



**WİTHAFERİN A’NIN HEPATOSSELÜLER KANSER
HÜCRELERİNDE PERİOSTİN ÜZERİNE ETKİSİNİN İN
VİTRO OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Saltuk Buğra KARAHAN

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Tuba DEMİRCİ**

Doktora Tezi-2023

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**WİTHAFERİN A’NIN HEPATOSSELÜLER KANSER
HÜCRELERİNDE PERİOSTİN ÜZERİNE ETKİSİNİN İN
VİTRO OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Saltuk Buğra KARAHAN

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Tuba DEMİRCİ**

**ERZURUM
2023**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XIV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser Nedir?	3
2.2. Karaciğer.....	3
2.2.1. Karaciğerin Embriyonik Gelişimi.....	3
2.2.2. Karaciğerin Anatomisi	4
2.2.3. Karaciğerin Histolojisi	5
2.2.3.1. Hepatositler	6
2.2.3.2. Endotel Hücreleri	6
2.2.3.3. Kupffer Hücreleri.....	7
2.2.3.4. Stellat Hücreleri (İto Hücreleri).....	7
2.2.3.5. Disse Aralığı	7
2.2.3.6. Karaciğerin Görevleri	8
2.3. Hepatoselüler Kanser	9
2.4. Periostin	10
2.5. Withaferin A	12
2.6. Sinyal Yolakları	15

2.6.1. Epitelyal Mezenkimal Geçiş	15
2.6.2. Akt Sinyal Yolağı	17
3. MATERYAL VE METOT.....	20
3.1. Etik Kurul Onayı.....	20
3.2. Malzemeler ve Ekipmanlar	20
3.2.1. Kimyasal Malzemeler	20
3.2.2 Cam ve Plastik Malzemeler	20
3.2.3. PCR Kitleri	21
3.2.4. Antikorlar.....	21
3.2.5. Hücre Hattı.....	22
3.2.6. Withaferin A	22
3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları İle İnsan HCC (HepG2, ATCC ® HB-8065 TM) Hücre Hattındaki Hücrelerin Pasajlanarak Çoğaltılması, Dondurulması, Hücre Canlılığı Testi ve Yara İyileşme Modelinin Oluşturulması	22
3.3.1. Medyum Hazırlama	22
3.3.2. Hücrenin Çözdürülmesi, Ekim Yapılması ve Hücrelerin Kaldırılması	22
3.3.3. Hücrelerin Pasajlanması	23
3.3.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	24
3.3.5. Hücre Sayılarının Hesaplanması.....	24
3.3.6. Uygulanan Withaferin A'nın Dozlarının Belirlenmesi.....	25
3.3.7. Hücre Proliferasyon Analizi (MTT Testi)	25
3.3.8. Yara Çizik Deneyi	27
3.4. Real Time-PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Prosedürü	28
3.4.1. Real Time-PCR Öncesi Hücre Kültürü	28
3.4.2. cDNA (Komplementer Zincir) Sentezlenmesi	29

3.4.3. Kantitatif Real Time-PCR	31
3.4.4. Real Time- PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	32
3.5. İmmünotokimyasal Prosedür	33
3.5.1. Hücrelerin Lamda Çoğaltılması.....	33
3.5.2. Fiksasyon	34
3.5.3. İmmüno-peroksidaz boyama tekniği.....	34
3.5.4. Mikroskopik İnceleme ve Fotoğraflama.....	35
3.5.5. İstatistiksel Analiz.....	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. MTT Testi Bulguları.....	37
4.2. Yara Çizik Deneyi Bulguları	38
4.2.1. Withaferin A'nın Hücre Canlılığı için Yara İyileşmesi Testinin Değerlendirilmesi	39
4.2.2. Yara Alanının Değerlendirilmesi.....	40
4.2.3. Hücre Göç Hızının Değerlendirilmesi	42
4.3. Real Time PCR için Bulgular	43
4.4. İmmünotokimyasal Boyama Bulguları	45
4.4.1. HepG2 hücrelerinde Periostinin İmmünotokimyasal Boyama Bulguları	45
4.4.2. HepG2 hücrelerinde Akt1'in İmmünotokimyasal Boyama Bulguları	50
4.4.3. HepG2 hücrelerinde pAkt1'in İmmünotokimyasal Boyama Bulguları	54
5. TARTIŞMA.....	60
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	68
KAYNAKLAR	69
EKLER	87
EK.1. ÖZGEÇMİŞ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	88
EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU	89



TEŞEKKÜR

Tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadar geçen süreçte ilgi ve desteklerini hissettiğim, değerli vakitlerini ve bilimsel desteklerini sunan, tez danışmanım olarak beni yönlendiren sayın hocam Doç. Dr. Tuba DEMİRCİ' ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarında benden yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Abdulgani TATAR'a ve Doç. Dr. Semin GEDİKLİ' ye teşekkürlerimi sunarım. Tezimin deney ve istatistiksel analizlerinin yapılmasında yardımcı olan değerli arkadaşım Ahmet YILMAZ'a, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarı personeline teşekkür ederim.

Tez çalışmamı TDK-2021-8917 proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde emeği geçen, maddi ve manevi hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan canım annem, babam ve kardeşlerime; çalışmalarım boyunca manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim, içten destekleri ve yardımları ile her işimi kolaylaştıran sevgili eşim Filiz'e ve canım oğlum Selim Eren'e şükranlarımı sunarım.

Saltuk Buğra KARAHAN

ÖZET

Withaferin A'nın Hepatoselüler Kanser Hücrelerinde Periostin Üzerine Etkisinin İn Vitro Olarak Araştırılması

Amaç: Hepatoselüler kanser (HSK) dünyada sık rastlanan kanserlerden biridir ve dünya çapında kanserle ilişkili ölümlerin en yaygın nedenleri arasındadır. Withaferin A antikanser vitanoliddir ve antienflamatuvar, immüno-modülatör, anti-metastaz ve anti-kanserojen etkilere sahiptir. Withaferin A, sağlıklı dokulara toksisitesi düşük olan bir antikanser ajandır ve dirençli kanser hücrelerini mevcut kemoterapötik ajanlara duyarlı hale getirir. Periostin, hücre proliferasyonu, hücre invazyonu ve anjiyogenez gibi birçok temel biyolojik süreçte yer alan bir proteindir ve epitelyal-mezenkimal geçiş (EMG)'de önemli rol oynamaktadır. Çalışmamızda Withaferin A'nın hepatoselüler kanser üzerindeki etkisi ve bu etkinin periostin, Akt ve pAkt ile olan ilişkisinin araştırılması amaçlandı.

Materyal ve Metot: HepG2 hücre hattında MTT testi ile hücre viabilitesi belirlendikten sonra hepatoselüler kanser hücreleri platelere ekildi. Konfluent olduktan sonra hücreler kontrol, 24 ve 48 saatlik gruplar şeklinde ayrıldı. Gruplara belirlenen dozlarda (2 μ M ve 4 μ M) Withaferin A uygulandı, kontrol grubuna ise Withaferin A uygulaması yapılmadı. Yara çizik deneyi ile hücrelerin proliferasyonu ve migrasyonu değerlendirildi. Moleküler olarak Real-Time PCR ile periostin (Postn), Akt1 ve pAkt1'in gen ekspresyon düzeyi analiz edildi ve immünositokimyasal olarak da bu proteinlerin ekspresyonu belirlendi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edildi.

Bulgular: Yara çizik deneyinde Withaferin A'nın hücre proliferasyonu ve migrasyonunu önlediği belirlendi. Withaferin A'nın kanser hücrelerinin çoğalmasını azalttığı ve sıfırıncı saatten başlayarak kırk sekizinci saate doğru kontrol grubunda yara alanının kapandığı ve Withaferin A uygulanan gruplarda ise yara alanının kapanmadığı tespit edildi. Hem moleküler hem de immünositokimyasal analizlerde de Withaferin A uygulanan gruplarda periostinin ekspresyonunun azaldığı ve bu azalmalara Akt1 ve pAkt1'in eşlik ettiği belirlendi.

Sonuç: Withaferin A'nın periostini baskılayarak hepatoselüler kanser hücrelerinde proliferasyon ve migrasyonu azalttığı, bu etkide periostin ile Akt1 ve pAkt1 arasındaki etkileşimin rol oynadığı belirlendi. Sonuç olarak Withaferin A'nın hepatoselüler kanser vakalarında tedavi edici etkisi olabileceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Akt1, Hepatoselüler kanser, pAkt1, Periostin, Withaferin A

ABSTRACT

In Vitro Investigation of the Effect of Withaferin A on Periostin in Hepatocellular Cancer Cells

Aim: Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common cancers in the world and one of the most common causes of cancer-related deaths worldwide. Withaferin A is an anticancer vitanolide and has anti-inflammatory, immunomodulatory, anti-metastasis, and anti-carcinogenic effects. Withaferin A is an anticancer agent with low toxicity to healthy tissues and makes resistant cancer cells susceptible to current chemotherapeutic agents. Periostin is a protein involved in many basic biological processes such as cell proliferation, cell invasion, and angiogenesis, and plays an important role in epithelial-mesenchymal transition (EMT). It was aimed to investigate the effect of Withaferin A on hepatocellular cancer and the relationship of this effect with periostinAkt1 and pAkt1 in this study.

Materials and Methods: After the cell viability was determined by MTT test in the HepG2 cell line, hepatocellular cancer cells were seeded into plates. After confluency, the cells were divided into control, 24- and 48-hour groups. Withaferin A was administered at the determined doses (2 μ M and 4 μ M) and Withaferin A was not administered to the control group. Proliferation and migration of cells were evaluated by wound scratch assay. The gene expression level of periostin (Postn), Akt 1 and pAkt1 was analyzed by Real-Time PCR molecularly, and the expression of these proteins was determined immunocytochemically. The obtained data were analyzed statistically.

Results: In the wound scratch assay, it was determined that Withaferin A prevented cell proliferation and migration. It was found that Withaferin A reduced the proliferation of cancer cells and that the wound area was closed in the control group starting from the zero hour to the forty-eighth hour and the wound area was not closed in the groups where Withaferin A was applied. In both molecular and immunocytochemical analyses, it was determined that the expression of periostin was reduced in the groups treated with Withaferin A and that these decreases were accompanied by Akt1 and pAkt1.

Conclusion: It was determined that Withaferin A suppressed periostin and decreased proliferation and migration in hepatocellular cancer cells and that the interaction between periostin and Akt1 and pAkt1 played a role in this effect. As a result, it was thought that Withaferin A may have a therapeutic effect in hepatocellular cancer cases.

Keywords: Akt1, Hepatocellular cancer, pAkt1, Periostin, Withaferin A

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	:	Santigrat Derece
μM	:	Mikro Molar
μL	:	Mikrolitre
μg	:	Mikrogram
ml	:	Mililitre
HCC	:	Hepatocellular carcinoma (HSK - Hepatoselüler Kanser)
HepG2	:	İnsan Hepatoselüler Kanser Hücre Hattı
HBV	:	Hepatit B
HCV	:	Hepatit C
Wit. A	:	Withaferin A
Postn	:	Periostin
AKT	:	Protein Kinaz A, B, C
pAKT	:	Fosforile Protein Kinaz
EMG	:	Endotelial Mezenşimal Geçiş
IL (3, 4)	:	İnterlökin (3, 4)
DMEM	:	Dulbeco's Modified Eagle Medium
FBS	:	Fetal Bovine Serum
PSA	:	Penisilin Streptomisin anfoterin B
DMSO	:	Dimetil Sülfoksit (Dimethile Sulfoxide)
PBS	:	Fosfat Tamponlu Solüsyon (Phosphat Buffered Saline)
HBSS	:	Hank's Balnced Salt Solution
H₂O₂	:	Hidrojen Peroksit (Hydrogen Peroxide)
MTT	:	3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid
cDNA	:	Komplementer DNA (Complementary DNA)

RT-PCR	:	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time Polimerase Chain Reaction)
Rpm	:	Revolutions Per Minute
PI3K	:	Fosfoinositid-3-kinaz
PIP3	:	Fosfatidilinositol-3-fosfat
MAPK	:	Mitojenle Aktive Edilmiş Protein Kinazlar
NF-kB	:	Nükleer Faktör-Kappa B
Wnt	:	Wingless and Int-1 geni
TGFβ1	:	Dönüştürücü büyüme faktörü (Transforming Growth Factor) Beta 1

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. 13.kromozom ve Postn geni (Mavi okla gösterilmiştir).....	11
Şekil 2. 2. Withania somnifera bitkisi A) bitki B) kök ve kök tozu C) çiçekler D) yapraklar E) meyveler	13
Şekil 2. 3. Withaferin A'nın yapısı	13
Şekil 2. 4. Withaferin A'nın antikanser aktivite mekanizmasının özetlenmiş ve şematik gösterimi	15
Şekil 2. 5. PI3K/Akt yolunun işlevleri	19
Şekil 3. 1. HepG2 Hücrelerinin 10X görünümü	24
Şekil 3. 2. HepG2 Hücrelerinin 20X görünümü	25
Şekil 3. 3. HepG2 hücrelerinin MTT testi sonrası 96 lık plateki renk değişimi.....	28
Şekil 3. 4. HepG2 hücrelerinin yara iyileşme testi için çizilen alanın X4 görünümü	29
Şekil 3. 5. Kontrol, 2Wit. A ve 4Wit. A gruplarına ait immünohistokimyasal boyamayı gösteren preparat.....	32
Şekil 3. 6. Nonodrop cihazının görünümü.....	34
Şekil 3. 7. Rotor-Gene Q PCR Cihazı	36
Şekil 4. 1. MTT Testine göre Withaferin A'nın Canlılık (%) ve Konsantrasyon (μ M) grafığı.....	39
Şekil 4. 2. MTT testine göre Withaferin A'nın Canlılık değerlerinin Log (M) grafığı ..	40
Şekil 4. 3. Yara iyileşmesi testi kontrol ve 2Wit. A uygulanan hücrelerin farklı saatlerdeki görünümü X4	40
Şekil 4. 4. Yara iyileşmesi testi kontrol ve 4Wit. A uygulanan hücrelerin farklı saatlerdeki görünümü X4	41
Şekil 4. 5. Kontrol grubu ile 2Wit. A grubu arasında yara iyileşmesi (%) ve zaman grafığı (Sa) ($p < 0,0001$ istatistiksel olarak anlamlıydı ve * şeklinde gösterildi).....	42

Şekil 4. 6. Kontrol grubu ile 4Wit. A grubu arasında yara iyileşmesi (%) ve zaman grafiği (Sa) (p<0,0001 istatistiksel olarak anlamlıydı ve *,**,**,* şeklinde gösterildi)	42
Şekil 4. 7. Kontrol ve 2Wit. A grubuna ait yara alanı (mm ²) ve zaman grafiği (Sa) (p<0,0001 istatistiksel olarak anlamlıydı ve * şeklinde gösterildi)	43
Şekil 4. 8. Kontrol ve 4Wit. A grubuna ait yara alanı (mm ²) ve zaman grafiği (Sa) (p<0,0001 istatistiksel olarak anlamlıydı ve *, **, *** şeklinde gösterildi).	44
Şekil 4. 9. Kontrol grubu ve 2Wit. A grubu arasında hücre göç hızı (µm/Sa) ve zaman (Sa) grafiği (p<0.0001 istatistiksel olarak anlamlıydı ve * şeklinde gösterildi)	45
Şekil 4. 10. Kontrol grubu ve 4Wit. A grubu arasında hücre göç hızı (µm/Sa) ve zaman (Sa) grafiği (p<0.0001 istatistiksel olarak anlamlıydı ve * ve ** şeklinde gösterildi)	45
Şekil 4. 11. Kontrol, 2Wit. A ve 4 Wit. A uygulanan gruplarda 24. ve 48. saatlerdeki Postn geni ekspresyon grafiği	46
Şekil 4. 12. Kontrol, 2Wit. A ve 4Wit. A uygulanan gruplarda 24. ve 48. saatlerdeki Akt1 gen ekspresyon grafiği (p<0.05 istatistiksel olarak anlamlıydı ve ** şeklinde gösterildi)	47
Şekil 4. 13. Kontrol grubuna ait HepG2 hücrelerinde 24 saatlik Periostinin ışık mikroskobu görüntüsü X20	49
Şekil 4. 14. Withaferin A'nın 2 µM dozunun uygulandığı gruba ait HepG2 hücrelerinde 24 saatlik Periostinin ışık mikroskobu görüntüsü X20	49
Şekil 4. 15. Withaferin A'nın 4 µM dozunun uygulandığı gruba ait HepG2 hücrelerinde 24 saatlik Periostinin ışık mikroskobu görüntüsü X20	50

Şekil 4. 16. Kontrol grubu, Withaferin A'nın 2 µM ve 4 µM dozlarının uygulandığı 24 saatlik gruplarda Periostinin IRS değerlerini gösteren grafik.....	50
Şekil 4. 17. Kontrol grubuna ait HepG2 hücrelerinde 48 saatlik Periostinin ışık mikroskobu görüntüsü X20.....	51
Şekil 4. 18. Withaferin A'nın 2 µM dozunun uygulandığı gruba ait HepG2 hücrelerinde 48 saatlik Periostinin ışık mikroskobu görüntüsü X20	51
Şekil 4. 19. Withaferin A'nın 4 µM dozunun uygulandığı gruba ait HepG2 hücrelerinde 48 saatlik Periostinin ışık mikroskobu görüntüsü X20	52
Şekil 4. 20. Kontrol grubu, Withaferin A'nın 2 µM ve 4 µM dozlarının uygulandığı 48 saatlik gruplarda Periostinin IRS değerlerini gösteren grafik.....	52
Şekil 4. 21. Kontrol grubuna ait HepG2 hücrelerinde 24 saatlik Akt1' in ışık mikroskobu görüntüsü X20.....	53
Şekil 4. 22. Withaferin A'nın 2 µM dozunun uygulandığı gruba ait HepG2 hücrelerinde 24 saatlik Akt1' in ışık mikroskobu görüntüsü X20.....	54
Şekil 4. 23. Withaferin A'nın 4 µM dozunun uygulandığı gruba ait HepG2 hücrelerinde 24 saatlik Akt1' in ışık mikroskobu görüntüsü X20.....	54
Şekil 4. 24. Kontrol grubu, Withaferin A'nın 2 µM ve 4 µM dozlarının uygulandığı 24 saatlik gruplarda Akt1'in IRS değerlerini gösteren grafik	55
Şekil 4. 25. Kontrol grubuna ait HepG2 hücrelerinde 48 saatlik Akt1' in ışık mikroskobu görüntüsü X20.....	55
Şekil 4. 26. Withaferin A'nın 2 µM dozunun uygulandığı gruba ait HepG2 hücrelerinde 48 saatlik Akt1' in ışık mikroskobu görüntüsü X20.....	56
Şekil 4. 27. Withaferin A'nın 4 µM dozunun uygulandığı gruba ait HepG2 hücrelerinde 48 saatlik Akt1' in ışık mikroskobu görüntüsü X20.....	56

Şekil 4. 28. Kontrol grubu, Withaferin A'nın 2 µM ve 4 µM dozlarının uygulandığı 48 saatlik gruplarda Akt1'in IRS değerlerini gösteren grafik	57
Şekil 4.29. Kontrol grubuna ait HepG2 hücrelerinde 24 saatlik pAkt1' in ışık mikroskobu görüntüsü X20.....	58
Şekil 4. 30. Withaferin A'nın 2 µM dozunun uygulandığı gruba ait HepG2 hücrelerinde 24 saatlik pAkt1' in ışık mikroskobu görüntüsü X20.....	58
Şekil 4. 31. Withaferin A'nın 4 µM dozunun uygulandığı gruba ait HepG2 hücrelerinde 24 saatlik pAkt1' in ışık mikroskobu görüntüsü X20.....	59
Şekil 4. 32. Kontrol grubu, Withaferin A'nın 2 µM ve 4 µM dozlarının uygulandığı 24 saatlik gruplarda pAkt1'in IRS değerlerini gösteren grafik	59
Şekil 4. 33. Kontrol grubuna ait HepG2 hücrelerinde 48 saatlik pAkt1' in ışık mikroskobu görüntüsü X20.....	60
Şekil 4. 34. Withaferin A'nın 2 µM dozunun uygulandığı gruba ait HepG2 hücrelerinde 48 saatlik pAkt1' in ışık mikroskobu görüntüsü X20.....	60
Şekil 4. 35. Withaferin A'nın 4 µM dozunun uygulandığı gruba ait HepG2 hücrelerinde 48 saatlik pAkt1' in ışık mikroskobu görüntüsü X20.....	61
Şekil 4. 36. Kontrol grubu, Withaferin A'nın 2 µM ve 4 µM dozlarının uygulandığı 48 saatlik gruplarda pAkt1'in IRS değerlerini gösteren grafik	61

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3. 1. 2xRT Master Mix Bileşenleri ve Miktarları	34
Tablo 3. 2. Thermal Cycler’da cDNA Eldesi İçin Kullanılan Program.....	35
Tablo 3. 3. PCR Reaksiyon Mix’in Hazırlanması.....	36
Tablo 3. 4. Applied Biosystems Real Time-PCR İçin Kullanılan Program.....	36
Tablo 3. 5. İmmünoreaktivite Skor (IRS)	40



1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ve kaynaklandığı organdan dolaşıma geçerek daha uzak bölgelere metastaz yapması ile karakterize bir hastalıktır¹. Hepatoselüler kanser (HSK) dünyada beşinci en yaygın kanserdir ve dünya çapında kanserle ilişkili ölümlerin üçüncü en yaygın nedenidir. Hepatoselüler karsinom en sık teşhis edilen kanserler arasında olup, 200'den fazla tipi vardır². HSK'nın etyolojisinde, hepatit B veya C (HBV, HCV) ile viral enfeksiyon, alkol, aflatoksin ile uzun süreli zehirlenme, kronik enfeksiyon veya obezite gibi önemli risk faktörleri yer alır³.

Periostin, matriselüler protein ailesinin bir üyesidir. Matriselüler proteinler, hem kollajen I, fibronektin ve tenazin C gibi diğer hücre dışı matrikse (ECM) hem de hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanma kabiliyeti olan proteinlerdir. İntegrin bağımlı bir mekanizma yoluyla hücre yapışması ve motilitesinin düzenlenmesinde rol oynayan bir protein olan periostinin iskelet ve kalp gelişimi ile yakın ilişkisi vardır. İlaveten, kanser ile de ilişkili bir protein olan periostinin, meme, kolon, akciğer ve pankreas kanserlerinde ekspresyonunun arttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir⁴. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, periostinin tümör oluşumu, kanserin ilerlemesi ve metastazı gibi aktivitelerde rol oynadığını ve proliferasyon ve invazyon gibi birçok hücrel olayda yer aldığını göstermektedir. Kanser hücrelerinin yaşama, proliferasyon, apoptozdan kaçma, angiogenez, invazyon ve metastazında periostinin önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Periostinin glioblastomalarda (derece IV gliomlar) normal beyne kıyasla yüksek derecede olduğu gösterilmiştir. Gliomalarda periostin ekspresyon seviyeleri, tümör derecesi ve nüks ile doğru ve sağkalım ile ters orantılıdır. Epitel hücreleri fiziksel ve genetik değişiklik geçirmeleri sonucu metastazik özellik kazanırlar.

Withania somnifera'dan ekstrakte edilen Withaferin-A ilk antikanser vitanoliddir. Vitanolidler, kardiyoprotektif, antienflamatuar, immüno-modülatör, anti-anjiyogenez,

anti-metastaz ve anti-kanserojen etkiye sahip yüksek biyolojik aktivite ile karakterize organik steroid bileşikleridir. Withaferin A, sağlıklı dokulara toksisitesi düşük olan bir antikanser ajandır ve dirençli kanser hücrelerini mevcut kemoterapötik ajanlara duyarlı hale getirir⁵.

Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMG), epitel hücrelerinin polarize organizasyonlarını kaybettikleri ve invaziv yetenekler kazandıkları bir hücresel programdır. Bu süreç birçok morfolojik ve biyokimyasal olaylar sonucu meydana gelir. EMG embriyonik gelişim, yara iyileşmesi ve tümör hücrelerinin göçünde görülen bir mekanizmadır ve tümör metastazı ile bağlantılı bir fenotipik dönüşümdür⁶.

Yapılan literatür taramasında Withaferin A'nın HSK'da periostin seviyesi ve EMG üzerine nasıl bir etkisi olduğunu araştıran bir çalışmaya rastlanmadı. Bu nedenle, planlanan tez çalışmasında Withaferin A'nın HSK'da periostin seviyesi ve EMG üzerindeki etkisinin HepG2 hepatoselüler karsinom hücre hattında hem immünohistokimyasal, hem de moleküler düzeyde incelenmesi amaçlandı.

Mevcut çalışmada, insan HSK (HepG2, ATCC ® HB-8065 TM) hücre hattında kanser hücrelerine Withaferin A uygulanacak ve Periostin (Postn geni) ve EMG ile ilişkili proteinler üzerine etkileri araştırılacaktır. Bu amaçla in-vitro olarak hücre kültürü yöntemiyle HepG2 hücre hatlarında histolojik, immünohistokimyasal ve gen ekspresyon analizi yöntemleri ile belirtilen proteinler araştırılacaktır. Elde edilen veriler HSK'nın invazyonuna ve güncel tedavi protokollerinin oluşturulmasına yönelik araştırmalara yol gösterici nitelikte olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser Nedir?

Kanser, yılda 10 milyondan fazla ölüm prevalansı ile dünyadaki ölüm nedenleri arasında ilk sıralarda gelmektedir⁷, “Asla iyileşmeyen bir yara” olarak kabul edilir ve anormal olan hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile karakterizedir. Kanserin her geçen gün insidansı artmakta ve günden güne de durumu endişe verici hale gelmektedir⁸. Kanserin habis biyolojik özelliklerinden bazıları sürekli proliferatif sinyalleme, hücre ölümüne karşı direnç, büyümenin baskılanmasından kaçınma, anjiyogenezi indükleme, replikatif ölümsüzlük, invazyon ve metastaz aktivasyonudur⁹. Günümüze kadar cerrahi, kemoterapi ve hatta yeni geliştirilen immünoterapi gibi birçok tedavi çeşidi kanser hücrelerini ortadan kaldırmak için kullanılmıştır¹⁰.

2.2. Karaciğer

Karaciğer, vücutta karın boşluğunda ve sağ üst bölümde, diyaframın alt tarafında, mide ve bağırsakların üstünde yerleşmiş, deriden sonraki en ağır ve en geniş hacimli (yaklaşık olarak 1,5 kg ağırlığında), hem endokrin hem de ekzokrin salgılama işlevleri olan organdır. Karaciğer, insan vücudundaki besin metabolizması, vitaminlerin depolanması, detoksifikasyon, protein sentezi ve safra salgılanması gibi son derece önemli işlevlerden sorumludur¹¹. Aynı zamanda glikozu da depo eder¹².

2.2.1. Karaciğerin Embriyonik Gelişimi

Karaciğerin fetal gelişimi 3. haftanın sonlarına doğru karaciğer tomurcuğu (hepatik divertikül) adı verilen endodermal epitel bir çıkıntı şeklinde başlar. Bu çıkıntı, gelişmekte olan kalp ile orta bağırsak arasındaki septum transversumu oluşturur¹³.

Septum transversum, ventral mezenteriy meydana getirir. Ventral mezenterinin iki yaprağı arasındaki hepatik divertikül büyüyerek iki kısma ayrılır. Primordium hepaticum (ilkel karaciğer), hepatik divertikülün daha büyük olan kranial kısmına, pars sistika ise

kaudal kısma denir. Karaciğer sinüzoidlerinin taslaklarını, hepatik hücre kordonları oluşturur¹⁴.

Safra kanalları hepatik divertikül ile duodenum arasındaki bağlantının daralmasıyla oluşur. Safra kanallarının iç yüzünü karaciğer kordonları karaciğer parankimine dönüşerek döşer. Hematopoietik hücreler, Kupffer hücreleri ve bağ dokusu hücreleri septum transversumdan gelişirler¹⁵. Embriyonik gelişimin 5 ile 10. haftaları arasında karın boşluğunun büyük bir kısmını karaciğer işgal eder. Başlangıçta karaciğer loblarının büyüklükleri aynı olmasına rağmen ilerleyen dönemlerde sağ lob daha büyük hal alır¹⁴. Karaciğerin hematopoietik organ olarak görev yapması embriyonun 6-22. haftaları arasındadır. Fetüsün doğumundan önceki son iki ayında karaciğerde kan yapımı iyice azalır. Karaciğerin ağırlığı, doğumda vücut ağırlığının çok küçük bir kısmını oluşturur. Karaciğerde safra üretimi 12. haftadan itibaren başlar ve karaciğerin önemli bir fonksiyonudur. Üretilen safra, koledok kanalından sistik ve hepatik kanalların bir araya gelmesiyle bağırsağa akar ve rengi koyu yeşildir¹⁶.

2.2.2. Karaciğerin Anatomisi

Karaciğer vücudun en büyük organlarından biridir. İnsanda yaklaşık 25×15 cm uzunluğunda, yaklaşık 8 cm yüksekliğinde ve ortalama 1.5 kg ağırlığındadır. Erişkinlerde vücut ağırlığının yaklaşık %2'si, çocuklarda %5'i kadardır¹⁷. Karaciğer parankimi, Glisson kapsülü adı verilen yapışkan bir bağ doku tabakası ile çevrilidir ve sinir lifleri, kan ve lenfatik damarlar bu tabakanın içerisinde bulunur¹⁸.

Karaciğer, büyük, kırmızı-kahverengi renkli bir organdır. Karaciğerin üst yüzü facies diaphragmatica ismini alır ve diyaframın şekline uyar. Alt yüzü ise facies visceralis olarak adlandırılmaktadır. Büyük bir kısmı periton ile örtülüdür ve karaciğerin alt yüzü iç organlarla komşu olan yüzüdür. Fissura ve fossaların bulundukları yer H harfine benzer ve peritonla örtülü değildir. Karaciğerin alt yüzünde, ligament teres, ligamentum

falciforme ve ligament coronarium, hilumda ise hepatik arter, portal ven ve safra kanalı bulunur¹⁶.

Karaciğer, lobus hepatis dexter, lobus hepatis sinister, lobus quadratus ve lobus caudatus şeklinde dört loba ayrılmıştır¹⁹. Karaciğerin margo posterior (arka) ve margo inferior (alt) olmak üzere iki kenarı vardır. Karaciğer karın duvarına, mide, duodenum ve diyafram gibi çevre dokulara, periton katlantıları içinde bulunan bağ dokusu bantları ile yapışır. Bu bantların karaciğeri yerinde sabitlemek, karaciğerdeki kan ve lenf damarları ile sinir pleksuslarını taşımak gibi görevleri vardır²⁰.

2.2.3. Karaciğerin Histolojisi

Yaklaşık 1,5 kg ağırlığına sahip olan karaciğer, insan vücudunda bulunan en büyük bezidir ve diyaframın alt tarafına yerleşmiştir²¹. Karaciğeri dıştan saran Glisson kapsülü, kollajen ve elastik liflerden zengin bağ dokusundan yapılmıştır. Karaciğer parankimasına doğru bu kapsülden uzanan dallar organı lop ve lopçuklara (lobüllere) ayırır. Histolojik kesitlerde lopçuklar, düzensiz altıgenler şeklinde gözlenir. Karaciğerde fonksiyon gören yapısal birim karaciğer lopçuğu (hepatik lopçuk) dur²¹. Karaciğer lobülleri hepatosit plaklarından oluşur. Sinüzoid boşlukları ile çevrilidir ve birbirleriyle anastomoz yapar. Yatay kesitlerde altıgen şeklinde görülür. Santral ven (v. centralis) merkezdedir ve bağ dokusu ile sarıdır. Vena sentralis, sinüzoidlerdeki kanı toplar. Bu kan birbirleriyle karışmış olarak hepatik arterin ve portal venin birleşen dallarından gelir. Karaciğerin parankim hücreleri poligonal şekilli hücrelerdir ve santral venden periferine doğru ışınsal tarzda kordonlar oluşturur²⁰. A. Hepatika ve V. porta ile karaciğere gelen kan sinüzoidlere oradan da V. Sentralis'e taşınır. V. Sentralis'ler birleşerek V. Sublobularis'leri, bunlarda birleşerek V. Hepatika'ları oluştururlar. Daha sonra bu venler de V. cava caudalis'e açılarak karaciğerdeki kanı buraya taşırlar²².

Karaciğer histolojik olarak; parankim, bağ dokusu, sinüzoidler ve Disse aralığından oluşmaktadır. Karaciğer parankiması hepatosit adı verilen fonksiyonel hücrelerden oluşmaktadır¹².

2.2.3.1. Hepatositler

Bu hücreler 20-30 µm çapında, polihedral yani altı ya da daha fazla yüzeylidir, eozinofilik boyanırlar ve çok sayıda mitokondri ve daha az olarak da endoplazmik retikuluma sahiptirler. İki hepatositin birbiriyle temas ettiği yerde hücreler arasında bulunan tübüler bir aralık safra kanalikülü olarak adlandırılır. Hepatositler arasındaki “Gap Junction”lar hücrelerin fizyolojik aktivitelerinin birbirleriyle olan iletişimde önemli rol oynarlar²³.

Hepatositlerde bol miktarda granüllü ve granülsüz endoplazmik retikulum bulunur. Albumin ve fibrinojen gibi proteinlerin sentezi ve vücuttaki toksik maddelerin detoksifikasyonu gibi metabolik olaylar karaciğer hücrelerinde gerçekleştirilir²⁴.

Hepatositler santral ven periferine doğru ışımsal bir biçimde bir ya da ikişer hücre olarak kordonları oluştururlar. Hepatositlerin içerdiği çekirdek çoğunlukla çift veya daha fazla sayıdadır. Karaciğer hücresinin, komşu hepatosit ile sıkı temas halinde olan yüzü, komşu hepatosit ile arasında safra kanalikülüni oluşturan yüzü ve perisinüzoidal aralığa bakan yüzü olmak üzere üç tip yüzü vardır. Perisinüzoidal aralığa bakan yüzünde düzensiz şekil ve boyutlarda mikrovillus denen yapılar vardır ki bunlar hücre yüzeyini 6 kat genişleterek hücrelerin absorpsiyon ve sekresyon kabiliyetini artırır²⁵.

2.2.3.2. Endotel Hücreleri

Karaciğer bu hücreler açısından zengindir. Sinüzoidlerde arteryel kanla birlikte venöz kan da bulunur. Endotel hücreleri, V. porta ile karaciğere bağırsaklardan gelen çeşitli kimyasal maddelerin ve mikroorganizmaların filtrasyonunda görev alırlar²⁶.

2.2.3.3. Kupffer Hücreleri

Kupffer hücreleri, karaciğerdeki makrofajlardır ve doğuştan gelen bağışıklık tepkisinde kritik rol oynarlar. Kupffer hücrelerinin hepatik sinüzoiddeki lokalizasyonları, portal veya arteriyel dolaşımdan giren patojenleri verimli bir şekilde fagosite etmelerine izin verir. Ayrıca portal dolaşım yoluyla gastrointestinal sistemden geçen partiküllere ve immünoreaktif maddelere karşı ilk savunma hattı görevi görürler²⁷.

2.2.3.4. Stellat Hücreleri (İto Hücreleri)

Karaciğerde A vitamininin metabolizmasında rol oynayarak retinolün vücuttaki toplamının %80'inin depolanmasında rol oynar. Bu hücreler yıldız şeklindedir ve birincil olarak immünolojik olmayan çok sayıda fonksiyona aracılık eder. Aktivasyon üzerine, bu hücreler, miyofibroblastlara farklılaşır ve hücre dışı matriks üretiminde rol oynayarak karaciğer fibrozuna yol açar. Ayrıca, aktive olan bu hücreler, portal hipertansiyonda yer alan vazokonstriksiyon yoluyla karaciğer kan akışını düzenler²⁸.

2.2.3.5. Disse Aralığı

Hepatositler ile sinüzoidler arasında bulunan bir aralıktır. Burada yoğun madde geçişi gerçekleşmektedir. Bu alanda, hücrelerarası matriks, kollajen ve retiküler lifler bulunmaktadır. Ayrıca, ito hücreleri de burada bulunur ve bu hücreler yağ depo ederler. Ayrıca ito hücreleri A vitaminini de depolarlar. İto hücreleri düşük miktarlarda tip-I, tip-III ve yüksek miktarda tip-IV kollajen salgırlar²⁹.

Karaciğerin fonksiyonel birimleri lobüllerdir. Karaciğer lobülleri 3 tanedir:

1. Klasik Karaciğer Lobülü: Altıgen şeklindedir, ortasında santral ven ve köşelerinde portal ven olan lobüldür. Hepatik kordonlar olarakta adlandırılan karaciğer kordonları vardır. Bunlar birbirleriyle anastomozlaşırlar ve santral venden başlayarak tek sıra halinde diziler oluştururlar. Lobülün köşelerinde portal alanlar (portal triad) bulunur.

Portal alanda hepatik arterin dalı, portal venin dalı, bir safra kanalı, lenf damarları ve sinirler yer alır.

2. Portal Lobül: Üçgen şeklindedir. Ortasında portal alanın bulunduğu ve üç komşu santral venin birleşmesiyle oluşur. Bu alandaki hepatositler, sentezleyip salgıladıkları safrayı kanalikülleri aracılığıyla ortak portal alandaki safra kanalına boşaltırlar.

3. Karaciğer Asinusu: Karşılıklı iki portal alan ile iki santral venin eşkenar dörtgen şeklinde birleşmesiyle oluşur. Asinus üç zondan oluşmaktadır; birinci zon iki portal alan arasındaki bölgeye yakın alan, 3. zon santral ven etrafındaki bölümdür ve 2. zon ise bu iki alan arasında kalan bölümdür. Her zon farklı hücrelere ve aktiviteye sahiptir. Bu nedenle organel dağılımı da birbirinden farklıdır. Aynı zamanda zararlı etmenlerden de farklı oranda etkilenirler³⁰.

Karaciğer epitel hücresi karaciğer ağırlığının yaklaşık %80'ini oluşturur. Karaciğer kütlesinin artmasında endotel hücreleri, safra kanalını döşeyen epitel hücreleri, karaciğerdeki makrofajlar olan kupffer hücreleri, ito hücreleri, arter ve venlerin de etkisi vardır. Karaciğerde enfeksiyon oluşması durumunda lenfositler ve granülositler karaciğere giderek enfeksiyonun ortadan kalkmasında yardımcı olurlar³¹.

2.2.3.6. Karaciğerin Görevleri

Karaciğer, hem endokrin ve hem ekzokrin bir bez olarak görev yapması nedeniyle çok yönlü bir organdır. Protein sentezlemesi, lenf yapımında rol oynaması, A vitamininin üretimi, detoksifikasyon, safranin salgılanması, A, D, E, K, B 12 vitaminlerinin depolanması, insülinin kontrolünde glikozu glikojene çevirerek depolayabilmesi ve kana vermesi, kan pıhtılaşmasında rol oynayan proteinlerin üretilmesi gibi çok önemli fonksiyonları vardır²⁴.

Sindirim kanalından emilen besinler de burada işlenir ve depolanır. İnce bağırsaklardan emilen maddelerin çoğu karaciğere portal ven yoluyla ulaşırken, kompleks lipidler lenf damarlarıyla organa taşınır³².

Karaciğer sessiz bir organ olarak adlandırılır; semptomlar bir hastalık iyice ilerleyene kadar ortaya çıkmaz. Karaciğerin metastatik olmayan tümör vakalarının ~%90'ını Hepatoselüler kanser (HSK) oluşturur³³.

2.3. Hepatoselüler Kanser

Hepatoselüler kanser (HSK), küresel olarak kanserle ilişkili ölümlerin en yaygın üçüncü malignitesidir³⁴. HSK tedavisi, 1 ve 3 yıllık sağkalım için sırasıyla % 20 ve % 5 düşük sağkalım oranları ile bir sorun olmaya devam etmektedir². Kronik hepatit B, hepatit C viral enfeksiyonları ve alkolsüz steatohepatit HSK'nın alkolik karaciğer hastalığının etiyolojik faktörleri arasında yer alır³⁵. Hepatoselüler kanser; karın sağ üst kadranda ağrısı, erken doyma ve kilo kaybı gibi tipik klinik belirtiler gösterir¹. Kür için tek fırsat cerrahi rezeksiyon veya karaciğer transplantasyonudur ama bu prosedürler hastaların çoğu için uygun değildir³⁶. Diğer kanserlerde olduğu gibi hepatoselüler karsinomunda erken evrede tespit edilmesi çok önemlidir. Hepatoselüler karsinom erken evrede tespit edilip tedavi edilirse, hastaların yaşam konforu ve hayatta kalma şansı artar. Tedaviler cerrahi, kemoterapi, radyasyon tedavisi ve hedefe yönelik tedavinin bir kombinasyonunu içerebilir. Hepatoselüler kanser dünyada önemi giderek artan; psikolojik, sosyal ve ekonomik yönden insanları etkileyen önemli bir sağlık sorunudur³⁷. Hepatoselüler kanserde erken tanı ve tedavi son derece önemlidir. Erken tanı, tedaviyi kolaylaştırır, maliyeti azaltır, hastanın kanser ilaçlarına verdiği cevabın artmasında yardımcı olur, doku ve organ kayıplarını önler. Son zamanlarda, faz III çalışmalarındaki pozitif sonuçlara dayalı olarak HSK için şu basamaklardaki tedaviler onaylanmıştır: birinci basamakta

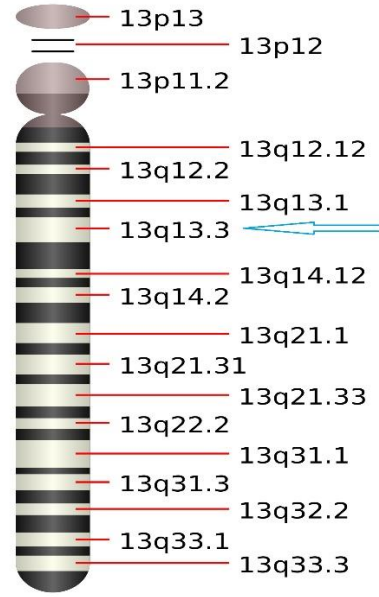
sorafenib ve lenvatinib, ikinci basmakta regorafenib, kabozantinib ve ramucirumab vardır^{11, 15}.

Hepatoselüler kanser için birçok tedavi çeşidi uygulanmakta fakat sonuca bir türlü varılamamaktadır. Bu yüzden son zamanlardaki çalışmalar HSK'nın altında yatan moleküler mekanizmaları çözmeye yöneliktir ve ilgi daha çok RNA üzerine yoğunlaşmıştır. HSK'nın gen ekspresyon paternleri iki alt sınıfa ayrılır; bunlardan biri tümörlerin %50'sini temsil eden proliferatif HSK'lar ve diğeri ise proliferatif olmayan HSK'lardır. Proliferatif HSK'lar, TGF- β , MET, AKT ve/veya IGF2 yolunu aktive ederek spesifik özellikler sergileyebilir. Proliferatif olmayan HSK'lar iyi prognozludur, iyi farklılaşmıştır, daha az agresiftir ve daha düşük serum a-fetoprotein (AFP) seviyeleri, TP53 mutasyonları gösterebilir³⁸. Anormal sinyal aktivasyonu, kanser kök hücre (KKH) özelliklerinin korunmasında yer alır. AKT sinyalinin aktivasyonu, HSK başlangıcında yer alır ve anormal AKT aktivasyonu, kanser kök hücre özelliklerine katkıda bulunur³⁹.

Günümüzde kanser hastalarının iyileştirilmesi amacıyla kullanılan birçok tedavi yöntemi vardır fakat gerek iyileşmenin uzun zaman alması gerekse maddi yönden pahalı olması nedeniyle yeni tedavi protokollerinin araştırılmasını gerekli kılmaktadır.

2.4. Periostin

Matriselüler protein ailesinin bir üyesi olan periostin, insanlarda 13. kromozomun 13q13.3 bölgesinde bulunan Postn geni tarafından kodlanır (Şekil 2.1)⁴⁰. Matriselüler proteinler, hem kollajen I, fibronektin ve tenazin C gibi diğer ekstraselüler matrikse (ECM) hem de hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanma kabiliyeti olan proteinlerdir⁴. Postn geni inflamatuvar yanıtları, hücre kaderi belirleme ve proliferasyonunu, tümör oluşumunu ve hatta ECM'nin yeniden şekillenmesini modüle edebildiği karaciğerde çok önemli bir rol oynar⁴¹.



Şekil 2. 1. 13.kromozom ve Postn geni (Mavi okla gösterilmiştir).

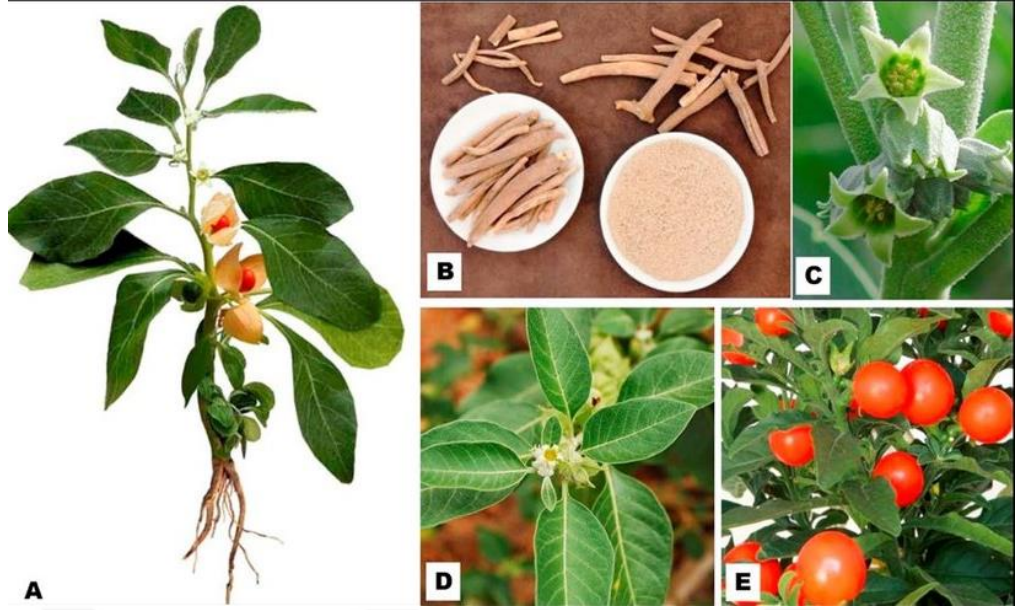
Periostin (Postn), Hepatoselüler kanser (HSK)'nın pulmoner metastazında ve anjiyogenezinde rol oynayan çok önemli bir gendir; karaciğer kanseri hastalarının %60'ında yüksek oranda eksprese edilir ve yüksek ekspresyonu kötü prognozu gösterir⁴². Postn geni ekspresyonu, kolon kanseri, pankreas kanseri, melanom ve meme kanseri dahil olmak üzere en yaygın tümörlerde yukarı regüle edilir ve özellikle tümörlerin metastazında ve gelişiminde önemli bir rol oynar⁴³. Periostin, büyüme, invazyon ve metastaz gibi tümörün progresyonunu gösteren olaylarda hayati bir rol oynayarak, tümör invazyonu ve metastazını teşvik etmektedir⁴⁴.

Postn geni, yara iyileşmesi ve miyokard enfarktüsünü takiben ventriküler yeniden modelleme de dahil olmak üzere doku gelişimi ve rejenerasyonunda işlev gören, hücre dışı bir matriks proteinini kodlar. Kodlanmış protein, epitel hücrelerinin yapışmasını ve göçünü desteklemek için integrinlere bağlanır. Bu protein kanser kök hücre bakımında ve metastazında rol oynar⁴⁵. Periostin, epitelyal hücrelerin yapışmasını ve göçünü desteklemek için alfa-V / beta-3 ve alfa-V / beta-5 integrinleri için bir ligand olarak işlev görür⁴⁶. Periostin başlangıçta bir fare osteoblast hücre hattında osteoblast spesifik faktör

2 olarak tanımlanmış olup periosteumda ve periodontal ligamentte eksprese edilmiştir ve periostin adını almıştır⁴⁷. Matriselüler proteinlerin ekspresyonu, dönüştürücü büyüme faktörü (TGF- β), interlökin-4 (IL-4) ve IL-13 dahil olmak üzere çeşitli sitokinler tarafından indüklenebilir. Periostin, anti-IL-13 tedavilerine yanıt veren hastaları tanımlayabilen en iyi kan biyobelirteçdir⁴. Periostin, ekstraselüler matriksin dikkate değer bir ana düzenleyicisidir. Periostin, son zamanlarda keşfedilen bir serum tümör biyo göstergesi olarak sadece malign hastalığın tanısında umut verici bir rol oynamamaktadır, aynı zamanda, özofagus yassı epitel hücreli karsinom, küçük hücreli akciğer kanseri, meme kanseri ve hepatoselüler karsinom gibi çok sayıda tümör için önemli prognostik değere de sahiptir⁴⁸. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, periostinin birçok kanser türünde metastatik potansiyel ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar, tümör dokularında periostinin aşırı ekspresyonunun, kolon, baş ve boyun, oral, nazofaringeal, tiroid, meme ve pankreas kanserleri de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde anjiyogenezi ve invazyonu artırabileceğini göstermektedir. Ayrıca epitelyal-mezenkimal geçişi de artırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur.

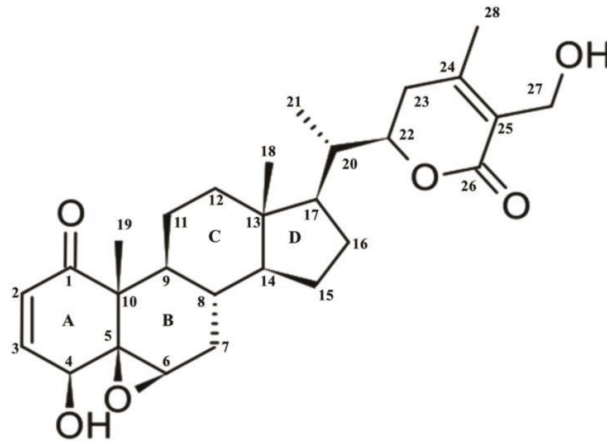
2.5. Withaferin A

Withania somnifera (yaygın adıyla Ashwagandha ya da Hint kış kirazı olarak da bilinir), geniş spektrumlu farmakolojik etkinlik gösteren bir bitkidir ve başarılı bir şekilde çeşitli hastalıkların tedavisi için Ayurvedik tıp pratiğinde kullanılmıştır (Şekil 2.2)⁴⁹. Bilinen 23 *Withania* türü olmasına rağmen, sadece *W. somnifera* ve *W. coagulans*'ın (*Rishyagandha*) antikanser aktivitesine, terapötik olarak etkili olduğuna inanılmaktadır⁵⁰.



Şekil 2. 2. *Withania somnifera* bitkisi A) bitki B) kök ve kök tozu C) çiçekler D) yapraklar E) meyveler

Withania somnifera'dan ekstrakte edilen ve yapısında bir doymamış keton halkası, 2 hidroksil grubu, bir epoksit halkası, bir 6-karbon lakton halkası ve bir doymamış karbonil grubu olarak beş fonksiyonel grup barındıran doğal olarak oluşan 28-karbon içeren bileşiklerin büyük bir grubu olan ilk antikanser vitanoliddir (Şekil 2.3). Vitanolidlerin kimyasal yapısı, bir lakton halkasına bağlı steroidal bir çerçeveden oluşur ve bazen 'steroidal-laktonlar' olarak da adlandırılır (Şekil 2.3)⁵¹.

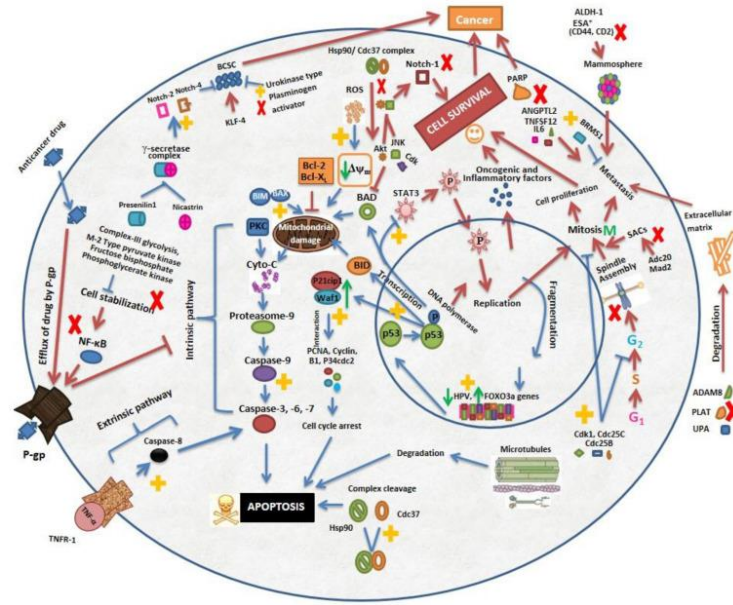


Şekil 2. 3. Withaferin A'nın yapısı

Withania somnifera'dan ekstrakte edilen Withaferin-A ilk antikanser vitanoliddir. Withaferin-A'nın antikanser etkilerinin mekanik temeli (Şekil 2.4)⁵⁰ aşğıdaki şekilde sıralanabilir:

- (1) hücrese antioksidan ve / veya detoksifikasyon sisteminin güçlendirilmesi,
- (2) enflamatuar yolların baskılanması
- (3) tümör hücresi proliferasyonunun seçici olarak inhibisyonu ve apoptozun indüksiyonu
- (4) tümör anjiyogenezinin baskılanması
- (5) epitelyal-mezenkimal geçişin (EMG), tümör invazyonunun ve metastazının bloke edilmesi
- (6) tümör hücresi metabolizmasının değıştirilmesi
- (7) immünomodülasyon
- (8) kanser kök hücrelerinin yok edilmesi

Bunlara ek olarak Akt ve NF-κB sinyal yollarının inhibisyonu yoluyla güçlü anti-enflamatuar özelliklere sahiptir⁵. Ayrıca yapılan çalışmalar withaferin-A'nın büyük ölçüde güçlü anti-oksidatif, anti-proliferatif ve apoptoz-indükleme özellikleri nedeniyle deneysel olarak indüklenen karsinogenezi baskıladığını ortaya koymuştur⁵².



Şekil 2. 4. Withaferin A'nın antikanser aktivite mekanizmasının özetlenmiş ve şematik gösterimi

2.6. Sinyal Yolakları

Kanserin oluşmasında birçok gen tanımlanmıştır ve bu genlere de işaret edildiği gibi çeşitli mekanizmaların sebep olduğu ve onkoproteinlerin büyük çoğunluğunun sinyal yolaklarıyla aktive edildiği görülmüştür⁵³.

Yetişkinlerde hasarlı karaciğeri yeniden inşa etmek için fetal gelişim sırasında karaciğer organogenezi düzenleyen birkaç sinyal yolu gereklidir. Bunlardan bazıları; Wnt, PI3K/AKT, Notch, TGF- β ve sonik kirpi (Shh) dir⁵⁴.

2.6.1. Epitelyal Mezenkimal Geçiş

Epitelyal mezenkimal geçiş, farklılaşmanın tamamlanma şekline bağlı olarak, epitelyal hücrelerin geçici ve geri dönüşümlü şekilde farklılaşmasını sağlayan mezenkimal benzeri veya mezenkimal bir fenotipe yönlendiren mekanizmadır³. Epitelden mezenkimal geçiş nöral krest oluşumu, kalp gelişimi veya gastrulasyon gibi embriyonal süreçlerin oluşmasına da katkıda bulunur⁵⁵.

Epitelden mezenkimal geçiş kanser hücresi metastazında da yer alır. Epitelden mezenkimal geçiş süreci embriyonik morfogenez, yara iyileşmesi, kanser

hücrelerinin metastazı ve doku fibrozunda önemlidir. Epitelden mezenkimal geçiş epitel hücrelerinin mezenkimal kök hücrelerin fenotipini edindiği bir süreçtir. Bu süreç, embriyonik evrim, doku fibrozu, doku oluşumu ve yara iyileşmesi dahil birçok temel süreçte yer alır. Ayrıca EMG, tümörlerin proliferasyonunda, ilaç direncinde ve tümör hücresi büyümesinde etkili olabilir⁵⁶.

Epitelden mezenkimal geçişin temel özelliklerinden bazıları, hücre hareketliliğinin arttırılması, hücreler arası temasların bozulması ve böylece hücrelerin ana epitel dokusundan salınmasına yol açmasıdır⁵⁷. Epitelyal mezenkimal geçiş, epitel hücrelerinin polaritelerini ve yapışma özelliklerini kaybetmelerine neden olur. Epitelden mezenkimal geçiş sırasında hücreler apikal-bazal polaritelerini, bazal ankrajlarını ve adezyon özelliklerini kaybederek göçmen ve istilacı özellik kazanırlar. Epitelden mezenkimal geçiş embriyonik gelişim boyunca, yara iyileşmesi sırasında ve tümörün ilerlemesi dahil olmak üzere çeşitli patolojik süreçlerde ortaya çıkar⁵⁸.

Epitelden mezenkimal geçiş düzenleyici mekanizmalara, biyolojik ortama ve ilgili fonksiyonlara göre 3 tipe ayrılabilir; Tip I embriyogenez, organların gelişimi ve implantasyon ile ilgilidir; dönüştürülmüş mezenkimal hücreler yeni epitel dokuları oluşturabilir. Tip II, doku rejenerasyonu, doku rekonstrüksiyonu, organ fibrozu ve yara iyileşmesi ile ilgilidir. Bu tip, inflamatuvar stimülasyon ile başlatılabilir ve stimülasyon kaybolduğunda sona erer; kalıcı stimülasyon organ fibrozisine ve doku rekonstrüksiyonuna yol açabilir. Tip III, kanserin gelişmesinde ve metastazında önemli bir rol oynar ve epitel hücrelerinin mezenkimal hücrelere dönüşümünü indükleyebilir⁵⁹.

Birçok sinyal iletim yolunun epitelyal mezenkimal geçişi düzenlediği bilinmektedir. Bu yolların arasında, Akt onkogenik aktivasyon merkezi bir özellik olarak ortaya çıkmıştır⁶⁰ ve Akt'nin anormal ekspresyonu birçok kanser tipinde belgelenmiştir. Bir dizi çalışma, Akt sinyallemesinin farklı insan metastatik kanser

türlerine karışmasını ve kemorezistanstaki potansiyel rolünü rapor etmiştir. Birkaç klinik öncesi çalışma, Akt'nin inhibisyonunun hücre proliferasyonunu, göçünü ve EMG'yi azalttığını göstermiştir, Epitelden mezenkimal geçiş PI3K/Akt, MAPK ve TGF- β vb. dahil olmak üzere yukarı akış yolları tarafından düzenlenir. Yeni çıkan kanıtlar, EMG'nin kanser kemorezistansına karıştığını ve EMG'nin inhibe edilmesinin bu direnci tersine çevirebileceğini düşündürmektedir⁶¹.

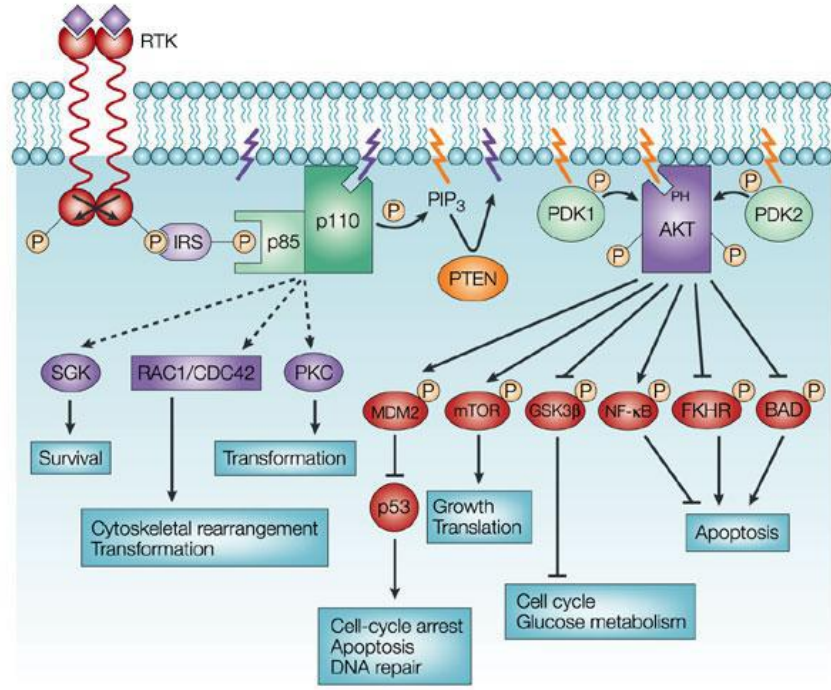
2.6.2. Akt Sinyal Yolağı

Serin/treonin kinaz Akt (protein kinaz B veya PKB), bir proto-onkogen olarak keşfedilmiştir. Büyüme, hayatta kalma, metabolizma, transkripsiyon, çoğalma ve protein sentezi gibi hücrel olaylarda kritik rol oynar. Akt aynı zamanda apoptozu etkileyen yolları da aktive etmektedir^{62,63}.

Akt (~60 kDa), %68 oranında protein kinaz A (PKA) ile ve %73 oranında protein kinaz C (PKC)'ye sahiptir; bundan dolayı Akt' ye, PKA ve PKC ile ilişkili kinaz da denir. PKB, Akt olarak da bilinen retrovirüs Akt-8'i kodlayan onkogen v-akt'ın bir ürünüdür. PKBa (Akt1), PKB β (Akt2) ve PKB γ (Akt3) olmak üzere üç alt tipi vardır. Akt1, çeşitli dokularda yaygın olarak, Akt2 esas olarak insüline duyarlı dokularda ifade edilirken, Akt3 beyin, kalp, akciğer, böbrek, testis ve iskelet kasına özgüdür.

Üç Akt izoformu, N-terminal düzenleyici bölge, kinaz katalitik alan ve C-terminal düzenleyici alan dahil olmak üzere homolog amino asit dizilerini paylaşır. N-terminal düzenleyici bölge aynı zamanda Akt homoloji alanları/pleckstrin homoloji alanları (PHD) alanı olarak da adlandırılır. Kinaz katalitik alanı, PKA ve PKC'deki enzimatik olarak aktif bölgelere oldukça homologdur ve bunun Thr308 bölgesi, Akt aktivasyonu için gereklidir. Akt'nin tam aktivasyonu için C-terminal düzenleyici alanın Ser473 bölgesi önemlidir^{64,65}.

Akt, apoptoz, transkripsiyon, hücre göçü, hücre proliferasyonu ve glikoz metabolizması dahil olmak üzere çok sayıda hücresel süreçte anahtar rol oynayan PI3K yolunun merkezi aracısıdır⁶⁴. PI3K yolağı özellikle glukoz taşınması ve kullanımında, protein biyosentezinde, hücre büyümesinin düzenlenmesi ve apoptozu önlenmesinde önemli rol oynamaktadır⁶⁶. PI3K, PI3K sinyal sisteminde ilk moleküldür⁶⁷. Gerçek PI3K yolağı PDK1 ve Akt boyunca ilerler. PDK1' in fosforilasyon ile Akt aktive olur⁵⁴. Reseptör Tirozin Kinaz (RTK=Protein Tirozin Kinaz)'lar, hücre membranında bulunan reseptörlerdir. Bunların uyarılmasıyla hücre zarında fosfolipidlerin fosforilasyonu gerçekleşir. Açığa çıkan fosfor plazma zarında oluşan PIP3' ün yapısına katılır. Akt sinyal zinciri fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) tarafından aktive edilir^{68,69}. PI3K, tirozin kinaz tarafından aktive edilerek PIP3 (Fosfotidil inozitol trifosfat)' ü plazma zarında oluşturur. Diğer tarafta PTEN (İnsan 10. Kromozomda bulunan fosfataz ve tensin homoloğu gen, tümör baskılayıcı protein) fosfataz aktivitesiyle PI3K/Akt yolağına müdahale eder⁷⁰. Daha sonra PIP3, Akt'ın PH alanı ile etkileşime girerek Akt'ın zarda toplanmasına neden olur. Akt'ın Thr308'i fosforile edilerek 3-fosfoinositide bağımlı protein kinaz 1 (PDK1) yardımıyla, Akt'ın aktivasyonunu sağlar (Şekil 2.5)⁵⁹.



Nature Reviews | Cancer

Şekil 2. 5. PI3K/Akt yolunun işlevleri

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Etik Kurul Onayı

Planlanan tez çalışması Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalımız hücre kültürü laboratuvarında in vitro olarak gerçekleştirildi. Çalışmanın yapılabilmesi için gerekli izin Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Kurulunun B.30.2.ATA.0.01.00/148 sayılı etik kurul kararıyla alındı.

3.2. Malzemeler ve Ekipmanlar

3.2.1. Kimyasal Malzemeler

- 1) FBS- Sa-Sourced 500 ML HYCLONE®
- 2) Dulbeccos Modified Eagles Medium - High 500 ML SIGMA®
- 3) L-Glutamine 200 mm Sterile Filtered 100 ML SIGMA®
- 4) MTT, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, 1 gr, G ACROS®
- 5) Hank's Balanced Salt solution (HBSS) BIOWEST®
- 6) Trypsin-Edta Solution % 25'lik SIGMA®
- 7) Antibiotic Antimycotic Solution (100×), 100 ml EUROCLONE®
- 8) 125 ml Antibody diluent ABCAM®
- 9) HRP/DAB IHC Detection (Mouse and Rabbit Specific) Kit 150 test ABCAM®
- 10) Dimethyl Sulfoxide 99.9% For Analysis Acs ISOLAB®
- 11) DPBS THERMO®
- 12) Etil alkol MERCK®
- 13) PAP Pen COSMO BIO®

3.2.2 Cam ve Plastik Malzemeler

- 1) Tube, 15 ml, pp, 17/120 mm, conical bottom, cellstar®, blu greiner
- 2) Tube, 50 ml, pp, 30/115 mm, conical bottom, cellstar® pk\50 greiner

- 3) Plate (6 wells) CORNING® COSTAR®
- 4) Plate (24 wells) CORNING® COSTAR®
- 5) Plate (96 wells) CORNING® COSTAR®
- 6) T25 Flask CORNING® COSTAR®
- 7) T75 Flask CORNING® COSTAR®
- 8) 2 ml Cryo tüp vidalı ayaklı BIOSİGMA
- 9) Cover Glass (yuvarlak lamel, 10 mm) SUPERIOR®
- 10) Pipet ucu 10 ul /20 ul eppendorf uzun 1000 µl'lik ISOLAB
- 11) Pipet ucu - şeffaf - 1000 ul'lik ISOLAB
- 12) Pipet ucu - şeffaf - 200 ul'lik ISOLAB
- 13) Petri Kutusu 100x20 mm ISOLAB

3.2.3. PCR Kitleri

- 1) RNA izolation kit 50 reactions ECO-TECH®
- 2) High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (200 reaction) THERMO®
- 3) Quantitect Sybr Green PCR Kit (200) QIAGEN®
- 4) Master Mix QIAGEN®
- 5) Periostin (Postn) THERMO®
- 6) Akt1 THERMO®
- 7) p-Akt1 THERMO®
- 8) GAPDH primer prob (Housekeeping gene) THERMO®

3.2.4. Antikorlar

- 1) Periostin (Postn) ABCAM®
- 2) Akt1 ABCAM®
- 3) p-Akt1 CELL SIGNALING TECHNOLOGY®

3.2.5. Hücre Hattı

1) HCC (HepG2, Human liver cancer cells, ATCC ® HB-8065 TM)

3.2.6. Withaferin A

1) 5 µg APOLLO SCIENTIFIC®

3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları İle İnsan HCC (HepG2, ATCC ® HB-8065 TM) Hücre Hattındaki Hücrelerin Pasajlanarak Çoğaltılması, Dondurulması, Hücre Canlılığı Testi ve Yara İyileşme Modelinin Oluşturulması

3.3.1. Medyum Hazırlama

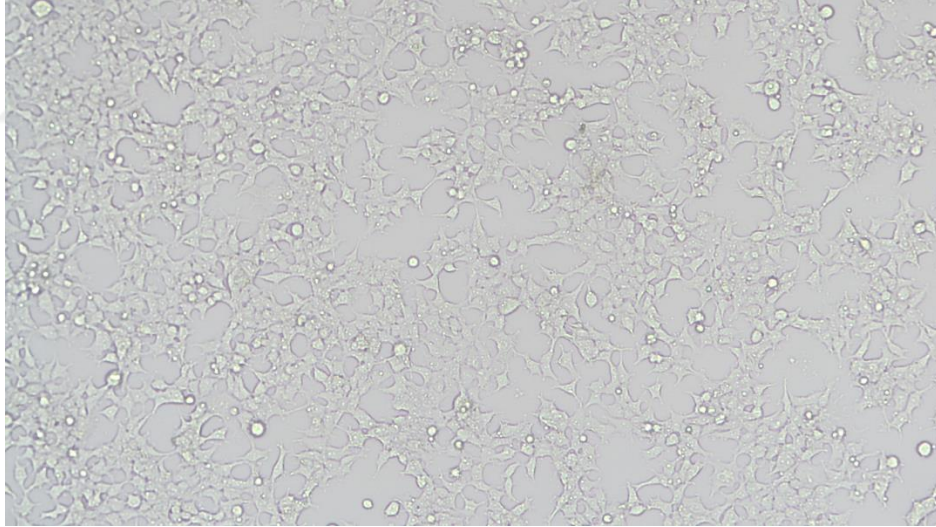
Çalışmada kullanılacak hücre çözündürülmeden önce 89 ml medyuma (DMEM), 10 ml Fetal Bovine Serum, 1 ml Penisilin/Streptomisin Anfoterisin B ve 10 µl L-Glutamin katılıp toplamda 100 ml olacak şekilde hazırlandı ve çözündürülen hücrenin ekiminde kullanıldı.

3.3.2. Hücrenin Çözündürülmesi, Ekim Yapılması ve Hücrelerin Kaldırılması

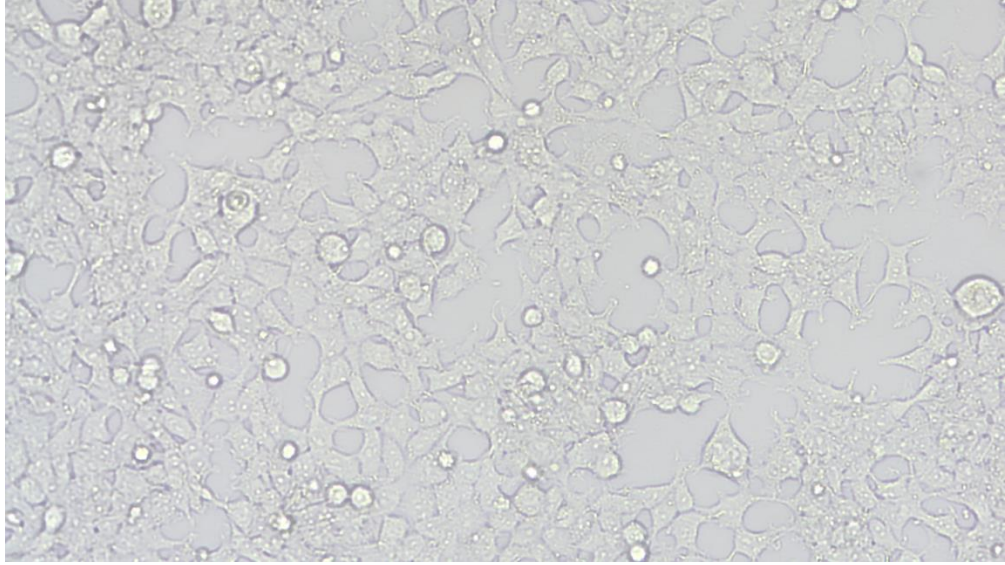
Yukarıda tarif edildiği şekilde hazırlanan medyum bir falkon tüpüne alındı. Falkon tüpü üzerine medyum türü, tarih ve ne kadar FBS konulduğu yazıldı. Başka bir falkon tüpüne hazırlanan besiyerinden 9 ml konuldu. Sıvı nitrojen içinde (-196°C) bulunan HepG2 hücreleri sıvı nitrojen tankından çıkarıldı. 37°C' deki su banyosu içinde çözündürülen hücreler içinde besiyeri konulan falkon tüpüne konuldu. Tüp 125 g'de 5 dk santrifüj edildi. Hücrelerin üzerindeki süpernatant atıldı ve üzerine 5 ml besiyeri eklendi. Ardından flaska ekim yapıldı. Flask üzerine hücre adı, medyum türü, tarih ve pasaj no yazılarak 37°C %5 CO₂'li inkübatörde bekletildi. 1 gün sonra hücreler invert mikroskopta kontrol edildi (Şekil 3.1-2). Ertesi gün flaskın üst kısmı (yapışmayan hücreler) alındı ve üzerine hücre adı, üst faz ve tarihin yazıldığı başka bir flaska aktarıldı ve 4 ml besiyeri konularak 37°C %5 CO₂'li inkübatöre konuldu. Yapışan hücrelerin bulunduğu flask içerisine 5 ml yeni besiyeri konuldu ve 37 °C %5 CO₂'li inkübatöre konuldu. Her 2 günde bir kontrol edilerek besiyeri değiştirildi ve yeterli konfluent olduğunda pasajlama işlemi gerçekleştirildi.

3.3.3. Hücrelerin Pasajlanması

Flask içerisindeki hücreler yaklaşık %80 konfluente ulaştığı zaman pasajlama yapıldı. Flask içerisindeki sıvı kısım alındı ve 500 µl tripsin (% 0.25 lik) eklenerek 2 dk 37°C %5 CO₂'li inkübatörde bekletildi. Süre sonunda, hücreler kalkmamışsa flask içerisine 500 µl tripsin (%0.25 lik) daha eklendi ve 2 dk 37°C %5 CO₂'li inkübatörde bekletildi. Daha sonra mikroskopta hücreler incelendi, hücrelerin yapıştıkları flaskın taban yüzeyinden kalktıklarına kanaat getirildiğinde flask içerisinde pipetaj yapıldı ve tripsini inaktive etmek için 5 ml besiyeri konarak bir tüpe alındı. 125 g'de 5 dk santrifüj edildi. Yeni bir flask üzerine hücre adı, besiyeri türü, tarih ve pasaj no yazıldı. Çöktürülen hücrelerin bulunduğu tüpün üst kısmı atıldı, 5 ml besiyeri konularak pipetaj yapıldı ve flask içerisine ekim yapılarak 37°C %5 CO₂'li inkübatöre konuldu. Her 2 günde bir inkübatörde bekletilen flasklardaki hücreler kontrol edildi ve besiyerleri değiştirildi. Hücreler yaklaşık %80 konfluent oldukları zaman hücreleri kaldırma ve pasajlama işlemleri tekrarlanarak hücreler çoğaltıldı.



Şekil 3. 1. HepG2 hücrelerinin 10X görünümü



Şekil 3. 2. HepG2 hücrelerinin 20X görünümü

3.3.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Hücrelerin bir kısmı aşağıda tarif edildiği şekilde dondurularak saklandı. Pasajlama işleminden sonra hücreler konfluent oluncaya kadar bekletildi ve hücreler flaskı tamamen doldurduktan sonra 1 ml Tripsin konuldu. 1 dk 37°C %5 CO₂'li inkübatörde bekletildi. Süre sonunda yapışan hücrelerin flask tabanından ayrıldığı kontrol edildi. Ayrılan hücreler üzerine 4 ml medyum eklenerek 15'lik falkon tüpüne aktarıldı. 125 g'de 5 dk santrifüj edildi. Süre sonunda üzerindeki süpernatant atıldı. Tüp dibinde kalan pellet üzerine dondurulacak her tüp için 1 ml medyuma %10 oranında DMSO konularak Cryo tüplere paylaştırıldı. Tüpler 2 saat -20°C'ye, sonrasında 1 gece -80°C'ye konuldu. Daha uzun süre bekletilecek olanlar ise sıvı azot tankına yerleştirildi.

3.3.5. Hücre Sayılarının Hesaplanması

1 ml kültür medyumunda sulandırılan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak ependorf tüpe konuldu ve üzerine 90 µl tripan blue boyası eklenerek karıştırıldı. Karışımdan 1 µl alınarak Thoma lamı üzerine yerleştirildi ve cam üzerindeki 16'lık bölmelerde sayıldı. Bunun sonucunda 1 ml medyumda 7×10^5 hücre olduğu saptandı. Hücre yoğunluğu fazla olduğundan 96'lık plate için her bir kuyucuğa 5×10^4 hücre ekimi gerçekleştirildi.

3.3.6. Uygulanan Withaferin A'nın Dozlarının Belirlenmesi

Toz halinde 5 mg olan Withaferin A (Wit. A), çalışmamız için -20°C'den çıkarılarak oda sıcaklığında çözündürüldü. Deneyde kullandığımız Withaferin A stok solüsyonu, aşağıdaki şekilde hazırlandı:

5 mg Withaferin A, 1 ml DMSO da çözündürüldü. 1,5 ml lik eppendorf tüpüne alındı. Buradan 80 µl alınarak 920 µl DMEM içinde çözündürüldü ve 1000 µl stok solüsyonu elde edildi. Hazırlanan stok çözeltisinden;

1 nolu tüp: 14,1 µl stok çözeltiden + 1485,9 ml DMEM= 100 µM

2 nolu tüp: 150 µl 1 nolu tüpten + 1350 ml DMEM= 10 µM

3 nolu tüp: 112,5 µl 1 nolu tüpten + 1387,5 ml DMEM= 7.5 µM

4 nolu tüp: 75 µl 1 nolu tüpten + 1425 ml DMEM= 5 µM

5 nolu tüp: 37,5 µl 1 nolu tüpten + 1462,5 ml DMEM= 2.5 µM

6 nolu tüp: 200 µl 3 nolu tüpten + 1300 ml DMEM= 1 µM

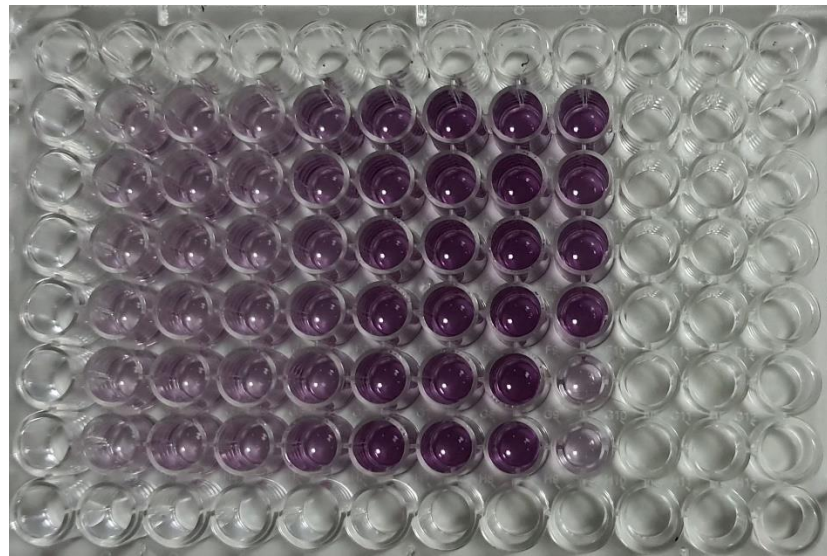
7 nolu tüp: 150 µl 6 nolu tüpten + 1350 ml DMEM= 0,1 µM konsantrasyonlarda dozlar ayarlandı.

3.3.7. Hücre Proliferasyon Analizi (MTT Testi)

Biyouyumluluk testi olan 3,(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyumbromid (MTT); sonuçların hızlı alınması, çalışmalar için hassas olması ve toksisite çalışmalarında düşük düzeyde bile sonuç elde edilebilmesi açısından en güvenilir testlerden biri olarak kabul edilmektedir⁷¹. MTT bileşiği firmadan elde edilen prosedüre göre, 1 mg/ml olacak şekilde PBS solüsyonunda hazırlandı. Hazırlanan solüsyon 2 ml'lik eppendorf tüplerine alınarak alikodlandı ve tüpler alüminyum folyo ile sarıldı. Böylece ışık ile teması önlenmiş oldu. Daha sonra kullanılacak olan MTT solüsyonları -20 °C'de saklandı.

Belirlenen konsantrasyonlardaki Withaferin A, kuyucuklardaki hücreler üzerine uygulandı. Aşağıda tarif edildiği şekilde MTT yöntemi ile hücre viabilitesi değerlendirildi:

- 1) 96 kuyucuklu plate'lerdeki herbir kuyucuğa 5×10^4 hücre ekimi yapıldı.
- 2) Plate'ler 37°C de %5 CO_2 içeren inkübatöre yerleştirildi ve hücrelerin konfluent olması beklendi.
- 3) Konfluent olduğu gözlendikten sonra belirlenen kuyucuklara belirlenen konsantrasyonlarda Withaferin A eklendi.
- 4) Daha sonra 24. saatte, kuyucukların herbirine MTT testi uygulandı.
- 5) 24 saat sonunda kuyucuklardaki besiyeri atıldı, %10 oranında (10 μl) MTT solüsyonu konuldu. 4 saat bekletikten sonra MTT solüsyonu döküldü ve önce negatif kontrole daha sonra en düşük konsantrasyondan en yüksek konsantrasyona doğru DMSO konuldu (Şekil 3.3).
- 6) Mikro Quant spectrum cihazında 570 nm'de ölçüm gerçekleştirildi.
- 7) Elde edilen veriler Prism 8 (GRAPHPAD, Boston, MA) programı ile değerlendirildi ve bu program yardımıyla grafik haline getirildi.



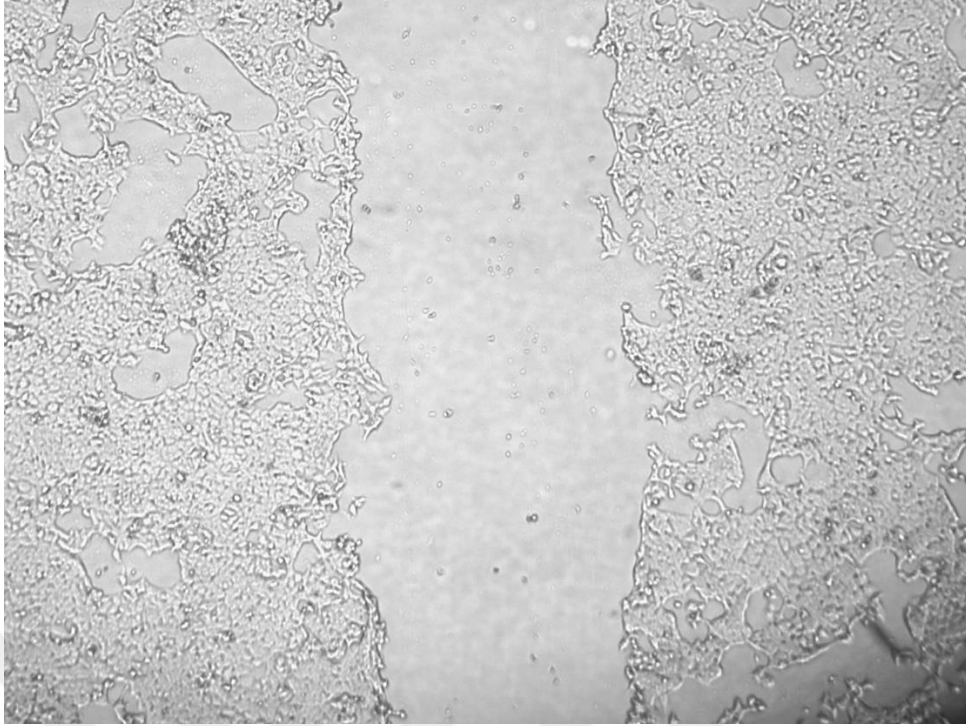
Şekil 3. 3. HepG2 hücrelerinin MTT testi sonrası 96'lık plateki renk değişimi

3.3.8. Yara Çizik Deneyi

İn vitro deneylerde konfluent olan hücreler çizildiklerinde aralarındaki bağlantılar hasara uğrar. ‘In vitro scratch assay’ tekniği, konfluent olan hücrelerde ince bir çizik yapmayı ve belirli zaman aralıklarıyla ölçüm yapıp, hücrelerin görüntülerinin alınması ile gerçekleştirilir. Test, oluşturulan boşluğun genişliği ölçülerek hücre migrasyonu değerlendirildiğinde kullanılan etkili ve yaygın bir modeldir⁷².

Biz de çalışmamızda, Withaferin A’nın hücre migrasyonu üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla yara iyileşme testi uyguladık. MTT sonucunda elde ettiğimiz LD 20 (2 μ M) ve LD 50 (4 μ M) değerlerine göre Withaferin A dozlarını 2 μ M ve 4 μ M olarak belirledik. Daha sonra belirlediğimiz kuyucuklara 2 μ M ve 4 μ M dozlarda Withaferin A ekleyerek yara çizik testini uyguladık. Test aşağıda tarif edildiği şekilde yapıldı:

- 1) HepG2 hücreleri, herbir kuyucukta 3×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plate’lere ekildi.
- 2), 37°C ve %5 CO₂’li inkübatör içinde plate yüzeyi konfluent oluncaya kadar bekletildi.
- 3) Konfluent olan hücre tabanında, steril pipet ucu ile bir çizik oluşturuldu.
- 4) Withaferin A uygulaması kontrol gruplarına yapılmadı.
- 5) Belirlenen dozlarda (2 μ M ve 4 μ M) Withaferin A diğer kuyucuklara uygulandı.
- 6) Daha sonra kamera ataçmanlı invert mikroskop altında çizik oluşturulan hücreler 0, 12, 24, 36 ve 48. saatlerde incelendi ve fotoğraflandı.
- 7) Daha sonra fotoğraflarda Prism 8 (GRAPHPAD) programı ile boşlukların genişliği ölçüldü ve grafikleri çizildi.



Şekil 3. 4. HepG2 hücrelerinin yara iyileşme testi için çizilen alanın X4 görünümü

3.4. Real Time-PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Prosedürü

3.4.1. Real Time-PCR Öncesi Hücre Kültürü

Hücreler 6 lı plate'deki 3 kuyucuk (negatif kontrol, 2 μ M, 4 μ M) için 3×10^5 hücre 3'er tekrarlı olacak şekilde ekim yapıldı. 24 ve 48. saatlerde hücreler tripsin ile muamele edilerek taban yüzeyinden kaldırıldı. 2 ml'lik eppendorf tüplerine alındı ve RNA izolasyonu yapılması için şu basamaklar izlendi;

1. EcoPure Lysis Binding Buffer'a 4 ml mercapto etanol eklendi.
2. 400 μ l EcoPure Lysis Binding Buffer pellete eklendi, pipetaj yapıldı ve 10 sn vortex yapıldı.
3. 400 μ l %96'lık etanol eklendi ve 10 sn vortex yapıldı.
4. Kolon tüp, toplama tüpün içerisine konuldu.
5. 700 μ l EcoPure kolona eklendi ve 30 sn max. hızda santrifüj edildi.

6. Toplama tüpün içerisindeki lizat döküldü ve 400 µl EcoPure Wash Buffer 1 kolona eklendi ve 30 sn max. hızda santrifüj yapıldı.
7. Toplama tüpün içerisindeki lizat döküldü ve 500 µl EcoPure Wash Buffer 2 kolona eklendi ve 30 sn max. hızda santrifüj gerçekleştirildi.
8. Toplama tüpün içerisindeki lizat döküldü ve 200 µl EcoPure Wash Buffer 2 kolona eklendi ve 2 dk max. hızda santrifüj yapıldı.
9. Kolon, 1,5 ml RNAaz free mikrosantrifüj tüpüne alındı. Üzerine 70 µl EcoPure Elution Buffer eklendi ve 1 dk oda sıcaklığında inkübe edildi süre sonunda max. hızda 30 sn santrifüj edildi.
10. Kolondan geçen solüsyon Nanodrop cihazında ölçüldü (Şekil 3.5).



Şekil 3. 5. Nanodrop cihazının görünümü

3.4.2. cDNA (Komplementer Zincir) Sentezlenmesi

Tek zincirli halde bulunan RNA zincirleri, Reverse Transcriptase Kiti ile sentezlenerek tamamlayıcı (komplementer) hale getirildi ve cDNA yapılarına dönüştürüldü. cDNA eldesi aşamasının tamamı buz üzerinde yapıldı.

1. Reverse Transcriptase kit derin dondurucudan (-20°C) çıkarıldı. Buz kabı içerisinde erimeye bırakıldı ve izole edilen RNA örnekleri kit içeriğinin yanına konuldu.
2. RNA örnekleriyle kit içeriği 10 dakika beklenerek aynı sıcaklığa gelmeleri sağlandı.
3. Nanodropta ölçülen RNA örneklerinin son hacmi 20 µl olacak şekilde RNAaz free water ile sulandırıldı.
4. Applied Biosystems High- Capacity cDNA Reverse Transcription kiti kullanılarak izole ettiğimiz RNA örneklerinden cDNA elde edildi.
5. Daha sonra Revers transkripsiyon (RT) master mix'i hazırlandı (Tablo 3.1).
6. PCR tüpleri içine 2xRT master mix'ten 10'ar µl konuldu ve üzerine 10 µl RNA eklenerek pipetaj yapıldı.
7. Böylelikle cDNA revers transkripsiyon reaksiyonu hazırlanmış oldu.
8. Thermal Cycler cihazına PCR tüpleri numaralandırılarak yerleştirildi ve Tablo 3.2'te verilen program kullanılarak cDNA reaksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar -20°C'de saklandı.

Tablo 3. 1. 2xRT Master Mix Bileşenleri ve Miktarları

Mix'in İçeriği	Kullanılma Oranı	Kullandığımız Miktar (X 10)
10X RT Buffer	2.0 µL	20 µL
25X dNTP mix	0.8 µL	8 µL
10X RT Random Primer	2.0 µL	20 µL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0 µL	10 µL
Nükleaz içermeyen Su	4.2 µL	42 µL
Toplam hacim	10.0 µL	100 µL

Tablo 3. 2. Thermal Cycler’da cDNA Eldesi İçin Kullanılan Program

	1. adım	2. adım	3. adım	4. adım
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Zaman	10 dakika	2 saat	5 dakika	∞

3.4.3. Kantitatif Real Time-PCR

Çalışmamızda 3 hedef gen (Postn, AKT1 ve Pakt1) ve 1 referans gen (GAPDH) proteinlerini kodlayan mRNA’ların ekspresyon seviyeleri, Applied Biosystems TaqMan Universal Master Mix II with UNG kiti kullanılarak ölçüldü. Bütün aşamalar üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde (Tablo 3.3) ve “Rotor Gene Q” PCR cihazında (Şekil 3.7), Applied Biosystems Real Time-PCR programı (Tablo 3.4) kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 3. 6. Rotor-Gene Q PCR Cihazı

Tablo 3. 3. PCR Reaksiyon Mix'in Hazırlanması

Reaksiyon Bileşenleri	Toplam Hacim (μl)
Tagman Universal Master Mix II	25.0 μl
TaqMan Gene Assay (Primerler)	2.5 μl
cDNA + RNAaz free water (40 μl)	22.5 μl
Total Hacim	50.0 μl

Tablo 3. 4. Applied Biosystems Real Time-PCR İçin Kullanılan Program

İşlem	Enzim	Enzim	PCR	
	İnkübasyonu	Aktivasyonu	Sikluslar (40 siklus)	
	HOLD	HOLD	Denatürasyon	DNA
				Primerlerinin Bağlanması ve Uzaması
Sıcaklık	50°C	95°C	95°C	60°C
Zaman	2:00	10:00	00:15	1:00
Hacim (μl)	20 ya da 50 μl			

3.4.4. Real Time- PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Real Time PCR'de, eşik değeri döngüsü (Threshold Cycle, CT) veya crossing points (Cp) değerleri arasındaki farklılıklar ölçülür⁷³, analiz edilen genin ekspresyon düzeyleri belirlenir. CT değeri; reaksiyon floresan sinyalinin eşik değerini geçtiği döngü değeridir ve gen ekspresyonundaki anlamlı artışın olduğu ilk noktayı belirtir⁷⁴.

Gerçekleştirilen deneyde, ΔC_p yöntemi kullanılarak Postn, Akt1 ve pAkt1 genlerinin ekspresyon düzeyleri belirlendi. Aşağıdaki formül kullanılarak sonuçlar değerlendirildi:

$$\Delta C_p = C_p \text{ hedef gen} - C_p \text{ referans gen}$$

$$\Delta \Delta C_p = \Delta C_p (\text{muamele edilen}) - \Delta C_p (\text{kontrol})$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta \Delta C}$$

3.5. İmmunositokimyasal Prosedür

Flasklara hücre ekimi yapıldı. Hücrelerin konfluent olması beklendi. Flask yüzeyini tamamen kaplayan hücreler tripsin ile muamele edilerek kaldırıldı. 15'lik falkon tüpüne alınan hücreler 125 g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı dökülerek tüpte kalan pelletin üzerine medyum eklendi.

3.5.1. Hücrelerin Lamda Çoğaltılması

1. Cover glass camlar, 3 saat hücre boyunca class II tip biyogüvenlik kabini içerisinde ultraviyole ışık altında sterilizasyon işlemine tabi tutuldu.
2. Sterilize edilen cover glass camlar 24 kuyucuklu platelere yerleştirildi.
3. Plate'lere her kuyucukta 5×10^4 hücre ve 3'er tekrarlı olacak şekilde ekim yapıldı.
4. 37°C ve %5 CO₂'li inkübatörde hücreler konfluent oluncaya kadar bırakıldı.
5. Konfluent olduktan sonra kuyucuklara Withaferin A (2 μ M ve 4 μ M) uygulaması yapıldı.
6. Kontrol grubuna Withaferin A uygulanmadı.
7. İmmunositokimyasal boyama için 24 ve 48. saatlik gruplar içerisinde Postn, Akt1, pAkt1 ve Withaferin A'nın 2 μ M ve 4 μ M dozları kullanıldı ve kontrol gruplarıyla birlikte toplam 18 ayrı grup oluşturuldu.
8. Daha sonra tüm gruptaki hücrelere fiksasyon işlemi uygulandı

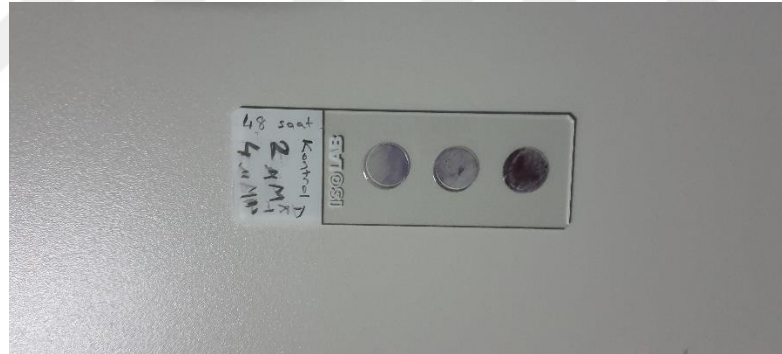
3.5.2. Fiksasyon

1. Fiksasyon amacıyla platelerdeki medyum uzaklaştırılmadan önce hücrelerin yüzeyini kaplayacak şekilde 300-400 µl %4'lük paraformaldehit platelere eklendi ve 2-3 dk beklendi. Süre sonunda kuyucuklardaki sıvı döküldü. Tekrar 300-400 µl %4 lük paraformaldehit platelere eklendi ve 30 dk fikse edildi.
2. 30 dk sonra fiksatif platelerden uzaklaştırıldı.
3. PBS ile 2 kez yıkandı.

3.5.3. İmmunperoksidaz boyama tekniği

1. PBS ile yıkanan camlar üzerine, 5 damla %3'lük H₂O₂ solüsyonu damlatıldı ve endojen peroksitlerin bloklanması için 5 dakika beklendi.
2. Camlar, 2 kez PBS ile yıkandı.
3. % 0,1 Triton X-100-PBS solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyonda, plate içerisindeki camlar 5 dakika bekletildi. Permeabilizasyon (geçirgenlik) ve intrasellüler protein tespiti için bu basamak önemlidir.
4. Camlar, 2 kez PBS ile yıkandı.
5. Üzerine non-spesifik bağlanmaların önüne geçmek için 5 damla %1 BSA-PBS (bloklama) solüsyonu damlatıldı ve 5-6 saat +4°C'de bekletildi.
6. Primer antikorlar, üreticinin talimatları doğrultusunda [(Postn Antibody (1/500), Akt1 Antibody (1/500) ve pAkt1 Antibody (1/100)] antibody diluent ile dilüe edilerek plate'lere uygulandı. Plate'ler +4 oC buzdolabına yerleştirildi ve 24 saat bekletildi.
7. Süre sonunda primer antikor uzaklaştırıldı.
8. Camlar, 2 kez PBS ile yıkandı.
9. Camlara, 5 damla sekonder antikor (komplement) solüsyonu damlatıldı.
10. Plate'ler inkübatöre yerleştirildi ve 15 dakika boyunca bekletildi.
11. Komplement plate'lerden uzaklaştırıldı.

12. Camlar, PBS ile 2 kez yıkandı.
13. Camlara, 5 damla (HRP) konjugeli streptavidin biotin damlatılarak inkübatör içerisinde 15 dakika bekletildi.
14. Horseradish peroksidaz solüsyonu camlardan uzaklaştırıldı.
15. Camlar, 2 kez PBS ile yıkandı.
16. Taze DAB solüsyonu hazırlandı ve her bir cam üzerine 100 µl damlatılarak karanlık ortamda 3 dakika bekletildi.
17. DAB solüsyonu camlardan uzaklaştırıldı ve camlar, 2 kez PBS ile yıkandı.
18. Mayer's Hematoksilen damlatılarak 5 dakika bekletildi.
19. Camlar, daha sonra %70 ve %100'lük alkol serilerinden geçirildi.
20. Kuyucukların içindeki camlar çıkarılarak dereceli ksilolden geçirildi.
21. Her bir camın üzerine entellan damlatılarak ters çevrildi ve lamlara yapıştırıldı.



Şekil 3. 7. Kontrol, 2Wit. A ve 4Wit. A gruplarına ait immünohistokimyasal boyamayı gösteren preparat

22. Hazırlanan preparatlar bilgisayar destekli ve kamera eklentili Olympus BX51 (Japan) marka mikroskop ile incelendi ve fotoğrafları çekildi.

3.5.4. Mikroskopik İnceleme ve Fotoğraflama

Her bir preparatta rastgele 10 alan incelendi ve immünopozitif boyanmanın derecesi değerlendirildi. Bu arada immünopozitif boyanan hücrelerin yüzdesi ve boyanma yoğunluğunun değerlendirildiği immünoreaktivite skorum (IRS) işlemi

gerçekleştirildi^{75,76}. Ortalama IRS değerleri herbir grup için hesaplandı ve kaydedildi. İmmünoreaktivite skoru, pozitif boyanan hücrelerdeki boyanma yoğunluğunun çarpımı derecesi ile pozitif boyanan hücre yüzdesinin çarpımı ile hesaplandı (Tablo 3.5).

Tablo 3. 5. İmmünoreaktivite Skor (IRS)

Pozitif Boyanan Hücre	Pozitif Boyanma	IRS
Yüzdesi	Yoğunluğu	
0 (Pozitif hücre yok)	0 (Boyanma yok)	0-1 (Negatif)
1 (Pozitif hücre %10'un altında)	1 (Hafif Boyanma)	2-3 (Hafif)
2 (Pozitif hücre %10-50 arasında)	2 (Orta Dereceli Boyanma)	4-8 (Orta)
3 (Pozitif hücre %51-80 arasında)	3 (Şiddetli Boyanma)	9-12 (Şiddetli Pozitif)
4 (Pozitif hücre %80'in üzerinde)		
IRS (Pozitif Boyanan Hücre Yüzdesi X Pozitif Boyanma Yoğunluğu): 0-12		

3.5.5. İstatistiksel Analiz

Hücre canlılık testinde (MTT) Brown-Forsythe and Welch's ANOVA testi kullanıldı. İstatistiksel veriler Prism 8 yazılım (GraphPad) programı ile analiz edildi.

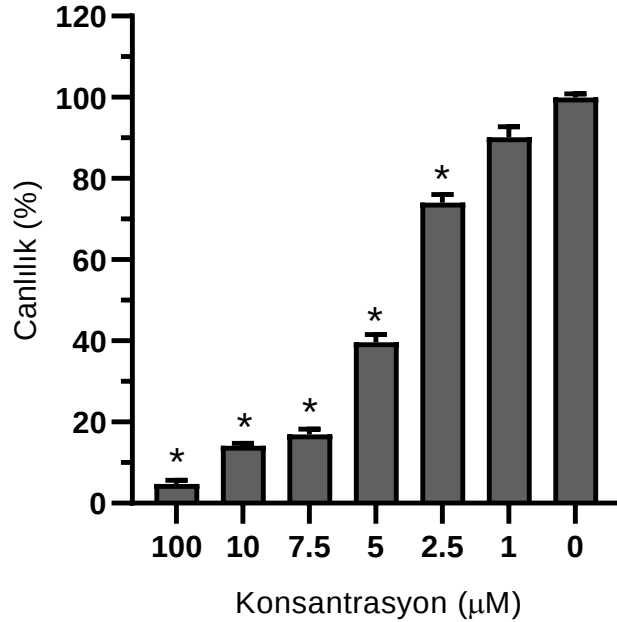
Yara çizik deneyi çalışmamızda Image J bilgisayar programı ile fotoğraflar çekildi. Hücre çoğalması ile zaman arasındaki ilişki basit linear regression testi ile analiz edildi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalarda 2 way ANOVA ile GraphPad programı kullanılarak grafikler elde edildi.

Real-Time PCR çalışmamızda one-way ANOVA ile istatistiksel veriler elde edildi. Veriler ortalama $\pm$ Standart sapma olarak ifade edildi. Karşılaştırmalarda $p < 0.0001$ için * ve $p < 0,05$ için ** değerleri anlamlı kabul edildi.

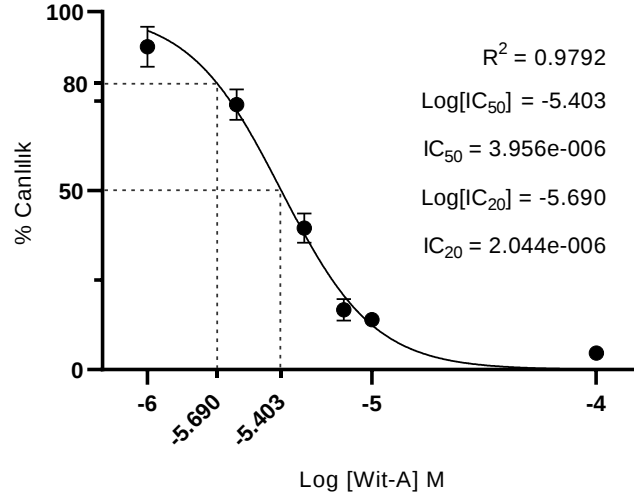
4. BULGULAR

4.1. MTT Testi Bulguları

Çalışmamızda Withaferin A'nın hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerine olan etkisi, hücrelere 100 μ M, 10 μ M, 7,5 μ M, 5 μ M, 2,5 μ M, 1 μ M ve 0,1 μ M dozlarda Withaferin A uygulanarak değerlendirildi. Çalışma sonucunda LD 50 değeri 4 μ M, LD 20 değeri 2 μ M bulundu. Ayrıca 0,1 μ M kontrol Withaferin A uygulanan hücrelerin canlılığını etkilemezken doz arttıkça hücre canlılığının ve proliferasyonunun giderek azaldığı belirlendi (Şekil 4.1). Özellikle 7,5 μ M dozunda Withaferin A uygulanan grupta hücrelerdeki proliferasyon kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşüktü ($P<0.001$). Hücre proliferasyonundaki azalma artan Withaferin A dozlarında daha belirgin ve bu dozdan itibaren diğer gruplardaki azalma kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.001$). (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).



Şekil 4. 1. MTT Testine göre Withaferin A'nın Canlılık (%) ve Konsantrasyon (μ M) grafiği

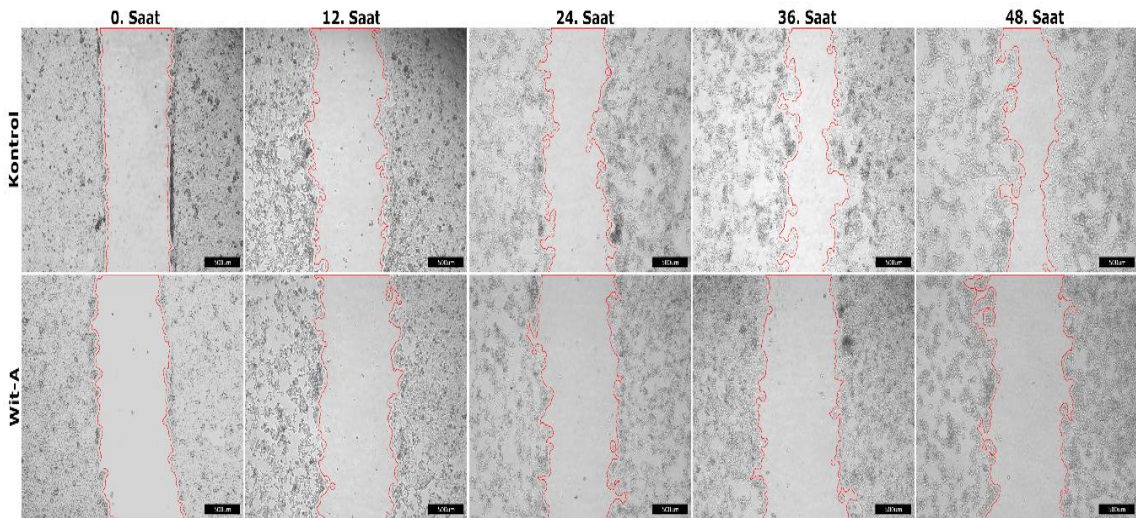


Şekil 4. 2. MTT testine göre Withaferin A'nın Canlılık değerlerinin Log (M) grafiği

4.2. Yara Çizik Deneyi Bulguları

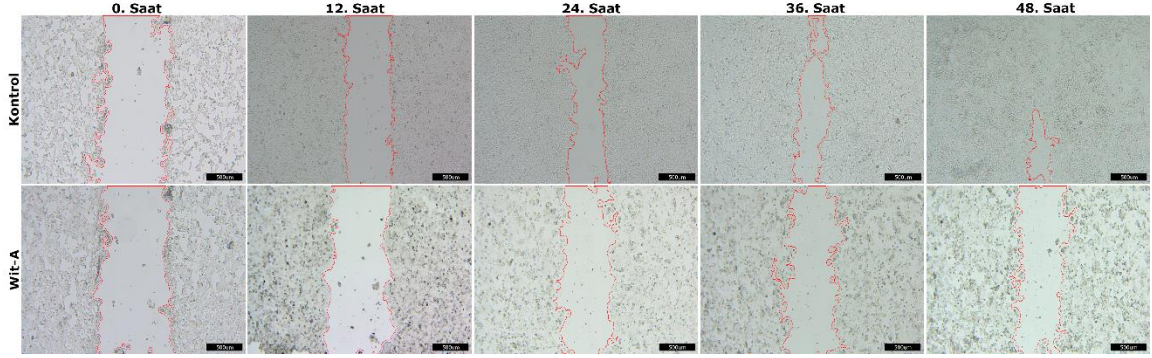
Oluşturulan yara çizik modelinde MTT testi sonucunda uygulanan Withaferin A'nın hücre çoğalması ve proliferasyonu üzerindeki etkisi değerlendirildi. Bu çizik testi ile oluşturulan boşluğun çoğalan hücrelerin migrasyonu ile kapatılan alanın derecesi değerlendirilmektedir.

Kontrol grubunda 24. saatten itibaren yara alanının kapanmaya başladığı 48. saatte ise yara alanında belirgin bir daralma olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4. 3. Yara iyileşmesi testi kontrol ve 2Wit. A uygulanan hücrelerin farklı saatlerdeki görünümü X4

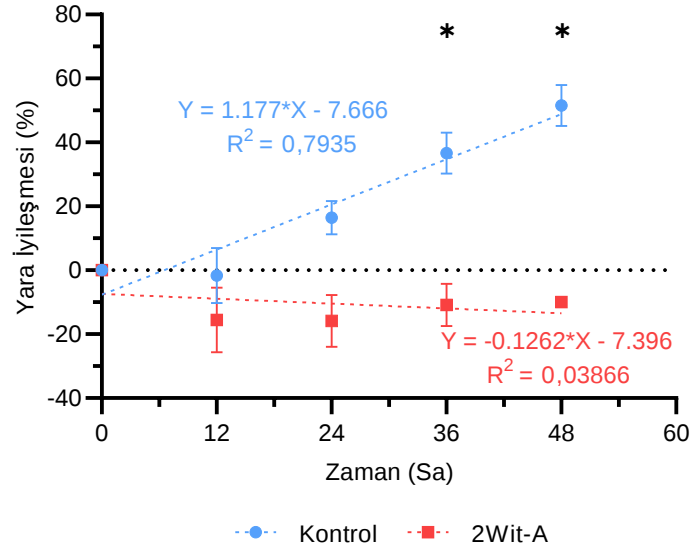
Withaferin A'nın hem 2 μ M hem de 4 μ M uygulanan gruplarında ise oluşturulan çizik alanının kapanmadığı izlendi (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). Bu durum bize Withaferin A'nın hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu belirgin şekilde önlediğini gösterdi.



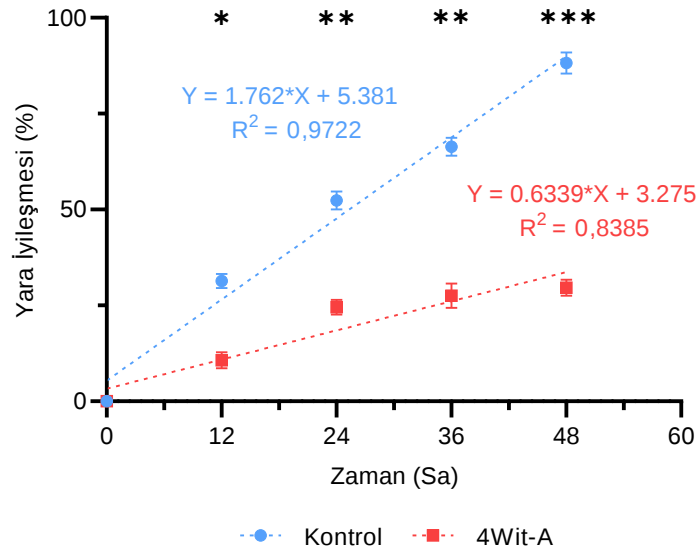
Şekil 4. 4. Yara iyileşmesi testi kontrol ve 4Wit. A uygulanan hücrelerin farklı saatlerdeki görünümü X4

4.2.1. Withaferin A'nın Hücre Canlılığı için Yara İyileşmesi Testinin Değerlendirilmesi

Yara çizik deneyinde elde edilen veriler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında kontrol ve 2Wit. A grubu arasında 36. saate kadar anlamlı bir fark yokken ($p>0,05$), 36. saat ile 48. saatler arasında belirgin bir fark mevcuttu ($p<0,0001$). Ayrıca 12, 24, 36 ve 48. Saatlerde, kontrol ve 4Wit. A grubu arasında anlamlı farklılıklar belirlendi ($p<0,0001$). Kontrol grubumuzda hücre proliferasyonu gerçekleştiği için R^2 değeri 1'e yakın olarak hesaplandı ve istatistiksel olarak sonuç anlamlı olarak değerlendirildi. Bu durum hepatoselüler kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu önlediği ve hatta durdurduğunu göstermektedir. Withaferin A gruplarında ise R^2 değeri 1'den uzaklaştığı için istatistiksel olarak sonuç anlamlı olarak değerlendirildi (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6) ve Withaferin A'nın antikanser etkisi belirlenmiş oldu.



Şekil 4. 5. Kontrol grubu ile 2Wit. A grubu arasında yara iyileşmesi (%) ve zaman grafiği (Sa) ($p < 0,0001$ istatistiksel olarak anlamlıydı ve * şeklinde gösterildi)

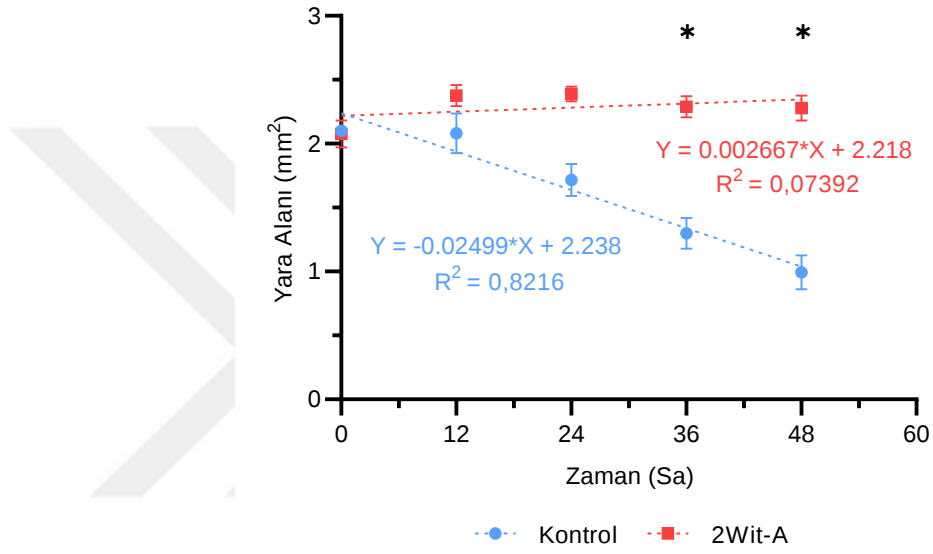


Şekil 4. 6. Kontrol grubu ile 4Wit. A grubu arasında yara iyileşmesi (%) ve zaman grafiği (Sa) ($p < 0,0001$ istatistiksel olarak anlamlıydı ve ***,*** şeklinde gösterildi)

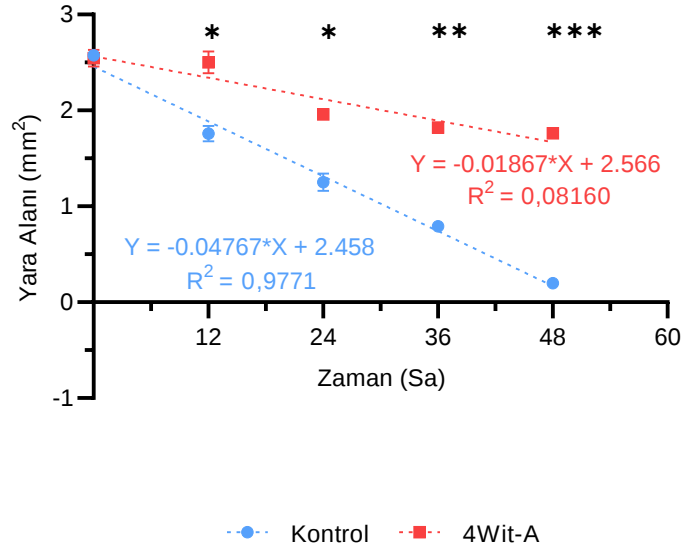
4.2.2. Yara Alanının Değerlendirilmesi

Yara alanı değerlendirildiğinde 0. saatten başlayarak 48. saate kadar kontrol grubunda yara alanının kapandığı ancak Withaferin A uygulanan gruplarda yara alanının

açıldığı tespit edildi. Bu açılma 2Wit. A grubunda ise daha belirgin olarak izlendi (Şekil 4.3). Yara alanı ölçüleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, R^2 derecesi 1'e yakın olduğu hesaplandı ve kontrol grubundaki kapanma ve zaman arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif yüksek bir korelasyon olduğu belirlendi ($p < 0,0001$) (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8).



Şekil 4. 7. Kontrol ve 2Wit. A grubuna ait yara alanı (mm²) ve zaman grafiği (Sa) ($p < 0,0001$ istatistiksel olarak anlamlıydı ve * şeklinde gösterildi)

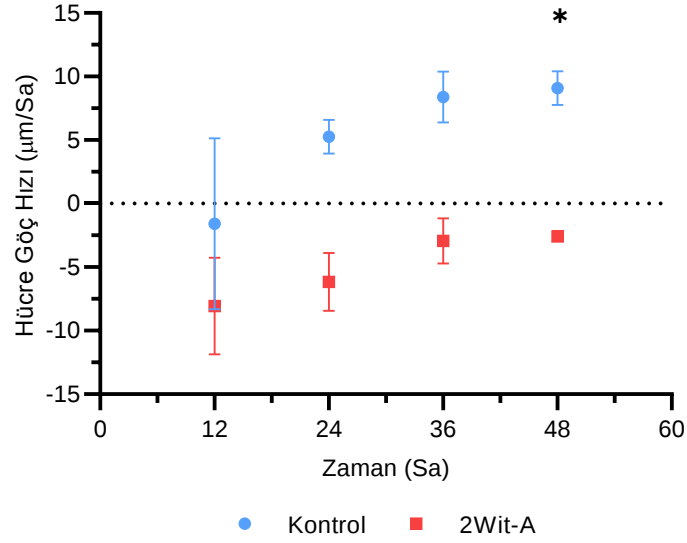


Şekil 4. 8. Kontrol ve 4Wit. A grubuna ait yara alanı (mm²) ve zaman grafiği (Sa) (p<0,0001 istatistiksel olarak anlamlıydı ve *, **, *** şeklinde gösterildi)

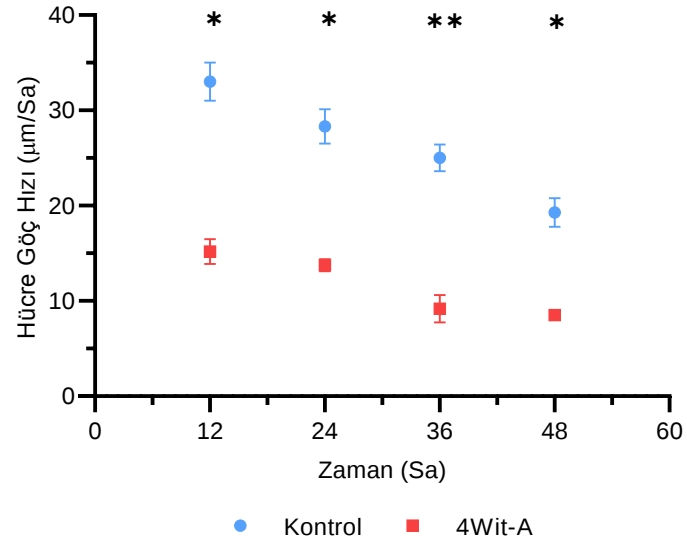
4.2.3. Hücre Göç Hızının Değerlendirilmesi

Yaptığımız çalışmada yara çizik testi ile kontrol ve Withaferin A'nın 2 µM ve 4 µM dozlarını uyguladığımız gruplarda yara alanının kapanması 24 ve 48. saatlerde invert mikroskop altında incelendi. 48. saate kadar kontrol grubu alanının kapanmasının gerçekleştiği ancak Withaferin A verilen gruplarda kapanmanın meydana gelmediği izlendi. Bütün gruplarda yara alanındaki hücre göç hızı hesaplandı. Bu işlemde Image J programından yararlanıldı ve grafiği çizildi.

İstatistiksel olarak elde ettiğimiz verileri karşılaştırdığımızda hücrelerin yara bölgesindeki göç hızının 48. saatte kontrol grubunda Withaferin A'nın 2 µM olarak uyguladığımız gruptan daha fazla olduğu ve bu farkın anlamlı olduğu belirlendi (p<0,0001) (Şekil 4.9). 0. saatten 48. saate kadar hücrelerin göç hızı açısından kontrol grubu ile 4Wit. A uygulanan grup karşılaştırıldığında, kontrol grubunda göç hızı daha fazlaydı ve istatistiksel olarak anlamlıydı (p<0,0001) (Şekil 4.10).



Şekil 4. 9. Kontrol grubu ve 2Wit. A grubu arasında hücre göç hızı ($\mu\text{m}/\text{Sa}$) ve zaman (Sa) grafiği ($p < 0.0001$ istatistiksel olarak anlamlıydı ve * şeklinde gösterildi)



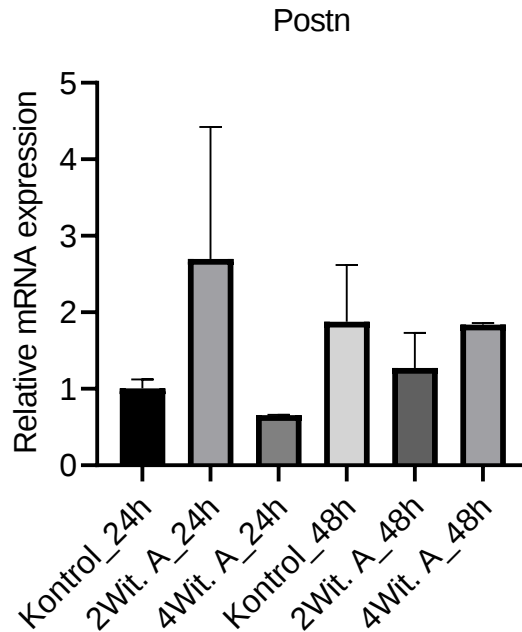
Şekil 4. 10. Kontrol grubu ve 4Wit. A grubu arasında hücre göç hızı ($\mu\text{m}/\text{Sa}$) ve zaman (Sa) grafiği ($p < 0.0001$ istatistiksel olarak anlamlıydı ve * ve ** şeklinde gösterildi)

4.3. Real Time PCR için Bulgular

HepG2 hücrelerinde Postn ve Akt1 primerlerinin gen ekspresyon düzeylerini Real-Time PCR ile belirlemek amacıyla hücrelerimizin öncelikle flaska ekimi yapıldı. Hücreler konfluent olunca tripsin ile muamele edilerek kaldırıldı ve 24 kuyucuklu

platelere ekim yapıldı. Konfluent olunca 24. ve 48. saatlerde kontrol grubu olarak belirlenen kuyucuklara Withaferin A uygulaması yapılmadan, belirlenen diğer kuyucuklara 2 μ M ve 4 μ M Withaferin A uygulaması yapıldı, süreler sonunda hücreler kaldırılarak RNA izolasyonu yapıldı ve Q-PCR cihazı ile çalışma tamamlanarak Postn ve Akt1 primerlerine ait gen ekspresyon düzeyleri ölçüldü, analiz edildi ve istatistiksel olarak değerlendirildi.

İlk 24 saatte Postn geni ekspresyonunda 4 μ M dozda Withaferin A uygulanan grupta belirgin şekilde azalma olduğu ancak bu azalmanın kontrol grubuna kıyasla anlamlı olmadığı ($p>0,05$) tespit edildi. Ayrıca 48. saatteki hücrelerdeki Postn geni ekspresyonunun da 24. saatteki kontrol ve 4Wit. A gruplarına göre yüksek olduğu belirlendi. 24 ve 48 saatlik gruplar birbirleriyle kıyaslandığında da gruplar arasındaki farkın anlamlı olmadığı belirlendi ($p>0,05$) (Şekil 4.11).

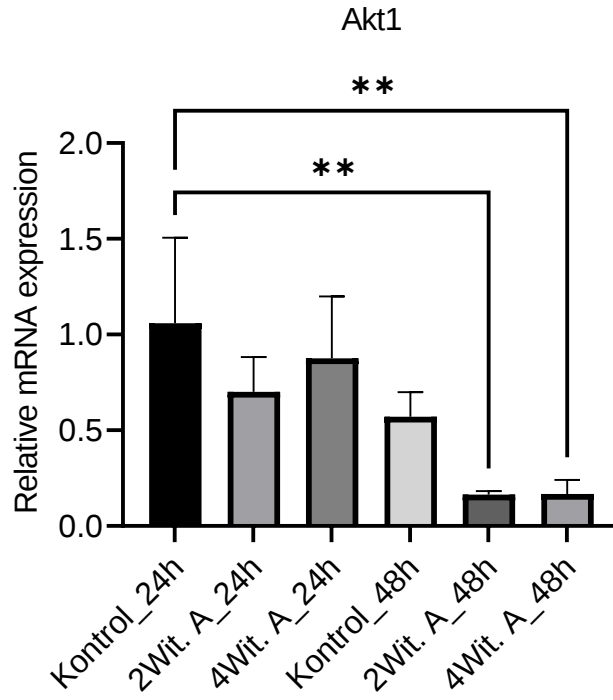


Şekil 4. 11. Kontrol, 2Wit. A ve 4 Wit. A uygulanan gruplarda 24. ve 48. saatlerdeki Postn geni ekspresyon grafiği

HepG2 hücrelerinde Akt1'in gen ekspresyon değerleri 24. saatte Withaferin A uygulanan gruplarda kontrol grubuna kıyasla azalmış olarak belirlendi. Ancak Akt1 gen

ekspresyon değerlerindeki düşüş istatistiksel olarak anlamlılık arz etmiyordu ($p>0,05$).

48. saatte ise Withaferin A uygulanan gruplardaki Akt1'in ekspresyon düşüklüğü çok belirgindi ve kontrole kıyasla anlamlıydı ($p<0,05$) (Şekil 4.12).



Şekil 4. 12. Kontrol, 2Wit. A ve 4Wit. A uygulanan gruplarda 24. ve 48. saatlerdeki Akt1 gen ekspresyon grafiği ($p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlıydı ve ** şeklinde gösterildi)

4.4. İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

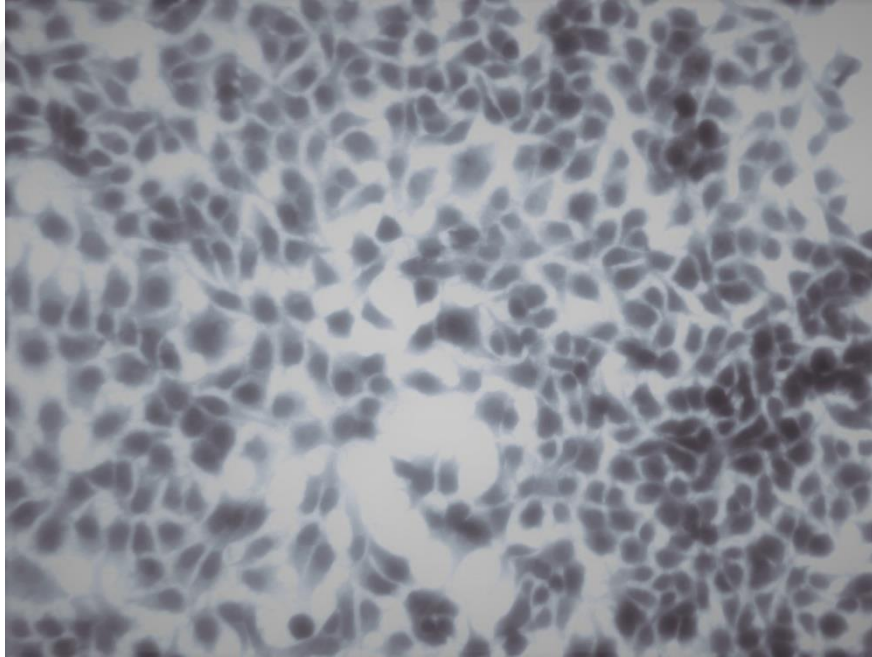
HepG2 hücrelerinde Postn, Akt1 ve pAkt1 primerlerinin immünohistokimyasal boyama sonuçlarının pozitifliğinin değerlendirilmesi için immünoreaktivite skorlama ile hesaplama yapıldı.

4.4.1. HepG2 hücrelerinde Periostinin İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

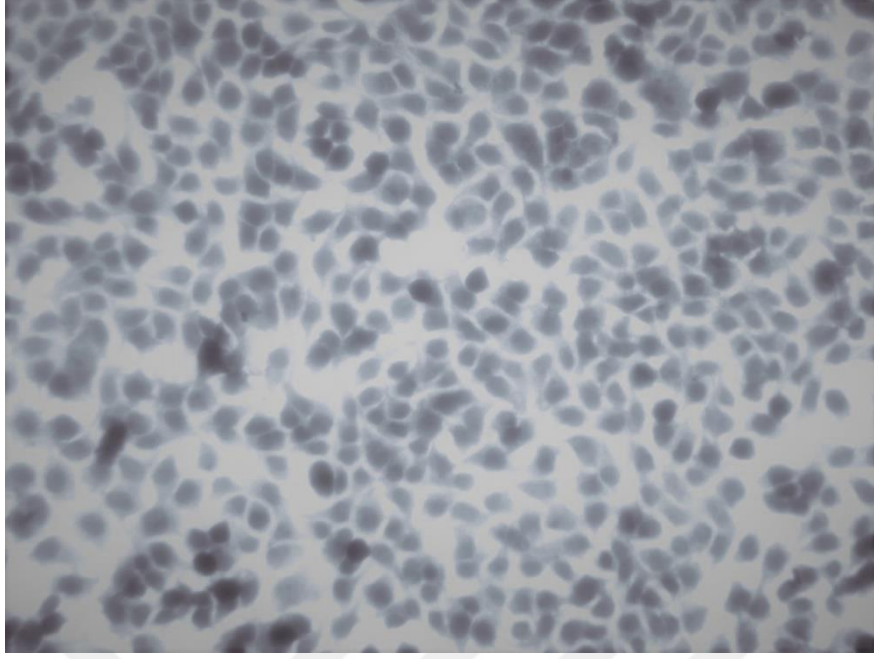
Çalışmamızda periostin ile boyanan hücreler ışık mikroskopunda incelendiğinde 24. saatte kontrol grubunda yoğun bir immünohistokimyasal boyanma mevcuttu (Şekil 4.13). Withaferin A uygulanan gruplarda da boyanmanın yoğunluğu kontrol grubu ile benzerlik

gösteriyordu (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15). Hücreler 48. saatte değerlendirildiğinde ise kontrol grubunda yoğun boyanmanın olduğu (Şekil 4.17), Withaferin A'nın 2 μ M verildiği grupta zayıf bir immünohistokimyasal boyanmanın olduğu (Şekil 4.18) ve Withaferin A'nın 4 μ M verildiği grupta ise yoğun bir boyanmanın varlığı (Şekil 4.19) dikkat çekiyordu.

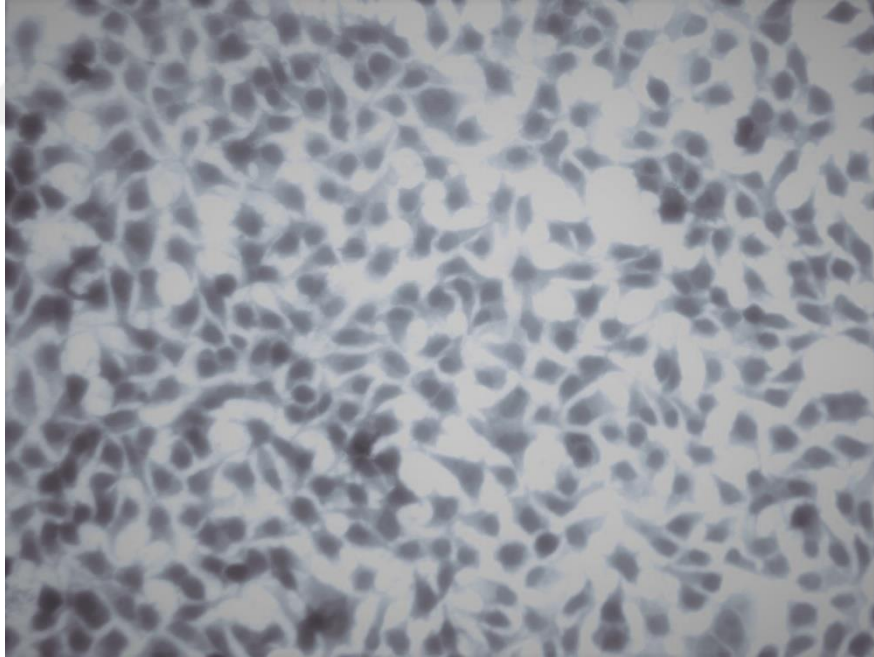
Gruplara ait 24 saat IRS değerlerine ait grafik Şekil 4.16'de gösterildi. 24. saatte kontrol ve Withaferin A grupları arasında anlamlı bir fark görülmezken ($p>0,05$), 48. saatte 2 μ M Withaferin A uygulanan grupta IRS değeri anlamlı bir şekilde düşüktü ($p<0,01$). Withaferin A'nın 4 μ M uygulandığı grupta ise skor yine yüksekti ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında aradaki fark anlamlı değildi ($p>0,05$) (Şekil 4.20).



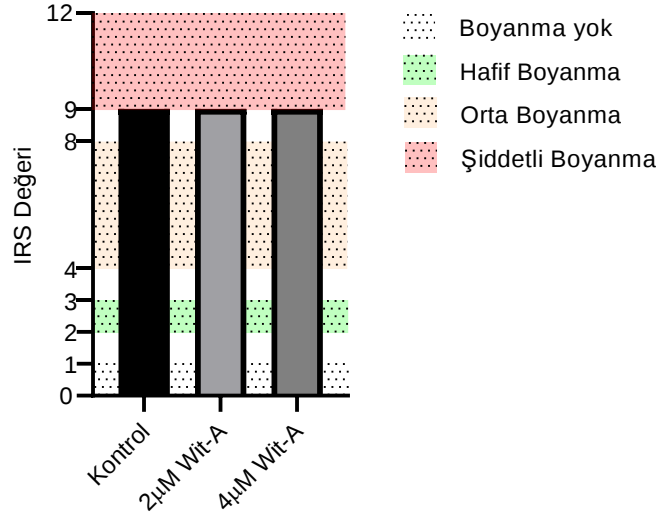
Şekil 4. 13. Kontrol grubuna ait HepG2 hücrelerinde 24 saatlik Periostinin ışık mikroskobu görüntüsü X20



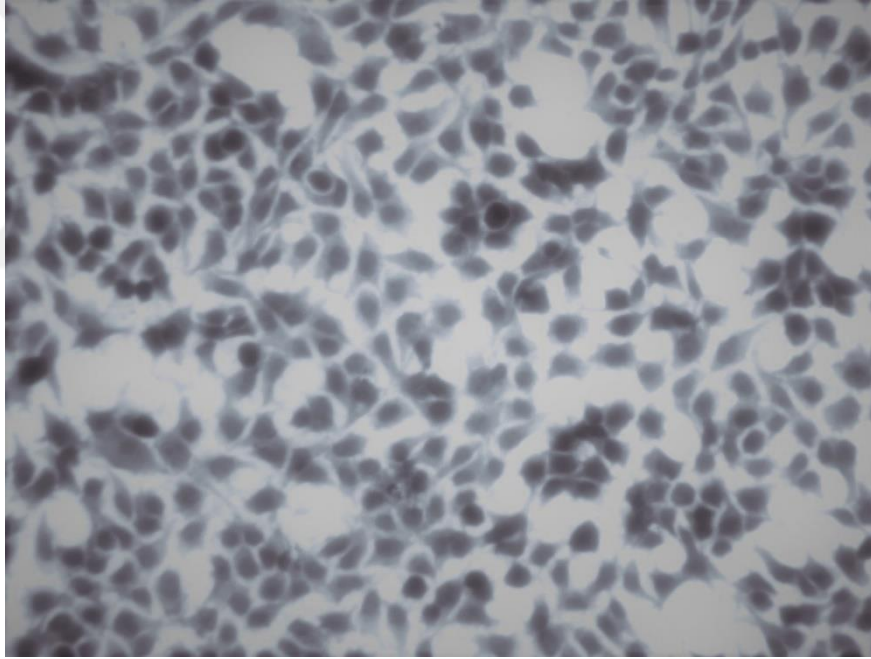
Şekil 4. 14. Withaferin A'nın 2 µM dozunun uygulandığı gruba ait HepG2 hücrelerinde 24 saatlik Periostinin ışık mikroskobu görüntüsü X20



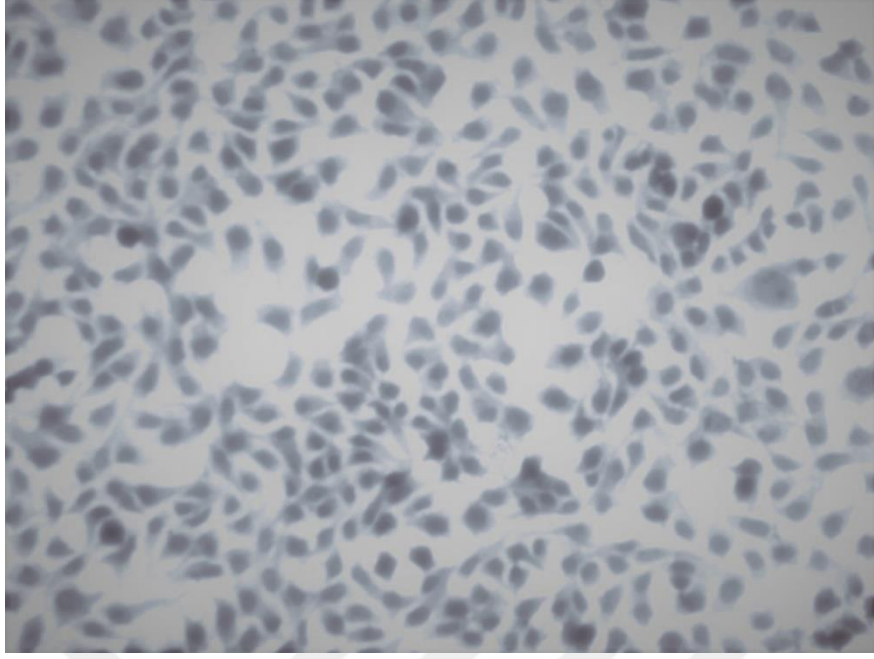
Şekil 4. 15. Withaferin A'nın 4 µM dozunun uygulandığı gruba ait HepG2 hücrelerinde 24 saatlik Periostinin ışık mikroskobu görüntüsü X20



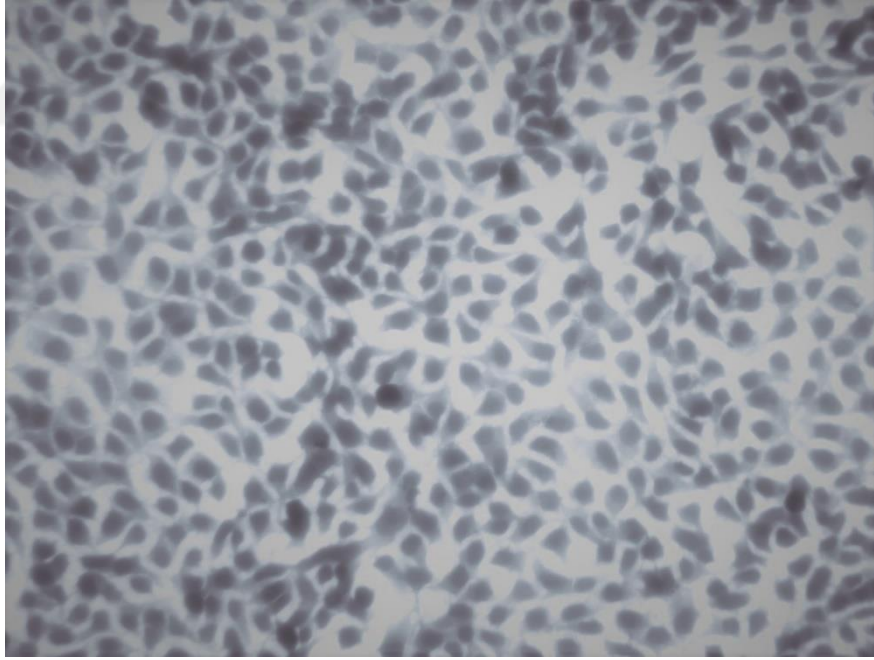
Şekil 4. 16. Kontrol grubu, Withaferin A'nın 2 µM ve 4 µM dozlarının uygulandığı 24 saatlik gruplarda Periostinin IRS değerlerini gösteren grafik



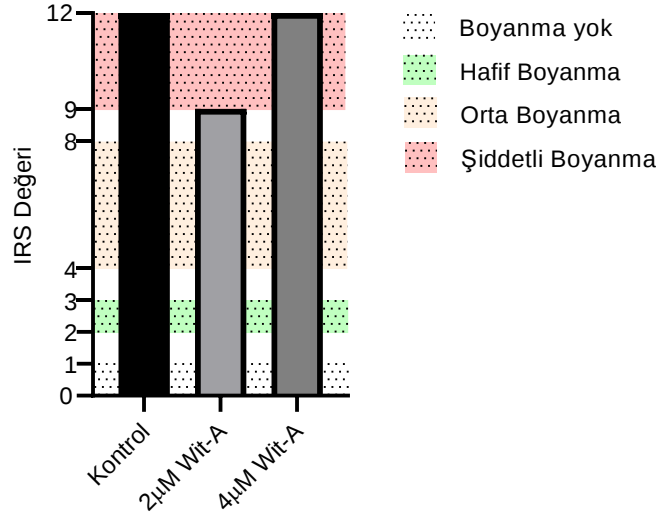
Şekil 4. 17. Kontrol grubuna ait HepG2 hücrelerinde 48 saatlik Periostinin ışık mikroskobu görüntüsü X20



Şekil 4. 18. Withaferin A'nın 2 µM dozunun uygulandığı gruba ait HepG2 hücrelerinde 48 saatlik Periostinin ışık mikroskobu görüntüsü X20



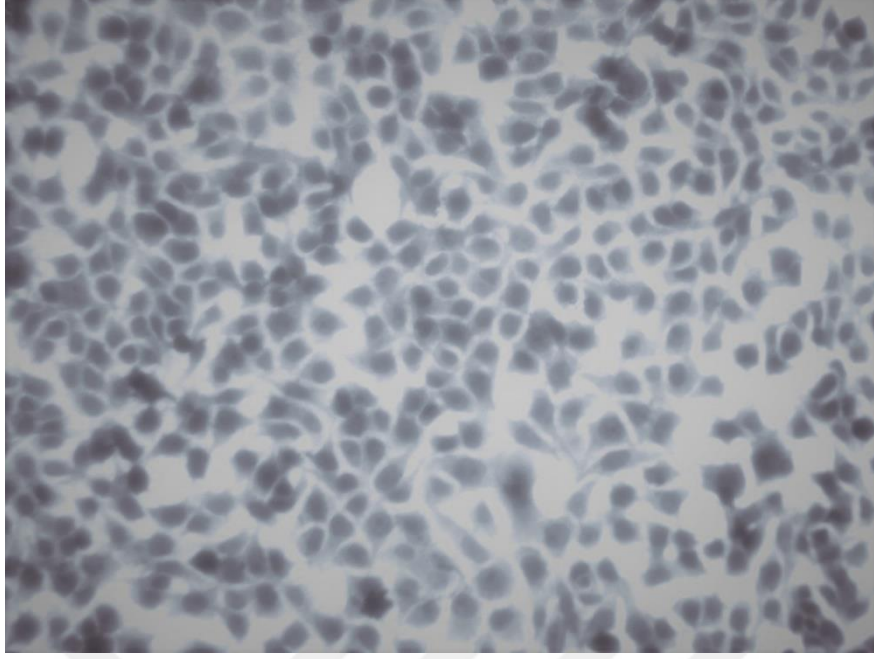
Şekil 4. 19. Withaferin A'nın 4 µM dozunun uygulandığı gruba ait HepG2 hücrelerinde 48 saatlik Periostinin ışık mikroskobu görüntüsü X20



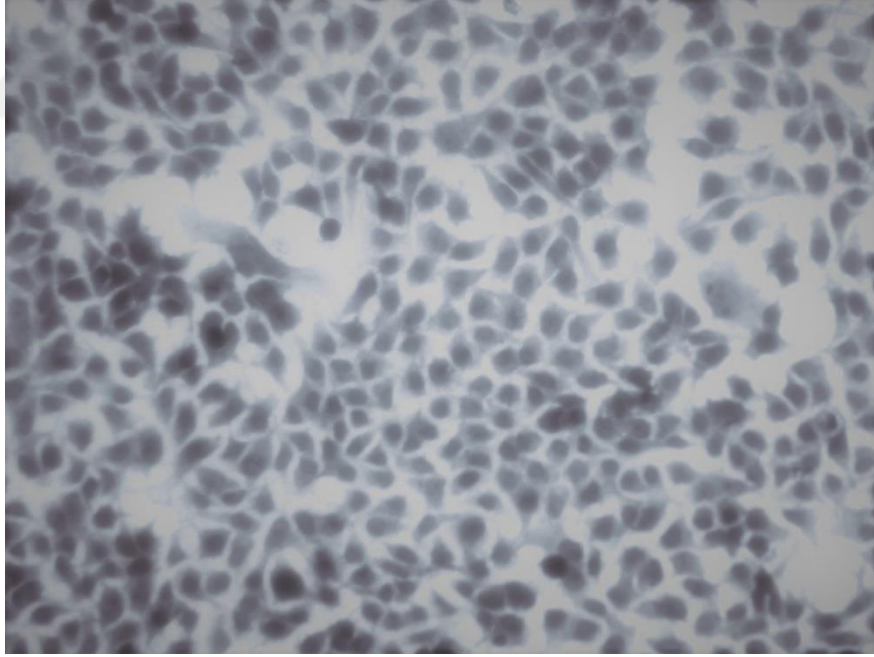
Şekil 4. 20. Kontrol grubu, Withaferin A'nın 2 µM ve 4 µM dozlarının uygulandığı 48 saatlik gruplarda Periostinin IRS değerlerini gösteren grafik

4.4.2. HepG2 hücrelerinde Akt1'in İmmünohistokimyasal Boyanma Bulguları

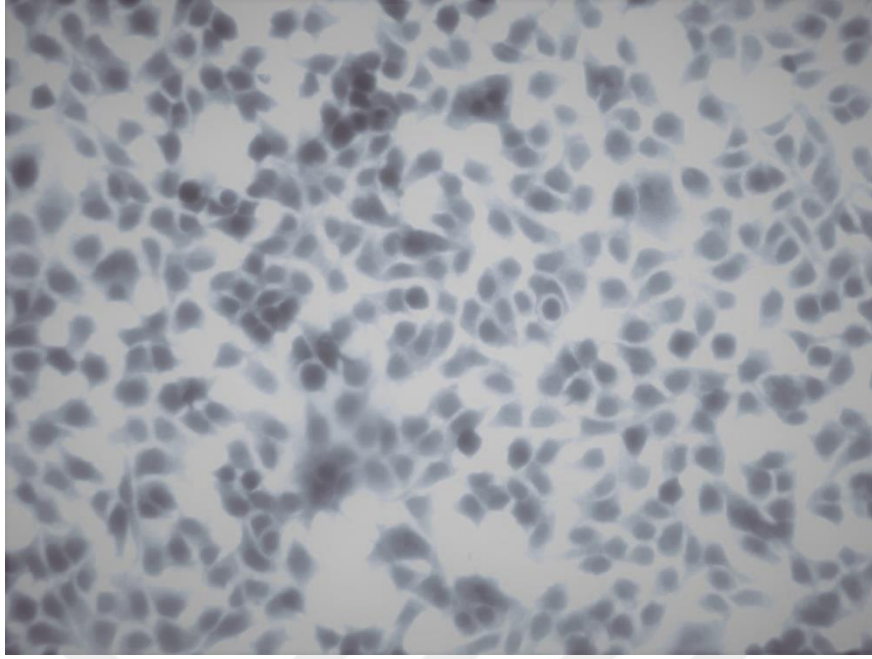
Akt1 proteininin immünohistokimyasal olarak boyandığı HepG2 hücreleri değerlendirildiğinde 24. saatte kontrol ve 2Wit. A grubunda yoğun bir boyanma gözlenirken (Şekil 4.21 ve Şekil 4.22), Withaferin A'nın 4 µM dozunun uygulandığı grupta boyanma yoğunluğunun belirgin şekilde azaldığı görüldü (Şekil 4.23). IRS değerleri açısından kontrol ile 2Wit. A grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değilken ($p>0,05$) (Şekil 4.24), 4Wit. A grubu ile arasında ki fark anlamlıydı ($p<0,01$) (Şekil 4.24). 48. saatte ise Withaferin A'nın hem 2 µM ve 4 µM uygulandığı gruplarda kontrol grubuna kıyasla zayıf bir immünohistokimyasal boyanma olduğu belirlendi (Şekil 4.25, Şekil 4.26 ve Şekil 4.27). Kontrol grubu ile 2Wit. A ve 4Wit. A grupları arasında IRS değerleri açısından istatistiksel olarak belirgin bir fark vardı ($p<0,01$ ve $p<0,01$) (Şekil 4.28).



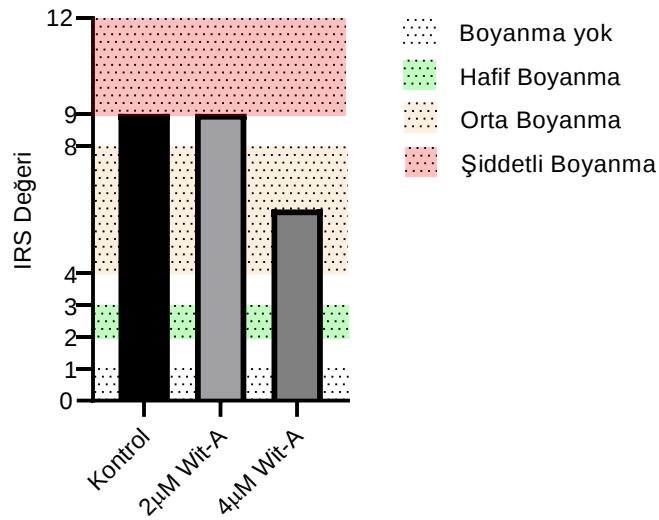
Şekil 4. 21. Kontrol grubuna ait HepG2 hücrelerinde 24 saatlik Akt1' in ışık mikroskobu görüntüsü X20



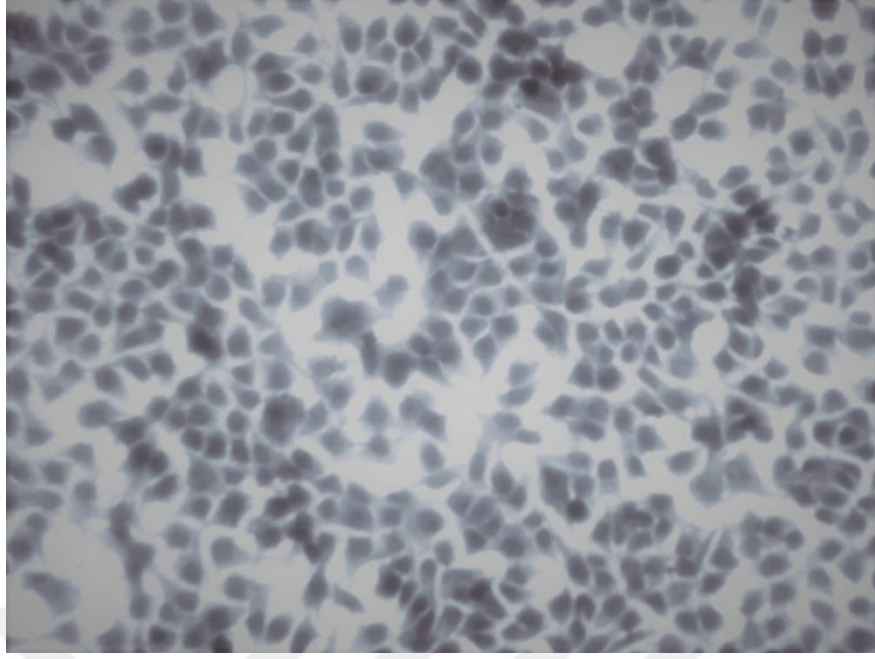
Şekil 4. 22. Withaferin A'nın 2 μ M dozunun uygulandığı gruba ait HepG2 hücrelerinde 24 saatlik Akt1' in ışık mikroskobu görüntüsü X20



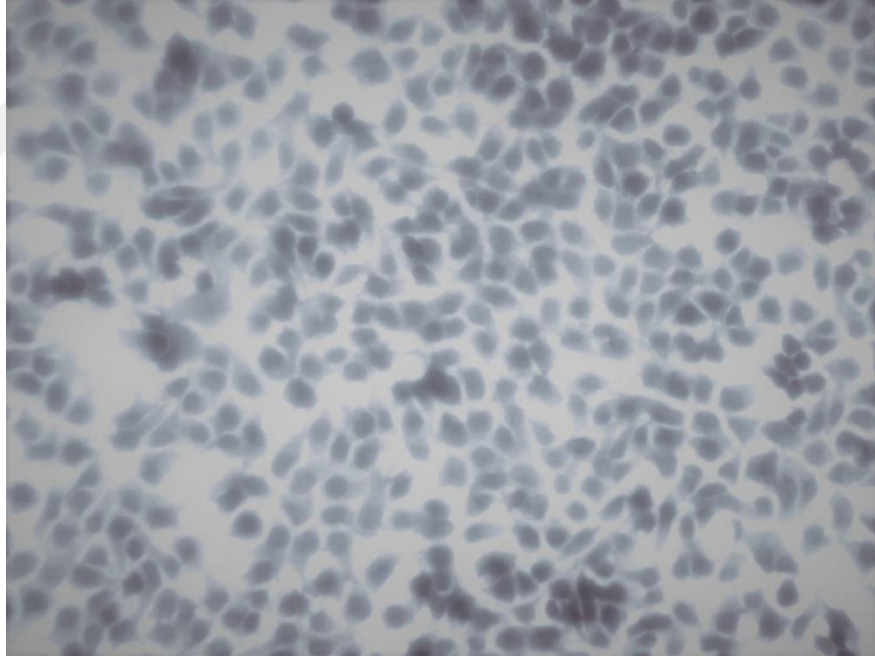
Şekil 4. 23. Withaferin A'nın 4 µM dozunun uygulandığı gruba ait HepG2 hücrelerinde 24 saatlik Akt1' in ışık mikroskobu görüntüsü X20



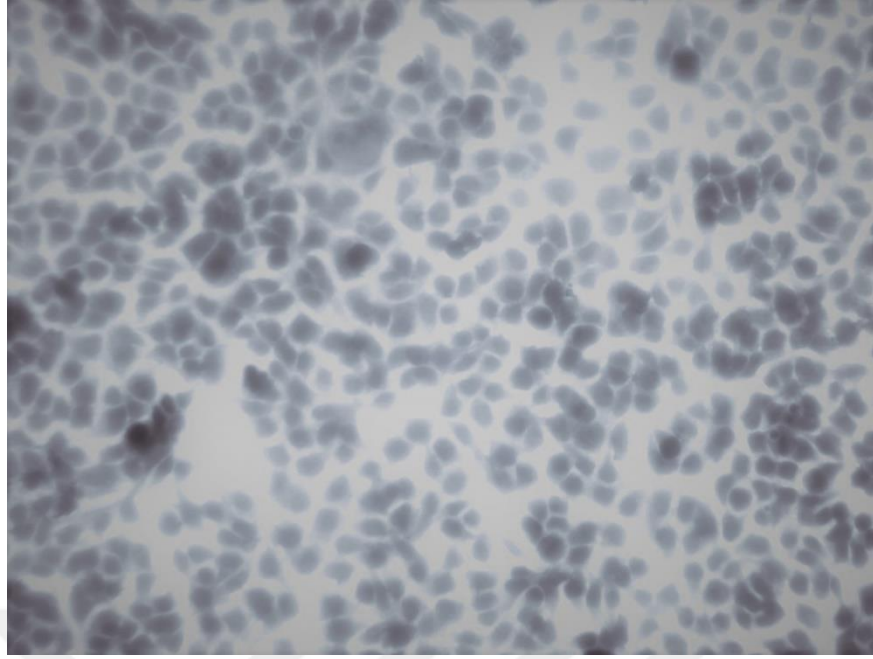
Şekil 4. 24. Kontrol grubu, Withaferin A'nın 2 µM ve 4 µM dozlarının uygulandığı 24 saatlik gruplarda Akt1'in IRS değerlerini gösteren grafik



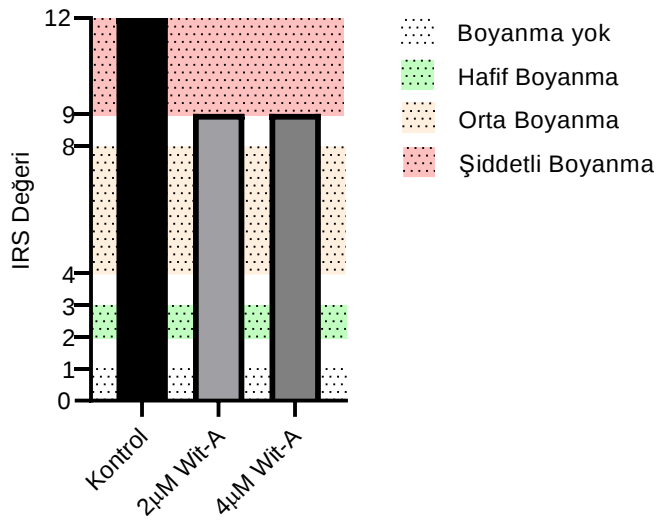
Şekil 4. 25. Kontrol grubuna ait HepG2 hücrelerinde 48 saatlik Akt1' in ışık mikroskobu görüntüsü X20



Şekil 4. 26. Withaferin A'nın 2 μ M dozunun uygulandığı gruba ait HepG2 hücrelerinde 48 saatlik Akt1' in ışık mikroskobu görüntüsü X20



Şekil 4. 27. Withaferin A'nın 4 µM dozunun uygulandığı gruba ait HepG2 hücrelerinde 48 saatlik Akt1' in ışık mikroskobu görüntüsü X20

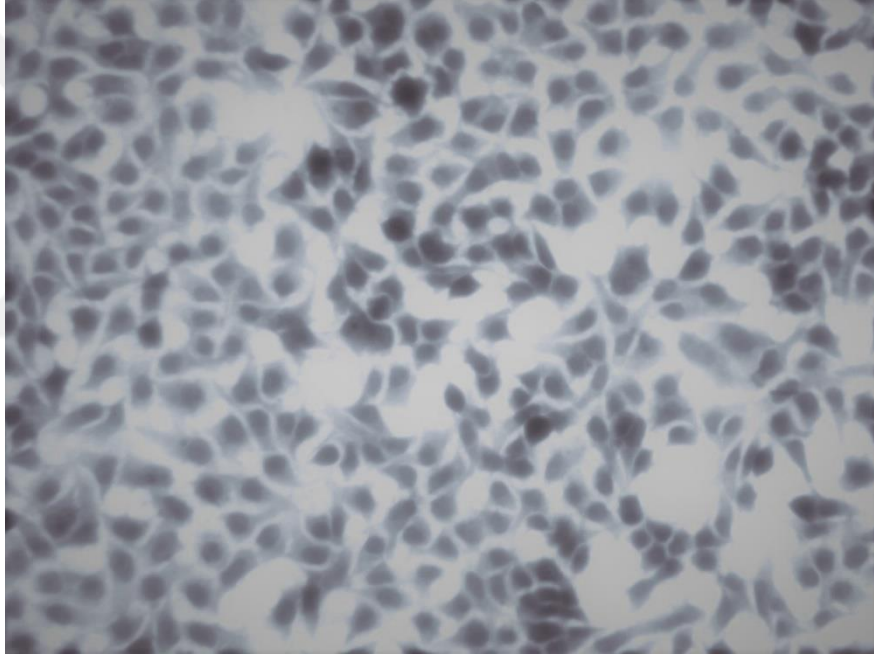


Şekil 4. 28. Kontrol grubu, Withaferin A'nın 2 µM ve 4 µM dozlarının uygulandığı 48 saatlik gruplarda Akt1'in IRS değerlerini gösteren grafik

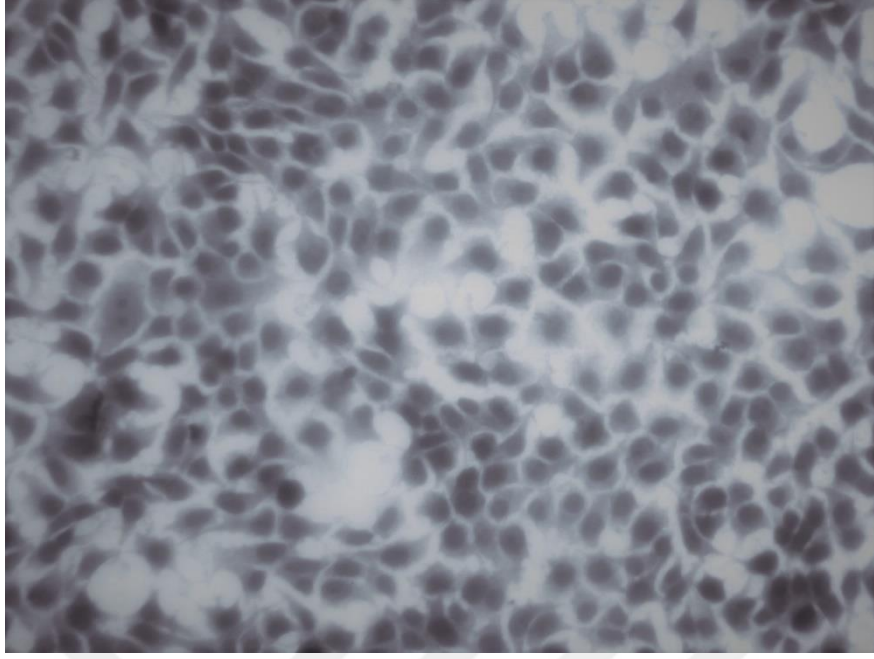
4.4.3. HepG2 hücrelerinde pAkt1'in İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

pAkt1 proteininin immünohistokimyasal olarak boyandığı HepG2 hücreleri değerlendirildiğinde 24. saatte kontrol ve 2Wit. A grubunda yoğun bir boyanma gözlenirken (Şekil 4.29 ve Şekil 4.30) Withaferin A'nın 4 µM dozunun uygulandığı

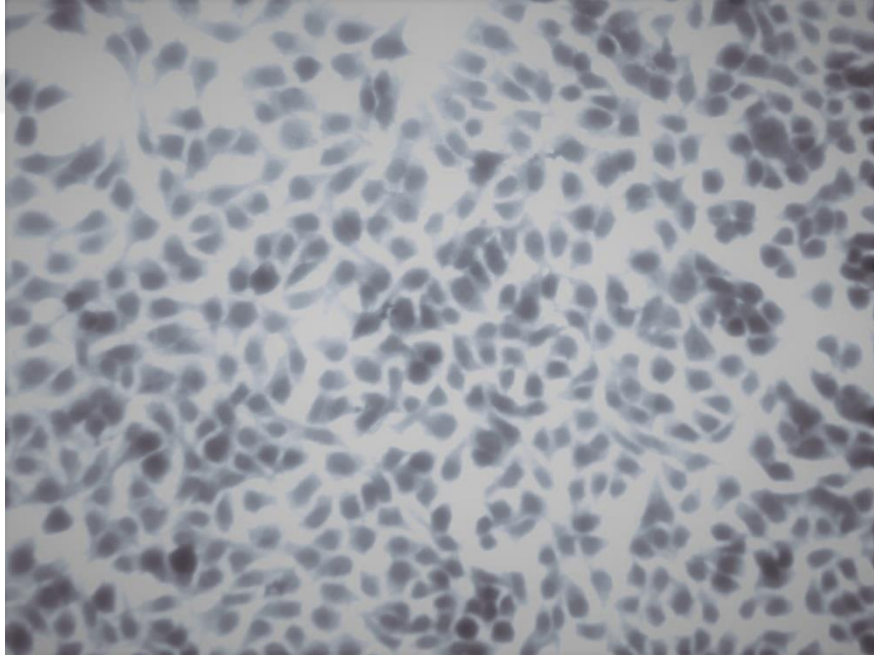
grupta boyanma yoğunluğunun belirgin şekilde azaldığı görüldü (Şekil 4.31). IRS değerleri açısından da kontrol grubu ile 2 Wit. A grubu arasında fark yokken ($p>0,05$) (Şekil 4.32), 4Wit. A grubu ile arasında ki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,01$) (Şekil 4.32). 48. saatte ise kontrol, 2Wit. A ve 4Wit. A gruplarında benzer bir immünohistokimyasal boyanma yoğunluğu izlendi (Şekil 4.33, Şekil 4.34 ve Şekil 4.35). IRS değerleri açısından da kontrol grubu ve Withaferin A grupları arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0,05$) (Şekil 4.36).



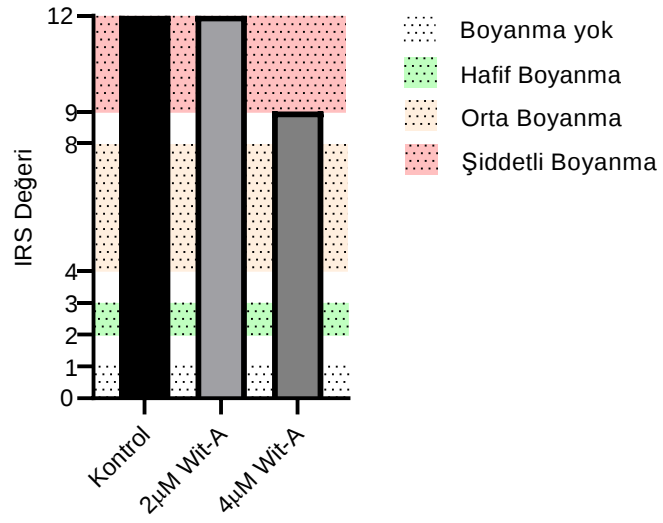
Şekil 4.29. Kontrol grubuna ait HepG2 hücrelerinde 24 saatlik pAkt1' in ışık mikroskobu görüntüsü X20



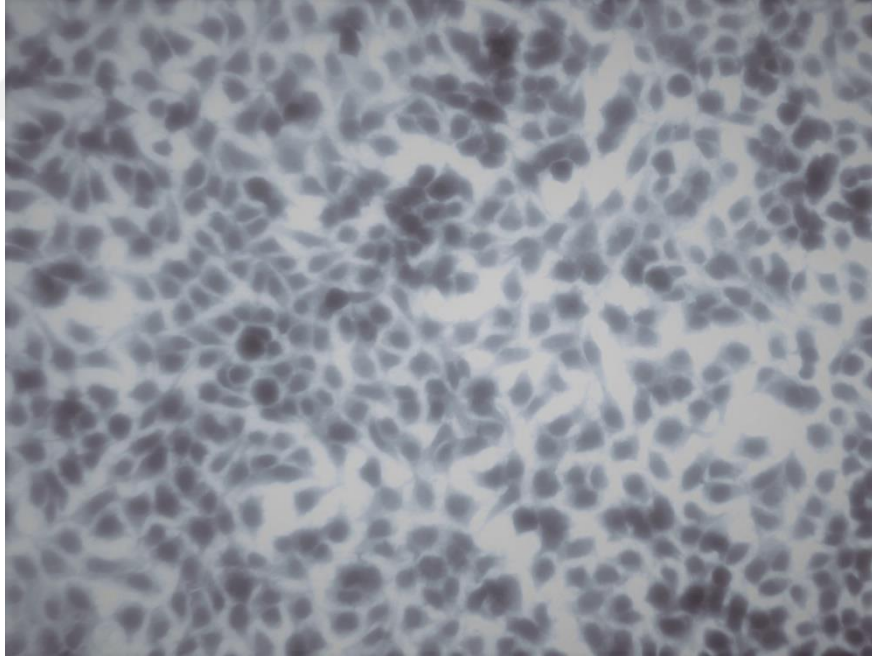
Şekil 4. 30. Withaferin A'nın 2 μ M dozunun uygulandığı gruba ait HepG2 hücrelerinde 24 saatlik pAkt1' in ışık mikroskobu görüntüsü X20



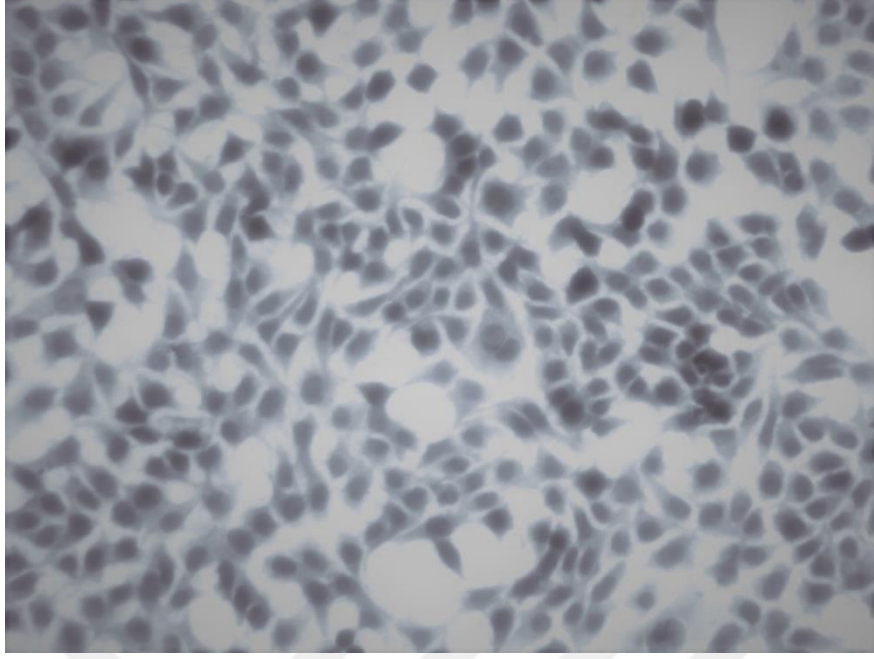
Şekil 4. 31. Withaferin A'nın 4 μ M dozunun uygulandığı gruba ait HepG2 hücrelerinde 24 saatlik pAkt1' in ışık mikroskobu görüntüsü X20



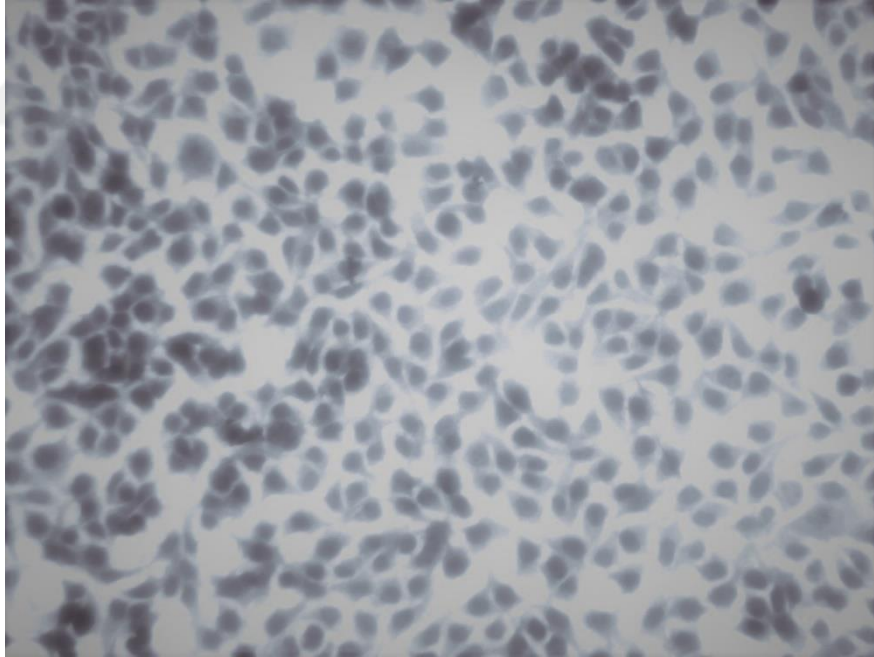
Şekil 4. 32. Kontrol grubu, Withaferin A'nın 2 µM ve 4 µM dozlarının uygulandığı 24 saatlik gruplarda pAkt1'in IRS değerlerini gösteren grafik



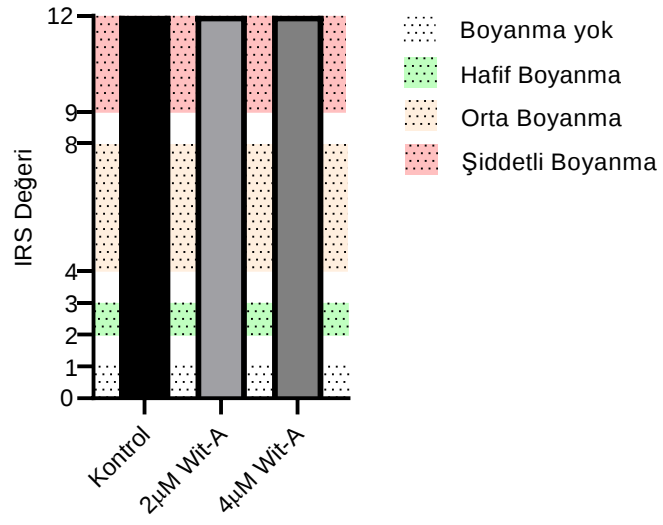
Şekil 4. 33. Kontrol grubuna ait HepG2 hücrelerinde 48 saatlik pAkt1' in ışık mikroskobu görüntüsü X20



Şekil 4. 34. Withaferin A'nın 2 µM dozunun uygulandığı gruba ait HepG2 hücrelerinde 48 saatlik pAkt1' in ışık mikroskobu görüntüsü X20



Şekil 4. 35. Withaferin A'nın 4 µM dozunun uygulandığı gruba ait HepG2 hücrelerinde 48 saatlik pAkt1' in ışık mikroskobu görüntüsü X20



Şekil 4. 36. Kontrol grubu, Withaferin A'nın 2 µM ve 4 µM dozlarının uygulandığı 48 saatlik gruplarda pAkt1'in IRS değerlerini gösteren grafik

5. TARTIŞMA

Kanser son zamanlarda dünya çapında yayılan ve uygulanan çeşitli tedavi protokollerine rağmen tedavinin tam olarak gerçekleşmediği, psikolojik, sosyal ve ekonomik yönden insanları etkileyen önemli bir sağlık sorunudur⁷⁷. Bu durum kanser tedavilerinde yeni ajanların araştırılmasını, kanserin tedavisi ve metastazın önlenmesi amacıyla farklı projeler geliştirilmesini gerekli kılmaktadır.

Karaciğer kanseri dünyadaki en yaygın kanserler arasında beşinci ve kanser ölümleri olarak da üçüncü sıradadır. Karaciğer kanseri prognozu kötü olan kanserler arasındadır. Sağkalım oranı ise %5'ten azdır. Karaciğer kanser hastalarının büyük çoğunluğu hepatoselüler kanserdir⁷⁸⁻⁸⁰. Hepatoselüler kanser tekrar nükse etmeye yatkın olan kanserlerdendir⁷⁹. Hepatoselüler kanser için kronik HBV, HCV enfeksiyonları ana risk faktörleridir⁷⁷⁻⁸¹. Diğer kanser türlerinde olduğu gibi Hepatoselüler kanserde de erken tanı çok önemlidir⁸².

Hepatoselüler kanser tedavisinde uygulanan pek çok tedavi yöntemi mevcuttur. Bu yöntemler hastanın klinik durumuna, kitlenin lokalizasyonuna ve büyüklüğüne, metastaz yapıp yapmadığına bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Cerrahi rezeksiyon, radyofrekans ablasyon, karaciğer nakli, transarteriyel kemoembolizasyon ve sistemik kemoterapi ana tedavi seçeneklerinden bazılarıdır⁸³.

Erken evredeki hastalarda parsiyel hepatektomi yöntemi ile sadece kitlenin çıkarılması ile kür sağlanabiliyorken, ileri evrelerde özellikle karaciğer fonksiyonları bozulmuş metastatik hastalarda karaciğer transplantasyonuna dahi ihtiyaç duyulabilmektedir. Kemoterapi ve radyoterapi Hepatoselüler kanser tedavisinde kullanılan diğer yöntemler olup bu tedavilerde de yan etkilerin fazla olması, hasta konforunu ve hastanın yaşam kalitesini olumsuz olarak etkilemektedir. Son yıllarda

popüler olan immünoterapide ise maliyetin yüksek olması uygulanabilirliğini azaltmaktadır⁸⁰⁻⁸¹.

Hepatoselüler kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar ileri evre Hepatoselüler kansere karşı sadece sınırlı etkinlik göstermektedir ve çoğu hasta önemli yan etkilerle sadece hafif bir sağkalım yararına sahiptir⁸⁴. İleri evre Hepatoselüler kanser hastalarının tedavisinde kullanılan sorafenibe karşı hastalarda zamanla ilaca karşı direnç gelişmektedir⁸⁵. Mevcut HSK tedavilerinin uygulanmasındaki zorluklar nedeniyle daha etkili stratejiler geliştirmeye ve yeni tedavi protokolleri oluşturulmasına acil ihtiyaç duyulmaktadır. Gerçekleştirdiğimiz tez çalışmasında, birçok özelliği olan withaferin A'nın hepatoselüler kanser hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonu üzerindeki etkisini ve withaferin A uygulamasının tümör metastazında ve EMG'de önemli bir role sahip olan periostin üzerine nasıl bir etkisi olduğunu araştırdık. Bu amaçla da, RT-PCR yöntemi ile periostin ve Akt1 gen ekspresyon düzeyleri, immünositokimyasal olarak da periostin, Akt1 ve pAkt1 proteinlerinin ekspresyonlarını analiz ettik.

Withaferin A, *Solanace* familyasına ait⁸⁶, *Withania somnifera*dan ekstrakte edilen ve anti-kanserojen etkiye sahip olan bir vitaloiddir. *Withania somnifera* geniş spektrumlu farmakolojik etkinlik gösteren bir bitkidir ve başarılı bir şekilde çeşitli tıbbi hastalıkların tedavisi için Ayurvedik tıp pratiğinde kullanılmıştır⁸⁷⁻⁸⁸. Aynı zamanda yapılan bir çalışmada Withaferin A'nın antienflamutuar etkisinin yanısıra kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerinin olduğu gösterilmiştir⁸⁹. Bitkinin aktif bileşenlerinden olan Withaferin A'nın toksisitesinin düşük seviyelerde olduğu gözlemlenmiştir⁹⁰. Withaferin A'nın epilepsi ve depresyon gibi hastalıklarda da iyileştirici etkisi bulunmaktadır⁹¹. Alzheimer hastalığı üzerine yapılan bir çalışmada Withaferin A'nın hastalığı inhibe edici aktiviteler gösterdiği belirtilmiştir⁹². Yapılan başka bir çalışmada beyin bozuklukları olarak değerlendirilen alzheimer, huntington, parkinson ve şizofreni gibi hastalıklarda

farmakolojik etki olarak önemli bir yer tuttuğu vurgulanmıştır⁹³. Biz de çalışmamızda Withaferin A'nın HepG2 kanser hücreleri üzerindeki olası olumlu etkisini moleküler düzeyde ve immünohistokimyasal olarak araştırdık.

Çalışmamıza başlarken öncelikle Withaferin A'nın hangi dozlarda etkin olabileceğini belirledik ve Withaferin A'nın farklı dozlarını hücrelerimize uygulayarak MTT Testi yaptık. Yaptığımız bu teste göre LD 50 değerini 4 µM ve LD 20 değerini ise 2 µM olarak belirledik. Çalışmamızda kullanılan dozlar Hui-Liang Zhang ve ark. ve Lin ve ark. ile uyumlu iken, Srivastava ve ark.'ın yaptığı çalışma ile farklılık göstermekteydi⁹⁴⁻⁹⁶.

Lin ve ark.'ın akciğer kanseri hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada Withaferin A'nın kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve migrasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir⁹⁵. Ayrıca Oh ve ark., lösemi U937 hücrelerinin Withaferin A ile 24 saat tedavi edildiği çalışmada Withaferin A'nın hücre canlılığını doza bağlı bir şekilde azalttığını belirlemişlerdir⁹⁷. Aliebrahimi ve ark. da Withaferin A'nın pankreatik kanser kök hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini rapor etmişler⁹⁸. Akciğer kanseri (A549) hücreleri ve osteosarkom (U2OS) hücrelerinde yapılan başka iki çalışmada da Withaferin A'nın düşük dozlarında kanser hücrelerinin motilitesini azaltarak hücre göçünün engellendiği belirtilmiştir^{95,99}. Çalışmamızda yaptığımız yara çizik deneyinde Withaferin A'nın uygulandığı gruplarda yara alanının hem 24 hemde 48. saatlerde kapanmadığı belirlendi. Bu durum Withaferin A'nın HepG2 kanser hücrelerinde proliferasyonu ve migrasyonu azalttığını göstermektedir.

Withaferin A'nın antikanser özelliği ile ilgili birçok çalışma yapılmış olmakla birlikte etki mekanizması ile ilgili çalışma sayısı azdır¹⁰⁰. Withaferin A'nın antikanser özelliklerinin oluşmasında çeşitli sinyal yolları rol oynamaktadır. Withaferin A'nın apoptozu indükleyerek hücre proliferasyonunu azalttığı belirtilmektedir. Withaferin

A'nın FOXO3a, Bax, Notch-4 aktivasyonu, p53 indüksiyonu, mikrotübül bölünmesini ve ROS üretimini artırma gibi yollar aracılığıyla apoptozu artırdığı ifade edilmektedir. Ayrıca Notch-1, Atk/JNK, PARP ve STAT3'ü bloke ederek de kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği rapor edilmiştir⁸⁶. Biz de çalışmamızda hücre proliferasyonunda ve migrasyonunda belirlediğimiz azalmanın periostin, Akt ve pAkt ile ilişkisini araştırdık.

Periostin (Postn), hücre ile hücre dışı mikro ortamları arasındaki iletişime aracılık eden bir hücre proteindir. Yaralı dokularda, tümör stromasında ve enflamatuar bölgelerde eksprese edilen fakat yetişkin normal dokularında bulunmayan periostin güçlü bir pro-anjiyogenik faktördür⁴⁵. Yapılan çalışmalarda periostinin metastatik dokularda kanserle ilişkili fibroblastlar tarafından salgılandığı ortaya konulmuştur. Ayrıca Periostinin karaciğer metastatik nişinde yüksek oranda eksprese edildiği ve dolayısıyla kolon kanserinin karaciğer metastazını desteklediği, hücre sağkalımını ve Akt yolağı aracılığıyla anjiyogenezi artırdığı gösterilmiştir^{43, 101}.

Periostin, PI3K/AKT ve fokal adezyon kinazı (FAK) ile ilişkili çeşitli hücre içi sinyal yollarının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Kanser hücrelerinin epitelial-mezenkimal geçişinde önemli rol oynayan periostin ayrıca kanser hücrelerinin metastaz yapmasında, lenfanjiyogenez, anjiyogenez süreçlerinde ve hücre dışı matrisin yeniden modellenmesinde de rol oynamaktadır¹⁰².

Ayrıca Makita ve ark. ise yaptıkları bir çalışmada, bronşial düz kas hücrelerinde IL-13 indüksiyonundan 24 ve 48 saat sonra, periostinin mRNA ekspresyonunu artırdığını göstermişlerdir ve bu artışın JAK/STAT6, ERK1/2 ve PI3K/AKT yolları aracılığıyla gerçekleştiğini rapor etmişlerdir¹⁰³.

Yaptığımız çalışmada, periostinin mRNA ekspresyonu 4 µM verilen grupta 24. saatte azalmış olarak belirlendi. 48. saatte de azalma olmasına rağmen 24. saate kıyasla fazlaydı ve bu azalmalar istatistiksel olarak anlamlı değildi. 48. saatteki bu yüksekliğin

Withaferin A'nın gen ekspresyonu üzerindeki etkinliđinin giderek azalmıř olmasından kaynaklandığını dűřünmekteyiz. Bu durum bize Withaferin A'nın tekrarlayan dozlarda verilmesinin gen ekspresyonunu baskılama açısından gerekli olabileceđini dűřündürdü. Ayrıca imműnositokimyasal olarak boyanan hücrelerde periostinin imműnoreaktivitesini gösteren IRS deđeri Withaferin A verilen 48 saatlik grupta dűřük olarak tespit edildi.

Bu durum, Withaferin A'nın periostin üzerindeki etkisini erken dönemden ziyade geç dönemde gösterdiđi ve etkinin devam edebilmesi için de tekrarlayan uygulamalara ihtiyaç duyulduđu şeklinde yorumlandı. Withaferin A'nın periostin üzerindeki inhibe edici bir etkisinin olması bize azalan periostinin hepatoselűler kanser hücrelerinde hem proliferasyonu hem de migrasyonu azalttıđını dűřündürdü.

Yapılan bir çalışmada eksojen periostinin, over kanserinde EMG'yi ve metastazı integrin aracılı PI3K/Akt yolunun aktivasyonu yoluyla desteklediği ve periostinin bloke edilmesi üzerine bu kanser hücrelerinin göçünün ve metastazının önemli ölçűde korunduğu rapor edilmiřtir¹⁰⁴.

Periostin tümörijenik aktivitesini, AKT/PKB ya da FAK-aracılı sinyal yolaklarını aktifleştirerek göstermektedir. Böylece kanser hücrelerinde hücre sağkalımı, EMG anjiyogenezi, invazyon ve metastazın artmasına yol aar¹⁰⁵.

Periostin, FAS1 alanı yoluyla hedef hücrelerin yüzeyindeki integrin avβ3, avβ5 ve a6β4'e bağlanır ve hücre içindeki çoklu sinyal yollarını aktive eder. Periostinin, çeşitli tümörlerde Akt fosforilasyonu yoluyla tümörün ilerlemesini desteklediği bildirilmiřtir¹⁰⁶. Yapılan birçok çalışmada osteoblastlar, normal ve kanser hücreleri gibi pekçok hücrede AKT, PI3K ve FAK sinyal yolaklarının aktivasyonu ile periostin iliřkilendirilmiřtir¹⁰⁷. Periostin karaciğer kanseri hastalarının büyük çoğunluğunda eksprese edilir ve yüksek ekspresyonu kötü prognoza işaret eder. Tümörlerin metastazında önemli bir rol oynar. HepG2 ve HUH-7 hücrelerinde periostinin protein ekspresyon seviyesi de yüksektir ve

periostinin sinyal yolları arasında Akt ve fokal adezyon kinaz (FAK), önemli bir yer tutar. Bir Akt kinazı olan AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK), AP-2 α 'yı aktive edebilir¹⁰⁸.

Suman ve ark. epitelyal mezenkimal geçişin düzenlenmesinde önemli rol oynayan AKT aktivitesinin Withaferin A tarafından inhibe edildiğini ve AKT'nin neden olduğu agresif tümör büyümesini önemli ölçüde bastırdığını belirtmişlerdir. Ayrıca epitelyalden mezenkimale geçiş markerlarını aşağı doğru düzenleyerek hücre proliferasyonu, göçü ve istilasının inhibisyonuna yol açtığını göstermişlerdir⁴³.

Oh ve ark. Withaferin A'nın pulmoner epitalyel hücrelerde Akt'nin fosforilasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir¹⁰⁹. Bir diğer çalışmada insan metastatik kanser Caski hücrelerinde Withaferin A'nın Akt'yi inhibe ederek tümör invazyonu ve metastazını kontrol edebileceği belirtilmiştir¹¹⁰. Wang ve ark. da insan meme kanseri hücrelerinde Withaferin A'nın, düşük dozlarda Akt'nin aktivasyonunu ortaya çıkardığını, ancak daha yüksek dozlarda Akt sinyalini inhibe ettiğini belirtmişlerdir¹¹¹. Başka bir çalışmada da Aliebrahimi ve ark. Withaferin A ile tedavi edilen pankreatik kanser kök hücrelerinde Akt gibi ilgili proteinlerde azalma olduğunu bulmuşlardır⁹⁸. Periostinin, PI3K/AKT ve Wnt/ β -katenin sinyal yolları aracılığıyla tümör metastatik büyümesini desteklediği belirtilmektedir¹¹².

Yaptığımız çalışmada Real-Time PCR ile yaptığımız analiz sonucunda Akt1'in gen ekspresyon düzeylerinin 2 μ M ve 4 μ M dozlarında Withaferin A verildiğinde belirgin bir şekilde azaldığı tespit edildi. Yine immünohistokimyasal olarak da Withaferin A verilen gruplarda Akt1 proteinin immünoaktivitesinin azaldığı gözlemlendi. Böylece Withaferin A'nın Akt1'i inhibe etmek suretiyle kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve migrasyonunu azaltmış olabileceği düşünüldü. Yaptığımız çalışmada pAkt1'e ait IRS değerlerinin 24. saatte Akt1'e benzer şekilde azaldığı izlendi. Ancak bu azalma 48. saatte

izlenmedi. Bu durum ise Withaferin A'nın doz tekrarı yapılması gerektiği şeklinde yorumlandı.

İmmünohistokimyasal boyama sonucu Withaferin A'nın 48. saatlik uygulamasında Periostinin ve Akt1'in kontrol grubuna göre azalması birbiriyle ilişkili olduklarını göstermektedir.

Yapılan bir çalışmada periostin seviyesinin sağlıklı kalp dokularında çok düşük olduğu ancak hasarlı kalp dokusunda arttığı belirtilmiştir. Periostinin hücre-matriks sinyal yolağına, hücrelerin canlı kalma yeteneklerine ve EMG'ye aracılık ederek fonksiyon gösterdiği belirtilmektedir¹¹³. Başka bir çalışmada periostinin, kolon kanserinde kanseri teşvik eden bir molekül olduğu ve periostinin inhibisyonunun EMG'yi baskılayabileceği gösterilmiştir¹¹⁴.

Periostin hücre dışı bir matris proteindir ve meme kanserinde EMG kötü prognozu ile ilişkilendirilmiş, periostinin yıkılmasının ise tümör hücrelerinin aşırı büyümesini ve istilasını inhibe ettiği bildirilmiştir¹¹⁵.

Yapılan bir çalışmada kolon kanserinde periostin hücre içi sinyalleşme için, AKT/PKB yoluyla hücre sağkalımını artırdığı ve kolon kanserinin metastatik büyümesini teşvik ettiği rapor edilmiştir¹⁰¹. Başka bir çalışmada ise kolanjiokanser hücrelerinde periostinin PI3K yolunun aktivasyonu yoluyla pAKT'yi indüklediği gösterilmiştir¹¹⁶.

İnsan kanserlerinde en sık aktive olan sinyal yolu Akt tarafından düzenlenen yoldur. pAkt1 (Ser473), Akt1'in fosforile edilmesinden sorumludur. pAkt1'in fosforilasyonu, Akt1'in kinaz aktivitesini daha da artırır¹¹⁷. Yapılan bir çalışmada p-Akt1'in aşırı ekspresyonunun mukozal melanomlarda bağımsız bir prognostik belirteç olduğunu ve sinonazal melanomlarda önemli ölçüde yukarı regüle edildiğini aynı zamanda meme, gastrik ve özofageal skuamöz hücreli karsinomlarda olumsuz sonuçlarla

ilişkilendirildiğini göstermişlerdir¹¹⁸. Başka bir çalışmada da pAktl'in insan mide kanserlerinde aşırı eksprese edildiğini bildirmişlerdir¹¹⁹.

Yaptığımız çalışmada, birçok özelliği olan withaferin A'nın, hepatoselüler kanser hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonu üzerindeki etkisini ve withaferin A uygulamasının tümör metastazında ve EMG'de önemli rol oynayan periostin aracılığıyla gerçekleştirmiş olabileceğini belirledik. Periostin, Akt ve pAkt moleküllerinin hem immünohistokimyasal olarak hem de RT-PCR ile analizleri sonucunda elde ettiğimiz bulgular bize, bu moleküllerin azaldığını gösterdi. Yaptığımız çalışma, Withaferin A'nın EMG üzerinde önemli rol oynayan periostini azalttığını, azalan periostinin de hem hücre proliferasyonu ve migrasyonunu önlediğini hem de EMG'yi engellediğini göstermektedir. Yani Akt1 ve pAkt1'in azalması da, periostinin bahsettiğimiz etkisini Akt aktivasyonu aracılığıyla gerçekleştirdiğini desteklemektedir.

Elde ettiğimiz bulgular ışığında, withaferin A'nın hepatoselüler kanser vakalarında hem EMG'nin azalması hem de hücre proliferasyonu ve migrasyonunun azalması ile tedavi edici etkisi olabileceğini düşünmekteyiz. Withaferin A'nın, hepatoselüler kanser tedavisinde kullanılabilecek olması, hastaların konforunu artıracak ve psikolojik açıdan daha iyi hissetmelerini sağlayabilecektir. Bununla birlikte hastalar iş ve sosyal hayatlarına devam edebileceklerdir. Ayrıca çalışmamızın, gelecekte bu konuda yapılacak çalışmalara ve araştırmacılara yol göstereceğine inanılmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamızda Withania somniferadan elde edilen, antikanser vb gibi özellikleri bulunan, farmakolojik ve ayurvedik tıp tedavisinde kullanılan Withaferin A'yı kullandık. Bu maddeyi kanser teşhislerinde kötü prognoz belirteci olarak görülen ve tümörün metastaz yapmasında önemli rol oynayan periostin üzerine etkisini göstermek amacıyla hepatoselüler kanser hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonu üzerindeki etkisini kanser hücre hatlarından biri olan HepG2 (ATCC ® HB-8065 TM) kanser hücrelerine uyguladık.

Yaptığımız çalışmalar sonucunda elde ettiğimiz MTT verilerine göre LD 20 (2µM) ve LD (4µM) hücre viabilite değerlerini bulduk. Yara çizik deneyine göre de uyguladığımız Withaferin A dozlarının (2µM ve 4µM), kanser hücrelerinde proliferasyonu ve migrasyonu önlediğini tespit ettik. Real-Time PCR ve immünohistokimyasal boyama çalışmalarına göre de Withaferin A'nın Akt1'i inhibe ettiği, periostinin ve Akt1'in kontrol grubuna göre azalmasının birbiriyle ilişkili olduklarını ve hepatoselüler kanser hücrelerinde hem proliferasyonu hem de migrasyonu azalttığı sonuçlarına vardık.

Elde ettiğimiz olumlu sonuçlar bize Withaferin A'nın hepatoselüler kanser vakalarında tedavi edici etkisinin olabileceğini, kanser tedavilerinde kullanılan kemoterapötik ilaçların yan etkilerini azaltabileceğini ve kanser hastalarının psikolojik, ekonomik ve sosyal yönden olumlu şekilde etkilenebileceklerini ayrıca sağkalım süresini artırdığını düşündürdü.

Ancak Withaferin A'nın başka sinyal mekanizmalarıyla farklı kanser hücrelerindeki rolünün belirlenmesi de gelecekte daha da değerli olacağı kanatındeyiz.

KAYNAKLAR

1. Kara, M. Kronik Servisit ve Serviks kanserlerinde mitokondrial DNA delesyonlarının incelenmesi. Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi. Erzurum: Atatürk Üniversitesi. 2009.
2. Kuppusamy P, Nagalingam A, Muniraj N, Saxena NK, Sharma D. Concomitant activation of ETS-like transcription factor-1 and Death Receptor-5 via extracellular signal-regulated kinase in withaferin A-mediated inhibition of hepatocarcinogenesis in mice. *Sci. Rep.* 2017;7:17943.
3. Giannelli G, Koudelkova P, Dituri F, Mikulits W. Role of epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 2016;65:798–808.
4. O'Dwyer DN, Moore BB. The role of periostin in lung fibrosis and airway remodeling. *Cell. Mol. Life Sci.* 2017;74:4305–4314.
5. Chung SS, Wu Y, Okobi Q, Adekoya D, Atefi M, Clarke O, et al. Proinflammatory Cytokines IL-6 and TNF- α Increased Telomerase Activity through NF- κ B/STAT1/STAT3 Activation, and Withaferin A Inhibited the Signaling in Colorectal Cancer Cells. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:e5958429.
6. Yuan K, Xie K, Lan T, Xu L, Chen X, Li X, et al. TXNDC12 promotes EMT and metastasis of hepatocellular carcinoma cells via activation of β -catenin. *Cell Death Differ.* 2020;27:1355–1368.

7. Zaimy MA, Saffarzadeh N, Mohammadi A, Pourghadamyari H, Izadi P, Sarli A, et al. New methods in the diagnosis of cancer and gene therapy of cancer based on nanoparticles. *Cancer Gene Ther.* 2017;24:233–243.
8. Roy PS, Saikia BJ. Cancer and cure: A critical analysis. *Indian J. Cancer* 2016;53:441–442.
9. Feng J, Li J, Wu L, Yu Q, Ji J, Wu J, et al. Emerging roles and the regulation of aerobic glycolysis in hepatocellular carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 2020;39:126.
10. Yin W, Wang J, Jiang L, James Kang Y. Cancer and stem cells. *Exp. Biol. Med.* 2021;246:1791–1801.
11. Tektemur, N. Farelerde Asetaminofen ile oluşturulan Akut Karaciğer hasarında N-Asetil Sistein ve Siklosporin A'nın etkileri. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Elazığ Fırat Üniversitesi. 2020.
12. Kaya, M. Sıçanlarda Tiyoaseramid ile oluşturulan karaciğer hasarı üzerine Juncus Inflexus (Sazak) ekstraktının etkilerinin araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Kayseri Erciyes Üniversitesi. 2021.
13. Türk, A. Siklofosfamid Uygulanan Sıçanların Karaciğer Dokusunda Asprosin İmmünreaktivitesi Üzerine Vitamin D'nin Etkileri. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

- Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Elazığ Fırat Üniversitesi. 2021.
14. Ünalmiş, S. Karaciğer Dokusunda Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Hasara Karşı Beta Glukan'ın Koruyucu Etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Kayseri Erciyes Üniversitesi. 2019.
 15. Tekin Kaya, B. Canlı Verici Karaciğer Transplantasyonunda Vericinin Sağ ve Sol Karaciğer Hacmi ile Karaciğer Vasküler Yapılarının Çapları Arasındaki Oranın Değerlendirilmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Anatomi Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul Medipol Üniversitesi. 2022.
 16. Doğanyigit, Z. Endotoksemi Oluşturulmuş Sıçanlarda Propolisin Karaciğer Koruyucu Etkinliğinin Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Kayseri Erciyes Üniversitesi. 2012.
 17. Gençler, C. Doksorubisin Uygulanmış Sıçanlarda Metformin'in Karaciğere Etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi. 2020.
 18. Kaya, S. Alkolsüz Yağlı Karaciğer Hastalığının Sınıflandırılmasında İnvaziv (Histolojik) ve Noninvaziv (Sitokeratin 18 Ve Tip III Kollajen N-Terminal Propeptid) Yöntemler Arasındaki Korelasyon. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Konya Selçuk Üniversitesi. 2021.

19. Sözen, ME. Gümüş Nanopartikülünün Boyut ve Doz Bağımlı Olarak Karaciğere Etkisinin Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi. 2017.
20. Coşkun Akçay, N. Fruktöz ve Bisfenol A'nın Eş Zamanlı Uygulaması ile Adipositokinlerde ve Karaciğer Dokusunda Oluşacak Olası Hasara Melatoninin Etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Ankara Gazi Üniversitesi. 2017.
21. Erhan, F. Tavuk ve Rat Karaciğerinde Yağ ve Karbonhidrat Metabolizmalarının Karşılaştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi. 2020.
22. Cihan, G. Etanolün Rat Karaciğer Parankimi ve Vitamin A Depolanması Üzerine Etkilerinin Işık ve Elektron Mikroskopik Olarak İncelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi. 2010.
23. Junqueira, LC. C J. *Basic Histology. (10 th edition), USA, 2003. 332-344.*
24. Tür, L. Karbon tetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda *matricaria chamomilla* 1 nin karaciğer üzerine koruyucu etkilerinin araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Biyokimya (Veterinerlik) Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi. 2008.

25. Aydemir Celep, N. SıçanlardaÇekal Ligasyon Perforasyon Yöntemi ile İndüklenen Sepsis Modelinde Silymarinin Karaciğer Dokusu Üzerine Etkisinin Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Erzurum Atatürk Üniversitesi. 2020.
26. Şentürk, H. Serbest radikal hasarının hepatobilier sistem hastalıklarındaki rolü. Kocatepe Tıp Dergisi. 2004. 5, 1-8.
27. Dixon LJ, Barnes M, Tang H, Pritchard MT, Nagy LE. Kupffer Cells in the Liver. *Compr. Physiol.* 2013;3:785–797.
28. Winau F, Quack C, Darموise A, Kaufmann SH. Starring stellate cells in liver immunology. *Curr. Opin. Immunol.* 2008;20:68–74.
29. Yurdakul U, Uçanku NL, Ömero S, Hat MT. Değişik Yaş Gruplarındaki Sıçan Karaciğer Dokusunda Bağ Dokusu Liflerinin Dağılımı.
30. Eşrefoğlu, M. *Özel Histoloji, İstanbul Tıp Kitabevi. 2016.*
31. Erdem Koç, G. Tiyoasetamid ile İndüklenmiş Sıçan Karaciğer Fibrozisine Bor Bileşikleri ile Muamele Edilmiş Sünnet Derisi Kökenli Mezenkimal Kök Hücrenin Etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi. 2019.
32. Uslu, S. Verapamil Tedavisinin Embriyonik Karaciğer Dokusu Kök Hücreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İzmir Ege Üniversitesi. 2007.

33. Huang A, Yang X-R, Chung W-Y, Dennison AR, Zhou J. Targeted therapy for hepatocellular carcinoma. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2020;5:146.
34. Alvarez M, Benhammou JN, Darci-Maher N, French SW, Han SB, Sinsheimer JS, et al. Human liver single nucleus and single cell RNA sequencing identify a hepatocellular carcinoma-associated cell-type affecting survival. *Genome Med.* 2022;14:50.
35. Aljumah, A, Kuriry, H, Alghamdi, H. Clinicopathologic characteristics and outcomes of hepatocellular carcinoma associated with chronic hepatitis B versus hepatitis C infection. 2018. [<https://www.annsaudimed.net/doi/full/10.5144/0256-4947.2018.358>]. 29.11.2022 tarihinde erişilmiştir.
36. Wang R, Geller DA, Wink DA, Cheng B, Billiar TR. NO and hepatocellular cancer. *Br. J. Pharmacol.* 2020;177:5459–5466.
37. Parikh S, Hyman D. Hepatocellular Cancer: A Guide for the Internist. *Am. J. Med.* 2007;120:194–202.
38. Yang C, Huang X, Liu Z, Qin W, Wang C. Metabolism-associated molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Mol. Oncol.* 2020;14:896–913.
39. Ma X-L, Hu B, Tang W-G, Xie S-H, Ren N, Guo L, et al. CD73 sustained cancer-stem-cell traits by promoting SOX9 expression and stability in hepatocellular carcinoma. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* 2020;13:11.

40. Tanrıverdi, Z. Asbeste Bağlı Malign Mezotelyomada Serum, Periostin, Tenascin-C, Neopterin, YKL-40 ve İndolamin 2,3- Dioksijenaz Düzeylerinin Değerlendirilmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı. Ortak Doktora Tezi. Malatya. İnönü ve Ankara Üniversitesi.2020.
41. Smirne C, Mulas V, Barbaglia MN, Mallela VR, Minisini R, Barizzzone N, et al. Periostin Circulating Levels and Genetic Variants in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Diagnostics* 2020;10:1003.
42. Chen G, Nakamura I, Dhanasekaran R, Iguchi E, Tolosa EJ, Romecin PA, et al. Transcriptional Induction of Periostin by a Sulfatase 2–TGF β 1–SMAD Signaling Axis Mediates Tumor Angiogenesis in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res.* 2017;77(3):632–645.
43. Cui D, Huang Z, Liu Y, Ouyang G. The multifaceted role of periostin in priming the tumor microenvironments for tumor progression. *Cell. Mol. Life Sci.* 2017;74(23):4287–4291.
44. Zhou W, Ke SQ, Huang Z, Flavahan W, Fang X, Paul J, et al. Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. *Nat. Cell Biol.* 2015;17(2):170–182.
45. Takeshita S, Kikuno R, Tezuka K, Amann E. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochem. J.* 1993;294(1):271–278.

46. Gillan L, Matei D, Fishman DA, Gerbin CS, Karlan BY, Chang DD. Periostin Secreted by Epithelial Ovarian Carcinoma Is a Ligand for $\alpha V\beta 3$ and $\alpha V\beta 5$ Integrins and Promotes Cell Motility¹. *Cancer Res.* 2002;62(18):5358–5364.
47. Ruan K, Bao S, Ouyang G. The multifaceted role of periostin in tumorigenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009;66(14):2219–2230.
48. Raman A, Parnell SC, Zhang Y, Reif GA, Dai Y, Khanna A, et al. Periostin overexpression in collecting ducts accelerates renal cyst growth and fibrosis in polycystic kidney disease. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* 2018;315(6):F1695–F1707.
49. Khan TA, Gohel AK, Mallya R. Standardisation and HPTLC Method Development of Marketed Ayurvedic Formulation–Balarishta. 8.
50. Palliyaguru DL, Singh SV, Kensler TW. Withania somnifera: From prevention to treatment of cancer. *Mol. Nutr. Food Res.* 2016;60:1342–1353.
51. Vanden Berghe W, Sabbe L, Kaileh M, Haegeman G, Heyninck K. Molecular insight in the multifunctional activities of Withaferin A. *Biochem. Pharmacol.* 2012;84:1282–1291.
52. Mohan R, Hammers H, Bargagna-mohan P, Zhan X, Herbstritt C, Ruiz A, et al. Withaferin A is a potent inhibitor of angiogenesis. *Angiogenesis* 2004;7:115–122.
53. Pazarbaşı A, Kasap M, Kasap H. Kanser Yolakları. *Arşiv Kaynak Tarama Derg.* 2011;20:187–229.

54. Valizadeh A, Majidinia M, Samadi-Kafil H, Yousefi M, Yousefi B. The roles of signaling pathways in liver repair and regeneration. *J. Cell. Physiol.* 2019;234:14966–14974.
55. Brabletz S, Schuhwerk H, Brabletz T, Stemmler MP. Dynamic EMT: a multi-tool for tumor progression. *EMBO J.* 2021;40:e108647.
56. Babaei G, Aziz SG-G, Jaghi NZZ. EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. *Biomed. Pharmacother.* 2021;133:110909.
57. Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology (Phila.)* 2007;39:305–318.
58. Kim H, Lee S, Shin E, Seong KM, Jin YW, Youn H, et al. The Emerging Roles of Exosomes as EMT Regulators in Cancer. *Cells* 2020;9(4):861.
59. Xu W, Yang Z, Lu N. A new role for the PI3K/Akt signaling pathway in the epithelial-mesenchymal transition. *Cell Adhes. Migr.* 2015;9:317–324.
60. Suman S, Das TP, Sirimulla S, Alatassi H, Ankem MK, Damodaran C. Withaferin-A suppress AKT induced tumor growth in colorectal cancer cells. *Oncotarget* 2016;7:13854–13864.
61. Huaman J, Bach C, Ilboudo A, Ogunwobi OO. Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Hepatocellular Carcinoma. In: Liu C, ed. *Precision Molecular Pathology of Liver Cancer*. Molecular Pathology Library. Cham: Springer International Publishing; 2018:131–152.

62. Arslan DÖ, Korkmaz G, Gözüaık D. Otofaji: Bir Hücresele Stres Yanıtı ve Ölüme Mekanizması. :11.
63. Faes S, Dormond O. PI3K and AKT: Unfaithful Partners in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16(9):21138–21152.
64. Xie Y, Shi X, Sheng K, Han G, Li W, Zhao Q, et al. PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia (Review). *Mol. Med. Rep.* 2019;19(2):783–791.
65. Hassan B, Akcakanat A, Holder AM, Meric-Bernstam F. Targeting the PI3-Kinase/Akt/mTOR Signaling Pathway. *Surg. Oncol. Clin.* 2013;22(4):641–664.
66. Antmen ŞE. Endometrial kanserde lipogenez ile AMPK/Akt/mTOR sinyal iletim yolu ilişkisi. 2020. [<https://acikbilim.yok.gov.tr/handle/20.500.12812/219189>]. 15.2.2023 tarihinde erişilmiştir.
67. Hsu C-M, Lin J-J, Su J-H, Liu C-I. 13-Acetoxy sarcocrossolide induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells through mitochondrial dysfunction and suppression of the PI3K/AKT/mTOR/p70S6K signalling pathway. *Pharm. Biol.* 60(1):2276–2285.
68. Cell Signaling Technology. <https://www.cellsignal.com/pathways/pathways-akt-signaling>. 21.11.2022.
69. Berber, B, Canbek, M. The importance of mTOR signal pathway in liver regeneration. *FNG Bilim Tıp Transplant. Derg.* 2017;2(2):68–73.

70. Yanshen Z, Lifen Y, Xilian W, Zhong D, Huihong M. miR-92a promotes proliferation and inhibits apoptosis of prostate cancer cells through the PTEN/Akt signaling pathway. *Libyan J. Med.* 2021;16(1):1971837.
71. Kiliç K, Kesim B, Sümer Z, Polat Z, Öztürk A. Tam seramik materyallerinin biyouyumluluğunun MTT testi ile incelenmesi. *Sağlık Bilimleri Dergisi.* 2010;19(2):125-132.
72. Liang C-C, Park AY, Guan J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protoc.* 2007;2(2):329–333.
73. Cömertpay G, Lüleyap Ü, Yilmaz MB, Tufan T, Pazarci P. Investigation of the effects of nicotine and resveratrol on expression levels of Sox2 and Sox4 genes in human amniotic cell culture by real time PCR. *Cukurova Med. J.* 2018;43(1):7–12.
74. Yu T, Li Z, Ruan C, Chen F, Lu X, Cai W. Development of an absorption-corrected method for 3D computed tomography of chemiluminescence. *Meas. Sci. Technol.* 2019;30(4):045403.
75. Fedchenko N, Reifenrath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue – a review. *Diagn. Pathol.* 2014;9(1):221.
76. Demirci T. The Protective Effect of N-acetylcysteine Against Methotrexate-Induced Hepatotoxicity in Rat. *Eurasian J. Med. Investig.* 2019. doi:10.14744/ejmi.2019.42299.

77. Sivasankarapillai VS, Madhu Kumar Nair R, Rahdar A, Bungau S, Zaha DC, Aleya L, et al. Overview of the anticancer activity of withaferin A, an active constituent of the Indian ginseng *Withania somnifera*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2020;27(21):26025–26035.
78. He S, Tang S. WNT/ β -catenin signaling in the development of liver cancers. *Biomed. Pharmacother.* 2020;132:110851.
79. Lv K, Cao X, Du P, Fu J-Y, Geng D-Y, Zhang J. Radiomics for the detection of microvascular invasion in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 2022;28(20):2176–2183.
80. Chen Y, E C-Y, Gong Z-W, Liu S, Wang Z-X, Yang Y-S, et al. Chimeric antigen receptor-engineered T-cell therapy for liver cancer. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 2018;17(4):301–309.
81. Ridruejo E. Does hepatitis B virus therapy reduce the risk of hepatocellular carcinoma? *Expert Opin. Drug Saf.* 2015;14(3):439–451.
82. Greene CM, Varley RB, Lawless MW. MicroRNAs and liver cancer associated with iron overload: Therapeutic targets unravelled. *World J. Gastroenterol. WJG* 2013;19(32):5212–5226.
83. Kawano Y, Kaneya Y, Aoki Y, Yoshioka M, Matsushita A, Shimizu T, et al. Medical Treatment for Hepatocellular Carcinoma in Japan. *J. Nippon Med. Sch. Nippon Ika Daigaku Zasshi* 2022;89(2):154–160.

84. Lambring CB, Ghabach B, Narra K, Basha R. Current Perspectives in Immunotherapy for Liver Cancer. *Crit. Rev. Oncog.* 2020;25(1). doi:10.1615/CritRevOncog.2020034965.
85. Makol A, Kaur H, Sharma S, Kanthaje S, Kaur R, Chakraborti A. Vimentin as a potential therapeutic target in sorafenib resistant HepG2, a HCC model cell line. *Clin. Mol. Hepatol.* 2020;26(1):45–53.
86. Sultana T, Okla MK, Ahmed M, Akhtar N, Al-Hashimi A, Abdelgawad H, et al. Withaferin A: From Ancient Remedy to Potential Drug Candidate. *Molecules* 2021;26(24):7696.
87. McKenna M, Gachuki B, Alhakeem S, Oben K, Rangnekar V, Gupta R, et al. Anti-cancer activity of withaferin A in B-cell lymphoma. *Cancer Biol. Ther.* 2015;16(7):1088–1098.
88. Semple D, Smyth R. *Chapter 1: Thinking about psychiatry*. 4th ed. Oxford University Press.; 2019.
89. Yan Z, Guo R, Gan L, Lau WB, Cao X, Zhao J, et al. Withaferin A inhibits apoptosis via activated Akt-mediated inhibition of oxidative stress. *Life Sci.* 2018;211:91–101.
90. Singh N, Yadav SS, Rao AS, Nandal A, Kumar S, Ganaie SA, et al. Review on anticancerous therapeutic potential of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *J. Ethnopharmacol.* 2021;270:113704.

91. Dutta R, Khalil R, Green R, Mohapatra SS, Mohapatra S. Withania Somnifera (Ashwagandha) and Withaferin A: Potential in Integrative Oncology. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(21):5310.
92. Das R, Rauf A, Akhter S, Islam MN, Emran TB, Mitra S, et al. Role of Withaferin A and Its Derivatives in the Management of Alzheimer's Disease: Recent Trends and Future Perspectives. *Mol. Basel Switz.* 2021;26(12):3696.
93. Zahiruddin S, Basist P, Parveen A, Parveen R, Khan W, Gaurav null, et al. Ashwagandha in brain disorders: A review of recent developments. *J. Ethnopharmacol.* 2020;257:112876.
94. Srivastava AN, Ahmad R, Khan MA. Evaluation and Comparison of the In Vitro Cytotoxic Activity of Withania somnifera Methanolic and Ethanolic Extracts against MDA-MB-231 and Vero Cell Lines. *Sci. Pharm.* 2016;84(1):41–59.
95. Lin C-C, Yang T-Y, Lu H-J, Wan C-K, Hsu S-L, Wu C-C. Attenuating role of withaferin A in the proliferation and migration of lung cancer cells via a p53-miR-27a/miR-10b pathway. *Oncol. Lett.* 2021;21(3):1–1.
96. Zhang H-L, Zhang H. Withaferin-A induces apoptosis in osteosarcoma U2OS cell line via generation of ROS and disruption of mitochondrial membrane potential. *Pharmacogn. Mag.* 2017;13(51):523.

97. Oh JH, Lee T-J, Kim SH, Choi YH, Lee SH, Lee JM, et al. Induction of apoptosis by withaferin A in human leukemia U937 cells through down-regulation of Akt phosphorylation. *Apoptosis* 2008;13(12):1494–1504.
98. Aliebrahimi S, Kouhsari SM, Arab SS, Shadboorestan A, Ostad SN. Phytochemicals, withaferin A and carnosol, overcome pancreatic cancer stem cells as c-Met inhibitors. *Biomed. Pharmacother.* 2018;106:1527–1536.
99. Chaudhary A, Kalra RS, Malik V, Katiyar SP, Sundar D, Kaul SC, et al. 2, 3-Dihydro-3 β -methoxy Withaferin-A Lacks Anti-Metastasis Potency: Bioinformatics and Experimental Evidences. *Sci. Rep.* 2019;9:17344.
100. Nagy Z, Cheung BB, Tsang W, Tan O, Herath M, Ciampa OC, et al. Withaferin A activates TRIM16 for its anti-cancer activity in melanoma. *Sci. Rep.* 2020;10:19724.
101. Bao S, Ouyang G, Bai X, Huang Z, Ma C, Liu M, et al. Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Cell* 2004;5(4):329–339.
102. Ratajczak-Wielgomas K, Dziegiel P. The role of periostin in neoplastic processes. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2015;53(2):120–132.
103. Makita K, Mikami Y, Matsuzaki H, Miyashita N, Takeshima H, Noguchi S, et al. Mechanism of Periostin Production in Human Bronchial Smooth Muscle Cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2018;175(1–2):26–35.

104. Yue H, Li W, Chen R, Wang J, Lu X, Li J. Stromal POSTN induced by TGF- β 1 facilitates the migration and invasion of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 2021;160(2):530–538.
105. Thongchot S, Singsuksawat E, Sumransub N, Pongpaibul A, Trakarnsanga A, Thuwajit P, et al. Periostin regulates autophagy through integrin α 5 β 1 or α 6 β 4 and an AKT-dependent pathway in colorectal cancer cell migration. *J. Cell. Mol. Med.* 2020;24(21):12421–12432.
106. Chu L, Wang F, Zhang W, Li H, Xu J, Tong X. Periostin Secreted by Carcinoma-Associated Fibroblasts Promotes Ovarian Cancer Cell Platinum Resistance Through the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Technol. Cancer Res. Treat.* 2020;19:1533033820977535.
107. Labrèche C, Cook DP, Abou-Hamad J, Pascoal J, Pryce BR, Al-Zahrani KN, et al. Periostin gene expression in neu-positive breast cancer cells is regulated by a FGFR signaling cross talk with TGF β /PI3K/AKT pathways. *Breast Cancer Res.* 2021;23(1):107.
108. Chen G, Wang Y, Zhao X, Xie X, Zhao J, Deng T, et al. A positive feedback loop between Periostin and TGF β 1 induces and maintains the stemness of hepatocellular carcinoma cells via AP-2 α activation. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2021;40(1):218.

109. Oh JH, Kwon TK. Withaferin A inhibits tumor necrosis factor- α -induced expression of cell adhesion molecules by inactivation of Akt and NF- κ B in human pulmonary epithelial cells. *Int. Immunopharmacol.* 2009;9(5):614–619.
110. Lee DH, Lim I-H, Sung E-G, Kim J-Y, Song I-H, Park YK, et al. Withaferin A inhibits matrix metalloproteinase-9 activity by suppressing the Akt signaling pathway. *Oncol. Rep.* 2013;30(2):933–938.
111. Wang H-C, Hu H-H, Chang F-R, Tsai J-Y, Kuo C-Y, Wu Y-C, et al. Different effects of 4 β -hydroxywithanolide E and withaferin A, two withanolides from Solanaceae plants, on the Akt signaling pathway in human breast cancer cells. *Phytomedicine* 2019;53:213–222.
112. Lu Y, Liu X, Jiao Y, Xiong X, Wang E, Wang X, et al. Periostin promotes liver steatosis and hypertriglyceridemia through downregulation of PPAR α . *J. Clin. Invest.* 2014;124(8):3501–3513.
113. Dixon IMC, Landry NM, Rattan SG. Periostin Reexpression in Heart Disease Contributes to Cardiac Interstitial Remodeling by Supporting the Cardiac Myofibroblast Phenotype. In: Kudo A, ed. *Periostin*. Advances in Experimental Medicine and Biology. Singapore: Springer; 2019:35–41.
114. Fu Q, Cheng J, Zhang JD, Zhang YL, Chen XB, Xie JG, et al. [Periostin regulated by let-7/miR-98 family mediates the apoptosis and epithelial-mesenchymal transition of colon cancer]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2019;41(8):573–579.

115. Nakazawa Y, Taniyama Y, Sanada F, Morishita R, Nakamori S, Morimoto K, et al. Periostin blockade overcomes chemoresistance via restricting the expansion of mesenchymal tumor subpopulations in breast cancer. *Sci. Rep.* 2018;8(1):4013.
116. Utispan K, Sonongbua J, Thuwajit P, Chau-In S, Pairojkul C, Wongkham S, et al. Periostin activates integrin $\alpha 5\beta 1$ through a PI3K/AKT-dependent pathway in invasion of cholangiocarcinoma. *Int. J. Oncol.* 2012;41(3):1110–1118.
117. Balasuriya N, McKenna M, Liu X, Li SSC, O'Donoghue P. Phosphorylation-Dependent Inhibition of Akt1. *Genes* 2018;9(9):450.
118. Soares C, Melo de Lima Morais T, Carlos R, Mariano FV, Altemani A, Freire de Carvalho MG, et al. Phosphorylated Akt1 expression is associated with poor prognosis in cutaneous, oral and sinonasal melanomas. *Oncotarget* 2018;9(99):37291–37304.
119. Han Z, Wu K, Shen H, Li C, Han S, Hong L, et al. Akt1/protein Kinase B α is Involved in Gastric Cancer Progression and Cell Proliferation. *Dig. Dis. Sci.* 2008;53(7):1801–1810.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Doğum tarihi: Doğum Yeri: Medeni Hali: Uyruğu: Adres: Tel: Faks: E-mail:
Eğitim
Lise: Lisans: Yüksek lisans: Doktora:
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: Almanca: - Rusça: -
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
İlgi Alanları ve Hobiler

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ Graduate School of Health Sciences	
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU'		
Öğrencinin Adı ve Soyadı	Saltuk Buğra KARAHAN	
Öğrencinin Numarası		
Ana Bilim Dalı	Histoloji ve Embriyoloji	
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Doktora	
Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.		
Bölümler	Benzerlik Oranı	Maksimum Benzerlik Oranları
I. Giriş	% 0	% 15
II. Genel Bilgiler	% 2	% 35
III. Materyal ve Metod	% 15	% 35
IV. Bulgular	% 9	% 15
V. Tartışma	% 0	% 20
<i>Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.</i>		
Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı	

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU**



KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	+90 442 234 65 11
	FAKS	+90 442 236 09 68
	E-POSTA	atatipetikkurul@gmail.com
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI		Dr.Öğr.Üy.Tuba DEMİRCİ
ARAŞTIRMACININ AÇIK ADI		Withaferin A'nın Hepatoselüler Kansere Hücrelerinde Periostin Üzerine Etkisinin İn Vitro Olarak Araştırılması
KARAR BİLGİLERİ	Toplantı Sayısı: 03 Karar No: 11	Tarih: 26.03.2020
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın bütçesinin BAP tarafından karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir. Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	