



**HEPG2 HÜCRELERİNDE CİSPLATİN
TOKSİKASYONUNA SİLYMARİNİN KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hilal ÇELİK

Danışman

Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK

ANABİLİM DALI

Şubat 2021

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HEPG2 HÜCRELERİNDE CİSPLATİN
TOKSİKASYONUNA SİLYMARİNİN
KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hilal ÇELİK

Danışman
Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

Şubat 2021

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HEPG2 HÜCRELERİNDE CİSPLATİN TOKSİKASYONUNA SİLYMARİNİN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hilal ÇELİK

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Tıbbi bitkilerin tarihi insanlık tarihi kadar eskidir. Tıbbi bitkiler terapötik ajan olarak kullanılmakla birlikte, sentetik ilaçların geliştirilmesi için de çok önemlidir. Günümüzde bitkisel tedaviye olan ilgi tüm dünyada artmıştır.

Deve dikeninden (*Silybum marianum*) elde edilen ve flavonoid yapısında aktif bir bitki ekstresi olan silymarin (SLM), antioksidan etkiye sahiptir. Aynı zamanda, silymarinin antiproliferatif, antiinflamatuvar ve antikarsinojenik etkilere sahip olduğu başka çalışmalarda da gösterilmiştir.

Cisplatin (CP), çeşitli kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapötik ajandır. Kanser hücrelerinin gelişimini engellemektedir ve ancak sağlıklı hücreleri de yok ettiği bilinmektedir. Bitkisel bileşiklerin kemoterapötik ilaçlarla birlikte kullanılmasıyla antikanser etkisinin artırılması ve yan etkilerin azaltılması için birçok çalışma yapılmaktadır.

Bu çalışmada karaciğer karsinom hücreleri (HepG2) kullanılmıştır. HepG2 hücrelerinde SLM'nin CP toksikasyonuna etkileri MTT yöntemi (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid), comet (tek hücre jel elektroforezi) ve mikronükleus testi

yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Yapılan çalışmada, SLM ve CP'nin HepG2 hücrelerindeki sitotoksitesi MTT yöntemi ile belirlenmiştir ve farklı konsantrasyonlarda hücre canlılığı etkisine bakılmıştır. Sonrasında SLM'nin CP ile kombinasyonu ile comet yöntemi ve mikronükleus testi yapılarak genotoksisite çalışmaları yapılmıştır.

SLM'nin HepG2 hücreleri üzerindeki sitotoksitesinin belirlenmesi için kontrol grubu, 1000 - 500 - 250 - 150 ve 75 µg/mL dozları kullanıldı. Mikroplak okuyucu ile 540 nm'de okutularak bulunan değerler yüzde (%) olarak ifade edildi. SLM'nin LD₀ değeri 75 µg/mL bulunmuştur. SLM'nin artan dozlarında hücre canlılığı artarken doz azaldıkça hücre canlılığı da azalmıştır. CP'nin HepG2 hücrelerinde LD₅₀ değeri 65,6 µg/mL olarak bulunmuştur.

Gruplar; kontrol grubu, SLM (LD₀) grubu, CP grubu (LD₅₀) ve SLM+CP (LD₅₀+LD₀) grubu olacak şekilde planlandı. 24 saatlik uygulama sonrasında genotoksiteyi belirlemek üzere comet ve mikronükleus testleri çalışıldı.

CP'nin HepG2 hücrelerinde DNA hasarı oluşturarak toksiteyi arttırdığı, SLM'nin LD₀ dozu CP toksikasyonu sonucu oluşan genotoksiteyi azalttığı gözlemlenmiştir. Böylece SLM'nin DNA koruyucu özellikte olduğu düşünülmektedir.

2021, xi + 75 sayfa

Anahtar Kelimeler: Silymarin, Cisplatin, Comet yöntemi, HepG2 hücreleri, MTT testi, Mikronükleus testi.

ABSTRACT

M.Sc.Thesis

INVESTIGATION OF PROTECTIVE EFFECTS OF SILYMARINE ON CISPLATIN TOXICATION IN HEPG2 CELLS

Hilal ÇELİK

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

The history of medicinal plants is as old as human history. Although medicinal plants are used as therapeutic agents, they are also essential for the development of synthetic drugs. Today, interest in herbal therapy has increased all over the world.

Silymarin (SLM), an active plant extract obtained from milk thistle (*Silybum marianum*) and having a flavonoid structure, has an antioxidant effect. At the same time, it has been shown in other studies that silymarin has antiproliferative, anti-inflammatory and anticarcinogenic effects.

Cisplatin (CP) is a chemotherapeutic agent widely used in the treatment of various cancers. It prevents the growth of cancer cells and also destroys healthy cells. Many studies are conducted to increase the anticancer effect and reduce the side effects by using herbal compounds together with chemotherapeutic drugs.

Liver carcinoma cells (HepG2) were used in this study. Effects of SLM on CP intoxication in HepG2 cells were investigated using MTT method (3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), comet (single cell gel electrophoresis) and micronucleus test method. In the study, cytotoxicity of SLM and CP in HepG2 cells was determined by MTT method and the cell viability effect was examined at different concentrations. Subsequently, genotoxicity studies were carried out by performing the

comet method and micronucleus test with the combination of SLM with CP.

To determine the cytotoxicity of SLM on HepG2 cells, the control group, 1000 - 500 - 250 - 150 and 75 $\mu\text{g} / \text{mL}$ doses were used. The values found by scanning at 540 nm with a microplate reader were expressed as percentage (%). LD_0 value of SLM was found to be 75 $\mu\text{g} / \text{mL}$. While cell viability increased with increasing doses of SLM, cell viability decreased as the dose decreased. LD_{50} value of CP in HepG2 cells was found as 65.6 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Groups; The control group was planned as SLM (LD_0) group, CP group (LD_{50}) and SLM + CP ($\text{LD}_{50} + \text{LD}_0$) group. Comet and micronucleus tests were studied to determine genotoxicity after 24 hours of application.

It increased genotoxicity because CP increased toxicity by causing DNA damage in HepG2 cells, LD_0 dose of SLM decreased genotoxicity resulting from CP toxicity. Thus, SLM is thought to have DNA protective properties.

2021, xi + 75 pages

Keywords: Silymarin, Cisplatin, Comet assay, HepG2 cells, MTT assay, Micronucleus test.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, çalışmanın yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ'ye teşekkür ederim. Deneysel çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Ömer HAZMAN'a teşekkür ederim.

Bu araştırma boyunca her zaman yanımda olduğunu hissettiren, bana güç veren, maddi ve manevi desteklerinden dolayı canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

Hilal ÇELİK
AFYONKARAHİSAR 2021

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	ii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
RESİMLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	3
2.1 Kanser.....	3
2.1.1 Kanser Hücrelerinin Özellikleri.....	3
2.1.2 Kansere Neden Olan Faktörler	4
2.1.3 Kanserin Oluşum Mekanizması (Karsinogenezis)	5
2.1.4 Kanserde Tedavi	7
2.2 Hepatosellüler Karsinom (HCC).....	9
2.2.1 HepG2 (İnsan Hepatosellüler Karsinom) Hücre Hattı.....	10
2.3 Silybum Marianum (Meryemana Dikeni)	13
2.3.1 Silymarin.....	14
2.3.2 Silymarinin Etkileri.....	15
2.4 Cisplatin	17
2.4.1 Cisplatin Etki Mekanizması.....	18
2.4.2 Cisplatin Toksisitesi.....	19
2.5 Genetik Toksisite (Genotoksisite) Testleri.....	20
2.5.1 Salmonella / Mikrozoim Mutajenite (AMES) Testi	22
2.5.2 Tek Hücre Jel Elektrofözezi (SCGE=COMET) Testi.....	23
2.5.3 Kromozom Anormallikleri (KA) Testi	26
2.5.4 Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Testi	27
2.5.5 Mikronükleus (MN) Testi	28
3. MATERYAL VE METOT.....	29
3.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	30
3.1.1 Cihazlar	30
3.1.2 Kimyasallar	30

3.2 Hücre Kültürü.....	31
3.2.1 Hücre Kültürü Mediyum Hazırlanması	33
3.2.2 HepG2 Hücrelerinin Kültüre Aktarılması.....	33
3.2.3 HepG2 Hücrelerinin Pasajlanması.....	34
3.2.4 HepG2 Hücrelerinin Sıvı Azotta Saklanması	35
3.3 Tripan Blue Yöntemi.....	35
3.3.1 Tripan Blue Yöntemi İle Hücre Sayımının Yapılması	36
3.4 MTT Yöntemi	37
3.4.1 MTT Hazırlanması.....	37
3.4.2 MTT Yöntemi ile HepG2 Hücreleri Üzerinde SLM'nin LD ₀ Dozunun Belirlenmesi	37
3.5 Comet Testi	38
3.6 Mikronükleus Testi	40
3.7 İstatistiksel Analiz.....	43
4. BULGULAR	44
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	46
6. KAYNAKLAR.....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	60

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

dH ₂ O	Distile su
G	Gram
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar
µL	Mikrolitre
mA	Miliamper
Mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
KCl	Potasyum klorür
°C	Santigrat derece
V	Volt
%	Yüzde
>	Büyüktür

Kısaltmalar

AA	Akrilamid
ATTC	Amerikan tipi kültür koleksiyonu
BrdU	Bromodeoksiüridin
BSS	Blanced Salt Solution
CP	Cisplatin
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EtBr	Etidyum bromür
FBS	Fetal bovine serum
GSH	Glutasyon
HCC	Hepatosellüler karsinom
HepG2	Karaciğer kanser hücre hattı
IL-6	İnterlökin-6
KA	Kromozom anormallikleri
KİT	Kemik iliği transplantasyonu
KKD	Kardeş kromatid değişimi
KT	Kemoterapi
LD	Letal doz
MAYV	Mayora virüsü
MN	Mikronükleus
MTT	Metil tiazol difenil tetrazolyum
MTX	Metatoraksat
NaOH	Sodyum hidroksit
Pt	Platin
ROS	Reaktif oksijen türleri
SCGE	Tek hücre je elektorforezi
SLM	Silymarin
S9	Memeli karaciğer post mitokondriyal süpernatant

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2. 1 Karsinogenezin Oluşumu	5
Şekil 2. 2 Silymarinin kimyasal yapısı	15
Şekil 2. 3 Cisplatinin kimyasal yapısı	18
Şekil 2. 4 Cisplatinin etki mekanizması	19
Şekil 2. 5 Genotoksik maddelerin DNA üzerindeki etki mekanizması ve sonuçları	21
Şekil 2. 6 Ames test.....	23
Şekil 2. 7 Kardeş kromatit değişimleri.....	27
Şekil 2. 8 Kimyasal ajanlar ile uyarılan hücrelerdeki MN'ler	28
Şekil 4. 1 HepG2 hücrelerinde sitotoksitenin belirlenmesi	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1 Farklı pH'larda SCGE yöntemiyle belirlenen DNA hasar tipleri.....	27
Çizelge 3. 1 Mediyumun hazırlanması.....	33
Çizelge 3. 2 Lizis çözeltisinin hazırlanması.....	39
Çizelge 3. 3 Elektroforez çözeltisinin hazırlanması.....	39
Çizelge 3. 4 Nötralizasyon çözeltisinin hazırlanması	39
Çizelge 3. 5 KCI çözeltisinin hazırlanması	41
Çizelge 4. 1 SLM' in uygulama grubu olan HepG2 hücreleri üzerindeki DNA hasar düzeylerinin belirlenmesi ve MN frekanslarının değerlendirilmesi.....	45



RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 2. 1 HepG2 hücre hattı	10
Resim 2. 2 Silybum marianum (Deve dikenı).....	14
Resim 2. 3 Comet yöntemine ait jel görüntüsü	24
Resim 2. 4 Tek hücre jel elektroforez yöntemi ile farklı skor seviyelerinde hasara uğramış olan DNA görüntüleri	25
Resim 2. 5 Kromozom anormallikleri içeren metafazların görüntüleri	26
Resim 3. 1 HepG2 hücrelerine MTT uygulaması	38



1. GİRİŞ

Kanser, organizmadaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünüp çoğalmasıyla oluşan bir hastalıktır (Balkan, Kısmalı, Turan, Balkan, & Sel, 2017).

Kronik hastalıklardan biri olan kanser günümüzde çok fazla görülmesi ve ölümlerle sonuçlanabilen bir hastalık olması nedeniyle önemli sağlık sorunlarından biri haline gelmiştir. Gelişmiş ülkelerdeki sonuçlara göre kanser, ölüme sebep olan kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almaktadır (Aslan, Vural, Kömürcü, & Özet, 2006).

Günümüzde kanser tedavisinde temel olarak üç teknik kullanılmaktadır: cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi. İlk yöntemde amaç tümörlü doku veya organın uzaklaştırılmasını sağlamaktır, son iki yöntem ise kanser hücrelerinin öldürülmesine yöneliktir (Tozkoparan & Aytaç, 2007). Biyolojik tedaviler (sitokinler, antikorlar, aşılar) olarak adlandırılan dördüncü bir tedavi yöntemi ise kanser tedavisinde yeni bir yaklaşım oluşturmuştur (Bilge, 2010).

Doğal ilaçlarla hazırlanmış bir tedavi yöntemi olan fitoterapi ise genel olarak bitkilerin tamamı veya bazı kısımları kullanılarak gerçekleştirilir. Bu tedavi yöntemi kullanılarak bazı kanser türlerinin tedavisine yönelik başarılı bilimsel çalışmalar yapılmıştır ve de son yıllarda bu çalışmalara yenileri eklenmeye devam etmektedir (Aydın Arslan & Yolcu, 2019). Gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerdeki geleneksel ilaçların üretimi ve kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Buna bağlı olarak bu durum artan bir ticari potansiyel oluşturmuştur (Demirkaya, Gündoğdu, Dodurga, Seçme, & Gündoğdu, 2019).

Kanser tedavisinde kemoterapi kanser tedavisinde seçeneklerinden birini oluşturmaktadır. Kemoterapinin amacı; hastanın normal hücrelerini koruyup; oluşmuş tümör hücrelerinin büyümesini, çoğalmasını durdurmak ya da yok etmektir. Kemoterapide kullanılan ilaçlar, kanserli hücrelerin gelişmesini ve çoğalmasını engellemek/önlemek amacıyla kullanılır (Ersöz & Çolak, 2019).

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar sitotoksik ilaçlar olarak tanımlanmaktadır. DNA ile etkileşime giren ajanlar, antimetabolitler, hormonlar, moleküler hedef ajanlar ve antibadiler gibi sitotoksite gösteren ajanlar, etki mekanizmaları ve kullanıldıkları kanser türlerine göre farklı sınıflara ayrılmaktadırlar (Aydın Arslan & Yolcu, 2019).

Birçok kanser türünde platin kökenli bir kemoterapötik olan cisplatin yıllardır başarılı bir şekilde uygulanmaktadır (Gür, 2014). Cisplatin, antineoplastik bir ilaçtır. Diğer antineoplastikler, tek başına veya radyoterapi ile birlikte uygulandığında birçok kanser türünde etkili olduğu gösterilmiştir. Testis, akciğer, over, prostat, ağız, baş-boyun kanserleri gibi birçok kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Becit, 2017).

CP gibi toksisitesi daha az olan yeni ajanlara yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Toksisitesi daha az olan yeni ajanların geliştirilmesi ile CP'nin klinikteki kullanımını artırmaya yönelik çalışmaları çok fazla ilgi çekmektedir (Sabuncuoğlu & Özgüneş, 2011).

Kansere yakalanma ve kanserden ölüm oranının artması sebebiyle bu hastalıkla mücadele etmek ve halkı bilinçlendirmek amacıyla birçok sosyal sorumluluk projeleri yapılmaktadır. Kanserden korunmak, hastalığın gelişimine yön vermek veya kanser hasatlarının yaşam kaliteleri üzerine çok fazla çalışma yapılmaktadır (Gür, 2014).

Çalışmamızda HepG2 hücre hattı üzerinde SLM'nin, bir kemoterapik olan CP ile oluşan toksisiteye karşı etkisi araştırılmıştır. Bununla birlikte CP'nin diğer hücre ve dokularda oluşturabileceği yan etkilerinin azaltılmasında SLM'nin rolü araştırılmıştır. Yine HepG2 hücre hattında SLM'nin antikanserojenik etkilere sahip olup olmadığı da araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Kanser

Kanser, büyüme özellikleri bozulmuş hücrelerin kendi genetik yapısına benzeyen hücreler üretmesi ve yayılmasıdır (Yokuş & Çakır, 2012)

Kanser ile ilgili olan en eski bilgiler MÖ 3000 yıllarına dayanmaktadır. Latince de yengeç anlamına gelen “*canker*” veya “*carcinos*” kelimelerinden türemiştir. MÖ 3. yüzyılda Hipokrat, tümör etrafındaki şişmiş damarları bir yengecin bacaklarına benzetmiştir ve tümör kelimesi ilk defa kullanılmıştır (Baykara, 2016).

Bazı toplumlarda yaşayan insanlarda kanser olanların yaklaşık beşte biri ölmektedir. Kanser, DNA diziliminde meydana gelen bazı değişiklikler sonucunda oluşmaktadır. Bazı kanser türleri kalıtsal olup bireylerdeki genlerle aktarılır ve tüm kanserlerin %10-15’lik kısmını oluşturur. Geriye kalan kısım ise %85-90’lık olup; DNA’nın mutajenik olan birçok maddeye maruz kalması sonucu oluşmaktadır. Mutajenik olan bu ajanların hücrenin DNA’sında yaptığı bazı değişikliklerin, replikasyon sonucu olan hatalara sebebiyet verdiği düşünülmektedir (Yokuş & Çakır, 2012).

Kanserin tedavisinde sık başvurulanan yöntemler; kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemlerdir (Baykara, 2016). Bu tedavi yöntemlerine ek olarak birçok tedavi yöntemleri vardır. Bunlar; alternatif tedaviler, lazer tedavisi, gen tedavisi, immünoterapi, anjiogenez inhibitörleri, kemik iliği transplantasyonu (KİT) ve kök hücre naklidir.

Kanserin neden olduğu belirtilerin tamamen yok edilmesi, kanser tedavisindeki asıl amaçlardan biridir. Kanser tedavisinde başarı sağlama; oluşan belirtileri azaltma, yaşam süresini uzatma ve bireylerin kaliteli bir yaşam sürmesini sağlama gibi daha birçok amaçta kullanılmaktadır (Öğüt Düzen & Korkmaz, 2015).

2.1.1 Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Kanser hücreleri, normal hücrelerden farklı olarak birçok özelliğe sahiptir. Kanserli hücrenin yüzeyinde bulunan reseptörler normal hücrelere göre çok fazla sinyal alır. Kontrolsüz bir şekilde proliferasyona sebep olurlar. Kanserli hücreler yanındaki hücreye temas ettikleri zaman bölünmeyi durdurmazlar. Sağlıklı olan hücreler her tipteki besini kullanabilirken, kanser hücreleri sadece glikoliz döngüsünden gelen glukozu kullanabilirler. Gerekli besin ve oksijeni alabilmek için kendilerine yeni damar sistemleri oluşturabilirler. Telomeraz aktivitesini korurlar ve bu sayede sonsuz replike olup çoğalabilme özelliğine sahiptirler. Dolaşım sistemi içerisinde bir yerden bir başka yere hareket edebilir ve bu şekilde bulundukları noktalara yerleşerek kanserleşmeyi (metastaz) başlatabilirler. Kanser hücreleri apoptozdan kaçabilme yeteneğine sahiptirler. Genetik ve epigenetik olarak stabil değildirler (Baykara, 2016).

2.1.2 Kansere Neden Olan Faktörler

Kansere neden olan faktörler, çevresel, beslenme, genetik ve hormonal olarak gruplandırılabilir (Bilgen, 2008).

Kanserde çevresel faktörler, ailesel bağlantı olmadan kansere neden olan tüm etmenler olarak bilinir. Çevresel faktörler kişinin kendi tercihleri olan sigara, alkol, düzensiz beslenme ve kişinin maruz kaldığı etmenler olan kimyasallar, yüksek maruziyette radyasyon, su ve hava kirlilikleri ve biyolojik faktörler olmak üzere iki grupta toplanmaktadır (Baran & Kiraz, 2014).

Tedavi veya doğum kontrolü amaçlı olarak hormonlar sıklıkla kullanılabilir. Hormonlar uzun süreli kullanımlarda karsinogenik özelliğe sahip olabilir (Üstündağ, 2013).

Yapılan araştırmalarda kanserin beslenmeyle ilişkisi %10-70 arasında değişir. Yetersiz ve dengesiz beslenme, kanser riskini arttırmaktadır. Bazı besinlerin kanserden koruyucu özellikleri olanları da mevcuttur (Aygün Çevik & Pirinççi, 2017).

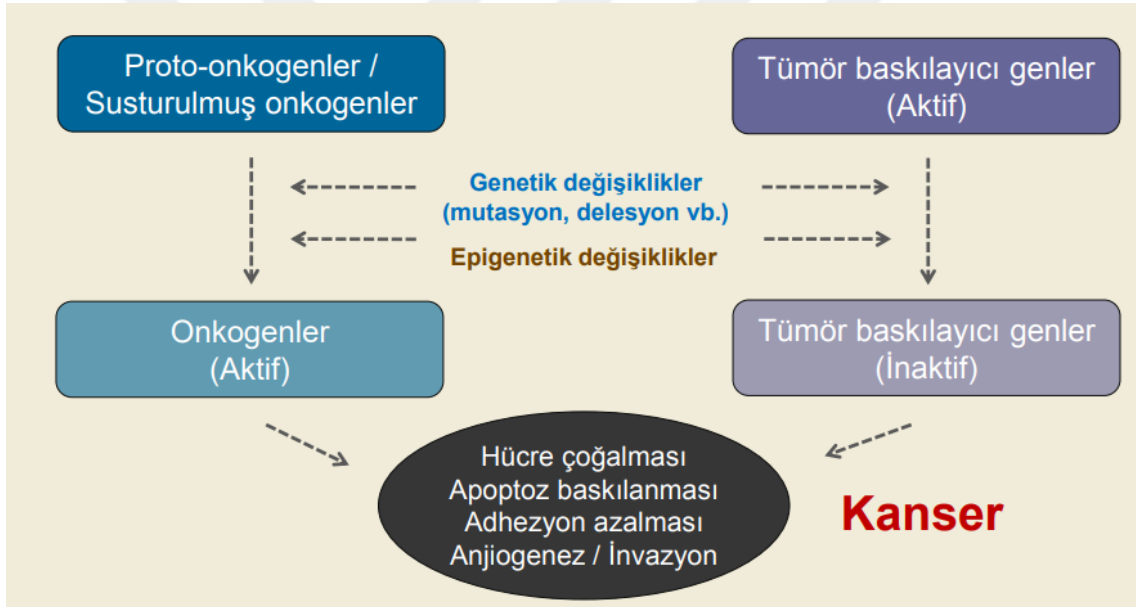
Çevresel faktörlere bağlı olarak kanserin meydana gelme olasılığı kalıtıma oranla daha fazladır. Bazı hastalıklara karşı genlerin yatkınlığa neden olduğu ve olmadığı konusu

hala araştırılmaktadır (Yokuş & Çakır, 2012).

2.1.3 Kanserin Oluşum Mekanizması (Karsinogenezis)

Hücreler yaşam süreci boyunca büyüme, bölünme ve apoptozis gibi birçok mekanizmalara sahiptir, bu mekanizmalar ile yaşamını devam ettirir ya da sonlandırır. Bu mekanizmaların çalışmaması durumu ise karsinogenezi tetiklemektedir.

Hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalması, yakınındaki dokulara invazyon sağlar ya da organlara metastaz yeteneği kazanır. Bu olaya karsinogenez denir (İnciser Paşalak & Seven, 2017).



Şekil 2. 1 Karsinogenez oluşumu (Pazarbaşı & Kasap, 2003).

Onkogen Aktivasyonu: Normal hücreler olan proto-onkogenler, kontrolsüz çoğalarak mutasyon geçirir (nokta mutasyonları, kromozom translokasyonu ve gen amplifikasyonu) ve bunun sonucunda aktif hale gelir. Bu olaya onkogen aktivasyonu denir. Onkogenleri aktif hale gelen hücre yeni bir işlevsel özellik kazanır. Hücre çoğalmasını sağlayan proteinleri aktif hale gelir ve onkogenler bu proteinleri şifrelemeye başlar.

Tümör Baskılayıcı Genler: Genetik materyal üzerinde mutasyon oluşturan fiziksel ve çevresel ajanlar, DNA onarım enzimlerinin ve apoptozisin inaktivasyonuna sebep olurlar. Meydana gelen mutasyonlar bazı genlerdeki proteinleri şifreler. Bu şifrelediği proteinler tarafından belirlenerek etkisiz hale getirilir. Kontrolsüz hücre çoğalması sonucu oluşan mutasyonları ortadan kaldırmak ve genom bütünlüğünü korumak, bu genlerin görevleri arasında yer almaktadır. p53, tümör baskılayıcı genlerden en fazla tanımlanmış olan gendir (İnciser Paşalak & Seven, 2017).

Hücrelerin aşırı çoğalmasına neden olan fonksiyon kaybı mutasyonları tümör süpresörler olarak adlandırılmıştır. Tümör baskılayıcı gen olan p53 geni, 17. kromozomun kısa kolu üzerinde bulunmaktadır. 53000 daltonluk bir proteini şifreler. Bir transkripsiyon faktörü olmakla birlikte aynı zamanda hücre döngüsü düzenleyicisidir (Pazarbaşı & Kasap, 2003).

Normal koşullar sağlandığı zaman p53 geni az eksprese olur. Az eksprese olan p53 geni genetik materyalde hasar meydana geldiğinde hücre bölünmesini durdurur ve oluşan hasarı değerlendirir. Meydana gelen hasar onarılabılır ise DNA onarım enzimleri DNA'daki hasarlı kısmı çıkartarak yeniden sentezler. Meydana gelen hasar onarılamayacak gibiyse, hücre bölünmesi durdurulur ve apoptozis mekanizması aktif hale gelerek hücre apoptoza girer.

Tümör hücreleri ise apoptozis mekanizmasından kaçarlar. Kontrollü hücre ölümünden kaçan bu hücreler ise DNA'larında oluşmuş olan mutasyonlar ile yaşarlar ve proliferasyona devam ederler (İnciser Paşalak & Seven, 2017).

Kanserin gelişim süreci olarak bilinen karsinogenez üç aşamadan oluşur:

1. İnisiyasyon (Başlangıç)
2. Promosyon (Artma)
3. Progresyon (İlerleme)

İnisiyasyon safhasında, epigenetik düzenlemeler, kromozom ve DNA hasarı ile kendini göstermeye başlar. İnisiyasyon safhası uzun bir süreçtir ve bu süreci takiben

enflamasyonla birlikte kararsız olan hücrelerin büyüdüğü ve çoğaldığı gözlemlenir. Progresyon safhasında hücrelerin proliferasyonu artar; hücreler kendi genomlarına zarar vermeye başlarlar ve sonucunda kötü huylu tümöre dönüşürler (Çiftçi, 2017).

2.1.4 Kanserde Tedavi

Günümüzde kanser tedavisi spesifik olmayan yöntemlerden spesifik yöntemlere doğru ilerlemektedir (Barbaros & Dikmen, 2015).

Kanser tedavisinde kullanılan tedavi yöntemleri şunlardır: cerrahi yöntem, immünoterapi, kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisi ve lazer tedavisi (Çevik & Aydın, 2012).

Cerrahi Yöntem

Tümörün uzaklaştırılmasını sağlayan ve kanser tedavilerinde sıkça başvurulanan tedavi şekli cerrahi yöntemlerdir. Özellikle yayılım göstermemiş olan farklı kanser türlerinde iyi bir tedavi yöntemidir (Çevik & Aydın, 2012).

Radyasyon Tedavisi

Kanser tedavisinde kullanılan X ışınları, gama ışınları ve iyonize ışınları radyasyon tedavisinin temelini oluşturur (Çevik & Aydın, 2012).

Radyasyon tedavisi kanserli hücreye zarar vererek etkisini gösterir. Belli bir bölgeyi ya da vücudun tamamını hedef alabilen tedaviler de mevcuttur (Baykara, 2016).

İmmünoterapi

Biyolojik moleküller olan interlekin ve interferonlar kullanılarak bağışıklık sisteminin uyarılması işlemidir (Çevik & Aydın, 2012). Biyolojik terapi ve biyoterapi olarak da adlandırılır (Barbaros & Dikmen, 2015).

Hormon Tedavisi

Vücudun doğal olarak ürettiği hormonun hücreye bağlanması ve kanser hücrelerinin büyümesini engellemesidir. Bu ilaçları kemoterapi ilaçlarından ayıran en büyük farktır (Baykara, 2016). Hormon salgılanmasına bağlı olarak meme ve prostat kanserlerinde bazı hormonlarla uygulanan tedavi yöntemidir (Çevik & Aydın, 2012).

Lazer Tedavisi

Lazer tedavisi cerrahi müdahalelerde birlikte uygulanınca yararlı olabilmektedir (Çevik & Aydın, 2012).

Kemoterapi

Kanserin çeşitli ilaçlarla tedavi edilmesi olan kemoterapi, en çok bilinen tedavi yöntemlerinden biridir. Kemoterapide kullanılan bazı ilaçlar kanserli olan hücrelerin proliferasyonuna engel olur. Aynı zamanda normal hücrelere de etki ederek bu hücreleri yok eder (Çevik & Aydın, 2012).

Tümörün boyutunu küçültmek için radyoterapi gibi kemoterapide kullanılır, kanserin tekrar riskini azaltıcı uygulamalar yapılmaktadır. Kemoterapi uygulamalarında kullanılan ilaçlar alkilleyici ajanlar, antimetabolitler, antitümör antibiyotikler, mitotik inhibitörler ve topoizomeras inhibitörlerdir (Baykara, 2016).

Günümüzde kanser vakaları artış göstermiştir, bu yüzden antineoplastik ilaçlar yüksek dozlarda kullanılmaya başlanmıştır. Bu durum uygulanan ilaç miktarının artmasına neden olmuştur (Olgun & Şimşek, 2010).

Kanserin kişiye özgü bir hastalık olması yapılan tedaviler arasında farklılıklara neden olur. Tedavide kesin ve tek bir yöntemden bahsetmek zordur (Baykara, 2016).

2.2 Hepatosellüler Karsinom (HCC)

Karaciğer kanseri, kanser türleri arasında olan ve ölümcül olarak bilinen kanserlerden birisidir (Yücel, 2018). Karaciğer kanserlerinin % 85-90'ını oluşturan, hepatosellüler karsinomdur (Tarhan, 2013).

Günümüzde tıp ve teknolojiadaki gelişmeler, teşhis ve tedavide artan imkânlarla rağmen ölüm nedenleri arasında kanser ilk sıralarda yer alır (Demirkaya, Gündoğdu, Dodurga, Seçme, & Gündoğdu, 2019). Türkiye'deki durumla alakalı olarak net bir sayısal veri bulunmamaktadır (Tarhan, 2013).

Hepatosellüler karsinom (HCC) dünya çapında görülme sıklığı olarak en fazla görülen dördüncü kanser türüdür ve karaciğer kanser türlerinin % 80'ini oluşturmaktadır (Öner, İsan, Gülhan Aktaş, & Çolak, 2020).

Hepatosellüler karsinomun erkeklerde görülme olasılığı kadınlara göre 3 kat daha fazladır. Yaşa bağlı olarak ölüm oranı da çok fazla artmaktadır. Hepatosellüler karsinomun erkeklerde çok sık görülme sebebi sadece cinsiyet ile ilgili değil aynı zamanda erkek bireylerin çok fazla miktarda alkol ve sigara tüketimi, yüksek testosteron seviyeleri olarak belirtilmektedir (Güvenalp, 2019). Hepatosellüler karsinomun oluşumu ve gelişiminin genetik ve epigenetik olaylar sonucunda kompleks ve birden fazla aşamalı bir süreçte rol aldığı öngörülmektedir (Demirkaya, Gündoğdu, Dodurga, Seçme, & Gündoğdu, 2019).

Cerrahi müdahaleler, hepatosellüler karsinoma (HCC) yakalanmış bir bireyin hayatta kalma durumunda en etkili tedavi yöntemi olmakla birlikte; parça olarak yapılan bu müdahale oldukça azdır ve metastaz (yayılım) oranının çok yüksek miktarda olması klinikte daviyi doğrudan etkilemektedir (Öner, İsan, Gülhan Aktaş, & Çolak, 2020).

HCC'li hastalarda antikanser ilaçlarına karşı bir dayanıklılık olduğu görülmektedir(Kuş, 2017). Kanserın tekrardan nüks etmesi durumunda, hastalarda sağ kalma oranlarını belirli bir şekilde azalttığı ve hastalığın tekrardan gelişmesi ise

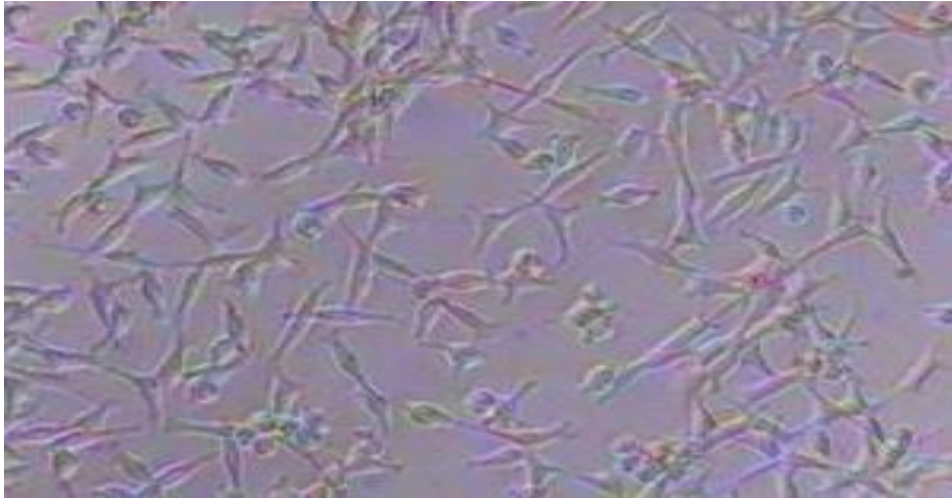
hastalarda tedavi imkanını sınırlı tuttuğu unutulmamalıdır. Bu nedenle hasta seçimi nüksün azaltılması için çok önemlidir (Günay, et al., 2013).

2.2.1 HepG2 (İnsan Hepatosellüler Karsinom) Hücre Hattı

Hepatoma hücre hatları, primer insan hepatositlerine in vitro alternatif olarak çok fazla kullanılmaktadır. Bu insan hepatoma hücre hatları; HepG2, Hep3B, HuH7 ve HepaRG dir. İlaç metabolizması ve hepatotoksisite çalışmalarında insan hepatom hücre hatları yaygın olarak kullanılmaktadır.

HepG2 hücre hattı, 1980 yılında, Philadelphia Wistar Enstitüsü'ndeki araştırmacılar tarafından "The Human Hepatoma-Derived Cell Line" patenti alınmış ve literatüre girmiştir.

O tarihten bu zaman kadar HepG2 hücreleri, 15 yaşındaki erkek bir hastanın karaciğer dokusundan elde edilen insan hücre hattı olarak Amerikan Tıp Kültür havuzunda bulunmaktadır (Güvenalp, 2019).



Resim 2. 1 HepG2 hücre hattı (Faedmaleki, Shirazi, Salarian, Ashtiani, & Rastegar, 2014).

HepG2, farmakolojik ve toksikolojik araştırma ve çalışmalarda çok sık kullanılan insan hepatom hücre hattıdır. HepG2 hücreleri çoğalma (proliferasyon) yetenekleri olan, tümorojenik olmayan ve epitelyal benzeri bir morfolojiye sahip olan hücrelerdir. Bu

hücreler birçok farklılaşmış karaciğer fonksiyonlarını gerçekleştirebilirler (Güvenalp, 2019).

HepG2 hücreleri; kültür yüzeyine yapışarak kümecikler oluştururlar. Kültür ortamının tamamını kaplayan bu kümecikler farklılaşırlar. Farklılaşan bu hücrelerin bir kısmı küresel yapılar oluştururken, diğer bir kısmı ise farklı şekilde çoğalmayı seçerler (Tatar, Şengül, İsan, & Gülhan Aktaş, 2016).

HepG2 hücreleri, karaciğer kanseri çalışmalarında çok fazla kullanılır ve hepatosellüler karsinoma bulunan hastadan izole edilmiş hücre dizisidir. Bir çalışmada hepatosellüler karsinoma tanısı konulmuş bir hastadan HepG2 hücreleri izole edilmiş ve morfolojik özelliklerine bakılarak (sitoplazmik organellerden mitokondri, endoplazmik retikulum ve golgi cisimciği ile hücre iskeletini oluşturan filamentlerden olan aktin filamentlerinin miktarı) kültür sürecindeki değişimi karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Sitoplazmik organel olarak bakıldığından ortamdaki hücre yoğunluğuna bağlı değişirken, hücre iskeletinde belirgin bir değişiklik olmamıştır (İsan, Cilacı Tombuş, Doğru, Şanlı, & Gülhan Aktaş, 2016).

Başka bir çalışmada FOXK1'in devreden çıkarılması, glikolizi inhibe ederek karaciğer kanserinin hücre canlılığını baskılanabildiği araştırılmıştır. Bunun için FOXK1'in dört insan karaciğer kanseri hücre hattında ekspresyonları qRT-PCR ve western blot kullanılarak; hücre canlılığı ise MTT kullanılarak değerlendirilmiştir. FOXK1'in yok edilmesi hücre canlılığını azaltmış ve buna bağlı olarak karaciğer kanseri hücrelerindeki glikoliz düşmüştür (Cui, Gao, Zhang, Han, & Wang, 2018).

Yapılan bir çalışmada, hepatosellüler karsinom hücre hattı olan HepG2 hücrelerinde parietinin sitotoksik ve genotoksik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. HepG2 hücreleri uygun kültür koşullarında elde edilmiş ve kültüre edilmiş hücreler 25-1000 μ M konsantrasyonunda parietin uygulanarak 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. XTT yöntemi ile hücre canlılık oranı belirlenmiş, comet yöntemi ile de genotoksik etkisi incelenmiştir. Elde edilen veriler; parietinin HepG2 hücrelerine IC50 değeri 25 μ M olarak belirlendiğini ve comet sonuçlarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış

görülmeyeceği gözlemlenmiştir ($p>0.05$) (Demirkaya, Gündoğdu, Dodurga, Seçme, & Gündoğdu, 2019).

Yapılan bir başka çalışmada, IL-6'nın kaspaz-1, kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitelerinin HepG2 hücreleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, IL-6 ilave edilmesi sonucunda kaspaz-3 aktivitesinde artışa neden olmuştur. HepG2 hücrelerinde apoptoza giden yolda etkili olduğu belirtilmiştir (Balkan, Kısmalı, Turan, Balkan, & Sel, 2017).

Başka bir çalışmada, Kaya kekiği (*Satureja cuneifolia*) bitkisinden elde edilen ekstraktların HepG2 insan karaciğer kanser hücrelerinde *in vitro* sitotoksik hücre ölümü üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Farklı dozlarda alınan bitki ekstraktları, çoğaltılmış olan karaciğer kanser hücrelerine verilmiştir ve etki düzeyleri belirli zaman aralıklarında incelenmiştir. Kanser hücrelerinde canlılık testleri tripan mavisi yöntemi ve MTT testi kullanılmıştır. Çalışma sonucu olarak; belirli zaman ve doz aralıklarına bağlı olarak *Satureja cuneifolia* ekstraktlarının karaciğer kanser hücrelerinin gelişimini engellediği ve kanser ilaçlarının tasarımında kullanılabileceği belirlenmiştir (Yücel, 2018).

HepG2 hücrelerinde palmitat ile oluşturulan yağlanma, karaciğerdeki yağ birikiminin zararlı etkilerinin araştırılmasında kullanılan *in vitro* non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı modelidir. Bu çalışmada ise HepG2 hücrelerinde palmitat ile oluşturulan yağlanmanın paraoksonaz-1 ve paraoksonaz-3 enzimlerine etkisini araştırılmıştır. Çalışma sonucunda HepG2 hücrelerinde palmitat ile oluşturulan yağlanma; paraoksonaz-1 mRNA düzeyini arttırmış, paraoksonaz-1 ve paraoksonaz-3 protein, paraoksonaz-3 mRNA düzeylerine ve arilesteraz aktivitesine etkisi olmadığı gösterilmiştir (Sayılan Özgün, Özgün, Tabakçioğlu, Süer Gökmen, & Eskiocak, 2019).

Yine bir başka çalışmada, kanser hücrelerinde işleyişi hasarlı olan apoptotik, anti-apoptotik ve çoklu ilaç direnci yollarının incelenmesinde, karaciğer kanseri hücre hattı (HepG2) kullanılmıştır. HepG2 hücre hattını en etkili antikanser ilaçlardan biri olan doksorubisin ile muamele ederek, apoptozun uyarılmasını sağlamıştır ve apoptozda

önemli rol oynayan bazı genlerin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. HepG2 hücrelerinde bazı ilaç uygulamalarından sonra kontrol gruplarına kıyasla deney gruplarında, bazı genlerde ekspresyon düzeylerini arttırdığı ve bir diğer gen grubunda ise gen ekspresyon düzeyinin uygulanan ilaç dozundan bağımsız olarak değişmediği gözlemlenmiştir (Aydın & Ercan, 2012).

2.3 *Silybum marianum* (Meryemana Dikeni)

Çok eski zamanlara dayanmakta olan bitkisel ilaçların kullanımı, insan sağlığı için çok önemlidir. Birçok hastalığın önlenmesi ve tedavisinde halen kullanılmaktadır. Dünya genelinde bu ilaçların standartları geliştirilmekte ve her ülkede bu durum farklılık göstermektedir (Süzgeç-Selçuk & Eyisan, 2012). Bitkisel ilaçlarla tedavi özellikle batıda yaygınlaşmış olup, yapılan araştırmalara göre batıda yaşayan ülkelerin nüfusunun % 20- 65'i düzenli olarak bu ilaçları kullanmaktadır (Altın, 2006).

Compositae/Asteracea familyasından olan Meryemana dikeni bitkisi (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.), tek yıllık otsu bir bitkidir (Katar, Yaman, Subaşı, & Arslan, 2013).

Silybum marianum bitkisinin özellikleri şunlardır:

- Gövdesi 30-100 cm yüksekliktedir.
- Yeşil, seyrek ve yumuşak tüylere sahiptir.
- Yaprakları beyaz damarlı, soluk yeşil renklidir.
- 7 mm uzunluğa sahip olan meyveleri bulunmaktadır.
- Siyah-çizgili renkte akenleri vardır.
- Bitkinin çiçek açma zamanı Nisan ve Mayıs aylarıdır. Kokusu onu diğer bitkilerden ayıran bir özelliktir (Eren & Şar, 2020).

Bitkinin tarihine baktığımız zaman 4.yy'da bile medikal bir bitki olarak görüldüğüne dair kanıtlar vardır. *Silybum marianum* bitkisi karaciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılan en eski bitkilerden birisidir (Sayın, 2012). Enginar gövde yapraklarındaki

damarlarından beyaz özsuyu çıktığı için bu bitki İngilizce’de Milk Thistle ismiyle bilinir (Türkmen, 2019).

Bu bitki Almanya’da Meryemanın dinsel bir sembolü olarak görülmektedir ve bu yüzden Meryemana diken i smi verilmiştir. Bu bitkiyi Kızılderililer ise Deve Dikeni, Kutsal Diken, Okunmuş Diken gibi pek çok isimde adlandırmışlardır. Türkiye’de ise deve diken i olarak bilinir (Sayın, 2012).



Resim 2. 2 Silybum marianum (Deve diken i) (Eren & Şar, 2020).

Bitkinin yayılım gösterdiği alanlar; Afrika’nın stepleri, Güney Avrupa ve Ön Asyadır (Katar, Yaman, Subaşı, & Arslan, 2013). Rusya’nın güneyinde yaygın olup, Amerika’da yetişenler Avrupa ve Asya’dakilere göre daha verimlidir (Sayın, 2012). Türkiye’de Akdeniz, Karadeniz ve Ege bölgelerinde görülmekte olan bu bitki en çok yol kenarlarında rastlanır (Katar, Yaman, Subaşı, & Arslan, 2013).

2.3.1 Silymarin

Silybum marianum tohumları birçok aktif madde içerir. Tohum içeriğinde bulunan

- Glukuronidasyonu hızlandırır ve glutatyonun azalmasını önler.
- Toksik etkiye maruz kalmış olan immün sistemin düzenlenmesini sağlar (Kocaman & Dabak, 2015).

Silymarin polimerik ve okside polifenolik içeriklidir ve *Silybum marianum* bitkisinden elde edilen flavonoid bir antioksidandır. Suda çözünmez ve standart kapsüllenmiş bitki ekstresi olarak kullanılır (Kocaman & Dabak, 2015).

Oral uygulama sonrası emilimi oldukça düşüktür, sıçan safrasındaki oranı %2-3 arasında değişirken hem hayvanlarda hem de insanlarda maksimum plazma konsantrasyonu 4-6 saatte ulaşır (Atlı, 2019). Yüksek dozlarda kullanımının zehirli etkisi olmadığı özellikle embriyo üzerinde zararlı etkisi olmadığı bilinmekle birlikte, karaciğeri koruyucu ve antioksidan özellikleri sayısız deneysel ve klinik çalışmalar ile gösterilmiştir (Türkmen, 2019).

Etanol, parasetamol ve karbon tetraklorid kaynaklı karaciğer hasarına karşı antihepatotoksik etki gösterir (Sayın, 2012). Silymarin, antienflamatuvar ve antimetastatik özelliktedir ve bundan dolayı apoptozda rol alan proteinlere etki eder. Kemoterapi ve radyoterapinin toksisitesini önlemek ve azaltmak amacıyla kanser hastalarına önerilmektedir (Özgüç, Kayalar, & Zeybek, 2018).

Östrojenik bir etkiye sahip olan SLM'nin hem uterus kalınlığı ve endometrial hücrelerin boyunun uzamasında olumlu etki yaptığı ve aynı zamanda beyinde bazı nörotransmitter maddelerin yoğunluğunu artırdığı bilinmektedir (Atlı, 2019).

Yapılan bir çalışmada SLM'nin HepG2 hücrelerinde akrilamid kaynaklı oluşan oksidatif hasar üzerindeki koruyucu etkisi incelenmiştir. SLM'nin koruyucu etkisi sitotoksikite testi olan MTT ile belirlenmiştir. Daha sonra HepG2 hücrelerinde bulunan reaktif oksijen türleri (ROS) tespit edilmiştir. Elde edilen verilere göre, 12-96 µg / mL'deki SLM'nin HepG2 hücreleri üzerinde sitotoksik bir etkiye sahip olmadığı bulunmuştur. SLM hücre canlılığını artırmış ve hücre içinde bulunan reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif hasarı azaltmıştır. Bu nedenle SLM karaciğer

hücrelerini akrilamidinin neden olduğu oksidatif hasardan koruyabildiği görülmüştür (Liang, XiaoDuo, Wei, Hongyang, HangYu, & Meili, 2018).

Yapılan bir başka çalışmada, SLM'nin PC12 hücrelerinde nükleer transkripsiyon faktörü E2 ile ilişkili faktör (Nrf2) yoluyla akrilamid (AA) kaynaklı oluşan nörotoksisiteye karşı koruyuculuğu araştırılmıştır. Çeşitli ilaçlarla tedavi edilen gruplarda hücre canlılığını ölçmek için MTT kullanılmıştır ve SLM'nin AA ile tedavi edilen PC12 hücrelerinde hücre canlılığını arttırdığı gözlemlenmiştir. Sonuçlara göre, SLM'nin Nrf2 sinyalini aktive edebildiği ve AA ile muamele edilmiş PC12 hücrelerinde Nrf2 ekspresyonunu artırabildiği görülmüştür (Sun, Li, Zhao, & Shao, 2017).

Başka bir çalışmada SLM'nin sıçanlarda histolojik ve biyokimyasal parametrelerle valproik asite bağlı beyin hasarı üzerindeki olası koruyucu etkilerini değerlendirilmiş, erkek sıçan ile yapılan bu çalışmada sıçanlar üç gruba ayrılarak farklı dozlarda valproik asit ve SLM verilmiştir. Valproik asidin neden olduğu beyin hasarı, SLM'nin antioksidatif ve anti-apoptotik etkileri nedeniyle SLM tedavisi ile azaltılmıştır (Aktaş & Sevimli, 2020).

Yapılan bir çalışmada SLM'nin mayaro virüsüne (MAYV) karşı antiviral aktivitesi ve virüs kaynaklı oluşan oksidatif strese koruyucu etkisinin olup olmadığı incelenmiştir. Sitopatik etki inhibisyonu, viral replikasyon ve plak azaltma deneyleri yapılmıştır. Ardından SLM'nin anti-MAYV aktivitesi belirlenmiştir. Buna ek olarak, SLM'nin MAYV'nin oluşturduğu oksidatif hücre hasarını azaltıp azaltamayacağına da bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre SLM'nin MAYV'ye karşı çok güçlü antiviral aktivite gösterdiği belirlenmiştir. SLM aynı zamanda MAYV kaynaklı oluşan ROS oluşumunu da azaltmıştır (Camini, da Silva, & da Silva Caetano, 2018).

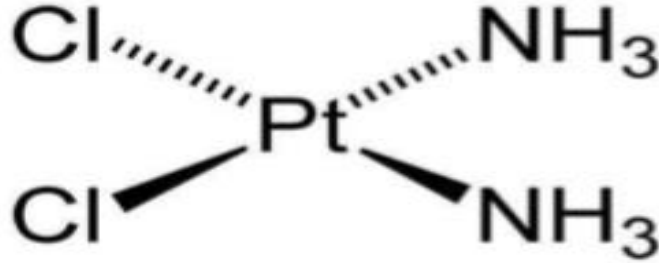
2.4 Cisplatin

Cisplatin metal bazlı güçlü bir antineoplastik ajandır. Yapısında VIII. grup metallerin içinde bulunan platin metalini içerir. Cisplatinin bazı yapıları tümör oluşumunu durdurucu etki gösterirken bazıları ise karsinogenik etkiye sahiptir. Amerikan Gıda ve

İlaç İdaresi (FDA) tarafından platin grubu kemoterapötikler, onaylanmış 6 sınıf kemoterapötikten biridir (Sabuncuoğlu & Özgüneş, 2011).

1893'te Alfred Werner tarafından kimyasal yapısı ilk kez açıklanmış ve bu bileşik hakkında çalışmalar 1960'lı yıllara kadar yapılmamıştır. Rosenberg ve arkadaşları, 1960 yılında yaptıkları ilk gözlemlerle *Escherichia coli*'deki hücre bölünmesini engelleyebildiğini ve bazı kanser hastalarının kemoterapisinde bu platin gruplarının kullanılabileceğini söylemişlerdir (Dizman, 2019).

Kimyasal yapısına bakıldığında ise merkezde iki değerlikli bir platin atomu bulunur. Bu platin atomuna bağlı iki amonyum ve iki klor bağı mevcuttur. Cis ve trans olarak iki izomere sahiptir, CP'nin cis formu yalnızca sitotoksik etkiye neden olur (Dizman, 2019).



Şekil 2. 3 Cisplatinin kimyasal yapısı (Dizman, 2019).

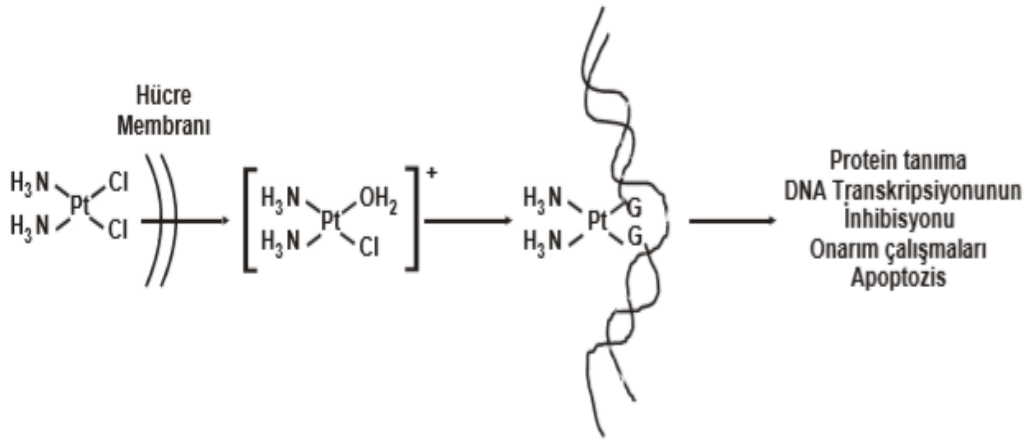
İlacın etkinliği, ortamda bulunan klor iyonu konsantrasyonuna bağlıdır. CP'nin daha az etkin olduğu durumlar; klor iyonu konsantrasyonunun 100 mM olduğu kan ve ekstrasellüler sıvılardır. Hücre içi klor iyonu konsantrasyonundaki ani düşüşler, ilacın etkinliğinin artmasına neden olur (Arslanbaş, 2010).

Testis, yumurtalık, akciğer, mide kanseri gibi birçok kanserin tedavisi için CP kullanılmaktadır (Ghosh, 2019).

2.4.1 Cisplatin Etki Mekanizması

Kanser gelişimini durdurucu bir etkinliği olan CP, DNA'nın çift ipliğinde çapraz bağlanmalar yapar. Bu sayede DNA sentezi engellenir. Tümör hücresinde DNA biyosentezini CP bu sayede inhibe eder. CP'nin DNA'ya bağlanma, transkripsiyon ya da replikasyon gibi birçok hücresel olayı etkilemesi sitotoksik etkinliğinden kaynaklanır. Çeşitli mekanizmalarla mitokondriyal permeabiliteyi artırır ve apoptozu indükler.

CP, bifonksiyonel alkilleyici ilaçlar gibi davranır ve bu yüzden etki mekanizmaları birbirine çok benzer. Sadece belirli bir zamanda etkili olan bir ilaç değildir, hücreleri her zaman etkileyebilme özelliğine sahiptir (Sabuncuoğlu & Özgüneş, 2011).



Şekil 2. 4 Cisplatinin etki mekanizması (Sabuncuoğlu & Özgüneş, 2011).

CP'nin kemirgen modeli, akut ve kronik böbrek hasarlarına sebep olan mekanizmaların ve potansiyel tedavi yöntemlerinin araştırılmasında vazgeçilmezdir. Yapılan bir araştırmada, kemirgen modellerinde CP kaynaklı oluşan hasarın zorlukları hakkında kısa bir fikir vermeyi amaçlamışlardır. Ayrıca gelecekteki araştırmalar için oluşabilecek zorluklardan da bahsetmişlerdir (Perşe & VeleriT-Haler, 2018).

2.4.2 Cisplatin Toksisitesi

Günümüzde toksisitesi düşük yeni CP ajanların geliştirilmesi ve CP'nin klinik kullanımının artırılmaya çalışılması ilgi çeken bir çalışma alanı haline gelmiştir.

Katı tümörlerin tedavisinde antineoplastik ajanlar tek başlarına başarısız olduklarından dolayı CP ile kombinasyonu uygulanmakta ve terapötik etkisi, doz artışıyla belirgin derecede artmaktadır (Sabuncuoğlu & Özgüneş, 2011).

Ototoksisite, nefrotoksisite ve nörotoksisite cisplatinin en önemli yan etkileridir. Kimyasal bir maddenin kullanımı sonucu iç kulakta bulunan dokularda hasar meydana gelmesi ve buna bağlı kişide dengesel veya işitsel kayıpların gelişmesine ototoksisite denir. Streptomisin ve gentamisin, cisplatin ve vincristin ototoksisiteye neden olan antineoplastik ajanlardan birkaçıdır. Bu ajanların tedavi edici dozları kullanılmaktadır fakat geçici ya da kalıcı bazı hasarlara sebep olabilmektedirler (Taş & Şimşek, 2017).

CP vücutta bazı toksik etkiler yapmaktadır. Bu toksisiteyi yapan metaboliti Cis-diamineaquachloroplatinum II dir (Taş & Şimşek, 2017).

CP'nin nefrotoksisitesini açıklayan bazı mekanizmalar bulunmaktadır. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu bunlardan birisidir. CP nefrotoksisitesine karşı ise antioksidanların koruyucu özelliği araştırılmıştır (Sabuncuoğlu & Özgüneş, 2011).

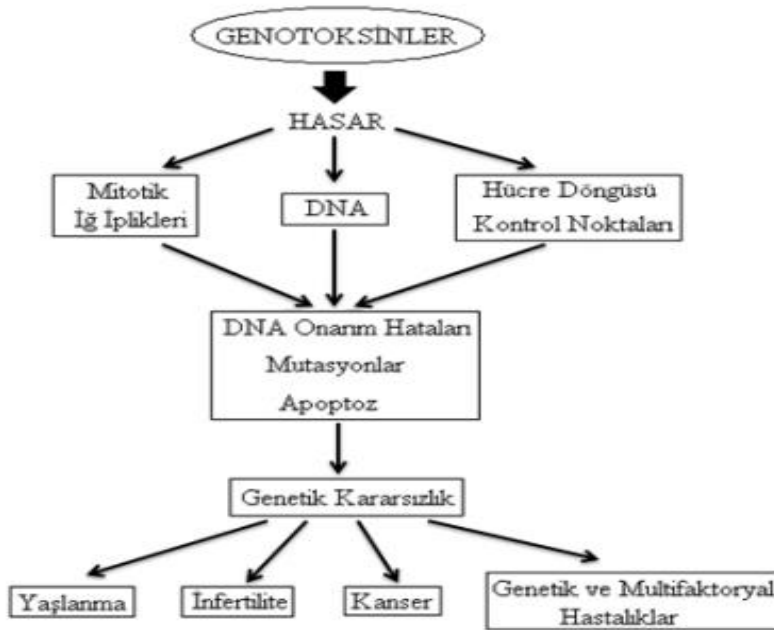
Puerarin, Çin tıbbi bitkisi olan *Radix puerariae*'den türetilen bir izoflavonoiddir. Yapılan bu çalışmada, puerarinin CP nefrotoksisitesi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Sıçan nefrotoksisite modeli oluşturulmuş ve puerarinin belirli, dozları ayarlanıp ven enjeksiyonu yoluyla sıçan modellerine uygulanmıştır. Yapılan western blot sonuçlarında CP böbrek dokularında TLR4 ve NF-κB protein ekspresyonunu artırmıştır. Çalışma sonucundaki bulgular, puerarinin TLR4 / NF-κB sinyalini inhibe ederek CP nefrotoksisitesine karşı renal koruma sergilediğini ileri sürmüştür (Ma, Yan, Zhu, & Shao, 2017).

2.5 Genetik Toksisite (Genotoksisite) Testleri

Fiziksel ya da kimyasal ajanların DNA'da hasar meydana getirmesine genetik toksisite ya da genotoksisite denir. Genotoksik ajanların DNA'da hasar meydana getirmesi

sonucunda DNA’da bazı değişikliklere ve farklılıklara neden olması durumuna genotoksik etki adı verilir. Doğrudan ya da dolaylı olarak DNA’yı etkileyebilirler (Atlı Şekeroğlu & Şekeroğlu, 2011).

Son gelişmeler, moleküler kanser genetiğinde karsinogen maddelerinin çoğunun onkogenler ve anti-onkogenlerdeki mutasyonlarla ilişkili olduğunu göstermektedir (Bedir, Bilgici, Yurdakul, Gürsel, & Alvur, 2004).



Şekil 2. 5 Genotoksik maddelerin DNA üzerindeki etki mekanizması ve sonuçları (Atlı Şekeroğlu & Şekeroğlu, 2011).

Genotoksisite testleri 1970’lerden beri kullanılmaktadır (Bedir, Bilgici, Yurdakul, Gürsel, & Alvur, 2004). Bu testler, DNA’da meydana gelen hasarları tespit etmek amacıyla kullanılmaktadır ve *in vitro* - *in vivo* test sistemleri geliştirilmiştir (Atlı Şekeroğlu & Şekeroğlu, 2011).

***In vivo* Genotoksisite Testleri:** Genotoksisitesi bilinmeyen bir kimyasal maddenin oluşturduğu etkilerinin *in vivo* olarak incelenmesine dayanmaktadır.

***In vitro* Genotoksisite Testleri:** İzolasyonu sağlanmış hücrelerde uygulanır. Bu testler kısa sürelidir ve *in vivo* veya *in vivo* - *in vitro* olarak yapılmaktadır.

Yaygın olarak kullanılan *in vitro* ve *in vivo* genotoksisite testleri şunlardır:

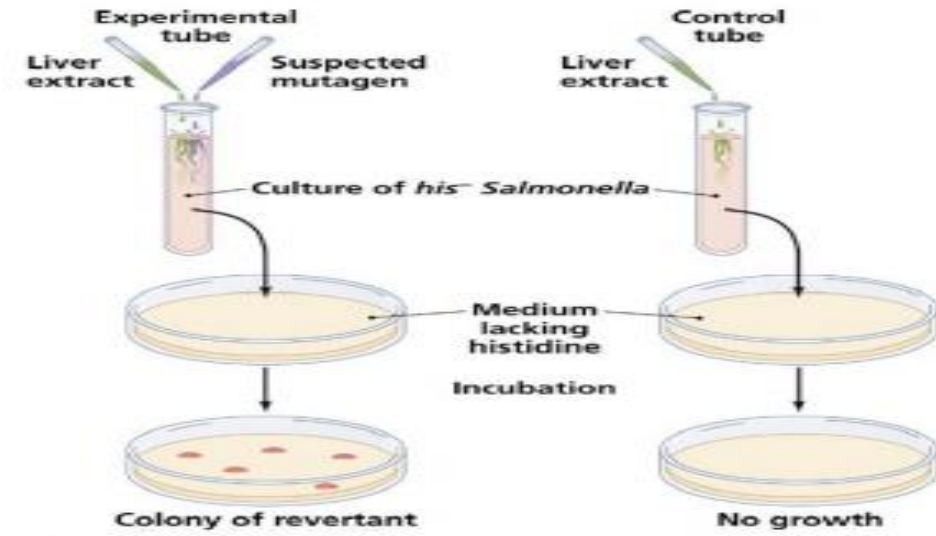
- Salmonella / Mikrozm Mutajenite (AMES) Testi
- Tek Hücre Jel Elektroforezi (SCGE=COMET) Testi
- Kromozom Anormallikleri (KA) Testi
- Kardeş Kromatit Değişimi (KKD) Testi
- Mikronükleus (MN) Testi (Atlı Şekeroğlu & Şekeroğlu, 2011).

2.5.1 Salmonella / Mikrozm Mutajenite (AMES) Testi

Kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılmasında kullanılan, geçerliliği yüksek oranda kabul edilen bakteriyal test yöntemlerinden biri olan Salmonella/mikrozm mutajenite testi, yüksek uygulanabilirlik, hızlı sonuç vermesi ve düşük maliyetli olması gibi çok yaygın kullanım alanına sahiptir (Aydoğan, Çavuşoğlu, & Yalçın, 2018).

1975 yılında Ames ve arkadaşları tarafından yayınlanan bu yöntem, bakteri mutasyonu sonucu oluşan mutant kolonilerin saptanması tekniğine dayanmaktadır (Karakaya & Karakaya, 1983).

Ames testi, havada, akarsu ve göllerde mutajeniteyi tespit etmek amacıyla da yaygın olarak kullanılmaktadır (Ciğerci, Liman, Kutlu, Aydoğan, & Konuk, 2007).



Şekil 2. 6 Ames test (Sezginer & Dane, 2016).

Histidin ya da triptofan operonunun değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içerdiği için *Salmonellatyphimurium* ya da *Escherichia coli* mutant suşları kullanılır (Yüzbaşıoğlu, Zengin, & Ünal, 2014).

Bu testin temelinde, *S. Typhimurium*'nun mutasyon sonucunda histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş suşları bulunmaktadır. Sitokrom P-450 enzimlerini içeren memeli karaciğer post mitokondriyal süpernatant (S9) varlığında veya yokluğunda bu suşlar uygulanacak olan kimyasalla muamelesi yapılır. Muamele sonrasında ikinci bir mutasyon meydana gelir. Mutasyon sonucunda artık histidin sentezleyebilen/üreyebilen koloniler oluşur. Koloniler sayılarak mutajenite belirlenir (Atlı Şekeroğlu & Şekeroğlu, 2011).

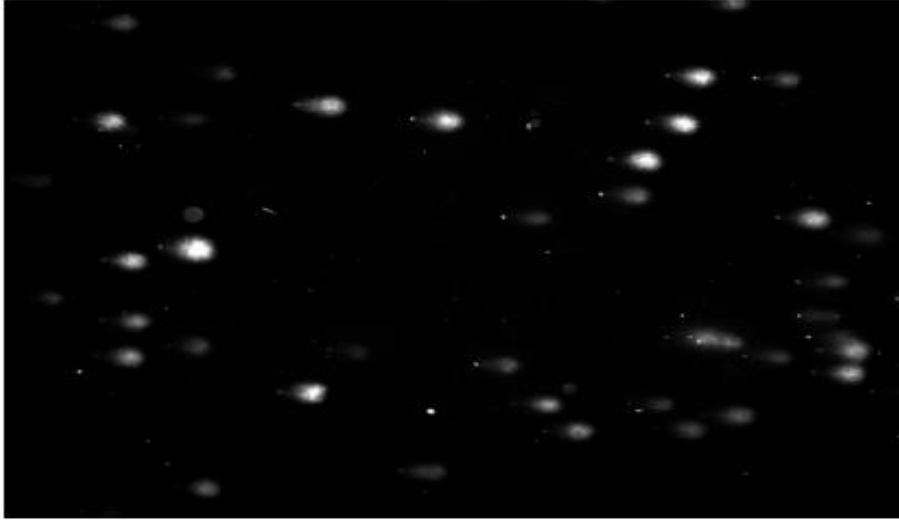
2.5.2 Tek Hücre Jel Elektroforezi (SCGE=COMET) Testi

Geçmişten günümüze kadar DNA'da meydana gelen hasarların gözlemlenmesinde farklı teknikler kullanılmıştır. Bu tekniklerin pahalı olması, uzun zaman alması gibi dezavantajlarının olması farklı seçeneklerde yöntemlere ihtiyacı artırmıştır. Singh ve arkadaşları tarafından 1988 yılında geliştirilen "Tek Hücre Jel Elektroforezi" metodu ortaya çıkarılmıştır (Güner & Gökalp Muranlı, 2013).

DNA’da meydana gelen hasarın belirlenmesinde kullanılan Tek Hücre Jel Elektroforezi (SCGE); hassas, basit ve hızlı bir floresan yöntemidir. Genetik toksikolojiden moleküler epidemiyolojiye kadar birçok farklı alanda kullanılmaktadır. Bu test “*Single Cell Gel Electrophoresis*”, “*Comet Analiz*” ya da “*Microgel Electrophoretic Technique*” olarak da adlandırılmaktadır (Yeni, Fidan, & Gündoğan, 2010).

Kırık olan DNA elektroforez sırasında hücre dışına çıkar ve DNA’da meydana gelen bu hasar kuyruklu yıldız görünümünü alır. Adını bu kuyruklu yıldız görünümünden alan SCGE, floresan mikroskopik bir yöntemdir (Bedir, Bilgici, Yurdakul, Gürsel, & Alvur, 2004).

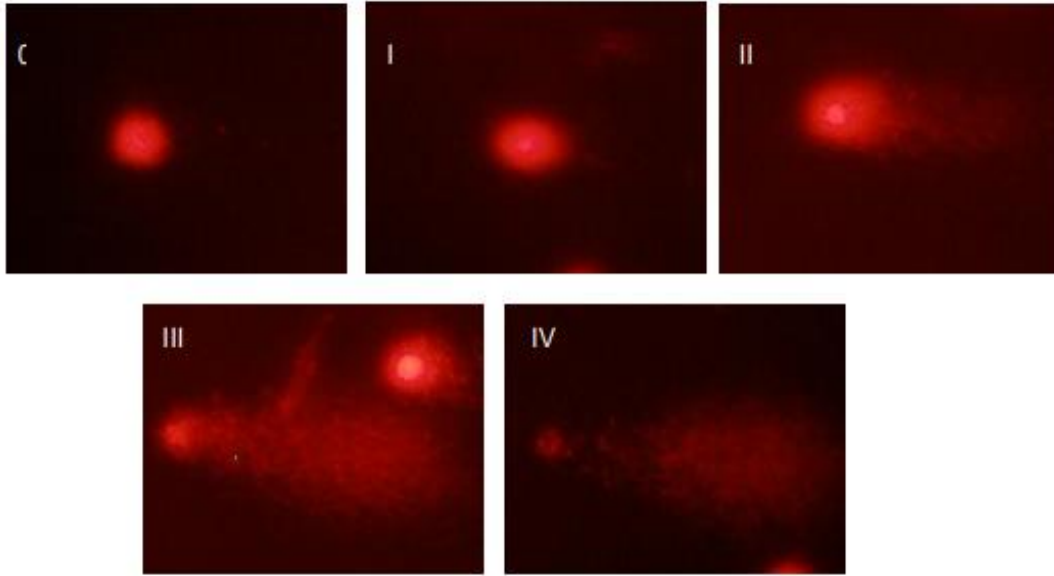
Bu metoddailk olarak hücreler agaroz içerisine yerleştirilir. Lizis tamponunda hücreler bekletilir. Elektroforez tamponunda yürütme işlemi yapılır ve floresan boya ile boyanır. Zarar görmemiş DNA’lar floresan mikroskobu altında kuyruk görüntüsü oluşturmazken, hasar görmüş DNA’larda kuyruklu yıldız görüntüsü oluşur. Hasara uğramış olan DNA fragmentleri farklı elektrik yüklerine ve moleküler ağırlıklarına sahip olması elektriksel alan içerisinde farklı hızlarda hareket etmelerine sebep olur.



Resim 2. 3 Comet yöntemine ait jel görüntüsü (Durmaz, Dikmen, & Gündüz, 2010).

Comet testi ile DNA hasarı belirlenir. Hasarın durumuna göre hücreler skorlanır; kuyruk momenti, kuyruktaki DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğu gibi değişkenlerin

hesaplamaları yapılır (Atlı Şekeroğlu & Şekeroğlu, 2011).



Resim 2. 4 Tek hücre jel elektroforez yöntemi ile farklı skor seviyelerinde hasara uğramış olan DNA görüntüleri

0- Hasarsız DNA; I-Çok az hasarlı DNA; II-Az hasarlı DNA; III-Hasarlı DNA; IV- Tamamen hasarlı DNA (Dikilitaş & Koçyiğit, 2010).

DNA'nın çift zincirinde hasar meydana getiren birçok ajan bulunmaktadır, bazı ajanlarda DNA tek zincirinde hasara neden olmaktadır. Proteinlerin tam olarak uzaklaştırılamaması durumundan dolayı, 1988 yılında “Alkalın Comet Metodu” keşfedilmiştir. Bu metotta DNA’da meydana gelen tek zincir kırıkları gözlemlenmektedir (Yeni, Fidan, & Gündoğan, 2010).

Çizelge 2.1Farklı pH'larda SCGE yöntemiyle belirlenen DNA hasar tipleri (Yeni, Fidan, & Gündoğan, 2010).

pH:7-8	pH: 10-12	pH>13
Çift sarmal kırıkları	Çift sarmal kırıkları	Çift sarmal kırıkları
Çapraz bağlar	Tek sarmal kırıkları	Tek sarmal kırıkları
	Eksizyon tamir bölgeleri	Eksizyon tamir bölgeleri
	Çapraz bağlar	Çapraz bağlar
		Alkali ortamda açığa çıkan hasarlar

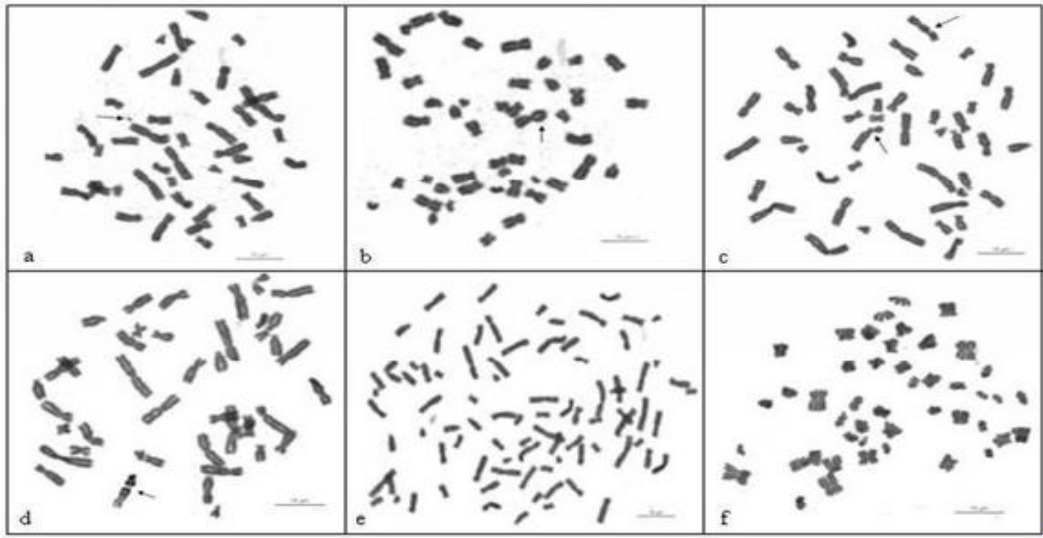
SCGE yöntemi; düşük düzeydeki DNA hasarlarını gösterebilmesi, az sayıda örnek

hücre ile metodun gerçekleştirilebilmesi, fazla malzemeye ihtiyaç duyulmaması, kolay uygulanabilmesi, güvenli - ekonomik olması ve sonuçların kısa süre içerisinde elde edilmesi bakımından bu testin avantajları arasında yer almaktadır (Fidan, 2008).

2.5.3 Kromozom Anormallikleri (KA) Testi

Kromozomal anormallikler, kendiliğinden veya kimyasal/radyasyon uygulaması sonucu olarak meydana gelen normal kromozom yapısı veya sayısındaki değişikliklerdir (Yüzbaşıoğlu, Zengin, & Ünal, 2014).

Çeşitli mutajenler tarafından oluşturulan yapısal ve sayısal kromozomal anormalliklerin tespit edilmesi amacıyla KA testi kullanılmaktadır (Sezginer & Dane, 2016).



Resim 2. 5 Kromozom anormallikleri içeren metafazların görüntüleri

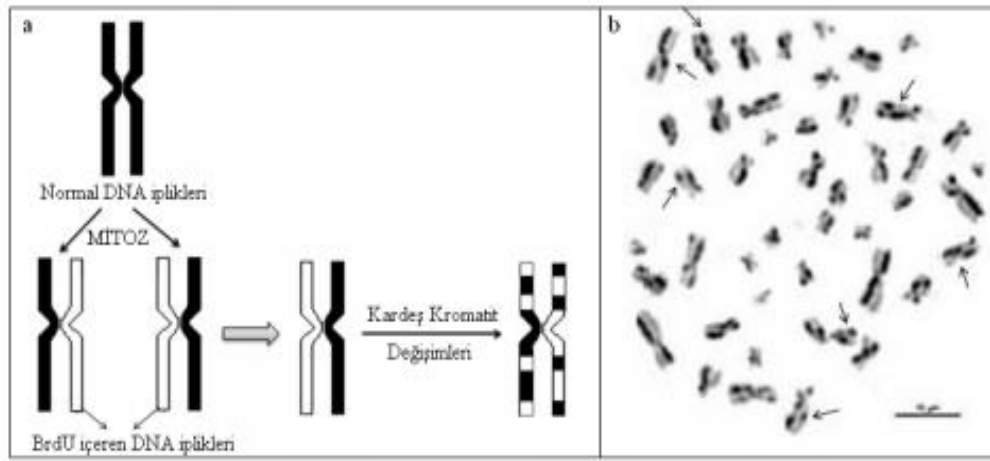
- a- Fragment b- Kardeş kromatitlerin birleşimi c- Kromatit kırığı d- Kromozom kırıkları e - Poliploidi f- Endoreduplikasyon (Atlı Şekeroğlu & Şekeroğlu, 2011).

Memeli hücre kültürlerinde oluşan kromozom anormallikleri *in vitro* KA testi ile belirlenirken, kemik iliği hücrelerinde oluşan kromozom anormallikleri ise *in vivo* KA testi ile belirlenmektedir (Atlı Şekeroğlu & Şekeroğlu, 2011).

2.5.4 Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Testi

KKD testi, genotoksik ajanların deoksiribonükleikaside (DNA) oluşturduğu hasarın kromozom düzeyinde tespit etmeyi sağlar.

Kromozomun iki kromatininde bulunan homolog bölgelerdeki DNA'da kırıkların oluşması ve kırılan bu bölgelerin birbirleri ile simetrik olacak şekilde yer değiştirerek tekrardan birleşmesi bu testin temelini oluşturmaktadır (Soysal, Şahin, & Menevşe, 2008).



Şekil 2. 7 Kardeş kromatit değişimleri (Atlı Şekeroğlu & Şekeroğlu, 2011).

- a- Kardeş kromatit değişiminin BrdU ile belirlenmesi b- Kardeş kromatitler arasındaki değişimleri gösteren metafaz görüntüsü

Hücre kültürlerinde DNA'da oluşan kırıkları görünebilir hale getirmek için timin analogu gibi davranan bromodeoksiüridin (BrdU) maddesi kullanılır. BrdU hücre döngüsü esnasında kardeş kromatitlerin homolog bölgelerine girerek karşılıklı olan parçaların farklı renklere boyanmasını sağlar (Sezginer & Dane, 2016).

Kardeş kromatit değişimi testi, DNA replikasyonu sonucu etkileşime giren mutajenlerin saptanmasını sağlayarak, çeşitli ajanların mutajenik ve karsinojenik etkilerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılır. Ayrıca deneysel olarak yapılan çalışmalarda indikatör test olarak özellikle kromozomlarda oluşan yapısal değişimleri

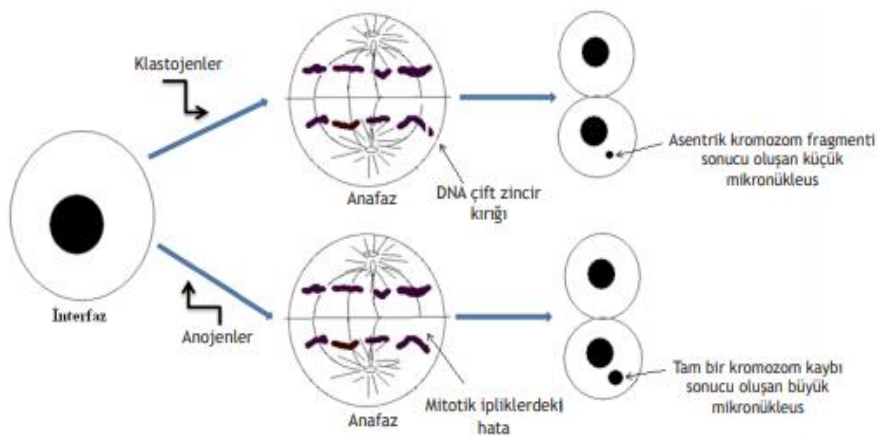
araştırma yönünden bu test önemlidir (Kontaş, Atlı Şekeroğlu, & Şekeroğlu, 2011).

2.5.5 Mikronükleus (MN) Testi

Mitoz bölünme geçiren tüm hücrelerde uygulanabilen bir testtir ve bu yüzden mikronükleus testi genetik toksikoloji araştırmalarında oldukça yaygın kullanılmaktadır (Sezginer & Dane, 2016).

Kimyasal ve fiziksel ajanların kromozomal düzeyde meydana getirdiği hasarları değerlendirmek amacıyla MN testi (Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay= CBMN Assay) kullanılmaktadır. Fazladan bir kültür işlemi gerektirmeyen MN testi; skorlanmasının kolaylığı ve farklı hücrelerde kullanılabilirliği açısından birçok avantaja sahiptir. MN testi *in vivo* ve *in vitro* olarak yapılabilir (Şekeroğlu & Atlı Şekeroğlu, 2011).

1950'lerde bitki hücrelerinde oluşan kromozomal hasarının ölçülmesinde MN testi kullanılmıştır. 1970'lerde ise bu test bazı kimyasal maddelerin kanserojenik etkiye neden olup olmadığını araştırmak için hayvan hücrelerinde denenmeye başlanılmıştır (Şekeroğlu & Atlı Şekeroğlu, 2011).



Şekil 2. 8 Kimyasal ajanlar ile uyarılmış hücrelerdeki MN'ler (Şekeroğlu & Atlı Şekeroğlu, 2011).

Uygun ortamlarda hücre kültürleri inkübasyona bırakılır. Bırakılan hücre kültürlerine ilk mitoz bölünme geçirmeden önce kültürün 44. saatinde sitokalsin-B maddesi ilave edilir. Sitokalsin-B sitoplazma bölünmesini durdurur ve bir hücre döngüsünü tamamlamış çift çekirdekli (binükleat) hücreler oluşur. İnkübasyon süresinin sonunda kültürlerde preparatlar hazırlanır. Mikronukleus içeren çift çekirdekli hücrelerin sayısı belirlenir (Sezginer & Dane, 2016).



3. MATERYAL VE METOT

3.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

3.1.1 Cihazlar

- Vortex
- Hassas Terazî
- Floresan Mikroskop
- Mikroskop
- Vakum Pompası
- Canlı Hücre Görüntüleme Mikroskobu
- Santrifüj
- Saf Su Cihazı
- Elektroforez
- Laminer Kabin
- Benmari
- CO₂ İnkübatörü
- pH metre
- Buzdolabı
- Otoklav
- Mikroplak Okuyucu (BioTekELx800)

3.1.2 Kimyasallar

- DMSO
- PBS
- RPMI
- FBS
- NEFA
- Tripsin-EDTA solüsyonu

- Penisilin-streptomisin
- Tripan Blue solüsyonu
- Etil alkol
- MTT
- Aseton
- LMA
- NMA
- NaCl
- Etidyum bromür
- NaOH
- EDTA
- Trisma Base
- Triton X-100
- Silymarin

3.2 Hücre Kültürü

Hücre kültürü, canlıdan alınan hücrelerin kontrollü şartlar altında yetiştirilmesi sürecidir. *İn vivo* olarak yapılamayan deneyler *in vitro* koşullarda hücre kültürü ile yapılmaktadır.

Hücre kültürüyle yapılan çalışmalar günümüzde popüler araştırma konularından birisidir. Farklı hücre hatları kullanılarak bu hücrelerin yaşamsal faaliyetlerini nasıl gerçekleştirdiği ya da bazı hastalık modellerinde (genetik hastalıklar ya da kanser gibi) tanı ve tedavi yöntemlerinin araştırılması gibi birçok alanda hücre kültürü çalışmaları yapılmaktadır (Sırcan Küçüksayan & Küçüksayan, 2020).

Hücre kültürü çalışmalarında çok farklı kültür yüzeyleri kullanılmaktadır. Laboratuvar ortamında yapılan çalışmalarda hücrelerin büyüüp çoğalmasını ve bulundukları yüzeye yapışmasını gözlemlemek için kültür kapları bulunmaktadır (İsan, Tombuş, Göklü, Tüfekçi, & Gülhan Aktaş, 2016).

Hücre kültürünün bazı avantaj ve dezavantajları vardır. En büyük avantajlarından birisi; ortam koşullarının (sıcaklık, oksijen ve karbondioksit yoğunluğu, pH gibi) istenilen düzeylerde sabit kalabilmesidir (Sırcan Küçüksayan & Küçüksayan, 2020). Ortam koşullarının sabit kalabilmesi için kültür ortamında hücrelerin beslenmesi gerekmektedir, bunun için besiyerleri kullanılmaktadır. Kullanılan her hücre tipinin besin ihtiyacı birbirinden farklıdır ve besiyerinin içerisine buna bağlı olarak hormon, serum ve aminoasit gibi maddeler eklenmektedir. Bir diğer önemli avantajı ise araştırmacının istediği bir hücre hattı üzerinde çalışmasıdır. Dokularda bulunan çeşitli hücrelerden pasajlama işlemleri yapılır ve bu sayede homojen hücreler elde edilir. Bu hücreler uygun koşullarda tekrardan kullanılmak üzere uzun yıllar saklanabilmektedir.

Hücre kültürü çalışmalarında meydana gelen dezavantajlardan birisi olan kontaminasyon, hücrelerin fizyolojik ve metabolik faaliyetlerini bozar. Besiyeri ortamında istenmeyen bir canlı (bakteri veya mantar gibi) ya da cansız faktörlerin bulunması hücre verimliliğinde azalışa sebep olur. Bu yüzden çalışmalar steril koşullar altında yapılmalıdır. Hücrelerin uzun süre pasajlanması, hücre kültüründeki diğer sorunlardan birisidir (Koçaklı, Akıllıoğlu, & Doğan, 2015).

Hücre kültürü ortamında kullanılan besiyerleri, hücrelerin gelişimi ve büyümesi için uygun kültür ortamının sağlanması çok önemlidir. Hücre kültürü besiyerleri aminoasit, karbonhidrat, vitamin ve iyonlar gibi çeşitli maddeler içerir. Her hücrenin besin ihtiyacı birbirinden farklıdır, bu yüzden çalışılan hücre tipine göre besiyeri seçimi yapılmalıdır.

Besiyeri, kültür ortamının önemli bileşenlerinden birisidir. Hücre kültür ortamlarında farklı besiyerleri kullanılmaktadır. Eagle'ın Temel Besiyeri (EMEM), 1955'de Harry Eagle tarafından hücre kültür ortamı olarak geliştirilen ilk besiyeridir. Aminoasitler, tuzlar (CaCl_2 , KCl, MgSO_4), glukoz ve vitamin gibi birçok bileşenden oluşmaktadır.

Dulbecco tarafından Eagle Besiyeri geliştirilerek bir EMEM çeşidi olan Dulbecco's Modified Eagle's Medium yani DMEM bulunmuştur. DMEM orijinalinden çok daha fazla vitamin ve aminoasit içerir.

Yavaş büyüyen hücrelerin proliferasyonunu artırmak ve yüzeye tutunmasını sağlamak için serum kullanılmaktadır. Yapısında büyüme faktörleri ve hormonlar bulunmaktadır. Dana ve at serumu gibi farklı serum tipleri de mevcuttur fakat çalışmalarda en fazla fetal sıgır serumu (Fetal Bovine Serum, FBS) kullanılır.

Besiyeri ortamının tuz konsantrasyonunu ve pH dengesini sağlayan dengeli tuz çözeltisi (Balanced Salt Solution, BSS); yapısında sodyum, potasyum, kalsiyum ve klor gibi birçok bileşen içermektedir. Hücrelerin ozmotik dengesini korumaya yardımcı olur.

HEPES, hücre kültürü ortamının pH dengesini korumada ve protein içerikli solüsyonların dondurulmasında kullanılır.

Hücre kültürü ortamında meydana gelebilecek herhangi bir mantar veya bakteri kontaminasyonunu önlemek amacıyla antibiyotikler kullanılır. Antibiyotikler bakterilerin gram pozitif ya da negatif özelliklerine göre tercih edilir (Koçaklı, Akıllıoğlu, & Doğan, 2015).

3.2.1 Hücre Kültürü Mediyum Hazırlanması

Çizelge 3. 1 Mediyumun hazırlanması

Kimyasal	Miktarı
RPMI	%88
NEFA	%1
Penicilin-streptomisin	%1
FBS	%10

- 0,20 µm çapında membran filtreden vakum yardımıyla tüm kimyasallar geçirilir ve yapılacak olan çalışmalar için mediyum hazırlanmış olur.
- Çalışma için hazırlanan mediyumlar +4 °C’de saklanılır.

3.2.2 HepG2 Hücrelerinin Kültüre Aktarılması

- Kabin içerisinde çalışma yapılmadan önce sterilizasyon işlemleri yapılır. 30-40 dk önce UV ışığı açılır ve kullanılacak malzemeler kabin içerisine konularak sterilizasyon işlemi sağlanmıştır.
- Kryo tüp içerisinde donmuş halde bulunan hücreler 37 °C'lik sıcak su banyosu içerisinde 1-2 dk çözündürülmüştür. Tam çözünme olmadan sıcak su banyosundan kryo çıkartılmıştır. Ardından %70 lik alkolden geçirilmiş ve kabin içerisine alınmıştır.
- Çözünen hücreler 3 mL mediyum bulunan 15 mL'lik falkon içerisine alınmıştır.
- Falkon içerisine alınan hücreler 800 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Tek yıkama işlemi hücreler için yeterli olmadığından dolayı bu işlem iki kez yapılmıştır.
- Santrifüj işlemi sürecinde flasklar düzenlenip, kullanılan hücre ismi ve tarihler yazılmıştır.
- Santrifüj işlemi bittikten sonra falkon alkolden geçirilerek kabin içerisine alınmış ve süpernatant kısmı atılarak üzerine 1 mL mediyum eklenmiştir.
- Yavaş bir şekilde pipetaj işlemi yapılmış ve %20 FBS içeren RPMI olan 75cm²'lik flasklara konulmuştur.
- Hücrelerin konfülenti için flasklar 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılmıştır.

3.2.3 HepG2 Hücrelerinin Pasajlanması

- İnkübatörde bulunan flasklardaki hücrelerin konfülent oranı hücre görüntüleme cihazından bakılmış ve %80-90 olması durumunda pasajlama işlemine geçilmiştir.
- Hücrelerin üzerindeki mediyum steril pipet yardımıyla yavaşça alınıp atılmıştır.
- 37°C'deki sıcak su banyosunda olan 3 mL tripsin-EDTA solüsyonu alkolden geçirilmiş ve hücrelerin bulunduğu flasklara eklenmiştir. Eklenen tripsin-EDTA solüsyonunun flaskın her tarafına yayılımı sağlanmıştır.
- Ardından inkübatöre (37°C ve % 5 CO₂) flasklar kaldırılmış ve 5 dk inkübe edilmiştir.
- İşlem sonrasında flask yüzeyinden ayrılan hücreler flasktan alınıp daha

- öncesinde hazırlanmış 3 mL mediyum bulunan falkonlara konulmuştur.
- Falkonlar 800 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir.
 - Santrifüj işlemi ardından süpernatant kısmı atılmış ve hücreler 3 mL mediyumda yıkanmıştır.
 - Santrifüj sonrasında süpernatant tekrar atılarak 2 mL mediyum eklenmiş ve hafifçe pipetaj işlemi yapılmıştır.
 - 10 mL mediyum bulunan 75 cm²’lik flasklara 1 mL olacak şekilde hücreler paylaştırılmıştır.
 - Flasklar inkübatöre (37°C ve % 5 CO₂) kaldırılmıştır.

3.2.4 HepG2 Hücrelerinin Sıvı Azotta Saklanması

- Hücre konfluent oranı %80-90 olduğunda flask içerisindeki mediyum atık kabına atılmıştır.
- Flaskta bulunan hücrelerin üzerine 4 mL tripsin-EDTA eklenilmiş ve flaskın tüm yüzeyine yayılımı sağlanmıştır.
- Ardından inkübatöre (37°C ve %5 CO₂) flasklar kaldırılıp 5 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması durumunda önceden hazırlanmış 4 mL mediyum bulunan falkonlara alınmıştır.
- Falkonlar 800 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant kısmı atılmıştır. Geriye kalan pellet üzerine 2 mL mediyum eklenmiştir. Pellet ile mediyum pipet yardımıyla homojenize edilmiştir.
- Tekrar 800 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj işlemi sonunda tekrardan süpernatant kısmı atılmış ve geriye kalan pellet üzerine %5 DMSO içeren soğuk FBS eklenmiştir.
- Buz içerisinde bulunan kryo tüplerine hücreler alınmıştır.
- Sıvı azotta dondurulmuştur ve ilerleyen zamanlarda yapılacak olan deneylerde kullanılmak için saklanılmıştır.

3.3 Tripan Blue Yöntemi

Tripan mavisi hücre kültüründeki canlı ve/veya ölü hücrelerin sayısını belirlemek amacıyla kullanılır. Negatif yüklü ve non-vital özelliktedir. Sitoplazma membran bütünlüğünü kaybetmiş hücrelerde birikir fakat canlı hücrelerin sitoplazma membranı bu boyayı kabul etmez. Canlı hücrelerin sitoplazmaları açık renkte görünürken ölü hücrelerin sitoplazması mavi renkte görülür.

Tripan mavisi ile hücre canlılık testinde genel yöntem elle boyama ve sayım için hemositometre (thoma lamı) kullanılır. Hücreler mikroskop altında incelendiği zaman canlı hücreler ortamdan boyayı almazlar. Canlılığını kaybetmiş hücreler ortamdan boyayı alarak belirgin mavi renkte görünür (Güvenalp, 2019).

3.3.1 Tripan Blue Yöntemi İle Hücre Sayımının Yapılması

- Konfluent oranı %80 olduğunda flask içerisinde bulunan mediyum atık kabına atılmıştır.
- Flask yüzeyinde bulunan hücrelerin üzerine 4 mL tripsin-EDTA solüsyonu eklenmiş ve solüsyonun flaskın her tarafına yayılması sağlanmıştır.
- Ardından flasklardaki hücreler inkübatöre (37° C ve % 5 CO₂) kaldırılmış ve 5 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- Hücrelerin flasktan ayrılması durumunda içerisinde öncesinde hazırlanmış 4 mL mediyum bulunan falkonlara alınmıştır.
- Falkonlar 800 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant kısmı atılarak pellet üzerine 1 mL mediyum eklenmiştir ve yavaş bir şekilde pipetaj işlemi yapılmıştır.
- Hücre süspansiyonundan 50 µL ve tripan blue’dan 50 µL pipet ile çekilerek tüp içerisinde karıştırılmıştır.
- Önceden hazır olan thoma lamına bu karışım pipet yardımıyla 10 µL çekilip lam üzerine aktarılmıştır ve ardından sayım işlemi yapılmıştır.
- Sayım sırasında boyayı içine çekmeyen canlı hücreler parlak görünürken, boyayı içine çeken ölü hücreler ise maviye boyanmıştır.
- Hazırlanan süspansiyon içerisindeki hücrelerin sayısını hesaplamak için

aşağıdaki formül kullanılmıştır:

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

- Hesaplama işleminin ardından kabin içerisinde gerekli olan malzemeler alkolden geçirilerek tekrar kabin içerisine alınmış ve kabin temizlenmiştir.

3.4 MTT Yöntemi

Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT), canlı hücrelerdeki metabolik faaliyetlerin ölçülmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde tetrazolyum tuzları kullanılmaktadır (Terzioğlu, Keskin, & Yanıkkaya Demirel, 2013).

Bu yöntemde, canlı hücrelerde bulunan mitokondriyal dehidrogenazlar, tetrazolium halkasını parçalar. Parçalanmış tetrazolium halkası suda çözünmeyen mavi-mor renkli formazan kristallerini oluşturur. Formazan kristallerinin oluşumu, aktif mitokondri içeren canlı hücrelerde görülür. Bu durum hücre canlılığı için bir araç olarak görülmektedir (Beytur, Tekin, Keleştimur, Ergin, & Sandal, 2011).

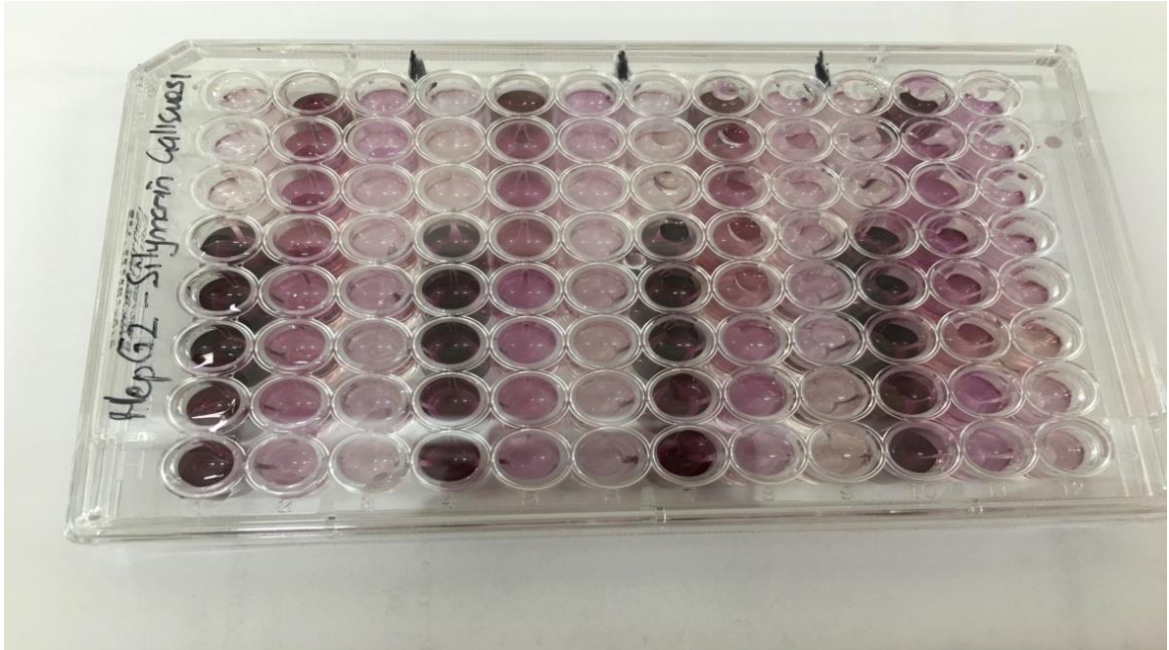
3.4.1 MTT Hazırlanması

- 10 mg MTT hassas terazide tartılır.
- 10 mg MTT, 10 mL PBS içerisinde çözündürülmüştür. 0,22 µm çapında olan enjektör filtresinden geçirilip steril edilmiştir.

3.4.2 MTT Yöntemi ile HepG2 Hücreleri Üzerinde SLM'nin LD₀ Dozunun Belirlenmesi

- Önce well planı yapıldı.
- Hücre sayısı hesaplanmış süspansiyondan 24'lük plak kullanılarak her bir kuyucuğa 1×10^5 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı.
- İnkübatör (37°C ve % 5 CO₂) içerisine plak bırakıldı ve inkübe edildi.

- Silymarinin DMSO'da çözünmesi sağlandı.
- Hücrelerin konfluent oranı % 50-60 olduğunda 1000 - 500 - 250 - 150 ve 75 µg/mL dozlarında SLM uygulandı.
- 1 mL DMSO kontrol grubuna eklendi.
- Plak inkübatöre (37° C ve % 5 CO₂) kaldırıldı ve 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda her bir kuyucuk için 200 µL MTT solüsyonu pipet yardımıyla çekilerek eklendi.
- 2-3 saat tekrar inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda kuyucukların içerisindeki mediyum pipet yardımıyla alınarak çekilip uzaklaştırıldı.
- Farmazon kristalleri oluşmuş plak içindeki kuyucuklara formazan kristallerini çözmesi için 600 µL DMSO eklendi.
- 15 dk inkübasyona plak bırakıldı.
- Çözünen formazanlar, 540 nm absorbans ile mikropalak okuyucu spektrofotometre cihazında ölçümü yapıldı.



Resim 2. 6 HepG2 hücrelerinde MTT uygulaması

3.5 Comet Testi

- Kimyasallar hazırlanarak dH₂O ile 200 mL'ye tamamlandı.
- pH 10 olacak şekilde ayarlaması yapıldı (Çizelge 3.2).

Çizelge 3. 2 Lizis çözeltisinin hazırlanması

Kimyasal	Miktarı
NaCl	29,4 g
EDTA	7,44 g
Trisma baz	0,24 g
Triton X-100	2 mL
DMSO	20 mL

- Kimyasallar hazırlanarak dH₂O ile 500 mL'ye tamamlandı.
- pH13 olacak şekilde ayarlandı (Çizelge 3.3).

Çizelge 3. 3 Elektroforez çözeltisinin hazırlanması

Kimyasal	Miktarı
NaOH	6 g
EDTA	0,18 g

- Kimyasallar hazırlanarak dH₂O ile 300 mL'ye tamamlandı.
- pH 7,5 olacak şekilde ayarlandı (Çizelge 3.4).

Çizelge 3. 4 Nötralizasyon çözeltisinin hazırlanması

Kimyasal	Miktarı
Trisma baz	14,55 g

- **% 1 NMA hazırlanması:**

0,03 g NMA hassas terazide tartıldı ve 3 mL PBS ile karıştırılıp bek alevinden geçirilerek hazırlandı.

- **% 0,8 LMA hazırlanması:**

0,016 g LMA hassas terazide tartıldı ve 2 mL PBS ile karıştırılıp bek alevinden geçirilerek hazırlandı.

- **Stok etidyum bromür hazırlanması:**

5 mg etidyum bromür (EtBr) hassas terazide tartıldı. 25 mL dH₂O'da çözünmesi sağlandı. 10 kat dilüe (10X) edilmiş olarak çalışmada kullanıldı.

- Doz uygulaması yapılmış hücreler flaskların yüzeyinden alındı.
- 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldı ve geriye kalan hücrelerin üzerine 1 mL PBS eklendi.
- Elde edilen hücre süspansiyonundan pipet yardımıyla 30 µL çekildi ve ependorf içerisine alındı.
- SLM, CP, SLM+CP ve kontrol grubu örnekleri bulunan ependorflardan her bir grup için 10 µL örnek alındı ve 120 µL LMA ile karıştırıldı.
- Hücre-LMA karışımı içeren ependorflar sırayla pipet yardımıyla alınarak daha önceden hazırlanmış olan NMA'lı lamlara yayılımı sağlandı.
- Hazırlanan lamalar lamel ile kapatıldı ve buz kasetlerinin üzerine donmaları için yerleştirildi.
- Donan lamalar üzerindeki lameller yavaş bir şekilde alındı ve lamaların her yerine gelecek şekilde 1 saat lizis çözeltisi içerisinde bekletildi.
- Lizis işleminden sonra 40 dk elektroforez tamponunda bekletildi.
- Elektroforez tamponunda bekletildikten sonra 20 dk elektroforez işlemi (25 V 300 mA'de) yapıldı.
- Elektroforez sonrasında alınan lamalar soğuk dH₂O ile yavaş bir şekilde yıkandı.
- Yıkama işleminin ardından her bir lama mikropipet yardımıyla 70 µL etidyum bromür damlatılarak boyaması yapıldı ve lamelle tekrardan kapatıldı.
- Floresans mikroskopta her bir lam için 100 hücre olacak şekilde sayım yapıldı.

3.6 Mikronükleus Testi

Çizelge 3. 5 KCl çözeltisinin hazırlanması

Kimyasal	Miktarı
KCl	0,4 g
dH ₂ O	100 mL

KCl ile dH₂O vorteks yardımıyla homojenize edildi.

Çalışmaya başlamadan 2-3 saat önce gerekli miktarda alındı ve 37°C olan etüv içerisinde bekletilerek çalışıldı.

- **Fiksatiflerin hazırlanışı:**

Fix 2:

40 mL Glasiyal Asetik Asit + 200 mL metanol ile karıştırılarak hazırlanır (Son hacim: 240 mL).

Fix 1:

50 mL Fix2 + 50 mL % 0.9 NaCl ile karıştırılarak hazırlanır (Son hacim: 100 mL)

Önce fix 2 daha sonra fix 1 hazırlanır.

Çalışmaya başlamadan 2 saat önce fiksatifler hazırlanmalıdır. +4° C de bekletilir.

- **%5'lik Giemsa boyasının hazırlanışı:**

5 mL Tampon A + 5 mL Tampon B + 5 mL Giemsa boyası karıştırılır. Son hacim dH₂O eklenerek 100 mL'ye tamamlanır.

Hazırlanan karışım filtre kâğıdından geçirildi.

- Hazırlanan şalelerin içerisine nitroz asit veya dH₂O eklendi.
- Bulunan örnek sayısı kadar lam sırasıyla numaralandırıldı ve şale içerisine dizildi.
- Nitroz asit veya dH₂O bulunan şaleler çalışma başlamadan 30 dk önce (+4 °C) buzdolabında bekletildi.
- Ependorf içerisinde bulunan SLM, CP, SLM + CP ve kontrol grubu örneklerinin üzerine 1mL KCI eklendi.
- Hücrelerin homojenizasyonu sağlandı ve 5dk beklenildi.
- KCI eklenen ependorf içerisindeki örnekler santrifüj cihazına yerleştirildi ve 1500 rpm’de 5 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj işlemi bittikten sonra süpernatant atıldı ve pellet üzerine fix 1 eklendi.
- Tekrardan 1500 rpm’de 5 dk santrifüj işlemi yapıldı.
- Santrifüj işlemi bittikten sonra süpernatant kısmı atıldı ve pellet üzerine fix 2 eklendi.
- Tekrar 1500rpm’de 5 dk santrifüj işlemi yapıldı.
- Yapılan son santrifüj sonrasında ependorflarda bulunan süpernatant kısmı atıldı. Pellet kısmı ise pipet yardımıyla alınarak şalelerdeki lamlara yayılması sağlandı.
- Lamlar 24 saat boyunca kurutma kağıdı üzerinde kurumaya bırakıldı.
- 24 saat sonrasında lamlardaki kuruyan örnekler şale içerisinde bulunan Giemsa boyasında 15 dk bırakılarak boyanması sağlandı.

3.7 İstatistiksel Analiz

MTT çalışması ile elde edilen spektrofotometrik ölçümler yüzde (%) olarak ifade edilerek kullanılmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir (n=6). Deney grupları arasında oluşan istatistiksel farklar harflerle gösterilmiş ve üst simge (a, b) halinde ifade edilmiştir. Veriler normal dağılım göstermemiştir ve normal dağılım göstermeyen veriler olduğu için non-parametrik testlerden olan Kruskal-Wallis ve Man Whitney testleri uygulanmıştır. Yapılan test sonuçlarının değerlendirilmesi Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.



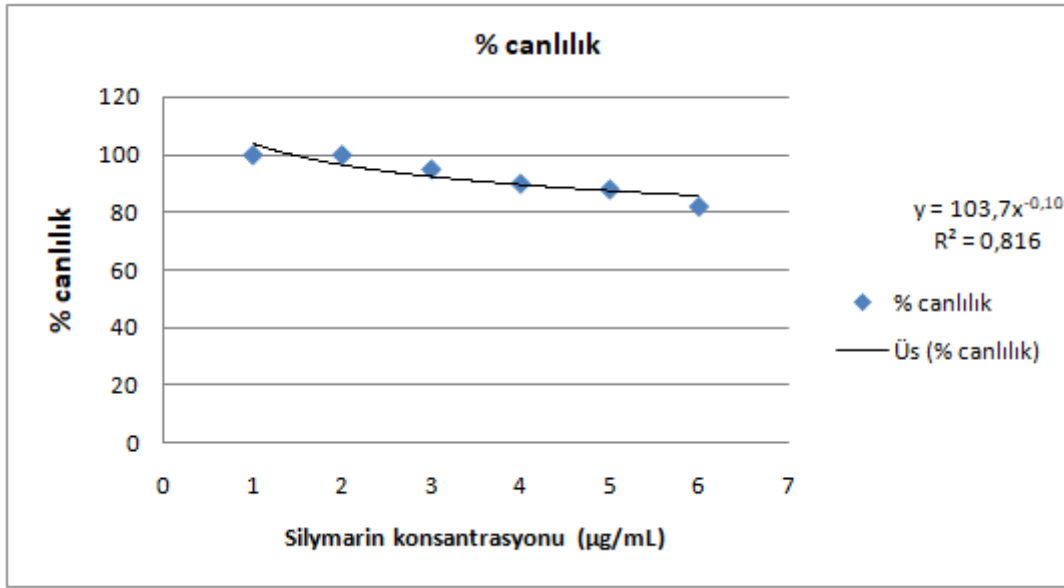
4. BULGULAR

4.1 SLM' in uygulama grubu olan HepG2 hücreleri üzerindeki DNA hasar düzeylerinin belirlenmesi ve MN frekanslarının değerlendirilmesi

SLM'nin LD₀ dozu belirlenmesi amacıyla HepG2 hücre hattı üzerinde MTT yöntemi kullanıldı ve hücre canlılığı belirlendi. HepG2 hücrelerinin 24'lük plak içerisinde 1 x 10⁵ hücre olacak şekilde ekimi yapıldı ve 24 saat inkübe edildi. % 40-50 konfluent oranına ulaşıldığında SLM'nin 1000 - 500 - 250 - 150 ve 75 µg/mL dozları ilave edildi. SLM'nin çözücüsü olarak DMSO kullanıldı. 24 saatlik süre sonrasında, MTT ile SLM'nin sitotoksitesi belirlendi. Kontrol grubu % 100 canlı olarak kabul edildi ve SLM' in LD₀ dozu 75 µg/mL olarak belirlendi. CP'nin LD₅₀ dozu olarak 65,6 µg/mL kullanılmıştır (Çizelge 4.1).

SLM'nin LD₀ dozu ve CP'in LD₅₀ dozunun birlikte uygulanması sonrasında hücrelerde comet ve mikronükleus testleri yapıldı. Her bir test için gruplarda 3 tekrarlı olacak şekilde flasklarda çalışıldı. Hücreler floresan mikroskop altında sayılarak incelendi. Comet testi için toplam 100 hücre ve MN testi için toplamda 1000 hücre sayıldı. Yapılan testlerin sonuçlarına göre SLM + CP (LD₀ + LD₅₀) dozunun birlikte uygulanması, DNA'da oluşan hasar seviyesini düşürdüğü gözlemlendi (p<0,05).

CP kanser tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. CP, HepG2 hücrelerinin büyümesini, gelişmesini ve proliferasyonunu durdurucu olarak görev yapmaktadır. SLM + CP dozunun kombinasyonu, bu durdurucu etkinin SLM ile birlikte çok daha fazla artmış olduğunu göstermiştir. Fakat CP'nin neden olduğu toksisitenin azaltılması için daha fazla araştırma ve çalışmalar yapılması gerekmektedir.



Şekil 4. 1 HepG2 hücrelerinde sitotoksitenin belirlenmesi.

Çizelge 4. 1 SLM' in uygulama grubu olan HepG2 hücreleri üzerindeki DNA hasar düzeyleri ve MN frekansları.

Uygulama Grupları	DNA Hasar Düzeyleri Komet Skorları (Arbitrary Unit)	MN Testi Frekansları (%)
Kontrol Grubu	5±2	0,0066±0,0057
SLM Grubu (75 µg/mL)	4,66±1,52	0,0066±0,0057
CP Grubu (66,5 µg/mL)	14±4 ^a	0,056±0,0208 ^a
SLM+CP Grubu	6,66±1,52 ^b	0,026±0,0115 ^b
P	0,000	0,000

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n=6). Deney grupları arasındaki istatistiksel farklar, harflerle üst simge (a, b) halinde ifade edilmiştir. Verilere (normal dağılım göstermediği için) non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis ve Man Whitney testleri uygulanmıştır.

a<0.05; istatistiki olarak kontrol grubundan farklı olan grupları ifade etmektedir.

b<0.05; istatistiki olarak cisplatin grubundan farklı olan grupları ifade etmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanser, ölüme neden olan hastalıklar arasında kalp hastalıklarından sonra gelmektedir (Batı Ayaz, Ayaz, Şahin, & Özdemir, 2019). Dünyada her yıl milyonlarca insana kanser tanısı konulmaktadır. Kanser tanısı konulan hastaların yarısından fazlası kanser nedeniyle hayatını kaybetmektedir (Aydoğan & Uygun, 2011).

Çevresel ve genetik faktörler, kanserin oluşmasını sağlayan faktörlerdir. Sigara, kimyasal ve fiziksel ajanlar, virüsler kansere neden olan çevresel faktörlerden bazılarıdır. Bireylerin yeterince fiziksel aktivite yapmaması, aşırı kahve tüketimi ve buna bağlı olarak dengesiz beslenmesi kanser oluşma riskini artırmaktadır (Pirinççi & Aygün Çevik, 2017).

Günümüzde kanser tedavisinde kemoterapi ve radyoterapi gibi birçok yöntem kullanılmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapide asıl amaç; kanser hücrelerine zarar vererek oluşan bu hücrelerin proliferasyonunu durdurarak yavaşlatmaya çalışmak ve kanserli hücreleri ortadan kaldırmaktır (Batı Ayaz, Ayaz, Şahin, & Özdemir, 2019).

Yapmış olduğumuz bu çalışma, hücre kültürü çalışması olmakla birlikte aynı zamanda bu çalışma kontrollü deneyler içermekte ve aşamalardan oluşmaktadır. Tanıda kullanılan altın standart yöntem; hücre kültürüdür (Çiçek, Aksoy Gökmen, Kalfaoğlu, & Saz, 2019). Farklı hücre kültür ortamlarının geliştirilmesi ile hücrelerin çoğalması, farklılaşması, büyüme faktörlerinin tanımlanmasında, çeşitli hücre tiplerindeki farklı mekanizmaların anlaşılmasında, hücre-hücre veya hücre-matriks etkileşimlerinde ve oluşturulan hastalık modellerinde ilaç adayı olabilecek moleküllerin etkilerinin belirlenmesi gibi birçok deneysel çalışmaların yapılmasında hücre kültürü kullanılmaktadır. Bu nedenden ötürü, hücre kültürleri; hücresel ve moleküler biyolojide kullanılan başlıca araçlardan biri olarak kullanılmaktadır (Koçancı & Aslım, 2019).

SLM, deve dikenli bitkisi olan *Silybum marianum* tohumlarından elde edilir. Tıbbi özelliklerinden dolayı birçok hastalığın tedavisinde yüzyıllar boyunca kullanılmıştır.

Karaciğerde meydana gelen birtakım reaksiyonlar reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu sağlar. Detoksifikasyon ile toksik maddelerin atılımı sağlanır. Yüksek seviyede toksinlere maruz kalınması anormal ROS üretimin tetikler ve oksidatif strese neden olur. SLM ile yapılan çalışmalarda güçlü bir ROS temizleyicisi olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda SLM'nin, karaciğer hücrelerini koruyucu farklı mekanizmaları olduğu da bilinmektedir (Gillesen & Schmidt, 2020). Yapmış olduğumuz çalışmada, HepG2 hücrelerinin CP toksikasyonu sonucu oluşan hasarda SLM'nin koruyucu etkileri araştırılmıştır.

CP iki aminoasit ve iki klora bağlı bir platin atomundan oluşur. Yapı olarak basit ve oldukça küçük olmasına rağmen çok güçlü antineoplastik bir ilaçtır. CP pürin bazlarının nükleofilik bölgeleri ile reaksiyona girerek kovalent bağlar yapar. Aynı zincir üzerinde bulunan pürin bazları DNA'da eklentilere neden olur. CP kaynaklı oluşan bu durum ise DNA'nın replikasyonunu inhibe eder. CP'nin bu kadar etkili olması, CP-temelli antikanser tedavilerinde zorluk oluşturur ve günümüzde oluşturmaya devam etmektedir (Silva, Reily Rocha, Quinet, Cabral-Neto, & Martins Menck, 2018). 1978'de FDA tarafından onay alan CP, yumurtalık ve testis kanserinde kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde ise halen birçok kanser türünde (akciğer, meme, servikal, mide, prostat kanserleri gibi) kemoterapötik bir ilaç olarak kullanılmaya devam etmektedir (Manohar & Leung, 2017). Yapmış olduğumuz çalışmada CP, HepG2 hücrelerinde toksikasyona sebep olmuş ve hasara yol açmıştır.

1970 yılından beri kullanılmakta olan genotoksisite testleri, genotoksik maddelerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Tümör oluşumu olan karsinogenezde, mutasyonların belirlenmesi ve kansere neden olan kimyasal ajanları tanımlamada genotoksisite testlerinin önemi büyüktür. Kansere neden olan bu kimyasal ajanların etkilerini belirlemek amacıyla farklı test sistemleri bulunmuştur. Kimyasal ajan özelliğindeki bir maddenin etkisi tek bir test sistemi ile incelenmemeli, birden çok test sistemleri kullanılarak incelenmelidir. Genotoksisite testlerinde ise in vivo- invitro test sistemleri birlikte kullanılmalıdır (Özparlak & Çelik, 2016).

MN testi, kromozomal düzeydeki hasarların belirlenmesi ve değerlendirilmesinde

kullanılan bir genotoksisite testidir. MN testi hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak uygulanabilmektedir (Şekeroğlu & Atlı Şekeroğlu, 2011).Günümüzde halen kullanılan MN, sitogenetik analizler için onaylanmış bir testtir (Özparlak & Çelik, 2016).

Comet testi, genotoksisite ve sitotoksisite etki gösteren bazı ajanların canlı hücrelerde meydana getirdiği DNA hasarını tespit etmekte kullanılır (Dikilitaş & Koçyiğit, 2010). Yaptığımız çalışmada, HepG2 hücreleri üzerinde SLM'nin genotoksik etkilerine bakılması amaçlanmıştır. Yapılan MN ve comet testleri sonucunda SLM uygulaması hücrelerde DNA'da hasar oluşumuna sebep olmadığı gözlemlenmiştir ve SLM genotoksik bulunmamıştır.

Elde ettiğimiz sonuçlarda SLM'nin kemoterapötik ajan CP'e karşı kanser gelişimini engelleyici, geriye çevirici ve önleyici bir etki gösterdiğini yani; SLM'nin HCC üzerinde kemopreventif etkisi olduğu tespit edilmiştir. Bu etki, yaptığımız çalışmada mikronükleus ve comet testinde uyguladığımız konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. Cisplatinin kimyasal yapısının serbest radikaller oluşturabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, oluşan serbest radikaller DNA'da hasar meydana getirerek zincir kırıklarına sebep olabilir. Yapılan çalışmada SLM'nin antigenotoksik etkisi tam olarak anlaşılmamasına rağmen, bu çalışmada CP toksikasyonu sonucu oluşmuş DNA hasarının azalttığı gözlemlenmiştir.

Çeçen vd. (2011), SLM'nin doksorubisine bağlı toksisitesi üzerine sıçan böbreği, kalbi ve karaciğeri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Doksorubisin grubu (10 mg/kg), SLM grubu (100 mg / kg) ve doksorubisin + SLM grubu (10 mg / kg, tek ip enjeksiyon) üzerinde her gün çalışılmış ve kalp, böbrek ve karaciğer kesitlerinin histopatolojik ve elektron mikroskobik incelemelerini yapmışlar ve elde edilen sonuçlara göre SLM, sıçan böbreği, kalbi ve karaciğere doksorubisinin neden olduğu toksisiteleri önemli ölçüde koruduğunu; doksorubisin içeren anti-kanser tedavilerinde destekleyici bir bakım maddesi olarak uygulanması önerilmiştir (Çeçen, Dost, Culhacı, Karul, Ergur, & Birincioglu, 2011).

Adriamisin, güçlü bir antikanser ajandır. Klinik kullanımı, belirgin kardiyotoksisitesi ve

nefrotoksitesitesi nedeniyle sınırlıdır. Bu çalışmada, doğal antioksidan SLM'nin adriamisinin neden olduğu kalp ve böbrek toksisitesi üzerindeki olası koruyucu rolünü araştırmışlardır. Dört grup sıçan üzerinde çalışmalar yapılmıştır (1 - kontrol grubu, 2 - SLM grubu (50 mg / kg), 3 - adriamisin grubu (10 mg / kg), 4 - adriamisin + SLM grubu). Elde edilen sonuçlar, SLM'nin erkek albino sıçanlarda adriamisin ile indüklenen kardiyotoksitesiteyi iyileştirdiğini ve ADR kaynaklı nefrotoksitesiteye karşı koruduğunu ortaya koymuştur (El-Shitany, El-Haggar, & El-desoky, 2008). Yapmış olduğumuz çalışmada da SLM, antikanserojenik bir ajan olan cisplatin kaynaklı oluşan DNA hasarını azalttığı düşünülmektedir.

Yurtçu vd. (2014), doksorubisin, SLM veya doksorubisin + SLM halinde HepG2 hücreleri üzerindeki genotoksik ve sitotoksik etkilerini 24 ve 48 saat boyunca araştırmışlardır. Hem doksorubisin hem de SLM, hücre proliferasyonunun doza bağlı inhibisyonuna neden olmuştur. SCGE sonuçlarına göre, doksorubisin zamana bağlı DNA hasarına neden olduğunu gözlemlemişlerdir. SLM'nin sitotoksik ve genotoksik potansiyeli göz önüne alındığında, karşılaştırılabilir sonuçlar elde etmişlerdir ve bu sonuçlara göre; konsantrasyona ve zamana bağlı olarak HepG2 hücrelerinin büyümesini inhibe etmiş, hücreler 24 saatlik SLM tedavisinden sonra yaklaşık % 50'ye düşmüş, hem doksorubisin hem de SLM 24 ve 48 saat sonra apoptotik ve nekrotik hücre ölümüne neden olmuştur. Aynı zamanda doksorubisin ve SLM'nin kombine uygulamaları, tek ajan uygulamalarına göre 24 saatte daha yüksek apoptoz ve hücrelerin nekrozuna neden olduğu gösterilmiştir (Yurtçu, İşeri, & Şahin, 2014).

Yapmış olduğumuz tez çalışmasının sonuçlarına göre, SLM'nin HepG2 hücreleri üzerinde genotoksik bir etkiye sahip olmadığı ortaya konulmuştur. CP kaynaklı oluşan hasarı azaltmada SLM'nin terapötik yönünün olabileceği ve kullanılabileceğini düşünülmüştür. Fakat SLM'nin farklı etki mekanizmalarını açıklamak için ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu sayede bu bileşik koruyucu tedavi olan kemoterapi aşamasında, kanserin nüks etkilerini azaltmada yani bir adjuvan tedavi olarak uygulanabilir ve ilerde yapılacak çalışmalara ışık tutabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Aktaş İ, Sevimli M, 2020, Protective Effects of Silymarin on Brain Injury in Rats. *Van Veterinary Journal* , 87-92.

Altın G, 2006, Silybum marianum L. Gaertner ve fitoterapideki önemi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi , 63s, Ankara.

Arslanbaş Ü, 2010, Sisplatine Bağlı Karaciğer Hasarında Üzüm Çekirdeği Özütü Ve Esansiyel Kekik Yağının Etkilerinin Araştırılması, Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi , 80s, Kayseri.

Aslan Ö, Vural H, Kömürcü Ş, Özet A, 2006, Kemoterapi alan kanser hastalarına verilen eğitimin kemoterapi semptomlarına etkisi. *Cumhuriyet Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi*, 15-28.

Atlı Şekeroğlu Z, Şekeroğlu V, 2011, Genetik Toksisite Testleri. *Tübbav Bilim Dergisi*, 221-229.

Atlı Z, 2019, Metotreksat İle Sıçan Testislerinde Oluşturulan Hasar Üzerine Silimarinin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması, Dicle Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi , 126s, Diyarbakır.

Aydın Arslan B, Yolcu M, 2019, Antikanser İlaç Etken Madde Busulfana Seçici Katı-Hal PVC Membran Potansiyometrik Mikrosensör. *Erzincan University Journal of Science and Technology*, 469-478.

Aydın G, Ercan A, 2012, Gene Expression Levels of Apoptotic Proteins and Multidrug Resistance Genes in HEPG2 Cells. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy* , 119-132.

Aydoğan F, Uygun K, 2011, Kanser Hastalarında Palyatif Tedaviler. *Klinik Gelişim*, 24,

4-9.

Aydoğan M, Çavuşoğlu K, Yalçın E, 2018, Ames / Salmonella / Mikrozom Testi ile Parabenin (p-hidroksibenzoik asit metil ester) Mutajenik Aktivitesinin Araştırılması. *Gaziosmanpaşa Journal of Scientific Research*, 7 (3), 181-188.

Aygün Çevik B, Pirinççi E, 2017, Beslenme ve Kanseri. *Fırat Tıp Dergisi*, 22 (1), 001-007.

Balkan B M, Kısmalı G, Turan D, Balkan A B, Sel T, 2017, How Does IL-6 Addition Effects Caspases Activities In HEPG2 Cell Line? *MAKÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi* , 85-92.

Baran Y, Kiraz Y, 2014, *Çevresel Faktörlerin Kanserin Oluşumu Üzerine Etkileri*. İzmir: 67.Türkiye Jeoloji Kurultayı.

Barbaros B, Dikmen M, 2015, Kanseri İmmünoterapisi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 31 (4), 177-181.

Batı Ayaz G, Ayaz U, Şahin Ö, Özdemir S M, 2019, Epigenetics and Cancer. *Madde, Diyalektik ve Toplum*, 2, 94-103.

Baykara O, 2016, Kanseri Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5 (3), 154-165.

Becit E, 2017, Pknogenol ve Kurkuminin Çeşitli Kanseri Hücre Hatlarında Sisplatin Sitotoksitesine Etkilerinin İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi , 171s, Ankara.

Bedir A, Bilgici B, Yurdakul Z, Gürsel B Ş, Alvr M, 2004, The Comparison of μ -FADU and COMET Methods in DNA Damage Analysis. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* , 97-103.

Beytur A, Tekin S, Keleştimur T, Ergin Z, Sandal S, 2011, Yeni Sentezlenen Bir Tiyosemikarbazon Türevinin Prostat Kanseri Hücre Kültürleri Üzerine Antikanserojenik Özelliklerinin Belirlenmesi: In Vitro Bir Çalışma. *F.Ü.Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi* , 25-32.

Bilge Z, 2010, Kanserli Hastaların Tamamlayıcı Ve Alternatif Tedavi Yöntemlerini Kullanımı, Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 72s, Diyarbakır.

Bilgen S, 2008, Akciğer Kanserinde Metabolik (Cyp1) Polimorfizminin İlaç Rezistansındaki Rolü, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 71s, Ankara.

Camini F C, da Silva T F, da Silva Caetano C C, 2018, Antiviral activity of silymarin against Mayaro virus and protective effect in virus-induced oxidative stress. *Antiviral Research* , 8-12.

Cigerci İ H, Liman R, Kutlu H M, Aydoğan G, Konuk M, 2007, Eber Gölü Ve Akarçay Suyunun Mutajenik Özelliklerinin Ames Salmonella/Mikrozom Testi İle Araştırılması. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 215-223.

Cui H, Gao Q, Zhang L, Han F, Wang L, 2018, Knockdown of FOXK1 suppresses liver cancer cell viability by. *Life Sciences* , 66-73.

Çeçen E, Dost T, Culhacı N, Karul A, Ergur B, Birincioglu M, 2011, Protective effects of silymarin against doxorubicin-induced toxicity. *Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention* , 2697-2704.

Çelik A S, Kan Y, 2013, Konya Ekolojik Şartlarında Yetiştirilen Meryemana Dikeni Bitkisinin (Silybum marianum) Tohum Verimi, Silimarin ve Sabit Yağ Bileşenlerinin Belirlenmesi. *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi* , 24-31.

Çevik Ö, Aydın U, 2012, Kanser Tedavisinde Lenfatik Hedeflendirme. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 32 (1), 67-90.

Çiçek C, Aksoy Gökmen A, Kalfaoğlu H, Saz E U, 2019, Gastroenterit semptomları olan olgularda adenovirüs sıklığının shell-vial hücre kültürü yöntemi ile saptanması. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 76 (2), 177-182.

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

Demirkaya A K, Gündoğdu G, Dodurga Y, Seçme M, Gündoğdu K, 2019, Parietinin HepG2 Hepatoselüler Karsinom Hücrelerinde Sitotoksik ve Genotoksik Etkisinin Belirlenmesi. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.* , 29-37.

Dikilitaş M, Koçyiğit A, 2010, Canlılarda “Tek Hücre Jel Elektroforez” Yöntemi İle Dna Hasar Analizi (Teknik Not): Comet Analiz Yöntemi. *HR.Ü.Z.F. Dergisi*, 14 (2), 77-89.

Dizman F, 2019, Ratlarda Cisplatinin Oluşturduğu Karaciğer Hasarında Beyaz Çayın Etkisi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 76s, Rize.

Durmaz A, Dikmen N, Gündüz C, 2010, DNA Hasar Analizinde Tek Hücre Jel Elektroforezi (Komet Yöntemi). *ARŞİV* , 236-243.

El-Shitany N A, El-Haggar S, El-desoky K, 2008, Silymarin prevents adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2422-2428.

Eren H B, Şar S, 2020, Meryemana Dikeni Bitkisi: Farmakolojik ve Folklorik Bir Değerlendirme. *Lokman Hekim Dergisi* , 23-27.

Ersöz Ç, Çolak D A, 2019, Sisplatin ve valproik asitin indüklediği toksisiteye karşı kudret narının *Drosophila melanogaster*'in yaşama yüzdesi ve ömür uzunluğu üzerine etkisi. *Eurasian J Bio Chem Science* , 73-78.

Faedmaleki F, Shirazi F H, Salarian A -A, Ashtiani H A, Rastegar H, 2014, Toxicity Effect of Silver Nanoparticles on Mice Liver Primary Cell Culture and HepG2 Cell Line. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* , 235-242.

Fidan A F, 2008, DNA Hasar Tespitinde Tek Hücre Jel Elektroforezi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi* , 41-52.

Ghosh S, 2019, Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry* , 1-20.

Gillessen A, Schmidt H H J, 2020, Silymarin as Supportive Treatment in Liver Diseases: A Narrative Review. *Advances in Therapy* , 1279-1301.

Günay Y, Güler N, Akyıldız M, Dayangaç M, Yaprak O, Yüzer Y, et al. 2013, Hepatosellüler karsinoma ve canlı vericili karaciğer nakli; kanser nüksü ve hasta sağkalımını etkileyen faktörler. Tek merkez deneyimi. *Gaziantep Tıp Dergisi* , 173-179.

Güner U, Gökalp Muranlı F D, 2013, Balıklarda Tek Hücre Jel Elektroforezi (Comet Assay). *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 103-114.

Gür C, 2014, Akciğer Kanseri Hücre Hattında Cetuximab, Cisplatin Ve Melatonin Uygulamalarının P53 Geni Ve Apoptoz Aktivasyonu Üzerine Etkilerinin Araştırılması., Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi , 80s, Erzurum.

Güvenalp N, 2019, HepG2 Hücre Hattının Canlılığı Üzerine Medium pH'sının Etkilerinin İncelenmesi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 57s, Samsun.

İnciser Paşalak Ş, Seven M, 2017, Genetic Advances in Oncology and the Effects on Nursing Roles. *Hemşirelikte Eğitim Ve Araştırma Dergisi* , 212-217.

İsan H, Cilacı Tombuş A, Doğru H O, Şanlı G, Gülhan Aktaş R, 2016, Karaciğer Kanseri Hücrelerinin Sitoplazmik Özellikleri ile Kültür Süreci İlişkisi: Konfokal Mikroskopik Karşılaştırmalı Kantitatif Bir Çalışma. *Maltepe Tıp Dergisi*, 8 (3), 18-23.

İsan H, Tombuş Ö, Göklü M E, Tüfekçi K, Gülhan Aktaş R, 2016, Karaciğer Kanseri Hücrelerinin Büyüme, Çoğalma ve Morfolojileri Üzerine Farklı Kültür Yüzeylerinin Etkisi. *Maltepe Medical Journal*, 8, 12-17.

Karakaya A E, Karakaya A, 1983, Karsinojenik Etkinin Kısa Süreli Testler ile Saptanması ve Ames Test. *FABAD Farm. Bil Der.* , 8-18.

Katar D, Yaman H, Subaşı İ, Arslan, Y, 2013, Meryemana Dikeni (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) Bitkisi Tohumlarına Farklı Dozlarda Gama Işını Uygulamasıyla Elde Edilen M1 Bitkilerinin Fidelerinin Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* , 78-83.

Kocaman D, Dabak D Ö, 2015, Hepatoprotektif bir ajan: Silymarin. *Fırat Tıp Dergisi*, 20 (3), 128-132.

Koçaklı Z G, Akıllıoğlu K, Doğan A, 2015, Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültürü. *Archives Medical Review Journal* , 390-401.

Koçancı F G, Aslım B, 2019, Üç Boyutlu Hücre Kültürü Modelleri ve Uygulamaları. *Türkiye Klinikleri Dergisi* , 8-14.

Kontaş S, Atlı Şekeroğlu Z, Şekeroğlu V, 2011, Kardeş Kromatid Değişimi Testi Ve Kullanım Alanları. *Tübav Bilim Dergisi* , 226-234.

Kuş G, 2017, Hepatosellüler Karsinom Hücrelerinde Karmofurun Sitotoksik Ve

Apoptotik Etkileri. *Kocatepe Medical Journal* , 55-60.

Liang L, XiaoDuo Z, Wei L, Hongyang S, HangYu Z, Meili S, 2018, Protective effects of silymarin on acrylamide-induced oxidative damage in HepG2 cells. *Food Science*, 39 (1), 238-242.

Ma X, Yan L, Zhu Q, Shao F, 2017, Puerarin attenuates cisplatin-induced rat nephrotoxicity: The involvement of TLR4/NFκB signaling pathway. *PLOS One* , 1-15.

Manohar S, Leung N, 2017, Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. *Nephrol Journal* , 15-25.

Olgun P D, Şimşek H H, 2010, Kemoterapi Hazırlayan ve Uygulayan Hemşirelerin Güvenlik Önlemlerini Kullanma Durumları ve Önlem Almalarını Etkileyen Faktörler. *Sağlık Bilimleri Fakültesi Hemşirelik Dergisi* , 13-23.

Öğüt Düzen K, Korkmaz M, 2015, Kanser Hastalarında, Semptom Kontrolü Ve Tamamlayıcı Ve Alternatif Tıp Kullanımı. *Dokuz Eylül Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Elektronik Dergisi* , 67-76.

Öner Ç, İsan H, Gülhan Aktaş R, Çolak E, 2020, The Effect of Vitamin D on Hepatocellölar Carcinoma. *Osmangazi Journal of Medicine* , 301-310.

Özgüç S, Kayalar H, Zeybek U, 2018, Meme Kanserinde Etkili Tıbbi Bitkiler Ve Seconder Metabolitleri. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi* , 42-62.

Özparlak H, Çelik B, 2016, Tavuk Yumurtası Mikronükleus Testi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* , 17-28.

Pazarbaşı A, Kasap M, 2003, Kanser Genetiği. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* , 328-340.

Perše M, VeJeriT-Haler C, 2018, Cisplatin-Induced Rodent Model of Kidney Injury: Characteristics and Challenges. *BioMed Research International* , 1-29.

Pirinçi E, Aygün Çevik B, 2017, Beslenme ve Kanser. *Fırat Tıp Dergisi*, 22 (1), 1-7.

Sabuncuoğlu S, Özgüneş H, 2011, Sisplatin Toksisitesi: Oksidatif Stresin Önemi Ve Antioksidanların Etkisi. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi*, 74 (1), 18-25.

Sayılan Özgün G, Özgün E, Tabakçioğlu K, Süer Gökmen S, Eskiocak, 2019, Effect of palmitate-induced steatosis on paraoxonase-1 and paraoxonase-3 enzymes in human-derived liver (HepG2) cells. *Arch Clin Exp Med* , 142-147.

Sayın F K, 2012, Silybum Marianum Ekstresinin Yüksek Yağlı Diyetle Beslenen Ratlarda İnsülin Rezistansı, Karaciğer Fonksiyonları, Lipit Düzeyleri Ve Leptin Seviyesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 82s, Konya.

Sezginer H, Dane F, 2016, Toksik Maddelerin Genotoksik Analiz Yöntemleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* , 50-55.

Silva M M, Reily Rocha C R, Quinet A, Cabral-Neto J B, Martins Menck C F, 2018, DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *CLINICS* , 478s.

Sırcan Küçüksayan A, Küçüksayan E, 2020, Geri Yansıma Spektroskopisi ile Hücre Kültürü Çalışmalarında Hücre Sayısının Belirlenmesi İçin Yeni Bir Metot. *Sdı Sağlık Bilimleri Dergisi*, 11, 231-235.

Soysal Y, Şahin F İ, Menevşe S, 2008, İnsan lenfosit hücre kültüründe melatonin ve b-karotenin mitomisin C ile indüklenmiş kardeş kromatid değişimi sıklığı üzerine in vitro etkileri. *S.D.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* , 23-29.

Sun H-y, Li L, Zhao H-Y, Shao M-l, 2017, Silymarin protects against acrylamide-induced neurotoxicity via Nrf2 signalling in PC12 cells. *Food and Chemical Toxicology*

, 93-101.

Süzgeç-Selçuk S, Eyisan S, 2012, Türkiye’deki eczanelerde bulunan bitkisel ilaçlar. *Marmara Pharmaceutical Journal* , 164-180.

Şekeroğlu V, Atlı Şekeroğlu Z, 2011, Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* , 241-252.

Tarhan S, 2013, ε- Viniferinin Tek Başına Ve Kemoterapötik Bir Ajan İle Birlikte Hepg2 Hücreleri Üzerine Antioksidan Etkisinin İncelenmesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi , 111s, Eskişehir.

Taş B M, Şimşek G, 2017, Cisplatin Ototoxicity. *Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* , 30-36.

Tatar G, Şengül, E, İsan H, Gülhan Aktaş R, 2016, Karaciğer Kanseri Hücre Kültürlerinde Pasaj Sayısının Sferoid Oluşumuna Etkisi. *Maltepe Medical Journal*, 8 (3), 24-28.

Terzioğlu G, Keskin A Ü, Yanıkkaya Demirel G, 2013, Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması. *Turkish Journal of Immunology* , 74-89.

Tozkoparan B, Aytaç S P, 2007, Kanseri Kemoterapisinde Terapötik Hedef Olarak Glutasyon S-Transferazlar. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 27 (2), 139-164.

Türkmen G E, 2019, Karaciğer Hastalıklarında Kullanılan Fitoterapötiklerde Farmakognozok Araştırmalar, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 147s, İzmir.

Üstündağ S, 2013, Kemoterapi Alan Kanseri Hastalarının Semptom Yönetiminde

Kullandıkları Tamamlayıcı Tedavi Yaklaşımlarının Yaşam Kalitesine Etkisi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi , 128s, Ankara.

Yeni D, Fidan A F, Gündoğan M, 2010, Spermatozoon'da Tek Hücre Jel Elektroforezi (SCGE) ile DNA Hasarı Tespiti. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 24 (3), 167-173.

Yokuş B, Çakır D Ü, 2012, Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* , 7-18.

Yurtçu E, İşeri Ö, Şahin F, 2014, Genotoxic and cytotoxic effects of doxorubicin and silymarin on human hepatocellular carcinoma cells. *Human and Experimental Toxicology* , 1-8.

Yücel D, 2018, Cytotoxic effects of Satureja cuneifolia extract in liver cancer cell line (HepG2). *Biological Diversity and Conservation*, 11 (2), 42-46.

Yüzbaşıoğlu D, Zengin N, Ünal F, 2014, Gıda Koruyucuları Ve Genotoksisite Testleri. *GIDA* , 179-186.