

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**PIROLOKİNOLİN KİNON'UN HEPG2 HÜCRE HATTI  
ÜZERİNDEKİ İNFLAMATUAR ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**RUMEYSA BUDAK**

**DENİZLİ, AĞUSTOS - 2022**

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**



**PİROLOKİNOLİN KİNON'UN HEPG2 HÜCRE HATTI  
ÜZERİNDEKİ İNFLAMATUAR ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**RUMEYSA BUDAK**

**DENİZLİ, AĞUSTOS - 2022**

**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.**

**RUMEYSA BUDAK**

## ÖZET

### PİROLOKİNOLİN KİNON'UN HEPG2 HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ İNFLAMATUAR ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

RUMEYSA BUDAK

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. ASLI SEMİZ)

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2022

Karaciğer kanseri, organın kendi dokusundan kaynaklanan hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve düzensiz çoğalmasıyla oluşan kötü huylu bir tümördür. İlerlemiş ya da metastaz gerçekleşmiş karaciğer kanserinin kalıcı bir iyileşme sağladığı bilinen net bir tedavi yöntemi yoktur. Kemoterapi ilaçlarına karşı dirençli kanser türlerinden biridir. Çoğu kanser tedavisinin amacı hastanın kansere bağlı belirtilerini azaltmak ve hastalığın ilerlemesini engellemektir. Pirolokinolin kinon (PQQ), hücrelerde serbest radikallerin neden olduğu hasarı önleyen bir antioksidan moleküldür. Metoksatın olarak da bilinen PQQ, suda çözünür iyonik bir bileşiktir. PQQ, büyüme ve gelişme için gerekli olan mükemmel bir besindir. Son yapılan çalışmalar PQQ'nun çeşitli kanser hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermiştir. Bu çalışmada PQQ'nun insan karaciğer kanseri hücre hattı (HepG2) üzerindeki inflamatuvar etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bu doğrultuda önce PQQ bileşiğinin HepG2 hücreleri üzerinde EC05 ve EC10 dozları (5,566  $\mu$ M ve 13,484  $\mu$ M) belirlendi ve belirlenen dozlarda PQQ hücrelere uygulandı. Hücrelerden total RNA'lar izole edildi ve belirlenen genlerin (IL-6, NF- $\kappa$ B, CXCL11, CCL2, TNF, CCL5, CXCL10, IL-1 $\beta$ , CCL7 ve CXCL9) mRNA ifadelerindeki farklılıklar qRT-PZR yöntemi ile incelendi. PQQ bileşiğinin EC05 dozunda HepG2 hücre hattında uygulanması sonucunda inflamasyon ile ilgili sitokinler olan IL-6, CCL2, TNF, CXCL10 ve CCL7 genlerinin mRNA ifadelerinde sırasıyla 2,63; 8,50; 2,66; 5,82; 2,65 kat artış gözlemlendi. Benzer olarak EC10 dozunun uygulanması sonucunda IL-6, CCL2, TNF, CXCL10, IL-1 $\beta$ , CCL7 ve CXCL9 genlerinin ifade düzeylerinde sırasıyla 2,48; 13,21; 7,93; 9,33; 4,33; 9,27; 3,70 kat artış gözlemlendi. PQQ uygulaması sonucunda HepG2 hücre hattı üzerindeki pro-inflamatuvar genlerin düzenlenmesine dayanarak PQQ bileşiğinin karaciğer

kanserinde terapötik potansiyele sahip olduğunu söyleyebiliriz. Eldeki sonuçların neticesinde PQQ'nun çok hedefli pro-inflamatuar etkiye sahip bir bileşik olma düşüncesi daha sonraki süreçlerde hayvan deneyleriyle desteklenerek daha kesin sonuçlara ulaşılabileceğinin bilgisini vermektedir.



**ANAHTAR KELİMELER:** Pirolokinolin Kinon, Karaciğer Kanseri, İnflamatuar, HepG2

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF INFLAMMATORY EFFECT OF PYRROQUINOLINE QUINONE ON HEPG2 CELL LINE**

**MSC THESIS**

**RUMEYSA BUDAK**

**PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE**

**BIOMEDICAL ENGINEERING**

**(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. ASLI SEMİZ)**

**DENİZLİ, AUGUST - 2022**

Liver cancer is a malignant tumor formed by uncontrolled division and irregular proliferation of cells arising from the organ's own tissue. There is no clear treatment method known to provide a permanent cure for advanced or metastasized liver cancer. It is one of the types of cancer resistant to chemotherapy drugs. The aim of most cancer treatment is to reduce the symptoms and to stop the progression of disease. Pyrroloquinoline quinone (PQQ) is an antioxidant molecule that prevents damage in cells caused by free radicals. PQQ known also as metoksatın is of the water soluble ionic compound. PQQ is an excellent nutrient necessary for growth and development. Recent studies have shown that PQQ induces apoptosis in various cancer cells. In our study we aimed to search of the inflammatory effect of PQQ on the human liver cancer cell line (HepG2). We first determined the EC05 and EC10 doses of PQQ (5.566  $\mu$ M and 13.84  $\mu$ M) and applied these PQQ doses on HepG2 cells. The determined doses of PQQ were applied to the cells. We isolated the total RNA of all and examined the mRNA expression differences of the identified genes (IL-6, NF- $\kappa$ B, CXCL11, CCL2, TNF, CCL5, CXCL10, IL-1 $\beta$ , CCL7 and CXCL9) and analyzed by qRT-PCR. As result of EC05 dose application we observed 2.63; 8.50; 2.66; 5.82; 2.65-fold increase in mRNA expression of the inflamotion related cytokines which are IL-6, CCL2, TNF, CXCL10, IL-1 $\beta$ , CCL7 and CXCL9 genes respectively. Similar to EC10 application, we observed a 2.48; 13.21; 7.93; 9.33; 4.33; 9.27; 3.70-fold increase in the expression levels of IL-6, CCL2, TNF, CXCL10, IL-1 $\beta$ , CCL7 and CXCL9 genes, respectively. Based on the arrangement of pro-inflammatory genes on HepG2 cell line as a result of PQQ application we can say that PQQ compound has a therapeutic potential in liver

cancer. Based on our results, we that; PQQ compound has a multi-target pro-inflammatory effect in the future, this should be supported with animal experiments in order to reach more accurate results.



**KEYWORDS:** Pyrroloquinoline Quinone, Liver Cancer, Inflammatory, HepG2

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>v</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>SEMBOL LİSTESİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>ix</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1    Kanser.....	1
1.1.1    Kanser Çeşitleri.....	5
1.1.2    Karaciğer Kanseri .....	5
1.2    İnflamasyon .....	7
1.2.1    İnflamasyonda Rol Alan Sitokinler .....	9
1.3    Pirolokinolin Kinon (PQQ) .....	12
1.3.1    Pirolokinolin Kinon ve Kanser .....	15
1.4    Çalışmanın Amacı .....	16
<b>2. YÖNTEM</b> .....	<b>17</b>
2.1    MATERİYAL.....	17
2.1.1    Çalışmada Kullanılan Cihazlar .....	17
2.1.2    Çalışmada Kullanılan Kimyasallar .....	17
2.2    METOD.....	18
2.2.1    Hücre Kültürü Çalışmaları .....	18
2.2.1.1    Besiyeri Hazırlanması, Hücre Büyütmesi ve Etken Madde....	18
2.2.1.2    Hücrelerin Pasajı .....	19
2.2.1.3    Sitotoksisite Çalışmaları .....	20
2.2.1.4    Hücrelere Bileşiklerin Uygulanması .....	22
2.2.2    RNA İzolasyonu .....	22
2.2.3    Agaroz Jel Elektroforezi ile RNA Görüntülenmesi .....	24
2.2.4    cDNA Sentezi .....	24
2.2.5    Gerçek Zamanlı PZR .....	25
2.2.6    İstatistiksel Analiz.....	27
<b>3. BULGULAR</b> .....	<b>28</b>
3.1    Sitotoksisite Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....	28
3.2    PQQ Bileşiğinin HepG2 Hücre Hattında Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Olan Etkisi.....	29
<b>4. TARTIŞMA</b> .....	<b>36</b>
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	<b>44</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	<b>45</b>
<b>7. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>60</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1: Sağlıklı hücreler ve kanser hücrelerinin farkı. ....	1
Şekil 2: Kanserın kazanılmış yetenekleri (Hanahan ve Weinberg 2000). ....	2
Şekil 3: İstila-metastaz çağlayanı (Valastyan ve Weinberg 2011). ....	3
Şekil 4: Normal karaciğer ve kanserli karaciğer. ....	6
Şekil 5: İnflamasyon oluşumu. ....	8
Şekil 6: Pirolokinolin kinon'un kristal yapısı, moleküler formülü, sembolü ve moleküler ağırlığı (PubChem). ....	14
Şekil 7: 4,5-Dioxo-4,5-dihydro-1H-pyrrolo[2,3-f]quinoline-2, 7, 9-tricarboxylic acid (PQQ). ....	18
Şekil 8: HepG2 hücrelerinin petrilere ekilmesi. ....	18
Şekil 9: HepG2 hücre hattının mikroskoptaki görüntüsü. ....	19
Şekil 10: Santrifüj cihazı ve HepG2 hücrelerinin santrifüj sonrası peleti. ....	20
Şekil 11: Santrifüj sonrası sayılan hücrelerin 96 kuyulu plakaya ekilmesi. ....	20
Şekil 12: 96 kuyulu plakadaki besiyerinin uzaklaştırılması. ....	21
Şekil 13: 630 nm'de plaka okuyucuda ölçüm. ....	21
Şekil 14: Hücrelerden RNA izolasyonu. ....	22
Şekil 15: Hücrelerin toplanması. ....	23
Şekil 16: Üç faza ayrılma ve RNeasy mini spin kolona ekilmesi. ....	23
Şekil 17: cDNA sentezi sonrası RT-PZR cihazına yerleştirme. ....	25
Şekil 18: qRT-PZR veri analizlerinin yapılması. ....	27
Şekil 19: PQQ bileşiminin HepG2 hücre canlılığına etkisi. ....	28
Şekil 20: PQQ uygulanmış HepG2 hücrelerinden RNA izolasyonu. ....	29
Şekil 21: HepG2 hücrelerinde PQQ'nun IL-6 mRNA ifadesine olan etkisi. ...	29
Şekil 22: HepG2 hücrelerinde PQQ'nun CXCL11 mRNA ifadesine olan etkisi. ....	30
Şekil 23: HepG2 hücrelerinde PQQ'nun NF-κB mRNA ifadesine olan etkisi. ....	30
Şekil 24: HepG2 hücrelerinde PQQ'nun CCL2 mRNA ifadesine olan etkisi. ....	31
Şekil 25: HepG2 hücrelerinde PQQ'nun TNF mRNA ifadesine olan etkisi. ...	31
Şekil 26: HepG2 hücrelerinde PQQ'nun CCL5 mRNA ifadesine olan etkisi. ....	32
Şekil 27: HepG2 hücrelerinde PQQ'nun CXCL10 mRNA ifadesine olan etkisi. ....	32
Şekil 28: HepG2 hücrelerinde PQQ'nun IL-1β mRNA ifadesine olan etkisi. ....	33
Şekil 29: HepG2 hücrelerinde PQQ'nun CCL7 mRNA ifadesine olan etkisi. ....	33
Şekil 30: HepG2 hücrelerinde PQQ'nun CXCL9 geni üzerindeki mRNA ifadesine olan etkisi. ....	34
Şekil 31: PQQ'nun HepG2 hücrelerinde interlökin ile ilişkili olan IL-6 ve IL-1β genlerinin mRNA seviyelerine olan etkisi. ....	34
Şekil 32: PQQ'nun HepG2 hücrelerinde kemokin ilişkili olan CXCL11, CCL2, CCL5, CXCL10, CCL7 ve CXCL9 genlerinin mRNA seviyelerine olan etkisi. ....	35
Şekil 33: PQQ'nun HepG2 hücrelerinde inflamasyon ile ilişkili olan NF-κB ve TNF genlerinin mRNA seviyelerine olan etkisi. ....	35

## TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 1:</b> cDNA sentez karışımı ve prosedürü .....	25
<b>Tablo 2:</b> RT-PZR koşulları.....	26
<b>Tablo 3:</b> PZR sıcaklık, döngü ve zamanları .....	26
<b>Tablo 4:</b> Çalışmada kullanılan primer dizileri.....	26
<b>Tablo 5:</b> PQQ bileşimi uygulaması sonucunda belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimleri. ....	37

## SEMBOL LİSTESİ

<b>A549</b>	:	Akciğer Epitelyal Karsinoma Hücre Hattı
<b>ACTB</b>	:	Beta-aktin
<b>ATP</b>	:	Adenozin Trifosfat
<b>CCL2</b>	:	Kemokin (CC motifi) ligandı 2
<b>CCL5</b>	:	Kemokin (CC motifi) ligandı 5
<b>CCL7</b>	:	Kemokin (CC motifi) ligandı 7
<b>CTX</b>	:	Siklofosfamid
<b>CXCL9</b>	:	Kemokin (CXC motifi) ligandı 9
<b>CXCL10</b>	:	Kemokin (CXC motifi) ligandı 10
<b>CXCL11</b>	:	Kemokin (CXC motifi) ligandı 11
<b>DMEM</b>	:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	:	Dimetil Sülfoksit
<b>DNA</b>	:	Deoksiribonükleik Asit
<b>dNTP</b>	:	Deoksiniükleotid Trifosfat
<b>EBV</b>	:	Epstein-Barr Virüsü
<b>FBS</b>	:	Fetal Bovine Serum
<b>HBV</b>	:	Hepatit B Virüsü
<b>HCC-LM3</b>	:	İnsan Hepatoselüler Karsinomu HCC-LM3
<b>HCV</b>	:	Hepatit C Virüsü
<b>HepG2</b>	:	İnsan Karaciğer Kanseri Hücre Hattı
<b>HPV</b>	:	İnsan Papilloma Virüsü
<b>HSK</b>	:	Hepatoselüler Karsinom
<b>HTLV-I</b>	:	İnsan T-lenfotropik Virüsü-I
<b>IL-6</b>	:	İnterlökin-6
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	:	İnterlökin-1 beta
<b>KSHV</b>	:	Kaposi Sarkomu Herpes Virüsü
<b>MAPK</b>	:	Mitojenle Aktive Olan Bir Protein Kinaz
<b>MCF7</b>	:	Meme Kanseri Hücre Hattı
<b>MCV</b>	:	Merkel Hücreli Polioma Virüsü
<b>MMP-1,3</b>	:	Matriks Metalloproteinaz-1, Matriks Metalloproteinaz-3
<b>Neuro-2A</b>	:	Fare Nöroblastom Hücre Hattı
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	:	Nükleer Faktör $\kappa$ B
<b>p53</b>	:	Tümör Protein 53
<b>PBS</b>	:	Fosfat Tampon Tuzu
<b>PQQ</b>	:	Pirolokinolin Kinon
<b>PZR</b>	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>Rb</b>	:	Retinoblastoma Protein
<b>RNA</b>	:	Ribonükleik Asit
<b>ROS</b>	:	Reaktif Oksijen Türleri
<b>RT-PZR</b>	:	Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>SW1353</b>	:	İnsan Kondrosarkom Hücre Hattı
<b>SW982</b>	:	İnsan Sinovyal Hücre Hattı
<b>TAE</b>	:	Tris-Asetik Asit-EDTA
<b>TNF</b>	:	Tümör Nekroz Faktörü
<b>U937</b>	:	İnsan Makrofaj Hücre Hattı
<b><math>\mu</math>l</b>	:	Mikrolitre
<b><math>\mu</math>M</b>	:	Mikromolar

## ÖNSÖZ

“Pirolokinolin Kinon’un HepG2 Hücre Hattı Üzerindeki İnflamatuar Etkilerinin Araştırılması” isimli çalışma Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomedikal Mühendisliği A.B.D. Biyokimya ve Moleküler Toksikoloji Araştırma Laboratuvarında yapılarak yüksek lisans tezi olarak hazırlandı.

Tez konumu belirlenmesinde ve araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın hocam Doç. Dr. Aslı SEMİZ’e çok teşekkür ediyorum. Ayrıca laboratuvarının tüm imkânlarını sonuna kadar açan Prof. Dr. Alaattin ŞEN’e, teşekkür ediyorum.

Laboratuvar çalışmalarım esnasında benden manevi desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen ve her daim yardımcı olan doktora öğrencisi Hajarat Abilo ALFA’ya ve hocamız Dr. Özden ÖZGÜN ACAR’e şükranlarımı sunarım.

Tez jürilerim olan Doç. Dr. Metin KONUŞ’a ve Dr. Öğr. Üyesi Şükrü Gökhan ELÇİ’ye bilimsel katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında gerek maddi gerek manevi desteğini esirgemeyen ve bana koşulsuz güvenen değerli anneme, babama ve dayıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Kanser

Normal hücrelerde büyüme ve proliferasyon gerçekleştikten sonra, hücrenin çekirdeğinde bulunan DNA hasar gören hücreleri apoptoza yönlendirir. p53 ve Rb gibi genlerde meydana gelen hasarlar nedeniyle hücre kontrolsüz bir şekilde bölünür ve tümör oluşumuna neden olur. İyi huylu (selim) tümörlerde herhangi bir şüpheli durum bulunmazken, kötü huylu (habis) tümörler ise kanser tümörleridir. Kanser, vücudun belirli bir bölgesindeki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesi ve çoğalmasıdır. Biyolojik sinyallerinin bozulması ve farklılaşması tümör gelişimini kolaylaştırır ve olumsuz ruhsal faktörlerin yanı sıra doğal, fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörlerle de ilişkilidir (Lai 2019). Şekil 1’de sağlıklı hücre ve kanser hücresi farkları görsel olarak verildi.



**Şekil 1:** Sağlıklı hücreler ve kanser hücrelerinin farkı.

Kanser, karmaşık ve dinamik bir hastalıktır (Grizzi ve diğ. 2006). Belirli bir organda etkileşim halindeki birçok hücresel ve mikro-çevresel elementin dengesindeki bozulma olarak kabul edilmektedir (Basanta ve Anderson 2013). Kansere neden olan

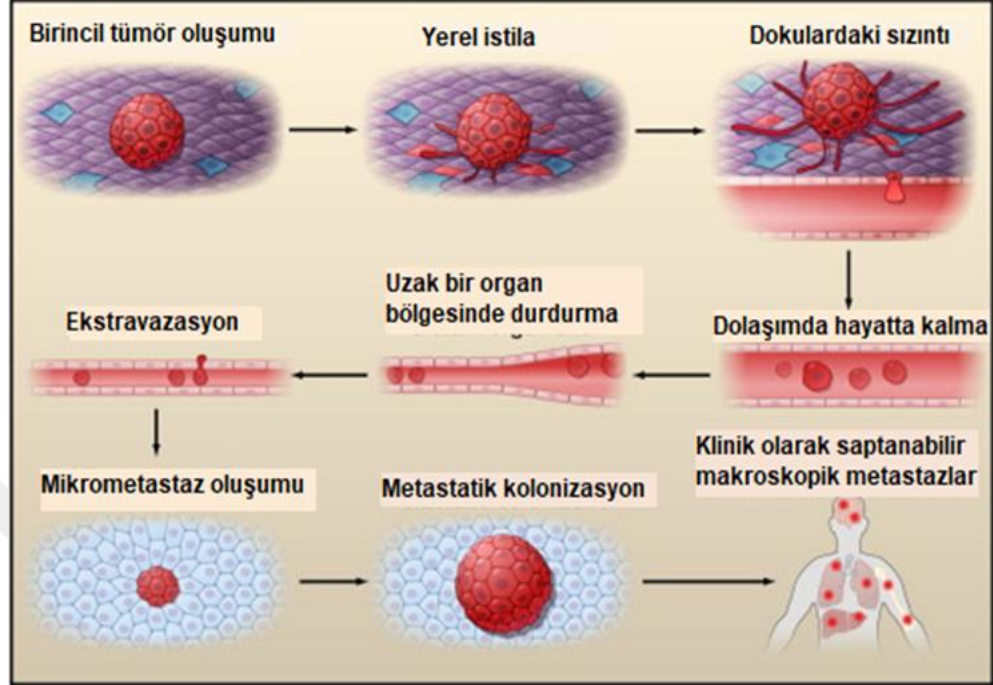
etkenlere uzun süre maruz kaldığında, hücrelerde bazı mutasyonlar gelişebilmektedir. Herhangi bir kanserde bulunan mutasyonların sayısı 10 ile yüz binler arasında değişebilir (Greaves ve Maley 2012). Mutasyonlar sonucunda normal hücre davranışını düzenleyen mekanizmalar bozulursa kanser hücrelerini oluşturur ve kanser hücreleri kontrolsüz olarak büyür, bölünür ve yayılır. Kanser hücreleri çoğalma üzerindeki olağan kontrollere karşı sağır olurlar ve üreme için kendi iç gündemlerini takip edip zamanla daha saldırgan hale gelirler, organizmanın bir bütün olarak hayatta kalması için gerekli olan doku ve organları bozduklarında ölümcül etkilere neden olabilirler (Weinberg 1996). Kanserlerin vücutta yıkıma yol açarken bağışıklık sistemine normal doku gibi görünerek aldatma yetenekleri de vardır (DeWeerd 2017).

İnsanlar, teknolojinin gelişmesi ile birlikte kanser yapıcı maddelere daha çok maruz kalmakta ve bunun sonucunda kanser hastalarının sayısını arttırmaktadır (Çevik ve Pirinçi 2017). Birçok kanser, kullanımda olan maddelere ve ilaçlara yanıt vermemekte veya bunlara karşı dirençli hale gelmektedir; bu nedenle kanser tedavisi için yeni ve daha yaratıcı yaklaşımlar gereklidir (Lujambio ve Lowe 2012). Çoğu insan farketmeden küçük tümörlere sahip olabilmektedir (Folkman ve Kalluri 2004).



**Şekil 2:** Kanserın kazanılmış yetenekleri (Hanahan ve Weinberg 2000).

Kanser hücreleri büyüme karşıtı sinyallere karşı duyarsızdırlar, apoptozdan kaçabilirler. Ayrıca kendi kendilerine yetebilme, sınırsız çoğalabilme ve metastaz yapabilme yeteneklerine sahiptirler (Şekil 2).



Şekil 3: İstila-metastaz çaglayani (Valastyan ve Weinberg 2011).

Kanserli bir tümörün oluştuğu esas bölge, birincil kanser olarak adlandırılır (Registries 2012). Kanser türlerinin gelişimi sırasında, birincil tümör kitleleri hareket ederek, bitişik dokuları istila eder ve ardından yeni koloniler oluşturmasıyla uzak bölgelere yayılarak öncü hücreler üretebilirler (Hanahan ve Weinberg 2000). Erken tanı yardımıyla kanserden kurtulanların sayısının artmasına rağmen, kemoterapi veya radyasyon tedavisine uzun süre maruz kalmasının yan etkileri, genetik ve davranışsal risk faktörlerinin kalıcı etkileri de birden fazla birincil kanser riskinin artmasına neden olmaktadır (Copur ve Manapuram 2019). Kanserli hücrelerin ikincil bir bölgeye yayılmasına ve kolonize etmesine ise Metastaz denir (Gupta ve Massagué 2006). Metastatik ilerleme sırasında, tümör hücreleri birincil büyüme bölgelerinden çıkar, sistemik olarak yer değiştirir ve hayatta kalmak ve uzak dokuların yabancı mikroçevrelerinde gelişmek için adapte olur (Valastyan ve Weinberg 2011) (Şekil 3). Alan kanserleşmesi ise vücuttaki somatik hücrelerin, malignite için gerekli olan tüm

fenotipleri değil de bazılarını taşıyan hücrelerle sonuçlanan evriminin bir sonucudur (Curtius ve diğ. 2018).

İnsanlığın genetik yapısı fazla değişmez, ancak çevresel etkilerin sonucunda zamanla bireysel kanser vakalarındaki değişiklikler ve bunların coğrafi farklılıkları büyük ölçüde gözlemlendi (Schulz 2005). İnsanların yaşamlarında büyük değişiklikler meydana getirerek kanseri önleyebileceklerine dair kanıtlar bulundu (Anand ve diğ. 2008). Hindistan'da, her yıl 11 milyondan fazla yeni kanser vakası kaydedilirken, bu rakam dünya çapında 14 milyonun üzerindedir (Roy ve diğ. 2016). Dünyadaki kanser vakalarının %60'ından fazlası Asya, Afrika ve Orta ve Güney Amerika'da meydana gelmektedir ayrıca bu bölgelerde kanser ölümlerin yaklaşık %70'inden sorumludur (Forman ve Ferlay 2014). Kanser teşhisi sonrasında yaşayan hastaların sıklığı, artan kanser insidansı, araştırma ve tedavisindeki ilerlemeler sayesinde hayatta kalma oranları artmaya devam etmektedir (Copur ve Manapuram 2019).

Dünya çapında, insan kanserlerinin %10-15'ine İnsan papilloma virüsü (HPV), İnsan T-lenfotropik virüsü-I (HTLV-I), Epstein-Barr virüsü (EBV), Hepatit C virüsü (HCV), Merkel hücreli polioma virüsü (MCV), Hepatit B virüsü (HBV) ve Kaposi sarkomu herpes virüsü (KSHV)'nün neden olduğu bulundu (Moore ve Chang 2010). Kanser vakalarının %5-10'u genetik kusurlara atfedilebilir iken, kalan %90-95'inin kökleri ise çevresel faktörler dahil kırmızı et, stres, sigara içmek, enfeksiyonlar, kızarmış yiyecekler, çevresel kirlenimler, alkol, obezite ve fiziksel hareketsizlik gibi yaşam tarzından kaynaklanmaktadır (Anand ve diğ. 2008). Fazla güneş ışığına maruz kalmak da kanserin nedenleri arasındadır (English ve diğ. 1997). Nikotin, en iyi bilinen bağımlılık yapan maddelerden biridir, tütün dumanına maruz kalmak da, kanserin en iyi bilinen en sık nedenidir ve aynı zamanda kanserden kaynaklanan ölümlerin tahminen %40'ına neden olur (DeVita ve Rosenberg 2012).

Etkili tedaviler, korunma ve erken tanı ile kanser hastalarının yaşam süresi artırılabilir (Cecen ve Bolaman 2010). Geleneksel olarak kanser tedavisinin amacı tüm kanserli hücreleri öldürmektir (Rahman ve diğ. 2011). Kanserli kitlenin cerrahi olarak çıkarılması, hormon tedavisi veya kemoterapi gibi kansere özel başka ilaç türlerinin kullanılması, radyasyon yöntemi ile tedavisinin uygulanması veya kanser hücrelerinin küçülüp kendi kendine kaybolması gibi tedavi yöntemlerinde biri gerçekleşmediği sürece kanser hücreleri büyümeye devam etmektedir (Roy ve diğ.

2016). Farklı doku ve hücre tiplerine sahip tümörler arasında ve aynı tümör tipine sahip bireyler arasında genetik ve fenotipik varyasyon gözlenir (Burrell ve diğ. 2013).

### **1.1.1 Kanser Çeşitleri**

Kanser çok fazla çeşidi bulunan bir hastalıktır. Kanserlerin kendine has özellikleri vardır ve bu çeşitli tümörleri üreten temel süreçler oldukça benzerlik göstermektedir (Weinberg 1996). Çok sayıda kanser türü olmasına rağmen bazı türler diğerlerine göre daha yaygındır. Bu türlere örnek olarak; akciğer kanseri, meme kanseri, beyin tümörleri, ağız kanseri, bağırsak kanseri, cilt kanseri, rahim ve rahim ağzı kanserleri, yumurtalık kanseri, prostat kanseri, mide kanseri, böbrek kanseri, karaciğer kanseri, pankreas kanseri, mesane kanseri ve gırtlak kanseri sayılabilir. Karaciğer kanseri Amerika Birleşik Devletleri'nde beşinci sıradadır ve hastalara genellikle ileri aşamalarda karaciğer kanseri teşhisi koyulmaktadır (Anwanwan ve diğ. 2020). Karaciğer kanseri Güney Kore'de ise en yaygın altıncı kanserdir (erkeklerde dördüncü ve kadınlarda altıncı) (Kim ve diğ. 2018).

### **1.1.2 Karaciğer Kanseri**

Karaciğer, fizyolojik, anatomik ve biyokimyasal rolü nedeniyle ilaçların metabolizmasında rol oynayan ve toksik maddelerin detoksifiye edildiği önemli bir organdır (Saral ve Kolaylı 2012). Karaciğerin görevleri arasında, vücudun enerji kaynaklarının kontrolü, enfeksiyonlarla mücadele, toksin ve ilaçların yıkılması ve atılımı, pıhtılaşma faktörleri ve bazı proteinlerin üretimi, safranın üretimi ve atılımı gibi önemli işlevler bulunmaktadır (Baran ve Karasu 2019).

Karaciğer kanseri dünya genelindeki en ölümcül malignitelerden biridir (Schulz 2005; Borie ve diğ. 2008; Wang ve diğ. 2015). Bu kanseri yönetmek oldukça zordur çünkü altta yatan karaciğer hastalıkları ve karaciğerin karmaşık anatomisidir (Orcutt ve diğ. 2018). Genelde erken döneminde, karaciğer kanserinin hiçbir belirtisi görülmez. Bu hastalar sağ üst kadranda dolgunluk, ağrı, sarılık, kilo kaybı, iştahsızlık, halsizlik gibi belirtiler ile başvurmaktadır (Vatansever ve Karasu 2019). Karaciğer kanseri tedavisinde antikanser ajanlar ve geleneksel tedaviler için tutarlı bir sonucun

olmaması, tümörün heterojenlik koşulu altında moleküler olarak hedef alınan yeni ilaçların faydalarının değerlendirilmesini gerektirir (Li ve diğ. 2016). En ölümcül kanserlerden biri olan karaciğer kanseri, obezite ile kuvvetli bir şekilde ilişkilidir (Siegel ve diğ. 2017).



**Şekil 4:** Normal karaciğer ve kanserli karaciğer.

Karaciğer kanseri diğer kronik hepatit enfeksiyonlarında olduğu gibi, nedeni bilinir, ama bazen karaciğer kanseri, altta yatan hastalığı olmayan insanlarda meydana gelir ve buna neyin sebep olduğu hala bilinmemektedir. Şekil 4’te sağlıklı ve kanserli karaciğer farklılıkları görsel olarak verildi. En yaygın görülen birincil karaciğer kanseri türü hepatosellüler karsinomdur (HSK). Karaciğer kanseri, dünyada kanser yüzünden olan ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir (Affo ve diğ. 2017; Hu ve diğ. 2019). Obezite, tip 2 diyabet, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı ve alkole bağlı karaciğer hastalığının yerini hepatosellüler karsinom almaktadır (Marengo ve diğ. 2016). Karaciğerde en yaygın görülen tümörler arasında bir organ veya dokudaki kanserin sıçramasıyla ortaya çıkan metastazlar da vardır.

İnsanlarda hepatosellüler karsinomun nedenleri Hepatit B virüsü (HBV) ve Hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonu olmasına rağmen, viral nedeni olmayan vakalar da görülmektedir (Block ve diğ. 2003). Çevresel, konakçı genetik ve viral faktörler, HBV veya HCV enfeksiyonu olan kişilerde HSK riskini etkileyebilmektedir (El-Serag 2012). HSK gelişimi, çok aşamalı bir süreçtir ve bu aşamalardan bazıları tümörün görünümü ve ilerlemesi ile ilgili olan konakçı gen ekspresyonundaki değişikliklerle ilişkilidir (Feitelson 2001). HSK kötü prognoza sahip bir malignite olmasına rağmen, HBV enfeksiyonuna karşı etkili bir aşının bulunması ve birçok ülkenin “Genişletilmiş Bağışıklama Programına” dahil edilmesi, HBV ile ilişkili HSK'nin nihai olarak ortadan

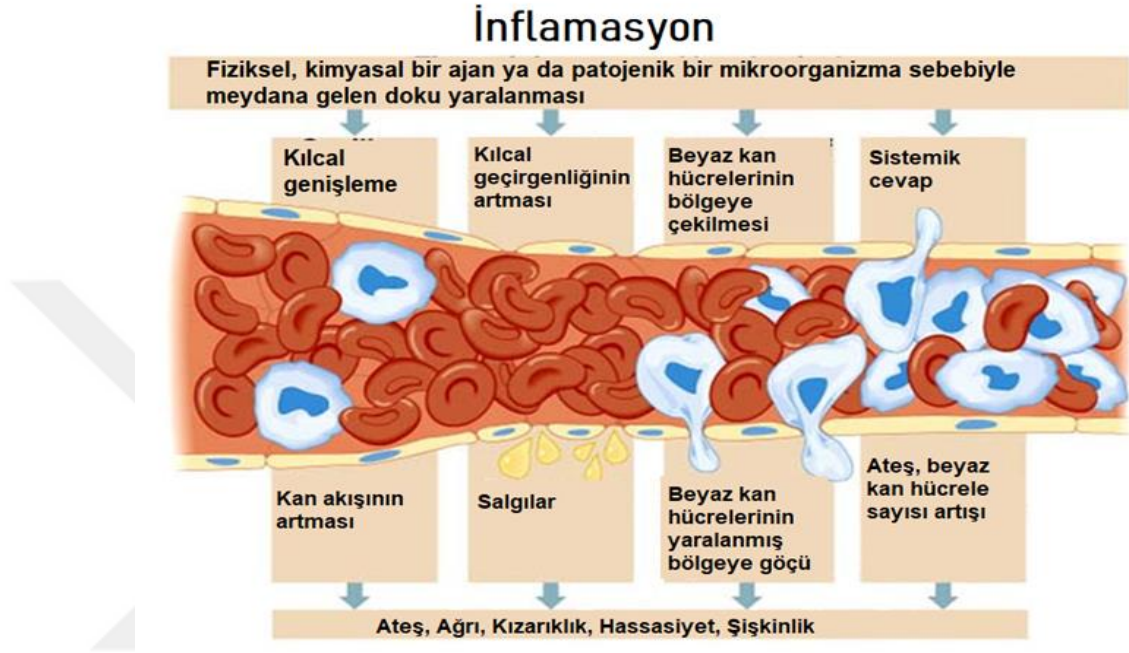
kaldırılması için iyi bir destek sağlamaktadır (Arbuthnot ve diğ. 2001). HSK'nın zaman eğilimlerindeki değişiklikleri, farklı yaşlar arasındaki varyasyonun, cinsiyete ve farklı bölgelerdeki ırka özgü oranların nedeni bir popülasyonda en yaygın olan hepatit virüslerindeki farklılıklar, yayılma zamanları ve virüslerin bulaştığı bireylerin yaşlarına bağlıdır (El-Serag 2012).

HepG2 hücreleri, hepatosellüler karsinoma tanısı konulmuş bir hastadan izole edilmiş ve karaciğer kanseri üzerine çalışmalarda çok sık kullanılan bir hücre hattıdır (İsan ve diğ. 2016). HepG2 hücreleri, hücre protein ekspresyonu açısından insan karaciğerine diğer hücre hatlarından daha fazla benzerlik göstermektedir (Choi ve diğ. 2015). HepG2, viral enfeksiyon olmamasından dolayı genellikle HSK modeli olarak kullanılır ve insan karaciğer karsinomunun saf bir hücre hattını temsil etmektedir (Costantini ve diğ. 2013).

## 1.2 İnflamasyon

Canlıların koruyucu bir stratejisi olan inflamasyon, enfeksiyon, doku hasarı gibi hücre homeostazın bütünlüğünü bozabilecek zararlı etkilere karşı, hücrenin hayatta kalmasını sağlayan bağışıklık sisteminin önemli bir yanıtıdır. İnflamasyonda meydana gelen vasküler damar yatağındaki çap değişiklikleri sonucu kan akımı artar. Sonra emigrasyon ile intersisyonel dokuya göç ederler (Şekil 5). İnflamasyon, kimyasal tahriş, hasar veya enfeksiyondan kaynaklanan yaralanmaya verilen fizyolojik yanıtıdır (Sethi ve diğ. 2008). Bu yanıtın altında birçok hücre bağlantı vardır ve bu hücreler dokudaki hasara ve buna sebep olan uyarıcılara (sitokinler, mediatörler, aktivatörler, vs.) karşı inhibitör, azaltıcı veya bloke edici yanıtlar oluşturmaktadır (Erol 2020). İnflamasyonun sürekli olarak devam etmesi ise doğal bir risktir, çünkü inflamasyon sağlıklı hücrelere ya da dokuya zarar verebilir ve nekroz inflamasyonunu tetikleyebilir (Nathan ve Ding 2010). Kontrolsüz olarak devam etmesine izin verildiğinde, iltihaplanma, otoinflamatuvar bozukluklara, nörodejeneratif gibi otoimmün hastalıklara veya kansere neden olabilir (Dinarello 2010). İnflamatuvar yanıt rahatsızlığın kaynağını ortadan kaldırmak veya tecrit etmek, hücre fizyolojinin korunmasında yararlı rolünün aksine, olumsuz koşullarının herhangi bir şekilde ortaya çıkmasını önlemek için inflamatuvar yanıtın sıkı kontrol altında tutulması

gerekmektedir (Medzhitov 2008). Venöz kan örneğinden dolaşımdaki hücrelerin incelenmesiyle inflamasyonun erken teşhisi saptanabilmektedir (Schmid-Schönbein 2006). Birincil karaciğer kanserinde, çoğunlukla hepatoselüler karsinomların %90'ından fazlası karaciğer hasarı ve inflamasyon nedeniyle ortaya çıktığı için, inflamasyonla ilişkili kanserin başlıca örneğidir (Bishayee 2014).



**Şekil 5:** İnflamasyon oluşumu.

İnflamasyon, hem akut hem de kronik olarak güçten düşüren hastalıkların çoğunda sık görülen olaylardan biridir ve günümüzde morbiditenin en önemli nedenidir (Patil ve diğ. 2019). Akut ve kronik inflamasyonda etkili birçok anti-inflamatuar ilaç geliştirildi ancak birçoğu yan etkilere neden olmaktadır. İki inflamasyon tipi vardır; akut inflamasyonla ilgili olanlar ve kronik inflamasyondan sorumlu olanlar (Feghali ve Wright 1997). Kısa süreli olup, asıl özelliği plazma protein ve sıvının eksüdasyonu, başlıca nötrofilik olmak üzere, lökositlerin emigrasyonu olayı akut tipi inflamasyonu gerçekleştirir (Sethi ve diğ. 2008). Akut inflamasyon tipinde zedeleyici ajana karşı ani gelişen erken bir yanıtıdır ve inflamasyon temelde, canlılığın bir savunma reaksiyonudur. Kronik inflamasyon, hücrelerin malign dönüşümünü ve karsinogenezi teşvik edebilen hücresel olayları tetikler (Landskron ve diğ. 2014; Galdiero ve diğ. 2018).

### 1.2.1 İnflamasyonda Rol Alan Sitokinler

Sitokinler, hücreler arasındaki iletişimi kolaylaştıran, antijene özgü efektör hücrelerin proliferasyonunu uyaran, sistematik inflamasyona aracılık eden küçük peptid proteinleridir (Neuman 2007). Sitokinler, hedef hücelere spesifik sitokin reseptör ligandlarından bağlanarak hücrede sinyal iletimini ve ikincil mesaj taşıyıcı yolları başlatır ve o hücrede miyotik bölünmeye sebep olan büyüme ve farklılaşma, göç, gen aktivasyonu ve apoptoz oluşumuna katkı sağlarlar. Vücudun savunma mekanizmasında rol almakta olan sitokinler, inflamatuvar hücrelerin iletişim ve etkileşiminden sorumludurlar, ayrıca cilt, bağ doku, sinir sistemi ve diğer organların somatik hücreleri arasında da iletişim sağlarlar. Sitokinler, lenfositler, makrofaj hücreler dahil çoğu hücre tipleri tarafından salınabilen polipeptitlerdir (Santos ve diğ. 2007). Sitokin reseptörlerinin en önemli görevi hücre dışı bir sinyali alarak hücre içi bir sinyale dönüştürmektir ve bu reseptörler transmembran proteinler olup hücre içi kısımları ile sinyal iletimini sağlar, ekstrasellüler kısımları ile özel sitokinleri bağlarlar. Karaciğer, böbrek ve akciğer gibi organların hücrelerinde sitokin bulunur (Dinarelo 2011).

Sitokin genel bir addır; diğer adları ise lenfositlerin ürettiği sitokinlere lenfokin, monositlerin ürettiği sitokinlere monokin, kemotaktik aktiviteleri olan sitokinlere kemokin ve lökositlerin ürettiği ve diğer lökositler üzerinde etkili olan sitokinlere interlökin denir (Zhang ve An 2007). Sitokin, kendini sentezleyen hücrede etkili olabilir (otokrin etki), yapıldığı hücrenin etrafındaki bir hücreyi etkileyebilir (parakrin etki) veya ender olarak dolaşıma karışıp ulaştığı uzaktaki bir hücreye etki edebilir (endokrin etki) (Knüpfer ve Preiß 2007). Sitokinlerin birçoğu *in vivo* parakrin etki gösterirken bazıları ekstrasellüler matriks elemanlarına bağlanabilmektedir. Ömürleri çok kısa olmakla birlikte üretimleri sıkı bir biçimde düzenlenmektedir.

Sitokinler, inflamasyon reaksiyonlarındaki rollerine göre anti-inflamatuvar ve pro-inflamatuvar sitokinler olarak gruplandırılmaktadır. IL-6 ve IL-1 $\beta$  gibi pro-inflamatuvar sitokinler inflamatuvar değişikliklerin oluşmasında, hızlı immün yanıtın ortaya çıkmasında rol almaktadırlar. Ayrıca IL-13 ve IL-10 gibi anti-inflamatuvar sitokinler, bazı sitokinlerin sentezini ve immün yanıtı baskılayabilirler. Pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinler arasındaki dengesizlik, inflamasyonun

çözülmesini engeller ve bunun yerine hastalığın sürmesine ve doku yıkımına yol açar (Neurath 2014). Aşırı artan pro-inflamatuar sitokinlerin kanser hücrelerinin büyümesini ve hayatta kalmasını desteklediği, anjiyogenezi desteklediği, DNA hasarını uyardığı ve hücre dışı matrisi yeniden şekillendirdiği bulundu ve böylece kanser hücrelerinin istilası ve göçü kolaylaştırılır (Jager ve diğ. 2008).

İnterlökin, ilk kez görüldükleri beyaz kan hücreleri lenfositlerince ekspresye edilen gizli sinyalleme molekülleri olan sitokinlerin bir grubu olarak bilinmektedir ve ismi, lenfositlerden lökin ve haberleşme anlamında inter-den gelir (Sahoo ve Im 2010). İnflamatuar ve immün hücreler arasındaki etkileşimlere interlökinler olarak adlandırılan proteinler büyük ölçüde aracılık eder, ayrıca hücre büyümesini, farklılaşmasını ve fonksiyonel aktivasyonu da teşvik edebilirler (Mizel 1989). Bağışıklık sisteminin geniş bir kısmı interlökinlere bağlıdır. İnterlökin ailesi makrofajlar ve T-lenfositlerden salınır. B-lenfositlerini olgunlaşmak ve farklılaşmak için uyarır. B lenfositlerin ve T lenfositlerin aktivitesini düzenlemektedirler. İnterlökinler virüslere karşı bağışıklık yanıtında, mikroplara karşı savunmada ve eklem inflamasyonunu tetiklemede önemli bir rol oynamaktadırlar (Bocci 1991).

İnterlökin-6, hem büyüme faktörüne sahiptir hem de iltihaplanma bölgesinde üretilir (Pedersen 2000). IL-6, sinir sistemi ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde görev almaktadır, ayrıca karaciğer rejenerasyonunda ve vücudun metabolik kontrolünde rol alan bir sitokindir (Rose-John 2012). IL-6 tarafından düzenlenen akut faz yanıtı, ateşin indüklenmesini ve karaciğerde sentezlenen hepsidin (demir düzenleyici peptit) salgılanmasını içermektedir (Cronstein 2007). IL-6, lenfoid olan ve lenfoid olmayan hücreler tarafından üretilen pleiotropik bir sitokindir, ayrıca inflamasyonu, hematopoezi, immün reaktivitesi ve ontogenezi düzenlemeye yardımcı olur (Song ve Kellum 2005).

IL-1, sistemik ve lokal inflamasyonda çok önemli bir sitokindir (Dinarello 2011). IL-1, yaralanma, immünolojik tehdit veya enfeksiyon sırasında en çok üretilen sitokinlerden biridir (Dinarello ve diğ. 1994). İnterlökin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), inflamatuvar sinyal yoluyla birçok immün hücrelerde indüklenir (Bent ve diğ. 2018). IL-1 $\beta$ , kan yoluyla taşınan ve inflamasyona uğrayan beyin hücreleri tarafından üretilen pro-inflamatuar bir sitokindir (Liu ve diğ. 1993).

Kemokinler, düşük moleküler ağırlıklı peptid gruplarıdır. Kemokinler çeşitli reseptörler ve bunlara eş olarak ligandlar bulundurmaktadır. Lökositlerin iltihaplanma bölgelerine alınması esas görevleridir, ancak tümör büyümesinde, anjiyogenezde ve metastazda da önemli rol oynarlar (Ding ve diğ. 2016). Kemokinler kanser ortamında anti-tümör bağışıklık tepkisindeki rolleri büyük ilgi çeken proteinlerdir ve bunu sebebi ise bağışıklık hücrelerinin farklılaşmasını, kemotaksiyi ve doku ekstrasvazasyonun indüklenmesinde önemli bir yeri olmasıdır (Tokunaga ve diğ. 2018).

CXCL9 insan malignitelerinin gelişiminde önemlidir (Wu ve diğ. 2016). CXCR3 ligandlarından biri olan CXCL9 karaciğer tarafından salgınır ve karaciğeri etkiler, dolayısıyla ekstrahepatik ve hepatik organ disfonksiyonuna katkıda bulunabilmektedir (Berres ve diğ. 2015). CXCL10, CXCR3 reseptörüne bağlanır ve eozinofiller, T hücreleri ve monositler gibi lökositlerin aktivasyonunu ve bağışıklık tepkilerini düzenler (Lee ve diğ. 2009). CXCL10, apoptoz indüksiyonu, kemotaksis, hücre büyümesinin düzenlenmesi ve anjiyostatik etkilerin aracılık edilmesinde yer almaktadır. Ayrıca, immün fonksiyon bozukluğu, kronik inflamasyon, bulaşıcı hastalıklar, tümör gelişimi, metastaz ve yayılma gibi hastalıklarla ilişkilidir. Hastalık şiddetine aracılık eden önemli bir biyolojik belirteç olarak CXCL10 tanımlanmakta ve birçok hastalık için prognostik bir gösterge olarak kullanılabilir (Liu ve diğ. 2011). CXCL10, doku hücreleri ve lökositler tarafından salgılanır, kemo-çekici olarak lenfositler için işlev görür (Van Den Borne ve diğ. 2014). CXCL11, inflamatuvar ve immün yanıtlarda yer alan küçük salgı proteinlerinden ve kemokin ailesinin üyelerinden biridir (Booth ve diğ. 2004). CXCL11 salınımı sistemik tümör koruyucu olarak bağışıklığın indüklenmesine katkıda bulunmaktadır (Hensbergen ve diğ. 2005).

CC kemokin ailesinin üyelerinden biri olan CCL2, makrofajların, monositlerin ve diğer inflamatuvar hücrelerin, CCR2'nin aktivasyonu yoluyla inflamasyon bölgelerine alınmasını düzenlemektedir (Charo ve Taubman 2004). CCL2, bağışıklık hücreleri, çeşitli malign hücreler ve stromal hücreler tarafından ifade edilir, ayrıca tümör progresyonu ve metastazında rolü bulunmaktadır (Li ve diğ. 2013). CCL2 stimülasyonu, tümör hücrelerinin büyümesi, hayatta kalması, istilası ve göçünde etkilidir (Zhang ve diğ. 2010). CCL2, kardiyometabolik, inflamatuvar ve bazı malign hastalıklar için umut verici bir ilaç hedefidir (Dommel ve Blüher 2021). CC kemokin ailesinin üyelerinden bir diğeri olan CCL5, T lenfositleri yaralanma bölgesine

ulaştığında ve spesifik antijenlerle aktive olduğunda, 3 veya 5 gün içerisinde büyük miktarlarda üretilmeye başlanır, bu da bağışıklık tepkisini korumakta ve güçlendirmektedir (Kawka ve diğ. 2014). CCL7, kemotaktik bir faktördür, çoklu hücre tiplerinde yaygın olarak ifade edilir ve bağışıklık hücrelerinin alınmasına aracılık etmek için reseptörlerine bağlanma yoluyla anti-inflamatuar yanıtlara katılabilmektedir (Liu ve diğ. 2018). CCL7'nin, monositler ve nötrofiller dahil olmak üzere birçok doğal immün hücre tipinin bakteriyel ve alerjik inflamasyon bölgelerine alınmasını teşvik ettiği bilinmektedir (Ford ve diğ. 2019).

Nükleer faktör kB (NF-κB), inflammatuar yanıtı düzenleyen çeşitli hücresel genlerin transkripsiyonunu kontrol eden bir transkripsiyon faktördür, bağışıklık ve iltihaplanma süreçlerinde önemlidir ve proteinleri kodlayan çeşitli genlerin ifadesini düzenler (O'Neill ve Kaltschmidt 1997). NF-κB, çoğalma, apoptoz ve göç gibi kanserin gelişmesinde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır (Dolcet ve diğ. 2005). NF-κB tarafından birçok pro-inflamatuar sitokin transkripsiyonel olarak düzenlenir ve bunların artan ekspresyonu, inflammatuar bağırsak hastalığının patogeneğinde rol oynamaktadır (Schottelius ve Baldwin 1999).

Tümör nekroz faktörü (TNF), fizyolojik ve patolojik süreçlere katkıda bulunan kritik bir sitokin olması dışında, normal fizyoloji, akut inflamasyon, kronik inflamasyon, otoimmün hastalıklar ve kansere bağlı inflamasyon görevinden dolayı, bilim insanlarının dikkatini çeken bir sitokindir (Chu 2013). TNF, esas olarak makrofajlar tarafından üretilir, fakat lenfoid hücreler, mast hücreleri, endotelial hücreler, fibroblastlar ve nöronal doku gibi çok çeşitli dokular tarafından da üretilebilir (Wajant ve diğ. 2003). TNF, enfeksiyon, yanıklar ve travma da önemli bir role sahiptir (Strieter ve diğ. 1993).

### **1.3 Pirolokinolin Kinon (PQQ)**

Kinolin, endüstriyel, sentetik, organik ve kimya alanlarındaki çok yönlü uygulamaları nedeniyle önemli bir heterosiklik bileşik haline gelmektedir (Weyesa ve Mulugeta 2020). Kinol'in anti-malaryal (sıtma karşıtı), anti-bakteriyel (bakteri karşıtı), anti-fungal (mantar karşıtı), anti-tümör (tümör karşıtı) ve anti-inflamatuar (iltahap

karşıtı) aktiviteye sahip olduğu bulundu (Marella ve diğ. 2013). Kinolin'in saf haliyle uygulanabilirliği oldukça sınırlıdır, ancak türevleri yaygın olarak kullanılmaktadır.

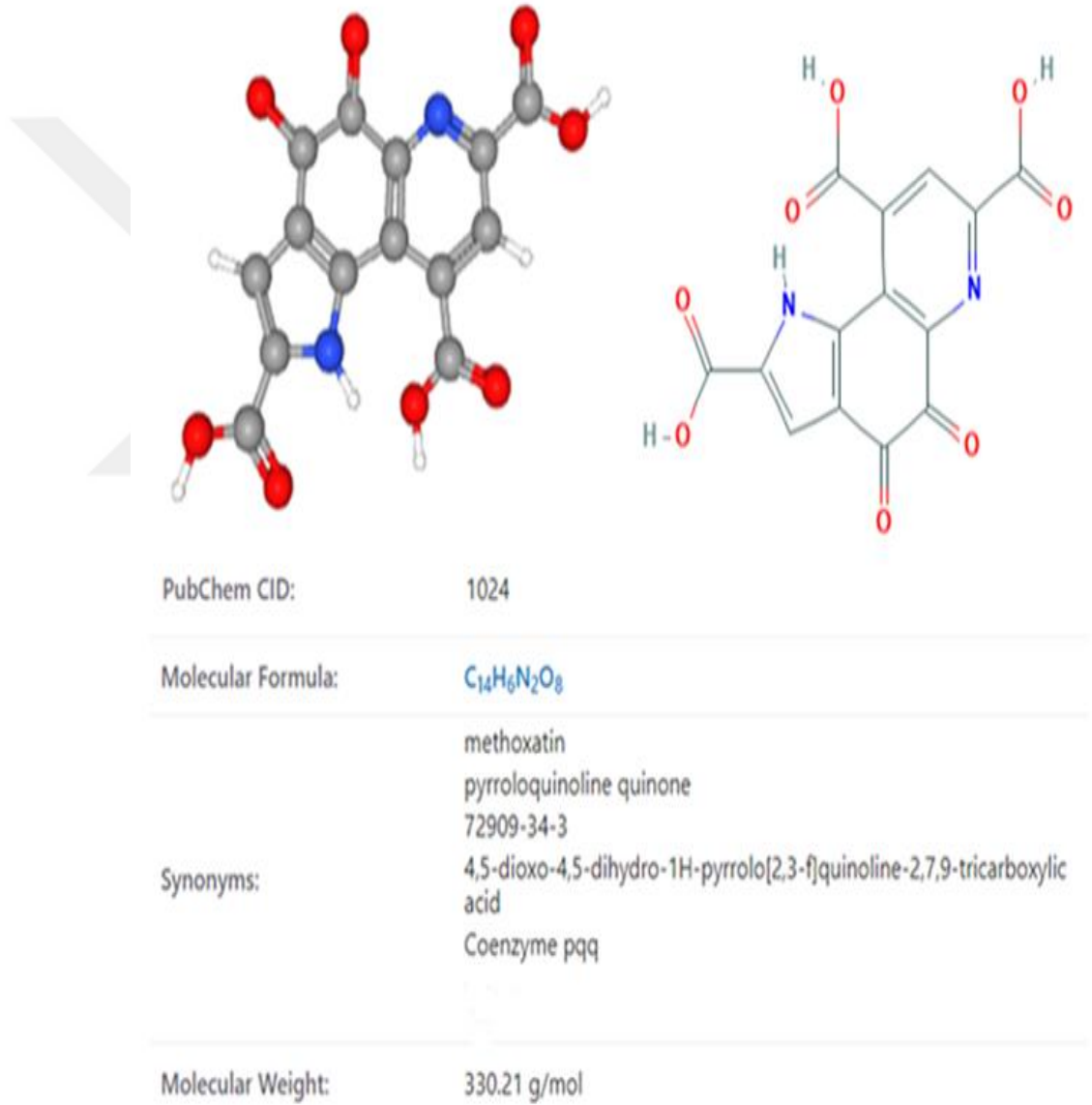
Pirolokinolin kinon (PQQ), 1964'te keşfedilen (Hauge 1964) ve kinoproteinler adı verilen enzim sınıfında bulunan temel bir besin maddesidir (Kong ve diğ. 2011). Antioksidatif ve yaşlanma önleyici etkilere sahip olan doğal bir antioksidandır (Hara ve diğ. 2007; Geng ve diğ. 2019). Güçlü immünosupresif etkiler gösterdiği rapor edildi (Liu ve diğ. 2016). Bakteriyel bir redoks koenzim ve radikal temizleyicidir (Kosano ve diğ. 1995). Çeşitli kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği bulundu (Wu ve diğ. 2018). Aynı zamanda PQQ güçlü bir bitki büyüme faktörüdür, hayvanlar ve insanlar üzerinde önemli etkilere sahiptir (Rucker ve diğ. 2009). PQQ, stres altındaki canlı hücrelerin büyümesini ve korunmasını desteklemek amacıyla besin ve vitamin olarak kullanılmaktadır (Misra ve diğ. 2012). PQQ, kalsiyum ve lantanid bağımlı alkol dehidrojenazların önemli bir kofaktörüdür ve 30 yılı aşkın bir süredir bilinmektedir (Lumpe ve diğ. 2020). PQQ, řu anda bir vitamin olarak sınıflandırılmıyor olsa bile memelilerde önemli bir besin kaynağı olarak gösterilmiştir (Akagawa ve diğ. 2016). PQQ'nun bilinen üretim yöntemlerinden; birisi, organik kimyasal sentez yöntemidir. Bu yöntemde kullanılan karmaşık adımlarla izomerler ve yan ürünler uzaklaştırılır. Bir diğer yöntem ise mikrobiyal fermentasyon yöntemidir. Bu, daha ekonomik ve çevre dostu bir yöntemdir.

PQQ, hayvanlarda nörolojik fonksiyonları ve enerjiyle ilgili metabolizmayı etkiler, aynı zamanda etki mekanizması hücre sinyal yolları ve mitokondriyal işlev ile etkileşimlerinde önemli bir yer almaktadır (Harris ve diğ. 2013). Kemirgenlerde yapılan beslenme çalışmalarında, PQQ eksikliğinin anormal üreme performansı, büyüme bozukluğu ve bağışıklık bozukluğu dahil çeşitli sistemik sorunlar sergilediğini ortaya koyuldu (Akagawa ve diğ. 2016). Mitokondriyal biyogenez üzerinde etkili bir faktördür (Augustyniak ve diğ. 2017). Olası bir anti-melanojenik ajandır ve hiperpigmentasyon bozukluklarına karşı etkili olabileceği gözlemlenmektedir (Sato ve diğ. 2009).

Gıdalarda bulunması, antioksidan özellikleri ve büyümeyi teşvik eden bir faktör olması büyük bir ilgi çekmiştir (Stites ve diğ. 2000). Hayvanlarda sadece PQQ kullanan enzimler tanımlanmaktadır ancak nanomolar miktarlarda PQQ'nun oral

yoldan takviyesi, B ve T hücrelerinin mitojenlere tepkisini arttırdığı ve kemirgenlerde nörolojik işlevi ve üreme sorununu iyileştirdiği görülmüştür (Stites ve diğ. 2000).

PQQ'nun, mitokondriyal fonksiyonları düzenleyerek rotenon kaynaklı Parkinson Hastalığı modellerinde mitokondriyal disfonksiyonu önleyebileceği öne sürüldü (Zhang ve diğ. 2020). PQQ tedavisinin, aşırı basınç yüklemesinin neden olduğu kardiyak yeniden şekillenmeyi ve hücre hipertrofisini iyileştirdiği bildirildi (Xu ve diğ. 2020). Şekil 6'da PQQ'nun yapısı gösterilmektedir.



**Şekil 6:** Pirolokinolin kinon'un kristal yapısı, moleküler formülü, sembolü ve moleküler ağırlığı (PubChem).

PQQ'nun oksidatif stresi azaltarak kalpte, beyinde ve karaciğerde oksidatif stres kaynaklı hücre hasarı üzerinde koruyucu etkiler gösterdiği öne sürüldü (He ve diğ. 2003). PQQ takviyesinin, oksidatif stresi, DNA hasarını, hücre yaşlanmasını ve yaşlanma ile ilişkili salgı fenotipinin gelişimini inhibe ederek ön çapraz bağ transeksiyonu kaynaklı tressin osteoartritini önleyebileceği gösterildi (Qin ve diğ. 2019). PQQ, temel bir besin maddesi ve antioksidan olarak işlev gören doğal olarak oluşan bir redoks eş faktörüdür ve güçlü anti-inflamatuar etkiler gösterdiği bildirildi (Wen ve diğ. 2020).

### 1.3.1 Pirolokinolin Kinon ve Kanser

Anti-kanser, anti-nörolojik, anti-dejeneratif ve anti-melanojenik ajan olarak kullanılan PQQ, antioksidan doğası gereği serbest radikalleri temizlemektedir (Naveed ve diğ. 2016). Yapılan bir çalışmada, PQQ tarafından indüklenen A549, Neuro-2A ve HCC-LM3 hücrelerinde apoptozu, hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesine ve ATP seviyelerindeki düşüşe neden olmaktadır (Min ve diğ. 2014). Başka bir çalışmada, PQQ tarafından indüklenen SW1353 hücrelerinin apoptozunun, hücre içi ROS birikimine atfedilebilecek konsantrasyona ve zamana bağlı bir şekilde arttığını göstermektedir ve *in vivo* deneylerde, PQQ hücre proliferasyonunu inhibe ederek, apoptozu teşvik ettiği ve ROS seviyelerini arttırdığından dolayı nakledilen hücrelerde DNA hasarına yol açtığı gösterildi (Wen ve diğ. 2018). PQQ kimyasal yapısına dayalı olarak, indol-2-karboksilat türevlerinin yeni bir sınıfı tasarlanarak sentezlendi ve bazı türevlerin HepG2, A549 ve MCF7 hücrelerinde önemli antiproliferatif aktivite sergilediğini gösterdi (Ji ve diğ. 2014). PQQ'nun kondrosarkomlu farelerde tümör büyümesini inhibe ettiği gözlemlenmekte, insan kondrosarkom hücrelerinde mitokondriyal kaspaz bağımlı yolları aktive ederek apoptozu indüklediğini bildirilmektedir (Wu ve diğ. 2018). PQQ, insan promonositik lösemi U937 hücrelerinde apoptozu indüklemekte ve bu, ana hücresele antioksidan glutasyonun tükenmesi ve hücre içi reaktif oksijen türlerin (ROS) artışına sebep olmaktadır (Shankar ve diğ. 2010).

#### 1.4 Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışmasında, insanların takviye olarak kullandıkları PQQ bileşiminin karaciğer kanseri hücre hattında (HepG2) inflamatuvar etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. PQQ, ticari olarak satılmakta ve insanlar tarafından günlük 60  $\mu\text{M}$  dozda tüketilmektedir. Literatürde, hücre kültürü çalışmalarında 10  $\mu\text{M}$  ve 30  $\mu\text{M}$  aralığında PQQ uygulandığı görülmektedir (Sato ve diğ. 2009; Zhang ve diğ. 2015). Çalışmamızda sitotoksikite deneyi sonucunda PQQ bileşiminin EC05 ve EC10 (5,566  $\mu\text{M}$  ve 13,484  $\mu\text{M}$ ) dozları belirlendi ve belirlenen dozların hücrelere uygulanması ile bu dozların karaciğer kanserinde (HepG2) inflamasyon yolağına olan etkisinin araştırılması hedeflendi. Bu bağlamda, HepG2 hücre hattında inflamasyon yolağında rol alan interlökinlerin ve kemokinlerin ekspresyonu incelendi ve literatüre bu konuda yeni bilgilerin kazandırılması amaçlandı.

## 2. YÖNTEM

### 2.1 MATERYAL

#### 2.1.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada, Kuru Isı Bloğu (Biosan TDB-100), Santrifüj (Sigma 1-14), Otoklav (Hiclave HVE-50), PZR Cihazı (Bioneer), AgaroZ Jel Elektroforez Aparatı (Thermo EC320), UV Transilluminatör, CO<sub>2</sub> İnkübatörü (Nuaire), Klasik ve Hassas Terazı (Precisa XB 220A), Mikrodalga Fırın (SHOV M7017-P), Vorteks (DragonLab MX-F), Güç Kaynağı (Thermo, EC-250-90), Olympus Ters Mikroskop (Olympus CX31), MikropIaka Okuyucu Spektrometre (Thermo Scientific Multiskan GO), Laminar Flow (Nuare Biological Safety Cabinets) (Class II), Hücre Sayıcı (Nexcellom), -80°C Ultralow Freezer (Nuaire), Human Power Scholar -UV Saf Su Sistemleri kullanıldı.

#### 2.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmamızda kullandığımız kimyasallar; Thiazol Blue Tetrazolium Bromide, Tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich, T4049), Phosphate Buffered Saline (PBS), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), L- Glutamin (Sigma-G8540), Fetal Bovine Serumu (Sigma-Aldrich, F9665), Tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich, T4049), Penisilin- Streptomisin (Sigma-Aldrich, P4333), Ethanol (Riedel, 071029), EDTA (Sigma, 03620), Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma, D4550), Kristal Viyole (Fluka,61135), GM SYBR qPCR Kit, EasyScript Plus cDNA Sentez Kiti ve Qiagen RNasy Plus Mini Kitidir.

## 2.2 METOD

### 2.2.1 Hücre Kültürü Çalışmaları

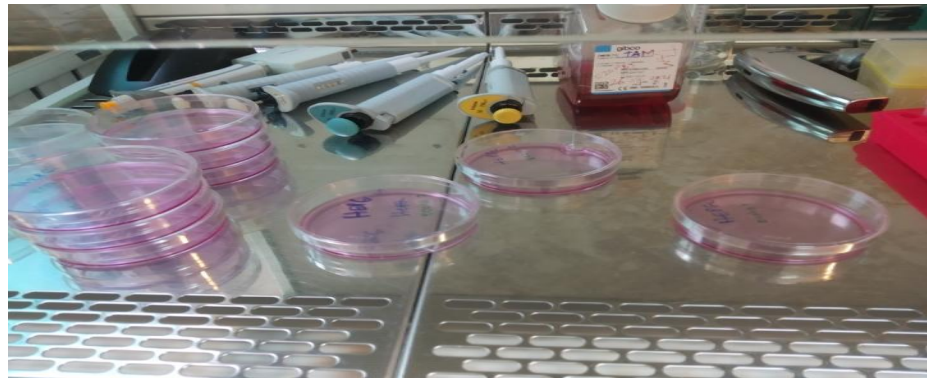
#### 2.2.1.1 Besiyeri Hazırlanması, Hücre Büyütmesi ve Etken Madde

Bu çalışmada PQQ'nun insan karaciğer kanseri hücre hattı HepG2 üzerinde inflamatuvar etkileri incelendi. Çalışmada kullanılacak olan PQQ, ticari olarak satın alındı (Şekil 7).



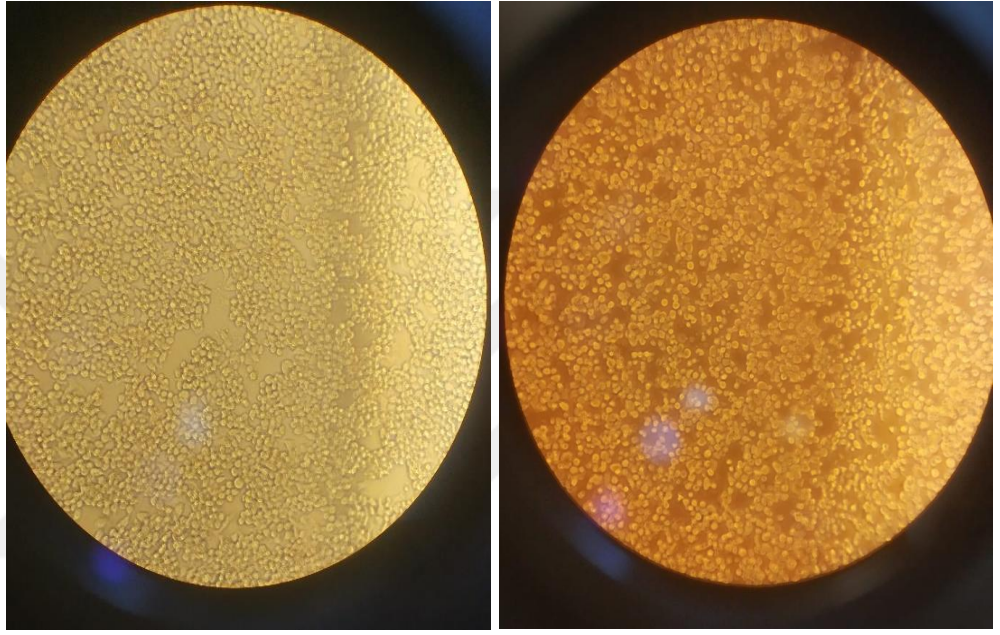
**Şekil 7:** 4,5-Dioxo-4,5-dihydro-1H-pyrrolo[2,3-f]quinoline-2, 7, 9-tricarboxylic acid (PQQ).

HepG2 hücre hattı için %1 penisilin ve %10 fetal bovine serum (FBS) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyeri hazırlandı. Derin dondurucuda (-80°C) saklanan hücreler çıkartılıp oda sıcaklığında çözülerek santrifüj edildi ve pelet besiyeri ile çözülüp petrilere ekildi (Şekil 8).



**Şekil 8:** HepG2 hücrelerinin petrilere ekilmesi.

Hücrelerin üzerine 10 ml DMEM besiyer eklenerek 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren ortamda 24 saat inkübatörde bekletildi ve hücrelerin büyümeleri sağlandı (Şekil 9). Ortamdaki DMSO'dan kurtarmak için hücrelerin besiyeri değiştirildi. Yirmi dört saatte bir canlılıkları ve çoğalma hızları kontrol edildi. Yeterli hücre yoğunluğuna sahip olana kadar gün aşırı besiyeri değişikli yapıldı. Yeterli hücre yoğunluğunda petrilerin besiyeri çekilerek boşaltıldı. Ardından, hücreler Ca<sup>++</sup> ve Mg<sup>++</sup> tuzları içermeyen steril PBS (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi) ile yıkandı.



**Şekil 9:** HepG2 hücre hattının mikroskoptaki görüntüsü.

#### **2.2.1.2 Hücrelerin Pasajı**

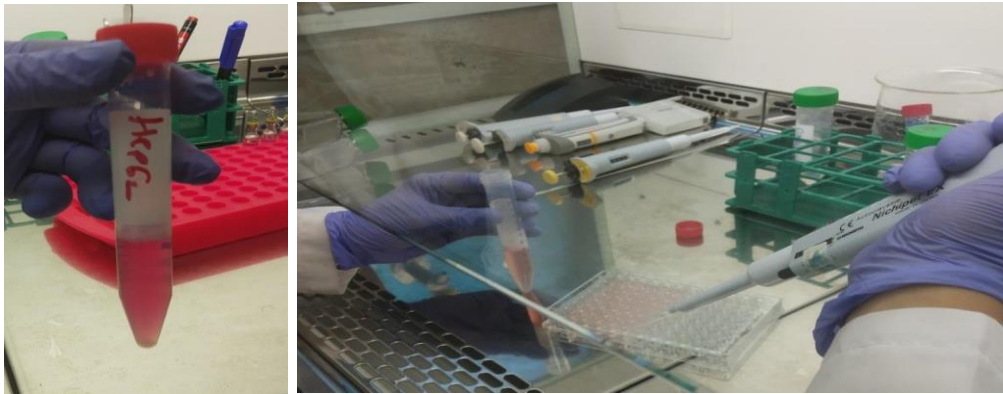
Tek tabaka haline gelen hücrelerin pasajları yapıldı. Bu işlemi gerçekleştirmek için ilk başta eski besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından, hücrelere 1 ml %0,25'lik tripsin eklenerek, 5 dak inkübatörde bekletildi ve hücrelerin petri tabakasından ayrılmaları sağlandı. Tripsini inhibe etmek için üzerine 2 ml DMEM eklendi ve hücreler steril santrifüj tüpüne alındı. Hücreler 2500 rpm'de 5 dak santrifüj edildi. Ardından, süpernatant uzaklaştırıldı ve pelete 1 ml besiyeri eklendi (Şekil 10). Ependorfta hazırlanan tripan mavisi (1:1000 sulandırıldı) ve hücre karıştırıldı. Hücre boya karışımı Thoma lamına koyuldu ve mikroskopta hücre sayımı yapıldı.



**Şekil 10:** Santrifüj cihazı ve HepG2 hücrelerinin santrifüj sonrası peleti.

### 2.2.1.3 Sitotoksosite Çalışmaları

Çalışmamızda kullanılan hücrelerinin büyüme ve gelişmesi daha önceki bölümde anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. PQQ sitotoksosite deneyleri için steril saf su içerisinde çözüldü ve HepG2 hücrelerinde canlılığa olan etkilerinin belirlenebilmesi için sitotoksosite testi yapıldı. Hücreler tripsin ile kaldırıldı ve tripsini inhibe etmek için koyulan tripsinin 2 katı besiyeri eklendi. Ardından, hücreler 15 ml'lik steril Falcon tüplere alınıp, 2500 rpm'de 5 dak santrifüj edildi. Ondan sonra istenilen hücre sayısı hesaplanıp 96 kuyulu plakalara ekim yapıldı (Şekil 11).

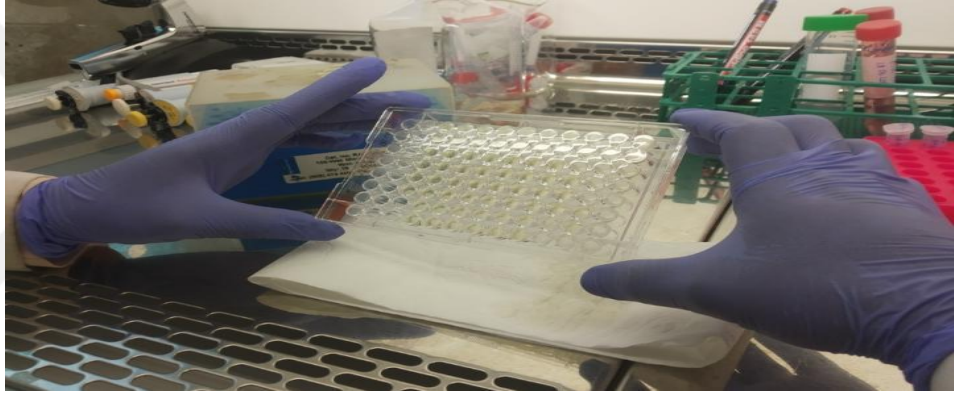


**Şekil 11:** Santrifüj sonrası sayılan hücrelerin 96 kuyulu plakaya ekilmesi.

Santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı ve pelet 1 ml besiyeri eklenerek çözüldü. Ependorfta hazırlanan tripan mavisi (1:1000 sulandırıldı) ve hücre karıştırıldı. Hücre boya karışımı Thoma lamına koyuldu ve mikroskopta hücre sayımı yapıldı. Hücreler  $4 \times 10^3$  olacak şekilde hesaplanıp 96 kuyulu plakalara ekildi ve 24

saat hücrelerin plakaya yapışması için %5'lik CO<sub>2</sub> inkübatöründe, %95 nem ortamında 37°C'de bekletildi.

Plakaya (4 x 10<sup>3</sup> hücre/kuyucuk) 24 saat önce ekilmiş olan hücrelerin 24 saat sonra eski besiyerleri çekilip hücrelerin üzerine farklı konsantrasyonlarda PQQ uygulandı. Hücrelerin indüklenmesini sağlamak amacıyla hücreler gece boyunca %5'lik CO<sub>2</sub> inkübatöründe, %95 nem ortamında 37°C'de inkübe edildi. Ardından, 96 kuyulu plakadaki besiyeri uzaklaştırıldı (Şekil 12) ve her kuyucuğa 100 µl kristal viyole boyası (% 0,5) eklendi ve 10 dak oda sıcaklığında bekledi. Hücrelerden boyayı uzaklaştırmak için kuyucuklar dikkatli bir şekilde su ile yıkandı. Her kuyucuğa 0,1 M %50 etanol içeren Na-Sitrat'tan (pH 4,2) 100 µl eklendi ve 100 rpm'de 10 dak çalkalandı.



**Şekil 12:** 96 kuyulu plakadaki besiyerinin uzaklaştırılması.

Çalkalama işlemi bittikten sonra 630 nm'de plaka okuyucuda ölçüldü (Şekil 13). Değişik konsantrasyondaki PQQ ile muamele ettiğimiz gruplar ve kontrol grupları arasındaki farklar karşılaştırarak, PQQ'nun hücre canlılığına olan etkisi saptandı.



**Şekil 13:** 630 nm'de plaka okuyucuda ölçüm.

#### 2.2.1.4 Hücrelere Bileşiklerin Uygulanması

HepG2 hücrelerinde PQQ için  $EC_{05}$  ve  $EC_{10}$  değerleri sitotoksosite deneyi ile belirlendi ve 1  $\mu$ M ile 200  $\mu$ M arasında 10 farklı doz konsantrasyonu hücrelere uygulandı. Genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla uygun ve steril şartlarda petrilere  $10^6$  hücre ekildi ve gece boyunca  $37^{\circ}C$ 'de, %5  $CO_2$  ve %95 nem içeren ortamda inkübe edildi. Hücrelere 1  $\mu$ M ile 200  $\mu$ M arasında 10 farklı dozda PQQ uygulandı ve 24 saat'lik inkübasyondan sonra RNA izolasyonu yapmak için hücreler toplandı.

#### 2.2.2 RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu yapmak için Qiazol Lysis Reagent ile hücreler toplandı. Üretici firmanın talimatları dikkate alınarak ve laboratuvarında optimize edilerek 'QIAGEN RNeasy Plus Universal' kit ile hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirildi (Şekil 14).



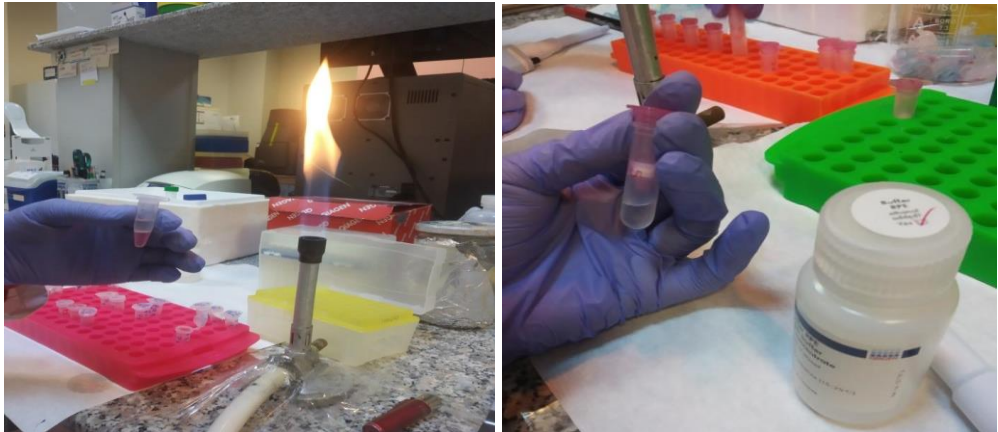
Şekil 14: Hücrelerden RNA izolasyonu.

Besiyeri hücrelerden uzaklaştırılarak iki defa PBS ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından 500  $\mu$ l trizol reaktifi eklendi ve hücre kazıyıcı kullanılarak lizis tamponu hücreler üzerine yayıldı, ardından toplanıp ependorfa alındı. Toplanan hücreler oda sıcaklığında 5 dak'yı geçmeden inkübe edildi. Ardından üzerine 100  $\mu$ l gDNA eliminasyon solüsyonu eklendi ve 15 sn karıştırıldı (Şekil 15).



**Şekil 15:** Hücrelerin toplanması.

Sonrasında kloroformdan 180  $\mu$ l eklenerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 3 dak inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra, +4°C’de, 12.000 xg 30 dak santrifüj edilerek üst faz alındı ve steril endorf tüpe aktarıldı. Alınan üst faza aynı miktarda %70 etanol eklendi. Karıştırılarak ‘RNeasy mini spin’kolona aktarıldı ve 30 sn 9.000 xg’de santrifüj yapıldı (Şekil 16). Alta geçen kısım döküldü ve kolonun üzerine 700  $\mu$ l yıkama tamponu ‘RWT’ eklenerek 30 sn 9.000 xg’de santrifüj edildi. Yine alta geçen kısım döküldü. Kolona 500  $\mu$ l yıkama tamponu ‘RPE’ eklendi ve 30 sn 9.000 xg’de santrifüj yapıldı. Alta geçen kısım döküldü. Kolon üzerine yeniden RPE tamponu ekleyerek 2 dak 30 sn 9.000 xg’de santrifüj edildi ve alta geçen kısım döküldü. Ardından, kolon yeni tüpe alınarak üzerine 40  $\mu$ l RNAz içermeyen saf su eklendi. Bir dak 15 sn 9.000 xg’de santrifüj edildikten sonra elde edilen RNA’ların saflığını belirlemek için agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Nano Drop cihazıyla hem saflığı hem de konsantrasyonları belirlendi.



**Şekil 16:** Üç faza ayrılma ve RNeasy mini spin kolona eklenmesi.

RNA'nın saflığını değerlendirirken A260/A280 ve A260/A230 oranlarına bakıldı. A260/A280 oranının yaklaşık olarak 1,9 ve A260/A230 oranının ise 1,8 ile 2,2 arasında olması izole edilen RNA'nın saf olduğunu gösterir.

### **2.2.3 Agaroz Jel Elektroforezi ile RNA Görüntülenmesi**

İzole edilen RNA'lar yatay agaroz jel elektroforezinde yürütülmek üzere, %1'lik agaroz jel Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tamponunda hazırlandı. Agaroz mikrodalga fırında ısıtılarak çözüldü. Tam çözünme sağlandıktan sonra agaroz solüsyonu soğutuldu ve üzerine 3 µl SafeView eklendi. Bu karışım elektroforez tablasına dökülerek katı hale gelmesi için bekletildi. Katılaştıran jel, RNA'nın (-) kutuptan (+) kutuba yürüyebilmesi için elektroforezin (-) kutbuna doğru yerleştirildi. Elektroforez tank seviyesi 1X TAE tamponuyla dolduruldu. Bu tampon RNA'nın jel üzerinde yürütmesini sağlamaktadır. Elde edilen RNA'dan 3 µl, 5 µl steril su, 2 µl yürütme boyası karıştırılarak jel üzerindeki kuyucuklara mikropipet yardımıyla dikkatli şekilde yüklemesi yapıldı. Elektroforez güç kaynağına bağlandı ve 90 volt, 500 mA'de 50 dak yürütüldü. Yürütme bitince jel UV transilluminatörde incelenip görüntüsü alındı.

### **2.2.4 cDNA Sentezi**

Nanodrop cihazıyla RNA konsantrasyonları belirlendikten sonra total RNA'lardan cDNA sentez kiti (ABM) ile cDNA'lar sentezlendi. PZR tüpü içerisine 2,5 µg total RNA, kit içerisindeki oligo d(T) (1 µl), dNTP çözeltisi (1 µl) ve RNAz içermeyen su eklenerek karıştırıldı. Karışım, kit içeriğinde yer alan reaksiyon tamponu (4 µl), RNAz inhibitörü (0,5 µl) ve 'EasyScriptRTase' enzimi (1 µl) ile birleştirildi. Tüpteki son hacim 20 µl oldu ve 50°C'de 60 dak inkübe edilerek cDNA sentezlendi. Sentezlenen cDNA'lar RT-PZR yapılana kadar -20°C'de saklandı. cDNA sentez karışımı için uygulanan prosedür Tablo 1'de verilmektedir.

**Tablo 1:** cDNA sentez karışımı ve prosedürü

	<b>Hacim</b>	<b>Son Hacim</b>
Total RNA	1 µl	2 µg/ml
Oligo d(T)	1 µl	0,5 µM
dNTP karışımı (10 nM)	1 µl	500 µM
RNAz içermeyen su	Değişken	14,5 µl
5X RT tamponu	4 µl	1 X
Ribonükleaz inhibitörü (40 U/µl)	0,5 µl	20 U/rxn
Reverse Transkriptaz enzimi (200 U/µl)	1 µl	200 U/rxn
<b>Toplam Hacim</b>	<b>20 µl</b>	
Karışım, sentez için 60 dak inkübatörde bekletilir.		



**Şekil 17:** cDNA sentezi sonrası RT-PZR cihazına yerleştirme.

### 2.2.5 Gerçek Zamanlı PZR

Üretici firmanın talimatlarına göre Gerçek zamanlı PZR reaksiyonları GM SYBR qPZR Kit'i kullanılarak yapıldı (Şekil 17). Laboratuvarımızda uygun olarak primer ve cDNA miktarları optimize edildi. Sonuçlar, 'Exicycler3' programı kullanılarak "housekeeping" gen  $\beta$ -aktin'e göre normalize edildi. Deneylerde kullanılan, PZR uygulama koşulları Tablo 2'de, döngü, sıcaklık ve süreler Tablo 3'de, primer listesi ise Tablo 4'de verildi.

**Tablo 2:** RT-PZR koşulları

Bileşenler	Reaksiyon Karışımı
GM SYBR qPZR Mix	12,5 µl
İleri Primer (10 pm)	0,6 µl
Geri Primer (10 pm)	0,6 µl
cDNA (1: 3 seyreltilmiş)	5 µl
dH <sub>2</sub> O	6,3 µl

**Tablo 3:** PZR sıcaklık, döngü ve zamanları

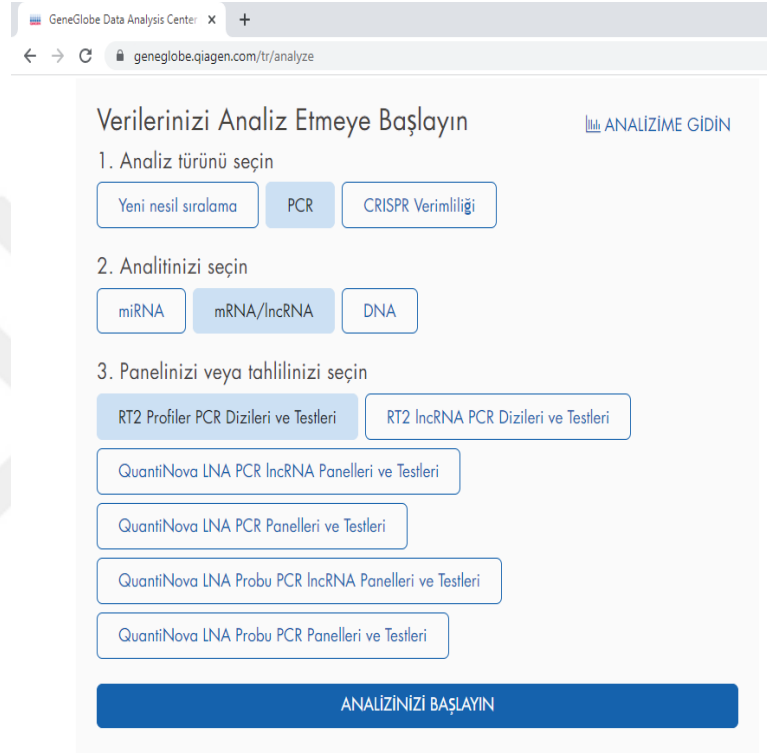
Döngü	Sıcaklık	Süre
Ön Denatürasyon	95°C	5 dak
Denatürasyon	95°C	20 sn
Yapışma	X°C	20 sn
Uzama	72°C	25 sn
Döngü Sayısı	40 Döngü	

**Tablo 4:** Çalışmada kullanılan primer dizileri

Primer	İleri Primer (5'→3')	Geri Primer (5'→3')
<b>ACTB</b>	<i>GCCGCCAGCTCACCAT</i>	<i>GATGCCTCTCTTGCTCTGGG</i>
<b>NF-κB</b>	<i>TCGCGCTGAGTATAAAAGCC</i>	<i>GGCAAAGTTTCGTGGATGCG</i>
<b>TNF</b>	<i>TGGGATCATTGCCCTGTGAG</i>	<i>GGTGTCTGAAGGAGGGGGTA</i>
<b>IL-1β</b>	<i>ACCTGTCCTGCGTGTGAAA</i>	<i>AGACGGGCATGTTTTCTGCT</i>
<b>IL-6</b>	<i>ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG</i>	<i>CCATCTTTGGAAGGTTCAAGTTG</i>
<b>CCL2</b>	<i>TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA</i>	<i>GCATTAGCTTCAGATTACGGGT</i>
<b>CCL5</b>	<i>CAGTCGTCTTTGTCACCCGA</i>	<i>AGAGCAAGCAGAAACAGGCA</i>
<b>CCL7</b>	<i>AAGATCCCCAAGAGGAATCTCAAG</i>	<i>CAGACTTCCATGCCCTTCTTT</i>
<b>CXCL9</b>	<i>GGCTCTTTCTGGCTACTCC</i>	<i>TCCCTGGTCCCTGTAGTGAG</i>
<b>CXCL10</b>	<i>ACCAGAGGGGAGCAAAATCG</i>	<i>GGAAGTGATGGGAGAGGCAG</i>
<b>CXCL11</b>	<i>GACGCTGTCTTTGCATAGGC</i>	<i>AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG</i>

## 2.2.6 İstatistiksel Analiz

Elde edilen sonuçlar her biri veri için Ortalama  $\pm$  Standart Sapma olarak ifade edildi. qRT-PZR veri analizleri Qiagen firmasının ücretsiz olarak sağladığı RT2 Profiller PCR Array Data Analysis v3.5 ile web üzerinden çevrim içi gerçekleştirildi (Şekil 18). (\*) ile işaretlenen genler  $P < 0.05$  düzeyinde anlamlı olarak farklılık gösteren genlerdir.



The screenshot shows the GeneGlobe Data Analysis Center interface. The browser address bar displays "geneglobe.qiagen.com/tr/analyze". The main heading is "Verilerinizi Analiz Etmeye Başlayın" (Start Analyzing Your Data). Below this, there are three steps for selection:

- 1. Analiz türünü seçin** (Select analysis type):
  - Buttons: Yeni nesil sıralama, PCR, CRISPR Verimliliği
- 2. Analitinizi seçin** (Select your analysis):
  - Buttons: miRNA, mRNA/lncRNA, DNA
- 3. Panelinizi veya tahlilinizi seçin** (Select your panel or analysis):
  - Buttons: RT2 Profiler PCR Dizileri ve Testleri, RT2 lncRNA PCR Dizileri ve Testleri, QuantiNova LNA PCR lncRNA Panelleri ve Testleri, QuantiNova LNA PCR Panelleri ve Testleri, QuantiNova LNA Probu PCR lncRNA Panelleri ve Testleri, QuantiNova LNA Probu PCR Panelleri ve Testleri

At the bottom, there is a large blue button labeled "ANALİZİNİZİ BAŞLAYIN" (START YOUR ANALYSIS).

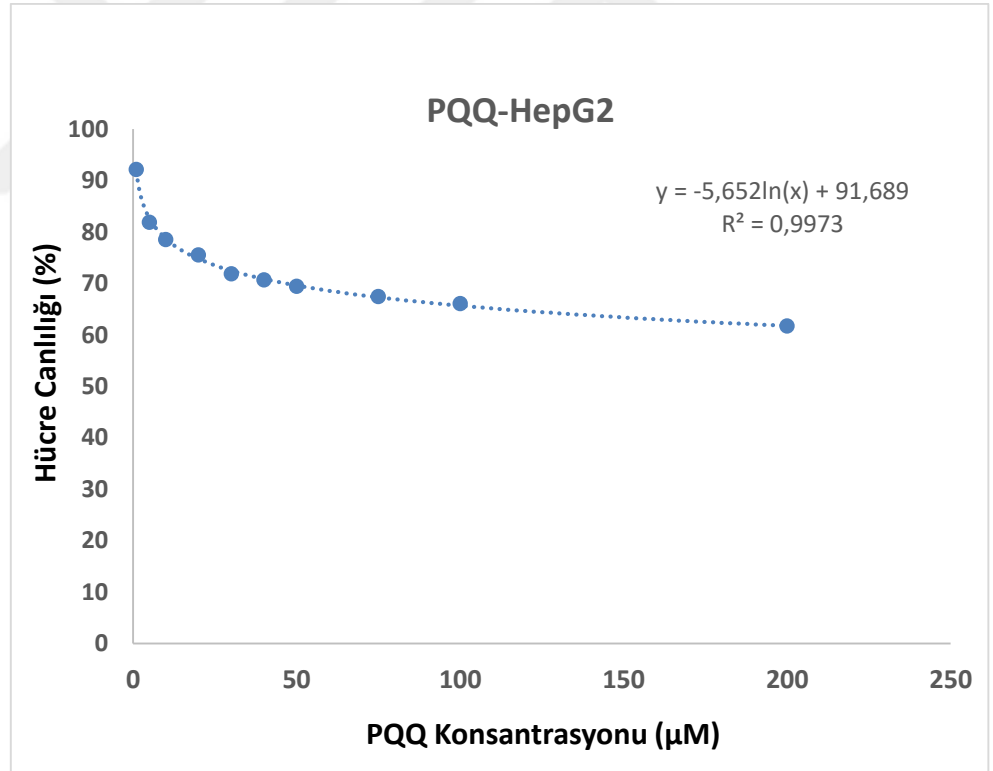
**Şekil 18:** qRT-PZR veri analizlerinin yapılması.

### 3. BULGULAR

Tekrarlanan deneyler sonucunda elde edilen ortalama  $\pm$  standart sapma deęerleri řeklinde verildi. Aksi belirtilmedięi sūrece tūm veriler her birinde triplike yapılan en az ū baęımsız tekrar deneylerin ortalaması řeklinde dir.

#### 3.1 Sitotoksisite Sonuçlarının Değerlendirilmesi

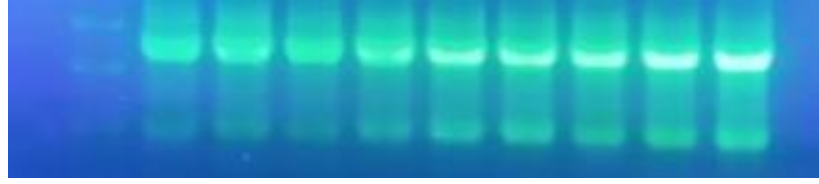
Sitotoksisite testinde PQQ'nun 1  $\mu$ M ile 200  $\mu$ M arasında 10 farklı doz konsantrasyonunda 24. saatteki etkinlięi arařtırıldı. 24 saat sonunda, kontrol ve PQQ uygulandı olan hūcrelerin arasında farklılıkları belirlemek iēin ELISA cihazı kullanılarak 630 nm absorbans deęeri ōlēūldū (řekil 19). Elde edilen sonuēlara gōre EC05 dozu 5,566  $\mu$ M, EC10 dozu ise 13,484  $\mu$ M olarak belirlendi.



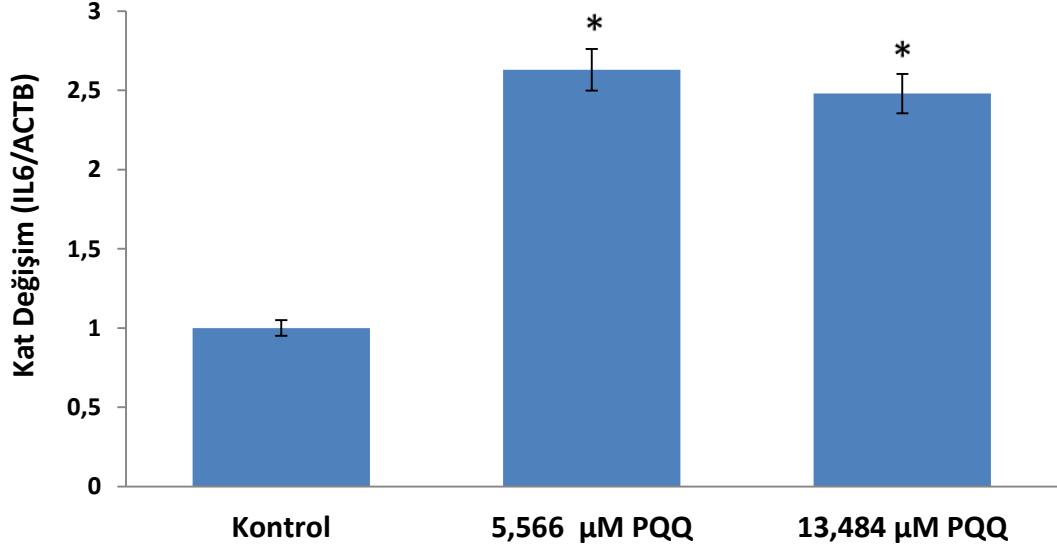
řekil 19: PQQ bileřięinin HepG2 hūcre canlılıęına etkisi.

### 3.2 PQQ Bileşiminin HepG2 Hücre Hattında Belirlenen Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeylerine Olan Etkisi

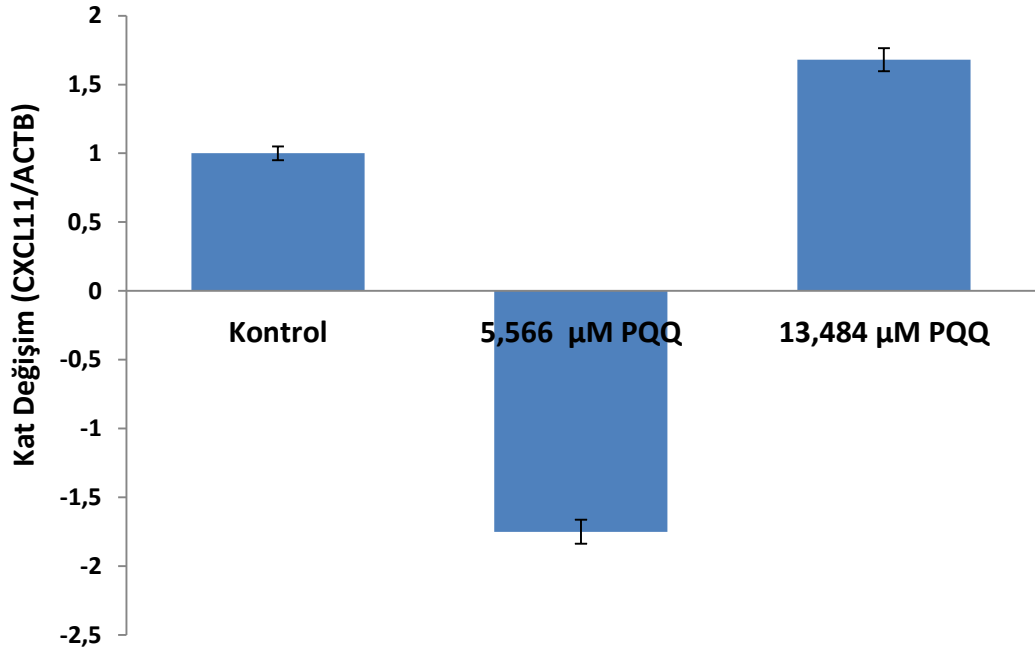
Sitotoksosite ile belirlenen PQQ bileşiği dozları hücelere uygulandı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. Sonra RNA izolasyonu yapıldı ve PZR yöntem ile hedef genler çoğaltılarak, genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri incelendi (Şekil 20-33). Elde edilen tüm sonuçları  $\beta$ -aktin ile normalize edilip kontrol değerleri 1 olarak alındı.



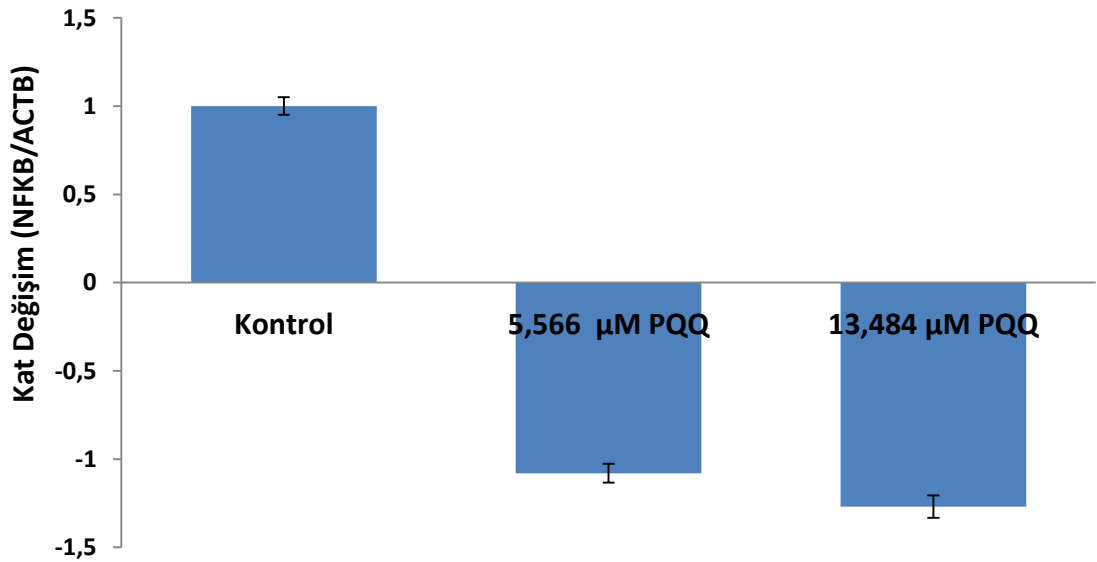
**Şekil 20:** PQQ uygulanmış HepG2 hücrelerinden RNA izolasyonu (Kuyu 1=marker, kuyu 2=kontrol-1, kuyu 3=kontrol-2, kuyu 4=kontrol-3, kuyu 5=EC05-1, kuyu 6=EC05-2, kuyu 7=EC05-3, kuyu 8=EC10-1, kuyu 9=EC10-2, kuyu 10=EC10-3).



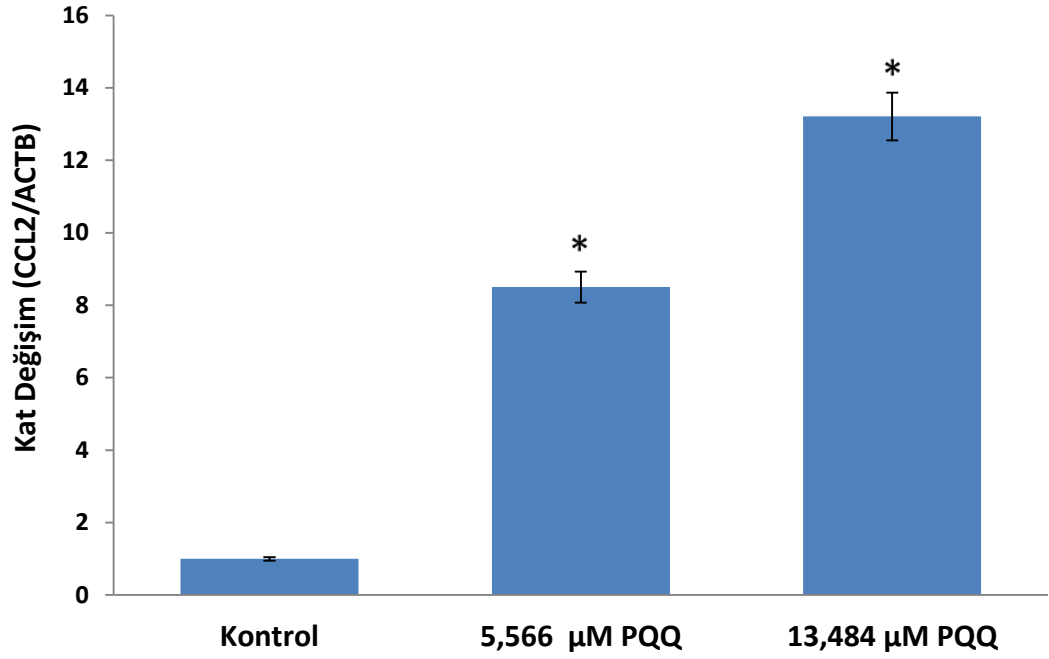
**Şekil 21:** HepG2 hücrelerinde PQQ'nun IL-6 mRNA ifadesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB (Beta-aktin) geni ile normalize edildi ve kontrol değeri 1 olarak alındı. \*: Kontrol grubundan farklı ( $p < 0.05$ ). Sonuçlar üç farklı zamanda gerçekleştirilen üçlü ( $n=3$ ) uygulamaların ortalaması alınarak hesaplandı.



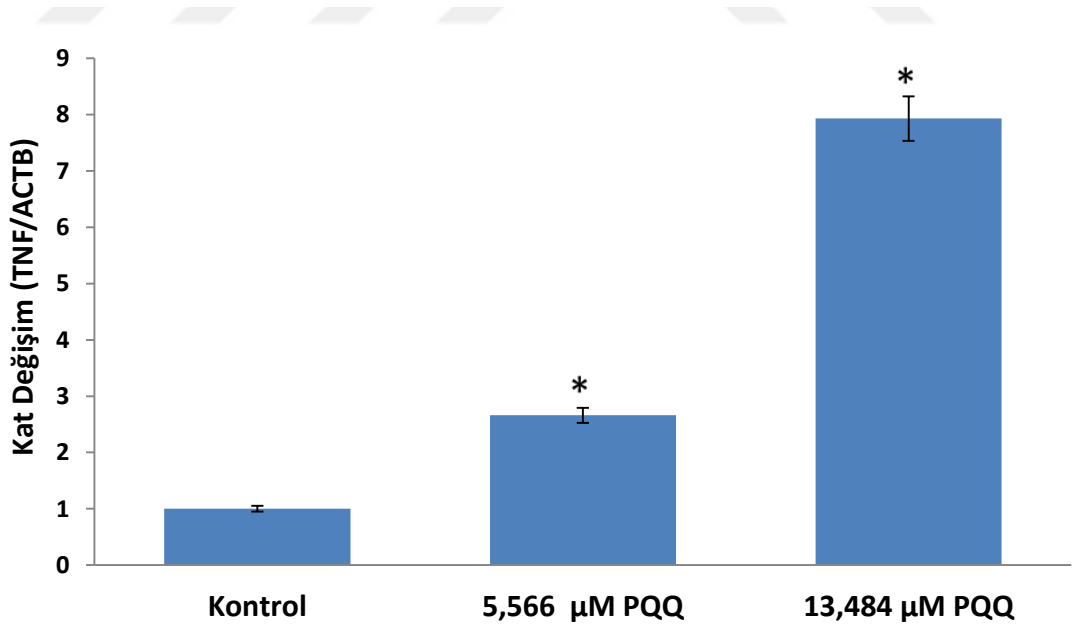
**Şekil 22:** HepG2 hücrelerinde PQQ'nun CXCL11 mRNA ifadesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB geni ile normalize edildi ve kontrol değeri 1 olarak alındı. Sonuçlar üç farklı zamanda gerçekleştirilen üçlü (n=3) uygulamaların ortalaması alınarak hesaplandı.



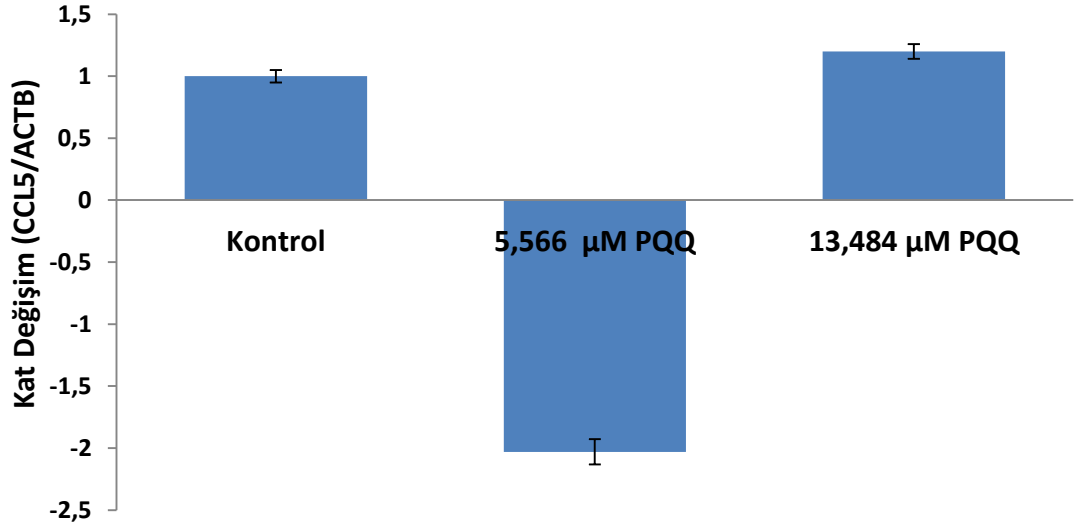
**Şekil 23:** HepG2 hücrelerinde PQQ'nun NF-κB mRNA ifadesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB geni ile normalize edildi ve kontrol değeri 1 olarak alındı. Sonuçlar üç farklı zamanda gerçekleştirilen üçlü (n=3) uygulamaların ortalaması alınarak hesaplandı.



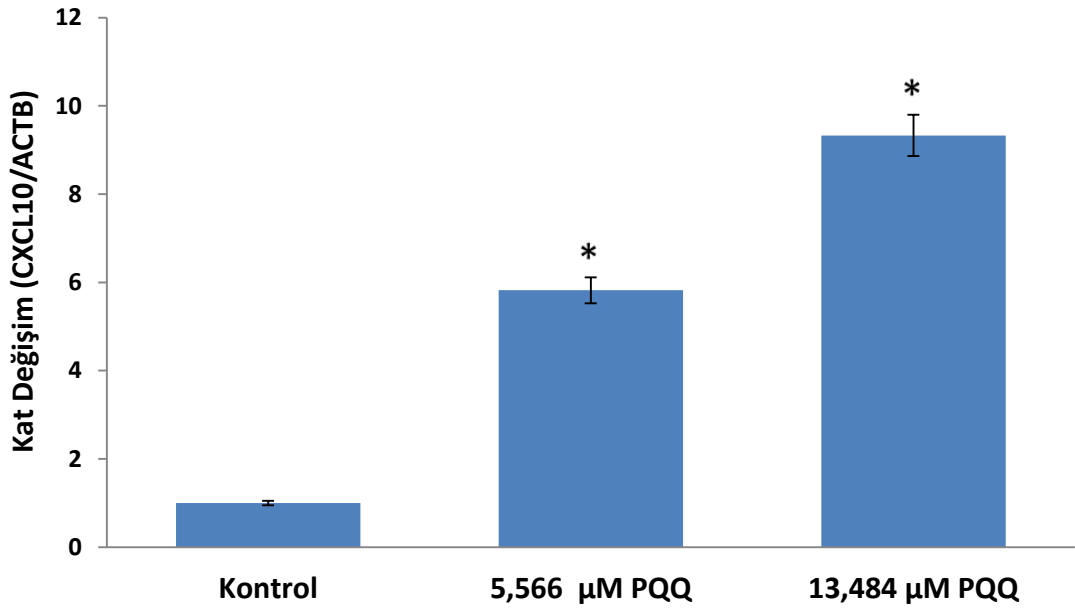
**Şekil 24:** HepG2 hücrelerinde PQQ'nun CCL2 mRNA ifadesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB geni ile normalize edildi ve kontrol değeri 1 olarak alındı. \*: Kontrol grubundan farklı ( $p < 0.05$ ). Sonuçlar üç farklı zamanda gerçekleştirilen üçlü ( $n=3$ ) uygulamaların ortalaması alınarak hesaplandı.



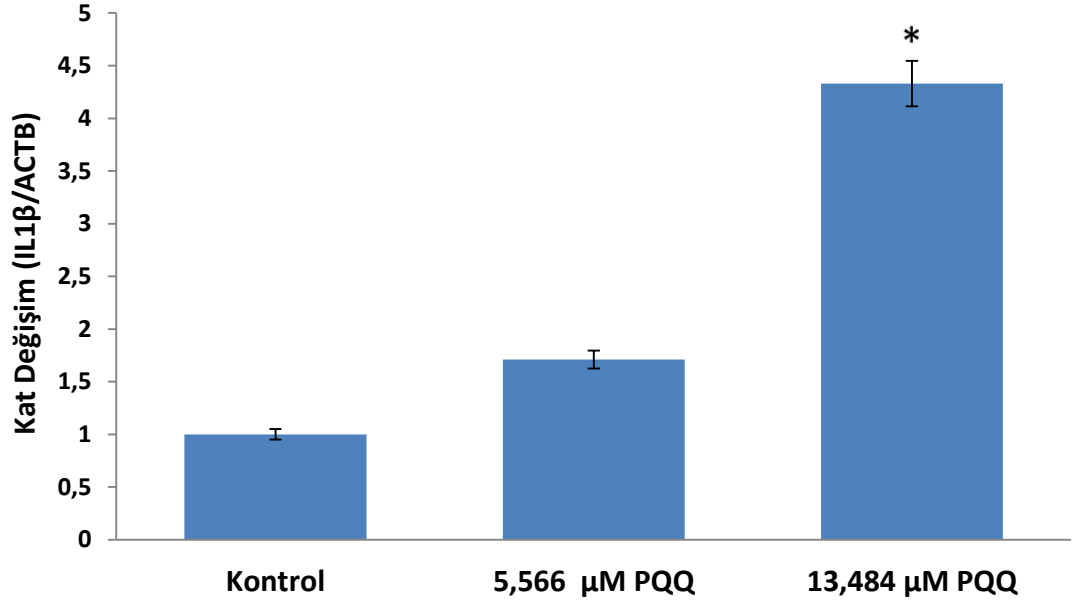
**Şekil 25:** HepG2 hücrelerinde PQQ'nun TNF mRNA ifadesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB geni ile normalize edildi ve kontrol değeri 1 olarak alındı. \*: Kontrol grubundan farklı ( $p < 0.05$ ). Sonuçlar üç farklı zamanda gerçekleştirilen üçlü ( $n=3$ ) uygulamaların ortalaması alınarak hesaplandı.



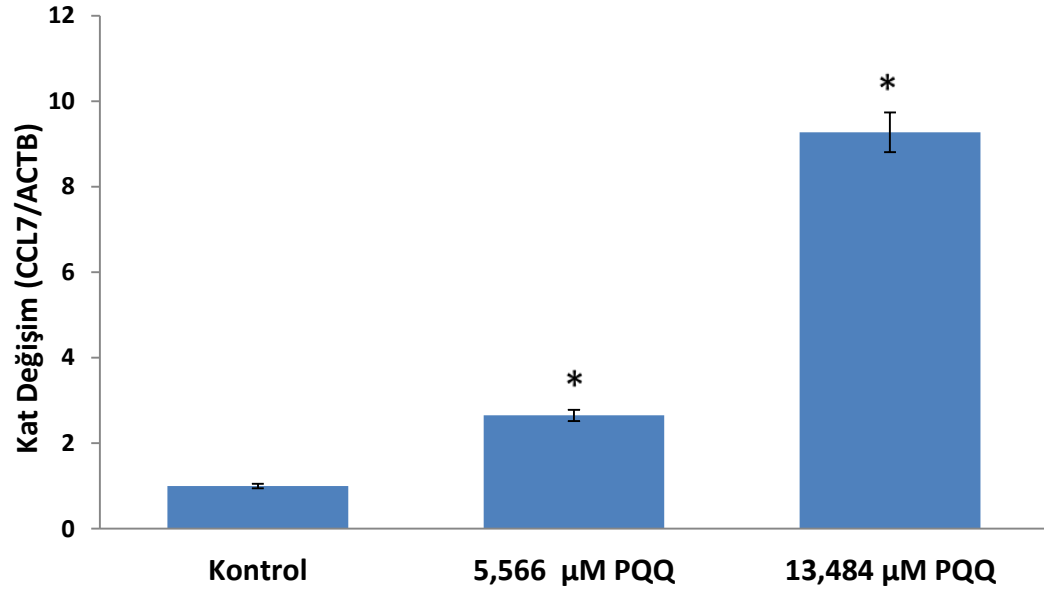
**Şekil 26:** HepG2 hücrelerinde PQQ'nun CCL5 mRNA ifadesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB geni ile normalize edildi ve kontrol değeri 1 olarak alındı. Sonuçlar üç farklı zamanda gerçekleştirilen üçlü (n=3) uygulamaların ortalaması alınarak hesaplandı.



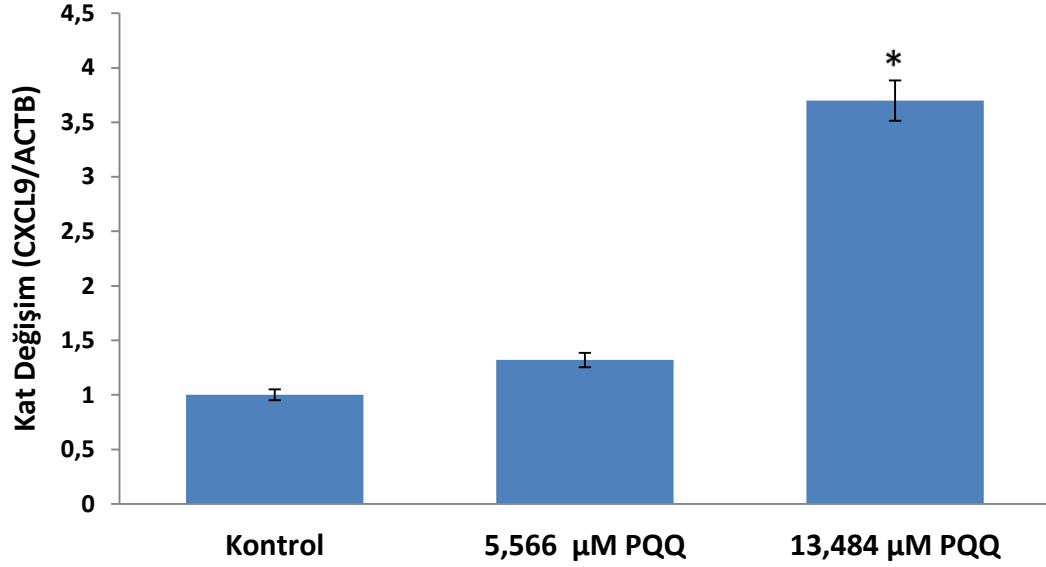
**Şekil 27:** HepG2 hücrelerinde PQQ'nun CXCL10 mRNA ifadesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB geni ile normalize edildi ve kontrol değeri 1 olarak alındı. \*: Kontrol grubundan farklı ( $p<0.05$ ). Sonuçlar üç farklı zamanda gerçekleştirilen üçlü (n=3) uygulamaların ortalaması alınarak hesaplandı.



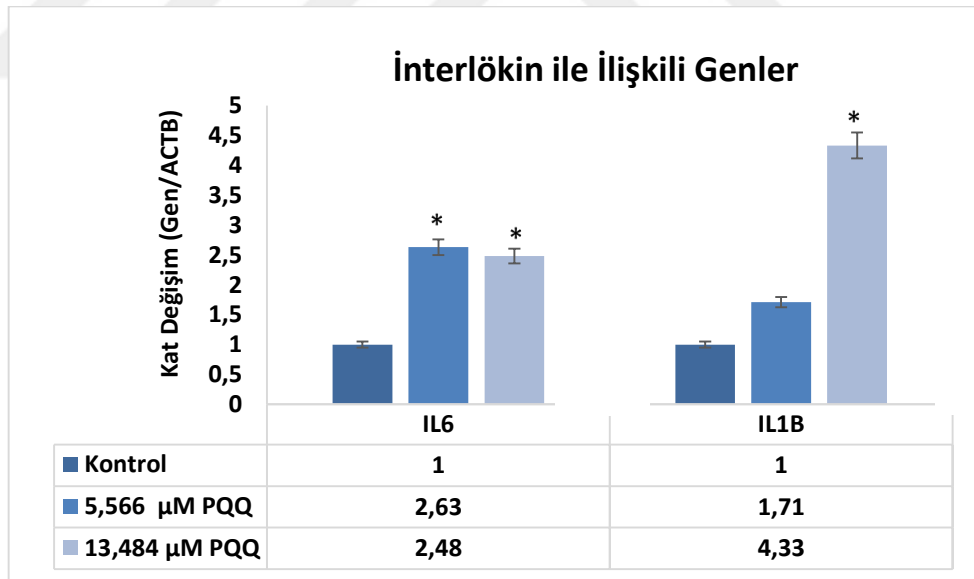
**Şekil 28:** HepG2 hücrelerinde PQQ'nun IL-1 $\beta$  mRNA ifadesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB geni ile normalize edildi ve kontrol değeri 1 olarak alındı. \*: Kontrol grubundan farklı ( $p < 0.05$ ). Sonuçlar üç farklı zamanda gerçekleştirilen üçlü ( $n=3$ ) uygulamaların ortalaması alınarak hesaplandı.



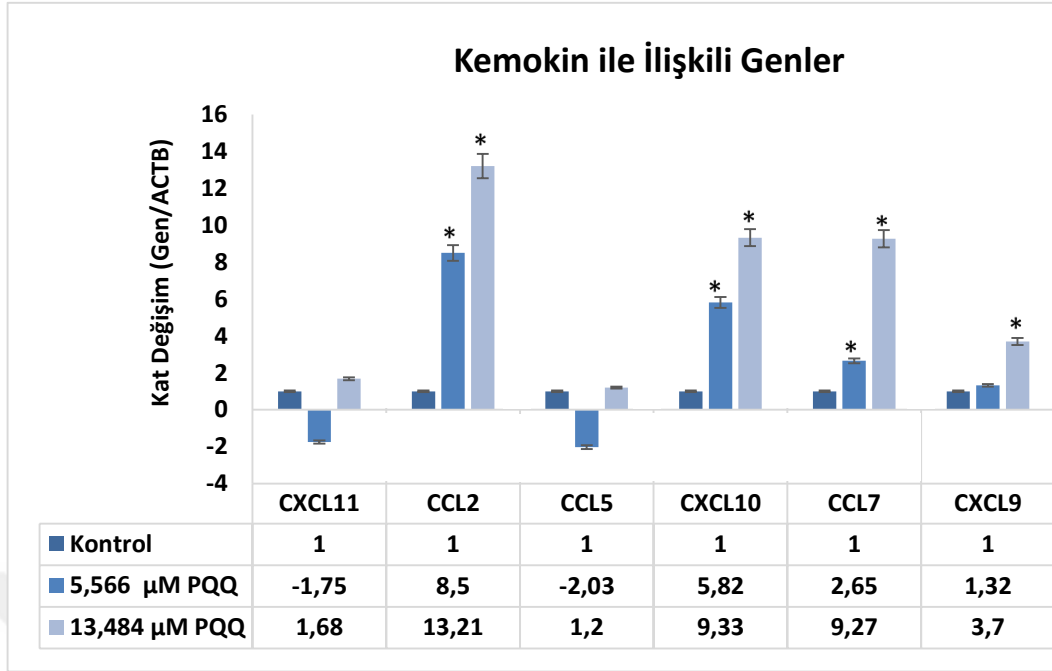
**Şekil 29:** HepG2 hücrelerinde PQQ'nun CCL7 mRNA ifadesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB geni ile normalize edildi ve kontrol değeri 1 olarak alındı. \*: Kontrol grubundan farklı ( $p < 0.05$ ). Sonuçlar üç farklı zamanda gerçekleştirilen üçlü ( $n=3$ ) uygulamaların ortalaması alınarak hesaplandı.



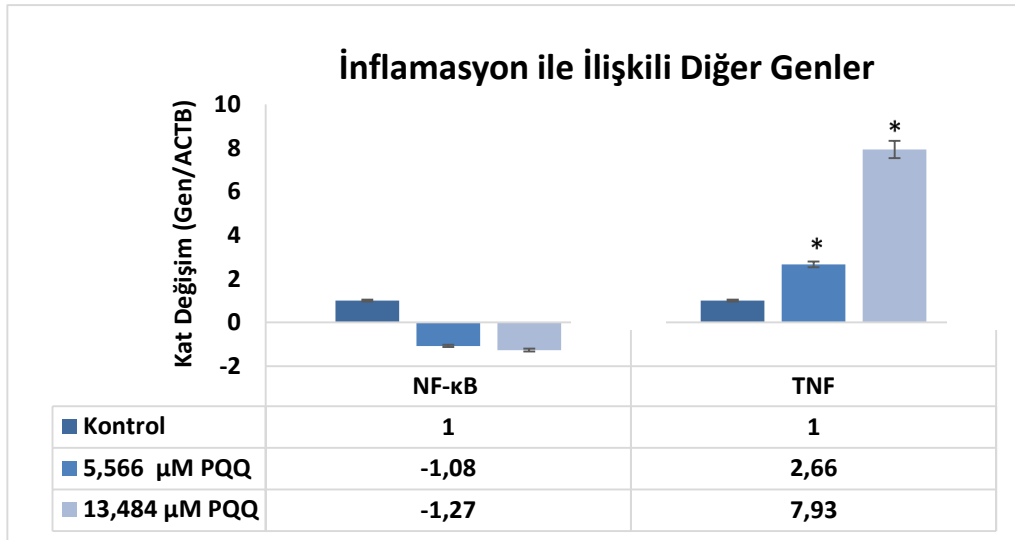
**Şekil 30:** HepG2 hücrelerinde PQQ'nun CXCL9 geni üzerindeki mRNA ifadesine olan etkisi. Sonuçlar ACTB geni ile normalize edildi ve kontrol değeri 1 olarak alındı. \*: Kontrol grubundan farklı ( $p < 0.05$ ). Sonuçlar üç farklı zamanda gerçekleştirilen üçlü ( $n=3$ ) uygulamaların ortalaması alınarak hesaplandı.



**Şekil 31:** PQQ'nun HepG2 hücrelerinde interlökin ile ilişkili olan IL-6 ve IL-1 $\beta$  genlerinin mRNA seviyelerine olan etkisi. Sonuçlar ACTB geni ile normalize edildi ve kontrol değeri 1 olarak alındı. \*: Kontrol grubundan farklı ( $p < 0.05$ ). Sonuçlar üç farklı zamanda gerçekleştirilen üçlü ( $n=3$ ) uygulamaların ortalaması alınarak hesaplandı.



**Şekil 32:** PQQ'nun HepG2 hücrelerinde kemokin ilişkili olan CXCL11, CCL2, CCL5, CXCL10, CCL7 ve CXCL9 genlerinin mRNA seviyelerine olan etkisi. Sonuçlar ACTB geni ile normalize edildi ve kontrol değeri 1 olarak alındı. \*: Kontrol grubundan farklı ( $p < 0.05$ ). Sonuçlar üç farklı zamanda gerçekleştirilen üçlü ( $n=3$ ) uygulamaların ortalaması alınarak hesaplandı.



**Şekil 33:** PQQ'nun HepG2 hücrelerinde inflamasyon ile ilişkili olan NF-κB ve TNF genlerinin mRNA seviyelerine olan etkisi. Sonuçlar ACTB geni ile normalize edildi ve kontrol değeri 1 olarak alındı. \*: Kontrol grubundan farklı ( $p < 0.05$ ). Sonuçlar üç farklı zamanda gerçekleştirilen üçlü ( $n=3$ ) uygulamaların ortalaması alınarak hesaplandı.

#### 4. TARTIŞMA

Karaciğer kanseri, organın kendi dokusundan kaynaklanan hücrelerin kontrolsüz olarak bölünmesi ve düzensiz çoğalmasıyla meydana gelen kötü huylu bir tümördür (Schulz 2005). Vücudun hemen her yerindeki kanserler karaciğere sıçrayabilmektedir (Wang ve diğ. 2015). Karaciğer kanserinde erken teşhis ile kanserli bölge tamamen temizlense bile, hastalık diğer organlara hızla yayılabilmektedir (Borie ve diğ. 2008). Karaciğer kanseri tedavisinde, hem antikanser ajanlar hemde geleneksel tedaviler kullanılmaktadır ancak henüz kalıcı bir iyileşme sağladığı bilinen net bir tedavi yöntemi yoktur (Li ve diğ. 2016). Karaciğer kanserinin moleküler olarak hedef alınan bir çözümü olmadığı için yeni ilaçların faydalarının değerlendirilmesi gereklidir.

PQQ, suda çözünen bir vitamin, kofaktör ve aynı zamanda antioksidan moleküldür (Hara ve diğ. 2007). PQQ, mitokondrilerin sağlıklı kalmasına ve sayılarının artmasına yardımcı olur aynı zamanda strese karşı da bedenimizi korur (Misra ve diğ. 2012). Bilim adamları ilk keşfettiklerinde bunun bir vitamin olduğuna inandılar ancak araştırmaya devam edildiğinde bir vitamin olmadığı vücudu beslemeye yardımcı olan ve düzgün çalışmasını sağlayan önemli bir mikro besin olduğunu fark ettiler (Akagawa ve diğ. 2016). PQQ, bilim adamlarının fazlasıyla dikkatini çekmekte ve hala araştırılmakta olan bir bileşiktir.

İnflamasyon, kimyasal tahriş, hasar veya enfeksiyondan kaynaklanan yaralanmaya verilen fizyolojik yanıtı denir (Sethi ve diğ. 2008). Vücudun iç ve dış çevresel uyaranlara verdiği tepkinin bir parçası olup, gelen uyaranları ortadan kaldırır ve doku fizyolojisinin düzenlenmesinde görev almaktadır (Visser ve diğ. 2006). İnflamatuar süreç kanserin başlamasını tetikleyebildiği gibi bazen uyarabilmekte bazen ise tümör büyümesini engelleyebilmektedir, dolayısıyla inflamasyon tümör oluşumundan gelişimine tüm süreçlerde etki edebilmektedir (Binen ve Özcan 2021). Viral etkinin sebep olduğu mide kanseri ve mukozayla ilişkili lenfoma, hepatoselüler karsinom gibi kanser türlerinde, enfeksiyonun tetiklediği inflamatuvar yanıtın tümör gelişimini önlediği ve patojen eliminasyonu hedefleyen bir savunma mekanizması olduğu belirtilmektedir (Wu ve diğ. 2009).

Çalışmamızda, karaciğer kanserinde inflamasyon ile ilişkili genler üzerinde PQQ'nun etkileri belirlemek için HepG2 hücre hattı kullanıldı. PQQ bileşiğinin HepG2 hücre hattında belirlenen genlerin mRNA seviyelerine olan etkisi qRT-PCR ile belirlendi. Sitotoksinite testi sonucunda PQQ bileşiği için EC05 ve EC10 değerleri 5,566  $\mu$ M ve 13,484  $\mu$ M olarak belirlendi ve bu dozlar HepG2 hücrelerine uygulanarak belirlenen genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri araştırıldı. RNeasy Plus Universal Kit ile total RNA izolasyonunun ve Onscript Plus cDNA Sentez Kiti ile cDNA sentezinin ardından inflamasyon ile ilişkili genlerin mRNA ekspresyonunun PQQ bileşiği uygulanmasında ortaya çıkan değişimlerin istatistiksel analizleri yapılarak elde edilen sonuçlar Tablo 5'de verilmektedir.

**Tablo 5:** PQQ bileşiği uygulaması sonucunda belirlenen genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimleri.

Genler	EC05 (5,566 $\mu$ M)	EC10 (13,484 $\mu$ M)
<b>IL-6</b>	2,63	2,48
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	-1,08	-1,27
<b>CXCL11</b>	-1,75	1,68
<b>CCL2</b>	8,50	13,21
<b>TNF</b>	2,66	7,93
<b>CCL5</b>	-2,03	1,20
<b>CXCL10</b>	5,82	9,33
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	1,71	4,33
<b>CCL7</b>	2,65	9,27
<b>CXCL9</b>	1,32	3,70

■; mRNA ifade düzeyinde meydana gelen anlamlı artma, ■; mRNA ifade düzeyinde meydana gelen anlamlı azalma.

Sitokinler, bitki ve hayvan hücrelerinde üretilen, hücrelerin birbirleri ile iletişimini sağlayan ve çoğalmasını uyarıcı proteinlerdir. Sitokinler, yara iyileşmesi, kemik iliği ve inflamasyon gibi önemli görevlerde yer almaktadır (Akdoğan ve Yöntem 2018). Sitokinler aynı zamanda bağışıklık sistemi hücrelerinde, kan hücrelerinin üretimi ve aktivitesinde önemli rol sahiptir (Barbaros ve Dikmen 2015). Pro-inflamatuar sitokinler bir patojenle karşılaşmaya ve doku hasarına yanıt salgılabilmek için immün sistem ve beyin arasındaki iletişime aracılık etmektedir (Schiepers ve diğ. 2005). Artan pro-inflamatuar sitokin ve kemokin yapılı

moleküllerin salınımı karaciğer ve diğer dokularda düşük seviyede inflamatuvar yanıt oluşturmaktadır (Curat ve diğ. 2006).

İnterlökin-6 (IL-6) iltihaplanma bölgesinde üretilir ve kronik inflamasyonda anahtar bir sitokindir (Gabay 2006). IL-6'nın inflamasyonda anahtar sitokin olmasının nedenlerinden biri trans-sinyal mekanizması nedeniyle çok çeşitli hedef hücrelere sahip olmasıdır (Hirano 2021). IL-6 pro-inflamatuvar bir sitokin olarak immün yanıtı, hematopoezin ve inflamasyonun düzenlenmesini, aynı zamanda çeşitli dokular üzerinde etkisini gösteren bir pleiotropik sitokindir (Akira ve diğ. 1990). IL-6'nın karaciğerde inflamatuvar proteinlerinin sentezini indükleyerek bağışıklık hücrelerinin proliferasyonunda ve büyümesinde önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir (Kishimoto ve diğ. 1992). Yapılan bir çalışmada, IL-6'nın tümör hücrelerinde hücre çoğalması ve anti-apoptotik etkileri artırması gibi önemli tümör gelişimini destekleyici özelliklerinin bulunduğu ve HepG2 hücrelerinde inflamatuvar kaspazlardan olan Kaspaz-1 düzeyindeki artış nedeniyle inflamasyona katkı sağladığı gösterilmektedir (Balkan ve diğ. 2017). Bir başka çalışmada, PQQ takviyesi, plazma C-reaktif protein, IL-6 ve trimetilamin N-oksit gibi idrar metillenmiş amin seviyelerinde önemli düşüşler ve gelişmiş mitokondri ile ilgili işlevlerle tutarlı olarak idrar metabolitlerinde değişiklikler ile sonuçlanmaktadır (Harris ve diğ. 2013). Çalışmamızda IL-6 geninin 5,566 µM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 2,63 kat anlamlı artış görülürken, 13,484 µM uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 2,48 kat anlamlı artış görüldü. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, PQQ pro-inflamatuvar bir sitokin olan IL-6'da anlamlı bir artışa sebep oldu. Bir çalışmada elde edilen sonuçlara göre, PQQ insan promonositik lösemi U937 hücrelerinde apoptozu indüklemekte ve bu durum ana hücrel antioksidan glutatyonun tükenmesi ve hücre içi reaktif oksijen türlerin (ROS) artışına sebep olmaktadır (Shankar ve diğ. 2010). Bu bağlamda PQQ bileşiğinin ROS miktarını arttırdığı gibi IL-6 artışına ve pro-inflamatuvar etkiye sahip olabileceği söylenebilir.. IL-6'nın ani ve geçici ifadesinin enfeksiyonlara ve doku hasarına karşı konakçı savunmasına inflamasyonda yer alan sitokinlerin salgılanmasını destekleyerek katkı sağladığı bilinmektedir.

Pro-inflamatuvar sitokin olarak interlökin-1β'nın (IL-1β) birçok biyolojik aktivitesi bulunmakta ve inflamasyonda sentezlenen genlerin çoğunu

düzenlemektedir (Dinarello 1996). IL-1 $\beta$  mikrobiyal etki ve doku hasarına karşı miyeloid hücrelerde yüksek seviyelerde eksprese edilmektedir (Pulugulla ve diğ. 2018). SW982 hücrelerinde uygulanan PQQ molekülünün, NF- $\kappa$ B fosforilasyonunun aktivasyonu dahil MAPK yollarının fosforilasyonunu yavaşlatarak, IL-1 $\beta$  ile indüklenen MMP-1, MMP3, TNF-a ve IL-6 ekspresyonunu azalttığı gözlemlendi (Liu ve diğ. 2016). Bir başka çalışmada, PQQ'nun Siklofosfamid (CTX) ile tedavi edilen farelerin böbrek dokularında IL-6, IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  düzeylerini önemli ölçüde azalttığı bulundu (Lin ve diğ. 2020). Çalışmamızda IL-1 $\beta$  geninin 13,484  $\mu$ M PQQ doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 4,33 kat artış elde edildi. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, PQQ'nun pro-inflamatuar bir sitokin olan IL-1 $\beta$ 'da anlamlı bir artışa sebep olduğu dolayısıyla PQQ bileşiği pro-inflamatuar genlerden IL-1 $\beta$ 'yı arttırdığı görülmektedir. Yapılan bir çalışmada, PQQ'nun IL-1 $\beta$  ile indüklenen SW1353 hücrelerinde nitrik oksit üretimini doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde azalttığını ortaya koymaktadır (Tao ve diğ. 2015).

Kemokinler, kemotaksi dahil bağışıklık hücrelerinin farklılaşmasını destekleyen, doku ekstrasvazasyonuna neden olan ve kanser ortamında anti-tümör bağışıklık tepkisindeki rolleri büyük ilgi çeken proteinlerdir (Tokunaga ve diğ. 2018). Yapılan bir çalışma, kanser hücrelerinin normal kemokin sistemini bozduğunu ve bu moleküllerin ve reseptörlerinin, tümör destekleyici hale getirmek için farklı yollarla tümör mikro-ortamının önemli bileşenleri haline geldiğini göstermektedir (Aldinucci ve Colombatti 2014). CXCL9, CXCL10 ve CXCL11 temel olarak, immün hücre göçünü, farklılaşmasını ve aktivasyonunu düzenleyerek tümör baskılanmasına yol açmaktadır (Tokunaga ve diğ. 2018). Birçok veri, CXCL9, CXCL10 ve CXCL11'in merkezi sinir sisteminin farklı patolojik koşullarında üretildiğini göstermektedir (Müller ve diğ. 2010). CXCL9, CXCL10 ve CXCL11 pro-inflamatuar kemokinlerdir (Karin ve Razon 2018; Callahan ve diğ. 2021). Yapılan bir çalışmada, CXCR3 ve ligandları CXCL10, CXCL9 ve CXCL11'in, infiltre edici immünokompetan hücrelere kıyasla tümör hücrelerinde CXCR3'ün aşırı ekspresyonları yoluyla tümör progresyonu ve metastazında rol oynayabileceği ve bunun sonucunda aşırı duyarlılığa neden olduğu öne sürülmektedir (Liu ve diğ. 2011). Çalışmamızda HepG2 hücre hattına PQQ bileşiğinin uygulanmasıyla CXCL9 geninin 13,484  $\mu$ M doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 3,70 kat anlamlı artış gözlemlendi. CXCL10 geninin 5,566  $\mu$ M doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 5,82 kat

artış elde edilirken, 13,484  $\mu\text{M}$  uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 9,33 kat artış elde edildi. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, PQQ uygulaması ile pro-inflamatuar kemokinlerden olan CXCL9 ve CXCL10'da anlamlı bir artış gözlenirken CXCL11'de anlamlı bir değişiklik görülmedi. Bu sonuçlardan yola çıkarak, CXCL9 ve CXCL10 etkileşimlerinin lökosit göç faktörü olarak etki ederek pro-inflamatuar reaksiyonlara aracılık ettiğini söyleyebiliriz.

CCL2 hücrel mekanığı düzenleyen pro-inflamatuar bir kemokindir (Wood ve diğ. 2014; Evers ve diğ. 2021). CCL2, metabolizmanın düzenlenmesinde ve inflamasyonun başlangıcındaki ilk adım olan makrofajların dokuya yönlendirilmesiyle ilgilidir (Rull ve diğ. 2010). Ayrıca CCL2 tümör hücreleri tarafından da salgılanabilir (Conti ve Rollins 2004). Yapılan bir çalışmada, CCL2-CCR2 sinyalini hedeflemenin meme kanserinde beklenmedik olumsuz etkilere yol açabileceğini göstermekte, ayrıca dört fare modelinde, CCL2 inhibisyonunun kesilmesi veya kesintiye uğratılmasının, metastazları arttırdığı ve ölümü hızlandırdığı gösterilmektedir (Lim ve diğ. 2016). Çalışmamızda CCL2 geninin 5,566  $\mu\text{M}$  doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 8,50 kat anlamlı artış gözlenirken, 13,484  $\mu\text{M}$  uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 13,21 kat anlamlı artış gözlemlendi. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, PQQ bileşiğinin HepG2 hücre hattında, pro-inflamatuar kemokin olan CCL2'yi arttırdığı görülmektedir. Yapılan bir çalışmada, nötrofil birikimini takiben CCL2 ile CCR2A reseptör ilişkisi sonucunda bölgeye monosit ve makrofajların göç ettiği gösterilmektedir (Çalar ve Kansu 2004).

CCL5, insan lenfositlerinin seçici bir kemotaksisidir ve hücre göçünü destekleyen pro-inflamatuar bir kemokindir (Huang ve diğ. 2009; Marques ve diğ. 2013). CCL5'i hedefleyerek bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri veya DNA'ya zarar veren maddeler etkilenebilmektedir (Aldinucci ve diğ. 2020). Yapılan bir çalışma, CCL2 ve CCL5'in tümör hücresi invazyonunda önemli bir rol oynadığını ve uzak bölgelerde metastaz oluşumuna yol açtığını göstermektedir (Soria ve Ben-Baruch 2008). Yapılan bir başka çalışmada, PQQ'nun insan hepatosit hücre hattında Sirt1 ve Sirt3 gen ve protein ekspresyonunun yanı sıra aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı ve genel protein asetilasyonunu azalttığı, ancak PQQ tedavisinin, membran potansiyelini veya hücre canlılığını değiştirmediği bulundu (Zhang ve diğ. 2015). Çalışmamızda, PQQ uygulaması ile pro-inflamatuar kemokin olan CCL5'de anlamlı bir değişiklik

görülmedi. Dolayısıyla PQQ bileşiğinin HepG2 hücre hattında, pro-inflamatuar kemokin olan CCL5 üzerinde etkiye sahip olmadığı söylenebilir. CCL5'in karaciğer enfeksiyonlarındaki rolü net değildir, çünkü CCL5'in faydalı veya zararlı etkileri, devreye giren kemokin reseptörüne bağlıdır ve enfeksiyonun kronik veya akut olup olmadığı bilinmemektedir (Marques ve diğ. 2013).

CCL7 hücre göçünde önemli görev yapan bir başka pro-inflamatuar kemokindir (Jung ve diğ. 2010; Liu ve diğ. 2018). CCL7, kanserin ilerlemesine ve metastazın artmasına neden olmaktadır (Lee ve diğ. 2016). Bir araştırmada, CCL7'nin aşırı ekspresyonunun tümör metastazı ile ilişkili olduğunu ve mide kanserli hastalarda prognostik bir faktör olarak görev yaptığı gösterilmektedir (Hwang ve diğ. 2012). Çalışmamızda CCL7 geninin 5,566  $\mu$ M doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 2,65 kat anlamlı artış gözlenirken, 13,484  $\mu$ M uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 9,27 kat anlamlı artış gözlemlendi. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, PQQ uygulamasının pro-inflamatuar kemokin olan CCL7'de anlamlı bir artışa sebep olduğu gözlemlendi. Yapılan bir çalışmada, CCL7'nin, monositler ve nötrofiller dahil olmak üzere birçok doğuştan gelen immün hücrelerin bakteriyel ve alerjik inflamasyon bölgelerine alınmasını teşvik ettiği bilinmektedir (Ford ve diğ. 2019).

Nükleer faktör  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), bağışıklık tepkilerinin düzenlenmesi ve iltihaplanma gibi çok çeşitli biyolojik tepkilerin düzenlenmesinde yer alan bir transkripsiyon faktörüdür. Aynı zamanda onkogeneze de önemli görevleri bulunmaktadır (Dolcet ve diğ. 2005). NF- $\kappa$ B, insan bağışıklık yanıtında görev yapan IL-6 ve TNF gibi çeşitli inflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonunu düzenleyen ve DNA'ya direk olarak bağlanabilen bir transkripsiyon faktörüdür (Nennig ve Schank 2017). Ayrıca hücre canlılığında, bağışıklık sisteminde, hücre proliferasyonda da görev almaktadır (Şen ve diğ. 2017). Bir araştırma, PQQ diyetinin ağırlıklı olarak antioksidan bir ortama yol açabileceğini, doku hasarını hafifletebileceğini ve diğer hastalıklarda olduğu gibi ayrıntılı egzersize yanıt olarak NF- $\kappa$ B yolunun aracılık ettiğini, immünolojik inflamasyona karşı koruyucu bir etki sağlayabildiğini göstermektedir (Liu ve diğ. 2021). NF- $\kappa$ B'nin karaciğer hemeostazındaki rolü, ilk olarak geniş çaplı karaciğer apoptozisi ve dejenerasyonu ile embriyonik öldürücü etkisi olan RelA/p65 yolağı eksik farelerin incelenmesiyle ortaya çıkmaktadır (Shang

ve diğ. 2017). Çalışmamızda, HepG2 hücre hattına PQQ bileşiğinin uygulanmasıyla NF-κB mRNA ekspresyon düzeyinde anlamlı bir değişiklik görülmedi. Yapılan bir çalışmada, 48 saat PQQ uygulandığında, NF-κB ekspresyonunu azaltarak yüksek glikoz ile indüklenen HK-2 hücreleri üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Wang ve diğ. 2019). Bizim çalışmamızda ise 24 saatlik inkübasyon sonucunda NF-κB ifadesinde istatistiksel olarak anlamsız bir azalma meydana geldi ve inkübasyon süresinin bunda etken olabileceği düşünülmektedir.

TNF (Tümör Nekroz Faktörü) insanlarda bağışıklık sisteminin önemli bir pro-inflamatuar sitokindir (Zhang ve An 2007). Doku hasarlarının iyileştirilmesine, vücudun istilacı bakteri ve virüslere karşı saldırılar düzenlemesine yardımcı olmaktadır. TNF, kronik inflamasyon ve malign hastalığın gelişimi arasındaki moleküler bağlantılardan birini temsil edebilmektedir. Tümör mikro-ortamı içindeki düzensiz TNF ekspresyonu, habis hücre dokusu istilasını, göçünü ve nihayetinde metastaz oluşumunu desteklemektedir (Mocellin ve Nitti 2008). Bir çalışmada, PQQ'nun HK-2 hücrelerinde yüksek glikoz kaynaklı inflamatuvar ve hücre yaşlanma üzerindeki koruyucu etkilerine odaklanılarak IL-1β, NF-κB ve TNF-α protein ekspresyonunun PQQ ile azalttığı gösterilmektedir (Wang ve diğ. 2019). Çalışmamızda TNF geninin 5,566 μM doz uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 2,66 kat anlamlı artış gözlenirken, 13,484 μM uygulamasındaki mRNA düzeyinde ekspresyon değişiminde 7,93 kat anlamlı artış gözlemlendi. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, PQQ bileşiğinin HepG2 hücre hattında, inflamasyon ilişkili TNF'yi arttırdığı görülmektedir. TNF'nin, inflamatuvar hastalıklarla bağlantılı doku yıkımında ve yeniden şekillenmede bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (Aggarwal ve diğ. 2013). HepG2 hücre hattında TNF genindeki artışın, hücrelerde inflamasyon kaskadını başlatıcı yönde olduğunu söyleyebiliriz.

ACTB (Beta-aktin), hücre bölünmesi, kas kasılması, hücre hareketliliği ve gen ekspresyonu gibi çeşitli işlevlerde çok önemli bir rol oynamak, ayrıca yüksek oranda korunmuş proteinler olduğundan dolayı bazı bilim insanları tarafından evrensel gen olarak kabul edilmektedir (Toscano ve diğ. 2018). ACTB, mRNA veya protein ekspresyonu çalışmalarında kontrol olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır (Lin ve Redies 2012). ACTB ekspresyonları, gen ekspresyon verilerinin normalleştirilmesi için kullanılmaktadır (Sikand ve diğ. 2012). Vücuttaki çoğu hücrede bulunmakta ve

birden fazla hücre aktivitesinde görev almaktadır. Bundan dolayı araştırmamızda referans gen olarak, genlerin normalize edilmesi için ACTB kullanıldı.



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Karaciğer kanseri, dünya genelindeki en ölümcül malignitelerden biri olarak görülmektedir. Karaciğer kanserinde erken teşhis ile kanserli bölge tamamen temizlene bile, hastalık diğer organlara hızla yayılabilmektedir. İlerlemiş ya da metastaz gerçekleşmiş karaciğer kanserlerinin kalıcı bir iyileşme sağladığı bilinen net bir tedavi yöntemi yoktur.

Çalışmamızda insan karaciğer kanseri hücre hattı (HepG2) kullanılarak PQQ bileşiğın inflamasyon ilişkili genlerin mRNA düzeyinde ekspresyon değışimlerine bakıldı. HepG2 hücre hattında PQQ bileşiğının inflamatuvar etkileri üzerine literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan bu çalışmayla literatüre bu konuda ilk veriler sunulmaktadır.

PQQ uygulaması sonucunda HepG2 hücre hattı üzerindeki genlerin anlamlı artışlardan dolayı karaciğer kanserinin tedavisine katkı sağlayabileceğı düşünölmektedir. Eldeki veriler ışığında PQQ bileşiğinin çok hedefli pro-inflamatuvar etkiye sahip bir bileşik olma düşüncesi daha sonraki süreçlerde hayvan deneyi çalışmalarıyla desteklenerek daha kesin sonuçlara ulaşılabilceğinin bilgisini vermektedir.

## 6. KAYNAKLAR

Affo, S., Yu, LX., Schwabe, RF., “The Role of Cancer-Associated Fibroblasts and Fibrosis in Liver Cancer”, *Annual Review of Pathology*, 24; 12: 153–186, (2017).

Aggarwal, B. B., Gupta, S. C., Sung, B., “Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers”, *British Journal of Pharmacology*, 169(8), 1672-1692, (2013).

Akagawa, M., Nakano, M., Ikemoto, K., “Recent progress in studies on the health benefits of pyrroloquinoline quinone”, *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 80(1):13-22, (2016).

Akdoğan, M., ve Yöntem, M., “Sitokinler”, *Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3(1): 36-45, (2018).

Akira, S., Hirano, T., Taga, T., and Kishimoto, T., “Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF)”, *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 4(11), 2860-2867, (1990).

Aldinucci, D., and Colombatti, A., “The inflammatory chemokine CCL5 and cancer progression”, *Mediators of Inflammation*, (2014).

Aldinucci, D., Borghese, C., Casagrande, N., “The CCL5/CCR5 axis in cancer progression”, *Cancers*, 12(7), 1765, (2020).

Anand, P., Kunnumakkara, AB., Sundaram, C., Harikumar, KB., Tharakan, ST., Lai, OS., Sung, B., Aggarwal, BB., “Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes”, *Pharmaceutical Research*, 25: 2097-2116, (2008).

Anwanwan, D., Singh, S. K., Singh, S., Saikam, V., Singh, R., “Challenges in liver cancer and possible treatment approaches”, *Biochimica et Biophysica Acta Reviews on Cancer*, 1873(1), 188314, (2020).

Arbuthnot, P., and Kew, M., “Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma”, *International Journal of Experimental Pathology*, 82(2), 77–100, (2001).

Augustyniak, J., Lenart, J., Zychowicz, M., Lipka, G., Gaj, P., Kolanowska, M., Stepień, P. P., Buzanska, L., “Sensitivity of hiPSC-derived neural stem cells (NSC) to Pyrroloquinoline quinone depends on their developmental stage”, *Toxicology in vitro : an International Journal Published in Association with BIBRA*, 45(Pt 3), 434–444, (2017).

Balkan, B. M., Kısmalı, G., Turan, D., Balkan, A. B., Sel, T., “IL-6 İlavəsi HEPG2 Hücrelerinde Kaspaz Aktivitelerini Nasıl Etkiler?”, *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5 (2), 85-92, (2017).

Baran, B., ve Karasu, Z., “Karaciğer Sirozu Ve Komplikasyonları”, *Türk Karaciğer Araştırmaları Derneği*, (2019).

Barbaros, M. B., ve Dikmen, M., “Kanser immünoterapisi”, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 31(4), 177-182, (2015).

Basanta, D., and Anderson, A. R. A., “Exploiting ecological principles to better understand cancer progression and treatment”, *Interface Focus*, 3:20130020, (2013).

Berres, M. L., Asmacher, S., Lehmann, J., Jansen, C., Görtzen, J., Klein, S., Trebicka, J., “CXCL9 is a prognostic marker in patients with liver cirrhosis receiving transjugular intrahepatic portosystemic shunt”, *Journal of Hepatology*, 62(2), 332-339, (2015).

Bent, R., Moll, L., Grabbe, S., and Bros, M., “Interleukin-1 beta-a friend or foe in malignancies?”, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2155, (2018).

Binen, T., ve Özcan, E. N., “Kanser ve Enflamasyon”, *Bioinforange*, (2021).

Bishayee, A., “Inflammation and Cancer”, (eds: B. Aggarwal, B. Sung, S. Gupta), *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 816, Springer, Basel, (2014).

Block, T. M., Mehta, A. S., Fimmel, C. J., Jordan, R., “Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma”, *Oncogene* 22, 5093-5107, (2003).

Bocci, V., “Interleukins”, *Clinical Pharmacokinetics*, 21(4), 274-284, (1991).

Booth, V., Clark-Lewis, I., and Sykes, B. D., “NMR structure of CXCR3 binding chemokine CXCL11 (ITAC)”, *Protein Science*, 13(8), 2022-2028, (2004).

Borie, F., Bouvier, A. M., Herrero, A., Faivre, J., Launoy, G., Delafosse, P., Velten, M., Buemi, A., Peng, J., Grosclaude, P., Trétarre, B., “Treatment and prognosis of hepatocellular carcinoma: a population based study in France”, *Journal of Surgical Oncology*, 98(7), 505–509, (2008).

Burrell, R., McGranahan, N., Bartek, J. et al. “The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution”, *Nature*, 501, 338–345, (2013).

Callahan, V., Hawks, S., Crawford, M. A., Lehman, C. W., Morrison, H. A., Ivester, H. M., Akhrymuk, I., Boghdeh, N., Flor, R., Finkielstein, C. V., Allen, I. C., Weger-Lucarelli, J., Duggal, N., Hughes, M. A., Kehn-Hall, K., “The Pro-Inflammatory Chemokines CXCL9, CXCL10 and CXCL11 Are Upregulated Following SARS-CoV-2 Infection in an AKT-Dependent Manner”, *Viruses*, 13(6), 1062, (2021).

Cecen, E., ve Bolaman, Z., “İkincil Kanserler”, *International Journal of Hematology & Oncology/UHOD: Uluslararası Hematoloji Onkoloji Dergisi*, 20(3), (2010).

Charo, I. F., and Taubman, M. B., “Chemokines in the pathogenesis of vascular disease”, *Circulation Research*, 95(9), 858-866, (2004).

Chu, W. M., “Tumor necrosis factor”, *Cancer Letters*, 328(2), 222-225, (2013).

Choi, J. M., Oh, S. J., Lee, S. Y., Im, J. H., Oh, J. M., Ryu, C. S., Kwak, H. C., Lee, J. Y., Kang, K. W., Kim, S. K., “HepG2 cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics”, *Archiv der Pharmazie, Res*;38(5):691-704, (2015).

Conti, I., and Rollins, B. J., “CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) and cancer”, *In Seminars in Cancer Biology*, (2004).

Copur, M. S., “Manapuram, S., Multiple Primary Tumors Over a Lifetime”, *Oncology*, (Williston Park, N.Y.), 33(7), 629384, (2019).

Costantini, S., Di Bernardo, G., Cammarota, M., Castello, G., Colonna, G., “Gene expression signature of human HepG2 cell line”, *Gene*, 518(2), 335–345, (2013).

Cronstein, B. N., “Interleukin-6”, *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*, 65(1), S11-5, (2007).

Curat, C. A., Wegner, V., Sengenès, C., Miranville, A., Tonus, C., Busse, R., Bouloumié, A., “Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin”, *Diabetologia*, 49(4), 744–747, (2006).

Curtius, K., Wright, N. A., and Graham, T. A., “An evolutionary perspective on field cancerization”, *Nature Reviews Cancer*, 18(1), 19–32, (2018).

Çağlar, M., Kansu E., “Kemokinler, Kemokin Reseptörleri ve İnflamasyon”, *Ankem*, 18 (Ek 2):164-168, (2004).

Çevik, B. A., Pirinçci, E., “Beslenme ve Kanser”, *Fırat Tıp Dergisi : Fırat Medical Journal* 22(1): 1-7 (2017).

Çiftçi, N., “Oksidatif Stresin Kanserdeki Rolü: Antioksidanlar Kansere Progresyonunun Yakıtı Olabilir mi?”, *Ahi Evran Tıp Dergisi*, 1, 8-13, (2017).

DeVita, V. T., Jr, M. D., Steven, A., Rosenberg, S. A., “Two hundred years of cancer research”, *The New England Journal of Medicine*, 366(23), 2207–2214, (2012).

DeWeerd, S., “Calling cancer's bluff with neoantigen vaccines”, *Nature*, 552(7685), S76–S77, (2017).

Dinarello, C. A., “Anti-inflammatory Agents: Present and Future”, *Cell*, 140(6), 935–950, (2010).

Dinarello, C. A., “Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases”, *The Journal of the American Society of Hematology*, 117(14), 3720-3732, (2011).

Dinarello, C., “Biologic basis for interleukin-1 in disease”, *Blood*, 87 2095-2147, (1996).

Ding, Q., Lu, P., Xia, Y., Ding, S., Fan, Y., Li, X., Liu, M., “CXCL9: evidence and contradictions for its role in tumor progression”, *Cancer Medicine*, 5(11), 3246-3259, (2016).

Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J., Matias-Guiu, X., “NF-κB in development and progression of human cancer”, *Virchows Archiv*, 446(5), 475-482, (2005).

Dommel, S., and Blüher, M., “Does CC motif chemokine ligand 2 (CCL2) link obesity to a pro-inflammatory state?”, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1500, (2021).

El-Serag, H. B., “Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma”, *Gastroenterology*, 142(6), 1264–1273, (2012).

English, D. R., Armstrong, B. K., Krickler, A., and Fleming, C., “Sunlight and cancer”, *Cancer Causes & Control*, 8(3), 271-283, (1997).

Erol, H. S., “İnflamasyon ve serbest radikaller”, (eds: G. Goncagül ve E. Günaydın), *Sağlık Bilimleri Alanında Güncel Araştırmalar*, 73, (2020).

Evers, T., Sheikhhassani, V., Haks, M. C., Storm, C., Ottenhoff, T., Mashaghi, A., “Single-cell analysis reveals chemokine-mediated differential regulation of monocyte mechanics”, *Science*, 25(1), 103555, (2021).

Feghali, C. A., and Wright, T. M., “Cytokines in acute and chronic inflammation”, *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 2(4), 12-26, (1997).

Feitelson, M. A., et al., “Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis”, *Oncogene*, 21, 2593-2604, (2001).

Folkman, J., and Kalluri, R., “Cancer without disease”, *Nature*, 427, 787, (2004).

Forman, D., and Ferlay, J., “The global and regional burden of cancer”, (eds: B. W. Stewart and C. P. Wild), *IACR World Cancer Report 2014*, 16-53, (2014).

Gabay, C., “Interleukin-6 and chronic inflammation”, *Arthritis Research & Therapy*, 8 Suppl 2, S3, (2006).

Galdiero, M. R., Marone, G., Mantovani, A., “Cancer inflammation and cytokines”, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(8), a028662, (2018).

Geng, Q., Gao, H., Yang, R., Guo, K., Miao, D., “Pyrroloquinoline Quinone Prevents Estrogen Deficiency-Induced Osteoporosis by Inhibiting Oxidative Stress and Osteocyte Senescence”, *International Journal of Biological Sciences*, 15(1), 58–68, (2019).

Greaves, M., and Maley, C. C., “Clonal evolution in cancer”, *Nature*, 481(7381), 306–313, (2012).

Grizzi, F., and Chiriva-Internati, M., “Cancer: looking for simplicity and finding complexity”, *Cancer Cell International*, 6, 4, 7 p, (2006).

Gupta, G. P., and Massagué, J., “Cancer metastasis: building a framework”, *Cell*, 127(4), 679–695, (2006).

Hanahan, D., and Weinberg, R. A., “The hallmarks of cancer”, *Cell*, 100: 57-70, (2000).

Hara, H., Hiramatsu, H., Adachi, T., “Pyrroloquinoline quinone is a potent neuroprotective nutrient against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity”, *Neurochemical Research*, 32(3), 489–495, (2007).

Harris, C. B., Chowanadisai, W., Mishchuk, D. O., Satre, M. A., Slupsky, C. M., Rucker, R. B., “Dietary pyrroloquinoline quinone (PQQ) alters indicators of inflammation and mitochondrial-related metabolism in human subjects”, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(12), 2076-2084, (2013).

Hauge, J. G., “Glucose dehydrogenase of *Bacterium Anitratum*: An enzyme with a novel prosthetic group”, *The Journal of Biological Chemistry*, 239, 3630–3639, (1964).

He, K., Nukada, H., Urakami, T., Murphy, M. P., “Antioxidant and pro-oxidant properties of pyrroloquinoline quinone (PQQ): implications for its function in biological systems”, *Biochemical Pharmacology*, 65(1), 67-74, (2003).

Hensbergen, P. J., Wijnands, P. G. B., Schreurs, M. W., Scheper, R. J., Willemze, R., Tensen, C. P., “The CXCR3 targeting chemokine CXCL11 has potent antitumor activity in vivo involving attraction of CD8+ T lymphocytes but not inhibition of angiogenesis”, *Journal of Immunotherapy*, 28(4), 343-351, (2005).

Hirano, T., “IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer”, *International Immunology*, Volume 33, Issue 3, Pages 127–148, (2021).

Hu, X., Jiang, J., Ni, C., Xu, Q., Ye, S., Wu, J., Ge, F., Han, Y., Mo, Y., Huang, D., Yang, L., “HBV Integration-mediated Cell Apoptosis in HepG2.2.15.”, *Journal of Cancer*, (2019).

Huang, C. Y., Fong, Y. C., Lee, C. Y., Chen, M. Y., Tsai, H. C., Hsu, H. C., Tang, C. H., “CCL5 increases lung cancer migration via PI3K, Akt and NF- $\kappa$ B pathways”, *Biochemical Pharmacology*, 77(5), 794-803, (2009).

Hwang, T. L., Lee, L. Y., Wang, C. C., Liang, Y., Huang, S. F., Wu, C. M., “CCL7 and CCL21 overexpression in gastric cancer is associated with lymph node metastasis and poor prognosis”, *World Journal of Gastroenterology*, 18(11), 1249–1256, (2012).

İsan, H., Tombuş, A. C., Doğru, H. O., Şanlı, G., Aktaş, R. G., “Karaciğer kanser hücrelerinin sitoplazmik özellikleri ile kültür süreci ilişkisi: Konfokal mikroskopik karşılaştırmalı kantitatif bir çalışma”, *Maltepe Tıp Dergisi*, 8(3), 18-23, (2016).

Jager, A., Sleijfer, S., Van Der Rijt, C. C. D., “The pathogenesis of cancer related fatigue: could increased activity of pro-inflammatory cytokines be the common denominator?”, *European Journal of Cancer*, 44(2), 175-181, (2008).

Ji, X. Y., Xue, S. T., Zhan, Y. C., Shen, J. J., Wu, L. T., Jin, J., Wang, Z., Li, Z. R., “Design, synthesis and antiproliferative activity of a novel class of indole-2-carboxylate derivatives”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 83, 409–418, (2014).

Jung, D. W., Che, Z. M., Kim, J., Kim, K., Kim, K. Y., Williams, D., Kim, J., “Tumor-stromal crosstalk in invasion of oral squamous cell carcinoma: a pivotal role of CCL7”, *International Journal of Cancer*, 127(2), 332-344, (2010).

Karin, N., and Razon, H., “Chemokines beyond chemo-attraction: CXCL10 and its significant role in cancer and autoimmunity”, *Cytokine*, 109, 24-28, (2018).

Kawka, E., Witowski, J., Fouquet, N., Tayama, H., Bender, T. O., Catar, R., Jörres, A., “Regulation of chemokine CCL5 synthesis in human peritoneal fibroblasts: a key role of IFN- $\gamma$ ”, *Mediators of Inflammation*, (2014).

Kim, B. H., and Park, J. W., “Epidemiology of liver cancer in South Korea”, *Clinical and Molecular Hepatology*, 24(1), 1–9, (2018).

Kishimoto, T., Akira, S., Taga, T., “Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines”, *Science (New York, N.Y.)*, 258(5082), 593–597, (1992).

Knüpfer, H., and Preiß, R., “Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer”, *Breast Cancer Research and Treatment*, 102(2), 129-135, (2007).

Kong, Y., Zhou, X., Cao, G., Xu, X., Zou, M., Qin, X., Zhang, R., “Preparation of  $^{99m}\text{Tc}$ -PQQ and preliminary biological evaluation for the NMDA receptor”, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 287(1), 93–101, (2011).

Kosano, H., Setogawa, T., Kobayashi, K., Nishigori, H., “Pyrroloquinoline quinone (PQQ) inhibits the expression of tyrosinase mRNA by alpha-melanocyte stimulating hormone in murine B16 melanoma cells”, *Life Sciences*, 56(20), 1707–1713, (1995).

Lai, S., “Cancer related fatigue and cancer cachexia are the consequence of endocrine failure caused by persistent stress”, *Medical Hypotheses*, 123, 60–62, (2019).

Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., Thuwajit, C., Hermoso, M. A., “Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment”, *Journal of Immunology Research*, (2014).

Lee, E. Y., Lee, Z. H., and Song, Y. W., “CXCL10 and autoimmune diseases”, *Autoimmunity Reviews*, 8(5), 379-383, (2009).

Lee, Y. S., Kim, S. Y., Song, S. J., Hong, H. K., Lee, Y., Oh, B. Y., Cho, Y. B., “Crosstalk between CCL7 and CCR3 promotes metastasis of colon cancer cells via ERK-JNK signaling pathways”, *Oncotarget*, 7(24), 36842, (2016).

Li, L., and Wang, H., “Heterogeneity of liver cancer and personalized therapy”, *Cancer Letters*, 379(2), 191–197, (2016).

Li, M., Knight, D. A., Snyder, L. A., Smyth, M. J., Stewart, T. J., “A role for CCL2 in both tumor progression and immunosurveillance”, *Oncoimmunology*, 2(7), e25474, (2013).

Lim, S. Y., Yuzhalin, A. E., Gordon-Weeks, A. N., Muschel, R. J., “Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis”, *Oncotarget*, 7(19), 28697–28710, (2016).

Lin, J., and Redies, C., “Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression”, *Development Genes and Evolution*, 222(6), 369-376, (2012).

Lin, X., Yang, F., Huang, J., Jiang, S., Tang, Y., Li, J., “Ameliorate effect of pyrroloquinoline quinone against cyclophosphamide-induced nephrotoxicity by activating the Nrf2 pathway and inhibiting the NLRP3 pathway”, *Life Sciences*, 256, 117901, (2020).

Liu, L., Zhang, Y., Liu, T., Ke, C., Huang, J., Fu, Y., Chen, Q., “Pyrroloquinoline quinone protects against exercise-induced fatigue and oxidative damage via improving mitochondrial function in mice”, *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 35(4), e21394, (2021).

Liu, M., Guo, S., and Stiles, J. K., “The emerging role of CXCL10 in cancer”, *Oncology Letters*, 2(4), 583-589, (2011).

Liu, T., McDonnell, P. C., Young, P. R., White, R. F., Sirèn, A. L., Hallenbeck, J. M., Feurestein, G. Z., “Interleukin-1 beta mRNA expression in ischemic rat cortex”, *Stroke*, 24(11), 1746-1750, (1993).

Liu, Y., Cai, Y., Liu, L., Wu, Y., Xiong, X., “Crucial biological functions of CCL7 in cancer”, *PeerJ*, 6, e4928, (2018).

Liu, Z., Sun, C., Tao, R., Xu, X., Xu, L., Cheng, H., Zhang, D., “Pyrroloquinoline quinone decelerates rheumatoid arthritis progression by inhibiting inflammatory responses and joint destruction via modulating NF- $\kappa$ B and MAPK pathways”, *Inflammation*, 39(1), 248-256, (2016).

Lujambio, A., and Lowe, S. W., “The microcosmos of cancer”, *Nature*, 482(7385), 347-355, (2012).

Lumpe, H., Mayer, P., and Daumann, L. J., “Crystal structure of a calcium(II)-pyrroloquinoline quinone (PQQ) complex outside a protein environment”, *Acta Crystallographica Section C, Structural Chemistry*, 76(Pt 12), 1051–1056, (2020).

Marella, A., Tanwar, O. P., Saha, R., Ali, M. R., Srivastava, S., Akhter, M., Shaquiquzzaman, M., Alam, M. M., “Quinoline: A versatile heterocyclic”, *Saudi Pharmaceutical Journal the Official Publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 21(1), 1–12, (2013).

Marengo, A., Rosso, C., Bugianesi, E., “Liver Cancer: Connections with Obesity, Fatty Liver, and Cirrhosis”, *Annual Review of Medicine*, 67, 103–117, (2016).

Marques, R. E., Guabiraba, R., Russo, R. C., Teixeira, M. M., “Targeting CCL5 in inflammation”, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 17(12), 1439-1460, (2013).

Medzhitov, R., “Origin and physiological roles of inflammation”, *Nature*, 454(7203), 428-435, (2008).

Min, Z., Wang, L., Jin, J., Wang, X., Zhu, B., Chen, H., Cheng, Y., “Pyrroloquinoline Quinone Induces Cancer Cell Apoptosis via Mitochondrial-Dependent Pathway and Down-Regulating Cellular Bcl-2 Protein Expression”, *Journal of Cancer*, 5(7), 609–624, (2014).

Misra, H. S., Rajpurohit, Y. S., Khairnar, N. P., “Pyrroloquinoline-quinone and its versatile roles in biological processes”, *Journal of Biosciences*, 37(2), 313–325, (2012).

Mizel, S. B., “The interleukins 1”, *The The Federation of American Societies for Experimental Biology journal*, 3(12), 2379-2388, (1989).

Mocellin, S., and Nitti, D., “TNF and cancer: the two sides of the coin”, *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 13(7), 2774-2783, (2008).

Moore, P., and Chang, Y., “Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology”, *Nature Reviews Cancer*, 10, 878–889, (2010).

Müller, M., Carter, S., Hofer, M. J., Campbell, I. L., “The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity—a tale of

conflict and conundrum”, *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 36(5), 368-387, (2010).

Nathan, C., and Ding, A., “Nonresolving inflammation”, *Cell*, 140(6), 871-882, (2010).

Nault, J. C., and Villanueva, A., “Intratumor molecular and phenotypic diversity in hepatocellular carcinoma”, *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 21(8), 1786–1788, (2015).

Naveed, M., Tariq, K., Sadia, H., Ahmad, H., Mumtaz, A. S., “The life history of pyrroloquinoline quinone (PQQ): a versatile molecule with novel impacts on living systems”, *International Journal of Molecular Sciences*, 1, 1-20, (2016).

Nennig, S. E., and Schank, J., “The role of NFkB in drug addiction: beyond inflammation”, *Alcohol and Alcoholism*, 52(2), 172-179, (2017).

Neuman, M. G., “Immune dysfunction in inflammatory bowel disease”, *Translational Research*, 149(4), 173-186, (2007).

Neurath, M. F., “Cytokines in inflammatory bowel disease”, *Nature Reviews Immunology*, 14(5), 329-342, (2014).

O'Neill, L. A., and Kaltschmidt, C., “NF-kB: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function”, *Trends in Neurosciences*, 20(6), 252-258, (1997).

Orcutt, S. T., and Anaya, D. A., “Liver Resection and Surgical Strategies for Management of Primary Liver Cancer”, *Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center*, 25(1), (2018).

Patil, K. R., Mahajan, U. B., Unger, B. S., Goyal, S. N., Belemkar, S., Surana, S. J., Ojha, S., Patil, C. R., “Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals”, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4367, (2019).

Pedersen, B. K., “Exercise and cytokines”, *Immunology and Cell Biology*, 78(5), 532-535, (2000).

Pulugulla, S. H., Packard, T. A., Galloway, N. L., Grimmett, Z. W., Doitsh, G., Adamik, J., Auron, P. E., “Distinct mechanisms regulate IL1B gene transcription in lymphoid CD4 T cells and monocytes”, *Cytokine*, 111, 373-381, (2018).

Qin, R., Sun, J., Wu, J., Chen, L., “Pyrroloquinoline quinone prevents knee osteoarthritis by inhibiting oxidative stress and chondrocyte senescence”, *American Journal of Translational Research*, 11(3), 1460–1472, (2019).

Rahman, M., Deleyrolle, L., Vedam-Mai, V., Azari, H., Abd-El-Barr, M., Reynolds, B. A., “The cancer stem cell hypothesis: failures and pitfalls”, *Neurosurgery*, 68(2), 531–545, (2011).

Registries, “Cancer in Australia: an overview 2012”, *Australian Institute of Health and Welfare*, Canberra, (2012).

Rose-John, S., “IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6”, *International Journal of Biological Sciences*, 8(9), 1237, (2012).

Roy, P. S., and Saikia, B. J., “Cancer and cure: A critical analysis”, *Indian Journal of Cancer*, 53(3), 441–442, (2016).

Rucker, R., Chowanadisai, W., Nakano, M., “Potential physiological importance of pyrroloquinoline quinone”, *Alternative Medicine Review: a Journal of Clinical Therapeutic*, 14(3), 268–277, (2009).

Rull, A., Camps, J., Alonso-Villaverde, C., Joven, J., “Insulin resistance, inflammation, and obesity: role of monocyte chemoattractant protein-1 (or CCL2) in the regulation of metabolism”, *Mediators of Inflammation*, (2010).

Sahoo, A., and Im, S. H., “Interleukin and interleukin receptor diversity: role of alternative splicing”, *International Reviews of Immunology*, 29(1), 77-109, (2010).

Santos, R. V. T. D., Tufik, S., De Mello, M. T., “Exercise, sleep and cytokines: is there a relation?”, *Sleep Medicine Reviews*, 11(3), 231-239, (2007).

Saral, Ö., ve Kolaylı, S., “Arı ürünlerinin karaciğer hasarını önlemedeki rolü nedir?”, (2012).

Sato, K., and Toriyama, M., “Effect of pyrroloquinoline quinone (PQQ) on melanogenic protein expression in murine B16 melanoma”, *Journal of Dermatological Science*, 53(2), 140–145, (2009).

Schiepers, O. J., Wichers, M. C., Maes, M., “Cytokines and major depression”, *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 29(2), 201–217 (2005).

Schmid-Schönbein, G. W., “Analysis of inflammation”, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 8, 93-151, (2006).

Schottelius, A. J. G., and Baldwin Jr, A. S., “A role for transcription factor NF- $\kappa$ B in intestinal inflammation”, *International Journal of Colorectal Disease*, 14(1), 18-28, (1999).

Schulz, W. A., “Molecular biology of human cancers”, *Springer*, 1, 5, 327 p, (2005).

Sethi, G., Sung, B., and Aggarwal, B. B., “TNF: a master switch for inflammation to cancer”, *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 13(13), 5094-5107, (2008).

Shang, G. S., Liu, L., Qin, Y. W., “IL-6 and TNF- $\alpha$  promote metastasis of lung cancer by inducing epithelial-mesenchymal transition”, *Oncology Letters*, 13(6), 4657–4660, (2017).

Shankar, B. S., Pandey, R., Amin, P., Misra, H. S., Sainis, K. B., “Role of glutathione in augmenting the anticancer activity of pyrroloquinoline quinone (PQQ)”, *Redox Report*, 15(4), 146-154, (2010).

Siegel, R. L., Miller, K. D., Jemal, A., “Cancer Statistics, 2017”, *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 67(1), 7–30, (2017).

Sikand, K., Singh, J., Ebron, J. S., Shukla, G. C., “Housekeeping gene selection advisory glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and  $\beta$ -actin are targets of miR-644a”, *Plos One*, (2012).

Song, M., and Kellum, J. A., “Interleukin-6”, *Critical Care Medicine*, 33(12), S463-S465, (2005).

Soria, G., and Ben-Baruch, A., “The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer”, *Cancer Letters*, 267(2), 271-285, (2008).

Stites, T. E., Mitchell, A. E., Rucker, R. B., “Physiological importance of quinoenzymes and the O-quinone family of cofactors”, *The Journal of Nutrition*, 130(4), 719–727, (2000).

Strieter, R. M., Kunkel, S. L., Bone, R. C., “Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation”, *Critical Care Medicine*, 21(10 Suppl), S447-63, (1993).

Şen, M., Ay, U., Akbayır, E., Şenyer, S., Tüzün, E., Küçükali, C. İ., “NF-κB, SUMO ve Ubikitinasyon İlişkisi”, *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 7(13), 35-46, (2017).

Tao, R., Wang, S., Xia, X., Wang, Y., Cao, Y., Huang, Y., Xu, X., Liu, Z., Liu, P., Tang, X., Liu, C., Shen, G., Zhang, D., “Pyrroloquinoline Quinone Slows Down the Progression of Osteoarthritis by Inhibiting Nitric Oxide Production and Metalloproteinase Synthesis”, *Inflammation*, 38(4), 1546–1555, (2015).

Tokunaga, R., Zhang, W. U., Naseem, M., Puccini, A., Berger, M. D., Soni, S., Lenz, H. J., “CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation—a target for novel cancer therapy”, *Cancer Treatment Reviews*, 63, 40-47, (2018).

Toscano, J. H. B., Lopes, L. G., Giraldeho, L. A., da Silva, M. H., Okino, C. H., de Souza Chagas, A., “Identification of appropriate reference genes for local immune-related studies in Morada Nova sheep infected with *Haemonchus contortus*”, *Molecular Biology Reports*, 45(5), 1253-1262, (2018).

Valastyan, S., and Weinberg, R. A., “Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms”, *Cell*, 147(2), 275–292, (2011).

Van Den Borne, P., Quax, P. H., Hofer, I. E., Pasterkamp, G., “The multifaceted functions of CXCL10 in cardiovascular disease”, *BioMed Research International*, (2014).

Vatansever, S., ve Karasu, Z., “Karaciğer Kanseri”, (2019).

Visser, K. E., Eichten, A., Coussens, L. M., “Paradoxical roles of the immune system during cancer development”, *Nature reviews Cancer*, 6(1), 24–37, (2006).

Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., “Tumor necrosis factor signaling”, *Cell Death & Differentiation*, 10(1), 45-65, (2003).

Wang, C. H., Wey, K. C., Mo, L. R., Chang, K. K., Lin, R. C., Kuo, J. J., “Current trends and recent advances in diagnosis, therapy, and prevention of hepatocellular carcinoma”, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 16(9), 3595–3604, (2015).

Wang, Z., Han, N., Zhao, K., Li, Y., Chi, Y., Wang, B., “Protective effects of pyrroloquinoline quinone against oxidative stress-induced cellular senescence and inflammation in human renal tubular epithelial cells via Keap1/Nrf2 signaling pathway”, *International Immunopharmacology*, 72, 445-453, (2019).

Weinberg, R., “How Cancer Arises”, *Scientific American*, 275(3), 62-70, Retrieved June 6, 2021, (1996).

Wen, J., Shen, J., Zhou, Y., Zhao, X., Dai, Z., Jin, Y., “Pyrroloquinoline quinone attenuates isoproterenol hydrochloride-induced cardiac hypertrophy in AC16 cells by inhibiting the NF- $\kappa$ B signaling pathway”, *International Journal of Molecular Medicine*, 45(3), 873–885, (2020).

Wen, L., Lu, X., Wang, R., Jin, X., Hu, L., You, C., “Pyrroloquinoline quinone induces chondrosarcoma cell apoptosis by increasing intracellular reactive oxygen species”, *Molecular Medicine Reports*, 17: 7184-7190, (2018).

Weyesa, A., and Mulugeta, E., “Recent advances in the synthesis of biologically and pharmaceutically active quinoline and its analogues: a review”, *The Royal Society of Chemistry Advances*, 10(35), 20784–20793, (2020).

Wood, S., Jayaraman, V., Huelsmann, E. J., Bonish, B., Burgad, D., Sivaramakrishnan, G., et al., “Pro-Inflammatory Chemokine CCL2 (MCP-1) Promotes Healing in Diabetic Wounds by Restoring the Macrophage Response”, *Plos One*, 9(3): e91574, (2014).

Wu, R., Pan, J., Shen, M., Xing, C., “Apoptotic effect of pyrroloquinoline quinone on chondrosarcoma cells through activation of the mitochondrial caspase-dependent and caspase-independent pathways”, *Oncology Reports*, 40(3), 1614–1620, (2018).

Wu, S., Rhee, K. J., Albesiano, E., Rabizadeh, S., Wu, X., Yen, H. R., Huso, D. L., Brancati, F. L., Wick, E., McAllister, F., Housseau, F., Pardoll, D. M., Sears, C. L., “A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses”, *Nature Medicine*, 15(9), 1016–1022, (2009).

Wu, Z., Huang, X., Han, X., Li, Z., Zhu, Q., Yan, J., Wang, Y., “The chemokine CXCL9 expression is associated with better prognosis for colorectal carcinoma patients”, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 78, 8-13, (2016).

Xu, X., Chen, C., Lu, W. J., Su, Y. L., Shi, J. Y., Liu, Y. C., Wang, L., Xiao, C. X., Wu, X., Lu, Q., “Pyrroloquinoline quinone can prevent chronic heart failure by regulating mitochondrial function”, *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*, 10(3), 453–469, (2020).

Zhang, J., Patel, L., Pienta, K. J., “Targeting chemokine (CC motif) ligand 2 (CCL2) as an example of translation of cancer molecular biology to the clinic”, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 95, 31-53, (2010).

Zhang, J. M., and An, J., “Cytokines, inflammation, and pain”, *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27–37, (2007).

Zhang, J., Meruvu, S., Bedi, Y. S., Chau, J., Arguelles, A., Rucker, R., Choudhury, M., “Pyrroloquinoline quinone increases the expression and activity of Sirt1 and-3 genes in HepG2 cells”, *Nutrition Research*, 35(9), 844-849, (2015).

Zhang, Q., Zhou, J., Shen, M., Xu, H., Yu, S., Cheng, Q., Ding, F., “Pyrroloquinoline Quinone Inhibits Rotenone-Induced Microglia Inflammation by Enhancing Autophagy”, *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(19), 4359, (2020).

