

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KİNÜRENİK ASİT VE KİNALDİK ASİT'İN İNSAN KARACİĞER
KANSERİ (HepG2) HÜCRE HATTINDA *in vitro* ANTİTÜMÖRAL
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Pınar ATALAY DÜNDAR**

**Danışman
Prof. Dr. N. Nalan İMAMOĞLU ŞİRVANLI**

Doktora Tezi

**Eylül 2019
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KİNÜRENİK ASİT VE KİNALDİK ASİT'İN İNSAN KARACİĞER
KANSERİ (HepG2) HÜCRE HATTINDA *in vitro* ANTİTÜMÖRAL
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Pınar ATALAY DÜNDAR**

**Danışman
Prof. Dr. N. Nalan İMAMOĞLU ŞİRVANLI**

Doktora Tezi

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2017-7121 kodlu proje ile
desteklenmiştir.**

**Eylül 2019
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Pınar ATALAY DÜNDAR

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Kinürenik Asit ve Kinaldik Asit’in İnsan Karaciğer Kanseri (HepG2) Hücre Hattında *in vitro* Antitümöral Etkilerinin Araştırılması” adlı **Doktora** Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Pınar ATALAY DÜNDAR

Danışman

Prof. Dr. N. Nalan İMAMOĞLU ŞİRVANLI

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

Prof. Dr. N. Nalan İMAMOĞLU ŞİRVANLI danışmanlığında **Pınar ATALAY DÜNDAR** tarafından hazırlanan “**Kinürenik Asit ve Kinaldik Asit’in İnsan Karaciğer Kanseri (HepG2) Hücre Hattında *in vitro* Antitümöral Etkilerinin Araştırılması**” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü **Doktora** Tezi olarak kabul edilmiştir.

..... / / 2019

JÜRİ

İmza

Danışman : Prof. Dr. N. Nalan İMAMOĞLU ŞİRVANLI

(Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalı)

Üye : Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ

(Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)

Üye : Prof. Dr. Nurhan CÜCER

(Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı)

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Emel Başak GENCER AKÇOK

(Abdullah Gül Üniversitesi, Yaşam ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü)

Üye : Dr. Öğr. Üyesi İsmail AKÇOK

(Abdullah Gül Üniversitesi, Yaşam ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca çalışmamı titizlikle yönlendiren, her zaman bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, desteğini hiçbir zaman esirgemeyip daima yanımda olan, sadece bilimsel çalışmama değil hayatın her köşesinden bana öğretiler sunan, hem bilimsel bakış açıma hem de hayata dair bana kazandırdığı tecrübelerden dolayı, tez danışmanım Prof. Dr. N. Nalan İMAMOĞLU ŞİRVANLI'ya saygı, sevgi ve sonsuz şükranlarımı sunarım.

Samimiyetleri ile ailemin birer üyesi haline gelen, her şartta ve her durumda yanımda olan sevgili dostlarım Merve Erdem, Deniz Tokluman, Nazlı Usta Lazaris, Nail Tanrıöven'a, Ömer Aydın'a, Hatice Bekçi'ye, hem hocalığını hem arkadaşlığını esirgemeyen Prof. Dr. A. Aslıhan Çelenk'e teşekkürü borç bilirim. Doktora sürecinde pek çok şeyi ve aynı odayı paylaştığımız değerli çalışma arkadaşlarım Ufuk İnce'ye, Güzide Başaran'a ve İhsan Han'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her koşulda yanımda olan ve hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve tezimin her aşamasında bana destek olan, katkı sağlayan sevgili eşim Haris Ubeyde Dünder ve uzun çalışma saatlerine, ayrı kaldığımız günlere yaşından beklenmeyecek bir erdem ve sabır ile karşılık veren, hayatımın en anlamlı parçası, kızım Zeynep'e teşekkürlerimi sunarım.

Beni yetiştirip destekleri ile bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan, evlatları olmaktan gurur duyduğum sevgili annem Filiz Atalay'a ve babam Abdullah Atalay'a, kardeşim Pelin Atalay'a ve isimlerini buraya sığdıramadığım, anamadığım tüm dostlarıma ayrı ayrı teşekkür ederim.

Doktora tezimi TDK-2017-7121 proje kodu ile destekleyen BAP kurumuna maddi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Pınar ATALAY DÜNDAR

Kayseri, Eylül 2019

**KİNÜRENİK ASİT VE KİNALDİK ASİT'İN İNSAN KARACİĞER KANSERİ
(HepG2) HÜCRE HATTINDA *in vitro* ANTİTÜMÖRAL ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Pınar ATALAY DÜNDAR

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Eylül 2019

Danışman: Prof. Dr. N. Nalan İMAMOĞLU ŞİRVANLI

ÖZET

Kinürenik asit (KA) bir triptofan yolağı metaboliti olup, KA'nın dehidroksilasyonu sonucunda Kinaldik asit (KİNA) oluşur. KA, aynı zamanda glutamat reseptörlerinin endojen bir antagonisti olup, glutamat antagonistlerinin antiproliferatif potansiyele sahip oldukları belirtilmektedir. Glutamat reseptörlerinden NMDA reseptörünün alt birimlerinin ise hepatosellüler karsinoma hücrelerinde bulunduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada insan karaciğer kanseri (HepG2) hücrelerinde KA ve KİNA'nın tek başlarına ve sentetik glutamat antagonisti MK-801 ile birlikte antitümöral etkileri moleküler düzeyde ilk kez araştırılmıştır. Bu amaçla, KA, KİNA, MK-801'in ve kombinasyonlarının HepG2 hücrelerinin canlılığı ve proliferasyonu üzerindeki etkileri; MTT ve BrdU analizleri ile tespit edilmiştir. Bu maddelerin PI3K/Akt ve FoxO sinyal yolları ile hücre döngüsü ve apoptozda görev yapan gen ve protein düzeylerine etkileri ise sırasıyla RT-qPCR (Bax, Bcl-2, FasL, Bim, Kaspaz-9, Kaspaz-3 ve p21) ve Western blot (PI3K, Akt, PTEN, p-PTEN, FOXO1, FOXO3a, TXNIP ve p27) analizleri ile belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, KA, KİNA ve MK-801'in hücre canlılığını %50 inhibe eden konsantrasyonlarının HepG2 hücrelerinde DNA sentezini de etkili şekilde inhibe ettiği görülmüştür. KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına HepG2 hücrelerinde daha yüksek konsantrasyonlarda göstermiş oldukları antiproliferatif etki, kombinasyon uygulaması ile daha düşük konsantrasyonlarda elde edilmiştir. Ayrıca, HepG2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinde, KA, KİNA, MK-801 ve kombinasyon gruplarının farklı hücresel yolları izlediği görülmüştür. Tek başına KA ve KİNA+MK-801 kombinasyonunun HepG2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkilerini karşılıklı olarak FoxO ve PI3K/Akt sinyal yolları üzerinden gerçekleştirdikleri belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antitümöral aktivite, HepG2, Kinaldik asit, Kinürenik asit

**INVESTIGATION OF THE *in vitro* ANTITUMORAL EFFECTS OF
KYNURENIC ACID AND QUINALDIC ACID IN HEPATOCELLULAR
CARCINOMA (HepG2) CELL LINE.**

Pınar ATALAY DÜNDAR

Erciyes Üniversitesi, Institute of Health Sciences

Medical Faculty, Department of Medical Biology

Doctorate Thesis, September 2019

Supervisor: Prof. Dr. N. Nalan İMAMOĞLU ŞİRVANLI

ABSTRACT

Kynurenic Acid (KA) is a metabolite of tryptophan pathway and as a result of dehydroxylation of KA, Quinaldic Acid (QINA) is formed. KA is also an endogenous antagonist of glutamate receptors and glutamate antagonists have been indicated to have antiproliferative potential. On the other hand, subunits of the NMDA receptor which is one of the glutamate receptors, have been shown to be found in hepatocellular carcinoma cells. Therefore, in this study the antitumor effects of KA and QINA alone and in combination with synthetic glutamate antagonist MK-801 in human liver cancer (HepG2) cells were investigated for the first time at the molecular level. For this purpose, the effects of KA, QINA and MK-801 and their combinations on viability and proliferation of HepG2 cells were determined by MTT and BrdU analyses. Effects of these chemicals on PI3K/Akt and FoxO signalling pathways as well as cell cycle and apoptosis were analysed in gene and protein levels were determined by RT-qPCR (Bax, Bcl-2, FasL, Bim, Caspase-9, Caspase-3 ve p21) and Western blot (PI3K, Akt, PTEN, p-PTEN, FOXO1, FOXO3a, TXNIP ve p27) respectively. As a result of the study, KA, QINA and MK-801 concentrations that inhibit cell viability up to 50% have been shown to effectively inhibit DNA synthesis in HepG2 cells. The antiproliferative effect of KA, QINA and MK-801 alone in HepG2 cells at higher concentrations was obtained at lower concentrations by combination application. In addition, KA, QINA, MK-801 and combination groups were observed to follow different cellular pathways in their antiproliferative activities on HepG2 cells. It was determined that the antiproliferative effects of KA alone and QINA+MK-801 combination on HepG2 cells were carried out via FoxO and PI3K/Akt signalling pathways, respectively.

Keywords: Antitumoral activity, HepG2, Quinaldic acid, Kynurenic acid

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	iii
ONAY	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR ve SİMGELER	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xv
ŞEKİLLER LİSTESİ	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Hepatosellüler Karsinoma	5
2.1.1. Hepatosellüler Karsinomanın Risk Faktörleri ve Epidemiyolojisi	5
2.1.2. Hepatosellüler Karsinogenezin Moleküler Mekanizması.....	6
2.1.3. Hepatosellüler Karsinomanın Tedavisi.....	8
2.1.3.1. Hepatosellüler Karsinomanın Tedavisinde Kullanılan Antikanser Ajanlar ve Yan Etkileri	8
2.2. Kinürenin Yolağı, Metabolitleri ve Biyolojik Önemi	10
2.2.1. Kinürenin Yolağı Metabolitlerinin Hastalıklarla Olan İlişkileri	13
2.3. Kinürenik Asit (KA).....	17
2.3.1. KA'nın Merkezi Sinir Sistemi (MSS) ve Perifer Dokulardaki Dağılımı	21
2.3.2. KA'nın Reseptörler Üzerindeki Etki Mekanizması.....	23
2.3.2.1. KA'nın GPR35 Reseptörü Üzerindeki Etkisi	24
2.3.2.2. KA'nın AhR'nin Reseptörü Üzerindeki Etkisi	25

2.3.2.3. KA'nın $\alpha 7$ nAChR Reseptörü Üzerindeki Etkisi	25
2.3.2.4. KA'nın Glutamat Reseptörü Üzerindeki Etkisi	26
2.3.2.4.1. NMDA ve AMPA Reseptörlerinin Kanserdeki Rolü	29
2.3.2.5. KA'nın Antiproliferatif Aktivitesinden Sorumlu Olan Potansiyel Sinyal Yolakları	32
2.4. Kinaldik Asit (KİNA)	33
2.4.1. KİNA'nın Antiproliferatif Aktivitesinden Sorumlu Olan Potansiyel Sinyal Yolakları	34
2.5. PI3K/Akt ve FoxO Sinyal Yolağı	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1. GEREÇLER	39
3.1.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar	39
3.1.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler	40
3.2. YÖNTEM	42
3.2.1. HepG2 Hücre Kültürü	43
3.2.1.1. Besi Yeri Hazırlanması	43
3.2.1.2. HepG2 Hücre Hattının Çözdürülmesi	44
3.2.1.3. HepG2 Hücre Hattının Pasajlanması ve Sayımı	44
3.2.1.4. HepG2 Hücrelerin Dondurulması	45
3.2.2. MTT (3-(4,5-Dimetil tiyazol-2) 2,5-difeniltetrazolyum bromür) Hücre Canlılığı Testi	46
3.2.3. BrdU (5-bromo-2'-Deoksiüridin) Analizi	47
3.2.4. RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve Kuantitatif Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) Analizi	48
3.2.5. Western Blot Analizi	49
3.2.6. İstatistiksel Analiz	51
4. BULGULAR	52

4.1. MTT Hücre Canlılık Testi Sonuçları.....	52
4.1.1. KA'nın HepG2 Hücrelerinin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi	52
4.1.2. KİNA'nın HepG2 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisi	54
4.1.3. MK-801'in HepG2 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisi	55
4.1.4. Doksorubisin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	55
4.1.5. KA ve KİNA'nın MK-801 ile Kombinasyonlarının HepG2 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkileri.....	56
4.1.5.1. KA ve MK-801 kombinasyonlarının HepG2 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkileri	58
4.1.5.2. KİNA ve MK-801 kombinasyonlarının HepG2 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkileri	61
4.2. BrdU (Bromodeoksi-Üridin) Hücre Proliferasyon Testi Sonuçları.....	64
4.2.1. KA ve MK-801'in Tek Başlarına ve Birlikte Kombinasyonlarının HepG2 Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerindeki Etkileri.....	64
4.2.2. KİNA ve MK-801'in Tek Başlarına ve Birlikte Kombinasyonlarının HepG2 Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerindeki Etkileri	66
4.3. KA ve KİNA'nın Tek Başlarına ve MK-801 ile Kombinasyonlarının HepG2 Hücrelerinde Apoptoz ve Hücre Döngüsü Yolağında Rol Oynayan Genlerin mRNA Ekspresyonlarına Etkileri	67
4.3.1. KA ve MK-801'in tek Başlarına ve Birlikte Kombinasyonlarının Apoptoz ve Hücre Döngüsü Yolağında Görev Alan Genlerin mRNA Ekspresyonlarına Etkileri	68
4.3.2. KİNA ve MK-801'in Tek Başlarına ve Birlikte Kombinasyonlarının Apoptoz ve Hücre Döngüsü Yolağında Görev Alan Genlerin mRNA Ekspresyonlarına Etkileri	74
4.4. KA ve KİNA'nın Tek Başlarına ve MK-801 ile Kombinasyonlarının HepG2 Hücrelerinde PI3K/Akt ve FoxO Yolağında Rol Oynayan Proteinlerin Ekspresyonlarına Etkileri	79

5. TARTIŞMA VE SONUÇ	89
----------------------------	----

6. KAYNAKLAR	103
--------------------	-----

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR ve SİMGELER

3-HAA	: 3-Hidroksiantranilik asit
3-HK	: 3-Hidroksikinürenin
5-FU	: 5 -Florourasil
α7nAChR	: α 7 nikotinik asetilkolin reseptörü
AH	: Alzheimer hastalığı
AhR	: Aril hidrokarbon reseptörü
Akt	: Protein kinaz B
ALS	: Amyotrofik lateral skleroz
AMPA	: α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol profionik asit
AMPA	: AMPA reseptörleri
ATCC	: Amerikan tipi kültür koleksiyonu
ATP	: Adenozin trifosfat
Bax	: BCL-2 ilişkili X proteini
Bcl-2	: B hücreli lenfoma -2
BrdU	: 5-bromo-2'-deoksiüridin
Caki-2	: Böbrek kanseri hücre hattı
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
CKI	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DS	: Down Sendromu
dTMP	: Deoksitimidin monofosfat
ERK	: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz

FADD	: Fas ilişkili ölüm bölgesi içeren protein
FasL	: Fas reseptörü ligandı
FBS	: Fetal sığır serumu
FK	: Formil kinürenin
FoxO	: Forkhead box O
GAPDH	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz
GluR	: Glutamat reseptörleri
GPR35	: G protein bağlı reseptör 35
HBV	: Hepatit B virüsü
HCV	: Hepatit C virüsü
HDV	: Hepatit D virüsü
HepG2	: İnsan karaciğer kanseri hücre hattı
HIV	: İnsan immün yetmezlik virüsü
HSK	: Hepatosellüler karsinoma
IFN-γ	: İnterferon gama
İDO	: İndolamin 2,3-dioksijenaz
iGluR	: İyonotropik glutamat reseptörü
KA	: Kinürenik asit
KAR	: Kainat reseptörleri
KAT	: Kinürenin aminotransferaz
KF	: Kinürenin formilaz
KİN	: Kinürenin
KİNA	: Kinaldik asit
KİNO	: Kinolinik asit
KMO	: Künirenin monooksijenaz
MAPK	: Mitojenle aktifleşen protein kinaz

MSS	: Merkezi sinir sistemi
mTOR	: Rapamisinin memeli hedefi
MTT	: 3-(4,5-Dimetil tiyazol-2) 2,5-difeniltetrazolyum bromür
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NASH	: Non-alkolik stetohepatit
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NO	: Nitrik oksit
PI3K	: Fosfatidilinositol-3-kinaz
PIP2	: Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat
PIP3	: Fosfatidilinositol (3-5)-trisfosfat
PİKO	: Pikolinik asit
PTEN	: Fosfataz ve tensin homologu
RIPA	: Radyoimmünopresipitasyon analizi
RT-qPCR	: Gerçek zamanlı-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TBS-T	: Tris-tamponlu salin-Tween
TDO	: Triptofan 2,3-dioksijenaz
Th1	: T yardımcı 1
TKİ	: Tirozin kinaz inhibitörü
TRAIL	: TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand
TXNIP	: Tioredoksin ile etkileşime giren protein
VEGFA	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü A

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2.1. Taze toplanan bitki materyalinin farklı kısımlarındaki kinurenik asit içeriği.....	19
Tablo 2.2. Bitkisel ilaçların maksimum günlük ilaç dozundaki KA içeriği.....	20
Tablo 2.3. Doku ve vücut sıvılarındaki KA içeriği	22
Tablo 2.4. Kanseri tiplerine göre hücrelerde ifade edilen NMDA reseptör alt birimleri	30
Tablo 3.1. HepG2 hücre hattı için kullanılan besiyeri.....	44

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Kinürenin Yolağı	11
Şekil 2.2. Kinürenik Asitin Kimyasal Yapısı.....	17
Şekil 2.3. Kinürenik Asitin Etki Mekanizması	23
Şekil 2.4. GluR'ların Sınıflandırılması	27
Şekil 2.5. Önemli Bağlanma Bölgelerini Gösteren NMDA Reseptörü Modeli.....	28
Şekil 2.6. Kinaldik Asitin Kimyasal Yapısı.....	33
Şekil 2.7. PI3K / Akt ve FoxO Sinyal Yolağı.....	36
Şekil 2.8. Apoptotik Yolaklar..	37
Şekil 3.1. HepG2 Hücrelerinin Görünümü	43
Şekil 4.1. KA'nın doza (0.001 mM - 10 mM) ve süreye bağlı (24 - 72 saat) olarak HepG2 hücrelerinin canlılığı (%) üzerindeki etkisi.	53
Şekil 4.2. KİNA'nın doza (0.001 mM - 10 mM) ve süreye bağlı (24 - 72 saat) olarak HepG2 hücrelerinin canlılığı (%) üzerindeki etkisi.	54
Şekil 4.3. HepG2 hücrelerinin MK-801'in artan konsantrasyonları (50-500 µM) ile 48 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği.	55
Şekil 4.4. HepG2 hücrelerinin Doksorubisinin artan konsantrasyonları (0.065 - 10 µM) ile 48 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği.	56
Şekil 4.5. KA+MK-801 kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği.....	58
Şekil 4.6. 5 mM KA'nın ve 100 µM MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonunun HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği.....	59
Şekil 4.7. 1 mM KA'nın ve 150 µM MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonunun HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği.....	60

Şekil 4.8. KİNA+MK-801 kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği.	61
Şekil 4.9. 2.5 mM KİNA ve 100 µM MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonunun HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği.	62
Şekil 4.10. 0.5 mM KİNA ve 150 µM MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonunun HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği.	63
Şekil 4.11. KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda elde edilen hücre proliferasyonu (%) grafiği.	65
Şekil 4.12. KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda elde edilen hücre proliferasyonu (%) grafiği.	66
Şekil 4.13. KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Bax geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri.	68
Şekil 4.14. KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Bcl-2 geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri.	69
Şekil 4.15. KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Bim geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri.	70
Şekil 4.16. KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda FasL geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri.	71
Şekil 4.17. KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Kaspaz-9 geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri.	72

Şekil 4.18. KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Kaspaz-3 geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri.	72
Şekil 4.19. KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda p21 geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri.	73
Şekil 4.20. KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Bax geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri.	74
Şekil 4.21. KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Bcl-2 geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri.	75
Şekil 4.22. KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Bim geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri.	75
Şekil 4.23. KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda FasL geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri.	76
Şekil 4.24. KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Kaspaz-9 geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri.	77
Şekil 4.25. KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Kaspaz-3 geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri.	77
Şekil 4.26. KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda p21 geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri.	78
Şekil 4.27. KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda PI3K protein ekspresyonuna etkilerini gösteren western blot görüntüsü.	80

- Şekil 4.28.** KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda PI3K protein düzeylerini gösteren grafik.....80
- Şekil 4.29.** KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Akt protein düzeylerini gösteren western blot görüntüsü.....81
- Şekil 4.30.** KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Akt protein düzeylerini gösteren grafik.....81
- Şekil 4.31.** KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda PTEN protein düzeylerini gösteren western blot görüntüsü.....82
- Şekil 4.32.** KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda PTEN protein düzeylerini gösteren grafik.....82
- Şekil 4.33.** KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda p-PTEN protein düzeylerini gösteren western blot görüntüsü.83
- Şekil 4.34.** KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda p-PTEN protein düzeylerini gösteren grafik83
- Şekil 4.35.** KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda PTEN/p-PTEN oranını gösteren grafik.84
- Şekil 4.36.** KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda FOXO1 protein düzeylerini gösteren western blot görüntüsü.85
- Şekil 4.37.** KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda FOXO1 protein düzeylerini gösteren grafik85

- Şekil 4.38.** KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda FOXO3a protein düzeylerini gösteren western blot görüntüsü.86
- Şekil 4.39.** KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda FOXO3a protein düzeylerini gösteren grafik86
- Şekil 4.40.** KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda TXNIP protein düzeylerini gösteren western blot görüntüsü.87
- Şekil 4.41.** KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda TXNIP protein düzeylerini gösteren grafik87
- Şekil 4.42.** KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda p27 protein düzeylerini gösteren western blot görüntüsü.....88
- Şekil 4.43.** KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda p27 protein düzeylerini gösteren grafik.....88

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, dünyada ölüm nedeni olarak kalp damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almakta olup, insan sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (Wang ve ark, 2017). Hepatoselüler Karsinoma (HSK) ise, en sık görülen karaciğer kanseri olup, dünyada en sık görülen kanserler içerisinde 6. sırada, kanserle ilişkili ölümlerde ise 3. sırada yer almaktadır. HSK'nın moleküler patogenezi tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, karaciğer tümörü oluşumuna neden olan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasının hastalığın tanı ve tedavisinde oldukça önemli olduğu belirtilmektedir (El-Serag ve Rudolph, 2007).

Günümüzde, HSK'nın tedavisinde cerrahi tedavi ilk tercih olmakla birlikte, yüksek postoperatif nüks oranı ve düşük rezeksiyon oranının cerrahi tedavide karşılaşılan en önemli sorunlar olduğu belirtilmektedir (Wang ve ark, 2017). HSK'nın tedavisinde kullanılmakta olan kemoterapötik ilaçların ise, yüksek toksisite göstermeleri, seçici olmamaları, yetersiz dağılım ve çözünürlüğe sahip olmaları gibi çeşitli sebeplerden dolayı etkilerinin sınırlı olduğu belirtilmektedir (Zhou ve ark, 2016). Tüm bu nedenlerden dolayı, kemoterapötiklerin bu olumsuz etkilerini azaltmaya yönelik, anti-tümör etkinlikleri yüksek olan yeni ve daha güçlü anti-tümör ajanları veya ilaç kombinasyonlarının geliştirilmesi gerektiği belirtilmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalar da HSK'nın gelişiminin önlenmesinde moleküler hedefli yeni tedavi ajanlarının geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmıştır (Crissien ve Frenette, 2014). Sonuç olarak, HSK'nın tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilecek olan yeni kemoterapötiklerin kanser hücrelerinde hücre sağ kalımı ve hücre ölümü sinyal yollarında görev yapan moleküler mekanizmaları hedeflemesi oldukça önemlidir.

Çeşitli bitkilerde doğal olarak bulunan bazı moleküllerin insan kanserlerinin önlenmesinde oldukça etkili olduğu bilinmektedir. Bu doğal kanser baskılayıcı ya da kanser önleyici moleküllerin düşük toksisiteye sahip olduğu ve tedavi sırasında

hastaların ağrılarını azaltabildiği belirtilmektedir. Bununla birlikte, bitkilerde doğal olarak bulunan bu moleküllerin kanser tedavisindeki etkinliğinin sentetik ilaçlara göre daha düşük olduğu, ancak bu moleküllerin farklı kombinasyonlarının kanser tedavisinin etkinliğini büyük ölçüde artırdığı bildirilmektedir (Jiang ve ark, 2017; Wang ve ark, 2017). Bu nedenle, kanser tedavisinde farklı tipteki doğal kanser baskılayıcıların uygun kombinasyonlarının keşfedilmesi büyük önem taşımaktadır.

Triptofan insan vücudu tarafından sentezlenemeyen esansiyel bir amino asit olup, besin yolu ile alınması gerekmektedir (Chung ve Gadupudi, 2011). Memelilerde diyetle alınan triptofanın büyük çoğunluğu, kinürenin yolağı vasıtasıyla metabolize edilmektedir. Kinürenin yolağı metabolitlerinin hücre iletişimi ve sağkalımı ile ilgili birçok süreçte rol oynadıkları, özellikle de bu metabolitlerden Kinürenik Asit (KA) ve Kinaldik Asit (KİNA)'ın konsantrasyon seviyelerine bağlı olarak belirli fizyolojik ve patolojik etkilere sahip oldukları bildirilmektedir (Walczak ve ark, 2011).

KA'nın, birçok doku, fizyolojik sıvı, çeşitli bitki ve gıda maddelerinde bulunduğu bildirilmiştir (Walczak ve ark, 2014a). KA içeren bitki ve gıda ürünlerinin tüketimi ile KA'nın intestinal lümeninden absorbe edilerek kan dolaşımı yoluyla periferel organlara taşındığı, özellikle karaciğer ve böbrekteki KA konsantrasyonlarının mikromolar seviyelere ulaşmış olduğu görülmüştür. Ayrıca bu dokulardaki KA içeriğinin uzun süre muhafaza edilebildiği de yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Turski ve ark, 2009). KA'nın aynı zamanda antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklere sahip olduğu belirtilmektedir (Turski ve ark, 2014). Tüm bunlara ek olarak KA, iyonotropik glutamat reseptörlerinin doğal endojen bir antagonistidir ve glutamat antagonistlerinin antikanserojen potansiyele sahip oldukları belirtilmektedir (Walczak ve ark, 2014b). Yapılan çeşitli çalışmalarda sentetik bir glutamat antagonisti olan MK-801'in çeşitli kanser hücre hatlarında *in vitro* antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Rzeski ve ark, 2002; Yamaguchi ve ark, 2013; Malsy ve ark, 2015). İyonotropik glutamat reseptörleri, yapısal benzerliklerine ve onları aktive eden sentetik agonistlere göre NMDA, AMPA ve kainat reseptörleri olmak üzere 3 çeşittir (Stepulak ve ark, 2009). Glutamat reseptörlerinin çeşitli kanser hücre tiplerinde bulunduğu bilinmektedir ve NMDA reseptör alt birimlerinin hepatosellüler karsinoma dahil olmak üzere bir çok kanser hücre hattındaki varlığı gösterilmiştir (Li ve ark, 2012; Stepulak ve ark, 2014). KA, NMDA reseptörünün glisin ko-agonist bölgesinin rekabetçi blokörü olarak işlev

görür ve aynı zamanda iyonotropik glutamat reseptörlerinin tüm alt tiplerinin geniş spektrumlu bir antagonistidir. Yapılan bir çalışmada, sıçanlara intragastrik olarak uygulanan KA'nın ince barsaklardan emilerek kan dolaşımıyla karaciğer ve böbreğe taşındığı ve bu organlardaki KA konsantrasyonunun NMDA reseptörleri ve glutamat reseptörlerinin alt birimleri ile etkileşime girmesi için yeterli olduğu görülmüştür (Turski ve ark, 2009) Bu nedenle, hem hepatosellüler karsinoma hücrelerinde NMDA reseptör alt birimlerinin bulunuşu, hem de KA'nın kan dolaşımı yoluyla karaciğere taşınması ve karaciğerde bulunan NMDA reseptörlerinin alt birimleri ile etkileşime girmesi için yeterli konsantrasyona ulaşabildiğinin görülmesinden dolayı, KA'nın HSK hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisinin değerlendirilmesi oldukça önemlidir.

KA'nın kanser hücre proliferasyonundaki rolüne ilişkin yapılan çalışmalarda da KA'nın hücre büyümesi, DNA sentezi ve hücre göçünü engelleyerek, çeşitli kanser hücre hatlarında antiproliferatif aktivite sergilediği gösterilmiştir. Ancak bu aktivitenin moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (Walczak ve ark, 2014a). Sonuç olarak, KA'nın birçok gıda ürünüde bulunması, intestinal lümeninden absorbe edilerek kan dolaşımına geçmesi, periferik organlara iletilmesi, antiinflamatuvar ve antioksidan özellikler sergilemesi, KA'nın kanser tedavisinde potansiyel terapötik bir ajan olarak kullanılabilme olasılığını desteklemektedir. Bu sebeple, KA'nın kanser hücrelerindeki antiproliferatif aktivitesinin moleküler mekanizmasının açığa çıkarılması büyük önem taşımaktadır.

KİNA ise yapısal olarak KA'ya benzeyip, kinürenin yolağında KA'nın dehidroksilasyonu sonucu oluşan bir diğer metabolittir (Kaihara ve Price, 1962). Yapılan çalışmalarda intestinal floranın da KİNA üretimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Gál ve Sherman, 1978). KA ile olan yapısal benzerliğinden ve insan organizmasında doğal olarak bulunuşundan dolayı KİNA'nın antitümöral potansiyelinin değerlendirilmesi de oldukça önemlidir. Literatürde KİNA'nın antitümöral potansiyeli ile ilgili çok az sayıda çalışma bulunmakta olup, bu çalışmalarda KİNA'nın antitümöral aktivitesinden sorumlu olabilecek hücre döngüsü mekanizmalarının ve hücre ölümüne neden olan potansiyel sinyal yollarının araştırılması gerektiği bildirilmiştir (Langner ve ark, 2015, 2019).

Literatürde, KA ve KİNA'nın çeşitli kanser hücrelerindeki antiproliferatif aktiviteleri ile bu aktivitelerden sorumlu olan potansiyel sinyal yolları üzerindeki etkileri ile ilgili

yapılmış çok az sayıda çalışma bulunmaktadır (Walczak ve ark, 2011, 2012a, 2012b, 2014a, 2014b). Bununla birlikte, literatürde KA ve KİNA'nın insan karaciğer kanseri üzerindeki antiproliferatif aktiviteleri ile ilgili herhangi bir bilgiye rastlanılamamıştır. Bu amaçla, tez çalışması kapsamında, KA ve KİNA'nın insan karaciğer kanseri hücre hattı (HepG2) üzerindeki antiproliferatif aktiviteleri ile PI3K/Akt ve FOXO sinyal yolları üzerinden hücre döngüsü ve apoptoza etkileri moleküler düzeyde ilk kez araştırılmıştır. Bunun için, KA ve KİNA'nın HepG2 hücrelerinde hücre çoğalması ve gelişiminde önemli roller oynayan PI3K/Akt ve FOXO sinyal yolları ile hücre döngüsü ve apoptozda görev yapan gen ve proteinlerin transkripsiyon ve ekspresyon düzeylerine etkileri sırasıyla RT-qPCR (p21, Bax, Bcl-2, FasL, Bim, kaspaz-3 ve kaspaz-9) ve western blot (PI3K, PTEN, p-PTEN, Akt, Foxo1, Foxo3a, p-27, TXNIP) analizleri ile belirlenmiştir.

Tez çalışması kapsamında ayrıca, KA ve KİNA'nın sentetik bir glutamat antagonisti olan MK-801 ile birlikte kombinasyonları HepG2 hücrelerine uygulanarak bu maddelerin birlikte (KA+MK-801 ve KİNA+MK-801) etkileri tek başlarına olan etkileriyle karşılaştırılmıştır. Böylece, HepG2 hücre hattında sentetik glutamat antagonisti olan MK-801'in doğal glutamat antagonisti olan KA ile veya KA'ya yapısal olarak benzeyen KİNA ile birlikte kombinasyonlarının daha güçlü bir antitümöral etki gösterip göstermeyeceğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hepatosellüler Karsinoma

Hepatosellüler karsinoma (HSK), en sık görülen primer karaciğer tümörüdür ve dünya çapında yılda 1 milyon insanın ölümüne neden olmaktadır. Giderek artan sıklıkta görülmeye başlayan HSK'ya, genellikle ileri evrede tanı konulmaktadır (Befeler ve di Bisceglie, 2002). Dünyada en yaygın görülen kanser türleri arasında 6. sırada, kanser kaynaklı ölümlerde ise 3. sırada yer almaktadır. Çoğunlukla kronik karaciğer hastalığı ve siroz geçmişi olan hastalarda görülmektedir (Forner ve ark, 2012).

Tedavi kanserin bulunduğu aşamaya göre değişmektedir. Bununla birlikte, hastalığın tanısının genellikle ileri evrede konulabilmesinden dolayı ileri evredeki HSK hastaları için etkin bir tedavinin oldukça güç olduğu belirtilmektedir. Hastalığın erken tanı ve tedavisinin sağlanması amacıyla sık tarama ve hasta takibi önerilmektedir (Gomaa ve Waked, 2017).

2.1.1. Hepatosellüler Karsinomanın Risk Faktörleri ve Epidemiyolojisi

HSK insidansı coğrafi bölgelere, etnik gruplara ve cinsiyete bağlı olarak değişmektedir. HSK vakalarının %80'inden fazlası Sahra Altı Afrika ve Doğu Asya gibi gelişmekte olan ülkelerde bulunmaktadır. Kuzey Avrupa ve Amerika gibi gelişmiş ülkelerde ise bu oranın daha az olduğu belirtilmektedir (El-Serag ve Rudolph, 2007). HSK gelişiminde çeşitli risk faktörleri tanımlanmıştır. Bunlar arasında kronik hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonu, kronik hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonu, alkol tüketimi, non-alkolik stetohepatit (NASH), siroz, sigara kullanımı, diyabet, fazla kilo alımı ve aflatoksin maruziyeti bulunmaktadır (Maucort-Boulch ve ark, 2018).

Coğrafi bölgeye göre büyük oranda değişen HSK epidemiyolojisi, özellikle hepatit B ve C gibi altta yatan hastalıkların epidemiyolojisindeki farklılıklar sebebiyle tam olarak açıklanamamaktadır. Buna bağlı olarak yaşa özgü insidans da dünyanın farklı bölgelerine göre değişmektedir. HSK'nın dünya genelinde görülme sıklığının, kadınlara

oranla erkeklerde daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Sherman, 2010). Batı toplumlarında HCV, NASH ve alkol tüketimine bağlı HSK'ya daha sık rastlanırken, doğu toplumlarında HBV ve aflatoksine bağlı HSK daha sık görülmektedir (Bardakçı ve ark, 2019).

Batı dünyasında, kronik alkol kullanımı ve NASH, siroz için önemli olduğu kadar kronik hepatit C için de önemli etiyolojik faktörlerdir. Kronik hepatit C hastalarının yaklaşık %20'sinin ise, 20-30 yıllık enfeksiyondan sonra siroz geliştireceği tahmin edilmektedir. Siroz geliştikten sonra kronik karaciğer hasarından dolayı kanser riskinin de belirgin bir şekilde arttığı belirtilmektedir. Siroz aşamasında HSK gelişme riskinin %3 ila 4 arasında olduğu tahmin edilmektedir. Bununla birlikte, kronik viral hepatitin HSK gelişimi ile nisbeten daha az ilişkili olduğu belirtilmektedir. Dünya genelinde HSK vakalarının %50'sinden fazlasının ise kronik HBV enfeksiyonundan kaynaklandığı bildirilmiştir. Asya ülkelerinde, sirozu olmayan kronik hepatit B hastalarında yıllık HSK gelişme riski ise %0.5 olarak bildirilmiştir. Siroz olmayan kronik hepatit C'nin HSK gelişimine yol açıp açmayacağı ise tam olarak bilinmemektedir (Peck-Radosavljevic 2010). Türkiye'de ise HSK'nın görülme sıklığının ileri yaş ve kronik hepatit hastalıklara bağlı olarak hızla artış gösterdiği bildirilmektedir. Kronik HBV ve kronik hepatit D virüsü (HDV) enfeksiyonlarının ülkemizde HSK gelişimindeki en önemli etiyolojik faktörler olduğu belirtilmektedir (Yalçın ve ark, 2013).

2.1.2. Hepatosellüler Karsinogenezin Moleküler Mekanizması

Hepatokarsinogenez, çok sayıda moleküler anormallikle sonuçlanan karmaşık ve çok aşamalı bir süreçtir (Thomas ve ark, 2008). Bu sebeple hepatokarsinogenez indükleyen moleküler mekanizmaların anlaşılmasının HSK'nın tedavisi açısından oldukça önemli olduğu belirtilmektedir (El-Serag ve Rudolph, 2007).

Hepatokarsinogenez kronik karaciğer hasarı ile yakından ilişkili olup, bu yakın ilişki hücrelerin bölünmesiyle artan genetik değişikliklerin hücresel transformasyona yol açması ve bunun sonucunda karaciğerde kanser gelişimine neden olması ile açıklanmaktadır. İnsan HSK'larında da kromozom kopya sayısı değişiklikleri ve translokasyonların oldukça yaygın olduğu bildirilmektedir. Hepatokarsinogenez ile ilişkili en yaygın durum ise, kronik karaciğer hastalığına bağlı uzun süreli sirozdur.

Kronik karaciğer hastalığı sırasında HSK riskinin düşük olduğu, bununla birlikte siroz aşamasında bu riskin katlanarak arttığı belirtilmektedir (El-Serag ve Rudolph, 2007).

HSK gelişimindeki ana mutasyonlar, tümör baskılayıcı bir gen olan p53 ve β katenini kodlayan CTNNB1 genini içermektedir. CTNNB1 mutasyonunun baskın olarak HCV ilişkili HSK'da görüldüğü belirtilmektedir. Diğer mutasyonların ise daha az sıklıkta görüldüğü bildirilmektedir. 1q, 6p, 8q, 17q ve 20q'daki kromozomal amplifikasyonlar ile 4q, 8p, 11q, 13q, 16q ve 17p'deki delesyonlar yaygındır ve önemli onkogenleri ve tümör baskılayıcıları etkilerler. Hastaların %5-10'unda, 6p21 (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü A [VEGFA]) ve 11q13'te (siklin D1) yüksek seviye amplifikasyon tanımlanmıştır. HSK'daki epigenetik değişiklikler ise yeterince tanımlanamamış olmakla birlikte, RASSF1, SOCS1, E-kaderin gibi tümör baskılayıcıların susturulduğu ve MYC gibi onkogenlerin yeniden aktifleştigi gösterilmiştir (Villanueva ve ark, 2007).

HSK gelişiminde yukarıda belirtilen değişiklikler sonucunda hücre sağkalımı ve proliferasyonu ile ilgili çeşitli sinyal yolları aktive edilmektedir. Proliferasyon ile ilgili sinyal yollarında görev alan epitel büyüme faktörü reseptörü ve Ras sinyalleri HSK'ların %50'sinden fazlasında aktif durumdadır. Diğer taraftan, tümör baskılayıcı PTEN'in (fosfataz ve tensin homoloğu) etkisiz hale getirilmesi veya fosfoinositid-3-kinazın mutasyonları nedeni ile mTOR (rapamisin'in memeli hedefi) yolunun yukarı akış sinyali karaciğer kanserlerinin %40-50'sinde bozulmuştur. Benzer şekilde, insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü 1 sinyali, erken aşamadaki HSK'ların %20'sinde aktiftir. Bununla birlikte erken aşamadaki HSK'da hepatosit büyüme faktörü ile c-MET yollarındaki düzensizlikler de yaygın görülen bir durumdur. HSK'ların üçte birinde ise, Wnt sinyal yolağının; transkripsiyon faktörü β -katenini kodlayan gendeki mutasyonlar, Wnt reseptörlerinin aşırı ekspresyonu veya E-kaderin inaktivasyonu sonucunda aktif olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte, HSK yüksek derecede vaskülarize bir kanser olup VEGFA, Angiopoietin 2 ve fibroblast büyüme faktörü sinyalleri ile anjiyojenik aktivite göstermektedir (Forner ve ark, 2012). Yapılan çeşitli çalışmalarda, kanser hücresi büyümesinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan ve tümör baskılayıcı olarak bilinen FoxO sinyal yolağında görevli transkripsiyon faktörlerinin de karaciğerde hücre çoğalması ve metabolizması için oldukça önemli olduğu gösterilmiştir (Adachi ve ark, 2007; Gross ve ark, 2008).

2.1.3. Hepatosellüler Karsinomanın Tedavisi

HSK erken aşamada teşhis edilirse, cerrahi olarak rezeksiyon veya karaciğer transplantasyonu ile küratif olarak tedavi edilebileceği belirtilmektedir. Bununla birlikte, HSK'lı hastaların çoğunda hastalık ileri seviyede olduğundan ve altta yatan bir karaciğer fonksiyon bozukluğu mevcut olduğundan, hastaların sadece %15'i küratif tedavilere uygundur ve genellikle medyan sağkalım süreleri de 1 yıldan az olan kötü bir prognoza sahiptir. Diğer taraftan HSK'nın tedavisinde; radyofrekans ablasyonu, mikrodalga ablasyonu, perkütan etanol enjeksiyonu, transarteriyel kemoembolizasyon, radyo-embolizasyon, kriyoablasyon, radyasyon terapisi, stereotaktik radyoterapi, sistemik kemoterapi ve moleküler hedefli tedaviler gibi diğer bazı tedavi yöntemleri de mevcuttur (Crissien ve Frenette, 2014).

HSK'nın tedavisinde çok az sayıdaki kemoterapötik ajanlar güvenilir HSK antitümör yanıtı ile ilişkili bulunmuştur. Kemoterapi sistemik veya bölgesel olarak uygulanabilmekte olup, bölgesel kemoterapi intra-arteriyel tedaviyi içermektedir. Sistemik kemoterapi de ise, hastaların tipik olarak %25'ten az yanıtla tedaviye düşük cevap verdikleri belirtilmektedir (Befeler ve di Bisceglie, 2002).

2.1.3.1. Hepatosellüler Karsinomanın Tedavisinde Kullanılan Antikanser Ajanlar ve Yan Etkileri

Sitotoksik ve hormonal ajanları içeren sistemik tedavilerin, HSK'lı hastalara ya çok az fayda sağladığı ya da hiç fayda sağlamadığı belirtilmektedir. Günümüzde Sisplatin, Doksorubisin, 5-Florourasil (5-FU) ve Sorafenib hepatokarsinogenezin tedavisinde tek başlarına veya kombinasyon halinde kullanılan ana kemoteropötiklerdendir. HSK, kemoterapiye dirençli bir tümördür ve birçok sebepten dolayı kemoterapi ileri evredeki HSK'lı hastalarda rutin olarak kullanılamamaktadır (Vogel ve ark, 2018).

Doksorubisin antrasiklin yapıda bir antibiyotik olup, HSK terapilerinde kemoterapötik bir madde olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Doksorubisin'in antineoplastik mekanizması, esas olarak topoizomerez II inhibisyonuna ve DNA zincirlerinin arasına girmesine dayanmaktadır. Böylece, hücre büyümesini durdurarak kanser hücrelerinin ölümüne yol açtığı belirtilmektedir (Zhong ve ark 2019). Doksorubisinin HSK'daki düşük terapötik etkisinin, çoklu ilaç direnci (MDR) mekanizmalarından kaynaklandığı varsayılmaktadır (de Verdière ve ark, 1997).

Sisplatin, çeşitli kanser türlerini tedavi etmek için kullanılan platin bazlı bir kemoterapi ilacı olup, hücre içinde DNA'ya bağlanarak çapraz bağ oluşturan bir platin kompleks içermektedir. Bu çapraz bağlanma, DNA'ya zarar verir ve bunun sonucunda DNA tamir mekanizmaları devreye girer. Onarım mekanizmaları da zarar gördüğünde ise apoptoz vasıtasıyla hücre ölümü tetiklenir (Li ve ark, 2016). Diğer yaygın kemoterapötik maddelere benzer şekilde, sisplatinin de hepatotoksisite, nefrotoksisite, nöro-toksisite ve ototoksisite gibi çok fazla sayıda yan etki sergilediği belirtilmektedir (Zhong ve ark, 2019).

5-FU, kanser tedavisinde, özellikle kolorektal kanserde yaygın olarak kullanılan bir antimetabolit ilaçtır. Timidilat sentazın yarışmasız inhibitörüdür ve metabolitlerini RNA ve DNA'ya dahil eder. Hücrenin içinde, 5-FU farklı sitotoksik metabolitlere dönüşür. Hücrenin DNA sentezleme yeteneğini bloke ederek hücre döngüsü durdurur ve apoptozu indükler. 5-FU, spesifik olarak deoksitimidilat (dTMP) sentezini inhibe eder. Bunun sonucunda hızla bölünen kanserli hücreler, dTMP olmadan timinsiz ölüme giderler. Bunun yanı sıra, 5-FU'nun hücrede rRNA işlemesi için gerekli olan eksozom kompleksinin aktivitesini de inhibe ettiği bilinmektedir (Li ve ark, 2016). Bununla birlikte, 5-FU hematolojik ve gastrointestinal toksisiteler dahil olmak üzere çeşitli ciddi yan etkilere sahiptir (Yamaguchi ve ark, 2008).

Bir tirozin kinaz inhibitörü (TKİ) olan Sorafenib'in ileri evre HSK'da kullanımı 2007 yılında onaylanmıştır. HSK'lı hastaların çoğunun Sorafenib'e hemen cevap vermelerine rağmen, daha sonra bu hastaların ilaca karşı direnç geliştirmeleri nedeniyle etkinlik kaybı yaşadıkları belirtilmektedir. Bununla birlikte, hastaların %20 ila 38'inin de yan etkilerden dolayı ilacı kullanmayı bıraktıkları bildirilmektedir. Sorafenib'in, ciltle ilişkili toksisiteler, hipertansiyon, proteinüri, diyare, sitopeni gibi yan etkilerinin yanı sıra, tromboembolizm, kanama ve bağırsak perforasyonu gibi hayatı tehdit eden birçok ciddi yan etkilerinin bulunduğu belirtilmektedir (Crissien ve Frenette, 2014).

İleri evre HSK'lı hastalarda birinci basamak tedavisi olarak yapılan faz II ve faz III çalışmalarında diğer TKİ'lerden sunitinib, linifanib, brivanib, dovitinib veya sorafenib'in erlotinib ile kombinasyonları uygulanmış ve bu kombinasyonlardan hiçbiri sorafenib kadar etkili bulunamamıştır (Gomaa ve Waked, 2017). Diğer taraftan Lenvatinib, ileri evre HSK'da ilk aşama tedavi olarak ümit verici sonuçlar göstermiştir (Kudo, 2017). Lenvatinib, Vasküler Endotelyal Büyüme Reseptörü 1-3'ü, Fibroblast

Büyüme Reseptörü 1-4'ü, trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörünü, trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörünü, RET ve KIT genlerini hedefleyen oral bir TKİ'dir. Lenvatinib ile gözlenen en yaygın yan etkilerin ise hipertansiyon, diyare, anoreksi, kilo kaybı ve yorgunluk olduğu belirtilmektedir (Gomaa ve Waked, 2017).

Sonuç olarak, HSK tedavisinde kullanılmakta olan kemoterapötik ilaçların ciddi yan etkilere sahip olmaları, hastada ilaç direnci geliştirmeleri, yüksek toksisite göstermeleri, seçici olmamaları, yetersiz dağılım ve çözünürlüğe sahip olmaları gibi çeşitli nedenlerden dolayı etkileri sınırlı kalmaktadır. Bu sebeple, anti-tümör etkilerini en üst düzeye çıkarmak ve kemoterapötiklerin bu olumsuz etkilerini azaltmak için, yeni ve daha etkili anti-tümör ajanlarının veya ilaç kombinasyonlarının geliştirilmesi gerekmektedir.

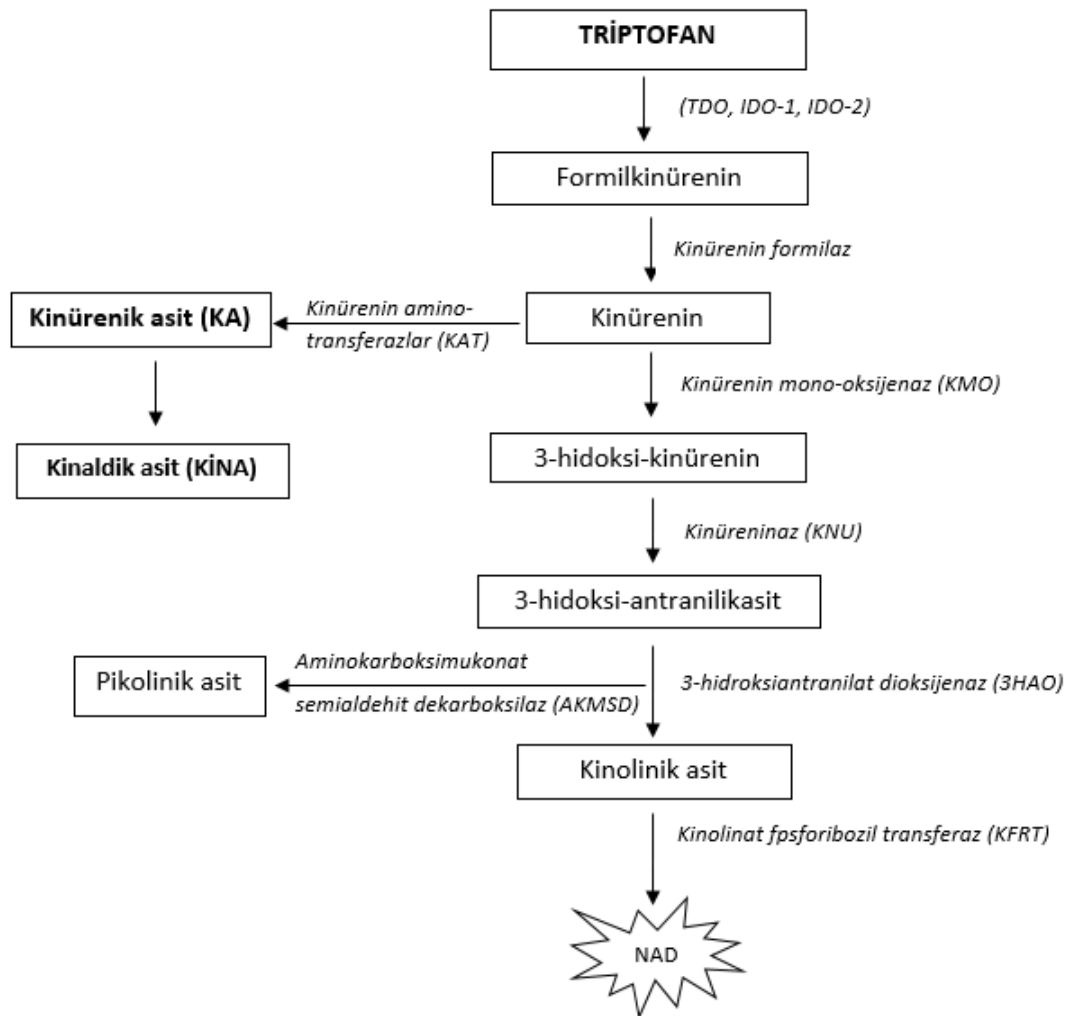
2.2. Kinürenin Yolağı, Metabolitleri ve Biyolojik Önemi

Triptofan insan vücudunun sentezleyemediği dokuz esansiyel aminoasitten birisidir ve insan vücuduna dışarıdan alınması gerekmektedir. Triptofan insan vücuduna alınır alınmaz ya albümine bağlı bir şekilde ya da serbest formda perifer dolaşıma katılmaktadır. Kan-beyin bariyerinde ise triptofan ancak yarışmalı ve spesifik olmayan L-tipi amino asit taşıyıcısı ile serbest formda taşınabilmektedir. Triptofan merkezi sinir sistemine (MSS) girdikten sonra çeşitli metabolik yolların öncüsü olarak işlev görmektedir ve serotonin ve kinürenin gibi farklı son ürünlerin meydana gelmesine neden olmaktadır (Chen ve Guillemin, 2009). Kinürenin yolağı, memelilerde hem periferik hem de merkezi sistemlerde triptofan metabolizması için ana yoldur (Mándi ve Vécsei, 2012).

Protein sentezi için kullanılmayan triptofanın yaklaşık %99'unun katabolizmasından sorumlu olan kinürenin yolağının önemi, başlangıçta nikotinamid adenin dinükleotit (NAD)'in biyolojik sentezindeki rolüne bağlanmıştır. Bununla birlikte, günümüzde yapılan çalışmalarla kinürenin yolağı ile tümör proliferasyonu, inflamasyon, depresyon ve nörodejeneratif hastalıklar arasında belirgin ilişkiler olduğu ortaya çıkarılmıştır. Kinürenin yolağı ilk kez 1853 yılında, triptofan ile beslenen hayvanlardan salgılanan ürünlerin analiz edilmesiyle keşfedilmiştir. Takip eden yıllarda ise, kinürenin yolağında görev yapan ilgili enzimleri, kimyasal dönüşümlerini ve olası hastalıklarla ilişkilerini ortaya çıkarmak üzere çok sayıda çalışmalar yapılmıştır. Kinürenin yolağında rol alan enzimlerin aktiviteleri ise 1960'lı yıllarda her bir enziminin sırasıyla memeli

dokusundan çıkarılmasıyla tamamen aydınlatılmıştır. Kinürenin yolağının enzimleri son yıllarda gerek modern moleküler biyolojik yöntemlerin gelişmesi gerekse bakteri türlerinde benzer kinürenin yollarının keşfi sayesinde moleküler düzeyde çalışılabilmektedir (Davis ve Liu 2015).

Memelilerde triptofan katabolizmasındaki ilk adım kinürenin yolağı üzerinden formil kinürenin (FK)'i üretmek üzere 3 farklı enzim tarafından katalizlenir (Şekil 2.1). Bu katalizleme işlemini gerçekleştiren enzimler; triptofan 2,3-dioksijenaz (TDO), indolamin 2,3-dioksijenaz (İDO-1) ve yakın zamanda keşfedilen İDO-1 ile ilişkili İDO-2 enzimleridir (Adams ve ark, 2014) (Şekil 2.1). Bu enzimler aynı zamanda hem bağımlı enzimlerdir.



Şekil 2.1. Kinürenin Yolağı (Chen ve Guillemin, 2009)

TDO, esas olarak karaciğerde ifade edilmesinin yanı sıra beyin, plasenta, maternal ve embriyonik dokularda da ifade edilmektedir. TDO sentezi triptofan veya kortikosteroidler tarafından uyarılmaktadır (Heng ve ark., 2016). TDO, diyetle alınan triptofanın çoğunluğunu katabolize eder. TDO sentezi diyetle alınan triptofanın yanı sıra tirozin, histidin, glukokortikoidler ve kinurenin tarafından da uyarılmaktadır (Adams ve ark, 2014). Diğer taraftan IDO-1 hepatic olarak baskın bir enzimdir ve makrofajlar, mikrogliya, nöronlar ve astrositler de dahil olmak üzere çok fazla çeşitteki hücrelerde bulunmaktadır. IDO-1'in sentezi, lipopolisakaritler, amiloid peptidler ve insan immün yetmezlik virüsü (HIV) proteinleri gibi belli sitokinler ve inflamatuvar moleküller tarafından düzenlenir. Bununla birlikte IDO-1'in sentezinin en güçlü uyarıcısı interferon gama (IFN- γ) olup, IDO-1'in hem gen ekspresyonunu hem de enzimatik aktivitesini indükleyebilmektedir (Chen ve Guillemin 2009). IDO-2 ise, IDO-1 ile benzer yapısal ve enzimatik aktivitelere sahip bir enzim olup, IDO-1 ve IDO-2'yi kodlayan genler yan yana bulunmaktadır. IDO-2; hepatositlerde, safra kanalında, serebral korteksin nöronal hücrelerinde ve dentritik hücrelerde bulunmaktadır. Bununla birlikte IDO-2 ifadesinin düzenlenmesi IDO-1'den farklı olup, sentezi D-1-metil-triptofan tarafından inhibe edilmektedir (Metz ve ark, 2007).

TDO, IDO-1 ve IDO-2 enzimleri kofaktör olarak hem proteaz grubu kullanan bilinen tek dioksijenazlardır. Ayrıca, IDO-2, oksidatif stres cevabının oluşmasını sağlayan süperoksit dismutaz enzimi dışında, süperoksiti substrat olarak kullanabilen tek enzimdir (Davis ve Liu, 2015). Memelilerde triptofan katabolizmasını sağlayan kinurenin yolağında, TDO, IDO-1 ve IDO-2 katalizli reaksiyonun ürünü olan FK, kinurenin formilaz (KF) enzimi ile ilk kararlı ara madde olan kinurenin'e (KİN) hidrolize olmaktadır. KİN'den de; 3-hidroksiantranilik asit (3-HAA), kinurenik asit (KA), pikolinik asit (PİKO) ve kinolinik asit (KİNO) ara ürünleri üretilir (Şekil 2.1) (Chen ve Guillemin 2009).

Nihai ürün olan NAD'ı oluşturmak üzere triptofan katabolizmasını gerçekleştiren kinurenin yolağında, triptofan KİN'e katabolize edildikten sonra kinurenin monooksijenaz (KMO) enzimi ile 3-hidroksikinurenin (3-HK)'e katabolize edilir. 3-HK'da kinureninaz tarafından 3-HAA'ya dönüştürülür (Myint ve ark, 2012). 3-HAA ise daha sonra NAD'a parçalanan KİNO'yu oluşturur. Bu oksidasyon yolağı tamamlanırken az miktarda PİKO oluşumu da gerçekleşir. Diğer taraftan KİN, kinurenin

aminotransferaz (KAT)'lar tarafından KA'e katabolize edilir (Şekil 2.1). Karaciğerdeki bu metabolizma çok kararlı olmayıp, yaş ve cinsiyetten de etkilenmektedir (Myint ve ark, 2012).

Kinürenin yolağında oluşan triptofan katabolitlerinin tümü hücre içi NAD oluşumuna katılmazlar. 3-HAA, PİKO, KİNO ve KA gibi triptofan katabolitlerinin önemli bir kısmının biyolojik aktivite göstermek üzere hücre dışına salındıkları belirtilmektedir (Braidy ve ark, 2011). Kinürenin yolağının bu metabolitleri toplu olarak "kinüreninler" olarak adlandırılırlar ve birçok farklı fizyolojik ve patolojik süreçte yer alırlar (Schwarcz ve ark, 1983; Schwarcz ve Pellicciari 2002; Sas ve ark, 2007). Kinürenin yolağı ile ilgili yapılan çalışmalar daha çok nörodejeneratif ve eksitotoksik hasarlarla ilgilidir (Stone ve Addae 2002; Stone ve Darlington 2002; Sas ve ark, 2007). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda, kinürenin yolağının hem doğal hem de kazanılmış (adaptif) immün yanıtların bir düzenleyicisi olduğu ve triptofan metabolizması ile kinürenin üretiminin immün sistem ve sinir sistemi üzerinde önemli rolü olduğu gösterilmiştir (Mándi ve Vécsei, 2012; Braidy ve Grant, 2017). Ayrıca, kinürenin yolağı metabolitlerinin hücre iletişimi ve sağkalımı ile ilgili birçok süreçte de önemli rol oynadıkları bildirilmektedir (Walczak ve ark, 2011).

2.2.1. Kinürenin Yolağı Metabolitlerinin Hastalıklarla Olan İlişkileri

Kinürenin yolağı immün cevabın düzenlenmesinde ve immün toleransının uyarılmasında etkili bir mekanizmadır. Kinürenin yolağının metabolitlerinin (kinüreninlerin), farklı doğal özellikleri ile birbirlerinin etkilerini sinerjik şekilde artırabildikleri ya da antagonize şekilde baskılayabildikleri belirtilmektedir. Çeşitli patolojik koşullar altında triptofan, kinüreninler ve Kinüren/Triptofan (K/T) oranının ölçülmesiyle, immün aktivasyon derecesi ve hatta kinürenin yolu ile hastalıklar arasındaki ilişki hakkında bilgi sahibi olunabileceği bildirilmektedir. Bununla birlikte, triptofan,IDO-1 ve kinüreninler arasındaki karmaşık etkileşimin tam olarak anlaşılabilmesi için daha fazla sayıda araştırma yapılması gerektiği belirtilmektedir.

Günümüze kadar kinürenin yolağı; adaptif bağışıklık yetersizliği sendromu, demans kompleksi, Alzheimer hastalığı (AH), şizofreni, Huntington hastalığı, Amyotrofik lateral skleroz (ALS), neoplazi ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalık ve rahatsızlıklarla ilişkili bulunmuştur. Yapılan çeşitli çalışmalarda, belirtilen bu patolojik durumlarda triptofan ve metabolitlerinin düzeyleri ölçülmüş ve ölçülen düzeylerde

önemli dengesizlikler gözlenmiştir. Bu metabolitlerin düzeyleri normal sınırlara getirildiğinde ise semptomların azaldığı gözlenmiştir (Chen ve Guillemin 2009).

Triptofan yolağı metabolitlerinden olan 3-HAA'nın immünoregülasyonda rol oynadığı belirtilmektedir. Mürin makrofajları ile yapılan bir çalışmada, 3-HAA'nın milimolardan daha düşük konsantrasyonlarının nükleer faktör Kappa B aktivasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Sekkai ve ark, 1997). Benzer şekilde, fare makrofajları ile yapılan bir diğer çalışmada da, 3-HAA'nın antimikrobiyal ve antitümöral aktivitelerle yakından ilişkili olan ve nitrik oksit (NO) oluşumunu katalizleyen indüklenebilir nitrik oksit sentaz ekspresyonunu ve aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Nathan ve Hibbs, 1991). Ayrıca, yapılan bir başka çalışmada da 3-HAA'nın nörotoksisiteye yol açan konsantrasyon seviyelerinin oldukça altındaki konsantrasyonda kaspaz-8 aktivasyonu ile mitokondriden sitokrom c salımını sağlayarak mürin timositler ve T helper 1 (Th1) hücreleri üzerinde seçici olarak apoptotik etki gösterdiği de belirtilmiştir. Makrofajlarda görülen bu etki ise 3-HAA'nın periferel immün regülasyonunda önemli rolü olduğunu göstermektedir (Fallarino ve ark, 2002).

Triptofan yolağının bir diğer metaboliti olan PİKO'nun ise endojen bir nöroprotektan ve doğal bir demir ve çinko şelatörü olduğu belirtilmektedir (Fernandez-Pol, 1977). PİKO'nun aynı zamanda hücrel büyüme kontrol etmesinin yanı sıra, anti-tümör, antifungal ve antiviral aktivitelerinin de bulunduğu bildirilmektedir. MBL-2 lenfoma hücreleri ile aşılınmış farelerle yapılan *in vivo* bir çalışmada, PİKO'nun tümör hücrelerinin rRNA metabolizmasını değiştirdiği ve makrofajların sitotoksik ve tümör öldürücü aktivitelerini artırdığı görülmüştür. Çalışma sonucunda farelerin hayatta kalma oranlarının arttığı belirtilmiştir (ruffmann 1987). PİKO'nun antifungal aktivitesi ile ilgili yapılan bir çalışmada, PİKO'nun IFN- γ ile sinerjik etki göstererek *Candida albicans*'ın büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Abe ve ark, 2004). HIV-1 ve insan herpes simpleks virüs-2 ile enfekte edilmiş hücrelerle yapılan bir başka çalışmada da, nispeten yüksek konsantrasyonlardaki (1,5-3 mM) PİKO'nun, enfekte olmuş hücreler üzerinde antiviral, sitotoksik ve apoptotik etkilere sahip olduğu görülmüştür (Fernandez-Pol ve ark, 2001). PİKO'nun aynı zamanda, kinolinik asidin neden olduğu nörotoksisiteyi bloke ettiği de bildirilmektedir (Beninger ve ark, 1994).

Triptofan yolağı metabolitlerinden KİNO'nun, glutamat reseptörlerinden biri olan nöronal NMDA reseptörünün alt birimlerini seçici olarak aktive ettiği belirtilmektedir.

Triptofan beyinde FK yerine 5-hidroksitriptamin'e metabolize edilmektedir. Bu sebeple, beyindeki KİNO konsantrasyonu kan ve sistemik dokulara oranla daha düşüktür (Heyes ve ark, 1997). Ayrıca, immün yanıt sırasında sistemik veya MSS'deki KİNO seviyesinin ve IDO-1 aktivitesinin çarpıcı biçimde yükseldiği belirtilmektedir (Heyes ve ark, 1992; Espey ve ark, 1996). KİNO'nun, immün regülasyon ve nörotoksik özellikleriyle ilgili olarak birçok araştırma yapılmıştır. KİNO'nun immün sistemle ilişkisine dair yapılan *in vitro* bir çalışmada, KİNO'nun Th1 hedef hücrelerinde apoptozu indüklediği ve CD4⁺, CD8⁺ T lenfositlerinin ve doğal öldürücü hücrelerin çoğalmasını seçici olarak inhibe ettiği görülmüştür (Belladonna ve ark, 2006). KİNO'nun, AH (Guillemin ve ark, 2003), Parkinson (Zinger ve ark, 2011), ALS (Guillemin ve ark, 2005), Huntington (Schwarcz ve ark, 2010) ve multipl skleroz (Lim ve ark, 2010) gibi nörotoksositeyle ilişkili bazı inflamatuvar beyin hastalıklarında da rol aldığı bildirilmektedir.

Triptofan yolağının bir diğer metaboliti olan ve tez çalışması kapsamında karaciğer kanserindeki antitümöral etkisi araştırılan KA'nın ise, konsantrasyon seviyesine bağlı olarak belirli fizyolojik etkilere sahip olduğu belirtilmektedir (Walczak ve ark, 2011). KA'nın gastrointestinal sistem patolojisindeki rolüne dair yapılan çeşitli çalışmalarda, KA'nın zehirli bir Atlantik deniz kabuklusunun neden olduğu mide ve duodenal ülserasyona karşı koryucu olduğu (Glavin ve ark, 1989) ve sıçanlarda stres ve etanolün neden olduğu ülserleri hafiflettiği (Glavin ve Pinsky, 1989) gösterilmiştir. Bu çalışmalara benzer şekilde, deneysel olarak kolon tıkanıklığı geliştirilen köpeklerde KA'nın hipermotilite ve ksantin oksidaz aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir (Kaszaki, 2008). Ayrıca, yapılan başka bir çalışmada da KA'nın sıçanlarda deneysel olarak indüklenen akut kolitin erken evrelerinde bağırsak hareketliliğini ve inflamatuvar aktivasyonu azalttığı belirtilmiştir (Varga ve ark, 2010). Tüm bu çalışmalar, KA'nın özellikle ülserler, kolon tıkanıklığı veya kolit gibi gastrointestinal sistem patolojileri üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. KA'nın gastrointestinal sistem patolojisindeki rolüne dair son yıllarda yapılan başka bir çalışmada ise, KA'nın kolon adenokarsinoma (HT-29) hücre hattında bir siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü olan p21 Waf1/Cip1 ekspresyonunu artırarak hücre proliferasyonunu ve DNA sentezini inhibe ettiği ve bu hücreler üzerinde antitümöral aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Walczak ve ark, 2012a). Ayrıca, tip 2 diyabet, multipl skleroz, huzursuz bağırsak sendromu ve kronik böbrek hastalıkları gibi inflamasyon ilişkili hastalıklarda hastaların

periferik kanındaki KA düzeylerinin artış gösterdiği belirlenmiştir (Wirthgen ve ark, 2018). Romatoid artritli hastalarla yapılan bir çalışmada, hastaların serumlarında bulunan KA düzeyi ile sabah tutulumu ve ağrı skoru pozitif korelasyonlu bulunmuştur (Parada-Turska ve ark, 2013). Elde edilen bu sonuç ise, inflamasyon şiddeti ile dolaşımdaki KA düzeyinin doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, bu konuda yapılan *in vitro* bir çalışmada da, KA'nın sinoviyositlerin proliferasyonunu inhibe ettiği ve sinoviyal fibroblastların hiperplazisini önleyen ilaçların antiproliferatif etkilerini arttırdığı gösterilmiştir (Parada-Turska ve ark, 2006). Ayrıca, bozulmuş KA sentezinin RA'da hiperplazi gelişimini tetikleyebileceği öne sürülmüştür (Wirthgen ve ark, 2018). Benzer şekilde, triptofan metabolizma dengesinin bozulması ile depresyon veya şizofreni gibi zihinsel bozuklukların gelişimi arasında bir bağlantı olduğu belirtilmiş ve AH, küme baş ağrısı ve kronik migren hastalarının kanındaki KA düzeyinin sağlıklı bireylere göre azalma gösterdiği bildirilmiştir (Wirthgen ve ark, 2018). Bu nedenle, KA üretimindeki artışın, nörotoksik etkilere karşı dengeleyici bir cevap olarak işlev görebileceği belirtilmiştir (Wirthgen ve ark, 2018).

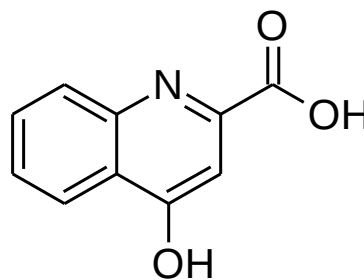
KA'nın gastrointestinal kanaldaki fizyolojik rolünün yanısıra, kanser hücre çoğalmasında da önemli bir rol oynayabileceği belirtilmektedir (Walczak ve ark, 2011). KA'nın kanser hücre proliferasyonundaki rolüne ilişkin yapılan çeşitli çalışmalarda KA'nın; hücre büyümesini, DNA sentezini ve hücre göçünü engelleyerek, çeşitli kanser hücre hatlarında antiproliferatif aktivite sergilediği gösterilmiştir (Walczak ve ark, 2011, 2012b, 2014a). Yapılan *in vitro* çalışmalarda, KA'nın insan kolon adenokarsinoma (HT-29, Caco-2 ve LS-180), böbrek kanser hücreleri (Caki-2) ve glioblastoma hücreleri (T-986) dahil olmak üzere birçok kanser hücre hattının çoğalmasını inhibe ettiği görülmüştür (Walczak ve ark, 2011, 2012b, 2014a). Bununla birlikte, bu çalışmalarda KA'nın kanser hücrelerindeki antiproliferatif aktivitesinin potansiyel moleküler mekanizmaları tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır.

Triptofan metabolizmasının bir diğer endojen metaboliti olan kinaldik asit (KİNA) ise KA'nın dehidroksilasyonu sonucu oluşur ve KA ile yüksek düzeyde yapısal benzerliğe sahiptir (Kaihara ve Price 1962). Diğer taraftan, intestinal floranın da KİNA üretimine katkıda bulunduğu bildirilmektedir (Yokoi ve ark, 1998). Tez çalışması kapsamında karaciğer kanserindeki antitümöral etkisi araştırılan KİNA'nın; glikoneogenez, proinsülin sentezi ve insülin salınımı, metal iyonları şelatlama, oksijen türevlerini

uzaklaştırma ve kolon içindeki patojenik mikrofloradaki büyümeyi baskılama gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bildirilmektedir (Langner ve ark, 2015). Bununla birlikte, bilinen bu biyolojik aktivitelere rağmen KİNA'nın insan organizmasındaki rolü hala tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. KİNA'nın antitümöral potansiyeli ile ilgili literatürde çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan *in vitro* bir çalışmada; çeşitli insan kolon adenokarsinoma hücre hatlarında (HT-29, Caco-2 ve LS-180) KİNA'nın tüm hücre hatlarında çoğalmayı inhibe ettiği görülmüştür (Langner ve ark, 2015). Bununla birlikte, çalışmada KİNA'nın antiproliferatif aktivitesinin moleküler mekanizması da tam olarak açığa çıkarılamamıştır. Bu sebeple, hem antiproliferatif aktiviteye sahip KA ile olan yapısal benzerliğinden hem de insan organizmasında doğal olarak bulunuşundan dolayı, KİNA'nın anti-tümör potansiyelinin değerlendirilmesi oldukça önemlidir.

2.3. Kinürenik Asit (KA)

Bir triptofan metaboliti olan KA (Şekil 2.2), ilk olarak idrarda Liebig tarafından keşfedilmiş (Liebig 1853) ve 1980 ve 1990'lı yıllarda iyonotropik glutamat reseptörünün bir antagonisti olduğu belirtilmiştir (Turski ve ark, 2013). Daha sonra yapılan araştırmalarda KA'nın insan beyninde bulunduğu öne sürülmüş ve KA'nın birçok doku ve fizyolojik sıvıda değişen konsantrasyonlarda bulunduğu bildirilmiştir (Turski ve ark, 2011). Ayrıca yapılan bir çalışmada, bir triptofan metaboliti olarak bilinen KA'nın, aynı zamanda çeşitli besin maddelerinde bulunanana dış kaynaklı doğal bir madde olduğu ve ince bağırsak mikroflorası tarafından da üretildiği gösterilmiştir (Turski ve ark, 2014). KA içeren gıdaların tüketimi ile KA'nın intestinal lümeninden kolayca absorbe edilerek kan dolaşımı yoluyla periferik organlara taşındığı belirtilmektedir (Turski ve ark, 2009).



Şekil 2.2. Kinürenik Asitin Kimyasal Yapısı

KA, tüm iyonotropik glutamat reseptörlerinin ve bir nöroprotektif metabolit olarak kabul edilen $\alpha 7$ nikotinik asetilkolin reseptörünün ($\alpha 7nAChR$) antagonisti olmakla birlikte, G-protein bağlı reseptör 35 (GPR35)'in de bir agonistidir (Turski ve ark, 2011). Buna bağlı olarak, KA'nın MSS'deki fizyolojisi ve patolojisindeki rolünü araştırmak için sayısız araştırma yapılmış ve çeşitli nörolojik hastalıkların patogenezinde büyük rol oynadığı tespit edilmiştir. Beyinde genellikle nanomolar konsantrasyonlarda bulunan KA'nın endojen bir antikonvülzan ve nöroprotektan olduğu gösterilmiştir. Ancak, KA'nın hem insan beynindeki konsantrasyonunun, hem de kan-beyin bariyeri geçişinin düşük olmasından dolayı, son yıllarda KA'nın daha çok beyin dışındaki potansiyel rolü araştırılmıştır (Turski ve ark, 2013).

İnsan organizmasında triptofandan KA üretiminin, günde yaklaşık olarak 840 - 1160 μg olduğu, ancak idrarla atılan KA konsantrasyonunun günde 1143.9 - 5376.6 μg arasında değiştiği belirtilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda, KA'nın sindirim sisteminden absorbe edildiği ve buradan kan dolaşımına geçtiği gösterilmiştir (Turski ve ark, 2009).

İnsan organizmasındaki KA içeriğinin yalnızca kinürenin yolağından üretilmediği, büyük bir kısmının kinürenin yolağı dışındaki farklı kaynaklardan sağlandığı belirtilmektedir (Turski ve ark, 2011). KA içeren bu eksojen kaynaklar; çeşitli besin maddeleri, tıbbi bitkiler ve ince bağırsak mikroflorası (kolon mikrobiotası)'dır (Kuc ve ark, 2008; Turski ve ark, 2011). KA içeren bu kaynaklar aşağıda açıklanmıştır.

- **Besin Maddelerindeki KA İçeriği;** KA'nın daha önce, *Gingko biloba* (Drieu, 1986) ve *Ephedra transitoria* (Al-Khalil ve ark, 1998) gibi bitkilerin bir bileşeni olduğu belirtilmiş, ancak bu çalışmalarda KA'nın tam olarak içeriği ölçülmemiş ve kesin tanımlanması yapılmamıştır. Daha sonra yapılan bir çalışmayla 37 adet gıda ve bal arısı ürünüde KA'nın varlığı kromatografik olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada; en yüksek KA konsantrasyonuna bal arısı ürünlerinde rastlanmıştır. Yiyecek, içecek ve halk ilacı olarak yaygın şekilde kullanılan Propolis'in, 1.63 $\mu g/g$ KA ihtiva ettiği görülmüştür. Çeşitli çiçek balı ve arı polenlerinde ise sırasıyla 0.87 ve 0.64 $\mu g/g$ KA bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca taze brokoli (0.42 $\mu g/g$) ve patatesten (0.51 $\mu g/g$) de yine yüksek KA konsantrasyonları ölçülmüştür. Bu çalışmada ilginç bir şekilde, haşlama işleminin havuç, karnabahar ve brokoli gibi bazı sebzelerde KA konsantrasyonunu sırasıyla %37, %81 ve %88'e kadar azalttığı görülmüştür. Bununla birlikte patatesteki KA içeriğinin haşlama işleminden etkilenmediği

görülmüştür (Turski ve ark, 2009). Yapılan başka bir çalışmada da yine balda son derece yüksek oranda KA seviyesi (2.114 µg/g) ölçülmüştür (Beretta ve ark, 2009). Propolis, bal ve arı poleni, halk tıbbında ve apiterapide yaygın olarak kullanılmakta olup bu çalışmalarda da belirtildiği gibi fazla miktarda KA içermektedir. Bunun üzerine KA'nın; tıbbi bitkilerdeki miktarı da kromatografik olarak analiz edilmiştir (Turski ve ark, 2011).

- **Tıbbi Bitkilerdeki KA İçeriği;** Karahindiba (*Taraxacum officinale*), ısırgan otu (*Urtica dioica*), kırlangıçotu (*Chelidonium majus*) ve atkestanesi (*Aesculus hippocastanum*) gibi dört tıbbi bitki üzerinde yapılan analizler sonucunda KA'nın bu bitkilerin yapraklarında, çiçeklerinde ve köklerinde olmak üzere incelenen tüm kısımlarında mevcut olduğu bulunmuştur. Tablo 2.1'de de gösterildiği gibi, KA konsantrasyonunun, bitkinin kısımlarına göre önemli ölçüde değiştiği görülmektedir.

Tablo 2.1. Taze toplanan bitki materyalinin farklı kısımlarındaki kinürenik asit içeriği

Bitkisel ilaç	KA içeriği (µg/g ıslak ağırlık)		
	Yaprak	Çiçek	Kök
Kırlangıçotu	0.283	0.069	0.022
Isırgan otu	0.445	0.243	0.063
Karahindiba	0,489	0.041	0.011
Atkestanesi	0.636	0.043	Belirli değil

Seçilen tüm bitkilerin yapraklarında yüksek miktarda KA bulunurken, çiçeklerinde düşük, köklerinde ise çok daha düşük miktarlarda KA konsantrasyonu gözlenmiştir. KA bileşiğinin en yüksek konsantrasyonu, 0.636 µg/g ortalama yaş ağırlığı ile atkestanesinin yapraklarında tespit edilmiştir (Tablo 2.1). KA'nın topraktaki içeriği de analiz edilmiş ve yüksek konsantrasyonda KA varlığı gözlenmiştir. Çalışma sonucunda bitkilerde KA'nın öncü L-kinürenin'den enzimatik olarak sentezlenebildiği gibi, bitkilerin KA'yı topraktan da absorbe edebildiği gösterilmiştir (Turski ve ark 2011). Yapılan bir çalışmada bitkisel tabletler, saşe formundaki otlar ve bitkisel çaylar, üreticilerin talimatlarına uygun olarak hazırlanmış ve önerilen maksimum günlük doz miktarında bulunan KA içeriği analiz edilmiştir (Tablo 2.2). Tablo 2.2'de de gösterildiği gibi, maksimum günlük bitkisel ilaç dozundaki en yüksek KA konsantrasyonu sarı kantaronun saşe formunda 32.6 µg olarak belirlenmiştir (Walczak ve ark, 2011).

Tablo 2.2. Bitkisel ilaçların maksimum günlük ilaç dozundaki KA içeriği

Bitkisel ilaç	Hazırlama Yöntemi / Sıcaklık / Zaman	Maksimum günlük dozdaki KA içeriği (µg/gün)
Isırgan otu kökü	İnfüzyon / 90 °C / 15 dk	1.1
Sığır otu çiçeği	İnfüzyon / 90 °C / 15 dk	2.4
Ihlamur çiçeği	İnfüzyon / 90 °C / 15 dk	4.2
Ebegümeci çiçeği	İnfüzyon / 90 °C / 10 dk	6
Papatya çiçeği	İnfüzyon / 90 °C / 10 dk	10.2
Altın otu çiçeği	Dekoksiyon / 100 °C / 5 dk	10.7
Keçisakalı otu	İnfüzyon / 90 °C / 5 dk	13.3
Nane yaprağı	İnfüzyon / 90 °C / 10 dk	19.5
Mürver çiçeği	Dekoksiyon / 100 °C / 3 dk	20.7
Isırgan yaprağı	İnfüzyon / 90 °C / 5 dk	32.5
Sarı Kantaron otu	İnfüzyon / 90 °C / 60 dk	32.6

KA'nın farmakolojik özellikleri ve tıbbi bitkilerde yüksek konsantrasyonlarda bulunması göz önüne alındığında, özellikle sindirim sistemi üzerinde terapötik potansiyele sahip olabileceği ve bunun yanısıra yeni ve değerli bir besin takviyesi olarak kullanılabileceği öne sürülmektedir (Turski ve ark, 2011). Bu gıdaların tüketimi ile KA'nın intestinal lümeninden kolayca absorbe edilerek kan dolaşımı yoluyla periferel organlara taşındığı belirtilmektedir. Yapılan bir çalışmada, sıçanlara intragastrik olarak uygulanan KA'nın ince barsaklardan emilerek kan dolaşımıyla karaciğer ve böbreğe taşındığı ve bu organlardaki KA konsantrasyonunun mikromolar seviyelere ulaşmış olduğu gösterilmiştir. Ayrıca KA uygulamasından sonra enterik rota incelendiğinde, periferel dokudaki KA içeriğinin uzun süre muhafaza edilebildiği de bildirilmiştir (Turski ve ark, 2009).

- **İnce Bağırsak Mikroflorasının KA Üretimine Katkısı;** KA'nın sıçan incebağırsak lümeninde yüksek mikromolar konsantrasyonlarda bulunduğu görülmüş ve bu üretimin intestinal flora tarafından yapıldığı öne sürülmüştür (Kuc ve ark, 2008). Bu çalışmada, KA'nın bağırsak sıvısında bulunduğu ve bu bileşiğin konsantrasyonunun ince bağırsak boyunca arttığı, barsağın distal kısmındaki sıvıda ise ortalama 16 µM konsantrasyona kadar ulaştığı bildirilmiştir. İnce bağırsak duvarındaki KA içeriği ise 0.21 ila 0.29 nmol /g (0.2 - 0.3 µM) olarak ölçülmüştür ki bu da bağırsak sıvısında

ölçülen KA miktarından çok daha düşük bir miktardır. Böylece, KA'nın ince bağırsak çeperinde üretilmediği ve bağırsak sıvısına salgılanmadığı da anlaşılmıştır. Ayrıca çalışmada, ince bağırsaktaki KA kaynağının analiz edilmesi amacıyla; fareler 24 saat boyunca KA içeren standart hayvan yeminden mahrum edilmiş, böylece sindirim sistemi besin maddelerinden arındırılmıştır. Sonuç olarak tesbit edilen KA kaynağının besin maddelerinden kaynaklanmadığı anlaşılmıştır. Çalışmanın sonucunda *Escherichia coli*'nin KA üretebildiği ve hücre dışına salındığı yani KA'nın bağırsak mikroflorasının bir ürünü olduğu gösterilmiştir (Kuc ve ark, 2008).

E. Coli ile ilgili daha önce yapılan bir çalışmada da *E. Coli*'de AspAT enzimi bulunduğu gösterilmiş olup, bu enzim yüksek kinürenin aminotransferaz ve glutamin transaminaz K aktivitelerine sahiptir. Çalışmada kinürenin ve piruvat ile takviye edilmiş *E. Coli*'nin reaksiyon ürünlerinde KA birikimi gözlenmiştir (Han ve ark, 2001). Ayrıca jejunum ve ileumda, mikroflora konsantrasyonu ile KA içeriği arasında pozitif korelasyon olduğu bildirilmiştir. Bu bulgular bağırsak florasının intestinal KA'nın ortak havuzunu oluşturmaya katılabileceğini göstermektedir. Öte yandan, KA'nın bakteriyel büyümeyi etkilediği de gösterilmiştir (Kuc ve ark, 2006). İlginç şekilde, düşük ve orta düzey KA konsantrasyonları bazı probiyotiklerin büyümesini teşvik ederken, yüksek konsantrasyonlardaki KA'nın antibakteriyel özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Kuc ve ark, 2006; Dolecka ve ark, 2011).

2.3.1. KA'nın Merkezi Sinir Sistemi (MSS) ve Perifer Dokulardaki Dağılımı

KA ilk olarak, 1853'te idrarda keşfedilmiş (Liebig, 1853), daha sonra plazmada 0.004-0.06 μM arasında değişen konsantrasyonlarda mevcut olduğu gösterilmiştir (Amirkhani ve ark, 2002). Ayrıca insan ve sıçanla ilgili yapılan çeşitli araştırmalar sonucunda KA'nın MSS'de ve perifer dokulardaki içeriği analiz edilmiştir. Buna göre; Tablo 2.3'te de gösterildiği gibi beyin omurilik sıvısı ve beyindeki KA konsantrasyonları sırasıyla 0.001-0.005 μM ve 0.14-1.58 μM aralığında tespit edilmiştir. Bunun yanında KA'nın beyin dışında periferik olarak çeşitli konsantrasyonlarda idrarda, serumda, amniyotik sıvıda ve sinoviyal sıvıda bulunduğu da gösterilmiştir. KA'nın aynı zamanda insan salyası, gastrik sıvı, safra, pankreatik sıvı ve insan kalın barsak mukusu gibi gastrointestinal yoldaki fizyolojik sıvılarda da bulunduğu bildirilmiştir. KA'nın periferik dokulardaki konsantrasyonu 0.09 μM (sıçan bağırsak duvarında) ile 0.815 μM (sıçan böbreğinde) arasında değişebilmektedir (Turski ve ark, 2013).

KA konsantrasyonu, gastrointestinal sistem boyunca kademeli olarak artmaktadır. Vücut sıvılarında KA'nın en düşük konsantrasyonu 0.003 μM ile insan tükürüğünde, en yüksek konsantrasyonu ise 16.1 μM ile sıçan ileum mukusunda saptanmıştır. Sıçan ileumundaki KA içeriğinin, insan tükürüğünden yaklaşık 5400 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir. KA konsantrasyonunun bu kadar belirgin şekilde derecelendirilmesinin sindirim sisteminde fizyolojik önemi halen bilinmemektedir (Turski ve ark, 2013).

Tablo 2.3. Doku ve vücut sıvılarındaki KA içeriği (Turski ve ark, 2013)

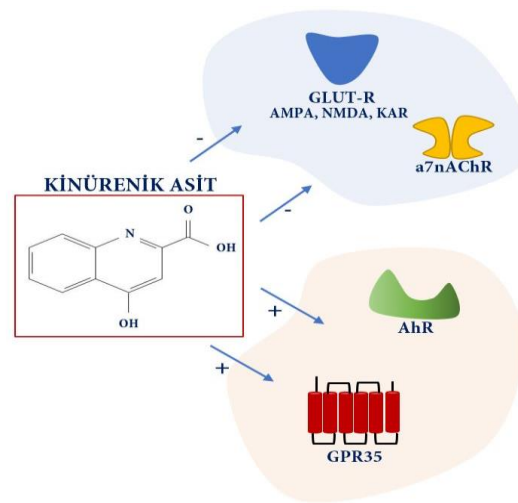
Doku	KA içeriği (μM)	Organizma
Beyin	0.14 - 1.58	İnsan
Karaciğer	0.161	Sıçan
Akciğer	0.172	Sıçan
Bağırsak	0.09 - 0.29	Sıçan
Dalak	0.129	Sıçan
Kas	0.197	Sıçan
Plazma	0.004 – 0.060	İnsan
Böbrek	0.815	Sıçan
İdrar	4 - 40	İnsan
Beyin omurilik sıvısı	0.001 – 0.005	İnsan
Sinovyal sıvı	0.016	İnsan
Amniyotik sıvı	1.132	İnsan
Tükürük	0.003	İnsan
Gastrik sıvı	0.01	İnsan
Safra	0.31 – 0.84	İnsan
Pankreatik sıvı	0.76	Domuz
Jejunum - mukus	1.49	Sıçan
Proksimal ileum - mukus	3.30	Sıçan
Orta ileum - mukus	8.08	Sıçan
Distal ileum - mukus	16.10	Sıçan

İnsan safrasındaki KA miktarı 0.31-0.83 μM konsantrasyonları arasında tespit edilmiştir. Domuz pankreatik sıvısında ise KA'nın nispeten yüksek konsantrasyonu (0.76 μM) gözlenmiştir. Bağırsaktaki KA Emilimi ve KA'nın safra ve pankreas sıvılarındaki varlığına ilişkin verilere dayanarak, bağırsak sıvısında hepatik-pankreatik-intestinal sekresyon-emilim fonksiyonel döngüsü, yüksek KA konsantrasyonu oluşumuna yol açabilmektedir. Ayrıca, kolon mikrobiyota aktivitesinin, KA'nın gastrointestinal içeriğinin muhafaza edilmesine katkısının olduğu öne sürülmektedir. KA'nın idrardaki içeriği ise 4-40 μM arasında değişmektedir (Turski ve ark, 2013).

Yapılan çalışmalar, beyin omurilik sıvısı ve beyindeki KA konsantrasyonları glutamat veya kolinerjik reseptörleri etkilemek için gereken konsantrasyondan düşük iken, ileum lümenindeki KA konsantrasyonunun Glutamat, alfa-7 kolinerjik ve in vitro GPR35 reseptörleri ile etkileşime girebilecek kadar yüksek olduğu tespit edilmiştir (Wang ve ark, 2006). Sonuç olarak, mevcut veriler KA'nın sindirim sisteminin lümeninde yüksek konsantrasyonda bulunduğunu göstermektedir. KA hem insan vücudunda triptofandan üretilirken hem de çeşitli yiyecek ve bitkilerden absorbe edilmektedir. Bunun yanında bağırsak florası da KA üretimine katkıda bulunmaktadır. Bu yüzden, yapılan son çalışmalarda KA'nın sindirim sisteminin işleyişinde önemli rol oynayabileceği ve KA'nın gastrointestinal sistem hastalıklarını tedavi etmek için kullanıldığında terapötik özelliklere sahip olabileceği öne sürülmektedir.

2.3.2. KA'nın Reseptörler Üzerindeki Etki Mekanizması

KA, üç iyonotropik glutamat reseptörünün tümünü yaklaşık olarak aynı dereceye kadar yüksek mikromolar konsantrasyonlarda inhibe eden, rekabetçi, geniş spektrumlu bir glutamat reseptör antagonistidir. Bunlar; N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri, kainat reseptörleri ve α -amino-3-hidroksi-5-metil-4 izoksazol propionik asit (AMPA) reseptörleridir (Chen ve Guillemin, 2009). KA, düşük konsantrasyonlarda NMDA reseptörünün glisin modülatör bölgesi üzerinde etki ederken, daha yüksek konsantrasyonlarda, NMDA reseptörlerinin glutamat bölgesinde ve AMPA reseptörleri üzerinde etki etmektedir (Schwarcz ve ark, 2012).



Şekil 2.3. Kinürenik Asitin Etki Mekanizması (Wirthgen ve ark, 2018)

Son yıllarda, KA'nın başka hedefleri de belirlenmiştir. Bunlardan sadece $\alpha 7nAChR$, şimdiye kadar beyinde “iyi niyetli” bir KA reseptörü olarak tanımlanmıştır, G-protein bağlı reseptör GPR35 ve aril hidrokarbon reseptörü gibi başka reseptörlerin rolü ise araştırılmaya devam edilmektedir (Schwarcz ve ark, 2012). Şekil 2.3'te de gösterildiği gibi KA, $\alpha 7nAChR$ ve GLUT-R'nin rekabetçi olmayan bir antagonisti iken, büyük ölçüde eksprese edilen GPR35 ve AhR'nin de bir agonistidir (Wirthgen ve ark, 2018).

2.3.2.1. KA'nın GPR35 Reseptörü Üzerindeki Etkisi

G-protein-bağlı reseptör 35, periferik monositler, bazofiller, eozinofiller, iNKT (değişmez doğal öldürücü hücreler) ve mast hücreleri, dahil olmak üzere çeşitli immün hücrelerinde eksprese edilmektedir (Fallarini ve ark, 2010; Yang ve ark, 2010). GPR35 ekspresyonu, sindirim sistemi boyunca, akciğer, iskelet kası, rahim ve dorsal kök ganglionunda yüksek düzeyde iken, kalp, karaciğer, mesane, omurilik, bütün beyin ve beyincikte ise orta düzeyde tesbit edilmiştir. KA, GPR35'in bildirilen ilk agonist ligandıdır. İlk olarak, çin hamsteri yumurtalık hücre hattında yapılan bir çalışmada yüksek verimli tarama sistemiyle hücre içi kalsiyum (Ca^{+2}) değişiklikleri belirlenerek, GPR35 ile birlikte eksprese edilen bir G-protein karışımı olarak tanımlanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarla, KA-GPR35 etkileşiminin, sempatik nöronlarda N tipi Ca^{+2} kanallarını inhibe ettiğini ve astrositlerde ATP ile indüklenen kalsiyum geçişlerinin plato fazını azalttığı ortaya konulmuştur. Başka bir çalışmada ise, KA'nın aracılık ettiği GPR35 aktivasyonunun, cAMP düzeyini azalttığı gösterilmiştir (Wirthgen ve ark, 2018).

Ya bir çalışmada, KA'nın, fosfotidilinositol 3-kinaz (PI3K) / protein kinaz B (Akt) ve mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolları üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olabileceği öne sürülmüştür. Bu çalışmada KA'nın kolon kanseri hücrelerinde hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinazların (ERK) 1/2, p38 MAPK ve Akt'nin fosforilasyonunu azalttığı, ayrıca KA'nın β -katenin birikimini indüklediği gösterilmiştir (Walczak ve ark, 2014b). MAPK, PI3K/Akt ve β -katenin yollarının ise GPR sinyalinin iyi bilinen hedefleri olduğu bildirilmiştir (Wirthgen ve ark, 2018). Dolayısıyla, yapılan çalışmada hücrelerin KA ile muamelesi sonucunda, ERK ve p38'te gözlenen inhibisyon ve β -katenin birikiminin indüklenmesi, GRP35 aktivasyonunun bir sonucu olabileceği de bildirilmiştir (Walczak ve ark, 2014b).

2.3.2.2. KA'nın AhR'nin Reseptörü Üzerindeki Etkisi

Aril hidrokarbon reseptörü, immün cevabının düzenlenmesinde kritik etkilere aracılık eden bir KA reseptörüdür. AhR bir liganda bağlanırken, AhR nükleer trans-yerleştiricisi ile dimerize olur ve bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür. AhR nakavt farelerin kullanıldığı birçok çalışmada, bu reseptörün, inflamasyonda önemli bir immün düzenleyici rolü olduğu gösterilmiştir. Örneğin, AhR-eksikliği olan farelerde, Lipopolisakkarit kaynaklı septik şoka karşı yüksek hassasiyet olduğu ve akciğerdeki lokal inflamasyondan sonra daha güçlü bir cevap geliştiği gösterilmiştir (Thatcher ve ark, 2007; Sekine ve ark, 2009). AhR aktivasyonu, fibroblastlar, endotel hücreleri ve makrofajlar dahil olmak üzere çeşitli hücrelerde inflamatuvar bir uyarana yanıt olarak gelişen proinflamatuvar sitokinlerin aşırı indüksiyonunun önlenmesinde rol oynar. Bu nedenle, KA gibi uygun bir AhR ligandı ile yapılan klinik tedavinin, inflamatuvar hastalıklarda ümit verici bir terapötik yöntem olabileceği öne sürülmüştür (Wirthgen ve ark, 2018).

KA'ya ek olarak, KA öncüsü KİN gibi diğer triptofan metabolitlerinin de AhR'nin ligandları olduğu gösterilmiştir, ancak KA daha güçlü bir AhR ligandı olarak tanımlanmıştır. Triptofan metabolitleri ile AhR etkileşiminin, immunomodülatör sinyalleme aktif ederek endotoksin toleransı sırasında immün homeostaza katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir (Bessede ve ark, 2014). AhR'ye bağlanmış KA'nın, meme kanseri hücrelerinde IL6 mRNA ekspresyonunu indüklediği ve ayrıca KA ile IL1 kombinasyonunun, tek başlarınayken olduğundan çok daha güçlü bir şekilde, IL6'yı indüklediği gösterilmiştir (DiNatale ve ark, 2010). IL6, hem anti-inflamatuvar hem de pro-inflamatuvar özelliklere sahip, pleiotropik bir sitokin olduğu için, KA aracılı IL6 ekspresyonunun sadece KA'nın immünoşüpresif fonksiyonuna katkıda bulunup bulunmadığı kesinleştirilememiştir (Tanaka ve ark, 2014).

2.3.2.3. KA'nın $\alpha 7$ nAChR Reseptörü Üzerindeki Etkisi

$\alpha 7$ nAChR, çoğunlukla MSS hücrelerinde ifade edilmekle birlikte immün hücrelerde, bağırsak hücrelerinde, vagal siniri hücrelerinde ve enterik sinir sistemi hücrelerinde ifade edilen nikotinik reseptörlerdir (Kalkman ve Feuerbach, 2016). Nöronal presinaptik $\alpha 7$ nAChR' nin aktivasyonu, kalsiyum ve sodyum iyonlarının akışını artırarak, nörotransmitter salınımını artırır. $\alpha 7$ nAChR'nin aktivasyonu, astrositler ve mikroglia, enflamatuvar tepkileri azaltırken endotel hücreleri, makrofajları, T hücreleri ve

olgunlaşmamış dendritik hücreler gibi nöronal olmayan hücreleri düzenlemektedir (Anderson ve Maes, 2017). Kolinerjik anti-inflamatuar yolağın bir üyesi olan $\alpha 7nAChR$ MSS ve periferel kanda inflamasyonun düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bununla birlikte yakın zamanda antagonistik $\alpha 7nAChR$ ligandlarının anti-inflamatuar etkileri olduğu bildirilmiştir (Steiner ve ark, 2014).

KA'nın beyin içeriğindeki seviyeleri bazı nörolojik hastalıklarda değişiklik göstermektedir. Elektrofizyolojik deneyler, $\alpha 7nAChR$ 'nin, KA inhibisyonuna karşı büyük bir duyarlılığı olduğunu ortaya koymuştur. KA'nın yüksek düzeylerde bulunduğu AH, Down sendromu (DS) ve şizofreni hastalarında görülen $\alpha 7nAChR$ 'in inhibisyonu, sırasıyla şizofreni ve AH'li hastalarda hipotamaterjik ve hipokolinerjik tonlarla; şizofreni, AH ve DS'li hastalarda ise bilişsel eksikliklerle ilişkili bulunmuştur (Hilmas ve ark, 2001).

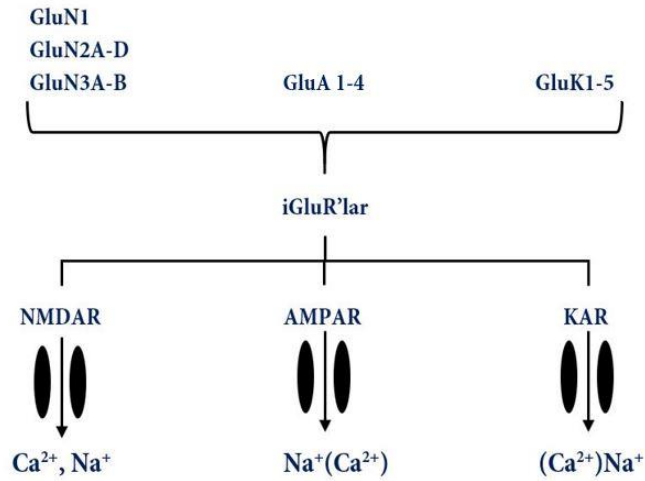
Elektrofizyolojik deneylerden elde edilen sonuçlar, KA'nın nikotinik kolinerjik sistemde bir nöromodülatör olarak görev yaptığını ve $\alpha 7nAChR$ 'yi voltajdan bağımsız şekilde inhibe ettiğini göstermektedir. Ayrıca çalışmalar KA'nın, $\alpha 7nAChR$ 'nin rekabetsiz bir antagonisti olduğunu da göstermiştir. $\alpha 7nAChR$ 'lere ek olarak, sadece glutamaterjik iyonotropik reseptörlerin KA tarafından inhibe edildiği bilinmektedir (Hilmas ve ark, 2001).

2.3.2.4. KA'nın Glutamat Reseptörü Üzerindeki Etkisi

Glutamat esansiyel bir amino asit olmakla birlikte, memeli MSS'deki ana uyarıcı nörotransmitterdir ve çeşitli reseptörler yardımıyla biyolojik aktivitesini gerçekleştirmektedir. Glutamat, anksiyete veya depresyon gibi psikiyatrik bozukluklarına ve epilepsi, spastisite, felç veya travmatik beyin hasarı gibi nörolojik hastalıklarla ilişkili bulunmuştur. Glutamat antagonistlerinin, anksiyolitik, antikonvülsan, kas gevşetici, yatıştırıcı, anestezi ve nöroprotektif özelliklere sahip oldukları gösterilmiştir (Rzeski ve ark, 2001a). Bununla beraber, bazı seçilmiş glutamat reseptörlerinin alt birimlerinin ekspresyonunun bloke edilmesiyle glutamat reseptör antagonistlerinin tümör büyümesini sınırladığı ve kanser hücrelerinin in vitro çoğalmasını önlediği bildirilmiştir (Luksch ve ark, 2011).

Glutamat reseptörleri (GluR'ler); ligand kapılı katyon kanalları olan iyonotropik glutamat reseptörleri (iGluR'ler) ve G protein-bağlı reseptörler olan metabotropik glutamat reseptörleri olmak üzere sinyallerini ilettikleri mekanizmaya göre iki ana sınıfa

ayrılır (Ribeiro ve ark, 2017). İyonotropik glutamat reseptörler, yapısal benzerliklerine ve onları aktive eden sentetik agonistlerinin tipine göre NMDA, AMPA ve kainat reseptörleri olmak üzere alt gruplara ayrılır (Şekil 2.4). Bu reseptörler, hücre içi Ca^{2+} seviyelerini arttırabilmekte ve NO, reaktif oksijen türleri ve bunun sonucu olarak hücre ölümüne neden olabilmektedir (Stone ve Addae 2002).



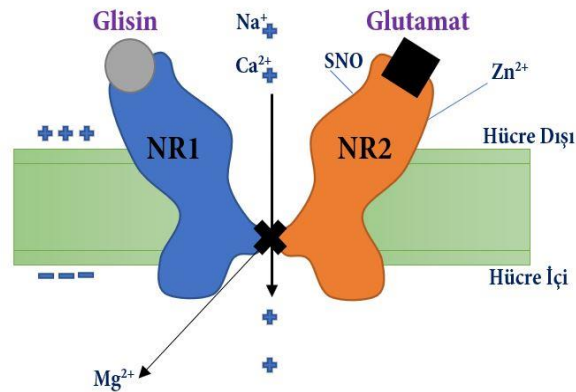
Şekil 2.4. GluR'ların Sınıflandırılması (Ribeiro ve ark, 2017)

AMPA reseptörleri (AMPA), ligandın bağlanmasıyla sodyum akısına izin veren GluA1-GluA4 alt birimlerinden oluşan homo veya heterotetramerlerdir. AMPAR kanalının elektrofizyolojik özellikleri reseptörün moleküler bileşimine dayanır. GluA2 alt birimi AMPAR'ların kalsiyum ve çinkoya geçirgenliğini belirler. Yapılan çalışmalar hem sinaptik plastisite hem de hastalıkta Ca^{2+} geçirgen AMPAR'ların kilit rolüne işaret etmektedir (Liu ve Zukin, 2007).

Kainat reseptörleri (KAR), tetramerik kanalları oluşturan GluK1-GluK5 alt birimlerinden oluşur. GluK4 ve GluK5 alt birimleri, fonksiyonel homomerik reseptörler oluşturmazlar, ancak fonksiyonel reseptörler oluşturmak için GluK1-GluK3 heteromerik grupları biraraya gelirler. GluA2'ye benzer şekilde, GluK1 ve GluK2, bu reseptörlerin kalsiyum geçirgenliğini azaltan glutamin/arginin düzenlemesinde önemli rol alır. Her ne kadar bazı çalışmalarda KAR'ın kanserdeki rolünü araştırılmış olsa da, bu rol yeterince keşfedilememiştir (Ribeiro ve ark, 2017).

NMDA reseptörleri iki GluN2 alt birimi ile ya da GluN2 ve GluN3 alt birimlerinin bir kombinasyonu ile oligomerize edilmiş iki GluN1 alt biriminden oluşan heterotetramerlerdir (Şekil 2.5). Reseptör kompleksinde bulunan GluN2 (A, B, C veya

D) ve GluN3 (A veya B) alt ünitelerine bağlı olarak, GluN3 alt ünitesini içeren reseptörlerle azalan kalsiyum geçirgenliği sunan, farklı elektrofizyolojik özelliklere sahip NMDA reseptörleridir. NMDA reseptörleri, eş-agonist glisin veya d-serin ile glutamatin aynı anda bağlanmasını gerektirir. Glisin veya d-serin GluN1 alt birimi bağlanma bölgesine bağlanırken, glutamat GluN2 alt birimlerine bağlanır. GluN1'e benzer şekilde, GluN3 alt birimleri glutamattan ziyade glisin ve d-serin bağlar.



Şekil 2.5. Önemli Bağlanma Bölgelerini Gösteren NMDA Reseptörü Modeli (Lipton 2004).

iGluR'ler arasında, NMDA reseptörleri genellikle kalsiyum için en geçirgen reseptörlerdir (Ribeiro ve ark, 2017). GluN1 reseptör (NR1) alt birimi kanalın kalsiyum iletkenliği için gereklidir, GluN2 reseptör (NR2) ve GluN3 reseptör (NR3) alt birimleri ise reseptörün elektrofizyolojik ve farmakolojik özelliklerini belirler (Luksch ve ark, 2011).

KA, tüm iyonotropik glutamat reseptörlerini etkileyen, NMDA, AMPA ve kainat reseptörleri dahil olmak üzere tüm iyonotropik glutamat reseptörlerini etkileyen bilinen tek geniş spektrumlu endojen bir antagonisttir. KA düşük mikromolar konsantrasyonlarda ($EC_{50} = 7.9 \mu M - 15 \mu M$) NMDA reseptörlerinin NR1 alt birimindeki glisin bağlama bölgesine yüksek afinite ile bağlanırken, daha yüksek konsantrasyonlarda ($EC_{50} = 200 \mu M - 500 \mu M$) NR2 alt ünitesindeki glutamat bağlanma bölgesini bloke edebilmektedir (Majláth ve ark, 2016). KA'nın nöroprotektif etkisinin, esas olarak NMDA reseptörü antagonizması yoluyla glutamat eksitotoksitesinin önlenmesi yoluyla gerçekleştiği öne sürülmektedir. Düşük KA konsantrasyonları presinaptik glutamat salınımını engelleyerek nöroprotektif etki gösterirken yüksek mikromolar konsantrasyonlarda ($\mu M - mM$) KA, AMPA reseptörleri üzerinde nöroinhibisyon etki göstermektedir (Szalardy ve ark, 2012).

2.3.2.4.1. NMDA ve AMPA Reseptörlerinin Kanserdeki Rolü

Glutamatın tümör büyümesi üzerindeki etkisini incelemek amacıyla yapılan çalışmalarda çeşitli tümör hücre hatları, NMDA antagonistleri, AMPA antagonistlerine ve glutamat'a maruz bırakılmış, tümör hücrelerinin göçü, çoğalması ve morfolojisi değerlendirilmiştir. Sonuçta NMDA ve AMPA antagonistlerinin tümör hücrelerinin proliferasyonunu ve göçünü inhibe ederken, glutamatın proliferasyonu uyardığı bulunmuştur (Rzeski ve ark, 2001b).

NMDA ve AMPA antagonistlerinin, glial ve nöronal tümörlerin yanı sıra, kolon, gırtlak, meme, hepatoselüler karsinom, prostat, melanoma, akciğer ve tiroid dahil olmak üzere birçok nöronal olmayan kanser hücrelerinin çoğalmasını da sınırladığı bildirilmiştir (Ribeiro ve ark, 2017). Kalsiyum yoksunluğu altında büyüyen tümör hücreleri NMDA ve AMPA antagonistlerinin antiproliferatif etkilerine karşı dirençli olduğu gösterilmiş ve buna bağlı olarak iGluR antagonistlerinin antiproliferatif etkisinin kalsiyum bağımlı olduğu bildirilmiştir (Rzeski ve ark, 2001b). Kalsiyum tümör büyümesini ve hücre göçünü uyaran ikinci habercidir. Glutamatın, ise membran depolarizasyonunu indükleyerek kalsiyum akışını düzenlediği, böylece hücre içi kalsiyum artışını tetiklediği bilinmektedir. Tümör hücreleri üzerindeki glutamat bağımlı reseptör/iyon kanalı komplekslerinin, tümör hücrelerinin çoğalma ve göçünü bu şekilde düzenlediği öne sürülmektedir (Rzeski ve ark, 2001b). Bununla birlikte MAPK yolağının inhibisyonunun, iGluR antagonistlerinin antiproliferatif aktivitesinde kilit bir rol oynadığı bildirilmiştir (Hardingham ve Bading 2003). Antiproliferatif aktivitelere ek olarak, GluR antagonistlerinin morfolojiyi değiştirdiği ve kanser hücrelerinin invazyonunu azalttığı da gösterilmiştir (Rzeski ve ark, 2001b).

Kanser hücrelerinde glutamat reseptörü alt ünite ekspresyonunun susturulmasının karsinogenezi etkilediği ve bazı GluR alt birimlerinin, tümörün hayatta kalmasını, proliferasyonunu ve metastaz için eğilimi düzenleyen biyokimyasal yolları kontrol etmede rol oynadığı gösterilmiştir (Luksch ve ark, 2011). GluR2'nin aşırı eksprese edilmesi, glioma hücre hattında hücre proliferasyonunun ve apoptoz indüklenmesinin inhibe edilmesine, GluR1'in susturulması da hücre proliferasyonun azalmasına ve apoptozun artmasına neden olmuştur. Bu bulgular, kanser türüne bağlı olarak, GluR alt birimlerinin fenotip ve malign davranışı modüle ettiği fikrini desteklemektedir (Luksch ve ark, 2011).

Tablo 2.4'te periferik kanserlerde NMDA reseptörü alt birimlerinin ekspresyonu gösterilmiştir. NMDA reseptörünün NR1 alt birimi, kanser numunelerinde yüksek oranda eksprese edilirken, normal dokularda ekspresyonu çok daha düşük şekilde gözlenmiştir. NR1 alt ünitesinin immünohistokimyasal ekspresyonu, kanser örneklerinin çoğunda gözlenmiştir. NMDA reseptörlerinin farklı kombinasyonları veya tekli alt birimleri; kolon kanseri, meme kanseri, oral kanser, laringeal karsinoma, akciğer kanserleri, prostat kanseri, tiroid kanseri ve gastrik, özofageal ve hepatoselüler karsinomlardan türetilen hücre hatlarında gösterilmiştir (Koiri, 2015)

Tablo 2.4. Kanser tipine göre hücrelerde ifade edilen NMDA reseptör alt birimleri (Koiri 2015)

Kanser Tipi	İfade Edilen NMDA Reseptör Alt Birimleri
Beyin tümörü	NR1 ve NR2C alt birimleri
Prostat kanseri	NR1 alt birimi
Kolon kanseri	NR1 ve NR2B alt birimleri
Akciğer kanseri	NR1 ve NR2B alt birimleri
Meme kanseri	NR1 ve NR2B alt birimleri
Pankreas tümörü	NR2B alt birimi
Ağız kanseri	NR1 alt birimi
Laringeal kanser	NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D ve NR3A alt birimleri
Tiroid kanseri	NR1 alt birimi
Mide kanseri	NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A ve NR3B alt birimleri
Yemek borusu kanseri	NR2B alt birimi
Karaciğer kanseri	NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A ve NR3B alt birimleri

Kemoterapi ilaçlarıyla kombinasyon halinde tümör hücre hatlarına uygulanan NMDA ve AMPA antagonistlerinin, tümör hücresi proliferasyonunu inhibe etmek suretiyle tümör hücre ölümüne yol açtığı ve böylece in vitro sitostatik ilaçların tümör öldürücü etkilerini arttırdığı görülmüştür (Rzeski ve ark, 2001b). Bu veriler, glutamat antagonistlerinin, mevcut kanser tedavilerine ilave olabilecek antikanser potansiyele sahip olduğunu da göstermiştir. Tümör hücrelerinde NMDA ve AMPA reseptör kanalı kompleksleri, olgun reseptör kanalı komplekslerinden farklı olabileceğinden, bu reseptörler hedeflenerek, daha az yan etkisi olan yeni ilaçların tasarımının mümkün olabileceği bildirilmiştir. Ek olarak, kan-beyin bariyerine nüfuz etmeyen ve bu nedenle nörolojik yan etkilere neden olmayan NMDA ve AMPA antagonistlerinin, periferik kanserlerin tedavisi için uygun olabileceği öne sürülmektedir (Rzeski ve ark, 2001b).

Hayvan kanser modelleriyle yapılan çalışmalar da iGluR antagonistlerinin, anlamlı seviyede toksisiteye neden olmayan dozlarında, farmakolojik etkileri olduğunu göstermiştir. Bu antagonistler arasında klinikte kullanılan Memantin'in ve halen klinik deneyleri devam eden Talampanel'in, kansere karşı terapötik stratejilere dahil edilecek uygun adayları temsil edebileceği bildirilmiştir (Ribeiro ve ark, 2017). Bununla birlikte, terapötik faydayı arttırmak ve toksisiteyi en aza indirmek için gelecekte planlanacak olan çalışmaların, aynı zamanda sinerjistik etki gösteren ilaçların kombinasyonlarını da araştırması gerektiği belirtilmiştir. Şimdiye kadar elde edilen sonuçların, umut verici olduğu ve kanser hücrelerinde glutamat sinyalizasyonunu hedefleyen tedavilerin geliştirilmesi için yeni fırsatlar sunduğu ifade edilmekle birlikte iGluR antagonistlerinin kanser tedavisine dahil edilmesini pekiştirmek amacıyla daha fazla araştırmanın yapılmasının gerekliliği belirtilmektedir (Ribeiro ve ark, 2017).

Glutamat reseptörlerinin çeşitli kanser hücre tiplerinde bulunduğu ve glutamat reseptörlerinin alt birimleri ile kanser hücrelerinde çoğalmayı, invazyonu ve metastazı düzenleyen hücre içi biyokimyasal yollar arasında fonksiyonel bir ilişki bulunduğu bildirilmektedir. İnsan kolon kanseri ve hepatoselüler karsinoma dahil olmak üzere bir çok kanser hücre hattında glutamat reseptörlerinden NMDA reseptörleri alt birimlerinin varlığı ise gösterilmiştir (Stepulak ve ark, 2014). Son dönemlerde yapılan çalışmalarda, glutamat reseptörleri antagonistlerinin farklı insan tümör hücre tiplerinde antiproliferatif özellikler sergiledikleri gösterilmiştir (Stepulak ve ark, 2005; Luksch ve ark, 2011). Bunun yanında, glutamat reseptörü antagonistlerinin kanser tedavisinde kullanılan sitostatik ilaçlara benzer şekilde tümör hücrelerinin bölünme ve migrasyonlarını inhibe ettikleri, tümör hücrelerinin morfolojilerini değiştirdikleri ve tümör hücre ölümünü artırdıkları gösterilmiştir (Rzeski ve ark, 2001b).

KA ise iyonotropik glutamat reseptörlerinin tüm alt tiplerinin geniş spektrumlu endojen bir antagonistidir (Turski ve ark, 2013). Yapılan bir çalışmada, sıçanlara intragastrik olarak uygulanan KA'nın ince barsaklardan emilerek kan dolaşımıyla karaciğer ve böbreğe taşındığı ve bu organlardaki KA konsantrasyonunun NMDA reseptörleri ile etkileşmek için yeterli olan mikromolar seviyeye ulaşmış olduğu da görülmüştür (Turski ve ark, 2009). Bu sebeple, KA'nın çeşitli tümör hücre hatlarına karşı göstermiş olduğu bu antiproliferatif özelliğinde ise özellikle glutamat reseptörlerinin rolü olduğu

belirlenmektedir (Rzeski ve ark, 2001; Stepulak ve ark, 2005; Luksch ve ark, 2011; Walczak ve ark, 2011).

Sonuç olarak, KA, iyonotropik glutamat reseptörlerinin endojen bir antagonisti olup glutamat antagonistlerinin antikanserojen potansiyele sahip olduğu belirtilmektedir. KA'nın fizyolojik olmayan yüksek konsantrasyonlarda, belirli tümör hücrelerinde antiproliferatif etki gösterdiği gösterilmiştir. Ancak, kanser hücrelerinde KA'nın antiproliferatif aktivitesinin potansiyel moleküler mekanizmalarına ilişkin çok az veri bulunmaktadır. Üstelik KA'nın HSK üzerindeki etkisi henüz bilinmemektedir. Bu sebeple, KA'nın kanser hücrelerindeki antiproliferatif aktivitesinin moleküler mekanizmasının açığa çıkarılması büyük önem taşımaktadır. KA'nın tümör gelişindeki rolünü ortaya çıkarmaya yönelik çalışmalar yapılması gerektiği bildirilmektedir (Walczak ve ark, 2014b).

2.3.2.5. KA'nın Antiproliferatif Aktivitesinden Sorumlu Olan Potansiyel Sinyal Yolakları

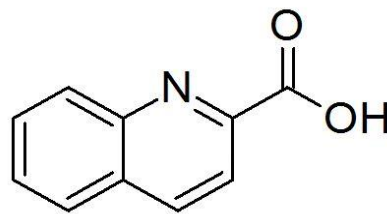
Literatürde, KA'nın kanser hücrelerindeki antiproliferatif aktivitesinden sorumlu olan potansiyel sinyal yolakları ile moleküler etkileşimi hakkında çok az veri bulunmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda, KA'nın tümör hücre çoğalmasını inhibe edici özelliğinin, hücre döngüsü düzenleyicileri ve sinyal proteinleri ile olan etkileşimleriyle ilgili olabileceği belirtilmiştir (Walczak ve ark, 2012a, 2012b, 2014b). İnsan kolon adenokarsinoma (HT-29) hücreleri ile yapılan bir çalışmada, KA'nın HT-29 hücrelerinde bir hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemli rol oynayan p21 Waf/Cip1 protein ekspresyonunu etkili şekilde artırdığı gösterilmiş ve KA'nın HT-29 hücrelerindeki hücre çoğalması ve DNA sentezini inhibe edici özelliğinin p21 düzeyini artırarak gerçekleştirdiği belirtilmiştir (Walczak ve ark, 2012a). KA'nın renal kanser hücre hattındaki (Caki-2) antiproliferatif etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise, KA'nın hücre döngüsü düzenleyicisi olan p21'in artan ekspresyonu ve hücre sağkalımında rol alan p38 MAPK'nın fosforilasyonunun inhibisyonu ile, KA'nın tümör büyümesinin kontrolünde etkili olduğunu bildirmişlerdir (Walczak ve ark, 2012b). Yine kolon kanseri HT-29 hücreleri ile yapılan bir diğer çalışmada da, KA'nın; hücre sağ kalımında ve kanser hücrelerinin çoğalmasında önemli rol alan yolaklar olan, PI3K/Akt, MAPK ve Wnt/ β -katenin sinyal yolaklarına olan etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, milimolar konsantrasyonlardaki KA'nın HT-29 hücrelerinde PI3K/Akt ve

MAPK sinyal yollarının aktivasyonunu inhibe ederek Akt, ERK 1/2 ve p38 kinazlarının fosforilasyonunu azalttığı ve β -katenin protein ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (Walczak ve ark, 2014b).

Sonuç olarak bu çalışmalarda KA'nın kolon kanseri tedavisinde standart kemoterapiyi desteklemek amaçlı veya potansiyel bir kemopreventif madde olarak kullanılma potansiyelinin olduğu öne sürülmüştür. İlave olarak, sıçanlarla yapılan bir çalışmada 50 veya 100 mg/kg/saat dozunda intravenöz KA uygulamasının sıçanlar tarafından iyi bir şekilde tolere edildiği görülmüştür (Marciniak ve Turski, 2010). Benzer şekilde yapılan başka bir *in vivo* çalışmada ise rat ve farelere içme suyu ile birlikte yüksek miktarda KA (250 mg/L konsantrasyonda) uzun süreyle (21 gün) uygulanmış ve bu hayvanlarda bu konsantrasyonların iyi bir şekilde tolere edildiği ve toksik etki oluşturmadığı gösterilmiştir (Turski ve ark, 2014). Böylece, yüksek miktarda KA içeren ya da KA ile zenginleştirilmiş gıdaların tüketiminin insan sağlığında bir risk teşkil etmediği bildirilmiştir (Turski ve ark, 2014). Bu bulgular KA'nın kanser terapisinde potansiyel terapötik etkileri olabileceği hipotezini desteklemektedir

2.4. Kinaldik Asit (KİNA)

Triptofan metabolizmasının bir diğer endojen metaboliti olan KİNA'nın ise KA ile yüksek düzeyde yapısal benzerliği bulunduğu bildirilmektedir (Şekil 2.6). KİNA, KA'nın dehidroksilasyonu sonucu oluşan bir üründür (Kaihara ve Price, 1962). KİNA'ya hayvan üresinde de rastlanmış olmakla birlikte, KA'ya kıyasla daha az seviyede olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte, intestinal floranın da KİNA üretimine katkıda bulunduğu bildirilmektedir (Yokoi ve ark, 1998).



Şekil 2.6. Kinaldik Asitin Kimyasal Yapısı

KİNA'nın; glikoneogenez, proinsülin sentezi ve insülin salınımı, metal iyonları şelatlama, oksijen türevlerini uzaklaştırma ve kolon içindeki patojenik mikrofloradaki büyümeyi baskılama gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bildirilmektedir

(Langner ve ark, 2015). Yapılan çalışmalar, üriner triptofan metabolitlerinden kinaldik asitin mesane kanserinde prokarsinojenik aktivitesini olduğunu göstermiştir. Dahası, kinaldik asidin izole edilmiş Langerhans adacıklarından insülin salınımına neden olduğu (Okamoto ve ark, 1973) ve 12 mM konsantrasyonunda glukoz ile indüklenmiş insülin salınımının ikinci fazını inhibe ettiği görülmüştür (Okamoto ve ark, 1974). Bununla birlikte, bilinen bu biyolojik aktivitelerine rağmen KİNA'nın insan organizmasındaki rolü hala tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır.

2.4.1. KİNA'nın Antiproliferatif Aktivitesinden Sorumlu Olan Potansiyel Sinyal Yolakları

KİNA'nın antitümöral potansiyeli ile ilgili olarak yapılmış çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. KİNA'nın anti-tümör potansiyelinin değerlendirilmesiyle ilgili olarak yapılan bir çalışmada; çeşitli insan kolon adenokarsinoma hücre hatlarında (HT-29, Caco-2 ve LS-180) *in vitro* antiproliferatif aktivitesi ve bu aktivitenin potansiyel moleküler mekanizması araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, KİNA'nın çalışılan tüm hücre hatlarında çoğalmayı inhibe ettiği görülmüştür. Ayrıca, KİNA'nın araştırılan sinyal yolaklarından hücre çoğalması ve hücre ölümünde önemli rol oynayan ERK, p38 MAPK ve PI3K/Akt sinyal yolaklarını etkilediği ve özellikle HT-29 hücrelerinde ERK 1/2 ve p38 kinazlarının fosforilasyonunu azalttığı görülmüştür. Bununla birlikte, çalışmada KİNA'nın antiproliferatif aktivitesinin moleküler mekanizması da tam olarak açığa çıkarılamamıştır (Langner ve ark, 2015). Bu çalışmanın devamı şeklinde yapılan bir başka çalışmada da, KİNA'nın, bir tümör baskılayıcı gen olan p53'ün ifadesini artırdığı ve böylece KİNA'nın kolon kanseri hücrelerindeki antiproliferatif etkisinde p53'ün belirgin bir katkısı olduğu öne sürülmüştür (Langner ve ark, 2019). Bu sebeple, hem antiproliferatif aktiviteye sahip KA ile olan yapısal benzerliğinden hem de insan organizmasındaki doğal bulunuşundan dolayı, KİNA'nın anti-tümör potansiyelinin değerlendirilmesi oldukça önemlidir.

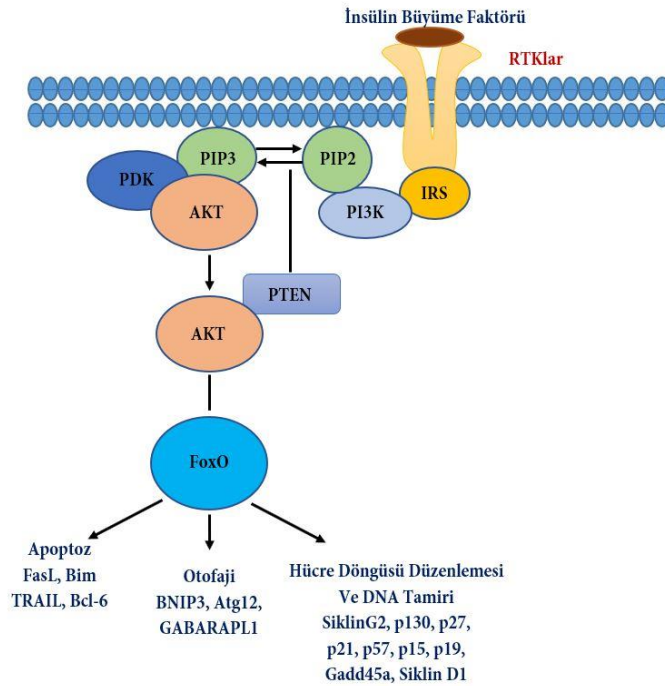
2.5. PI3K/Akt ve FoxO Sinyal Yolağı

Hücre sağkalımını, çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenleyen Fosfatidilinositol-3-kinaz'lar (PI3K), sınıf I, sınıf II ve sınıf III olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır. Sınıf I, en çok çalışılan sınıftır ve üç katalitik alt üniteye ve p85 düzenleyici alt üniteye sahiptir. Büyüme faktörleri veya sitokinlerin uyarılmasının ardından reseptör tirozin kinazların ve G protein-bağımlı reseptörlerin aktive edilmesiyle, PI3K hücre zarına toplanır.

Aktive edilmiş PI3K, ikinci haberci fosfatidilinositol (3-5)-trisfosfat (PIP3)'ü üretir. Aktive edilmiş PI3K, lipid zarındaki fosforilasyona uğrayan inositollerle fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat'tan (PIP2) ikinci haberci fosfatidilinositol (3-5)-trisfosfat'ı (PIP3) üretir. Daha sonra serin-treonin kinaz Akt, PIP3'e bağlanarak zara alınır, bu da fosfoinositide bağlı kinazlarla fosforillenmesine neden olur. Akt etkinleştikten sonra, hücrenin hayatta kalmasını, çoğalmasını, hücre döngüsü ilerleyişini, göçünü ve anjiyogenezini düzenlemek için aşağı yönde sinyal vericileri aktive eder. PI3K/Akt sinyal yolağı, çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından aktive edilebildiği gibi, fosfataz ve tensin homoloğu PTEN tarafından da negatif olarak düzenlenebilir. PTEN, PIP3'ü defosforile eden bir tümör baskılayıcısıdır. PTEN'in aktivasyonu, proteinin fosforilasyonu ve defosforilasyonu dengesi ile düzenlenir ve defosforile edilmiş PTEN aktif formu temsil eder (Zhao ve ark, 2014). Yapılan çalışmalar PI3K yolağı bileşenlerinin, HSK dahil olmak üzere birçok insan malignitesinde rol aldığını ortaya koymuştur (Zhou ve ark, 2011). HSK'lı hastaların yaklaşık %40-60'ında Akt sinyal yolunun aktivasyonu ve Akt'nin negatif bir düzenleyicisi olan PTEN'in ise azalmış ekspresyonunun varlığı bildirilmiştir. Akt yolunun aktivasyonu ile apoptoz ve hücre büyümesini önleyici aktivitelerin baskılanmasından dolayı bu iki etkinin özellikle siroz aşamasında tümör oluşumunu desteklediği belirtilmektedir (El-Serag ve Rudolph, 2007). Akt kinazın aynı zamanda Forkhead Box O (FoxO), mTOR, NFkB ve MDM2 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivitelerini de düzenlediği ve kaspaz-9, c-Raf ve GSK3β kinazlar gibi çeşitli hedef proteinlerin fosforilasyonunu gerçekleştirdiği, buna bağlı olarak hücre proliferasyonunu, apoptoz ve farklılaşmayı kontrol ettiği bilinmektedir (Li ve ark, 2010). Bununla birlikte Akt'nin, CDK inhibitörleri p21 Waf1/Cip1 ve p27 Kip1'in negatif düzenleyicisi olduğu da bildirilmiştir (Walczak ve ark, 2012a).

FoxO sinyal yolağı ise kanser hücre gelişiminin düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir transkripsiyon faktörü ailesidir. *Caenorhabditis elegans* ile yapılan genetik çalışmalar, PI3K/Akt yolunun, memeli FoxO proteinlerinin nematod ortoloğu olan DAF-16 çatal uçlu (Fork Head) transkripsiyon faktörünün aktivitesini baskıladığını göstermiştir. DAF-16 dizisinin analizi sonucu, üç konsensüs Akt bölgesi ortaya çıkarılmıştır. Bu bölgelerin insanlarda FOXO1, FOXO3 (FOXO3a), FOXO4 ve FOXO6'yı içeren, memeli FoxO ailesinin tüm üyelerinde korunmuş olduğu görülmüştür. Akt tarafından fosforile edilen FoxO proteinleri, 14-3-3 şaperon

proteinlerine bağlanarak sitoplazmada herhangi bir moleküle bağlanması engellenmiş olur (sekestrasyon) ve bunun sonucunda gen ekspresyonunu düzenleyemezler (Huang ve Tindall, 2007). FoxO proteinlerinin, apoptoz, otofaji, hücre döngüsü geçişleri, DNA onarımı, oksidatif stres ve yaşam süresi ile ilgili genlerin ekspresyonu ile hücre farklılaşması ve glukoz metabolizmasını kontrol ederek hücrenin işleyişini düzenleyebildiği belirtilmektedir (Şekil 2.7) (Yamaguchi ve ark, 2013).

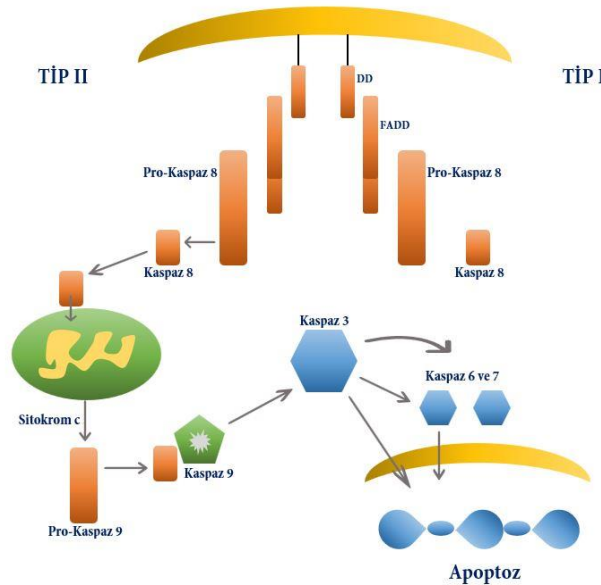


Şekil 2.7. PI3K / Akt ve FoxO Sinyal Yolağı (Zhang, 2011)

FoxO yolağı karaciğerde hücre çoğalması ve metabolizması için önemli bir yoldur. Karaciğerin, rutin beslenme ve açlık döngülerine uyum sağlamak ve hastalığın neden olduğu streslere cevap vermek için birkaç FoxO bağımlı yol kullandığı bilinmektedir. FOXO1 glukoneogenezin doğrudan transkripsiyonel düzenleyicisidir, insülin tarafından düzenlenir ve hepatik lipid metabolizması üzerinde etkileri vardır. Ayrıca FOXO1'in hücre döngüsü ve apoptozda kritik roller oynayan bir kısım genlerin ekspresyonunu düzenlediği bildirilmiştir. FOXO3'ün ise antioksidan cevap ve otofaji için gerekli olup, tümör baskılayıcı aktiviteden sorumlu olduğu bilinmektedir. Yapılan son çalışmalarda hepatosellüler karsinomalarda FOXO3 ekspresyonunda düzensizlik olduğu bildirilmiştir (Tikhonovich ve ark, 2013). Bu yüzden karaciğer kanserinde FoxO yolağının araştırılması oldukça önemlidir.

FoxO yolağının baskılanmasıyla, TXNIP (Tiyoredoksin etkileşimli protein) ekspresyonunun azaldığı bilinmektedir. TXNIP'in tümör baskılayıcı rolü vardır ve

birçok tümör hücresinde TXNIP'in azalmış ekspresyonlarının varlığı gözlenmektedir. Ayrıca, TXNIP'in aşırı ekspresyonunun kanser hücresi büyümesini inhibe ettiği görülmüştür (Yamaguchi ve ark, 2013). TXNIP'in ayrıca, p27 proteininin JAB1 tarafından degrade olmasını engelleyerek, p27'i stabilize ettiği ve hücrenin G1 hücre döngüsünde kalmasını sağladığı bilinmektedir (Jeon ve ark, 2005). p27 siklin bağımlı kinaz inhibitörüdür (CKI) ve tümör baskılayıcı roller sergilediği bilinmektedir. Bir CKI olarak birincil işlevi, siklin/CDK komplekslerini bağlamak ve inhibe etmek olduğundan, p27 proteini, farklı siklin/CDK kompleksleri ile etkileşime girerek tüm hücre döngüsü aşamalarında işlev görür (Lee ve Kim 2009). FoxO proteinlerinin, p27'yi uyararak ve siklin D1 ifadesini baskıladığı ve hücrenin G1 hücre döngüsünde kalmasını sağladığı bilinmektedir. FoxO proteinleri, otokrin ve parakrin yolaklarında görev yapan Bim ve BNIP3 gibi BH3-proteinlerinin ve FasL (Fas reseptörü ligandı) ve TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) gibi ölüm reseptör ligandlarının ekspresyonunu düzenleyerek hücre ölümünde rol alırlar. FoxO yolağı, FasL ve TRAIL gibi proapoptotik faktörlerin transkripsiyonunu artırarak ekstrinsik apoptotik yolu doğrudan düzenlemektedir (Zhang ve ark, 2011). FoxO yolağının baskılanmasının sonucunda, Bim ve FasL gibi hedef genlerin ekspresyonunun azaldığı görülmüştür (Yamaguchi ve ark, 2013).



Şekil 2.8. Apoptotik Yolaklar. Tip I, Kaspaz-8 ve Kaspaz-3'ün aracılık ettiği doğrudan yolu temsil eder. Tip II mitokondri ve Bcl-2 ailesini içerir. (Vikki M. Abrahams, 2003)

Fas reseptörü FasL ligandı TNF süper ailesine aittir. Fas'ın FasL'ye bağlanarak aktive edilmesiyle, Fas'ın hücre içi ölüm bölgesi (DD), Fas-ilişkili DD içeren proteine (FADD) bağlanır ve böylece sinyal prokaspaz-8'i harekete geçirir. Kaspaz-8, ölüm sinyalinin iletiminde rol alan proteinazlardan birisidir. Kaspaz-8'in aktive olmasıyla sırayla kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 aktivasyonu ve mitokondrial hasar başlar. Aktif kaspaz-8 doğrudan ve dolaylı olmak üzere 2 yolla kaspaz-3'ü aktive eder (Şekil 2.8). Ya direkt kaspaz-8 kaspaz-3'ü aktive eder ya da bir Bcl-2 ailesi üyesi olan BID'in aktivasyonu ile mitokondriyal yolu kullanarak dolaylı olarak intrinsik mekanizmada kaspaz-9'u aktive ettikten sonra kaspaz-3'ü aktive eder. Mitokondriyal yolda, apoptozom hücre içi sinyaller sitokrom-c salınımını tetiklediğinde oluşur. Sitokrom-c, Apaf-1/kaspaz-9 holoenziminin oluşumunu tetikler ve ardından kaspaz-3'ü aktive eder. Kaspaz-3, -6 ve -7 ise birkaç farklı hücresel substratı ayırır ve apoptotik ölümü gerçekleştirir (Abrahams ve ark, 2003). Kaskaddaki her adım, apoptotik yolu inhibe edebilen hücre içi faktörlerle kontrol edilmektedir. Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin sitokrom-c salınımını önlemek için mitokondriyal zarı stabilize ettiği bilinmektedir. Bcl-2 (B hücreli Lenfoma-2) ailesi, apoptoz sinyalini indükleyici ve baskılayıcı olmak üzere birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşmaktadır. Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W ve Mcl-1 gibi üyeler apoptozisi inhibe edici (antiapoptotik) etkiye sahiplerken, Bax (BCL-2 ilişkili X), Bik, Bak, Bad ve Bcl-xs gibi üyeler ise apoptozu aktive edici (proapoptotik) etkiye sahip oldukları bilinmektedir (McDonnell ve ark, 1999).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmalar Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalı ve Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

- Soğutmalı Santrifüj (Hettich-Universal 320R)
- Soğutmalı Mikro Santifüj (Hettich-Micro 200R)
- Multispin Cihazı (Gilson, GmClab)
- Dijital Isıtıcı/Soğutucu Kuru Blok (Bioer, CHB-202)
- Isıtıcı ve Manyetik Karıştırıcı (Heidolph, MR Hei-Standard)
- pH Metre (Mettler Toledo, SC S210U)
- Vorteks (isolab)
- Shaker (Bioer)
- Su banyosu (Memmert, WNB 29)
- Çalkalayıcı (IKA KS130 Basic)
- Etüv (EcoCell)
- Hassas Terazî (Ohaus, PA214C)
- Otoklav (Hırayama, HMC HV 50)
- Thermoshaker (Biosan)
- Multipipet ve Mikropipet Seti (Eppendorf, Gilson)
- -80°C Dondurucu (New Brunswick Scientific U570-86)
- -20°C Derin Dondurucu (Vestel)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Laminar Akım Kabini (Safe Fast Elite, 212S)
- CO₂'li İnkübatör (New Brunswick Galaxy, 170R)
- İnvrt Mikroskop (Nikon, TS100)

- Hücre sayım cihazı (Roche -Innovatis-Cedex XS)
- Multifonksiyonel Mikroplaka okuyucu (Biotek, Synergy HT)
- Nanodrop (Denovix, DS-11)
- Real Time PCR cihazı (Roche-Light Cyclers 480)
- Thermal Cyclers (BioRad, T100)
- Western Blot Dikey Elektroforez Sistemi (Bio-Rad, Mini-Protean Tetra System)
- Güç Kaynağı (Bio-Rad, PowerPac™ Basic)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Bio-Rad, ChemiDoc MP Sistem)

3.1.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler

- Kinürenik Asit (Sigma, K3375)
- Kinaldik Asit (Sigma 160660)
- Doksorubisin (Sigma, D1515)
- MK801 (Abcam, ab120027)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Besiyeri (Sigma, D5546)
- Fenol Redsiz Besiyeri (Capricorn Scientific, DMEM-HXRXA)
- Fetal Bovine Serum (Thermo Fisher, 10500056)
- Dimetil Sulfoksit (DMSO) (Sigma, 41640)
- L-Glutamin (Biological Industries, 03-020-1B)
- Penisilin - Streptomisin (Biological Industries, 03-031-1C)
- Tripsin-EDTA (Sigma, T4049)
- Etanol (Merck, K21078586)
- Metanol (Merck, 502K5275408)
- TC Flask T75 (Sarstedt, 83.3911.002-100)
- Hücre Kültürü Petri Kabı 100 x 20mm (Sarstedt, 83.1802-100)
- TC 96 Kuyucuklu Mikroplate (Sorfa, SCP-11-096)
- Cedex Smart Slides (Roche, 05650801001)
- Steril Tek Kullanımlık Plastik Pipetler 5 ml'lik (Orange Scientific, PN5E1)
- Steril Tek Kullanımlık Plastik Pipetler 10 ml'lik (Orange Scientific, PN10E1)
- Steril Tek Kullanımlık Plastik Pipetler 25 ml'lik (Sarstedt, 86.1685.020)
- Falcon Tüp Steril 15 ml'lik (Isolab, 078.02.007)
- Falcon Tüp Steril 50 ml'lik (Isolab, 078.02.008)

- Bisinkoninik asit (BCA) protein analiz kiti (Thermo Fisher, 23225)
- Trizol kit (Roche, 11 667 157 001)
- Proteaz / Fosfataz İnhibitör Kokteyl (Boster, 1182-1)
- RIPA (Radyoimmunopresipitasyon analizi) Lizis Buffer (Santa Cruz, SC-24948)
- PCR Tüpü 0,2 ml'lik (Bilogix, 60-0082)
- Light Cycler 480 Prob Master Kiti (Roche, 04707494001)
- Light Cycler 480 96 Kuyucuklu Plate (Roche, 04729692001)
- Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, 05091284001)
- Kaspaz9 (Roche, RealTime ready Katalog Assays 100233)
- Kaspaz3 (Roche, RealTime ready Katalog Assays 148589)
- FasL (Roche, RealTime ready Katalog Assays 145654)
- Bim (Roche, RealTime ready Katalog Assays 100096)
- p21 (Roche, RealTime ready Katalog Assays 100844)
- Bax geni (Roche, RealTime ready Katalog Assays 102861)
- Bcl-2 geni (Roche, RealTime ready Katalog Assays 100083)
- GAPDH geni (Roche, RealTime ready Katalog Assays 141139)
- 1-Butanol (Fluka, 437603)
- 2-Merkapta-etanol (Sigma, M3148)
- 2-Propanol (Riedel-de Haen, 24137)
- Bisakrilamid (AppliChem, A3636)
- Kloroform (Sigma)
- Gliserol (Merck, 1040922511)
- Glisin (Merck, 1042011000)
- N, N, N, N-Tetrametil-etilenediamin (Sigma, T9281)
- N, N-Metilen -bisakrilamid (Sigma, M7256)
- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Sigma, 71725)
- Süt Tozu (Fluka, 70166)
- 4xLaemmli Sample Buffer (Bio Rad, 161-0747)
- Tris Hidroklorid (Amresco, 0234)
- Trizma Baz (Sigma, T1503)
- Tween 20 (Sigma, P5927)
- Kemilüminesans Tespit Etme Ayıracı (ECL) (Bio Rad, 1705061)

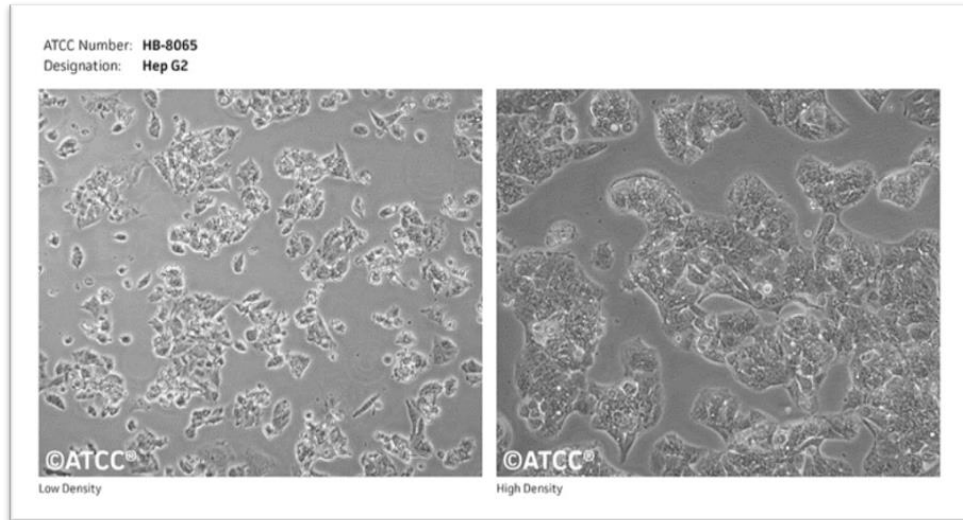
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) (Sigma, M5655)
- Akt Monoklonal Antikor (Cell Signalling, 9272)
- PTEN Monoklonal Antikor (Cell Signalling, 9188)
- p-PTEN Monoklonal Antikor (Cell Signalling, 9551)
- FOXO1 Monoklonal Antikor (Cell Signalling, 14952)
- FOXO3a Monoklonal Antikor (Cell Signalling, 2497)
- p27 Monoklonal Antikor (Cell Signalling, 2552)
- TXNIP Monoklonal Antikor (Cell Signalling, 14715)
- PI3K Monoklonal Antikor (Cell Signalling, 17366)
- GAPDH Monoklonal Antikor (Cell Signaling, 2118)

3.2. YÖNTEM

Bu tez çalışmasının deneyleri Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Temel Bilimler Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasında KA ve KİNA'nın HepG2 hücre hattında apoptoz ve hücre döngüsü yollarında önemli rol oynadıkları düşünülen genlerin mRNA düzeyindeki ifade düzeylerinin kantitatif olarak ölçülmesi ve PI3K/Akt ile FoxO sinyal yollarında rol aldıkları düşünülen proteinlerin ifade seviyelerinin analiz edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Real-time PCR yöntemi ile Bax, Bcl-2, Kaspaz-9, Kaspaz-3, FasL, Bim, p21 ve GAPDH genlerinin gen ekspresyonları analiz edilmiş, western blot yöntemi ile ise PI3K, Akt, PTEN, p-PTEN, FOXO1, FOXO3a, TXNIP, p-27, ve GAPDH proteinleri analiz edilmiştir. Çalışma, hücre kültürü ve moleküler analizler olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Deneyin hücre kültürüyle çalışma basamakları; hücre hatlarının pasajlanması ve hücrelerin testler için hazırlanması, maddelerin konsantrasyonlarının belirlenmesi ve hücrelere uygulanması, MTT ve BrdU analizi kısımlarından oluşmaktadır. Moleküler analiz aşamaları ise total RNA izolasyonu, total RNA konsantrasyonunun belirlenmesi, total RNA'lardan cDNA sentezlenmesi, RT-qPCR analizi ile hedef genlerin mRNA transkripsiyon düzeylerinin belirlenmesi, protein izolasyonu, protein konsantrasyonunun belirlenmesi ve western blot yöntemi ile hedef proteinlerdeki ifade seviyelerinin analiz edilmesi kısımlardan oluşmaktadır.

3.2.1. HepG2 Hücre Kültürü

Çalışmamızda insan karaciğer hepatosellüler karsinoma hücre hattı olarak HepG2 hücre hattı kullanılmıştır. HepG2 hücre dizisi, 15 yaşındaki kafkas kökenli hepatosellüler karsinomu olan bir erkek bireyden izole edilmiştir (Şekil 3.1). HepG2 hücrelerinin morfolojisi epitel hücreleridir ve 55 kromozom çifti içerir. HepG2 hücreleri büyük çapta başarılı bir şekilde büyüyebilir ve transferin, fibrinijen, plasminogen ve albümin gibi birçok plasma proteinini salgılayabilir. İnsan büyüme hormonu ile stimüle edilebilirler. HepG2 hücreleri adherent, epitel-benzeri hücrelerdir ve monolayer halinde ve küçük kümeler halinde büyürler (http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HB8065.aspx?geo_country=tr. Erişim tarihi: 08.08.2019). Amerikan tipi kültür koleksiyonundan (ATCC) temin edilen HepG2 hücreleri (ATCC® HB-8065™), %10 fetal sığır serumu (FBS), 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penisilin, 100 U/ml streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyerinde 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda, 75 cm²'lik flasklarda kültüre edildiler.



Şekil 3.1. HepG2 Hücrelerinin Görünümü (<http://www.lgcstandards-atcc.org>)

3.2.1.1. Besi Yeri Hazırlanması

1. DMEM besiyeri'nin içerisine Tablo 3.1'de gösterilen miktarlarda FBS, L-Glutamin ve penisilin/streptomisin eklenir.
2. Pipetle birkaç kez çekilip bırakılarak ortamın homojen olması sağlanır.
3. Besi yeri +4°C'de saklanır.

Tablo 3.1. HepG2 hücre hattı için kullanılan besi yeri

Solüsyonlar	%	Hacim
DMEM besi yeri	88	44 ml
FBS	10	5 ml
L-Glutamin	1	500 µl
Penisilin/Streptomisin	100 U/ml	500 µl

3.2.1.2. HepG2 Hücre Hattının Çözdürülmesi

- Stok hücre -80 °C deki dondurucudan alınmadan hemen önce, kullanılacak olan besi yeri 37°C deki su banyosunda ısıtılır, hücre dondurucudan çıkarıldıktan hemen sonra 37°C deki su banyosunda kapak kısmından tutup sallanarak hızlı bir şekilde çözdürülür.
- Steril kabin içerisinde 15 ml’lik falkona alınır ve üzerine ısınmış olan besi yerinden 3ml ilave edilir.
- Pipetaj yapılarak ardından hücreler 1000 rpm’de 5 dk santrifüj edilir.
- Falkondaki süpernatant atılarak tüpün içine 1 ml besi yeri konulup pipetaj yaptıktan sonra hücreler, içerisinde 7 ml besi yeri bulunan 75 cm²’lik flaska aktarılır.
- 37°C’de, %5 CO₂’li inkübatörde hücrelerin büyümesi için inkübasyona bırakılır.

3.2.1.3. HepG2 Hücre Hattının Pasajlanması ve Sayımı

- Mikroskopta %70 yoğunluğa ulaşan hücrelerin pasajlama işlemine başlanır.
- Deney sırasında kullanılacak olan maddeler önceden 37°C’ deki su banyosuna konularak 37°C’ye gelmeleri sağlanır.
- Laminar kabin çalıştırıldıktan sonra %70’lik etanolle temizlenir.
- Kültür kapları içerisindeki besi yeri uzaklaştırılır.
- Kültür kaplarına 3 ml steril PBS eklenip hafifçe karıştırıldıktan sonra PBS’li ortam da uzaklaştırılır.
- Kültür kaplarına %0.25’lik 2.5 ml Tripsin-EDTA solüsyonundan eklenip, 3 dakika bekletilir.

- Süre bitiminde hücrelerin tutundukları kültür kabının yüzeyinden ayrıldığı gözlenir ve hemen Tripsinle hidroliz edilen hücre ortamına 6 ml besi yeri eklenir.
- Bolca pipetaj yaparak hücreler ayrıştırılır ve flasklarda bulunan bu hücreler falkon tüplerine aktarılıp 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
- Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısım dökülür ve hücre pelletinin üzerine 1 ml besiyeri eklenir. Ardından hücreler cedex cihazında sayılır.
- Hücrelerin sayımı için; 10 µl hücre stoğundan alınan hücreler, 10 µl Tripan mavi boyasıyla karıştırılır ve karışımdan 10 µl alınarak cedex lamında, cedex cihazında hücrelerin sayımı yapılır. Cihaz 1ml'deki hücre sayısını hesaplar.
- Bu işlemin sonucunda hücreler çoğaltılma işlemi için yeni flasklara alınır, dondurma işlemi yapılacaksa dondurulur, deneyde kullanılacaksa hücre sayısı hesaplanıp gerekli miktarda hücre ekimi yapılır.
- Deney sırasında 96 kuyucuklu hücre kültür kabının her bir kuyucuğuna 24 saat için; 1.5×10^4 , 36 saat için; 1.25×10^4 , 48 saat için; 1×10^4 ve 72 saat için; 6×10^4 sayıda hücre olacak şekilde süspansiyon karışımından gerekli hesaplamalar yapılarak alındı.
- Hücrelerin tekrar yüzeye tutunması ve ortama alışması için 37°C 'de, %5 CO_2 de 24 saat inkübe edildi.

3.2.1.4. HepG2 Hücrelerin Dondurulması

- HepG2 hücreleri, her bir krio tüp içerisinde 1 milyon sayıda olacak şekilde donduruldu.
- 1000 µl içerisinde %5 DMSO, 1 milyon sayıda hücre ve besi yeri olacak şekilde dondurulma işlemi gerçekleştirildi.
- Dondurma işlemi izopropil alkol içeren hücre dondurma kaplarında dakikada 1°C soğutma sağlayacak şekilde -80°C deki dondurucuya daha sonra çalışmak üzere kaldırıldı.

3.2.2. MTT (3-(4,5-Dimetil tiyazol-2) 2,5-difeniltetrazolyum bromür) Hücre Canlılığı Testi

KA, KİNA, MK-801'in tek başlarına ve kombinasyonları ile pozitif kontrol olarak kullanılan Doksorubisin'in HepG2 hücrelerinin canlılıkları üzerindeki etkisi MTT (3-(4,5-Dimetil tiyazol-2) 2,5-difeniltetrazolyum bromür) yöntemi ile belirlendi. MTT analizi; canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat dehidrogenaz enzimi tarafından sarı renkli tetrazolyumun indirgenerek mor farmazan kristaline dönüştürülmesi prensibine dayanmaktadır (Stockert ve ark, 2012). Bunun için;

- Hücreler, 96 kuyucuklu kültür kabına 50 µl DMEM besiyeri içerisinde her bir kuyucuğa 24 saat için; 1.5×10^4 , 36 saat için; 1.25×10^4 , 48 saat için; 1×10^4 ve 72 saat için; 6×10^4 sayıda hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin kültür kabı tabanına tutunmaları için 24 saat %5 CO₂'li steril etüvde 37°C'de inkübe edildi.
- 24 saat sonunda kuyucuklardaki besi yerinin üzerine test maddeleri 50 µl içerisinde 2X konsantrasyonda olacak şekilde çeşitli konsantrasyonlarda eklendi, hücreler bu maddelerle 24, 36, 48, 72 saat inkübe edildi. Uygun inkübasyon süresi sonunda hücre üzerindeki maddeleri içeren besiyeri atıldı ve hücrelere 100 µl besiyeri içerisinde 10 µl MTT reaktifi eklenerek 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda oluşan formazan kristalleri 100 µl DMSO ile çözünerek 570 nm dalga boyunda 96 kuyucuklu mikroparka okuyucuda ölçüldü ve ölçülen absorbans değerlerinden % hücre canlılığı hesaplandı. Tüm analizler 3 kez tekrarlandı.
- Test maddelerinin her bir konsantrasyonu ve kontrol hücre grupları için 3'er kuyucuk kullanıldı. İçerisinde sadece hücre ve besiyeri bulunan kuyucuklar çalışmada pozitif kontrol olarak kullanıldı. Çalışma kapsamında etkisi araştırılan KA, deiyonize su ile birlikte 0.1 N NaOH içinde çözündüğü için, çözücüde kullanılan NaOH'ın hücrelerin canlılığı üzerinde toksik bir etkiye sahip olup olmadığını belirlemek üzere NaOH kontrol grubu oluşturuldu. Bu amaçla, içinde hücre bulunan kuyucuklara en yüksek KA konsantrasyonunda (10 mM) bulunan NaOH miktarını içeren besiyeri eklendi. NaOH'ın kültür ortamındaki final konsantrasyonu %1'den daha düşüktü. Çalışma kapsamında etkisi araştırılan diğer test maddeleri; KİNA, MK-801 ve Doksorubisin ise deiyonize su içerisinde çözündükleri için bu gruplar için çözücü kontrol grubu yapılmaya gerek duyulmamıştır.

3.2.3. BrdU (5-bromo-2'-Deoksiüridin) Analizi

KA, KİNA, MK-801'in tek başlarına ve kombinasyonları ile pozitif kontrol olarak kullanılan Doksorubisin'in HepG2 hücrelerinin DNA sentezine olan etkileri BrdU (5-bromo-2'-Deoksiüridin) bağlanmasına dayalı kolorimetrik immunoanaliz yöntemi ile ölçülmüştür. Hücre proliferasyonunu değerlendirmek amacıyla yapılan BrdU analizi bölünen hücrelerdeki DNA'ya BrdU bağlanması esasına dayanan bir analiz yöntemidir. BrdU bir timidin analogudur ve DNA sentezi sırasında timidin molekülünün yerini alarak DNA zincirinin yapısına girer. Anti-BrdU antikorlarının ortama eklenmesiyle oluşan immün komplekslerin ışına vermesi sonucu spektrofotometrik olarak ölçüm yapılır ve S fazındaki hücreler değerlendirilir (Cecchini ve ark, 2012). Bunun için;

- HepG2 hücreleri steril 96 kuyucuklu kültür kabına 2×10^4 hücre 100µl/kuyu olacak şekilde ekilip kültür kabı tabanına tutunmaları için 24 saat standart koşullarda inkübe edildi.
- Daha sonra besiyeri uzaklaştırılarak, hücreler KA, KİNA, MK-801, Doksorubisin ve kombinasyon gruplarının test maddelerinin belirlenen konsantrasyonlarıyla 48 saat inkübe edildiler. Test maddeleri 2x konsantrasyonda hazırlandı ve 100 µl/kuyu olacak şekilde kuyulara eklendi. Kontrol grubu ise sadece taze besiyerine maruz bırakıldı.
- 20 µl BrdU inkübasyon süresinin bitiminden 24 saat önce kuyucuklara eklendi. BrdU'nun negatif kontrolü olarak kullanılan kuyulara ise BrdU eklenmedi.
- İnkübasyon süresinin sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri aspire edildi ve 200 µl fiksasyon solüsyonu eklenerek 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Fiksasyon işleminden sonra yıkama aşamasına geçildi. Kültür kabı tabanına tutunan hücreler 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra aspire edildi.
- Her bir kuyucuğa 100 µl anti-BrdU monoklonal detektör antikor eklenerek hücreler 1 saat oda ısısında inkübe edildi ve yıkama aşaması tekrar edildi.
- Ardından her bir kuyucuğa 100 µl Peroksidaz Goat anti-mouse IgG konjugatı eklenerek hücreler 30 dk oda ısısında inkübe edildi ve yine yıkama aşaması tekrarlandı.

- Daha sonra, kuyucuklara 100 µl Tetrametilbenzidin peroksidaz substratı eklenerek hücreler 30 dk karanlıkta inkübe edildi ve son olarak her bir kuyucuğa 100 µl stop solüsyonu eklenerek 450 nm dalga boyunda 96 kuyucuklu mikrolaka okuyucuda ölçüm yapıldı. Ölçülen absorbans değerlerinden % hücre proliferasyonu hesaplandı ve tüm analizler 3 kez tekrarlandı.

3.2.4. RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve Kanitatif Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) Analizi

KA ve KİNA'nın tek başlarına ve MK-801 ile kombinasyonlarının HepG2 hücre hattında apoptoz ve hücre döngüsü yollarında önemli rol oynadıkları düşünülen Bax, Bcl-2, kaspaz 9, kaspaz 3, FasL, Bim, p21 genlerinin ve kontrol geninin mRNA düzeyindeki ifade düzeyleri kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) yöntemi ile analiz edilmiştir. Bunun için; sinyal yollarında belirlenen hedef genlerin hücre içi mRNA ifadeleneceklerini ölçmek amacıyla total RNA izolasyonu yapılmıştır. Total RNA izolasyonu için, ticari olarak satın alınan TriPure izolasyon kiti kullanılarak, kit üreticisi firma tarafından sağlanan protokol uygulanmıştır. RNA izolasyonu 4 aşamada gerçekleşmiştir.

- Örneklerin hazırlanması
- Faz ayrımı
- Çöktürme işlemi
- Yıkama ve eldesi

Bunun için öncelikle HepG2 hücreleri her bir petride 2×10^6 hücre olacak şekilde 100x20 mm'lik kültür kabına 5 mL DMEM besiyeri içerisinde ekildi ve kültür kabı tabanına tutunmaları için 24 saat CO₂'li steril etüvde 37°C'de inkübe edildiler. 24 saat sonunda kültür kaplarındaki besiyerleri ortamdan uzaklaştırdı ve hücreler KA, KİNA, MK-801, kombinasyon grupları ve tez çalışmasında pozitif kontrol olarak kullanılan Doksorubisin'in MTT ve BrdU analizi ile belirlenen konsantrasyonları ile 48 saat boyunca inkübe edildiler. Bir başka hücre grubu da çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan Doksorubisin (1 µM'lık konsantrasyon) ile 48 saat inkübe edildiler. Belirtilen inkübasyon süreleri sonunda hücre gruplarındaki besiyerleri ortamdan uzaklaştırıldı ve hücreler soğuk PBS ile yıkandı. Daha sonra hücrelerin üzerine 1 mL

soğuk PBS eklendi ve hücre kazıyıcısı ile hücreler kültür kabı tabanından kazınarak steril tüp içinde toplandılar.

- Tüp içinde toplanan hücre süspansiyonları 4°C’de 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edildiler. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılarak hücre pelleti üzerine 500 µl trizol eklendi ve izolasyon protokolü takip edilerek total RNA izolasyonu gerçekleştirildi, elde edilen RNA’ların saflığı ve miktarı spektrofotometrik olarak 260 ve 280 nm dalga boylarında optik dansite ölçümü ile hesaplandı.
- Test maddeleri ile inkübe edilen HepG2 hücrelerinden total RNA izole edildikten sonra, RNA örnekleri reverse-transkripsiyon yöntemi ile cDNA’ya dönüştürüldü. Total RNA’lardan cDNA sentezi gerçekleştirmek için, ticari olarak satın alınan cDNA sentez kiti kullanılmış ve kit üreticisi firma tarafından sağlanan protokole uygun olarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bunun için her bir örneğe ait total RNA ve kit karışımları, ayrı ayrı uygun sıcaklıklarda belirli sürelerle inkübe edilmiş ve böylece RNA’ların cDNA’ya reverse-transkripsiyonları gerçekleştirildi.
- Analiz edilmek istenen genlere spesifik primer-problar kullanılarak, kit üreticisi firma tarafından sağlanan protokole uygun şekilde ve LightCycler 480 cihazı kullanılarak, elde edilen her bir örneğe ait cDNA’ların, gerçek zamanlı PCR’ı gerçekleştirildi. Böylece incelenen genlerin mRNA transkripsiyon düzeyleri kantitatif olarak belirlendi. Sonuçlar, her dokuda ifade edildiği bilinen GAPDH kontrol geninin ifade seviyesi ile normalize edildi. Böylece, test maddeleri uygulandıktan sonra, incelenen her bir genin HepG2 hücrelerindeki ifade seviyeleri tespit edildi ve tüm analizler 2 kez tekrarlandı.

3.2.5. Western Blot Analizi

KA, KİNA ve MK-801’in tek başlarına ve KA ile KİNA’nın MK-801’le birlikte olan kombinasyon dozlarının, HepG2 hücrelerinde PI3K/Akt ile FoxO sinyal yollarında rol aldıkları düşünülen PI3K, Akt, PTEN, p-PTEN, FOXO1, FOXO3a, p27, TXNIP proteinleri ve GAPDH kontrol proteininin ifade seviyeleri Western blot yöntemi ile analiz edilmiştir. Bunun için; Öncelikle HepG2 hücreleri her bir petride 2×10^6 sayıda hücre olacak şekilde 100x20 mm’lik hücre kültürü petri kaplarına 6 ml DMEM besiyeri içerisinde ekildi ve kültür kabı tabanına tutunmaları için 24 saat CO₂’li steril etüvde

37°C’de inkübe edildiler. 24 saat sonunda petri kaplarındaki besiyerleri ortamdan uzaklaştırıldı ve ardından KA, KİNA ve MK-801’in tek başlarına ve kombinasyon dozları ile pozitif kontrol olarak kullanılan Doksorubisin’den oluşan ilaç grupları daha önce belirtilen doz ve sürelerde hücrelere uygulanarak farklı hücre grupları oluşturdu. Belirtilen inkübasyon süreleri sonunda hücre gruplarındaki besiyerleri ortamdan uzaklaştırıldı ve hücreler soğuk PBS ile yıkandı. Daha sonra hücrelerin üzerine 1 ml soğuk PBS eklendi ve hücreler hücre kazıyıcısı ile kültür kabı tabanından kazınarak steril tüp içinde toplandılar. Soğuk PBS ile kazıma işlemi 3 kez tekrarlandı ve daha sonra tüp içinde toplanan hücre süspansiyonları 4°C’de 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edildiler. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılarak hücre pelletleri elde edildi ve elde edilen hücre pelletlerinden çalışılacak proteine göre total hücre lizatı hazırlandı.

- Total Hücre Lizatının Hazırlanması: HepG2 hücrelerinden total hücre lizatlarının hazırlanması için proteaz ve fosfataz inhibitör kokteyli içeren RIPA lizis tamponu kullanıldı. Bunun için; hücre pelletinin büyüklüğüne RIPA (50 mM Tris-HCl; pH 7,4, 150mM NaCl, %0.1 SDS, %0.5 sodyum deoksikolat, %1 Triton X-100, 200 mM PMSF, 100 mM sodium orthovanadate (Na_3VO_4) ve proteaz inhibitör kokteyl) çözeltisinden 40-100 μL arasında eklendi.
- Total hücre lizatlarındaki protein konsantrasyonları, Pierce™ BCA (Bisikoninik asit) protein analiz kiti kullanılarak kit üreticisi firma tarafından sağlanan protokole uygun şekilde ölçüldü.
- Elektroforez aşaması için; her bir protein örneğinden jel kuyucuklarına 40 μg protein yüklendi ve proteinler araştırılan proteinin büyüklüğüne göre %8-15’lik SDS-PAGE’de elektroforez edildi.
- Protein büyüklüğüne göre jelde yürüyen proteinler, ıslak transfer yöntemi ile Poli-viniliden florür membran üzerine transfer edildi. Daha sonra membran, spesifik olmayan bağlanmalardan kaçınmak için %5 yağsız süt tozu içeren TBS-T (Tris-tamponlu salin-Tween) tamponu (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl ve %0.1 Tween 20) ile 3 saat boyunca bloklandı. Bloklama işleminin ardından membran TBS-T tamponu ile 3 kez, 10’ar dakika yıkanarak süt tozu ortamdan uzaklaştırıldı.
- Daha sonra membran TBS-T içinde hazırlanan uygun dilüsyondaki spesifik bir primer antikorla (PI3K, Akt, PTEN, p-PTEN, FOXO1, FOXO3a, p27, TXNIP)

ile 4°C’de gece boyu inkübe edildi. İnkübasyonun ardından membran TBS-T tamponu ile 3 kez yıkanarak spesifik olmayan bağlanmalar ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra membran TBS-T içinde hazırlanan uygun dilüsyondaki horseradish peroksidaz bağlı sekonder antikor ile 2 saat oda ısısında ve karanlıkta inkübe edildi.

- İnkübasyon süresi sonunda membran tekrar TBS-T tamponu ile 3 kez 10’ar dakika yıkandı ve yıkama işleminin ardından araştırılan hedef protein, kemilüminesans tespit etme ayıraçları (ECL) kullanılarak tespit edildi. Oluşan kemilüminesans sinyaller uygun bir yazılıma sahip olan bilgisayara bağlı jel görüntüleme sisteminde görüntülendi.
- Aynı membranlarda daha sonra, GAPDH kontrol proteini görüntülendi. Jel görüntüleme sisteminde elde edilen bantların görüntüleri “Image J” programı kullanılarak analiz edildi. Araştırılan hedef proteinin ifade seviyesi, aynı membranda görüntülenen kontrol proteinin ifade seviyesi ile normalize edildi ve tüm analizler 2 kez tekrarlandı.

3.2.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizlerde her bir deney için uygun olan farklı analiz yöntemleri kullanılmıştır. Deney grupları kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. MTT, RT-qPCR ve Western blot deneyleri için her bir grubun verileri, ortalama $\pm$ standart sapma (SS) ile ifade edilmiştir. Çalışma ve kontrol gruplarının ortalamaları arasındaki farklılıklar One-way ANOVA, Tukey veya Dunnet post-hoc testleri kullanılarak analiz edilmiştir. Anlamlılık $p < 0.05$ veya $p < 0.001$ düzeyinde değerlendirilmiş olup, tüm istatistiksel hesaplamalar SPSS 18.0 programı kullanılarak yapılmıştır.

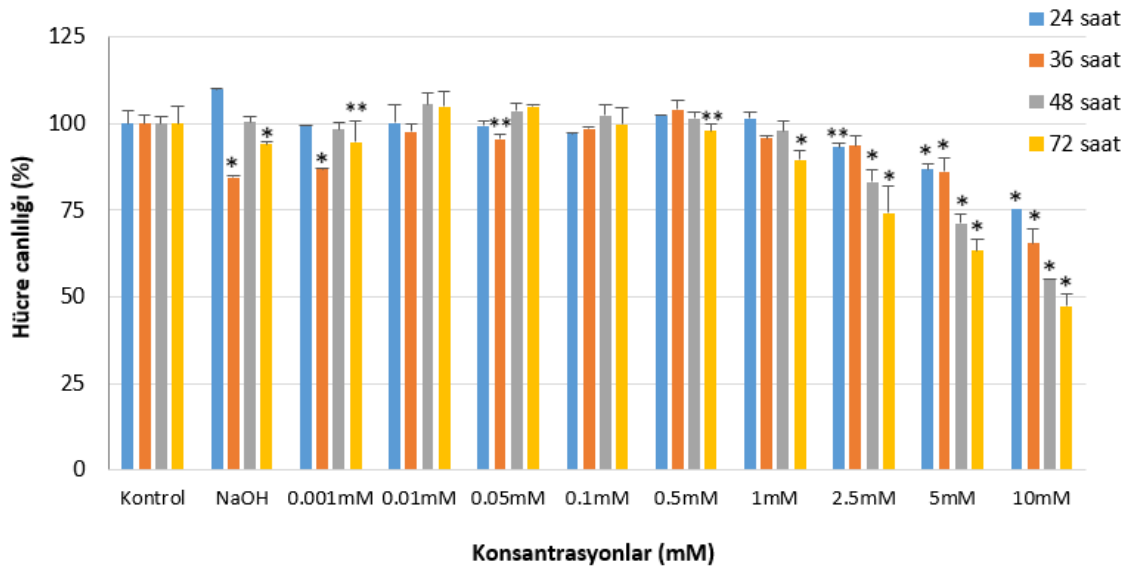
4. BULGULAR

4.1. MTT Hücre Canlılık Testi Sonuçları

Tez  alışması kapsamında antitümöral etkileri araştırılacak olan KA ve K NA'nın HepG2 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri MTT yöntemi ile doza ve süreye bağlı olarak analiz edilmiştir. Bunun için, HepG2 hücreleri KA ve K NA'nın giderek artış gösteren (1  M-10 mM) konsantrasyonları ile 24, 36, 48 ve 72 saat inkübe edilmişlerdir. Böylece, KA ve K NA'nın HepG2 hücrelerinin %50 inhibisyonuna (IC₅₀) neden olan ve çalışma süresince kullanılacak olan en uygun inkübasyon süreleri ile konsantrasyonları belirlenmiştir. Daha sonra HepG2 hücrelerinde, çalışma kapsamında etkisi araştırılan diğer test maddelerinden NMDA antagonisti MK-801'in (50  M -500  M) ve pozitif kontrol olarak kullanılan standart kemoterapi ilacı Doksorubisinin (0.065  M - 10  M) 48 saatlik ink basyonlarındaki canlılık analizleri yapılmış ve IC₅₀ dozları belirlenmiştir. Çalışmamızda ayrıca, KA ve K NA maddeleri ile MK-801'in çeşitli konsatrasyonlardaki kombinasyonları HepG2 hücrelerine eş zamanlı olarak uygulanmış ve oluşturulan kombinasyonların HepG2 hücrelerinin canlılıklarına etkisi belirlenmiştir.

4.1.1. KA'nın HepG2 Hücrelerinin Hücre Canlılığı  zerindeki Etkisi

KA'nın HepG2 hücrelerinin canlılığına etkisi doza (0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5 ve 10 mM) ve süreye (24, 36, 48 ve 72 saat) bağlı olarak MTT yöntemi ile analiz edilmiştir. MTT analizi sonucunda elde edilen % hücre canlılığı grafiği şekil 4.1'de gösterilmiştir.



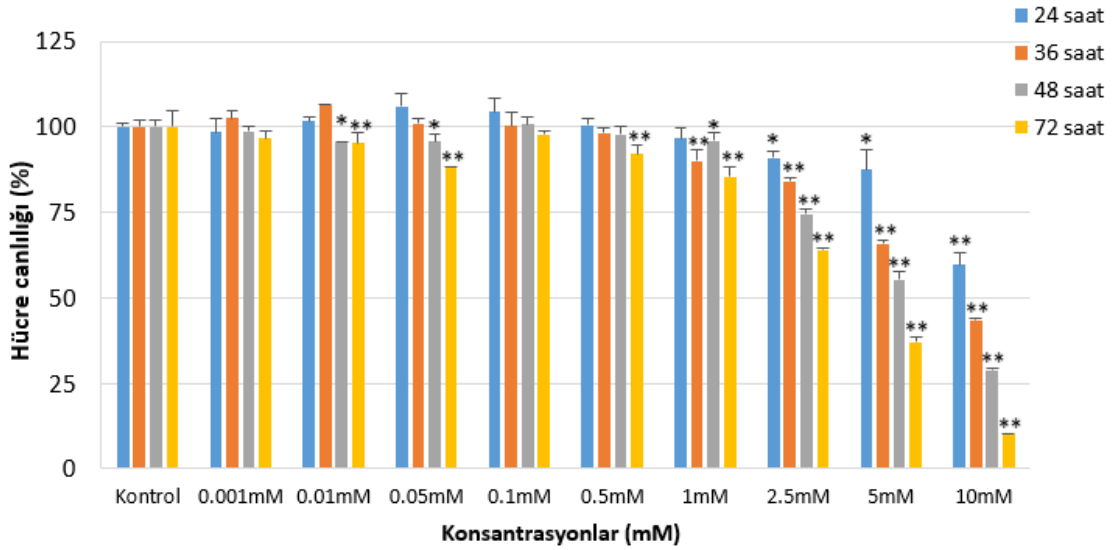
Şekil 4.1. KA'nın doza (0.001 mM - 10 mM) ve süreye bağlı (24 - 72 saat) olarak HepG2 hücrelerinin canlılığı (%) üzerindeki etkisi. * $p < 0.001$ ve ** $p < 0.05$ kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=3$).

MTT analizi sonucunda, KA'nın HepG2 hücrelerinin canlılığını doza ve süreye bağımlı şekilde azalttığı ve HepG2 hücreleri üzerinde genel olarak milimolar konsantrasyonlarda sitotoksik etkiye sahip olduğu görülmüştür. HepG2 hücrelerinin canlılığını yaklaşık %50'ye kadar azaltan konsantrasyonlar ve süreler; 10 mM'lık KA konsantrasyonu ile 48 saatlik inkübasyon (hücre canlılığı % 54) ($p < 0.001$) ve yine 10 mM'lık KA konsantrasyonu ile 72 saatlik inkübasyon (hücre canlılığı % 46.6) ($p < 0.001$) olarak belirlenmiştir. KA'nın 48 saatlik inkübasyonda HepG2 hücreleri üzerindeki IC_{50} değeri; 11.32 mM, 72 saatlik inkübasyondaki IC_{50} değeri ise 9.8 mM olarak hesaplanmıştır.

Çalışma kapsamında etkisi araştırılan KA, 0.1 N NaOH içinde çözünmüştür. Bununla birlikte, NaOH'un kültür ortamındaki final konsantrasyonu %1'den daha düşüktür. NaOH'un kültür ortamındaki final konsantrasyonunun HepG2 hücreleri üzerinde sitotoksik bir etkiye sahip olup olmadığını belirlemek amacıyla NaOH kontrol grubu oluşturulmuştur. Yapılan MTT analizi ve istatistiksel değerlendirme sonucunda kültür ortamındaki NaOH konsantrasyonunun 24 ve 48 saatlik inkübasyonlarda sitotoksik bir etki göstermediği ve kontrol grubuna göre HepG2 hücrelerinin canlılığını anlamlı şekilde azaltmadığı ($p > 0.05$) görülmüştür. Bununla birlikte, 36 ve 72 saatlik inkübasyonlarda NaOH'un hücrelerdeki canlılığı anlamlı şekilde azalttığı belirlenmiştir ($p < 0.001$). Bu sebeple, tez çalışmasının bundan sonraki aşamalarında KA için 48 saatlik inkübasyon süresinin en uygun inkübasyon süresi olduğuna karar verilmiştir.

4.1.2. KİNA'nın HepG2 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisi

KİNA'nın HepG2 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi doza (0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5 ve 10 mM) ve süreye (24, 36, 48 ve 72 saat) bağlı olarak MTT yöntemi ile analiz edilmiştir. MTT analizi sonucunda elde edilen % hücre canlılığı grafiği Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



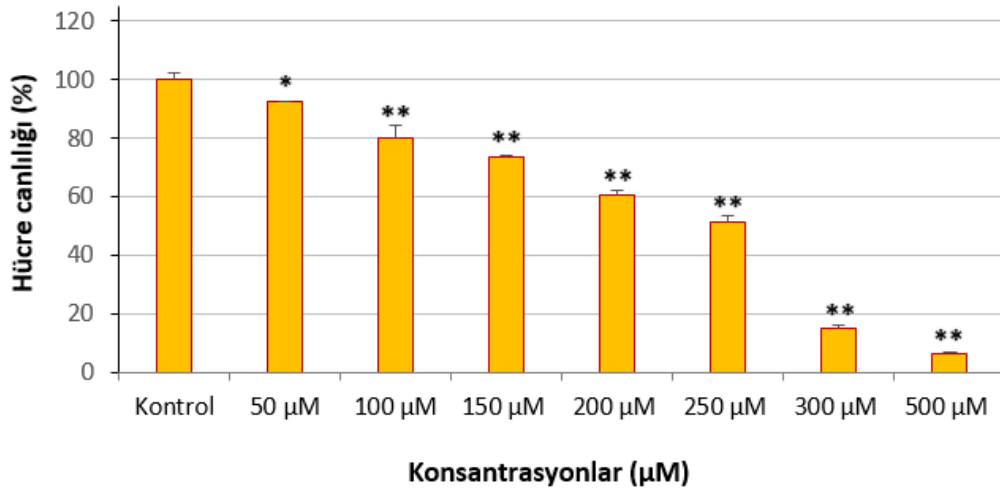
Şekil 4.2. KİNA'nın doza (0.001 mM - 10 mM) ve süreye bağlı (24 - 72 saat) olarak HepG2 hücrelerinin canlılığı (%) üzerindeki etkisi. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=3$).

Yapılan MTT analizi sonucunda, KİNA'nın HepG2 hücrelerinin canlılığını doza ve süreye bağımlı şekilde azalttığı belirlenmiştir. Hücrelerinin canlılığını yaklaşık %50'ye kadar azaltan konsantrasyonlar ve süreler; 10 mM KİNA konsantrasyonu ile 36 saatlik inkübasyon (hücre canlılığı %43.5) ($p < 0.001$) ve 5 mM KİNA konsantrasyonu ile 48 saatlik inkübasyon (hücre canlılığı %54.6) ($p < 0.001$) olarak belirlenmiştir. KİNA'nın HepG2 hücrelerinde 36 saatlik inkübasyondaki IC_{50} değeri 10.4 mM, 48 saatlik inkübasyondaki IC_{50} değeri ise 6.82 mM olarak hesaplanmıştır.

Böylece, HepG2 hücrelerinin canlılığını yaklaşık %50'ye kadar azaltan ve çalışma boyunca kullanılacak olan KA ve KİNA konsantrasyonları ile süreleri belirlenmiştir. Buna göre **KA için**; 10 mM'lık konsantrasyon ile 48 saatlik inkübasyon, **KİNA için**; 5 mM'lık konsantrasyon ile 48 saatlik inkübasyon HepG2 hücrelerinin yarısını öldüren uygun konsantrasyonlar ve inkübasyon süresi olarak belirlenmiştir.

4.1.3. MK-801'in HepG2 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisi

MK-801'in HepG2 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi, MK-801'in giderek artış gösteren 50-150 μ M arasındaki konsantrasyonları (50, 100, 150, 200, 250, 300 ve 500 μ M) ile HepG2 hücrelerinin 48 saatlik inkübasyonu sonucunda doza bağlı olarak MTT yöntemi ile analiz edilmiştir. MTT analizi sonucunda elde edilen % hücre canlılığı grafiği Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



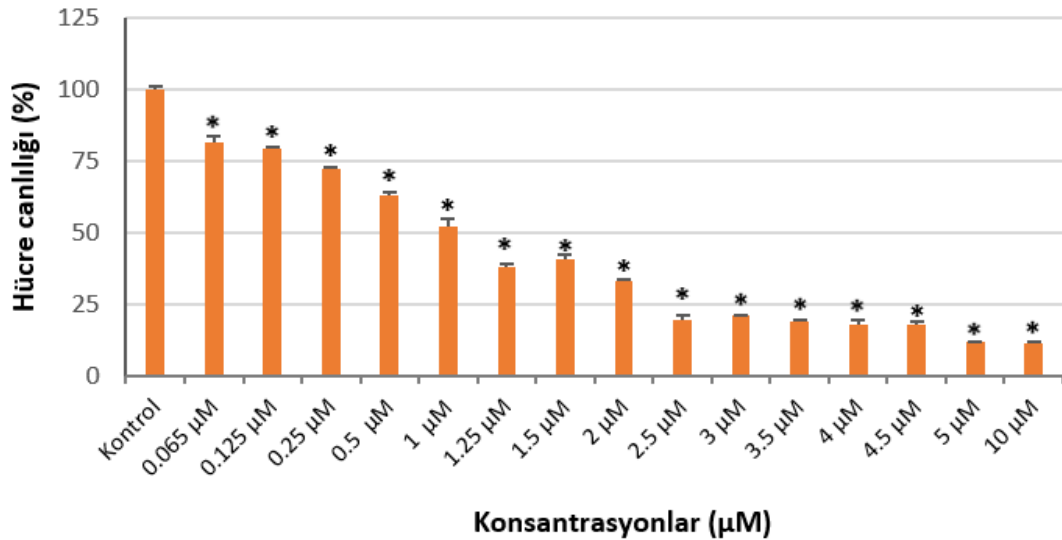
Şekil 4.3. HepG2 hücrelerinin MK-801'in artan konsantrasyonları (50-500 μ M) ile 48 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=3$).

Yapılan MTT analizi sonucunda, MK-801'in giderek artış gösteren konsantrasyonları ile HepG2 hücrelerinin 48 saatlik inkübasyonu sonucunda; kullanılan tüm konsantrasyonların HepG2 hücrelerinin canlılığını kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalttığı görülmüştür ($p < 0.05$ ve $p < 0.001$). Böylece, 48 saatlik inkübasyonda MK-801'in HepG2 hücrelerinin canlılığını kontrole göre yaklaşık %50 azaltan konsantrasyonu 250 μ M (hücre canlılığı % 51.47) olarak belirlenmiştir. HepG2 hücrelerinde MK-801'in 48 saatlik inkübasyondaki IC_{50} değeri ise 209.7 μ M olarak hesaplanmıştır.

4.1.4. Doksorubisin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Klinikte HSK tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapi ilacı olan Doksorubisin, çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Doksorubisinin HepG2 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi MTT analizi ile belirlenmiştir.

Bu amaçla, HepG2 hücreleri Doksorubisinin giderek artış gösteren 0.065-10 μM arasındaki (0.065, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 1.25, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 10 μM) konsantrasyonları ile 48 saatlik inkübasyonu sonucunda doza bağlı olarak analiz edilmiştir. MTT analizi sonucunda elde edilen % hücre canlılığı grafiği Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. HepG2 hücrelerinin Doksorubisinin artan konsantrasyonları (0.065 - 10 μM) ile 48 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği. * $p < 0.001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=3$).

Yapılan MTT analizi sonucunda, Doksorubisinin tüm konsantrasyonlarının HepG2 hücrelerinin canlılığını kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalttığı görülmüştür ($p < 0.001$). Böylece 48 saatlik inkübasyonda Doksorubisinin HepG2 hücrelerinin canlılığını kontrole göre yaklaşık %50 azaltan konsantrasyonu 1 μM (hücre canlılığı %51.9) olarak belirlenmiştir. HepG2 hücrelerinde Doksorubisinin 48 saatlik inkübasyondaki IC_{50} değeri ise 0.7 μM olarak hesaplanmıştır.

4.1.5. KA ve KİNA'nın MK-801 ile Kombinasyonlarının HepG2 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkileri

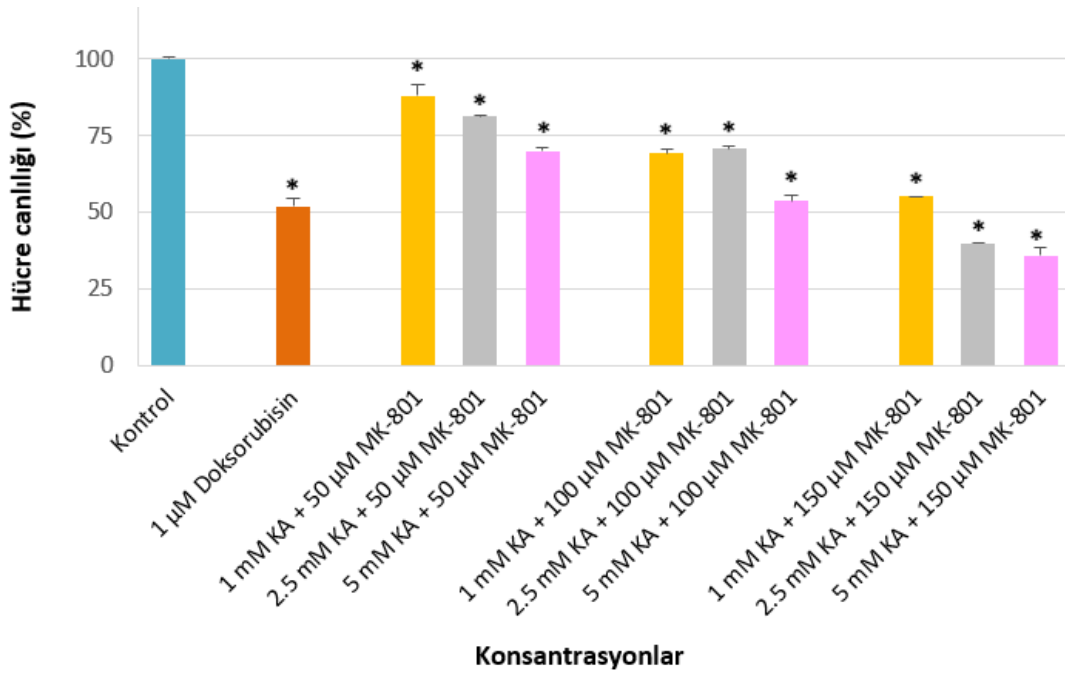
İyonotropik glutamat reseptörlerinin doğal bir antagonisti olan KA'nın ve sentetik bir glutamat antagonisti olan MK-801'in antitümöral etkilerinin olduğu yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Tez çalışması kapsamında bu iki antagonistin HepG2 hücrelerine birlikte verildiklerinde, HepG2 hücrelerinin canlılıkları üzerinde daha düşük dozlarda daha güçlü bir antitümöral etki gösterip göstermeyeceklerinin belirlenmesi de amaçlanmıştır. Bu amaçla, KA'nın HepG2 hücre canlılıkları, sırasıyla, %95.7, %80.4 ve

%71.9 olan 1 mM, 2.5 mM ve 5 mM konsantrasyonları ile, MK-801'in HepG2 hücre canlılıkları %92.4, %80.4 ve %73.6 olan 50 μ M, 100 μ M ve 150 μ M konsantrasyonları birbirleriyle kombine edilerek 9 farklı kombinasyon oluşturulmuştur (Şekil 4.5). Daha sonra, KA ve MK-801'in IC₅₀ konsantrasyonlarından daha düşük olan ve dolayısıyla daha yüksek hücre canlılığına sahip olan konsantrasyonları, hem tek başlarına hem de kombinasyon halinde HepG2 hücrelerine uygulanarak hücrelerle 48 saat inkübe edilmiş ve hücre canlılıkları üzerindeki etkileri MTT analizi ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar, çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan Doksorubisin'in 48 saatlik inkübasyonda HepG2 hücrelerinin canlılığını %50 inhibe eden 1 μ M'lık konsantrasyonu (hücre canlılığı %51.9) ile karşılaştırılmıştır.

Benzer şekilde, tez çalışması kapsamında KA ile yapısal benzerlik gösteren KİNA'nın da MK-801 ile kombinasyonunun HepG2 hücreleri üzerinde daha düşük dozlarda daha güçlü antitümöral etki gösterip göstermeyecekleri araştırılmıştır. Bu amaçla, KİNA'nın HepG2 hücre canlılıkları, sırasıyla, %96.6, %94.8 ve %73.6 olan 0.5 mM, 1 mM ve 2.5 mM'lık konsantrasyonlar ile, MK-801'in HepG2 hücre canlılıkları %92.4, %80.4 ve %73.6 olan 50 μ M, 100 μ M ve 150 μ M konsantrasyonları birbirleriyle kombine edilerek 9 farklı kombinasyon oluşturulmuştur (Şekil 4.6). Daha sonra, KİNA ve MK-801'in IC₅₀ konsantrasyonlarından daha düşük olan ve dolayısıyla daha yüksek hücre canlılığına sahip olan konsantrasyonları, hem tek başlarına hem de kombinasyon halinde birlikte HepG2 hücrelerine uygulanarak hücrelerle 48 saat inkübe edilmiş ve hücre canlılıkları üzerindeki etkileri MTT analizi ile ölçülmüştür.

4.1.5.1. KA ve MK-801 kombinasyonlarının HepG2 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkileri

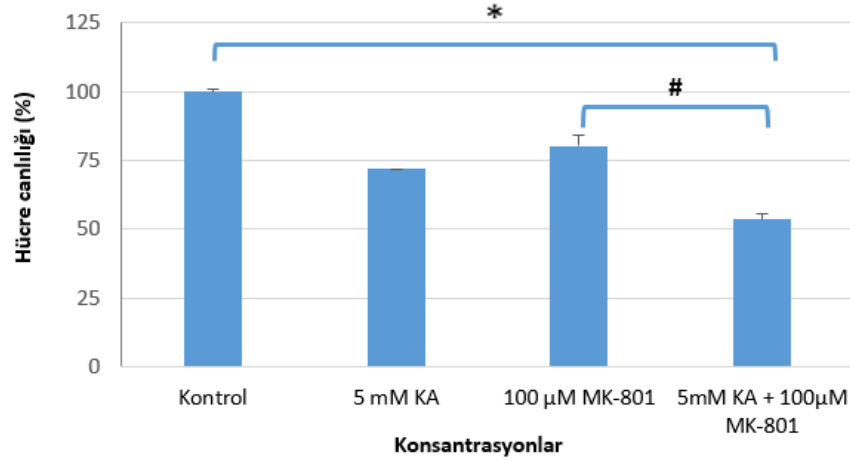
KA'nın belirlenen 3 farklı konsantrasyonu (1 mM, 2.5 mM ve 5 mM) ile MK-801'in 3 farklı konsantrasyonunun (50 μ M, 100 μ M ve 150 μ M) birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda MTT analizi ile elde edilen % hücre canlılığı grafiği Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5. KA+MK-801 kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği. * $p < 0.001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=3$).

Yapılan MTT analizi ve istatistiksel değerlendirmeler sonucunda, KA ve MK-801'in tüm kombinasyonlarının HepG2 hücrelerinin canlılığını kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalttıkları görülmüştür ($p < 0.001$) (Şekil 4.5). Bununla birlikte, KA'nın 3 farklı konsantrasyonu ile 50 μ M'lık MK-801 kombinasyonlarının hiçbirinin HepG2 hücrelerinin canlılığını %50'ye kadar indiremediği görülmüştür. Ancak, 5 mM KA ve 100 μ M MK-801 kombinasyonu ile 1 mM KA ve 150 μ M MK-801 kombinasyonunun, pozitif kontrol Doksorubisine benzer şekilde, HepG2 hücrelerinin canlılıklarını yaklaşık %50'ye kadar indirdikleri görülmüştür (hücre canlılıkları karşılıklı olarak; %53 ve %55). Böylece, 5 mM KA+100 μ M MK-801" ve "1 mM KA+150 μ M MK-801" kombinasyonları, HepG2 hücrelerinin canlılığının yarısını inhibe eden kombinasyonlar olarak belirlenmiştir.

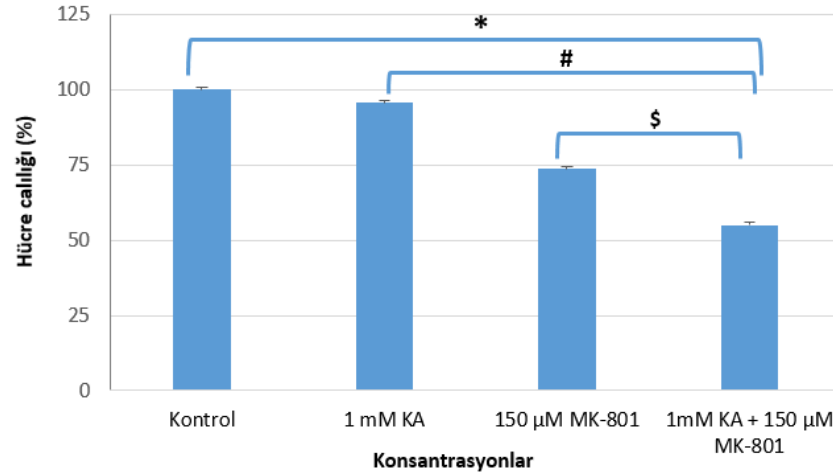
1 mM KA ve 100 μ M MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonunun HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda elde edilen % hücre canlılığı grafiği Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. 5 mM KA'nın ve 100 μ M MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonunun HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği. * $p < 0.001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında, # $p < 0.05$ 100 μ M MK-801 ile kıyaslandığında (n=3)

Yapılan MTT analizi sonucunda, 5 mM KA tek başına HepG2 hücrelerine uygulandığında hücre canlılığının %71.9, tek başına 100 μ M MK-801 hücrelere uygulandığında hücre canlılığının %80.4, 5 mM KA+100 μ M MK-801 kombinasyonunun hücrelere uygulandığında ise hücre canlılığının %53 olduğu görülmüştür (Şekil 4.6). Yapılan istatistiksel değerlendirmede, 5 mM KA+100 μ M MK-801 kombinasyonunun HepG2 hücrelerinin canlılığını kontrol grubuna göre ($p < 0.001$) ve tek başına 100 μ M MK-801 uygulanan gruba göre ($p < 0.05$) anlamlı şekilde azalttığı belirlenmiştir.

1 mM KA ile 150 μ M MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonunun HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda elde edilen % hücre canlılığı grafiği Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. 1 mM KA'nın ve 150 μ M MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonunun HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği. * $p < 0.001$ kontrol grubu, # $p < 0.05$ 1 mM KA ve \$ $p < 0.05$ 150 μ M MK-801 ile kıyaslandığında ($n=3$).

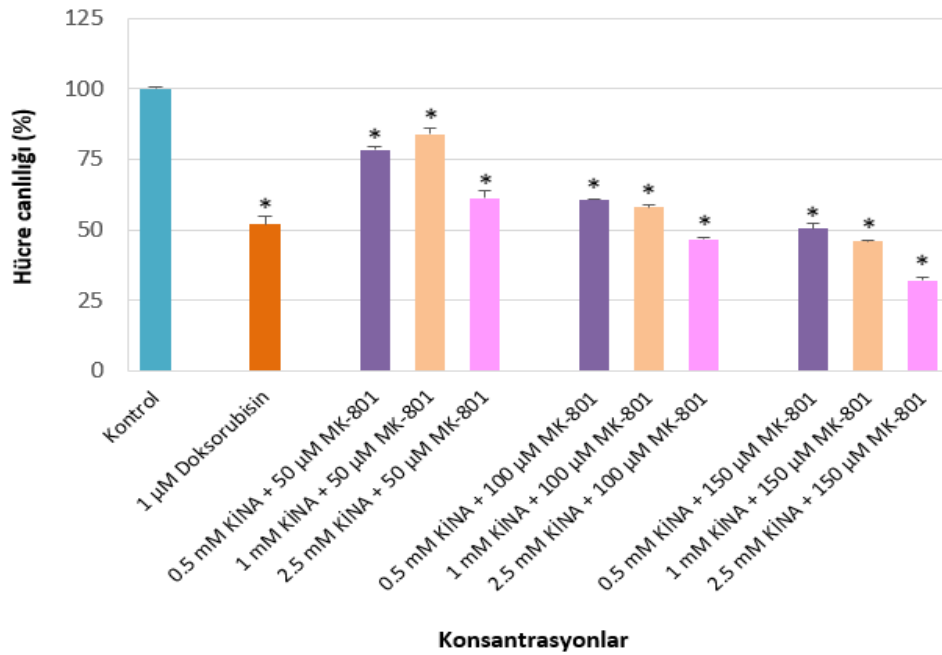
Yapılan MTT analizi sonucunda, 1 mM KA tek başına HepG2 hücrelerine uygulandığında hücre canlılığının %95.7, tek başına 150 μ M MK-801 hücrelere uygulandığında hücre canlılığının %73.6, 1 mM KA+150 μ M MK-801 kombinasyonunun hücrelere uygulandığında ise hücre canlılığının %55 olduğu görülmüştür (Şekil 4.7). Yapılan istatistiksel değerlendirmede, 1 mM KA+150 μ M MK-801 kombinasyonunun HepG2 hücrelerinin canlılığını kontrol grubuna, tek başına 1mM KA grubuna ve tek başına 150 μ M MK-801 uygulanan hücre gruplarına göre anlamlı şekilde azalttığı belirlenmiştir ($p < 0.05$).

Yapılan tüm MTT analizleri ve istatistiksel değerlendirmeler sonucunda, KA+MK-801 kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonu sonucunda hücre canlılığını yaklaşık %50'ye kadar azaltan kombinasyonları; 5 mM KA + 100 μ M MK-801 ve 1 mM KA + 150 μ M MK-801 olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan, 1 mM KA + 150 μ M MK-801 kombinasyonu ile inkübe edilen hücre grubunda, HepG2 hücre canlılığındaki azalma, hem tek başına KA (1 mM) hem de tek başına MK-801 (150 μ M) ile inkübe edilen hücre gruplarına göre anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). 5 mM KA + 100 μ M MK-801 kombinasyonu ile inkübe edilen hücre grubunda görülen hücre canlılığındaki azalma ise, yalnızca MK-801 (100 μ M) ile inkübe edilen hücre grubuna

göre anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Bu sebeple, HepG2 hücrelerinin canlılığını inhibe etmede 1 mM KA + 150 μ M MK-801 kombinasyon grubu daha etkili bulunmuş ve tez çalışmasının moleküler analiz aşamalarında 1 mM KA ve 150 μ M MK-801 konsantrasyonlarının tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının etkileri araştırılmıştır.

4.1.5.2. KİNA ve MK-801 kombinasyonlarının HepG2 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkileri

KİNA'nın belirlenen 3 farklı konsantrasyonu (0.5 mM, 1 mM ve 2.5 mM) ile MK-801'in 3 farklı konsantrasyonunun (50 μ M, 100 μ M ve 150 μ M) birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda MTT analizi ile elde edilen % hücre canlılığı grafiği Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

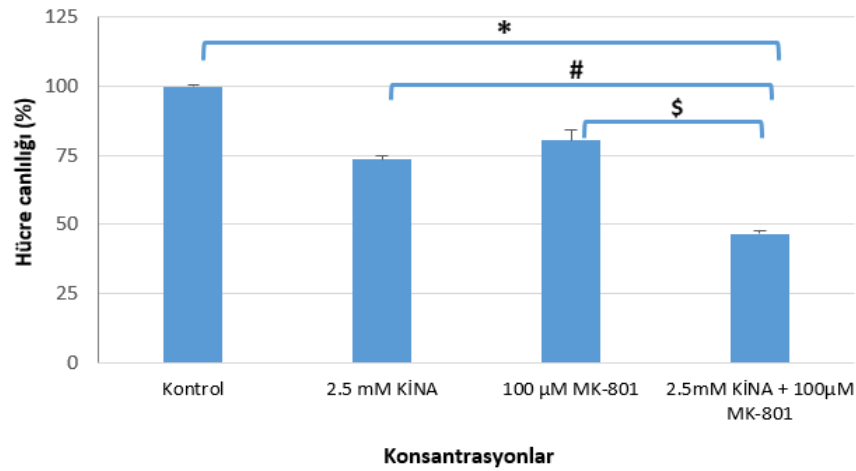


Şekil 4.8. KİNA+MK-801 kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği. * $p<0.001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=3$).

Yapılan MTT analizi ve istatistiksel değerlendirmeler sonucunda, KİNA ve MK-801'in tüm kombinasyonlarının HepG2 hücrelerinin canlılığını kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalttıkları görülmüştür ($p<0.001$) (Şekil 4.8). Bununla birlikte, KİNA'nın 3 farklı konsantrasyonu ile 50 μ M'lık MK-801 kombinasyonlarının hiçbirinin HepG2 hücrelerinin canlılığını %50'ye kadar indiremediği görülmüştür. Ancak, 2.5 mM KİNA ve 100 μ M MK-801 kombinasyonu ile 0.5 mM KİNA ve 150 μ M MK-801

kombinasyonunun, pozitif kontrol Doksorubisine benzer şekilde, HepG2 hücrelerinin canlılıklarını yaklaşık %50'ye kadar indirdikleri görülmüştür (hücre canlılıkları karşılıklı olarak; %47 ve %51). Böylece, 2.5 mM KİNA + 100 µM MK-801" ve "0.5 mM KİNA + 150 µM MK-801" kombinasyonları, HepG2 hücrelerinin canlılığını yarıya indiren kombinasyonlar olarak belirlenmiştir.

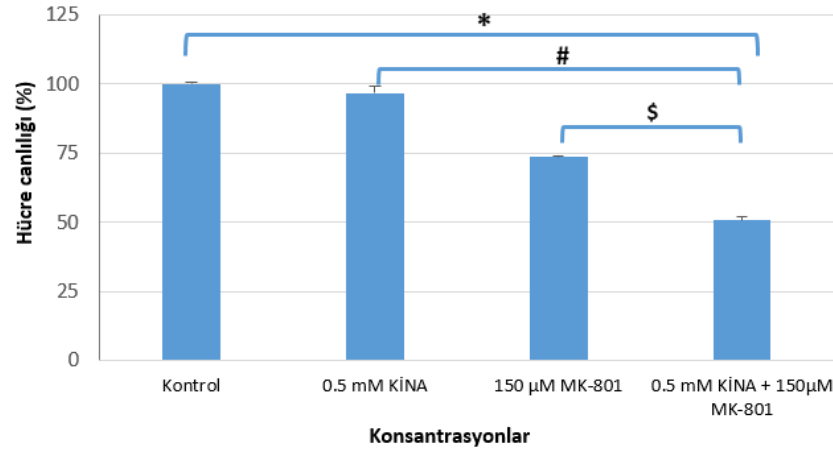
2.5 mM KİNA ile 100 µM MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonunun HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda elde edilen % hücre canlılığı grafiği Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. 2.5 mM KİNA ve 100 µM MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonunun HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği. * $p < 0.001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında, # $p < 0.001$, 2.5 mM KİNA ve \$ $p < 0.001$ 100 µM MK-801 ile kıyaslandığında (n=3).

Yapılan MTT analizi sonucunda, 2.5 mM KİNA tek başına HepG2 hücrelerine uygulandığında hücre canlılığının %73.6, tek başına 100 µM MK-801 hücrelere uygulandığında hücre canlılığının %80.4, 2.5 mM KİNA+100 µM MK-801 kombinasyonunun hücrelere uygulandığında ise hücre canlılığının %47 olduğu görülmüştür (Şekil 4.9). Yapılan istatistiksel değerlendirmede, 2.5 mM KİNA+100 µM MK-801 kombinasyonunun HepG2 hücrelerinin canlılığını kontrol grubuna ($p < 0.001$), tek başına 2.5 mM KİNA ve tek başına 100 µM MK-801 uygulanan hücre gruplarına göre ($p < 0.001$) anlamlı şekilde azalttığı görülmüştür.

0.5 mM KİNA ile 150 μ M MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonunun HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda elde edilen % hücre canlılığı grafiği Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. 0.5 mM KİNA ve 150 μ M MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonunun HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%) grafiği. * $p < 0.001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında, # $p < 0.001$ 0.5 mM KİNA ve \$ $p < 0.001$ 150 μ M MK-801 ile kıyaslandığında (n=3).

Yapılan MTT analizi sonucunda, 0.5 mM KİNA ve 150 μ M MK-801 tek başlarına HepG2 hücrelerine uygulandığında hücrelerin canlılıklarını sırasıyla %96.6 ve %73.6'ya düşürdükleri, 0.5 mM KİNA+150 μ M MK-801 kombinasyonunun ise hücrelerin canlılıklarını %51'e düşürdüğü görülmüştür (Şekil 4.10). Yapılan istatistiksel değerlendirmede, 0.5 mM KİNA+150 μ M MK-801 kombinasyonunun HepG2 hücrelerinin canlılığını kontrol grubuna ($p < 0.001$), tek başına 0.5 mM KİNA ve tek başına 150 μ M MK-801 uygulanan hücre gruplarına göre ($p < 0.001$) anlamlı şekilde azalttığı tespit edilmiştir.

Yapılan MTT analizleri ve istatistiksel değerlendirmeler sonucunda, 48 saatlik inkübasyon sonucunda HepG2 hücrelerinin canlılıklarını yaklaşık %50'ye kadar azaltan KİNA+MK-801 kombinasyonları; 2.5 mM KİNA + 100 μ M MK-801 ve 0.5 mM KİNA + 150 μ M MK-801 olarak belirlenmiştir (hücre canlılıkları karşılıklı olarak; %47 ve %51). Her iki kombinasyon grubunda da HepG2 hücrelerinin canlılığında görülen azalma, hem tek başına KİNA (0.5 ve 2.5 mM) hem de tek başına MK-801 (100 ve 150 μ M) grubuna göre anlamlı bulunmuştur. Diğer taraftan, 0.5 mM KİNA+150 μ M MK-801 kombinasyonun HepG2 hücrelerinin canlılığını %50'lik inhibisyona daha yakın şekilde inhibe etmesinden (%51) dolayı tez çalışmasının moleküler analiz aşamalarında

0.5 mM KİNA ve 150 μ M MK-801 konsantrasyonlarının tek başlarına ve birlikte kombinasyonunun etkileri araştırılmıştır.

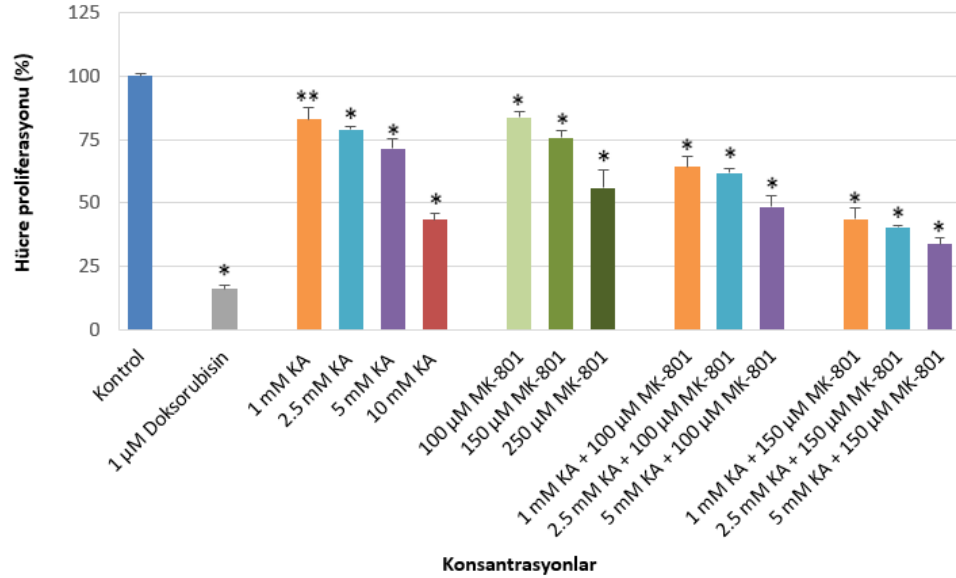
4.2. BrdU (Bromodeoksi-Üridin) Hücre Proliferasyon Testi Sonuçları

KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonları ile Doksorubisin'in MTT analizi ile belirlenen süre (48 saat) ve konsantrasyonları HepG2 hücrelerine uygulanmış ve hücrelerdeki DNA sentezine etkileri bromodeoksiuridin (BrdU) yöntemi ile analiz edilmiştir. Böylece, elde edilen sonuçların birbirleri ile karşılaştırılması ile test maddelerinin hücrelerin proliferasyonu üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

4.2.1. KA ve MK-801'in Tek Başlarına ve Birlikte Kombinasyonlarının HepG2 Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerindeki Etkileri

KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerini belirlemek amacı ile, MTT analizi ile belirlenen KA'nın 3 farklı konsantrasyonu (1 mM, 2.5 mM ve 5 mM) ve MK-801'in 2 farklı konsantrasyonu (100 μ M ve 150 μ M) 6 farklı kombinasyon olacak şekilde hücrelere uygulanmış ve 48 saatlik inkübasyon sonucunda hücrelerin proliferasyonlarına olan etkileri BrdU analizi ile belirlenmiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak Doksorubisin'in ise, yine MTT analizi belirlenen ve 48 saatlik inkübasyonda hücre canlılığını %50 inhibe eden 1 μ M'lık konsantrasyonu kullanılmıştır.

BrdU proliferasyon testi kullanılarak, maddelerin tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda elde edilen % hücre proliferasyonu grafiği Şekil 4.11’de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. KA ve MK-801’in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda elde edilen hücre proliferasyonu (%) grafiği. * $p < 0.001$, ** $p < 0.05$ kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=3$).

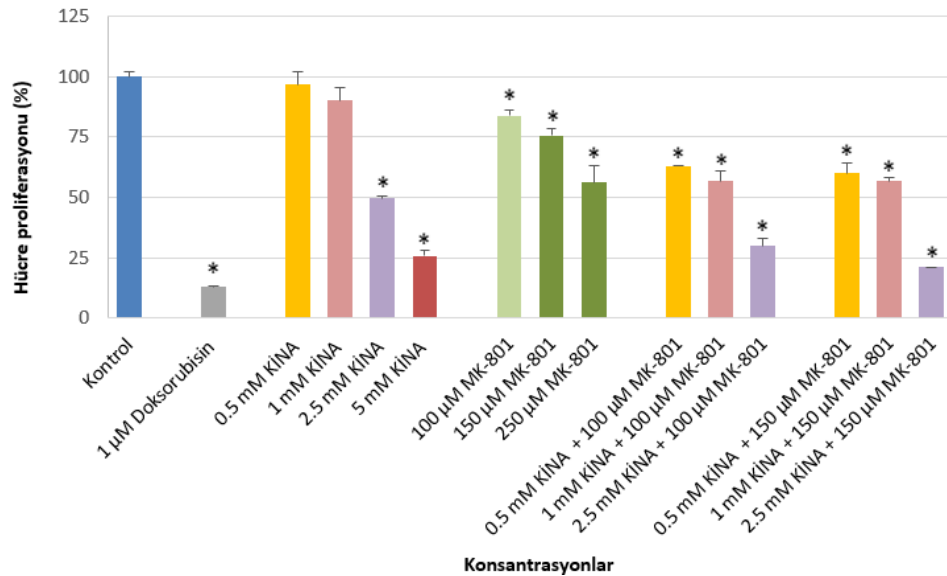
BrdU analizi sonucunda; KA ve MK-801 tek başlarına uygulandıklarında 48 saatlik inkübasyon sonucunda HepG2 hücrelerinin proliferasyonunu doza bağımlı şekilde azalttıkları görülmüştür (Şekil 4.11). Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda, KA ve MK-801’in tek başına uygulanan tüm konsantrasyonlarının, tüm kombinasyonlarının ve pozitif kontrol Doksorubisin’in HepG2 hücrelerinin proliferasyonunu kontrole göre anlamlı şekilde azalttıkları görülmüştür ($p < 0.05$ ve $p < 0.001$). Analiz sonucunda, 48 saatlik inkübasyonda HepG2 hücrelerinin proliferasyonunu %50’ye kadar azaltan KA + MK-801 kombinasyonları; 5 mM KA+100 µM MK-801 (hücre proliferasyonu %49) ve 1 mM KA+150 µM MK-801 (hücre proliferasyonu %44) kombinasyonları olarak belirlenmiştir.

BrdU analizi ile elde edilen ve HepG2 hücrelerinin proliferasyonlarını %50’ye kadar azaltan kombinasyon grupları ile MTT analizi ile elde edilen ve HepG2 hücrelerinin canlılıklarını %50’ye kadar azaltan kombinasyon grupları birbirleri ile uyumlu olup, elde edilen bu sonuçlar birbirini desteklemiştir. Ayrıca, yapılan BrdU analizi sonucunda KA’nın 10 mM’lık konsantrasyonu ile MK-801’in 250 µM’lık konsantrasyonu HepG2 hücrelerinin proliferasyonlarını %50’ye kadar azaltan konsantrasyonlar olarak

belirlenmiş olup, elde edilen bu sonuçlar da yine MTT analizinden elde edilen sonuçları desteklemiştir.

4.2.2. KİNA ve MK-801'in Tek Başlarına ve Birlikte Kombinasyonlarının HepG2 Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerindeki Etkileri

KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerini belirlemek amacı ile, MTT analizi ile belirlenen KİNA'nın 3 farklı konsantrasyonu (0.5 mM, 1 mM ve 2.5 mM) ve MK-801'in 2 farklı konsantrasyonu (100 μ M ve 150 μ M) 6 farklı kombinasyon olacak şekilde hücrelere uygulanmış ve 48 saatlik inkübasyon sonucunda hücrelerin proliferasyonlarına olan etkileri BrdU analizi ile belirlenmiştir. BrdU proliferasyon testi kullanılarak, maddelerin tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda elde edilen % hücre proliferasyon grafiği Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda elde edilen hücre proliferasyonu (%) grafiği. *p<0.001 kontrol grubu ile kıyaslandığında (n=3).

BrdU analizi sonucunda; KİNA ve MK-801 tek başlarına uygulandıklarında 48 saatlik inkübasyon sonucunda HepG2 hücrelerinin proliferasyonunu doza bağımlı şekilde azalttıkları görülmüştür (Şekil 4.12). Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda, KİNA'nın 0.5 ve 1 mM'lık konsantrasyonları ile inkübe edilen hücreler dışındaki diğer tüm hücre gruplarında, proliferasyonun kontrole göre anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür (p<0.001).

Analiz sonucunda, 48 saatlik inkübasyonda HepG2 hücrelerinin proliferasyonunu %50'ye en yakın azaltan KİNA + MK-801 kombinasyonları; 1 mM KİNA + 100 µM MK-801 (hücre proliferasyonu %56.6), 0.5 mM KİNA + 150 µM MK-801 (hücre proliferasyonu %59.8) ve 1 mM KİNA + 150 µM MK-801 (hücre proliferasyonu %56.8) kombinasyonları olarak belirlenmiş olup, HepG2 hücrelerinin proliferasyonunu en güçlü şekilde azaltan KA+MK-801 kombinasyonlarının ise; 2.5 mM KİNA + 100 µM MK-801 (hücre proliferasyonu %30) ve 2.5 mM KİNA + 150 µM MK-801 (hücre proliferasyonu %21) olduğu görülmüştür. Ayrıca, yapılan BrdU analizi sonucunda KİNA'nın 5 mM'lık konsantrasyonu ile MK-801'in 250 µM'lık konsantrasyonu HepG2 hücrelerinin proliferasyonlarını etkili şekilde azalttığı belirlenmiş ve elde edilen bu sonuçlar MTT analizinden elde edilen sonuçları desteklemiştir.

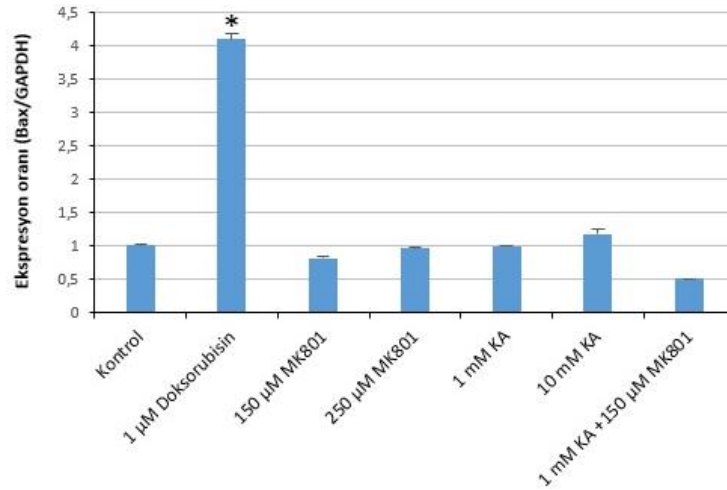
4.3. KA ve KİNA'nın Tek Başlarına ve MK-801 ile Kombinasyonlarının HepG2 Hücrelerinde Apoptoz ve Hücre Döngüsü Yolağında Rol Oynayan Genlerin mRNA Ekspresyonlarına Etkileri

KA ve KİNA'nın tek başlarına ve MK-801 ile olan kombinasyonlarının HepG2 hücrelerinde apoptotik yolda önemli roller oynayan Bax, Bcl-2, Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bim ve FasL genlerinin mRNA transkripsiyon düzeyleri ile hücre döngüsünde önemli rol oynayan p21 geninin mRNA transkripsiyon düzeyine etkileri RT-qPCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Genlerin transkripsiyon düzeyleri, GAPDH kontrol geninin transkripsiyon seviyesi ile normalize edilmiştir.

KA ve KİNA'nın tek başlarına ve MK-801 ile birlikte olan kombinasyonlarının HepG2 hücrelerinde apoptotik yolağa ve hücre döngüsüne olan etkilerini belirlemek amacıyla, MTT ve BrdU analizleri ile belirlenen ve karşılıklı olarak HepG2 hücrelerinin canlılıklarını ve proliferasyonlarını 48 saatlik inkübasyonda yaklaşık %50'ye kadar azaltan konsantrasyonlar ve kombinasyonlar ile canlılık ve proliferasyonun %50'nin üzerinde olduğu bir alt konsantrasyonlar ve kombinasyonlar kullanılmıştır. Buna göre, tek başına madde konsantrasyonları olarak; KA'nın 1 ve 10 mM'lık, KİNA'nın 0.5 ve 5 mM'lık ve MK-801'in de 150 ve 200 µM'lık konsantrasyonları kullanılmıştır. Birlikte kombinasyonları olarak ise; 1 mM KA+150 µM MK-801 ve 0.5 mM KİNA+150 µM MK-801 kombinasyonları kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan Doksorubisin'den (1 µM) elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

4.3.1. KA ve MK-801'in tek Başlarına ve Birlikte Kombinasyonlarının Apoptoz ve Hücre Döngüsü Yolağında Görev Alan Genlerin mRNA Ekspresyonlarına Etkileri

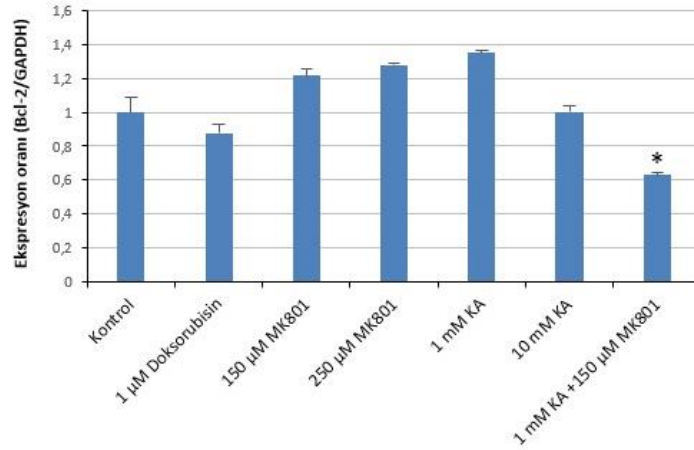
KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Bax geninin mRNA transkripsiyon düzeyine etkileri Şekil 4.13'te gösterilmiştir.



Şekil 4.13. KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Bax geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri. * $p < 0.001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=2$).

Yapılan RT-qPCR analizi ve istatistiksel değerlendirme sonucunda, KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonunun uygulandığı hücre gruplarının hiçbirinde Bax'ın mRNA düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artmadığı ($p > 0.05$) görülmüştür (Şekil 4.13). Bununla birlikte, çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan Doksorubisin uygulanan hücre grubunda ise Bax'ın mRNA düzeyinin kontrole göre anlamlı şekilde arttığı belirlenmiştir ($p < 0.001$)

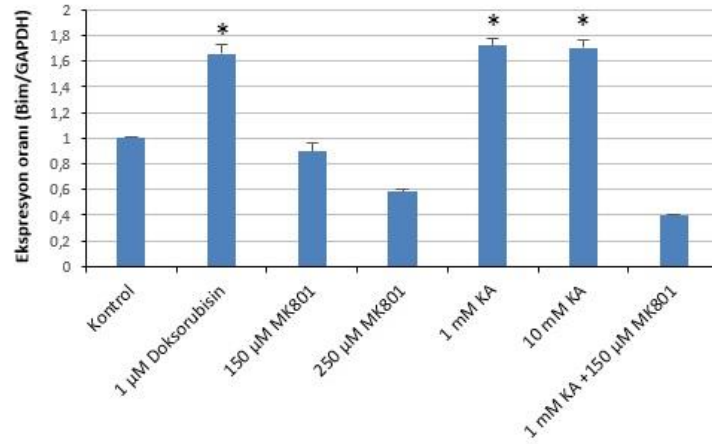
KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Bcl-2 geninin mRNA transkripsiyon düzeyine etkileri Şekil 4.14'te gösterilmiştir.



Şekil 4.14. KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Bcl-2 geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri. * $p < 0.05$ kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=2$).

Yapılan RT-qPCR analizi sonucunda; 1 mM KA+150 µM MK-801 ve Doksorubisin uygulanan hücre gruplarında anti-apoptotik Bcl-2 mRNA düzeyinin kontrol grubuna göre azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.14). Bununla birlikte, yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda Doksorubisin uygulanan hücre grubundaki azalmanın kontrol grubuna göre anlamlı olmadığı ($p > 0.05$), 1 mM KA+150 µM MK-801 uygulanan hücre grubundaki azalmanın ise kontrol grubuna göre anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0.05$).

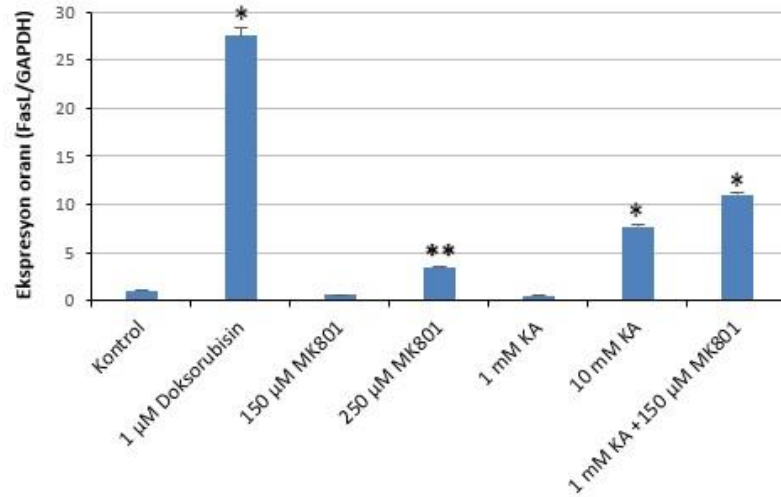
KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Bim geninin mRNA transkripsiyon düzeyine etkileri Şekil 4.15'te gösterilmiştir.



Şekil 4.15. KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Bim geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri. * $p < 0.001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=2$).

Yapılan RT-qPCR analizi ve istatistiksel değerlendirme sonucunda, tek başına KA ve Doksorubisin ile inkübe edilen hücre gruplarındaki Bim'in mRNA düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı görülmüştür ($p < 0.001$) (Şekil 4.15). Bim ifadesindeki en fazla artış ise, 1 mM KA ile inkübe edilen hücre grubunda olduğu görülmüş ve kontrol grubuna göre yaklaşık 1.7 kat arttığı tespit edilmiştir.

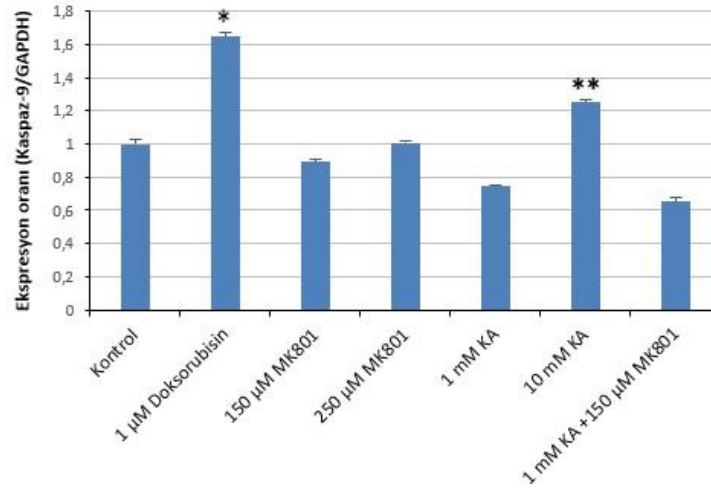
KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda FasL geninin mRNA transkripsiyon düzeyine etkileri Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.16. KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda FasL geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=2$).

Yapılan RT-qPCR analizi ve istatistiksel değerlendirme sonucunda, Doksorubisin, 250 μ M MK-801, 10 mM KA ile 1 mM KA+150 μ M MK-801 grubunda FasL mRNA düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı görülmüştür ($p < 0.05$ ve $p < 0.001$) (Şekil 4.16). Pozitif kontrol Doksorubisin dışında, FasL mRNA düzeyindeki en fazla artış 1 mM KA+150 μ M MK-801 ve 10 mM KA ile inkübe edilen hücre gruplarında görülmüş olup, kombinasyon grubundaki FasL mRNA düzeyinin kontrol grubuna göre yaklaşık 10 kat, 10 mM KA grubundaki FasL mRNA düzeyinin ise yaklaşık 7.5 kat fazla olduğu tespit edilmiştir.

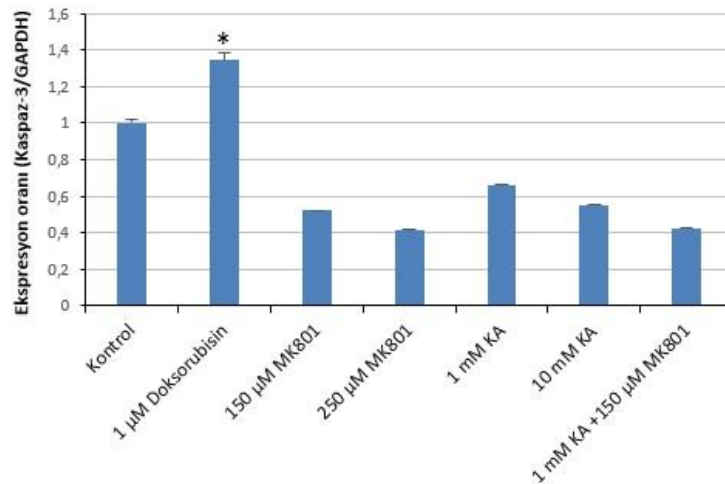
KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Kaspaz-9 geninin mRNA transkripsiyon düzeyine etkileri Şekil 4.17'de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Kaspaz-9 geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri. * $p < 0.001$, ** $p < 0.05$ kontrol grubu ile kıyaslandığında (n=2).

Yapılan RT-qPCR analizi ve istatistiksel değerlendirme sonucunda; 10 mM KA ($p < 0.05$) ve Doksorubisin ($p < 0.001$) uygulanan hücre gruplarında Kaspaz-9 mRNA düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.17).

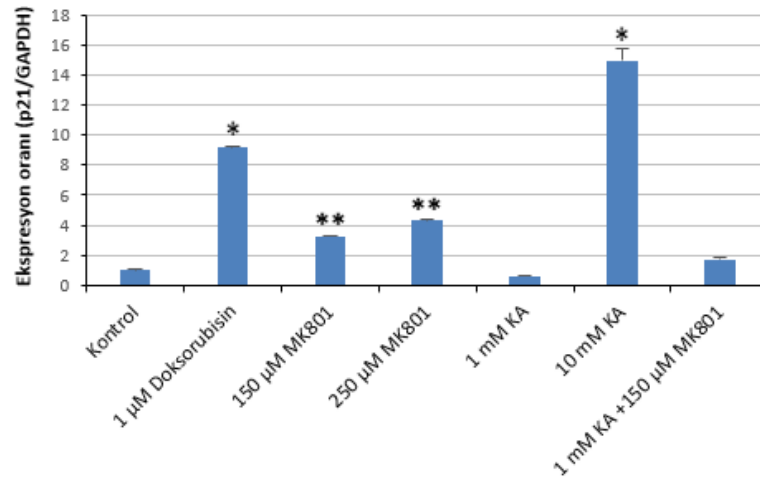
KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Kaspaz-3 geninin mRNA transkripsiyon düzeyine etkileri Şekil 4.18'de gösterilmiştir.



Şekil 4.18. KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Kaspaz-3 geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri. * $p < 0.001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında (n=2).

Yapılan RT-qPCR analizi ve istatistiksel değerlendirme sonucunda, KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonunun uygulandığı hücre gruplarının hiçbirinde Kaspaz-3'ün mRNA düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artmadığı görülmüştür ($p>0.05$) (Şekil 4.18). Bununla birlikte, çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan Doksorubisin uygulanan hücre grubunda ise Kaspaz-3'ün mRNA düzeyinin kontrole göre anlamlı şekilde arttığı belirlenmiştir ($p<0.001$).

KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda, hücre döngüsünde rol alan p21 geninin mRNA transkripsiyon düzeyine etkileri Şekil 4.19'da gösterilmiştir.

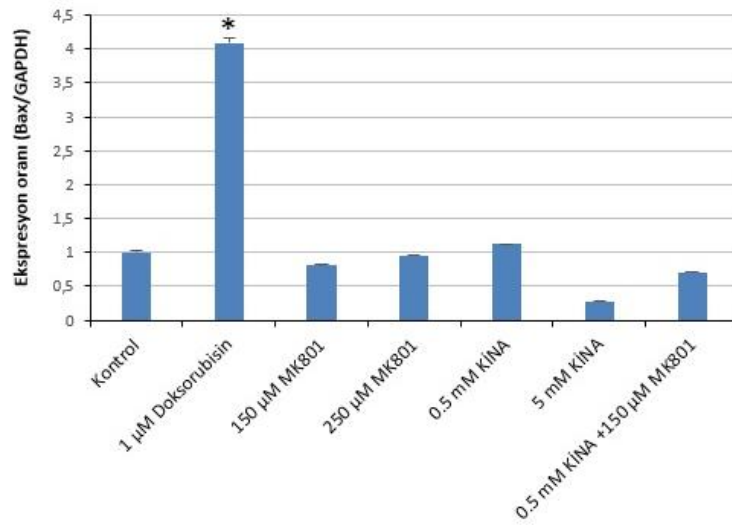


Şekil 4.19. KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda p21 geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri. * $p<0.001$, ** $p<0.05$ kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=2$).

Yapılan RT-qPCR analizi ve istatistiksel değerlendirme sonucunda; MK-801'in 150 μ M ve 250 μ M 'lık konsantrasyonları ($p<0.05$), KA'nın 10 mM'lık konsantrasyonu ve Doksorubisin ($p<0.001$) ile inkübe edilen hücre gruplarında p21 mRNA düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı görülmüştür (Şekil 4.19). Hücre grupları arasında p21 düzeyindeki en fazla artış ise 10 mM KA ile inkübe edilen hücre grubunda görülmüş olup, bu gruptaki p21 mRNA düzeyinin kontrol grubuna göre yaklaşık 15 kat fazla olduğu tespit edilmiştir.

4.3.2. KİNA ve MK-801'in Tek Başlarına ve Birlikte Kombinasyonlarının Apoptoz ve Hücre Döngüsü Yolağında Görev Alan Genlerin mRNA Ekspresyonlarına Etkileri

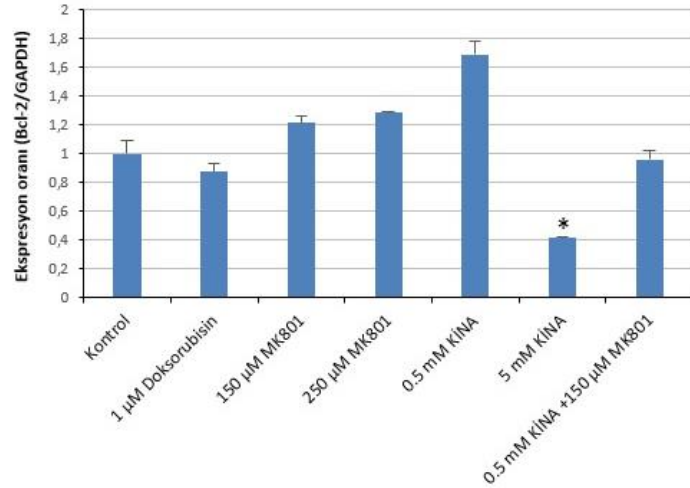
KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Bax geninin mRNA transkripsiyon düzeyine etkileri Şekil 4.20'de gösterilmiştir.



Şekil 4.20. KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Bax geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri. * $p < 0.001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=2$).

Yapılan RT-qPCR analizi ve istatistiksel değerlendirme sonucunda, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının uygulandığı hücre gruplarının hiçbirinde Bax'ın mRNA düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artmadığı görülmüştür ($p > 0.05$). Bununla birlikte, Doksorubisin ile inkübe edilen hücre gruplarında Bax mRNA düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı görülmüştür ($p < 0.001$) (Şekil 4.20).

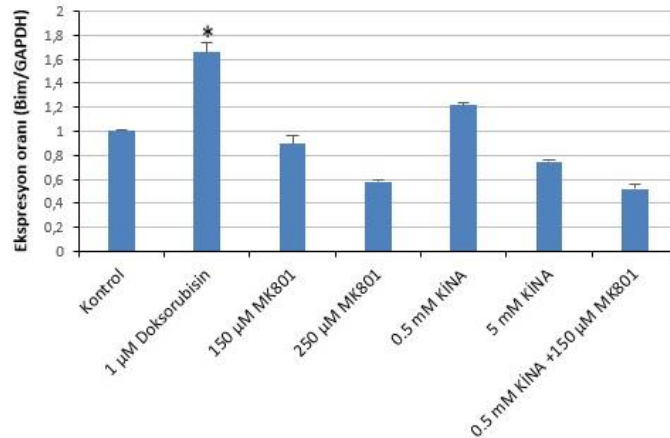
KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Bcl-2 geninin mRNA transkripsiyon düzeyine etkileri Şekil 4.21'da gösterilmiştir.



Şekil 4.21. KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Bcl-2 geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri. * $p < 0.05$ kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=2$).

Yapılan RT-qPCR analizi sonucunda; 5 mM KİNA, 0.5 mM KİNA + 150 µM MK-801 ve Dokсорubisin uygulanan hücre gruplarında Bcl-2 mRNA düzeyinin kontrol grubuna göre azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.21). Bununla birlikte, yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda 5 mM KA uygulanan hücre grubundaki azalmanın kontrol grubuna göre anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0.05$).

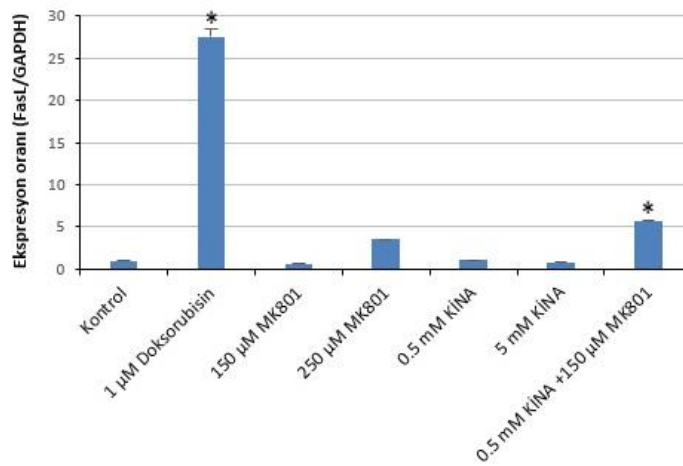
KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Bim geninin mRNA transkripsiyon düzeyine etkileri Şekil 4.22'de gösterilmiştir.



Şekil 4.22. KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Bim geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri. * $p < 0.001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=2$).

Yapılan RT-qPCR analizi sonucunda; 0.5 mM KİNA ve Doksorubisin uygulanan hücre gruplarında Bim mRNA düzeyinin kontrol grubuna göre arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.22). Bununla birlikte, yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda yalnızca Doksorubisin uygulanan hücre grubunda Bim mRNA düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı görülmüştür ($p<0.001$).

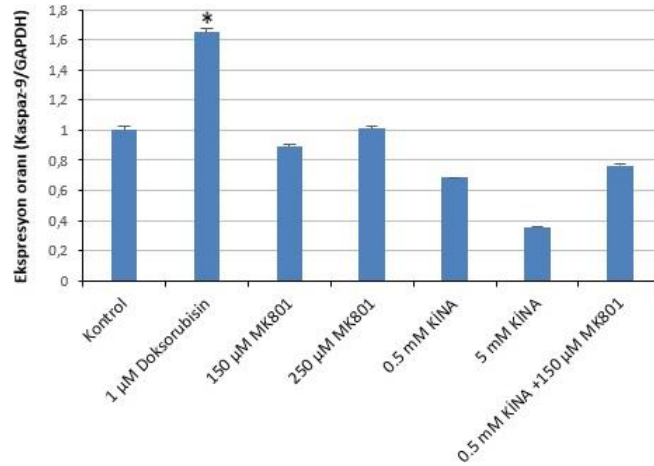
KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda FasL geninin mRNA transkripsiyon düzeyine etkileri Şekil 4.23'te gösterilmiştir.



Şekil 4.23. KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda FasL geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri. * $p<0.001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=2$).

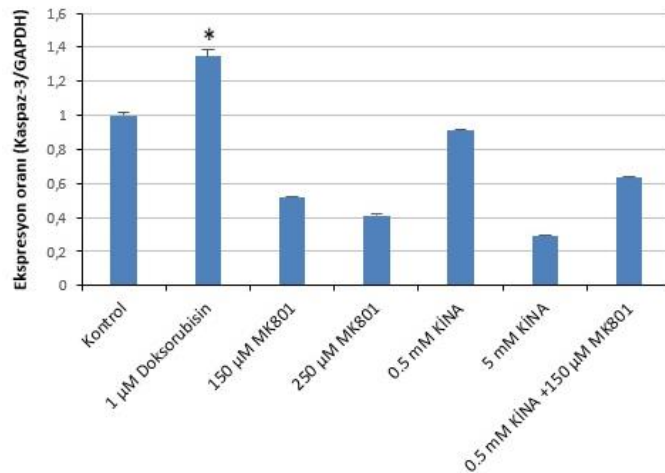
Yapılan RT-qPCR analizi ve istatistiksel değerlendirme sonucunda; 250 µM MK-801, kombinasyon grubu ve Doksorubisin ile inkübe edilen hücre gruplarında FasL mRNA düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı görülmüştür ($p<0.001$) (Şekil 4.23). Pozitif kontrol Doksorubisin dışında, FasL mRNA düzeyindeki en fazla artış 0.5 mM KİNA+150 µM MK-801 ile inkübe edilen hücre grubunda görülmüş olup, bu gruptaki FasL mRNA düzeyinin kontrol grubuna göre yaklaşık 5 kat fazla olduğu tespit edilmiştir.

KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Kaspaz-9 geninin mRNA transkripsiyon düzeyine etkileri Şekil 4.24'te gösterilmiştir.



Şekil 4.24. KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Kaspaz-9 geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri. * $p < 0.001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=2$).

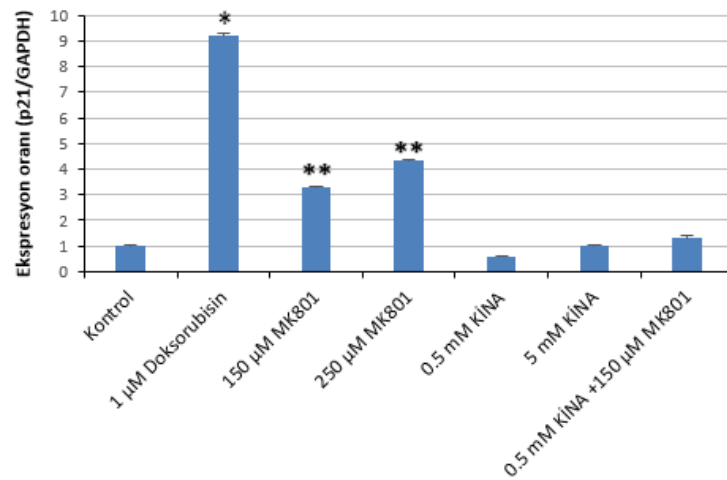
Yapılan RT-qPCR analizi ve istatistiksel değerlendirme sonucunda, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonunun uygulandığı hücre gruplarının hiçbirinde Kaspaz-9'un mRNA düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artmadığı görülmüştür ($p > 0.05$). Bununla birlikte, çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan Doksorubisin uygulanan hücre grubunda ise Kaspaz-9'un mRNA düzeyinin kontrole göre anlamlı şekilde arttığı belirlenmiştir ($p < 0.001$) (Şekil 4.24). KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Kaspaz-3 geninin mRNA transkripsiyon düzeyine etkileri Şekil 4.25'te gösterilmiştir.



Şekil 4.25. KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Kaspaz-3 geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri. * $p < 0.001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=2$).

Yapılan RT-qPCR analizi ve istatistiksel değerlendirme sonucunda; KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonunun uygulandığı hücre gruplarının hiçbirinde Kaspaz-3 mRNA düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Bununla birlikte, çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan Doksorubisin uygulanan hücre grubunda ise Kaspaz-3 mRNA düzeyinin kontrole göre anlamlı şekilde arttığı belirlenmiştir ($p<0.001$) (Şekil 4.25).

KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda p21 geninin mRNA transkripsiyon düzeyine etkileri Şekil 4.26'da gösterilmiştir.



Şekil 4.26. KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda p21 geninin mRNA transkripsiyon düzeylerine etkileri. * $p<0.001$, ** $p<0.05$ kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=2$).

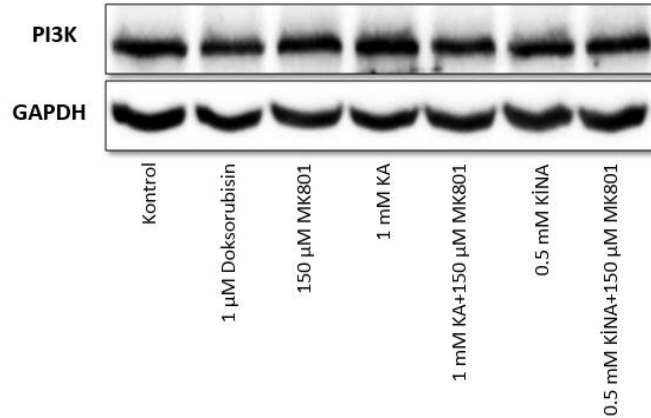
Yapılan RT-qPCR analizi ve istatistiksel değerlendirme sonucunda; MK-801'in 150 μ M ve 250 μ M 'lik konsantrasyonları ($p<0.05$) ve Doksorubisin ($p<0.001$) ile inkübe edilen hücre gruplarında p21 mRNA düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı görülmüştür (Şekil 4.26).

4.4. KA ve KİNA'nın Tek Başlarına ve MK-801 ile Kombinasyonlarının HepG2 Hücrelerinde PI3K/Akt ve FoxO Yolağında Rol Oynayan Proteinlerin Ekspresyonlarına Etkileri

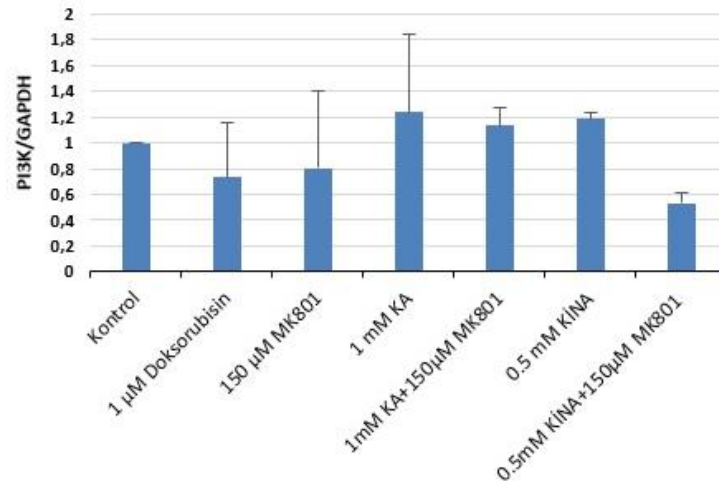
KA ve KİNA'nın tek başlarına ve MK-801 ile olan kombinasyonlarının HepG2 hücrelerinde PI3K/Akt ve FoxO yolaklarında önemli rolleri olan; PI3K, Akt, PTEN, p-PTEN, FOXO1, FOXO3a, TXNIP ve p-27 proteinlerinin ifade düzeylerine etkileri Western Blot yöntemi ile analiz edilmiştir. Proteinlerdeki ifade düzeyleri GAPDH kontrol proteininin ifade seviyesi ile normalize edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, çalışmada pozitif kontrol olarak Doksorubisin'den elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

Western blot analizinde, MTT ve BrdU analizleri sonucunda HepG2 hücrelerinin canlılığını ve proliferasyonu yaklaşık %50'ye kadar azaltan kombinasyon ve bu kombinasyonu oluşturan maddeler ile devam edilmesine karar verilmiştir. Bu sebeple, 1 mM KA+150 µM MK-801 ve 0.5 mM KİNA+150 µM MK-801 kombinasyonları ve bu kombinasyonu oluşturan maddelerin (1 mM KA, 0.5 mM KİNA ve 150 µM MK-801) HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda PI3K/Akt ve FoxO yolağında rol alan proteinlerinin ifade düzeylerine etkileri western blot analizi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar birbirleri ile ve pozitif kontrol Doksorubisin'den (1µM) elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

KA, KİNA ve MK-801 maddelerinin tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücrelerinde PI3K protein ekspresyonuna etkilerini gösteren western blot görüntüsü Şekil 4.27’de, görüntülerin analizi ile elde edilen PI3K protein düzeyi de Şekil 4.28’de gösterilmiştir.



Şekil 4.27. KA, KİNA ve MK-801’in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda PI3K protein ekspresyonuna etkilerini gösteren western blot görüntüsü.

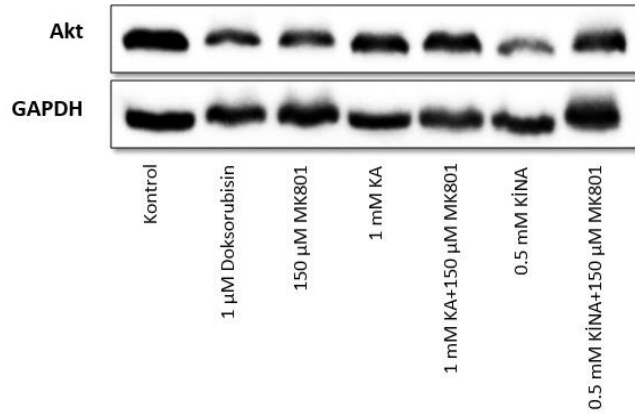


Şekil 4.28. KA, KİNA ve MK-801’in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda PI3K protein düzeylerini gösteren grafik (n=2).

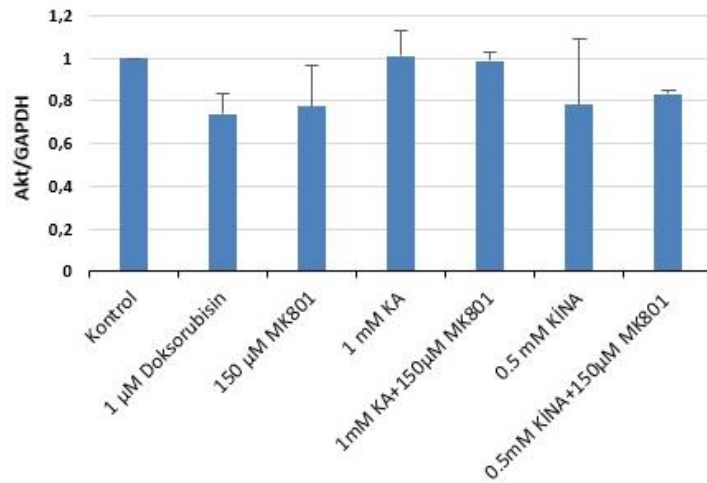
Yapılan Western blot analizi sonucunda; Dokсорubisin, 150 µM MK-801 ve 0.5 mM KİNA+150 µM MK-801 kombinasyonu ile inkübe edilen hücre gruplarında PI3K protein düzeylerinin etkili şekilde azaldığı görülmüştür (Şekil 4.28). Bununla birlikte, yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu hücre gruplarındaki azalmaların kontrol grubuna göre anlamlı olmadığı belirlenmiş ($p>0.05$), bu durumun ise standart sapmaların yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Diğer taraftan, 0.5 mM KİNA+150 µM MK-801 ile inkübe edilen hücre grubundaki PI3K seviyesinin kontrol

grubuna göre 0.5 kat azaldığı, bu azalmanın Doksorubisin uygulanan hücre grubundan daha etkili bir azalma olduğu gösterilmiştir.

KA, KİNA ve MK-801 maddelerinin tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücrelerinde Akt protein ekspresyonuna etkilerini gösteren western blot görüntüsü Şekil 4.29’da, görüntülerin analizi ile elde edilen Akt protein düzeyi de Şekil 4.30’da gösterilmiştir.



Şekil 4.29. KA, KİNA ve MK-801’in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Akt protein düzeylerini gösteren western blot görüntüsü.

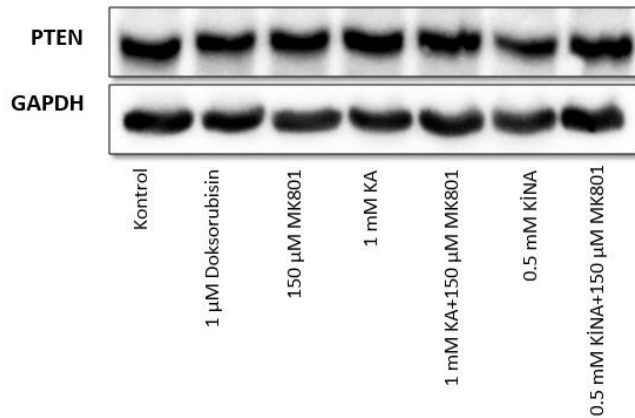


Şekil 4.30. KA, KİNA ve MK-801’in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda Akt protein düzeylerini gösteren grafik (n=2).

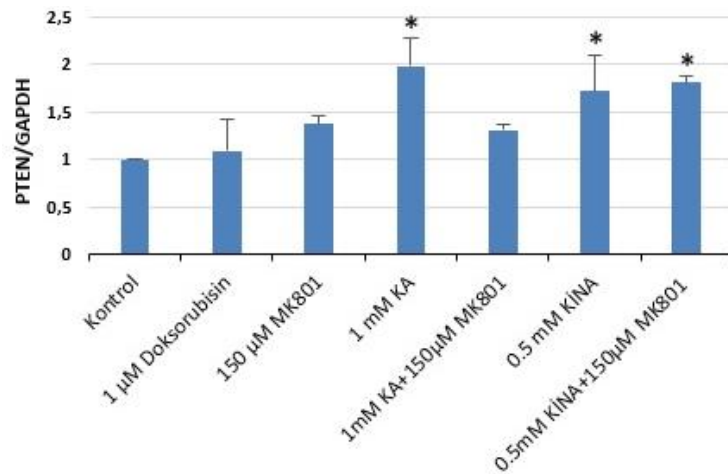
Yapılan Western blot analizi sonucunda; Doksorubisin, 150 µM MK-801, 0.5 mM KİNA ve 0.5 mM KİNA+150 µM MK-801 ile inkübe edilen hücre gruplarındaki Akt protein düzeylerinin azaldığı görülmüştür (Şekil 4.30). Yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu hücre gruplarındaki azalmaların kontrol grubuna göre anlamlı olmadığı ($p>0.05$), bununla birlikte 0.5 mM KİNA+150 µM MK-801 ile inkübe edilen hücre

grubundaki Akt seviyesindeki azalmanın kontrol grubuna göre 0.8 kat olduğu görülmüştür.

KA, KİNA ve MK-801 maddelerinin tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücrelerinde PTEN protein ekspresyonuna etkilerini gösteren western blot görüntüsü Şekil 4.31’de, görüntülerin analizi ile elde edilen PTEN protein düzeyi de Şekil 4.32’de gösterilmiştir.



Şekil 4.31. KA, KİNA ve MK-801’in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda PTEN protein düzeylerini gösteren western blot görüntüsü.

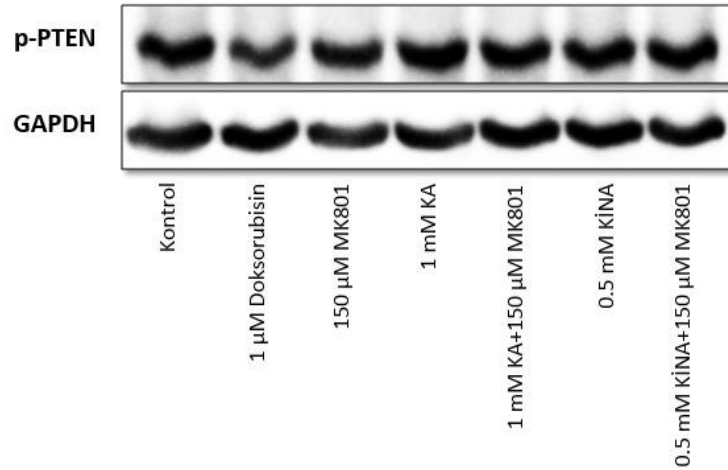


Şekil 4.32. KA, KİNA ve MK-801’in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda PTEN protein düzeylerini gösteren grafik *p<0.05 kontrol grubu ile kıyaslandığında (n=2).

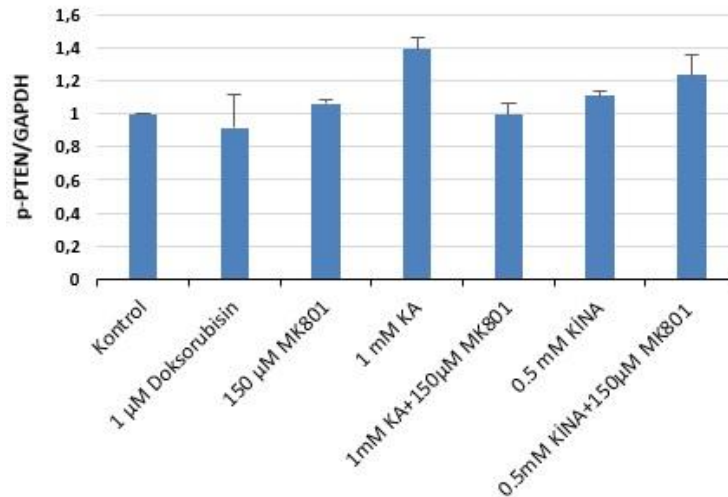
Yapılan Western blot analizi sonucunda; tüm hücre gruplarında PTEN protein düzeylerinin arttığı görülmüştür (Şekil 4.32). Bununla birlikte, yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, 1mM KA, 0.5 mM KİNA ve 0.5 mM KİNA+150 µM MK-801 (p<0.05) ile inkübe edilen hücre gruplarında PTEN protein ifadesinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı görülmüştür. Diğer taraftan 1 mM KA, 0.5 mM

KİNA ve 0.5 mM KİNA+150 μ M MK-801 uygulanan hücre gruplarında PTEN protein düzeyinin pozitif kontrol Doksorubisine göre daha etkili şekilde arttığı görülmüştür.

KA, KİNA ve MK-801 maddelerinin tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücrelerinde p-PTEN protein ekspresyonuna etkilerini gösteren western blot görüntüsü Şekil 4.33'te, görüntülerin analizi ile elde edilen p-PTEN protein düzeyi de Şekil 4.34'te gösterilmiştir.



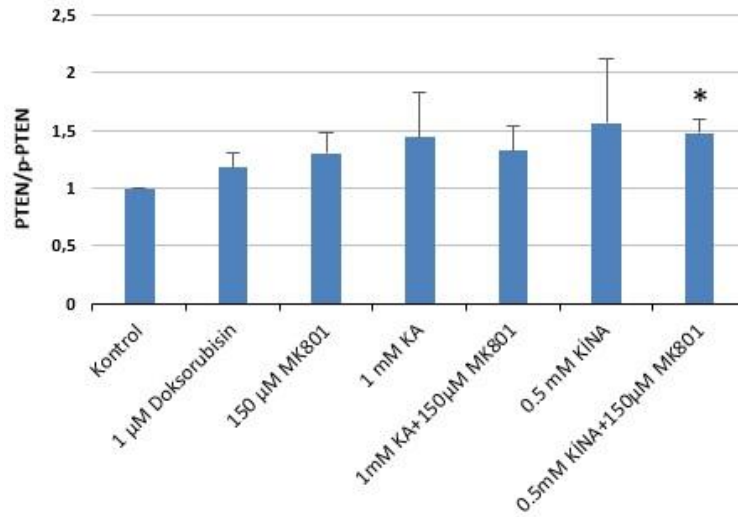
Şekil 4.33. KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda p-PTEN protein düzeylerini gösteren western blot görüntüsü.



Şekil 4.34. KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda p-PTEN protein düzeylerini gösteren grafik * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=2$).

Yapılan Western blot analizi sonucunda; sadece pozitif kontrol Doksorubisin hücre grubunda p-PTEN protein düzeyinin azaldığı görülmüştür (Şekil 4.34). Bununla birlikte, yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, hiçbir hücre grubunda p-PTEN protein ifadesinde anlamlı bir azalma elde edilememiştir ($p > 0.05$).

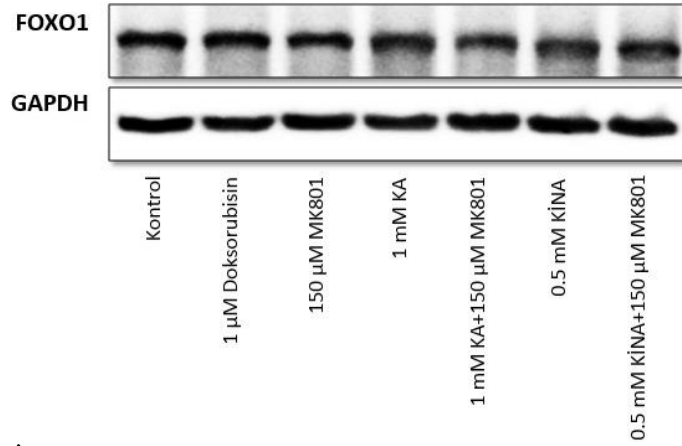
KA, KİNA ve MK-801 maddelerinin tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücrelerinde aktif PTEN protein düzeyinin inaktif p-PTEN protein düzeyine (PTEN/p-PTEN) oranı Şekil 4.35'te gösterilmiştir.



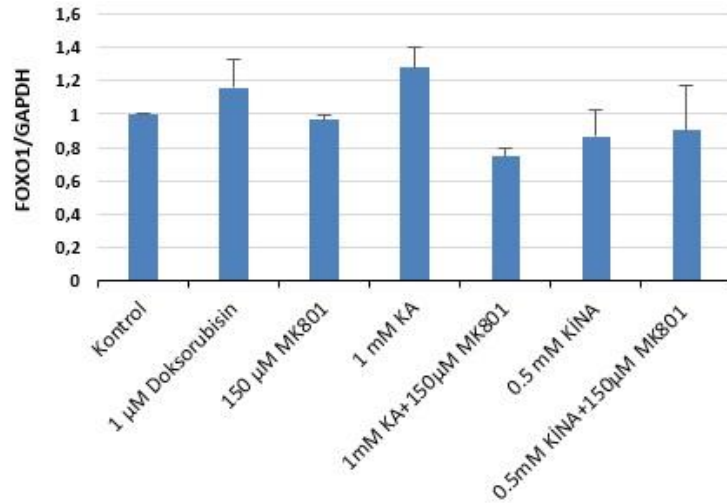
Şekil 4.35. KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda PTEN/p-PTEN oranını gösteren grafik. * $p<0.05$ kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=2$).

Yapılan Western blot analizi sonucunda; tüm hücre gruplarında PTEN proteininin ifade seviyesinin p-PTEN proteininin ifade seviyesine oranının arttığı görülmüştür (Şekil 4.35). Bununla birlikte, yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda 0.5 mM KİNA+150 µM MK-801 ile inkübe edilen hücre grubundaki PTEN/p-PTEN oranının kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı ($p<0.05$) ve bu oranın kontrol grubuna göre 1.5 kat fazla olduğu gösterilmiştir.

KA, KİNA ve MK-801 maddelerinin tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücrelerinde FOXO1 protein ekspresyonuna etkilerini gösteren western blot görüntüsü Şekil 4.36'da, görüntülerin analizi ile elde edilen FOXO1 protein düzeyi de Şekil'da 4.37'de gösterilmiştir.



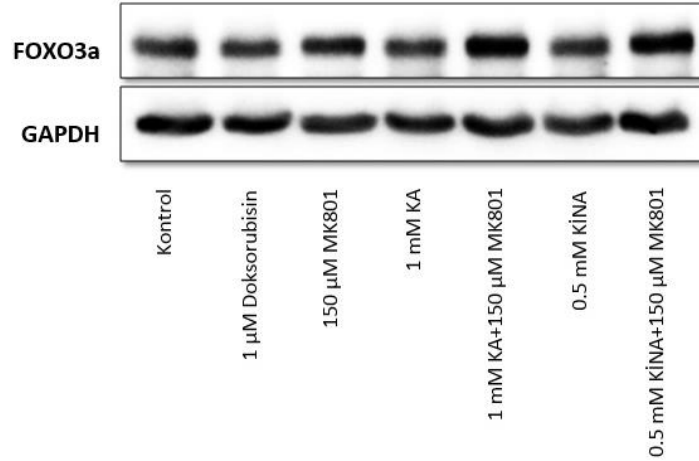
Şekil 4.36. KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda FOXO1 protein düzeylerini gösteren western blot görüntüsü.



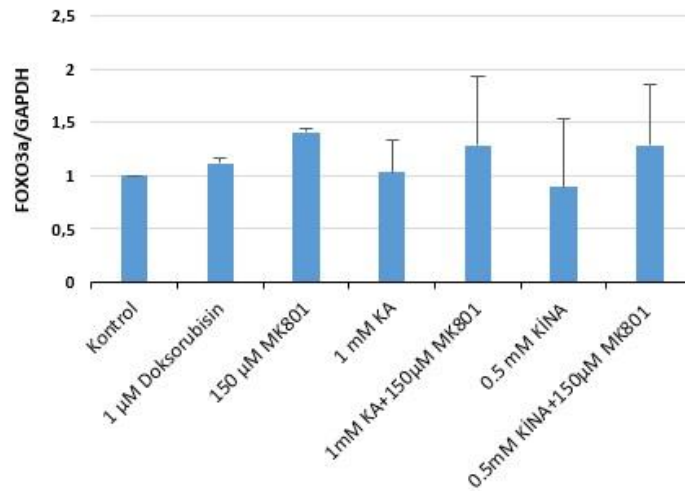
Şekil 4.37. KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda FOXO1 protein düzeylerini gösteren grafik (n=2).

Yapılan Western blot analizi sonucunda; Doksorubisin ve 1 mM KA ile inkübe edilen hücre gruplarındaki FOXO1 protein düzeylerinin arttığı görülmüştür (Şekil 4.37). Bununla birlikte, yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu hücre gruplarındaki artışların kontrol grubuna göre anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). 1 mM KA ile inkübe edilen hücre gruplarındaki FOXO1 protein düzeylerinin Doksorubisin uygulanan hücre grubuna göre daha etkili şekilde arttığı ve kontrol grubuna göre bu artışın yaklaşık 1.3 kat fazla olduğu tespit edilmiştir.

KA, KİNA ve MK-801 maddelerinin tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücrelerinde FOXO3a protein ekspresyonuna etkilerini gösteren western blot görüntüsü Şekil 4.38’de, görüntülerin analizi ile elde edilen FOXO1 protein düzeyi de Şekil 4.39’da gösterilmiştir.



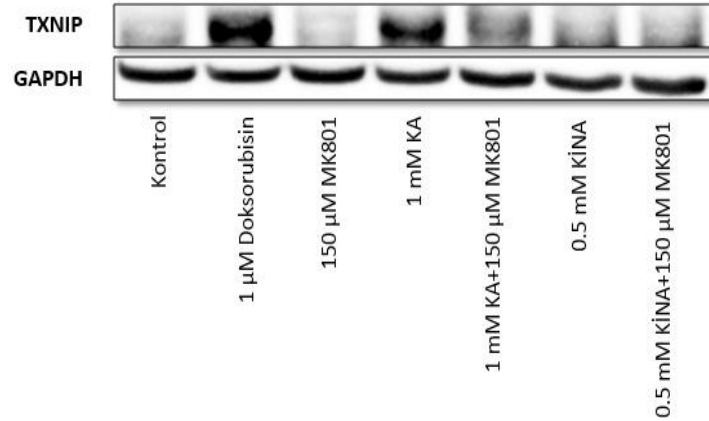
Şekil 4.38. KA, KİNA ve MK-801’in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda FOXO3a protein düzeylerini gösteren western blot görüntüsü.



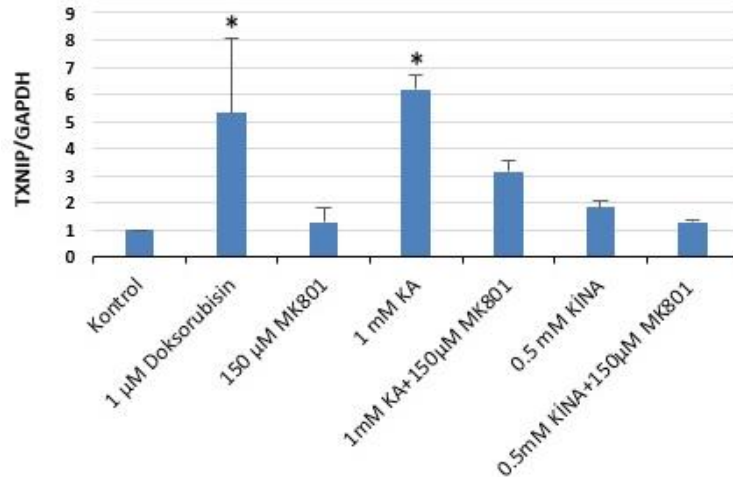
Şekil 4.39. KA, KİNA ve MK-801’in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda FOXO3a protein düzeylerini gösteren grafik (n=2).

Yapılan Western blot analizi sonucunda; Doksorubisin, 150 µM MK-801, 1 mM KA+150 µM MK-801 ve 0.5 mM KİNA+150 µM MK-801 ile inkübe edilen hücre gruplarındaki FOXO3a protein düzeylerinin arttığı görülmüştür (Şekil 4.39). Bununla birlikte, yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu hücre gruplarındaki artışların kontrol grubuna göre anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$).

KA, KİNA ve MK-801 maddelerinin tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücrelerinde TXNIP protein ekspresyonuna etkilerini gösteren western blot görüntüsü Şekil 4.40'da, görüntülerin analizi ile elde edilen TXNIP protein düzeyi de Şekil 4.41'de gösterilmiştir.



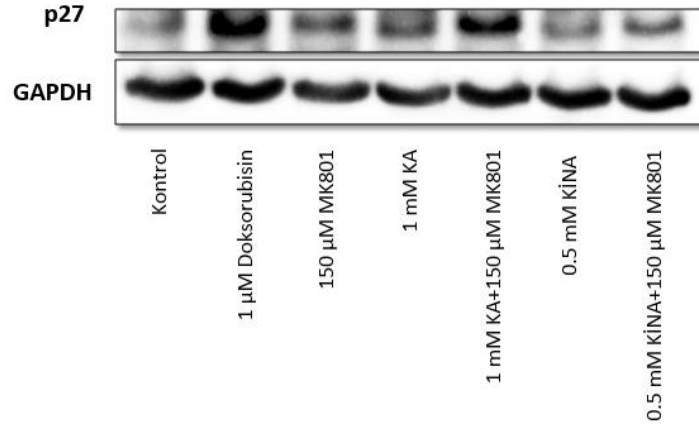
Şekil 4.40. KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda TXNIP protein düzeylerini gösteren western blot görüntüsü.



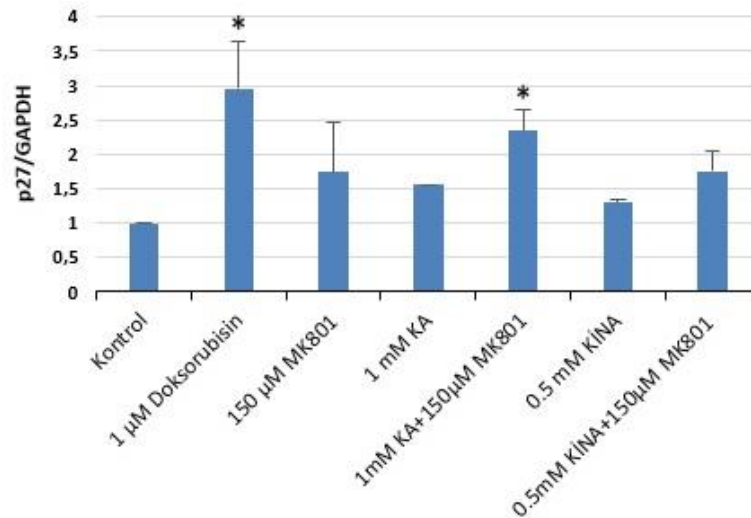
Şekil 4.41. KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda TXNIP protein düzeylerini gösteren grafik * $p<0.001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=2$).

Yapılan Western blot analizi sonucunda; tüm hücre gruplarında TXNIP protein düzeylerinin arttığı görülmüştür (Şekil 4.41). Bununla birlikte, yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, Doksorubisin ve 1mM KA ile inkübe edilen hücre gruplarında TXNIP protein ifadesinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı görülmüştür ($p<0.001$). Diğer taraftan 1mM KA ile inkübe edilen hücre grubundaki TXNIP seviyesinin kontrol grubuna göre 6 kat fazla arttığı ($p<0.01$) ve bu artışın Doksorubisin uygulanan hücre grubundan daha etkili bir artış olduğu gösterilmiştir.

KA, KİNA ve MK-801 maddelerinin tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücrelerinde p27 protein ekspresyonuna etkilerini gösteren western blot görüntüsü Şekil 4.42’de, görüntülerin analizi ile elde edilen p27 protein düzeyi de Şekil 4.43’te gösterilmiştir.



Şekil 4.42. KA, KİNA ve MK-801’in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda p27 protein düzeylerini gösteren western blot görüntüsü.



Şekil 4.43. KA, KİNA ve MK-801’in tek başlarına ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonları sonucunda p27 protein düzeylerini gösteren grafik * $p < 0.001$ kontrol grubu ile kıyaslandığında ($n=2$).

Yapılan Western blot analizi sonucunda; tüm hücre gruplarında p27 protein düzeylerinin arttığı görülmüştür (Şekil 4.43). Bununla birlikte, yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, Doksorubisin ($p < 0.001$) ve 1mM KA+150 µM MK-801 ile inkübe edilen ($p < 0.05$) hücre gruplarındaki p27 protein ifadesinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı görülmüştür. 1mM KA+150 µM MK-801 ile inkübe edilen hücre grubundaki p27 düzeyinin ise kontrol grubuna göre yaklaşık 2.5 kat fazla olduğu görülmüştür.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

HSK, dünya çapında yılda yaklaşık 1 milyon insanın ölümüne neden olan karaciğerin en sık görülen primer tümörüdür (Befeler ve di Bisceglie, 2002). Hastalığın moleküler patogenezi tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, HSK'nın tanı ve tedavisi için karaciğer tümörü oluşumuna neden olan moleküler mekanizmalar üzerinde çalışmalar yapılmakta ve böylece hastalığın patogenezinin daha iyi anlaşılması hedeflenmektedir (El-Serag ve Rudolph, 2007).

Kemoterapötik ilaçların etkileri, hastada ilaç direnci geliştirmesi, yüksek toksisite, seçici olmamaları, yetersiz dağılım ve çözünürlülüğü gibi çeşitli nedenlerden dolayı sınırlıdır. Bu sebeple, yeni terapötik stratejilere ihtiyaç duyulmakta ve HSK tedavisinde kullanılan kemoterapötiklerin anti-tümör etkilerini en üst düzeye çıkarmak ve olumsuz etkilerini azaltmaya yönelik daha yeni anti-tümör ajanları veya ilaç kombinasyonlarının geliştirilmesi gereklidir. Günümüzde mevcut araştırmalar, HSK'nın gelişimini önlemek ve moleküler hedefli yeni tedavi ajanlarının geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır (Crissien ve Frenette, 2014). Bu amaçla günümüzde geliştirilmeye çalışılan yeni kemoterapötikler, yan etkisi az olan ve hücre sağ kalım mekanizmalarını baskılayarak hücre ölümüne yol açan sinyal yollarını tetikleyen moleküler mekanizmaları hedef almaktadır.

Triptofan metabolitlerinden KA ve KİNA, konsantrasyon seviyelerine bağlı olarak belli fizyolojik ve patolojik etkilere sahip olduğu belirtilmektedir (Walczak ve ark, 2011, Langner ve ark, 2015). KA birçok doku, fizyolojik sıvı ve çeşitli gıda maddelerinde bulunmaktadır (Walczak ve ark, 2014b). KA'nın kanser hücre proliferasyonundaki rolüne ilişkin yapılan çalışmalarda, çeşitli kanser hücre hatlarında hücre büyümesi, DNA sentezi ve hücre göçünü engelleyerek antiproliferatif aktivite sergilediği gösterilmiştir (Walczak ve ark, 2011, 2012b, 2014a). Ancak bu aktivitenin moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (Walczak ve ark, 2014b).

KA, aynı zamanda iyonotropik glutamat reseptörlerinin endojen, geniş spektrumlu bir antagonisti olup, glutamat antagonistlerinin ise antiproliferatif potansiyele sahip oldukları belirtilmektedir (Walczak ve ark, 2014a). Daha da ötesi, glutamat reseptörü antagonistlerinin kanser tedavisinde kullanılan sitostatik ilaçlara benzer şekilde, tümör hücrelerinin bölünme ve migrasyonlarını inhibe ettikleri, tümör hücrelerinin morfolojilerini değiştirdikleri ve tümör hücre ölümünü artırdıkları belirtilmiştir (Stepulak ve ark, 2009). İyonotropik glutamat reseptörleri, yapısal benzerliklerine ve onları aktive eden sentetik agonistlere göre NMDA, AMPA ve kainat reseptörleri olmak üzere 3 çeşittir (Stepulak ve ark, 2009). Yapılan bir dizi in vitro ve in vivo deneylerde NMDA ve AMPA antagonistlerinin, farklı insan tümör hücresi tiplerinde belirgin bir antiproliferatif aktivite ortaya koyduğu gösterilmiştir (Stepulak ve ark, 2005). Glutamat reseptörlerinin çeşitli kanser hücre tiplerinde bulunduğu bilinmektedir ve NMDA reseptör alt birimlerinin hepatosellüler karsinoma dahil olmak üzere bir çok kanser hücre hattındaki varlığı gösterilmiştir (Li ve ark, 2012; Yamaguchi ve ark, 2013; Stepulak ve ark, 2014). KA, NMDA reseptörünün glisin ko-agonist bölgesinin rekabetçi blokörü olarak işlev görür ve aynı zamanda iyonotropik glutamat reseptörlerinin tüm alt tiplerinin geniş spektrumlu bir antagonistidir. Yapılan bir çalışmada, sıçanlara intragastrik olarak uygulanan KA'nın ince barsaklardan emilerek kan dolaşımıyla karaciğer ve böbreğe taşındığı ve bu organlardaki KA konsantrasyonunun NMDA reseptörleri ve glutamat reseptörlerinin alt birimleri ile etkileşime girmesi için yeterli olduğu görülmüştür (Turski ve ark, 2009). Bu nedenle, hem hepatosellüler karsinoma hücrelerinde NMDA reseptör alt birimlerinin bulunuşu, hem de KA'nın kan dolaşımı yoluyla karaciğere taşınması ve karaciğerde bulunan NMDA reseptörlerinin alt birimleri ile etkileşime girebilmek için yeterli konsantrasyona ulaşmasından dolayı, KA'nın HSK hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisinin değerlendirilmesi önem taşımaktadır. Bununla birlikte, literatürde KA ve KİNA'nın insan karaciğer kanseri üzerindeki antiproliferatif aktiviteleri ile ilgili herhangi bir bilgiye rastlanılamamıştır. Bu sebeple tez çalışması kapsamında, KA ve KİNA'nın' insan karaciğer kanseri hücre hattı (HepG2) üzerindeki antiproliferatif aktiviteleri ile bu aktiviteden sorumlu olabilecek PI3K/Akt ve FOXO sinyal yolları üzerinden hücre döngüsü ve apoptoza etkileri moleküler düzeyde ilk kez araştırılmıştır.

KA'nın çeşitli tümör hücre hatlarında gösterdiği in vitro antiproliferatif aktivitesinde özellikle glutamat reseptörlerinin rolü olduğu belirtilmektedir (Rzeski ve ark, 2001b).

Bu sebeplerden dolayı, KA'nın kanser hücrelerindeki antiproliferatif aktivitesinin moleküler mekanizmasının açığa çıkarılması büyük önem taşımaktadır. KİNA ise, KA'nın dehidroksilasyonu sonucu oluşan bir diğer triptofan yolağı metaboliti olup, intestinal floranın da KİNA üretimine katkıda bulunduğu belirtilmektedir (Langner ve ark, 2015). KİNA'nın, KA ile olan yapısal benzerliğe sahip olması ve insan organizmasında doğal olarak bulunmasından dolayı KİNA'nın da antitümöral potansiyelinin değerlendirilmesi oldukça önemlidir.

KA'nın kanser hücrelerinin çoğalmasındaki rolüne ilişkin yapılmış çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Son yapılan in vitro çalışmalarda, mikromolar ve milimolar düzeydeki KA konsantrasyonlarının, kolon kanseri (HT-29, Caco-2 ve LS-180), böbrek kanseri (Caki-2) ve glioblastoma (T-986) gibi çeşitli kanser hücre hatlarında çoğalmayı ihhabe ettiği bildirilmiştir (Walczak ve ark, 2011, 2012b, 2014a). Walczak ve ark. (2011)'nin KA'nın kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri ile ilgili yapmış olduğu bir çalışmada, KA'nın Caco-2, HT-29 ve LS-180 kolon adenokarsinoma hücre hatlarında hücre proliferasyonunu anlamlı şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Caco-2, HT-29 ve LS-180 hücreleri, 0.001-10 mM doz aralığında KA ile 96 saat inkübe edilmiş ve MTT analizi sonucu KA'nın bu hücre hatlarındaki IC₅₀ değerleri sırasıyla 1.2 mM, 0.9 mM ve 0.2 mM olarak belirlenmiştir. Walczak ve ark. (2012a)'nın yapmış olduğu bir başka çalışmada da, KA'nın HT-29 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen IC₅₀ değeri 2mM olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada KA'nın HT-29 hücrelerindeki DNA sentezine olan etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen BrdU analizi sonucunda, KA'nın 48 saatlik inkübasyondaki IC₅₀ değeri ise 4.4 mM olarak tespit edilmiştir (Walczak ve ark, 2012a). KA'nın insan böbrek kanseri (Caki-2) hücre hattına olan etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise, KA'nın 96 saatlik inkübasyon sonucunda Caki-2 hücrelerinin proliferasyonunu anlamlı şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. MTT analizi sonucu KA'nın bu hücrelerdeki IC₅₀ değeri ise 0.04 mM olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, KA'nın Caki-2 hücrelerinde DNA sentezine etkisi BrdU analizi ile ölçülmüş ve 48 saatlik inkübasyon sonucu IC₅₀ değeri 2.13 mM olarak tespit edilmiştir (Walczak ve ark, 2012b). İnsan Glioma (T98G) hücreleriyle yapılan bir çalışmada ise, KA'nın T98G hücreleri ile 96 saatlik inkübasyonu sonucu MTT analizi ile belirlenen IC₅₀ değeri 1.3 mM olarak bulunmuştur. KA'nın T98G hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonu sonucu DNA sentezine olan etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen BrdU analizi sonucunda ise, KA'nın IC₅₀ değeri 8.9 mM

olarak tespit edilmiştir (Walczak ve ark, 2014a). Bizim çalışmamızda ise, KA'nın HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonu sonucunda MTT analizi ile belirlenen IC₅₀ değeri 11.32 mM, DNA sentezine olan etkisini belirlemek amacı ile gerçekleştirilen BrdU analizi sonucu elde edilen IC₅₀ değeri ise, 10.9 mM olarak tespit edilmiştir.

KA'nın dehidroksilasyonu sonucu oluşan KİNA'nın da antiproliferatif etkisiyle ilgili literatürde çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. KİNA'nın HT-29, LS180 ve Caco-2 hücrelerinde antiproliferatif etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, KİNA'nın bu hücrelerle 96 saatlik inkübasyonu sonucunda MTT analizi ile elde edilen IC₅₀ değerleri sırasıyla; 0.5 mM, 0.5 mM ve 0.9 mM olarak bulunmuştur (Langner ve ark, 2015). Aynı çalışmada, KİNA'nın 48 saatlik inkübasyonda bu hücrelerdeki DNA sentezine olan etkisini belirlemek amacıyla yapılan BrdU analizi sonucunda elde edilen IC₅₀ değerleri ise sırasıyla; 2.7 mM, 4.3 mM ve 2 mM olarak belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise, KİNA'nın HepG2 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonu sonucunda MTT analizi ile belirlenen IC₅₀ değeri 6.82 mM, DNA sentezine olan etkisini belirlemek amacı ile gerçekleştirilen BrdU analizi sonucu elde edilen IC₅₀ değeri ise, 2.57 olarak tespit edilmiştir.

KA ve KİNA için MTT ve BrdU analizleri ile elde edilen IC₅₀ değerleri milimolar konsantrasyonlarda bulunmuştur. Bununla birlikte, yapılan in vivo bir çalışmada, rat ve farelere içme suyu ile birlikte yüksek miktarda KA (250 mg/L konsantrasyonda) uzun süreyle (21 gün) uygulanmış ve bu hayvanlarda bu konsantrasyonların iyi bir şekilde tolere edildiği ve toksik etki oluşturmadığı gösterilmiştir (Turski ve ark, 2014). Böylece, yüksek miktarda KA içeren ya da KA ile zenginleştirilmiş gıdaların tüketiminin insan sağlığında bir risk teşkil etmediği bildirilmiştir (Turski ve ark, 2014). Bununla birlikte, literatürde KİNA'nın yüksek miktarda tüketiminin insan sağlığı için bir risk oluşturup oluşturmayacağı ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır. Ancak, KİNA'nın yapı olarak KA'ya benzemesi ve insan organizmasında intestinal flora tarafından da üretilmesi, yüksek miktarda KİNA'nın, KA'ya benzer şekilde, insan sağlığı açısından bir risk oluşturmayabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, bu durumun yapılacak çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Hepatosellüler karsinoma dahil olmak üzere, birçok kanser hücre hattında bulunduğu belirlenen NMDA reseptör alt birimleri ile ilgili yapılan çeşitli çalışmalarda, glutamat antagonistlerinin beyin, tiroid, kolon, meme, akciğer ve karaciğer gibi çeşitli kanser

hücre hatlarında büyümeyi inhibe ettiği gösterilmiş ve NMDA reseptörlerinin kanser hücrelerinin büyümesinde önemli bir rol oynayabileceği belirtilmiştir (Rzeski, 2001; Li ve ark, 2012; Yamaguchi ve ark, 2013; Stepulak ve ark, 2014). Yapılan bir çalışmada, sentetik bir NMDA antagonisti olan MK-801 tarafından, A549 hücrelerinde ERK yolağının inhibisyonu ve tümör baskılayıcı proteinler olan p21 ve p53'ün indüklenmesi yoluyla akciğer adenokarsinomada büyümeyi baskıladığı bildirilmiştir (Stepulak ve ark, 2005a). NMDA reseptör antagonistlerinin karaciğer kanseri üzerindeki antitümöral etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise, insan hepatoselüler karsinoma (HepG2, HuH-7 ve HLF) hücre hatlarında NMDA reseptörlerinin ekspresyonu gösterilmiş ve MK-801'in bu hücrelerde hücre döngüsündeki G1 fazını durdurarak hücrelerin büyümesini baskıladığı gösterilmiştir (Yamaguchi ve ark, 2013). Bu sebeple, HepG2 hücrelerinde de ifade olduğu gösterilen (Li ve ark, 2012; Yamaguchi ve ark, 2013) NMDA reseptörleri ve bu reseptörlerin doğal endojen bir antagonisti olan KA ve KA ile yapısal benzerliğe sahip olan KİNA'nın antiproliferatif etkilerinin araştırılması oldukça önemli olup, tez çalışması kapsamında KA ve KİNA'nın hem tek başlarına hem de sentetik NMDA reseptör antagonisti MK-801 ile birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri araştırılmıştır. Böylece, HepG2 hücrelerinde sentetik NMDA antagonisti yerine doğal NMDA antagonisti kullanarak, yada doğal NMDA antagonisti ile birlikte daha düşük konsantrasyonda sentetik NMDA antagonisti kullanarak karaciğer kanserinde, daha doğal ve daha güçlü antitümöral etkileri olan tedavi ajanlarının yada kombinasyonlarının ortaya çıkarılması hedeflenmiştir.

KA'nın hem tek başına hem de MK-801 ile birlikte kombinasyonunun HepG2 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerini belirlemek amacı ile KA'nın 1, 2.5 ve 5 mM'lık konsantrasyonları ile MK-801'in 50, 100 ve 150 μ M'lık konsantrasyonları çeşitli kombinasyonlar halinde HepG2 hücreleri ile 48 saat inkübe edilmiş ve hücre canlılığına olan etkileri MTT analizi ile ölçülmüştür. Analiz sonucunda, "5 mM KA + 100 μ M MK-801" ve "1 mM KA + 150 μ M MK-801" kombinasyonlarının HepG2 hücrelerinin canlılıklarını yaklaşık %50'ye kadar indirdikleri belirlenmiştir (hücre canlılıkları karşılıklı olarak; %53 ve %55). Bununla birlikte, 5 mM KA, 100 μ M MK-801, 1 mM KA ve 150 μ M MK-801 HepG2 hücrelerine tek başlarına uygulandıklarında, hücre canlılıklarının sırasıyla %71.9, %80.4, %95.7 ve %73.6 olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, KA+MK-801 kombinasyonlarının HepG2 hücrelerinin canlılığını inhibe etmede tek başına KA ve tek başına MK-801'e göre daha

etkili olduğu belirlenmiştir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde, kanser hücrelerinde KA ve MK-801'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonun antitümöral etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, insan glioblastoma (T98G) hücreleri, KA (100 μ M) ve MK-801 (100 μ M)'in tek başlarına ve birlikte kombinasyonları ile 96 saat inkübe edilmiştir. Çalışma sonucunda, tek başlarına KA ve MK-801 ile inkübe edilen hücre gruplarına göre, 100 μ M KA+100 μ M MK-801 kombinasyonu ile inkübe edilen hücre grubunda glioma hücrelerinin canlılığının anlamlı bir şekilde azaldığı ve KA+MK-801 kombinasyonunun T98G hücrelerinin canlılığını inhibe etmede tek başına KA ve tek başına MK-801'e göre daha etkili olduğu belirlenmiştir (Walczak ve ark, 2014a). Elde edilen bu sonuçlar, bizim çalışmamızdan elde edilen sonuçları desteklemiştir.

KA'ya benzer şekilde, KİNA'nın da hem tek başına hem de MK-801 ile birlikte kombinasyonunun HepG2 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerini belirlemek amacı ile KİNA'nın 0.5, 1 ve 2.5 mM'luk konsantrasyonları ile MK-801'in 50, 100 ve 150 μ M'luk konsantrasyonları çeşitli kombinasyonlar halinde HepG2 hücreleri ile 48 saat inkübe edilmiş ve hücre canlılığına olan etkileri MTT analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonucunda, "2.5 mM KİNA + 100 μ M MK-801" ve "0.5 mM KİNA + 150 μ M MK-801" kombinasyonlarının HepG2 hücrelerinin canlılıklarını yaklaşık %50'ye kadar indirdikleri belirlenmiştir (hücre canlılıkları karşılıklı olarak; %47 ve %51). Bununla birlikte, 2.5 mM KİNA, 100 μ M MK-801, 0.5 mM KİNA ve 150 μ M MK-801 HepG2 hücrelerine tek başlarına uygulandıklarında, hücre canlılıklarının sırasıyla % 73.6, %80.4, %96.6 ve %73.6 olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, KİNA+MK-801 kombinasyonlarının HepG2 hücrelerinin canlılığını inhibe etmede tek başına KİNA ve tek başına MK-801'e göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, literatürde KİNA'nın kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisi ile ilgili yapılan çok az sayıda çalışma bulunmakta olup (Langner ve ark, 2015; Langner ve ark, 2019), KİNA ve MK-801'in birlikte kombinasyonunun kanser hücrelerinde antitümöral etkilerinin araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu sebeple, tez çalışması kapsamında KİNA+MK-801 kombinasyonunun HepG2 hücrelerinin canlılıkları üzerindeki etkisi ilk kez çalışılmış olup, elde edilen sonuçlar başka çalışmalar ile kıyaslanamamıştır.

KA'nın hem tek başına hem de MK-801 ile birlikte kombinasyonunun HepG2 hücrelerindeki DNA sentezine olan etkilerini belirlemek amacı ile, KA'nın; 1, 2.5 ve 5

mM’lık konsantrasyonları ile MK-801’in 100 ve 150 μ M’lık konsantrasyonları çeşitli kombinasyonlar halinde HepG2 hücreleri ile 48 saat inkübe edilmiş ve hücre proliferasyonuna olan etkileri BrdU analizi ile ölçülmüştür. BrdU analizi sonucunda, KA+MK-801 kombinasyonlarının tümünün HepG2 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmede etkili olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, MTT analizi ile elde edilen sonuçlara benzer şekilde, BrdU analizleri sonucunda da “5 mM KA+100 μ M MK-801” ve “1 mM KA+150 μ M MK-801” kombinasyonlarının HepG2 hücrelerinin proliferasyonunu daha etkili şekilde inhibe ettikleri belirlenmiş (hücre proliferasyonları karşılıklı olarak; %49 ve %44) ve elde edilen sonuçlar birbirini desteklemiştir. Yapılan çeşitli çalışmalarda, KA’nın kolon kanseri (HT-29), böbrek kanseri (Caki-2) ve glioblastoma (T-986) hücre hatlarında milimolar konsantrasyonlarda DNA sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir (Walczak ve ark, 2012a, 2012b, 2014a). Bizim çalışmamızda da KA’nın HepG2 hücrelerinde milimolar konsantrasyonlarda DNA sentezini inhibe ettiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, literatürde KA ve MK-801’in birlikte kombinasyonunun kanser hücrelerindeki DNA sentezine etkileri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Bu sebeple, tez çalışması kapsamında KA+MK-801 kombinasyonunun HepG2 hücrelerindeki DNA sentezine etkileri ilk kez çalışılmış olup, elde edilen sonuçlar başka çalışmalar ile kıyaslanamamıştır.

Benzer şekilde, KİNA’nın hem tek başına hem de MK-801 ile birlikte kombinasyonunun HepG2 hücrelerindeki DNA sentezine olan etkilerini belirlemek amacı ile KİNA’nın; 0.5, 1 ve 2.5 mM’lık konsantrasyonları ile MK-801’in 100 ve 150 μ M’lık konsantrasyonları çeşitli kombinasyonlar halinde HepG2 hücreleri ile 48 saat inkübe edilmiş ve hücre proliferasyonuna olan etkileri BrdU analizi ile ölçülmüştür. BrdU analizi sonucunda, KİNA+MK-801 kombinasyonlarının tümünün HepG2 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmede etkili olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, MTT analizi ile elde edilen sonuçlara benzer şekilde, BrdU analizleri sonucunda da “2.5 mM KİNA+100 μ M MK-801” ve “0.5 mM KİNA+150 μ M MK-801” kombinasyonlarının HepG2 hücrelerinin proliferasyonunu daha etkili şekilde inhibe ettikleri belirlenmiş (hücre proliferasyonları karşılıklı olarak; %30 ve %60) ve elde edilen sonuçlar birbirini desteklemiştir. Yapılan bir çalışmalarda, KİNA’nın kolon kanseri (HT-29, LS180 ve Caco-2 HT-29), hücre hatlarında milimolar konsantrasyonlarda DNA sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir (Langner ve ark 2019). Bizim çalışmamızda da KİNA’nın HepG2 hücrelerinde milimolar konsantrasyonlarda

DNA sentezini inhibe ettiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, literatürde KİNA ve MK-801'in birlikte kombinasyonunun kanser hücrelerindeki DNA sentezine etkileri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Bu sebeple, tez çalışması kapsamında KİNA+MK-801 kombinasyonunun HepG2 hücrelerindeki DNA sentezine etkileri ilk kez çalışılmış olup, elde edilen sonuçlar başka çalışmalar ile kıyaslanamamıştır.

Literatürde, KA'nın kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif aktivitesinden sorumlu olan potansiyel moleküler mekanizmalar ile ilgili çok az sayıda çalışma bulunmakta olup (Walczak ve ark, 2012a, 2012b, 2014b), bu çalışmalarda KA'nın antiproliferatif aktivitesinden sorumlu moleküler mekanizmalar tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. İnsan kolon adenokarsinoma (HT-29) hücreleri ile yapılan bir çalışmada, KA'nın HT-29 hücrelerinde, hücre döğüsünün düzenlenmesinde önemli rol oynayan p21 Waf/Cip1 protein ekspresyonunu etkili şekilde artırdığı gösterilmiş olup, KA'nın, hücre çoğalması ve DNA sentezini inhibe edici özelliğinin p21 düzeyini artırarak gerçekleştirdiği belirtilmiştir (Walczak ve ark, 2012a). KA'nın böbrek kanser hücre hattındaki (Caki-2) antiproliferatif etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise, KA'nın hücre döngüsü düzenleyicisi olan p21'in artan ekspresyonu ve hücre sağkalımında rol alan p38 MAPK'nın fosforilasyonunun inhibisyonunun gerçekleştirerek, tümör büyümesinin kontrolünde etkili olduğu bildirilmiştir (Walczak ve ark, 2012b). Yine kolon kanseri HT-29 hücreleri ile yapılan bir diğerk çalışmada da, KA'nın; hücre sağ kalımında ve kanser hücrelerinin çoğalmasında önemli rol alan yolaklar olan, PI3K/Akt, MAPK ve Wnt/ β -katenin sinyal yolaklarına olan etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, milimolar konsantrasyonlardaki (0.01-5 mM) KA'nın HT-29 hücrelerinde PI3K/Akt ve MAPK sinyal yollarının aktivasyonunu inhibe ederek Akt, ERK 1/2 ve p38 kinazlarının fosforilasyonunu azalttığı ve β -katenin protein ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (Walczak ve ark, 2014b). Literatürde, KİNA'nın kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif aktivitesinden sorumlu olan potansiyel moleküler mekanizmalar ile ilgili olarak ise yine çok az sayıda çalışma vardır. Yapılan bir çalışmada, KİNA'nın, kolon adenokarsinoma hücre hatlarında (HT-29, Caco-2 ve LS-180), ERK, p38 MAPK ve PI3K/Akt sinyal yolaklarına etkisi araştırılmış ve özellikle HT-29 hücrelerinde ERK 1/2 ve p38 kinazlarının fosforilasyonunu azalttığı görölmüştür (Langner ve ark, 2015). Benzer bir çalışmada da, KİNA'nın, bir tümör baskılayıcı gen olan p53'ün ifadesini artırdığı ve böylece KİNA'nın kolon kanseri hücrelerindeki antiproliferatif etkisinde p53'ün belirgin bir katkısı olduğu öne

sürülmüştür (Langner ve ark, 2019). Bizim çalışmamızda ise, HepG2 hücrelerinde KA ve KİNA'nın tek başlarına ve MK-801 ile kombinasyonlarının hücre sağkalımını, çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenleyen PI3K/Akt ve yine hücre çoğalması ve metabolizması için önemli bir yolak olan FoxO sinyal yolları üzerindeki etkileri moleküler düzeyde ilk kez araştırılmıştır.

Hücre proliferasyonu, hücre döngüsü düzenlenmesi ve apoptozda önemli rol oynayan PI3K/Akt yolağı aktivasyonunun HSK'da sık görülen bir moleküler değişiklik olduğu belirtilmektedir (El-Serag ve Rudolph 2007). Akt yolunun aktivasyonu ile apoptoz ve büyüme önleyici aktivitelerin baskılandığı ve böylece tümör oluşumunu desteklediği ve HSK'lı hastaların %40-60'ında Akt sinyal yolunun aktive olduğu bildirilmiştir (El-Serag ve Rudolph 2007). Yapılan bir çalışmada, kolon kanseri (HT-29) hücrelerinde KA'nın PI3K/Akt yolağı üzerindeki aktivitesi araştırılmış ve 1 mM KA konsantrasyonunun Akt kinazın fosforilasyonunu inhibe ettiği görülmüştür. KİNA'nın HT-29 hücrelerinde 1 mM KİNA'nın Akt kinazın fosforilasyonunu anlamlı olarak arttırmadığı gösterilmiştir. Bizim tez çalışmamız kapsamında gerçekleştirilen western blot analizleri sonucunda ise, HepG2 hücrelerinde çalışmada kullanılan kombinasyonlardan 0.5mM KİNA+150 µM MK-801 kombinasyonunun, kombinasyonu oluşturan KİNA (0.5 mM) ve MK-801 (150 µM)'e göre PI3K'yı daha etkili şekilde inhibe ettiği görülmüştür. 0.5 mM KİNA+150 µM MK-801 kombinasyonunun ise kombinasyonu oluşturan KİNA (0.5 mM) ve MK-801 (150 µM)'e benzer şekilde HepG2 hücrelerindeki Akt protein düzeyini azalttığı görülmüştür.

PTEN, tümör baskılayıcı bir protein olup aynı zamanda Akt'nin negatif düzenleyicisidir. HSK'lı hastaların %40-60'ında PTEN ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (El-Serag ve Rudolph 2007). Literatürde, kanser hücrelerindeki PTEN ekspresyonuna KA'nın etkisi ile ilgili yalnızca bir çalışma bulunmakta olup, KİNA'nın etkisi ile ilgili olarak ise herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. KA ile yapılan bu çalışmada ise, kolon kanseri (HT-29) hücrelerinde KA'nın PI3K/Akt yolağı üzerindeki aktivitesi araştırılmış ve 1 mM KA konsantrasyonunun p-PTEN seviyesinde herhangi bir değişiklik meydana getirmediği, ancak Akt kinazın fosforilasyonunu inhibe ettiği görülmüştür (Walczak ve ark, 2014b). Bizim tez çalışmamız kapsamında gerçekleştirilen western blot analizleri sonucunda ise, hücrelerdeki aktif PTEN'in inaktif p-PTEN'e oranı (PTEN/p-PTEN) ölçüldüğünde bu oranın 0.5 mM KİNA+150

μM MK-801 ile inkübe edilen hücre grubunda etkili şekilde artmış olduğu görülmektedir. Bu durum PI3K/Akt yolağının PTEN tarafından baskılanmış olabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak 0.5 mM KİNA + 150 μM MK-801 kombinasyon grubunda, hem PI3K protein seviyesinin azalmış olması, hem de aktif PTEN oranının artış göstermesi, yine aynı gruplarda Akt protein düzeyinin de düşmüş olması, bilhassa bu hücre grubunda PI3K/Akt yolağının baskılanmış olabileceğini düşündürmektedir.

Böylece çalışmamızdan elde edilen sonuçlar, KİNA'nın MK-801 ile birlikte kombinasyonunun HepG2 hücreleri üzerindeki anproliferatif etkisini, HSK gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülen PI3K/Akt sinyal yolağını inhibe ederek gerçekleştiğini göstermiştir. Böylece, daha yüksek konsantrasyonlardaki KİNA (5 mM) ve MK-801 (250 μM)'in HepG2 hücrelerinde tek başlarına göstermiş oldukları antiproliferatif etki, kombinasyon uygulaması ile daha düşük konsantrasyonlarda (KİNA için 0.5 mM, MK-801 için 150 μM) elde edilmiş ve bu daha düşük konsantrasyonlarda HSK gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülen PI3K/Akt sinyal yolağının inhibe olduğu gösterilmiştir.

FoxO yolağı karaciğerde hücre çoğalması ve metabolizması için önemli bir yoldur (Tikhanovich ve ark, 2013). FoxO proteinleri apoptoz, otofaji ve hücre döngüsü kontrolü ile ilgili genlerin ekspresyonunu kontrol ederek hücrenin işleyişini düzenlemektedirler (Yamaguchi ve ark, 2013). FOXO1, hücre döngüsünü ve apoptozu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür ve bu nedenle hücre transformasyonu ve tümör gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. (Tikhanovich ve ark, 2013). FOXO3a'nın da yine apoptozda, otofajide, hücre proliferasyonunda, DNA hasarında ve oksidatif strese karşı dirençte çok önemli rolleri olduğu iyi bilinmektedir. FOXO3a'nın aşırı ekspresyonunun, kanser hücrelerinde proliferasyon, tümör oluşumu ve invazyonu inhibe ettiği görülmüştür (Liu ve ark, 2018). FoxO sinyal yolağının NMDA reseptör sinyali ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Yapılan bir çalışmada, MK-801'in HepG2 hücrelerindeki antiproliferatif etkisi FoxO yolağı üzerinden araştırılmış ve MK-801'in (250 μM) FOXO1 seviyesini artırdığı görülmüştür (Yamaguchi ve ark, 2013). Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen FOXO1 ve FOXO3a protein düzeylerinin analizleri sonucunda ise, HepG2 hücrelerinde 1 mM KA uygulanan hücre grubundaki FOXO1 ekspresyonunun MK-801 (150 μM)'e göre daha etkili şekilde arttığı görülmüştür. FOXO3a seviyesindeki en etkili artış 150 μM MK-801 ile inkübe edilen

hücre grubunda görülmüş olup 0.5 mM KİNA+150 μ M MK-801 ve 1 mM KA+150 μ M MK kombinasyonlarında görülen artışın MK-801'den kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte FOXO1 protein seviyesinin 1 mM KA grubunda artış göstermiş olması NMDA antagonistlerinin FoxO yolağı ile ilişkisinin varlığını desteklemektedir.

TXNIP, FoxO yolağının hedef genlerinden bir tanesidir ve tümör baskılayıcı rolü olduğu bilinmektedir. FoxO yolağı baskılandığında ise TXNIP ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (Yamaguchi ve ark, 2013). Yapılan bir çalışmada MK-801'in, TXNIP promotör aktivitesini artırdığı gözlenmiştir. Böylece, MK-801 tarafından gerçekleşen hücre büyümesi baskılanmasında FoxO yolunun aktivasyonu sonucu TXNIP'in uyarılmasının rol oynadığı bildirilmiştir (Yamaguchi ve ark, 2013). Bizim çalışmamızda gerçekleştirilen western blot analizleri sonucunda, HepG2 hücrelerinde 1 mM KA'nın ve 1 mM KA+ 150 μ M MK-801 ile kombinasyonunun TXNIP protein seviyesini etkili şekilde artırdığı gösterilmiştir. Böylece 1 mM KA uygulanan hücre gruplarında, FoxO yolu aktivasyonu sonucu TXNIP uyarılmasının gerçekleştiği sonucuna ulaşılmıştır.

TXNIP'in, p27 proteinini düzenlediği ve hücrelerin hücre döngüsünün G1 evresinde kalmasını sağladığı bilinmektedir (Jeon ve ark, 2005). CDK inhibitörü p27'nin, hücre proliferasyonunu ve apoptozu düzenlediği, bununla birlikte kanser hücrelerinde p27 protein seviyesinin azaldığı bilinmektedir (Chu ve ark, 2008). Yapılan bir çalışmada HepG2 hücrelerinde MK-801'in p27 düzeyini artırdığı görülmüştür (Yamaguchi ve ark, 2013). Bizim çalışmamızda ise, kombinasyon gruplarının, tek başına KA ve KİNA hücre gruplarına göre p27 düzeyini daha etkili şekilde artırdıkları görülmüştür. Böylece, kombinasyon gruplarının, HepG2 hücrelerindeki antiproliferatif etkisinde hücre döngüsünde rol olan p27 proteinin rolü olduğu gösterilmiştir.

FoxO proteinlerinin hücre döngüsü inhibitörü olan p21'in ekspresyonunu artırarak hücrelerin G1 evresinde kalmasını sağladıkları bilinmektedir (Zhang ve ark, 2011). Literatürde, kanser hücrelerindeki p21 ekspresyonuna KA ve KİNA'nın etkisi ile ilgili yapılmış az sayıda çalışma bulunmaktadır. KA'nın böbrek kanseri (Caki-2) ve kolon kanseri (HT-29) hücrelerinde, hücre döngüsüne olan etkileri ile ilgili yapılmış bir çalışmada Caki-2 ve HT-29 hücrelerinde 2.5 mM KA ile inkübe edilen hücre gruplarında p21 seviyelerinin arttığı görülmüştür (Walczak ve ark, 2012a, 2012b). Bizim tez çalışmamız kapsamında gerçekleştirilen mRNA ekspresyonu sonucunda ise, 10 mM KA'nın p21 ekspresyon düzeyini etkili şekilde artırdığı görülmüştür. Benzer

şekilde 150 ve 250 μ M MK-801 ile inkübe edilen hücre gruplarında da p21 ekspresyon düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir. KİNA'nın kolon kanseri (LS180) hücrelerinde, hücre döngüsüne olan etkisiyle ilgili yapılan bir çalışmada ise 1 mM KİNA'nın hücrelerde p21 seviyesini artırdığı görülmüş olup (Langner ve ark, 2019) bizim çalışmamızda ise KİNA'nın HepG2 hücrelerindeki p21 seviyesini etkilemediği görülmüştür. Böylece KA'nın HepG2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisinde hücre döngüsünde önemli rol alan p21'in rolü olduğu gösterilmiştir.

FoxO yolağının baskılanmasının sonucunda, FasL ve Bim gibi hedef genlerin ekspresyonunun azaldığı bilinmektedir (Yamaguchi ve ark, 2013). Fas/FasL sisteminin, karaciğer dokusunda hücrel süreçlere katıldığı (Hammam ve ark, 2012) ve birçok kanser hücresinde apoptozu indüklediği bilinmektedir (Abrahams ve ark, 2003). Literatürde, kanser hücrelerindeki FasL ve Bim ekspresyonuna KA ve KİNA'nın etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Tez çalışmamız kapsamında gerçekleştirilen mRNA ekspresyonu sonucunda; kombinasyon gruplarında, 10 mM KA ve 250 μ M MK-801 gruplarında FasL mRNA düzeylerinin etkili bir şekilde artmış olduğu görülmüştür.

Bim, Bcl-2 ailesinin proapoptotik bir üyesidir (Stahl ve ark, 2002). Yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinde, FoxO protein ekspresyonunun artmasıyla, apoptoza yol açan Bim mRNA ve protein seviyelerinde de artış olduğu bildirilmiştir (Sunters ve ark, 2003; Deng ve ark, 2010). Çalışmamızda gerçekleştirilen mRNA ekspresyonu sonucunda; tek başına KA (1 mM ve 10 mM) ile inkübe edilen hücre gruplarında Bim düzeylerinin etkili şekilde artmış olduğu görülmüştür.

Bcl-2 ailesinin üyelerinden olan Bax proapoptotik bir etkiye sahipken, Bcl-2 antiapoptotik etkilere sahiptir (McDonnell ve ark, 1999). Literatürde, KA ve KİNA'nın kanser hücrelerindeki Bax ve Bcl-2 ekspresyonuna etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Tez çalışmamız kapsamında gerçekleştirilen mRNA ekspresyonu sonucunda; hücre gruplarının hiç birinde Bax mRNA seviyesinin anlamlı şekilde artmadığı görülmekle birlikte, KİNA'nın (5mM) ve KA+MK-801 kombinasyonunun Bcl-2 düzeylerini azaltmış olduğu tespit edilmiştir.

Literatürde, KA ve KİNA'nın kanser hücrelerindeki Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 ekspresyonuna etkileri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Çalışmamızda, mRNA ekspresyonu analizi sonucunda; yalnızca 10 mM KA ile inkübe

edilen hücre grubunda Kaspaz-9 düzeyinin etkili şekilde arttığı, bununla birlikte bir efektör kaspaz olan ve apoptozun son basamağında görev alan Kaspaz-3 mRNA düzeyinin ise hiçbir hücre grubunda artmadığı, görülmüştür. Sonuç olarak, tez çalışması kapsamında apoptozda önemli rolleri olan; Bim, FasL, Bax, Bcl-2, Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 moleküllerinin Western Blot ve PCR analizleri sonucunda KA, KİNA, MK-801 ve birlikte kombinasyonlarının HepG2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkilerini apoptoz üzerinden gerçekleştirmede, farklı bir ölüm mekanizması üzerinden bu antiproliferatif etkiyi gerçekleştirdiği düşünülmektedir.

Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde bu tez çalışmasında; KA, KİNA ve MK-801'in HepG2 hücrelerinin canlılığını %50 inhibe eden konsantrasyonlarının (sırasıyla 10 mM, 5 mM ve 250 μ M), HepG2 hücrelerindeki DNA sentezini de etkili şekilde inhibe ettikleri görülmüştür. KA, KİNA ve MK-801'in tek başlarına HepG2 hücrelerinde daha yüksek konsantrasyonlarda (sırasıyla 10 mM, 5 mM ve 250 μ M) göstermiş oldukları bu antiproliferatif etki, kombinasyon uygulaması ile daha düşük konsantrasyonlarda (1 mM, 0.5 mM ve 150 μ M) elde edilmiştir. Bununla birlikte, HepG2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif aktivitede, kombinasyon gruplarının tek başlarına KA, KİNA ve MK-801'e göre farklı hücreyel yolları izlediği görülmektedir.

Tek başına KA'nın HepG2 hücrelerinde göstermiş olduğu antiproliferatif etkisini FoxO yolağı üzerinden TXNIP, p21, FasL ve Bim düzeylerini artırarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Tek başına MK-801'in ise, hücre döngüsünde rol alan p21 düzeyini artırarak HepG2 hücrelerinde antiproliferatif etki gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan, KİNA+MK-801 kombinasyonunun HepG2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisini, PI3K ve Akt düzeylerini inhibe ederek ve PTEN'in fosforilasyonunu azaltarak PI3K/Akt sinyal yolağı üzerinden gerçekleştirdiği görülmüştür.

Sonuç olarak, tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen MTT, BrdU, RT-qPCR ve Western blot analizleri sonucunda, triptofan yolağı metabolitlerinden KA ve KİNA'nın insan karaciğer kanseri HepG2 hücre hattı üzerinde milimolar konsantrasyonlarda antiproliferatif etkilere sahip oldukları görülmüştür. Tez çalışmasından elde edilen bulgular sonucunda, doğal glutamat antagonisti KA ile sentetik glutamat antagonisti MK-801'in HepG2 hücreleri üzerindeki antitümöral etkilerini farklı hücreyel yollar üzerinden gerçekleştirdikleri belirlenmiştir. Yine çalışma sonucunda, daha düşük konsantrasyonda KİNA ve MK-801 kombinasyonunun daha güçlü anti-tümöral etkiye

sahip olduğu ve bu etkiyi PI3K/Akt yolağı üzerinden gerçekleştirdiği görülmüştür. Böylece, tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar HSK tedavisinde KA ve K NA'nın potansiyel terapötik etkilere sahip olabileceklerini göstermiştir. Bununla birlikte, KA, K NA, MK-801 ve birlikte kombinasyonlarının göstermiş oldukları antiproliferatif aktivitelerin daha iyi anlaşılabilmesi için, karaciğer kanseri hücre hatlarında farklı sinyal yolakları ve diğer hücre döngüsü molekülleri üzerindeki etkilerinin de kapsamlı şekilde araştırılması gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abe S, Hu W, Ishibashi H, Yamaguchi H, Hasumi K. Augmented İnhibition of *Candida Albicans* Growth by Murine Neutrophils in The Presence of A Tryptophan Metabolite, Picolinic Acid. *J Infect Chemother*, 2004;10:181-4.
- Abrahams VM, Kamsteeg M, Mor G. The Fas/Fas Ligand System and Cancer: Immune Privilege and Apoptosis. *Mol Biotechnol*, 2003;25:19-30.
- Adachi M, Osawa Y, Uchinami H, Kitamura T, Accili D, Brenner DA. The Forkhead Transcription Factor FoxO1 Regulates Proliferation and Transdifferentiation of Hepatic Stellate Cells. *Gastroenterology*, 2007;132:1434–46.
- Adams S, Teo C, McDonald KL, Zinger A, Bustamante S, Lim CK, Sundaram G, Braidy N, Brew BJ, Guillemin GJ. Involvement of the Kynurenine Pathway in Human Glioma Pathophysiology. *PLoS One*, 2014;9:e112945.
- Al-Khalil S, Alkofahi A, El-Eisawi D, Al-Shibib A. Transthorine, a New Quinoline Alkaloid from *Ephedra Transitoria*. *J Nat Prod*, 1998;61:262-3.
- Amirkhani A, Heldin E, Markides KE, Bergquist J. Quantitation of Tryptophan, Kynurenine and Kynurenic Acid in Human Plasma by Capillary Liquid Chromatography-electrospray İonization Tandem Mass Spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002;780:381-7.
- Anderson G, Maes M. Interactions of Tryptophan and Its Catabolites With Melatonin and the Alpha 7 Nicotinic Receptor in Central Nervous System and Psychiatric Disorders: Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor and Direct Mitochondria Regulation. *Int J Tryptophan Res*, 2017;10:117864691769173.
- Bardakçı M, Ergün Y, Yalçın K. Retrospective Analysis of Demographic and Laboratory Data of Patients with Hepatocellular Carcinoma: Single Center

- Experience. *Acta Oncol Turc*, 2019;52:64–72.
- Befeler AS, di Bisceglie AM. Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis and Treatment. *Gastroenterology*, 2002;122:1609–19.
- Belladonna ML, Grohmann U, Guidetti P, Volpi C, Bianchi R, Fioretti MC, Schwarcz R, Fallarino F, Puccetti P. Kynurenine Pathway Enzymes in Dendritic Cells Initiate Tolerogenesis in the Absence of Functional IDO. *J Immunol*, 2006;177:130–7.
- Beninger RJ, Colton AM, Ingles JL, Jhamandas K, Boegman RJ. Picolinic Acid Blocks the Neurotoxic But Not The Neuroexcitant Properties of Quinolinic Acid in The Rat Brain: Evidence from Turning Behaviour and Tyrosine Hydroxylase Immunohistochemistry. *Neuroscience*, 1994;61:603–12.
- Beretta G, Artali R, Caneva E, Orlandini S, Centini M, Facino RM. Quinoline alkaloids in honey: Further analytical (HPLC-DAD-ESI-MS, multidimensional diffusion-ordered NMR spectroscopy), theoretical and chemometric studies. *J Pharm Biomed Anal*, 2009;50:432–9.
- Bessede A, Gargaro M, Pallotta MT, Martino D, Servillo G, Brunacci C, Bicciato S, Mazza EMC, Macchiarulo A, Vacca C, Iannitti R, Tissi L, Volpi C, Belladonna ML, Orabona C, Bianchi R, Lanz T V. Puccetti P. Aryl Hydrocarbon Receptor Control of A Disease Tolerance Defence Pathway. *Nature*, 2014;511:184–90.
- Braidy N, Grant R. Kynurenine pathway metabolism and neuroinflammatory disease. *Neural Regen Res*, 2017;12:39–42.
- Braidy N, Guillemin GJ, Mansour H, Chan-Ling T, Grant R. Changes in Kynurenine Pathway Metabolism in The Brain, Liver and Kidney of Aged Female Wistar Rats. *FEBS J*, 2011;278:4425–34.
- Cecchini MJ, Amiri M, Dick FA. Analysis of cell cycle position in mammalian cells. *J Vis Exp*, 2012; 59:3491.
- Chen Y, Guillemin GJ. Kynurenine Pathway Metabolites in Humans: Disease and Healthy States. *Int J Tryptophan Res*, 2009;2:1–19.

- Chu IM, Hengst L, Slingerland JM. The Cdk Inhibitor p27 in Human Cancer: Prognostic Potential and Relevance to Anticancer Therapy. *Nat Rev Cancer*, 2008;8:253–67.
- Chung K-T, Gadupudi GS. Possible Roles of Excess Tryptophan Metabolites in Cancer. *Environ Mol Mutagen*, 2011;52:81–104.
- Crissien AM, Frenette C. Current Management of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterol Hepatol*, 2014;10:153–61.
- Davis I, Liu A. What is the tryptophan kynurenine pathway and why is it important to neurotherapeutics? *Expert Rev Neurother*, 2015;15:719–21.
- de Verdière A, Dubernet C, Némati F, Soma E, Appel M, Ferté J, Bernard S, Puisieux F, Couvreur P. Reversion of multidrug resistance with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: towards a mechanism of action. *Br J Cancer*, 1997;76:198–205.
- Deng R, Tang J, Xie B-F, Feng G-K, Huang Y-H, Liu Z-C, Zhu X-F. SYUNZ-16, A Newly Synthesized Alkannin Derivative, Induces Tumor Cells Apoptosis and Suppresses Tumor Growth through Inhibition of PKB/AKT Kinase Activity and Blockade of AKT/FOXO Signal Pathway. *Int J Cancer*, 2010;127:220–9.
- DiNatale BC, Murray IA, Schroeder JC, Flaveny CA, Lahoti TS, Laurenzana EM, Omiecinski CJ, Perdew GH. Kynurenic Acid Is a Potent Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand that Synergistically Induces Interleukin-6 in the Presence of Inflammatory Signaling. *Toxicol Sci*, 2010;115:89–97.
- Dolecka J, Urbanik-Sypniewska T, Skrzydło-Radomańska B, Parada-Turska J. Effect of Kynurenic Acid on The Viability of Probiotics in vitro. *Pharmacol Reports*, 2011;63:548–51.
- Drieu K. Preparation and Definition of Ginkgo Biloba Extract. *Press Medicale*, 1986;15:1455-7.
- El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology*, 2007;132:2557–76.

- Espey MG, Tang Y, Morse HC, Moffett JR, Namboodiri MAA. Localization of Quinolinic Acid in The Murine AIDS Model of Retrovirus-induced Immunodeficiency: Implications for Neurotoxicity and Dendritic Cell Immunopathogenesis. *AIDS*, 1996;10:151–8.
- Fallarini S, Magliulo L, Paoletti T, de Lalla C, Lombardi G. Expression of Functional GPR35 in Human iNKT Cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010;398:420–5.
- Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, Puccetti P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ*, 2002;9:1069–77.
- Fernandez-Pol JA, Klos DJ, Hamilton PD. Antiviral, Cytotoxic and Apoptotic Activities of Picolinic Acid on Human Immunodeficiency Virus-1 And Human Herpes Simplex Virus-2 Infected Cells. *Anticancer Res*, 2001;21:3773–6.
- Fernandez-Pol JA. Iron: Possible cause of the G1 arrest induced in NRK cells by picolinic acid. *Biochem Biophys Res Commun*, 1977;78:136–43.
- Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular Carcinoma. *Lancet*, 2012;379:1245–55.
- Gál EM, Sherman AD. Synthesis and Metabolism of 1-Kynurenine in Rat Brain. *J Neurochem*, 1978;30:607–13.
- Glavin GB, Bose R, Pinsky C. Kynurenic Acid Protects Against Gastroduodenal Ulceration in Mice Injected With Extracts From Poisonous Atlantic Shellfish. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 1989;13:569–72.
- Glavin GB, Pinsky C. Kynurenic Acid Attenuates Experimental Ulcer Formation And Basal Gastric Acid Secretion in Rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1989;64:111–9.
- Gomaa A, Waked I. Management Of Advanced Hepatocellular Carcinoma: Review Of Current And Potential Therapies. *Hepatoma Res*, 2017;3:112.
- Gross DN, van den Heuvel APJ, Birnbaum MJ. The Role of Foxo in The Regulation of

Metabolism. *Oncogene*, 2008;27:2320–36.

Guillemin GJ, Meininger V, Brew BJ. Implications for the Kynurenine Pathway and Quinolinic Acid in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurodegener Dis*, 2005;2:166–76.

Guillemin GJ, Williams KR, Smith DG, Smythe GA, Croitoru-Lamoury J, Brew BJ. Quinolinic Acid in The Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Adv Exp Med Biol*, 2003;527:167–76.

Hammam O, Mahmoud O, Zahran M, Aly S, Hosny K, Helmy A, Anas A. The Role of Fas/Fas Ligand System in the Pathogenesis of Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. *Hepat Mon*, 2012;12:e6132.

Han Q, Fa J, Li J. Kynurenine Aminotransferase and Glutamine Transaminase K of *Escherichia Coli*: Identity with Aspartate Aminotransferase. *Biochem J*, 2001;360:617.

Hardingham GE, Bading H. The Yin and Yang of NMDA Receptor Signalling. *Trends Neurosci*, 2003;26:81-9.

Heng B, Lim CK, Lovejoy DB, Bessede A, Gluch L, Guillemin GJ, Heng B, Lim CK, Lovejoy DB, Bessede A, Gluch L, Guillemin GJ. Understanding the role of the kynurenine pathway in human breast cancer immunobiology. *Oncotarget* 2016;7:6506–20.

Heyes MP, Chen CY, Major EO, Saito K. Different kynurenine pathway enzymes Limit Quinolinic Acid formation by various human cell types. *Biochem J*, 1997;326:351–6.

Heyes MP, Saito K, Crowley JS, Davis LE, Demitrack MA, Der M, Dilling LA, Elia J, Kruesi MJP, Lackner A, Larsen SA, Lee K, Leonard HL, Markey SP, Martin A, Milstein S, Mouradian MM, Tourtellotte WW. Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease. *Brain*, 1992;115:1249–73.

Hilmas C, Pereira EF, Alkondon M, Rassoulpour A, Schwarcz R, Albuquerque EX. The

- brain metabolite kynurenic acid inhibits $\alpha 7$ nicotinic receptor activity and increases non- $\alpha 7$ nicotinic receptor expression: Physiopathological implications. *J Neurosci*, 2001;21:7463–73.
- Huang H, Tindall DJ. Dynamic foxo transcription factors. *J Cell Sci*, 2007;120:2479–87.
- Jeon J-H, Lee K-N, Hwang CY, Kwon K-S, You K-H, Choi I. Tumor suppressor VDUP1 increases p27^{kip1} stability by inhibiting JAB1. *Cancer Res*, 2005;65:4485-9.
- Jiang Q, Yang M, Qu Z, Zhou J, Zhang Q. Resveratrol enhances anticancer effects of paclitaxel in HepG2 human liver cancer cells. *BMC Complement Altern Med*, 2017;17:477.
- Kaihara M, Price JM. The metabolism of quinaldic acid, kynurenic acid, and xanthurenic acid in the rabbit. *J Biol Chem*, 1962;237:1727-9.
- Kalkman HO, Feuerbach D. Modulatory effects of $\alpha 7$ nAChRs on the immune system and its relevance for CNS disorders. *Cell Mol Life Sci*, 2016;73:2511–30.
- Koiri R. N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptors: Therapeutic target against Cancer. *Int J Immunother Cancer Res*, 2015:013-7.
- Kuc D, Rahnema M, Tomaszewski T, Rzeski W, Wejksza K, Urbanik-Sypniewska T, Parada-Turska J, Wielosz M, Turski WA. Kynurenic acid in human saliva - does it influence oral microflora? *Pharmacol Rep*, 2006;58:393-8.
- Kudo M. A New Era of Systemic therapy for hepatocellular carcinoma with regorafenib and lenvatinib. *Liver Cancer*, 2017;6:177–84.
- Langner E, Jeleniewicz W, Turski WA, Plech T. Quinaldic acid induces changes in the expression of p53 tumor suppressor both on protein and gene level in colon cancer LS180 cells. *Pharmacol Reports*, 2019;71:189–93.
- Langner E, Walczak K, Jeleniewicz W, Turski WA, Rajtar G. Quinaldic acid inhibits proliferation of colon cancer ht-29 cells in vitro: effects on signaling pathways.

- Eur J Pharmacol, 2015;757:21–7.
- Lee J, Kim SS. The function of p27^{KIP1} during tumor development. *Exp Mol Med*, 2009;41:765.
- http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HB8065.aspx?geo_country=tr. Erişim tarihi: 08.08.2019.
- Li C-J, Chang J-K, Chou C-H, Wang G-J, Ho M-L. The PI3K/Akt/FOXO3a/p27Kip1 signaling contributes to anti-inflammatory drug-suppressed proliferation of human osteoblasts. *Biochem Pharmacol*, 2010;79:926–37.
- Li S, Qian J, Yang Y, Zhao W, Dai J, Bei J-X, Foo JN, McLaren PJ, Li Z, Yang J, Shen F, Liu L, Yang J, Li S, Pan S, Wang Y, Li W, ... Zhou W. GWAS Identifies Novel Susceptibility Loci on 6p21.32 and 21q21.3 for Hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus carriers. *PLoS Genet*, 2012;8:e1002791.
- Li Y, Farmer RW, Yang Y, Martin RCG. Epithelial cell adhesion molecule in human hepatocellular carcinoma cell lines: a target of chemoresistance. *BMC Cancer*, 2016;16:228.
- Liebig J. Ueber Kynurensäure. *Ann der Chemie und Pharm*, 1853;86:125–6.
- Lim CK, Brew BJ, Sundaram G, Guillemin GJ. Understanding the Roles of the Kynurenine Pathway in Multiple Sclerosis Progression. *Int J Tryptophan Res*, 2010;3:157.
- Lipton SA. Failures and successes of NMDA receptor antagonists: Molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRX*, 2004;1:101–10.
- Liu SJ, Zukin RS. Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends Neurosci*, 2007;30:126–34.
- Liu Y, Ao X, Ding W, Ponnusamy M, Wu W, Hao X, Yu W, Wang Y, Li P, Wang J. Critical role of FOXO3a in carcinogenesis. *Mol Cancer*, 2018;17:104.
- Luksch H, Uckermann O, Stepulak A, Hendruschk S, Marzahn J, Bastian S, Stauffer C,

- Temme A, Ikonomidou C. Silencing of selected glutamate receptor subunits modulates cancer growth. *Anticancer Res*, 2011;31:3181–92.
- Majláth Z, Török N, Toldi J, Vécsei L. Memantine and Kynurenic Acid: Current Neuropharmacological Aspects. *Curr Neuropharmacol*, 2016;14:200–9.
- Malsy M, Gebhardt K, Gruber M, Wiese C, Graf B, Bundscherer A. Effects of ketamine, s-ketamine, and MK 801 on proliferation, apoptosis, and necrosis in pancreatic cancer cells. *BMC Anesthesiol*, 2015;15:111.
- Mándi Y, Vécsei L. The kynurenine system and immunoregulation. *J Neural Transm*, 2012;119:197–209.
- Maucort-Boulch D, de Martel C, Franceschi S, Plummer M. Fraction and incidence of liver cancer attributable to hepatitis B and C viruses worldwide. *Int J Cancer*, 2018;142:2471–7.
- McDonnell JM, Fushman D, Milliman CL, Korsmeyer SJ, Cowburn D. Solution Structure of the Proapoptotic Molecule BID: A Structural Basis for Apoptotic Agonists and Antagonists. *Cell*, 1999;96:625–34.
- Metz R, DuHadaway JB, Kamasani U, Laury-Kleintop L, Muller AJ, Prendergast GC. Novel Tryptophan Catabolic Enzyme IDO2 Is the Preferred Biochemical Target of the Antitumor Indoleamine 2,3-Dioxygenase Inhibitory Compound D-1-Methyl-Tryptophan. *Cancer Res*, 2007;67:7082–7.
- Myint A-M, Schwarz MJ, Müller N. The role of the kynurenine metabolism in major depression. *J Neural Transm*, 2012;119:245–51.
- Nathan CF, Hibbs JB. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol*, 1991;3:65–70.
- Okamoto H, Miyamoto S, Mabuchi H, Takeda R. Inhibition effect of quinaldic acid on glucose-induced insulin release from isolated Langerhans islets of the rat. *Biochem Biophys Res Commun*, 1974;59:623–9.
- Okamoto H, Miyamoto S, Mabuchi H, Yoneyama Y, Takeda R. Insulin-releasing effect

of quinaldic acid and its relatives on isolated Langerhans islets. *Biochem Biophys Res Commun*, 1973;53:1297–303.

Parada-Turska J, Rzeski W, Zgrajka W, Majdan M, Kandefer-Szerszeń M, Turski W. Kynurenic acid, an endogenous constituent of rheumatoid arthritis synovial fluid, inhibits proliferation of synoviocytes in vitro. *Rheumatol Int*, 2006;26:422–6.

Parada-Turska J, Zgrajka W, Majdan M. Kynurenic Acid in Synovial Fluid and Serum of Patients with Rheumatoid Arthritis, Spondyloarthropathy, and Osteoarthritis. *J Rheumatol*, 2013;40:903–9.

Peck-Radosavljevic M. Hepatocellular carcinoma: the place of new medical therapies. *Therap Adv Gastroenterol*, 2010;3:259–67.

Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*, 1999;6:99–104.

Ribeiro MPC, Custódio JBA, Santos AE. Ionotropic glutamate receptor antagonists and cancer therapy: time to think out of the box? *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017;79:219–25.

Rzeski W, Turski L, Ikonomidou C. Glutamate antagonists limit tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001a;98:6372–7.

Sas K, Robotka H, Toldi J, Vécsei L. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J Neurol Sci*, 2007;257:221–39.

Schwarcz R, Bruno JP, Muchowski PJ, Wu H-Q. Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nat Rev Neurosci*, 2012;13:465–77.

Schwarcz R, Guidetti P, Sathyaikumar KV, Muchowski PJ. Of mice, rats and men: Revisiting the quinolinic acid hypothesis of Huntington's disease. *Prog Neurobiol*, 2010;90:230–45.

Schwarcz R, Pellicciari R. Manipulation of Brain Kynurenines: Glial Targets, Neuronal

- Effects, and Clinical Opportunities. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002;303:1–10.
- Schwarcz R, Whetsell W, Mangano R. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*, 1983;219:316–8.
- Sekine H, Mimura J, Oshima M, Okawa H, Kanno J, Igarashi K, Gonzalez FJ, Ikuta T, Kawajiri K, Fujii-Kuriyama Y. Hypersensitivity of Aryl Hydrocarbon Receptor-Deficient Mice to Lipopolysaccharide-Induced Septic Shock. *Mol Cell Biol*, 2009;29:6391–400.
- Sekkaï D, Guittet O, Lemaire G, Tenu J-P, Lepoivre M. Inhibition of Nitric Oxide Synthase Expression and Activity in Macrophages by 3-Hydroxyanthranilic Acid, a Tryptophan Metabolite. *Arch Biochem Biophys*, 1997;340:117–23.
- Sherman M. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology, Surveillance, and Diagnosis. *Semin Liver Dis*, 2010;30:003–16.
- Stahl M, Dijkers PF, Kops GJPL, Lens SMA, Coffey PJ, Burgering BMT, Medema RH. The Forkhead Transcription Factor FoxO Regulates Transcription of p27Kip1 and Bim in Response to IL-2. *J Immunol*, 2002;168:5024–31.
- Steiner L, Gold M, Mengel D, Dodel R, Bach J-P. The endogenous $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor antagonist kynurenic acid modulates amyloid- β -induced inflammation in BV-2 microglial cells. *J Neurol Sci*, 2014;344:94–9.
- Stepulak A, Luksch H, Gebhardt C, Uckermann O, Marzahn J, Siffringer M, Rzeski W, Stauffer C, Brocke KS, Turski L, Ikonomidou C. Expression of glutamate receptor subunits in human cancers. *Histochem Cell Biol*, 2009;132:435–45.
- Stepulak A, Rola R, Polberg K, Ikonomidou C. Glutamate and its receptors in cancer. *J Neural Transm*, 2014;121:933–44.
- Stepulak A, Siffringer M, Rzeski W, Endesfelder S, Gratopp A, Pohl EE, Bittigau P, Felderhoff-Mueser U, Kaindl AM, Buhrer C, Hansen HH, Stryjecka-Zimmer M, Turski L, Ikonomidou C. NMDA antagonist inhibits the extracellular signal-regulated kinase pathway and suppresses cancer growth. *Proc Natl Acad Sci*, 2005; 102(43):15605–10.

- Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, 2012;114:785-796.
- Stone TW, Addae JL. The pharmacological manipulation of glutamate receptors and neuroprotection. *Eur J Pharmacol*, 2002;447:285-96.
- Stone TW, Darlington LG. Endogenous kynurenes as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*, 2002;1:609-20.
- Suntes A, Fernández de Mattos S, Stahl M, Brosens JJ, Zoumpoulidou G, Saunders CA, Coffey PJ, Medema RH, Coombes RC, Lam EW-F. FOXO3a Transcriptional Regulation of Bim Controls Apoptosis in Paclitaxel-treated Breast Cancer Cell Lines. *J Biol Chem*, 2003;278:49795–805.
- Szalardy L, Zadori D, Toldi J, Fulop F, Klivenyi P, Vecsei L. Manipulating Kynurenic Acid Levels in the Brain - On the Edge Between Neuroprotection and Cognitive Dysfunction. *Curr Top Med Chem*, 2012;12:1797–806.
- Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014;6:a016295–a016295.
- Thatcher TH, Maggirwar SB, Baglole CJ, Lakatos HF, Gasiewicz TA, Phipps RP, Sime PJ. Aryl Hydrocarbon Receptor-Deficient Mice Develop Heightened Inflammatory Responses to Cigarette Smoke and Endotoxin Associated with Rapid Loss of the Nuclear Factor- κ B Component RelB. *Am J Pathol*, 2007;170:855–64.
- Thomas MB, O'Beirne JP, Furuse J, Chan ATC, Abou-Alfa G, Johnson P. Systemic Therapy for Hepatocellular Carcinoma: Cytotoxic Chemotherapy, Targeted Therapy and Immunotherapy. *Ann Surg Oncol*, 2008;15:1008–14.
- Tikhanovich I, Cox J, Weinman SA. Forkhead box class O transcription factors in liver function and disease. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013;28 Suppl 1:125–31.
- Turski L, Ikonomidou C. NMDA antagonist inhibits the extracellular signal-regulated kinase pathway and suppresses cancer growth. *Proc Natl Acad Sci*,

2005a;102:15605–10.

Turski M, Turska M, Paluszkiewicz P, Parada-Turska J, Oxenkrug GF. Kynurenic Acid in the Digestive System—New Facts, New Challenges. *Int J Tryptophan Res*, 2013;6:IJTR.S12536.

Turski M, Turska M, Zgrajka W, Bartnik M, Kocki T, Turski W. Distribution, Synthesis, and Absorption of Kynurenic Acid in Plants. *Planta Med*, 2011;77:858–64.

Turski M, Turska M, Zgrajka W, Kuc D, Turski WA. Presence of kynurenic acid in food and honeybee products. *Amino Acids*, 2009;36:75–80.

Turski WA, Małaczewska J, Marciniak S, Bednarski J, Turski MP, Jabłoński M, Siwicki AK. On the toxicity of kynurenic acid in vivo and in vitro. *Pharmacol Reports*, 2014;66:1127–33.

Varga G, Erces D, Fazekas B, Fülöp M, Kovacs T, Kaszaki J, Fülöp F, Vecsei L, Boros M. N -Methyl-d-aspartate receptor antagonism decreases motility and inflammatory activation in the early phase of acute experimental colitis in the rat. *Neurogastroenterol Motil*, 2010;22:217-e68.

Villanueva A, Newell P, Chiang D, Friedman S, Llovet J. Genomics and Signaling Pathways in Hepatocellular Carcinoma. *Semin Liver Dis*, 2007;27:055–76.

Vogel A, Cervantes A, Chau I, Daniele B, Llovet JM, Meyer T, Nault J-C, Neumann U, Ricke J, Sangro B, Schirmacher P, Verslype C, Zech CJ, Arnold D, Martinelli E. Hepatocellular carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 2018;29:iv238–55.

Walczak K, Dabrowski W, Langner E, Zgrajka W, Piłat J, Kocki T, Rzeski W, Turski WA. Kynurenic acid synthesis and kynurenine aminotransferases expression in colon derived normal and cancer cells. *Scand J Gastroenterol*, 2011;46:903–12.

Walczak K, Deneka-Hannemann S, Ena Jarosz B', Zgrajka W, Stoma F, Trojanowski T, Turski WA, Rzeski W. Kynurenic acid inhibits proliferation and migration of human glioblastoma T98G cells. *Pharmacol Reports*, 2014a;66:130–6.

- Walczak K, Turski WA, Rajtar G. Kynurenic acid inhibits colon cancer proliferation in vitro: effects on signaling pathways. *Amino Acids*, 2014b;46:2393–401.
- Walczak K, Turski WA, Rzeski W. Kynurenic acid enhances expression of p21 Waf1/Cip1 in colon cancer HT-29 cells. *Pharmacol Rep*, 2012a;64:745–50.
- Walczak K, Żurawska M, Kiś J, Starownik R, Zgrajka W, Bar K, Turski WA, Rzeski W. Kynurenic acid in human renal cell carcinoma: its antiproliferative and antimigrative action on Caki-2 cells. *Amino Acids*, 2012b;43:1663–70.
- Wang B, Xu J, Wang H, Chang S, Liu N. Effect and Mechanism of Sophoridine to suppress Hepatocellular carcinoma in vitro and vivo. *Biomed Pharmacother*, 2017;95:324–30.
- Wang J, Simonavicius N, Wu X, Swaminath G, Reagan J, Tian H, Ling L. Kynurenic Acid as a Ligand for Orphan G Protein-coupled Receptor GPR35. *J Biol Chem*, 2006;281:22021–8.
- Wirthgen E, Hoeflich A, Rebl A, Günther J. Kynurenic Acid: The Janus-Faced Role of an Immunomodulatory Tryptophan Metabolite and Its Link to Pathological Conditions. *Front Immunol*, 2018;8:1957.
- Yalçın K, Yakut M, Değertekin H, Türkdoğan K, Harputluoğlu M, Bahçecioğlu İH, Kadayıfçı A, Okçu N, Yılmaz N. Clinical and Epidemiological Characteristics of Hepatocellular Carcinoma Cases in East and Southeastern Region of Turkey: A Multicenter Retrospective Study. *Türkiye Klin J Med Sci*, 2013;33:806–13.
- Yamaguchi F, Hirata Y, Akram H, Kamitori K, Dong Y, Sui L, Tokuda M. FOXO/TXNIP pathway is involved in the suppression of hepatocellular carcinoma growth by glutamate antagonist MK-801. *BMC Cancer*, 2013;13:468.
- Yamaguchi F, Kamitori K, Sanada K, Horii M, Dong Y, Sui L, Tokuda M. Rare sugar D-allose enhances anti-tumor effect of 5-fluorouracil on the human hepatocellular carcinoma cell line HuH-7. *J Biosci Bioeng*, 2008;106:248–52.

- Yang Y, Lu JY-L, Wu X, Summer S, Whoriskey J, Saris C, Reagan JD. G-Protein-Coupled Receptor 35 Is a Target of the Asthma Drugs Cromolyn Disodium and Nedocromil Sodium. *Pharmacology*, 2010;86:1–5.
- Yokoi I, Uchida A, Kabuto H, Yamamoto N, Ogawa N, Nishijima Y. Effects of kynurenine metabolites on the electrocorticographic activity in the rat. *J Neural Transm*, 1998;105:147–60.
- Zhang B, Tomita Y, Ch'ng E, Qiu Y, He J, Jin Y-F, Tomoeda M, Hamada K, Ueda T, Aozasa K. Prognostic Significance of Phosphorylated FOXO1 Expression in Soft Tissue Sarcoma. *Ann Surg Oncol*, 2009;16:1925–37.
- Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*, 2011;1813:1978–86.
- Zhao M, Zhou A, Xu L, Zhang X. The role of TLR4-mediated PTEN/PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway in neuroinflammation in hippocampal neurons. *Neuroscience*, 2014;269:93–101.
- Zhong C, Qiu S, Li J, Shen J, Zu Y, Shi J, Sui G. Ellagic acid synergistically potentiates inhibitory activities of chemotherapeutic agents to human hepatocellular carcinoma. *Phytomedicine*, 2019;59:152921.
- Zhou Q, Lui VW, Yeo W. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma. *Futur Oncol*, 2011;7:1149–67.
- Zhou Y, Li Y, Zhou T, Zheng J, Li S, Li H-B. Dietary Natural Products for Prevention and Treatment of Liver Cancer. *Nutrients*, 2016;8:156.
- Zinger A, Barcia C, Herrero MT, Guillemin GJ. The Involvement of Neuroinflammation and Kynurenine Pathway in Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis*, 2011;2011:1–11.

KİNÜRENİK ASİT VE KİNALDİK ASİT'İN İNSAN KARACİĞER KANSERİ (HepG2) HÜCRE HATTINDA in vitro ANTİTÜMÖRAL ETKİLERİNİN

ORJİNALLIK RAPORU

% 3	% 2	% 1	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
2	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
3	Michal Turski. "Distribution, Synthesis, and Absorption of Kynurenic Acid in Plants", Planta Medica, 12/14/2010 Yayın	<% 1
4	readgur.com İnternet Kaynağı	<% 1
5	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
6	theses.gla.ac.uk İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.pmbj.com.cn İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı : Pınar ATALAY
Uyruğu : Türkiye (TC)
Doğum Tarihi ve Yeri: 08.08.1985 /Afyon-Karaadilli
Medeni Durumu : Evli
e-mail : pinaratalay@gmail.com
Yazışma Adresi : Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Melikgazi/Kayseri

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2008
Yüksek Lisans	Yeditepe Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı	2011

YABANCI DİL

İngilizce

İŞ DENEYİMLERİ

2012	Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri	Araştırma Görevlisi
------	--	---------------------