



**YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

***Cynara cornigera* L. EKSTRELERİNİN HEPATOSELLÜLER  
KARSİNOM ÜZERİNE ETKİSİ**

**DOKTORA TEZİ**

**ERDAL ŞANLIDAĞ**

**Lefkoşa**

**Haziran, 2022**

ERDAL ŞANLIDAĞ

TEZİN BAŞLIĞI

DOKTORA TEZİ

2022

**YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

***Cynara cornigera* L. EKSTRELERİNİN HEPATOSELLÜLER  
KARSİNOM ÜZERİNE ETKİSİ**

**DOKTORA TEZİ**






**Erdal ŞANLIDAĞ**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Eda BECER**


**Lefkoşa  
Haziran, 2022**

## TEZ ONAYI


Erdal Şanlıdağ tarafından hazırlanan “*Cynara cornigera* L. Ekstrelerinin Hepatosellüler Karsinom Üzerine Etkisi” başlıklı tez, kapsam ve nitelik açısından kalite standartlarına uygunluğu ile ilgili Biyokimya Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak 27/06/2022 tarihinde kabul edilmiştir.


Jüri Üyeleri	Adı - Soyadı	İmza
Jüri Başkanı:	Prof. Dr. İhsan ÇALIŞ	
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER	
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Murat SAYAN	
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Dudu ÖZKUM	
Danışman:	Doç. Dr. Eda BECER	

### Anabilim Dalı Başkanı Onayı

  
27/06/2022  
Doç. Dr. Eda BECER  
Anabilim Dalı Başkanı

### Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

  
27/06/2022  
Prof. Dr. Kemal Hüsnü Can Başer  
Enstitü Müdürü



## **BEYAN**

Bu tezin içinde sunduğum verileri, bilgileri ve belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi; tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu; çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kurallar gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

**Erdal ŞANLIDAĞ**

**27 / 06 / 2022**

## TEŞEKKÜR

Bu proje ve tezin farmakognozi kısmının oluşmasında ve ilerlemesinde çok emeği olan, bu konuda bana her zaman yardımcı olan, ortaokuldan beri dostluğumuz bulunan sevgili Dr. Azmi HANOĞLU'na; tezin farmakognozi kısmının ana mimarları olan, alanlarında dünyaca ünleri bulunan, kendileri ile çalışma fırsatı yakaladığım için kendimi çok şanslı hissettiğim, çok sevdiğim ve çok değerli olan hocalarım Prof. Dr. İhsan ÇALIŞ ve Prof. Dr. Hüsnü Can BAŞER'e; tezin LC-MS/MS kısmında bana yardımcı olan değerli hocam Doç. Dr. Fatih GÖGER hocama; tezin hücre kültürü kısmında emeğini ve bilgisini hiçbir zaman esirgemeyen, kendisinden çok şey öğrendiğim, çok değerli hocam Prof. Dr. Seda VATANSEVER hocama; tez ve makalenin yazım kısmında, pandemi koşulları altında bana yol gösteren çok sevgili hocalarım Prof. Dr. Pınar TULAY'a ve Dr. Ferdiye TANER'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Yüksek lisans eğitimimden itibaren, doktora eğitimimin sonuna kadar bana yol gösteren sevgili danışman hocam Doç. Dr. Eda BECER hocama, tüm bana kattıklarından ve desteklerinden dolayı çok teşekkür ediyorum.

Hayatımın her noktasında bana desteğini esirgemeyen, doktora eğitimim boyunca bana her zaman yol gösteren, amcam Prof. Dr. Tamer ŞANLIDAĞ'a ayrıca teşekkür ediyorum.

Hayatımın her noktasında yanımda olan burada isimlerini tek tek yazamayacağım aileme ve arkadaşlarıma, bu tez süreci boyunca bana kattıklarından ve desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tezi yazmaya başladığımda henüz dünyaya gelmemiş olan, dünyaya geldikten sonra beni parlak ışığıyla aydınlatan, ilham perim, parlayan yıldızım, kızım Arven ŞANLIDAĞ'a bu tezi ithaf ediyorum.

## ÖZET

### *Cynara cornigera* L. EKSTRELERİNİN HEPATOSELLÜLER KARSİNOM ÜZERİNE ETKİSİ

Erdal ŞANLIDAĞ

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü – Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Eda BECER

Haziran 2022, 122 sayfa

Karaciğer kanserinin birden fazla türü olmasına rağmen, en yaygın şekli olan ve hepatositlerde meydana gelen bir kanser türü olarak tanımlanır ve hepatoselüler karsinom olarak da bilinir. Karaciğer kanseri risk faktörleri arasında Hepatit B ve C virüslerine bağlı kronik rahatsızlıklar, aflatoksin maruz kalmak, alkol ve tütün kullanımı, obezite ve diyabet bulunmaktadır. Karaciğer kanseri oluşum ve ilerleme mekanizmaları ise hücre döngüsü kontrolü kaybı, hücre yaşlanmasından kaçış, hücre ölümüne karşı direnç, fenotipik plastisite ve metastaz olarak tanımlanmıştır. Bu mekanizmalarda Jak2, Stat3, Wnt3a, Wnt11 ve  $\beta$ -catenin yolları önemli roller üstlenmektedirler. Kıbrıs'ta halk arasında yaygın olarak kullanılan *Cynara cornigera* L. bitkisi karaciğer rahatsızlıkları halk tıbbında kullanılmaktadır. *Cynara* cinsine ait bitkilerde bulunan bileşikler hali hazırda karaciğer hastalıklarında kullanılmaktadır. Bu cinse ait, *C. cornigera* bitki içeriğine ait bileşikler arasında kuersetin, apigenin gibi anti-kanser özelliği olan bileşikler bulunmaktadır. *C. cornigera* bitkisinden elde edilen metanol ekstraktları, poliamid kolonda fraksiyonlara ayrılmış ve bu fraksiyonlar hepatoselüler karsinom hücre hattı olan HepG2 hücre hattında fraksiyonların sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Bunun yanında sitotoksik etki gösteren fraksiyonlar immüno kimyasal olarak değerlendirilmeye alındı ve Jak2, Stat3, Wnt3a, Wnt11 ve  $\beta$ -catenin yollarındaki aktiviteleri tespit edilmiştir. Yapılan araştırma sonucunda iki fraksiyonda anlamlı ve etkin bir sitotoksik etki belirlenmiş ve bu iki fraksiyonun da kanonik olmayan Wnt11 yolağında anlamlı ve etkin bir aktivitesi olduğu saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** cynara cornigera, fenolik bileşik, hepg2, sitotoksikite, wnt11

**ABSTRACT****THE EFFECT OF *Cynara cornigera* L. EXTRACTS ON HEPATOCELLULAR CARCINOMA****Erdal ŞANLIDAĞ****Institute of Graduate Studies – Department of Biochemistry****Supervisor : Doç. Dr. Eda BECER****June 2022, 122 pages**

Liver cancer, also referred to as hepatocellular carcinoma (HCC) occurs in hepatocytes. Risk factors for the development of HCC are chronic diseases such as Hepatitis B and C, exposure to aflatoxin, alcohol and tobacco use, obesity and diabetes. Liver cancer formation and progression mechanisms are a result of the loss of cell cycle control, escape from cell senescence, resistance to cell death, phenotypic plasticity, and metastasis. Jak2, Stat3, Wnt3a, Wnt11 and  $\beta$ -catenin pathways play a key role in these mechanisms.

The compounds which are found in *Cynara* genus plants have been used in the treatment of liver diseases. Compounds such as quercetin, apigenin have anti-cancer properties and these compounds are found in *C. cornigera* L. belonging to the genus *Cynara*.

Methanol extracts obtained from *C. cornigera* were fractionated using polyamid columns and the fractions were analysed to determine cytotoxicity in the HepG2 cell line which is an example of a hepatocellular carcinoma cell line. A MTT assay was used to determine the cytotoxic effect, while , fractions which have significant cytotoxicity were evaluated to determine the activity in Jak2, Stat3, Wnt3a, Wnt11 and  $\beta$ -catenin pathways using immunocytochemistry. As a result, cytotoxic effect was identified in two obtained fractions in HepG2 cell lines and significant anti-cancer activity were identified in non-canonical Wnt11 pathway in HepG2 cells which were treated by these two fractions which have significant cytotoxic effect.

**Keywords:** *cynara cornigera*, phenolic compounds, hepg2, cytotoxicity, wnt11

**İÇİNDEKİLER**

TEZ ONAYI .....	III
BEYAN .....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
ÖZET .....	VI
ABSTRACT.....	VII
İÇİNDEKİLER .....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XII
TABLolar DİZİNİ .....	XIV
KISALTMALAR .....	XV

**BÖLÜM I**

Giriş.....	1
Amaç .....	2
Alt Amaçlar.....	2
Araştırmanın Önemi.....	2
Tanımlar .....	3
Hipotez.....	5

**BÖLÜM II**

Kavramsal Temeller ve İlgili Araştırmalar .....	6
Karaciğer Kanseri .....	6
Karaciğer Kanseri Epidemiyolojisi.....	6
Karaciğer Kanseri Risk Faktörleri .....	7
Hepatit B Virüsü (HBV) .....	8
Hepatit C Virüsü (HCV) .....	8
Alkol.....	9
Aflatoksin.....	9



Diyabet .....	10
Obezite .....	11
Alkole Bağlı Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı (ABOYKH).....	11
Tütün Kullanımı .....	11
Karaciğer Kanserinde Büyüme Faktörleri .....	11
Karaciğer Kanseri Moleküler Mekanizmalar.....	12
Hücre Döngüsü Kontrolü Kaybı .....	13
Hücre Yaşlanmasından Kaçış .....	15
Hücre Ölümüne Karşı Direnç .....	16
Fenotipik Plastisite .....	17
Motilite, İnvazyon ve Metastaz.....	19
Apoptoz.....	20
Karaciğer Kanserinde Apoptoz.....	21
Fenolik Bileşikler .....	22
Flavonoidler .....	23
Fenolik asitler.....	29
Tanenler .....	29
Stilbenler .....	30
Lignanlar .....	31
<i>Cynara cornigera</i> L. ....	31
<i>Cynara cornigera</i> L. Coğrafik Dağılımı ve Habitatı .....	32
<i>Cynara cornigera</i> L. Taksonomisi .....	33
<i>Cynara cornigera</i> L. Fitokimyasal İçeriği .....	34
<i>Cynara cornigera</i> L. Bileşiklerinin Kansere Üzerine Etkileri.....	35
Kuersetin ve türevlerinin Kansere Üzerine Etkisi .....	35
Apigenin ve türevlerinin Kansere Üzerine Etkisi .....	36

## BÖLÜM III

Gereç ve Yöntem.....	37
Bitki Materyalleri .....	37
Ekstraksiyon ve Fraksiyonlara Ayırma .....	37
<i>C. cornigera</i> L. Çiçek Ekstraktlarının Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LS-MS/MS) Analizi.....	38
Reaktifler ve Uygulamaları .....	38
Hücre Hattı ve Hücre Kültürü .....	38
Hücre Açma Protokolü.....	39
Hücre Pasajlama Protokolü .....	39
Hücre Dondurma Protokolü .....	40
Hücre Canlılığı ve Hücre Büyümesi Analizi .....	40
Hücre Fiksasyon Protokolü .....	41
İmmünohistokimya .....	41
İstatistiksel Analiz.....	42

## BÖLÜM IV

Bulgular.....	43
<i>C. cornigera</i> L. Ekstraksiyon, Fraksiyonlama İşlemi Bulguları .....	43
Hücre Sitotoksitesisi Bulguları .....	44
<i>C. cornigera</i> L. İçerik Analizi.....	49
4.4. Hücre Morfolojisi.....	59
İmmünohistokimyasal Değerlendirme .....	59

## BÖLÜM V

Tartışma .....	63
----------------	----

## BÖLÜM VI

Sonuç.....	69
------------	----

KAYNAKÇA.....	71
EKLER.....	89
ÖZGEÇMİŞ .....	106

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.</b> <i>Karaciğer kanserinin, dünya çapında yaşa göre standardize edilmiş insidans değerleri (her iki cinsiyet ve tüm yaş grupları), (Globocan,2020) .....</i>	7
<b>Şekil 2.</b> <i>Hepatit C virüsüne bağlı olarak gelişen HSK'nın zamana bağlı gelişimi ve gelişim evrelerinin görülme oranı .....</i>	9
<b>Şekil 3.</b> <i>AFBI-exo-8,9-epoksit moleküler yapısı .....</i>	10
<b>Şekil 4.</b> <i>Fenol ve flavonoid yapı iskeletleri.....</i>	22
<b>Şekil 5.</b> <i>Flavonoid türevleri olan flavonol, izoflavonlar, antosiyanidinler, flavanonlar, flavonoller ve flavonların yapı iskeletleri .....</i>	24
<b>Şekil 6.</b> <i>Antosiyanidin iskeleti ve bazı antosiyanidinlerin fonksiyonel grupları.....</i>	25
<b>Şekil 7.</b> <i>Flavon kimyasal yapısının iskeleti.....</i>	26
<b>Şekil 8.</b> <i>Flavonol bileşiklerinin kimyasal yapı iskeleti .....</i>	27
<b>Şekil 9.</b> <i>Flavanon örneği olarak naringenin kimyasal yapısı.....</i>	27
<b>Şekil 10.</b> <i>Flavononol örneği olarak taksifolin bileşiğinin kimyasal yapısı .....</i>	27
<b>Şekil 11.</b> <i>Flavanlara örnek olarak flavan-3-ol bileşiğinin kimyasal yapısı .....</i>	28
<b>Şekil 12.</b> <i>İzoflavonoidlere örnek olarak genisteinin kimyasal yapısı .....</i>	28
<b>Şekil 13.</b> <i>Hidroksibenzoik asit .....</i>	29
<b>Şekil 14.</b> <i>Tanen alt sınıfları ve molekül yapıları .....</i>	30
<b>Şekil 15.</b> <i>Resveratrol.....</i>	30
<b>Şekil 16.</b> <i>Lignanların Kimyasal Yapısı .....</i>	31
<b>Şekil 17.</b> <i>Cynara cornigera L. bitki fotoğrafı (Saxifraga, Jan van der Straaten) .....</i>	32
<b>Şekil 18.</b> <i>Cynara cornigera L. bitkisinin Kıbrıs'ta bulunduğu bölgeler. (Hand, 2021 ) .....</i>	33
<b>Şekil 19.</b> <i>C. cornigera L. ekstraktının kolon kromatografisi ile elde edilen Fr. G'nin 24 ve 48 saatlik süreler boyunca, HepG2 hücreleri üzerinde, canlılıkları üzerine etkisi .....</i>	46
<b>Şekil 20.</b> <i>Cynara cornigera L. ekstraktının kolon kromatografisi sonucunda elde edilen Fr. J'nin 24 ve 48 saatlik süreler boyunca, HepG2 hücreleri üzerinde, canlılıkları üzerine etkisi.....</i>	47
<b>Şekil 21.</b> <i>Fraksiyon G ve Fraksiyon J'ye ait IC<sub>50</sub> grafikleri .....</i>	49
<b>Şekil 22.</b> <i>Fr. G içeriğinde bulunan 5-O-kafeoilkinik (1), kaempferol-3-rutinosit (2), apigenin glukozit (3), apigenin (4) bileşiklerinin kimyasal yapısı.....</i>	52

- Şekil 23.** *Fr. G LC Kromatogramı*..... 54
- Şekil 24.** *Fraksiyon J içerisinde bulunan, 5-O-kafeoilkinik asit (1), dikafeoilkinik asit (2), kaempferol-glukozit-glukuronid (3), luteolin-7-glukozit 3'-glukuronid (4), kaempferol glukuronid (5), kersetin glukozit (6), luteolin glukuronid (7), apigenin glukuronid (8), apigenin (9), dikaffeoil-sukkinoilkinik asit (10)...* 56
- Şekil 25.** *Fraksiyon J, LC Kromatogramı*..... 58
- Şekil 26.** *Kontrol (A), Fr G (B) ve Fr J (C) ile muamele edilmiş HepG2 hücrelerinin mikroskop görüntüleri (Ölçek = 100 µm).* ..... 59
- Şekil 27.** *Fr. G ve Fr. J ile muamele edilmiş HepG2 hücrelerinin immünohistokimyasal olarak boyanmalarının sonucu elde edilen mikroskop görüntüleri* ..... 61

## TABLOLAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> <i>C. cornigera L. Taksonomisi (J. Sibthorp &amp; J. Lindley, Fl. graec. 10:74. 1840).....</i>	33
<b>Tablo 2.</b> <i>2012 yılında Elsayed vd. tarafından yayınlanan araştırma sonuçlarına göre Cynara cornigera L. içeriğinde bulunan bileşikler.....</i>	34
<b>Tablo 3.</b> <i>2015 yılında Hegazy vd. tarafından yayınlanan araştırma sonuçlarına göre Cynara cornigera L. içeriğinde bulunan bileşikler.....</i>	34
<b>Tablo 4.</b> <i>2016 yılında El Sohafy vd. tarafından yayınlanan araştırma sonuçlarına göre Cynara cornigera L. içeriğinde bulunan bileşikler.....</i>	35
<b>Tablo 5.</b> <i>Fraksiyonlar ve Birleştirilmesi .....</i>	43
<b>Tablo 6.</b> <i>Kolon kromatografisi sonucu elde edilen fraksiyonlar ve fraksiyonların liyofilizasyonu sonucu elde edilen örneklerin miktarları .....</i>	44
<b>Tablo 7.</b> <i>Tüm fraksiyonlara ait MTT 1 sonuçları.....</i>	45
<b>Tablo 8.</b> <i>HepG2 hücrelerinin Fr.G ile muamelesi sonucundaki canlılığı yüzdesi ...</i>	46
<b>Tablo 9.</b> <i>HepG2 hücrelerinin Fr. J ile muamelesi sonucu hücre canlılığı yüzdesi... </i>	47
<b>Tablo 10.</b> <i>Fr. G ve Fr. J'ye ait MTT-2 sonuçları .....</i>	48
<b>Tablo 11.</b> <i>Fr. F,G, H, I, J, K'ye ait IC50 değerleri.....</i>	49
<b>Tablo 12.</b> <i>Fr. F, G, H, I, J, K'ye ait LC-MS/MS Sonuçları.....</i>	50
<b>Tablo 13.</b> <i>Fr. G ile Fr. F ve Fr. H'de ortak olarak bulunan bileşikler .....</i>	51
<b>Tablo 14.</b> <i>Sadece Fr. G'de bulunan bileşikler .....</i>	52
<b>Tablo 15.</b> <i>Fr. J ile Fr. I ve Fr. K fraksiyonlarına ait ortak bileşikler .....</i>	55
<b>Tablo 16.</b> <i>Sadece Fr. J'de bulunan bileşikler.....</i>	55
<b>Tablo 17.</b> <i>Kontrol grubu, fraksiyon G ve fraksiyon J ile 48 saat için 100 µg/mL konsantrasyonda muamele edilen hücrelerin, Wnt11, Wnt3a, Stat3, Jak2 ve β-catenin yolları için immün boyama H-Score değerleri ve istatistiksel olarak karşılaştırma sonuçları .....</i>	62

**KISALTMALAR**

- ABD : Amerika Birleşik Devletleri  
ABOYKH : Alkole Bağlı Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı  
AFB1 : Aflatoksin B1  
AOKYH : Alkolik Olmayan Karaciğer Yağlanması Hastalığı  
B/N : Bileşik Numarası  
BAK : Bcl-2 homologous killer protein  
BAX : Bcl-2-ilişkili X proteini  
BuOH : Bütanol  
CDK : Siklin bağımlı kinaz  
CIP: CDK interacting protein  
KIP : Kinase inhibitory protein  
DCM : Diklorometan  
Diamiobenzidin (DAB  
DNA : Deoksiribonükleik asit  
DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü  
EBF : Epidermal büyüme faktörü (EBF)  
EBFR : Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EBFR)  
EMG : Epitelyal-mezenkimal geçiş  
FBF : fibroblast büyüme faktörü (FBF)  
FBS : Fetal Bovine Serum  
Fr. : Fraksiyon  
FSS : Fetal Sığır Serum  
HB-EBF :heparin bağlantılı- epidermal büyüme faktörü  
HBF : hepatosit büyüme faktörü  
HBV : Hepatit B virüsü  
HCV : Hepatic C virüsü  
HSK : Hepatosellüler karsinom  
IER3 : Immediate early response gene  
IL-6 : İnterlökin-6  
ITK : İnce Tabaka Kromatografisi  
KKTC : Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti

MeOH : Metanol

RNA : Ribonükleik asit

TGF -  $\alpha$  : Transforming growth factor alpha

TGF -  $\beta$  : Transforming growth factor beta

TNFR1 : tümör nekroz faktörü reseptörü

TRAIL : TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand

UKAA : Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı

WHO : World Health Organisation

WNT : Wingless-related integration protein



## BÖLÜM I

### Giriş

Karaciğer; insan vücudunda bulunan çok fonksiyonlu ve kompleks özellikleri olan en büyük organlardan biridir. Vücudun laboratuvarı olarak da adlandırılabilen, metabolizma üzerinde önemli bir görevi olan ve kendine özgü fonksiyonlarını yerine getirmesi elzem olan bir organdır (Arias vd., 2020).

Karaciğer, bazı virüsler veya yabancı toksik etkisi olan maddelerle karşılaşması sonucunda birçok rahatsızlığa uğrayabilmektedir. Bu bağlamda, dış etkilere veya genetik olarak gelen mirasa bağlı olarak karaciğerde kanser görülebilmektedir. “Karaciğer kanseri” terimi kullanıldığında primer tümör olarak hepatosellüler karsinomdan (HSK) bahsedilir ve hepatosellüler karsinom, hepatosit hücrelerinin normal olmayan bir şekilde proliferasyona uğraması sonucu gelişen bir kanser türüdür (McGlynn vd., 2001).

Vücut için çok önemli fonksiyonları olan karaciğerin fonksiyonlarının, kansere bağlı olarak bozulması sonucunda vücut metabolizmasında olumsuz bir değişim meydana gelmektedir. Karaciğerin, metabolizma üzerinde, birçok ve önemli fonksiyonlarının olmasından dolayı, oluşan kanserin tedavi edilmesi elzemdir. Bu bağlamda karaciğer kanseri için, evresine bağlı olarak kullanılan ilaçlar bulunmakta ve tedavide kullanılmaktadır. Bu ilaçların yan etkilerinin olması ve tedavideki başarı oranının beklenen düzeyde olmamasından dolayı bilim dünyası yeni, yan etkisi daha az ve tedavideki başarısının yüksek olduğu ilaçlar arayışlarını sürdürmektedir (Chen vd., 2020).

Bitkilerden elde edilen bileşikler birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Bu bağlamda bitkilerden elde edilecek yeni doğal bileşikler karaciğer kanserini önlemede veya tedavi etmekte önemli bir rol üstlenmesi öngörülmektedir (Rodriguez vd., 2021). Buna bağlı olarak ve hali hazırda karaciğer rahatsızlıklarında kullanılan ilaçların bir kısmı *Cynara* cinsine ait bitkilerden elde edilmesi göz önünde bulundurularak, Kıbrıs'ta doğal olarak yetişen yabancı bir enginar türü olan *Cynara cornigera* L. (Gafgarıt) karaciğer kanseri üzerinde olumlu bir etkisi olacağı düşünülerek bu çalışmada kullanılmıştır (Hegazy vd., 2015).

Önceki yapılan çalışmalar göz önüne alındığında *C. cornigera* bitkisinde, anti-tümör özellikleri olan bileşikler olduğu ve bu bileşiklerin de karaciğer kanserinde etkili olacağı düşünülmüştür.

### **Amaç**

Bu çalışmanın amacı, *C. cornigera* L. bitkisinin çiçek kısmı ekstraksiyonundan elde edilecek ekstrenin, kolon kromatografisi ile fraksiyonlarına ayrılması ve bu fraksiyonların, *in vitro* olarak HepG2 hücre hattında uygulayarak, fraksiyonların sitotoksitesini belirlemektir.

### **Alt Amaçlar**

Sitotoksitenin belirlenmesi amacına bağlı olarak, *C. cornigera* L. bitkisinden elde edilen fraksiyonların;

- I. Sitotoksik aktivitesi bulunan fraksiyonlarda etkin dozu belirlemek,
- II. Apoptatik yolları belirlemek,
- III. *C. cornigera* L. bitkisinin çiçek kısmının fitokimyasal içeriğinin kalitatif olarak tespit etmek,

çalışmanın alt amaçlarını oluşturmaktadır.

### **Araştırmanın Önemi**

Dünya’da karaciğer kanserinden dolayı ölümler, diğer kanser türleri ile karşılaştırıldığında, mortalite sıralamasında dördüncü, yaygınlık olarak bakıldığında zaman ise altıncı sırada yer almaktadır. (Globocan, 2020) *Cynara* cinsine ait türlerin karaciğer rahatsızlıklarını tedavi etmekte hali hazırda kullanılması ve literatürde bu bitki ile ilgili yapılan içerik analizi çalışmalarında tespit edilen bileşiklerin sitotoksik aktiviteye sahip olması, *C. cornigera* bitkisinin karaciğer kanseri üzerinde olumlu bir etkisinin olabileceği varsayımına dayanarak çalışmaya dahil edilmiştir.

Bu veriler ışığında karaciğer kanseri için, yan etkisi daha az olan, karaciğer kanserini iyileştirmeye veya inhibe etmeye yönelik bileşiklerin bitki içeriğinde olması düşünülmesinden ve buna bağlı olarak yeni bir anti-kanser ajanının geliştirilme potansiyeli olması, araştırmanın genel olarak önemini ortaya koymaktadır.

## Tanımlar

Kanser, en kısa tanımı ile hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmaları olarak ifade edilebilir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre, kanser dünyada, kardiyovasküler hastalıklardan sonra, en fazla görülen, ikinci ölüm sebebidir. Ayrıca, giderek yükselen bir morbidite ve mortaliteye sahip olmasından dolayı sağlık sorunu olmasının ötesinde toplum sorunu haline gelmiştir (Gürel, 2007). Birçok araştırma laboratuvarında, kanserin önlenmesi, tedavi edilmesine yönelik birçok araştırma yapılmaktadır.

Dünya çapında hepatoselüler karsinom vakalarının büyük çoğunluğu (>%83) özellikle Doğu ve Güneydoğu Asya ve Sahra-altı Afrika gibi daha az gelişmiş bölgelerde görülmektedir (Globocan, 2020). Dünya çapında, Tayland'ın Kaen bölgesi karaciğer kanserinin en yüksek oranda görüldüğü bölgedir (Okuda vd., 2002). HSK oluşumuna sebep olan iki majör risk faktörü olan Hepatit B ve Hepatit C virüsleri yaklaşık olarak HSK vakalarının %80'inde görülmektedir. Diğer risk faktörleri ise alkol ve tütün kullanımı, aflatoksine maruz kalmak, obezite, diyabet, yağsız karaciğer hastalığı ve beslenme şekli olarak gösterilmektedir.

HSK yetişkinlerde primer kanser türü olarak görülen kanser türleri içerisinde %85-90 arası bir orana sahiptir. Tüm toplumlarda HSK, erkeklerde kadınlara oranla (2:1 ve 4:1 arasında değişen bir oranda) daha fazla görülmektedir. (IARC vd., 2013)

Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı 2012 yılı kanser kayıt raporu verilerine göre karaciğer kanseri Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde (KKTC) tüm kanser olguları içerisinde %2.4 görülme oranı ile onuncu sırada yer almaktadır. HSK'nın yaşa standartize insidans hızı (100 bin kişide) 3.9, kaba insidans hızı (100bin kişide) ise 4.5 olarak tespit edilmiştir.

Erkeklerde tüm kanser olguları içerisinde HSK'nın görülme oranı %3.5 ve kaba insidans hızı (100bin kişide) 5.3, yaşa standartize insidans hızı (100 bin kişide) 5.1 olarak tespit edilmiş ve erkeklerde görülen tüm kanser olgularının içerisinde en sık görülen sekizinci kanser türü olduğu belirtilmiştir. Kadınlarda ise kadınlarda görülen tüm kanser olgularına oranla %1,7 görülme oranına ve 3.7 kaba insidans hızı (100bin kişide), 2.7 yaşa standartize insidans hızı(100bin kişide) ile onuncu sırada bulunmaktadır.

Bilim dünyası kemoterapi, radyoterapi gibi mevcut kanser tedavi yöntemlerinin hasta üzerinde yarattığı olumsuz etkileri en az indirgeyecek veya bu etkilerin görülmediği bir tedavi yöntemi arayışı içindedir. Bu bağlamda bitki içeriklerinde bulunan, anti-kanser özelliğine sahip biyoaktif bileşikler büyük bir potansiyele sahip olarak önem arz etmektedirler.

Biyoaktif bileşik özelliğine sahip olan flavanoidler, doğal olarak oluşan genellikle hemen hemen her meyve ve sebze de bulunan polifenolik bileşiklerdir. Flavonlar, flavenler, flavonoller, katekinler ve antosiyanidinler, flavonoid ailesinin en genel üyeleri olarak öne çıkmaktadırlar. (Seyoum vd., 2002) Polifenoller , anti-allerjik, anti-inflamatuar, anti-kanser, anti-mikrobiyal, anti-oksidan, anti-trombotik, anti-aterojenik ve kardiyoprotektif özellikler gibi, geniş farmasötik özelliklere sahip bileşiklerdir (Hegazy vd., 2015).

Yiyecek, kozmetik ve farmasötik alanlarında bitki ekstraktları kullanımının giderek artmasına bağlı olarak, Dünya çapında tıbbi bitkilerin bilimsel temel üzerinde sistematik olarak çalışılmasına hız verilmiştir (Stanojevic vd., 2009). Bu bağlamda Kıbrıs'ta yetişen bitkiler ile yapılacak çalışmalar bilim dünyasına katkılar sağlanabilir. *C. cornigra* L. bitkisi bu amaçla kullanılabilir potansiyele sahip Kıbrıs'ta yetişen bitkilerden birisidir.

Kıbrıs Türkçesinde "Gafgarıt" , bilimsel ismi ile *C. cornigera* L. *Asteraceae* ailesine ait Akdeniz bölgesinde, Kuzeybatı Afrika'da, Avustralya'da, Arjantin'de ve Kanarya Adaları'nda doğal olarak yetişebilen yabani bir enginar türü olan çiçekli bir bitkidir.

*C. cornigera* L. fitokimyasal olarak içeriğine bakıldığı zaman kuersetin, apigenin gibi birçok fenolik bileşiğe sahip olduğu görülmektedir. Bu fenolik bileşikler biyolojik olarak aktif bileşiklerdir ve *C. cornigera* L. bitki içeriğinde bulunmaktadır (Hegazy vd , 2015).

Bu araştırma ile *C. cornigera* L. bitkisinden elde edilecek biyoaktif moleküllerin karaciğer kanseri üzerinde anti-kanser özellik göstereceği ve bu hastalığa yönelik diğer kanser tedavi yöntemlerinden daha etkili ve daha az yan etkisi olan yeni bir potansiyel ajanın bulunacağı düşünülmektedir.

**Hipotez**

*C. cornigera* L. çiçek ekstraktlarından elde edilecek ekstrakt, bu ekstraktın kolon kromatografisinde yürütülmesi sonucunda elde edilecek fraksiyonların içerisindeki bileşikler, HepG2 kanser hücre hattında sitotoksik etki yaratacak, hücre canlılığını azaltacak ve apoptoza sebep olacaktır. *C. cornigera* L. çiçek ekstraktlarından elde edilecek olan fraksiyonlar ayrıca anti-kanser özelliğe sahip ajanlara sahip olmakla birlikte biyolojik olarak aktif moleküller içermektedir.

Ayrıca *C. cornigera* L. ekstraktlarında anti-kanser özelliğine sahip yeni ve daha önce hiç tanımlanmamış, biyolojik olarak aktif moleküller bulunmaktadır.

## BÖLÜM II

### Kavramsal Temeller ve İlgili Araştırmalar

#### **Karaciğer Kanseri**

Primer karaciğer kanseri birkaç alttıpten oluşabilmektedir. Bunlar hepatoselüler karsinom, kolanjiokarsinom, hepatoblastom ve anjiyosarkom olarak alt tiplere ayrılır. Yetişkinlerde, primer karaciğer kanseri olarak hepatoselüler karsinom %85-90 arasında bir oranda görülmektedir. Buna bağlı olarak, genellikle primer karaciğer kanseri olarak hepatoselüler karsinom karşımıza çıkmaktadır ve karaciğer kanseri terimi hepatoselüler karsinom olarak tanımlanmaktadır (McGlynn vd., 2001).

#### ***Karaciğer Kanseri Epidemiyolojisi***

Karaciğer kanseri genellikle cinsiyete ve yaşanılan bölgeye bağlı olarak, orta-yaşlı ve yaşlı insanlarda daha sıklıkla görülmektedir. Cinsiyete göre bakıldığında zaman, karaciğer kanseri erkekleri kadınlara göre daha çok etkilemekte ve erkeklerde kadınlara oranla daha yüksek bir mortaliteye sahiptir (Lozano vd., 2010).

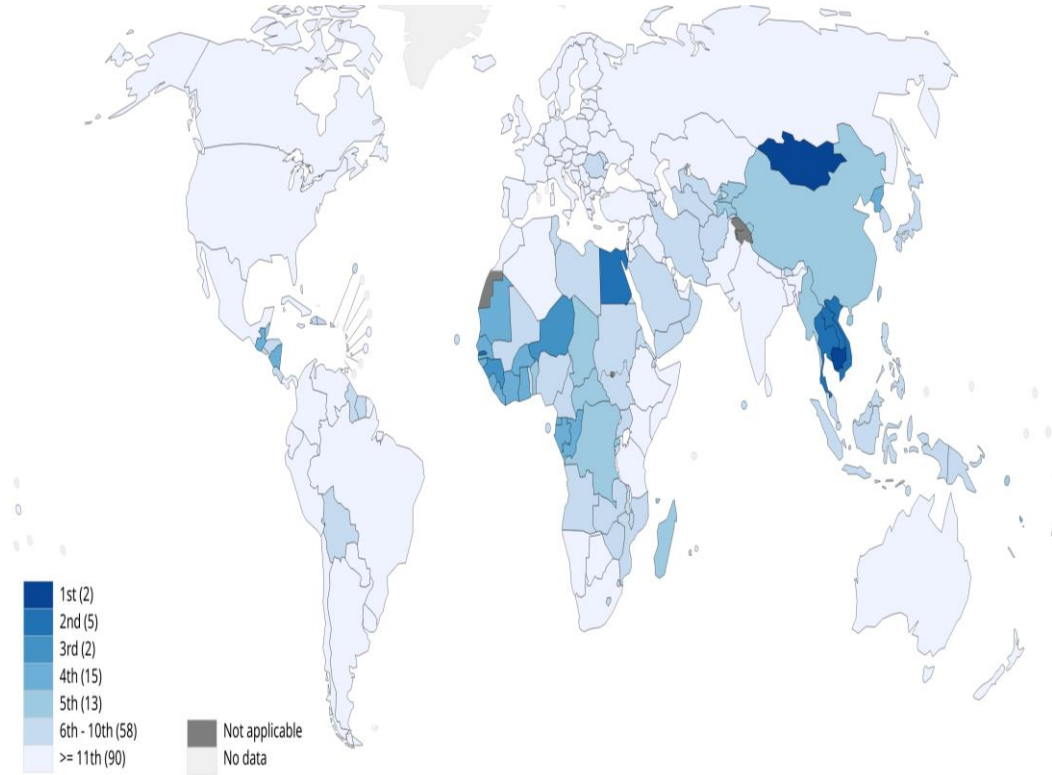
Karaciğer kanseri, tüm dünyada bölgelere göre aynı etkide bir yaygınlık ve mortalite göstermemektedir. GLOBOCAN 2020 verilerinde, yaşa göre standartize edilmiş insidans verileri incelendiğinde, gelişmemiş ülkelerde, gelişmiş ülkelere oranla karaciğer kanseri daha yüksek olarak görülmektedir. Bölgelere göre karaciğer kanseri mortalitesi ve morbiditesindeki belirgin farklılıkların olma sebebi, bu bölgelerde yaşayan insanların karaciğer kanserine sebep olan risk faktörlerine maruz kalma oranına ve buldukları bölgelerdeki yönetimlerin sağlık politikalarına bağlıdır (Ferlay vd., 2020).

Karaciğer kanseri risk faktörleri arasında bulunan Hepatit B ve Hepatit C virüslerine bağlı olarak gelişen karaciğer kanseri vakaları, aşılama politikası yürütülerek azaltılabilmektedir. Gelişmiş ülkelerde, hepatit virüslerine karşı aşılama politikası ve tedaviye yönelik alt yapının tamamlanmış olması, karaciğer kanseri vakalarının gelişmemiş ülkelere göre daha az olmasını anlamlı kılmaktadır (Wen vd., 2011).

Buna karşın, çocuklar arasında en yaygın karaciğer kanseri türü olarak hepatoblastoma görülmektedir. Çocuklarda primer karaciğer kanseri olarak

hepatoblastoma görülme sebebi olarak arka planda gerçekleşen genetik hastalıklar olduğu düşünülmektedir (Raney, 1997).

Şekil 1.  
Karaciğer kanserinin, dünya çapında yaşa göre standardize edilmiş insidans değerleri (her iki cinsiyet ve tüm yaş grupları), (Globocan,2020)



### ***Karaciğer Kanseri Risk Faktörleri***

Karaciğer kanserinin büyük çoğunluğu arkaplanda oluşan siroza bağlı olarak gelişmektedir. Siroz oluşumuna sebep olan iki ana risk faktörü Hepatit B ve Hepatit C virüsleridir ve bu virüslere bağlı olarak gelişen karaciğer kanseri oranı yaklaşık olarak %80'dir (Lam vd., 2021).

Bu iki virüs dışında kalan diğer risk faktörleri, alkol ve tütün kullanımı, aflatoksine maruz kalma, obezite, diyabet, alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı ve tütün kullanımı olarak görülmektedir. Bu risk faktörlerinin dağılımları ve etkileri dünyadaki bölgelere, popülasyonlara ve zamana bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (WHO, 2015).

### ***Hepatit B Virüsü (HBV)***

Global olarak HSK'nın oluşmasına sebep olan en yaygın faktör HBV virüsüdür. Dünya çapında, yaklaşık olarak üç kişiden biri HBV ile enfekte olmuş ve bunların yalnızca %5'i kronik olarak taşıyıcı olmuştur. Bu kronik taşıyıcıların da %25'i siroz ve/veya hepatosellüler karsinom gibi ciddi karaciğer rahatsızlıkları geliştirmiştir. HBV'ye bağlı gelişen HSK vakalarının çoğu, Asya ve Sahraaltı Afrika'da ortaya çıkmaktadır (Lozano vd., 2010).

Kronik HBV enfeksiyonundan yaklaşık olarak 240 milyon insan etkilenmekte olup, yaklaşık olarak yılda 780 bin ölüm, HBV ile ilişkili karaciğer hastalıklarından meydana gelmektedir (GBD, 2013).

Epidemiyolojik çalışmalar göstermiştir ki, kronik HBV taşıyıcıları, genel popülasyonla karşılaştırıldığı zaman, 5-15 kat daha fazla HSK oluşturma riskine sahiptirler. HBV'ye bağlı HSK gelişimi büyük bir oranda (%70-90) arkaplandaki siroza bağlı olarak gelişmektedir (Thiele vd., 2014).

HBV taşıyıcılarının arasında; cinsiyet açısından erkek olmak, yaşlı olmak, yüksek HBV DNA seviyesine sahip olmak, HBV'ye bağlı HSK gelişmesinde artışa sebep olmaktadır (Kao vd. 2002).

### ***Hepatit C Virüsü (HCV)***

HCV, HSK gelişmesinde dünya çapında ikinci risk faktörüdür. Global olarak son yıllarda yayılımı artmaktadır. Yılda yaklaşık olarak bir milyon insan HCV ile ilişkili karaciğer hastalıklarından hayatını kaybetmektedir (Mohd vd., 2013).

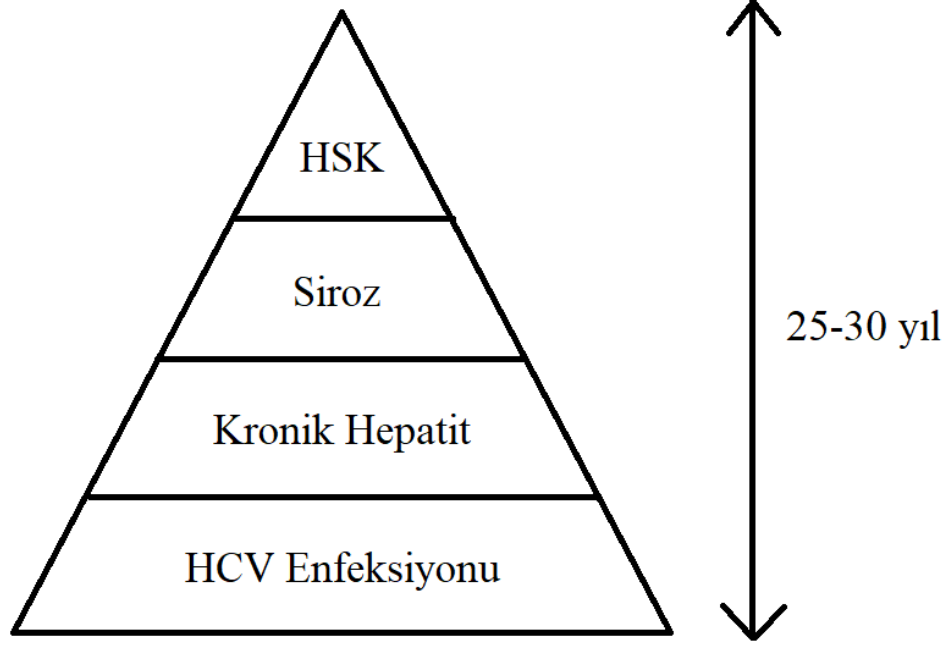
HBV'ye ters bir şekilde, HCV çocuklarda ender olarak görülmekte buna bağlı olarak neredeyse tüm yeni HCV vakaları erken yetişkinlik dönemindeki bireylerde görülmektedir. Bunun yanında HCV enfeksiyonu, yetişkinlerin neredeyse %80'inde kronik olarak görülmektedir (Benova vd., 2015).

HCV enfeksiyonu, HSK gelişme riskini artırmaktadır. HCV enfekte kişilerde, HCV negative kişilere göre 17 kat daha fazla HSK geliştirme riski bulunmaktadır. HCV virüsü fibrozis ve sonunda siroz oluşumuna sebep olmaktadır (Poynard vd., 1997).



Şekil 2.

*Hepatit C virüsüne bağlı olarak gelişen HSK'nın zamana bağlı gelişimi ve gelişim evrelerinin görülme oranı*



***Alkol***

Yüksek alkol kullanımına bağlı olarak karaciğerde siroz oluşumu gerçekleşmektedir. Buna bağlı olarak, uzun süreli, günlük olarak yüksek miktarda (50-70 g) alkol kullanımı, yüksek derece HSK risk faktörü oluşturmaktadır (IARC Çalışma Grubu, 2010). Obezite ve viral hepatit hastalıklarına bağlı olarak alkol kullanımı, HSK için daha yüksek bir risk faktörü oluşturmaktadır (Loomba vd., 2010).

***Aflatoksin***

Aflatoksin B1 (AFB1), yaygın olarak bulunan, *Aspergillus* mantarları tarafından üretilen bir mikotoksindir. Tahıllar, ağaç yemişleri, baklagiller (özellikle yer fıstığı) ve mısır aflatoksin kontaminasyonuna maruz kalma ihtimali yüksek olan besinlerdir. Özellikle bu tür besinlerin, saklanma koşullarına uygun olmayan ortamlarda depolanmaları, bu besinlerin aflatoksin ile kontamine olma risklerini artırmaktadır.

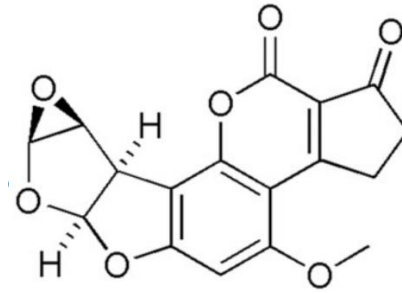
Yapılan hayvan deneylerine göre, AFB1'e maruz kalan hayvanlarda yüksek oranda HSK görülmüş olmasına bağlı olarak Uluslararası Kanser Araştırmaları

Ajansı (UKAA), AFB1'i karsinojen olarak tanımlamıştır (IARC Çalışma Grubu, 1987).

AFB1'in vücutta metabolize edilmesi sonucunda oluşan AFB1-exo-8,9-epoksit meydana gelmektedir. AFB1-exo-8,9-epoksit, DNA'ya bağlanıp, p53 tümör baskılayıcı gen üzerinde karakteristik bir mutasyona sebep olmaktadır. Bu mutasyona bağlı olarak kanser oluşumu gerçekleşebilmektedir.

Şekil 3.

*AFB1-exo-8,9-epoksit moleküler yapısı*



Çeşitli çalışmalarda AFB1 ile diğer karaciğer hastalıklarına ait risk faktörleri arasında kuvvetli bir etkileşim söz konusudur. Buna bağlı olarak da HSK oluşma riskinde de artış olması anlamlıdır (Yu vd., 1996).

### ***Diyabet***

Özellikle Tip 2 diyabet, HSK için önemli bir risk faktörüdür. Tip 2 diyabet, özellikle siroz ile bağlantılı olduğu zaman, Tip 2 diyabet HSK için daha bir önem arz etmektedir. Özellikle hepatik steatoza katkıda bulunan diyabet, artan steatoz ile ilişkili olarak nekroinflamasyona ve fibroza sebebiyet verir (El-Serag vd., 2006).

Diyabetin HSK risk faktörünü artırdığı yönünde deneysel çalışmalar mevcuttur. Bunun sonucunda diyabete bağlı olarak reaktif oksijen türü maddelerin oluşumu diyabete bağlı sitokin benzeri IL-6 ve TNF- $\alpha$  seviyelerinde artışa sebebiyet vererek, hepatik hücre DNA'larında hasar oluşturmaktadır (Tatsch vd., 2015; Yao vd.,2010).

### ***Obezite***

Obezite, özellikle artan insülin direncine ve tip 2 diyabet risklerine korele olarak HSK için risk oluşturmaktadır. Diyabete benzer şekilde obezite de hepatik fibrozun oluşmasını destekleyerek HSK riskini artırmaktadır. Bunun dışında literatürde, hepatositlerde epigenetik yaşlanmayı artırarak HSK riskini artırdığı düşünülmektedir (Nakagawa vd., 2014; Yoshimoto vd., 2013).

### ***Alkole Bağlı Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı (ABOYKH)***

Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı, karaciğer hücrelerinde trigliserid birikimine bağlı olarak (steatoz) ortaya çıkan bir sendromdur ve sendrom alkole bağlı olmadan gelişmektedir. Bu hastalık, diyabet, obezite ve hipertansiyon ile ilişkili olup, HSK için diyabet ve obezite risk faktörleri ile korele bir şekilde HSK riski oluşturmaktadır (Vernon vd., 2011).

### ***Tütün Kullanımı***

2014 yılında Amerika Birleşik Devletleri Genel Cerrahları birliğinin yaptığı bir araştırmaya göre tütün kullanımının HSK üzerine göre etkileri araştırılmıştır. Yapılan araştırmalara göre tütün kullanımı HSK riskini artıran bir faktör olarak tespit edilmiştir. Buna ek olarak normal olarak tüketilen tütün miktarına ek olarak, günde on ek sigara içmenin HSK için tütün kullananlara ait risk faktörüne ek olarak % 7.1 daha fazla risk oluşturduğu belirtilmiştir. Ayrıca erkeklerin tütün kullanımından dolayı kadınlara göre daha fazla HSK görülme riski olduğu da araştırma sonuçlarında elde edilmiştir.

### ***Karaciğer Kanserinde Büyüme Faktörleri***

Karaciğer kanserinde, epitel hücrelerde bulunan epidermal büyüme faktörü reseptörü (EBFR) önemli bir etkiye sahiptir. Epidermal büyüme faktörü (EBF) ve bunun yanında karaciğer kanseri için önemli diğer büyüme faktörleri olan, TGF-  $\alpha$ , heparin bağlantılı- epidermal büyüme faktörü (HB-EBF), fibroblast büyüme faktörü (FBF) ve hepatosit büyüme faktörü (HBF), EBFR reseptörü aracılığı ile karaciğer hücrelerinde etkinlik göstermektedir. Bu reseptörün aktive olması sonucunda,

Ras/Raf/MEK1-2/ERK yolakları ve transkripsiyon faktörleri tetiklenerek gen transkripsiyonunu ve hücre proliferasyonunu artırır (Febregat vd., 2007).

Karaciğer kanseri için önemli bir diğer reseptör tümör nekroz faktörü reseptörü 1'dir (TNFR1). Bu reseptörün oluşturduğu iki kompleks bulunmaktadır. Bu kompleksler TNFR1-Kompleks1 ve TNFR1-Kompleks2 olarak adlandırılır. Bu komplekslerden TNFR1-Kompleks1, hücre canlılığını sürdürmeyi desteklerken, TNFR1-Kompleks2 apoptozu desteklemektedir (Zou vd., 2020).

Bunun yanında tümör nekroz faktör-  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) ile TNFR1 reseptörü kompleksi oluşumu sonucunda, TNF- $\alpha$ / TNFR1 sinyal yolağının aktif olması, hücre proliferasyonunu artırmakta, tümör gelişimine katkıda bulunmaktadır (Knight vd., 2000).

TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) birçok tümör tipine ait hücrelerde apoptoz indükleyici bir proteindir (Falschlehner vd., 2009).

Yapılan çalışmalar sonucunda, bu ligand (TRAIL) ve ani erken yanıt geni 3 (ani erken yanıt geni 3, AEYG3; Immediate early response gene 3, IER3) gibi konjugantları koordineli bir şekilde bir arada bulunduğu Wnt/ $\beta$ -catenin sinyal yolağını inhibe edici rolü olduğu gösterilmiştir (Liu vd., 2021).

Fas-FasL sistemi apoptozu sağlayan önemli yolaklardan birisidir. Fas proteinine agonistik antikoronun veya doğal ligandının bağlanması, hedef hücrelere "ölüm sinyali"nin gönderilmesini sağlar ve bu durum genel olarak apoptozu başlatır. Yapılan araştırmalara göre hepatositlerde Fas, apoptozu düzenlemesi açısından HSK, siroz, hepatit gibi hastalıklarda önemli bir rol oynamaktadır. Fas ile ilgili yolağın inaktif olması durumunda, apoptoz sekteye uğrar ve bunun sonucunda HSK oluşumu gerçekleşmektedir (Galle vd., 1995; Yano vd. 1996; Muller vd., 1997).

### ***Karaciğer Kanseri Moleküler Mekanizmalar***

Heptoselüler karsinom çeşitli sebeplerden dolayı çok yönlü etkenlere bağlı olarak ortaya çıkabilen bir kanser türüdür. Bu etkenlerin başında bazı DNA (HBV), RNA (HCV) virüsleri, kimyasallar (aflatoksin, alkol) ve diğer metabolik rahatsızlıklar gelmektedir. Bu çevresel etkilerin dışında, bu kanser genetik miras olarak aktarılıp, olgun hepatositlerde meydana gelebilmektedir.

Birçok etkene bağlı olmasından dolayı HSK gelişimindeki mekanizmlar çok çeşitlilik göstermektedir. HSK ile ilgili birçok tanımlanmış mekanizmalar bulunmasına rağmen, en önemlileri hücre döngüsü kontrolü kaybı, hücre yaşlanmasından kaçış, hücre ölümüne karşı direnç, fenotipik plastisite, motilite, invazyon, ve metastaz mekanizması olarak tanımlanmaktadır (Carr, 2016).

Hepatoselüler karsinomda yer alan moleküler mekanizmalar, bu tümörlerin, hepatositlerin ve/veya progenitörlerinin sayısına ve fenotipini kontrol eden mekanizmaların deregülasyonu ile karakterize edildiğini gösterir.

Düzensiz hücre döngüsü kontrolü, hücre yaşlanmasından kaçış ve hücre ölümüne karşı direnç, genel hücre proliferasyonunu destekler. İlginç bir şekilde, bu değişikliklerin bazıları, p53 ve p16 mutasyonları gibi HSK'daki edinilmiş genetik mutasyonlar ile açıklanabilir.

Bununla birlikte, diğer birçok sapma şu anda bilinen herhangi bir mutasyonla bağlantılı değildir. Malignitenin diğer bir ana mekanizması olgun hepatositlerde gözlenen fenotipik stabilite kaybıdır.

Birçok HSK hücresi, ihtiyaçlarına bağlı olarak bir fenotipik plastisite sergiler. Örnek olarak, epitelyal veya mezenkimal morfolojiler kazanmalarına izin veren bir plastisite sergileyebilirler.

Diğer bir özellikleri ise karaciğerde buldukları noktadan karaciğerin diğer bölümlerine, hatta vücudun diğer bölgelerine geçmelerini sağlayan özelliklerinin bulunmasıdır. Bu çevresel koşullara bağlı olarak değişen morfoloji ve hareket edebilme özellikleri, HKS hücrelerine büyük bir hayatta kalma ve genişleme avantajı sağlar.

### ***Hücre Döngüsü Kontrolü Kaybı***

Tümörojenik hücrelerde gözlemlenen en önemli değişikliklerden biri hücre döngüsü kontrolündeki kayıptır. Bu kayıp sonucunda hücre proliferasyonunda artış meydana gelir ve bu artış sonucunda da tümör oluşumu gerçekleşir (Hananah & Weinberg, 2011).

Hepatositlerde meydana gelen hücre döngüsü kontrolündeki kayıp, genellikle mutasyonlara bağlı olarak gerçekleşmektedir. Bu değişiklikler hücre proliferasyonunu düzenleyen genlerde proliferasyonu artırıcı nitelikte olabileceği gibi, hücre

proliferasyonunu engelleyici proteinlere ait genetik materyalde değişikliğe sebep olarak proliferasyonun inhibe edilmesi niteliğinde de olabilir (Bisteau vd., 2014).

Karaciğer hücrelerinden olan hepatositler, normal koşullarda hücre döngüsünün G0 fazında bulunurlar ve sıklıkla bölünmezler. Ancak, hücre döngüsünü ve proliferasyon sürecini başlatmak için bir sinyal aldıkları zaman bunu sağlayacak özelliklere de sahiptirler. Bunun en güzel örneği olarak karaciğerin kendini yenilemesi ve karaciğerin cerrahi olarak %70'nin alınmasına rağmen tekrardan kendini oluşturması gösterilebilir (Mitchell & Willenbring, 2008).

Ökaryotik hücrelerin hücre döngüleri ile ilgili süreç, sikline bağımlı kinazlar (cyclin-dependent kinases, CDK) ve bu moleküller ile birlikte çalışan başka moleküller veya bu moleküllerin aktivatörü olan siklinlerin, aktivitelere bağlı olarak düzenlenir.

Kromozom kondensasyonu, DNA replikasyonu gibi olaylar (her bir olay ayrı ayrı) Cdk / siklin kopleksleri tarafından yönetilir ve bu kompleksler bu süreçlerin oluşmasından ve sürekliliğinden ayrı ayrı sorumludur (Satyanarayana & Kaldis, 2009).

Buna bağlı olarak mitoz hücre döngüsü için Cdk1/cyclin B1 kompleksi elzem bir kompleksitr (Diril vd., 2012). G0 fazında olan hepatositlerde, sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından tetiklenen hücre döngüsü süreci, siklin D1 gen ekspresyonunu başlatılır (Albrecht vd., 1995).

Siklin D1, Cdk4 ve Cdk6 ile kompleksler oluşturur ve bunun sonucunda bu kompleksler tarafından retinoblastoma proteini (pRb) fosforlanarak konformasyonel değişikliğe uğrar (Ezhevsky vd., 1997). Bu fosforlanmanın sonucunda, E2F transkripsiyon faktörü ve hücre döngüsü ile ilgili olan diğer siklin E, A, B ve Cdk1 genlerinin transkripsiyonu gerçekleşir. Cdk2 / siklin E kompleksleri pRb proteinini fosforlayarak inaktif hale getirir ve hücre döngüsü sürecinin ilerlemesini sağlar (Yao vd., 2008).

HSK hastalarına ait karaciğer kanseri tümör örnekleri ile karaciğer normal hücreleri, Cdk ve siklin ekspresyonları baz alınarak karşılaştırıldıkları zaman, tümör hücrelerine daha yüksek oranda ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir (Xu vd., 2001).

DNA replikasyonu Cdk2 / siklin E kompleksi tarafından başlatılır ve Cdk2 / siklin A kompleksi tarafından sürdürülerek, tamamlanır (Gopinathan vd., 2011).

Hepatositlerin hücre döngüsüne girmesini ve proliferasyonunu engelleyici birçok düzenleyici yolak bulunmaktadır. Hücre döngüsünü ve proliferasyona sebebiyet veren genlerin transkripsiyonunu engelleyici özellikleri olan pRb, p107 ve p130 proteinleri örnek olarak gösterilebilir (Hensley & Dick, 2012).

HSK hücrelerinde, pRb yolağı ile ilgili olarak yapılan araştırmalarda bu yolağa ait genlerin ekspresyonunda azalma meydana geldiği tespit edilmiştir (Zhang vd., 1994).

Ayrıca Ink4 ailesine ait inhibitörler (p15, p16, p18 ve p19) hücrenin, Cdk4/6 kinazlarına bağlanarak veya Siklin D ile kompleks oluşmasını engelleyerek, hücre döngüsüne girmesini engellerler (Ortega vd., 2002).

CIP/KIP protein ailesine ait p21, p27 ve p57 proteinleri Cdk/siklin komplekslerine bağlanarak bu kompleksleri inaktif hale gelir ve hücre döngüsü sürecini inhibe eder (Besson vd., 2008).

CIP/KIP aile üyesi proteinler olan p21 ve p27 Cdk/siklin kompleksi aktivitesini inhibe eder ve böylece hücre döngüsü sekteye uğratar. HSK örneklerine bakıldığında zaman zaman bu proteinlerin ekspresyonlarında azalma tespit edilmiştir ve buna bağlı olarak kontrolsüz hücre proliferasyonuna sebebiyet vermektedirler (Tannapfel vd., 2000).

Ancak bu görüşe zıt görüşler de literatürde mevcuttur. p21 ve p27 gen ekspresyonlarının HSK hücrelerinde arttığına yönelik de çalışmalarda gösterilmiştir (Fiorentino vd., 2000).

### ***Hücre Yaşlanmasından Kaçış***

Hücre yaşlanma, hücre kültüründe iyi tanımlanmış morfolojik değişikliklerle ilişkili geri dönüşü olmayan bir büyüme durması şeklindedir (Hayflick, 1965).

Telomer; tekrarlayan ve farklı uzunluklarda olabilen DNA elemanlarına sahip, uçlarında proteinler içeren bölgeler olarak tanımlanır. Telomerler, bağlayıcı proteinleri olmalarından dolayı kromozomların uçlarını kapatır ve kromozomlarda bulunan genetik kodun kaybolmasını veya zarar görmesini engeller. Telomerler, normal hücrelerde, hücre bölünmesi sırasında kısalırlar. Bu kısalma da, hücre için bir son kullanma tarihi belirleyicisi olarak görev yapmalarına olanak sağlar (Blackburn, 1991).

Normal hücrelerde olan ve bu hücrelerin normal yaşam döngüsü içerisinde var olan hücre bölünmesi sırasındaki telomer kısaltmaları HSK hücrelerinde telomeraz aktivitesi olmadığı için gerçekleşmez. Bunun sonucu olarak da HSK hücreleri, hücre yaşlanmasından kaçmış olur (Hayflick, 1965).

HSK hücrelerinde, telomeraz aktivitesine bağlı olarak hücre yaşlanmanın durmasına, sikline bağımlı kinazlar üzerinde etki eden, p16 ve p21 tarafından pRb fosforilasyonunun inhibisyonu aracılık eder. Bu inhibisyon, G1'den S fazına geçiş sırasında, E2F faktörlerini inhibe eden proteinlerin pRb ile ilişkili olması sonucuna bağlı olarak gerçekleşir (Campisi, 2007).

### ***Hücre Ölümüne Karşı Direnç***

Alkol, toksik safta asitleri, yağ asitler, ilaçlar ve virüsler gibi birçok etken karaciğerde hücrelerin ölmelerine sebep olur. Ancak, bazı çevresel veya genetik değişikliklere bağlı olarak hücrede mutasyonlar gerçekleşmesine bağlı olarak, ölüm mekanizması sekteye uğrayabilir. Özellikle tümör hücrelerinde meydana gelen mutasyon ve değişiklikler, bu ölüm mekanizmadan başarılı bir şekilde kaçmalarını sağlar (Wag, 2014).

Hepatositlerde hücre ölümü, programlanmış yani apoptotik olarak veya kontrolsüz, programlanmamış yani nekrotik hücre ölümü olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca hepatositler için, otofajik hücre ölümü ve nekroptoz hücre ölümü gibi farklı hücre ölüm formları da bulunmaktadır (Lee & Jang, 2015).

Otofaji ise bazal ve stresli koşullar altında hücre homeostaza aracılık etmek için otofajiyle ilişkili bazı proteinler tarafından kontrol edilen katabolik bir süreçtir. HSK hücreleri için bakıldığı zaman, otofaji tümörigenezin bir promotörü veya bir tümör baskılayıcı olay olarak hareket edebilir. Otofaji mekanizmaları apoptoz mekanizmaları ile örtüşmesinden dolayı, tümör baskılayıcı özellikte olduğu düşünülmektedir. (Lee & Jang, 2015).

Nekroz, rastgele, çevresel bir toksik veya istenmeye etkiye bağlı olarak gelişen, ölümcül sonuçları olan hücre ölümünün bir şeklidir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu, mitokondrinin fonksiyonlarında bozukluğa yol açabilecek hücre oksijen yoksunluğu ve hücre bütünlüğü korumak için gereken eşğin altında ATP seviyelerinde bir düşüş, nekroz ile sonuçlanır (Eguchi vd., 2014).



Morfolojik olarak nekroz; hücresel şişme, hücresel organellerden yoksun zar kabarcıklarının oluşumu ve bütün bunlara ek olarak hücresel içeriklerin salınması ile hücre zarının yırtılması ile sonuçlanabilen bir ölüm sürecidir (Hotchkiss vd., 2009).

Bilindiği üzere apoptoz, intrinsik ve ekstrinsik yollardan ilerleyebilen ve her iki yolda da kaspazların, özellikle kaspaz-3 ve kaspaz-7 enzimlerinin görev aldığı programlanmış hücre ölümüdür (Eguchi vd., 2014; Fabregat vd., 2007).

Hepatositlerdeki apoptotik olaylar, Fas ligandı (FasL), tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-a) veya TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) gibi hücre zarındaki ölüm reseptörlerine bağlanan farklı uyaranlar tarafından düzenlenir.

Ayrıca, diğer faktörler, özellikle dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- $\beta$ ), ölüm reseptörlerine bağlanmaz, ancak intrinsik yolun aktivasyonu yoluyla apoptotik yolu uyarabilir (Fabregat vd., 2007).

TRAIL, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla apoptozu başlatabilen TNF süper ailesinin bir üyesidir. Bu tür apoptoz, TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 reseptörleri tarafından düzenlenir. Deneysel kanıtlar, TRAIL'in karaciğer kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediğini, ancak sağlıklı hepatositlerde apoptozu indükmediğini gösterdiğinden, TRAIL umut verici bir alternatif olarak görülmektedir (Wahl vd., 2013) Ancak HSK patogeneğinde TRAIL sisteminin rolü henüz netlik kazanmamıştır.

Apoptozun mitokondri aracılı düzenlenmesinde çeşitli hücre içi proteinler, özellikle Bcl-2 protein ailesi yer alır. Bu proteinler, etkilerini ölüm ve hayatta kalma sinyallerini birleştiren mitokondrinde gösterirler. Hayatta kalma sinyalleri oluşturma görevleri olan veya apoptotik özellikleri olan üyelere sahip olan bu protein ailesi, hücre içinde ölüm-yaşam dengesini sağlamada da görevlidir (Yang vd., 2006).

### ***Fenotipik Plastisite***

Hücre adhezyonu ve hücre farklılaşması omurgalı embriyo gelişimi için önemli olaylardır. Hücre adhezyonu E-cadherin tarafından düzenlenir ve bu süreç iyi bilinen bir süreçtir. E-cadherin geni epitelyal-mezankimal geçiş (EMG) ve mezankimal-epitelyal geçiş (MEG) süreçlerinde etkindir. Bu iki süreç de normal gelişim için gereklidirler. Ancak kanserin ilerlemesi sırasında invazyon ve

kolonizasyon için HSK dahil diğer tüm tümör hücreleri tarafından kullanılan süreçlerdir (Carr, 2016).

EMG genel olarak fibrosiz, yara iyileşmesi ve kanser sırasında aktif olur (Kalluri & Weinberg, 2009). EMG, E-cadherinin düzensiz olarak görevini yapmasından kaynaklanır. Bu düzensizlik, hücre polaritesinin bozulmasından, adhezyon bir morfoloji oluşmasından ve epitelyal hücrelerin ortak sahip olduğu genetik materyalden yoksunluk tarafından tetiklenir (Stemmler, 2008; Thiery vd. 2009). Bunun sonucunda motilite artar, mezenkimal hücrelerin ortak sahip olduğu genetik materyale geçiş ve adheziv bir morfolojiye geçiş gerçekleşir. Bu durumlar hücreyi invazyon yapmaya olanaklı kılar. (Eckert vd., 2011)

EMG oluşması, TGF- $\beta$ , Wnt gibi birçok farklı sinyal yolağı ile bağlantılıdır. Tümör oluşumu sırasında, EMG olayının tetiklenmesi, hücre motilitesini, istilasını ve metastazını kolaylaştırdığından, TGF- $\beta$ 'ye verilen hücrel tepkiler farklıdır (Bogaerts vd., 2014; Drabsch & ten Dijke, 2012). HSK hücrelerinde, TGF- $\beta$  yolağının inhibisyonu, E-cadherinin artışı ile sonuçlanır ve hücrenin, daha düşük bir göç potansiyeli olan epitelyal durumda, aynı şekilde kalabilmesine yol açar (Fransvea vd., 2008; Giannelli vd., 2014). Ancak bu yolağın aktive edilmesi, E-cadherin azalmasına yol açacağından hücrenin vereceği tepkiler tam ters yönde olacaktır.

Kanonik Wnt sinyal yolağı, normal hücrelerde çoğalma ve hayatta kalma gibi çeşitli hücrel mekanizmaların temel bir düzenleyicisidir ve embriyonik gelişim sırasında önemli bir rol oynar (MacDonald vd., 2009).  $\beta$ -katenin, kanonik Wnt sinyal yolunun önemli bir bileşenidir ve Wnt yokluğunda,  $\beta$ -katenin, adhezyon moleküllerini hücre iskeleti ile köprüleyen, böylece hücrel polariteyi koruyan bir kompleks oluşmasını sağlar.  $\beta$ -katenin / Wnt yolağı, HSK gelişimini destekleyen diğer onkojenik yollarla işbirliği yapabilir. Buna bağlı olarak, bu yolak tümör oluşumundan ziyade, tümör ilerlemesini desteklediği düşünülmektedir (Pez vd., 2013; Stauffer vd., 2011).  $\beta$ -katenin / Wnt yolağı ile EMG arasındaki ilişki incelendiğinde,  $\beta$ -katenin birikiminin, E-cadherin ekspresyonunu azalttığı gözlemlenmiştir (Heuberger vd., 2010).

### ***Motilite, İnvazyon ve Metastaz***

Metastaz, genel olarak kanserlerin bir özelliğidir. HSK'da tümör hücrelerinin intrahepatik (karaciğer içinde) ve ekstrahepatik ortamlara (karaciğer dışında, diğer organlarda) metastaz yapması, HSK'li hastalarda mortaliteye neden olan birincil faktördür (Yand vd., 2010).

Genel olarak HSK vakalarının %75'inde intrahepatik olarak metastaz yapan HSK tümörleri, hastalığın geç evrelerinde ekstrahepatik metastaz da yapar. Hastalığın geç evrelerinde ortaya çıkan ekstrahepatik metastaz, hastaların yaklaşık olarak %40'ında görülmektedir. HSK'nın ekstrahepatik olarak metastaz yaptığı bölgeler çoğunlukla akciğerler olmakla birlikte daha az sıklıkta lenf düğümleri ve kemikler olarak görülmektedir (Natsuzaka vd., 2005; Terada & Maruo, 2013).

Tümör metastazı çok adımlı bir programdır ve gelişmiş hücre hareketliliği ve invazyonu, tümör metastazının ortak bir özelliğidir. Tümör mikroçevresi, tümör invazyonu ve metastazı için çok önemlidir ve tümörün ilerlemesi sırasında önemli değişikliklere uğrar (Joyce & Pollard, 2009)

Hem in vitro hem de in vivo çalışmalar, istilacı hücrelerin morfolojilerinde ve hücre göçünün yolunda büyük bir çeşitlilik olduğunu ortaya koymuştur. Kanser ilerlemesi sırasında, çeşitli tümör hücreleri morfolojik ve fonotipik değişiklikler gösterir ve bu plastisite, tümörlerin mikroçevresel koşullara adapte olmasını sağlar (Clark & Vignjevic, 2015; Friedl & Wolf, 2003)

Tümör hücreleri, tek hücre olarak veya toplu olarak hareket ederek stromayı istila eder ve topludan tek hücreli geçişe veya tam tersi dönüşümler tümör metastazında tanımlanmıştır (Friedl & Wolf, 2003; Haeger vd., 2015; van Zijl vd., 2011).

Diğer katı tümörler gibi, HCC hücreleri de şekillerini değiştirme, hareket için koşullar yaratma ve ayrıca çevre dokularına göç için yeniden şekillendirme mekanizmalarını etkinleştirebilir (Yang vd., 2011). Bireysel göçten toplu göçe geçişin, malign neoplazmların invaziv ve metastatik potansiyelini artırmaya yönelik önemli bir adım olduğu bildirilmiştir (Clark & Vignjevic, 2015; Haeger vd., 2015; Krakhmal vd. 2015).

## **Apoptoz**

Apoptoz, en kısa tanımlama ile programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanabilir. Apoptoz, ATP kullanan, enzimler tarafından gerçekleştirilen, genetik olarak programlanmış, organizmanın artık ihtiyacı olmayan hücrelerde meydana gelen ve organizmayı tehdit etmeyen bir olaydır (Sperandio vd., 2000).

Çok hücreli organizmalarda normalde, hücre ve dokularda hücre proliferasyonu ve hücre ölümü bir dengededir. Apoptoz denilen bu hücre ölümü, hücre gelişimi ve sağlığı için önem arz etmektedir ve belirli yollar üzerinden gerçekleşir. Bu yollar intrinsik yolk ve ekstrinsik yolk olmak üzere iki ana yolağa ayrılır ve her iki yolkta da kaspaz enzimlerinin aktivasyonu görülmektedir. Bu iki yolk dışında CD8+ T hücrelerinin görev aldığı bir başka yolk daha bulunmaktadır (Renehan vd. 2001).

Intrinsik yolk, hücre içersinden meydana gelen değışiklikler veya anomalilerden dolayı aktive olan bir yoldur. Hücre içinden gelen bu uyarıcılara örnek olarak x-ray veya UV ışığa maruz kalmaktan dolayı DNA hasarı, kemoterapötik ajanlar, hipoksiya, yanlış katlanmış proteinler gibi örnekler verilebilir.

Hücre bir stres altına girdiği zaman, mitokondriden sızan sitokrom c, kaspazların aktive olmasını sağlar. Ayrıca Bcl-2 ve TP53 gen ailesine ait proteinler de bu yolağı düzenler.

Ekstrinsik yolk, hücre dışından genellikle başka bir hücre veya hücrelerden gelen ölüm sinyali tarafından tetiklenen bir yoldur. Bu yolağın aktivitesi, hücre reseptörlerine ve bu reseptörlere bağlanan ligandlara bağlıdır. Hücre yüzeyinde bulunan reseptörlere gelip bağlanan ligandlar ölüm sinyalini oluşturur ve hücrenin programlı ölümü için yolağı aktive eder. Bu yolkta da kaspaz 8 enzimler daha çok görev yapmaktadır.

Sitotoksik CD8+ T-Hücre aracılı yolkta, CD8+ T hücreleri perforinler salgılayarak hedef hücrede bir delik oluşturur. Ardından diğer CD8+ T hücreleri bu açılan delikten girebilen granzim salgılayarak kaspazları aktive eder.

Kaspazlar, proteaz grubu enzimlerdendir. Apoptotik cevaba karşı birinci dereceden etkili olan protein grubudur. Genel olarak iki gruba ayrılırlar. Birinci grup başlatıcı kaspazları, ikinci grup efektör kaspazlardan oluşur. Başlatıcı kaspazlar

grubu, kaspaz-2, kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-10, kaspaz-11 ve kaspaz-12'den oluşur. Efektör kaspazlar grubu ise kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'den oluşur.

Aktive olmuş başlatıcı kaspazlar, efektör kaspazların aktive olmasını sağlar. Aktif olan efektör kaspazlar, hücre içerisinde çeşitli proteinlerin parçalanmasını sağlayarak, hücre ölümünü başlatırlar. Tüm kaspaz proteinleri içerisinde en sık aktif halde olan ve en önemli hücre proteinlerin parçalanmasını sağlayan ise kaspaz-3'tür (Renehan vd. 2001).

### ***Karaciğer Kanserinde Apoptoz***

Apoptoz programı, hepatokarsinogeneze karşı en belirgin savunma mekanizmasını oluşturur. HSK hüclerinde BAX ve BAK proteinleri apoptoz için önemli bir rol oynar. BAX ve BAK tarafından kontrol edilen apoptoz mekanizması, kaspazların aktif hale getirilmesi ile hücrede apoptozu başlatır (Eskes vd., 1998).

Buna karşın BAX ve BAK aktivitesi ile ilişkili olan ve daha çok apoptozu önlemek için görev yapan BCL-2 proteini tarafından, BAX ve BAK proteinlerinin aktivitesi engellenebilir ve hücre apoptoza girmeyebilir. Hepatositlerin genomik bütünlüğünü korumada BCL-2 proteinleri önemli bir rol oynarlar (Ichim vd., 2015).

BAX aktivitelerin engellenmesi ve p53 proteinindeki değişiklikler, HSK'nın ortak bir özelliğidir ve hastalığın ilerlemiş aşamalarında gözlenir (Farazi & DePinho, 2006). Ayrıca, kaspazların inhibisyonu da HSK'de yaygındır. Proapoptotik proteinlerin veya kaspazların inhibisyonuna ek olarak, hayatta kalma genlerinin yanı sıra hayatta kalma yollarının aktivasyonu karaciğer kanseri gelişimine ve ilerlemesine katkıda bulunur (Moreno-Caceres & Fabregat, 2015).

Çok sayıda HCC hastasında saptanan belirgin bir moleküler değişiklik, NF- $\kappa$ B yoludur (Locatelli vd., 2013). Hepatositlerde, NF- $\kappa$ B temel olarak örneğin oksidatif strese yanıt olarak kronik hasar sırasında hayatta kalmaya aracılık ederken, baskılama malign dönüşüme katkıda bulunur. Tümör nekroz faktörü- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) ve interlökin-6 (IL-6), bu yolu indükleyen başlıca inflamatuvar sitokinler arasındadır.

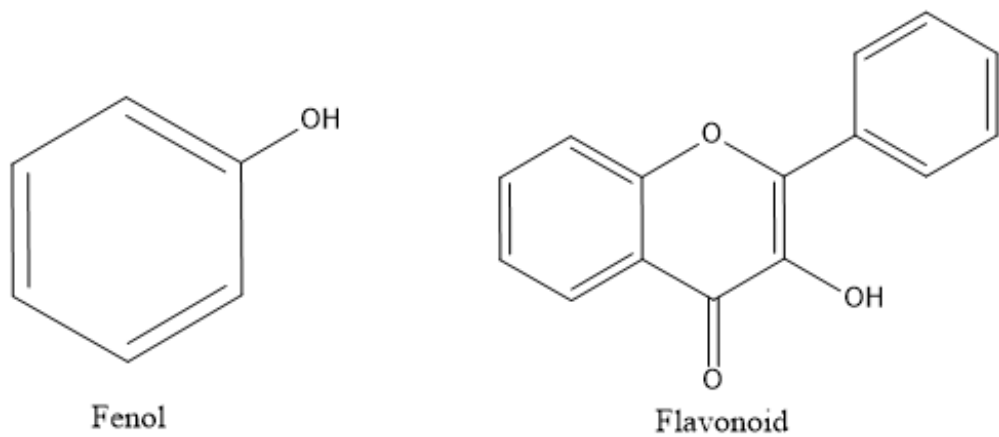
Kronik karaciğer hastalığı sırasında sitokinlerin yanı sıra hayatta kalma yollarının düzensizliği de dahil olmak üzere, kritik hücre ölümü işlevine sahip geniş bir molekül yelpazesinin dengesizliği HSK tümörlerinin apoptozdan kaçmasına sebep olmaktadır.

## Fenolik Bileşikler

Moleküler yapısında fenol grupları içeren bileşiklere genel olarak fenolik bileşikler adı verilir. Fenolik bileşikler, meyve ve sebzeler dahil birçok bitkide bulunabilen bileşiklerdir. Bitkiler tarafından, şikimik asit ve fenilpropanoid yollarını kullanarak üretilen ikincil metabolitlerdir. Fenolik bileşikler çeşitli biyoaktif özellikler sergilemektedir. Bu biyoaktif özelliklerinin hastalık önleyici etkilerinden, tedavi edici etkilerine kadar birçok alanda faydaları bulunmaktadır. Genel olarak bitkilerde, hidroksil grupları üzerinden, bir veya birden fazla glikoz molekülleri ile birlikte bulunan bu bileşiklerdir. Ancak bazı durumlarda aromatik halka üzerindeki karbonlar ile glikoz molekülü arasında da bir bağ oluşabilmektedir (Yahia & Carillo-Lopez, 2019).

Buna bağlı, genel olarak fenolik bileşikler doğal olarak glikozidler olarak bitkilerde bulunmaktadır ve bu moleküller su veya organik çözücülerde iyi bir çözünürlüğe sahiptirler. Fenolik bileşikler ayrıca, karboksili asit, organik asitler, aminler, yağlar ve diğer fenolik bileşikler ile bir araya gelerek farklı moleküller de oluşturabilmektedir (Barba vd. 2014).

Şekil 4.  
*Fenol ve flavonoid yapı iskeletleri*



Fenolik bileşikler yapılarına ve içerdikleri halka sayısı ve yapısına göre sınıflandırılırlar. Fenolik bileşikler flavonoidler, fenolik asitler, tanenler, stilbenler ve lignanlar olmak üzere beş ana sınıfa ayrılırlar.

### ***Flavonoidler***

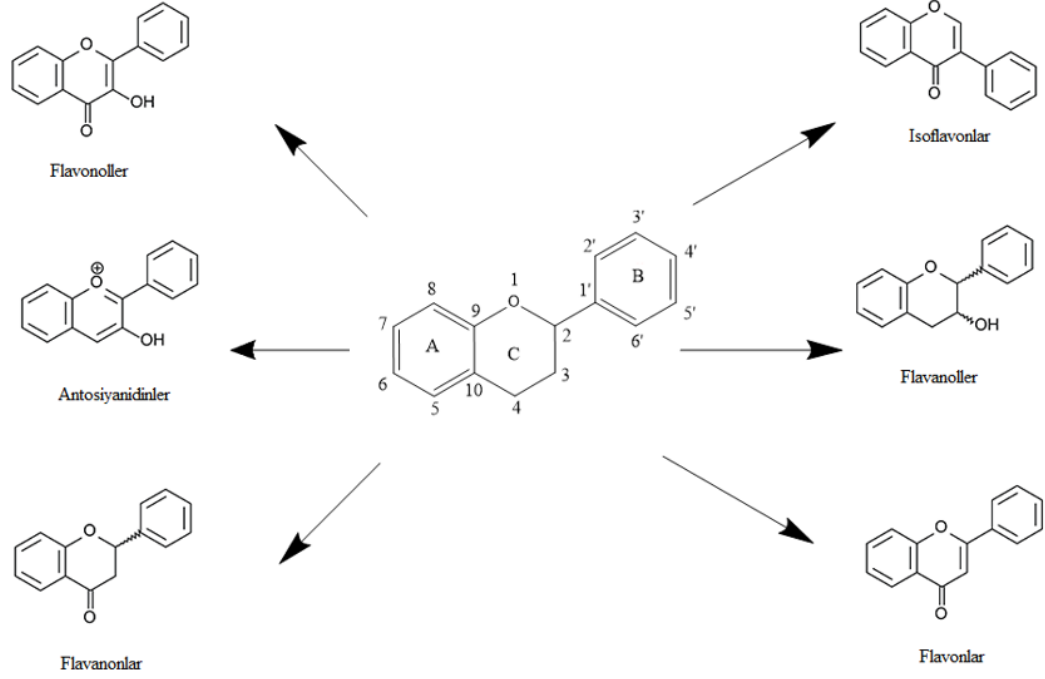
Flavonoidler, fenolik bileşiklerin en geniş ailesini oluştururlar. Bu bileşikler bitkilerde, hücre büyümesini düzenlemeden, çevresel etkilere karşı bitkilerin mücadele etmesine kadar birçok alanda bitkilerde görev almaktadırlar. İnsanlar tarafından diyetlerinde kullanıldıkları zaman sağlık açısından olumlu yönde önemli etkileri olmasının yanında, hastalıkları önleyici etkileri de bulunmaktadır (Kumar & Pandey, 2013).

Flavonoidler genel olarak altı alt sınıfa ayrılır. Bunlar;

- 1- Antosiyanidinler
- 2- Antoksanterinler
  - a. Flavonlar
  - b. Flavonoller
- 3- Flavanonlar
- 4- Flavanonoller
- 5- Flavanlar
  - a. Flavanoller
- 6- Isoflavonoidler

### Şekil 5.

*Flavonoid türevleri olan flavonol, izoflavonlar, antosiyanidinler, flavanonlar, flavonoller ve flavonların yapı iskeletleri*



### Antosiyanidinler

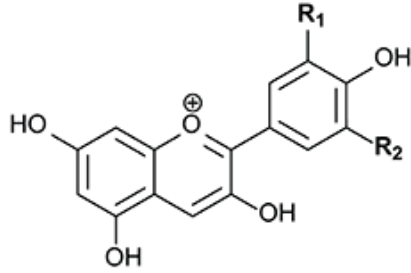
Antosiyanidinler genel olarak, antosiyaninlerin şeker bağlanmamış yapısı olarak bulunan bitki pigmentleridirler. Renkleri sulu çözeltilerindeki pH'a bağlı olarak genelde kırmızı, pembe, mavi ve mavimsi yeşil tonlardadır.

Antosiyanidinler polimetin boyaların ve flavonoidlerin alt sınıfını oluştururlar. Genel molekül omurgası aşağıdaki şekilde gösterilmiştir. Molekül üzerinde pozitif bir yük bulunmaktadır ve bu yük molekül etrafında hareket edebilmektedir. Bazı önemli antosiyanidinlerin isimleri ve fonksiyonel gruplarına bağlı molekül yapıları aşağıdaki şekilde fonksiyonel grupları ile birlikte gösterilmiştir (Khoo vd., 2017).



Şekil 6.

*Antosiyanidin iskeleti ve bazı antosiyanidinlerin fonksiyonel grupları*



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Siyanidin	OH	H
Delfinidin	OH	OH
Malvidin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Pelargonidin	H	H
Peonidin	OCH <sub>3</sub>	H
Petunidin	OCH <sub>3</sub>	OH

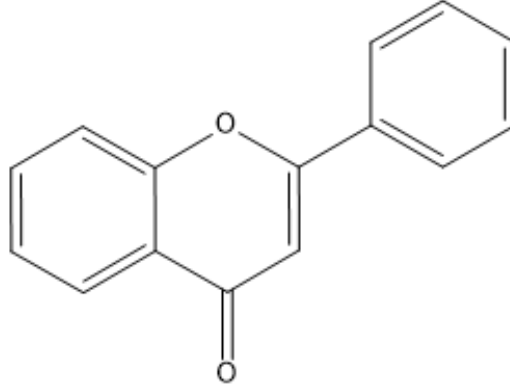
### Antoksaninler

Antoksaninler, flavonoidlerin bir alt sınıfıdır. Bu moleküllerin suda çözünebilir özellikler vardır. Genellikle sulu çözeltilerinin rengi, beyaz veya renksiz, krem veya sarı renklerdedir. Flavonlar ve flavonoller olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar.

#### *Flavonlar*

Flavon kelimesi Latince “Sarı” kelimesinden türemiş bir kelimedir. Genel olarak yiyeceklerde özellikle baharatlarda, sarı ve turuncu meyvelerde ve sebzelerde bulunmaktadır. En fazla rastlanan flavonlar; apigenin, tangeritin, luteolin , krisin ve hidroksiflavonlardır ("Flavonoids". Micronutrient Information Center, Linus Pauling Institute, Oregon State University, Corvallis,). Birçok ilacın vücuttaki metabolizmasını sağlayan CYP (P450) enzimlerinin aktivitesi üzerinde etkileri bulunmaktadır (Si vd., 2009).

Şekil 7.  
*Flavon kimyasal yapısının iskeleti*

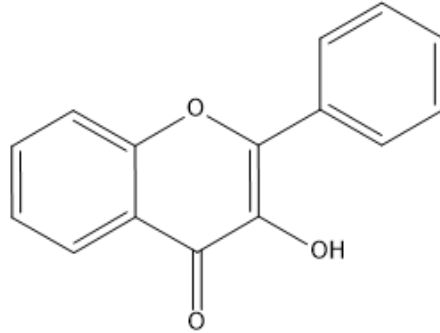


Flavon omurgası

### ***Flavonoller***

Flavonoller, 3-hidroksiflavon omurgasına sahip, flavonodilerin bir alt grubudur. Çeşitlilikleri fenolik –OH gruplarının farklı pozisyonlarda bulunmasından kaynaklanır. Flavonoller birim olarak kendi başlarına bulunabilmelerine rağmen, glikozit türevleri şeklide de bulunabilirler. Rhamnetin, isorhamnetin, kaempferol, kuersetin, kaempferid, 3-hidroksiflavon, azaleatin, fisetin, galangin, gosipetin, morin, mirisetin, natsudaïdain, pakipodol, rhamnazin çeşitli flavonollere örnek gösterilebilir. Flavonoller birçok sebze ve meyve türünde bulunmaktadır (Cermak vd., 2006; Pinelli vd., 2013).

Şekil 8.  
Flavonol bileşiklerinin kimyasal yapı iskeleti

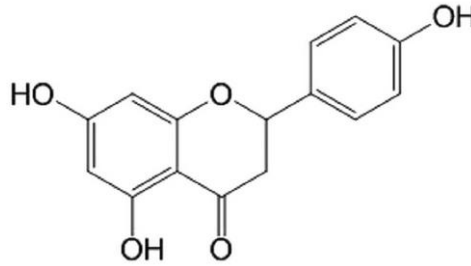


### Flavanonler

Flavanoidlerin alt grubu olan flavanonlar, bitkilerde sıklıkla glikozid halinde bulunurlar. Bu bileşikler flavondan türeyen aromatik, renksiz ketonlardır.

Blumeatin, butin, eriodikyol, hesperetin, hesperidin, homoeriodiktol, izokuranetin, naringenin, naringin, pinocembrin, ponsirin, sakuranetin, sakuranin, sterubin, pinostrobin bu bileşiklere örnek olarak gösterilebilir (Nibbs & Scheidt, 2012).

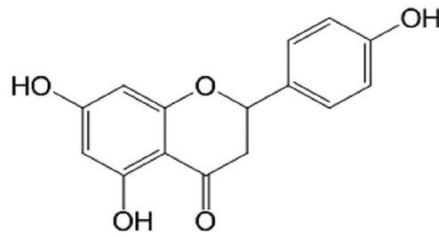
Şekil 9.  
Flavanon örneği olarak naringenin kimyasal yapısı



### Flavanonoller

Flavanonoller, flavanoidlerin alt grubudur. 3-hidroksi-2,3-dihidro-2-fenilkromen-4-on iskeletine sahip bileşiklerdir. Dihidrokuersetin, dihidrokaempferol ve dihidrokaempferol-3-rhamnosid bu bileşiklere örnek olarak gösterilebilir. Bu bileşikler de glikozidleri olarak bitkilerde bulunabilirler (Kun vd., 2008; Dokkedal vd., 2007; Yuan vd., 2004).

Şekil 10.  
Flavanonol örneği olarak taksifolin bileşiğinin kimyasal yapısı

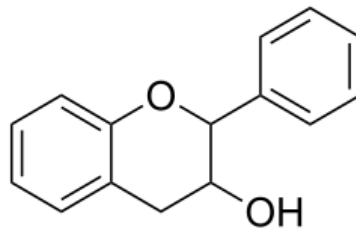


### Flavanlar

Flavanlar, fenolik bileşikler olan flavonoidlerin alt sınıfıdır. Bu sınıfta en önemli flavanlar, flavanoller olarak ön plana çıkmaktadır. Katekin, flavanollere örnek olarak gösterilebilir. Flavan-3-oller, flavan-4-oller ve flavaon-3,4-dioller olmak üzere flavanoller kendi içinde üç alt gruba ayrılır.

Şekil 11.

*Flavanlara örnek olarak flavan-3-ol bileşiğinin kimyasal yapısı*

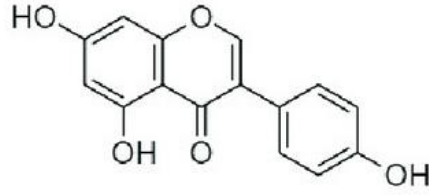


### Isoflavonoidler

İzoflavonoidler, flavonoidlerin alt sınıfıdır ve birçoğu biyolojik olarak aktif bileşiklerdir. İzoflavonoid alt sınıfına ait birçok molekül bulunmaktadır. Bu yüzden bu alt sınıf da kendi içerisinde gruplara ayrılır. İzoflavonoidler; izoflavonlar, izoflavanonlar, izoflavanlar ve retoniodler olarak alt gruplara ayrılabilirler. İzoflavonoidler, likuiritigenin veya naringenin yoluna bağlı olarak flavonoid biyosentez yolundan elde edilir. Bu bileşiklere örnek olarak genistein, daidzein örnek olarak gösterilebilir (Lorent vd., 2015).

Şekil 12.

*İzoflavonoidlere örnek olarak genisteinin kimyasal yapısı*



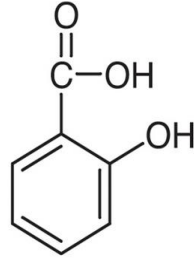
### ***Fenolik asitler***

Fenolik asitler, fenolik bileşiklerin bir alt grubudur. Bu bileşikler aromatik asit bileşikleri olara da bilinirler. Fenolik halka ile karboksil asit fonksiyonel grubunun birleşmesi sonucunda oluşur.

Bu bileşikler bitkilerde bulunur. Ancak bu bileşiklere bitkilere oranla daha fazla mantarlarda rastlanmaktadır. Bu bileşiklerin anti-tümör, anti-bakteriyel ve anit-oksidan özellikleri bulunmaktadır. Önemli fenolik asitlere, hidroksibenzoik asit ve hidroksisinamik asit örnek olarak gösterilebilir (Heleno vd., 2015).

Şekil 13.

*Hidroksibenzoik asit*



### ***Tanenler***

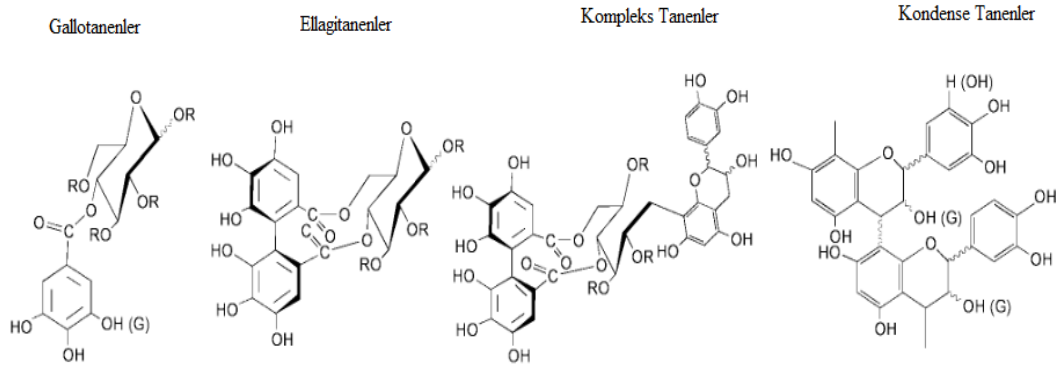
Tanenler, polifenolik biyomoleküllerin bir alt sınıfıdır. Proteinler ve diğer organik moleküller ile bağ yapabilme özellikleri vardır. Tanenler birçok bitki türünde (*Fagaceae* türlerinin %73'ünde, *Mimosaceae* türlerinin %39'unda, *Solanaceae* türlerinin %6'sında ve *Asteraceae* türlerinin %4'ünde) buna ek olarak bazı alglerde de bulunurlar (Mole, 1993). Bitkilerde, bitki büyümesine ve bitkinin pestisitler dahil bitkiye zarar verebilecek birçok etkenlerden korunmasında görev alırlar. Tanenlerin başlıca bulunduğu besinler, nar, çilek, böğürtlen, fındık ve çeşitli renkli meyvelerde ve sularında bulunurlar.

Tanenlerin moleküler ağırlıkları 500 dalton ile 20.000 dalton arasında değişkenlik gösterir. Tanenlerin yapılarının karmaşılığından dolayı sınıflandırılmaları

zor olmakla birlikte, dört alt sınıfa ayrılabilirler. Bunlar, gallotanenler, ellagitaninler, kompleks taninler ve kondense taninler (In Natural Product Reports, 2001).

Şekil 14.

*Tanen alt sınıfları ve molekül yapıları*



### ***Stilbenler***

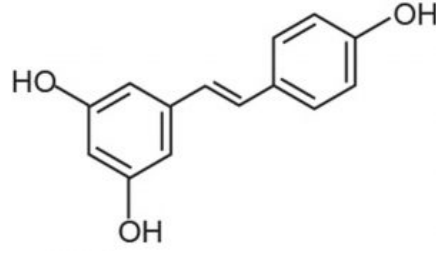
Stilbenler, ethanol veya etilen ile birleşmiş olan iki benzen halkası içeren fenolik bileşiklerdir. Stilbenler fenilpropadoin yolağına bağlı olarak biyosentezelen ve doğal olarak bulunan bileşiklerdir (Dutta vd., 2021)

Stilbenler, monomer ve oligomer olarak bulunurlar. Yapısal olarak hidroksil grupları bağlı 1,2-difeniletilen varlığı ile karakterizedirler. En bol miktarda bulunan ve üzerinde en fazla çalışma yapılan stilben trihidroksistilben iskeleti bulunan resveratroidir. Resveratrolün trans formunun konfigürasyonundan dolayı birçok alanda kullanılabilmesini sağlar (Vasantha vd., 2014). Resveratrol, fındık (*Arachis hypogaea*), üzüm (*Vitis vinifera*), çam (*Pinus* türleri) ve dut (*Morus* türleri) bulunur (Rauf vd., 2018).

Bazı stilbenlerin anti-oksidan, anti-inflmatuvar, vazoprotektif, anti-kanser ve anti-mikrobiyal önemli biyolojik özellikleri bulunmaktadır. Ayrıca karaciğeri koruyucu etkisi, Alzheimer hastalığını önleyici etkisi, glikoz ve trigliserid artışını inhibe edici özellikleri de bulunmaktadır (Flamini & De Rosso, 2019).

Şekil 15.

*Resveratrol*



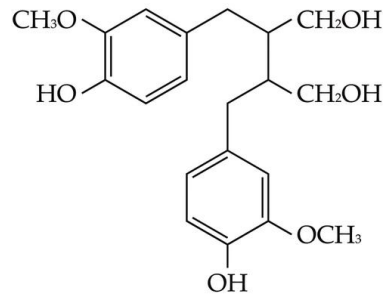
### ***Lignanlar***

Lignanlar, aynı fenilpropan birimlerinden meydana gelen dimerleşmiş doğal bileşiklerdir. Sesquiliglanlar, diliganlar ve neolignanlar olarak alt birimlere ayrılabilir. Genel olarak lignanlar yan zincirlerindeki  $\beta$ -karbonları arasında bir bağ oluşturarak iki birime sahip bileşiklerdir. Buna örnek olarak neolignanlar gösterilebilir. Buna karşın, sesquiliglanlar üç, diliganlar dört birime sahip moleküller olarak doğada bulunurlar.

Lignanların çeşitli biyoaktiviteleri vardır. Bu biyoaktiviteler arasında anti-tümör özellikleri göze çarpmaktadır. Bu bağlamda, birçok kanser türünde (lösemi, akciğer kanseri, meme kanseri, kolon kanseri, fibro karsinom, nazofarengeal karsinom vb) anti-tümör etkileri bulunmaktadır.

Şekil 16.

*Lignanların Kimyasal Yapısı*



### ***Cynara cornigera L.***

*C. cornigera L.* bitkisi, *Astreceae* ailesine ait bir bitkidir. Bu bitki yaklaşık 30 cm boyunda, bodur, çok yıllık, çok sayıda taban yaprağı olan, dikenli bir çiçeğe sahip bir bitkidir. Çiçek başı yaklaşık 5 cm kadar olup, kirli beyaz rengindedir. Kış sonundan itibaren de toplanabilmeye başlanıp, ilkbahar sonuna kadar toplanmaya devam

edilebilir. Ancak en uygun toplanma dönemi özellikle Nisan ve Mayıs aylarındadır (Wiklund, 1992).

Kıbrıs'ta halk arasında "Hostes", "Gafurez", "Gafgarıt", "Diken Otu" olarak bilinmektedir. Kıbrıs'ta halk tarafından diyetlerinde bitkinin çeşitli kısımları kullanılmaktadır. Başta yaprak sapları olmak üzere, çiçek kısmı da halk tarafından kullanılmaktadır. Ayrıca çiçek kısmının karaciğer hastalıklarına iyi geldiği yönünde halk arasında bilinen bir olgu olmasından dolayı, karaciğer rahatsızlığı yaşayan kişiler diyetlerinde bu bitkiyi kullanmaktadırlar.

Şekil 17.

*Cynara cornigera* L. bitki fotoğrafı (Saxifraga, Jan van der Straaten)



### ***Cynara cornigera* L. Coğrafik Dağılımı ve Habitatı**

*C. cornigera* L. bir Doğu Akdeniz bitki türü olarak anılmaktadır. Yunanistan adalarında, Kıbrıs'ta, Libya ve Mısır'ın Akdeniz'e olan sahil bölgelerinde ve Türkiye'nin Akdeniz'de bulunan adalarında görülen bir bitkidir. Deniz seviyesinden başlayarak 450 m yükseklikteki yerlere kadar görülebilen bitki, kalkerli toprağın kayalık veya çakıllık alanlarda bulunabilmektedir (Wiklund, 1992).



Kıbrıs adasının, özellikle yüksek dağlık alanlar ve kumluk alanlar içeren bölgeler hariç, hemen hemen büyük bir kısmında *C. cornigera* L. bitkisine rastlanmaktadır (Wiklund, 1992).

Şekil 18.

*Cynara cornigera* L. bitkisinin Kıbrıs'ta bulunduğu bölgeler. (Hand, 2021 )



### *Cynara cornigera* L. Taksonomisi

Tablo 1.

*C. cornigera* L. Taksonomisi (J. Sibthorp & J. Lindley, *Fl. graec.* 10:74. 1840)

Taksonomi Sırası	Bilimsel Sınıfı
Alem	Plantae
Şube	Tracheophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Takım	Asterales
Aile	Asteraceae
Cins	Cynara
Tür	<i>Cynara cornigera</i>

### *Cynara cornigera* L. Fitokimyasal İçeriği

*C. cornigera* L. bitkisinin fitokimyasal olarak analizi farklı farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Genel olarak bu çalışmalarda, fitokimyasal içerik analizi için yapılan ekstraksiyon sırasında çeşitli polaritede olan çözücüler (metanol, etanol, etil asetat, petrolium eter, su) kullanılmıştır. Aşağıdaki tablolarda (Tablo 2,3 ve 4) *C. cornigera* L. bitkisinin literatürde bulunan, fitokimyasal içeriği verilmiştir. Bu tablolar daha önceki çalışmalarda, *C. cornigera* L. bitkisini tümünün veya bitkinin herhangi bir parçasının analiz edilmesi sonucu elde edilen tüm verilere dayanılarak hazırlanmıştır.

Tablo 2.

2012 yılında Elsayed vd. tarafından yayınlanan araştırma sonuçlarına göre *Cynara cornigera* L. içeriğinde bulunan bileşikler

B/N	Bileşik İsmi
1	Luteolin-7-O-glukozid
2	Apigenin-7-O-glukozid
3	Luteolin-7-O-ramnoglukozid
4	Grosheimin
5	Solstitalin A

Tablo 3.

2015 yılında Hegazy vd. tarafından yayınlanan araştırma sonuçlarına göre *Cynara cornigera* L. içeriğinde bulunan bileşikler

B/N	Bileşik İsmi
6	Gallik asit
7	Pirogallik
8	Klorojenik asit
9	Resorsinol
10	Kateşin
11	p-Hidroksi benzoik asit
12	Luteolin-3-metoksi-7-rutinosit
13	Kafeik asit
14	Vanillin
15	Ferulik asit
16	Rutin
17	Fenol
18	p-kumarik asit
19	Luteolin
20	Kuersetin

21	Salisilik asit
22	Apigenin
23	Öjenol
24	5,7-Dihidro 4 metoksi izoflavon
25	Krizin

Tablo 4.  
2016 yılında El Sohafy vd. tarafından yayınlanan araştırma sonuçlarına göre *Cynara cornigera L.* içeriğinde bulunan bileşikler

B/N	Bileşik İsmi
26	$\beta$ -sitosterol glikozit
27	Apigenin 7-O- $\beta$ -D-glukopiranozid
28	Luteolin-7-O- $\beta$ -D-glukopiranozid
29	Apigenin-7-O-rutinosid
30	Sinarin 1,5-di-O-kafeoilkinik asit
31	Apigenin-7-O- $\beta$ -D-glukuronid

#### *Cynara cornigera L.* Bileşiklerinin Kansere Üzerine Etkileri

Literatürde bulunan daha önceki çalışmalara bağlı olarak *C. cornigera L.* bitki içeriğinde anti-kanser özellik gösterebilen bileşikler olduğu tespit edilmiştir. Bu bağlamda bu bileşiklerin çeşitli kanser hücrelerindeki etkinlikleri literatürde araştırılmıştır. Ancak bu bitkinin içeriği ile ilgili çok fazla çalışma olmadığından dolayı bitki içeriğindeki bileşikler, literatürde bulunandan daha fazla olduğu düşünülmektedir.

#### *Kuersetin ve türevlerinin Kansere Üzerine Etkisi*

Kuersetin iki halde bulunabilmektedir. Kendi başına ve diğer moleküllerle birleşerek aglikon şeklinde bulunabilmektedir. Kuersetin, karbonhidratlar, lipidler, alkoller ve ayrıca sülfat grupları ile birleşerek kuersetin glikosid, kuersetin etherleri ve kuersetin sülfatları oluşturabilmektedir (Panche vd., 2016).

Kuersetinin anti-kanser özelliği ile ilgili önemli miktarda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda, çeşitli kanser türlerindeki çeşitli yolaklar üzerinde kuersetinin etkileri araştırılmıştır. Elde edilen verilere bakıldığında zaman zaman kuersetin biyoaktif molekülünün pankreas, yumurtalık, prostat, kolorektal, böbrek, meme kanseri ve akciğer kanseri üzerinde olumlu etkisi olduğu saptanmıştır (Vafadar vd., 2020).

Kuersetin sağlıklı hücreler için hiçbir zararlı etkisi yoktur. Kansere hücreleri üzerinde kuersetinin çeşitli mekanizmalar aracılığı ile sitotoksik etkileri mevcuttur (Vargas & Burd, 2010).

### *Apigenin ve türevlerinin Kansere Üzerine Etkisi*

Apigenin, kimyasal olarak 4',5,7-trihidroksiflavon olarak adlandırılan, flavon alt sınıfına ait olan, üzüm, elma gibi meyvelerde, maydanoz gibi sebzelerde ve şarap gibi içeceklerde bolca bulunan bir flavondur. Apigenin anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-oksidan, anti-inflamatuvar, anti-viral özelliklerinin yanında kan basıncını düşürücü özelliği yıllardır geleneksel tıp tarafından bilinmektedir (Yan vd., 2017).

Bu özelliklerine ek olarak tümör gelişimini engelleyici etkisi bulunmaktadır. 1986 yılında Birt ve arkadaşları tarafından apigeninin anti-kanser özellikleri olduğu tanımlanmıştır ve bu yıldan sonra yapılan birçok araştırmada çeşitli kanser türleri ve yollarında bu bileşiğin anti-kanser özellikleri in-vitro olarak hücre hatlarında ve in-vivo olarak hayvan modellerinde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Birt vd., 1986).

Apigenin; osteosarkoma, prostat kanseri, melanoma, akciğer kanseri, karaciğer kanseri, meme kanseri ve kolorektal kanser üzerinde anti-kanser özelliği gösterilmiş olan bir bileşiktir (Xu vd., 2016; Huang vd., 2016; Lee vd., 2016; Zhao vd., 2017; Gupta vd., 2002; Angulo vd., 2017).

## BÖLÜM III

### Gereç ve Yöntem

#### Bitki Materyalleri

Bitki örnekleri Mayıs 2018 tarihinde Akdoğan, Kuzey Kıbrıs'ta toplanmıştır. Toplanan bitki örnekleri Yakın Doğu Üniversitesi Herbaryum'u tarafından tanımlanmış ve NEUN6893 kodu ile saklanmaktadır.

#### Ekstraksiyon ve Fraksiyonlara Ayırma

300gr numune (çiçek) toz edilip metanol (MeOH) ile 7 gün boyunca arada çalkalanarak muamele edildi. Ekstre süzüldü ve Rotary Evaporatör (Buchi® (Model: R-210 / Water Bath: B-491 model / Vacuum Pump: V-700 model / Vacuum Pump Control Panel: V-850 model and Water Coolant: Thermo EZ Cool 80) ile kuruluğa kadar uçuruldu.

Numune 100ml diklorometan (DCM, Merck, 1.06009.2500) ve 250 ml distile H<sub>2</sub>O ile çözülüp ayırma hunisine alındı. İlk faz ayırımı için 24 saat beklendi. 100 ml DCM ve 50 ml DCM eklenerek faz ayırımı işlemi 3 kez yapıldı. Her iki faz da (DCM ve su fazları) ayrı ayrı darası alınmış balonlarda yoğunlaştırıldı. DCM fazı kuruluğa kadar uçuruldu. Su fazı kuruluğa kadar uçurulup tartım yapıldı. Kuru örnek 100 mL hacme sahip olacak şekilde distille su içerisinde çözüldü.

Poliamid kolon ; 75g poliamid , 800ml su ile 24 saat magnetik karıştırıcı ile karıştırılması ve kolona aktarılması sonucunda hazırlandı. ( 75g [(Fluka Polyamids) 5-10 mikrometre ] R=3cm h = 41cm ) 100 mL olacak şekilde ayarlanan su fazı çözültisi kolona yüklendi. Kolonda ayırma %100 H<sub>2</sub>O kullanılarak başlandı, daha sonra yürütücü fazda MeOH kullanılarak, yürütücü fazın polaritesi gradiyent bir şekilde azaltılarak en sonda yürütücü faz olarak %100 MeOH'e ulaşılmıştır. Toplamda her biri 50 mL olan 38 fraksiyon elde edilmiştir. 38 fraksiyon ince tabaka kromatografisi (ITK, TLC Silica Gel 60 F254, Merck, 1.05554.0001) ile kromatografik olarak 3 tatbik yapılarak görüntülendi. ITK sonuçlarına göre fraksiyonlar birleştirildi. Birleştirilen fraksiyonlar kuruluğa kadar evaporatörde uçuruldu. Balonun dibinde oluşan katı örnekler eser miktarda çözücü ile çözülerek flakonlara koyularak, donmaları için dondurucuya kaldırıldı. Donan fraksiyonlara ait

flakonlar liyofilizatörde (Christ® - Model: Alpha 1-4 LD plus) liyofilize edildi. Elde edilen liyofilize katı örnekler LC – MS/MS ve sitotoksosite analizine gönderildi.

### ***C. cornigera* L. Çiçek Ekstraktlarının Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LS-MS/MS) Analizi**

LC-MS/MS analizi Absciex 3200 Q tutucu MS / MS dedektörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneyle, negatif iyon modunda çalışan, elektrosprey iyonizasyon kaynağı ile donatılmış, Applied Biosystems 3200 Q-Trap LC MS/MS cihazına bağlı bir Shimadzu 20A HPLC sistemi ile gerçekleştirilmiştir.

Kromatografik ayırma için, 40°C'de çalışan 250 x 4.6 mm, 5 µm parçacık büyüklüğü olan, GL Science Inertsil ODS - 3 kolon kullanılmıştır. Solvent akış hızı 0.5 ml/dk'da tutulmuştur. İçerik tespiti photo-diode array (PDA) dedektörü ile yapılmıştır.

Gradyan elüsyonu mobil fazlar içermektedir: (A) metanol:su:formik asit (10:89:1,v/v/v) ve (B) metanol:su:formik asit (89:10:1, v/v/v). B bileşimi 40 dakikada %10'dan %100'e çıkarılmıştır. LC-ESI-MS/MS verileri, Analyst 1.6 yazılımı tarafından toplanmış ve analiz edilmiştir.

### **Reaktifler ve Uygulamaları**

Ekstraksiyon sonucu elde edilen fraksiyonlar, Dimetil Sülfoksit (DMSO, Biomatik, A2424-500ML) içerisinde çözdürülmüştür. Fraksiyonlar kullanılacağı zaman , RPMI-1640 (Capricorn Scientific, RPMI-A) vasat ile dilüe edilmiştir. Etkin dozun belirlenmesi için hücrelere farklı konsantrasyonlardaki (5, 10, 25, 50 ve 100 µM) 10 fraksiyon ayrı ayrı uygulanmıştır. DMSO oranı %0.05'ten fazla olmayacak şekilde konsantrasyonlar ayarlanmıştır.

### **Hücre Hattı ve Hücre Kültürü**

Bu çalışma için, insan hepatoselüler karsinom hücre hattı olan (HepG2, ATCC® HB-8065™) hücre hattı kullanılmıştır. HepG2 hücreleri vasat içerisinde % 10 ısı ile inaktive edilmiş Fetal Sığır Serum (FSS, Capricorn Scientific, FBS-HI-11B)%1 penisilin-streptomisin (Capricorn Scientific, PS-B) ve % 1 L-glutamin

(Capricorn Scientific, GLN-B) ile hazırlanmıştır. 37 °C ve %5 karbondioksit (CO<sub>2</sub>) olan nemli ortamda hücreler kültüre edilmiştir. Kültüre edilmiş hücreler konfluent duruma ulaştığında, %0.25 triptisin-EDTA (Capricorn Scientific, TRY-1B) solüsyonu kullanılarak sub-kültür edilmiştir.

### **Hücre Açma Protokolü**

-80 °C dondurucuda bulunan viyal, 37 °C'lik su banyosunda ısıtılarak çözündürüldü ve açılacak flask sayısına göre her flaska 2ml vasat olacak şekilde hesaplanmak kaydı ile toplam vasat, 15ml'lik falkon içerisine koyulur ve viyal falkon içerisine eklenir. Hücreler santrifüjde 1000 rpm'de 5dk boyunca santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında süpernatant atılır. Süpernatantın atılmasından sonra sadece hücrelerin bulunduğu falkon tüp içerisine her flaska 2ml vasat olacak şekilde eklenen toplam vasat ile alt-üst edilir. Her flaska 2ml gelecek şekilde falkon içerisine eklenmiş toplam vasat ile iyice alt-üst edilmiş süspansiyon, daha önceden 3ml vasat eklenmiş olan flasklara, her flaska 2ml eklenecek şekilde eklenir. Flasklarda toplam 5ml vasat ile meydana gelen süspansiyon 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> ortamda inkübasyona bırakıldı.

### **Hücre Pasajlama Protokolü**

Hücreler, buldukları ortamda %80 hücre yoğunluğuna ulaşmalarının ardından pasajlanmaları gerçekleştirilmiştir. Pasajlama işlemine, ilk olarak flasklarda bulunan hücrelerin üst vasatları toplanarak başlandı. Üst vasat toplandıktan sonra flaska 2.5 mL Tripsin-EDTA (Capricorn Scientific, TRY-1B) eklendi ve 10 dk boyunca 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Pasajlama işleminin başında toplanan üst vasat ile birlikte Tripsin-EDTA eklenerek inkübasyona bırakılan hücrelerin olduğu süspansiyon birleştirip, 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Santrifüj sonucunda falcon tüpün dibinde kalan hücrelerin üzerine 2 ml vasat eklenip, homojen bir karışım olması için alt üst edilerek karıştırılmıştır. Hücrelerin pasajlanması 1:2 olacak şekilde tasarlandığı için 2ml vasat eklenerek oluşturulan hücre-vasat süspansiyonundan, her flaska (toplam 2 flask) 1 ml

gelecek şekilde süspansiyondan aktarım gerçekleştirildi ve her flask üzerine 4 mL vasat ilave edilerek, 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır.

### **Hücre Dondurma Protokolü**

Dondurma işleminin belirli basamakları pasajlama işlemi ile benzerlik gösterir. İlk olarak flasklarda bulunan hücrelerin üst vasatları toplandı. Üst vasat toplandıktan sonra flaska 2.5 mL Tripsin-EDTA (Capricorn Scientific, TRY-1B) eklendi ve 10 dk boyunca 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Pasajlama işleminin başında toplanan üst vasat ile birlikte Tripsin-EDTA eklenerek inkübasyona bırakılan hücrelerin olduğu süspansiyon birleştirip, 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Dondurma solüsyonu hazırlanır. Bu solüsyon, 1:9 oranında DMSO ve FBS'den oluşmaktadır. Bir viyal için, 1 mL dondurma solüsyonu (200 µL DMSO, 800 µL PBS) hazırlanır. Hücreler dondurma solüsyonuna eklenir eklenmez -80 °C'de dondurulmak üzere derin dondurucuya kaldırılır.

### **Hücre Canlılığı ve Hücre Büyümesi Analizi**

Sitotoksisite analizi, MTT testi (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Glentham Life Sciences, 471OVO) ile değerlendirilmiştir. Fraksiyonlar DMSO ile çözülmüştür.. Fraksiyonlar kültür vasatı ile dilue edilerek ayrı ayrı her fraksiyon için beş farklı konsantrasyon ( 5, 10, 25, 50 ve 100 µM) için hazırlanmıştır. Tüm fraksiyonlar için DMSO konsantrasyonu %0.05'ten az olacak şekilde ayarlanmıştır. HepG2 hücreleri toplanarak vasat içerisinde süspansiyon edilmiş ve 96 kuyucuklu hücre kültürü kabına her bir kuyucuğa  $5 \times 10^3$  yoğunluktaki hücre olacak şekilde ekilmiştir. Negatif kontrol satırı hiçbir fraksiyonu içermezken, pozitif kontrol satırı sadece ekilmiş hücreleri içermekteydi ve tümü 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, 10 µL MTT solüsyonu her bir kuyucuğa eklenmiş ve 4 saat boyunca 37 °C ve %5 CO<sub>2</sub> ortamında bekletilmiştir. Kuyucukta 25 ul kalacak şekilde vasat ve MTT çözeltisi karışımı atılır. Sonra, formazan kristallerini çözdürmek için 50 µL DMSO eklenmiştir. 15 dk beklenip, absorbanslar 570nm'de spektrofotometre (VersaMax, Molecular Device, Sunnyvale, USA) ile ölçülmüştür. Tüm deneyler, her fraksiyon için üç kez yapılmıştır.



### **Hücre Fiksasyon Protokolü**

Tablet kullanılarak hazırlanacak PBS çözeltisi, her 100 cc suya bir tablet PBS kullanılarak hazırlanır. Fiksasyon işlemi için gerekli olan bir diğer gerekli çözelti paraformaldehit çözeltisidir. Bu çözelti de %4 konsantrasyonda PBS kullanılarak hazırlanır. Fiksasyon işlemi için fikse edilecek hücrelerin bulunduğu ortamdaki üst vasat atılır ve üzerine PBS ilave edilir. Bir süre beklendikten sonra eklenen PBS çekilerek üzerine PBS kullanılarak hazırlanmış %4 paraformaldehit çözeltisi eklenip, inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrasında eklenen paraformaldehit çözeltisi de toplanarak atılır. Tekrardan hücrelerin üzerine PBS çözeltisi eklenerek +4 °C’de hücreler muhafaza edilir.

### **İmmünohistokimya**

Hücreler, Fosfat Tamponlu Tuz (Phosphate Buffered Saline, PBS) çözeltisi içinde %4’lük paraformaldehit (Sigma-Aldrich, STBH3693) ile 30 dakika boyunca 4 °C’de fikse edilmiştir. PBS ile yıkandıktan sonra, hücre geçirgenliğini artırmak için hücrelere %0.1 Triton X-100 (Sigma, 9002-93-1) eklenerek 15 dakika boyunca bekletilmiştir. HepG2 hücreleri PBS ile yıkanmış ve endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için hücreler oda sıcaklığında, 5 dakika boyunca %3 hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Riedel-de Haën, 70570) ile inkübe edilmiştir. PBS ile üç kere 5’er dakika yıkama yapıldıktan sonra, bloklama solüsyonu eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Bloklama solüsyonu uzaklaştırıldıktan ve PBS ile tekrardan yıkandıktan sonra hücreler, primer antikorlar olan Wnt11 (Elabscience, E-AB-10836), Wnt3a (St John’s Laboratory, STJ115662), Stat3 (St John’s Laboratory, STJ27462), Jak2 (St John’s Laboratory, STJ90945) ve  $\beta$ -catenin (Proteintech, 51067-2-AP) ile bir gece boyunca 4 °C’de inkübe edilmiştir. PBS ile tekrar yıkama işlemi yapıldıktan sonra (üç kere 5’er dakika), hücreler biotinlenmiş sekonder antikor (Protein Novex Life Technologies, 1666262A) ile 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. 100  $\mu$ l Horseradish Peroksidaz (HRP)-Streptavidin kompleksi (Protein Novex Life Technologies, 1666262A) kültüre edilmiş hücrelere eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra, hücreler PBS ile yıkanmış ve immünohistokimyasal reaksiyonun görülürülüğünü saptamak için hücrelere Diaminobenzidin (DAB, ScyTek Laboratories, ACK125eklenerek) 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir. DAB, destile su ile yıkanmış ve hücrelere artalan

boyanmasını sağlması için Mayer's Hematoksilen solüsyonu 5 dakika boyunca uygulanmıştır. Daha sonra, kapatma vasatı (Merck Millipore, 107961, Germany) ile kapatılmıştır. Tüm örnekler, ışık mikroskobu (Olympus CX31, CX31RTSF) kullanılarak değerlendirilmiştir. Wnt11, Wnt3a, Stat3, Jak2 ve  $\beta$ -catenin boyanmaları, yarı kantitatif olarak Histolojik-Skor (H-Skor) kullanılarak derecelendirilmiştir. Aşağıdaki denkleme göre hesaplama yapılmıştır. H-Score =  $\sum_{i=1}^n (i + 1) \cdot \pi$ . Denklemdaki i, boyanmanın yoğunluğunu (intensity) göstermektedir. i:1,2 ve 3 (sırasıyla, zayıf, orta, güçlü) değerlerini alabilmektedir. Bunlara ek olarak  $\pi$  ise, her yoğunluktaki boyanmış hücrelerin yüzdesini göstermektedir. (%0 ve %100 arasında değişen.)

### **İstatistiksel Analiz**

Veriler ortalama +- standart sapma olarak ifade edilmiştir. Bulgular Graphpad Prism 8 ve SPSS 18.0 programları ile analiz edilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıkları tespit etmek ve sürekli verilerin çoklu gruplar arasında karşılaştırılması için Tek Yönlü Varyans Aanalizi (One Way Analysis of Variance, ANOVA) kullanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık bulunduğu, ikili karşılaştırmalar için post-hoc testi olarak Tukey testi uygulanmıştır.

## BÖLÜM IV

### Bulgular

#### *C. cornigera* L. Ekstraksiyon, Fraksiyonlama İşlemi Bulguları

*Cynara cornigera* L. bitkisinin 300 gr çiçek kısmı 700 mL metanol ile ekstrakte edildi. Ekstrenin evaporasyonu sonucunda 18.7 g kuru ekstre elde edildi.

Kuru ekstre distile su ile çözülerek üzerine DCM ilave edilerek DCM/H<sub>2</sub>O karışımı elde edildi ve karışıma alt üst edilerek iyice karışması sağlandı. Ayırma hunisi yardımı ile DCM ve su fazları birbirinden ayrıldı. DCM fazı klorofil ve türevleri içerdiğinden dolayı çalışmaya dahil edilmedi. Su fazı kuruluğa kadar uçuruldu ve 8.7 g kuru ekstre elde edildi.

Su fazından elde edilen kuru ekstre, poliamid kolona yüklenmek için 100 mL distile su içerisinde çözdürüldü.

Önceden şartlandırılmış poliamid kolon üzerine eklenen çözelti, gradiyent olarak polaritesi değiştirilen yürütücü ile (100:0 H<sub>2</sub>O-MeOH ; 0:100 H<sub>2</sub>O-MeOH) yürütülerek, her fraksiyon 50 mL olacak şekilde fraksiyonlama işlemi yapıldı. 50 mL fraksiyonları toplamadan önce, şartlandırılmış kolon içerisindeki yürütücünün toplanması aşamasında 0. fraksiyon olarak 200 mL ayrı bir fraksiyon elde edilmiştir. Fraksiyonlama işlemi sonucunda toplam bir tane 200 mL ve 38 tane 50mL fraksiyon elde edildi.

Elde edilen tüm fraksiyonlar kaba içerikleri ITK kullanılarak, tespit edildi. ITK kullanılarak elde edilen veriler doğrultusunda benzer içeriğe sahip fraksiyonlar birleştirildi.

Fraksiyon 0 ve fraksiyon , ITK sonuçlarına göre içeriğinde herhangi bir madde tespit edilmedi. Aşağıdaki tabloda ITK sonuçlarına göre farklılık ve benzerlik gösteren fraksiyonlar ve benzerlik gösteren fraksiyonların birleşimleri gösterilmiştir.

Tablo 5.  
*Fraksiyonlar ve Birleştirilmesi*

Birleştirilen Fraksiyonlar	Birleşmiş Fraksiyon
Fr. 2	Fr. A
Fr. 3	Fr. B
Fr. 4 + Fr.5 + Fr. 6	Fr. C

Fr. 7 + Fr.8	Fr. D
Fr. 9 + Fr. 10 + Fr. 11	Fr. E
Fr. 12 + Fr. 13	Fr. F
Fr. 14 + Fr. 15	Fr. G
Fr. 16 + Fr. 17	Fr. H
Fr. 18	Fr. I
Fr. 19 + Fr. 20	Fr. J
Fr. 21 + Fr. 38	Fr. K

Birleştirilen fraksiyonlar evaporatörde kuruluğa kadar uçuruldu. Balon içerisindeki kuru örnekler liyofilize işlemi için flakonlara aktarıldı. Fr. K haricindeki tüm fraksiyonlar eser miktarda %100 distille su ile çözülerek flakonlara aktarıldı. Fr. K ise eser miktarda bütanol-su (1:3) karışımı ile çözülerek flakona aktarıldı. Flakonlara aktarılan tüm fraksiyonlar donmaları için dondurucuya yerleştirildi.

Fr. A içeren flakon dışındaki tüm flakonlar içerisindeki örneklerin tümü dondu. Donan örnekleri içeren flakonlar liyofilize işlemi için liyofilizatöre yerleştirildi. Fr. A donmadığı için liyofilize edilemedi. Liyofilize işlemi sonucunda elde edilen örnek miktarları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 6.

*Kolon kromatografisi sonucu elde edilen fraksiyonlar ve fraksiyonların liyofilizasyonu sonucu elde edilen örneklerin miktarları*

Fraksiyon	Flakon Dara (g)	Liyofilizasyon (g)	Örnek Miktarı (mg)
Fr. A	14.2009	-	-
Fr. B	14.0156	14.1236	108.0
Fr. C	14.4346	14.6169	182.3
Fr. D	14.6434	14.7174	74.0
Fr. E	14.0879	14.1961	108.2
Fr. F	14.1208	14.5897	469.9
Fr. G	14.6216	14.8169	195.3
Fr. H	14.4172	14.6862	269
Fr. I	14.4740	14.6064	132.4
Fr. J	14.2869	14.4955	208.6
Fr. K	14.3858	14.7789	393.1

### Hücre Sitotoksitesi Bulguları

HepG2 hücre hattında, *C. cornigera* L. ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstraktan, poliamid kullanılarak yapılan kolon kromatografisi sonucunda elde edilen 10 farklı fraksiyon, farklı konsantrasyonlarda 24 ve 48 saatlik süreler boyunca inkübe edilmiştir. Konsantrasyonlar sırası ile 5, 10, 25, 50 ve 100 µg/ml'dir.

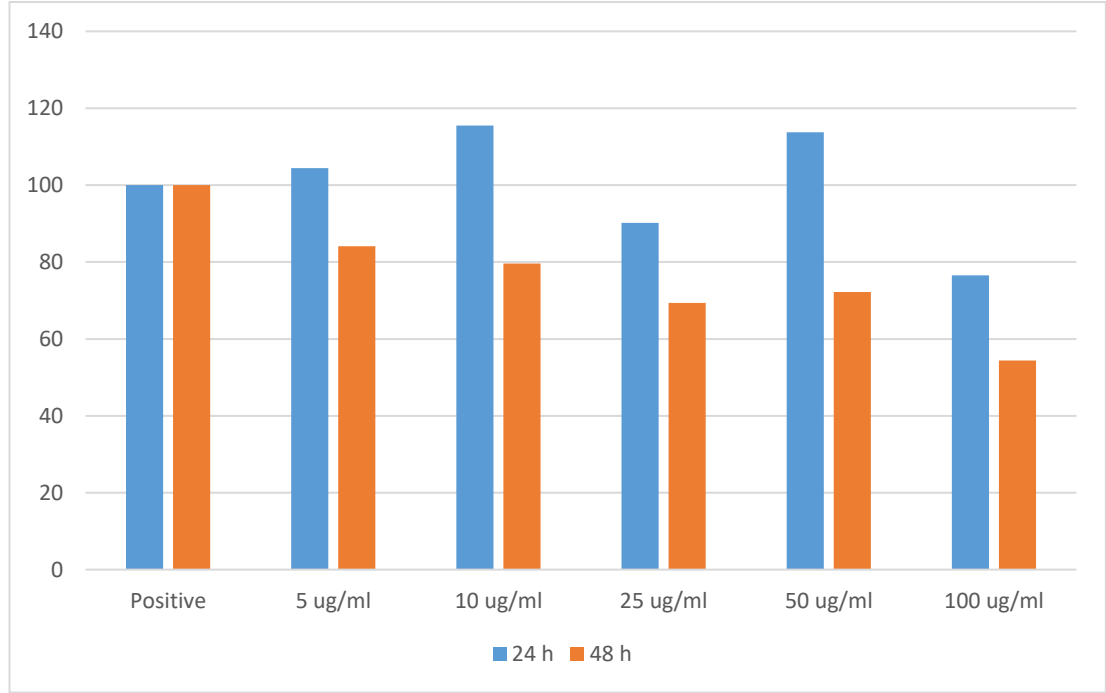
Tablo 7.  
Tüm fraksiyonlara ait MTT I sonuçları

Fr.	5 µg/mL		10 µg/mL		25 µg/mL		50 µg/mL		100 µg/mL	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Fr B	96,82	96,89	101,07	106,68	96,61	102,79	90,50	98,24	83,21	77,83
Fr C	104,81	104,45	100,93	101,97	96,31	90,85	88,58	76,38	73,70	64,08
Fr D	98,70	107,56	89,12	114,04	97,4	87,89	90,76	83,24	76,60	68,49
Fr E	99,67	104,00	93,00	94,59	79,82	86,33	70,36	76,41	66,78	53,10
Fr F	90,82	92,56	95,20	83,92	96,47	85,13	91,43	70,34	84,47	59,24
Fr G	104,42	84,10	115,51	79,58	90,21	69,40	113,72	72,23	76,55	54,37
Fr H	106,37	99,38	108,15	100,20	121,78	90,18	121,95	95,25	115,49	83,06
Fr I	111,97	92,46	101,04	95,46	98,50	81,63	94,54	80,73	77,14	52,06
Fr J	93,40	91,53	99,19	89,14	101,73	83,31	82,76	80,74	84,22	55,06
Fr K	82,35	96,47	99,70	84,07	84,45	75,89	87,27	72,91	76,91	64,76

MTT sonuçlarına göre Fr. G ve Fr. J’de doz yükseldikçe doza bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı görülmüştür. Her iki fraksiyon için, özellikle en yüksek dozda (100 µg/ml) hücre canlılığının daha az olduğu belirlenmiştir. Fr. G için en etkin doz olan 100 µg/ml’de, 24 saatlik süre için hücre canlılığı % 76.55, 48 saatlik muamele süresi sonucunda da hücre canlılığı %54.37 olarak belirlenmiştir. Fr. J için de 24 saatlik inkübasyonda en etkili doz olan 100 µg/ml ‘de hücre canlılığı %84.22, 48 saatlik inkübasyon sonucunda yine 100 µg/ml konsantrasyonda %55.06 olarak belirlenmiştir.

Şekil 19.

*C. cornigera L.* ekstraktının kolon kromatografisi ile elde edilen Fr. G'nin 24 ve 48 saatlik süreler boyunca, HepG2 hücreleri üzerinde, canlılıkları üzerine etkisi



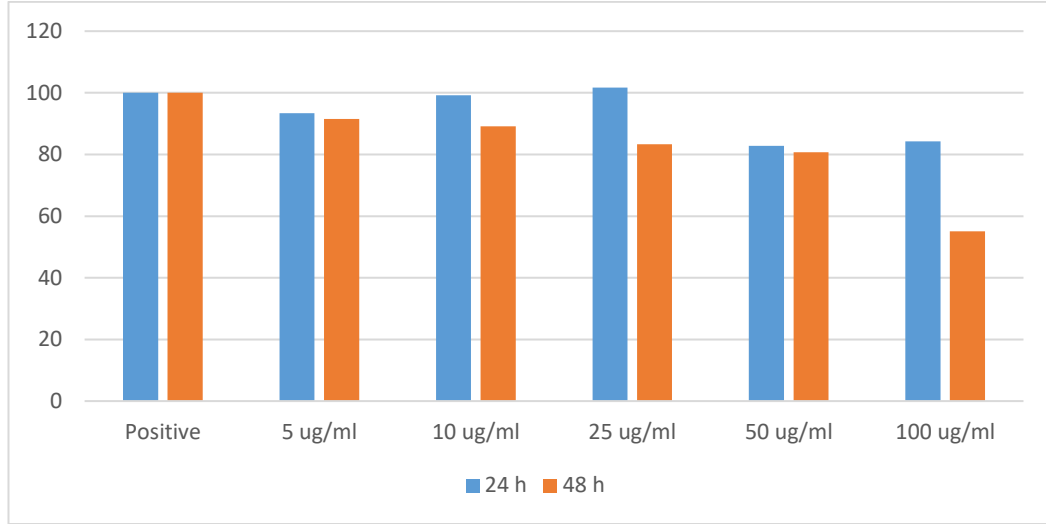
Tablo 8.

*HepG2 hücrelerinin Fr.G ile muamelesi sonucundaki canlılığı yüzdesi*

Süre	5 µg/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
24 h	104,4263	115,5116	90,21549	113,7255	76,55795
48 h	84,10865	79,58945	69,40368	72,23697	54,3709

Şekil 20.

*Cynara cornigera L.* ekstraktının kolon kromatografisi sonucunda elde edilen Fr. J'nin 24 ve 48 saatlik süreler boyunca, HepG2 hücreleri üzerinde, canlılıkları üzerine etkisi



Tablo 9.

*HepG2 hücrelerinin Fr. J ile muamelesi sonucu hücre canlılığı yüzdesi*

Süre	5 µg/mL	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
24 h	93,407	99,1989	101,7311	82,76243	84,22652
48 h	91,53897	89,14057	83,31113	80,74617	55,06329

Hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azaltan fraksiyonlar olan Fr G ve Fr J için optimum etkin dozu belirlemek amacıyla tekrardan bir hücre canlılığı testi yapılmıştır. İkinci hücre canlılığı testi 24, 48 ve 72 saatlik süreler için 25, 50, 100, 200 ve 400 µg/mL konsantrasyonlarda gerçekleştirildi. İkinci hücre canlılığına ait canlı hücrelerin yüzdelik oranlarını gösteren test sonuçları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 10.  
Fr. G ve Fr. J'ye ait MTT-2 sonuçları

Fraction	25 µg/mL			50 µg/mL			100 µg/mL			200 µg/mL			400 µg/mL		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Fr G	102,83	96,39	91,76	110,31	83,75	81,88	87,16	71,32	63,28	65,75	26,95	11,21	9,07	4,59	3,74
Fr J	106,70	99,78	97,43	96,84	91,45	81,78	115,74	76,11	63,54	67,59	11,25	5,00	11,62	5,88	4,74

Fr. G ve Fr. J'nin kullanıldığı ikinci MTT sonuçlarına göre süre ve doz arttıkça, hücre canlılığında bir azalma meydana gelmektedir. İkinci MTT sonuçlarına göre 400 µg/mL konsantrasyonda 72 saat boyunca muamele edilmiş olan hücrelerde en az canlılık gözlemlenmiştir.

Fr. G'nin 24 saatlik muamelesi sonucunda dozajın artırılması sonucuna bağlı olarak 50 ug/ml konsanstrasyona kadar hücre canlılığında bir azalma meydana gelmemiştir. Ancak 50 µg/mL konsantrasyondan yüksek konsantrasyonlarda, konsantrasyon ile hücre canlılığında arasında ters orantılı bir ilişki vardır. Yani, konsantrasyon arttıkça, hücre canlılığından bir azalma meydana gelmiştir. Bunun dışında 48 ve 72 saatlik muamele süresi boyunca, konsantrasyon arttıkça hücre canlılığında anlamlı bir azalma meydana gelmiştir.

Fr. J'nin de 24 saatlik hücrelere muamelesi sonucunda 100 µg/mL konsantrasyona kadar hücre canlılığından beklenen azalma meydana gelmemiştir. 100 µg/mL konsantrasyonun üzerindeki konsantrasyonlarda beklendiği şekilde hücre canlılığı ve konsantrasyon arasındaki ters orantılı ilişki gözlemlenmiş ve hücre canlılığında azalma meydana gelmiştir.

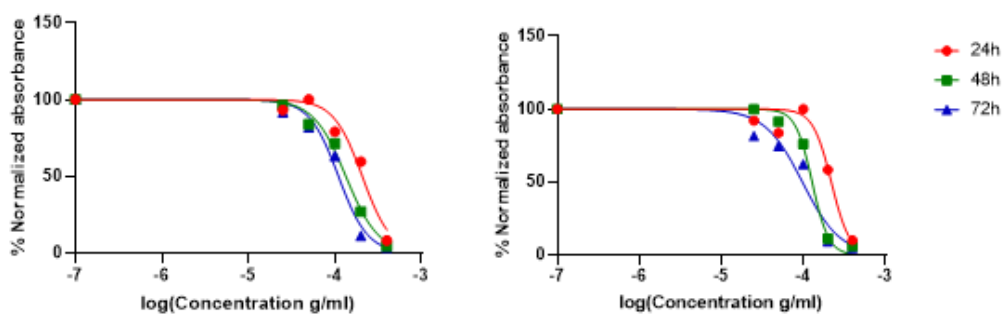
İlk MTT test sonuçlarına göre tüm fraksiyonların 24 ve 48 saatlik süreleri için IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır. Bunun dışında anlamlı bir sitotoksositeye sahip olan Fr. G ve Fr. J için ayrıca 72 saatlik inkübasyon süresi sonucuna bağlı IC<sub>50</sub> değeri hesaplanmıştır.



Tablo 11.  
Fraksiyon F, G, H, I, J, K'ye ait IC<sub>50</sub> değerleri

Fraksiyon	24h IC <sub>50</sub> Değeri (µg/mL)	48h IC <sub>50</sub> Değeri (µg/mL)	72h IC <sub>50</sub> Değeri (µg/mL)
Fr F	236.6	143.0	-
Fr G*	207.2	134.7	110.2
Fr H	39872	642.2	-
Fr I	255.0	99	-
Fr J*	220.4	128.5	97.87
Fr K	334.9	156.9	-

Şekil 21.  
Fraksiyon G ve Fraksiyon J'ye ait IC<sub>50</sub> grafikleri



### *C. cornigera* L. İçerik Analizi

*C. cornigera* L. çiçek kısmının metanol ile ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktan poliamid kolon kullanılarak elde edilen fraksiyonlardan, Fr. G ve Fr. J HepG2 kanser hücre hattında anlamlı bir sitotoksik aktivite göstermiştir. Bunun sonucunda, sitotoksik aktivite gösteren fraksiyonlardan Fr. G, bu fraksiyondan önce elde edilmiş olan Fr. F ve Fr. G'ten sonra elde edilmiş olan Fr. H ile bir diğer anti-kanser aktivitesi gösteren fraksiyon olan Fr. J ve bu fraksiyondan önce elde edilmiş Fr. I ve Fr. J'den sonra elde edilmiş Fr. K, toplam altı fraksiyon içerikleri belirlenmek üzere LC- MS/MS ile analiz edilmiştir. Bu altı fraksiyon için yapılan LC – MS/MS analizi sonuçları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 12.  
Fr F, G, H, I, J, K'ye ait LC-MS/MS Sonuçları

Rt	m/z [M-H] <sup>-</sup>	Fragmentler	Tanımlanan Bileşik	Fr.
11.9	353	191, 179, 135	3-O-kafeoilkinik asit	F,G
12.1	353	191, 179, 135	5-O- kafeoilkinik asit	F,G,H ,I,J
13.7	515	353, 335, 179	1,3-dikafeoilkinik asit	I,J
15.3	337	191, 173, 163	5-p-kumaroilkinik asit	G
16.6	367	191, 179, 135	3-O-feruloilkinik asit	G
17.3	623	447, 285	Luteolin 7-glukozit 3'- glukuronid / Kaempferol- glukozit-glukuronid	J
18.9	463	301	Kuersetin-3-glukozit	J
20.2	515	353,335, 191,179	1,5- dikafeoilkinik asit	I,J,K
20.6	593	285, 151	Luteolin-7-rutinosit / Kaempferol-3-rutinosit	F,G,H ,I
20.9	615	515,453,353, 191	Dikaffeoil-süksinoilkinik asit	J,K
21.3	433	271, 177, 151	Naringenin glukozit	K
21.3	609	314, 299, 285, 271	Rhamnetin heksosil pentosit / isorhamnetin heksosil pentosit ile benzer	K
22.3	461	285	Luteolin glukuronid / Kaempferol glukuronid	J,K
22.7	577	269	Apigenin rutinozid	K
23.1	607	299, 284	300 moleküler ağırlıklı metoksiflavonoid (Diosmetin/kampferid/hispid ulin gibi) rutinosid	G
23.3	431	268, 117	Apigenin glukozit	G,H,I

23.9	461	327,313,297,2 83,269,254	Bilinmeyen polimetoksi flavonoid	G
24.3	477	314, 299, 285	İzorhamnetin / ramnetin hekzosid	H,I
24.5	445	269, 113	Apigenin glukuronid	I,J,K
28.2	459	311,269	Apigenin türevi	J
29.2	285	151, 133	Luteolin veya Kaempferol	K
31.7	269	117	Apigenin	G,H,I, J

Sitotoksositeye sebep olan fraksiyonlar ile bu fraksiyonlardan önceki ve sonraki fraksiyonlardaki ortak ve ortak olmayan bileşikler LC - MS/MS sonuçlarına bağlı olarak belirlendi. Buna göre Fr. F, Fr. G ve Fr. H fraksiyonlarında ortak olarak bulunan bileşikler aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 13.

*Fr. G ile Fr. F ve Fr. H'de ortak olarak bulunan bileşikler*

Rt	m/z [M-H] <sup>-</sup>	Fragmentler	İçeriğinde bulunan bileşik
12.1	353	191, 179, 135	5-O-kafeoilkinik asit
20.6	593	285, 151	Luteolin / kaempferol rutinosit
23.3	431	268, 117	Apigenin glukozit
31.7	269	117	Apigenin

Fr. F ve Fr. H'den farklı olarak anlamlı ve etkili bir sitotoksositeye sahip olan Fr. G içerisinde bulunan bileşikler aşağıdaki tabloda gösterilmiştir. Bu sonuca göre sadece Fr. G içerisinde bilinmeyen bir polimetoksi flavonoid tespit edilmiştir.

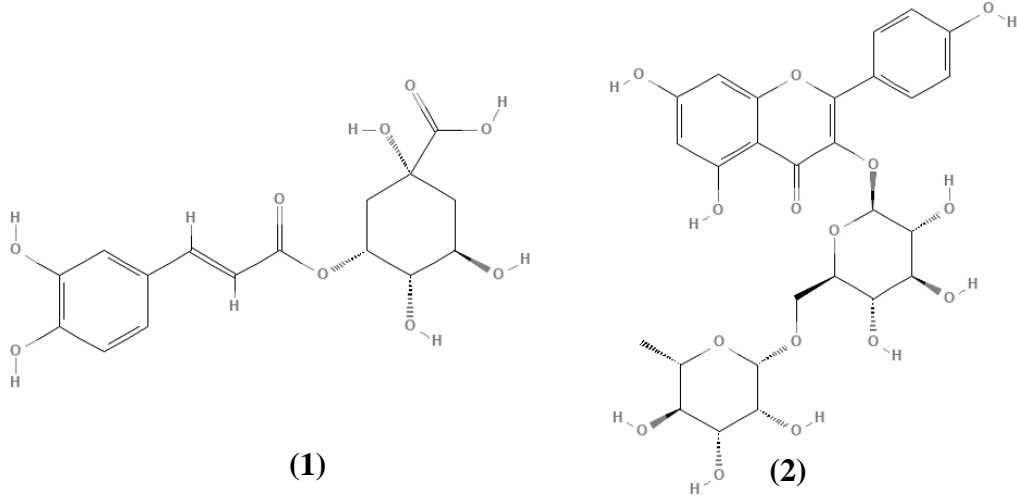
Tablo 14.  
Sadece Fr. G'de bulunan bileşikler

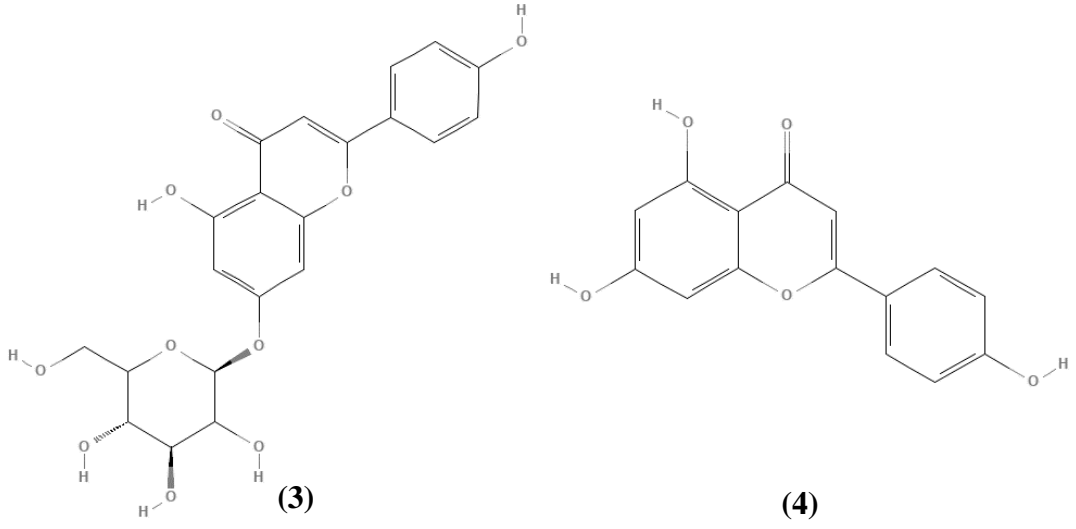
Rt	m/z [M-H] <sup>-</sup>	Fragments	İçeriğinde bulunan bileşik
23.9	461	327,313,297,283,269, 254	Bilinmeyen polimetoksi flavonoid

Fr. G içerisinde bulunan bileşiklerin kimyasal yapıları M/Z oranına ve ayrıldığı fragmentlere göre literatür ve LC – MS/MS cihazına ait kütüphane yardımıyla bulunmuştur. Kalitatif olarak yapılan analiz sonucunda 5-O-kafeoilkinik asit (Şekil 22, 1), kaempferol-3-rutinosit (Şekil 22, 2), apigenin glukozit (Şekil 22, 3) ve apigenin (Şekil 22, 4) kimyasal yapıları tayin edilmiş ve doğrulanmıştır.

Şekil 22.

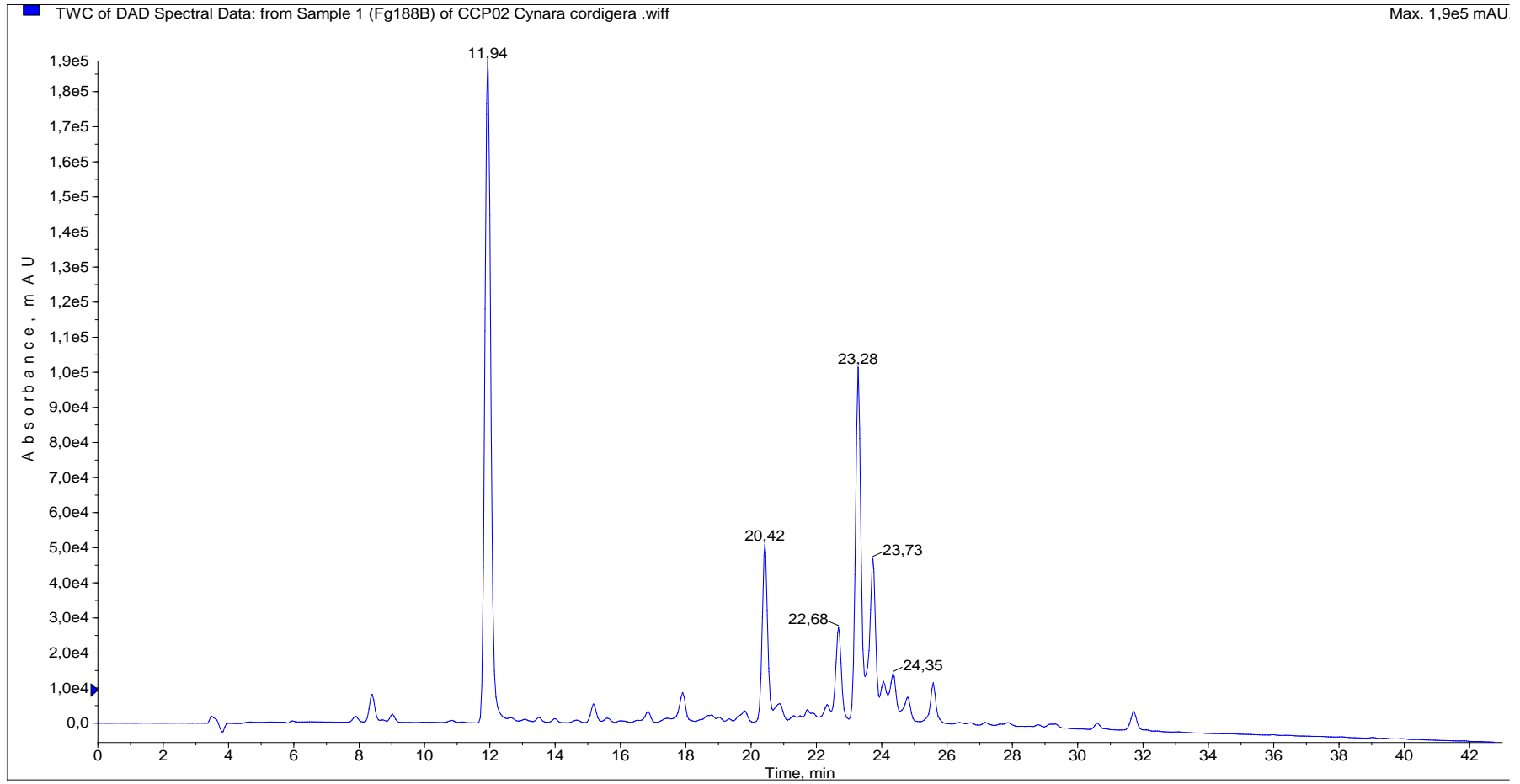
Fr. G içeriğinde bulunan 5-O-kafeoilkinik (1), kaempferol-3-rutinosit (2), apigenin glukozit (3), apigenin (4) bileşiklerinin kimyasal yapısı





Fr. G içerisinde tespit edilen bir diğer bileşik olan bilinmeyen polimetoksi flavonoid için yapı tahmini yapılmıştır. Polimetoksi flavonoid yapısının muhtemel konfigürasyonları gösterilmiştir.

Şekil 23.  
Fraksiyon G, LC DAD Kromatogramı



Sitotoksosite gösteren fraksiyonlardan biri olan Fr. J için LC- MS/MS analizi yapılmıştır. Bu analiz sonucunda Fr. J içerisinde dokuz bileşik tespit edilmiştir.

Luteolin ve kaempferolün molekül formülleri, molekül kütleleri ve polariteleri birbirlerine benzer olmasından dolayı, ilgili Rt değerinde bu bileşikler ve türevleri birlikte tanımlanmıştır.

Fr. J'den önceki fraksiyon olan Fr. I ve sonraki fraksiyon olan Fr. K ile Fr. J'ye ait ortak bileşikler aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 15.

*Fr. J ile Fr. I ve Fr. K fraksiyonlarına ait ortak bileşikler*

Rt	m/z [M-H] <sup>-</sup>	Fragments	İçeriğinde bulunan bileşik
12.1	353	191, 179, 135	5-O-kafeoilkinik asit
13.7	515	353, 335, 179	Dikafeoilkinik asit
22.3	461	285	Luteolin glukuronid / Kaempferol glukuronid
24.5	445	269, 113	Apigenin glukuronid
31.7	269	117	Apigenin

Fr. J'ye özgü olan, diğer fraksiyonlarda bulunmayan bileşikler aşağıdaki tabloda (Tablo 16) gösterilmiştir. Buna göre anlamlı ve etkili bir sitotoksositeye sahip Fr. J içerisinde dört farklı bileşik tespit edilmiştir. Luteolin veya kaempferol türevleri bu fraksiyonda da bulunmaktadır.

Tablo 16.

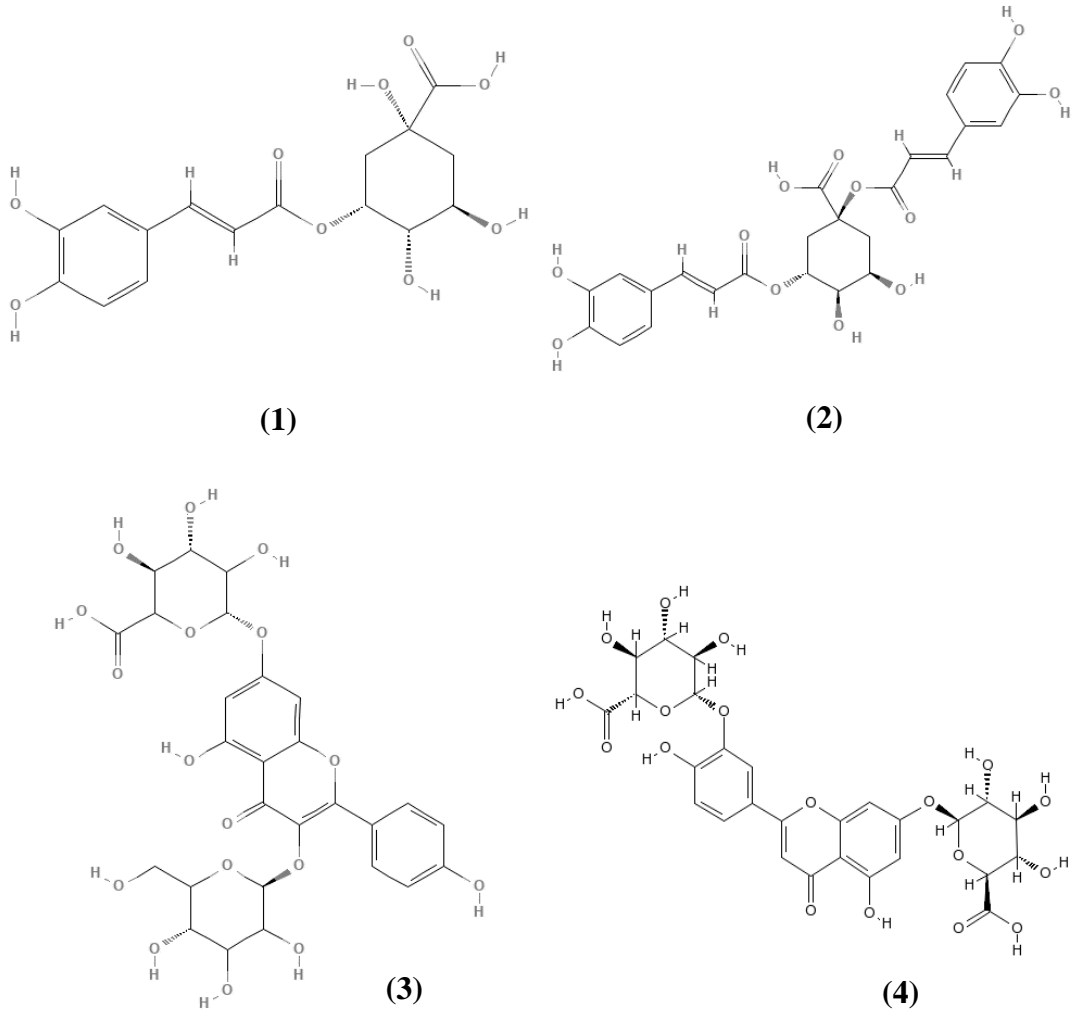
*Sadece Fr. J'de bulunan bileşikler*

Rt	m/z [M-H] <sup>-</sup>	Fragments	İçeriğinde bulunan bileşik
17.3	623	447, 285	Luteolin-glukozit-glukuronid / Kaempferol-glukozit-glukuronid
18.9	463	301	Kuersetin glukozit
20.9	615	515,453, 353, 191	Dikaffeoil-süksinoilkinik asit
28.2	459	311,269	Apigenin türevi

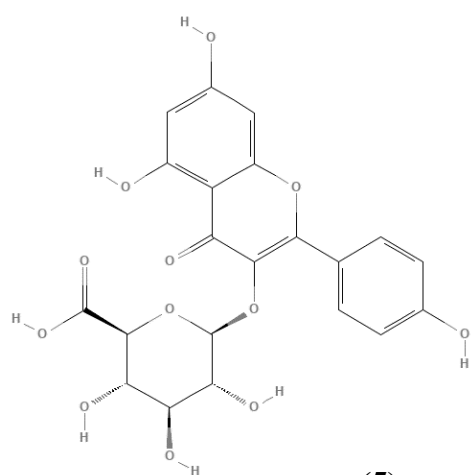
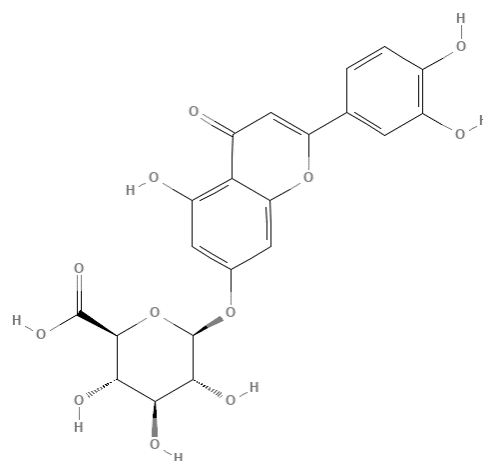
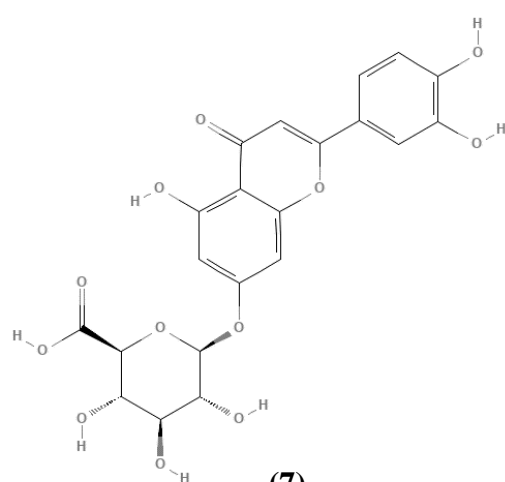
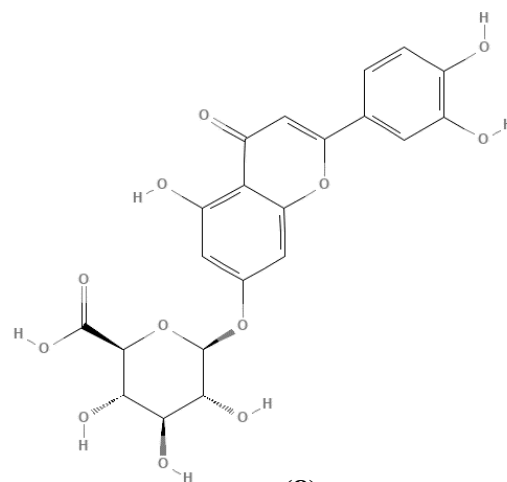
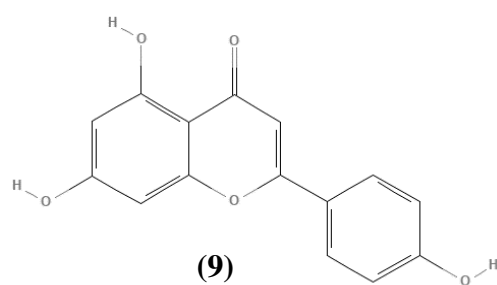
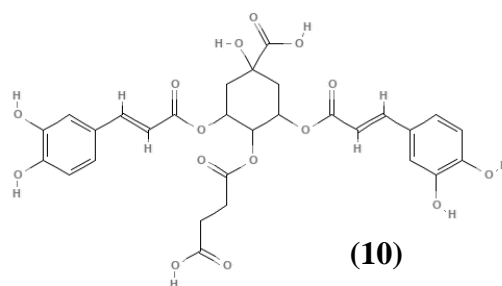
Fr. J içeriğine ait moleküllerin yapı formülleri Şekil 24 'da gösterilmiştir.

Şekil 24.

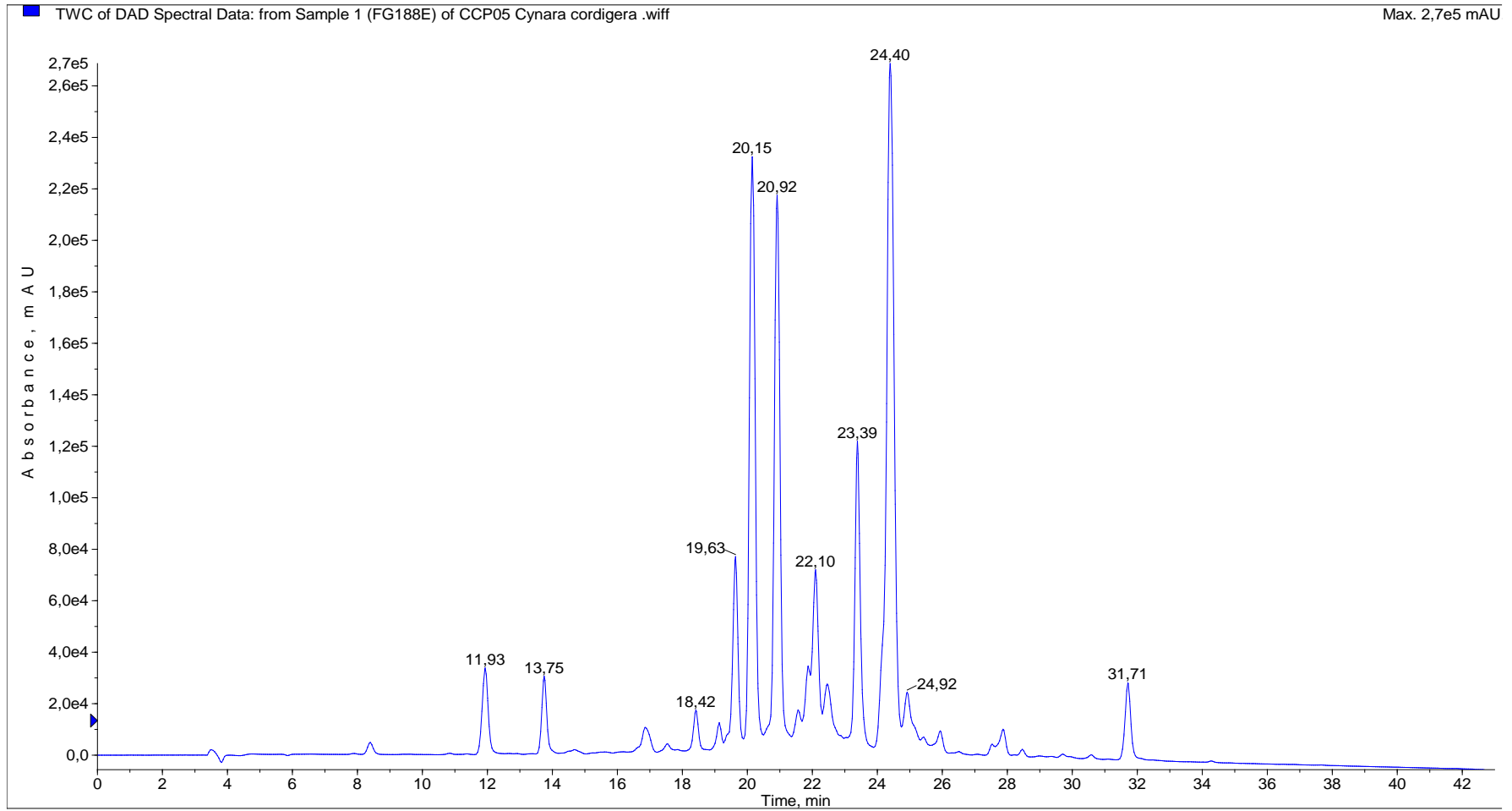
*Fraksiyon J içerisinde bulunan, 5-O-kafeoilkinik asit (1), dikafeoilkinik asit (2), kaempferol-glukozit-glukuronid (3), luteolin-7-glukozit 3'-glukuronid (4), kaempferol glukuronid (5), kersetin glukozit (6), luteolin glukuronid (7), apigenin glukuronid (8), apigenin (9), dikaffeoil-sukkinoilkinik asit (10)*





**(5)****(6)****(7)****(8)****(9)****(10)**

Şekil 25.  
Fraksiyon J, LC DAD Kromatogramı

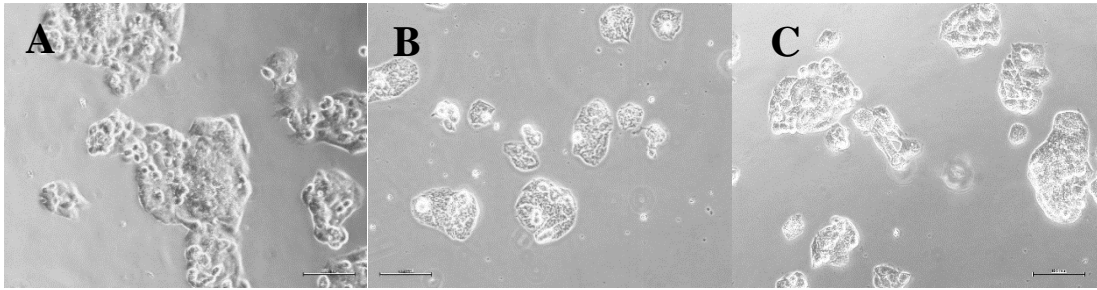


#### 4.4. Hücre Morfolojisi

HepG2 hücreleri 48 saatlik kültürden sonra epitel koloni morfolojisi gösteren epitel benzeri hücrelerdir. Fr. G ve Fr. J ile muamele edilen hücrelerin morfolojilerinde ve miktarlarında değişiklik meydana gelmiştir. Kontrol grubu hücreleri ile karşılaştırıldıklarında bu fark belirgin olarak görülmektedir.

Şekil 26.

*Kontrol (A), Fr G (B) ve Fr J (C) ile muamele edilmiş HepG2 hücrelerinin mikroskop görüntüleri (Ölçek = 100 µm).*



#### İmmünohistokimyasal Değerlendirme

İmmünohistokimyasal değerlendirme için, IC<sub>50</sub> hesaplamalarına bağlı olarak 48 saatlik süre için Fr. G ve Fr. J ile ayrı ayrı muamele edilmiş HepG2 hücreleri kullanılmıştır.

İmmünohistokimyasal olarak değerlendirme aşamasında hücrelerin boyanma yoğunluklarına bağlı olarak H-Score hesaplanmıştır. H-score sonucuna göre boyanma değerleri, düşük, orta ve yüksek olarak değerlendirilmiştir.

Wnt11 yolağı için yapılan immünohistokimyasal değerlendirme sonucunda, kontrol grubunda immünboyanma yoğunluğu zayıf olarak tespit edildi (Şekil 27, A). Bunun yanında Fr. G (Şekil 27, B) ve Fr. J (Şekil 27, C) ile muamele edilen HepG2 hücrelerinin immünboyanma yoğunluğu orta derece olarak tespit edilmiştir. Wnt11 yoğunluğu, kontrol grubundaki hücelere göre daha yüksek ve istatistiksel olarak kontrol grubu ile Fr.G ve Fr. J ile muamele edilmiş hücreler arasında anlamlı bir fark olduğu sonucuna ulaşılmıştır ( $p < 0.05$ , Tablo 17).

$\beta$ -catenin yolağı için yapılan immün boyama sonucunda Fr. G (Şekil 27, N) ile muamele edilmiş hücrelerde immün boyama yoğunluğu yüksek bulunmuştur. Buna karşın Fr. J (Şekil 27, O) ile muamele edilmiş hücrelerde orta yoğunlukta bir

boyama görülmüştür.  $\beta$ -catenin yolağı için kontrol grubu (Şekil 27, M) olarak kullanılan hücrelerde immün boyama yoğunluğu Fr. G ve Fr. J'ye göre daha zayıf bulunmuştur. Kontrol grubuna ait  $\beta$ -catenin yolağına ait immün boyama değerleri ile Fr. G ve Fr. J ile muamele edilmiş hücrelerdeki  $\beta$ -catenin yolağı için yapılan immün boyama değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığı zaman anlamlı bir fark tespit edilmiştir. ( $p<0.05$ , Tablo 17)

Bu çalışmada,  $\beta$ -catenin inhibisyonu beklenmekteydi fakat bu yolağın anlamlı ve etkin bir sitotoksosite gösteren fraksiyonlar olan Fr G ve Fr J tarafından inhibe edilmediği tespit edilmiştir.

Karaciğer kanseri gelişimindeki bir diğer önemli yolak kanonik yolaktır ve bu yolak Wnt3a ile ilişkilidir. Bu bağlamda bu yolakla ilgili Fr. G ve Fr. J ile muamele edilen hücreler kontrol grubu ile immünohistokimyasal olarak değerlendirilerek karşılaştırılmıştır.

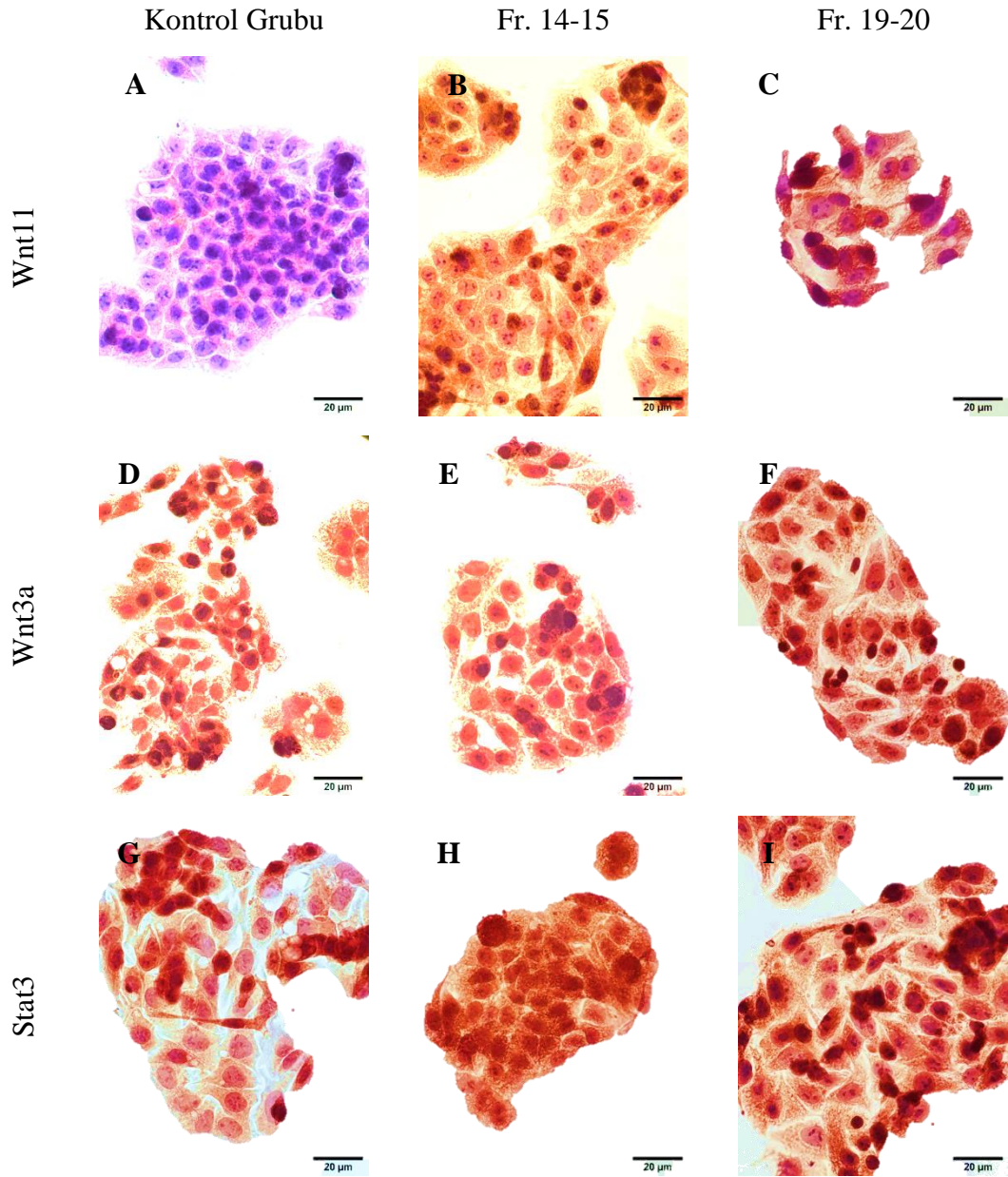
Kontrol grubu (Şekil 27, D) ve Fr. G (Şekil 27, E) ve Fr. J (Şekil 27, F) ile muamele edilmiş hücrelerde Wnt3a yolağı için yapılan immünohistokimyasal boyama değerleri güçlü olarak tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak kontrol grubu hücreleri ile Fr. G ve Fr. J ile muamele edilmiş hücrelerin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmeleri sonucu hesaplanan H-Score değerleri ayrı ayrı karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ( $p>0.05$ , Tablo 17).

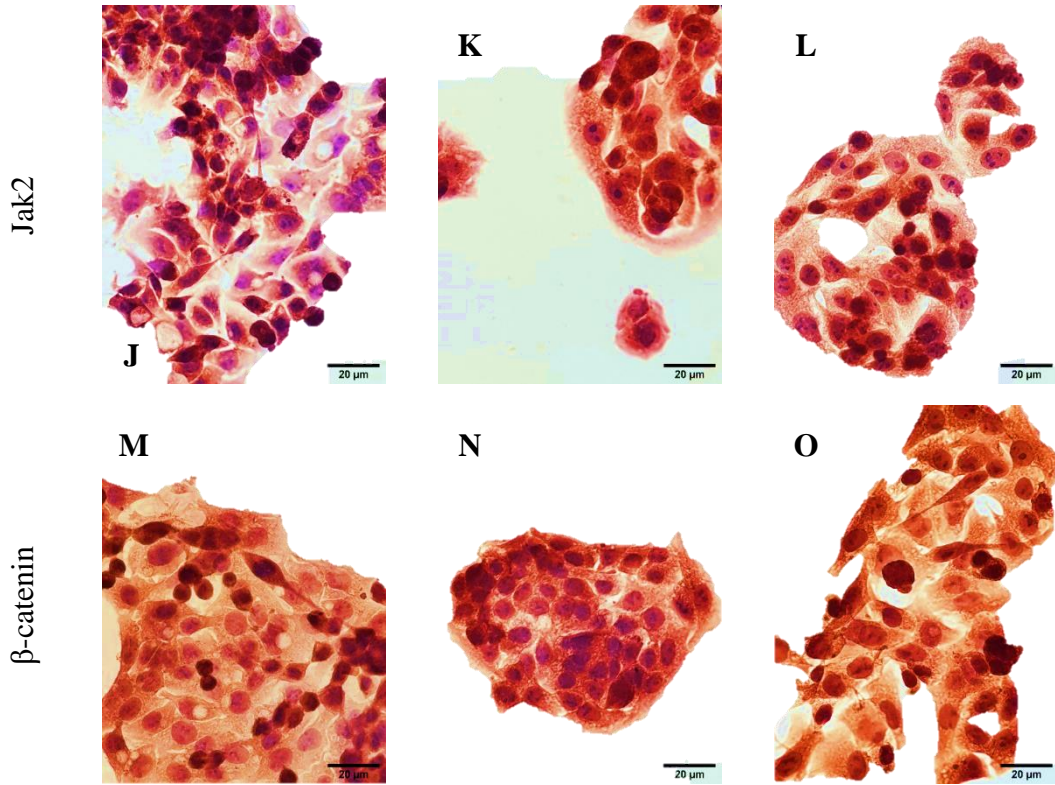
Kontrol grubu (Şekil 27, J) olarak kullanılan hücrelerde JAK2 yolağına ait yapılan immün boyama sonucunda immün boyama yoğunluğu zayıf olarak tespit edilmiştir. Buna karşın Fr. G (Şekil 27, K) ve Fr. J (Şekil 27, L) ile muamele edilmiş hücrelerde yapılan immün boyama sonucu yüksek olarak değerlendirilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda Fr G ve Fr J ile muamele edilmiş hücrelerin immün boyama sonucundaki H-score değerleri anlamlı bir şekilde kontrol grubundan farklı çıkmıştır ( $p<0.05$ , Tablo 17).

Bir diğer immünokimyasal olarak değerlendirilen yolak olan STAT3 ile ilgili yapılan immün boyama yoğunlukları değerlendirildiğinde, kontrol grubu (Şekil 27, G) , Fr. G (Şekil 27, H) ve Fr. J (Şekil 27, I) ile muamele edilmiş hücrelerin boyanma yoğunlukları yüksek çıkmış ve yapılan istatistiksel analiz sonucunda kontrol grubu ile Fr. G ve Fr. J ile muamele edilmiş hücrelerin boyama yoğunlukları arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ( $p>0.05$ , Tablo 17).

Şekil 27.

*Fr. G ve Fr. J ile muamele edilmiş HepG2 hücrelerinin immünohistokimyasal olarak Wnt11, Wnt3a, Jak2, Stat3 ve  $\beta$ -catenin yolaklarına ait boyanmalar sonucu elde edilen mikroskop görüntüleri*





Tablo 17.

*Kontrol grubu, fraksiyon G ve fraksiyon J ile 48 saat için 100 μg/mL konsantrasyonda muamele edilen hücrelerin, Wnt11, Wnt3a, Stat3, Jak2 ve β-catenin yolları için immün boyama H-Score değerleri ve istatistiksel olarak karşılaştırma sonuçları*

	Wnt11	Wnt3a	Stat3	Jak2	β-catenin
Kontrol	117.91 ± 9.83	285.41 ± 80.53	266.48 ± 81.15	151.90 ± 66.90	224.65 ± 71.10
Fr. B	283.37 ± 33.92 <sup>a</sup>	299.46 ± 82.87	284.70 ± 35.58	268.31 ± 54.06 <sup>c</sup>	299.39 ± 23.50 <sup>e</sup>
Fr. E	153.84 ± 20.34 <sup>b</sup>	304.92 ± 19.74	303.29 ± 35.45	250.90 ± 40.04 <sup>d</sup>	328.44 ± 11.02 <sup>f</sup>

Veriler ± standart sapma ile gösterilmiştir. Karşılaştırmalar için One way ANOVA test kullanılmıştır.

<sup>a,b,c,d,e,f</sup> Veriler, kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman anlamlı bir fark tespit edilmiştir (p<0.05).

## BÖLÜM V

### Tartışma

*C. cornigera* L. bitkisinin metanol ile ekstraksiyonu sonucunda 300 g çiçek kısmı kullanılmıştır. Elde edilen ekstrakt, darası alınmış balon içerisinde rotary evaporatörde kuruluğa kadar uçurulmuştur. Bunun sonucunda 18.7 g kuru ekstrakt elde edilmiştir ve ekstraksiyon verimi %6.25 g/g olarak tespit edilmiştir.

*C. cornigera* L. literatür taramasında bu bitki ile yapılan bir başka çalışmada aynı yöntem ile elde edilen ekstraksiyon yüzdesi 86.35 mg/g olduğu bildirilmiştir (Hegazy vd., 2015).

Bu bağlamda önceki çalışma ile bu çalışma karşılaştırıldığı zaman ekstraksiyon veriminde önemli bir fark tespit edilmiştir. Bu farkın, çalışılan yöntemin aynı olmasına rağmen, uygulanmasındaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Başka bitki ekstraksiyonlarının verimi ile *C. cornigera* L. bitkisinin çiçek kısmı ekstraksiyon verimi karşılaştırıldığında, *C. cornigera* L. bitkisinden elde edilen ekstraksiyon verimi diğer bitki kısımlarının ekstraksiyonuna göre düşük kalmaktadır (Johansen, 1996; Vaghasiya & Chanda, 2007). Bu düşük verimin olma sebebi olarak, *C. cornigera* L. bitkisinin çiçek kısmının fazlaca dikenli olmasından dolayı olduğu düşünülmektedir. Dikenli kısımdan ekstraksiyon ile özüt çıkarmanın daha zor olmasının sebebi olarak, sert ve kalın bir yapısının olması, diğer bitkilerin daha kolay ekstakte edilebilmesini de ekstraksiyona uygun ve daha uygun morfolojik yapıların olması olarak düşünülmektedir.

Elde edilen total ekstrakt, poliamid kolon kullanılarak içeriğindeki maddelerin kromatografik olarak ayrılması uygulanmıştır. Yürütücü faz olarak gradiyent olarak azalan bir polaritenin olması için %100 su ile başlandı ve %100 metanole ulaşılan kadar polarite kademeli olarak azaltılmıştır. Yürütücü fazın bu şekilde kullanılmasının sebebi, daha iyi bir ayırtırmaya olanak sağlamak ve olabildiğince farklı maddeleri farklı fraksiyonlarda elde etmektir. Bunun sonucunda hacmi 50 mL olan 38 fraksiyon elde edildi. Elde edilen fraksiyonlar İTK tekniği uygulanarak kabaca içerikleri tespit edilmeye çalışılmıştır.

Fraksiyonlara uygulanan İTK sonuçlarına göre fraksiyon 0 ve fraksiyon 1’de herhangi bir bileşiğe rastlanmamıştır. Bunun sebebi olarak şartlandırılmış olan kolon içerisindeki sıvının ilk önce gelmiş olması düşünülmektedir. İleri tetkik olarak bu iki fraksiyon rotary evaporatörde kuruluğa kadar uçurulmuş ve herhangi bir katı kalıntıya ulaşılmamıştır. Bu sonuç da İTK ile yapılan değerlendirmeyi destekler niteliktedir.

Geriye kalan 36 fraksiyon da İTK ile değerlendirilmeye alındı ve İTK sonuçlarına göre içeriklerinde en az bir bileşiğe rastlanmıştır. Bu veriler ışığında benzer bileşikler içeren fraksiyonlar birbiri ile birleştirilmiştir veya herhangi bir fraksiyon ile benzerliği tespit edilmediyse ayrı tek bir fraksiyon olarak değerlendirilmiştir. Bunun sonucunda birbirlerinden farklı içeriklere sahip olduğu düşünülen 11 fraksiyon (Fr. A-K) elde edilmiştir.

Elde edilen bu fraksiyonlar kuruluğa kadar rotary evaporatör ile uçuruldu ve ardından eser miktarda distille su ile çözünerek liyofilize işlemine hazırlanmaları için derin dondurucuya kaldırıldı. Bunun sonucunda, Fr. A çözeçisi derin dondurucuda donmamış ve dolayısı ile liyofilize edilememiştir. Bunun sebebi olarak kolon kromatografisi işlemi sırasında ekstrakt içerisinde olan ve kolondan ilk gelmeye başlayan bileşiklerin şeker molekülleri olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Şeker molekülünün çözelti içerisinde bulunmasından dolayı da bu çözeltinin derin dondurucuda donmadığı düşünülmektedir. Geriye kalan 10 fraksiyon derin dondurucuda dondurulmuş ve liyofilize edilmiştir.

Liyofilize edilmiş olan tüm örnekler HepG2 hücre hattında, sitotoksitelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Bunun sonucunda anlamlı ve etkili sitotoksiteye sahip iki fraksiyon tespit edilmiştir. Bunlar fraksiyon G ve fraksiyon J’dir. 24 ve 48 saatlik süreler için uygulanan sitotoksite testi sonucunda bu iki fraksiyon etkili ve anlamlı sonuçlar vermiştir.

Kanser hücrelerinde etkili ve anlamlı bir sitotoksiteden bahsederken, çok toksik bir etkiye sahip bileşiklerin olması istenmez. Buna bağlı olarak bu iki fraksiyonun sitotoksite değerleri orta düzeyde olup aşırı bir sitotoksik etkiye sahip değildir. Bu sonuçta bir sitotoksiteye sahip olmaları beklentileri karşılamaktadır.

Sitotoksite testi farklı zamanlarda iki kere tekrarlanmıştır. Birinci sitotoksite testinde tüm fraksiyonlar teste tabi tutulup, etkili ve anlamlı bir



sitotoksositeye sahip fraksiyonlar belirlenmiştir. İkinci sitotoksosite testinde ise birinci sitotoksosite testine göre farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde sitotoksosite testi gerçekleştirilmiştir. Ancak ikinci sitotoksosite testi birinci sitotoksosite testinde etkili ve anlamlı bir sitotoksositeye sahip fraksiyonlara uygulanmıştır. İkinci sitotoksosite testi yapılmasının sebebi etkin dozu ve etkin süreyi belirlemektir. Bunun sonucunda 48 saatlik bir süre için, 100 ug/mL etkin doz, birinci sitotoksosite testinde etkili ve anlamlı bir sitotoksik etki gösteren her iki fraksiyon (Fr. G ve Fr. J) için de tespit edilmiştir.

Birinci sitotoksosite testinde elde edilen veriler doğrultusunda bazı fraksiyonlar için içerik analizi testine gidilmiştir. Bu fraksiyonlar öncelikli olarak etkili ve anlamlı bir sitotoksositeye sahip bileşikler olarak düşünülmüştür. Fakat daha iyi bir karşılaştırma yapmak ve sonuç elde etmek adına etkili ve anlamlı sitotoksositeye sahip fraksiyonlar yanında, kolon kromatografisi sırasında sıra ile bu fraksiyonların elde edilmesinden dolayı, etkili ve anlamlı sitotoksositeye sahip fraksiyonlardan önceki fraksiyon ve sonraki fraksiyon da içerik analizi testine gönderilmiştir.

Bu bağlamda, içerik analizi testine 6 fraksiyon gönderilmiştir. İçerik analizi kalitatif olarak, LC – MS/MS yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda 22 tane farklı Rt değerine sahip molekül tespit edilmiştir.

LC – MS/MS analizi sonuçlarının değerlendirme ve tanımlama aşamasında tanımlayıcı fragment iyon tabanlı tanımlama tekniği kullanılmıştır. Bu teknik sayesinde fragmentler ve m/z oranlarına bağlı olarak moleküller tespit edilmiş ve cihaza ait kütüphane ve literatür ile karşılaştırılmıştır. Fakat bazı moleküllerin aynı m/z oranına sahip olması ve ayrıca aynı fragmentlere ayrılabilmesinden dolayı kesin olarak tespit edilmesi mümkün değildir. Bu bağlamda, bu çalışmada yukarıda anılan sebebe bağlı olarak, yani bazı Rt değerlerinde birden fazla molekül olabilme ihtimalinden dolayı, ihtimal dahilinde olan bileşikler ilgili Rt değerinde birlikte verilmiştir.

Bu çalışmada, luteolin-glukozit-glukuronid/kaempferol-glukozit-glukuronid; luteolin-rutinosit / kaempferol-3-rutinosid ; ramnetin heksosil pentosit / isorhamnetin heksosil pentosit ; luteolin glukuronid / kaempferol glukuronid; izarhamnetin/ramnetin heksosit; luteolin / kaempferol bileşikleri aynı Rt değerine

sahip olup, benzer m/z oranına ve fragmentlere sahip bileşikler olarak tespit edilmiştir.

Luteolin ve kaempferol bileşiklerinin molekül ağırlıkları ve m/z oranları aynıdır. Bunun yanında rhamnetin ve isorhamnetin bileşiklerinin de molekül ağırlıkları ve m/z oranları birbiri ile benzerlik göstermektedir. Bu moleküllerin ayrıca molekül yapıları da birbirleri ile benzerlik göstermektedir. Bu sebepten dolayı LC / MS-MS tekniğinde sıvı kromatografisi kısmında kolon içerisinde benzer polariteye sahip olmalarından dolayı aynı Rt değerinde dedektöre ulaşabilmektedirler. Buna bağlı olarak bu bileşikleri birbirinden LC / MS-MS’de birbirlerinden ayırt edebilmek için standart çözeltilerinin kullanılması gerekmektedir. Elde olan imkanlar dahilinde yürütülen bu çalışmada standart çözeltilerin olmamasından dolayı bu şekilde tespit edilen bileşikler birbirlerinden ayırt edilememiştir. Buna bağlı olarak, çalışma kalitatif bir çalışma olmasına da bağlı olarak, bu bileşikler sonuçlarda birlikte verilmiştir. Ancak, literatürdeki verilere dayanılarak *Cynara* cinsine ait bitkilerde luteolin yerine daha çok kaempferol bulunduğu göz önüne alınarak, bu şekilde tespit edilmiş luteolin/kaempferol veya luteolin/kaempferol türevlerinin, kaempferol tabanlı olacağı düşünülmektedir. Bu durum ancak literatürde bu yönde bir çalışma olmamasına bağlı olarak rhamnetin/ isorhamnetin ve türevleri için geçerli değildir.

Ayrıca, flavonoid türevi tanımlanmasında çeşitli *Cynara* türlerine ait literatür bilgisi de kullanılmıştır ( Clifford vd., 2003; Shen vd., 2010; Abu Reidah vd., 2013; Piston vd., 2014; Sanchez-Rabaneda, 2003; da Silva vd., 2013; Chen vd., 2014). Bu çalışmada flavonoid türevi olan flavon veya falavonol türevleri, bunların dışında kinik asit esterleri tanımlanmıştır. Tüm bu bileşikler daha önceki *Cynara* türleri ile yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, bilinmeyen 300 molekül ağırlığına sahip metoksiflavonoid rutinoside benzeri ve bilinmeyen bir polimetoksiflavonoid gibi metoksiflavonoid türevleri tanımlandığı düşünülmektedir. Bu sonuca literatür ve cihaz kütüphanesi referans alınarak elde edilen m/z oranları ve fragmenet değerleri göz önüne alınarak varılmıştır. Bune kesin olarak belirlemek için ileri analizler yapılması gerekmektedir.

Kalitatif sonuçlar elde etmek için LC – MS/MS tekniğini kullanmamıza rağmen bu analiz sonucunda elde edilen LC kromatogramlarından yarı-kantitatif sonuç elde edebiliriz. Kromatogramlarda zamana karşı absorbans grafikleri elde

edilmiş olup, bu kromatogramlarda belirlenen piklerin alan hesaplamaları yarı-kantitatif sonuçlar elde edebilmemize olanak sağlar.

Fr. G ve Fr J ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde morfolojik olarak değişiklikler meydana gelmiştir. Bu morfolojik değişikliklerinin sebebi olarak, fraksiyonların içeriklerinde bulunan maddelerin miktarlarının tam olarak bilinmemesinden dolayı hangi maddeden dolayı bu değişikliklerin olduğu kesin olarak belirlenememiştir. Fakat, fraksiyon içerisinde bulunan maddelerin birbirleri ile sinerjik etki yaratmalarına bağlı olarak değişikliklerin meydana geldiği düşünülmektedir.

Çalışmada kullanılan HepG2 hücrelerinde bazı kanser yolaklarının analizi gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda HKK'de önemli rol oynayan Wnt/ $\beta$ -catenin ve Jak/Stat yolakları incelenmiştir.

Wnt11'in hücrelerde bulunması veya aktif hale gelmesi hücre proliferasyonunu ve hücre migrasyonunu inhibe eder (Toyama vd., 2010). Buradan yola çıkarak, elde edilen veriler doğrultusunda Wnt11 yolağı için yapılan immünohistokimyasal değerlendirmede, Fr. G ve Fr. J ile muamele edilmiş hücrelerdeki hücre proliferasyonunda azalma, bu yolakta yer alan Wnt11'in hücrelerdeki aktivitesinin artmasına bağlı gerçekleşmiş olabileceği düşünülmektedir.

Wnt11 ilişkili non-kanonik yolağa yönelik yapılan immünohistokimyasal değerlendirmelerde hücre proliferasyonu inhibisyonu  $\beta$ -catenin'e bağlıdır. Bu sebepten dolayı  $\beta$ -catenin seviyeleri bu bağlamda önem arz etmektedir. Birçok kanser türüne ait yapılan önceki çalışmalar,  $\beta$ -catenin yolağının aktif olması sonucunda hücre proliferasyonunu artırdığı ve hücre apoptozunun inhibe edildiği yönündedir.

Bu çalışmada  $\beta$ -catenin yolağında yönelik yapılan immünohistokimyasal değerlendirmede, Fr. G ve Fr. J ile muamele edilmiş, bu fraksiyonlara ait hücrelerde  $\beta$ -catenin yolağını inhibe etmediği, ancak  $\beta$ -catenin seviyelerini artırıcı bir etki de göstermediği tespit edilmiştir.

Bu bağlamda Wnt11 ve  $\beta$ -catenin'e bağlı olan non-canonical yolakta Wnt11 seviyelerinin bu iki fraksiyonla muamele edilen hücrelerde artmasına bağlı olarak hücre proliferasyonunda azalmanın gerçekleştiği düşünülmektedir.

Önceki çalışmalarda, canonical Wnt3a yolağının aktivasyonu HepG2 hücrelerinde proliferasyona sebep olduğu gösterilmiştir (Lu vd., 2017). Bu bağlamda, çalışmadaki kontrol grubu hücrelerinde ve Fr. G ve Fr. J ile muamele edilmiş hücrelerde Wnt3a yolağının yüksek boyanma yoğunluklarına sahip olmalarından ötürü hücre proliferasyonunu engellemekte etkili olmadığı belirlenmiştir. Buna bağlı olarak bu yolağın hücre proliferasyonunu engelleyici bir etkisi olmadığı düşünülmektedir.

STAT3 yolağı ile ilgili yapılan önceki çalışmalarda, bu yolağın inhibe olması sonucunda kanser hücrelerindeki apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Wu vd., 2019). Bu bağlamda, bu çalışmadaki STAT3 yolağına ait yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, Fr. G ve Fr. J ile muamele edilmiş HepG2 hücrelerinde bu yolağın inhibe edilmediği tespit edilmiştir. Bundan dolayı da hücre proliferasyonunun azalmasının bu iki fraksiyondaki bileşiklerden kaynaklanmadığı düşünülmektedir.

## BÖLÜM VI

### Sonuç

Metanol ekstraksiyonu ve ardından gerçekleştirilen kolon kromatografisi sonucunda elde edilen tüm fraksiyonlar HepG2 hücre hattında denendi ve iki fraksiyonda (Fr. G ve Fr. J) anlamlı ve etkin sitotoksosite tespit edilmiştir.

Bu etkin ve anlamlı sitotoksositeye sahip iki fraksiyon HepG2 hücrelerinde ayrıca karsinogenez mekanizmalarının araştırılması için kullanılmıştır. Bu araştırmada Wnt11, Wnt3a, Stat3, Jak2 ve  $\beta$ -catenin yolakları için immünohistokimyasal değerlendirme yapılmış olup, immün boyama değerleri araştırılmış ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Bu bağlamda bu iki fraksiyon kullanılarak, Wnt3a, Stat3, Jak2 ve  $\beta$ -catenin yolakları için yapılan immünohistokimyasal değerlendirmede bu yolakların hücre proliferasyonunu azaltıcı veya apoptozu engelleyici bir etkilerinin bulunmadığı tespit edilmiştir.

Buna karşın, noncononical yolda yer alan Wnt11 için yapılan immünohistokimyasal analiz sonucunda, etkin ve anlamlı bir sitotoksositeye sahip olan fraksiyonlarla muamele sonucunda bu yolağın hücre proliferasyonunu engelleyici yönde etkilendiği tespit edilmiştir.

Wnt11 non-cononical yolak üzerinden gerçekleşen proliferasyondaki azalmanın, bu iki fraksiyon içerisinde bulunan bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Fakat çalışmanın kalitatif bir çalışma olmasına bağlı olarak bu aktivitenin hangi bileşikten kaynaklandığı tam olarak söylenemez. Çalışma sonuçlarına göre aktivite, yalnız bir moleküle bağlı olarak da görülmüş olabileceği gibi fraksiyonlar içerisindeki bileşiklerin birbirleri ile olan sinerjik etkilerinden de kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma sonucunda, *C. cornigera* L. bitkisinin geriye kalan kısımlarının da fenolik bileşikler içerdiği düşünülmekte olup, buna bağlı olarak ileriki araştırmalarda bitkinin farklı kısımlarının da HSK üzerinde etkili ve anlamlı bir anti-kanser etkisi olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu bitki içeriğinde bulunan maddeler, diğer kanser türlerine ait araştırmalarda etkili ve anlamlı bir anti-kanser ajanı olabilecekleri düşünülmektedir.

Sonuç olarak, *C. cornigera* L. bitkisinin metanol ekstraksiyonu ve kolon kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan iki fraksiyon, HSK'da kanonik olmayan Wnt11 yolağı üzerinden hareket ederek, etkili ve anlamlı bir sitotoksisiteye ve buna bağlı olarak anti-kanser özelliğe sahiptir.

## KAYNAKÇA

- Abu-Reidah, I. M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Extensive characterisation of bioactive phenolic constituents from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. *Food chemistry*, 141(3), 2269–2277. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.066>
- Albrecht, J. H., Hu, M. Y., & Cerra, F. B. (1995). Distinct patterns of cyclin D1 regulation in models of liver regeneration and human liver. *Biochemical and biophysical research communications*, 209(2), 648–655. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1548>
- Angulo P., Kaushik G., Subramaniam D., Dandawate P., Neville K., Chastain K., & Anant S. (2017). Natural compounds targeting major cell signaling pathways: a novel paradigm for osteosarcoma therapy. *J Hematol Oncol.* 2017;10:10. <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0373-z>.
- Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2014). Bioactive Components from Leaf Vegetable Products. *Studies in Natural Products Chemistry*, 321–346. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63294-4>.
- Benova, L., Awad, S. F., Miller, F. D., & Abu-Raddad, L. J. (2015). Estimation of hepatitis C virus infections resulting from vertical transmission in Egypt. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 61(3), 834–842. <https://doi.org/10.1002/hep.27596>
- Besson, A., Dowdy, S. F., & Roberts, J. M. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Developmental cell*, 14(2), 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.01.013>
- Birt, D. F., Walker, B., Tibbels, M. G., & Bresnick, E. (1986). Anti-mutagenesis and anti-promotion by apigenin, robinetin and indole-3-carbinol. *Carcinogenesis*, 7(6), 959-963. <https://doi.org/10.1093/carcin/7.6.959>
- Bisteau, X., Caldez, M. J., & Kaldis, P. (2014). The Complex Relationship between Liver Cancer and the Cell Cycle: A Story of Multiple Regulations. *Cancers*, 6(1), 79–111. <https://doi.org/10.3390/cancers6010079>
- Blackburn E. H. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature*, 350(6319), 569–573. <https://doi.org/10.1038/350569a0>

- Bogaerts, E., Heindryckx, F., Vandewynckel, Y. P., Van Grunsven, L. A., & Van Vlierberghe, H. (2014). The roles of transforming growth factor- $\beta$ , Wnt, Notch and hypoxia on liver progenitor cells in primary liver tumours (Review). *International journal of oncology*, 44(4), 1015–1022.  
<https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2286>
- Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(9), 729–740.  
<https://doi.org/10.1038/nrm2233>
- Carr, B. I. (Ed.). (2016). *Hepatocellular Carcinoma*. Springer International Publishing.  
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-34214-6>
- Cermak, R., & Wolfram, S. (2006). The potential of flavonoids to influence drug metabolism and pharmacokinetics by local gastrointestinal mechanisms. *Current drug metabolism*, 7(7), 729–744.  
<https://doi.org/10.2174/138920006778520570>
- Chen, F., Long, X., Liu, Z., Shao, H., & Liu, L. (2014). Analysis of phenolic acids of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) responding to salt-stress by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 568043.  
<https://doi.org/10.1155/2014/568043>
- Chen, Z., Xie, H., Hu, M., Huang, T., Hu, Y., Sang, N., & Zhao, Y. (2020). Recent progress in treatment of hepatocellular carcinoma. *American journal of cancer research*, 10(9), 2993–3036.
- Clark, A. G., & Vignjevic, D. M. (2015). Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Current opinion in cell biology*, 36, 13–22.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.06.004>
- Clifford, M. N., Johnston, K. L., Knight, S., & Kuhnert, N. (2003). Hierarchical scheme for LC-MS<sup>n</sup> identification of chlorogenic acids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(10), 2900–2911.  
<https://doi.org/10.1021/jf026187q>
- da Silva, L. M., Allemand, A., Mendes, D. A., Dos Santos, A. C., André, E., de Souza, L. M., Cipriani, T. R., Dartora, N., Marques, M. C., Baggio, C. H., & Werner, M. F. (2013). Ethanolic extract of roots from *Arctium lappa* L. accelerates the



- healing of acetic acid-induced gastric ulcer in rats: Involvement of the antioxidant system. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 51, 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.026>
- Diril MK, Ratnacaram CK, Padmakumar VC, Du T, Wasser M, Coppola V, Tessarollo L, Kaldis P. Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) is essential for cell division and suppression of DNA re-replication but not for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109:3826–31.
- Dokkedal, A. L., Lavarda, F., Santos, L. C. D., & Vilegas, W. (2007). Xeractinol: a new flavanonol C-glucoside from *Paepalanthus argenteus* var. *argenteus* (Bongard) Hensold (Eriocaulaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18, 437-439. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532007000200029>
- Drabsch, Y., ten Dijke, P. (2012). TGF-beta signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 31: 553–68
- Dutta, S., Mahalanobish, S., & Sil, P. C. (2021). Phytoestrogens as Novel Therapeutic Molecules Against Breast Cancer. In *Discovery and Development of Anti-Breast Cancer Agents from Natural Products* (pp. 197–229). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821277-6.00008-8>
- Eckert, M. A., Lwin, T. M., Chang, A. T., Kim, J., Danis, E., Ohno-Machado, L., & Yang, J. (2011). Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis. *Cancer cell*, 19(3), 372-386. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.01.036>
- Eguchi, A., Wree, A., & Feldstein, A. E. (2014). Biomarkers of liver cell death. *Journal of hepatology*, 60(5), 1063–1074. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.12.026>
- El Sohafy, S.M., Metwally, A.M., Omar, A.A., Amer, M.E., Radwan, M.M., Abdel-Kader, M.S., El Toumy, S.A., ElSohly, M.A. (2016). Cornigerin, a new sesquiterpene lactone from the hepatoprotective fractions of *Cynara cornigera* L. *Fitoterapia*. 115:101-105. <https://www.doi.org/10.1016/j.fitote.2016.09.015>
- Elsayed, S. M., Nazif, N. M., Hassan, R. A., Hassanein, H. D., Elkholy, Y. M., Gomaa, N. S., & Shahat, A. A. (2012). Chemical and biological constituents from the leaf extracts of the wild Artichoke (*Cynara cornigera*). *Int J Pharm Pharm Sci*, 5, 396-400.

- El-Serag, H. B., Hampel, H., & Javadi, F. (2006). The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 4(3), 369–380. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2005.12.007>
- Eskes, R., Antonsson, B., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Richter, C., Sadoul, R., Mazzei, G., Nichols, A., & Martinou, J.-C. (1998). Bax-induced Cytochrome C Release from Mitochondria Is Independent of the Permeability Transition Pore but Highly Dependent on Mg<sup>2+</sup> Ions. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 143, Issue 1, pp. 217–224). Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1083/jcb.143.1.217>
- Ezhevsky, S. A., Nagahara, H., Vocero-Akbani, A. M., Gius, D. R., Wei, M. C., & Dowdy, S. F. (1997). Hypo-phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D:Cdk4/6 complexes results in active pRb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20), 10699–10704. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.20.10699>
- Fabregat, I., Roncero, C., & Fernández, M. (2007). Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 27(2), 155–162. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2006.01409.x>
- Falschlehner, C., Ganten, T. M., Koschny, R., Schaefer, U., & Walczak, H. (2009). TRAIL and other TRAIL receptor agonists as novel cancer therapeutics. *Advances in experimental medicine and biology*, 647, 195–206. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-89520-8\\_14](https://doi.org/10.1007/978-0-387-89520-8_14)
- Farazi, P. A., & DePinho, R. A. (2006). Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature reviews. Cancer*, 6(9), 674–687. <https://doi.org/10.1038/nrc1934>
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C et al. GLOBOCAN 2020: cancer incidence and mortality, version 1.1. IARC Cancer Base ed. Lyon: IARC; 2022
- Fiorentino, M., Altimari, A., D'Errico, A., Cukor, B., Barozzi, C., Loda, M., & Grigioni, W. F. (2000). Acquired expression of p27 is a favorable prognostic

- indicator in patients with hepatocellular carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 6(10), 3966–3972.
- Flamini, R., & De Rosso, M. (2019). High-Resolution Mass Spectrometry and Biological Properties of Grapevine and Wine Stilbenoids. In *Studies in Natural Products Chemistry* (pp. 175–210). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64183-0.00005-1>
- Fransvea, E., Angelotti, U., Antonaci, S., & Giannelli, G. (2008). Blocking transforming growth factor-beta up-regulates E-cadherin and reduces migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 47(5), 1557–1566. <https://doi.org/10.1002/hep.22201>
- Friedl, P., & Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature reviews. Cancer*, 3(5), 362–374. <https://doi.org/10.1038/nrc1075>
- Galle, P. R., Hofmann, W. J., Walczak, H., Schaller, H., Otto, G., Stremmel, W., Krammer, P. H., & Runkel, L. (1995). Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *The Journal of experimental medicine*, 182(5), 1223–1230. <https://doi.org/10.1084/jem.182.5.1223>
- GBD (2013). Mortality and Causes of Death Collaborators (2015). Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet (London, England)*, 385(9963), 117–171. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61682-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61682-2)
- Giannelli, G., Villa, E., & Lahn, M. (2014). Transforming growth factor- $\beta$  as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Cancer research*, 74(7), 1890–1894. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0243>
- GLOBOCAN 2018: cancer incidence and mortality, version 1.1. IARC Cancer Base ed. Lyon: IARC
- Gopinathan, L., Ratnacaram, C. K., & Kaldis, P. (2011). Established and novel Cdk/cyclin complexes regulating the cell cycle and development. *Results and problems in cell differentiation*, 53, 365–389. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-19065-0\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-642-19065-0_16)

- Gupta, S., Afaq, F., & Mukhtar, H. (2002). Involvement of nuclear factor-kappa B, Bax and Bcl-2 in induction of cell cycle arrest and apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma cells. *Oncogene*, 21(23), 3727–3738. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205474>
- Gürel, D.K. (2017). Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Erişkin Onkoloji, Hematoloji Kliniklerinde Kemoterapi Uygulanan Hastaların Yaşam Kalitesi Ve Bunu Etkileyen Faktörlerin İncelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hemşirelik Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi
- Haeger, A., Wolf, K., Zegers, M. M., & Friedl, P. (2015). Collective cell migration: guidance principles and hierarchies. *Trends in cell biology*, 25(9), 556–566. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.06.003>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hand, R., Hadjikyriakou G.N., & Christodoulou C.S., (2021). *Cynara cornigera*. Flora of Cyprus — a dynamic checklist. Retrieved June 21, 2022, from [https://flora-of-cyprus.eu/cdm\\_dataportal/taxon/eeddda6-ea02-4d32-9a99-40e45e822842](https://flora-of-cyprus.eu/cdm_dataportal/taxon/eeddda6-ea02-4d32-9a99-40e45e822842)
- Hayflick L. (1965). The Limited In Vitro Lifetime Of Human Diploid Cell Strains. *Experimental cell research*, 37, 614–636. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9)
- Hegazy, A., Ezzat, S., Qasem, I., Ali-Shtayeh, M., Basalah, M., Ali, H., & Hatamleh, A. (2015). Diversity of active constituents in *Cichorium endivia* and *Cynara cornigera* extracts. In *Acta Biologica Hungarica* (Vol. 66, Issue 1, pp. 103–118). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1556/abiol.66.2015.1.9>
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. In *Food Chemistry* (Vol. 173, pp. 501–513). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.057>
- Henley, S. A., & Dick, F. A. (2012). The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. *Cell division*, 7(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-7-10>

- Heuberger, J., & Birchmeier, W. (2010). Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(2), a002915. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002915>
- Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E., & Swanson, P. E. (2009). Cell death. *The New England journal of medicine*, 361(16), 1570–1583. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0901217>
- Huang, C., Wei, Y. X., Shen, M. C., Tu, Y. H., Wang, C. C., & Huang, H. C. (2016). Chrysin, Abundant in *Morinda citrifolia* Fruit Water-EtOAc Extracts, Combined with Apigenin Synergistically Induced Apoptosis and Inhibited Migration in Human Breast and Liver Cancer Cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(21), 4235–4245. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00766>
- IARC, (1987). Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum Suppl.* 7:1–440.
- IARC, (2010). IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Alcohol consumption and ethyl carbamate. *IARC Monogr Eval Carcinogenic Risks Hum* 96:3–1383.
- IARC, (2013). Forman D, Bray F, Brewster DH, Gombe MC, Kohler B, Pinerson M et al. *Cancer incidence in five continents*, vol. X (electronic version). Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- Ichim, G., Lopez, J., Ahmed, S. U., Muthalagu, N., Giampazolias, E., Delgado, M. E., Haller, M., Riley, J. S., Mason, S. M., Athineos, D., Parsons, M. J., van de Kooij, B., Bouchier-Hayes, L., Chalmers, A. J., Rooswinkel, R. W., Oberst, A., Blyth, K., Rehm, M., Murphy, D. J., & Tait, S. (2015). Limited mitochondrial permeabilization causes DNA damage and genomic instability in the absence of cell death. *Molecular cell*, 57(5), 860–872. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.018>
- In *Natural Product Reports* (2001). (Vol. 18, Issue 6, pp. 641–649). Royal Society of Chemistry (RSC). <https://doi.org/10.1039/b101061l>

- Irwin, M., Arias, Harvey J., Alter, James L., Boyer, David E., Cohen, David A., Shafritz, Snorri S., Thorgeirsson, Allan W. (2020). *The Liver : Biology and Pathobiology* Wiley Blackwell, UK; p:23
- Johansen, H. N., Glitsø, V., & Bach Knudsen, K. E. (1996). Influence of Extraction Solvent and Temperature on the Quantitative Determination of Oligosaccharides from Plant Materials by High-Performance Liquid Chromatography. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 44, Issue 6, pp. 1470–1474). American Chemical Society (ACS). <https://doi.org/10.1021/jf950482b>
- Joyce, J. A., & Pollard, J. W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature reviews. Cancer*, 9(4), 239–252. <https://doi.org/10.1038/nrc2618>
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
- Kao, J. H., Chen, P. J., Lai, M. Y., & Chen, D. S. (2002). Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Journal of clinical microbiology*, 40(4), 1207–1209. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1207-1209.2002>
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & nutrition research*, 61(1), 1361779. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>
- Knight, B., Yeoh, G. C., Husk, K. L., Ly, T., Abraham, L. J., Yu, C., Rhim, J. A., & Fausto, N. (2000). Impaired preneoplastic changes and liver tumor formation in tumor necrosis factor receptor type 1 knockout mice. *The Journal of experimental medicine*, 192(12), 1809–1818. <https://doi.org/10.1084/jem.192.12.1809>
- Krakhmal, N. V., Zavyalova, M. V., Denisov, E. V., Vtorushin, S. V., & Perelmuter, V. M. (2015). Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms. *Acta naturae*, 7(2), 17–28.

- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *TheScientificWorldJournal*, 2013, 162750. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Lam, C. Z., Gulamhusein, A., & Wald, R. M. (2021). Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma After the Fontan Operation: Reaching Clarity in the Face of Uncertainty. *Circulation*, 144(25), 1977–1980. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.057431>
- Lee, Y. J., & Jang, B. K. (2015). The Role of Autophagy in Hepatocellular Carcinoma. *International journal of molecular sciences*, 16(11), 26629–26643. <https://doi.org/10.3390/ijms161125984>
- Lee, Y.M., Lee, G., Oh, T.I., Kim, B.M., Shim, D.W., Lee, K.H., Kim, Y.J., Lim, B.O., Lim, J.H. (2016). Inhibition of glutamine utilization sensitizes lung cancer cells to apigenin-induced apoptosis resulting from metabolic and oxidative stress. *Int J Oncol*. 48:399–408. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3243>.
- Liu, S., Qiu, J., He, G., He, W., Liu, C., Cai, D., & Pan, H. (2021). TRAIL promotes hepatocellular carcinoma apoptosis and inhibits proliferation and migration via interacting with IER3. In *Cancer Cell International* (Vol. 21, Issue 1). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01724-8>
- Locatelli, I., Sutti, S., Vacchiano, M., Bozzola, C., & Albano, E. (2013). NF- $\kappa$ B1 deficiency stimulates the progression of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in mice by promoting NKT-cell-mediated responses. *Clinical science (London, England : 1979)*, 124(4), 279–287. <https://doi.org/10.1042/CS20120289>
- Loomba, R., Yang, H. I., Su, J., Brenner, D., Ilse, U., & Chen, C. J. (2010). Obesity and alcohol synergize to increase the risk of incident hepatocellular carcinoma in men. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 8(10), 891–898.e8982. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2010.06.027>
- Lorent, K., Gong, W., Koo, K.A., Waisbourd-Zinman, O., Karjoo, S., Zhao, X., Sealy, I., Kettleborough, R.N., Stemple, D.L. (2015). "Identification of a plant isoflavonoid that causes biliary atresia". *Science Translational Medicine*. 7 (286): 286ra67. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa1652>.

- Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., Ahn, S. Y., AlMazroa, M. A., Alvarado, M., Anderson, H. R., Anderson, L. M., Andrews, K. G., Atkinson, C., Baddour, L. M., Barker-Collo, S., Bartels, D. H., ... Murray, C. J. (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. In *The Lancet* (Vol. 380, Issue 9859, pp. 2095–2128). Elsevier BV. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(12\)61728-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(12)61728-0)
- Lu, C., He, Y., Duan, J., Yang, Y., Zhong, C., Zhang, J., Liao, W., Huang, X., Zhu, R., & Li, M. (2017). Expression of Wnt3a in hepatocellular carcinoma and its effects on cell cycle and metastasis. *International journal of oncology*, 51(4), 1135–1145. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4112>
- MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental cell*, 17(1), 9–26. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>
- McGlynn, K. A., Tsao, L., Hsing, A. W., Devesa, S. S., & Fraumeni, J. F., Jr (2001). International trends and patterns of primary liver cancer. *International journal of cancer*, 94(2), 290–296. <https://doi.org/10.1002/ijc.1456>
- Mitchell, C., & Willenbring, H. (2008). A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nature protocols*, 3(7), 1167–1170. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.80>
- Mohd Hanafiah, K., Groeger, J., Flaxman, A. D., & Wiersma, S. T. (2013). Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 57(4), 1333–1342. <https://doi.org/10.1002/hep.26141>
- Mole, S. (1993). The systematic distribution of tannins in the leaves of angiosperms: A tool for ecological studies. In *Biochemical Systematics and Ecology* (Vol. 21, Issue 8, pp. 833–846). Elsevier BV. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(93\)90096-a](https://doi.org/10.1016/0305-1978(93)90096-a)
- Moreno-Càceres, J., & Fabregat, I. (2015). Apoptosis in liver carcinogenesis and chemotherapy. *Hepatic oncology*, 2(4), 381–397. <https://doi.org/10.2217/hep.15.27>



- Müller, M., Strand, S., Hug, H., Heinemann, E. M., Walczak, H., Hofmann, W. J., Stremmel, W., Kramer, P. H., & Galle, P. R. (1997). Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *The Journal of clinical investigation*, 99(3), 403–413. <https://doi.org/10.1172/JCI119174>
- Nakagawa, H., Umemura, A., Taniguchi, K., Font-Burgada, J., Dhar, D., Ogata, H., Zhong, Z., Valasek, M. A., Seki, E., Hidalgo, J., Koike, K., Kaufman, R. J., & Karin, M. (2014). ER stress cooperates with hypernutrition to trigger TNF-dependent spontaneous HCC development. *Cancer cell*, 26(3), 331–343. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.07.001>
- Natsuzaka, M., Omura, T., Akaike, T., Kuwata, Y., Yamazaki, K., Sato, T., Karino, Y., Toyota, J., Suga, T., & Asaka, M. (2005). Clinical features of hepatocellular carcinoma with extrahepatic metastases. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 20(11), 1781–1787. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2005.03919.x>
- Nibbs, A.E., Scheidt, K.A. (2012). Asymmetric Methods for the Synthesis of Flavanones, Chromanones, and Azaflavanones. *European Journal of Organic Chemistry*. 2012 (3): 449–462. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201101228>.
- Okuda, K., Nakanuma, Y., & Miyazaki, M. (2002). Cholangiocarcinoma: Recent progress. Part 1: Epidemiology and etiology. In *Journal of Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 17, Issue 10, pp. 1049–1055). Wiley. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2002.02781.x>
- Ortega, S., Malumbres, M., & Barbacid, M. (2002). Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1602(1), 73–87. [https://doi.org/10.1016/s0304-419x\(02\)00037-9](https://doi.org/10.1016/s0304-419x(02)00037-9)
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Pez, F., Lopez, A., Kim, M., Wands, J. R., Caron de Fromentel, C., & Merle, P. (2013). Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: molecular targets for the development of innovative anticancer drugs. *Journal of hepatology*, 59(5), 1107–1117. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.07.001>

- Pinelli, P., Romani, A., Fierini, E., Remorini, D., & Agati, G. (2013). Characterisation of the Polyphenol Content in the Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) Exocarp for the Calibration of a Fruit-sorting Optical Sensor. In *Phytochemical Analysis* (Vol. 24, Issue 5, pp. 460–466). Wiley. <https://doi.org/10.1002/pca.2443>
- Pistón, M., Machado, I., Branco, C. S., Cesio, V., Heinzen, H., Ribeiro, D., Fernandes, E., Chisté, R. C., & Freitas, M. (2014). Infusion, decoction and hydroalcoholic extracts of leaves from artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *cardunculus*) are effective scavengers of physiologically relevant ROS and RNS. *Food research international* (Ottawa, Ont.), 64, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.078>
- Poynard, T., Bedossa, P., & Opolon, P. (1997). Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* (London, England), 349(9055), 825–832. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(96\)07642-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)07642-8)
- Raney, Beverly M.D. (1997). Hepatoblastoma in Children, *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* Volume 19 - Issue 5 - p 418-422
- Rauf, A., Imran, M., Butt, M. S., Nadeem, M., Peters, D. G., & Mubarak, M. S. (2017). Resveratrol as an anti-cancer agent: A review. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 58, Issue 9, pp. 1428–1447). Informa UK Limited. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1263597>
- Renehan, A. G., Booth, C., & Potten, C. S. (2001). What is apoptosis, and why is it important?. *BMJ* (Clinical research ed.), 322(7301), 1536–1538. <https://doi.org/10.1136/bmj.322.7301.1536>
- Rodriguez, S., Skeet, K., Mehmetoglu-Gurbuz, T., Goldfarb, M., Karri, S., Rocha, J., Shahinian, M., Yazadi, A., Poudel, S., & Subramani, R. (2021). Phytochemicals as an Alternative or Integrative Option, in Conjunction with Conventional Treatments for Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*, 13(22), 5753. <https://doi.org/10.3390/cancers13225753>
- Sánchez-Rabameda, F., Jáuregui, O., Lamuela-Raventós, R. M., Bastida, J., Viladomat, F., & Codina, C. (2003). Identification of phenolic compounds in artichoke waste by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

- Journal of chromatography. A, 1008(1), 57–72. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(03\)00964-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(03)00964-6)
- Satyanarayana, A., & Kaldis, P. (2009). Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*, 28(33), 2925–2939. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.170>
- Seyoum, A., Asres, K., & El-Fiky, F. K. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67(18), 2058–2070. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.07.002>
- Shen, Q., Dai, Z., & Lu, Y. (2010). Rapid determination of caffeoylquinic acid derivatives in *Cynara scolymus* L. by ultra-fast liquid chromatography/tandem mass spectrometry based on a fused core C18 column. *Journal of separation science*, 33(20), 3152–3158. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000397>
- Si, D., Wang, Y., Zhou, Y.-H., Guo, Y., Wang, J., Zhou, H., Li, Z.-S., & Fawcett, J. P. (2008). Mechanism of CYP2C9 Inhibition by Flavones and Flavonols. In *Drug Metabolism and Disposition* (Vol. 37, Issue 3, pp. 629–634). American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <https://doi.org/10.1124/dmd.108.023416>
- Sperandio, S., de Belle, I., & Bredesen, D. E. (2000). An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(26), 14376–14381. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.26.14376>
- Stanojević, L., Stanković, M., Nikolić, V., Nikolić, L., Ristić, D., Canadanovic-Brunet, J., & Tumbas, V. (2009). Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Contents of *Hieracium pilosella* L. Extracts. *Sensors* (Basel, Switzerland), 9(7), 5702–5714. <https://doi.org/10.3390/s90705702>
- Stauffer, J. K., Scarzello, A. J., Andersen, J. B., De Kluyver, R. L., Back, T. C., Weiss, J. M., Thorgeirsson, S. S., & Wiltrout, R. H. (2011). Coactivation of AKT and  $\beta$ -catenin in mice rapidly induces formation of lipogenic liver tumors. *Cancer research*, 71(7), 2718–2727. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2705>
- Stemmler, M. P. (2008). Cadherins in development and cancer. In *Molecular BioSystems* (Vol. 4, Issue 8, p. 835). Royal Society of Chemistry (RSC). <https://doi.org/10.1039/b719215k>

- Tannapfel, A., Grund, D., Katalinic, A., Uhlmann, D., Köckerling, F., Haugwitz, U., Wasner, M., Hauss, J., Engeland, K., & Wittekind, C. (2000). Decreased expression of p27 protein is associated with advanced tumor stage in hepatocellular carcinoma. *International journal of cancer*, 89(4), 350–355. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(20000720\)89:4<350::aid-ijc6>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0215(20000720)89:4<350::aid-ijc6>3.0.co;2-3)
- Tatsch, E., De Carvalho, J. A., Hausen, B. S., Bollick, Y. S., Torbitz, V. D., Duarte, T., Scolari, R., Duarte, M. M., Londero, S. W., Vaucher, R. A., Premaor, M. O., Comim, F. V., & Moresco, R. N. (2015). Oxidative DNA damage is associated with inflammatory response, insulin resistance and microvascular complications in type 2 diabetes. *Mutation research*, 782, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.10.003>
- Terada, T., & Maruo, H. (2013). Unusual extrahepatic metastatic sites from hepatocellular carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology*, 6(5), 816–820.
- Thiele, M., Gluud, L. L., Fialla, A. D., Dahl, E. K., & Krag, A. (2014). Large variations in risk of hepatocellular carcinoma and mortality in treatment naïve hepatitis B patients: systematic review with meta-analyses. *PloS one*, 9(9), e107177. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107177>
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5), 871–890. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>
- Toyama, T., Lee, H. C., Koga, H., Wands, J. R., & Kim, M. (2010). Noncanonical Wnt11 inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration. *Molecular cancer research : MCR*, 8(2), 254–265. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0238>
- Vafadar, A., Shabaninejad, Z., Movahedpour, A., Fallahi, F., Taghavipour, M., Ghasemi, Y., Akbari, M., Shafiee, A., Hajighadimi, S., Moradizarmehri, S., Razi, E., Savardashtaki, A., & Mirzaei, H. (2020). Quercetin and cancer: new insights into its therapeutic effects on ovarian cancer cells. *Cell & bioscience*, 10, 32. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00397-0>

- Vaghasiya, Y., & CHANDA, S. (2007). Screening of methanol and acetone extracts of fourteen Indian medicinal plants for antimicrobial activity. *Turkish Journal of Biology*, 31(4), 243-248.
- van Zijl, F., Krupitza, G., & Mikulits, W. (2011). Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutation research*, 728(1-2), 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.05.002>
- Vargas, A. J., & Burd, R. (2010). Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. *Nutrition reviews*, 68(7), 418–428. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00301.x>
- Vasantha Rupasinghe, H. P., Nair, S. V. G., & Robinson, R. A. (2014). Chemopreventive Properties of Fruit Phenolic Compounds and Their Possible Mode of Actions. In *Studies in Natural Products Chemistry* (pp. 229–266). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63281-4.00008-2>
- Vernon, G., Baranova, A., & Younossi, Z. M. (2011). Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 34(3), 274–285. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04724.x>
- Wahl, K., Siegemund, M., Lehner, F., Vondran, F., Nüssler, A., Länger, F., Krech, T., Kontermann, R., Manns, M. P., Schulze-Osthoff, K., Pfizenmaier, K., & Bantel, H. (2013). Increased apoptosis induction in hepatocellular carcinoma by a novel tumor-targeted TRAIL fusion protein combined with bortezomib. In *Hepatology* (Vol. 57, Issue 2, pp. 625–636). Wiley. <https://doi.org/10.1002/hep.26082>
- Wang K. (2014). Molecular mechanisms of hepatic apoptosis. *Cell death & disease*, 5(1), e996. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.499>
- Wang, K., Yang, J. Z., Zuo, L., & Zhang, D. M. (2008). Two new flavanonol glycosides from *Gordonia chryandra*. In *Chinese Chemical Letters* (Vol. 19, Issue 1, pp. 61–64). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2007.10.033>
- Wen WH, Chen HL, Ni YH, Hsu HY, Kao JH, Hu FC, et al. Secular trend of the viral genotype distribution in children with chronic hepatitis B virus infection after universal infant immunization. *Hepatology*. 2011;53(2):429–36

- WHO | WHO issues its first hepatitis B treatment guidelines. (2015). Erişim tarihi : 25/7/2022 - <https://apps.who.int/mediacentre/news/releases/2015/hepatitis-b-guideline/en/index.html>
- Wiklund, A. (1992). *The genus Cynara L. (Asteraceae-Cardueae)*. Oxford University Press (OUP). <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1992.tb00260.x>
- Wu, L., Li, J., Liu, T., Li, S., Feng, J., Yu, Q., Zhang, J., Chen, J., Zhou, Y., Ji, J., Chen, K., Mao, Y., Wang, F., Dai, W., Fan, X., Wu, J., & Guo, C. (2019). Quercetin shows anti-tumor effect in hepatocellular carcinoma LM3 cells by abrogating JAK2/STAT3 signaling pathway. *Cancer medicine*, 8(10), 4806–4820. <https://doi.org/10.1002/cam4.2388>
- Xu, M., Wang, S., Song, Y. U., Yao, J., Huang, K., & Zhu, X. (2016). Apigenin suppresses colorectal cancer cell proliferation, migration and invasion via inhibition of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Oncology letters*, 11(5), 3075–3080. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4331>
- Xu, X. R., Huang, J., Xu, Z. G., Qian, B. Z., Zhu, Z. D., Yan, Q., Cai, T., Zhang, X., Xiao, H. S., Qu, J., Liu, F., Huang, Q. H., Cheng, Z. H., Li, N. G., Du, J. J., Hu, W., Shen, K. T., Lu, G., Fu, G., Zhong, M., ... Han, Z. G. (2001). Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26), 15089–15094. <https://doi.org/10.1073/pnas.241522398>
- Yahia, E. M., & Carrillo-Lopez, A. (Eds.). (2018). *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables*. Woodhead Publishing.
- Yan, X., Qi, M., Li, P., Zhan, Y., & Shao, H. (2017). Apigenin in cancer therapy: anti-cancer effects and mechanisms of action. *Cell & bioscience*, 7, 50. <https://doi.org/10.1186/s13578-017-0179-x>
- Yang, J. D., & Roberts, L. R. (2010). Hepatocellular carcinoma: A global view. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 7(8), 448–458. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.100>
- Yang, Y. A., Zhang, G. M., Feigenbaum, L., & Zhang, Y. E. (2006). Smad3 reduces susceptibility to hepatocarcinoma by sensitizing hepatocytes to apoptosis

- through downregulation of Bcl-2. *Cancer cell*, 9(6), 445–457. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.04.025>
- Yano, H., Fukuda, K., Haramaki, M., Momosaki, S., Ogasawara, S., Higaki, K., & Kojiro, M. (1996). Expression of Fas and anti-Fas-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Journal of Hepatology*, 25(4), 454–464. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(96\)80204-2](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(96)80204-2)
- Yao, D., & Brownlee, M. (2010). Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes*, 59(1), 249–255. <https://doi.org/10.2337/db09-0801>
- Yao, G., Lee, T. J., Mori, S., Nevins, J. R., & You, L. (2008). A bistable Rb-E2F switch underlies the restriction point. *Nature cell biology*, 10(4), 476–482. <https://doi.org/10.1038/ncb1711>
- Yoshimoto, S., Loo, T. M., Atarashi, K., Kanda, H., Sato, S., Oyadomari, S., Iwakura, Y., Oshima, K., Morita, H., Hattori, M., Honda, K., Ishikawa, Y., Hara, E., & Ohtani, N. (2013). Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature*, 499(7456), 97–101. <https://doi.org/10.1038/nature12347>
- Yu, M. W., Lien, J. P., Liaw, Y. F., & Chen, C. J. (1996). Effects of multiple risk factors for hepatocellular carcinoma on formation of aflatoxin B1-DNA adducts. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 5(8), 613–619.
- Yuan, J. Z., Dou, D. Q., Chen, Y. J., Li, W., Kazuo, K., Tamotsu, N., & Yao, X. S. (2004). Studies on dihydroflavonol glycosides from rhizome of *Smilax glabra*. *China journal of Chinese materia medica*, 29(9), 867–870.
- Zhang, X., Xu, H. J., Murakami, Y., Sachse, R., Yashima, K., Hirohashi, S., Hu, S. X., Benedict, W. F., & Sekiya, T. (1994). Deletions of chromosome 13q, mutations in Retinoblastoma 1, and retinoblastoma protein state in human hepatocellular carcinoma. *Cancer research*, 54(15), 4177–4182.
- Zhao, G., Han, X., Cheng, W., Ni, J., Zhang, Y., Lin, J., Song, Z. (2017). Apigenin inhibits proliferation and invasion, and induces apoptosis and cell cycle arrest

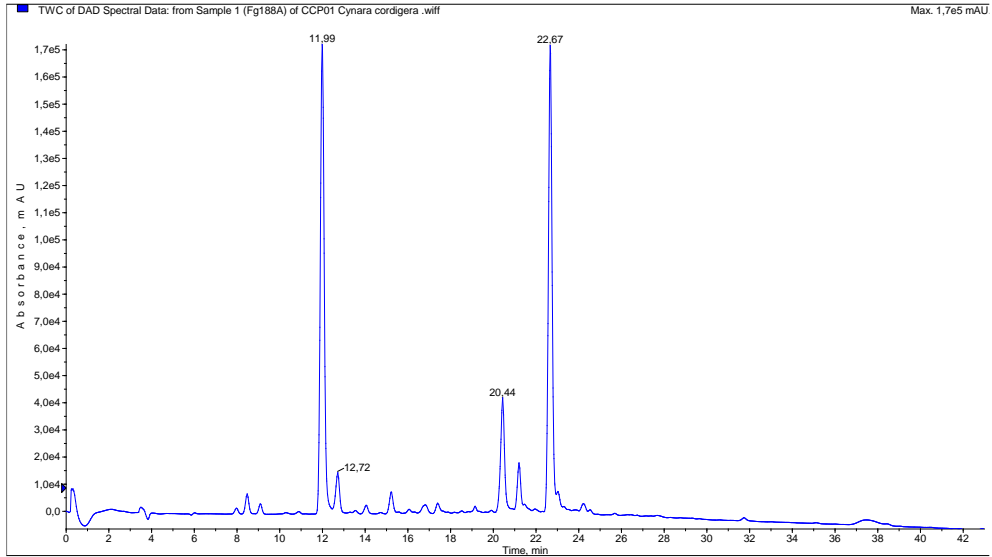
in human melanoma cells. *Oncol Rep.* 37: 2277–2285.  
<https://doi.org/10.3892/or.2017.5450>.

Zou, X., Zhang, D., Song, Y., Liu, S., Long, Q., Yao, L., Li, W., Duan, Z., Wu, D., & Liu, L. (2020). HRG switches TNFR1-mediated cell survival to apoptosis in Hepatocellular Carcinoma. *Theranostics*, 10(23), 10434–10447.  
<https://doi.org/10.7150/thno.47286>

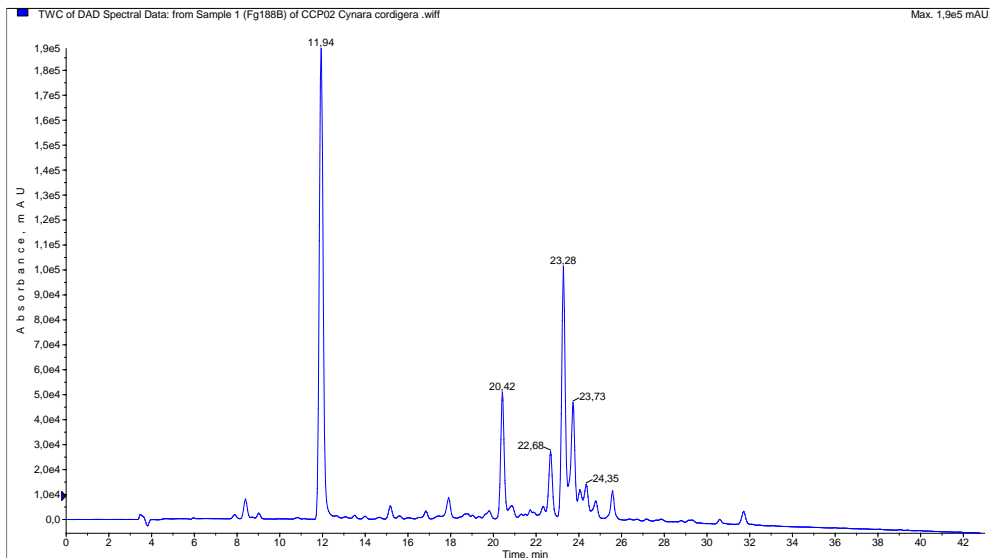


## EKLER

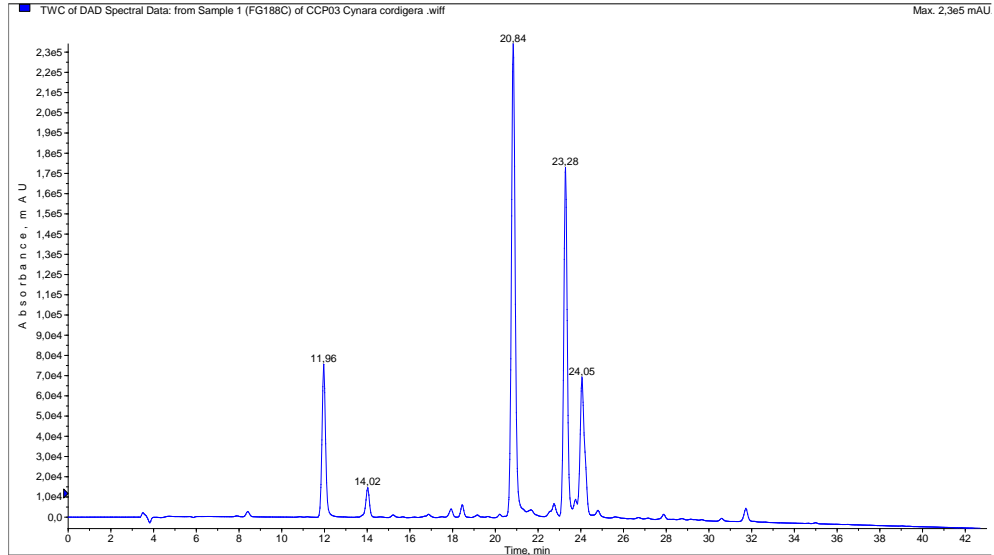
### Ek 1 : Fraksiyon F'ye ait DAD Kromatogramı



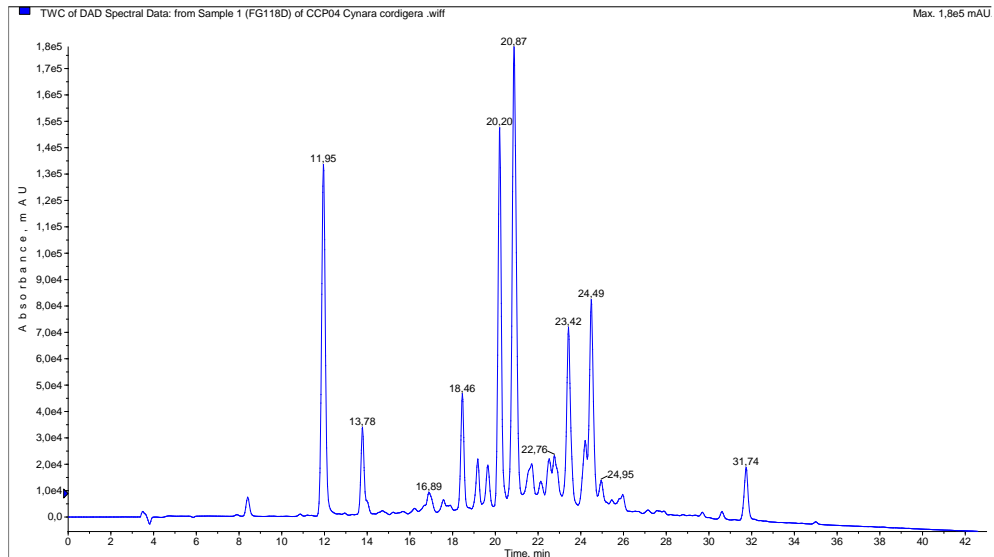
### Ek 2 : Fraksiyon G'ye ait DAD Kromatogramı

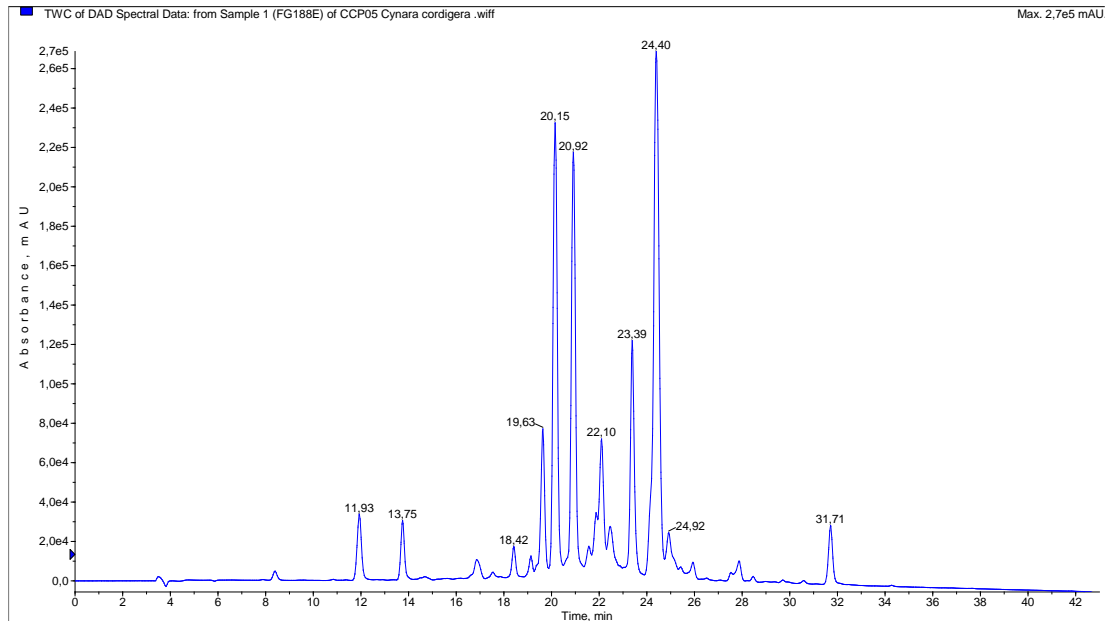
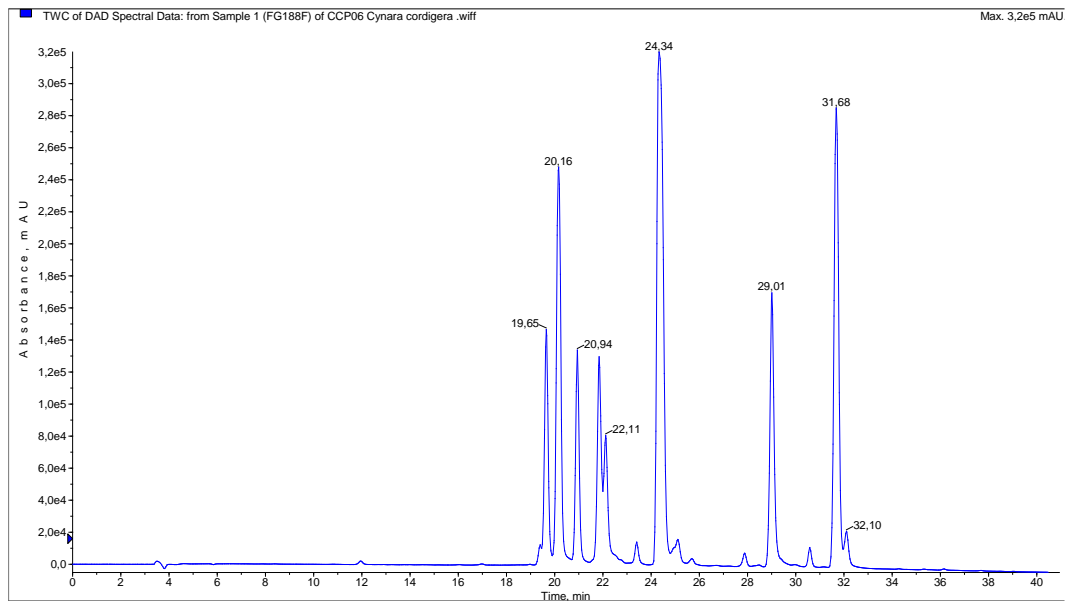


### Ek 3 : Fraksiyon H'ya ait DAD Kromatogramı



### Ek 4 : Fraksiyon I'ye ait DAD Kromatogramı



**Ek 5 : Fraksiyon J'ye ait DAD Kromatogramı****Ek 6 : Fraksiyon K'ye ait DAD Kromatogramı**

## Ek 7 : İntihal Raporu

ORIGINALITY REPORT			
12%	10%	3%	7%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS
PRIMARY SOURCES			
1	docs.neu.edu.tr Internet Source	5%	
2	Submitted to Yakın Doğu Üniversitesi Student Paper	4%	
3	www.acgpubs.org Internet Source	1%	
4	acikbilim.yok.gov.tr Internet Source	<1%	
5	Submitted to Anadolu University Student Paper	<1%	
6	www.non-sport.com Internet Source	<1%	
7	9lib.net Internet Source	<1%	
8	d-nb.info Internet Source	<1%	
9	studentsrepo.um.edu.my Internet Source	<1%	

## Ek 8 : Records of Natural Products dergisinde tez sonuçlarının yayınlandığı makale

ORIGINAL ARTICLE

**A C G**  
publications

Rec. Nat. Prod. X:X (20XX) XX-XX

records of natural  
products

**The Effect of *Cynara cornigera* L. in HepG2 Hepatocellular  
Carcinoma Cells**

**Erdal Şanlıdağ** <sup>1\*</sup>, **Eda Becer** <sup>1,4</sup>, **İhsan Çalış** <sup>2,3</sup>,  
**K. Hüsnü Can Başer** <sup>3</sup>, **Azmi Hanoğlu** <sup>3</sup>, **Fatih Göger** <sup>1,6</sup>  
and **H. Seda Vatansever** <sup>6</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Near East University, Nicosia, Turkish Republic of Northern Cyprus

<sup>2</sup> Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Near East University, Nicosia, Turkish Republic of Northern Cyprus

<sup>3</sup> Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Anadolu University, Eskişehir, Türkiye

<sup>4</sup> DESAM Research Institute, Near East University, Turkish Republic of Northern Cyprus

<sup>5</sup> Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Manisa Celal Bayar University, Manisa, Türkiye

<sup>6</sup> Medicinal Plant, Drug and Scientific Research and Application Center (AUBIBAM), Anadolu University, Eskişehir, 26470 Türkiye

(Received April 12, 2022; Revised May 30, 2022; Accepted June 08, 2022)

**Abstract:** Amongst all cancer types, liver cancer is the fourth leading cause of cancer mortality. It is frequently stated as hepatocellular carcinoma (HCC) and occurs in hepatocytes. Genetic alterations of hepatocytes such as Wnt/ $\beta$ -catenin and JAK / STAT signaling pathways play a key role for the development of the HCC. Currently, there are a few available treatments for HCC; such treatments include transplantation, surgical resections and anti-cancer drugs. Most of the anti-cancer drugs target the signaling pathways for achieving an effective treatment. However, these treatments have some undesirable side effects. Thus, there is a need for discovering alternative anti-cancer agents with no or lesser side effects. Plant constituents are promising anti-cancer agents. *Cynara cornigera* L. contains plenty of phenolic compounds including quercetin, apigenin, etc. This study aimed to analyze the anti-cancer property of the fractionated methanol extract of the flowers of *C. cornigera*. All the fractions obtained were analyzed to determine the cytotoxic activity on HepG2 cells. Two of the fractions containing polyphenolic compounds had a significant cytotoxic activity related to non-canonical Wnt11 signaling pathways on HepG2 cells.

**Keywords:** *Cynara cornigera*; phenolic compounds; HepG2; cytotoxicity; Wnt11; liver cancer. ©2022 ACG Publications. All right reserved

## 1. Introduction

The liver is the largest internal organ of the human body with multi-functional and complex properties [1]. Many diseases such as hepatitis -B, -C and cancer may affect the functioning of this

\* Corresponding author: E-Mail: [esanlidag@gmail.com](mailto:esanlidag@gmail.com)

The article was published by ACG Publications  
<http://www.acgpubs.org/journal/records-of-natural-products> Month-Month 202x EISSN:1307-6167  
DOI: <http://doi.org/10.25135/mp.335.2106.2092>  
Available online: July 04, 2022

### Biactivity of *Cynara cornigera* L.

fundamental organ. Cancer occurs when there is uncontrolled proliferation of the cells within the body and it is the leading cause of death worldwide after cardiovascular diseases [2,3]. Amongst all cancer types, liver cancer is the fourth most frequent cancer leading to death and the sixth most prevalent cancer type worldwide [4]. Liver cancer is frequently referred to as Hepatocellular Carcinoma (HCC) which occurs in the hepatocytes; a specific type of liver cell [5].

Untreated Hepatitis –B, -C infection may lead to cirrhosis and the development of HCC through years [6,7]. Liver diseases are a worldwide problem, but they occur particularly frequently in developing countries; such as China and sub-Saharan Africa [8,9]. HCC occurs with approximately 80% of all cases of cirrhosis. [10]. Other risk factors contributing to liver disease are tobacco and alcohol consumption, aflatoxin exposure, obesity, diabetes, non-fatty liver disease and diet [11]. In addition to these risk factors, regional differences play a significant role in developing HCC associated with liver diseases [7].

The process of developing HCC involves interactions between different cellular mechanisms such as hypoxia, oxidative stress, necroinflammation and changes in the microenvironment of a tumor [12]. HCC can occur as a consequence of both genetic and epigenetic alterations [13]. Transcription factors with genetic alterations such as the dysregulation of the Wingless-related integration site and  $\beta$ -catenin complex (Wnt/ $\beta$ -catenin), and Janus kinase-signal transducer and activator transcription factor (JAK / STAT) pathways have devastating effects on the pathogenesis of HCC [14]. Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activation leads to increased cell proliferation, angiogenesis, decrease of apoptosis and formation of the extracellular matrix supporting the generation of the tumor [15-18]. Activation of Wnt3a which is a member of Wnt protein family leads to cell proliferation in HepG2 cells [19]. On the other hand, non-canonical Wnt11 inhibits cell proliferation and migration of hepatocellular carcinoma [20]. Moreover,  $\beta$ -catenin has a distinct role in the nucleus, affecting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway which leads to cell proliferation and angiogenesis in HCC [18,21].

Another important transcription factor involving hepatocellular carcinoma is Stat3. Its function is to increase cell proliferation, differentiation and affect cell survival. Stat3 functions as an oncogene as well as a tumor suppressor, that blocks cell apoptosis and suppresses tumor growth in HCC upon its inhibition [22,23]. Transcription factor Jak2 is also a frequently active agent for cancer progress [24] JAK/STAT pathway thus leads to dysregulation of genes which control metastasis, angiogenesis and cell survival in HCC [25]. Activation of JAK / STAT pathway occurs in tumor cells and it causes progression of cancer.

There are different treatment options for HCC, such as liver transplantation, surgical resections and particularly, when surgical sectioning is not possible, pharmaceuticals such as sorafenib, regorafenib, nivolumab cabozantinib, ramucirumab [12,13]. All drugs used to treat HCC have serious side effects; particularly stomach pain, loss of hair, decrease of white blood cell (WBC) count, diarrhea and fatigue [26]. Also, HCC is highly resistant to chemotherapy [12]. Therefore, researchers are in the search of a treatment to reduce or do away with negative effects of current treatment methods. In this context, compounds in plants with anti-cancer activity have great potential to find a treatment for cancer.

There are a large variety of compounds such as phenolic molecules which are produced by plants in nature as secondary metabolites. Phenolic compounds are an important group of phytochemicals biosynthesized by plants [27].

Polyphenols have pharmaceutical properties such as anti-inflammatory, anti-microbial, anti-cancer and anti-oxidant activities [28]. Flavonoids are also polyphenolic compounds naturally occurring in almost every fruit and vegetables [29]. In this sense, *Cynara cornigera* L. is rich in polyphenolic compounds and also flavonoids [30,31].

*C. cornigera* (wild artichoke) belongs to the family *Asteraceae*. Ten *Cynara* species exist in nature and six of them (*Cynara syriaca*, *Cynara scolymus*, *Cynara makrisii*, *Cynara cyrenaica*, *Cynara cornigera*, *Cynara cardunculus*) grow in Cyprus. The plant is used in folk medicine for various liver diseases in Cyprus. Previous studies have shown that compounds of *C. cornigera* possess good treatment and hepatoprotective activity in animals with liver damage [30]. *C. cornigera* has plenty of flavonoids such as quercetin, apigenin, kaempferol etc. [31]. Quercetin, in particular, is an inhibitor of cell migration, apoptosis and invasion in hepatocellular carcinoma [32].

Investigation of cytotoxic effect of the flower part of *C. cornigera* methanol extract fractions on the HepG2 liver cancer cells and also identification of their anti-carcinogenic effect on Wnt11, Wnt3a, Stat3, Jak2 and  $\beta$ -catenin signaling pathways constituted the aims of this study.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Plant Materials

*C. cornigera* samples were collected in May 2018 from Akdoğan in North Cyprus. A voucher specimen is deposited in Near East University Herbarium with the code NEUN6893.

### 2.2. Extraction and Fractionation

The flowers of *C. cornigera* (300 g) were treated with 700 mL MeOH. The extract was evaporated till dryness by using a rotary evaporator (Buchi®) (Model: R-210 / Water Bath: B-491 model / Vacuum Pump: V-700 model / Vacuum Pump Control Panel: V-850 model and Water Coolant: Thermo EZ Cool 80) to yield 18.7 g total extract (yield: 6.23%). The dried extract was partitioned with dichloromethane (DCM, Merck, 1.06009.2500) (100 mL) and distilled H<sub>2</sub>O (3 × 250 mL). DCM (S<sub>1</sub>) and H<sub>2</sub>O (S<sub>2</sub>) phases were separated and evaporated separately till dryness.

S<sub>2</sub> (8.4 g) was dissolved in 100 mL distilled H<sub>2</sub>O and fractionated on a polyamide column (75 g [(Fluka Polyamides – Sigma-Aldrich, 63428-83-1) 5-10  $\mu$ m] R=3cm h = 41cm). For the elution, H<sub>2</sub>O and H<sub>2</sub>O-MeOH mixtures with increasing proportion of MeOH were used. 38 obtained fractions were separately evaluated with Thin Layer Chromatography (TLC, TLC Silica Gel 60 F254, Merck, 1.05554.0001) profiles. The fractions were combined according to the TLC results into 6 combined fractions (Fr. A – F). The combined fractions were concentrated and dissolved in H<sub>2</sub>O and frozen. The frozen fractions were lyophilized using freeze-dryer (Christ® - Model: Alpha 1-4 LD plus).

### 2.3. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) Analysis

LC-MS/MS analysis was carried out using an Absciex 3200 Q trap MS/MS dedector. Experiments were performed with a Shimadzu 20A HPLC system coupled to an Applied Biosystems 3200 Q-Trap LC- MS/MS instrument equipped with an ESI source operating in negative ion mode. For the chromatographic separation, a GL Science Inertsil ODS - 3 250 × 4.6 mm, 5  $\mu$ m particle size, analytical column operating at 40° C has been used. The solvent flow rate was maintained at 0.5 mL/min. Detection was carried out with PDA detector. The elution gradient consisted of mobile phases (A) methanol:water:formic acid (10:89:1, v/v/v) and (B) methanol:water:formic acid (89:10:1, v/v/v). The composition of B was increased from 10% to 100% in 40 min. LC-ESI-MS/MS data were collected and processed by Analyst 1.6 software.

### 2.4. Cell Line and Cell Culture

The human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2, ATCC® HB-8065™) was used. HepG2 cells were cultured in RPMI-1640 (Capricorn Scientific, RPMI-A) medium supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS, Capricorn Scientific, FBS-HI-11B), 1% penicillin-streptomycin (Capricorn Scientific, PS-B) and 1% L-glutamin (Capricorn Scientific, GLN-B) at 37 °C and in a 5% CO<sub>2</sub> containing humidified chamber. They were sub-cultured with 0.25% trypsin-EDTA solution (Capricorn Scientific, TRY-1B) when they reached at least %75 confluent situation.

### 2.5. Cell Viability and Cell Growth

Cytotoxicity and cell viability analysis was evaluated with MTT test (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Glentham Life Sciences, 471OVO). Following trypsinization of HepG2 cells, they were seeded into 96 well plate and each well contained 5x10<sup>3</sup> cells. After 24h incubation, five different concentrations (5, 10, 25, 50 and 100  $\mu$ g/mL) of each fraction were prepared by diluting with the medium. Negative control group did not contain any fraction or cell, while positive

### Biactivity of *Cynara cornigera* L.

control group contained only HepG2 cells. HepG2 cells were incubated for 24, 48 and 72 hours for MTT analysis. Then, 10  $\mu$ L MTT solution was added to each well and all the wells were incubated for 4 hours at 37 °C and in a 5% CO<sub>2</sub> containing humidified chamber. After incubation time, 50  $\mu$ L Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Biomatik, A2424-500ML) was added to each well to dissolve the formazan crystals and absorbance was measured with spectrophotometer (VersaMax, Molecular Device, Sunnyvale, USA) at 570 nm. All the experiments were repeated three times.

#### 2.6. Reactives and Applications

Fractions which were dissolved as 100 mM concentration in Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Biomatik, A2424-500ML) were diluted by the HepG2 culture medium. For all fractions, concentration of DMSO was less than 0.05%. Different concentrations (5, 10, 25, 50 and 100  $\mu$ M) of fractions were separately treated to the cells for determining the active dose and cytotoxicity.

#### 2.7. Immunocytochemistry

Cultured HepG2 cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, STBH3693) in phosphate buffer saline (PBS) at 4 °C for 30 minutes. After the cells were washed with PBS for three times, % 0.1 Triton X-100 (Sigma, 9002-93-1) was added to the cell permeabilization and incubated for 15 minutes on ice. HepG2 cells were washed with PBS for three times and incubated with %3 hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Riedel-de Haën, 70570) to inhibit the activity of endogen peroxidase for 5 minutes at room temperature. After washing the cells with PBS three times for 5 minutes, a blocking solution (Histostain – Thermo Fisher Plus Kit HRP, 859043) was added and incubated for 1 hour. After discharging of the blocking solution without washing, the cells were incubated with primer antibodies which are against Wnt11 (Elabscience, E-AB-10836), Wnt3a (St John's Laboratory, STJ115662), Stat3 (St John's Laboratory, STJ27462), Jak2 (St John's Laboratory, STJ90945) and  $\beta$ -catenin (Proteintech, 51067-2-AP) for overnight at 4 °C. After washing with PBS for 5 minutes three times, the cells were incubated with a biotinylated-secondary antibody (Protein Novex Life Technologies, 1666262A) for 30 minutes. After washing again with PBS, 100  $\mu$ l Horseradish peroxidase (HRP) – Streptavidin complex (Protein Novex Life Technologies, 1666262A) was added and incubated at room temperature for 30 minutes. The cells were washed with PBS and they were incubated in diaminobenzidine (DAB, ScyTek Laboratories, ACK125) for 5 minutes in order to screen for the immunoreactivity. After washing the cells with distilled water, Mayer's Hematoxylin solution was applied to counterstain for 5 minutes. All the samples were mounted with the mounting medium (Merck Millipore, 107961, Germany) and examined with light microscope (Olympus CX31, CX31RTSF). The staining of Wnt11, Wnt3a, Stat3, Jak2 and  $\beta$ -catenin were determined semi-quantitatively by using Histologic-Score (H-Score). H-Score was calculated as;  $H\text{-Score} = \sum (i + 1)$  equation. In the equation,  $i$  is intensity of staining and value of  $i$  can be 1 (mild), 2 (moderate) and 3 (strong).  $\sum$  is the percentage of cells which were dyed each intensity (values changing from 0% to 100%).

#### 2.8. Statistical Analysis

Data were stated as mean standard deviation. Results were evaluated by using Graphpad Prism 8 and SPSS 20.0. For comparison of continuous data between multiple groups, One Way Analysis of Variance, ANOVA Analysis was used. When they were statistically significant, Tukey test was used as a post-hoc test for paired comparisons. IC<sub>50</sub> values and graphics were determined by using Graphpad Prism 8.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Extraction and Fractionation

DCM and H<sub>2</sub>O phases of the methanolic extract (18.7 g) were evaporated till dryness yielding 10.3 g DCM extract (S<sub>1</sub>, 55.08%) and 8.4 g H<sub>2</sub>O extract (S<sub>2</sub>, 44.92%). The methanol extraction yielded 6.23g extract per 100g of dried flowers of *C. cornigera*.



S<sub>2</sub> (8.4 g) was dissolved in distilled water and loaded on a polyamide column. 38 fractions (fraction volume: 50 mL) were collected from the fractionation of S<sub>2</sub>. First eight fractions (total volume, 400 mL) were combined according to TLC results, but the combination of first eight fractions were not evaporate till dryness. Also, they did not freeze due to possibility of sugar. Therefore, mass of solid sample of first eight fractions ingredients was not determined.

Remaining thirty fractions were combined into six fractions (Frs. A – F) according to the TLC results. The combined fractions were evaporated till dryness and frozen. The frozen fractions were freeze-dried and solid samples were weighted. Amounts of the fractions are shown below (Table 1). S<sub>1</sub> was not fractionated due to chlorophyll or chlorophyll residues.

**Table 1.** Amount of freeze-dried fractions

Fraction	Amount
Fr A	469.9 mg
Fr B	195.3 mg
Fr C	269 mg
Fr D	132.4 mg
Fr E	208.6 mg
Fr F	393.1 mg
Total	1668.3 mg

### 3.2. Compound Identification of Fractions with LC-MS/MS

A total of twenty two compounds were identified with LC-MS/MS analysis from all fractions (Table 2). The diagnostic fragment ion based identification method was used to identify the compounds. "Hierarchical key for identification of chlorogenic acid derivatives" of Clifford [34] was used for the identification of chlorogenic acid derivatives. On the otherhand, flavonoid derivative identification was completed by using previously published LC-MS/MS analysis of several *Cynara* species, refer to Table 2. Flavonoid derivatives as flavone or flavonol derivatives and quinic acid esters were identified. All of these compounds were previously determined in several *Cynara* species.

Flavone or flavonol derivatives identified with LC-MS/MS were not precisely identified due to their similar chemical compositions and molecular weight. For this reason, these compounds were given together at the same retention time in Table 2. It was avoided to use a precise identification of these compounds such as kaempferol and luteolin. Because it is not possible to precisely identify a compound without using standard reference compounds with LC-MS analysis. But according to previous studies, *Cynara* species contain luteolin derivatives rather than kaempferol derivatives.

Apigenin and apigenin derivatives were identified from the fragment ion peak at  $m/z$  269 [M-H]<sup>-</sup> arising from apigenin aglycone. Additionally, the characteristic fragments resulting from the cleavage of the interglycosidic linkages at  $m/z$  309, 162, and 176 arising from the rhamnopyranosyl-glucopyranosyl (= rutinosyl) and sugar units (glucopyranosyl and glucuronopyranosyl), respectively.

Methoxyflavonoid derivatives are thought to be identified, such as, unknown 300 molecular weight methoxyflavonoid rutinoside and unknown polymethoxyflavonoid contain methoxy groups due to their molecular weights and fragmentations.

Biactivity of *Cynara cornigera* L.**Table 2.** LC – MS/MS analysis results of fractions A, B, C, D, E, F

RT	<i>m/z</i> [M-H] <sup>-</sup>	Fragments	Identified as	Fraction	Reference
11.9	353	191, 179, 135	3- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	A,B	[34, 35]
12.1	353	191, 179, 135	5- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	A,B,C,D, E	[34, 36]
13.7	515	353, 335, 179	1,3-Dicaffeoylquinic acid	D,E	[34, 35]
15.3	337	191, 173, 163	5- <i>p</i> -Coumaroylquinic acid	A	[34, 37]
16.6	367	191, 179, 135	3- <i>O</i> -Feruloylquinic acid	A	[34, 36]
17.3	623	447, 285	Luteolin 7-glucoside 3'-glucuronide / Kaempferol-glucoside-glucuronide	E	[36]
18.9	463	301	Quercetin-3-glucoside	E	[38]
20.2	515	353,335, 191,179	1,5-dicaffeoylquinic acid	D,E,F	[34, 36]
20.6	593	285, 151	Luteolin-7-rutinoside / Kaempferol-3- rutinoside	A,B,C,D	[36]
20.9	615	515,453,353, 191	Dicaffeoyl-succinoylquinic acid	E,F	[39]
21.3	433	271, 177, 151	Naringenin glucoside	A	[38]
21.3	609	314, 299, 285, 271	Similar to Rhamnetin hexosyl pentoside / isorhamnetin hexosyl pentoside	A	
22.3	461	285	Luteolin glucuronide / Kaempferol glucuronide	E,F	[36]
22.7	577	269	Apigenin rutinoside	A	[36]
23.1	607	299, 284	methoxyflavonoid (like Diosmetin/kaempferide/hispidulin)	A	
23.3	431	268, 117	Apigenin glucoside	B,C,D	[36]
23.9	461	327,313,297,283, 269,254	Unknown polymethoxy flavonoid	B	
24.3	477	314, 299, 285	Isorhamnetin / rhamnetin hexoside	C,D	[40]
24.5	445	269, 113	Apigenin glucuronide	D,E,F	[36]
28.2	459	311,269	Apigenin derivative	E	
29.2	285	151, 133	Luteolin or Kaempferol	F	[36]
31.7	269	117	Apigenin	B,C,D,E	[36]

RT: Retention time

**3.3. Cell Viability and Cytotoxicity**

HepG2 cells were treated with freeze-dried fractions with concentrations ranging from 5, 10, 25, 50 100 µg/mL of *C. cornigera* extracts. MTT assay was used to determine the cell viability and cytotoxic effect of fractions on HepG2 cells for 24h and 48h. Two of the *C. cornigera* extracts (Fr B and Fr E) showed a decrease of HepG2 cell proliferation and a toxic effect in a dose and time-dependent manner (Table 3).

**Table 3.** Percentage of cell viability results of freeze-dried fractions of the methanolic extract of *C. cornigera* flowers treated in HepG2 cells, in dose and time-dependent manner.

Fraction	5 µg/mL		10 µg/mL		25 µg/mL		50 µg/mL		100 µg/mL	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Fr A	90.82	92.56	95,20	83,92	96,47	85,13	91,43	70,34	84,47	59,24
Fr B	104.42	84.10	115,51	79,58	90,21	69,40	113,72	72,23	76,55	54,37
Fr C	106.37	99.38	108,15	100,20	121,78	90,18	121,95	95,25	115,49	83,06
Fr D	111.97	92.46	101,04	95,46	98,50	81,63	94,54	80,73	77,14	52,06
Fr E	93.40	91.53	99,19	89,14	101,73	83,31	82,76	80,74	84,22	55,06
Fr F	82.35	96.47	99,70	84,07	84,45	75,89	87,27	72,91	76,91	64,76

Percentage of cell viability was calculated based on the absorbance of the control group of related fraction as 100. Percentage of cell viability was determined by using the [(Absorbance of Fraction / Absorbance of Control Group) x 100] formula.

Cell viability of cells treated with Fr A, C, D and F did not decrease significantly. On the other hand, HepG2 cells treated with Fr B and Fr E showed a significant decrease of cell viability. This result shows that Fr B and Fr E have significant cytotoxic effect.

Fr A is the previous fraction of Fr B and Fr C is the next fraction of Fr B. Fr A and Fr C do not have a significant cytotoxic effect on HepG2 cells. Compounds of Fr B were compared with compounds of Fr A and Fr C. Unknown polymethoxy flavonoid was only determined in Fr A.

Fr D is the previous fraction of Fr E and Fr F is the next fraction of Fr E. For this reason, LC-MS/MS results of Fr E were compared with Fr D and Fr F LC-MS/MS results to determine the differences among them.

Fr B and Fr E which showed significant cytotoxic effect in HepG2 cells, were treated with the concentration range from 25, 50, 100, 200, 400 µg/mL for 24h, 48h and 72h.

**Table 4.** Percentage of cell viability of Fr B and Fr E compounds for 24h, 48h and 72h at the concentration ranging from 25, 50, 100, 200 and 400 µg/mL.

Fraction	25 µg/mL			50 µg/mL			100 µg/mL			200 µg/mL			400 µg/mL		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Fr B	102.83	96.39	91.76	110.31	83.75	81.88	87.16	7.32	63.28	65.75	26.95	11.21	9.07	4.59	3.74
Fr E	106.70	99.78	97.43	96.84	91.45	81.78	115.74	76.11	63.54	67.59	11.25	5.00	11.62	5.88	4.74

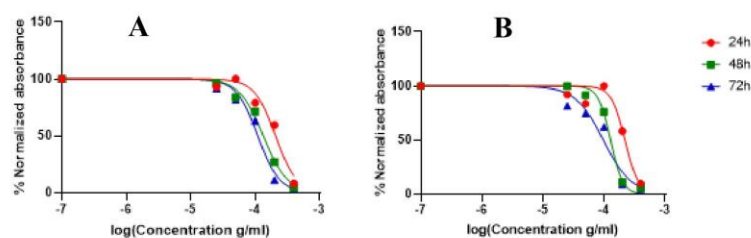
Fr A, B, C, D, E and F were performed at 5, 10, 25, 50, 100 µg/mL concentration range in MTT assay. IC<sub>50</sub> values were calculated for all fractions for 24h and 48h by using Graphpad Prism 8 program. However, cell viability tests of Fr B and Fr E were repeated at 25, 50, 100, 200 and 400 µg/mL for 24h, 48h and 72h due to having significant cytotoxicity.

Biactivity of *Cynara cornigera* L.**Table 5.** 24h, 48h and 72h IC<sub>50</sub> values for freeze-dried fractions

Fraction	24h IC <sub>50</sub> Value (µg/mL)	48h IC <sub>50</sub> Value (µg/mL)	72h IC <sub>50</sub> Value (µg/mL)
Fr A	236.6	143.0	-
Fr B*	207.2	134.7	110.2
Fr C	39872	642.2	-
Fr D	255.0	99.0	-
Fr E*	220.4	128.5	97.87
Fr F	334.9	156.9	-

\* Fraction which has significant cytotoxic effect.

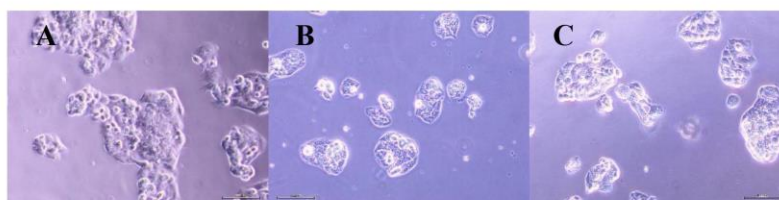
Fr C showed the highest IC<sub>50</sub> value and Fr B had the lowest IC<sub>50</sub> value for 24h (Table 5). Fr C has the highest IC<sub>50</sub> value and Fr D has the lowest IC<sub>50</sub> value for 48h (Table 5). For 72h, IC<sub>50</sub> value of Fr B was higher than Fr C (Table 5). IC<sub>50</sub> values of Fr B and Fr E graphics are shown in Figure 1.



**Figure 1.** IC<sub>50</sub> graphics of Fr A and Fr B for 24h, 48h and 72h on HepG2 cells

### 3.4. Cell Morphology

HepG2 cells are epithelial-like cells which grow epithelial colony morphology after 48-hour in culture. The morphology of HepG2 cells changed and the number of cells decreased after the cells were treated with Fr B and Fr E (Figure 2). Although we were unable to determine the precise concentration of each compound in a fraction, we can however speculate that the morphological occurred due to a synergetic effect.



**Figure 2.** Microscope images of control (A), Fr B treated (B) and Fr E treated (C) HepG2 cells. Scale Bars = 100 µm

### 3.5. Immunocytochemical Evaluation

For immunocytochemical evaluation, 100 µg/mL of Fr B and Fr E were used separately to treat HepG2 cells for 48h. Concentration which was used for immunocytochemical investigation was determined from IC<sub>50</sub> calculation.

While the immunostaining intensity of Wnt11 was weak in the HepG2 cell control group (Figure 3, A), immunoreactivity was moderate in both Fr B (Figure 3, B) and Fr E (Figure 3, C) treated HepG2 cells. Wnt11 intensity was higher in the cells which were treated with Fr B and Fr E than control group (Figure 3) and it was statistically significant ( $p < 0.05$ , Table 6). Thus, Wnt11 pathway may be activated by Fr B and Fr E and thus cell proliferation decreased. Presence of Wnt11 inhibits the stabilization of  $\beta$ -catenin and related signaling pathway. Consequently, the presence of Wnt11 inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration [20]. In this study, non-canonical Wnt11 pathway could be activated by fractions B and E. Non-canonical Wnt11 related inhibition of proliferation is depend on  $\beta$ -catenin. Because of this reason,  $\beta$ -catenin level is important. Previous studies showed that activation of  $\beta$ -catenin pathway induces cell proliferation and inhibits apoptosis in many cancer types. Immunostaining intensity was strong in HepG2 cells which were treated with Fr B (Figure 3, O) and was moderate in HepG2 cells which were treated with Fr E (Figure 3, N). Immunostaining intensity of the control group (Figure 3, M) was weaker than Fr B and Fr E treated cells. Fr B and Fr E intensities were statistically higher and significant according to control group. ( $p < 0.05$ , Table 6). In this research,  $\beta$ -catenin inhibition was expected but  $\beta$ -catenin pathway was not inhibited by Fr B and Fr E.

Other important pathway for cancer development is the canonical pathway and it is related with Wnt3a [41]. Immunostaining intensities of Wnt3a was strong in the control group (Figure 3, D), Fr B (Figure 3, E) and Fr E (Figure 3, F) treated cells. Therefore, Wnt3a intensity was strong in Fr B and Fr E and was not statistically significant in Fr B and Fr E treated cells when compared with the control group cells ( $p > 0.05$ , Table 6). It previously has been shown that canonical activation of the Wnt3a pathway causes cell proliferation in HepG2 cells [19]. In this context, according to the strong staining intensity of Wnt3a in control group Fr B and Fr E were not effective for the inactivation of cell proliferation.

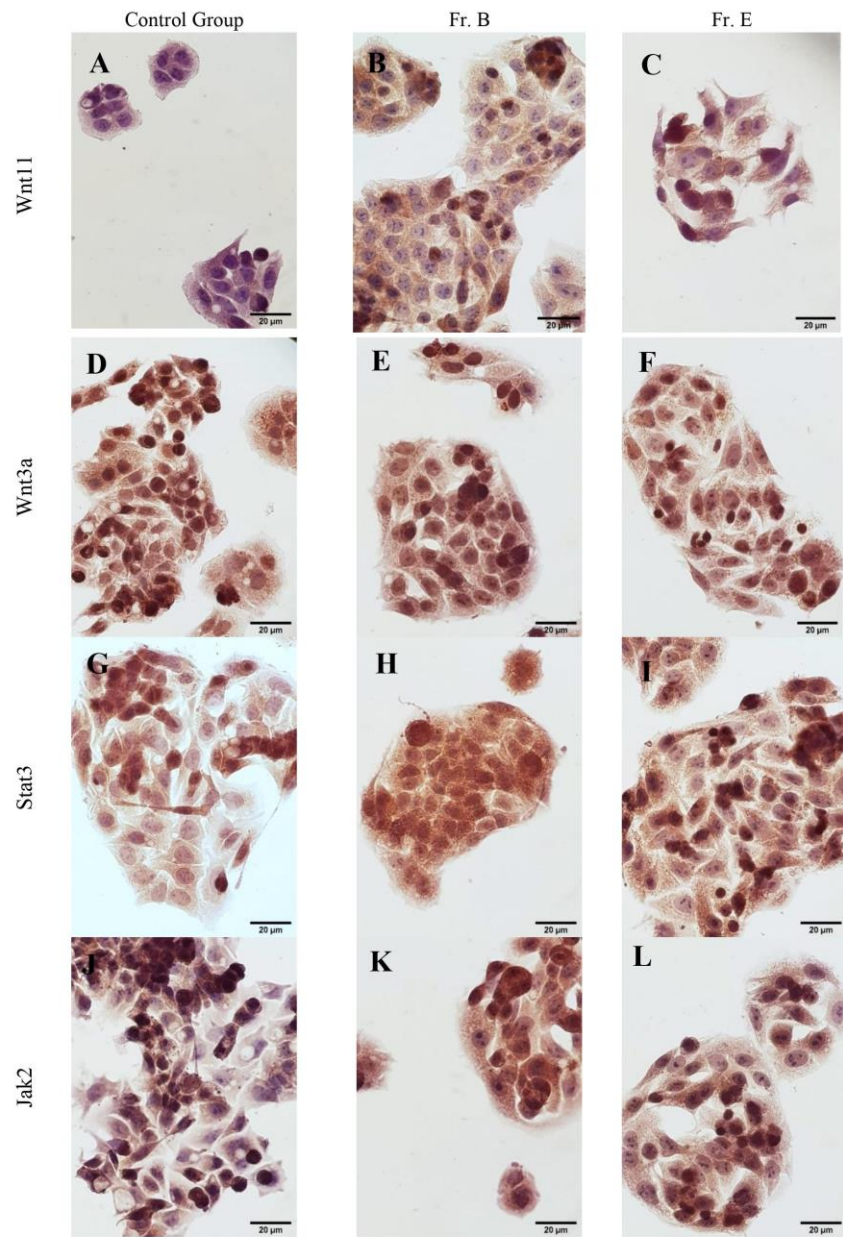
Immunostaining intensity of JAK2 was weak in the control group (Figure 3, J). JAK2 intensity was high for Fr H (Figure 3, K) and Fr K (Figure 3, L). JAK2 intensity was determined statically and significantly higher in HepG2 cells which were treated with Fr B and Fr E ( $p < 0.05$ , Table 6). Immunostaining intensities of STAT3 was strong in the control group (Figure 3, G), Fr B (Figure 3, H) and Fr E (Figure 3, I) treated cells. As a result, STAT3 intensity was not statistically significant in Fr B and Fr E treated cells according to control group ( $p > 0.05$ , Table 6). STAT3 pathway inhibition induces apoptosis of cancer cells [23]. However, according to the current study results, the STAT3 pathway wasn't inhibited in Fr B and Fr E treated cells. Accordingly, apoptosis was not induced by Fr B and Fr E.

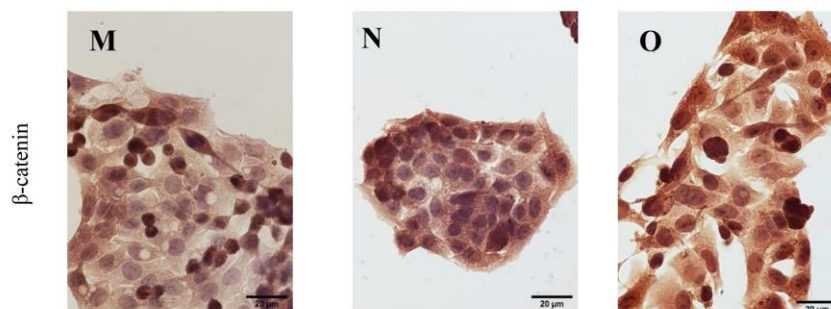
**Table 6.** The H-Score of Wnt11, Wnt3a, Stat3, Jak2 and  $\beta$ -catenin in HepG2 cells which treated with Fraction B, and Fraction E at 100 µg/mL concentration for 48 hours

	Wnt11	Wnt3a	Stat3	Jak2	$\beta$ -catenin
Control group	117.91 ± 9.83	285.41 ± 80.53	266.48 ± 81.15	151.90 ± 66.90	224.65 ± 71.10
Fr. B	283.37 ± 33.92 <sup>a</sup>	299.46 ± 82.87	284.70 ± 35.58	268.31 ± 54.06 <sup>c</sup>	299.39 ± 23.50 <sup>e</sup>
Fr. E	153.84 ± 20.34 <sup>b</sup>	304.92 ± 19.74	303.29 ± 35.45	250.90 ± 40.04 <sup>d</sup>	328.44 ± 11.02 <sup>f</sup>

Data is expressed as means ± standard deviation. One way Anova Test was used to determine the comparisons. <sup>a,b,c,d,e,f</sup> The data was significant when compared with the control group ( $p < 0.05$ ).

Biactivity of *Cynara cornigera* L.





**Figure 3.** Light microscope images of HepG2 cells which show immunoreactivity of Wnt11 (A-C), Wnt3a (D-F), Stat3 (G-I), Jak2 (J-L) and  $\beta$ -catenin (M-O). Cells were treated without (A, D, G, J, M) or with 100  $\mu$ g/mL concentration of Fr B (B, E, H, K, N) and Fr E (C, F, I, L, O) for 48 hours. Scale Bars = 20  $\mu$ m

#### 4. Conclusion

In conclusion, two of all obtained fractions from the methanol extracts of *C. cornigera* flowers containing phenolic compounds showed significant cytotoxic activity in HepG2 cells. These two fractions were investigated for their effects on the carcinogenesis mechanism of hepatocellular carcinoma in HepG2 cells. Significant effects for the inhibition of cell proliferation or inducing apoptosis were not determined on Wnt3a, Stat3, Jak2 and  $\beta$ -catenin signaling pathways. Compounds of B and E fractions of *C. cornigera* methanol extracts individually or coordinately have a significant role in the inhibition of proliferation on noncanonical Wnt11 signaling pathway. The remaining parts of the *C. cornigera* plant, such as the leaves and roots, are also expected to contain polyphenolic compounds and may have potential for further HCC anti-cancer drug studies. Consequently, cytotoxic effects of both fractions were not determined by a specific compound solely or a group of compounds, so cytotoxicity occurred by synergic effect of all compounds in the fractions.

#### Acknowledgments

This work was supported by Research Fund of the Near East University. Project Number: SAG-2017-2-017. In addition, it was carried out at DESAM Institute Cell Culture laboratory of Near East University.

#### Supporting Information

Supporting information accompanies this paper on <http://www.acgpubs.org/journal/records-of-natural-products>

#### ORCID

Erdal Sanlidag: [0000-0003-4377-9045](https://orcid.org/0000-0003-4377-9045)

Eda Becer: [0000-0002-2378-128X](https://orcid.org/0000-0002-2378-128X)

İhsan Çalış: [0000-0001-5489-3420](https://orcid.org/0000-0001-5489-3420)

K. Hüsnü Can Başer: [0000-0003-2710-0231](https://orcid.org/0000-0003-2710-0231)

Azmi Hanoğlu: [0000-0002-7586-9080](https://orcid.org/0000-0002-7586-9080)

Fatih Göger: [0000-0002-9665-0256](https://orcid.org/0000-0002-9665-0256)

H. Seda Vatansever: [0000-0002-7415-9618](https://orcid.org/0000-0002-7415-9618)

Biactivity of *Cynara cornigera* L.

## References

- [1] I. Arias, H. Alter, J. Boyer, D. Cohen, D. Shafritz, S. Thorgeirsson and W. Allan (2020). The liver : Biology and pathobiology. Wiley, Blackwell UK.
- [2] M.A. Feitelson, A. Arzumanyan, R.J. Kulathinal, S.W. Blain, R.F. Holcombe, J. Mahajna, M. Marino, M.L. Martinez-Chantar, R. Nawroth, and I. Sanchez-Garcia et.al. (2015). Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets, *Semin. Cancer Biol.* **35**, 25–54.
- [3] Ma, Xiaomei and Herbert Yu. (2006). Global burden of cancer, *Yale J. Biol. Med.* **79**, 85-94.
- [4] GLOBOCAN 2018: cancer incidence and mortality, version 1.1. IARC Cancer Base ed. Lyon: IARC <https://gco.iarc.fr/> Access date: 30/05/2022
- [5] S. Thorgeirsson and J. Grisham (2002). Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma, *Nat. Genet.* **31**, 339–346.
- [6] H. Kim and H.B. El-Serag (2019). The epidemiology of hepatocellular carcinoma in the USA, *Curr. Gastroenterol. Rep.* **21**, 17.
- [7] World Health Organization. Regional Office for South-East Asia. (2011). Frequently asked questions on viral hepatitis. WHO Regional Office for South-East Asia. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/205127> Access date : 30/05/2022
- [8] F. Wang, J. Fan, Z. Zhang, B. Gao and H. Wang (2014). The global burden of liver disease: The major impact of China, *Hepatology* **60**, 2099–2108.
- [9] M.C Kew (2013). Epidemiology of hepatocellular carcinoma in sub-Saharan Africa, *Ann. Hepatol.* **12**, 173-182.
- [10] J. Rowe, Y. Ghouri and I. Mian (2017). Review of hepatocellular carcinoma: epidemiology, etiology, and carcinogenesis, *J. Carcinog.* **16**, 1 doi:10.4103/jcar.JCar\_9\_16. eCollection 2017.
- [11] H. Alotaibi, N. Atabey, K. Diril, E. Erdal and M. Ozturk (2016). Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. In: Hepatocellular Carcinoma. *Current Clinical Oncology*, ed: B. Carr, Springer International, pp.43-63
- [12] A. Bishayee (2014). The role of inflammation in liver cancer. In: Book inflammation and cancer, advances in experimental medicine and biology, ed: B. B. Aggarwal, B. Sung, S. C. Gupta, Springer, Basel, Switzerland, pp.401–435.
- [13] M. Liu, L. Jiang and X.Y. Guan (2014). The genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma: A recent update, *Protein Cell.* **5**, 673–691.
- [14] M. Dimri, A. Manali and A. Satyanarayana (2020). Molecular signaling pathways and therapeutic targets in hepatocellular carcinoma, *Cancers* **12**, 491.
- [15] M. Nishikawa, S. Nishiguchi, S. Shiomi, A. Tamori, N. Koh, T. Takeda, S. Kubo, K. Hirohashi, H. Kinoshita, E. Sato and M. Inoue (2001). Somatic mutation of mitochondrial DNA in cancerous and noncancerous liver tissue in individuals with hepatocellular carcinoma, *Cancer Res.* **61**, 1843–1845
- [16] W.Y. Lau, P.B. Lai, M.F. Leung, B.C. Leung, N. Wong, G. Chen, T.W. Leung and C. T. Liew (2000). Differential gene expression of hepatocellular carcinoma using cDNA microarray analysis, *Oncol. Res.* **12**, 59–69.
- [17] M. Honda, S. Kaneko, H. Kawai, Y. Shiota, and K. Kobayashi (2001). Differential gene expression between chronic hepatitis B and C hepatic lesion, *Gastroenterology* **120**, 955–966
- [18] Y. Takigawa, and M.A. Brown (2008). Wnt signaling in liver cancer, *Current Drug Targets.* **9(11)**, 1013–1024.
- [19] C. Lu, Y. He, J. Duan, Y. Yang, C. Zhong, J. Zhang, W. Liao, X. Huang, R. Zhu, and M. Li (2017). Expression of Wnt3a in hepatocellular carcinoma and its effects on cell cycle and metastasis, *Int. J. Oncol.* **51**, 1135–1145.
- [20] T. Toyama, H.C. Lee, H. Koga, J.R. Wands, and M. Kim (2010). Noncanonical Wnt11 inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration, *Mol. Cancer Res.* **8**, 254–265.
- [21] E. Kim, A. Lisby, C. Ma, N. Lo, U. Ehmer, K. E. Hayer, E. E. Furth and P. Viatour (2019). Promotion of growth factor signaling as a critical function of  $\beta$ -catenin during HCC progression, *Nat. Commun.* **10**, 1909.
- [22] A. Shodeinde, K. Ginjupalli, H. D. Lewis, S. Riaz and B. E. Barton (2013). STAT3 inhibition induces apoptosis in cancer cells independent of STAT1 or STAT2, *J. Mol. Biochem.* **2**, 18–26.
- [23] J. F. Bromberg, M. H. Wrzeszczynska, G. Devgan, Y. Zhao, R. G. Pestell, C. Albanese and J.E. Darnell Jr. (1999) Stat3 as an oncogene, *Cell* **98**, 295–303.
- [24] R.L. Levine, A. Pardanani, A. Tefferi and D. G. Gilliland (2007). Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders, *Nat. Rev. Cancer.* **7**, 673–83.
- [25] J.J. Hin Tang, D. K. Hao Thng, J. J. Lim and T. B. Toh (2020). JAK/STAT signaling in hepatocellular carcinoma, *Hepat. Oncol.* **7**, 18.



- [26] Y. Li, Z. H. Gao and X. J. Qu (2015). The adverse effects of sorafenib in patients with advanced cancers, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **116**, 216-221.
- [27] G. Velderrain-Rodríguez, H. Palafox-Carlos, A. Wall-Medrano, J. Ayala-zavala, C.O. Chen, M. Robles-Sánchez, H. Astiazaran-García, E. Alvarez-Parrilla, G. A.González-Aguilar (2014). Phenolic compounds: their journey after intake, *Food Funct.* **5**, 189-197.
- [28] R. Tsao (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols, *J. Nutr.* **2**, 1231-1246.
- [29] G. Di Carlo, N. Mascolo, A. A. Izzo and F. Capasso (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sci.* **65**, 337-353.
- [30] S. M. El Sohafy, A. M. Metwally, A. A. Omar, M. E. Amer, M. M. Radwan, M. S. Abdel-Kader, S. A. El Toumy and M. A. ElSohly (2016). Cornigerin, a new sesqui-lignan from the hepatoprotective fractions of *Cynara cornigera* L., *Fitoterapia* **115**, 101-105.
- [31] A. Hegazy, S. Ezzat, I. Qasem, M. Ali-Shtayeh, M. Basalah, H. Ali and A. Hatamleh (2015). Diversity of active constituents in *Cichorium endivia* and *Cynara cornigera* extracts, *Acta. Biol. Hung.* **66**, 103-118.
- [32] L. Wu, J. Li, T. Liu, S. Li, J. Feng, Q. Yu, J. Zhang, J. Chen, Y. Zhou, J. Ji, K. Chen, Y. Mao, F. Wang, W. Dai, X. Fan, J. Wu and C. Guo (2019). Quercetin shows anti-tumor effect in hepatocellular carcinoma LM3 cells by abrogating JAK2/STAT3 signaling pathway, *Cancer Med.* **8**, 4806-4820.
- [33] M. N. Clifford, K. L. Johnston, S. Knight and N. Kuhnert (2003). Hierarchical scheme for LC-MS n identification of chlorogenic acids, *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2900-2911.
- [34] Q. Shen, Z. Dai and Y. Lu (2010). Rapid determination of caffeoylquinic acid derivatives in *Cynara scolymus* L. by ultra-fast liquid chromatography/tandem mass spectrometry based on a fused core C18 column, *J. Sep. Sci.* **33**, 3152-3158.
- [35] I. M. Abu-Reidah, D. Arráez-Román, A. Segura-Carretero and A. Fernández-Gutiérrez (2013). Extensive characterisation of bioactive phenolic constituents from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS, *Food Chem.* **141**, 2269-2277.
- [36] M. Pistón, I. Machado, C. S. Branco, V. Cesio, H. Heinzen, D. Ribeiro, E. Fernandes, R. C. Chisté and M. Freitas (2014). Infusion, decoction and hydroalcoholic extracts of leaves from artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *cardunculus*) are effective scavengers of physiologically relevant ROS and RNS, *Food Res. Int.* **64**, 150-156.
- [37] F. Sánchez-Rabaneda, O. Jáuregui, R. M. Lamuela-Raventós, J. Bastida, F. Viladomat and C. Codina (2003). Identification of phenolic compounds in artichoke waste by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* **1008**, 57-72.
- [38] L. M. da Silva, A. Allemand, D. A. G. B. Mendes, A. C. dos Santos, E. André, L. M. de Souza, T. R. Cipriani, N. Dartora, M. C. A. Marques, C. H. Baggio and M. F. Werner (2013). Ethanolic extract of roots from *Arctium lappa* L. accelerates the healing of acetic acid-induced gastric ulcer in rats: Involvement of the antioxidant system, *Food Chem. Toxicol.* **51**, 179-187.
- [39] F. Chen, X. Long, Z. Liu, H. Shao and L. Liu (2014). Analysis of phenolic acids of jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) responding to salt-stress by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Sci. World J.* **2014**, 1-8
- [40] S. He, Y. Lu, X. Liu, X. Huang, E.T. Keller, C. Qian and J. Zhang (2015). Wnt3a: functions and implications in cancer, *Chin. J. Cancer.* **34**, 50.

## ÖZGEÇMİŞ

<b>Adı</b>	Erdal	<b>Soyadı</b>	ŞANLIDAĞ
<b>Doğum Yeri</b>	Yeşilyurt	<b>Doğum Tarihi</b>	02.07.1988
<b>Uyruğu</b>	KKTC		
<b>E-Mail</b>	esanlidag@gmail.com		

<b>Eğitim Düzeyi</b>	<b>Mezun Olduğu Kurum Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora/Uzmanlık</b>	Yakın Doğu Üniversitesi – Lisansüstü Eğitim Enstitüsü – Biyokimya Anabilim Dalı	2022
<b>Yüksek Lisans</b>	Yakın Doğu Üniversitesi – Eczacılık Fakültesi – Biyokimya ABD	2014
<b>Lisans</b>	Çukurova Üniversitesi Fen – Edebiyat Fakültesi – Kimya Bölümü	2011
<b>Lise</b>	20 Temmuz Fen Lisesi	2005

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama</b>	<b>Konuşma</b>	<b>Yazma</b>
İngilizce	İyi	İyi	İyi

### **Bilgisayar Bilgisi**

<b>Program</b>	<b>Kullanma Becerisi</b>
Microsoft Word	Çok İyi
Microsoft Power Point	Çok İyi
Microsoft Exel	Çok İyi
IBM SPSS Statistics	İyi