

**T.C
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SİLYBUM MARIANUM BİTKİSİNİN İN VİTRO
ORTAMDA KARACİĞER KANSERİ HÜCRE
HATLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

DİLEK BAYRAM

DOKTORA TEZİ

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Meral ÖNCÜ**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Yönetim Birimi tarafından 1742-D-08 Proje numarası ile desteklenmiştir
Tez No: 53**

2011-İSPARTA

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı** Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 06 / 01 / 2011

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Meral ÖNCÜ
Süleyman Demirel Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Erdal KARAÖZ
Kocaeli Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Mehmet Kaya ÖZER
Süleyman Demirel Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Osman SULAK
Süleyman Demirel Üniversitesi

Üye : Yrd. Doç. Dr. Nilüfer ŞAHİN ÇALAPOĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi

ONAY : Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu' nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Serpil DEMİRCİ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Tez konumun belirlenmesinden basılmasına kadar geçen sürede yardımlarını esirgemeyen eski danışmanım Sayın Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN ve yeni danışmanım Sayın Doç Dr. Meral ÖNCÜ'ye,

Tez çalışmasının deneysel kısımlarının yapılabilmesi için bana hücre kültürünü öğreten ve tüm imkânlarını sunan İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ayhan Bilir'e,

Tez çalışmamın deneysel bölümünün gerçekleşmesinde yardımcı olan Arş. Gör. İ. Aydın CANDAN, Arş. Gör. Hakan DARICI ve Arş. Gör. Meltem ÖZGÖÇMEN'e,

Beni bugünlere getiren ve eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan anneme babama,

Çalışmamın ilk aşamasından itibaren her zaman desteğini hissettiğim değerli eşim Ahmet BAYRAM'a,

Çalışmam süresince her zaman varlığını hissettiğim hayatımıza yeni bir anlam katan biricik oğlum Furkan'a en içten, sonsuz teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	ix
GRAFİKLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Karaciğer kanseri	4
2.2. Hepatosellüler Karsinoma.....	5
2.3. Kanser Tedavisinde Kullanılan Yöntemler	10
2.4. Bitkisel Tedaviler	11
2.4.1. <i>Silibum marianum</i> L. Gaertn (Devedikeni) Bitkisi.....	12
2.4.2. Kimyasal Özellikleri	16
2.4.3. Silimarinin Genel Özellikleri	16
2.4.4. Kemoprotektif ve Antikanser Ajan Olarak Silimarin	18
2.4.5. Kanser Tedavisinde Silimarin	19
2.5. Apoptosiz	20
2.6. Hücre Kültürü.....	24
2.6.1. Hücre Kültürlerinin Kullanım Alanları.....	26
2.7. Hücre Döngüsü.....	28
2.7.1. Hücre Döngüsü Değerlendirme Yöntemleri	29
2.7.2. İmmünohistokimya	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. Gereç	35
3.1.1. Kullanılan Maddeler.....	35
3.1.1.1. Kimyasal Maddeler	35
3.1.1.2. Bitki Ekstraktı	35

3.1.1.3. Enzimler	35
3.1.1.4. İlaçlar.....	35
3.1.1.5. Kitler	36
3.1.1.6. Diğer Maddeler	36
3.1.2. Kullanılan Gereçler	36
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler	37
3.1.3.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler	37
3.1.3.2. İmmünohistokimyada Kullanılan Çözeltiler	37
3.2. Kullanılan Yöntemler.....	37
3.2.1. Hücre Kültürü.....	37
3.2.2. Hücre Soyunun Açılması	38
3.2.3. Hücrelerin Çoğaltılması	38
3.2.4. Hücrelerin Pasajlanması.....	38
3.2.5. Hücre Sayımı.....	39
3.2.6. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	39
3.2.7. Doz Belirleme Deneyi.....	40
3.2.8. Tutunma (Proliferasyon) Deneyi ve Canlılık Tayini	40
3.2.9. İki Boyutlu Kültürlerde Bromodeoksiüridin ile İmmünohistokimyasal İşaretleme	41
3.2.10. İki Boyutlu Kültürlerde Kaspaz-3 ile İmmünohistokimyasal İşaretleme	42
3.2.11. Üç Boyutlu Sferoid Modelde Hücre Kültürü Deneyleri	42
3.2.12. Üç Boyutlu Sferoid Kültürlerin Değerlendirilmesi.....	43
3.2.13. Sferoidlerin Işık Mikroskobu Takibi.....	44
3.2.14. Üç Boyutlu Kültürlerde Bromodeoksiüridin ile İmmünohistokimyasal İşaretleme	44
3.2.15. Üç Boyutlu Kültürlerde Kaspaz-3 ile İmmünohistokimyasal İşaretleme	45
3.2.16. Hematoksilen – Eozin (Erich) Boyama.....	45
3.3. İstatistiksel Yöntem.....	46
4. BULGULAR	47
4.1. Doz Belirleme Deneyi Bulguları.....	47

4.2. Hücre Proliferasyonunun Kinetik Deneylerinin Bulguları	48
4.3. İki boyutlu Kültürlerde BrdU İşaretlenme Değerleri	50
4.4. İki boyutlu Kültürlerde Kaspaz-3 İşaretlenme Değerleri	54
4.5. Üç Boyutlu Sferoid Kültürlerde Hematoksilen Eozin Boyası ile Sferoid Morfolojisi Değerlendirmeleri	58
4.6. Üç Boyutlu Sferoid Kültürlerde BrdU İşaretlenme Değerleri	62
4.7. Üç Boyutlu Kültürlerde Kaspaz-3 İşaretlenme Değerleri	67
4.8. Sitotoksikite Verileri	71
5. TARTIŞMA	72
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	83
ÖZET.....	84
ABSTRACT	85
KAYNAKLAR	86
ÖZGEÇMİŞ.....	96

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATCC	: Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu
BrdU	: Bromodeoksiüridin
BrdU-LI	: BrdU Labaling İndeks
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide
ECM	: Ekstrasellüler Matriks
FBS	: Fetal Bovine Serum
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
HBV	: Hepatit B Virüsü
HCV	: Hepatit C Virüsü
H-E	: Hematoksilen-Eozin
HGF	: Hepatosit Büyüme Faktörü
HSK	: Hepatosellüler Karsinoma
IL-8	: İnterlökin-8
LI	: Labeling İndeks
MI	: Mitotik İndeks
MTS	: Multisellüler Tümör Sferoid
PARP	: NAD ⁺ bağımlı poli ADP-riboz polimeraz enzimi
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
RFA	: Radyofrekans Ablasyon
ROR	: Reaktif Oksijen Radikalleri
TACE	: Transarteriyel Kemoembolizasyon
TLI	: Thymidine Labelling Index
VEGF	: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1: Sitolde bulunan kaspaz tipleri	24
--	----

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1: Kanser oluşumu	5
Şekil 2: Hepatokarsinogenez sürecinin oluşmasında etkin olan çeşitli risk faktörler.....	6
Şekil 3: HSK' nın histopatolojik ilerleyişi ve moleküler özellikleri.....	8
Şekil 4: <i>Silybum marianum</i> (= <i>Carduus marianus</i>) Bitkisi.....	13
Şekil 5: Silimarinin kimyasal formülü.....	14
Şekil 6: Silimarin bileşenlerinin Kimyasal formülleri.....	15
Şekil 7: Apoptotik ve nekrotik hücre ölümünün karşılaştırılması.....	22

GRAFİKLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Grafik1: Silibin'in unda Doz inaktivasyon grafiği.....	47
Grafik2: Zamana Bağlı Hücre oğalma Verileri.....	48
Grafik 3: İki Boyutlu Kültürlerde BrdU İle İşaretlenme Grafiği.....	50
Grafik 4: İki Boyutlu Kültürlerde Kaspaz-3 İle İşaretlenme Grafiği.....	54
Grafik5: Üç Boyutlu Kültürlerde BrdU İle İşaretlenme Grafiği.....	62
Grafik 6: Üç Boyutlu Kültürlerde Kaspaz-3 İle İşaretlenme Grafiği.....	67
Grafik 7: Zamana Bağlı Hücre Sitotoksisite Verileri	71

RESİMLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Resim 1: İki boyutlu Hep3B hepatosellüler karsinoma hücre kültürü	49
Resim 2: 24. saat Kontrol grubu	51
Resim 3: 24. saat Silibin grubu	51
Resim 4: 48. saat Kontrol grubu	52
Resim 5: 48. saat Silibin grubu	52
Resim 6: 72. saat Kontrol grubu	53
Resim 7: 72. saat Silibin grubu	53
Resim 8: 24. saat Kontrol grubu kaspaz-3 tayini.....	55
Resim 9: 24. saat Silibin grubu kaspaz-3 tayini	55
Resim 10: 48. saat Kontrol grubu kaspaz-3 tayini.....	56
Resim 11: 48. saat Silibin grubu kaspaz-3 tayini.....	56
Resim 12: 72. saat Kontrol grubu kaspaz-3 tayini.....	57
Resim 13: 72. saat Silibin grubu kaspaz-3 tayini.....	57
Resim 14: 24. saat Kontrol grubu sferoid model (H-E).....	59
Resim 15: 24. saat Silibin grubu sferoid model (H-E).....	59
Resim 16: 48. saat Kontrol grubu sferoid model (H-E).....	60
Resim 17: 48. saat Silibin grubu sferoid model (H-E).....	60
Resim 18: 72. saat Kontrol grubu sferoid model (H-E).....	61
Resim 19: 72. saat Silibin grubu sferoid model (H-E).....	61
Resim 20: Üç boyutlu multisellüler sferoid model kültür.....	63
Resim 21: 24. saat Kontrol grubu sferoid model BrdU boyama.....	64
Resim 22: 24. saat Silibin grubu sferoid model BrdU boyama.....	64
Resim 23: 48. saat Kontrol grubu sferoid model BrdU boyama.....	65
Resim 24: 48. saat Silibin grubu sferoid model BrdU boyama.....	65
Resim 25: 72. saat Kontrol grubu sferoid model BrdU boyama.....	66
Resim 26: 72. saat Silibin grubu sferoid model BrdU boyama.....	66
Resim 27: 24. saat Kontrol grubu sferoid model kaspaz-3 tayini	68
Resim 28: 24. saat Silibin grubu sferoid model kaspaz-3 tayini.....	68
Resim 29: 48. saat Kontrol grubu sferoid model kaspaz-3 tayini.....	69
Resim 30: 48. saat Silibin grubu sferoid model kaspaz-3 tayini	69
Resim 31: 72. saat Kontrol grubu sferoid model kaspaz-3 tayini.....	70
Resim 32: 72. saat Silibin grubu sferoid model kaspaz-3 tayini.....	70

1. GİRİŞ

Sindirim kanalından emilen besinlerin işlendiği ve vücudun diğer kısımları tarafından kullanılmak üzere depolandığı bir organ olan karaciğer, vücudun deriden sonra en büyük organı ve bezidir. Karaciğerin dolaşım sistemindeki konumu, metabolitlerin bir araya getirilmesi, dönüştürülmesi, biriktirilmesi ve toksik maddelerin etkisizleştirilmesi ve elenmesi için çok uygundur (Junqueira and Carneiro 2003).

Kendini belli bir noktaya kadar yenileyebilme özelliği olmakla birlikte, karaciğerde gerek iyi gerekse kötü huylu birincil tümörlere rastlanmaktadır. Karaciğerin kendi hücrelerinden kaynaklanan habis tümörlere primer (birincil) karaciğer kanseri denmektedir. Hepatosellüler karsinom (HSK) adıyla anılan bu tür kanser, en ölümcül tümörlerden birisidir.

Etyolojisi birden çok faktöre bağlı olan HSK'nın tedavisinde birçok güçlük mevcuttur. Erken dönemdeki HSK'nın tipik özelliği sessiz olması ve yavaş büyüyerek ilerleyinceye kadar çok az belirti vermesidir (Gışh 2006). HSK için bazı risk faktörleri mevcuttur: Siroz, HSK'lı olguların büyük çoğunluğunda (%75-95'inde) risk faktörüdür. Hepatit B enfeksiyonu siroza neden olarak dünyadaki en önemli HSK sebebidir.

Hepatosellüler karsinom karaciğerin en sık (%75) rastlanan birincil tümörüdür. Dünyada kansere bağlı ölümlerin yarısından sorumlu olan HSK teşhisi konan hastalarda uygulanabilecek tedavi seçenekleri oldukça kısıtlıdır. Radyoterapi ve/veya kemoterapi tedavisi ile genellikle başarılı sonuçlar alınamamaktadır.

Çoğunlukla kronik karaciğer hasarı zemininde gelişen ve HSK tanısı alan hastalarda, sağ kalım karaciğer işlevlerinin düzeyiyle ilgilidir. Yalnızca %15 oranında cerrahi çıkarım ve transplantasyon yapılabilen hastaların geriye kalanı kemoterapi ve/veya radyoterapi uygulamalarıyla tedavi edilmeye çalışılmaktadır. Kemoterapi uygulamaları karaciğer işlev bozukluğu nedeniyle, radyoterapi uygulamaları ise komşu hayati organlar, karaciğer dokusunun duyarlılığı gibi nedenlerle oldukça sınırlıdır.

HSK tedavisinde kemoterapi ve radyoterapi uygulamalarının sınırlı düzeyde yapılması sebebiyle insanlar alternatif yöntemlere başvurmaktadır. Alternatif

yöntemlerin arasında da bitkisel tedavi yöntemleri ilk sırada gelmektedir. Karaciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılan şifalı bitkiler arasında hindiba otu (*Taraxacum officinale*), enginar (*Cynara scolymus*), zencefil (*Zingiber officinale*), sarımsak (*Allium sativum*), meyan kökü (*Glycyrrhiza glabra L*), meryem ana dikenini (devedikeni, *Silybum marianum*) bulunmaktadır (Orhan et al., 2009, www.saglikdanis.com/hastalikgoster.asp?hid=745, Erişim tarihi 16 Mart 2010).

Silybum marianum (meryem ana dikenini, dededikeni), Asteraceae familyasından bazı dikenli bitkilerin ortak adıdır. Devekengeli, meryemana dikenini, sütlü kengel olarak da bilinir. Meyveleri yaklaşık olarak 2000 yıldır karaciğer hastalıklarında kullanılmasına karşın, bitki ile ilgili ilk araştırmalar 1958 yılında başlamıştır (Friedman and Bansal 2006, McKillop et al., 2006).

Devedikeni bileşiminde karaciğeri koruyucu etken maddeler; flavonolignandan meydana gelen silimarin, taksifolin, kuersetrin, albümin, misiliaj, sabit yağ ve acı maddeler şeklindedir. Bitkinin tohumları %4–6 oranında silimarin içermesine rağmen günümüzde Amerika’da üretilen yoğunlaştırılmış ekstraları %70–80 oranında silimarin içermektedir. Silimarin bileşiklerinin karaciğer hücrelerinde ribozomal RNA moleküllerini uyararak protein sentezini arttırdığı sanılmaktadır (French 2004). Ayrıca yapılan çalışmalarda bitkiden elde edilen ekstraktın akciğer tümörü büyümesini baskıladığı, meme, kolon, mesane kanseri hücre hatlarında hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptozisi tetiklediği gösterilmiştir (Feitelson et al., 2002, Libbrecht et al., 2004, Qin and Tang 2004, Friedman and Bansal 2006, Thorgeirsson et al., 2006).

Apoptozis, kaspaz (caspase, cysteine-containing aspartate specific proteases) adı verilen proteazlar tarafından kontrol edilmektedir. Bunların doğrudan veya dolaylı yollardan apoptozisin hem biyokimyasal hem de yapısal değişikliklerinden sorumlu olduğu ortaya çıkarılmıştır (Avila et al., 2006). Memelilerde en az 12 kaspaz vardır. Bunlar; başlatıcı (-8,-9,-10) ve sonlandırıcı (efektör) (-3,-4,-5) kaspazlar olmak üzere ikiye ayrılır (Kim et al., 2002). Silimarin, doza bağlı olarak T-24 ve TCC-SUP (mesane kanseri hücre hatları) hücrelerinde DNA’da kırıklar meydana getirerek kaspaz-3’ün aktivasyonuna neden olur (Okouneva et al., 2003). Ancak, silimarinin hepatosellüler karsinoma hücre hattı üzerinde hem iki boyutlu hem de üç boyutlu

(multisellüler tümör sferoid model) kültür ortamında apoptotik etkisi olduğuna dair az bilgi mevcuttur (Varghese et al., 2005).

Çalışmamızda Hep3B (hepatit B virüsü (HBV) pozitif ve p53 geni mutasyona uğramış, HSK hücre soyudur.) hücre soyu üzerine *Silybum marianum* (devedikeni) bitkisinin ekstraktı olan silimarinin apoptotik etkisini hem iki boyutlu hem de üç boyutlu (in vivo uyumlu ve in vivo mikroçevre özelliklerini sağlayan en iyi in vitro model olarak kullanılan multisellüler sferoidler) kültür ortamında incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.KARACİĞER KANSERİ

Karaciğer vücudun en büyük organlarından birisidir. Diyafragmanın altındaki abdominal boşlukta yerleşmiştir ve ağırlığı, yaklaşık 1,5 kg kadardır. Karaciğer, sindirim kanalından emilen besinlerin işlendiği ve vücudun diğer kısımları tarafından kullanılmak üzere depolandığı bir organdır. Bu yüzden sindirim sistemi ile kan arasında bir geçiş bölgesi oluşturur. Organa kanın % 70-80'i portal venden gelir. Geri kalan az bir bölümü ise, hepatik arterle sağlanır. Metabolitlerin bir araya getirilmesi, dönüştürülmesi, biriktirilmesi ve toksik maddelerin zararsızlaştırılması ve atılımı gibi pek çok işlevlere sahiptir. (Junqueira and Carneiro 2003).

İnsan karaciğeri kendi kendini yenileme yeteneğine sahip bir organdır. Bunun yanında karaciğerde iyi huylu veya kötü huylu tümörlere rastlanmaktadır.

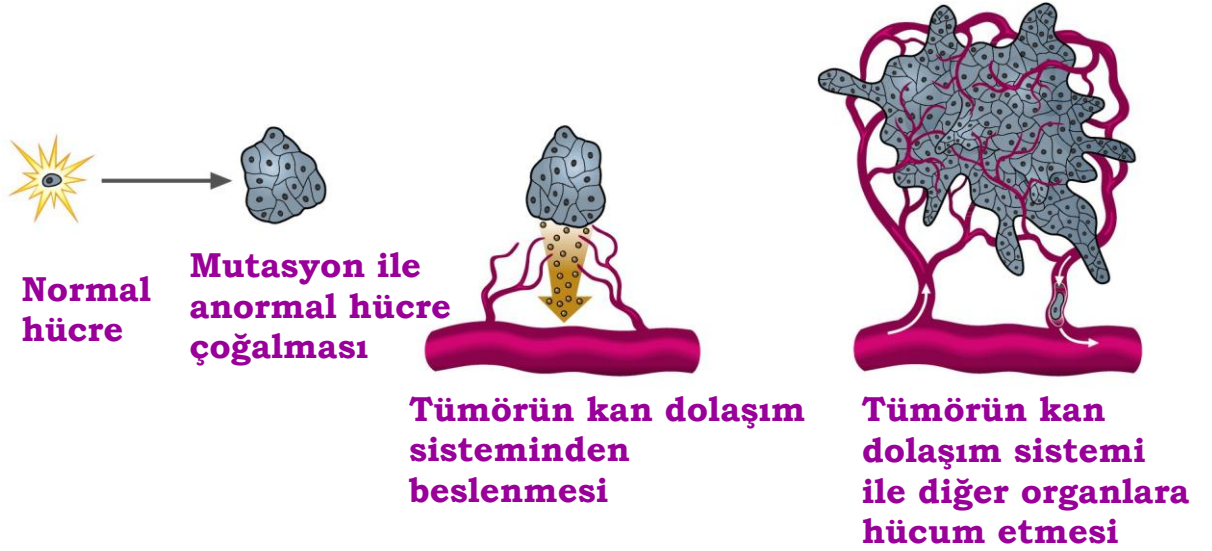
Kanser, vücut hücrelerinin anormal şekilde vücut içine yayılması ve kontrolsüz olarak çoğalmasıyla tariflenen bir hastalıktır (Dhannikula and Panchagnula 1999) (Şekil1). Hücreler bir taraftan programlı hücre ölümü ya da "apoptoz" denen olay ile yok olurken, diğer taraftan da büyüme faktörlerinin etkisiyle çoğalır. Büyüme faktörleri normalde DNA'daki çeşitli genlerin etkisiyle oluşan proteinlerdir. Bu genler mutasyona (değişime) uğrayarak hücrelerin aşırı büyümesine sebep olurlarsa, o zaman kanser oluşur ve bu genlere de "onkogen" denir. Genlerdeki bozukluklar doğuştan olabileceği gibi, sonradan meydana gelen mutasyon adı verilen değişikliklerle de oluşabilir (Bozkurt 2004, Denir 2005).

Karaciğerin vücut içerisindeki önemi ve hücre yapısı düşünüldüğünde bu organın en öldürücü kanser türlerinin başında kendi hücrelerinden kaynaklanan türleri gelir ve bu habis tümörlere primer (birincil) karaciğer kanseri denmektedir. Karaciğer kanseri, karaciğerdeki hücrelerde görülen anormal büyümedir. Bu anormal büyümeler genellikle tümör olarak adlandırılır (Qin and Tang 2003).

Karaciğerin primer (kendine has) malign (kötü huylu) tümörleri, bir başka deyişle kanserleri şunlardır: Hepatosellüler karsinom (HSK), intrahepatik kolanjiyosellüler karsinom, hepatokolanjiokarsinom, hepatoblastom, anjiyosarkom, epitelooid hemanjiyoeptelioma ve diğer sarkomlar (leiomyosarkom, rabdomiyosarkom,

indiferansiye embriyonel sarkom). Karaciğer kanserlerinin tümüne yakını HSK ve intrahepatik kolanjiyosellüler karsinom oluşturur.

İntrahepatik kolanjiyosellüler karsinom; karaciğer içi safra kanallarının kanseridir. Karaciğer içi safra kanallarının herhangi bir yerinde oluşabilir. Karaciğerin hilusu veya periferik kısımlarında gelişebilir. Karaciğer birincil tümörlerinin % 8-25'ini oluşturur (Qin and Tang 2003).



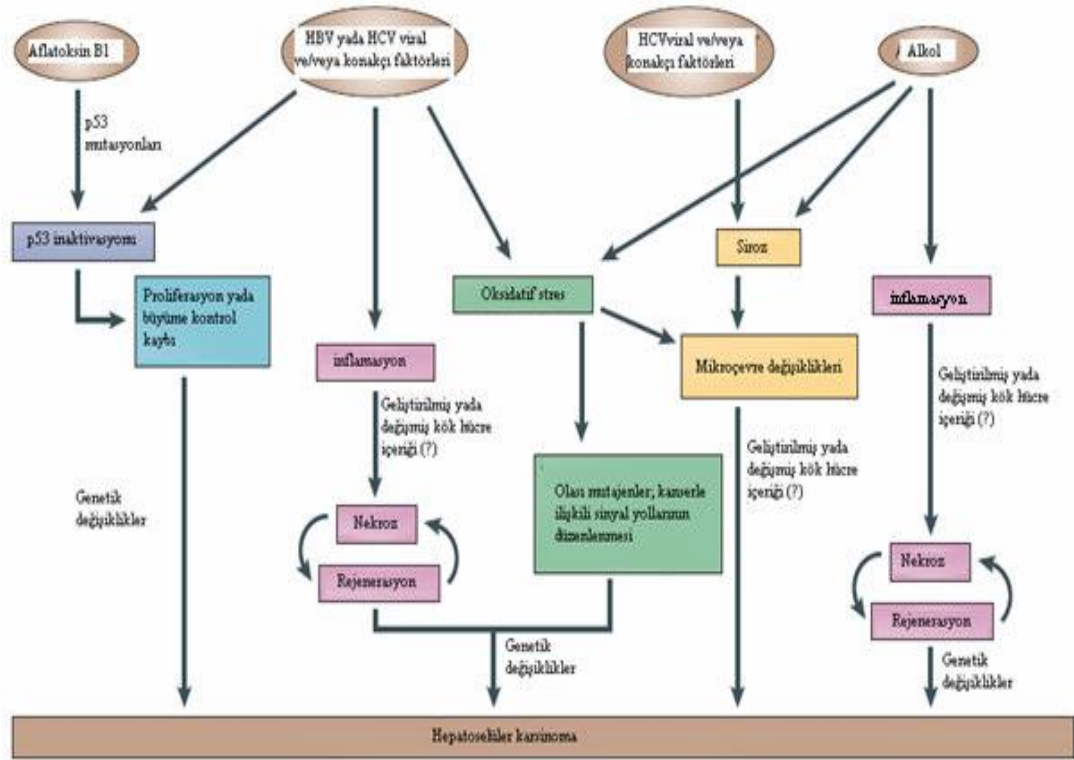
Şekil 1: Kanser oluşumu (El, 2005)

2.2. HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA

Karaciğer, vücuttaki çeşitli kanserlerin en sık metastaz yaptıkları organlar arasında yer almaktadır. Karaciğer kanserleri, karaciğer hücrelerinden ya da organın içinde bulunan safra yollarından kaynaklanmaktadır. Karaciğer hücrelerinden (hepatositler) gelişen ve "hepatosellüler karsinoma-HSK" veya "hepatoma" adı verilen kanser, % 75'ini oluşturur (Moradpour and Blum 2005).

HSK, kanserden ölüm nedenleri arasında üçüncü sırada ve tüm dünyada en sık ortaya çıkan kanserler arasında sekizinci sırada yer alır. Sıklığı coğrafik koşullara göre değişkenlik göstermektedir; en fazla Asya ve Afrika'daki gelişmekte olan ülkelerde, daha az oranda ise gelişmiş ülkelerde görülmektedir. HSK gelişimine neden olan kronik karaciğer hasarı açısından önemli risk faktörleri HBV, Hepatit C Virüsü (HCV), aflatoksin 1ve alkol kullanımıdır (Şekil 2) (Thorgeirson et al., 2006).

Bütün bu risk faktörlerinin karaciğerde başlıca, enflamasyon ve ekstrasellüler matriks (ECM) yapısının değişimine sebep oldukları ve böylelikle hepatosellüler karsinogenez sürecine zemin hazırladıkları düşünülmektedir. Yine bu risk faktörlerinin normal hücre çoğalmasını arttırıcı yönde görev alan önemli bazı genlerin mutasyonunu tetiklediği gösterilmiştir (Llovet et al., 2003, Farazi and DePinho 2006). Örneğin aflatoksinle bağlı olan HSK olgularında, tümör baskılayıcı bir gen olarak görev alan p53' ün 249. kodonunda bulunan arjinin aminoasidinin serine dönüşmesine sebep olan bir mutasyon tanımlanmıştır (Wong et al., 2000).



Şekil 2: Hepatokarsinogenez sürecinin oluşmasında etkin olan çeşitli risk faktörleri (Farazi and DePinho 2006).

Gelişmekte olan ülkelerdeki tüm HSK'ların % 85'inden, HBV enfeksiyonları sorumludur. Gelişmiş ülkelerde ise HCV enfeksiyonları ve alkol kullanımı HSK gelişiminden daha fazla oranlarda sorumludur. Siroza ilerleme HSK gelişiminde oldukça önemli, fakat ön koşul olmayan bir süreç olarak görülmektedir. HBV enfeksiyonlarına bağlı HSK'lıların çoğunda siroz görülmezken, HCV ve alkole bağlı HSK'ların neredeyse tamamında siroz görülmektedir (Marrero 2005).

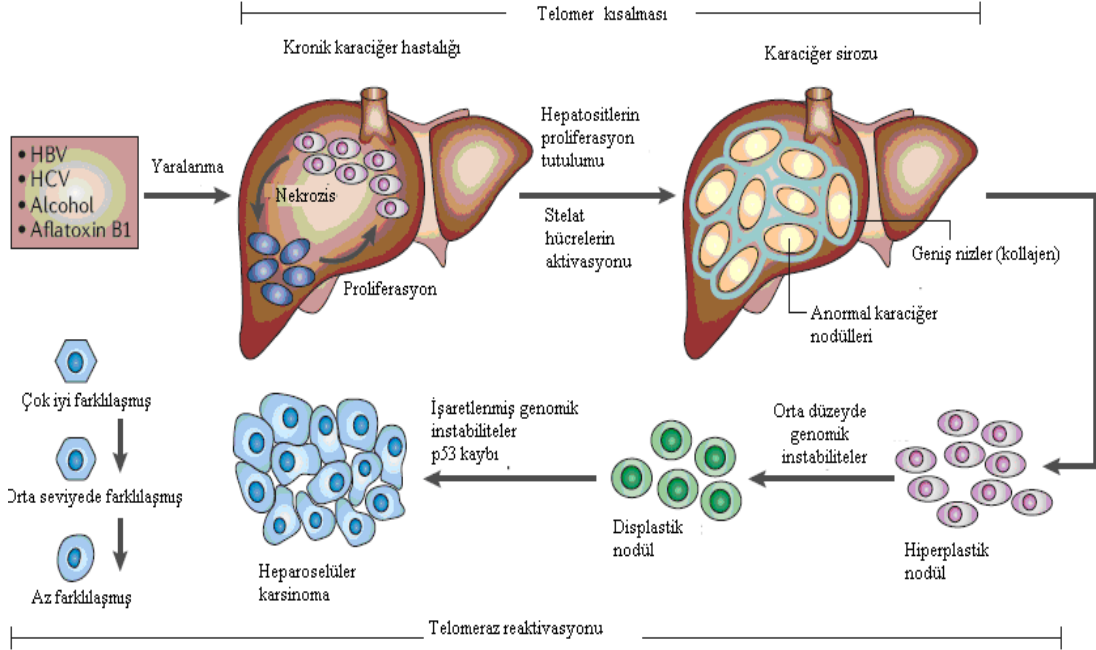
HSK kesin tedavisi olmayan bir hastalıktır. Erken dönemdeki hepatosellüler karsinomun tipik özelliği sessiz olması ve yavaş büyüyerek ilerleyinceye kadar çok az belirti vermesidir (Gish 2006). Çoğunlukla sirotik zeminde bölgesel ilerlemiş olarak veya birden fazla odak oluşturmuş şekilde ortaya çıkmaktadır (Guo et al., 2006). Hastanın hayatta kalması karaciğer işlevleriyle yakından ilişkilidir. Kronik karaciğer hasarı veya siroz varlığı karaciğer işlevlerini esas etkileyen faktörlerdir. Tümör dokusuyla ilgili özellik ise tümörün büyüklüğüdür. Tümör dokusunun cerrahi rezeksiyonu (çıkarımı) hastaların 2/3'ünde 5 yıllık yaşam şansını sağlamaktadır. Ancak hastaların sadece %15'inden azında rezeksiyon veya transplantasyon yapılabilmektedir, kalan hastalara değişik tedavi yaklaşımları uygulanmaktadır (Hawkins and Dawson 2006).

Karaciğer işlevlerinin bozuk olması sistemik kemoterapi uygulamasını sınırlamaktadır. Karaciğer dokusunun radyasyon hasarına hassas olması nedeniyle tüm karaciğere, tümör ilerlemesini durduracak dozda radyasyon uygulanamamaktadır. Radyoterapi uygulaması sonrası karaciğer yetmezliği gelişimi riski yanında, viral hepatitin aktive olması veya mide ve böbrekler gibi komşu dokularda hasar oluşumu oranı artmaktadır (Lambert and Wiele 2005, Szyszkowicz et al., 2007).

HSK risk faktörleriyle karşılaşan hepatositlerde uzun süreli hasar meydana gelmektedir. HBV, HCV virüsleri hepatositleri enfekte ederek yol açtıkları doğrudan hasar yanında viral enfeksiyona bağlı immün yanıt oluşması nedeniyle karaciğer dokusunda enflamasyona da yol açmaktadırlar (Park et al., 1995). Alkol kullanımı dolaşımdaki endotoksinleri arttırmakta, enflamatuvar sitokinlerin salınmasına neden olmaktadır (French 2004). Alkolün hepatositlerde neden olduğu lipid peroksidasyonu sonrasında meydana gelen karaciğer hasarı fibrozis ve siroz gelişimine yol açmaktadır (Seitz and Stickel 2006, Friedman and Bansal 2006). Aflatoksin hepatositlerde mutajenik etkiler göstermekte, özellikle p53 tümör baskılayıcı geninde neden olduğu mutasyonlar bu protein işlevlerini bozmakta veya Ras onkogeninde proteini aktive edici mutasyonlara neden olmaktadır (McKillop et al 2006).

HSK'nın neoplastik gelişimi histolojik açıdan birçok olayla ilişkilidir. Risk faktörlerine bağlı hücre ölümüne yanıt olarak karaciğerde gözlenen hepatosit rejenerasyonunda oluşan hiperplastik nodüller sitolojik olarak normal bulgulardır ve

HSK oluşumunda ilk basamakta yer almaktadır. Bu lezyonlar pre-malignant displastik nodüllere dönüşebilmekte ve sitolojik olarak iyi tespit edilebilen hücre değişiklikleri ile çekirdek yığılımına sebep olmaktadır (Şekil 3) (Farazi and DePinho 2006).



Şekil 3: HSK' nin histopatolojik ilerleyişi ve moleküler özellikleri (Farazi and DePinho 2006).

Etyolojik faktörlerin neden olduğu enflamatuvar yanıt ve oksidatif stres karaciğer stromasını ve mikroçevresini değiştirmekte, siroz gelişimine yol açmaktadır. Hepatositlerde değişen mikroçevre içinde rejenerasyon amacıyla çoğalma hızı artmaktadır. Gerek etyolojik faktörler gerekse enflamasyonun yol açtığı çoğalma, zamanla genetik ve genomik düzenlenme değişikliklerine yol açacaktır (Thorgeirsson et al., 2006). Zamanla sirotik karaciğer dokusu içinde fibrotik stromayla çevrilmiş, çoğalan hepatositlerden oluşan nodüller oluşmaya başlar. Bu nodüller hiperplastik nodüllere daha sonra da büyüme hızı kontrolü kaybı ve genomik değişkenlik gelişimiyle displastik nodüllere sonuçta karsinomaya dönüşeceklerdir (Libbrecht et al., 2005). Düşük seviyede displastik (normal olmayan ancak henüz kanserleşmemiş) nodül içi hepatositler yüksek çoğalma hızına sahiptir ancak çoğu hepatosit hücre özelliğini korumaktadırlar ve işlevlerini yerine

getirmektedirler. Zamanla hücrelerin farklılaşma seviyesi azalır ve hepatosit işlevleri kaybolmaya başlar (Feitelson et al., 2002).

İleri seviye displazi aşamasında nodüllerin büyüklüğü artmaya başlar (Feitelson et al., 2002). Çoğalma hızı yüksek olan ancak hepatosellüler özellikleri azalmış olan hücreler komşu karaciğer dokusu içine ilerleme eğilimindedir. Hücrelerin karaciğer dokusu içine ve damar yapıları aracılığıyla uzak dokulara yayılma yeteneği kazanmalarıyla birlikte düşük seviyede farklılaşmış, karaciğer işlevlerini gerçekleştiremeyen HSK hücreleri ortaya çıkar. Metastatik fenotipin kazanılmasında hepatositlerin hücre-hücre bağlantılarını kaybetme, matriks içinde hareket edebilme ve matriksi parçalama, dolaşıma girme, uzak dokulara metastaz ve sonunda metastaz tekrarlamaları gibi ileri evredeki malign davranışların ortaya çıkması hastanın prognozunu kötüleştirdiği gibi tedavi yanıtınlığını da beraberinde getirmektedir (Qin et al., 2004, Avila et al., 2006).

HSK damarsal bir tümördür (Guo et al., 2002, Sun and Tang 2004, Kanematsu et al., 2005). Hepatokarsinogenez sürecinde kronik karaciğer hasarın başladığı aşamadan itibaren damarlanmayı arttıran büyüme faktörlerinin ekspresyonu artmıştır. İnterlökin-8 (IL-8) gibi sitokinler kronik enflamasyonda rol almalarının yanında anjiyogenezi de tetiklemektedirler. Karaciğer dokusunda meydana gelen enflamasyon, hücrelerin hayatta kalmak için koruyucu büyüme faktörleri salgılamalarına neden olmaktadır (Tanaka and Arii 2006). Çevreye salınan vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi faktörler endotel hücrelerini yeni damar oluşturmaya yönlendirir. Oksidatif hasar sonucu oluşan reaktif oksijen radikallerinin (ROR) de anjiyogeneze neden olan VEGF in ekspresyonunda artışa neden olduğu bilinmektedir (Kuo et al., 2006). Kronik enflamasyon görülen karaciğer dokularında normalden daha fazla VEGF var olduğu belirlenmiştir (Medina et al., 2004). Ayrıca HBV virüsüyle enfekte hepatositlerde eksprese olan HBx proteini de VEGF salınımını artırmaktadır (Sanz-Cameno et al., 2006).

Süreç ilerledikçe displastik nodüller içinde ilk mikrovasküler ağ yapıları ortaya çıkar. İleri seviye displastik nodüllerde, büyüklüğün artışı nedeniyle nodül içindeki hücreler yeterli oksijen ve besin desteği alamazlar (Ratcliffe et al., 1998, Zhou et al 2006). Hipoksiye maruz kalan bu hücreler kendilerine oksijen desteğini sağlamak

için damarlanmayı artırıcı büyüme faktörleri üretmeye başlarlar. VEGF, FGF, hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi anjiyogeneze yol açan büyüme faktörleri ekspresyonu hipoksi ile artar (Kim et al., 2002). Bu artış anjiyogenez yanında hücre çoğalmasının daha da artmasına, hücrelerin içinde bulundukları enflamasyon stresine karşı direnç geliştirmelerine ve daha malign özellik kazanmalarına da neden olacaktır. Displastik hücreler sadece değişen mikro çevreleri nedeniyle değil aynı zamanda artmış olan genomik değişimlerin bir sonucu olarak büyüme faktörü yollarını normalden daha fazla aktive etmektedirler. Metilasyona bağlı değişimler, mikrosatellit değişkenliği ve telomeraz enzim ekspresyonu değişimleri gibi sıklıkla genlerin ekspresyon düzeylerinde epigenetik değişimler gözlenir (Thorgeirson and Grisham 2002). Düşük seviyede olmakla birlikte genlerde ve kromozomlarda yapısal değişimler de gözlenmeye başlar.

HSK dokularında mikrovasküler yoğunluk artmıştır. Damarlanmanın az olduğu bölgelerde iskemi nedeniyle tümör hücreleri nekrozla ölürler. Nekrotik alanlarda da komşu tümör dokularında da hipoksi nedeniyle VEGF miktarının yüksek olduğu saptanmıştır. HSK'da damarlanmanın varlığı maligniteyle de yakından ilişkilidir. Damar desteği iyi olan tümör dokularında hücrelerin çoğalma hızları daha yüksek, yayılım ve metastaz yetenekleri daha fazladır. Tümör dokusundaki VEGF miktarının hastalığın prognozuyla ve tedavi sonrası tekrar etme olasılığıyla da ilişkili olduğunu öne süren çalışmalar bulunmaktadır (Poon et al., 2007, Kuboki et al., 2008).

2.3. KANSER TEDAVİSİ VE KULLANILAN YÖNTEMLER

Kanser tedavisi son derece masraflı olup hasta ve yakınları için zor aşamaları içeren tedavi şeklidir.

Kanser tedavisinde klinik olarak 3 tip yaklaşım vardır:

1) Cerrahi yaklaşım: Genellikle kanser tedavilerinde cerrahi müdahale çıkarılabilir tipte tümöre sahip hastalar için başarılı geçer. Fakat müdahaledeki başarısızlık metastatik yayılımlara ya da tekrarlayan bölgesel birincil tümörlere sebebiyet verir.

2) Kemoterapi: Sistemik bir tedavi şeklidir, başka bir deyişle kan dolaşımı aracılığıyla vücudun tüm bölgelerine yayılır, vücuttaki tüm dokuları etkiler. Bu

bakımdan kemoterapi, ameliyat ve radyoterapi gibi yerel tedavi amaçlayan tedavilerden farklıdır.

Kemoterapide amaç, kullanılan ilaçlarla tümörün büyümesini engelleyecek sitotoksik etki sağlamaktır. Genellikle hücre bölünmesini sağlayan metabolik olayların engellenmesi amaçlanır; örneğin DNA ve RNA sentezi için gerekli olan pürin ve pirimidin bazlarının işlevlerinin bozulması gibi (Denir 2005, www.talktalk.co.uk, Erişim tarihi 12 Aralık 2009). İdeal olarak bu ilaçların sadece malign hücreleri etkilemesi amaçlanır. Ancak kullanımda olan ilaçlar kanser hücrelerine özgün etki göstermemekte ve bölünmekte olan tüm normal ve anormal hücreleri etkilemektedir (Dhannikula and Panchagnula 1999, Denir 2005, www.talktalk.co.uk, Erişim tarihi 12 Aralık 2009).

3) Radyoterapi: Tümör hücrelerinin kuvvetli radyasyon kullanılarak yok edilmeye çalışıldığı tedavi şeklidir. Radyoterapide radyasyon tümörün bulunduğu bölgeye doğru yönlendirilir. Bu yöntemde sağlıklı dokular mümkün olduğunca korunmaya çalışılır ancak radyasyon tümöre ulaşırken, tümörün çevresindeki sağlıklı dokulara da temas eder. Sağlam hücreler X ışınlarına daha dayanıklıdır, DNA tamirini daha iyi yaparlar ve çoğalma mekanizmalarını daha iyi kontrol ederler (Bozkurt 2004, Denir 2005, www.ch.ic.ac.uk, Erişim tarihi 12 Ocak 2010).

Günümüzde kullanılmakta olan gen tedavisi, immünoterapi, antikor tedavisi ve kanser aşılı da kanser tedavisi için umut verici tedavi yöntemleridir (Bozkurt 2004, Denir 2005).

2.4. BİTKİSEL TEDAVİLER

Hastalıkların tedavi edici değere sahip taze ve kurutulmuş bitki kısımları (DROG) ya da bunlardan elde edilen ekstraksiyon ürünleri kullanılarak üretilen çay, damla, draje, kapsül, şurup, tablet ile tedavi edilmesi “fitoterapi” olarak isimlendirilmektedir.

Gerek insan, gerekse doğa ve çevre sağlığı fitoterapinin gerekli olduğunu göstermektedir. Günümüzde dünya nüfusunun çoğunluğu için bitkiler, en seçkin ilaç kaynaklarından (Çubukçu et al., 2002).

Son yıllarda fitoterapinin daha fazla önem kazanmasında, geleneksele karşı olan eğilimin yanı sıra tıbbi bitkilerin yeni formlarda sunulmasının da rolü vardır.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) dünya nüfusunun %60'ının sentetik ilaçları hiç kullanmadığını dörtte üçünün kendi geleneksel kültürlerindeki esas olarak bitkisel kaynaklı olan ilaçlara güvendiğini ve bunları kullanmaya devam ettiklerini saptamıştır (Çubukçu ve ark., 2002). Bu tedavilerin birçoğu bitki ekstraktlarının ya da onların aktif bileşenlerinin kullanımına dayanır (Craig 1999).

Tıbbi bitkilerin etken maddeleri insan sağlığı yönünden önem taşıdığından bu maddelerin sentetik olarak elde edilmesine eskiden beri çalışılmaktadır. Araştırmalar sonucu bunların bazılarının sentetik olarak elde edilmesi zamanla tıbbi bitkilerin kullanım alanlarını geriletmiştir. Ancak bu bitkilerdeki etken maddelerin yeni kullanım yerlerinin bulunması bu bitkilerin değerini arttırmıştır. Bugün, yaşama standartlarına göre kullanılma ve üretim amaçları değişmektedir (Anon 1998).

Tıbbi bitkilerinin tıpta kullanılma amaçları kanı temizleyici, sinirleri teskin edici, hazmı kolaylaştırıcı, idrar ve ter söktürücü, iştah açıcı, kanı dindirici, gaz giderici ve balgam söktürücü, ateş ve parazit düşürücü, nefes açıcı, mikrop öldürücü, felç, romatizma, sara, sıtma, astım, dizanteri, şeker, deri hastalıkları vb. rahatsızlıkların tedavisidir (İlisulu 1992).

Kanser tedavisinde her ne kadar umut verici gelişmeler olsa da, bunlara hastalığın farklı tiplerde olmasının ve başarı yüzdelerinin düşük olması eklendiğinde insanlar bu zorlu yolda belki de şanslarını bir parça daha arttırdıklarını düşündükleri değişik yöntemlere başvurmaya başlarlar. Bunların başında da bitkisel tedavi metotları gelmektedir (Bozkurt 2004, Denir 2005).

2.4.1. *Silybum marianum* L. Gaertn (Devedikeni) Bitkisi

Silybum marianum (= *Carduus marianus*) Meryemana dikenli bitkisi Asteraceae (=Compositae) familyasına ait bir bitkidir (Şekil 4). Ülkemizde doğal olarak yetişenleri ve kültürü yapılanları tek yıllıktır.

Bitki 1–1,5 m yüksekliğinde gövdesi köşeli seyrek tüylü otsu bir bitkidir. Çiçekleri; baş şeklinde olup bir arada toplu görünümündedir. Meyveleri 3-5 cm kadar uzunlukta koyu renkli, çiçekleri mor ve beyaz renkli uç kısımlarında 15 mm kadar uzunlukta bir tüy demeti bulunur. Yapraklar yeşil- beyaz karışımlı renktedir. Tohumu; koyu renkli oval ortalama 6 mm uzunluğundadır.



Şekil 4: *Silybum marianum* (= *Carduus marianus*) Bitikisi

a: http://www.floralimages.co.uk/images/silybum_marianum_b66.jpg

b: <http://www.robsplants.com/images/portrait/SilybumMarianum040623.jpg>

Tohumları hemen hemen 2000 yıldır karaciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılan bir bitki olup modern araştırmalar ve çalışmalar sonucunda karaciğer hastalıkları üzerine olumlu etkisinin ispatlanmış olması geleneksel bilgilerin de doğru olabileceğinin çok ilginç bir örneğidir (Acartürk 1996, Singh et al., 2004). Bu bitki Almanya’ da Meryemana’ yı andıran bir dinsel sembol olarak görüldüğü için ona bu isim verilmiştir. Kızılderililer ise bu bitkiye Deve Dikeni, Kutsal Diken, Okunmuş Diken olarak adlandırmışlardır. Meryemana diken bitkisi ile ilgili araştırmalar yaklaşık 30 yıl önce 1958’ de başlamıştır. 10 yıllık bir araştırma sonunda ise Münih üniversitesinden H.Wagner başkanlığındaki bir araştırma grubu silimarin olarak bilinen bir bileşiği tohumlarından ayırmayı başarmışlardır. Meryemana Dikeni tohumları % 1–6 oranında silimarin içermektedir. Günümüzde Amerika ve Avrupa’ da üretilen yoğunlaştırılmış meryemana diken ekstreleri %70–80 oranında silimarin içermektedir. Silimarin (Şekil 5) meryemana diken bitkisinin tohumlarında bulunan farmakolojik olarak aktif, silibin (silibinin), izosilibin, silikristin, silidianin, taksifolin ve dehidrosilibinin gibi flavonolignanlardan meydana gelmektedir (Şekil 6) (Sanchez-Sampedro ve ark., 2008). Saflaştırılmış ekstraktı, silimarin flavonolignanların yaklaşık %70–80’ ini içeren *S. marianum* tohumlarından

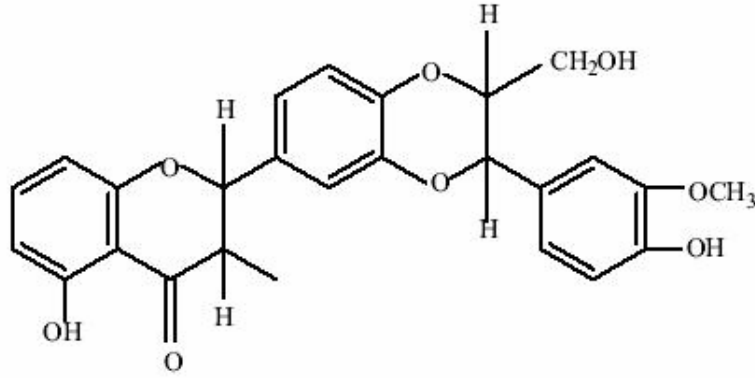
elde edilmiştir ve yaklaşık %20–30 oranında kimyasal olarak belirlenmemiş, çoğunlukla polimerik ve okside olmuş polifenolik bileşiklerden oluşmaktadır. Silimarin bileşiğinin asıl elemanı silibindir (Simanek et al., 2000).

Meryemana Dikeninin drog adı ve diğer dillerdeki isimlendirilmesi şu şekildedir;

Latince: *Silybum marianum*, *Carduus marianus*

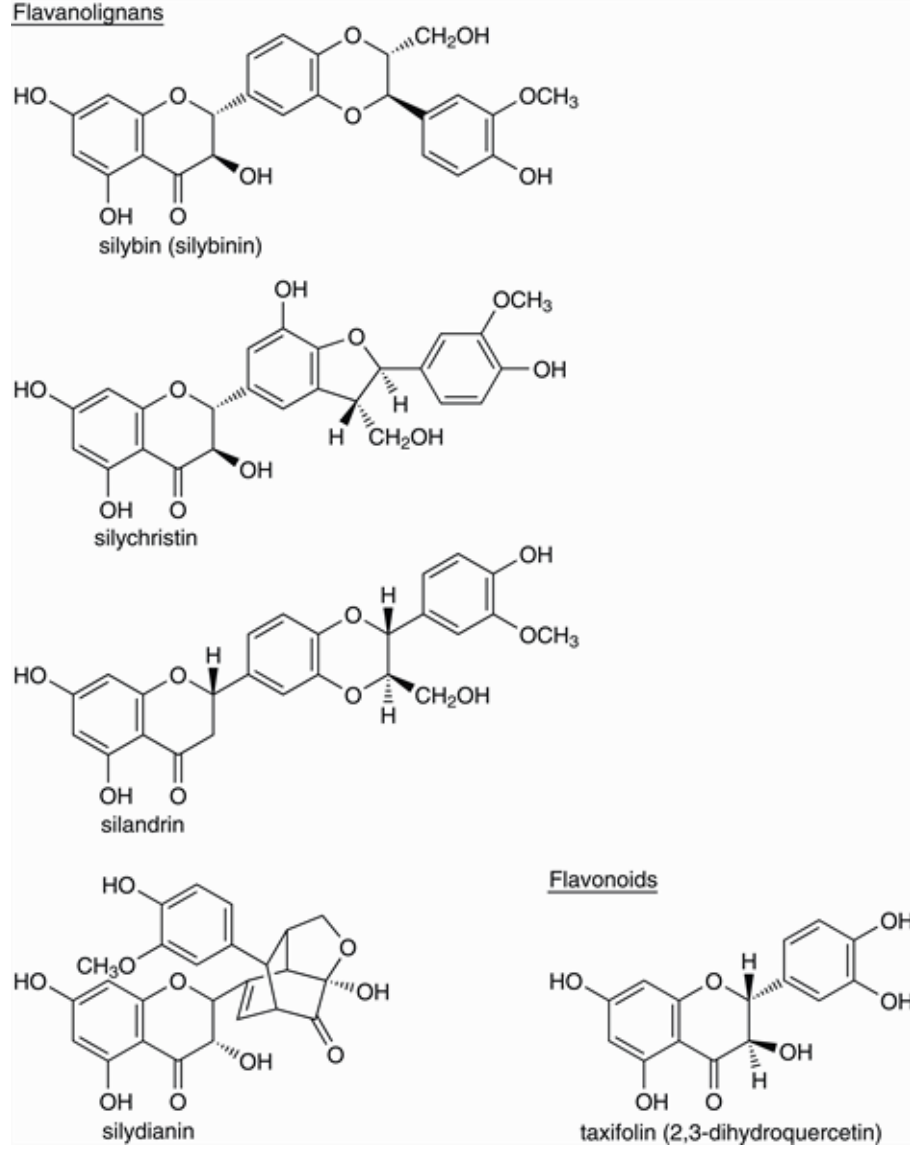
Dünyadaki isimleri: Marian thistle, Milk Thistle,

Türkçe isimleri: Deve diken, Akkız, Kenger otu, Akdiken, Mübarek diken, Meryemana diken, Yabani enginar, Deve kengeli, Sütü kengel, Kıbbun, Şevkülmerem



Şekil 5: Silimarinin kimyasal formülü.

(www.medicinescomplete.com/mc/herbals/2008/images/HrbMilkThistleC001)



Şekil 6: Silimarin bileşenlerinin Kimyasal formülleri
(www.medicinescomplete.com/mc/herbals/2008/images/HrbMilkThistleC001)

Türkiye’de Batı ve Güney Anadolu’ da İzmir, Aydın, Denizli, Mersin, Adana ve Antakya yörelerinde ve Marmara bölgesinin sahil kesiminde; yol ve tarla kenarları ile boş alanlarda yetişmekte olan bir çit bitkisidir. Ülkemizde kültürüne yeni başlanmıştır. Bitkinin tüm kısımları zararlı olmadığı için yiyecek olarak kullanılabilir (Meriçli 1984).

2.4.2. Kimyasal Özellikleri:

Bu bitkinin bileşiminde karaciğeri koruyucu etken maddeler ve kendine has diğer maddeler bulunmaktadır. Bunlar; flavanolignandan meydana gelen silimarin, taksifolin, kuarsetrin, albumin, müsilaj, sabit yağ ve acı maddelerdir. Meryemana dikenini ekstreleri %70–80 silimarin içermesinden dolayı antioksidan etki göstererek karaciğerin serbest radikallerinin zararlarından korur. Aynı zamanda karaciğer hormonlarının, ilaçların ve kimyasalların zararsız hale getirilmesinden sorumludur. Tohumları; %25–30 sabit yağ, nişasta, tanen, silimarin (silibin, silidianin ve silisiristin) içermektedir. Silimarin bileşiklerinin karaciğer hücrelerinde ribozomal RNA moleküllerini uyarak protein sentezini arttırdığı sanılmaktadır (French 2004). Aynı preparatlar mantar zehirlenmelerinde amonitin ve folloidin alkaloidlerinin karaciğerde zehir etkisini önleyici olarak da kullanılmaktadır. Meryemana dikenini bitkisinde bu maddeler yanında, tiramin, flavonid, histamin, reçine, amin, albümin, agmatin maddeleri de bulunmaktadır (Tanker 2003).

2.4.3. Silimarinin Genel Özellikleri

S. marianum L. tohumlarından elde edilen ekstreleri bol miktarda silimarin içermektedir (Ding et al., 2001). Silimarinin biyolojik aktivitesinden sorumlu olduğu düşünülen temel bileşeni silibindir ancak yapısında bulunan diğer flavanolignanların da bu biyolojik aktivitede rolü olabileceği düşünülmektedir. (Morazzoni et al., 1995).

Deve dikenini sütünün çok eski zamanlardan beri tanımlanan ve kullanılan tipik uygulamaları, çoğunlukla sindirim sistemi problemlerinde ve karaciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır (Flora et al., 1998). Son zamanlarda, silimarin/silibin ve onların preparasyonları alkol tüketimi ile ilişkili karaciğer hastalıkları, kronik hepatit ve siroz tedavisi ile çevresel toksin etkilerinin tedavisinde destekleyici olarak uygulanmaktadır (Blumenthal, et al., 1998, Simanek et al., 2001, Fraschini, et al., 2002).

Silimarin 30 yılı aşkın bir süredir klinik olarak alkole bağlı karaciğer hastalıklarının tedavisinde ve anti-hepatotoksik ajan olarak kullanılmaktadır (Saller et al., 2001). Fakat silimarinin asıl aktivitesi; içerdiği flavanolignanlar ve diğer polifenolik bileşikler ile antioksidan özellik göstermesi ve buna bağlı olarak serbest

radikal tutucu işlevinin bulunmasıdır (De Groot and Rauwen 1998). Bu özelliğinden dolayı silimarin ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Silimarinin hücre glutatyon peroksidaz (GSH) seviyesinde artışa neden olduğu (Valenzuela et al., 1989), süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini arttırdığı (Zhao et al., 2000) ve lipit peroksidasyonunu baskıladığını (Bosisio et al., 1992) ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır.

Karaciğer zehirlenmelerinde (alkol, ilaç, mantar gibi), akut ve kronik hepatitte, sirozda ve sarılıkta, safra taşlarını gidermede kullanılır. Karaciğer rejenarasyonunu hızlandırır (Tanker ve ark., 2007). Yapılan pek çok klinik çalışmada flavonolignanların karaciğer hücrelerini yenileme yeteneğini teşvik ettiği ortaya konulmuştur (Sonnenbichler et al., 1999).

S. marianum tohumlarının kaynağına bağlı olarak çeşitli silimarin bileşenlerinin oranı belirlenmiştir (Kren et al., 2005). Silimarinin oldukça güvenli olduğu düşünülür ve zıt etkileri üzerine sadece birkaç çalışma vardır. Jacobs ve arkadaşları (2002) yaptıkları meta analiz çalışmasında yalnızca 3 ciddi zıt etkiyi göstermişlerdir. Bunlardan biri, deve dikenini süti içeren bitkisel formülün bir kombinasyonun, bir hastada gastroenterit belirtilerine neden olmasıdır. Diğer ikisi ise, *S. marianum* çayının sindirimden sonra anaflaktik reaksiyonun tanımlanmış olmasıdır (Jacobs et al., 2002). Genel olarak Silibinin (ca 0.5 gr/1 H₂O) düşük çözünürlüğünden dolayı in vivo şartlarda onun toksik konsantrasyonlarına ulaşmak hemen hemen imkansızdır. Silibinin ve ilişkili flavanolignanların fizyolojik olarak aşırı konsantrasyonlarda in vitro olarak sitokrom P450 (CYP) izoenzimlerinin katalitik aktivitelerini baskıladığı belirlenmiştir. Ayrıca silibinin CYP1A2 ve CYP3A4'ün ekspresyonunu engellemediği de gösterilmiştir (Kosina et al., 2005). Bu sonuçlar, ilaç ilaç etkileşimlerinde silimarinin yan etkilerinin olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte, silimarinin etki mekanizmalarının ve yan etkilerinin detaylı olarak açıklanması için iyi planlanmış klinik denemelere gereksinim vardır (Kren and Walterova 2005).

Son yıllarda, silimarin başka yararlı etkilerinden dolayı da dikkat çekmiştir. Bu etkileri, karaciğeri koruma ve antioksidan etkileri ile doğrudan ilişkili değildir. Bunlar, çoğunlukla düşük kolesterol, kalbi koruyucu, nöroaktif ve nöroprotektif aktiviteler kadar kimyasallara karşı koruma ve antikanser etkileri de içine almaktadır.

Ayrıca silibin uygulama alanları karaciğer ve sindirim sisteminin yanı sıra diğer organ sistemlerini de kapsamaktadır. Silibin, adenokarsinomu içeren çeşitli prostat hastalıklarının tedavisinde, böbrek hastalıklarında, akciğer hastalıklarının tedavisinde, şekerin dengelenmesinde ve pankreas hastalıklarının tedavisinde de umut verici olarak görülmektedir. Bu, silibinin pek çok yeni etkisinin keşfedilmesi ile bağlantılıdır.

S.marianum toz ekstresi karaciğerin işlevini ve karaciğer hücre çoğalmasını artırır, güçlü antioksidan etkisi vardır. Sedef hastalığı, hepatit, siroz, sarılık, karaciğeri çeşitli zehirlerden arındırma gibi kullanım alanları vardır. Cilt sorunlarında ise; çalışmalar silimarinin cilt hücrelerinin üreme hızını normal düzeyde tuttuğunu göstermektedir. Bu aktivitesi ve anti-inflamatuar olması sayesinde sedef hastalığında kullanımı başarılı olmuştur. (Anon 2008).

2.4.4. Kemoprotektif ve antikanser ajan olarak silimarin

Kemoprotektif (kemoterapinin yan etkilerinden koruyucu) ve kanser koruyucu ajan olarak silimarin uygulamasında en önemli neden silibin ve silimarinin antioksidan özellikte olmasıdır. Bu yüzden hücre koruyucu etkisi vardır (Kren and Walterova 2005).

Silibin/silimarin, koruyucu etkisi sayesinde birçok kimyasalın karsinojenik etkisini baskılar (Dorai et al., 2004). Silibin, belirgin bir şekilde N-butil-N-(4-hidroksibutil) nitrozaminin yol açtığı mesane hasarlarını önemli ölçüde azaltmıştır (Vinh et al., 2002) . Ayrıca; silibin, sıçanlarda azoksimetan ile oluşturulan kalın bağırsak karsinogenezini önemli ölçüde azaltmıştır (Kohno et al., 2002). Silimarin bezoil peroksit veya 12-O-tetradekanoilformol-13-asetat ile oluşturulmuş deri kanserini de baskılamıştır (Lahiri-Chatterjee et al., 1999, Zhao et al., 2000). Yine, silibinin karsinogenez ya da kanser hücrelerinin çoğalma aşamasında görev alan reseptörler üzerinde etkisi vardır. Silibinin, hücre uyarı ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynadığı gözlemlenmiştir (Ahmad et al., 1998, Singh et al., 2002, Dorai et al., 2004). İnsan prostat karsinomasında, silimarin mitoz bölünme sinyal yollarını baskılar ve hücre döngüsü düzenleyicilerinin etki yollarını değiştirerek (Zi et al., 1999) androjenden bağımsız prostat karsinoma hücrelerinin büyümesini durdurur ve onların ölümüne yol açar (Bhatia et al., 2001).

Silibinin bir diğ er tümör baskılama mekanizması ise; insülin-benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein- 3' n oluşmasında belirlenmiştir. Hem silimarin hem de silibin prostat kanseri LNCaP hücre dizisinde anti-androjenik aktiviteye neden olmuştur (Zhu et al., 2001, Thelen et al., 2004). Silibin/silimarin'ın anti-androjenik aktivitesi, insan umbilikal ven endotel hücrelerinde tanımlanmış olup, VEGF azalması silimarin/silibin dozuna bağlıdır. Bu sonuçlar daha sonra insan ovaryum kanserinde de doğrulanmıştır (Kren, et al., 2005). Ayrıca yapılan çalışmalarda bitkiden elde edilen ekstraktın akciğer tümörü büyümesini baskıladığı, meme, kolon, mesane kanseri hücre hatlarında hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptozisi tetiklediği gösterilmiştir.(Zi et al., 1998, Zi and Feyes 1998, Agarwal et al., 2003, Singh et al., 2004, Tyagi et al., 2004). Silibin, doza bağlı olarak T-24 ve TCC-SUP (mesane kanseri hücre hatları) hücrelerinde DNA'da kırıklar meydana getirerek kaspaz -3' n aktivasyonuna neden olur. Ayrıca bu hücrelerde, kaspazların katalitik aktivasyonu ile bağlantılı olarak DNA tamir enzimi olan PARP (NAD⁺ bağımlı poli ADP-riboz polimeraz enzimi) 'ın ayrışmasına neden olmaktadır (Okouneva et al., 2003). Ancak, silibinin hepatokarsinoma hücre hattı üzerinde özellikle üç boyutlu kültür ortamında apopitotik etkisi olduğuna dair henüz çok az bilgi mevcuttur (Varghese et al., 2005).

2.4.5. Kanser tedavisinde silimarin

Silibinin ve türevlerinin bilinen en önemli özelliklerinden biri, antikanser aktivitesidir. Burada; silibin, kemoterapötikler tarafından oluşturulan oksidatif strese karşı dokuları korumada bir antioksidan olarak etki etmesinin yanı sıra karaciğeri de korur (Ladas et al., 2003).

Laboratuar çalışmalarında silibin ve silimarinin kimyasal tedavi sırasında yan etkilerinin olmadığı gözlemlenmiştir. Yapılan bir çalışmada; polimyelositik lösemili 34 yaşındaki bir kadında silimarin kullanılmıştır. 18 ay boyunca metotraksat ve 6-merkaptopürin ile yapılan kemoterapik tedavi sırasında karaciğerde doza bağlı olarak hasarlar oluşmuştur. Daha sonra hastaya 4 ay süresince bu ilaçlara ek olarak 800 mg silimarin uygulandığında hastanın karaciğerinde aminotransferaz seviyelerinin normale döndüğü g r lm ştir (Kren et al., 2005).

Cisplatin ile oluşturulmuş böbrek hasarına karşı silibinin koruyucu olduğu sıçanlarda gösterilmiştir. Cisplatinden önce silibin infüzyonu, böbrek tübüler toksisitesinde ve glomerüllerde belirgin bir azalma ortaya çıkartmıştır. Silibin ile ortak verilen 4-hidroperoksifosfamid ve cisplatinin anti tümör aktivitesini baskıladığı, üç insan testis kanser hücre dizisi ile in vitro şartlarda gösterilmiştir (Bokemeyer et al., 1996).

Böbrek tübüler epitel hücre (LLC-PK1) kültüründeki cisplatin toksisitesi quersetin ile yapılan ön tedavi ile kısmen azaltılmıştır. Fakat test edilen diğer flavonoidler (katesin, silibin, rutin) ile etkili olmamıştır (Kuhlmann et al., 1998). Silibinin, hem östrojen bağımlı hem de bağımsız insan göğüs kanser hücrelerinde (MCF-7 ve MDAMB468) doksorubisin, cisplatin ve karboplatinin terapötik potansiyelini arttırdığı belirlenmiştir. Bu dört ajanın her biri tek başına test edildiğinde, doza ve zamana bağlı olarak her iki hücre dizisinde de büyümenin baskılandığı görülmüştür. Bu dört ajanın, büyümeyi geciktirici etkilerine bağlı olarak, silibin (25–100 μ M) ile doksorubisinin (10–75 nM), cisplatin (0,2–2 μ g/ml) veya karboplatinin (2–20 μ g/ml) birçok kombinasyonu ile hücre büyümesinin baskılanması ve apoptik ölümdaki sinerjistik etkileri değerlendirilmiştir. Hücre büyümesinin baskılanmasında en güçlü sinerjistik etkiler, her iki hücre dizisinde de 100 μ M silibin ve 25nM doksorubisin dozunda olmuştur (Tyagi et al., 2003).

2.5. APOPTOZİS

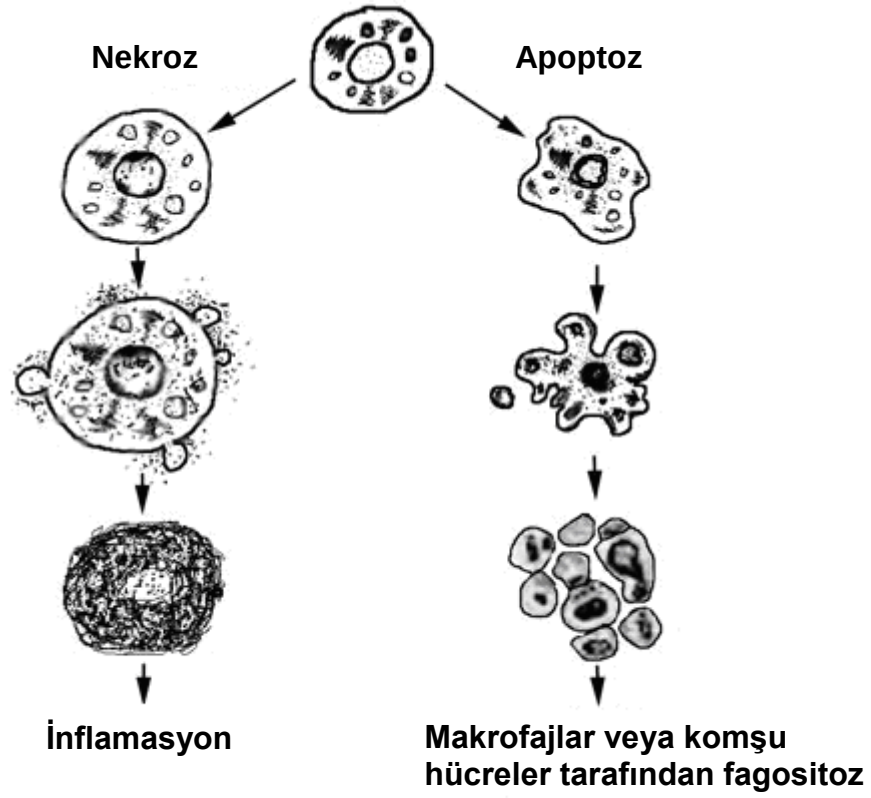
Çok hücreli organizmalarda hücre sayısının kontrolü, hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengenin devamı ile sağlanır. Apoptoz programlı ve fizyolojik bir ölüm şekli olması nedeniyle bu dengenin sürdürülmesinde önemli rol oynar. Fizyolojik hücre ölümü uzun yıllardır bilinen bir kavram olmasına rağmen apoptoz terimi ilk kez 1972’de Kerr ve arkadaşlarının ölen hücrede gelişen karakteristik yapısal değişiklikleri belirlemeleri ve bu süreci apoptoz olarak tanımlamaları ile kullanılmaya başlanmıştır (Kerr et al., 1972).

Hücre çoğalımının kontrolü hakkında oldukça ayrıntılı bilgiye sahip olmamıza rağmen hücre ölümü ile ilgili bilgilerimiz azdır. Günümüzde hücre çoğalımı kadar karışık bir süreç olan hücre ölümü üzerinde önemle durulmakta, apoptozu düzenleyen mekanizmalar hızla açıklığa kavuşmakta, bu olayı uyaran veya

baskılayan birçok sinyal tanımlanmaktadır (Krammer et al., 1994, Ekert and Vaux 1997, Scaffidi et al., 1999).

Apoptozis, normal yetişkin dokuların erken gelişim ve büyüme döneminde önemli rol oynayan morfolojik olarak farklı bir çeşit hücre ölümüdür (Gerschenson and Rotello 1992). Çoğunlukla programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı ile aynı anlama gelir (Allen et al., 1993).

Hücre ölümü nekroz ve apoptoz olmak üzere başlıca iki şekilde meydana gelir. Nekroz ve apoptoz arasında biyolojik ve morfolojik belirgin değişiklikler vardır (Cohen 1993, Wyllie 1997) (Şekil 7). Nekroz kimyasal ve fiziksel hasarı takiben ortaya çıkan patolojik bir ölüm şeklidir. Başta mitokondriyon olmak üzere sitoplazmik organeller hasarlanır, hücre membranı seçici geçirgenliğini kaybeder ve şişerek parçalanır. Hücre içeriği çevre dokuya yayılarak, inflamatuvar bir cevaba neden olur. Apoptotik hücrede, nekrozun aksine en çarpıcı değişiklik çekirdekte meydana gelir. Hücre küçülür, yüzeyinde sitoplazmik çıkıntılar meydana gelir. Sitoplazmada yoğunlaşma, hücre yoğunluğunda artma ve çekirdek zarına yakın bölgelerden başlayarak kromatinde yoğunlaşma görülür. Daha sonra tüm çekirdek yoğunlaşır ve DNA'nın fragmentasyonu meydana gelir. Hücre her biri membranla kaplı birçok apoptotik partiküle ayrılır. Komşu hücreler ya da fagositler tarafından bu apoptotik partiküller fagosite edilerek dokudan hızla uzaklaştırıldığı için inflamatuvar reaksiyon görülmez. Bu nedenle apoptoz kesin bir ölüm şeklini ifade eder. İnflamasyonun olmaması önemli bir özelliktir ve komşu hücrelere zarar verilmeden hücre ölümü gerçekleşir (Wyllie 1998).



Şekil 7: Apoptotik ve nekrotik hücre ölümünün karşılaştırılması. (Hetts 1998)

Apoptoz dokuların yenilenmesi ve gelişiminde rol oynayan fizyolojik bir süreçtir. Embriyonal gelişme esnasında çok sayıda hücre apoptoz ile yok olmaktadır. Gelişme faktörleri, hormonlar ve sitokinlerin sinyalleri olmadığında hücreler apoptoza giderler. Ancak apoptoz çok çeşitli iç ve dış uyarı ile tetiklenebilmektedir (Lambert and, Wiele 2005). Toksinler, iyonize radyasyon, reaktif oksijen radikalleri, çeşitli kimyasallar, yaşlanma veya iskemi sonucu gelişen subletal hasarlar hücredeki apoptotik süreci aktive edebilir. Çekirdekte, hücre zarında, mitokondriyonda veya hücre içi herhangi bir bölgeden gelebilecek bir uyarı apoptozu başlatabilir. DNA’da oluşan bir hasar özellikle önemli bir uyarıdır. Duyarlı hücrede p53’ün aktivasyonu veya diğer başka mekanizmalar apoptozu başlatabilir. Bu hasarlanmalar dışında apoptozu tetikleyen bazı fizyolojik sitokinler vardır. Örneğin apoptoz ilişkili bir reseptör olan Fas’ın (Apo1, CD95 isimleri de verilmektedir) kendi ligandı ile etkileşimi sonucu apoptoz gelişir (Szyszkoa et al., 2007). Apoptozu başlatabilen tüm bu uyarılar, sonuç olarak kaspazların (sistein proteazlar) aktivasyonuna neden olmakta, bunların aktivasyonu ile kromatin yoğunlaşması, DNA parçalanması gibi

apoptoza ait belirgin yapısal ve biyokimyasal değişiklikler gelişmektedir. Kaspazlar apoptozun efektör kolunu oluşturmaktadır ve apoptoza giden bütün hücrelerde aynı şekilde gelişmektedir (Park et al., 1995).

Bir tümör süpresör gen olarak çalışan p53 mutasyona uğradığı veya bulunmadığı zaman hücre yaşamı uzar. p53 protein ürünü, DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı tanıdıktan sonra, ya G1'de hücre döngüsünün durmasını teşvik ederek tamir için gerekli zamanı kazanır ya da hasar fazlaysa apoptoza yönlendirir. Ayrıca p53'ün Bax / Bax, Bax / Bcl-2, Bcl-2 / Bcl-2 gruplarının oranlarını düzenlediği düşünülmektedir (Israels and Israels 1999).

Apoptozun genetik mekanizması ilk kez *Caenorhabditis elegans* isimli nematodun gelişim aşamalarında belirlenmiştir (Wang et al., 2001).

Apoptozun regülasyonu Bcl-2 / Bax gen ailesi ile sağlanır (Israels and Israels E.D., 1999, Chao and Korsmeyer 1998). Bcl-2 / Bax gen ailesinin ürünleri, mitokondriyon ve çekirdek zarlarının yanı sıra endoplazmik retikulum zarının üzerinde de yer alırlar ve homodimer ya da heterodimerler şeklinde bileşik oluşturarak çalışırlar (Israels and Israels E.D., 1999, Hetts 1998). Örneğin; Bcl-2 nin Bax ile olan etkileşiminde Bcl-2 nin oranının daha yüksek olması hücrenin yaşamını sürdürmesini sağlarken, Bax'ın daha fazla olması durumunda hücre ölüme gitmektedir (Behnia et al., 2000). Son yıllardaki, hücrenin yaşamı ya da ölümü konusundaki araştırmalar dikkatleri mitokondriyon üzerinde toplamıştır (Büyükgebiz ve Caferler 2001).

Apoptoz mekanizmasında üç temel grup rol alır. Bunlar: Ölüm reseptörleri, adaptör proteinler ve proteolitik enzimlerdir (kaspazlar) (Hetts 1998, Büyükgebiz ve Caferler 2001). Adaptör proteinler, reseptörle gelen sinyal sonucunda kaspazlara bağlanıp onları aktive ederler. Bu reseptörlerin en çok bilinenleri tümör nekrozis faktör reseptörü-1 (TNFR1) ve Fas (CD95) karaciğerde bol miktarda bulunur. Fas'ın etkisiyle kaspaz dizisi (kaskadı) aktive olur ve kaspazla aktive olan DNaz (caspase-activated DNase; CAD) aracılığı ile DNA yıkımına neden olur (Büyükgebiz ve Caferler 2001).

Şimdiye kadar sitozolde bulunan 14 kaspaz tanımlanmıştır (Strasser et al., 2000, Wang et al., 2001) (Tablo 1); inflamasyonu uyaran ve ilk kez bir proteaz olarak tanımlanan ICE, prokaspaz-1 olarak isimlendirilmiştir. Kaspazlar bir seri

olaylar dizisinde diğer prokaspazları aktive ederler. Kaspazlar; sitokin üretimine katkıda bulunanlar (kaspaz 1, 4, 5, 13), proteolizisin "başlatıcıları" (kaspaz 2, 8–10) ve "uygulayıcıları" (kaspaz 3, 6, 7) olarak sınıflandırılırlar (Budihardjo and Oliver 1999, Büyükgebiz ve Caferler 2001). Ölüm sinyali veren başlatıcı kaspazlar, adaptöre bağlanırlar ve ölüme yönlendirirler ama infazı gerçekleştirmezler bunu yapacak olanları aktifleştirirler. İnfazı gerçekleştiren uygulayıcı (efektör) kaspazlardır. Uygulayıcı kaspazlar, başlatıcı kaspazların akışını aktive ederler (Büyükgebiz ve Caferler 2001).

Tablo 1: Sitozolde bulunan kaspaz tipleri (Büyükgebiz ve Caferler 2001)

Apoptozu Başlatanlar	Apoptozu Yürütenler	Sitokin Aktivasyonu Yapanlar
C-2	C-3	C-1(ICE, İnterleukin-1 beta converting enzim)
C-8	C-6	C-4
C-9	C-7	C-14
C-10		C-5
		C-11
		C-12

2.6. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Teorik olarak çekirdeği olan her hücre çoğalabilme kabiliyetinde ise de vücudumuzdaki hücreler çoğalma özelliklerinden dolayı üç ana gruba ayrılır. Birincisi; kök hücreler, kemik iliği ve mide-bağırsak sistemin epitel hücreleri gibi daima çoğalan hücreler, ikincisi; karaciğer, periferik lenfosit ve makrofajlar gibi uyarıldığı zaman çoğalan hücreler, son grup ise; sinir sistemi ve gözün bazı hücreleri gibi yaşam boyu bir kez çoğalan hücrelerdir. Bunlardan başka normal olmayan bir grup daha vardır ki; doğal olarak apoptoza uğramayan anarşist hücreler olduğu kabul edilen ve sürekli çoğalan tümör hücreleridir (Walker 1997).

Hücre kültürü, canlı bir dokudan veya organdan çeşitli yöntemlerle (mekanik ya da enzimatik) ayrıştırılmış in vitro ortamda yaşatılan ve üretilen hücre topluluğudur (Helgason and Miller 2005).

Organizmadan doğrudan doğruya alınan organ, doku veya hücrelerden üretilen kültürler primer kültürler adı verilir. Primer kültürler, bulundukları yerde çoğalıp başka bir yere bölünerek aktarıldıktan (hücre pasajı) sonra hücre soyu (cell line) adını alırlar (Bilir ve ark., 2004).

Hücre suşları veya hücre soyları diploid veya heteraploid olabilirler. Hücrelerin heteraploid oluşları onların habis hücreler olduklarını veya in vitro çoğalmalarının sınırsız oldukları anlamına gelmez. Hücre kültüründe sınırsız çoğalan hücre soyu veya suşları, devamlı hücre soyları (established cell line) şeklinde tanımlanarak, yaşam süreleri sınırlı diploid veya heteraploid hücre soylarından ayrılırlar. Üç gün ara ile en az 70 defa pasajı yapılan hücre soyları “devamlı hücre soyu” olarak kabul edilmektedirler (Bilir ve ark., 2004).

Transforme hücreler adı verilen bir diğer hücre tipi daha vardır ki bunlar sınırsız sayıda pasajlama yapılmasına rağmen hayatta kalıp çoğalmaya devam ederler. Bunlar kanser hücreleri olup kanserli dokudan çıkarımla elde edilmiş olabilir. Viral onkogenler, kanserojen kimyasallar veya radyoaktif ışınlar kullanılarak bilinçli şekilde veya normal pasajlamalar sırasında hücre döngüsünde meydana gelen aksaklıklarla kendiliğinden kanser hücrelerine dönüşmüş olabilirler. Kanser hücreleri sürekli kullanım avantajına sahip olsa da in vivo şartlardaki hücrelerden davranış yönünden oldukça farklılık gösterirler (Helgason and Miller 2005).

Günümüzde, hücre kültürleri esas olarak iki yolla üretilmektedir: Tek tabaka (monolayer) hücre kültürleri ve süspansiyon halinde hücre kültürleri. Tek tabaka hücre kültürleri, cam veya plastik zemin üzerine tutunarak yaşayan, işlevlerini sürdüren ve üreyen hücrelerdir. Süspansiyon halindeki hücre kültürlerinde, hücreler hayatsal işlev ve üremelerini süspansiyon halinde bulundukları ortamda sürdürebilir (Bilir ve ark., 2004).

2.6.1. Hücre Kültürlerinin Kullanım Alanları

Bugün için moleküler tanı ve tedavi amaçlı başta olmak üzere çok sayıda (özellikle araştırma amaçlı) doku ve hücre kültürlerinden yararlanılmaktadır. Doku ve hücre kültürlerinin sağladığı avantajlar şöyledir:

- Aşı, antikor, enzim ve hormon üretimi
- İlaçların hücre bölünmesini durdurucu ve toksik etkilerinin araştırılması
- Çeşitli ilaçların hücre döngüsüne etkisi
- Hücre içi metabolik olayların araştırılması
- Hücre içi enerji metabolizması ile ilgili araştırmalar
- DNA ve RNA replikasyonu araştırması
- Protein sentezi
- Hücre yüzey reseptörlerinin ve sinyal mekanizmalarının çalışılması
- Enfeksiyonların hücreye etkileri
- Hücrenin beslenme özellikleri, yaşlanma ve farklılaşma
- Programlı hücre ölüm mekanizmaları
- Tümör hücrelerinin ilaç duyarlılıkları
- Radyoterapinin hücresel düzeydeki etkileri
- Gen aktarımı ile yapılan araştırmalar
- Embriyonik araştırmalar ve üreme tekniklerinin geliştirilmesi
- Kök hücre araştırmaları
- Sitolojik, sitogenetik analizler ve genetik uygulamalar gibi çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır (Bilir ve ark., 2004).

Bugün için artık tek tabakalı ve süspansiyon hücre kültürlerinin klinik faydalarını en üst düzeye çıkarmak üzere orijinal doku mikro çevre özelliklerini yansıtan üç boyutlu kültür metotları geliştirilmiştir. Bu metotların içinde yumuşak agarda koloni oluşturma yöntemi ve multiselüler tümör sferoid yöntemleri gibi metotlar gelmektedir. Bu metotların en önemli avantajları arasında orijinal doku özelliklerini yansıtma sayılabilir (Bilir ve ark., 2004).

Yumuşak agarda koloni oluşturma yöntemi: Bu model hücrelerin medyum içerisinde flask yüzeyine ekilmesi yerine uygun agar/medyum karışımı içerisinde ekilerek üç boyutlu üreme esasına dayanır. Hücreler in vivo doku kıvamındaki agar

medyum karışımına ekildiği için doku mikroçevresi baskısı altında üreyip çoğalarak koloni adını alan düzgün hücre grupları oluşturlar (Uçar and Ovalı 2003).

Multiselüler tümör sferoid yöntemi: Tümör hücreleri ile yapılan in vitro deneylerde birçok laboratuvarında tek tabakalı hücre kültürleri kullanılmaktadır. In vitro hücre modeliyle kanserin temel oluşum mekanizmaları ve tedavisi üzerine oldukça değerli bilgiler edinilmiştir (Öktem ve ark., 2006).

Çalışmalarda kullanılan tek tabakalı kültürde üretilen hücrelerin kemoterapiye karşı oluşturdıkları yanıt ile klinik gözlemler arasında birçok farklılık bulunduğu gözlenmektedir. Örneğin tek tabakalı kültürde çok etkili bulunan ve belirgin antitümoral etkinliği saptanan bir ilacın ya da ilaç kombinasyonlarının klinikte bu derece etkili olmadığı görülmektedir. Bu nedenle tek tabakalı hücre kültürünün üç boyutlu in vivo solid tümörlerin özelliklerini tam olarak yansıtmada yetersiz kaldığı kabul edilmektedir. Bu nedenle, solid tümörlerin üç boyutlu düzenini dikkate alarak daha uygun in vitro sistemler oluşturması amacıyla multisellüler tümör sferoidleri (MTS) geliştirilmiştir (Ahışhalı ve Bilir 2002, Öktem ve ark., 2006).

Tümör sferoidleri, solid tümörlerin üç boyutlu büyüme ve organizasyonunu oldukça gerçekçi bir biçimde yansıtmakta ve bunun sonucunda tümörlerde söz konusu hücreler arası ilişkileri ve mikroçevresel koşulları çok daha net olarak ortaya koyabilmektedir (Öktem ve ark., 2006).

Üç boyutlu kültürlerin diğer bir üstünlüğü de her bir ayrıntının kolayca gözlemlendiği yapısal şekle sahip olmalarıdır. Bu yapısal şekiller, yaygın makromolekülleri gözlemlenmede ve çevresel şartları incelemeye bize bir şans verir (Öktem ve ark., 2006).

İn vitro sferoid kültürleri çeşitli metotlarla elde edilebilir. Bunlardan en sık kullanılanı sıvı üst tabaka yöntemidir. Bu yöntemde hücre kültür kaplarının tabanı agarla kaplanarak tümör hücrelerinin plastik zemine yapışmaları önlenmekte ve hücreler agarlı zemin üzerinde büyümelerini sürdürmektedir. Daha sonra 1-3 gün içinde küçük hücre kümelenmeleri oluşmakta ve ardından içinde tümör hücrelerinin sıkı bir şekilde organize olduğu düzgün sferoid yapıları şekillenmektedir. Sferoid üretme teknikleri arasında sıvı üst tabaka yönteminden başka “spinner flask” ve “daireselel rotasyon (gyratory rotation)” gibi teknikler de bulunmaktadır. Ancak bu

yöntemler ek donanım gereksinimi göstermekte ve çalışma maliyetleri oldukça yüksek olmaktadır. Sıvı üst tabaka yöntemi ise laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilecek ucuz, kolay ve hızlı bir yöntem olarak dikkati çekmektedir (Ahışhalı ve Bilir 2002).

2.7. HÜCRE DÖNGÜSÜ

İki yavru hücre ortaya çıkarmak üzere birbirini izleyen iki mitoz bölünme arasındaki aralık hücre döngüsü (siklus) olarak tanımlanır. Bu süreç iki aşamaya ayrılır:

1. İnterfaz
2. M Fazı (mitoz) (Kierszenbaum 2002).

İnterfaz da 3 evreye ayrılır:

1. G1 (sentez öncesi)
2. S (DNA sentezi)
3. G2 (DNA eşlenmesi sonrası)

G1 evresi, RNA ve protein sentezinin olduğu evredir. Sentezlenen bu proteinlerden bazılarının görevi; hücre döngüsünü kontrol etmek, hücre hacmini mitozdan sonra yarıya indirerek normal büyüklüğüne ulaştırmaktır. S evresi, DNA sentezi ve sentrozom eşlenmesinin başlamasıyla özellik kazanır. (Aytekin ve Solakoglu 2006).

G1 evresindeki hücreler ya DNA çoğalması için S fazına girerler ya da girmezler. S fazına girmeyen hücre G0 (G sıfır) fazı denen dinlenme dönemine girer. Hücreler bu evrede döngüye girmeden önce günlerce, aylarca, hatta yıllarca kalabilir (Kierszenbaum 2002).

Sürekli bölünmeyen hücrelerde, hücre döngüsü faaliyetleri geçici veya kalıcı olarak durur. Kas ve sinir hücrelerini örnek olarak gösterebileceğimiz bu hücreler G0 evresinde kabul edilirler.

Hücre kültüründe, kültür ortamı serumdan yoksun bırakılırsa, hücreler çoğalmayı durdurup G0 evresine girerler. Serumun besi ortamına kattığı temel bileşen “büyüme faktörü” denilen özelleşmiş bir proteindir. Hücre S fazına girmeden önce G1 kontrol noktasında durdurulur. Eğer DNA hasarı meydana gelmişse hasar tamir edilir. Memeli hücrelerinde G1 kontrol noktasında durdurma, “p53” denilen protein aracılığıyla gerçekleşir. p53 proteinini kodlayan gen insan kanserlerinde mutasyona uğramıştır. Bunun sonucunda hücrenin hasarlı DNA’yı tamir etme yeteneği azalır. Hasarlı DNA’nın kalıtımla yavru hücrelere geçmesi, değişimlerin hızla çoğalmasına ve genomun kararsızlığına; bu da, kanser gelişmesine neden olur (Aytekin ve Solakoglu 2006).

Hücre çoğalmasında önemli rolü olan hücre döngüsünün en önemli olayı DNA kopyalanmasıdır (replikasyon). İnterfazın bu en belirgin olayı S fazında gerçekleşir. Burada çekirdekteki DNA iki katına çıkar (Kierszenbaum 2002, Aytekin ve Solakoglu 2006). G2 fazında, mitozda kullanılacak enerji biriktirilir, mitotik mikrotübüllere katılacak tübülünler ve kromozomal histon olmayan proteinler sentezlenir.

G2 fazında da kontrol noktası vardır. Hücre, bu noktada hatalı sentezlenmiş olan tüm DNA’lar düzeltilene kadar bekler. G2 fazında “MPF” (olgunlaşma başlatan faktör) adlı bir protein bileşiği birikmeye başlar. Bu bileşik, mitozun başlamasına, kromozomların yoğunlaşmasına, çekirdek kılıfının yırtılmasına ve mitozla ilgili tüm diğer olayların gerçekleşmesine neden olur (Aytekin ve Solakoglu 2006).

2.7.1. Hücre Döngüsü Değerlendirme Yöntemleri

Bilindiği üzere tümör dokusu, hücre döngüsünün değişik fazlarında bulunan hücrelerden oluşmuş heterojen bir populasyon olarak kabul edilir. Böyle bir hücre populasyonunda DNA sentezinin yapılmadığı G1 fazında bulunan hücreler, DNA sentezinin yapıldığı sentez (S) fazında bulunan hücreler ile DNA’nın iki kat olarak bulunduğu G2 fazı ve bölünmenin gerçekleştiği mitoz (M) fazına ait hücreler bulunur (Karatay ve ark., 1995, Bilir ve Gülgün 1995, Daidone et al., 2001).

Bir hücre popülasyonundaki aynı cins hücrelerin hücre döngüsü süreleri tam olarak aynı değildir. Hücre döngüsüyle ilgili kantitatif verilerin elde edilmesi amacıyla, iki ölçüm yapılır.

Bu ölçümlerden birincisi, popülasyonda mitoz bölünme yapan hücre sayısının tüm hücre sayısına oranının hesaplanmasıdır. Bu değere “Mitotik İndeks” (Mi) adı verilir. Eğer popülasyondaki tüm hücrelerin bölündüğü, hepsinin aynı hücre döngüsü süresine sahip olduğu ve bütün hücrelerin hücre döngüsünün çeşitli fazlarına homojen olarak dağıldığı düşünülürse, mitotik indeks değerinden aşağıdaki eşitlik çıkabilir:

$$\text{Mitotik İndeks (Mi)} = T_m / T_c$$

T_m , mitoz fazının süresini, T_c ise hücre siklusunun toplam süresini belirtmektedir.

İkinci basit ölçüm ise, işaretlenmiş yani S fazındaki hücrelerin sayılarak bunların tüm hücrelere oranının saptanmasıdır. Bu değere de “Labeling İndeks” (LI) ya da “İşaretlenme İndeksi” denir.

$$\text{Labeling İndeks (LI)} = T_b / T_c$$

T_b , S fazı süresini, T_c ise toplam hücre siklusu süresini göstermektedir.

Uygulamada bu iki yöntemle küçük miktarda ve tek bir örnekte mitotik indeks ve işaretlenme indeksi saptanarak hücre döngüsüne kantitatif yaklaşımda bulunmak mümkündür. Bu olay özellikle insan dokuları ile yapılan çalışmalarda çok önemlidir (Özalpan 2001).

Howard ve Pelc tarafından 1953 yılında geliştirilen ve otoradyografi temeline dayanan Timidin İşaretleme İndeksi (TLI= Thymidine Labelling Index) adı verilen bu yöntemde, interfazdaki hücrelerin fizyolojik açıdan farklı davrandıklarının ortaya konması, hücre biyolojisinde yeni bir çıkırın açılmasına neden olmuştur (Studzinski 1994, Güneri 2002). Günümüzde tümörlerin çoğunda prognostik parametre olarak kullanılan bu yöntem, özellikle meme kanserli hastalar başta olmak üzere kantitatif olarak tümör büyüme hızını gösteren kinetik bir parametredir (Müslümanoğlu ve ark., 1995, Bilir ve ark., 2004). Bu yöntem sayesinde tümörün büyüme oranı, lokal saldırganlığı ve kısmen de uzak metastaz yapma olasılığı gösterilebilmektedir (Bilir

ve ark., 1987, 1988, 1991, 1999, 2004, Anıl ve ark., 1987, Onel ve ark., 1990, Ünal ve ark., 2000). Timidin işaretleme indeksinin (TLI) hesaplanabilmesi için hücrelere birim zaman içerisinde radyoaktif timidin (^3H -TdR) uygulanır. Bu uygulama sırasında DNA sentezi yapmakta olan hücreler yeni DNA molekülü yapısına timidini alırlar (Bilir ve Gülgün 1995, Bilir ve ark., 1987, 1988, 1991, 1999, 2002, 2004, Anıl ve ark., 1987, Onel ve ark., 1990, Ünal ve ark., 2000). Bu yöntemde timidinde, bir hidrojen atomu radyoaktif izotopu olan trityumla değiştirilir ve bu özelliğine bağlı olarak β partikülleri yayar (Güneri 2002). Bu durum otoradyografi sonrasında timidini alan hücre çekirdeklerinde siyah noktacıklar halinde izlenir (Bilir ve Gülgün 1995, Kierszenbaum 2002). İşaretli hücrelerin toplam hücrelere oranı % olarak ifade edilir. TLI olarak adlandırılan bu veri hücre popülasyonunun çoğalma oranını göstermesi bakımından, tümörün saldırganlığının, terapötik etkinin ve prognozunu anlaşılmada önemlidir (Bilir ve Gülgün 1995, Bilir ve Gülgün 1995, Bilir ve ark., 1987, 1988, 1991, 1999, 2002, Anıl ve ark., 1987, Onel ve ark., 1990, Toshikazu et al., 1993, Ünal ve ark., 2000).

Ancak günümüzde radyoaktif bir metot olduğu gerekçesiyle uygulamadaki zorluklarından dolayı, bu metodun yerini yine bir timidin analogu olan halojenli pirimidin grubundan 5-bromo-2'-deoksiüridin (BrdU) kullanımı almıştır. Bu yöntem, sadece S fazındaki hücrelerin BrdU işaretlenmesi ve bu işaretli hücre grubunun hücre döngüsündeki ilerlemesinin izlenmesine dayanır (Schutte et al., 1987, Waldman et al., 1991, Toshikazu et al., 1993, Özalpan 2001).

BrdU, timidin molekülündeki metil grubunun yerine aynı boyutlardaki bir brom atomunun geçmesi ile oluşan timidin analogudur. DNA sentezini düzenleyen enzimler timidin ve timidin analoglarını ayırt edemedikleri için, bunlar aynen timidin gibi yeni sentezlenen DNA'nın yapısına girebilirler.

Radyoaktif olmayan timidin analogu olan Bromodeoksiüridin S fazındaki hücrelerin DNA'sına bağlanarak bunun sonucunda Anti-BrdU antikorlarının kullanımı ile ortaya çıkarılması sağlanır. Bu metot hücre kinetiği araştırmalarında timidine göre daha elverişli bir metottur (Toshikazu et al., 1993, Koehm 1997).

Hücrelerin BrdU ile muamelesi sonunda monoklonal antikorlar kullanılarak immünohistokimyasal teknikler uygulanır ve DNA sentezi yapan hücrelerin oranı

(BrdU Labaling Indeks BrdU-LI) klinik veriler ve tümör histolojisiyle karşılaştırılarak mikroskobik olarak değerlendirilir (Toshikazu et al., 1993).

Bu durumda timidin yerine Bromodeoksiüridin (BrdU) ile işaretlenen S fazı hücrelerini görünür hale getirebilmek için otoradyografi yerine immünohistokimya teknikleri kullanılır (Özalpan 2001).

2.7.2. İmmünohistokimya

İşaretlenmiş antikörler kullanılarak hücre ve dokulardaki özgün makromoleküllerin varlığını ve yerleşimini saptamada kullanılan bir yöntemdir. Antijen-antikör reaksiyonu temeline dayanır. Organizmaya girdiğinde reaktif immün yanıt oluşturabilen maddelere immünojen; bu immünojenlerden kendilerine karşı özgün antikör oluşturabilenlere ise antijen denir.

İmmünohistokimyada kullanılan antikörler ikiye ayrılır:

- 1) Poliklonal antikör
- 2) Monoklonal antikör

Antikörlerin işaretlenmesinde 4 yöntem kullanılır;

- Floresan bileşiklerle işaretleme

Dondurulmuş doku kesitleri, yaymalar ve hücre kültürlerinde tercih edilir.

Sekonder antikör uygulaması ve sonraki işlemler karanlıkta yapılır.

İmmünfloresan mikroskopla değerlendirilir. Diğerlerinden üstün tarafı sadece işaretlenen moleküller görülür, diğer kısımlar karanlıkta kalır.

- Enzimle işaretleme

Reaksiyon sonuncunu gözlemek için işaret maddesi olarak bir enzim kullanılır. Enzimin reklendirilmiş ürünleri, mikroskopta antijen-antikör kompleksinin immünreaksiyon sonucu olarak gözlenir. Bu yöntemde en çok kullanılan enzimler (Demir 2001);

- Peroksidaz

- Alkalen fosfataz
- Glukoz oksidaz
- Elektron yoğun bileşikle işaretleme

Bu yöntemde işaret maddesi olarak antikora koloidal altın partikülleri bağlanır. Işık mikroskopide immün işaret, gümüş tuzları ile yapılan bir redüksiyon işlemi ile altın partiküllerinin gümüş metali ile kaplanması ile alınır (Demir 2001).

- Biotinle işaretleme

Avidin yumurta akından izole edilen bir glikoproteindir. Karaciğerde bulunan vitaminlerden biyotine yüksek bir affinite gösterir. İmmün işaretin ortaya çıkarılması için avidin-biotin-enzim kompleksi kullanılır. Enzim olarak en çok kullanılan ise Streptavidin peroksidazdır (Demir 2001).

İmmünohistokimya yöntemi gerek ışık gerekse elektron mikroskopide; tek aşamalı (doğrudan) veya iki aşamalı (dolaylı) yöntem olmak üzere iki şekilde uygulanabilir (Buchwalow and Böcker 2010).

- Doğrudan yöntem
 - Gösterilmek istenen antijene özgü antikor yöntemlerden herhangi biri ile işaretlenir. İşaretli antikorum dokudaki antijenle reaksiyona girmesi sağlanır.
 - Tek basamaklı olduğundan hızlı yapılır. Ancak primer antikor işaretlendiği için antikorum reaksiyon gücünde azalma olabilmektedir.
 - Özgül olmayan reaksiyonlar azdır.
 - Hassasiyeti düşüktür. Bu nedenle nadiren kullanılır. Yerini iki aşamalı yöntemle bırakmıştır (Demir 2001, Buchwalow and Böcker 2010).
- Dolaylı yöntem
 - Primer antikorların yanı sıra sekonder antikorlar da kullanılır.
 - Primer antikor değil sekonder antikor işaretlenir.
 - Birinci aşamada işaretsiz primer antikor antijene bağlanır.

- İkinci aşamada işaretli sekonder antikor primer antikorun tutucu bölgesi ile reaksiyona girer, böylece antijen iki aşamada işaretlenmiş olur.
- Önemli olan, antikorlar farklı hayvanlarda geliştirilmiş olmalıdır.
- Daha hassas ve güvenilir bir yöntemdir. Primer antikor ile birden fazla sekonder antikor bulunabilir ve daha güçlü bir işaretlenme elde edilebilir (Demir 2001, Buchwalow and Böcker 2010).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın deneysel kısmı Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.1. GEREÇ

3.1.1. KULLANILAN MADDELER

3.1.1.1. Kimyasal Maddeler

NaOH (Merck 106495), NaCl (Merck 106406), Na₂HPO₄ (Merck 106586), NaH₂PO₄ (Merck 106346), Absolü etanol (Merck 100983), HCl (Merck 113386), Metanol (Merck 106008), H₂O₂ (Merck 108600), Ksilol (Riedel-de Haen), Trypan blue (Sigma T6146), KCl (Merck 104934), KH₂PO₄ (Merck 105108), KCl (Merck 104934), Formaldehit (Riedel-de Haen), NaHCO₃ (Merck 3011729), Agar (Merck 101614), Parafin (VMS Chemical), CaCl₂ (Merck 2380), PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma), DMSO (Dimethyl Sulfoxide, Applichem).

3.1.1.2. Bitki Ekstraktı

Silibinin (Sigma S0417)

3.1.1.3. Enzimler

Tripsin (Biological Industries, 03-045-1B)

3.1.1.4. İlaçlar

Penicilin Streptomycin (Biological Industries, 03-031-1B)

3.1.1.5. Kitler

BrdU	(Sigma B5002)
BrdU Staining Kit Streptavidin-Biotin System	(Zymed 96-3-3943)
Detection System Anti-Polyvalent AEC/HRP	(Zymed)
Aueous-Mount	(Zymed)
Caspas 3 Primer ve Sekonder Antikor kompleks Kit	(Santa Cruz)
Rabbit active Caspase 3 antibody	(Santa Cruz)
Rabbit ABC Staining System	(Santa Cruz)

3.1.1.6. Diğer Maddeler

Fetal Sığır Serumu	(Biological Industries, 04-007-1A)
DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium	(Biological Industries, 01-040-1A)
L-Glutamin	(Biological Industries, 03-020-1B)

3.1.2. KULLANILAN GEREÇLER

1. İnkübatör	(Heal Force)
2. Laminar akım kabini	(ISO TS EN 12469)
3. Su banyosu	(Leica)
5. Otoklav	(Hüreyama HVY-50)
6. İnvrt mikroskop	(Olympus CKX41)
7. Manyetik karıştırıcı	(Nüve)
8. Mikrotom	(Leica)
9. Santrifüj	(Nüve NF 200)
10. Pipet aid	(LEVO PLUS)
11. Derin dondurucu	(U 410 Premium)
12. Buzdolabı	(Simens)

3.1.3. KULLANILAN ÇÖZELTİLER

3.1.3.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler

AGAR

3 gr agar 100 ml bidistile su içerisine konarak karıştırıldı. Otoklavda 121° C’de, 3 atm basınçta steril edildi.

3.1.3.2. İmmünohistokimya Kullanılan Çözeltiler

H₂O₂

1,5 ml H₂O₂; 98,5 ml metanole ilave edildi.

Solüsyon taze hazırlandı.

HCl

12,08 ml HCl; 87,92 ml distile suya kondu.

Solüsyon taze hazırlandı.

%5 CaCl₂

5 gr CaCl₂ 100 ml distile suda çözöldü.

NaOH

1 gr NaOH 100 ml distile suda çözöldü.

3.2. KULLANILAN YÖNTEMLER

3.2.1. Hücre Kültürü

Çalışmamız in vitro koşullarda yapılmış deneysel bir çalışma olup, deneyler Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Faköltesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında araştırma laboratuvarı ve hücre kültürü laboratuvar imkanları kullanılarak gerçekleştirildi.

Araştırmada Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu (ATCC) hücre bankasından sağlanan Hep3B (CRL no: HB-8064) hepatosellüler karsinoma hücre soyu kullanıldı.

Hep3B hepatosellüler karsinoma hücreleri için besi ortamı, inaktive edilmiş %10 FCS, 100 IU/ml penisilin/streptomisin içeren DMEM (Biological Industries) medyumunu kullanıldı.

Hücreler bu besi ortamını içeren 25 cm² ve 75 cm²'lik flasklarda, iç ortamı %5 CO₂, %95 hava karışımı ve nem içeren ve 37°C olan inkübatör (Heal Force) içinde tutularak ve haftada 3 kez rutin pasaj yapılarak üretildi.

Hücre pasajları laminar akım kabini (ISO TS EN 12469), hücre kültürleri incelemeleri invert mikroskop (Olympus CKX41), stokların -80°C'de depolanması için derin dondurucu (U 410 Premium) kullanıldı.

3.2.2. Hücre Soyunun Açılması

Uzun süre sıvı azot buharında saklanmış olan hücreler çözünmesi sağlanana dek 37 °C'lik su banyosunda tutulur. Çözünen hücre süspansiyonu santrifüj tüpüne alınarak üzerine 1-2 ml %10 serumlu medyum ilave edilir ve 1500 rpm'de 3 dk santrifüj edilir. Süpernatant atıldıktan sonra DMSO (Dimetil Sülfoksit)'nin etkisinden kurtarmak amacıyla tekrar 1-2 ml %10 serumlu medyumla 2 defa 1500 rpm'de 1-2 dk daha santrifüj edilir. Pellete az miktar %10 serumlu medyum eklenerek yavaşça pipetajlanır ve medyum konulmuş flasklara ekim yapılır.

3.2.3. Hücrelerin Çoğaltılması

Hücreler, 25 cm²'lik flasklarda 5 ml, 75 cm²'lik flasklarda ise 10 ml %10 FBS ve 100 IU/ml penisilin-streptomisin içeren DMEM medyumunu içerisinde %80-90 yoğunluğa geldiklerinde pasajlanmak suretiyle üretildi.

3.2.4. Hücrelerin Pasajlanması

Flasklar içerisinde %80-90 yoğunluğa gelen hücrelerden medyum uzaklaştırılır. Hücrelerin üzerine %0,05'lik tripsinden küçük flasklara 1-2 ml, büyük flasklara 3-5

ml eklenerek 37 °C'lik CO₂ etüvde bekletilerek kontrollü kalkmaları sağlanır. Yüzeyden ayrılan hücrelere tripsinle aynı miktarda medyum ilave edilerek tripsinin etkisi bloke edilir ve santrifüj tüpüne süspanse halde toplanan hücreler 1500 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek süpernatantı uzaklaştırılır. Bir miktar medyumla süspanse edilen hücreler medyum konulmuş flasklara ekilir. Flasklar 37 °C'lik % 5 CO₂'li etüve kaldırılır.

3.2.5. Hücre Sayımı

Toplam hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısını hesaplamak için, üzeri 4 adet 16 küçük kare içeren bölgeden oluşan 1 mm²'lik alan ve 0.1 mm derinliğe sahip hemositometre (sayma kamarası) kullanılır. Süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle bulundu.

Toplam hücre sayısı/ml = Hemositometre sayım sonucu x 10⁴ x Medyum miktarı (ml) (Bilir 2004)

3.2.6. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Hücreler %0,05'lik tripsin uygulaması ile yapıştıkları yüzeyden kaldırılır. Yüzeyden kalktıkları gözlenen hücrelere tripsinin etkisini bloke etmek için medyum eklenir ve süspansiyon santrifüj tüpünde toplanarak 1500 rpm'de 3 dk santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırılır. Pellete tekrar medyum eklenir ve tripsinin etkisinden kurtarmak için tekrar santrifüj edilir. Bu işlem sonrası pellete tekrar medyum ilave edilir. Hemositometrede hücre sayımı yapılır. Hücreleri içeren falkon tüpü, %20 DMSO'lu medyum içeren ve %40 FBS'li medyum içeren santrifüj tüpleri buz içerisine oturtulur. Soğuğa dayanıklı saklama tüpleri (kriyo tüp) de buza oturtularak soğumaları sağlanır. Tüp içerisindeki tek hücre süspansiyonundan serumlu medyum içerisine alınan hücreler pastör pipeti ile karıştırılır. DMSO'lu medyum bu karışım içerisine damla damla ilave edilir. Saklama tüpü daha sonra 1 gece -20 °C'de, 1 gece de -70 °C'de bekletildikten sonra sıvı nitrojene alınır. Ancak hücreler sıvı nitrojene değmemeli, nitrojenin buharında kalmalıdır. Tüpte son konsantrasyon 2,5x10⁶ hücre/ml olmalıdır.

3.2.7. Doz Belirleme Deneyi

Hücrelerin toplanması aşamasında flasklardaki üst medyum döküldü ve üzerine % 0,5 tripsin eklendi. İnkübatörde 5 dk bekletilerek hücrelerin flaskın yüzeyinden ayrılması sağlandı.

Hücreler flasklardan 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve üzerlerine tripsinin etkisini ortadan kaldırmak için tripsinle eşit miktarda medyum eklendi. Hücreler 3 dk 1500 rpm'de santrifüj edildi ve medyum-tripsin karışımı uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine medyum konarak süspansiyon haline getirildi ve hemasitometride sayıldı.

Deneylerde 6 kuyucuklu kültür kapları (six-well plate) kullanıldı. Pleytlerin her kuyucuğuna %100 canlı 500.000 Hep3B hücresi 5 ml DMEM medyumunda içinde ekildi.

Devedikeni bitkisinin ekstraktı olan silibinin, 1; 10; 50; 100; 200 μ M konsantrasyonlarda olacak şekilde steril DMSO içerisinde hazırlanmış taze çözeltileri 100'er μ l'lik eşit hacimlerde hücrelere verildi. Ayrıca kontrol grubu için aynı konsantrasyonlarda (1; 10; 50; 100; 200 μ M) DMSO 100'er μ l'lik eşit hacimlerde hücrelere verildi.

Her bir doz için 3'er kuyucuğa ekim yapıldı. Tüm gruplar için 24., 48. ve 72. saatler için ekildi ve 37°C'de %5 CO₂ hava karışımında rutubetli ortamda inkübe edildi.

24., 48. ve 72. saatlerin sonunda kuyucuklarda bulunan hücreler % 0,5 tripsin ile ayrı ayrı toplanıp santrifüj edildi. Süpernatant kısımları atıldıktan sonra 1 ml medyum ile süspansiyon haline getirilip sayma kamerasıyla sayıldı.

3.2.8. Tutunma (Proliferasyon) Deneyi ve Canlılık Tayini

6'lı kültür kaplarının her bir kuyucuğuna 500.000 hücre 5 ml medyum içerisinde ekildi. Gruplar kontrol ve silibin verilen grup olarak düzenlendi.

Her bir grup için 3'er kuyucuğa ekim yapıldı. Bu gruplar 24, 48, 72. saatler için ayrı ayrı ekildi. Her bir sürenin bitiminde hücreler santrifüj tekniğiyle toplanarak sayma kamerasında sayıldı ve hücre sayıları kaydedildi.

%0,1'lik tripan mavisi boyasıyla, hücre solüsyonu 1/1 oranında hazırlandı ve lam lamel arasına konarak mikroskopta sayıldı. Böylece canlı hücre oranları saptandı.

3.2.9. İki Boyutlu Kültürlerde Bromodeoksiüridin ile İmmünohistokimyasal İşaretleme

24 kuyucuklu kültür kaplarına yuvarlak lameller konularak kuyucuk başına 100.000 hücre lamel üzerine ekildi ve hücrelerin yapışması için 2 saat beklendi. Silibinin doz belirleme deneyinde hesaplanan 100 µM dozu kullanıldı. 24, 48 ve 72. saatlerin sonunda hücreler 1 saat BrdU ile 37°C'de inkübe edildi. Üst medyum çekilip atıldıktan sonra PBS'te 37°C etüvde 15 dk bekletildi. PBS çekilip atıldıktan sonra %70 etanolde 4°C'de 30 dk bekletilerek hücreler tespit edildi.

İmmünohistokimya için lameller PBS'te 10 dk bekletildikten sonra metanolde hazırlanmış %0.5 H₂O₂'de 10 dk tutulup 3 kez 2'şer dk distile su ile yıkandı. Daha sonra BrdU Staining Kit Streptavidin-Biotin System adı verilen BrdU boyama kiti kullanılarak boyama yapıldı. Bunun için kitin içerisinde bulunan denatürasyon solüsyonunda 30 dk bekletilip PBS ile 3 kez 2 dk yıkandı. 10 dk blocking solüsyonunun ardından 1 saat primer antikorda, (Biyotinli Mouse Anti-BrdU monoklonal) nemli ortamda oda ısısında tutuldu. 3 kez PBS ile 2'şer dk yıkandıktan sonra streptavidin peroksidazda 10 dk tutuldu. PBS ile yıkamanın ardından substrat-kromojende (DAB) 5 dk karanlıkta bekletildi ve distile su ile yıkandı. Mayer Hematoksilen ile zemin boyası yapıldıktan sonra kesitler çeşme suyunda 20 dk morarmaya bırakıldı. Kapatıcı (Ultramount) ile kapatıldı. Işık mikroskopunda sayım yapılarak işaretleme oranları belirlendi.

3.2.10. İki Boyutlu Kùltürlerde Kaspaz-3 ile İmmünohistokimyasal İşaretleme

24 kuyucuklu kùltür kaplarına yuvarlak lameller konularak kuyucuk başına 100.000 hücre lamel üzerine ekildi ve hücrelerin yapışması için 2 saat beklendi. Silibinin yine doz belirleme deneyinde hesaplanan 100 µM dozu kullanıldı. 24, 48 ve 72. saatlerin sonunda üst medyum çekilip atıldıktan sonra PBS'te 37°C etüvde 15 dk bekletildi. PBS çekilip atıldıktan sonra %70 etanolde 4°C'de 30 dk bekletilerek hücreler tespit edildi.

İmmünohistokimya için lameller PBS'te 10 dk bekletildikten sonra metanolde hazırlanmış %0.5 H₂O₂'de 10 dk tutularak 3 kez 5 dk distile su ile yıkandı. Daha sonra 30 dk 4 N HCl'de bekletilip PBS ile 3 kez 5 dk yıkandı. 20 dk Ultra-V-block'un ardından 1 saat primer antikorda, nemli ortamda oda ısısında tutuldu. 3 kez PBS ile 5'er dakika yıkandıktan sonra sekonder antikorda (Biotinylated Goat Anti-Mouse) 20 dk, tekrar yıkamadan sonra streptavidin peroksidazda yine 20 dk tutuldu. PBS ile yıkamanın ardından substrat-kromojende (DAB) 5 dk karanlıkta bekletildi ve distile su ile yıkandı. Mayer Hematoksilen ile zemin boyası yapıldıktan sonra kesitler çeşme suyunda 20 dk morarmaya bırakıldı. Kapatıcı (Ultramount) ile kapatıldı. Işık mikroskobunda sayım yapılarak işaretlenme oranları belirlendi.

3.2.11. Üç Boyutlu Sferoid Modelde Hücre Kùltürü Deneyleri

Tek tabakalı kùltürde büyütölen hücrelerin kemoterapiye karşı oluşturdıkları yanıt ile klinik gözlemler arasında birçok farklılık olduğu, tek tabakalı kùltürde çok etkili bulunan ve belirgin antitümorale etkinliği saptanan bir ilacın ya da ilaç kombinasyonlarının klinikte bu derece etkili olmadığı saptanmıştır. Bu nedenle üç boyutlu hücre kùltürlerinin (sferoid) in vivo katı tümörlerin özelliklerini tam olarak yansıttığı düşünölmektedir. Hep3B çok hücreli tümör sferoidleri üretimi için sıvı üst tabaka yöntemi kullanıldı (Ahışhalı ve Bilir 2002).

Sıcak su içerisinde eritilmiş %3 agar solüsyonu (60°C) ve medyum (40°C) karışımı ¼ oranında hazırlandı ve kuyucuklara (6'lı kùltür kapları kullanıldı.) bu karışımından 1 ml konarak tüm yüzeyinin kaplanması sağlandı. Agarın donması için kùltür kapları 10 dk buzdolabında 4°C'de bekletildi. Agarın donmasını takiben üzerine 5 ml DMEM eklendi.

Hücreler doz inaktivasyon deneyinde bahsedilen hücre toplama tekniğiyle toplandı ve her bir kuyucuğa 1×10^6 hücre ekildi. Her bir grup için 3 kuyucuğa ekim yapıldı. Hücreler, % 5 CO₂, % 95 nem içeren ve 37 °C olan inkübatör ortamında tutularak sferoid oluşturmaları için 4-7 gün beklendi. Süre sonunda büyüklüğü 100-400 mikrona ulaşan sferoidlere tek tabakalı kültür sonuçlarında elde edilen istatistiki olarak anlamlı bulunan en yüksek dozları yani 100µg/ml silibin ve kontrol grubu için 100µg/ml DMSO verildi ve 37 °C %5 CO₂ ve 1 atmosfer basıçta inkübe edildi.

3.2.12. Üç Boyutlu Sferoid Kültürlerin Değerlendirilmesi

Bitki ekstraktı verildikten 24 saat sonra 1 saat BrdU ile 37°C'de inkübe edildi. Sferoidler santrifüj tüplerine dikkatlice alındı. Üst medyumunu pastör pipeti ile yavaşça çekilip atıldı.

Kaspas 3 aktivite tayini için silibin verildikten 24 saat sonra sferoidler santrifüj tüplerine dikkatlice alındı. Üst medyumunu pastör pipeti ile yavaşça çekilip atıldı. Bu aşamadan sonra BrdU- işaretlenme indeksi ile aynı takip yöntemi uygulandı.

PBS'te 5 dk bekletildikten sonra tespit solusyonu %10'luk formaldehitte 30 dk oda ısısında bekletildi. 5 dk PBS konulduktan sonra üst sıvı çekilerek filtre kağıdından süzölmüş taze yumurta akı konuldu. 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi ve yumurta akının fazlası çekildi ancak bir miktarının kalması sağlandı. Üzerine %70 etanol konarak 24 saat oda ısısında yumurta akının sertleşmesi için bekletildi. Tüplerin kesilmesiyle dikkatlice çıkarılan sferoidler ışık mikroskopi takibine alındı.

3.2.13. Sferoidlerin Işıık Mikroskobu Takibi

%70 etanolde 30 dk (oda ısısında)

%90 etanolde 30 dk (oda ısısında)

%96 etanolde 30 dk (oda ısısında)

%100 etanolde 30 dk (oda ısısında)

%100 etanolde 30 dk (oda ısısında)

Ksilolde 30 dk (Etüvde (56°C))

Parafinde 45 dk (Etüvde (56°C))

Bekletildikten sonra gömölerek parafin bloklar hazırlandı. 4 µm kalınlığındaki kesitler Poly-l-Lysine ile kaplanmış lamlara alındı.

Alınan kesitlere hematoksilen eozin boyası ve immünohistokimya uygulaması sonrası preparatlar Olympus BX50 mikroskopta değeriendirildi.

3.2.14.Üç Boyutlu Kültürlerde Bromodeoksiüridin ile İmmünohistokimyasal İşaretleme

Kesitlerden parafin uzaklaştırıldı (62°C etüvde 30 dk; Ksilol: 30 dk x 2; %100 etanol: 5dk x 2; %96 etanol 5 dk x 2; %90 etanol 5 dk x 2; %70 etanol 5 dk x 2; saf su). Metanolde hazırlanmış %0.5 H₂O₂'de 10 dk karanlıkta bekletildi. PBS ile 3 kez 2 dk yıkandı. Tripsinde 10 dk 37°C etüvde bekletildikten sonra 3 kez 2 dk PBS'te bekletildi. 30 dk denaturasyon solüsyonu ve 10 dk blocking solüsyonun ardından yıkama yapmadan 1 saat primer antikorda (Biyotinli Mouse Anti-BrdU monoclonal) nemli ortamda oda ısısında tutuldu. 3 kez PBS ile 2'şer dk yıkandıktan sonra streptavidin peroksidazda 10 dk tutuldu. PBS ile yıkamanın ardından substrat-kromojende (DAB kromojen) 5 dk karanlıkta bekletildi ve distile su ile yıkandı. Mayer Hematoksilen ile zemin boyası yapıldıktan sonra kesitler çeşme suyunda 20 dk morarmaya bırakıldı. Kapatıcı (Ultramount) ile kapatıldı. Işıık mikroskobunda sayılarak BrdU-işaretlenme indeksi (BrdU-LI) değeri saptandı.

3.2.15.Üç Boyutlu Kültürlerde Kaspaz-3 ile İmmünohistokimyasal İşaretleme

Kesitlerden parafin uzaklaştırıldı (62°C etüvde 30 dk; Ksilol: 30 dk x 2; %100 etanol: 5dk x 2; %96 etanol 5 dk x 2; %90 etanol 5 dk x 2; %70 etanol 5 dk x 2; saf su). Metanolde hazırlanmış %0.5 H₂O₂'de 10 dk karanlıkta bekletildi. PBS ile 3 kez 2 dk yıkandı. Tripsinde 10 dk 37°C etüvde bekletildikten sonra 3 kez 2 dk PBS'te bekletildi. Daha sonra Rabbit ABC Staining System kullanıldı. Bunun için 1 saat blocking solüsyonda bekletildi ve yıkama yapmadan 1 gece primer antikorda (Rabbit active Caspase 3 antibody) nemli ortamda 4°C'de tutuldu. PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra biyotinli sekonder antikorda 30 dk, PBS ile yıkamadan sonra avidin ve biyotinli HRP içeren AB enzim solüsyonunda 30 dk, tekrar yıkamanın ardından peroksidaz substratta (substrat buffer + DAB kromojen + peroksidaz substrat içeren solüsyon)10 dk bekletildi ve distile su ile yıkandıktan sonra Mayer hematoxilen ile zemin boyası yapıldı ve çeşme suyuna alındı. Çeşme suyunda morartılan kesitler ultramount kapatıcı ile kapatıldı. Işık mikroskopunda değerlendirildi.

3.2.16. Hematoksilen – Eozin (Erich) Boyama

Parafini giderilmiş kesitler alkol serilerinden geçirilerek suya alındı. Bu amaçla kesitler 62°C etüvde 30 dk bekletilip 30 dk ksilolde tutulduktan sonra %96, %90, %80, %70 alkollerde 10 dk bekletildi ve distile suya alındı.

Hematoksilen solüsyonunda 3 dk boyandı. Çeşme suyunda çalkalandı. Boyanın fazlası asit alkolde (%80 alkol 1 ml HCL) çok çabuk differansiye edildi. Kesitler tekrar çeşme suyunda çalkalandı ve morarınca kadar suda bırakıldı (En az 15 dk). Kesitler kontrollü olarak 2 dk eozinde tutuldu. Distile sudan geçirildi. Hızlı bir şekilde, alkol serilerinden geçirilerek ksilole alındı ve entellan ile kapatılarak ışık mikroskopunda değerlendirildi.

3.3. İSTATİKSEL YÖNTEM

İstatistiksel analizler SPSS 17.0 paket istatistik programı ile yapıldı. Elde edilen veriler üzerinde çok yönlü istatistik değerlendirmeler yapılmıştır. Ölçüm değerleri homojen dağılım göstermediği için non-parametrik testlerle çalışıldı. Gruplar arası farkın anlamlılığını değerlendirmede Kruskal-Wallis Varyans analiz testi kullanıldı. Sürekli değişken değerlerden oluşan iki bağımsız grup arasında farklılığın olup olmadığı ise Mann-Whitney U Testi ile belirlendi. Anlamlılık sınırı $p<0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

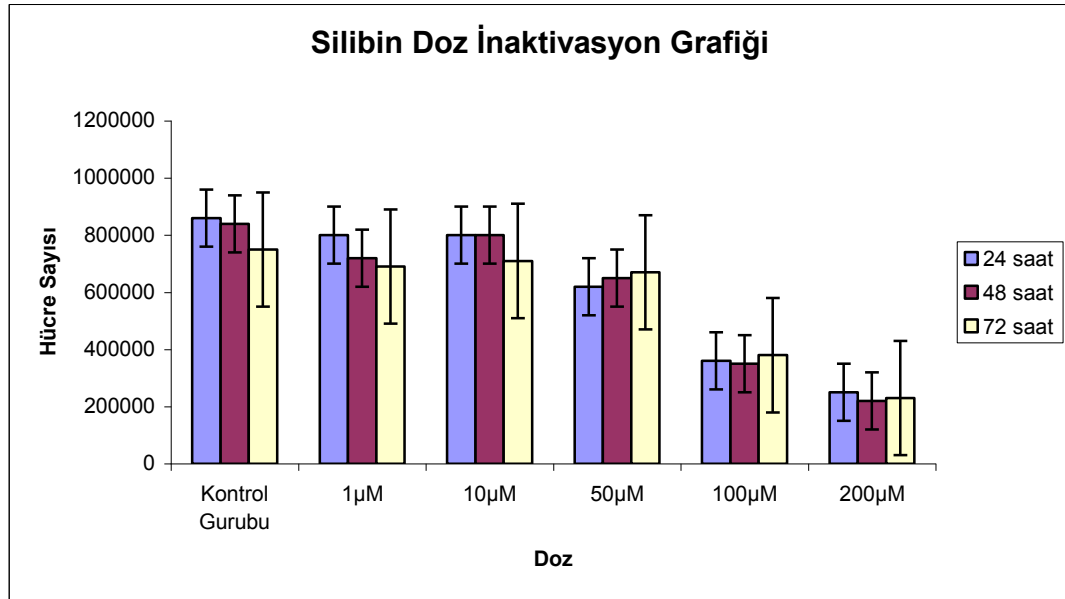
4.1. Doz Belirleme Deneyi Bulguları

Deneyde 6 kuyucuklu kültür pleytlerinin her kuyucuğuna %100 canlı 500.000 Hep3B hücresi 5 ml DMEM medyumunu içinde ekildi.

Devedikeni bitkisinin ekstraktı olan silibinin, 1; 10; 50; 100; 200 μ M konsantrasyonlarda olacak şekilde steril DMSO içerisinde hazırlanmış taze çözeltileri 100'er μ l'lık eşit hacimlerde hücrelere verildi. Ayrıca kontrol grubu için aynı konsantrasyonlarda (1; 10; 50; 100; 200 μ M) DMSO 100'er μ l'lık eşit hacimlerde hücrelere verildi.

24, 48 ve 72. (Grafik 1) saatlerin sonunda kuyucuklarda bulunan hücreler % 0,5 tripsin ile ayrı ayrı toplanıp santrifüj edildi. Süpernatant kısımları atıldıktan sonra 1 ml medyum ile süspansiyon haline getirilip sayma kamarasıyla (hemasitometri) sayıldı. Toplam hücre sayıları kaydedilerek silibin için ID50 (İnhibisyon dozu %50) dozu 100 μ M olarak saptandı.

Grafik 1: Silibin'in Doz inaktivasyon grafiği

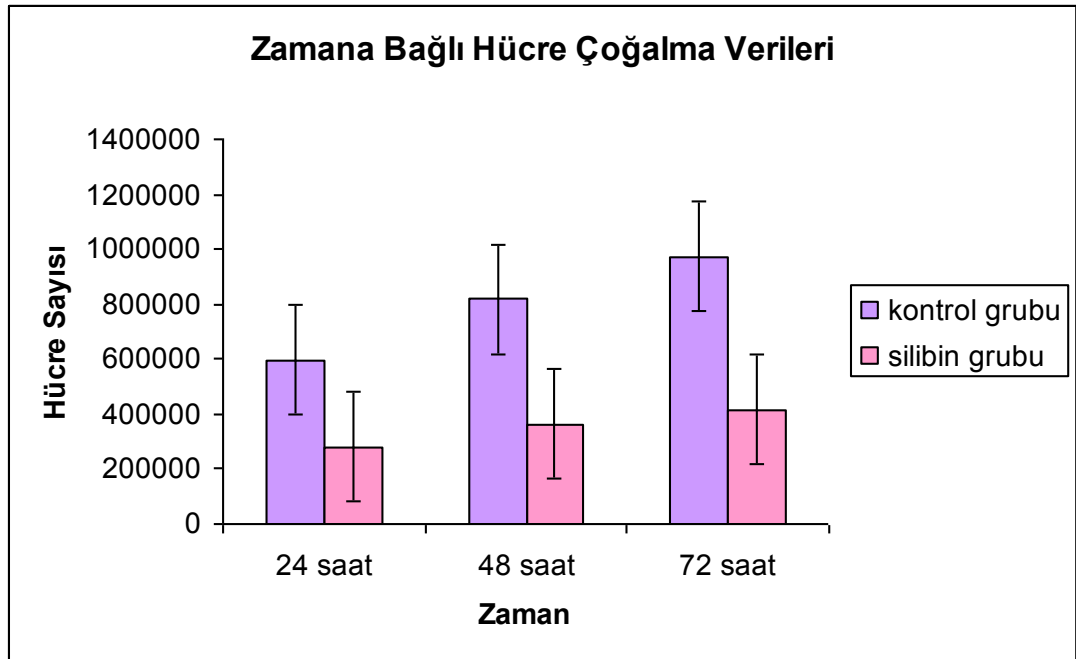


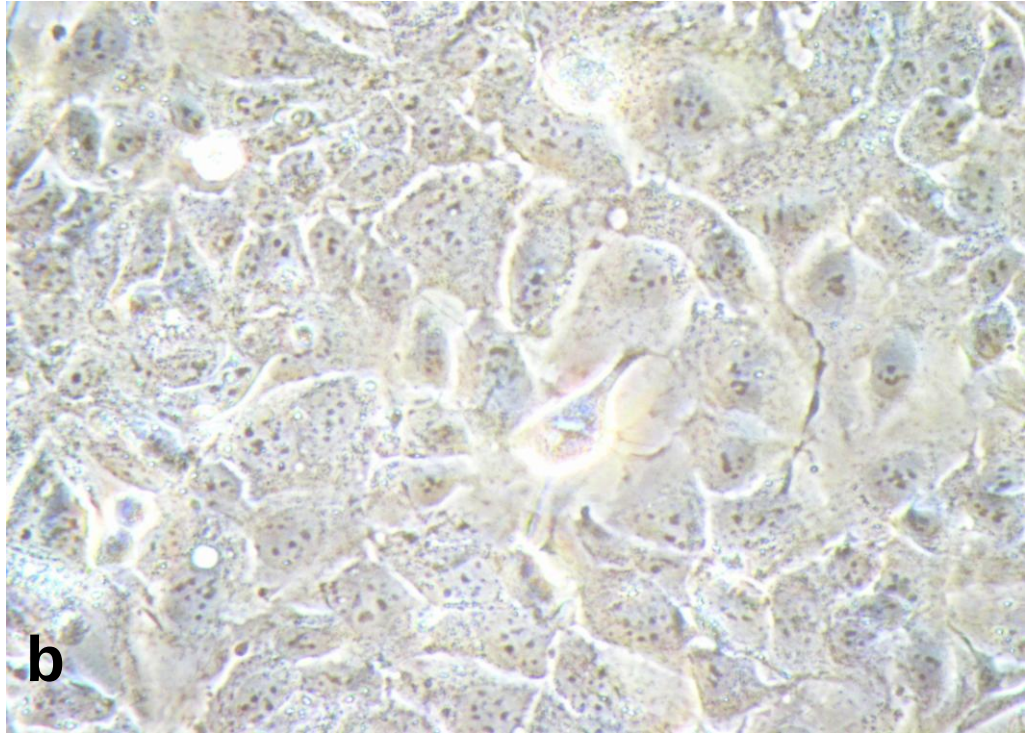
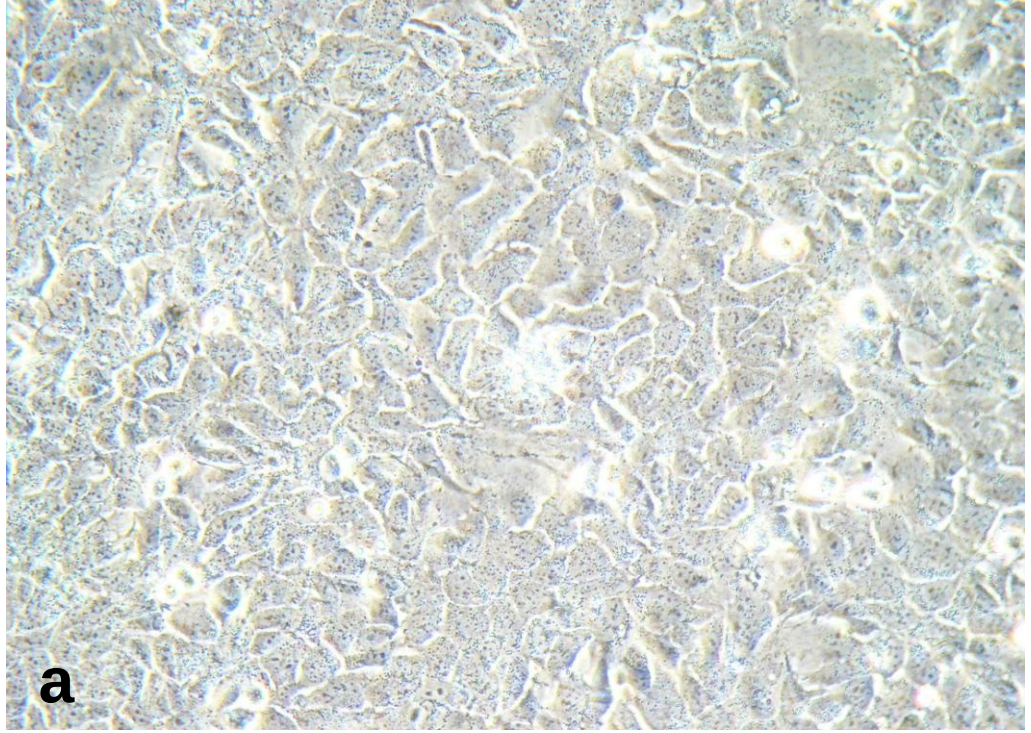
4.2. Hücre Proliferasyonunun Kinetik Deneylerinin Bulguları

Kontrol grubunda (Resim 1) 24, 48 ve 72. saatler arasındaki zaman dilimi boyunca hücre sayısında sağlıklı bir yükseliş gözlemlendi.

Silibum marianum bitkisinin ekstraktı olan silibin maddesinin doz belirleme deneyi sonuçlarından elde ettiğimiz %50 (ID50) inhibisyon dozu olan 100 μ M hücrelere verildiğinde 24, 48 ve 72. saatler sonunda hücre sayısında anlamlı bir azalma görüldü ($p < 0.05$) (Grafik 2).

Grafik 2: Zamana Bağlı Hücre Çoğalma Verileri





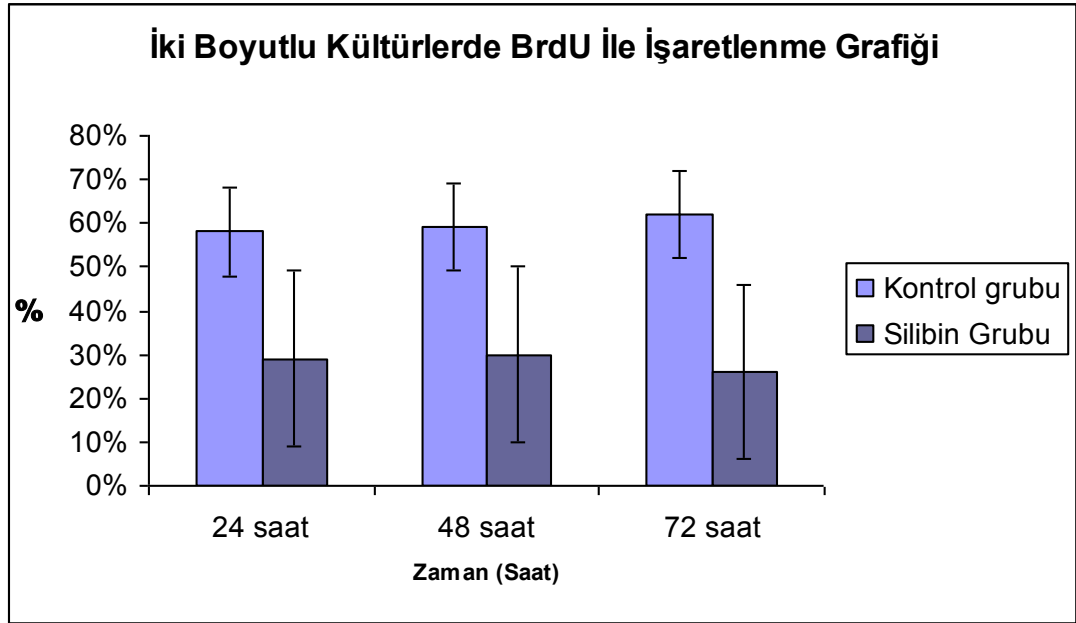
Resim 1: İki boyutlu Hep3B hepatosellüler karsinoma hücre kültürü. a:20X
b:40X

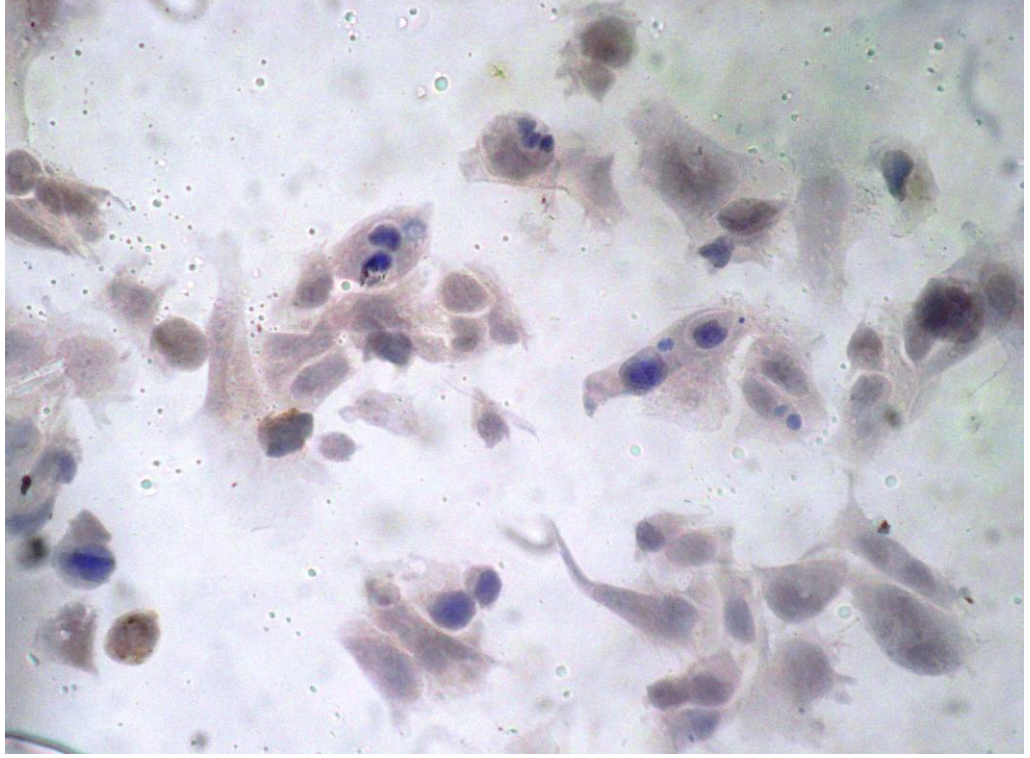
4.3. İki boyutlu Kùltùrlerde BrdU İşaretlenme Değerleri

24 kuyucuklu platelere ekimini (lammelli grup) yaptığımız iki boyutlu kùltürde kontrol grubu incelendiğinde tüm saatlerde (24, 48, 72 saat) çok sayıda sentez fazında hücre BrdU ile işaretlendi (Resim 2, 4, 6).

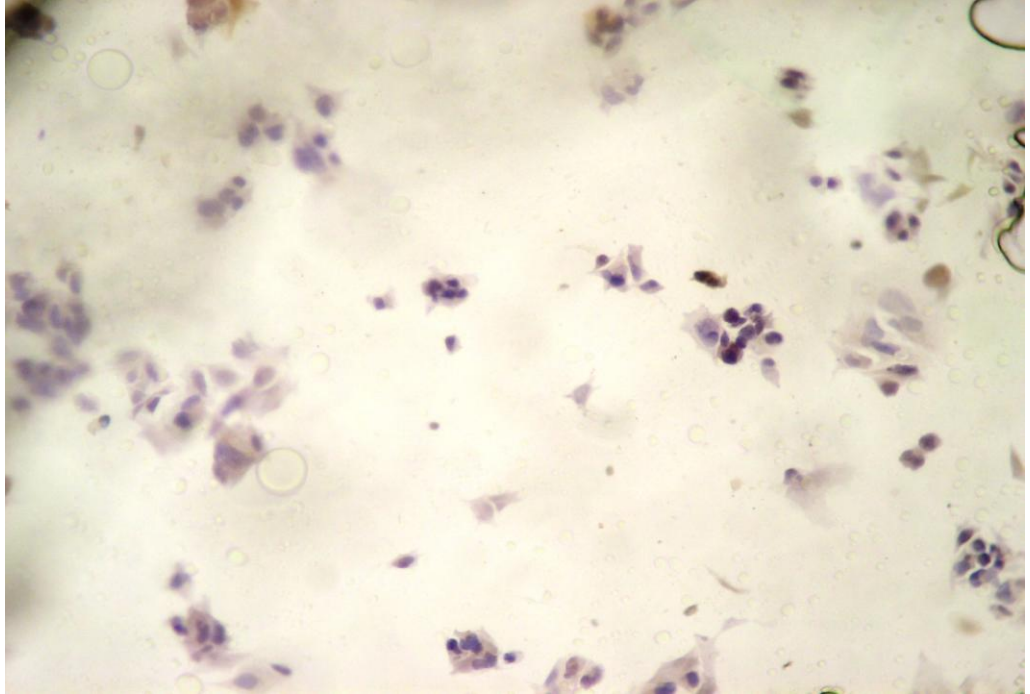
100 µM silibin uyguladığımız grupta ise kontrol grubuna kıyasla BrdU işaretleme indeksi tüm saatlerde anlamlı bir azalma göstermiştir ($p < 0.05$) (Grafik 3) (Resim 3, 5, 7).

Grafik 3: İki Boyutlu Kùltùrlerde BrdU İle İşaretlenme Grafiği

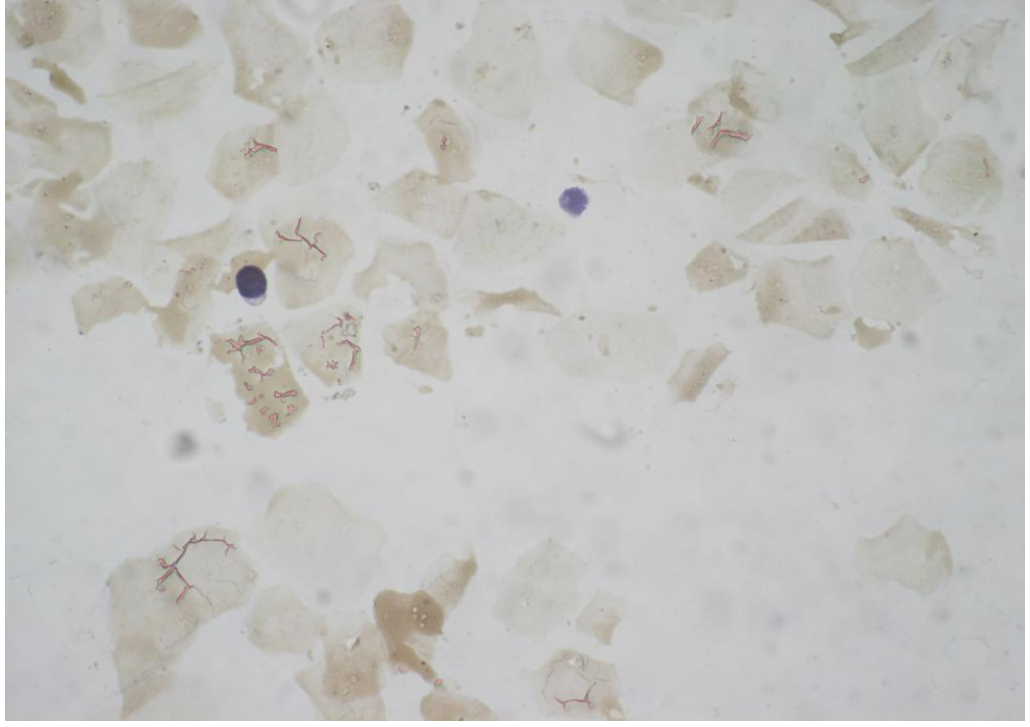




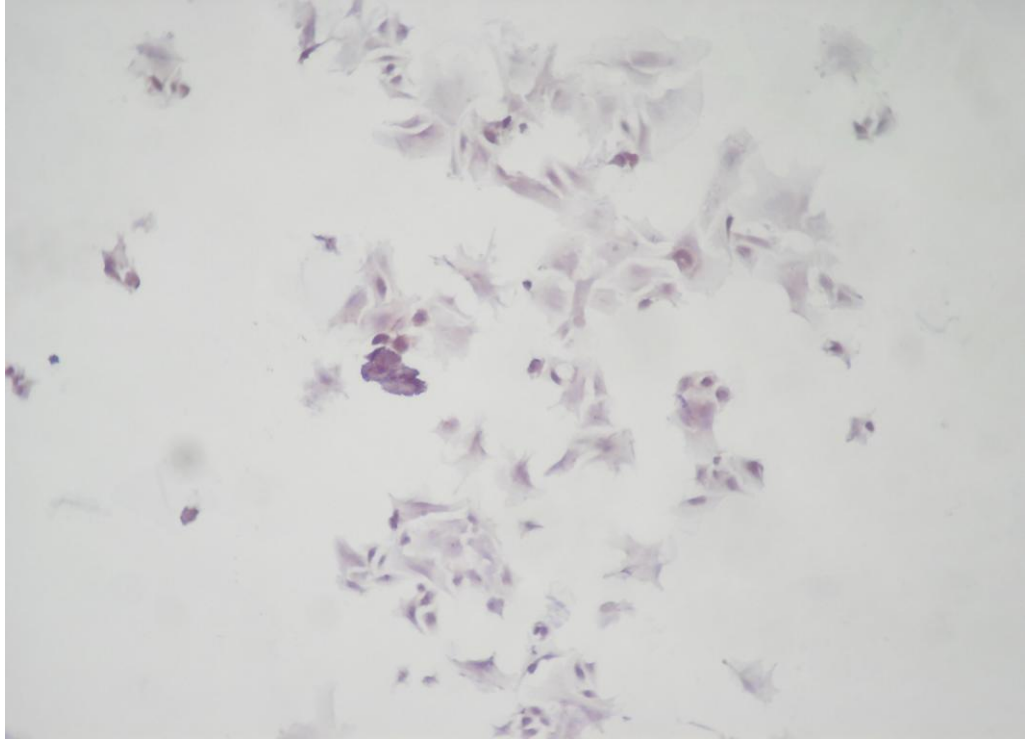
Resim 2: 24. saat Kontrol grubu; iki boyutlu kültürlerde 24. saatte çok sayıda Hep3B hepatosellüler karsinoma hücresi Brdu ile işaretlenmiş (kahverengi renkli) olarak gözlemlendi. (İşaretlenmeyen hücreler mavi-mor renkli) 40X.



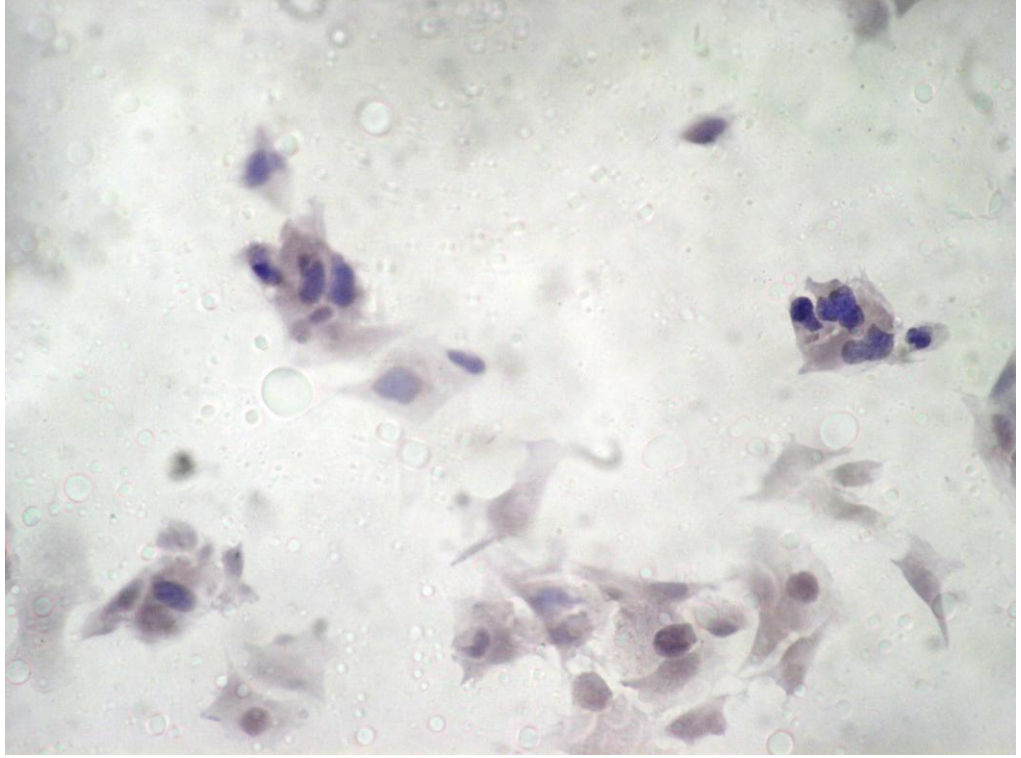
Resim 3: 24. saat Silibin grubu; kontrol grubuna göre daha az sayıda Brdu ile işaretlenmiş tümör hücresi. 20X.



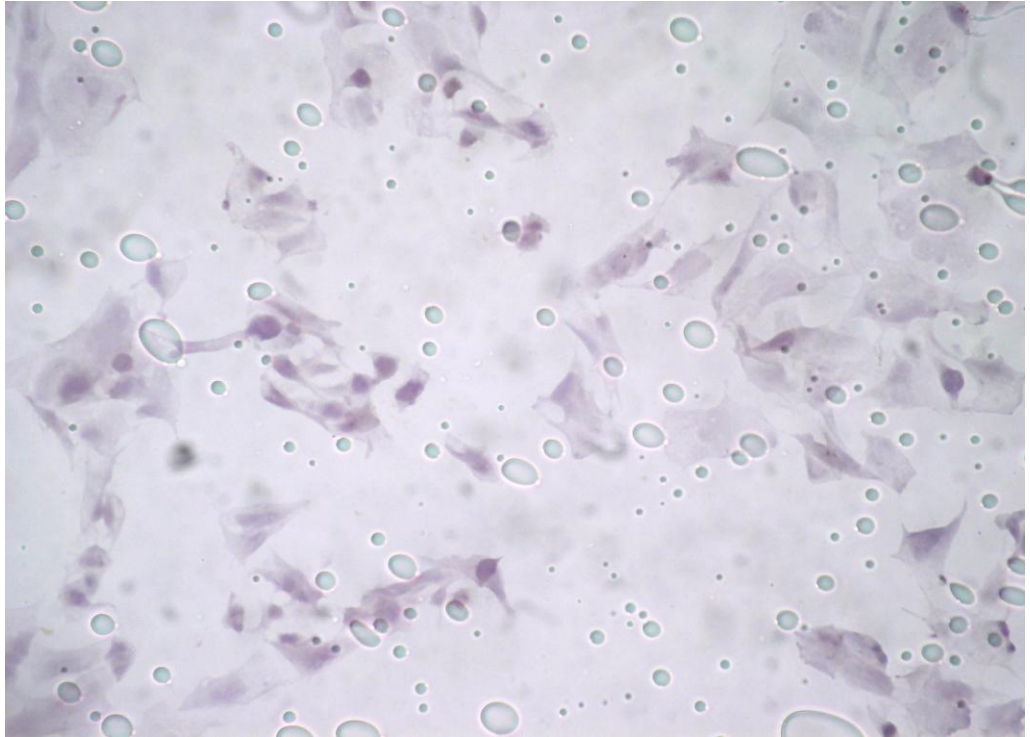
Resim 4: 48. saat Kontrol grubu; iki boyutlu kültürlerde 48. saatte çok sayıda Hep3B hepatosellüler karsinoma hücresi Brdu ile işaretlenmiş (kahverengi renkli) olarak görüldü. 40X.



Resim 5: 48. saat Silibin grubu; kontrol grubuna göre daha az sayıda Brdu ile işaretlenmiş tümör hücresi. 40X.



Resim 6: 72. saat Kontrol grubu; iki boyutlu kültürlerde 72. saatte çok sayıda Hep3B hepatosellüler karsinoma hücresi Brdu ile işaretlenmiş (kahverengi renkli) olarak gözlemlendi. 40X.



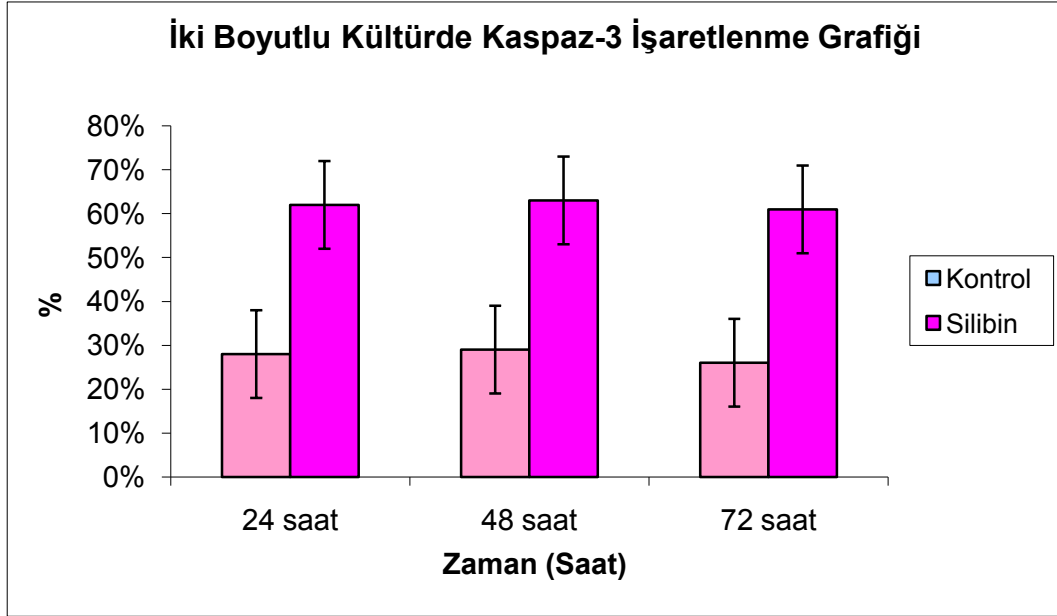
Resim 7: 72. saat Silibin grubu; kontrol grubuna göre daha az sayıda Brdu ile işaretlenmiş tümör hücresi. 40X.

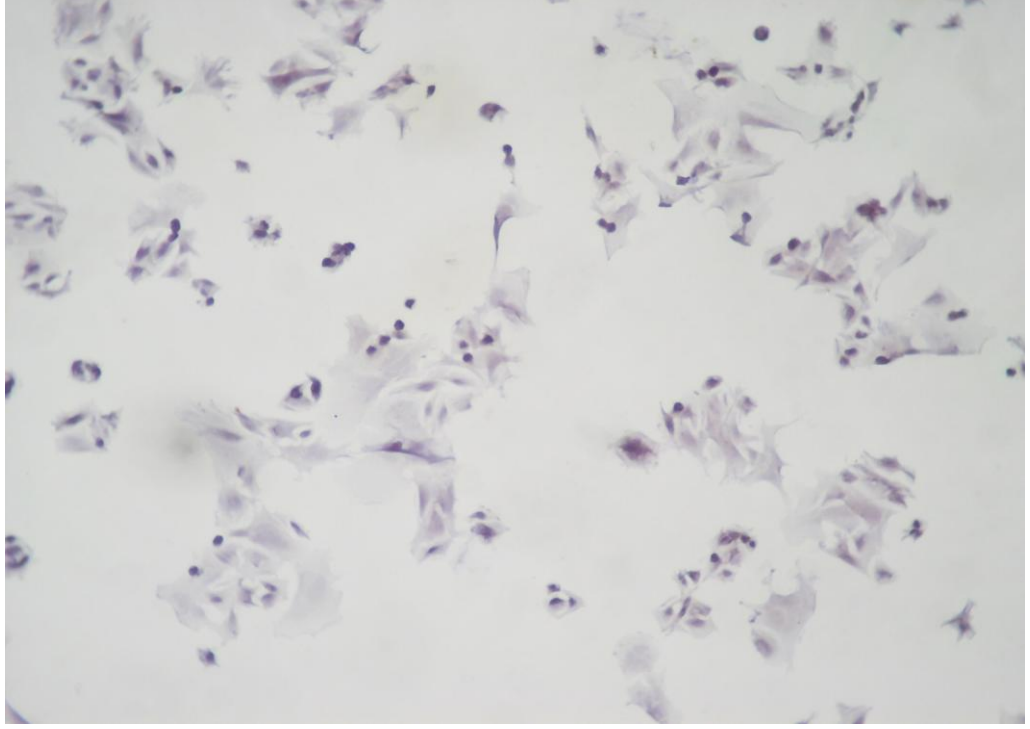
4.4. İki boyutlu Kùltùrlerde Kaspaz-3 İşaretlenme Değerleri

24 kuyucuklu platelere ekimini (lammelli grup) yaptığımız iki boyutlu kùltürde kontrol grubu incelendiğinde tüm saatlerde (24, 48, 72 saat) apoptotik hücreler çok az olduğu için kaspaz-3 ile çok az hücre işaretlendi (Resim 8,10,12).

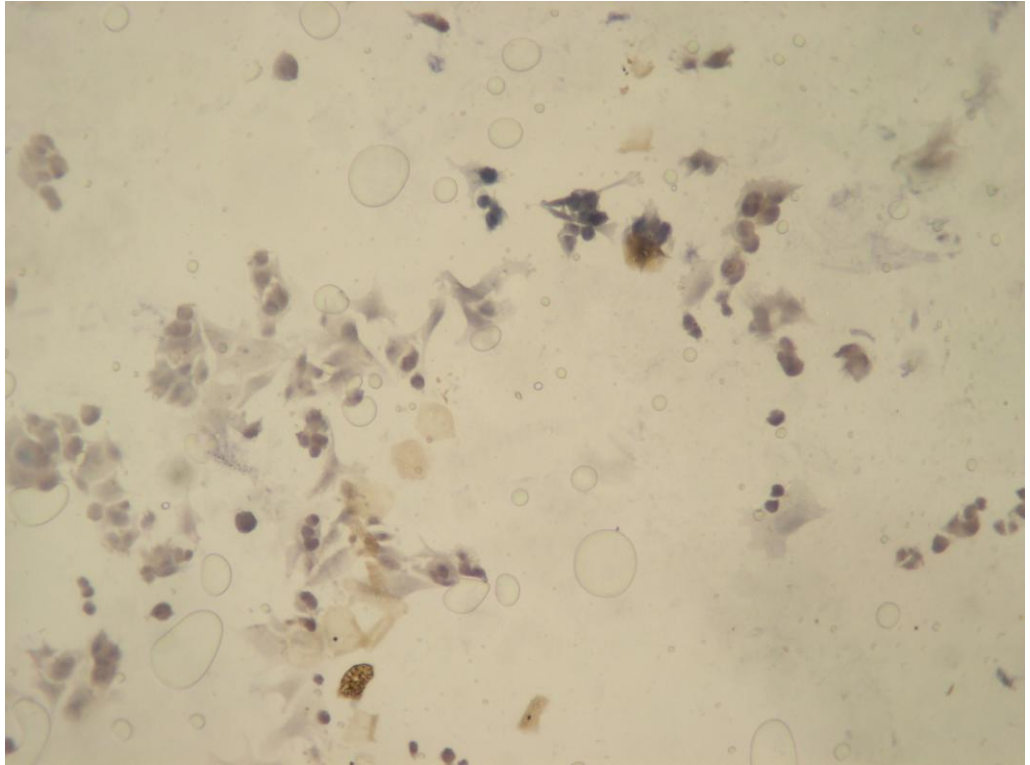
100 µM silibin uyguladığımız grupta ise tüm saatlerde kontrol grubuna kıyasla oldukça fazla miktarda ($p < 0.05$) kaspaz-3 ile işaretilenen hücre görüldü (Grafik 4) (Resim 9,11,13).

Grafik 4: İki Boyutlu Kùltürde Kaspaz-3 ile İşaretlenme Grafiği

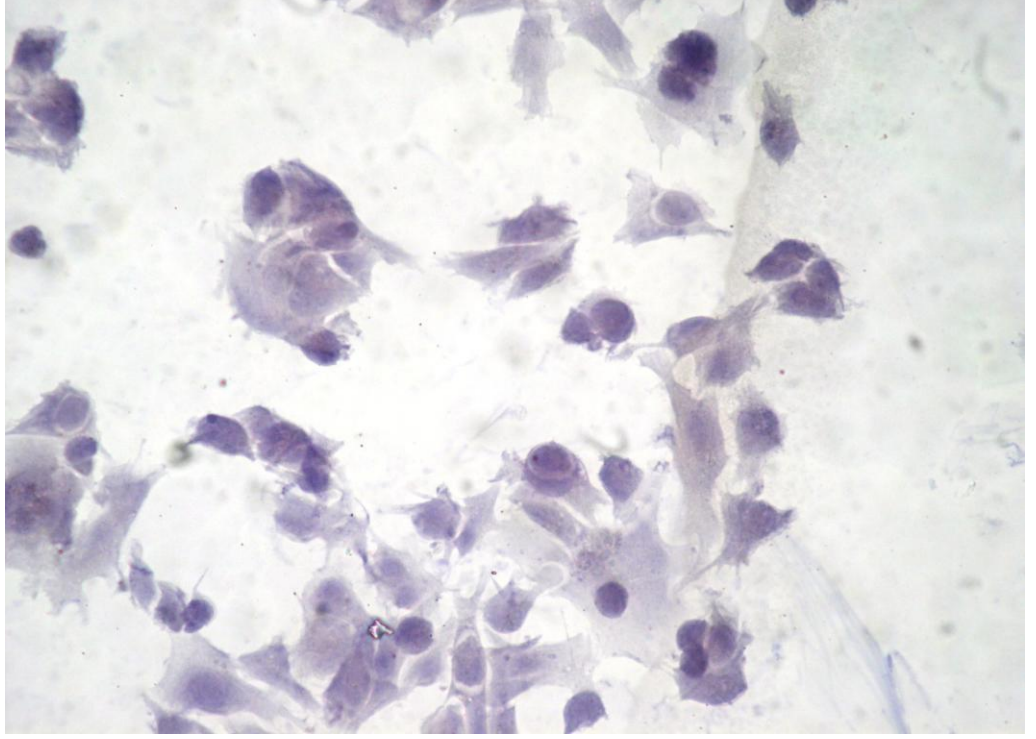




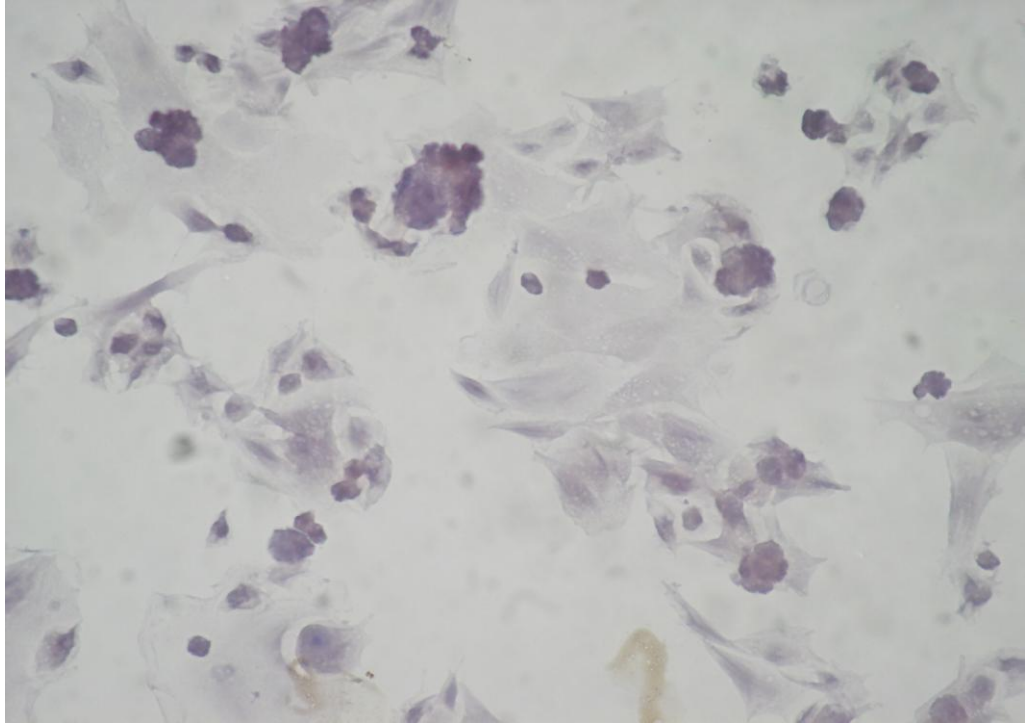
Resim 8: 24. saat Kontrol grubu; iki boyutlu kültürlerde 24. saatte çok az sayıda Hep3B hepatosellüler karsinoma hücresi Kaspaz-3 ile işaretlenmiş 40X



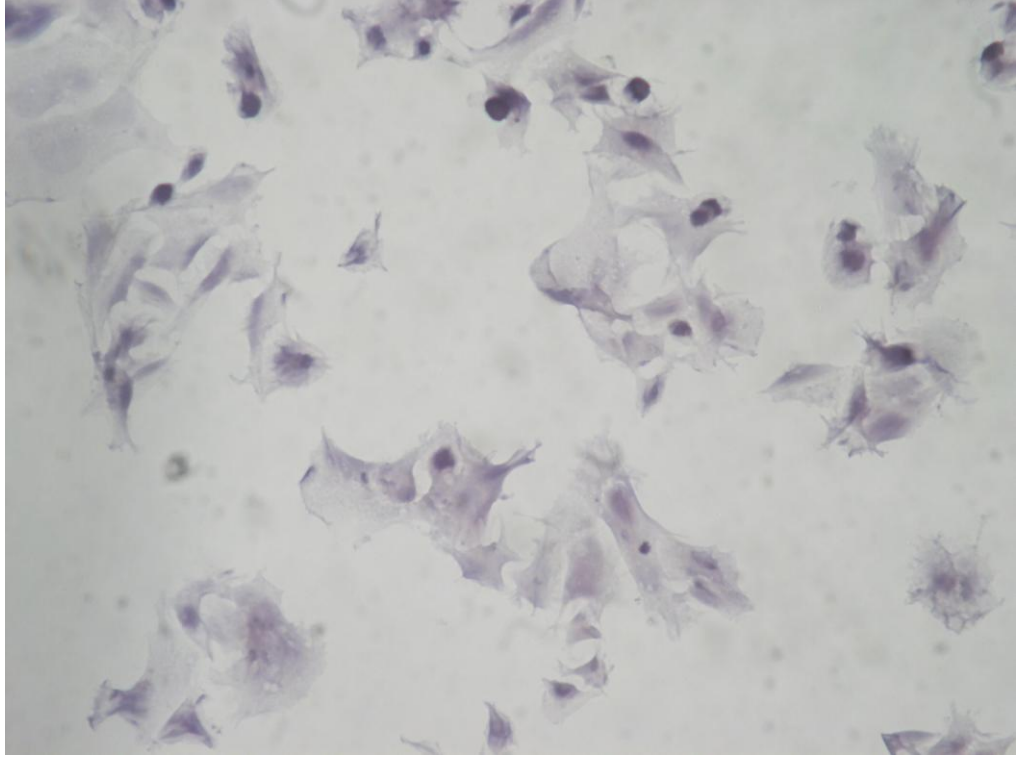
Resim 9: 24. saat Silibin grubu; kontrol grubuna göre daha fazla sayıda Kaspaz-3 ile işaretlenmiş tümör hücresi. 40X.



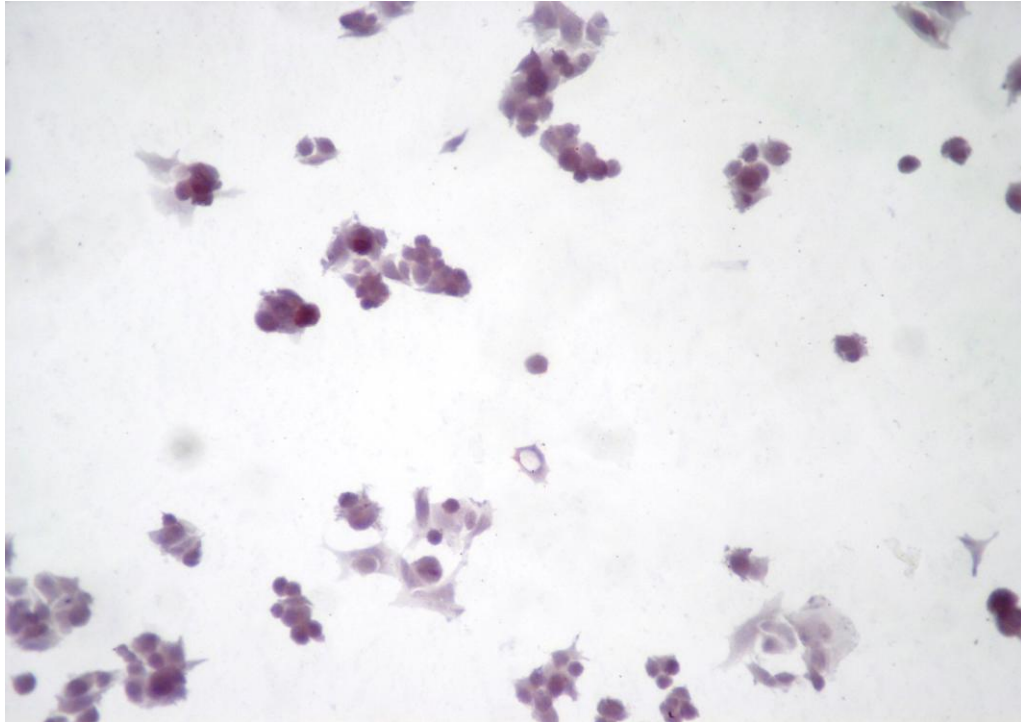
Resim 10: 48. saat Kontrol grubu; iki boyutlu kültürlerde 48. saatte az sayıda Hep3B hepatosellüler karsinoma hücresi Kaspaz-3 ile işaretlenmiş 40X.



Resim 11: 48. saat Silibin grubu; kontrol grubuna göre daha fazla sayıda Kaspaz-3 ile işaretlenmiş tümör hücresi. 40X.



Resim 12: 72. saat Kontrol grubu; iki boyutlu kültürlerde 72. saatte az sayıda Hep3B hepatosellüler karsinoma hücresi Kaspaz-3 ile işaretlenmiş 40X.

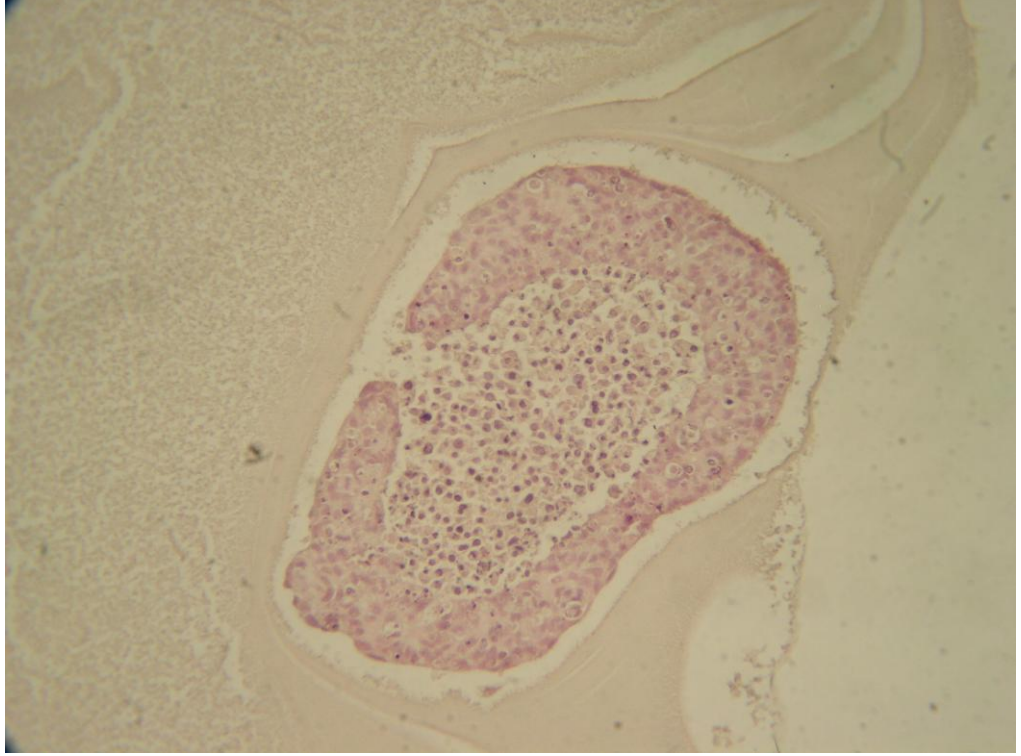


Resim 13: 72. saat Silibin grubu; kontrol grubuna göre daha fazla sayıda Kaspaz-3 ile işaretlenmiş tümör hücresi. 40X.

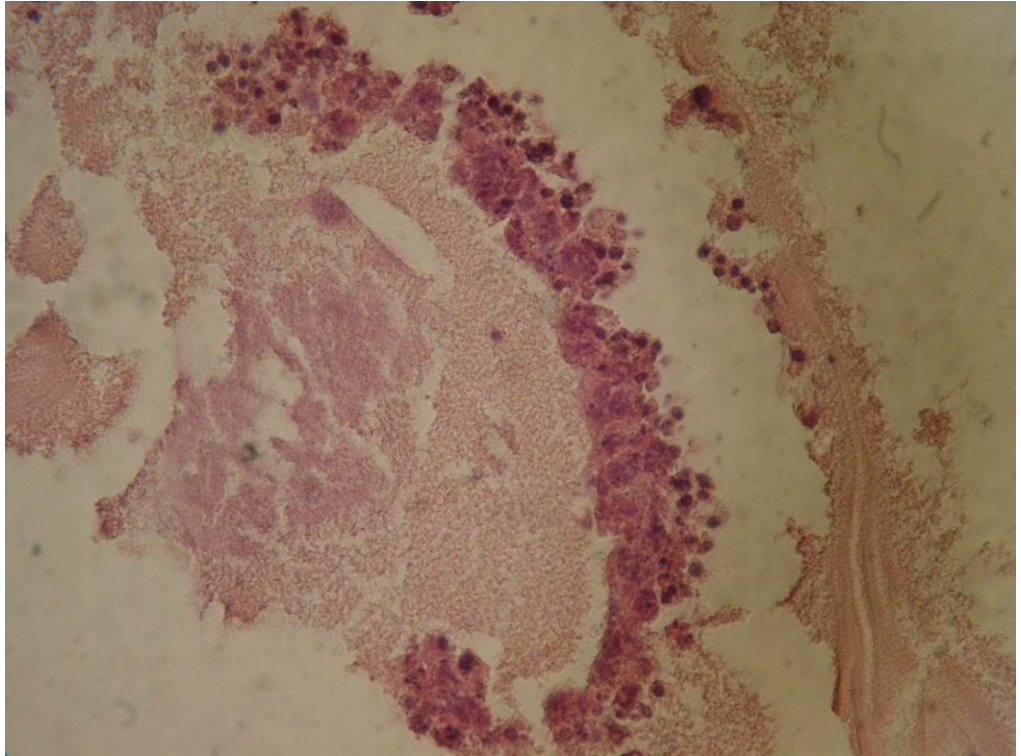
4.5. Üç Boyutlu Sferoid Kùltürlerde Hematoksilen Eozin Boyası ile Sferoid Morfolojisi Değerlendirmeleri

Kontrol grubu sferoidlerinin ışık mikroskopik incelemesinde tüm saatlerde (24,48,72. saat) sferoid yapıları oldukça düzgün görünümde izlendi (Resim 14, 16, 18).

Silinin verilen gruplarda ise düzgün görünümlü sferoidlerin yanında sınırları bozulmuş, dağınık sferoid yapılarına rastlandı. Ayrıca bazı sferoid yapılarında dejenerasyon görüldü (Resim 15, 17, 19)



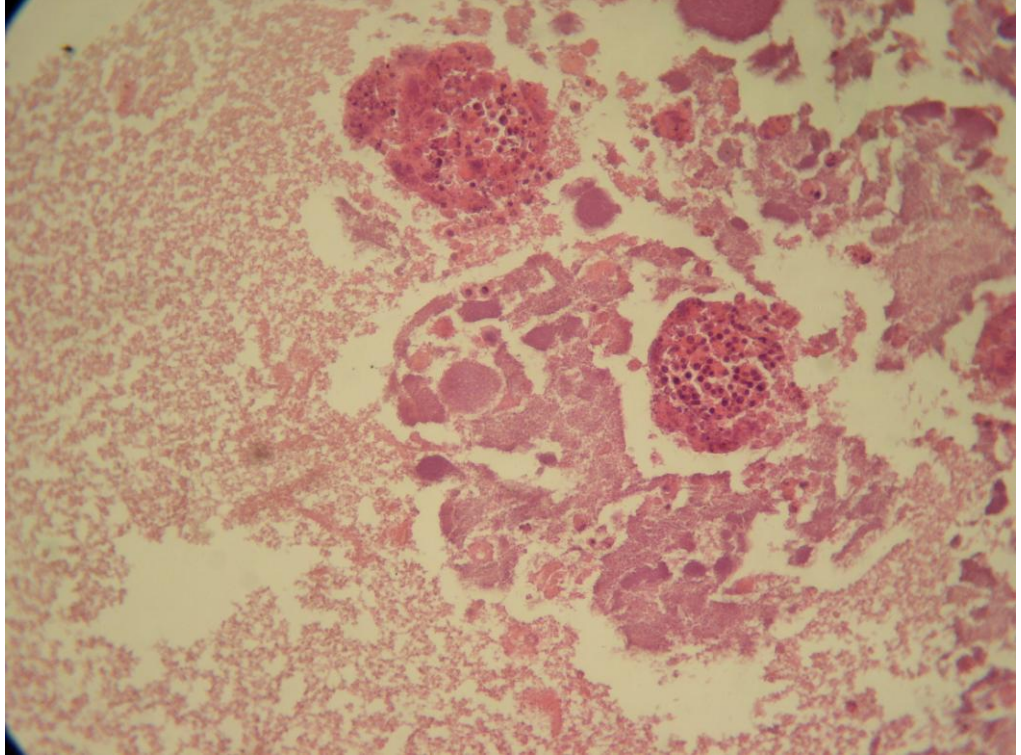
Resim 14: 24. saat Kontrol grubu sferoid model; düzgün sferoid yapısı (H-E) 40X.



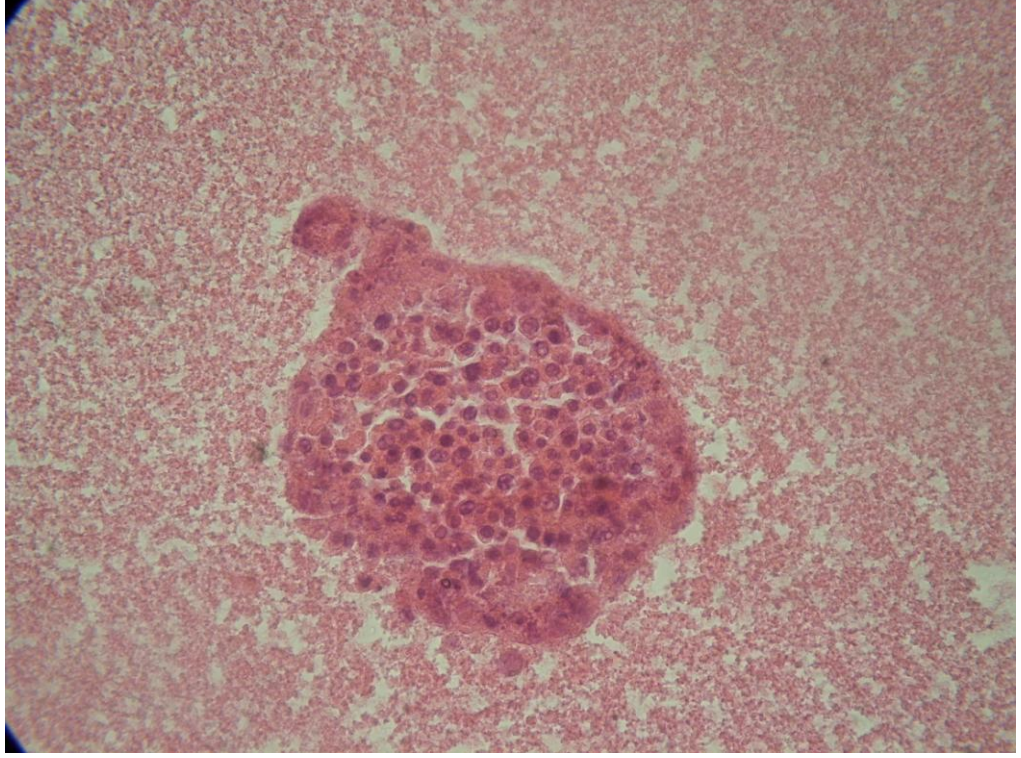
Resim 15: 24. saat Silibin grubu sferoid model; sferoid bütünlüğünün bozulduğu görülmekte (H-E) 40X.



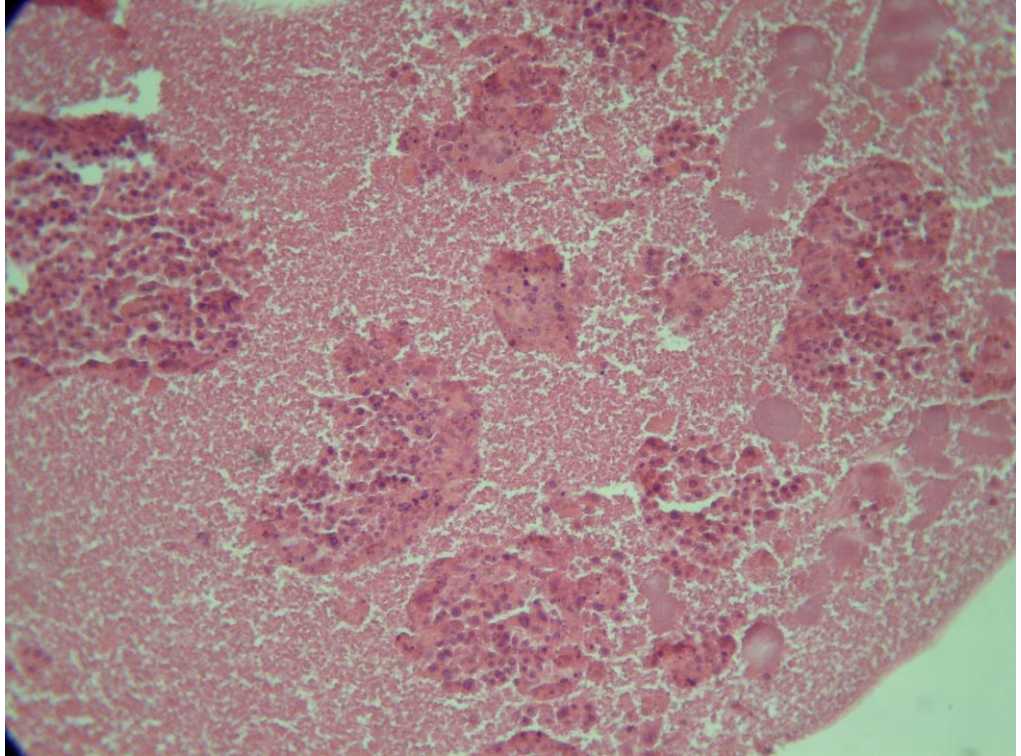
Resim 16: 48. saat Kontrol grubu sferoid model; düzgün sferoid yapısı (H-E) 40X.



Resim 17: 48. saat Silibin grubu sferoid model; sferoidlerde dejenerasyon ve dağılma gözlenmekte (H-E) 20X.



Resim 18: 72. saat Kontrol grubu sferoid model; düzgün sferoid yapısı (H-E) 20X.



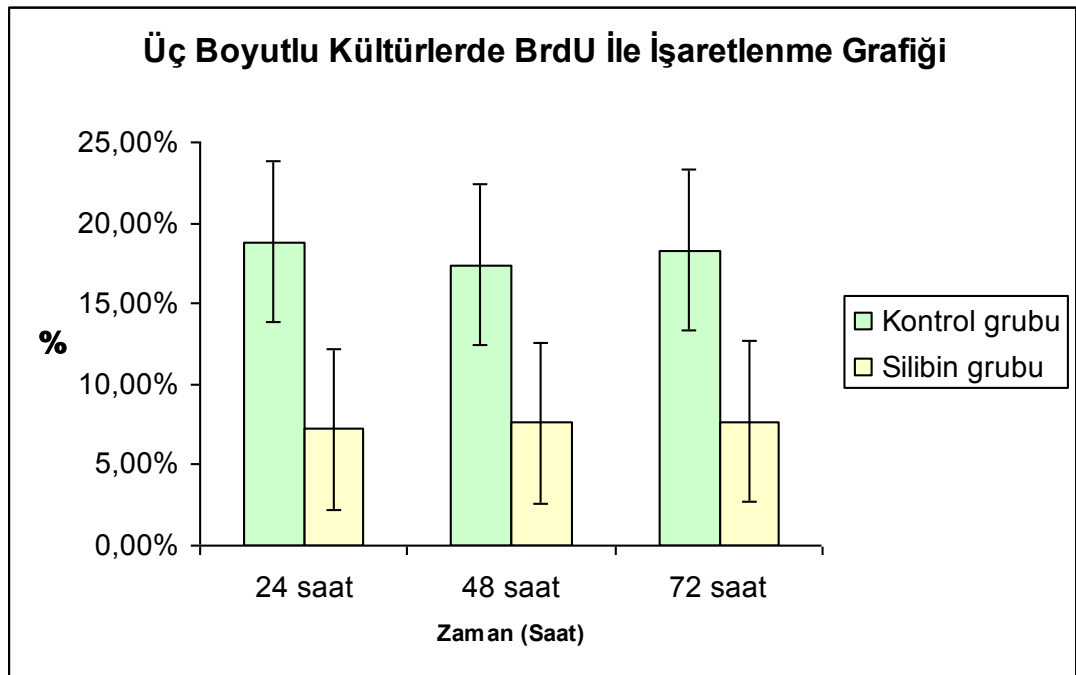
Resim 19: 72. saat Silibin grubu sferoid model; sferid bütünlüğünün bozulduğu ayrıca bazı sferoidlerde dejenerasyon olduğu görülmekte (H-E) 20X.

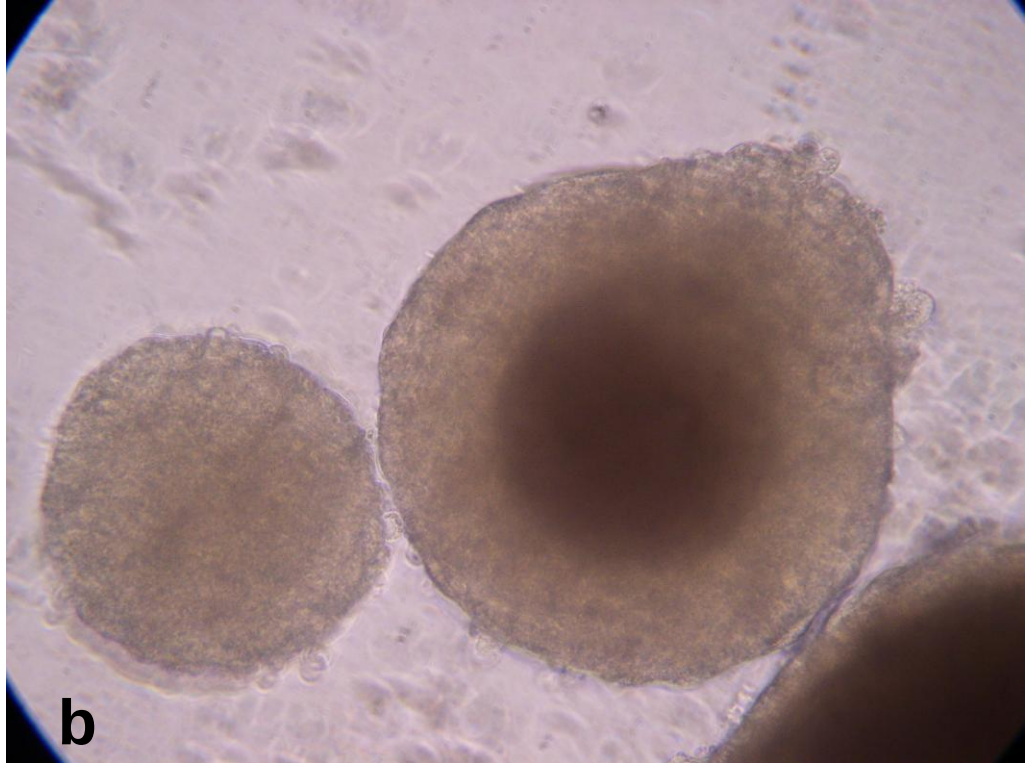
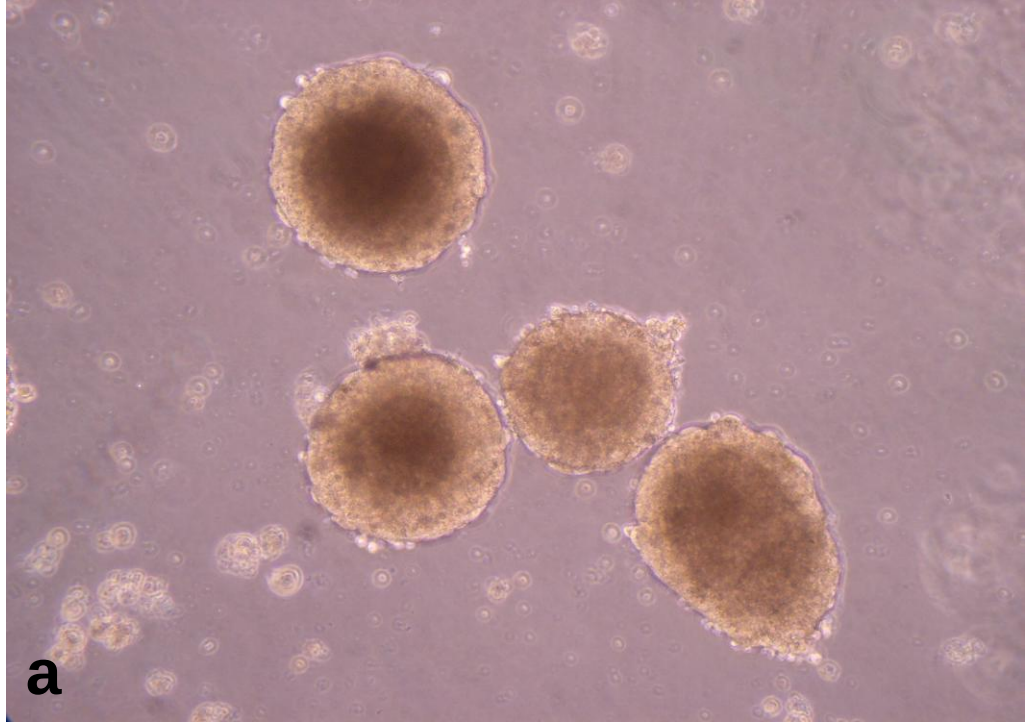
4.6. Üç Boyutlu Sferoid Kültürlerde BrdU İşaretlenme Değerleri

Üç boyutlu multisellüler sferoid model kültürde (Resim 20) yapılan BrdU işaretleme indeksi değerlendirmelerine göre kontrol grubunda sferoidlerin periferinde çok sayıda, sferoid merkezinde ise az sayıda işaretlenme gözlemlendi. İki boyutlu kültür sonuçlarımıza uyumlu olarak çok sayıda hücre BrdU ile işaretlendi (Resim 21, 23, 25). Kontrol grubunda işaretlenme değerleri 24 saat için %18,7, 48 saat için %18,9 ve 72 saat için %18,4 olarak belirlendi.

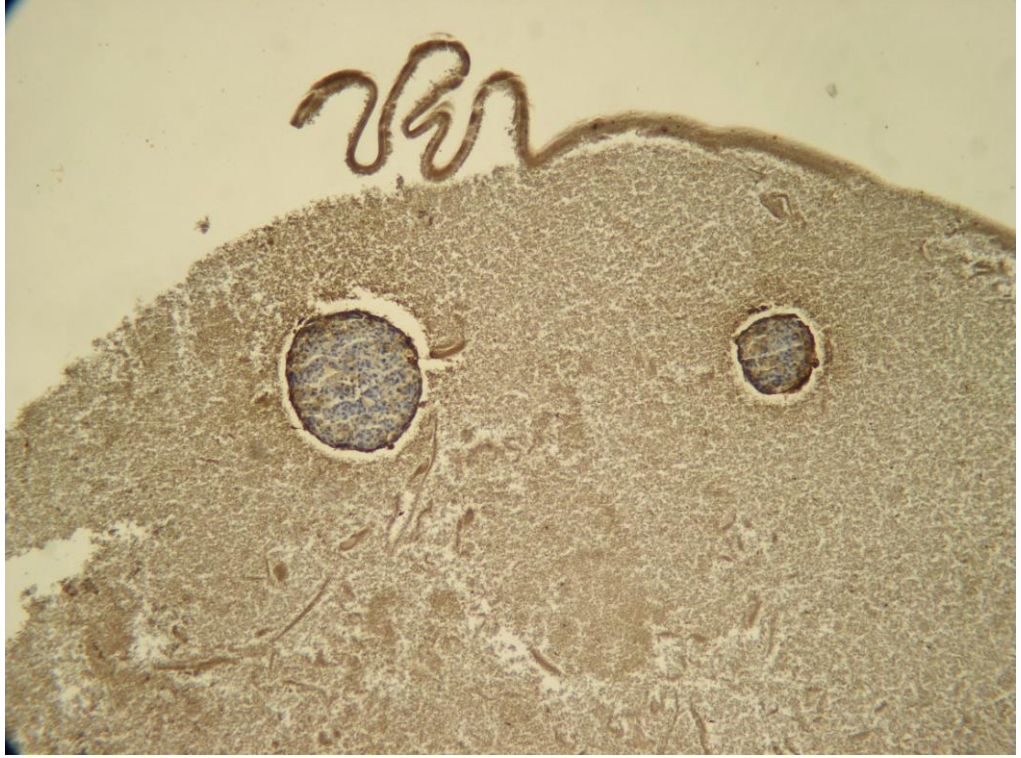
Silibin verilen sferoid modelde işaretlenme değerleri ise 24 saat için %7,6, 48 saat için %7,9 ve 72 saat için %8,1 olarak belirlendi. Dolayısıyla silibin grubunda yine lamelli gruplarda olduğu gibi BrdU işaretleme indeksinde tüm saatlerde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma görüldü ($p < 0.05$) (Grafik 5) (Resim 22, 24, 26).

Grafik 5: Üç Boyutlu Kültürlerde BrdU İle İşaretlenme Grafiği

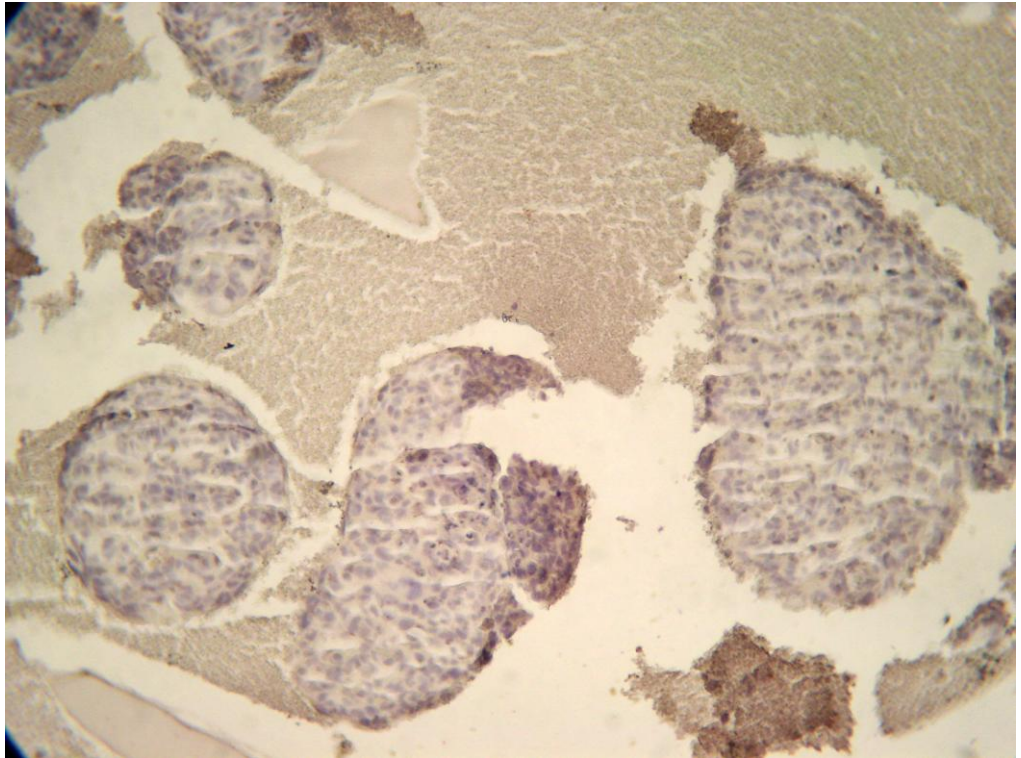




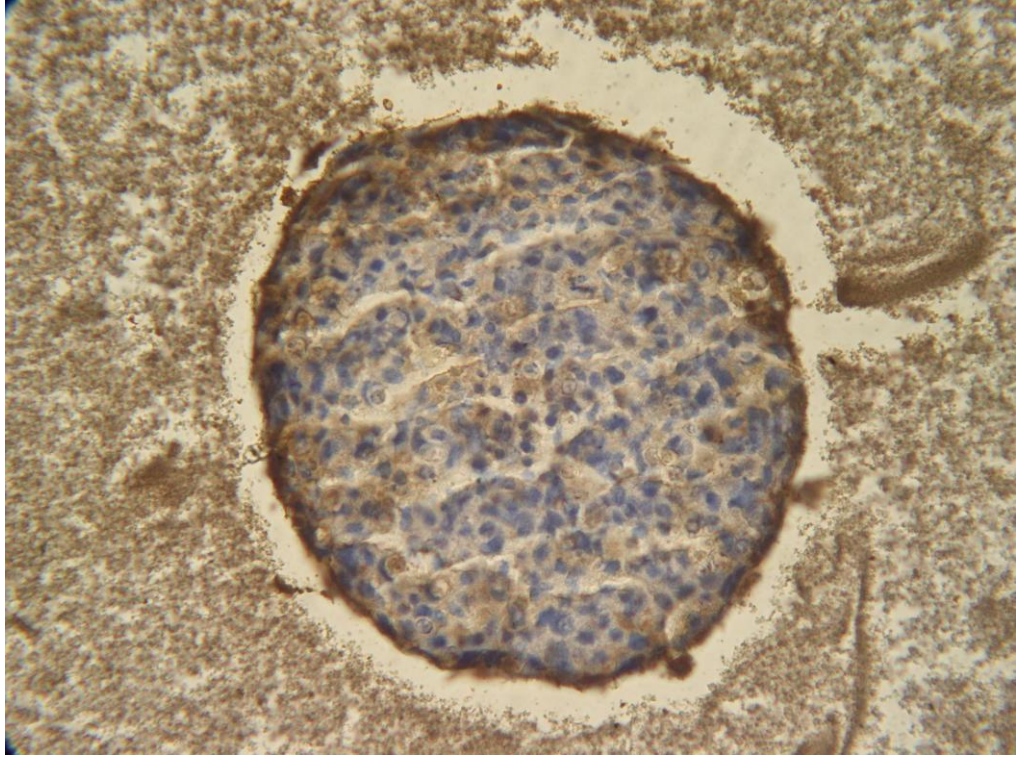
Resim 20: Üç boyutlu multisellüler sferoid model kültür. **a:**20X **b:**40X



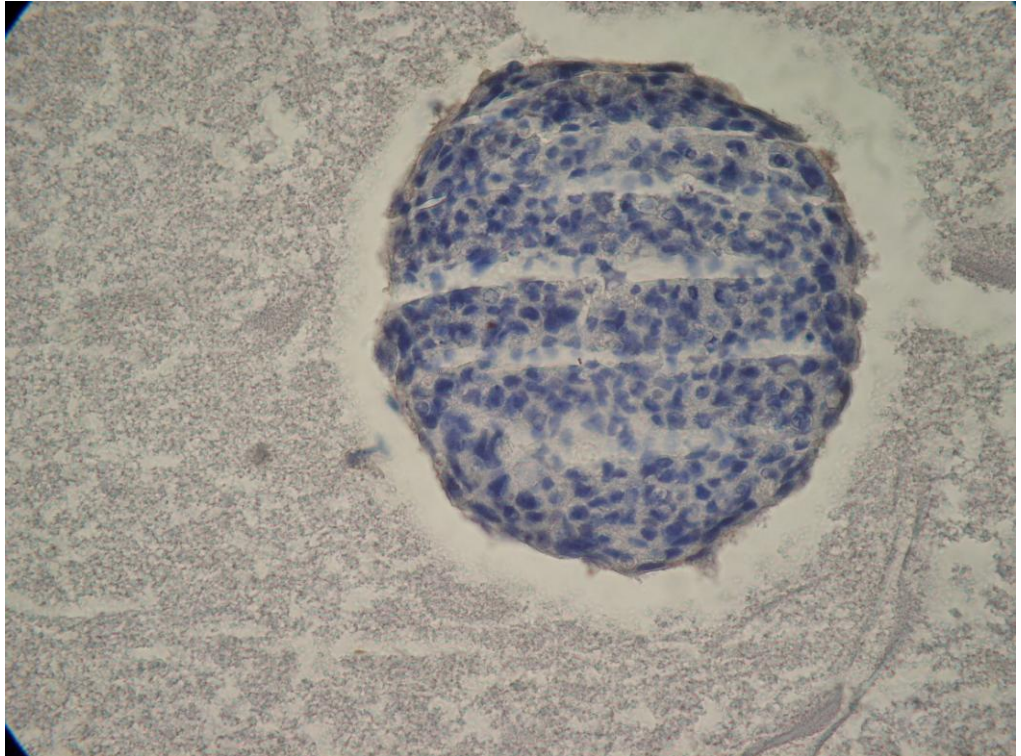
Resim 21: 24. saat Kontrol grubu sferoid model; çok sayıda işaretli hücreler 20X.



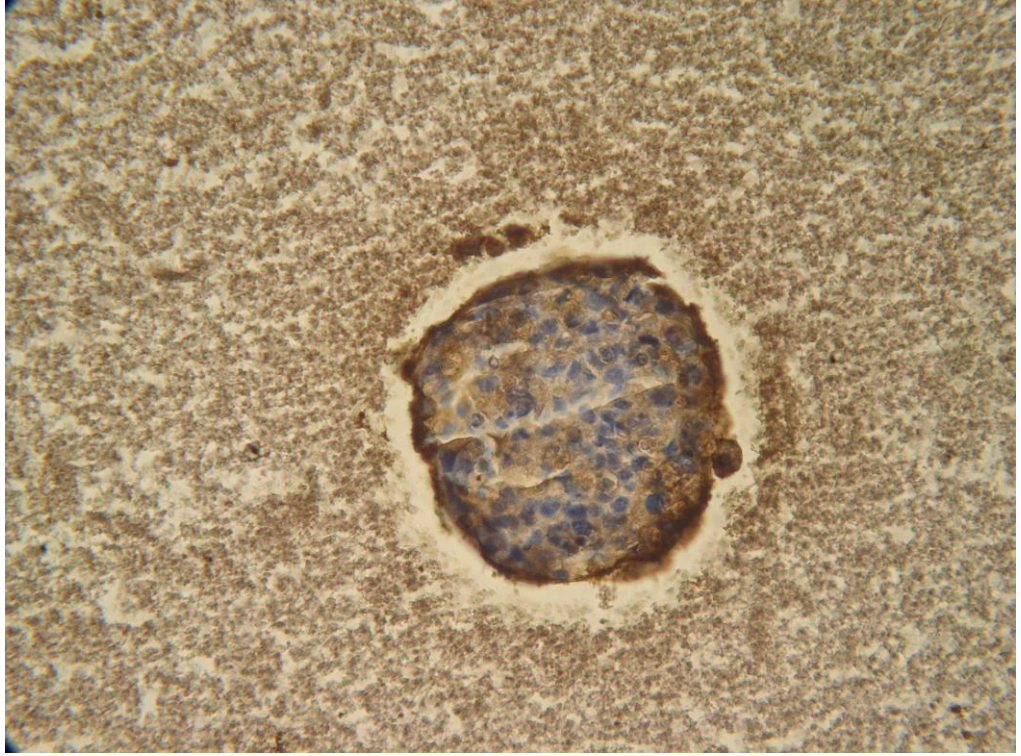
Resim 22: 24. saat Silibin grubu sferoid model; kontrole göre az sayıda işaretli hücre 40X.



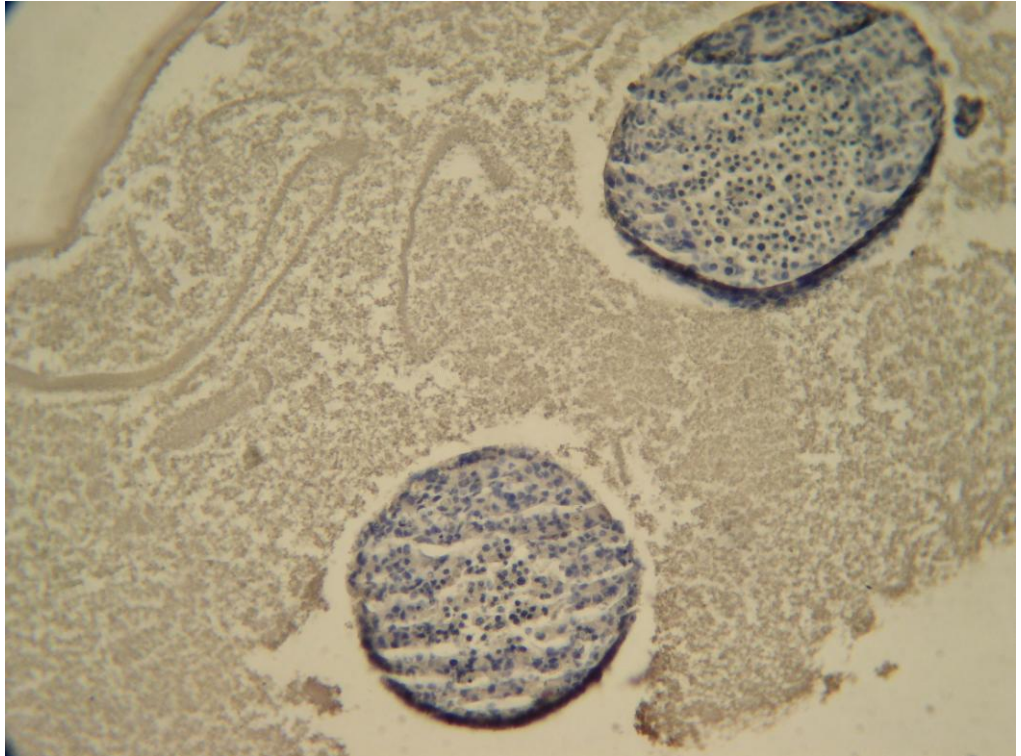
Resim 23: 48. saat Kontrol grubu sferoid model; çok sayıda işaretli hücreler 40X.



Resim 24: 48. saat Silibin grubu sferoid model; kontrole göre az sayıda işaretli hücre 40X.



Resim 25: 72. saat Kontrol grubu sferoid model; çok sayıda işaretli hücreler 40X.



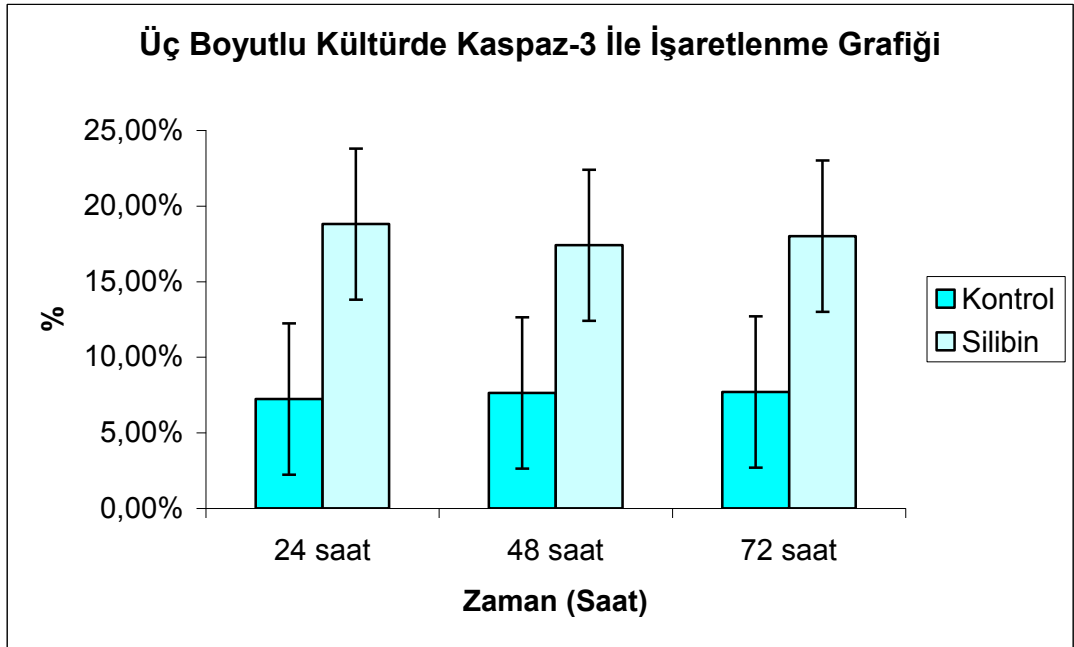
Resim 26: 72. saat Silibin grubu sferoid model; kontrole göre az sayıda işaretli hücre 40X.

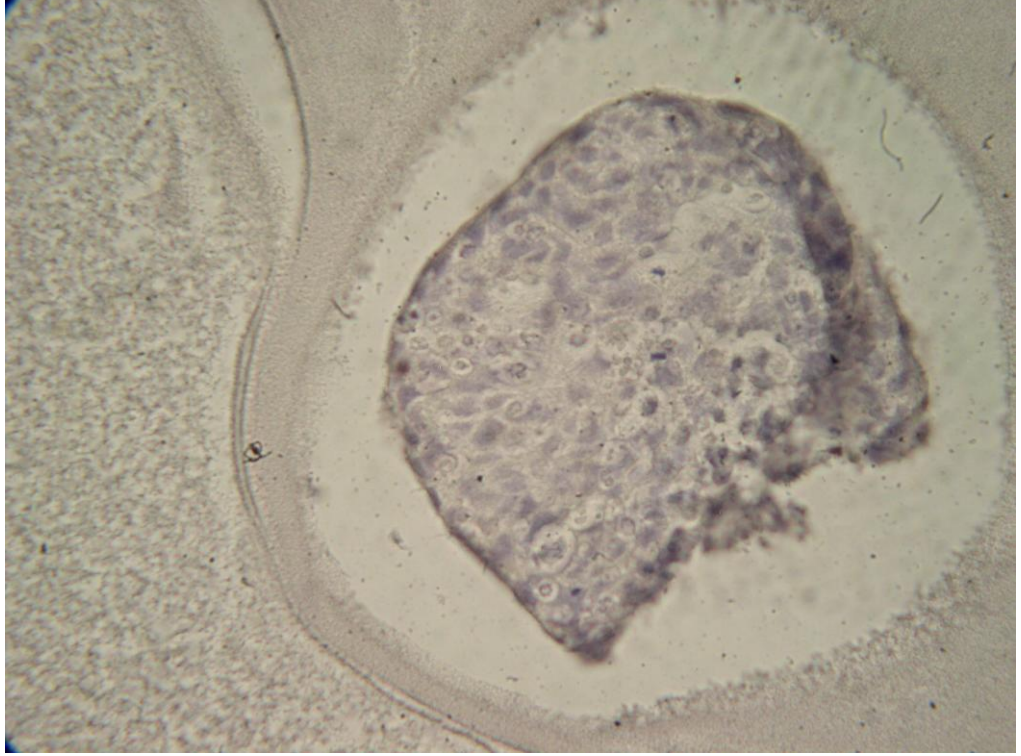
4.7. Üç Boyutlu Kültürlerde Kaspaz-3 İşaretlenme Değerleri

Üç boyutlu multisellüler sferoid model kültürde ise kontrol grubunda iki boyutlu kültür sonuçlarımıza uyumlu olarak az sayıda hücre Kaspaz-3 ile işaretlendi (Resim 27,29,31).

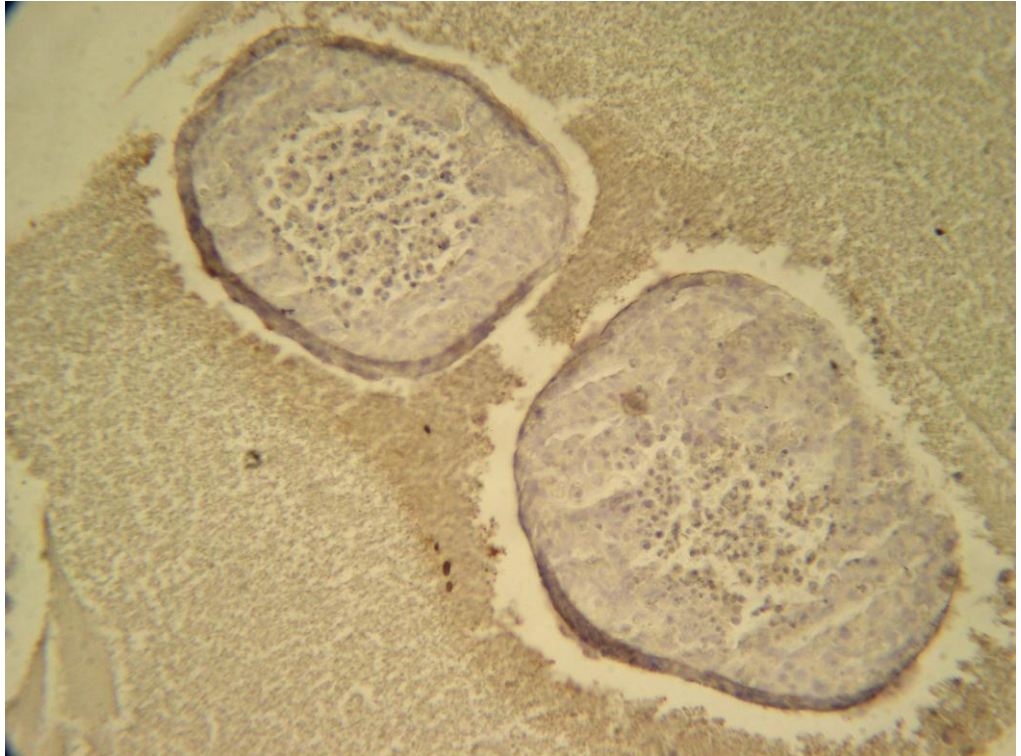
Silibin verilen sferoid modelde ise yine lamelli gruplarda olduğu gibi Kaspaz-3 ile işaretlenen hücreler tüm saatlerde kontrol grubuna göre anlamlı artış gösterdi ($p<0.05$) (Resim 28,30,32).

Grafik 6: Üç Boyutlu Kültürlerde BrdU İle İşaretlenme Grafiği

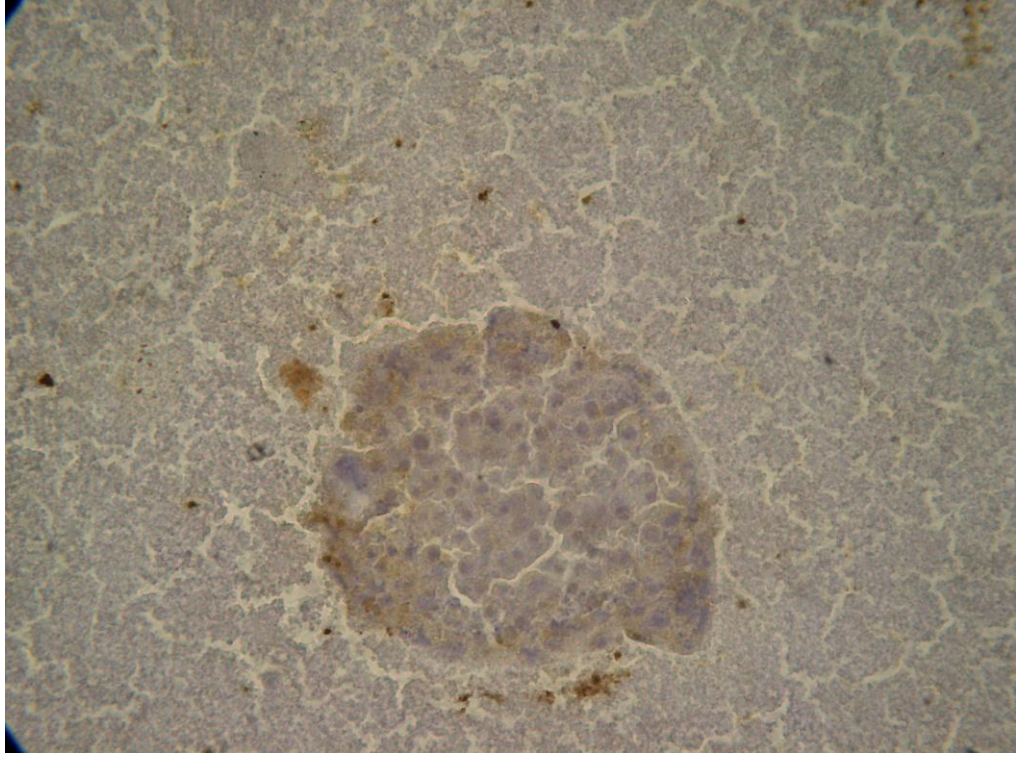




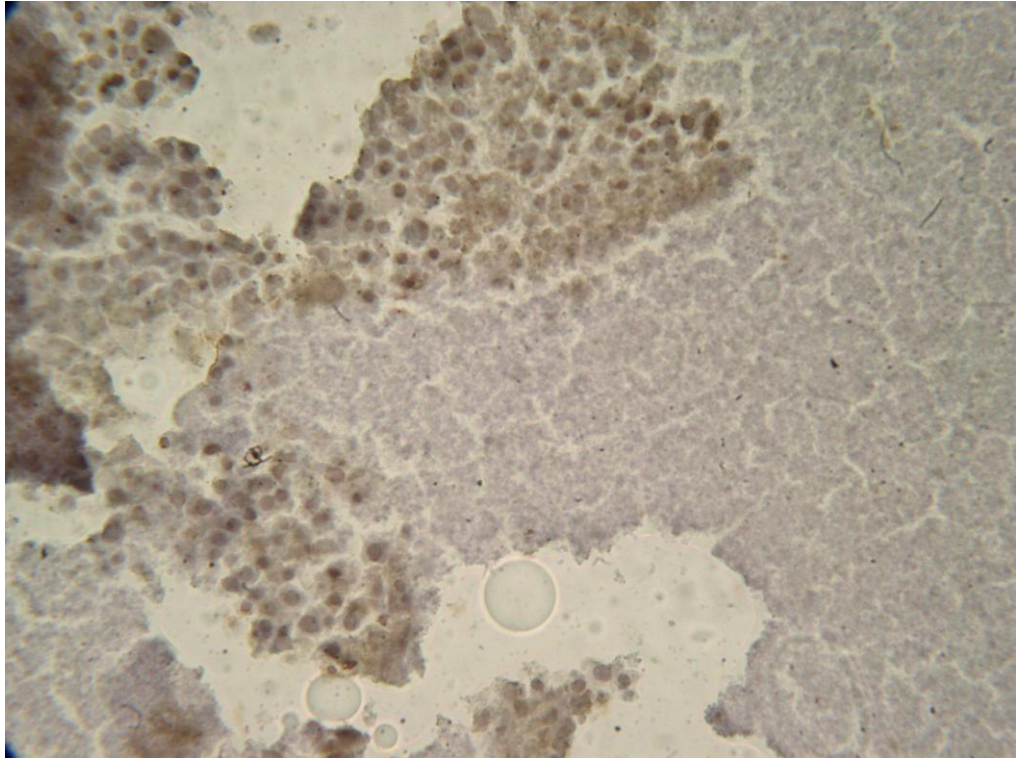
Resim 27: 24. saat Kontrol grubu sferoid model; az sayıda kaspaz-3 ile işaretli hücreler 40X.



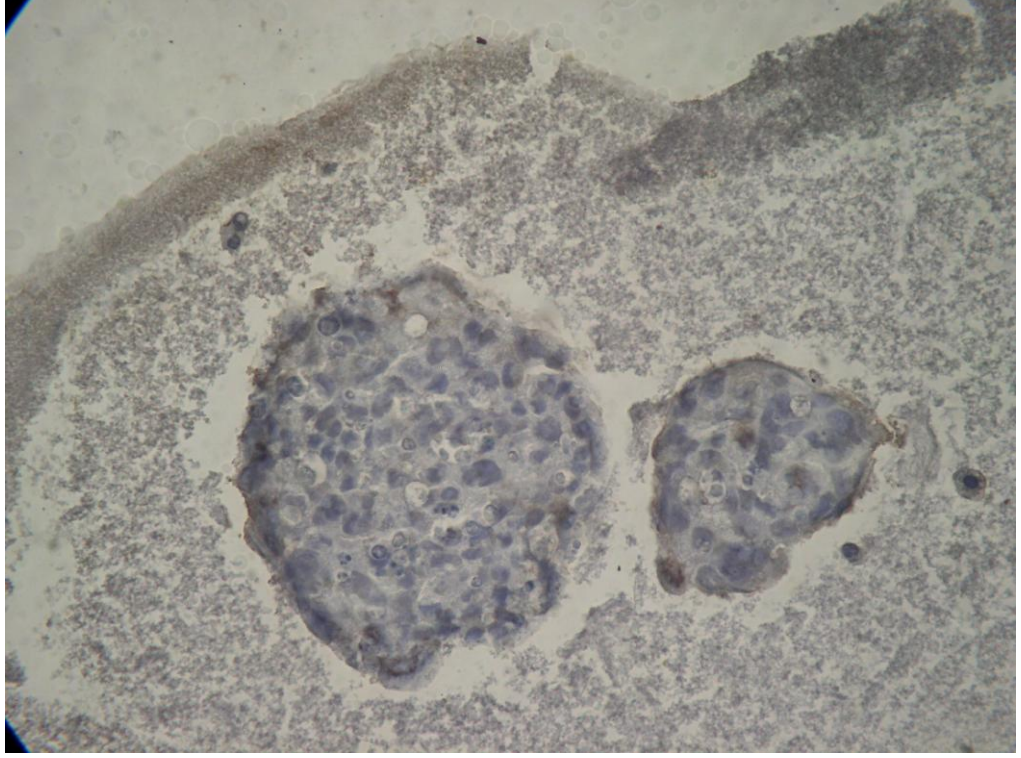
Resim 28: 24. saat Silibin grubu sferoid model; kontrole göre çok sayıda kaspaz-3 ile işaretli hücre 40 X.



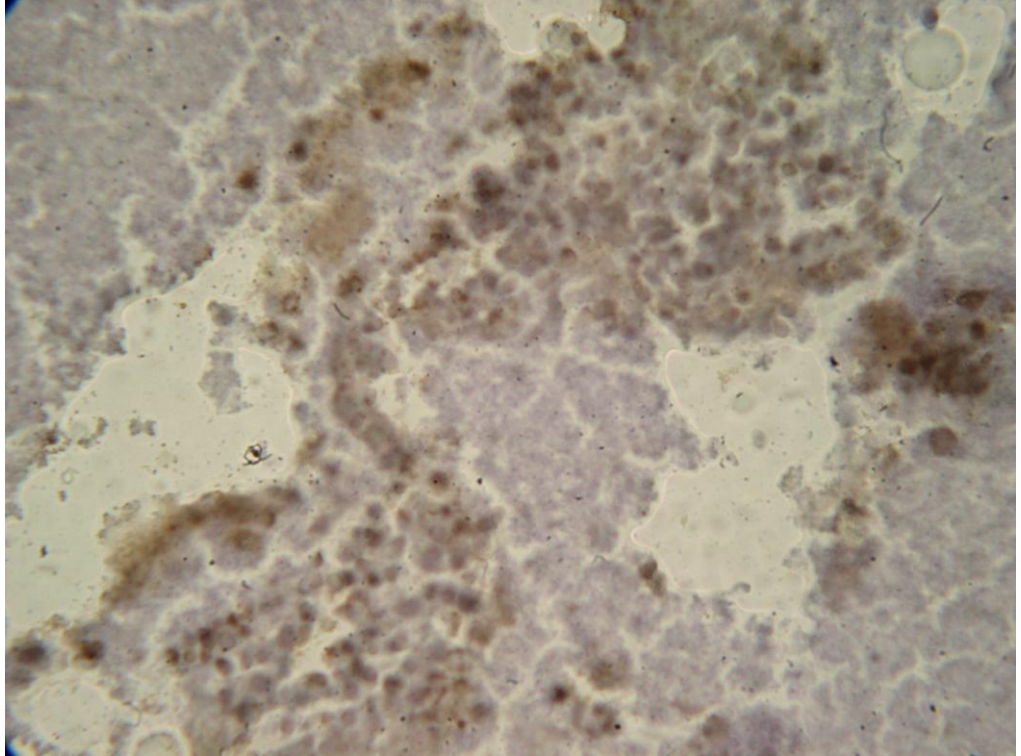
Resim 29: 48. saat Kontrol grubu sferoid model; az sayıda kaspaz-3 ile işaretli hücreler 40X.



Resim 30: 48. saat Silibin grubu sferoid model; kontrole göre çok sayıda kaspaz-3 ile işaretli hücre 40X.



Resim 31: 72. saat Kontrol grubu sferoid model; az sayıda kaspaz-3 ile işaretli hücreler 40X.

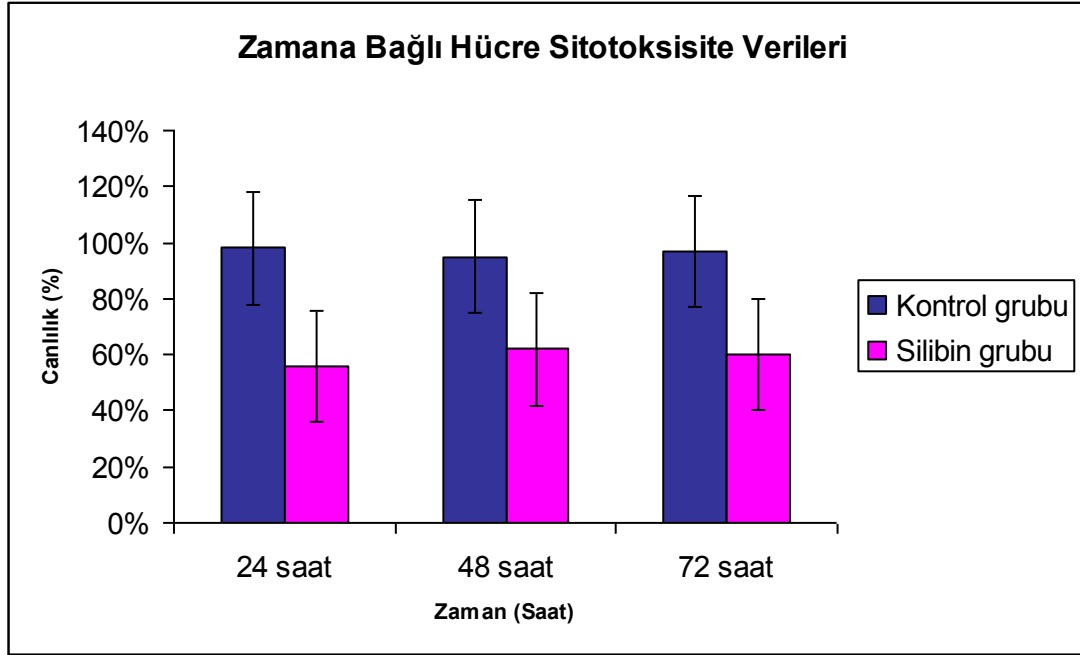


Resim 32: 72. saat Silibin grubu sferoid model; kontrole göre çok sayıda kaspaz-3 ile işaretli hücre 40X.

4.8. Sitotoksosite Verileri

24, 48 ve 72. saatlerde 100 μ M silibin verilen grupta kontrol grubuna kıyasla anlamlı hücre ölümleri gözlenmiştir ($p < 0.05$) (Grafik 7).

Grafik 7: Zamana Bağlı Hücre Sitotoksosite Verileri



5. TARTIŞMA

Kanser çok hızlı yayılım göstermesi özelliği nedeniyle tedavisi oldukça zor bir hastalıktır. Çok farklı tedavi stratejileri kullanılarak sorun çözülmeye çalışılmaktadır. Bu farklı tedavi stratejilerinin ortak amacı tümörün kontrol altına alınarak büyümesinin önlenmesi ya da tedavisinin sağlanarak yok edilmesidir. Ancak bu süreç o denli zordur ki, çok sayıda yan etkiyi de beraberinde getirerek metabolizmayı altüst eder. Bu amaçla dizayn edilen antikanser ajanlarının hücre düzeyinde etkilerinin çok iyi araştırılması ve tedavinin de son derece kontrollü şekilde sürdürülmesi gerekmektedir (Dhannikula and Panchagnula 1999).

Hepatosellüler karsinoma (HSK) hepatit virüslerine bağlı enflamasyon ve siroz zemininde ortaya çıkan, zamanla hipoksik strese bağlı anjiyogenik sürecin başladığı ve ileri evrelerinde iyi vaskülarize olmuş, farklılaşmasını yitirmiş invazif karakterdeki hücrelere sahip kötü prognozlu bir hastalıktır (Friedman 2000, Guo et al., 2006). Karaciğer dokusunda karsinoma gelişim sürecini anlamaya yönelik olarak yapılan çalışmalar, günümüzde sadece etyolojik faktörlerin genom üzerindeki etkilerini belirlemeyi amaçlamakla yetinmemektedir (Thorgeirsson 2006, Hsu 2007). Karsinogenez süreci içinde oluşan ve sürekli değişmekte olan hepatik mikroçevrenin, karaciğer dokusu içindeki tüm hücre gruplarında nasıl etkiler oluşturduğunu, hücreler arasında ne gibi karşılıklı etkileşimlere neden olduğunu ve bu olayların karaciğer fonksiyonlarının idamesi ile bağlantılı olarak hastalardaki sağ kalım beklentisini ne derecede değiştirdiğini belirlemeyi de amaçlamaktadır (Von Marschall et al., 2001, Wada et al., 2006).

HSK dokularında yeterli damarlanmanın var olması maligniteyi arttıran faktörlerden biri olarak değerlendirilmektedir (Wada et al., 2006). Hastalık prognozunun ve tedavi sonrası tekrarlama riskinin belirlenmesi amacıyla VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor) değerleri yanında anjiyopoietin gibi diğer anjiyogenezle ilişkili proteinlerin de ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmaktadır (Poon et al., 2007, Kuboki et al., 2008). Dolayısıyla HSK hastalarında seyir ve hastalığın tekrarlama riski büyük oranda mikroçevre tarafından, başta hipoksi olmak üzere, miktarları ve etkileri düzenlenen VEGF, HGF (Hepatosit Büyüme Faktörü) gibi büyüme faktörleriyle yakından ilgilidir.

HSK gelişim mekanizması ve seyri ile ilgili tüm değişkenlerin tedavi yanıtı ile de doğrudan bağlantısı bulunmaktadır (Thorgeirson and Grisham 2002, Thorgeirson et al., 2006). Son yıllarda geliştirilen teknolojik yöntemler sayesinde radyoterapinin de HSK tedavi seçenekleri arasına girmesi sağlanmıştır (Hawkins and Dawson 2006). Tümör alanı içine sınırlandırılmış radyoterapi uygulaması ile HSK hücrelerinde oluşan hücresel yanıtlar ve tedavi direnci gelişmesine yol açan moleküler mekanizmalar çok aktif araştırma alanlarından birisidir, ancak henüz tam olarak açıklığa çıkarılamamıştır (Lambert and Wiele 2005).

HSK dünyadaki 5. en sık görülen kanser olup, kanser ile ilişkili ölümlerde ise 3. sırada gelmektedir (Cole and Morrison 1980, Yazıcı ve Bahar 2008). Türkiye'deki durum ile ilgili tam olarak sayısal bir veri olmamakla beraber artan kronik hepatit hastalıkları sıklığı ile birlikte HSK insidans ve prevalansının hızla arttığı görülmektedir. Yaşa göre ayarlanmış HSK insidansı 65 yaş ve üstünde 1993 yılında 100.000 kişide 14 iken, 1999 yılında bu sayı 100.000 de 18.1 kişiye yükselmiştir (Davila et al., 2004, Yazıcı ve Bahar 2008).

HSK tanısı zor bir hastalık olup, genelde; serum markerları, bir ya da daha fazla görüntüleme yöntemi ve histolojik doğrulama gerekmektedir. HSK'ya yönelik patognomonik semptomların olmaması ve karaciğerin büyük fonksiyonel rezervi sebebiyle hastalar genelde geç tanı almaktadır (Yazıcı ve Bahar 2008).

HSK gelişiminde oldukça önemli basamaklardan biri siroz gelişimidir. HCV ve alkol kökenli HSK'ların neredeyse tamamında siroz da gözlenirken, HBV kökenli HSK gelişiminde siroz gelişimi genellikle görülmez (Moradpour and Blum 2005). HBV enfeksiyonuna bağlı HSK ise, yaşam standartları ve sağlık sistemi oturmamış gelişmekte olan ülkelerde gözlenmektedir. Gelişmiş ülkelerde HSK'nın en büyük etkenleri HCV enfeksiyonları ve alkol tüketimidir (Çokaklı 2006).

Karacigerde siroz ve HSK gelişimi öncesinde gerek sitokinler ve reaktif oksijen radikalleri (ROR), gerekse büyüme faktörleri açısından zengin, hipoksi-reoksijenasyon döngülerinin yaşandığı bir ortam oluştuğu tanımlanmaktadır (Tanaka and Arii 2006). Böyle bir mikroçevre içinde var olan HSK dokularında, hipoksik ortamın etkisiyle ekspresyon birçok protein düzeyinin arttığı veya azaldığı belirlenmiştir (Lee et al., 2004, Brader et al., 2007). Bu proteinler arasında özellikle

büyüme faktörleri ve bunların reseptörleri yer almaktadır (Villa et al., 2003). Anjiyogenik yanıtın oluşması açısından da büyük öneme sahip olan büyüme faktörlerinin sinyal ileti yollarlarında yer alan ya da bu yollar tarafından düzenlenen proteinlerin, karsinogenez süreci sonrasında invazif ve metastatik karakterin kazanılmasına neden olduğu ve hastanın sağ kalım süresini kısalttığı ortaya çıkmıştır (Kanematsu et al., 2005). Klinik çalışma sonuçları, HSK tedavisine yanıtın düzenlenmesinde de benzer proteinlerin etkisiyle, hastaların yanısızlık ve direnç gelişimi problemleriyle karşı karşıya kaldığını ortaya koymaktadır (Sun and Tang 2004, Tanaka and Aii 2006).

HSK gelişiminin erken dönemlerinde hepatositlerde yoğun bir çoğalma hızı artışı gözlenirken ileri aşamalarda bu hızın görece azaldığı buna karşılık hücrelerin motilite, invazyon yeteneklerinin arttığı tanımlanmıştır. Dolayısıyla motilitenin artması ve hücrelerin çevre doku içine invazyon yapabilmeleri, kanserin ileri evrelerinde daha belirgin olarak gözlenmekte, hastalar açısından ise kötü prognozu işaret etmektedir. Bu nedenlerle HSK hücrelerinin mikroçevreye bağlı olarak hipoksi veya HGF uyarımı gibi faktörlerle hareketliliklerinin hangi proteinler aracılığıyla düzenlendiğinin belirlenmesi önemlidir (Toylu 2007).

Hepatokarsinogenez sürecinde başlangıçtan itibaren konakçı dokuda bulunan ekstrasellüler matriks (ECM) bileşenlerinde yapısal ve miktarsal açıdan değişiklikler meydana gelmektedir. HSK hücrelerinde meydana gelen moleküler değişiklikler sonucunda hücrelerden sentezlenen ECM bileşenleri değişmekte ve hücrelerin ECM bileşenlerine olan afiniteleri artmakta, aynı zamanda hücrelerin invazyon ve metastaz yapabilmeleri için uygun ortam sağlanmaktadır. HSK' da çeşitli integrinlerle ilişki kurulan fibronektin, laminin, kollajen I, kollajen IV gibi ECM bileşenlerinin invazyonda önemli rol oynadıkları bilinmektedir (Hood and Cheresch 2002, Alex et al., 2005).

Hücreler, ECM bileşenleriyle olan ilişkilerini yüzeylerinde bulunan reseptörler aracılığı ile gerçekleştirmektedirler. Bu reseptörlerden bir tanesi integrin olarak bilinen ve hücredeki proliferasyon, apoptoz, diferansiyasyon gibi önemli olayları kontrol ederek invazyon sürecinde önemli bir rol üstlenen reseptördür (Alex et al., 2005). ECM-integrin ilişkisi karsinogenez sürecinin devamı açısından önemli olan

birçok sinyal yolunun aktif hale gelmesini ve buna bağlı olarak karsinogenez sürecinin ilerlemesini sağlamaktadır (Çelik 2008).

Günümüzde HSK tedavisinde karaciğer rezeksiyonu, karaciğer nakli, radyofrekans ablasyon (RFA), perkutan alkol ya da asetik asit ablasyonu, transarteriyel kemoembolizasyon (TACE), kryoablasyon, radyasyon terapisi, sistemik kemoterapi kullanılmaktadır (Makuuchi et al., 2008).

Kanser tedavisinde her ne kadar umut verici gelişmeler olsa da, bunlara hastalığın tip sayısının yüksekliği ve başarı yüzdesinin düşüklüğü eklendiğinde insanlar bu zorlu yolda belki de şanslarını bir parça daha artırdıklarını düşündükleri alternatif metotlara başvurmaya başlarlar. Bunların başında da bitkisel tedavi metotları gelir. Bitkisel tedavi metotlarının tedavi sürecinde yan etkiler açısından da rahat bir tedavi şekli olması bu durumu kuvvetlendirmektedir (Baytop 1999).

Gerek insan sağlığı, gerekse doğa ve çevre sağlığı fitoterapinin gerekliliğini güçlendirmektedir. Bugün dünya nüfusunun çoğunluğu için bitkiler en tercih edilen ilaç kaynaklarından. Büyük farmasötik firmalar yeni lider yapılar için bir kaynak olarak bitkilere yeniden ilgi göstermektedirler (Baytop 1999).

Bitki olarak kullanıldığında faydalı olabilecek ancak rastgele kullanımında faydası bir yana zararlı olabilen bitki ve bitkisel preparatların kullanımı ile ilgili bir standart oluşturulması gerekli ve zorunludur. Fakat şifalı bitkilerin halk arasında kullanımı konusunda ne yazık ki mevcut bir standart bulunmamaktadır. İnsan sağlığını yakından ilgilendiren birçok bitki hiçbir denetime tabi tutulmaksızın halk arasında kullanılmakta, bu bitkiler semt pazarlarında tamamen ehliyetsiz kişilerce halka şifalı bitkiler olarak sunulmaktadır (Denir 2005).

Fitoterapinin varolan kimyasal ilaçlarla tedavinin yerine geçmesi söz konusu olmasa da tedavide kimyasal ilaçlara destek vermekte aynı zamanda da tedavi süresince yaşanan sıkıntıları hafifletmektedir (Baytop 1999).

Silybum marianum (Devedikeni), Asteraceae familyasından bazı dikenli bitkilerin ortak adıdır. Devekengeli, meryemana diken, sütlü kengel olarak da bilinir. Meyveleri yaklaşık olarak 2000 yıldır karaciğer hastalıklarına karşı kullanılan bitki ile ilgili ilk araştırmalar 1958'de başlamıştır. Devedikeni bileşiminde karaciğeri koruyucu etken maddeler; flavonolignandan meydana gelen silimarin (silibin),

taksifolin, kuersetrin, albümin, misiliaj, sabit yağ ve acı maddeler şeklindedir. Bitkinin tohumları %4–6 oranında silimarin içermesine rağmen günümüzde Amerika’da üretilen yoğunlaştırılmış ekstraları %70–80 oranında silimarin içermektedir (Acartürk 1996, Singh et al., 2004). Silimarin hepatositlerin hücre çekirdeğinde RNA polimeraz 1’i uyarır ve böylece ribozomal protein sentezinde artış ve karaciğerin rejeneratif yeteneği ortaya çıkar. Bu mekanizma RNA polimeraz 1’i inhibe eden a-amanitini taşıyan amanita phalloides isimli mantarın meydana getirdiği zehirlenmelerde antidot olarak etki göstereceği için önemlidir (El Hafny 1997). Ayrıca yapılan çalışmalarda bitkiden elde edilen ekstraktın akciğer tümörü büyümesini baskıladığı, meme, kolon, mesane kanseri hücre hatlarında hücre siklusunu durdurduğu ve apoptozisi tetiklediği gösterilmiştir. (Zi et al., 1998, Zi and Feyes 1998, Agarwal et al., 2003, Singh et al., 2004, Tyagi et al., 2004).

Syng-Ook Lee ve arkadaşları (2007), silibinin insan meme karsinoma hücrelerinde MAPK sinyal yolunda AP-1 (metastaz, tümörögenesis, inflamasyon olaylarında genlerin ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörü) aktivasyonunu bloke ederek MMP-9 (matriks mettalloproteinaz 9- kanser hücrelerinin metastaz ve invazyonunda önemli rol oynar) ekspresyonunu baskıladığını MTT analizi, jelatin zimografi, gerçek zamanlı PCR yöntemlerini kullanarak gözlemlemişlerdir. Yine yapılan çalışmalarda silibinin; insan mesane karsinoma hücrelerinde hücre siklusunu durdurduğu (flow sitometri analizi ile değerlendirilmiş.) ve apoptozisi tetiklediği (Tyagi et al., 2004), erkek F344 sıçanlarda 4-nitrokuinolin 1-oksit aracılı dil karsinogenezisini baskıladığı (Yoshitame et al., 2002), yine erkek F344 sıçanlarda azotmetan aracılı kolon karsinogenezisini inhibe ettiği (Kohno et al., 2002), DU145 insan prostat karsinoma hücrelerinde Stat3 (çeşitli tümörlerin aktive olmasında etkili sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü)’ün aktive olmasını inhibe ederek kaspaz 3 aktivasyonuna ve apoptotik hücre ölümüne neden olduğu (Chapla et al., 2007), insan servikal ve hepatoma kanser hücrelerinde HIF-1 α (hipoksi indüklenebilir faktör 1 α – tümör büyümesi ve anjiyogeneziste merkez bir rol oynar) ve mTOR/p7056K/4E-BP1 sinyal yolunu inhibe ettiği görülmüştür (P Garcı’a-Maceira and J Mateo, 2009).

Çalışmamızda *Silybum marianum* bitkisinden elde edilen silibinin ekstraktının hem iki boyutlu hem de üç boyutlu kültür ortamında, hücre çoğalması üzerine

etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Bunun için hücre kültürü deneylerinde Hep3B hepatosellüler karsinoma hücre soyu kullanılmıştır. Hep3B hücre soyu hepatit B virüsü pozitif ve p53 geni mutasyona uğramış hepatosellüler karsinoma hücre hattıdır (Varghese et al., 2005).

Silibinin hepatosellüler karsinoma HepG2 ve Hep3B hücrelerinde hücre büyümesini durdurduğu ve apoptozisi tetiklediği (Varghese et al., 2005), ayrıca yine aynı hücre soylarında hücre siklusunu durdurduğu gösterilmiştir (Varghese et al., 2005).

John ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada çeşitli hepatosellüler karsinoma hücre hatlarında (HepG2, HuH7, PLC/PRF/5, Hep3B hücre hatları) silibinin etki mekanizmasını araştırmışlardır. Çalışmada hücre proliferasyonunu MTT analizi ile, apoptozisi apoptozis kiti ile, MMP 2 ve 9 ekspresyonu, kaspaz 3 ve 9 aktivasyonunu ise immünblot yöntemi ile değerlendirmişlerdir. Sonuçta silibinin doza bağlı olarak antiproliferatif etki gösterdiği, apoptotik etkisinin olduğu (kaspaz 3 ve 9'un aktivasyonunu sağlayarak) ve kanser hücrelerinin metastaz ve invazyonunda önemli rol oynayan MMP 2 ve 9'un ekspresyonunu azalttığı görülmüştür (John et al., 2007).

Silybum marianum bitkisinden elde edilen polifenolik antioksidan bir madde olan silibinin hepatosellüler karsinoma üzerine etkisiyle ilgili in vitro ortamda yapılan tüm araştırmalar iki boyutlu kültür ortamında gerçekleştirilmiştir ve yapılan çalışmalarda silibinin karaciğer kanserli hücre hatlarında hücre büyümesini durdurucu etkileri, proliferasyonu inhibe edici ve apoptozisi tetikleyici etkileri western blot, MTT analizi, etidyum bromid/akridin orange (apoptozisin gösterilmesi için), flow sitometri (hücre siklusu için) gerçek zamanlı PCR, immünblot gibi yöntemler kullanılarak gösterilmiştir (Momeny et al., 2008, Ramakrishnan et al., 2009).

Çalışmamızda ise, yaptığımız tüm araştırmalar hem iki boyutlu (monolayer hücre kültürü) hem de üç boyutlu kültür (multisellüler sferoid model) ortamında gerçekleştirilmiş ve iki yöntem arasındaki sonuçlar karşılaştırılmıştır. Silibinin Hep3B hepatosellüler karsinoma hücre hattı üzerine etkisinin üç boyutlu kültür ortamında (in vivo uyumlu ve in vivo mikroçevre özelliklerini sağlayan en iyi in

vitro model olarak kullanılan multiselüler sferoidler) çalışılması ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma mevcut değildir. Bu açıdan araştırmamız bir ilk olmaktadır.

Monolayer hücre kültürü deneylerinde her kuyucuğa 500000 hücre ekilmiş, hücrelerin yüzeye tutunması için 1 saat beklendikten sonra doz belirleme deneyi için farklı dozlarda (1; 10; 50; 100; 200 μ M) silibin ekstraktı verilmiştir. Silibin DMSO'da çözöldüğü için aynı dozlarda DMSO kontrol grubuna uygulanmıştır. Her bir doz 24, 48 ve 72 saat sürelerle denenmiş ve bu konsantrasyonlardaki hücre sayısında nasıl bir değışiklik olduğuna bakılmıştır. Her deney grubu 3'lü çalışılmış ve anlamlılık değeri tek yönlü varyans analizi ile değeriendirilmiştir. Sonuçta silibinin ID50 (İnhibition dose %50) dozu 100 μ M olarak saptanmıştır.

İki boyutlu kültürde doz belirleme deneyi sonuçlarımıza göre elde ettiğimiz silibinin 100 μ M ID50 dozu lamelli ekim yapıldıktan sonra hücrelere uygulanmış, 24, 48 ve 72 saat sürelerle beklendikten sonra DNA sentezi yapan hücreleri işaretlemek amacıyla timidin analogu olan BrdU ile immünohistokimyasal boyama yapılmıştır. Buna göre BrdU'yu alarak işaretlenmiş sentez fazındaki hücreler sayılarak yüzdeleri alınmış ve böylece BrdU işaretleme indeksi hesaplanmıştır.

Yapılan değeriendirmeye göre silibin (100 μ M/ml) uygulanan gruptaki hücrelerde 24, 48, 72 saat süreler sonunda işaretleme indeksinin kontrol grubu işaretleme indeksine oranla anlamlı derecede azaldığı görölmüştür ($p < 0.05$). Ayrıca tripan blue ile yapılan canlılık testinde de silibin verilen grupta hücre sayısında anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p < 0.05$). Elde ettiğimiz bu sonuçlar, silibinin iki boyutlu kültür ortamında Hep3B hücre soyu üzerine etkisiyle ilgili daha önce yapılan çalışmaların sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir (Varghese et al., 2005, John et al., 2007).

Monolayer hücre kültürü deneylerinde apoptotik hücreleri belirlemek amacıyla immünohistokimyasal olarak aktif kaspaz-3 tayini yapılmıştır. Bunun için yine lamelli ekim yapıldıktan sonra silibinin (100 μ M/ml) verilmiş ve 24, 48, 72 saat süreler sonunda kaspaz-3 ile immünohisyoimyasal boyama yapılmıştır. Sonuçta kaspaz-3 ile boyanan hücre sayısında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p < 0.05$). Bu da bize silibinin hücrelerde (Hep3B hepatosellüler hücre soyunda) apoptozisi tetiklediğini göstermektedir. Konuyla ilgili

daha önce yapılan çalışmalarda silibinin apoptotik etkisi farklı yöntemler kullanılarak (immünblotting, etidyum bromid-akridin orange yöntemi) belirlenmiş olup yine bizim sonuçlarımızla paralellik göstermektedir (John et al., 2007, Momeny et al., 2008, Ramakrishnan et al., 2009).

Tümör hücreleri ile yapılan in vitro deneylerde birçok laboratuvarında tek tabakalı hücre kültürleri kullanılmaktadır. Bu in vitro hücre modeliyle kanserin temel oluşum mekanizmaları ve tedavisi üzerine oldukça değerli bilgiler edinilmiştir. Ancak, tek tabakalı kültür ortamında oksijen ve besinler kanser hücrelerine eşit oranda ulaşmakta ve hücreler bu koşullar altında iki boyutlu bir büyüme göstermektedir. Oysa vücutta kitle oluşturan solid tümörler üç boyutlu uzaysal bir konumda büyümektedir. Bu durum tümörlerin iç bölümündeki hücreler arasında oksijen ve besin dağılımının eşit olmamasına yol açmakta ve hücreler farklı düzeylerde fiziksel ve kimyasal streslerle karşılaşmaktadır. Oksijen ve besin kaynaklarının düşük olduğu bölümlerde hücre hasarı ve hatta nekroz kendiliğinden gelişebilmektedir. Ayrıca tek tabakalı hücre kültür modelinin aksine hücrelerin yanıtların gelişmesinde önemli rol oynadığı düşünülen hücreler arası temaslar üç boyutlu kültür ortamında gerçekleşmektedir (Ahışhalı ve Bilir, 2002).

Tümör sferoidleri, solid tümörlerin üç boyutlu büyüme ve organizasyonunu oldukça gerçekçi bir biçimde yansıtmakta ve bunun sonucunda tümörlerde söz konusu hücreler arası ilişkileri ve mikro çevresel koşulları çok daha net ortaya koyabilmektedir (Ahışhalı ve Bilir, 2002).

Bu durumdan yola çıkarak tek tabakalı hücreler üzerinde silibinin istatistiksel olarak anlamlılık taşıyan en yüksek değeri seçilmiş ve seçilen bu değer vücuttaki üç boyutlu tümör yapısını daha iyi yansıtan sferoid kültürde denenmiştir. Hep3B hepatosellüler karsinoma hücreleri ile sferoid model oluşturulmuş ve 100 µM/ml silibin oluşan sferoidlere verilerek 24, 48 ve 72 saat süreler beklendikten sonra değerlendirilmiştir.

Sferoid kültürlerde değerlendirmeler üç aşamalı gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada DNA sentezi yapan hücreleri işaretlemek amacıyla timidin analogu olan BrdU kullanılmıştır. BrdU ile işaretlenmiş sferoidler ışık mikroskobu takibi sonrası parafine gömülmüş ve parafin kesitlere immünohistokimya uygulaması ile BrdU'yu

olarak işaretlenmiş sentez fazındaki hücreler sayılarak yüzdeleri alınmış ve böylece BrdU işaretleme indeksi (BrdU-LI) değerleri hesaplanmıştır.

Yapılan değerlendirmeye göre, sferoidlere uygulanan silibin (100 μ M/ml) grubunda hücrelerde işaretlenme indeksinin kontrol grubu işaretlenme indeksine oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir ($p < 0.05$). Bu sonuç iki boyutlu kültür sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Ancak iki boyutlu kültür ortamında BrdU ile işaretlenen hücrelerin yerleşiminde herhangi bir farklılık bulunmazken sferoid modelde boyanma sferoidlerin çevresindeki hücrelerde daha yoğun olarak görülmüştür. Bu da bize silibinin daha çok sferoidlerin dış kısmındaki hücreler üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir. Sferoidin orta kısmındaki hücrelerde az sayıda işaretlenmenin olması ise aynı tümör yapısında olduğu gibi bu bölgedeki hücrelerde oksijen ve besin yetersizliğinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Sferoid kültürde ikinci aşamada sferoid modelde apoptotik hücreleri gözlemek amacıyla immünohistokimyasal olarak kaspaz-3 boyaması yapılmıştır. Bunun için sferoidler BrdU ile işaretlenmeden ışık mikroskobu takibi sonrası parafine gömülmüş ve parafin kesitlere immünohistokimya uygulaması ile kaspaz-3 ile boyanmış hücreler sayılarak yüzdeleri alınmış ve bu şekilde apoptotik hücre oranı belirlenmiştir.

İmmünohistokimyasal boyama sonucunda silibin verilen sferoidlerdeki çok sayıda hücre Kaspaz-3 ile boyanmıştır. Bu boyanma kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla görülmüştür ($p < 0.05$). Böylece sferoid modelde de (üç boyutlu kültür ortamı) silibinin apoptotik etkisinin olduğu gözlenmiştir. İki boyutlu kültür ortamında kaspaz-3 boyanma sonuçlarına bakıldığında bu boyanmanın bölgesel bir farklılık göstermediği görülmüştür. Oysa sferoid modelde aynı BrdU işaretlenme indeksinde olduğu gibi sferoidlerin dış kısmındaki hücrelerde boyanmanın daha yoğun olduğu gözlenmiştir. Bu da bize silibinin apoptotik etkisinin sferoidin periferindeki hücrelerde daha baskın olabileceğini düşündürmektedir.

Sferoid kültürlerde üçüncü aşamada sferoid morfolojisini incelemek amacıyla sferoidlerin parafin kesitlerine hematoksilin-eozin boyası uygulanmıştır. Kesitler ışık mikroskopunda değerlendirmeye alınmıştır.

Monolayer sonuçlarına göre anlamlı kabul edilen dozun seçilmesiyle sferoid tekniğinde yapılan hematoksilin-eozin boyası sonucunda mikroskopik olarak yapılan değerlendirmeye göre, silibin (100 µM/ml) uygulanan grupta genel sferoid yapısının düzgün görüldüğü ancak bütünlüğü bozulmamış, düzgün görümlü sferoidlerin yanında sınırları kaybolmuş, dağınık sferoid yapılarının da olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak Silybum marianum bitkisinden elde edilen silibin ekstraktının Hep3B hepatosellüler karsinoma hücrelerinde yapılan in vitro deneylerde verdiği sonuçlardan yola çıkarak bu bitkinin hücre popülasyonundaki artışı azaltmada etkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Hep3B hücre soyu ile yapılan monolayer hücre kültürü deneyleri bu azalmayı desteklerken, üç boyutlu tümör yapısını yansıtan sferoid hücre kültürü deneyleri sonucunda parafin kesitlere uygulanmış hematoksilin-eozin boyası sonuçları da, monolayer kültürde istatistiksel olarak anlamlılık taşıyan silibin grubunun ışık mikroskopik olarak genel sferoid yapısını dejenere ettiğini göstermekte ve bu durum düzgün sferoid yapılarının yanında yer yer dağınık sferoid formları ile desteklenmektedir.

Sferoid hücre kültürlerine BrdU uygulaması sonrasında gerçekleştirilen immünohistokimya neticesinde saptanan BrdU işaretleme indeksi değerleri de hem iki hem de üç boyutlu kültür ortamında silibinin hücre artışı inhibe edici etkisini desteklemektedir. Ayrıca immünohistokimyasal olarak kaspaz-3 boyaması sonucunda da silibinin yine hem iki hem de üç boyutlu kültür ortamında hücreler üzerinde apoptotik etki gösterdiği görülmüştür.

Çalışmamızda monolayer kültürde silibinin hücre proliferasyonunu inhibe edici ve apoptotik etkisini göstermek amacıyla kullandığımız yöntemlere daha önce yapılmış çalışmalarda rastlanmamıştır. Ayrıca, silibin üç boyutlu kültür ortamında (sferoid modelde) Hep3B hepatosellüler karsinoma hücre hattı üzerine etkisi de daha önce (yaptığımız literatür taramalarına göre) araştırılmamıştır. Bu açılarından çalışmamız bir ilki oluşturmaktadır.

Yaptığımız literatür taramalarında silibinin in vitro ortamda hepatosellüler karsinoma üzerinde etkisini konu alan çeşitli çalışmalar mevcuttur. Ancak BrdU işaretleme indeksi ve aktif kaspaz-3 tayini immünohistokimyasal yöntemle yapılmamıştır. Ayrıca silibin, üç boyutlu kültür ortamında hiç denenmemiştir. Bu nedenle üç boyutlu sferoid model vücuttaki tümör yapısını daha iyi yansıttığı için elde ettiğimiz sonuçların hepatosellüler karsinoma tedavisine ışık tutacağı kanısındayız.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

HSK kesin tedavisi olmayan bir hastalıktır. Erken dönemdeki hepatosellüler karsinomun tipik özelliği sessiz olması ve yavaş büyüyerek ilerleyinceye kadar çok az belirti vermesidir. HSK teşhis edildiğinde genellikle oldukça ilerlemiş durumdadır. Bu nedenle insanlar pek çok kanser türünde olduğu gibi karaciğer kanserinde de sadece medikal tedavi yöntemleri ile yetinmeyip alternatif yöntemlere de başvurmaktadır.

Fitoterapi tıbbi tedavinin tamamen yerine geçmek yerine kimyasal ilaçlara destek vermekte aynı zamanda da tedavi süresince yaşanan sıkıntıları hafifletmektedir. *Silybum marianum* (Devediken) bitikisinden elde edilen ekstraktlarda karaciğeri koruyucu etken maddeler tespit edilmiştir. Bu maddelerin başında silibinin gelmektedir. Bu nedenle çalışmamızda karaciğer koruyucu olduğu bilinen silibinin hepatosellüler karsinoma üzerine etkisini araştırdık.

Sonuç olarak yaptığımız çalışmada hem iki boyutlu hem de üç boyutlu kültür ortamında immünohistokimyasal yöntem kullanarak silibinin Hep3B hücre soyunda proliferasyonu inhibe edici ve apoptotik etki gösterdiğini gözlemledik. Ayrıca çalışmamız silibinin üç boyutlu kültür ortamında ilk defa denenmesi açısından önem arz etmektedir.

Çalışmamız vücuttaki tümör yapısını yansıtan sferoid modelde de çalışıldığı için kanser tedavisinde bu bitkinin destekleyici olarak kullanılabilmesine ışık tutacağını düşünmekteyiz. Yine de HSK'nın moleküler patogeneziyle ilgili birçok bilinmeyen vardır (Moradpour et al., 2005, Cha and DeMatteo 2005). Bu bilinmeyenlerin temelinde ise HSK'nın oldukça heterojen bir kanser türü olması yatar. HSK'nın erken öngörüsü, tanısı ve tedavisi için, bu kanser türünün gelişimine neden olan moleküler mekanizmaların aydınlatılması gerekmektedir.

ÖZET

Silybum Marianum Bitkisinin İn Vitro Ortamda Karaciğer Kanseri Hücre Hatları Üzerine Etkisi

Hepatosellüler Karsinom (HSK) karaciğerin en sık (%75) rastlanan primer tümörüdür. HSK'nin etkin bir tedavisi yoktur. HSK'da radyoterapi ve kemoterapi tedavisi ile genellikle başarılı sonuçlar alınamamaktadır. Hep3B, hepatit B virüsü pozitif ve p53 geni mutasyona uğramış hepatosellüler karsinoma hücre soyudur.

Silybum marianum (Devedikeni), Asteraceae familyasından bazı dikenli bitkilerin ortak adıdır. Meyveleri yaklaşık olarak 2000 yıldır karaciğer hastalıklarına karşı kullanılan bitki ile ilgili ilk araştırmalar 1958'de başlamıştır. Devedikeni bileşiminde karaciğeri koruyucu etken maddeler; flavonolignandan meydana gelen Silymarin (silibin), taxifolin, quercetrin, albümin, miisiliaj, sabit yağ ve acı maddeler şeklindedir. Yapılan çalışmalarda bitkiden elde edilen ekstraktın (silibin) akciğer tümörü büyümesini baskıladığı, meme, kolon, mesane kanseri hücre hatlarında hücre siklusunu durdurduğu ve apoptozisi tetiklediği gösterilmiştir.

Çalışmamızda silibinin Hep3B hücre soyu üzerine etkisini hem iki boyutlu hem de üç boyutlu kültür ortamında incelemek amacıyla 100 µM/ml doz silibin in vitro ortamdaki hücrelere uygulandı. Monolayer kültürde hücrelere silibin (100 µM/ml) verildikten sonra 24, 48 ve 72 saat süreler sonunda BrdU işaretleme indeksi ve aktif kaspaz-3 tayinine immünohistokimyasal yöntemle bakıldı. Üç boyutlu kültürde ise sferoid model oluşturulduktan sonra silibin (100 µM/ml) uygulandı ve yine immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak değerlendirildi.

Sonuç olarak silibinin hem monolayer kültürde hem de sferoid model kültürde BrdU ile işaretlenen hücrelerin sayısını azalttığı, kaspaz-3 ile boyanan hücrelerin sayısını ise arttırdığı görüldü. Buradan da anlaşılabileceği üzere silibin Hep3B hepatosellüler karsinoma hücre soyunda hücre proliferasyonunu inhibe edici ve apoptozisi tetikleyici etki göstermiştir. Üç boyutlu sferoid model vücuttaki tümör yapısını daha iyi yansıttığı için elde ettiğimiz sonuçların hepatosellüler karsinoma tedavisine ışık tutacağı kanısındayız.

Anahtar Sözcükler: Hep3B hücre soyu, *Silybum marianum*

ABSTRACT

Effect of *Silybum Marianum* Plant on Liver Cancer Cell Lines: An In Vitro Study

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most seen primer tumor in liver (75%). There is no exact cure for HCC. No successful results can be obtained with the treatment of chemotherapy and radiotherapy in liver cancer. Hep3B cell line is hepatitis B virus positive and p53 gene-mutated hepatocarcinoma cell line.

Silybum marianum is common name of thorny plants from Asteracea family. Fruits have been used for 2000 years for liver diseases. Researchs about this plant was started about 30 years ago in 1958. Active liver-protective compounds are Silymarin derived from flavonolignan, taxifolin, quercetrin, albumin, musillage, constant fat and bitter substances. Previous studies showed extracts of plant suppressed lung tumor growth and interrupted cell cycle and promoted apoptosis on breast, colon and bladder cancer cell lines.

In this study the effect of silibinin on Hep3B cell line and two-dimensional and three-dimensional in the culture medium to examine the 100 microM/ml dose was applied silibin cells in vitro environment. silibin two-dimensional culture medium (100 microM/ml) after applying 24, 48 and 72 hour periods of time marking the end of BrdU labelling index and the determination of active caspase-3 were measured by immunohistochemistry. Three-dimensional culture models after the creation of the spheroids silibin (100 microM/ml) was administered and again assessed using immunohistochemical methods.

In conclusion, silibinin both monolayer culture and spheroids the model to reduce the number of cells marked with BrdU in culture, increase the number of cells stained with caspase-3 were seen. Silibin Hep3B hepatocellular carcinoma cell soyunda inhibiting cell proliferation and trigger apoptosis in effect. Three-dimensional tumor spheroids in the body structure of the model to better reflect the results we obtained shed light on the treatment of hepatocellular carcinoma think.

Key Words: Hep3B cell line, *Silybum marianum*

KAYNAKLAR

- Acartürk R, Şifalı Bitkiler, *Flora ve Sağlığımız*. Karşıyaka, İzmir, 1996.
- Agarwal C, Singh RP, Dhanalakshmi IS, et al. Silibinin up-regulates the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and causes cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma HT-29 cells. *Oncogene* 2003; 22:8271-82.
- Ahışhalı, B., Bilir, A. Tümör Hücrelerinin Multisellüler Tümör Sferoid Modelinde Üretilmesi *İst. Tıp Fak. Mecmuası* 2002; 65:1.
- Ahmad N, Gali H, Javed S, Agarwal R. Skin cancer chemoprotective effects of a flavonoid antioxidant silymarin are mediated via impairment of receptor tyrosine kinase signaling and perturbation in cell cycle progression, *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 248:294–301.
- Alex YH, Friedman SL. Extracellular Matrix, Dufour J.F., Clavien P.A., Trautwein C., Graf R., Signaling Pathways in Liver Diseases, *Springer Berlin Heidelberg*, 2005, 63-71.
- Allen PD, Bustin SA, Newland AC. The role of apoptosis (programmed cell death) in haemopoiesis and the immune system. *Blood Reviews* 1993; 7:63-73.
- Anıl Y.D, Aytekin Y, Erbeni T, Özkan T, Bilir A, Aykaç İ, Öner A. Testosteron'un L-Strain Hücre Kültürlerinde S Fazına Etkisi. *Türk Üroloji Dergisi* 1987; 13(19):7-13.
- Anon. Drog Ticareti. *Anadolu Üniversitesi Tıbbi ve Aromatik Bitki ve İlaç Arş. Mer., Tıbbi ve Aromatik Bitkiler (TAB)* 1998;13–14.
- Anon., Şifalı Bitkiler Doğal İlaçlarla Geleneksel Tedaviler, www.bitkiterapi.net. 2001.
- Anon., Solgar Vitamin Tıbbi Bitkiler (Herbs) Rehberi 2008.
- Avila MA, Berasain C, Sangro B, Prieto J. New therapies for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006; 25: 3866–3884.
- Aytekin, Y. ve Solakoglu, S. Temel Histoloji. *İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri* 2006; 60-64.
- Baytop T. “Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi Geçimişte ve Bugün” *Nobel Tıp Kitapevleri* 1999; 142-44.
- Behnia M, Robertson KA, Martin WJ. Role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. *Official Publication of The American College of Chest Physicians (CHEST)* 2000; 117:1771-7.
- Bhatia N, Agarwal R. Detrimental effect of cancer preventive phytochemicals silymarin, genistenin and epigallocatechin 3- galate on epigenetic events in human prostate carcinoma DU145 cells, *The Prostate* 2001; 46:98–107.
- Bilir A, Altınöz M.A, Atar E, Erkan M, Aydın A. Acetaminophen Modulation of Chemotherapy Efficacy in MDAH 2774 Human Endometrioid Ovarian Cancer Cells In Vitro. *Neoplasma* 2002; 49(1).
- Bilir A, Anıl D, Erbeni T. Dimetil Sülfoksit’in L-Strain Hücrelerinde S Fazına Etkisi. *Klinik Gelişim The Journal of İstanbul Chamber of Medicine* 1987; 1(2).
- Bilir A, Anıl Y.D, Erbeni T, Gürtekin M. Colcemid’in L-Strain Hücre Kültürlerinde S Fazına Etkisi. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 1988, 1999, 1991; 5,6,7 (Bileşik Sayı); 11-37.

Bilir A, Eralp Y, Cabioğlu N, Agizhali B, Çamlıca H, Aydiner A. Thymidine Labeling Index: Prognostic Role in Breast Cancer. *American Journal of Clinical Oncology* 2004; 27(4).

Bilir A. Gossypol ve Dimethylsulfoxide'nin L-Strain Hücre Kültürlerinde G0 Fazı Üzerine Etkisi. *İstanbul Tıp Fakültesi Mecmuası* 1991; 54: 31-38.

Bilir A, Gülgün C. Tümör prognozunda Thymidine Labelling Index'in Önemi. *İstanbul Tıp Fakültesi Mecmuası* 1995; 58:2.

Bilir A, Solakoğlu S. ve Ahışhalı B. Uygulamalı Flow Sitometri-PCR ve Hücre Kültürü Kursu. İstanbul, 2004

Blumenthal M. Busse W. The complete german commission E monographs: Therapeutic guide to herbal medicines, American botanical council and integrative medicine communications, Austin, TX 1998, 685–698.

Bokemeyer C, Fels LM, Dunn T, Voigt W, Gaedeke J, Schmoll HJ, et al. Silibinin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising cisplatin or ifosfamide anti-tumour activity. *Br J Cancer* 1996; 74:2036–2041.

Bosisio E, Benelli C, Pirola O. Effect of flavanolignans of *Silybum marianum* L. on lipid peroxidation in rat liver microsomes and freshly isolated hepatocytes, *Pharmacol. Res.* 1992; 25:147-154.

Bozkurt H. “Bazı Cisplatin Türevlerinin Sitotoksitesinin ve Antitümör Aktivitesinin Belirlenmesi”. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, 2004.

Brader P, Riedl CC, Woo Y, Ponomarev V, Zanzonico P, Wen B, Cai S, Hricak H, Fong Y, Blasberg R, Serganova I. Imaging of hypoxia-driven gene expression in an orthotopic liver tumor model. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6(11):2900-8.

Buchwalow IB, Böcker W. Immunohistochemistry Basic and Methods. DOI 10.1007/978-3-642-04609-4_1, Springer – Verlag Berlin Heidelberg 2010.

Budihardjo I, Oliver HLM. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 1999; 15:269-90.

Büyükgebiz O, Caferler JS. Apoptoz. *Sendrom* 2001; 13:102-7.

Cha C, DeMatteo RP. Molecular mechanisms in hepatocellular carcinoma development. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2005; 19-1:25-37.

Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual Review of Immunology* 1998; 16:395-419

Chapla Agarwal, Alpna Tyagi, Manjinder Kaur and Rajesh Agarwal. Silibinin inhibits constitutive activation of Stat3, and causes caspase activation and apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells. *Carcinogenesis*, 2007; 28(7):1463–1470,

Cohen JJ. Overview: Mechanisms of apoptosis. *Immunol Today* 1993; 14:126-30.

Cole P, Morrison AS. Basic issues in population screening for cancer. *J Natl Cancer Inst* 1980; 64: 1263-72.

Craig WJ. Health-promoting properties of common herbs 1,2 (Suppl). *American Journal of Clinical Nutrition*, 1999; 70(3): 491-499.

Çelik E. Hepatosellüler Karsinoma Hücre Motilitesinde PKB/AKT/mTOR Sinyal Yolağının Önemi. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İzmir, 2008.

Çokaklı M. Hepatosellüler Karsinoma Dokularında ve Hücre Hatlarında Kaveolin- c-Met İlişkisinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İzmir, 2006.

Çubukçu B, Sarıtar G, Meriçli AH, Sütülpınar N, Mat A, Meriçli F. Fitoterapi Yardımcı Ders Kitabı. İstanbul Üniversitesi Farmakognozi Anabilim Dalı, İstanbul, 2002; 1-3.

Daidone MR, Costa A, Silvestrini N. Cell proliferation markers in human solid tumors: assessing their impact in clinical oncology. *Methods in Cell Biology*, 2001; 64: 359-84.

Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, et al. Hepatitis C infection and the increasing incidence of hepatocellular carcinoma: a population-based study. *Gastroenterology* 2004; 127: 1372-80.

De Groot H, Rauen U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effect of flavanoids, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1998; 12 (3), 249-255.

Demir R. Histolojik Boyama Teknikleri. Ankara, *Palme Yayıncılık*, 2001.

Demirezer Ö, Ersöz T, Saraçoğlu İ, Şener B. Tedavide Kullanılan Bitkiler, FED Monografları. *Medikal&Nobel Yayınevi*, 2007; 265-270.

Denir S. Farklı Salvia Tomentosa Ekstarktlarının C6 Glioma Monolayer ve Sferoid Hücre Kültürü Modelinde Antitümör Etkisinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, 2005.

Dhannikula AB, Panchagnula R. Localized Paclitaxel Delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 1999; 183:85-100.

Ding T, Tian S, Zhang Z, Gu D, Chen Y, Shi Y, Sun Z. Determination of active component in silymarin by RP-LC and LC/MS. *J. Pharmacol. Biomed. Anal.* 2001; 26 (1), 155-161, p.

Dorai T, Aggarwal B. Role of Chemopreventive Agents in Cancer Therapy. *Cancer Lett.* 2004; 215, 129–140, p.

Ekert PG, Vaux DL. Apoptosis and the immune system. *Br Med Bull* 1997; 53:591-603.

El SN. Beslenme ve Kanser. Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, ppt sunusu, İzmir, 2005.

El Hafny B, Cano N, Piciotti M, Regina A, Scherrmann JM. and Roux F. Role of P-glycoprotein in colchicine and vinblastine cellular kinetics in an immortalized rat brain microvessel endothelial cell line. *Biochem Pharmacol.* 1997; 53(11), 1735-1742.

Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular Carcinoma Pathogenesis: from Genes to Environment. *Nature genetics*, 2006; 6:674-687.

Feitelson MA, Sun B, Tufan NLS, Liu J, Pan J, Lian Z. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene*. 2002;21: 2593-2604.

Flora K, Hahn M, Rosen H, Benner K. Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. *Am J Gastroenterol* 1998; 93, 139–143.

Fraschini F, Dermartini G, Esposti D. Pharmacology of silymarin. *Clin Drug Invest.* 2002; 22, 51–65.

French SW. The role of hypoxia in the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Hepatology Research* 2004; 29:69–74.

Friedman SL, Bansal MB. Reversal of hepatic fibrosis - fact or fantasy? *Hepatology*. 2006; 43(2 Suppl 1):82-8.

Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*. 2000; 275(4):2247-50.

Gerschenson LE, Rotello RJ. Apoptosis: a different type of cell death. *Faseb J* 1992; 6:2450-55.

Gışh RG. Hepatosellüler Karsinom: Hastalığın Tedavisinde Zorlukların Aşılması. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2006; 1:2.

Guo R, Zhong C, Shi M, Zhang C, Wei W, Zhang Y, Li J. Clinical value of apoptosis and angiogenesis factors in estimating the prognosis of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006; 132:547-555.

Güneri AD. Gemcitabin, Dimetilsülfoksit (DMSO) ve Parasetamol'ün FM3A Hücre Kùltürlerinde Proliferasyon Üzerine Etkileri. Uzmanlık Tezi. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakùltesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, 2002.

Hawkins AM, Dawson LA. Radiation therapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 2006;106:1653-1663.

Helgason CD, Miller CL. In Basic Cell Culture Protocols. Third Edition. *Human Pres. Inc. Totowa NJ*. 2005; Vol. 290, 207—90.

Hetts SW. To die or not to die. *The Journal of The American Medical Association (JAMA)*. 1998; 279:300-7.

Hood JD, Cheresh DA, Role of intgrins in cell invasion and migration. *Nature reviews*, 2002; 2: 91-100.

Hsu CN, Lai JM, Liu CH, Tseng HH, Lin CY, Lin KT, Yeh HH, Sung TY, Hsu WL, Su LJ, Lee SA, Chen CH, Lee GC, Lee DT, Shiue YL, Yeh CW, Chang CH, Kao CY, Huang CY. Detection of the inferred interaction network in hepatocellular carcinoma from EHCO (Encyclopedia of Hepatocellular Carcinoma genes Online). *BMC Bioinformatics*. 2007; 8:66.

http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/s_liu/Html

http://www.floralimages.co.uk/images/silybum_marianum_b66.jpg

<http://www.medicinescomplete.com/mc/herbals/2008/images/HrbMilkThistleC001.gif>

<http://www.robsplants.com/images/portrait/SilybumMarianum040623.jpg>

<http://www.saglikdanis.com/hastalikgoster.asp?hid=745>

<http://www.talktalk.co.uk/lifestyle/healthfitness/conditions/article/chemotherapy>

http://www.turkcebilgi.com/karaci%C4%9Fer_kanseri/ansiklopedi

Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *The Oncologist*, 1999; 4:332-9.

İlisulu K. İlaç ve Baharat Bitkileri. *Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yay.* 1992; 360.

Jacobs BP, Dennehy C, Ramirez G, Sapp J, Lawrence VA. Milk thistle for the treatment of liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Am J Med*. 2002; 113:506—515.

John J Lah, Wei Cui, Ke-Qin Hu. "Effects and mechanisms of silibinin on human hepatoma cell lines" *World Journal of Gastroenterology*, 2007; 13(40): 5299-5305.

Junqueira LC, Carneiro J. Basic Histology 10th Edition. *New York: McGraw Hill Companies Inc*. 2003; 332-44.

Kanematsu M, Semelka RC, Osada S, Amaoka N. Magnetic Resonance Imaging and Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Hepatocellular Nodules in Cirrhosis and Hepatocellular Carcinomas. *Top Magn Reson Imaging* 2005; 16:67–75.

Karatay MC, Katırcıoğlu OS, Sütöğlu Y, Ünal M, Erdamar B, Bilir A. Larenks yassı epitelyum hücreli karsinomunda timidin labelling indeksi. *XIII. Ulusal Otorinolarenoloji ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi*, 1995, Antalya.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer*, 1972; 26:239-57.

Kierszenbaum AL. Histology and Cell Biology. *New York, Mosby Inc.* 2002; 40-45.

Kim K, Moon H, Kim K. Hypoxia-induced angiogenesis in human hepatocellular carcinoma. *J Mol Med.* 2002; 80:703-714.

Koehm S. Bromodeoxyuridine Staining. *St. Luke's Hospital Chesterfield Missouri*, 1997.

Kohno H, Tanaka T, Kawabata K, Hirose Y, Sugie S, Tsuda H and Mori H. Silymain, A Naturally Occurring Polyphenolic Antioxidant Flavonoid, Inhibits Azoxymethane-Induced Colon Carcinogenesis in Male F344 Rats. *Int. J. Cancer*, 2002; 101:461–468.

Kosina P, Maurel P, Ulrichova J, Dvorak Z. Effect of silybin and its glycosides on the expression of cytochromes P450 1A2 and 3A4 in primary cultures of human hepatocytes. *J Biochem Mol Toxicol.* 2005; 19, 149–153, p.

Krammer PH, Behrmann I, Daniel P, Dhein J, Debatin MK. Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr Opin Immunol.* 1994; 6:279-89.

Kren V, Walterova D. Silybin and silymarin-new effects and new applications. *Biomed. Papers*, 2005; 149 (1):29-41.

Kuboki S, Shimizu H, Mitsuhashi N, Kusashio K, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Miyazaki M. Angiopoietin-2 Levels In The Hepatic Vein As A Useful Predictor Of Tumor Invasiveness And Prognosis In Human Hepatocellular Carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008, 23(7): 157-64.

Kuhlmann MK, Horsch E, Burkhardt G, Wagner M, Kohler H. Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by the bioflavonoid quercetin. *Arch Toxicol.* 1998; 72, 536–540, p.

Kuo MT, Savaraj N. Roles of Reactive Oxygen Species in Hepatocarcinogenesis and Drug Resistance Gene Expression in Liver Cancers. *Molecular Carcinogenesis*, 2006; 45:701–709.

Ladas EJ, Kelly KM. Milk thistle: Is there a role for its use as an adjunct therapy in patients with cancer? *J. Alternative and Complementary Med.* 2003; 9: 411–416, p.

Lahiri-Chatterjee M, Katiyar SK, Mohan RR, Agarwal R. A flavonoid antioxidant silymarin affords exceptionally high protection against tumor promotion in the sencar mouse skin tumorigenesis model. *Cancer Res.* 1999; 59, 622–632.

Lambert B, Wiele CV. Treatment of hepatocellular carcinoma by means of radiopharmaceuticals. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2005; 32:980–989.

Lee J, Chu I, Heo J, Calvisi DF, Sun Z, Roskams T, Durnez A, Demetris AJ, Thorgerirsson SS. Classification and Prediction of Survival in Hepatocellular Carcinoma by Gene Expression Profiling. *Hepatology*, 2004; 40:667– 676.

Libbrecht L, Desmet V, Roskams T. Preneoplastic lesions in human hepatocarcinogenesis. *Liver International*, 2005; 25:16–27.

Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular Carcinoma. *Lancet*, 2003; 362:1907–17.

Makuuchi M, Kokudo N, Arii S, et al. Development of evidencebased clinical guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma in Japan. *Hepatology Research*, 2008; 38: 37-51.

Marrero JA. Hepatocellular Carcinoma. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2005; 21:308-312.

Mat A. Türkiye’ de mantar zehirlenmeleri ve *S. marianum* bitkisinin önemi. *Sendrom Dergisi*, 1997; 9. Sayı, 30–34.

McKillop IH, Moran DM, Jin X, Koniaris LG. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *J Surg Res*. 2006; 136(1):125-35.

Medina J, Arroyo AG, S’anchez-Madrid F, Moreno-Otero R. Angiogenesis in Chronic Inflammatory Liver Disease. *Hepatology*, 2004; 39:1185–1195.

Meriçli, AH. Türkiye’nin değişik bölgelerinde yetişen silybum marianum türlerinin meyvelerinin flavonolignan bileşikleri yönünden incelenmesi. *Doğa Bilim Der.* 1984; 8(2):203.

Momeny M, Khorramizadeh MR, Ghaffari SH, Yousefi M, Yekaninejad MS, Esmaeili R, et al. Effects of silibinin on cell growth and invasive properties of a human hepatocellular carcinoma cell line, HepG-2, through inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. *European Journal of Pharmacology*, 2008; 591:13–20.

Moradpour D, Blum HE. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2005, 17:477-483.

Morazzoni P, Bombardelli E. Silybum marianum (Carduus marianus). *Fitoterapia*, 1995; 64:3–42.

Müslümanoğlu M, Bilir A, Özmen V, İğci A, Bozfakıoğlu Y, Dağoğlu T, Parlak M, Keçer M, Ünal M. Meme Karsinomlarında Proliferatif İndeks Olan Tymidine Labeling (TLI): Tümör Çapı Hariç Prognostik Parametrelerden Bağımsız Bir Faktördür. *Meme Kanseri Dergisi*, 1995; 2(4).

Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science*, 1995; 267:1449-55.

Okouneva T, Hill BT, Wilson L and Jordan MA. The effects of vinflunine, vinorelbine, and vinblastine on centromere dynamics. *Mol Cancer Ther.* 2003; 2(5), 427-436.

Onel D, Sarı H, Cengiz A, Bilir A, Anıl D, Erbeni T. Ultrasonun L-Strain Fibroblast Hücre Kültürü Üzerine Etkileri. *İstanbul Tıp Fakültesi Mecmuası*, 1990; 53:19-28.

Orhan DD, Aslan M, Sezik E. Herbal Medicines Used in the Treatment of Liver Diseases. *Cell & Tissue Biology Research*, 2nd International Liver Symposium Isparta/Turkey, 2009; p: 8.

Öktem G, Vatansever S, Ayla S, Uysal A, Aktaş A, Karabulut B ve ark. Effect of apoptosis and response of extracellular matrix proteins after chemotherapy application on human breast cancer cell spheroids. *Oncology Reports*, 2006; 15:335-340.

Özalpan, A. Temel Radyobioloji. İstanbul, *Haliç Üniversitesi Yayınları* 2001; 77-80,90-97, 115-119,196-197.

P Garcí'a-Maceira and J Mateo. Silibinin inhibits hypoxia-inducible factor-1 α and mTOR/p70S6K/4E-BP1 signalling pathway in human cervical and hepatoma cancer cells: implications for anticancer therapy. *Oncogene* 2009; 28:313–324.

Park BC, Huh MH, Seo JH. Differential expression of transforming growth factor alpha and insulin-like growth factor II in chronic active hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 1995; 22:286-94.

Poon RT, Lau C, Pang R, Ng KK, Yuen J, Fan ST. High serum vascular endothelial growth factor levels predict poor prognosis after radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: importance of tumor biomarker in ablative therapies. *Ann Surg Oncol.* 2007; 14(6):1835-45.

Qin L, Tang Z. Hepatocellular carcinoma with obstructive jaundice: diagnosis, treatment and prognosis. *World J Gastroenterol*, 2003; 9(3):385-391.

Qin L, Tang Z. Recent progress in predictive biomarkers for metastatic recurrence of human hepatocellular carcinoma: a review of the literature. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2004;130: 497–513.

Ramakrishnan G, Lo Muzio L, Elinos-Báez CM, Jagan S, Augustine TA, Kamaraj S. Silymarin inhibited proliferation and induced apoptosis in hepatic cancer cells. *Cell Prolif.* 2009; 42:229–240

Ratcliffe PJ, O'rourke JF, Maxwell PH, Pugh CW. Oxygen Sensing, Hypoxia-Inducible Factor-1 And The Regulation Of Mammalian Gene Expression. *Journal of Experimental Biology*, 1998; 201:1153–1162.

Saller R, Meier R, Brignoli R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs*, 2001; 61(14):2035-2063.

Sanchez-Sampedro MA, Pelaez R, Corchete P. An Arabinogalactan Protein Isolated from Medium of Cell Suspensions Cultures of *Silybum marianum* Gaertn. *Carbohydrate Polymers*, 2008; 71:634-638.

Santini MT, Gabriella R. Three-Dimensional Spheroid Model in Tumor Biology. *Pathobiology*, 1999; 67:148

Sanz-Cameno P, Martin-Vilchez S, Lara-Pezzi E, Borque MJ, Salmeron J, Munoz de Rueda P, Solis JA, Lopez-Cabrera M, Moreno-Otero R. Hepatitis B virus promotes angiopoietin-2 expression in liver tissue: role of HBV x protein. *Am J Pathol.* 2006; 169(4):1215-22.

Scaffidi C, Kirchhoff S, Krammer PH, Peter ME. Apoptosis Signaling in Lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* 1999; 11:277-85.

Schutte B, Reinders MMJ, Van Assche CLMVJ, Hupperest PSGJ, Bomsan FT, Blijham GH. An Improved Method for the Immunocytochemical Detection of Bromodeoxyuridine Labeled Nuclei using Flow Cytometry. *Cytometry*, 1987; 8:372-376.

Seitz HK, Stickel F. Risk factors and mechanisms of hepatocarcinogenesis with special emphasis on alcohol and oxidative stress. *Biol Chem.* 2006; 387(4):349-60.

Simanek V, Kren V, Ulrichova J, Vicar J, Cvak L. Silymarin: What is in the name? *Hepatology*, 2000; 32:442–443.

Simanek V, Walterova D, Vicar J, Urbanikova J, Kren V, Modrianskí M, Skottova N, Ulrichova J. Silymarin, extract from the milk thistle (*Silybum marianum*) – medicine or a nutraceuticals? *Ceska a Slovenska Farmacie*, 2001; 50:66–69.

Singh RP, Mallikarjuna GU, Sharma G, et al. Oralsilibinin inhibits lung tumor growth in athymic nude mice and forms a novel chemocombination with doxorubicin

targeting nuclear factor κ B-mediated inducible chemoresistance. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 8641-7.

Singh RP, Tyangi AK, Zhao J, Agarwal R. Silymarin inhibits growth and causes regression of established skin tumors in SENCAR mice *via* modulation of mitogen-activated protein kinases and induction of apoptosis, *Carcinogenesis*, 2002; 23:499–510.

Syng-Ook Lee, Yun-Jeong Jeong, Hyo Gwon Im, Cheorl-Ho Kim, Young-Chae Chang, In-Seon Lee. Silibinin suppresses PMA-induced MMP-9 expression by blocking the AP-1 activation via MAPK signaling pathways in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007; 354:165–171

Sonnenbichler J, Scalera F, Sonnenbichler I, Weyhenmeyer R. Stimulatory Effect of Silibinin and Silicristin from the Milk Thistle *Silybum marianum* on Kidney cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1999; 290:1375-1385.

Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annual Review of Biochemistry*, 2000; 69:217-45.

Studzinski G.P. Cell Growth and Apoptosis. *IRL Oxford University Pres. Oxford*, 1994; 7-18

Sun H,Tang Z. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma: the retrospectives and perspectives. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2004; 130:307–319.

Szyszkowa T, AL-Nahhasa A, Canelob R, Habib N, Jiaob L, Wasanc H, Pagoua M, Taitd P. Assessment of response to treatment of unresectable liver tumours with 90Y microspheres: Value of FDG PET versus computed tomography. *Nucl Med Commun.* 2007; 28:15–20.

Tanaka S, Arii S. Current status and perspective of antiangiogenic therapy for cancer: hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Oncol.* 2006; 11:82–89.

Tanker M, Tanker N. Farmakognozi. Cilt I. *Ankara Üniv. Ecz. Fak. Yayınları* No:58, Ankara, 2003; 213-214.

Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M. Farmasötik Botanik Ders Kitabı, *Ankara Üniv. Ecz. Fak. Yayınları.* 2007; 324.

Thelen P, Jarry H, Ringert RH, Wuttke W. Silibinin downregulates prostate epithelium-derived Ets transcription factor in LNCaP prostate cancer cells. *Planta Med.* 2004; 70, 397–400, p.

Thorgeirson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 2002; 31:339-346.

Thorgeirson SS, Lee J, Grisham JW. Molecular prognostication of liver cancer: End of beginning. *J Hep.* 2006; 44:798-805.

Thorgeirsson SS, Lee J, Grisham JW. Functional Genomics of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, 2006; 43:145-150.

Thorngerry NA. The caspase family of cystein proteases. *Br Med Bull.* 1997; 53:478-90.

Toshikazu H, Zitsch RP, Gluckman JL. Cell Kinetics Study of Upper Aerodigestive Tract Squamous Cell Carcinoma using Bromodeoxyuridine. *Ann Otol. Rhinol Laringol*, 1993; 102.

Toylu A. Hepatosellüler Karsinoma Hücre Dizilerinde Hipoksi ve Radyasyon Stresine Karsı Hücrenin Direnç Geliştirmesinde HGF Sinyal İletim Sisteminin

Rolünün Belirlenmesi. Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İzmir, 2007.

Tyagi A, Agarwal C, Harrison G, Glode LM, Agarwal R. Silibinin causes cell cycle arrest and apoptosis in human bladder transitional cell carcinoma cells by regulating CDKI-CDK-cyclin cascade, and caspase 3 and PARP cleavages. *Carcinogenesis* 2004; 25:1711-20.

Tyagi AK, Agarwal C, Chan DCF, Agarwal R. Synergistic anti-cancer effects of silibinin with conventional cytotoxic agents doxorubicin, cisplatin and carboplatin against human breast carcinoma MCF-7 and MDA-MB468 cells. *Oncol Rep* 2003; 11:493-499.

Uçar F, Ovalı E. Hücre Kültüründe Temel İlkeler. *Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri Kursu*. Isparta: 19-21 Haziran, 2003: 1-9.

Ünal M, Bilir A, Karatay MC. Larenks Epidermoid Karsinomunda Cisplatin ve 5-Fluorourasil Duyarlılığının Timidin İşaretleme İndeksi ile Araştırılması: Ön Çalışma. *Kulak Burun Boğaz İhtisas Dergisi*, 2000; 7(2): 130-133.

Valenzuela A, Aspillaga M, Vial S, Guerra R. Selectivity of silymarin on the increase of the glutathione content in different tissues of the rat. *Planta Med*. 1989; 55:420-422.

Varghese L, Agarwal C, Tyagi A, Singh RP and Agarwal R. Silibinin Efficacy against Human Hepatocellular Carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2005; 11(23):8441-8448.

Varghese L, Agarwal C, Tyagi A, Singh RP and Agarwal R. Silibinin induces cell cycle arrest in human hepatocellular carcinoma HepG2 and Hep3B cells by modulating cyclin-cyclin dependant kinase-cyclin dependant kinase inhibitor levels and activity. *Proc Amer Assoc Cancer Res*, , 2005; 46.

Villa E, Colantoni A, Cammà C, Grottola A, Buttafoco P, Gelmini R, Ferretti I, Manenti F. Estrogen receptor classification for hepatocellular carcinoma: comparison with clinical staging systems. *J Clin Oncol*. 2003; 21(3):441-6.

Vinh PQ, Sugie S, Tanaka T, Hara A, Yamada Y, Katayama M, Deguchi T, Mori H. Chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin on *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Jpn J Cancer Res*. 2002; 93:42-49.

Von Marschall Z, Cramer T, Höcker M, Finkenzeller G, Wiedenmann B, Rosewicz S. Dual mechanism of vascular endothelial growth factor upregulation by hypoxia in human hepatocellular carcinoma. *Gut*, 2001; 48:87-96.

Wada H, Nagano H, Yamamoto H, Yang Y, Kondo M, Ota H, Nakamura M, Yoshioka S, Kato H, Damdinsuren B, Tang D, Marubashi S, Miyamoto A, Takeda Y, Umeshita K, Nakamori S, Sakon M, Dono K, Wakasa K, Monden M. Expression pattern of angiogenic factors and prognosis after hepatic resection in hepatocellular carcinoma: importance of angiopoietin-2 and hypoxia-induced factor-1a. *Liver International*, 2006; 26: 414-423.

Waldman F, Chew K, Ljung B.M, Goodson W, Hom J, Duarte L.A, Smith H.S, Mayall B. A Comparison between Bromodeoxyuridine and 3H Thymidine Labeling in Human Breast Tumors. *Modern Pathology*, 1991; 4(6): 718.

Walker JM. Basic Cell Culture Protocols. *Human Pres. New Jersey* 1997.

Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proceedings of The National Academy of Science of The United States of America (PNAS)*, 2001; 98:13884-8. Wyllie A. A tidy death. *Odyssey*, 1998; 4:47-52.

Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull*. 1997; 53:451-65.

Wong N, Lai P, Pang E, Fung LF, Sheng Z, Wong V, Wang W, Hayashi Y, Perlman E, Yuna S, Lau JWY, Johnson PJ, Genomic aberrations in human hepatocellular carcinomas of differing etiologies. *Clinical Cancer Research*, 2000; 6:4000–4009.

Yazıcı O, Bahar K. Hepatosellüler Karsinomda Yeni Tanı ve Tedavi Yöntemleri. *Güncel Gastroenteroloji*, 2008; 12(1); 47-52.

Yoshitame Y, Hiroyuki K, Koujiro Y, Yoshinobu Y, Hisdeki M and Tajuki t. Dietary Silymarin Suppresses–Nitroquinoline 1-Oxide-Induced Tongue Carcinogenesis in Male F344 Rats. *Carcinogenesis*, 2002; 23(5):787-794.

Zhao J, Lahiri-Chatterjee M, Sharma Y, Agarwal R. Inhibitory effect of a flavonoid antioxidant silymarin on benzoyl peroxide-induced tumor promotion, oxidative stress and inflammatory responses in SENCAR Mouse skin. *Carcinogenesis*, 2000; 21:811-816.

Zhou J, Schmid T, Schnitzer S, Brune B. Tumor hypoxia and cancer progression. *Cancer Letters*, 2006; 237: 10-21.

Zhu W, Zhang JS, Young YF. Silymarin inhibits function of the androgen receptor by reducing nuclear localization of the receptor in the human prostate cancer cell line LNCaP. *Carcinogenesis*, 2001; 22:1399–1403.

Zi X, Feyes DK, Agarwal R. Anti-carcinogenic effect of a flavonoid antioxidant silymarin in human breast cancer cells MDA-MB 468: induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of CDKs and associated cyclins. *Clin Cancer Res*. 1998; 4:1055-64.

Zi X, Grasso AW, Kung H-J, Agarwal R. A flavonoid antioxidant Silibinin inhibits activation of erbB1 signaling, and induces cyclin-dependent kinase inhibitors, G1 arrest and anti-carcinogenic effects in human prostate carcinoma DU145 cells. *Cancer Res*. 1998; 58:1920-9.

Zi X, Agarwal R. Silibinin decreases prostate-specific antigen with cell growth inhibition via G1 arrest, leading to differentiation of prostate carcinoma cells: implications for prostate cancer intervention. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:7490–7495.

ÖZGEÇMİŞ

Dilek BAYRAM

TC Kimlik No: 31897768964

Doğum Yılı: 03.04.1979

Eğitim Bilgileri

Lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (1998–2002)

Yüksek Lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D. (2002–2005)

Doktora: Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D. (2005–2010)

Uzmanlık Alanları

Sağlık Bilimleri, Toksikoloji, Karaciğer Toksikolojisi, Hücre Kültürü, Karaciğer Hücre Kültürü

Yayımları

Hakemli Dergilerde Yayımlanan Teknik Not, Editöre Mektup, Tartışma, Vaka Takdimi Ve Özet Türünden Yayınlar Dışındaki Makale

- 1.Ural M, Özgüner M, Senal D, Sütçü R, Delibas N, "Siklosporin A'nın sıçanlarda oluşturduğu nefrotoksisiteye Vitamin C ile Vitamin E'nin ve verapamilin etkilerinin ışık mikroskopunda değerlendirilmesi Süleyman Demirel üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 12(4)/ 28-35 2005
- 2.Gökçimen A, Özgüner M, Bayram D, Ural M, Sulak O, "Metamizol sodyumun sıçan karaciğer, böbrek ve akciğer dokuları üzerine etkisi", Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 13(1)/27-31 (2006).

**Sci, Ssci Ve Ahcı Tarafından Taranan Dergilerde Yayımlanan Teknik Not,
Editöre Mektup, Tartışma, Vaka Takdimi Ve Özet Türünden Yayınlar
Dışındaki Makale**

1. Koyu A , Gokcimen A, Ozguner F, Bayram DS and Kocak A "Evaluation of the effects of cadmium on rat liver" Molecular and Cellular Biochemistry. 2006.
2. Gokcimen A, Kocak A, Kilbas S, Bayram D, Kilbas A, Cim A, Kockar C and Kutluhan S "Effect of lisinopril on rat liver tissues in L-NAME induced hypertension model" Molecular and Cellular Biochemistry, 2007
3. A Gokcimen, A Cim, HT Tola, D Bayram, A Kocak, F Özgüner and A Ayata "Protective effect of N-acetylcysteine, caffeic acid and vitamin E on doxorubicin hepatotoxicity" Human & Experimental Toxicology (2007) 00: 1–7
4. Gokcimena A, Gullea K, Demirinb H, Bayram D, Kocak A, Altuntas I, "Effects of diazinon at different doses on rat liver and pancreas tissues" Pesticide Biochemistry and Physiology, 2007.
5. Ozer MK, Asci H, Oncu M, Yesilot S, Savran M, Bayram D, Cicek E. "Effects of pentoxifylline on amikacin-induced nephrotoxicity in rats". Ren Fail. 2009;31(2):134-9.
6. Gençel O, Naziroglu M, Celik O, Yalman K, Bayram D."Selenium and Vitamin E Modulates Radiation-Induced Liver Toxicity in Pregnant and Nonpregnant Rat: Effects of Colemanite and Hematite Shielding"Biol Trace Elem Res.2009, 12011-009-8513-8.
7. Yesilot S, Ozer MK, Bayram D, Oncu M, Karabacak HI, Cicek E."Effects of Aspirin and Nimesulide on tissue damage in diabetic rats". Cytokine, 2010, 52:163–167
8. Koçkar MC, Nazıroğlu M, Celik O, Tola HT, Bayram D, Koyu A."N-acetylcysteine modulates doxorubicin-induced oxidative stress and

antioxidant vitamin concentrations in liver of rats." Cell Biochem Funct 2010; 28: 673–677.

Ulusal Toplantıda Sunularak Özet Metin Olarak Yayımlanan Bildiri

1. Şenal D, Ural M, Gökçimen A, Koçak A, Özgüner M, "Farklı toksik dozlarda metamizol sodyumun sıçan karaciğeri üzerine yaptığı yapısal değişiklikler", I. Uluslararası Katılımlı Karaciğer Sempozyumu s:40, 21-22 Nisan 2004
2. Gevrek, F., M. Öncü, K. Gülle, O. Gökalp, D. Şenal, E. Karaöz, "Normotansif ve Hipertansif Sıçan Böbrek Dokularında Leptin (Ob-Protein)'İN İmmünohistokimyasal Olarak Tanımlanması" (VII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi s:51 18-21 Mayıs 2004, Mersin, Türkiye)
3. Gökçimen A, Özgüner M, Şenal D, Ural M, Sulak O, "Metamizol sodyumun sıçan dokuları üzerine etkisi" I. Uluslararası Katılımlı Karaciğer Sempozyumu S:31 21-22 Nisan 2004, Isparta, Türkiye)
4. Senal D. "1998-2003 Yılları Arasında Ülkemizde Yapılan Karaciğer Çalışmaları" (I. Uluslararası Katılımlı Karaciğer Sempozyumu 21-22 Nisan 2004, Isparta, Türkiye)
5. Gökçimen A, Çim A, Tola HT, Bayram D, Koçak A, Özgüner F, Ayata A, "Doksozobisine bağlı karaciğer toksisitesinde N-asetil sistein, kafeik asit fenetil ester ve vitamin-E'nin koruyucu etkilerinin karşılaştırılması", VIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi s:244 27-30 Haziran 2006 Malatya, Türkiye)
6. Bayram D, Öncü M, Özçelik N, Yılmaz HR, Uz E, Gökçimen A", Sıçan karaciğer üzerine tiyopental sodyum ve propofolün etkilerinin incelenmesi", VIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi s:246 27-30 Haziran 2006, Malatya, Türkiye)

7. Bayram D, Ulusoy D, Öncü M, Gökçimen A, Darıcı H, "Midazolamın karaciğerde yaptığı hasara karşı karnitinin koruyucu etkisi", VIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi s:248 27-30 Haziran 2006, Malatya, Türkiye)
8. M. Öncü, D.Bayram, E. Uz, H.R. Yılmaz, A.Altunbaşak, A.Koçak. 'Sıçan karaciğeri üzerine midazolam ve etomidat'ın etkilerinin histolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirilmesi', VIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi s:197 27-30 Haziran 2006, Malatya, Türkiye)
9. Gökçimen A, Gökalp O, Gülle K, Altuntaş İ, Bayram D, Koçak A, Demirin H, "Değişik Dozlardaki Diazinonun Pankreas Ve Karaciğere Etkisi" VIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi s:252 27-30 Haziran 2006, Malatya, Türkiye)
10. Gökçimen A, Koçak A, Kılbaş S, Bayram D, Kılbaş A, Çim A, Koçkar C, Kutluhan S, "Lizinoprilin L-NAME Uygulanan Karaciğer Dokusu Üzerine Etkisi" VIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi S:249 27-30 Haziran 2006, Malatya, Türkiye)
11. Bayram D, Koçak A, Gökçimen A, Altuntaş A, Yılmaz HR. "Effect of caffeic acid phenylethyl ester on small intestinal tissues of rats treated with amphotericin-B" 9th National Histology and Embryology p:52 20 to 23 May 2008, Adana, Türkiye.
12. Karatopuk DU, Gökçimen A, Bayram D, Koçak A. "The effects of tenoxicam on kidney tissues". 9th National Histology and Embryology p:60 20 to 23 May 2008, Adana, Türkiye.)
13. Özer MK, Aşçı H, Öncü M, Yeşilot Ş, Savran M, Bayram D, Çiçek E. "Effects of pentoxifylline on amikacin-induced nephrotoxicity in rat kidney tissue". 9th National Histology and Embryology p:60 20 to 23 May 2008, Adana, Türkiye.

Uluslararası Toplantıda Sunularak Özet Metin Olarak Yayımlanan Bildiri

1. Bayram D, Karatopuk D, Kocak A, Candan A, Gokcimen A, Ozgocmen M, "Determination of Lethal Dose of Tenoxicam: A Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug" 2nd International Liver Symposium p.44 20-22 May 2009, Isparta
2. Bayram D, Candan A, Karatopuk D, Gokcimen A, Kocak A, Fedakar O, Birden B, "Effect of Slybium marianum Plant Extract on Liver Damage Induced by Different Doses of Acetaminophen". 2nd Intenational Liver Symposium, p:44 20-22 May 2009, Isparta
3. Gumral N, Bayram D, Kocak A, Gokcimen A, Doguc D, Ozguner F, Soydan M. "Investigation of the Effect of Electromagnetic Field at 2,45 GHz on Rat Liver Tissue and Protection by Selenium and L-Carnitine" 2nd International Liver Symposium, p:46, 20-22 May 2009, Isparta, Turkey

Ulusal Kuruluşlarca Desteklenen Projede Görev Alma

- 1.Sıçan Karaciğeri Üzerine Tiopental Sodyum, Propofol, Etomidate ve Midazolam İsimli Anestezik Maddelerin Etkisinin Işık Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi. SDÜ BAP, Proje No:YL-881

Uluslararası Sempozyum, Kongre, Kurs (Workshop) Düzenlenmesi Gibi Etkinliklerde Görev Almak

- 1.2nd International Liver Symposium (20-22 May 2009, ISPARTA)

Ulusal Sempozyum, Kongre, Kurs (Workshop) Düzenlenmesi Gibi Etkinliklerde Görev Almak

- 1.Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri Kursu
- 2.I. Uluslar Arası Katılımlı Karaciğer Sempozyumu
- 3.VI. Stereolojik Metotlar Ve Uygulamaları Kursu

Alanında Ulusal Bilimsel Nitelikli Ödöl (Kongre, Sempozyum Ve Bildiri Ödülleri Hariç)

- 1.Uluslararası Bilimsel Yayınları Teşvik Programı Ödülü, TÜBİTAK, 2006
Ahmet Koyu, Alpaslan Gokcimen, Fehmi Ozguner, Dilek Senal Bayram and Ahmet Kocak. Evaluation of the effects of cadmium on rat liver. Molecular and Cellular Biochemistry, 284(1-2):81-5

Yüksek Lisans Tezi

- 1.Sıçan Karaciğeri Üzerine Tiopental Sodyum, Propofol, Etomidate ve Midazolam İsimli Anestezik Maddelerin Etkisinin Işık Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi

Üye Olunan Bilimsel Kuruluş

- 1.Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği
- 2.Stereoloji Derneği
- 3.Karaciğer Derneği