



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HEPATOSELÜLER KANSER HÜCRELERİNDE
APIGENİN, SORAFENİB VE KOMBİNE
UYGULAMALARININ APOPTOZ VE HÜCRE DÖNGÜSÜ
ÜZERİNE OLASI ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nazlı ŞİRİN

Temmuz 2018
DENİZLİ

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEPATOSELÜLER KANSER HÜCRELERİNDE APİGENİN,
SORAFENİB VE KOMBİNE UYGULAMALARININ APOPTOZ VE
HÜCRE DÖNGÜSÜ ÜZERİNE OLASI ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nazlı ŞİRİN

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Yavuz DODURGA

Denizli, 2018


YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Nazlı ŞİRİN tarafından Doç. Dr. Yavuz DODURGA yönetiminde hazırlanan "Hepatoselüler Kansere Hücresinde Apigenin, Sorafenib Ve Kombine Uygulamalarının Apoptoz Ve Hücre Döngüsü Üzerine Olası Etkilerinin Araştırılması" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Doç. Dr. Yavuz DODURGA
Pamukkale Üniversitesi



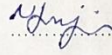
Danışman: Doç. Dr. Yavuz DODURGA
Pamukkale Üniversitesi



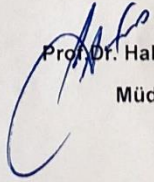
Üye: Doç. Dr. Ayşe Gaye TOMATIR
Pamukkale Üniversitesi



Üye: Dr. Öğr. Üyesi Nur Selvi GÜNEL
Ege Üniversitesi



Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
07.08/2018 Tarih ve 2018/142 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Hakan AKÇA
Müdür

Bu tezin tasarımı, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğinin ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Nazlı ŞİRİN

İmza: 

ÖZET

HEPATOSELÜLER KANSER HÜCRELERİNDE APİGENİN, SORAFENİB VE KOMBİNE UYGULAMALARININ APOPTOZ VE HÜCRE DÖNGÜSÜ ÜZERİNE OLASI ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nazlı ŞİRİN

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji AD
Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Yavuz DODURGA

Temmuz 2018, 74 Sayfa

Hepatoselüler karsinoma (HSK) karaciğer tümörünün en yaygın olan tipidir ve dünyada kanser ilişkili ölümler arasında üçüncü sıradadır. HSK, heterojen yapısı ve günümüzde tedavi için kullanılan tek kemoterapotik ilaç sorafenib olduğu için tedavi başarısında kısıtlamalar yaşanmakta ve bu sebeple başarı oranı düşmektedir. Son zamanlarda birçok hastalıkta olduğu gibi kanser tedavilerinde mevcutta kullanılan ajan ile birlikte kombine ilaç veya bitkisel etken maddeler üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu tez kapsamında ise HSK tedavisine yeni bir yaklaşım sunmak ve HSK tedavisi için kullanılmakta olan sorafenibin etkinliğini arttırmak ve sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini en aza indirmek amacıyla ilk kez HSK hücre hattı olan HepG2 hücrelerinde kombine terapotik etkileri araştırılmıştır. Bu tez çalışmasında sorafenib ve apigeninin belirlenen doz ve sürelerde tek ve kombine olarak HepG2 hücrelerine uygulanmış ardından XTT analizi ile hücre canlılığı üzerine etkileri belirlenmiştir. Apoptotik etkilerinin belirlenmesi için TUNEL testi yapılmıştır. Migrasyon ve invazyon üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için sırasıyla yara-iyileşme ve Matrigel invazyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Hücre döngüsü ve apoptoz ile ilişki genlerin mRNA seviyesindeki değişimleri ise gerçek zamanlı PZR ile analiz edilmiştir. XTT analizi sonuçlarına göre sorafenib + apigenin kombine uygulanan grupta tekli dozlarla karşılaştırıldığında hücre canlılığındaki azalmanın daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca sorafenib + apigenin kombine uygulamasının apoptotik hücre sayısında belirgin bir artışa sebep olduğu görülmektedir. Yara- iyileşme ve Matrigel analizleri sonucunda kombine grupta tekli dozlara göre hücrelerin migrasyon ve invazyon yeteneklerinin daha fazla baskılandığı görülmüştür. Son olarak gerçek zamanlı PZR sonuçlarında belirlenen *kaspaz-3*, *kaspaz-8*, *kaspaz-10*, *p21* ve *p53* ekspresyon seviyelerindeki anlamlı artış kombine uygulamanın tekli gruplara göre hücre döngüsünü durdurarak apoptozu daha fazla indüklediğini kanıtlar niteliktedir. Sonuç olarak sorafenib ve apigeninin kombine uygulamasının HepG2 HSK hücre hattındaki sitotoksik etkileri, hücre döngüsü ve apoptoz üzerindeki etkileri *in vitro* olarak araştırılmış ve sorafenib ve apigeninin sinerjik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: HSK, hepatoselüler karsinoma, sorafenib, apigenin, kombine etki

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2017SABE002).

ABSTRACT**INVESTIGATION OF POSSIBLE EFFECTS OF APIGENIN, SORAFENIB AND
COMBINED APPLICATIONS ON APOPTOSIS AND CELL CYCLE IN
HEPATOCELLULAR CANCER CELLS**

ŞİRİN, Nazlı

M.Sc. Thesis in Medical Biology

Supervisor: Assoc. Dr. Yavuz DODURGA

July 2018, 74 Pages

Hepatocellular carcinoma (HCC) is most common type of liver tumors and it is the third most common cause of cancer-related death in the world. HCC curative therapies have some problems because of the heterogen structure of the tumor and there is only one chemodrug called sorafenib for this patients. Thus, there is a limitation for treatment of HCC that decrease the treatment success rate. Nowadays, most disease tretment including cancer, combination therapies with other chemodrugs and herbal extracts beside current drugs are very popular and promising. The aim of this study to offer a new approach for HSK treatment, increase the anticancer activity of sorafenib and decrease its cytotoxic effects on normal cells investigated therapeutic effects of sorafenib and apigenin combined treatment on HepG2 HCC cell line for the first time. In this study, sorafenib and apigenin added to cells with determinated doses and times alone and combined. Cytotoxic effects of sorafenib, apigenin and combined treatment indicated with XTT analysis. Effects of alone and combine treatment of sorafenib and apigenin on apoptosis were calculated by TUNEL Analysis. Treatment with alone and combined effects on cell migration and invasion determined by wound-healing and Matrigel invasion assays respetively. The effects of expression changes of apoptosis and cell cycle genes were analyzed by real-time PCR. According to XTT analysis results, sorafenib + apigenin combined group has more decreasing effect on cell viability than control and alone tretment groups. Also, sorafenib + apigenin combined group caused significant increase of apoptotic cell numbers. Wound-healing and Matrigel invasion assays indicated that migration and invasion capability of cells in combined group inhibited more than cells in alone treatment groups. Lastly, real-time PCR results showed that significant increase of *caspase-3*, *caspase-8*, *caspase-10*, *p21* and *p53* expression levels in combined group in comparison with alone tretment group prove that combined treatment stops cell cycle and induct more apoptosis than alone treatment groups. These results showed that cytotoxic effects of sorafenib and apigenin combine treatment, and effects on cell cycle and apoptosis in HepG2 HCC cell line investigated *in vitro* and suggest that sorafenib and apigenin have synergitic effect.

Keywords: HCC, heparocelular carcinoma, sorafenib, apigenin, combined effects

**This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects
Coordination Unit through (Project number: 2017SABE002)**

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bana her türlü desteği sağlayan değerli danışman hocam Doç. Dr. Yavuz DODURGA'ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerini ve yardımlarını benden esirgemeyen başta anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŐ olmak üzere tüm bölüm hocalarıma,

Deneylerin gerçekleşmesindeki yardımları ve içten dostlukları için Arş. Gör. Dr. Levent ELMAS ve Arş. Gör. Mücahit SEÇME'ye,

Yüksek Lisans tez projemin gerçekleşmesi için gerekli kaynağı sağlayan Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Yüksek lisans eğitimim dahil olmak üzere yaklaşık 20 yıllık eğitim hayatım boyunca her durumda benimle birlikte olan, maddi ve manevi desteğini bir an bile esirgemedi beni bu günlere getiren aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç	3
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	4
2.1. Hepatoselüler Karsinoma (HSK).....	4
2.1.1. Tedavi	6
2.2. Hücre Döngüsü.....	8
2.2.1. Hücre Döngüsünün Kontrolü.....	9
2.2.2. Hücre Döngüsü ve Kanser.....	12
2.3. Apoptoz	13
2.3.1. Apoptozun Mekanizması	14
2.3.2. Apoptozun Düzenlenmesi.....	16
2.3.3. Apoptoz ve Kanser	18
2.4. Sorafenib	19
2.5. Apigenin	23
2.6. Hipotez	26

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	27
3.1. Hücre Kültürü.....	27
3.2. Hücrelerin Sayımı	28
3.3. Hücre Canlılık Analizleri.....	28
3.4. Koloni Oluşum Analizi.....	29
3.5. Wound-Healing (Yara-İyileşme) Yöntemi İle Migrasyon Analizi.....	30
3.6. İnvazyon Kapasitesinin Belirlenmesi	30
3.7. Tunel Yöntemi ile Apoptoz Analizi.....	31
3.8. Trizol Reagent ile Total RNA İzolasyonu.....	32
3.9. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	33
3.10. Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PZR).....	34
3.11. Verilerin İstatistiksel Analizi.....	36
4. BULGULAR	37
4.1. XTT Sonuçları.....	37
4.2. Koloni Oluşum Sonuçları	42
4.3. Wound- Healing Sonuçları	44
4.4. Matrigel İnvazyon Analizi Sonuçları	45
4.5. TUNEL Apoptoz Analizi Sonuçları	47
4.6. Gerçek Zamanlı PZR Sonuçları	49
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇ	62
7. KAYNAKLAR	63
8. ÖZGEÇMİŞ	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Hücre döngüsü	9
Şekil 2.2 Hücre döngüsü kontrol noktaları	12
Şekil 2.3 Apoptozun morfolojik etkileri	14
Şekil 2.4 Apoptozun iç ve dış yolak tarafından aktivasyonu.....	16
Şekil 2.5 Sorafenib kimyasal ve üç boyutlu yapısı	19
Şekil 2.6 Sorafenibin etki ettiği yolaklar (FLT3; FMS ile ilgili tirozin kinaz 3 reseptörü, PDGFR; büyüme faktörü reseptörü, VEGFR; vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü, KIT; kök hücre faktörü reseptörü, RET; proto-onkogen)	20
Şekil 2.7 Apigenin kimyasal ve üç boyutlu yapısı.....	23
Şekil 2.8 Apigeninin kimyasal yapısı ve fizyolojik fonksiyonları.....	24
Şekil 4.1 Sorafenibin 24 saat sonunda HepG2 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi	38
Şekil 4.2 Sorafenibin 48 saat sonunda HepG2 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi	38
Şekil 4.3 Sorafenibin 24 ve 48 saat sonunda HepG2 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi.....	39
Şekil 4.4 Apigeninin 24 saat sonunda HepG2 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi.....	39
Şekil 4.5 Apigeninin 48 saat sonunda HepG2 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi.....	40
Şekil 4.6 Apigeninin 72 saat sonunda HepG2 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi.....	40
Şekil 4.7 Apigeninin 24, 48 ve 72 saat sonunda HepG2 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi	41
Şekil 4.8 50 µM apigenin ve 5 µM sorafenibin kombine uygulamasının 48 saat sonunda HepG2 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi	42
Şekil 4.9 A) Kontrol grubu. B) 50 µM apigenin C) 5 µM sorafenib D) 50 µM apigenin + 5 µM sorafenib uygulanan grupların 48 saat sonundaki koloni görüntüleri	43
Şekil 4.10 Kontrol, 50 µM apigenin, 5 µM sorafenib ve 50 µM apigenin + 5 µM sorafenib uygulanan grupların 48 saat sonundaki koloni sayıları	44
Şekil 4.11 Kontrol, 50 µM apigenin, 5 µM sorafenib ve 50 µM apigenin + 5 µM sorafenib uygulanan grupların 0, 16 ve 24. saatlerdeki wound-healing görüntüleri	45

Şekil 4.12 A) Kontrol grubu B) 50 µM apigenin C) 5 µM sorafenib D) 50 µM apigenin + 5 µM sorafenib uygulanan gruplardaki invaze olmuş hücrelerin mikroskop görüntüleri ..	46
Şekil 4.13 Kontrol, 50 µM apigenin, 5 µM sorafenib ve 50 µM apigenin + 5 µM sorafenib uygulanan gruplarda invaze olmuş hücre sayıları ..	46
Şekil 4.14 A) Kontrol grubu. B) 50 µM apigenin C) 5 µM sorafenib D) 50 µM apigenin + 5 µM sorafenib uygulanan gruplardaki apoptotik hücrelerin floresan mikroskop altındaki görüntüleri.....	48
Şekil 4.15 Kontrol, 50 µM apigenin, 5 µM sorafenib ve 50 µM apigenin + 5 µM sorafenib uygulanan gruplarda % apoptoz miktarları ..	49



TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1 HSK tedavisinde sorafenib ile birlikte kullanıldığında etkili olan ve henüz çalışmaları devam eden ilaçlar.....	22
Tablo 2.2 Apigeninin farklı kanser türlerindeki terapötik etkileri	24
Tablo 3.1 Bir kuyucuk için kullanılan TUNNEL reaksiyon karışımı	31
Tablo 3.2 Bir kuyucuk için kullanılan cDNA sentez karışımı	33
Tablo 3.3 Bir kuyucuk için kullanılan Gerçek Zamanlı PZR karışımı	34
Tablo 3.4 Kullanılan genlerin Forward ve Reverse Primer Dizileri	34
Tablo 4.1 Gerçek Zamanlı PZR Sonuçlarına göre 50 µM apigenin, 5 µM sorafenib ve 50 µM apigenin + 5 µM sorafenib doz gruplarındaki ekspresyon değişimleri (p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir).....	50

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AIF.....	Apoptoz İndükleyici Faktör
APAF-1.....	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
ATP.....	Adenozin Tri Fosfat
Bax.....	Bcl-2 İlişkili X proteini
Bcl-2.....	B Hücreli Lenfoma-2
BH.....	Bcl-2 Homoloji Domaini
Bid.....	BH-3 İlişkili Domain Ölüm Agonisti
Bim.....	Bcl-2 ile etkileşen protein
Bok.....	Bcl-2 İlişkili Ovaryan Öldürücü
CAD.....	Kaspaz ile Aktive olan DNaz
CDK.....	Siklin Bağımlı Kinaz
cDNA.....	Komplementer DNA
DMSO.....	Dimetil sülfoksit
DNA.....	Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ.....	Dünya Sağlık Örgütü
EGFR.....	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
ERK1/2.....	Ekstrasellüler sinyal ilişkili kinaz
ER.....	Endoplazmik Retikulum
FADD.....	Fas ilişkili Ölüm Domaini
FasL.....	Fas Ligandı
HBV.....	Hepatit B virüsü
HCV.....	Hepatit C virüsü
HSK.....	Hepatoselüler karsinoma
IC ₅₀	Letal Doz 50
lt.....	Litre
MAPK.....	Mitojen aktive protein kinaz
MDM-2.....	Fare double minute-2
miRNA.....	Mikro RNA
ml.....	Mililitre
mM.....	Milimolar
MMP.....	Matriks Metalloproteinaz
mRNA.....	Mesajcı Ribo Nükleik Asit
ng.....	Nanogram
PAGE.....	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PDGFRA.....	Platelet Kökenli Büyüme Faktör Reseptörü A
PI3K.....	Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PRB1.....	Retinoblastom Yatkınlık Lokusu Proteini 1
PTEN.....	Fosfataz ve Tensin Homolog
PUMA.....	Apoptozun p53 upregüle Edici Modülatörü
PZR.....	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA.....	Ribonükleik asit
TNF.....	Tümör Nekrozis Faktör
TNFR.....	Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü
TRAIL.....	Tümör Nekrozis Faktör İlişkili Apoptoz İndükleyen Ligand
XTT.....	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

VEGF.....	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
µg.....	Mikrogram
µl.....	Mikrolitre
µM.....	Mikromolar
°C.....	Santigrat Derece



1. GİRİŞ

Tüm kanserlerin %5,4' lük kısmını oluşturan hepatoselüler karsinoma (HSK) karaciğer tümörünün en yaygın tipidir. Son verilere göre dünyada kanser ilişkili ölümler arasında üçüncü sırada yer almaktadır ve her yıl bir buçuk milyondan fazla insan bu hastalık nedeniyle ölmektedir (Lin vd 2012; Chen vd 1997). HSK, primer karaciğer hücrelerinden köken alan malign bir tümördür. HSK gelişimindeki en yaygın risk faktörü sirozdur ve hastaların %80' i kronik hepatit B virüsü (HBV) ve/veya hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonuna sahiptir (Chang vd 1997; Nguyen vd 2009). Bu faktörlerin yanısıra alkol kullanımı, obezite, yaş, cinsiyet ve diğer hastalıklar da HSK gelişiminde etkili faktörlerdendir (Mahmood vd 2005). HSK görülme sıklığı coğrafi bölgeden bölgeye değişiklik göstermekle birlikte HBV enfeksiyonunun endemik olduğu bölgeler olan Asya, Afrika ve Uzak Doğu bu hastalığın en çok görüldüğü yerlerdir. Dünya çapında yılda bir milyondan fazla yeni vaka tanı almakta fakat bunların sağkalım oranları 5 yıl için %3' den azdır. Ayrıca kronik hepatit B virüsü taşıyıcılarında HSK gelişme riski, enfeksiyonu olmayan insanlara göre yaklaşık 100 kat daha fazladır ve bu bugüne kadar bilinen en yüksek viral etken-kanser oluşum riski ilişkisidir (Arbuthnot ve Kew, 2001; Beasley, 1988). HSK hastaları düşük sağkalım oranına sahiptir ve operasyon sonrası nüks ve metastaz oranı da oldukça yüksektir (Tang, 2001; Tang vd 1999).

HSK, risk faktörlerinin azaltılmasıyla önlenabilir bir kanser tipidir fakat, ancak ileri evrede tanı konulabilmesi, heterojen tümör yapısı, yüksek nüks riski, hastaların kemoterapi ve radyoterapiye karşı direnç geliştirmesi uygulanan tedavinin başarısız olmasına neden olarak hastaların sağkalım süresini uzatamamaktadır. HSK tedavisi için günümüzde kullanılabilen tek kemoterapotik ajan sorafenibdir. Sorafenib farklı onkogenetik yolları inhibe ederek tümör hücrelerinin çoğalmasını ve anjiyogenezini baskılamaktadır (Gong vd 2017). Günümüzde birçok kanser tedavisinde olduğu gibi HSK tedavisinde de kombine ilaç uygulamalarına yönelik çalışmalar ağırlıktadır. Sorafenib ile birlikte MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR, EGFR, histon deasetilaz ve anjiyogenez inhibitörlerinin kombine etkilerine yönelik çeşitli çalışmalar yapılmakta olup

bu çalışmaların bir kısmı için klinik süreç devam ederken bir kısmı için olumlu sonuçlar elde edilememiştir. Bu yüzden HSK tedavisinin başarı oranını arttırmak için yeni tedavi yöntemleri ve ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır (Chang vd 1997; Nissen ve Martin 2002; Nguyen vd 2009).

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapotik ajanların çoğu bitkisel kaynaklıdır. Bu sebeple son zamanlarda bitkisel özütler, metabolitler ve etken maddelerin kanser tedavilerindeki önemi artmış ve bitkilerin terapotik etkileri ile ilgili birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışma yapılmıştır. Fakat mevcut kemoterapotik ajanların hastada çoklu ilaç direnci ve normal hücreler üzerindeki toksik etkilerinden dolayı son yıllarda HSK tedavisinde bu yan etkileri ve dezavantajları ortadan kaldırabilecek veya en aza indirebilecek kemoterapotik ajanların, bitkisel özütlerin ve etken maddelerinin kombinasyonları üzerinde *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (Miao vd 2001).

Sorafenib, belirli hücrel hedefleri olan ve ileri HSK tedavisinde oral olarak kullanılabilen bir çoklu kinaz inhibitörüdür. Nanomolar konsantrasyon düzeyinde inhibe ettiği kinazlar arasında c-Raf, B-Raf, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR, FLT3, Ret ve c-kit sayılabilir (Wei vd 2010; Gedaly vd 2010). Sorafenibin renal karsinom, ürolojik kanserler, tiroid kanseri, meme kanseri ve melanom gibi birçok farklı kanser türünde kullanımı bildirilmiştir. HSK oldukça yoğun vaskülerizasyon içermekte ve Ras/Raf/MAPK yolağında rol alan proteinler komşu non-tümör dokularla karşılaştırıldığında oldukça fazla eksprese edilmektedir. Bu nedenle; sorafenib ile HCC tedavisinde hücre proliferasyonu ve anjiogenezin engellenmesi sırası ile Ras/Raf/MAPK yolağının inhibisyonu ve VEGFR-PDGFR yolağının inhibisyonu ile gerçekleşmektedir.

Apigenin, kimyasal olarak 4', 5, 7-trihidroksiflavon olarak bilinen flavon alt sınıfında bulunan, doğal olarak meydana gelen bir flavonoiddir. Meyvelerde (portakal, elma, vişne, üzüm), sebzelerde (soğan, maydanoz, brokoli, tatlı yeşil biber, kereviz, arpa, domates) ve içeceklerde (çay, şarap) bol miktarda bulunmaktadır (Yan vd 2017). Apigenin, yapısal olarak benzer olduğu diğer flavonoidlerden farklı olarak kanser hücrelerine karşı koruyucu olmasının yanısıra normal hücrelere karşı da düşük sitotoksisite göstermektedir (Gupta vd 2001). Memelilerde *in vitro* ve *in vivo* olarak yapılan çalışmalarda, apigeninin serbest radikal süpürücüsü olarak anti-oksidan aktiviteye sahip olduğu, buna ek olarak anti-mutajenik, anti-inflamatuar, anti-viral ve pürgatif etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Özçelik vd 2011). Bununla birlikte, kanser üzerine yapılan çalışmalarda, prostat, meme, kolon, lösemi ve akciğer kanser hücre hatlarında Apigenin'in hücre büyüme inhibisyonunu, hücre döngüsünün durdurulmasını ve

apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Kim vd 2012; Zhao vd 2017; Angulo vd 2017; Huang vd 2016).

HepG2 hücrelerinde sorafenibin, apigeninin ve sorafenib + apigeninin kombine uygulamasının sitotoksik etkileri XTT analizi ile, apoptotik hücrelerin tayini TUNNEL testi ile, hücre döngüsü ve apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyon değişimlerinin değerlendirilmesi ise gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizi ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler student T testi ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

Gerçekleştirilen tez çalışmasında ilk kez HSK hücre hattı olan HepG2 hücrelerinde sorafenib ve apigeninin kombine uygulamasının sitotoksik etkileri *in vitro* olarak değerlendirilmiş, sorafenib ve apigenin birlikte kullanıldığında daha düşük konsantrasyonlarda terapotik etkinin arttığı görülmüştür. Sonuç olarak, mevcut tez çalışmasında elde edilen bu sonuçların HSK tedavisinde daha etkili yöntemler geliştirilmesi için bir potansiyele sahip olduğu ve bu sebeple yapılacak ileri çalışmalara ışık tutabileceği düşünölmektedir.

1.1. Amaç

Bu tez çalışmasında, HSK tedavisindeki güncel tedavi yaklaşımlarını geliştirerek kullanılan sorafenibin terapötik etkisini arttırmak amacı ile anti-kanserojen özelliğe sahip apigenin ile kombine uygulamasının HepG2 hücre hattında apoptoz ve hücre döngüsü üzerine olası etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Hepatoselüler Karsinoma (HSK)

Hepatoselüler karsinoma (HSK) karaciğer tümörünün en yaygın görülen tipidir ve dünyada kanser ilişkili ölümler arasında üçüncü sıradadır(Lin vd 2012). Hepatoselüler karsinoma primer karaciğer hücrelerinden köken alan malign tümördür. Tüm dünyada hepatoselüler karsinoma görülme sıklığı coğrafi bölgeden bölgeye değişiklik göstermekle birlikte %80'den fazlası Sahra Altı Afrika ve Doğu Asya gibi gelişmekte olan ülkelerde, Kuzey Avrupa ve Amerika gibi gelişmiş ülkelerde ise daha az oranda görülmektedir. Türkiye'deki kanser kayıtlarında HSK ayrı bir başlık olarak değerlendirilmediğinden insidansı ile ilgili güvenilir veri bulunmamaktadır. Fakat yapılan çalışmalarda, Türkiye'deki HSK olgularının %56'sının HBV, %23,2'sinin HCV, %15'inin ise aşırı alkol tüketimi sebebiyle meydana geldiği ayrıca, etiyolojik faktörlerin coğrafi bölgeye göre farklılık gösterdiği saptanmıştır. Doğu Anadolu ve İç Anadolu'da HBV en önemli faktör iken batı bölgelerine doğru gidildikçe HCV ve alkol tüketiminin daha önemli bir etken olduğu görülmektedir (Uzunaliçoğlu vd 2001). Türkiye'de de kronik hepatit hastalıkları sıklığı ile birlikte HSK'nın insidansının ve prevalansının hızla arttığı görülmektedir. Genel olarak bakıldığında ise gelişmekte olan ülkelerde HBV enfeksiyonları, gelişmiş ülkelerde HCV enfeksiyonları ve alkol kullanımı HSK oluşumundan sorumludur (El-Serag ve Rudolph 2007; Parkin vd 2002; Bozkaya, 2009). HSK görülme sıklığı erkeklerde kadınlara oranla daha fazla görülürken yaşla birlikte artış göstermektedir. Tüm dünyada her yıl ortalama bir milyondan fazla yeni vaka tanı almaktadır ve bunların sağ kalım oranları 5 yıl için %3'den azdır. Operasyon sonrası nüks ve metastaz oranı da oldukça yüksektir (Tang, 2001; Tang vd 1999). Her yıl bir buçuk milyondan fazla insan bu hastalık nedeniyle ölmektedir (Chen, 1997).

HSK genelde kronik karaciğer hastalığı veya siroz zemininde gelişmektedir. Yapılan araştırmalar sirozun HSK ile ilişkisinin bölgeden bölgeye değişiklik gösterdiğini, örneğin; Japonya'daki vakaların %90'ında siroz bulunurken, Afrika'nın bazı bölgelerinde bu oranın %50-63'e kadar düştüğü göstermektedir (Bosman vd 2010). Bu sebeple

sirozun HSK gelişiminde tek başına premalign olmadığı, kronik karaciğer hastalığı zemininde malign transformasyonu kolaylaştıran bir süreç olduğu düşünülmektedir (Burt vd 2012). Kronik hepatit B, kronik hepatit C, alkol kullanımı, sigara kullanımı, aflatoksin, metabolik hastalıklar (hemokromatozis, alfa 1 antitripsin eksikliği), nonalkolik karaciğer yağlanması, diabetes mellitus ve erkek cinsiyet gibi çeşitli faktörler HSK için ana risk faktörleridir (El-Serag ve Rudolph 2007). Kronik hepatit B virüsü taşıyıcılarında hepatoselüler karsinoma gelişme riski, enfeksiyonu olmayan insanlara göre yaklaşık 100 kat daha fazladır ve bu bugüne kadar bilinen en yüksek viral etken-kanser oluşum riski ilişkisidir (Arbutnot ve Kew 2001; Beasley, 1988). Hepatoselüler karsinom olgularının hepsi siroz zemininde gelişmemektedir. Vakaların yaklaşık %15-20' si de sirotik zemine dayanmadığı düşünülmektedir (Borie vd 2008; Sherman, 2005). HSK tümörlerine çok sık rastlanmakla birlikte, hastalara ancak ileri evrede tanı koyulabilmektedir. Ayrıca sirotik zeminde gelişen HSK vakalarına kıyasla daha iyi prognoz gösterdikleri bildirilmiştir (Alkofer, 2011).

Risk faktörlerine maruz kalan hepatositlerde hasar meydana gelmektedir. Bu hasarın yanısıra HBV ve HCV'nin hepatositleri enfekte etmesi sonucu viral enfeksiyona bağlı immün yanıt oluşmasına neden olarak karaciğer dokusunda inflamasyon oluşmasına neden olur (Toylu, 2007; Park vd 1995). Bu inflamatuvar yanıt ve oksidatif stres karaciğerin stromasının ve mikroçevresinin değişmesine ve bir sonraki aşama olarak da sirozu gelişimine neden olmaktadır. Değişen mikroçevre ile birlikte hepatositlerde rejenerasyon amacıyla çoğalma hızı artmaktadır. Bu hızlı çoğalma zamanla genetik değişimlere yol açarak sirotik karaciğer dokusu içinde fibrotik stromayla çevrilmiş, çoğalan hepatositlerden oluşan nodüller oluşmaya başlar. Oluşan bu nodüller önce hiperplastik nodüllere daha sonra da büyüme hızı kontrolünün kaybı, hepatosit fonksiyonlarının kaybı ve genomik instabilitenin meydana gelmesiyle displastik nodüllere yani sonuç olarak hepatoselüler karsinomaya dönüşmektedir (Thorgeirsson vd 2006).

Kronik HBV, HCV enfeksiyonu, aflatoksin veya alkol maruziyeti sonucu meydana gelen hepatokarsinogenezde diğer karsinogenezlerde de olduğu gibi sınırsız bölünme yeteneği, apoptozdan kaçabilme ve anjiogenez özellikleri görülmektedir. HSK, allelik kayıplarda artış, kromozomal anormallikler, mutasyonlar ve hücresele yolaklarda meydana gelen anormalliklerle de ilişkilidir (Feitelson vd 2002; Kunter, 2007). Yapılan son çalışmalar HSK'nın erken evrelerinde kromozomal instabilitenin görüldüğünü ve bunun hastalığın seyri bakımından malignant bir fenotip oluşumuyla doğrudan ilişkili olduğunu göstermiştir (Raidl vd 2004). Kronik HBV, HCV enfeksiyonlu ve sirozlu karaciğerlerde DNA hipermetilasyonunun artmış olduğu görülmektedir. HSK vakalarında

ise p16/INK4A gibi farklı tümör baskılayıcı genlerde DNA hipermetilasyonunun arttığı gözlenmiştir (Wong ve Ng 2008; Kondo vd 2000). Sirozlu karaciğerlerde görülen diğer bir anormallik ise telomer kısalmasıdır. Telomer kısalması sadece hepatositlerde görülen, HSK için önemli bir mekanizmadır gözlenmektedir. Yapılan çalışmalarda telomer kısalmasının karsinogen maruziyeti sonrası farelerde karaciğer tümörü oluşumunu arttırdığı görülmüştür. İnsan HSK vakalarında da yapılan çalışmalarda telomer kısalması gözlemlenmiştir. İnsan hepatositlerinde kromozomal instabiliteye neden olabilen bu telomer kısalmasının HSK gelişimini tetikleyerek önemli bir rol oynuyor olabileceği ileri sürülmüştür (Wiemann vd 2007). Yapılan bir çok çalışma HSK'da genetik değişikliklerin yanısıra epigenetik değişikliklerin de oldukça önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Bird, 2007).

Kanser hücrelerinde hücre döngüsü, apoptoz, proliferasyon ve metastazi düzenleyen birçok gende çeşitli mutasyonlar görülmektedir. Yapılan araştırmalara göre HSK'da en sık mutasyona uğrayan genlerin P53 ve β -katenin olduğu görülmüştür. Çeşitli hücrel onkogenlerin aktivasyonu veya tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu sonucu Wnt/ β -katenin, p14Arf/p53, p16INK4A/Rb, TGF β ve PTEN/Akt gibi hücre döngüsü, apoptoz, proliferasyon ve metastazın düzenlenmesinden sorumlu sinyal yollarında hatalar meydana gelmektedir (El-Serag ve Rudolph 2007).

2.1.1. Tedavi

HSK vakalarının çoğunda tanı ancak ileri evrede konulabilmekte ve bu yüzden hastaların sağkalım süresi oldukça kısa olmaktadır. HSK tedavisinde kullanılan yöntemleri aşağıdaki gibi gruplandırmak mümkündür.

2.1.1.1. Cerrahi yöntemler

- **Rezeksiyon:** Siroz olmayan veya sirozun erken evrelerinde olan hastalar için uygulanan ilk yöntemdir (Belghiti vd 2002). İleri evrelerde daha geniş rezeksiyon yapılması gerektiğinden operasyon sonrasında karaciğer yetmezliği meydana gelme riski çok yüksektir. Operasyon sonrası geriye kalacak karaciğer doku hacmi önemlidir bu yüzden hesaplamalar çok dikkatli yapılmalıdır. Hastaların işlemi tolere edebilmeleri için siroz olmayan hastaların %25, siroz olan hastaların ise %50'den fazla karaciğer dokusunun kalması gerekmektedir (Shoup vd 2003).

- Karaciğer transplantasyonu: Karaciğer fonksiyonlarında ileri derecede bozukluk olan ve rezeksiyon yapılamayan hastalarda uygulanan yöntemdir.

2.1.1.2. Perkütan tedavi yöntemleri

- Alkol ablasyonu: Perkütan yolla doku içine alkol verilerek dokuda koagülasyon nekrozu oluşması sağlanır. Kolay ve düşük maliyetlidir. Bu yöntemin tümör çapı 3 cm'den küçük hastalarda başarı oranı %90 iken 3 cm'den büyük tümörlü hastalarda oran %50 civarındır.
- Radyofrekans termal ablasyon: Perkütan olarak, laparoskopik veya açık cerrahi yöntemlerle uygulanabilen bir çeşit termal ablasyondur. Tümör boyutunun 5cm'in altında olduğu vakalarda oldukça etkinken tümör boyutunun 5cm üstü vakalarda da uygulanabilir.

2.1.1.3. Transarteriyel tedavi yöntemleri

Cerrahi ve peruktan tedaviler uygulanamıyacak aşamadaki hastalar için kullanılan yöntemlerdir. Genelde karaciğer nakli için bekleyen hastalara uygulanan tedavilerdir.

- Embolizasyon: Kullanılan embolizan ajanlar jelatin ve lipiodoldür.
- Kemoembolizasyon: Kullanılan kemoterapötik ajanlar doksorubisin, mitomisin ve cisplatindir.

2.1.1.4. Radyoterapi

İyonize ışın kullanılarak HSK hücrelerinin öldürülmesini amaçlayan bir yöntemdir. Özellikle hastanın cerrahi tedavi seçenekleri için uygun olmadığı durumlarda uygulanan bir yöntemdir. Karaciğer damarları içerisine yerleştirilen kateterler yardımı ile içeriden ya da stereotaktik radyoterapi şeklinde dışarıdan uygulanması mümkündür. Boyutları 5-7cm'den küçük ve toplam 3'den az tümör içeren vakalarda etkili bir yöntemdir.

2.1.1.5. Kemoterapi

Son zamanlarda HSK hastalarında kemoterapide doxorubicin, cisplatin, adriamisin, carboplatin, etoposide, siklofosfamid, ifosfamid, vinkristin ve 5-florourasil

kullanılmaktadır (Evans vd 1982). Yapılan araştırmalarda ileri evrede uygulanan bir tirozin kinaz inhibitörü olan sorafenibin de HSK tedavisinde etkili olarak hastanın sağkalımını arttırdığı bildirilmiştir (Llovet vd 2008).

2.2. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, genetik materyalin kopyalanarak bölünme sonucu oluşturulan yeni hücrelere eşit olarak dağıtıldığı hücresel ve moleküler bir dizi olaydan oluşan döngüdür. Bu döngü birbiriyle bağlantılı 4 süreçten meydana gelir;

- 1- Hücre büyümesi
- 2- DNA replikasyonu
- 3- Kromozomların yavru hücrelere dağılması
- 4- Hücre bölünmesi

Genel olarak interfaz (G1, S, G2) ve mitoz (M) olarak iki bölüme ayrılır. Hücre bölünme sinyali aldığı anda bir hazırlık evresine girer ve hücre büyümeye başlar. Bu evreye interfaz evresi denir ve kendi içinde G1, S, G2 olmak üzere üçe ayrılır.

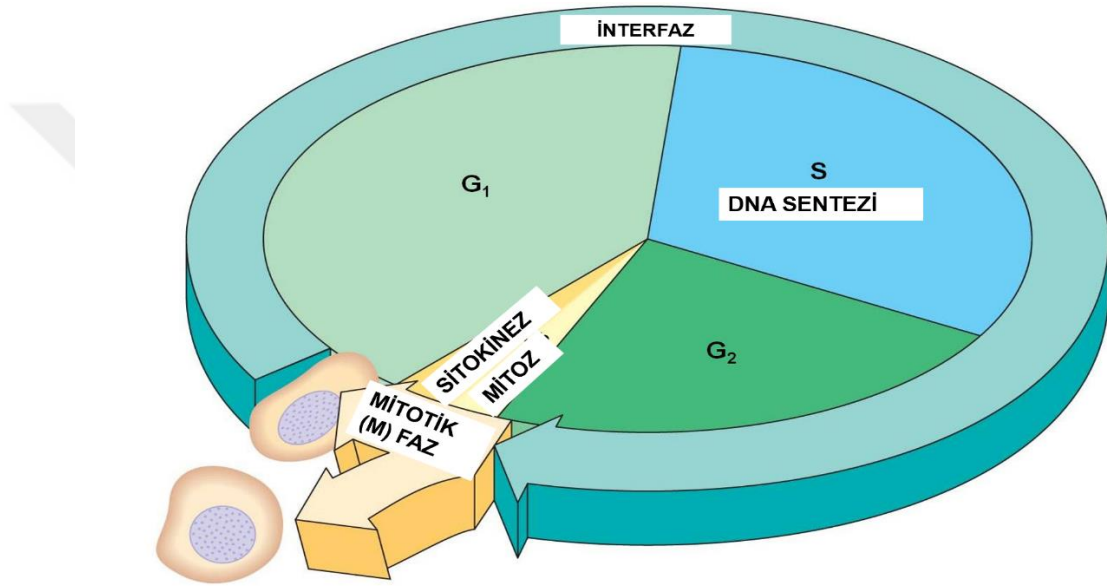
G0 fazı: Herhangi bir büyüme faktörü ile uyarılmadığı sürece yada bölünme için yeteri kadar büyümemiş ise hücreler bu aşamada bekler. Hücre metabolik olarak aktiftir fakat hücre dışı faktörler tarafından uyarılmadıkça çoğalmazlar. Hücrenin dinlenme evresidir.

G1 fazı: Hücre bu aşamada DNA sentezi için gerekli hazırlıkları tamamlar. ATP sentezi artar, organel sayısı artar ve metabolizma hızı artar. Hücre için gerekli RNA ve proteinlerin sentezi gerçekleşir, büyüme faktörleri aktive olur. Sentez evresi için hazırlık yapılır.

S fazı: Sentez fazıdır. RNA sentezi devam ederken protein sentezi en yüksek seviyeye ulaşmış olur. DNA replikasyonu gerçekleşir ve DNA miktarı iki katına çıkarılır. Sentrozom kendini eşlemeye başlar.

G2 fazı: Hücre bu aşamada mitoz için hazırlanır. DNA sentezi tamamlanmıştır fakat RNA ve protein sentezi devam eder. Sentrozom kendini eşlemiş olur.

M fazı: Mitoz bölünmenin gerçekleştiği evredir. Kromozomlar meydana gelir. Kendi içinde profaz, prometafaz, metafaz, anafaz ve telofaz evrelerinden oluşmaktadır. Son olarak sitoplazma bölünmesinin ardından aynı genetik materyale sahip iki yeni hücre meydana gelir. Sürekli bölünen hücrelerde döngü tekrar G1, S, G2, M olarak devam eder (Vermeulen vd 2003, Kumar vd 2005).



Şekil 2.1 Hücre döngüsü (Web_1)

2.2.1. Hücre Döngüsünün Kontrolü

Hücre döngüsü birçok gen ve gen ürünü tarafından kontrol edilmektedir. Sağlıklı hücrelerde, hücre döngüsü sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Döngü süresince bir aşamanın bitişi ve diğer aşamaya geçiş farklı mekanizmalar tarafından kontrol altına alınmıştır. Hücre döngüsünün kontrolünün sağlandığı 3 temel kontrol noktası vardır. Bu kontrol noktaları; G1-S, G2-M ve M kontrol noktalarıdır (Klug ve Cummings 2002, Lukas vd 2004).

2.2.1.1. G1-S Kontrol Noktası

Bu noktada DNA'da bir hasar olup olmadığı ve hücrenin bölünme için uygun boyuta ulaşıp ulaşmadığı kontrol edilir. S evresine girmeden önce oluşmuş veya bir önceki evre olan mitoz evresinde meydana gelmiş DNA hasarının varlığı hücre döngüsünün S evresine girmeden durdurulmasını sağlar. Eğer DNA'da bir hasar tespit edilirse veya hücre bölünme için uygun boyutta değilse döngü bu aşamada durdurulur. Böylece S fazından hasarlı DNA'nın bir sonraki aşamaya geçmesi engellenmiş olur. Böylece hücre hasarı tamir etmek için zaman kazanır ve hasarlı DNA'nın kopyalanması önlenir.

G1, S ve G2 evrelerinde hücre döngüsünün durması, hasar görmüş yada replike olmamış DNA'ya bağlanan protein kompleksleri ile tetiklenir. Bu proteinler DNA hasarını algılar ve ardından sadece hücre döngüsünü durdurmakla kalmaz DNA tamirini ve eğer tamir gerçekleştirilemezse programlı hücre ölümünü de aktive ederler.

Memeli hücrelerinde G1-S kontrol noktasında hücre döngüsünün duraklatılması *Chk2* ve *ATM* tarafından fosforillenen, *p53* olarak bilinen tümör baskılayıcı gen tarafından gerçekleştirilir. Fosforillenme *p53*'ü kararlı hale getirir ve DNA hasarı *p53* miktarında hızlı bir artışa neden olur. *p53* aynı zamanda bir transkripsiyon faktörüdür ve miktarındaki hızlı artış, hücre döngüsünü durduracak olan hedef genlerin uyarılmasını tetikler. *p53* döngüsünü durdurduktan sonra *p21*'i aktive ederek DNA'nın transkripsiyonel olarak tamirini başlatır. DNA'daki hasar tamir edilmezse *p53* hücrenin apoptoza gitmesini sağlar.

Farklı kanser türlerine bakıldığında genellikle *p53*'ü kodlayan genin iki kopyasında da mutasyon görülmektedir. *p53*'te meydana gelen fonksiyonu kaybı hasarlı DNA'ya sahip hücrenin G1-S kontrol noktasında hasarın tespit edilip döngünün durdurulamamasına neden olur. Böylece hasarlı DNA tamir edilemeden yeni oluşan hücrelere aktarılmış olur. Böylece mutasyonlar artar ve genom kararsızlaşır.

G1-S kontrol noktasında *p53*'ün yanısıra siklin/CDK kompleksleri (siklin A/CDK2, siklin E/CDK2, siklinD/CDK4 ve siklin D/CDK6) gibi bazı protein kompleksleri de görev almaktadır. Siklin/CDK komplekslerinin fazla ekspresyonu hücrenin G1-S noktasındaki duraklama süresini kısaltırken, az ekspresyonu hücrelerin G1 evresinde kalmasına neden olur (Resnitzky vd 1994, Lee vd 1995, Ito vd 1999). Bu yüzden siklinler ve CDK'lar önemli onkogenlerdir (Strauss vd 1995).

2.2.1.2. Restriksiyon Noktası

Hücre döngüsünün evreleri arasındaki geçişte etkili olan bir diğer kontrol noktası ise restriksiyon noktasıdır. Restriksiyon noktası orta ve geç G1 evresinin arasında bulunur. Restriksiyon noktası, hücre için gerekli büyüme sinyallerinin alınıp alınmadığını kontrol ederek hücrenin G1'den S evresine geçişini düzenler (Planas-Silva ve Weinberg, 1997). Hücre yeterli miktarda büyüme sinyali almamış ise hücre S evresine geçemez ve G0 dinlenme evresinde kalır (Garrett, 2001).

2.2.1.3. G2-M Kontrol Noktası

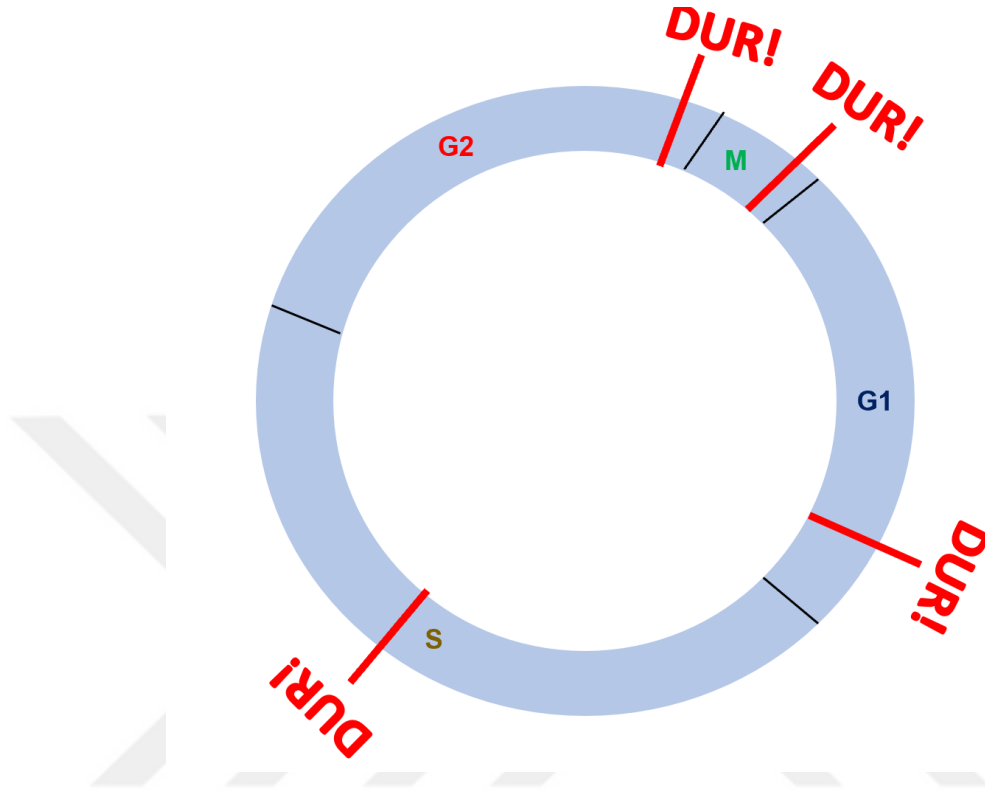
G2-M kontrol noktasında DNA replikasyonunun tamamlanıp tamamlanmadığı ve hücrenin fizyolojik olarak mitozu hazır olup olmadığı kontrol edilir. Eğer DNA replikasyonu tamamlanmamış hücre döngüsünü durduran bir sinyal oluşturulur ve böylece hücrenin M evresine geçmesi engellenir. Böylece hücre tüm genomun replikasyonu tamamlanıncaya kadar G2'de bekler. G2-M kontrol noktasında meydana gelebilecek hatalar kromozomal anomalilere yol açmaktadır. DNA replikasyonunun ardından her bir kromozomun iki kopyasının da ayrılması gerekir, bu ayrılmayı ise Siklin/CDK kompleksleri düzenler. G2-M kontrol noktasında BRCA1'in yanı sıra G1'de olduğu gibi p53'ün de rol aldığı bilinmektedir. Bu durum p53'ün genomun kararlılığında önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Vauzour vd 2007, Lüleyap 2008, Shiotani ve Zou 2009).

2.2.1.4. M Kontrol Noktası

M kontrol noktası en önemli kontrol noktalarındandır. Kromozomların mitotik iğ üzerinde düzenli bir şekilde yer almalarını sağlar. Bu sayede yeni oluşacak hücrelere kromozomların doğru şekilde dağılması sağlanır. Eğer bu aşamada iğ ipliklerinin oluşması ve kromozomların bağlanmasında bir sorun meydana gelirse hücre döngüsü metafaz aşamasında durdurularak hatalı kromozomların yavru hücrelere gitmesi engellenmiş olur (Klug ve Cummings 2002, Lüleyap 2008).

Bu kontrol noktaları sayesinde DNA replikasyonunda, hasarlı DNA'nın tamirinde, kromozomların biçimlendirilmesi veya düzenlenmesinde bir hata meydana gelirse, hücre döngüsü hata düzeltilene kadar durdurulur. Böylece tespit edilememiş veya tamir edilememiş mutasyonların artması ve bunun sonucu olarak hücrelerde biriken

kromozomal anormallikler engellenmiş olur. Fakat tüm kontrol noktalarına rağmen hasarlı olan DNA tamir edilemez veya kromozomal hasar giderilemezse hücre programlanmış hücre ölümü yani apoptoz ile ölüme gider (Klug ve Cummings 2002).



Şekil 2.2 Hücre döngüsü kontrol noktaları

2.2.2. Hücre Döngüsü ve Kanser

Kanser, proto-onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen birçok mutasyon sonucu hücre döngüsünün düzenlenmesinde ortaya çıkan hatalar sonucu hücrenin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ile ortaya çıkmaktadır (Bos, 1989). Yapılan çalışmalarda DNA hasarını tespit eden ve ardından tamir için p21 proteinini aktive eden ve hücre döngüsünün durdurulmasını sağlayan p53 tümörlerin %50'sinden fazlasında mutasyona uğramış olduğu tespit edilmiştir. Yine yapılan çalışmalarda çeşitli kanser türlerinde tümör baskılayıcı proteinler düşük seviyede ekspres edilirken CDK' lar ise yüksek seviyede ekspres edilmektedir (Zhang, 2007). Normal hücreler ile karşılaştırıldığında protein seviyesindeki bu değişiklikler kanser hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde bölünüp çoğalmasının sebebidir. Tüm insan tümörlerinin yaklaşık %30' unda bir proto-onkogen olan ve siklin D-CDK4 kompleksini aktive ederek hücre döngüsünün ilerlemesinin sağlayan RAS proteininin aktif olduğu görülmektedir (Bos, 1989). Kanser hücrelerinde hücre döngüsü kontrol noktaları işlevsel değildir veya kanser hücreleri bu

noktaları duraklamadan geçebilirler. Bu durum da hasarlı DNA'nın sürekli çoğalarak yeni hücrelere aktarılmasına yani mutasyonun giderek artmasına neden olur. Örneğin G2 kontrol noktasından kaçan hasarlar kromozomal kırıklara ve dolayısıyla genomik kararsızlığa neden olmaktadır (Pecorino, 2008; Puri vd 1999). Yine radyasyon gibi çevresel mutajenlere maruz kalmış bir hücrede hücre döngüsü kontrolünde hatalar meydana gelebilmektedir. Yapılan çalışmalara göre gamma radyasyonuna maruz kalmış hücrelerin hücre döngüsünün G evresinde kalmadan S evresine geçtiği ve bu sebeple hasarlı DNA'nın kopyalanarak mutasyonlara ve yanlış kromozom dizilimlerine neden olduğu gösterilmiştir (Cabadak, 2008; Park ve Lee, 2003).

2.3. Apoptoz

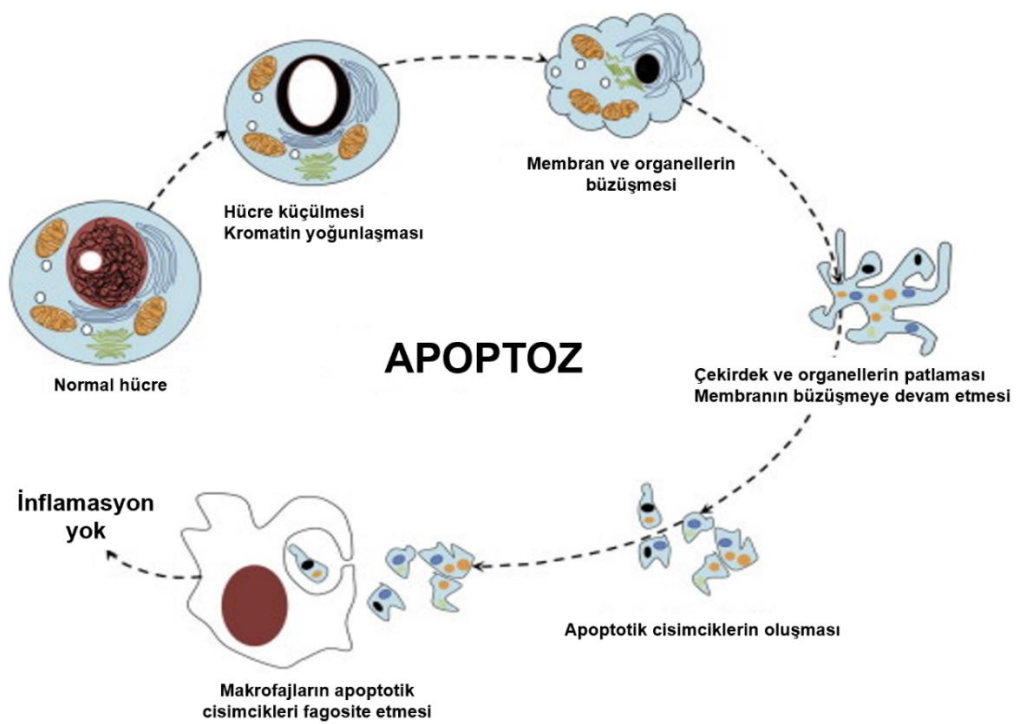
Yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, düzensiz gelişmiş veya hasarlı, çeşitli nedenlerle artık ihtiyaç duyulmayan hücrelerin genler tarafından kontrol edilerek programlı bir şekilde ortadan kaldırıldığı mekanizmaya apoptoz denir (Saunders ve Birchall, 1998; Gewies, 2003; Fischer ve Schulze-Osthoff, 2005). Bir organizmada hücrelerin çoğalması ve ölümleri arasındaki dinamik denge homeostazinin korunması için önemlidir. İnsan vücudunda hergün milyarlarca hücre homeostazın korunabilmesi için ölmektedir (Fischer ve Schulze-Osthoff, 2005). Hücre ölümü, organizmanın gelişiminde ve doku homeostazında da hücre çoğalması kadar önemlidir (Saunders ve Birchall, 1998). Fakat plansız şekilde gerçekleşen apoptoz, apoptoz sürecinin hızlanması veya yavaşlaması gibi bozukluklar organizma için hayati sonuçlar doğurabilmektedir. Örneğin; bazı nörodejeneratif hastalıklar, AIDS, arteriosklerozis gibi hastalıklarda apoptoz sürecinin hızlandığı görülürken, bazı otoimmün hastalıklar ve kanserde apoptoz sürecinin yavaşladığı bu sebeple de apoptoz mekanizmasında bozukluklar görülmektedir (Lüleyap 2008).

Apoptoz sürecine girmiş hücreler geçirdikleri morfolojik değişimler ile diğer hücrelerden ve nekroz gibi diğer ölüm mekanizmalarından ayrılırlar. Apoptoza giren bir hücrede özetle;

- hücre şekli yuvarlaklaşır ve bunun sonucu olarak komşu hücrelerle olan bağlantı kaybolur,
- hücre hacminde azalma ve büzülme meydana gelirken sitoplazma yoğunluğunda artış görülür,
- kromatin yoğunlaşır,
- apoptotik cisimler oluşarak hücre parçalara ayrılmaya başlar,

- daha sonra bu cisimler komşu hücreler tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılır.

Ölen hücrelerin artıkları ve kalan apoptotik cisimlerin fagositler ve komşu hücreler tarafından fagosite edilmesi dokuda bir inflamatuvar yanıt oluşmasını engellenmektedir (Willingham, 1999; Gewies, 2003). Eğer bu apoptotik süreçte bir hata meydana gelirse bu organizma için kötü sonuçlar meydana getirebilmektedir. Örneğin; ölmesi gereken mutasyonlu bir hücrenin meydana gelen bir hata sonucu yaşamaya devam etmesi o mutasyonlu hücrenin çoğalmasına ve bunun sonucunda organizmada genetik bozukluklara sebep olmaktadır.



Şekil 2.3 Apoptozun morfolojik etkileri (Web_2)

2.3.1. Apoptozun Mekanizması

Hücrede büyüme faktörleri ve sitokinler gibi hücrenin yaşaması için gerekli olan pozitif sinyallerin yanısıra, Fas-ligand ve TNF gibi hücrede ölümü tetikleyen negatif sinyaller bulunmaktadır. Bu iki zıt sinyal arasındaki dengenin bozulması hücreyi apoptoza sürüklemektedir (Özçimen, 2005). Bcl-2 gen ailesi apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan önemli faktörlerin başındadır. Bir kısmı pro-apoptotik olarak görev yaparken bir kısmı anti-apoptotik olarak görev yapar. Bunlardan pro-

apoptotik olanlar; Bax, BclXs, Bad, Bak, Bid, Bim, Puma ve Noxa'dır. Bu proteinler mitokondriden Sitokrom- C salınımını ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) salınımını artırır ve bu sayede apoptozu tetikler. Anti-apoptotik olanlar; Bcl-2, Mcl-1 ve Bcl-XI'dir. Hücrede kalsiyum oranının korunmasını düzenlerler. Pro-apoptotiklerin tersine Sitokrom- C ve AIF salınımını inhibe ederek apoptozu engellerler. Hücrenin apoptoza girip girmeyeceğini hücredeki Bax-Bcl-2 dengesi belirler. Eğer hücre apoptoza girecekse hücredeki Bax oranı Bcl-2 oranından yüksektir (Adams ve Cory, 2011; Adrain ve Martin, 2001; Spierings vd, 2004; Cory ve Adams, 2002). Apoptoz mekanizması Şekil 2.4'de gösterildiği üzere hücrede iki farklı şekilde aktive olur;

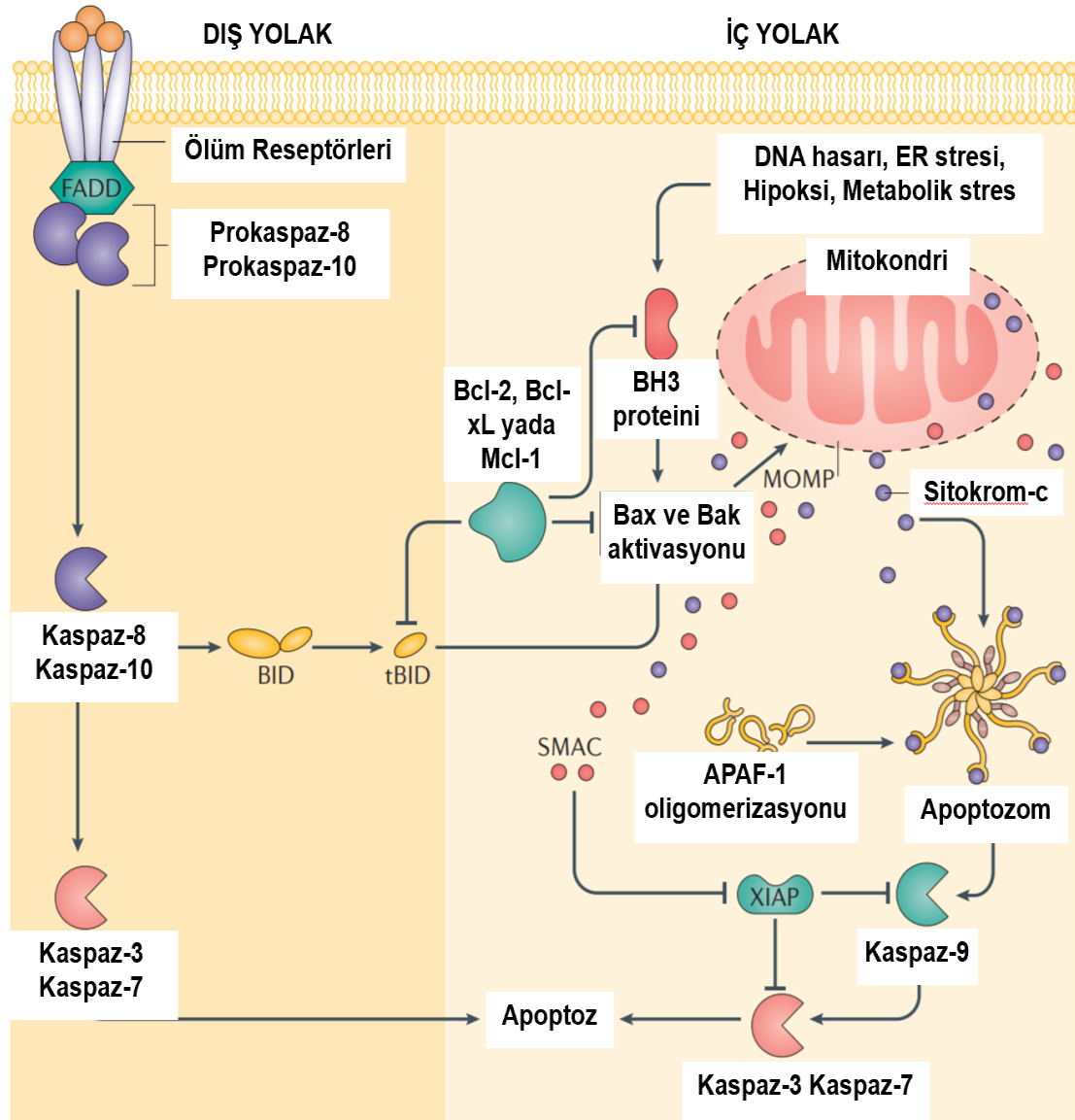
2.3.1.1. Apoptozun hücre içi sinyaller tarafından uyarılması (İç Yolak)

Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör) molekülüne bağlanan Bcl-2 proteini hücrede mitokondrinin dış zarında eksprese edilmektedir. Hücrede hasar meydana geldiğinde Bcl-2, Apaf-1 molekülünü serbest bırakır. Bcl-2 ile ilişkili diğer bir protein olan Bax, mitokondri membranından girerek Sitokrom C' nin salınımını başlatır. Diğer yandan serbest kalan Apaf-1, Kaspaz-9 molekülüne bağlanır. Böylece ATP enerjisi harcanarak sitoplazmada "Apoptozom Kompleksi" oluşmuş olur. Kaspaz-9 proteinleri keserek diğer kaspazların da aktive olmasını sağlar. Böylece proteolitik yollar aktive olarak sitoplazmik proteinler ve DNA yıkılır. Kalan hücre artıkları ve apoptotik cisimler fagositozla ortadan kaldırılır (Green ve Kromer, 2004; Ricci vd, 2003).

2.3.1.2. Apoptozun hücre dışı sinyaller tarafından uyarılması (Ölüm Reseptör Yolu) (Dış Yolak)

Fas-Ligand ve TNF gibi ölüm aktivatörlerinin hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerine bağlanmasıyla reseptörlerin sitoplazmik tarafına bağlanan kaspaz 8 kendini kırarak aktifleşir. Aktive olan kaspaz-8 de pro-kaspaz 3'ü kırarak aktifleştirir. Böylece kaspaz kaskadı oluşur (Song vd 2006) ve hücrenin fagositozu sağlanır (Wolf ve Green, 2002).

Ölüm reseptör yolağındaki bir diğer faktör ise mitokondri lümeninde bulunan apoptoz indükleyici faktör (AIF) dür. Hücre ölüm sinyalleri tarafından uyarılan AIF serbest kalarak çekirdeğe geçer. Çekirdekte DNA'ya bağlanan AIF DNA'nın yıkılmasını ve bunun sonucunda hücrenin parçalanmasını sağlar (Green ve Kromer, 2004; Ricci vd 2003).



Şekil 2.4 Apoptozun iç ve dış yolak tarafından aktivasyonu (Ichim ve Tait 2016)

2.3.2. Apoptozun Düzenlenmesi

Apoptozun düzenlenmesinde kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi, p53, kaspazlar, sitokrom-c ve mitokondriyonlar gibi birçok eleman görev almaktadır. Hücrenin apoptoza girdiği andan itibaren hücre içerisine sürekli bir kalsiyum girişi olmakta ve bu kalsiyum iyonları, endonükleaz, proteaz ve transglutaminaz aktivasyonunda, gen regülasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda düzenleyici olarak görev yapmaktadır. Yapılan çalışmalar, bazı onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin de apoptozun düzenlenmesinde rol aldığını göstermektedir. Bu genlerden bazıları; c-myc, p53, bcl-2 ve kaspaz ailesidir.

c-myc: Bir transkripsiyon faktörü olmasının yanısıra protoonkogen olarak da görev yapar. Ortamda bulunan moleküllere bağlı olarak hücrenin çoğalmasını ve proliferasyonunu düzenler. Hücrede yeterli miktarda c-myc ve uygun büyüme faktörleri yoksa hücre büyümesi durur, her ikisinde yeterli miktarda bulunması halinde ise çoğalma gerçekleşir. Fakat c-myc var ama ortamda uygun büyüme faktörleri yoksa hücre apoptoza girer (Cummins vd 1997; King, 1995).

p53: Tümör baskılayıcı olan p53, radyasyon, kemoterapi gibi etkenler sonucu oluşmuş DNA hasarını tanır ve hücre döngüsünü G1 evresinde durdurarak DNA'nın tamir edilmesini sağlar. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek seviyede ise hücrenin apoptoza girmesini indükler. Bunu takiben Bax ekspresyonu artar ve hücredeki bcl-2/Bax dengesi değişir. Ayrıca Fas, DR4 ve DR5 gibi hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri aracılığı ile de apoptozu indükleyebilir (Thiede vd 2000; Aksit ve Bildik, 2008; Pınarbası, 2007).

Bcl-2 ailesi: Bax, Bad, Bid, Bcl-Xs gibi bazı üyeleri apoptozu indüklerken, Bcl-2, Bcl-Xl gibi bazı üyeleri de apoptozu inhibe etmektedir. Bu apoptotik ve antiapoptotik üyelerin hücredeki oranları hücrenin sağkalımını düzenlemektedir. Örneğin; hücredeki Bcl-2 / Bax oranının değişmesi hücrede apoptozun indüklenmesine veya inhibe edilmesine yol açar. (Ulukaya, 2003). Proapoptotik üyelerden olan Bax ve Bak heterodimerizasyon ile kaspazların ve mitokondriden salınan sitokrom- C'nin serbestleşmesini ve böylece kaspazların aktive olmasını sağlarlar (Tsujimoto, 1998; Taneja vd 2001).

Kaspazlar: Apoptoz için merkezi bir konuma sahip olan kaspazlar bir sistein proteaz ailesidir. Substratlarının aspartik asit (ASP) bölgelerindeki karboksil gruplarındaki peptid bağlarını keserler. Normal şartlarda hücrede inaktif halde bulunurlar ve uyarı aldıklarında proteolitik olarak birbirlerini aktive ederler (Gewies, 2003; Serbes, 2009). Hücrede özellikle hücre iskeletini oluşturan ve DNA tamirinden sorumlu proteinlerin kullanıldıktan sonra veya işlevlerini kaybettikten sonra parçalanarak ortadan kaldırılmasından sorumludurlar (Kandas, 2004; Ekshyyan ve Aw, 2004). 14 üyesi olan bu kaspaz ailesinin 7 üyesi apoptozda rol alan kaspaz 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10'dur. Kaspaz 3, 6 ve 7 apoptoz sırasında hücrenin parçalanmasına neden olurken diğer kaspazlar ise apoptozun başlatılması ve apoptozda rol alan kaspazların aktive olmasından (Earnshaw vd 1999).

2.3.3. Apoptoz ve Kanser

DNA'da meydana gelen hasar, tamir mekanizmaları tarafından tespit edildikten sonra tamir edilir. Hasarın tamir edilemediği durumlarda ise hücre genetik kontrol mekanizmalarının gözetimi ile ortadan kaldırılır (Lozano ve Elledge, 2000). Eğer bu kontrol mekanizmalarında bir hasar meydana gelirse hücre ortadan kaldırılamaz ve hasarlı bir şekilde bölünmeye devam eder. Bu hasarlı hücreler hızla çoğalarak neoplastik bir oluşumu dolayısıyla kanseri tetikler. Yapılan çalışmalarda Bcl-2 ve c-myc gibi sağkalımı tetikleyen genlerin kanser hücrelerinde oldukça fazla eksprese edilerek ölüme neden olan genleri baskıladığı görülmüştür (Curtin ve Cotter, 2003). Yine yapılan çalışmalarda nöroblastom ve kolon kanserinde survivin ve Bcl-2 proteinlerinin yüksek seviyede eksprese edildiği ve bunun kötü prognoz ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (Özçimen, 2005). Melanoma hücrelerinde de Apaf-ekspresyonu inhibe edilerek hücrenin apoptoza girmesi engellenir (Schroter vd 2000). Akciğer ve kolon kanserlerinde ise Fas-liganda bağlanan "decoy" molekülü fazla miktarda üretilerek Fas-ligandın Fas proteinine bağlanması engellenir ve bu sayede kanser hücreleri sitotoksik T hücreleri tarafından tanınıp öldürülemezler (Özçimen, 2005). Bcl-2 ve c-myc proteinlerinin aşırı ekspresyonu AML hücrelerinde apoptozu engelleyerek hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına neden olur. Ayrıca yapılan çalışmalar Bcl-2'nin hücrede aşırı derecede artışı lösemi hücrelerinin sağkalımını arttırdığı ve hastanın kemoterapiye karşı direnç oluşturmasına neden olduğu görülmüştür (Lotem ve Sachs, 2002).

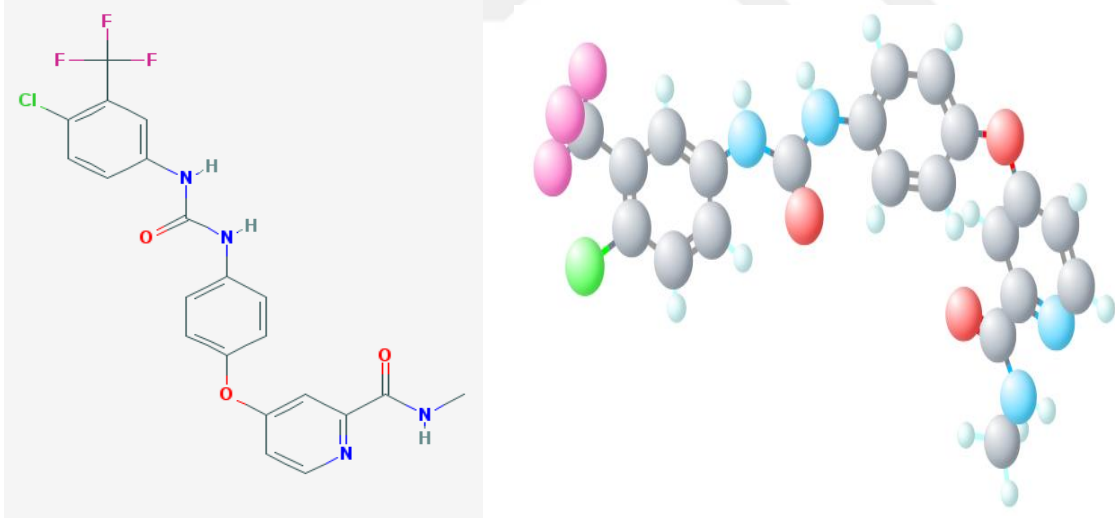
Apoptoz sayesinde hasarlı hücreler ortadan kaldırılarak bir sonraki kuşağa aktarılması engellenir. Böylece organizma için kanser oluşumunu tetikleyen genetik mutasyonların sayısı da en aza indirilir (Klug ve Cummings 2002). Bu yüzden son yıllarda kanser tedavisi için apoptozu indükleyecek yeni ajanlar üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Fesik 2005).

Tümör dokuları artan genomik kararsızlık sebebiyle heterojen bir yapıya sahiptir. Bu sebeple kanser hücreleri normal hücrelerle karşılaştırıldığında yüksek proliferasyon yetenekleri, apoptoza karşı direnç, yüksek metastaz, invazyon ve anjiyogenez yetenekleri sebebiyle tedavi başarısı düşüktür. Bu durum, kanser tedavisinde son zamanlarda tekli tedavilerden çok kombine tedavilerin dikkat çekmesine neden olmaktadır (Frei ve Eder, 2003). Son zamanlarda HSK tedavisinde de birçok ilaca karşı tedavi başarısı sağlanamadığından veya tedavi sürecinde hastaların ilaca karşı direnç geliştirmesi sebebiyle kombine ilaç tedavilerine odaklanılmıştır.

Çeşitli kanser türlerinde bugüne kadar yapılan çalışmalarda farklı maddelerin hücre döngüsü ve apoptoza olan etkileri araştırılmış fakat çalışmamızda kullandığımız apigenin ve sorafenibin özellikle hepatoselüler karsinoma hücrelerinde kombine uygulanması ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır.

2.4. Sorafenib

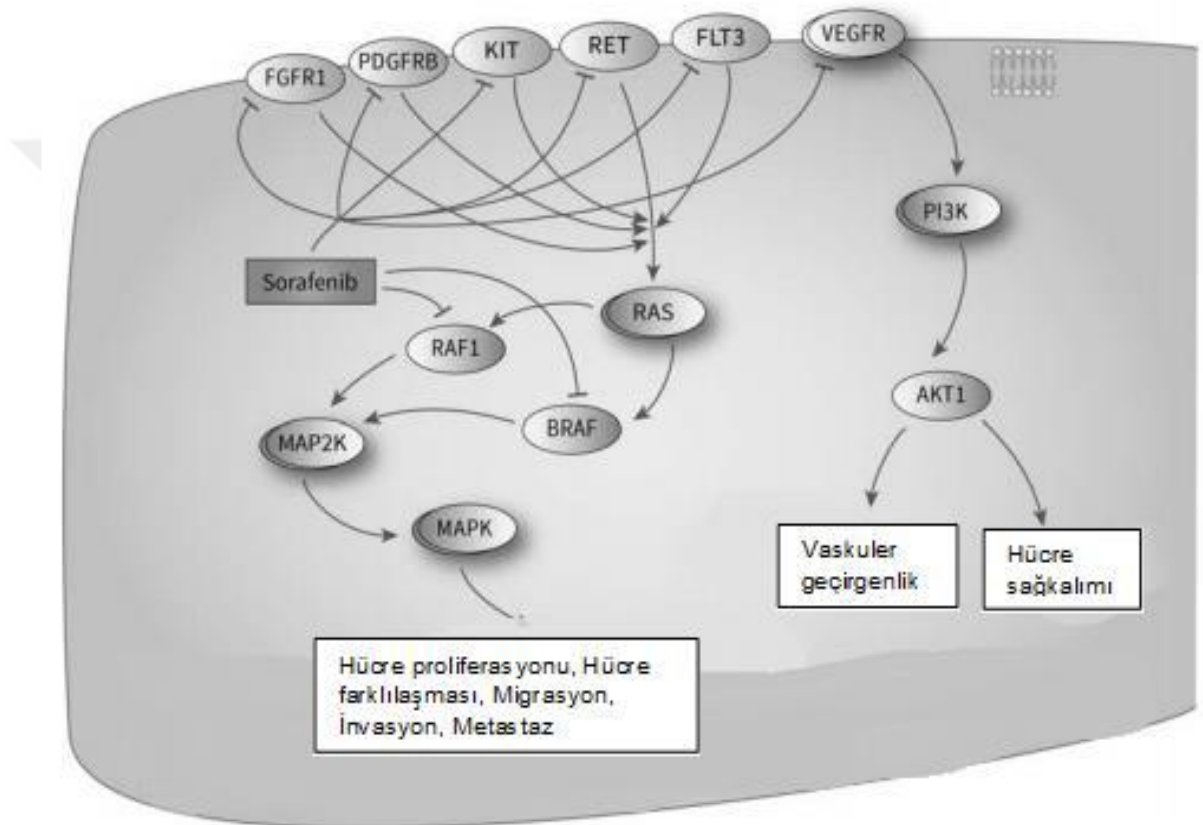
Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar), kimyasal formülü $C_{21}H_{16}ClF_3N_4O_3$ (Şekil 2.4) olan birçok farklı kanser türünde etkili bir çoklu kinaz inhibitörüdür (Wilhelm vd 2004). Son yıllarda protein kinazlar hücre sel sinyal iletim yollarının kritik bileşenleri olduğu için kanser tedavisinde ilaç gelişimi için en önemli hedefler haline gelmiştir. Renal karsinom, ürolojik kanserler, tiroid kanseri, meme kanseri ve melanom gibi farklı kanser türlerinde kullanımı bildirilmiştir. Günümüzde ileri evre ve cerrahi müdahale için uygun olmayan HSK hastalarının tedavisinde oral olarak kullanılmaktadır. Erken evre HSK hastalarında sağ kalım süresini 19-20 ay, orta evredeki hastaların sağ kalım sürelerini yaklaşık 1 yıl ve son evredeki HSK hastaları için kullanılan tek tedavi yöntemi olarak hastaların sağ kalımını 3-4 ay kadar uzatmaktadır (El-Serag vd 2008).



Şekil 2.5 Sorafenib kimyasal ve üç boyutlu yapısı (Web_3)

Sorafenibin etki mekanizması incelendiğinde nanomolar konsantrasyon düzeyinde uygulandığında kanser gelişiminde önemli rol oynayan VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR, FLT3, Ret ve c-kit gibi hücre yüzey kinazlarını inhibe ederek tümör büyümesini engellediği görülmüştür (Wilhelm vd 2004; Carlomagno vd 2006). Hepatoselüler

karsinoma oldukça yoğun vaskülezasyon içermektedir ve bu durum HSK gelişimindeki önemli basamaklardan biridir. Hepatoselüler karsinoma tümör dokularında, komşu non-tümör dokulara göre çok daha fazla Ras/Raf/MAPK yolağında rol alan protein ekspresyonları olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle sorafenib ile HSK tedavisinde hücre proliferasyonu ve anjiogenezin engellenmesi hedeflenmektedir. Şekil 2' de gösterildiği gibi sorafenib serin/ treonin kinazlar olan c-RAF ve BRAF'ı da inhibe ederek RAF/ MEK/ ERK sinyal yollarını dolayısıyla farklı onkogenetik yolları bloke ederek tümör hücrelerinin proliferasyonunu ve anjiyogenezini de bloke etmektedir (Gong vd 2017).



Şekil 2.6 Sorafenibin etki ettiği yollar (FLT3; FMS ile ilgili tirozin kinaz 3 reseptörü, PDGFR; büyüme faktörü reseptörü, VEGFR; vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü, KIT; kök hücre faktörü reseptörü, RET; proto-onkogen) (Yurdacan, 2017)

Liu ve arkadaşlarının 2006 yılında iki farklı HSK hücre hattı olan PLC/ PRF/ 5 ve HepG2 hücre hatları ile gerçekleştirdikleri çalışmada sorafenibin doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği görülmüştür. PLC/ PRF/ 5 hücre hattı için IC₅₀ değeri 6,3 µM/L iken HepG2 hücre hattı için 4,5 µM/L olarak tespit edilmiştir. Ayrıca her iki hücre hattında da sorafenibin DNA fragmentasyonuna sebep olduğu gözlemlenmiştir (Liu vd 2006). PLC/ PRF/ 5 insan HSK tümörü ksenograft fareler ile yapılan *in vivo* çalışmalarda

ise farelere subkutan olarak verilen sorafenibin doza bağılı olarak tümör büyümesini inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Liu vd 2006).

RAS/RAF/MEK/ERK sinyal yolları hücrenin büyümesi ve proliferasyonunda rol oynayan temel yollardır. 2010 yılında Huynh ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada sorafenibin HSK hücrelerinde aktive edilmiş RAF (c-RAF) seviyesini arttırırken ERK ve MEK fosforilasyonunu da arttırdığı ve böylece hücre proliferasyonunu engellediği görülmüştür. Araştırmacılar bu sonuçtan yola çıkarak sorafenibin bir MEK inhibitörü olan AZD6244 ile kombine uygulamasının etkilerini araştırdıklarında AZD6244'ün sorafenib ile birlikte uygulandığında sinerjik etki gösterdiğini görülmüştür (Huyn vd 2010). Bir diğer araştırmada ise Schmieder ve arkadaşları HSK hücre hatları ile gerçekleştirdikleri *in vitro* çalışmalarda sorafenibin bir MEK inhibitörü olan refametinib ile kombine uygulamasının da HSK hücreleri üzerinde sinerjik bir etki meydana getirdiğini tespit etmişlerdir (Schmieder vd 2013).

PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı hücrede sağkalım, proliferasyon, anjiyogenez, apoptoz gibi önemli birçok hücreyel olayın merkezindedir. Yapılan çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda sorafenibin çeşitli mTOR inhibitörleri ile kombine uygulamasının sorafenibin antitümör etkisini arttırdığı dolayısıyla sinerjik bir etki gösterdiği görülmüştür (Huyn vd 2009; Piguet vd 2011). Tümör hücrelerinin proliferasyonunda ve sağkalımında etkili olan epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EGFR) HSK gelişiminde de önemli rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda EGFR inhibitörleri ile uygulanan sorafenibin antitümör etkisinin arttığı belirtilmektedir (Seshacharyulu vd 2012; Ezzoukhry vd 2012).

Sorafenibin insan lösemi hücreleri ve diğer insan kanserleri hücrelerinde Bcl-2 ailesinin bir üyesi olan miyeloid hücre lösemi-1(Mcl-1)' i downregüle ederek apoptozu tetiklediği bildirilmiştir (Rahmani vd 2005; Yu vd 2005). Diğer bir çalışmada ise sorafenib tarafından indüklenen GADD45 β (growth arrest DNA damageinducible gene 45 β)' nın HSK hücrelerinde apoptozu indüklediği öne sürülmüştür (Ou vd 2010). Yapılan *in vitro* araştırmalar doğrultusunda sorafenib tek başına kullanıldığında HSK hücrelerinde apoptozu düşük seviyede tetiklerken TRAIL, Bcl-XI inhibitörleri, histon deasetilaz inhibitörleri, anjiyogenez inhibitörleri rapamisin veya MEK/ERK inhibitörleri gibi diğer terapötik ilaçlarla kullanıldığında bu ilaçların apoptotik etkilerini yüksek oranda arttırdığı görülmüştür (Chen vd 2010; Ganten vd 2004; Hikita vd 2010; Newell vd 2009; Ou vd 2009). Sorafenibin diğer terapötik ilaçlarla kullanımı üzerine birçok çalışma yapılmıştır bu çalışmalar Tablo 2.1' de kısaca gösterilmiştir (Gao vd 2015).

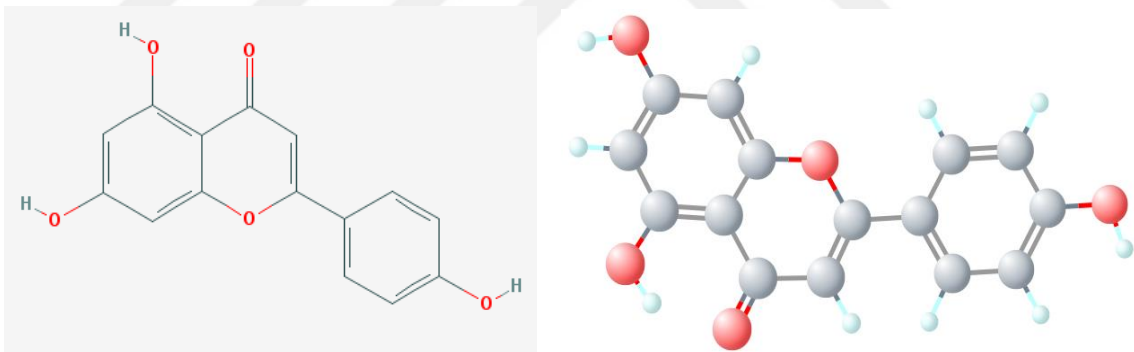
Tablo 2.1 HSK tedavisinde sorafenib ile birlikte kullanıldığında etkili olan ve henüz çalışmaları devam eden ilaçlar (Yurdacan, 2017)

İLAÇLAR	TEDAVİ	DURUM
ANTİANJİYOGENENİK AJANLAR		
Dalantercep	Eş zamanlı	Bekleniyor
Axitinib	Başarısız tedavi sonrası	İleri klinik denemeleri
Apatinib	Başarısız tedavi sonrası	Bekleniyor
MEK/ERK İNHİBİTÖRLERİ		
AZD6244	Eş zamanlı	Bilinmiyor
Refametinib	Eş zamanlı	İleri klinik denemeleri
MTOR İNHİBİTÖRLERİ		
Sirolimus	Eş zamanlı	Sinerjik
Everolimus	Eş zamanlı	Bekleniyor
Temsirolimus	Eş zamanlı	Bekleniyor
PI-103	Eş zamanlı	Sinerjik
PIK-587	Eş zamanlı	Sinerjik
HİSTON DEASETİLAZ İNHİBİTÖRLERİ		
Vorinostat	Eş zamanlı	İleri klinik denemeleri
Resminostat	Eş zamanlı	Bilinmiyor
MPT0E028	Eş zamanlı	Sinerjik
EGFR İNHİBİTÖRLERİ		
Erlotinib	Eş zamanlı	Uygun bulunmadı

c-MET İNHİBİTÖRLERİ		
MSC2156119J	Başarısız tedavi sonrası	Bekleniyor
Tivantinib	Başarısız tedavi sonrası	Bekleniyor
DE605	Eş zamanlı	Sinerjik

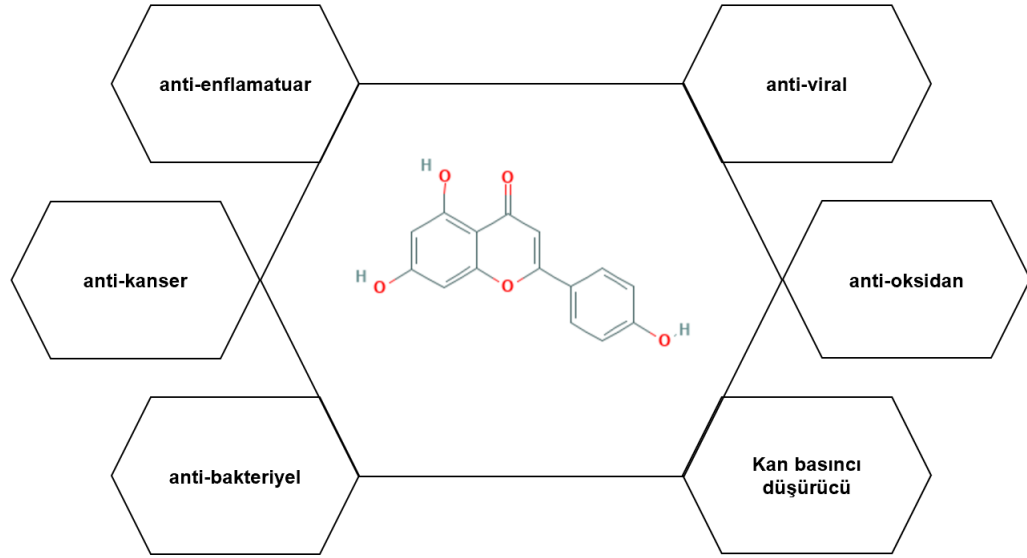
2.5. Apigenin

Apigenin ($C_{15}H_{10}O_5$), kimyasal olarak 4', 5, 7-trihidroksiflavon olarak bilinen flavon alt sınıfında bulunan, doğal olarak meydana gelen bir flavonoiddir (Şekil 2.6). Meyvelerde (portakal, elma, vişne, üzüm), sebzelerde (soğan, maydanoz, brokoli, tatlı yeşil biber, kereviz, arpa, domates) ve içeceklerde (çay, şarap) bol miktarda bulunmaktadır (Janssen, 1998; Ross ve Kasum 2002; Patel vd 2007; Tong ve Pelling 2013).



Şekil 2.7 Apigenin kimyasal ve üç boyutlu yapısı (Web_4)

Apigenin, antioksidan ve antienflamatuar özelliği sebebiyle geleneksel tıpta yıllardır kullanılmaktadır (Papay vd 2017; Wang ve Huang 2013). Yapılan araştırmalarda kan basıncını düşürdüğü, antibakteriyel ve antiviral özelliklerinin olduğu görülmüştür (Zhu vd 2016; Özçelik vd 2011). Bu özelliklerinin yanısıra son on yıllarda apigeninin tümör baskılayıcı özelliğinin de olduğu kanıtlanmıştır (Şekil 2.7). İlk defa 1986 yılında Since Birt ve arkadaşları tarafından antikanser özelliği bildirilen (Birt vd 1986) apigeninin sonraki yıllarda bir çok farklı kanser türünde anti-tümör etkisinin olduğu yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir.



Şekil 2.8 Apigeninin kimyasal yapısı ve fizyolojik fonksiyonları

Yapılan çalışmalarda apigeninin kolorektal kanser, meme kanseri, karaciğer kanseri, akciğer kanseri, melanoma, prostat kanseri ve osteosarkoma gibi çeşitli kanser türlerinde anti-kanser etkisinin olduğu görülmüştür (Xu vd 2016; Huang vd 2016; Lee vd 2016; Zhao vd 2017; Gupta vd 2002; Angulo vd 2017).

Kanser tedavisinde amaç apoptozu indükleyerek veya hücre döngüsünü durdurarak hücrelerin proliferasyonunu önlemek ve tümör hücrelerini ortadan kaldırarak hastanın sağkalımını arttırmaktır. Bunun için kullanılan stratejiler, apoptoz veya otofajinin indüklenmesi, hücre döngüsünün düzenlenmesi, tümör hücrelerinin migrasyon ve invazyonunun inhibe edilmesi ve hastanın tümör hücrelerine karşı immün sisteminin uyarılması yönündedir. Apigeninin ise tüm bu anti-tümör etkilerini gösterdiği yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla kanıtlanmıştır. Apigeninin çeşitli kanser türlerindeki terapötik etkileri Tablo 2.2'de özetlenmiştir.

Tablo 2.2 Apigeninin farklı kanser türlerindeki terapötik etkileri

Kanser Tipi	Terapötik Etki
Kolorektal kanser	Proliferasyon, invazyon ve migrasyonun inhibisyonu, otofaji ve apoptoz (Xu vd 2016; Lee vd 2014)
Meme kanseri	Hücre proliferasyonunun inhibisyonu ve apoptoz (Seo vd 2015)

Akciğer kanseri	Proliferasyon, invazyon ve migrasyonun inhibisyonu ve apoptoz (Lee vd 2016; Zhou vd 2017)
Prostat kanseri	Hücre döngüsünün durdurulması ve apoptoz (Shukla vd 2014)
Lösemi	Hücre döngüsünün durdurulması ve apoptoz (Wang vd 1999; Ruela-de-Sousa vd 2010; Budhraj vd 2012)
Ovaryum kanseri	Adhezyonun, migrasyon ve invazyonun inhibe edilmesi, hücre yenilenme kapasitesinin inhibisyonu (Hu vd 2008; Tang vd 2015)
Renal hücre karsinomu	Hücre döngüsünün durdurulması (Meng vd 2017)
Osteosarkoma	Proliferasyon ve invazyonun inhibe edilmesi (Liu vd 2015)
Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinoma	Kanser kök hücre belirteçlerinin ekspresyonunun baskılanması (Ketkaew vd 2017)
Melanoma	Proliferasyon, invazyon ve metastazın inhibisyonu ve hücre döngüsünün durdurulması (Zhao vd 2017; Hasnat vd 2015)

PC-3 ve DU145 prostat kanseri hücre hatları ile gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarda apigeninin azalan Bcl-2, Bcl-xL ve artan aktif Bax sebebiyle apoptozu indükleyerek hücre canlılığını düşürdüğü tespit edilmiştir (Shukla vd 2014). Fakat yapılan bir diğer çalışmada ise apigeninin meme kanserinde Bcl-2 veya Bax seviyesini etkilemeden aktif kaspaz-3 ve aktif kaspaz-8 seviyelerini artırarak apoptozu kaspaz bağımlı yolak üzerinden tetiklediği belirtilmiştir (Seo vd 2015). İnsan kolorektal karsinoma hücre hattı olan HCT116 ile yapılan çalışmalarda apigeninin hücre döngüsünü G2/M evresinde durdurarak hücre büyümesini inhibe ettiği görülmüştür (Lee vd 2014).

Prostat kanseri hücre hattı olan DU145 ile yapılan çalışmalarda apigeninin doza bağlı olarak tümör hücrelerinin invazyonunu ve migrasyonunu güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (Zhu vd 2015). Malignant melonoma hücre hatlarında yapılan deneylerde ise 40µM apigeninin AKT/mTOR yolağı aracılığıyla migrasyon ve invazyonunu önemli derecede inhibe ettiği belirtilmiştir (Zhao vd 2017). Ayrıca apigeninin farklı kanser türlerinde direkt olarak PI3K'ın ATP bağlanma bölgesini bloke ederek AKT kinaz aktivitesini inhibe ettiği belirtilmiştir (Tong vd 2013). Apigenin, diğer bir onkogenik yolak olan MAPK/ERK yolağını üzerinde de etkilidir. İnsan melanoma hücre hattı olan A375 ve C8161 ile yapılan *in vitro* çalışmalarda p-ERK1/2, p-AKT ve p-mTOR seviyesini düşürerek hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğu ve apoptozu indüklediği, böylece proliferasyon, migrasyon ve invazyonu baskıladığı bulunmuştur (Zhao vd 2017).

Yapılan araştırmalarda anti-kanser özelliği kanıtlanan apigeninin diğer ajanlarla birlikte kullanımının anti-kanser aktiviteyi hızlandırdığı, sitotoksik etkiyi arttırdığı, apoptozu hızlandırdığı görülmüştür. Kim ve arkadaşları anaplastik tiroid kanserinde apigeninin TRAIL ile kombine uygulamasının Bcl-2 ailesi proteinleri aracılığı ile sitotoksik etkiyi arttırarak sinerjik etki gösterdiğini belirtmiştir (Kim vd 2015). Kolorektal kanser hücre hattı olan HCT116 ve DLD1 ile yapılan çalışmada ise apigeninin ABT-263 ile kombine uygulamasının AKT ve ERK' inhibisyonu aracılığı ile ABT-263' ün anti-tümör etkinliğini hızlandırdığı tespit edilmiştir (Shao vd 2013).

2.6. Hipotez

Bu çalışmadaki hipotezimiz "Sorafenib ve apigeninin kombine uygulamasının, tekli uygulamaya göre HepG2 hücre hattında hücre proliferasyonu, migrasyon ve invazyonu daha fazla azaltarak hücre döngüsünün baskılanmasını ve apoptozun indüklenmesini sağlar." dır.

Bu tez kapsamında, çeşitli kanser türlerinde doz ve etki mekanizması araştırılmış olan kemoterapotik bir ajan olan sorafenib ile bir flavonoid olan apigenin kombine uygulamasının HepG2 hepatoselüler karsinoma hücre hattında proliferasyon ve migrasyona etkisi, hücre döngüsü, apoptoz ve bunlar ile ilişkili hangi yolakları etkilediği araştırılmıştır. Yapılan literatür araştırmaları dahilinde apigenin, sorafenib ve kombine uygulaması ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Apigenin ve sorafenibin HSK hücre hattındaki hücresel etkileri ve bu etkinliğin altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılması daha ileri ve detaylı çalışmalara kaynak olacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hücre Kültürü

Çalışmamızda kullandığımız hepatoselüler karsinoma hücre hattı HepG2 (ATCC® HB-8065[™]) kendi stoklarımızdan temin edilmiştir. Kullandığımız HepG2 hücre hattının bazı özellikleri şu şekildedir;

Organizma: İnsan

Cinsiyet/Köken/Yaş: Erkek/Kafkas/15

Doku: Karaciğer

Morfoloji: Epitel

Kültür Tipi: Adherent (yapışarak çoğalan)

Kültür ortamı olarak DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Capricorn Scientific), %10 fetal siğir serumu, 2 mM L-glutamin, %1 Penisilin-Streptomisin kullanılmış, hücrelerin proliferasyonu, pasajları ve takip işlemleri inverted mikroskop ile takip edilmiştir. Hücrelerden yeterli üreme elde edilene kadar %95 nem ve %5 CO₂'li etüvde inkübe (NuAire) edilmiştir.

Hücre kültüründe gerçekleştirilen basamaklar aşağıdaki gibidir.

1. Kriyo tüpler ile -80°C'de saklanan hücreler 37°C'deki su banyosunda çözüldü.
2. Çözülme tamamlandıktan sonra kriyo tüpler %70'lik etil alkol ile silindikten sonra "Sınıf II hava akımlı çalışma kabinine (NuAire, ABD)" alındı.
3. 1 ml'lik pipetle alınan hücreler 5 ml DMEM ile 15ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 1000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj (Hettich, Almanya) edildi.
4. Santrifüjün ardından supernatant kısım pastör pipeti ile çekilerek hücre peleti elde edildi ve üzerine 1-5 ml besiyeri eklendi.

5. Hücreler pipet yardımıyla iyice homojenize edilerek, içerisinde 8-10ml besiyeri olan bir ya da birden fazla hücre kültür kabına ekildi.
6. İnkübasyon için kültür kapları 37°C ve %5 CO₂'li inkübatöre (NuAire, ABD) yerleştirildi.
7. Hücreler her gün invert mikroskop (Nikon, Japonya) altında takip edildi ve yoğunlukları %80– 85 civarına ulaştığında pasajlama işlemleri yapıldı.
8. Hücrelerin stoklanması için ise kriyo tüplerde yaklaşık 1×10^6 hücre olacak şekilde 1,5 ml hacimli kriyo tüplere, 9:1 oranında besi yeri ve DMSO (%10 DMSO (dimetil sülfoksit)) olacak oranda hücre homojenize edilerek koyuldu ve daha sonraki deneyler için -80 derecede saklandı.

3.2. Hücrelerin Sayımı

Tripan mavisini negatif yüklü bir boya olduğu için zarar görmemiş, canlı hücrelerin membranlarından geçemez. Bu yüzden sadece ölü hücrelerin membranlarından geçerek ölü hücrelerin maviye boyanmasına, canlı hücrelerin ise boya almadığı için açık renkte görülmesini sağlayan tripan mavisini boyası ile boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücreler kültür kabından tripsin ile kaldırılıp santrifüj edilmiş ardından üzerine tekrar besiyeri ilave edilerek homojenize edilmiştir. Bu hücre süspansiyonundan 100 µl alınarak üzerine 400 µl PBS ve 1 µl tripan mavisini eklenmiştir. Hücrelerin sayımı için ise hücre sayar (Cellometer, Nexellum) cihazı kullanılmıştır. Elde edilen bu karışımdan 20 µl alınarak cellometer lamına yüklenmiştir. Daha sonra cellometer cihazı ile hücre sayısı tespit edilmiştir.

3.3. Hücre Canlılık Analizleri

HepG2 hücrelerine ilk etapta apigenin ve sorafenibin farklı aralıklarda değişen dozları uygulanarak zamana ve doza bağlı olarak hücrelerin yüzde ellisinin (%50) öldüğü dozu bulmak için XTT analizi ve proliferasyon analizleri yapılmıştır. Bu dozlar belirlendikten sonra aynı işlemler sorafenib ve apigeninin kombine uygulanarak en etkili olduğu dozu tespit edebilmek için de tekrar edilmiştir. Deneylerde kullanılan apigenin (Selleckchem) ve sorafenib (Nexavar) ticari olarak firmalardan temin edilmiştir.

XTT analizi, suda çözünebilir bir tetrazolyum türevidir olan XTT (2,3-bis (2-methoxy-4 nitro-5- sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)'nin canlı hücrelerde turuncu renkli formazon bileşenlerine indirgenmesi esasına dayanır.

Oluşan turuncu renkli boyanın yoğunluğu bir spektrometre ile 450-570 nm dalga boylarında okutulmakta ve bu yoğunlukla yani oluşan formazon bileşenlerinin miktarıyla canlı hücre sayısı doğru orantılı olduğundan hızlı bir şekilde hücre canlılığının değerlendirilmesi sağlanır. Doz ve zamana bağlı sitotoksite analizi için "Cell Proliferation Assay with XTT Reagent-Cell Proliferation Kit (Cat # 20-300-1000-Biological Industries)" kullanılmıştır.

Öncelikle toz halinde bulunan apigenin (Selleckchem) ve sorafenib (Nexavar) hesaplanan miktarlarda tartılarak DMSO içinde çözülmüş ve 100 mM'lık ana stoklar elde edilmiştir. HepG2 hücreleri 96 kuyucuklu kollajenli hücre kültürü kaplarına kuyucukbaşı 1×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin yüzeye yapışması için 24 saat inkübe edilmiştir. İki madde için de literatür taramaları sonucunda belirlenen çeşitli konsantrasyonlar ana stok ve DMEM' in hesaplanan miktarlarda karıştırılması ile hazırlanmış ve 24 saatin sonunda hücrelere uygulanmıştır. Bu dozlar sorafenib için 1-40 μM arasında değişirken apigenin için 10-1000 μM arasında değişmektedir. Zamana bağlı etkinin değerlendirilebilmesi için doz uygulanan bu hücrelerin 24, 48 ve 72 saatlik analizleri yapılmıştır. Cell Proliferation Assay with XTT Reagent-Cell Proliferation Kit (Cat # 20-300-1000-Biological Industries) ile yapılan bu analizlerde mevcut besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra her bir kuyucuğa 100 μL DMEM ve 50 μL aktive edilmiş XTT solüsyonu (49 μL XTT Reagent Solüsyonu ve 1 μL Aktivatör Solüsyonu) eklenmiş ve 3-4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında doz gruplarının absorbans değerleri ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında okunarak analiz edilmiştir. Elde edilen verilerin analizi sonucunda IC_{50} oranları belirlenmiştir.

3.4. Koloni Oluşum Analizi

HepG2 hücrelerinin apigenin, sorafenib ve kombine uygulamanın ardından koloni oluşturabilme yeteneklerindeki değişimin tespiti için, 6 kuyucuklu petrilere kuyucukbaşı 10^3 hücre olacak şekilde hem kontrol hem doz grupları için ekim yapılmış ve 14 gün boyunca 37°C 'de, %5 CO_2 'li etüvde inkübe edilmiştir. Bu 14 gün boyunca 2 günde bir hücrelerin sadece besiyerleri değiştirilmiştir. 14 günlük inkübasyon sonrasında hücrelerin sabitlenmesi için mevcut besiyerleri uzaklaştırılarak hücreler soğuk metanolla -20°C 'de 10 dakika bekletilmiştir. Sabitlenen koloniler kristal viole boyası ile boyanmıştır. Koloniler sayılmış, doz ve kontrol grupları karşılaştırılarak değerlendirme yapılmıştır.

3.5. Wound-Healing (Yara-İyileşme) Yöntemi İle Migrasyon Analizi

Apigenin, sorafenib ve kombine uygulamasının migrasyon üzerine etkisini belirlemek için hücreler 6 kuyucuklu kolajenli kültür kaplarına 2×10^5 hücre/ml olacak şekilde ekilmiş ve %90 confluent duruma geldiğinde hücrelerin bulunduğu medyum çekilip serumsuz DMEM ile yıkanmıştır. 200 µL steril pipet ucu kullanılarak petri düz bir şekilde çizilmiştir. Çizme işleminden sonra hücreler 3 kez serumsuz DMEM ile yıkanarak hücre artıkları giderilmiştir. Kontrol grubu sadece serumlu besiyerinde kültüre edilirken, doz grupları ise belirlenen dozda madde içeren besiyerinde kültüre edilmiştir. Daha sonra 0. saatte hücreler fotoğraflanmıştır. Kontrol ve doz grubundaki hücreler 16, 24 ve 48. saatlerde tekrar fotoğraflanmış ardından son olarak, kontrol ve doz gruplarındaki hücre hareketleri görsel olarak karşılaştırılıp, yorumlanmıştır.

3.6. İnvazyon Kapasitesinin Belirlenmesi

İnvazyon kapasitesi “trans-well matrigel invasion chamber”- invazyon kapları kullanılarak araştırılmıştır. 24 kuyucuktan oluşan bu kaplar sayesinde hücrelerin invazyon özellikleri değerlendirilebilmektedir. Bu invazyon kuyucukları 8 mikron çaplı porlar içeren bir membran ve buna ek olarak bir matrigel matrix ile kaplıdır. Bu matrigel matrix hücreler için *in vitro* koşullarda bazal membranı oluşturur. Bu sayede invazyon yeteneği olmayan hücreler membranın diğer yüzeyine geçemezken invazyon yeteneği olan hücreler geçebilmektedir. Böylece matrijel membran, invazyon yeteneği olan ve olmayan hücreleri birbirinden ayırabilen bir ayraç olarak görev yapar. Bu analiz kısaca şu basamaklardan oluşmaktadır;

1. Matrijel membranın ve 8 µm çapında porlara sahip membranın üst kısmına gece boyunca serumsuz besiyerinde inkübe olmuş, apigenin (uM), sorafenib(uM) ve kombine (uM) dozları her kuyucuğa 5×10^5 hücre olacak şekilde serum içermeyen 0.5 ml DMEM besiyeri ile ekilmiştir.
2. Kuyucukların dışına ise, 0.75 ml %10 serum içeren DMEM besiyeri konulmuş ve bu sayede kuyucuğun dış kısmının hücreler için kemoatraktan olması sağlanmıştır.
3. Hücreler 48 saat 37°C 'de CO_2 'li inkübatörde inkübe edilmiştir.

4. İnkübasyon saatinin sonunda invaziv özellikte olan hücreler invazyon odacığındaki membranının dış yüzeyine geçeceklerinden, invazyon odacığının içindeki besi yeri uzaklaştırılmıştır. İç yüzeyindeki hücreler ise “cell scaper” ile kazınmıştır.
5. Bir gece inkübe edilmiş ve ardından membranın üst kısmında kalan hücreler kulak çubuğu ile silinerek temizlenmiştir.
6. İnvaze olmuş dış yüzeydeki hücreler, önce 2 ml metanol ile fikse edilmiş, ardından 1 ml kristal viyole ile boyanarak ışık mikroskobunda sayılmıştır.

3.7. Tunel Yöntemi ile Apoptoz Analizi

- Tunel yöntemi ile apoptoz tayini ticari kit kullanılarak (AAT bioquest) aşağıda belirtilen sıra ile gerçekleştirilmiştir.
- HepG2 hücreleri TUNEL testi için hücreler 8 odacık içeren lamlara (BD Falcon Culture Slides; 8 Chamber Polystyrene Vessel Tissue culture treated Glass Slide) her bir odacık içinde 5×10^3 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler belirlenen dozlarla 48 saat inkübe edilmiştir.
- 48 saatlik inkübasyon sonunda besiyerleri çektirilip her kuyucuğa 100µl %4 formaldehit fixative tampon eklenmiştir. Ardından 20-30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonunda fixative tampon çekilerek hücreler PBS ile 2-3 kez yıkanmıştır.
- Kuyucuk sayısına göre reaksiyon karışımı kuyucuk başı Tablo 3.1.’ da verildiği gibi olacak şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 3.1: Bir kuyucuk için kullanılan TUNNEL reaksiyon karışımı

	Hacim (µl)
100X TF3-dUTP (Component A)	0.5µl
Reaction Buffer (Component B)	50µl
Toplam Hacim	50.5µl

- Her kuyucuğa bu reaksiyon mixi 50µl olacak şekilde dağıtılmış ve 37°C’de 60 dakika inkübe edilmiştir.
- Daha sonra reaksiyon mixi çektirilmiş ve hücreler 3-5 kez 200µl PBS ile yıkanmıştır.

- Daha sonra hücre çekirdeklerinin görüntülenmesi için kuyucuk başı 20 µl 1X Hoechst (Component C, Ex/Em= 350/460nm) ile boyandıktan sonra floresan mikroskop ile görüntülenerek analiz yapılmıştır.

3.8. Trizol Reagent ile Total RNA İzolasyonu

Gen seviyesinde ekspresyon miktarlarının değerlendirilmesi için kontrol ve doz gruplarından Trizol Reagent kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon basamakları kısaca aşağıdaki gibidir;

- Hücreler kuyucuk başı 3×10^6 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiştir,
- Kontrol grubu ve doz gruplarının XTT ile tespit edilen IC_{50} dozları ve belirlenen kombine dozlar uygulanarak inkübe edilmiştir,
- İnkübasyon sonunda her kuyucuğa 500 µl Trizol eklenerek scraper ile hücreler tamamen kaldırılmış ardından 1 ml'lik ependorf tüplerine aktarılmıştır,
- Her bir tüpe 200 µl kloroform eklenerek iyice pipetlendikten sonra oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilmiştir,
- Ardından soğutmali santrifüj ile $+4^{\circ}C$ ' de 15.000 g' de 20 dk santrifüj yapılmıştır,
- Santrifüj sonunda elde edilen renksiz üst fazlar alınarak yeni ependorf tüplere aktarılmıştır,
- Toplanan bu üst fazların üzerine 500µl izopropanol eklenerek iyice pipetlenmiş ve 10dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir,
- Tekrar $+4^{\circ}C$ 'de 15.000 g'de 30 dk santrifüj edilmiştir,
- Üst faz atılarak elde edilen peletin üzerine %70'lik etanol konulmuş ve $+4^{\circ}C$ 'de 12.000g'de 10 dk tekrar santrifüj edilmiştir,
- Ardından üst faz atılmış ve elde edilen peletde kalan alkolün buharlaşması için, kısa bir süre beklenmiştir,
- Pellet 40 µl RNase-DNase free su ile çözünerek deneyler için hazır hale getirilmiştir.

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığının değerlendirilmesi için Nanodrop cihazı (Thermo) kullanılmıştır. Uygun konsantrasyonlarda (cihazın ölçebileceği RNA

konsantrasyon aralığı 2-3000 ng/ μ l'dir) sulandırılan RNA örnekleri, 1 μ l RNase free su ile kör alındıktan sonra, 1 μ l olacak şekilde pipetlenerek yüklenmiş ve 230, 260,280 nm' de okuma işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.9. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Elde edilen RNA'lardan, Transcriptor High Fidelity cDNA sentez kiti (CatNo: 05 081 955 001) kullanılarak üretici firmanın protokolü doğrultusunda cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan karışımın ayrıntıları aşağıdaki gibidir. Sentezlenen cDNA'lar, RT-PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) için üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.2 Bir kuyucuk için kullanılan cDNA sentez karışımı

	Hacim (μl)
Total RNA	Değişken
Oligo(dT) Primer	1 μ l
dNTP karışımı (10 mM)	1 μ l
5X RT tamponu	4 μ l
DTT	1 μ l
Protector RNase Inhibitör	0,5 μ l
Easyscript plus RTase (200U/μL)	1 μ l
RNAaz içermeyen su	Değişken
Son hacim	20 μ l

3.10. Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PZR)

Gerçek zamanlı PZR, gen ekspresyonunun kantitatif olarak değerlendirilmesi amacıyla kullanılan hassas, moleküler bir yöntemdir. Bu yöntem ile RNA örnekleri kısa sürede analiz edilebilmekte ve çok sayıda örnek düşük kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir. Gerçek zamanlı PZR/RT-PZR' da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılabilmektedir. Çalışmamızda 96 kuyucuklu mikropłaka okuyabilen Gerçek Zamanlı PZR sistemi olan "Applied Biosystems StepOne Plus" cihazı kullanılmıştır. Bu cihaz sayesinde aynı anda ve kantitatif olarak Gerçek-Zamanlı PZR ile analiz yapılabilmektedir. Apigenin, sorafenib ve kombine muamelesi sonrasında HepG2 hücrelerinde, hücre döngüsü ve apoptozda rol alan genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimler belirlenmiştir. Referans housekeeping olarak β -*aktin* geni kullanılarak hedef genlerdeki rölatif değişiklik analiz edilmiştir. Kuyucuk başına gerekli olan reaksiyon karışımı aşağıdaki gibidir.

Tablo 3.3 Bir kuyucuk için kullanılan Gerçek Zamanlı PZR karışımı

	Hacim (μ l)
SYBR Green Master Mix	5 μ l
Primer (F + R)	2 μ l
dH₂O	6.5 μ l
cDNA	1 μ l
Son Hacim	14.5 μ l

Çalışmamızda kullanılan apoptoz ve hücre döngüsünde rol alan genler ve primer dizileri Tablo 3.4'de gösterilmiştir.

Tablo 3.4 Kullanılan genlerin Forward ve Reverse Primer Dizileri

Gen	Forward ve Reverse Diziler
ACTB	F 5'-CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3' R 5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3'
BAX	F 5'-AGAGGATGATTGCCGCCGT-3' R 5'-CAACCACCCTGGTCTTGGA-3'
BCL-2	F 5'-CAGGGCGATGTTGTCCACC-3' R 5'-GGGGAGGATTGTGGCCTTC-3'

CASP-3	F 5'-CATGGAAGCGAATCAATGGACT-3' R 5'-CTGTACCAGACCGAGATGTCA-3'
CASP-8	F 5'-ACACCAGGCAGGGCTCAAAT-3' R 5'-GCAGGTTTCATGTCATCATCCAGTT-3'
CASP-9	F 5'-CTTCGTTTCTGCGAACTAACAGG-3' R 5'-GCACCACTGGGGTAAGGTTT-3'
CASP-10	F 5'-TAGGATTGGTCCCCAACAAGA-3' R 5'-GAGAAACCCTTTGTCTGGGTGG-3'
BID	F 5'-CCTACCCTAGAGACATGGAGAA-3' R 5'-TTTCTGGCTAAGCTCCTCACG-3'
P53	F 5'- ATCTACAAGCAGTCACAGCACA-3' R 5'- GTGGTACAGTCAGAGCCAACC-3'
P21	F 5'-TGGAGACTCTCAGGGTTCGAAA-3' R 5'- GCGTGGAGTGGTAGAAATC-3'
P16	F 5'-CAGTAACCATGCCCGCATAGA-3' R 5'- AAGTTTCCCGAGGTTTCTCAGA-3'
CDK-6	F 5'-AGACCCAAGAAGCAGTGTGG-3' R 5'-AAGGAGCAAGAGCATTTCAGC-3'
CYCLIN-D1	F 5'-AGCTCCTGTGCTGCGAAGTGGA-3' R 5'-AGTGTTC AATGAAATCGTGCGG-3'
MDM2	F 5'-GGATTTCCGACGGCTCTCGC-3' R 5'- CGCGCAGCGTTCACACTAGTG-3'
RB	F 5'-TGTA AACGACGGCCAGT-3' R 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'
PUMA	F 5'-GACCTCAACGCACAGTACGAG-3' R 5'-AGGAGTCCCATGATGAGATTGT-3'

Öncelikle Forward ve Reverse primerlerin ana stoklarından 5'er µl alınarak mikrosantrifüj tüplerinde karıştırıldı. Ardından 10 µl'lik bu karışıma 90 µl DNaz/RNaz içermeyen su eklendi ve böylece primerlerin ara stokları hazırlanmış oldu. Hazırlanan reaksiyon karışımı 96-kuyucuklu mikroplakaya kuyucuk başına 14,5 µl olarak dağıtıldı. Kullanılan 96 kuyucuklu plakanın üzeri özel yapışkan ve şeffaf plaka etiketi ile kapatıldı ve kısa bir santrifüjün ardından cihaza yerleştirilerek yaklaşık 1 saat 15 dakika süresince analiz gerçekleştirildi.

3.11. Verilerin İstatistiksel Analizi

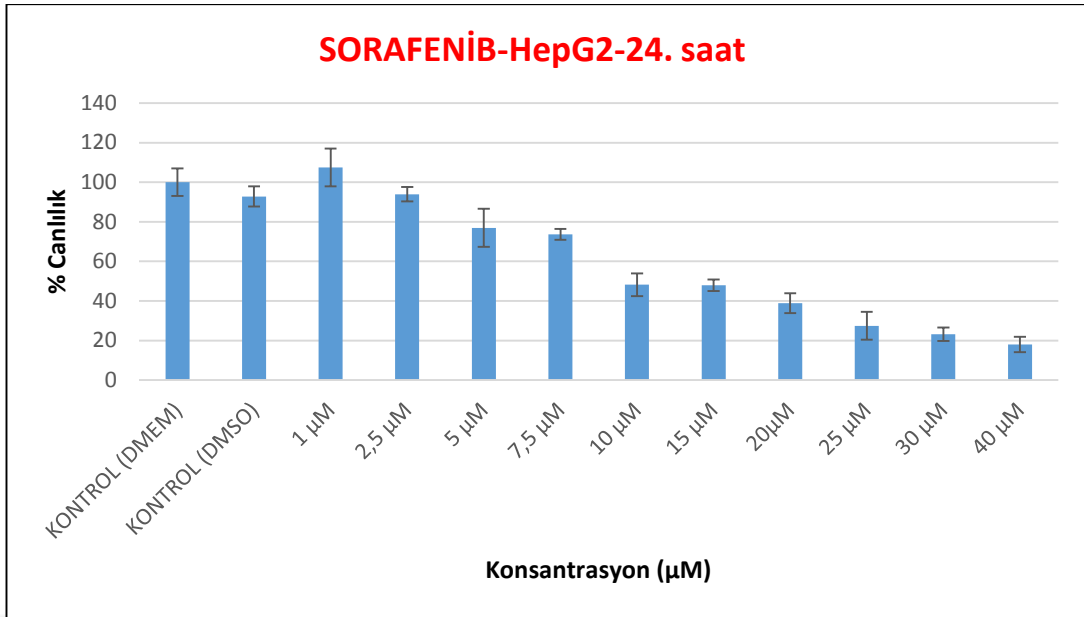
Verilerin analizi $\Delta\Delta CT$ metodu ile bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirildi. Web tabanlı bir program olan "RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis" programında bulunan, Volcano Plot analizleri kullanılarak kontrol ve doz gruplarında ilgili genlerin ekspresyon değerleri belirlendi. Ardından grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması "RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis" programında bulunan "Student t-testi" ile gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

4.1. XTT Sonuçları

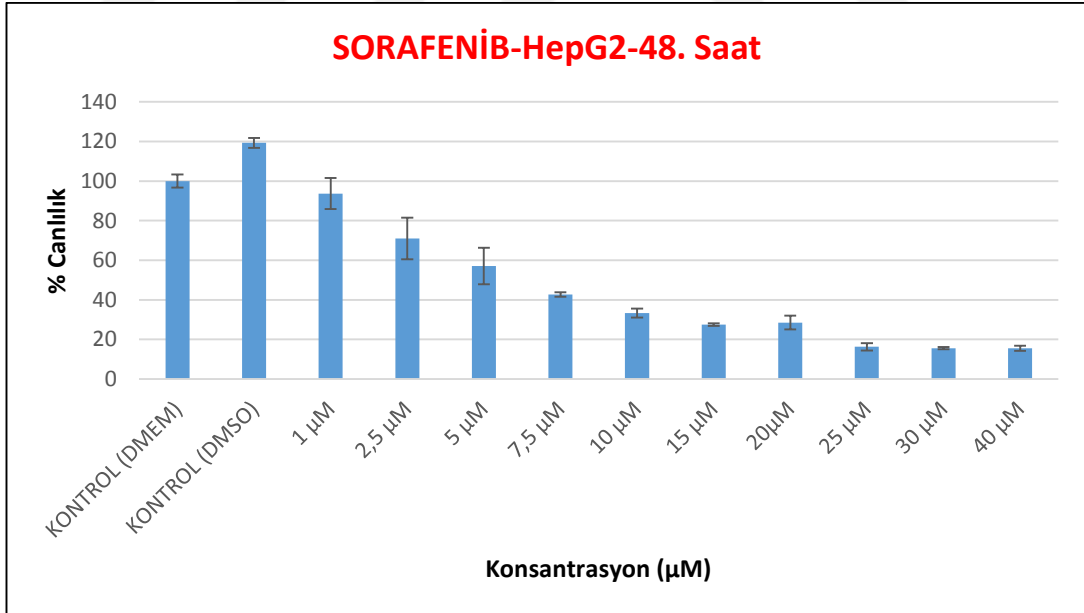
96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekimi yapılan HepG2 hücrelerine daha önce yapılan çalışmalar baz alınarak sorafenibin 1 μM ve 40 μM arasında değişen 10 farklı doz uygulanarak 24 ve 48. saatlerde hücre canlılığına olan etkisi tespit edilmiştir. Apigenin için ise literatür taramaları doğrultusunda 10 μM ile 100 μM arasında değişen 8 farklı doz uygulanarak 24, 48 ve 72. saatlerde hücre canlılığına olan etkisi tespit edilmiştir. Kolorimetrik bir analiz olan XTT analizi ile oluşan renk değişimi sayesinde kontrol ve doz gruplarının absorbans değerleri (OD) ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında okunmuştur.

Sorafenib için 24. saatin sonunda doza bağlı olarak hücre canlılığındaki değişimler Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Bu verilere göre 24 saat sonunda sorafenibin hücre canlılığını %50'nin altına düşürdüğü doz 10 μM olarak belirlenmiştir.



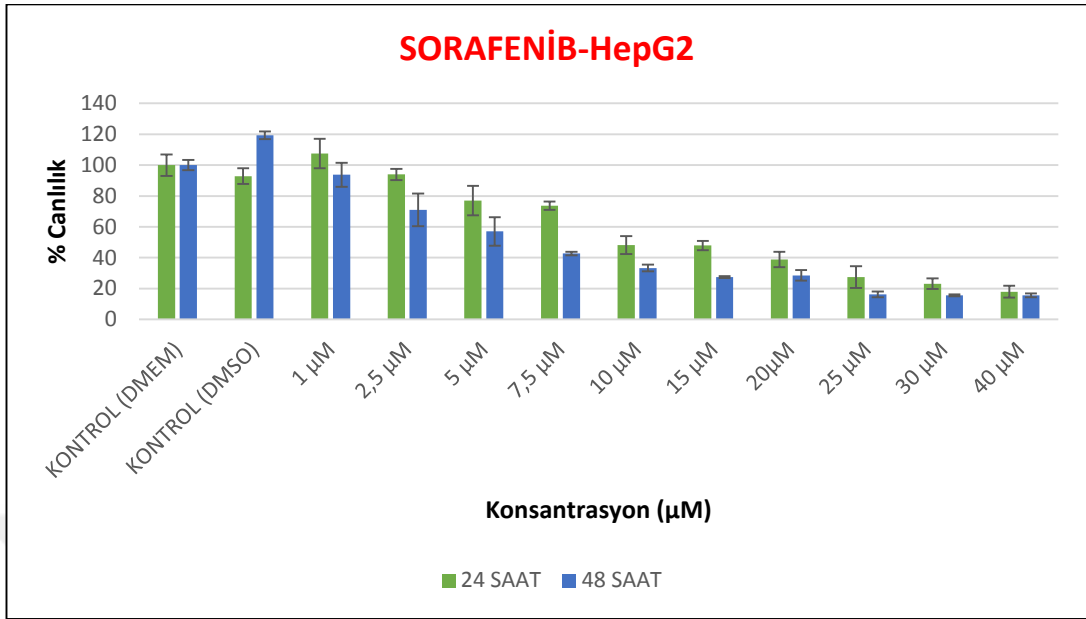
Şekil 4.1 Sorafenibin 24 saat sonunda HepG2 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi

Sorafenibin 48. saatin sonunda doza bağlı olarak hücre canlılığı üzerine etkisi Şekil 4.2'de gösterilmiştir. 48. saatin sonunda yapılan bu ölçümlerde hücre canlılığının %50'nin altına düştüğü doz 7,5 µM olarak belirlenmiştir.



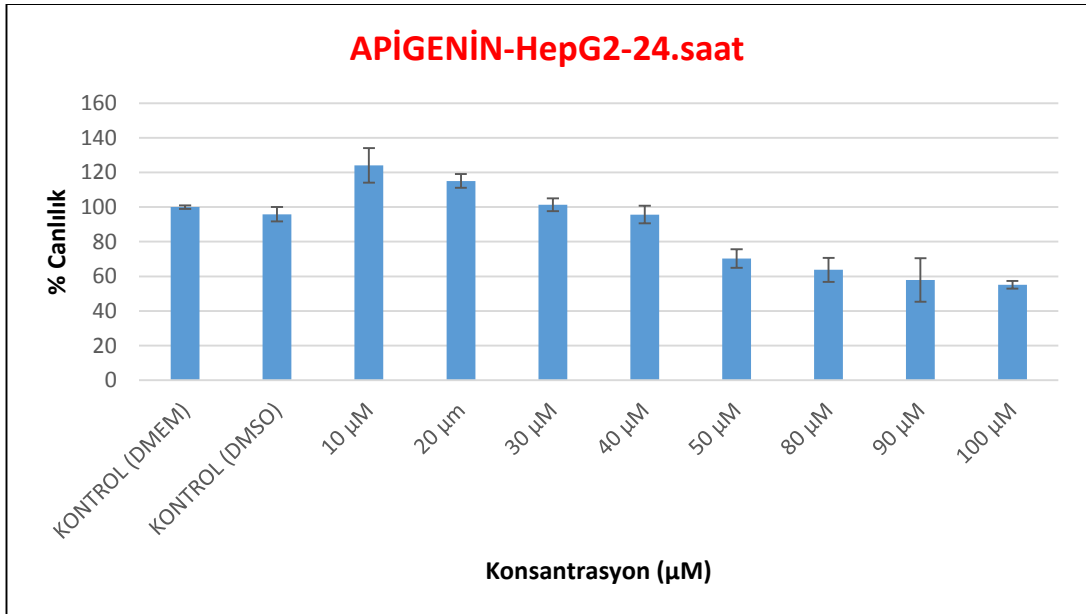
Şekil 4.2 Sorafenibin 48 saat sonunda HepG2 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi

Daha önce yapılan çalışmalar referans alınarak sorafenib için 72. saat uygulaması yapılmamıştır. 24 ve 48. saatlerde Şekil 4.3 'te özetlendiği gibi canlı hücre sayısını %50'nin altına düşüren dozlar tespit edilmiştir. 24. ve 48. saatlerdeki sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde sorafenib için IC₅₀ dozu 48. saatte 7,5 µM olarak belirlenmiştir.



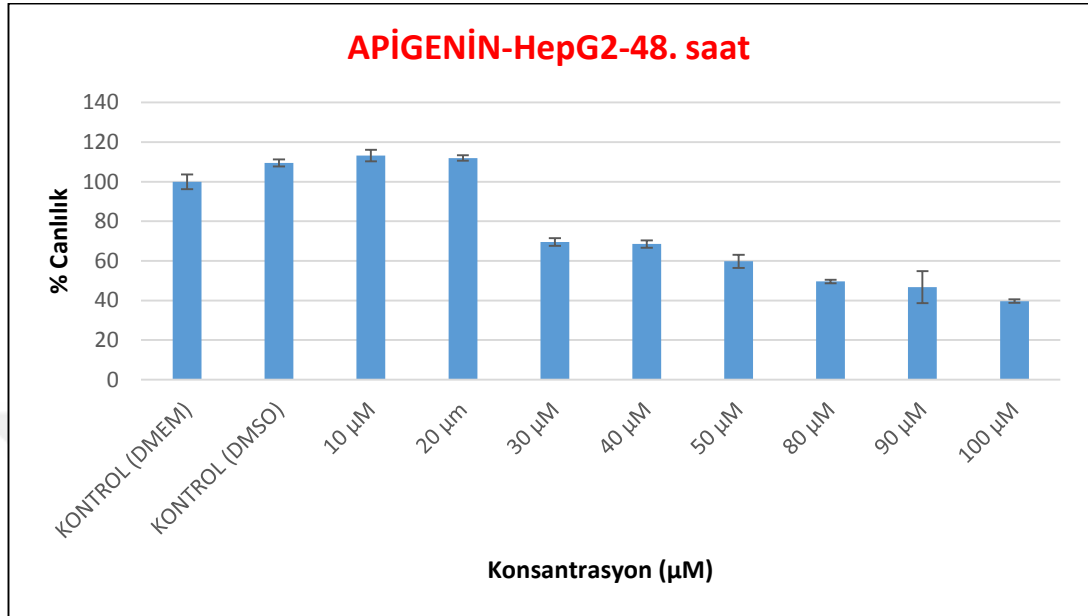
Şekil 4.3 Sorafenibin 24 ve 48 saat sonunda HepG2 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi

Apigenin için 24. saatin sonunda doza bağlı olarak hücre canlılığındaki değişimler Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Bu verilere göre 24 saat sonunda apigeninin hücre canlılığını %50'nin altına düşürdüğü bir doz belirlenememiştir.



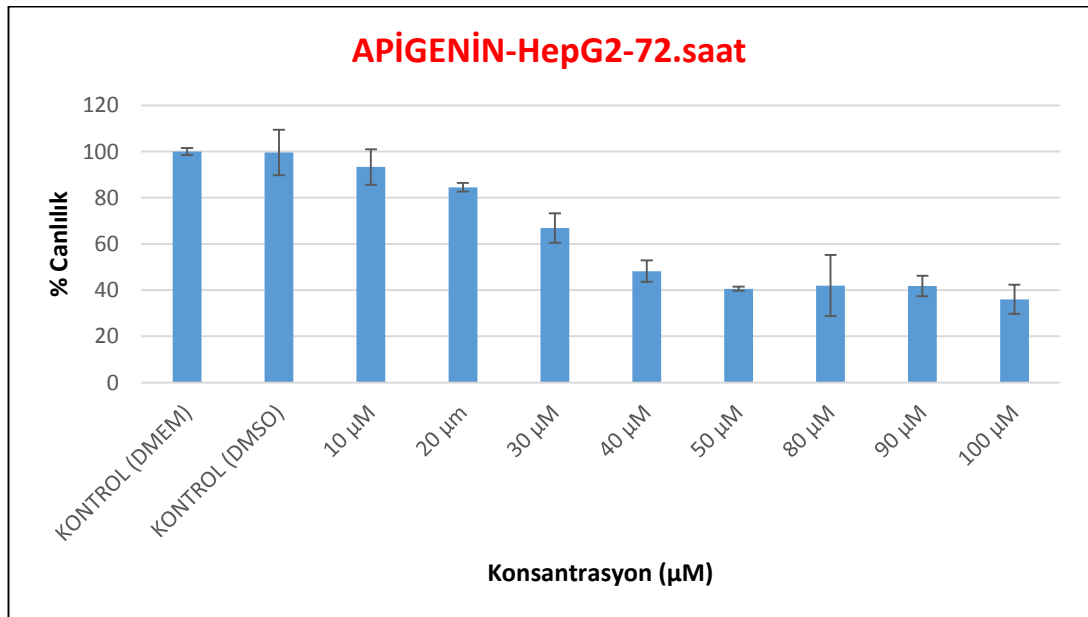
Şekil 4.4 Apigeninin 24 saat sonunda HepG2 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi

48. saatin sonunda apigeninin doza bağılı olarak hücre canlılığı üzerine etkisi Şekil 4.5'te gösterilmiştir. 48. saatin sonunda yapılan bu ölçümlerde hücre canlılığının %50'nin altına düştüğü doz 80 μM olarak belirlenmiştir.



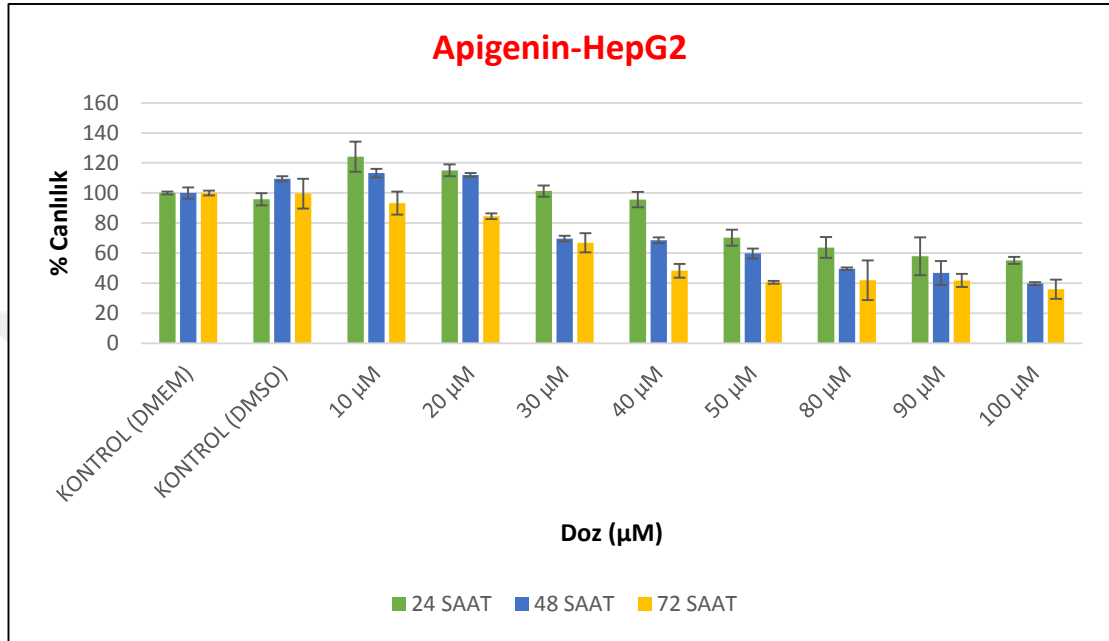
Şekil 4.5 Apigeninin 48 saat sonunda HepG2 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi

72. saatin sonunda apigeninin doza bağılı olarak hücre canlılığı üzerine etkisi Şekil 4.6'da gösterilmiştir. 72. saatin sonunda yapılan bu ölçümlerde hücre canlılığının %50'nin altına düştüğü doz 40 μM olarak belirlenmiştir.



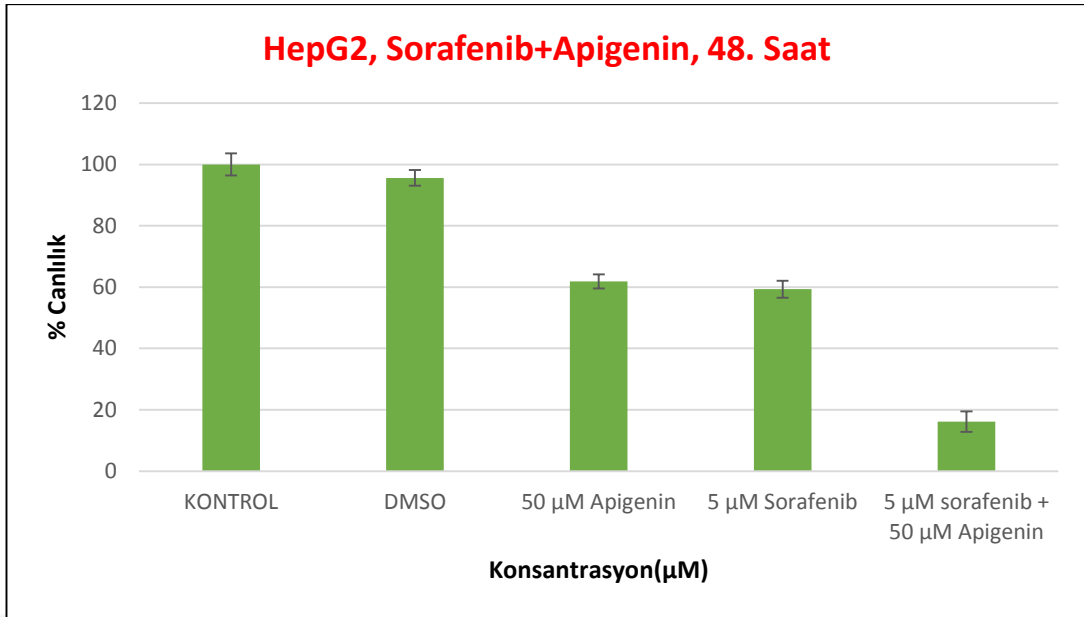
Şekil 4.6 Apigeninin 72 saat sonunda HepG2 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi

24, 48 ve 72. saatlerde Şekil 4.7 'de özetlendiği gibi canlı hücre sayısını %50'nin altına düşüren dozlar tespit edilmiştir. 24, 48 ve 72. saatlerdeki sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde sorafenib için IC₅₀ dozu 72. saate 40 µM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7 Apigeninin 24, 48 ve 72 saat sonunda HepG2 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi

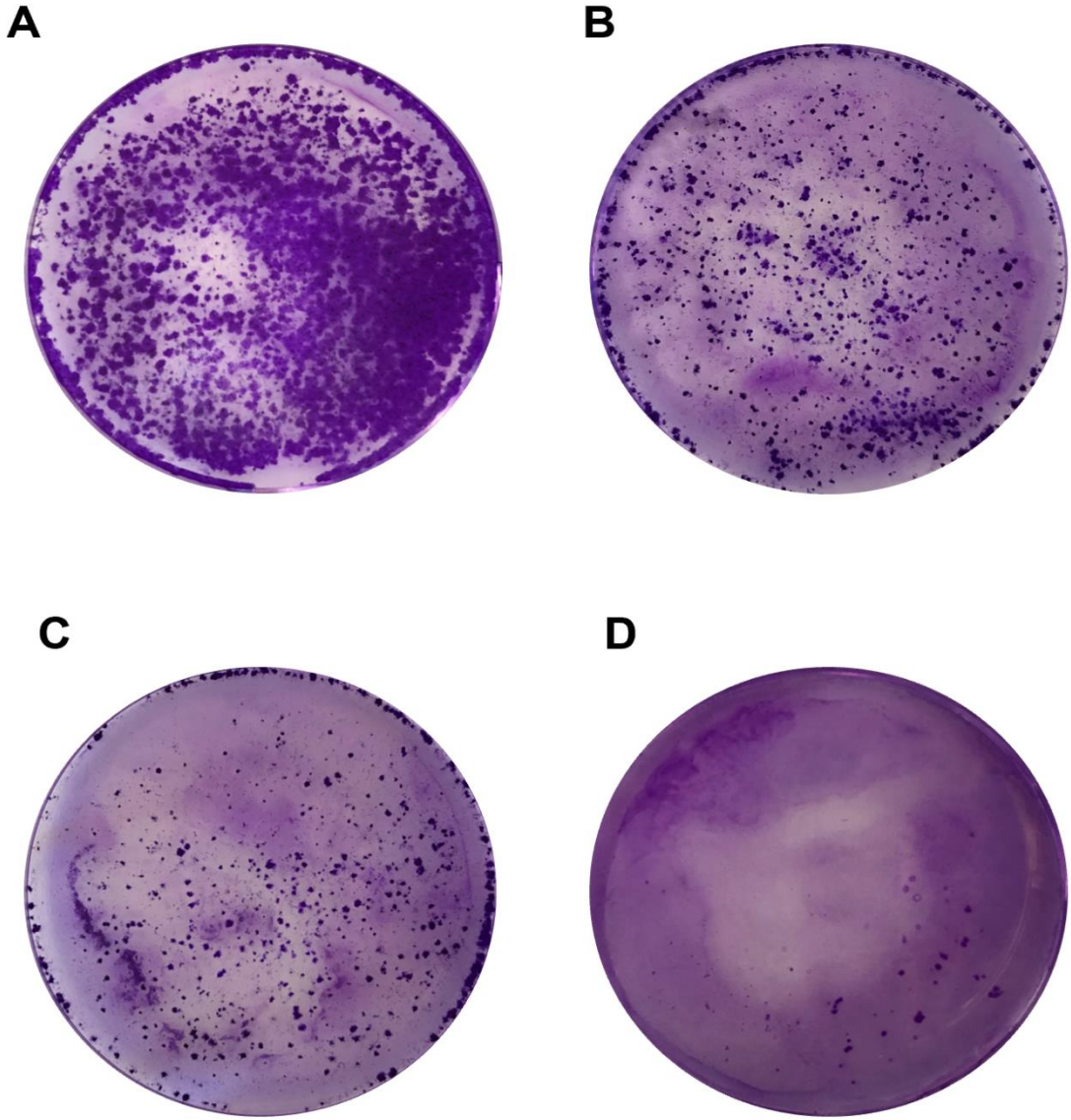
Elde edilen veriler doğrultusunda kombine uygulama için sorafenib ve apigeninin IC₅₀ dozlarından düşük olan dozlar ve 48 saat uygulama süresi denenmiştir. Bu denemeler sonucunda kombine uygulamada sorafenib için 5 µM seçilirken apigenin için 50 µM seçilmiş ve 48 saat sonundaki sitotoksik etkileri Şekil 4.8'de gösterildiği gibi belirlenmiştir. 48. saatte yalnız 5 µM sorafenib uygulaması hücrelerin %43'ünü öldürürken 50 µM apigenin uygulaması hücrelerin %41'ini öldürmüştür. Fakat 5 µM sorafenib ve 50 µM apigenin kombine olarak uygulandığında 48 saat sonunda hücrelerin %84'ünü öldürdüğü açık bir şekilde görülmüştür. Bu sebeple çalışmanın diğer deney aşamalarında kombine grubu olarak 5 µM sorafenib + 50 µM apigenin kullanılmıştır.



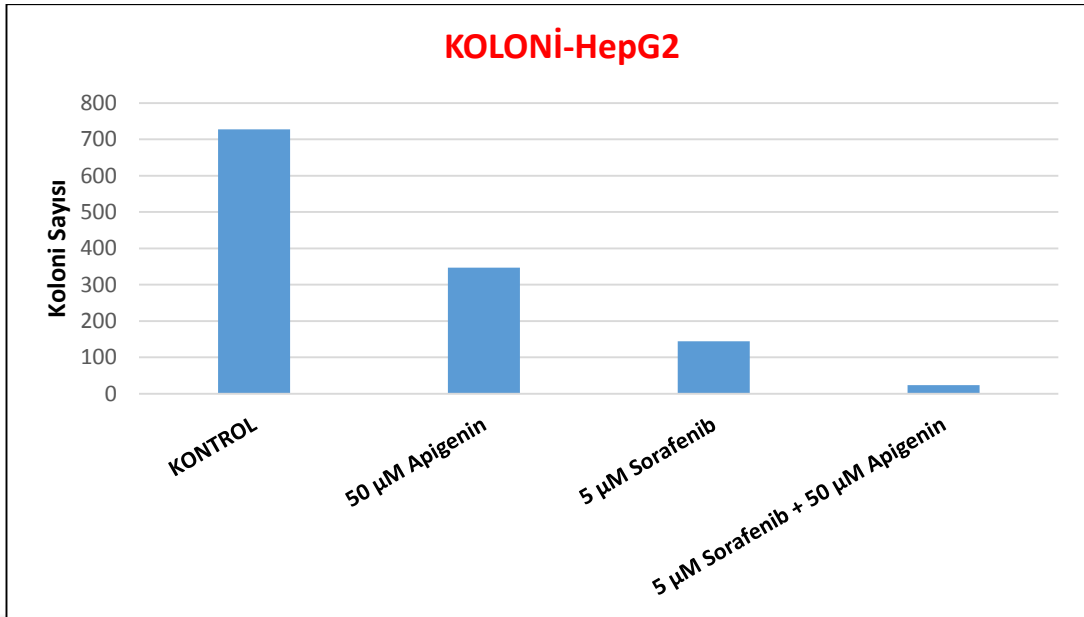
Şekil 4.8 50 μM apigenin ve 5 μM sorafenibin kombine uygulamasının 48 saat sonunda HepG2 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi

4.2. Koloni Oluşum Sonuçları

Yapılan koloni oluşum analizlerine göre kontrol grubunda sayılan toplam koloni sayısı 728, 50 μM apigenin uygulanan gruptaki koloni sayısı 347, 5 μM sorafenib uygulanan gruptaki koloni sayısı 144 ve 50 μM apigenin + 5 μM sorafenib uygulanan grubun koloni sayısı 24 olarak belirlenmiştir. Şekil 4.9'da kombine uygulamanın koloni oluşumunu ciddi şekilde baskıladığı görülmektedir. Şekil 4.10'da gösterildiği gibi veriler analiz edildiğinde 50 μM apigenin uygulanan grupta kontrol grubuyla karşılaştırıldığında koloni oluşumunda %27 oranında, 5 μM sorafenib uygulanan grupta %80 oranında bir azalma söz konusu iken kombine gruptaki koloni sayısında yaklaşık %96'lık bir azalma dikkat çekmektedir.



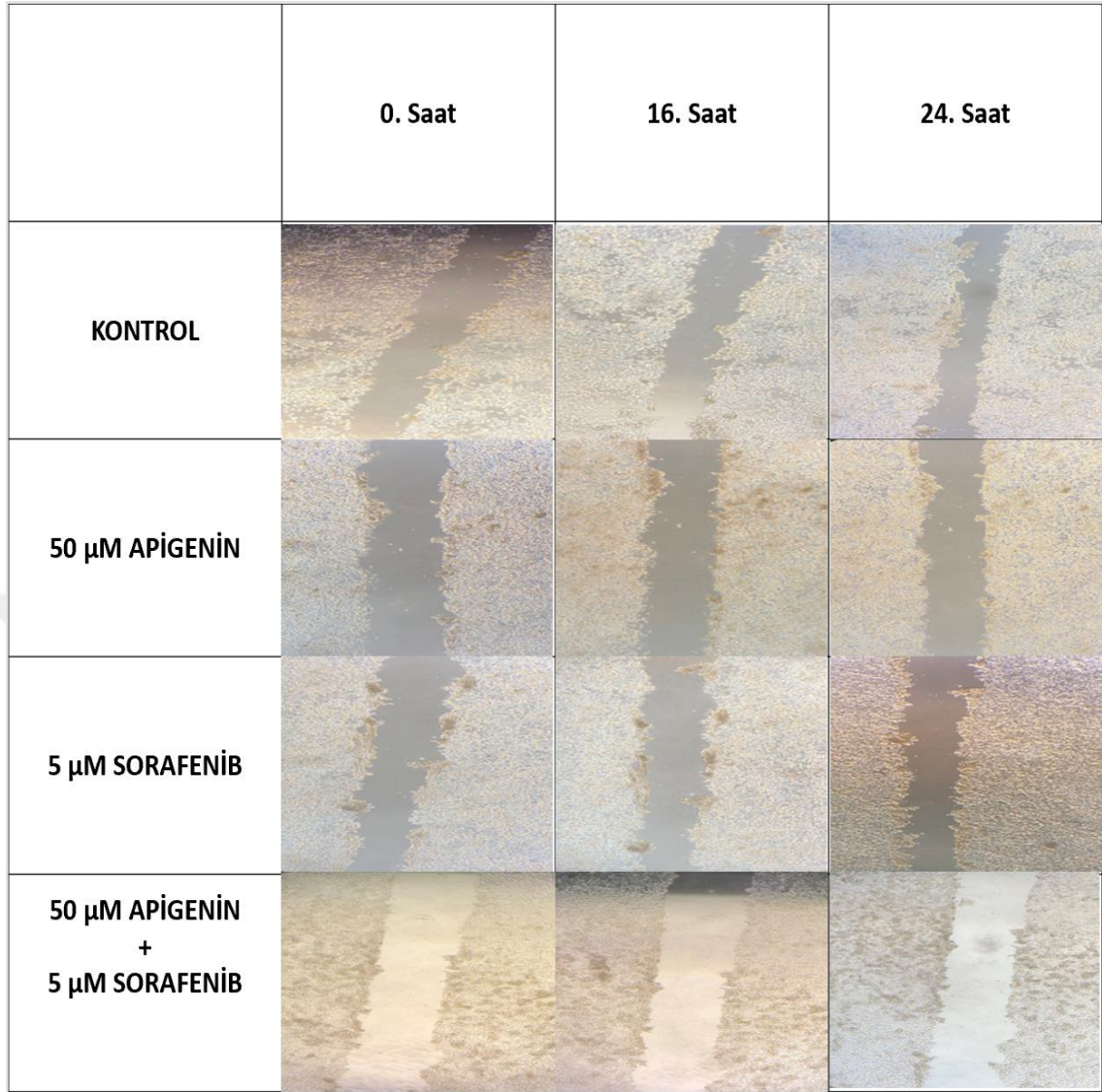
Şekil 4.9 A) Kontrol grubu. B) 50 μ M apigenin C) 5 μ M sorafenib D) 50 μ M apigenin + 5 μ M sorafenib uygulanan grupların 48 saat sonundaki koloni görüntüleri



Şekil 4.10 Kontrol, 50 µM apigenin, 5 µM sorafenib ve 50 µM apigenin + 5 µM sorafenib uygulanan grupların 48 saat sonundaki koloni sayıları

4.3. Wound- Healing Sonuçları

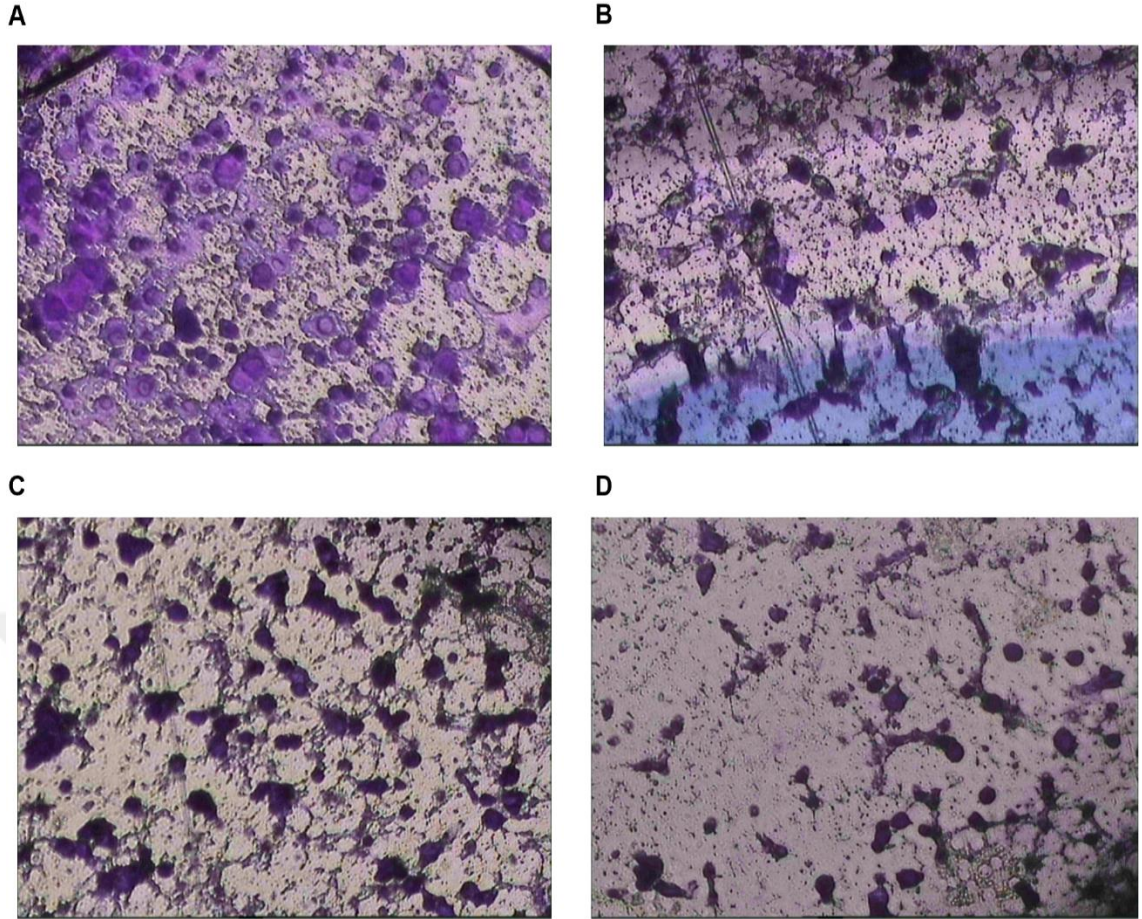
Wound- healing analizleri ile kontrol ve doz gruplarındaki hücrelerin migrasyon yetenekleri karşılaştırılmıştır. Yapılan sitotoksite ve koloni oluşum analizleri ile uyumlu olarak 50 µM apigenin + 5 µM sorafenib uygulanan kombine gruptaki hücrelerin migrasyon yeteneği, kontrol ve tekli doz gruplarıyla karşılaştırıldığında yüksek oranda baskılandığı Şekil 4.11'de görülmüştür.



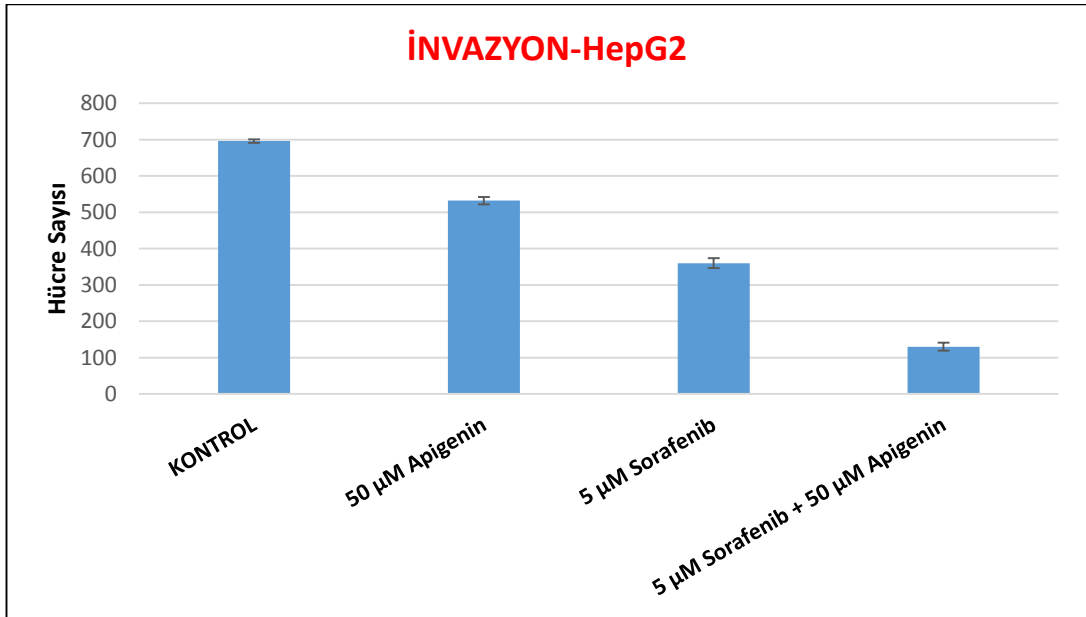
Şekil 4.11 Kontrol, 50 µM apigenin, 5 µM sorafenib ve 50 µM apigenin + 5 µM sorafenib uygulanan grupların 0, 16 ve 24. saatlerdeki wound-healing görüntüleri

4.4. Matrigel İnvazyon Analizi Sonuçları

Yapılan invazyon analizleri sonucunda Şekil 4.12'de gösterildiği gibi kontrol ve doz gruplarındaki invazyon yeteneğine sahip hücreler sayılarak analiz edilmiştir. Kontrol grubu membranında yaklaşık 696, 50 µM apigenin uygulanan grupta yaklaşık 532, 5 µM sorafenib uygulanan grupta yaklaşık 360 ve 50 µM apigenin + 5 µM sorafenib uygulanan grupta ise yaklaşık 130 hücre sayılmıştır (Şekil 4.13). Elde edilen bu verilere göre kontrol ve tekli doz grupları karşılaştırıldığında 50 µM apigenin + 5 µM sorafenib uygulanan kombine gruptaki hücrelerin invazyon yeteneğinin ciddi anlamda düştüğü dikkat çekmektedir.



Şekil 4.12 A) Kontrol grubu B) 50 µM apigenin C) 5 µM sorafenib D) 50 µM apigenin + 5 µM sorafenib uygulanan gruplardaki invaze olmuş hücrelerin mikroskop görüntüleri

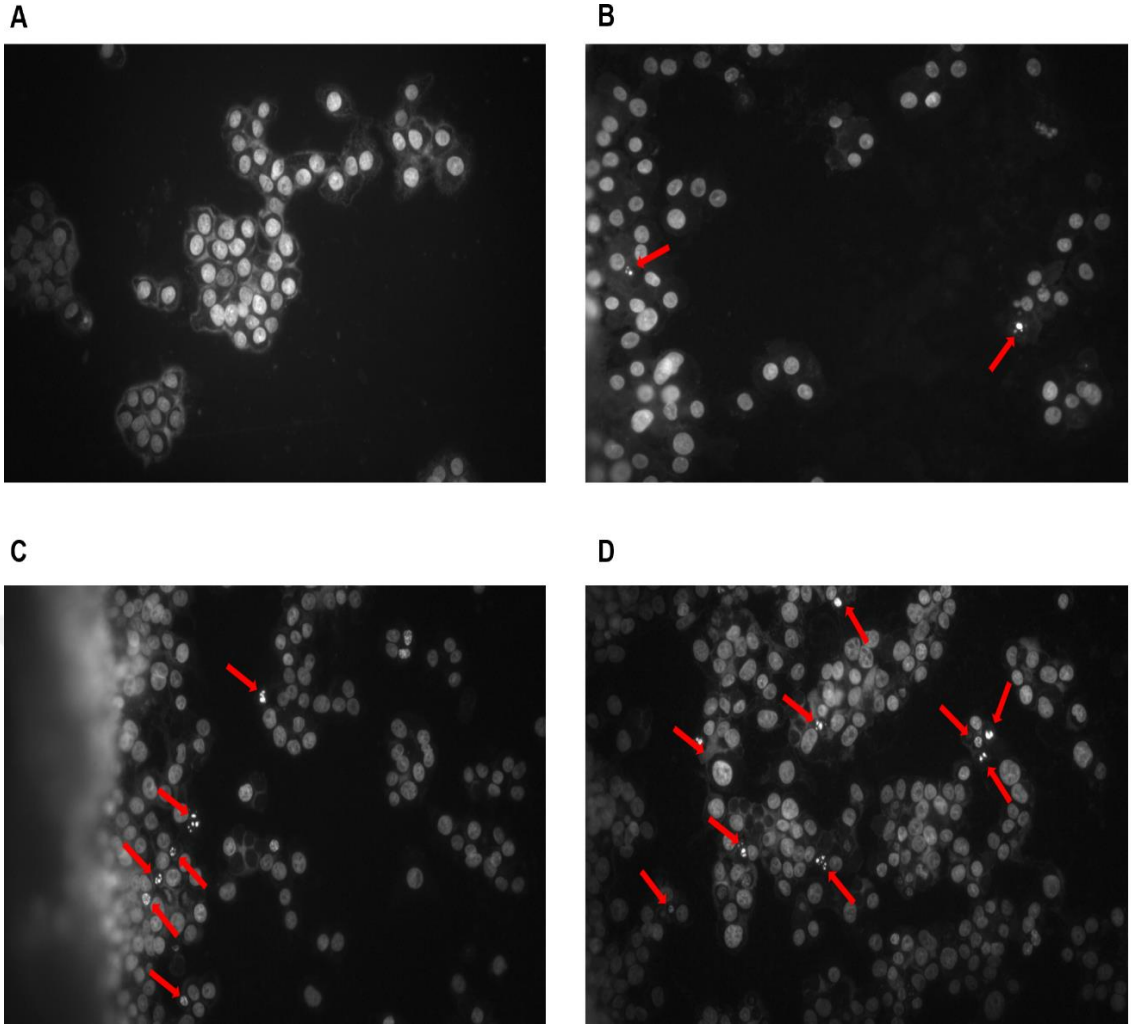


Şekil 4.13 Kontrol, 50 µM apigenin, 5 µM sorafenib ve 50 µM apigenin + 5 µM sorafenib uygulanan gruplarda invaze olmuş hücre sayıları

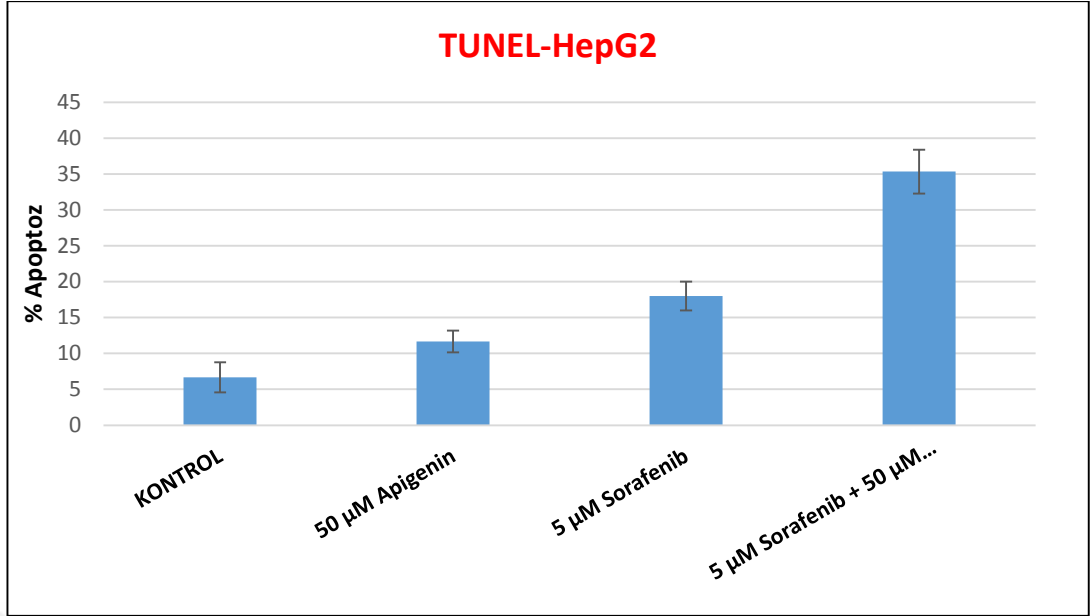
4.5. TUNEL Apoptoz Analizi Sonuçları

Apoptoza giren hücreler belirli morfolojik değişikliklere uğramaktadır. Örneğin; hücrenin kondanse olmaya başlaması ve küçülmesi, hücre iskeletinin parçalanması, çekirdek zarı ve DNA'nın parçalanması. Bu yüzden Hoechst boyası ile boyanan apoptotik hücrelerin floresan mikroskop altında belirlenebilmesi için bu değişikliklerden yararlanılmıştır.

Kontrol ve doz gruplarının her biri için 5 farklı alan sayılmıştır. Kontrol ve doz gruplarının floresan mikroskop altındaki görüntüleri Şekil 4.14'te verilmiştir. Elde edilen sayılar doğrultusunda apoptotik hücreler canlı hücreler ile oranlanarak her grup için yüzde apoptoz miktarları tespit edilmiştir. Kontrol ve doz grupları için tespit edilen % apoptoz miktarları Şekil 4.15'de verilmiştir.



Şekil 4.14 A) Kontrol grubu. B) 50 µM apigenin C) 5 µM sorafenib D) 50 µM apigenin + 5 µM sorafenib uygulanan gruplardaki apoptotik hücrelerin floresan mikroskop(20X) altındaki görüntüleri (Apoptotik hücreler kırmızı oklar ile gösterilmiştir)



Şekil 4.15 Kontrol, 50 µM apigenin, 5 µM sorafenib ve 50 µM apigenin + 5 µM sorafenib uygulanan gruplarda % apoptoz miktarları

4.6. Gerçek Zamanlı PZR Sonuçları

Yapılan gerçek zamanlı PZR analizleri sonucunda ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler bulunan hücre döngüsü ve apoptoz ile ilişkili genler Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1 Gerçek Zamanlı PZR Sonuçlarına göre 50 µM apigenin, 5 µM sorafenib ve 50 µM apigenin + 5 µM sorafenib doz gruplarındaki ekspresyon değişimleri (p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir)

50 µM APİGENİN			5 µM SORAFENİB			50 µM APİGENİN + 5 µM SORAFENİB		
GEN ADI	DEĞİŞİM	p-DEĞERİ	GEN ADI	DEĞİŞİM	p-DEĞERİ	GEN ADI	DEĞİŞİM	p-DEĞERİ
ACTB	1	0	ACTB	1	0	ACTB	1	0
CASP-3	25,8772	0,004373	CASP-3	7,6452	0,263194	CASP-3	38,3339	0,000383
CASP-8	9,2679	0,009727	CASP-8	7,1014	0,019322	CASP-8	35,7977	0,00002
CASP-9	1,6372	0,243546	CASP-9	1,4048	0,516756	CASP-9	1,5123	0,37111
CASP-10	1,3635	0,59007	CASP-10	2,6379	0,016314	CASP-10	5,6785	0,003432
BID	5,4378	0,007372	BID	3,3969	0,015453	BID	4,0826	0,001222
P53	2,74	0,011864	P53	2,0882	0,076615	P53	2,1042	0,056283
P21	66,0504	0,029612	P21	5,7746	0,131687	P21	15,7327	0,001871
P16	2,3975	0,0301	P16	1,6386	0,318869	P16	2,7531	0,013047
PUMA	1,9648	0,088869	PUMA	2,0327	0,07139	PUMA	1,4447	0,466551

50 µM apigenin uygulanan grupta *kaspaz-3*, *kaspaz-8*, *BID*, *p53*, *p21* ve *p16* ekspresyonlarında anlamlı bir artış görülmüştür. Bu durum yalnız apigeninin HepG2 hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermektedir. 5 µM sorafenib uygulanan gruptaki mRNA seviyesindeki ekspresyon değişimlerine bakıldığında ise *kaspaz-10*, *BID* ve *PUMA* ekspresyonlarında anlamlı bir artış görülmektedir. 50 µM apigenin + 5 µM sorafenib uygulanan kombine gruba bakıldığında ise *kaspaz-3*, *kaspaz-8* ve *kaspaz-10* seviyesinde tekli dozlara oranla çok daha fazla bir artış görülmektedir. Bunun yanısıra *BID*, *p21* ve *p16* ekspresyonlarında da anlamlı bir artış görülmektedir. Bu sonuçlar apigenin ve sorafenib kombine uygulandığında HepG2 hücrelerinde apoptozu dış yolak üzerinden tetikleyebileceğini düşündürmektedir.

5. TARTIŞMA

Hepatoselüler karsinoma (HSK), dünya çapında en yaygın görülen beşinci kanser tipidir ve yılda ortalama 600.000 binden fazla ölümün sorumlusudur (Llovet vd 2003). Hastaların büyük bir çoğunluğu teşhis koyulduktan sonra yaklaşık bir yıl içinde hayatını kaybetmektedir. HSK teşhisinin ise ancak ileri evrede koyulabilmesi hastaların potansiyel tedavi yöntemlerinden bir fayda görememelerine sebep olmaktadır. Bu hastalar için kemoterapi, kemobolizasyon ve ablasyon gibi yöntemleri çok etkili olmamakta ve nüks oranları çok yüksektir. 5 yıl için sağkalan hasta oranı %7 civarındadır (Bosch vd 2004). Bu durum agresif bir hastalık olan HSK için en kısa zamanda erken teşhis için yeni biyobelirteçler ve daha etkili bir şekilde tümörü hedef alan yeni terapiler geliştirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Diğer kanserlerde olduğu gibi HSK'da da kullanılan kemoterapötik ajanlara karşı direnç gelişimi, tümörün anjiyogenez ve metastaz yeteneği ve kemoterapötik ajanların ağır yan etkileri tedavinin başarısını olumsuz etkilemektedir (Frei ve Eder, 2003, Zhang ve ark. 2012). Bu sebeple araştırmacılar son yıllarda HSK tedavisinde kemoterapik ajanlar ile kombine kullanılmak üzere bitkisel özütler veya etken maddeler üzerine yoğunlaşmıştır.

Sorafenib oral olarak kullanılan bir çoklu kinaz inhibitörüdür. İnhibe ettiği kinazlar arasında hücrede sağkalım, büyüme, proliferasyon, apoptoz gibi hayati fonksiyonların merkezinde bulunan Raf-1 ve B-Raf Serin-Treonin kinazları, Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) reseptörleri 1, 2 ve 3, Trombosit Türevi Büyüme Faktörü (PDGF) reseptörünü, KIT, RET ve FLT-3 yer almaktadır (Wilhelm vd 2004). Sorafenibin birçok kinazı inhibe etmesi tedavide oldukça etkili olmasının sebebidir. Bir tirozin kinazın görev aldığı yolağın bloke edilmesi bile tek başına anti-kanser özelliğe sahipken birçok kinazın aynı anda bloke edilmesi kanser oluşumunda rol alan çeşitli yolakların inhibisyonuna neden olarak tedavinin başarılı olmasını sağlamaktadır.

Tümör gelişimi, proliferasyon, metastaz ve apoptozun baskılanması gibi neoplastik süreçler aktif tirozin kinaz reseptörlerinin uyardığı yollarla kontrol edilir. Örneğin; Ras protoonkogeni tarafından tetiklenen Ras yolağı kanser gelişiminde rol oynayan en önemli yollardan biridir. Kanser hücreleri hücreleri yüksek seviyede PDGF- β ve VEGF gibi büyüme faktörleri ve sitokinleri üretir. Bu moleküllerin endotel hücreleri üzerindeki reseptörlere bağlanmasıyla da Raf/MEK/ERK yolları aktive olur, bu da anjiyogenezi tetikleyen faktörlerden biridir (Hood vd 2002). Bu sebeple Raf kinazlar, VEGF ve PDGF- β anjiyogenezin engellenmesinde dolayısıyla kanser tedavisinde potansiyel tedavi hedefleridir (Fruse, 2008). Yapılan çalışmalar sorafenibin çeşitli kanser türlerinde hücre proliferasyonunu ve anjiyogenezi engellediği ve apoptozu hızlandırdığı gösterilmiştir. (Liu vd 2006). İleri evre HSK hastaları ve renal karsinomda ise hastaların sağkalım süresini uzattığı görülmüştür (Ratain vd 2006; Escudier vd 2007).

Liu ve arkadaşları iki farklı HSK hücre hattı olan HepG2 ve PLC/ PRF/5 hücre hatlarında sorafenibin 72 saat sonunda hücre canlılığına etkisini CellTiter Glo analizi ile araştırmıştır. Elde ettikleri sonuçlara göre PLC/ PRF/5 hücrelerinde IC_{50} 6,3 mol/L iken HepG2 hücrelerindeki IC_{50} dozu 4,5 mol/L olarak tespit edilmiştir. Ayrıca DNA fragmentasyon analizi ile gerçekleştirdikleri apoptoz tayininde sorafenibin iki hücre hattında DNA parçalanmasını indüklediği görülmüştür (Liu vd 2006). Bu çalışmada XTT analizi kullanılarak HepG2 hücrelerinde sorafenibin IC_{50} dozu 48 saat için 7,5 μ M'dir. Bulunan IC_{50} dozunun literatürdeki diğer çalışmalarda tespit edilen IC_{50} dozlarından farklı olmasının kullanılan canlılık analiz metodlarının farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Apigenin bir flavonoid olarak sağlıklı hücreler üzerine düşük toksik özelliğinin yanısıra birçok farklı özelliğe de sahiptir. Yapılan tüm araştırmalar apigeninin tek ve başka bir ajanla kombine uygulamasının insan kanserlerinde oldukça güçlü anti-kanser aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalar apigeninin apoptozu indükleyerek kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığını, otofajiyi indüklediğini, hücre döngüsünü düzenlediğini, kanser hücrelerinin hareket etme kapasitelerini sınırlandırarak migrasyonu ve invazyonu baskıladığını hatta immün sistemi uyararak da anti-kanser etki gösterdiğini kanıtlamıştır.

Kolorektal kanser hücre hatları olan SW480 ve HCT116 hücre hatları ile yapılan çalışmada 0,5, 10, 20, 40 ve 80 μ M konsantrasyonlarında apigenin uygulanan hücrelerin 48 saat sonunda MTT testi ile hücre canlılık analizleri gerçekleştirilmiştir. IC_{50} dozu SW480 hücre hattı için 18.17 μ M olarak tespit edilirken HCT116 hücre hattı için 23.57

μM olarak tespit edilmiştir. Tümör migrasyonu ve invazyonu tümörögenез için en önemli basamaklardan biridir. Bu sebeple yara- iyileşme testi ile gerçekleştirilen migrasyon analizlerinde $40 \mu\text{M}$ apigeninin oldukça etkili olduğu ve hücrelerin migrasyonunu baskıladığı görülmüştür. Transwell hücre invazyon analizi ile yapılan invazyon analizlerinde de $40 \mu\text{M}$ apigeninin SW480 hücrelerinin invazyon yeteneğini yüksek oranda baskıladığı görülmüştür. Yapılan *in vitro* çalışmalarda ise apigeninin SW480 hücrelerinde Wnt/ β -katenin sinyalizasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir (Xu vd 2016).

Yapılan bir diğer çalışmada SW480 kolorektal karsinoma hücre hatlarında proteomik analizler ile apigeninin anti-tümör ve anti-metastaz özellikteki transgelin (TAGLN) ekspresyonunu upregüle ettiği, TAGLN'nin ise AKT fosforilasyonunu düşürerek MMP-9 ekspresyonunu downregüle ettiği böylece de hücre proliferasyonu ve migrasyonuna engel olduğu görülmüştür (Chunhua vd 2013).

Tseng ve arkadaşları $40 \mu\text{M}$ apigeninin meme kanseri hücre hattı olan MDA-MD-231 hücrelerinde siklin A, siklin B ve CDK1 ekspresyonunu baskımlarken p21 ekspresyonunu upregüle ettiğini ve böylece hücre döngüsünün G2/M fazında durmasına neden olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda HDAC aktivitesinin inhibe olduğu ve histon H3 asetilasyonunun indüklediği görülmüştür (Tseng vd 2017). Bu çalışmada ise gerçek zamanlı PZR analizi sonuçlarına göre $50 \mu\text{M}$ apigenin uygulanan grupta p21 ekspresyonunda anlamlı derecede bir artış görülürken $5 \mu\text{M}$ sorafenib uygulanan grupta yöntem, kullanılan kit veya el hatalarından kaynaklandığı düşünülen sebeplerden dolayı p21 ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Fakat buna rağmen $50 \mu\text{M}$ apigenin + $5 \mu\text{M}$ sorafenib uygulanan kombine grupta p21 ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. Bu durumda sorafenib ve apigeninin belirlenen dozlarda kombine olarak uygulanmasının hücre döngüsünü p21 aracılığıyla durdurarak hücre proliferasyonunu baskıladığı yani sinerjik etki gösterdiği söylenebilmekte fakat hücre döngüsü ile ilişkili yollardaki moleküler hedef ve mekanizmalarının belirlenebilmesi için ileri çalışmalar gerektirmektedir.

PI3K/AKT sinyal yolağı hücre proliferasyonu, sağkalım, migrasyon ve invazyon gibi birçok hücreyel olayda rol almaktadır. İnsan akciğer kanseri hücre hattı olan A549 ile yapılan *in vitro* çalışmalarda $40 \mu\text{M}$ apigeninin PI3K/AKT yolağını hedef alarak proliferasyon, migrasyon ve invazyonu baskıladığı görülmüştür. Yapılan MTT ve koloni formasyon analizleri de apigeninin doz ve zamana bağılı olarak hücre proliferasyonunu baskıladığını göstermiştir. Hücre hareketliliğini belirlemek için yapılan yara- iyileşme ve Transwell invazyon analizleri de apigeninin A549 hücrelerinde migrasyon ve invazyonu

engellediğini göstermiştir. Yapılan western blot analizleri ise apigeninin AKT ekspresyonunu ve aktivasyonunu düşürdüğünü göstermiştir. Araştırmacılar yaptıkları daha ileri çalışmalar sonucunda apigeninin akciğer kanserinde yeni bir AKT inhibitörü ve kanserden korunmada potansiyel bir bileşen olduğunu söylemiştir (Zhou vd 2017).

Prostat kanseri hücre hattı olan PC3 hücre hattı ile yapılan çalışmalarda apigeninin MTT analizi kullanılarak hücre canlılığına olan etkisi araştırılmıştır. Apigeninin 0, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μM arasında değişen dozları uygulanan hücreler 48 saatlik inkübasyonun sonunda analiz edilmiş ve IC_{50} dozu 25 μM olarak tespit edilmiştir. Yapılan Annexin V apoptoz testi ile apigeninin apoptozu indüklediği tespit edilmiştir. Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile de elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak *p21* ve *p27* ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış olduğu, *kaspaz-3*, *kaspaz-8* ve $\text{TNF-}\alpha$ upregüle olurken PI3K/AKT ve $\text{NF-}\kappa\text{B}$ sinyalizasyonunun downregüle olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar hücre döngüsü ve kök hücre migrasyonunun durdurularak apoptozun indüklendiğini göstermektedir (Erdogan vd 2016). Bu çalışmada ise apigeninin kullandığımız HepG2 hücre hattında *p21* ekspresyonunda oldukça anlamlı bir artışa neden olduğu gözlemlenmektedir. Bu sebeple apigeninin HSK hücre hattı olan HepG2 hücrelerinde de hücre döngüsünü durdurarak proliferasyonun baskılanmasına neden olduğu düşünülmektedir. Fakat hücre döngüsünün kontrolündeki bu rolünün daha iyi anlaşılması ve moleküler hedeflerinin tam olarak belirlenebilmesi için ileri çalışmalar gerekmektedir.

Zhao ve arkadaşları insan malignant melonoma hücre hatları olan A375 ve C8161 hücre hatlarında apigeninin etkinliğini araştırmıştır. Hücrelere apigeninin 40, 80, 120, 160, 200, 240 and 280 μM konsantrasyonları uygulanarak 24, 48, 72 ve 96. saatlerde MTT testi ile canlılık analizi yapılmıştır. 24 saatin sonunda IC_{50} dozu iki hücre hattı için de 100 μM olarak tespit edilmiştir. Apigeninin hücre migrasyonuna olan etkisini araştırmak için yapılan yara- iyileşme analizi sonucunda A375 hücrelerinde 40 μM ve C8161 hücrelerinde 80 μM apigeninin hücre migrasyon kapasitesini anlamlı derecede baskıladığı, 100 μM apigenin uygulanan gruplarda ise migrasyon yapan hücreye rastlanmadığı belirtilmiştir. Hücrelerin hareketliliğine olan etkilerinin araştırılması için A375 ve C8161 hücrelerine 72 saat süreyle 40 μM apigenin uygulanarak invazyon analizleri gerçekleştirilmiş ve 40 μM apigeninin iki hücre hattı için de invazyonu önemli ölçüde baskıladığı 80 μM apigenin uygulanan grupta ise herhangi bir invaziv hücre gözlemlenemediği belirtilmiştir. Ayrıca apigeninin A375 ve C8161 hücre hatlarında apoptozu indüklediği ve hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğu tespit edilmiştir. Yapılan western blot analizleri ise apigeninin aktif *kaspaz-3* ve aktif PARP ekspresyonunun arttığını ERK1/2 proteinleri, p-AKT ve p-mTOR ekspresyonlarının da

azaldığını göstermiştir (Zhao vd 2017). Bu çalışmadan elde edilen veriler ise apigeninin HSK hücre hattı olan HepG2 hücrelerinde de diğer kanser türlerinde olduğu gibi proliferasyon, invazyon ve migrasyonu önemli ölçüde baskılandığını kanıtlamıştır. Apigeninin HepG2 hücre hatlarında proliferasyon, invazyon ve migrasyonu tam olarak hangi yollar üzerinden baskılandığını belirleyebilmek için ileri çalışmalarda western blot analizlerinin yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Ruela-de-Sousa ve arkadaşlarının HL60 lösemi hücre hattı ile gerçekleştirdikleri çalışmada 50 μ M apigeninin JAK/STAT yolağını inhibe ederek hücre döngüsünün durmasına neden olduğu tespit edilmiştir (Ruela-de-Sousa vd 2010). Aynı hücre hattı ile yapılan diğer bir çalışmada ise 60 μ M apigeninin kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivasyonunu artırarak apoptozu indüklediği görülmüştür (Wang vd 1999). Bu çalışmada ise 50 μ M apigenin uygulanan grupta gerçek zamanlı PZR verilerine göre kaspaz-3 ekspresyonunda anlamlı bir artış görülmektedir.

Ovaryum kanseri hücre hattı olan A2780 hücre hattında yapılan çalışmalarda ise 40 μ M apigeninin FAK ekspresyonunu düşürerek hücrelerin tutunmasını inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Hu vd 2008). Tang ve arkadaşları SKOV3 ovaryum kanseri hücre hatları ile yaptıkları çalışmada apigeninin hücrenin kendini yenileme kapasitesini düşürdüğünü ve birçok kanser türünde yüksek seviyede aktive olan Gli1 ve CK2 α proteinlerinin ekspresyonunun downregüle olduğunu ortaya koymuştur (Tang vd 2015).

ACHN, 786-0 ve Caki-1 renal karsinoma hücre hatları ile yapılan araştırmada IC₅₀ dozları ACHN için 39.4 μ M 24 saat, 15.4 μ M 48 saat, 786-0 için 39.1 μ M 24 saat, 19.0 μ M 48 saat, Caki-1 için 50.9 μ M 24 saat, 21.4 μ M 48 saat olarak tespit edilmiştir. ACHN hücrelerinde yapılan komet analizi sonucunda apigeninin ACHN hücrelerinde DNA hasarına neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan western blot analizleri ile de DNA'da meydana gelen çift iplik kırıkları belirteci olan H2AX fosforilasyonunun doza bağlı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir. Yine ACHN hücreleri kullanılarak yapılan hücre döngüsü analizleri sonucunda G2/M fazında duran hücre sayısı kontrol grubunda %12,57 ike da 5 μ M apigenin uygulanan grupta %16,85, 10 μ M apigenin uygulanan grupta %30,54 ve 20 μ M apigenin uygulanan grupta ise %46,77 olarak tespit edilmiştir. ATM/ATR sinyal yolağı hücre döngüsünün G2/M fazında durmasının DNA hasarı ile indüklenmesinde önemli rol oynamaktadır. Yapılan western blot analizlerinde p-ATM, fosforile Chk2, Cdc25, Cdc2 ekspresyonunda doza bağlı olarak önemli bir artış gözlemlenmiştir. Ayrıca doza bağlı olarak p53 seviyesinde ve bununla uyumlu olarak

apoptoz miktarında artış gözlemlenmiştir(Meng vd 2017). Bu çalışmada ise 50 µM apigeninin p53 ekspresyonunda anlamlı bir artışa neden olduğu görülmektedir.

Kim ve arkadaşları gerçekleştirdikleri *in vitro* çalışmalarda apigeninin HepG2 hücre hattında 24 saat sonunda MTT analizi ile hücre canlılığını %50'nin altına düşürdüğü dozu 20 µM olarak tespit etmişlerdir (Kim vd 2013). Bu çalışmada ise apigenin için IC₅₀ dozu XTT analizi ile belirlenmiş olup 48 saat için 80 µM olarak bulunmuştur. Yapılan literatür taramaları sonucunda farklı hücre tiplerinde ve farklı hücre canlılık analiz yöntemlerinde apigenin için çoğunlukla 1 - 500 µM arasında değişen farklı IC₅₀ dozları tespit edildiği dikkat çekmektedir. Bu durumun apigeninin bir flavonoid oluşundan ve farklı kanser hücresi tiplerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Tekli dozlar için elde ettiğimiz verilerin literatürdeki çalışmalarla uyumlu olduğu görülmektedir.

DNA tamir genleri, tümör baskılayıcı ve protoonkogenler ve bunların düzenlenmesinde meydana gelebilecek hasarlar, hasarlı hücrelerin hücre ölüm mekanizmalarını atlatmalarına, tedaviye karşı direnç kazanmalarına veya metastaz yapmalarına neden olmaktadır. Apoptoz ve hücre döngüsünün kontrolünde görev alan temel mekanizmaların ve moleküler hedeflerin belirlenmesi yeni ve etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için kanser tedavisinde önemli bir unsurdur. Bu sebeple tez çalışmamızda günümüzde HSK tedavisi için kullanılan ve etkinliği kanıtlanmış sorafenibin bir flavonoid olan apigenin ile kombine uygulamasının HepG2 hücre hattında apoptoz ve hücre döngüsü üzerine etkileri araştırılmıştır.

Yapılan *in vivo* ve *in vitro* kombine araştırmalar apigeninin diğer ajanlarla birlikte kullanımının antikanser etkilerini hızlandırdığı yönündedir. Günümüzde kullanılan cisplatin, paclitaxel gibi antikanser ilaçları hastaların sağkalım sürelerini önemli ölçüde arttırmaktadır. Fakat bunun yanında sağlıklı hücreler üzerinde de gösterdikleri toksik etkileri klinisyenler ve hastalar için endişe sebebidir. Bu ajanların antikanser etkilerini hızlandırmak, sınırlılıklarını azaltmak ve yan etkilerini en aza indirmek için apigenin ile birlikte kombine uygulamaları üzerine çeşitli kanser türlerinde çalışmalar yapılmaktadır.

Rekombinant Apo2L/tümör nekrozis faktör ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) normal hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerinin ölümünü indükleyen bir ajandır. Fakat buna rağmen TRAIL kanser hücrelerinin direnç kazanması sebebiyle birçok malignant kanser türünde sınırlı etki gösterebilmektedir (Selvarajoo vd 2017). Bu direncin üstesinden gelebilmek için Apo2L/TRAIL yolağını kullanan bir kemoterapi geliştirilmelidir. Prostat kanseri hücre hatları olan DU145 ve LNCaP hücrelerinde

apigenin adenin nükleotit translokaz-2 (ANT2)'yi inhibe ederken DR5'i upregüle ederek bu direnci kırdığı görülmüştür. Ayrıca ANT2'nin siRNA aracılığı ile susturulmasının apigeninin DR5'i upregüle etme hızını düşürdüğü tespit edilmiştir. Sonuç olarak ANT2 inhibisyonu aracılığıyla DR5'in upregülasyonunun ve Apo2/TRAIL indüklü apoptozun hızlandırılması için apigenine ihtiyaç vardır (Chen vd 2016; Oishi vd 2013). A549 ve H1299 akciğer kanseri hücre hatları tek başına TRAIL tedavisine karşı dirençlidir. Apigenin ile birlikte uygulaması ise DR4 ve DR5 ekspresyonunu upregüle ederken hücrelerin p53 bağımlı TRAIL indüklü apoptoza girmesini tetiklemektedir (Chen vd 2016; Oishi vd 2013). Kim ve arkadaşları apigeninin anaplastik tiroid kanserinde Bcl-2 ailesi proteinleri aracılığıyla TRAIL sitotoksitesini hızlandırarak sinerjik etki gösterdiğini belirtmiştir (Kim vd 2015).

İnterferon gamma (IFN γ), T lenfositleri ve doğal öldürücü hücreler tarafından üretilen immün hücrelerin fonksiyonu için ve adaptif immün yanıtın başlatılması için gerekli pleiotropik bir sitokindir (Miller vd 2009). IFN γ , kanser de dahil olmak üzere birçok klinik durumda kullanılmaktadır. IFN γ antiproliferatif, antianjiyogenik ve proapoptotik özelliklerinden dolayı antikanser bir ajan olarak kullanılmaktadır (Miller vd 2009). Fakat hücreSEL, mikroçevresel ve moleküler yapıya bağlı olarak proliferatif ve antiapoptotik sinyalizasyon gibi protümör aktivite de gösterebilmektedir (Zaidi ve Merlino 2011). Yang ve arkadaşları servikal kanser hücre hatları olan HeLA ve SiHa hücre hatları ile yaptıkları çalışmada yalnız IFN γ uygulanan ve IFN γ + apigenin uygulanan dozları karşılaştırdıklarında IFN γ + 10 μ M apigenin uygulanan grupta hücre canlılığının tekli doza göre anlamlı bir şekilde düştüğü görülmüştür. Ayrıca yapılan apoptoz ve hücre döngüsü analizleri sonucunda ise IFN γ + 10 μ M apigenin kombine tedavisinin Cdk-1'i hedef alarak hücre döngüsünün durdurulmasına neden olduğu belirlenmiştir. Böylece apigeninin IFN γ 'nın antikanser aktivitesini hızlandırdığı görülmüştür (Yang vd 2017).

Kanser tedavisinde karşılaşılan sorunlardan biri olan mevcut ilaca karşı geliştirilen direnç tedavideki başarıyı olumsuz etkilemektedir. Kombine tedaviler kullanılan ilaca karşı geliştirilen direnci kırmak için de etkili ve umut vaad eden bir potansiyele sahiptir. SKOV3 ovaryum kanseri hücre hatlarında yapılan çalışmada taxol dirençli SKOV3 hücrelerinde 40 μ M apigeninin Axl ve Tyro3 reseptör tirozin kinazlarını downregüle ederek taxol direncini ortadan kaldırdığı ve antikanser etkinliğini hızlandırdığı görülmüştür (Suh vd 2015). HSK tedavisinde karşılaşılan en büyük sorunlardan biri de hastaların 6 ay içerisinde sorafenibe karşı direnç geliştirerek tedavinin başarısız olmasıdır. Bu çalışmalardan yola çıkarak apigeninin sorafenib direncinin ortadan kaldırılmasına ve sorafenibin antikanser etkinliğinin hızlandırılmasında etkili olabileceği

düşünülmektedir. Bu tez çalışmasının da sorafenib direncinin aşılması ile ilgili uzun vadeli ve ileri çalışmalara ışık tutabileceği öngörülmektedir.

Cisplatin, birçok kanser türünde terapotik etkileri kanıtlanmış, platinyum içeren antikanser ilaçlar sınıfının bir üyesidir (Chanber ve Roberts 2005; Billecke vd 2006). Cisplatin birkaç farklı yol ile DNA'ya çapraz bağlar ile bağlanarak mitoz bölünmeyi engeller. DNA'da meydana gelen hasarlar sonucu DNA tamir mekanizması uyarılır ve eğer hasar tamir edilmezse apoptotik mekanizmalar aktive edilir (Mendes vd 2011). Cisplatin genel olarak çoğu kanser türünde etkili bir ajandır fakat özellikle akciğer kanseri, kolorektal kanser, prostat kanseri ve ovaryum kanseri başta olmak üzere bazı kanser türlerinde cisplatin direnci gelişerek tedavinin başarısız olmasına neden olur (Galluzzi vd 2012). HeLa, A549, HCT116, H1299 ve MCF-7 gibi birçok farklı kanser türüne ait hücre hatları ile yapılan çalışmada cisplatin ile birlikte uygulanan 30 µM apigeninin hücrelerdeki proliferasyonu yüksek oranda inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği, p53'e bağlı olarak DNA hasarını arttırdığı görülmüştür. Böylece apigeninin cisplatinin sitotoksik etkisini önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir (Liu vd 2017). Prostat kanseri hücre hattı olan PC3 ve prostat kanseri kök hücreleriyle yapılan araştırmada 7,5 µM cisplatin ile birlikte uygulanan 15 µM apigeninin yapılan MTT analizi sonucunda hücre canlılığını kontrol ve yalnız cisplatin uygulanan gruba göre oldukça önemli ölçüde düşürdüğü görülmüştür. 48 saatlik kombine uygulama sonunda yapılan western blot analizleri ise kombine grupta tekli gruplara kıyasla protein seviyesinde PI3K/AKT aktivasyonunun ve NF-kB ekspresyonunun baskılandığını göstermiştir (Erdogan vd 2017). Larinks kanseri hücre hattı olan Hep-2 hücre hattında yapılan çalışmalarda cisplatin ile birlikte uygulanan 40 µM apigeninin GLUT-1 ve p-AKT inhibisyonuna neden olarak hücrelerin cisplatin hassasiyetini hızlandırdığı görülmüştür (Xu vd 2014).

HSK hücre hatları olan SK-Hep-1 ve BEL-7402 hücre hatları ve SK-Hep-1 hücre hatları ile oluşturululan HSK ksenograft model atimik nude farelerde *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan 20 ksenograft fare her grupta 5 fare olmak üzere kontrol, yalnız apigenin (20 mg/kg), yalnız 5-Fluorourasil (5-FU) (20 mg/kg) ve apigenin + 5-FU gruplarına ayrılmış ve subkutan olarak dozlar uygulanmıştır. 20 günün sonunda yapılan analizlerde apigenin + 5-FU uygulanan gruptaki tümör hacminin kontrol ve tekli doz gruplarına göre oldukça küçük olduğu gözlemlenmiştir. Apigenin, 5-FU ve kombine uygulamasının sitotoksik etkilerinin araştırılması için SK-Hep-1 ve BEL-7402 hücre hatlarına apigeninin 0, 2, 4, 8, 10, 12,5, 16, 50 ve 100 µM, 5-FU için ise 0, 5, 10, 50, 100, 200, 500, 800 ve 1000 µg/ml dozları kullanılarak 48 saat sonunda MTT analizi ile doza bağlı hücre canlılıkları analiz edilmiştir. SK-Hep-1 hücre hattı için apigeninin

IC₅₀ dozu 18 µM olarak bulunurken BEL-7402 hücre hattı için 37 µM olarak bulunmuştur. 5-FU için ise SK-Hep-1 hücre hattı IC₅₀ dozu 431 µg/ml, BEL-7402 hücre hattı için 660 µg/ml olarak belirlenmiştir. Kombine uygulama için apigeninin 0, 5, 10, 15, 30 µM, 5-FU için ise 0, 100, 300 ve 500 µg/ml dozları kombine olarak uygulanmıştır. Apigenin ve 5-FU kombine uygulamasının doza bağlı olarak hücre canlılığını kontrol ve tekli doz gruplarına göre anlamlı bir şekilde düşürdüğü görülmüştür. 4 µM apigenin + 100mg/ml 5-FU ve tekli doz grupları 48 saat sonunda Annexin PI yöntemi ile analiz edildiğinde kombine grupta apoptoza giren hücre sayısının kontrol ve tekli dozlara göre anlamlı bir artış gösterdiği görülmüştür. Ardından ksenograft fareler ile yapılan *in vivo* çalışmada 20 mg/kg apigenin + 20 mg/kg 5-FU ve tekli dozlar verilen farelerden alınan tümör kesitleri ile gerçekleştirilen TUNEL testi ile kombine grupta DNA hasarının diğer gruplara oranla daha fazla olduğu görülmüştür (Hu vd 2015). Johnson ve arkadaşlarının pankreas kanseri hücre hattı olan BxPC-3 hücre hattında yaptıkları çalışmada ise 5-FU ile birlikte uygulanan apigeninin NF-κB ve p65'i düşürerek 5-FU'nun antiproliferatif etkisini arttırdığı görülmüştür (Johnson vd 2013).

Topoizomeraz II inhibitör ajanları olan doxorubicin ve etoposide hücrede doza bağımlı olarak ATP seviyesini düşürürken kaspaz-3 aktivitesini arttırmaktadır. Doxorubicin ve apigeninin kombine uygulaması CCRF, CEM ve Jurkat lösemi hücre hatlarında sinerjik olarak ATP'nin indirgenmesini sağladığı görülmüştür. Etoposide ve apigeninin kombine uygulaması ise THP-1 miyeloid lösemi hücre hattında ATP seviyesinin düşmesine neden olmuştur. Apigeninin diğer ajanlarla birlikte kullanımının sitotoksik etkiyi arttırdığı görülmüştür (Mahbub vd 2015).

PI3K/AKT ve d Ras/ERK yolları hücre sağkalımı ve proliferasyonu için transmembran reseptörlerinden çekirdeğe sinyal taşıyan en önemli iki sinyalizasyon kaskadıdır. (12, 13) ABT-263 (Navitoclax), oral olarak kullanılan ABT-737 analogudur. BH3 mimetik inhibitörleri Mcl-1 veya A1 dışındaki *Bcl-XL*, *Bcl-2* ve *Bcl-w* gibi *Bcl-2* ailesi proteinlerinin fonksiyonlarını bloke ederek apoptozu indüklemektedir. ABT-263'ün lösemi veya solid tümörlere karşı kullanılan diğer FDA onaylı diğer ilaçlarla kombine olarak kullanılması klinik olarak denenmektedir. Fakat yüksek oranda Mcl-1 ekspresyonu gösteren tümör hücreleri ABT-263 veya ABT-737'ye karşı direnç göstermektedir. Fakat diğer ajanlar ile Mcl-1 ekspresyonu sınırlandırılarak direncin ortadan kaldırılması ve ABT-263'ün anti tümör etkinliğinin artırılması hedeflenmektedir. Kolon kanseri hücre hatları olan HCT116 ve DLD1 hücrelerinde ABT-263 ile birlikte kullanılan apigeninin yalnız Mcl-1 ekspresyonunu inhibe etmediği bunun yanısıra AKT ve ERK sinyal

yolaklarını da inaktive ettiği ve Bim ekspresyonunu upregüle ederek apoptozu hızlandırdığı görülmektedir (Shao vd 2013).

MicroRNA'lar (miRNA'lar), son zamanlarda keşfedilen tümör baskılayıcı veya onkogen olarak görev yapan, küçük, kodlamayan RNA'lardır. Son zamanlarda kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde etkili ajanlar olarak kullanılmaktadır. Li ve arkadaşları glioblastoma (GBM) hücrelerinde yüksek seviyede eksprese edilen miR-423-5p adında yeni bir miRNA tanımlamıştır (Li vd 2017). miR-423-5p inhibitörü transfekte edilen GBM hücrelerinde 48 saat sonunda yapılan MTT analizlerine göre miR-423-5p inhibitörü transfekte edilen grupta hücre büyümesi inhibisyon oranı dikkat çekici bir şekilde artmıştır fakat apoptoz oranında anlamlı bir değişiklik görülememiştir. Bu veriler doğrultusunda miR-423-5p'nin glioblastom kök hücrelerinde bir onkogen olarak görev yaptığı belirtilmiştir. Yapılan son çalışmalarda apigeninin glioblastoma hücre hattı olan U87 hücrelerinde hücre büyümesini inhibe ettiği ve U251 hücrelerinde glioblastoma kök hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur. Yapılan çalışmada yalnız apigeninin glioblastoma kök hücrelerinde apoptoz üzerine bir etki göstermediği tespit edilmiştir. Fakat miR-423-5p knockdownu ile birlikte uygulanan apigeninin doza bağımlı olarak glioblastoma kök hücrelerinde dikkat çekici bir şekilde proliferasyonu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği tespit edilmiştir. Yapılan western blot analizleri ile de miR-423-5p inhibitörü + apigenin uygulanan grupta *Bax/Bcl-2* oranının değiştiği, sitokrom-c seviyesinin arttığı, Apaf-1'in indüklendiği ve *kaspaz-3* aktivasyonunun arttığı tespit edilmiştir. Böylece apigeninin miR-423-5p inhibitörü ile birlikte kullanımının glioblastoma kök hücrelerinde apoptozu hızlandırdığı kanıtlanmıştır (Wan vd 2017). Bu çalışmada ise sorafenib ve apigeninin kombine uygulamasının tekli dozlarla karşılaştırıldığında mRNA seviyesinde *kaspaz-3*, *kaspaz-8* ve *kaspaz-10* ekspresyonunu arttırdığı ve böylece apoptozu dış yolak üzerinden indüklemiş olabileceği yapılan gerçek zamanlı PZR analizleri sonucu tespit edilmiştir. Apigenin ve sorafenibin apoptozun dış yolağı üzerindeki moleküler hedeflerinin ve etki mekanizmasının tam olarak anlaşılması için daha detaylı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Bu tez kapsamında elde edilen veriler sorafenibin ve apigeninin IC₅₀ dozlarının altında seçilmiş iki dozunun kombine uygulamasının kontrol ve tekli doz gruplarına kıyasla sorafenibin sitotoksik etkinliğini hızlandırdığı ve apoptozu indüklediği açık bir şekilde görülmüştür. Sorafenib ve apigeninin kombine uygulamasının düşük dozlarda hücrelerde apoptozun indüklenmesini sağlayabileceği düşünülmektedir. Ayrıca sorafenibin normal hücrelere olan sitotoksik etkisinin en aza indirgenebilmesinin apigenin ile kombine uygulanması sonucu mümkün olabileceği düşünülmekte fakat ileri

çalışmalar gerektirmektedir. Ayrıca sorafenib tedavisinde en sık karşılaşılan sorun hastaların kısa süre içerisinde sorafenibe karşı direnç geliştirmesidir. Yapılan literatür taramaları sonucunda elde edilen bilgilere göre apigeninin mevcutta kullanılan ilaçlara karşı gelişen direnci kombine kullanım sonucunda üstesinden gelerek ilacın antikanser özelliğini arttırdığı bildirilmiştir. HSK tedavisinde de sorafenib direncinin aşılması ve sorafenibin antikanser etkinliğinin artırılması için apigenin umut vaat eden bir flavonoid olduğu ve bunun için ileri in vitro ve in vivo çalışmalar gerektiği düşünülmektedir. Tüm bunlar doğrultusunda apigeninin klinik tedavide etkin olarak kullanılabilmesi için apoptoz ve hücre döngüsü üzerindeki moleküler etkileri ve direkt hedeflerinin belirlenebilmesi, farklı kanser tiplerinde kullanımı için uygun doz ve sürelerin belirlenmesi için bu çalışmanın bir temel oluşturabileceği ve ileri in vitro ve in vivo çalışmalar ile desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir.



6. SONUÇ

Bu tez kapsamında HepG2 insan HSK hücre hattında sorafenib ve apigeninin düşük dozlarda ve sürede kombine uygulamasının tümör hücrelerinin canlılığını istatistiksel olarak tekli doz gruplarından daha etkili bir şekilde azalttığı ve aynı zamanda apoptozu indüklediği saptanmıştır.

Sorafenib HSK tedavisi için mevcutta kullanılan tek kemoterapotik ajandır. Fakat sorafenibin sağlık hücreler üzerinde de sitotoksik etki göstermesi ve hastaların kısa süre içerisinde sorafenibe karşı direnç geliştirmesi tedavideki başarıyı düşürmektedir.

Apigenin ise antikanser özelliklerinin yanısıra sağlıklı hücreler üzerinde düşük sitotoksositeye sahip bir flavonoiddir. Literatür taramaları da göz önünde bulundurulduğunda elde ettiğimiz veriler apigeninin sorafenibin antikanser etkisini hızlandırdığı ve arttırdığı yönündedir. Ayrıca yine literatürdeki çalışmalardan yola çıkarak apigeninin sorafenib direncinin üstesinden gelmek ve etkinliğini arttırmak için de umut vaad eden bir bileşik olabileceği düşünülmektedir.

Elbette apigeninin rutin sorafenib tedavisi yanında yer alması, uygun doz ve tedavi şekillerinin belirlenmesi için için daha fazla araştırma ve ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu bağlamda yapılan tez çalışmasının HepG2 hücre hattında sorafenib ile apigeninin kombine uygulamasının ilk defa denenmiş olması yönünden özgün olduğu ve bu sebeple ileri araştırmalara bir temel sağlayarak kaynak olabileceği düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

Adams JM, Cory S. Life or death decisions by the Bcl-2 family. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 61-6.

Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 390-7.

Aksit, H. ve Bildik, A. (2008), "Apoptosis," *YYÜ. VETERİNERLİK FAKÜLTESİ DERGİSİ*, 19(1), 55-63.

Alkofer, B., V. Lepennec, and L. Chiche, Hepatocellular cancer in the non-cirrhotic liver. *J Visc Surg*, 2011. 148(1): p. 3-11.

Angulo P, Kaushik G, Subramaniam D, Dandawate P, Neville K, Chastain K, Anant S. Natural compounds targeting major cell signaling pathways: a novel paradigm for osteosarcoma therapy. *J Hematol Oncol*. 2017; 10:10.

Arbuthnot P, and Kew M. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *Int J Exp Pathol* 82, 77-100 (2001).

Beasley RP. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 61, 1942-1956 (1988).

Belghiti j, Regimbeau JM, Durand F, et al. Resection of hepatocellular carcinoma: a European experience of 328 cases. *Hepatogastroenterology* 2002; 49:41-46.

Billecke C, Finniss S, Tahash L, Miller C, Mikkelsen T, Farrell NP and Böglér O: Polynuclear platinum anticancer drugs are more potent than cisplatin and induce cell cycle arrest in glioma. *Neuro Oncol* 8: 215-226, 2006.

Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature*, 2007; 447: 396–398.

Birt DF, Walker B, Tibbels MG, Bresnick E. Anti-mutagenesis and antipromotion by apigenin, robinetin and indole-3-carbinol. *Carcinogenesis*. 1986; 7:959–63.

Borie, F., et al., Treatment and prognosis of hepatocellular carcinoma: a population based study in France. *J Surg Oncol*, 2008. 98(7): p. 505-9.

Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004;127:S5–16.

Bos J. (1989), "ras Oncogenes in Human Cancer: A Review," *Cancer Res.*, 49 (17), 49-4682.

Bosman F.T., C.F., Hruban R.H., Theise N.D. (Eds): WHO Classification of Tumours of the Digestive System, **IARC**: Lyon 2010: p. 205-216. 5.

Bozkaya G. Hepatosellüler karsinoma gelişiminde hepatosit büyüme faktörü/c-Met yolağı ile Musin1 ve Musin20 arasındaki etkileşimin rolü. **Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, İzmir, 2009.

Budhreja A, Gao N, Zhang Z, Son YO, Cheng S, Wang X, Ding S, Hitron A, Chen G, Luo J, Shi X. Apigenin induces apoptosis in human leukemia cells and exhibits anti-leukemic activity in vivo. **Mol Cancer Ther.** 2012;11:132–42.

Burt, A.D., et al. (2012). MacSween's Pathology of the Liver, **Churchill Livingstone/Elsevier** p. 773-798.

Cabadak, H. (2008), "Hücre Siklusu ve Kanser," **ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi**, 9(3), 51-61.

Carlomagno F, Anaganti S, Guida T, et al. BAY 43-9006 inhibition of oncogenic RET mutants. **J Natl Cancer Inst** 2006;98:326–34.

Chabner BA and Roberts TG Jr: Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. **Nat Rev Cancer** 5: 65-72, 2005.

Chang MH, Chen CJ, Lai MS (1997) Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. **N Engl J Med**; 336:1855–1859.

Chen CJ, Yu MW, and Liaw YF. Epidemiological characteristics and risk factors of hepatocellular carcinoma. **J Gastroenterol Hepatol** 12(Suppl), 294-308 (1997).

Chen KF, Tai WT, Liu TH, Huang HP, Lin YC, Shiau CW, Li PK, Chen PJ, Cheng AL. Sorafenib overcomes TRAIL resistance of hepatocellular carcinoma cells through the inhibition of STAT3. **Clin Cancer Res.** 2010; 16(21):5189–5199. [PubMed: 20884624]

Chen M, Wang X, Zha D, Cai F, Zhang W, He Y, Huang Q, Zhuang H, Hua ZC. Apigenin potentiates TRAIL therapy of non-small cell lung cancer via upregulating DR4/DR5 expression in a p53-dependent manner. **Sci Rep.** 2016;6:35468.

Chunhua L, Donglan L, Xiuqiong F, Lihua Z, Qin F, Yawei L, Liang Z, Ge W, Linlin J, Ping Z, Kun L, Xuegang S. Apigenin up-regulates transgelin and inhibits invasion and migration of colorectal cancer through decreased phosphorylation of AKT. **J Nutr Biochem.** 2013;24:1766–75.

Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nat Rev Cancer** 2002; 2: 647-56.

Cummings, M.C., Winterford, C.M. ve Walker, N.I. (1997), "Apoptosis," **Am J Surg Pathol.**, 21(1), 862.

Curtin, J.F. ve Cotter, T.G. (2003), "Apoptosis: Historical Perspectives," **Assays Biochem.**, 39, 1-10.

Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H. (1999), "Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis," **Annual Review of Biochemistry**, 68, 383-424.

Ekshyyan, O. ve Aw, T.Y. (2004), "Apoptosis in Acute and Chronic Neurological Disorders," *Frontiers in Bioscience*, 9, 1567-1576.

El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 2007;132: 2557-2276.

El-Serag HB, Marrero JA, Rudolph L, et al (2008) Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008 May; 134(6): 1752–63

Erdogan S, Doganlar O, Doganlar ZB, Serttas R, Turkecul K, Dibirdik I, Bilir A. The flavonoid apigenin reduces prostate cancer CD44(+) stem cell survival and migration through PI3K/Akt/NF-kappaB signaling. *Life Sci*. 2016;162:77–86.

Erdogan S, Turkecul K, Serttas R, Erdogan Z. The natural flavonoid apigenin sensitizes human CD44+ prostate cancer stem cells to cisplatin therapy. *Biomed Pharmacother*. 2017;88:210–7.

Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Freeman S, Schwartz B, Shan M, Simantov R, Bukowski RM; TARGET Study Group.(2007): Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma, *N Engl J Med* 356(2) 125-34.

Evans AE, Land VJ, Newton WA, Randolph JG, Sather HN, Tefft M. Combination chemotherapy (vincristine, adriamycin, cyclophosphamide, and 5-fluorouracil) in the treatment of children with malignant hepatoma. *Cancer*. Sep 1 1982;50(5):821-6.

Ezzoukhry Z, Louandre C, Trécherel E et al (2012) EGFR activation is a potential determinant of primary resistance of hepatocellular carcinoma cells to sorafenib. *Int J Cancer*. 2012 Dec 15;131(12):2961-9

Feitelson MA, Sun B, Tufan NLS, Liu J, Pan J, Lian Z. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene*, 2002;21:2593-2604.

Fesik SW, Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer* 2005;5,876-885.

Fischer, U., Schulze-Ostoff, K. (2005), "Apoptosis-based therapies and drug targets," *Cell Death and Differentiation*, 12, 942-961.

Frei E, Eder JP (2003) Combination Chemotherapy *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition.

Furuse J.(2008): Sorafenib for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma, *Biologics* Dec,2(4) 779-88.

Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M and Kroemer G: Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 31: 1869-1883, 2012.

Ganten TM, Haas TL, Sykora J, Stahl H, Sprick MR, Fas SC, Krueger A, Weigand MA, Grosse-Wilde A, Stremmel W, Krammer PH, Walczak H. Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitisation of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs. *Cell Death Differ*. 2004; 11(Suppl 1):S86–96. [PubMed: 15105837]

Gao Y, Ruan B, Liu W et al (2015) Knockdown of CD44 inhibits the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma both in vitro and in vivo by reversing epithelial-mesenchymal transition.; **Oncotarget** 6(10): 7828–7837.

Garrett MD. Cell cycle control and cancer. **Current Sci** 2001; 81: 515–522

Gedaly R, Angulo P, Hundley J, Daily MF, Chen C, Koch A, Evers BM. PI-103 and sorafenib inhibit hepatocellular carcinoma cell proliferation by blocking Ras/Raf/MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways. **Anticancer Res.** 30(12):4951-8 (2010).

Gewies, A. (2003), **ApoReview** – Introduction to Apoptosis. <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/apointro.pdf>

Gong WF, Zhong JH, Lu SD et al (2017) Effects of antiviral therapy on post-hepatectomy HBV reactivation and liver function in HBV DNA-negative patients with HBV-related hepatocellular carcinoma. **Oncotarget** Feb 28; 8(9): 15047–15056.

Green, D.R. ve Kromer, G. (2004), “The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death,” **Science**, 305(5684), 626-629.

Gupta, S., Afaq, F., Mukhtar, H. 2001. “Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cellis.” **Biochem Biophys Res Commun.**, 287, 914-920.

Gupta S, Afaq F, Mukhtar H. Involvement of nuclear factor-kappa B, Bax and Bcl-2 in induction of cell cycle arrest and apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma cells. **Oncogene.** 2002;21:3727–38.

Hasnat MA, Pervin M, Lim JH, Lim BO. Apigenin attenuates melanoma cell migration by inducing anoikis through integrin and focal adhesion kinase inhibition. **Molecules.** 2015;20:21157–66.

Hikita H, Takehara T, Shimizu S, Kodama T, Shigekawa M, Iwase K, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib. **Hepatology.** 2010; 52(4):1310–1321. [PubMed: 20799354]

Hood JD, Bednarski M, Frausto R, Guccione S, Reisfeld RA, Xiang R, Cheresch DA. (2002): Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature, **Science** Jun 28, 296(5577) 2404-7.

Huang C, Wei YX, Shen MC, Tu YH, Wang CC, Huang HC. Chrysin, abundant in *Morinda citrifolia* fruit water-EtOAc extracts, combined with apigenin synergistically induced apoptosis and inhibited migration in human breast and liver cancer cells. **J Agric Food Chem.** 2016;64:4235–45.

Huynh H, Ngo VC, Koong HN et al (2009) Sorafenib and rapamycin induce growth suppression in mouse models of hepatocellular carcinoma. **J Cell Mol Med.** ;13:2673–2683

Hu XW, Meng D, Fang J. Apigenin inhibited migration and invasion of human ovarian cancer A2780 cells through focal adhesion kinase. **Carcinogenesis.** 2008;29:2369–76.

Hu XY, Liang JY, Guo XJ, Liu L, Guo YB. 5-Fluorouracil combined with apigenin enhances anticancer activity through mitochondrial membrane potential (DeltaPsm)-

mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma. ***Clin Exp Pharmacol Physiol.*** 2015;42:146–53.

Huynh H, Ngo VC, Koong HN et al (2010) AZD6244 enhances the anti-tumor activity of sorafenib in ectopic and orthotopic models of human hepatocellular carcinoma (HCC) ***J Hepatol*** ;52:79–87.

Ichim G, Tait SWG (2016) A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. ***Nature Reviews Cancer*** 16, 539–548 doi:10.1038/nrc.2016.58

Janssen, K., Mensink, R. P., Cox, F. J., Harryvan, J. L., Hovenier, R., Hollman, P. C., Katan, M. B. 1998. "Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteer: results from an in vitro and a dietary supplement study". ***Am J Clin Nutr.***, 67,255-262.

Johnson JL, de Mejia EG. Interactions between dietary flavonoids apigenin or luteolin and chemotherapeutic drugs to potentiate antiproliferative effect on human pancreatic cancer cells, in vitro. ***Food Chem Toxicol.*** 2013;60:83–91.

Kandas, N.Ö. (2004), "Apoptosis, Programlı Hücre Ölümü," ***Ankara Üniversitesi Dikimevi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi***, 5(1), 7-10.

Ketkaew Y, Osathanon T, Pavasant P, Sooampon S. Apigenin inhibited hypoxia induced stem cell marker expression in a head and neck squamous cell carcinoma cell line. ***Arch Oral Biol.*** 2017;74:69–74.

Kim E. Y., Yu J. S. , Yang M., Kim. A. K. "Sub-Toxic Dose of Apigenin Sensitizes HepG2 Cells to TRAIL through ERK-Dependent Up-Regulation of TRAIL Receptor DR5" ***Mol. Cells*** 35, 32-40, January 31, 2013 DOI/10.1007/s10059-013-2175-2 eISSN: 0219-1032

Kim E. Y., and Kim, A. K. 2012. "Apigenin sensitizes Huh-7 Human Hepatocellular Carcinoma Cells to TRAIL-induced Apoptosis". ***Biomol Ther***, 20(1), 62-67.

Kim SH, Kang JG, Kim CS, Ihm SH, Choi MG, Yoo HJ, Lee SJ. Suppression of AKT potentiates synergistic cytotoxicity of apigenin with TRAIL in anaplastic thyroid carcinoma cells. ***Anticancer Res.*** 2015;35:6529–37.

Kim SH, Kang JG, Kim CS, Ihm SH, Choi MG, Yoo HJ, Lee SJ. Suppression of AKT potentiates synergistic cytotoxicity of apigenin with TRAIL in anaplastic thyroid carcinoma cells. ***Anticancer Res.*** 2015;35:6529–37.

King, K.L. ve Cidlowski, J.A. (1995), "Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death," ***Journal of Cellular Biochemistry***, 58(2), 175- 180

Klug WS, Cummings MR.Genetik. ***Palme Yayıncılık***, Ankara, 2002; 28, s635-651.

Kondo Y, Kanai Y, Sakamoto M, Mizokami M, Ueda R, Hirohashi S. Genetic instability and aberrant DNA methylation in chronic hepatitis and cirrhosis—A comprehensive study of loss of heterozygosity and microsatellite instability at 39 loci and DNA hypermethylation on 8 CpG islands in microdissected specimens from patients with hepatocellular carcinoma. ***Hepatology***,2000; 32: 970-979.

Kunter İ. Hepatosellüler karsinomada IP3 kinaz sinyal yolağının önemi. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, ***Sağlık Bilimleri Enstitüsü***, İzmir, 2007

Lee Y, Sung B, Kang YJ, Kim DH, Jang JY, Hwang SY, Kim M, Lim HS, Yoon JH, Chung HY, Kim ND. Apigenin-induced apoptosis is enhanced by inhibition of autophagy formation in HCT116 human colon cancer cells. *Int J Oncol*. 2014;44:1599–606.

Lee YM, Lee G, Oh TI, Kim BM, Shim DW, Lee KH, Kim YJ, Lim BO, Lim JH. Inhibition of glutamine utilization sensitizes lung cancer cells to apigenin-induced apoptosis resulting from metabolic and oxidative stress. *Int J Oncol*. 2016;48:399–408.

Li S, Zeng A, Hu Q, et al. miR-423-5p contributes to a malignant phenotype and temozolomide chemoresistance in glioblastomas. *Neuro Oncol* 2017; 19(1): 55–65

Lin S., Hoffmann K., and Schemmer P., “Treatment of hepatocellular carcinoma: a systematic review,” *Liver Cancer*, vol. 1, no. 3-4, pp. 144–158, 2012.

Liu L, Cao Y, Chen C, et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res* 2006; 66: 11851–8.

Liu R, Ji P, Liu B, Qiao H, Wang X, Zhou L, Deng T, Ba Y. Apigenin enhances the cisplatin cytotoxic effect through p53-modulated apoptosis. *Oncol Lett*. 2017;13:1024–30.

Liu X, Li L, Lv L, Chen D, Shen L, Xie Z. Apigenin inhibits the proliferation and invasion of osteosarcoma cells by suppressing the Wnt/betacatenin signaling pathway. *Oncol Rep*. 2015;34:1035–41.

Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003;362:1907–17.

Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. Jul 24 2008;359(4):378-90.

Lotem, J. ve Sachs, L. (2002), “Cytokine control of developmental programs in normal hematopoiesis and leukemia,” *Oncogene*, 21(21), 3284-3254.

Lozano, G. ve Elledge, S. J. (2000), “p53 sends nucleotides to repair DNA,” *Nature*, 404, 24-25.

Mahbub AA, Le Maitre CL, Haywood-Small SL, Cross NA, Jordan-Mahy N. Polyphenols act synergistically with doxorubicin and etoposide in leukaemia cell lines. *Cell Death Discov*. 2015;1:15043.

Mahmood S, Niiyama G, Kamei A et al (2005) Influence of viral load and genotype in the progression of Hepatitis B associated liver cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Liver Int*.; 25:220-225.

Mendes F, Groessl M, Nazarov AA, Tsybin YO, Sava G, Santos I, Dyson PJ and Casini A: Metal-based inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase-the guardian angel of DNA. *J Med Chem* 54: 2196-2206, 2011

Meng S, Zhu Y, Li JF, Wang X, Liang Z, Li SQ, Xu X, Chen H, Liu B, Zheng XY, Xie LP. Apigenin inhibits renal cell carcinoma cell proliferation. *Oncotarget*. 2017;8:19834–42.

Miao V, Legal MFC, Brown D et al (2001) Genetic approaches to harvesting lichen products. *Trends in Biotechnol*; 19: 349-355.

Miller CH, Maher SG, Young HA. Clinical use of interferon-gamma. **Ann N Y Acad Sci.** 2009; 1182: 69-79.

Newell P, Toffanin S, Villanueva A, Chiang DY, Minguez B, Cabellos L, Savic R, Hoshida Y, Lim KH, Melgar-Lesmes P, Yea S, Peix J, Deniz K, Fiel MI, Thung S, Alsinet C, Tovar V, Mazzaferro V, Bruix J, Roayaie S, Schwartz M, Friedman SL, Llovet JM. Ras pathway activation in hepatocellular carcinoma and anti-tumoral effect of combined sorafenib and rapamycin in vivo. **J Hepatol.** 2009; 51(4):725–733. [PubMed: 19665249]

Nguyen VTT, Law MG, Dore GJ (2009) Hepatitis B-related hepatocellular carcinoma: epidemiological characteristics and disease burden J. **Viral Hepat.** 16. 453–463

Nissen NN, Martin P (2002) Hepatocellular carcinoma: the high-risk patient. **J.Clin. Gastroenterol.**; 35:79-85.

Oishi M, Iizumi Y, Taniguchi T, Goi W, Miki T, Sakai T. Apigenin sensitizes prostate cancer cells to Apo2L/TRAIL by targeting adenine nucleotide translocase-2. **PLoS ONE.** 2013;8:e55922

Ou DL, Shen YC, Liang JD, Liou JY, Yu SL, Fan HH, Wang DS, Lu YS, Hsu C, Cheng AL. Induction of Bim expression contributes to the antitumor synergy between sorafenib and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase inhibitor CI-1040 in hepatocellular carcinoma. **Clin Cancer Res.** 2009; 15(18):5820–5828. [PubMed: 19737956]

Ou DL, Shen YC, Yu SL, Chen KF, Yeh PY, Fan HH, Feng WC, Wang CT, Lin LI, Hsu C, Cheng AL. Induction of DNA damage-inducible gene GADD45beta contributes to sorafenib-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. **Cancer Res.** 2010; 70(22):9309–9318. [PubMed: 21062976]

Özçelik B, Kartal M, Orhan I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. **Pharm Biol.** 2011;49:396–402.

Özçimen, A. (2005), Steroid'in HL-60 (İnsan Akut Miyeloid Lösemi) Hücre Hattında, Apoptoz ve Farklılaşma Üzerindeki Etkisi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, **Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Ankara.

Papay ZE, Kosa A, Boddi B, Merchant Z, Saleem IY, Zariwala MG, Klebovich I, Somavarapu S, Antal I. Study on the pulmonary delivery system of apigenin-loaded albumin nanocarriers with antioxidant activity. **J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.** 2017;30:274–88.

Park BC, Huh MH, Seo JH. Differential expression of transforming growth factor alpha and insulin-like growth factor II in chronic active hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. **J Hepatol,** 1995;22:286-294.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. Cancer incidence in five continents. **IARC Sci Publ,** 2002;155:1-781.

Park, M., ve Lee, S. (2003), "Cell Cycle and Cancer," **Journal of Biochemistry and Molecular Biology,** 36(1), 60-65.

Patel, D., Shukla, S., and Gupta, S. 2007. "Apigenin and cancer chemoprevention; progress, potential and promise". **Int. J. Onco.,** 30,233-245.

Pecorino, L. (2008), *Molecular Biology of Cancer*, Oxford University Press Inc., New York.

Pınarbası, E. (2007), "Apoptosis (Programlı Hücre Ölümü)," *Moleküler Biyoloji*, (Ed: Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karatas, M. ve Tanyola., B.), *Nobel Yayın Dağıtım*, Ankara, 423-467.

Piguet AC, Saar B, Hlushchuk R et al (2011) Everolimus augments the effects of sorafenib in a syngeneic orthotopic model of hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther.* ;10:1007–1017.

Planas-Silva MD, Weinberg RA. Estrogen-dependent cyclin E-cdk2 activation through p21 redistribution. *Mol Cell Bio* 1997; 17: 4059–4069.

Puri, P.L., Maclachlan, T.K., Levrero, M. ve Giordano, A. (1999), "The Intrinsic Cell Cycle: From Yeast to Mammals," *The Molecular Basis of Cell Cycle and Growth Control*, (Ed: Stein, G.S., Baserga, R., Giordano, A., ve Denhardt, D.T.), *A John Wiley & Sons*, Inc., United States America, 15-80.

Rahmani M, Davis EM, Bauer C, Dent P, Grant S. Apoptosis induced by the kinase inhibitor BAY 43-9006 in human leukemia cells involves down-regulation of Mcl-1 through inhibition of translation. *J Biol Chem* 2005;280:35217–27.

Raidl M, Pirker C, Schulte-Hermann R, Aubele M, Kandioler-Eckersberger D, Wrba F, Micksche M, Berger W, Grasl-Kraupp B. Multiple chromosomal abnormalities in human liver (pre)neoplasia. *J Hepatol*, 2004;40:660-668.

Ratain MJ, Eisen T, Stadler WM, Flaherty KT, Kaye SB, Rosner GL, Gore M, Desai AA, Patnaik A, Xiong HQ, Rowinsky E, Abbruzzese JL, Xia C, Simantov R, Schwartz B, O'Dwyer PJ. (2006): Phase II placebo-controlled randomized discontinuation trial of sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma, *J Clin Oncol* 24 (16) 2505-12.

Ricci, J.E., Waterhouse, N. ve Green, D.R. (2003), "Mitochondrial functions during cell death, a complex (I-V) dilemma," *Cell Death & Differentiation*, 10(5), 488-492.

Ross, J. A., and Kasum, C. M. 2002. "Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety". *Annu Rev Nutr.*, 22, 19-34.

Ruela-de-Sousa RR, Fuhler GM, Blom N, Ferreira CV, Aoyama H, Peppelenbosch MP. Cytotoxicity of apigenin on leukemia cell lines: implications for prevention and therapy. *Cell Death Dis.* 2010;1:e19.

Saunders, M.W., Birchall, M.A. (1998), "Molecular Biology Series Apoptosis, Matters of Life and Death," *The Journal of Laryngology and Otology*, 112, 822-826.

Schroter, M., Peli, J., Hane, M., Tschopp, J. ve Reichmann, E. (2000), "Fasdependent tissue turnover is implicated in tumor cell clearance," *Oncogene*, 19(14), 1794- 1800.

Selvarajoo K. A systems biology approach to overcome TRAIL resistance in cancer treatment. *Prog Biophys Mol Biol.* 2017;128:142–54.

Seo HS, Jo JK, Ku JM, Choi HS, Choi YK, Woo JK, Kim HI, Kang SY, Lee KM, Nam KW, Park N, Jang BH, Shin YC, Ko SG. Induction of caspase-dependent extrinsic apoptosis by apigenin through inhibition of signal transducer and activator of transcription 3

(STAT3) signalling in HER2-overexpressing BT 474 breast cancer cells. **Biosci Rep.** 2015;35:e00276.

Serbes, U. (2009), "HeLa Hücre Kültürlerinde Apoptoz ve Moleküler Mekanizması," **Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, İstanbul.

Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D et al (2012) Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. **Expert Opin Ther Targets.**; 16(1): 15–31.

Schmieder R, Puehler F, Neuhaus R et al (2013) Allosteric MEK1/2 inhibitor refametinib (BAY 86-9766) in combination with sorafenib exhibits antitumor activity in preclinical murine and rat models of hepatocellular carcinoma. **Neoplasia.** ;15:1161–1171

Shao H, Jing K, Mahmoud E, Huang H, Fang X, Yu C. Apigenin sensitizes colon cancer cells to antitumor activity of ABT-263. **Mol Cancer Ther.** 2013;12:2640–50.

Sherman, M., Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors, and screening. **Semin Liver Dis**, 2005. 25(2): p. 143-54.

Shoup M, Gonen M, Jarnagin WR, DeMatteo RP, Schwartz LH. Vplumetric analysis predicts hepatic dysfunction in patient undergoing major liver rezection. **J Gastrointest Surg** 2003;7:325-333.

Shukla S, Fu P, Gupta S. Apigenin induces apoptosis by targeting inhibitör of apoptosis proteins and Ku70-Bax interaction in prostate cancer. **Apoptosis.** 2014;19:883–94.

S. Lin, K. Hoffmann, and P. Schemmer, "Treatment of hepatocellular carcinoma: a systematic review," **Liver Cancer**, vol. 1, no. 3-4, pp. 144–158, 2012.

Song L, Morris M, Bagui T, Lee FY, Jove R, Haura EB. Dasatinib (BMS-354825) Selectively Induces Apoptosis in Lung Cancer Cells Dependent on Epidermal Growth Factor Receptor Signaling for Survival. **Cancer Res** 2006;66 (11): 5542-5548.

Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, et al. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. **J Histochem Cytochem** 2004; 52: 821-31.

Suh YA, Jo SY, Lee HY, Lee C. Inhibition of IL-6/STAT3 axis and targeting Axl and Tyro3 receptor tyrosine kinases by apigenin circumvent taxol resistance in ovarian cancer cells. **Int J Oncol.** 2015;46:1405–11.

Taneja, N., Tjalkens, R., Philbert, M.A., Rehemtulla, A. (2001), "Irradiation of mitochondria initiates apoptosis in a cell free system," **Oncogene**, 20(2), 167-77.

Tang AQ, Cao XC, Tian L, He L, Liu F. Apigenin inhibits the self-renewal capacity of human ovarian cancer SKOV3 derived sphere-forming cells. **Mol Med Rep.** 2015;11:2221–6.

Tang Z.-Y., "Hepatocellular carcinoma-cause, treatment and metastasis," **World Journal of Gastroenterology**, vol. 7, no. 4, pp. 445–454, 2001.

Tang Z., Zhou X., Lin Z. et al., "Surgical treatment of hepatocellular carcinoma and related basic researchwith special reference to recurrence and metastasis," **Chinese Medical Journal**, vol. 112, no. 10, pp. 887–891, 1999.

Thiede, C., Kim, T.D. ve Neubauer, A. (2000), "Use of p53 as Cancer Cell Target for Gene Therapy," *Apoptosis and Its Modulation by Drugs*, (Ed: Cameron, R.G. ve Feuer, G.), **Springer- Verlag**, Berlin Heidelberg, 236-255.

Thorgeirsson SS, Lee J, Grisham JW. Functional genomics of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2006;43:145-150.

Tong, X., and Pelling, J. 2013. "Targeting the PI3K/Akt/mTOR axis by apigenin for cancer prevention". *Anticancer Agents Med. Chem.*, 13(7), 971-978.

Toylu A. Hepatosellüler karsinoma hücre dizilerinde hipoksi ve radyasyon stresine karşı hücrenin direnç geliştirmesinde HGF sinyal iletimi sisteminin rolünün belirlenmesi. Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2007.

Uzunlimoglu, O., et al., Risk factors for hepatocellular carcinoma in Turkey. *Dig Dis Sci*, 2001. 46(5): p. 1022-8.

Tseng TH, Chien MH, Lin WL, Wen YC, Chow JM, Chen CK, Kuo TC, Lee WJ. Inhibition of MDA-MB-231 breast cancer cell proliferation and tumor growth by apigenin through induction of G2/M arrest and histone H3 acetylation-mediated p21WAF1/CIP1 expression. *Environ Toxicol*. 2017;32:434-44.

Tsujimoto Y. (1998), "Role of Bcl-2 family of proteins in apoptosis, apoptosomes or mitochondria?" *Genes to Cell*, 3(11), 697-707.

Ulukaya, E. (2003), Apoptozis Ders Notları
http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf

Wan Y, Fei X, Wang Z, Jiang D, Chen H, Wang M, Zhou S. miR- 423-5p knockdown enhances the sensitivity of glioma stem cells to apigenin through the mitochondrial pathway. *Tumour Biol*. 2017;39:1010428317695526.

Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK. 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. *Eur J Cancer*. 1999;35:1517-25.

Wang YC, Huang KM. In vitro anti-inflammatory effect of apigenin in the *Helicobacter pylori*-infected gastric adenocarcinoma cells. *Food Chem Toxicol*. 2013;53:376-83.

Web_1:

https://www.google.com.tr/search?q=pearson+education+cell+cycle&rlz=1C1CHZL_trTR727TR727&source=Inms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjH48mkgoDcAhXmBsAKHbzvD18Q_AUICigB&biw=1422&bih=629#imgrc=s0YZZB77ATa07M

Web_2:

https://www.google.com.tr/search?rlz=1C1CHZL_trTR727TR727&biw=1422&bih=629&tbn=isch&sa=1&ei=GRE6W6TlItH4kwW8govICQ&q=apoptosis&oq=apoptos&gs_l=img.1.2.35i39k1l2j0l6j0i10k1j0.13199.14815.0.20321.4.3.1.0.0.0.177.442.0j3.3.0....0...1c.1.64.img..0.3.313....0.wMLKz8Tkm9Q#imgrc=kQ2agPTnXmWgDM

Web_3: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sorafenib#section=Top>

Web_4: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/apigenin#section=Top>

Wei G, Wang M, Hyslop T, Wang Z, Carr BI. Vitamin K enhancement of sorafenib-mediated HCC cell growth inhibition in vitro and in vivo. *Int J Cancer*. Dec 15;127(12):2949-58 (2010).

Wiemann SU, Satyanarayana A, Tshuridu M, Tillmann HL, Zender L, Klempnauer J, Flemming P, Franco S, Blasco MA, Manns MP, Rudolph KL. Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J*, 2002;16:935–942.

Wilhelm SM, Carter C, Tang L, et al. 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* 2004;64:7099–109.

Willingham, M. C. (1999), "Cytochemical Methods for The Detection of Apoptosis," *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47(9), 1101 - 1109.

Wolf, B.B. ve Green, D.R. (2002), "Apoptosis: Letting Slip the Dogs of War," *Curr. Biol.*, 12(5), 177-179.

Wong CM, Ng IO. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int*, 2008;28:160-174.

Xu M, Wang S, Song YU, Yao J, Huang K, Zhu X. Apigenin suppresses colorectal cancer cell proliferation, migration and invasion via inhibition of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Oncol Lett*. 2016;11:3075–80.

Xu YY, Wu TT, Zhou SH, Bao YY, Wang QY, Fan J, Huang YP. Apigenin suppresses GLUT-1 and p-AKT expression to enhance the chemosensitivity to cisplatin of laryngeal carcinoma Hep-2 cells: an in vitro study. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7:3938–47.

Yan X, Qi M, Li P, Zhan Y ve Shao H "Apigenin in cancer therapy: anti- cancer effects and mechanisms of action" *Cell Bioscience* 2017 7:50 DOI10.1186/s13578-017-0179-x

Yang PM, Chou CJ, Tseng SH, Hung CF. Bioinformatics and in vitro experimental analyses identify the selective therapeutic potential of interferon gamma and apigenin against cervical squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2017;8:46145–62.

Yu C, Bruzek LM, Meng XW, et al. The role of Mcl-1 downregulation in the proapoptotic activity of the multikinase inhibitor BAY 43-9006. *Oncogene* 2005;24: 6861–9.

Yurdacan B. Hepatoselüler karsinomada üsnik asit ve sorafenibin kombin tedavi olarak anti-tümöral etkilerinin araştırılması. *Yüksek lisans tezi, Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı*, Bursa, 2017 s.14.

Zaidi MR, Merlino G. The two faces of interferon-gamma in cancer. *Clin Cancer Res*. 2011; 17: 6118-6124.

Zhang, H. (2007), "Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging," *J Cell Physiol*, 210(3), 567-574.

Zhang, Y., Zhang, B., Zhang, A et al (2012). Synergistic growth inhibition by sorafenib and vitamin K2 in human hepatocellular carcinoma cells. *Clinics*, 67(9), 1093-1099.

Zhao G, Han X, Cheng W, Ni J, Zhang Y, Lin J, Song Z. Apigenin inhibits proliferation and invasion, and induces apoptosis and cell cycle arrest in human melanoma cells. ***Oncol Rep.*** 2017;37:2277–85.

Zhou Z, Tang M, Liu Y, Zhang Z, Lu R, Lu J. Apigenin inhibits cell proliferation, migration, and invasion by targeting Akt in the A549 human lung cancer cell line. ***Anticancer Drugs.*** 2017;28:446–56.

Zhu Y, Wu J, Li S, Wang X, Liang Z, Xu X, Xu X, Hu Z, Lin Y, Chen H, Qin J, Mao Q, Xie L. Apigenin inhibits migration and invasion via modulation of epithelial mesenchymal transition in prostate cancer. ***Mol Med Rep.*** 2015;11:1004–8.

Zhu ZY, Gao T, Huang Y, Xue J, Xie ML. Apigenin ameliorates hypertension- induced cardiac hypertrophy and down-regulates cardiac hypoxia inducible factor- α in rats. ***Food Funct.*** 2016;7:1992–8.



8. ÖZGEÇMİŞ

Nazlı ŞİRİN 1992 yılında Samsun'da doğdu. İlk ve orta öğretimini Ordu Mehmet Akif Ersoy İlköğretim Okulu'nda tamamladı. Lise eğitimini Ordu Cumhuriyet Lisesi'nde tamamladı. 2010 yılında Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji (%30 İngilizce) kazandı. 1 yıl süreyle Pamukkale Üniversitesi Yabancı Diller Yüksek Okulunda İngilizce hazırlık eğitimi aldı. 2011 yılında Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne başladı. 2014 yılında son sınıfta 1 yıl boyunca Erasmus değişim programı ile PAdam Mickiewicz Universty Biology Faculty' Poznan POLONYA'da eğitimine devam etti. 2015 yılında mezun olduktan sonra Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda 1 dönem boyunca özel öğrenci olarak yüksek lisans eğitimine başladı. 2016 Şubat ayında ise asil olarak yüksek lisans eğitimine devam etti. 2017 yaz döneminde 4 ay süreyle Work & Travel programı ile Michigan, Amerika Birleşik Devletleri'nde çalıştı.