



**HepG2 HÜCRELERİNDE
ROSMARİNİK ASİDİN
CİSPLATİN TOKSİKASYONUNA ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gizem SAÇLI

**Danışman
Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI**

Haziran 2019

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HepG2 HÜCRELERİNDE ROSMARİNİK ASİDİN
CİSPLATİN TOKSİKASYONUNA ETKİLERİ**

Gizem SAÇLI

**Danışman
Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI**

Haziran 2019

TEZ ONAY SAYFASI

Gizem SAÇLI tarafından hazırlanan “HepG2 HÜCRELERİNDE ROSMARİNİK ASİDİN CİSPLATİN TOKSİKASYONUNA ETKİLERİ” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 21/06/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

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

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

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

İmza

Rf

İmza

İmza

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

Prof. Dr. İbrahim EROL
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI
Afyon Kocatepe Üniversitesi

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

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

beyan ederim.

21/06/2019


Gizem SAÇLI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HepG2 HÜCRELERİNDE ROSMARİNİK ASİDİN CİSPLATİN TOKSİKASYONUNA ETKİLERİ

Gizem SAÇLI

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Tıbbi bitkiler yalnızca terapötik ajan olarak değil, farmakolojik araştırmalar ve ilaç geliştirme için önemlidir. Günümüzde fitoterapiye (phytos: bitki, therapy: tedavi) ilgi artmıştır. Özellikle dermatolojik hastalıklar, enfeksiyonlar ve çeşitli kanser hastalıklarının tedavisinde fitoterapi kullanılmaktadır.

Biberiye, kekik gibi bitkilerde bulunan, doğal antioksidan olan rosmarinik asit (RA), antimikrobiyal etkiye de sahiptir. Kemoterapik ajan olan cisplatin (CisP), kanser hücrelerinde gelişimi ilerlemeyi durdurucu etki gösterirken bununla birlikte sağlıklı hücreleri de yok etmektedir. Kemoterapik ilaçlarla birlikte fitoterapik bileşikler kullanılarak antikanser etkinin artırılması ve yan etkilerin ise azaltılması amaçlı çalışmalar yapılmaktadır. Sunulan çalışmada karaciğer karsinom hücrelerini (HepG2) kullanarak, rosmarinik asitin cisplatin toksikasyonuna etkilerini; MTT yöntemi (3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid), mikronükleus testi ve komet yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Bu amaçla RA ve CisP'nin HepG2 hücrelerinde MTT yöntemi ile sitotoksitesi belirlendi ve farklı konsantrasyonlarda hücre canlılığı etkisine bakıldı. Sonrasında RA'nın CisP ile kombinasyonunda mikronükleus testi ve komet yöntemi ile DNA hasar tespiti ile antikanser etkilerine açıklık getirilmesi incelenmiştir. RA'nın HepG2 hücrelerinde sitotoksitesi belirlenirken kontrol grubu, 0,125 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1,25 mM, 2,5 mM, 6,25 mM, 12,5 mM, 25 mM, 50 mM dozları

kullanıldı. RA'in LD₅₀ değeri 13,8 mM ve LD₀ değeri ise 0,01 mM bulundu. Sitotoksosite analizi sonuçlarına göre RA konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığı azalmıştır. CisP dozları ise 10 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL, 600 µg/mL, 800 µg/mL, 1000 µg/mL kullanıldı. Sisplatinin HepG2 hücrelerinde LD₅₀ değeri 11,06 µg/ml olarak bulundu. RA ve CisP'e ait LD₅₀ dozları belirlendikten sonra, HepG2 hücreleri yeterince çoğaltılarak hücrelerden 4 grup oluşturuldu. Her grupta n sayısı en az 3 olacak şekilde çalışıldı.

Gruplar; kontrol grubu, RA grubu, CisP grubu ve RA+CisP grubu şeklinde planlandı. RA'in CisP toksikasyonuna etkisi belirlenirken LD₀ dozu kullanıldı. CisP 'in ise LD₅₀ dozu kulanıldı. Deney gruplarına uygulamalar yapıldıktan 24 saat sonra elde edilen hücreler komet ve mikronükleus testlerinde kullanıldı.

Elde edilen sonuçlar CisP'nin HepG2 hücrelerinde genotoksisiteyi artırdığını, LD₀ dozunda RA'in ise CisP toksikasyonu sonucu oluşan genotoksisiteyi azaltabileceğini akla getirmektedir. Fakat bunun daha net ortaya konabilmesi için, bu tez çalışmasında yapılan uygulamaların, sağlıklı hücrelerle eş zamanlı bir şekilde tekrarlanmasının yararlı olabileceği düşünülmektedir.

2019, xii + 62 sayfa

Anahtar Kelimeler: Komet yöntemi; sisplatin; rosmarinik asit; mikronükleus test; HepG2 hücreleri, MTT test.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

THE EFFECTS OF ROSMARINIC ACID ON CISPLATIN TOXICITY IN HepG2 CELLS

Gizem SAÇLI

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Medicinal plants are important not only as therapeutic agents, but also for pharmacological investigations and drug development. Today phytotherapy (phytos: plant, therapy: treatment) has increased interest. Phytotherapy is used for the treatment of dermatological diseases, infections and various cancer diseases.

Rosmarinic acid (RA), a natural antioxidant, found in many plants such as rosemary, oregano, has antimicrobial effect. The chemotherapeutic agent, cisplatin (CisP), has a progressive effect on the development of cancer cells, but it also destroys healthy cells. Chemotherapeutic drugs are used together with phytotherapeutic compounds to increase the anticancer effect and reduce cytotoxicity. In our study, the effects of rosmarinic acid on cisplatin toxicity were examined by MTT method (3-(4,5-dimethyltriazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid), micronucleus test and comet method on liver carcinoma cells (HepG2). The cytotoxicity of RA and CisP in HepG2 cells was determined by MTT by using different concentrations. Then, RA with CisP were used in combination to evaluate the DNA damage by micronucleus test and comet method.

Different doses of RA were used, 0,125 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1,25 mM, 2,5 mM, 6,25 mM, 12,5 mM, 25 mM, 50 mM on HepG2 cells along with control group for 24-hour. The LD₅₀ value was 13,8 mM and the LD₀ value was 0,01 mM. According to the MTT method results, cell viability decreased as RA concentration increased. CisP doses

were 10 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL, 600 µg/mL, 800 µg/mL, 1000 µg/mL used. The LD₅₀ value was found to be 11,06 µg/mL. After LD₅₀ doses of RA and CisP were determined, HepG2 cells were sufficiently amplified to form 4 groups of cells. In each group, the number of n was studied at least 3. Groups; control group, RA group, CisP group and RA + CisP group. LD₀ dose was used to determine the effect of RA on CisP toxicity. LD₅₀ dose of CisP was used. 24 hours after the application to the experimental groups, the obtained cells were used in comet and micronucleus tests.

The results suggest that CisP increases genotoxicity in HepG2 cells and that LD₀ dose of RA may reduce genotoxicity caused by CisP toxicity. However, in order to make this clearer, it is thought that it may be useful to repeat the applications performed in this thesis study simultaneously with healthy cells.

2019, xii + 62 pages

Keywords: Comet assay; cisplatin; rosmarinic acid; micronucleus test; HepG2 cells, MTT assay

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ'ye, araştırma süresince yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Ömer HAZMAN'a, her konuda önerileriyle yardımını gördüğüm Doç. Dr. Recep LİMAN'a teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olduğunu hissettiren, maddi ve manevi desteği gösteren aileme teşekkür ederim.

Gizem SAÇLI
AFYONKARAHİSAR, 2019

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	3
2.1 Kanser	3
2.1.1 Karaciğer Kanseri Hücresi (HepG2).....	8
2.2 Rosmarinik Asit (RA).....	11
2.2.1 Rosmarinik Asitin Antioksidan Etkisi	12
2.2.2 Rosmarinik Asitin Genotoksik ve Antigenotoksik Etkileri	14
2.3 Cisplatin.....	15
2.3.1 Genel Özellikleri ve Moleküler Yapısı.....	15
2.3.2 Cisplatin Toksik etki Mekanizmaları.....	16
2.3.3 Cisplatin Toksisitesi.....	17
2.4 DNA Hasarı	18
2.4.1 Komet Yöntemi.....	20
2.4.2 Mikronükleus Testi.....	22
3. MATERYAL ve METOT	25
3.1.1 Cihazlar.....	25
3.1.2 Kimyasallar.....	25
3.2 Hücre Kültürü	26
3.2.1 Hücre Kültürü Mediyumun Hazırlanması	28
3.2.2 HepG2 Hücre Hattının Kültüre Aktarılması.....	29
3.2.3 HepG2 Hücre Hattının Pasajlanması	34
3.2.4 HepG2 Hücre Hattının Sıvı Azotta Saklanması	38

3.2.5 Hücre Sayımı ve Canlılığının Belirlenmesi	41
3.3 MTT Yöntemi	43
3.3.1 MTT Hazırlanması.....	44
3.3.2 MTT Yöntemi ile HepG2 Hücreleri Üzerine RA'in LD ₀ Belirlenmesi.....	44
3.4 Komet Testi.....	45
3.5 Mikronükleus Testi	47
3.6 İstatistiksel Analiz.....	48
4. BULGULAR	49
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	52
6. KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	62

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

dH ₂ O	Distile su
HO-1	Heme oxygenase 1
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
OH [•]	Hidroksil radikali
Ma	Miliamper
μM	Mikromolar
Mm	Milimolar
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
O ₂ ^{•-}	Süperoksit radikali
mM	Milimolar
IL-6	İnterlökin 6
>	Büyüktür
<	Küçüktür

Kısaltmalar

RA	Rosmarinik asit
CisP	Cisplatin
HepG2	Hepatocellular karsinoma (Karaciğer kanser hücresi)
Mcf7	Michigan Cancer Foundation-7 (Göğüs kanser hücresi)
MDA	Malondialdehit
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
LD	Letal Doz
GSTP	Glutasyon-s-transferaz Pi
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
V79	Lung fibroblast cell (Akciğer fibroblast hücresi)
MAPK	Mitojen aktive proteinkinazlar
TNCB	Üçlü negatif meme kanseri
MSP-MB	Isı şoku proteini
HSK	Hepatoselüler karsinom
CCC	İntrahepatik kolaniyosellüler karsinom
PHEN	Fenantrolinin
DXR	Doksorubisin
SCGE	Tek hücreli jel elektroforez
ROS	Reaktif oksijen türleri
KD	Kadmiyum
KE	Klorprifos-etil
AD	Alzheimer hastalığı
FTC	Ferrik tiyosiyanat
Pt	Platin
Pt-GSH	Glutasyon konjugatları
GGT	Gamaglutamil transpeptidaz

APN	Aminotransferaz
CCBL	Sistein-s-konjugat beta liyaz
MN	Mikronükleus
MÇ	Mikroçekirdek
N ₂ A	Nöral Hücreleri
CCBL	Sistein-s-konjugatbetaliyaz
FISH	Fluorescent in situ hybridization
HBV	Hepatit B
HCV	Hepatit C
DHEAS	Dehidroepiandrosteron sülfat
FBS	Fetal Bovine Serum



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Hücre bölünmeleri	3
Şekil 2.2 İnsan kanserlerinde MAPK ve PI3K yolaklarındaki değişimlerden bir görünüm	4
Şekil 2.3 Klinik çalışmalarda kullanılan Wnt	6
Şekil 2.4 Rosmarinik Asit yapısal formülü.....	11
Şekil 2.5 Sisplatinin moleküler yapısı ve özellikleri.....	15
Şekil 2.6 Oluşan DNA hasarının bölgeleri.....	19
Şekil 2.7 DNA Hasar çeşitleri.....	20
Şekil 2.8 Klastojenler ve Anojenler tarafından uyarılarak oluşan mikronükleuslar	22
Şekil 2.9 <i>İn vivo</i> mn yöntemi	23
Şekil 2.10 <i>İn vitro</i> mn yöntemi.....	24
Şekil 4.1 HepG2 Hücrelerinde Sitotoksitenin Belirlenmesi.....	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1 Mediyumun hazırlanması.....	28
Çizelge 3.2 Lzis çözeltisinin hazırlanması.....	45
Çizelge 3.3 Elektroforez çözeltisinin hazırlanması.....	45
Çizelge 3.4 Nötralizasyon çözeltisinin hazırlanması	46
Çizelge 3.5 KCL çözeltisinin hazırlanması.....	47
Çizelge 4.1 RA' in Uygulama grubu HepG2 hücrelerinde DNA hasar düzeyleri ve MN Frekansları.....	51



RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

Resim 2.1 Karaciğer Karsinom Hücrelerinin (HepG2) mikroskop görüntüsü.....	9
Resim 3.1 Mediyumun hazırlanması.....	29
Resim 3.2 Flask kodlaması	30
Resim 3.3 Santrifüj sonrası falkonda biriken hücre pelleti	30
Resim 3.4 Hücre homojenizasyonu.....	31
Resim 3.5 Hücre 1. yıkama işlemi.....	31
Resim 3.6 Hücre 2. yıkama işlemi	32
Resim 3.7 Kullanılan pipet uçlarının sterilizasyonu	32
Resim 3.8 Flasklara mediyum eklenmesi	33
Resim 3.9 Flasklara hücrelerin eşit dağılması	33
Resim 3.10 Hücre konfluent oranının gözlenmesi	34
Resim 3.11 Flasktan mediyumun dışa aktarımı.....	34
Resim 3.12 Tripsinijasyon.....	35
Resim 3.13 Flask yüzğine tripsin yaydırılması	35
Resim 3.14 İnkübatör içerisine flask dizimi	36
Resim 3.15 Hücrelerin flask yüzğinden ayrılma kontrolü	36
Resim 3.16 Hücre ekimi	37
Resim 3.17 İnkübatör düzeni	37
Resim 3.18 HepG2 Hücre Konfluenti	38
Resim 3.19 Tripsin yayılımı.....	38
Resim 3.20 Flask sterilizasyonu	39
Resim 3.21 Hücrelerin falkonda toplanması	39
Resim 3.22 Hücrelerin homojenizasyonu pipet ile sağlandı	40
Resim 3.23 Mikropipet ile hücre homojenizasyonu.....	40
Resim 3.24 Süpernatant uzaklaştırılması.....	41
Resim 3.25 Hücre sayım lam görüntüsü.....	42
Resim 3.26 Saf su ile ilk aşama kabin temizliği.....	42
Resim 3.27 %70lik etil alkol ile ikinci aşama kabin temizliği.....	43
Resim 3.28 HepG2 Hücrelerine Doz Uygulaması.....	43
Resim 3.29 Flasktaki hücelere tripsin eklenmesi.....	45
Resim 4.1 HepG2 Hücrelerine MTT Uygulaması.....	49
Resim 4.2 Farklı doz uygulamaları sonucu HepG2 canlı hücre görseli.....	50

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerde DNA'nın hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalmasıyla oluşup, dünyada ve ülkemizde ölüm nedeni olarak kardiyovasküler sistem hastalıklardan sonra ikinci sırada yer almaktadır. Klasik tedavi yöntemleri; cerrahi tedavi, kemoterapi ve radyoterapidir. Bu tedavi yöntemlerine ek olarak alternatif tedaviler, lazer tedavisi, gen tedavisi, immünoterapi, anjiogenez inhibitörleri, kemik iliği transplantasyonu, kök hücre nakli gibi tedavi yöntemleri de bulunmaktadır (Öğüt Düzen *et al.* 2015).

Kemoterapi, kanser tedavisinde neoplastik hastalığın sürecini yavaşlatmak, geriletmek ya da durdurmak amacıyla konakçıya zarar vermeden hastalık etkenine göre; antibakteriyel ilaçlar, antifungal ilaçlar, antitüberküloz ilaçlar, antiviral ilaçlar, antihelmentik ilaçlar ve antineoplastik ilaçlarla uygulanan tedavi yöntemidir. Kemoteröfik ajanlar; sitotoksik ilaçlar, homonlar ve hormon antagonistleri, alkilleyici ajanlar, biskloretilaminler, nitrozüreler, triazenler ve hidrozin türevleri, antimetabolitler, purin antimetabolitleri, primidin antimetabolitleri, bitkisel kaynaklı antineoplastik ilaçlar, sitotoksik antibiyotikler, sisplatin ve türevleridir (Eren *et al.* 2012).

Kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan kemoterapötik ajan cisplatin (CisP), birçok tümörün tedavisinde kullanılan güçlü bir antineoplastik ilaçtır. Güncel çalışmalara bakıldığında kemoterapötik ilacın yanında çeşitli birçok bitkisel kaynaklı bileşikler kullanılmaktadır. Özellikle fenolik bileşikler kullanılarak antikanser etkinin artırılması, sitotoksitenin azaltılması amaçlanmakta ve araştırılmaktadır. CisP'in kanser kemoterapisinde etkinliğini artırmak, direnç gelişimini azaltmak ve toksisitesini azaltmak için diğer antikemoterapötikler ve antioksidan maddeler ile kombine kullanımının pozitif sonuçlar doğurduğu birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur. Fakat CisP'in antikanser tedavisini iyileştirmek ve neden olduğu toksik etkilerin azaltılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Fenolik maddelerin kanser üzerine etkilerinin aydınlatılması ve daha ileri düzey araştırmaların yapılması gerekmektedir (Becit 2017).

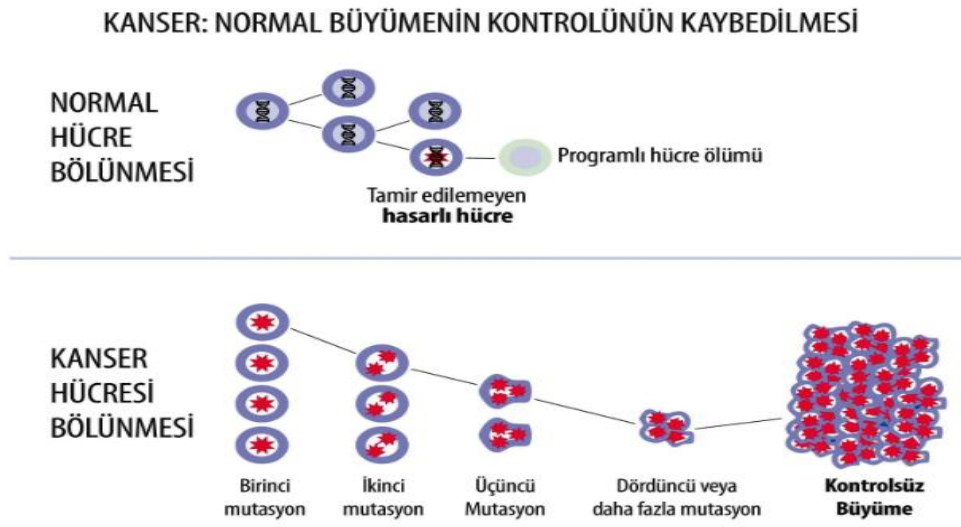
Bu tez çalışmasında karaciğer karsinomu (HepG2) hücre hattı üzerinde rosmarinik asitin (RA) kemoterapik tedavide kullanılan CisP ile toksikasyonu sonucu oluşan hasara, bu maddelerin dozları belirlenerek uygulanması ile kanserli hücre ve dokuların dışında kalan kısımlarda oluşan yan etkilerin azaltılması amaçlanmıştır. Ayrıca sunulan çalışma ile HEPG2 hücre hattında RA'nın antikanserojenik etkilerinin olup olmadığı da araştırılacaktır.



2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Kanser

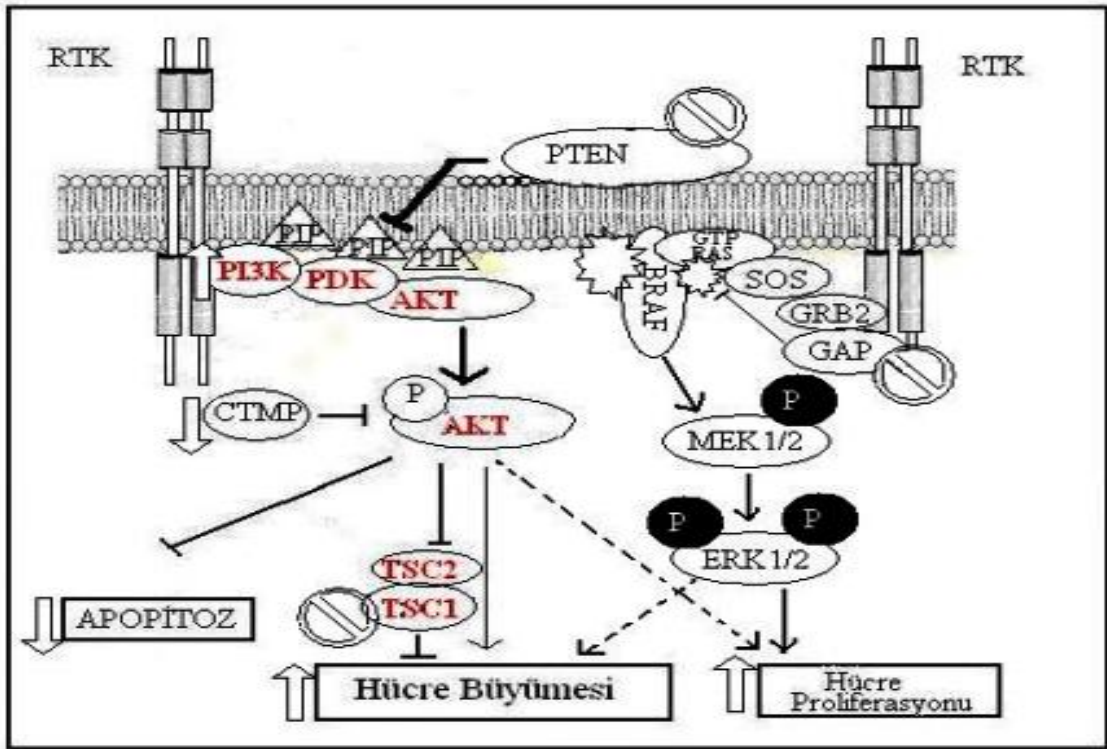
Kanser, hücrelerde DNA hasarı birikmesi sonucu ve hücrelerin düzensiz olarak çoğalmasıyla oluşan hastalıktır. Dünyada en önemli sağlık problemlerinden biri haline gelmesiyle birlikte hastalık kaynaklı yaşam kayıplarının önde gelen sebeplerinden biri olmuştur.



Şekil 2.1 Hücre bölünmeleri (İnt. Kyn. 1)

Son yıllarda, kanser gelişiminde rol alan yolların keşfedilmesi ve mekanizmalarının anlaşılması onkolojide ışık kaynağı olmaktadır. Kansere neden olan çok sayıda gen tanımlanmıştır. Onkogenlerin büyük çoğunluğunun yollar üzerinde kanseri indükleyici etkisi olduğu kanıtlanmıştır ve bu yollar aynı zamanda normal hücrelerinde çoğalmasını, farklılaşmasını, yaşamını ve fonksiyonunu düzenleyen sistemlerdir. Kanser hücreleri kontrolsüz çoğalma, farklılaşmanın bloke edilmesi, azalmış apoptoz, değişmiş doku yapısı gibi karakteristik özelliklere sahiptir. Kanser hücrelerinde bu yolların aktivitesi karakteristik özellikleri sayesinde artmış veya azalmıştır. Kanser ilişkili bir yolk, kanserin gelişimi için genetik veya epigenetik mutasyonla aktivasyonu veya inaktivasyonu gerekli olan hücresel düzenleme sistemidir. Tipik olarak kanser yolları bir ya da farklı kanser tiplerine sahip bireylerde aynı regülatör sistemlerin farklılıklarıyla ortaya çıkabilir. Çeşitli düzenleyici sistemler,

prototipik kanser yolları olarak değerlendirilebilir. Bunlar MAPK yolağı, TP53 düzenleyici sistemi ve RB1 yolağı etrafında yoğunlaşmış olan hücre döngüsü düzenleme ağından oluşmaktadır. Bu yolların hepsi birbiri ile etkileşim halindedir ve PI3K yolağı, PKC kinazlar, STAT yolağı, NFkB yolağı ve TGFβ yanıt yolağı gibi diğer yollar ve proteinlerle de bağlantılıdır. Üçüncü bir kanser yolağı grubu da WNT ve Hedhehog yanıt yolağı ve Notch regülatör sisteminden oluşmaktadır. Notch yolağına ilk olarak *Drosophila melanogaster*'de rastlanmış ve insana kıyasla model organizmalarda gelişimdeki fonksiyonu yoğun olarak çalışılmıştır. Günümüzde insan kanseri yolağı olduğu kesin olarak ispatlanmış olup aynı zamanda alzheimer hastalığı ile ilişkili bir faktör olarak belirtilmektedir. Kanserde etkisi bilinen TGFβ ve STAT yolları gibi Notch yolağı da farklı hücre tiplerinde fonksiyon kaybı ya da aşırı aktivite gibi farklı özellikler göstererek kanserin ilerleme sebebi olabilir (Yağcı ve Güneş 2017).

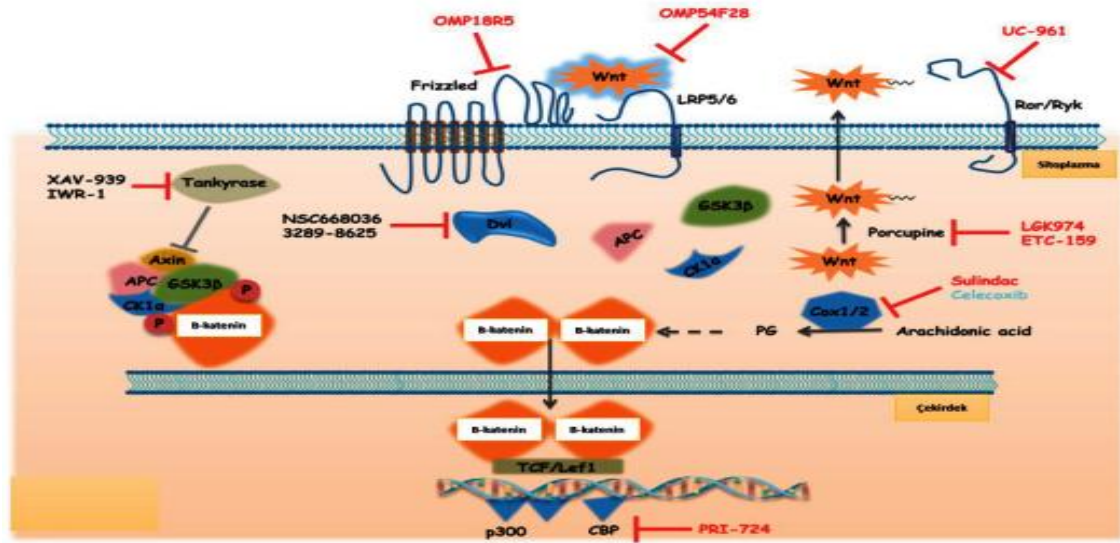


Şekil 2.2 İnsan kanserlerinde MAPK ve PI3K yollarındaki değişimlerden bir ürünüm(Altınok ve Sungurlu 2016)

Mutasyona uğramış kansere neden olan onkojenler ve genler, aslında sağlıklı hücrelerdeki çeşitli bakım ve onarım işlerinden sorumludur. Genler üzerindeki

farklılıklar yeteneklerini güçlendirebilirse vücut tarafından hücrenin üremesinin kontrol altına alınması zorlaşır. Bu genler de mutasyona uğrayarak aksaklığa uğrayarak kanserli hücrelerin üremesinin kontrolsüz kalmasına sebep olabilir. Her ne kadar bilim insanları, kanserlerin nasıl evrimleştiği ve birçok spesifik genin oynadığı roller konusunda geniş bir bilgiye sahip olsa da, onkogenlerin ve tümör baskılayan genlerin kombinasyonlarıyla ilgili yeterli bilgiye ulaşamamıştır. Bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesi için kaç mutasyona ihtiyaç vardır sorusuna yanıt olarak, karaciğer kanserlerinde ortalama hasta başına yaklaşık dört mutasyon görülürken, kalın bağırsak kanserleri tipik olarak 10 veya daha fazla mutasyona ihtiyaç duyar. Evre 1 tiroit kanserinde ise, süreci sürdürebilmek için tek bir mutasyon yeterli olmakadır (İnt. Kyn. 1).

Wnt sinyal yolağının keşfinden sonra Amerikan gıda ve ilaç dairesi (FDA= US Food and Drug Administration) tarafından onaylanmış Wnt sinyal yolağını hedef alan moleküller tanımlanmıştır. Örneğin, non-steroid, anti-inflamatuar ilaçlar ya da vitamin türevi ürünlerin antikanser etkileri gözlemlenmiştir. Vitamin A metabolizması sonucu üretilen Retinoidler’de kısmen Wnt sinyal yolağı inhibisyonunu sağlayarak antikanser etkiler gösterir. Vitamin D’nin aktif formu 1 α ,25- dihidroksi-vitamin D3, tümör supresör bir etki göstererek, β -katenin ile transkripsiyonel bir kompleks oluşturarak E-kaderini artırır. Böylelikle meme ve kolon kanserlerinde β -kateninin sitoplazmada kalmasını sağlayarak, çekirdeğe girişini engelleyerek Wnt yolağının inhibisyonuyla sonuçlanır. Wnt/ β -katenin sinyal yolağının anahtar rolü kök hücrelerin ve kanser kök hücrelerin “self renewal” ve farklılaşma özelliklerinin düzenlenmesidir. Bu yolağın anormal aktivasyonu çeşitli tümör tipleri ile ilişkilendirilmiş ve yolağın elemanları anti-kanser terapötikler için iyi birer hedef olarak kullanılmaya başlanmıştır. Wnt sinyal yolağının değişik basamaklarını hedef alan ajanlar geliştirilmiş ve bu ajanlar ile klinik çalışmalara başlamıştır. Wnt/ β -katenin yolağı ile ilişkili hastalıklar için etkili tedavi yolları bulabilmek amacıyla bu yolağın kendisi ve diğer yolaklarla ilişki halinde bulunan mikroçevreyi kapsayan ağ üzerinde çalışmalar devam etmektedir (Altınok ve Sunguroğlu 2016).



Şekil 2.3 Klinik çalışmalarda kullanılan Wnt inhibitörleri (Duchartre *et al.* 2016)

Kromozom veya genlerde meydana gelen kalıcı değişikliklere (mutasyon) çözüm için birçok araştırma yapılmıştır. 2015 yılında hücrelerin hasar gören DNA'ları nasıl onardığını ve genetik bilgisini koruduğunu haritalandıran araştırmalarıyla Prof. Dr. Aziz Sancar Nobel Kimya ödülünü kazanmıştır. Sancar, nükleotid kesim onarımı alanında buluşlar yapmıştır. Çalışma arkadaşları Thomas Lindahl ve Paul Modrich ise DNA'daki baz kesim onarımını ve yanlış eşleşme onarımını keşfetmişlerdir. Aydınlattıkları temel mekanizmalar daha sonra insan dahil kompleks organizmalarda kanıtlanmıştır. Ayrıca nükleotid kesim onarımı bozuklukları ile deri kanserleri ile doğrudan ilişkili olduğu bulunmuştur (İnt. Kyn. 2).

Serbest radikaller; DNA, protein, hücre fosfolipitlerinin doymamış yağ asitleri başta olmak üzere birçok organik ve inorganik bileşiklerle reaksiyona girerler. Özellikle DNA'yı etkileyen serbest radikaller ciddi hasarlara neden olurlar. Bu hasarlar da karsinojenik mutasyonlara neden olabilmektedir. Karsinojenik ksantobiyotikler, hücre içindeki peroksizomlar ve mitokondriyumdaki enzimatik sistemleri indükleyerek serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar. Bu serbest radikaller hücreyi koruyan enzimatik ya da enzimatik olmayan sistemlerin inhibisyonuna neden olur. Tüm bu etkilerin sonucunda oluşan oksidatif hasar, hücrede lipid peroksidasyonu, DNA hasarı veya protein değişikliklerine yol açmaktadır. Bunlar da azalmış gap junction ile haberleşme, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, intraselüler kalsiyum ve pH değişiklikleri veya

hücre ölümü gibi hücresel fonksiyon bozukluklarına yol açabilmektedir. Vücutta reaktif oksijen türlerinin düzeylerini kontrol altında tutarak oluşturabilecekleri hasarları engellemek için birçok savunma mekanizması bulunmaktadır. Bunlar "antioksidanlar" olarak adlandırılır. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonu engelleyerek veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler (Patat *et al.* 2003).

Kanser tedavisi için fitoterapi, radyoterapi, hormon tedavileri, kök hücre nakli ve kemoterapi uygulanmaktadır. Kemoterapi de karsinomlu hücrenin türüne göre ve hastalık derecesine göre farklı uygulanmaktadır. Karaciğer metastazı olan kolorektal kanserlerinde tedavi seçenekleri; sistemik kemoterapi, ablasyon tedavisi, rejyonel kemoterapi, cerrahi tedavidir (Şen ve Turan 2009).

Kanserin köken aldığı doku ve hücrenin embriyonik orijinine göre kanserler sınıflandırılırlar. Bronşlar, meme duktusları ve barsak mukozası gibi epitel hücrelerinden köken alan kanserler karsinom, bağ dokusu, kemik veya kas hücrelerinden köken alanlar sarkom, bunların yanı sıra diğer grup ise kemik iliği, lenfatik sistem ve periferik kan hücrelerinden köken alanlar ise lösemi ve lenfomalardır. İnsan kanserlerinin yaklaşık %90'ını karsinomlar oluşturmaktadır. Sarkomlar da solid tümörlerin gelişmesine neden olmaktadır (Taş 2010).

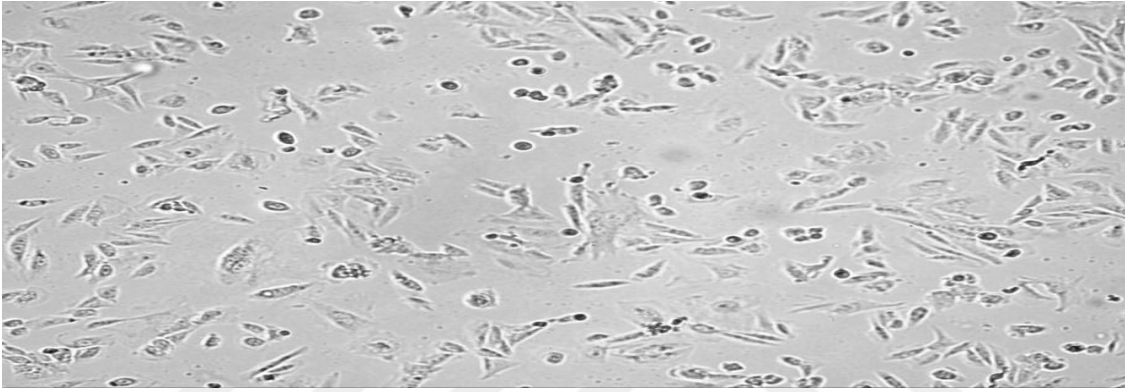
Apoptozis, rejenerasyon ve tamir olaylarında, hücresel homeostazın sağlanmasında ve organ büyüklüklerinin korunmasında önemlidir. Yapılan çalışmalar apoptozisin kanser gelişiminde ve tedaviye cevapta önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır. Bir çalışmada güçlü bir antioksidan olan Vitamin C'nin farklı dozlarının hepatoselüler karsinom hücrelerindeki hücre canlılığına ve apoptotik hücre ölümüne etkileri incelenmiştir. Farklı dozlarda Vitamin C uygulanan HepG2 hücrelerinde kaspaz 1, 3 ve 9 enzim aktivitelerinde istatistik olarak önemli bir artış olduğu gözlemlenmiştir. Vitamin C uygulanan HepG2 hücrelerinde görülen hücre ölümü kaspaz bağımsız olarak şekillenmektedir. Meydana gelen hücre ölümü mitokondriden bazı apoptotik proteinlerin sitoplazmaya salınımı ile şekillenen diğer hücre ölüm yolları ile ilişkilendirilmiştir (Balkan ve Sert 2014).

Kılınç (2013) ‘‘HepG2 VE MCF-7 Hücre Modellerinde Desferoksamin ve Fenantrolin’in Antikanser Etkilerinin Moleküler Düzeyde Araştırılması’’ adlı çalışmasında, HDAC inhibitörü olan TSA ile birlikte Grp78 ekspresyonunu düşürücü ajan olarak desferoksamin ve fenantrolin kullanarak TSA’nın etkinliğindeki artışı görmek için hücre canlılık testi uygulamıştır. UPR etkilerini incelemek için ise gen ekspresyon analizi, desferoksamin (DFO) ve fenantrolinin (PHEN) Grp78 ekspresyonunu azaltma mekanizmasını açıklamak için ChIP deneyi yapmıştır. MCF-7 ve HepG2 hücreleri 96 kuyucuklu plakta bir gece kültüre edilerek, ardından 24 saat boyunca TSA, DFO, PHEN ve TSA ile muamele edilmiştir. Çalışmada DFO ve PHEN’in Grp78, Grp94 ve p53 ekspresyonunu her iki hücrede de azalttığını ve HK-2 ekspresyonunu artırdığı görülmüştür. MCF-7 hücrelerinde TSA’nın artırdığı Grp78, Grp94, HO-1 ve MRP1 ekspresyonunu, HepG2 hücrelerinde ise HO-1, MDR1 ve MRP1 ekspresyonunu DFO ve PHEN’in azalttığını bulmuştur. Bu ve buna benzer çalışmalar ile ülkemizde ve diğer ülkelerde gelişen teknolojiyle araştırmalar yenisi eklenerek kanser ve tedavisi ile ilgili yeni bulgular elde edilmektedir.

2.1.1 Karaciğer Karsinom Hücresi (HepG2)

Karaciğerin malign tümörleri hepatosellüler karsinom, intrahepatik kolanjiyosellüler karsinom, hepatokolanjiokarsinom, hepatoblastom, anjiyosarkom, epitelioid hemanjiyoeptelioma ve diğer (leiomyosarkom, rabdomyosarkom, indifferansiye embriyonel sarkom) sarkomlardır. Hepatosellüler karsinom (HSK) ve intrahepatik kolanjiyosellüler karsinom (CCC) karaciğer kanserinin çoğu kısmını oluşturur. Karaciğer hücrelerinden gelişen HSK primer karaciğer kanserlerinin % 85-90’ ını oluşturur ve dünyadaki en yaygın 5. kanser olup yılda yaklaşık yarım milyon insanın ölümünden sorumludur. HSK’ nın Asya ve Afrika’da ölümlerin majör sebebi olmakla beraber batıda rastlanma oranı gittikçe artmasından dolayı moleküler patogenezi, epidemiyolojisi ve tedavisi önem arz etmektedir. Türkiye’deki sayısal veri net olmamakla birlikte kronik hepatit hastalıkları sıklığı ile HSK insidansının ve prevalansının hızla arttığı görülmektedir (Tarhan 2013).

HepG2, plazma proteinlerinin büyük bir kısmını üretebilmesi, biyosentetik özelliklerinin normal hepatositlere benzerliği, hücre yüzey reseptörlerini koruyabilmesi, kullanılan proteinleri işleyebilmesi nedeniyle *in vitro* modellemelerde yaygın şekilde kullanılan bir hücre hattı olmuştur. HepG2 hücreleri kültür yüzeyine yapışarak üremeyi seven bir hücre tipidir ve kültür içerisinde topluluk oluştururlar. Hücreler tüm kültür yüzeyini kapladıktan sonra farklılaşmaya başlamakta; bazı hücreler küresel yapılar oluşturmakta, ancak bazı hücreler bu küresel yapılar dışında çoğalmayı tercih etmektedir (Tatar vd. 2016).



Resim 2.1 Karaciğer Karsinom Hücrelerinin (HepG2) mikroskop görüntüsü

HepG2 çalışmalarda tek ya da kıyaslamalı olarak kullanılan bir hücre hattıdır. Örneğin yapılan bir çalışmada, MCF-7, HepG2 hücre hatları ve embriyonik böbrek hücresi hattı (HEK293), apoptozun işleyişinde belirli genlerin rolü ve apoptoz durumunda genlerin ekspresyon düzeylerinin incelenmesi amacıyla bir anti-kanser ilacı olan doksorubisinin artan dozları kullanılmıştır. MCF-7 ve HepG2 hücrelerinde TP53'ün ekspresyon düzeyi düşük dozlarda artarken; yüksek dozlarda azalma göstermiştir. HEK293 hücrelerinde ise dozdan bağımsız bir azalma görülmüştür (Öncül 2013).

İlaçlar ile indüklenen hepatotoksisite hem yeni ilaç aday moleküllerinin, hem de piyasadaki ilaçların geri çekilmesine neden olabilecek temel sorunlardan biri olmakla birlikte akut karaciğer hasarı ve hatta karaciğer nakli gibi ciddi sorunlara neden olabilir. Günümüzde beklobrat, ketokonazol, nevirapin, nefazodon, sitaksentan sodyum gibi etken maddeleri içeren ilaçlar dünyanın farklı bölgelerinde karaciğere bağlı yan etkiler nedeniyle piyasadan çekilmiştir. İmmün reaksiyonlar ve reaktif metabolitlerin yol açtığı

hücre stresi karaciğer hasarlanmasına neden olabilmektedir. Reaktif bileşikler etkilerini glutasyonu azaltarak, DNA, RNA, protein, lipid ve enzimlerle etkileşerek genellikle apoptotik veya nekrotik hücre ölümüne sebep olabilmektedir (Yalçın vd. 2018).

HepG2 hücre hatlarında *T. turcica*'nın farklı ekstraktlarının gen ekspresyon analizi yoluyla sitotoksik etkisi ile genotoksik etkisi ve apoptotik mekanizmaları araştırılmıştır. MTT sitotoksikite yöntemi kullanılan çalışmada, etil asetat ekstraktları en yüksek sitotoksik etkiyi göstermiştir. Metanol ekstresi, etanol ekstresi ile karşılaştırıldığında yüksek konsantrasyonlarda daha fazla etkiye sahiptir. Su ekstresi ve hekzan ekstresi en az sitotoksik etki göstermiştir. Etil asetat ekstresi, sitotoksik konsantrasyonda en yüksek DNA hasarını gösterirken en az hasar su ekstresinde gözlenmiştir (Ali 2017).

Klorprifos-etil (KE), yaygın olarak kullanılan organofosfat insektisitlerden biridir. Yapılan bir çalışmada ise KE'in insan karaciğer hücre dizisi HepG2 üzerine sitotoksik etkisini ve melatoninin koruyucu etkisini araştırılmıştır. Melatoninle bir saat inkübe edilen HepG2 hücrelerine KE uygulaması melatonin uygulanmayan gruba oranla hücre canlılığını artırmıştır (Patat *et al.* 2003).

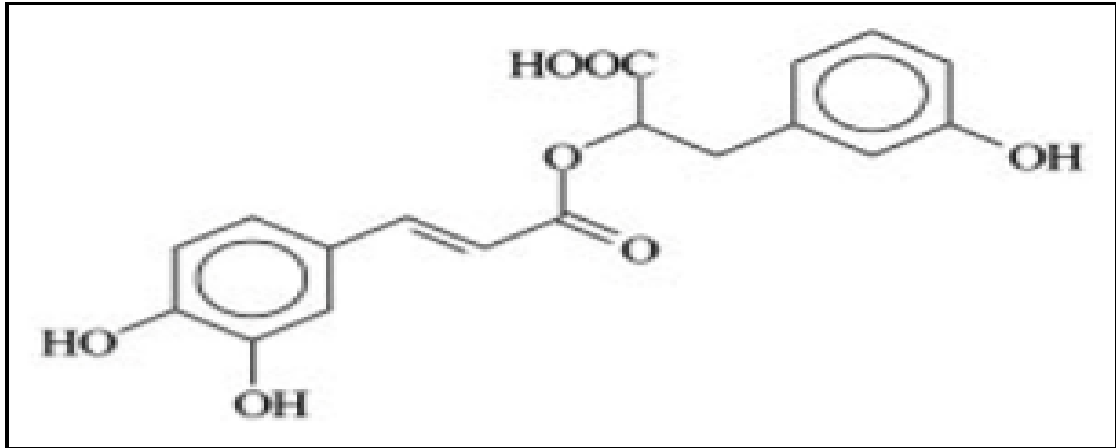
Kadmiyum (KD) endüstriyel amaçlı kullanılan toksik bir ajan olmakla birlikte karaciğerde birikir ve toksik dozları karaciğer hasarına yol açar. Kadmiyumun fareler üzerinde yapılan bir çalışmada hepatositlerde apoptozu indüklediğini göstermiştir. Kurkumin, *Curcuma longa* bitkisinden elde edilen doğal bir bileşik olup güçlü anti-inflamatuar ve reaktif oksijen süpürücü özelliklere sahiptir. Ayrıca doz bağımlı anti-apoptotik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Kronik kadmiyum uygulamasının karaciğerde apoptozu indüklediği gözlemlenmiştir. Apoptotik hücre sayısının KD grubunda kontrol grubuna oranla iki kat arttığı, tedavi grubunda ise KD grubuna oranla yaklaşık iki kat azaldığı görülmüştür (Bayındır *et al.* 2016).

Kısmalı (2009) "Paraquat ile Oluşturulmuş Oksidatif Stresin HepG2 Hücrelerinde Apoptozis Üzerine Etkisinin Araştırılması" adlı çalışmada, paraquat ile oluşturulmuş oksidatif stresin HepG2 hücre hattında kaspaz bağımlı apoptozis üzerine etkilerini

inceleyerek sitokrom c düzeylerindeki değişimi ve DNA kırıklarının oluşumunu ortaya koymuştur. Çalışmada, MTT hücre canlılık testi, farklı PQ yoğunluklarında ve zaman periyotlarında uygulanmış olup, Lipid peroksidasyonunun belirteci olarak malondialdehit düzeyleri TBA testi ile analiz edilmiştir. Sitokrom c düzeyleri ELISA ile belirlenmiştir. Ayrıca, DNA fragmentasyonunu gösterebilmek amacıyla DNA laddering testi uygulanmıştır. Yapılan testler sonucu, inkübasyonun 24. saatinde önemli farklılıkların ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, kaspaz 9 düzeylerinde inkübasyonun 12. ve 24. saatlerinde kontrol ve deneme grupları arasında istatistik olarak önemli farklar bulunmuştur.

2.2 Rosmarinik Asit

RA; biberiye, adaçayı gibi tıbbi bitkilerde yaygın olarak bulunan, fenolik asit yapısında ikincil bir metabolittir. Her ikisi de iki OH grubu taşıyan iki fenolik halka içeren ve doğal olarak oluşan hidroksillenmiş bir bileşiktir. İki fenolik halka arasında karbonil grup, doymamış bir ifte bağ ve karboksilik asit grubu yer almaktadır. RA kimyasal formülü: $C_{18}H_{16}O_8$, molekül ağırlığı 360,31 gramdır (Basmacıoğlu Malayoğlu 2010).



şekil 2.4 Rosmarinik Asit yapısal formülü (Basmacıoğlu Malayoğlu 2010).

RA, kafeik asit ve 3,4-dihidroksifenilaktik asitten oluşan bir esterdir. Boraginaceae türlerinde ve Lamiaceae alt familyası Nepetoideae'de yaygın olarak bulunur. Bununla birlikte, diğer yüksek bitki familyalarının türlerinde ve bazı eğreltiotlarında ve diken altı cinslerinde bulunur. RA, antiviral, antibakteriyel, antiinflamatuvar ve antioksidan gibi

bir takım biyolojik aktivitelere sahiptir. Şifalı bitkiler, otlar ve baharatlarda RA'nın varlığı yararlı ve sağlık teşvik edici etkilere sahiptir. Bitkilerde, RA'nın önceden oluşturulmuş, kurucu olarak biriken savunma bileşeni olarak işlev göreceği düşünülmektedir. Örneğin *Coleus blumei* ve *Salvia officinalis* bitkileri kendisinden daha yüksek miktarlarda RA toplar. Bu yüzden bitki hücre kültürleri ile birlikte RA üretimi biyoteknolojik olarak önerilmiştir. Bilinen en iyi RA türevleri; litospermik asit, RA ve kafeik asidin bir konjugatı ve RA'nın dimeri olan litospermik asit B'dir (Petersen and Simmonds 2003).

Yapılan bir çalışmada allium testinde, A. cepa'nın kök meristem hücreleri, farklı laboratuvarlarda DNA hasarını tespit etmek için, RA'nın sitotoksik ve genetik toksik potansiyelini A. cepa kök uçlarının mitotik hücrelerinde Allium ve komet yöntemi ile değerlendirilerek RA'nın sitotoksisiteyi azalttığı, RA yüksek dozlarda genotoksik etkileri gözlemlenmiştir (Liman *et al.* 2018).

RA'nın kalp kası hücrelerinde apoptozu önlediği ve nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu faktör olarak rol aldığı gözlemlenmiştir. RA'nın, CCl₄ ile tedavi edilmiş farelerde akut karaciğer hasarını iyileştirdiği görülmüştür. İnsan karaciğer hücre dizisi olan HepG2 hücrelerinde RA tedavisi ile SIN-1 tarafından üretilen oksidatif stresi azaltılabileceği gösterilmiştir (Hyun Jin *et al.* 2013).

2.2.1 Rosmarinik Asitin Antioksidan Etkisi

RA birçok bitkide bulunan bir polifenoldür. Özellikle kekikotu, biberiye, oğulotu, adaçayı ve merzengüş bitkilerinde yüksek konsantrasyonda bulunur. Bu bitkilerdeki aroma veren bileşenlerinden bir tanesidir (Bulduk ve Gökce 2017).

RA çok güçlü antioksidan aktiviteye sahiptir. RA'nın antioksidan aktivitesi E vitamininkinden daha güçlüdür. RA kanser ve damar tıkanıklığı riskini azaltırken serbest radikallerden kaynaklanan hücre hasarlarını engeller. Ayrıca gıda korunmasında da kullanılır. Japonya'da RA zengin olan perilla ekstraktı taze deniz ürünlerinin raf ömürlerini uzatmak için kullanılır. RA hem antioksidan hem de prooksidan özellik

gösterebilen etken bir maddedir. RA, A ve B olarak gösterilen iki difenolik halkaya sahiptir ve serbest radikal oluşturabilirler. Otokatalitik mekanizma ile süperoksit ve H₂O₂ oluşturlar. Ayrıca RA'nın protein kinaz A sinyalizasyon yolağı aracılığıyla melanin biyosentezinde yer alabileceğı açıklanmıştır. Diğer bir çalışmada melanoma hücrelerinde polifenol oksidazın ve devamında melanin biyosentezinin RA varlığında aktive edildiğı açıklanmaktadır (Taner 2015).

Erkan ve Ayrancı (2008), biberiye ekstresi, çörek otu (*Nigella sativa*) uçucu yağı, karnosik asit, RA ve sesamolün antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. Bu çalışmada üç saf bileşiğın ve iki bitki ekstresinin etkileri; aktivite tayini ve ferrik tiyosiyanat (FTC) yöntemi ile belirlenmiştir. Her üç yöntemde de biberiye ekstresi çörek otundan elde edilen uçucu yağlardan daha yüksek bir antioksidan aktivite göstermiştir. Saf bileşiklerin antioksidan aktiviteleri sıralamalarının ise farklı yöntemlerde farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir. Bu sıralama DPPH yönteminde RA < sesamol < karnosik asit; ABTS testinde sesamol < RA < karnosik asit ve FTC testinde RA < karnosik asit < sesamol şeklinde olduğu bildirilmiştir. Bu farklılık her bir bileşiğın yapısal özelliklerinden ve farklı radikal tutucu özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada ayrıca biberiye ekstresinin ve çörekotu yağının fenolik içerikleri belirlenmiş, biberiye ekstresinin çörekotu yağına göre çok daha yüksek fenolik içeriğe sahip olduğu görölmüştür. Bu durum aynı zamanda biberiye ekstresinin neden daha yüksek bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

Basmacıoğlu Malayaoğlu (2010) biberiyenin antioksidan etkisi üzerine yaptığı derlemede, antioksidan aktivite üzerine yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışma sonuçlarının, bitkinin yetiştiğı bölgeye, hasat zamanına, kullanılan bitki kısmına, fenolik yapıya ve konsantrasyona, ekstraksiyon yöntemine, ürün ve oksidasyon koşullarına, analitik yönteme ve hayvan türüne göre farklılık gösterdiğini bildirmiştir. RA'nın antioksidan aktivitesinin membran stabilizasyonunu ve radikal ilerlemesini engelleyerek membranın oksidatif hasara karşı korunması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu çalışma RA'nın lipozomların fiziksel ve oksidatif stabilizasyonunu artırıcı etkisi ile uyumludur. RA aynı zamanda reaktif oksijen türlerinin üretimini ve IL-6 salınımını azaltmakla birlikte insan keratinositlerinde UVB'nin neden olduğu hasarı engellemektedir.

Paluszczak vd. (2010) hayvanlara diyetleri ile birlikte uzun süreli olarak RA verildiğinde kanser hastalığında kimyasallara karşı önemli derecede koruma sağladığını kanıtlamıştır.

2.2.2 Genotoksik ve Antigenotoksik Etkileri

RA'in genotoksik ve antigenotoksik etkileriyle ilgili birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar mevcuttur. Kimyasal olarak indüklenmiş kromozom hasarı ve kaybına, ayrıca primer DNA hasarına karşı koruyucu etkileri araştırılmıştır. RA'in çeşitli dozlarının antitümoral ajan doksorubisine (DXR) karşı mutajenik veya antimutajenik etkilerini *in vivo* olarak Swiss farelerin periferik kan hücrelerinde MÇ (mikroçekirdek) yöntemi ile araştırmışlardır. RA'in üç farklı dozu ile muamele edilen farelerde, kontrol grubuna kıyasla MÇ frekansında herhangi bir artış gözlenmemiştir. RA ile kombine olarak DXR verilen hayvanlara kıyasla MÇ frekansında önemli bir azalma gözlenmiştir. Her ne kadar bu koruyucu etkiye neden olan mekanizmalar tam olarak bilinmese de, DXR toksisitesine karşı RA'in güçlü antioksidan aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir (Furtado *et al.* 2008).

Ayrıca Furtado vd. (2010), V79 hücrelerinde MÇ ve comet yöntemlerini kullandıkları *in vitro* çalışmalarda da DXR'in oluşturduğu DNA hasarına karşı RA'in farklı konsantrasyonlarında koruyucu etkisini incelemiştir. RA'in farklı konsantrasyonlarında tek başına genotoksik etkisinin olmadığı, DXR tarafından indüklenen MÇ frekansını ve DNA hasarını istatistiksel olarak önemli derecede azalttığını ve antigenotoksik etkili olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada DXR tarafından oluşturulan DNA hasarındaki azalmanın, RA'in antioksidan aktivitesinden kaynaklandığı açıklanmıştır.

Ghaffari vd. (2014), N₂A nöronal hücrelerinde H₂O₂ tarafından indüklenen genotoksositeye karşı RA'in koruyucu etkisini incelemişler ve hücreleri 12 saat süreyle RA ile 24 saat H₂O₂ ile muamele etmişlerdir. Çalışma comet yöntemiyle değerlendirilip, kuyruk uzunluğu değerlerinin RA uygulanan hücrelerle kontrol grubu hücrelerinde aynı düzeyde olduğu bildirilmiştir. Düşük konsantrasyon aralığında RA uygulanması ile H₂O₂ ile muamele edilen hücrelerde DNA hasarı azaldığı görülmüştür. RA uygulanan

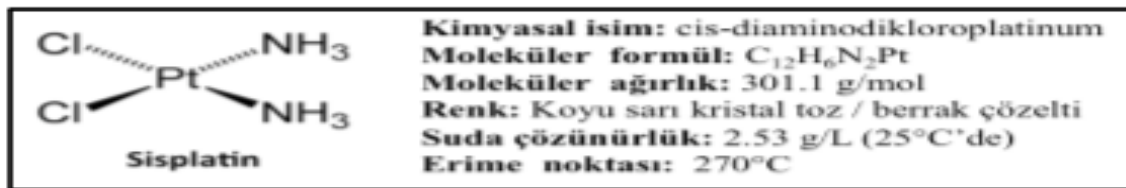
hücrelerde bu azalma her ne kadar kontrol düzeyinde olmasa da H_2O_2 uygulanan grupla kıyaslandığında istatistiksel olarak daha az orandadır. Ayrıca apoptotik hücre ölümü, hücrelerdeki büzülme, kromozomal DNA'nın bozulması ve hücre ölümü ile sonlanan süreçtir. Komet yöntemi ile DNA'daki hasar ve RA'in bu hasara karşı koruyucu etkisini gösterilmiştir (Taner 2015).

2.3 Cisplatin

2.3.1. Cisplatinin Genel Özellikleri ve Moleküler Yapısı

CisP, ağır bir metal olan platin (Pt) içeren geniş spektrumlu güçlü kemoterapötik bir ilaçtır. 1965'de biyofizik uzmanı Barnett Rosenberg CisP'in biyolojik özelliklerini keşfetmiştir. Sıvı ortamda platin elektrotlar ile oluşturulan elektriksel alanın E.coli'nin çoğalması üzerindeki etkisini incelemek üzere yapılan deneyler sırasında, platin elektrotlarından ortaya çıkan elektroliz ürünlerinin antibakteriyel ve antineoplastik etki yaptığı fark edilmiştir. CisP'e ait bu bulgular yayınlandıktan sonra, yapılan ileri araştırmalar ile ilk keşfedilen platin türevi olan CisP'in ve platin komplekslerinin antitümör ve karsinojenik etki gücü kanıtlanmıştır.

CisP ile tedavi 1971 yılında başlamış, 1978 yılında FDA tarafından platin grubu taşıyan kemoterapötiklerin kanser tedavisinde kullanımı onaylanmıştır. Geniş spektrumlu bir antineoplastik ilaç olan CisP, tek başına veya diğer antineoplastik ajanlarla veya radyoterapi ile birlikte testis, over, mesane, prostat, serviks, özefagus, akciğer kanseri, ağız, baş-boyun kanserleri gibi solid tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır. CisP yatay düzlemde cis pozisyonunda platin atomuna bağlı klor ve amonyum içeren inorganik, suda çözünür bir moleküldür ve sadece cis izomeri sitotoksik özelliği vardır (Becit 2017).



Şekil 2.5 Cisplatinin moleküler yapısı ve özellikleri (Becit 2017).

2.3.2 Cisplatinin Toksik Etki Mekanizmaları

Başta nefrotoksisite olmak üzere cisplatinin; hepatotoksisite, nörotoksisite, ototoksisite, miyelosupresif etki, geçici lökopeni, trombositopeni ve anemi gibi doza bağımlı olarak yan etkileri vardır (Boulikas and Vougrouka 2003).

CisP, kolaylaştırılmış difüzyon ile taşınıp, hedef organlarda birikerek nefrotoksisiteye yol açabileceği düşünülmektedir. Bazı çalışmalarda CisP'in renal tübüler epitel hücrelerinde daha güçlü nefrotoksik etkili bir metabolitine dönüştüğü görülmüştür. Ayrıca CisP'in redükte glutatyon ile konjugasyonu sonucunda oluşan reaktif tiyoller toksisiteye yol açabilir (Dugbortoy *et al.* 2016).

CisP renal tübüler hücrelerde glutatyon-S- transferaz Pi (GSTP) enziminin katalizlemesiyle glutatyon konjugatlarına (Pt-GSH) dönüşür. Konjugat oldukça kararsız bir yapıdadır ve glutatyon konjugatları tübüler hücrelerden geçer ve gama-glutamil transpeptidaz (GGT) ve aminotransferaz N (APN) enzimleri tarafından sisteinil-glisin konjugatları ve sistein konjugatlarına ayrılır. Sistein konjugatları proksimal tübüler hücre içine geçer ve orada sistein-S- konjugat beta liyaz (CCBL) aracılığı ile yüksek reaktif sistein tiyollerine dönüştürülür. Reaktif sistein tiyollerinin proksimal tübüler hücrelerdeki esansiyel proteinlere bağlanması toksisiteye neden olur (Townsend *et al.* 2009).

Yapılan bir *in vitro* çalışmada hücre dışı glutatyon katabolizmasında ve tiyollerin hücresel taşınmasında önemli rol oynayan plazma membran enzim olan GGT aktivitesinin yüksek olduğu hücrelerin platin bileşiklerine karşı daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (Paolicchi *et al.* 2002).

CisP'in antikanser etkisi hücre çekirdeğinde DNA çift zincirine çapraz bağlanması ve transkripsiyon ve DNA replikasyon mekanizmasını baskılaması ile açıklanmaktadır. Hücre içine giren cisplatin, su ile reaksiyon sonucunda klor iyonlarını kaybederek hücre içindeki DNA, RNA ve protein gibi nükleofil molekülleri hedef alır. CisP, DNA'daki guanin bazının oldukça reaktif olan N7 pozisyonundaki pürin bazlarıyla reaksiyona

girerek interstrand ve en sık olarak da intrastrand çapraz bağlar oluşturarak DNA'nın yapısını bozar; replikasyon ve transkripsiyon inhibisyonu aracılığıyla kanser hücresinin çoğalması ve tümör büyümesi engellenmiş olur (Becit 2017).

Sıçanlarda CisP ile indüklenen kardiyak toksisite modelinde hem nükleer hem mitokondriyal DNA'nın hasara uğradığı gösterilmiştir (El-Awady et al 2009). Ayrıca CisP kaynaklı genotoksik stresin apoptotik birçok sinyal iletim yolağını aktive ederek hücreyi apoptoza götürdüğü ifade edilmektedir (Dasari and Tchounwou 2014).

CisP ile indüklenen tümör hasarının başlıca mekanizması apoptozun indüklenmesiyle olmaktadır. Sitotoksik etkili CisP'in düşük dozlarda kaspaz bağımlı yolak ile apoptozu indükleyebildiği, daha yüksek dozlarda nekrotik hücre ölümüne neden olduğu yapılan çalışmalarla bulunmuştur (Dasari and Tchounwou 2014).

Yapılan bir *in vivo* çalışmada CisP ile tedavi edilen hayvanlarda görülen antioksidan enzim düzeyi gibi biyokimyasal değişimlerin üzüm çekirdeği ekstresi ile antagonize edilerek koruyucu bir etki yaptığı gözlemlenmiştir. Diğer bir çalışmada ise üzüm çekirdeği ekstresinin yalnızca CisP toksisitesini azaltmakla kalmayıp antikanser etkisini de artırdığı görülmüştür (Yousef et al. 2009).

Mitojen aktive protein kinazlar (MAPK), hücrel sinyallerini düzenleyerek hücre büyümesi ve canlılığında rol oynayan düzenleyen enzimlerdir. CisP özellikle küçük hücreli akciğer kanser hücreleri olmak üzere çeşitli hücrelerde, MAPK ailesinden c-Jun N-terminal kinaz stres sinyal iletim yollarının aktivatörü olduğu bilinmektedir. Ayrıca MAPK enzim ailesinden hücreler arası sinyal düzenleyici kinaz (ERK) aktivasyonunun ise p53 aracılığı ile CisP tarafından indüklenen DNA hasarının onarılması için hücre siklusunu duraklattığı belirtilmiştir (Dadhaniya 2011).

2.3.3 Cisplatin Toksisitesi

CisP ana eliminasyon organı olan böbreklerden glomerüler filtrasyon ve tübüler sekresyona uğrayarak atılmaktadır. CisP'in doz kısıtlayıcı önemli yan tesiri de böbrekler

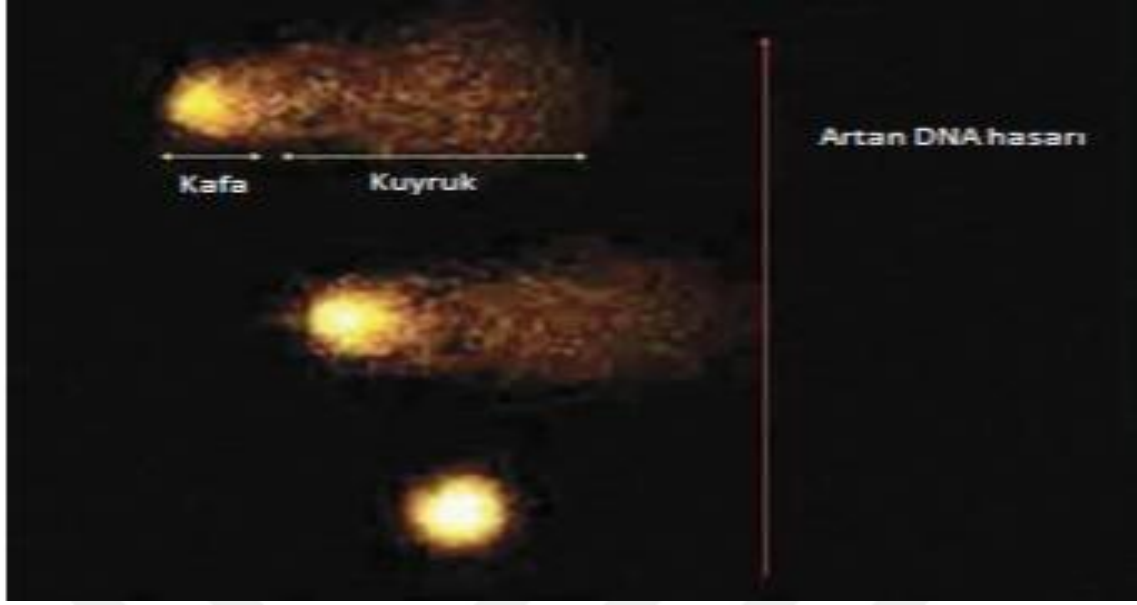
üzerinedir, belirgin nefrotoksik etkiye sahiptir. CisP, yüksek dozda maruz kalan bir insanın böbrek fonksiyonlarını tamamen bozabilecek bir nefrotoksin olarak değerlendirilmektedir. Özellikle proksimal tübül hücrelerinde, diğer organlara göre daha fazla tutularak ciddi böbrek hasarına yol açar. Hem hayvan hem insan çalışmaları CisP'in kan üre azotu düzeyinde artışa, elektrolit kaybını arttırdığı, renal kan akımında, glomerüler filtrasyon hızında ve renal klerenste doz ve zamana bağlı olarak azalma görülmüştür. Tekrarlanan CisP dozlarında, nefrotoksisiteye bağlı hipomagnezemi, hipokalsemi, hiponatremi hipokalemi gibi elektrolit bozuklukları görülmekte, kemik metabolizması ve bütünlüğünü etkilemekte ve tetani görülmektedir (Becit 2017).

Kardiyotoksisitesi kemoterapi uygulamalarına bağlı kardiyovasküler komplikasyonlar sık görülmektedir. CisP tedavisi gören hastalarda yaklaşık yirmi yıl sonra kardiyotoksisite tanımlanmıştır. Bunun yanı sıra vasküler endotelyal hasar, akut miyokard infarktüsü, otonomik kardiyovasküler disfonksiyon, hipertansiyon ve hipotansiyonun da görüldüğü bildirilmiştir (Dugbortoy *et al.* 2016).

Dermatolojik sistem üzerindeki toksik etkisi cisplatin uygulaması sırasında kazara ekstrevasyon (damar dışına sızması) durumunda deri ülserasyonunun oluştuğu bildirilmiştir. Ayrıca birçok antikanser ilacın sperm kromozomlarında anormalliklere yol açtığı araştırmalarda gözlemlenmiştir. Düşük doz CisP'in Leyding hücre işlevlerinde herhangi bir olumsuz etkiye neden olmadığı, ancak kümülatif yüksek doz kemoterapinin kalıcı hasara yol açtığı görülmüştür (Hartmann and Lipp 2003).

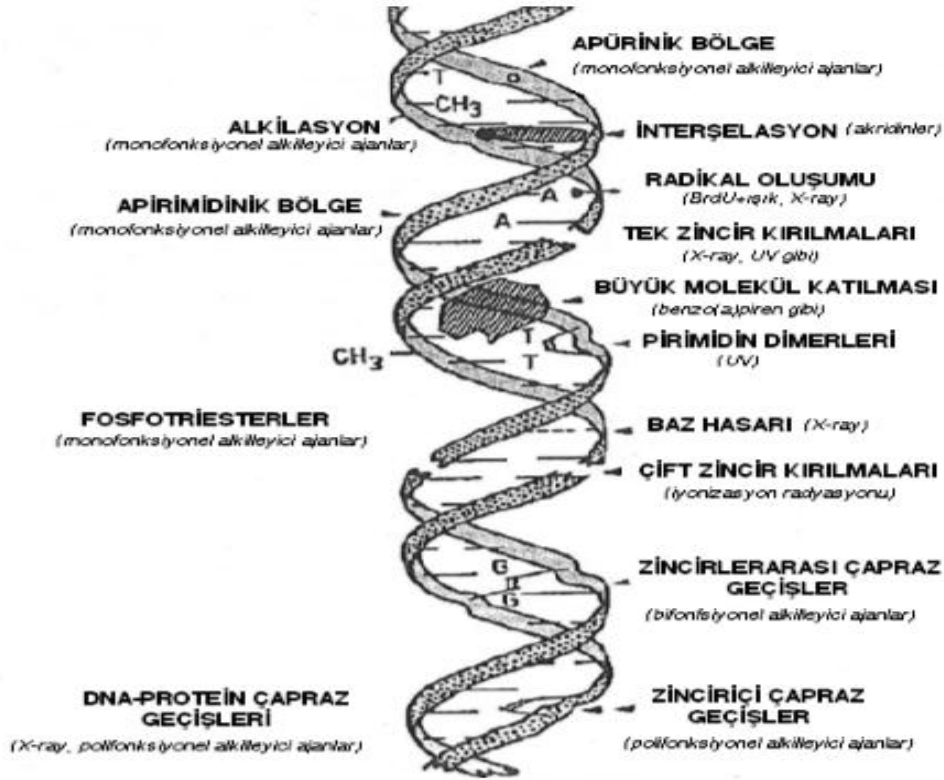
2.4 DNA Hasarı

Depolanmış bilginin kalıtsal olarak gelecek nesillere aktarımında son derece önemli olan unsur DNA yapısının korunmasıdır. İç veya dış faktörlerin etkisiyle oluşabilecek DNA yapısındaki tüm değişimler 'DNA hasarı' olarak adlandırılır.



Şekil 2.6 Oluşan DNA hasarının bölgeleri (Yılmaz 2014).

Hasarı önleyebilecekse hücre, buna karşı mekanizmalarını devralır veya hasarı düzeltemeyecek durumda ise programlı hücre ölümünü gerçekleştirir. Yani apoptoz yolu indüklenerek hücre ölüme götürülür. Hücre, farklı metabolik yolları kullanarak DNA hasarlarına yanıt verir. DNA molekülü onarılabilen dinamik yapıya sahip tek molekül olması bakımından önemlidir. Kimyasal bileşikler, X-ışınları ve ultraviyole gibi çevresel faktörler farklı DNA hasarlarına neden olmaktadır. DNA hasarında bazik alanlar, çift ve tek zincir kırıkları, delesyonlar, insersiyonlar ve DNA-protein çapraz bağ oluşumları örnek verilebilir. Ayrıca DNA’da dış faktörlerin yanında iç faktörlerden de kaynaklanan hasar oluşabilir. Hasara neden olan endojen etmene DNA rekombinasyonu ve replikasyonunun gerçekleştiği işlemler sırasında oluşan serbest radikaller de örnek olarak gösterilebilir. Replikasyon hataları, mutasyon, hücre ölümü, genomik kararsızlık ve DNA hasarının devamlılığında ise DNA onarımı devreye girmektedir. Polimerazlar, rekombinazlar, helikazlar, nükleazlar, demetilazlar kinazlar, fosfatazlar, topoizomerazlar, glikozilazlar ve ligazların enzimatik aktivitelerinde kimyasal değişimlerle DNA onarımı gerçekleştirilir (Turhan 2017).



Şekil 2.7 DNA Hasar Çeşitleri (Yılmaz 2014).

DNA'daki hasar düzeyinin ölçülmesinde ilk olarak kullanılan standart testler sırasıyla; Ames Testi, Timidin Kinaz, MN, SCE testleridir. Daha sonra kullanılmaya başlanılan ve önemi giderek artan FADU (fluorescence analysis of DNA unwinding), kromozomal translokasyonların gösterilmesinde FISH (fluorescent in situ hybridization), p53 mutasyon tayini, apoptozisin saptanması, anti-sentromer antikörler ile anoploidi tayini ve komet testi yöntemleridir (Yılmaz 2014).

2.4.1 Komet Testi

UV, radyasyon, reaktif oksijen (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) gibi birçok çevresel etmenin oluşturduğu kötü etmenler hücrelerde bulunan DNA'nın da oldukça zarar görmesine neden olur. Hastalıkların etiyolojisiyle DNA hasarı ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. Özellikle yaşlanma, nörodejeneratif hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklarla oksidatif DNA hasarı ilişkilendirilmiştir. Oksidatif DNA hasarı, sigaranın, kanserojenlerin, besinlerle alınan antioksidanların veya UV ışınlarının insan sağlığına

etkisinin izlenmesinde önemli bir kriter olarak gösterilir. Oksidatif DNA hasarının ölçülmesi için çeşitli yöntemler önerilmiş olsada komet testi spesifik olarak bütün DNA hasarlarını ölçmek için kullanılır (Gyori *et al.* 2014).

Komet testi *in vitro* ve *in vivo* olarak DNA hasarının değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Hızlı, güvenilir ve basit bir biyokimyasal teknik olması son yıllarda geliştirilmesini sağlamıştır. Tek hücreli jel elektroforezi (SCGE) olarak da bilinmektedir. Agaroz jel içine gömülmüş hücrelerin parçalanmasından sonra elektroforez işlemi ile yürütülmesine dayanır. Elektroforez işlemi anında hasar görmemiş DNA'lar oldukları yerde kalırken, kırılmış DNA parçaları kuyruklu yıldız şeklinde bir yapı oluşturarak anoda doğru uzanır. Daha sonra bu kuyruklu yıldız şeklindeki DNA, DNA bağlayıcı bir boya (örneğin etidyum bromür) kullanılarak görünür hale getirilir. DNA'da oluşmuş hasarın derecelerini değerlendirmek için kuyruklu yıldızın şekli, boyutu ve içindeki DNA miktarı ölçülür. Komet testi analiz protokolü çeşitleri DNA çapraz bağları, tek iplik kırıkları ve çift iplik kırıklarının ölçülmesidir.

Komet testi biyolojik gözlem, radyasyon biyolojisi, çevresel toksikoloji, beslenme çalışmaları ve kanser çalışmaları dahil olmak üzere DNA hasarının incelenmesinde kullanılır. Kuyruklu yıldızların skorlanması görsel olarak veya görüntü analiz yazılımları ile değerlendirilebilir (Gyori *et al.* 2014).

Komet testi, tek bir hücrede DNA hasarını değerlendirmek için iyi kurulmuş basit, hassas ve ucuz bir yöntemdir. Koruma ve duyarlılıkla sağlam sonuçlar elde etmek için gerekli olan az sayıdaki hücre nedeniyle tercih edilmektedir (Liman *et al.* 2018).

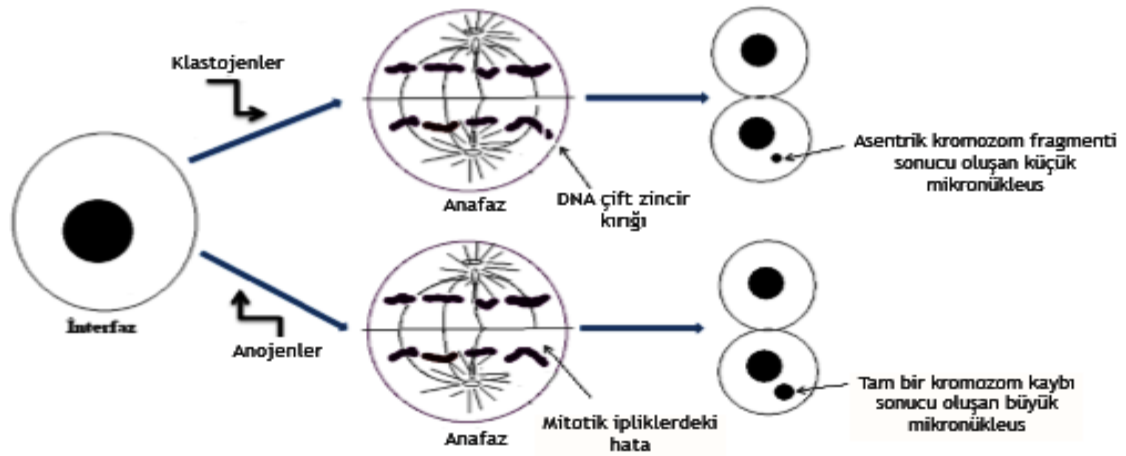
Bu özelliklerinin yanında önemli olarak tek bir dezavantajı bulunur ki komet testi sadece DNA onarım hızını ölçer, DNA onarım doğruluğunu ölçmez (Üstündağ *et al.* 2014).

Melissa officinalis yaprak ekstraktlarının antimikrobiyal, antioksidan kapasiteleri ve H₂O₂- indüklenmiş oksidatif hasara karşı DNA koruyucu etkisi komet testi ile

incelenmiştir. Oksidatif strese karşı DNA hasarında azalma gözlemlendi. *Melissa officinalis* metanolik yaprak ekstraktlarının hidrojen peroksitin zararlı etkisine karşı DNA'yı koruduğunu ve farklı mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkisi gözlemlenmiştir (Korcan *et al.* 2018).

2.4.2 Mikronukleus Testi

MN'lar hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkarlar ve ana çekirdeğe katılmazlar.

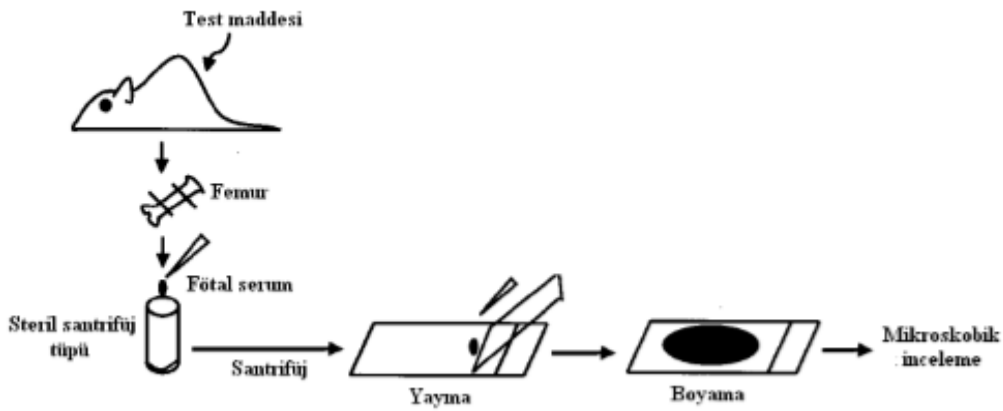


Şekil 2.8 Klastojenler ve Anojenler tarafından uyarılarak oluşan MN'lar (Şekeroğlu ve Atlı Şekeroğlu 2011).

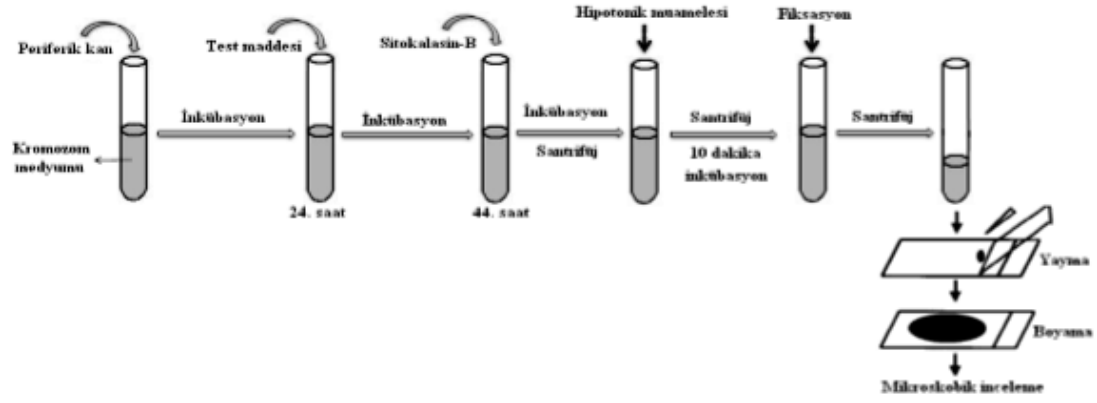
Tam kromozom veya asentrik kromozom parçalarından köken alırlar. Somatik hücrelerdeki MN artışı genomik kararsızlığın göstergesidir. Fiziksel ve kimyasal ajanların hücrelerde oluşturduğu genotoksik etkinin belirlenmesinde MN testi kullanılır. MN testi, mitoz bölünme ile oluşan hücre tipleri üzerinde *in vitro* ve *in vivo* olarak uygulanabilmekte ve kromozom anormallikleri testine göre daha kolay ve hızlı sonuç vermektedir. Kültürde bir kez bölünmesini tamamlamış binükleat hücrelerde MN frekansını saptayan ve sitokalsin-B ile sitokinezin bloklanmasına dayanan metodun gelişmesi ile MN testinin güvenilirliği ve geçerliliği artmıştır. Ayrıca *in vitro* çalışmalarda nükleer bölünme indeksi, *in vivo* çalışmalarda ise polikromatik eritrositler ile normokromatik eritrositler arasındaki oran kullanılarak sitotoksitenin tahmini de MN testi ile sağlanmaktadır. Kimyasal ve fiziksel faktörlerin potansiyel riskleri ve

olumsuz etkilerini değerlendiren genotoksisite çalışmaları günden güne daha çok önem kazanmaktadır.

MN testi; fiziksel etkenlerin, ilaçların, çevresel kirleticiler ve gıda katkı maddeleri gibi günlük yaşamda maruz kaldığımız her türlü kimyasal maddenin genotoksik ve karsinojenik potansiyellerinin ve güvenilirliklerinin araştırılması, kanser riskinin tahmin edilmesi, kanser genetiğinde hastalığın tanısının konulması ve takibinin yapılmasında tercih edilen güvenilir testlerdendir. Bu teknik hücrelerin morfolojik bozukluğunu, kromozom kırıklarını, premalign değişiklikleri ve kanseri gösterebildiğinden bir biyomarker olarak değerlendirilebilmekte ve karsinojenlere maruz kalmış bireylerde kanser risk derecesini göstermek amacıyla kullanılabilir. Sigara, pestisitler, nanomateriyaller, gıda katkı maddeleri ve diğer birçok kimyasal maddeler, parazitik enfeksiyonlar gibi çevresel ve mesleki etkileri değerlendirebilmek için de MN testi kolaylıkla kullanılmaktadır.



Şekil 2.9 *In vivo* MN yöntemi (Atlı Şekeroğlu 2011)



Şekil 2.10 *in vitro* MN yöntemi (Atlı Şekeroğlu 2011)

İlaçların genotoksik etkilerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bu test, hem yeni üretilen ilaçların mutajenik etkilerinin önceden gözlenebilmesini hem de ilaç kullanan kişilerdeki genotoksik etkilerin belirlenmesini sağlamasından dolayı ilaç şirketleri ve farmakolojik çalışmalar için giderek değeri artan bir test haline gelmiştir. MN sayısını belirlemek amacıyla her bir preparatta genel olarak 2000 binükleat hücre incelenir. Bu hücreler içerisinde MN taşıyanlar belirlenir. İncelenen binükleat hücrelerde toplam MN sayısı saptanarak, MN taşıyan binükleat hücrelerin oranı ve toplam MN sayısının incelenen binükleat hücre sayısına bölünmesiyle hücre başına düşen MN ortalaması ve % MN hesaplanır (Atlı Şekeroğlu 2011).

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

3.1.1 Cihazlar

- Hassas Terazî (Sartorius, Germany)
- Vortex (IKA, USA)
- Vakum Pompası (KNF Neuberger, Germany)
- Pikofüj (Roth, Taiwan)
- Floresan Mikroskop (Olympus, Japan)
- Mikroskop (Olympus, Japan)
- Santrifüj (Hettich, Germany)
- Saf Su Cihazı (GFL 2102, Germany)
- Laminer Kabin (JSR, Korea)
- Benmari (GFL, Germany)
- CO₂ İnkübatörü (Panasonic, Japan)
- Canlı Hücre Görüntüleme Mikroskobu (JULI Br, Korea)
- Elektroforez (Thermo Scientific EC 1000-90, USA)
- Otoklav (Jeio tech, Korea)
- pH metre (Hanna instruments, Romania)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Soxhlet (FALC Instruments, Italy)

3.1.2 Kimyasallar

- RPMI (Sigma, USA)
- FBS (Sigma, USA)
- Penisilin-streptomisin (Sigma, Israel)
- NEFA (Sigma, USA)
- Tripsin-EDTA solüsyonu (Sigma, USA)
- Tripan BLUE solüsyonu (Sigma, USA)

- DMSO (Sigma, China)
- PBS (Sigma, Germany)
- Etil alkol (Sigma-Aldrich, Germany)
- MTT (Sigma, USA)
- Beta Mercaptoetanol (Sigma, Germany)
- LMA (Sigma, USA)
- NMA (Sigma, USA)
- NaCl (Sigma-Aldrich, Germany)
- Etidyum bromür (Vivantis, USA)
- Aseton (Carlo Erba Reagenti, Italy)
- NaOH (AppliChem, Germany)
- EDTA (Sigma, USA)
- Trisma Base (Sigma, USA)
- Triton X-100 (Sigma, USA)
- Rosmarinik asit (Sigma USA)

3.2 Hücre Kültürü

Hücrelerin canlı vücudunun dışında incelenebilmesi ve çalışmalar yapılması amacıyla Harisson tarafından 1907 yılında hücre kültürü keşfedilmiştir. Harrison hayvan modeli olarak, öncelikle kurbağayı seçmiş ve doku parçalarının vücut dışında canlılığını koruyabilmesini amaçlayarak hücreleri kültüre etmiştir. Yeni ilaç moleküllerinin ve kimyasalların insanlar üzerinde ortaya çıkartabileceği potansiyel toksik etkilerin belirlenebilmesi amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Kimyasallar genellikle hayvanlara veya *in vitro* hücre kültürlerine uygulanmaktadır. *In vitro* hücre kültürünün en önemli avantajı sıcaklık, osmotik basınç, pH, O₂ ve CO₂ yoğunluğu gibi fizikokimyasal koşulların kültür ortamında kontrolünün sağlayarak fizyolojik koşulların sabit tutulabilmektedir. Hücre kültürünün avantajı, araştırmacının özel bir hücre tipi üzerinde çalışmasına olanak tanımasıdır.

Birçok doku çeşitli hücre tiplerini içerebilir. Dokudan elde edilen hücrelerden, tekrarlanan pasajlama işlemleri ile hedeflenen miktarda hücre elde edilebilir.

Hedeflenen hücreye ulaşıldıktan sonra, farklı araştırmalar için uygun şartlar altında uzun yıllar saklanabilir.

Hücrelerin kültüre edilirken avantajları ile karşılaştığı gibi dezavantajlarıyla da karşılaşmak mümkündür. Ortamdaki kontaminasyon, kültür ortamında bakteri ve mantar bulunması, hücrelerin gelişmesini ve çoğalmasını yavaşlatır. Steril koşullar altında gerçekleştirilen çalışma, bu problemi en aza indirgeyecektir. Diğer önemli problem ise, hücrelerin uzun süre pasajlanması durumunda, hücrelerin farklılaşmalarıdır.

İdeal kültür ortamının sağlanmasında besiyerleri, hücrelerin normal metabolik aktivitelerini yerine getirebilmeleri için gerekli olan ortam koşullarını sağlamak üzere hazırlanmış besleyici solüsyonlardır. Besiyeri içerisindeki aminoasit, karbonhidrat, vitamin ve iyonlar hücrenin gelişimini desteklerken, bazı iyonlar da hücrelerin çoğalabilmesi için uygun osmolarite ve pH'ın sağlanmasında rol alır. Hücre serisinin geliştirilmesine yönelik günümüzde en çok kullanılan Eagle'ın Temel Besiyeri (1959) ve Dulbecco tarafından modifiye edilen Eagle Besiyeri'dir (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM). Demir ve fenol kırmızısı içerisinde mevcuttur. Çoğu hücre hattı için tercih edilmektedir. Besiyerine eklenen serum, hücre çoğalmasını ve tutunmasını sağlayan büyüme faktörü, mineral, lipid ve hormonları içerir. Yetişkin sığır serumu, fetal sığır serumu, dana, at ve insan serumları doku kültürlerinde kullanılan serumlardır. Genellikle çalışmalarda fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum, FBS) tercih edilmektedir. Diğer serum tipleri daha çok, özel koşul sağlanması gereken hücre kültürlerinde kullanılmaktadır. FBS, bir sığır fetüsünden alınan kanın doğal pıhtılaşmasından artan kısımdan hazırlanır. *In vitro* hücre kültüründe serum kullanılan çalışmalarda yaygın kullanılmaktadır. Tabiki hücre çeşidine ve uygulama alanlarına göre kullanımı değişebilir. Hücre kültüründe standart serum oranı %10'dur. İçerdiği büyüme faktörleri ile hücrelerin çoğalmasını artırır aynı zamanda çeşitli proteinler ile hücrelerin kültür ortamında daha kolay tutunması için olanak sağlar. Protein ve nükleik asit sentezinin gerçekleştiği ve enerji ihtiyacının en fazla olduğu dönemde, hücrelerin gelişimine destek amacıyla glukoz yanında glutamin de gerekir. Hücreler nükleotid, aminoasit, vitamin gibi bazı moleküllerin sentezi için azota ihtiyaç duyar. Glutamin ise

bu moleküllerin ve diğer azot içeren bileşiklerin sentezinde azot kaynağı olarak rol almaktır. Hızlı çoğalan hücrelerde, kültür ortamında glukoz miktarı azalmakta ve enerji ihtiyacı artmaktadır. Bu durumda daha fazla enerji elde etmek için aminoasitler metabolize olur. Kültür ortamında meydana gelebilecek kontaminasyonları engellemek için ise antibiyotikler kullanılmaktadır (Koçaklı vd. 2015).

Yılmaz (2014) ‘‘Borik Asitin Antioksidan Aktivitesinin Hücre Kültüründe Araştırılması’’ adlı çalışmada, V79 hücrelerinde oksidatif DNA hasarına karşı borik asitin koruyucu etkisini araştırmıştır. Çalışmada test edilen borik asit konsantrasyonları insanların günlük yaşamda maruz kalabilecekleri seviyeleri yansıtmaktadır. Borik asitle ön-maruziyet uygulanmış V79 hücrelerinde H₂O₂’nin oluşturduğu oksidatif DNA hasarı anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür.

3.2.1 Hücre Kültürü Mediyumun Hazırlanması

0,20 µm çapında PES membran filtreden tüm kimyasallar vakum yardımıyla geçirilerek (Resim 3.1) çalışmada kullanılan mediyumlar hazırlanmıştır. Hazırlanan mediyum +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.1 Mediyumun Hazırlanması

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



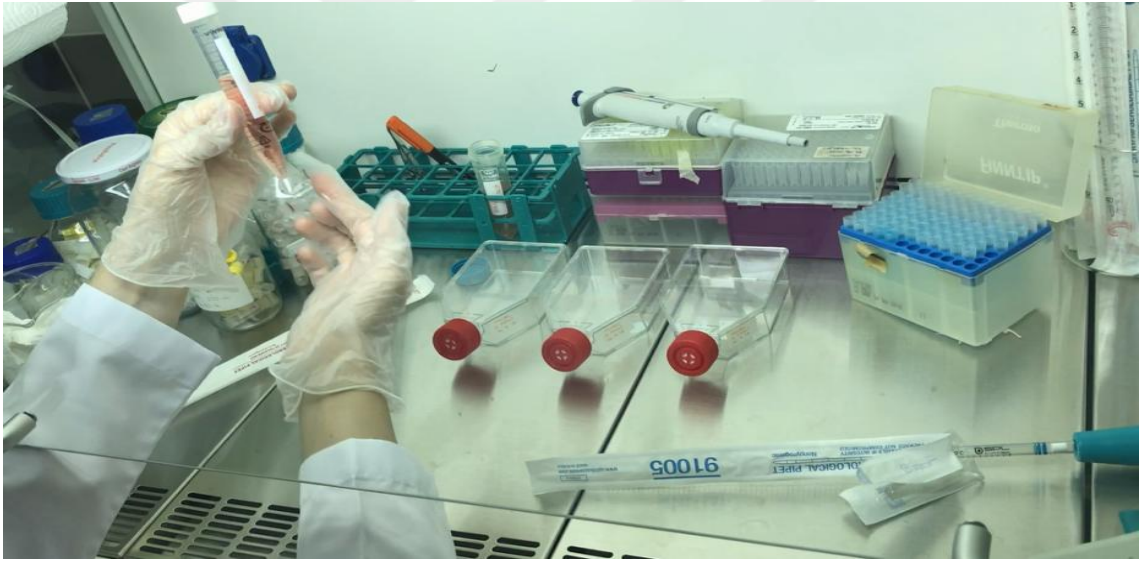
Resim 3.1 Mediyumun hazırlanması

3.2.2 HepG2 Hücre Hattının Kültüre Aktarılması

- Kryo tüp içerisinde donmuş halde bulunan hücreler 37° C'deki sıcak su banyosunda 1-2 dk süre bekletilerek tam çözünmeden su banyosundan çıkarıldı ve %70'lik alkolden geçirilerek kabine alındı.
- Kabin içi sterilizasyonu için 40dk önce UV ışığı açıldı ve kullanılacak malzemeler kabin içinde steril edildi.
- Hücreler, içerisinde 3 ml mediyum bulunan 15 ml'lik falkona alındı. Ardından 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- Flasklar düzenlendi, kullanılan hücre ismi ve günün tarihleri yazıldı. (Resim3.2 ve Resim 3.3)

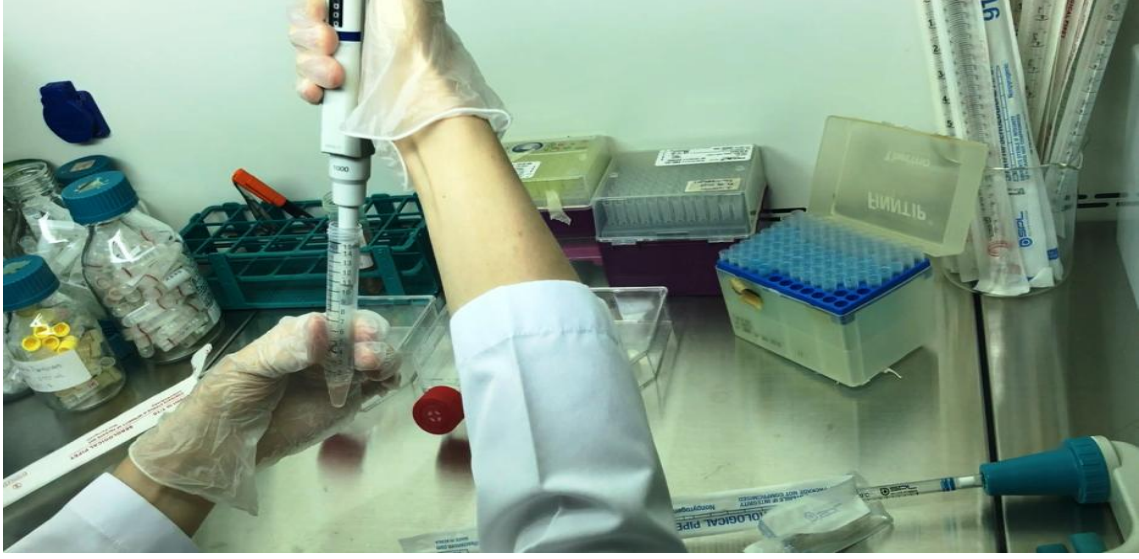


Resim 3.2 Flask kodlaması



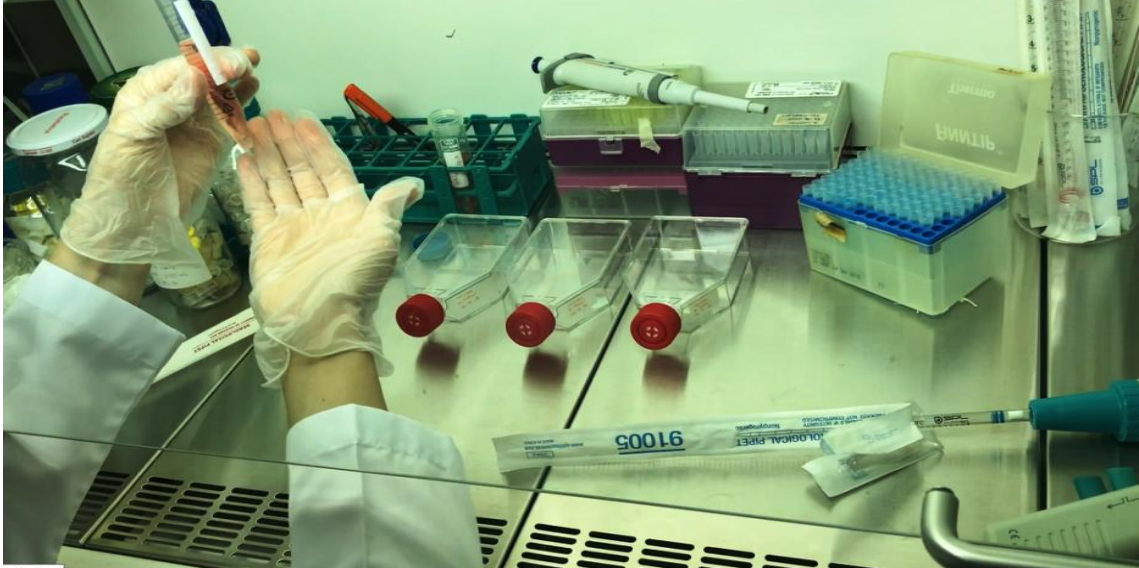
Resim 3.3 Santrifüj sonrası falkonda biriken hücre pelleti

- Santrifüj işleminden sonra süpernatant atılıp, hücrelerin üzerine 1 ml mediyum eklenerek hafifçe pipetaj yapıldı. % 20 FBS içeren 75 cm²'lik flaska aktarıldı (Resim 3.4).



Resim 3.4 Hücre homojenizasyonu

- Hücre homojenizasyonu, hücre yıkama işlemlerinde ve hücre ekim işleminde önemlidir. Yıkama işleminde detripsinijasyon etkiliyken, ekim işlemindeyse hücrelerin flask yüzüne eşit dağılımı için etkilidir (Resim 3.5).

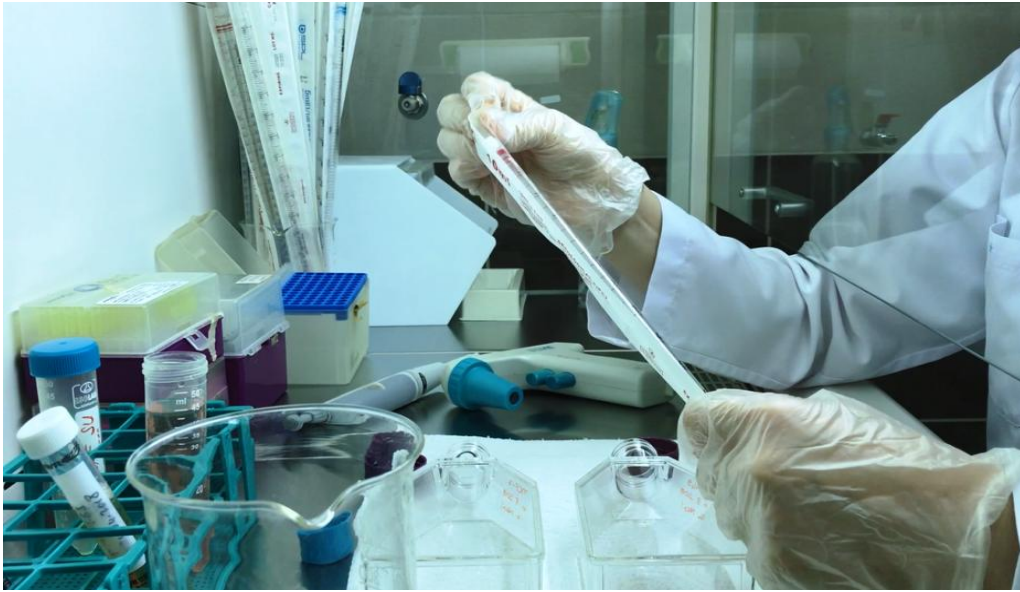


Resim 3.5 Hücre 1. yıkama işlemi



Resim 3.6 Hücre 2. yıkama işlemi

- Hücreler için tek yıkama yeterli değildir. Buyüzden iki kez yıkama işlemi yapıldı (Resim 3.6).
- Sağlıklı hücre konfluenti için flasklar 37° C ve % 5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı.
- Sterilizasyon çalışma öncesinde önem arzettiği gibi çalışma esnasında da önem arzeder. Kullanılan pipet uçları herhangi bir yere değdirilmeden işlem gerçekleştirilir (Resim 3.7, Resim 3.8 ve Resim 3.9).



Resim 3.7 Kullanılan pipet uçlarının sterilizasyonu



Resim 3.8 Flasklara mediyum eklenmesi



Resim 3.9 Flask yüzeyine hücrelerin eşit dağılımı

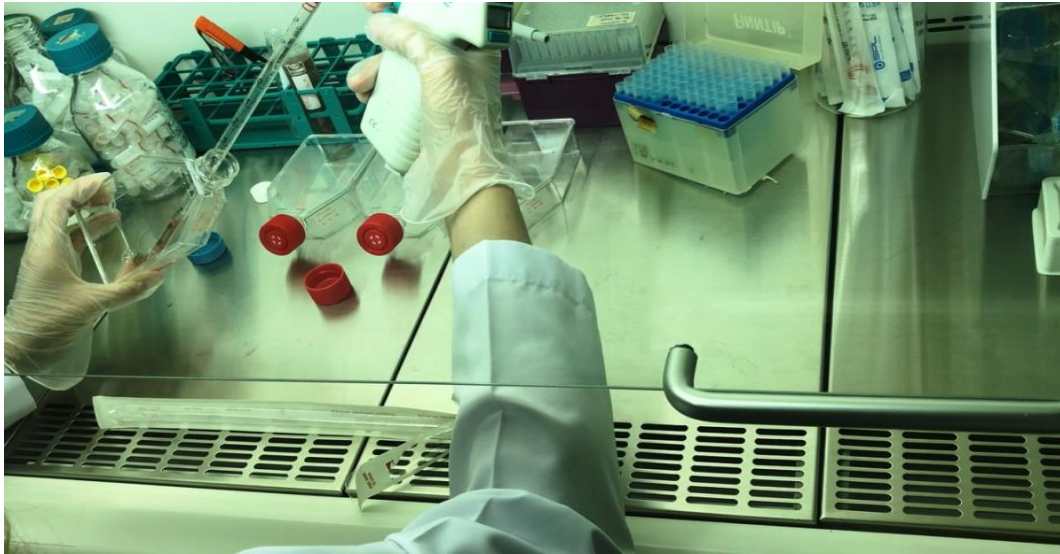
3.2.3 HepG2 Hücre Hattının Pasajlanması

- Flask içinde hücrelerin konfluent oranı % 80 olduğunda pasajlama işlemine geçildi (Resim 3.10).



Resim 3.10 Hücre konfluent oranı gözlemlenmesi

- Hücrelerin üzerindeki mediyum steril pipet yardımıyla alınıp atıldı (Resim 3.11).



Şekil 3.11 Flasktan mediyumun dışa aktarımı

- Hücrelerin üzerine 37° C olan 3 ml tripsin-EDTA eklenmiş ve flask yüzeyinin her tarafına yayılması sağlandı (Resim 3.12, Resim 3.13).



Resim 3.12 Tripsinijasyon



Resim 3.13 Flask yüzğine tripsin yaydırılması

- Ardından flask 37° C ve % 5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılıp 5 dk inkübe edildi (Resim 3.14).



Resim 3.14 İnkübatör içerisine flask dizilimi

- Hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldıkları gözlemlendiğinde flasktan alınarak içerisinde 3 ml mediyum olan falkona aktarıldı (Resim 3.15).



Resim 3.15 Hücrelerin flask yüzeğinden ayrılma kontrolü

- Falkona aynı miktarda denge hazırlanarak 800 rpm’de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılıp pellet üzerine 2 ml mediyum eklenip, hafifçe pipetaj yapıldı (Resim 3.16).



Resim 3.16 Hücre pellet ve süpernatant kısmı

- Ardından içerisinde 12 ml mediyum bulunan 75 cm²'lik flasklara 0,5 ml olacak şekilde paylaştırıldı (Resim 3.17).



Resim 3.17 Hücre ekimi

- Flasklar 37⁰ C ve % 5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı (Resim 3.18).

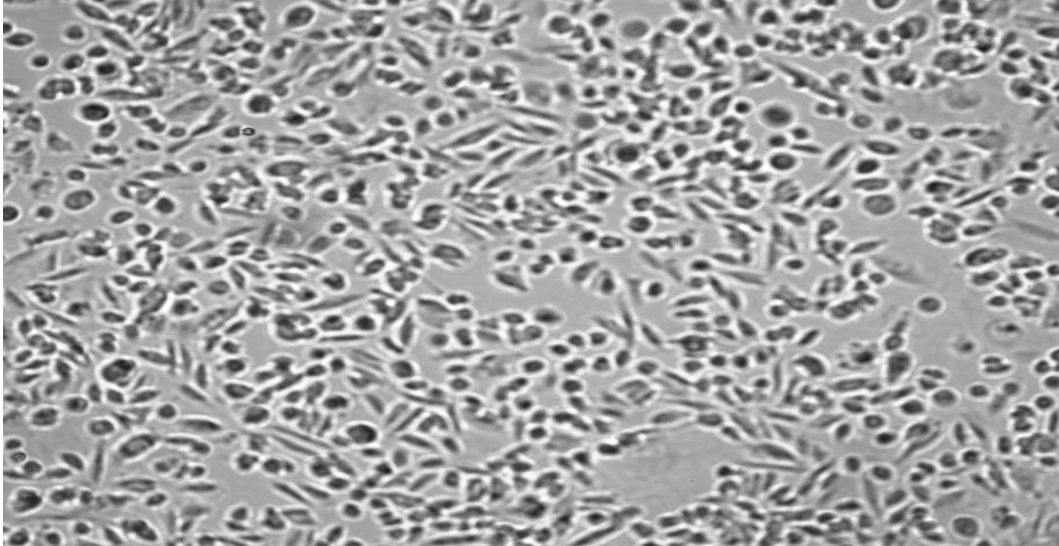


Resim 3.18 İnkübatör düzeni

- Zaman kaybı ve karışıklık olmaması için inkübatör düzenine dikkat edildi.

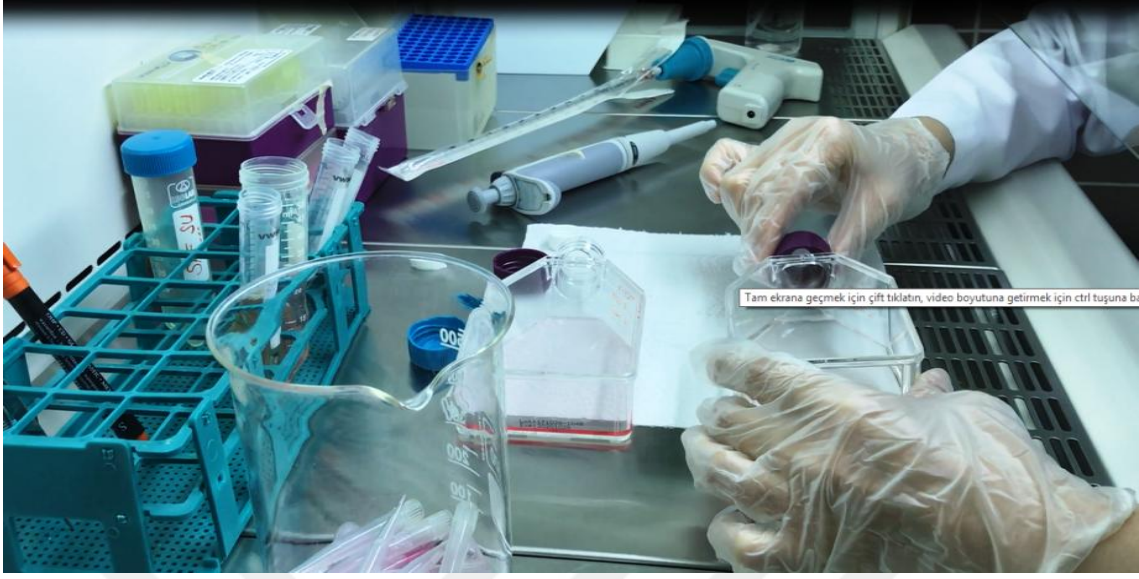
3.2.4 HepG2 Hücre Hattının Sıvı Azotta Saklanması

- Flask yüzeyinde hücre yoğunluğu % 80 olduğunda mediyum atıldı (Resim 3.19).



Resim 3.19 HepG2 hücre konfluenti

- Hücrelerin üzerine 4 ml tripsin-EDTA eklenerek flask yüzeyinin her tarafına yayılması sağlandı (Resim 3.20).



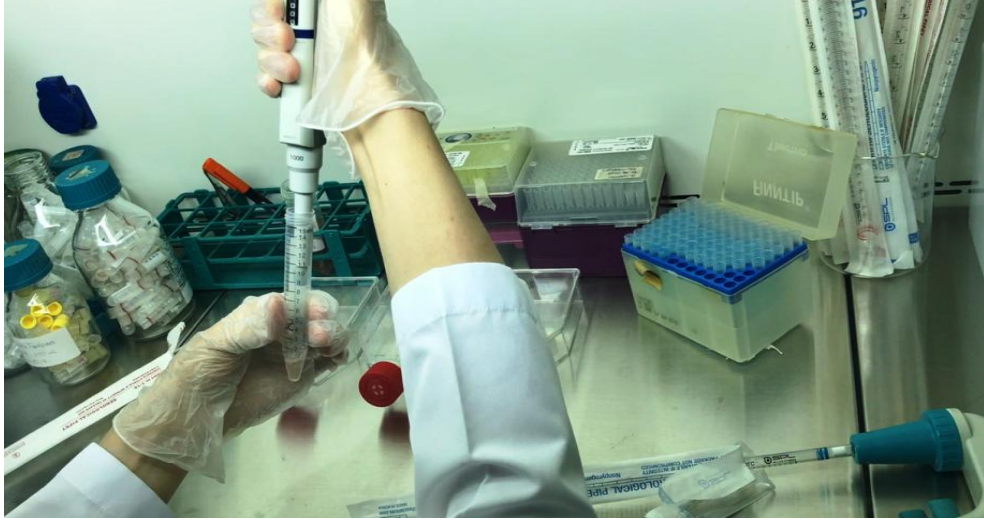
Resim 3.20 Tripsin yayılımı

- Flasklar 37° C ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde 5 dk inkübasyona bırakıldı (Resim 3.21).



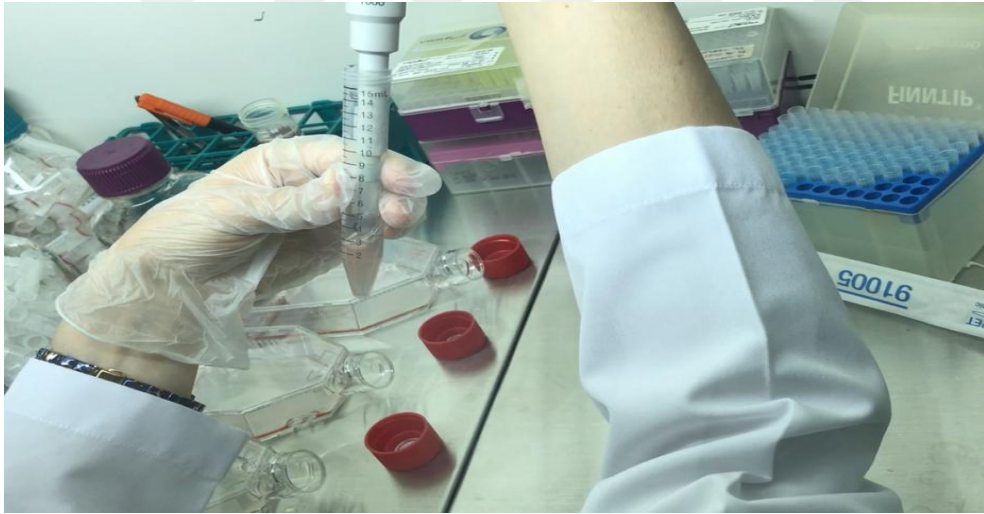
Resim 3.21 Flask sterilizasyonu

- Hücreler flask yüzeyinden kalkınca içerisinde 4 ml mediyum bulunan falkonlara alındı (Resim 3.22).



Resim 3.22 Hücrelerin falkonda toplanması

- Falconlar 800 rpm’de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılarak pellet üzerine 4 ml mediyum eklendi ve pellet mediyum ile homojenize edildi (Resim 3.23).



Resim 3.23 Mikropipet ile hücre homojenizasyonu

- 800 rpm’de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılarak pellet üzerine soğuk % 5 DMSO içeren FBS eklendi.
- Hücreler buz içerisinde bulunan kryo tüpe alındı.
- Sıvı azotta dondurularak ilerleyen zamandaki çalışmalar için saklandı.

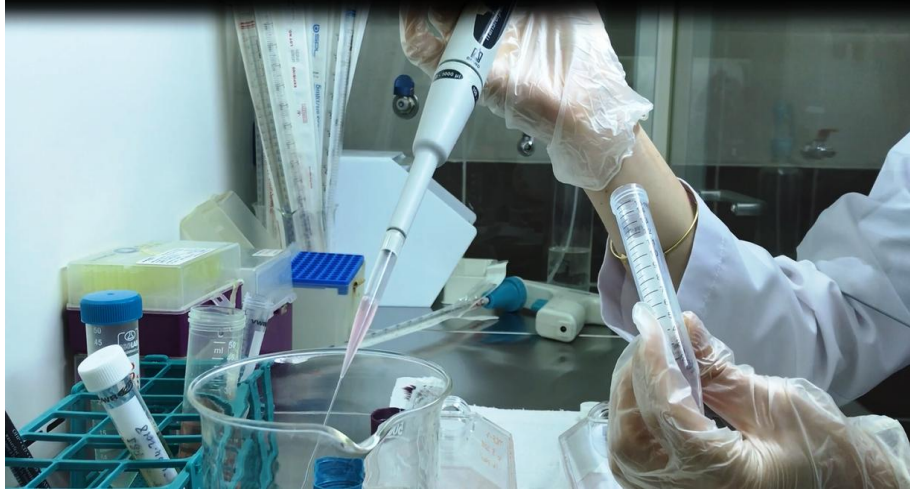
3.2.5 Hücre Sayımı ve Hücre Canlılığının Belirlenmesi

- Flask yüzeyinde hücre yoğunluğu % 80 olduğunda mediyum atıldı.
- Hücrelerin üzerine 4 ml tripsin-EDTA eklenerek flask yüzeyinin her tarafına yayılması sağlandı (Resim 3.24).



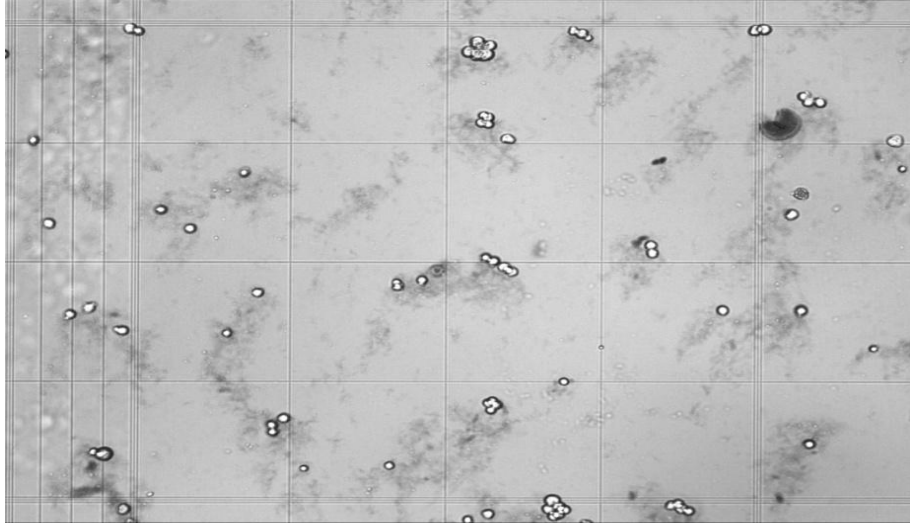
Resim 3.24 Flasktaki hücelere tripsin eklenmesi

- Flasklar 37° C ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde 5 dk inkübasyona bırakıldı.
- Hücreler flask yüzeyinden kalkınca içerisinde 4 ml mediyum bulunan falkonlara alındı.
- Faklon 800 rpm’de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılıp (Resim 3.25) hücrelerin üzerine 2 ml mediyum eklendi ve hafifçe pipetaj yapıldı.



Resim 3.25 Süpernatant uzaklaştırılması

- Hücre süspansiyonundan 50 µl alınarak, 50 µl tripan blue ile karıştırıldı.
- Karışımdan thoma lamına 10 µl aktararak sayım yapıldı (Resim 3.26).



Resim 3.26 Hücre sayım lam görüntüsü

- Canlı hücreler parlak görünürken ölü hücreler maviye boyandı.
- Süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı:

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

Bütün işlemler bittikten sonra gerekli malzemeler yerlerine alınır ve kabin temizlendi (Resim 3.27 ve Resim 3.28).



Resim 3.27 Saf su ile ilk aşama kabin temizliği



Resim 3.28 %70lik etil alkol ile ikinci aşama kabin temizliği

3.3 MTT Yöntemi

Hücre proliferasyon testlerinde metabolik aktivitenin ölçümü ve sitotoksitenin değerlendirilmesi için metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) öncelikli tercih edilen tuzdur. Bu yöntemin amacı MTT boyasının tetrazolium halkasının parçalanmasını sağlamaktır. MTT absorbe olduğu canlı hücrelerde mitokondriyal süksinat dehidrogenaz

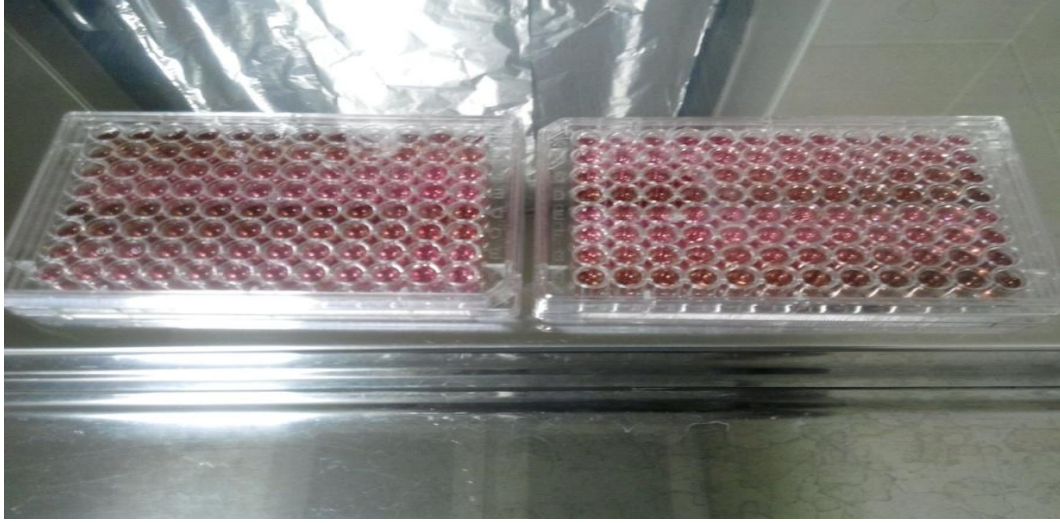
enziminin katalizlediği reaksiyonla mor-mavi renkli ve suda çözünmeyen formazana indirgenerek sadece mitokondrinin aktif olduğu hücrelerde formazan kristalleri görülmesini sağlar. Formazan kristallerinin varlığı canlılığın olduğunu gösterir ve canlı hücreler ile spektrofotometrik olarak ilişkisi yorumlanır (Turhan 2017).

3.3.1 MTT'nin Hazırlanması

- 10 mg MTT 10 mL PBS ile çözündürüldü.
- 0.22 µm çapındaki enjektör filtresinden geçirilerek steril edildi.

3.3.2 MTT Yöntemi ile HepG2 hücreleri üzerinde RA'in LD₀ Belirlenmesi

- Hücre sayısı hesaplanmış süspansiyondan 96'lık plağın her bir kuyucuğuna 5×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı.
- Plak 37° C ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi.
- RA mediyumda çözündürüldü.
- Hücrelerin plak yüzeyinde konfluent oranı % 40-50 olduğunda Rosmarinik asit ekstresi; 50 mM, 25 mM, 12,5 mM, 6,25 mM, 2,5 mM, 1,25 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,125 mM dozlarında uygulandı.
- Kontrol grubuna aynı hacimde mediyum eklendi.
- Plak inkübatöre kaldırılıp 37° C ve % 5 CO₂ ortamında 24 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyondan sonra her bir kuyucuğa 30µl MTT solüsyonu eklendi ve 3 saat tekrar inkübe edildi.
- Plak kuyucuklarındaki mediyum pipet yardımıyla çekilip uzaklaştırıldı.
- Plaktaki kuyucuklara formazan kristallerini çözen DMSO 200 µl olacak şekilde eklendi.
- Plak 15 dk inkübasyona tabi tutuldu.
- Çözünen formazanlar mikropalak okuyucu spektrofotometre (BioTekELx800, BioTek Instruments, USA) ile 540 nm absorbansta ölçümleri yapıldı.



Resim 3.29 HepG2 Hücrelerine Doz Uygulaması

3.4 Komet Testi

Hazırlanan kimyasallar dH_2O ile 200 ml'ye tamamlanarak pH 10 olacak şekilde ayarlandı (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

Hazırlanan kimyasallar dH_2O ile 500 ml'ye tamamlanarak $\text{pH} > 13$ olacak şekilde ayarlandı (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 Elektroforez çözeltisinin hazırlanması

Kimyasal	Miktarı
NaOH	6 g
EDTA	0,18 g

Hazırlanan kimyasal dH₂O ile 300 ml'ye tamamlanarak 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 için 0,03 g NMA 3 ml PBS ile bek alevinde prepara edilerek hazırlandı.

% 0,8 LMA hazırlanması için 0,016 g LMA 2 ml PBS ile bek alevinde prepara edilerek hazırlandı.

Stok etidyum bromür hazırlanması için 5 mg etidyum brömür 25 ml dH₂O'da çözdürüldü. Çalışmada 10 kat dilüe edilerek kullanıldı.

- Uygulanan konsantrasyonlardaki hücreler flask yüzeyinden alınarak 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırılarak hücreler süspanse edildi.
- Hücre süspansiyonundan 40 µl alınarak ependorf içerisinde 100 µl LMA ile karıştırıldı.
- Ependorf içindeki hücre-LMA karışımının hepsi alınarak bir gün önceden hazırlanmış NMA'lı lamlara prepara edildi.
- Preparatlar donmaları için buz kasetlerinin üzerine yerleştirildi.
- Donan preparatlar üzerindeki lameller yavaşça alınarak 60 dk lizis işlemine tabi tutuldu.
- Lizis işleminden sonra 20 dk alıştırma 20 dk yürütme olmak üzere 25 V 300 mA'de elektroforez işlemine tabi tutuldu.
- Elektroforezden alınan preparatlar nötralizasyon tamponuyla yıkandı.
- Yıkama işleminin ardından her bir preparat 70 µl etidyum bromür ile boyanarak lamelle kapatıldı.
- Elde edilen preparatlardan her bir preparat için floresans mikroskopta 100 hücre olacak şekilde sayımlar yapıldı.

3.5 Mikronükleus Testi

Çizelge 3.5 KCL çözeltisinin hazırlanması

Kimyasal	Miktarı
KCl	0,4g
Distile su	100ml

KCl ile dH₂O vortekslenerek homojenize edilir.

Fiksatiflerin Hazırlanışı:

Fix2 için; 40ml Glasiyal Asetik Asit + 200ml metanol (Son hacim: 240ml)

Fix1 için; 50ml Fix2 + 50ml %0.9 NaCl (Son hacim: 100ml)

Önce fix2 daha sonra fix1 hazırlanır.Çalışmaya başlamadan 2saat önce fiksatifler hazırlanmalıdır.

%5'lik Giemsa boyası için;

5ml TamponA +5ml TamponB + 5ml Giemsa karıştırılır. Son hacim dH₂O ile 100ml'ye tamamlandı. (ph:6,8) Hazırlanan karışım filtre kağıdından geçirildi.

- Şale içerisine nitrozaset veya distile su eklendi.
- Örnek sayısı kadar lam numaralandırılarak şale içerisine dizildi. Çalışma başlamadan 30 dk önce (+4 °C) buzdolabında bekletildi.
- Ependorf içerisindeki RA, CisP, RA+CisP ve kontrol grubu örnekleri üzerine 1ml KCL eklendi, homojenize edildi ve 5dk beklendi.
- KCL eklenen örnekler santrifüje 5dk tabi tutuldu(1500rpm)
- Süpernatant atıldı, pellet üzerine fix1 eklendi ve 5dk yine santrifüj edildi(1500rpm).
- Süpernatant atıldı, pellet üzerine fix2 eklendi ve tekrar 5dk santrifüj edildi(1500rpm)
- Son santrifüj sonrası süpernatant yine atıldı, pellet kısmı şalelerdeki lamlara yayıldı.
- Birgün sonra lamdaki kuruyan örnekler şale içerisinde giemsa boyasına 15dk maruz bırakılarak boyanması sağlandı.

3.6 İstatistiksel Analiz

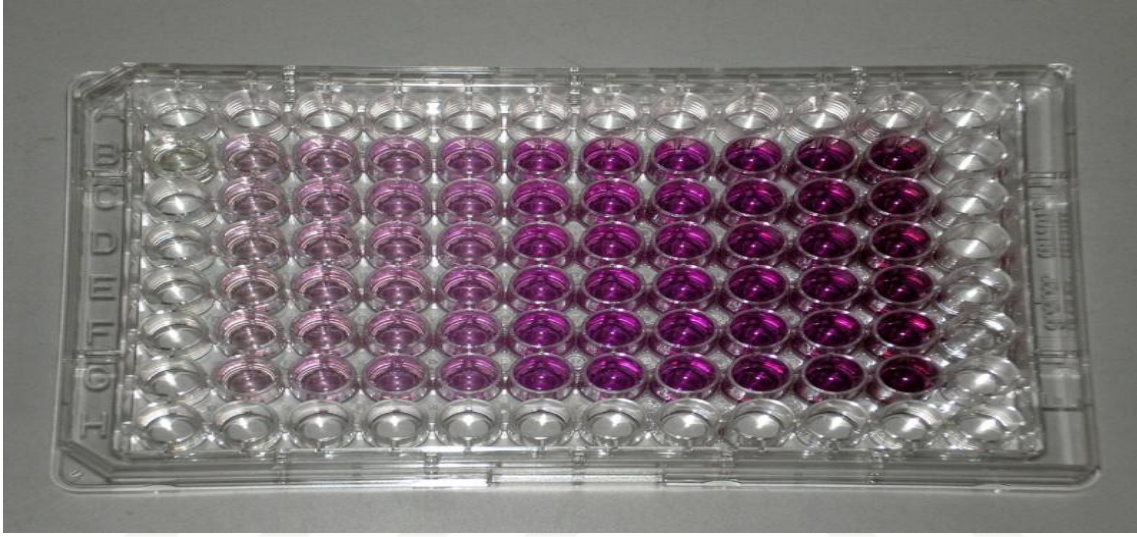
MTT çalışması ile elde edilen spektrofotometrik ölçümler % olarak ifade edilmiştir. Verilere (normal dağılım göstermediği için) non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis ve Man Whitney testleri uygulanmıştır. Sonuçlar ortalaması $\pm$ SS (standart sapma) olarak verilmiştir. Kontrol ile uygulama grupları arasındaki istatistiksel farklılıklar SPSS ile değerlendirildi. Komet analizinden elde edilen veriler varyans alanizi (ANOVA), LSD test ile belirlendi ($p < 0.05$). Yapılan değerlendirme Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.



4. BULGULAR

4.1 RA' in Uyguluma grubu HepG2 hücrelerinde DNA hasar düzeyleri ve MN Frekanslarının Değerlendirilmesi

HepG2 hücre hattı üzerinde rosmarinik asitin etkileri belirlenmesi için farklı dozlar kullanılarak, tripan blue yöntemi ile hücre yoğunluğu belirlendi.



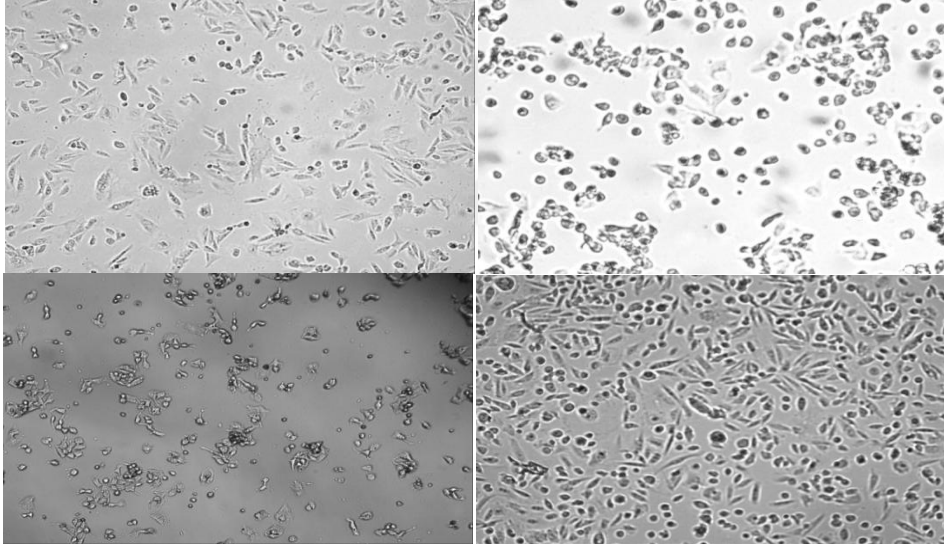
Resim 4.1 HepG2 Hücrelerine MTT Uygulaması

HepG2 hücre hattı üzerine RA' in LD₀'nun belirlenmesi amacıyla MTT yöntemi kullanılarak hücre canlılığı belirlendi. HepG2 hücre hattı 96'lık plak içerisine 5×10^3 hücre ekilerek hücrelerin metabolik fonksiyonlarını düzenlemeleri için 24 saat beklendi. Konfluent oranı % 40-50 olduğunda kültür ortamındaki mediyum alınıp kültür mediyumu ile dilüe edilmiş RA' in 50, 25, 6,25, 1,25, 0,5, 0,25 ve 0,125 mM dozları ilave edildi. Plak 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatin sonunda, MTT yöntemi ile RA' in HepG2 hücreleri üzerindeki olası sitotoksik etkisi mikropalak okuyucu ile 540 nm'de okutularak sonuçlar yüzde olarak ifade edildi. Kontrol yüzde yüz canlı olarak kabul edilerek RA' in LD₀ dozu 0,01 mM olarak belirlendi. CisP'in LD₅₀ dozu olarak 11,06 µg/ml kullanılmıştır (Çizelge 4.1).

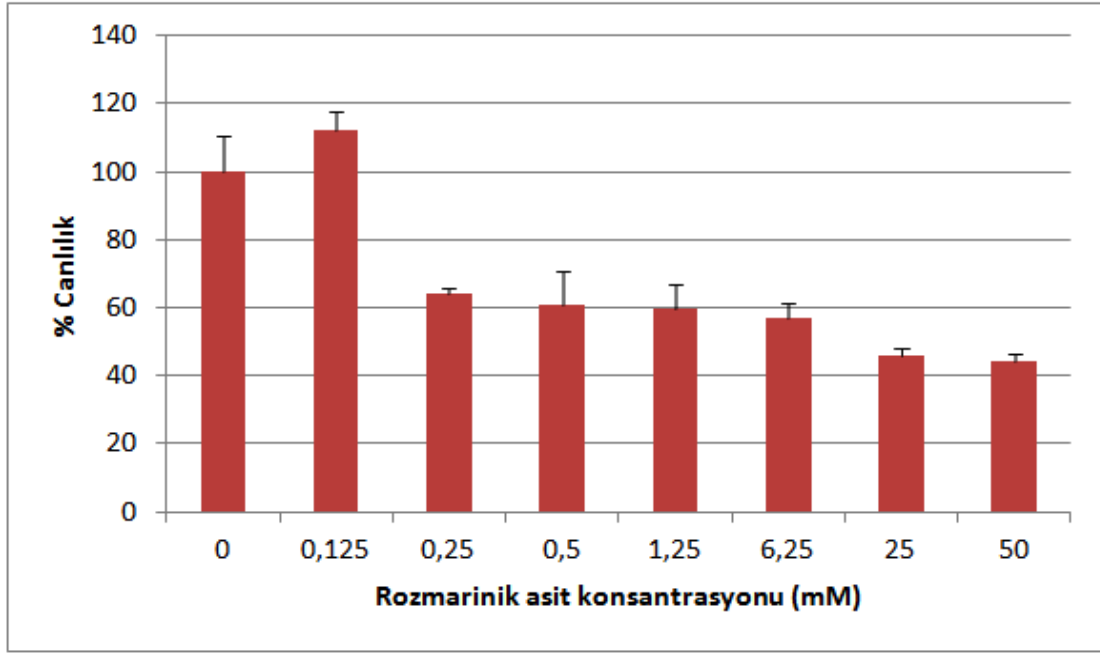
CisP dozları ise 10 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 600 µg/ml, 800 µg/ml, 1000 µg/ml kullanıldı. Sitotoksik dozu (LD₅₀) 11,06 µg/ml olarak

bulundu. RA'in LD₀ dozu, CisP'in LD₅₀ dozu çalışmamızda genotoksisiteye etkisini gözlemlemek için kombine edildi. Komet yöntemi ve MN testi için sırasıyla kontrol grubu, RA, CisP, RA + CisP grupları 3'er tekrarlar floresan mikroskopta sayılarak incelendi. Toplam 100 hücre sayılıp komet ve MN testi analizinden elde edilen veriler varyans analizine tabi tutuldu. (RA+CisP: RA'in LD₀ dozu, CisP'in LD₅₀ dozu kullanıldı) RA + CisP kombinasyonunda DNA hasar skorunun düşük olduğu görüldü ($p<0,05$).

CisP karaciğer karsinom hücrelerinin gelişimini ve ilerlemesini durdurucu olarak etki ederken, RA ile kombinasyonunda bu etkinin fazla olduğu görülmüştür. Ancak CisP antikanser tedavisini iyileştirmek ve neden olduğu toksik etkilerin azaltılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.



Resim 4.2 Farklı doz uygulamaları sonucu HepG2 canlı hücre görseli



Şekil 4.1 HepG2 Hücrelerinde Sitotoksitenin Belirlenmesi

Çizelge 4.1 RA' in Uyguluma grubu HepG2 hücrelerinde DNA hasar düzeyleri ve MN Frekansları

Uygulama Grupları	DNA Hasar Düzeyleri Komet Skorları (Arbitrary Unit)	MN Testi Frekansları (%)
Kontrol Grubu	4,83±1,94	0,0067±0,0052
RA Grubu (0,01 mM)	4,33±0,82	0,0033±0,0052
CisP Grubu (11,06 µg/ml)	13,67±1,97 ^a	0,0533±0,0175 ^a
RA+CisP Grubu	7,33±0,52 ^b	0,0333±0,033 ^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 p<0.05; istatistiksel olarak kontrol grubundan farklı olan grupları ifade etmektedir.

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

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de ciddi sağlık sorunlarından biri olan kanser 2030 yılına kadar ölüm nedeni olarak ilk sırayı alacağı düşünülmektedir. Kanseri oluşturan faktörler hem çevresel hem de genetik olabilir. Çevresel nedenlere başta sigara olmak üzere, fiziksel ve kimyasal ajanlar, virüsler gibi birçok örnek verilebilir. Bazı kaynaklara göre kanserin beslenme ile ilişkisi %35 olarak gösterilmiştir. Bunun yanı sıra yeterince fiziksel aktivite yapmayan ve dengesiz beslenen bireylerde de kanser riski artmaktadır. Ayrıca kahve tüketimi de bazı kanser türlerine karşı paralel arttığı gözlemlenirken, bazı türlere göreyse koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (Aygün Çevik ve Pirinçci 2017).

Potansiyel olarak klastojenik bileşiklerin tanımlanmasına ilişkin *in vitro* MN testi, kromozom sapmaları deneyleri ve komet testleri arasındaki yüksek uyum, gerek MN gerekse komet testlerinin geçerliliği ve uygunluğu için ek kanıtlar sağlar (Hude *et al.* 2000).

Komet testi, DNA hasarının ölçümü için hızlı, görsel ve kantitatif bir tekniktir. Alkali koşullar altında, test, tek ve çift sarmal kırılmalarını, eksik onarım yerlerini ve alkali kararsız bölgeleri, ayrıca DNA-protein ve DNA-DNA çapraz bağlarını tespit edebilir (Burlinson *et al.* 2007). Çalışmamızda RA, MN ve DNA' da hasar oluşumuna sebep olmadığından genotoksik bulunmamıştır.

Pereira vd. (2005) komet yöntemi kullanarak Wistar sıçan beyin dokusunda veya periferik kanda RA tarafından indüklenen DNA hasarına rastlamamıştır. RA ayrıca mikronükleus testi ile fare periferik kanında mutajenik etki göstermediği belirtilmiştir (Furtado *et al.* 2008).

Bulgularımız, RA'nın kemoterapötik ajan CisP'e karşı net bir kemopreventif aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu etki, hem MN testinde hem de komet testinde test edilen konsantrasyonda tespit edilmiştir. CisP'in kimyasal yapısının serbest radikal oluşumunu destekleyebileceği düşünülmekte ve bileşik, DNA ile kompleksler

oluşturabilmektedir. Bu durum DNA'da zincir kırıklarına neden olabilir. Her ne kadar RA'in antijenotoksik etkisinin altında yatan mekanizmalar hala tam olarak anlaşılmamasına rağmen, RA'in antioksidan aktivitesinin, bu çalışmada gözlemlenen CisP kaynaklı DNA hasarının azaltılmasına katkıda bulunması mümkündür.

Vattem vd. (2006), Ames testi ile RA'in, sodyum azid ve N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidinin mutajenik aktivitesini inhibe ettiğini göstermişlerdir. RA'nın antimutagenik aktivitesinin, bakteri redoks ortamının modülasyonuna bağlı olabileceği sonucuna varmışlardır. Del Baño vd. (2006) ve Sánchez-Campillo vd. (2009), RA'in insan lenfositlerinde gama radyasyonu ile indüklenen MN sıklığını azalttığını göstermişlerdir. İyonlaştırıcı radyasyonun reaktif oksijen türleri (ROS) ürettiği ve mutasyonlara ve kromozom sapmalarına yol açan hücresel DNA hasarını indüklediği (Riley 1994) bilindiğinden, RA'in radyoprotektif etkisi, serbest radikalleri temizleme kabiliyeti ile ilişkilendirilmiştir. RA'in antimutajenik kapasitesi, fare periferik kan MN testi ile değerlendirilmiş ve RA'in koruyucu etkisinin, antioksidan aktivitesinden kaynaklanıyor olabileceği ifade edilmiştir (Furtado *et al.* 2008).

RA'in astrositler ve makrofajlardaki ROS aracılı hasarı etkili bir şekilde inhibe ettiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (Gao *et al.* 2005, Qiao *et al.* 2005). Ayrıca, diğer çalışmalar RA'in kalp kası hücrelerinde (Kim *et al.* 2005), PC12 hücrelerinde (Iuvone *et al.* 2006) ve insan dopaminerjik nöronal hücrelerinde (Lee *et al.* 2008) apoptozu önleyebileceğini göstermiştir. RA'in inhibe edici etkisi, serbest radikal temizleyici aktivitesi ile ilişkilendirildi. DXR ile indüklenmiş genotoksisitede RA'in önemli bir doza bağımlı koruyucu etkisinin olmaması, efor için optimum bir dozun varlığını göstermektedir. RA maksimum etkisi, RA konsantrasyonunun optimal dozun üstünde artırılması, MN ve komet testinde istenen herhangi bir etki vermediği de gösterilmiştir (Furtado *et al.* 2008).

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında, HepG2 hücrelerinde, RA'in genotoksik etkiye sahip olmadığı, aynı zamanda CisP'in neden olduğu genotoksisiteyi azaltmada ise tedavi edici dozunun genotoksisiteyi azaltmada etkili olabileceği ortaya konmuştur.

RA'in kimyasal mutagenezi uygun şekilde modüle ettiği mekanizmaları ve koşulları belirlemek için ileri çalışmalar gereklidir. Böylece bu bileşik ileride kemoterapi sırasında veya oksidatif stres ile ilgili hastalıkların tedavisi için bir adjuvan olarak uygulanabilir.



6. KAYNAKLAR

- Ali, M. M. (2017). Farklı *Thermopsis turcica* Ekstrelerinin HepG2 Hücre Hatlarında Antikanser, Sitotoksik, Genotoksik Mekanizmalarının Gen Ekspresyon Analizleri Yöntemiyle Değerlendirilmesi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Afyonkarahisar.
- Altınok, B. ve Sunguroğlu, A. (2016). WNT Sinyal Yolağı ve Kanser. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, **2**: 27-38.
- Aygün Çevik, B. ve Pirinççi, E. (2017). Beslenme ve Kanser. *Fırat Tıp Dergisi*, **22**: 1-7.
- Aziza, A. N., Froemming Kadira, S.H.S.A. and Ibrahim, M. J. (2018). Apigenin Increases Cisplatin Inhibitory Effects on the Telomerase Activity of Triple Negative Breasts Cancer Cells. *Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)* **80**: 123-132.
- Balkan, B. M. ve Sel, T. (2014). Vitamin C'nin HepG2 hücrelerinde apoptozis üzerine etkileri. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, **61**: 237-24.
- Bayındır, N., Eşrefoğlu, M., Kumaş, M., Iraz, M., Kesgin, S. ve Kılıç, E. (2016). Protective Effect of Curcumin on Cadmium-Induced Liver Apoptosis in Rats. *Bezmialem Science* **3**: 99-105.
- Basmacioğlu Malayoğlu H. (2010). Biberiyenin (*Rosmarinus officinalis* L.) Antioksidan Etkisi. *Hayvansal Üretim* **51**: 59-67.
- Becit M. (2017). Pknogenol ve Kurkuminin Çeşitli Kanser Hücre Hatlarında Sisplatin Sitotoksitesine Etkilerinin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

- Boulikas T, Vougiouka M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). *Oncol Rep.* 2003; **10**: 1663-82.
- Bulduk İ., Gökce S. (2017). Yüzey Yanıt Metodolojisi ile Biberiye Yapraklarından Rosmarinik Asit Ekstraksiyonunun Optimizasyonu. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, **5**: 441-454.
- Çulha, G. ve Gülkan, B. (2011). 2006-2010 yıllarında Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'na başvuran hastalarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. *Türk Hijyen ve Biyoloji Dergisi*, **68**: 165-74
- Dadhaniya P, Patel C, Muchhara J, Bhadja N, Mathuria N, Vachhani K. (2011). Safety assessment of a solid lipid curcumin particle preparation: acute and subchronic toxicity studies. *Food Chemistry Toxicology* **49**: 1834-42.
- Dasari S, Tchounwou P.B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*. **740**: 364-78.
- Dugbartey G.J, Peppone L.J. ve Graaf I.A. (2016). An integrative view of cisplatin-induced renal and cardiac toxicities: Molecular mechanisms, current treatment challenges and potential protective measures. *Toxicology*. **371**: 58-66.
- Erkan, N., Ayrancı, G. ve Ayrancı, E. (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis L.*) extract blackseed (*Nigella sativa L.*) essential oil, camasic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, **110**: 76-82.
- El-Awady el S.E., Moustafa Y.M., Abo-Elmatty D.M. ve Radwan A. (2011). Cisplatin-induced cardiotoxicity: Mechanisms and cardioprotective strategies. *European Journal Pharmacology*. **650**: 335-41.
- Eren, E., Ata, A. ve Arıcan, A. (2012). Kanser Tedavisinde Kullanılan İlaçlar ve Nefrotoksisite. *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, **29**: 229 – 235

- Furtado, M.A., Almeida L.C.F., Futado R.A., Cunha W.R. and Tavares D.C. (2008). Antimutagenicity of rosmarinic acid in swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Enviromental Mutagenesis*. **657**: 150-154
- Furtado, R.A., Rezende de Araújo F.R., Resende, F.A., Cunha, W.R. and Tavares, D.C. (2009). Protective eff ect of rosmarinic acid on V79 cells evaluated by the micronucleus and comet assays. *Journal of Applied Toxicology*, **DOI**: 10.1002/jat.1491
- Gyori, B.M., Venkatachalam, G., Thiagarajan, P.S., Hsu, D. and Clement, M.V. (2014). OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology*, **2**: 457-465
- Hartmann JT, Lipp HP. Toxicity of platinum compounds. *Expert Opin Pharmacother*, 2003; **4**: 889-901.
- Hazman Ö, Cığerci İH, Kaya H. 2018, Two Faces Of Arbutin in Liver Carcinoma Cells: Anticancer Effect in LD₅₀ Dose Andprotective Role Aganist Cisplatin Toxicity In LD₀ Dose, Book of Abstracts, 1st international veterinary biochemistry and clinical biochemistry congress, 12-15 April 2018, Hatay, Turkey
- Hyun Jin, C., Yang, H.S., Choi, D.S., Byun, M.W., Kim, W.G. and Jeong, Y. (2013). Rosmarinic Acid Attenuated SIN-1-induced Cytotoxicity in HepG2 Cells through the HO-1 Induction and Radical Scavenging Activity. *Food Science Biotechnology*, **22**: 549-556
- Jeon, Y.J., Song, K.S., Han H.J.,Park, H.S., Chang,W., Lee, M.Y. (2014). Rosmarinic acid inhibits chemical hypoxia-induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. *Arch. Pharm. Res.* **37**: 907–915.

- Karabag Coban, F., Akil M., Liman, R. and Ciğerci İ. (2018). Effects of Resveratrol on Oxidative DNA Damage Induced by the Acute Swimming Exercise. *Journal of Pharmaceutical Research International*, **21**: 1-10.
- Kazemi Noureini, S. and Wink, M. (2012). Antiproliferative Effects of Crocin in HepG2 Cells by Telomerase Inhibition and hTERT Down-Regulation. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **13**: 2305-2309.
- Kılınç, V. (2013). HepG2 ve Mcf-7 hücre modellerinde desferoksamin ve fenantrolin'in antikanser etkilerinin moleküler düzeyde araştırılması. Uzmanlık Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Samsun.
- Kısmalı G. (2009). Paraquat ile Oluşturulmuş Oksidatif Stresden HEPG2 Hücrelerinde Apoptozis Üzerinde Etkisinin Araştırılması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Koçaklı, Z.G., Akıllıoğlu, K. ve Doğan, A. (2015). Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültürü. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi (Archives Medical Review Journal)*.
- Korcan, S. E., Aksoy, B., Erdoğan, S. F. ve Ciğerci, İ. H. (2018). Melissa officinalis Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitesinin ve DNA Koruyucu Kapasitesinin Araştırılması. *AKÜ FEMÜBİD* **18**: 011002 (757-762).
- Liman, R., Ciğerci, İ.H., Gökçe, S. (2018). Cytogenetic and genotoxic effects of Rosmaniric Acid on Allium cepa L. Root meristem cells. *Food and Chemical Toxicology*, **121**:444-449.
- Öğüt Düzen, K. ve Korkmaz, M. (2015). Kanser Hastalarında, Semptom Kontrolü ve Tamamlayıcı Alternatif Tıp Kullanımı. *Dokuz Eylül Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Elektronik Dergisi*, **8**: 67-76.

- Öncül S. (2013). Karaciğer ve Meme Kanseri Hücreleri İle Embriyonik Böbrek Hücrelerinde Doksorubisinin Apoptotik Genlerin ve MDR-1 Geninin Ekspresyon Düzeylerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Paluszczak, J., Krajka-Kuzniak, V. and Baer-Dubowska, W. (2010). The effect of dietary polyphenols on the epigenetic regulation of gene expression in MCF7 breast cancer cells. *Toxicology Letters*. **192**: 119-125.
- Paolicchi, A., Lorenzini, E., Perego, P., Supino, R., Zunino, F. and Comporti, M. (2002). Extra-cellular thiol metabolism in clones of human metastatic melanoma with different gamma-glutamyl transpeptidase expression: Implications for cell response to platinum-based drugs. *International Journal of Cancer*. **97**: 740-5.
- Patat, S., Akça, H., Kaleli S., Karakoyun, Y., Koçak, A., Gültekin, F. (2003)., Klorprifos-e etil'in HEPG2 hücre dizilerinde hücre canlılığına etkisi ve melatoninin koruyucu etkisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **10**: 39-43.
- Pazarbaşı, A., Kasap, M. ve Kasap, H. (2011). Kanser Yolakları. *Derleme*, **20**: 187
- Petersena, M. and Simmonds, M.S.J. (2003). Molecules of Interest Rosmarinic acid. *Phytochemistry*. **62**: 121–125
- Sabuncuoğlu, S.A., Baydar, T., Giray, B. ve Şahin, G. (2008). Mikotoksinler: toksik etkileri, degradasyonları, oluşumlarının önlenmesi ve zararlı etkilerinin azaltılması. *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi*, **28**: 63-92.
- Şen, M., Turan, M. (2009). Karaciğer metastazı olan kolorektal kanserde cerrahi yaklaşım. *Cumhuriyet Tıp Dergisi* **31**: 331-338.

- Tarhan S. (2013). ϵ -Viniferlerinin Tek Başına ve Kemotöröpik Bir Ajan ile Birlikte HEPG2 Hücreleri Üzerine Antioksidan Etkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Taş M. (2010). Kanserli Olgularda Mikronukleus Sıklığının Belirlenmesi ve Mikronukleusların Orijininin MN+FISH Yöntemi ile Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Tatar, G., Şengül, E., İsan, H. ve Aktaş, R.G. (2016). Karaciğer Kanser Hücre Kültürlerinde Pasaj Sayısının Sferoid Oluşumuna Etkisi. *Maltepe Tıp Dergisi / Maltepe Medical Journal*. **3**: 024-028.
- Turan, İ., Demir, S., Aliyazıcıoğlu, R. ve Aliyazıcıoğlu, Y. (2017). Primula vulgaris Yaprak Ekstraktının Antioksidan ve Sitotoksik Özelliklerinin Değerlendirilmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi *Doğa Bilimleri Dergisi*, **20**: 361-367.
- Turhan H. (2017). Endoplazmik Redikulum Stres Modeli Oluşturulan İnsan Meme Kanseri (MCF-7) Hücrelerinde Linearolün Endoplazmik Redikulum Stres Markerleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar.
- Townsend D.M, Tew K.D, He L, King J.B and Hanigan M.H. (2009). Role of glutathione S-transferase Pi in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biomedical Pharmacother*, **63**: 79-85.
- Üstündağ, A., Şimşek, K., Ay, H., Dünder, K., Süzen, S., Aydın, A. and Duydu, Y. (2014). Evaluation of the Genotoxic Effects of Patients Undergoing Hyperbaric Oxygen (HBO) Therapy. *Turk Journal Pharmacology Science* **11**: 203-208.
- Yağcı, E. ve Güneş, H.V. (2017). Notch Sinyal Yolağı ve Karsinogenez. *Osmangazi Tıp Dergisi* **39**: 109-116.

Yalçın, C.Ö. ve Yılmaz Sarıaltın, S. (2018). Kök Hücrelerin Toksikoloji Çalışmalarında Kullanımı. *Anadolu University Journal of Science and Technology C- Life Sciences and Biotechnology*.

Yılmaz S. (2014). Borik Asitin Antioksidan Aktivitesinin Hücre Kültüründe Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Yousef, M.I., Saad, A.A. and El-Shennawy L.K. (2009). Protective effect of grape seed proanthocyanidin extract against oxidative stress induced by cisplatin in rats. *Food Chemistry Toxicology*. **47**: 1176-83.

İnternet Kaynakları

1) <https://www.drozdogan.com/kanserde-yeni-bir-tedavi-stratejisi-kesfedildi-collateral-lethality/> 05.01.2019

2) <https://www.e-psikiyatri.com/bir-hucre-nasil-kanser-hucresine-donusuyor-63619> 06.05.2019

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gizem SAÇLI
Doğum Yeri ve Tarihi : MANİSA/KULA 01.09.1990
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (Telefon/e-posta) : gizem_candostum@hotmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Kula Süper Lise, (2004-2008)
Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü,
(2012-2016)

