



**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÇEŞİTLİ HÜCRE HATLARINDA SİLİMARİNİN EPIGENETİK
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Yeşim KORKMAZ KASAP

DOKTORA TEZİ

ANKARA, 2019



**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇEŞİTLİ HÜCRE HATLARINDA SİLİMARİNİN EPİGENETİK
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

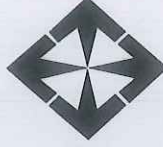
Dr. Yeşim KORKMAZ KASAP

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Erkan YURTCU

ANKARA

2019



T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Tıbbi Biyoloji Doktora Programı çerçevesinde Yeşim Korkmaz Kasap tarafından yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24/09/2019

Tez Konusu : “Çeşitli Hücre Hatlarında Silimarinin Epigenetik Etkisinin Değerlendirilmesi”

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Erkan YURTCU

TEZ JÜRİSİ ÜYELERİ

Prof. Dr. Erkan YURTCU

Prof. Dr. F. Belgin ATAÇ

Doç. Dr. İrem DOĞAN TURAÇLI

Doç. Dr. Hasibe VERDİ

Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI

Başkent Üniversitesi

Başkent Üniversitesi

Ufuk Üniversitesi

Başkent Üniversitesi

Hacettepe Üniversitesi

ONAY: Bu tez, Başkent Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun 26 / 09 / 2019 tarih ve 44-10. Karar Sayısı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Fatma Belgin ATAÇ
Enstitü Müdürü

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 29 / 08 / 2019

Öğrencinin Adı, Soyadı : Yeşim Korkmaz Kasap

Öğrencinin Numarası : 21310089

Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji

Programı : Doktora

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı : Prof. Dr. Erkan YURTCU

Tez Başlığı : Çeşitli Hücre Hatlarında Silimarinin Epigenetik Etkisinin Değerlendirilmesi

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans/Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 53 sayfalık kısmına ilişkin, 29 / 08 / 2019 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 13'dür.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Ar. Gör. Yeşim Korkmaz Kasap



Onay

29 / 08 / 2019



Prof. Dr. Erkan YURTCU

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince destek ve ilgisini esirgemeyen, tez konumun belirlenmesinde ve tez çalışmalarımnda hep yanımda olan değerli hocam Prof. Dr. Erkan YURTCU'ya,

Göstermiş olduğu ilgi ve yardımlarından dolayı değerli hocam Prof. Dr. F. Belgin ATAÇ'a

Değerli hocam Doç. Dr. Hasibe VERDİ'ye,

Tez çalışmalarım boyunca ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. İrem DOĞAN TURAÇLI'ya

Tez çalışmalarım boyunca yardımını esirgemeyen çalışma arkadaşım Uzm. Biyolog Erkan ERMİŐ'e,

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın tüm yüksek lisans ve doktora öğrencilerine,

Yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın tüm çalışanlarına,

Desteklerinden dolayı Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu'na,

Öğrenim hayatım boyunca desteklerini hiç esirgemeyen sevgili aileme,

Her zaman yanımda olan en büyük destekçim, biricik eşim Mustafa KASAP'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZET

Yeşim Korkmaz Kasap, Çeşitli Hücre Hatlarında Silimarinin Epigenetik Etkisinin Değerlendirilmesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji, Doktora Tezi, 2019

Epigenetik değişimler kanser gelişiminde etkilidirler. Waddington 1940'lı yıllarda epigenetiği DNA'nın baz dizilimini değiştirmeden gen ifadenmesinin değişmesi olarak açıklamıştır. DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kromatin yeniden modelleme ve kodlamayan RNA'lar (mikro-RNA, uzun kodlamayan RNA'lar ve PIWI proteiniyle ilişkili RNA'lar) temel epigenetik mekanizmalar olarak kabul edilmektedir.

Kanser hücrelerinde tümör gelişimi ile ilgili yolakları etkilediği için epigenetik değişiklikler, tümörün oluşumunda ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır. Epigenetik etkili ilaçlar hücre döngü kontrolü, apoptozis, hücre sinyalizasyonu, invazyon, metastaz ve anjiyogenez ile ilgili gen ifadelerinin kontrolünde kullanılmaktadır. Epigenetik düzensizliklerin geri döndürülebilir olması, DNA metilasyon ve histon asetilasyon inhibitörlerinin kanser tedavisinde kullanımına olanak sağlamaktadır ve DNA modifikasyonu ve histon modifikasyonu gibi epigenetik farklılıkların hedef alınarak kanser tedavisinde etkili bir strateji izlenebileceği gösterilmiştir. DNA metilasyon ve histon modifikasyon profilini değiştirebilen ilaç adayları bileşikler geliştirilmeye başlanarak prelinik ve klinik aşamalara geçilmiştir.

5-azasitidin ve SAHA inhibitör grupları Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanan tek başlarına veya kemoterapi, radyoterapi gibi sitotoksik ajanlarla birlikte uygulanmaktadır. 5-azasitidin, yapısal olarak sitozin nükleotidine benzemektedir ve DNA metiltransferazların inhibisyonunu sağlamaktadır. Epigenetik mekanizmalar kullanılarak geliştirilen bir diğer tedavi ajanı histon deasetilaz (HDAC) inhibitörü olan SAHA'dır.

Silimarin, Asteraceae familyasına ait devedikeni olarak da adlandırılan *Silybum marianum* L. bitkisinin tohumlarından elde edilmektedir. Silimarin kimyasal olarak bir polifenol olup, bitki kimyası olarak da bir flavonolignandır. Yapılan çalışmalarla silimarinin antioksidan, antimetastatik, antianjiyogenik ve antiinflamatuvar etkileri gösterilmiştir. Silimarin, antikarsinojenik etkileri sebebiyle kemoterapi alan hastalar arasında tamamlayıcı ve alternatif tedavi amacıyla en sık kullanılan ajandır.

Bu çalışma ile silimarinin çeşitli kanser hücre dizilerinde epigenetik regülasyon üzerine olan etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

İnsan nöroblastom hücre dizisi SHSY5Y hücreleri, insan hepatosellüler hücre dizisi HepG2 hücreleri ve insan meme kanseri hücre dizisi MCF-7 hücreleri %5 CO₂ ve %95 nem içeren 37°C'lik inkübatörde çoğaltıldı. Silimarin, 5-azasitidin ve SAHA'nın genotoksik dozları MTT testi ile belirlendi. Belirlenen IC₅₀ dozlarına göre hücrelere 48 saatlik uygulama yapıldı. DNMT ve HDAC enzim aktiviteleri ölçüldü. Western Blot ile p53, cMyc ve NFκB protein düzeyleri belirlendi.

Silimarinin epigenetik yollara olan etkisi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada ise silimarinin tek başına ve epigenetik inhibitörler ile birlikte uygulandığında çeşitli kanser hücre dizilerinde epigenetik enzimler ve protein düzeylerine olan etkileri değerlendirilmiştir.

Sonuçlarımıza göre silimarin DNMT üzerinde inhibe edici etki göstermiştir. HDAC üzerinde inhibisyon etki görülmemiştir. Silimarin p53 K373, p53 K382, cMyc ve NFκB protein seviyelerini baskılayarak, p53 S46 protein seviyesini artırmıştır.

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu (Proje no: DA 17/09) tarafından onaylanmış ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: 5-azasitidin, SAHA, silimarin, kanser, epigenetik

ABSTRACT

Yeşim Korkmaz Kasap, Evaluation of the epigenetic effect of silymarin on various cell lines, Baskent University, Institute of Health Sciences, Medical Biology, PhD Thesis, 2019

Epigenetic changes are effective in cancer development. Waddington described epigenetics in the 1940s as a change in gene expression without altering the base sequence of DNA. DNA methylation, histone modifications, chromatin remodeling and non-coding RNAs (micro-RNAs, long non-coding RNAs, and PIWI protein-related RNAs) are accepted for basic epigenetic mechanisms.

Epigenetic changes play important roles in tumor formation and progression since it affects pathways related to tumor development in cancer cells. Epigenetically effective drugs are used in the control of gene expression related to cell cycle control, apoptosis, cell signaling, invasion, metastasis and angiogenesis. Reversibility of epigenetic irregularities allows the use of DNA methylation and histone acetylation inhibitors in the treatment of cancer, and has been shown to be an effective strategy in cancer treatment by targeting epigenetic differences such as DNA modification and histone modification. Drug candidate compounds capable of altering DNA methylation and histone modification profile have begun to develop and have been switched to preclinical and clinical stages.

5-azacitidine and SAHA inhibitor groups are administered alone or in combination with cytotoxic agents such as chemotherapy, radiotherapy approved by the Food and Drug Administration (FDA). 5-azacytidine is structurally similar to the cytosine nucleotide and provides for inhibition of DNA methyltransferases. Another therapeutic agent developed using epigenetic mechanisms is the histone deacetylase (HDAC) inhibitor SAHA.

Silymarin is obtained from the seeds of *Silybum marianum* L. also called milk thistle of Asteraceae family. The most important active ingredient is silymarin is a polyphenol chemically and a flavonolignan as plant chemistry. Antioxidant,

antimetastatic, antiangiogenic and antiinflammatory effects of silymarin have been shown in the studies. Silymarin is the most frequently used agent for complementary and alternative therapy among chemotherapy patients due to its anticarcinogenic effects.

The aim of this study was to evaluate the effect of silymarin on epigenetic regulation in various cancer cell lines.

Human neuroblastoma cell line SHSY5Y cells, human hepatocellular cell line HepG2 cells and human breast cancer cell line MCF-7 cells were grown in a 37°C incubator containing 5%CO₂ and 95% humidity. Genotoxic doses of silymarin, 5-azacytidine and SAHA were determined by MTT test. Cells were treated for 48 hours according to the determined IC₅₀ doses. DNMT and HDAC enzyme activities were measured. p53, cMyc and NFκB protein levels were determined by Western Blot.

There are a limited number of studies on the effect of silymarin on epigenetic pathways. In this study, the effects of silymarin on epigenetic enzymes and protein levels in various cancer cell lines when used alone and in combination with epigenetic inhibitors were evaluated.

According to our results, silymarin showed an inhibitory effect on DNMT. There was no inhibition effect on HDAC. Silymarin inhibited p53 K373, p53 K382, cMyc and NFκB protein levels, while increased p53 S46 protein level.

This study was approved by Baskent University Medical and Health Sciences Research Council (Project no: DA 17/09) and supported by Baskent University Research Fund.

Keywords: 5-azacytidine, SAHA, silymarin, cancer, epigenetics

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI

TEŞEKKÜR i

ÖZET ii

ABSTRACT v

İÇİNDEKİLER DİZİNİ vii

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ x

ŞEKİLLER DİZİNİ xi

TABLolar DİZİNİ xii

1. GİRİŞ ve AMAÇ 1

2. GENEL BİLGİLER 4

2.1 Kanser 4

2.1.1 DNA Metilasyonu 5

2.1.2 Histon Modifikasyonu 6

2.1.3 Kodlamayan RNA 6

2.1.4 Kromatin Yeniden Modellemesi 7

2.2 Epigenetik İnhibitörler 7

2.2.1 DNMT inhibitörleri 8

2.2.1.1 5-azasitidin 8

2.2.2 SAHA 9

2.3 Silimarin	10
2.3.1 Tanım ve Özellikler	10
3. SİNYAL YOLAKLARI	11
3.1 p53 Yolağı	11
3.2 Myc Yolağı	11
3.3 NFκB Yolağı	12
4. GEREÇ ve YÖNTEM	13
4.1 Gereç ve Malzemeler	13
4.1.1 Kullanılan Cihazlar	13
4.1.2 Kullanılan Kimyasallar	14
4.1.3 Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	14
4.2 Yöntem	15
4.2.1 Hücre Kültürü Çalışmaları	15
4.2.2 MTT Yöntemi ile IC₅₀ Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	15
4.2.3 Hücre Kültüründen Protein Saflaştırılması	16
4.2.4 Hücre Kültüründen Protein Miktar Analizi	17
4.2.5 Nükleer Protein Ekstrakt Saflaştırılması	18
4.3 DNMT Activity/Inhibition Assay	19
4.4 HDAC Activity/Inhibition Assay	21
4.5 Western Blot	22
5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	25

6. BULGULAR	26
6.1 MTT Yöntemi ile Belirlenmiş Olan 5-azasitidin, SAHA ve silimarin IC₅₀ Değerleri	26
6.2 Protein Miktar Analizi Sonuçları	26
6.3 Nükleer Protein Ekstrakt Sonuçları	29
6.4 DNMT Activity/Inhibition Assay ile Enzim Aktivite Sonuçları	30
6.5 HDAC Activity/Inhibition Assay ile Enzim Aktivite Sonuçları	33
6.6 Western Blot Sonuçları	36
7. TARTIŞMA	52
8. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
9. KAYNAKLAR	63

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

IC50	Hücre proliferasyonunun %50 baskılandığı konsantrasyon
Kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium
bromide	
μ M	Mikromolar
μ l	Mikrolitre
PBS	Fosfat tamponlu tuz
SDS	Sodyumdodesilsülfat
APS	Amonyumpersülfat
MYC	MYC proto-onkogen
NF κ B	Nükleer faktör kappa B
p53	Tümör protein 53
°C	Santigrad derece
NE	Nükleer ekstrakt
SAHA	Suberoylanilid hidroksamik asit
DNMT	DNA Metiltransferaz
HDAC	Histon Deasetilaz
HAT	Histon Asetilaz
HDACi	Histon Deasetilaz İnhibitörü
DNMTi	DNA Metiltransferaz İnhibitörü
WB	Western Blot

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa Numarası
Şekil 2.1: DNMT inhibitörü 5-azasitidinin kimyasal yapısı	9
Şekil 2.2: HDAC inhibitörü SAHA kimyasal yapısı	10
Şekil 2.3: Silimarinin kimyasal yapısı	11



TABLULAR ve GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa Numarası

Tablo 6.1: MTT hücre proliferasyon testlerinin analiz sonuçlarına göre belirlenen dozlar	26
Tablo 6.2: SHSY5Y protein miktarları	27
Tablo 6.3: HepG2 protein miktarları	28
Tablo 6.4: MCF-7 protein miktarları	29
Tablo 6.5: Tüm hücre hatları nükleer protein ekstrakt miktarları	30
Tablo 6.6: SHSY5Y WB bant görüntüleri	40
Tablo 6.7: HepG2 WB bant görüntüleri	45
Tablo 6.8: MCF-7 WB bant görüntüleri	51
Grafik 6.1: SHSY5Y Bradford Assay sonuçları	26
Grafik 6.2: HepG2 Bradford Assay sonuçları	27
Grafik 6.3: MCF-7 Bradford Assay sonuçları	28
Grafik 6.4: Nükleer protein ekstrakt Bradford Assay sonuçları	29
Grafik 6.5: SHSY5Y DNMT enzim aktivite yüzdeleri	30
Grafik 6.6: HepG2 DNMT enzim aktivite sonuçları	31
Grafik 6.7: MCF-7 DNMT enzim aktivite yüzdeleri	32
Grafik 6.8: SHSY5Y HDAC enzim aktivite yüzdeleri	33
Grafik 6.9: HepG2 HDAC enzim aktivite yüzdeleri	34
Grafik 6.10: MCF-7 HDAC enzim aktivite yüzdeleri	35
Grafik 6.11: SHSY5Y p53 Asetil 382 WB kat değişimi	36

Grafik 6.12: SHSY5Y p53 Asetil 373 WB kat değişimi	37
Grafik 6.13: SHSY5Y CMYC WB kat değişimi	37
Grafik 6.14: SHSY5Y p53 Fosfo 46 WB kat değişimi	38
Grafik 6.15: SHSY5Y NFκB WB kat değişimi	39
Grafik 6.16: HepG2 p53 Asetil 382 WB kat değişimi	41
Grafik 6.17: HepG2 p53 Asetil 373 WB kat değişimi	42
Grafik 6.18: HepG2 CMYC WB kat değişimi	43
Grafik 6.19: HepG2 p53 Fosfo 46 WB kat değişimi	43
Grafik 6.20: HepG2NFκB WB kat değişimi	44
Grafik 6.21: MCF-7p53 Asetil 382 WB kat değişimi	46
Grafik 6.22: MCF-7p53 Asetil 373 WB kat değişimi	47
Grafik 6.23: MCF-7cMyc WB kat değişimi	48
Grafik 6.24: MCF-7p53 Fosfo 46 WB kat değişimi	49
Grafik 6.25: MCF-7NFκB WB kat değişimi	50

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, çevresel ve genetik faktörlerin etkisiyle hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesi olarak tanımlanmaktadır. Karsinogenez kanserleşme süreci olup, çok basamaklı bir süreçte gerçekleşir (1). Karsinogenezde bazı hücrel değişiklikler gözlenmektedir. Bunlar büyüme sinyallerine duyarsızlığın artması, apoptozdan kaçınma, sınırsız bölünme, metastaz ve anjiyogenezdir. Temel olarak kanserde onkogenlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, DNA hasarının onarılması ile ilişkili genlerin çalışmasında genetik ve moleküler hasarlar görülmektedir. Kanser hücrelerinde ortaya çıkan kromozomal anormallikler ve genomik kararsızlık (translokasyon, anöploidi, kromozom kaybı, DNA amplifikasyonu, delesyonlar, vb) sonucunda hücre büyümesi, apoptoz ve hücrel bağlantıları kontrol altında tutan proteinlerin aşırı ya da hatalı üretimi veya hiç üretilmemesi söz konusu olur (1,2).

Öte yandan kanser gelişiminde epigenetik değişimler de oluşmaktadır. 1940'lı yıllarda ilk kez Waddington tarafından epigenetik terimi kullanılmıştır. DNA'nın baz diziliminde herhangi bir değişiklik olmaksızın gen ifadenmesinin değişmesi olarak tanımlanmıştır. Temel epigenetik mekanizmalar olarak DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları kabul görmektedir. Günümüzde miRNA yürütülü gen ifade kontrolü ve kromatin yeniden modelleme de epigenetik tanımı içinde yer almaktadır (3).

DNA metilasyonu en çok bilinen ve üzerinde birçok çalışma yapılan epigenetik mekanizmadır. DNA metilasyonu kovalent bir modifikasyon olup, sitozinin 5. karbonuna metil grubu takılması ile 5-metil sitozin oluşması sürecidir. Bu reaksiyon DNA metiltransferazlar (DNMT) tarafından katalizlenmektedir. S-adenozil-L-metiyonin metil grubu donörü olarak kullanılır. DNMT1; DNMT3A; DNMT3B; DNMT3L; DNMT2 memelilerde bulunan DNA metiltransferaz enzimleridir. DNMT1; DNMT3A ve DNMT3B katalitik aktiviteye sahip olan enzimlerdir. DNA zincirindeki mevcut metilasyon kalıplarının yeni zincirlere aktarılmasından DNMT1 sorumludur. DNMT3A ve DNMT3B *de novo* metiltransferazlar olarak gelişimin erken evrelerinde ilk metilasyon kalıplarını kurma görevini üstlenirler. (4).

Genomda sitozinlerin ve guaninlerin sıralanmasıyla yoğun CpG adacıkları oluşur. DNA metilasyonu, bu adacıkların yoğunlaştığı promotor bölgede gerçekleşmektedir (5).

Hipometilasyon, kolon kanserinde görülen ilk epigenetik bozukluk olup, serviks, karaciğer ve prostat kanserlerinde de varlığının gösterilmesi kanserde yaygın bir modifikasyon olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalarda hipometilasyonun genomik instabiliteye ve gen aktivasyonunda değişikliklere yol açtığı bildirilmiştir. Tümör baskılayıcı gen promotorlarının hatalı metilasyonu kanserli olgularda çok sık görülmektedir. Özellikle meme ve kolon kanserlerinde tümör baskılayıcı genlerin promotor bölgelerinin aşırı metillendiği gösterilmiştir (6).

Ökaryotik hücreler gen ifade kontrolü için kromatini kullanırlar. Kromatin yapısı, çeşitli değişikliklere uğrayarak gen ifadesini etkilemektedir. Kromatin yapısı ve fonksiyonları histon modifikasyonları tarafından değiştirilmektedir. Bir genin ifade edilmesi, yeniden modellenme sonucu mümkün olmaktadır. Histon proteinlerinin amino ucunda, metilasyon, fosforilasyon, asetilasyon, ubiquitinizasyon, sumolizasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlar görülmektedir. Modifikasyonlar tek başlarına veya farklı kombinasyonlarda bulunarak kromatine bazı anlamlar yüklemekte veya bu anlamları değiştirebilmektedir. Üzerinde en fazla çalışılan histon modifikasyonu asetilasyondur. Histonlardaki pozitif yük asetil grupları tarafından nötralize edilerek histonlar ve DNA arasındaki elektrostatik etkileşimi zayıflatmaktadır. Histon proteinlerinin nükleozomdan dışarı uzanan amino uçlarındaki lizin rezidüleri histon asetil transferaz (HAT) enzimi tarafından asetillenmektedir. Histon deasetilaz enzimleri (HDAC) histon deasetilasyonunu gerçekleştirirler. Asetilasyon kaybı, kromatin yapıyı yoğunlaştırmaktadır, böylece gen ifadenmesi baskılanmaktadır. DNA metilasyonu ile histon modifikasyonları arasında direkt ilişki olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (7,8).

Kanser hücrelerinde tümör gelişimi ile ilgili yolları etkilediği için epigenetik değişiklikler, tümörün oluşumunda ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır. Epigenetik etkili ilaçlar hücre döngü kontrolü, apoptozis, hücre sinyalizasyonu, invazyon ve metastaz, anjiyogenez ile ilgili gen ifadelerinin kontrolünde

kullanılmaktadır. Epigenetik düzensizliklerin geri döndürülebilir olması, DNA metilasyon ve histon asetilasyon inhibitörlerinin kanser tedavisinde kullanımına olanak sağlamaktadır ve DNA modifikasyonu ve histon modifikasyonları epigenetik hedef alınarak kanser tedavisinde etkili bir yol izlenebilmektedir. DNA metilasyon ve histon modifikasyonların etkileyen aday ilaçlar geliştirilerek, prelinik ve klinik çalışmalara geçilmiştir (9,10).

Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanan 5-azasitidin ve SAHA inhibitör grupları tek başlarına veya kemoterapi, radyoterapi gibi sitotoksik ajanlarla birlikte uygulanmaktadır. 5-azasitidin, sitozin nükleotidinde benzemektedir ve DNA metiltransferazların inhibisyonunu sağlamaktadır. Epigenetik mekanizmalar kullanılarak geliştirilen bir diğer tedavi ajanı HDAC inhibitörü olan SAHA'dır (11). Miyeloid lösemi ve meme kanserlerinde hipermetile olan susturulmuş genlerin DNMT inhibitörü kullanılmasıyla ifadelenmeye başladığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (12). HDAC inhibitörü T-hücreli lenfoma tedavisi için kullanılmakta, meme ve prostat kanserleri üzerine etkisinin değerlendirilmesi pre-klinik çalışmalarla devam etmektedir (13).

Bitki kimyasallarının tedavi amaçlı kullanımı insanlık tarihiyle birlikte başlamıştır. Modern tıpta kullanılan birçok ilaç bitkilerden elde edilmiştir. Silimarin, Asteracea familyasına ait devedikeni olarak da adlandırılan *Silybum marianum* L. bitkisinin tohumlarından elde edilmektedir. En önemli etken maddesi bir polifenol olup, bitki kimyası olarak da bir flavonolignandır. Silimarin toksisite oranının düşük olması ve yan etkilerinin olmaması sebebiyle 2000 yıldan beri karaciğer koruyucu olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarla silimarinin antioksidan, antimetastatik, antianjiyogenik ve antiinflamatuvar etkileri gösterilmiştir. Antikarsinojenik etkilerinden dolayı kemoterapi tedavisi uygulanan hastalarda alternatif tedavi amacıyla çok sık tercih edilmektedir (10,14).

Bu çalışma ile silimarinin çeşitli kanser hücre dizilerinde epigenetik regülasyon üzerine olan etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

Kanser, hücre ölümünden kaçmak için mekanizmalar geliştiren genetik, sitogenetik ve epigenetik temelli karmaşık bir hastalıktır. Normal hücreler, hücrenin bölünmesi, başka bir hücreye farklılaşması veya ölmesi gerekip gerekmediğini belirten sinyallere sürekli olarak maruz kalırlar. Kanseri hücreleri, bu sinyallere bir ölçüde otonomi geliştirir, bu da kontrolsüz büyüme ve çoğalma ile sonuçlanır. Aslında, kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %90'ı, metastazdan kaynaklanmaktadır (15). Başlangıçta genetik bir hastalık olarak bilinen kanserin, genetik değişikliklerle birlikte epigenetik anormallikleri içerdiği bilinmektedir. Epigenetik bozuklukların, neoplazilerin gelişiminde rol oynadığı anlaşılmaktadır (16).

İnsan kanserlerinde, anormal epigenomiklerin başlangıç (initiation), ilerleme (promotion), istila (invasion), metastaz ve kemoterapi direnci dahil olmak üzere çeşitli neoplastik gelişim aşamalarına katkı sunduğu bilinmektedir. Son zamanlarda 300'den fazla gen ve gen ürününün çeşitli insan kanserlerinde epigenetik olarak değiştiği ileri sürülmüştür. DNA metilasyonu ve kanser arasındaki bağlantı ilk olarak 1983 yılında kanser hücrelerinin genomlarının normale göre hipometile olduğu gösterildiğinde ortaya çıkmıştır. DNA metilasyonu açısından, kanser hücreleri genom çapında hipometilasyon ve bölgeye özgü CpG ada promotör hipermetilasyonu göstermektedir. Spesifik genlerdeki hipermetilasyon tipik olarak CpG adalarındaki promotörü inaktive eden transkripsiyonu etkiler. Hipermetilasyon spesifik CpG adalarında gözlenir. Promotör hipermetilasyonu transkripsiyonel inaktiviteye neden olur (17,18).

Epigenetik terimi, 1942 yılında, Conrad Waddington tarafından, fenotip modifikasyonunu uyarmada çevresel etki kavramı olarak tanıtılmıştır. Kavram, 1990'ların sonuna kadar, Wolffe ve Matzkeset'in, DNA dizisinde bir değişiklik olmaksızın ortaya çıkan gen ifadesinde kalıtsal değişimlerin incelenmesi olan modern tanımının ortaya çıkmasına kadar açıklığa kavuşturulmamıştır. Epigenetik değişiklikler, anormal DNA metilasyonu, posttranslasyonel histon modifikasyonları, anormal kodlanmayan RNA (miRNA, lnc-RNA gibi) ifadenmesi ve kromatinin

yeniden modellenmesini içermektedir. Bu mekanizmalar kanser gelişiminde onkogenlerin, tümör baskılayıcı genlerin ve diğer tümörle ilişkili genlerin ifadelenmesini ve yolların değişimini doğrudan etkilemektedir (19,20).

2.1.1 DNA metilasyonu

DNA metilasyonu, ökaryotlarda ve prokaryotlarda görülen korunmuş bir mekanizmadır. Ökaryotlarda metilasyon, genom bütünlüğünün korunmasında, genomik baskılama, transkripsiyonel düzenleme ve gelişimsel süreçlerin korunmasında önemli rol oynayan epigenetik DNA modifikasyonları ile karakterize edilir. DNA metilasyonu, bir metil grubunun, DNA zincirindeki azotlu baz sitozin içindeki beşinci karbona kovalent eklenmesi anlamına gelir. Bunun sonucu genlerin ve kodlamayan genomik bölgelerin susturulması olur. 5-metil sitozindeki modifikasyon, DNA metiltransferaz enzimi (DNMT'ler) tarafından katalize edilir. Üç ana DNMT vardır; DNA replikasyonunu takiben mevcut metilasyon kalıplarını koruyan DNMT1, DNMT3A ve metilasyonu başlatmak için metillenmemiş CpG'leri hedefleyen ve embriyogenez sırasında yüksek oranda ifade edilen, yetişkin dokularında ise en az ifade edilen DNMT3B. Sadece metiltransferaz enzimleri tarafından metilasyon için guanine bitişik olan sitozin rezidüleri hedeflenir ve metillenmiş ve metillenmemiş CpG'nin dağılımı, dokuya özgüdür ve bu da hücreye özgü DNA metilasyon modeline yol açar. Normal hücrelerde, DNA metilasyonu ağırlıklı olarak uydu DNA ve uzun serpiştirilmiş traspozon elementler dahil, tekrarlayan genomik bölgelerde meydana gelir. Metillenmiş sitozinler, toplam nükleotidlerin yaklaşık %1'ini ve insan genomundaki tüm CpG dinükleotidlerinin yaklaşık %75'ini oluşturur. CpG dinükleotidleri, insan genomunda eşit olmayan bir şekilde dağılmaktadır ancak CpG adaları (CGI) adı verilen ceplerde yoğunlaşmıştır. Gen promotorlarının yaklaşık %50-60'ı CpG adalarında bulunur ve insan genomunu yaklaşık 29 000 CpG dizisi içerdiği tahmin edilir. DNA metilasyonu spesifik transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını inhibe ederek gen ifadelenmesini doğrudan baskılar. (21).

2.1.2 Histon Modifikasyonları

Histon modifikasyonları kromatin ile ilişkili olan proteinler ile etkileşime girerek gen transkripsiyonunun düzenlenmesini gerçekleştiren faktörlerdir. Bu modifikasyonlar, gen düzenlenmesinde ve karsinogenezde önemli rol oynayan kromatin yapısını etkiler. Kromatin, bağlayıcı (linker) DNA ile bağlanmış nükleozomların tekrarlarında oluşan oldukça düzenli bir yapıdır. Her bir nükleozom, histon proteinlerinin bir oktomerine sarılı 146 baz çifti DNA'yı kapsar. Bu oktomerler H2A, H2B, H3 ve H4 olmak üzere çekirdek histon proteinlerinin her birinin iki alt biriminden oluşur. Histonlar, nükleozomdan çıkıntı yapan, globüler domain içeren ve histon kuyruğu olarak bilinen esnek yüklü bir NH₂ terminali içeren küçük proteinlerdir. Histon kuyruklarında yapılan translasyon sonrası değişiklikler, kromatinin yapısal durumunu ve belirli lokustaki genlerin transkripsiyonel durumunu yönetir. Bu değişiklikler geri dönüşümlüdür ve histon içeren HAT'lar, HDAC'lar, metiltransferazlar (HMT), demetilazlar (HDM), kinazlar, fosfotazlar, ubikuitin ligazları, SUMO, proteazlar gibi enzimler tarafından kontrol edilir (22).

2.1.3 Kodlamayan RNA

Kodlamayan RNA'lar proteine çevrilmezler fakat fonksiyoneldirler ve bilgi taşırlar. Bu RNA'lar kromatin yapının oluşturulması, epigenetik hafıza, transkripsiyon, RNA splicing, editing ve translasyon gibi yolların tümünde görev almaktadır. Epigenetik mekanizmalarda en önemli kodlamayan RNA'lar miRNA'lar, uzun kodlamayan RNA'lar ve PIWI proteini ile ilişkili RNA'lardır (23).

MikroRNA'lar (miRNA'lar) yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda küçük kodlamayan RNA'lardır (ncRNA) ve mRNA translasyonunu kontrol ederek posttranslasyonel gen susturma işlemine katılırlar. miRNA'lar DNA dizisini değiştirmeden gen ifadenmesinde kalıtsal değişiklikleri uyarır ve böylece epigenetik mekanizmalara katkıda bulunurlar. Ek olarak miRNA'lar epigenetik mekanizmalar tarafından düzenlenirler. miRNA normal hücre

fizyolojisinde hayati olmasına rağmen, yanlış ifadenmesi kanser de dahil olmak üzere birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Kanser gelişimi ve miRNA profilleri insan kanserlerini sınıflandırmak amacıyla kullanılmaktadır. miRNA'ların protein kodlayan genlerin %60'ından fazlasının translasyon oranını düzenlediği ve hücrel işlemlerin düzenlenmesinde rol oynadıkları öngörülmüştür.

Uzun kodlamayan RNA'lar (lnc-RNA), DNA, RNA ya da proteinler ile etkileşime girerek gen ifadenmesine etki ederler. 200 nükleotitten büyüktürler. Gene özgü ifadenmeyi düzenlemektedirler. En çok çalışılmış olanı Xist olup, X kromozomu inaktivasyonunda görevlidir. HOTAIR lnc-RNA Hox genlerinden HOXA kompleksinin ifadenmesini engeller. Pek çok kanserde lnc-RNA ifadenmesi anormal düzeydedir.

PIWI proteini ile ilişkili RNA (pi-RNA), PIWI proteiniyle bir araya gelerek ribonükleoprotein yapısını oluşturur. Pek çok kanser türünde tümör baskılayıcı genlerden transkribe olan mRNA'lar pi-RNA'ların aşırı ifadenmesi sonucu inhibisyona uğrarlar. Düşük seviyede ifadelenmelerinde onkogenlerin transkripsiyonlarının artmasına neden olurlar (24).

2.1.4 Kromatin Yeniden Modellenmesi

Transkripsiyonun gerçekleşebilmesi için kromatin yapının açılması gerekmektedir. Bu olay kromatinin yeniden düzenlenmesi olarak adlandırılır. SWI/SNF, ISWI ve CHD mekanizmaları bu süreçte görev alırlar. Hepsi farklı histon kuyruğu modifikasyonuna sahiptir ve ATP'yi hidroliz ederler (25).

2.2 Epigenetik İnhibitörler

Genom, gen ifadesinde kritik roller oynayan kromatin yapıları halinde düzenlenir. Kromatinin temel birimi, DNA tarafından sarılmış olan çekirdek histonlarının her biri H2A, H2B, H3 ve H4'ün iki kopyasından oluşan nükleozomdur. Kromatin, RNA polimeraz II'nin verimli alımı ve işleyişine fiziksel bir engel oluşturarak transkripsiyonu engeller. DNA metilasyonu, gen baskılanmasında rol oynar ve DNMT ile korunur. DNMT inhibitörleri

azasitidin ve desitabin, kanser tedavisinde kullanılan en uzun epigenetik ilaç geçmişi ile bugüne kadar en başarılı olanlardır. Bu bileşikler, replikasyon sırasında DNA'ya katılan ve hücrede aktif enzimler havuzunu bu şekilde tüketen DNMT'lerle kovalent katkılar oluşturan nükleozit analoglarıdır. Histon asetilasyonu gen ifadenmesinde rol oynar ve HAT'lar ve HDAC'ların etkisiyle kontrol edilir. HDAC inhibitörleri, deri veya periferik T hücreli lenfomaların ve multiple miyelomun tedavisi için onaylanmıştır. HDACi, diğer malignitelerde sınırlı tek ajan aktivitesi olduğunu göstermiştir (26, 27).

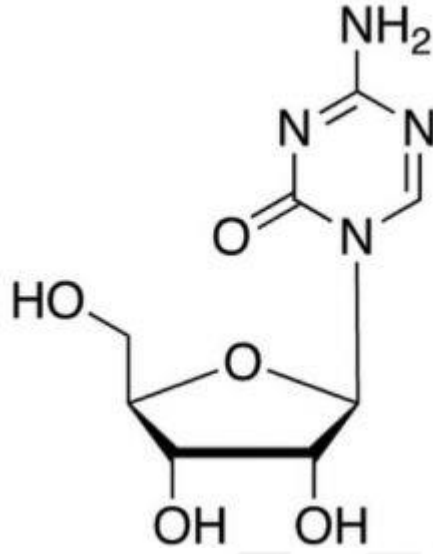
2.2.1 DNMT inhibitörleri

Tümör baskılayıcı gen hipermetilasyonu kanserde rol oynar ve tersinirliği nedeniyle demetilasyonu terapötik bir strateji oluşturur. Uzun yıllardır bilinen ve incelenen nükleozit analogları ve yapısı inhibe edici mekanizmalara göre değişen nükleozit olmayan inhibitörler olmak üzere iki aileye bölünmüş ve birçok DNMT inhibitörü tanımlanmıştır (28).

2.2.1.15-azasitidin

5-azasitidin, DNA ve RNA'da bulunan sitidin nükleozitinin kimyasal bir analogudur (Şekil 2.1). İki mekanizma aracılığıyla antineoplastik aktiviteye sahip olduğu düşünülmektedir. Düşük dozlarda, DNA metiltransferazın inhibe edilmesi, DNA'nın hipometillenmesine neden olarak ve yüksek dozlarda kemik iliğinde anormal hematopoetik hücrelerin DNA ve RNA'ya katılmasıyla doğrudan sitotoksitesi ile hücre ölümüyle sonuçlanmaktadır (28).

Azasitidin, bir ribonükleozittir, bu nedenle RNA'ya DNA'dan daha büyük oranda dahil edilir. Buna karşılık desitabin (5-aza-2-deoksisitidin) deoksiribonükleozittir ve sadece DNA'ya katılabilir. Azasitidin RNA'ya dahil edilmesi, poliribozomların ayrılmasına, hatalı metilasyon ve transfer RNA'nın alıcı fonksiyonuna ve protein üretiminin inhibe edilmesine yol açar. DNA'ya dahil edilmesi, DNA sentezini önleyen ve ardından sitotoksiteye yol açan DNA metiltransferazlarla kovalent bağlanmaya yol açar (29).

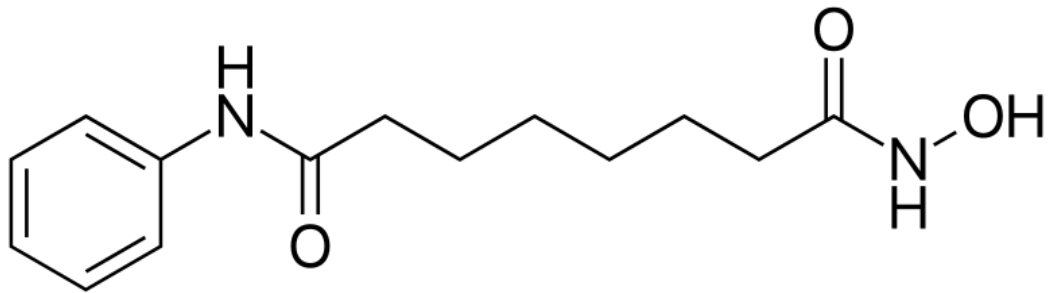


Şekil 2.1: DNMT inhibitörü 5-azasitidin kimyasal yapısı

2.2.2 Suberoylanilid hidroksamik asit (SAHA, vorinostat)

Suberoylanilid hidroksamik asit (SAHA), *in vitro* ve *in vivo* olarak birçok tümör tipinde büyümenin durması, farklılaşması ve / veya apoptozisine neden olan güçlü bir histon deasetilaz (HDAC) inhibitörüdür (Şekil 2.2). SAHA, kanser tedavisi için klinik deneylerde kullanılmaktadır. HDAC inhibitörleri kültürlenmiş hücrelerde %2'den daha az gen ifadenmesini uyarır (30).

Hidroksamik asit bazlı hibrit polar bileşik suberoylanilid hidroksamik asit (SAHA) gibi HDAC inhibitörleri, *in vitro* olarak büyüme durmasını, farklılaşmasını ve / veya dönüştürülmüş hücrelerin apoptozunu *in vitro* olarak inhibe eder ve tümör büyümesini önler. SAHA, solid ve hematolojik tümörlerin tedavisi için I. aşama klinik deneylerde kullanılmaktadır (31).



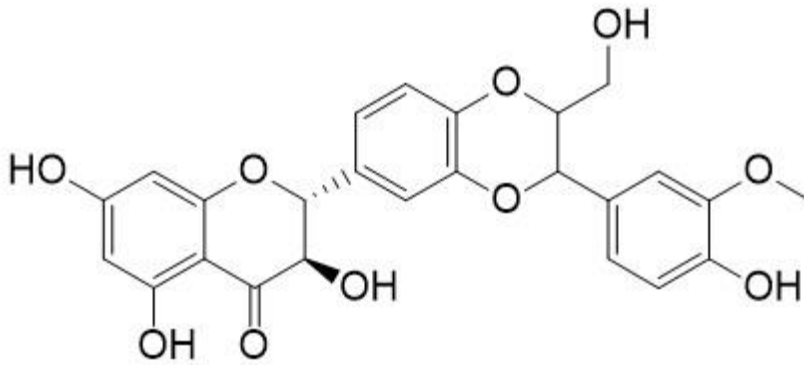
Şekil 2.2: HDAC inhibitörü SAHA kimyasal yapısı

2.3 Silimarin

2.3.1 Tanım ve Özellikler

Silimarin, devedikeni (*Silybum marianum* L.) tohumlarından elde edilen aktif bir özdür ve yaklaşık olarak %65-80 flavonolignan, %20-35 yağ asidi ve diğer polifenolik bileşikler içerir (32) (Şekil 2.3). Karsinogenez, çoğalma, hücre döngüsü, farklılaşma, apoptoz, anjiyogenez, invazyon ve metastaz ile ilgili transkripsiyonel faktörlerin ve proteinlerin ifadenmesinde farklılıklar ile aktive edilen çok adımlı bir işlemdir. Artan anjiyojenik potansiyeli, invazyon ve metastaz ile birlikte düzensiz hücre döngüsü ilerlemesi ve apoptoz, kanser belirtileri olarak tanımlanmıştır. Buna göre, bu işlemlerin bir veya daha fazlasını hedefleyebilen maddeler, etkili ve ideal kanser kemo-önleyici ajanlar olmalıdır. Silimarin, hücre döngüsü düzenleyicileri ve apoptoza katılan proteinlerdeki ifadenmelere müdahale ederek hücre sağkalımı ve apoptoz arasındaki dengesizliği düzenler. (33).

Silimarinin anti-inflamatuar etkileri, inflamasyon, hücre sağkalımı, farklılaşma ve büyümede rol oynayan çeşitli genlerin ifadenmesini düzenleyen ve koordine eden transkripsiyon faktörü NFκB inhibisyonu ile ilgilidir. Anti-anjiyojenik aktivite, kanser tedavisinde temel yollardan biridir. Silimarin anti-anjiyojenik potansiyeli çeşitli kanserlerde gösterilmiştir (34).



Şekil 2.3: Silimarinin kimyasal yapısı

3. SİNYAL YOLAKLARI

3.1 p53 Yolağı

Başlangıçta bir onkogen olarak tarif edilen p53, şimdi insan kanserlerinde en sık inaktive edilmiş tümör baskılayıcısı olarak kabul edilmektedir (35,36). Proliferasyon, DNA onarımı, apoptoz, otofaji, metabolizma ve hücre göçü dahil olmak üzere birçok önemli hücresel süreci etkileyen genlerin ve miRNA'ların ifadenmesini kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür (37). p53, yüzlerce farklı genin ifadenmesini uyararak veya baskılayarak çeşitli genotoksik ve hücresel streslere (örneğin DNA hasarı veya onkogen aktivasyonu) cevap verir (38,39). p53'ün transkripsiyonel olarak düzenlenmesi, hasar görmüş hücrelerin durdurulmasına, tamir ve hayatta kalmalarını kolaylaştırmaya veya DNA onarılamaz şekilde zarar gördüğünde hücre ölümüne neden olmada önemli rol oynar. p53 ayrıca hücrelerin kalıcı bir şekilde büyümesinin durdurulmasına neden olabilir, böylece yaşlanan hücrelerin bağışıklık sistemi tarafından temizlenmeleri artırılarak, tümörün gerilemesine yol açan faktörler salgılanabilir (40,41,42).

3.2 Myc Yolağı

Myc proto-onkogeni, ilk olarak retroviral aracılı tümör oluşumunun etiyolojik ajanı olarak bulunmuştur. Daha sonra Myc'nin Burkitt lenfomada kromozom translokasyonu ile aktive olduğu gösterilmiştir. Myc, hem onkojenik hem de epigenetik olayların bir sonucu olarak tümör oluşumunda yaygın olarak aktive edilir. Aslında, Myc, insan kanserlerinin yarısından fazlasında aşırı ifade edilir ve/veya aktive edilir. Myc, büyük ölçüde birçok biyolojik süreci koordine eden bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür. Bu nedenle, Myc aktivasyonu otonom proliferasyon ve büyümeye, aralıksız DNA replikasyonuna, artmış protein biyojenezine, hücresel metabolizmada global değişimlere, anjiyojenik anahtara geçişe, otokrin ve parakrin düzenleyici programlara verilen yanıtın bastırılmasına ve konakçı immün tepkilerinin bir kısıtlamasına katkıda bulunur. Myc aktivasyonunun kanserin moleküler bir özelliği olduğu görülmektedir (43).

3.3 NFκB Yolağı

NFκB transkripsiyon faktörleri ve bunları aktive eden sinyal yolları, doğuştan gelen ve adaptif immün yanıtların merkezi koordinatörleridir. NFκB, transkripsiyonu, sitokin üretimini ve hücre sağkalımını kontrol eden bir protein kompleksidir (44). NFκB, hemen hemen tüm hayvan hücresi tiplerinde bulunur ve stres, sitokinler, serbest radikaller, ağır metaller, ultraviyole ışınlaması, oksitlenmiş LDL ve bakteriyel veya viral antijenler gibi uyarılara hücrel tepkilerde rol oynar (45). NFκB, enfeksiyona karşı bağışıklık yanıtını düzenlemede önemli bir rol oynar. NFκB'nin yanlış regülasyonu, kanser, enflamatuar ve otoimmün hastalıklar, septik şok, viral enfeksiyon ve uygunsuz immün gelişimine bağlanmıştır. NFκB ayrıca sinaptik plastisite ve hafıza süreçlerinde de rol oynamaktadır (46,47).

Son zamanlarda, NFκB sinyallemesinin kanser gelişimi ve ilerlemesinde de kritik bir rolü olduğu ortaya çıkmıştır. NFκB, inflamasyon ve kanser arasında bir mekanik bağlantı sağlar ve hem neoplastik hem de malign hücrelerin apoptoza dayalı tümör-gözetim mekanizmalarına direnç gösterme yeteneğini kontrol eden önemli bir faktördür. NFκB ayrıca tümör anjiyogenezini ve invazivliğini düzenleyebilir ve aktivasyonuna aracılık eden sinyal yolları yeni kemopreventif ve kemoterapötik yaklaşımlar için çekici hedefler sağlar (48).

Kanserde, NFκB sinyalini kontrol eden proteinler mutasyona uğrar veya anormal şekilde ifade edilir ve malign hücre ile organizmanın geri kalanı arasında kusurlu koordinasyona yol açar. Bu, hem metastazda hem de tümörün bağışıklık sistemi tarafından etkisiz eradikasyonu ile ortaya çıkar. Tümör hücrelerinde NFκB, NFκB transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlara bağlı olarak veya NFκB aktivitesini kontrol eden genlerde aktiftir; ek olarak, bazı tümör hücreleri NFκB'nin aktif hale gelmesine neden olan faktörleri salgılar. NFκB'yi bloke etmek, tümör hücrelerinin çoğalmayı, ölmeyi ya da anti-tümör ajanlarının etkisine karşı daha duyarlı hale gelmesine neden olabilir (49).

Çalışmamızda silimarinin SHSY5Y, HepG2 ve MCF-7 hücre dizilerine tek başına ve epigenetik inhibitörler ile birlikte uygulandığında DNMT ve HDAC enzim aktiviteleri üzerine olan ve p53, cMYc, NFκB protein düzeylerine olan etkilerini

değerlendirmeyi amaçladık. Literatürde silimarinin antikarsinojen, antimetastatik, antianjiyogenik ve antiinflamatuvar etkileri ile ilgili çalışmalar mevcutken, epigenetik yollar üzerindeki etkisini açıklayıcı çalışmalar sınırlı sayıdadır. Çalışmamızın sonuçlarına göre silimarin DNMT üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğunu ancak HDAC üzerinde inhibisyon etkisinin olmadığını gösterdik. Silimarinin tek başına uygulanmasının p53 K382, p53 K373, cMyc ve NFκB protein düzeylerini azalttığını ve p53 S46 protein seviyesinde artışa neden olduğunu gösterdik.

4. GEREÇ ve YÖNTEM:

4.1 Gereç ve Malzemeler

4.1.1 Kullanılan cihazlar

Laminar flow (HeraSafe KS Class II Safety Cabin)

İnkübatör (Hereaus HeraCell 150i, Almanya)

Inverted mikroskop (Olympus, Japonya)

Santrifüj cihazı (Harrier, İngiltere)

Vorteks (Dragon Laboratory, Çin)

Spektrofotometre (Epoch, Biotek, ABD)

Otomatik mikropipet (10µl, 100µl, 1000µl skalalarında, Gilson)

Otomatik çok kanallı pipet (20-200µl skalasında Gilson)

Ph Metre (Consort C1020)

BioRad Mini Protean Tetra Cell

4.1.2 Kullanılan Kimyasallar

Hücre kültürü besiyeri RPMI 1640 (Biochrome AG, Germany)

Hücre kültürü besiyeri DMEM(Biochrome AG, Germany)

Hücre kültürü besiyeri DMEM F-12(Biochrome AG, Germany)

L-glutamin 100X (Biowest)

Fetal bovine serum (Biochrome AG, Germany)

Antibiyotik (PSA) (Penicilin&Streptomycin)

Tripsin-EDTA (Biowest)

Tyrphan blue (Sigma-Aldrich, USA)

MTT (Sigma-Aldrich, USA)

DMSO (Sigma-Aldrich, USA)

Albumin (Sigma-Aldrich, USA)

Bradford Solüsyonu (1X)

Western Bright ECL HRP-K (Advansta)

5-azasitidin (Sigma)

Silimarin (Sigma)

Suberoylanilide hydroxamic acid (Sigma)

4.1.3 Kullanılan tampon ve çözeltiler

Bradford solüsyonu (5X, seyreltilmiş)

MTT (5 mg/ml konsantrasyonda, PBS ile hazırlanmış)

SDS %10 (50 g SDS+ 5 ml 1 N HCL+ 500 ml distile su)

4.2 Yöntem

4.2.1 Hücre kültürü çalışmaları

MCF-7 hücreleri %10 fetal dana serumu, %1 penisilin/streptomisin karışımından oluşan RPMI 1640 besiyeri, HepG2 hücreleri DMEM ve SHSY5Y hücreleri DMEM-F12 ile birlikte 25 cm²'lik flasklara ekildi. Hücre kültürlerinin inkübasyonu %5CO₂ ve %95 nem içeren 37 °C sabit sıcaklıktaki inkübatörde gerçekleştirildi. Hücrelerin gelişimleri inverted mikroskop ile takip edildi. Hücreler 2-3 günde bir pasajlandı. Yeterli sayıya ulaşması beklendi. Thoma lamı ile hücre sayımları yapılırken, canlılıklar Tryphan blue testi ile değerlendirildi. Yeterli sayıya ulaşan hücreler MTT testi için kullanıldı.

4.2.2 MTT yöntemi ile IC₅₀ konsantrasyonlarının belirlenmesi:

MTT([3-(4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H tetrazoliumbromide]) testi sitotoksitenin değerlendirilmesinde kullanılan enzimatik bir testtir. Bu test ile hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanabilmektedir. MTT testi temel olarak mitokondrinin tetrazolium halkasının parçalanması ilkesine dayanmaktadır. Mitokondri enzimleri indirgenğinde sarı renkli tetrazolium kristalleri oluşur. Oluşan bu kristaller organik çözücüler ile çözüldüğünde mavi mor formazan kristallerine dönüşür. Oluşan kristaller 540 nm dalga boyunda optik yoğunluklarının ölçülmesi ile değerlendirilir.

Yöntem 96 kuyucuklu plakalarda çalışıldı ve uygulanma şekli aşağıdaki gibidir.

1. İlk kolon besiyeri kontrol kolonu olup, 150 µl besiyeri eklendi, 2.kolon hücre kontrol kolonudur ve 100 µl besiyeri eklendi. 3. kolon en yüksek ilaç dozun eklendiği kolon olduğundan boş bırakıldı. 4-12 arasındaki tüm kolonlara da 100 µl besiyeri eklendi.
2. En yüksek ilaç dozu 200 µl olacak şekilde boş olan 3. kolona konuldu.
3. İlaç yatay olarak 100 µl dilüe edilerek dağıtıldı.
4. Kuyu başına 15000/50 µl hücre gelecek şekilde hücre süspansiyonu tüm kuyulara dağıtıldı.
5. Plak belirlenen sürede (48 saat) 37 °C de inkübasyona bırakıldı.

6. İnkübasyonun ardından 20 µl MTT kuyulara dağıtıldı.
7. 37 °Cde 4 saat inkübasyona bırakıldı.
8. İnkübasyon sonunda tüm kuyulara 100 µl %10 SDS eklenerek bir gece inkübasyona bırakıldı.
9. İnkübasyonun ardından 540 nm değerinde okutulularak sonuçlar kaydedildi.

Uygulama yapılmayan hücrelerin optik değerlerinden kör okumanın değerleri çıkartılarak elde edilen verilerden grafik çizildi. Grafiğin eğimi hesaplanarak, bu eğime uygun olan, hücrelere uygulanan kimyasalların IC50 dozları hesaplandı.

4.2.3Hücre Kültüründen Protein Saflaştırılması:

Proteinleri izole etmek için aşağıda belirtilen şekilde lizis tamponu taze olarak hazırlandı.

Tris HCL (1 M, 10 ml):

1,21 gr Tris-base tartılıp, 10 ml distile su eklendi. pH 7.5 olacak şekilde ayarlanıp, hazırlanan solüsyon otoklavlandı. +4°C 'de saklandı.

EDTA (0.125 M, 10 ml):

EDTA 0,7 gr tartılarak, hacim 10 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

CHAPS Buffer (%5, 5 ml) :

CHAPS 0,25 gr tartılarak, son hacim distile su ile 5 ml'ye tamamlandı. +4°C 'de saklandı.

β-mercaptoethanol (0,5 M, 5ml) :

β-mercaptoethanol' den 175 µl alındı, 4825 µl distile su ile 5 ml'ye tamamlandı.

Lysis tamponu (300 µl) hazırlanışı:

Tris HCl : 3µl

MgCl₂ : 12µl

EDTA: 2.4µl

CHAPS : 30µl

Gliserol : 34.5 µl

Protein coctail : 3µl

β-merkaptöetanol : 3µl

Distile su : 212,1 µl

Her defasında taze hazırlanan tampon, 1,5 ml'lik tüplere hazırlanan hücre gruplarına 300 µl olacak şekilde dağıtıldı. Tampon eklenen hücrelerin 30 dk +4 °C'de inkübe edildi. Hücreler daha sonra +4 °C'ye ayarlanmış soğutmalı santrifüj cihazında 20 dakikada 15000 g'de santrifüj edildi. Santrifüj işlemi tamamlanan hücrelerin üst fazları yeni 1,5 ml'lik tüplere alındı. Üst fazları alınan hücrelerin protein düzeylerini ölçmek için Bradford yöntemi uygulandı.

4.2.4 Hücre Kültüründen Protein Miktar Analizi

Bradford tarafından geliştirilen metotla total protein içeriği belirlendi. 5X olarak hazırlanan Bradford solüsyonu karanlık ortamda +4°C'de saklandı. 5X solüsyonunu hazırlamak için 500 mg Coomassie brilliant blue G250' den, 250 mL etanolden ve 500 mL fosforik asitten eklendi, solüsyon 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan 5X solüsyonu 1X'e seyreltildi ve süzüldü. BSA (Bovine serum albumin) taze olarak, 1mg/ml olacak şekilde hazırlandı.

Örnekler hazırlanırken 15 µl örnek + 235 µl distile su olacak şekilde tüplere dağıtıldı. Kontrol tüpü (kör) bradford ve distile su içerecek şekilde hazırlandı. Tüplere

sırasıyla Bradford solüsyonu, distile su ve örnek koyuldu. Hazırlanan tüpler 10 dk karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda tüpler iyice vortekslendi ve 96 kuyucuklu kaba konuldu. 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü ve absorbans değerlerine göre oranlar belirlendi. Belirlenen oranlara uygun grafik formüle edilerek çizildi.

4.2.5 Nükleer Proteinlerin Saflaştırılması

Kullanılan malzemeler:

NP1 (10X Ön ekstraksiyon solüsyonu)

NP2 (Ekstraksiyon solüsyonu)

NP3 (Ekstraksiyon ön temizleyici)

NP4 (Ekstraksiyon temizleyici)

1000X DTT Solution

1000X Proteaz inhibitör kokteyli (PIC)

Nükleer protein ekstraksiyon için EpiQuik Nuclear Extraction Kit II kullanıldı. Hücre pelletinin hazırlanması için; %70-80 doluluk gösteren hücrelerin ($2-5 \times 10^6$) besi yerleri alındı, iki kez PBS ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldı. Hücreler 3 ml PBS eklenerek hücre kazıyıcı ile kaldırıldı. Falcon tüpe alındı. 5 dk 1000 rpm ($G = 1.12 \times \text{Radius} \times (\text{rpm}/1000)$)'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. NP1 (1X), DTT ve PIC eklendi. Buz üzerinde 10 dk inkübe edildi ve 10 sn vortekslendi. 1 dk 1200 rpm'de santrifüj edildi. Sitoplazmik ekstrakt dikkatlice nükleer pelletten ayrıldı. Nükleer pelletlerin üzerine 225 μL NP2, 0,225 μL PIC ve 0,225 μL DTT eklendi. Üzerine 25 μL NP3 eklendi. Buz üzerinde 15 dk bekletildi. Her 3 dk bir 5 sn vorteks yapıldı. +4°C'de 14.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant yeni tüpe alındı. Tüplere NP4 eklendi. Oda sıcaklığında 15-20 dk inkübasyona bırakıldı. +4°C'de 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant iki yeni tüpe alınıp, -80 °C'ye kaldırıldı. Protein miktar ölçümleri yapıldı.

4.3 DNMT Aktivite/İnhibisyon Assay

Kullanılan malzemeler:

MU1 (10X Yıkama Solüsyonu)

MU2 (DNMT Assay Solüsyonu)

MU3 (Adomet, 50X)

MU4 (DNMT Enzim Kontrolü, 50 µg/mL)

MU5 (Yakalama Antibody, 1000 µg/mL)

MU6 (Deteksiyon Antibody, 400 µg/mL)

MU7 (Güçlendirici Solüsyon)

MU8 (Geliştirici Solüsyon)

MU9 (Durdurma Solüsyonu)

Solüsyonların Hazırlanması:

a. Dilue MU1 1X yıkama solüsyonu hazırlamak için 26 mL MU1 ile 234 mL dH₂O karıştırıldı. pH: 7.2-7.5 olarak ayarlandı.

b. Dilue MU3 solüsyonu hazırlamak için 2 mL MU3 üzerine 98 mL MU2 eklendi.

c. Dilue MU5 yakalama antibody solüsyonu hazırlamak için 1000 µL MU1 (1:1000) ile 1 µL MU5 karıştırıldı.

d. Dilue MU6 deteksiyon antibody solüsyonu hazırlamak için 1 µL MU6 ve 2000 µL MU1 (1:2000) karıştırıldı.

e. Dilue MU7 güçlendirici solüsyon hazırlamak için 5000 µL MU1 (1:5000) üzerine 1 µL MU7 eklendi.

Enzimatik Reaksiyon:

1. 40-45 μL dilue MU3 tüm kuyucuklara eklendi. Üzerine 1-5 μL nükleer ekstrak eklendi ve son hacim 50 μL 'ye ulaştı.
2. 37°C'de 90-120 dk inkübasyona bırakıldı.
3. 50 μL dilue MU5 eklendi. Oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı.
4. MU5 uzaklaştırıldı. 150 μL dilue MU1 ile 3 kez yıkama yapıldı.
5. 50 μL dilue MU6 eklendi. Oda sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakıldı.
6. Dilue MU6 solüsyonu toplandı.
7. 150 μL dilue MU1 ile dört kez yıkandı.
8. 50 μL dilue MU7 eklendi. Oda sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakıldı.
9. Dilue MU7 solüsyonu toplandı.
10. 150 μL dilue MU1 ile beş kez yıkama yapıldı.
11. 100 μL MU8 eklendi. Oda sıcaklığında 1-10 dk arası karanlıkta inkübe edildi.
12. MU8 solüsyonunun maviye dönmesi gözlemlendi (Mavi renk metile DNA varlığını göstermektedir).
13. MU9 100 μL eklendi. Rengin sarıya dönmesi gözlemlendi.
14. 450 nm dalga boyunda okutuldu.

4.4 HDAC Aktivite/İnhibisyon Assay

Kullanılan malzemeler:

H1 (10X Yıkama Solüsyonu)

H2 (HDAC Assay Solüsyonu)

H3 (Biotinlenmiş HDAC Substratı)

H4 (HDAC inhibitörü, 0.5 mM)

H5 (HDAC Assay standartı, 20 µg/mL)

H6 (Yakalama Antibody, 100 µg/mL)

H7 (Deteksiyon Antibody, 200 µg/mL)

H8 (Geliştirme Solüsyonu)

H9 (Durdurma Solüsyonu)

Protokol:

1. H3, 1:50 oranında dilue H1 ile hazırlandı.
2. Kuyucuklara 50 µL H3 eklendi (Blank ve standartlar hariç).
3. 0.1-10 ng arasında 1 µL H5 eklendi.
4. 30-45 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
5. Aspire edilip, 150 µL dilue H1 ile iki kez yıkandı.
6. 28 µL H2 eklendi, 2 µL NE (4-20 µg) eklendi.
7. 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
8. Aspire edilip, 150 µL H1 ile üç kez yıkandı.
9. Her kuyucuğa 50 µL H6 (1:100) eklendi, oda sıcaklığında 1 saat çalkayıcıda (50-100 rpm) bırakıldı.

10. Aspire edildi, dört kez dilue H1 ile yıkandı.
11. Her kuyucuğa 50 µL H7 (1:1000) eklendi. Oda sıcaklığında 25-30 dk inkübe edildi.
12. Aspire edildi, dört kez 150 µL dilue H1 ile yıkandı.
13. 100 µL H8 kuyucuklara eklendi ve oda sıcaklığında 2-10 dk ışıktan koruyarak inkübe edildi. Mavi renk oluşumu gözlemlendi.
14. 50 µL H9 eklendi ve enzim reaksiyonu durduruldu.
15. 450 nm'de okutuldu.

4.5 Western Blot

Western Blot, hücre biyolojisi ve moleküler biyolojide kullanılan önemli bir teknik olup, saflaştırılan kompleks protein karışımından spesifik proteinleri belirlemede kullanılır. Tekniğin temelinde büyüklüğüne göre ayırma, katı bir desteğe aktarma ve hedef proteini görselleştirmek için uygun bir birincil ve ikincil antikor kullanarak işaretleme bulunmaktadır.

SDS-PAGE (w/v)	Ayırıcı Jel (mL) %12	Paketleyici Jel (mL) %4
Jel solüsyonu	1.7	2.1
dH ₂ O	2	0.5
Ayırıcı Jel Solüsyonu	1.3	-
Paketleyici Jel Solüsyonu	-	0.38
SDS	0.05	0.03
APS	0.05	0.03
TEMED	0.002	0.003
Toplam Hacim	5	3

Jel Solüsyonu

14,6 gr akrilamid ile 0,4 gr bisakrilamid tartıldı, 50 mL dH₂O içinde çözdürüldü. Filtreden süzdürüldü. +4 °C'de karanlıkta muhafaza edildi.

Ayırıcı Jel Solüsyonu (1.5 M, 100 mL)

18,15 gr Tris-base tartıldı, pH:8.8 olarak ayarlandı. 100 mL'ye dH₂O ile tamamlanıp, +4°C'de saklandı.

Paketleyici Jel Solüsyonu

6 gr Tris-base tartıldı, pH:6.8 olarak ayarlandı. 100 mL'ye dH₂O ile tamamlanıp, +4 °C'de saklandı.

SDS (10 % w/v, 10 mL)

1 gr SDS tartıldı, 10 mL'ye dH₂O ile tamamlandı. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

APS (10 % w/v, 1 mL)

100 mg amonyumpersülfat 1 mL'ye dH₂O ile tamamlandı. Her deney öncesi taze hazırlandı.

Ayırıcı jel döküldükten sonra üzerini kapatacak kadar isopropanol eklendi. Jel polimerleştikten sonra isopropanol uzaklaştırıldı ve paketleyici jel döküldü. 1X elektroforez solüsyonu %0.1 SDS içerecek şekilde hazırlandı. Taraklar kuyulara zarar vermeden dikkatlice çıkarıldı ve tanka yerleştirildi.

Running (Elektrot) Solüsyonu (10X, 50 mL)

15 gr Tris-base ve 72 gr Glisin tartıldı, solüsyon dH₂O ile 500 mL'ye tamamlandı. +4°C'de saklandı.

Örnek yüklemek için, 4X örnek dilüsyon buffer örnekle karıştırılarak 1X'e dilue edildi. Örnekler 95°C'de 5 dk denatüre edildi. Örnekler 30 µg protein içerecek şekilde yüklendi.

Örnek Dilüsyon Solüsyonu (4X, 10 mL)

2,5 mL Tris-HCl, 4 mL gliserol, 2 mL β -merkaptoetanol, 0,8 gr SDS ve 0,001 gr bromfenolblue karıştırıldı. Solüsyon dH₂O ile 10 mL'ye tamamlandı. Karanlıkta +4°C'de saklandı.

Elektroforez paketleyici jel için 100 V, ayırıcı jel için 140 V olacak şekilde ayarlandı.

Jeldeki toplam hücre proteinlerini görüntülemek için jel, 1 saat Comassie Blue boyama solüsyonu ile boyandı. Renksizleştirme solüsyonu ile arada değiştirilerek 1 gece çalkalayıcıda bekletildi.

Comassie Mavisi Boyama Solüsyonu (400 mL)

Comassie blue brilliant R 0,4 gr tartıldı. 200 mL metanol ve 48 mL glacial asetik asit ile karıştırıldı. Solüsyon dH₂O ile 400 mL'ye tamamlandı. Filtre kağıdından süzüldü ve karanlıkta +4°C'de saklandı.

Renksizleştirme Solüsyonu (500 mL)

150 mL metanol ile 35 mL glacial asetik asit karıştırıldı, Solüsyon dH₂O ile 500 mL'ye tamamlandı. Filtre kağıdından süzüldü. Karanlıkta +4°C'de saklandı.

0.45 μ m nitroselüloz membrana transfer solüsyonu içinde elektroforetik olarak transfer edildi. Membran ve filtre kağıtları transfer solüsyonu ile ıslatıldı.

Transfer (Blotting) Solüsyonu (4L)

12,114 gr Tris-base, 57,65 Glisin tartıldı. 800 mL metanol eklendi. Solüsyon dH₂O ile 4L'ye tamamlandı. +4°C'de saklandı.

Transfer 90 dk 90 V'da gerçekleştirildi.

Transfer sonrası membran TBST Buffer ile 10 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra spesifik olmayan bağlanma bölgeleri oda sıcaklığında bloklama solüsyonu ile çalkalayıcı üzerinde 1 saat bloklandı.

TBST (Equilibration) Solüsyonu (1L)

29,25 gr sodyumklorit ile 3,16 gr Tris-HCl tartıldı. 500.5 µL Tween 20 eklendi. Solüsyon dH₂O ile 1 L'ye tamamlandı ve +4°C'de saklandı.

Bloklama Solüsyonu (300 mL)

15 gr albümin tartıldı, 300 mL'ye TBST ile tamamlandı. +4°C'de saklandı.

+4°C'de membran monoklonal antibody ile gece boyu inkübe edildi. Daha sonra 3 kez 5 er dakika TBST ile yıkandı. Peroksidaz konjugatı olan Goat Anti-Mouse IgG ikincil antibody ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. 3 kez TBST ile yıkandıktan sonra görüntüleme aşamasına geçildi.

5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 25 (IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.) istatistik paket programı kullanılmıştır. Değişkenler ortalama±standart sapma ve Medyan (Maksimum-Minimum) yüzde ve frekans değerleri kullanılmıştır. Verilerin faktöriyel düzende varyans analizine uygunluğu çok değişkenli normal dağılım ve Box-M Varyansların Homojenliği Testi ile değerlendirilmiştir. Ortalamaların karşılaştırmaları için faktöriyel düzende varyans analizi kullanılmıştır. Eğer parametrik testlerin (faktöriyel düzende varyans analizi) önşartlarını sağlamıyorsa box cox veri transformasyonu ile veriler yeniden elde edilmiş ve faktöriyel düzende varyans analizi elde edilen dönüştürülmüş verilerle kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırmalar ise Düzeltilmiş Bonferroni Testi ile gerçekleştirilmiştir. Sürekli iki değişken arasındaki ilişki Pearson Korelasyon Katsayısı ile parametrik test ön şartlarını sağlamadığı durumda ise Spearman Korelasyon Katsayısı ile değerlendirilmiştir. Testlerin anlamlılık düzeyi için $p<0,05$ ve $p<0,01$ değeri kabul edilmiştir.

6. BULGULAR:

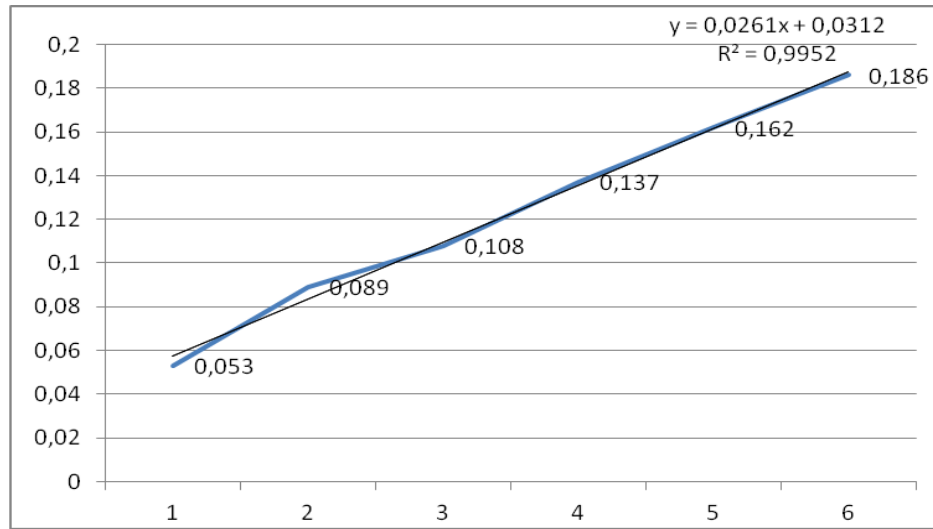
6.1 MTT Yöntemi ile Belirlenmiş olan 5-azasitidin, SAHA ve Silimarin IC₅₀ Değerleri

MTT hücre proliferasyon testlerinin 48 saat analizi sonrasında silimarin dozu SHSY5Y için 15,47 µM, MCF-7 için 170,08 µM, HepG2 için 700,74 µM olarak hesaplanmıştır. 5-azasitidin dozu SHSY5Y için 182,20 µM, MCF-7 için 48,97 µM, HepG2 için 462,90 µM olarak bulunmuştur. SAHA dozu için SHSY5Y için 32,49 µM, MCF-7 için 20 µM, HepG2 için 54,52 µM olarak hesaplanmıştır (Tablo 6.1).

Tablo 6.1: MTT hücre proliferasyon testlerinin analizi sonuçlarına göre belirlenen dozlar

Uygulama/ 48 Saat	5-Azasitidin	SAHA	Silimarin
SHSY5Y	182,20 µM	32,49 µM	15,47 µM
MCF-7	48,97 µM	20 µM	170,08 µM
HepG2	462,90 µM	54,52 µM	700,74 µM

6.2 Protein Miktar Analizi Sonuçları

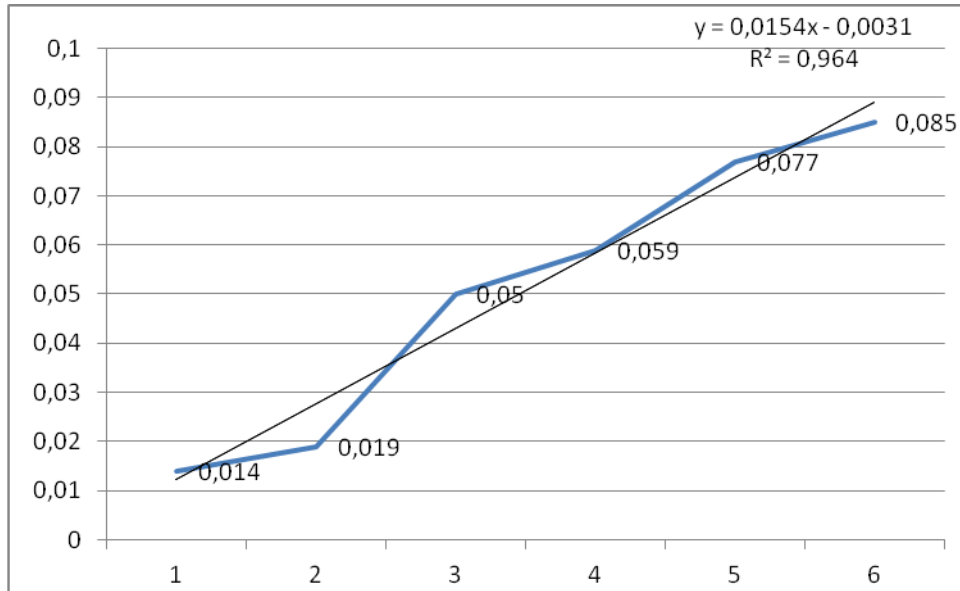


Grafik 6.1: SHSY5Y Bradford Assay Sonuçları

Bradford Assay ile protein miktar analizi yapılan SHSY5Y, HepG2 ve MCF-7 sonuçları aşağıda tablolar halinde verilmiştir (Tablo 6.2, Tablo 6.3, Tablo 6.4)

Tablo 6.2: SHSY5Y protein miktarları

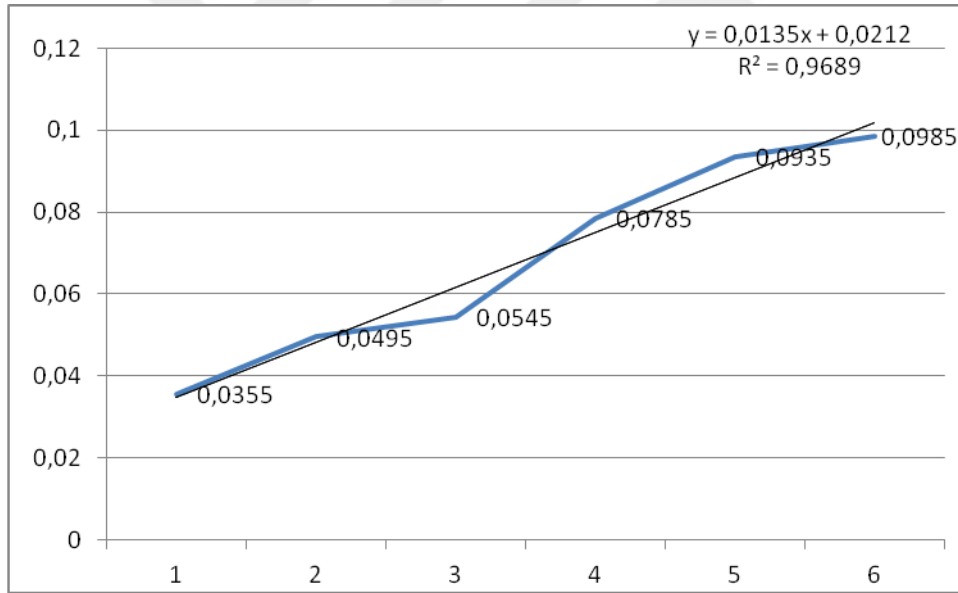
Uygulama	SHSY5Y Protein miktarı ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Kontrol	1967,94
5-azasitidin	1027,65
SAHA	1974,96
Silimarin	1192,72
5-aza+Sil	1164,62
SAHA+sil	1076,82



Grafik 6.2: HepG2 Bradford Assay Sonuçları

Tablo 6.3: Hepg2 protein miktarları

Uygulama	HepG2 Protein miktarı ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Kontrol	1735,56
5-azasitidin	1728,77
SAHA	1526,91
Silimarin	2129,38
5-aza+Sil	1918,89
SAHA+sil	1880,00

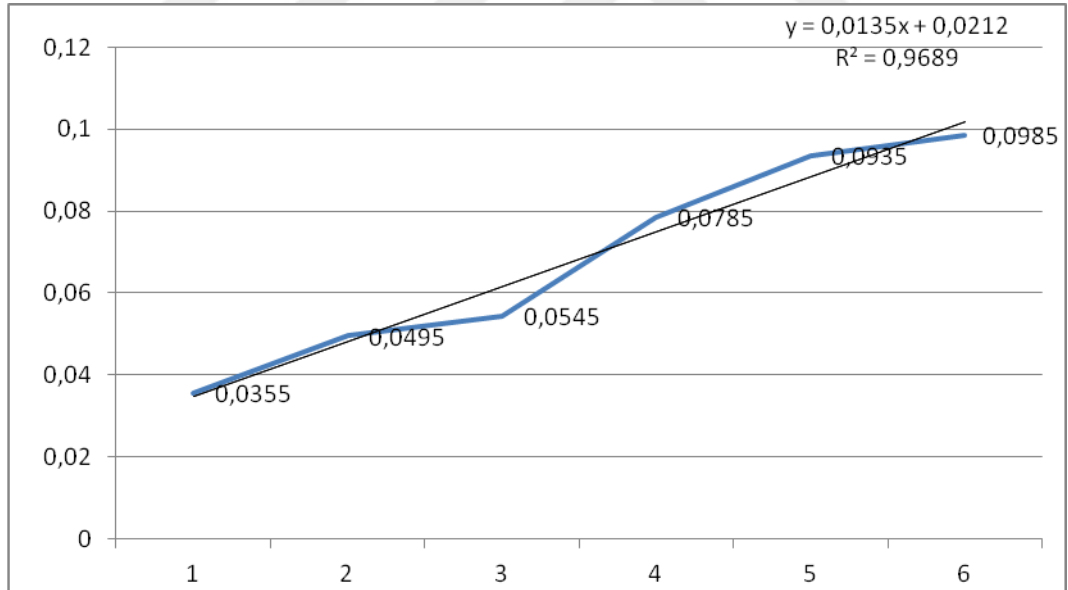


Grafik 6.3:MCF-7 Bradford Assay Sonuçları

Tablo 6.4:MCF-7 protein miktarları

Uygulama	MCF-7 Protein miktarı (µg/µL)
Kontrol	1626,19
5-azasitidin	1376,79
SAHA	1292,89
Silimarin	1560,71
5-aza+Sil	1554,76
SAHA+sil	1846,42

6.3 Nükleer Protein Ekstrakt Sonuçları

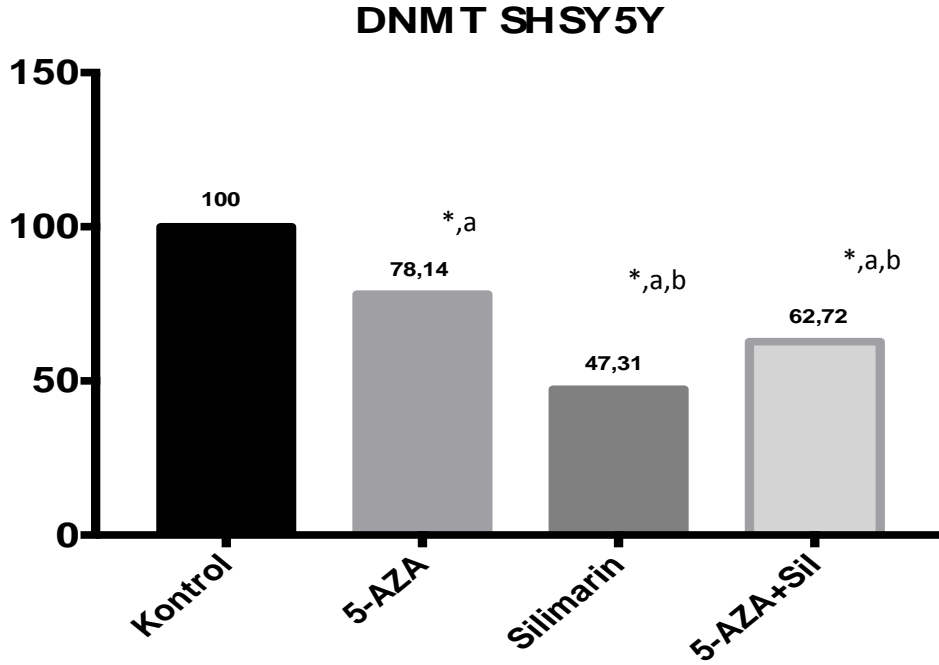


Grafik 6.4:Nükleer Protein Ekstrakt Bradford Assay Sonuçları

Tablo 6.5: Tüm hücre hatları nükleer protein ekstrakt protein miktarları

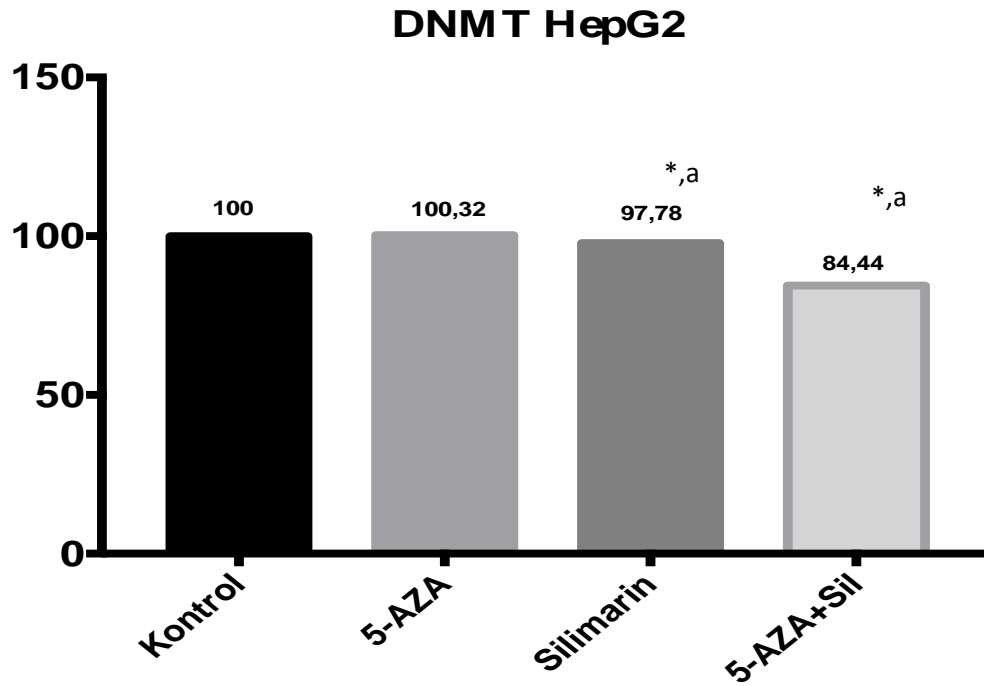
Uygulama	SHSY5Y NE ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	HepG2 NE ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	MCF-7 NE ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Kontrol	472,05	456,66	501,11
5-azasitidin	328,64	314,07	332,02
SAHA	378,09	547,96	436,29
Silimarin	476,74	562,22	384,07
5-aza+Sil	567,38	682,22	415,55
SAHA+Sil	376,05	394,11	322,22

6.4 DNMT Aktivite/İnhibisyon Assay ile Enzim Aktivite Sonuçları



Grafik 6.5: SHSY5Y DNMT enzim aktivite yüzdeleri

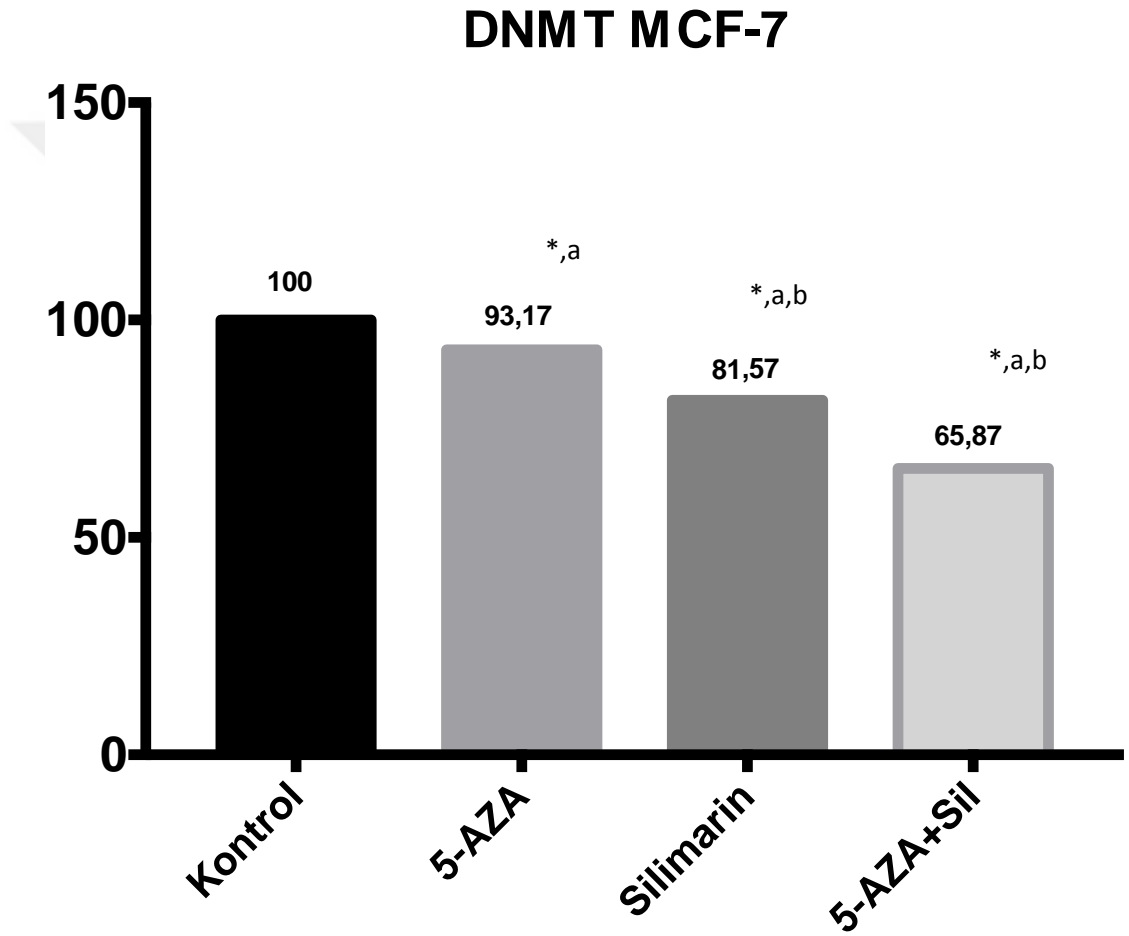
48 saatlik uygulama sonunda SHSY5Y hücre hattında DNMT enzim aktiviteleri değerlendirildiğinde tüm uygulama grupları için elde edilen değerler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gözlenen fark istatistiksel açıdan anlamlıdır ($p<0.05$). Nöroblastom hücrelerine tek başına 5-azasitidin uygulandığında DNMT aktivitesindeki azalma anlamlıdır ($p<0.05$). Tek başına silimarin uygulaması DNMT aktivitesini azaltmış olup, bu azalma istatistiksel olarak anlam ifade etmektedir ($p<0.05$). SHSY5Y hücrelerine iki ajanın birlikte uygulanması enzim aktivitesini azaltmakla beraber, bu azalma silimarinin tek başına uygulanmasıyla elde edilen azalmadan daha az, 5-azasitidin tek başına uygulanmasından elde edilen azalmadan daha fazladır. İki ajanın beraber uygulanmasıyla elde edilen aktivite azalması istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$), (Grafik 6.5).



Grafik 6.6: HepG2 DNMT enzim aktivite yüzdeleri

HepG2 hücre hattında DNMT enzim aktiviteleri değerlendirildiğinde kontrol grubu ile 5-azasitidin uygulaması arasında istatistiksel anlamda fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Kontrol grubu ile silimarin uygulaması karşılaştırıldığında tek başına silimarin uygulaması DNMT aktivitesini azaltmış ve bu azalma istatistiksel açıdan

anlamli bulunmuştur ($p<0.05$). İki ajanın beraber kullanılması kontrol grubuna göre enzim aktivitesini azaltmış ve bu azalma istatistiksel olarak anlamli bulunmuştur ($p<0.05$), (Grafik 6.6).

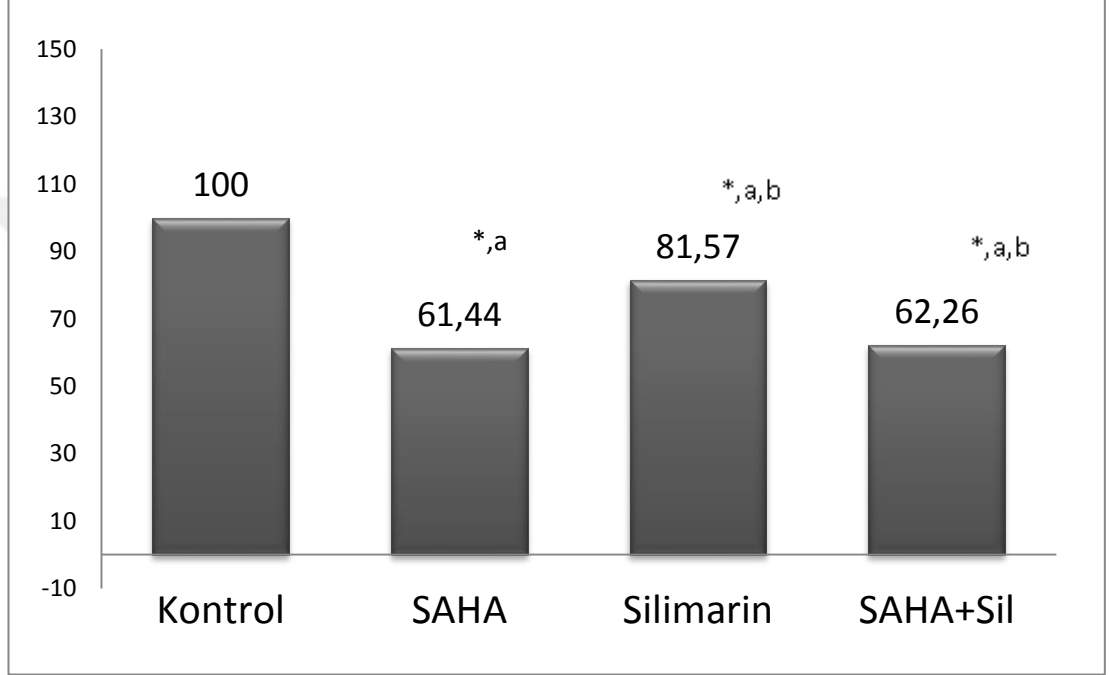


Grafik 6.7: MCF-7 DNMT enzim aktivite yüzdeleri

MCF-7 hücre hattında DNMT aktiviteleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre tüm uygulama grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamli bulunmuştur ($p<0.05$). Meme kanseri hücrelerine tek başına 5-azasitidin uygulaması enzim aktivitesini azaltmış olup, bu azalma istatistiksel olarak anlamlidir ($p<0.05$). Silimarinin tek başına uygulanması enzim aktivitesini azaltmıştır, bu azalma

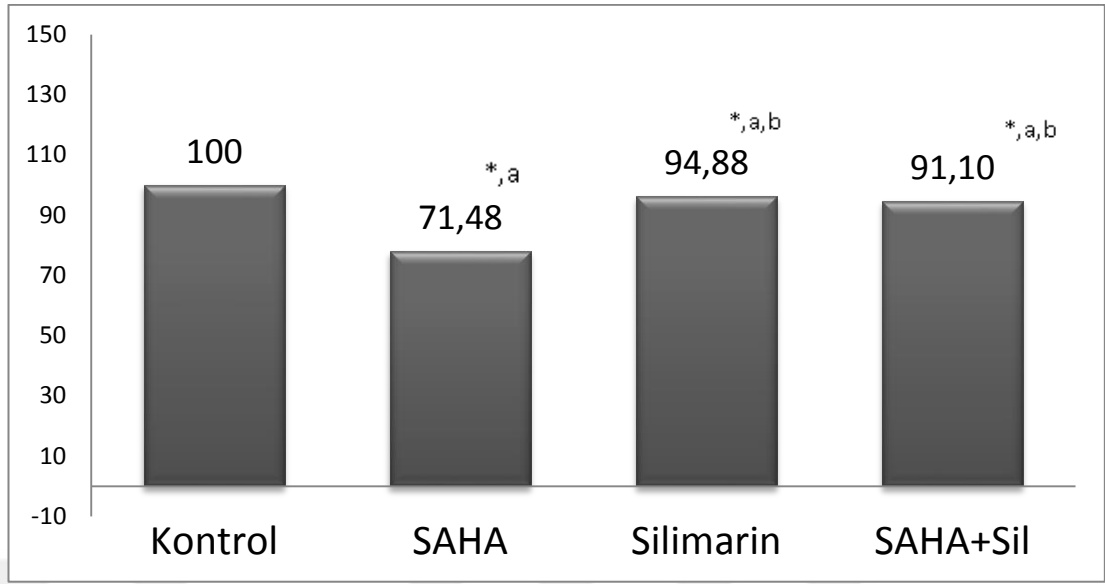
anlamlıdır ($p<0.05$). 5-azasitidin ve silimarinin beraber uygulanmasıyla DNMT aktivitesi ajanların tek tek uygulanmasına göre daha fazla azalma göstermiştir, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$), (Grafik 6.7).

6.5 HDAC Aktivite/İnhibisyon Assay ile Enzim Aktivite Sonuçları



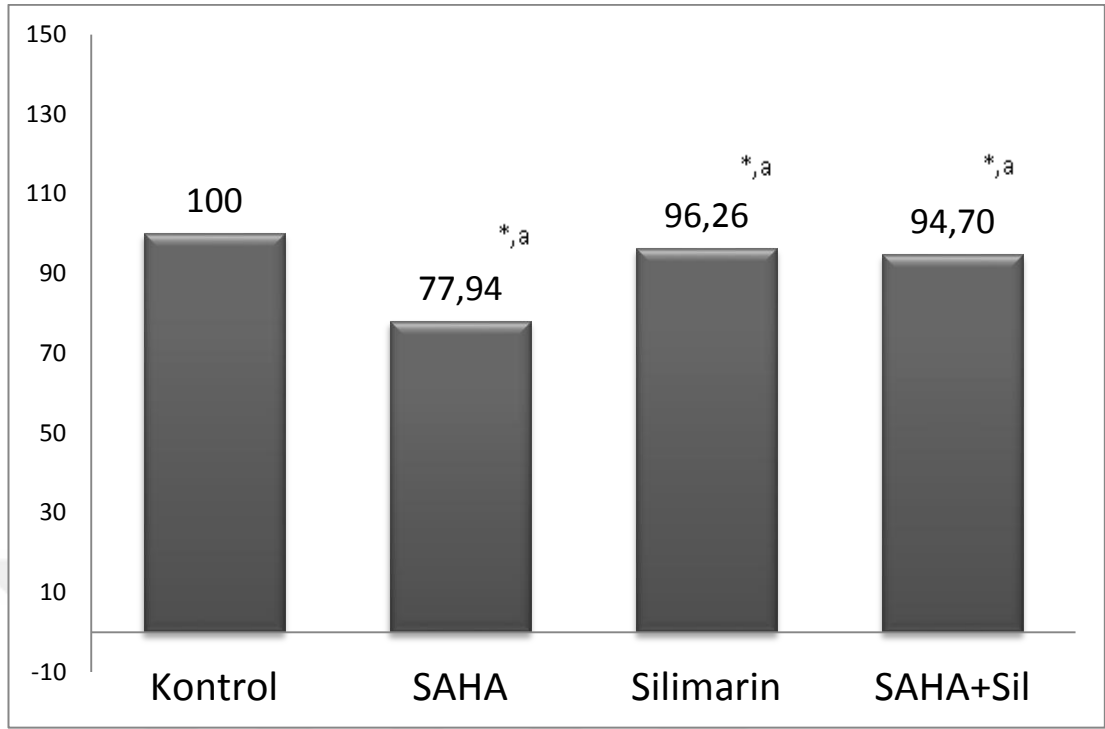
Grafik 6.8: SHSY5Y HDAC enzim aktivite yüzdeleri

SHSY5Y hücre hattında HDAC enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında kontrol grubu ile tüm uygulama grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). Nöroblastom hücrelerine SAHA tek başına uygulandığında enzim aktivitesini azaltmış, bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). Tek başına silimarin uygulaması istatistiksel anlamda enzim aktivitesinde azalmaya neden olmuştur ($p<0.05$). Ajanların beraber uygulanması silimarinin tek başına uygulanmasından daha az aktivite azalmasına neden olmuştur. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$), (Grafik 6.8).



Grafik 6.9: HepG2 HDAC enzim aktivite yüzdeleri

HepG2 hücre hattında HDAC enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre tek başına silimarin uygulaması arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p < 0.05$), kontrol grubu ve saha uygulaması arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Kontrol grubu ile iki ajanın beraber uygulanmasıyla elde edilen değer istatistiksel açıdan anlamlı olarak belirlenmiştir ($p < 0.05$), (Grafik 6.9).

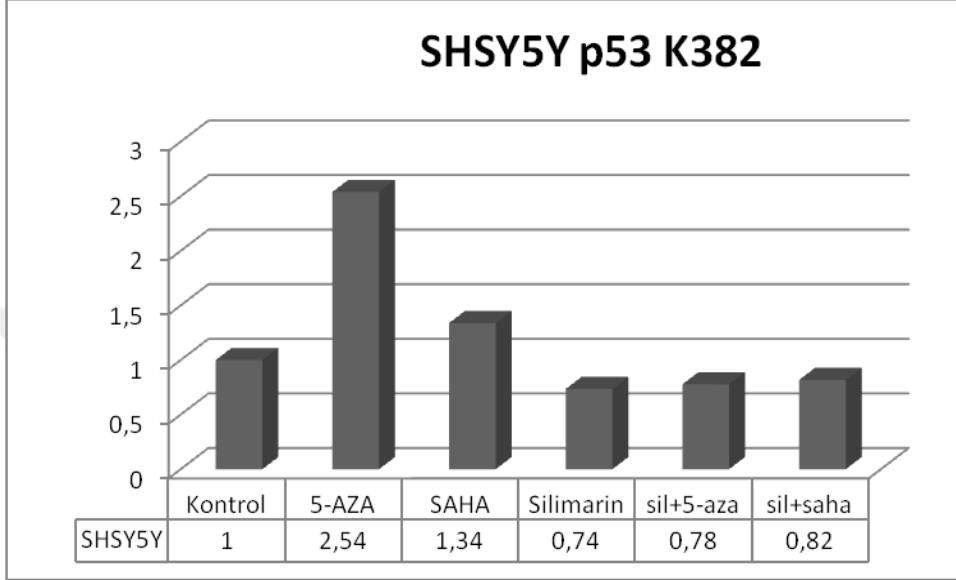


Grafik 6.10: MCF-7 HDAC enzim aktivite yüzdeleri

MCF-7 hücre hattında HDAC enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre silimarin uygulaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p < 0.05$). Kontrol grubu ile SAHA uygulaması arasındaki fark anlamlı olarak belirlenmiştir ($p < 0.05$). Kontrol grubu ile SAHA ve silimarinin beraber uygulandıkları grup karşılaştırıldığında ise ortaya çıkan fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). SAHA uygulamasının tek başına HDAC enzim aktivitesini azalttığı belirlenmiştir. SAHA'nın tek başına uygulanmasıyla elde edilen fark, iki ajanın beraber uygulanmasıyla elde edilen farktan istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$), (Grafik 6.10).

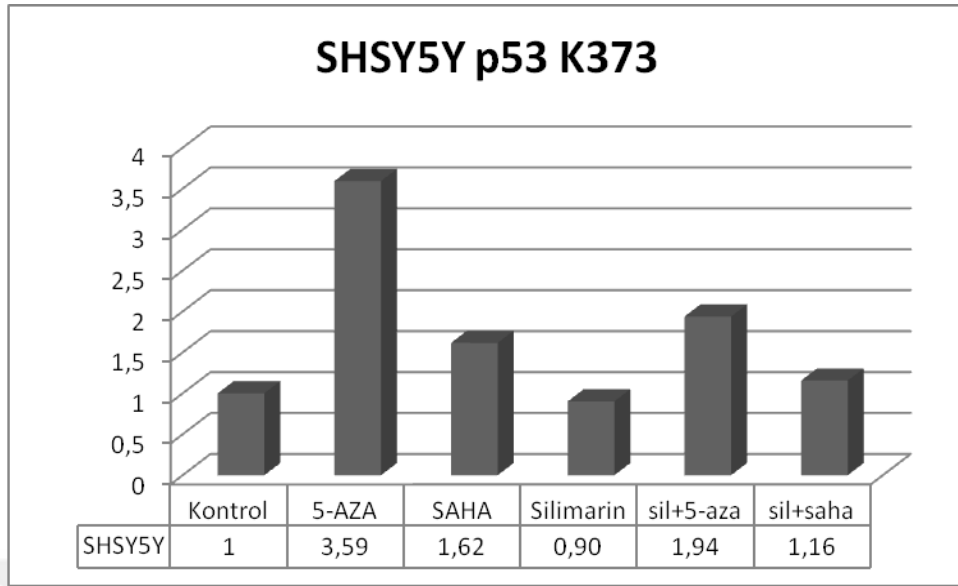
6.6 Western Blot Sonuçları

SHSY5Y WB Sonuçları



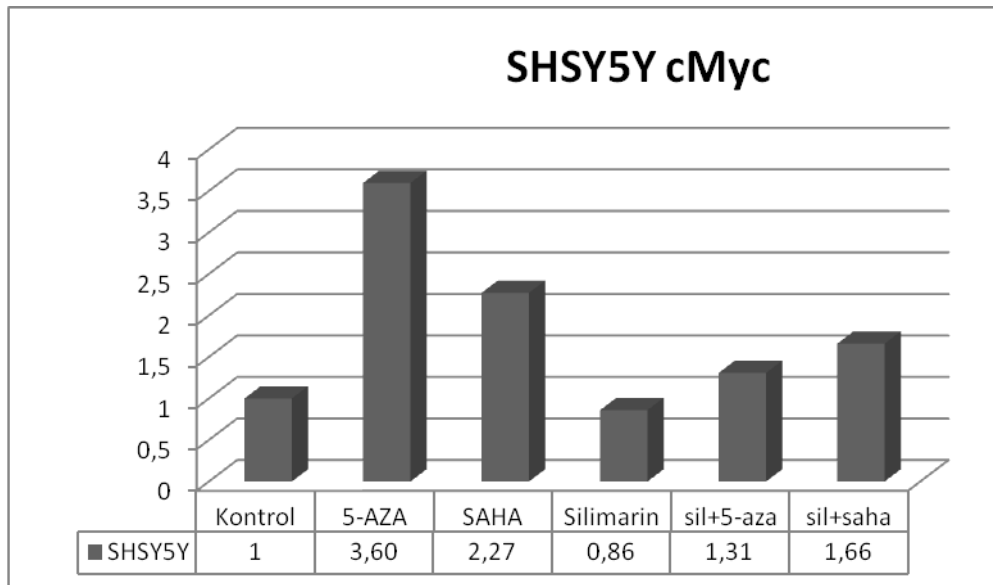
Grafik 6.11: SHSY5Y p53 Asetil 382 WB kat değişimi

SHSY5Y hücre hattında DNMT inhibitörü 5-azasitidin, HDAC inhibitörü SAHA, silimarin ve ajanların beraber uygulanmasıyla p53 asetil 382 protein düzeyleri belirlenmiştir. 5-azasitidin uygulanan grup kontrol grubuna göre 2,54 kat artış göstermiştir. Kontrol grubuna göre SAHA uygulaması protein düzeyini 1,34 kat artırmıştır. Silimarinin tek başına uygulanmasıyla protein düzeyi azalmıştır. 5-azasitidin+silimarin uygulaması ve SAHA+silimarin uygulaması protein düzeyini azaltmıştır (Grafik 6.11).



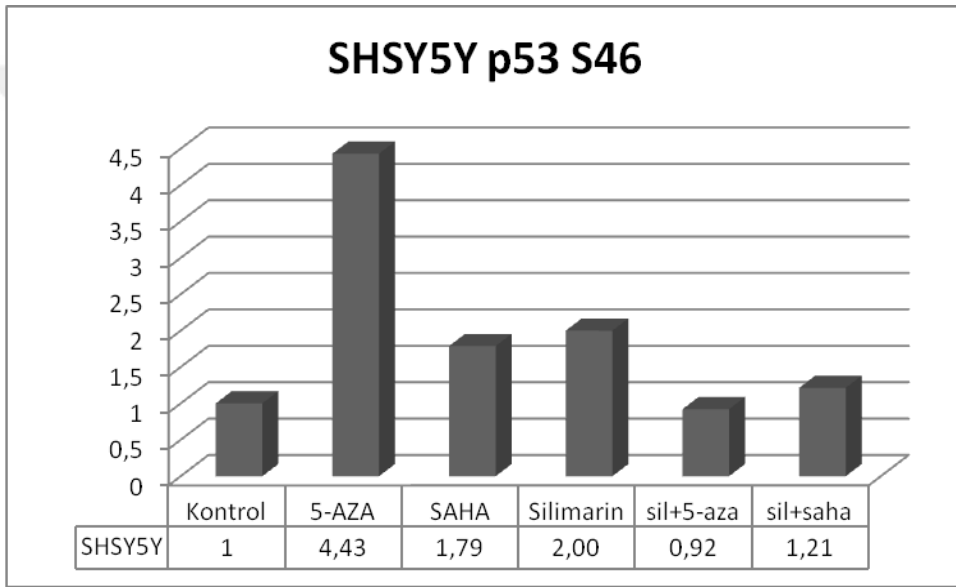
Grafik 6.12: SHSY5Y p53 Asetil 373 WB kat değişimi

SHSY5Y hücre hattında DNMT inhibitörü 5-azasitidin, HDAC inhibitörü SAHA, silimarin ve ajanların beraber uygulanmasıyla p53 asetil 373 protein düzeyleri belirlenmiştir. 5-azasitidin uygulaması protein düzeyini 3,59 kat artırmışken, SAHA uygulamasındaki artış 1,61 kattır. Silimarin tek başına uygulandığında protein düzeyi azalmıştır. Silimarin, 5-azasitidin ile birarada uygulandığında protein düzeyindeki artış 1,94 iken, SAHA ile birarada uygulandığında artış 1,16 olarak belirlenmiştir (Grafik 6.12).



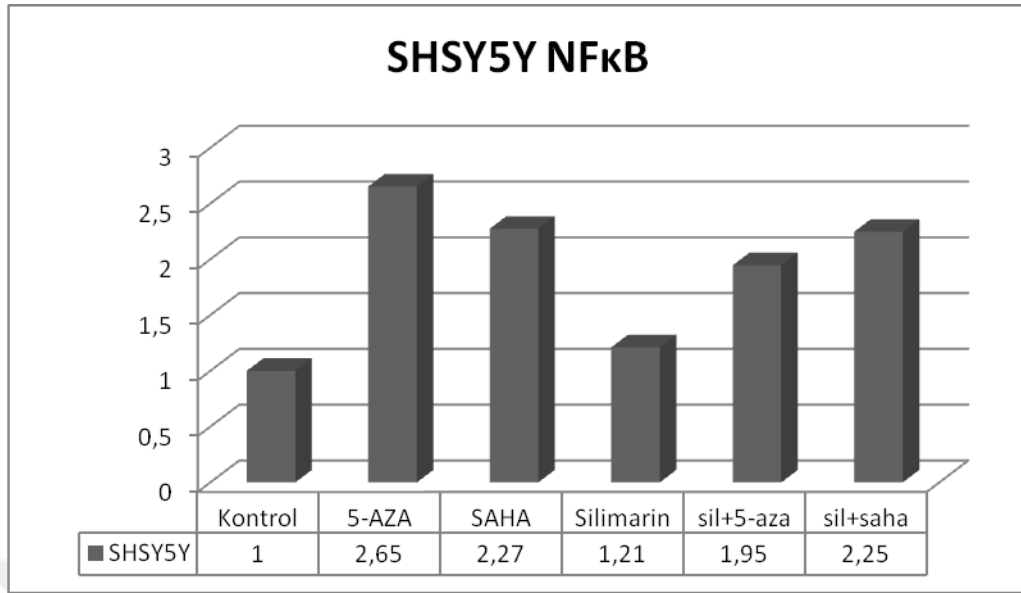
Grafik 6.13: SHSY5Y cMyc WB kat değişimi

SHSY5Y hücre hattında DNMT inhibitörü 5-azasitidin, HDAC inhibitörü SAHA, silimarin ve ajanların beraber uygulanmasıyla Myc protein düzeyleri belirlenmiştir. Tek başına 5-azasitidin uygulaması protein düzeyini 3,60 kat artırmıştır. 5-azasitidin, silimarin ile birarada uygulandığında artış 1,31 kattır. SAHA tek başına uygulandığında protein seviyesindeki artış 2,27 iken, silimarin ile beraber uygulandığında protein seviyesinde artış 1,66'dır. Silimarinin tek başına uygulanması Myc protein düzeyini azaltmıştır (Grafik 6.13).



Grafik 6.14: SHSY5Y p53 Fosfo 46 WB kat değişimi






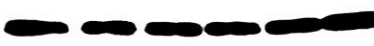
SHSY5Y hücre hattında DNMT inhibitörü 5-azasitidin, HDAC inhibitörü SAHA, silimarin ve ajanların beraber uygulanmasıyla p53 fosfo 46 protein düzeyleri belirlenmiştir. 5-azasitidin uygulaması protein düzeyini 4,43 kat artırmıştır. 5-azasitidin silimarin ile birlikte uygulandığında protein seviyesi azalmıştır. Tek başına SAHA uygulaması protein düzeyini 1,79 kat artırırken, silimarin ile birlikte uygulandığında artış 1,21'dir. Tek başına silimarin uygulaması protein düzeyini 2 kat artırmıştır. (Grafik 6.14).



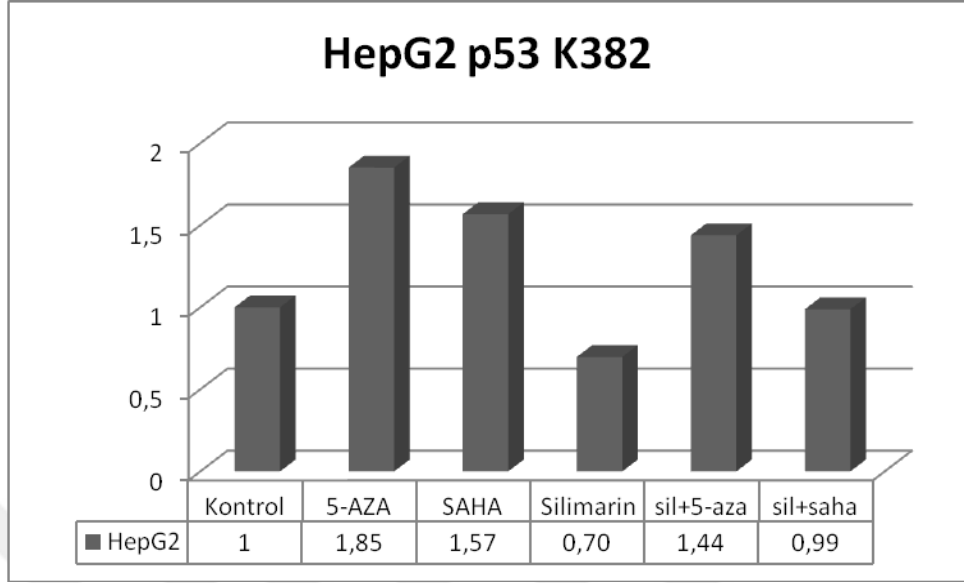
Grafik 6.15: SHSY5Y NFκB WB kat değışimi

SHSY5Y hücre hattında DNMT inhibitörü 5-azasitidin, HDAC inhibitörü SAHA, silimarin ve ajanların beraber uygulanmasıyla NFκB protein düzeyleri belirlenmiştir. 5-azasitidin tek başına uygulandığında protein seviyesindeki artış 2,65 kattır. SAHA tek başına uygulandığında kat artışı 2,27 ve silimarin tek başına uygulandığında kat artışı 1,21 olarak belirlenmiştir. 5-azasitidin silimarin ile birlikte uygulandığında 1,94 kat artış olurken, bu oran SAHA ile silimarin birarada uygulandığında 2,24'tür (Grafik 6.15).

Tablo 6.6: SHSY5Y WB bant görüntüleri

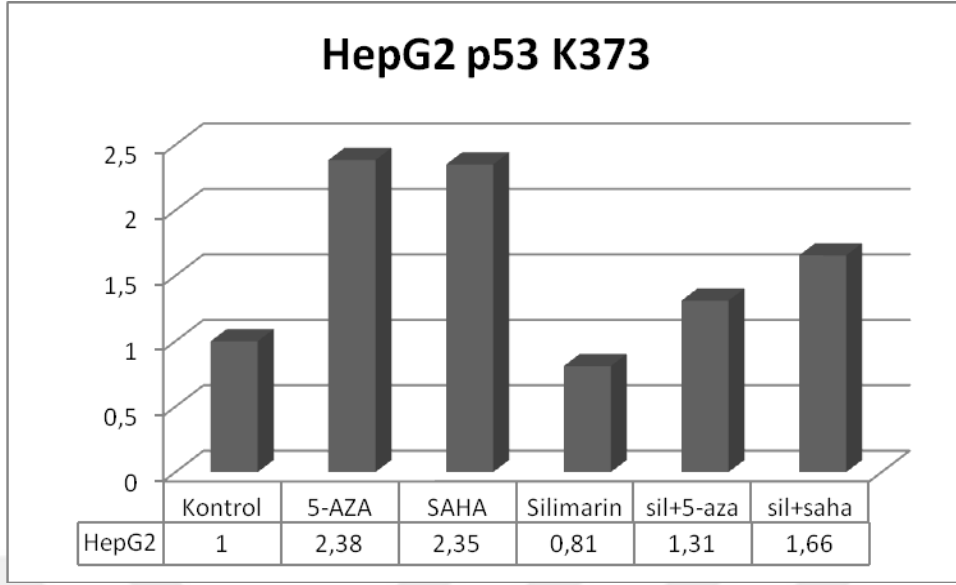
1	2	3	4	5	6	
						p53 K382
						p53 K373
						p53 S46
						cMyc
						NFkB
						Beta Actin
1.SAHA+Sil, 2.5-AZA+Sil, 3.SAHA, 4.5-AZA, 5.silimarin, 6.kontrol						Uygulama

HepG2 WB Sonuçları



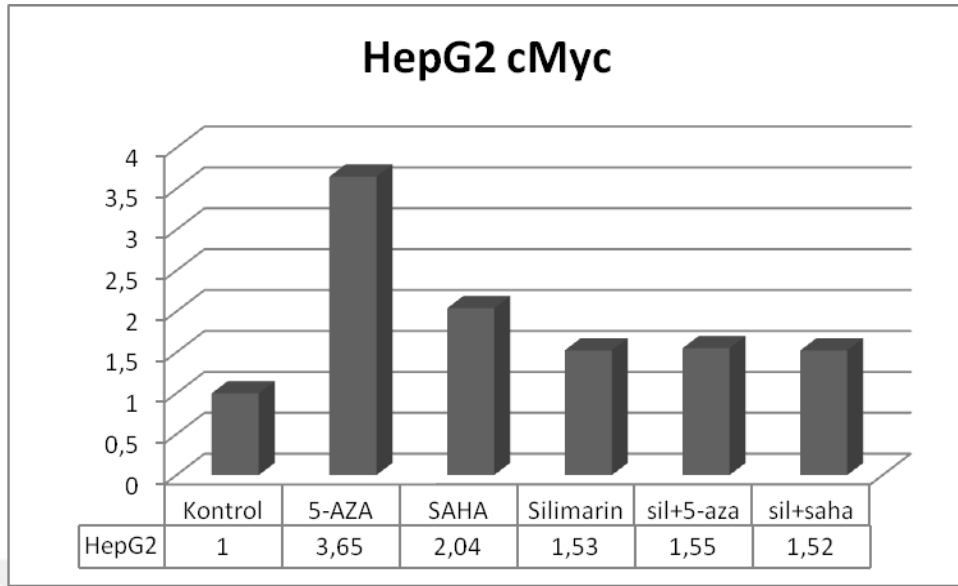
Grafik 6.16: HepG2 p53 Asetil 382 WB kat değişimi

HepG2 hücre hattında DNMT inhibitörü 5-azasitidin, HDAC inhibitörü SAHA, silimarin ve ajanların beraber uygulanmasıyla p53 Asetil 382 protein düzeyleri belirlenmiştir. Tek başına 5-azasitidin uygulaması p53 asetil 382 düzeyini 1,85 kat artırmıştır. Tek başına SAHA uygulaması protein düzeyini 1,56 kat artırmıştır. Silimarinin tek başına uygulanmasıyla protein düzeyi azalmıştır. DNMT inhibitörü silimarin ile birarada uygulandığında protein düzeyi 1,44 kat artarken, HDAC inhibitörü ile silimarin birarada uygulandığında protein düzeyi azalmıştır (Grafik 6.16).



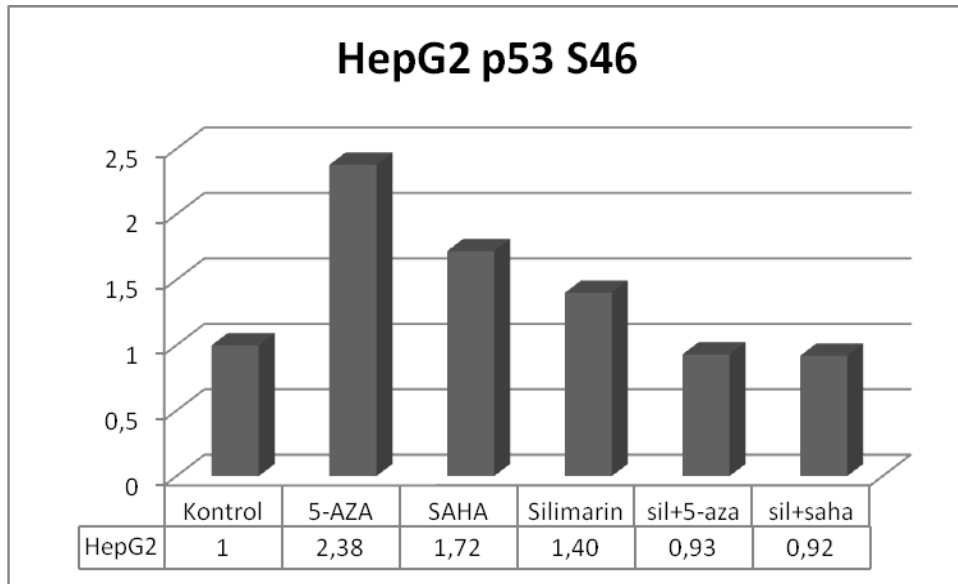
Grafik 6.17: HepG2 p53 Asetil 373 WB kat değişimi

HepG2 hücre hattında DNMT inhibitörü 5-azasitidin, HDAC inhibitörü SAHA, silimarin ve ajanların beraber uygulanmasıyla p53 Asetil 373 protein düzeyleri belirlenmiştir. 5-azasitidin uygulaması protein düzeyini 2,38 kat artırırken, silimarin ile beraber uygulandığında protein düzeyi 1,31 kat artmıştır. Tek başına SAHA uygulamasındaki kat artışı 2,35 iken, silimarin ile birlikte uygulandığında artış 1,66 kattır. Silimarin tek başına uygulandığında protein düzeyini azaltmıştır (Grafik 6.17).



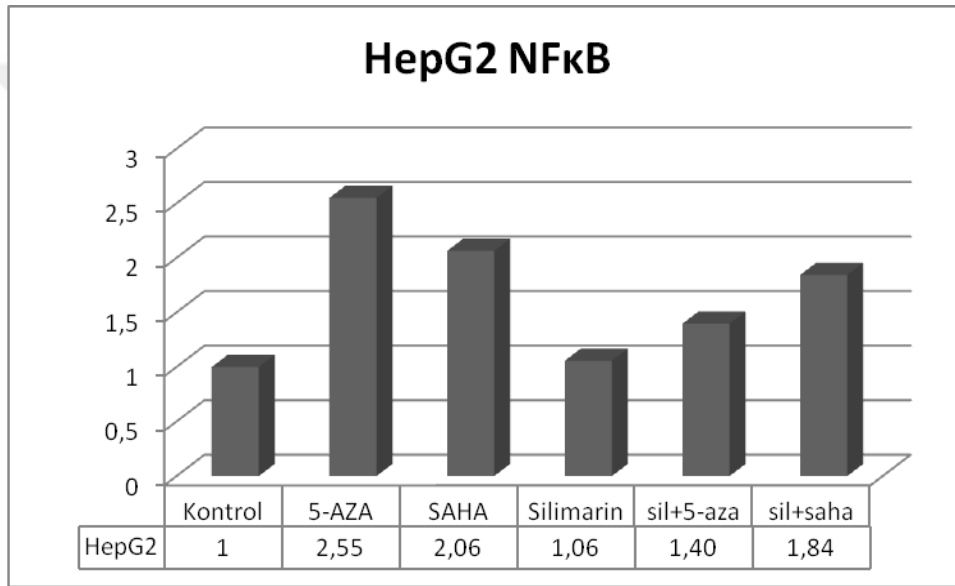
Grafik 6.18: HepG2 cMyc WB kat değişimi

HepG2 hücre hattında DNMT inhibitörü 5-azasitidin, HDAC inhibitörü SAHA, silimarin ve ajanların beraber uygulanmasıyla Myc protein düzeyleri belirlenmiştir. Tek başına 5-azasitidin uygulaması protein düzeyini 3,65 kat artırırken, tek başına SAHA uygulaması 2,04 kat artırmıştır. Tek başına silimarin uygulaması protein düzeyini 1,53 kat artırırken, 5-azasitidin ile birlikte uygulandığında artış 1,55'tir. SAHA ve silimarin birlikte uygulandığında protein düzeyi 1,52 kat artmıştır (Grafik 6.18).



Grafik 6.19: HepG2 p53 Fosfo 46 WB kat değişimi




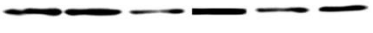


HepG2 hücre hattında DNMT inhibitörü 5-azasitidin, HDAC inhibitörü SAHA, silimarin ve ajanların beraber uygulanmasıyla p53 Fosfo 46 protein düzeyleri belirlenmiştir. 5-azasitidin uygulaması protein seviyesini 2,38 kat artırmıştır. SAHA uygulandığında protein düzeyi 1,72 kat artmıştır. Tek başına silimarin uygulaması protein düzeyini azaltırken, 5-azasitidin ile birlikte uygulandığında artış 1,4'tür. SAHA ile silimarin birlikte uygulandığında protein düzeyi azalmıştır (Grafik 6.19).



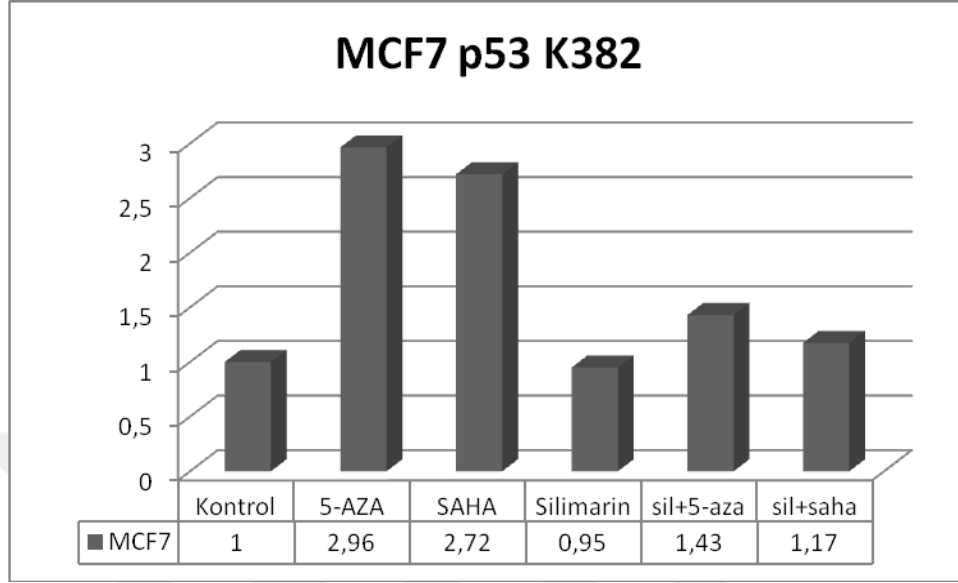
Grafik 6.20: HepG2 NFκB WB kat değişimi

HepG2 hücre hattında DNMT inhibitörü 5-azasitidin, HDAC inhibitörü SAHA, silimarin ve ajanların beraber uygulanmasıyla NFκB protein düzeyleri belirlenmiştir. 5-azasitidin tek başına uygulandığında protein seviyesi 2,55 kat artmıştır. Silimarin ile birlikte uygulandığında artış 1,39'dur. Tek başına SAHA uygulaması protein düzeyini 2,06 kat artırırken, silimarin ile birlikte uygulandığında artış 1,84'tür. Tek başına silimarin uygulaması protein düzeyini 1,06 kat artırmıştır (Grafik 6.20).

Tablo 6.7:HepG2 WB bant görüntüleri

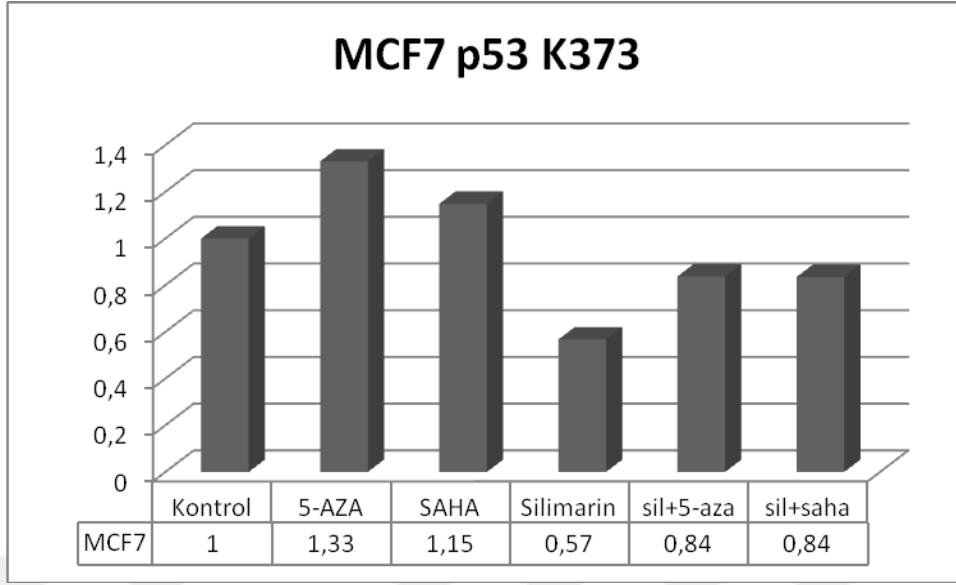
	1	2	3	4	5	6	
							p53 K382
							p53 K373
							p53 S46
							cMyc
							NFkB
							Beta Actin
	1.SAHA+Sil, 2.5-AZA+Sil, 3.SAHA, 4.5-AZA, 5.silimarin, 6.kontrol						Uygulama

MCF-7 WB Sonuçlar



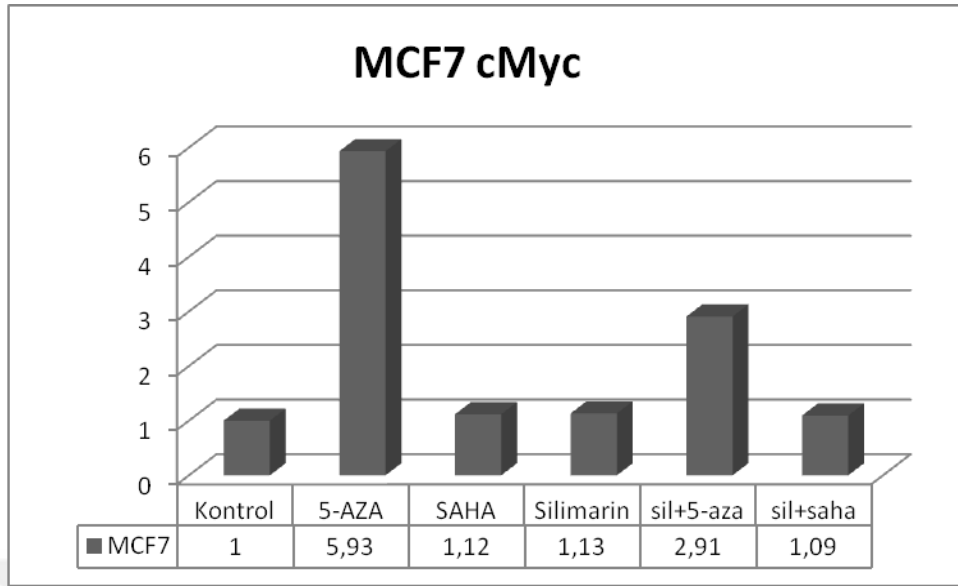
Grafik 6.21: MCF-7 p53 Asetil 382 WB kat değişimi

MCF-7 hücre hattında DNMT inhibitörü 5-azasitidin, HDAC inhibitörü SAHA, silimarin ve ajanların beraber uygulanmasıyla p53 Asetil 382 protein düzeyleri belirlenmiştir. 5-azasitidin uygulaması protein düzeyini 2,96 kat artırmıştır. SAHA uygulaması protein düzeyini 2,72 kat artırırken, silimarin uygulaması 1,43 kat artırmıştır. 5-azasitidin silimarin ile birlikte uygulandığında protein düzeyi azalmıştır. SAHA ile silimarin birlikte uygulandığında protein düzeyindeki artış 1,17 kattır (Grafik 6.21).



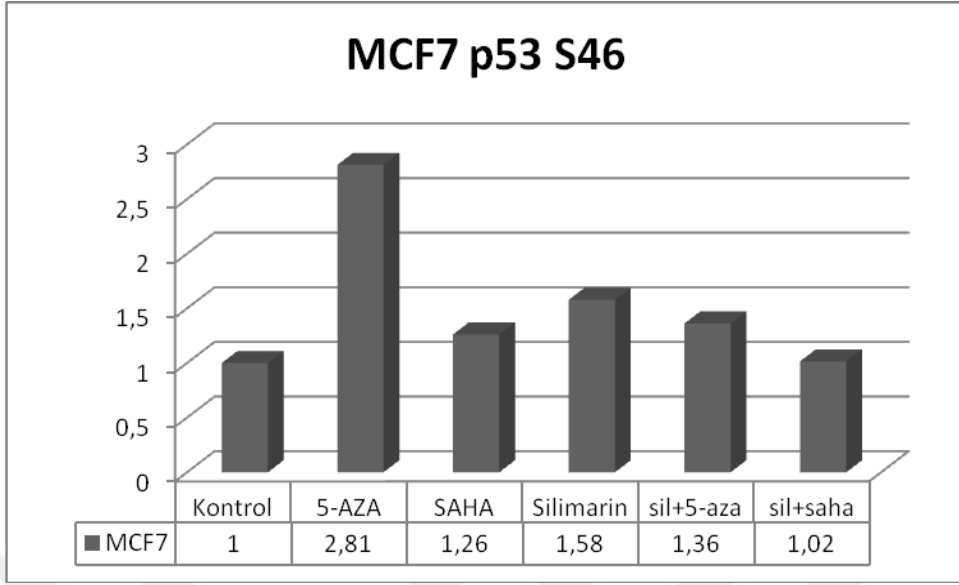
Grafik 6.22: MCF-7 p53 Asetil 373 WB kat değişimi

MCF-7 hücre hattında DNMT inhibitörü 5-azasitidin, HDAC inhibitörü SAHA, silimarin ve ajanların beraber uygulanmasıyla p53 Asetil 373 protein düzeyleri belirlenmiştir. Tek başına 5-azasitidin uygulaması protein düzeyini 1,33 kat artırırken, tek başına SAHA uygulaması 1,5 kat artırmıştır. Silimarinin tek başına, 5-azasitidin ile birlikte uygulanması ve SAHA ile birarada uygulanması protein düzeyini azaltmıştır (Grafik 6.22).



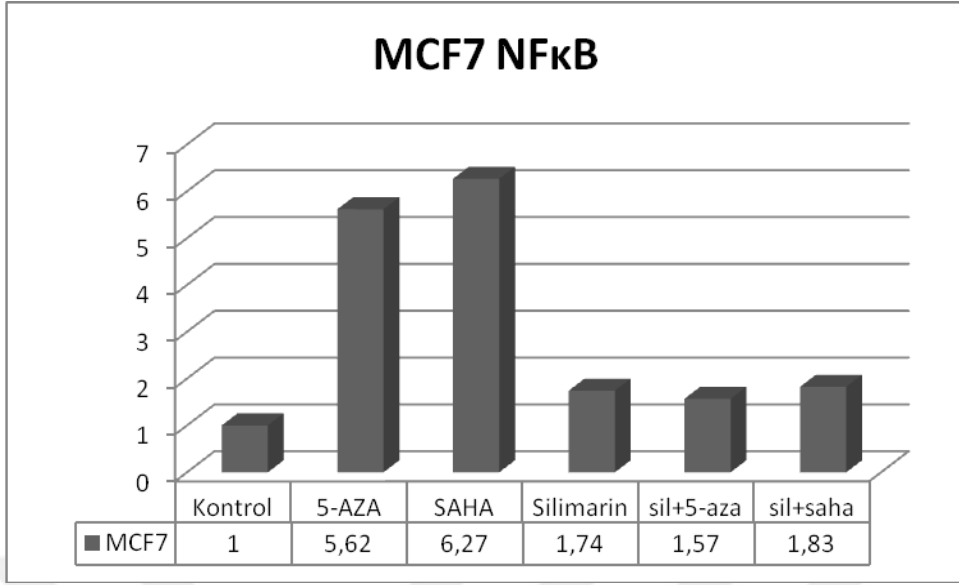
Grafik 6.23: MCF-7 cMyc WB kat değişimi

MCF-7 hücre hattında DNMT inhibitörü 5-azasitidin, HDAC inhibitörü SAHA, silimarin ve ajanların beraber uygulanmasıyla Myc protein düzeyleri belirlenmiştir. 5-azasitidin tek başına uygulanmasıyla protein düzeyi 5,93 kat artmıştır. SAHA'nın tek başına uygulanmasıyla protein düzeyi 1,12 kat artarken, silimarinin tek başına uygulanmasıyla meydana gelen artış 1,13 kattır. 5-azasitidin, silimarin ile beraber uygulandığında protein düzeyini 2,91 kat artırmıştır. SAHA, silimarin ile beraber uygulandığında protein düzeyi 1,09 kat artış göstermiştir (Grafik 6.23).



Grafik 6.24: MCF-7 p53 Fosfo 46 WB kat değişimi

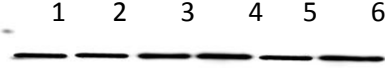

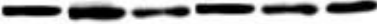



MCF-7 hücre hattında DNMT inhibitörü 5-azasitidin, HDAC inhibitörü SAHA, silimarin ve ajanların beraber uygulanmasıyla p53 Fosfo 46 protein düzeyleri belirlenmiştir. 5-azasitidin uygulaması tek başına protein düzeyini 2,81 kat artırmıştır. SAHA uygulaması tek başına protein düzeyini 1,26 kat artırırken, silimarin tek başına protein düzeyini 1,58 kat artırmıştır. 5-azasitidin ve silimarinin beraber uygulanmasıyla protein düzeyindeki artış 1,36 kat iken, SAHA ve silimarinin beraber uygulanmasıyla protein düzeyi 1,02 kat artmıştır (Grafik 6.24).



Grafik 6.25: MCF-7 NFκB WB kat değişimi

MCF-7 hücre hattında DNMT inhibitörü 5-azasitidin, HDAC inhibitörü SAHA, silimarin ve ajanların beraber uygulanmasıyla NFκB protein düzeyleri belirlenmiştir. 5-azasitidin uygulaması protein düzeyini 5,62 kat artırmıştır. SAHA uygulaması protein düzeyini 6,27 kat artırmıştır. Silimarin uygulaması protein düzeyini 1,74 kat artırmıştır. 5-azasitidin silimarin ile birlikte uygulandığında protein düzeyindeki artış 1,57 iken, SAHA ile silimarin birarada uygulandığında protein düzeyindeki artış 1,83 kat olarak belirlenmiştir (Grafik 6.25).

Tablo 6.8:MCF-7 WB bant görüntüleri

	p53 K382
	p53 K373
	p53 S46
	cMyc
	NFkB
	Beta Actin
1. SAHA+Sil, 2. 5-AZA+Sil, 3.SAHA, 4.5-AZA, 5. silimarin, 6. kontrol	Uygulama

7. TARTIŞMA

Son otuz yılda yapılan araştırmalar, meyve ve sebzeler yönünden zengin diyetlerin farklı kanser türlerine karşı koruyucu olabileceğini destekleyen kanıtlar sağlamıştır (50). Bitki kökenli birçok tıbbi bitki, farmakolojik etkilerinin geniş olmasından dolayı da büyük ilgi görmüştür. Bütün bu diyet ajanları ve tıbbi bitkiler kanser kemopreventif aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. Fitokimyasallar, kanser riskini ve toksisiteyi azaltarak kanser kemopreventif etkiler gösterebilirler (51).

Beslenme ve diyetin epigenetik mekanizmalarla etkileşim halinde olduğu gösterilmiştir ve son araştırmalar, hem miktar hem de nitelik olarak diyetin kanser insidansı ve prognozu ile bağlantılı olduğunu ortaya koymuştur. (52-54). “Epigenetik Diyet” terimi, kansere karşı koruyan epigenetik mekanizmaları uyardığı gösterilen soya, üzüm, kurisifer sebzeler ve yeşil çay gibi bazı yiyeceklerin tüketimini belirtmek için kullanılmaktadır. (55,56). Bu besin gruplarının normal bir diyet rejimine alınması, tıbbi ve kemopreventif amaçlar için etkili bir terapötik strateji olarak kabul edilebilir (57,58).

Silimarin, 2000 yıldan fazla bir süredir hepatit, siroz tedavisinde ve karaciğeri toksik maddelerden korumak için doğal bir ilaç olarak kullanılmaktadır (59). Silimarin, deneysel karaciğer hastalıklarında anti-oksidatif, anti-lipit peroksidatif, anti-fibrotik, anti-enflamatuvar, membran stabilize edici, immünomodülatör ve karaciğer yenileyici mekanizmalarla etki eder. Ayrıca silimarin, hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak, çeşitli kanserlere karşı kanser kemopreventif potansiyeli için kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Son yıllarda Avrupa ve Asya'da Legalon ve Silipid IdB1016 ticari formunda klinik olarak kullanılmaktadır (60).

Silimarinin antikarsinojen, antioksidan, antimetastatik, antianjiyogenik ve antiinflamatuvar etkileri gösterilmiş olmasına rağmen HDAC ve DNMT aktiviteleri gibi epigenetik mekanizmalara etkileri ile ilgili çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu yüzden bu çalışma ile silimarinin epigenetik yollar üzerindeki etkisini araştırmayı hedefledik. Bu kapsamda DNMT inhibitörü 5-azasitidin ve HDAC inhibitörü SAHA ile silimarinin birlikte kullanarak nöroblastom, hepatosellüler

karsinom ve meme kanseri hücreleri üzerindeki, DNMT ve HDAC enzim aktivite, p53, Myc ve NFκB protein seviyeleri üzerindeki etkilerini belirledik.

Histon asetilasyonun yeniden düzenlenmesiyle sessiz halde duran ancak anahtar düzenleyici rolü olan bazı tümör baskılayıcı veya onkoproteinler yeniden aktifleştirilebilir. Bu yolla tümör savunma mekanizması ya da tümör gelişimini destekleyen genlerin ifadenmesi aktive edilebilir (61). HDAC inhibitörlerinin tek başına kullanımını içeren tedavi rejimlerine ilişkin prelinik çalışmalar ümit verici olsa da, çoğu solid tümör tipleri (örneğin, yumurtalık, meme, böbrek, prostat ve baş boyun kanseri) için faz II klinik çalışmalarında beklenen fayda görülmemiştir (62). Bu yüzden birçok biyoaktif diyet bileşeninin sentetik HDAC inhibitörleri ile birlikte kullanılması, HDAC aktivitesinin doğrudan veya dolaylı inhibisyonu yoluyla kanserin önlenmesi ve tedavisinde ümit verici sonuçlar göstermiştir (63).

DNA metiltransferazlar gen ifadenmesinde, kromatin stabilitesi ve genetik baskılamada önemli bir rol oynar. DNMT inhibitörleri, susturulmuş genlerin aktifleştirilmesi, kanser hücresi proliferasyonunu durdurma ve apoptozu uyarma ile sonuçlanan epigenetik değişiklikleri tersine çevirebilmekte ve kanser tedavisi için kullanılmaktadır (64). Hedef gen transkripsiyonunun inhibisyonu nedeniyle, DNMT'ler kromozomal homeostazın korunmasında önemli bir rol oynar (65). Yapılan çalışmalar, optimum metilasyon inhibisyonunun düşük dozlarda meydana geldiğini göstermiştir. Son klinik araştırmalar, düşük dozlarda kullanılan inhibitörlerin daha etkili olduğunu ve daha az toksisite ile ilişkilendirildiğini doğrulamıştır. Devam eden klinik deneyler, düşük dozda DNMT inhibitörlerinin, melanom, meme kanseri, kolon ve mesane kanserleri dahil olmak üzere solid tümörlerin tedavisi için kullanımını araştırmaktadır. DNA metiltransferaz inhibitörleri çeşitli fitokimyasallar ile birleştirilerek tümör hücre büyümesi inhibisyonunda sinerjistik etki gösterebilmektedir (65). Her iki ajanı da solid tümörlerin tedavisi için birleştirmek avantajlı olabilir, çünkü solid tümörlerde DNMT inhibitörleri ile tedavi tek başına bugüne kadar başarılı olamamıştır. Literatürde fitokimyasalların DNMT enzim aktivitesi üzerine sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Epigenetik diyet ajanlarının HDAC ve DNMT inhibisyonu üzerine olan etkileri bağlı olduğu fitokimyasal grubuna göre farklılık göstermektedir. Brokolide bulunan sülforofan bir izotiyosiyanattır. Yapılan çalışmada sülforofanın HDAC inhibitörü olarak etki ettiği, kanser hücrelerinde HDAC protein ifadenmesini azalttığı gösterilmiştir (66,67). Buna ek olarak sülforofanın özellikle DNMT1 ve DNMT3A'da inhibitör olarak ikili bir role sahip olduğu da gösterilmiştir (68).

Yeşil çayın aktif bileşeni olan epigallocatechin gallat (EGCG) bir polifenol olup DNMT üzerinde inhibitör etkiye sahiptir (69). EGCG *in vitro* koşullarda, özefagus kanseri hücrelerinde DNMT aktivitesini düşürdüğünü ve p16, RARB, MLH1 ve MGMT de dahil olmak üzere tümör baskılayıcı genlerin metilasyonlarını kaldırdığı ortaya koymuştur (70). EGCG'nin HDAC aktivitesi bulunmamaktadır (71).

Genistein, öncelikle soya fasulyesinde bulunan bir izoflavonlardır. (71). Fang ve ark. (72), özefagus karsinom hücrelerinin genistein ile muamelesinin, kısmi bir DNA hipermetilasyonu ve p16, RARB ve MGMT aktivitelerinde artış ile sonuçlandığını göstermiştir. Qin ve ark. (73), genistein dahil günlük doz izoflavon alan kadınların, kanserle ilişkili genler RARB ve CCND2'nin artan hipermetilasyonunu gösterdiğini bildirmiştir. Ayrıca genistein MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde DNA metiltransferaz (DNMT) aktivitesini inhibe etmektedir (74).

Resveratrol, antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-kanser özellikleri gösteren bir stilben polifenoldür (75, 76). Resveratrol, DNMT inhibisyonunda EGCG kadar güçlü olmamasına rağmen, BRCA1 gibi bazı tümör baskılayıcıların susturulmasını önleyebilir (77). Bununla birlikte, resveratrolün en önemli özelliklerinden biri, bilinen bir HDAC inhibitörü olan SIRT1'in bir aktivatörü olarak hareket etme kabiliyeti olabilir (78).

Quercetin, meyve ve sebzelerde bulunan flavonoiddir. Antioksidan görevi görür ve detoksifikasyon, inflamasyon, proliferasyon, apoptoz, anjiyogenez, otofaji, immün savunma ve yaşlanmaya dahil olan enzimleri ve sinyal yollarını uyarır (79). Kolon, meme, cilt ve akciğer kanseri için kemirgen modelinde kanser önleyici etkisi gösterilmiştir (80). Çalışmalara göre quercetin oksidatif stres ve inflamasyon belirteçlerini azaltırken *in vitro* olarak DNMT aktivitesini inhibe eder (81).

Silimarinin kompleks bir karışımdır. En aktif bileşeni olan silibinin HDAC inhibitörü ile birlikte uygulandığında, çeşitli kanser hücrelerinde büyüme önleyici etkisi olduğu gösterilmiştir (82,83). Silibininin DNA metiltransferaz aktivitesinde artışa neden olurken HDAC aktivitesini baskıladığı gösterilmiştir (84,85).

Çalışmamızın sonuçlarına göre silimarin HDAC inhibitörü SAHA ile birlikte uygulandığında inhibitörün etkinliğini değiştirmezken DNMT inhibitörü 5-AZA ile birlikte uygulanmasının, her üç hücre dizisinde DNMT aktivitesini spesifik ajanın tek başına uygulanmasından daha anlamlı bir şekilde inhibe etmektedir.

Sonuçları yayımlanan çalışmalarda silimarinin bu iki ajanla birlikte etkinliğini değerlendiren bir çalışmaya ilişkin veriye rastlanmamıştır. Kanser tedavileri için bir umut olan silimarinin yukarıda örnekleri verilen epigenetik diyet ajanlarından farklı bir davranış kalıbı gösterdiğini gözlemledik. Silimarin *in vitro* koşullarda sadece DNMT inhibitörünün etkinliğini artırırken HDAC inhibitörünün etkinliğini değiştirmez ya da azaltmaktadır.

Buradan hareketle silimarinin DNMT inhibisyonuna dayalı epigenetik tedavilerde destekleyici bir ajan olarak kullanılabilmesine ilişkin ilk *in vitro* verileri elde ettik. DNMT inhibitörüne olan katkısı daha detaylı olarak incelendiğinde silimarinin nöroblastom hücre dizisinde en çok etkiye sahip olduğu görülmektedir. DNMT inhibisyonu açısından ikinci en etkili olduğu hücre dizisi MCF7 meme kanseri hücreleridir. Bu hücre hattı ER (+) olup aslında çoğu tedaviye oldukça iyi cevap vermektedir. Bu yüzden silimarinin etkinliğinde uygulama yapılan hücrenin reseptör ifadenme profili göz önüne alınmalıdır. Silimarinin DNMT inhibitörüne en az katkı sunduğu hücre hepatosellüler karsinoma hücreleri olup orijin olarak metabolik aktivitesi yüksek karaciğer hücrelerinin malign formlarıdır. Bu yüzden bu hücreler kimyasalların detoksifikasyonunda asıl görevli hücrelerdir. Bu hücreler açısından elde ettiğimiz aktivite düşüklüğünü hücrelerin yüksek metabolik aktivitesine, silimarinin yüksek IC₅₀ dozuna ve uygulanan kimyasalın etki gösterememesine bağlıyoruz. Enzim aktiviteleri açısından üç hücre dizisinde elde ettiğimiz farklı sonuçların hücrelerin histolojik orijini, metabolik ve fizyolojik işlevlerine, gen ifadenme profillerine atfedilebileceğini düşünüyoruz.

Çalışmamızın ikinci basamağında epigenetiği etkileyen enzim aktivitelere ek olarak silimarinin hücrel sinyal yollarının ana kavşağında yer alan p53, cMyc ve NF-κB protein miktarları üzerine olan etkinliklerini değerlendirdik.

p53 işlevi asetilasyon, metilasyon, ubiquitinasyon, sumolizasyon gibi spesifik transasyon sonrası modifikasyonlar tarafından düzenlenir (86). Posttranslasyonel modifikasyonlar (PTM) p53 stabilitesini, konformasyonu, lokalizasyonu ve protein konformasyonel değişiklikleri etkiler. PTM ile ilişkili yolların bozukluğu, özellikle kanserler olmak üzere, p53 ile ilişkili hastalıkların ana nedenleri arasındadır (87). Hücrel stres durumunda p53, Ser-15, Ser-20 ve bu çalışmada da değerlendirdiğimiz **Ser-46'dan** fosforile edilir (88). Spesifik aminoasit rezidülerinde fosforilasyonun, p53'ün transkripsiyonel aktivitesini ve / veya farklı gen alt kümesine yönelik seçiciliğini etkileyebilir ve böylece strese spesifik hücrel yanıt tipini belirleyebilir. Ser46 fosforilasyonu, p53'e bağlı apoptotik cevabın uyarılmasında rol oynar. p53 fosforilasyonu, hem stabilizasyonunda hem de transkripsiyonel aktivitesinin düzenlemesinde önemli bir rol oynayabilir (89).

DNA hasar stresi yeterince güçlü ise, p53'teki S46, p53 aracılı apoptozu uyararak için fosforile edilir. S46'nın fosforilasyonu PUMA, NOXA, BAX ve PIG3 gibi p53 aracılı apoptozla ilgili genleri uyararak ve BCL-2 gibi genlerin transkripsiyonel olarak baskılanmasını sağlamak için gereklidir (90,91).

Yaban tip p53, hedef genlerin promotör bölgelerine bağlanır ve ko-aktivatörler veya korepresörler yoluyla histonlar H3 ve H4'ün asetilasyonunu değiştirir (92). Bu epigenetik değişiklikler nedeniyle, gen ifadenmesinde bir azalma görülür (93). p53 asetilasyonunun, transkripsiyonel aktivite için gerekli olduğu ve deasetilasyonun, p53'ü fonksiyonel olarak aktif olmayan bir durumda tutmak için çok önemli olduğu anlaşılmaktadır. Asetilasyonun kendisi p53 aktivitesini düzenlemektedir(94-96).

Resveratrol MCF-7 hücrelerinin bir yüzey integrinini kullanarak ERK1/2 yolağını uyarır. Bu uyarı ve S15 ve S20'de p53 fosforilasyonuna neden olarak, apoptozu başlatır (97). Benzer şekilde insan lenfoblastoid hücre dizileri C3ABR ve AT1ABR'de genisteinin (S6, S9, S15, S20, S46, S392) ve quercetin (S15, S20)

p53 fosforilasyonunda artışa neden olduğu bildirilmiştir ancak bu etki biochanin A ve daidzeinde görülmemiştir (98).

Katiyar ve ark. tarafından silimarinin preneoplastik epidermal keratinosit hücre hattı JB6 C141 hücrelerinde p53 ifadenmesini ve p53 S46 fosforilasyonunu artırdığı bildirilmiştir (99,100).

Bizim çalışmamızda her üç hücre hattında da silimarinin DNMT inhibitörü 5-AZA ve HDAC inhibitörü SAHA ile birlikte uygulanmasıyla, p53 S46 seviyesinin spesifik inhibitörün tek başına uygulanmasına göre anlamlı şekilde artırdığını belirledik. Yukarıda örnekleri verilen epigenetik diyet ajanlarının da benzer şekilde silimarin p53 S46 seviyesini artırmaktadır.

Bir diğer p53 PTM'ü asetilasyon olup, DNA hasarına ve genotoksik strese cevap olarak ortaya çıkar. p53'ün asetilasyonu normalde kapalı olan konformasyonunu açarak veya gen hedeflerinde belirli cevap elementlerine bağlanmasını değiştirerek transkripsiyonel aktivitesini doğrudan etkiler (101). p53'deki sekiz ana asetilasyon bölgesinin (K120, 164, 370, 372, **373**, 381, **382**, 386) birleşik kaybı p53'ü transkripsiyonel olarak etkisiz hale getirir ve hücre döngüsü durması/apoptozun uyarılmasını önler. Bunun tersine, birçok hücre tipinde asetil gruplarını p53'ten uzaklaştıran HDAC'ların inhibisyonu, p53 asetilasyonunun, apoptozun ve yaşlanmanın p53'e bağlı aktivasyonunun artmasına neden olur. Bu bulgular asetilasyonun p53'ün anti-kanser fonksiyonlarının önemli bir düzenleyicisi olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalar SAHA'nın p53'ü aktif hale getirdiğini, ancak anti-kanser etkisinin uyarılması için p53 gerekmediğini göstermektedir. Bu aktivasyon p53 protein seviyelerindeki bir artıştan değil, nükleer aktif formu stabilize ettiği düşünülen hiperasetilasyondan kaynaklanmaktadır (102).

Resveratrolün, meme kanseri hücre dizileri MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine uygulandığında HDAC ve HAT inhibisyonuna neden olduğu (103) ve p53 (K370, K379, K383) asetilasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (104).

Bizim çalışmamızda her üç hücre hattında da silimarinin DNMT inhibitörü 5-AZA ve HDAC inhibitörü SAHA ile birlikte uygulanmasıyla, p53 K382, p53 K373 protein seviyelerinin spesifik inhibitörün tek başına uygulanmasına göre anlamlı şekilde

azaltmaktadır. Bu etki yukarıda örnekleri verilen epigenetik diyet ajanlarına benzerdir ve silimarinin antikanser potansiyelini göstermesi açısından önemlidir. Deneysel düzeneğimizde epigenetik inhibitörler ile silimarinin birlikte uygulandığı koşullarda kimyasal olarak modifiye edilmiş p53 seviyeleri değerlendirilmiştir. p53 seviyeleri açısından literatürde sonuçları yayımlanmış çalışmalara benzer veriler elde etmiş olmamıza rağmen silimarinin HDAC inhibitörü ile antagonist olarak yorumlanabilecek etkiye sahip olması p53 üzerine etkisinde farklı mekanizmaların rol oynayabileceği fikrini doğurmuştur. En azından sadece HDAC inhibisyonuna bağlı deneysel çalışmalarda silimarinin etkinliğinin tekrar değerlendirilmesi gerektiğini düşünüyoruz.

Diğer açıdan silimarin her üç hücre dizisine de tek başına uygulandığında p53 K382, p53 K373 protein seviyeleri baskılarken, p53 S46 protein seviyesi artırmaktadır. Buradan silimarinin p53 üzerine etkinliğinin epigenetik düzenleyiciler dışı yollarla olabileceği de düşünülmelidir. Bu konuda yapılacak daha detaylı moleküler çalışmalar bu paradigmanın çözümüne katkı sunacaktır.

Myc'in onkogenliği, hücre büyümesi ve çoğalması için gerekli olan genlerin ifadenmesini düzenleme kabiliyetinden kaynaklanmaktadır. c-Myc'in aşırı ifadenmesi, hipoksi, DNA hasarı, glikoz yoksunluğu ve anti-kanser ajanları gibi çeşitli faktörlere cevap olarak bildirilmiştir. Protoonkogen Myc'in temel ifadesinin, onkogenik aktivasyona yol açması ve çeşitli tümörlerin ilerlemesine katkıda bulunması olarak bildirilmiştir. Myc'nin antioksidanlar tarafından baskılanması, kanser için ümit verici bir farmakolojik tedavi olarak önerilmiştir (105).

Silimarinin, β -katenin birikimini ve dolayısıyla siklin D1 ve Myc için hedef genlerini inhibe ederek hepatoselüler karsinom HepG2 hücrelerinin çoğalmasını baskıladığı ve bu nedenle bunun antiproliferatif etkisinin altta yatan mekanizması olduğu sonucuna varılabilmektedir. Aynı zamanda kemoterapiye bağlı sitotoksitenin giderilme sürecinde c-Myc gen ifadenmesini azalttığı yapılan çalışmalar ile bildirilmiştir (106).

Kanserleşme sürecinde c-Myc'in amplifikasyonu görülür (107). Bu amplifikasyon sonrasında c-Myc aşırı ifadenmesi de aktivitesinin düzenlenmesi temel moleküler

mekanizmadır. Çalışmamızda kullandığımız her iki inhibitör de beklenmedik etkileri sebebiyle belirli kanser tipleri dışında tedavide halen tek başlarına kullanılmamaktadır. Bu yüzden inhibitör uygulamasına bağlı protein düzeylerindeki artış, aktivitenin de artacağı anlamına gelmeyebilir. Ancak yine de elde ettiğimiz sonuçların tekrarlayan deneysel düzeneklerle doğrulanması gerekmektedir.

NFκB kanserde sık sık artan ve hücre ölümünü engelleyen önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Yüksek riskli miyeloblastik sendrom ve akut miyeloid lösemide NFκB inhibitörü BAY11-7082 ile konvansiyonel kemoterapötik ajan 5-azasitidin birlikte uygulanması sinerjistik bir sitotoksosite sağlamazken, tek başına 5-azasitidin uygulanması NFκB aktivitesinde artış meydana getirmiştir. HDAC aktivitesinin Trikostanin A ile inhibisyonunun NFκB ifadeleneğinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (108).

Cooks ve ark., intestinal hücrelerde *in vivo* mutant p53 ile TNF-α'nın neden olduğu NFκB aktivasyonunu bildirmiştir. Ek olarak, mutant p53 birikimi, artırılmış NFκB aktivasyonu ile inflamasyonlu hücrelerin invaziv karsinomlara ilerlemesi arasında bir etki belirlenmiştir (109).

Genisteinin östrojen ve androjen reseptörü pozitif ve negatif meme ve prostat kanserlerinin büyümesini engellediği ve hücre sağkalımı için önemli olan NFκB ve Akt sinyal yollarının güçlü bir inhibitörü olduğu gösterilmiştir. Genisteinin NFκB'nin düzenlenmesi yoluyla kemoterapötik ajanların antitümör aktivitesini artırdığı bulunmuştur (110).

Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada meme kanseri MCF-7 hücrelerine kurkimin uygulandığında, kurkiminin NFκB sinyal yolunu düzenleyerek MCF-7 hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve hücreleri apoptoza yönlendirdiği bildirilmiştir (111).

Silimarinin anti-enflamatuar etkileri, enflamasyon, hücre hayatta kalması, farklılaşması ve büyümesinde rol oynayan çeşitli genlerin ifadeleneğini düzenleyen ve koordine eden transkripsiyon faktörü nükleer NFκB inhibisyonu ile ilgilidir. Özellikle, NFκB, interlökin (IL) -1 ve -6, TNF-α, lenfotoksin, granülosit

makrofaj üretimine katkıda bulunur. Çalışmalar, silimarinin NFκB aktivasyonunun güçlü bir inhibitörü olduğunu göstermiştir. Bu etkiye fosforilasyonun inhibisyonu ve İκB'nin bozulması yoluyla aracılık edilmiştir (112).

Agarwal ve ark. tarafından yapılan çalışmada silimarin uygulanan MCF-7 hücrelerinde proliferasyon etkisinin azaldığı ve büyümeyi inhibe ettiği gösterilmiştir. Silimarin uygulandığında meme kanseri hücrelerinde cMyc ve NFκB seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir (113).

Silimarin, insan prostat karsinom hücre dizisi DU145 hücrelerinde NFκB p65 ve p50 seviyelerini azaltarak, NFκB' nin aktivasyonunu inhibe etmektedir (114).

Prostat kanserinde silimarin tedavisi androjen reseptörünü, epidermal büyüme faktörü reseptörünü ve NFκB aracılı sinyalleme düşürür ve hücre döngüsü durmasını tetikler. Preklinik bulgular, silimarinin antikanser potansiyelini desteklemektedir (115).

Silimarin insan prostat karsinom hücrelerinde hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz ERK1/2 aktivasyonunu inhibe ederek, antiproliferatif bir etki göstermektedir. Anti-apoptotik transkripsiyon faktörü NFκB'nin HDAC aktivitesinin inhibe edilmesinin ardından up-regüle edildiği gösterilmiştir (116). Deasetilaz aktivitesinin kaybı ile birlikte NFκB aktivitesinde artış meydana gelmektedir. Bu artış, hücreleri HDAC inhibitörlerinin pro-apoptotik potansiyelinden korumaktadır (117). Sonuçlarımızla uyumlu olarak histon deasetilaz inhibitörü uygulanan üç hücre hattında da NFκB protein seviyesinde artış görülmüştür.

Bizim çalışmamızda da yukarıda örnekleri verilen çalışmalara benzer şekilde inhibitörler NFκB seviyelerini kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır. Ancak silimarin ile birlikte uygulandığında bu etkinlik azalmaktadır. Silimarinin çoklu bir kimyasal karışım olduğu göz önüne alındığında her bir inhibitör için hücresel hedeflerde farklı davranışlar sergilemesinin şaşırtıcı olmayacağını düşünüyoruz.

Çalışmamız silimarinin epigenetik yollara olan etkisi ile ilgili yapılan ender çalışmalardandır. Çalışmamızda birlikte uygulamaların yanısıra silimarinin tek

başına uygulanmasıyla DNMT enzim aktivitesinde DNMT inhibitörü 5-azasitidinden daha fazla inhibisyona neden olduğunu tespit ettik. Silimarinin HDAC enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin olmadığını belirledik. Ayrıca yine tek başına uygulamaların protein seviyeleri üzerine olan etkilerini değerlendirdik. Silimarinin tek başına uygulanmasıyla p53 asetilasyonunu baskıladığı ve p53 fosforilasyonunu artırdığını belirledik. Ayrıca silimarinin cMyc ve NFκB protein seviyelerini inhibitörlere göre daha fazla azalttığını gösterdik. Bu çalışma ile elde edilen verilerin yapılacak daha ileri çalışmalara ışık tutacağını ve silimarin gibi fitokimyasalların antikanser ajanların etkinliğinin artırılmasına yönelik çalışmalara ışık tutabileceğini düşünmekteyiz.



8. SONUÇ ve ÖNERİLER

1- Silimarin nöroblastom hücrelerinde DNMT inhibitörünün etkinliğini artırmaktadır. SHSY5Y hücrelerinde en fazla inhibisyon tek başına silimarin uygulamasında görülmüştür. Hepatosellüler karsinom ve meme kanseri hücrelerinde ise 5-azasitidin ve silimarinin birlikte uygulanmasıyla inhibitörün tek başına yaptığı inhibisyondan daha fazla etki göstermiştir.

2- Silimarinin HDAC enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi yoktur.

3- Silimarin p53 asetilasyonunu inhibe ederken, p53 fosforilasyonunu artırmıştır.

4- Silimarin cMyc protein seviyesini azaltmıştır.

5- Silimarin NFκB protein seviyesini azaltmıştır.

Silimarin, enzim aktiviteleri açısından karşılaştırıldığında DNMT üzerinde güçlü bir inhibisyon etki göstermiştir. Ancak bu etki HDAC üzerinde tespit edilmemiştir. Nöroblastom ve benzeri histolojik orijini olan malignitelerde silimarin etkinliği daha detaylı olarak değerlendirilmelidir. Protein düzeyindeki değişimler literatürle uyumlu bulunmuştur. Silimarinin potansiyel bir DNMT inhibitörü olarak kullanılabilmesi için ileri düzey moleküler çalışmaların yapılmasını ve elde ettiğimiz verilerin ileri çalışmalara ışık tutabileceğini düşünmekteyiz.

9. KAYNAKLAR

- 1- Topcul M, Cetin I. Endpoint of cancer treatment: Targeted therapies. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(11): 4395-4403, 2014.
- 2- Martin-Subero J, Esteller M. Epigenetic mechanisms in cancer development. *The molecular basis of human cancer* 263-275, 2016.
- 3- Dupont C, Armont DR, Brenner CA. Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. *Semin Reprod Med* 27(5): 351-357, 2009.
- 4- Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology Reviews* 38: 23-38, 2013.
- 5- Alokail MS, Alenad AM. DNA Methylation. A concise review of molecular pathology of breast cancer, 2015.
- 6- Kim JK, Samaranyake M, Pradhan S. Epigenetic mechanisms in mammals. 66: 596-612, 2009.
- 7- MacAlpine DM, Almouzni G. Chromatin and DNA Replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013.
- 8- Putiri EL, Robertson KD. Epigenetic mechanisms and genome stability. *Clin Epigenet.* 2: 299-314, 2011.
- 9- Kanwal R, Gupta S. Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet* 81: 303-311, 2012.
- 10- Kelly TK, Carvalho DD, Jones PA. Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nature Biotechnology* 28 (10), 2010.
- 11- Hull EE, Montgomery MR, Levya KJ. HDAC inhibitors as epigenetic regulators of the immune system: impacts on cancer therapy and inflammatory diseases. *BioMed Research International*, 2016.
- 12- LeRoy G et al. A quantitative atlas of histone modifications signatures from human cancer cells. *Epigenetics and Chromatin* 6:20, 2013.
- 13- Mottamal M, Zheng S, Huang T, Wang G. Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. *Molecules* 3898-3941, 2015.
- 14- Mueller S, Yang X, Sottero T, Gragg A, Prasad A, Polley M, Weiss W, Matthoy K, Davidoff A, DuBois S, Haas-Kaga D. Cooperation of the HDAC inhibitor vorinostat and radiation in metastatic neuroblastoma: Efficacy and underlying mechanisms. *Cancer Lett* 306 (2): 223-229, 2011.
- 15- Gupta SC, Kim JH, Prasad S, Aggarwal B. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer Metastasis Rev* 29(3): 405-434, 2010.

- 16- Gonzales-Recio O, Toro MA, Bach A. Past, present, and future of epigenetics applied to livestock breeding. *Frontiers in Genetics*, 2015.
- 17- Dupont C, Armont DR, Brenner CA. Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. *Semin Reprod Med* 27(5): 351-357, 2009
- 18- Gabay M, Li Y, Felsher DW. MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4(6), 2014.
- 19- Allis CD, Caparros ML, Jenuwein T, Reinberg D. Epigenetics. Second Edition, Cold Spring Harbour, New York, 2015.
- 20- Ayissi VB, Ebrahimi A, Schluesener H. Epigenetic effects of natural polyphenols: a focus on SIRT1-mediated mechanisms. *Mol Nutr Food Res* 58: 22-32, 2014.
- 21- Kaur J, Daoud A, Eblan ST. Targeting Chromatin Remodeling for Cancer Therapy. *Current Molecular Pharmacology*.
- 22- Pistrutto G, Triscivoglia D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging* 8(4): 603-619, 2016.
- 23- Min C, Moore N, Shearson JR, Quayle SN, Huang P, Van Duzer JH, Jarpe MB, Jones SS, Yang M. Selective Inhibitors of Histone Deacetylases 1 and 2 Synergize with Azacitidine in Acute Myeloid Leukemia. *PLoS One*, 6(12), 2017.
- 24- Miles MA, Harris MA, Hawkins CJ. Proteasome inhibitors trigger mutations via activation of caspases and CAD, but mutagenesis provoked by the HDAC inhibitors vorinostat and romidepsin is caspase/CAD-independent. *Apoptosis*, 1-10, 2019.
- 25- Singh T, Prasad R, Katiyar SK. Therapeutic intervention of silymarin on the migration of non-small cell lung cancer cells is associated with the axis of multiple molecular targets including class 1 HDACs, ZEB1 expression, and restoration of miR-203 and E-cadherin expression. *Am J Cancer Res* 6 (6): 1287-1301, 2016.
- 26- Khan O, Thangue NB. HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. *Immunology and Cell Biology* 90:85-94, 2012.
- 27- West AC, Johnstone RW. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *The Journal of Clinical Investigation* 124 (1): 30-39, 2014.-
- 28- Kumar RMR, Schor NF. Methylation of DNA and chromatin as a mechanism of oncogenesis and therapeutic target in neuroblastoma. *Oncotarget* 9 (31): 22184-2193, 2018.
- 29- Surai PF. Silymarin as a natural antioxidant: An overview of the current evidence and perspectives. *Antioxidants* 4:204-247, 2015.

- 30- Butler LM, Zhau X, Xu WS, Scher HI, Ritkind A, Marks PA, Richan VM. The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci* 99(18): 11700-11705, 2002.
- 31- Saldana-Meyer R, Recillas-Targa F. Transcriptional and epigenetic regulation of the p53 tumor suppressor gene. *Epigenetics* 6(9): 1068-1077, 2011.
- 32- Rastegar H, Ashtiani H, Anjorani S, Bakae S, Khaki A, Javadi L. The role of milk thistle extract in breast carcinoma cell line (MCF-7) apoptosis with doxorubicin. *Acta Medica Iranica* 51 (9): 591-598, 2013.
- 33- Permana MY, Soediro TM, Louisa M. Silymarin increases the sensitivity of breast cancer cells to doxorubicin in doxorubicin-induced MCF-7 cells by inhibiting breast cancer resistance protein expression. *The 2nd Physics and Technologies in Medicine and Dentistry Symposium* 1073, 2018.
- 34- Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2017.
- 35- Thompson T, Tovar C, Yang H, Carvajal D, Vu BT, Xu Q, Wahl GM, Heimbrock DC, Vassilev LT. Phosphorylation of p53 on key serine is dispensable for transcriptional activation and apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (5): 53015-53022, 2004.
- 36- Yogosawa S, Yoshida K. Tumor suppressive role for kinases phosphorylating p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Science*, 2018.
- 37- Mrakovcic M, Kleinheinz J, Frohlich LF. p53 at the cross roads between different types of HDAC inhibitor-mediated cancer cell death. *Int J Mol Sci* 10: 15-20, 2019.
- 38- Li JL, Pan YY, Chen O, Luan Y, Xue X, Zhao JJ, Liu L, Jia LL. Curcumin inhibits MCF-7 cells by modulating the NF κ B signaling pathway. *Oncology Letters* 14: 5581-5584, 2017.
- 39- Razi M, Varasteh S. Preventive and protective effects of silymarin on doxorubicin-induced testicular damages correlate with changes in c-myc gene expression. *Phytomedicine* 19: 1077-1084, 2012.
- 40- Saldana-Meyer R, Recillas-Targa F. Transcriptional and epigenetic regulation of the p53 tumor suppressor gene. *Epigenetics* 6 (9): 1068-1077, 2011.
- 41- Maclaine N, Hupp TR. The regulation of p53 by phosphorylation: A model for how distinct signals integrate into the p53 pathway. *Aging*, 2009.
- 42- Ozaki T, Nakagawara A. P53: the attractive tumor suppressor in the cancer research field. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.
- 43- Miller DM, Thomas SD, Islam A, Muench D, Sedoris K. c-Myc and cancer metabolism. *Clinical Cancer Research* 18 (20): 5546-5553, 2012.

- 44- Mayo MW, Denlinger CE, Broad RM, Yeung F, Reilly ET, Shi Y, Jones DR. Ineffectiveness of histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis involves the transcriptional activation of NFκB through the Akt pathway. *The Journal of Chemistry* 278 (21): 18980-18989, 2003.
- 45- Santos MD, Zambrano A, Aranda A. Combined effects of retinoic acid and histone deacetylase inhibitors on human neuroblastoma SHSY5Y cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 6(4): 1425-1431, 2007.
- 46- Aggarwal BB, Sung B. NFκB in cancer: A matter of life and death. *American Association for Cancer Research*, 2014.
- 47- Xia Y, Shen S, Verma IM. NFκB, an active player in human cancers. *Cancer Immunology Research* 2 (19): 823-830, 2014.
- 48- Park MH, Hong JT. Roles of NFκB in cancer and inflammatory diseases and their therapeutic approaches. *Cells*, 2016.
- 49- Naugler WE, Karin M. NFκB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev.* 18 (1):19-26, 2008.
- 50- Qin W, Zhu W, Shi H, Hewett JE, Ruhlen RL, MacDonald RS, Rottinghaus GE, Chen YC, Sauter ER. Soy isoflavones have an antiestrogenic effect and alter mammary promoter hypermethylation in healthy premenopausal women. *Nutr Cancer* 61: 238-244, 2009.
- 51- Li Y et al. Combinatorial epigenetic mechanisms and efficacy of early breast cancer inhibition by nutritive botanicals. *Epigenomics* 8 (8): 1019-1037, 2016.
- 52-Li Y, Daniel M, Tollefsbol TO. Epigenetic regulation of caloric restriction in aging. *BMC Med.* 9: 98, 2011.
- 53- Mercken EM, Crosby SD, Lamming DW, JeBailey L, Krzysik-Walker S, Villareal DT, Capri M, Franceschi C, Zhang Y, Becker K, et al. Calorie restriction in humans inhibits the PI3K/AKT pathway and induces a younger transcription profile. *Aging Cell* 12: 645-651, 2013.
- 54- Mao QQ, Bai Y, Lin YW, Zheng XY, Qin J, Yang K, Xie LP. Resveratrol confers resistance against taxol via induction of cell cycle arrest in human cancer cell lines. *Mol Nutr Food Res* 54: 1574-1584, 2010.
- 55- Meeran SM, Patel SN, Tollefsbol TO. Sulforaphane causes epigenetic repression of hTERT expression in human breast cancer cell lines. *PLoS ONE*, 2010.
- 56- Hardy TM, Tollefsbol TO. Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer. *Epigenomics* 3: 503-518, 2011.
- 57- Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol.* 71: 1397-1421, 2006.

- 58- Dashwood RH, Ho E. Dietary agents as histone deacetylase inhibitors: sulforaphane and structurally related isothiocyanates. *Nutr Rev* 66 Suppl 1: 36-38, 2008.
- 59- Jiang C, Agarwal R, Lü J. Anti-angiogenic potential of a cancer chemopreventive flavonoid antioxidant, silymarin: Inhibition of key attributes of vascular endothelial cells and angiogenic cytokine secretion by cancer epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276, 371-378, 2000.
- 60- Ramakrishnan G, Muzio LL, Elinos-Baez CM, Agustine TA, Kamaraj S, Anandakumar P, Devaki T. Silymarin inhibited proliferation and induced apoptosis in hepatic cancer cells. *Cell Proliferation* 42: 229-240, 2009.
- 61- Sanaei M, Kavosi F. Effect of DNA methyltransferase in comparison to and in combination with histone deacetylase inhibitors on hepatocellular carcinoma HepG2 cell line. *Asian Pac J Cancer Prev* 20 (4): 1119-1125, 2019.
- 62- Sonnemann J, Marx C, Becker S, Wittig S, Palani CD, Kramer OH, Beck JF. p53-dependent and p53-independent anticancer effects of different histone deacetylase inhibitors. *British Journal of Cancer* 110: 656-667, 2014.
- 63- Wawruszak A, Kalafut J, Okon E, Czapinski J, Halasa M, Przybyszewska A, Miziak P, Okla K, Rivero-Muller A, Stepulak A. Histone deacetylase inhibitors and phenotypical transformation of cancer cells. *Cancers*, 2019.
- 64- Ho E, Clarke JD, Dashwood RH. Dietary sulforaphane a histone deacetylase inhibitor for cancer prevention. *The Journal of Nutrition* 139 (12): 2393-2396, 2009.
- 65- Coley HM. Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 34: 378-390, 2008.
- 66- Telang U, Brazeau DA, Morris ME. Comparison of the effects of phenethyl isothiocyanate and sulforaphane on gene expression in breast cancer and normal mammary epithelial cells. *Exp Biol Med* 234: 287-295, 2009.
- 67- Fang MZ, Wang Y, Ai N, Hou Z, Sun Y, Lu H, Welsh W, Yang CS. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res.* 63: 7563-7570, 2003.
- 68- Siddiqui IA, Asim M, Hafeez BB, Adhami VM, Tarapore RS, Mukhtar H. Green tea polyphenol EGCG blunts androgen receptor function in prostate cancer. *FASEB J.* 25: 1198-1207, 2011.
- 69- Gros C, Fahy J, Halby L, Dufau I, Erdman A, Gregoire JM, Ausseil F, Vispe S, Arimondo PB. DNA methylation inhibitors in cancer: Recent and future approaches. *Biochimie* 94: 2, 280-2296, 2012.
- 70- Valls J, Millán S, Martí MP, Borràs E, Arola L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *J Chromatogr A* 1216: 7143-7172, 2009.

- 71- Barnes S. Effect of genistein on *in vitro* and *in vivo* models of cancer. J Nutr 125 Suppl 777-783, 1995.
- 72- Fang MZ, Chen D, Sun Y, Jin Z, Christman JK, Yang CS. Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARbeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy. Clin Cancer Res 11: 7033-7041, 2005.
- 73- Athar M, Back JH, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL. Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. Arch Biochem Biophys 486: 95-102, 2009.
- 74- Billam M, Sobolewski MD, Davidson NE. Effects of novel DNA methyltransferase inhibitor zebularine on human breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat 120: 581-592, 2010.
- 75- Smeenk L, van Heeringen SJ, Koeppl M, Gilbert B, Janssen-Megens E, Stunnenberg HG, Lohrum M. Role of p53 serine 46 in p53 target gene regulation. PLoS One 6 (3), 2011.
- 76- Liu PL, Tsai JR, Charles AL, Hwang JJ, Chou SH, Ping YH, Lin FY, Chen YL, Hung CY, Chen WC, et al. Resveratrol inhibits human lung adenocarcinoma cell metastasis by suppressing heme oxygenase 1-mediated nuclear factor-kappaB pathway and subsequently downregulating expression of matrix metalloproteinases. Mol Nutr Food Res 54 (2): 196-204, 2010.
- 77- Stefanska B, Rudnicka K, Bednarek A, Fabianowska-Majewska K. Hypomethylation and induction of retinoic acid receptor beta 2 by concurrent action of adenosine analogues and natural compounds in breast cancer cells. Eur J Pharmacol 638: 47-53, 2010.
- 78- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. Nature 425: 191-196, 2003.
- 79- Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, et al. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. Biochemical Pharmacology 83: 6-15, 2012.
- 80- Tan S, Wang C, Lu C, et al. Quercetin is able to demethylate the p16INK4a gene promoter. Chemotherapy, 55: 6-10, 2009.
- 81- Vargas AJ, Burd R. Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. Nutrition Reviews 68: 418-428, 2010.
- 82- Meng J, Li Y, Zhang M, Li W, Zhou L, Wang Q, Lin L, Jiang L, Zhu W. A combination of curcumin, vorinostat and silibinin reverses $\alpha\beta$ -induced nerve cell toxicity via activation of AKT-MDM2-p53 pathway. PeerJ, 2019.

- 83- Ezhilarasan D, Evraerts J, Brice S, Buc-Calderon P, Karthikayon S, Sokal E, Najimi M. Silibinin inhibits proliferation and migration of human hepatic stellate LX cells. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* 6 (3): 167-174, 2016.
- 84- Condorelli F, Gnemmi I, Vallario A, Genazzoni AA, Canonica PL. Inhibitors of histone deacetylase (HDAC) restore the p53 pathway in neuroblastoma cells. *British Journal of Pharmacology* 158: 657-668, 2008.
- 85- Smeenk L, Heeringen SJ, Koeppel M, Gilbert B, Janssen-Megens E, Stunnenberg HG, Lohrum M. Role of p53 serine 46 in target gene regulation. *Plos One*, 2011.
- 86- Yamaguchi H, Woods NT, Piluso LG, Lee HH, Chen J, Bhalla KN, Monteiro A, Liu X, Hung MC, Wang HG. P53 acetylation is crucial for its transcription-independent proapoptotic functions. *The Journal of Biological Chemistry* 284 (17): 11171-11183, 2009.
- 87- Liu Y, Tavana O, Gu W. p53 modifications: exquisite decorations of the powerful guardian. *Journal of Molecular Cell Biology* 1-14, 2019.
- 88- Tang Y, Zhao W, Chen Y, Zhao Y, Gu W. Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell*, 2008.
- 89- Reed SM, Quelle DE. P53 acetylation: regulation and consequences. *Cancers* 7: 30-69, 2015.
- 90- Mayo LD, Seo YR, Jackson MW, Smith ML, Guzman JR, Korgaonkar CK, Donner DB. Phosphorylation of human p53 at serine 46 determines promoter selection and whether apoptosis is attenuated or amplified. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (28): 25953-25959, 2005.
- 91- Mishra A, Brat DJ, Verma M. p53 tumor suppression network in cancer epigenetics. *Cancer Epigenetics* 597-605, 2014.
- 92- Brooks CL, Gu W. The impact of acetylation and deacetylation on the p53 pathway. *Protein and Cell* 2 (6): 456-462, 2011.
- 93- Westerlund I, Shi Y, Toskas K, Fell SM, Li S, Surova O, Södersten E, Kogner P, Nyman U, Schisia S, Holmberg J. Combined epigenetic and differentiation-based treatment inhibits HIF2 α to tumor suppression. *PNAS*, 2017.
- 94- Murphy M, Ahn J, Walker KK, Hoffman WH, Evans RM, Levine AJ, George DL. Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev* 13: 2490-2501, 1999.
- 95- Barlev NA, Liu L, Chehab NH, Mansfield K, Harris KG, Halazonetis TD, Berger SL. Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell* 8: 1243-1254, 2011.
- 96- Vrba L, Junk DJ, Novak P, Futscher BW. p53 induces distinct epigenetic states at its direct target promoters. *BMC Genomics* 9: 486, 2008.

- 97- Hernandez-Valencia J, Garcia-Villa E, Arenas-Hernandez A, Garcia-Mena J, Diaz-Chavez J, Gariglio P. Induction of p53 phosphorylation at serine 20 by resveratrol is required to activate p53 target genes, restoring apoptosis in MCF-7 cells resistant to cisplatin. *Nutrients* 1148 (10), 2018.
- 98- Ye R, Goodarzi AA, Kurz EU, Saito S, Higashimoto Y, Lavin MF, Appella E, Anderson CW, Lees-Miller SP. The isoflavonoids genistein and quercetin activate different stress signaling pathways as shown by analysis of site-specific phosphorylation of ATM, p53 and histone H2AX. *DNA Repair* 3, 235-244, 2004.
- 99- Katiyar SK, Roy AM, Baliga MS. Silymarin induces apoptosis primarily through a p53-dependent pathway involving Bcl-2/Bax, cytochrome c release, and caspase activation. *Molecular Cancer Therapeutics* 4 (2), 2005.
- 100- Deep G, Agarwal R. Chemopreventive efficacy of silymarin in skin and prostate cancer. *Integrative Cancer Therapies* 6 (2): 130-145, 2007.
- 101- Fabre C, Carvalho G, Tasdemir E, Braun T, Grosjean AJ, Boehran S, Metivier D, Souqere S, Pierron G, Fenoux P, Kroemer G. NFκB inhibition sensitizes the starvation-induced cell death in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Oncogene* 26: 4071-4083, 2007.
- 102- Zheng S, Koh XY, Goh HC, Rahmat SAB, Hwang LA, Lane DP. Inhibiting p53 acetylation reduces cancer chemotoxicity. *Tumor and Stem Cell Biology*, 2017.
- 103- Juan LJ, Shia WJ, Chen MH, Yang WM, Seto E, Lin YS, Wu CW. Histone deacetylases specifically downregulate p53-dependent gene activation. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (27): 20436-20443, 2000.
- 104- Yang SH, Lin JK, Chen WS, Chiu JH. Anti-angiogenic effect of silymarin on colon cancer LoVo cell line. *Journal of Surgical Research* 113: 133-138, 2003.
- 105- Morton JP, Timpson P, Karim SA, Ridgway RA, Athineos D, Doyle B, Jamieson NB, Oien KA, Lowy AM, Brunton VG, et al. Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci* 107, 246-251, 2010.
- 106- Cooks T, Pateras IS, Tarcic O, Solomon H, Schetter AJ, Wilder S, Lozano G, Pikarsky E, Forshew T, Rosenfeld N, et al. Mutant p53 prolongs NF-κB activation and promotes chronic inflammation and inflammation-associated colorectal cancer. *Cancer Cell* 23, 634-646, 2013.
- 107- Chatterjee B, Ghosh K, Karade SR. Resveratrol modulates epigenetic regulators of promoter histone methylation and acetylation that restores BRCA1, p53, p21 in human breast cancer cell lines. *Biofactors* 1-12, 2019.
- 108- Agarwal R, Agarwal C, Ichikawa H, Singh RP, Agarwal BB. Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side. *Anticancer Research* 26: 4457-4498, 2006.

- 109- Banerjee S, Li Y, Wang Z, Sarkar FH. Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Letters* 269: 226-242, 2008.
- 110- Ashburner BP, Westerheide SD, Baldwin AS. The p65 (Rel A) subunit of NF κ B interacts with the HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression 2 (20): 7065-7077, 2001.
- 111- Witt O, Deubzer HE, Milde T, Oehme I. Hdac family: What are the cancer relevant targets?. *Cancer Letters* 277:8-21, 2009.
- 112- David-Searles PR, Nakanishi Y, Kim NC, Graf TN, Oberlies NH, Wani NC, Wall MC, Agarwal R, Kroll DJ. Milk thistle and prostate cancer: differential effects of pure flavonolignans from *Silybum marianum* on antiproliferative end points in human prostate carcinoma cells. *Cancer Research* 65 (10): 4448-4457, 2005.
- 113- Won DH, Kim LH, Jon B, Yang IH, Kwan HJ, Jin B, Oh SH, Kang JH, Hong SD, Shin JA, Cho SD. *In vitro* and *in vivo* anti-cancer activity of silymarin on oral cancer. *Tumor Biology*, 2018.
- 114- Montgomery A, Adeyeni T, Son K, Heuertz RM, Ezekiel UR. Curcumin sensitizes silymarin to exert synergistic anticancer activity in colon cancer cells. *J Cancer* 7 (10): 1250-1257, 2016.
- 115- Kalla PK, Chitti S, Aghamirzaei ST, Senthilkumar R, Arjuna S. Anti-cancer activity of silymarin on MCF-7 and NCIH-23 cell lines. *Advances in Biological Research* 8 (2): 57-61, 2014.
- 116- Shafiei-Roudbari SK, Malekinejad H, Janbaz-Aciabar H, Razi M. Crosstalk between E2F1 and p53 transcription factors in doxorubicin-induced DNA damage: evidence for preventive/protective effects of silymarin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2017.
- 117- Sasu A, Herman H, Mariasiu T, Rosu M, Balta C, Anghel N, Miutescu E, Cotoraci C, Hermenean A. Protective effects of silymarin of epirubicin induced mucosal barrier injury of the gastrointestinal track. *Drug and Chemical Toxicology*, 2015.