Pharmacology.*, 80, 1746-1753.

- Marfe, G., Tafani, M., Indelicato, M., Salimei P.S., Reali V., Pucci B., Fini M., Russo M.A. (2009). Kaempferol Induces Apoptosis in Two Different Cell Lines Via Akt Inactivation, Bax and SIRT3 Activation, and Mitochondrial Dysfunction, *Journal of Cellular Biochemistry.*, 106, 643-650.
- Meguro, M., Mizuguchi, T., Kawamoto, M., Hirata K. (2011). The Molecular Pathogenesis and Clinical Implications of Hepatocellular Carcinoma, SAGE-Hindawi Access to Research International Journal of Hepatology., 8.
- Merle, P. and Trepo, C. (2009). Molecular Mechanisms Underlying Hepatocellular Carcinoma Viruses., 1, 852-872.
- Merle, P., Kim, M., Herrmann, M., Gupte, A., Lefrancois, L., Califano, S. (2005). Oncogenic role of the frizzled-7/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma, *J Hepato.*, 1(43), 854-862.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods.*, 65(1-2), 55-63.
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Batkai, S., Kashiwaya, S., Hasko, G., Liaudet L., Szabo C., Pacher P. (2009). Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro, *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 296, 1466-1483.
- Mylonis, I., Lakka, A., Tsakalof, A., Simos, G. (2010). The dietary flavonoid Kaempferol effectively inhibits HIF-1 activity and hepatoma cancer cell viability under hypoxic conditions, *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 398(1-16), 74-78.
- Nairs, S. and Varalakshmi, K.N. (2011). Anticancer, cytotoxic potential of *Moringa oleifera* extracts on HeLa cell line, *J. Nat Pharm.*, 2, 138-42.
- Nakagawa, H. and Maeda, S. (2012). Molecular Mechanisms of Liver Injury and Hepatocarcinogenesis: Focusing on the Role of Stress-Activated MAPK Hindawi Publishing Corporation Pathology Research International., 14.
- Nguyen, T.T.T., Tran, E., Ong, C.K., Lee, S.K., Do, P.T., Huynh, T.T., Nguyen, T.H., Lee, J.J., Tan, Y., Ong C.S., Huynh, H. (2003). Kaempferol-Induced Growth Inhibition and Apoptosis in A549 Lung Cancer Cells Is Mediated

- by Activation of MEK-MAPK, *Journal of Cellular Physiology.*, 197, 110-121.
- O'Brien, M. and Kirby, R. (2008). Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease, *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care.*, 18(6), 572-585.
- Osellame, L.D., Blacker, T.S. and Duchen, M.R. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.*, 26,711-723.
- Ölgen, S., Bıçak, I. ve Nebioğlu, D., (2002).Angiogenesis ve kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar, *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 31(3), 193-214.
- Pauklin, S., Kristjuhan, A., Maimets, T., Jaks, V. (2005). ARF and ATM/ATR cooperate in p53-mediatedapoptosis upon oncogenic stress,*Biochem. Biophys. Res. Com.*,334, 386-394.
- Perryman, SV., Sylvester, Kg. (2006).Repair and regeneration: opportunities for carcinogenesis from tissue stem cells,*J Cell Mol Med.*,10(2), 292-308.
- Pećina-Šlaus, N., (2010). Wnt signal transduction pathway and apoptosis: a review, *Cancer Cell Int.*, 10(22), 2-5.
- Pietkiewicz, S., Schmidt, J.H. and Lavrik I.N. (2015). Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining, *Journal of Immunological Methods.*, 42399-103.
- Ravid, A., Rocker, D., Machlenkin, A., Rotem, C., Hochman, A., Icekson, G,K., Liberman, U.A., Koren, R. (1999).1,25-Dihydroxyvitamin D3Enhances the Susceptibility of Breast Cancer Cells to Doxorubicin-induced Oxidative Damage1, *Cancer Res.*, 59,862-867.
- Sabuncuoğlu, S. ve Özgüneş, H. (2011).Kemoterapi, Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres, *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi.*, 31(2), 137-150.
- Sadeghi-Alıabadı, H., Mosavi, H., Mirian, M., Kakhki, S., Zarghi, A. (2012).The Cytotoxic and Synergistic Effects of Flavonoid Derivatives on Doxorubicin Cytotoxicity in Hela, MDA-MB-231, and HT-29 Cancer Cells, *Iranian Journal of Toxicology.*, 5, 15.

- Sahin, F., Kannangai, R., Adegbola, O., Wang, J., Su G., Torbenson, M. (2004). mTOR and P70 S6 kinase expression in primary liver neoplasms, *Clin Cancer Res.*,10, 8421-25.
- Semenza, G.L. (2009).Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics, *Oncogene.*, 29, 625-634.
- Sharma, V., Joseph, C., Ghosh, S., Agarwal, A., Mishra M.K., Sen E, (2007). Kaempferol induces apoptosis in glioblastomacells through oxidative stres, *Mol Cancer Ther.*, 6(9), 2544-53.
- Shi, Y. (2004). Caspase Activation: Revisiting the Induced Proximity, *Model Cell.*, 117, 855-858.
- Siegelin, M.D., Reuss, D.E., Habel, A., Mende, C.H., Deimling, A.V. (2008). The flavonoid Kaempferol sensitizes human glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by proteasomal degradation of survivin, *Mol Cancer Ther.*, 7(11), 3566-74.
- Sivas, H. and Tomsuk, O., (2011). Antiproliferative and apoptotic effects of the essential oil of origanum onites and carvacrol on Hep-G2 cells.*Anadolu Üniversitesi Journal of Science and Technology-C. Life Sciences and Biotechnology.*, 2, 171-180.
- Solakoğlu, Z., (2009).Apoptoz Varlığı ya da Yokluğu Bir Hastalık Nedeni, *Klinik Gelişim.*, 22(3), 20-25.
- Staedler, D., Idrizi, E., Kenzaoui, B-H., Jeanneret, L-J, (2011). Drug combinations with quercetin: doxorubicin plus quercetin in human breast cancer cells, *Cancer Chemother Pharmacol.*, 68, 1161-1172.
- Stagos, D., Amoutzias , G.D., Matakos, A., Spyrou, A., Tsatsakis, A.M., Kouretas D. (2012).Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols, *Food and Chemical Toxicology.*, 50, 2155–2170.
- Şimşek, F. and Vatansever H.S. (2014). Apoptotik ve Otofajik Ölümlerde Hücre içi Organizasyon *Yeni Tıp Dergisi.*,31,6-11.
- Tan, C., Lu, Y., Ji L.N. and Mao Z.W. (2014). Metallomics insights into the programmed cell death induced by metal-based anticancer compounds *Metallomics.*, 6, 978-995

- Tanaka, H., Yamamoto, M., Hashimoto, N., Miyakoshi, M., Tamakawa, S., Yoshie, M., Tokusashi, Y., Yokoyama, K., Yaginuma, Y., Ogawa, K. (2006). Hypoxia-independent overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha as an early change in mouse hepatocarcinogenesis, *Cancer Res.*, 66, 11263-11270.
- Tsai, S C., Valkov, N., Yang, W M., Gump, J., Sullivan, D., Seto E (2000). Histone deacetylase interacts directly with DNA topoisomerase II. *Nat. Genet.*, 26 (3), 349–53.
- Thomas, MB. and Zhu, AX. (2005). Hepatocellular carcinoma: the need for progress. *J Clin Oncol.*, 23,2892-2899.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11, 700.
- Villanueva, A, Newell P, Chiang, DY, Friedman, SL, Llovet, JM(2007). Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis.*, 27, 55-76.
- Yangiu, H., Linjuan, C., Jin, W., Honjung, H., Yongjin, S., Guobin, X., Hanyun, R. (2011). The effects of quercetin and kaempferol on multidrug resistance and the expression of related genes in human erythroleukemic K562/A cells, *African Journal of Biotechnology.*, 10(62), 13399-13406.
- Yao, D.F., Jiang, H., Yao, M., Li, Y.M., Gu, W.J., Shen, Y.C., Qiu, L.W., WU, W., WU, X.H., SAI, W.L. (2009). Quantitative analysis of hepatic hypoxia-inducible factor-1alpha and its abnormal gene expression during the formation of hepatocellular carcinoma, *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, 8, 407-413.
- Yih, L.H. and Lee, T.C., (2008). Arsenite induces p53 accumulation through an ATM-dependent pathway in human fibroblasts, *Cancer Research.*, 60 (22), 6346-6352.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karatağ, M., Tanyolaç, B. (2007). *Moleküler Biyoloji, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.*
- Yoshida, T., Konishi, M., Horinaka, M., Yasuda, T., Goda A.E., Taniguchi H., Yano K., Wakada M., Sakai T. (2008). Kaempferol sensitizes colon cancer

- cells to TRAIL-induced apoptosis, *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 375,129-133.
- Xiao, J., Sun, G-B., Sun, B., Wu, Y., He, L., Wang, X., Chen,R-C., Cao, L., Ren, X-Y., Sun, X-B. (2012). Kaempferol protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in vivo and in vitro, *Toxicology.*, 292, 53-62.
- Wang, G., Zhang, J., Liu L., Sharma, S., Dong, Q, (2012).Quercetin Potentiates Doxorubicin Mediated Antitumor Effects against Liver Cancer through p53/Bcl-xl, *Plos one.*,7(12), e51764.
- Wang, I.K., Shiau S.Y.L., Lin J.K, (1999).Induction of Apoptosis by Apigenin and Related Flavonoids Through Cytochrome c Release and Activation of Caspase-9 and Caspase-3 in Leukaemia HL-60 Cells, *European Journal of Cancer.*,35(10),151-1525.
- Wang, S., Konorev, E.A., Kotamraju, S., Joseph J., Kalivendi, S., Kalyanaraman ,B. (2004).Doxorubicin Induces Apoptosis in Normal and Tumor Cells via Distinctly Different Mechanisms, *The Journal of Biological Chemistry.*, 279,(24), 25535–25543.
- Wells, J. A. (1988).Technique for Staining the Superficial Cells of Plucked Hair Follicles and Other Solid Tissues, *Stain Technology.*, 63,3.
- White,S.J.,Kasman, L.M.,Kelly, M.M., Lu, P., Spruill, L., McDermott, P.J, Voelkel-Johnson, C. (2007).Doxorubicin generates a proapoptotic phenotype by phosphorylation of elongation factor 2, *Free Radical Biology & Medicine.*, 43, 1313-1321.
- Wilhelm, S.M., Carter, C., Tang, L., Wilkie D., Mcnabola A., Rong H., Chen, C., Zhang, X., Vincent, P., Mchugh M., Cao Y., Shujath, J., Gawlak S., Eveleigh D., Rowley B., Liu, L., Adnane L., Lynch M., Auclair D., Taylor I., Gedrich, R., Voznesensky A., Riedl, B., Post, L.E., Bollag G. Trail P.A. (2004).BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis, *Cancer Res.*, 64 7099-7109,
- Wong, CM and Ng, IO, (2007).Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma, *Liver Int.*, 28,160-174

- Zhang, S., Hunter ,DJ., Hankinso,n SE., Giovannucci, EL., Rosner, BA., Colditz, GA., Speizer,FE., Willett, WC. (1999).A prospective study of folate intake and the risk of breast cancer, *Jama.*, 281(17), 1632-7.
- Zhang, Y., Chen, A.Y., Li, M., Chen, C., Yao, Q.(2008). Ginkgo bilobaExtract Kaempferol Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells, *Journal of Surgical Research.*, 148,17-23.
- Zhang, Q., Zhao, X.H., Wang, Z.J. (2009).Cytotoxicity of flavones and flavonols to a human esophageal squamous cell carcinoma cell line (KYSE-510) by induction of G2/M arrest and apoptosis, *Toxicology in Vitro.*, 23 ,797-807.
- Zhang, Q., Zhao, X.H., Wang, Z.J. (2008). Flavones and flavonols exert cytotoxic effects on a human oesophageal adenocarcinoma cell line (OE33) by causing G2/M arrest and inducing apoptosis, *Food and Chemical Toxicology.*, 46, 2042-2053.
- Zappia, V.,Della, F., Ragione, F. D., Panico, S., Russo G.L. Budillon A.,Ed. Başaran G., Başaran M. (2014). *Nutrisyon ve Kanser Tedavisindeki Gelişmeler*, Nobel Tıp Kitabevleri.