



**KARACİĞER KARSİNOMU (HepG2)  
HÜCRELERİNDE  
CİSPLATİN TOKSİKASYONUNA  
ARBUTİNİN ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Hatice EVİN

Danışman  
Doç. Dr. Ömer HAZMAN

KİMYA ANABİLİM DALI

Mayıs 2020

Bu tez çalışması 17.FEN.BİL.10 numaralı proje ile AKÜ-BAPK tarafından desteklenmiştir.

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KARACİĞER KARSİNOMU (HepG2) HÜCRELERİNDE  
CİSPLATİN TOKSİKASYONUNA ARBUTİNİN ETKİLERİ**

**Hatice EVİN**

**Danışman**

**Doç. Dr. Ömer HAZMAN**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**Mayıs 2020**

**BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI**  
**Afyon Kocatepe Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

**03 / 05 / 2020**

**Hatice EVİN**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### KARACİĞER KARSİNOMU (HepG2) HÜCRELERİNDE CİSPLATİN TOKSİKASYONUNA ARBUTİNİN ETKİLERİ

Hatice EVİN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

**Danışman:** Doç. Dr. Ömer HAZMAN

Kanser tedavisinde cerrahi yaklaşım, radyoterapi ve kemoterapi yıllardan beri kullanılmaktadır. Özellikle kemoterapik tedavide kanserli hücre ve dokuların dışında kalan kısımlarda oluşan yan etkileri azaltacak kombine tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi kanser tedavisinin başarı şansını artırmaktadır. Bu nedenle söz konusu yan etkileri azaltacak alternatif yöntemler sıkça araştırmalara konu olmaktadır. Sunulan çalışmada da bir antioksidan olarak arbutinin karaciğer karsinomu (HepG2) hücreleri üzerine olası etkileri ile bir kemoterapik ajan olan cisplatinin oluşturduğu toksikasyona karşı arbutinin HepG2 hücrelerinde etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Arbutin ve cisplatinin antikanserojenik etkinlikte dozları MTT analizleri ile belirlendi. Arbutin izoformlarına ve cisplatinine ait lethal dozlar (LD) belirlendikten sonra deney grupları (Grup 1: Kontrol, Grup 2:LD<sub>0</sub> dozunda  $\alpha$ -arbutin, Grup 3:LD<sub>50</sub> dozunda  $\alpha$ -arbutin, Grup 4: LD<sub>50</sub> dozunda cisplatin Grup 5: Tedavi grubu LD<sub>50</sub> dozunda Cisplatin + LD<sub>0</sub> dozunda  $\alpha$ -arbutin oluşturuldu. Deney gruplarından elde edilen numunelerde biyokimyasal olarak total antioksidan statü (TAS), total oksidan statü (TOS), oksidatif stres indeksi (OSI), proinflamatuvar stokin düzeyleri (TNF- $\alpha$ , IL-6 ve TGF- $\beta$ 1) belirlendi. Moleküler analizlerle ise DNA hasarı (comet testi ile), mikronükleus oluşumu aracılığı ile deney gruplarında yapılan uygulamaların genotoksisiteye etkisi belirlenmeye çalışıldı. Apoptozisle ilgili kaspaz 3 ve proliferasyonla ilgili Bcl-2 genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR yardımıyla analiz edildi. Ayrıca oluşturulan in-vitro modellemede

yapılan uygulamaların p53 ve kaspaz3 düzeylerine etkileri immunostokimyasal yöntemlerle analiz edildi.

Sitotoksisite analizleri sonucunda  $\alpha$ -arbutinin LD<sub>50</sub> dozundaki sitotoksiste düzeyi  $\beta$ -arbutine göre daha yüksek çıktığı için çalışmalarda  $\alpha$ -arbutin kullanıldı. Düşük doz (LD<sub>0</sub> dozunda)  $\alpha$ -arbutinin tek başına hepatosellüler karsinom (HepG2) hücrelerine uygulandığında herhangi bir genotoksik ve sitotoksik etkileri olmadığı, inflamasyon, apoptoz ve proliferasyonu etkilemediği belirlendi. Bununla birlikte cisplatin toksikasyonu oluşturulduktan sonra tedavi amacıyla düşük doz arbutin kullanıldığında, cisplatin toksikasyonu sonucu artan oksidatif stres, inflamasyon, genotoksisite düzeylerinde düşüşler gözlenirken, bu durumdan kaspaz 3 seviyelerinin etkilenmediği belirlendi.  $\alpha$ -arbutinin yüksek dozlarda (LD<sub>50</sub> dozunda) HepG2 hücrelerine uygulanması sonucunda ise oksidatif stresi, genotoksisiteyi, inflamasyonu, apoptozu artırarak, proliferasyonu ise baskılayarak hepatosellüler karsinom hücrelerinde antikanserojen etkiler gösterebileceği belirlenmiştir.

Elde edilen bulgular karaciğer karsinomu HepG2 hücre hattında cisplatin toksikasyonu sonucu oluşan hasarda arbutinin yararlı etkiler gösterebileceğine işaret etmektedir. Ayrıca sunulan çalışma ile HepG2 hücre hattında özellikle de yüksek dozlarda arbutin izoformlarının antikanserojenik etkilerinin olabileceğini göstermektedir.

**2020, ix + 88\* sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Kanser, HepG2 hücre hattı, Cisplatin, Arbutin, İnflamasyon,  
Oksidatif stres

## **ABSTRACT**

M.Sc. Thesis

### **EFFECTS OF ARBUTIN ON CISPLATIN TOXICATION IN HEPATIC CARCINOMA HepG2 CELLS**

Hatice EVİN

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry


**Supervisor:** Assoc. Prof. Ömer HAZMAN

Surgical approach, radiotherapy and chemotherapy have been used in cancer treatment for many years. Especially in chemotherapeutic treatment, the development of combined treatment methods to reduce the side effects that occur outside the cancer cells and tissues increases the chance of success of cancer treatment. Therefore, alternative methods to reduce these side effects are frequently investigated. In the present study, it was aimed to determine the efficacy of arbutin against hepatic toxicity caused by cisplatin, a chemotherapeutic agent, with the possible effects of arbutin on liver carcinoma (HepG2) cells as an antioxidant.

The doses of arbutin and cisplatin in anticarcinogenic efficacy were determined by MTT analysis. After lethal doses (LD) of arbutin isoforms and cisplatin were determined, experimental groups (Group 1: Control, group, Group 2: LD<sub>0</sub> dose  $\alpha$ -arbutin, Group 3: LD<sub>50</sub> dose  $\alpha$ -arbutin, Group 4: LD<sub>50</sub> dose cisplatin, Group 5: Treatment group LD<sub>50</sub> dose Cisplatin + LD<sub>0</sub> dose  $\alpha$ -arbutin) were created. Biochemical total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS), oxidative stress index (OSI), proinflammatory cytokine levels (TNF- $\alpha$ , IL-6 and TGF- $\beta$ 1) were determined in the samples obtained from the experimental groups. Molecular analysis of DNA damage (comet test), the effect of micronucleus formation on genotoxicity in experimental groups were tried to determine the applications. mRNA expression levels of apoptosis-related caspase 3 and proliferation-related Bcl-2 genes were analyzed by RT-PCR. In addition, the effects of in-vitro modeling on p53 and caspase3 levels were analyzed by immunocytochemical methods.

As a result of cytotoxicity analyzes,  $\alpha$ -arbutin was used in the studies since the level of  $\alpha$ -arbutine in LD<sub>50</sub> dose cytotoxicity was higher than  $\beta$ -arbutine. When low dose (in LD<sub>0</sub> dose)  $\alpha$ -arbutine was administered to hepatocellular carcinoma (HepG2) cells alone, it was determined that it did not have any genotoxic and cytotoxic effects and did not affect inflammation, apoptosis and proliferation. However, when low dose arbutin was used for treatment after cisplatin toxicity was created, it was observed that the levels of oxidative stress, inflammation and genotoxicity decreased due to cisplatin toxicity. Caspase 3 levels were not affected. As a result of the application of  $\alpha$ -arbutine to HepG2 cells at high doses (LD<sub>50</sub> dose), it was determined that it may exhibit anticarcinogenic effects in hepatocellular carcinoma cells by increasing oxidative stress, genotoxicity, inflammation, apoptosis and suppressing proliferation.

The findings suggest that arbutin may have beneficial effects in liver carcinoma HepG2 cell damage caused by cisplatin toxicity. Furthermore, the present study demonstrates that arbutin isoforms may have anticarcinogenic effects, especially at high doses in the HepG2 cell line.



**2020, ix + 88\* sayfa**

**Keywords:** Cancer, HepG2 cell line, Cisplatin, Arbutin, Inflammation, Oxidative stres

## TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazım aşamasında yapmış olduğu rehberlikten dolayı tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Ömer HAZMAN'a teşekkür ederim.

Araştırma ve laboratuvar aşamasında analizlerin gerçekleştirilmesinde yardımcı olan arkadaşım Zehra Betül KUMRAL'a teşekkür ederim.

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca ders aldığım, desteğini gördüğüm Doç. Dr. Laçine AKSOY'a teşekkür ederim.

İmmünostokimya analizlerinde yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Fatih BOZKURT'a ve genotoksisite analizlerinde yardımını esirgemeyen Prof.Dr İbrahim Hakkı CİĞERCİ'ye teşekkür ederim.

Her konuda eleştirileriyle ve önerileriyle bana destekte bulunan çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca yüksek lisans çalışmalarına maddi anlamda 17.FEN.BİL.10 numaralı proje ile destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na teşekkür ederim.

Öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen Canım annem, babam ve ağabeyim Türkan, Muammer ve Bekir KAYA'ya sevgili eşim Doğançan EVİN'e tüm kalbimle teşekkür ederim.

Hatice EVİN  
Afyonkarahisar 2020



## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iv
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1.GİRİŞ.....	1
2.LİTERATÜR BİLGİLER.....	4
2.1 Türkiye ve Dünyada Kanser.....	5
2.2 Kanserden Korunma ve Tedavi.....	8
2.3 Kanser Tedavisindeki Gelişmeler .....	10
2.3.1 Kanser Tedavisinde Bakteri Suşları, Antioksidan ve Kanser Kök Hücrelerinin Etkinliği .....	10
2.3.2 Kanser Tedavisinde İmmunotoksin, Kardiyotoksisite ve Mikrobiyota Rolü..	11
2.3.3 Kanser Tedavisinde Lizin Spesifik Dimetilaz (LSD1) İnhibitörleri.....	12
2.3.4 Kanser Tedavisi ve Small İnterfering RNA (siRNA).....	13
2.4 Karaciğer Kanseri.....	13
2.4.1 Karaciğer Kanserini Etkileyen Faktörler .....	15
2.4.2 Karaciğer Kanseri (Hepatoselüler Karsinom) Tanı ve Tedavi Yöntemleri ...	16
2.4.3 İn Vitro Modellemelerde HepG2 Hücre Hattının Kullanımı.....	18
2.5 Karaciğer Kanseri ve İnflamasyon.....	19
2.5.1 Akut ve Kronik İnflamasyon .....	19
2.5.2 İnflamasyon Tanı ve Tedavi Yöntemleri .....	20
2.5.3 İnflamasyonun Kanser ve Karaciğer Kanseri ile İlişkisi .....	21
2.6 Kanser ve Oksidatif Stres .....	22
2.6.1 Karaciğerde Oksidan-Antioksidan Sistem.....	23
2.6.2 Oksidatif Stres ve Karaciğer Hastalıkları .....	26
2.7 Karaciğer Kanseri, Apoptoz ve Proliferasyon.....	28
2.8 Karaciğer Kanseri ve Cisplatin .....	29
2.9 Arbutin .....	29
3. MATERYAL ve METOT .....	33
3.1 Hücre Besiyeri Hazırlama .....	33

3.2 Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekilmesi .....	34
3.3 Hücrelerin Çoğaltılması (Pasajlanması).....	35
3.4 Hücrelere Uygulanan Tripsinizasyon/Detripsinizasyon.....	35
3.5 Hücrelerin Sayılması .....	36
3.5.1 Çalışmada Kullanılan Arbutin Cisplatin ve MTT Çözeltileri Hazırlanması ..	41
3.6 MTT Hücre Viabilite Ölçüm Testi.....	38
3.7 Biyokimyasal Analizlerde Kullanılacak Hücre Lizatlarının Hazırlanması ve Yapılan Biyokimyasal Analizler .....	40
3.7.1 Hücre Lizatlarında Total Protein Analizi.....	41
3.7.2 Total Antioksidan Statü (TAS) Düzeyleri Analizi.....	42
3.7.3 Total Oksidan Statü (TOS) Düzeyleri Analizi.....	42
3.7.4 Oksidatif Stres İndeksi (OSI) Seviyelerinin Belirlenmesi .....	42
3.7.5 İnflamatuvar Stokin (TNF- $\alpha$ , IL-6 ve TGF- $\beta$ 1) Seviyelerinin Belirlenmesi ..	43
3.8 Genotoksisite Düzeylerinin Belirlenmesi İçin Yapılan Analizler.....	43
3.8.1 Komet Analizinin Yapılması .....	44
3.8.2 Mikronükleus Analizinin Yapılması.....	46
3.9 Moleküler Analizler .....	47
3.9.1 RNA İzolasyonu .....	47
3.9.2 Komplementari DNA (cDNA) Sentezi ve RT-PCR Analizleri .....	48
3.10 İmmunostokimyasal Analizler .....	49
3.11 İstatistiksel Analizler .....	50
4. BULGULAR .....	51
4.1 HepG2 Hücrelerinde $\alpha$ -Arbutinin Sitotoksisite Düzeyleri.....	51
4.2 HepG2 Hücrelerinde $\beta$ -Arbutinin Sitotoksisite Düzeyleri.....	52
4.3 HepG2 Hücrelerinde Cisplatinin Sitotoksisite Düzeyleri .....	53
4.4 HepG2 Hücre Hattında Cisplatin, $\alpha$ -Arbutin ve $\beta$ -Arbutinin Belirlenen Lethal Dozları.....	53
4.5 HepG2 Hücrelerinde $\alpha$ -Arbutinin Genotoksisiteye Etkisi .....	54
4.6 $\alpha$ -arbutinin HepG2 Hücrelerinde Oksidatif Strese Etkisi.....	55
4.7 $\alpha$ -arbutinin HepG2 Hücrelerinde İnflamasyona Etkisi .....	57
4.8 Kaspaz 3 ve Bcl-2 mRNA Ekspresyon Düzeyleri .....	58
4.9 İmmunostokimyasal Yöntemle Kaspaz 3 ve Bcl-2 Sayılarının Değerlendirilmesi	58
5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	66
6. KAYNAKLAR.....	76
ÖZGEÇMİŞ.....	88

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

---

dH <sub>2</sub> O	Distile su
Cr (VI)	Hekzavalent krom
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
OH <sup>•</sup>	Hidroksil radikal
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
Ma	Miliamper
mM	Milimolar
O <sub>2</sub>	Süperoksit radikali

### Kısaltmalar

---

Bcl-2	B-cell lymphoma 2
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DMSO	Dimetil sülfoksit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ELISA	Enzim-Linked Immuno Sorbent Assay
FBS	Fetal bovine serum
HQ	Hidrokinon
IL-6	İnterlökin 6
JAK	Janus Kinaz
HepG2	Karaciğer kanseri hücre hattı
CAT	Katalaz
LD	Lethal Dozlar
LPS	Lipopolisakkarit
NF-kB	Nükleer faktör-kappa B
OSI	Oksidatif stres indeksi
PBS	Phosphate buffered saline (pH=4)
RAW	Fare makrofaj hücre hattı
RGC	Reaktif azot türleri
RNS	Reaktif oksijen türleri
ROS	Retinal ganglion hücreleri
STAT	Signal transducer and activator of transcription factor
SOD	Super oksit dismutaz
TAS	Total antioksidan statü (total antioksidan kapasite)
TOS	Total oksidan statü (total oksidan kapasite)
TGF-β1	Tümör hücre ölüm faktörü beta
TNF-α	Tümör nekroz faktörü alfa (Tümör nekrozis factor α)
p53	Tümör protein 53 (EC :2.7.1.37)

---

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Türkiye'de ve Dünyada Kanselerin Yaşa Standardize İnsidans Hızlarının Cinsiyete Göre Dağılımı .....	7
Şekil 2.2 Türkiye'de Erkeklerde En Sık Görülen Kanselerin Toplam Sayısı ve Yüzde Dağılımları .....	7
Şekil 2.3 Türkiye'de Kadınlarda En Sık Görülen Kanselerin Toplam Sayısı ve Yüzde Dağılımları .....	8
Şekil 2.4 Karaciğerde Redoks Dengesinin Sağlanması .....	24
Şekil 2.5 Enzimatik Antioksidanlar ve Etki Mekanizmaları .....	25
Şekil 2.6 Karaciğerde Oksidatif Stres ve İlişkili Karaciğer Hastalıkları .....	27
Şekil 2.7 $\alpha$ ve $\beta$ Arbutinin Kimyasal Yapıları .....	30
Şekil 2.8 Arbutinin Hidrolizi .....	31
Şekil 3.1 DNA Hasar Dereceleri .....	44
Şekil 4.1 HepG2 Hücrelerinde $\alpha$ Arbutinin Sitotoksitesi .....	52
Şekil 4.2 HepG2 Hücrelerinde $\beta$ Arbutinin Sitotoksitesi .....	52
Şekil 4.3 HepG2 Hücrelerinde Cisplatinin Sitotoksitesi .....	53
Şekil 4.4 LD <sub>0</sub> Dozunda $\alpha$ -Arbutinin HepG2 Hücrelerinde Apoptoz ve Proliferasyon Etkisi .....	60
Şekil 4.5 LD <sub>50</sub> Dozunda $\alpha$ -Arbutinin HepG2 Hücrelerinde Apoptoz ve Proliferasyon Etkisi .....	61
Şekil 4.6 Cisplatinin LD <sub>50</sub> Dozunda HepG2 Hücrelerinde Apoptoz ve Proliferasyon Etkisi .....	62
Şekil 4.7 LD <sub>50</sub> Dozunda Cisplatin Uygulanan HepG2 Hücrelerinde LD <sub>0</sub> Dozunda $\alpha$ -Arbutinin Apoptoz ve Proliferasyon Etkisi .....	62
Şekil 4.8 Immunostokimya Analiz Sonuçları (Cas3 <sup>+</sup> ve p53 <sup>+</sup> hücre sayıları) .....	64
Şekil 5.1 HepG2 Hücrelerinde $\alpha$ -Arbutinin Antikanserojen Etkilerinin Oluşmasına Aracılık Eden Mekanizma .....	73
Şekil 5.2 HepG2 Hücrelerinde $\alpha$ -Arbutinin Cisplatin Toksikasyonun Azaltıcı Etkilerine Aracılık Eden Mekanizma .....	74

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

<b>Çizelge 2.1</b> Türkiye ve Dünyada 2012-2015 Yılları Arasında Kadın ve Erkeklerde Yaşa Göre Kanser Dağılımı .....	6
<b>Çizelge 2.2</b> Karaciğer Kanseri Sınıflandırılması.....	14
<b>Çizelge 3.1</b> Çalışmada Kullanılan Besiyerinin (medium) Bileşenleri .....	33
<b>Çizelge 3.2</b> Çalışmalarda Oluşturulan Deney Grupları ve Yapılan Uygulamalar .....	40
<b>Çizelge 3.3</b> Lizis Çözeltisinin Hazırlanması .....	45
<b>Çizelge 3.4</b> Elektroforez Çözeltisinin Hazırlanması .....	45
<b>Çizelge 3.5</b> Nötralizasyon Çözeltisinin Hazırlanması.....	45
<b>Çizelge 3.6</b> KCl Çözeltisinin Hazırlanması .....	46
<b>Çizelge 3.7</b> Oliganükleotit Primer Dizileri ve RT-PCR Programları.....	48
<b>Çizelge 4.1</b> Cisplatin, $\alpha$ -Arbutin ve $\beta$ -Arbutine Ait Lethal Dozları.....	54
<b>Çizelge 4.2</b> $\alpha$ -Arbutinin HepG2 Hücrelerinde DNA Hasarı ve Mikronükleus Oluşumuna Etkisi.....	55
<b>Çizelge 4.3</b> Deney Gruplarına Ait TAS, TOS, OSI ve Total Protein Seviyeleri .....	56
<b>Çizelge 4.4</b> Proinflamatuvar Stokin (TNF $\alpha$ , IL-6 ve TGF- $\beta$ 1) Düzeyleri .....	58
<b>Çizelge 4.5</b> Deney Gruplarına Ait Kaspaz 3 mRNA Ekspresyon Seviyeleri.....	59
<b>Çizelge 4.6</b> Deney gruplarına ait Bcl-2 mRNA ekspresyon seviyeleri.....	59
<b>Çizelge 4.7</b> Deney gruplarına ait Kaspaz 3 ve p53 Pozitif Hücre Sayıları .....	63

## 1. GİRİŞ

Kanser, son yüzyılda insanoğlunun karşılaştığı ve toplumdaki insidansında her geçen gün daha fazla artış görülen hastalıkların başında gelmektedir. Dünyada kanser ölüm nedeni olarak ikinci sıradadır. Yapılan kanser araştırmalarına göre 2030 yılına kadar kanserin hızla artış göstererek ilk sıraya yerleşebileceği öngörülmektedir (İnt Kay. 1).

Kanser dünyada mortalitesi sürekli artan toplumsal sorunlardan biri haline gelmiştir. Her yıl dünya da 8 milyondan fazla insana kanser teşhisi konmaktadır (Jemal vd. 2010). Çoğu kanser türü için yapılan çalışmalarda, sağlıklı bir diyet ve yaşam tarzını değiştirerek korunabileceğini göstermektedir (Anand vd. 2008).

Yıllardır kanser tedavisinde kullanılan yöntemler cerrahi yaklaşım, kemoterapi ve radyoterapidir. Kanserde kullanılan tedavinin çeşitleri ve rehabilitasyon süreleri maddi kayıplara yol açtığı gibi, kanserli hastaların psikolojisi, ailelerinin uzun süre çektiği sıkıntılar, maddi ve manevi baskılara da yol açmaktadır (Adam vd. 2013).

Bulunan tedavi yöntemlerinin hastaların yaşam tarzına olumsuz etkileri ve yan etkileri sebebiyle bilim adamlarını daha doğal ve yan etkisi az olabilecek yöntemler araştırmaya yönlendirmiştir. Bu bağlamda bitkilerden elde edilen antikanser etkili bileşenlerin etkileri in vivo ve in vitro deney modelleri ile laboratuvarlarda, tedaviye etkisi olduğu gözlenenler ise kliniklerde gönüllüler üzerinde denenmeye başlanmıştır (Deisinger vd. 1996).

Günümüzde birçok tıbbi bitkide bulunan ve doğal olarak oluşan bir glikozit olan arbutin başta cilt kanseri tedavisi, böbrek taşı tedavisi, idrar yolları enfeksiyonlarının tedavisi, ciltte görülen çil ve lekelenmelerin tedavisinde cilt beyazlatma ajanı olarak, ilaç ve kozmetik sanayisinde yerini almış bulunmaktadır (Olumide vd. 2008). Ayrıca arbutin izoformları ve türevlerinin cilt kanseri üzerine etkili olabileceği birçok çalışma ile gösterilmiştir (Cheng vd. 2007, Nawarak vd. 2009).

Arbutinin melanomada antikanser etkileri gösterilmiş olmasına karşı diğer kanser türlerine etkisi hakkında yapılan çalışma çok az sayıdadır. Arbutinin antitirozinaz

etkinliği nedeniyle cilt lekelerine karşı kozmetik ürün olarak kullanıldığı da düşünülürse, bu ürünlerin kanserli hastalarda güvenilirliğinin araştırılması önemli olabilir. Bu bağlamda yapılan laboratuvar analizleri ile karaciğer kanseri hücre hattı olan hepatokarsinom (HepG2) hücrelerinde düşük ve yüksek dozlarda arbutinin etkilerinin araştırılmasının yanında, HepG2 hücrelerinde bir kemoterapik ajan olan cisplatinin oluşturduğu toksikasyona arbutinin olası yararlı/zararlı etkilerinin de belirlenmesi hedeflenmiştir.

Sunulan çalışmada kemoterapik olarak kullanılması düşünülen cisplatin, selektif ve spesifik olarak hücre çoğalmasını engelleyen ve içeriğinde ağır bir metal olan platin (Pt) elementini içeren güçlü bir antineoplastik ajandır. Cisplatinin kanserli dokuda bulunan hücreleri öldürmenin yanında diğer dokulardaki sağlıklı hücelere de zarar vererek oluşturduğu yan etkileri, ilacın kullanımını ve kanserle mücadeleyi sınırlandırmaktadır. Bu nedenle kemoterapi uygulamalarında yan etkileri azaltabilecek protokollerin geliştirilmesi kanser tedavisi açısından son derece önemlidir. Bu kapsamda arbutin gibi doğal maddelerin söz konusu kemoterapik tedavilerin yan etkilerini azaltması, kanser tedavisi açısından önemlidir. Çünkü kemoterapik tedavinin yan etkilerini azaltan aktif maddelerin cisplatin gibi tedavi ajanları ile kombine kullanımları kanser tedavisinde kullanılan tedavinin başarı şansını artırabilmektedir.

Son yıllarda kemoterapiklerin yan etkilerini azaltan birçok doğal aktif madde araştırmaların odağında yer almaktadır. Bu kapsamda HepG2 hücrelerinde cisplatinin oluşturduğu toksikasyon sonucu gelişen inflamasyon, oksidatif stres, genotoksisite, apoptoz ve proliferasyona düşük doz, başka bir ifade ile LD<sub>0</sub> dozunda (kansere hücrelerinde herhangi bir proliferasyona/apoptoza neden olmayan doz) ve antikanserojenik doz olarak LD<sub>50</sub> dozunda arbutinin etkileri araştırılmıştır.

Sunulan tezde öncelikle literatür bilgi kısmında kanser, karaciğer kanseri, oksidatif stres, inflamasyon gibi tezle ilgili kavramlar ele alınmış, bu konularda yapılan güncel çalışmalar kullanılarak teorik zemin oluşturulmuş, arbutinin antikanserojen etkilerini araştırmaya yönelik yapılan son çalışmaların sonuçları derlenerek sunulmaya çalışılmıştır. Literatür bilgileri sunulduktan sonra çalışmada kullanılan meteryaller ve

analizlerde kullanılan metotlar verilmiştir. Laboratuvar analizlerinden elde edilen ham verilerin istatistik programları ile analiziyle elde edilen verilere sunulan tez metninin bulgular kısmında yer verilmiştir. Bulgular ışığında elde edilen tüm sonuçlar, tartışma ve sonuç ana başlığı altında sunulmuş olup, elde edilen veriler ile literatür özeti kısmında sunulan bilgiler ilişkilendirilerek çalışmanın özgünlüğü ifade edilmeye çalışılmıştır.





## 2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

Kanser ile ilgili en eski kayıtlar M.Ö 3000 yıllarına dayanmaktadır. Latince kanser kelimesi yengeç anlamına gelen “cancer” veya “carcinos” kelimelerinden türetilmiştir. Hipokrat tarafından ilk defa M.Ö 3.yüzyılda tümörün çevresindeki şişmiş damarları yengecin bacaklarına benzettiği için tümör terimini kullanmış, Yunan doktor Galen de şişme anlamına gelen “oncos” terimini kullanmıştır (Baykara 2016).

Dokular vücudu oluşturan hücrelerin bir araya gelmesi ile organlar ise dokuların bir araya gelmesi ile oluşmaktadır. Hücreler düzen halinde belirli iş bölümü yapar ve bir araya gelerek organ ve dokuları oluştururlar. Organizmanın temelini oluşturan hücreler hızlı ve kontrollü bir şekilde çoğalırlarken yaşlanan veya fonksiyonları bozulan hücrelerde hızla yıkılmaktadırlar. Ancak çeşitli nedenlerle (mutasyonlar gibi) ömrü dolmasına rağmen yıkılamayan veya karsinojen maddelerin etkisiyle fonksiyonları değişen bazı hücreler yok edilemezlerse, kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya başlayabilirler. Kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya devam eden yapı ve fonksiyonu bozuk hücreler buldukları doku, organ veya organizmanın çalışmasında olumsuzlukların başlamasına neden olur. Yapı ve fonksiyonu bozulan hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile başlayan ve sonrasında tüm organizmayı tehdit eden bu hastalık genel olarak kanser olarak ifade edilmektedir. Kanser oluşum süresi kanser türlerine göre değişkenlik göstermekle beraber ortalama 15-20 yıl sürmektedir ( Hazman 2018).

Kanser hücreleri 2 temel özelliklerle tanımlanır. Bunlar; kanser hücrelerinin hücre bölünmesindeki normal sınırlamaları aşarak çoğalması ve diğer hücelere ayrılmış bölgelere yayılarak yerleşmeleridir. Hücrelerin çoğalmaları kontrol altında değilse, bir tümör ya da neoplazmaya yani aşırı büyüyen anormal hücreler kitlesinin (neoplastik hücreler) oluşumuna sebep olurlar ve tek bir kitle içinde grup halinde durdukları süresince bu tümör iyi huylu olarak isimlendirilir. Bu durumda kitle, cerrahi yolla çıkartılarak tam tedavi sağlanabilir. Ama tümör kötü huylu ise, hücrelerin çevresindeki dokuyu istila etmişlerse kanser olarak kabul edilir (Alberts vd. 2008). Söz konusu hücreler çeşitli yapısal kriterler, büyüme hızı, salgıladıkları özel proteinler, lokal invazyon durumu, metastaz kabiliyeti gibi ölçütler dikkate alınarak iyi huylu (benign) ve kötü huylu

(malign) tümör ayrımı yapılabilmektedir (Onat vd. 2006).

Kanser türlerinin hemen hepsi hücrelerin kontrol dışına çıkıp çoğalması ile başlamaktadır. Kanser hücrelerinin çoğalması aşamasında, kanserli hücrelerde normal hücrelere göre yapısal ve işlevsel ayrımlar meydana gelir. Bazen de hücre normalde görevi olmayan bazı fonksiyonları yapmaya başlar. Bu ayrımlar ilk kez Warburg tarafından araştırılmış olup solunum zinciri ve glikoz metabolizmasının maligniteden sorumlu olduğu belirlenmiştir (Kalaycıoğlu vd. 2013).

Kanserlerin çoğunun başlangıçta mutasyona uğrayarak tek bir hücreden kaynaklandığı düşünülmektedir. Mutasyona uğrayarak değişen hücreden oluşan yeni nesillerde daha değişik ve sınırsız sayıda mutasyonların meydana gelmesi sonucunda kanserli hücrelerin oluşmaya başladığı ifade edilmektedir. Genellikle çok uzun yıllar süren bu tümör gelişimi, somatik hücreler üzerindeki doğal seçim ve mutasyon yoluyla oluşan şansız bir evrim sürecini yansıtır. Bu durumda oluşan kanserler doku ve hücre çeşidine göre sınıflandırılmaktadır. Epitel hücrelerden oluşan kanserlere karsinom, bağ dokusu veya kas hücrelerinden oluşan kanser çeşitlerine sarkom, melanin üreten pigment hücrelerinden köken alan kanser çeşitlerine ise melanom adı verilir. Bununla birlikte kan hücrelerinden türeyen çeşitli lösemiler ve sinir sistemi hücrelerinden türeyen kanser çeşitleri de mevcuttur (Alberts vd. 2008).

## **2.1 Türkiye ve Dünyada Kanser**

Kanserin ilk defa M.Ö.3000’li yıllarda Mısır’da ortaya çıktığı bilinmektedir. Anormal hücrelerin kontrol dışı çoğalması ile de kanser türleri oluşmaktadır. Kanser sıklığının belirlenmesindeki faktörler; sosyoekonomik durum, coğrafi dağılım, cinsiyet, yaş ve mesleki özellikler yer almaktadır. Bununla birlikte kanserin sebepleri arasında sigara ve alkol tüketimi, karsinojenlere maruz kalma, enfeksiyonlar, sağlıksız doğumlar, yetersiz ve dengesiz beslenme yer almaktadır (İnt Kay. 2). Kanserin cinsine göre belirti, bulgu ve tedavileri farklılık göstermektedir. En sık karşılaşılan kanser türleri akciğer, deri, meme, sindirim ve üreme sistemi ile ilişkili kanserlerdir (Kutluk ve Kars, 1992). Türkiye ve dünyada cinsiyete göre görülen kanser oranları (Çizelge 2.1)’de sunulmuştur (İnt Kay. 6).

**Çizelge 2.1** Türkiye ve dünyada 2012-2015 yılları arasında kadın ve erkeklerde cinsiyete göre kanser dağılımı

	<b>ERKEK *</b>	<b>KADIN *</b>
<b>DÜNYA</b>	204,9	165,2
<b>IARC'a ya üye 24 ülke</b>	235,4	192,1
<b>AB (28 ülke)</b>	311,3	241,4
<b>ABD</b>	347,0	297,4
<b>TÜRKİYE</b>	220,3	156,8

\*Tablodaki değerler 100.000 kişideki ortalama görülme sıklığını ifade etmektedir.

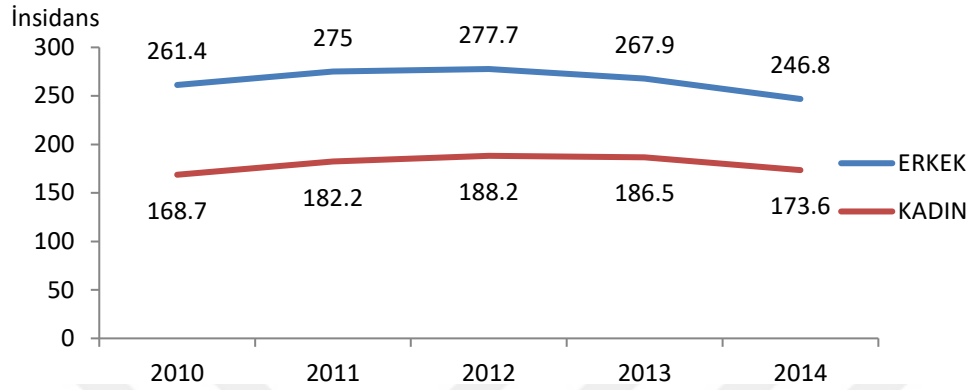
Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından derlenen ve dünya genelinde 36 kanserden ve 2018 yılı için birleştirilmiş tüm kanserler için görülme ve ölüm oranlarının tahminleri GLOBOCAN 2018 veri tabanında mevcuttur. Dünyada tahmini 18,1 milyon (% 95 UI: 17,5-18,7 milyon) yeni kanser vakası (melanom dışı cilt kanseri hariç 17 milyon ) ve 9,6 milyon (% 95 UI: 9,3-9,8 milyon) kanserden (9,5 milyon hariç ) ölüm meydana geldiği ifade edilmektedir (Ferlay vd. 2019).

Dünya da en çok görülen kanser vakası Dünya Kanser Araştırma Fonu (WCRF) 'in yayınladığı verilerde 100 binde yaklaşık 470 kişi ile Avustralya'da, 438 ile Yeni Zelanda ile 374 ile de İrlanda, 100 binde 144 kişi ile Türkiye olarak bildirilmiştir (İnt Kay. 2).

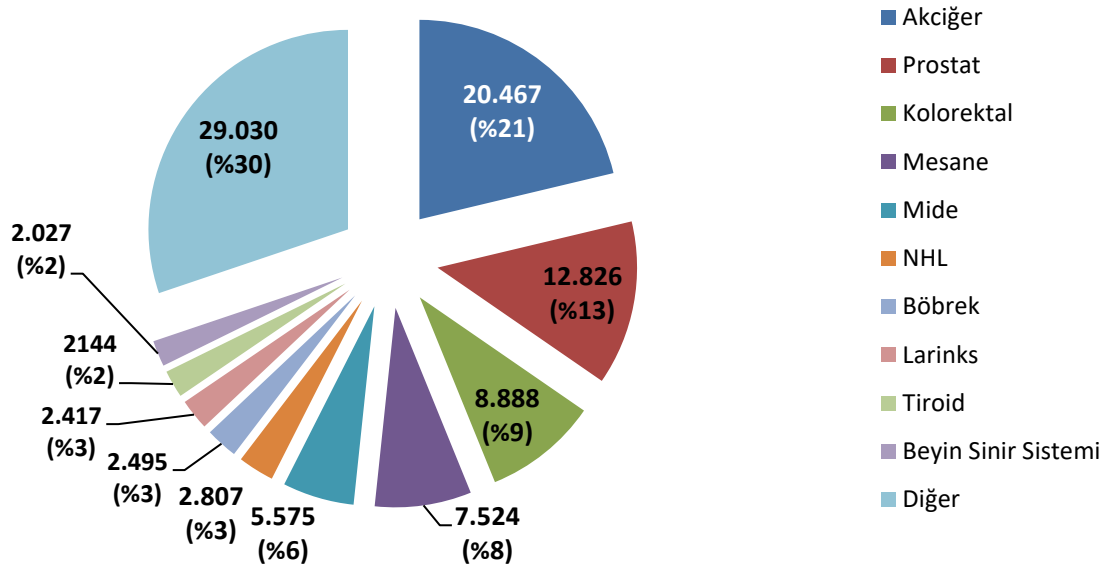
Türkiye'de görülen kanserin sıklığı Avrupa Birliği ülkeleri ve Amerika gibi gelişmişlik düzeyi yüksek olan ülkelere göre daha düşüktür. Türkiyede 2010-2014 yıllarındaki veriler incelendiğinde kanser sıklığında herhangi bir artış ya da azalış olmadığı söylenebilir. Ülkemizde resmi rakamlar değerlendirildiğinde bir yıl içerisinde yaklaşık 96.200 erkek ve 67.200 kadına kanser teşhisi konulmaktadır. Türkiye'de yılda 163.500 civarında yeni kanser vakası teşhis edilmektedir. Ülkemizde bir günde yaklaşık 450 kişinin kanser teşhisi aldığı söylenebilir.

Türkiye'de yapılan araştırmalar 2010-2014 yılları arasında erkeklerde kanser görülme insidansının bayanlara göre daha yüksek (Şekil 2.1) olduğunu göstermektedir (İnt Kyn. 3). Bunun nedeni olarak birçok faktör sayılabilir. Ama erkeklerde en çok görülen kanser türleri incelendiğinde kanser insidansının yüksek olma nedeni olarak genel anlamda kötü

alışkanlıklar ve beslenmenin etkilelerinin öne çıktığı düşünülebilir. Çünkü erkeklerde en çok görülen il beş kanser türlerinin akciğer, prostat, kolorektal (kalın bağırsak), mesane ve mide kanserleri olduğu görülmektedir (Şekil 2.2).



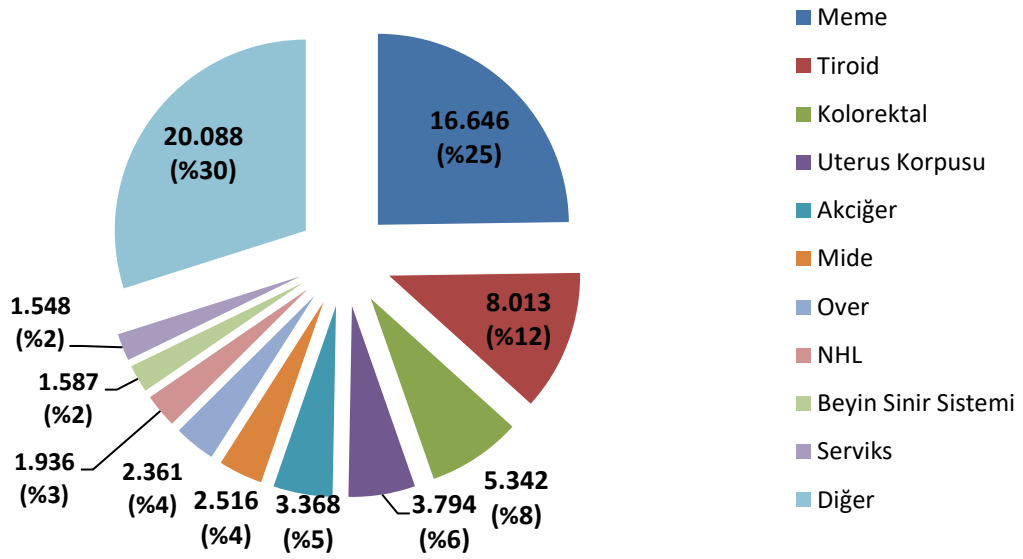
**Şekil 2.1.** Türkiye’de Tüm Kanserler Yaşa Standardize İnsidans Hızlarının Cinsiyete Göre 2010-2014 Yılları Arasındaki Dağılımı (Her 100.000 kişide yıllık teşhis edilen kanser sayısı) (İnt Kay. 3).



**Şekil 2.2** Türkiye’de Erkeklerde En Sık Görülen Kanserlerin (2010-2014) Toplam Sayısı ve Yüzde Dağılımları (İnt Kay. 3).

2010-2014 yıllarındaki veriler değerlendirildiğinde özellikle erkeklerde tütün kullanımına bağlı olarak gelişen kanserlerin sıklığında azalan bir seyir görülmektedir. Ancak bu azalma seyri, son yıllarda artan tütün kullanımı ile gelecek yıllardaki kanser istatistiklerinde artış seyrine dönüşebilir

Kadınlarda ise en sık görülen kanser türleri arasında meme, tiroid, kolorektal, rahim ağzı (uterus korpusu) ve akciğer kanseri sayılabilir. Kadınlarda en sık görülen meme kanseri, her 4 kadın kanserinden birisi olmaya devam etmektedir. Bir yıl içinde yaklaşık 17.000 kadına meme kanseri teşhisi konulmuştur. Bunun yanında obeziteye bağlı olarak gelişen kanserlerin sayısı 6.000 civarında tahmin edilmektedir. Hem erkeklerde hem de kadınlarda bağırsak (kolorektal) kanseri üçüncü en sık görülen kanser türüdür. Çocukluk çağı kanserlerinde ise lösemi en sık görülen kanser türüdür (İnt Kay. 3).



**Şekil 2.3** Türkiye’de Kadınlarda En Sık Görülen Kanserlerin (2010-2014) Toplam Sayısı ve Yüzde Dağılımları (İnt Kay. 3).

## 2.2 Kanserden Korunma ve Tedavi

Dünya Sağlık Örgütü’nün yayınladığı kanseri önleme planları üç aşamada gerçekleşir. İlk olarak kanserin mevcut durum ve kontrol mekanizmalarının tespit edilmesi gerekmektedir. İkinci olarak kanser hastalığına karşı bir politika belirlenmesi ve uygulanması gerekmektedir. Öncelikle hedef kitlenin belirlenerek, kanserle mücadele edilecek noktalara karar verilmelidir. Son olarak bu politikaların uygulanması gereken adımların tanımlanması gerekmektedir.

Kanserden korunma ile kanserden kaynaklanan ölümlerin yaklaşık yüzde 40'ı önlenmektedir. Kanser risk faktörlerinin belirlenerek önlemini almak kanserden korunma için etkin yollardan birisidir. Bu bağlamda sağlıklı yaşam için gerekli olan tütün ve alkol kullanımının azaltılması, düzenli yaşam ve egzersiz, yeterli ve dengeli beslenme, karsinogen olabilecek çevresel ve kimyasal faktörlerin en aza indirilmesi, kanser açısından risk faktörlerinin azaltılması adına yararlı olabilir. Aynı zamanda sağlıklı bir yaşam için gerekli olan değişkenlerin kontrol altında tutulması, kanser hastalığına yakalanmış bireylerin tedavisinin olumlu yönde ilerlemesine katkı sağlayabilmektedir (İnt Kay. 2).

Diyet kanserlerde önemli bir rol oynar. Epidemiyolojik çalışmalar, genel kanser risklerinin azalmasının, önemli miktarda meyve ve sebze tüketiminin yanı sıra, yüksek lifli, az yağlı bir diyetin düzenli alımı ile ilişkili olabileceğini göstermiştir. Birçok diyet doğal ürününün, üzüm, siyah frenk üzümü, erik, nar, baklagiller, sebzeler, fasulye, domates, kuşkonmaz, sarımsak, zerdeçal, zencefil, soya, pirinç kepeğinin karaciğer kanserinin önlenmesi ve tedavisi için potansiyel kaynaklar olduğunu göstermektedir (Zhou vd. 2016).

Bu nedenle, diyetle alınan doğal ürünler karaciğer kanseri için yeni ve önleyici seçenekler sunabilir. Araştırmacılar, tümör hücresi büyümesini ve metastazı inhibe etme, karaciğer kanserojenlerine karşı koruma, immüno-modüle etme ve kemoterapötik ilaçların etkilerini artırma gibi diyetel doğal ürünlerin çeşitli antikanser etkilerini bulmuşlardır. Ayrıca, birçok diyet ürünü, kanser hücrelerine karşı seçici inhibisyon sergilemiştir (Jo vd. 2006).

Kanser tedavisinde geleneksel olarak cerrahi yaklaşım, radyoterapi ve kemoterapi uzun yıllardır kullanılmaktadır. Son yıllarda teknolojinin gelişmesiyle birlikte, var olan geleneksel yöntemler kullanılmaya devam etse de, birçok yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmeye başlanmıştır. Bunlardan birisi olarak kanser hücrelerinde radyoterapi ve kemoterapiye direncin oluşmasında görev alabilen DNA hasarının oluşmasını önleyen proteinlerin kanserli hücrelerde baskılanması gösterilebilir. Böylelikle uygulanan radyoterapi veya kemoterapi tedavisi, kanser hücrelerinin DNA'sında da etkili hasar

oluşturarak ölmesini, yani tedavinin amacına düşük tedavi dozları ile ulaşılabilmesine imkan tanıyabilmektedir (Tian vd. 2015). Fakat bu yeni yöntemlerin uygulanabilirliği konusunda halen sınırlamaların olduğu da göz ardı edilmemelidir.

## **2.3 Kanser Tedavisindeki Gelişmeler**

Kanserin tanı ve tedavisinde kullanılan cerrahi, kemo ve radyoterapi yöntemlerinin kullanımı, bazı kanser türlerinde iyileşme oranını artırmaktadır. Kanser tedavisinin amacı ilaç vb. tedavi edici ajanlar, cerrahi işlem veya iyonize edici radyasyon ile tümörün büyümesini engelleyecek sitotoksik etki oluşturmaktır. Kullanılan tedavi ile birlikte hücre büyümesi için DNA ve RNA sentezini önlemesi amaçlanmaktadır. Sadece malign hücreleri etkilemesi düşünülerek tedavide kullanılan ilaçlar, malign hücrelerin yanı sıra proliferen olan tüm hücreler üzerinde de toksik etkilerini göstererek ciddi yan etkilerin oluşmasına sebep olmaktadır (Hazman 2018).

### **2.3.1 Kanser Tedavisinde Bakteri Suşları, Antioksidan ve Kanser Kök Hücrelerinin Etkinliği**

Yıllar önce önerilmiş olan kanser tedavisi için bakteri kullanımı, yakın zamana kadar potansiyel bir terapötik strateji olarak tanınmadı. Teknolojik gelişmeler ve güncel bilgiler, bakterilerin kanser tedavisinde güvenli ve etkili uygulamalarını mümkün kılmıştır. Radyoterapinin etkinliği temel olarak doku oksijen seviyelerine bağlıdır. Nekrotik ve hipoksik bölgelerdeki düşük oksijen konsantrasyonları tedavi başarısızlığının yaygın bir nedenidir. Bir ilacın dağılımı kemoterapinin terapötik etkisi için önemlidir ve tümörlerdeki zayıf vaskülatür (herhangi bir organdaki damarlaşma durumu) oluşumlar, ilacın verilmesini olumsuz yönde etkiler. Böylelikle ilacın özellikle nekrotik ve hipoksik bölgelerde etkinliğini sınırlar. Bakterilerin aracılık ettiği kanser tedavisi iyi ya da zayıf oksijenli bölgelerde hayatta kalabilen fakültatif anaeroblarla ilişkilidir. Bu anaerob bakteriler tümör kitlesi boyunca tedavide kullanılan ilacın dağılımını geliştirerek etkilerini gösterirler. Bu terapötik bakteri suşlarının kanser tedavilerinde kullanımı 1990'ların ortasından beri belirgin şekilde artmıştır (Nguyen ve Min 2017).

Geleneksel kanser tedavisinde kullanılan radyasyon ve bazı kemoterapötik ajanlar reaktif oksijen türleri üretir ve yüksek reaktif oksijen türleri seviyesi hücrel antioksidan kapasiteyi azaltır ve apoptoz kanser hücresi ölümüne yol açar. Antioksidan takviyeler, kanser tedavisinin normal doku ve organlara toksik yan etkilerini önlemek için kanser hastaları tarafından geniş çapta tüketilmektedir. Mümkün olan en iyi bakımı elde etmek ve kanser hastaları için riskli tedavileri önlemek için büyük klinik deneylere dayanan antioksidan takviyeye ihtiyaç duyulmaktadır (Özben 2015). Çünkü antioksidanlar sağlıklı hücrelerde antikanser ilaçların neden olabileceği yan etkileri azaltırken, kanser hücrelerinin tedaviye direncini artırabilir.

İlaç direnci, spesifik hedefleme zorluğu ve kanser kök hücrelerinin kendini yenileme özellikleri nedeniyle, kanser tedavisi başarısızlığına katkıda bulunur. Kanser kök hücreleri hem primer kanser hücreleri hem de kemo ve radyoterapi direncinin olduğu öne sürülmüştür. Kanser kök hücrelerini hedeflemek için ilaçların tam olarak verilebilmesi kanser tedavisi için bir ihtiyaçtır. Vücut sıvılarında geniş çapta dağılmış ve tümörgenezi de içeren çok sayıda hastalık işleminde yer alan eksozomlar, hücre kaynaklı doğal nanometrik veziküllerdir. Antikanser ilaçları ve genleri tedavide kullanmak için güçlü bir nanokariyer olarak eksozomların kullanılması yenilikçi yaklaşımlar arasındadır (Wang vd. 2017).

### **2.3.2 Kanser Tedavisinde İmmünotoksin, Kardiyotoksisite ve Mikrobiyota'nın Rolü**

İmmünoterapi, kemoterapi ve radyasyonla birlikte en iyi kanser tedavisi yöntemlerinden biri haline geldi. "İmmünotoksin Tedavisi" umut verici bir kanser tedavisi yöntemidir. İmmünotoksinler, kanserde bulunan bir antikör hedef proteinlerine bağlanan bir toksinden yapılır. Birinci kuşak immünotoksinler, bütün monoklonal antikörlere bağlı tam uzunlukta bir toksinden yapılmıştır. Ancak, bu immünotoksinler normal hücrelere bağlanabilir. DAB389IL2, FDA tarafından onaylanan ilk immünotoksindir. İmmünotoksinlerle kombinasyon halinde minimal immünojenliğe ve hedef hücre öldürme için en yüksek potansiyele sahip proteinlerin bulunmasına dair mevcut eğilimler ve araştırmalar devam etmektedir (Allahyari vd. 2017).



Kanser insidansı artmakta ve doktorlar düzenli olarak sitotoksik tedavilerin yan etkileri ile karşı karşıya kalmaktadır. Kanser, tedaviye bağlı kardiyotoksisite ciddi bir komplikasyondur. Çünkü ölümcül olabilir ve tedavinin geçici veya kalıcı olarak kesilmesine neden olabilmektedir (Frères vd. 2016).

Modern kanser tedavisi birçok kanseri başarıyla tedavi ederek, terminal hastalığı kronik hastalığa dönüştürdü ve kanserden kurtulanların sayısını artırdı. Bununla birlikte kanser, zamanla miyokard hasarına neden olabilir, endotel disfonksiyonunu indükleyebilir. Böylelikle kansere bağlı komplikasyonların yol açtığı hastalıkların oluşmasında rol oynayabilir. Bu nedenle kardiyologlar, kanser tedavisinin kardiyovasküler komplikasyonlarının teşhisi, önlenmesi ve yönetimi konusunda bilgili olmalıdırlar (Chang vd. 2017).

Konak ve mikrobiyota arasındaki ilişki, iltihaplanma ve bağışıklık dahil fizyolojik fonksiyonları düzenler bazı virüsler ve bakteriyel türler onkogeneze yer alırken, mikrobiotadaki bazı mikroorganizmaların da kansere karşı mücadelede yararlı bir rolü vardır. Alkilleyici ajanlar ve immün kontrol noktası blokerleri dahil olmak üzere birçok terapi etkinliği, eğitimini bağırsak mikrobiyotasından alan bağışıklığa dayanır. Kanser tedavisinde immüno-uyarıcı oligonükleotitler ve platin tuzları ile mikrobiyota, pro-enflamatuar faktörlerin ve reaktif oksijen türlerinin salınmasına aracı olarak yanıtı modüle eder. Bu yeni bilgi, mikrobiyotayı hedef alarak kanser tedavisini ve toksik yan etkilerini modüle etme konusunda umut verici klinik olanaklar sunmaktadır (Perez-Chanona vd. 2016).

### **2.3.3 Kanser Tedavisinde Lizin Spesifik Dimetilaz (LSD1) İnhibitörleri**

KDM1A olarak da ifade edilen LSD1 enzimi DNA'da bulunan bazı histon proteinlerinden metil gruplarının koparılmasında görev alır. Çoğu kanser türünde bu enzimin aşırı üretildiği belirlendi (Yang vd. 2018). Bu nedenle LSD1 kanser tedavisi için biyolojik olarak doğrulanmış önemli bir epigenetik hedef haline gelmiştir. LSD1, birçok hücrel sinyalleşme yoluna aracılık eder ve kanserlerin başlatılması ve gelişmesinde rol oynar. Farklı kanser türlerinde LSD1'nin aşırı ekspresyonu gözlenmiştir ve küçük moleküller tarafından inaktivasyon, kanser hücresi farklılaşmasını, çoğalmasını,

yayılmasını ve göçünü baskıladığı belirtilmiştir (Fu vd. 2017).

### **2.3.4 Kanser Tedavisi ve Small İnterfering RNA (siRNA)**

Canlı hücrelerinde bulunan genlerden hangilerinin nasıl aktifleşeceği mikroRNA (miRNA) ve küçük interferans RNA (siRNA;small interferring RNA) adı verilen küçük RNA moleküllerince düzenlenir. Bu nedenle kanser gelişiminde rol alan onkogenlerin aktifleşmesini önleyebilmek adına son yıllarda RNA temelli terapötik yaklaşımlar üzerinde de durulmaktadır. Bu yaklaşımda siRNA, mRNA ekspresyonunu hedefleyerek kanserojen genlerin ekspresyonunu baskılanması hedeflenir. Bununla birlikte, in vivo sistemik siRNA tedavisi, zayıf hücre alımı, fizyolojik koşullar altında kararsızlık, hedef dışı etkiler ve olası immünojeniklik gibi engeller tarafından engellenir. Bu zorlukların üstesinden gelmek için, sistemik siRNA terapisi klinik olarak uygun, güvenli ve etkili ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesine bağlıdır (Singh vd. 2018).

### **2.4 Karaciğer Kanseri**

Karaciğer tümörleri 3 bölümden oluşmaktadır. Primer benign, primer malign ve sekonder (metastatik) tümörlerdir (Çizelge 2.2). Primer benign tümörler nadir görülür ve karaciğer tümörlerinin %5' ten azını oluşturmaktadır. En önemlileri arasında karaciğer hemanjiomu, hepatosellüler adenom, fokal nodüler hiperplazi ve safra kanalı adenomu yer almaktadır. Primer malign tümörlerin %70'ten fazlasını hepatosellüler karsinom, %14'ünü kolanjiokarsinom ve geri kalanını mezenşimal tümörler oluşturmaktadır. Çocukluk döneminde hepatoblastoma ise karaciğer tümörlerinin % 2'sini oluşturmaktadır. Metastatik tümörler içerisinde en önemli olanı kolorektal karaciğer metastazları teşkil etmektedir. Lenf nodundan sonra metastazların en sık görüldüğü organ karaciğerdir. Otopsi raporlarında kansere bağlı ölümlerin % 25-50 oranında karaciğer metastazı bulunmuştur (Varoğüneş vd. 1997).

En sık karaciğer metastazı yapan maligniteler akciğer, meme ve kolon karsinomlarıdır. Karaciğerin birincil tümörleri oldukça azdır. En sık görülen benign lezyonları kavernöz hemanjiomlarıdır. Vücudun herhangi bir bölgesindeki kanser yanısıra lösemi ve lenfomalar da karaciğere yayılabilir (Cotran vd. 1994 ve Lee 1994). Karaciğerin en sık

birincil malign tümörü olan hepatosellüler karsinom, endemik viral hepatit bölgelerindeki malignitelerin %20-40'ından sorumludur (Cotran vd. 1994). Kuzey Amerika ve Batı Avrupa'da, 1000000 de 44'ün altında olmasına karşın, Güneydoğu Asya ve Sahra Afrika'sında insidansı 50 kat daha çoktur ( Lee 1994).

**Çizelge 2.2** Karaciğer Kanserinde Sınıflandırma

<b>Karaciğer Tümörlerinin Sınıflandırılması</b>		
<b>Tümör Çeşitleri</b>	<b>Sınıflandırma</b>	
Primer Benign Tümörler	Epitelial tümörler	Hepatosellüler
		Hepatosellüler adenoma
		Fokal nodüler hiperplazi
		Nodüler transformasyon
		Kolanjiosellüler
		Safra kanalı adenomu
		Biliyer kistadenom
	Mezenşimal tümörler	Adipoz doku
		Lipom
		Miyolipom
		Anjiolipom
		Vasküler doku
		İnfanıl hemanjioendotelioma
		Memanjoma
		Mezotelial doku
		Benign mezotelioma
		Mezenşimal hamartoma
	Mikst tümörler	Benign teratoma
Primer Malign Tümörler	Epitelial Tümörler	Hepatosellüler karsinoma
		Kolanjiokarsinoma
		Hepatoblastoma
	Mezenkimal tümörler	Anjiyosarkom
		Mikst tümörler
		Rabdomiyosarkom
		Leiomyosarkom
		Nöroendokrin
Sekonder Malign Tümörler	Kolorektal	
	Nonkolorektal	

Karaciğer kanserinin çoğu, % 83'ü daha az gelişmiş ülkelerde meydana geldiği ve en yüksek oranda Asya ve Afrika'da gözlendiği ifade edilmektedir (Ferlay vd. 2015). Karaciğer kanseri insidansı eğilimleri dünya çapında farklılık göstermektedir. Örneğin Asya ve Pasifik Adalılarında karaciğer kanseri insidansı son

yıllarda sabit veya azalma eğilimindedir (Petrick vd. 2016). Kore'de ise genel karaciğer kanseri insidansının 1999-2014 yılları arasında artış gösterdiği ifade edilmektedir (Jung vd. 2017).

Ülkemizde ise karaciğer kanseri, insidansı düşük maligniteler arasında yer almaktadır. Tüm kanser olguları içerisinde karaciğer kanseri oranı erkeklerde %1.92, kadınlarda %1.65 dir. En sık görüldüğü bölge olan Güneydoğu Anadolu Bölgesinde bile, en sık görülen karsinomlar arasında kadınlarda 10. erkeklerde 8. sırada yer almaktadır (Tuncer vd. 1994).

#### **2.4.1 Karaciğer Kanserini Etkileyen Faktörler**

Karaciğer kanseri çok geç farkedilmediği sürece hastanın kaybedilme ihtimali düşüktür. Dünya genelinde en yaygın görülen altıncı kanser türü olup, 2012'de yaklaşık 800.000 vaka bildirilmiştir. Karaciğer kanseri neredeyse her zaman altta yatan bir hastalıktan kaynaklanır, ancak bu hastalığın kaynağı tüm dünyada çeşitlilik gösterir. Bunlar arasında hepatit B virüsü, zayıf diyet, hareketsizlik ve mantar toksinleri sayılabilir. Yapılan aşılar hepatit B hastalığını önleyebilir, gelişmiş sağlık uygulamaları yağlı karaciğer hastalığının ilerlemesini yavaşlatabilir, hatta durdurabilir. İyi tarım uygulamaları ve saklama koşulları mantar gelişimini sınırlayabilir (Gravitz 2014). Karaciğer kanseri risk faktörlerinin % 80'ini oluşturan risk faktörleri arasında kronik hepatit B veya hepatit C virüsü enfeksiyonları, bazı metabolik karaciğer hastalıkları ve sirozun olduğu bilinmektedir (Zhao vd. 2016). Ayrıca tehlikeli hava kirleticileri de karaciğer kanseri oluşumunda risk faktörü olarak görülmektedir. Artan üretime bağlı olarak daha fazla oluşan hava kirleticilerine maruz kalma ile karaciğer kanseri varlığı arasında bir ilişki olduğu öne sürülmektedir. (Cicalese vd. 2017).

Karaciğer rezeksiyonu, karaciğer transplantasyonu ve perkütan ablasyon gibi cerrahi girişimler, karaciğer kanseri için küratif potansiyel ile en etkili yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Ne yazık ki, sayısız lezyon ve ekstrahepatik metastaz nedeniyle karaciğer kanseri hastalarının sadece % 20'si ameliyat için uygundur. Bununla birlikte, klinik yararları mütevazı kalmıştır ve Sorafenib'in yaklaşık % 30 hasta için faydalı olduğu ve altı ay içinde ilaç direncinin geliştiği bildirilmiştir (Chen vd. 2015).

Öte yandan, karaciğer kanseri için kemoterapötik ilaçlar sınırlıdır ve en yaygın reçeteli ilaç grubu Sorafenib'dir. Faz III denemeleri, Sorafenib'in genel hayatta kalma süresini ve ilerleme sürelerini artırabileceğini göstermiştir (Bruix vd. 2012 ve Peng vd. 2014).

Yapılan bir araştırmada karaciğer hastalığı olan ve olmayan hastalarda karaciğer kanserinin gelişimini karşılaştırmak için geriye dönük uyumlu bir tasarımı uygulandı. 66.192 hasta ve karaciğer hastalığı olmayan belirli sayıdaki sağlıklı gönüllülerle yürütülen çalışmada; tüm hastalarda yaşa ve gelir seviyesine göre sınıflandırılan her grubun karaciğer kanseri ile ilişkisini belirleyebilmek adına cox-orsal tehlike regresyonu yapıldığı belirtilmektedir. Yapılan alt grup analizlerinin, karaciğer hastalığının varlığının yaşlılarda olduğu kadar gençlerde de önemli bir risk faktörü olduğunu ve Medicaid (düşük gelir grubu) hastalarında daha yüksek bir karaciğer hastalığı riskinin gözlemlendiğini gösterdiği ifade edilmektedir. 50 yaşın altındaki gençlerde karaciğer kanseri gelişimine dikkat edilmesi gerektiği ve düşük gelirli hastalar arasında karaciğer kanseri insidansını azaltmak için önleyici çabalara ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (Suh vd. 2018).

#### **2.4.2 Karaciğer Kanseri (Hepatoselüler Karsinom) Tanı ve Tedavi Yöntemleri**

Hepatoselüler karsinom ölümcül bir neoplazidir. Bazı çalışmalar, sirozlu hastalarda hepatoselüler karsinomun başlıca ölüm nedeni olduğunu göstermiştir (Liccioni vd. 2014). Görülme sıklığı artmakta ve ileri karaciğer hastalığı ile yakından ilişkilendirilmektedir. Siroz, bu malignite için en büyük risk faktörünü temsil etmektedir (Hartke vd. 2017).

Hepatoselüler karsinom tedavisinde doxorubicin kemoterapik bir ajandır. Bununla birlikte, vitamin E türevleri, özellikle  $\gamma$ -tokotrienol açısından zengin fraksiyonlar, apoptoza neden olduğundan kanser hücreleri üzerinde anti-proliferatif ve inhibe edici etkiye sahiptir. Hücrelerin,  $\gamma$ -tokotrienol ve kemoterapi ilaçlarıyla birlikte işlem gördüklerinde sinerjik etki gözlenmiştir (Özyurt 2017).

Hepatoselüler karsinomun ana etiyolojisi, hepatit B ve hepatit C virüsünün kronik enfeksiyonudur. Hepatoselüler karsinom patoloji ile teşhis edilmez. Hepatoselüler

karsinom için tedaviler, tümörün ilerlemesi ve hepatik rezerv göz önünde bulundurularak seçilir. Hepatik rezeksiyon, karaciğer nakli lokal ablasyon tedavisi, transarterial kemoembolizasyon kemoterapi ve radyasyon terapisi tercih edilebilmektedir (Yamashita ve Kaneko 2016).

Cerrahi rezeksiyon ve transplantasyon, erken evre hepatoselüler karsinomda tedavinin temel taşı olsa da, lokaljiyonel tedavi ve sorafenib, daha ileri hastalığı olanlarda veya cerrahi aday olmayanlarda faydalıdır. Zaman zaman, hem cerrahi hem de lokalistik tedavinin entegrasyonu gerekli olabilir. Dolayısıyla, hepatoselüler karsinomun tedavisinde ideal sonuçlar için en uygun tedaviyi ve çeşitli tedavilerin zamanlamasını belirlemek için multidisipliner bir yaklaşım gerekmektedir (Grandhi vd. 2016).

Karaciğer kanseri tespiti ve tedavisinde gelişmeler, hastalığın erken aşamalarında iyileştirilme olasılığını arttırsa da, ne yazık ki çoğu hastada hastalığın tekrar etme olasılığı mevcuttur (Sun vd. 2016). Kanser hastalığı tedavi edildikten sonra tekrar etme olasılığının minimize edilmesinin kanser kök hücrelerinin yok edilmesine bağlıdır. Kanser kök hücreleri, kanser hücrelerinin oluşmasına öncüllük eden hücrelerdir ve kemoterapiye dirençlidir. Bir tümör içindeki kanser kök hücreleri alt popülasyonlarının tanımlanması, kanser gelişiminde yeni bir anlayış sunmaktadır. Bu anlayış, tümörlerin kanser kök hücrelerinin hedeflenerek yok edilebileceği, kanser tedavisinin bu şekilde daha etkili olabileceğini ve hastalığın tekrar nüksetmesinin önüne geçilebileceğini öne sürmektedir. Genellikle karaciğer kanseri kök hücreleri tümör büyümesinden, metastazından ve karaciğer kanseri tekrarından ve ayrıca kemoterapi ve radyoterapinin başarısızlığından sorumlu olduğu düşünülmektedir (Xu vd. 2010).

Bu bilgiler karaciğer kanseri tedavilerinin, tümör hücrelerinin çoğunu öldürmesine rağmen sonuçta başarısız olabileceğini, çünkü uygulanan tedavilerin çoğunlukla yeni tümörleri oluşturabilecek karaciğer kanseri kök hücrelerini ortadan kaldırmadıklarını göstermektedir. Bu nedenle, kanser kök hücre teorisi, tümör teşhisi, tedavisi ve önlenmesi konusunda yeni bilgiler sunmaktadır.

### 2.4.3 İn Vitro Modellemelerde HepG2 Hücre Hattının Kullanımı

HepG2 (insan hepatoselüler karsinoma) hücre hattı ilk olarak, 15 yaşında Amerikalı beyaz bir erkeğin hepatoselüler karsinoma örneğinden hazırlanmıştır. HepG2 hücre hattı, çalışma ve kültürü bakımından diğer hücre hatlarına göre daha kolay olması bakımından tercih edilmektedir. İn vitro modellemelerde plazma proteinlerini üretebilmesi, üretilen proteinleri işleyebilmesi, biyosentetik özelliklerinin normal hepatositlere benzerliği, hücre yüzey reseptörlerini koruyabilmesi, yüksek-düşük yoğunluklarda lipoproteinlerin sentezlenebilmesi-salınması, karaciğere özel çeşitli serum proteinlerini üretebilmesi, sitokrom p450'ye bağımlı monooksijenaz enzimlerine sahip olması ve glukuronat-sülfatla birleşme tepkimelerini gerçekleştirebilmesi sonucu detoksifikasyon işlemlerinde gerekli olan normal biyotransformasyon etkinliklerinin çoğunu yapabilmesi gibi özellikleri HepG2 hücreleri ile çalışmanın avantajlarındanır. Bu nedenle in vitro toksisite modellemelerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Dehn vd. 2004).

Hepatoma hücre hatları sıklıkla primer insan hepatositlerine in vitro alternatifler olarak kullanılır. Hücre hatları sınırsız ömürleri, sabit fenotipleri, yüksek kullanılabilirlikleri ve kolay kullanımları ile karakterize edilir. Bununla birlikte, bazı metabolik aktiviteleri hepatositlerle karşılaştırıldığında daha düşük kaldığı ifade edilmektedir. HepG2 hücre hatları, yüksek çoğalma oranlarına sahip olmayan ve çok farklılaşmış hepatik fonksiyonları gerçekleştiren epitelyal bir morfolojiye sahip olan nontorigenik hücrelerdir (Donato vd. 2015). HepG2 hücreleri bitki sitotoksitesi araştırmalarında da kullanılmıştır (Lee vd. 2000 ve Park vd. 2002).

İnsan HepG2 hücre hattının gen ekspresyonunda, viral enfeksiyonun bulunmaması nedeniyle sıklıkla hepatosellüler karsinom modeli olarak kullanılan HepG2 hücre hattı, insan karaciğer karsinomunun saf hücre çizgisini temsil eder. Bununla birlikte normal hepatositlere kıyasla HepG2 hücrelerinde 2646 geninin önemli ölçüde aşağı regüle edildiği, 3586 geninin ise önemli ölçüde yukarı regüle edildiği gösterilmiştir (Costantini vd. 2013).

## 2.5 Karaciğer Kanseri ve İnflamasyon

Bilim adamları inflamasyon ile ilgili farklı tanımlamalarda bulunmuştur. İnflamasyonun klinik özelliklerinin tarihçesi Celsus tarafından İ.Ö 3000'li yıllarda rubor (eritem), tumor (ödem) calor (ısı artışı) ve dolor (ağrı) terimleriyle tanımlanmıştır. İskoç cerrah John Hunter 1793 yılında inflamasyonun bir hastalık olmadığını nonspesifik bir durum olduğunu ileri sürmüştür. Thomas Lewis ise derideki inflamasyon ile ilgili yaptığı bir çalışmada histaminin inflamasyondaki vasküler değişikliklere neden olduğunu öne sürmüştür. Bu kavram inflamasyonda kimyasal mediatörlerin önemini vurgulamış ve antiinflamatuvar ajanların kullanılmasına sebep olmuştur (Kumar vd. 2013).

İnflamasyonun temel amacı hücre hasarını durdurmak ve zarar gören hücreleri iyileştirmektir. Herhangi bir iyileşme sağlanamıyorsa inflamasyonu yok etmek gerekmektedir. Aksi halde vücudun o bölgesinde çok fazla yıkım meydana gelebilir (İnt Kay.4). İnflamasyonun oluşumunda kan damarları ve lökositler önemli rol oynar. İnflamasyonun başlaması vasküler ve hücrel reaksiyonları, çeşitli hücreler tarafından üretilen veya bazı plazma proteinlerinden kaynaklanan mediatörler aracılığı ile olmaktadır (Goldman vd. 2012).

### 2.5.1 Akut ve Kronik İnflamasyon

Vücudumuzda meydana gelen tüm inflamasyonlar akut veya kronik olarak ikiye ayrılır. Akut inflamasyon zararlı uyarılara karşı oluşan ilk yanıttır. Akut inflamasyon deride bir kesik olması, tırnağın içe batması, bileğin incinmesi veya boğaz ağrısı gibi küçük olayların sonucunda olur. Akut inflamasyonun bulguları ağrı, ısı artışı, kızarıklık, şişlik ve/veya fonksiyon kaybıdır (Şentürk 2013).

Akut inflamasyon hızlı başlar, süresi kısadır (birkaç saat- birkaç gün), önemli özelliği ödem ve lökositlerden zengin doku infiltrasyonudur. Kronik inflamasyon akut inflamasyonu takip edebilir ya da sinsiçe başlayabilir. Süresi daha uzundur, dokularda lenfosit ve makrofaj hakimiyeti, vasküler proliferasyon, fibrozis ve doku yıkımı ile karakterizedir (Kumar vd. 2013).



Dokuların ve zedeleyici ajanın özellikleri inflamasyonun iyileşme, fibrozis veya kronikleşme sonucunu belirlemektedir. Uygun olmayan inflamasyon kronik inflamatuvar hastalıklarda dokuların yıkımına yol açmaktadır (Şentürk 2013).

Kronik inflamasyon, kalp hastalığı, romatoid artrit ve lupus gibi otoimmün hastalıklara yol açabilir. Uzun süre devam eder ve ciddi rahatsızlıkların neticesinde ortaya çıkar. Bazen de kendisi ciddi sorunlara neden olur. Çevresel etken veya alışkanlıklar da kronik inflamasyonun ortaya çıkmasına neden olabilir. Örneğin, aşırı kilo, sağlıksız beslenme, hareketsizlik, stres, sigara içmek ve aşırı alkol tüketmek kronik inflamasyona yol açan etkenlerdendir (İnt Kay. 4).

İnflamasyon mikroorganizmanın ya da ölü dokuların tanınmasıyla başlar. Doğal immün sistem yanıtıyla başlayıp kazanılmış (adaptif) immün yanıtla devam edebilir. Kronik inflamasyon enfeksiyonun tamamen yok edilemediği ya da doku hasarının uzadığı durumlarda ortaya çıkar ve tamir sürecinde sıklıkla angiogenesis ve fibrozis görülür. İnflamasyonda kompleman sistemi, sitokinler, akut faz proteinleri ve fagositik hücreler rol oynarlar. Ölü hücreler, kristaller, mineraller ve protein agregatları gibi bir çok steril uyarı da inflamasyonun tetiklenmesinde etkilidir. Bu etkenlerle oluşan inflamasyon steril inflamasyon olarak adlandırılır (Baştürk 2017).

### **2.5.2 İnflamasyon Tanı ve Tedavi Yöntemleri**

İnflamasyon tanısında akut vakalarda özellikle inflamasyonun olduğu bölge kronik inflamasyonda ise eklemler ve cilt muayene edilir. Sonrasında şüphelenilen tanıyı doğrulamak için çeşitli laboratuvar testleri ve görüntüleme yöntemleri kullanılır. İnflamasyon varlığını gösteren iki kan testi bulunmaktadır. Bunlar yüksek hassasiyetli C-reaktif protein (hsCRP) ve fibrinojeni içerir. Yüksek hsCRP seviyeleri iltihaplanmaya işaret eder. Ancak bu test kronik bir iltihaplanma için spesifik bir belirteç değildir, çünkü yeni bir yaralanma veya hastalıktan kaynaklanan akut iltihapta da yükselir. Tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- $\alpha$ ), interlökin-1 beta (IL-1  $\beta$ ), interlökin-6 (IL-6) ve interlökin-8 (IL-8) gibi sitokinlerin saptanması pahalı bir yöntemdir. Ama bu testlerle kronik inflamasyona neden olan spesifik faktörler tanımlanabilir (İnt Kyn.5). Sunulan çalışmada

deney gruplarından elde edilen numunelerde inflamasyonu belirlemek amacıyla TNF- $\alpha$ , IL-6 ve TGF- $\beta$ 1 düzeyleri analiz edilmiştir.

### **2.5.3 İnflamasyonun Kanser ve Karaciğer Kanseri ile İlişkisi**

Bazı organlardaki inflamatuvar durumlar kanser riskini artırır. Ayrıca, iltihaplanma ile epidemiyolojik olarak ilişkili olmayan tümörlerin mikro ortamında da iltihaplı bir bileşen bulunur. Bilimsel çalışmalar inflamasyon ve kanseri birleştiren moleküler yolların olduğunu göstermiştir. Organizmada yapı ve fonksiyonu bozulan hücrelerin yaşamı programlı bir mekanizma ile sonlandırılır. Buna programlı hücre ölümüne (apoptoz) adı verilir. Apoptozda temel olarak intrinsik (içsel) ve ekstrinsik (dışsal) olmak üzere 2 sinyal yolu etkilidir. İntrinsik (neoplaziye neden olan genetik olaylar tarafından yönlendirilir) ve ekstrinsik (kansere neden olan inflamatuvar koşullar tarafından tahrik edilir) sinyal yolları iltihaplanma ve kanseri birbirine bağlar. Hücrelerin çoğalmasını ve hayatta kalmasını, anjiyogenezi, metastazı, adaptif immünitinin bozulmasını, hormonlara ve kemoterapötik maddelere tepkiyi teşvik eder. Kansere ilişkili inflamasyon, yenilikçi teşhis ve tedavi stratejileri için bir hedefi temsil eder (Mantovani 2010).

Kronik inflamasyonun maligniteyi arttırdığı ve şiddetlendirdiği bilinmektedir. Çoğunlukla hepatosellüler karsinom olan primer karaciğer kanseri, hepatosellüler karsinomların % 90'ından fazlası hepatik yaralanma ve inflamasyon bağlamında ortaya çıkmaktadır. Kronik inflamasyon; fibroz, siroz ve hepatosellüler karsinomun art arda gelişmesine yol açan kalıcı karaciğer hasarı ve eş zamanlı rejenerasyon ile ilişkilidir. Bu nedenle, kronik karaciğer hasarından displaziye ve hepatosellüler karsinomaya geçişe neden olan temel inflamatuvar sinyal yollarının tanımlanması, kronik karaciğer inflamasyonu olan hastaları tanımlamak ve tedavi etmek için yeni öngörücü biyobelirteçleri ve hedefleri gösterebilir. Karaciğer kanserini önlemek ve tedavi etmek için anti-inflamatuvar ajanların klinik gelişimini hızlandırmak için inflamatuvar sinyalleme inhibisyonu ile ilgili mevcut sınırlamalar ve potansiyel zorlukların aşılması önemlidir (Bishayee 2014).

## 2.6 Kanser ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres, reaktif nitrojen türlerinin ve reaktif oksijen türlerinin üretilmesinde ve oksidanların uzaklaştırılmasında bir dengesizlik olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif stres oksidan ve antioksidan maddeler arasındaki bir dengesizliği temsil eder. Bu dengesizlik oluştuğunda, biyomoleküller zarar görür ve normal hücre metabolizması bozulur. Bu durum hücre içi ve hücre dışında değişikliklere neden olur. Reaktif oksijen türleri mutasyonlar, delesyonlar (kromozomun bir parçasının kopması veya yok olması), gen amplifikasyonu ve yeniden düzenlemeler gibi DNA'da, malign dönüşümlere, kanser başlamasına ve ilerlemesine yol açan lezyonlara neden olabilmektedir (Rodrigues vd. 2014).

Bir organizmada bulunan reaktif türlerinin seviyesi yüksekse ve antioksidan savunma mekanizmaları bunların detoksifikasyonunda yetersiz kalırsa, antioksidanlar tarafından etkisiz hale getirilememiş reaktif moleküller, lipidlere, proteinlere veya doğrudan DNA'ya etki ederek zarar oluşturabilir. Oksidatif stres aracılı oluşan DNA hasarı karsinogenezin başlama sebeplerinden biri olarak gösterilmektedir (Lee vd. 2017).

Oksidatif stres iç veya dış kaynaktan tehlike sinyali aldığı anda DNA'yı oksidatif hasara ve anormal protein ekspresyonuna ve vücudu kanser gibi çeşitli hastalıkların gelişmesine karşı bir zayıflık durumuna sokar. Hepatit B virüsü ve hepatit C virüsü enfeksiyonu, alkol kullanımı ve nanokolik stereohepatit dâhil olmak üzere karaciğer kanserogenezinde rol oynayan birçok faktör vardır (Wang vd. 2016).

Hepatit C virüsü enfeksiyonu, özellikle batı ülkelerinde kronik karaciğer hastalıklarının ve Hepatitelüler karsinomanın baskın nedenidir. Oksidatif stresin olduğu hepatit C virüsü ile ilişkili hepatitelüler karsinomanın gelişiminde ve ilerlemesinde çoklu moleküler mekanizmalar yer alır. Hepatit C virüsü enfeksiyonu reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimini indükler ve endojen antioksidanların işlevini bozar. Aşırı miktarda reaktif oksijen türleri doğrudan DNA'ya, lipidlere ve proteinlere zarar verir. ROS dolaylı olarak bir dizi sinyalleme kaskadını aktive eder ve birçok transkripsiyon faktörünün aktivitesini modüle ederek hücre sağkalımını, proliferasyonunu, anjiyogenezini, istilasını ve metastazını kontrol eden genlerin ekspresyonunun değişmesine neden olur (Fu vd. 2017).

### 2.6.1 Karaciğerde Oksidan-Antioksidan Sistem

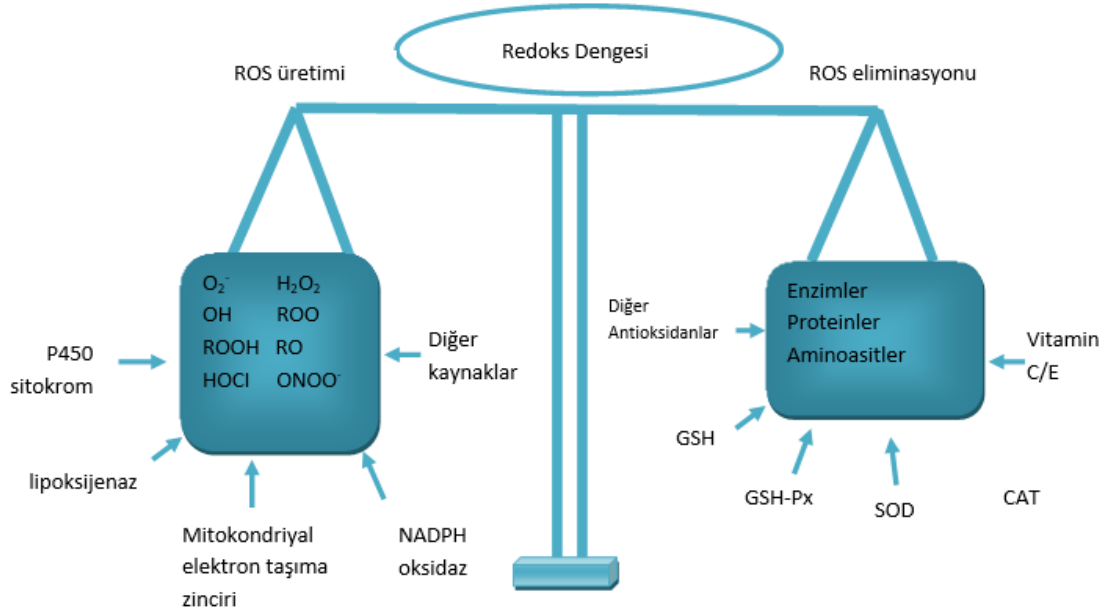
Organizmada ksantobiyotikleri (ilaç veya toksik etkili bileşikler gibi gıda dışında vücuda alınan maddeler) endojen ve ekzojen diğer molekülleri metabolize ederek, metabolizmanın devamlılığını sağlayan ana organ karaciğerdir. Karaciğer metabolizmanın düzenlediği ve organların başında gelmektedir. Karaciğer metabolizmanın düzenlenmesinde etkin bir rol oynarken serbest radikallerin ve oksidan moleküllerin etkisine aşırı miktarlarda maruz kalabilmektedir.

Karaciğer dokularında bulunan hücre tipleri; hepatosit hücreleri, Kupffer hücreleri, karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri, pit hücreleri (karaciğer ile ilişkili lenfositler) ve hepatik stellat hücreler şeklinde sınıflandırılabilir (Casas-Grajales vd, 2015 ve Sha vd. 2015).

Karaciğerde bulunan parankimal hücreler, oksidatif stresin oluşumuna neden olabilecek moleküllerin en fazla üretildiği hücreler arasındadır. Parankimal hücrelerde mitokondri, mikrozoimler ve peroksizomlarda PPAR- $\alpha$  aracılığıyla şekillenen yağ asidi oksidasyonu sırasında aşırı miktarda ROS üretilmektedir. Karaciğer, Kupffer hücreleri, hepatik stellat ve endotel hücreleri oksidatif strese meydana gelen artışlardan olumsuz etkilenen hücrelerin başında gelir. Özellikle kuffer hücrelerinde oksidatif stres ile TNF- $\alpha$  gibi proinflamatuvar stokinlerin üretimi artarak inflamasyon apoptoz uyarılabilir. Benzer şekilde hepatik stellat hücrelerinde kollojen sentezi ve proliferasyon sırasında oluşan lipidperoksidasyonu da karaciğer hücrelerinde oksidatif streste artışlara neden olabilir (Sanchez-Valle, 2012, Sakaguchi vd. 2012, Cichoż-Lach ve Michalak, 2014).

Karaciğerde metabolize edilen maddelerin metabolizmaları sırasında gerçekleşen redoks homeostazını korumak için özel bir antioksidan savunma sistemi bulunmaktadır (Casas-Grajales vd. 2015). Memeli karaciğerinde bulunan bu antioksidan sistemler karaciğerde redoks dengesini sağlarken, aynı zamanda metabolizmanın devamlılığını sağlar. Çünkü karaciğerde redoks dengesinin bozulmasına bağlı olarak ROS'un aşırı üretimi sonucu öncelikle karaciğer hastalıkları oluşur (Şekil 2.4). Oluşan karaciğer hastalığının kronik hale gelmesi sonucu ise oragnizmada sistemik oksidatif streste artışlar oluşmaya başlar.

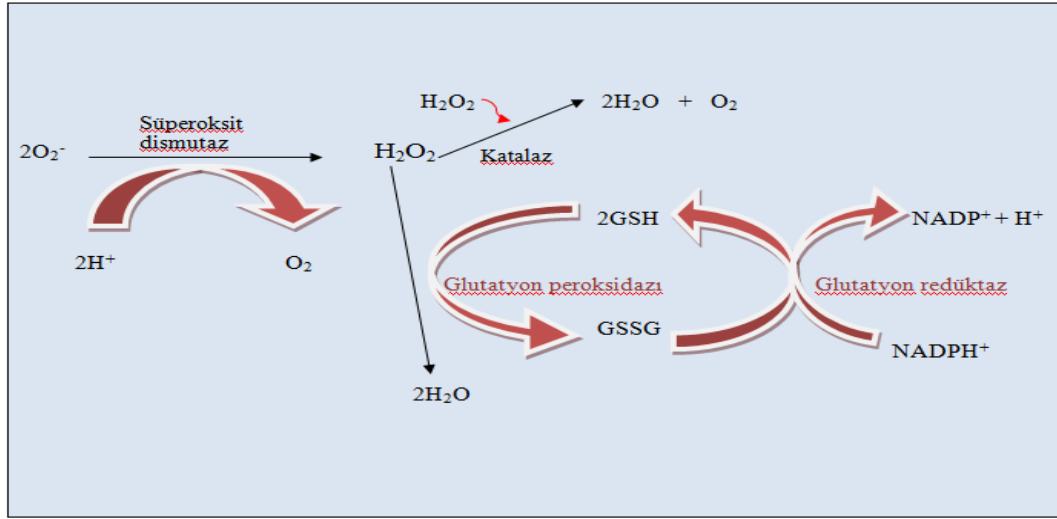
Sistemik oksidatif stresin artması; ekstrahepatik organlar olarak bilinen beyin, böbrek gibi organlarda hasarlar oluşmasına, immün sistemin zayıflayarak organizmanın diğer hastalıklara açık hale gelmesine sebep olabilir (Palma vd. 2014).



Şekil 2.4 Karaciğerde redoks dengesinin sağlanması (Casas-Grajales vd. 2015).

Karaciğerde oksidan-antioksidan dengenin sağlanabilmesi için hem endojen (enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar) hem de eksojen (vitaminler, sekonder metabolitler vb.) antioksidanlar ihtiyaca göre kullanılabilir. Özellikle metabolizmanın sürdürülmesinde görev alan enzimatik antioksidanlar (SOD; süperoksit dismutaz, CAT; katalaz, GSH-Px; glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz) ve nonenzimatik antioksidanlar (Glutatyon, seruloplazmin, transferrin, bilirubin vb.) karaciğer hücrelerince yoğun bir şekilde kullanılarak serbest oksijen radikalleri (ROS) detoksifiye edilmeye çalışılır (Şekil 2.5). Metabolizmanın bozulması veya karaciğer hastalıklarının oluşması sonucunda, özellikle de kronik dönemde antioksidan-oksidan sistem arasındaki denge oksidanlar lehine daha çok kaymaya başlar. Bunun nedenleri arasında, metabolizmanın bozulmasına bağlı olarak serbest radikallerin ve oksidan moleküllerin aşırı üretimi ve organizmada aktif kullanılabilecek antioksidan seviyelerinin düşmesi sayılabilir. Nitekim hepatokarsinomlarda karaciğer dokusunda antioksidan düzeyleri ile ilişkili olarak yapılan ilk çalışmalardan biri olan Corrocher ve arkadaşlarının (1986)

yaptıkları çalışmada karaciğer kanseri hastalarının karaciğer dokularında CAT, GSH, GSH-Px düzeylerinin azaldığı belirlenmiştir.



**Şekil 2.5** Enzimatik antioksidanlar ve etki mekanizmaları (Sarıova, 2019).

Karaciğer, ksantobiyotiklerin yani ilaç veya toksik etkili olabilecek birçok kimyasalın detoksifikasyonunda görev alan organdır. Detoksifikasyon sürecinde üretilen ROS ve RNS türleri hepatotoksisite gelişmesinde rol oynayabilmektedir. Bununla beraber ksantobiyotiklerin kullanım süresi, dozu maruz kalan organizmanın durumu (yaşı, kilosu vb) gibi durumlar hepatotoksisitenin gelişmesi sırasında oksidatif strese farklı değişimler görülebileceğini işaret etmektedir. Örneğin kronik alkoliklerde karaciğer ve kan GSH seviyelerinin genelde azaldığı, bununla beraber SOD, CAT gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinin alkol kullanım süresi ve miktarına bağlı bir şekilde artış veya azalış gösterebileceği ifade edilmektedir. Serumda ise lipidperoksidasyonun bir göstergesi olan MDA seviyelerinin genelde artış gösterdiği, serum vitaminlerinin (vitamin E ve vitamin C) genelde düştüğü belirtilmektedir (Videla vd. 2004, Das vd. 2008 ve Chen vd. 2011).

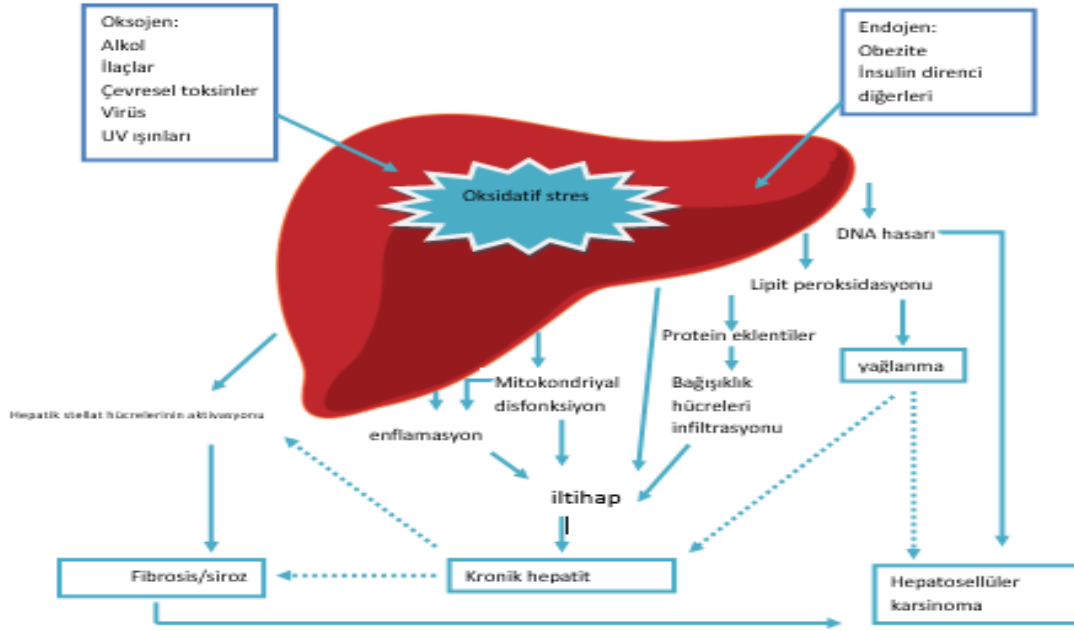
Hastalıkların tedavisinde kullanılan (antiinflamatuvar, antidepresanlar, antikanserojenler vb.) ilaçların özellikle yüksek dozlarda karaciğer hücrelerinde oksidan molekül ve lipidperoksidasyonu seviyelerini artırarak ve antioksidanların aşırı tüketilmesine sebep olarak toksisitelerini gösterebileceği belirtilmektedir (O’Riordan vd. 2011, Pieniazek vd. 2013 ve Nguyen vd. 2015). Bu nedenle hastalıkların tedavisinde klinisyenlerin önerdiği tedavi protokollerine uyulmalı gereğinden fazla sürede ve dozlarda ilaç

kullanılmamalıdır. Ayrıca ilaç kullanımı sırasında metabolizmanın devamlılığı açısından karaciğere destek olabilmek adına günlük içilen su miktarı %20-25 oranında artırılabilir. Çünkü karaciğerde gerçekleşen detoksifikasyon reaksiyonlarının son ürünleri çoğunlukla suda çözülerek organizmadan boşaltımla atılabilmektedir.

## **2.6.2 Oksidatif Stres ve Karaciğer Hastalıkları**

Kanser, mutasyonları kontrolsüz hücre çoğalmasını içeren çok aşamalı bir süreçtir. Oksidatif stres kanser gelişiminde önemli rol oynar. Hem endojen hem de ekzojen reaktif oksijen türlerinin kaynakları hücrede oksidatif stresin artmasına neden olur. Organizmada oksidatif stresle birlikte oluşan aşırı reaktif oksijen radikalleri (ROS), hücresel makromoleküllerden en önemlisi olan genomik DNA'ya zarar verebilir. Ayrıca oksidatif stres, DNA onarımı, hücre proliferasyonu ve antioksidanlarda yer alan alt hedeflerin gen ekspresyonunu modüle eder. Oksidatif stres ile gen ekspresyonunun modülasyonu kısmen transkripsiyon faktörlerinin ve ikinci habercilerin aktivasyonu veya inhibisyonu yoluyla oluşur. Oluşan DNA hasarının onarımı ve enzimatik antioksidanların etkinliği potansiyel kanser riskinin belirlenmesinde önemlidir (Klaunig, 2018).

Reaktif oksijen türleri öncelikle mitokondride ve hepatositlerin endoplazmik retikulumunda sitokrom P450 enzimleri ile üretilir. Hepatositik proteinler, lipitler ve DNA, öncelikle reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türlerinden etkilenen hücresel yapılar arasındadır. İşlem karaciğerde yapısal ve fonksiyonel anormallikler ile sonuçlanır. Karaciğerde oluşan oksidatif stres ile siroz, karaciğer iltihablanması, hepatosellüler karsinoma gibi hastalıklar birebir ilişkilendirilmektedir (Şekil 2.6). Ayrıca, hepatositler arasında oksidatif markörlerin izlenmesi karaciğer hasarının derecesini teşhis etme ve nihayetinde farmakolojik tedavilere yanıtı gözlemleme potansiyeli sunmaktadır (Cichoż-Lachetal ve Michalak 2014). Karaciğerin ana kısmı, ksenobiyotik metabolizmasında çok aktif olan hepatositlerden oluştuğundan, karaciğer oksidatif strese karşı daha duyarlıdır (Lima vd. 2006 ve Kim vd. 2007).



Şekil 2.6 Karaciğerde oksidatif stres ve ilişkili karaciğer hastalıkları (Casas-Grajales vd. 2015).

Oksidatif stres, akut karaciğer yetmezliği ve kronik karaciğer hastalıklarının önemli bir patogenetik faktörünü temsil eder (Thiel vd. 2014). Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı sanayileşmiş ülkelerde en sık görülen kronik karaciğer hastalığını temsil eder. Bazı vakalarda karaciğer yetmezliği veya hepatosellüler karsinom geliştirirken, alkolsüz steatohepatitin inflamatuvar fazından fibroz ve siroza ilerler. Karaciğer biyopsisi, Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı kesin tanısı ve basit steatoz ile alkolsüz steatohepatitin arasındaki ayrımın altın standart yaklaşımı olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte bağırsak mikrobiyotası, oksidatif stres ve mitokondriyal hasar alkolsüz steatohepatitin patogenezinde kilit rol oynamaktadır (Borrelli vd. 2018).

Viral olarak indüklenen karaciğer kanseri, kronik karaciğer iltihabı ve rejenerasyon süreçleri ile karakterize kuvvetli oksidatif bir mikro-ortam genellikle uzun süre boyunca gelişir. Hücre büyümesini ve çoğalmasını sağlayan birçok hücresel sinyalleşme kaskadında onkojenik mutasyonlara neden olurlar. Bu nedenle hepatit virüslerinin neden olduğu oksidatif stres, karaciğerde neoplastik dönüşüm sürecini tetikleyen faktörlerden biridir (Ivanov vd. 2017).



Oksidatif stres, çeşitli kronik karaciğer hastalıklarının patogenezinde önemli bir rol oynar. Yapılan çalışmalar oksidatif stresin, ilaç ve kimyasal kaynaklı kronik karaciğer hastalıklarının patogenezindeki rolünü doğrulamıştır. Kronik karaciğer hasarı nekroz, kolestaz, fibroz ve siroz ile kendini gösterir. Anti-tüberküloz, anti-retroviral, immünoşüpresif ilaçların kronik olarak uygulanmasının karaciğerde biyotransformasyonu sırasında serbest radikal oluşumunu indüklediği bildirilmektedir. Oksidatif stres ve serbest radikallerin, kronik karaciğer hastalıklarının ilerlemesine neden olan yaralı karaciğerde hepatik stellat hücrelerinin aktivasyonunu ve proliferasyonunu tetiklediği bildirilmektedir. Bu nedenle, bu reaktif ara maddeleri yok etmek veya ortadan kaldırmak için, bitki kaynaklı bazı antioksidan etkili maddeler oksidatif strese karşı etkili bir şekilde kullanılabilir (Ezhilarasan, 2018). Bu bağlamda sunulan çalışmada da bitkisel kaynaklı ( $\beta$ -Arbutin) ve sentetik ( $\alpha$ -Arbutin) olarak üretilen arbutin izoformlarının hepatokarsinom (HepG2) hücre hattında hem antikanser etkileri hemde neoplastik bir kemoterapik ajan olan cisplatin toksikasyonuna etkileri araştırılmıştır. Araştırmada deney gruplarından elde edilen numunelerde oksidatif stres düzeyleri de belirlenmiştir.

## **2.7 Karaciğer Kanseri, Apoptoz ve Proliferasyon**

Programlı hücre ölümü, embriyogenez döneminde uzun yıllardır belirtilmesine karşın fizyolojik hücre ölümü 1972'de Kerr, Currie ve Wyllie tarafından tanımlanmış ve Apoptoz olarak adlandırılmıştır. Yunanca'da apo (= ayrı) ve ptozis (= düşen) kelimelerinden oluşan apoptoz sonbaharda yaprak dökümü'nü tanımlayan bir kelimedir. Deneysel düzeyde apoptozis, ilk kez 1980'de Wyllie tarafından gösterilmiştir. Apoptoz günümüzde biyoloji ile tıp bilimlerinin en yoğun şekilde araştırılan konularından biridir. Apoptoz; hasarlı hücrelerin yok olmasını, histogenez ve morfogenezde ise aktif olarak kendini yenileyen dokularda mitozun dengelenmesini sağlayan metabolik bir cevap olarak da ifade edilebilir (Önal 1996).

Son yıllarda, apoptoz düzensizliği (baskılanmış/uyarılmış apoptoz), henüz çok fazla bilgiye sahip olunmayan birçok hastalığın gelişimindeki önemli özellikleri açıklamak için yeni bir bakış açısı kazandırmıştır. Toksikasyon sonucu gelişen karaciğer hasarı, miyokard infarktüsü, inme gibi iskemik hasarlar, alzheimer ve parkinson hastalığı gibi

nörodejeneratif hastalıklar ile AIDS artmış apoptoz ile ilişkili hastalıklardır. Bunlardan farklı olarak uygun olmayan azalmış apoptoz ise viral enfeksiyonların sebep olduğu karaciğer hastalıkları, birçok deri hastalığı, göz hastalıkları, akciğer hastalıkları, otoimmün hastalıklar, ateroskleroz ve kanser ile ilişkilidir (Görür 2010).

Proliferasyon ya da hücrelerin çoğalması/yenilenmesi hücre bölünmesi üzerinden gerçekleşir. Hücre bölünmesi dört farklı aşamada gerçekleşir. Bu evreler G1, S, G2 ve M evresidir. Bölünmeyen hücrelerin bulunduğu evre ise G0 olarak tanımlanmaktadır. G1, S ve G2 evreleri interfaz olarak adlandırılır ve interfaz da mitoz için gerekli hazırlıklar yapılır. M evresi bölünmenin gerçekleştiği evredir. Kanser oluşumuna neden olan mutasyonların bir kısmı da hücre bölünmesini kontrol eden sinyal yollarında gerçekleşmektedir. (Terzioğlu vd. 2013).

## **2.8 Karaciğer Kanseri ve Cisplatin**

Cisplatin [cis-diamminedichloroplatin (II)], biyolojik aktivitesi ilk olarak 1965'te bildirilen, yaygın olarak kullanılan bir antikanser ilacıdır (Miyata vd. 2015). Cisplatin hepatik kanseri tedavi etmek için etkili kemoterapötik bir ilaçtır. Ancak etkinliği yan etkileri nedeniyle azalmaktadır (Shu vd. 2016, Hazman ve Bozkurt, 2018). Cisplatin; karsinomalar, germ hücreli tümörler, lenfomalar ve sarkomlar dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerine karşı da etkilidir. Bununla birlikte, ilaç direnci ve böbrek sorunları, alerjik reaksiyonlar, enfeksiyonlara karşı bağışıklık, kanamalar ve özellikle genç hastalarda işitme kaybı gibi birçok istenmeyen yan etki nedeniyle, karboplatin gibi platin içeren antikanser ilaçları da kullanılmaktadır (Dasari ve Tchounwou 2014).

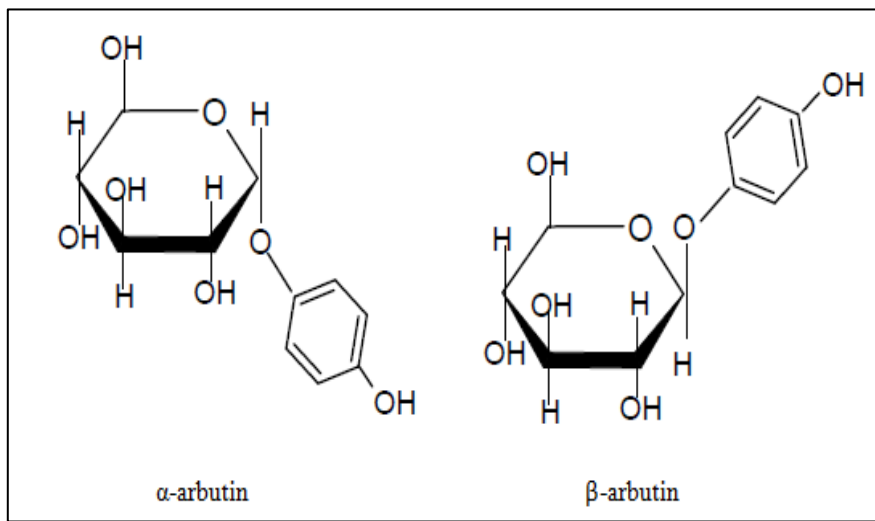
## **2.9 Arbutin**

Bir glikozile hidrokinon (HQ) form olan arbutin, kahve, buğday ürünleri, brokoli ve armut gibi bazı meyveler gibi pek çok yenilebilir bitki ve ürünlerinde bulunur (Khanal vd. 2011). Arbutin özellikle ayı üzümü, kış sümbülü, armut ve dut ağacı gibi bitkilerin yapraklarından elde edilebilen doğal aktif maddelerden biridir (Deisinger vd. 1996).

Arbutin ( $C_{12}H_{16}O_7$ ), basit bir molekül yapısına sahip olup, bitkilerden yüksek saflıkta elde edildiğinde beyaz renkli bir toz gibi görünür. Arbutin metil alkol, etil alkol, asetonitril ve tetrahidrofuran gibi polar çözücülerde belirli oranlarda çözünebilir. Ancak sikloheksan, dietil eter, kloroform, petrol ve DMSO gibi apolar çözücülerde çözünürlüğü çok düşüktür. Asitli ortamda kararsızdır ve kolayca hidrolize edilir, ancak bitki ekstraksiyon teknikleri, biyolojik dönüşüm, organik sentez ve enzimatik sentez yöntemleri kullanılarak birçok bitki türünden başarıyla izole edilebilmektedir ( Seo vd. 2012).

Arbutin, insan tirozinaz aktivitesi üzerindeki güçlü inhibe edici etkisinden dolayı, kozmetik endüstrisinde güçlü bir cilt beyazlatma ajanı olarak kullanılır (Zhu X vd. 2018). Ayrıca böbrek taşlarının düşünülmesinde ve antibakteriyel özelliklere sahip olması nedeniyle sistit ve idrar yolu enfeksiyonlarını iyileştirebilir (Funayama vd. 1995). Aynı zamanda antioksidan, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar aktivitelerinden dolayı farmasötik endüstrisinde de yaygın olarak kullanılır (Shen vd. 2017). Özellikle cilt kanseri üzerine etkili olabileceği ise birçok çalışmayla gösterilmiştir (Cheng vd. 2007 ve Nawarak vd. 2009).

Glilozit formdaki arbutinin, glukoz molekülündeki anomerik karbon atomuna bağlanan hidrokinonun bağlanma durumuna göre 2 farklı izomeri vardır (Şekil 2.7). Bu izomerler  $\alpha$ -arbutin ve  $\beta$ -arbutindir. Bitkilerden izole edilen doğal arbutin,  $\beta$  izomeridir.

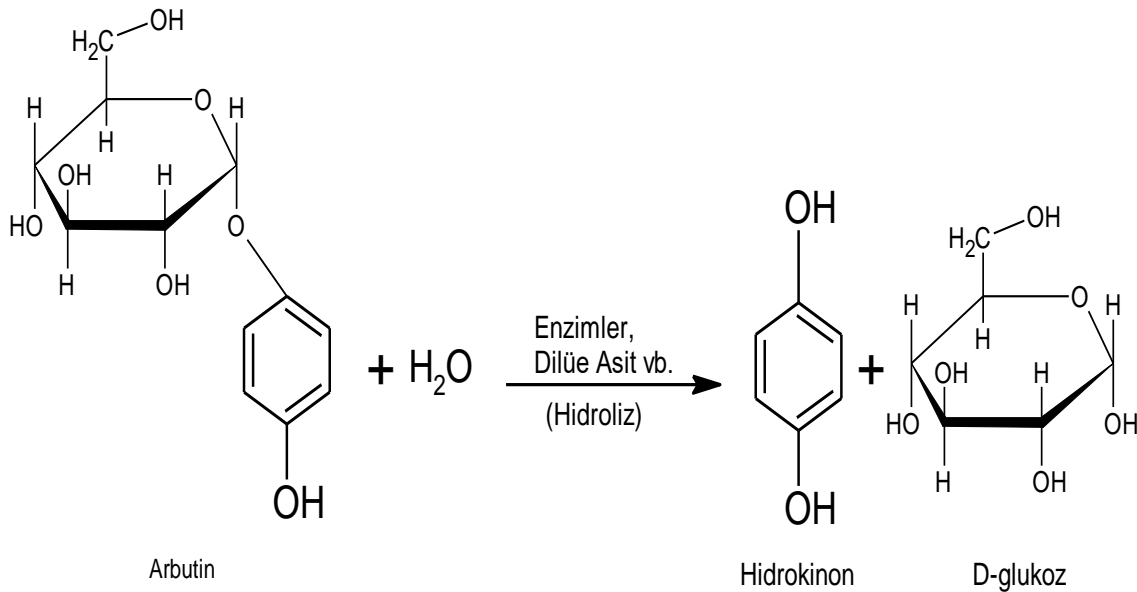


Şekil 2.7  $\alpha$ -arbutin,  $\beta$ -arbutinin kimyasal yapıları.

Alfa arbutin ise genellikle hidrokinonun mikrobiyal glikosiltransferazlar tarafından transglukosilasyonu ile üretilir. Alfa amilaz, sükröz fosforilaz, siklodekstrin glikosiltransferaz,  $\alpha$ -glukosidaz, dekstransükraz, amilosükraz ve sukroz izomeraz dahil olmak üzere  $\alpha$ -arbutin üretebilecek yedi farklı mikrobiyal enzimin tespit edildiği belirlenmiştir (Zhu vd. 2018).

Kozmetiklerde  $\alpha$  ve  $\beta$ -arbutinin güvenilirliği ile ilgili olarak, Tüketici Güvenliği Bilimsel Komitesi (SCCS), kozmetiklerdeki arbutin izoformlarından  $\alpha$ -arbutin oranının yüz kremlerinde % 2, vücut losyonlarında % 0.5 olması gerektiğini ve  $\beta$ -arbutin için yüz kremlerinde bu oranın % 7'ye kadar çıkarılabileceğini ifade etmektedir (Garcia Jimenez vd. 2017). Bu bilgi bize doğal kaynaklardan izole edilen  $\beta$ -arbutinin, sentetik olarak üretilen  $\alpha$ -arbutine oranla daha yüksek oranlarda kozmetik ürünlerde kullanılabileceğini göstermektedir.

Hidrokinonlar arbutinin hidrolizi ile kolaylıkla oluşabilmektedirler (Şekil 2.8). Bu nedenle özellikle hidrokinonların glikozit türevleri olan alfa ve beta arbutin doğal cilt beyazlatma ajanı olarak günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. Beta arbutin hem alfa arbutine göre hem de diğer kimyasal cilt beyazlatıcı ajanlara göre daha etkili olması nedeniyle kullanıcılarca daha çok tercih edilmektedir (Draelos 2007 ve Tomita vd. 1992).



Şekil 2.8 Arbutinin Hidrolizi.

İnsanların idrarında ve plazmasında düşük konsantrasyonda HQ varlığı saptanmıştır (Deisinger vd. 1996). HQ; fotografik, kauçuk, kimya ve kozmetik endüstrisinde kullanılan kalıcı bir kimyasaldır. HQ, sigara dumanının bilinen bir bileşenidir. Ama idrar ve plazmada düşük oranlarda olabileceği belirtilen HQ'nun kaynağı gıdalarla alınan arbutinde olabilir.



### 3. MATERYAL ve METOT

Sunulan çalışmada arbutinin karaciğer kanserinde inflamasyon ve oksidatif strese etkileri analiz edilirken, hücre hattı olarak kullanılan HepG2 hücreleri tercih edilmiştir. Çalışmada kullanılan hücreler Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Biyoloji Laboratuvar stoklarından tedarik edilmiş olup proje kapsamında hücrelerle yapılan tüm çalışmalarda sterilizasyona itina gösterilmiştir. Çalışma esnasında kullanılan hücrelerin herhangi bir strese maruz kalmamaları amacıyla, hücrelerle temas edecek her türlü çözücü/çözeltinin 37 °C'de olmasına, santrifüj (Nüve NF400, Türkiye) işlemlerinin 800 rpm hızda 5 dakika süreyle yapılmasına önem verilmiştir.

#### 3.1 Hücre Besiyeri Hazırlama

Hücrelerin çoğaltılması için kullanılacak olan besiyeri 0,22 µm gözenekli pess membran filtreler (WVR Corporation, USA) kullanılarak hazırlandı. Filtreye konacak besiyeri bileşenleri steril ortamda (flow kabinde) konuldu. 1 L besiyeri hazırlamak için filtreye öncelikle %10 (v/v) oranında ısı ile inaktive edilmiş fetal buzağı serumu (FBS; Fetal bovine serum veya fetal calf serum), %1 (v/v) oranında penisilin streptomisin, %1 (v/v) oranında (1 mM) sodyum piruvat eklendi. İçeriğinde glutamin olan düşük glukoz konsantrasyonuna sahip Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ile hacim 1 litreye tamamlandı. Böylelikle besiyerindeki DMEM oranı %88 oldu (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1** Çalışmada kullanılan besiyerin (medium) bileşenleri.

Bileşen	Oran (%)	Hacim (mL)
DMEM (glutaminli)	88	880
FBS	10	100
Penisilin Streptomisin	1	10
Sodyum Piruvat	1	10
<b>Toplam</b>	<b>100</b>	<b>1000</b>

Hücre besiyeri elde etmek için hazırlanan karışım bir vakum pompası aracılığı ile pess membran filtreden geçirildi. Filtratta toplanan medium filtreden ayrılarak şişe içine alınıp kapağı kapatıldı. Hücrelerin çözündürülmesi, yıkanması, pasajlanması ve üretilmesi amacıyla kullanılacak medium, steril 50 mL'lik falkonlara konularak, kullanım süresine kadar +4 °C'ye kaldırıldı. Bu şekilde 50'lik falkonlarda kullanıma hazır edilen besiyerleri, hücre ekimi yapılacağı veya manuplasyonlarda kullanılacakları zaman, önceden çıkarılarak 37 °C'deki sıcak su banyosunda (Memmert WNB10, Germany) 20-30 dakika ısıtılmıştır.

### **3.2 Hücrelerin Çözündürülmesi ve Ekilmesi**

HepG2 hücreleri sıvı azotta karyotüpler içinde laboratuara getirilmiştir. Donmuş halde karyotüp içinde bulunan hücreler öncelikle sıvı azottan -18 °C ye alınmıştır. 10 dakika beklendikten sonra 37 °C deki sıcak su banyosunda 1-2 dk süre ile inkübe edilerek çözülmeye bırakılmıştır. Bu arada 15'lik bir falkona 5mL medium konulmuştur. Su banyosunda tamamı çözülmek üzere olan karyotüpteki hücreler hazırlanan (içine medium konan) falkona alındı. Sonrasında kibarca pipetaj yapılarak hemen santifüj edildi. Santifürüj sonunda falkon tabanında biriken hücrelere temas edilmeden medium pipetle çekildi. Hücre peleti üzerine tekrar 2 mL medium eklenerek ve nazıkçe pipetaj yapılarak ikinci kez yıkama işlemi yapıldı. Santifürüjden sonra hücrelerin üzerinde kalan medium tekrar çekildi. Anlatıldığı üzere çözündürülerek 2 yıkamada içeriğinde bulunan DMSO (dimetil sülfoksit) dan arındırılan HepG2 hücreleri flaska ekilmek üzere son defa 1 mL medium içinde çözüldü.

Hücreler dondurulup çözüldüklerinde strese girerler. Hücrelerin stresten daha kolay çıkarak tekrar kısa zamanda bölünme yeteneğine kavuşabilmesi için hücrelerin besiyerinin temel protein unsuru olan FBS oranı %15-20 oranında olmalıdır. Halbuki standart olarak kullanılan mediumun FBS oranı %10'dur. Bu nedenle mevcut olan mediumdan belirli bir hacimde alınarak, üzerine enjektör filtresinden geçirilerek steril hale getirilen FBS eklenerek, medium içindeki FBS oranının %20 olması sağlanır. İlk ekim için hazırlanan ve %20 FBS içeren 37 °C'deki complete medium 25'lik flaska 5 mL hacminde eklenir. Bu şekilde ekim için hazır hale getirilen flaska, ekim için çözündürülerek DMSO'dan arındırılarak hazırlanan HepG2 hücreleri yavaşça eklenir.

Ekimi yapılacak hücre sayısı 500-600 binden az ise hücreler eklendikten sonra, hücreler fazla ayrı düşmesin diye flask fazla sallanmaz. Çünkü hücrelerin birbirine yakın olması adherent hücre kültüründe özellikle hücre sayısının az olduğu durumlarda, hücre bölünmesini pozitif yönde etkiler. Hücre sayısının çok olması durumunda (özellikle de 1-2 milyondan fazla) ekim yapılan 25'lik flask ekim sonrası kibarca sallanarak hücrelerin flask içine homojen dağılması sağlanabilir. Bu işlem hücrelerin daha kısa sürede doluluk olmasına katkı sağlar. Bununla birlikte çözdürülerek ekilmesi düşünülen hücre sayısı çok ise ilk pasaj 75'lik flaska da yapılabilir. 25'lik flaska ekimi yapılan hücreler üremesi için 37 °C ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre (Panasonic MCO-18AC, Japan) kaldırılmıştır. Günlük olarak takibi yapılan hücrelerin besiyerleri, hücreler %80-90 doluluk oluncaya kadar, 2 günde bir değiştirilmiştir. 25'lik flask istenen oranda doluluk olunca 75'lik flaska pasajlanmıştır.

### **3.3 Hücrelerin Çoğaltılması (Pasajlanması)**

Pasajlama hücrelerin ürettiği bir flasktan, başka bir flaska hücrelere zarar vermeden transfer edilmesidir. Pasajlama işleminde flask tabanına yapışık halde (doluluk) bulunan hücrelere önce tripsinizasyon, sonrasında ise detripsinizasyon (tripsinden arındırma) işlemi uygulanmıştır. Böylelikle tekrar bir falkonun dibinde elde edilerek çözülen hücreler 75'lik flaska ekilmiştir. Hücrelerin pasajlanması sırasında kullanılan tripsinizasyon/detripsinizasyon yöntemleri şu şekilde uygulanmıştır.

### **3.4 Hücrelere Uygulanan Tripsinizasyon/Detripsinizasyon**

Flask tabanında %80-90 oranında doluluk olan hücrelerin üzerindeki medium steril pipet yardımıyla alınıp atılmıştır. Hücrelerin üzerine 37 °C olan 1-1,5 mL tripsin EDTA (Serox, Germany) eklenmiş ve flask yüzeyinin her tarafına yayılması sağlanmıştır. Ardından flasklar 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre kaldırılıp 5-8 dk ünkübasyona tabi tutulmuştur. Flask tabanına yapışık haldeki hücrelerin bu süre inkübasyonda büyük oranda tabandan ayrıldığı gözlemlendi. Ayrılmayanların ise flaska hafifçe vurularak tabandan ayrılması sağlandı.



Tripsinin bir proteaz enzim olduğu düşünülürse uzun süreli inkübasyonlar hücreye zarar vermeye başlar. Bu nedenle tripsinle inkübasyon süresinin 10 dakikayı geçmemesine özen gösterildi. Hücrelerin tamamı tabandan kaldırıldığında flaskın içine 5 mL medium eklendi. Böylelikle ortamdaki tripsin dilüe edilerek detripsinizasyona kadar hücrelere verebileceği zarar en az indirildi. Flaskın içindeki tripsinize hücre-medium süspansiyonu streil bir falkona alınarak detripsinizasyon için santifürüj (800 rpm, 5 dk) edildi. Santrifüj işleminin ardından olası kalıntı tripsinden hücreleri tamamen arındırmak için hücreler tekrar 2 mL medium ile yıkanmıştır. Süpernatant atılıp hücre pelleti üzerine 1 mL mediyum eklenmiş ve hafifçe pipetaj yapılarak hücreler tekrar ekim için hazır hale getirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan hücreler, içerisinde 10 mL medium bulunan 75 cm'lik flaska ekimi yapılmıştır. Flasklar 37 °C ve % 5 CO<sub>2</sub> bir ortam içeren inkübatöre kaldırılmıştır.

İnkübatörde inkübasyona bırakılan 75'lik flask her gün takip edilmiş ve 2 günde bir mediumu 10 mL taze medium ile değiştirilmiştir. 75'lik flask da % 80-90 oranında konfulent olunca hücreler tekrar tripsinizasyon/detripsinizasyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Bu şekilde tekrar ekilebilecek duruma getirilen ve bir 75'lik flasktan elde edilmiş olan HepG2 hücreleri isteğe bağlı olacak şekilde 1:4-1:10 arasındaki bölünme oranlarında (split ratio) yeni 75'lik flasklara ekilebilir. Ekim işlemi istenirse bir flasktan elde edilen hücrelerin toplam sayısı belirlendikten sonra da yapılabilir.

### **3.5 Hücrelerin Sayılması**

Analizlerde kullanılmak amacıyla 96 kuyruklu plaka veya flasklara hücre ekilirken, aynı/yakın sayıda hücre ekilmesi esastır. Bu nedenle sunulan çalışmada lethal dozları (LD) belirlenirken 96 kuyruklu plakalara hücreler ekilmeden önce mL'de ne kadar hücre olduğu belirlenmiş, yani hücreler sayılmıştır. Bu amaçla tripan blue hücre sayım yöntemi kullanılmıştır. Tripan blue (Sigma Aldrich, USA) canlı hücrelerin ışık altında parlak görünmesini sağlayan bir boyadır. Sayım yapılacak lama uygulanan ve tripan mavisi ile boyanmış canlı hücreler mikroskop altında parlak görülürken, ölü hücreler mavi/mat olarak görülür. Sayım lamında her biri 16 kareden oluşan 4 sayım bölgesindeki hücreler sayılarak ortalamaları alınır ve hücre sayımı yapılmış olur.

Sonrasında ise formül kullanılarak medium-hücre süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısı hesaplanır. Sayımın güvenilirliği açısından dilüsyon miktarı önemlidir. Sayım yapılan lamın bir bölgesinde ortalama hücre sayısının 50-150 arasında olması hücre süspansiyonunun ideal dilüsyona tabi tutulduğunun bir göstergesidir. Şayet ortalama hücre sayısı çok yüksek çıkarsa tripan mavisi – hücre karışımındaki hücre hacmi azaltılarak, tripan mavisi hacmi artırılarak daha dilüe hücre süspansiyonu elde ederek sayım tekrarlanır. Bu durumda dilüsyon oranında artacaktır. Hücre sayısının çok yoğun olduğu durumlarda 20 µL hücre süspansiyonu, 80 µL tripan mavisi (dilüsyon oranı 5) alınarak sayım yapılabilir. mL’deki hücre sayısını belirlemek amacıyla aşağıda sunulan formül kullanılmaktadır:

$$\text{mL'deki canlı hücre sayısı} = (\text{Ortalama Hücre Sayısı}) \times (10^4) \times (\text{Dilüsyon Faktörü})$$

Sunulan çalışmada hücrelerin sayımı şu şekilde yapıldı. Flask tabanından tripsinizasyon ile kaldırılıp, detripsinizasyon ile tripsinden arındırılan hücreler, hücre yoğunluğuna göre 2-6 mL aralığında istenen hacimde çözülür. Bu çalışmada ise ortalama bir değer olarak hücreler 4 mL mediumda çözüldü. Hücre süspansiyonundan 50 µL alınarak, 50 µL tripan blue ile (dilüsyon oranı 2) karıştırıldı. Hücrelerin sayımında kullanılacak lam ve lamel (Neubauer counting chamber) hazırlandı. Hazırlanan tripan blue-hücre süspansiyonu karışımından pipetaj yapılarak, 10 µL alınarak Neubauer lamına uygun şekilde konuldu. Sayım bölgelerinde sayılan hücrelerin ortalamaları alınarak hücre süspansiyonunun mL’inde kaç adet hücre olduğu formül yardımı ile bulundu. Sonrasında uygulamalarda kullanılacak hücre sayısına göre hücre süspansiyonundan kaç mL alınması gerektiği hesaplanarak, hücrelerle yapılacak manüplasyonlara geçildi.

### **3.5.1 Çalışmada Kullanılan Arbutin, Cisplatin ve MTT Çözeltilerinin Hazırlanması**

Sunulan çalışmada kullanılan arbutin izoformlarının ikisi de sitotoksisite çalışmalarında aynı dozlarda kullanılmıştır. α-arbutin (Abcam, UK) ve β-arbutin (Alfa Aesar, Germany) mediumda çözülerek hazırlanmıştır. Bu kapsamda MTT analizlerinde kullanılmak üzere 1 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM ve 400 mM konsantrasyonlarında α ve β arbutin çözeltileri medium içerisinde hazırlandı.

Çalışmada kullanılan cisplatin (Sigma Aldrich, USA) serum fizyolojik (%0,9'luk NaCl çözeltisi) içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Uygulama için hazırlanan stok cisplatin çözeltileri hedeflenen son cisplatin konsantrasyonlarından 10 kat daha konsantre hazırlandı. MTT analizlerinde kullanılmak üzere dokuz farklı (10 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL, 600 µg/mL, 800 µg/mL ve 1000 µg/mL) cisplatin çözeltileri hazırlandı.

Sitotoksisite analizlerinde kullanılan MTT çözeltisi, ticari olarak elde edilen MTT tuzu (Sigma Aldrich, USA) kullanılarak hazırlandı. Bu amaçla MTT tuzu pH'ı 7,4'e ayarlanmış fosfat tamponunda 5 mg/mL konsantrasyonunda çözüldü. Hazırlanan MTT çözeltisi analiz süresine kadar ışıktan korunarak +4 °C'de saklandı. Hücrelere uygulanmadan önce ise su banyosunda 37 °C'de ısıtıldı.

### **3.6 MTT Hücre Viabilite Ölçüm Testi**

Sitotoksik etkiler, sitotoksisitenin değerlendirilmesinde devamlı olarak kullanılan enzimatik testlerden biri olan MTT yöntemi ile belirlendi. Bu yöntemde, MTT canlı hücrelere aktif olarak absorbe olur ve reaksiyon mitokondriyal suksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Dolayısı ile ölçülen absorbans değerleri canlı hücre sayısı çok olan vellerde yüksek iken, canlı hücre sayısı azaldıkça absorbans değerlerinde de düşme gözlenir. Böylelikle elde edilen absorbans değerleri kullanılarak ve kontrol grubu ile kıyaslama yaparak welllerdeki hücrelerin canlılık oranları hesaplanabilir.

Bu kapsamda sunulan çalışmada arbutin izoformlarının ve cisplatinin HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi şu şekilde belirlendi. MTT analizleri 96 kuyucuklu plakalarda yapıldı.  $2 \times 10^4$  hücre/mL de olacak şekilde hazırlanan hücre süspansiyonundan 100 µL alınarak 96 kuyulu microplate kabının her kuyucuğuna aktarıldı. Uygun konsantrasyonlarda (uygulama dozlarının 2 katı konstrasyonda) olacak şekilde mediumda çözülerek hazırlanan  $\alpha$  ve  $\beta$  arbutin çözeltileri, önceden planlanan kuyucuklara 100 µL hacminde eklendi. Böylelikle HepG2 hücrelerine uygulanan son  $\alpha$  ve  $\beta$  arbutin

konsantrasyonları 0,5 mM, 1 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM ve 200 mM olarak belirlendi. Arbutin izoformları için tasarlanan kontrol kuyucuklarına 100 µL medium eklendi.

Cisplatin uygulanacak kuyucuklara ise cisplatinin son konsantrasyonları 1 µg/mL, 2 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 60 µg/mL, 80 µg/mL ve 100 µg/mL olacak şekilde 1:10 dilüsyon oranında cisplatin çözeltileri eklendi. Cisplatinin çözücüsü olan serum fizyolojik cisplatin uygulaması yapılmayan ve cisplatin analizleri için tasarlanan kontrol kuyucuğunda aynı hacimde eklendi. Hücreler inkübatöre kaldırıldı.

37°C'de 24 saat daha inkübasyondan sonra her bir kuyucuğa 20 µL MTT boyası (5mg/mL konsantrasyonunda) ilave edilerek, hücreler 37°C'de 2-4 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 200 µL DMSO eklenerek formozan kristallerinin çözünmesi sağlandı. Renk değişimi, ELISA plaka okuyucusunda 540 nm dalga boyunda belirlendi. Arbutin ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edilmiştir (Ersin vd. 2016 ve Ulaşlı vd. 2013).

MTT uygulamaları sonucunda kontrol grubuna göre hücre canlılığını %50 oranında azaltan arbutin dozu LD<sub>50</sub> dozu olarak kabul edilmiştir. Biyokimyasal ve moleküler analizler için gerekli numunelerin temini için arbutin dozu olarak LD<sub>0</sub> ile LD<sub>50</sub> dozları kullanılmıştır. MTT uygulamaları sonucunda lethal dozlar belirlendikten sonra deney grupları oluşturulmuştur. Çalışmada oluşturulan beş deney grubu ve ilgili gruplara yapılan uygulamalar Çizelge 3.2'de sunulmuştur. Oluşturulan deney gruplarından ikisine (grup 4 ve grup 5) cisplatin uygulaması yapılmıştır. Cisplatinin çözücüsü olan serum fizyolojik ise cisplatin uygulaması yapılmayan deney gruplarına (grup 1, grup 2 ve grup 3) aynı hacimde eklenmiştir.

**Çizelge 3.2** Çalışmalarda oluşturulan deney grupları ve yapılan uygulamalar.

<b>Gruplar*</b>	<b>Hücrelere Yapılan Uygulamalar</b>
<b>Grup 1 :</b> Kontrol	Hücrelere cisplatinin çözücüsü olan serum fizyolojik uygun hacimde eklendi.
<b>Grup 2 :</b> $\alpha$ -Arbutin (LD <sub>0</sub> )	Medium içinde çözülen $\alpha$ -arbutin LD <sub>0</sub> dozunda uygulandı.
<b>Grup 3:</b> $\alpha$ -Arbutin (LD <sub>50</sub> )	Medium içinde çözülen $\alpha$ -arbutin LD <sub>50</sub> dozunda uygulandı.
<b>Grup 4:</b> Cisplatin (LD <sub>50</sub> )	Serum fizyolojik içinde çözülen cisplatin LD <sub>50</sub> dozunda uygulandı.
<b>Grup 5:</b> Tedavi Grubu Cisplatin (LD <sub>50</sub> ) + $\alpha$ -Arbutin (LD <sub>0</sub> )	LD <sub>50</sub> dozunda cisplatin uygulanan wellere eş zamanlı olarak LD <sub>0</sub> dozunda arbutin uygulandı.

\* Her bir grup 5 adet flaska ekilen hücrelerden oluşturulmuştur. Biyokimyasal ve immunostokimyasal analizler için gerekli hücreler 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda, moleküler analizler için gerekli hücreler ise 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda çoğaltılmıştır.

HepG2 hücrelerinde arbutinin oksidatif strese, apoptoza, proliferasyon ve inflamasyona etkilerinin belirleyebilmek amacıyla oluşturulan deney modelinde, hücrelerden oluşturulan 5 deney grubuna öngörülen uygulamalar yapılmış, her bir grupta ise en az 5 tekrar yapılarak laboratuvar analizlerinde kullanılan numuneler (hücre lizatlarının) hazırlanmıştır.

### **3.7 Biyokimyasal Analizlerde Kullanılacak Hücre Lizatlarının Hazırlanması ve Yapılan Biyokimyasal Analizler**

İnkübasyonlar sonrasında hücrelerin tabana yapışmış olduğu flask zemininden kaldırmak için flasklara tripsin (1mL %0.25) eklenerek çok kısa süre sonra hafif vurma hareketleri ile hücreler serbest bırakıldı. Süspansiyonlar pipet aracılığı ile toplanarak kapaklı tüpler içerisinde 25°C, 800 rpm devirde 5 dakika süreyle santrifüj edilerek pelet elde edildi. Hücre peleti PBS ile yıkandıktan sonra (tekrar santrifüj) üzerine hücre lizis tamponu konmuştur. Lizis tamponu şu şekilde hazırlandı. 200 mL PBS tamponu (pH 7,4) içerisine %1 triton-X-100(v/v), son hacim 500 mL'ye göre hesaplanan %8 oranında (40mL)

proteaz inhibitör kokteyli (Roche Complete Tablet, Germany) eklendi. En son lizis tamponunun hacmi PBS tamponu ile 500 mL'ye tamamlandı. İyice çalkalanarak homojen bir karışım oluşması sağlandı. Bu şekilde hazırlanan lizis tamponu deney gruplarındaki her bir flasktan elde edilen hücre peletinin üzerine 500 µL hacminde eklendi, pipetaj yapıldı. Sonrasında 20 saniye sonikasyona (Binder HD2070, Germany) tabi tutuldu. 40 saniye beklendi. Sonikasyon işlemi bu şekilde 10 kez tekrarlandı. Sonikasyon işlemi buz içinde gerçekleştirildi.

Sonikasyon sonucunda hücre/organel içi sıvıların lizis tamponuna geçmesi sağlandı. Tüm uygulamalara rağmen lizis tamponunda çözünmeyen proteinler 8500 rpm'da, 4 °C'de 10 dakika süre ile santrifüj edilerek çöktürüldü. Bu şekilde elde edilen süpernatantlar hücre lizatı olarak biyokimyasal analizlerde kullanıldı. Analizlerde blank olarak lizis tamponu kullanıldı.

Deney gruplarında yapılan uygulamalar sonrası elde edilen hücre lizatlarında gerçekleştirilen total protein, oksidatif stres düzeyleri ve proinflamatuvar stokin seviyelerinin analizinde kullanılan metodoloji özetlenerek bundan sonraki başlıklarda sunulmuştur.

### **3.7.1 Hücre Lizatlarında Total Protein Analizi**

Hücre lizatında çalışılacak parametrelerin sonuçlarının hesaplanmasında kullanılan total protein seviyeleri ticari kit (Sigma-Aldrich, USA) ile ELİSA (Biotek ELx800, Vermont, US) cihazında ölçüldü. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250, negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ve mavi formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Yapılan analizde total protein içeriği bilinmeyen 6 µL numune ve 125-4000 µg/mL konsantrasyonu aralığındaki 6 standart 96'lık plaktakivellere eklendi. Üzerlerine zaman geçirmeden multikanal pipetle 300 µL Coomassie brilliant blue reaktifi eklendi. Microwellerde oluşan mavi renkli komplekslerin absorbansları 595 nm de ölçüldü. Bu şekilde belirlenen doku protein düzeyleri g/L veya mg/mL şeklinde ifade edildi.

Numunelere ait olan total protein seviyeleri biyokimyasal analizlerde elde edilen verilerin normalize edilmesinde kullanıldı. Bu amaçla her bir numuneye ait oksidatif stres parametreleri ve proinflamatuvar stokinlerin analizler sonucu elde edilen veriler, her bir numunenin kendi total protein düzeyine bölünerek ham veriler elde edildi.

### **3.7.2 Total Antioksidan Statü (TAS) Düzeyleri Analizi**

Oksidatif stres parametresi olarak TAS seviyeleri spektrofotometrik yöntemle çalışan ticari kitler (Rell Assay, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. TAS seviyelerinin belirlenebilmesi amacıyla standart olarak 0,125-2 mmol aralığında Trolox kullanıldı. Bu amaçla 5 standart kullanılarak (0,125-0,25-0,5-1-2 mmol) ELISA okuyucudan alınan kalibrasyon grafiğine göre TAS düzeyleri belirlendi. Seviyeleri belirlenen serum TAS düzeyleri numunelerin total protein düzeylerine bölünerek mmol Trolox Equivalent/g-protein şeklinde ifade edildi.

### **3.7.3 Total Oksidan Statü (TOS) Düzeyleri Analizi**

Oksidatif stres parametresi olarak TOS seviyeleri spektrofotometrik yöntemle çalışan ticari kitler (Rell Assay, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak kit protokolünde verilen ve aşağıda sunulan formül kullanılarak TOS seviyeleri hesaplandı:

$$\text{TOS } (\mu\text{M hidrojenperoksitEquiv./L}) = [(\Delta\text{Absnumune}) / (\Delta\text{Absstandart})] * 20$$

Bulunan TOS sonuçlarının birimi  $\mu\text{mol hidrojenperoksit equivalent litre } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L})$  olarak bulundu. Daha sonra elde edilen sonuçlar her bir numunenin kendi total protein düzeyine bölünerek hücrelerdeki TOS seviyeleri  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./g protein}$  şeklinde belirlendi (Erel, 2005).

### **3.7.4 Oksidatif Stres İndeksi (OSI) Seviyelerinin Belirlenmesi**

Oksidatif stres İndeksi (OSI) bir ortamda oksidatif stresi ifade etmede tercih edilen bir parametredir. Bu nedenle oksidatif stresi etkileyen tüm oksidan ve antioksidanların

etkilerinin hesaba katılarak hesaplanması esastır. Bu nedenlerle numunelerdeki antioksidanların genel bir ifadesi olarak belirlenen TAS seviyeleri ve numunelerdeki oksidanların genel bir ifadesi olarak belirlenen TOS seviyeleri dikkate alınarak OSI düzeyleri belirlendi. OSI düzeyleri kit protokolüne uygun olacak şekilde aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı:

$$\text{Oksidatif Stres İndeksi (OSI)} = [(TOS/TAS) \times 100]$$

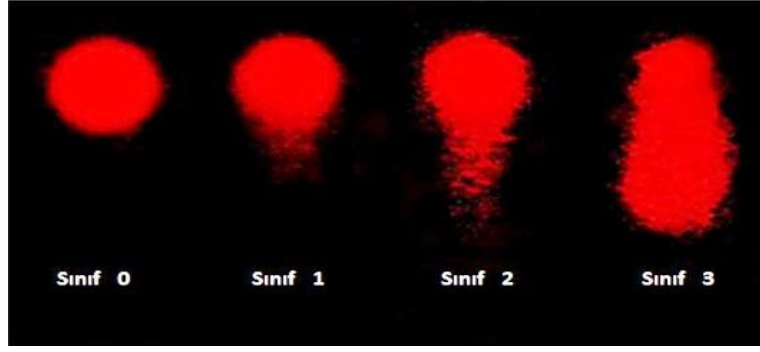
### **3.7.5 İnflamatuvar Stokin (TNF- $\alpha$ , IL-6 ve TGF- $\beta$ 1) Seviyelerinin Belirlenmesi**

$\alpha$ - Arbutinin HepG2 hücrelerinde antiinflamatuvar etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla, TNF- $\alpha$ , IL-6 ve TGF- $\beta$ 1 (Elabscience, China) düzeyleri ELISA cihazıyla (Biotek ELx800, US) spesifik ELISA kitleri kullanılarak belirlendi. Kitlerle birlikte verilen standartlar kullanılarak her bir analiz için ayrı bir kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Sonrasında oluşturulan kalibrasyon eğrileri kullanılarak hücre lizatlarındaki stokin seviyeleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar her bir numunenin total protein seviyelerine bölünerek normalize hale getirildi. Stokin seviyeleri pg/mg-protein olarak ifade edildi.

### **3.8 Genotoksisite Düzeylerinin Belirlenmesi İçin Yapılan Analizler**

Komet testi tek hücreli jel elektroforezi (SCGE) olarak da bilinmektedir. Agaroz jel içine gömülmüş hücrelerin parçalanmasından sonra elektroforez işlemi ile yürütülmesine dayanır. Elektroforez işlemi anında hasar görmemiş DNA'lar oldukları yerde kalırken, kırıklar ilerler. Kırılmış DNA parçaları kuyruklu yıldız şeklinde bir yapı oluşturarak anoda doğru uzanır. Daha sonra bu kuyruklu yıldız şeklindeki DNA, DNA bağlayıcı bir boya (örneğin etidyum bromür) kullanılarak görünür hale getirilir. DNA'da oluşmuş hasarın derecelerini değerlendirmek için kuyruklu yıldızın şekli, boyutu ve içindeki DNA miktarı ölçülür. Komet testi analiz protokolü çeşitleri DNA çapraz bağları, tek iplik kırıkları ve çift iplik kırıklarının ölçülmesidir. (Şekil 3.1)' de DNA hasar dereceleri gösterilmiştir.





Şekil 3.1 DNA hasar dereceleri (Yılmaz 2014).

Hasar derecesi sınıf(0) olan DNA'nın sadece kafa kısmı bulunur. Hasar derecesi sınıf(1) olan DNA'nın kafa kısmı ile birlikte kuyruk kısmı az belirmiş şekilde görülür. Hasar derecesi sınıf(2) olan DNA'da ise kafa kısmı kadar kuyruk uzunluğu da görülmektedir. Sınıf(3) derecesine sahip olan hasarlı DNA ise kafa kısmı oldukça küçülmüş, kuyruk kısmı oldukça uzun görülür.

Hasar tespiti için kullanılan bir diğer yöntem ise mikronükleus analiz testidir. Fiziksel ve kimyasal ajanların hücrelerde oluşturduğu genotoksik etkinin belirlenmesinde mikronükleus testi kullanılır. Mikronükleus testi, mitoz bölünme ile oluşan hücre tipleri üzerinde in vitro ve in vivo olarak uygulanabilmekte ve kromozom anormallikleri testine göre daha kolay ve hızlı sonuç vermektedir. Kültürde bir kez bölünmesini tamamlamış binükleat hücrelerde mikronükleus frekansını saptayan ve sitokalsin- $\beta$  ile sitokinezin bloklanmasına dayanan metodun gelişmesi ile mikronükleus testinin güvenilirliği ve geçerliliği artmıştır. Yapılan bu çalışmada HepG2 hücrelerinde komet ve mikronükleus analizleri aşağıda izlenen belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

### 3.8.1 Komet Analizinin Yapılması

Komet analizinin yapılabilmesi için öncelikle gerekli çözeltiler hazırlandı. Bu amaçla hazırlanan lizis çözeltisi (Çizelge 3.3), elektroforez çözeltisi (Çizelge 3.4), nötralizasyon çözeltisi (Çizelge 3.5) hazırlamak için kullanılan yöntemler çizelgelerde sunulmuştur. Sonrasında ise hazırlanan çözeltilerin kullanılmasıyla komet analizinin nasıl gerçekleştirildiği açıklanmaya çalışılmıştır.

**Çizelge 3.3** Lizis çözeltisinin hazırlanması.

<b>Kimyasal</b>	<b>Miktarı</b>
NaCl	29,4 g
EDTA	7,44 g
Trisma baz	0,24 g
Triton X-100	2 Ml
DMSO	20 Ml

Hazırlanan kimyasallar dH<sub>2</sub>O ile 200 mL'ye tamamlanarak pH 10 olacak şekilde ayarlandı.

**Çizelge 3.4** Elektroforez çözeltisinin hazırlanması.

<b>Kimyasal</b>	<b>Miktarı</b>
NaOH	6 g
EDTA	0,18 g

Hazırlanan kimyasallar dH<sub>2</sub>O ile 500 mL'ye tamamlanarak pH>13 olacak şekilde ayarlandı.

**Çizelge 3.5** Nötralizasyon çözeltisinin hazırlanması.

<b>Kimyasal</b>	<b>Miktarı</b>
Trisma baz	14,55 g

Hazırlanan kimyasal dH<sub>2</sub>O ile 300 mL'ye tamamlanarak pH 7,5 olacak şekilde ayarlandı.

Öncelikle % 1 NMA (normal kaynama noktalı agaroz) hazırlanması için 0,03 g NMA 3 mL PBS ile bek alevinde prepara edilerek hazırlandı. % 0,8 LMA (Düşük kaynama noktalı agaroz) hazırlanması için 0,016 g LMA 2 mL PBS ile bek alevinde hazırlanarak edilerek hazırlandı. Stok etidyum bromür hazırlanması için 5 mg etidyum bromür 25 mL dH<sub>2</sub>O'da çözdürüldü. Çalışmada 10 kat dilüe edilerek kullanıldı.

1. Uygulanan konsantrasyonlardaki hücreler flask yüzeyinden alınarak 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
2. Süpernatant uzaklaştırılarak hücreler PBS ile süspanse edildi.
3. Hücre süspanسیونundan 40 µL alınarak ependorf içerisinde 100 µL LMA ile karıştırıldı.

4. Ependorf içindeki hücre-LMA karışımının hepsi alınarak bir gün önceden hazırlanmış NMA'lı lamlara hazırlanarak elde edildi.
5. Hazırlanaraklar donmaları için buz kasetlerinin üzerine yerleştirildi.
6. Donan hazırlanaraklar üzerindeki lameller yavaşça alınarak 60 dk lizis işlemine tabi tutuldu.
7. Lizis işleminden sonra 20 dk alışma 20 dk yürütme olmak üzere 25 V 300 mA'de elektroforez işlemine tabi tutuldu.
8. Elektroforezden alınan hazırlanaraklar nötralizasyon tamponuyla yıkandı.
9. Yıkama işleminin ardından her bir hazırlanarak 70 µL etidyum bromür ile boyanarak lamelle kapatıldı.
10. Elde edilen hazırlanaraklardan her bir hazırlanarak için floresans mikroskopta 100 hücre olacak şekilde sayımlar yapıldı.

### 3.8.2 Mikronükleus Analizinin Yapılması

Bu yöntemde kullanılan KCl çözeltisinin hazırlanması (Çizelge 3.6)'da sunulmuştur. Sonrasında ise analizlerde kullanılan fiksatiflerin, giemsa boyasının hazırlanmasına değinilmiştir. Son olarak ise mikronükleus analiz protokolü verilmiştir.

**Çizelge 3.6** KCl çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktarı
KCl	0,4 gr
Distile su	100 MI

KCl ile dH<sub>2</sub>O vorteksenerek homojenize edilir.

#### **Fiksatiflerin Hazırlanışı:**

Önce fix2 daha sonra fix1 hazırlanır. Çalışmaya başlamadan 2 saat önce fiksatifler hazırlanmalıdır. Fix2 için; 40 mL Glasiyal Asetik Asit + 200 mL metanol (Son hacim: 240 mL), fix1 için; 50 mL Fix2 + 50 mL %0.9 NaCl (Son hacim: 100 mL) kullanıldı.

### **%5'lik Giemsa boyası için;**

5 mL Fix1 +5 mL Fix2 + 5 mL Giemsa karıştırılır. Son hacim dH<sub>2</sub>O ile 100 mL'ye tamamlandı. Çözeltinin pH'ı 6.8'e ayarlandı. Hazırlanan karışım filtre kâğıdından geçirildi.

### **Mikronükleus analiz protokolü;**

- Şale içerisine nitrozaset veya distile su eklendi.
- Örnek sayısı kadar lam numaralandırılarak şale içerisine dizildi. Çalışma başlamadan 30 dk önce (+4 °C) buzdolabında bekletildi.
- Ependorf içerisindeki numunelerin üzerine 1mL KCl eklendi, homojenize edildi ve 5dk beklendi.
- KCl eklenen örnekler santrifüje 5dk tabi tutuldu (1500rpm).
- Süpernatant atıldı, pellet üzerine fix1 eklendi ve 5dk yine santrifüj edildi (1500rpm).
- Süpernatant atıldı, pellet üzerine fix2 eklendi ve tekrar 5dk santrifüj edildi (1500rpm).
- Son santrifüj sonrası süpernatant yine atıldı, pellet kısmı şalelerdeki lamlara yayıldı.
- Bir gün sonra lamdaki kuruyan örnekler şale içerisinde giemsa boyasına 15 dk maruz bırakılarak boyanması sağlandı.
- Elde edilen hazırlanarlarda ışık mikroskobu kullanılarak nükleus sayımı yapılarak, mikronükleus frekansları belirlendi.

## **3.9 Moleküler Analizler**

### **3.9.1 RNA İzolasyonu**

Reverz Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile yapılan gen ekspresyonu analizlerinde kullanılan total RNA, HepG2 hücrelerinden hazır ticari kit (Gen Matrix, EURx, Poland) kullanılarak izole edilmiştir. RNA izolasyonu sırasında kullanılan bütün malzemeler RNAase free bir ortam oluşturabilmek adına uygun çözeltilerle (RNase Away, Thermo Fisher Scientific, ABD) önceden temizlenerek hazır hale getirilmiştir. Elde edilen RNA'ların miktarı nanodropta optic dansitelerinden hareketle (OD<sub>260/280</sub>) belirlenmiştir. OD<sub>260/280</sub> oranı 1.7-2,2 arasında olan RNA'lar çalışmada kullanıldı. RNA izolasyonu işleminin tüm aşamaları buz üzerinde gerçekleştirildi.

### 3.9.2 Komplementari DNA (cDNA) Sentezi ve RT-PCR Analizleri

PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmak üzere her bir örneğe ait total RNA'dan 0,1-5 µg alınarak önce reverz transkriptaz (RT) ile komplementari DNA (cDNA) sentezi yapıldı. Bunun için ticari cDNA sentez kiti kullanıldı (Termo Fisher Scientific, ABD). Elde edilen her bir numuneye ait cDNA'dan 1,5 µL kullanılarak üzerine Sybr Green PCR Master Mix (12,5 µL) ve primer çifti (oligonükleotid) protokollere uygun miktarlarda eklenmiştir. Primerler her bir transkripsiyon analizi için spesifik olup, literatürdeki çalışmalar (Ersin vd. 2016 ve Ulaşlı vd. 2013) kullanılarak belirlendi. (Çizelge 3.7)'de sunulan primerler her bir RT-PCR reaksiyonunda 100 ng düzeyinde kullanıldı.

**Çizelge 3.7** Oligonükleotid primer dizileri ve RT-PCR programları.

Gen	Primer Dizisi	RT-PCR Protokolleri	Döngü Sayısı
<b>β-Aktin</b>	F-5'CACCCCAGCCATGTACGTTGC R-5'CCGGAGTCCATCACGATGCCA	93°-15 s / 61°-30 s / 68°-1 dk	35
<b>Kaspaz 3</b>	F-5'GGAAGCGAATCAATGGACTCTGGA R-5'CCTGAGGTTTGCTGCATCGAC	94°-1 dk / 59°-1 dk / 72°-1 dk	35
<b>Bcl-2</b>	F-5'GACGGGCTACGAGTGGGATGC R-5'GGAGGAGAAGATGCCCGGTGC	94°-1 dk / 58°-1 dk / 72°-1 dk	35

Denatürasyon, primer yapışması ve zincir uzatma olmak üzere üç basamaktan oluşan amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerlerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu ile hesaplandı (Pfaffl 2001) ve mRNA ekspresyon düzeyi misli olarak azalma ya da artış şeklinde belirlendi. Hesaplamalar REST 2009 yazılımı kullanılarak yapıldı. Endojen kontrol olarak beta aktin geni kullanıldı ve her bir örneğe ait beta aktin gen düzeyine göre diğer genlerin ekspresyon düzeylerinde düzeltme (normalizasyon) uygulandı. HepG2 hücrelerinde arbutinin antikanserojen etkileri analiz edilirken, kontrol ve tedavi gruplarından izole edilen total RNA ve sonrasında sentezlenen cDNA'lar kullanılarak Bcl-2 ve Kaspaz 3 mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR cihazında analiz edilmiştir.

### 3.10 İmmunostokimyasal Analizler

İmmunostokimya uygulaması yapılacak hücreler, her grupta en az 3 flask olacak şekilde çoğaltıldı. Flasklardaki hücrelerin çoğalma oranı yeterli (%60-70 konfluent) olduğunda her bir gruba (Çizelge 3.2)'de öngörülen uygulamalar yapıldı. 24 saatlik inkübasyon sonunda hücreler tripsinle kaldırıldı. Mediumla 2 kez yıkanarak detripsinizasyona tabi tutuldu. Son yıkamadan sonra 15 mL'lik falkonların dibinde kalan ve immunostokimyasal analizlerde kullanılacak hücreleri sabitlemek için, her bir falkona %8'lik 1mL nötral paraformaldehit solüsyonu eklendi. Hücrelere hafif pipetaj uygulandı. Sonrasında oluşan hücre süspansiyonuna 1mL PBS (pH:7,4) tamponu eklendi. Tekrar kibarca pipetaj edildi. Hücreler böylelikle %4'lük nötral paraformaldehit içerisinde sabitlenmiş oldu. Sabitlenen hücreler 24 saat inkübasyondan sonra immunostokimya analizlerinde kullanıldı.

% 4'lük tamponlu nötral paraformaldehit solüsyonunda 24 saat süreyle tespit edilen hücreler, inkübasyon sonunda 3 kez distile su ile yıkandı ve sitoblok uygulaması ile pellet yapılarak rutin doku takibi yapıldı. Hücreler parafinde bloklandı ve mikrotom kullanılarak 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Adhesivli lamlara alınan örnekler immunostokimyasal teknik ile boyandı. Bu amaçla örneklerin üzerine tavşan anti-kaspaz 3 (1/200 sulandırma, Abcam, ab13847) ve Mouse p53 (1/25 sulandırma, DAKO, M7001) antikoları damlatıldı. Sekonder olarak bitonize Anti tavşan antikor (IgG BA1000, Vector Laboratories Inc., CA, USA) ile diğer bitonize Anti tavşan antikor (IgG BA2000, Vector Laboratories Inc., CA, USA) uygulandı ve 30 dakika inkübe edildi. Yıkama işleminden sonra peroksidaz enzimi konjuge edilmiş strepteavidin ile muamele edildi (Standard Vectastain Elite ABC Kit, PK-6100, Vector Laboratories Inc, CA, USA). 30 dakika inkübe edildi. PBS ile yıkandı. Peroksidaz substratı 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) uygulanarak reaksiyon renklendirildi. Zemin için Gill's (III) hematoksileni kullanılıp aköz yapıştırıcı ile lamlar kapatıldı. Tüm örnekler ışık mikroskopunda incelendi ve Zeiss Imager A2-Axiocam HRc görüntüleme sistemi ve ZEN2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) yazılımı kullanılarak analiz edildi.

### 3.11 İstatistiki Analizler

Elde edilen veriler ortalama  $\pm$  standart sapma (SH) şeklinde tanımlandı, verilerin değerlendirilmesinde SPSS 18 paket program kullanılmıştır. Verilerin öncelikle normal dağılımlı olup olmadığı test edilmiştir. Normal dağılım gösteren verilere parametrik testlerden tek yönlü varyans analizi (ANOVA), post hoc test olarak ise Duncan testi uygulanmıştır. Normal dağılım göstermeyen analiz sonuçlarına ise non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi uygulanarak istatistiki bir fark olup olmadığı belirlendi. Aralarında istatistiki fark olduğu belirlenen parametrelerde, hangi grupların kontrol grubundan istatistiki farklılık gösterdiği ise Mann-Whitney U testi ile belirlendi.

#### **Sunulan çalışmada HepG2 hücreleri ile yapılan uygulamalar ve analizler özetlenecek olursa;**

- $\alpha$  ve  $\beta$  arbutinin, HepG2 hücreleri canlılığına etkisini belirleyebilmek için MTT viabilite testi,
- $\alpha$ -arbutinin, HepG2 hücrelerindeki lethal dozları belirlendikten ve deney grupları belirlendikten sonra genotoksisite analizleri,
- Bazı inflamatuvar stokinlerin (TNF- $\alpha$ , IL-6 ve TGF- $\beta$ 1) seviyeleri,
- HepG2 hücre lizatlarında TAS, TOS, OSI seviyeleri,
- Arbutinin, HepG2 hücrelerinde apoptoz ve proliferasyona etkilerinin belirlenmesi amacıyla moleküler düzeyde Bcl-2 ve Kaspaz 3 mRNA ekspresyon seviyeleri ile immunostokimyasal olarakta p53 ve Kaspaz 3 düzeyleri belirlenmeye çalışıldı.

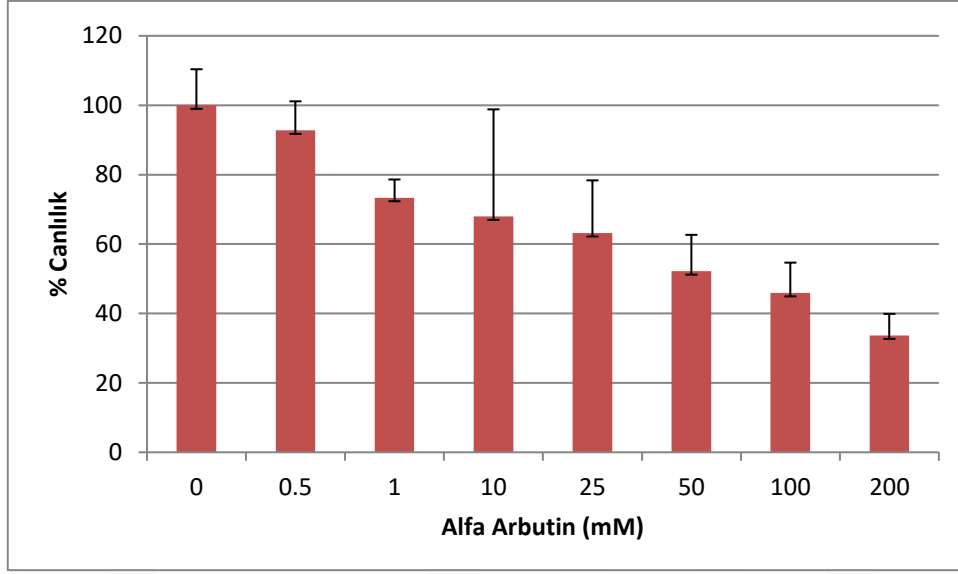
#### 4. BULGULAR

Sunulan çalışmada yapılan laboratuvar analizleri 4 aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada  $\alpha$ -arbutin ve  $\beta$ -arbutinin HepG2 hücrelerinde sitotoksik dozları belirlenmiş ve daha sitotoksik olan  $\alpha$ -arbutinin kullanılmasına karar verilmiştir. İkinci aşamada deney grupları planlanarak üretim yapılmıştır. Hücreler her grupta en az 5 flask (n=5) olacak şekilde üretilmiştir. Çalışmanın materyal-metot kısmında ifade edilen manipülasyonlar hücrelere uygulandıktan sonra hücrelerden laboratuvar analizlerinde kullanılacak olan numuneler (hücre lizatları) elde edilmiştir. Üçüncü aşamada ise elde HepG2 hücre hattında  $\alpha$ -arbutinin etkilerini belirlemeye yönelik analizler, elde edilen hücre lizatlarında gerçekleştirilmiştir. Laboratuvar analizlerinde elde edilen bulgular sırası ile bu bölümde paylaşılmıştır. Hücrelerden elde edilen lizatlarda inflamatuvar stokin (TNF- $\alpha$ , IL-6 ve TGF- $\beta$ 1) seviyeleri ve apoptotik süreçte hücrelerin durumlarını belirlemeye imkan verecek olan Bcl-2 ve Kaspaz 3 genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR cihazı yardımıyla belirlenmiştir. Ayrıca HepG2 hücrelerinde arbutinin apoptotik kaspaz 3 ve p53 genlerine etkisi immunostokimyasal yöntemle de analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar kaydedilmiş ve istatistiksel analiz ile değerlendirilmiştir.

##### 4.1 HepG2 Hücrelerinde $\alpha$ -Arbutinin Sitotoksosite Düzeyleri

Arbutinin HepG2 hücrelerinde MTT analizi aracılığı ile sitotoksitesini belirlenirken iki farklı izomeri ( $\alpha$ -arbutin ve  $\beta$ -arbutin) ve cisplatin kullanılmıştır. Sitotoksosite analizlerinde öncelikle 1-100 mM arbutin dozlarının sitotoksitesini araştırılmıştır. Fakat düşük dozlarda arbutin izoformlarının herhangi bir sitotoksitesini gözlenmemiştir. Bunun üzerine daha yüksek dozlarda, başka bir ifade ile 0,5-200 mM aralığındaki arbutin dozlarının sitotoksitesini analiz edildi. Yapılan analizlerde  $\alpha$ -arbutinin yedi farklı konsantrasyonun (0,5mM, 1 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM ve 200 mM) HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi belirlenmiştir. Elde edilen bulgular  $\alpha$ -arbutinin kullanılan tüm dozlarda sitotoksik etkili olduğu belirlendi. Sitotoksitenin kullanılan  $\alpha$ -arbutin dozuyla doğru orantılı bir şekilde arttığı belirlendi.  $\alpha$ -arbutinin HepG2 hücrelerindeki sitotoksitesini Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

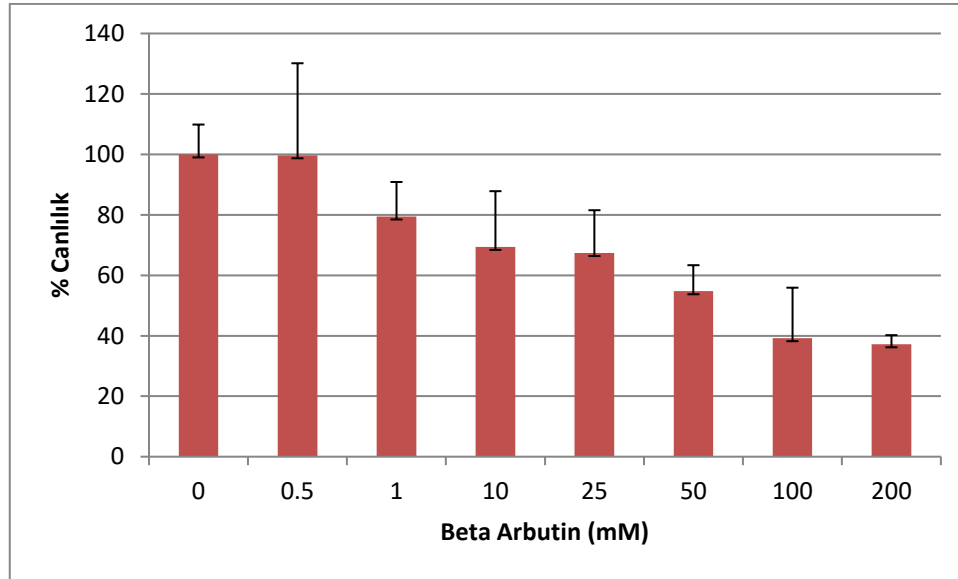




Şekil 4.1 HepG2 hücrelerinde  $\alpha$ -arbutinin sitotoksitesi.

#### 4.2 HepG2 Hücrelerinde $\beta$ -Arbutinin Sitotoksite Düzeyleri

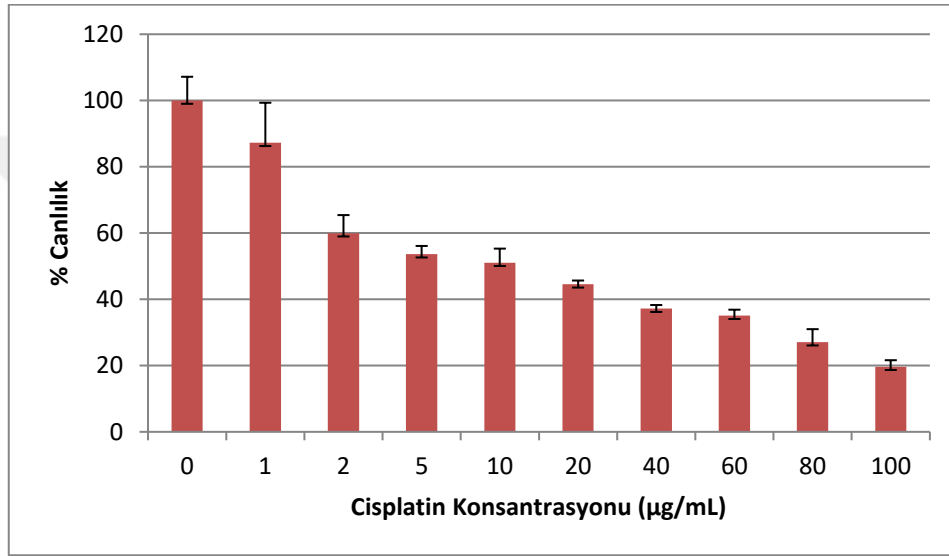
HepG2 hücrelerinde MTT analizi aracılığı ile  $\beta$ -arbutinin sitotoksitesi belirlenmiştir. Yapılan analizlerde  $\beta$ -arbutinin yedi farklı konsantrasyonun (0,5 mM, 1 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM ve 200 mM) HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi belirlendi ve edinilen bulgular  $\beta$ -arbutinin kullanılan tüm dozlarda sitotoksik etkili olduğu sonucuna varıldı. HepG2 hücrelerinde  $\beta$ -arbutinin sitotoksitesi Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2 HepG2 hücrelerinde  $\beta$ -arbutinin sitotoksitesi.

### 4.3 HepG2 Hücrelerinde Cisplatinin Sitotoksosite Düzeyleri

HepG2 hücrelerinde MTT analizi aracılığı ile cisplatinin sitotoksitesi belirlenmiştir. Yapılan analizlerde cisplatinin dokuz farklı konsantrasyonun (1 $\mu$ g, 2 $\mu$ g, 5 $\mu$ g, 10 $\mu$ g, 20 $\mu$ g, 40 $\mu$ g, 60 $\mu$ g, 80 $\mu$ g, ve 100 $\mu$ g) HepG2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi belirlendi. Cisplatinin kullanılan tüm dozlarda sitotoksik etkili olduğu sonucuna varıldı. HepG2 hücrelerinde cisplatinin sitotoksitesi Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3 HepG2 hücrelerinde cisplatin sitotoksitesi

### 4.4 HepG2 Hücre Hattında Cisplatin, $\alpha$ -Arbutin ve $\beta$ -Arbutinin Belirlenen Lethal Dozları

MTT analizlerinden elde edilen bulgulardan yola çıkılarak, kontrol grubundaki hücrelerin canlılık oranları %100 kabul edildiği bir durumda, farklı dozlarda arbutin uygulanan hücrelerin verileri kontrol grubu verileri ile kıyaslanarak elde edilen her bir doza karşılık % hücre canlılık oranları (Çizelge 4.1)'de sunulmuştur. Bu veriler kullanılarak HepG2 hücrelerinde  $\alpha$ -arbutin,  $\beta$ -arbutin ve cisplatinin lethal dozları hesaplanmıştır.

**Çizelge 4.1** Cisplatin,  $\alpha$ -Arbutin ve  $\beta$ -Arbutine ait lethal dozlar (LD)

	<b>Cisplatine ait Lethal Dozlar (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b><math>\alpha</math>-Arbutine ait Lethal Dozlar (mM)</b>	<b><math>\beta</math>-Arbutine ait Lethal Dozlar (mM)</b>
<b>LD<sub>0</sub></b>	0,006	0,003	0,022
<b>LD<sub>5</sub></b>	0,055	0,057	0,226
<b>LD<sub>10</sub></b>	0,178	0,261	0,779
<b>LD<sub>15</sub></b>	0,393	0,733	1,795
<b>LD<sub>50</sub></b>	11,060	57,471	61,270

$\alpha$  ve  $\beta$ -arbutine ait hesaplanan lethal dozlar kıyaslandığında,  $\alpha$ -arbutinin LD<sub>50</sub> dozunun daha düşük olduğu görülmektedir. Bunun anlamı HepG2 hücrelerinde aynı orandaki sitotoksisiteyi  $\alpha$ -arbutinin daha düşük dozlarla sağlayabildiğidir. Yani  $\alpha$ -arbutinin sitotoksisitesi  $\beta$ -arbutine göre daha yüksektir. LD<sub>50</sub> dozu hücrelerin en az yarısının ölmesine sebep olan dozdur. Başka bir ifade ile antikanserojenik dozdur. HepG2 hücrelerinde LD<sub>0</sub> dozu alfa ve beta arbutinin 24 saat inkübasyon sonunda herhangi bir ölüm veya proliferasyona neden olmayan dozdur. Bu doz kanser hücrelerin de herhangi bir proliferasyona neden olmadığı için, diğer hücrelerin kanser nedeniyle organizmada oluşmuş olan oksidatif stres, inflamasyon vb. durumları düzeltmek amacıyla antioksidan olarak kullanılan dozdur. Çünkü daha düşük dozlar HepG2 hücrelerinin üremesine pozitif katkı sağlamaktadır.

#### **4.5 HepG2 Hücrelerinde $\alpha$ -Arbutinin Genotoksisiteye Etkisi**

HepG2 hücrelerinde  $\alpha$ -arbutinin genotoksisiteye etkisini belirleyebilmek için Comet testi ile DNA hasarı, mikronükleus testi ile mikronükleus oluşum frekansları belirlendi. Veriler incelendiğinde LD<sub>0</sub> dozunda arbutin uygulandığında kontrol grubuna göre hem DNA hasarında hemde mikronükleus oluşum frekanslarında istatistiki fark oluşmadığı belirlendi. Bununla beraber LD<sub>50</sub> dozunda  $\alpha$ -arbutin uygulanan grubun komet ve mikronükleus skorlarının kontrol grubundan istatistiki düzeyde farklı ve yüksek çıktığı belirlendi. Aynı şekilde hücelere LD<sub>50</sub> dozunda cisplatin hücelere uygulandığında comet ve mikronükleus testi sonuçlarının kontrol grubuna göre farklılık gösterdiği görüldü.

Cisplatin toksikasyonu sonrası  $\alpha$ -arbutin koruyucu etkisini belirlemek amacıyla, HepG2 hücrelerine LD<sub>0</sub> dozunda  $\alpha$ -arbutin uygulandığında (grup 5) ise cisplatin uygulanan gruba ( grup 4) göre genotoksisite düzeylerini azalttığı belirlendi.

**Çizelge 4.2**  $\alpha$ -arbutinin HepG2 hücrelerinde Comet ve Mikronükleus oluşumuna etkisi.

<b>Groups</b>	<b>Comet scores (Arbitrary Unit)</b>	<b>Micro Nükleus Testi Frekansları (%)</b>
<b>Grup 1:</b> Kontrol	3,33±0,82	0,0117±0,0041
<b>Grup 2:</b> $\alpha$ -Arbutin (LD <sub>0</sub> )	4,67±1,21	0,0183±0,0041
<b>Grup 3:</b> $\alpha$ -Arbutin (LD <sub>50</sub> )	7,67±0,52 <sup>a</sup>	0,0433±0,0052 <sup>a</sup>
<b>Grup 4:</b> Cisplatin (LD <sub>50</sub> )	13,67±2,07 <sup>a</sup>	0,0533±0,0163 <sup>a</sup>
<b>Grup 5:</b> Tedavi Grubu Cisplatin (LD <sub>50</sub> ) + $\alpha$ -Arbutin (LD <sub>0</sub> )	10,00±3,95 <sup>b</sup>	0,0467±0,0082
<b>P</b>	0,000	0,000

\*Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde verilmiştir (n=6). Deney grupları arasındaki istatistiksel farklar, harflerle üst simge (<sup>a,b</sup>) halinde ifade edilmiştir. Verilere (normal dağılım göstermediği için) non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis ve ManWhitney testleri uygulanmıştır.

<sup>a</sup> p <0.05; istatistiki olarak kontrol grubundan farklı olan grupları ifade etmektedir.

<sup>b</sup> p <0.05; istatistiki olarak cisplatin grubundan farklı olan grupları ifade etmektedir.

#### **4.6 $\alpha$ -arbutinin HepG2 Hücrelerinde Oksidatif Strese Etkisi**

Sunulan çalışmada HepG2 hücrelerinde  $\alpha$ -arbutinin 2 dozu kullanılarak (LD<sub>0</sub> ve LD<sub>50</sub> dozları) hem antikanser etkileri belirlenmeye çalışılmış, hemde düşük doz arbutin uygulamalarında arbutinin olası koruyucu etkileri belirlenmesi amaçlanmıştır. Söz konusu koruyucu etkilerin belirlenebilmesi amacıyla  $\alpha$ -arbutinin HepG2 hücrelerinde oksidatif strese etkileri incelenmiştir. HepG2 hücrelerine  $\alpha$ -arbutin uygulanan deney gruplarında oksidatif stres düzeylerinin belirlenebilmesi amacıyla hücre lizatlarında TAS, TOS ve OSI düzeyleri analiz edilmiştir.

TAS analizlerinde elde edilen verilere göre kontrol grubu TAS düzeyleri 0,297 mmol trolox equiv/g-protein olarak belirlenmiştir. Deney gruplarına LD<sub>0</sub> dozunda (0,003 mM) arbutin uygulandığında 0,152 mmol trolox equiv/g-protein belirlenirken, LD<sub>50</sub> dozunda (57,47 mM) α-arbutin uygulandığında 0,226 mmol trolox equiv/g-protein seviyesinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında iki doz grubunda da azalma gözlenmiştir. α-arbutinin TAS analizlerinde her iki dozda da oksidatif strese etkisi olmadığı gözlenmiştir. LD<sub>0</sub> dozu ile LD<sub>50</sub> dozu ile karşılaştırıldığında ise LD<sub>50</sub> dozunun LD<sub>0</sub> dozuna göre TAS seviyelerinde artış olduğu görülmüştür. Bununla beraber deney gruplarında TAS düzeyleri arasında farklılıklar olsa da, bu farklılıkların istatistiksel düzeyde anlamlı olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

**Çizelge 4.3** Deney Gruplarına ait TAS, TOS ve OSI seviyeleri.

Deney Grupları	TAS (mmolTrolox Equiv./g- protein)	TOS (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - Equiv./g- protein)	OSI (Arbitrary Unit)
<b>Grup 1:</b> Kontrol	0,297 ± 0,079	2,66 ± 1,16 <sup>a</sup>	862,8 ± 256,1 <sup>a</sup>
<b>Grup 2:</b> α-Arbutin (LD <sub>0</sub> )	0,152 ± 0,037	2,34 ± 1,18 <sup>a</sup>	1635,4 ± 550,6 <sup>a, b</sup>
<b>Grup 3:</b> α-Arbutin(LD <sub>50</sub> )	0,226 ± 0,041	7,24 ± 2,45 <sup>a, b</sup>	3400,7 ± 977,3 <sup>b</sup>
<b>Grup 4:</b> Cisplatin LD <sub>50</sub>	0,136 ± 0,060	4,74 ± 0,96 <sup>a</sup>	4695,3 ± 1089,8 <sup>c</sup>
<b>Grup 5:</b> Cisplatin LD <sub>50</sub> + α-Arbutin (LD <sub>0</sub> )	0,192 ± 0,032	2,52 ± 1,26 <sup>a, b</sup>	1289,6 ± 493,9 <sup>a, b</sup>
<b>P</b>	0,253	1,26	0,006

\*Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir (n=6)

<sup>a, b</sup>: Aynı sütunda farklı üslü ifadeleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p < 0,05).

Deney gruplarına ait TOS analizleri incelendiğinde kontrol grubu TOS düzeyleri 2,66 µmol trolox equiv/g-protein olarak belirlenmiştir. Deney gruplarına LD<sub>0</sub> dozunda (0,003

mM) arbutin uygulandığında TOS düzeyleri 2,34  $\mu$ mol trolox equiv/g-protein belirlenirken, LD<sub>50</sub> dozunda (57,47 mM)  $\alpha$ -arbutin uygulandığında 7,24  $\mu$ mol trolox equiv/g-protein düzeyinde olduğu görüldü. Bu veriler kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında LD<sub>0</sub> dozunda TOS düzeylerinde azalma gözlenirken LD<sub>50</sub> dozunda artış gözlenmiştir. Cisplatin uygulanan grupta (grup 4) ve LD<sub>50</sub> dozunda  $\alpha$ -arbutin uygulanan gruplardan TOS düzeylerinin diğer gruplara oranla daha yüksek çıktığı söylenebilir. Fakat yapılan istatistiki analizlerde bu farklılıkların istatistiki yönden anlamlı olmadığı sonucuna varılmıştır (Çizelge 4.3).

Gruplar arasında oluşan TAS ve TOS düzeyleri arasındaki farklılıklar istatistiki düzeyde anlamlı olmasa da, TOS düzeylerinin TAS düzeylerine oranının bir ifadesi olan OSI değerlerinde gruplar arasında istatistiki düzeyde bir farklılık olduğu gözlenmiştir. Tüm grup verileri kontrol grubu verileri ile kıyaslandığında LD<sub>50</sub> dozunda uygulanan arbutinin uygulanan grubun (grup 3) verilerinin kontrol grubu OSI değerlerine oranla istatistik düzeyde farklı ve yüksek çıktığı belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Benzer şekilde LD<sub>50</sub> dozunda cisplatin uygulandığında da OSI değerlerinin kontrol grubuna göre istatistiki düzeyde farklı ve yüksek çıktığı görüldü.

Cisplatin maruziyeti sonrası tedavi olarak LD<sub>0</sub> dozunda  $\alpha$ -arbutin uygulandığında (grup 5) ise, cisplatin uygulaması ile artış göstren OSI düzeylerinin arbutin uygulaması sonucunda düşüş gösterdiği belirlendi. Bu veriler LD<sub>0</sub> dozundaki  $\alpha$ -arbutinin HepG2 hücrelerinde oksidatif stresi etkilemediği ve cisplatin toksikasyonu sonrası oksidatif stres düzeylerini azaltabileceği, LD<sub>50</sub> dozundaki  $\alpha$ -arbutinin ise oksidatif stresi artırarak antikanserijen etkinlikte rol alabileceğini göstermektedir.

#### **4.7 $\alpha$ -arbutinin HepG2 Hücrelerinde İnflamasyona Etkisi**

$\alpha$ -arbutinin HepG2 hücrelerinde inflamasyona etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla proinflamatuvar stokinlerden bazılarının (TNF- $\alpha$ , IL-6 ve TGF- $\beta$ 1) seviyeleri hücre lizatlarında belirlenmeye çalışıldı. Yapılan analizler sonucunda deney gruplarına ait TNF- $\alpha$  düzeyleri arasında farklılıklar olduğu görülse de, bu farklılıkların çoğunlukla istatistiki düzeyde anlamlı olmadığı belirlendi. Sadece LD<sub>50</sub> dozunda cisplatin uygulanan

grubun TNF- $\alpha$  düzeylerinin diğer gruplara oranla istatistiki olarak farklı ve yüksek çıktığı anlaşıldı (Çizelge 4.4).

**Çizelge 4.4** Proinflamatuvar stokin (TNF- $\alpha$ , IL-6 ve TGF- $\beta$ 1) düzeyleri.

Deney Grupları	TNF- $\alpha$ (pg/mg-protein)	IL-6(pg/mg- protein)	TGF- $\beta$ 1 (pg/mg-protein)
<b>Grup 1:</b> Kontrol	39,94 $\pm$ 14,86 <sup>a</sup>	55,75 $\pm$ 17,42 <sup>a</sup>	22,53 $\pm$ 7,06 <sup>a</sup>
<b>Grup 2 :</b> $\alpha$ -Arbutin (LD <sub>0</sub> )	43,05 $\pm$ 16,30 <sup>a</sup>	48,80 $\pm$ 5,84 <sup>a</sup>	17,79 $\pm$ 2,90 <sup>a</sup>
<b>Grup 3:</b> $\alpha$ -Arbutin(LD <sub>50</sub> )	27,71 $\pm$ 15,88 <sup>a</sup>	97,17 $\pm$ 42,72 <sup>b</sup>	45,47 $\pm$ 16,20 <sup>b</sup>
<b>Grup 4:</b> Cisplatin LD <sub>50</sub>	85,42 $\pm$ 15,88 <sup>b</sup>	82,72 $\pm$ 15,73 <sup>a,b</sup>	24,94 $\pm$ 5,95 <sup>a</sup>
<b>Grup 5:</b> Cisplatin LD <sub>50</sub> + $\alpha$ -Arbutin (LD <sub>0</sub> )	51,16 $\pm$ 29,78 <sup>a</sup>	73,72 $\pm$ 25,93 <sup>a,b</sup>	26,87 $\pm$ 10,52 <sup>a</sup>
<b>P</b>	0,008	0,085	0,011

\* Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde verilmiştir (n=6)

<sup>a,b</sup>: Aynı sütunda farklı üslü ifadeleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0,05$ ).

IL-6 ve TGF- $\beta$  düzeyleri incelendiğinde ise özellikle LD<sub>50</sub> dozunda  $\alpha$ -arbutin uygulanan deney grubuna ait IL-6 ve TGF- $\beta$  düzeylerini kontrol grubuna göre istatistiki düzeyde farklı ve yüksek çıktığı belirlendi. Bu veriler LD<sub>50</sub> dozunda HepG2 hücrelerine uygulandığında inflamasyonu artırarak apoptotik sinyal yolunu uyarabileceğini göstermektedir.

#### 4.8 Kaspaz 3 ve Bcl-2 mRNA Ekspresyon Düzeyleri

HepG2 hücrelerinde  $\alpha$ -arbutin apoptoza etkisini belirlemek amacıyla apoptotik kaspaz kaskadının son üyesi olan kaspaz 3'ün mRNA ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler kontrol grubu ile kıyaslandığında sadece cisplatin uygulanan grup 3'te kaspaz 3 mRNA ekspresyon düzeylerinin istatistiki düzeyde anlamlı olacak şekilde uyarıldığını (up regulation) göstermektedir (Çizelge 4.5).

**Çizelge 4.5** Deney Gruplarına ait Kaspaz 3 mRNA ekspresyon seviyeleri.

Deney Grupları	Kaspaz-3 mRNA		Sonuç
	Ekspresyon Düzeyleri	P	
<b>Grup 2 :</b> $\alpha$ -Arbutin (LD <sub>0</sub> )	0,061	0,072*	
<b>Grup 3:</b> $\alpha$ -Arbutin(LD <sub>50</sub> )	0,052	0,084*	
<b>Grup 4:</b> Cisplatin LD <sub>50</sub>	7,770 <sup>a</sup>	0,000*	Uyarılma
<b>Grup 5:</b> Cisplatin LD <sub>50</sub> + $\alpha$ -Arbutin (LD <sub>0</sub> )	0,985	0,900**	

\*Veriler ortalama (Standard hata) şeklinde ifade edildi (n=3). \*; Kontrol grubu ile kıyaslanan grupların P değerini, \*\*; Cisplatin grubu ile kıyaslanan grupların P değerini ifade etmektedir.

<sup>a</sup> : İstatistiki olarak kontrol grubundan farklılık gösteren verileri ifade etmektedir (p<0,05).

HepG2 hücrelerinde  $\alpha$ -arbutin proliferasyona etkisini belirlemek amacıyla deney gruplarından elde edilen numunelerde Bcl-2 genine ait mRNA ekspresyon düzeyleri analiz edildi. Elde edilen veriler incelendiğinde, LD<sub>0</sub> dozunda  $\alpha$ -arbutin uygulanan grup (grup 3) dışında kalan bütün grupların kontrol grubu verilerinden istatistiki düzeyde farklılık gösterdiği görülmektedir (Çizelge 4.6).

**Çizelge 4.6** Deney Gruplarına ait Bcl-2 mRNA ekspresyon seviyeleri.

Deney Grupları	Bcl-2 mRNA		Sonuç
	Ekspresyon Düzeyleri	P	
<b>Grup 2 :</b> $\alpha$ -Arbutin (LD <sub>0</sub> )	2,13	0,579*	
<b>Grup 3:</b> $\alpha$ -Arbutin(LD <sub>50</sub> )	0,10 <sup>a</sup>	0,000*	Baskılanma
<b>Grup 4:</b> Cisplatin LD <sub>50</sub>	0,005 <sup>a</sup>	0,012*	Baskılanma
<b>Grup 5:</b> Cisplatin LD <sub>50</sub> + $\alpha$ -Arbutin (LD <sub>0</sub> )	0,104 <sup>b</sup>	0,000**	Baskılanma

\*Veriler ortalama (Standard hata) şeklinde ifade edildi (n=3). \*; Kontrol grubu ile kıyaslanan grupların P değerini, \*\*; Cisplatin grubu ile kıyaslanan grupların P değerini ifade etmektedir.

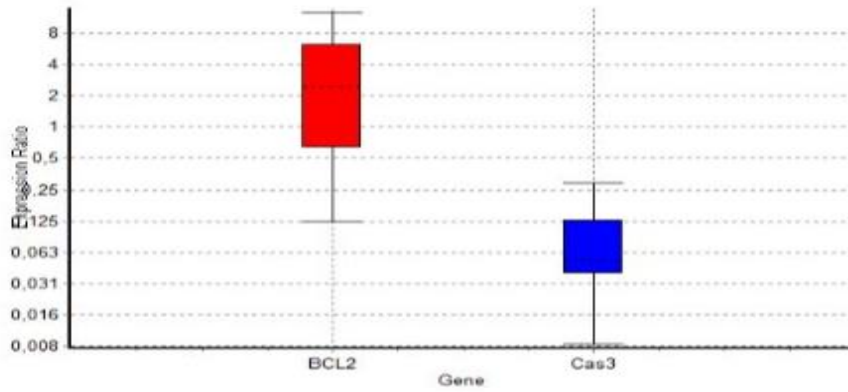
<sup>a</sup> : İstatistiki olarak kontrol grubundan farklılık gösteren verileri ifade etmektedir (p<0,05).

<sup>b</sup> : İstatistiki olarak cisplatin grubundan farklılık gösteren verileri ifade etmektedir (p<0,05).



LD<sub>50</sub> dozunda  $\alpha$ -arbutin ve cisplatin uygulanan gruplarda (grup 3 ve 4) Bcl-2 mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol gruplarına göre baskılandığı (down regulation) ve istatistiki düzeyde farklılık gösterdiği belirlendi. Cisplatin toksikasyonu oluştuktan sonra LD<sub>0</sub> dozunda  $\alpha$ -arbutin uygulanan grubun (grup 5) verileri Cisplatin grubu (grup 4) ile kıyaslandığında da Bcl-2 düzeylerinin baskılandığı ve belirlenen baskılanma düzeylerinin istatistiki yönden farklılık gösterdiği Çizelge 4.6’da görülmektedir.

Bir maddenin kanser hücrelerinde tedavi edici olabilmesi için kanser hücrelerinde programlı hücre ölümü olan apoptozisi uyarabiliyor seviyede olması gerekmektedir.  $\alpha$ -arbutinin HepG2 hücrelerinde apoptoz ve proliferasyona etkilerini belirleyebilmek için, deney gruplarından elde edilen veriler, kontrol grubu ile ayrı ayrı kıyaslanmıştır. Böylelikle  $\alpha$ -arbutinin HepG2 hücrelerinde tedavi edici olabilecek LD<sub>0</sub> dozunun etkisi ve antikanserojen etkili doz olarak kabul edebileceğimiz LD<sub>50</sub> dozunun etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Tablo Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6’da verilerin başka bir ifade edilmiş şekilleri olan grafikler (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5) bundan sonraki kısımda sunulmuştur. Grafikler RT-PCR verileri kullanılarak ilgili genlerin belirlenen Ct (Cq) değerlerinden hareketle REST2009 yazılımı aracılığı ile oluşturulmuştur.

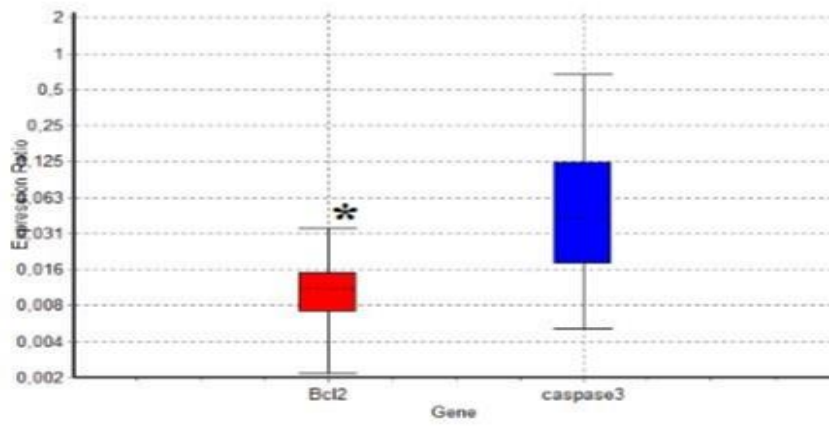


**Şekil 4.4** LD<sub>0</sub> dozunda  $\alpha$ -arbutinin HepG2 hücrelerinde apoptoz ve proliferasyon etkisi (Grafik kontrol grubu verileri ile kıyaslanarak elde edilmiştir).

Bu bağlamda LD<sub>0</sub> dozunda arbutin uygulanan grubun verileri kontrol grubu ile kıyaslandığında Bcl-2 ve Kaspaz 3 mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna ile herhangi bir istatistiki fark oluşturmadığı (p=0,579 ve p=0,072) görüldü (Şekil 4.4). Bu

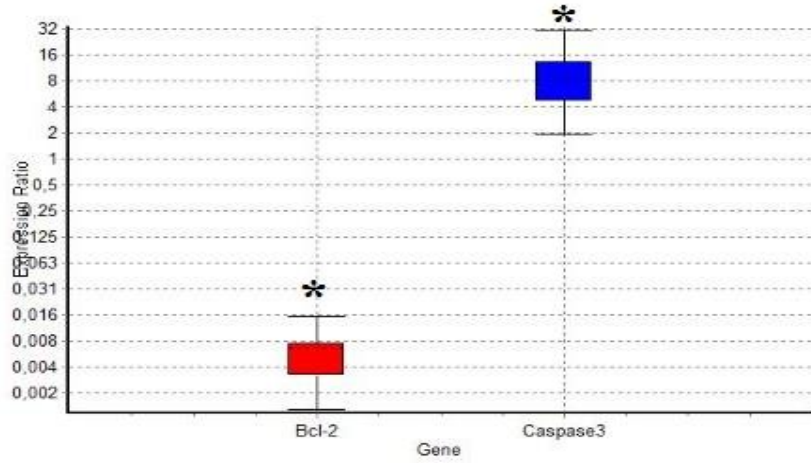
veriler LD<sub>0</sub> dozunda  $\alpha$ -arbutinin kanser hücrelerinde herhangi bir apoptoz ve proliferasyona neden olmadan antioksidan etkilerini gösterebileceğini ifade etmektedir.

LD<sub>50</sub> dozunda arbutin uygulanan grubun verileri kontrol grubu ile kıyaslandığında kaspaz 3 mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna herhangi bir istatistiki fark oluşturmadığı için (p=0,084) apoptozun uyarılmadığı görüldü (Şekil 4.5). Bununla birlikte uygulanan  $\alpha$ -arbutin dozunun analizi gerçekleştirilen Bcl-2 mRNA ekspresyon düzeylerini kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiki fark oluşturacak düzeyde (p=0,000) uyardığı belirlendi (Şekil 4.5).



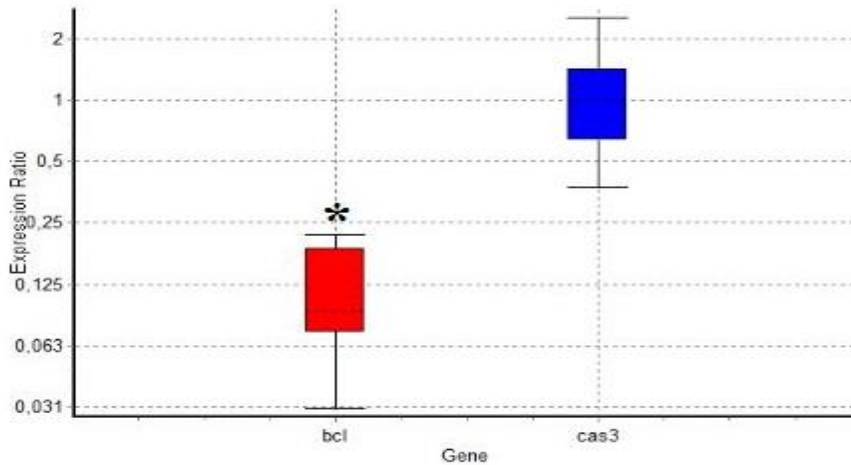
**Şekil 4.5** LD<sub>50</sub> dozunda  $\alpha$ -arbutinin HepG2 hücrelerinde apoptoz ve proliferasyon etkisi (\* ; işaretini taşıyan parametre istatistiksel olarak p<0,05 düzeyinde kontrol grubuna göre farklıdır).

Cisplatin LD<sub>50</sub> dozunda HepG2 hücrelerine uygulandığında kontrol grubu verilerine göre kaspaz 3 ve Bcl-2 mRNA ekspresyon düzeylerinin istatistiki düzeyde farklı olduğu belirlendi. Cisplatin uygulanan grupta (grup 4) kontrol grubuna oranla kaspaz 3 seviyelerininin uyarıldığı (p=0,000), Bcl-2 düzeylerinin ise istatistiki düzeyde (p=0,012) baskılandığı belirlendi. Başka bir ifade ile LD<sub>50</sub> dozunda HepG2 hücrelerine uygulanan cisplatinin kaspaz 3 aracılığı ile apoptozu uyararak, Bcl-2 aracılığı ile ise proliferasyonu baskılayarak, ideal bir antikanserojen ajan profili çizdiği söylenebilir (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6** Cisplatinin LD<sub>50</sub> dozunda HepG2 hücrelerinde Apoptoz ve Proliferasyon Etkisi (\*işaretini taşıyan parametre istatistiksel olarak p<0,05 düzeyinde kontrol grubuna göre farklıdır).

LD<sub>50</sub> dozunda cisplatin uygulanan HepG2 hücrelerinde LD<sub>0</sub> dozunda  $\alpha$ -arbutin uygulanan grubun verileri cisplatin grubu ile kıyaslandığında kaspaz 3 mRNA ekspresyon düzeylerinin cisplatin grubuna göre herhangi bir istatistiki fark oluşturmadığı için (p=0,900) apoptozun uyarılmadığı görüldü. Bununla birlikte Bcl-2 mRNA ekspresyon düzeyleri cisplatin grubu ile kıyaslandığında istatistiki fark oluşturacak düzeyde (p=0,000) uyarıldığı belirlendi (Şekil 4.7).



**Şekil 4.7** LD<sub>50</sub> dozunda Cisplatin uygulanan HepG2 hücrelerinde LD<sub>0</sub> dozunda  $\alpha$ -Arbutinin Apoptoz ve Proliferasyon Etkisi (\*işaretini taşıyan parametre istatistiksel olarak p<0,05 düzeyinde cisplatin grubuna göre farklıdır).

#### 4.9 İmmunostokimyasal Yöntemle Analiz Edilen Kaspaz 3 ve p53 Pozitif Hücre Sayılarının Değerlendirilmesi

Sunulan çalışmanın metaryal metot kısmında ifade edildiği üzere apoptozda etkili olan kaspaz 3 ve p53 genleri, immunostokimyasal metotla analiz edilerek, deney gruplarına yapılan uygulamalar sonucunda hücrelerdeki kaspaz 3 ve p53 pozitif hücre sayıları belirlenmiştir (Çizelge 4.7).

**Çizelge 4.7** Deney gruplarına ait Kaspaz 3 ve p53 Pozitif Hücre Sayıları.

Deney Grupları	Kaspaz 3 (mm <sup>2</sup> 'deki cas3 <sup>+</sup> hücre sayısı)	p53 (birim alandaki p53 <sup>+</sup> hücre yüzdesi)
<b>Grup 1:</b> Kontrol	60,45 ± 6,03 <sup>a</sup>	48,82 ± 12,38 <sup>b</sup>
<b>Grup 2 :</b> $\alpha$ -Arbutin (LD <sub>0</sub> )	75,59 ± 30,92 <sup>a,b</sup>	31,28 ± 9,81 <sup>a</sup>
<b>Grup 3:</b> $\alpha$ -Arbutin(LD <sub>50</sub> )	104,93 ± 45,16 <sup>b,c</sup>	73,20 ± 8,63 <sup>d</sup>
<b>Grup 4:</b> Cisplatin LD <sub>50</sub>	121,35 ± 41,02 <sup>c</sup>	49,97 ± 10,81 <sup>b</sup>
<b>Grup 5:</b> Cisplatin LD <sub>50</sub> + $\alpha$ -Arbutin (LD <sub>0</sub> )	107,81 ± 43,41 <sup>b,c</sup>	59,68 ± 15,76 <sup>d</sup>
<b>P</b>	0,004	0,000

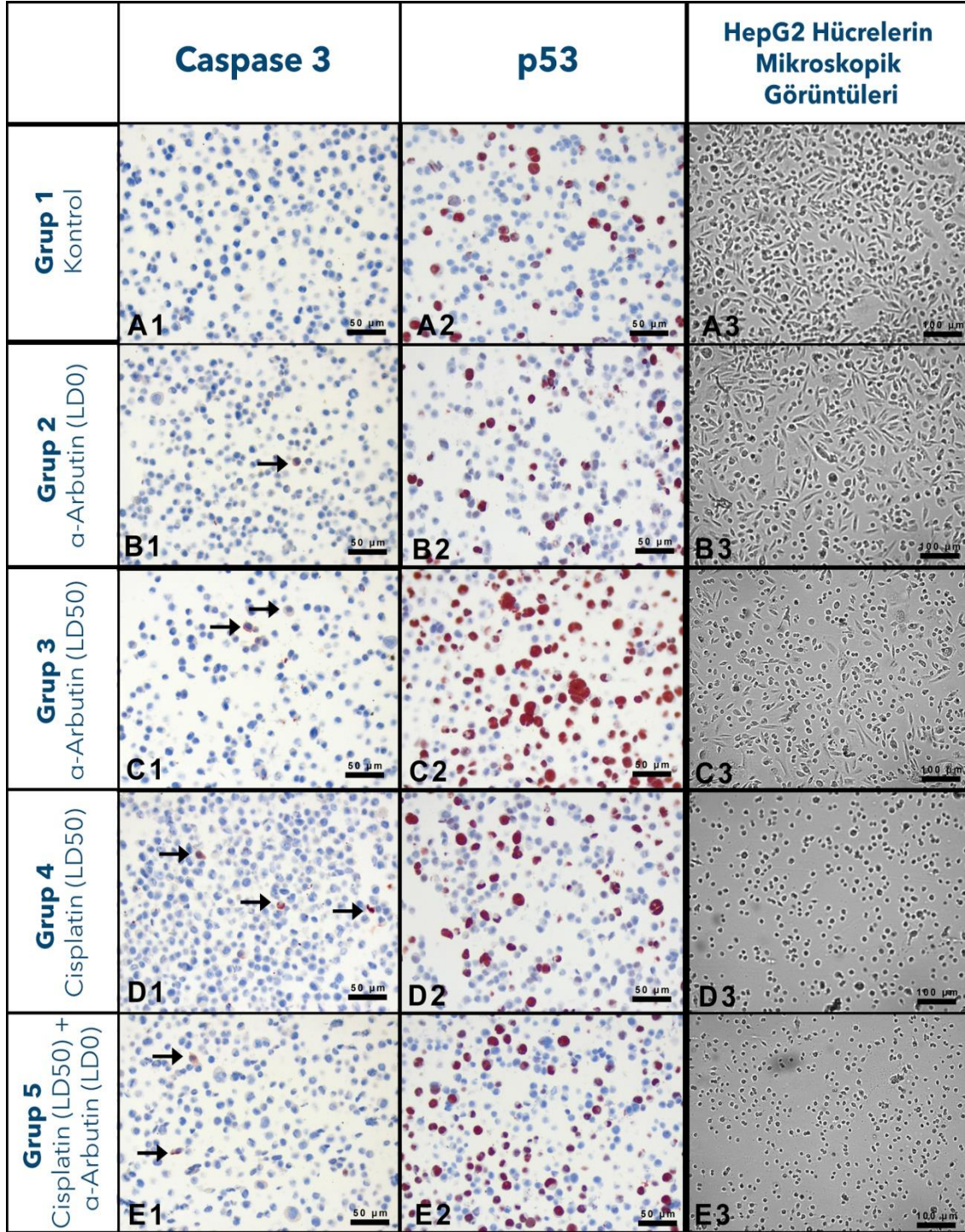
\*Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir (n>8)

<sup>a,b</sup>: Aynı sütunda farklı üslü ifadeleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p < 0,05).

Kaspaz 3 pozitif hücre sayıları incelendiğinde, LD<sub>50</sub> dozunda  $\alpha$ -arbutin ve LD<sub>50</sub> dozunda cisplatin uygulanan grupların kaspaz 3 pozitif hücre sayılarının kontrol grubuna göre istatistiki düzeyde farklı (p < 0,05) ve yüksek olduğu görülmektedir (Çizelge 4.7). p53 pozitif hücre oranları karşılaştırıldığında ise kontrol grubuna göre LD<sub>50</sub> dozunda  $\alpha$ -arbutin uygulanan grupta artış olduğu belirlendi. Bu veriler LD<sub>50</sub> dozundaki arbutinin özellikle p53 aracılığı ile kaspaz 3'ü uyararak HepG2 hücrelerini apoptoza sürükleyebileceğini ve



böylelikle antikanserojen etkiler gösterebileceğini ifade etmektedir. Çizelge 4.7’de sunulan verilerin elde edildiği preparatlardan bir kısmı kullanılarak hazırlanan deney gruplarına ait mikroskop görüntüleri Şekil 4.8’de sunulmuştur.



Şekil 4.8 İmmunostokimyasal değerlendirilmede kullanılan hücrelerin mikroskop görüntüleri

\*1.sütunda (A1-E1) yer alan mikroskop görüntüleri p53 parametresine ait olup, → oklar p53<sup>+</sup> hücreleri göstermektedir.

2. Sütunda (A2-E2) yer alan mikroskop görüntüleri kaspaz 3 parametresine ait olup, kırmızı renkle boyanan hücreler cas3<sup>+</sup> hücreleri göstermektedir.

3. Sütunda ise deney gruplarında yapılan uygulamalar sonrası oluşan HepG2 hücrelerine yer verildi. A1-3; kontrol grubuna ait resimleri, B1-3;LD<sub>0</sub> dozunda α-arbutin uygulanan gruba ait resimleri, C1-3; LD<sub>50</sub> dozunda α-arbutin uygulanan gruba ait resimleri; D1-3; Cisplatin grubuna ait resimleri, E1-3;Cisplatin+ LD<sub>0</sub> dozunda α-arbutin uygulanan gruba ait resimleri ifade etmektedir)



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de ciddi sağlık sorunlarından biri olan kanserin 2030 yılına kadar ölüm nedeni olarak ilk sırada olacağı düşünülmektedir. Kanseri oluşturan faktörler çevresel veya genetik olabilir. Çevresel nedenlere başta sigara, alkol olmak üzere, fiziksel ve kimyasal ajanlar, virüsler ve beslenme örnek olarak gösterilebilir. Bunun yanı sıra fiziksel aktivite yapmayan ve dengesiz beslenen bireylerde de kanser riski artmaktadır (Aygün Çevik ve Pirinççi 2017).

Karaciğer kanseri ve diğer kanser türlerinin tedavisinde yan etkileri nedeniyle toksik olmayan, çok hedefli ve ilaç direnci oluşturmayan yeni tedavi protokollerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kapsamda toksik etkileri kısıtlı olan doğal aktif maddeler alternatif olmaya devam etmektedir. Bu alanda yapılan çalışmalar doğal aktif maddelerin kanser tedavisinde yeni çözümlerin geliştirilmesine katkı sağlayabileceğini göstermektedir. Sunulan çalışmayla bir karaciğer kanseri hücre hattı olan HepG2 hücrelerinde  $\alpha$ -arbutinin olası etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Böylelikle  $\alpha$ -arbutinin karaciğer kanserine ve karaciğer kanserinde cisplatin toksikasyonuna olası fayda/zararları oluşturulan bir in-vitro model üzerinde belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen bulguların hem klinisyenlere hem de literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Arbutin; ayı üzümü (*Arctostaphylos uva-ursi*), kış sümbülü, armut ve dut ağacı gibi bitkilerin yapraklarından elde edilen doğal aktif maddelerden biridir (Deisinger vd. 1996 ve Jiang vd. 2018). Yapılan bilimsel araştırmalar arbutinin cilt kanseri ve böbrek taşı tedavilerinde kullanılabileceği gibi, insanların cildinde görülen çil, ben ve lekelerin giderilmesinde cilt beyazlatma ajanı olarak da yararlı olabileceğini öngörmektedir (Olumide vd. 2008, Cheng vd. 2007). Arbutin izoformlarından doğal olan  $\beta$ -arbutin, sentetik izoformu  $\alpha$ -arbutine göre diğer kimyasal cilt beyazlatıcı ajanlara göre daha etkili ve doğal olması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir (Draelos 2007 ve Tomita vd. 1992). Fakat doğal kaynaklardan  $\beta$ -arbutin izolasyonu maliyetli olduğu için, çoğu kozmetik üründe sentetik arbutin ( $\alpha$ -arbutin) formunun kullanılıyor olma ihtimalinin daha yüksek olduğu söylenebilir.

Arbutinin metabolizma ve çeşitli hastalıklara olası olumlu katkıları deney hayvanı modelleriyle çalışılmıştır. Bu çalışmalardan birinde arbutin diyabetik ratlara uygulandığında oral glukoz alımını takiben barsaklardan salınımı artan ve böylelikle pankreatik insülin sentez ve salınımını artırarak glukoz metabolizmasının dengede kalmasını sağlayan GLP-1 seviyelerini artırdığı rapor edilmektedir (Farzanegi, 2014). Başka bir çalışmada ise arbutinin kan glukozu ve lipit seviyelerini dengelediği böylelikle glukoz homeostazisine katkı sağladığı, bunu antioksidan etkinliği aracılığı ile düzenlemiş olabileceği ifade edilmektedir (Shahaboddin vd. 2011).

Arbutinin mide hastalıkları üzerine de faydalı etkileri olabileceği ileri sürülmektedir. Deneysel peptik ülser oluşturulan deney hayvanlarında ülser indeksi, mide özsuyu eşitliği, mukus içeriği incelenmiştir. Arbutinin mide mukozasında ülser alanına uygulandığında ödem, iltihaplanma ve lökositlerde azalma meydana getirdiği ifade edilmektedir. Ayrıca doku hasarında da önemli bir şekilde azalmaya neden olduğu ve bağışıklık sistemini geliştirdiği belirtilmektedir (Taha vd. 2012).

Kanser etiyolojisinde oluşan hücrel hasarın önemli sebepleri arasında oksidatif stres ve inflamasyon da sayılmaktadır. Kanser gelişimi sırasında, ileri evrelerde organizmada immun sistemin zayıflaması ile oksidatif stres ve inflamasyonda artış gözlenir. Bu yüzden vücudun direncinin artırılması için antioksidan takviye önemli olabilir. Ama takviyenin kanser hücrelerinin üremesine de katkı yapabileceği düşünülürse, söz konusu antioksidan takviyenin doğru dozlarda ve bilinçli bir şekilde yapılması önem arz etmektedir. Bu nedenle antioksidan maddelerin kanser hücrelerinde etkilerinin incelenmesi ve etkilerinin bilim dünyasıyla paylaşılması kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar geliştirilmesine katkı sunabilir.

Arbutin gibi birçok antioksidan düşük dozlarda organizma ve hücreler için koruyucu rol üslenirken yüksek dozlarda apoptozu uyararak, proliferasyonu baskılayarak sitotoksik etkili olabilmektedir. Düşük dozlarda koruyucu yüksek dozlarda ise sitotoksik etkili olan biyoaktif maddeler kanser hücrelerinde antikanserojen etkileri nedeniyle uzunca yıllardır araştırma konusu olmuştur. Yüksek dozlardaki  $\alpha$ -arbutinin HepG2 hücrelerinde apoptozu hangi mekanizmalarla uyardığının belirlenebilmesi için deney gruplarında apoptozla



birlikte; inflamasyon, oksidatif stres ve genotoksisite düzeyleri de analiz edilmiştir. Elde edilen bulgular ışığında özellikle LD<sub>50</sub> dozunda HepG2 hücrelerine uygulanan  $\alpha$ -arbutinin hangi mekanizmalar aracılığı ile antikanserojenik etki göstermiş olabileceği özetlenmeye çalışılmıştır.

Yapılan bir araştırmada arbutinden, insan dışkı hazırlanarak ile kuluçka işlemi sonucunda HQ oluşabileceği belirlenmiştir. İlgili çalışmada arbutinin metabolik aktivasyon için bir insan fekal hazırlanaraksiyonu ile kuluçkalanmasının ardından, reaksiyon karışımının filtre ile sterilize edildiği, sonrasında HepG2 hücrelerine uygulandığı belirtilmektedir. Karışımın konsantrasyona bağlı olarak HepG2 hücrelerinde sitotoksisiteye neden olduğu bulunmuştur Ayrıca aynı çalışmada arbutin ve arbutinin deglikosile edilmiş bir metaboliti olan hidrokinoon (HQ) sitotoksisiteleri HepG2 hücreleri kullanılarak karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar HQ'un arbutinden daha toksik olabileceğini göstermektedir (Khanal vd. 2011). Benzer şekilde arbutin ile bir bakteri kültür ortamının toksisitesi HepG2 hücre dizisinde test edildiğinde, arbutin içeren bakteri kültür ortamının, arbutin içermeyen bakteri kültür ortamına oranla daha sitotoksik etkiler gösterebileceği ifade edilmektedir. Ama arbutinin sitotoksisite gösterebilmesi için metabolik olarak aktivasyonunun yani bakterilerle muhtemelen hidrolizinin sağlanmasının gerekli olduğu belirlenmiştir (Kang vd. 2011). Bu bilgiler bizlere toksisitenin arbutinden ziyade onun bir metaboliti olan HQ kaynaklı olduğunu ve insan bağırsak mikroflorasının arbutini metabolize etmesi sonucu apoptozu indükleyebilen HQ'nun üretebileceğini göstermektedir.

Sunulan çalışmada ise arbutin HepG2 hücrelerine mediumla birlikte, herhangi bir deglikozisyona tabi tutulmadan, yani arbutin hidrolize edilmeden uygulanmıştır. Yapılan sistotoksisite analizleri sonucunda HepG2 hücrelerinde yüksek dozlardaki arbutin izoformlarının sitotoksik etkili olabileceği belirlenmiştir. HepG2 hücrelerinde hem  $\alpha$ -arbutin hem de  $\beta$ -arbutinde doz arttıkça hücre canlılığı azalırken sitotoksisitelerinin arttığı görülmüştür. HepG2 hücreleri ve arbutinle ilgili benzer bir çalışmaya literatürde raslanılmamıştır. Bununla birlikte literatürde arbutin ve MCF-7 hücreleri ile yapılan çalışmalarda arbutinin düşük dozlarda sitotoksisite göstermediği (Berdowska vd. 2013), fakat arbutin izoformlarının MCF-7 hücrelerinde yüksek dozlarda sitotoksik etkiler

gösterebileceği, böylelikle antikanserojen etkinlikten bahsedebileceği belirtilmektedir (Sariova 2019).

Yapılan MTT analizleri sonucunda arbutin izoformlarından  $\alpha$ -arbutinin,  $\beta$ -arbutine oranla sitotoksitesinin HepG2 hücrelerinde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Arbutin izomerlerinin sitotoksitesilerinin farklı farklı çıkmış olması her iki izomerin farmakokinetiğinin farklı olmasıyla ilişkisi olabilir. Literatürde başka bir hücre hattı ile yapılan bir çalışmada da  $\alpha$ -arbutin ve  $\beta$ -arbutinin MCF-7 hücrelerindeki sitotoksitesileri farklı çıktığı belirtilmektedir. İlgili çalışmada MCF-7 hücrelerinde  $\beta$ -arbutinin  $\alpha$ -arbutinden daha sitotoksik etkiler gösterdiği ifade edilmektedir (Sariova, 2019).

Sunulan çalışmada cisplatin toksikasyonuna arbutinin etkilerinin de belirlenmesi amaçlandığı için HepG2 hücrelerinde cisplatinin sitotoksik etkili olabilecek LD<sub>50</sub> dozu da MTT analizleri ile belirlenmiştir. Yapılan analizlerde HepG2 hücrelerinde cisplatin sitotoksitesinin 2  $\mu$ g/mL konsantrasyondan itibaren hızla yükseldiği belirlendi. Yapılan hesaplamalarda HepG2 hücreleri için cisplatinin LD<sub>50</sub> dozu 11,06  $\mu$ g/mL olarak bulundu. Literatürde HepG2 hücreleri ile yapılan çalışmalar incelendiğinde cisplatinin sitotoksik dozlarının daha yüksek olduğu belirtilmektedir. Örneğin 5-80  $\mu$ g/mL konsantrasyon aralığında cisplatin dozları kullanılan bir çalışmada cisplatinin ancak yüksek dozlarda (40-80  $\mu$ g/mL) HepG2 hücrelerindeki proliferasyonu %30-40 oranlarında azaltabileceği ifade edilmektedir (Shu vd. 2016). Cisplatinin HepG2 hücrelerinde sitotoksitesinin bu şekilde farklı farklı olması kullanılan cisplatin çözeltisi ile ilişkili olabilir. Çünkü kanser hastaları için kullanılan enjekte edilebilir formdaki cisplatin çözeltilerine toksik etkileri ve yan etkileri azaltmak için mannitol ilave tamponlayıcı maddeler ilave edilebilmektedir. Sunulan tez çalışmasında ise insanlardaki kanser hastalığının tedavisi için hazırlanmış enjekte edilebilir cisplatin çözeltisi değil, aktif madde olarak cisplatinin kendisi kullanılmıştır. Bu nedenle cisplatinin toksikasyon oranı literatüre göre yüksek çıkmış olabilir. Nitekim HepG2 hücreleri ile enjekte edilebilir cisplatin çözeltisi kullanılarak yapılan başka bir çalışmada (Hazman ve Cigerci, 2018) da cisplatinin LD<sub>50</sub> dozunun 65,6  $\mu$ g/mL olduğu ifade edilmektedir.

Sunulan tez çalışmasında  $\alpha$ -arbutin,  $\beta$ -arbutinin ve cisplatinin lethal dozları belirlendikten sonra arbutinin HepG2 hücrelerinde genotoksisiteye, oksidatif strese, inflamasyona, apoptoz ve proliferasyona etkilerini belirlemek için çalışmanın ikinci kısmına geçilmiştir. Daha önce de belirtildiği üzere çalışmaların bu aşamasında  $\alpha$ -arbutinin sitotoksisitesi daha yüksek bulunduğu için hücrelere sadece  $\alpha$ -arbutin uygulanmıştır. Ayrıca cisplatin toksikasyonuna karşı  $\alpha$ -arbutinin LD<sub>0</sub> dozu (0,003  $\mu$ M) kullanılarak, arbutinin olası tedavi edici etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

Tez çalışması kapsamında yapılan laboratuvar analizleri LD<sub>50</sub> dozunda cisplatinin hem DNA hasarını hem de mikronükleus oluşumunu artırarak HepG2 hücrelerinde genotoksik etkili olduğunu göstermektedir. Bu bulgular literatür paralelindedir. Çünkü literatürde cisplatinin DNA hasarını ve mikronükleus oluşumunu artırarak genotoksisiteye neden olduğu farklı çalışmalarla gösterilmiştir (Zhang vd. 2010 ve Cheki vd. 2019). HepG2 hücrelerine LD<sub>50</sub> dozunda  $\alpha$ -arbutin uygulandığında ise  $\alpha$ -arbutinin cisplatin kadar olmasa da kontrol grubuna göre istatistiki olarak farklı ve yüksek düzeyde genotoksik etkiler gösterdiği belirlendi. Literatürde arbutin ve HepG2 hücreleri ile yapılan bir çalışmaya raslanılmamıştır. Ancak in-vitro olarak yapılan bir çalışmada oral yolla uygulanan arbutinin rat hepatositlerinde DNA hasarına neden olmadığı belirtilmektedir (Jurica 2020). Bununla birlikte HepG2 dışında bir hücre hattı olan MCF-7 hücrelerinde yapılan bir çalışmada arbutinin başka bir izomeri olan  $\beta$ -arbutinin hem DNA hasarını hem de mikronükleus oluşumunu artırarak genotoksik etkiler gösterebileceği ifade edilmektedir (Sarıova, 2019).

Sunulan çalışmada HepG2 hücrelerinde cisplatin toksikasyonu oluşturulduktan sonra LD<sub>0</sub> dozunda  $\alpha$ -arbutin uygulandığında (grup 5) ise cisplatin grubuna (grup 4) göre DNA hasarının azaldığı belirlendi. Bu veriler LD<sub>0</sub> dozunda  $\alpha$ -arbutinin cisplatin toksikasyonu sonucu oluşan toksisiteyi azaltarak, sağlıklı hücrelerde olası cisplatinin yan etkilerini azaltmada yararlı olabileceğini akla getirmektedir. Ayrıca düşük dozlarda  $\alpha$ -arbutinin DNA hasarını azaltıyor olmasının nedeni, düşük dozlarda uygulanan arbutinin antioksidan etkinliği ile ilişkili olabilir. Nitekim U937 makrofaj hücreleri ile yapılan bir çalışmada (Wu vd. 2014), iyonize radyasyonun U937 hücrelerinde oluşturduğu oksidatif stresi özellikle hidroksil radikallerini etkisiz hale getiren arbutinin antioksidan etkinlik

gösterebileceği ifade edilmektedir.

Arbutin ve farklı hücre hatları ile yapılan çalışmalarda tedavi amaçlı arbutin kullanımının genellikle düşük dozlarda olduğu görülmektedir. Yapılan çalışmalar düşük dozlarda arbutinin herhangi bir sitotoksikite göstermeden antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri oluşturabileceğini ifade etmektedir. Yapılan böyle bir çalışmada lipopolisakkarit ile rat BV2 mikroglia hücrelerinde oluşturulan toksikasyon sonucu artan oksidatif stres ve inflamasyona arbutinin etkileri araştırılmıştır. Elde edilen bulgular lipopolisakkaritin neden olduğu oksidatif stresi ve inflamasyonu arbutinin hücrel toksisite göstermeksizin azalttığını göstermektedir (Lee and Kim 2012). Başka bir çalışmada Seyfizadeh vd. (2012), HepG2 hücrelerinde tert-bütül hidroperoksit (t-BHP) ile oluşturulan toksikasyona karşı sitotoksik olmadığı belirlenen düşük dozlardaki (50-100 ve 150  $\mu$ M) arbutinin koruyucu etkileri araştırılmıştır. Düşük dozlardaki arbutinin toksikasyon öncesinde uygulanması sonucu HepG2 hücrelerinde antioksidan gücü artırdığı, böylelikle toksikasyon sonucu hücre ölümlerini azaltabileceği ifade edilmektedir. Sunulan çalışmada ise cisplatin toksikasyonu oluşturulmuş olup, toksikasyon sonucunda HepG2 hücrelerinde hem oksidatif stresin hem de inflamasyonun arttığı belirlenmiştir. Ayrıca HepG2 hücrelerinde cisplatin ile toksikasyon oluşturulduktan sonra düşük dozda  $\alpha$ -arbutin tedavisinin OSI düzeylerini düşürerek oksidatif stresi (Çizelge 4.3) ve TNF- $\alpha$  seviyelerini düşürerek (Çizelge 4.4) ise inflamasyonu azalttığı belirlenmiştir. Muhtemelen düşük dozlardaki arbutinin bu etkileri arbutinin sahip olduğu güçlü antioksidan aktivitesi Takebayashi vd. (2010) ile ilişkili olabilir.

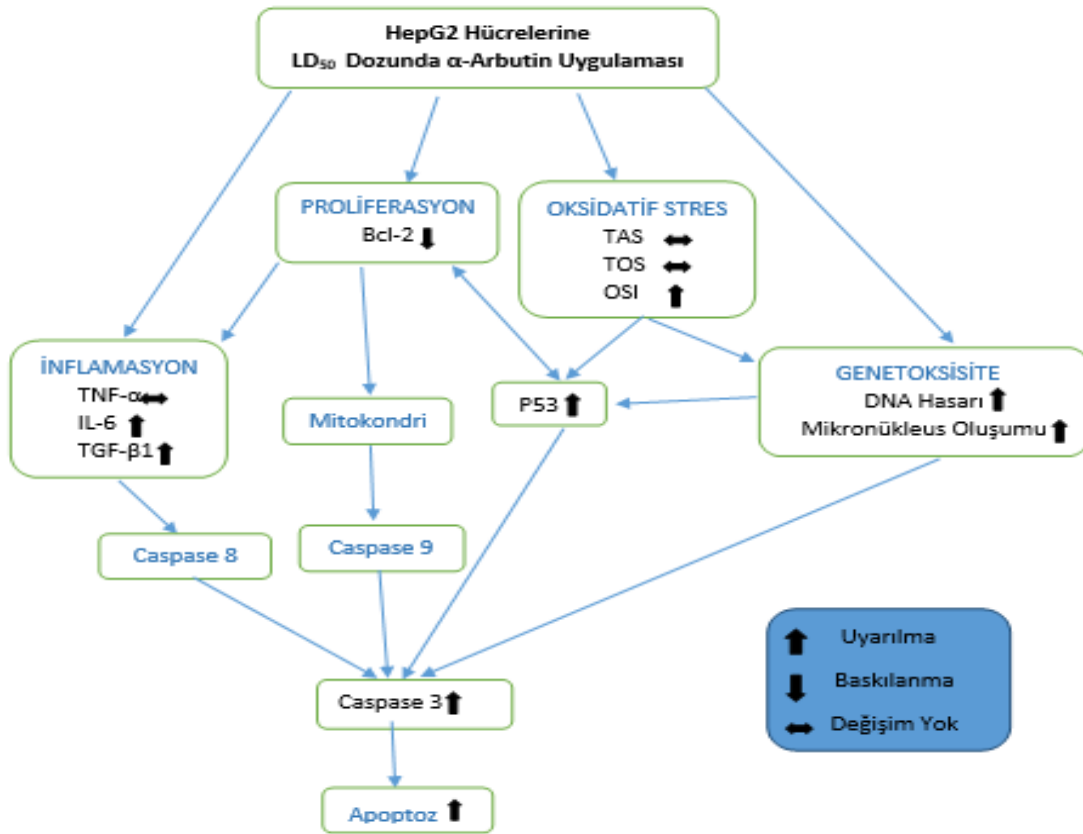
HepG2 hücrelerine yüksek dozda, başka bir ifade ile LD<sub>50</sub> dozunda (57,471 mM)  $\alpha$ -arbutin uygulandığında ise OSI düzeylerinin artması sonucu oksidatif stresin (Çizelge 4.3), IL-6 ve TGF- $\beta$ 1 düzeylerinin artması ile de akut inflamasyonun (Çizelge 4.4) uyarıldığı belirlenmiştir. HepG2 hücrelerinde yüksek dozlarda arbutin uygulaması ile ilgili literatürde herhangi bir kaynağa raslanılamamıştır. Fakat başka bir hücre hattı olan MCF-7 hücreleri ile yapılan bir çalışmada yüksek dozda kullanılan arbutinin hücrelerde oksidatif stresi ve inflamasyonu artırabileceği ifade edilmektedir (Sarıova 2019).

Yapılan analizler yardımıyla arbutinin, cisplatinin ve cisplatin toksikasyonu sonrasında arbutinin apoptoz ve proliferasyona etkileri de belirlenmeye çalışılmıştır. RT-PCR ve immünotokimyasal yöntemlerle yapılan analizler sonucunda cisplatinin HepG2 hücrelerinde kaspaz 3 ekspresyonunu uyararak apoptoza neden olduğu belirlendi. Bu veriler literatür bilgileri ile paralellik teşkil etmektedir. Çünkü HepG2 hücrelerine cisplatin uygulandığında kaspaz 3'ün uyarılarak apoptoza sebebiyet verebileceği ifade edilmektedir (Sherif ve Al-Gayyar 2018). Elde edilen sonuçlara göre apoptotik kaspaz 3'ü uyararak cisplatinin aynı zamanda Bcl-2 mRNA gen ekspresyon düzeylerini de baskıladığı (Çizelge 4.6) düşünülürse HepG2 hücreleri içinde etkili bir antikanser ilacı olduğu söylenebilir.

Sunulan tez çalışmasında yapılan immünotokimyasal analizlerde cisplatin uygulanan grupta p53 pozitif hücre sayısının kontrol grubuna göre değişmediği gösterilmiştir (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.8). p53; apoptozun ve hücre siklusunun düzenlenmesinde rol alan çok önemli bir gendir. Çünkü hücre döngüsü sırasında hücre DNA'sında hasar varsa, DNA'nın tamiri için hücre siklusu p53 etkisiyle durdurulabilir. Eğer DNA'nın tamiri mümkün değilse p53 etkisiyle apoptoz uyarılabilmektedir. Bu nedenle p53'ün aşırı inhibe olması veya işlevini kaybetmesi kanser hastalıklarının nedenleri arasında sayılmaktadır. Bu sebeple cisplatin toksikasyonu sonucu HepG2 hücrelerinde p53 geninin uyarılma/baskılanma durumu varsa bunun net olarak ortaya konması önemlidir. Sunulan tez çalışmasında daha önce belirtildiği üzere, cisplatinin HepG2 hücrelerinde p53<sup>+</sup> hücre sayısında herhangi bir değişiklik oluşturmadığı belirlenirken, literatürde cisplatin aracılığı ile p53'ün uyarılarak hücre siklusunu durdurabileceği (Qu vd. 2013, Wang vd. 2016) ifade edilmektedir. Yani tez çalışmasından elde edilen bulgular ile literatür bilgileri kısmen çelişmektedir. Cisplatinin hepatosellüler karsinomda p53'e olası etkilerinin belirlenmesi ve netleştirilmesi tedavide cisplatinin etkinliğinin açıklanabilmesi adına önemlidir. Bu nedenle bu konuda daha ileri çalışmaların yapılması yararlı olacaktır.

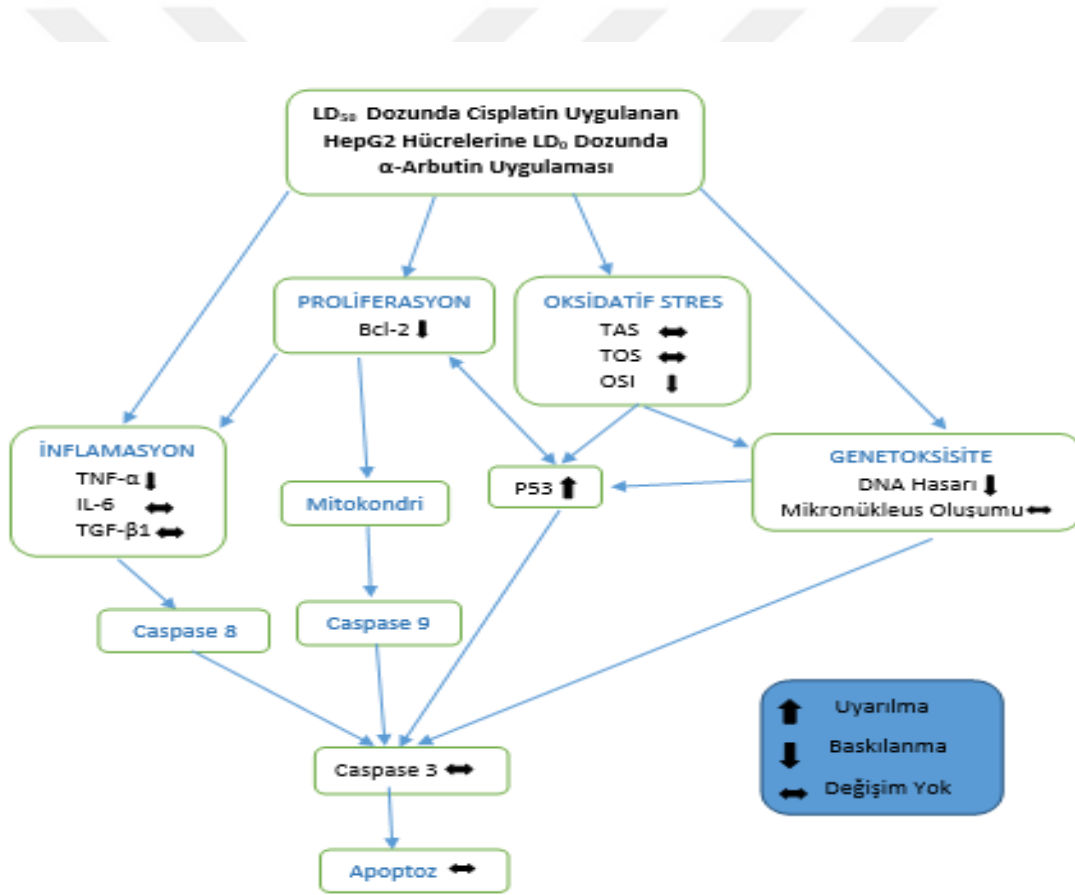
HepG2 hücrelerine cisplatin uygulandıktan sonra LD<sub>0</sub> dozunda  $\alpha$ -arbutin ile muamele edildiğinde p53<sup>+</sup> hücre sayısının arttığı (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.8) ile belirlenmiştir. Cisplatinle beraber kombine kullanılan bir ajanın apoptotik p53'ü uyarıyor olması, antikanserojen etkinliğin arttığı anlamına gelmektedir. Bu nedenle karaciğer kanserinde

cisplatinle beraber düşük doz arbutin tedavisinin mevcut tedavilere katkısı olabileceği düşünülebilir. Nitekim arbutin ve HepG2 ile yapılan çalışmalar, kullanılan arbutin dozu arttıkça Bax/Bcl-2 oranının artması ve kaspaz 3'ün uyarılması sonucu apoptotik hücre sayısının artabileceğini (Khanal vd. 2011) ifade etmektedir. Bu bağlamda sunulan çalışmada da LD<sub>50</sub> dozunda  $\alpha$ -arbutin HepG2 hücrelerine uygulandığında p53 pozitif hücre sayısı önemli bir artış gösterirken, Bcl-2 mRNA ekspresyon düzeyleri ise baskılanmıştır. Bu veriler arbutininin yüksek dozlarda p53 aracılığı ile apoptozu uyarırken, Bcl-2 aracılığı ile ise proliferasyonu baskılayarak, antikanserojenik etki gösterebileceğine (Şekil 5.1) işaret etmektedir. Benzer şekilde farklı bir hücre hattı olan B16 murin melanom hücreleri ile yapılan bir çalışmada da arbutinin Bcl-xL ve Bcl-2 gibi genleri baskılayarak kanser hücrelerinin proliferasyonunu azaltırken, apoptozu uyardığı (Jiang vd. 2018) gösterilmiştir.



**Şekil 5.1** HepG2 hücrelerinde  $\alpha$ -arbutinin antikanserojen etkilerinin oluşmasına aracılık eden mekanizma (Kontrol grunu ile LD<sub>50</sub> dozunda  $\alpha$ -arbutin uygulanan deney grubu verileri karşılaştırılarak elde edilmiştir).

Sonuç olarak, elde edilen veriler özetlenecek olursa, düşük doz (LD<sub>0</sub> dozunda)  $\alpha$ -arbutinin tek başına hepatosellüler karsinom (HepG2) hücrelerine uygulandığında herhangi bir genotoksik ve sitotoksik etkileri olmadığı, inflamasyon, apoptoz ve proliferasyonu etkilemediği belirlendi. Bununla birlikte cisplatin toksikasyonu oluşturulduktan sonra tedavi amacıyla düşük doz arbutin kullanıldığında, cisplatin toksikasyonu sonucu artan oksidatif stres, inflamasyon, genotoksisite düzeylerinde düşüşler gözlenirken, bu durumdan kaspaz 3 seviyelerinin etkilenmediği belirlendi. Başka bir ifade ile LD<sub>0</sub> dozunda uygulanan arbutin, HepG2 hücrelerinde cisplatinin apoptoz aracılığı ile oluşturduğu antikanserojenik etkinliği bozmadan, toksikasyona eşlik eden septomların şiddetini azalmaktadır (Şekil 5.2).



Şekil 5.2 HepG2 hücrelerinde  $\alpha$ -arbutinin cisplatin toksikasyonunu azaltıcı etkilerine aracılık eden mekanizma (Cisplatin grubu ile cisplatin toksikasyonu sonrasında LD<sub>0</sub> dozunda  $\alpha$ -arbutin uygulanan deney grubu verileri karşılaştırılarak elde edilmiştir).

Bu veriler arbutinin düşük dozlarda cisplatinle kombine bir şekilde kullanıldığında, cisplatinin diğer sağlıklı hücrelerde oluşabilecek yan etkilerini azaltmada yararlı olabileceğini akla getirmektedir. Ama bunun tam olarak belirlenebilmesi için çalışmaların sağlıklı hücre hatlarının bulunduğu in-vitro modellemelerle veya deney hayvanlarında oluşturulacak in-vivo modellemelerle tekrarlanması yararlı olabilir.

Daha önce değinildiği ve Şekil 5.1’de etki mekanizması gösterildiği haliyle,  $\alpha$ -arbutinin yüksek dozlarda (LD<sub>50</sub> dozunda) HepG2 hücrelerine uygulanması sonucunda ise oksidatif stresi, genotoksisiteyi, inflamasyonu, apoptozu artırarak, proliferasyonu ise baskılayarak hepatosellüler karsinom hücrelerinde antikanserojen etkiler gösterebileceği belirlenmiştir.  $\alpha$ -arbutinin hücresel boyutta belirlenen bu etkinliği oluşurken kullanılan arbutin dozunun, diğer doku ve organlarda bulunan hücrelerde olumlu/olumsuz ne tür etkiler oluşturduğunun belirlenmesi önerilebilir. Bu amaçla deney hayvanlarında hepatosellüler karsinom modeli oluşturularak yüksek doz arbutin uygulamaları ile karaciğer kanseri üzerinde tedavi edici etkilerinin belirlenmesinin yanı sıra, diğer doku ve organlara olası etkileri belirlenebilir.

Arbutin gibi aktif maddelerin farklı hastalık modelleri üzerindeki etkilerinin öncelikle hücre kültürü ortamında belirlenmesi önem arz etmektedir. Sonrasında etkileri araştırılan aktif maddenin olası yararlı etkileri var ise deney hayvanları ile oluşturulacak modellemelerle ileri araştırmaların yapılması, sonrasında ise kliniklerde faz çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Yapılan tez çalışması bu kapsamda değerlendirilirse, bir aktif madde olarak arbutinin karaciğer kanseri (HepG2) hücrelerinde olası etkileri araştırılmıştır. Arbutinin düşük dozlarda kanser tedavisinde kullanılan kemoterapiklerin (cisplatin) yan etkilerini gidermek için yararlı olabileceği, yüksek dozlarda ise hepatosellüler karsinom (HepG2) hücrelerinde antikanser bir aktif madde olarak kullanılabileceği belirlenmiştir. Tez çalışması kapsamında elde edilen bulgular arbutinin karaciğer kanserinin tedavisinde yararlı olabileceği konusunda olası bilgiler edinmemizi sağlamıştır. Bu nedenle elde edilen bulgular ışığında çalışmalara deney hayvanları ile yapılacak modellemelerle devam edilmesi, böylelikle arbutinin karaciğer kanserinde hastalığa ve metabolizmaya olası etkilerinin ayrıntılı bir şekilde ortaya konması gerektiği önerilebilir.



## 6. KAYNAKLAR

- Adam B, Kıyıcı A, Ardıçoğlu Y, 2013, Temel ve Klinik Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri, 362-64, İstanbul.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, 2002, Molecular biology of the cell, 4th ed. Newyork, Çeviri Editörleri: Buyru N, Dalay N, Özgüç M, Öztürk M, Sakızlı M, 2008, Hücrenin Moleküler Biyolojisi, TÜBA Yayınları, 1313-1361, Ankara.
- Allahyari H, Heidari S, Ghamgosha M, Saffarian P, Amani J, 2017, Immunotoxin: A new tool for cancer therapy: Tumor Biol, 39, 1010428317692226.
- Anand P, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, 2008, Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes, Pharm. Res, 25, 2097-2116.
- Aygün Çevik B, Piriñçi E, 2017, Beslenme ve Kanser, Fırat Tıp Dergisi, 22, 1-7.
- Baştürk B, 2017, İnflamasyonda İmmün Yanıt, Türkiye Klinikleri J Immun Allergy-Special Topics, 10, 3, 161-4.
- Baykara O, 2016, Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlar, Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi, 5, 154-165.
- Berdowska I, Zieliński B, Fecka I, Kulbacka J, Saczko J and Gamian A, 2013, Cytotoxic impact of phenolics from Lamiaceae species on human breast cancer cells, Food Chem, 141, 1313-21.
- Bishayee A, 2014, Inflammation and the role of liver cancer, 816, 401-35.
- Borelli A, Bonelli P, Tuccillo FM, Goldfine ID, Evans JL, Buonaguro FM, Mancini A, 2018, Role of gut microbiota and oxidative stress in the progression of nonalcoholic fatty liver disease to hepatocarcinoma, Current and innovative therapeutic approaches, 15, 467-479.
- Bruix J, Raoul JL, Sherman M, Mazzaferro V, Bolondi L, Craxi A, Galle PR, Santoro PR, Beaugrand M, Sangiovanni A, Porta C, Gerken G, Marrero JA, Nadel A, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Llovet JM, 2012, Efficacy and safety of sorafenib

- in patients with advanced hepatocellular carcinoma, subanalyses of phase III trial, 57, 821-829.
- Casas-Grajales S, Muriel P, 2015, Antioxidants in liver health, *World J Gastrointest Pharmacol Ther*, 6, 59-72.
- Chang HM, Moudgil R, Scarabelli T, Okwuosa TM, 2017, Cardiovascular Complications of Cancer Therapy, *Best Practices in Diagnosis, Prevention, and Management*, *J Coll Cardiol*, 70, 2536-2551.
- Cheki M, Jafari S, Najafi M, Mahmoudzadeh A, 2019, Glucosamine Protects Rat Bone Marrow Cells Against Cisplatin induced Genotoxicity and Cytotoxicity, *Anticancer Agents Med Chem*, 19, 1695-1702.
- Chen J, Jin RA, Zhao J, Liu JH, Ying HN, Yan H, Zhou SJ, Liang YL, Huang DY, Liang X, et al, 2015, Potential molecular, cellular and microeconomic mechanism of Sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma, 367, 1-11.
- Chen YL, Chen LJ, Bair MJ, Yao ML, Peng HC, Yang SS, Yang SC, 2011, Antioxidative status of patients with alcoholic liver disease in southeastern Taiwan, *World J. Gastroenterol*, 17, 1063–1070.
- Cheng SL, Liu RH, Sheu JN, Chen ST, Sinchaikul S, Tsay GJ, 2007, Toxicogenomics of A375 human malignant melanoma cells treated with Arbutin, 14, 87-105.
- Cicalese L, Curcuru G, Montalbano M, Shirafkan A, Georgiadis J, Rastellini C, 2017, Hazardous air pollutants and primary liver cancer in Texas, 12, e0185610.
- Cichoż Lach H, Michalak A, 2014, Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases, 20, 8082-91.
- Corrocher R, Casaril M, Bellisola G, Gabrielli GB, Nicoli N, Guidi GC, De Sandre G, 1986, Severe impairment of antioxidant system in human hepatoma, 58, 1658-62.
- Costantini S, Di Bernardo G, Cammarota M, Castello G, Colonna G, 2013, Gene expression signature of human HepG2 cell line, *World J Gastroenterol*, 518, 335-45.
- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, 1994, Crawford JM. *The Liver and Biliary Tract*. In,

- Robbins Pathologic Basis of Disease.5 th Ed.Philadelphia, WB Saunders Company, 831-96.
- Dasari S, Tchounwou PB, 2014, Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of Action, 740, 364-78.
- Das K.S, Balakrishnan V, Mukherjee S, Vasudevan D.M, 2008, Evaluation of blood oxidative stress-related parameters in alcoholic liver disease and non-alcoholic fatty liver disease, Scand. J. Clin. Lab. Investig, 68, 323–334.
- Dehn PF, White CM, Connors DE, Shipkey G, Cumbo TA, 2004, Characterization of The human hepatocellular carcinoma (hepg2) cell line as an in vitro model for cadmium toxicity studies, In Vitro Cell Dev Biol Anim, 40, 172-82.
- Deisinger PJ, Hill TS, English JC, 1996, Human exposure to naturally occurring Hydroquinone, J Toxicol Env Health, 47, 31-46.
- Donato MT, Tolosa L, Gómez Lechón MJ, 2015, Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells, 1250, 77-93.
- Draeos ZD, 2007, Skin lightening preparations and the hydroquinone controversy, Dermatol Ther, 20, 308-313.
- Erel O,2005,A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clin Biochem, 38, 1103-11.
- Ersin G, Çelik S, Ulasli SS, Özyürek A, Hazman Ö, Günay S, Özdemir M and Ünlü M, 2016, Comparison of the Anti-inflammatory Effects of Proanthocyanidin, Quercetin, and Damnacanthol on Benzo(a)pyrene Exposed A549 Alveolar Cell Line, Inflammation, 39, 744-51.
- Ezhilarasan D, 2018, Oxidative stress is bane in chronic liver diseases: Clinical and experimental perspective, 19, 56-64.
- Farzanegi P, 2014, The Effect of Aerobic Training and Arbutin on GLP1 and GLP1R in Diabetes Rats 4, 356-362.
- Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Pineros M, Znaor A, Bray F, 2019, Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018, globocan sources and methods, Int J Cancer, 144, 1941-1953.

- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, vd. 2015, Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in globocan 2012, *Int J Cancer*, 136, e359–86.
- Frères P, Poncin B, Moonen M, Josse C, Oury C, Bours V, Lancellotti P, Kudüs G, 2016, Cancer therapy-induced cardiotoxicity, *Rev Med Liege*, 71, 382-387.
- Fu N, Yao H, Nan Y, Qiao L, 2017, Role of Oxidative Stress in Hepatitis C Virus Induced Hepatocellular Carcinoma, 17, 498-504.
- Funayama M, vd. 1995, Effects of alpha and beta arbutin on activity of tyrosinases from mushroom and mouse melanoma, 59, 143-4.
- Fu X, Zhang P, Yu B, 2017, Advances toward LSD1 inhibitors for cancer therapy, 9, 1227-1242.
- Garcia Jimenez A, Teruel Puche JA, Berna J, Rodriguez Lopez JN, Tudela, Rodriguez Lopez JN, Tudela Garcia Canovas F, 2017, The effect of tyrosinase on alpha and beta arbutin: A kinetic study, 12, e0177330.
- Goldman L, Schafer AI, 2012, Mechanisms of inflammation and tissue repair, *Cecil Medicine: Expert Consult Premium Edition 24th Saunders Elsevier*, 1604-7.
- Görür A, 2010, Hepatosellüler karsinomda apoptozis mekanizması ve bazı Benzimidazol türevlerinin hepatosellüler karsinom üzerine etkisi, *Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, 6-7, Mersin.
- Grandhi MS, Kim AK, Ronnekleiv-Kelly SM, Kamel IR, Ghasebeh MA, Pawlik TM, 2016, Hepatocellular carcinoma: From diagnosis to treatment, 25, 74-85.
- Gravitz L, 2014, Liver cancer, 516, 7529.
- Hartke J, Johnson M, Ghabril M, 2017, The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma, 34, 153-159.
- Hazman Ö, 2018, MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde Krosinin İnflamasyon ve Oksidatif Strese Etkileri, *AKÜ Bilimsel Araştırma Projesi Proje Sonuç Raporu*, Proje no: 16.Kariyer, 160, 3-8.
- Hazman Ö, Bozkurt MF, Fidan AF, Uysal FE ve Çelik S, 2018, The Effect of Boric Acid and Borax on Oxidative Stress, Inflammation, ER Stress and Apoptosis in

- Cisplatin Toxication and Nephrotoxicity Developing as a Result of ToxicationInflammation, 41, 1032-1048.
- Hazman Ö, Ciğerci İH, 2018, Comparison of Cisplatin Cytotoxicity in A549, MCF And HepG2 Cancer Cell Lines, 2018 Paris International Academic Conference Proceedings, ISBNBN-10:0615846882, 22, Paris, France.
- Ivanov AV, Valuev-Elliston VT, Tyurina DA, Ivanova ON, Kochetkov SN, Bartosch BI sagulians MG, 2017, Oxidative stress is a trigger of liver carcinogenesis caused by hepatitis C and B virüs, 8, 3895-3932.
- Jemal AR, Siegel J, Xu E, Ward E, 2010, Cancer statistics CA Cancer J.Clin, 60, 277-300.
- Jiang L, Wang D, Zhang Y, Li J, Wu Z, Wang Z, Wang D, 2018, Investigation of the proapoptotic effects of arbutine and acetylated derivatives on murine melanoma cells, 41, 1048-1054.
- Jo JY, Mejia EG, Lila MA, 2006, Üzüm hücre kültüründen insan hepatoselüler karsinom, fare lösemi ve kanserli olmayan PK15 böbrek hücreleri üzerindeki biyoaktif polimerik fraksiyonların sitotoksitesisi, Besin Kimyası Toxicol, 44, 1758-1767.
- Jung KW, Won YJ, Oh CM, Kong HJ, Lee DH, Lee KH, 2017, Prediction of Cancer Incidence and Mortality in Korea, Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association, 49, 306–12.
- Jurica K, Benković V, Sikirić S, Kopjar N, Brčić Karačonji I, 2020, Liver function and DNA integrity in hepatocytes of rats evaluated after treatments with strawberry tree water leaf extract and arbutin. Drug Chem Toxicol, 43, 127-137.
- Kalaycıoğlu L, Serpek B, Nizamlıoğlu M, Başpınar N ve Tiftik, MA, 2013, Biyokimya 5.basım, ISBN: 978-605-133-450-9, Nobel Yayınları, Ankara.
- Kang MJ, Ha HW, Kim HG, Lee DH, Kong MJ, Ahn YT, Kim DH, Shin BS, Kang W, Jeong HG, Jeong TC, 2011, Role of metabolism by intestinal bacteri in arbutin-induced toxicity in vitro, 34, 687-93.
- Khanal T, Kim HG, Hwang YP, Kong MJ, Kang MJ, Yeo HK, Kim DH, Jeong TC, Jeong HG, 2011, Role of metabolism by the human intestinal microflora in

- arbutin-induced cytotoxicity in HepG2 cell cultures, *Biochem Biophys Res Commun*, 413, 318-24.
- Kim MK vd. 2007, Protective effect of aqueous extract of *Perilla frutescens* on tertbutyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity in rats, *Food and chemical toxicology an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 45, 1738-44.
- Klaunig JE, 2018, *Oxidative Stress and Cancer*, 24, 4771-4778.
- Kumar V, Abbas AK, Aster JC, 2013, *Inflammation and repair*, Robbins Basic Pathology (9th edition) Saunders (Elsevier), 43, 1781-5.
- Kutluk T, Kars A, 1992, *Kanser Konusunda Genel Bilgiler*, T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüğü Yayınları, Ankara.
- Lee HJ, Kim KW, 2012, Anti-inflammatory effects of arbutin in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells, *Inflamm Res*, 61, 817-25.
- Lee JD, Cai Q, Shu, XO and Nechuta SJ, 2017, The Role of Biomarkers of Oxidative Stress in Breast Cancer Risk and Prognosis: A Systematic Review of the Epidemiologic Literature, *Journal of Women's Health*, 26, 467-482.
- Lee M, Cheng B, Che C, Hsieh D, 2000, Cytotoxicity assessment of Ma-huang (Ephedra) under different conditions of preparation, *Toxicological Sciences*, 56, 424-430.
- Lee RG, 1994, *Diagnostic Liver Pathology*, First Ed. St. Louis Mosby, 421-500.
- Liccioni A, Reig M, Bruix J, 2014, Treatment of hepatocellular carcinoma, 32, 554-63.
- Lima CF, M. Fernandes-Ferreira and C. Pereira Wilson, 2006, Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels, *Life Sciences*, 79, 2056-68.
- Mantovani A, 2010, Molecular pathways linking inflammation and cancer, 10, 369-73.
- Miyata M, Morishita A, Sakamoto T, Katsura A, Kato K, Nishioka T, Toyota Y, Fujita K, Maeda E, Nomura T, Tani J, Miyoshi H, Yoneyama H, Kobara H, Fujiwara S, Nishiyama N, Iwama H, Himoto T, Hirashima M, Masaki T, 2015, MicroRNA profil in cisplatin induced apoptos of hepatocellular carcinoma cells, 47, 535-42.

- Nawarak J, Huang-Liu R, Kao SH, Liao HH, Sinchaikul S, Chen ST, Cheng SL, 2009, Proteomic analysis of A375 human malignant melanoma cells in response to arbutin treatment, *Biochim Biophys Acta*, 1794, 159-67.
- Nguyen V, Huang J, Doan V, Lin X, Tang X, Huang Y, Tang A, Yang X, Huang R, 2015, Hepatoprotective effects of Yulansan polysaccharide against nimesulide-induced liver injury in mice, *J. Ethnopharmacol*, 172, 273–280.
- Nguyen VH, Min JJ, 2017, Salmonella-Mediated Cancer Therapy, Roles and Potential, *Nucl Med Mol Imaging*, 51, 118-126.
- Olumide YM, Akinkugbe AO, Altraide D, Mohammed T, Ahamefule N, Ayanlowo S, Onyekonwu C, Essen N, 2008, Complications of chronic use of skin lightening cosmetics. *Int J Dermatol*, 47, 344–53.
- Onat T, Emerk K, Sözmen EY, 2006, İnsan Biyokimyası, 717-734, Palme Yayıncılık, Ankara.
- O’Riordan A, Brummell Z, Sizer E, Auzinger G, Heaton N, O’Grady J.G, Bernal W, Hendry B.M, Wendon J.A, 2011, Acute kidney injury in patients admitted to a liver intensive therapy unit with paracetamol induced hepatotoxicity, *Nephrol. Dial. Transplant*, 26, 3501-3508.
- Önal B, 1996, Apoptozis, SSK tepecik hosp, 6, 20-35, Turkey.
- Özben T, 2015, Antioxidant supplementation on cancer risk and during cancer therapy: an update, *Curr Top Med Chem*, 15, 170-8.
- Özyurt İ, 2017, Karaciğer kanseri hücre hattında,  $\gamma$ -tokotrienol ajanının doxorubicin ile konjuge tedavisinin terapötik etkilerinin moleküler incelenmesi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 69, Ankara.
- Palma HE, Wolkmer P, Gallio M, Corrêa MM, Schmatz R, Thomé GR, Pereira LB Castro VS, Pereira AB, Bueno A, de Oliveira LS, Rosolen D, Mann TR, de Cecco BS, Graça DL, Lopes ST, Mazzanti CM. 2014, Oxidative stress parameters in blood, liver and kidney of diabetic rats treated with curcumin and/or insulin. *Mol. Cell. Biochem*, 386, 199–210.
- Park KJ, Yang S, Eun Y.A, Kim S.Y, Lee HH, Kang H, 2002, Cytotoxic effects of

- Korean medicinal herbs determined with hepatocellular carcinoma cell lines, *Pharmaceutical Biology*, 40, 189-195.
- Peng S, Zhao Y, Xu F, Jia CJ, Xu YQ, Dai CL, 2014, An updated meta-analysis of randomized controlled trials assessing the effect of sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma, 9, 156.
- Perez-Chanona E, Trinchieri G, 2016, The role of microbiota in cancer therapy *Curr Opin Immunol*, 39, 75-81.
- Petrick JL, Braunlin M, Laversanne M, Valery PC, Bray F, McGlynn KA, 2016, International trends in liver cancer incidence, overall and by histologic subtype, 139, 1534-45.
- Pieniazek A, Czepas J, Piasecka-Zelga J, Gwozdziński K, Koceva-Chyla, A, 2013, Oxidative stress induced in rat liver by anticancer drugs doxorubicin, paclitaxel and docetaxel, 58, 104-111.
- Qu K, Lin T, Wei J, Meng F, Wang Z, Huang Z, Wan Y, Song S, Liu S, Chang H, Dong Y, Liu C, 2013, Cisplatin induces cell cycle arrest and senescence via upregulating P53 and P21 expression in HepG2 cells, *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 33, 1253-9.
- Rodrigues P, Marco G, Furriol J, Mansego LM, Alonso PM, Neira GA, Escudero JCM, Benitez J, Lluch A and Chaves JF, 2014, Pilar Eroles Oxidative stress in Susceptibility to breast cancer, study in Spanish population, *BMC Cancer*, 14, 861.
- Sakaguchi S, Takahashi S, Sasaki T, Kumagai T, Nagata K, 2011, Progression of alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis: Common metabolic aspects of innate immune system and oxidative stress. *Drug Metab. Pharmacokinet*, 26, 30-46.
- Sanchez-Valle V, Chavez-Tapia N.C, Uribe M, Mendez-Sanchez N, 2012, Role of Oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis, A review, *Curr. Med. Chem*, 19, 4850-4860.
- Sarıova A, 2019, Meme Kanseri (MCF-7) Hücre Hattında Arbutinin Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar.



- Sha Li, Hor-Yue Tan, NingWang, Zhang-Jin Zhang, Lixing Lao, Chi-WoonWong and Yibin Feng, 2015, The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Disease *Int. J. Mol. Sci*, 16, 26087–26124.
- Seo DH, Jung JH, Lee JE, Jeon EJ, Kim K, Park CS, 2012, Biotechnological Production of arbutins (a-and b-arbutins), skin-lightening agents, and their derivatives. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 95, 1417–1425.
- Seyfizadeh N, Mahjoub S, Zabihi E, Moghadamnia AA, Pouramir M, Mir H, Khosravifarsani M, Elahimanesh F, 2012, Cytoprotective Effects of Arbutin Against Tert-Butyl Hydroperoxid Induced Toxicity in Hep-G2 Cell Line, *World Applied Sciences Journal* 19, 163-167.
- Shahaboddin M.E, Pouramir Mehdi, Moghadamnia AE, Parsian Hadi, Lakzaei Mustafa, Mir Hamid, 2011, *Pyrus bioessieriana* Buhse leaf extract:An antioxidant, antihyperglycaemic and antihyperlipidemic agent, *Food Chemistry*, 126, 1730-173.
- Shen X, Wang J, Wang J, Chen Z, Yuan Q, Yan Y, 2017, High-level De novo biosynthesis of arbutin in engineered *Escherichia coli* *Metab Müh*, 42, 52-58.
- Sherif IO, Al-Gayyar MMH,2018,Oleuropein potentiates anti-tumor activity of cisplatin against HepG2 through affecting proNGF/NGF balance. *Life Sci*, 198, 87-93.
- Shu XL, Fan CB, Long B, Zhou X, Wang Y,2016,The anti-cancer effects of cisplatin on hepatic cancer are associated with modulation of miRNA-21 and miRNA-122 expression, *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 20, 4459-4465.
- Singh A, Trivedi P, Jain NK, 2018, Advances in siRNA delivery in cancer therapy, *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 46, 274-283.
- Suh JK, Lee J, Lee JH, Shin S, Tchoe HJ, Kwon JW, 2018, Risk factors for developing liver cancer in people with and without liver disease, 13, e0206374.
- Sun JH, Luo Q, Liu LL, Song GB, 2016, Liver cancer stem cell markers: Progression and therapeutic implications, 22, 3547-57.
- Şentürk N, 2013, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deri ve Zührevi Hastalıklar Anabilim Dalı, *Türkderm Samsun*, 47, 28-36, Türkiye.

- Taha MM, Salga MS, Ali HM, Abdullah MA, Abdelwahab SI, 2012, Gastro protective activities of turnera diffuse willd ex schult revisited role of arbutin, *Journal of Ethnopharmacology*, 141, 273-81.
- Takebayashi J, Ishii R, Chen J, Matsumoto T, Ishimi Y, Tai A, 2010, Reassessment of antioxidant activity of arbutin: multifaceted evaluation using five antioxidant assay systems. *Free Radic Res*, 44, 473-8.
- Terzioğlu G, Keskin A, Yanıkkaya Demirel G, 2013, Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması *Turk J Immunol* 1, 74-89.
- Thiel C, Katt T, Schenk M, Grasshoff C, Morgalla MH, Peter A, Königsrainer A, Thiel K, 2014, How much oxidative stress exists without the liver, 52, 43-9.
- Tian H, Gao Z, Li H, Zhang B, Wang G, Zhang Q, Pei D, Zheng J, 2015, DNA damage response-a double-edged sword in cancer prevention and cancer therapy *Cancer Lett*, 358, 8-16.
- Tomita Y, Maeda K and Tagami H, 1992, Melanocyte-stimulating properties of Arachidonic acid metabolites: possible role in postinflammatory pigmentation, *Pigment cell research/sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International, Pigment Cell Society*, 5, 357–361.
- Tuncer I, Burgut R, Bozdemir N, Coşar EF, 1994, Türkiye’de Kanser Sıklığı, Çukurova Üniv. Tıp Fak. Ve Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, Adana.
- Wang J, Zheng Y, Zhao M, 2017a, Exosome-Based Cancer Therapy: Implication for Targeting Cancer Stem Cells, *Front Pharmacol*, 12, 7, 533.
- Wang P, Cui J, Wen J, Guo Y, Zhang L, Chen X, 2016, Cisplatin induces HepG2 cell Cycle arrest through targeting specific long noncoding RNAs and the p53 signaling pathway, *Oncol Lett*, 12, 4605-4612.
- Wang Z, Li Z, Ye Y, Xie L, Li WB, 2016, Oxidative Stress and Liver Cancer Etiology and Therapeutic Targets, 7891574.
- Wu LH, Li P, Zhao QL, Piao JL, Jiao YF, 2014, Kadowaki M, Kondo T. Arbutin, an intracellular hydroxyl radical scavenger, protects radiation-induced apoptosis in

- human lymphoma U937 cells. *Apoptosis*, 19, 1654-63.
- Xu XL, Xing BC, Han HB, Zhao W, Hu MH, Xu ZL, Li JY, Xie Y, Gu J, Wang Y, 2010, Liver cancer stem cell markers: Progression and therapeutic implications, 31, 167-174.
- Varolgüneş H, Aydın İ, Kaptanoğlu E, Demirci S, 1997, Primer ve metastatik karaciğer tümörlerinde tedavi yöntemleri ankara üniversitesi tıp fakültesi mecmuas cilt 50, sayı 4, 209-230.
- Videla L.A, Rodrigo R, Orellana M, Fernandez V, Tapia G, Quinones L, Varela N, Contreras J, Lazarte R, Csendes A, 2004, Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients, 106, 261-268.
- Yamashita T, Kaneko S, 2016, Liver cancer Rinsho Byori, 64, 787-796.
- Yang Gj, Lei PM, Wong SY, Ma DL, Leung CH, 2018, Pharmacological inhibition of LSD1 for cancer treatment, *Molecules*, 23, 3194.
- Zhang R, Niu Y, Zhou Y, 2010, Increase the cisplatin cytotoxicity and cisplatin-induced DNA damage in HepG2 cells by XRCC1 abrogation related mechanisms, *Toxicol Lett*, 192, 108-14.
- Zhou Y, Li Y, Zhou T, Zheng J, Li S, Li HB, 2016. Dietary Natural Products for Prevention and Treatment of Liver Cancer, 8, 156.
- Zhu X, Tian Y, Zhang W, Zhang T, Guang C, Mu W, 2018, Recent developments related to the biological production of Alfa arbutin, 102, 8145-8152.

## **İnternet Kaynakları**

- 1- <https://hsgm.saglik.gov.tr/>, pdf, 09.09.2019.
- 2- <http://www.hastane.deu.edu.tr/>, 09.09.2019.
- 3- <https://www.saglik.gov.tr/>, 08.08.2019.
- 4- <https://sinirbilim.org/>, 08.08.2019.
- 5- <https://www.medikalakademi.com.tr/>, 10.12.2019.
- 6- <https://hsgm.saglik.gov.tr/>, pdf, 07.11.2019.



## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hatice Evin  
Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara/Polatlı 14.03.1992  
Yabancı Dili : İngilizce  
İletişim (Telefon/e-posta) : 05456270009/ htcky1905@hotmail.com

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Polatlı Lisesi (2006-2010)  
Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,  
Kimya Bölümü (2011-2016)  
Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,  
Kimya ABD, (2017-2020)

### Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

: Provet Veteriner Ürünleri (2017-2019).