T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NARİNGENİN VE TİMOKİNON'UN TFEB GENİNİN EKSPRESYONUNA ETKİLERİNİN HEPG2 VE FİBROBLAST HÜCRELERİNDE ANALİZİ

Vildan SARAÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Temmuz, 2024

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NARİNGENİN VE TİMOKİNON'UN TFEB GENİNİN EKSPRESYONUNA ETKİLERİNİN HEPG2 VE FİBROBLAST HÜCRELERİNDE ANALİZİ

Vildan SARAÇ tarafından hazırlanan tez çalışması 02.07.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Ayşegül ERDEMİR, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Onur Emre ONAT, Üye
Bezmialem Vakıf Üniversitesi _____

Danışmanım Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Naringenin ve Timokinon'un TFEB Geninin Ekspresyonuna Etkilerinin HepG2 Ve Fibroblast Hücrelerinde Analizi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Vildan SARAÇ

İmza

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FCD-2022-5032 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans sürecim boyunca akademik tecrübelerini esirgemeyen, ilgisi ve hoşgörüsüyle her zaman bana rehberlik eden saygıdeğer danışmanım Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT'a,

Lisans eğitimimden itibaren derslerimde, deneysel çalışmalarımda bana destek olan, uzun çalışma saatlerinde bana eşlik eden, başım sıkıştığında yardımıma yetişen, başarısız deneylerde beraber ağladığım, kimi zaman da başarısızlıklarıma gülmemi sağlayan, fikirlerine daime önem verdiğim çok sevgili arkadaşlarım Kosar ZAD GHAFFARİ VAHDAT ve Şeyda AYDIN'a, bana laboratuvarda çalışmakta öncülük eden Pınar ÖZTÜRK'e, çalışmam boyunca deneysel sürecime desteklerini benden esirgemeyen, sevincimi üzüntümü paylaştığım arkadaşlarım Rabia HIZARCI ve Seda GENÇ' e, akademik kazanımlarını benimle paylaşan Tahaberk ATEŞOĞLU'na

İlkokuldan bugüne kadar her zaman arkamda duran, başarabileceğime güvenen ve başarmam için ellerinden geleni yapan, maddi manevi desteklerini esirgemeyen, zorluklar karşısında dik durabilmeyi öğreten, dertlerimi ve sevinçlerimi samimiyetle paylaşabildiğim, beni asla yalnız bırakmayan çok kıymetli aileme,

BİDEB-2210A Yurt İçi Yüksek Lisans burs programı kapsamında yüksek lisans sürecim boyunca burs desteği sağlayan TÜBİTAK'a,

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Vildan SARAÇ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR iv

SİMGE LİSTESİ viii

KISALTMA LİSTESİ ix

ŞEKİL LİSTESİ x

TABLO LİSTESİ xii

ÖZET xiii

ABSTRACT xv

1 GİRİŞ 1

1.1 Kanser 1

1.1.1 Karaciğer Kanseri 3

1.1.2 Karaciğer Kanseri Risk Faktörleri 5

1.2 Hepatoselüler Karsinomda Genetik ve Epigenetik Değişiklikler 7

1.3 Hepatoselüler Karsinomda Moleküler Mekanizmalar 8

1.3.1 Otofaji 8

1.3.2 Apoptoz 11

1.3.3 Hepatoselüler Karsinomda Otofaji ve Apoptozun Önemi 13

1.3.4 Transkripsiyon Faktörlerinin Otofaji ve Apoptoz Mekanizmalarındaki Rolleri 15

1.3.5 Hepatoselüler Karsinomda TFEB Rolü 17

1.4 Naringenin ve Timokinon'un Terapötik Etkisi 18

1.4.1 Naringenin 18

1.4.2 Timokinon 19

1.5 Tezin Amacı 20

1.6 Hipotez 21

2 MATERYAL METOD 22

2.1 Materyal 22

2.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Sarf Malzemeler 22

2.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar 22

2.1.3 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar 23

2.2 Metod 23

2.2.1 Naringenin ve Timokinon'un Çözdürülmesi 23

2.2.2 Hücre Kültürü Çalışmaları 25

2.3 RNA İzolasyonu 31

2.4 RNA Miktar ve Saflık Tayini 32

2.5 cDNA Sentezi 32

2.6 Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu 33

2.7 İstatistiksel Analiz 35

3 SONUÇ 36

3.1 Timokinon ve Naringenin'in Çözdürülmesi 36

3.2 Hücre Kültürü Çalışmaları 38

3.2.1 in vitro Sitotoksik Analizleri 38

3.3 Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu 44

3.3.1 Fibroblast Hücre Hattı Timokinon Muamelesinin TFEB Geni Ekspresyonuna Etkisi 44

3.3.2 Fibroblast Hücre Hattı Naringenin Muamelesinin TFEB Geni Ekspresyonuna Etkisi 45

3.3.3 Fibroblast Hücre Hattı Timokinon ve Narigenin Muamelesinin TFEB Geni Ekspresyonuna Etkisi 46

3.3.4 HepG2 Hücre Hattı Timokinon Muamelesinin TFEB Geni Ekspresyonuna Etkisi 47

3.3.5 HepG2 Hücre Hattı Naringenin Muamelesinin TFEB Geni Ekspresyonuna Etkisi 48
3.3.6 HepG2 Hücre Hattı Timokinon ve Naringenin Muamelesinin TFEB Geni Ekspresyonuna Etkisi 48
3.4 Öneriler ve Tartışma 49
KAYNAKÇA 55
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR 65

SİMGE LİSTESİ

A	Alfa
B	Beta
rpm	Dakikada Devir Sayısı
Δ	Delta
g	Gram
CO_2	Karbondioksit
µl	Mikro litre
µM	Mikromolar
ml	Mililitre
nm	Nanometre
˚C	Santigrat Derece
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

AMPK	AMP-aktive protein kinazı
ATG	Otofaji ilişkili protein
CO_2	Karbondioksit
CTNNB1	Katenin beta-1
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ELISA	Enzime Bağlı Immünosorbent Deneyi
ER	Endoplazmik retikulum
ERGIC	Endoplazmik–retikulum-Golgi ara bölmesi
FADD	Fas ilişkili Ölüm Domaini
FasL	Fas Ligand
FOXO	Forkhead kutusu O
HBV	Hepatit B Virüsü
HCC	Hepatoselüler karsinoma
HCV	Hepatit C Virüsü
IC_{50}	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu
MEF	Fare embriyonik fibroblast
MiTF	Mikroftalmi ile ilişkili transkripsiyon faktörü
mTOR	Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NAFLD	Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı
Nrf2	Nükleer faktör eritroid 2
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinazlar
RASSF1A	Ras ilişki alanı içeren protein 1
RNA	Ribonükleik Asit
SOCS1	Sitokin sinyallemesini baskılayıcısı 1
TFE	Transkripsiyon faktörü E
TFEB	Transkripsiyon Faktörü EB
TNFR	Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü
TNF-α	Tümör nekroz faktörü alfa
ULK	Unc-51 benzeri otofajiyi aktive eden kinazlar
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 En çok ölüme sebep olan kanser türleri 4

Şekil 1.2 Dünya genelinde karaciğer kanserinin mortalite dağılımı 4

Şekil 1.3 Farklı otofaji mekanizmaları 9

Şekil 1.4 Otofaji yolağı ve biyogenezi 11

Şekil 1.5 Apoptoz yolakları 13

Şekil 1.5 Naringenin'in kimyasal yapısı..... 19

Şekil 1.6 Timokinon'un kimyasal yapısı 20

Şekil 3.1 Timokinon çözeltileri için spektrometrik ölçüm absorbans sonuçları standart eğri grafiği 37

Şekil 3.2 Naringenin çözeltileri için spektrometrik ölçüm absorbans sonuçları standart eğri grafiği 37

Şekil 3.1 Fibroblast hücre hattı Timokinon muamelesi sonucu saatlere göre % canlılık oranları..... 39

Şekil 3.2 Fibroblast hücre hattı Naringenin muamelesi sonucu saatlere göre % canlılık oranları..... 40

Şekil 3.3 Fibroblast hücre hattı Timokinon + Naringenin muamelesi sonucu saatlere göre % canlılık oranları 40

Şekil 3.4 HepG2 hücre hattı Timokinon muamelesi sonucu saatlere göre % canlılık oranları..... 41

Şekil 3.5 HepG2 hücre hattı Naringenin muamelesi sonucu saatlere göre % canlılık oranları..... 42

Şekil 3.6 HepG2 hücre hattı Timokinon + Naringenin muamelesi sonucu saatlere göre % canlılık oranları 42

Şekil 3.8 HepG2 hücre hattı için IC_{50} değerleri..... 44

Şekil 3.9 Fibroblast hücrelerinde Timokinon muamelesi sonucu TFEB geni ekspresyon değişimi 45

Şekil 3.10 Fibroblast hücrelerinde Naringenin muamelesi sonucu TFEB geni ekspresyon değişimi 46

Şekil 3.11 Fibroblast hücrelerinde Timokinon ve Naringenin muamelesi sonucu TFEB geni ekspresyon değişimi 47

Şekil 3.12 HepG2 hücrelerinde Timokinon muamelesi sonucu TFEB geni ekspresyon değişimi 47

Şekil 3.13 HepG2 hücrelerinde Naringenin muamelesi sonucu TFEB geni ekspresyon değişimi 48

Şekil 3.14 HepG2 hücrelerinde Timokinon ve Naringenin muamelesi sonucu TFEB geni ekspresyon değişimi 49

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1 Kanser türlerine göre 2024 yılında kanserden tahmini ölüm oranları (*American Cancer Society*, 2024) 1

Tablo 2.1 Spektrometrik ölçüm için kullanılan çözelti konsantrasyonları 24

Tablo 2.2 Fotometrik ölçüm için kullanılan çözelti konsantrasyonları..... 25

Tablo 2.3 HepG2 hücre hattı saatlik sitotoksisite testleri Timokinon ve Naringenin için kullanılan konsantrasyonlar..... 28

Tablo 2.4 HepG2 hücre hattı sitotoksisite testleri Timokinon ve Naringenin kombine uygulaması için kullanılan konsantrasyonlar 29

Tablo 2.5 Fibroblast hücre hattı saatlik sitotoksisite testleri Timokinon ve Naringenin için kullanılan konsantrasyonlar..... 29

Tablo 2.6 HepG2 hücre hattı sitotoksisite testleri Timokinon ve Naringenin kombine uygulaması için kullanılan konsantrasyonlar 30

Tablo 2.7 cDNA sentez protokolü 33

Tablo 2.8 Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu koşulları 34

Tablo 2.9 Reaksiyon bileşenleri..... 34

Tablo 2.10 Kullanılan primerler..... 35

ÖZET

Naringenin ve Timokinon'un TFEB Geninin Ekspresyonuna Etkilerinin HepG2 ve Fibroblast Hücrelerinde Analizi

Vildan SARAÇ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Kanser hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve çoğalması sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Hücrelerin bozulmuş büyüme ve bölünme mekanizmalarının altında birçok genetik, epigenetik ve çevresel faktör yer almaktadır. Karaciğer kanseri, dünya genelinde ölüm oranının yüksek olduğu kanser türleri arasındadır. Hepatoselüler karsinoma (HCC) ise en sık karşılaşılan karaciğer kanseri tipidir. Diğer kanser türlerinde olduğu gibi HCC'de de otofaji ve apoptoz mekanizmalarının düzensizleştiği bilinmektedir. Otofaji ve apoptoz mekanizmalarının düzensizleşmesi hücrelerin kontrolsüz bölünmesine sebebiyet veren sebeplerden biridir. Transkripsiyon Faktörü EB (TFEB)'nin otofaji ve apoptozu düzenlediği, ekspresyonunun otofajiyi ve apoptozu indüklediği bilinmektedir. Bu çalışma kapsamında önceki çalışmalarda anti-kanser özellikleri gösterilmiş Timokinon ve Naringenin'in ayrı ayrı ve kombine olarak *in vitro* sitotoksik analizleri yapılarak IC_{50} değerleri Fibroblast hücrelerinde Timokinon muamelesi sonucu 24, 48 ve 72 saat sonunda sırasıyla 45.12 µM, 46.10 µM, 24.43 µM; Naringenin muamelesi sonucu 24, 48 ve 72 saat sonunda sırasıyla 76.43 µM, 53.61 µM, 46.76 µM olarak; kombine muamele sonucu 24, 48 ve 72 saat sonunda sırasıyla 47.85 µM, 52.28 µM, 33.28 µM olarak hesaplanmıştır.

HepG2 hücrelerinde Timokinon muamelesi sonucu 24, 48 ve 72 saat sonunda sırasıyla 88.26 µM, 82.95.10 µM, 84.93 µM; Naringenin muamelesi sonucu 24, 48 ve 72 saat sonunda sırasıyla 85.34 µM, 63.55 µM, 66.05 µM olarak; kombine muamele sonucu 24, 48 ve 72 saat sonunda sırasıyla 108.01 µM, 69.21 µM, 68.51 µM olarak hesaplanmıştır. Saptanan konsantrasyon değerleri baz alınarak HepG2 ve insan Fibroblast hücreleri Timokinon ve Naringenin ile ayrı ayrı ve kombine olarak 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilmiştir. Belirlenen sürelerin sonunda Real-Time PCR ile TFEB geninin ekspresyon seviyelerindeki değişimin analizi yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Hepatoselüler karsinoma, TFEB, timokinon, naringenin, real-Time PCR

ABSTRACT

Analysis of the Effects of Naringenin and Thymoquinone on TFEB Gene Expression in HepG2 and Fibroblast Cells

Vildan SARAÇ

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Cancer is a disease that arises from uncontrolled growth and proliferation of cells. Many genetic, epigenetic, and environmental factors are involved in the disrupted growth and division mechanisms of cells. Liver cancer is among the types of cancer with high mortality rates worldwide. Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common type of liver cancer. As with other types of cancer, it is known that autophagy and apoptosis mechanisms are dysregulated in HCC. Dysregulation of autophagy and apoptosis mechanisms is one of the causes leading to uncontrolled cell division. It is known that Transcription Factor EB (TFEB) regulates autophagy and apoptosis, and its expression induces autophagy and apoptosis. In this study, in vitro cytotoxicity analyses of The in vitro cytotoxic analyses of Thymoquinone and Naringenin, both separately and in combination, were conducted. The IC_{50} values for Fibroblast cells treated with Thymoquinone were determined to be 45.12 µM, 46.10 µM, and 24.43 µM at 24, 48, and 72 hours, respectively. For Naringenin treatment, the IC50 values were 76.43 µM, 53.61 µM, and 46.76 µM at 24, 48, and 72 hours, respectively. For the combined treatment, the IC_{50} values were 47.85 µM, 52.28 µM, and 33.28 µM at 24, 48, and 72 hours,

respectively. In HepG2 cells, the IC_{50} values for Thymoquinone treatment were found to be 88.26 µM, 82.95 µM, and 84.93 µM at 24, 48, and 72 hours, respectively. For Naringenin treatment, the IC50 values were 85.34 µM, 63.55 µM, and , 66.05 µM at 24, 48, and 72 hours, respectively. For the combined treatment, the IC_{50} values were 108.01 µM, 69.21 µM, and 68.51 µM at 24, 48, and 72 hours, respectively. Based on the determined concentration values, HepG2 and human Fibroblast cells were treated with Thymoquinone and Naringenin, both separately and in combination, for 24, 48, and 72 hours. At the end of these time periods, the changes in the expression levels of the TFEB gene were analyzed using Real-Time PCR.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, TFEB, thymoquinone, naringenin, real-Time PCR

1
GİRİŞ

1.1 Kanser

Kanser, genetik mutasyonların birikmesiyle hücrelerin, sinyalizasyon ve metabolizmalarının bozulması sonucu kontrolsüz büyüyebildikleri ve bölünebildikleri bir hastalıktır (Kamal vd., 2022; Upadhyay, 2021). Dünya Sağlık Örgütü 2020 verilerine göre yıllık 10 milyon ölüme sebebiyet vermesiyle kanser dünya çapında en çok ölüme neden olan hastalıklardan bir tanesidir. Akciğer, kolon ve rektum, pankreas, meme ve karaciğer kanserleri diğer kanser türleri arasında ölüm oranlarının en yüksek olduğu kanserlerdir (Lambert vd., 2017).

Tablo 1.1 Kanser türlerine göre 2024 yılında kanserden tahmini ölüm oranları (*American Cancer Society*, 2024)

Kanser Türü	**2024 Yılı için Tahmini Ölüm Oranları**
Akciğer ve Bronş	125,070
Kolorektum	53,010
Pankreas	51,750
Meme	42,780
Karaciğer ve İntrahepatik Safra Kanalı	29,840
Lösemi	23,670
Lemfoma	21,050
Beyin ve diğer sinir sistemi	18,760
İdrar Kesesi	16,840
Yemek borusu	16,130

Tablo 1.1 Kanser türlerine göre 2024 yılında kanserden tahmini ölüm oranları (*American Cancer Society*, 2024)) (devamı)

Böbrek	14,390
Rahim	13,250
Deri	13,120
Yumurtalık	12,740
Miyelom	12,540
Ağız boşluğu ve yutak	12,230
Mide	10,880
Yumuşak doku	5,200
Serviks	4,360
Tiroit	2,170
Göz	560
Testis	500

Kanser hücreleri, normal hücre homeostazisini kontrol eden yolaklarda bozulmalarla oluşmaktadır. Tümör gelişimi sırasında meydana gelen bu fizyolojik değişiklikler; sınırsız bölünme potansiyeli, apoptozdan kaçınabilme, büyümeyi baskılayıcı faktörlere karşı duyarsızlık, büyüme sinyallerinde kendi kendilerine yeterlilik, anjiyogenez ile damar sistemlerine erişim, bağışıklık yıkımından kaçınabilme ve metastaz yeteneğidir. Kanser hücrelerinin normal hücrelerden ayırt edici bu özelliklerinin, 200'den fazla çeşidi olduğu bilinen kanser türlerinin tamamında, tümör oluşumunda ve metastazda etkili olduğu bilinmektedir (Hanahan & Weinberg, 2000;B. Alberts, 2008;Hanahan & Weinberg, 2011; Lambert vd., 2017)

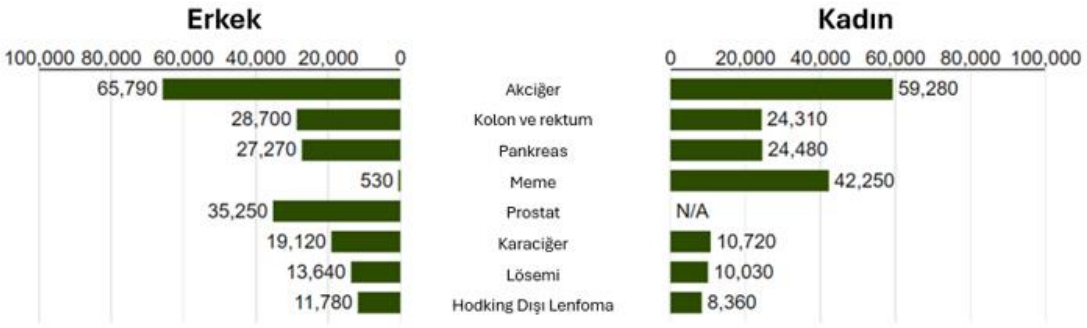
Kontrolsüz olarak büyüyen hücrelerin oluşturduğu anormal hücre kitlesine tümör denmektedir. Tümörler, bening ve maling tümörler olmak üzere iki sınıfta ele alınmaktadır. Benign tümörler belirgin sınırlarını koruyarak birincil konumlarında yavaş büyüme gösterirler. İstilacı değillerdir ancak maling tümöre dönüşebilmektedirler. Maling tümörler ise kontrolsüz ve hızlı büyüyerek kan dolaşımı ve/veya lenfatik dolaşım yoluyla metastaz yaparlar (Patel A., 2020).

Kanser, DNA'da meydana gelen birtakım mutasyonlar sonucu hücre fonksiyonlarının bozulmasıyla meydana gelmektedir. Tütün dumanı, aflatoksin, beslenme alışkanlıkları gibi kanserojen çevresel faktörler, viral enfeksiyonlar genel olarak kansere sebep olan gen işlev bozukluklarında önemli bir yere sahiptirler. Kansere sebep olan etkenler tam olarak aydınlatılamamış olsa da kanserojenlere maruziyet sonucu tümör baskılayıcı genlerin işlevini kaybetmesi, hücre büyümesi ve bölünmesinden sorumlu proto-onkogenlerin onkogene dönüşmesi sonucu normal hücreler kanser hücrelerine dönüşmektedir(Migliore & Coppedè, 2002; Hassanpour & Dehghani, 2017)

1.1.1 Karaciğer Kanseri

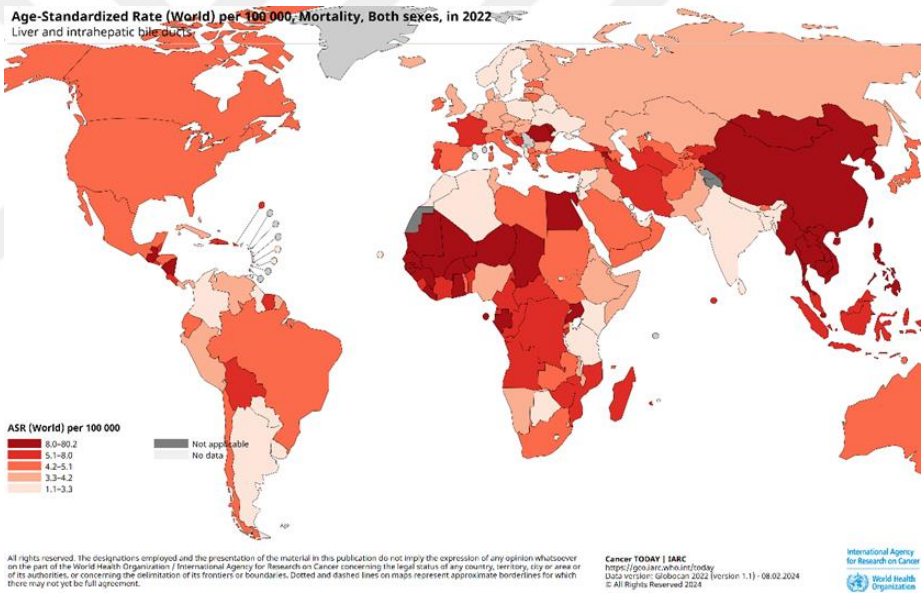
Karaciğer, insan vücudundaki en büyük organlardan biri olup karnın üst bölgesinde, göğüs kafesinin içinde konumlanmaktadır. Sindirim için safra üretmek, vitaminlerin ve glikozun depolanması, kandaki moleküllerin filtrelenip zararlı olanların vücuttan uzaklaştırılmasını sağlamak karaciğerin ana görevlerindendir. Bunlara ek olarak bağışıklıkta, metabolizmada da kritik fonksiyonları olan bir organdır (What Is Liver Cancer?, 2022; Kalra A, 2023). Yıldız hücreleri, karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri, safra epitel hücreleri, Kupffer hücreleri ve hepatosit hücrelerinden oluşmaktadır. Karaciğeri oluşturan bu hücreler farklı kök hücrelerden köken almaktadır. Hepatosit hücreleri karaciğerde birincil epitel hücreler olarak yer alıp yoğunluğu en çok olan hücre grubudur. Karaciğer fonksiyonlarının birçoğu hepatosit hücreleri tarafından gerçekleştirilmektedir (Trefts vd., 2017).

Karaciğer kanseri, Tablo 2.1'de yer alan kanser türleriyle kıyaslandığında ölüm oranının yüksek olduğu kanser türleri arasındadır. American Cancer Society 2024 verilerine göre karaciğer kanseri kadın ve erkeklerde en çok ölüme sebep olan altıncı kanser türüdür (Şekil 1.1)(*American Cancer Society*, 2024) .



Şekil 1.1 En çok ölüme sebep olan kanser türleri (American Cancer Society,2024 en modifiye edilmiştir.)

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2022, karaciğer kanserinden ölüm oranlarının dünya genelindeki dağılım verilerine (Şekil 1.2) göre ülkemizde karaciğer kanserinden ölüm oranlarının görece yüksek olduğu söylenebilmektedir.



Şekil 1.2 Dünya genelinde karaciğer kanserinin mortalite dağılımı (*WHO*, 2022)

Primer karaciğer kanser tipleri başladığı hücreye göre belirlenmektedir ve 5 ana tip primer karaciğer kanseri vardır. Bunlar: fibrolameller karsinom, kolanjiyokarsinom (safra kanalı kanseri), anjiyosarkom, hepatoblastoma ve hepatoselüler karsinom (HCC) (*Karaciğer Kanseri Türleri*, 2022). Hepatoselüler karsinom, erişkinlerde en çok rastlanan ve dünya çapında en çok ölüme sebep olan kanser türlerindendir (*What Is Liver Cancer?*, 2022). Karaciğer kanserinin birçok sebebi olmakla beraber çoğu zaman mevcut başka bir

hastalıktan kaynaklanmaktadır ve sebebi dünya genelinde heterojenite göstermektedir (Shibata & Aburatani, 2014)

1.1.2 Karaciğer Kanseri Risk Faktörleri

1.1.2.1 Viral Hepatit B ve Hepatit C

Hepatoselüler karsinom vakalarının yaklaşık %80'ninde siroza yol açmaları sebebiyle hepatit B veya hepatit C virüsleriyle karşılaşılmaktadır. Siroz, HCC'yle en iyi ilişkilendirilen risk faktörüdür (El-Serag, 2012; Flemming vd., 2014). HBV'ye bağlı HCC hastalarında çoğunlukla siroza rastlanmamaktadır (J. D. Yang, Mohamed, vd., 2017). HCV hastalarının çoğunda sirozu takiben HCC gelişse de sirozu olmayan HCV hastalarında da HCC gelişimi gözlemlenmiştir (J. D. Yang vd., 2011). Kronik Hepatit B ve Hepatit C enfeksiyonu inflamatuar sitokinlerin salınmasına sebep olarak reaktif oksijen türlerinin oluşmasını tetiklemektedir. Genotoksik olan reaktif oksijen türleri hücre çoğalmasını teşvik etmekle beraber karaciğer kaskadını da aktifleştirmektedir. Meydana gelen bu değişimler hücre bölünmesini hızlandırmakla beraber hepatosit hücrelerinin kanser hücrelerine dönüşmesini tetikleyebilir (Budhu & Wang, 2006). Ek olarak HBV'nin konakçı genomuna entegre olabildiği için tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin ifadesini değiştirebilir (Paterlini-Bréchot vd., 2003).

1.1.2.2 Yağlı Karaciğer Hastalığı ve Diyabet

Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) son yıllardan en sık rastlanan kronik karaciğer hastalığıdır. Hastalarda diyabet ve siroz riskini arttırmaktadır. Diyabet ve siroza bağlı komplikasyonları da tetikleyebilmesiyle beraber HCC vakalarının yaklaşık %15'inden sorumludur(J. D. Yang, Mohammed, vd., 2017; Powell vd., 2021). Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığının HCC'ye sebep olmasındaki etkenin sirozu tetiklemesi gibi gözükse de yapılan çalışmalar NAFLD vakalarının yaklaşık %25'inde sirozdan bağımsız HCC gelişimi gözlemlenmiştir (Walker vd., 2016).

Diyabetin, diğer birçok kanser türüyle ilişkilendirildiği gibi HCC riskini de 2-3 kat arttırdığı bilinmektedir. Diyabetin karaciğer kanserine nasıl sebep olduğu yönünde farklı hipotezler üzerinde durulmaktadır (J. D. Yang vd., 2016) . Diyabet hastalarında insülin direnci karaciğerde hepatosit hasarına ve karaciğerde proinflamatuara sebep olmaktadır (Starley vd., 2010) . İnsülin direnci reaktif oksijen türlerinin inflamatuar kaskadları

tetikleyebilir. Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif stres proinflamatuar sitokinlerin salınmasına sebep olabilir. Proinflamatuar sitokinlerin kanserli hücrelerde büyümeyi uyardığı, sağ kalımı arttırdığı, anjiyogenezi tetiklediği ve bağışıklık yıkımından kaçmayı kolaylaştırdığı bilinmektedir (Balkwill F., 2001).

1.1.2.3 Alkol

Alkol, birçok kanser ile ilişkilendirildiği için Uluslararası Kanser Araştırma ajansı tarafından başlıca kanserojen maddeler arasında sınıflandırılmaktadır. Özellikle ortalama alkol tüketiminin yüksek olduğu ülkelerde alkol, HCC'nin önde gelen sebeplerindendir. Aşırı alkol tüketimi HCC vakalarının yaklaşık %15-30'una sebep olmaktadır. Alkol kullanımının HCC etiyolojisine etkisi bölgeler arasında alkol tüketim oranına göre değişiklik göstermektedir (Taniai, 2020). Yapılan çalışmalar sonucu uzun süreli olarak yüksek miktarda (günlük >50 g) alkol tüketimi çoğunlukla alkole bağlı karaciğer hastalığına sebep olurken daha az sıklıkta siroz ve kansere sebep olduğu belirlenmiştir. Bu durum HCC'nin önde gelen sebepleri arasında belirtilen aşırı alkol tüketiminin, HCC'ye sebep olmasında alkol tüketiminin miktarı, alkol tüketim süresi ve biçimi, obezite, yaş, genetik, cinsiyet risk faktörlerinin etkili olmasından kaynaklanmaktadır (Huang vd., 2023).

1.1.2.4 Aflotoksin

Aflotoksin, sıcak ve nemli ortamlarda üreyen Aspergillus mantarının ürettiği bir mikotoksindir. Bu şartlar altında depolanmış gıda ürünlerinde aflotoksine rastlanması mümkündür. Aflotoksin B1 en yaygın mikotoksin olup en güçlü kanserojenlerdendir ve Aflotoksin B1'in ana hedeflerinden biri karaciğerdir. Aflotoksinin endemik olduğu bölgelerde HCC vakalarının %30-60'ında tümör baskılayıcı bir gen olan p53'te aflotoksinin sebep olduğu karakteristik bir mutasyon tespit edilmiştir. DNA mutasyonlarına sebep olmasının yanı sıra Aflotoksin B1'in kanser gelişiminde inflamasyona ve oksidatif strese yol açması etkili olabilir. Ek olarak yapılan çalışmalarda, HCC vakalarında, dokularda aflotoksine karakterize DNA hasarı tespit edilmesi, idrarda aflatoksine rastanılması ve serumda aflatoksin eklentilerinin bulunması da HCC için aflotoksinin risk faktörü olduğunu göstermektedir (El-Serag & Rudolph, 2007; Liew & Mohd-Redzwan, 2018; Weiya Cao, 2021) .

Vinil klorür, mikrosistin, organoklorin, aristoloşik asit gibi kimyasallara ve pestisitlere maruziyet de HCC için risk faktörleri arasındadır. Hava kirliliği, kötü beslenme alışkanlıkları sonucu obezite HCC ilişkili karaciğer hastalıklarını tetiklemekte pozitif etki gösterebilir (J. D. Yang vd., 2019; M. Yang vd., 2023). Ancak bahsedilen etkenleri doğrudan HCC ile ilişkilendirebilmek için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

1.2 Hepatoselüler Karsinomda Genetik ve Epigenetik Değişiklikler

Tümör baskılayıcı genler kanser gelişimini önleyen veya tümör büyümesini kontrol altında tutan genlerdir. Bu genler hücre döngüsünü düzenler, hücre hasarını onarır veya hücre apoptozunu (programlanmış hücre ölümü) teşvik eder. Tümör baskılayıcı genlere örnek olarak TP53 ve RB1 genleri verilebilir. Hücrelerde DNA hasarının algılanmasından sorumlu bir tümör baskılayıcı gen olarak bilinir. P53, hücre döngüsünü durdurarak DNA hasarının onarımına izin verir veya hasarın çok büyük olduğunda hücre apoptozunu başlatır. P53 mutasyonları birçok kanser türünde sıkça görülür (A. J. Levine, 1997; Moretto vd., 2021). RB1 geni, hücre döngüsünü kontrol eden bir tümör baskılayıcı gen olarak bilinir. Bu gen, hücrelerin aşırı bölünmesini önleyerek kanser gelişimini engeller (Friend S., 1986). Onkogenler ise kanser oluşumunu teşvik eden genlerdir, genellikle hücre büyümesi ve bölünmesini düzenleyen normal genlerin hasar görmesi veya anormal aktivasyonu sonucunda kanser hücrelerinin oluşumunu teşvik ederler (Cooper GM., 2000). Ana onkogenlerdeki ve tümör baskılayıcı genlerdeki genetik değişikliklerin, HCC gelişiminde önemli roller oynadığı bilinmektedir. CTNNB1 genindeki mutasyonlar aracılığıyla sıkça gözlenen Wnt/β-katenin yolunun düzensizliği de HCC'de sık görülen genetik bir değişikliktir (Clevers & Nusse, 2012).

Anormal DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve düzensiz microRNA ifadesi, HCC'de yaygın görülmektedir. Epigenetik değişiklikler gen susturulması, genomik istikrarsızlık ve değiştirilmiş gen ifadelerinde rol oynamaktadır. HCC'de sıkça gözlenen p16, RASSF1A ve SOCS1 gibi tümör baskılayıcı genlerin promotor hipermetilasyonu vardır (Nishida & Goel, 2011) .

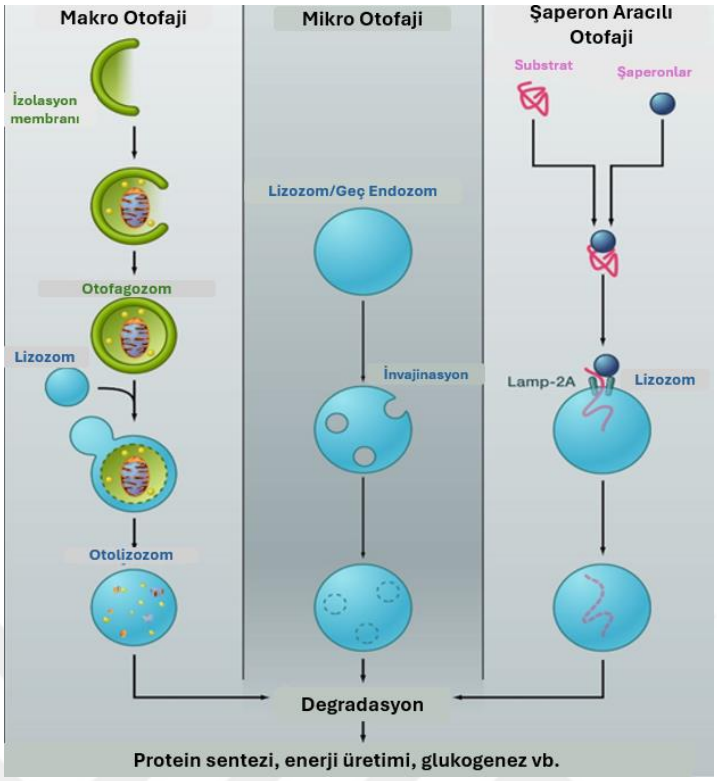
HCC'de meydana gelen genetik ve epigenetik mekanizmalar belirgin olsa da moleküler mekanizmalar oldukça karmaşıktır (Niu vd., 2016). Moleküler mekanizmaların anlaşılması HCC tespit ve tedavi yöntemlerinin gelişmesine katkı sağlayacaktır.

1.3 Hepatoselüler Karsinomda Moleküler Mekanizmalar

Hepatoselüler karsinom, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi pro-anjiyogenik faktörlerin aşırı ifadesi tarafından yönlendirilen yaygın anjiyogenezle karakterizedir. HCC ilerlemesi ve metastazı için önemli olan tümör mikroçevresi, hepatik stellat hücreleri, immün hücreler ve hücre dışı matriks bileşenleri ile etkileşimleri içerir (Forner vd., 2018). Hepatoselüler karsinoma hücreleri, hızlı proliferasyonla ilişkili artmış enerji gereksinimlerini karşılamak için metabolik değişiklikler sergilemektedir. Enerji ihtiyacını karşılamak için glikolizin artması (Warburg etkisi), lipid metabolizmasının ve glutamin metabolizmasının değişmesine sebep olmaktadır. mTOR ve AMP-aktive protein kinazı (AMPK) gibi düzensiz sinyal yolakları, HCC'de metabolik yeniden programlamada rol oynamaktadır (Yang J.-D. vd., 2019). Diğer kanser türlerinde olduğu gibi hepatoselüler karsinomda da hücre otofaji ve apoptoz yolakları kanser mekanizmalarının anlaşılması ve terapötik stratejilerin geliştirilmesi amacıyla aydınlatılması gereken konular arasındadır.

1.3.1 Otofaji

Otofaji, yaşlanmış, hasar görmüş veya gereksiz hale gelmiş hücrelerin hasarlı organel ve proteinler gibi bileşenlerini parçalayıp ve geri dönüştürdüğü biyolojik bir süreçtir. Hücresel homeostazı sürdürmek ve açlık veya enfeksiyon gibi streslere yanıt vermek için hayati öneme sahiptir. Açlık, büyüme faktörlerinin yokluğu veya biyoenerjetik taleplerin artması sonucu otofaji mekanizmaları indüklenmektedir. Süreç, hücresel materyali yutan çift zarlı veziküller olan otofagosomların oluşumunu ve hücresel materyallerin içeriklerini parçalamak için otofagosomların lizozomlarla birleşmesini içermektedir. Her biri farklı mekanizmalar ve hedeflerle çalışan makro, mikro ve şaperon aracılı otofaji gibi farklı otofaji türleri bulunmaktadır (Şekil 1.3) (Mizushima & Komatsu, 2011).

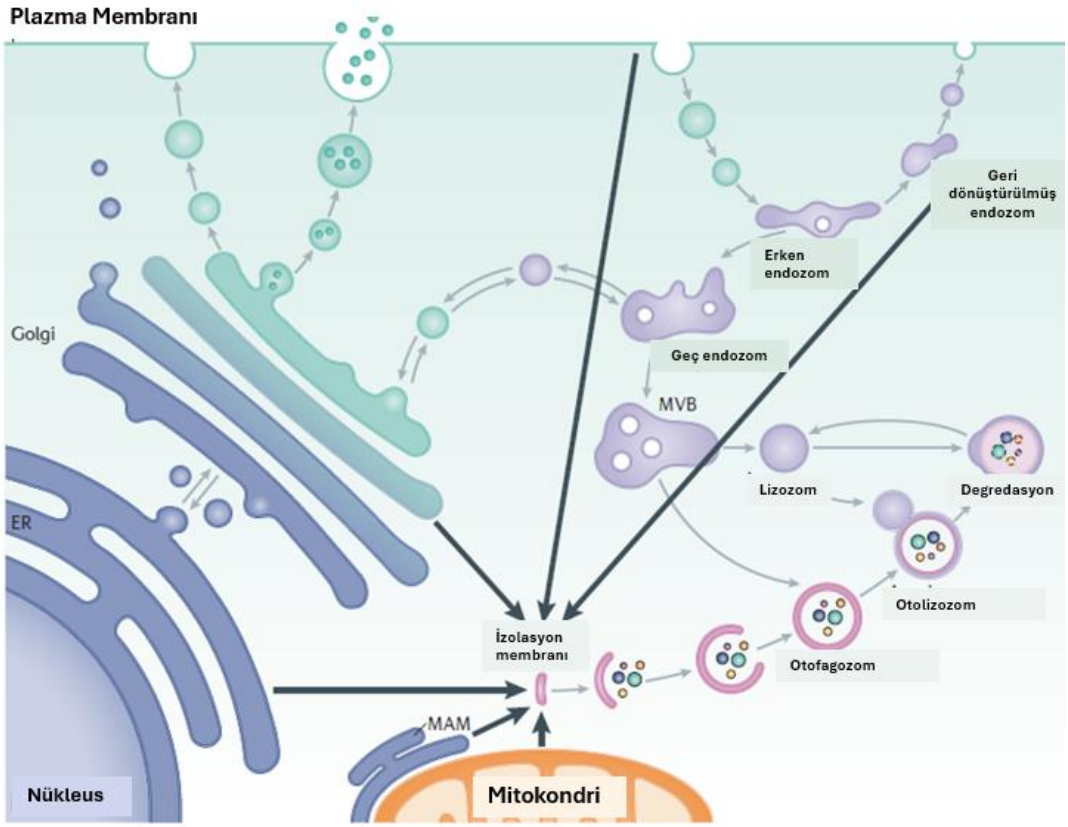


Şekil 1.3 Farklı otofaji mekanizmaları (Mizushima & Komatsu, 2011'den modifiye edilmiştir.)

1.3.1.1 Otofajinin Biyogenezi ve Düzenlenmesi

Makro otofaji, sitoplazmik bileşenlerin otofagosomlar etrafında oluşumu ve ardından parçalanmasıyla ilgili olarak en çok çalışılan ve ökaryotik hücrelerin büyük protein ve organelleri parçalamak için kullandığı otofaji türüdür. Ek olarak, hasarlı mitokondriyi parçalamayı hedefleyen mitofaji ve hücre içi patojenleri parçalayan ksenofaji gibi ilişkili süreçler bulunmaktadır. Bu süreçler, hücresel kalite kontrolü ve bağışıklık savunmasında önemli roller oynamaktadır. Genel olarak, otofaji ve ilişkili süreçler, hücresel sağlık ve işlevine katkıda bulunan sıkı bir şekilde düzenlenmiş ve dinamik mekanizmalardır (B. Levine & Kroemer, 2008;Galluzzi vd., 2017). Otofaji, genellikle amino asit açlığı durumunda aktive olan bir süreçtir. Bu süreçte, otofajinin bir alt türü olan makrofaji, zarla çevrili organeller olan otofagozomlar aracılığıyla lizozomal bozunma sürecidir. Otofaji mekanizması otofaji ile ilişkili (ATG) proteinleri tarafından düzenlenmektedir. Otofagojen (ATG) proteinler, otofagozom oluşumunu yönlendirmektedir ve bu proteinlerin neredeyse yarısı memelilerde korunmuştur. Rapamisin kompleksi 1 (mTORC1) anahtar düzenleyici yolaktır ve besin açısından zengin koşullarda otofajiyi inhibe etmektedir. Amino asit açlığı gibi besin kıtlığı oluştuğunda ise mTORC1 memeli

hedef hücre için otofajiyi teşvik etmektedir. Bu, otofajinin indüklenmesine ve otofagozom oluşumunun artmasına yol açmaktadır. Hem UNC51 benzeri kinaz (ULK) kompleksi hem de otofajiye özgü sınıf III PI3K kompleksi, mTORC1 inaktivasyonunun öncesinde etkinleştirilmektedir. Otofagozom oluşumu, amino asit açlığından sonra endoplazmik retikulum (ER) ve mitokondri arasında gerçekleşmektedir. Otofajiye özgü PI3K kompleksi tarafından üretilen fosfatidilinositol 3-fosfat bakımından zenginleştirilmiş platformlar olan omegasomlar, bu bölgede genişlemektedir. Omegasomlar, ATG proteinlerini toplamak için izolasyon membranları (aynı zamanda fagoforlar olarak da bilinir) oluşturmaktadır. İzolasyon membranının genişlemesi, çeşitli hücresel bölmelerden gelen veziküler trafik tarafından yönlendirilir, bu bölmeler arasında ER-Golgi ara bölgesi (ERGIC), Golgi ve geri dönüşüm endozomları bulunmaktadır. İzolasyon membranının genişlemesini takiben, omegasomdan ayrılma ve sitozolik proteinlerin ve membranların etrafını saran keseciklerin kapanması gerçekleşmektedir. Yapılan çalışmalar sonucu otofajiyi yöneten karmaşık moleküler mekanizmalar, çeşitli ATG proteinlerinin, düzenleyici kinazların ve fosfatazların rolleri aydınlatılmıştır. Otofajinin bozulması, yaşlanma, nörodejeneratif hastalıklar, enflamasyon, ve kanser gibi birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, otofaji üzerine yapılan araştırmalar, potansiyel olarak bu hastalıkların tedavisi veya önlenmesi için yeni terapötik stratejiler geliştirmenin önemli bir yönünü oluşturur (Şekil 1.4) (Mizushima & Levine, 2010; Lamb vd., 2013; Klionsky vd., 2016;)(Galluzzi vd., 2017).



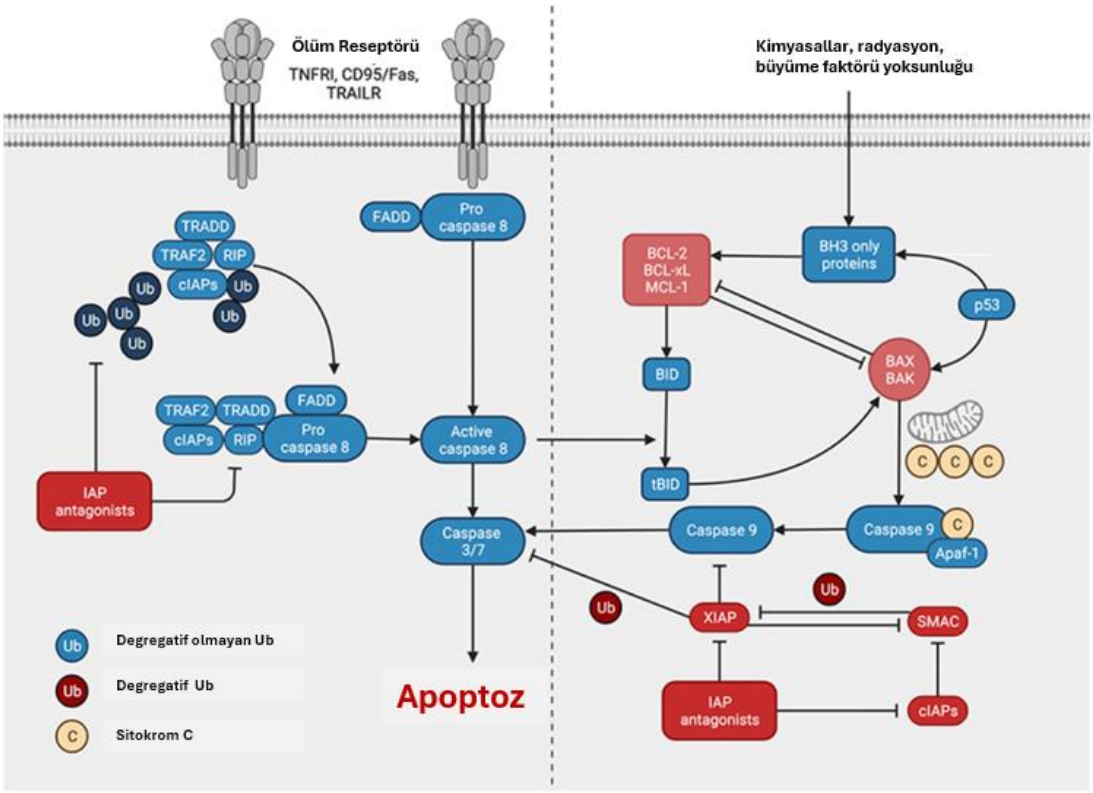
Şekil 1.4 Otofaji yolağı ve biyogenezi (Lamb vd., 2013'den modifiye edilmiştir.)

1.3.2 Apoptoz

Apoptoz, planlanmış hücre ölüm sürecini tanımlanmaktadır. Bu süreç, hücrelerin kontrollü olarak ölmesini, dokuların gelişmesini ve yenilenmesini sağlamaktadır. Apoptoz, embriyonel gelişimden yetişkin doku homeostazına kadar kritik öneme sahiptir. Biyolojik sistemlerin normal fonksiyonlarının sürdürülmesindeki rollerinin yanı sıra, apoptoz mekanizmasından meydana gelen defektler hastalıkların patogenezinde etkili olmaktadır. Apoptoz temelde intrinsik ve ekstrinsik yolak olarak iki ayrı mekanizma içermektedir. İntrinsik yolakta, hücre apoptozu başlatıcı bir sinyal aldığında mitokondri zarındaki gözenekler artmakta ve sitokrom C gibi pro-apoptotik proteinlerin serbest bırakılmasına izin vermektedir. Sitokrom C, sitokrom C salınımı sinyalini alan sitozolde birikmektedir. Sitokrom C'nin serbest kalması apoptozu başlatmak için kaspaz adı verilen enzimleri aktive etmektedir. Kaspazlar, hücre içindeki çeşitli substratları parçalayan proteazlardır. Sitokrom C, apoptozun başlatılmasını sağlayan bir kaspaz aktivasyon kaskadını başlatmaktadır. Bcl-2 ailesi, hücrede apoptozu inhibe eden veya teşvik eden proteinlerdir. Anti-apoptotik proteinler (Bcl-2, Bcl-XL vb.) ve pro-apoptotik proteinler

(Bax, Bak vb.) olarak iki ana gruba ayrılmaktadırlar. Anti-apoptotik proteinler, mitokondriyal zarın bütünlüğünü korumakta ve sitokrom C'nin salınmasını önlemekte, pro-apoptotik proteinler ise, zarın permeabilitesini artırarak sitokrom C'nin salınmasını teşvik etmektedir. Kaspazlar, DNA parçalanmasını ve hücrenin nükleer yapısının bozulmasını sağlamaktadırlar. Bu, hücrenin ölümünü tetikleyen belirgin bir özelliktir. Apoptoz süresince, hücre morfolojik değişiklikler geçirmektedir. Hücre küçülmekte, hücre zarında kırılmalar meydana gelmekte, çekirdek kromatin yoğunlaşmakta ve nükleus küçülmektedir. Son olarak, apoptozu başlatan sinyalleri alan komşu hücreler veya immün hücreler, apoptotik hücreleri tanımakta ve fagositoz yoluyla ortadan kaldırılmaktadır (Elmore, 2007; Galluzzi vd., 2018).

Apoptozun ekstrinsik yolağı birincil olarak ölüm reseptörleri adı verilen Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFR) reseptörlerine bağlanan ligandlar ile başlamaktadır. Hücrenin dışında bulunan bu ligandlar ölüm sinyalleri olarak da bilinmektedir. Hücre ölümünü başlatmakta görevli ölüm sinyallerinin başlıcaları TNF-α ve Fas Ligand (FasL) gibi ligandlardır (Ashkenazi & Dixit, 1998). FasL yolağı özellikle hücresel bağışıklık yanıtında görev almaktadır (Krammer P., 2000). Fas reseptörü, Fas Ligand ligandı ile etkileşime girmekte ve Fas-Associated Death Domain (FADD) adlı bir adaptör proteinini etkinleştirmektedir. FADD, Fas reseptörüne bağlanmakta ve daha sonra prokaspaz-8 veya prokaspaz-10 gibi öncül prokaspazları aktivasyon bölgesine getirmektedir(Strasser vd., 2009) . Bu, DISC'in (Death-Inducing Signaling Complex) oluşumunu başlatır. DISC kompleksi, prokaspazların aktive edilmesini sağlamaktadır (Krammer P., 2000). Aktive edilmiş prokaspazlar daha sonra aktif kaspazlar haline gelmektedirler. Özellikle kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 hücre içinde apoptotik olayları başlatmaktadır (Lavrik & Krammer, 2012). Apoptozun dışsal yolağı hücre dışındaki belirli sinyallerin hücre içinde bir dizi olayı başlatarak programlanmış hücre ölümünü tetiklediği karmaşık bir süreçtir. Bu yolaktaki bozukluklar, çeşitli hastalıkların, özellikle kanser gibi, patogenezinde önemli bir rol oynayabilir.



Şekil 1.5 Apoptoz yolakları (Apoptosis Pathway Antibodies, 2024'den modifiye edilmiştir.)

1.3.3 Hepatoselüler Karsinomda Otofaji ve Apoptozun Önemi

Otofaji ve apoptoz arasındaki ilişki oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. Bu süreçler birbirleriyle etkileşime girmekte ve kimi zaman birbirlerini düzenlemektedirler. Örneğin, otofaji, hücrede apoptotik tepkinin tetiklenmesini veya engellenmesini etkileyebilmektedir. Otofaji, hasarlı organel ve proteinlerin hücre içinde temizlenmesinde ve hücredeki stresin azaltılmasına katkı sağlayarak apoptozu önleyebilmektedir. Ancak, bazı durumlarda otofaji, hücredeki aşırı hasarı temizlemekte yetersiz kalmakta ve bunun sonucunda apoptoz başlayabilmektedir. Bu nedenle, otofaji ve apoptoz arasındaki denge, sağlıklı hücre işlevinin sürdürülmesi açısından hayati öneme sahiptir. Bu denge, hücrelerin çeşitli fizyolojik koşullara uyum sağlamasına ve sağlıklı bir hücre popülasyonunun korunmasına yardımcı olmaktadır (Green & Levine, 2014; Denton & Kumar, 2019)

Otofaji, hücrelerin bileşenlerini parçalayıp ve yeniden dönüştürdüğü karmaşık bir süreçtir ve özellikle hepatoselüler karsinom (HCC) gibi karaciğer kanserinin en yaygın türünde önemli bir rol oynamaktadır. Bu süreç, hasarlı organel ve proteinleri temizleyerek hücresel hasarın birikmesini engelleyebilir ve bu sayede kanser gelişimini önleyebilir. Özellikle metabolik olarak aktif dokuların, örneğin karaciğerin homeostazını sağlamak için kritik öneme sahiptir. Otofajinin düzensizleşmesi, HCC dahil diğer kanser türlerinde metabolik stresle ilişkilendirilir ve kanser gelişimine katkıda bulunabilir (Cui vd., 2020). Otofaji, sadece kanser hücrelerini değil, aynı zamanda tümör mikroçevresini de etkilemektedir. Dolayısıyla HCC'nin ilerlemesi ve tedaviye yanıtı üzerinde önemli bir rol oynayabilir (Cheng, 2020). Otofajiyi terapötik bir hedef olarak kullanmak, HCC tedavisinde potansiyel bir strateji olarak değerlendirilir. Kanser hücrelerinde otofaji aktivitesinin modüle edilmesi, tümör baskılanmasını teşvik edebilir veya kanser hücrelerini kemoterapi veya diğer tedavilere daha duyarlı hale getirebilir (Amaravadi vd., 2019). Genel olarak, otofajinin HCC'deki rolü, bağlama bağlı olarak hem tümör baskılayıcı hem de tümör teşvik edici işlevleri içermektedir. Bu süreci hedefleyen etkili terapötik stratejilerin geliştirilmesi ve otofajinin HCC'deki rolünün tam olarak anlaşılabilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Bcl-2 ailesi proteinleri, mitokondriyal apoptotik yolakları düzenlemektedir. HCC'de, Bcl-2 ailesi proteinlerinin aşırı veya yetersiz ekspresyonları tespit edilmiştir. Bu düzensizlik, mitokondriyal dış zarın bütünlüğünü bozmakta ve sitoplazmaya sitokrom C gibi pro-apoptotik faktörlerin salınmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla kaspaz kaskadları aktive olmaktadır (Villanueva & Llovet, 2011).

Ölüm reseptörleri, Fas (CD95) ve tümör nekroz faktörü reseptörü 1 (TNFR1) gibi, ekstrinsik apoptotik yolaklarda görev almaktadır. HCC'de, ölüm reseptörlerinin ve ligandlarının anormal ifadesi, ölüm reseptörü aracılı apoptoz direncine katkıda bulunabilir (J. D. Yang & Roberts, 2010).

Tümör baskılayıcı protein p53, pro-apoptotik genlerin ifadesini düzenleyerek ve anti-apoptotik genlerin inhibe edilmesiyle apoptozda kritik bir rol oynamaktadır. HCC'de, p53'ün mutasyonları veya fonksiyon kaybıyla sıklıkla karşılaşılmaktadır. Dolayısıyla apoptozun bozulması ve artmış tümör hücresi hayatta kalımı yaygındır (Elmore, 2007).

Akt/mTOR yolakları, pro-apoptotik proteinleri fosforilasyonla inaktive ederek ve anti-apoptotik proteinleri aktive ederek apoptozu engellemektedir. HCC'de sıklıkla gözlenen bu yolakların düzensizleşmesi, apoptoz direncine katkıda bulunur ve tümör büyümesini ve hayatta kalımını teşvik etmektedir (Purushotham vd., 2009).

1.3.4 Transkripsiyon Faktörlerinin Otofaji ve Apoptoz Mekanizmalarındaki Rolleri

Transkripsiyon faktörleri, gen ifadesini düzenlemede kritik bir rol oynayan proteinlerdir. Belirli DNA dizilerine bağlanarak etraflarındaki genlerin transkripsiyonunu teşvik eder veya inhibe ederler. Bu süreç, gen aktivitesini kontrol etmek ve onların doğru zamanında ve doğru miktarda ifade edilmesini sağlamak için büyük öneme sahiptir. Transkripsiyon faktörleri, gelişme, farklılaşma ve çevresel sinyallere tepki gibi çeşitli hücresel süreçlerde rol oynamaktadırlar. Onların işlevini anlamak, gen düzenlemesinin karmaşıklıklarını çözmek ve sonuç olarak organizmaların nasıl geliştiğini ve işlediğini anlamak için hayati öneme sahiptir (S.D. Minchin, 2013)

Birçok transkripsiyon faktörü, otofajinin düzenlenmesinde kritik roller oynamaktadır. Otofaji düzenlemesinde önemli bir transkripsiyon faktörü FOXO'dur (Forkhead box O). FOXO transkripsiyon faktörleri, oksidatif stres ve besin eksikliği gibi stres sinyallerine yanıt olarak otofaji dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçleri düzenlediği bilinmektedir. FOXO proteinleri, stres koşullarında hücresel homeostazı korumak için otofajiyi teşvik ederek, otofaji ile ilgili genlerin ekspresyonunu doğrudan artırabilir (Y. Zhao vd., 2010). p53, otofaji düzenlemesi ile ilişkilendirilen başka bir transkripsiyon faktörüdür. p53, hücresel streslere yanıt olarak DNA onarımı, hücre döngüsü durdurma ve apoptoz gibi süreçlerde rol almaktadır. Bununla birlikte, p53 ayrıca, otofaji ile ilgili genlerin ekspresyonunu modüle ederek ve diğer otofaji düzenleyicileriyle etkileşime girerek otofajiyi düzenleyebilir (Feng vd., 2005). Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2), hücresel antioksidan yanıtında yer alan bir transkripsiyon faktörüdür. Nrf2, oksidatif stres yanıtında ve hücresel detoksifikasyonda rol oynayan genlerin ekspresyonunu düzenleyerek otofajiyi dolaylı olarak etkileyebilir. Bu, hücresel ortamı değiştirir ve otofajiyi etkileyebilir (Jain & Jaiswal, 2006). Bunlar, otofaji ile transkripsiyon faktörleri arasındaki karmaşık ilişkinin sadece birkaç örneğidir. Transkripsiyon faktörleri tarafından otofajinin düzenlenmesi, hücrelerin çeşitli çevresel

koşullara uyum sağlamasını ve hücresel homeostazı korumasını sağlayan dinamik ve karmaşık bir süreçtir.

En çok çalışılan transkripsiyon faktörlerinden biri Transkripsiyon Faktörü EB (TFEB)'dir. TFEB, çeşitli uyaranlara yanıt olarak birden fazla genin ekspresyonunu transkripsiyonel olarak düzenleyen mikroftalmi ile ilişkili transkripsiyon faktörü/transkripsiyon faktörü E (MiTF/TFE) ailesine aittir (Zhu vd., 2021). TFEB, lizozomal biyogenez, makro ve mikrootofaji ve şaperon aracılı otofaji dahil tüm otofaji türlerinin gerçekleşmesinde rol oynamaktadır. Ayrıca otofagozom oluşumunda ve otofagozomlar ile lizozomlar arasındaki füzyonda da görev almaktadır (Settembre vd., 2012; Kim vd., 2018). Yapılan çalışmalar sonucu TFEB aktivitesinin ve hücresel konumunun fosforilasyon ile düzenlendiği gösterilmiştir. TFEB fosforilasyon dinamikleri ile gen ifadesinin aktivasyonu veya inhibisyonu sağlanmaktadır. TFEB fosforilasyonu ile hücresel konumu besinlerin bulunabilirliği, hücresel stres ve sinyal yolakları gibi çeşitli faktörlerden etkilenir (Puertollano vd., 2018). Hücre tarafından besin eksikliği veya hasarlı proteinlerin veya organel birikimi gibi stresler algılandığında, TFEB, çekirdeğe transloke olmakta ve otofaji ve lizozomal fonksiyonla ilgili genlerin ekspresyonunu aktive etmektedir (Settembre vd., 2011).

Lizozomlar, hücresel yıkım ve geri dönüşüm sisteminin önemli bir bileşenidir ve hücre içi dengeyi korumak için doğru işlevlere sahip olmaları hayati öneme sahiptir. Endositoz, otofaji ve lizozomal ekzositoz gibi çeşitli süreçlerde rol alarak hücre içi aktiviteleri düzenlemektedirler. Lizozomlar eskiden sadece atık maddelerin nihai parçalanması için kullanılan statik organeller olarak görülüyordu. Ancak son araştırmalar, bu organellerin ince ayarlanmış transkripsiyonel düzenlemeye tabi olduğunu ortaya koymuştur. Mikrodizi analizi, farklı hücre tiplerinde ve çeşitli koşullar altında birlikte ifade edilen lizozomal proteinleri kodlayan genleri göstermiştir. Lizozomal genlerin promotör analizi, bu genlerin ortak bir 10 bazlık palindromik (CLEAR) diziyi paylaştığını göstermektedir. TFEB'in bu CLEAR elemanlarına doğrudan bağlandığı ve bu yolla tüm CLEAR ağının ekspresyonunu teşvik ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle, TFEB aşırı ekspresyonu lizozomların sayısını ve lizozomal enzim seviyelerini artırarak lizozomal katabolik aktivitesini artırır. Daha sonraki çalışmalar, TFEB'in sadece lizozomal biyogenez ve fonksiyonunu değil, aynı zamanda otofaji ve lizozomal ekzositozda da rol oynadığını göstermiştir. TFEB, birçok otofaji geninin promotör bölgelerine bağlanır ve otofajik

süreçleri indükler (Settembre vd., 2011; Napolitano & Ballabio, 2016). Ayrıca, TFEB aşırı ekspresyonunun, uzun ömürlü proteinlerin parçalanmasının artmasının yanı sıra lipit damlacıklarının ve hasarlı mitokondrinin temizlenmesiyle sonuçlandığı bulunmuştur. Ayrıca, TFEB'in lizozomların plazma zarına kaynaştığı ve içeriklerini hücre dışına saldığı lizozomal ekzositozu indüklediği belirlenmiştir (Medina vd., 2011). Sonuç olarak, TFEB, lizozomal biyogenez, otofaji ve lizozomal ekzositoz süreçlerini düzenleyerek, ana hücresel parçalayıcı yolları kontrol edebilen ve hücre içi temizliği teşvik edebilen bir transkripsiyonel programı koordine eder. TFEB, çevresel ipuçlarına yanıt vererek transkripsiyonel seviyelerini arttırır ve bu şekilde temel transkripsiyonunu düzenler.

Önceleri onkogen olarak kabul edilen TFEB yapılan çalışmalar sonucunda genellikle otofaji-lizozomal biyogenez, hücresel enerji homeostazisi, stres yanıtı ve metabolizma gibi süreçlerin düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir. TFEB geninin düzensizliği, rol aldığı çoklu hücresel süreçleri etkileyeceğinden TFEB birçok hastalıkla ilişkilendirilmektedir. Nörodejeneratif hastalıklar, iskemik hasar, metabolik bozukluklar, inflamasyon ve çeşitli kanser türlerinde patojenik rol aldığı bilinmektedir (Chen vd., 2024).

Apoptozun hücresel boyutta yapılan çeşitli çalışmalarda TFEB tarafından, doğrudan veya dolaylı yoldan apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesi yoluyla, indüklenebileceği gösterilmiştir. Settembre ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, TFEB aşırı ifadesinin fare embriyonik fibroblastlarda (MEF) Bax ve Bak gibi pro-apoptotik genlerin upregülasyonu ve Bcl-2 gibi anti-apoptotik genlerin downregülasyonu aracılığıyla apoptoza sebep olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla araştırmalar TFEB geninin aşırı eksprese olmasının kanser hücrelerinde apoptozu indükleyebileceğini göstermektedir (Settembre vd., 2011;Martina vd., 2012).

1.3.5 Hepatoselüler Karsinomda TFEB Rolü

Otofaji, karaciğer kanserinde (HCC) hasarlı organel ve proteinleri uzaklaştırmasıyla kanser gelişim riskini azaltarak tümör baskılayıcı bir mekanizma olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak, otofaji yolaklarındaki bozulmalar metabolik stresi tetikleyebilmekte ve böylece kanser ilerlemesini hızlandırabilmektedir (Cui vd., 2020). Otofajinin HCC üzerindeki etkisi henüz tam olarak anlaşılamamış olmasının yanı sıra HCC'deki rolü değişkenlik göstermekte ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Kanser gelişiminin

erken evrelerinde otofaji, tümör baskılayıcı bir mekanizma olarak işlev görebilmekte ve hasar görmüş mitokondriyi ve mutasyona uğramış hücreleri temizleyebilmektedir. Ancak, bir tümör oluştuktan sonra, düzensizleşen otofaji, HCC hücrelerinin hayatta kalmasına katkıda bulunabilmekte ve tümör büyümesini teşvik edebilmektedir. Otofaji inhibitörleri, tümör oluşum aşamasında tümör baskılayıcı bir etki gösterirken, kanser gelişiminin erken aşamasında tümörü teşvik edici bir rol üstlenebilmektedir. Sonuçta, otofajinin HCC'deki rolü, kanserin evresine göre değişmektedir (Liu vd., 2017).

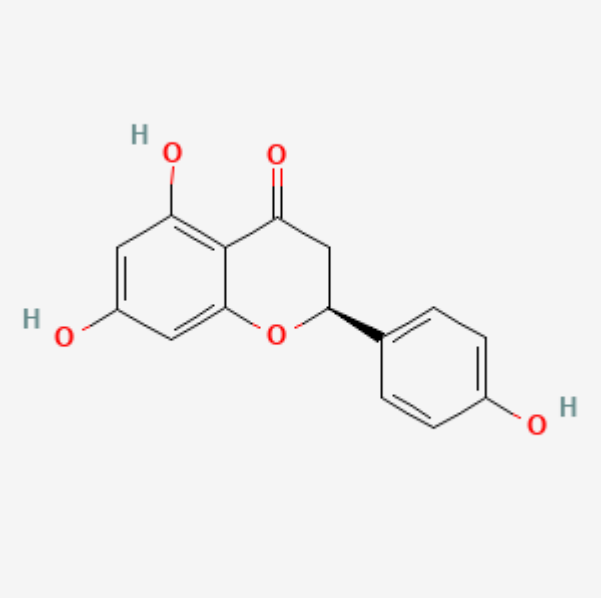
Yapılan bir çalışma sonucunda TFEB'in aşırı ekspresyonunun lizozomal genlerin mRNA düzeylerinde ve lizozomal enzim aktivitelerinde artışa sebep olduğu gözlemlenmiştir. Aynı çalışma içerisinde yapılan farklı analizler sonucu TFEB'in lizozomal genlerin ifadesini düzenlediği gözlemlenmiştir (Marco Sardiello, 2009). TFEB geninin lizozom enzimlerin aktivitesinin ve lizozomal genlerin ekspresyonunun düzenlenmesindeki rolleri ele alındığında otofajiyi indükleyebileceği ve bu yolla da HCC için terapötik bir hedef olabileceği düşünülebilir.

1.4 Naringenin ve Timokinon'un Terapötik Etkisi

1.4.1 Naringenin

Kimyasal adı 2,3-dihidro-5,7-dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4H-1-benzopiran-4-on (Şekil 1.4) olan Naringenin, genel olarak Narenciye türleri gibi meyvelerde bulunan doğal olarak oluşan en önemli flavonoidlerden biridir (Salehi vd., 2019). Naringenin'in şimdiye kadar yapılan çalışmalarda nöroprotektif etki göstermektedir (Atoki vd., 2023). Serbest radikallerin neden olduğu oksidatif strese karşı koruma sağlayabilmesi sebebiyle antioksidan özelliklere sahip olduğu söylenmektedir (Erlund vd., 2000). İnflamasyonu azaltabilmekte ve inflamatuvar reaksiyonları modüle edebilmektedir (Galati, 1999). Bazı araştırmalar, Naringenin'in kan lipidlerinin seviyelerini düşürebildiğini ve kardiyovasküler hastalık riskini azaltabildiğini göstermektedir (C. H. Lee vd., 2001). Naringenin, metabolik bozuklukların önlenmesinde ve tedavisinde rol alabileceği, insülin direncini azaltabileceği, kan şekerini düzenleyebileceği ve yağ metabolizmasını etkileyebileceği (Hirata, 1995), karaciğer hasarını önleyebileceği ve karaciğer fonksiyonlarını destekleyebileceği çalışmaların sonuçlarında gösterilmiştir (Smith, 2019). Naringenin'in HepG2 hücre hatlarında hücre büyümesini inhibe ettiğini ve apoptozu indüklediğini (Arul & Subramanian, 2013), karaciğer kanserinde olumlu etkiler

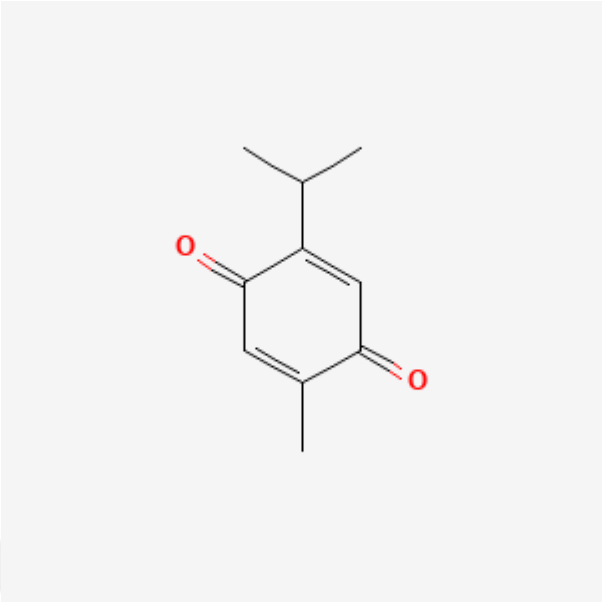
gösterdiğini, tümör büyümesini yavaşlattığını (Kang vd., 2019), ERK, JNK ve NF-κB gibi sinyal yollarını baskıladığını ve böylece karaciğer kanseri üzerinde olumlu bir etkisi olduğunu göstermektedir (Yen vd., 2015).



Şekil 1.6 Naringenin'in kimyasal yapısı (National Center for Biotechnology Information, Naringenin, 2024)

1.4.2 Timokinon

Nigella sativa halk arasında çörek otu olarak bilinen antioksidan özellikte fenolik bileşikler, yağ asitleri, proteinler, aminoasitler, organik asitler, mineraller ve vitaminler içeren bir bitkidir (Mohammed vd., 2016). Kimyasal adı 2-metil-5-izopropil-1,4-benzokinon olan Timokinon, Nigella sativa'nın siyah tohumlarından elde edilen doğal, farmokolojik etkilere sahip bitkinin ana bileşenidir (Mahmud vd., 2022)(Şekil 1.6). Timokinon'un alerjik ensefalit, alerjik astım, alerjik akciğer iltihabı fayda gösterdiği raporlanmıştır. Kardiyovasküler hastalıklarda, bakteriyel enfeksiyonlarda, kandaki kolesterolün düşmesindeki pozitif etkileri de bilinmektedir. Hayvan deneyleri sonucu mide fonksiyon bozukluklarının ve mide ülserinin iyileşmesinde etkili olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, Timokinon'un sahip olduğu anti-inflamatuar ve anti-oksidan aktiviteler gösterdiği ve nöroprotektif etkileri nörolojik bozukluk çalışmalarında gösterilmiştir. Timokinon'un çeşitli kanser türlerinde anti-kanser özellik gösterdiği de bilinmektedir (Ali vd., 2021).



Şekil 1.7 Timokinon'un kimyasal yapısı (National Center for Biotechnology Information, Thymoquinone, 2024)

Timokinon'un antikanser özellikleri farklı mekanizmalar üzerinden gösterilmiştir. Timokinon'un HIF-1α'nın ifadesini azaltarak ve HIF-1α'nın aşağı akış genlerini baskılayarak hipoksik kanser hücrelerinde apoptozu indüklediğini belirtilmektedir (Y. M. Lee vd., 2019), oral skuamöz hücreli karsinomda kanser hücresi aşamalarını baskıladığını ve PI3K/Akt yolunu inhibe ettiği (Ren & Luo, 2019), AGS hücre hatlarında hücre yayılma hızını düşürdüğünü, apoptozu indüklediğini ve VEGF-A gen ekspresyonunu azalttığı (Rashid, 2019), apoptotik hedeflerle etkileşime girerek hücre ölümünü indüklediğini ve PARP gen ekspresyonunu aşağı regüle ettiği (Vegesna V. vd., 2019), farklı insan kanser hücre hatlarında hücre sayısını azalttığını ve apoptozu indüklediği (Kus vd., 2018) belirtilmektedir. Timokinon'un Bax/Bcl-2 oranını arttırması yoluyla apoptozu indüklediği de gösterilmiştir (Ahmad vd., 2019).

1.5 Tezin Amacı

Önerilen tez çalışmasının amacı terapötik ve anti-kanser özellikleri gösterilmiş Timokinon ve Naringenin'in karaciğer kanseri ve sağlıklı insan hücrelerinde hücre ölümünü düzenleyen Transkripsiyon faktörü EB geninin ekspresyonu üzerindeki etkisini

analiz etmektir. Böylece *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ile karaciğer kanseri üzerine terapötik bir strateji sunulması hedeflenmiştir. Bu amaçlar doğrultusunda;

- MTT analizleri ile HepG2 ve insan Fibroblast hücre hatlarında Timokinon ve Naringenin'in ayrı ayrı ve kombine halde IC50 değerlerinin belirlenmesi
- Belirlen IC50 konsantrasyonları kullanılarak hücre hatlarının Timokinon ve Naringenin'in ayrı ayrı ve kombine halde 24, 48 ve 72 saat muamele edilmesi
- Belirlenen süre sonunda hücrelerden total RNA izole edilerek Real-Time PCR yapılması hedeflenmiştir.

1.6 Hipotez

Sunulan tez çalışmasında hücreleri Timokinon ve Naringenin ile ayrı ayrı ve kombine halde muamele etmek uygun konsantrasyonun belirlenmesi için IC50 değerleri tespit edilecektir. Belirlenen konsantrasyonlar ile hücreler muamele edildikten 24, 48 ve 72 saat sonunda Real-Time PCR ile TFEB geninin ekspresyon seviyelerindeki değişim incelenecektir. Bu sayede yapılacak olan ileri çalışmalar için öncelikli olarak karaciğer kanseri olmak üzere diğer kanser türleri için potansiyel terapötik stratejiler için *in vivo* çalışmalarla Timokinon ve Naringenin'in TFEB genine etkisi incelenecektir.

Timokinon ve Naringenin'in ayrı ayrı ve kombine olarak karaciğer kanseri hücrelerine uygulanmasının, TFEB gen ekspresyonunu değiştireceği düşünülmektedir. TFEB, diğer genlerin ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olarak, bu değişikliklerin kanser hücrelerinin hayatta kalma ve çoğalma süreçlerini etkileyeceği ön görülmektedir. Kombine tedavi, TFEB gen ekspresyonu üzerinde daha güçlü bir etki göstererek, gelecekteki terapötik stratejiler için umut vaat eden bir potansiyel sunacaktır.

2
MATERYAL METOD

2.1 Materyal

2.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Sarf Malzemeler

- Thoma Lamı (ISOLAB 075.03.002)
- 0.22 µm Gözenekli Steril Şırınga Filtresi
- 0,45 µm Gözenekli Steril Şırınga Filtresi
- 1,5 ml Mikrosantrifüj Tüpü (Mercury- MCTB015)
- Kryotüpler (Nest- 607101)
- 10 ml Steril Enjektör
- 15 ml Steril Falkon Tüpler (ISOLAB)
- 50 ml Steril Falkon Tüpler ISOLAB)
- 10 ml Serolojik Pipetler (Nest)
- ml Serolojik Pipetler (Nest)
- 2 ml Serolojik Pipetler (Nest- 325001)
- Pipet Ucu 1000 µl (Nest)
- Pipet Ucu 200 µl (Nest- 302106)
- Pipet Ucu 10 µl (Nest- 301006)
- 25 cm2 ’lik Hücre Kültürü Flaskları (Nest- 707003)
- 75 cm2 ’lik Hücre Kültürü Flaskları (Nest- 708003)
- 96 Kuyucuklu Hücre Kültürü Plakası (Nest- 701001)
- Nitril eldiven (Tenty)

2.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar

- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) (Bostonchem)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO)-(Bostonchem)
- Fosfat Buffered Saline (PBS) (Capricorn-)
- EtOH (Tekkim- TK.200650.05001)
- FBS (Capricorn)
- Tripan Mavisi (Sigma T8154)

- Tripsin-EDTA (Capricorn 100 mL)
- DMEM High Glucose besi yeri (Capricorn)
- Penisilin/Streptomisin (Capricorn 100 mL)
- Timokinon (Bostonchem)
- Naringenin (Bostonchem)
- GenMark total RNA İzolasyon Kiti
- Nepenthe cDNA Sentez Kiti
- Hibrigen Real Time PCR Kiti

2.1.3 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

- Hassas terazi (Shimadzu)
- Manyetik karıştırıcı (Variomag Mono)
- Santrifüj cihazı (Beckman Coulter Allegra X-30 R)
- Vorteks (Velp Scientifica)
- CO2 inkübatör (Esco, CelCulture CO2 INCUBATOR)
- Otoklav (Hirayama)
- Inverted mikroskop (Zeiss, Zen Blue2)
- Biyogüvenlik kabini (Mikrotest MLF120)
- Mikroplaka okuyucusu (Biotek PowerWave XS2)
- Ultra Derin Dondurucu (Thermo Scientific Forma 700 Series)
- NanoDrop spektrofotometre (Thermo Scientific One/OneC Microvolume UV-Vis)
- Thermo StepOnePlus Real Time PCR cihazı

2.2 Metod

2.2.1 Naringenin ve Timokinon'un Çözdürülmesi

Naringenin, etanol içerisinde (50mg/mL) çözünebilmektedir (*Naringenin,* n.d.). *in vitro* Sitotoksik analizlerde kullanılacak olan konsantrasyonlarda homojen olarak çözünebilirliğini ve kimyasal özelliklerinin korunduğunun tespit edilebilmesi için farklı konsantrasyonları (Tablo 3.1) spektrometrik ölçümlere tabi tutulmuştur. Belirlenen dalga boyu için farklı konsantrasyonlarda (Tablo 3.2) çözeltiler için fotometrik ölçümler

yapılmıştır. İlgili konsantrasyonlara düşürülmek üzere konsantrasyonu 3000 µM olacak şekilde hazırlanan ana stok alikotlanarak -20°C'de saklanmıştır.

Timokinon H_2O içerisinde (0,87mg/mL) çözünebilmektedir (*Thymoquinone*, n.d.). *in vitro* Sitotoksik analizlerde kullanılacak olan konsantrasyonlarda homojen olarak çözünebilirliğini ve kimyasal özelliklerinin korunduğunun tespit edilebilmesi için farklı konsantrasyonları (Tablo 3.1) spektrometrik ölçümlere tabi tutulmuştur. Belirlenen dalga boyu için farklı konsantrasyonlarda (Tablo 3.2) çözeltiler için fotometrik ölçümler yapılmıştır. İlgili konsantrasyonlara düşürülmek üzere konsantrasyonu 1000 µM olacak şekilde otoklavlanmış çift distile H_2O içerisinde çözdürülerek ana stok hazırlanmıştır. Alikotlanarak -20°C'de saklanmıştır. Timokinon'un ışığa karşı hassasiyeti olduğundan hazırlanması ve saklanması süresince ışıktan korunmuştur.

Tablo 2.1 Spektrometrik ölçüm için kullanılan çözelti konsantrasyonları

Çözelti	**Konsantrasyon**
Naringenin ve Timokinon	0,1 µM
Naringenin ve Timokinon	1 µM
Naringenin ve Timokinon	10 µM
Naringenin ve Timokinon	100 µM
Naringenin ve Timokinon	1000 µM

Tablo 2.2 Fotometrik ölçüm için kullanılan çözelti konsantrasyonları

Çözelti	Konsantrasyon
Naringenin ve Timokinon	10 µM
Naringenin ve Timokinon	25 µM
Naringenin ve Timokinon	50 µM
Naringenin ve Timokinon	100 µM
Naringenin ve Timokinon	200 µM
Naringenin ve Timokinon	300 µM
Naringenin ve Timokinon	400 µM
Naringenin ve Timokinon	500 µM
Naringenin ve Timokinon	600 µM
Naringenin ve Timokinon	700 µM
Naringenin ve Timokinon	800 µM
Naringenin ve Timokinon	900 µM

2.2.2 Hücre Kültürü Çalışmaları

Tez çalışması kapmasında Naringenin ve Timokinon'un ayrı ayrı ve kombine halde, TFEB geninin ekspresyonu üzerine etkilerinin analizi insan fibroblast hücre hattı (HDF) ve hepatosellular karsinom hücre hattı (HepG2) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.3 Hücrelerin canlandırılması

Tez çalışması kapsamında kullanılan Fibroblast ve HepG2 hücre kültürleri, kryotüplerde -80°C'de muhafaza edilmektedir. Dondurulmuş halde muhafaza edilen stok hücreler, canlandırılmak üzere çözdürülmüştür. Çözdürme işleminin ardından, hücre süspansiyonları 4 mL uygun besiyeriyle karıştırılarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant aspire edilmiştir. Pelet üzerine, hücre yoğunluğuna uygun olacak miktarda, tamamlanmış besiyeri eklenerek homojen bir hücre süspansiyonu elde edene kadar pipetaj yapılmıştır. Hücreler uygun hücre kültürü flasklarına ekilmiş ve 37°C'de, %5 CO_2 koşullarında inkübatörde inkübe edilmiştir. İnverted mikroskop ile yüzeye tutunmaları incelenen adherent HepG2 ve HDF hücre hatları büyümeleri takip edilerek flask yüzeyinde %80-90 yoğunluğa ulaştığında pasajlanmıştır (Bakar, 2023).

2.2.2.4 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler flask yüzeyinde %80-90 oranında konfluent olduklarında hücre kültür ortamının bölünmesiyle alt kültür oluşturma işlemine hücrelerin pasajlanması denmektedir. Hücrelerin pasajlanması pipet yardımıyla flask yüzeyini kaplayan besiyeri ortamının uzaklaştırılmasıyla başlamaktadır. Hücrelerin kültür kabından ayrılması tripsin aktivasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Tripsin aktivasyonunu sağlamak için besiyeri ortamında bulunan FBS'in uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla flask yüzeyini kaplayacak miktarda fosfat tamponlu salin (PBS) ile flask yüzeyi yıkanır ve ardından eklenen PBS aspire edilir. Flask içerisindeki hücrelerin yüzeyi kaplanacak kadar %0,05 Tripsin-EDTA eklenip kültür kabı enzimin optimum çalışma sıcaklı olan 37°C'de 2-3 dakika inkübe edilmiştir. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldıkları inverted mikroskop ile kontrol edildikten sonra Tripsin-EDTA aktivasyonunu inhibe etmek için eklenen Tripsin-EDTA miktarının en az iki katı kadar tamamlanmış uygun besiyeri ile yıkanmıştır. Süspansiyon içerisindeki tüm hücrelerk steril falkonlarda toplanarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant aspire edilmiştir. Pelet üzerine tamamlanmış uygun besiyeri eklenmiş ve yavaşça pipetaj yapılarak hücrelerin homojen dağılması sağlanmıştır. Pipetaj işlemini takiben hücreler yeni kültür ortamlarına ekilmiştir. 37°C'de, %5 CO2 koşullarında inkübatörde inkübe edilen hücrelerin takibi her gün inverted mikroskop ile yapılmış olup %80-90 oranında konfluent olduklarında pasajlamı işlemi takip edilmiştir (Bakar, 2023).

2.2.2.5 Canlı Hücrelerin Sayılması

In vitro hücre kültürü çalışmalarının her aşaması için canlı hücre sayısının tespit edilmesi ve ekimlerin belirlenen canlı hücre sayısına göre yapılması gerekmektedir. Canlı ve ölü hücreler tripan mavisi ile boyanıp thoma lamı üzerinde inverted mikroskop ile gözlemlenmiştir. 10 µL hücre süspansiyonu 10 µL tripan mavisiyle 1:1 oranında pipetaj ile karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım Thoma lamının her iki bölmesine 10 µL olacak şekilde eklenmiştir. Ölü hücrelerin membran bütünlüğü bozulduğu için tripan mavisi ile sitoplazmaları boyanır. Bu sebeple mikroskop altında hücreler mat ve mavi renk görünürler. Canlı hücreler boyayı içine hapsetmediğinden beyaz ve parlak görünür. Thoma lamının 4 bölmesinde 16 eşit kare yer almaktadır. Bu kareler üzerindeki canlı hücreler sayılarak aşağıda yer alan eşitliğe göre canlı hücre sayısı belirlenmiştir.

Canlı Hücre Sayısı = Thoma lamında sayılan canlı hücre sayısının ortalaması x Dilüsyon faktörü x Hücre Süspansiyon Hacmi (mL) x 10^4 (Çakır, 2023) (2.1)

2.2.2.6 Hücrelerin Dondurulması

Deneylerde kullanılan hücreler, deneyler bittiğinde ve/veya hücre stoğu oluşturulmak istendiğinde daha sonra kullanılmak üzere dondurularak muhafaza edilmektedir. Hücreler hızlıca dondurulurken hücre içinde ve dışında oluşan buz kristalleri ile hücre mekanik olarak parçalanabilmektedir. Dondurma işlemi yavaş gerçekleştirildiğinde ise hücreler dehidrasyon sonucu ölebilmektedir. Hücreleri ısı değişimlerine karşı korunabilmesi için dondurma işlemi yapılırken kriyoprotektan maddeler kullanılmaktadır. DMSO bu maddelerden biridir. Pasajlama işlemindeki aşamalar takip edilerek hücreler, tutundukları yüzeyden kaldırılır ve santrifüj edilir. Süpernatantın uzaklaştırılmasının ardından pelet üzerine 1 mL dondurma solüsyonu (%90 FBS, %10 DMSO) eklenmiştir. Pipetaj ile homojen hale getirilen süspansiyon canlılığın korunması için kademeli olarak dondurulmuştur. Kademeli dondurma süreci kapsamında hücreler bulundukları dondurma solüysonu içerisinden -20°C'de 1 saat muhafaza edildikten sonra uzun süreli saklama için -80°C'ye aktarılmıştır (Çakır, 2023).

2.2.2.7 *In vitro* Sitotoksisite Testleri

Tez çalışması kapsamında Timokinon ve Naringenin'in ayrı ayrı ve kombine halde, HDF ve HepG2 hücre hatları üzerindeki in vitro sitotoksisitelerinin ve IC_{50} değerlerinin belirlenmesi için MTT analizi yapılmıştır. Tamamlanmış DMEM High Glucose besiyeri

ortamında önceden büyütülmüş HDF ve HepG2 hücreleri Thoma lamında sayılmıştır. Her iki hücre hattı da farklı 96 kuyucuklu kültür plakasına, her bir kuyucukta 10^4 hücre olacak miktarda ekim yapılmıştır. Plaka hücrelerin tutunması amacıyla 24 saat boyunca 37°C, %5 CO_2 koşullarında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda hücrelerin yüzeye tutunması inverted mikroskop ile kontrol edilmiş ve toksisitesi kontrol edilmek istenen kimyasalların farklı konsanstrasyonları hazırlanmıştır (Liu vd., 2021).

Tablo 2.3 HepG2 hücre hattı saatlik sitotoksisite testleri Timokinon ve Naringenin için kullanılan konsantrasyonlar

Timokinon Konsantrasyonları			**Naringenin Konsantrasyonları**		
24 h	**48h**	**72h**	**24h**	**48h**	**72h**
-	12,5 µM	12,5 µM	-	12,5 µM	12,5 µM
25 µM	25 µM	25 µM	25 µM	25 µM	25 µM
37,5 µM	37,5 µM	37,5 µM	37,5 µM	37,5 µM	37,5 µM
50 µM	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM
62,5 µM	62,5 µM	62,5 µM	62,5 µM	62,5 µM	62,5 µM
75 µM	75 µM	75 µM	75 µM	75 µM	75 µM
87,5 µM	87,5 µM	87,5 µM	87,5 µM	87,5 µM	87,5 µM
100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM
112,5 µM	112,5 µM	112,5 µM	-	112,5 µM	112,5 µM
-	125 µM		-	125 µM	

Tablo 2.4 HepG2 hücre hattı sitotoksisite testleri Timokinon ve Naringenin kombine uygulaması için kullanılan konsantrasyonlar

Timokinon + Naringenin Konsantrasyonları		
24h	**48h**	**72h**
6,25 µM +6,25 µM	6,25 µM +6,25 µM	6,25 µM +6,25 µM
12,5 µM +12,5 µM	12,5 µM +12,5 µM	12,5 µM +12,5 µM
18,75 µM +18,75 µM	18,75 µM +18,75 µM	18,75 µM +18,75 µM
25 µM +25 µM	25 µM +25 µM	25 µM +25 µM
31,25 µM +31,25 µM	31,25 µM +31,25 µM	31,25 µM +31,25 µM
37,5 µM +37,5 µM	37,5 µM +37,5 µM	37,5 µM +37,5 µM
43,5 µM +43,5 µM	43,5 µM +43,5 µM	43,5 µM +43,5 µM
50 µM +50 µM	50 µM +50 µM	50 µM +50 µM
56,25 µM +56,25 µM	56,25 µM +56,25 µM	56,25 µM +56,25 µM
62,5 µM +62,5 µM	62,5 µM +62,5 µM	62,5 µM +62,5 µM

Tablo 2.5 Fibroblast hücre hattı saatlik sitotoksisite testleri Timokinon ve Naringenin için kullanılan konsantrasyonlar

Timokinon Konsantrasyonları			Naringenin Konsantrasyonları		
24 h	**48h**	**72h**	**24h**	**48h**	**72h**
5 µM	5 µM	5 µM	5 µM	5 µM	5 µM
15 µM	15 µM	15 µM	12,5 µM	15 µM	15 µM
25 µM	25 µM	25 µM	15 µM	25 µM	25 µM
30 µM	30 µM	30 µM	25 µM	30 µM	30 µM
35 µM	35 µM	35 µM	37,5 µM	35 µM	35 µM
45 µM	45 µM	45 µM	50 µM	45 µM	45 µM
55 µM	55 µM	55 µM	62,5 µM	55 µM	55 µM
60 µM	60 µM	60 µM	75 µM	60 µM	60 µM
65 µM	65 µM	65 µM	87,5 µM	65 µM	65 µM
75 µM	75 µM	75 µM	100 µM	75 µM	75 µM
85 µM	85 µM	85 µM	-	85 µM	85 µM
95 µM	95 µM	95 µM	-	95 µM	95 µM
100 µM	-	-	-	-	-

Tablo 2.6 HepG2 hücre hattı sitotoksisite testleri Timokinon ve Naringenin kombine uygulaması için kullanılan konsantrasyonlar

Timokinon + Naringenin Konsantrasyonları		
24h	**48h**	**72h**
2,5 µM +2,5 µM	2,5 µM +2,5 µM	2,5 µM +2,5 µM
7,5 µM +7,5 µM	7,5 µM +7,5 µM	7,5 µM +7,5 µM
12,5 µM +12,5 µM	12,5 µM +12,5 µM	12,5 µM +12,5 µM
17,5 µM +17,5 µM	17,5 µM +17,5 µM	17,5 µM +17,5 µM
22,5 µM +22,5 µM	22,5 µM +22,5 µM	22,5 µM +22,5 µM
27,5 µM +27,5 µM	27,5 µM +27,5 µM	27,5 µM +27,5 µM
32,5 µM +32,5 µM	32,5 µM +32,5 µM	32,5 µM +32,5 µM
37,5 µM +37,5 µM	37,5 µM +37,5 µM	37,5 µM +37,5 µM
42,5 µM +42,5 µM	42,5 µM +42,5 µM	42,5 µM +42,5 µM
47,5 µM +47,5 µM	47,5 µM +47,5 µM	47,5 µM +47,5 µM

Kuyucuklarda yer alan besiyeri mikropipet yardımıyla uzaklaştırılmış ve hücrelerin üzerine hazırlanan Tablo 3.3 ve 3,4'te belirtilen konsantrasyonlardaki kimyasallar eklenmiştir. Naringenin çözeltileri için etanol miktarı %0,1'i geçemeyecek şekilde hazırlanmıştır. Pozitif kontrol grubu için DMSO eklenirken, negatif kontrol grubuna tamamlanmış DMEM High Glucose eklenmiştir. Deney prosedürüne göre kimyasallar 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilmiştir. Kimyasallar ve kontrol grupları plaka üzerinde 3 tekrar olacak şekilde hazırlanmıştır. Her bir saat aralığı için deneyler 3 defa tekrarlanmıştır. İnkübasyon sürelerinin sonunda kimyasalları içeren besiyeri çözeltisi kuyucuklardan uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklar üzerine PBS içerisinde çözdürülmüş MTT (5mg/ml) 1:10 oranında DMEM High Glucose ile seyreltilmiş ve kuyucuklara eklenmiştir. MTT, çoğalan hücrelerde artan mitokondriyal dehidrogenaz enziminin aktivitesi sonucu formazan kristalleri oluşturacak şekilde indirgenir. Bu aktivitenin gerçekleşmesi için MTT eklenen plakalar 37°C'de 3-4 saat inkübe edilir. İnkübasyonun ardından tamamlanmış besiyeri-MTT karışımı uzaklaştırılır. Mor renkli formazan kristallerinin çözünmesi için kuyucuklara DMSO eklenir ve 37°C'de 15 dakika inkübe edilir. Kuyucuklardaki formazan kristallerinin ELISA okuyucu ile 570 nm'de absorbans

değerleri belirlenmiştir. Hücre canlılık oranı aşağıda yer alan formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Canlılık} = \text{OD570 (örnek)} / \text{OD570 (negatif kontrol)} \times 100 \quad (2.2)$$

Elde edilen % Canlılık oranları ile GraphPad Prism 9.0 kullanılarak Timokon, Naringenin ve Timokinon +Naringenin ile muamele edilen her iki hücre hattı için IC50 konsasntrasyon değerleri hesaplanmıştır.

2.3 RNA İzolasyonu

MTT analizleri ile hücre canlılığı hesaplanmış ve Naringenin ve Timokinon'un ayrı ayrı ve kombine halde uygulanmaları sonucu IC_{50} değerleri belirlenmiştir. HDF ve HepG2 hücreleri, hücre kültür kaplarında 37°C'de, %5 CO_2 koşullarındaki inkübatörde büyütülmüştür. %80-90 konfluent seviyesine ulaşan HDF hücreleri 75cm^2 boyutundaki flasklara, her bir flaskta 5x105 hücre olacak şekilde aktarılarak 24 saat 37°C'de, %5 CO2 koşullarında inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda DMEM High Glucose besiyeri aspire edilmiştir. Hücreler üzerine MTT analizi sonucu HDF hücre hattı için belirlenen IC50 konsantrasyonlarında Timokinon, Naringenin'i ayrı ayrı ve kombine halde içeren besiyerleri ve negatif kontrol DMEM High Glucose besiyeri eklenmiş ve 24, 48, 72 saat boyunca 37°C'de, %5 CO2 koşullarındaki inkübatörde inkübe edilmiştir. HepG2 hücreleri her bir kuyucuğa $3.5x10^5$ hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Hücreler 24 saat 37°C'de, %5 CO_2 koşullarında inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda DMEM High Glucose besiyeri aspire edilmiştir. Hücrelerin üzerine MTT analizi sonucu HepG2 hücre hattı için belirlenen IC_{50} konsantrasyonlarında Timokinon, Naringenin'i ayrı ayrı ve kombine halde içeren besiyerleri ve negatif kontrol DMEM High Glucose besiyeri eklenmiştir. 24, 48, 72 saat boyunca 37°C'de, %5 CO_2 koşullarındaki inkübatörde inkübe edilmiştir. 24, 48, 72 saatin sonunda ilgili flask ve kuyucuklardan GenMark Total RNA Purification Kit kullanılarak HDF ve HepG2 hücrelerinden total RNA izolasyonu yapılmıştır. Kit içeriğinde yer alan tamponlar firmanın önerileri doğrultusunda hazırlanmıştır. Kit içerisinde yer alan RNA Lizis solüsyonu (RLS) üzerine 350 µL 2-Mercaptoethanol (2-ME), RNA yıkama solüsyonu II (RWSII) üzerine 64 mL %100 etanol eklenmiştir. Gerekli solüsyonlar hazırlandıktan sonra kuyucuklar ve flask üzerinden besiyerleri aspire edilmiştir. Hücreler kitte önerildiği gibi PBS ile yıkandıktan sonra %0.1 tripsin kullanılarak tutundukları yüzeyden kaldırılmışlardır. Steril santrifüj

tüplerinde toplandıktan sonra 300 xg'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantın uzaklaştırılmış ve hücrelerin üzerinde 350 µL RNA Lizis/2-ME solüsyonu eklenmiştir. Pelet, solüsyon içerisinden homojen hale gelecek şekilde pipetaj yapılmış ve vortekslenmiştir. Homojen hale getirilen hücre peleti, RNA Lizis/2-ME karışımının üzerine 350 µL %70 etanol eklenip pipetaj yapılmıştır. Elde edilen 700 µL lizat/etanol karışımı kit içerisinde bulunan kolonlara aktarılmış ve 12.000 xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolonlardan geçen sıvı atılarak kolonlara 500 µL RNA yıkama solüsyonu I (RWS I) eklenmiş ve 12.000 xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolonlardan geçen sıvı atıldıktan sonra kit içeriğinde bulunan, her bir kolon için 80 µL DNase I İnkübasyon Buffer içerisinden çözdürülen 2 µL DNase I, kolonlar üzerine eklenmiş ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda kolonlar üzerine 500 µL RNA yıkama solüsyonu I (RWS I) eklenmiş ve 12.000 xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolonlardan geçen sıvı atılarak kolonlara 600 µL RNA yıkama solüsyonu II (RWS II) eklenmiş ve 12.000 xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolonlardan geçen sıvı atıldıktan sonra kolonlarda kalabilecek etanolün tamamını uzaklaştırabilmek için kolonlar 12.000 xg'de 3 dakika santrifüj edilmiştir ve kolonlardan geçen sıvı atılmıştır. RNA kolonu steril ve yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır ve üzerlerine 40 µL nükleazsız su eklenip 1 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından 14.000 xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolonlardan elüe edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflıkları Nanodrop ile 280, 260 ve 230 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerle belirlenmiştir. Elde edilen RNA'lar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

2.4 RNA Miktar ve Saflık Tayini

İzole edilen RNA örnekleri NanoDrop spektrofotometre (Thermo Scientific One/OneC Microvolume UV-Vis) kullanılarak saflık ve miktar analizlerine tabii tutulmuştur. İzolasyon kitine ait elution buffer kullanılarak blank ölçümleri yapılmıştır. Örneklerin saflık ve miktar tayinleri matematiksel veri olarak alınmıştır. Uygun görülmeyen RNA örnekleri tekrar izole edilmiştir.

2.5 cDNA Sentezi

Bu çalışmada, Nepenthe cDNA sentez kiti kullanılmıştır. Reaksiyonlar Tablo 2.7'de yer alan üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte, total RNA'yı degredasyondan koruma amacıyla tüm aşamalar soğuk plaka üzerinde yürütülmüştür.

Başlangıç RNA'nın konsantrasyonu 500 ng/µl olarak belirlenmiş ve bu konsantrasyonda cDNA sentez reaksiyonu başlatılmıştır. Bu seviye, hedeflenen miktarda cDNA elde etmek için optimizasyonu sağlamıştır.

Tablo 2.7 cDNA sentez protokolü

Komponent	**Hacim**
Kalıp RNA (1 ng- 5µl)	X µl
Buffer- Mix (2x)	10 µl
Enzim Mix	2 µl
H_2O	20 µl'ye tamamlayacak kadar
Toplam Hacim	**20 µl**

2.6 Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) için Thermo StepOnePlus cihazı ile Hibrigen SYBR Green Real Time PCR kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri, 50 ng/µL konsantrasyona seyreltilmiştir. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu, yapılan optimizasyon deneylerinde belirlenen 300 ng/µL (GAPDH için), 350 ng/µL (TFEB için) ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan konsantrasyonlar, deneylerin güvenilirliğini ve spesifikliğini artırmak için önceden optimize edilmiş değerlerdir. Reaksiyonlar Tablo 2.5'te yer alan koşullar ve Tablo 2.6'da yer alan bileşenler ile gerçekleştirilmiştir. Tüm analizler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2.8 Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu koşulları

Başlangıç sıcaklığı	94 °C	1 dakika	
Denatürasyon	94 °C	25 saniye	**40 Döngü**
Bağlanma	60 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	25 saniye	

Tablo 2.9 Reaksiyon bileşenleri

Komponent	**Miktar**
Hibrigen SYBER Green Real Time Mix	12.5 µl
İleri ve Geri Primer	1 µl
Kalıp DNA	<1000 ng cDNA
dH_2O	Son hacim 25µl'ye tamamlanacak kadar

Tablo 2.10 Kullanılan primerler

Gen	Primer
GAPDH	Kit içeriğinden temin edilmiştir.
TFEB	Forward: 5'-GCGGCAGAAGAAAGACAATC-3' Reverse: 5'- CTGCATCCTCCGGATGTAAT-3'

2.7 İstatistiksel Analiz

Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) sonuçlarının analizi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi gerçekleştirilmiştir (Livak & Schmittgen, 2001). Verilerin daha hassas bir şekilde değerlendirilmesini sağlayacağından Ct ortalamalarının hesaplanmasında geometrik ortalamaya kullanılmıştır. Ayrıca, tez kapsamındaki bulguların güvenilirliğini ve bilimsel geçerliliğini güçlendirmek amacıyla standart sapma ve varyasyon katsayısı hesaplamaları yapılmıştır.

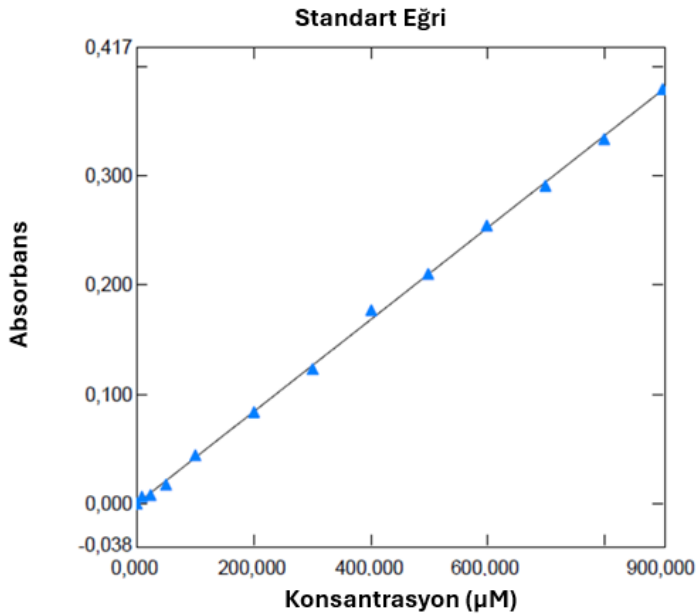
Kontrol grubu olan Fibroblastlar ve deney grubu olan HepG2 hücre hatlarında TFEB ekspresyon değişimlerinin anlamlı olup olmadığı t Testi ile analiz edilmiştir.

3
SONUÇ

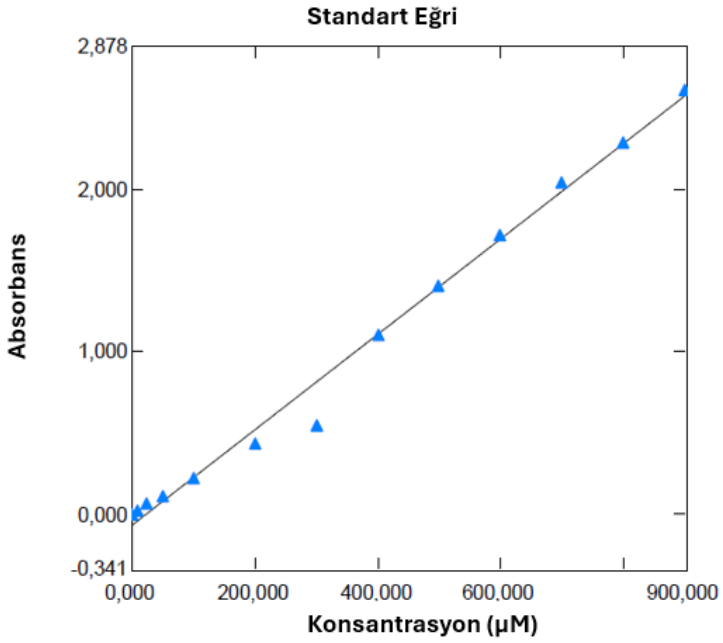
3.1 Timokinon ve Naringenin'in Çözdürülmesi

Timokinon ve Naringen'in çözdürülmesi için sırasıyla çift distile H_2O ve etanol kullanılmıştır. Çözeltiler Tablo 3.3 ve Tablo 3.4'te yer alan konsantrasyon değerlerine çözdürülmek üzere ana stok olarak hazırlanmıştır. Timokinon ana stoğu 1000 µM, Naringenin ana stoğu 3000 µM konsantrasyonda olacak şekilde hassas terazide ölçüm alınmış ve çözücülerinden çözdürülmüştür. Çözeltilerin in vitro Sitotoksisite analizlerinde alikotlanmış ana stoklardan seyreltilerek kullanılması planlanmıştır. Yüksek oranda seyreltilecek çözeltilerin homojenitesini ve karakteristik özelliklerini koruduğunu tespit etmek amacıyla fotometrik ölçüm yapılmıştır. Fotometrik ölçümde kullanılmak üzere her iki çözeltinin hangi dalga boyu değerinde pik verdiğini tespit etmek amacıyla Tablo 3.1'de yer alan konsantrasyon değerlerindeki çözeltilerde spektrometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerin sonucunda Timokinon'un 300 nm dalga boyunda, Naringenin'in 340 nm dalga boyunda pik verdiği tespit edilmiştir.

Tespit edilen dalga boyları kullanılarak her iki çözelti için Tablo 3.2'de yer alan konsantrasyon aralıkları için spektrometrik ölçüm yapılarak toz halinde ticari olarak satın alınan Timokinon ve Naringenin'in çözücüleri içerisinde homojen olarak dağıldığını ve düşük konsantrasyonlarda karakteristik özelliklerini sürdürdüklerini göstermek amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda her bir ölçüm 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve ölçüm sonucunda elde edilen absorbans değerlerinden standart eğri grafiği oluşturulmuştur.



Şekil 3.1 Timokinon çözeltileri için spektrometrik ölçüm absorbans sonuçları standart eğri grafiği



Şekil 3.2 Naringenin çözeltileri için spektrometrik ölçüm absorbans sonuçları standart eğri grafiği

Her iki standart eğri grafiği için ayrı istatistiksel hesap yapılmıştır. Hesaplamaların sonucunda r^2 değerleri Timokinon ve Naringenin için sırasıyla 0,99940 ve 0,99131 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen değerler Timokinon ve Naringenin'in çözücülerinde homojen olarak çözündüğünü ve analiz edilen her konsantrasyon için homojenitelerini ve karakteristik özelliklerini koruduğunu göstermektedir.

3.2 Hücre Kültürü Çalışmaları

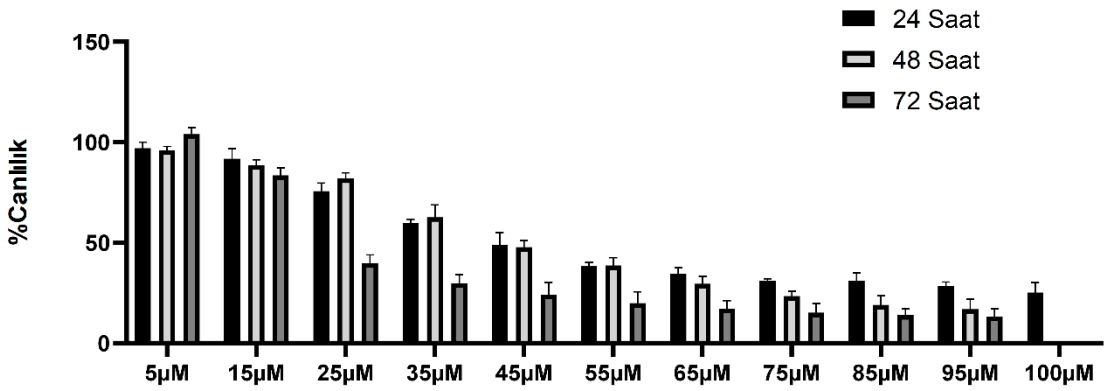
Hücre açma işlemi için stok hücre hattı miktarının en az iki katı olacak kadar besi yeri eklenmiş ve santrifüj ile DMSO içeren dondurma solüsyonunu içeren süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pelet yoğunluğuna bağlı olarak 2-3 mL besiyeri ile pelet çözdürülmüştür. 1:1 oranında olacak şekilde, 10 µL hücre süspansiyonu 10 µL tripan mavisi ile 1-2 dakika inkübe edilerek boyanmıştır. 3.1.5.3 bölümünde yer alan formüle göre canlı hücre sayısı hesaplanmış ve 25cm^2lik hücre kültürü flasklarına 10^3 hücre ekimi yapılmıştır. %80-90 yoğunluğa ulaşan hücre kültürleri 75cm^2lik hücre kültürü kaplarına pasajlanmıştır. Hücre yoğunlukları %80-90'a ulaştığında hücre stoğu oluşturmak adına hücrelerin bir kısmı dondurulmuştur. Dondurulmayan hücreler *in vitro* sitotoksik analizlerde kullanılmak üzere büyütülmüştür.

3.2.1 in vitro Sitotoksik Analizleri

Timokinon ve Naringenin kimyasallarının ayrı ayrı ve kombine halde TFEB genine ekspresyonlarının incelenebilmesi için belirlenen saatler (24, 48, 72) süresince HepG2 ve Fibroblast hücreleri üzerindeki toksisiteleri MTT analizleri ile incelenmiştir. Bu amaçla Tablo 3.3 ve Tablo 3.4'te yer alan konsantrasyonlarda Timokinon, Naringenin ile ayrı ayrı ve kombine halde belirlenen süre boyunca hücre hatları muamele edilmiştir. Muamele süresi sonunda MTT ile boyanan hücre hatlarının canlılıklarının ve IC_{50} değerlerinin hesaplanması amacıyla ELISA okuyucu ile absorbans değerleri ölçülmüştür. Her bir konsantrasyon değeri 3 kuyucukta ve 3 farklı zaman diliminde tekrarlanmıştır. Bölüm 3.1.5.5'te yer alan % Canlılık hesabı için verilen formüle göre canlılık oranları hesaplanmıştır.

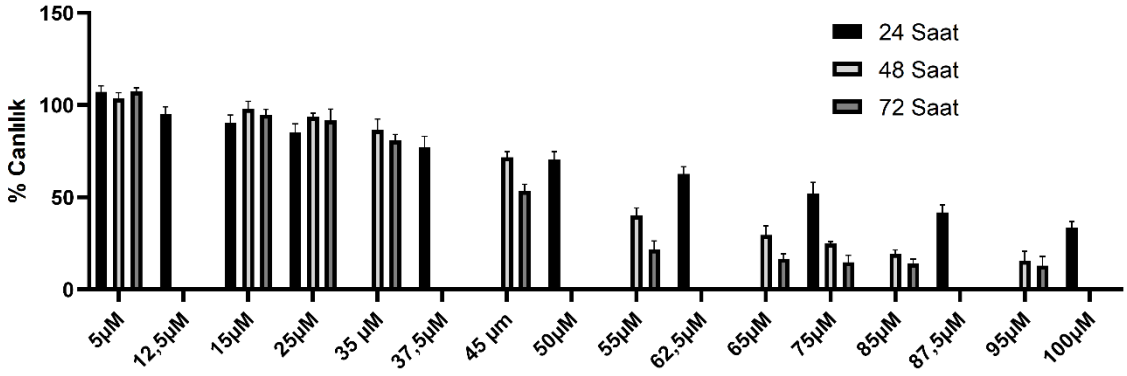
Fibroblast hücre hattında Şekil 3.1'de yer alan konsantrasyon değerleri için 24 saatlik Timokinon muamelesi sonucu % Canlılık değerleri 97.06 µM, 91.75 µM, 75.64 µM, 59.64 µM, 48.94 µM, 38.31 µM, 34.66 µM, 31.07 µM, 30.92 µM, 28.41 µM, 25.16 µM olarak; 48 saatlik Timokinon muamelesi sonucu % Canlılık değerleri 96.05 µM, 88.62

µM, 81.90 µM, 62.66 µM, 47.85 µM, 38.74 µM, 29.61 µM, 23.42 µM, 19.07 µM, 16.91 µM olarak; 72 saatlik Timokinon muamelesi sonucu % Canlılık değerleri 104.08 µM, 83.56 µM, 39.68 µM, 29.64 µM, 24.04 µM, 19.88 µM, 17.01 µM, 15.23 µM, 13.88 µM, 13.33 µM olarak saptanmıştır.



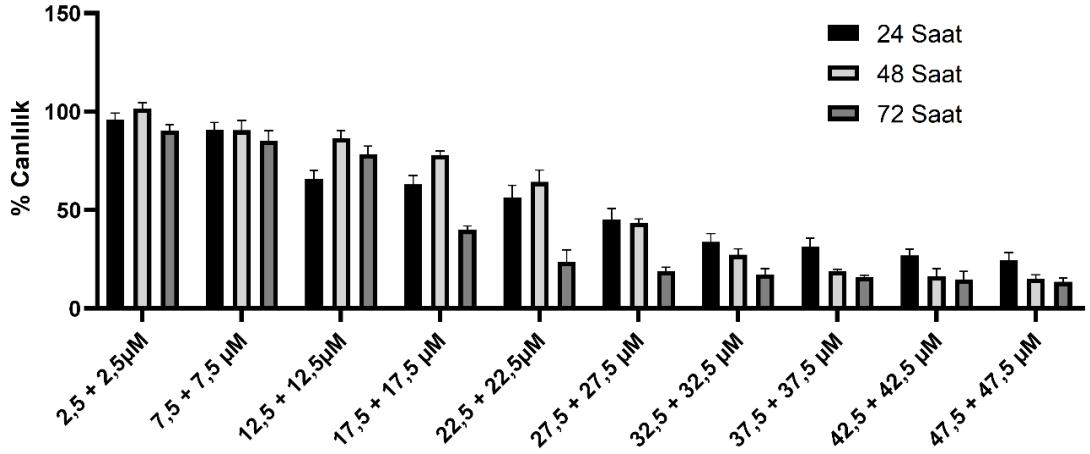
Şekil 3.3 Fibroblast hücre hattı Timokinon muamelesi sonucu saatlere göre % canlılık oranları

Fibroblast hücre hattında Şekil 3.2'de yer alan konsantrasyon değerleri için 24 saatlik Naringenin muamelesi sonucu % Canlılık değerleri 107.22 µM, 95.36 µM, 90.27 µM, 85.21 µM, 77.34 µM, 70.47 µM, 62.70 µM, 51.97 µM, 41.78 µM, 33.68 µM olarak; 48 saatlik Naringenin muamelesi sonucu % Canlılık değerleri 103.68 µM, 98.05 µM, 93.70 µM, 86.40 µM, 71.74 µM, 40.17 µM, 29.51 µM, 24.93 µM, 19.45 µM, 15.69 µM olarak; 72 saatlik Naringenin muamelesi sonucu % Canlılık değerleri 107.40 µM, 94.83 µM, 91.75 µM, 80.80 µM, 53.51 µM, 21.79 µM, 16.67 µM, 14.77 µM, 14.12 µM, 12.96 µM olarak saptanmıştır.



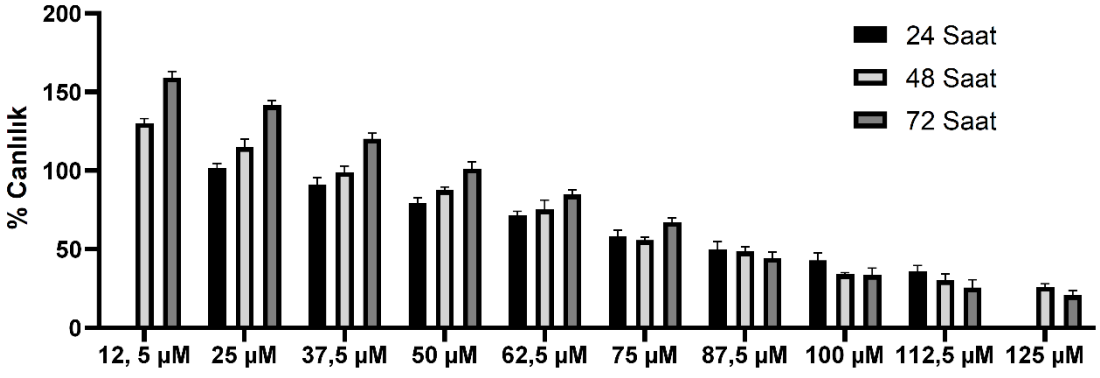
Şekil 3.4 Fibroblast hücre hattı Naringenin muamelesi sonucu saatlere göre % canlılık oranları

Fibroblast hücre hattında Şekil 3.3'de yer alan konsantrasyon değerleri için 24 saatlik Timokinon+Naringenin muamelesi sonucu % Canlılık değerleri 96.04 µM, 90.68 µM, 65.70 µM, 63.00 µM, 56.49 µM, 45.11 µM, 33.84 µM, 31.31 µM, 26.92 µM, 24.41 µM olarak; 48 saatlik Timokinon+Naringenin muamelesi sonucu % Canlılık değerleri 101.62 µM, 90.59 µM, 86.43 µM, 77.88 µM, 64.35 µM, 43.49 µM, 27.28 µM, 18.89 µM, 16.36 µM, 15.02 µM olarak; 72 saatlik Naringenin muamelesi sonucu % Canlılık değerleri 90.42 µM, 85.28 µM, 78.43 µM, 39.97 µM, 23.86 µM, 18.87 µM, 17.24 µM, 15.93 µM, 14.85 µM, 13.58 µM olarak saptanmıştır.



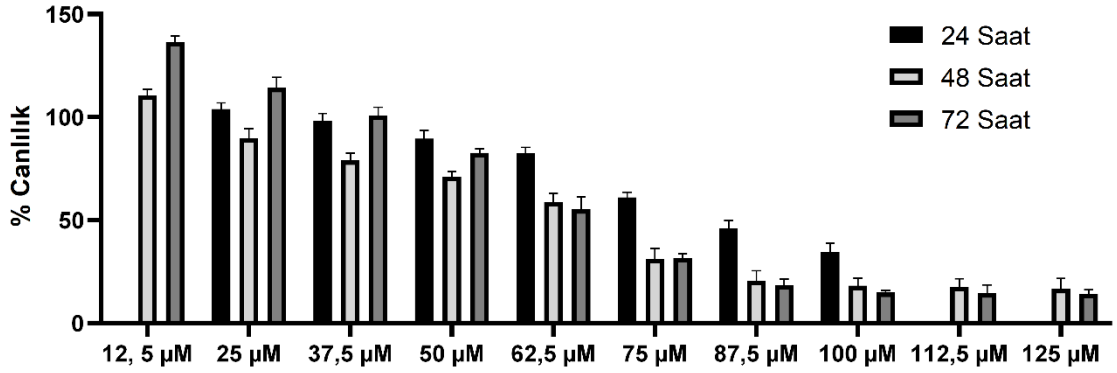
Şekil 3.5 Fibroblast hücre hattı Timokinon + Naringenin muamelesi sonucu saatlere göre % canlılık oranları

HepG2 hücre hattında Şekil 3.4'de yer alan konsantrasyon değerleri için 24 saatlik Timokinon muamelesi sonucu % Canlılık değerleri 101.71 µM, 90.96 µM, 79.25 µM, 71.64 µM, 58.03 µM, 49.73 µM, 42.88 µM, 35.83 µM olarak; 48 saatlik Timokinon muamelesi sonucu % Canlılık değerleri 130.07 µM, 114.95 µM, 98.92 µM, 87.60 µM, 75.24 µM, 55.81 µM, 48.59 µM, 34.11 µM, 30.24 µM, 25.91 µM olarak; 72 saatlik Timokinon muamelesi sonucu % Canlılık değerleri 159.05 µM, 141.63 µM, 120.20 µM, 101.31 µM, 84.80 µM, 67.30 µM, 44.33 µM, 33.58 µM, 25.52 µM, 20.68 µM olarak saptanmıştır.



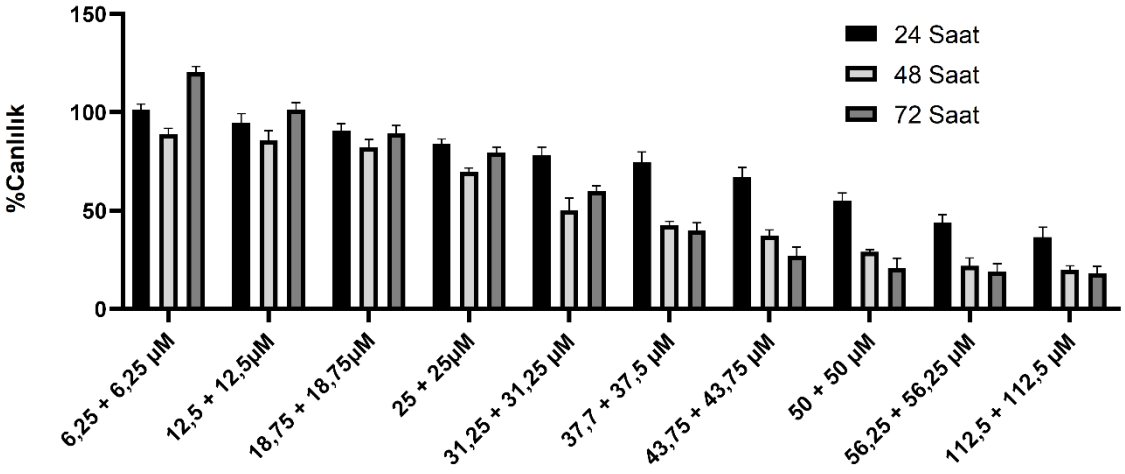
Şekil 3.6 HepG2 hücre hattı Timokinon muamelesi sonucu saatlere göre % canlılık oranları

HepG2 hücre hattında Şekil 3.5'te yer alan konsantrasyon değerleri için 24 saatlik Naringenin muamelesi sonucu % Canlılık değerleri 103.90 µM, 98.21 µM, 89.51 µM, 82.56 µM, 61.00 µM, 46.01 µM, 34.55 µM olarak; 48 saatlik Naringenin muamelesi sonucu % Canlılık değerleri 110.56 µM, 89.82 µM, 79.07 µM, 71.15 µM, 58.82 µM, 31.13 µM, 20.53 µM, 18.15 µM, 17.61 µM, 16.63 µM olarak; 72 saatlik Naringenin muamelesi sonucu % Canlılık değerleri 136.44 µM, 114.26 µM, 100. µM, 82.73 µM, 55.26 µM, 31.65 µM, 18.49 µM, 14.97 µM, 14.55 µM, 14.16 µM, olarak saptanmıştır.



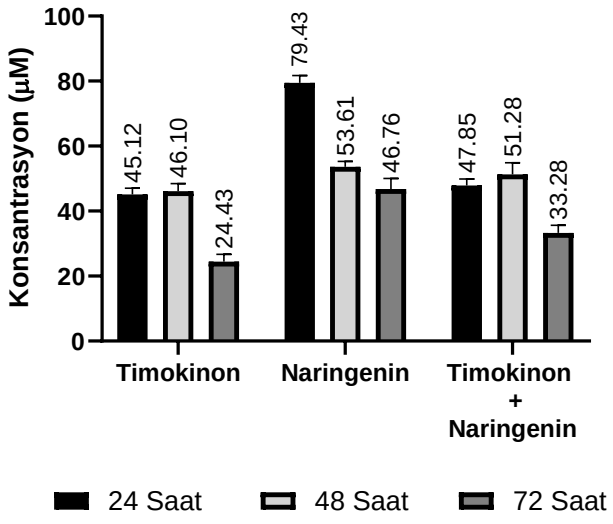
Şekil 3.7 HepG2 hücre hattı Naringenin muamelesi sonucu saatlere göre % canlılık oranları

HepG2 hücre hattında Şekil 3.6'de yer alan konsantrasyon değerleri için 24 saatlik Timokinon+Naringenin muamelesi sonucu % Canlılık değerleri 101.29 µM, 94.65 µM, 90.64 µM, 84.02 µM, 78.18 µM, 74.71 µM, 67.16 µM, 55.21 µM,43.89 µM, 36.50 µM olarak; 48 saatlik Timokinon+Naringenin muamelesi sonucu % Canlılık değerleri 88.83 µM, 85.70 µM, 82.13 µM, 69.67 µM, 50.33 µM, 42.62 µM, 37.23 µM, 29.09 µM, 21.88 µM, 19.96 µM olarak; 72 saatlik Naringenin muamelesi sonucu % Canlılık değerleri 120.36 µM, 101.35 µM, 89.34 µM, 79.49 µM, 60.07 µM, 39.86 µM, 27.18 µM, 20.73 µM, 19.09 µM, 18.13 µM olarak saptanmıştır.

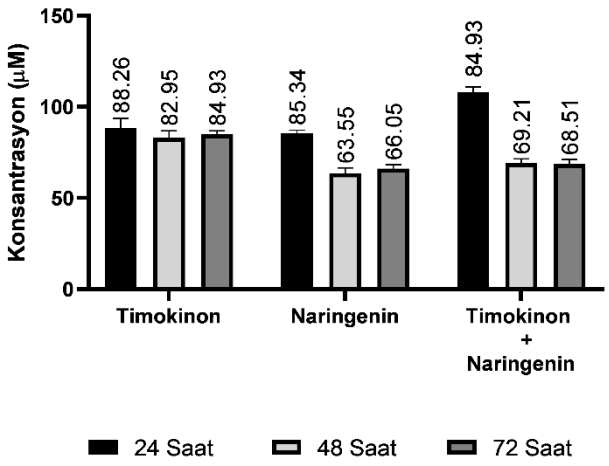


Şekil 3.8 HepG2 hücre hattı Timokinon + Naringenin muamelesi sonucu saatlere göre % canlılık oranları

İleri deneylerde hücrelere muamele etmek amacıyla MTT analizlerinden elde edilen canlılık oranları ile GraphPad Prism 9.0 kullanılarak IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Yapılan hesaplamalar sonucunda Şekil 3.7'de yer alan grafikte gösterildiği üzere Fibroblast hücrelerinde Timokinon muamelesi sonucu 24, 48 ve 72 saat sonunda sırasıyla 45.12 µM, 46.10 µM, 24.43 µM; Naringenin muamelesi sonucu 24, 48 ve 72 saat sonunda sırasıyla 76.43 µM, 53.61 µM, 46.76 µM olarak; kombine muamele sonucu 24, 48 ve 72 saat sonunda sırasıyla 47.85 µM, 52.28 µM, 33.28 µM olarak hesaplanmıştır. Şekil 3.8'de yer alan grafikte gösterildiği üzere HepG2 hücrelerinde Timokinon muamelesi sonucu 24, 48 ve 72 saat sonunda sırasıyla 88.26 µM, 82.95.10 µM, 84.93 µM; Naringenin muamelesi sonucu 24, 48 ve 72 saat sonunda sırasıyla 85.34 µM, 63.55 µM, 66.05 µM olarak; kombine muamele sonucu 24, 48 ve 72 saat sonunda sırasıyla 108.01 µM, 69.21 µM, 68.51 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.9 Fibroblast hücre hattı için IC_{50} değerleri (* verilen değerler Timokinon ve Naringenin konsantrasyonlarının toplamıdır.)



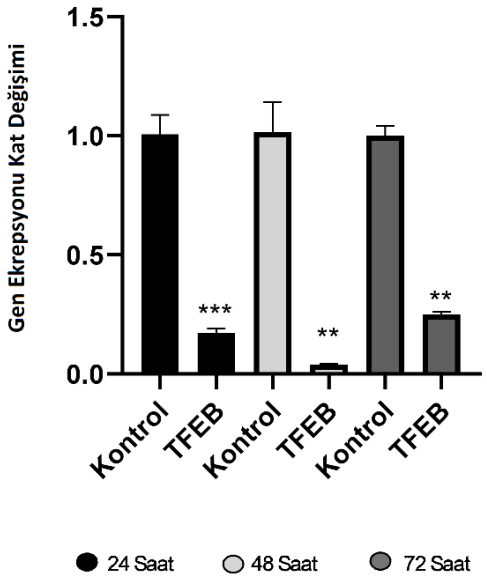
Şekil 3.10 HepG2 hücre hattı için IC_{50} değerleri (* verilen değerler Timokinon ve Naringenin konsantrasyonlarının toplamıdır.)

3.3 Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Fibroblast ve HepG2 hücreleri Şekil 3.7 ve Şekil 3.8'der yer gösterilen IC_{50} konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat boyunca Timokinon ve Naringenin ile ayrı ayrı ve kombine halde muamele edilmiştir. İzole edilen total RNA'lardan sentezlenen cDNA'lar ile gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

3.3.1 Fibroblast Hücre Hattı Timokinon Muamelesinin TFEB Geni Ekspresyonuna Etkisi

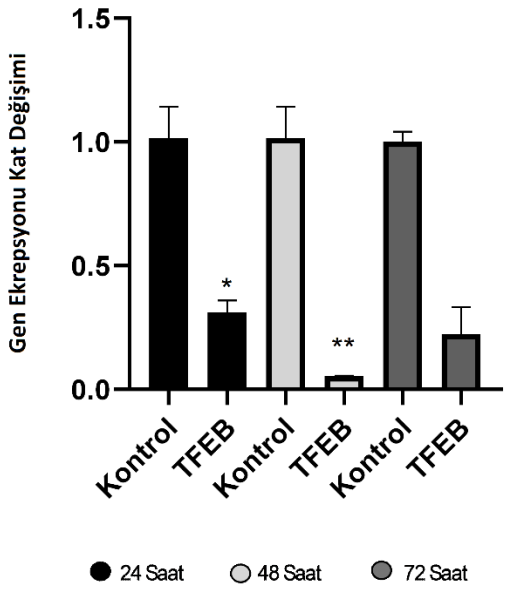
Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu deneylerinin sonucunda kontrole kıyasla 45.12 µM Timokinon ile 24 saat muamelenin sonunda TFEB geni ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. 46.10 µM ,48 saat Timokinon'la muamelede 24 saate göre daha az olan ekspresyon seviyelerinin 24.43 µM Timokinon'la 72 saat muamele sonucu kontrole kıyasla daha az olmasına rağmen 24 ve 48 saate kıyasla arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 3.11 Fibroblast hücrelerinde Timokinon muamelesi sonucu TFEB geni ekspresyon değişimi

3.3.2 Fibroblast Hücre Hattı Naringenin Muamelesinin TFEB Geni Ekspresyonuna Etkisi

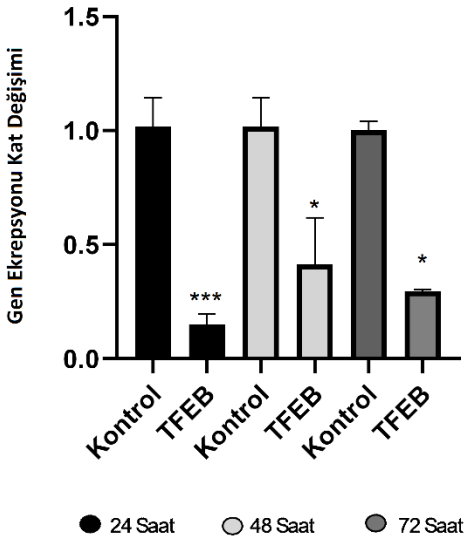
Kontrole kıyasla 76.43 µM Naringenin muamelesinin 24 saat uygulanması sonucu TFEB geni ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. 48 saat, 53.61 µM Naringenin uygulanması sonucunda 24 saate kıyasla TFEB geni ekspresyon seviyelerinin daha fazla azaldığı, 72 saat, 46.76 µM Naringenin uygulanması sonucunda 24 ve 48 saate kıyasla yüksek olan ekspresyon seviyelerinin kontrole kıyasla azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 3.12 Fibroblast hücrelerinde Naringenin muamelesi sonucu TFEB geni ekspresyon değişimi

3.3.3 Fibroblast Hücre Hattı Timokinon ve Narigenin Muamelesinin TFEB Geni Ekspresyonuna Etkisi

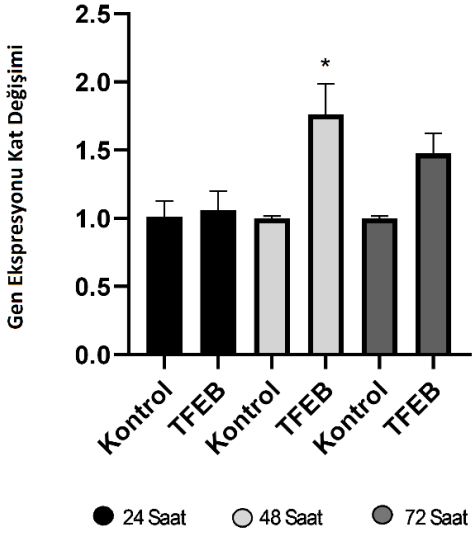
Kontrole kıyasla 47.85 µM Timokinon ve Naringenin'in 24 saat sonucunda TFEB geni ekspresyonunun düştüğü gözlemlenmiştir. 52.28 µM Timokinon ve Naringenin'in 48 saat uygulanması sonucunda kontrole kıyasla anlatım azalmış ve 33.28 µM Timokinon ve Naringenin'in 72 saat uygulanması sonucu kontrole kıyasla TFEB geni ekspresyonlarının azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 3.13 Fibroblast hücrelerinde Timokinon ve Naringenin muamelesi sonucu TFEB geni ekspresyon değişimi

3.3.4 HepG2 Hücre Hattı Timokinon Muamelesinin TFEB Geni Ekspresyonuna Etkisi

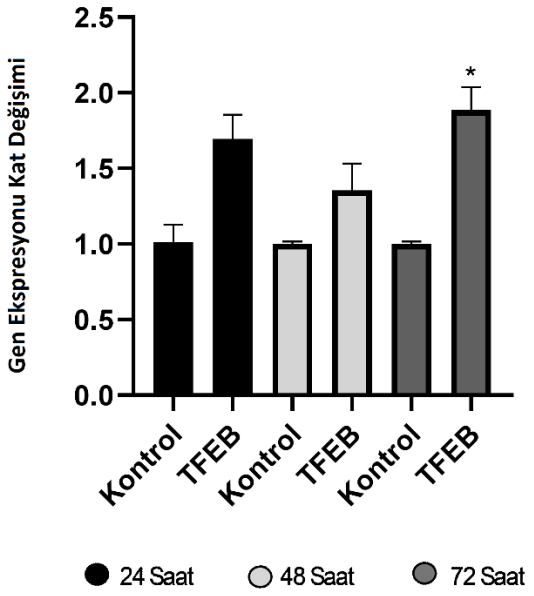
HepG2 hücre hattında Timokinon etkisinin incelenmesinde 24 ve 72 saat sonunda TFEB geninin ifadesinde anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. 48 saat sonunda kontrole kıyasla anlatımın arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 3.14 HepG2 hücrelerinde Timokinon muamelesi sonucu TFEB geni ekspresyon değişimi

3.3.5 HepG2 Hücre Hattı Naringenin Muamelesinin TFEB Geni Ekspresyonuna Etkisi

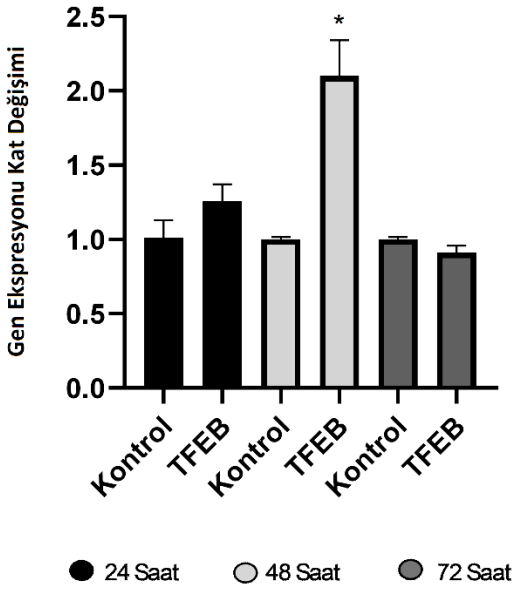
HepG2 hücre hattında Naringenin etkisinin incelenmesinde 72 saatin sonunda TFEB geninin ifadesinde artış gözlemlenmiştir. 24 ve 48 saatte ise anlamlı bir artış söz konusu değildir.



Şekil 3.15 HepG2 hücrelerinde Naringenin muamelesi sonucu TFEB geni ekspresyon değişimi

3.3.6 HepG2 Hücre Hattı Timokinon ve Naringenin Muamelesinin TFEB Geni Ekspresyonuna Etkisi

HepG2 hücre hattında Timokinon ve Naringenin etkisinin incelenmesinde 24 ve 72 saatin sonunda TFEB geninin ifadesinde anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. 48 saat sonunda TFEB geni ekspresyon seviyelerinde kontrole kıyasla anlamlı bir artış tespit edilmiştir.



Şekil 3.16 HepG2 hücrelerinde Timokinon ve Naringenin muamelesi sonucu TFEB geni ekspresyon değişimi

3.4 Öneriler ve Tartışma

Kanser, kontrolsüz hücre büyümesi ve bölünmesi ile karakterize bir hastalıktır. Dünya genelinde ölüm sebeplerinin büyük bir kısmı kanserden kaynaklanmaktadır. Geçmişten günümüze birçok kanser türü tanımlanmış olmakla beraber öldürücülüğü en yüksek kanserler arasında akciğer, kolon, pankreas, karaciğer kanserleri yer almaktadır. (Sung vd., 2021). Karaciğer insan vücudunda birçok kritik rol üstlenen bir organdır. Büyük bir çoğunluğu hepatosit hücrelerinden oluşan karaciğerde meydana gelen kanserlerin de en sık karşılaşılanı hepatoselüler karsinomadır(Bruix vd., 2014). Diğer kanser türlerinde olduğu gibi hepatoselüler karsinomda da somatik mutasyonların zaman içerisinde birikmesi sonucu hücresel mekanizmaların işleyişinde oluşan majör etkiler kansere sebep olmaktadır(Teufel vd., 2007).

Diğer kanser türlerinden farklı olarak hepatoselüler karsinomda çevresel faktörler kanser oluşumunda yüksek risk faktörleri arasında yer almaktadır. Hepatit B ve C viral enfeksiyonu (J.-Y. Zhang vd., 1998), karaciğer yağlanması, diyabet (Chrysavgis vd., 2022), aflatoksin maruziyeti gibi çevresel etkenler karaciğer kanseriyle ilişkilendirilmiş risk faktörleridir(Magnussen & Parsi, 2013). Çevresel faktörlerin doğrudan karaciğer kanserine sebep olduğu söylenemiyor olsa da karaciğer kanser riskini büyük ölçüde arttırdığı bilinmektedir.

Hepatoselüler karsinomda moleküler mekanizmalar halen aydınlatılamamış olsa da yapılan çalışmalar otofaji ve apoptoz mekanizmalarındaki düzensizleştirmeler gösterilmiştir. Transkripsiyon Faktörü EB (TFEB) otofajinin ana düzenleyicisi olarak görev almaktadır (Vishnoi vd., 2020). Yapılan çalışmalar TFEB'in ekspresyonun artmasının otofaji yolaklarında rol alan lizozomal genlerin ekspresyonunu düzenlediği ve apoptozu indüklediğini göstermiştir(B. Zhao vd., 2020). Bu bulgular TFEB'in kanser hücrelerinde kontrolsüz hücre bölünmesinin önüne geçmek için potansiyel bir terapötik strateji olarak karşımıza çıkmaktadır.

Timokinon halk arasında çörek otu olarak bilinen *Nigella Sativa*'nın ana bileşenidir. Geçmişten günümüze kadar terapötik amaçlarla kullanılan Timokinon'un yapılan çalışmalarda apoptozu indüklediği ve anti-kanser etkisi olduğu gösterilmiştir(Khader & Eckl, 2014). Naringenin, genellikle narenciyelerde bulunan flavonoid türevi bir bileşiktir. Yapılan çalışmalarda birçok terapötik etkisi tespit edilmiş olan Naringenin'in apoptozu indüklediği de bilinmektedir. Ayrıca Naringenin'in de anti-kanser özellik gösterdiği çalışmalarda sunulmuştur (Lu vd., 2022).

Bu tez çalışmasında ticari olarak satın alınan toz haldeki Timokinon ve Naringenin çözücüleri içerisinden çözdürülmüştür. Elde edilen stoğun homojen olduğu ve düşük konsantrasyonlarda karakteristik özelliklerin korunuyor olduğunu tespit edebilmek amacıyla spektrometrik ve fotometrik ölçümler yapılmıştır.

Hazırlanan Timokinon ve Naringenin çözeltilerinin HepG2 ve insan Fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin incelenmesi amacıyla MTT analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda her iki hücre hattı farklı konsantrasyonlarda Timokinon ve Naringenin ayrı ayrı ve kombine halde muamele edilmiştir. 24, 48 ve 72 saatlik deney sürelerinin sonunda MTT boyası ile boyanan hücrelerin absorbans ölçümleri 570 nm dalga boyunda ELISA okuyucu ile gerçekleştirilmiştir. Ölçülen absorbans değerleri ile % Canlılık oranları hesaplanmıştır. Elde edilen % Canlılık oranlarından GraphPad Prism 9.0 kullanılarak IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Hesaplamalar sonucunda Fibroblast hücre hattında IC_{50} değerleri Timokinon için 24 saatte 45.12 µM, 48 saatte 46.1 µM, 72 saatte 24.43 µM olarak belirlenmiştir. Naringenin için 24 saatte 79.43 µM, 48 saatte 51.28 µM, 72 saatte 47.76 µM olarak belirlenmiştir. Timokinon ve Naringenin için 24 saatte 47.85 µM, 48 saatte 51.28 µM, 72 saatte 33.38 µM olarak belirlenmiştir. HepG2 hücre hattında IC_{50} değerleri Timokinon için 24 saatte 88.26 µM, 48 saatte 82.95 µM, 72 saatte 84.93

μM olarak belirlenmiştir. Naringenin için 24 saatte 85.34 μM, 48 saatte 63.55 μM, 72 saatte 66.05 μM olarak belirlenmiştir. Timokinon ve Naringenin için 24 saatte 108.01 μM, 48 saatte 69.21 μM, 72 saatte 68.51 μM olarak belirlenmiştir. Her iki hücre hattı için saptanan IC_{50} konsantrasyonları incelendiğinde HepG2 hücre hattı için konsantrasyon değerlerinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuç HepG2 hücre hatlarının Timokinon ve Naringenin'in ayrı ayrı ve kombine muamelesine daha dirençli olabileceğini düşündürmektedir. Hesaplamalar sonucu belirlenen IC_{50} konsantrasyonları için çözeltiler hazırlanarak 24, 48 ve 72 saat boyunca hücreler inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerden total RNA izolasyonu yapılmıştır. Saflık ve konsantrasyonları uygun olan RNA'lardan cDNA sentezlenmiştir.

Son olarak elde edilen cDNA'lar ile gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonları (Real-Time PCR) gerçekleştirilmiştir. Real-Time PCR deneylerinde housekeeping gen olarak GAPDH kullanılmıştır. İnsan Fibroblast hücre hatlarının Timokinon'la muamelesi sonucu TFEB geninin ekspresyon seviyeleri kontrole kıyasla düşmüştür. 48 saatte en düşük olan TFEB seviyesi 72 saatte diğer saatlere göre yüksektir. HepG2 hücre hattında Timokinon 48 ve 72 saatte TFEB ekspresyon seviyelerini arttırmıştır. Elde edilen sonuçlara göre Timokinon muamelesi, sağlıklı hücre grubunda TFEB ifadeleri düşerken kanser hücrelerinden TFEB ekspresyonlarının artışıyla sonuçlanmıştır.

Sağlıklı hücre grubu olan Fibroblast'ların Naringenin'le muamelesi sonucu TFEB ekspresyon seviyeleri kontrole kıyasla azaldığı gözlemlenmiştir. Daha detaylı incelendiğinde en düşük seviyenin 48 saatlik deney grubunda olduğu tespit edilmiştir. HepG2 hücrelerinde Fibroblast hücrelerine kıyasla anlatım farkı azdır. Anlamlı değişimler yalnızca Timokinon'un 48., Naringenin'in 72., kombine uygulamanın da 48. saatinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir. T Testi ile anlatım farklarının anlamlı olduğu belirlenmiştir.

Real-Time PCR sonuçları kontrol grubu olarak deneye dahil edilen sağlıklı insan fibroblast hücre hatlarının Timokinon ve Naringenin'in ayrı ayrı ve kombine halde muamele edilmesinin TFEB geninin ekspresyon seviyelerini düşürdüğü tespit edilmiştir. HepG2 hücre hatlarında ise Timokinon ve Naringenin'in ayrı ayrı ve kombine halde uygulanması sırasıyla 48, 72 ve 48. saatlerde TFEB gen anlatımını arttırmıştır. Elde edilen Real-Time PCR sonuçları IC_{50} değerlerinde elde edilen sonucu doğrular nitelik

göstererek HepG2 hücrelerinde TFEB gen anlatımının Timokinon ve Naringenin'in ayrı ayrı ve kombine uygulamasından Fibroblast hücrelerine kıyasla daha az etkilendiği tespit edilmiştir.

TFEB ekspresyonlarının HepG2 hücrelerinde lizozomal fonksiyonları düzenlediği ve kemoterapi ilacı olan Cisplatin'in hücrelere olan zararlı etkiyi azaltılmasında potansiyel bir etki göstermektedir(Jernberg vd., 2013). Yapılan bir çalışma TFEB'in aktivasyonuyla, hücrelerde otofaji ve lizozomal biyogenezin arttığı ve dolayısıyla hücrelerin çeşitli stres durumlarına karşı daha iyi korunabildiği gösterilmiştir (Settembre vd., 2013).

TFEB, otofaji ve lizozomal genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir (Smith vd., 2021). Kanser hücrelerinde TFEB ekspresyonunun artması, otofaji mekanizmalarını hızlandırarak hücresel atıkların ve hasarlı organellerin temizlenmesini sağlamaktadır. Böylece hücreler stres koşullarında hayatta kalabilmektedirler (Kim vd., 2020). Timokinon ve Naringenin'in ayrı ayrı ve kombine halde HepG2 hücre hatlarında TFEB gen ekspresyonunu arttırması otofajinin tetiklenmiş olabileceğini düşündürmektedir (Liu vd., 2019). Otofajinin tetiklenmiş olması, Timokinon ve Naringenin'in hepatoselüler karsinoma için terapötik etki potansiyellerinin olduğunu göstermektedir (Zhang vd., 2022). TFEB, lizozomal biyogenez ve otofaji yoluyla hücresel metabolizmayı yeniden düzenleyebilir (Fang vd., 2018). Bu, kanser hücrelerinin enerji üretimini optimize ederek hızlı proliferasyon için gerekli olan kaynakları sağlamasına olanak tanımaktadır (Johnson vd., 2021). TFEB'nin artması, hücrelerin enerji dengesini korumasına ve böylece büyümelerini sürdürmesine yardımcı olabilir (Wu vd., 2019). Ayrıca, TFEB geninin otofajiyi teşvik etmesi kanser hücrelerinin kemoterapiye karşı direnç geliştirmesine sebep olabilmektedir (Kumar vd., 2020). Otofaji, kemoterapi tarafından indüklenen hücresel stresi hafifleterek hücrelerin hayatta kalmasını sağlamaktadır (Park vd., 2018). Bu durum, kanser tedavisinin etkinliğini azaltabilir ve tedaviye dirençli tümörlerin oluşmasına yol açabilir (Carter vd., 2022). Kanser hücrelerinde TFEB ekspresyonunun indüklenmesi, bahsedildiği gibi çeşitli hücresel süreçleri etkileyebilmektedir ve bu da kanser progresyonu ve tedaviye yanıtı üzerindeki sonuçları önemli oranda etkileyebilmektedir (Lee vd., 2021).

Fibroblast hücrelerinde TFEB ekspresyonunun düşmesi, otofaji mekanizmasının zayıflamasına ve hücresel atıkların birikmesine neden olabilir (Settembre vd., 2011). Bu, hücrelerin atık maddeleri ve hasarlı organelleri yeterince temizleyememesi anlamına

gelir, bu da hücresel işlev bozukluğuna ve stresin artmasına yol açacaktır (Martina vd., 2012). TFEB ekspresyonunun düşmesi aynı zamanda metabolik dengesizliğe, nörodejeneratif hastalıklara, bağışıklık sistemi fonksiyonlarının bozulmasına, hücresel yaşlanmaya sebep olabilir (Raben vd., 2009). Bu etkiler, TFEB'nin sağlıklı hücre işlevleri ve genel hücresel sağlık için ne kadar önemli olduğunu göstermektedir (Napolitano vd., 2016).

HepG2 hücre hatlarında anlatım farklarının Fibroblast hücre hattına kıyasla daha az olması, meydana gelen değişimlerin büyük çoğunluğunun anlamlı olmaması kullanılan kimyasalların kanserli hücre hatları üzerindeki terapötik etkilerinde şüphelerin meydana çıkmasına sebep olmaktadır. İleri çalışmalarda tez çalışması kapsamında TFEB geni ekspresyonuna etkileri incelenen kimyasalların kemoteröpik ajanlarla kombine etkileri incelenmesi Timokinon ve Naringenin için daha geniş bir bakış açısı sunacaktır.

TFEB geninin, otofaji ve apoptoz yolaklarını regüle etmesi üzerinden değerlendirilen bu çalışmada Fibroblast hücre hatlarında IC_{50} konsantrasyonlarında TFEB gen ekspresyonu düşmesine rağmen hücre ölümünün HepG2 hücrelerine kıyasla yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Gözlemlenen bu durum hücre ölümünün TFEB geni dışında başka bir gen ile tetiklenmiş olabileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda hücre ölümlerinin p53 regülasyonu ile tetiklendiği düşünülebilir. Ancak yapılan önceki çalışmalar TFEB geni ekspresyonlarının düşmesinin p53 yarı ömrünü düşürdüğünü göstermektedir (H. Zhang vd., 2023). Dolayısıyla TFEB gen ekspresyonlarının düşük olduğu koşullarda hücre ölümünün p53 ile tetiklenmesinin mümkün olmadığı ön görülmektedir. Yapılan çalışmalar mTOR yolağının inhibe olmasının otofajiyi tetiklediğini göstermektedir. Timokinon'un mTOR yolağı inhibitörü olarak işlev görebiliyor olması, mTOR inhibisyonu sonucu alt yolakların TFEB'i fosforile ediyor olması hücre ölümlerinin mTOR yolağı üzerinden regüle edilmiş olabileceğini düşündürmektedir (He vd., 2023). TFEB'in fosforile olmasının TFEB geni ekspresyonlarını düşüreceği ön görülerek mTOR yolağının inhibe olması aracılığıyla hücre ölümünün tetiklenmiş olması Fibroblast hücre hattında TFEB gen ekrespyonlarının azalması ve hücre ölümlerinin artmasıyla ilişkilendirilebilir.

Sonuçta Timokinon ve Naringenin'in kanser hücrelerinde etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi, terapötik potansiyellerinin daha net belirlenebilmesi ve sağlıklı hücrelerde TFEB ekspresyonlarının düşmesi sonucu meydana gelen değişikliklerin daha

iyi anlaşılabilmesi için otofaji yolaklarının izlenmesi gibi daha ileri analizlere ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKÇA

Ahmad, A., Mishra, R. K., Vyawahare, A., Kumar, A., Rehman, M. U., Qamar, W. Khan, A. Q., Khan, R. (2019). Thymoquinone (2-Isoprpyl-5-methyl-1, 4-benzoquinone) as a chemopreventive/anticancer agent: Chemistry and biological effects. In *Saudi Pharmaceutical Journal* (Vol. 27, Issue 8, pp. 1113–1126). Elsevier B.V. doi:10.1016/j.jsps.2019.09.008

Ali, M. Y., Akter, Z., Mei, Z., Zheng, M., Tania, M., Khan, M. A. (2021). Thymoquinone in autoimmune diseases: Therapeutic potential and molecular mechanisms. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 134). Elsevier Masson s.r.l. doi: 10.1016/j.biopha.2020.111157

Amaravadi, R. K., Kimmelman, A. C., Debnath, J. (2019). Targeting autophagy in cancer: Recent advances and future directions. In *Cancer Discovery* (Vol. 9, Issue 9, pp. 1167–1181). American Association for Cancer Research Inc. doi:10.1158/2159-8290.CD-19-0292

American Cancer Society. (2024). Erişim Tarihi: 1 Mayıs 2024, https://cancerstatisticscenter.cancer.org/#!/

Apoptosis Pathway Antibodies. (2024). Erişim Tarihi: 1 Mayıs 2024, https:/ www.rockland.com/resources/apoptosis-pathway-antibodies/

Arul, D., Subramanian, P. (2013). Naringenin (Citrus Flavonone) induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Pathology and Oncology Research*, *19*(4), 763–770. doi:10.1007/s12253-013-9641-1

Çakır, A., (2023). Nanoenkapsüle Fitokimyasalların Meme Kanseri Hücreleri Üzerindeki Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi

Ashkenazi, A., Dixit, V. M. (1998). Death Receptors: Signaling and Modulation. *American Association for the Advancement of Science*, 1305–1308. http://about.jstor.org/terms

Atoki, A. V., Aja, P. M., Shinkafi, T. S., Ondari, E. N., Awuchi, C. G. (2023). Naringenin: its chemistry and roles in neuroprotection. *In Nutritional Neuroscience*. Taylor and Francis Ltd. doi:10.1080/1028415X.2023.2243089

B. Alberts, Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter., P. (2008). Molecular biology of the cell (5th edition). New York: Garland Science; 2002. Erişim Tarihi 30 Nisan 2024, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001 Şubat 17;357(9255):539-45. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04046-0. PMID: 11229684.

Bruix, J., Gores, G. J., & Mazzaferro, V. (2014). Hepatocellular carcinoma: Clinical frontiers and perspectives. In *Gut* (Vol. 63, Issue 5, pp. 844–855). *BMJ Publishing* Group. doi:10.1136/gutjnl-2013-306627

Budhu, A., Wang, X. W. (2006). The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. *Journal of Leukocyte Biology*, *80*(6), 1197–1213. doi:10.1189/jlb.0506297

Chen, H., Gong, S., Zhang, H., Chen, Y., Liu, Y., Hao, J., Liu, H., Li, X. (2024). From the regulatory mechanism of TFEB to its therapeutic implications. In *Cell Death Discovery* (Vol. 10, Issue 1). Springer Nature. doi:10.1038/s41420-024-01850-6

Cheng, X., Feng, H., Wu, H., Jin, Z., Shen, X., Kuang, J (2020). Targeting autophagy enhances apoptosis induced by liver tumor-initiating cells via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Journal of Cancer*, *11*(1), 124–135.

Chrysavgis, L., Giannakodimos, I., Diamantopoulou, P., Cholongitas, E. (2022). Non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: Clinical challenges of an intriguing link. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 28, Issue 3, pp. 310–331). Baishideng Publishing Group Inc. doi:10.3748/wjg.v28.i3.310

Clevers, H., Nusse, R. (2012). Wnt/β-catenin signaling and disease. In *Cell* (Vol. 149, Issue 6, pp. 1192–1205). Elsevier B.V. doi:10.1016/j.cell.2012.05.012

Cooper GM. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; (2000). Oncogenes. Erişim Tarihi: 30 Nisan 2024, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9840/

Cui, J., Shen, H. M., Lim, L. H. K. (2020). The role of autophagy in liver cancer: Crosstalk in signaling pathways and potential therapeutic targets. *In Pharmaceuticals* (Vol. 13, Issue 12, pp. 1–27). MDPI AG. doi: 10.3390/ph13120432

Denton, D., Kumar, S. (2019). Autophagy-dependent cell death. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 26, Issue 4, pp. 605–616). Nature Publishing Group. doi:10.1038/s41418-018-0252-y

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, *35*(4), 495–516.

El-Serag, H. B. (2012). Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, *142*(6). doi:10.1053/j.gastro.2011.12.061

El-Serag, H. B., Rudolph, K. L. (2007). Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. In *Gastroenterology* (Vol. 132, Issue 7, pp. 2557–2576). doi:10.1053/j.gastro.2007.04.061

Erlund, I., Kosonen, T., Alfthan, G., Mäenpää, J., Perttunen, K., Kenraali, J., Parantainen, J., Aro, A. (2000). Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*, *56*(8), 545–553. doi:10.1007/s002280000197

Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Haziran 7;102(23):8204-9. doi: 10.1073/pnas.0502857102. Epub 2005 Mayıs 31. PMID: 15928081; PMCID: PMC1142118.

Flemming, J. A., Yang, J. D., Vittinghoff, E., Kim, W. R., Terrault, N. A. (2014). Risk prediction of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: The ADRESS-HCC risk model. *Cancer*, *120*(22), 3485–3493. doi:10.1002/cncr.28832

Forner, A., Reig, M., Bruix, J. (2018). Hepatocellular carcinoma. In The Lancet (Vol. 391, Issue 10127, pp. 1301–1314). Lancet Publishing Group. doi:10.1016/S0140-6736(18)30010-2

Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature.* 1986 Ekim 16-22;323(6089):643-6. doi: 10.1038/323643a0. PMID: 2877398.

Galati EM, Monforte MT, Kirjavainen S, Forestieri AM, Trovato A, Tripodo MM. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): antiinflammatory and analgesic activity. *Farmaco.* 1994 Şubat ;40(11):709-12. PMID: 7832973.

Galluzzi, L., Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J. M., Cecconi, F., Choi, A. M., Chu, C. T., Codogno, P., Colombo, M. I., Cuervo, A. M., Debnath, J., Deretic, V., Dikic, I., Eskelinen, E., Fimia, G. M., Fulda, S., Gewirtz, D. A., Green, D. R., … Kroemer, G. (2017). Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal*, *36*(13), 1811–1836. doi:10.15252/embj.201796697

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., … Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 25, Issue 3, pp. 486–541). Nature Publishing Group. doi:10.1038/s41418-017-0012-4

Green, D. R., Levine, B. (2014). To be or not to be? How selective autophagy and cell death govern cell fate. In *Cell* (Vol. 157, Issue 1, pp. 65–75). Elsevier B.V. doi:10.1016/j.cell.2014.02.049

Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. In *Cell* (Vol. 100).

Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. In *Cell* (Vol. 144, Issue 5, pp. 646–674). doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

Hassanpour, S. H., Dehghani, M. (2017). Review of cancer from perspective of molecular. Journal of Cancer Research and Practice, 4(4), 127–129. doi:10.1016/j.jcrpr.2017.07.001

He, P., He, Y., Ma, J., Liu, Y., Liu, C., Baoping, Y., Dong, W. (2023). Thymoquinone induces apoptosis and protective autophagy in gastric cancer cells by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Phytotherapy Research*, *37*(8), 3467–3480. doi:10.1002/ptr.7820

Hirata, H., Yagi, K., Kikugawa, K., Terao, J (1995). Naringenin attenuates the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat liver DNA. *Lipids*, *30*(6), 575–578.

Huang, D. Q., Mathurin, P., Cortez-Pinto, H., Loomba, R. (2023). Global epidemiology of alcohol-associated cirrhosis and HCC: trends, projections and risk factors. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 20, Issue 1, pp. 37–49). Nature Research. doi:/10.1038/s41575-022-00688-6

Jain, A. K., Jaiswal, A. K. (2006). Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(17), 12132–12142. doi:10.1074/jbc.M511198200

Jernberg, E., Thysell, E., Ylitalo, E. B., Rudolfsson, S., Crnalic, S., Widmark, A., Bergh, A., Wikström, P. (2013). Characterization of prostate cancer bone metastases according to expression levels of steroidogenic enzymes and androgen receptor splice variants. *PLoS ONE*, *8*(11). doi:10.1371/journal.pone.0077407

Kalra A, Yetiskul E, Wehrle CJ, (2023). *Liver Functions*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

Kamal, N., Ilowefah, M. A., Hilles, A. R., Anua, N. A., Awin, T., Alshwyeh, H. A., Aldosary, S. K., Jambocus, N. G. S., Alosaimi, A. A., Rahman, A., Mahmood, S., Mediani, A. (2022). Genesis and Mechanism of Some Cancer Types and an Overview on the Role of Diet and Nutrition in Cancer Prevention. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 6). MDPI. doi:10.3390/molecules27061794

Kang, Q., Gong, J., Wang, M., Wang, Q., Chen, F., Cheng, K. W. (2019). 6-C-(E-Phenylethenyl)Naringenin Attenuates the Stemness of Hepatocellular Carcinoma Cells by Suppressing Wnt/β-Catenin Signaling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(50), 13939–13947. doi:10.1021/acs.jafc.9b05733

Karaciğer Kanseri Türleri. (2022)., Dünya Sağlık Örgütü, Erişim Tarihi: 5 Şubat 2024, https://www.who.int/

Khader, M., Eckl, P. M. (2014). Thymoquinone: an emerging natural drug with a wide range of medical applications. *Iran J Basic Med Sci*, *17*, 950–957.

Kim, H. J., Joe, Y., Rah, S. Y., Kim, S. K., Park, S. U., Park, J., Kim, J., Ryu, J., Cho, G. J., Surh, Y. J., Ryter, S. W., Kim, U. H., Chung, H. T. (2018). Carbon monoxide-induced TFEB nuclear translocation enhances mitophagy/mitochondrial biogenesis in hepatocytes and ameliorates inflammatory liver injury. *Cell Death and Disease*, *9*(11). doi:/10.1038/s41419-018-1112-x

Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M. J., Abeliovich, H., Arozena, A. A., Adachi, H., Adams, C. M., Adams, P. D., Adeli, K., Adhihetty, P. J., Adler, S. G., Agam, G., Agarwal, R., Aghi, M. K., Agnello, M., Agostinis, P., Aguilar, P. V., Aguirre-Ghiso, J., … Zughaier, S. M. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). In *Autophagy* (Vol. 12, Issue 1, pp. 1–222). Taylor and Francis Ltd. doi:10.1080/15548627.2015.1100356

Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature.* 2000 Ekim 12;407(6805):789-95. doi: 10.1038/35037728. PMID: 11048730.

Kus, G., Ozkurt, M., Kabadere, S., Erkasap, N., Goger, G., Demirci, F. (2018). Antiproliferative and antiapoptotic effect of thymoquinone on cancer cells in vitro. *Bratislava Medical Journal*, *119*(5), 312–316. doi:10.4149/BLL_2018_059

Lamb, C. A., Yoshimori, T., Tooze, S. A. (2013). The autophagosome: Origins unknown, biogenesis complex. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 14, Issue 12, pp. 759–774). doi:10.1038/nrm3696

Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., Weinberg, R. A. (2017). Emerging Biological Principles of Metastasis. In *Cell* (Vol. 168, Issue 4, pp. 670–691). Cell Press. doi:10.1016/j.cell.2016.11.037

Lavrik, I. N., Krammer, P. H. (2012). Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 19, Issue 1, pp. 36–41). doi:10.1038/cdd.2011.155

Lee, C. H., Jeong, T. S., Choi, Y. K., Hyun, B. H., Oh, G. T., Kim, E. H., Kim, J. R., Han, J. Il, Bok, S. H. (2001). Anti-atherogenic effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, associated with hepatic ACAT and aortic VCAM-1 and MCP-1 in high cholesterol-fed rabbits. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *284*(3), 681–688. doi:10.1006/bbrc.2001.5001

Lee YM, Kim GH, Park EJ, Oh TI, Lee S, Kan SY, Kang H, Kim BM, Kim JH, Lim JH. Thymoquinone Selectively Kills Hypoxic Renal Cancer Cells by Suppressing HIF-1α-Mediated Glycolysis. Int J Mol Sci. 2019 Mart 3;20(5):1092. doi: 10.3390/ijms20051092. PMID: 30832444; PMCID: PMC6429094.

Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell. 1997 Feb 7;88(3):323-31. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81871-1. PMID: 9039259.

Levine, B., Kroemer, G. (2008). Autophagy in the Pathogenesis of Disease. In *Cell* (Vol. 132, Issue 1, pp. 27–42). doi:10.1016/j.cell.2007.12.018

Liew, W. P. P., Mohd-Redzwan, S. (2018). Mycotoxin: Its impact on gut health and microbiota. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 8, Issue FEB). Frontiers Media S.A. doi:10.3389/fcimb.2018.00060

Liu, L., Liao, J.-Z., He, X.-X., Li, P.-Y. (2017). Oncotarget 57707 www.impactjournals.com/oncotarget The role of autophagy in hepatocellular carcinoma: friend or foe. In *Oncotarget* (Vol. 8, Issue 34). www.impactjournals.com/oncotarget/

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. *Methods*, *25*(4), 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262

Lu, R., Yu, R. J., Yang, C., Wang, Q., Xuan, Y., Wang, Z., He, Z., Xu, Y., Kou, L., Zhao, Y. Z., Yao, Q., Xu, S. H. (2022). Evaluation of the hepatoprotective effect of naringenin loaded nanoparticles against acetaminophen overdose toxicity. *Drug Delivery*, *29*(1), 3256–3269. doi:10.1080/10717544.2022.2139431

Magnussen, A., Parsi, M. A. (2013). Aflatoxins, hepatocellular carcinoma and public health. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 19, Issue 10, pp. 1508–1512). Baishideng Publishing Group Co. doi:10.3748/wjg.v19.i10.1508

Mahmud, N. M., Paraoan, L., Khaliddin, N., Kamalden, T. A. (2022). Thymoquinone in Ocular Neurodegeneration: Modulation of Pathological Mechanisms via Multiple Pathways. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 16). Frontiers Media S.A. doi:10.3389/fncel.2022.786926

Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, Di Malta C, Donaudy F, Embrione V, Polishchuk RS, Banfi S, Parenti G, Cattaneo E, Ballabio A. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. Science. 2009 Haziran 24;325(5939):473-7. doi: 10.1126/science.1174447. Epub 2009 Jun 25. PMID: 19556463.

Martina, J. A., Chen, Y., Gucek, M., Puertollano, R. (2012). MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy*, *8*(6), 903–914. doi:10.4161/auto.19653

Medina, D. L., Fraldi, A., Bouche, V., Annunziata, F., Mansueto, G., Spampanato, C., Puri, C., Pignata, A., Martina, J. A., Sardiello, M., Palmieri, M., Polishchuk, R., Puertollano, R., Ballabio, A. (2011). Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance. *Developmental Cell*, *21*(3), 421–430. doi:10.1016/j.devcel.2011.07.016

Bakar, M., G. (2023). Meme Kanseri Tedavisinde Kullanılmak Üzere Genistein Yüklü Nanopartiküllerin Sentezi ve İn Vitro Değerlendirilmesi., Yüksek Lisans Tezi Yıldız Teknik Üniversitesi

Migliore L, Coppedè F. Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. Mutat Res. 2002 Aralık ;512(2-3):135-53. doi: 10.1016/s1383-5742(02)00046-7. PMID: 12464348.

Mizushima, N., Komatsu, M. (2011). Autophagy: Renovation of cells and tissues. In *Cell* (Vol. 147, Issue 4, pp. 728–741). Elsevier B.V. doi:10.1016/j.cell.2011.10.026

Mizushima, N., Levine, B. (2010). Autophagy in mammalian development and differentiation. In *Nature Cell Biology* (Vol. 12, Issue 9, pp. 823–830). Nature Publishing Group. doi:10.1038/ncb0910-823

Mohammed, N. K., Abd Manap, M. Y., Tan, C. P., Muhialdin, B. J., Alhelli, A. M., Hussin, A. S. M. (2016). The Effects of Different Extraction Methods on Antioxidant Properties, Chemical Composition, and Thermal Behavior of Black Seed (Nigella sativa L.) Oil. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2016. doi: 10.1155/2016/6273817

Moretto, L., Supervised, S., Jensen, M. H., Heltberg, M. L. (2021). Period variations in the p53 network after protein inhibition Investigating inhibition responses of p53 in vitro and through in silico comparisons across various model formulations.

Napolitano, G., Ballabio, A. (2016). TFEB at a glance. *Journal of Cell Science*, *129*(13), 2475–2481. doi:10.1242/jcs.146365

Naringenin. Erişim tarihi: 2 Mayıs 2024, https:/lktlabs.com/product/naringenin/

National Center for Biotechnology Information, Naringenin. Erişim Tarihi: 2 Mayıs 2024, https:/pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Naringenin.

National Center for Biotechnology Information, Thymoquinone. Erişim Tarihi: 2 Mayıs 2024, https:/ pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thymoquinone.

Nishida, N., Goel, A. (2011). Genetic and Epigenetic Signatures in Human Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review. In *Current Genomics* (Vol. 12).

Niu, Z. S., Niu, X. J., Wang, W. H. (2016). Genetic alterations in hepatocellular carcinoma: An update. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 22, Issue 41, pp. 9069–9095). Baishideng Publishing Group Co. doi:10.3748/wjg.v22.i41.9069

Patel A., Benign vs Malignant Tumors. *JAMA Oncology*, (2020) Eylül 1;6(9):1488. doi: 10.1001/jamaoncol.2020.2592. PMID: 32729930.

Paterlini-Bréchot, P., Saigo, K., Murakami, Y., Chami, M., Gozuacik, D., Mugnier, C., Lagorce, D., Bréchot, C. (2003). Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene*, *22*(25), 3911–3916. doi:10.1038/sj.onc.1206492

Powell, E. E., Wong, V. W. S., Rinella, M. (2021). Non-alcoholic fatty liver disease. In *The Lancet* (Vol. 397, Issue 10290, pp. 2212–2224). Elsevier B.V. doi:10.1016/S0140-6736(20)32511-3

Puertollano, R., Ferguson, S. M., Brugarolas, J., Ballabio, A. (2018). The complex relationship between TFEB transcription factor phosphorylation and subcellular localization . *The EMBO Journal*, *37*(11). doi:10.15252/embj.201798804

Purushotham, A., Schug, T. T., Xu, Q., Surapureddi, S., Guo, X., Li, X. (2009). Hepatocyte-Specific Deletion of SIRT1 Alters Fatty Acid Metabolism and Results in Hepatic Steatosis and Inflammation. *Cell Metabolism*, *9*(4), 327–338. doi:10.1016/j.cmet.2009.02.006

Rashid, M. , Sanjarin, F. , Sabouni F., (2019). Thymoquinone effects on cell viability, apoptosis and VEGF-A gene expression level in AGS (CRL-1739) cell line. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, *19*(6), 820–826.

Ren, X., Luo, W. (2019). Exploration of pro-apoptotic effect of Thymoquinone on oral squamous cell carcinoma cells through PI3K/Akt signaling pathway. *Cellular and Molecular Biology*, *65*(1), 61–64.

Salehi, B., Fokou, P. V. T., Sharifi-Rad, M., Zucca, P., Pezzani, R., Martins, N., Sharifi-Rad, J. (2019). The therapeutic potential of naringenin: A review of clinical trials. In *Pharmaceuticals* (Vol. 12, Issue 1). MDPI AG. doi:10.3390/ph12010011

S.D. Minchin, S. J. W. B. (2013). Transcription Factors. In K. H. Stanley Maloy (Ed.), *Encyclopedia of Genetics* (2nd ed., pp. 93–96). Academic Press.

Settembre, C., De Cegli, R., Mansueto, G., Saha, P. K., Vetrini, F., Visvikis, O., Huynh, T., Carissimo, A., Palmer, D., Klisch, T. J., Wollenberg, A. C., Di Bernardo, D., Chan, L., Irazoqui, J. E., Ballabio, A. (2013). Erratum: TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop (Nature Cell Biology (2013) 15 (647-658)). In Nature Cell Biology (Vol. 15, Issue 8, p. 1016). doi:10.1038/ncb2814

Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V. A., Arencibia, M. G., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S. U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., Sardiello, M., Rubinsztein, D. C., Ballabio, A. (2011). TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science*, *332*(6036), 1429–1433. doi:10.1126/science.1204592

Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D. L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M. C., Facchinetti, V., Sabatini, D. M., Ballabio, A. (2012). A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO Journal*, *31*(5), 1095–1108. doi:10.1038/emboj.2012.32

Shibata T, Aburatani H. Exploration of liver cancer genomes. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2014 Jun;11(6):340-9. doi: 10.1038/nrgastro.2014.6. Epub 2014 Jan 28. PMID: 24473361.

Smith, J. , D. A. , J. B. (2019). Reversal Mechanisms of Immunopression by Naringenin and Enhancement of T Cell Activation. *Journal of Immunotherapy*, *25*(3), 301–308.

Starley, B. Q., Calcagno, C. J., Harrison, S. A. (2010). Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: A weighty connection. In *Hepatology* (Vol. 51, Issue 5, pp. 1820–1832). doi:10.1002/hep.23594

Strasser, A., Jost, P. J., Nagata, S. (2009). The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System. In *Immunity* (Vol. 30, Issue 2, pp. 180–192). doi:10.1016/j.immuni.2009.01.001

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249. doi:10.3322/caac.21660

Teufel, A., Staib, F., Kanzler, S., Weinmann, A., Schulze-Bergkamen, H., Galle wwwwjgnetcom, P. R., Galle, P. R. (2007). Genetics of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, *13*(16), 2271–2282. www.wjgnet.comhttp://www.wjgnet.com/1007-9327/13/2271.asp

Thymoquinone. Erişim Tarihi: Mayıs 2, 2024, https:// www.scbt.com/p/thymoquinone-490-91-5#technicalInformation

Trefts, E., Gannon, M., Wasserman, D. H. (2017). The liver. In *Current Biology* (Vol. 27, Issue 21, pp. R1147–R1151). Cell Press. doi:10.1016/j.cub.2017.09.019

Upadhyay, A. (2021). Cancer: An unknown territory; rethinking before going ahead. In *Genes and Diseases* (Vol. 8, Issue 5, pp. 655–661). Chongqing University. doi:10.1016/j.gendis.2020.09.002

Vegesna V., Srinithi A., Sumathi E., Sushmithawathi K., Vaishnavi M., Muthukumaran, N. (2019). An Embedded Based Integrated Flood Forecasting through HAM Communication. In *Asian Journal of Applied Science and Technology (AJAST) (Peer Reviewed Quarterly International Journal* (Vol. 3, Issue 1).

Villanueva, A., Llovet, J. M. (2011). Targeted therapies for hepatocellular carcinoma. In *Gastroenterology* (Vol. 140, Issue 5, pp. 1410–1426). W.B. Saunders. doi:10.1053/j.gastro.2011.03.006

Vishnoi, K., Viswakarma, N., Rana, A., Rana, B. (2020). Transcription factors in cancer development and therapy. In *Cancers* (Vol. 12, Issue 8, pp. 1–32). MDPI AG. doi:10.3390/cancers12082296

Walker, M., El-Serag, H. B., Sada, Y., Mittal, S., Ying, J., Duan, Z., Richardson, P., Davila, J. A., Kanwal, F. (2016). Cirrhosis is under-recognised in patients subsequently diagnosed with hepatocellular cancer. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, *43*(5), 621–630. doi:10.1111/apt.13505

Weiya Cao, P. Y. K. Y. D. C. (2021). Aflatoxin B1: metabolism, toxicology, and its involvement in oxidative stress and cancer development. *Toxicology Mechanisms and Methods*, *32*(6).

What is Liver Cancer?, 2022, Erişim tarihi: 2 Mayıs,2024, https://www.cancer.gov/types/liver/what-is-liver-cancer

WHO. (2022). Erişim Tarihi: 2 Mayıs 2024, https//:gco.iarc.fr/today/en/dataviz/maps-heatmap?mode=population cancers=11 types=1

Yang, J. D., Hainaut, P., Gores, G. J., Amadou, A., Plymoth, A., Roberts, L. R. (2019). A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 16, Issue 10, pp. 589–604). Nature Publishing Group. doi:10.1038/s41575-019-0186-y

Yang, J. D., Kim, W. R., Coelho, R., Mettler, T. A., Benson, J. T., Sanderson, S. O., Therneau, T. M., Kim, B., Roberts, L. R. (2011). Cirrhosis Is Present in Most Patients With Hepatitis B and Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, *9*(1), 64–70. doi:10.1016/j.cgh.2010.08.019

Yang, J. D., Mohamed, E. A., Aziz, A. O. A., Shousha, H. I., Hashem, M. B., Nabeel, M. M., Abdelmaksoud, A. H., Elbaz, T. M., Afihene, M. Y., Duduyemi, B. M., Ayawin, J. P., Gyedu, A., Lohouès-Kouacou, M. J., Ndam, A. W. N., Moustafa, E. F., Hassany, S. M., Moussa, A. M., Ugiagbe, R. A., Omuemu, C. E., … Roberts, L. R. (2017). Characteristics, management, and outcomes of patients with hepatocellular carcinoma in Africa: a multicountry observational study from the Africa Liver Cancer Consortium. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*, *2*(2), 103–111. doi:10.1016/S2468-1253(16)30161-3

Yang, J. D., Mohamed, H. A., Cvinar, J. L., Gores, G. J., Roberts, L. R., Kim, W. R. (2016). Diabetes mellitus heightens the risk of hepatocellular carcinoma except in patients with hepatitis C cirrhosis. *American Journal of Gastroenterology*, *111*(11), 1573–1580. doi:10.1038/ajg.2016.330

Yang, J. D., Mohammed, H. A., Harmsen, W. S., Enders, F., Gores, G. J., Roberts, L. R. (2017). Recent trends in the epidemiology of hepatocellular carcinoma in Olmsted County, Minnesota: A US population-based study. *Journal of Clinical Gastroenterology*, *51*(8), 742–748. doi:10.1097/MCG.0000000000000810

Yang, J. D., Roberts, L. R. (2010). Hepatocellular carcinoma: A global view. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 7, Issue 8, pp. 448–458). doi:10.1038/nrgastro.2010.100

Yang J.-D., Gores, G. J., Hainaut P., Amadou, A. (2019). Molecular classification of hepatocellular carcinoma: Potential therapeutic implications. *Hepatology*, *69*(6), 2027–2039.

Yang, M., Zhang, H., Zhang, J., Yao, X. (2023). Risk factors and prevention of liver cancer: A bibliometric and visual analysis. In *Medicine (United States)* (Vol. 102, Issue 47, p. E35740). Lippincott Williams and Wilkins. doi: 10.1097/MD.0000000000035740

Yen, H. R., Liu, C. J., Yeh, C. C. (2015). Naringenin suppresses TPA-induced tumor invasion by suppressing multiple signal transduction pathways in human hepatocellular carcinoma cells. *Chemico-Biological Interactions*, *235*, 1–9. doi:10.1016/j.cbi.2015.04.003

Zhang, H., Brady, O. A., Jeong, E., Martina, J. A., Pirooznia, M., Tunc, I., Puertollano, R. (2023). *The transcription factors TFE3 and TFEB amplify p53 dependent transcriptional programs in response to DNA damage*. doi:10.7554/eLife.40856.001

Zhang, J.-Y., Dai, M., Wang, X., Lu, W.-Q., Li, D.-S., Zhang, M.-X., Wang, K.-J., Dai, L.-P., Han, S.-G., Zhou, Y.-F., Zhuang, H. (1998). A case-control study of hepatitis B and C virus infection as risk factors for hepatocellular carcinoma in Henan, China. In *Great Britain International Journal of Epidemiology* (Vol. 27). https://academic.oup.com/ije/article/27/4/574/754830

Zhao, B., Dierichs, L., Gu, J. N., Trajkovic-Arsic, M., Axel Hilger, R., Savvatakis, K., Vega-Rubin-de-Celis, S., Liffers, S. T., Peña-Llopis, S., Behrens, D., Hahn, S., Siveke, J. T., Lueong, S. S. (2020). TFEB-mediated lysosomal biogenesis and lysosomal drug sequestration confer resistance to MEK inhibition in pancreatic cancer. *Cell Death Discovery*, *6*(1). doi:10.1038/s41420-020-0246-7

Zhao, Y., Yang, J., Liao, W., Liu, X., Zhang, H., Wang, S., Wang, D., Feng J., Yu, L., Zhu, W. (2010). Cytosolic FoxO1 is essential for the induction of autophagy and tumour suppressor activity. *Nature Cell Biology*, *12*(7), 665–675.

Zhu, S. Y., Yao, R. Q., Li, Y. X., Zhao, P. Y., Ren, C., Du, X. H., Yao, Y. M. (2021). The Role and Regulatory Mechanism of Transcription Factor EB in Health and Diseases. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. doi:10.3389/fcell.2021.66775

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

SARAÇ V., VURAL KORKUT Ş., "Timokinon'un TFEB Geninin Ekspresyonuna Etkilerinin HepG2 ve Fibroblast Hücrelerinde Analizi", 12. Uluslararası Akademik Araştırmalar Kongresi (ICAR), Ankara, Türkiye, 19,20 Aralık 2023, ss 197-198.

Projeler

HepG2, SH-SY5Y ve fibroblast hücrelerinde Timokinon ve Naringenin'in BAX ve TFEB ekspresyonlarına etkilerinin araştırılması

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FCD-2022-5032 numaralı projesi ile desteklenmiştir.