



**FARKLI *Thermopsis turcica* EKSTRELERİNİN HepG2
HÜCRE HATLARINDA ANTİKANSER, SİTOTOKSİK,
GENOTOKSİK MEKANİZMALARININ
GEN EKSPRESYON ANALİZLERİ YÖNTEMİYLE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Muhammad MUDDASSİR ALİ

Danışman

Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Temmuz, 2017

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**FARKLI *Thermopsis turcica* EKSTRELERİNİN HepG2 HÜCRE
HATLARINDA ANTİKANSER, SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK
MEKANİZMALARININ GEN EKSPRESYON ANALİZLERİ
YÖNTEMİYLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Muhammad MUDDASSİR ALİ

Danışman

Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİKANABİLİM DALI

Temmuz, 2017

TEZ ONAY SAYFASI

Muhammad MUDDASSİR ALİ tarafından hazırlanan “Farklı *Thermopsis turcica* Ekstrelerinin HepG2 Hücre Hatlarında Antikanser, Sitotoksik, Genotoksik Mekanizmalarının Gen Ekspresyon Analizleri Yöntemiyle Değerlendirilmesi” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca/...../..... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Başkan : Doç. Dr. Mustafa KARGIOĞLU
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,

Üye : Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,

Üye : Doç. Dr. Recep LİMAN
Uşak Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,

Üye : Doç. Dr. Ömer HAZMAN
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,

Üye : Yrd. Doç. Dr. Funda KARABAĞ ÇOBAN
Uşak Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
...../...../..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. Hüseyin ENGİNAR
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi

**Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım
bu tez çalışmada;**

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

11/07/2017

Muhammad Muddassir ALİ

ÖZET

Doktora Tezi

FARKLI *Thermopsis turcica* EKSTRELERİNİN HepG2 HÜCRE HATLARINDA ANTİKANSER, SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK MEKANİZMALARININ GEN EKSPRESYON ANALİZLERİ YÖNTEMİYLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Muhammad MUDDASSİR ALİ

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Günümüzde birçok geleneksel tıbbi bitki, farklı kanser türlerini tedavi etmek için yaygın şekilde kullanılmaktadır. Benzer şekilde, birçok *Thermopsis* türü, geleneksel oryantal ilaçların kaynağı olarak kullanılmaktadır ve tüm dünyada şifalı bitkiler olarak adlandırılmaktadır. Birçok türü dünyanın farklı bölgelerinde endemiktir. Türkiye endemiği olan *Thermopsis turcica* (*T. turcica*) 'nın genel antioksidan, antibakteriyel ve anti-kanser aktiviteleri açıktır, ancak genotoksitesitesi ve gen ekspresyonu analizinde, özellikle karaciğer karsinomasında, HepG2 hücre hattı ile ilgili kapsamlı araştırmalar yapılmamıştır. Bu nedenle, bu çalışma HepG2 hücre hatlarında *T. turcica* 'nın farklı ekstrelerinin gen ekspresyon analizi yoluyla sitototoksik etkisi MTT yöntemi ile, genototoksik etkisi comet yöntemi ile ve apoptotik mekanizmaları araştırmak üzere tasarlanmıştır. MTT sitotoksitesite yönteminde, etil asetat ekstreleri, diğer ekstrelerle kıyasla en yüksek sitotoksik etkiyi göstermiştir. Metanol ekstresi, etanol ekstresi ile karşılaştırıldığında yüksek konsantrasyonlarda daha fazla etkiye sahiptir. Su ekstresi ve hekzan ekstresi en az sitotoksik etki göstermiştir. MTT sonuçlarına bağlı olarak sitotoksik ve nonsitotoksik dozları sırasıyla 200 µg/ml ve 50 µg/ml olarak bulunmuştur. Etil asetat ekstresi, sitotoksik konsantrasyonda en yüksek DNA hasarını (22.33 ± 1.52) göstermiştir. En az hasar sırasıyla her iki konsantrasyonda su ekstresinde (8.33 ± 1.73 ; 4.33 ± 0.57) gözlenmiştir. 200 µg/ml konsantrasyonda tüm gruplar, kontrol grubundan önemli ölçüde farklıydı ($P < 0.05$). Ekstrelerin tüm konsantrasyonlarında PCBP4, Bax,

Bcl-2 ve Bcl-xl genlerinin ifadelerinde baskılanma gözlemlenirken, p53, p21, Siklin D1, NFkB, TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 genlerinin ifadelerinde uyarılma gözlemlenmiştir. Kaspaz 3, 8 ve 7, aynı zamanda, baskılanma görülen heksan ve su haricinde, farklı özütlerin tüm dozlarında ifade edilmiştir. DNA tamir genleri sitotoksik olmayan hekzan ekstresi konsantrasyonları ve su ekstresinin her iki konsantrasyonu dışında düzenlenmiştir. *T. turcica*'nın çeşitli ekstreleri, HepG2 hücrelerinde antikanser aktivitesi ifade ederken etil asetat ekstreleri ise en yüksek sitotoksik ve genotoksik aktiviteye sahiptir.

2017, xii + 69 sayfa

Anahtar kelimeler: Apoptoz, Sitotoksisite, Hepatokarsinoma, Endemik bitki, Hücre döngüsü, Genotoksisite.

ABSTRACT

PhD Thesis

EVALUATION OF ANTI-CANCEROUS, CYTOTOXIC, GENOTOXIC MECHANISMS VIA GENE EXPRESSION ANALYSIS OF VARIOUS EXTRACTS FROM *Thermopsis turcica* IN HepG2 CELL LINE

Muhammad MUDDASSİR ALİ

Afyon Kocatepe University

Institute of Science and Technology

Department of Molecular Biology and Genetics Department

Supervisor: Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Nowadays, many traditional medicinal plants are extensively being used to treat different kind of cancers. Similarly, many species of *Thermopsis* have been used as a source of traditional oriental medicines and considered to be medicinal plants all over the world. Its many species are endemic in different regions of the world, for example, *Thermopsis turcica* (*T. turcica*) is endemic to Turkey. Its general anti-oxidant, antibacterial and anti-cancerous activities are evident, but no deep investigations have been observed in term of genotoxicity and gene expression analysis, especially on liver carcinoma, HepG2 cell line. So, current study was designed to investigate the cytotoxic, genotoxic and apoptotic mechanisms via gene expression analysis of various extracts from *T. turcica* in HepG2 cell line. In MTT cytotoxicity assay, ethyl acetate extracts showed the highest cytotoxic effect, compared to other extracts. Methanol had more effect at higher concentration compared to ethanol. Water and hexane had the least cytotoxic effects. Depending upon the MTT results, cytotoxic and non-cytotoxic doses were selected as 200 µg/ml and 50 µg/ml, respectively. Ethyl acetate showed the highest DNA damage (22.33 ± 1.52) at cytotoxic concentration. While least was observed in water extract (8.33 ± 1.73 ; 4.33 ± 0.57) at both concentrations, respectively. All groups were significantly differ ($P > 0.05$) from the control group at 200 µg/ml concentration. Up regulation of the p53, p21, Cyclin D1, NFkB, TRAIL-R1 and TRAIL-R2 was observed, Whereas, down regulation was observed in PCBP4, Bax, bcl-2 and bcl-xl

genes at all concentrations of the all extracts. Kaspaz 3, 8 and 7 were also expressed at all doses of different extracts, except for the hexane and water, where they were down regulated. DNA repair genes were up regulated except at the non-cytotoxic concentrations of hexane and at both concentrations of water extracts. Various extracts of *T. turcica*, expressed the anti cancerous activity in the HepG2 cells and ethyl acetate extracts had the highest cytotoxic and genotoxic activity.

2017, xii + 69 pages

Keywords: Apoptosis, Cytotoxicity, Hepatocarcinoma, Endemic plant, Cell cycle, Genotoxicity.

TEŞEKKÜR

Tezim boyunca bana her türlü desteği gösteren, iyi niyet ve sabırla beni bu çalışmaya teşvik eden değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ' ye teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım boyunca fikir ve önerileri ile yardımcı olan ve laboratuvar çalışmalarında her türlü kolaylığı gösteren değerli hocam Sayın Doç. Dr. Ömer HAZMAN' a ve çalışmalarında her zaman bana yardımcı olan Dr. Şöhret YÜKSEK KAYGISIZ, Halil TURHAN, Tuğba TAŞÇAN ve Gizem SAÇLI' ya teşekkür ederim. Beni destekleyerek, doktora programına Afyon Kocatepe Üniversitesi' nde devam etme imkânı sağladığı için TÜBİTAK 2215 programına teşekkür ederim.

Ayrıca hep yanımda olan bana her zaman inanan, güvenen, destek olan, varlığı ile daima güç veren aileme ve özellikle eşime sonsuz teşekkür ediyorum.

Muhammad Muddassir Ali
AFYONKARAHİSAR, 2017

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	5
2.1 Thermopsis cinsi	5
2.2 Thermopsis Türlerinin Tıbbi Özellikleri	7
2.3 Hepatosellüler kanser (HCC)	9
2.4 Apoptozis	10
2.4.1 HEPG2 Hücrelerinde Apoptotik Mekanizmalar	11
2.4.2 Ekstrinsik Yol (Reseptör aracılı Apoptozis)	11
2.4.3 İntrinsik Yol (mitokondri aracılı apoptozis)	12
2.5 Apoptotik Geneleri.....	14
2.5.1 P53 Geni.....	14
2.5.2 P21 Geni.....	15
2.5.3 PCBP4 Geni	16
2.5.4 Siklin D1 Geni	17
2.5.5 Kaspaz Genleri.....	18
2.6 Pro ve Anti-apoptotik Genelri	20
2.6.1 Bcl-2 ailesi	20
2.7 Toll Benzeri Reseptörleri (Sitokinler) Doku Nekroz Faktörleri	21

2.7.1 NFkB Geni	22
2.8 Onarım Genleri.....	23
2.8.1 OGG1 Geni	23
2.8.2 ERCC4 Geni	23
2.9 Apoptozis, Apoptotik Yol ve HepG2 Hücre Hattındaki Farklı Kemotoksik Ajanlar Tarafından Hücre Döngüsünün Durdurulması	24
2.10 Komet Yöntemi	26
3. MATERYAL ve METOT	27
3.1 Materyaller	27
3.1.1 Kullanılan Cihazlar ve Kitler	27
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları	28
3.2 Metot	30
3.2.1 Bitkilerin toplanması.....	30
3.2.1.1 Bitki ekstraksiyonu.....	30
3.2.1.2 Hücre Hatlarını Kültürlenmesi	31
3.2.1.3 Hücrelerin Pasajlanması	31
3.2.1.4 HepG2 Hücrelerinin Sıvı Azotta Saklanması	32
3.2.1.5 Hücre Sayımı ve Hücre Canlılığının Tripan Blue Yöntemi ile Belirlenmesi	32
3.2.1.6 MTT Yöntemi ile <i>Thermopsis turcica</i> 'nin LD ₅₀ Dozunun Belirlenmesi .	33
3.2.2 Genotoksisite Deneyi	33
3.2.2.1 Komet Yöntemi	33
3.2.3 RNA izolasyonu.....	34
3.2.3.1 Protokol	35
3.2.3.2 RNA Saflık kontrolü ve cDNA Sentezi.....	35
3.2.4 qQRT-PCR Vasıtasıyla Gen Ekspresyonunun Analizi.....	36
3.2.5 İstatistiksel Analiz.....	38

4. BULGULAR	39
4.1 Hücre Canlılığı Test Sonuçları	39
4.2 <i>T. turcica</i> 'nın Farklı Ekstrelerinin Genotoksisite Analizinin Sonuçları	41
4.3 HepG2 Hücre Dizisinde Apoptotik ve DNA Onarım Genlerinin Mesajcı RNA (mRNA) Ekspresyon Seviyeleri	41
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	48
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	68



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

mM	Milimolar
mg/L	Miligram/Litre
µg / ml	mikrogram/mili litre
°C:	Derece santigrat
%:	Yüzde
<:	Küçüktür

Kısaltmalar

DNA	Deoksiribonükleik asit
NMPA	Normal erime noktalı agaroz
LMPA	Düşük erime noktalı agaroz
DMSO	Dimetil sülfoksit
UV	Ultraviyole
Tm	Erime sıcaklığı
Rpm	Dakikadaki dönüş hızı
RNA	Ribonükleik asit
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Bcl-2	B hücreli lenfoma 2
Bcl-xl	B hücreli lenfoma-ekstra geniş
Bax	BCL 2 ilişkili X proteini
PCBP4	Poli (RC) bağlayıcı protein 4
OGG1	8-Oksoguanin DNA glikosilaz 1
ERCC4	Eksizyon Onarımı Çapraz İyileştirme 4

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. <i>T. turcica</i> 'da (A) tek çiçekten gelişmiş 4 serbest karpelli meyve ve (B) tek çiçekten gelişmiş 3 serbest karpelli olgunlaşmış meyve	5
Şekil 2.2. <i>T. turcica</i> 'nın yayılış alanında belirlenen populasyonlar.	6
Şekil 2.3. P53 gen aktivasyonunun genel mekanizması.....	15
Şekil 2.4. PCBP4'ün apoptoz ve hücre döngüsü durması yolağı	17
Şekil 2.5. Başlatıcı ve Sonlandırıcı kaspazların mekanizması.	19
Şekil 2.6. Bcl-2 ailesinin apoptoz indükleyen ve inhibe eden genleri.	20
Şekil 2.7. Bcl-2 ailesinin görev dağılımı.	21
Şekil 2.8. TRAIL reseptörlerinin ve indüklediği dış apoptotik yolağın şematik gösterimi	22
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyon serileri (50 µg/ml, 100 µg/ ml, 200 µg/ ml, 300 µg/ ml, 400 µg/ ml) <i>T. turcica</i> 'nın çeşitli ekstrelerinin HepG2 hücresi üzerindeki sitotoksik etkileri.	40
Şekil 5.1. <i>T. Turcica</i> 'nın çeşitli ekstreleri tarafından indüklenen apoptoz ve hücre siklusu arrestinin moleküler mekanizması (etkileşimi).	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Primer sekanslar, apoptotik ve onarım genlerinin PCR koşulları.	37
Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda <i>T. turcica</i> ekstrelerinin sitotoksik etkileri ile ilgili sonuçlar.	40
Çizelge 4.2. <i>T. turcica</i> 'nın sitotoksik ve sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda farklı ekstrelerinin DNA hasar skorları	41
Çizelge 4.3. Apoptotik genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri.	42
Çizelge 4.4. Pro apoptotik ve anti apoptotik genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri....	46
Çizelge4.5.Toll benzeri reseptör genleri ve onarım genleri mRNA ekspresyon düzeyleri.	47

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

Resim 3.1. Bitkilerin toplanması.....	30
Resim 3.2. HepG2 hücrelerinin mikroskop görüntüsü (a: 20-30% konfluent; a: 85-95% konfluent).....	31
Resim 3.3. Sitotoksisite ve genotoksisite testleri için hücrelerin kültüre edilmesi.	34



1. GİRİŞ

İnsanoğlu geniş kapsamlı sağlık sorunlarını tedavi etmek için yüzyıllardır tıbbi ajan kaynağı olarak bitkilere güvenmektedir. Doğal ilaçların sentetik ilaçlardan çok daha güvenli olduğu inancı son yıllarda popülerlik kazanarak, fitofarmasötiklerin kullanımında muazzam bir artışa neden olmuştur. Son yıllarda, çeşitli hastalıkların gelişimine karşı doğal bileşenlerin tanımlanması konusunda artan bir ilgi mevcuttur. Batı toplumlarında bitkisel ilaçlar veya sağlıklı gıdalar vasıtasıyla nüfusun tükettiği bitki ürün çeşitliliğini arttırmaya yönelik bir eğilim görülmektedir (Ahmad *et al.* 2007).

Potansiyel kemoterapötik ilaçları ortaya çıkarmak ve bu potansiyel ilaçların ortak kullanım emniyetini belirlemek için şifalı bitkiler incelenmektedir. Türkiye, çeşitlilik açısından zengin bitki ve flora örtüsüne sahiptir. Floradaki çeşitlilik, üç fitocoğrafik bölgenin (Akdeniz, İran-Turan ve Avrupa-Sibiry) kesişmesinden, Güney Avrupa florası ile Güneybatı Asya florası arasında bir köprü olmaktan kaynaklanmaktadır. Türkiye çok sayıda bitki cinsinin menşei ve çeşitlendirme merkezi olup, muhtemelen ekolojik ve fitocoğrafik çeşitlilik ile ilgili olan bitki türlerinin endemizm oranı floradaki çeşitliliği artırmaktadır. Tıbbi bitkiler, Türkiye' de bulaşıcı hastalık gibi bazı hastalıkların iyileştirilmesinde önemli rol oynamaktadır (Dagci *et al.* 2002). İlaç niyetine kullanılan bitkilerin kısımları (çiçeği, yaprağı, tohumu, kökü, kabuğu vb.) etkili bileşenlerinden dolayı hastalıkların iyileştirilmesini sağlamaktadır (Kültür 2007, Dogan *et al.* 2010). Tüm dünyada sağlıklı olmaları ve düşük yen etkileri nedeniyle kullanımları artmıştır (Baytop 1999, Dulger ve Gonuz 2004, Basgel ve Erdemoğlu 2006).

Fabaceae familyasında yer alan *Thermopsis* cinsi bitkiler, düşük besi değeri olan zehirli ve zararlı türleri içermektedir. Bununla birlikte, bu cins geleneksel oryantal ilaçların kaynağı olarak da kullanılmıştır ve tüm dünyada şifalı bitkiler olarak addedilmiştir. *T. turcica*, Türkiye' de bu cinsin benzersiz bir endemik türüdür. Batı Anadolu' nun iç kesiminde Eber Gölü ile Akşehir Gölü arasında dar aralıklarla yayılmaktadır (Ekim *et al.* 2000). "Eber Sarısı" veya "Acı Piyan" olarak bilinmektedir. Türkiye bitkileri Kırmızı Veri Kitabı tarafından kritik durumda olan kategoriye ayrılmış olsa da (Ekim *et al.*

2000), biyolojik aktivitelerinin araştırılması, doğada *T. turcica* korunumunun önemini artırabilir. *Thermopsis* türleri sürekli olarak çeşitli alanlarda araştırılmıştır (Tan *et al.* 1983, Saito *et al.* 1989, Özdemir *et al.* 2008, Liman *et al.* 2012). Bazı *Thermopsis* türlerinin flavonoid içeriğinde olarak formononetin, krisozol, apigenin, lüteolin, termopsosid ve sinarozid gibi bileşenler yer almaktadır. *Thermopsis* ekstreleri potansiyel hipolipidemik ve antisklerotik ajan olarak çalışılmıştır (Faizieva *et al.* 1999, Khushbaktova *et al.* 2001, Kotenko *et al.* 2001).

Thermopsis alterniflora, alkaloidler, flavanoidler, C vitamini, makro ve mikro elementleri içerir ve tıbbi ham madde olarak kullanılmaktadır (Asilbekova 2004). *T. turcica* hakkında literatürde sınırlı sayıda araştırma mevcuttur. *T. turcica* ile ilgili çalışmalar antimikrobiyal aktivite, morfoloji ve anatomi, mutajenik potansiyeli, konvansiyonel ve *in vitro* teknikler kullanılarak çoğalmasının saptanması ve serbest radikal temizleme aktivitesi, toplam fenolik içerik, antioksidan özellikleri ile ilgilidir (Cenkci *et al.* 2009, Korcan *et al.* 2009, Aksoy *et al.* 2013, Cigerci *et al.* 2014).

T. turcica Türkiye'ye özgü olmakla birlikte anti kanser özellikleri, genotoksisitesi ve moleküler mekanizması bakımından henüz kapsamlı bir şekilde ele alınıp çalışılmamıştır. *Thermopsis* türlerinin, bitki parçalarını yutan çocuklarda zehirlenme kaynağı olduğuna inanılmaktadır (McGrath-Hill and Vicas 1997). Literatürdeki kaynaklar *Thermopsis* türlerinden hazırlanan ekstrelerin kanser hücreleri için sitotoksik olduğunu belirtmektedir. Bu familyaya ait bitkilerin bileşenleri arasında anagirin, sitisin ve türevleri, termopsin ve lupanin bulunmaktadır. Bu alkaloidlerin sığır gibi otlatılan otoburlar için toksik olduğu gösterilmiştir (Keeler and Baker 1990). Bu bileşiklerin herhangi birinin hücre döngüsünün durdurulmasına, hücrenin adezyonunu etkileyip etkilemediği veya herhangi bir anti-kanser özelliği olup olmadığı bilinmemektedir.

Ayrıca, anti-kanser, sitotoksik bileşiklerle uyumlu olarak, *T. turcica* bitki kısımlarının kullanımında, dozajın kontrol edilemeyeceği, kazara yutma ile bile toksik olduğu görülmüştür. Yapılacak çalışmalarda, farklı ekstreler, doza bağımlı bir şekilde kanser hücrelerine yönelik olarak selektif olacaktır. Bu nedenle, endemik bitki olan *T. turcica* 'nın birçok tıbbi özelliği olduğu ve farklı hepatosellüler karsinomanın (HepG2)

tedavisinde kullanılabileceği düşünülebilir. Bu çalışmanın uygulanması, çeşitli ekstreleri kullanarak *T. turcica*' dan potansiyel anti-kanser molekülleri ve genotoksisiteyi tanımlamak üzere biyolojik etkisi olan bitki bileşenlerini fraksiyonlamaya büyük ölçüde yardımcı olacaktır.

İnsan hepatoselüler karsinom (HepG2) hücre hatları başlangıçta hepatositlerin birçok özelliğini koruyan insan hepatoblastomundan türetilmiştir ve biyolojik çalışma modellerinde, ayrıca ksenobiyotikler için toksisite değerlendirmesinde kullanılmaktadır (Blaauboer *et al.*1998).

T. turcica' nın antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin çalışılmış olmasına rağmen, insan hücreleri üzerindeki etkisinin kapsamlı bir şekilde araştırılması amacıyla herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle, kanserli hücre hatları -insan hepatom HepG2 hücreleri- kullanılarak, hücre kültürü sisteminde *T. turcica*' nın çeşitli ekstrelerinin sitotoksik, genotoksik etkilerinin ve etki mekanizmasının -gen ifadesi analizi yoluyla- değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla sunulan çalışma ile;

1. Anti-kanser ve sitotoksisite testleri HepG2 hücreleri üzerinde yapılmıştır.
2. Genotoksisite değerlendirmesi komet yöntemi ile yapılmıştır. Komet (tek hücre jel elektroforezi) yöntemi düşük seviyelerdeki DNA (Deoksiribonükleik asit) hasarını bile belirleyebilmesinden dolayı diğer yöntemlere göre daha avantajlıdır (Dhawan *et al.*2009). Örnek başına hücre sayısının azlığı, düşük maliyet, uygulama kolaylığı ve kısa sürede çalışmanın tamamlanabilirliği açısından da avantajı fazladır.
3. Gerçek zamanlı PCR kullanarak farklı genlerin ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir. Bu metodolojiyle çeşitli hücresel yollar, P53, P21, Kaspaz 8, Kaspaz 3, Kaspaz 7, Bcl-xl, Bcl-2, Bax, Siklin-D1, NFKB, TRAIL R1, TRAIL R2, PCBP4 ve DNA onarım genleri (ERCC4, OGG1) apoptoz genlerinin gen ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Bu tür yolların çalışılması, atıf yapılan bileşikle işleme tabi tutulan hücrede aktive edilen veya inaktive edilen proseslerin belirlenmesine yardımcı olacaktır.

Çalışma sonunda elde edilen ham veriler istatistiki yöntemlerle analiz edilerek bulgular kısmında sunulmuştur. Çalışmadan elde edilen bulguların bilime olası katkıları ise tezin tartışma kısmında verilmiştir.



2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 *Thermopsis* cinsi

Thermopsis, Orta Asya ve Doğu Amerika' ya özgü bir cins olup, Türkiye' de yalnızca bir endemik tür olan *T. turcica* ile temsil edilmektedir. *T. turcica*' nın morfolojik olarak benzersiz özelliği, üç serbest karpelin muntazam bir şekilde oluşmasıdır (Tan *et al.* 1983, Özdemir *et al.* 2008).

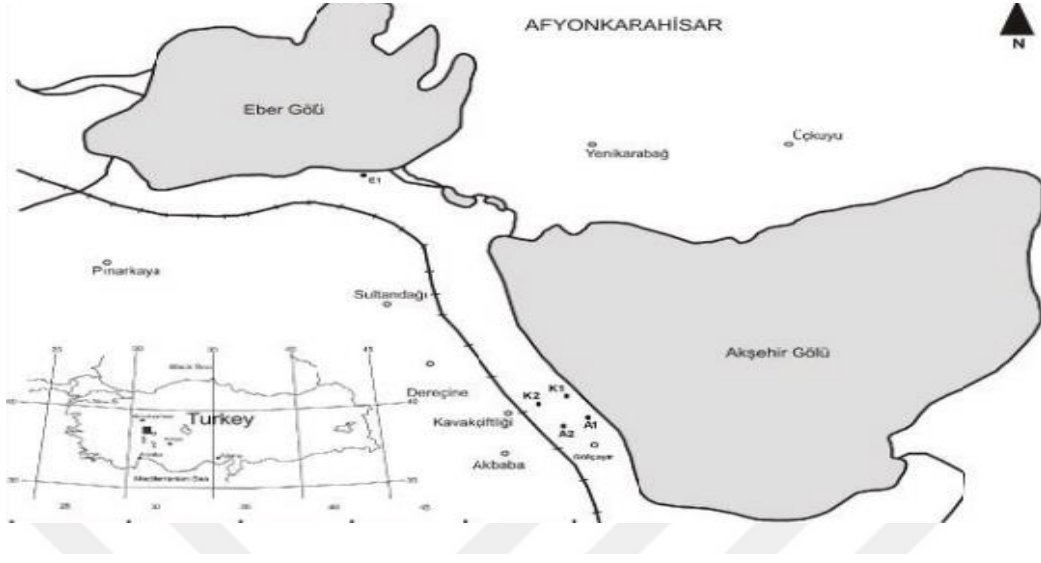
Taksonomik Hiyerarşi

Alem	: Plantae
Sınıf	: Magnoliopsida
Alt sınıfını	: Rosidae
Takım	: Fabales
Familya	: Fabaceae
Cins	: <i>Thermopsis</i>
Tür	: <i>Thermopsis turcica</i>

Thermopsis turcica toprakaltı uzun rizomlu gövdeye sahip, dik 35-80 cm arası boylanan, sarı çiçekli, otsu bir bitki türüdür. Gövde ve yaprakları uzun yumuşak tüylüdür. Yaprakları trifoliattır. Çiçek durumu uç kısımda olup, rasemöz şeklindedir. Çanak yapraklar sık beyaz tüylü, taç yapraklar sarı, yaklaşık 25 mm'dir. Stamenler 10 adet ve serbesttir. Ovaryum 3 karpellidir. Meyve 3-10 tohumlu legümen (bakla tipi) ve tüylüdür (Özdemir *et al.* 2008).



Şekil 2.1 *T. turcica*'da (A) tek çiçekten gelişmiş 4 serbest karpelli meyve ve (B) tek çiçekten gelişmiş 3 serbest karpelli olgunlaşmış meyve (Cenkci *et al.* 2012).



Şekil 2.2 *T. turcica*'nın yayılış alanında belirlenen populasyonlar.

Thermopsis cisine ait diğer türler şöyledir:

Thermopsis alpina (Pall.) Ledeb.,

Thermopsis alterniflora Regel & Schmalh.,

Thermopsis barbata Benth.,

Thermopsis bargusinensis Czefr.,

Thermopsis californica S.Watson,

Thermopsis chinensis S.Moore,

Thermopsis dahurica Czefr.,

Thermopsis divaricarpa A.Nelson,

Thermopsis dolichocarpa V.A.Nikitin.,

Thermopsis fraxinifolia (Torr. & A.Gray) M.A.Curtis.,

Thermopsis gracilis Howell.,

Thermopsis gyirongensis S.Q.Wei,

Thermopsis inflata Cambess.,

Thermopsis jacutica Czefr.,

Thermopsis lanceolata R.Br.,

Thermopsis longicarpa N.Ulziykh.,

Thermopsis lupinoides (L.) S.Q.Wei.,

Thermopsis yushuensis (Walter) Fernald & B.G.Schub.,

Thermopsis yunnanensis Gand.,
Thermopsis villosa (Franch.) P.C. Li.,
Thermopsis turcica Kit Tan & al.,
Thermopsis smithiana E.Peter,
Thermopsis robusta Howell.,
Thermopsis rhombifolia (Pursh) Richardson.,
Thermopsis przewalskii Czefr.,
Thermopsis montana Torr. & A.Gray.,
Thermopsis mongolica Czefr.,
Thermopsis mollis (Michx.) A.Gray.,
Thermopsis macrophylla Hook. & Arn.

Bu cinsin diğ er türlerinden olan *Thermopsis lanceolate* mart ve mayıs ayları arasında görülen mavi/yeşil kalikse sahip parlak sarı çiçekler üreten otsu bir bitki türüdür. Esas olarak üç Moğolistan, Gansu, Ningxia ve Qinghai bölgelerinde bulunan bu cinsin türlerinden birisidir (Yong *et al.* 2007).

Yine bu cinse ait *Thermopsis rhombifolia* bitkisi mayıs ve haziran ayının başlarında  i ek açar ve av için mevsimsel gösterge olarak kullanılır. Bakla şekli ve renkleri sebebiyle "yerel manda fasulyesi" veya "altın fasulye" adları ile anılmaktadır (Peacock 1992).

2.2 Thermopsis Türlerinin Tıbbi  zellikleri

T. turcica yaprak özlerinin toplam alkaloid ve anagyrin tipi alkaloid içeriği sırasıyla % 1.48 ve % 0.69 olarak bildirilmiştir (şener *et al.*1992). *T. turcica*  z tlerinin antimikrobiyal ve mutajenik etkileri gösterilmiştir (Korcan *et al.*2009, Liman *et al.* 2012, Bali *et al.*2014). Her ne kadar şıfalı bir bitki gibi görünse de, halk *T. turcica*' yı benzerlerinde olduğu gibi şıfalı bitki olarak kullanmaz. Örneğin, *Thermopsis lanceolata* R.Br. yaraları tedavi etmek ve ateşi düşürmek için ve bünyeyi güçlendirmek için kullanılmaktadır yine *Thermopsis inflanta* Camb. eklem ağrılarını iyileştirmek için tüketilir ve tohumları genel sağlık durumunu iyileştirmek için oral olarak süt veya su ile tonik niyetine tüketilmektedir (Singh 2012). Diğ er yandan *Thermopsis montana* Nutt.

Montana tohum tozuyla kaynatılan özütü 1950' lerde Amerika' da öksürük ilacı olarak kullanılmıştır (Tilley 2012). Bununla birlikte, *Thermopsis* yaprakları ya da tohumlarının doğrudan evcil hayvanlar tarafından tüketilmesi, hayvan kayıplarına veya doğmamış yavrularda teratojenik etkilere neden olabilmektedir (Keeler and Baker 1990). *Thermopsis* tüketen hayvanların sütüyle beslenen çocuklarda ve hayvanların yavrularında, iskelet ve kas bozuklukları rapor edilmiştir (McGrath-Hill and Vicas 1997). *Thermopsis lanceolate*, hayvanların zehirlenmesine neden olabilen zehirli bitkidir, ancak aynı zamanda nefes açıcı, direnç kazandıran ve öksürük önleme işlevine sahip tıbbi bitkidir (Yong *et al.* 2007) .

T. rhombifolia ile hazırlanan etanolik ekstre HT-29 (kolon) ve SH-SY5Y (beyin) kanser hücre hatlarına karşı sitotoksiktir ve normal insan hücre hattına (WI-38) karşı çok az sitotoksikite sergilemiştir. Bu veriler, kuzey ekolojik bölgelerinde bulunan daha önce denenmemiş bitkilerin anti-kanser potansiyelini ve doğal ürün özütlerinin anti-kanser potansiyelini incelemek için uygulanabilirliğini vurgulamaktadır (Kerneis *et al.* 2014).

Literatürde *T. turcica* bitkisi ile yapılmış çalışmalar sınırlı sayıdadır. *T. turcica*' nın yaprak, kök ve kallus ekstralarının insan patojenik mikroorganizmalarına (*Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, metisilin'e dayanıklı *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*) disk difüzyon yöntemi ile 100 µg/mL konsantrasyonda metabolitler olarak alkaloidler de dahil olmak üzere güçlü antimikrobiyal bileşikler bulunduğu bildirilmiştir (Korcan *et al.* 2009).

Bir başka çalışmada, *T. turcica*' nın su, etanol, metanol, n-hekzan ve etil asetat ekstralarının periyodontopojenik bakteri suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesini araştırmış ve insan kanseri ve HGF hücrelerine karşı antioksidan potansiyel ve sitotoksik etkileri değerlendirmiştir. Etil asetat ekstresi, *A. actinomycetemcomitans* ve *P. gingivalis*' e karşı etanol ve metanol ekstresine kıyasla daha güçlü antimikrobiyal etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu çalışma, *T. turcica*' nın etanol ve etil asetat ekstralarının

HL60 ve K-562 hücreleri üzerinde sitotoksik etkiler gösterdiğini öne sürmektedir. Etil asetat ekstresi, HL60 hücrelerindeki etanol ekstresinden daha güçlü sitotoksik etkiye sahip olduğundan dolayı etil asetat ekstresindeki bileşiklerin toksik fitokimyasalları içerdiğini göstermiştir (Bali *et al.* 2014).

Aksoy vd. (2013), *T. turcica*'nın aseton ve metanol ekstraktlarının tüm konsantrasyonlarda (50, 100, 200 µg/mL) radikal temizleyici etkilere sahip olduğunu ifade etmektedirler antioksidan aktivite sonuçlarına göre BHT'nin radikal temizleme etkisinin, *T. turcica*'ya ait aseton ve metanol ekstresinden yüksek olduğunu bildirilmektedir. Çalışmanın sonucunda aseton ekstresi metanol ekstresine kıyasla daha yüksek radikal temizleme etkisine sahip bulunmuştur.

Thermopsis inflata Camb. (PLP 4213) tohum tozu eklem ağrılarını gidermek için kullanılmıştır. Tonik olarak oral ya da süt ile de alınabilmektedir (Bhattacharyya1991). *Thermopsis schischkinii* (Fabaceae) bitkisinden elde edilen alkaloidler tanımlanarak, Influenza A (H1N1) 'in tedavisinde kullanılmıştır (Tsypysheva *et al.* 2015).

2.3 Hepatosellüler kanser (HCC)

Karaciğerin malign (kötü huylu) tümörleri primer veya sekonder olabilir. Çoğu karaciğer fonksiyonları normal olup asemptomatiktir. Karaciğerde en yaygın görülen iki malign primer tümörü hepatosellüler karsinom (HCC) ve kolanjiyokarsinomdur. HCC; kolanjiyokarsinomadan on kat daha yaygın olup, dünya çapında en yaygın görülen malign primer neoplazmalar arasında bulunmaktadır (Irfan and Dileep 2006). HCC, dünyadaki en yaygın beşinci neoplazi ve kansere bağlı ölümlerin, üçüncü nedenidir. Dünya çapında her yıl 500.000' den fazla yeni vaka teşhis edilmektedir. İnsidans aralığı, Kuzey Amerika ve Batı Avrupa' da her 100.000 nüfusa karşılık 10' dan az, Afrika ve Asya'nın bir bölümünde 100.000 nüfusa karşı 50-150 arasında değişmektedir (Irfan and Dileep 2006).

Son on yılda, hepatit C virüsünün enfeksiyon oranlarının yüksekliği ve siroz yönetimindeki iyileşmelerin bir göstergesi olan HCC insidansı artmıştır. HCC, İngiltere' de nadir görülmekte ve kanserlerin yalnızca% 2' sini oluşturmaktadır. Bu nedenle yılda

1500 ölüm vakası görülmekte ve bu insidans her yıl artmaktadır (Irfan and Dileep 2006).

Karaciğer kanserine model hücre hatlarından biri olan HepG2 hücreleri, 15 yaşında Kafkas etnik kökenli bir erkek hastanın karaciğer epitel dokusundan elde edilmiştir. HepG2 hücreleri tek katmanlı büyüyen yapışkan hücre hattıdır. HepG2 hücreleri, toksikolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılır, çünkü ksenobiyotikleri metabolize etme ve *in vivo*da meydana gelen deney koşullarını yakalama yeteneği sergilemektedir. HepG2 hücreleri, kimyasal karsinogenez ile ilgili işlemleri etkileyen faz I ve II biyotransformasyon enzim aktivitelerinin yüksek olduğu hücrelerdir (Knasmüller *et al.* 2004, Mersch-Sundermann *et al.* 2004). HepG2 hücreleri, fonksiyonel reseptörüne (Roberts *et al.* 1990), indüklenebilir glutatyon S-transferaza (Dawson *et al.* 1985, Dierickx 1989), sülfotransferaz (Dierickx 1989) ve NAD (P) H: kuinon oksidoredüktaza (Backman *et al.* 1991) sahiptir.

2.4 Apoptozis

Hücre proliferasyonu hücrelerin normal yaşam döngüsünde temel teşkil eder. Ancak aşırı olduğunda DNA'yı hedef alan herhangi bir karsinojen, bu etkinliği harekete geçirebilir. Aşırı hücre proliferasyonunun kanserleşmeye yol açtığı kabul edilmektedir. Apoptozis hücre proliferasyonunu düzenleyen ve zıt yönde çalışan bir mekanizmadır. Apoptozis ilk kez 1972'de Kerr ve arkadaşları tarafından "programlı hücre ölümü" olarak tanımlanmıştır. Apoptozis işlevini tamamlamış, yaşlanmış veya hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasında önemlidir. Apoptozise karşı anormal bir direnç çeşitli malformasyonlar, otoimmün hastalıklar ve kanser gelişmesine yol açabilir. Apoptozis değişik yollarla düzenlenir. Genel olarak hücre membranındaki ölüm reseptörlerinin aktive edilmesi apoptozisi başlatır. Bu reseptörler TNF tarafından aktive edilen TNF reseptörünü, FasLigand tarafından aktive edilen Fas reseptörünü ve TRAIL reseptörünü içerir. Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu kaspaz-8 ve kaspaz-10 gibi başlatıcı kaspazları aktive eder. Başlatıcı kaspazlar kaspaz 3 gibi efektör kaspazları aktive eder, bunlar da hücre için yaşamsal olan proteinleri parçalayarak hücre ölümüne yol açarlar. Hasarlı mitokondrilerden açığa çıkan sitokrom-C ve diğer bazı proteinler kaspaz 3'ü daha da

aktive ederler. Böylece mitokondrial membranın bütünlüğünün korunması apoptozisten kaçınmak için şarttır. Mitokondri membran bütünlüğü çoğunlukla Bcl-2 ailesi tarafından kontrol edilir. Bu aile hem Bcl-2, Bcl-xl, Bfl-1/A1 gibi antiapoptotik üyeleri hem de Bid, Bak, Bad, Bax gibi proapoptotik üyeleri içerir. Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyeleri mitokondri dış zarında porlar oluşturarak proapoptotik proteinlerin sitoplazmaya sızmasını sağlarlar. Antiapoptotik üyeler ise mitokondri zarında por oluşumunu engellerler. Böylelikle apoptozisi arttıran proteinler mitokondriden sitoplazmaya geçemezler. Bcl-2 ailesinin pro ve 17 antiapoptotik üyeleri arasındaki denge bir hücrenin apoptozise ne kadar duyarlı yada dirençli olduğunu belirler. Antiapoptotik fenotipe doğru bir geçiş normal hücrelerin sürekli proliferen olan malign hücrelere dönüşümünü tetikleyebilir. Hepatosellüler karsinom ve lösemilerde Bcl-2 ailesinin aşırı ekspresyonu rapor edilmiştir (Erkan 2007).

2.4.1 HEPG2 Hücrelerinde Apoptotik Mekanizmalar

Araştırmalar, ekstrinsik ve intrinsik olarak iki ana apoptotik yolun olduğunu, bu iki yolun birbiri ile bağlantılı olduğu ve bir yolda rol alan moleküllerin diğer yoldakini de etkilediğini göstermiştir. Bu iki yola ilave olarak T-hücre aracılı sitotoksisiteyi ve perforin-granzim bağımlı hücre ölümünü içeren bir yol daha vardır.

2.4.2 Ekstrinsik Yol (Reseptör aracılı Apoptozis)

Hücre ölüm reseptörleri olan Fas ve TNF-R1'in kendi ligandları ile etkileşime girmesi sonucu başlar. Fas ligandı (FasL), sitotoksik T lenfositlerde ve doğal öldürücü (NK) hücrelerde bulunur. TNF-R1'in ligasyonu, TNF-R1'e TNF nin bağlanması ile gerçekleşir (Hung ve Chow 2004). Fas ve TNF-R1 kendi ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olurlar. Fas reseptörü, birbirine komşu iki Fas ligandının birbirleriyle bağlanması sonucu trimer kompleks halinden hexamer kompleks haline dönüşür. Daha sonra, Fas reseptörü kendisinin intrastoplazmik ölüm bölgesi olan FADD (Fas ilişkili ölüm bölgesi) ile, TNF-R1 ise kendi intrastoplazmik ölüm bölgesi olan TRADD (TNF-R1 ilişkili ölüm bölgesi) ile etkileşime girer. Böylece ölüme sebep olan sinyal kompleksi (DISC) oluşur. Bu kompleks, prokaspaz 8'in efektör ölüm bölgesi (DED) ile

birleşerek prokaspaz 8'in aktif formu olan kaspaz 8'in oluşumuna neden olur. Kaspaz 8; ya prokaspaz 3'ü aktive ederek hücre ölümüne sebep olur ya da Bcl-2 ailesinin üyesi olan Bid'in c-terminal bölgesini keserek aktif formu olan tBid'in oluşmasına ve böylece apoptozisin intrinsek yola doğru ilerlemesine neden olur. Hücreler, bu iki 18 yoldan birisine daha fazla yatkındırlar. Lenfositler, kaspaz 3 aktivasyon yolunu tercih ederken, hepatositler intrinsik yola doğru ilerlemeyi tercih ederler.

2.4.3 İntrinsik Yol (mitokondri aracılı apoptozis)

Sitotoksik ilaçlar, oksidatif stres, iyonize radyasyon, DNA hasarı, büyüme faktör eksikliği gibi nedenlerle oluşabilen ölüm sinyali, Bcl-2 ailesinin sadece BH3 bölgesini içeren üyeleri (bid, bad, bim, PUMA, NOXA) tarafından mitokondriye taşınır. İntrinsik yolun en önemli bölümü, mitokondri dış membran geçirgenliğinde oluşan artıştır. MOMP (Mitokondriyal dış membran geçirgenliği)'un Bcl-2 ailesinin sadece BH3 bölgesini içeren üyeleri tarafından oluşum mekanizmaları;

a) Timusta bulunan otoreaktif T hücrelerin ortadan kaldırılmaları, T hücre reseptörünün (TCR) uyarılması ile başlar. Uyarılmış olan TCR, inaktif halde bulunan Bim'in aktif hale gelmesine neden olur. Aktifleşen Bim; Bax ve Bak'ın birbirleriyle etkileşime girerek oligomerik hal almalarını sağlar. Bax/Bak oligomerizasyonu MOMP'u oluşturur. T lenfositlerde sitokin eksikliğinde IL-2 (İnterleukin-2) reseptörünün uyarılmasına bağlı olarak gözlenen apoptozis de bu yol ile gerçekleşir.

b) Aktif kaspaz 8 eksikliği. Bid'in c-terminal bölgesinin kesilmesine ve aktif formu olan tBid'in oluşmasına neden olur. Oluşan tBid, Bim ile aynı yolu izleyerek MOMP'a neden olur.

c) Sitotoksik T hücreleri, hedef aldıkları hücreleri FasL/Fas reseptörü aracılığıyla öldürürler. Bunu başaramadıkları zaman degranüle olarak perforin ve granzim B salınımına neden olurlar. Perforin, hedef hücre membranında cep (pot) oluşturarak Granzim B'nin hücre içine girişini sağlar. Granzim B; kaspaz 3, 8 ve Bid'i hedef alır. Granzim B, prokaspaz 3 ile başlayan süreci başlatabilir ancak tamamlayamaz. En sonunda granzim B, Bid'i aktif formu olan tBid haline dönüştürerek tBid aracılığıyla oluşan MOMP'u gerçekleştirir.

d) DNA hasarında p53; PUMA ve NOXA'nın sentezini artırır. PUMA ve

NOXA proapoptotik proteinler olan Bax ve Bak aracılığıyla MOMP'un oluşumunu sağlar. PUMA ve NOXA, Bax ve Bak'ı direk olarak aktive edemezler. Antiapoptotik Bcl-2 veya Bcl-xl; Bim veya Bid'i bağlayarak Bim ve Bid'in Bax/Bak oligomerizasyonunu tetiklemelerini engellenebilir. İşte PUMA ve NOXA; Bcl-2 veya Bcl-xl'nin bağlayıcı bölgeleri için Bim ve Bid ile yarışır. Böylece serbestleşen Bim ve Bid, Bax ve Bak'ın birbirleriyle etkileşime girerek oligomerik hal almalarına ve MOMP oluşumuna neden olurlar. Hangi yol ile olursa olsun ölüm sinyalinin, MOMP oluşumunu gerçekleştirebilmesi mitokondriden apoptozisin aktivasyonuna neden olan başta sitokrom-c olmak üzere Smac/diablo (second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI), AIF (apoptozis indikleyici faktör), endonükleaz G ve Omi (HtrA bakteriyel homologu) gibi maddelerin salımına neden olur. Sitokrom-c; Apaf- 1 (apoptotik proteaz aktifleştirici faktör - 1) ve pro-kaspaz 9'a bağlanarak apoptozom adı verilen oligomerik Apaf-1 kompleksi (7 Apaf-1 + 7 sitokrom-c + 7ATP + 7 Prokaspaz 9)'nin oluşumunu sağlar. Aktifleşen kaspaz 9, prokaspaz 3'ü aktive eder. Aktif kaspaz 3, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD) inaktifleştirir. Böylece ICAD'ın bağladığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD) serbestleşir. CAD, apoptozisin karakteristik bulgularından olan kromatin yoğunlaşmasına ve oligonükleozomal DNA parçalanmasına neden olur. Ayrıca aktif kaspaz 3; ilgili proteinleri (hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini (lamin A) ve DNA tamirinde rol alan poli ADPriboz polimerazı (PARP) parçalayarak, apoptotik hücre morfolojisinin oluşmasını da sağlar. Smac/diablo; kaspazlara bağlanarak kaspaz inhibisyonuna yol açan IAP'ın yerini değiştirerek, Omi ise IAP'ı geri dönüşümsüz olarak inhibe ederek kaspaz aktivasyonunu sağlarlar. AIF; direkt olarak nükleusa giderek kromatin yoğunlaşmasını başlatır ve endonükleaz G; kaspaz aktivasyonundan bağımsız olarak nükleustaki parçalanmaya katılır.

3-Diğer Yollar: Perforin/granzim yolu, granzim B ya da granzim A ile apoptozisi indükleyebilir. Ekstrinsik, intrinsik ve granzim B yolu aynı uçta ya da infaz yolunda odaklanabilir. Bu yol kaspaz 3'ün parçalanması ile başlatılabilir ve DNA'nın 20 fragmantasyonunu, hücre iskeleti ve çekirdek proteinlerinin parçalanmasını, proteinlerin çapraz bağlanmasını, apoptotik yapıların oluşumunu, fagositik hücre reseptörleri için ligantların ekspresyonunu ve sonuç olarak fagositik hücreler tarafından yutulma

basamaklarını içermektedir. Granzim A yolu tek iplikli DNA hasarı aracılığıyla paralel olan kaspaz bağımlı hücre ölüm yolunu aktive eder. Sitotoksik T lenfositler (CTLs) konakçı hücre yüzeyindeki antijenleri tanırlar ve bu sırada yüzeylerinde FasL oluşturarak hedef hücrenin Fas reseptörüne tutunurlar. CTL'ler sitoplazmalarında granzim B (serin proteaz) ve perforin adı verilen, apoptozisin oluşmasını sağlayan proteinler içeren sitoplazmik granüllere sahiptirler. Bu CTL'ler, perforin ile porlar oluşturarak hedef hücrelerde kaspazları aktive edecek olan granzim B salgırlar ve böylece perforinin salınımını içeren yeni bir yol aracılığı ile tümör hücresi ve virüs tarafından enfekte edilmiş hücre üzerinde sitotoksik etkilerini uygulayabilirler. Granzim A'da aynı zamanda apoptozisi uyaran ve kaspaz bağımsız yolu aktive eden sitotoksik T hücrelerinde de önemlidir. Hücrede bir kez granzim A, DNA'az NM23-H1 aracılığı ile DNA nicking'i aktive ettiğinde bir tümör süpressör gen üretilir. Nükleozomda toplanan endoplazmik retikulum ilişkili (SET) proteinler, normal olarak NM23-H1 (metastaz- ilişkili gen) genini inhibe eder. Granzim A proteaz SET kompleksini parçalar böylece NM23-H1'in inhibisyonunu serbest bırakır bu da apoptotik DNA parçalanmasına yol açar (Çiftçi 2014).

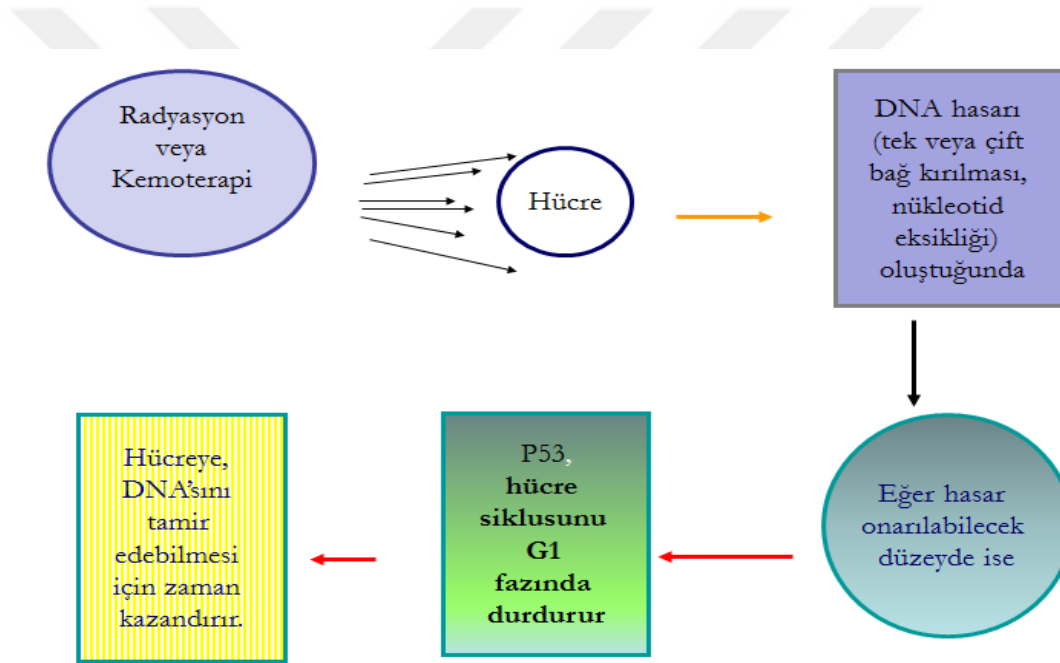
2.5 Apoptotik Geneleri

2.5.1 P53 Geni

İlk kez 1979 yılında iki ayrı grup olan Lane, Crawford ve Linzer, Levine tarafından SV40 tümör virusunun onco proteini (Large T antijen) ile kompleks yapan bir protein olarak tanımlanmış (Zilfou *et al.* 2009).

DNA hasarı ile aktive olan ATM yolağı ile p53 hücre bölünmesini G1 fazında durdurur. Yine Siklin dependent kinaz inhibitörü olan p21'in p53 ile uyarılması, hücre bölünmesini G1 fazında durdurur. P53 aynı zamanda Siklin B1/cdc2 kompleksinin fonksiyonunu bozarak G2/M arrestine neden olur (Ashkenazi 2008). P53 aracılı apoptosis transkripsiyon aracılı ve aracısız olmak üzere 2 yol ile gerçekleşir. Aktive p53 Bax, PIG3 (p53-inducible gene 3), Killer/DR5, CD95 (Fas), PERP (p53 apoptosis effector related to PMP-22) ve PUMA gibi apoptotik genleri (çoğu proapoptotik Bcl-2 ailesinden) transaktive eder (Riley *et al.* 2008). Nükleus dışında p53 ün sitozolik

aktivitesi de mevcuttur. İyonize radyasyon sonrası p53 hızla mitokondride lokalize olur ve mitokondrial dış membran geçirgenliğinin artmasına ve proapoptotik faktörlerin intermembran aralığına geçmesine neden olur (Clair *et al.* 2006). p53 geninde somatik mutasyon çok sıktır. p53 geninde mutasyonun kalıtımı erken yaşta meme karsinomu, sarkomlar, beyin tümörleri ve adrenal kortikal karsinomlarla seyreden Li-fraumeni sendromu ve Li-fraumeni- like sendromlara neden olur. Tümör supressor mutasyonları genellikle frameshift yada nonsense iken p53 mutasyonları missens ve tek amino asidin değişimi ile karakterizedir. Somatik p53 mutasyonları her tip kanserde görülmekte iken, over, özefagial, kolorektal, baş ve boyun, larinks ve akciğer kanserlerinde %38-50 gibi yüksek bir oranda gözükmemektedir (Olivier *et al.* 2010).



Şekil 2.3 P53 gen aktivasyonunun genel mekanizması.

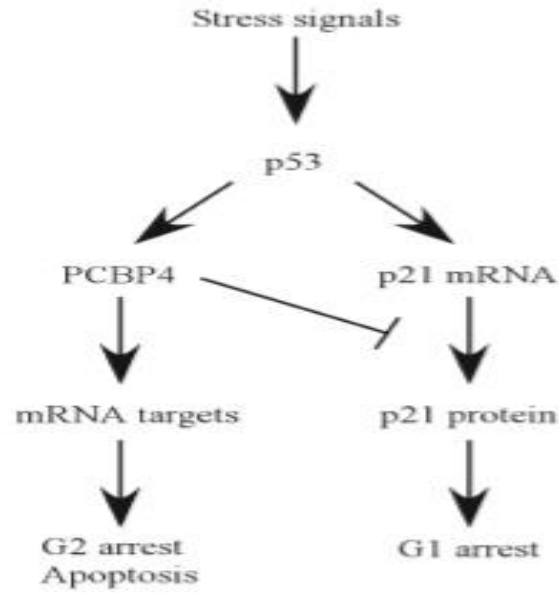
2.5.2 P21 Geni

P21 geni, güçlü bir siklin bağımlı kinaz inhibitörünü kodlar. Kodlanmış protein, siklin-siklin bağımlı kinaz 2 veya siklin bağımlı kinaz 4 komplekslerine bağlanır ve inhibe eder ve böylece G1 faz hücre döngüsü ilerlemesinin düzenleyicisi olarak işlev görür (Abbas *et al.* 2009). G1 safhasında p53, iyonize radyasyon tarafından aktive edilerek p21, GADD45 ve 14-3-3 proteinlerini indüklemektedir. p21' in indüklenmesi

sonrasında siklin-bağımlı kinazlar inhibe edilerek, Rb-E2F kompleksinin devamlılığı sağlanmaktadır ve böylece S fazına giriş önlenmektedir. IR sonrası ATM aktive edildiğinde ise, c-ABL 13 kinazın fosforillenmesinin ardından p21 GADD45' in transaktivasyonu gerçekleştirmektedir ve böylece yine G1 engeli meydana gelmektedir (Sohn *et al.* 2006). Hücre döngüsü negatif kontrolünde p21'in bazı işlevleri, p27 ve p57 tarafından karşılanabilmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmaların sonuçlarına göre; p21'in "growth arresti" uyardığı görülmektedir. (Deschénes *et al.* 2001).

2.5.3 PCBP4 Geni

CPs veya hnRNP Es olarak da bilinen poli (C) bağlayıcı proteinler (PCBP'ler), gen ekspresyonu, mRNA stabilizasyonu ve translasyonunu içeren birçok biyolojik proseste rol oynayan yaygın olarak RNA-bağlayıcı proteinler (RBP'ler) ifade eder (Collier *et al.* 1998). PCBP ailesinin beş önemli bileşeni vardır: hnRNP K, PCBP1, PCBP2, PCBP3 ve PCBP4. bütün PCBP ailesi üyeleri, DNA veya RNA hedeflerinde poli (C)-zengin elementlere bağlanmak için gerekli olan 70 amino asidi motifinden oluşan birkaç hnRNP K homoloji (KH) alanına sahiptirler (Makey and Liebhaber 2002). PCBP4 ekspresyonu, DNA hasarına tepki olarak siklin bağımlı kinaz inhibitörü p21 indüksiyonunu azaltır. PCBP4, p53'ten bağımsız olarak p21 ifadesini düzenler. Buna ek olarak, PCBP4'te eksiklik DNA hasarında p21 indüksiyonunu arttırır. Son olarak, PCBP4'ün p21 mRNA stabilitesini düzenlemek için in vitro ve in vivo olarak p21 transkriptinin 30-UTR'sine bağlandığını ortaya çıkarmıştır (Scoumanne *et al.* 2011).



Şekil 2.4 PCBP4'ün apoptoz ve hücre döngüsü durması yolağı (Scoumanne *et al.* 2011).

2.5.4 Siklin D1 Geni

Siklinler hücre siklusunun düzenlenmesinde rol oynayan proteinlerdir (Sherr 1995). Kromozom 11q13'te yer alan siklin D1 (CCND1) geninin ürünü hücre siklusunun progresyonunu başlatarak Rb'yi fosforiller. CCND1'in aktivitesi G1 fazı süresince maksimum seviyede kalır ve p16, p21 ve p27 gibi tümör baskılayıcı genler tarafından inhibe edilebilir (Gleich *et al.* 2002). Meme, baş-boyun, özofagus, larinks ve akciğer gibi çeşitli kanserlerde CCND1 aktivasyonu ya da aşırı ekspresyonunun gözlenmesi CCND1'deki değişikliklerin karsinogenezde rol oynadığını düşündürmektedir (Okami *et al.* 1999; Toyoda *et al.* 2000). Yapılan çalışmalarda HNC'de, tümörlerin %18-%58'inde CCND1 amplifikasyonu gözlenmiş, genin amplifikasyonu ya da aşırı ekspresyonu, nüks, nodal metastaz ve ölümle ilişkilendirilmiştir (Gleich *et al.* 2002).

Siklin D1, hücre döngüsünün G1 fazı boyunca ilerleme için gereken bir proteindir. G1 evresi sırasında hızla sentezlenir ve çekirdekte birikir ve hücre S fazına girdiğinde bozundur. Siklin D1, siklin bağımlı kinazlar CDK4 ve CDK6'nın bir düzenleyici altbirimidir. Protein, G1 / S faz geçişini ve S fazına girişi düzenlemek için CDK4 / 6 ile dimerleşir (Baldin *et al.* 1993).

2.5.5 Kaspaz Genleri

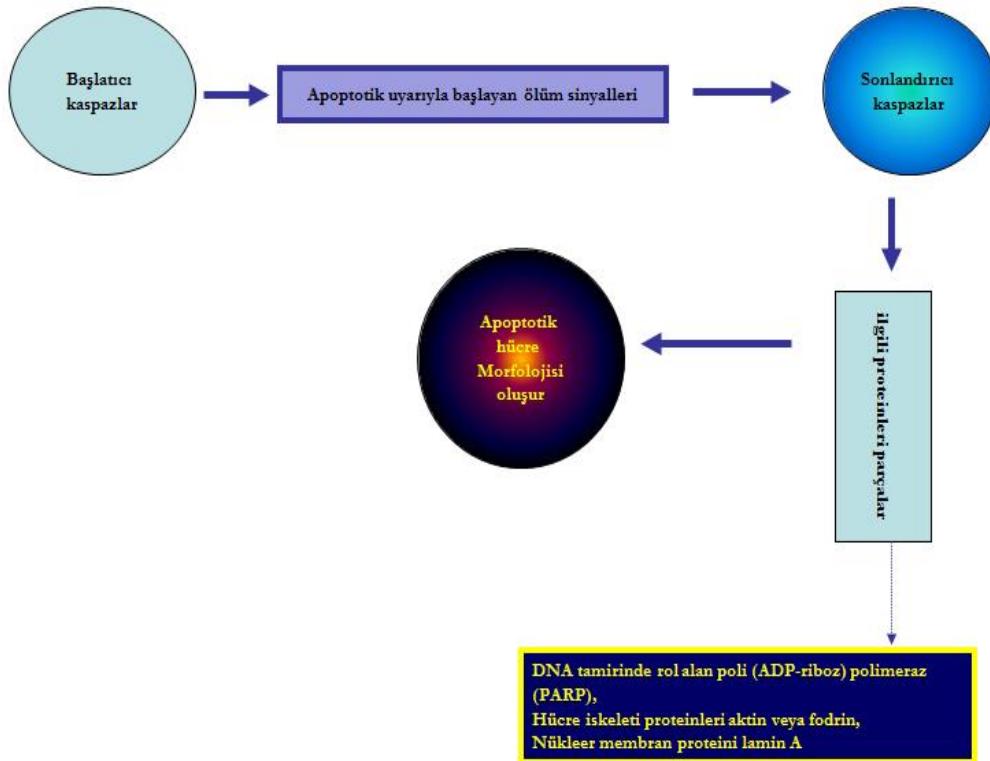
Kaspaz'lar, zimojen (inaktif haberci) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından, sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimdir. Şu ana kadar kaspazların 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu apoptozisde rol almaktadır, Kaspaz-1 (ICE), Kaspaz-2 (ICH-1, Nedd-2), Kaspaz-3 (CPP32, Apopain, Yama), Kaspaz-4 (ICH-2, TX, ICERen), Kaspaz-5 (ICERelııı, TY), Kaspaz-6 (Mch2), Kaspaz-7 (ICE-LAP3, Mch3, CMH-1), Kaspaz-8 (FLICE, Mch5, MACH), Kaspaz-9 (Mch6, ICE-LAP6), Kaspaz-10 (Mch4), Kaspaz-11 (ICH-3), Kaspaz-12, Kaspaz-13 (ERICE), Kaspaz-14 (MICE). Kaspaz enzimleri büyük bir proteaz ailesidir. Aktif merkezlerinde sistein aminoasidi taşırlar ve hedefledikleri proteinleri aspartik asit birimlerinden kestikleri için kaspaz ismini almışlardır (C-Asp-ase; C: sistein aminoasiti simgesi, Asp:aspartik asit, -ase: kesici enzim eki) (Cohen 1997).

Kaspazlar hücre içerisinde inaktif zimojenler olarak sentezlenirler ve prokaspaz adını alırlar. Bu inaktif prokaspaz enzimleri apoptoz sinyalinin alınmasıyla birlikte aktifleşirler ve aktifleşen bu kaspazlar diğer iaktif kaspazları aspartik birimlerinden keserek aktifleştirirler. Apoptozun belirgin bir özelliği hücrel protein substratların kaspazlar tarafından kırılmasıdır (Turk 2007).

Kaspazlar hücrede iki önemli biyolojik yolda görev almaktadırlar; enflamatuar sinyal yolu ve hücre ölüm yolu. Kaspaz ailesinin 7 üyesi (kaspaz-2, -3 ve 6-10) apoptotik ölüm yolunda görev alırken, diğer üçü (kaspaz-1, -4 ve 5) proinflamatuar sitokinleri aktifleştirerek savunma sisteminde görev alır. İki yol birbirinden farklı olsa da sitokin aktivatörü kaspazlar ve apoptotik kaspazlar büyük benzerlikler gösterirler. Bu sınıflandırmaların dışında kalan kaspaz-14 keratinositlerde üretilir ve epidermal farklılaşma sürecinde aktif olarak çalışır (Cohen 1997).

Kaspazlar apoptotik yolda “başlatıcılar” ve “bitiriciler” olmak üzere iki grupta toplanırlar. Apoptotik ölüm işlem sırasına göre kaspazlardan ilk görev alanlar başlatıcı ya da öncü kaspazlardır ve bunların uzun öncül bölgeleri bulunur. Apoptotik yolun daha sonraki aşamalarında görev alan kaspazların diğer üyeleri ise efektör kaspazlar olarak

adlandırılır. Efektör kaspazlar başlatıcı kaspazlar tarafından aktiflenirler. Her bir kaspaz enziminin optimum kesme bölgesi vardır ve bu bölge aspartik kesim noktasının N-terminalinde bulunan dört aminoasitlik bir motiftir. Bu motifin görevi, kaspazın hedef proteininin seçimini belirlemektir (Türk 2007). Ayrıca bu motif ilgili kaspazın peptid inhibitörlerle inaktive olmasına aracılık etmektir. Kaspaz-2, -8, -9 ve 10 başlatıcı kaspazlardır, kaspaz-3, 6 ve 7 ise efektör kaspazlardır. Başlatıcı kaspazların üç önemli özelliği vardır; farklı şekillerde gelen uyarıları, genel bitirici faza taşırlar, yeterli miktarda bitirici kaspazın aktifleşmesini sağlayarak apoptotik sinyalin çoğalmasını sağlarlar, ölümün en son basamağında bir kontrol noktası olarak bulunurlar. Kaspazlar hücrede yüzden farklı proteini substrat olarak kullanırlar. Kaspaz-3, 6 ve 7 başlatıcı kaspazlardan farklı olarak kısa bir N-terminal peptid (23-28 aminoasitlik) bulundurulur. Substrat ve inhibitör özgüllüğünde kaspaz-3 ve 7 genellikle benzerdir. Kaspaz-6 ve 7, kaspaz-3 tarafından aktifleştirildiği için bitirici kaspazlar olarak sınıflandırılırlar (Salvesen and Dixit 1997).

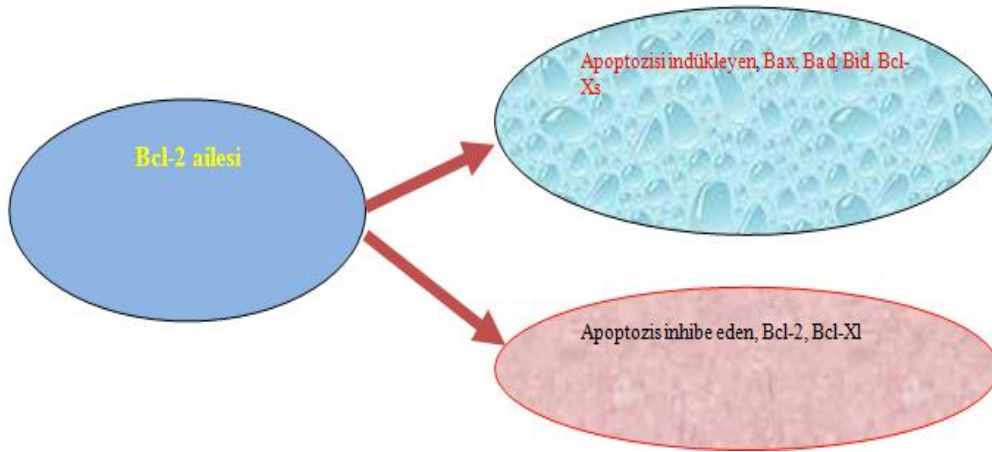


Şekil 2.5 Başlatıcı ve Sonlandırıcı kaspazların mekanizması.

2.6 Pro ve Anti-apoptotik Genelri

2.6.1 Bcl-2 ailesi

Bcl-2 geni, ilk olarak insan B hücreli foliküler lenfomada tanımlanmıştır. Anti-apoptotik proteinlere mensup olan Bcl-2 ve Bcl-XL proteinleri apoptoz gibi otofajiyi de inhibe edebilmektedirler. Bcl-2, özellikle mitokondri dış membranında bulunmakta ve iyon transportunu düzenlemektedir. Bcl-2'nin mitokondri ile olan ilişkisinden dolayı, antioksidan bir etkiye sahip olduğu böylece oksidan stresin neden olduğu apoptozisi, baskılayabildiği bulunmuştur. Bcl-2 ailesi de apoptozisi indükleyen Bax, Bad, Bid, Bcl-Xs ve apoptozis inhibe eden Bcl-2, Bcl-Xl genleridir (Tsujimoto 2003).



Şekil 2.6 Bcl-2 ailesinin apoptoz indükleyen ve inhibe eden genleri.

Otofaji keseciği oluşumda görev yapan Vps34 PI3 kinazın aktivitesinin Atg6/Beclin'i de içeren bir grup protein tarafından kontrol edilir. Bcl-2 ya da BclXL, Beclin'in sahip olduğu BH3 bölgesine bağlanabilmekte ve bu şekilde onu otofaji üzerinde etkisiz hale getirebilmektedir (Levine *et al.* 2008). BclXL'in JNK tarafından fosforillenmesi Beclin'e bağlanmasını zayıflatmakta ve otofajiyi aktive etmektedir. DAPk da benzer etkiyi Beclin üzerinden gösterebilmektedir. Beclin yanında, Vps34 düzenleyici proteinlerden biri olan Bif-1 de hücre ölümü ile ilişkilidir. Bif-1, otofaji yanında, Bax/Bak aktivasyonu ile apoptozu da düzenlemektedir. Bcl-2 protein ailesinden, hipoksi ve apoptozda rol oynayan bir protein olan BNIP-3'ün otofajiyi aktive ettiği çeşitli

sistemlerde gösterilmiştir (Noble *et al.* 2008).

Pro ve anti-apoptotik Bcl-2 üyelerin dengesi, yaşam ile ölüm arasındaki seçeneği belirler. Bax sitozolde bulunur. Apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanır. Burada küçük delikçikler “pore” oluşumunu indükler. Böylece selektif iyon permeabilitesi kaybolur. Sonuçta sitokrom c ve apoptozis-indükleyici faktör olarak bilinen AIF’ün mitokondriden sitozole çıkmasını sağlar (Jurgensmeier *et al.* 1998).

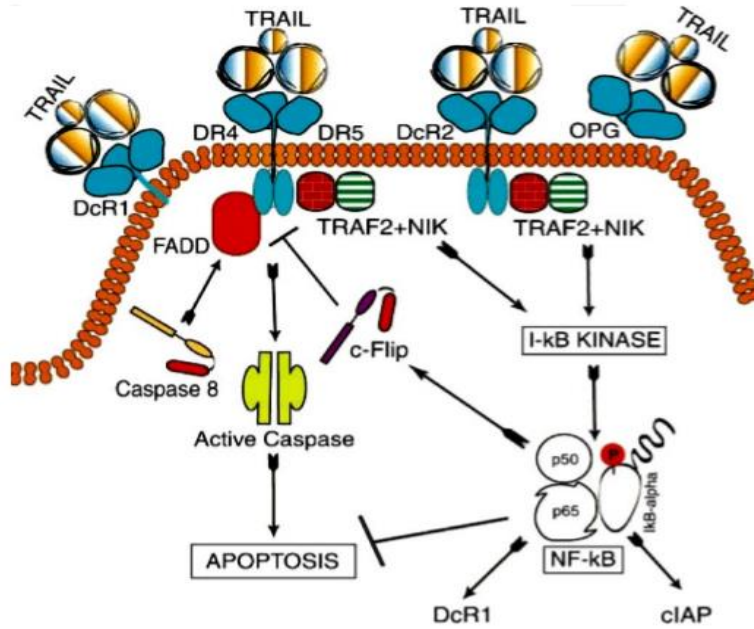


Şekil 2.7 Bcl-2 ailesinin görev dağılımı.

2.7 Toll Benzeri Reseptörleri (Sitokinler) Doku Nekroz Faktörleri

TRAIL, 1995 yılında iki bağımsız grup tarafından tanımlanmış olan, TNF süper ailesi üyesi bir apoptotik liganttır (Wiley *et al.* 1995a). TNF-alfa'ya %23, Fas-liganda ise %28 amino asit benzerliği olan bir transmembran proteindir (Nagane *et al.* 2001). TRAIL'ın bağlanabildiği 5 farklı reseptör vardır. Bu reseptörlerin ikisi (TR-1/DR4 ve TR-2/DR5) ölüm reseptörüdür ve sitoplazmik bölgede ölüm domainleri bulundurur. TRAIL bu reseptörlere bağlandığında hücre içi kaspaz bağımlı apoptotik yolları indükler (Şekil 2.8). TR-3/DcR1 ve TR4/DcR2 reseptörleri ise yalancı reseptörler olarak adlandırılırlar. Bu reseptörler, apoptotik süreci başlatamazlar (Griffith and Lynch, 1998).

TRAIL'ın indüklediği apoptotik sinyal yolları şöyle özetlenebilir: TRAIL, ölüm reseptörlerine bağlandığında (TR-1/DR4 ve TR-2/DR5), hücrede dış apoptotik yolağın aktivasyonu gerçekleşir (Şekil 2.8), (LeBlanc and Ashkenazi 2003). TRAIL'ın bağlanması ile DR4 ve DR5, ölüm birimi içeren adaptör molekül Fas-Associated Death Domain-containing adaptör molekül (FADD) aracılığıyla, apoptozu başlatıcı kaspazlar olan kaspaz 8 ve kaspaz 10'u reseptöre çekerek aktive eder. Kaspaz 8 ve kaspaz 10 ise, efektör kaspazları, yani kaspaz 3, 6, ve 7'yi aktive eder. Bazı hücrelerde kaspaz 3'ün TRAIL aracılı aktivasyonu, iç apoptotik yolun da indüklenmesi ile sonuçlanır (Ravi and Bedi, 2002).



Şekil 2.8 TRAIL reseptörlerinin ve indüklediği dış apoptotik yolağın şematik gösterimi (Sanlioglu *et al.* 2008).

2.7.1 NFKB Geni

NFKB, proliferasyon ve apoptoz sırasında gen aktivitesini modüle eden bir transkripsiyon faktörüdür. NFKB aktivasyonu, kaspaz aktivitesini kısıtlayan apoptoz inhibitörleri ile apoptozu azaltabilir (Connelly *et al.* 2011). Normalde NFKB sitoplazmada inaktif formda tutulur, aktive edilince nükleusa geçer. Böbrek ve endotel hücrelerinde düşük doz ouabain NFKB 'yi aktive ederek uyarılan apoptozdan hücreleri korur (Harwood and Yaqoob 2005). NFKB, siklin D1'in ekspresyonunu artırarak

çoğalmayı kontrol ederek apoptoz, NFkB'nin inhibasyonu ile arttırılır ve çoğalma, siklin D1 ekspresyonunu azaltılır (Connelly *et al.* 2011).

2.8 Onarım Genleri

DNA onarımında görev alan OGG1, ERCC1, XRCC1, XRCC2, XRCC3, XPC, XPD, XPF, BRCA2, MRE11, NBS1, Ku70/80, LIG4, RAD...vb. genlerin polimorfizmleri, proteinlerin işlevini ve bireylerin hasarlı DNA'yı onarma kapasitesini değiştirebilmektedir. Eksik onarım kapasitesi de genetik kararsızlığa ve dolayısıyla kanser oluşumuna neden olabilmektedir (Goode *et al.* 2002). Ancak, DNA onarım genlerindeki polimorfizmler tek başlarına kanser risk çeşitliliğini açıklamak için yeterli değildir. Kanserle ilişkili somatik mutasyonların birikimi sadece DNA onarımındaki kusurdan değil, hücre ölüm mekanizmasının hasarlı hücreleri elimine etme yeteneğinin azalmasından da kaynaklanır . DNA onarımı, genomik kararsızlık ve apoptozis birbirleriyle etkileşen olaylar olduğundan, her biri kanserin patofizyolojisinde çok önemli role sahiptir (Imyanitov *et al.* 2005).

2.8.1 OGG1 Geni

8-Oksoguanin DNA glikosilaz 1 (OGG1), DNA'dan 7,8-dihidro-8-oksooguenin (8oxoG) eksil eden bir DNA tamir enzimidir. 8oxoG oldukça yanıtıcı bir lezondur, azalmış OGG1 ekspresyon seviyesi daha yüksek bir arka plan mutasyon sıklığına yol açabilir ve oksidatif stres altında bir bireyin kanser riskini artırabilir (Ba *et al.* 2014).

2.8.2 ERCC4 Geni

ERCC4, DNA'dan UV-C fotoprodüktörleri ve hantal adüktlerin çıkarılmasından sorumlu olan nükleotid eksizyon onarımı (NER) yolunda önemli bir insan genidir. NER genleri arasında, ERCC4 ve ERCC1, aynı zamanda, DNA arası zincirler arası çapraz bağlanma hasarının çıkarılmasında da yer almaktadır (Brookman *et al.* 1996).

2.9 Apoptozis, Apoptotik Yol ve HepG2 Hücre Hattındaki Farklı Kemotoksik Ajanlar Tarafından Hücre Döngüsünün Durdurulması

'Apoptoz' terimi, modern bilime Kerr ve diğerleri tarafından 1972'de fizyolojik hücre ölümünün özel morfolojisini tanımlamak amacıyla getirilmiştir. Sözcüğün kendisi, yaprak dökümü anlamına gelen eski bir Yunanca kelimedir ve başlangıçta klasik Yunan ve Roma zamanlarının tıp felsefesi ve felsefi metinlerinde kullanılmıştır. Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, önceden var olan ölüm programının kodladığı genomun düzenlenmiş aktivasyonunu temsil etmektedir (Kamuhabwa *et al.* 2000, Salami and Tehrani, 2003). Apoptoz, çeşitli kanser türlerinde sitotoksik ilaç tedavisinden sonra hücre ölümünde belirgin bir yol olarak gösterilmiştir. Apoptozun indüksiyonu, antikanser ilaçların tanımlanması için bir strateji olarak kabul edilmiştir (Powell *et al.* 2003). Hücre döngüsünü ve apoptozu kontrol eden hücrel ve moleküler yollardaki değişikliğin, antikanser ajanlara duyarlılığı ve direnci değiştirebileceğine dair önemli kanıtlar vardır (Ho *et al.* 2007).

Eurycomanone, Eurycoma longifolia'nun aktif bir bileşenidir. Eurycomanone, HepG2 üzerinde sitotoksiktir normal karaciğer hücreleri ve WLR-68 üzerinde daha az toksik etkiye sahiptir. Ayrıca, çeşitli yöntemler, eurycomanone ile muamele edilmiş HepG2 hücrelerinde apoptozun ölüm şekli olduğunu ispatlamıştır. Eurycomanone tedavisinden sonra kromatin yoğunlaşması, DNA parçalanması ve apoptotik maddeler gibi apoptozun özellikleri bulunmuştur. Bu çalışma aynı zamanda eurycomanone tarafından tetiklenen apoptotik işlemin p53 tümör baskılayıcı proteinin yukarı regülasyonunu tespit etmiştir. P53'ün yukarı-regülasyonu pro-apoptotik Bax'ın artırılması ve anti-apoptotik Bcl-2'nin azaltılması ile takip edildi. Sitoplazmada sitokrom C düzeylerinin artması da apoptozun indüksiyonuyla sonuçlanmaktadır (Jurgensmeier *et al.* 1998).

Artemisia princeps var. *orientalis* (APME), Asya'da iyi bilinen geleneksel bitkidir. APME hücre döngüsü tutulmasını sağlayan tümörlerin ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır. Birçok çalışma, çeşitli fitokimyasalların insan kanseri hücrelerinde hücre döngüsünün durmasını sağladığını ve *Artemisia* türlerinin, çeşitli insan kanseri hücrelerinde G1 veya G2/M evrelerindeki hücre döngüsünün engellediğini

göstermektedir. APME 'nin böylece, hücre çoğalmasını inhibe ederek ve hücre döngüsünü durdurduğu, HepG2 ve Hep3B hücrelerinde antikanser etkili olduğu ifade edilmektedir. Bu çalışmada, APME, hepatokarsinoma hücre hatlarında önemli antioksidan ve anti kanser aktivitesi araştırılmıştır.

HepG2 hücrelerinde *Aspidosperma polinöron*' undan ekstrakte edilen indol alkaloid aspidosperminin (antiparazitik) sitotoksikite, genotoksikite ve etki mekanizması (gen ifadesi analizi yoluyla) değerlendirilmiştir. Sonuçlar, aspidospermin ile tedavinin sitotoksik (75IU'dan başlayarak) ve genotoksik (50LM'den başlayan) olduğunu göstermiştir. Aşağıdaki genlerin ekspresyonunda belirgin bir modülasyon görülmemiştir: (ksenobiyotik metabolizma); CAT (oksidatif stres); TP53 ve CCNA2 (hücre döngüsü); (Endoplazmik retikulum stres); Kaspaz 8, Kaspaz 9, Kaspaz 3, Kaspaz 7, Bcl-2, Bcl-xl ve Bax (apoptoz); PCBP 4 ERCC4, OGG1, RAD21 ve MDH1 (DNA onarımı). HepG2 hücrelerinde 50 µl konsantrasyonda (sitotoksik olmayan ancak genotoksik olan), CYP1A1 (ksenobiyotik metabolizma) ve APC (hücre döngüsü) ekspresyonunda belirgin bir artış gözlenmiş ve 100 µl konsantrasyonda CYP1A1 ekspresyonunda (ksenobiyotik metabolizma), GADD153 (endoplazmik retikulum stres) ve SOD (oksidatif stres) ekspresyonlarının tespit edilmiştir (Marcarinive *et al.*2015).

Hoechst boyama sonucuna dayanarak, eurycomanone ile yapılan tedavinin HepG2 hücrelerinde DNA fragmentasyonuna neden olduğu tespit edilmiştir. Internükleozomal DNA parçalanması, erken bir apoptoz olayını göstermek için birincil biyokimyasal özelliktir ve hücre ölümü yolundan geri dönüşün olmadığı bir noktayı temsil eder (Allen *et al.* 1997). Hücrelerin çekilmesi, DNA yoğunlaşması, nükleer ve plazma membran konvülsiyonu ve nükleer parçalanma eurycomanon ile tedavi edilen HepG2 hücrelerinde gözlenmiştir. Tamoksifen ile işlenen hücrelerin pozitif kontrolü benzer nükleer flüoresans sergilediğinden elde edilen verilerin kabul edilebileceğini göstermiştir. Bu gözlemler, eurycomanon tedavisi ile apoptotik bir yolak oluştuğunu kanıtlamıştır (Zakaria *et al.*2009).

2.10 Komet Yöntemi

Hücrelerde bulunan DNA UV, radyasyon, reaktif oksijen (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) gibi birçok çevresel etmen ve kimyasalların saldırısına uğrar. Büyük hastalıkların etiyolojisiyle DNA hasarının ilişkili olduğu gösterilmiştir. Özellikle nörodejeneratif hastalıklar, yaşlanma ve kardiyovasküler hastalıklarla oksidatif DNA hasarı ilişkilendirilmiştir. Karsinogenezin çeşitli evrelerinde DNA hasarı patolojik açıdan incelenmiştir. Oksidatif DNA hasarı, sigaranın, kanserojenlerin, besinlerle alınan antioksidanların veya UV ışınlarının insan sağlığına etkisinin izlenmesinde önemli bir kriter olarak düşünülür. Oksidatif DNA hasarının ölçülmesi için çeşitli yöntemler önerilmiş olsada Komet tahlili spesifik olarak bütün DNA hasarlarını ölçmek için kullanılır (Gyori *et al.* 2014).

Komet yöntemi *in vitro* ve *in vivo* olarak DNA hasarının değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Dalrymple *et al.* 2015). Hızlı, güvenilir ve basit bir biyokimyasal teknik olması komet yönteminin son yıllarda geliştirilmesini sağlamıştır (Darrag and Fayyad 2014). Tek hücreli jel elektroforezi (SCGE) olarak da bilinmektedir. Komet yönteminin temel ilkesi basittir. Agaroz jel içine gömülmüş hücrelerin parçalanmasından sonra elektroforez işlemi ile yürütülmesine dayanır. Elektroforez işlemi anında hasar görmemiş DNA'lar oldukları yerde kalırken, kırıklar ortaya çıkar. Kırılmış DNA parçaları kuyruklu yıldız şeklinde bir yapı oluşturur. Daha sonra bu kuyruklu yıldız şeklindeki DNA, DNA bağlayıcı bir boya (örneğin etidyum bromur) kullanılarak görünür hale getirilir. DNA'da oluşmuş hasarın derecelerini değerlendirmek için kuyruklu yıldızın şekli, boyutu ve içindeki DNA miktarı ölçülür. Komet yönteminin analiz protokolü çeşitleri DNA çapraz bağları, tek iplik kırıkları ve çift iplik kırıklarının ölçülmesidir.

Komet yönteminin özellikleri numune başına az bir miktar hücreye ihtiyacının olması ve bireysel olarak veri sağlamasıdır. Komet yöntemi biyolojik gözlem, radyasyon biyolojisi, çevresel toksikoloji, beslenme çalışmaları ve kanser çalışmaları da dahil olmak üzere DNA hasarının incelenmesinde kullanılır. Komet yönteminde kuyruklu yıldız görünümünde DNA'ların skorlanması görsel olarak veya görüntü analiz yazılımları ile değerlendirilebilir (Gyori *et al.* 2014).

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Materyaller

3.1.1 Kullanılan Cihazlar ve Kitler

1. Soğutmalı santrifüj (Hettich)
2. Floresan mikroskop (Olympus)
3. Işık mikroskobu (Olympus)
4. -20°C Derin dondurucu (Uğur)
5. -80°C derin Dondurucu (Uğur)
6. Manyetik karıştırıcı (Hangping, Variomag)
7. Vorteks (Nüve NM 110)
8. Pipetler (0,5-2 µl, 0,5-100 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl, 1-5 ml) (Gilson)
9. Hassas terazi (Sartorius)
10. Distile su cihazı (Nüve)
11. Elektroforez düzeneği (Biolab)
12. Hotplate (Thermolyne)
13. pH metre (Hanna Instruments)
14. Lam (IsoLab)
15. Homojenizatör (Ultra Turrax)
16. Mikro santrifüj (Stratagene)
17. Karıştırıcı (Labart)
18. Kaynar su banyosu (WiseCircu)
19. NanoDrop Cihazı (ND 1000)
20. ThermoScript™ RT-PCR (cDNA Sentez Kiti) (Invitrogen)
21. Power SYBR® Green PCR Master Mix (Life Tech)
22. Ultrapure Dnase/Rnase ari Su (Life Tech)
23. 0.2 µm PES membran steril filtre (1000 ml)

3.1.2 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

Normal erime noktalı agaroz (NMPA) çözeltisi

0,02 gr NMPA tartılıp üzerine 2 ml 1X'lik PBS eklenip ve ısıtılarak % 1'lik NMPA çözeltisi hazırlandı ve ısıtıcı tabla üzerinde ısıtılan lamaların üzerine yayıldı.

Düşük erime noktalı agaroz (LMPA) çözeltisi

0,016 gr LMPA tartılıp üzerine 2 ml 1X'lik PBS eklenip ısıtılarak % 0,8'lik LMPA çözeltisi hazırlandı.

Lizis tamponu

Stok lizis solüsyonu 100 mM EDTA, 2,5 M sodyum klorür, 10 mM trizma base'den oluşmaktadır. % 1 oranında triton X-100 ve % 10 oranında DMSO balon jojeye alınarak üzeri stok solüsyonla 100 ml'ye tamamlandı. pH 10 olarak ayarlandı.

Elektroforez tamponu

Alkali elektroforez çözeltisi 1 mM EDTA ve 300 mM Sodyum hidroksit tartılıp 500 ml'ye tamamlandı ve pH> 13 olacak şekilde ayarlandı.

Etidyum bromür çözeltisi

10 mg etidyum bromür 50 ml distile suda çözülerek 200 µg/ml'lik stok etidyum bromür çözeltisi hazırlandı. Stok çözelti oda sıcaklığında saklandı. Stok etidyum bromür çözeltisinden 1 ml alınıp distile su ile 10 ml'ye tamamlanarak 20 µg/ml'lik etidyum bromür çözeltisi hazırlandı.

%70'lik Etil Alkolün Hazırlanması (100 ml)

%96'lık etil alkolden 72,9 ml alınıp üzeri dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı.

Örneğin hazırlanması

Tripsin-EDTA (% 0,25 tripsin, % 0,02 EDTA) 100 ml stok solüsyondan, 15 ml'lik falkon tüplere 10'ar ml eklenerek, -20 °C'de saklandı.

Penisilin/10 mg Streptomisin, 100x stok

Stok solüsyondan 15 ml'lik falkon tüplere 5'er ml olacak şekilde eklenerek, -20 °C'ye kaldırıldı.

Fetal Bovin Serum (FBS)

Stok solüsyondan (500 ml), 50 ml'lik falkon tüplere 50'ar ml eklenerek, -20 °C'de saklandı.

RPMI 1640 Besiyeri

L-Glutamin ile HEPES 25 mM içerir. Likit, kullanıma hazır, 2-8 °C'de son kullanım tarihine kadar saklanabilir.

RPMI 1640 komplet besiyeri hazırlığı Madde Volüm Final konsantrasyon

RPMI 1640 83.5 ml **komplet besiyeri** içerisine 15 ml % 15' lik FBS (fetal calf serum) ve Penisilin/Streptomisin, 1.5 ml % 1 (1x) eklenerek hazırlandı.

MTT'nin Hazırlanması

10 mg MTT 10 ml PBS ile çözündürüldü. 0.22 µm çapındaki filtreden geçirilerek steril edildi. Her kullanımda taze hazırlandı.

3.2 Metot

3.2.1 Bitkilerin toplanması

T. turcica Mayıs 2015'te Çiçeklenme döneminde Türkiye Afyon 38N, 31 18'49 "E, araştırmacı tarafından Sultandağı, Dereçine, Kavaklı köy, Köprülüöz, 965 m, Akşehir Gölü civarında toplanmıştır. Bitki materyali, Afyonkocatepe Üniversitesi'ndeki herbaryuma bırakılmıştır.



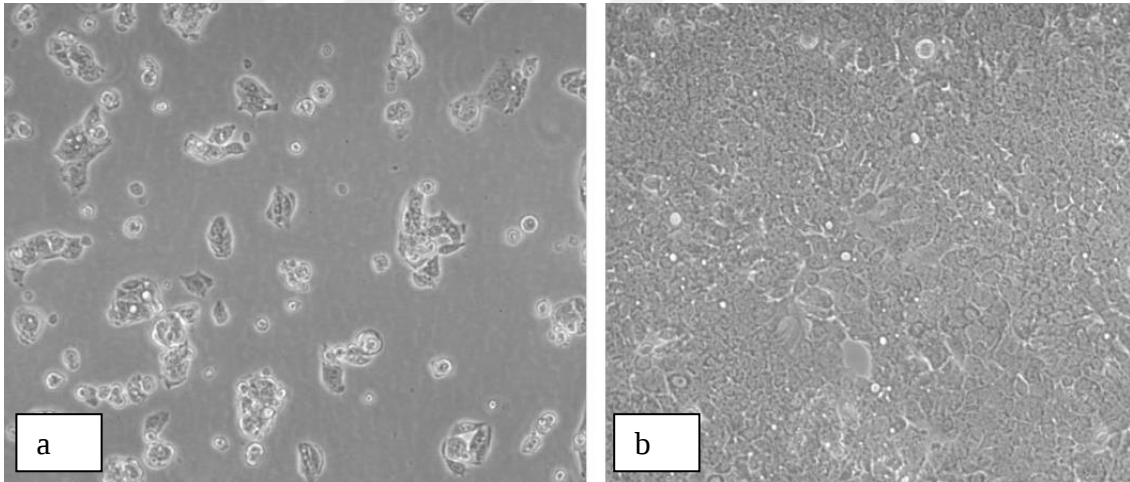
Resim 3.1 Bitkilerin toplanması.

3.2.1.1 Bitki ekstraksiyonu

Toplanan bitkiler oda sıcaklığında 4-7 gün boyunca kurutuldu. Kurutulmuş bitkiler (30 g) öğütülerek toz haline getirildi ve oda sıcaklığında 24 saat boyunca 450 ml etanol, metanol, etil asetat (EtAc), n-heksan ve su ile üç kez ekstre edildi. Ekstreler süzülde ve 40 °C'de döner buharlaştırıcı ile kuruyana kadar konsantre edildi. Ekstreler, kullanılıncaya kadar karanlıkta 4 °C'de saklandı.

3.2.1.2 Hücre Hatlarını Kültürlenmesi

İnsan hepatom HepG2 hücre hattı Eskişehir Anadolu Üniversitesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU' dan temin edildi. RPMI 1640 içeren, % 15 sıgır fetusu serumu, % 1 antibiyotik ile desteklenmiş besiyeri hazırlandı. Dondurulmuş hücre hızlı bir şekilde çözündürüldü. Besiyeri önceden ısıtıldı. Soğuk viyaller sıvı azottan çıkarıldı ve hemen 37 ° C su banyosuna yerleştirildi ve yaklaşık % 80 çözülüne kadar beklendi. Bu işlem bir dakikadan fazla sürmedi. Materyal hızlıca pipetle şişeye alındı, uygun miktarda örnek eklendi ve 5 dakika süre ile 1000 rpm'de santrifüje edildi. Süpernatant atıldı ve pellet, 2 ml vasat ile yeniden süspanse edildi. Hücreler tüpten 25 cm²'lik flasklara aktarıldı. Flaska 4 ml besiyeri ilave edildikten sonra inkübatöre yerleştirildi. 24 saat süre ile hücrelerin tabana yapışması beklendi. Yapışık olmayan hücreleri uzaklaştırmak için flastaki besiyeri atılarak yerine 4ml yeni besiyeri eklendi. Yine hücreler % 80 konfluent oluncaya kadar inkübe edildi. Besiyeri her 3 günde değiştirildi.



Resim 3.2. HepG2 hücrelerinin mikroskop görüntüsü (a: 20-30% konfluent; b: 85-95% konfluent).

3.2.1.3 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler % 80'lik konfluenti sağladıktan sonra 75 cm²'lik bir flaska aktarıldı. Pasajlama (alt kültür veya hücrelerin bölünmesi olarak da bilinir) az sayıdaki hücrenin yeni bir kaba aktarılmasından ibarettir. Besiyeri doğrudan aspirasyonla uzaklaştırıldı.

Trypsin-EDTA (cm² başına 0.02-0.03 ml) 3 ml eklenerek 4-6 dakika inkübe edildi. Daha sonra, trypsin-EDTA ile ayrılmış hücre, taze besiyerine aktarıldı. Besiyeriyle birleşen örneğin toplam miktarı, trypsin EDTA miktarı ile eşitti. Bu karışım, 1000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüje tabi tutuldu. Süpernatant atıldı. Pelet, 2-3ml taze besiyeri ile karıştırıldı. Ardından, 75 cm² flaska eklendi ve inkübatöre yerleştirildi. Yine besiyeri her 3 günde bir değiştirildi ve %80 lik konfluent elde edilinceye kadar inkübe edildi.

3.2.1.4 HepG2 Hücrelerinin Sıvı Azotta Saklanması

Flask yüzeyinde hücre yoğunluğu % 80-90 olduğunda mediyum atıldı. Hücrelerin üzerine 4 ml trypsin-EDTA eklenerek flask yüzeyinin her tarafına yayılması sağlandı. Flasklar 37⁰ C ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde 4-6 dk ünkübasyona bırakıldı. Hücreler flask yüzeyinden kalkınca içerisinde 4 ml mediyum bulunan falkonlara alındı. Falkonlar 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet üzerine 4 ml mediyum eklendi ve pellet mediyum yardımıyla çözündürüldü. 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet üzerine soğuk % 5 DMSO içeren FBS eklendi. Hücreler buz içerisinde bulunan kryo tüpe alındı. Sıvı azotta dondurularak ilerleyen zamandaki çalışmalar için saklandı.

3.2.1.5 Hücre Sayımı ve Hücre Canlılığının Tripin Blue Yöntemi ile Belirlenmesi

Flask yüzeyinde hücre yoğunluğu % 80-90 olduğunda mediyum atıldı. Hücrelerin üzerine 4 ml trypsin-EDTA eklenerek flask yüzeyinin her tarafına yayılması sağlandı. Flasklar 37⁰ C ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde 4-6 dk ünkübasyona bırakıldı. Hücreler flask yüzeyinden kalkınca içerisinde 4 ml mediyum bulunan falkonlara alındı. Faklon 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılıp hücrelerin üzerine 2 ml mediyum eklendi ve hafifçe pipetaj yapıldı. Hücre süspansiyonundan 50 µl alınarak, 50 µl tripan blue ile karıştırıldı. Karışım 5 dk inkübasyona bırakıldı. Karışımdan thoma lamına 10 µl aktararak sayım yapıldı. Canlı hücreler parlak görünürken ölü hücreler maviye boyandı. Süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı

$$\text{Toplam canlı hücre sayısı/ml} = \text{Sayım sonucu} \times 10^4 \times 2$$

3.2.1.6 MTT Yöntemi ile *Thermopsis turcica*'nin LD₅₀ Dozunun Belirlenmesi

Sitotoksosite deneyi mikrokültür tetrazolyum analizi (MTT (3- (4,5) -dimetiltiazol-2-yl) -2,5-difenil tetrazolyum bromür deneyi) ile gerçekleştirildi. Hücreler tripsinize edildi ve mikroskop yardımıyla sayıldı. Canlı hücre sayı eldesi için tripan mavisi kullanıldı. Hücreler sayıldıktan sonra 96 kuyucuklu plaklara yerleştirildi. Her kuyucuğa yaklaşık 200 µl mediyum kondu ve 20 bin hücre ilave edildi ve 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonra besiyeri uzaklaştırıldı ve her bir bitki ekstresinin farklı konsantrasyonları (50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml) ilave edilmiştir. Kontrol grubu için, % 1 DMSO ile muamele edilmiş hücreler kullanıldı. Bitki ekstreleri ile muamele edilen hücreler 24 saat inkübatörde tutuldu. Ertesi gün, her bir kuyucuk hacminin %10 hacmi olacak şekilde MTT solüsyonu ilave edildi.

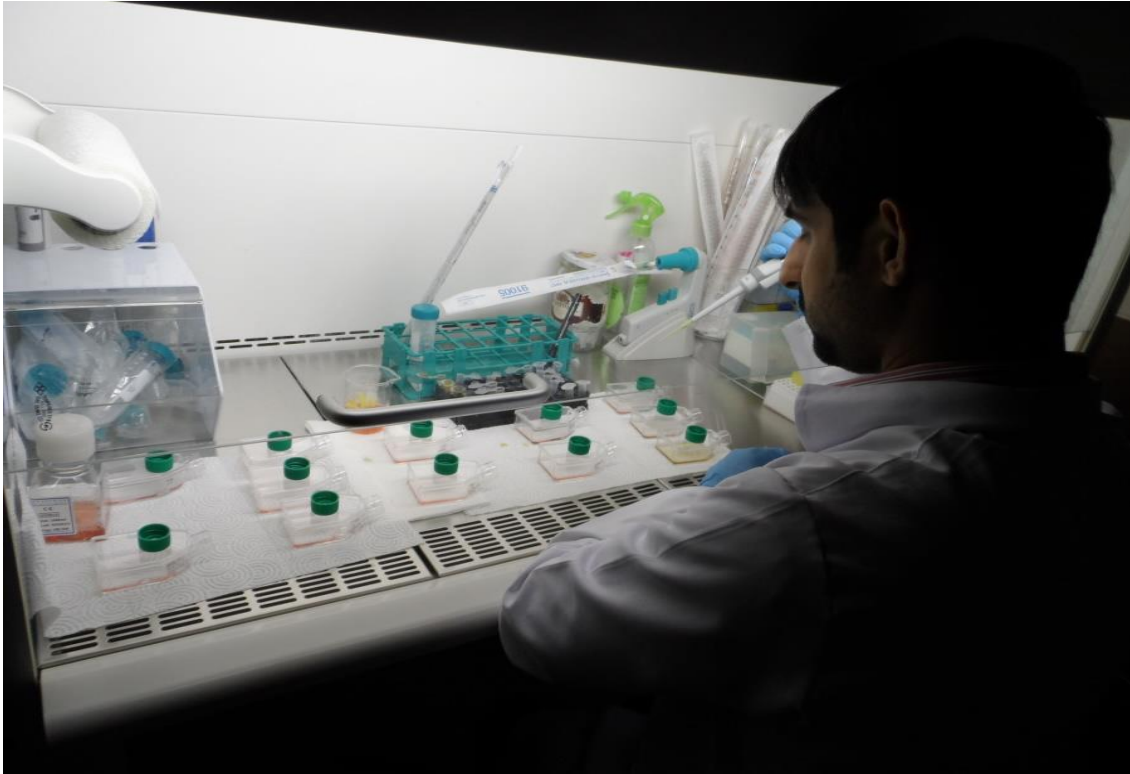
4 saat boyunca tekrar inkübe edildi. 4 saat sonra, her bir MTT ile birlikte tüm çözelti aspire edildi ve her kuyucuğa DMSO (300 µl) ilave edildi. 15 dakika sonra ELİZA okuyucusundan 540 nm'de okumalar alındı. Sonuçlar, DMSO ile muamele edilmiş hücreleri normalize edilen, 540 nm'de absorbansı % 50 düşürülmüş özüt konsantrasyonu olan bir IC₅₀ değeri olarak ifade edildi. Bu parametre üç kez tekrarlandı.

3.2.2 Genotoksosite Deneyi

3.2.2.1 Komet Yöntemi

MTT sitotoksosite testine bağlı olarak, sırasıyla sitotoksik ve sitotoksik olmayan dozlar 200 µg/ml ila 50 µg/ml olarak seçildi. Komet yöntemi, her ekstre için sitotoksik konsantrasyon (200 µg/ml) ve sitotoksik olmayan konsantrasyon (50 µg/ml) için gerçekleştirilmiştir. Deney kültürlerinden yaklaşık 1×10^5 hücre, kuyucuğa konfluent olunca 24 saat süreyle stabilize edildikten sonra aşağıdaki deneysel işlemler uygulandı: kontrol (% 1 DMSO, diğer işlemlerde kullanılan konsantrasyonun aynısı), daha önce MTT sitotoksosite deneyinin sonuçlarına dayanılarak seçilen *T. turcica* sitotoksik olmayan ve sitotoksik konsantrasyonu alındı. 24 saatlik işlemten sonra hücreler PBS ile yıkandı, tripsinize edildi, 5 dakika süreyle santrifüje edildi ve daha sonra kültür ortamında yeniden süspanse edildi. Yeniden süspansiyon haline getirilmiş hücrelerin 20

μ l'si ve 120 μ l LMP,% 0.5 karışımı, normal erime noktalı agarozlu (% 1.5) olan önceden hazırlanmış slaytlara uygulandı. Daha sonra, slaytlar bir lizis çözeltisinde bir saat tutulduktan sonra elektroforez tamponu içinde 40 dakika bekletildi ve sonra 20 dakika boyunca elektroforez uygulandı. Bu adımdan sonra, slaytlar soğuk distile su ile nötralize edildi. Slaytların boyanması etidyum bromid (20 μ g / ml ile yapıldı. Komet skoru hesaplandı ve hasar derecesine bağlı olarak 0-4 arasında skor alındı.



Resim 3.3. Sitotoksikite ve genotoksikite testleri için hücrelerin kültüre edilmesi.

3.2.3 RNA izolasyonu

HepG2 hücrelerinde *T. turcica*'nın etki mekanizmasını değerlendirmek için ekstrelerin apoptoz ve DNA onarımında rol oynayan anahtar genlerin ekspresyonu üzerindeki etkisi qRT-PCR tekniği kullanılarak test edildi.

RNA izolasyonu için, HepG2 hücreleri (1×10^5), 25 cm²' lik kültür flasklarına ekimi yapıldı. Hücreler % 70 ile % 80' lik konfluent elde edilinceye kadar 1-2 gün inkübe edildi. Her bir ekstrenin, sitotoksik olmayan konsantrasyon ve sitotoksik

konsantrasyonu 24 saat boyunca hücrelere uygulandı. Hücreler toplandı ve steril fosfat tamponu (PBS) ile yıkandı ve toplam RNA, RNAeasy kiti ile izole edildi.

3.2.3.1 Protokol

Hücreler 1000xg de 5 dakika boyunca 2 ml'lik ependorf tüpünde santrifüj edildi. Hücre peletine 400 µl tampon RL ilave edildi ve vorteksleme ile iyice karıştırıldı. β -ME, tampon RL'ye ilave edildi. Ardından lizat 2 ml'lik alıcı tüpüne ve homojenleştirme döndürme-kolonuna dikkatlice aktarıldı. 2 dakika maksimum hızda santrifüj edildi. Bundan sonra üzerine 350 µl % 70 etanol ilave edilerek pipetle homojenize edildi. Daha sonra çökelti 2 ml alıcı tüpü içinde RNA bağlayıcı döndürme-kolonuna yerleştirildi ve 1 dakika süre ile 11.000xg olarak santrifüj edildi.

DN1 tamponu yıkandıktan sonra 400 µl ilave edildi ve 11,000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Döndürme kolonundan çıkarıldı, süpernatant dökülerek tekrar alıcı tüpüne yerleştirildi. 650 µl yıkama RBW tamponu ilave edildi ve 11,000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Ardından, döndürme kolonundan çıkarıldı, süpernatant döküldü ve tekrar ayırıştırma tüpüne kondu. 350 µl yıkama RBW tamponu ilave edildi ve 11,000xg'de 2 dakika santrifüje edildi. Son olarak, döndürme-kolonuna yeni ayırıştırıcı tüp (1.5-2 ml) yerleştirildi ve doğrudan membrana 40-60 µl RNaz'dan ilave edildi. Materyal 11.000xg'de 1 dakika süreyle santrifüje tabi tutuldu. RNA, daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere -20 °C' de saklandı.

3.2.3.2 RNA Saflık kontrolü ve cDNA Sentezi

Çıkarılan RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu A260/A280 absorban oranları temelinde nanodrop UV-spektrofotometre ile teyit edilmiş ve cDNA (20 µl), üreticinin protokolüne göre bir birinci dizi cDNA Sentez kiti (Thermo Scientific) ile üretilmiştir.

0.2 veya 0.5 mL'lik bir tüpte kombine primer (50 µM Oligo (dT) 20, 50 ng/µl, RNA ve dNTP karıştırılarak DEPC ile işlenmiş su ile hacmi 12 µl'ye ayarlandı.

Bileşik primer miktarı	1 µl RNA (10 pg ila 5 µg)
X µl 10 mM dNTP karışımı	2 µl
DEPC ile işlenmiş su	12 µl olarak tamamlandı

Daha sonra 65 °C'de 5 dakika inkübe edilerek RNA ve primeri denatüre hale getirildikten sonra buz üzerine yerleştirildi. Daha sonra ana reaksiyon karışımı buz üzerinde hazırlandı ve hafifçe vortekslendi. Tek Reaksiyon Bileşeni aşağıdaki gibidir.

5x cDNA Sentez Tamponu	4 µl
0.1 M DTT	1 µl
RNaseOUT™ (40 U/µL)	1 µl
DEPC ile işlenmiş su	1 µl
ThermoScript™ RT (15 birim/µl)	1 µl

Buz üzerinde her reaksiyon tüpüne 8 µl temel reaksiyon karışımı pipetlendi. Uygun cDNA sentez sıcaklığına ısıtılmış termal döngüleyiciye aktarıldıktan sonra 55 °C'de 45 dakika inkübe edildi. Ardından 85 °C'de 5 dakika inkübe edilerek reaksiyon durduruldu. cDNA sentez reaksiyonları, PCR için kullanılabilecek kadar -20 °C'de saklandı.

3.2.4 qQRT-PCR Varsitesiyle Gen Ekspresyonunun Analizi

Nicel gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) uygulandı (Stratagene Mx3005P QPCR sistemi, ABD). Spesifik PCR koşulları altında kullanılan apoptotik ve DNA onarım genlerinin primeri Tablo 1'de gösterilmektedir. Aşağıda belirtilen RT-PCR karışımı bahsedilen miktarlarda kullanıldı.

RT-PCR karışımı:	Quantity
SYBR Green karışımı	10 µl
İleri primer (10 pmol/µl)	1 µl
Reverse primer (10 pmol/µl)	1 µl
Damıtılmış su	7 µl
cDNA	1 µl

Genlerin amplifikasyonu, Maxima SYBR Green boyasıyla (Thermo Scientific) tespit

edildi. Deneyler üçlü olarak gerçekleştirildi. Her bir hedef genin gen ekspresyon seviyesi, endojen β -aktin (ΔCt) genine normalize edildi. Gen ekspresyon değerleri daha sonra aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Pfaffl, 2001).

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{hedef\ gen} - Ct_{\beta-aktin})_{deneysel\ grup} - (Ct_{hedef\ gen} - Ct_{\beta-aktin})_{kontrol\ grup}$$

Çizelge 3.1 Primer sekanslar, apoptotik ve onarım genlerinin PCR koşulları.

Genler	Sekanslar	PCR Koşulları	Döngül
β -aktin	F-5' CACCCAGCCATGTACGTTGC3' R-5' CCGGAGTCCATCACGATGCCA3'	başlangıç: 95°-10dak; 94°c-1m/62°c-1 m/72°c-1 m	40
Bax	F-5' CGCCTCACTCACCATCTGGAA3' R-5' CCTCAAGACCACTCTTCCCA3'	başlangıç: 95°c-10 dak; 94°c-1 m/58°c-1m/72°c-1 m	40
Bcl-2	F-5' GAGGGGTACGAGTGGGATGC3' R-5' GGAGGAGAAGATGCCCCGGTGC3'	başlangıç: 95°c-10 dak; 94°c-1 m/62°c-1m/72°c-1 m	40
TRAIL-R1	F-5' GAGAAGTCCCTGCACCACGAC3' R-5' CCGGAAAGTTCTGTTTGACAC3'	başlangıç: 95°c-10 dak; 94°c-1 m/59°c-1m/72°c-1 m	40
TRAIL-R2	F-5' TCCTTACCTGAAAGGCATCTGC3' R-5' GTCGTTGTGAGCTTCTGTCCA3'	başlangıç: 95°c-10 dak; 94°c-1 m/57°c-1m/72°c-1 m	40
Siklin -D1	F-5' ATGCTGGAGGTCTGCGAGGAA3' R-5' CGACAGGAAGCGGTCCAGGTA3'	başlangıç: 95°c-10 dak; 94°c-1 m/60°c-1m/72°c-1 m	40
P21	F-5' CCGTGAGCGATGGAACCTTCGAC3' R-5' TGGGAAGGTAGAGCTTGGGCA3'	başlangıç: 95°c-10 dak; 94°c-1 m/60°c-1m/72°c-1 m	40
P53	F-5' CGGAGGTCTGTGAGACGCTG 3' R-5' CACATGTACTTGTAGTGGATGGTGG3'	başlangıç: 95°c-10 dak; 94°c-1 m/60°c-1m/72°c-1 m	35
NFKB	F-5' GGTGCGGCTCATGTTTACAGC3' R-5' GCGTCTGATACCACGGGTTC3'	başlangıç: 95°c-10 dak; 94°c-1 m/59°c-1m/72°c-1 m	40
Kaspaz 8	F: 5' GCAAAAGCACGGGAGAAAGT 3' R: 5' TGCATCCAAGTGTGTTCATT 3'	başlangıç: 95°C de 5 dak; 40 döngü 95°C de 20 s,60°C de 30 s ve 72°C de 20 s;1döngü 95°C de 10 s	40
Kaspaz 3	F: 5' GTGCTACAATGCCCCTGGAT 3' R: 5' GCCCATTCATTTATTGCTTTC 3'	Başlangıç: 95°C-10 dak; 94°C-1 dak/58°C -1 dak/72°C -1 dak	35
Kaspaz 7	F: 5' GTGCTACAATGCCCCTGGAT 3' R: 5' GCCCATTCATTTATTGCTTTC 3'	başlangıç: 95°C de 5 dak; 40 döngü 95°C de 20 s,60°C de 30 s ve 72°C de 20 s;1döngü 95°C de 10 s	40
Onarım genleri			
<i>ERCC4</i>	F: 5' CGCAAATATAACACCACCTTG 3' R: 5' CACCTCCCTCGCCGTGTA 3'	başlangıç: 95°C de 5 dak; 40 döngü 95°C de 20 s,60°C de 30 s ve 72°C de 20 s;1döngü 95°C de 10 s	40
<i>OGG1</i>	F: 5' AATTCCAAGGTGTGCGACTG 3'/ R: 5' CGATGTTGTTGTTGGAGGAAC3'	başlangıç: 95°C de 5 dak; 40 döngü 95°C de 20 s,60°C de 30 s ve 72°C de 20 s;1döngü 95°C de 10 s	40

3.2.5 İstatistiksel Analiz

Komet analizinden elde edilen veriler varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur ($p < 0.05$) ve grup ortalamalarının karşılaştırılması Duncan testi ile yapıldı. Gen ekspresyon analizi, referans geni β -aktin kullanılarak normalize edilmiştir (Pfaffl, 2001).



4. BULGULAR

4.1 Hücre Canlılığı Test Sonuçları

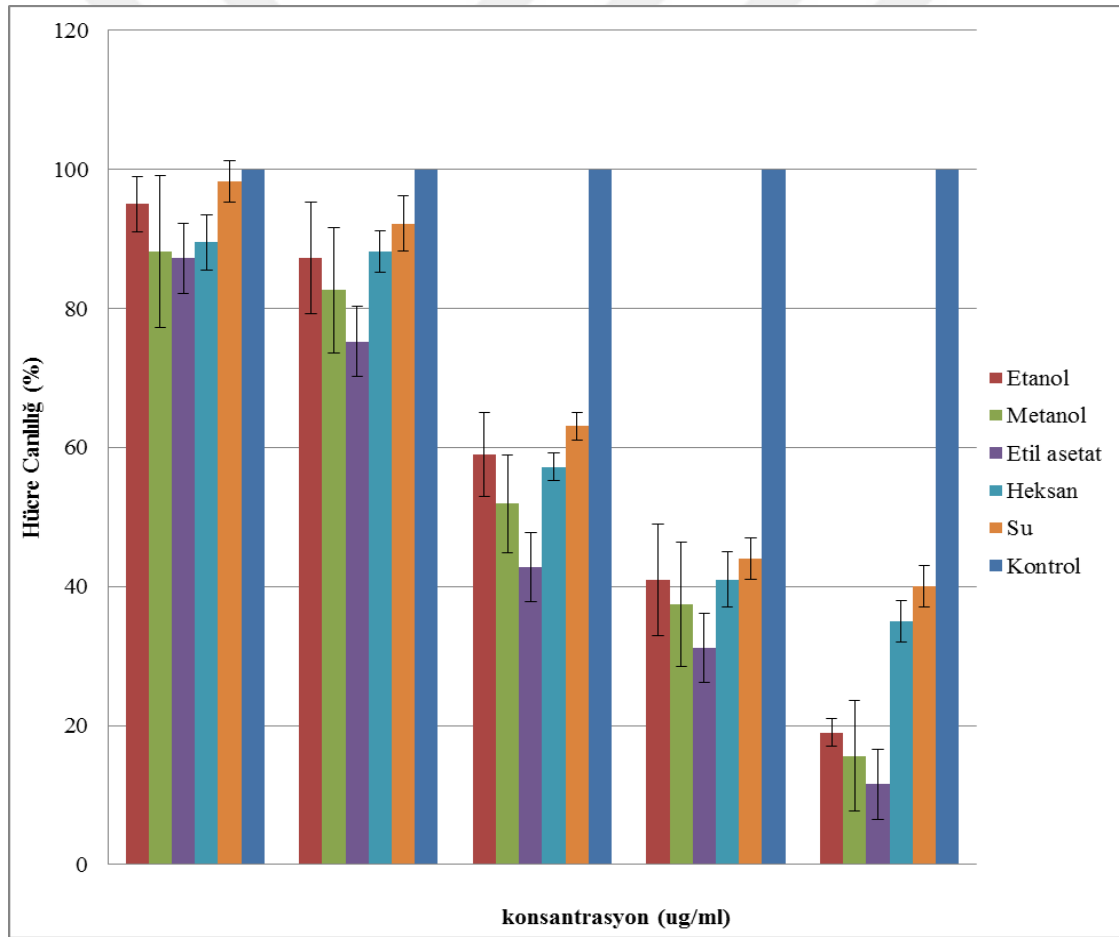
Konfluent oranı % 40-50 olduğunda kültür ortamındaki mediyum alınıp kültür mediyumu ile dilüe edilmiş *T. turcica*'nın 50 µg/ml, 100 µg/ ml, 200 µg/ ml, 300 µg/ ml, 400 µg/ ml) ve kontrol olarak % 1 DMSO ilave edildi. Farklı *T. turcica*'nın konsantrasyonlarda çeşitli ekstrelerinin sitotoksik etkileri ile ilgili sonuçlar çizelge 4.1. ve şekil 4. 2'de gösterilmektedir.

T. turcica 'nın 50 µg/ml konsantrasyonlarda etil asetat ekstresinin uygulanmadığı grupta hücre canlılığının en yüksek %85,58±2,29 olduğu görüldü ve 400 µg/ml konsantrasyonlarda 15,38±1,02 gözlemlendi. Etil asetat, diğer ekstrelerle karşılaştırıldığında en yüksek sitotoksik etkiyi gösterdi. Metanol, etanol ile karşılaştırıldığında daha yüksek konsantrasyonda daha fazla etkiye sahiptir. Su en az sitotoksik etkiye sahiptir. Heksan ekstresi, su ve kontrol ile karşılaştırıldığında daha fazla sitotoksik etki göstermiştir. Hücrede sitotoksik etki sırasıyla, 250 µg / ml ila 400 µg / ml arasında bulunmuştur. Tüm ekstrelerde hücre canlılığında, doza bağımlı bir şekilde azalma gözlemlendi. Daha yüksek dozlarda, hücre canlılığı daha düşük olmasına rağmen ekstre konsantrasyonu azaldıkça hücre canlılığı artış göstermiştir.

IC₅₀ değerlendirilirken; kontrol grubu diğer gruplar ile tek tek kıyaslandı. Kontrol yüzde yüz canlı olarak kabul edilerek, *T. turcica* ekstresinin inhibisyon konsantrasyonu (IC₅₀) belirlendi. Oysa metanol, etanol, etil asetat, hekzan ve su için IC₅₀ değerleri sırasıyla 195±10 µg/ml, 210±15 µg/ml, 185±10 µg/ml, 240±20 µg/ml 250±24 µg/ml olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1 Farklı konsantrasyonlarda *T. turcica* ekstrelerinin sitotoksik etkileri ile ilgili sonuçlar.

Konsantrasyonlar	% hücre canlılığı (Ort.±St. Sapma)					
	Etanol	Metanol	Etil asetat	Heksan	Su	Kontrol
400 µg/ml	18,81±1,17	16,19±1,11	15,38±1,02	38,51±2,00	40,25±3,44	100±0,00
300 µg/ml	40,58±2,99	38,39±0,00	33,28±3,44	41,91±3,44	43,27±1,86	100±0,00
200 µg/ml	57,29±3,41	48,15±3,44	42,44±2,00	57,03±0,14	61,92±5,44	100±0,00
100 µg/ml	83,14±1,56	82,00±1,44	75,15±0,00	87,92±0,00	89,86±3,44	100±0,00
50 µg/ml	91,88±4,02	89,88±2,32	85,58±2,29	93,84±1,39	95,99±2,13	100±0,00



Şekil 4.1 Farklı konsantrasyon serileri (50 µg/ml, 100 µg/ ml, 200 µg/ ml, 300 µg/ ml, 400 µg/ ml) *T. turcica*'nın çeşitli ekstrelerinin HepG2 hücresi üzerindeki sitotoksik etkileri.

4.2 *T. turcica*'nın Farklı Ekstrelerinin Genotoksisite Analizinin Sonuçları

MTT sitotoksisite testine bağlı olarak, sitotoksik ve sitotoksik olmayan dozlar sırasıyla 200 µg/ml ve 50 µg/ml olarak seçildi. Sitotoksik ve sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda farklı ekstrelerin neden olduğu genotoksisite sonuçları Çizelge 1'de gösterilmektedir. Tüm gruplarda, 200 µg /ml konsantrasyonda DNA hasar skorlarındaki artış kontrol grubundan anlamlı olarak farklılık göstermiştir. Etil asetat, sitotoksik konsantrasyonda en yüksek DNA hasarını (22.33 ± 1.52) gösterdi. Her iki konsantrasyonda su ekstresinde sırasıyla en az hasar (8.33 ± 1.73 ; 4.33 ± 0.57) gözlemlendi. Metanol, sitotoksik konsantrasyonda 2. en yüksek DNA hasarını (19 ± 1) gösterdi.

Çizelge 4.2 *T. turcica*'nın sitotoksik ve sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda farklı ekstrelerinin DNA hasar skorları

Ekstreler	DNA Hasarı (Arbitrary Unit) (Ortalama±SD)*	
	200 µg/ml	50 µg/ml
Etanol	18 ± 1^{ab}	10 ± 1^a
Metanol	19 ± 1^{ab}	9.67 ± 1.52^a
Etil asetat	22.33 ± 1.52^{bc}	10 ± 1^a
Heksan	9.33 ± 1.15^a	5 ± 2^b
Su	8 ± 1.73^a	4.33 ± 0.57^b
Kontrol	3 ± 1.0^b	3 ± 1^b

Aynı harfle ifade edilen ortalama P < 0.05 düzeyinde istatistiksel olarak farklılık göstermez. (SD: Standart Sapma).

4.3 HepG2 Hücre Dizisinde Apoptotik ve DNA Onarım Genlerinin Mesajcı RNA (mRNA) Ekspresyon Seviyeleri

T. turcica'nın farklı ekstrelerinin apoptotik ve onarım gen ekspresyonu ile ilgili veriler Çizelge 4.3, 4.4, 4.5 'de gösterilmektedir.

T. turcica'nın metanol ekstresi hücrelere 24 saat süreyle uygulandığı zaman kontrol grubuna göre 50 ve 200 µg /ml dozu uygulanan gruplarda p53 mRNA ekspresyon düzeylerinin sırası ile +1,67 ve +2,47 misli uyarıldığı görülmektedir. Bu uyarılmanın 200 µg /ml lik konsantrasyonda fazla olduğu anlaşılmıştır. *T. turcica*'nın etanol ekstraktının 50 ve 200 µg /ml konsantrasyonlarında p53 geni mRNA ekspresyon düzeyleri sırasıyla +2,08 ve +2,94 misli uyarıldığı görülmektedir. Etil asetat ekstresinin uygulama sonuçlarında ise p53 geninin ifadesinde uyarılma olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.3 Apoptotik genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri.

Gruplar	Apoptotik genleri						
Gruplar	P53	P21	Kaspaz 3	Kaspaz 8	Kaspaz 7	PCBP4	Siklin D1
Kontrol	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
*Met₂₀₀	+2.47	+1.92	+1.97	+1.97	+2.87	-0.80	+1.26
*Met₅₀	+1.67	+1.55	+1.31	+1.31	+1.25	-0.90	+1.21
*Eta₂₀₀	+2.94	+1.97	+1.90	+1.90	+1.23	-0.97	+2.59
*Eta₅₀	+2.08	+1.44	+1.35	+1.35	+1.13	-1.80	+1.38
*Etil₂₀₀	+2.51	+1.91	+1.97	+1.97	+2.53	-1.76	+1.85
*Etil₅₀	+2.22	+1.38	+1.45	+1.45	+1.86	-1.10	+1.54
*Hek₂₀₀	+1.85	+2.10	-0.86	-0.96	-0.84	-0.41	+1.24
*Hek₅₀	+1.68	+1.96	-0.83	-0.83	-0.29	-0.29	+1.93
Su₂₀₀	+2.89	+2.25	-0.71	-0.79	-0.47	-1.48	+1.53
Su₅₀	+2.34	+1.12	-0.43	-0.43	-0.36	-1.78	+1.21

*Met=Metanol; *Eta= Etanol; *Etil= Etil asetat; *Hek= Heksan , + = uyarılma, - = baskılanma

Uyarılma düzeyleri 50 ve 200 µg/ml’de sırasıyla +2,22 ve +2,51 olduğu görülmüştür. Etil asetatın uygulanması iki grupta yakın değerler vermiştir. *T. turcica*’nın hekzan ekstresi hücrelere 50 ve 200 µg/ml dozda uygulanmıştır. Uygulama sonunucu kontrole göre uyarılma gözlenirken 50 ve 200 µg/ml dozlarının uyarılma düzeyleri sırası ile +1,68 ve +1,85 olarak belirlenmiştir. *T. turcica*’nın su ekstraktı diğer ekstreler gibi p53 genini uyarmıştır. Uyarılma düzeyleri 50 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla +2,34 ve +2,89 misli olmuştur. Ayrıca p53 geninin uyarılma düzeyinin en fazla olduğu, su ekstresi 200 µg/ml dozu göstermiştir (Çizelge 4.3).

T. turcica ekstreleri hücrelere uygulandığı zaman metanol ekstraktının P21 geni uyarılma düzeyleri kontrole göre kıyaslandığında 50 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla +1,55 ve +1,92 katı arttığı görülmektedir. P21 genine 50 ve 200 µg/ml etanol ekstresinin uyarılma düzeyleri sırasıyla +1,44 ve +1,97 misli olduğu görülmektedir. Bu uyarılmanın

200 µg/ml dozda daha yüksek olduğu görülmektedir. P21 geninde etil asetat etkisi uygulanan 50 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla +1,38 ve +1,91 kat olduğu görülmektedir. Diğer ekstreler gibi hekzan ekstreside kontrole kıyasla uyarılmayı sağlarken 50 ve 200 µg/ml dozlarında sırası ile +1,96 ve +2,10 kat olduğu görülmektedir. *T. turcica*'nın sulu ekstresi hücrelere 24 saat uygulandığında 50 ve 200 µg/ml dozlarında uyarılma düzeyleri sırası ile +1,12 ve +2,25 misli olduğu görülmüştür. Bu uyarılma 200 µg/ml'de daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca bütün ekstrelerin uygulama dozlarına göre en yüksek düzeyde ifade dozu 200 µg/ml dozu olup ifade düzeyi +2,25 kat olduğu görülmüştür.

Apoptotik genler olan kaspazlar *T. turcica* ekstrelerinin uygulanması sonucu bazı uygulamalarda baskılandığı görülürken, bazı uygulamalarda uyarıldıkları görülmüştür. Kaspaz 3 geninin *T. turcica* uygulama sonuçları kontrole göre, 50 ve 200 µg/ml metanol ekstresinde sırasıyla +1,31 ve +1,97 misli uyarıldığı görülmüştür. *T. turcica*'nın etanol ekstresi 50 ve 200 µg/ml dolarında kontrole kıyasla kaspaz 3 genini sırasıyla +1,35 ve +1,90 kat uyarmıştır. Bu uyarılma 200 µg/ml dozda daha fazla olduğu görülmüştür. *T. turcica* etil asetat ekstresi ekspresyon düzeyleri kaspaz 3 geninde uyarıldığı görülmüştür. 50 ve 200 µg/ml dozlarda kontrole kıyasla uyarılma düzeyleri sırasıyla +1,45 ve +1,97 kat olduğu görülmüştür. Kaspaz 3 geninin ekspresyon düzeyleri *T. turcica* hekzan ekstresine baskılanmış olup 50 ve 200 µg/ml dozlarda sırasıyla baskılanma düzeyleri -0,83 ve -0,86 misli olduğu görülmüştür. *T. turcica* sulu ekstresi ise kaspaz 3 geninin ekspresyon düzeylerini hekzan gibi baskılamış olup, 50 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla -0,43 ve -0,71 misli baskılanmış olduğu görülmüştür.

Kaspaz 8 geninin *T. turcica* uygulama sonuçları kontrole göre 50 ve 200 µg/ml metanol ekstresine sırasıyla +1,31 ve +1,97 misli uyarıldığı görülmüştür. *T. turcica*'nın etanol ekstresi 50 ve 200 µg/ml dolarında kontrole kıyasla kaspaz 8 genini sırasıyla +1,35 ve +1,90 kat uyarmıştır. Bu uyarılma 200 µg/ml dozda daha fazla olduğu görülmüştür. *T. turcica* etil asetat ekstresi ekspresyon düzeyleri kaspaz 8 geninde uyarıldığı görülmüştür. 50 ve 200 µg/ml dozlarda kontrole kıyasla uyarılma düzeyleri sırasıyla +1,45 ve +1,97 kat olduğu görülmüştür. Kaspaz 8 geninin ekspresyon düzeyleri *T. turcica* hekzan ekstresinde baskılanmış olup 50 ve 200 µg/ml dozlarda sırasıyla

baskılanma düzeyleri -0,83 ve -0,96 misli olduğu görülmüştür. *T. turcica* sulu ekstresi ise kaspaz 8 geninin ekspresyon düzeylerini hekzan gibi baskılamış olup, 50 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla -0,43 ve -0,79 misli baskılanmış olduğu görülmüştür.

Kaspaz 7 geninin *T. turcica* uygulama sonuçları kontrole göre 50 ve 200 µg/ml metanol ekstresinde sırasıyla +1,25 ve +2,87 misli uyarıldığı görülmüştür. *T. turcica* nın etanol ekstresi 50 ve 200 µg/ml dozlarında kontrole kıyasla kaspaz 7 genini sırasıyla +1,13 ve +1,23 kat uyarmıştır. Bu uyarılma 200 µg/ml dozda daha fazla olduğu görülmüştür. *T. turcica* etil asetat ekstresi ekspresyon düzeyleri kaspaz 7 geninde uyarıldığı görülmüştür. 50 ve 200 µg/ml dozlarda kontrole kıyasla uyarılma düzeyleri sırasıyla +1,86 ve +2,53 kat olduğu görülmüştür. Kaspaz 7 geninin ekspresyon düzeyleri *T. turcica* hekzan ekstresinde baskılanmış olup 50 ve 200 µg/ml dozlarda sırasıyla baskılanma düzeyleri -0,29 ve -0,84 misli olduğu görülmüştür. Bu baskılanmanın 200 µg/ml doz uygulamasında daha fazla olduğu görülmüştür. *T. turcica* sulu ekstresi ise kaspaz 7 geninin ekspresyon düzeylerini hekzan gibi baskılamış olup, 50 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla -0,36 ve -0,47 misli baskılanmış olduğu görülmüştür.

Apoptotik yolun bir diğer geni olan PCBP4 *T. turcica* uygulanmasında bütün uygulama gruplarında baskılandığı görülmüştür. *T. turcica* metanol ekstresi hücrelere uygulandıktan sonra kontrole kıyasla baskılandığı görülmüş olup, 50 ve 200 µg/ml doz uygulamasında sırasıyla baskılanma düzeyleri -0,90 ve -0,80 misli baskılamıştır. *T. turcica*'nın etanol ekstresi kontrole kıyasla PCBP4 genini baskılamıştır. 50 ve 200 µg/ml dozlarda sırasıyla baskılanma düzeyleri -1,80 ve -0,90 kat baskılandığı görülmüştür. Bu baskılanmanın 50 µg/ml dozda daha yüksek olduğu bulunmuştur. *T. turcica*'nın etil asetat ekstresinin PCBP4 genini baskılamıştır. Bu baskılanma kontrole kıyasla 50 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla -1,10 ve -1,76 misli olduğu görülmüştür. *T. turcica*'nın hekzan ekstresinin uygulamalarında PCBP4 geni baskılanma gösterirken, bu baskılanma 50 ve 200 µg/ml dozlarda baskılanma düzeyleri sırasıyla -0,29 ve -0,41 misli olduğu görülmüştür. *T. turcica*'nın su ekstraktı HepG2 hücrelerinde PCBP4 genini baskımlarken, bu baskılanma 50 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla -1,78 ve -1,48 kat olduğu gösterilmiştir.

Apoptotik yolun diğer bir geni olan siklin D1 geni bütün ekstraların uygulama dozlarında kontrole kıyasla uyarılmıştır. *T. turcica* metanol ekstresi kontrole kıyasla 50 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla +1,21 ve +1,26 kat uyarılma düzeyi göstermiştir. *T. turcica* etanol ekstresi hücrelere uygulandığında siklin D1 geni kontrole kıyasla 50 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla +1,38 ve +2,59 misli uyarıldığı gösterilmiştir. *T. turcica* etil asetat ekstresi siklin D1 geninin ekspresyon seviyelerini kontrole kıyasla uyarmış olup, 50 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla uyarılma düzeyleri +1,54 ve +1,85 olduğu görülmüştür. Hekzan ekstresi 50 ve 200 µg/ml dozlarında sırasıyla +1,93 ve +1,24 misli uyarılmıştır. Sulu ekstrakta diğer ekstralar gibi siklin D1 geninin ekspresyon düzeylerini uyarmıştır. 50 ve 200 µg/ml dozlarda uyarılma düzeyleri sırası ile +1,21 ve +1,53 kat attığı görülmüştür.

T. turcica ekstraları HepG2 hücrelerine uygulandıktan 24 saat sonra antiapoptotik ve proapoptotik genleri baskıladığı gösterilmiştir. Antiapoptotik genlerden Bcl-xl, *T. turcica*'nın bütün ekstralarında baskılanırken, en yüksek baskılanma metanol ekstresinin 200 µg/ml dozunda -0,98 kat ile olmuştur. Diğer bir antiapoptotik gen olan Bcl-2 ise en yüksek baskılanmayı *T. turcica*'nın etanol ekstresinde göstermiştir. Bu baskılanma 50 µg/ml dozda -1,07 misli olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.4 Pro apoptotik ve anti apoptotik genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri.

Grupları	Pro apoptotik ve anti apoptotik Geneler		
	Bcl-xl	Bcl- 2	Bax
Kontrol	+1	+1	+1
*Met₂₀₀	-0.98	-0.12	-1.45
*Met₅₀	-0.73	-0.09	-0.37
*Eta₂₀₀	-0.84	-0.88	-0.07
*Eta₅₀	-0.95	-1.07	-0.83
*Etil₂₀₀	-0.89	-0.76	-0.09
*Etil₅₀	-0.15	-0.56	-2.11
*Hek₂₀₀	-0.58	-0.90	-0.25
*Hek₅₀	-0.37	-0.36	-0.01
Su₂₀₀	-0.75	-0.69	-0.20
Su₅₀	-0.53	-0.35	-0.003

*Met=Metanol; *Eta= Etanol; *Etil= Etil asetat; *Hek= Heksan , + = uyarılma, - = baskılanma

Proapoptotik bir gen olan Bax'ta antiapoptotik genler gibi baskılanırken, en yüksek baskılanma düzeyleri *T. turcica* etil asetat ekstresinin 50 µg/ml dozunda -2,11 misli baskılanma düzeyi göstermiştir. Etil asetat baskılanma düzeyi en az 50 µg/ml dozunda sulu ekstrede gösterilmiştir.

T. turcica farklı ekstrelerinin HepG2 hücrelerine uygulanması sonucu toll benzeri reseptörleri doku nekroz faktörleri kontrole kıyasla uyarılma düzeyleri göstermiştir. Ancak onarım genlerinin bazı uygulamaları baskılanırken bazı uygulama grupları uyarılmıştır. TRAIL R1 geni en yüksek ekspresyon düzeyi +2,95 kat ile 200 µg/ml etanol ekstraktında olmuştur. TRAIL R2 geninin en yüksek ekspresyon düzeyi kontrole kıyasla +6,58 kat uyarılmış olup, bu değer 50 µg/ml etil asetat dozunda görülmüştür. NfKB genide diğer genler gibi uyarılmış olup en yüksek uyarılma düzeyi kontrole kıyasla +2,73 ile *T. turcica*'nın sulu 50 µg/ml dozunda gösterilmiştir.

Onarım genleri 50 µg/ml hekzan ve sulu ekstrede baskılanırken, diğer uygulama gruplarında uyarılmıştır. OGG1 geni en yüksek uyarıma ve baskılanma düzeyleri sırasıyla 200 µg/ml hekzan ve 200 µg/ml sulu ekstre dozlarında +2,07 ve -0,79 misli olmuştur. *T. turcica* metanol ekstresi 200 µg/ml dozda ERCC4 geninin uyarıma düzeyini en yüksek düzeyde arttırırken, 200 µg/ml su ekstresi kontrole kıyasla en çok baskıladığı görülmüştür.

Çizelge 4.5 Toll benzeri reseptör genleri ve onarım genleri mRNA ekspresyon düzeyleri.

Grupları	Toll benzeri reseptör genleri			Onarım genleri	
	TRAIL R 1	TRAIL R 2	NFKB	OGG1	ERCC4
Kontrol	+1	+1	+1	+1	+1
*Met₂₀₀	+2.69	+2.69	+2.34	+1.28	+2.27
*Met₅₀	+2.39	+2.54	+1.91	+1.37	+1.16
*Eta₂₀₀	+2.95	+3.86	+1.74	+1.06	+1.64
*Eta₅₀	+2.53	+2.60	+1.93	+1.48	+1.28
*Etil₂₀₀	+2.32	+2.21	+1.29	+1.14	+1.54
*Etil₅₀	+1.79	+6.58	+1.04	+1.07	+1.17
*Hek₂₀₀	+2.63	+2.07	+1.97	+2.07	+1.17
*Hek₅₀	+2.77	+2.54	+1.16	-0.77	-0.76
Su₂₀₀	+2.62	+4.08	+2.25	-0.79	-0.79
Su₅₀	+2.94	+3.09	+2.73	-0.35	-0.3

*Met=Metanol; *Eta= Etanol; *Etil= Etil asetat; *Hek= Heksan , + = uyarılma, - = baskılanma

Özetle, P53, P21, Siklin D1, NFKB, TRAIL-R1 ve TRAIL-R2'nin uyarılması, farklı özütlerin tüm sitotoksik ve sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda görülmüştür. Halbuki PCBP4, Bax, Bcl-2 ve Bcl-xl genlerinde ekstrelerin tüm konsantrasyonlarında baskılanma gözlemlenmiştir. Kaspaz 3, 8 ve 7, aynı zamanda, aşağı regülasyona tabi tutulmuş olan heksan ve su haricinde, farklı özütlerin tüm dozlarında ifade edilmiştir. DNA onarım genleri sitotoksik olmayan hekzan konsantrasyonları ve her iki su konsantrasyonu dışında düzenlenmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kimyasal zararları önleyici ilaçların geliştirilmesine yönelik stratejiler yıllardır gelişmektedir (Newman *et al.* 2003, Gurib-Fakim 2006). Son zamanlarda, çok aşamalı karsinogeneziyi inhibe etme, geciktirme yeteneğine sahip yeni kansere karşı kimyasal zararları önleyici bileşiklerin belirlenmesine büyük önem verilmiştir. Hücre canlılığı, sitotoksisiteyi belirlemek için yaşamsal bir parametredir. Hücre kültürlerinde, kimyasalların etkilerinin belirlenmesi için kullanılan birçok test yöntemi vardır. Sitotoksiste testleri olarak bilinen bu testler kimyasalların hücreler üzerinde ne derece ve hangi fonksiyonlarını etkilediğini göstermek için kullanılmaktadır. Bu testlerden en çok kullanılanları WST-1, XTT ve MTT vb. testlerdir (Yaramış 2011).

Hücre canlılığında konsantrasyona bağlı azalma gözlenmiştir. Bu ekstrelerin IC₅₀ değeri HL60 ve K-562 hücreleriyle karşılaştırıldığında HepG2 hücre dizisinde daha yüksek bulunmuştur (Bali *et al.* 2014). Ancak bu çalışmada, etil asetat ekstresi mevcut çalışma ile benzer şekilde en yüksek sitotoksiste etkiye sahip olduğu belirlendi. Buna göre etil asetat ekstresi toksik fitokimyasal maddeleri ve güçlü antioksidan aktivitesini içerdiğini göstermektedir (Bali *et al.* 2014). Önceki araştırmalar, bir kimyasalın antioksidan özelliği ve sitotoksiste arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (Cai *et al.* 2004, Hou ve ark., 2007, Allahghadri *et al.* 2010, Sulaiman *et al.* 2013).

Çözücü ekstraksiyonları, kullanım kolaylığı, verimlilik ve geniş uygulanabilirlik nedeniyle bitki materyalinden özüt hazırlamak için en yaygın kullanılan prosedürlerdir. Kimyasal ekstraksiyon verimi, değişen polariteli, ekstraksiyon zamanı ve sıcaklığı, numune / solvent oranı ve aynı zamanda numunelerin kimyasal bileşimi ve fiziksel özellikleri ile çözücü türüne bağlı olduğu genel olarak bilinir. Fenoliklerin çözünürlüğü, bitki örneğinin kimyasal niteliğine ve kullanılan çözücülerin polaritesine göre yönetilir (Sulaiman *et al.* 2013).

Thermopsis cinsi flavonoidleri ve alkaloidleri, N-metilcytinin, N-formycytisine, anagyrine, thermopsine ve sitoizin bakımından zengindir (Dement 1975, Saito *et al.* 1989, Saito *et al.* 1988). *T. turcica*'nın kökü, köksapı ve yapraklarının kumarin, anagirin lupin alkaloidleri, steroidler, kardiyoaktif glikozitler ve flavonoidleri içerdiğini

bildirdiler (Şener *et al.* 1992). Bu nedenle; etil asetat, etanol ve metanol özütlerinde flavonoidler ve alkalonoidler gözlenmiştir.

Alkalonoidler ve flavonoidler bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan çok çeşitli polifenolik bir gruptur. Özellikle yaprakların renklenmesinden sorumludurlar. İnsanların tükettiği meyvelerin, sebzelerin ve çayların renklenmesine ve tatlanmasına katkı sağlarlar (Dhiman *et al.* 2016). Bitkilerden türetilen sekonder metabolitler olup günümüze kadar 7000'den fazla flavonoid saptanmıştır (Akimoto *et al.* 2017). Kimyasal yapılarına göre flavonoller, flavanonlar, flavonlar, izoflavonoidler ve antosiyanidinler olmak üzere 5 gruba ayrılmışlardır (Hoensch and Oertel 2015). Flavonoidlerin anti-kanser, anti-oksidatif, anti-diyabetik, anti-obezite ve anti-inflamatuar etkileri olup insülin direncinide arttırdıkları belirlenmiştir (Nishina *et al.* 2017). Mevcut çalışmada HepG2 üzerinde heksan ve su özütlerinin zayıf sitotoksik etkisi gözlemlendi. *T. rhombifolia* nın su ekstresi da HT-29 hücreleri üzerindeki zayıf sitotoksik etkisini göstermiştir (Kerneis *et al.* 2015).

Tek hücreli jel elektroforez (SCGE) tahlili olarak da bilinen Komet Yöntemi, DNA hasarın için çok hassas bir testtir ve tek tek hücrelerdeki tekli ve çift sarmallı DNA'larının doğrudan belirlenmesini sağlar. Komet yöntemi biyolojik gözlem, radyasyon biyolojisi, çevresel toksikoloji, beslenme çalışmaları ve kanser çalışmaları da dahil olmak üzere DNA hasarının incelenmesinde kullanılır. Komet yönteminde kuyruklu yıldızların skorlanması görsel olarak veya görüntü analiz yazılımları ile değerlendirilebilir (Gyori *et al.* 2014). Birçok yazar, çeşitli hücre soyları ile çeşitli kimyasalların *in vitro* veya *in vivo* genotoksisite / antigenotoksisitesini değerlendirmek için Komet analizini kullanmıştır (Valentin-Severin *et al.* 2003; (Cigerci *et al.* 2015; Cigerci *et al.* 2016).). Sunulan çalışmada da *T. turcica*'nin HepG2 hücrelerinde genotoksik etkileri komet analizi ile belirlenmiştir.

Bu çalışmada sitotoksik ve sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda çeşitli *T. turcica* özütlerinin genotoksik etkileri gözlenmiştir. Bununla birlikte, sitotoksik konsantrasyonlarda daha fazla genotoksisite gözlenmiştir. Benzer şekilde, *T. turcica* özütünün genotoksik etkileri, soğan başlarının kök hücrenin çekirdeğinde doza bağımlı

bir şekilde gözlenmiştir (Cigerci *et al.* 2016). Bitki kökenli genotoksik bileşenlerin kemoterapötik madde olarak kullanılabileceği zaten gösterilmiştir. Podophyllotoxinin *Podophyllum peltatum*'dan elde edildiği gibi; *Catharanthus roseus*'tan katarantin; *Datura ssp*'den izole edilen skopolamin; *Dioscores ssp*'den ekstrakte edilen diosgenin ve *Glycine max*'den elde edilen stigmasterol de toksik özelliklere sahip olup, tedavide kullanılmıştır (Bali *et al.* 2014).

Karaciğer karsinom hücrelerinde genotoksik ve sitotoksik stres, bu çalışmada çoğunlukla apoptotik ve hücre siklusunun devamını sağlayan mekanizmaların uyarılmasına neden oldu (Şekil 4.2). Tümör süpresör geni P53, tüm ekstrelerde ve Şekil 3'te gösterildiği gibi doğrudan ve dolaylı olarak apoptozu ve hücre büyümesini aktive eden tüm konsantrasyonlarda DNA hasarıyla ifade edildi. P53, apoptozu teşvik etmek için stres ve DNA hasarı gibi farklı sinyaller vasıtasıyla aktive edilir. Bu, DNA'yı spesifik bir şekilde hedefleyen ve transkripsiyona bağımlı ve bağımsız mekanizmalar yoluyla etkili bir şekilde hücre ölümüne yol açan transkripsiyon faktörüdür (Fridman and Lowe 2003).

Ho ve arkadaşları, 2007, *Taiwania cryptomerioides* Hayata'dan izole edilen bir lignin olan Taiwanin'in, HepG2 hücrelerinin G2 / M fazında hücre döngüsü durdurmasını sağladığını bildirmiştir. Meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunan yaygın bir diyetel flavanoid olan Apigenin'in, HepG2 hücrelerinin hücre salınımını G2 / M safhasında p53'e bağımlı yolak aracılığı ile durdurduğunu bildirilmiştir (Chiang *et al.* 2005). Ayrıca Shieh ve ark. 2003 (Shieh *et al.* 2004), emodin veya 1,3,8-trihidroksi-6-metil-antrakinonun, çeşitli insan hepatoma hücre çizgilerinin büyümesi üzerinde etkili inhibisyon etkileri sergilediğini ve G2/M fazında HepG2 / C3A hücrelerinin hücre siklus arrestinden üretilen HepG2 /C3A hücreleri ile sonuçlanan p53 ve p21 ekspresyonu uyardığını raporlamıştır.

Diğer önemli bir apoptotik regülatör olan Bcl-2 ve ailesi 20'den fazla üyeye sahiptir Bcl-2 apoptozu baskıladığı halde Bax alt ailesi apoptozu indüklemektedir. Bcl-2 ve Bax oranları, hücrelerin sağ kalım veya ölümüne karar verir (Tsujimoto 2003). Sonuçlarımız, bu genlerin, farklı ekstreler tarafından indüklenen HepG2 hücrelerinin

apoptotik mekanizmasına katılabileceğini ileri sürmektedir. Çünkü sunulan çalışmada HepG2 hücrelerine uygulanan bütün dozlarda Bcl-2 mRNA ekspresyonlarının baskılandığı görülmektedir. Bu nedenle *T. turcica*'nın antipoptotik bir gen olan Bcl-2'yi baskılayarak apoptozu teşvik etmiştir.

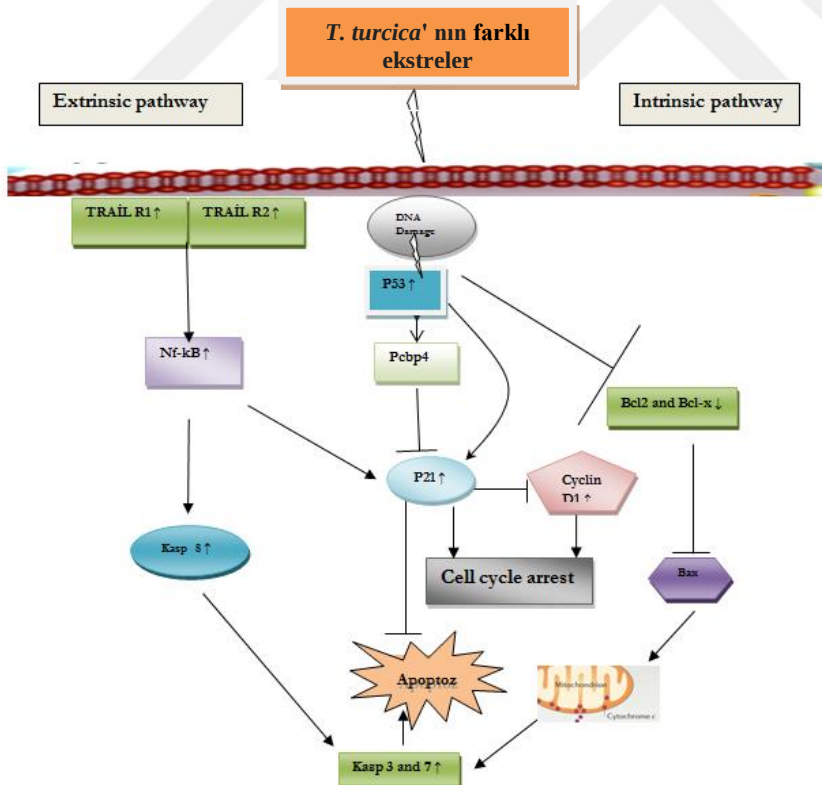
Buna ek olarak, Bcl-2, sitokrom C salınımını kontrol ederek apoptozu düzenleyebilir. Apoptoza giren hücrelerdeki sitokrom C salınımı, Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu ile önlenabilir. Bax, P53'ün aşağı akış mediyatörü olduğu gösterildiğinden, sitokrom C'nin P53 ile indüklenen apoptoza dahil olabileceği hipotezini desteklemektedir.. Artan Bax protein seviyelerinin, muhtemelen sitokrom C'nin dışarı akmasına izin veren mitokondrinin dış zarında bir gözenek oluşturarak sitokrom C'nin salınmasını doğrudan indükleyebildiği gösterilmiştir (Jurgensmeier *et al.* 1998). Çalışmada proapoptatik genler olan Bax ve Bcl-xl'nin *T. turcica* uygulamaları sonucu baskılandığı görülmektedir. PCBP4 ekspresyonu, DNA hasarına tepki olarak siklin bağımlı kinaz inhibitörü p21 indüksiyonunu azaltır. PCBP4, p53'ten bağımsız olarak p21 ifadesini düzenler. Bu çalışmada proapoptatik PCBP4 geni *T. turcica* uygulamaları sonucu baskılandığı görülmektedir.

Bu durumda büyük olasılıkla mitokondriyal disfonksiyonunu tetikleyerek apoptoza neden olan sitc aracılı apoptatik mekanizmada baskılanacaktır. Bu nedenle *T.turcica*'nın HepG2 hücrelerinde apoptozu uyarması daha farklı mekanizmalar ile gerçekleşiyor olabilir.Nitekim *T. turcica*'nın ölüm reseptörleri olarak bilinen TRAIL-1 ve TRAIL-2'ye etkileri incelenirse tüm dozlarda mRNA ekspresyon seviyelerini uyararak apoptotik mekanizmayı uyardığı görülmektedir.(sekil)

Kaspaz ailesinin üyeleri aynı zamanda kaspaz-3, kaspaz-7, kaspaz-8 ve kaspaz-9 gibi apoptozu indükleme ve uygulama konusunda önemli başlatıcılar olarak düşünülmektedir (Salvesen and Dixit 1997). En önemlisi, kaspaz-8, ölüm reseptör aracılı yol boyunca apoptozda anahtar rol oynar (Schempp *et al.* 2001). Tetiklenen kaspaz-8 veya kaspaz-9 kaspaz-3'e doğrudan etki ederek ölüm substratlarını parçalayıp apoptozu uygular (Kroemer and Reed, 2000; Scaffidi *et al.* 1998). Bu çalışmada benzer bir mekanizma gözlemlenmiştir, diğer bir deyişle, kaspazların ekspresyon seviyesi,

T. turcica'nın transkripsiyona neden olan farklı özlerinin maruz kalmasıyla daha yüksekti. Şekil 5.1 'de gösterildiği gibi HepG2 hücrelerinde kaspaz-3 enzim aktivitesini yükseltti. NF-kappaB, siklin D1'in ekspresyonunu arttırarak çoğalmayı kontrol ederek apoptoz, NF-kappaB'nin inhibisyonu ile arttırılır ve çoğalma, siklin D1 ekspresyonunu azaltılır (Connelly *et al.* 2011).

TRAIL'in indüklediği apoptotik sinyal yolları şöyle özetlenebilir: TRAIL, ölüm reseptörlerine bağlandığında (TR-1/DR4 ve TR-2/DR5), hücrede dış apoptotik yolağın aktivasyonu gerçekleşir (LeBlanc and Ashkenazi 2003). TRAIL'in bağlanması ile DR4 ve DR5, ölüm birimi içeren adaptör molekül Fas-Associated Death Domain-containing adaptor molecule (FADD) aracılığıyla, apoptozu başlatıcı kaspazlar olan kaspaz 8 ve kaspaz 10'u reseptöre çekerek aktive eder. Kaspaz 8 ve kaspaz 10 ise, efektör kaspazları, yani kaspaz 3, 6, ve 7'yi aktive eder. Bazı hücrelerde kaspaz 3'ün TRAIL aracılı aktivasyonu, iç apoptotik yolun da indüklenmesi ile sonuçlanır (Ravi and Bedi, 2002).



Şekil 5.1 *T. Turcica*'nın çeşitli ekstratleri tarafından indüklenen apoptoz ve hücre siklusu arrestinin moleküler mekanizması (etkileşimi).

T.turcica ekstrelerinin uyarılan Trail reseptörlerinin etkisiyle NFkB gen ekspresyonlarında uyarıldığı görülmektedir. NFkB'nin ölüm reseptörlerinin apoptotik etkilerine hem kaspaz selalesini, hem de hücre döngüsü genlerinden olan ve tümör supressör gen olarak bilinen P21'i uyararak aracılık ettiği belirlendi. *T.turcica* etkisiyle NFkB aracılığı ile uyarılan kaspaz-8 ve kaspaz-3 aracılığı ile, P21 ise hücre siklusunu sekteye uğratarak apoptoza neden olduğu görülmektedir.

Kanserin beklenen bir şekilde kademeli aşamalarda gelişmediği, bunun yerine metastatik düzenleyici genlerin tanımlanmış biçimde değiştirilmesinden kaynaklandığı bilinmektedir (Stanley 1995). Farklı onkojenler ve tümör süpresör genler, artmış proliferasyon, azalmış apoptoz, hücre farklılaşması ve olgunlaşma gibi hücre sel süreçlerde değişikliğe neden olmaktadır. *T.turcica* fenolikleri içerdiğinden bitki fenolikleri, apoptoz veya hücre siklusu arresti ile tümör büyümesini baskılayabilir (Dai and Mumper 2010). Genellikle, fenolikler, metastatik hücrelerin düzensiz proliferasyonunu aktif olarak etkiler veya inhibe eder. Fenoliklerin, siklin bağımlı kinazları (CDKs) aşağı regüle ederek veya p21, p27 ve p53 genlerinin ekspresyonunu teşvik ederek fenoliklerin hücre döngüsü fazlarını (G1, S ve G2) durdurabileceği daha önce bildirilmiştir (Fresco *et al.* 2006, Kampa *et al.* 2007, Ramos 2008).

Onarım genleri, sitotoksik olmayan hekzan konsantrasyonları ve her iki su özüt konsantrasyonu hariç, bu çalışmada uyarıldığı görüldü.; görünüşe göre DNA onarım mekanizması diğer özütlerin genotoksik stresinden dolayı aktive edilmiştir. Daha düşük dozda hekzan ve her iki su konsantrasyonu da onarım genlerini aktive edememiştir. Aşırı genotoksik stres ve DNA onarım mekanizması başlatıldığında hücre döngüsü ilerlemesinin engellendiği gözlemlenmiştir (Dietlein *et al.* 2014). OGG1 geni, DNA'dan 7,8-dihidro-8-oksoogenin (8oxoG) eksil eden bir DNA tamir enzimidir. 8oxoG oldukça yanıltıcı bir lezondur, azalmış OGG1 ekspresyon seviyesi daha yüksek bir arka plan mutasyon sıklığına yol açabilir ve oksidatif stres altında bir bireyin kanser riskini muhtemelen artırabilir (Ba *et al.* 2014). ERCC4, DNA'dan UV-C fotoprodüktörleri ve hantal aduktlerin çıkarılmasından sorumlu olan nükleotid eksizyon onarımı (NER) yolunda önemli bir insan genidir. NER genleri arasında, ERCC4 ve ERCC1, aynı

zamanda, DNA arası zincirler arası çapraz bağlanma hasarının çıkarılmasında da yer almaktadır (Brookman *et al.* 1996).

Mevcut araştırmada hem apoptotik hem de onarım genleri aktive edildi, ki bu da farklı özütlerin hasar görmüş DNA'nın hücre ölümünde ve onarımında rol aldığını ve karaciğer karsinomasının daha da ilerlemesini durdurduğunu gösteriyor. Bu da hücre döngüsünün genotoksik hasarın onarılmasına izin vermek üzere durdurulmasından kaynaklanmaktadır.

Çalışmada, *T. turcica*'nın HepG2 hücreleri üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkilere sahip olduğu sonucuna varıldı. Bu endemik bitkinin çeşitli ekstreleri, karaciğer karsinomasında anti-kanser potansiyeli gösterdi. Bu çalışmada incelenen apoptotik yol, *T. turcica* tedavisine bağlı olarak gen düzeyinde tetiklenen veya duraklatılmış süreçlerin araştırılmasına yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abbas, T. and Dutta. A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Review Cancer*, **9**: 400–414.
- Ahmad, M., Khan, M.A., Zafar, M. and Sultana, S. (2007). Treatment of common ailments by plant-based remedies among the people of district Attock (Punjab) of northern Pakistan. *African journal of Trade chemical*, **4**: 112-120.
- Aksoy, L., Kolay, E., Agilonu, Y., Aslan, Z. and Kargioglu, M. (2013). Free radical scavenging activity, total phenolic content, total antioxidant status, and total oxidant status of endemic *Thermopsis turcica*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **20**: 235-239.
- Allahghadri, T., Rasooli, I., Owlia, P., Nadooshan, M.J., Ghazanfari, T., Taghizadeh, M. and Astaneh, S.D. (2010) Antimicrobial property, antioxidant capacity, and cytotoxicity of essential oil from cumin produced in Iran. *Journal of Food Science*, **75**: 54-61.
- Allen, R.T., Hunter , W.J. and Agrawal, D.K. (1997). Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *Journal of Pharmacology and Toxicology Methods*, 37(4): 215-228.
- Ashkenazi, A., (2008). Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7: 1001-1012.
- Asilbekova, D.T. (2004). Lipids of *Thermopsis alterniflora* bean seeds and shells. *Chemical Nature Compound*, **40**: 532-534.
- Ba, X., Leopoldo, A.A., Rashid, Q.T., Hegde, M.L. and Boldogh, I. (2014). The Role of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase-1 in Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, **15**: 16975-16997.

- Backman, L., Appelkvist, E.L., Sundberg, A., Teclebrhan, H. and U. Brunk. U. (1991). Modulation of metabolism in HepG2 cells upon treatment with cyclosporin A and Nva2-cyclosporin Exp. *Molecular Pathology*, **54(3)**: 242–254.
- Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M.J., Pagano, M. And Draetta, G. (1993). "Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1". *Genes & Development*. 7: 812–21.
- Bali, E.B., Acik, L., Akca, G., Sarper, M., Elci, M.P., Avcu, F. and Vural, M. (2014). Antimicrobial activity against periodontopathogenic bacteria, antioxidant and cytotoxic effects of various extracts from endemic *Thermopsis turcica*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **4**: 505-514.
- Basgel, S. and Erdemoglu, S.B. (2006). Determination of mineral and trace elements in some medicinal herbs and their infusions consumed in Turkey. *Science Total Environmont*, 359 **(1-3)**: 82-89.
- Baytop, T. (1999). Therapy with medicinal plants in Turkey (past and present)]. Istanbul: Istanbul University Publications, 92.
- Bhattacharyya, A. (1991). Ethnobotanical observations in the ladakh region of northern jammu and kashmir state, India. *Economic Botany*, **45(3)**: 305-308.
- Blaauboer, B.J., Balls, M., Barratt, M., Casati, S., Coecke, S., Mohamed, M.K., Moore, J., Rall, D., Smith, K.R., Tennant, R., Schwetz, B.A., Stokes, W.S., Younes, M. (1998). 13th meeting of the Scientific Group on Methodologies for the Safety Evaluation of Chemicals (SGOMSEC): alternative testing methodologies and conceptual issues. *Environmental Health Perspective*, 106 Suppl 2: 413-418.
- Brookman, Lamerdin. and Thelen, M.P. (1996). ERCC4 (XPF) encodes a human nucleotide excision repair protein with eukaryotic recombination homologs. *Moecular Cell Bioogyl*, **16**: 6553-6562.

- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. and Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Science*, **74**: 2157-2184.
- Cenkci, S., Temel, M., Kargioğlu, M. and Dayan, S. (2009). Propagation of endangered *Thermopsis turcica* Kit Tan, Vural & Küçüköyük using conventional and in vitro techniques. *Turkish Journal of Biology*, **33**: 327-333.
- Cenkci, S., Yıldız M. and Terzi, H. (2012). *Thermopsis turcica*, Endemic to Afyonkarahisar: Its Past, Today and Gaining to Economy. *Afyon kocatepe University journal Science*, **12**: 23-26.
- Chiang, L.C., Ng, L.T., Lin, I.C., Kuo, P.L. and Lin, C.C. (2005). Anti-proliferative effect of apigenin and its apoptotic induction in human Hep G2 cells. *Cancer Letters*, 2005, **237**: 207-214.
- Cigerci, I.H., Cenkci, S., Kargiöglu, M. and Konuk, M. (2016). Genotoxicity of *Thermopsis turcica* on *Allium cepa* L. roots revealed by alkaline comet and random amplified polymorphic DNA assays. *Cytotechnology*, **68**: 829-838.
- Cigerci, I.H., Liman, R., Özgül, E. and Konuk, M. (2015). Genotoxicity of indium tin oxide by *Allium* and Comet tests. *Cytotechnology*, **67**: 157-163.
- Clair, Selvon, St. Manfredi. and James, J. (2006). The dual specificity phosphatase Cdc25C is a direct target for transcriptional repression by the tumor suppressor p53. *Cell Cycle*, **5**: 709-13.
- Cohen G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*, **15**: 326: 1-16.

- Collier, B., Goobar-Larsson, L., Sokolowski, M. and Schwartz, S. (1998). Translational inhibition in vitro of human papillomavirus type 16 L2 mRNA mediated through interaction with heterogenous ribonucleoprotein K and poly(rC)-binding proteins 1 and 2. *Journal of Biology Chemistry*, **273**: 22648–22656.
- Connelly, L., Barham, W. and Onishko, H.M. (2011). Inhibition of NF-kappa B activity in mammary epithelium increases tumor latency and decreases tumor burden. *Oncogene*, **30**: 1402-12.
- Çiftçi, H. (2014). Akciğer kanserlerinde ngal ekspresyonu ve apoptozisle ilişkisi. Doktora tezi, Selçuk Üniversitesi, Biyokimya (Tıp) Anabilim Dalı, Konya.
- Dagci, E.K., Izmirli, M. and Digrak M. (2002). A research of the antimicrobial activities of some tree species grown in Kahramanmaraş city. *King saudi Journa of Science Engineering*, **5(1)**: 38-46.
- Dai, J. and Mumper, R.J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, **15**: 7313.
- Dawson, J.R., Adams, D.J. and Wolf. C.R. (1985). Induction of drug metabolizing enzymes in human liver cell line Hep G2. *FEBS Letters*, **183(2)**: 219–222.
- Dalrymple, A., Ordonez, P., Thorne, D., Dillon, D. and Meredith, C. (2015). An improved method for the isolation of rat alveolar type II lung cells: Use in the Comet assay to determine DNA damage induced by cigarette smoke. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **72**: 141-149.
- Darrag, A.M. and Fayyad, D.M. (2014). Genotoxicity of three endodontic sealers by single cell gel-electrophoresis/comet assay. *Tanta Dental Journal*, **11**: 85-92.
- Dement, W.A. (1975). Biological implication of flavonoid chemistry in Baptisia and Thermopsis. *Biochem System Ecology*, **3**: 91-94.

- Deschénes, C., Vézina, A., Beaulieu, J.F. and Rivard, N. (2001). Role of p27Kip1 in Human Intestinal Cell Differentiation. *Gastroenterology*, **120**: 423-38.
- Dhawan, A., Bajpayee, M. and Parmar, D. (2009). Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology Toxicology*, **25**(1): 5-32.
- Dierickx, P.J. (1989). Partial purification and characterization of the soluble glutathione transferase isoenzymes from cultured Hep G2 cells. *Cell Biology International*, **13**(7): 585–593.
- Dietlein, F., Thelen, L. and Reinhardt, H.C. (2014). Cancer-specific defects in DNA repair pathways as targets for personalized therapeutic approaches. *Trends Genetics*, **30**: 326-339.
- Dogan, N.M., Cansaran, A., Acar, G. and Öztekin, M. (2010). Antimicrobial activity of extracts of some plants from Amasya (Turkey). *Abio Research* **1**(1): 87-91.
- Dulger, B. and Gonuz, A. (2004). Antimicrobial activity of some endemic Verbascum, Salvia, and Stachys species. *Pharmacology Biology* **42** (4-5): 301-304.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z. and Adigüzel, N. (2000). Red data book of Turkish plants (pteridophyta and spermatophyta). Ankara: TDKA and Van Centennial University Press.
- ERKAN, G.C. (2007). BCL-2 ve COX-2 Apoptosis belirteçlerinin doku düzeyinde ekspresyonu, apoptosis ve proliferasyonunun değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara.

- Faizieva, S.K., Khushbaktova, Z.A., Syrov, V.N., Yuldashev, M.P., Batirov, É.K. and Sagdullaev, S.S. (1999). The total flavonoids from *Thermopsis alterniflora*, *Th. dolichocarpa*, *Vexibia alopecuroides*, and *Rhaponticum carthamoides* and their hypolipidemic activity. *Chemistry of Natural Compounds*, **35**: 155-158.
- Fresco, P., Borges, F., Diniz, C. and Marques, M.P. (2006). New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med Research Review*, **26**: 747-766.
- Fridman, J.S. and Lowe, S.W. (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, **22**: 9030-9040.
- Gleich, L.L. and Salamone F.N. (2002). Molecular genetics of head and neck cancer. *Cancer Control*, **9**: 369-78.
- Goode, E.L., Ulrich, C.M. and Potter, J.D. (2002). Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **11**: 1513-1530.
- Griffith, T. S., and Lynch, D. H. (1998) TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Current Opinion Immunology*, **10**: 559-63.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditional of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of Medicine*, **27**: 1-93.
- Gyori, B.M., Venkatachalam, G., Thiagarajan, P.S., Hsu, D. and Clement, M.V. (2014). OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology*, **2**: 457-465.
- Harwood, S., Yaqoob, M.M. (2005). Ouabain-induced cell signaling. *Front Biosci*, **10**: 2011- 7.

- Ho, P.J., Chou, C.K., Kuo, Y.H., Tu, L.C. and Yeh, S.F. (2007). Taiwanin A induced cell cycle arrest and p53-dependent apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Life Sciences*, **80**: 493-503.
- Hou, J., Sun, T., Hu, J., Chen, S., Cai, X. and Zou, G. (2007). Chemical composition, cytotoxic and antioxidant activity of the leaf essential oil of *Photinia serrulata*. *Food Chem*, **103**: 355-358.
- Imyanitov, E., Hanson, K. and Zhivotovsky, B. (2005). Polymorphic variations in apoptotic genes and cancer predisposition. *Cell Death Differ*, **12**: 1004– 1007.
- Jurgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D. and Reed, J.C. (1998) Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci*, **95**: 4997-5002.
- Kampa, M., Nifli, A.P., Notas, G. and Castanas, E. (2007). Polyphenols and cancer cell growth. *Review Physiology Biochemistry Pharmacology*, **159**: 79-113.
- Kamuhabwa, A., Nshimo, C. and Witte, P.D. (2000). Cytotoxicity of some medicinal plant extracts used in Tanzanian traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacol*, **70**: 143-149.
- Keeler, R.F. and Baker, D.C. (1990). Myopathy in Cattle induced by Alkaloid Extracts from *Thermopsis montana*, *Laburnum anagyroides* and a *Lupinus* sp. *Journal Compound Pathology*, **103**: 141-146.
- Kerneis, S., Swift, L.H., Lewis, C.W., Bruyere, C., Oumata, N., Colas, P., Ruchaud, S., Bain, J. and Golsteyn, R.M. (2015). Natural product extracts of the Canadian prairie plant, *Thermopsis rhombifolia*, have anti-cancer activity in phenotypic cell-based assays. *Nature Product Research*, **29**: 1026-1034.

- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal Cancer*, **26**: 239-257.
- Khushbaktova, Z.A., Faizieva, S.K., Syrov, V.N., Yuldashev, M.P., Batirov, E.K. and Mamatkhanov, A.U. (2001). Isolation, chemical analysis, and study of the hypolipidemic activity of the total flavonoid extract from *Thermopsis altherniaflora*. *Pharmacology Chemical Journal*, **35**: 155-158.
- Knasmüller, V., Mersch-Sundermann, S., Kevekordes, F., Darroudi, W.W., Huber, C., Hoelzl, J. and Bichler, B.J. (2004). Major Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*, **198**: 315–328.
- Korcan, S.E., Cigerci, I.H., Dilek, M., Kargioglu, M., Cenkci, S. and Konuk, M. (2009). Antimicrobial activity of an endemic species, *Thermopsis turcica*, Turkey. *Kuwait Journal Science Engineering*, **36**: 101-112.
- Kotenko, L.D., Mamatkhanov, A.U., Turakhozhaev, M.T. and Yuldashev, M.P. (2001). Quantitative analysis of flavonoids in the total preparation of *Thermopsis alterniflora*. *Chem Nat Compd*, **37**: 137-139.
- Kroemer, G. and Reed, J.C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*, **6**: 513-519.
- Kültür, S. (2007). Medicinal plants used in Kırklareli province(Turkey). *J Ethnopharmacol*, **111**: 341-364.
- LeBlanc, H.N. and Ashkenazi, A. (2003). Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ*, **10**: 66-75.

- Levine, B, Sinha, S., Kroemer, G. (2008). Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*, **4**: 600-6.
- Liman, R., Eren, Y., Akyil, D. and Konuk, M. (2012). Determination of mutagenic potencies of aqueous extracts of *Thermopsis turcica* by Amestest. *Turk J Biol*, **36**: 85-92.
- Makeyev, A.V. and Liebhaber, S.A. (2002). The poly(C)-binding proteins: a multiplicity of functions and a search for mechanisms. *RNA*, **8**: 265–278.
- Marcarini, J.C., Sartori, D., Fidelis, Q.C., Ferreira D.T. and Mantovani, M.S. (2015). Cytotoxicity, genotoxicity and mechanism of action (via gene expression analysis) of the indole alkaloid aspidospermine (antiparasitic) extracted from *Aspidosperma polyneuron* in HepG2 cells Cytotechnology. DOI 10.1007/s10616-015-9874-9.
- McGrath-Hill, C.A and Vicas, I.M. (1997). Case series of *Thermopsis* exposures. *J Toxicol Clin Toxicol*, **35**: 659–665.
- Mersch-Sundermann, S. Knasmuller, X.J. Wu, F. Darroudi, F. and Kassie. (2004). Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology*, **198 (1–3)**: 329–340.
- Nagane, M., Huang, H.J. and Cavenee, W.K. (2001). The potential of TRAIL for cancer chemotherapy. *Apoptosis*, **6**: 191-7.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. and Snader, K.M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *J Nat Prod*, **66 (7)**: 1022-1037.
- Noble, C., Dong, J., Manser, E and Song, H. (2008). BCL-XL and UVRAG cause a monomer-dimer switch in beclin1. *J Biol Chem*, **283**: 26274–82.

- Okami, K., Reed, A.L., Cairns, P., Koch, W.M., Westra, W.H. and Wehage, S. (1999). Cyclin D1 amplification is independent of p16 inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*, **18**: 3541-5.
- Olivier, Magali, Hollstein, Monica ve Hainaut, Pierre. (2010). TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use., Cold Spring Harb *Perspect Biol*, 1-17.
- Özdemir, C., Dural, H., Ertugrul, K., Küçüködük, M., Baran, P. and Sanda, M.A. (2008). Morphology and anatomy of endemic *Thermopsis turcica* Kit Tan, Vural & Küçüködük. *Bangladesh J Bot.* 37 (2): 105-114.
- Peacock, S.L. (1992). Traditional plant knowledge of the Piikani peoples of the Northwestern plains [MA]. Calgary (AB): University of Calgary.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucl Acids Res*, **29**: 2002-2007.
- Powell, C.B., Fung, P., Jackson, J., Dall'Era, J., Lewkowicz, D., Cohen, I. and McCune, K.S (2003). Aqueous extract of herba *Scutellaria barbatae*, a Chinese herb used for ovarian cancer, induces apoptosis of ovarian cancer cell lines. *Gynecol Oncol*, **91**: 332-340.
- Ramos, S. (2008). Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol Nutr Food Res*, **52**: 507-526.
- Ravi, R. and Bedi, A. (2002) Requirement of BAX for TRAIL/Apo2L-induced apoptosis of colorectal cancers: synergism with sulindac-mediated inhibition of Bcl-x(L). *Cancer Res*, **62**: 1583-7.
- Riley, Todd, et al. 2008. Transcriptional control of human p53-regulated genes., *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **9**: 402-412.

- Roberts, E.A., Johnson, K.C., Harper, P.A. and Okey A.B. (1990). Characterization of the Ah receptor mediating aryl hydrocarbon hydroxylase induction in the human liver cell line Hep G2. *Arch. Biochem. Biophys*, **276** (2): 442–450.
- Saito, K., Takamatsu, S., Murakoshi, I., Ohmiya, S. and Otomasu, H. (1989). Isolation of a new alkaloid (-) -0-acetylbaptifoline and the absolute stereochemical relationships of lupine alkaloids in *Thermopsis chinensis*. *J Nat Prod*, **52**: 1032-1035.
- Saito, K., Takamatsu, S., Ohmiya, S., Otomasu, H., Yasuda, M., Kano, Y. and Murakoshi, I., (1988). Lupin alkaloids from the seeds of *Thermopsis lupinoides*. *Phytochemistry*, **27**: 3715-3716.
- Salami, S., and Tehrani, F.K. (2003). Biochemical studies of apoptosis induced by tamoxifen in estrogen receptor positive and negative breast cancer cell lines. *Clinical Biochemistry*, **36**: 247-253.
- Salvesen, G.S. and Dixit, V.M. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, **91**: 443-446.
- Sanlioglu, A. D., Griffith, T. S., Omer, A., Dirice, E., Sari, R., Altunbas, H. A., Balci, M. K., and Sanlioglu, S. (2008). Molecular mechanisms of death ligand-mediated immune modulation: a gene therapy model to prolong islet survival in type 1 diabetes. *Journal Cell Biochemistry*, **104**: 710-20.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO Journal*, **17**: 1675-1687.
- Schempp, C.M., Simon-Haarhaus, B., Termeer, C.C. and Simon, J.C. (2001). Hypericin photo-induced apoptosis involves the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and activation of caspase-8. *FEBS Lett*, **493**: 26-30.

- Scoumanne, A., Cho, S.J., Zhang J. and Chen X. (2011). The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is regulated by RNA-binding protein PCBP4 via mRNA stability. *Nucleic Acids Research*, **39**: 213-24.
- Sherr, C.J. (1995). D-type cyclins. *Trends Biochemistry Science*, **20**: 187-90.
- Shieh, D.E., Chen, Y.Y., Yen, M.H., Chiang, L.C and Lin, C.C. (2004). Emodin-induced apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatoma cells. *Life Sciences*, **74**: 2279-2290.
- Sohn, D., Essmann, F., Schulze-Osthoff K., Janick R.U., p21 blocs irradiation-induced apoptosis downstream of mitochondria by inhibition of cyclin-dependent kinase mediated caspase-9 activation, *Cancer Research*, **1**;66(23)11254-62, 2006
- Stanley, L.A. (1995). Molecular aspects of chemical carcinogenesis: The roles of oncogenes and tumour suppressor genes. *Toxicology*, **96**: 173-194.
- Sulaiman, G.M., Hussien, N.N., Marzog, T.R. and Awad, H.A. (2013). Phenolic content, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of ethanolic extract of *Salix alba*. *Biochemical Biotechnology*, **9**: 41-46.
- Şener, B., Koyuncu, M. and Ergun, F. (1992). Proceedings of the 9th symposium on Plant Drugs, Eskisehir, Turkey.
- Tan, K., Vural, M. And Küçüköyük, M. (1983). An unusual new Thermopsis from Turkey. *Notes Roy Bot Gard Edinburgh*, **40(3)**: 515-518.
- Toyoda H, Nakamura T, Shinoda M, Suzuki T, Hatooka S, Kobayashi S. (2000). Cyclin D1 expression is useful as a prognostic indicator for advanced esophageal carcinomas, but not for superficial tumors. *Disease Science*, **45**: 864-9.

- Tsujimoto, Y. (2003). Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *Journal Cell Physiology*, **195**: 158-167.
- Tsypysheva, I.P., Galkin, E.G., Baikova, L.P., Fedorov, Petrova, P.R., Ya., R., Orshanskaya, Fedorova, V.A. and V. V. Zarubaev, V.V. (2015). Activity of Thermopsis schischkinii alkaloids against influenza a(h1n1)pdm09 virus. *Chemistry of Natural Compounds*, **51**: 5.
- Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W. S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C. And Smith, C.A. (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, **3**: 673-82.
- Yong, L., Xiangyang, C., Zhang and Yongkang, Z. (2007). Research progress of Thermopsis lanceolate. *Journal of Agricultural Sciences*, **01**: 23-18.
- Zakaria, Y., Rahmat, A., Pihie A.H.L., Abdullah N.R. and Peter, J. H. (2009). Eurycomanone induce apoptosis in HepG2 cells via up-regulation of p53. *Cancer Cell International*, **9**: 16.
- Zilfou, Jackm, T. Lowe. and Scott W. (2009). Tumor Suppressive Functions of p53. *Cold Spring Harb Perspective Biology*, 1-12.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Muhammad Muddassir Ali
Doğum Yeri ve Tarihi : Pakistan, 04-06-1986
Yabancı Dili : English, Urdu
İletişim (Telefon/e-posta) : 00905070265909

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Government Emerson college Multan, Pakistan
Lisans : University of Veterinary and Animal Sciences Lahore, Pakistan
Yüksek Lisans : University of Skovde, Sweden

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl :

Working as a **lecturer** at Institute of Biochemistry and Biotechnology, University of Veterinary and Animal Sciences Lahore from 03-02-2010 to date.

Worked as a **teaching assistant** in Department Of Clinical Medicine and surgery from 25-02-2009 to 02-08-2010.

Yayınları (SCI ve diğer) :

Ali., M.M. and Ciğerci, İ.H. (2017). Evaluation of anti-cancerous, cytotoxic, genotoxic mechanisms via gene expression analysis of various extracts from *thermopsis turcica* in hepg2 cell line. Accepted in *Pakistan Journal of zoology*,

Ali., M.M. and Ciğerci, İ.H. (2017). (2017). Anti-Cancerous Efficacy of Alcoholic and Aqueous Extracts from an Endemic Plant *Thermopsis turcica* on Liver Carcinoma. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 16(3): 1-5.

Ciğerci., İ.H, Ali M.M, Kaygısız, Ş.Y. and Liman R. (2016). Genotoxicity assessment of cobalt chloride in *Eisenia hortensis* earthworms coelomocytes by comet assay and micronucleus test. *Chemosphere*, 144: 754-7.

Ali., M.M. Baber, Hussain T., Awan and Nadeem. (2014). The contribution of donkeys to human health. *EquineVeterinaryJournal*, **46**: 766–767.

Afridi., S.Q M.M.Ali, F. awan, N. Zahid (2013). Molecular epidemiology and viral load of HCV in different regions of Punjab, Pakistan. *The virology journal*, **11**: 14.

Babar., M. E., Hussain, T. Abdullah, A. and Ali, M.M. (2013). Evaluation of genetic resistance to haemonchus contortus infection in Pakistani sheep breeds. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, **23(5)**: 1219-1222.

