

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

FENOLİK ASİTLERİN DNA METİLASYONU ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NEVİN KAYA DİKİCİ

DENİZLİ, NİSAN 2021

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



FENOLİK ASİTLERİN DNA METİLASYONU ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NEVİN KAYA DİKİCİ

DENİZLİ, NİSAN 2021

Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2019EBE018 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

Nevin KAYA DİKİCİ

ÖZET

**FENOLİK ASİTLERİN DNA METİLASYONU ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
NEVİN KAYA DİKİCİ
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. ŞEVKİ ARSLAN)**

DENİZLİ, NİSAN - 2021

Son yıllarda çoğu insan, kimyasal maddelerin toksik, mutajenik ve karsinojenik etkilerinin giderilmesinde ve farklı hastalık faktörlerine karşı koruyucu ajanlar olarak bitkisel preparatları veya normal beslenmelerinin bileşenleri olan fitokimyasalları sıklıkla kullanmaktadırlar. Bu bağlamda fenolik asitler antioksidan etkileri nedeniyle kanserin önlenmesinde potansiyel etkilerinden dolayı birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir. Yapılan araştırmaların sonuçlarına göre fenolik asitlerin kanser hücrelerinin canlılığını azaltma da, hücre döngüsünü değiştirip düzenlemede ve apoptozu indüklemeye önemli bir rol oynadığını göstermiştir.

Bu tez çalışmasında insanların sık sık besinlerle beraber aldıkları ve tıbbi bitkilerin yapısında yaygın bir şekilde bulunan fenolik asitlerden olan kafeik asit, o-kumarik asit, ferulik asit'in DNA metilasyonuna olan etkilerinin insan karaciğer kanseri hücre hattındaki etkileri araştırılmıştır. Bu bağlamda insan karaciğer kanseri hücre hattında (HepG2) değişik dozlarda kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asit uygulaması yapılmış, etkin dozları hesaplanmıştır. Bu fenolik maddelerin, DNMT3A, DNMT3B, TET1, HDAC1, HDAC3 ve HAT1 mRNA ve protein seviyelerine olan etkileri Western Blot ve qRT-PZR ile belirlenmiştir. Kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asit için EC₅₀ dozları sırasıyla 1.02 mM, 3.1 mM ve 5 mM bulunmuştur. Kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asitin EC₅₀ dozunun HepG2 hücrelerine uygulanması sonucunda DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, HDAC1, HDAC3 ve HAT1 mRNA seviyelerinde anlamlı azalışlar gözlemlenmiştir. Buna ek olarak DNMT enzim aktivitesi ölçülmüştür. Tüm bu sonuçlar fenolik asitlerin epigenetik değişimlerden olan DNA metilasyonu azalttığını ortaya koymuştur.

ANAHTAR KELİMELER: Fenolik asitler, HepG2 hücre hattı, Epigenetik, DNA metilasyonu, DNA asetilasyonu

ABSTRACT

INVESTIGATION THE EFFECTS OF PHENOLIC ACIDS ON DNA METHYLATION

MSc THESIS

NEVİN KAYA DİKİCİ

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. SEVKİ ARSLAN)

DENİZLİ, APRİL 2021

In recent years, most people have frequently used herbal preparations or phytochemicals, which are components of their normal diets, to eliminate toxic, mutagenic and carcinogenic effects of chemical substances and as a protective agents against different disease factors. In this context, phenolic acids have attracted the attention of many researchers because they have potential in the prevention of cancer due to their antioxidant effects. According to the results of the researches, phenolic acids have shown that they play an important role in reducing the viability of cancer cells, changing and regulating of the cell cycle and inducing apoptosis.

In this thesis study, the effects of phenolic acids namely caffeic acid, o-coumaric acid, ferulic acid commonly found in medicinal plants on DNA methylation were investigated on human liver cancer cell line. In this context, various doses of caffeic acid, ferulic acid and o-coumaric acid were administered in human liver cancer cell line (HepG2) and their effective doses were calculated. The effects of these phenolic substances on DNMT3A, DNMT3B, TET1, HDAC1, HDAC3 and HAT1 mRNA and protein levels were determined by Western Blot and qRT-PCR. EC₅₀ doses for caffeic acid, ferulic acid and o-coumaric acid were found to be 1.02 mM, 3.1 mM and 5 mM, respectively. As a result of the administration of the EC₅₀ dose of caffeic acid, ferulic acid and o-coumaric acid to HepG2 cells, it was observed significant decreases in DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, HDAC1, HDAC3 and HAT1 mRNA levels. In addition, DNMT enzyme activity was measured. All these results revealed that phenolic acids decreased DNA methylation, which is one of the epigenetic changes.

KEYWORDS: Phenolic acids, HepG2 cell line, epigenetic, DNA methylation DNA acetylation.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Epigenetik	1
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1 Fenolik Asitler	7
2.1.1 Hidroksisinamik Asitler	9
2.2 Fenolik Asitlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	10
2.2.1 Kafeik Asit.....	10
2.2.2 Ferulik Asit	11
2.2.3 o-Kumarik Asit.....	13
2.3 Fenolik Asitlerin Biyolojik Etkileri	14
2.4 DNA Metilasyonu.....	15
2.5 Tezin Amacı.....	20
3. YÖNTEM.....	20
3.1 Materyal	22
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	22
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	21
3.1.3 Çalışmada Kullanılan Primerler	21
3.2 Metod.....	24
3.2.1 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	22
3.2.1.1 Kafeik Asit, Ferulik Asit ve o-Kumarik Asit Konsantrasyonlarının Hazırlanması.....	23
3.2.2 Hücre Canlılığının Saptanması.....	23
3.2.2.1 Tripan Mavi Boyama Testi ile Hücre Canlılığının Saptanması.....	23
3.2.2.2 Hücre Canlılık Testi (MTT veya Kristal Viyole).....	25
3.2.3 Total RNA İzolasyonu	27
3.2.3.1 RNA'nın Spektrofotometrik Analizi.....	28
3.2.3.2 Total RNA'nın Agaroza Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi.....	28
3.2.4 cDNA Sentezi.....	29
3.2.5 mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Kantitasyonu	30
3.2.5.1 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	30
3.2.6 Protein Düzeyinde Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi	31
3.2.6.1 RİPA Tamponu ile Protein İzolasyonu.....	32
3.2.6.2 Bikinkoninik Asit (BCA) Yöntemi ile Protein Tayini	32
3.2.6.3 DNA Metilasyonunda Görev Alan DNMT Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	34
3.2.6.4 SDS-PAGE Elektroforezi	35
3.2.6.5 Western Blot Analizi.....	38

3.2.6.6 İstatiksel Analizler	39
4. BULGULAR.....	40
4.1 Sitotoksisite Analizi.....	40
4.2 Western Blot Analizi	42
4.3 mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	48
4.3.1 Total RNA İzolasyonu	48
4.3.2 mRNA Ekspresyon Analizleri.....	49
4.4 DNMT Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	55
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ VE ÖNERİ	65
7. KAYNAKLAR	69
8. ÖZGEÇMİŞ	77

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Epigenetik mekanizmalar (Yokuş, 2013).....	5
Şekil 1.2: Çevresel ve epigenetik faktörler (Seo ve diğ., 2014).	6
Şekil 2.1: Hidroksisinamik asit	8
Şekil 2.3: Sinamik asitler.....	9
Şekil 2.4: Kafeik asidin yapısal formülü	10
Şekil 2.5: Ferulik asidin yapısal formülü	11
Şekil 2.6: o-Kumarik asidin yapısal formülü	12
Şekil 2.7: DNA metilasyonu ve etkileri (Yokuş, 2013).	17
Şekil 2.8: Histon modifikasyonları ve etkileri (Yokuş, 2013).	19
Şekil 3.1: Thoma lamındaki karelerin genel ve sınırlandırılmış görüşü	23
Şekil 3.2: Formazanda MTT indirgemesi (Zerbinati ve diğ. 2018).....	25
Şekil 3.3: StepOne Real-Time PZR Sistemi	30
Şekil 3.4: HepG2 hücre hattında BCA yöntemi ile protein miktarı tayini	33
Şekil 4.1.1: Değişik konsantrasyonlardaki Ferulik Asit'in hücre canlılığına etkisi.....	39
Şekil 4.1.2: Değişik konsantrasyonlardaki Kafeik Asit'in hücre canlılığına etkisi.....	40
Şekil 4.1.3: Değişik konsantrasyonlardaki o-Kumarik Asit'in hücre canlılığına etkisi.....	40
Şekil 4.2.1: Kafeik asit, Ferulik asit ve o-Kumarik asitin insan karaciğer kanseri hücre (HepG2) hattında DNMT3B protein seviyesine olan etkisi.....	42
Şekil 4.2.2: Kafeik asit, Ferulik asit ve o-Kumarik asitin insan karaciğer kanseri hücre (HepG2) hattında HDAC1 protein seviyesine olan etkisi.....	43
Şekil 4.2.3: Kafeik asit, Ferulik asit ve o-Kumarik asitin insan karaciğer kanseri hücre (HEPG2) hattında HDAC3 protein seviyesine olan etkisi.....	44
Şekil 4.2.4: Kafeik asit, Ferulik asit ve o-Kumarik asitin insan karaciğer kanseri hücre (HEPG2) hattında HAT1 protein seviyesine olan etkisi.....	45
Şekil 4.2.5: Kafeik asit, Ferulik asit ve o-Kumarik asitin insan karaciğer kanseri hücre (HEPG2) hattında TET1 protein seviyesine olan etkisi.....	46
Şekil 4.3.1.1: Kafeik asit uygulanan HepG2 hücresinden elde edilen RNA'nın %1'lik agaroz jel elektroforezi.....	48
Şekil 4.3.1.2: Ferulik asit uygulanan HepG2 hücresinden elde edilen RNA'nın %1'lik agaroz jel elektroforezi.....	49
Şekil 4.3.1.3: o-Kumarik asit uygulanan HepG2 hücresinden elde edilen RNA'nın %1'lik agaroz jel elektroforezi.....	49
Şekil 4.3.2.1: Kafeik asit, ferulik asit ve o-Kumarik asit'in insan karaciğer kanseri hücre (HepG2) hattında DNMT1 mRNA seviyesine olan etkisi.....	51

Şekil 4.3.2.2: Kafeik asit, ferulik asit ve o-Kumarik asit'in insan karaciğer kanseri hücre (HepG2) hattında DNMT3A mRNA seviyesine olan etkisi.....	50
Şekil 4.3.2.3: Kafeik asit, ferulik asit ve o-Kumarik asit'in insan karaciğer kanseri hücre (HepG2) hattında DNMT3B mRNA seviyesine olan etkisi.....	51
Şekil 4.3.2.4: Kafeik asit, ferulik asit ve o-Kumarik asit'in insan karaciğer kanseri hücre (HepG2) hattında TET1 mRNA seviyesine olan etkisi.....	51
Şekil 4.3.2.5: Kafeik asit, ferulik asit ve o-Kumarik asit'in insan karaciğer kanseri hücre (HepG2) hattında HAT1 mRNA seviyesine olan etkisi.....	52
Şekil 4.3.2.6: Kafeik asit, ferulik asit ve o-Kumarik asit'in insan karaciğer kanseri hücre (HepG2) hattında HDAC1 mRNA seviyesine olan etkisi.....	52
Şekil 4.3.2.7: Kafeik asit, ferulik asit ve o-Kumarik asit'in insan karaciğer kanseri hücre (HepG2) hattında HDAC3 mRNA seviyesine olan etkisi.....	53
Şekil 4.4.1: Kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asitin insan karaciğer hücre hattında (HepG2) DNA metilasyonuna etkisi.....	54

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1: Seçilmiş olan genler için tanımlanan primer dizileri	23
Tablo 2: Kuyucuklara yüklenen RNA örnekleri ve marker konsantrasyonları	29
Tablo 3: cDNA sentez karışımı ve protokolü	30
Tablo 4: RIPA tamponunun hazırlanışı	33
Tablo 5: BCA Solüsyonu	35
Tablo 6: Reaksiyon karışımı	36
Tablo 7: Ayrışma ve sıkıştırma jellerinin hazırlanması.	37
Tablo 8: EC ₅₀ Değerleri	40

SEMBOL LİSTESİ

°C:	Celcius derecesi
M:	Molaritre
EC₅₀:	Etkili konsantrasyon
mg:	Miligram
ml:	Mililitre
mM:	Milimolar
µg:	Mikrogram
µl:	Mikrolitre
µM:	Mikromolar
dH₂O:	Distile su
rpm:	Dakikadaki devir sayısı
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
BSA:	Bovine serum albumin
BCIP:	5-bromo-4-kloro-indol-fosfat
ATCC:	Amerika tipi kültür koleksiyonu
RIPA:	Radyo-immünopresipitasyon deneyi
PBS:	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PAGE:	Poliakrilamid jel elektroforezi
ALP:	Alkalen Fosfataz
TEMED:	Tetrametilendiamin
DMSO:	Dimetilsulfoksit
FBS:	Fetal sığır serumu
DMEM:	Dulbecco Modifiye Eagle Medyum
cDNA:	Komplementer DNA
dNTP:	2'-deoksinükleozid 5'-trifosfat
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asid
EtBr:	Etidyum bromür

mRNA: mesajcı RNA

NaCl: Sodyum Klorür

qRT-PZR: Gerçek zamanlı kantitatif polimer zincir reaksiyonu

RNA: Ribonükleik asit

DNA: Deoksiribonükleik asit

TAE: Tris-Asetik asit-EDTA

CO₂: Karbondioksit

DNMT: DNA metil transferaz

TET: tet metilozin dioksijenaz

GAPDH: gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz

HDAC: histon deasetilaz

HAT: histon asetiltransferaz

ÖNSÖZ

Epigenetik temelli hastalıkların tedavisi için epigenetik hataları düzelteren ilaçlar son yıllarda kullanılmaya başlanmıştır. Kemoterapi ilaçlarının en büyük dezavantajı yan etkileridir. Bu yüzden yan etkilerin azaltılması için doğal geleneksel yaklaşımların araştırılması, etkilerinin ortaya konulması ve daha az yan etkiye sahip çok hedefli etken maddelerin tespit edilmesi son derece önemlidir. Bu çalışma kapsamında antikarsinogenik etkisini o-kumarik asit ile onunla benzer kimyasal yapıya sahip kafeik ve ferulik asitlerin epigenetik mekanizmalardan olan DNA metilasyonuna olan etkileri belirlenmiştir. Bu çalışma ile bu maddelerin epigenetik etkileri kapsamlı olarak insan karaciğer hücre hattında ilk defa ortaya konulmuştur.

Bu tez çalışmasında elde edilen her sonucun ve bilimsel bilginin yalnızca benim çabam ile değil, değerli hocalarımla ve laboratuvar arkadaşlarımla destekleri sayesinde gerçekleştiğini belirtmek isterim.

Yüksek lisans eğitim hayatım boyunca ilk günden tezimin son aşamasına kadar yardımlarını esirgemeyen, tecrübelerini en iyi şekilde aktaran değerli danışman hocam Prof. Dr. Şevki ARSLAN'a,

Çalışmalarım süresince, zaman ayırarak gerekli bilimsel bilgilerin edinilmesinde önemli katkıları olan değerli hocam Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN'a,

Projenin maddi desteğini sağlayan Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Bana hem deney çalışmalarında hem de zor anlarımda yanımda olan, aynı laboratuvar ortamını paylaştığım sevgili laboratuvar arkadaşlarım N. Nur BOZBEYOĞLU KART'a, Farid NASIRLI'ya, Doğukan MUTLU'ya, Buket YILDIRIM'a,

Tezimi yazma sürecimde beni sürekli destekleyerek, cesaretlendiren değerli eşim Mümin DİKİCİ'ye,

Aramıza tez aşamalarımın son dönemlerinde katılan ve en büyük motivasyon kaynağım sevgili kızım Mihra DİKİCİ'ye,

Aralarında olmaktan mutluluk duyduğum sevgili Ahmet DİKİCİ, Ümmü DİKİCİ ve Beyza DİKİCİ'ye,

Ve son olarak her zaman arkamda olan maddi, manevi desteğini esirmeyen rahmetli babam Mehmet KAYA'ya, dualarıyla her zaman başarılı olmamı dileyen sevgili annem Esma KAYA'ya ve beni hep başarılı görmeyi isteyen canım ablam Ayşe ALP'e teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

1.1 Epigenetik

DNA'nın yapısının ve işlevinin aydınlatılması biyoloji alanındaki çalışmalara yeni bir kapı açılmasını sağladı. Genetik bilimindeki gelişmeler ile bir hastalığın etkeni olan bir genin genomdaki yeri tespit edilerek tedavi yöntemlerinin belirlenmesi çalışmalarına yardımcı olmaktadır. Ancak DNA ile ilgili bu bilgi yine de gen düzenlenmesinin altında yatan mekanizmaları ya da buna bağlı olarak hastalığın gelişim sürecini tamamen açıklayamamaktadır. Bu eksiklik epigenetik alanı ile aydınlatılmaktadır (Ayaz ve diğ., 2019).

İlk kez 1950'li yıllarda Waddington tarafından öne sürülen Epigenetik, günümüzde "DNA dizisindeki değişimlerle açıklanamayan, mitoz ve/veya mayoz bölünme ile kalıtılabilen, gen fonksiyonundaki değişiklikler" olarak tanımlanmaktadır. Son yıllarda epigenetik alanında yapılmış çalışmalar incelendiğinde, epigenetik olayların canlılar üzerinde (özellikle yüksek yapılı canlılarda) oldukça etkili olduğu tespit edilmiştir. Epigenetik, özellikle canlıların gelişim sürecindeki hücre farklılaşmaları sırasında meydana gelen gen ifadesindeki değişikliklerde önemli rol oynamaktadır. Bu değişiklikler DNA'nın seçici olarak, farklı epigenetik yapılardaki farklı kromatin yapılarına paketlenmesiyle ortaya çıkmaktadır. Epigenetik fenomenin üzerinde en çok çalışma yapılmış olan iki tipi, birbiriyle bağlı ve geri dönüşümlü olan DNA metillenmesi ve histon modifikasyonlarıdır (Orcan, 2006).

Günümüzde yapılan bir diğer epigenetik tanımı şöyledir; gen ifadesindeki değişikliklere sebep olan kalıtılabilir mekanizmaları inceleyen bilim dalı. Epigenetik mekanizmalar genotoksik mekanizmaların tam tersine DNA dizilimini değiştirmeden gen ifade seviyesini düzenlemektedir. Epigenetik mekanizmaların bir diğer farklı ve ilginç özelliği tersinir olmasıdır. Yani bireyler kendi epigenetik profilini değiştirebilir ve bu profili gelecek nesillere aktarabilir (Yaykaşlı ve diğ., 2012).

Epigenetik olayların etkilerinin keşfedilmesiyle birçok hastalığın epigenetik mekanizmaların düzenlenmesindeki hatalardan dolayı ortaya çıktığı anlaşılmıştır. Organizmanın sağlıklı bir embriyonik gelişim geçirmesi, epigenetik mekanizmaların birbiriyle uyumlu etkileşimi ve düzenlenmesi ile mümkündür. Bir organizmada genlerin farklı yer ve zamanlarda ifade edilmesi tek bir hücreden çok farklı hücre tipinin oluşmasını sağlamaktadır. Böylece aynı genetik diziyi içeren hücreler, epigenetik mekanizmaların belirli genlerin ifade olmasını sağlaması ve belirli genlerin ifadesini baskılamasıyla farklı ifade profilleri göstererek değişik fenotiplerin ortaya çıkmasını sağlarlar. Bu sırada mekanizmalarda oluşabilecek herhangi bir hata ya da düzensizlik, genlerin ifadesinde aşırı artış ya da baskılanmaya neden olarak epigenetik kaynaklı hastalıkları meydana getirir (Güler ve Peynircioğlu, 2016).

Epigenetik değişikliklerin altında yatan mekanizmalar oldukça karmaşık olup en iyi bilinenleri DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ya da gen düzenlenmesinde görevli kodlanmayan RNA (ncRNA)'lardır. Karmaşık yapıda olan epigenetik mekanizmalarda gerçekleşebilecek hatalar ise en başta kanser olmak üzere pek çok hastalıkla bağlantılıdır. Özellikle son yıllarda insan kanser türlerinde yapılan ekzon dizileme çalışmalarında, bu dizilerde epigenomu kontrol eden genlerin birçok mutasyona uğradığı gösterilerek epigenetik-kanser ilişkisi kanıtlanmıştır. Epigenom gen kontrol mekanizmalarının başında olduğu için oluşacak tek bir mutasyon bile kanser oluşumunu sağlayan çok sayıda yolakta etkilidir. Dolayısıyla kanser hem genetik hem de epigenetik süreçlerdeki değişimlerin birikimiyle meydana gelen ve pek çok adımdan oluşan karmaşık bir hastalıktır. Onkogenlerin aktivasyonu ya da tümör baskılayıcı genlerin işlevini kaybetmesi gibi sebepler kontrolsüz büyüme ve metastaz yapabilme özelliği gösteren kanser hücrelerinin meydana gelmesine sebep olmaktadır. Kanser pek çok adımdan oluşan karmaşık bir hastalık olmasını hem onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki fonksiyonel değişiklikler hem de epigenetik değişiklikler sağlamaktadır (Ayaz ve diğ., 2019).

Kanser, dünya genelinde ölüm nedenlerinden biridir ve kanser ölüm oranlarının önümüzdeki 20-40 yılda iki kattan daha fazla olması beklenmektedir. Genel olarak tümör büyümesi, hem epigenetik hem de değişmiş gen ifadesine sebep olan genetik sapmalarla ilişkilidir. Ayrıca epigenetik deregülasyon hali hazırda neoplastik gelişim erken fazlarında meydana gelir ve kötü huylu transformasyonu teşvik etmede karşılaştırılabilir etkiye sahip olduğu önerilmiştir. Epigenetik

mekanizmaları hedeflemek kanserin önlenmesinde ya da tedavisinde ayrıca diğer hastalıklar için umut verici bir yaklaşımdır. Kanser vakaların en az %30-40'ında uygun ya da dengeli beslenme, düzenli fiziksel aktivite ile önlenebilir. Bu ana kadar biyolojik olarak aktif gıda bileşenlerinin büyük çoğunluğunun etkileri henüz kesin olarak belirlenmemiş olsa da bu bileşikler kanser oluşumuna karşı koruyucu etkiye sahiptir. Bu bileşiklere örnek olarak metil grubu donörleri, selenyum, yağ asitleri ve flavonoidler, retinoidler, izotiyosiyanatlar ve alil bileşikler gibi fitokimyasallar verilebilir. Meyve ve sebzelerce zengin diyetlerin tüketilmesi kanserin gelişimini hem başlangıcını hem de ilerlemesini önemli ölçüde azaltır (Busch ve diğ., 2015).

Son yıllarda bilim insanları tarafından kanser türleri için yeni tedavi ve tanı yöntemleri geliştirebilmek için yapılan çalışmalarda kanserin tüm evrelerindeki (başlangıç, gelişim ve metastaz evreleri) epigenetik değişimler araştırılmaktadır. Bu çalışmalar sırasında özellikle DNA metilasyonunda ya da histonların modifikasyonunda değişimlere neden olan ajanlar keşfedilmiş olup şu anda bu ajanların klinik çalışmaları yapılmaktadır. Ayrıca epigenetik hataların düzeltilmesi amacıyla yürütülen ilaç araştırma ve geliştirme çalışmaları da son yıllarda büyük hız kazanmıştır (Ayaz ve diğ., 2019).

Kanser ve DNA metilasyonu arasındaki ilişki ilk olarak 1983 yılında kanser hücrelerinin genomlarının normale göre hipometile olduğu gösterildiğinde ortaya çıkmıştır. Hipometilasyon tümör hücreleri öncelikle genomun tekrarlayan bölgelerinden metilasyon kaybına bağlıdır ve tümör hücrelerinin ayırt edici özelliği olan genomik kararsızlık sonucu ortaya çıkar (Robertson, 2005).

Epigenetik, genotip farklılıklara dayalı olmayan olmayan alternatif fenotipik durumları ifade eder ve potansiyel olarak geri dönüşümlüdür, ancak hücre bölünmesi sırasında genellikle stabil bir şekilde muhafaza edilir. Bu kavramın sınırlı yorumu, kararlı gen ifadesinin farklı durumlarıdır. Çok daha genişletilmiş epigenetik görüşü son zamanlarda ortaya çıkmıştır. Birçok mekanizmalar, kromatin yapısı, histon modifikasyonu, ilişkili protein bileşimi, transkripsiyonel aktivite ve memelilerde, CpG dinükleotidlerinde sitozin-5 DNA metilasyonu toplu olarak alternatif durumlar oluşturmak için etkileşime girer (Laird, 2005).

Epigenetik, DNA sekansı ile ilişkili olmayan gen ifadesinde meydana gelen kalıtsal değişiklikler sayesinde stabil kalabilen bir multi-katmanlı bir fenomendir.

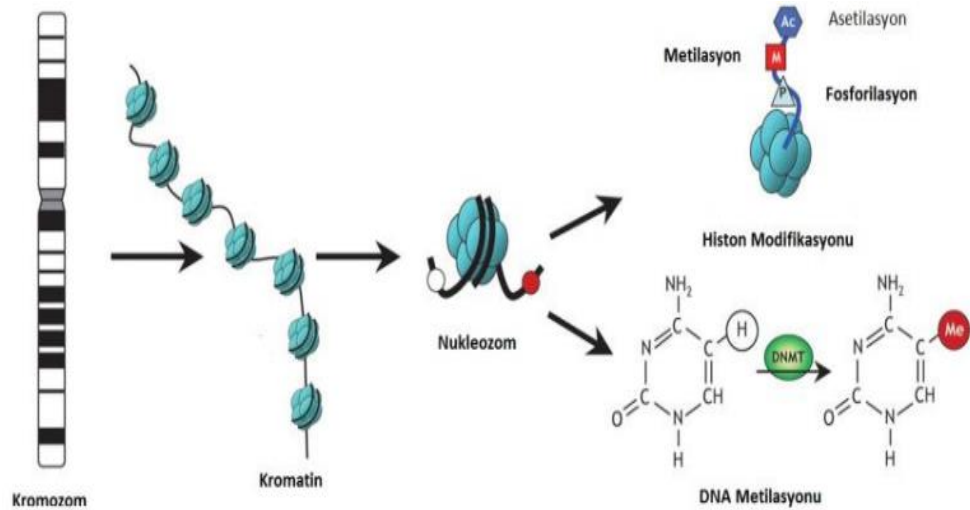
Gen ifadesini düzenleyen iki birincil modifikasyon biçimleri; DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarıdır. Kanser çalışmaları bağlamında gen susturma en iyi epigenetik mekanizmalar aracılığıyla anlaşılır. Kanser ilerlemesi sırasında çok sayıda tümör baskılayıcı genler epigenetik modülasyon yoluyla susturulur. Genel olarak spesifik genlerin DNA'nın global hipometilasyonu ve hipermetilasyonu ortaya çıkar. Bu farklı etki için sebep özellikle artan kanser hücrelerinde DNMT aktivitesi açık şekilde bilinmemektedir ancak hasarlı DNA'ya yüksek afinite ile bağlandığından DNA onarım enzimi olarak DNMT'nin atalarından kalma işleviyle ilişkili olabilir. Çeşitli kanser hücre hatlarının tedavisinde DNMT inhibitörleri, p16INK4a, RAR β , O6-metilguanin transferaz, insan mutL homoloğu 1 ve glutatyon S-transferaz-II dahil olmak üzere çeşitli tümör supresör genler hipermetile CpG adacıklarının demetilasyonuna sebep olur (Gilbert ve Liu, 2010).

Ayrıca, epigenetik mekanizmalar hem hastalığın teşhisinde biyolojik markör gibi hem de tedavi sürecinde kullanılabilir. Örneğin, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu gibi epigenetik farklılıklar hedef alınarak kanser tedavisinde etkili bir strateji izlenebileceği gösterilebilir. Epigenetik mekanizmaların dışında pek çok protein ile DNA metilasyonunun kontrolü yapılabilmektedir. Bu proteinlerin bir kısmı üzerinde yeni ilaçların geliştirilmesi çalışmaları yürütülmektedir. Örneğin, günümüzde özellikle hematolojik kanser türlerinin tedavisinde kullanılan azasitidin ve desitabin. Bu bileşikler, yapısal olarak sitozin nükleotidine benzemekle birlikte DNA metil transferaz enzimlerinin inhibisyonunu sağlamaktadır. Epigenetik mekanizmalardan ilham alınarak geliştirilmiş bir diğer tedavi aracı "Varinostat" ve "Romidepsin" gibi anti kanser etkisi gösteren histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleridir (İzmirli, 2013).

Epigenetik ilaçlar, tek başlarına ya da diğer terapik yöntemler veya ilaçlarla birlikte kullanılarak bozulmuş heterokromatik bölgeleri hedefleyerek, tümör-supresör genlerin ve/veya hücrenin normal fonksiyonu için gerekli olan diğer genlerin yeniden aktivasyonunu sağlarlar. Örneğin, tümör-supresör genlerin ve DNA onarım mekanizmalarının yeniden aktivasyonu sağlanarak hücreler kimyasallara duyarlı hale gelebilir ve sonrasında başka bir yöntemle tedaviye olumlu yanıt alınabilir (Orcan, 2006).

Epigenetik olayların potansiyel tersine çevrilebilirliği, epigenetik olarak susturulmuş tümör supresör genlerin yeniden aktif hale gelebilen yeni kanser ilaçları için fırsatlar sunmuştur. DNA metiltransferaz ya da histon deasetilaz aktivitesinin bloke edilmesi potansiyel olarak epigenetik susturma sürecini tersine çevirebilir veya inhibe edebilir. DNA metiltransferazlar ve histon deasetilazlar bugüne kadar ki epigenetik inhibisyon için iki ana ilaç hedefleridir. DNA metiltransferaz ve histon deasetilaz inhibitörlerinin kombinasyonları, epigenetik olarak susturulmuş genlerin yeniden aktive olması etkili şekilde sinerji oluşturduğunu ortaya koymuştur. Bu bağlamda kombinasyon çalışmaları klinik alanda da test edilmeye devam etmektedir (Laird, 2005).

DNMT'nin inhibisyonu özellikle DNMT1, susturulmuş genlerin yeniden ifade edilmesi ve hipermetilasyonun tersine çevrilmesine neden olarak, yeni sentezlenmiş DNA zincirinin hipermetilasyonunu engelleyecektir. DNMT inhibitörleri olarak bilinen 5-aza-2-deoksisitidin ve zebularin ile yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu bileşiklerin kanser hücresinin büyümesini engellediği, kanser hücrelerinin apoptozu uyardığı ve farelerde tümör hacmini azalttığı gösterilmiştir (Fang ve diğ., 2003).

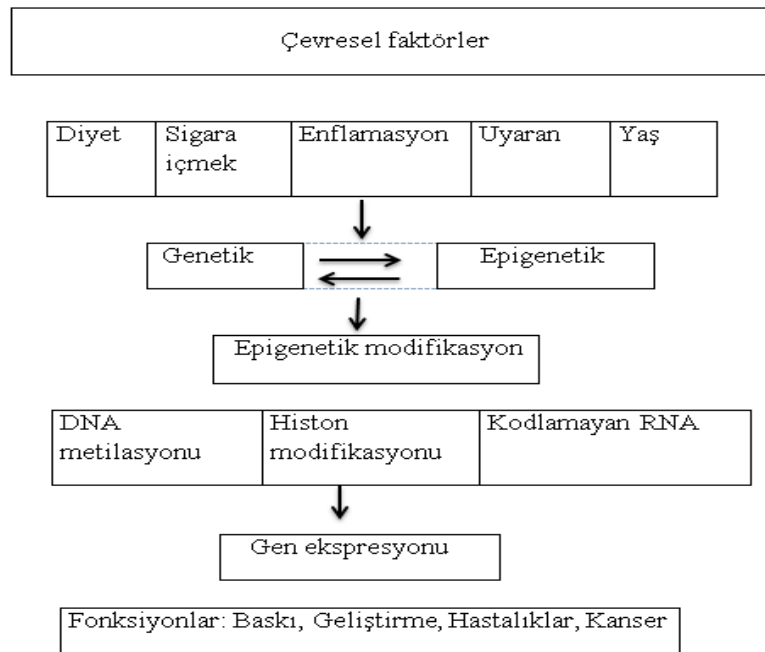


Şekil 1.1: Epigenetik mekanizmalar (Yokuş, 2013).

Pek çok güçlü anti-kanser ilacı klinik olarak uygulanabilir olsa da kemoterapik ilaçların genellikle güçlü hücresel sitotoksisiteye ve yan etkilere sahip

olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, herhangi bir sitotoksikite ve yan etkisi olmayan güçlü anti-kanser ilaçları oldukça tercih edilir (Chung ve diğ., 2004).

Kemoterapi şu an ilerlemiş olsa da kansere karşı daha hedefli tedaviye doğru hala önlenemeyen komplikasyonlar ve yan etkilerle mücadele ediyor, bu yüzden araştırmalarda yeni ilaçlar bilimsel alanda büyük önem taşımaktadır. Yüzyıllar boyunca bitkisel kökenli doğal ürünler potansiyel antikanser ilaçları değerli bir kaynak olarak kabul edilmiştir (Khazendar ve diğ., 2019).



Şekil 1.2: Çevresel ve epigenetik faktörler (Seo ve diğ., 2014).

Çevresel etkenler, stres ve tanımlanmamış diğer etmenlerden nedeniyle epigenetik mekanizmalarda meydana gelen değişimler sonucunda birçok kanser türü oluşabilmektedir (Şekil 1.2). Erken teşhis ve tedavideki gelişmelerin olmasına rağmen, kanser bütün dünyada sağlık problemleri içinde, önemli bir yeri oluşturmaktadır. Dünyada ve Türkiye’de çoğu kanser hastası kemoterapi, radyoterapi gibi geleneksel tedavileri kullanmaktadır. Kanser tedavisinde en fazla kullanılan yöntem kemoterapidir. Fakat gerek yan etkileri gerekse normal hücrelere zarar vermelerinden dolayı insanlar yeni ve daha etkili molekülleri yıllardan beri aramaktadırlar. Epigenetik temelli bu hastalıkların tedavisi için; epigenetik hataları

düzelten ilaçlar son yıllarda kullanılmaya başlanmıştır. Bu nedenle yan etkilerin azaltılması için doğal geleneksel yaklaşımların araştırılması, etkilerinin ortaya konulması ve daha az yan etkiye sahip çok hedefli etken maddelerin tespit edilmesi son derece önem kazanmıştır. Bu çalışma kapsamında kafeik, ferulik ve o-kumarik asitlerin antikarsinojenik etkisini epigenetik mekanizmalarda önemli yeri olan DNA metilasyonuna etkileri belirlenmiştir. Bu çalışma ile bu maddelerin epigenetik etkileri kapsamlı olarak insan karaciğer hücre hattında ilk kez araştırılmıştır. Ayrıca, ileriki çalışmalar ile kullanılan maddelerin tek başına ya da kombin kullanımlarının hastalıkların tedavisinde kullanılma potansiyeli yüksek bir hal alarak ekonomik yönden ürünlerin üretilmesi sağlanabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Fenolik Asitler

Günümüze kadar yapılmış çalışmalar ile bitkiler ve bitkisel ürünlerde 5000'den fazla fitokimyasal belirlenmiştir. Bu fitokimyasallardan başlıcaları şunlardır; fenolik asitler, flavonoidler, tanenler, stilbenler, kurkuminoidler, kumarinler, lignanlar, kinonlar gibi farklı bileşikler grubunu temsil eden fenolik bileşikler (Şen ve diğ., 2015).

Fenolik bileşikler insan diyetinin önemli bir parçasını oluşturur. Gıdalarda en sık görülenleri fenolik asitler ve flavanoidlerdir. Polifenollere ilgi bunların beslenme önleyici etkileriyle ilişkilidir. Yani proteinleri ve mineralleri bağlama yeteneğinden dolayı gıdaların emilimini ve sindirilebilirliğini azaltır (Yang ve diğ., 2001).

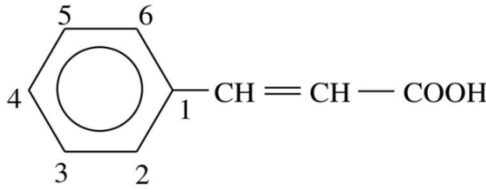
Tümör hücreleriyle yapılan birçok çalışmada polifenollerin sitotoksik etkisinin bulunması nedeniyle kanserin tedavisinde ve önlenmesinde katkı sağladığı bildirilmiştir (Rao ve diğ., 2007).

Fenolik bileşikler, bitkilerin çeşitli kısımlarında meydana gelen pentoz fosfat, şikimat ve fenilpropanoid reaksiyonları sonucu oluşan sekonder metabolitlerdir. Bu bileşikler, en çok yaygın olarak oluşan fitokimyasal grupları, bitkilerde morfolojik ve fizyolojik öneme sahiptir. Fenolik bileşikler, bitkilerde büyüme ve üremede dış faktörlere karşı önemli bir rol oynar. Fenolik bileşikler, anti-alerjik, anti-arterojenik, anti-enflamatuar, anti-mikrobiyal, antioksidan, anti-trombotik, kardiyoprotektif ve damar genişletici etkiler gibi çok çeşitli fizyolojik özellikler sergiler (Balasundram ve diğ., 2006).

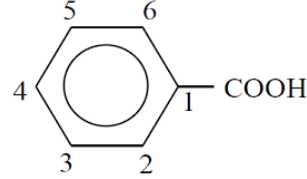
Fitokimyasalların önemli bir üyesi olan fenolik asitler, bitkilerde yaygın olarak bulunan, bitkilerin rengi, kokusu ve tatlarından sorumlu olan doğal antioksidan maddelerdir. Genellikle doğada serbest olarak bulunmamaktadır (küçük bir grubu hariç). Bu tip antioksidanların gıdalardaki varlığı besinlerin kararlılığını, rengini, kokusunu, besin değerini ve kalitesini etkilemektedir. Bu sayede raf ömrünü uzatıcı koruyucu madde olarak kullanımı çok yaygındır. Ayrıca fenolik asit içeren

çoğu bitki bazı hastalıkların tedavisinde etkili bir şekilde kullanılmaktadır (Akkan, 2008).

Genel olarak serbest halde bulunmayan fenolik asitler; hidroksisinamik asitler (Şekil 2.1) ve hidroksibenzoik asitler (Şekil 2.2) olmak üzere iki grupta incelenirler. Bu bileşiklere -OH ve -OCH₃ grupları bağlanarak önemli fenolik asit türevleri oluşmaktadır (Kolaç ve diğ., 2017).



Şekil 2.1: Hidroksisinamik asit

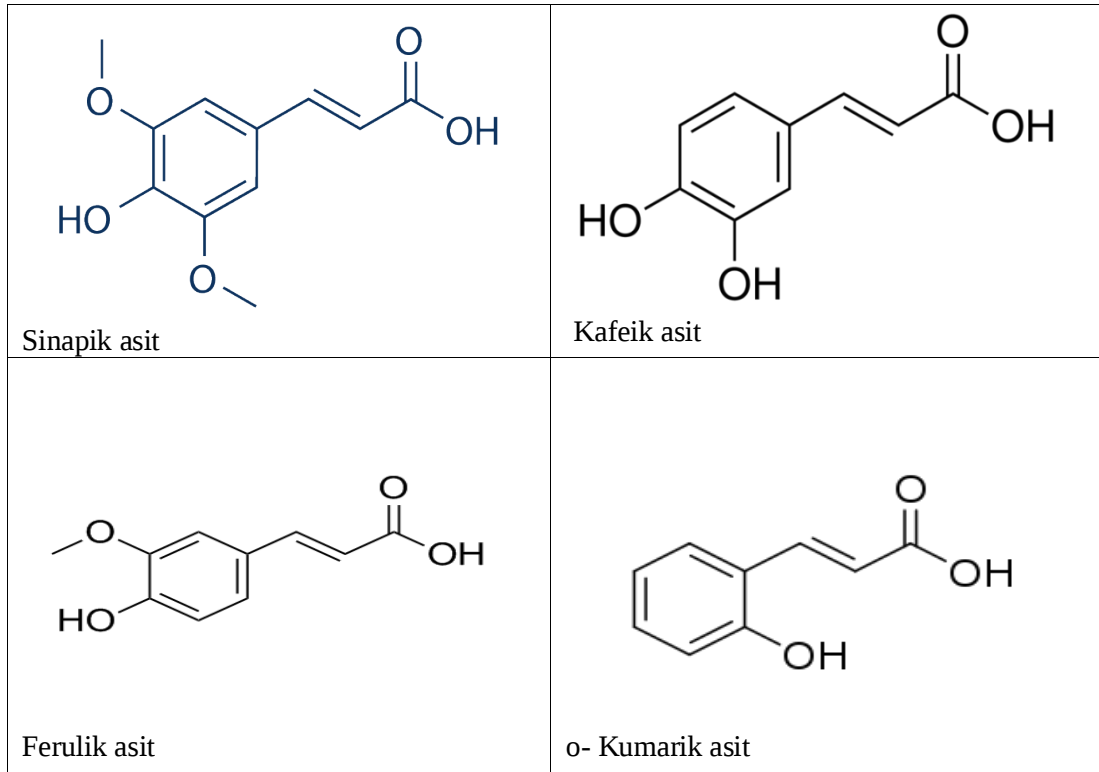


Şekil 2.2: Hidroksibenzoik asit

Fenolik asitler, mekanizmaları hala tam olarak anlaşılmamış olsa da bir dizi kanıt, antikanser özelliklerini desteklemektedir. Ancak fenolik asitlerin serbest radikalleri temizlemek, ksenobiyotiklerin metabolizmasında yer alan enzimleri indüklemek, gen ifadesinin düzenlenmesinin yanı sıra hücresel sinyal yollarının modülasyonu, DNA hasarı onarımı, hücre proliferasyonu, apoptoz ve istilayı içerebilir (Rosa ve diğ., 2016).

2.1.1 Hidroksisinamik Asitler

Fenilpropan halkasına bağlanan hidroksil grubunun konumu ve sayısına göre özelliği değişen hidroksisinamik asitler içinde ön plana çıkan türler; ferulik asit, kafeik asit, o-kumarik asit ve sinapik asittir (Şekil 2.3). Genellikle asit türevleri halinde olsalar da çok az miktarlarda serbest halde bulunabilirler.



Şekil 2.3: Sinamik asitler

Yapısı ferulik aside çok benzeyen kafeik asit, başlıca kahve, kekik, adaçayı, nane, Seylan tarçını, anason, kırmızı şarap, elma, kayısı, erik, kuru erik gibi bitkilerde bulunmaktadır. Kafein gibi antioksidan özelliği olan kafeik asit, ferulik asitle birlikte çalışarak bitki hücrelerindeki lignin biyosentezinde yer alır. Kafeik asit lipid peroksidasyonu ve doku hasarına karşı baskılayıcı, immünmodülatör, anti-inflamatuvar, nefroprotektif aktivite göstermektedir. Tahıl tanelerinde kabuğa yakın kısımda bulunan sinapik asidin ise antimikrobiyal, anti kanserojen ve anti-inflamatuvar etki gösterdiği, diyabetik hayvanlarda antihiperglisemik etkisi olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca; kanda bulunan üre, serum kreatin ve ürik asit miktarlarının azalmasına, toplam protein ve albümin seviyelerinin ise artmasına sebep olduğu ortaya konmuştur (Kolaç ve diğ., 2017).

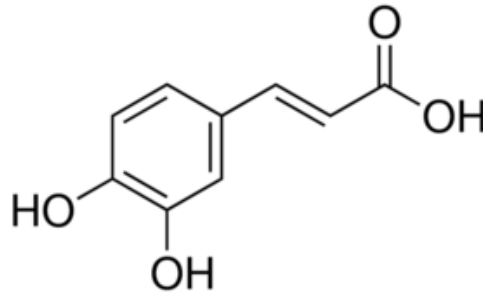
Küçük bir sınıf kabul edilen fenolik asitlerin antioksidan özellikleriyle alakalı birçok çalışma dikkatleri bu grup üzerine çekmiştir. Bu maddelerin bitki odaklı yiyeceklerin yapısında kaçınılmaz olarak bulunmasından dolayı, insanlar diyetlerinde (diyetlerin sebze, meyve hububat, çay, kahve, baharat içeriğine göre) bu maddelerden günde yaklaşık 25 mg ile 1 g arasında almaktadırlar (Clifford, 1999).

Hidroksisinnamik asitlerden kafeik, ferulik, m- ve p-kumarik asitler sahip oldukları antioksidan, antifibröz, antiviral, antitümör, antitrombotik aktiviteleri sayesinde bilim dünyasında oldukça popüler iken; o-kumarik asitin biyolojik aktiviteleriyle alakalı yapılmış çok az çalışma bulunmaktadır (Şen ve diğ., 2013).

2.2 Fenolik Asitlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

2.2.1 Kafeik Asit

Kafeik asit (3,4-dihidroksi-sinnamik asit) organik bir bileşik ve güçlü bir antioksidandır. Çok çeşitli bitkilerde doğal olarak bulunabilir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Kafeik asidin yapısal formülü

Kafeik asit en yaygın bulunan fenolik asitlerdendir. Hidroksisinnamik asit, meyvelerin bütün kısımlarında özellikle de olgun meyvenin dış kısmında yüksek oranda bulunmaktadır. Meyvedeki miktarı çoğunlukla olgunlaşmayla azalma gösterirken, toplam kalitesi ise meyvedeki büyüklük artışıyla artmaktadır. Ayrıca, immün sistemle ilişkili astım ve alerji gibi hastalıkların oluşumunda etken olan lökotrienlerin sentezini seçici olarak inhibe ettiği ve kolon kanserine karşı antitümoral aktivitesi gösterilmiştir (Barut ve Sürücüoğlu, 2010).

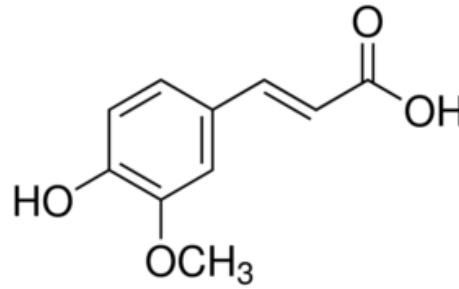
Kahve polifenolleri kafeik asit ve klorojenik asit, kanser metabolizmasının bazı önemli yollarının aktivasyonu ve inhibisyonu yoluyla antitümör etki gösterir. Dahası, epidemiyolojik çalışmalar, yüksek kahve tüketiminin, spesifik kanser ve metabolik, sindirim sistemi, hepatik veya nörolojik rahatsızlıkların görülme sıklığının daha düşük olmasıyla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Kahve

polifenollerinin antitümör etkisi, tümör hücre dizilerinde, klinik öncesinde ve klinik çalışmalarda araştırılmıştır. Kafeik asit, apoptozu indükleyerek hepatoselüler karsinom hücrelerinin ve SK-Mel-28 insan melanoma kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe eder, SK-Mel-28 hücrelerinde gen ekspresyonunu değiştirir. DNA metilasyonunu artırarak ve miR-148a ekspresyonunu indükleyerek kanser kök hücresi benzeri hücrelerin özelliklerini zayıflatır. Kafeik asit MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde DNA metilasyonunu baskılar (Hernandes ve diğ. 2020).

Kafeik asit, nükleer faktör- κ B (NF- κ B) ve matris metaloproteinaz 9 (MMP-9) aktivitelerinin inhibisyonu aracılığıyla hepatokarsinom hücrelerinin büyümesini ve metastazını inhibe etmiştir (Chung ve diğ., 2004).

2.2.2 Ferulik Asit

Ferulik asit (FA, 3-metoksi, 4-hidroksi sinamik asit), sebze ve meyvelerde sıklıkla bulunan, fenilalanin ve tirozin metabolizmasından kaynaklan, fenolik bir bileşiktir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Ferulik asidin yapısal formülü

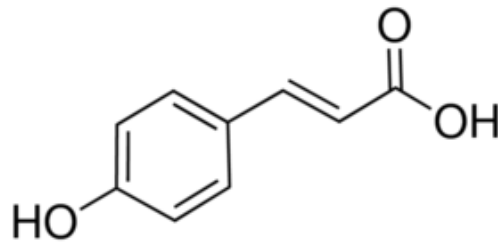
Kimyasal yapısı zerdaçale sarı rengini veren ve önemli bir antioksidan olan kurkumine benzemektedir. Özellikle tohumlarda ve yapraklarda serbest halde ve lignin gibi biyopolimerlere bağlı halde bulunmaktadır. Mısırdaki, buğday, pirinç, yulaf, çavdar gibi tahılların kepeklerinde, kavrulmuş kahve, domates ve turuncgillerde bulunmaktadır. Undaki toplam fenolik asitler içinde %90'ını ferulik asit oluşturmaktadır (Taner, 2007).

Ferulik asit, fenoksiradikal yapısına bağı olarak yüksek antioksidan potansiyele sahiptir. Etkili bir serbest radikalleri uzaklaştırıcı olmasının yanında bazı ülkelerde lipit peroksidasyonunu engelleme özelliğinden faydalanılarak gıdaların içeriğinde katkı maddesi olarak yer almaktadır. Ferulik asitin insanlarda, güçlü bir membran antioksidanı olarak etki ettiğı ve deri kanseri, yaşlanma, yorgunluk, soğuk algınlığı, grip ve influenzaya karşı koruyucu etkili olduğı bilinmektedir. Ferulik asit hidroksil radikali, hipokloröz asit ve peroksil radikali gibi reaktif oksijen türlerini süpürücü etkilidir; serbest radikal zincir reaksiyonlarını sonlandırdığı ispatlanmıştır. FA'nın ratlarda pankreatik hücrelerde insülin salınımını arttırdığı bildirilmiştir. Antioksidan özellikleri ratlarda kimyasallar aracılığıyla oluşturulan karsinogeneze ve farelerde deri tümörü oluşumunda da görülmüştür (Taner, 2007).

Ferulik asitin karaciğer kanserine (HepG2) karşı antitümör aktivitesini yönlendirdiğı ve apoptozu indüklediğı bildirilmiştir (Lee, 2005).

2.2.3 o-Kumarik Asit

Yapıdaki hidroksi grubunun yerine bağı olarak orto, para ve meta olmak üzere üç tane izomeri bulunan kumarik asit sinnamik asitten türemiş organik bileşiktir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: o-Kumarik asidin yapısal formülü

Molekül formülü $C_9H_8O_3$, molekül ağırlığı $164,15 \text{ g mol}^{-1}$ 'dür. Erime noktası 210 ile $213 \text{ }^{\circ}\text{C}$ arasındadır. Portakal, kiraz, kahve, çikolata ve şarapta bulunmaktadır. Strese karşı koruma sağlamanın yanında antitümör aktivitesi göstermektedir. DNA'da oksidatif hasara neden olduğı için yüksek miktarlarda alındığı zaman toksik olmaktadır. p-Kumarik asit özellikle mide kanserine karşı oldukça yararlı olduğı bildirilmiştir (Akkan, 2008).

o-Kumarik asit kahve, çay kuruyemiş gibi birçok gıda ve bitki ürünü içinde bulunan bir hidroksisinamik asittir. o-kumarik asidin antilipidemik, antioksidan ve antikarsinojenik gibi farklı biyolojik aktiviteler gösteren çalışmaları var (Kowczyk-Sadowy ve diğ., 2015).

2.3 Fenolik Asitlerin Biyolojik Etkileri

Fenolik asitler, bitkilerin kokusundan, tatlarından, renklerinden sorumludurlar ve sadece küçük bir grubu dışında doğada serbest olarak bulunmamaktadır. Gıda maddelerinin içinde bulunan fenolik asitlerin besinlerin kararlılığını, rengini, kokusunu, besin değerini ve kalitesini etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle raf ömrünü uzatmak amacıyla gıdalarda koruyucu madde olarak kullanılmaktadır.

Ayrıca fenolik asit içeren pek çok bitkide bazı hastalıklarda tedavi edici olarak kullanılmaktadır (Aslan, 2015).

Son yıllarda, antikanser aktivitesine sahip olduğuna inanılan ve antioksidan olarak bilinen fenolik asitlerin sağlığı geliştiren özelliklerinden dolayı büyük ilgi çekmektedir. (Li ve diğ., 2009).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, sebze, meyve ve diğer bitkisel kaynaklı (ay ve şarap gibi) rn ağırlıklı beslenen kişilerde kanser ve birçok kronik hastalığa karşı bitkilerin içeriğindeki fenolik bileşiklerin koruyuculuk sağladığı ne sürülmektedir. Polifenollerin antialerjik, antiarterojenik, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antibakteriyel, antiviral, antimutajenik, antikarsinojenik, antiülser, antioksidan ve antitrombotik etki gibi pek çok etki gösterdiği iddia edilmektedir (Bacanlı, 2014).

Tümör hücreleriyle yapılan çalışmalarda ise beslenme yoluyla vücuda giren polifenollerin antikanserojen aktivitesi tespit edilmiş olup bu bileşiklerin kanser tedavisinde yer alabileceği söylenmiştir. Özellikle yeşil aydaki polifenollerin tümör gelişimini önleyerek kansere karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (Bacanlı, 2014).

Birçok çalışma epigenetik değişikliklere erken müdahalenin kanser oluşumunu engelleyebileceğini göstermiştir. Epigenetik değişiklikler genellikle kanser gelişimi sırasında erken evrelerde ortaya çıkmaktadır. Bu epigenetik değişikliklerin erken değişimi önleyerek kanser hücre proliferasyonunu azaltabilir. Bu yüzden erken aşamadaki epigenetik müdahaleler kanser büyümesinin ve metastazının şiddetini azaltabilir. Pek çok epigenetik değiştiricilerin tamamı doğal olarak oluşur ve diyet besinleri olarak kolayca elde edilebilir. Bu diyet besinleri arasında polifenoller ve flavanoidler, epigenetik değiştiriciler önemli bir besin kaynağı olarak tanımlanmıştır. Bu anlamda çay/kahve alımı ile göğüs kanseri vakaları arasındaki ilişkiyi analiz eden çalışmalar vardır. Hem çay hem de kahve farklı grup polifenoller içerir. İsveçli kadınlar üzerinde yapılan bir araştırmada kahve alımının hastalarda meme tümörü gelişiminin menopoş öncesi ve sonrası görülme sıklığını önemli ölçüde azalttığı bulmuşlardır ancak çay alımının artmasıyla meme kanseri görülme sıklığı artmıştır (Selvakumar ve diğ., 2020).

2.4 DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, öncelikle sitozinin C5 pozisyonunda birçok biyolojik süreçte farklılaşma, genomik baskı, DNA mutasyonu ve DNA onarım gibi gen ifadesini etkiler. DNA hipermetilasyonu, genellikle promotor CpG adalarında meydana gelen genlerin ifadesini susturmada önemli bir epigenetik mekanizmadır (Fang ve diğ., 2007).

DNA metilasyonu; embriyonik gelişim, transkripsiyon, kromatin yapısının düzenlenmesi, X kromozomu inaktivasyonu, genomik “imprinting” ve kromozom stabilitesinin sağlanması gibi birçok hücresel süreçte rol oynayan önemli bir epigenetik mekanizmadır. Metilasyonun bu tip kritik süreçlerde rol alması, onun çok iyi bir şekilde kontrol edilmesini gerektirmektedir. Birçok hastalığın temelinde, epigenetik kontrol sisteminin düzgün bir şekilde çalışmaması yatmaktadır. Epigenetik modifikasyonlar düzgün bir şekilde kurulamaz ya da devam ettirilemezse, bu süreçle ilgili patolojik sonuçlar ortaya çıkabilmektedir (Güler ve Peynircioğlu, 2016)

DNA metilasyonunun anormal modelleri ve düzensizliği tümörigenez sırasında ilişkili genin susturulması kararlı, kalıtsal transkripsiyona neden olur. Spesifik olarak epigenetik çeşitlilik, beslenme değişiklikleri tarafından modülasyona duyarlı görünmektedir. Bu nedenle DNA metilasyonu sürecini etkileyebilecek diyet bileşenleri, belirli anahtar genlerin ekspresyonunun düzenlenmesiyle tümör oluşumunu etkiler. Epigenetik mekanizmaların değiştirmek için teröpatik stratejilerin gelişimi, örneğin DNMT'lerin aktivitesi hedeflenerek, biyoaktif bitkisel ekstratların uygulanması alternatif kanser kemoterapisinde ve önlenmesinde birçok fayda sağlar (Li ve Tollefsbol, 2010).

Son araştırmalar, çeşitli çevresel streslerin patojenler içeren bitkiler, ağır metaller, soğuk, kuraklık ve yüksek tuz dahil olmak üzere DNA metilasyon seviyelerinde değişikliklere yol açtığını göstermektedir. Dahası birçok gen stres direnci ile ilişkili DNA metilasyonu tarafından düzenlenir (Yang ve diğ., 2018).

DNA metilasyonunun en önemli ve üzerinde en çok çalışılmış türü DNA'daki bazı bölgelerde bulunan sitozin bazının metillenerek 5-metilsitozine dönüşümüdür. Beşinci baz da denilen 5-metilsitozin (5-mC) modifikasyonu genelde CpG adacıkları olarak da isimlendirilen ve 5'-sitozin-fosfat-guanozin- 3' dinükleotidlerinin sıklıkla bulunduğu 500- 2000 baz çifti uzunluğundaki DNA bölgelerinde yer alır. Bu adacıklar gen promotör bölgelerinin önemli bir kısmında yer almaktadır. CpG adacıkları dışındaki genomun diğer bölgelerinde de DNA metilasyonu gerçekleşebilir. DNA da yer alan bu bölgelere metil grubu takılması olayı DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b olmak üzere 3 izoformdan oluşan DNA metil transferazlar (DNMT) enziminin aktivitesi ile gerçekleştirilir. DNMT izoformlarından DNMT1 mitotik hücre bölünmesi sırasında yeni oluşan hücrelere metilasyon profilini kopyalarken, DNMT3a ve 3b ise de novo metilaz enzimleri olarak işlev görür (Eser ve diğ., 2016).

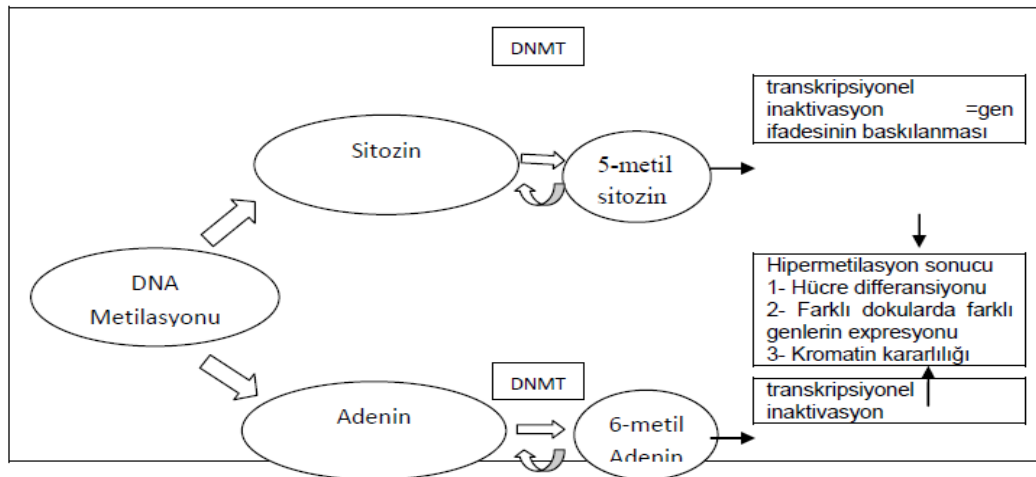
DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve histon olmayan proteinlerle kombinasyon halinde kromatin yapı ve erişilebilirliğini tanımlar. Bu nedenle DNA metilasyonu gen ekspresyonunu, transpozon susturmayı kromozom etkileşimleri ve kalıtım özelliklerini düzenlemeye yardımcı olur (Zhang ve diğ., 2018).

İnsan kanserlerinde, anormal epigenomiklerin başlama, ilerleme, istila (invazyon), metastazlar ve kemoterapi direnci dahil olmak üzere neoplastik

gelişmenin çeşitli aşamalarında katkı sağladığı bilinmektedir. Son zamanlarda 300'den fazla gen ve gen ürünleri çeşitli insan kanserlerinde, epigenetik olarak değiştiği ileri sürülmüştür (Kanwal ve Gupta, 2012).

DNA metilasyonu, iki mekanizma yoluyla gen aktivitesini düzenleyebilir. Birinci olarak, transkripsiyon faktörü içinde CpG dinükleotidlerinin metilasyonu bağlanma yerleri, transkripsiyon faktörü bağlanmasını inhibe edebilir ve bu nedenle gen aktivitesini doğrudan etkiler. İkinci olarak, metillenmiş CpG dinükleotidleri metil CpG bağlayıcı proteinler için bağlanma yerleri olarak işlev görür, ki bu da histon deasetilazlar dahil baskılayıcı kromatin yapıları oluşturmak gibi diğer faktörlerle ilişkilidir (Chin ve diğ., 2011).

Genel olarak, genlerin promoter bölgelerinde DNA metilasyon eksikliği, genellikle transkripsiyon aktivasyonu ve gen ekspresyonu ile ilişkilidir. Aksine, metilasyon gen susturmadan sorumlu gen promoterlerinde olabilir. DNA CpG adalarının hipermetilasyonu hücre döngüsü regülasyonu, reseptörler, DNA onarımı ve apoptozda çok önemli olan genleri susturmak için, epigenetik mekanizmada önemli bir rol oynar (Şekil 2.7). Bu nedenle, spesifik inhibitörler tarafından DNMT aktivitesinin düzenlenmesi, terapötik hedef ile anormal hücresel süreçleri durdurma açısından umut vericidir (C'iz ve diğ., 2020).



Şekil 2.7: DNA metilasyonu ve etkileri (Yokuş, 2013).

Hücreyi kanserden koruyan, sinyal iletim yollarında, DNA onarımında, hücre döngüsünde ve kontrollü hücre ölümü olan apoptozda görevli olan tümör supresör genlerin promoter bölgedeki hipermetilasyonu ile bu genler

susturulmaktadır. Bu susturulma ile kanser hücrelerinde büyüme ve proliferasyon artmaktadır. Bu susturulma ancak genlerdeki alellerin ikisinde susturulması ile gerçekleşmektedir. Çalışmalar sonucunda tümör supresör genlerin bir alelinde mutasyon görülürken, diğer alelde hipermetilasyon ile susturulmaktadır. DNA metilasyon durumlarındaki değişiklikler hastalığın, prognoz, yatkınlık, ilaçların yan etkilerinin belirlenmesinde belirteç olarak kullanılabilir olduğu gösterilmektedir (Karaçoban, 2016).

DNMT ve TET enzimleri metillenmiş DNA seviyesinin kontrolünde çok etkili bir şekilde rol almaktadırlar. DNA metilasyon olayı çoğunlukla genlerin susturulmasını sağlayarak belirli proteinlerin ifadesini azaltır, demetilasyon ise suskun genleri aktive eder. Bu şekilde DNA metillenmesi ve dolayısıyla da gen ifadesi vücut tarafından aktif olarak kontrol edilmektedir. Böylelikle statik bir yapıda olan genom, DNA dizisi üzerinde değişiklik olmadan gelecek nesillere aktarılabilen geri dönüşümlü dinamik bir yapı kazanmaktadır (Eser ve diğ., 2016).

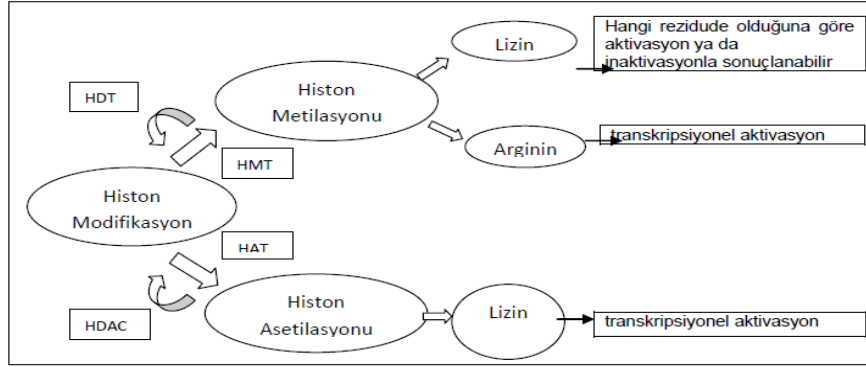
Normal fizyolojik koşullar altında DNMT'ler, sitozin kalıntılarındaki DNA metilasyonu için önemlidir: spesifik olarak DNMT1 hücre bölünmesi sırasında metilasyonun sürdürülmesinden sorumlu iken, DNMT3 bir başlangıç metilatör olarak görev alır. Bununla beraber DNMT'lerin aşırı ekspresyonu ve belirli genleri etkileyen anormal metilasyon modelleri, birçok kanser türlerinde karaciğer, kolorektal, prostat, meme, endometriyal, mide, hepatoselüler, servikal ve pankreas kanserleriyle ilişkilendirilmiştir (Aldawsari ve diğ., 2015).

İnsan genomundaki protein kodlayan genlerin bazıları gelişim sürecinin belli dönemlerinde aktif iken, diğer dönemlerinde inaktiftir. Yani, hepsi aynı zamanda fonksiyonel değildir. Bir genin aktif olması için kromatin yapısının gevşemesi ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanması gerekmektedir. Gen ekspresyonunun transkripsiyonel seviyede düzenlenmesi, kromatinin yeniden modellenmesi ve histon modifikasyonları ile sağlanmaktadır (Küçükoğlu, 2014).

Histonlar, epigenetikte başka bir kilit oyuncudur. Bugün onlar gen ifadesi ve kromatin yapısı kontrolünde birincil bir role sahip olduğu kabul edilerek DNA metilasyon mekanizmasında yakın partnerlerdir. Kanser hücrelerindeki histonların davranışı hakkındaki bilğimiz DNA metilasyonu ile karşılaştırıldığında biraz daha

azdır. Biz biliyoruz ki bazı histon modifikasyonları, p21 durumunda olduğu gibi CpG ada hipermetilasyon ile bağlantılı olarak tümör baskılayıcı gen susturmaya katılır veya yok olur (Esteller, 2006).

Histon modifikasyonları, nükleozom yapısının dışında kalan histon kuyruklarına (amino terminal uçları) asetil, metil ve fosfor gruplarının eklenmesiyle gerçekleşmektedir (Şekil 2.8). Geçmişten günümüze kadar yapılmış histon asetilasyonu ile ilgili araştırmalar sayesinde histon asetil transferaz (HAT) ve histon deasetil transferaz (HDAC) enzimlerinin asetilasyon olaylarında önemli görevler aldığı kanıtlanmıştır (Küçükoğlu, 2014).



Şekil 2.8: Histon modifikasyonları ve etkileri (Yokuş, 2013).

HAT enzimi, asetil koenzim-A' histon proteinini değiştirdiği ispatlanan ilk enzim olup günümüze kadar insanlarda en az 25 HAT ve 18 HDAC enzimi tanımlanmıştır. En az 25 üye içeren HAT'lar birincil yapı homolojisine dayalı 4 aileye organize olmuştur. Farklı HAT ailesi asetilatlar, histonlar ve histon olmayan hedefler transkripsiyon aktivasyonu, gen susturma, DNA onarımı ve hücre döngüsü ilerlemesi gibi çeşitli süreçlerde yer alır. HDAC enzimlerinin 9'u doğrudan DNA'ya bağlanmaz ondan ziyade çekirdek baskılayıcıları ve ortak aktifleştiricileri içeren multiprotein kompleksleri yoluyla DNA ile etkileşime girer (Fu ve Kurzrock, 2010).

DNMT ve HDAC inhibitörlerinin bir arada kullanılması sinerjistik etkiye neden olmaktadır. Epigenetik değişiklikler hedef inhibitörlerinin geliştirilmesi ile kişiye özel tedavilerin kullanımını sağlamaktadır. Ancak, tümör baskılayıcı genlerin

aktivesine yol açan epigenetik ilaçlar, normal işleyişli hücreler için kritik öneme sahiptir. Bu ilaçlar, bağımsız olarak ya da terapötik olarak diğer tedavi yöntemleri ile birlikte kullanılabilir. DNMT ve HDAC inhibitörleri kullanılarak epigenetik terapi ve geleneksel terapinin birleştirilmesiyle en iyi etkiyi üretebilir (Eroğlu, 2018).

HDAC inhibitörleri, farklı biyolojik fonksiyonları etkiledikleri için özellikle kanser, spinal musküler atrofi, Alzheimer hastalığı, diyabet, psikiyatrik hastalıklar, inflamasyon, astım, romatizma ve paraziter enfeksiyonlar gibi farklı hastalık gruplarının tedavilerinde öne plandadır (Küçüköğlu, 2014).

DNA metilasyonu çok kararlı bir epigenetik modifikasyon olarak kabul edilirken, histon modifikasyonları, histon modifiye edici enzimler arasında seviyeleri bir denge ile korunurken, nispeten daha kararsızdır ki bu da spesifik modifikasyonları ekler veya kaldırır (Kelly ve diğ., 2010).

2.5 Tezin Amacı

Hidroksisinnamik asitlerden, kafeik asit, ferulik asit, m- ve p-kumarik asitler antioksidan, anti-fibroz, antiviral, anti-tümör ve anti-trombotik aktiviteler gibi çeşitli biyolojik aktiviteler sahip oldukları maddelerden dolayı çok daha fazla ilgi görmüştür (Şen ve diğ. 2013). Bu anlamda literatürde fenolik asitlerin bu etkileriyle ilgili mevcut çalışmalar varken, epigenetik modifikasyonlardan olan DNA metilasyonu üzerine etkisini açıklayan çalışma yapılmamıştır.

Antikarsinojenik etkileri ortaya konulan bu fenolik asitlerin epigenetik parametrelerden olan DNA metilasyonuna olan etkilerine yönelik çalışmalar literatürde çok azdır (Paluszczak ve diğ, 2010). Son yıllarda yapılmış olan çalışmalar besinlerde bulunan fitokimyasalların epigenetik mekanizmalar üzerinde etki ettiğini göstermiş olup bu alandaki araştırmalar için ilgi çekici hale gelmiştir.

Bu amaçla bu tez çalışmasında insanların sık sık beslenmeleriyle birlikte aldıkları ve tıbbi bitkilerin yapısında yaygın bir şekilde bulunan fenolik asitlerden olan kafeik asit, o-kumarik asit, ferulik asit'in insan karaciğer kanseri hücre hattında epigenetik değişimlerden olan DNA metilasyonuna olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda bu fenolik maddelerin DNA asetilasyonu ve DNA deasetilasyonu üzerinde olan etkileri de bu çalışma ile ortaya konulacaktır.

3. YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Agaroz (Sigma, A9539), Etidyum bromür (EtBr, Bio Basic; D0197), 1 kb DNA ladder (Fermentas, SM0311), Sodyum Klorür (NaCl) (Merck, 1.06400), Kafeik Asit (Sigma-Aldrich, C0625), Ferulik Asit (Sigma-Aldrich, Y0001013), o-Kumarik Asit (Sigma-Aldrich, H2,280-9), Dulbecco Modifiye Eagle Medyum (DMEM, Sigma, D5796), Fetal sığır serumu (FBS, Gibco, 10270), Penisilin (Sigma, P4333), Tripsin-EDTA (Gibco, 25200), cDNA Sentez Kiti (Abm, G236), Kilogreen qPZR Kiti (Abm, mastermix-KS), innuPREP RNA İzolasyon Kiti (analytikjena, 845-KS-2040010), BCA Protein Test kiti (Biovision, K813-2500), Mitochondria/Cytosol Fractionation Kiti (Biovision, K256-25), Methltransferase Activity Assay Kiti (Colorimetric) (Biovision, K986-100).

3.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Laminar flow kabini, Inverted mikroskop, CO2 inkübatörü, -80 derin dondurucu, Agaroz jel elektroforezi aparatı (Thermo, EC320), Süper Mini Santrifüj, Pzr cihazı, Gerçek zamanlı PZR cihazı, Soğutmalı Santrifüj, Otoklav, Biotek Take3 mikro RNA/DNA ölçüm cihazı, Etüv, Jel görüntüleme cihazı, pH metre, Su banyosu, Vorteks, Otomatik mikropipet, Manyetik karıştırıcı, Deiyonize su cihazı, Mikrodalga fırın, Hassas terazi.

3.1.3 Çalışmada Kullanılan Primerler

Çalışmamızda HepG2 hücre hattında DNA metilasyon mekanizmasında görev alan DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, GAPDH, HDAC1, HDAC3 ve

HAT genleri seçilerek uygun diziler belirlenmiştir. Ardından elde edilen dizilerin blastlaması NCBI/Primer-BLAST veri tabanı aracılığıyla doğruluğu tayin edilmiştir. Çalışmada kullanmak amacıyla bu primer dizileri Sentebiolab firmasına 100 nmol skalada sentezlettirilerek -20°C’de saklanmıştır. Kullanılan primerler Tablo 1’de verilmiştir.

Her deneyin sonunda, kontrol aktivitesi yeniden ölçülmüş ve başlangıçtaki kontrol aktivitesi ile karşılaştırılmıştır. Bu arada, seyreltilmiş enzimin stabilitesi de sürekli kontrol edilmiştir.

Tablo 1: Seçilmiş olan genler için tanımlanan primer dizileri

Gen	İleri Primer ve Geri Primer (5'→3')
DNMT1 (DNA metil transferaz 1)	AGGCGGCTCAAAGATTTGGAA
	GCAGAAATTCGTGCAAGAGATTC
DNMT3A (DNA metiltransferaz 3 alfa)	CCGATGCTGGGGACAAGAAT
	CCCGTCATCCACCAAGACAC
DNMT3B (DNA metiltransferaz 3 beta)	AGGGAAGACTCGATCCTCGTC
	GTGTGTAGCTTAGCAGACTGG
TET1 (tet metilozin dioksijenaz 1)	CATCAGTCAAGACTTTAAGCCCT
	CGGGTGGTTTAGGTTCTGTTT
GAPDH (gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz)	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
HDAC1 (histon deasetilaz 1)	TGGAAATCTATCGCCCTCAC
	TCTCTGCATCTGCTTGCTGT
HDAC3 (histon deasetilaz 3)	GCAAGGCTTCACCAAGAGTCT
	AGATGCGCCTGTGTAACGC
HAT (histon asetiltransferaz)	TACAGCGGAAGATCCATCCAA
	CTGTTGTGCCTCTATCGCCA

3.2 Metod

3.2.1 Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmamızda insan karaciğer kanseri hücre hattı (HEPG2) kullanılmıştır. HEPG2 hücre hattı hücre kültürü laboratuvarımızdaki inkübatörde 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nem içerecek şekilde inkübe edilmiştir. Hücrelerin gelişimi ve çoğaltılması, %10 Fetal Sığır Serumu (FBS) kullanılarak kontaminasyonu önlemek amacıyla da %1 penisilin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besi yeriyle sağlanmıştır. Hücrelerin yoğunluğuna bağlı olarak her 2-3 günde bir pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücrenin ihtiyacına göre yeni besi yeri ile tazelenmiştir. Steril petrilerde üretilen hücreler yaklaşık %80-90 yoğunluğa varıncaya kadar beslenmiştir. Pasajlama işlemine geçildiğinde öncelikle ortamdaki kullanılmış besi yeri uzaklaştırılır. Daha sonra hücreler PBS (fostat tamponlu tuz) yardımıyla yıkanmıştır. Besiyerinden uzaklaştırılan hücreleri petriden kaldırmak amacıyla tripsin-EDTA ilave edilmiştir. Santrifüj yardımıyla çöktürülen hücreler kendi besi yeri içerisine konularak yeni bir petriye aktarılmıştır. Bu sayede hücrelerin çoğaltılması işlemi sağlanmıştır. Hücrelerin sayılması için tripan mavi boyası kullanılarak thoma lamında sayım gerçekleştirilmiştir.

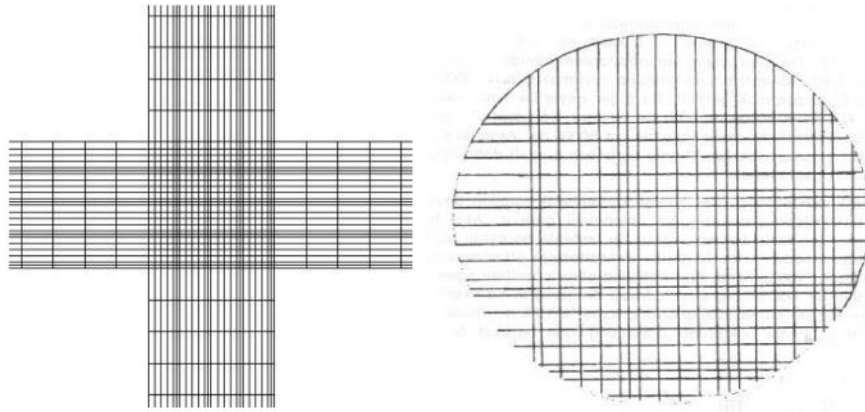
3.2.1.1 Kafeik Asit, Ferulik Asit ve o-Kumarik Asit Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Moleküler ağırlıkları bilinen toz halindeki kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asit belirli hacimlerde dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözülerek 400 mM konsantrasyonda ana stoklar hazırlanmıştır. Bu stok solüsyonlardan, her deney öncesinde taze besiyeriyle seyreltme işlemleri yapılarak farklı konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Kontrol grubuna besiyeri içinde %50 oranında DMSO eklenerek uygulanmıştır. DMSO'nun son konsantrasyonu % 0.5'i geçmemiştir.

3.2.2 Hücre Canlılığının Saptanması

3.2.2.1 Tripan Mavi Boyama Testi ile Hücre Canlılığının Saptanması

Hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla Tripan mavi boyası kullanılmıştır. Bu boya negatif yüke sahip bir boyadır ve hücrelerin canlı ya da cansız olup olmadığını belirlememizi sağlamıştır. Tripan mavi boyasının çalışma ilkesi; hücre membranı zarar görmemiş ve canlı bir hücre ise, boya hücre içine giremez. Ancak cansız hücreler boyayı absorbe ederek mikroskop altında mavi olarak görünürler. Thoma lamına yüklenen hücrelere tripan mavi boyası eklenerek ışık mikroskopunda sayım işlemi gerçekleştirilir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Thoma lamındaki karelerin genel ve sınırlandırılmış görüşü

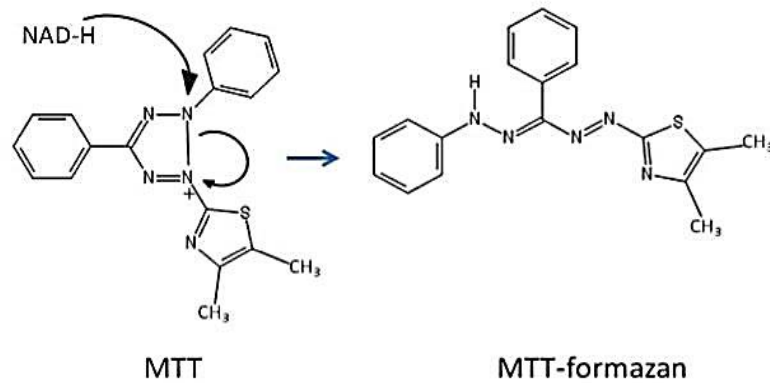
Toplam hücre sayısı = Toma lamında sayılan hücreler x 10,000 x seyreltme faktörü

3.2.2.2 Hücre Canlılık Testi (MTT veya Kristal Viyole)

Canlı hücreler çeşitli boyama yöntemlerinden biriyle ölçülebilir ancak işlem süresini azaltmak ve numuneyi artıracak herhangi bir yıkama adımından kaçınmak için bu yöntem geliştirilmiştir. Multiwell tarama spektrofotometreleri (ELISA okuyucuları) yüksek derecede hassasiyetle çok sayıda örnekle ölçüm yapabilir. Bu nedenle canlı hücre sayısının bir ölçüsü olarak bir renk reaksiyonu kullanma olasılığı

araştırılmıştır. Sadece canlı hücreler ve taramalı çok delikli spektrofotometrede (ELISA okuyucu) ölçülen tetrazolyum tuzu MTT'ye (3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolyum bromür) dayalı hızlı bir kolorimetrik test geliştirilmiştir. Bu yöntem çok yönlü ve kantitatifdir (Mosmann, 1983).

Çalışmada fenolik asitlerin HEPG2 hücrelerine olan sitotoksik dozları ihtiyaç durumuna göre iki farklı metot (MTT veya Kristal Viyole) ile tayin edilmiştir. MTT testi Mosmann (1983) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. HEPG2 karaciğer kanseri hücre hattı, DMEM besi yerinde %5 CO₂ ve 37 °C' deki nemli inkübatörde çoğaltılmıştır. Çoğaltılan hücreler 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi uygulanarak kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asitin HEPG2 hücrelerine olan sitotoksik konsantrasyonları belirlenmiştir. Hücreler 96'lık plakaya (2x10³/kuyucuk) ekilerek 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından hücreler çeşitli dozlar ile muamele edilerek 24 saat boyunca maruz bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra hücelere MTT çözeltisi uygulanarak 4 saat boyunca bekletilmiş, bekleme sonunda çözünmüş olan formazan kristallerinin canlı yüzeyine birikmesiyle işlem gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda sıvı kısım uzaklaştırılarak kuyucuklara 50µl DMSO eklenerek çalkalayıcıda düşük devirde 3 dakika karıştırılmıştır. Formazon kristallerinin çözünmesi için 30 dakika inkübe edilmiştir. Örnekler spektrofotometrik ölçüm yöntemiyle (540 nm ELISA plaka okuyucu) okunmuştur ve EC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Bu bağlamda hiç fenolik madde ile muamele edilmeyen kontrol grubu ve fenolik asitler ile muamele edilen gruplar karşılaştırılarak değişik dozlardaki fenolik asitlerin hücre canlılığına etkisi saptanmıştır.



Şekil 3.2: Formazanda MTT indirgemesi (Zerbinati ve diğ. 2018).

3.2.3 Total RNA İzolasyonu

Doku ya da hücrelerin liziz solüsyonu kullanılarak parçalanması ve fenol yardımıyla RNA'nın ekstrakte edilmesi ilkesine dayanan prosedür ilk kez 1987 yılında Chomczynski ve Sacchi tarafından yapılmıştır (Chomczynski ve Sacchi, 1987).

Yüksek oranda verim ve kalitede RNA üretmek için borat tamponunu Qiagen RNeasy döndürme kolonları ile birleştirerek hızlı ve basit bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem kullanılarak izole edilen RNA'nın biyolojik olarak in vitro translasyon ve ters transkripsiyon deneyleri sırasında aktiftir. Bu yöntemi, daha sonra yüksek kaliteli cDNA kitaplıkları oluşturmak ve mikrodizi deneylerinde cDNA problemleri yapmak için RNA'yı izole etmede rutin olarak kullanılmışlardır (Wu ve diğ., 2002).

Fenolik asitlerin sitotoksik etkisi saptandıktan sonra, EC₅₀ değerleri belirlenen kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asit petrilere ekilmiş olan hücreler üzerine (1×10^6) steril olarak eklenerek 24 saat sonra hücreler besi ortamından uzaklaştırılmıştır. Kontrol olarak fenolik asitlerle muamele edilmemiş hücreler kullanılmıştır. Toplanan hücrelerden Analytic Jena RNA izolasyon kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda total RNA izole edilmiştir. Kit içerisinde bulunan Liziz (RL) ve Yıkama (HS ve LS) Solüsyonu kullanılarak firmanın prosedürü uygulanmıştır. Liziz solüsyonu ile toplanan hücreler santrifüj işleminden geçirilmiştir. Ortaya çıkan pelet yıkama solüsyonu ile yıkanarak işlem iki kez tekrarlanmıştır. Son olarak oluşan pelete RNase-free su eklenerek - 20 °C'de saklanmıştır.

Hücre peletine 400 µl liziz (RL) solüsyonu eklenmiştir. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilerek alıcı tüpün içine spin filtre D yerleştirilmiştir. Lizize edilen örnek 11000 g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Spin filtre D atılmıştır ve içerisinde RNA bulunduğu için süzüntü bırakılmıştır. Yeni bir alıcı tüpüne spin filtre R yerleştirilmiş üzerine 400 µl %70'lik etanol eklenmiştir. 11000 g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Spin filtre R yeni bir alıcı tüpe eklenerek içerisine 500 µl yıkama solüsyonu HS eklenmiştir ve 11000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Alıcı tüpteki sıvı boşaltılarak 700 µl yıkama solüsyonu LS eklenerek 11000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından alıcı tüpteki sıvı dökülerek hiçbir şey eklemeyen 11000

g’de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Son olarak Spin filtre R yeni bir ependorfa alınarak tam ortasına 60 µl RNAaz içermeyen su eklenmiş ve santrifüj edilmiştir. Elde edilen son ürün toplam RNA -80 °C’de saklanmıştır.

3.2.3.1 RNA’nın Spektrofotometrik Analizi

İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu Biotek Take3 mikro RNA/DNA ölçüm aparatı kullanılarak Biotek Mikropilaka okuyucusunda optik dansite (OD) ile ölçülmüştür (OD 260nm / OD 280 nm > 4.7). 260 nm DNA’nın 280 nm proteinin absorbans verdiği dalga boyudur.

3.2.3.2 Total RNA’nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi

Elektroforezi ilk olarak İsveçli bilim insanı Arne Tiselius serum proteinleri üzerine çalışırken bulmuştur. Bu çalışması sayesinde 1948’de Nobel Ödülüne layık görülmüştür.

Agaroz, deniz yosunundan ekstrakte edilen ve bir jel matris oluşturan doğal bir doğrusal polimerdir. Çoğu uygulama için, yalnızca tek bileşenli bir agaroz ihtiyacı vardır ve polimerizasyon katalizörü gerekmez. Bu nedenle, agaroz jellerin hazırlanması basit ve hızlıdır (Barril ve Nates, 2012).

İzole edilen RNA’ların görüntülenebilmesi için yatay jel elektrofrezinde yürütülmüştür. %1’lik agaroz jel ile Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tamponu hazırlanmıştır. Hazırlanan jel mikrodalga fırında kontrollü olarak ısıtılmış ve agarozun çözünmesi sağlanmıştır. Çözünmüş olan agaroz çözeltisi soğutma işleminden geçirilerek üzerine 0,75 µL EtBr eklenmiştir. Ardından elektrofrez tablasına dökülen jel katılaşmaya kadar beklenmiştir. Katı hale gelen jel elektrofrez tankına yerleştirilmiştir. Kuyucuklara yüklenen RNA’lar ‘– den +’ ya doğru yürüyebilmesi için elektrofrezin (–) kutbuna doğru yerleştirilerek, güç kaynağına bağlanmıştır. Elektrofrez tankı 1x TAE tamponu ile doldurularak jelin üstü kapatılmıştır. 5 µl RNA örneği, 2 µl yürütme boyası ve 1 µl steril su ile homojenize edilerek mikropipet yardımıyla jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. Kuyucuklara marker ve örnek yükleme miktarları Tablo 2’de belirtilmiştir.

Tablo 2: Kuyucuklara yüklenen RNA örnekleri ve marker konsantrasyonları

RNA için;		Marker için;	
5 µl RNA örneği	Toplamda 8 µl kuyucuklara yüklenmiştir.	6 µl kb DNA ladder marker	Kuyucuklara 5 µl yüklenmiştir.
2 µl boya (6x loading dye)		2 µl boya (6xloading dye)	
1µl enjeksiyonlu su		2 µl enjeksiyonlu su	

Güç kaynağına bağlanan elektroforez 90 V, maksimum 500 mA’de 45 dakika boyunca yürütülmüştür. Yürütme işlemi bitince jel UV transilluminatörde görüntülenerek DNR LightBis ProImage Analysis System cihazında fotoğraflandırılmıştır.

3.2.4 cDNA Sentezi

cDNA sentezi için Easy Script Plus cDNA sentez kiti ile oligod(T) primeri ve Ters Transkriptaz enzimi (RT) kullanılmıştır. Sentez işlemi üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. cDNA sentez karışım protokolü ve yapılışı Tablo 3’te verilmiştir. RT-PZR yapmak üzere sentezlenen cDNA’lar, -20°C’de saklanmıştır.

Tablo 3: cDNA sentez karışımı ve protokolü

Bileşenler	Hacim	Son konsantrasyon
Total RNA		2,5µg/ml
Oligo (dT) Primer	1µl	0.5 µM
dNTP Karışımı (herbiri 10mM)	1µl	500µM
RNAaz içermeyen su		14.5µl
Hazırlanan karışım 65°C'de 5 dakika bekletildikten sonra buza alınır.		
5X RT Tamponu	4µl	1X
Ribonükleaz İnhibitörü (40U/µl)	0.5µl	20U/rxn
Reverse Transkriptaz Enzimi (200U/µl)	1µl	200U/rxn
Karışım cDNA sentezi için 50°C'de 60 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyonu sonlandırmak amacıyla 85°C'de 5 dakika bekletilir.		

3.2.5 mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Kantitasyonu

3.2.5.1 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

1985 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilen bu teknik in vitro koşullarda belirli DNA parçasının enzimatik olarak kopyalanması ve çoğaltılması ile gerçekleştirilir. Temel olarak DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılması (denatürasyon), daha sonra primerlerin (sentetik oligonükleotidler) hedef DNA'ya bağlanması (yapışma) ve zincirin uzamasından oluşan döngünün belirli bir sayıda tekrarlanmasına dayanmaktadır.

Bu bağlamda PZR'nin çeşitlerinden biri olan Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR); hücrelerden izole edilen RNA moleküllerinin retrovirüslerden izole edilen Revers transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) sentezini gerçekleştirmesi sonucu, gen ekspresyonu analizlerinin yapılabilirdiği hızlı ve hassas bir yöntemdir. Gerçek zamanlı RT-PZR Taq DNA polimerazın 5' nükleaz aktivitesi sayesinde hibridizasyon probunu uzamanın dallanma noktasında kesilmesine dayanır. Burada diğery yöntemlerden farklı olarak floresan şiddetinin baskılanması (sönümü) izlenir.

PZR'de yer alan bileşenler; amplifiye (çoğaltılacak) hedef DNA dizisini içeren kalıp DNA, amplifiye edilecek kalıp DNA'nın komplementeri olacak şekilde seçilmiş yaklaşık 20 bazlık sentetik kısa tek zincirli DNA molekülleri oligonükleotid primerler, termostabil karakterli Taq DNA polimeraz, enzimidir. Mg²⁺ iyonu da işlemde kofaktör olarak önemlidir.

PZR işleminde hedef DNA'nın çoğaltılması 20-40 döngü arasında gerçekleşir. Her döngü farklı sıcaklıklardan oluşan 3 bölüm içerir. Bunlar;

Denatürasyon, kalıp DNA çift zincirinin açılması olup DNA tek zincirli haline gelir. Annealing (birleşme) tek zincirli kalıp DNA'nın primerlerle birleşme adımıdır ve 50-60°C arasında gerçekleşir.

Extension (uzama) DNA polimeraz enziminin maksimum aktiviteye sahip olduğu 72°C de gerçekleşir. Tek sarmal hedef DNA'nın komplementeri primerle zincir başlar ve Taq polimeraz ortamdaki dNTP'leri kullanarak zinciri uzatır.

Tek iplikli DNA çift iplikli forma gelir. İşlem 20-40 döngü olarak bu 3 adımın tekrarıyla devam eder. (Okutucu ve Pehlivan, 2003).



Şekil 3.3: StepOne Real-Time PZR Sistemi (Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyokimya Laboratuvarı)

Gerçek zamanlı PZR çalışmaları ABM KiloGreen 2X qPCR MasterMix kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği talimatlara göre gerçekleştirilmiştir. Primer ve cDNA miktarları, yapışma sıcaklıkları, eklenen Mg^{2+} laboratuvarımızda optimize edilmiştir. Gerçek zamanlı PZR sonucunda elde edilen sonuçlar StepOneSoftware v2.3 programı kullanılarak hesaplanmış ve “housekeeping” gen olan GAPDH’e göre normalize edilmiştir (Şekil 3.3). Her gen için ayrı ayrı amplifikasyon analizi ile standart kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş erime eğrisi analizleri yapılmıştır. Amplifikasyon sonucunda elde edilen Ct (threshold) değerleri kullanılarak yedi adet genin uygulamalar sonucunda mRNA düzeyinde ekspresyon değişimleri belirlenmiştir.

3.2.6 Protein Düzeyinde Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

3.2.6.1 RİPA Tamponu ile Protein İzolasyonu

Radyo immünopresipitasyon tayini (RIPA) hücreleri ve dokuları parçalamak için kullanılan bir lizis tamponudur. RIPA tamponu hücrelerden proteinlerin serbest

olarak proteinler arasındaki en zayıf etkileşimleri bozar. RIPA tamponunun hazırlanışı Tablo 4’te verilmiştir.

Tablo 4: RIPA tamponunun hazırlanışı

RIPA Tamponu
150 mM Sodyum Klorür
%1 NP-40 ya da Triton X-100
%0,5 Sodyum Deoksikolat
%0,1 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)
50 mM Tris pH:8.0

Hazırlanan tampon için %10’luk sodyum deoksikolat stoğu ışıktan korunmuştur. İşlem gerçekleşmeden önce proteaz inhibitörü eklenmiştir. RIPA tamponuyla toplanan hücreler 30 dakika buzda bekletilmiştir. Ardından +4 °C’de 10000 rpm’de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı yeni bir ependorfa alınarak -20°C’de saklanmıştır.

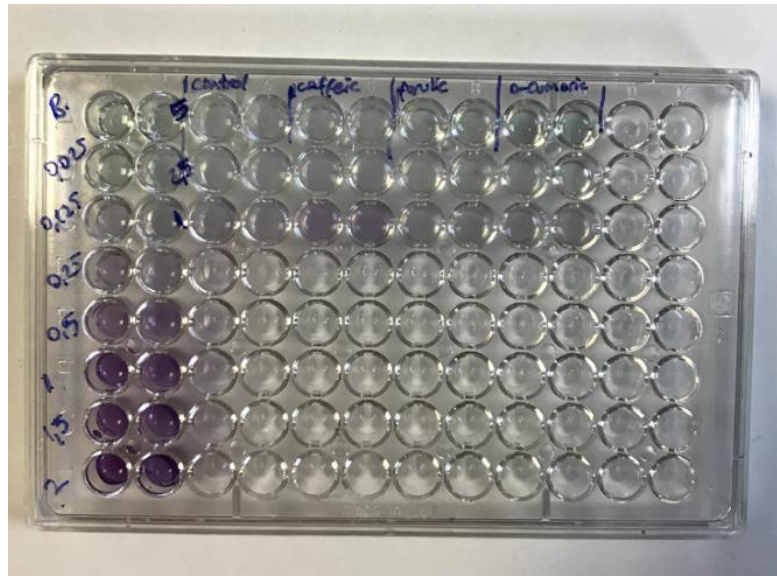
3.2.6.2 Bikinkoninik Asit (BCA) Yöntemi ile Protein Tayini

Paul K. Smith’in geliştirdiği bu yöntem iki reaksiyona dayanır. Birinci reaksiyon biüret reaksiyonudur. Cu^{2+} iyonları, peptid azotlarına bağlanarak Cu^{1+} iyonuna indirgenirler. İkinci reaksiyonda ise bu indirgenmiş Cu^{1+} iyonları BCA ile renkli bir kompleks oluştururlar ve bu rengin şiddeti protein yoğunluğu ile orantılıdır. Oluşan bu renk kompleksi 562 nm’de maksimum absorbands gösterir (Smith ve diğ., 1985).

562 nm’de absorbands veren koyu mor renk ile karakterize olur. BCA yöntemi proteinin amino asit kompozisyonundan az etkilenir ve girişim etkisi gösteren çok fazla bileşik yoktur. Ancak BCA reaktifi pahalıdır ve tekrarlanabilirliği düşüktür. Bu metod ile amino asitler, deterjanlar, lipitler, şekerler ve nükleik asitler Lowry metoduna göre daha iyi tolere edilir. İndirgen şekerler ve bakır şelatlayıcı maddeler bu yöntemde girişim etkisi gösterir. Biovision BCA Protein Assay Kit II kullanılarak üretici firmanın belirttiği talimatlar doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

BSA Standartlarının Hazırlanması;

De-iyonize su kullanarak BSA Standardını seyrelterek, Biovision BCA test kitinin talimatları doğrultusunda BSA Standartları hazırlanmıştır. Kit içerisinde bulunan protein standartları sığır serum albümini (BSA) 2 mg/ml; 1,5 mg/ml; 1 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,125 mg/ml; 0,025 mg/ml konsantrasyonlarda kullanılmıştır (Şekil 3.4). Seyreltilmiş standart çözeltiler, +4 °C’de saklandığında bir haftaya kadar kullanılabilir.



Şekil 3.4: HepG2 hücre hattında BCA yöntemi ile protein miktarı tayini

BCA Reaktifi’nin Hazırlanması;

BCA çalışma reaktifini hazırlamak için, Reaktif A’yı Reaktif B ile 50:1 oranında karıştırılmıştır. Olması gereken yeşil renkli bir çözelti elde etmek için iyice karıştırılır. Her numune için 200 µl BCA reaktifi gerekmektedir. Tüm BSA standartları ve örneklere eklemek için gereken miktarda BCA reaktif çözeltisi hazırlanmıştır (Tablo 5).

Tablo 5: BCA Solüsyonu

BCA Solüsyonu	
BCA Reaktif A	500 ml
BCA Reaktif B	25 ml
BSA Standart (2 mg/ml)	5 x 1 ml

Mikroplaka Prosedürü;

Mikroplakanın kuyucuklarına her BSA standartları ve protein numunesinden 25 µl eklenmiştir. Standart ve numune kuyucuklarına 200 µl BCA çalışma reaktifi ekleyerek, 30 saniye boyunca iyice karıştırılmıştır. Plakayı örterek ve 37 °C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, plaka oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Mikroplaka okuyucusunda 562 nm’de okunmuştur.

3.2.6.3 DNA Metilasyonunda Görev Alan DNMT Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

3.2.6.3.1 Nükleer proteinlerin saflaştırılması

Fenolik asitler EC₅₀ dozlarında 24 saat boyunca HepG2 hücrelerine uygulanmıştır ve bu zaman sonunda hücreler toplanmıştır. Daha sonra toplanan hücrelerden nükleer fraksiyon Biovision Mitochondria/Cytosol Fractionation Kit kullanılarak nükleer fraksiyonlara izole edilmiştir. İzolasyon işlemi üretici firmanın önerdiği talimatlar doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda toplanan hücreler +4°C’de 500g’de 3 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Supernatant kısmı atılarak oluşan pelet önceden soğutulmuş PBS’de iki defa yıkanmıştır. 1ml Buffer A’ya 1 µl DTT, 10 µl PMSF ve 1 µl proteaz inhibitörü eklenerek her örnek için 250 µl kullanılmıştır. Daha sonra oluşan pelet tutularak ön-soğutulmuş Buffer A eklenerek 15 saniye boyunca vortekslenmiştir. Ardından 10 dakika buzda bekletilmiştir. Oluşan karışıma her bir örnek için 11 µl Buffer B eklenerek 5 saniye vortekslenmiş ve 1 dakika buzda bekletilmiştir. Buzda bekletilen örnekler 5 dakika boyunca vortekslenmiştir. +4°C’de 10000g’de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. En üst tabaka başka bir ependorfa alınmıştır. Orta tabakada yeni bir ependorfa alınarak her bir örneğe 100 µl Buffer C eklenmiştir. 1 ml Buffer C’ye 1 µl DTT, 10 µl PMSF ve 1

μ l proteaz inhibitörü eklenmiştir. Her kullanımda taze hazırlanmıştır. Buffer C eklendikten sonra 10 dakika vortekslenmiştir. Ardından 10000 g'de +4 °C'de 5 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Oluşan supernanat farklı bir ependorfa alınarak -80 °C'de saklanmıştır. İzole edilen nükleer proteinlerin miktarları BCA ile belirlenmiştir.

3.2.6.3.2 DNMT Aktivite Yöntemi

İzole edilen nükleer proteinler kullanılarak DNA metiltransferaz aktivitelerinin nasıl değiştiği Biovision Methltransferase Activity Assay Kiti (Colorimetric) kullanılarak belirlenmiştir.

Bu kapsamda öncelikle örnekler hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu plaka kullanılmıştır. Kontrol için yalnızca buffer eklenmiştir. Pozitif kontrol için 6 μ l MT pozitive control ile 44 μ l MT Assay Buffer eklenmiştir. SAH standart eğrisi için 0, 5, 15, 25, 35 ve 45 μ l 200 μ M SAH standartlarını sırasıyla 0, 1, 3, 5, 7, 9 nmol /kuyucuk olacak şekilde ayarlanmıştır. Her bir SAH standartı için son hacim 50 μ l olacak şekilde MT Test Tampon ile üzerine tamamlanmıştır.

Tablo 6: Reaksiyon karışımı

	Örnek reaksiyon karışımı (1 assay)
MT test tamponu	37 μ l
Enzim mix I	2 μ l
Enzim mix II	2 μ l
Enzim mix III	6 μ l
SAM kofaktör (50mM)	1 μ l
OxiRedTM probe	2 μ l

Pozitif kontrol, test örnekleri, standartlar ve kontrol içeren her kuyucuğa 50 μ l örnek reaksiyon karışımı eklenmiştir (Tablo 6). Hazırlanan örnekler 37 °C'de en az 45 dakika boyunca her 30 saniyede bir kinetik modda ölçüm alınmıştır. Kısaca yapılan deney kitin manualine göre belirlenmiştir. Oluşturulan standart eğri kullanılarak metiltransferaz enzim aktivitesi belirlenmiştir. DNMT inhibitörü olduğu bilinen 5-aza-2'-deoxycytidine (5' Aza-dc) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.6.4 SDS-PAGE Elektroforezi

Elektroforez anyonik varlığında deterjan sodyum dodesil sülfatın (SDS) poliakrilamid jellerde, polipeptit zincirlerinin ayrılması ve tanımlanması için yararlı bir araç olduğu kanıtlanmıştır (Shapiro ve diğ., 1967).

Elektroforez işlemi iki fazlı akrilamid jel üzerinde gerçekleştirilmiştir. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAJE) iyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS), varlığında Laemmli (1970) tarafından tanımlanmış olan kesintili bir tampon sisteminde %8,5'lik ayrışma ve %4 sıkıştırma jeli, aşağıdaki Tablo 7'ye göre hazırlanmıştır. Poliakrilamid tabaka jelleri, jel sandviçinin hazırlanması ile Emperor Penquin Dual Gel Elektroforez (Owl Separation Systems) sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 7: Ayrışma ve sıkıştırma jellerinin hazırlanması.

Jel içeriği		Ayrışma jeli (%8,5)	Sıkıştırma jeli (%4)
Akrilamid/ Bisakrilamid		2,85 ml	750 µl
Distile su		4,5 ml	2,5 ml
Tris-HCl Tamponu	pH 8.8	2,5 ml	
	pH 6.8		1,25 ml
%10 SDS		150 µl	100 µl
APS		50 µl	25 µl
TEMED		65 µl	5 µl

Cam plakalar jelin döküleceği standa yerleştirilip iki cam arasına önce ayrışma jeli ardından sıkıştırma jeli dökülmüştür. Ardından sıkıştırma jelinin üzerine tarak yerleştirilmiştir. Oda sıcaklığında sırasıyla 50 ve 20 dakika boyunca jelin donması beklenmiştir. Jel donduktan sonra tarak düzgün şekilde çıkartılmıştır. Daha sonra ilk kuyucuğa molekül ağırlığı bilinen proteinlerden oluşan markır, diğer kuyucuklara ise BCA ile miktarları belirlenen protein örnekleri jele yüklenmiştir. 1X elektroforez tamponu varlığında örneklerin ayrışma jeline kadar aynı anda toplanabilmesi için akım önce 10 mA'e, daha sonra asıl ayrışmanın olması için 15 mA'e ayarlanarak elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.

Elektroforez işlemi bittikten sonra, jel bloğu standtan çıkartılarak oda sıcaklığında 45 dakika süreyle %0,2 Coomassie pırlanta mavisi R-250, %50 metanol ve %12 asetik asit içeren boya çözeltisiyle bir karıştırıcı kullanarak hem boyanmış hem de sabitlenmiştir. Ardından jel bağlanmayan çözünmüş boyanın uzaklaştırılması için %7'lik asetik asit içeren %30'luk metanol çözeltisi ile inkübe edilerek saklanmıştır.

3.2.6.5 Western Blot Analizi

Western blotlamayı ilk kez H. T. Towbin, 1979 yılında ve 1981 yılında W. N. Burnette tanımlamıştır. Elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin destek membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immunolojik metotlarla gösterilmesi temeline dayanır. Proteinler, membran, sitoplazmik ve nükleer kaynaklı olabilmektedirler. Bu nedenle, farklı kanser türlerinden hazırlanan örneklerdeki protein ekspresyonları bu metotla belirlenebilmektedir (Üstüner, 2010).

Elektroforez sonunda cam plakaların arasından alınan jel, 1X transfer tamponu içerisinde nitroselüloz membran ile sandviçlenmiştir. Bu amaçla kullanılacak olan nitroselüloz membran, süngerler ve Whatman # 1 filtre kağıtları soğuk 1x transfer tamponu ile önceden doyurulmuştur. Sandviç için, katottan anota doğru sırasıyla sünger, Whatman # 1 filtre kağıdı, jel, nitroselüloz membran, Whatman # 1 filtre kağıdı ve sünger sandviç aparatı içerisinde üstü üste yerleştirilmiş ve aparat sıkıca kapatılmıştır. Hazırlanan sandviçin anot kutbunun anot, katot kutbunun da katotta olmasına dikkat edilerek Hoefer MiniVE transfer tankına yerleştirilmiştir. Transfer işlemi 1X tamponu içerisinde +4°C'de 45 V ve 350 mA'de 90 dakika süresince gerçekleştirilmiştir. Hava kabarcıklarının tamamen uzaklaştırılmasını sağlamak için membranı kendi pozisyonunda sabit tutarken bir deney tüpü ile nazikçe üzerinde yuvarlanır ve sandviç etrafına taşan fazla transfer tamponları temizlenerek alan kurulanmıştır.

Transfer sonucunda sandviç aparatının içinden alınan membran, önce non-spesifik bağlanmaların engellenmesi amacıyla %5'lik bloklama solüsyonu ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonrasında membran primer antikora alınarak +4°C'de gece boyu bekletilmiştir. Ardından membran 3 kez 15 dakika

boyunca TBST ile yıkanmıştır. Sonrasında işaretleyici enzim-alkali fosfataz (örneğin; anti-rabbit IgG- ALP konjugatı) ile bağlı olan ikincil antikorlarla 1 saat inkübe edilmiştir. İşlem sonunda membran 3 kez 15 dakika boyunca TBST ile yıkanmıştır. Bu işlem buzdolabında orbital karıştırıcıda gerçekleştirilmiştir.

Görüntüleme için membran, antikor bağlanan proteinlerin tespiti için Ey ve Ashman (1986) tarafından tanımlanan Alkalen Fosfataz (ALP) substrat çözeltisi (1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 1 M NaCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM ZnCl₂, Dietanolamin, NBT (Nitrobluetetrazolyum), PMS (fenazinmetasülfat) ve BCIP (5-bromo,4-kloro,3-indoilfosfat) ile inkübe edilmiştir. Görüntü elde edildikten sonra blot kurutularak alüminyum folyoda saklanmıştır.

Oluşan protein bantlarının densitometrik analizleri Scion Image Analyzer yazılımı ile belirlenmiştir.

3.2.6.6 İstatiksel Analizler

Elde edilen sonuçlar; her bir veri için Ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Farklı gruplar içinde ve arasında kayda değer bir fark olup olmadığını analiz etmek için Student's t-test ya da Tek Yönlü Anova ve parametrik olmayan Mann-Whitney U testleri uygulanmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Sitotoksisite Analizi

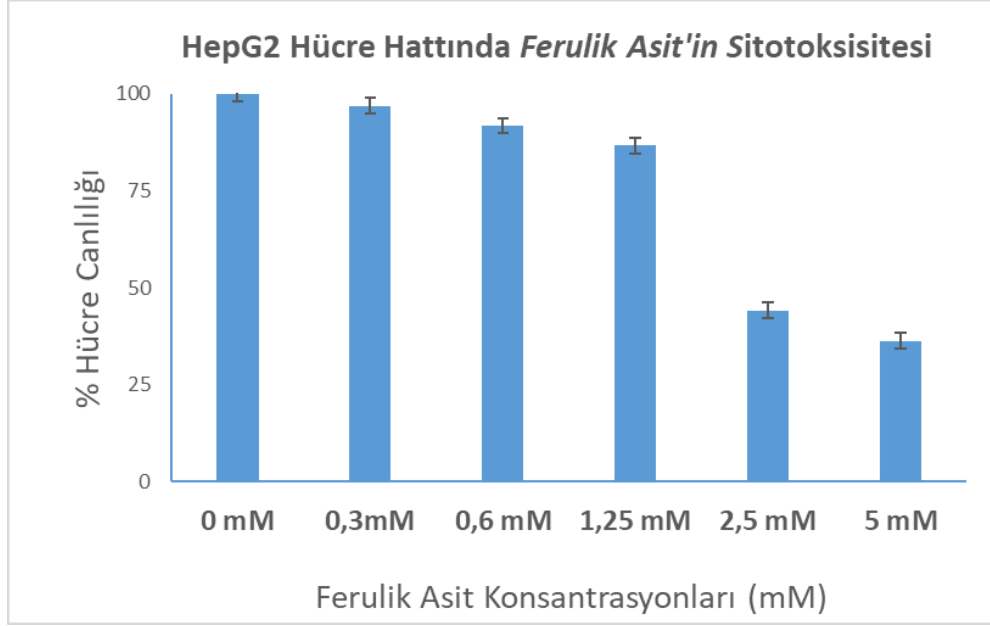
Fenolik asitlerin HepG2 hücrelerine olan sitotoksik etkileri incelenmiştir. Bu amaçla çoğaltılan hücreler 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-l)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi ve kristal viyole metodu uygulanarak kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asitin HepG2 hücrelerine olan sitotoksik konsantrasyonları belirlenmiştir. Hücreler 96'lık plakaya 2×10^3 /kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. MTT testi ile kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asitin HepG2 hücre hattı için etkili dozları (EC_{50}) bulunmuştur (Tablo 8). Her bir fenolik asitin hücre hattına uygulamasından elde edilen EC_{50} değeri; etken maddenin uygulanan hücre hattına (HepG2) olan %50'lik bir etki veya hücre hattının %50'sinde görülen anormallik, yapı değişikliği veya ölümdür.

Tablo 8: EC_{50} Değerleri

HepG2	
Fenolik Asit	EC_{50} Değeri
Kafeik Asit	1,02 mM
Ferulik Asit	3,1 mM
O-Kumarik Asit	5 Mm

Hiç fenolik madde ile muamele etmediğimiz kontrol grubu ile fenolik asitler ile muamele ettiğimiz grupları karşılaştırdığımızda değişik dozlardaki fenolik asitlerin hücre canlılığına etkisi saptanmıştır.

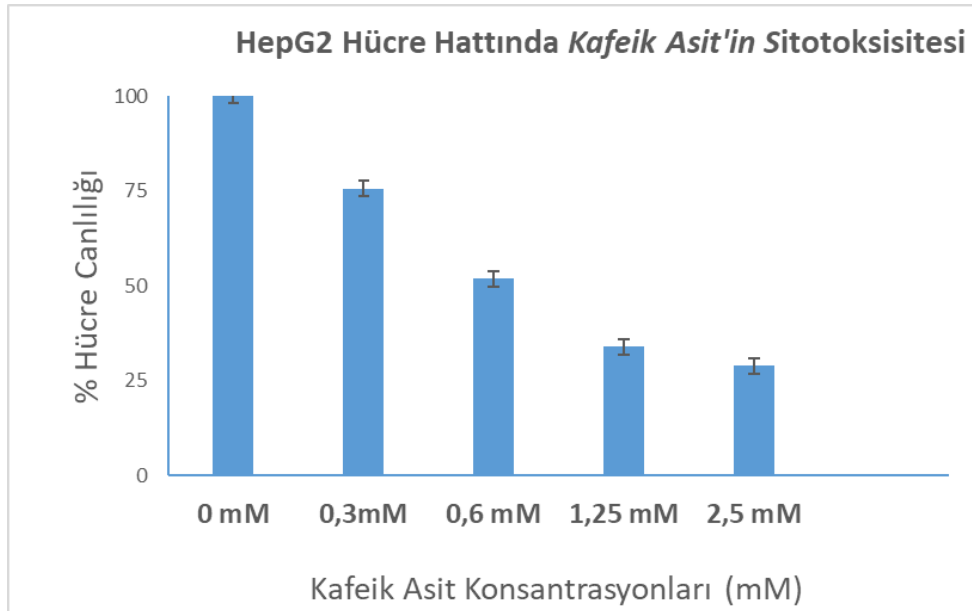
Şekil 4.1.1'de görüldüğü gibi yüksek doz ferulik asit ile muamele edilen gruplarda hücre canlılığı düşük doz ferulik asit gruplarındaki hücrelerin canlılık oranlarına göre daha düşük bulunmuştur. Buna göre 3,1 mM konsantrasyonundaki ferulik asit hücrelerin %50'sinin fazlasının ölüme yol açmıştır ve bu doz EC_{50} olarak saptanmıştır.



Şekil 4.1.1: Değişik konsantrasyonlardaki Ferulik Asit'in hücre canlılığına etkisi (Sonuçlar iki farklı sitotoksosite deneyinin, triplike ölçümünün ortalama değerleridir.) Kontrol değerleri 100% alınmıştır.

*: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

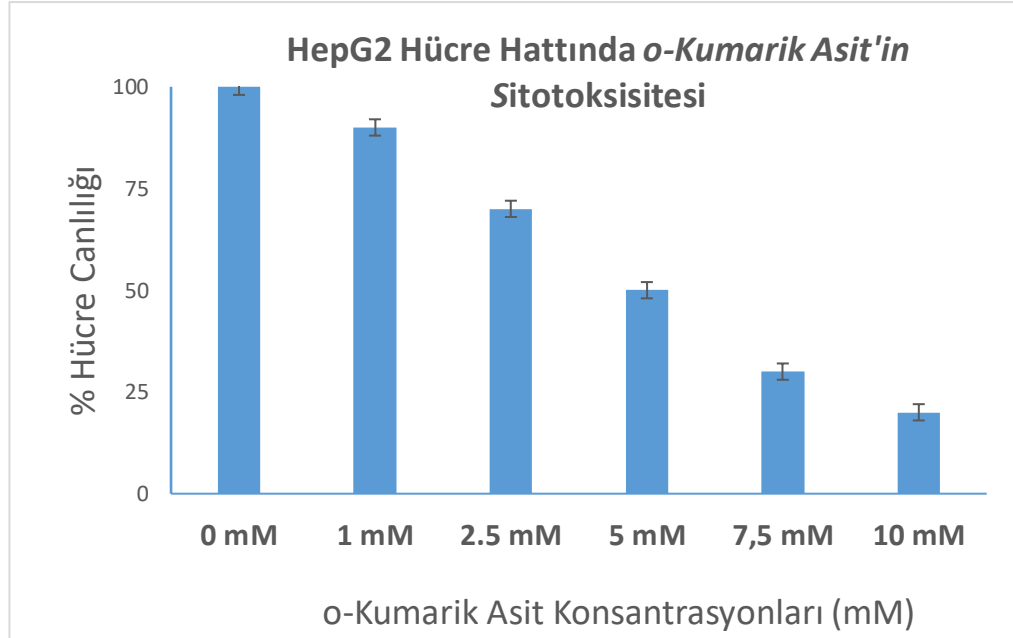
Benzer şekilde kafeik asit için EC_{50} dozu 1.02 mM olarak bulundu ve hücre canlılığını doza bağlı olarak azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.1.2).



Şekil 4.1.2: Değişik konsantrasyonlardaki Kafeik Asit'in hücre canlılığına etkisi (Sonuçlar iki farklı sitotoksosite deneyinin, triplike ölçümünün ortalama değerleridir.) Kontrol değerleri 100% alınmıştır.

*: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Tüm bunlara ek olarak, o-kumarik asitin sitotoksik etkileri bu çalışma ile ortaya konulmuştur (Şekil 4.1.3). o-Kumarik asit için EC₅₀ dozu 5 mM olarak hesaplanmıştır.



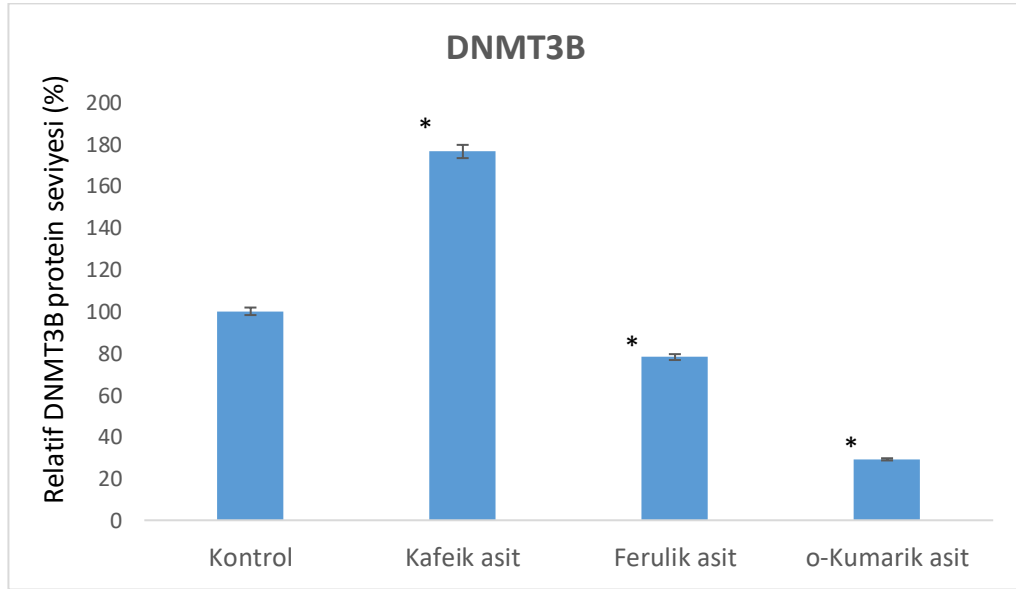
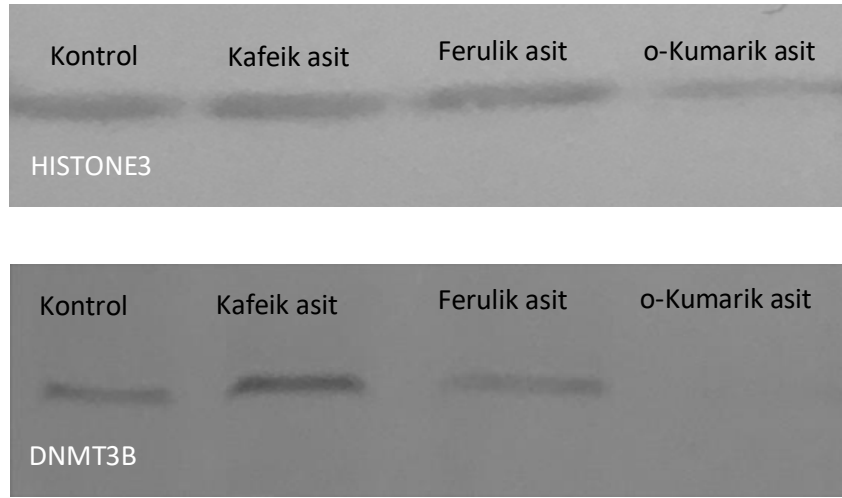
Şekil 4.1.3: Değişik konsantrasyonlardaki o-Kumarik Asit'in hücre canlılığına etkisi (Sonuçlar iki farklı sitotoksosite deneyinin, triplicate ölçümünün ortalama değerleridir.) Kontrol değerleri 100% alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

4.2 Western Blot Analizi

Fenolik asitlerden olan kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asidin HepG2 hücre hattına uygulanması sonucu hücrede çeşitli görevleri olan DNMT3B, HDAC1, HDAC3, HAT1 ve TET1 protein seviyesindeki değişimler aydınlatılmıştır. Western Blot analizinde bulunan sonuçlar mRNA ekspresyon seviyesindeki sonuçları ile anlamlı olup olmadığı karşılaştırılmıştır. Buna bağlı olarak bu proteinlerin seçiminde mRNA ekspresyon düzeylerindeki anlamlı değişimler etkili olmuştur. Deney sonucu oluşmuş protein bantlarının yoğunlukları (kalınlıkları vb.) densitometrik analiz ile Scion Image Software programı kullanılarak belirlenmiştir.

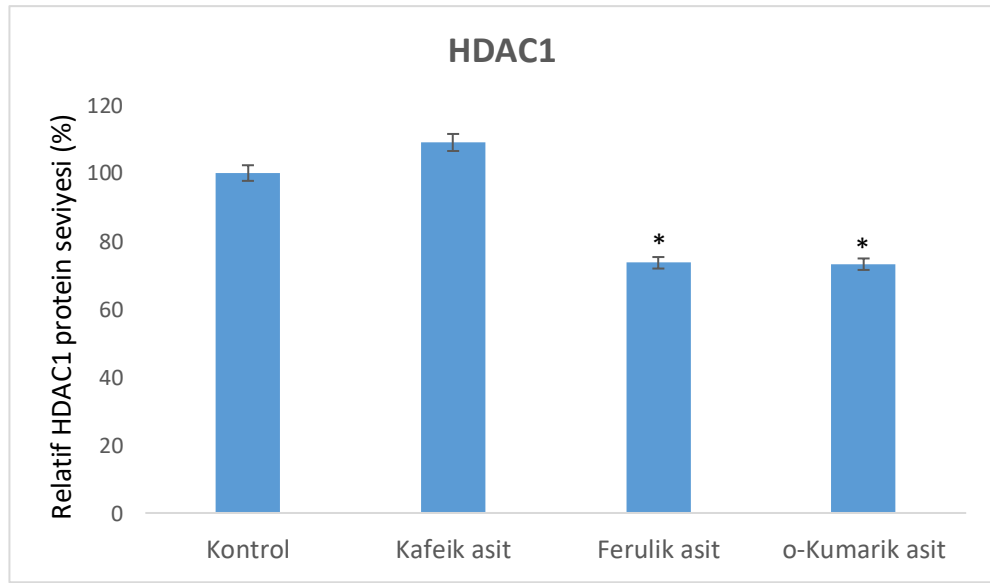
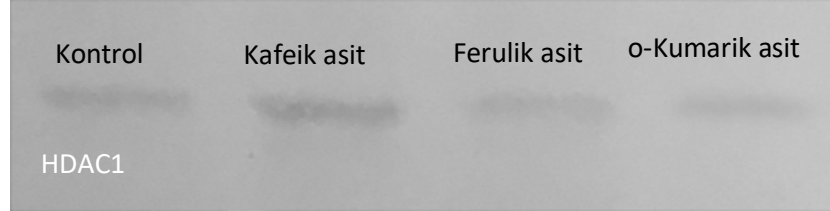
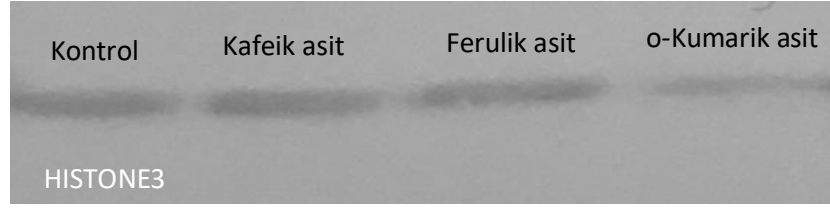
Fenolik asitlerin uygulandığı HepG2 hücre hattında oluşan DNMT3B protein seviyesindeki bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde kafeik

asit, ferulik asit ve o-kumarik asit sırasıyla %76 artış, %21,9 ve %70,9 azalış meydana gelmiştir (Şekil 4.2.1).



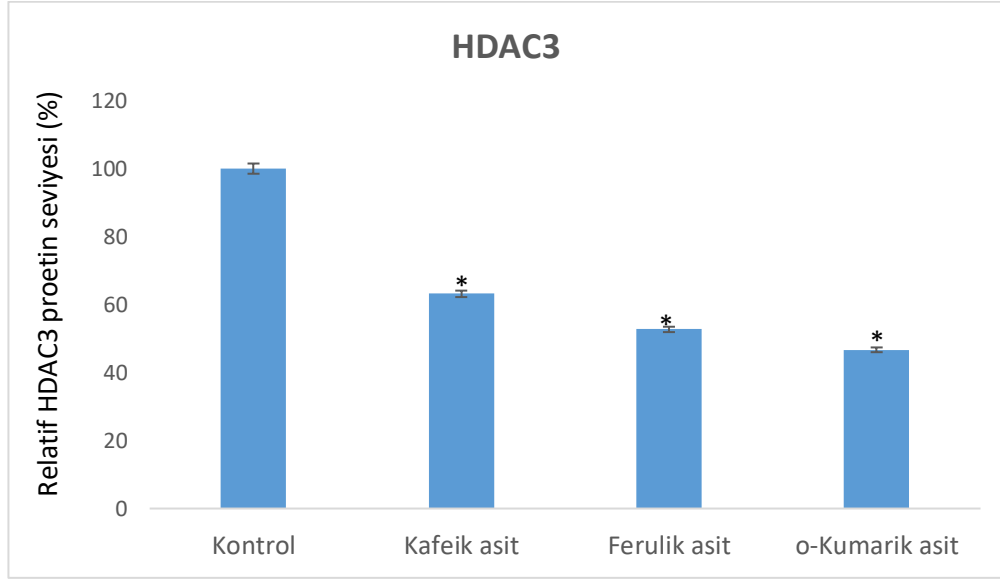
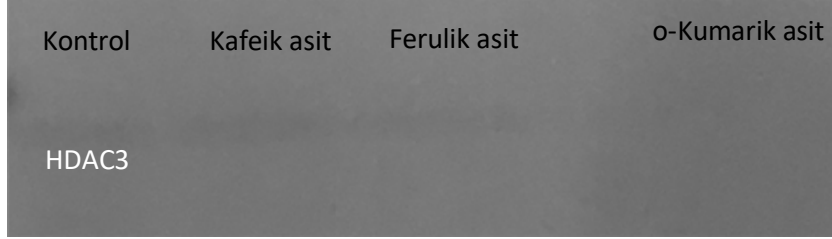
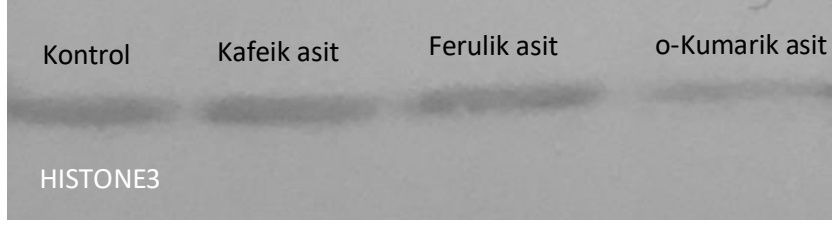
Şekil 4.2.1: Kafeik asit, Ferulik asit ve o-Kumarik asitin insan karaciğer kanseri hücre (HepG2) hattında DNMT3B protein seviyesine olan etkisi. Sonuçlar Histone 3 ile normalize edilmiştir. Protein bantlarının yoğunlukları ImageJ programı kullanılarak densitometrik analiz ile belirlenmiştir. Kontrol değerleri %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Fenolik asitlerin uygulandığı HepG2 hücre hattında oluşan HDAC1 protein seviyesindeki bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asit sırasıyla %9 artış, %26,4 ve %26,8 azalış meydana gelmiştir (Şekil 4.2.2).



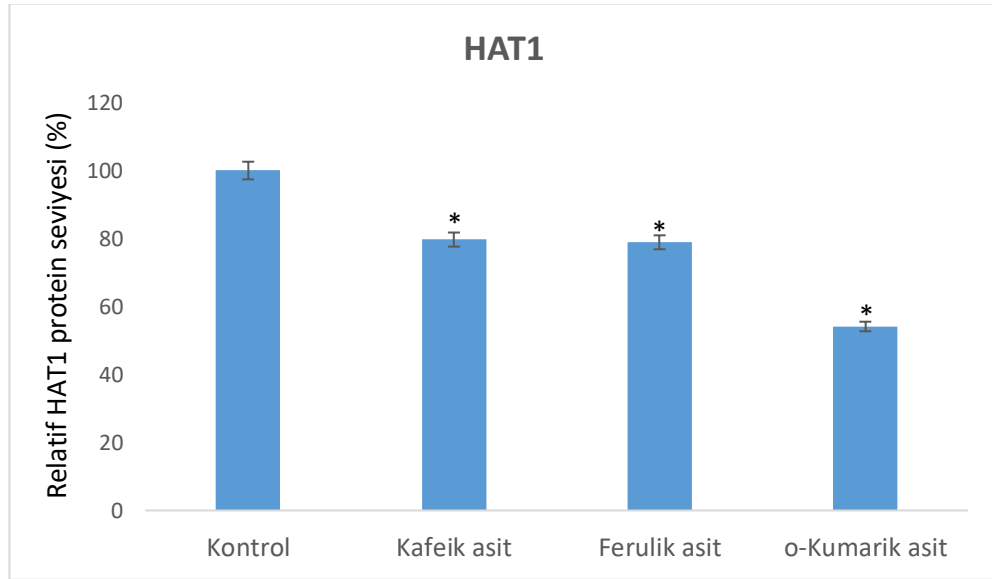
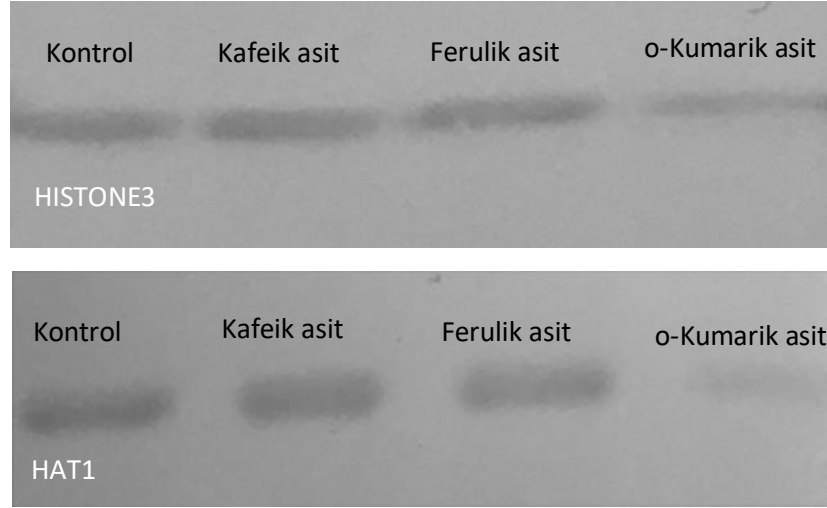
Şekil 4.2.2: Kafeik asit, Ferulik asit ve o-Kumarik asitin insan karaciğer kanseri hücre (HepG2) hattında HDAC1 protein seviyesine olan etkisi. Sonuçlar Histone 3 ile normalize edilmiştir. Protein bantlarının yoğunlukları ImageJ programı kullanılarak densitometrik analiz ile belirlenmiştir. Kontrol değerleri %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Fenolik asitlerin uygulandığı HepG2 hücre hattında oluşan HDAC3 protein seviyesindeki bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asit sırasıyla %36,8, %47,3 ve %53,3 azalış meydana gelmiştir (Şekil 4.2.3).



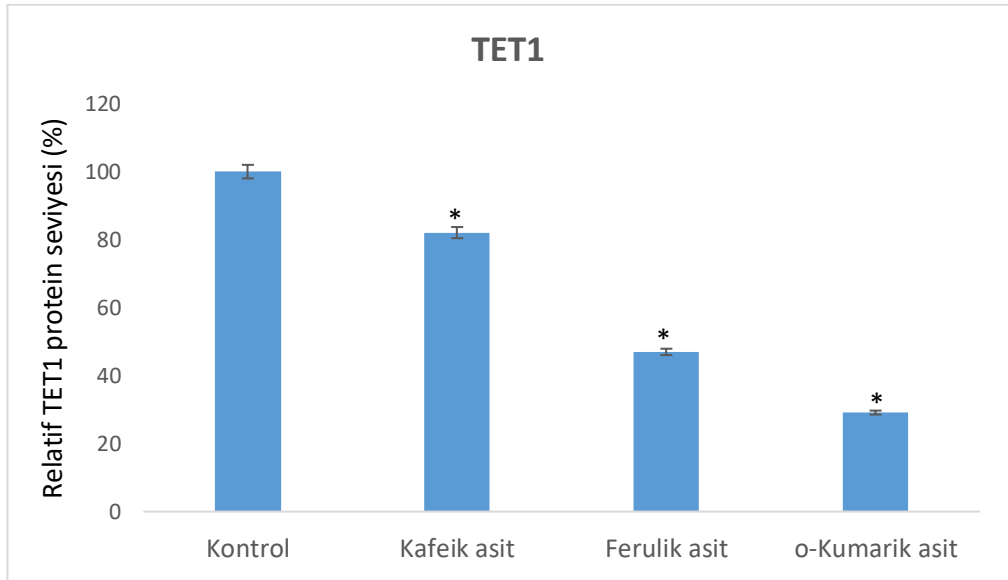
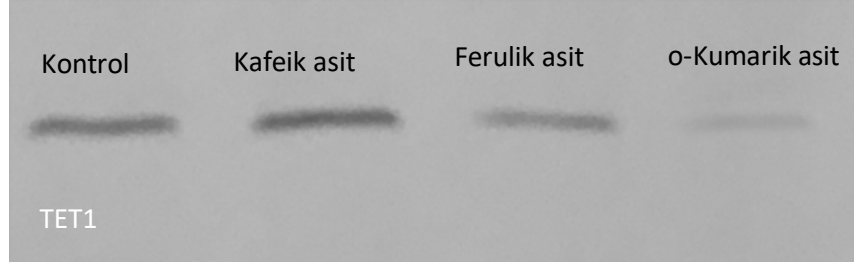
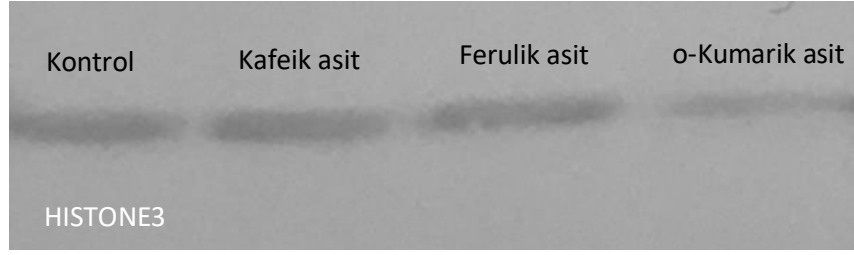
Şekil 4.2.3: Kafeik asit, Ferulik asit ve o-Kumarik asitin insan karaciğer kanseri hücre (HEPG2) hattında HDAC3 protein seviyesine olan etkisi. Sonuçlar Histone 3 ile normalize edilmiştir. Protein bantlarının yoğunlukları ImageJ programı kullanılarak densitometrik analiz ile belirlenmiştir. Kontrol değerleri %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Fenolik asitlerin uygulandığı HepG2 hücre hattında oluşan HAT1 protein seviyesindeki bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asit sırasıyla %20,3, %21,1 ve %46 azalış meydana gelmiştir (Şekil 4.2.4).



Şekil 4.2.4: Kafeik asit, Ferulik asit ve o-Kumarik asitin insan karaciğer kanseri hücre (HEPG2) hattında HAT1 protein seviyesine olan etkisi. Sonuçlar Histone 3 ile normalize edilmiştir. Protein bantlarının yoğunlukları ImageJ programı kullanılarak densitometrik analiz ile belirlenmiştir. Kontrol değerleri %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

Fenolik asitlerin uygulandığı HepG2 hücre hattında oluşan TET1 protein seviyesindeki bantlarının densitometrik analizi sonucunda protein seviyesinde kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asit sırasıyla %18, %54 ve %70,9 azalış meydana gelmiştir (Şekil 4.2.5).



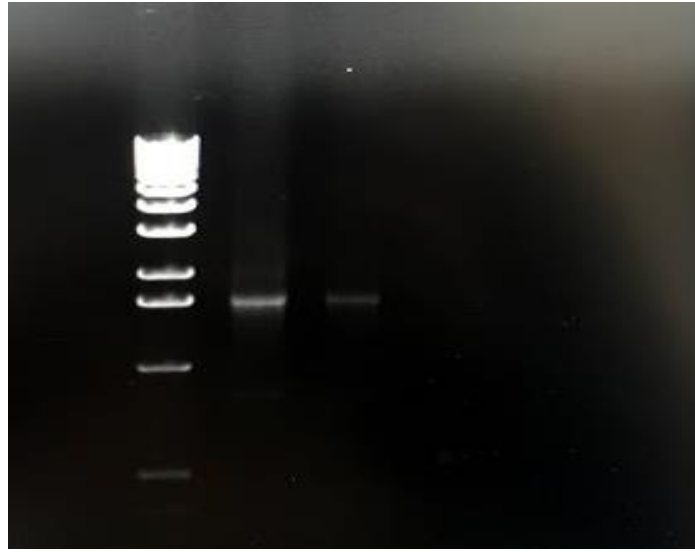
Şekil 4.2.5: Kafeik asit, Ferulik asit ve o-Kumarik asitin insan karaciğer kanseri hücre (HEPG2) hattında TET1 protein seviyesine olan etkisi. Sonuçlar Histone 3 ile normalize edilmiştir. Protein bantlarının yoğunlukları ImageJ programı kullanılarak densitometrik analiz ile belirlenmiştir. Kontrol değerleri %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

Diğer yandan DNMT1 ve DNMT3A proteinlerinin western blot analizinde antikordan kaynaklanan sorunlardan dolayı analiz için uygun sonuçlar elde edilememiştir.

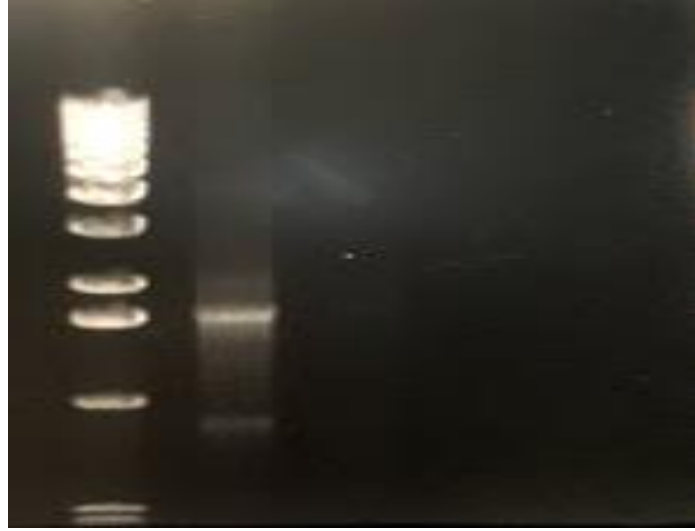
4.3 mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Tayin Edilmesi: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

4.3.1 Total RNA İzolasyonu

Fenolik asitlerle (kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asit) muamele edilmiş olan HepG2 hücre hattından toplam RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen RNA'lar %1'lik agaroz jel ile görüntülenmiştir (Şekil 4.3.1.1, 4.3.1.2 ve 4.3.1.3).



Şekil 4.3.1.1: Kafeik asit uygulanan HepG2 hücrelerinden elde edilen RNA'nın %1'lik agaroz jel elektroforezi. Soldan sağa Hat 1: GeneRulerTM 1bp DNA Marker; Hat 2: Kontrol (%100 DMSO); Hat 3: Kafeik asit



Şekil 4.3.1.2: Ferulik asit uygulanan HepG2 hücrelerinden elde edilen RNA'nın %1'lik agaroz jel elektroforezi. Soldan sağa Hat 1: GeneRulerTM 1bp DNA Marker; Hat 2: Kontrol (%100 DMSO); Hat 3: Ferulik asit



Şekil 4.3.1.3: o-Kumarik asit uygulanan HepG2 hücrelerinden elde edilen RNA'nın %1'lik agaroz jel elektroforezi. Soldan sağa Hat 1: GeneRulerTM 1bp DNA Marker; Hat 2: Kontrol (%100 DMSO); Hat 3: o-Kumarik asit

4.3.2 mRNA Ekspresyon Analizleri

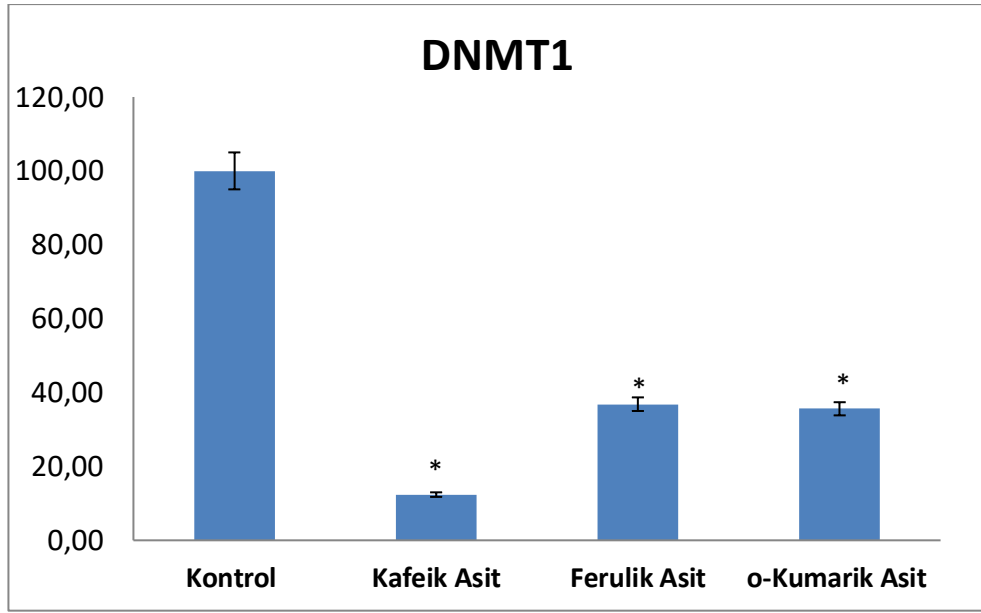
cDNA sentezi, üretici firmanın talimatlarına göre yapılmıştır. DNA metilasyonu, deasetileasyonu ve histon modifikasyonunda görev alan primerler kullanarak KiloGreen 2X qPZR Master Mix kiti ile üretici firmanın önerdiği

talimatlara göre mRNA düzeyinde ekspresyon tayini gerçekleştirilmiştir. Housekeeping gen olarak GAPDH kullanılmış ve hedef genlerin ekspresyon seviyeleri $\Delta\Delta C_t$ metotuna göre normalize edilmiştir.

$\Delta\Delta C_t$ metodu verimlilik düzeltmesi olmadan meydana gelen her gerçek zamanlı PCR döngüsü sırasında hedef DNA'nın iki katına çıkarılmasını varsayan bir yöntemdir (Pfaffl, 2004).

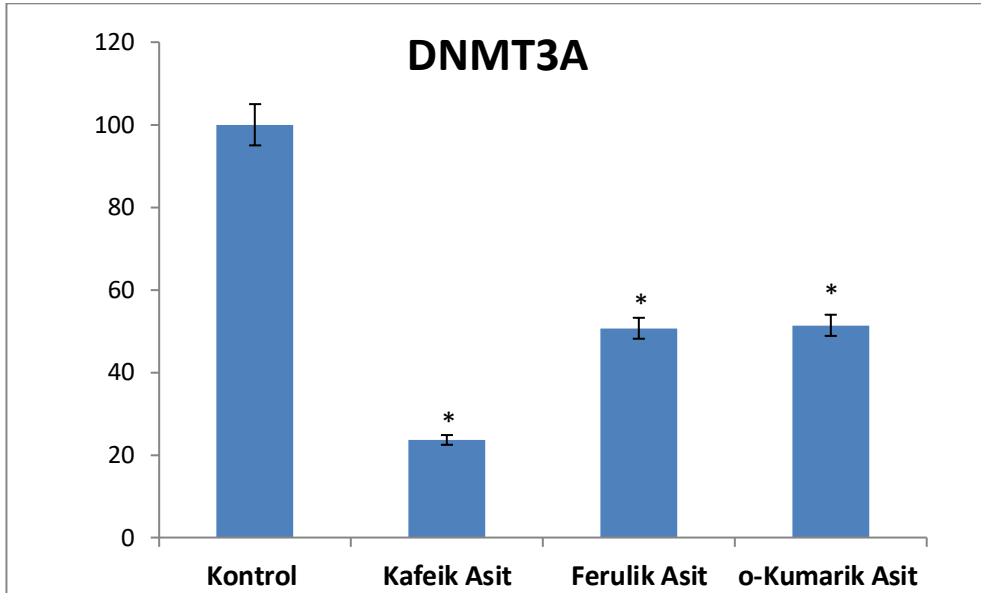
HepG2 hücre hattına fenolik asitlerin uygulanması sonucu mRNA seviyesindeki değişimler için, DNA metilasyon mekanizmasında görev alan DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, HAT1, HDAC1 ve HDAC3 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimler belirlenmiştir. HepG2 hücre hattında kafeik asitin EC_{50} dozunun uygulanması sonucunda DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, HAT1, HDAC1 ve HDAC3 genlerinin mRNA seviyelerinde sırasıyla %87.6, %76.4, %99.3, %98.6, %81, %96.4 ve %87.8 azalış gözlenmiştir. Benzer şekilde, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, HAT1, HDAC1 ve HDAC3 genlerinin mRNA seviyesinde ferulik asit uygulaması sonucunda sırasıyla %64, %49.3, %84.5, %95.6, %36.7, %89.4 ve %69.1 azalış saptanmıştır. Benzer şekilde, o-Kumarik asitin EC_{50} dozunun HepG2 hücrelerine uygulanması sonucunda DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, HAT1, HDAC1 ve HDAC3 mRNA seviyesinde sırasıyla %64.4, %48.6, %91.2, %76.1, %36.9, %97.2 ve %80.8 azalma gözlemlenmiştir.

DNA metilasyonunda görev alan DNMT1 geninin mRNA ekspresyon düzeyinde fenolik asitlerden kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asit sırasıyla %87.6, %64 ve %64.4 azalış meydana gelmiştir (Şekil 4.3.2.1).



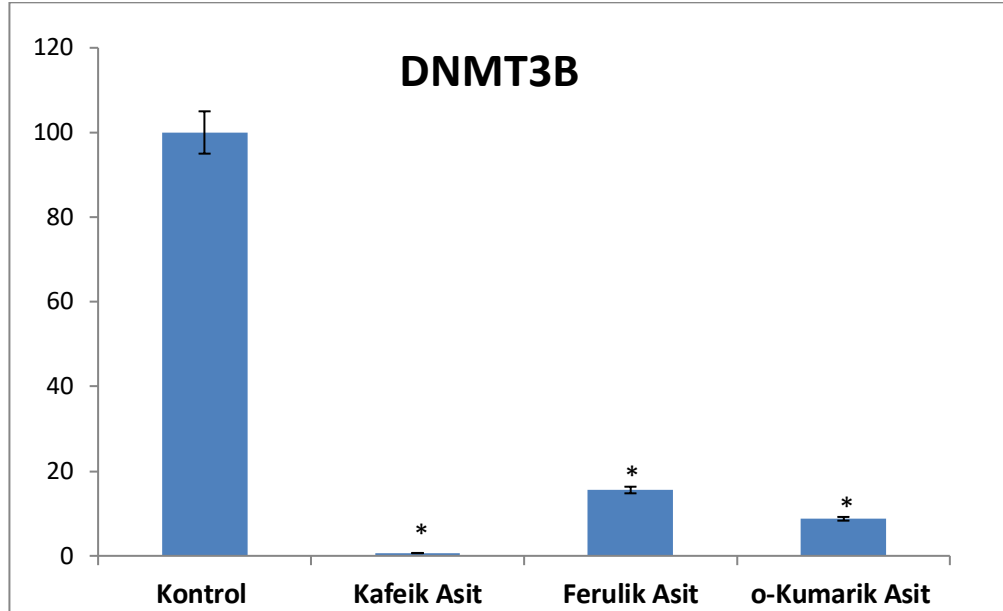
Şekil 4.3.2.1: Kafeik asit, ferulik asit ve o-Kumarik asit'in insan karaciğer kanseri hücre (HepG2) hattında DNMT1 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar GAPDH ile normalize edilmiştir. Kontrol değerleri %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

DNA metilasyonunda görev alan DNMT3A geninin mRNA ekspresyon düzeyinde fenolik asitlerden kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asit sırasıyla %76.4, %49.3 ve %48.6 azalış meydana gelmiştir (Şekil 4.3.2.2).



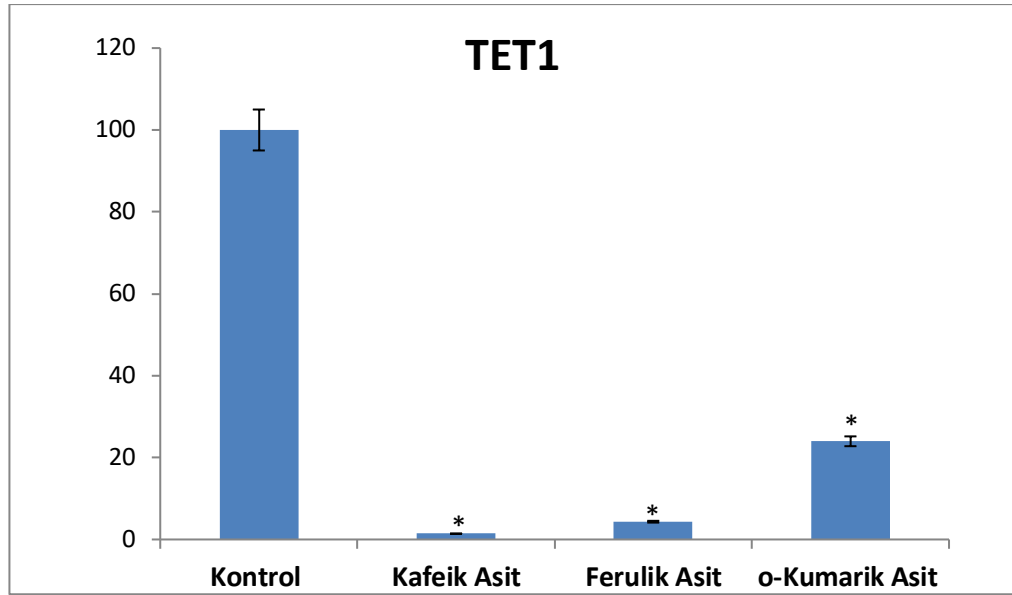
Şekil 4.3.2.2: Kafeik asit, ferulik asit ve o-Kumarik asit'in insan karaciğer kanseri hücre (HepG2) hattında DNMT3A mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar GAPDH ile normalize edilmiştir. Kontrol değerleri %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

DNA metilasyonunda görev alan DNMT3B geninin mRNA ekspresyon düzeyinde fenolik asitlerden kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asit sırasıyla %99.3, %84.5 ve %91.2 azalış meydana gelmiştir (Şekil 4.3.2.3).



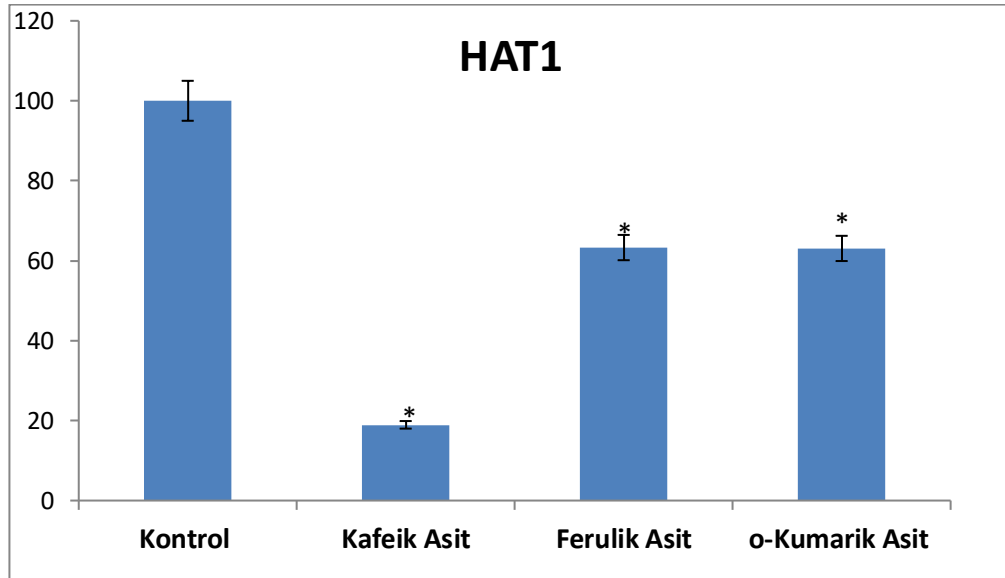
Şekil 4.3.2.3: Kafeik asit, ferulik asit ve o-Kumarik asit'in insan karaciğer kanseri hücre (HepG2) hattında DNMT3B mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar GAPDH ile normalize edilmiştir. Kontrol değerleri %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

DNA metilasyonunda görev alan TET1 geninin mRNA ekspresyon düzeyinde fenolik asitlerden kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asit sırasıyla %98.6, %95.6 ve %76.1 azalış meydana gelmiştir (Şekil 4.3.2.4).



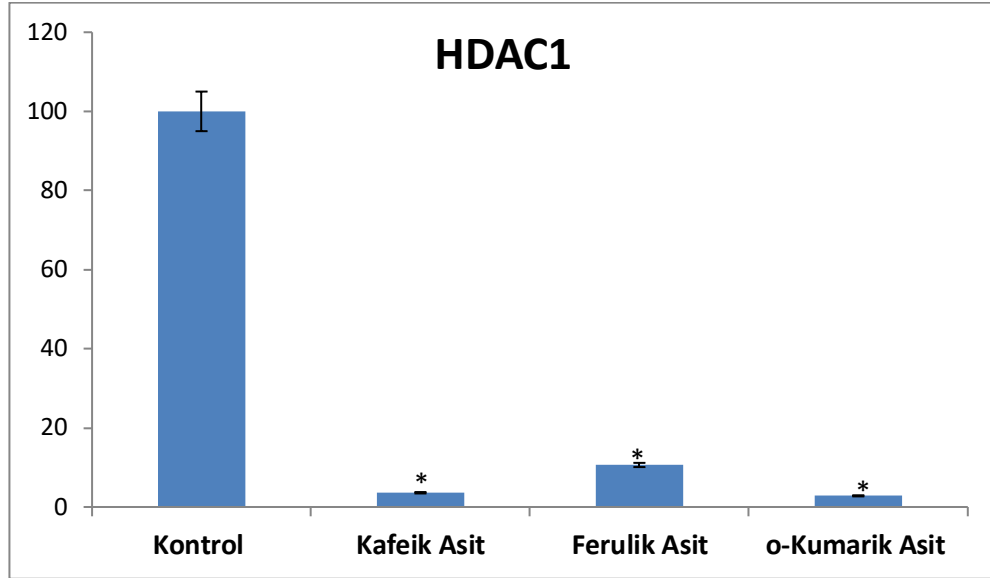
Şekil 4.3.2.4: Kafeik asit, ferulik asit ve o-Kumarik asit'in insan karaciğer kanseri hücre (HepG2) hattında TET1 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar GAPDH ile normalize edilmiştir. Kontrol değerleri %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

DNA metilasyonunda görev alan HAT1 geninin mRNA ekspresyon düzeyinde fenolik asitlerden kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asit sırasıyla %81.1, %36.7 ve %36.9 azalış meydana gelmiştir (Şekil 4.3.2.5).



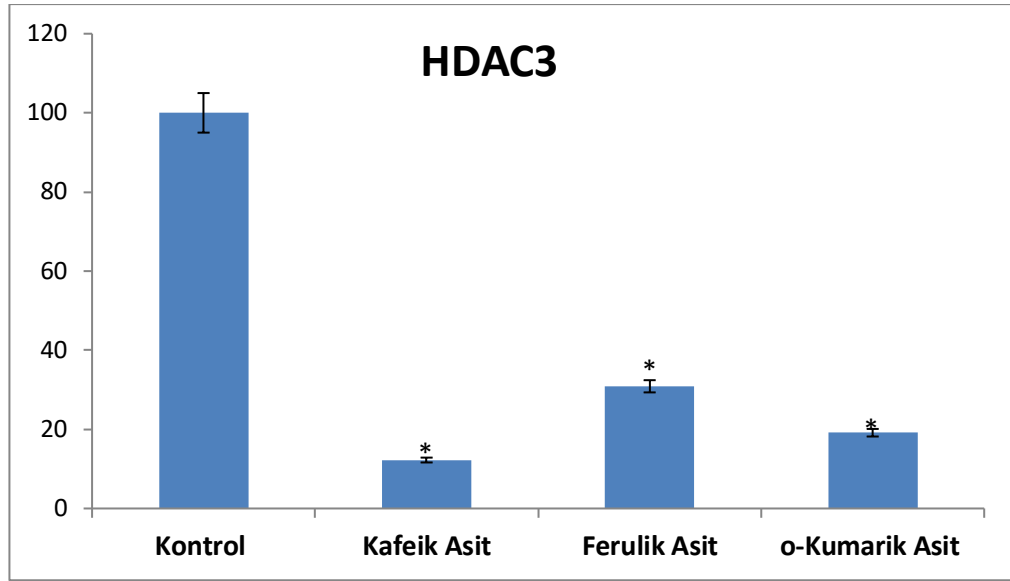
Şekil 4.3.2.5: Kafeik asit, ferulik asit ve o-Kumarik asit'in insan karaciğer kanseri hücre (HepG2) hattında HAT1 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar GAPDH ile normalize edilmiştir. Kontrol değerleri %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

DNA metilasyonunda görev alan HDAC1 geninin mRNA ekspresyon düzeyinde fenolik asitlerden kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asit sırasıyla %96.4, %89.4 ve %97.2 azalış saptanmıştır (Şekil 4.3.2.6).



Şekil 4.3.2.6: Kafeik asit, ferulik asit ve o-Kumarik asit'in insan karaciğer kanseri hücre (HepG2) hattında HDAC1 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar GAPDH ile normalize edilmiştir. Kontrol değerleri %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

DNA metilasyonunda görev alan HDAC3 geninin mRNA ekspresyon düzeyinde fenolik asitlerden kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asit sırasıyla %87.8, %69.1 ve %80.8 azalış saptanmıştır (Şekil 4.3.2.7).



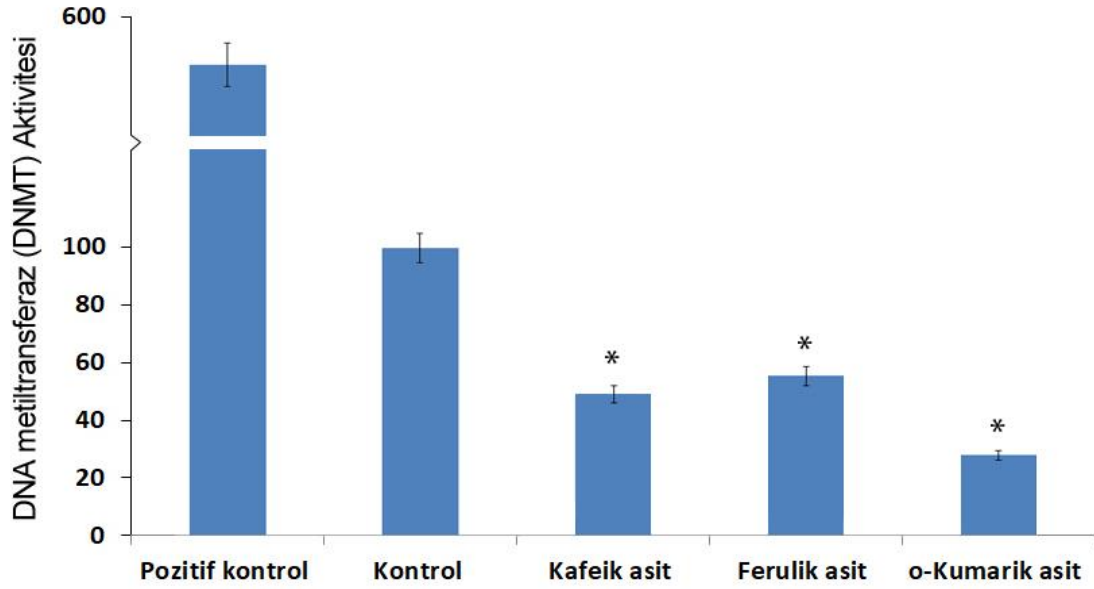
Şekil 4.3.2.7: Kafeik asit, ferulik asit ve o-Kumarik asit'in insan karaciğer kanseri hücre (HepG2) hattında HDAC3 mRNA seviyesine olan etkisi. Sonuçlar GAPDH ile normalize edilmiştir. Kontrol değerleri %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

Elde edilen veriler sonucunda fenolik asitlerin DNA metilasyonu mekanizması ile ilgili genlerin ekspresyonlarını etkileyerek HepG2 hücrelerinde hücrelerin ölmesine neden olabilecek mekanizmaların artmasına ve bu sayede hücrelerin ölmesine neden olabileceği düşünülmektedir.

4.4 DNMT Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

24 saatlik uygulama sonucunda HepG2 hücre hattında DNA metiltransferaz enzim aktivitesi değerlendirildiğinde bütün uygulama grupları kontrol grubu ile kıyaslandığında gözlemlenen fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Pozitif kontrol lizatında aktivite 2,39 pmol/min/mg iken, kontrol lizatında aktivite 0,407 pmol/min/mg protein, kafeik asit lizatında bu değer 0,224 pmol/min/mg, ferulik asit lizatında 0,248 pmol/min/mg ve o-kumarik asit lizatında 0,125 pmol/min/mg proteindir.

Buradan hareketle insan karaciğer kanser hücre hattına kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asit uygulamaları kontrol grubuna göre enzim aktivitelerini azaltmıştır (Şekil 4.4.1). Bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).



Şekil 4.4.1: Kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asitin insan karaciğer hücre hattında (HepG2) DNA metilasyonuna olan etkisi. DNMT enzim aktivitesi kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asit ile 24 saat boyunca muamele edilen HepG2 hücrelerinde denenmiştir. Kontrol değerleri yüzde (%) olarak hesaplanmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

5. TARTIŞMA

Birçok hastalığın oluşmasında epigenetik mekanizmaların regülasyonu sırasında meydana gelen hatalar etkili olmuştur. DNA'daki bu mekanizmalar normal ve düzenli çalışarak embriyonun gelişim sürecini sorunsuz şekilde tamamlaması açısından önem taşımaktadır (Bird, 1992).

Genetik lezyonlardan farklı olarak kanserdeki epigenetik hatalar, kemoterapötik müdahaleler aracılığıyla nispeten kolay bir şekilde tersine çevrilebilir ki bu da epigenetik tedaviyi umut verici kılar. Epigenetik tedavinin amacı, hızla bölünen tümör hücrelerinin kromatini hedeflemek ve sağlıklı hücrelerin epigenomunu hafif derecede normal duruma dönüştürmektir (Cortez ve Jones, 2008).

Kanser, dünyadaki ölüm nedenlerinin içinde ikinci sırada yer alır. Akciğer, kolon, hepatik veya prostat metastatik karsinomlar endişe kaynağı olmaya devam etmekte ve tüm kanser ölümlerinin yarısından fazlasını oluşturmaktadır. Şu anda kullanılan neredeyse tüm yapay ajanlar toksik ve normal hücrelere ciddi zararlar verdiği bilinmektedir. Bu nedenle toksik olmayan ajanlarla kemoterapinin birlikte kullanılması hastalığın azaltılması için bir yaklaşım olabilir. Doğal olarak oluşan şifalı bitkilerde bulunan diyet antioksidanlar teoride şu işlevi görür: kimyasal olarak tasarlanmış antikanser ajanlara alternatifler olarak hizmet eder (Rao ve diğ., 2007).

Son zamanlarda epigenetik yolları hedefleyen çok sayıda ilaç ortaya çıkmış ve yaygın şekilde çeşitli kanser türlerini hedef alan farklı klinik çalışmalarda test edilmiştir. Ancak yüksek toksisite, neoplastik hücrelerde spesifik hedeflerin eksikliğinin yanı sıra solid tümörlerin nispeten düşük etkinlik göstermesi, epigenetik ilaçların kanser tedavisi için klinik uygulamada büyük ölçüde sınırlı olması dikkat çekmektedir. Bu yüzden daha az toksik, daha ulaşılabilir ve etkili doğal bileşiklerin keşfi, epigenetik kanser tedavisi yaklaşımını ortaya çıkarmıştır (Li ve diğ., 2016).

Son on yılda, farklı kanser türlerini tedavi etmek için geliştirilen epigenetik mekanizmaları etkileyen ilaçlarda büyük bir artış görülmektedir. Örnekler, DNA metilasyon inhibitörleri, histon modifikasyon inhibitörleri ve kromatini yeniden şekillendiren proteinleri hedefleyen küçük moleküllerdir. Azasitidin, epigenetik mekanizmalarda rol oynayan bir enzimin ilk inhibitörüdür. Bu ilaç DNA ve RNA moleküllerinin sitozinlere metil gruplarının eklenmesiyle DNA metiltransferaz

enzimini inhibe eder. DNMT inhibitörünün bir diğer örneği, 5-aza-2'-deoksisitidindir ve sadece DNA molekülüne dahildir. 5- azasitidin miyelodisplastik sendromun tedavisinde ve lösemide umut veren sonuçlar göstermiştir (Costa, 2010).

Bir diğer inhibitör, histon deasetilaz (HDAC) inhibitörüdür, ki bu da histonlarda N-asetil rezidülerinin hidrolizinin katalizini ve histon asetiltransferaz aktivasyonunu sağlar. Çalışmalarda HDAC'ların tümör sağkalım ve progresyonunda önemli bir aracı olarak rol aldığı bildirilmiştir. Food and Drug Administration (FDA) tarafından toplam dört adet HDAC inhibitörü onaylanmıştır. Bunlar Vorinostat, belinostat, panobinostat ve romidepsindir (Bai ve diğ., 2018).

Bu bağlamda fenolik asitlerden olan kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asitin antioksidan, antifibröz, antiviral, antitümör, antitrombotik etkileri gösterilmiş olmasına rağmen DNMT enzim aktiviteleri gibi epigenetik mekanizmalara olan etkileri üzerine daha önce hiç çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle bu çalışma ile fenolik asitlerin epigenetik mekanizmalar üzerindeki etkilerini araştırmak ve bu mekanizmaların nasıl çalıştığını belirlemek hedeflenmiştir. Buradan hareketle çalışmamızda MTT testi ile belirlenen ilaç dozlarının HepG2 insan karaciğer kanseri hücre hattına uygulanmasıyla hücrelerde oluşabilecek sitotoksitenin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla hücreler üzerinde sitotoksik özelliği saptanan fenolik asitlerin DNA metilasyonunda rol alan DNMT1, DNMT3A DNMT3B, TET1, HAT1, HDAC1, HDAC3 ve Histon3 proteinlerinin gen ekspresyon seviyeleri ile protein seviyelerine olan etkileri saptanmıştır.

Çalışmamızda yüksek doz fenolik asit ile muamele edilen gruplarda hücre canlılığı düşük doz fenolik asit gruplarındaki hücrelerin canlılık oranlarına göre daha düşük bulunmuştur. Buna göre 3,1 mM konsantrasyonundaki ferulik asit HepG2 hücrelerin %50'sinden fazlasının ölümüne yol açmıştır. Benzer şekilde kafeik asit için EC₅₀ dozu 1,02 mM olarak bulunmuş ve hücre canlılığını doza bağlı olarak azaldığı saptanmıştır. Tüm bunlara ek olarak, o-kumarik asitin sitotoksik etkileri bu çalışma ile ortaya konulmuştur. o-Kumarik asit için EC₅₀ dozu 5 mM olarak hesaplanmıştır.

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

etkilerini değerlendirmiştir. Silimarin DNMT üzerinde inhibe edici etki göstermiştir. HDAC üzerinde inhibisyon etki görülmemiştir. Silimarin p53 K373, p53 K382, cMyc ve NF B protein seviyelerini baskılarken, p53 S46 protein seviyesini artırmıştır (Kasap, 2019). Bu anlamda bizim çalışmamızla DNMT enzim aktiviteleri üzerine olan etkisi yönünden benzemektedir. Farklılık olarak çalışmamızda fenolik asitler kullanılırken Kasap'ın yaptığı çalışmada polifenollerden olan silimarinin epigenetik inhibitörlerle birlikte kullanılması sonucunda DNMT ve HDAC enzim aktivitesine bakılmıştır.

Lee ve diğerleri (2005) yaptığı çalışmada diyet polifenolleri olan çay kateşinleri (kateşin, epikateşin ve (-)-epigallokateşin-3-O-gallat (EGCG)) ve biyoflavonoidler (kuersetin, fisetin ve myrisetin) insan DNMT1 ve prokaryotik SssI DNMT tarafından katalize edilen DNA metilasyonunu inhibe etmedeki etkinliklerini incelemişlerdir. Bu anlamda toksik olmayan konsantrasyonlarda EGCG ve kateşin ile tedavi edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri RAR beta geninin promotör bölgelerinin metilasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Kateşin, epikateşin ve çeşitli flavonoidler tarafından insan DNMT1 *in vitro* inhibisyonu için IC50 değerleri 1.0 ve 8.4  M arasında değişmekte ancak EGCG 0.21 ile 0.47  M IC50 değerleri ile daha güçlü inhibitör olduğunu göstermektedir (Lee ve diğ., 2005).

Ramos ve arkadaşlarının (2005)  alışmalarında farklı saf polifenoller (kuersetin, klorojenik asit ve (-)-epikateşin) ve doğal meyve ekstratlarının ( ilek ve erik) farklı inkübasyon sürelerinde (4 ve 18 saat) HepG2 hücrelerinde canlılık ve apoptozu indüklemeye etkisini araştırmışlardır. Hücrelerin 18 saat boyunca kuersetin ve meyve ekstratları ile tedavisi doza bağlı şekilde hücre canlılığını azaltmış ancak klorojenik asit ve (-)-epikateşin hücre ölüm oranı üzerinde belirgin etki göstermemiştir. Bu anlamda klorojenik asit ve (-)-epikateşinden ziyade kuersetin,  ilek ve erik ekstratları HepG2 hücrelerinde apoptozu indüklemiştir (Ramos ve diğ., 2005).

Bouzaiene ve diğerleri (2015) tarafından ilk olarak kafeik, kumarik ve ferulik asitlerin 50–1000 mM konsantrasyonlarının A549 ve HT29-D4 hücre hatlarında, 24 saat inkübasyondan sonra MTT testi kullanılarak sitotoksitesi değerlendirilmiştir.    fenolik asitin de hem insan akciğer (A549) hem de kolon adenokarsinomu (HT29-

D4) hücrelerinin proliferasyonunu konsantrasyona bağlı bir şekilde önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir (Bouzaiene ve diğ., 2015).

A549 ve HT29-D4 hücreleri ile kafeik, kumarik ve ferulik asitler 30 dakika boyunca 50, 100 veya 200 μ M, işlenmemiş hücreler ile karşılaştırıldığında doza bağımlı bir şekilde reaktif oksijen türleri seviyesini düşürmüştür. Süperoksit anyon üretimi kafeik asitin test edilen en yüksek konsantrasyonda (200 μ M) sırasıyla A549 ve HT29-D4 hücre hatlarında %92 ve %77 azalmıştır. (Bouzaiene ve diğ., 2015).

Fenolik asitlerin insan akciğeri (A549) ve kolon (HT29-D4) kanser hücre hatlarında proliferasyonu, yapışmayı, göçü azaltarak anti-kanser aktivitelerini iyileştirdiğini gösterdi (Bouzaiene ve diğ., 2015).

Prasad ve diğerleri (2011) yaptıkları çalışmada kafeik asitin fibrosarkom hücrelerinin (HT-1080) proliferasyonu üzerine etkilerini araştırmışlardır. 24 saatlik inkübasyondan sonra 5, 10 ve 20 μ g/ml konsantrasyonlarındaki kafeik asit tedavisi önemli bir proliferasyon inhibisyonu göstermedi. 30, 40 ve 50 μ g / ml konsantrasyondaki kafeik asit tedavisi HT-1080 hücrelerini önemli ölçüde inhibe etmiştir (Prasad ve diğ., 2011). Çalışmamızda MTT sonuçlarına göre kafeik asitin HepG2 hücre hattı üzerinde, en çok 1,2 mM konsantrasyonda uygulanması sonucunda hücre canlılığını önemli ölçüde inhibe ettiği belirlenmiştir.

Kafeik asitin türevlerinin çoğalmasında üzerindeki inhibe edici etkileri insan CRC hücreleri (HCT-116 ve SW-480 hücreleri) *in vitro* ortamda araştırılmıştır. Kafeik asit türevleri 5, 10, 20, 50 ve 100 μ M konsantrasyonları insan CRC HCT-116 ve SW-480 hücrelerinin proliferasyonunu önemli ölçüde sırasıyla %58-64 oranında inhibe etmiştir (Chiang ve diğ., 2014).

Kolon kanseri (HCT 15) hücreleri, kafeik asitin değişen konsantrasyonlarında 48 saat boyunca tedavi edildi ve Kafeik asit HCT 15 hücrelerinin büyümesini doza bağlı şekilde inhibe etmiştir. HCT 15 hücre büyümesi, bir IC50 (IC50 %50 hücrelerin yaklaşık olarak öldüğü yüzde) 800 μ M konsantrasyonda kafeik asit kullanılmıştır (Jaganathan, 2012).

Kafeik asitle yapılan başka bir çalışmada Chang ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan çalışmada kafeik asitin HeLa hücreleri üzerindeki etkilerini

incelemek için çeşitli konsantrasyonlarda kafeik asit ile işlenmiş hücreler doza bağlı olarak HeLa hücrelerinin çoğalmasını önemli ölçüde azaltmıştır (Chang ve diğ., 2010).

Dilber'in yaptığı çalışmanın MTT sonuçlarına göre, Caco-2 hücrelerine 3,125 μ M konsantrasyondaki bortezomib, ellajik asit, ferulik asit, kafeik asit tekli ve bortezomib + ellajik asit, bortezomib + ferulik asit, bortezomib + kafeik asit kombinasyon (3,125 μ M + 3,125 μ M) gruplarında, kontrole göre % hücre canlılık oranları sırası ile; %50,96, 96,12, 48,80, 86,21, 44,94, 80,46 ve 26,56 olarak belirlenmiştir (Dilber, 2020).

MTT sonuçlarına göre, Caco-2 hücrelerinde sadece 6,25 μ M konsantrasyonda rimkazol, p-kumarik asit, o-kumarik asit, kurkumin uygulanan gruplarda % hücre canlılık oranları kontrole göre sırasıyla %68,69, %78,59, %86,92 ve %84,15 olarak belirlenmiştir (Çiftçi, 2020).

Lee ve Zhu (2006), insan meme kanseri hücreleriyle (MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri) yaptıkları çalışmada, 1, 5, 20 veya 50 μ M kafeik asit veya klorojenik asit içeren insan meme kanseri hücreleri 8 gün boyunca tedavi edilmiştir. Bu bağlamda hipermetile RAR β genini doza bağlı şekilde demetile etmiştir ve RAR β geninin metilasyona özgü olmayan bantlarını arttırmıştır. Kafeik asit ve klorojenik asit için IC₅₀ değeri sırasıyla 3.0 ve 0.75 μ M olup, insan DNMT1 aracılı DNA metilasyonunun inhibisyonu sırasıyla 2.3 and 0.9 μ M'dır (Lee ve Zhu, 2006).

Janicke ve diğerleri (2005) tarafından yapılan bir çalışmada ferulik asitin, Caco-2 hücrelerinin proliferasyonu ve hücre döngüsü faz dağılımı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Buna göre 15 veya 150 μ M ferulik asit veya p-kumarik asit ile tedavi edilen Caco-2 hücrelerinin proliferasyonunu etkilemedi. Ancak hücreler 1500 μ M ferulik asit ile tedavi edildiğinde, tedaviden 2 ve 3 gün sonra hücre sayısı %75 ve %43'e düşmüştür (Janicke ve diğ., 2005).

Khazendar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ferulik asitin MCF-7 ve HepG2 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi belirlenmiştir. Buna göre 48 saat ferulik asit uygulanan hücrelerde IC₅₀ değerleri bulunmuştur. MCF-7 hücreleri için 24, 48 ve 72 saat uygulanan ferulik asitin IC₅₀ değerleri sırasıyla 143,8, 75,4 ve 85,6

$\mu\text{g} / \text{mL}$ iken HepG2 hücrelerinin IC_{50} değerleri 24, 48 ve 72 saatte sırasıyla 150.7, 81,38 ve 210,4 $\mu\text{g} / \text{mL}$ idi (Khazendar ve diğ., 2019). Bu çalışmamızda ferulik asit uygulanan HepG2 hücrelerinde EC_{50} değeri 3,1 mM bulunmuştur. 24 saat uygulanan ferulik asit hücre proliferasyonunu önemli derecede düşürmüştür.

Chen ve arkadaşları (2007) ferulik asitin insan lösemi hücre hattı (HL-60 hücreleri) üzerinde yaptıkları çalışmada, 24 saat ferulik asit uygulanan hücrelerin sitotoksitesine bakılmış MTT sonuçlarına göre EC_{50} değeri 8,2 μM bulunmuştur. RT-PCR sonuçları Bcl-2 geninde önemli ölçüde azalma meydana gelirken, Bax gen ekspresyonunda bir değişiklik olmamıştır (Chen ve diğ., 2007).

o-Kumarik asitin CYP3A4 ve CYP2C9'un protein ve mRNA seviyeleri üzerindeki etkileri belirlendi. CYP3A4 mRNA ve protein seviyeleri azaldı. Benzer şekilde MCF7 hücrelerinde o-kumarik asit tedavisine yanıt olarak mRNA seviyesinde %75 düşüşü bildirilmiştir (Şen ve diğ., 2015).

24 saatlik o-kumarik asit tedavisinden sonra HepG2 hücresinde CYP2C9 protein ve mRNA seviyeleri artarken, MCF7 hücrelerinde mRNA seviyesi önemli ölçüde azalmıştır (Şen ve diğ., 2015). Bizim çalışmamızda yapılan çalışmaya benzer olarak HepG2 hücre hattı kullanılmış olup farklı proteinler ve mRNA seviyeleri üzerindeki etkisine bakılmıştır. Bu anlamda DNMT3B protein ve mRNA seviyelerinde azalış meydana gelmiştir.

Yapılan tez çalışmasında HepG2 hücre hattında kafeik asitin EC_{50} dozunun uygulanması sonucunda DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, HAT1, HDAC1 ve HDAC3 genlerinin mRNA seviyelerinde sırasıyla %87.6, %76.4, %99.3, %98.6, %81, %96.4 ve %87.8 azalış gözlenmiştir. Benzer şekilde, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, HAT1, HDAC1 ve HDAC3 genlerinin mRNA seviyesinde ferulik asit uygulaması sonucunda sırasıyla %64, %49.3, %84.5, %95.6, %36.7, %89.4 ve %69.1 azalış saptanmıştır. Son olarak o-Kumarik asitin EC_{50} dozunun HepG2 hücrelerine uygulanması sonucunda DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, HAT1, HDAC1 ve HDAC3 mRNA seviyesinde sırasıyla %64.4, %48.6, %91.2, %76.1, %36.9, %97.2 ve %80.8 azalma gözlemlenmiştir.

Western blot analizi, anti-apoptotik protein Bcl-2 aşağı regüle edildi ve HeLa hücrelerinde 10 mM kafeik asit ile tedavisinden sonra apoptoz promotörü p53'ün seviyesi artmıştır. 1 mM kafeik asit maruziyetin ardından sitokrom c salınımı tespit edildi; mitokondride sitokrom c seviyeleri konsantrasyona bağlı bir şekilde azaldı. Bu sonuçlar, sitokrom c'nin kafeik asit kaynaklı apoptozda doğrudan rol oynar (Chang ve diğ., 2010).

Billam'ın yaptığı çalışmada DNA inhibitörü zebularinin insan meme kanseri hücreleri üzerine etkilerini çalışmıştır. Zebularinin DNMT inhibitörü olarak aktivitesinden dolayı meme kanseri hücreleri üzerine ekspresyonu incelendi. Zebularin ile tedavi edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b proteinleri en düşük dozda bile (50 µM) istatistiksel olarak anlamlı bir doza bağımlı olarak azalma gözlenmiştir (Billam, 2010). Billam'ın yaptığı çalışma ile bizim çalışmamız arasında kullanılan proteinler yönünden benzerlik bulunmaktadır.

Fang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, yeşil çaydaki ana polifenol olan epigallocateşin gallat (EGCG), DNMT aktivitesini inhibe ettiğini ve kolon kanseri HT-29, yemek borusu kanseri KYSE 150 ve PC3 prostat kanseri hücrelerinde metilasyon susturucu genleri yeniden aktive ettiğini ortaya koymuştur. Bu anlamda yaygın olarak tüketilen diyet bileşeni tarafından DNA metilasyonu inhibisyonunu ilk kez göstermişlerdir ve karsinogenezin önlenmesinde gen susturmanın önlenmesi ya da tersine çevrilmesi için EGCG'nin potansiyel kullanımı önerilmektedir. Yeşil çayın düzenli tüketiminden dolayı olumsuz etkilerine dair bir kanıt yok ancak insanlara verilen EGCG yüksek dozlarda verilerse endişe verici olabilir (Fang ve diğ., 2003).

Çalışmamızın ikinci basamağında DNA metilasyonunu etkisine ek olarak fenolik asitlerin DNA metilasyonunda görev alan DNMT1, DNMT 3A ve DNMT 3B genleri, histon modifikasyonlarında görev alan HAT1, HDAC1, HDAC3 ve TET1 genleri de incelenmiş olup bu genlerin protein düzeyindeki etkisini saptamak için western blot analizleri yapılmıştır.

Gao ve Tollefsbol (2018) resveratrol ile üzüm çekirdeği proantosiyanidinlerin, insan meme kanseri hücrelerini (MDA-MB-231 ve MCF-7) inhibe etmede sinerjistik etkisine baktığı çalışmada, DNA metiltransferaz (DNMT)

aktivitesi ve histon deasetilaz (HDAC) aktivitesi üzüm çekirdeği proantosiyanidinler ve resveratrol ile kombinasyon halinde tedavilerden sonra MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde büyük ölçüde azalma görülmüştür (Gao ve Tollefsbol, 2018).

Liu ve diğ., (2015) farelerde karaciğer hasarı üzerine kuersetin uygulaması üzerine yaptıkları çalışmada, kuersetinin nikel kaynaklı karaciğer hasarını önemli ölçüde engellediği belirlenmiştir. Kuersetinin temelini keşfederken etki mekanizmaları, farelerin nikel ile tedavi edilmiş karaciğerinde NF-E2 ile ilgili faktör 2 (Nrf2) DNA metilasyon seviyesini ve DNA metiltransferaz (DNMT) aktivitesini azalttığı bulunmuştur. Kuersetin'in nikel ile tedavi edilen farelerin karaciğerlerindeki Nrf2 / HO-1 ve p38 / STAT1 / NF-κB yolları DNA metilasyonunu ve iltihaplanmayı inhibe ettiği belirlenmiştir (Liu ve diğ., 2015).

Kuersetin ile yapılan başka bir çalışmada insan serviks kanseri hücre hattı (HeLa) üzerinde yapılmıştır. İki farklı dozda (25 µM ve 50 µM) kuersetin uygulanan HeLa hücreleri önemli ölçüde doza bağlı şekilde DNMT enzim aktivitesini düşürdüğü gözlemlenmiştir. Ayrıca kuersetinin çeşitli kromatin değiştiricilerin ekspresyonunu modüle ettiği ve DNMT'lerin, HDAC'lerin ve HMT'lerin aktivitesini doza bağlı bir şekilde azalttığı bulunmuştur (Kedhari Sundaram ve diğ., 2019).

Ferulik asit ile indüklenen apoptozda kaspaz yolakları, olası rolünü araştırmak için kaspaz-8 ve kaspaz-9'un aktiviteleri 100 ve 200 µg / ml konsantrasyonlarda ferulik asit ile tedaviye yanıt olarak 48 saat olarak belirlendi. Sonuçlar, ferulik asit ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinde kaspaz-8 aktivitesi doz yanıtında önemli ölçüde yükseldi (p <0,05), 200 µg / mL'lik konsantrasyonda kaspaz-9 aktivitesinde hafif bir yükselme görülmüştür (p <0,073). HepG2 hücre hattı için, kaspaz-8 ve kaspaz-9'un 200 µg / mL'lik konsantrasyonda her ikisinin aktivitesi yükseldi (Khazendar ve diğ., 2019).

Kampa ve diğerleri (2004) yaptıkları çalışmada kafeik asit, siringik asit, sinapik asit, protokatekuik asit, ferulik asit ve 3,4-dihidroksi-fenilasetik asit (PAA) T47D insan meme kanseri hücrelerine anti-proliferatif etkilerini incelemiştir. Apoptotik ilişkili proteinlerin analizine bakıldığında her iki fenolik asit (kafeik ve PAA) anti-apoptotik protein Bcl-2'yi önemli ölçüde indükledi (3,3 kat ve 2,8 kat Sırasıyla). Ek olarak, pro-apoptotik FasL protein, kafeik asit (1,6 kat) ile indüklendi.

Aksine apoptoza yol açan farklı sinyal yollarını göstererek, pro-apoptotik proteinler Bak ve Fas seviyelerini önemli ölçüde düşürdü (Kampa ve diğ., 2004).

Assumpção ve arkadaşlarının (2020), yaptığı çalışmada yaygın olarak tespit edilen üç fenolik asitten kafeik, dihidrosinamik ve p-kumarik asidi, DNA demetile ajan olarak bilinen propolis ve yeşil çaydan epigallokateşin-3-gallat (EGCG) seçmişlerdir. Tedavi için BT-20, BT-549, MDA-MB-231 ve MDA-MB-436 meme kanseri hücre hattı kullanmışlardır. Propolis, fenolik asitler ve EGCG ile muamele edilen üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarını sitotoksik etkisi MTT testi ile hesaplanmış ve propolisin BT-20 ve BT-549 hücrelerinde doza ve zamana bağımlı hücre canlılığını azaltmıştır. Propolis için (IC₅₀) değerleri BT-20 ve BT-549 hücreleri için sırasıyla 18.06 ve 25.45 µg / ml olarak bulunmuş ancak MDA-MB-231 ve MDA-MB-436'da hücre canlılığında önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Aynı hücre hatlarında *in vitro* ortamda maruz bırakılan hücreler EGCG ve p-kumarik asitte hücre canlılığını azaltırken, kafeik asit ve dihidrosinamik asitte etki tespit edilmemiştir (Assumpção ve diğ., 2020).

Rosa ve diğerleri (2018) yaptıkları çalışmada insan kolon adenokarsinom hücrelerinde (HT-29) antioksidan aktivitesini ve 3,4-dihidroksifenilasetik (3,4-DHPAA), p-kumarik (p-CoA), vanilik (VA) ve ferulik (FA) asitlerin hücre canlılığı üzerindeki etkisini, hücre döngüsü ilerlemesi ve apoptoz hızı değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Bu çalışma sonucunda HT-29 hücreleri 0,1 µM ile 100,0 µM arasındaki konsantrasyonlarda 3,4-DHPAA, p-CoA, VA ve FA ile 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücre canlılığını belirlemek için MTT testi kullanılmıştır. FA ile test edilen tüm konsantrasyonlarla muameleden sonra kontrol ile karşılaştırıldığında canlı hücrelerin inhibe edici bir büyüme etkisi göstermiştir. FA, 2,5 µM ile 100,0 µM ile tedavi edilen hücrelerin ortalama %63,0'ının inhibisyonunu desteklemiştir (Rosa ve diğ., 2018).

24 saatlik uygulama sonucunda HepG2 hücre hattında DNA metiltransferaz (DNMT) enzim aktivitesi değerlendirildiğinde bütün uygulama grupları kontrol grubu ile kıyaslandığında gözlemlenen fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). Pozitif kontrol lizatında aktivite 2,39 pmol/min/mg iken, kontrol lizatında aktivite 0,407 pmol/min/mg protein, kafeik asit lizatında bu değer 0,224 pmol/min/mg, ferulik asit lizatında 0,248 pmol/min/mg ve o-kumarik asit lizatında

0,125 pmol/min/mg proteindir. Sonuç olarak fenolik asitler DNMT enzim aktivisini azaltmıştır.

Çalışmamız fenolik asitlerin DNA metilasyonuna etkisi ile ilgili yapılan ilk çalışma olduğu için elde edilen sonuçlara benzer çalışma bulunmamaktadır. Bu bağlamda kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asitin protein düzeyindeki değişimlerini gösteren çalışma olmadığı için literatürle uyumuna bakılamamıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİ

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile fenolik asitlerin birçok hastalığın tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Bu nedenle fenolik asitlerin bu özellikleri araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Bitkilerin yapısında bulunan fenolik asitlerin antialerjik, antiarterojenik, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antibakteriyel, antiviral, antimutajenik, antikarsinojenik, antiülser, antioksidan ve antitrombotik etki gibi pek çok etkisi iddia edilmiştir.

Epigenetik alanındaki araştırmaların artması klinik çalışmalarıyla paralel olarak artmasını sağlamıştır. Epigenetik sadece hastalıkların teşhisinde değil, aynı zamanda gen düzenlemelerinde yeni bakış açıları sağlamaktadır. Bu nedenle epigenetik çalışmalar geliştirilerek hastalıkların daha erken teşhis edilmesi sağlanabilir. Yeni geliştirilecek antikanser ajanların yan etkilerinin açıkça bilinmemesi dezavantaj sağlamasına neden olmaktadır. Yapılan çalışmanın klinik alanda da yararlarının bulunması, bireye özgü tedavilerin geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır.

Çalışmada kafeik, ferulik ve o-kumarik asitlerin MTT sonuçlarına göre etkin dozları sırasıyla 1,25 mM, 3,1 mM ve 5 mM bulunmuştur. Bu bağlamda bu konsantrasyonların kontrol grubuna göre hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. HepG2 hücre hattına etkin dozun uygulanması sonucunda DNA metilasyon mekanizmasında görev alan DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, HAT1, HDAC1 ve HDAC3 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişimler belirlenmiştir. Bu anlamda mRNA seviyesinde fenolik asitlerin uygulanması sonucunda belirlenen genlerde azalış meydana gelmiştir.

HepG2 hücre hattına fenolik asitlerin uygulanması sonucu mRNA seviyesindeki değişimler bakıldığında en fazla azalış kafeik asitte meydana gelmiştir.

Kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asitin enzim aktivitesine bakıldığında DNMT üzerinde önemli bir inhibisyon göstermiştir. Bu bağlamda fenolik asitlerin DNMT inhibitörü olarak kullanılabilmesi için moleküler düzeyde yeni çalışmaların yapılmasını sağlayabilir.

Bu tez çalışması karaciğer kanserinin tedavisi ve teşhisine yönelik olarak, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarının etkisinin ortaya konulması bakımından son derece önem taşımaktadır. Bu anlamda çalışmanın alandaki mevcut literatüre katkı sağlaması yeni çalışmaların ortaya konulmasında aydınlatıcı olacaktır.

Yapılan bu çalışmada bitkilerin içeriğinde bulunan fenolik asitlerden olan kafeik asit, ferulik asit ve o-kumarik asitin insan karaciğer hücre hattındaki (HepG2) epigenetik değişimlerden DNA metilasyonuna olan etkileri araştırılmıştır. Bu çalışma ile bu maddelerin epigenetik etkileri kapsamlı olarak insan karaciğer hücre hattında ilk kez araştırılması nedeniyle özgün bir değer taşımaktadır. Bu çalışma ile elde edilen verilerin ileride yapılacak olan çalışmalara ışık tutarak, fenolik asitler gibi fitokimyasallar antikanser ilaçların etkinliğini artırarak yeni çalışmalara rehber olabileceğini düşünüyoruz.

7. KAYNAKLAR

Akkan, A.C., “Bazı fenolik asit bileşiklerinin kapiler elektroforez yöntemi ile tayini”, Yüksek Lisans Tezi, *Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir, s. 7-8, (2008).

Aldawsari, F.S., Ortiz, R.A., Kapilashrami, K., Yoo, J., Luo, M., Medina-Franco, J.L., Velázquez-Martínez, C.A., “Resveratrol-salicylate derivatives as selective DNMT3 inhibitors and anticancer agents”, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 1475-6366 (Print) 1475-6374, (2015).

Aslan, H.E., “Koyun Karaciğerinden Aldoz Redüktaz ve Sorbitol Dehidrogenaz Enzimlerinin Saflaştırılması ve Bazı Fenolik Asitlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi”, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, (2015).

Assumpção, J.H., Takeda, A.A., Sforcin, J.M., Rainho, C.A., “Effects of Propolis and Phenolic Acids on Triple-Negative Breast Cancer Cell Lines: Potential Involvement of Epigenetic Mechanisms”, *Molecules*, 25, 1289, (2020).

Ayaz, G., Şahin, Ö., Ayaz, U., ve Özdemir, S.,M., “Epigenetik ve kanser”, *İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyomühendislik Bölümü*, (2019).

Bacanlı, M., “Bitkisel Kaynaklı Fenolik Yapıdaki Bileşiklerin Olası Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi”, *Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, (2014).

Balasundram N., Sundram K., Samman S., “Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses”, *Food Chemistry*, 99: 191-203, (2006).

Bai, Z.T., Bai, B., Zhu, J., Di, CX., Li, X., Zhou, WC., “Epigenetic actions of environmental factors and promising drugs for cancer therapy”, *Oncol Lett*,15(2):2049-2056 (2018).

Barril, P. ve Nates, S., “Introduction to Agarose and Polyacrylamide Gel Electrophoresis Matrices with Respect to Their Detection Sensitivities”, *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*, (2012).

Barut Uyar, B. ve Sürücüoğlu, M.S., “Besinlerdeki Biyolojik Aktif Bileşenler”, *Beslenme Ve Diyet Dergisi*, 38(1-2), 69-76, (2010).

Billam, M., Sobolewski, M.D., Davidson, N.E., “Effects of novel DNA methyltransferase inhibitor zebularine on human breast cancer cells”, *Breast Cancer Res Treat* 120: 581-592, (2010).

Bird, A., “The essentials of DNA methylation”, *Cell*, 70(1), 5-8, (1992).

Bouzaïene, N.N., Jaziri, S.K., Kovacic, H., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K., Luis, J., “The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells in vitro”, *European Journal of Pharmacology*, 766, 99-105, (2015).

Busch, C., Burkard, M., Leischner, C., Lauer, U., Frank, J., Venturelli, S., “Epigenetic activities of flavonoids in the prevention and treatment of cancer”, *Clinical Epigenetics*, 7:64, (2015).

Cafasso, J., “What is caffeic acid?” [online], (17.03.2021), <https://www.healthline.com/health/caffeic-acid>, (2018).

Chang, W.C., Hsieh, C.H., Hsiao, M.W., Lin, W.C., Hung, Y.C., Ye, J.C., “Caffeic acid induces apoptosis in human cervical cancer cells through the mitochondrial pathway”, *Taiwan J. Obstet. Gynecol.*, 49(4):419-24, (2010).

Chen, C.J., Hsu, M.H., Kuo, S.C., Lai, Y.Y., Chung, J.G., Huang, L.J., “(2E)-N, N-dibutyl-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylamide induces apoptosis and cell cycle arrest in HL-60 cells”, *Anticancer Res.*, 27(1A):343-9, (2007).

Chiang, E.P., Tsai, S.Y., Kuo, Y.H., Pai, M H., Chiu, H L., Rodriguez, R.L., and Tang, F.Y., “Caffeic Acid Derivatives Inhibit The Growth Of Colon Cancer: Involvement Of The PI3-K/Akt And AMPK Signaling Pathways”, *Plos One*, 9 (6), e99631, (2014).

Clifford, M.N., “Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence and dietary burden”, *J. Sci. Food. Agric.*, 79: 362–372, (1999).

Chin, S. P., Dickinson, J. L., and Holloway, A. F., “Epigenetic regulation of prostate cancer”, *Clin Epigenetics*, 2, 151-169, (2011).

Chomczynski, P., Sacchi, N., “Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction”, *Anal Biochem.* 162: 156-159 (1987).

Chung, T., Moon, S., Chang, C., Ko, J., Lee, C., Cho, G., Kim S., Kim, J., Kim, C., “Novel And Therapeutic Effect Of Caffeic Acid And Caffeic Acid Phenyl Ester On Hepatocarcinoma Cells: Complete Regression Of Hepatoma Growth And Metastasis By Dual Mechanism”, *Faseb J.*, (2004).

Číž M., Dvořáková A., Skořcková V., Kubala L., “The Role of Dietary Phenolic Compounds in Epigenetic Modulation Involved in Inflammatory Processes”, Rev., *Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University*, 625 00 Brno, Czech Republic, (2020).

Cortez, C.C., Jones, P.A., “Chromatin, cancer and drug therapies”, *Mutat. Res.*, 647:44–51 (2008).

Costa, F.F., “Epigenomics in cancer management”, *Cancer Manag Res*; 2:255-65 (2010).

Dilber, M., “Bortezomib İle Ellajik Asit, Ferulik Asit, Kafeik Asit Kombinasyonlarının Caco-2, A549 Ve 3t3 Hücrelerinde, Sinerjistik Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Anadolu Üniversitesi, *Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı*, (2020).

Çiftçi B., “Rimkazol İle P-Kumarik Asit, O-Kumarik Asit, Kurkumin Kombinasyonlarının Caco-2, A549 Ve 3t3 Hücrelerinde Sinerjistik Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması”, Eskişehir Anadolu Üniversitesi, *Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı*, (2020).

Eroğlu, O., “Meme Kanserinde Epigenetik Tedavi”, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, *Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü*, (2018).

Eser, B. E., Yazgan, Ü.C., Gürses, S.A., Aydın, M., “Diabetes Mellitus ve Epigenetik Mekanizmalar”, *Dicle Tıp Dergisi*, 43 (2): 375-382, (2016).

Esteller, M., “Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes”, *British Journal of Cancer*, 94, 179 – 183, (2006).

Fang, M., Chen, D., Chang, C.S., “Dietary Polyphenols May Affect DNA Methylation”, *Department of Chemical Biology, Ernest Mario School of Pharmacy, Rutgers, The State University of New Jersey, Piscataway, NJ 08854-8020*, (2007).

Fang, M.Z., Wang, Y., Ai, N., Hou, Z., Sun, Y., Lu, H., Welsh, W., Yang, C.S., “Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines”, *Cancer Res.* 63: 7563-7570, (2003).

Fu, S., Kurzrock, R., “Development of Curcumin as an Epigenetic Agent”, *American Cancer Society*, 116:4670–6, (2010).

Gao, Y., ve Tollefsbol, T., “Combinational Proanthocyanidins and Resveratrol Synergistically Inhibit Human Breast Cancer Cells and Impact Epigenetic–Mediating Machinery”, *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 2204, (2018).

Gilbert, E., Liu, D., “Flavonoids Influence Epigenetic-Modifying Enzyme Activity: Structure-Function Relationships and the Therapeutic Potential for Cancer”, *Current Medicinal Chemistry*, 17, 1756-1768, (2010).

Güler, C., Balcı Peynircioğlu, B., “DNA Metilasyonu ve Hastalıklarla İlişkisi”, *ACU Sağlık Bilimleri Dergisi*, (2):61-68, (2016).

Hernandes, L.C., Machado, T., Tuttis, K., Ribeiro, D.L., Aissa, A.F., Dévoz, P., “Caffeic acid and chlorogenic acid cytotoxicity, genotoxicity and impact on

global DNA methylation in human leukemic cell lines”, *Genet. Mol. Biol.*, vol.43, no.3, Ribeirão Preto (2020).

İzmirli, M., “Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser Tedavisinde Epigenetik Yaklaşımlar”, *Van Tıp Dergisi*, 20(1): 48-51, (2013).

Jaganathan S.K., “Growth İnhibition By Caffeic Acid, One Of The Phenolic Constituents Of Honey, İn HCT 15 Colon Cancer Cells”, *The Scientific World Journal*, 372-345, (2012).

Janicke, B., Onning, G., Oredsson, S.M., “Differential Effects Of Ferulic Acid And P- Coumaric Acid On S Phase Distribution And Length Of S Phase İn The Human Colonic Cell Line Caco-2”, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 6658-6665, (2005).

Kampa M., Alexaki V.I., Notas G., Nifli A.P., Nistikaki A., Hatzoglou, A., Bakogeorgou E., Kouimtzoglou E., Blekas G., Boskou D., Gravanis A., Castanas E., “Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action”, *Breast Cancer Res.*, 6, R63–R74, (2004).

Kanwal, R., Gupta, S., “Epigenetic modifications in cancer” *Clin Genet* 81: 303-311, (2012).

Karaçoban, E., “Kafeik Asit Fenetil Ester (Cape)’İn, Dna Metil Transferaz İnhibitörü (Dnmti) Zebularin Kombinasyonu ile Tetiklenen Apoptotik Mekanizmadaki Epigenetik Değişimlerin Mda-Mb-231 Meme Kanseri Hücresi Hatlarında Araştırılması”, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, *Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü* (2016).

Kasap, Y., “Çeşitli Hücre Hatlarında Silimarinin Epigenetik Etkisinin Değerlendirilmesi”, Başkent Üniversitesi, *Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı*, Ankara, (2019).

Kedhari Sundaram, M., Hussain, A., Haque, S., Raina, R., Afroze, N., “Quercetin modifies 5’ CpG promoter methylation and reactivates various tumor

suppressor genes by modulating epigenetic marks in human cervical cancer cells”, *J Cell Biochem.*, (2019).

Kelly, T.K., Carvalho, D.D., Jones, P.A., “Epigenetic modifications as therapeutic targets” *Nature Biotechnology* 28 (10), 2010.

Khazendar, M., Chalak, J., Huneidi, W., Vinod, A., Rahman, W., Gharbieh, E., “Antiproliferative And Proapoptotic Activities Of Ferulic Acid In Breast And Liver Cancer Cell Lines”, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 18 (12): 2571-2576, (2019).

Kolaç, T., Gürbüz, P., ve Yetiş, G., “Doğal Ürünlerin Fenolik İçeriği Ve Antioksidan Özellikleri”, *İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi*, Cilt 5 , Sayı 1, Sayfalar 26 – 42, (2017).

Kowczyk-Sadowy, M., Świsłocka, R., Lewandowska, H., Piekut, J., Lewandowski, W., “Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, ¹H- and ¹³C-NMR), Theoretical and Microbiological Study of trans o-Coumaric Acid and Alkali Metal o-Coumarates”, *Molecules*, 20, 3146-3169, (2015).

Küçükoğlu, K., “Histonların Asetilasyonu ve Histon Deasetilaz İnhibitörleri”, Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Erzurum, (2014).

Laemmli, U. K., “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”, *Nature* 227(5259): 680-685, (1970).

Laird, P.W., “Cancer epigenetics”, Departments of Surgery and of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern California, Keck School of Medicine, Norris Comprehensive Cancer Center, Room 6418, 1441 Estlake Avenue, Los Angeles, CA 90089-9176, USA *Human Molecular Genetics*, Vol. 14, Review Issue 1, (2005).

Lee, Y.S., “Role of NADPH Oxidase-Mediated Generation of Reactive Oxygen Species in the Mechanism of Apoptosis Induced by Phenolic Acids in HepG2 Human Hepatoma Cells”, *Archives of Pharmacal Research*, 28, 1183-9,(2005).

Lee, W., ve Zhu, B., “Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols”, *Carcinogenesis* vol.27 no.2 pp.269–277, (2006).

Lee, W., Shim, J., ve Zhu, B., “Mechanisms for the Inhibition of DNA Methyltransferases by Tea Catechins and Bioflavonoids”, *Mol Pharmacol* 68:1018–1030, (2005).

Li, Y., Tollefsbol, T., “Impact on DNA methylation in cancer prevention and therapy by bioactive dietary components”, *Curr Med Chem.*, 17(20): 2141–2151, (2010).

Li, Y., Buckhaults, P., Cui, X., Tollefsbol, T., “Combinatorial epigenetic mechanisms and efficacy of early breast cancer inhibition by nutritive botanicals”, *Epigenomics*, 8 (8): 1019-1037, (2016).

Li, L., Harflett, C., Beale, M.H., Ward, J.L., “Phenolic Acids”, Analysis of Bioactive Components in Small Grain Cereals, *Journal of Cereal Science*, 52(3):520, (2009).

Liu, C., Ma, J., Xie, W., Liu, S., Feng, Z., Zheng, G., Wang, A., “Quercetin protects mouse liver against nickel-induced DNA methylation and inflammation associated with the Nrf2/HO-1 and p38/STAT1/NF- κ B pathway”, *Food and Chemical Toxicology*, 82 ,19–26, (2015).

Mosmann, T., “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays”, *Journal of immunological methods* 65(1), 55-63, (1983).

Okutucu, B., ve Pehlivan, S., “Reverz-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Uygulama Alanları”, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 12(2), (2003).

Orcan, S., “Epigenetik ve Epigenomik”, [online] (12.02.2021), http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_epigenetik.pdf (2006).

Özkan Vardar, D., Mollahaliloğlu, S., Öztaş, D., “Fitoterapide Kullanılan Bazı Fitokimyasalların Toplum Sağlığına Etkilerinin Değerlendirilmesi”, *Hitit Üniversitesi, Sungurlu Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikleri Bölümü*, 1(4): 99-105, (2018).

Paluszczak, J., Krajka-Kuźniak, V., Baer-Dubowska, W., “The effect of dietary polyphenols on the epigenetic regulation of gene expression in MCF7 breast cancer cells”, *Toxicol Lett.*, 192(2):119-25, (2010).

Pfaffl, M., Relative quantification, Published by International University Line (Editor: T. Dorak), p 63-82, (2004).

Prasad, N., Karthikeyan, A., Karthikeyan, S., Venkata Reddy, B., “Inhibitory Effect Of Caffeic Acid On Cancer Cell Proliferation By Oxidative Mechanism In Human HT-1080 Fibrosarcoma Cell Line”, *Mol Cell Biochem*, 349:11–19, (2011).

Ramos, S., Alia, M., Bravo, L., Goya, L., “Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2)”, *J Agric Food Chem.*, 53:1271-1280, (2005).

Rao, Y.K., Geethangili, M., Fang, S.H., Tzeng, Y.M., “Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: a comparative study”, *Food Chemical Toxicol*, 45: 1770-6, (2007).

Robertson, D.K., “DNA methylation and human disease”, *Nature Reviews Genetics*, 6:597-610 (2005).

Rosa, L.S., Jordão, N.A., da Costa Pereira Soares, N., deMesquita, J.F., Monteiro, M., and Teodoro, A.J., “Pharmacokinetic, Antiproliferative and Apoptotic Effects of Phenolic Acids in Human Colon Adenocarcinoma Cells Using In Vitro and In Silico Approaches”. *Molecules*, 23 (10), 2569, (2018).

Rosa, L.S., Silva, N.J.A., Soares, N.C.P., Monteiro M.C. and Teodoro A.J., “Anticancer Properties of Phenolic Acids in Colon Cancer-A Review”. *Journal of Nutrition and Food Sciences*, 6, 1-7, (2016).

Seo, J.Y., Park, Y.J., Yi, Y.A., Hwang, J.Y., Lee, I.B., Choo, B.H., Son, H.H., Seo, D.G., “Epigenetics: general characteristics and implications for oral health”, *Restor Dent Endod*, (2014).

Shapiro, A. L., Vinuela, E., and Maizel, J.V., JR., “Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28, 815 (1967).

Selvakumar, P., Badgeley, A., Murphy, P., Anwar, H., Sharma, U., Lawrence, K., Lakshmikuttyamma, A., “Flavonoids and Other Polyphenols Act as Epigenetic Modifiers in Breast Cancer”, *Nutrients*, 12, 761, (2020).

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. “Measurement of protein using bicinchoninic acid”, *Anal Biochem*, 150, 76-85, (1985).

Şen, A., Atmaca, P., Terzioğlu, G., Arslan, Ş., “Anticarcinogenic effect and carcinogenic potential of the dietary phenolic acid: o-coumaric acid.”, *Natural Product Communications*, 8 (9), 1269-1274. (2013).

Şen, A., Terzioğlu, G., Atmaca, P., Çelik, G., Özgün, Ö., Arslan, Ş., “Modulatory actions of o-coumaric acid on carcinogen-activating cytochrome P450 isozymes and the potential for drug interactions in human hepatocarcinoma cells”, *Pharmaceutical Biology*, 53 (9), 1391–1398, (2015).

Taner, G., “Lipoik Asit ve Ferulik Asitin İnsan Lenfosit Kültüründe Mitomisin-c’ye Karşı Antigenotoksik Etkileri”, Ankara, (2007).

Üstüner, D., “Tümör Hücrelerinde Western Blotlama Uygulamaları”, *Tübbas Bilim Dergisi*, (3), 4, 330-334, (2010).

Wu, Y., Llewellynn, D.J., Dennis, E.S., “A Quick and Easy Method for Isolating Good Quality RNA From Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Tissues”, *Plant Molecular Biology Reporter* 20:213–218(2002).

Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M.T., Newmark, H.L., “Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds”, *Annual Review of Nutrition*, 21:381-406(2001).

Yang, D., Huang, Z., Jin, W., Xia, P., Jia, Q., Yang, Z., Hou, Z., Zhang, H., Ji, W., Han, R., “DNA methylation: A new regulator of phenolic acids biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*”, *Industrial Crops & Products*, 402-411, (2018).

Yaykaşı, K.O., Hatipoğlu, Ö.F., Kaya, E. ve Yaykaşı E., “Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser”, *Düzce Tıp Dergisi*, 14(3): 58-68, (2012).

Yokuş, B., “Epigenom ve Epigenetik”, Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(2):5-13, (2013).

Zerbinati, N. et al., “In Vitro Evaluation of the Biosafety of Hyaluronic Acid PEG Cross-Linked with Micromolecules of Calcium Hydroxyapatite In Low Concentration”, *Open Access Maced J Med Sci*, (2018).

Zhang, H., Lang, Z., Zhu, J.K., “Dynamics and Function of DNA Methylation in Plants”, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 19(8), 489-506 (2018).