

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANA BİLİM DALI



**SİLİBİNİN MOLEKÜLÜNÜN HİDROJEN PEROKSİT (H₂O₂)
UYARILI U-2 OS HÜCRELERİ ÜZERİNE ANTİOKSİDAN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kübra GÜNDÜZ

Danışman

Doç. Dr. Meral URHAN KÜÇÜK

HATAY-2018

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANA BİLİM DALI

**SİLİBİNİN MOLEKÜLÜNÜN HİDROJEN PEROKSİT (H₂O₂)
UYARILI U-2 OS HÜCRELERİ ÜZERİNE ANTİOKSİDAN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kübra GÜNDÜZ

Danışman

Doç. Dr. Meral URHAN KÜÇÜK

HATAY-2018

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMALÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANA BİLİM DALI

**SİLİBİNİN MOLEKÜLÜNÜN HİDROJEN PEROKSİT (H₂O₂)
UYARILI U-2 OS HÜCRELERİ ÜZERİNE ANTİOKSİDAN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi
Kübra GÜNDÜZ

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 16.08.2018 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri Başkanı: Prof. Dr. Abdullah ARPACI

Üye: Doç. Dr. Meral URHAN KÜÇÜK

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Muhittin ÖNDERCI

Bu tez, Enstitümüz Tıp Moleküler Biyokimya ve Genetik Ana Bilim Dalında hazırlanmıştır.

16.08.2018

Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamın planlanması ve yürütülmesinde ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren değerli danışman hocam Doç. Dr. Meral URHAN KÜÇÜK'e,

Tezimin laboratuvar aőamasında bana yardımcı olan ve her zaman desteğini hissettiğim Arő. Gör. Dr. Hasret ECEVİT'e, yardımlarından dolayı yüksek lisans öğrencileri Kübra ERKOÇ ve Nilüfer BİLGİ'e,

Hayatıma yön vermemi sağlayan ve hayalim olan bu yolda beni koőulsuz ve sabırla destekleyen canım babam İhsan GÜNDÜZ'e, canım annem Hanife GÜNDÜZ'e ve kardeőlerim Mustafa, Merve, Seher ve Bilgenur'a

Sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

| | |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| Kabul ve Onay | II |
| TEŞEKKÜR..... | III |
| İÇİNDEKİLER | IV |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | VI |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | VII |
| SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ | VIII |
| ÖZET | X |
| ABSTRACT..... | XI |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. <i>Silybum marianum</i> L. Gaertn. (Devedikeni)..... | 3 |
| 2.1.1. Silibininin Yapısı ve Kimyası..... | 4 |
| 2.2. Flavonoidler ve Flavolignanlar | 5 |
| 2.2.1. Flavonoidlerin Biyolojik Aktiviteleri | 7 |
| 2.2.1.1. Antioksidan Aktivite..... | 7 |
| 2.2.1.2. Oksidatif Stresle Mücadele | 8 |
| 2.3. Silibinin ve Oksidatif Stres | 8 |
| 2.4. Reaktif Oksijen Türleri ve Serbest Radikaller | 9 |
| 2.4.1. Reaktif Oksijen Türleri Kaynakları | 9 |
| 2.4.2. Reaktif Oksijen Türleri ve Özellikleri | 12 |
| 2.4.2.1. Süperoksit Radikali (O_2^-) | 12 |
| 2.4.2.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)..... | 13 |
| 2.4.2.3. Hidroksil Radikali ($OH\cdot$)..... | 13 |
| 2.5. Oksidatif Stresin Neden Olduğu Hücre Hasar Mekanizmaları..... | 14 |
| 2.5.1. Lipidlerde Hasar | 14 |
| 2.5.2. Proteinlerde Hasar..... | 14 |
| 2.5.3. Nükleik Asitler ve DNA Üzerinde Hasar | 15 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.6. Antioksidan Savunma Sistemleri..... | 15 |
| 2.6.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) | 15 |
| 2.6.2. Katalaz (CAT)..... | 16 |
| 2.6.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx) | 16 |
| 2.7. Kanser | 17 |
| 2.8. Kas ve İskelet Sistemi Tümörleri..... | 18 |
| 2.8.1. Osteosarkom (OS)..... | 19 |
| 2.9. Kanser ve Oksidatif Stres | 20 |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM | 22 |
| 3.1. GEREÇ | 22 |
| 3.1.1. U-2 OS Hücre Hattı | 22 |
| 3.1.2. Kimyasallar | 22 |
| 3.1.3. Cihazlar | 23 |
| 3.2. YÖNTEM | 24 |
| 3.2.1. U-2 OS Hücre Kültürü..... | 24 |
| 3.2.2. H ₂ O ₂ ve Silibinin Süspansiyonlarının Hazırlanması | 25 |
| 3.2.3. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi..... | 25 |
| 3.2.4. Oksidatif Stres Parametre Analizleri | 26 |
| 3.2.4.1. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi..... | 26 |
| 3.2.4.2. Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Belirlenmesi | 28 |
| 3.2.5. İstatistiksel Analiz..... | 29 |
| 4. BULGULAR..... | 31 |
| 4.1. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi..... | 31 |
| 4.2. Katalaz Enzim Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesi | 33 |
| 4.3. MDA Düzeylerinin Belirlenmesi | 36 |
| 5. TARTIŞMA | 40 |
| 6. SONUÇ..... | 44 |
| 7. KAYNAKLAR | 45 |
| ÖZGEÇMİŞ | 50 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | Sayfa No |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Şekil 2. 1. <i>Silybum marianum</i> L | 3 |
| Şekil 2. 2. Silibininin kimyasal yapısı | 5 |
| Şekil 2. 3. Flavonoidler | 6 |
| Şekil 2. 4. Serbest radikallerin intrasellüler oluşum yolları | 11 |
| Şekil 3. 1. U-2 OS hücre morfolojisi | 24 |
| Şekil 3. 2. MDA standart eğri grafiği | 29 |
| Şekil 4. 1. U-2 OS hücrelerinde 24 saatlik H ₂ O ₂ maruziyeti sonucu hücre canlılığının değerlendirilmesi | 31 |
| Şekil 4. 2. U-2 OS hücrelerinde 48 saatlik H ₂ O ₂ maruziyeti sonucu hücre canlılığının değerlendirilmesi | 32 |
| Şekil 4. 3. U-2 OS hücrelerinde 24 saatlik silibinin maruziyeti sonucu hücre canlılığının değerlendirilmesi | 33 |
| Şekil 4. 4. U-2 OS hücrelerinde 500 µM H ₂ O ₂ maruziyeti sonucu katalaz enzim aktivite düzeyleri | 34 |
| Şekil 4. 5. U-2 OS hücrelerinde 650 µM H ₂ O ₂ maruziyeti sonucu katalaz enzim aktivite düzeyleri | 35 |
| Şekil 4. 6. U-2 OS hücrelerinde 500 µM H ₂ O ₂ maruziyeti sonucu MDA düzeyleri | 37 |
| Şekil 4. 7. U-2 OS hücrelerinde 650 µM H ₂ O ₂ maruziyeti sonucu MDA düzeyleri | 38 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | Sayfa No |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Çizelge 2. 1. Kas ve iskelet sistemi tümörlerinde histopatolojik sınıflandırma | 18 |
| Çizelge 3. 1. Kimyasallar..... | 22 |
| Çizelge 3. 2. Cihazlar..... | 23 |
| Çizelge 4. 1. U-2 OS hücrelerinde 500 µM H ₂ O ₂ maruziyeti sonucu katalaz enzim aktivite düzeyleri | 34 |
| Çizelge 4. 2. U-2 OS hücrelerinde 650 µM H ₂ O ₂ maruziyeti sonucu katalaz enzim aktivite düzeyleri | 36 |
| Çizelge 4. 3. U-2 OS hücrelerinde 500 µM H ₂ O ₂ maruziyeti sonucu MDA düzeyleri | 37 |
| Çizelge 4. 4. U-2 OS hücrelerinde 650 µM H ₂ O ₂ maruziyeti sonucu MDA düzeyleri | 39 |

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------|
| CAT | : Katalaz |
| Cu | : Bakır |
| DMEM | : Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMF | : Dimetilformamid |
| DMSO | : Dimetil sülfoksit |
| EtOH | : Etanol |
| FCS | : Fetal Calf Serum |
| Fe | : Demir |
| Fl-OH | : Flavonoid |
| GSH | : Glutasyon |
| GSSG | : Glutasyon disülfid |
| HBSS | : Hank's Balanced Salt Solution |
| HCl | : Hidroklarik asit |
| M | : Molar |
| MDA | : Malondialdehit |
| MeOH | : Metanol |
| mL | : Mililitre |
| mM | : Milimolar |
| Mn | : Manganez |
| MTT | : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide |
| NADH | : Nikotinamid adenin dinükleotit |
| nM | : Nanomolar |
| NO | : Nitrik oksit |
| OH· | : Hidroksil radikali |
| OS | : Osteosarkom |
| O ₂ ⁻ | : Süperoksit radikali |

| | |
|---------------|---------------------------|
| ROS | : Reaktif oksijen türleri |
| SDS | : Sodyum dodesil sülfat |
| Se-OH | : Selenol |
| SOD | : Süperoksit dismutaz |
| TBA | : Tiobarbütirik asit |
| TEP | : Tetraetoksipropan |
| THF | : Tetrahidrofuran |
| WHO | : Dünya sağlık örgütü |
| XO | : Ksantin oksidaz |
| μL | : Mikrolitre |
| μM | : Mikromolar |

ÖZET

Silibinin Molekülünün Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Uyarılı U-2 OS Hücreleri Üzerine Antioksidan Etkisinin Araştırılması

Silibinin, *Silybum marianum* L. (devedikeni) bitkisinin tohumlarında bulunan bileşenlerden biridir. Silibininin anti-oksidan, anti-inflamatuar, anti-apoptotik ve anti-karsinojenik etkilerini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan birçok çalışmada, bu maddenin çeşitli kanser türlerine karşı etkileri gösterilmiştir. Ancak silibininin, kemik kanseri üzerine anti-oksidan etkileri araştırılmamıştır.

Çalışmamızda silibinin maddesinin, U-2 OS hücre proliferasyonu ve oksidatif stres parametrelerinden katalaz ve MDA üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık. Bu doğrultuda, U-2 OS hücreleri farklı dozlarda ve sürelerde H₂O₂ (24 ve 48 saat süreyle 0-800 µM dozlarda) ve silibinin maddesine (24 saat süreyle 0-100 µM dozlarda) maruz bırakıldı. Oksidatif stresli model için, H₂O₂'nin uygun maruziyet dozu ve süresi (24 saat süreyle 500 ve 650 µM dozlarda), MTT yöntemi ile belirlendi. U-2 OS hücreleri, 0-100 µM dozlarda 24 saat süresince silibinin maddesine maruz bırakıldıktan sonra hücre canlılığı MTT yöntemi ile değerlendirildi. Ayrıca, U-2 OS hücreleri 24 saat boyunca H₂O₂ (500 ve 650 µM), silibinin (5 ve 10 µM) ve H₂O₂+silibinin (500 µM H₂O₂+ 5µM silibinin, 500 µM H₂O₂+10 µM silibinin, 650 µM H₂O₂+5 µM silibinin ve 650 µM H₂O₂+10 µM silibinin)'e maruz bırakılarak katalaz enzim aktivitesi ve MDA düzeyi spektrofotometrik yöntem ile belirlendi.

Kontrol grubu (0 µM H₂O₂), 500 ve 650 µM H₂O₂ maruziyet grupları ile karşılaştırıldığında, katalaz enzim aktivitesinin maruziyet yapılan gruplarda anlamlı olarak daha yüksek olduğu gözlemlendi (sırasıyla p=0.034, p=0.021). Bununla birlikte, katalaz enzim aktivitesinin 500 µM H₂O₂+10 µM silibinin grubunda, 500 µM H₂O₂ grubuyla kıyaslandığında anlamlı olarak daha düşük olduğu gözlemlendi (p=0.05). Kontrol grubu (0 µM H₂O₂), 500 ve 650 µM H₂O₂ maruziyet grupları ile karşılaştırıldığında, MDA düzeyinin maruziyet yapılan gruplarda anlamlı olarak daha yüksek olduğu gözlemlendi (p=0.05). Bununla birlikte, katalaz enzim aktivitesinin 650 µM H₂O₂+10 µM silibinin grubunda, 650 µM H₂O₂ grubuyla kıyaslandığında anlamlı olarak daha düşük olduğu gözlemlendi (p=0.05).

Sonuç olarak çalışmamızda, silibinin molekülünün U-2 OS hücrelerinde anti-proliferatif etkisinin olduğu ve doza bağımlı olarak katalaz enzim aktivitesi ve MDA düzeylerini azalttığı gözlemlendi.

Anahtar Kelime: Silibinin, Antioksidan etki, U-2 OS hücre hattı, Oksidatif stres

ABSTRACT

Investigation of Antioxidant Effect of Silibinin Molecule on U-2 OS Cells Induced by Hydrogen Peroxide (H₂O₂)

Silibinin is one of the compounds found in *Silybum marianum* L. (thistle) seed. There are many studies indicating the anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic and anti-carcinogenic effects of silibinin. In recent years, many studies have shown the effect of this substance against various types of cancer. However, anti-oxidant effects of silibinin on bone cancer have not been investigated.

In our study, we aimed to investigate the effects of silibinin on cell proliferation and oxidative stress parameters catalase and MDA in U-2 OS cells. For this purpose, the U-2 OS cells were exposed to H₂O₂ (0-800 μM for 24 and 48 hour time periods) and silibinin (0-100 μM for 24 hours) at different doses and time periods. The suitable time period and treatment dose of H₂O₂ for oxidative stressed model was determined by MTT method. After exposing U-2 OS cells with silibinin at 0-100 μM doses for 24 hours, cell viability was evaluated with MTT assay. U-2 OS cells exposed to H₂O₂ (500 and 650 μM), silibinin (5 and 10 μM) and H₂O₂+silibinin (500 μM H₂O₂+5 μM silibinin, 500 μM H₂O₂+10 μM silibinin, 650 μM H₂O₂+5 μM silibinin and 650 μM H₂O₂+10 μM silibinin) together at different doses for 24 hours. MDA level and catalase enzyme activity were determined by spectrophotometric method.

When control group (0 μM H₂O₂) compared with 500 and 650 μM H₂O₂ treatment groups, catalase enzyme activity was found to be significantly higher in treatment groups (p=0.034 and p=0.021, respectively). However, catalase enzyme activity was significantly lower in 500 μM H₂O₂+10 μM silibinin group compared to 500 μM H₂O₂ (p=0.05). When control group (0 μM H₂O₂) compared with 500 and 650 μM H₂O₂ treatment groups, MDA level was significantly higher in treatment groups (p=0.05). However, MDA level was significantly lower in 650 μM H₂O₂+10 μM silibinin group when compared with 650 μM H₂O₂ treatment group (p=0.05).

In conclusion, silibinin molecule was observed to have anti-proliferative effect and decrease the catalase enzyme activity and MDA levels in dose-dependent manner in U-2 OS cells.

Key words: Silibinin, Antioxidant effect, U-2 OS cell line, Oxidative stress

1. GİRİŞ

Silibinin, *Silybum marianum* L. (devedikeni) bitkisinden izole edilen bir bileşiktir (Zhao ve Agarwal 1999). *Silybum marianum* L.' nin tohumlarında bol miktarda silibinin, silidianin ve silikristin olarak birden çok flavonolignan izomerinin karışımından oluşmuş kompleks bir yapı olan silimarin bulunur. Silimarinin ana maddesi olan silibinin, silimarinde yaklaşık olarak % 50-70 oranında bulunur. *Silybum marianum* L. bitkisinin tohumundan elde edilen silibinin maddesinin anti-oksidan, anti-inflamatuar, anti-apoptotik, anti-karsinojenik, anti-viral, anti-fibrotik ve anti-anjiojenik etkilerinin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Singh ve Agarwal 2005, Deep ve ark. 2006, Deep ve Agarwal 2010).

Normal hücrelerde, süperoksit anyonları (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve yüksek reaktif hidroksil radikali (OH \cdot) içeren reaktif oksijen türleri (ROS), hücrel metabolizmanın yan ürünleri olarak üretilir ve biyokimyasal antioksidanlar ile hücrel redoks dengesinde bulunurlar (Nohl ve ark. 2003). Bununla birlikte, birçok kanserde bu hayati denge bozulmakta, oksidatif stres ve ROS birikimi ile sonuçlanmaktadır (Scandalios 2002). Reaktif oksijen türleri; DNA, RNA ve proteinlerin hasar görmesine neden olduğundan kanser gibi hastalıkların gelişimine katkıda bulunurlar (Khan ve ark. 2013). Kanser hücrelerinde, düşük seviyelerde oksidatif stres hayatta kalmayı ve çoğalmayı teşvik edebilir ancak yüksek düzeyler apoptozu ve hücre döngüsünü durdurmayı tetikleyebilir (Storz 2005, Storz ve ark. 2005). Bu nedenle, artan ROS üretiminin kanser tedavileri için önemli bir strateji olabileceği düşünülmektedir.

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ve bazen de metastaz yapması sonucu anormal bir şekilde büyümesi olarak tanımlanabilir. Kanser, dünyadaki ikinci ölüm sebebi olarak kardiyovasküler hastalıklardan sonra gelmektedir. Batı toplumlarında her yıl 250-350 kişiden biri kansere yakalanmaktadır. Yaş arttıkça kanserin görülme sıklığı giderek artmaktadır. En yaygın görülen kötü huylu kemik tümörlerinden olan osteosarkomlar (OS), solid tümörler grubuna aittir ve kemikleri oluşturan hücrelerin dejenerasyonu sonucu oluşurlar. Doğrudan kemik dokusundan kaynaklandıkları için primer kemik tümörleri olarak da adlandırılırlar (Ottaviani ve Jaffe 2009). Osteosarkomlar, en sık çocukluk ve gençlik çağında görülür. Cerrahi ve sistemik kemoterapi OS için temel tedavidir ve tedavi oranı % 58-% 76 aralığındadır (Link ve ark.

1991). Bununla birlikte, hayatta kalma oranı da sınırlıdır. Bugün tek başına cerrahi tedaviden sonra beş yıllık sağ kalım oranı yaklaşık % 20'dir. Bu oran diğer kanser türleriyle karşılaştırıldığında; meme kanseri % 50, mesane kanseri % 43, tiroid kanseri % 57 ile hayatta kalım oranları kemik kanserine göre daha yüksektir. Ayrıca ülkemizde 2009 yılı verilerine göre (15-24 yaş grubu) genç erkeklerde kemik kanseri en sık karşılaşılan kanser türlerinden biridir (Gültekin ve Boztaş 2014). Bu istatistiki veriler bize kemik kanseri üzerine yeni tedavi yaklaşımları ve yeni terapötik ajanların keşfedilmesi/araştırılmasına ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda silibinin maddesinin, meme, prostat, deri, akciğer, karaciğer, kolon ve mesane kanserlerine karşı etkileri gösterilmiştir (Wing Ying Cheung ve ark. 2010, Chhabra ve ark. 2013). Ancak bu maddenin kemik kanseri üzerine antioksidan etkileri araştırılmamıştır. Biz de bu çalışmada, birçok doku ve hücre grubunda çeşitli biyoaktiviteleri ortaya konan silibininin, insan kemik kanser hücre hattı olan U-2 OS hücreleri üzerindeki antioksidan aktivitesi ile bu maddenin U-2 OS'nin hücre proliferasyonu üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık.

Bu çalışmanın amacı; U-2 OS hücre hattını farklı dozlarda H₂O₂'ye maruz bırakarak oksidatif stres oluşturup, daha sonra uygun dozlarda silibinin maddesi verilerek bu maddenin hücre proliferasyonu ve katalaz enzim aktivitesi ile MDA (Malondialdehit) düzeyleri üzerine etkilerini belirlemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Silybum marianum* L. Gaertn. (Devedikeni)

Silybum marianum L. Gaertn., halk arasında süt dikenini, devedikeni olarak bilinen ve binlerce yıldır çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan tıbbi bir bitkidir (Rainone 2005). Bu bitkinin kullanımını Antik Mısır çağına kadar uzanmaktadır. Mısır Müzesi'nde *Silybum marianum* 'u temsil eden arkeolojik bulgular bulunmaktadır. *Silybum marianum* L., Asteraceae ailesine ait, sıcak bir atmosferde ve kuru topraklarda yetişen 1-2 yıllık otsu bir bitkidir. Temmuz-Ağustos aylarında kırmızımsı mor renklerle kaplanırlar (Şekil 2.1). Doğal yerleşim alanları Güney Avrupa, Güney Rusya, Küçük Asya ve Kuzey Afrika, Güney Avustralya'da Kuzey ve Güney Amerika'dır (Abenavoli ve ark. 2010).



Şekil 2. 1. *Silybum marianum* L. (Anonim)

Silybum marianum L., eski zamanlarda doktorlar ve bitkisel ilaç uzmanları tarafından karaciğer fonksiyon bozuklukları ve safra kesesi hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır. (Abenavoli ve ark. 2010). *Silybum marianum* L. tohumunun bir ekstraktı olan silimarin, 1970'lerde WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından hepatoprotektif özelliklere sahip resmi bir ilaç olarak sınıflandırılmıştır (Wesołowska ve ark. 2007).

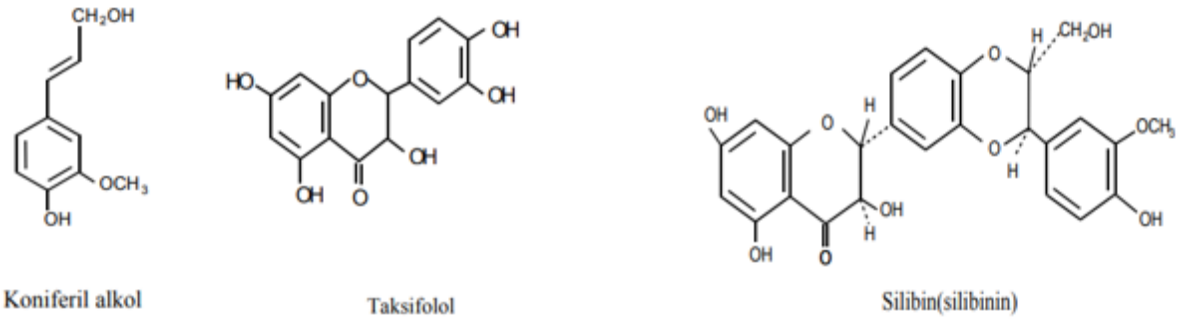
Silimarin, *Silybum marianum* L. tohumunun kuru ağırlığının % 1.5-3'ünü temsil eder ve eşsiz flavonoid komplekslerinin izomerik bir karışımıdır. Hepatoprotektif, anti-oksidan (AbouZid 2012), anti-kanser (Zi ve ark. 1997), anti-inflamatuar (Puerta ve ark.

1996) ve anti-diyabetik (Maghrani ve ark. 2004) özelliklere sahip olduğu bilinen silimarin, karaciğer, dalak ve safra kesesi hastalıklarının tedavisinde yüzyıllardır kullanılmaktadır (Shaker ve ark. 2010).

Silimarin, silibinin, izosilibin, silikristin, silidianin, dehidrosilibin ve diğer fenolik bileşiklerden oluşmaktadır (Skottova ve Krecman 1998). Bu yapısal izomerlerin ortak özelliği flavonolignan bir iskelettir. Temel olarak flavonolignan çekirdeği, oksan halkası yoluyla koniferil alkol grubuna bağlı dihidroflavanol taksifolinden oluşur. Oksan halka, silimarinin biyolojik aktivitesinden sorumludur ve bu halkanın açılması aktivite kaybına neden olur. Sadece silibinin ve izosilibininler, yapılarında 1,4-dioksan halka sistemini içerir. Silibinin ve izosilibinin aynı C-2, C-3 ve C-7 ' , C-8' trans konformasyonuna sahiptir. Flavonolignanlara ek olarak *Silybum marianum* L. tohumunun kimyasal bileşimi, diğer flavonoidler (taksifolin, kuersetin, kaempferol, apigenin, naringin vb.), 5,7-dihidroksi kromon, dehidro-koniferil alkol, sabit yağ (% 60 linoleiktokoferol, steroller (kolesterol, kampesterol, stigmasterol ve sitosterol), şekerler (arabinoz, ramnoz, ksiloz ve glukoz) ve proteinlerden oluşmaktadır (Abenavoli ve ark. 2010). Bununla birlikte, ekstraktın yaklaşık % 50-70'ini oluşturan en yüksek konsantrasyon, önemli biyoaktif komponent silibininidir (Bijak 2017).

2.1.1. Silibininin Yapısı ve Kimyası

Silibinin kimyasal yapısı ilk olarak 1968'de Pelter ve Hansel tarafından, ortaya konmuştur (Pelter ve Hänsel 1968). Flavobin, silliver, silybine, sililyum I, silybina ve silybine olarak da adlandırılan silibinin, $C_{25}H_{22}O_{10}$ ve molekül ağırlığı 482.441 olan, CAS No. 22888-70-6 (pubchem web sitesinden elde edilen veriler) bir moleküler formüle sahiptir. Silibinin yapısı iki ana birimden oluşur. Birincisi, flavonoidlerde bir flavonol grubu olan bir taksifolin birimidir. İkincisi, koniferil alkol olan bir fenilpropanoid birimidir. Bu iki ünite bir oksan halkasıyla bir yapıya birleştirilir (Kurkin 2003, Althagafy ve ark. 2013) (Şekil 2.2).



Şekil 2. 2. Silibininin kimyasal yapısı (Althagafy ve ark. 2013).

Silibinin yapısında, beş hidroksil grubu bulunur. Bu hidroksil gruplarından üçü (5-OH, 7-OH ve 20-OH) fenolik bir niteliğe sahiptir. 5-OH grubu, aromatik halkayla konjugasyonda olan ve 5-OH grubu ile hidrojen bağı için serbest elektron çifti donörü olarak işlev gören bitişik okso grubuna karşı çok güçlü bir hidrojen bağına sahiptir. 7-OH ve 20-OH grupları benzer özelliklere sahiptir, ancak C-7 OH grubu, düşük sterik engel ve bir hidrojen bağı varlığına sahip olmasından dolayı 20-OH grubundan daha reaktiftir. Silibinin, etanol (EtOH) ve metanol (MeOH) gibi çözücüler içerisinde az çözünür, kloroform ve petrol eteri içinde çözünmez ancak dimetil sülfoksit (DMSO), aseton, dimetilformamid (DMF) ve tetrahidrofuran (THF) gibi çözücüler içinde oldukça kolay çözünebilir (Bijak 2017). Doğada silibinin, silibin A ve silibin B olmak üzere iki trans diastereoizomer halinde bulunur. Bu iki diastereoizomer, 1,4-benzodioksan halkasında C-10 ve C-11 referans konumlarına göre farklılaşırlar (Althagafy ve ark. 2013).

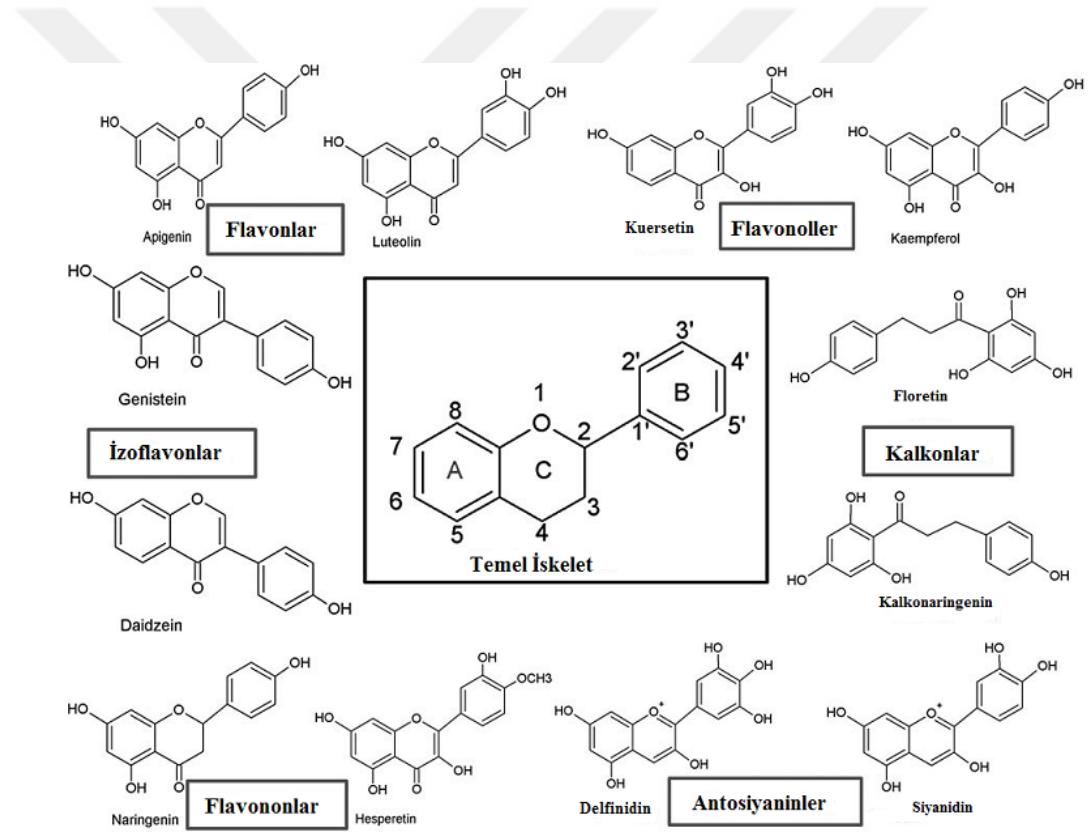
Silybum marianum'daki flavonolignanlar, flavonoid ve lignan yapılarının birleşimi ile oluşur. Silimarinin fenolik bileşiklerinden biri olan silibinin, flavonolignan bir iskelete sahiptir.

2.2. Flavonoidler ve Flavolignanlar

Flavonoidler (Fl-OH), çeşitli fenolik yapıları olan ve bitkilerde bulunan doğal bileşikler grubudur. Bitkilerin çiçeklerindeki sarı, kırmızı veya mavi pigmentlerden sorumludurlar. Günümüze kadar flavonoidlerin 4000'den fazla çeşidi tanımlanmıştır (Kumar ve Pandey 2013). Flavonoidlerin biyolojik etkilerinin daha çok anlaşılmasıyla,

son yıllarda önemleri giderek artmaktadır. *Silybum marianum* tohumlarında bulunan flavonolignanlar terapötik etkiden sorumlu gruptur.

Flavonoidler, kimyasal olarak bir heterosiklikpiran halkası (C) ile bağlanmış iki benzen halkasından (A ve B) oluşan on beş karbon iskeletine dayanır. Flavonoidler, flavonlar (örn, flavon, apigenin ve luteolin), flavonoller (örn, kuersetin, kaempferol, myisetin ve fisetin), flavononlar (örn, hesperetin ve naringenin) gibi çeşitli sınıflara ayrılabilirler (Şekil 2.3). Flavonoidler, glikozitler ve metil türevleri olarak bulunur. Temel flavonoid yapı aglikonlar'dır. Benzen halkasıyla kondanse edilen altı üyeli halka, bir α -piron (flavonoller ve flavanonlar) veya dihidrojen türevli (flavonoller ve flavanonlar) dir (Narayana ve ark. 2001).



Şekil 2. 3. Flavonoidler (Panche ve ark. 2016).

2.2.1. Flavonoidlerin Biyolojik Aktiviteleri

2.2.1.1. Antioksidan Aktivite

Flavonoidlerin birçok biyokimyasal özelliği vardır ancak en iyi tanımlanan özellikleri, antioksidan olarak hareket etme kapasiteleridir. Flavonoidlerin antioksidan aktivitesi fonksiyonel grupların nükleer yapısının düzenlenmesine bağlıdır. Konfigürasyon, yer değiştirme ve hidroksil gruplarının toplam sayısı, radikal temizleyici ve metal iyonu şelasyon yeteneği gibi antioksidan aktivitenin çeşitli mekanizmalarını büyük ölçüde etkiler (Heim ve ark. 2002). B halkası hidroksil konfigürasyonu, hidrojen ve bir elektronunu, hidroksil, peroksil ve peroksinitrit radikaline verdiği için ROS' un temizlenmesinin en önemli belirleyicisidir, onları stabilize eder ve nispeten kararlı bir flavonoid radikali meydana getirir (Rice-Evans ve ark. 1996).

Antioksidan etki mekanizmaları arasında, (1) enzimlerin inhibisyonu ya da serbest radikal oluşumunda rol oynayan eser elementlerin şelatlanması ile ROS oluşumunun baskılanması, (2) ROS' un temizlenmesi ve (3) antioksidan savunmaların artırılması ya da korunması yer alabilir (Halliwell ve Gutteridge 2015). Flavonoidler, ROS üretimi ile ilgili enzimleri olan mikrozomal monooksijenaz, glutatyon S-transferaz, NADH oksidaz vb. enzimleri inhibe eder (Kumar ve Pandey 2013). Lipid peroksidasyonu oksidatif stresin yaygın bir sonucudur. Flavonoidler, lipidleri çeşitli mekanizmalarla oksidatif hasara karşı korur (Halliwell ve Gutteridge 2015). Serbest metal iyonları, yüksek ölçüde reaktif hidroksil radikali üreterek hidrojen peroksidin indirgenmesi ile ROS oluşumunu arttırmaktadır. Flavonoidler, düşük redoks potansiyellerinden dolayı termo-dinamik olarak hidrojen atomu bağıışı ile süperoksit, peroksil, alkoksil ve hidroksil radikalleri gibi aşırı oksitleyici serbest radikalleri azaltabilirler. Flavonoidler ayrıca metal iyonlarını (demir, bakır vb.) şelatlama kapasiteleri nedeniyle serbest radikal oluşumuna engel olurlar (Mishra ve ark. 2013).

2.2.1.2. Oksidatif Stresle Mücadele

Flavonoidlerin bitkilerde birden fazla fonksiyona hizmet ettiği uzun süredir bilinmektedir (Shirley 1996). Değişken abiyotik ve biyotik faktörler, bitkilerde oksidatif strese yol açan ROS üretimine yardımcı olur. Bitkilerdeki flavonoid biyosentezi, oksidatif stres durumunda artar. Flavonoidler, en enerjik güneş dalga boylarını (UV-B ve UV-A) absorbe etme, ROS üretimini engelleme ve oluştuktan sonra ROS' u giderme kapasitelerine sahiptirler (Agati ve ark. 2012). Flavonoidler içindeki en reaktif hidroksil grupları (flavonlarda 7-OH veya flavonollerde 3-OH) genellikle glikosillerdir. Glikosilasyon, sulu ortamlarda çözünürlüğü artırır, reaktif hidroksil gruplarını otomatik oksidasyona karşı korur (Agati ve Tattini 2010) ve flavonoidlerin endoplazmik retikulumdan çeşitli hücresel kompartmanlara taşınmasını ve plazma membranına ve hücre duvarına salınmalarına izin verir (Zhao ve Dixon 2010).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, antioksidan flavonoidlerin mezofil hücrelerinin çekirdeğinde ve ROS üretiminin merkezlerinde yani kloroplastta olduğunu göstermektedir. Burada H₂O₂, hidroksil radikali ve singlet oksijeni kolayca söndürebilirler (Agati ve ark. 2012, Kumar ve Pandey 2013).

2.3. Silibinin ve Oksidatif Stres

Flavonoidlerin, antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve biyolojik olarak koruyucu özellikleri olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Rice-Evans ve ark. 1996, de Groot ve Rauen 1998, Di Carlo ve ark. 1999). Flavonoid özelliğe sahip olan silibinin de güçlü bir antioksidandır (Ligeret ve ark. 2008).

Silibinin, serbest radikal oluşumu inhibe eder, membranların lipid peroksidasyonunu engeller ve bu nedenle membran geçirgenliğini modüle eder (Trouillas ve ark. 2008). Oksidatif ve nitrozatif stres varlığında silibinin, süperoksit anyon radikalleri ve nitrik oksit (NO) oluşumunu inhibe eder, ADP'nin fosforilasyonu yoluyla ATP içeriğini artırır, malondialdehit (MDA) glutatyon, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon

peroksidaz ve glutasyon redüktaz gibi doğal hücrel antioksidan mekanizmalarında etkili olduğu bulunmuştur (Dehmlow ve ark. 1996, Fu ve ark. 2008).

Aynı zamanda, silibinin ortamda bulunan demiri bağlayarak reaktif oksijen türlerinin toksik etkilerini yok eder ve bu şekilde demir şelatörü olarak da bir antioksidan görevi görür (Borsari ve ark. 2001, Gharagozloo ve ark. 2008).

2.4. Reaktif Oksijen Türleri ve Serbest Radikaller

Anaerobik organizmalar dışındaki tüm bitki ve hayvanlar enerji üretimi için moleküler oksijene ihtiyaç duyarlar. Moleküler oksijen yararlı olduğu kadar bazen zararlı da olabilmektedir. Moleküler oksijenin toksik etki göstermesi singlet oksijen, hidroksil radikali, süperoksid radikali, hidrojen peroksit gibi reaktif ürünlerin meydana gelmesinden kaynaklanmaktadır. Biyolojik sistemlerde oksijen metabolizması sonucu oluşan bu ürünlere reaktif oksijen türleri adı verilmektedir (Halliwell ve Gutteridge 2015).

Bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren yüksek enerjiye sahip atom veya moleküller serbest radikaller olarak adlandırılmaktadır (Karabulut ve Gülay 2016). Eşleşmemiş elektronların varlığı genellikle serbest radikal üzerinde önemli ölçüde bir reaktivite verir. Bir bileşik dışarıdan bir elektron alarak veya bir elektronunu kaybederek serbest radikale dönüşebilir. Serbest radikaller, kararsız ve reaktiftirler. Kararlı hale gelebilmek için başka atom veya moleküllerle eşleşmeye çalışırlar. Bunun için başka atom veya molekülün bir hidrojen atomunu çalabilirler, o moleküle bağlanabilirler veya diğer serbest radikallerle etkileşebilirler. Serbest radikaller pozitif, negatif yüklü veya nötral olabilirler (Halliwell 1994).

2.4.1. Reaktif Oksijen Türleri Kaynakları

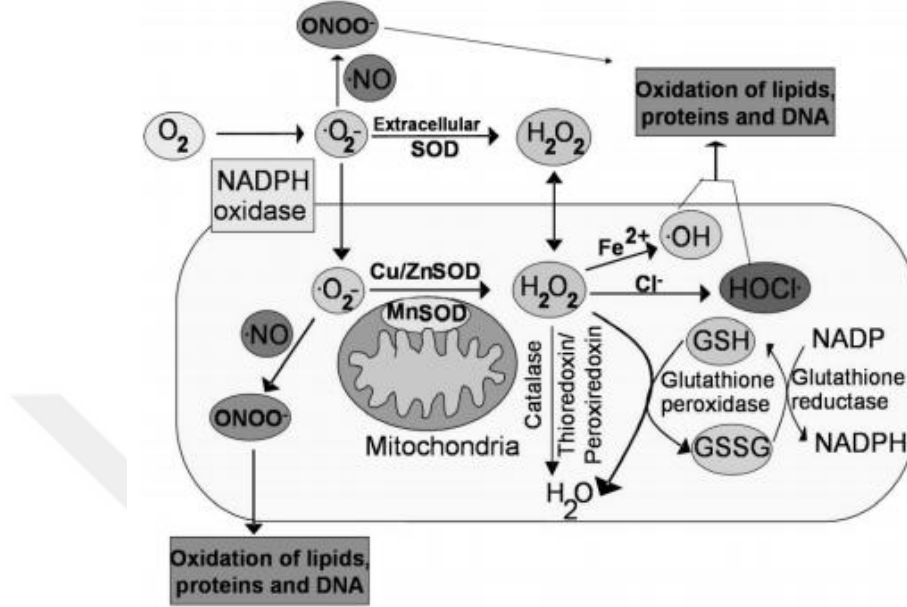
Reaktif oksijen türleri, normal bir hücrel metabolizmanın ürünleridir, hücre içi ve çevresel koşullardaki değişikliklere yanıt olarak bitki ve hayvan hücrelerindeki sinyal yollarının uyarılmasında hayati rol oynarlar (Jabs 1999). Reaktif oksijen türleri, hem endojen hem de eksojen maddelerden üretilebilir. Potansiyel endojen kaynaklar arasında mitokondri, sitokrom P450 metabolizması, peroksizomlar ve inflamatuvar hücre

aktivasyonu yer alır. Endojen metabolik reaksiyonlar sırasında aerobik hücreler, süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH\cdot$) ve moleküler oksijenin biyolojik olarak indirgenmesinin normal ürünleri olarak organik peroksitler gibi reaktif oksijen türleri üretirler. Hücrede serbest radikal üretiminin esas kaynağı mitokondrilerdir. Solunan oksijenin yaklaşık % 80-90 kadarı burada kullanılmaktadır. Kullanılan oksijenin sadece çok küçük miktarı ROS'a dönüşmesine rağmen vücutta üretilen ROS'un büyük kısmı hücrelerdeki mitokondriyal solunum zincirlerinde oluşmaktadır (Wu ve Cederbaum 2003). Mitokondrinin, önemli miktarda süperoksit radikali ve hidrojen peroksit ürettiği bilinmektedir. Fizyolojik koşullar altında, hidrojen peroksit üretiminin organizmanın toplam oksijen alımının yaklaşık % 2'sini oluşturduğu tahmin edilmektedir.

Mitokondri, serbest radikal oluşumunun ana bölgesi olduğundan, organeldeki oksidatif stresi en aza indirmek için, membranlarının her iki tarafında bulunan süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzimler; indirgenmiş glutatyon (GSH) gibi antioksidanlar ile yoğun bir şekilde zenginleştirilmiştir (Cadenas ve Davies 2000). Süperoksit radikalleri, mitokondriyal iç membranların her iki tarafında bulunan Cu, Zn-SOD (intermembran boşlukta lokalize edilmiş SOD1) ve MnSOD (matriks içinde lokalize edilmiş SOD2) tarafından etkili bir biçimde başlangıçta hidrojen perokside daha sonra suya detoksifiye edilir. Mitokondrinin yanı sıra ksantin oksidaz (XO) gibi başka hücrel süperoksit radikal kaynakları da vardır. XO, memelilerin çeşitli dokularında ve türler arasında (bakteriden insana) geniş çapta bulunan son derece değişken bir enzimdir (Li ve Jackson 2002). Ksantin oksidaz, önemli bir serbest oksijen radikali kaynağıdır. Molibden demir-kükürt flavin hidroksilaz olarak bilinen bir grup enzimin bir üyesidir ve pürinlerin hidroksilasyonunu katalize eder. XO, özellikle hipoksantin ve ksantin ve ksantinin ürik aside reaksiyonunu katalize eder. Her iki adımda, moleküler oksijen indirgenmektedir. Birinci aşamada süperoksit radikali, ikinci aşamada ise hidrojen peroksit oluşmaktadır (Valko ve ark. 2004).

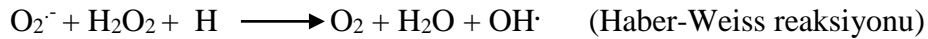
ROS kaynaklarından biri de mikrozomlar ve peroksizomlardır. Mikrozomlar, in vivo üretilen H_2O_2 konsantrasyonunun % 80'inden sorumludur. Peroksizomların ise fizyolojik koşullar altında H_2O_2 ürettiği fakat O_2^- üretmediği bilinmektedir. Karaciğer tüm H_2O_2 üretimine peroksizomal katkının önemli olduğu birincil organ olmasına rağmen peroksizom içeren diğer organlar da H_2O_2 üretici bu mekanizmalara maruz kalmaktadır. Uzun süren açlık sonunda yağ asitlerinin peroksizomal oksidasyonunun önemli bir

potansiyel H₂O₂ üretim kaynağı olduğu açıklanmıştır (Valko ve ark. 2006). Serbest radikallerin intrasellüler oluşum yolları şekil 2.4.'te gösterilmektedir.

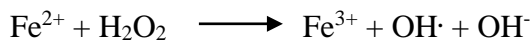


Şekil 2. 4. Serbest radikallerin intrasellüler oluşum yolları (Azad ve ark. 2008).

Hücrel reaktif oksijen türlerinin diğer endojen kaynakları, nötrofiller, eozinofiller ve makrofajlardır. Aktif makrofajlar, süperoksit anyonu, nitrik oksit ve hidrojen peroksit dahil olmak üzere çeşitli reaktif oksijen türlerine yol açan oksijen alımında bir artış başlatır. Süperoksit radikali ve hidrojen peroksit birbirleriyle reaksiyona girerek hidroksil radikali oluşturabilmektedirler (Haber-Weiss reaksiyonu). Bu reaksiyonun biyolojik sistemlerdeki hidroksil radikali üretiminin önemli bir kısmından sorumlu olduğu düşünülmektedir (Wu ve Cederbaum 2003).



Aynı zamanda H₂O₂, serbest geçiş elementleri (Fe, Cu ve Mn) varlığında, en reaktif oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluşturabilir. Bu reaksiyon “Fenton reaksiyonu” olarak adlandırılmaktadır.



Vücutta doğal yolla ROS oluşumunun dışında, kirli hava, sigara dumanı, pestisitler UV ışığı ve radyasyon gibi bazı redoks döngüsü ajanları ve kanser tedavisinde kullanılan bazı ilaçlar da serbest radikal üretimine neden olabilmektedir (Wu ve Cederbaum 2003).

Ayrıca sitokrom P450, reaktif oksijen türlerinin kaynağı olarak gösterilmektedir. Sitokrom P450 enzimlerinin indüksiyonu yoluyla, reaktif oksijen türlerinin, özellikle süperoksit anyonunun ve hidrojen peroksidin üretilme olasılığı, sitokrom P450 katalitik döngüsünün parçalanması veya ayrılmasından sonra ortaya çıkar (Valko ve ark. 2006).

2.4.2. Reaktif Oksijen Türleri ve Özellikleri

Reaktif oksijen türleri, oksijen içeren oldukça reaktif moleküllerdir. Hidroksil ve süperoksit radikalleri, hidrojen peroksit ve singlet oksijen reaktif oksijen türlerinden bazılarıdır. Bu moleküllerden hidroksil radikali son derece reaktifken, süperoksit ve hidrojen peroksit radikalleri daha az reaktiftir (Nordberg ve Arner 2001). Hücre içi ROS'un % 90'dan fazlası aerobik solunum reaksiyonları zincirinde mitokondrinin iç membranında üretilmektedir (Wei ve Pang 2005). Metabolizmanın bu yan ürünleri, oksidan ve mutajen özellikte olup DNA, protein ve diğer makro moleküllerde hasara hatta hücrenin ölümüne neden olarak kronik hastalıkları başlatmaktadır (Shinde ve ark. 2012).

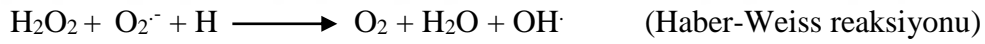
2.4.2.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi ile süperoksit anyon radikali oluşmaktadır. Oluşan süperoksit anyonu bir serbest radikal olmasına karşın çok fazla reaktif değildir. Süperoksit radikali, mitokondriyal solunum zincirinde oluşabilmekte ya da ksantin oksidaz gibi bazı enzimler tarafından endojen olarak üretilmektedir. (Nordberg ve Arner 2001)

2.4.2.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit molekülü, eşleşmemiş bir elektron içermez ve dolayısıyla radikal bir tür değildir. Serbest radikal olmadığı halde ROS kapsamına girer ve serbest radikal oluşumunda önemli rol oynar. Fizyolojik koşullar altında, hidrojen peroksit üretiminin organizmanın toplam oksijen alımının yaklaşık % 2'sini oluşturduğu tahmin edilmektedir (Valko ve ark. 2006). H₂O₂, süperoksitin SOD ile dismutasyonu sonucu veya spontan olarak üretilmektedir. Yağda çözünür olduğundan oluştuğu yerden uzakta olan ve Fe²⁺ içeren hücrel membranlarda da hasar oluşturabilir. Bu yüzden, membranları geçen, sitozole difüze olan ve uzun ömürlü bir oksidan olarak bilinmektedir.

H₂O₂, Fe²⁺ veya diğer geçiş metallere varlığında (Fenton reaksiyonu) ve süperoksit radikalinin (O₂⁻) varlığında (Haber-Weiss reaksiyonu) en güçlü radikal olan hidroksil radikalini (OH[·]) oluşturur (Jomova ve Valko 2011).



2.4.2.3. Hidroksil Radikali (OH[·])

Biyolojik sistemlerde yaklaşık 10⁻⁹ saniye yarı ömrü olan hidroksil radikali, bilinen en toksik radikal ve son derece güçlü bir oksidandır. Hidroksil radikali difüzyon ile nükleik asitler, proteinler ve lipidler olmak üzere hemen hemen tüm biyolojik makromolekülleri sınırlı oranlarda okside edebilir (Fantel 1996).

Hidroksil radikali, geçiş metal iyonlarının (Fe²⁺ veya Cu⁺) aracılığıyla katalizlenen Fenton reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Bu nedenle geçiş metalleri hidroksil radikalının oluşumunda önemli rol oynamaktadır.



2.5. Oksidatif Stresin Neden Olduğu Hücre Hasar Mekanizmaları

2.5.1. Lipidlerde Hasar

Fosfolipidler, mitokondri ve hücre çekirdeğini çevreleyen membranların esas bileşenleridir. Bu nedenle fosfolipidlerde oluşan hasar, hücre yaşamını önemli derecede etkilemektedir. Membran fosfolipidlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitleri, hidroksil radikalleri ve diğer oksidanların ataklarına karşı son derece hassastırlar (Marnett 1999).

Lipit peroksidasyonunun genel süreci üç aşamadan oluşur. Bunlar; başlama, ilerleme ve sonlandırma aşamasıdır (Kohen ve Nyska 2002). Lipit peroksidasyonu bir metilen grubundan (CH₂) bir hidrojen (H) atomunun uzaklaştırılmasıyla birlikte karbon atomu (·CH) üzerinde eşleşmemiş bir elektron oluşmasıyla başlar ve lipid radikali oluşur. Lipid radikali oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksil radikalini oluşturmaktadır. Lipid peroksil radikali de diğer doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girer ve lipit peroksitleri oluşturur. Lipid peroksitler daha sonra malondialdehid (MDA) ve 4-hidroksi nonenal gibi yıkım ürünlerine dönüşmektedir. Bu yıkım ürünleri mutajenik olup DNA veya proteinlerle reaksiyona girebilmektedirler (Memişoğulları 2005). Üç veya daha fazla çift bağa sahip yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu MDA oluşmaktadır. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir. Ama lipid peroksidasyonunun derecesiyle orantılı olarak artış göstermektedir (Altınışik 2000).

2.5.2. Proteinlerde Hasar

Oksidatif stres sonucu oluşan reaktif oksijen türleri proteinler üzerinde hem geri dönüşümlü hem de geri dönüşümsüz oksidatif modifikasyonlara sebep olurlar (Prokai ve ark. 2007). Geri dönüşümsüz modifikasyonlar, protein karbonilasyonu ve tirozin nitrasyonudur (Rao ve Møller 2011). Oksidatif stres sonucu proteinlerde oluşan bu oksidatif modifikasyonlar, enzimlerde ve hücre iskelet proteinlerinde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olurlar (Özcan ve ark. 2015). Bu modifikasyonlar çoğunlukla oksidatif hasar ile ilişkili birçok hastalığın sonucunda oluşan oksidatif stresin

değerlendirilmesi için biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Yan ve Sohal 1998, Stadtman 2001). Geri dönüşümlü protein oksidatif modifikasyonları ise protein sistein modifikasyonlarıdır. Bu modifikasyonlar, özellikle hücrel redoks durumundaki değişiklikleri yansıtan, aynı zamanda hedef proteinleri daha fazla hasardan koruyabilen, geri dönüşümlü sistein oksidasyonlarıdır (Gupta ve ark. 2014).

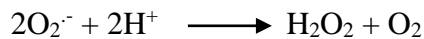
2.5.3. Nükleik Asitler ve DNA Üzerinde Hasar

Reaktif oksijen türleri DNA ile etkileşime girerek oksidatif hasar oluşumuna yol açarlar ve DNA üzerinde mutasyonlara neden olurlar. Bu serbest radikaller, DNA'nın tüm komponentleri ile etkileşebilmektedir ve pürin ve pirimidin bazlarında ve deoksiribozun yapısında hasar oluşturmaktadır (Fang ve ark. 2002). Birçok kanserli dokuda serbest radikallerin neden olduğu DNA hasarı gözlemlenmiştir. Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu DNA hasarlarının arasında; tek veya çift iplik kırıkları, pürin, pirimidin veya deoksiriboz modifikasyonları ve DNA-protein çapraz bağlanmaları sayılabilir. DNA hasarı, transkripsiyonun indüklenmesine veya durmasına, sinyal iletim yollarının indüksiyonuna, replikasyon hatalarına ve genomik kararsızlığa neden olabilmektedir (Marnett 2000).

2.6. Antioksidan Savunma Sistemleri

2.6.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) (EC: 1.15.1.1)

En etkili hücre içi enzimatik antioksidanlardan biri süperoksit dismutazdır (SOD) Süperoksit dismutaz, süperoksit anyonunun oksijen ve daha az reaktif olan hidrojen peroksite dismutasyonunu katalize eden enzimdir. Bu enzim ilk olarak 1939'da izole edilmiş olmasına rağmen antioksidan aktivitesi 1969 yılında McCord ve Fridovich tarafından ortaya çıkarılmıştır (McCord ve Fridovich 1969).



SOD' un, aktif merkezlerinde bulunan metallere, amino asit içeriğine, alt birimlerinin sayısına, kofaktörlerine ve diğer özelliklerine göre çeşitli izoformları bulunur. İnsanlarda üç tür SOD formu vardır: Sitosolik Cu, Zn-SOD, mitokondriyal Mn-SOD ve ekstrasellüler SOD (EC-SOD) (Landis ve Tower 2005).

2.6.2. Katalaz (CAT) (EC: 1.11.1.6)

Katalaz (CAT), bitkilerin, hayvanların ve aerobik bakterilerin hücrelerinde bulunan bir enzimdir. 4 tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Katalaz, hücre içerisinde peroksizom organelinde bulunur. Görevi; hidrojen peroksidin suya ve moleküler oksijene dönüşümünü çok etkili bir şekilde katalizlemektedir (Matés ve Sánchez-Jiménez 1999). Katalaz, tüm enzimler içinde en yüksek dönüştürücü orana sahip enzimlerden biridir. Bir katalaz molekülü, her dakika 6,6 milyon hidrojen peroksit molekülünü su ve oksijene dönüştürebilmektedir. Katalaz enzimi, ortamda hidrojen peroksit konsantrasyonunun arttığı durumlarda optimum aktivite göstermektedir.



Çeşitli tümör hücrelerinin hidrojen peroksiti detoksifiye etme kapasitelerinin önemli ölçüde azalmış olmasının, hücrelerdeki katalaz miktarının azalmasıyla doğru orantılı olduğu düşünülmektedir (Matés ve ark. 1999, Valko ve ark. 2006).

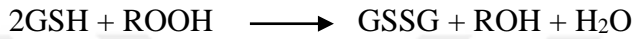
2.6.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidaz enziminin iki formu vardır, bunlardan biri selenyumdan bağımsızdır (glutasyon-S-transferaz, GST, EC: 2.5.1.18), diğeri ise selenyum bağımlıdır (GPx, EC: 1.11.1.19) (Matés ve Sánchez-Jiménez 1999). Bu iki enzim, alt birimlerinin sayısı, aktif merkezlerindeki selenyumun bağlanma şekli ve katalitik mekanizmaları bakımından birbirlerinden ayrılmaktadırlar. Glutasyon metabolizması, en önemli antioksidatif savunma mekanizmalarından biridir.

İnsanlarda dört farklı Se-bağımlı glutasyon peroksidaz bulunur (Matés ve ark. 1999). Glutasyon peroksidazlar, selenol (Se-OH) bileşiklerini oluşturarak peroksitleri

indirgemektedir. Bu selenoenzimler antioksidan özellikleri sayesinde, peroksitlerin fenton reaksiyonu için potansiyel substratlar olarak elimine edilmesini sağlarlar.

GPx, hücrelerde yüksek (mikromolar) konsantrasyonlarda bulunan ve bir tripeptid olan glutatyon (GSH) ile birlikte çalışmaktadır. GPx'in katalitik reaksiyonu için substratı, H₂O₂ veya başka bir organik peroksit ROOH'dir. Glutatyon peroksidaz, peroksitleri su veya alkole parçalarken aynı zamanda GSH'ı yükseltmektedir. GPx, ortak substratları olarak H₂O₂ için katalaz ile rekabet eder ve bu şekilde GPx düşük seviyelerde oksidatif strese karşı ana koruma kaynağıdır.



2.7. Kanser

Kanser, hücrelerin genetik ve çevresel koşulların etkisi altında kontrolsüz bir şekilde proliferasyonu olarak tanımlanmaktadır (Baykara 2016). Kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra dünyadaki ikinci ölüm sebebidir ve tüm insan ölümlerinin yaklaşık % 13'ünü oluşturmaktadır (Fitzmaurice ve ark. 2015). İnsan vücudunu etkilediği bilinen 100'den fazla kanser türü bulunmaktadır (Pavlopoulou ve ark. 2015).

Kanserin ülkemizde görülme sıklığı her geçen gün daha da artmaktadır. Her yıl yaklaşık olarak 160.000 kişiye kanser tanısı konulurken, yaklaşık 100.000 kişi bu hastalıktan yaşamını yitirmektedir. Önümüzdeki 20 yıl içinde dünyada kansere bağlı ölümlerin 13 milyon kişiye ulaşacağı öngörülmektedir Dünya Kanser Raporu'na göre 2012 yılında dünyada 14,1 milyon yeni kanser vakası bulunmuştur ve 2015 yılında ise kanser hastalığından ölen insan sayısı 8.2 milyon olarak bildirilmiştir (WHO 2018). Sağlık Bakanlığı'nın 2016 verilerine göre Türkiye'de 2013 yılında yaşa bağlı kanser hızı erkeklerde yüz binde 267.9, kadınlarda ise yüz binde 186.5'dir. Kadın ve erkek ortalama kanser insidansı ise yüz binde 227.2'dir (Kurumu 2016).

2.8. Kas ve İskelet Sistemi Tümörleri

Kas ve iskelet sistemi tümörleri mezenkimal kökenli tümörlerdir. Köken aldıkları doku, büyüme ve davranış paternlerine göre benign tümörler, benign-agressif tümörler ve malign tümörler olarak 3 gruba ayrılırlar (Çizelge 2.1).

Çizelge 2. 1. Kas ve iskelet sistemi tümörlerinde histopatolojik sınıflandırma (Doyle 2014).

| Kaynak Doku | Benign Tümörler | Benign-Agressif Tümörler | Malign Tümörler |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kemik | <ul style="list-style-type: none">•Osteom•Osteoblastom•Osteoid osteom | <ul style="list-style-type: none">•Agressif Osteoblastom | <ul style="list-style-type: none">•Osteosarkom |
| Kıkırdak | <ul style="list-style-type: none">•Kondrom•Osteokondrom•Kondroblastom•Kondromiksoidfibrom | | <ul style="list-style-type: none">•Kondrosarkom |
| Dev Hücre | | <ul style="list-style-type: none">•Osteoklastom | |
| Kemik İliği | | | <ul style="list-style-type: none">•Ewing Sarkom•Miyeloma•Kemiğin lenfosarkomu•Kemiğin nöroektodermal tümörü |
| Damar Kökenli | <ul style="list-style-type: none">• Hemanjiom• Lenfanjiom• Glomanjiom | <ul style="list-style-type: none">•Hemanjioendotelyoma•Hemanjioperisitoma | <ul style="list-style-type: none">•Anjiosarkom•Habis hemanjioperisitom |
| Bağ Doku Tümörleri | <ul style="list-style-type: none">• Benign fibröz histiyositom• Lipom | <ul style="list-style-type: none">• Desmoplastik fibrom | <ul style="list-style-type: none">•Liposarkom•Fibrosarkom•Malign fibrözhistiyositom•Habis mezenkimom•Leiomyosarkom•Dediferansiye sarkom |

Çizelge 2. 2. (Devamı) Kas ve iskelet sistemi tümörlerinde histopatolojik sınıflandırma (Doyle 2014).

| | | | |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--------------------------------------------------------------------------------|
| Diğer Tümörler | <ul style="list-style-type: none">• Nörolemmoma• Nörofibroma | | <ul style="list-style-type: none">•Kordoma•Adamantinoma |
| Tümör Benzeri Lezyonlar | <ul style="list-style-type: none">•Soliter kemik kisti•Anevrizmal kemik kisti•Jukstaartiküler kemik kisti•Metafizerverfibrözdefekt•Eozinofilikgranülom (soliter)•Fibrözdisplazi ve osteofibrözdisplazi•Miyozitisossifikans•Hipertirodiye bağlı 'Brown tümörü'•Paget hastalığı•İntraosseözepidermoid kist•El ve ayağın dev hücreli (reparatif) granülomu | | |

2.8.1. Osteosarkom (OS)

Osteosarkom, çocuklar ve gençlerde en sık rastlanan primer malignitelerden biridir (Ottaviani ve Jaffe 2009, Durfee ve ark. 2016). Histolojik olarak malign hücreler tarafından osteoid üretimi ile karakterize edilen primer mezenkimal tümörlerdir. Bu tümörler, solid tümörler grubuna aittir ve doğrudan kemik dokusundan kaynaklandıkları için, primer kemik tümörleri olarak da adlandırılırlar. (Ottaviani ve Jaffe 2009, Broadhead ve ark. 2011). Bu tümörler genellikle lokal olarak agresiftir ve erken sistemik metastaz üretme eğilimindedirler. Bu özelliklerinden dolayı diğer organlarda oluşan ve metastaz oluşturan habis tümörlerden ayrı tutulurlar. Osteosarkomların çoğu, etkili bir tedavi sağlanmazsa hastayı ölüme götürecek derecede hızlıca büyür ve dağılır.

Osteosarkomun standart tedavisi cerrahi ve kemoterapiden oluşur. Her ne kadar cerrahi tedavi gerekli olsa da, tek başına cerrahi ile tedavi edilen OS hastalarının % 80'inden fazlası metastatik hastalık geliştirmektedir (Link ve ark. 1986). Bu muhtemelen OS hastalarının çoğunda tanı anında mevcut olan subklinik metastazlardan kaynaklanmaktadır (Marina ve ark. 2004). Metastatik olmayan hastalığın 5 yıllık sağkalım oranı % 70 iken metastatik hastalık çoğunlukla akciğerlere oranla % 15-30 hayatta kalma oranına sahiptir. Cerrahi tedavi ile birlikte kemoterapi ile OS hastalarının sağkalım oranları

% 20-30'dan % 60-70'e çıkmaktadır. Hedef ajanlar dahil olmak üzere çeşitli yeni yöntemler denenmiş olmasına rağmen, ana OS kemoterapisi geleneksel anti-kanser ilaçları içerir (Jaffe ve ark. 2013). Osteosarkom ağırlıklı olarak, 5-20 yaş arasındaki çocukları ve gençleri etkilemektedir ve ABD'de bu hastalığa sahip yılda yaklaşık 400 yeni çocuk hasta teşhis edilmektedir. Cerrahide ve kemoterapideki gelişmelere rağmen, osteosarkom oluşumunun (osteosarkomagenesis) moleküler mekanizmalarının henüz bilinmemesi, hastaların son 40 yıldaki sağkalım oranlarında belirgin bir iyileşmeye engel olmuştur. Bu malignite, osteosarkomu çocuk ve ergenler arasında kanser mortalitesinin önde gelen nedenlerinden biri haline getirir. Bu nedenle, bireysel osteosarkom ile ilişkili gen fonksiyonlarının, osteosarkom başlangıcı, gelişimi ve ilerlemesi ile ilgili olası patolojik mekanizmaları araştırmak için aydınlatılması, gelecekteki osteosarkom bulguları ve tedavisi için çok önemlidir.

2.9. Kanser ve Oksidatif Stres

Oksijen, yaşamımız için oldukça önemli bir elementtir (Bucci 2009). Hücreler enerji üretmek için oksijen kullandığında, mitokondri tarafından ATP (adenosin trifosfat) üretiminin bir sonucu olarak serbest radikaller oluşur. Oluşan bu yan ürünler, genellikle hücrel redoks işleminden kaynaklanan reaktif oksijen türleridir (ROS) (Gill ve ark. 2017). Bu türler, hem toksik hem de faydalı bileşikler olarak ikili bir rol oynarlar. Bu iki antagonistik etki arasındaki hassas denge oldukça önemlidir. ROS, düşük ve orta seviyelerde proliferasyon veya hayatta kalmayı destekleyen sinyal yollarını aktive ederek hücreler için avantajlı olabilirler. Daha yüksek seviyelerde ise, proteinler, lipitler ve nükleik asitler gibi hücre yapılarına zarar vererek oksidatif stres oluşumuna sebep olurlar (Genestra 2007, Gill ve ark. 2017).

Aktif oksijen, iki muhtemel mekanizma ile kanser oluşumuna (karsinogenez) neden olabilir. Bunlar: sinyal transdüksiyonu ve transkripsiyon faktörleri üzerine etkileri ve hücre hasarından kaynaklanan gen mutasyonlarının indüksiyonudur (Noda ve Wakasugi 2001, Birben ve ark. 2012). DNA ve hücre membranındaki fosfolipitler, karbonhidratlar ve proteinler oksidatif stresten etkilenen hücrel mekanizmalardır. Oksitlenmiş ve hasarlı DNA, genetik mutasyonu indüklemeye potansiyeline sahiptir. Bazı telomer genlerinin,

serbest radikallerin varlığında mutasyona karşı yüksek derecede duyarlı olduğu ve tümör baskılayıcı gen olarak bilinen p53 ve hücre döngüsü ile ilişkili genlerde hasara neden olabileceği bilinmektedir (Friedberg ve Meira 2006). ROS' un DNA'da mutasyonlara sebep olması ve hücrelere zarar verme yeteneği, hücresel yaşlanma ve kanser başlangıcının zaman içinde birikmiş ROS hasarının sonucu ortaya çıkması olasılığını arttırmıştır (Gill ve ark. 2017).

Oksidan / antioksidan denge kanserin başlangıcı ve ilerlemesi için önemli bir faktör olarak rol oynar (Gupta ve ark. 2014). İnsan vücudu, doğal olarak in situ (endojen) üretilen veya gıdalar ve takviyeler (eksojen) yoluyla dışarıdan sağlanan antioksidanlar üreterek oksidatif stresi önlemeye yönelik çeşitli mekanizmalara sahiptir. Endojen ve ekzojen antioksidanlar, ROS' un neden olduğu zararları önleyerek ve onararak “serbest radikal süpürücü” olarak hareket eder; Bu nedenle bağışıklık savunmasını artırabilir, hastalık ve kanser riskini azaltabilir (Valko ve ark. 2006).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. U-2 OS Hücre Hattı

Çalışmada, insan kemik kanser hücre hattı (U-2 OS) kullanıldı. U-2 OS hücre hattı American Type Culture Collection (ATCC® HTB-96™)' dan temin edildi.

3.1.2. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3. 1. Kimyasallar

| Kimyasal Adı | Markası |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium (1X) (DMEM) | Gibco |
| Fetal Calf Serum (FCS) | Gibco |
| Hank's Balanced Salt Solution (1X) (HBSS) | Gibco |
| Trypsin/EDTA (1X) | Gibco |
| Penicillin/Streptomycin (10.000 Units/ml penicillin) (10.000 µg/ml streptomycin) | Gibco |
| 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) | Sigma |
| Acetic Acid | Sigma |
| Dimethyl Sulfoxide (DMSO) | Sigma |
| Hydrochloric Acid (HCl) | Sigma |

Çizelge 3. 2. (Devamı) Kimyasallar

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Hydrogen Peroxide (H ₂ O ₂) | Sigma |
| 1-Butanol | Merck |
| Pyridine | Merck |
| Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) | Sigma |
| Sodium dihydrogen phosphate monohydrate (NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O) | Merck |
| 1,1,3,3-Tetraethoxypropane | Sigma |
| 2-Thiobarbituric Acid (TBA) | Merck |
| Pierce BCA Protein Assay Kit | Thermo |

3.1.3. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3. 3. Cihazlar

| Cihazın Adı | Markası |
|---------------------------|-----------------------------------------|
| Biyogüvenlik Kabini | Thermo, HeraSafe KS Class II |
| Boncuklu Homojenizatör | Qiagen, TissueLyser LT |
| CO ₂ İnkübatör | NuAire NU-5830 |
| Hassas Terazı | OHAUS, Pioneer PA214C |
| Işık Mikroskobu | Novel, N-120 |
| İnverted Mikroskop | Nikon, Eclipse TS100 |
| pH Metre | HANNA Instruments, HI 2211 pH/ORP Meter |

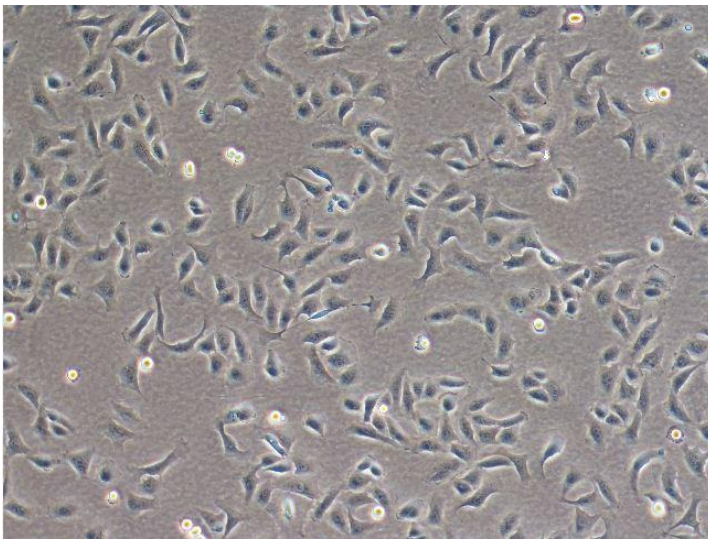
Çizelge 3. 4. (Devamı) Cihazlar

| | |
|--------------------------|-------------------------|
| Soğutmalı Santrifüj | Hettich, Universal 320R |
| Spektrofotometre | Thermo, Multiskan Go |
| Su Banyosu | Stuart, SWBD |
| Ultrasonik Homojenizatör | Elma, Elmasonic S 40 |

3.2. YÖNTEM

3.2.1. U-2 OS Hücre Kültürü

U-2 OS hücreleri (Şekil 3.1), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)(Gibco, Türkiye), % 10 Fetal Calf Serum (FCS)(Gibco, Türkiye) ve % 1 penisilin streptomisin (Gibco, Türkiye) içeren vasatta (CM) % 95 nem, % 5 CO₂ ve 37 °C koşulları sağlayan inkübatörde (NuAire NU-5830) üretildi. Kültür vasatı haftada iki kez değiştirildi ve hücreler yeterli sayıya ulaştıklarında deneylerde kullanıldı.



Şekil 3. 1. U-2 OS hücre morfolojisi

3.2.2. H₂O₂ ve Silibinin Süspansiyonlarının Hazırlanması

Çalışmada kullanılan hidrojen peroksit (H₂O₂) (Sigma, Türkiye), % 1 penisilin streptomisin (Gibco, Türkiye) takviye edilmiş DMEM (FCS içermeyen serum free medium; SF) içerisinde 0, 500, 650, 750 ve 800 µM dozlarda hazırlandı.

Silibinin (Sigma, Türkiye), dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözdürüldü daha sonra % 1 penisilin streptomisin (Gibco, Türkiye) takviye edilmiş DMEM (FCS içermeyen serum free medium; SF) içerisinde 0, 5, 10, 20, 30, 50, 75 ve 100 µM dozlarda hazırlandı.

3.2.3. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

Hücrelerin canlılığı tetrazolium tuzu 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide'un (MTT) metabolik aktivitenin bir göstergesi olan mitokondriyal enzimler tarafından, suda çözünmeyen formazana indirgenmesi esasına dayanan ve bu şekilde canlı hücre sayısını yansıtan yöntem ile değerlendirildi.

U-2 OS hücre dizilerinin 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına (Thermo, Türkiye) her bir kuyuya 0.5 mL (50000 hücre/mL) olacak şekilde, hücre tipine uygun CM içerisinde ekimi yapıldı. U-2 OS hücreleri kuyucukların tabanını % 70-80 oranında kapladıktan sonra serumsuz vasat içinde 24 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra, uygun doz ve süreleri belirlemek amacıyla SF ile hazırlanmış 0, 500, 650, 750 ve 800 µM dozlarda H₂O₂'ye 24 ve 48 saat ve SF ile hazırlanmış 0, 5, 10, 20, 30, 50, 75 ve 100 µM dozlarda silibinine 24 saat süreliğine maruz bırakıldı.

24 kuyucuklu hücre kültür kaplarının tabanına yapışık olarak kalan hücreler 1 mg/ml MTT (Sigma, Türkiye) ile 60 dakika süreyle inkübe edildikten sonra MTT solüsyonu döküldü ve hücrelerin üzerine 0.5 mL dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma, Türkiye) eklendi. Renkteki değişim spektrofotometre (Thermo, Multiskan GO) ile 595 ve 670 nm dalga boylarında okutularak iki dalga boyu arasındaki absorbans farkı alındı. Değerlendirmeler sonucunda oksidatif stres modeli oluşturulacak H₂O₂ uygun dozları 500 ve 650 µM ve süresi 24 saat, silibinin molekülünün deneylerde kullanılacak uygun dozları ise 5 ve 10 µM ve süresi 24 saat olarak belirlendi.

3.2.4. Oksidatif Stres Parametre Analizleri

U-2 OS hücre dizilerininin 75 cm²'lik hücre kültür kaplarına (flask) (Thermo, Türkiye) 200000 hücre/mL olacak şekilde uygun CM vasatı içerisinde ekimi yapıldı. Hücre tipine uygun şartlarda, hücre kültür kaplarının yüzeyinin % 70-80'ini kaplayınca kültüre edildi. Sürenin sonunda hücre kültür kaplarının içindeki CM vasatı uzaklaştırılıp, yerine serum içermeyen SF ile değiştirildi. Hücreler SF içinde 24 saat inkübe edildikten sonra 500 ve 650 µM dozlarında H₂O₂ ve 5 ve 10 µM silibinin varlığında ve yokluğunda 24 saat inkübe edildi. Süre sonunda flasttaki hücreler, kazıyıcı (scraper) ile kazınarak soğuk HBSS ile ayrı bir tüpe toplandı. Deneyler yapılmaya kadar -80 °C ye kaldırıldı.

Toplanan 500 µM H₂O₂, 650 µM H₂O₂, 5 µM silibinin, 10 µM silibinin, 500 µM H₂O₂+5 µM silibinin, 500 µM H₂O₂+10 µM silibinin, 650 µM H₂O₂+5 µM silibinin ve 650 µM H₂O₂+10 µM silibinin e 24 saat maruz bırakılmış hücreler, boncuklu homojenizatör (Qiagen, TissueLyser LT) ile 10 dk. homojenize edildikten sonra katalaz, MDA ve total protein tayini için kullanıldı.

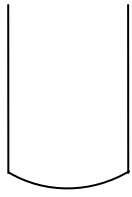
3.2.4.1. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Katalaz aktivitesinin ölçülmesi Aebi, H. (Aebi 1984) tarafından önerilen Lartillot, S. ve ark. (Lartillot ve ark. 1988) tarafından geliştirilmiş olan metoda göre yapıldı. Enzimatik aktivite tayini, H₂O₂'in 240 nm'deki absorbands değerinin enzimle etkileşmesi sonucu zamanla azalmasına bağlı olarak gerçekleştirildi.

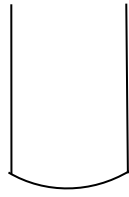
Katalaz enzim aktivitesinin ölçülmesi için gerekli çözeltiler;

- 50 mM fosfat tamponu (pH: 7,5)
- 10 mM H₂O₂ (fosfat tamponu ile hazırlandı)
- 1 M Hidroklorik asit (HCl)

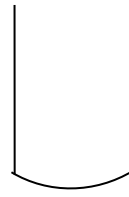
Her bir örnek için substrat, total ve reaksiyon tüpü olmak üzere 3 cam tüp hazırlandı ve her tüpe aşağıdaki gibi çözeltiler sırasıyla eklendi.

**Kör Tüpü**

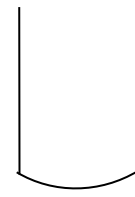
0,5 mL HCl
2,5 mL fosfat tamp.

**Substrat Tüpü**

2,5 mL H₂O₂
0,5 mL HCl

**Total Tüpü**

2,5 mL fosfat tamp.
0,5 mL HCl
0,1 mL örnek

**Reaksiyon Tüpü**

2,5 mL H₂O₂
0,1 mL örnek
2 dk. bekle
0,5 mL HCl

Kör tüpünün içerisine 0,5 mL 1M HCl ve 2,5 ml 50 mmol/L fosfat tamponu (pH: 7,5) eklendi. Substrat tüpüne 50 mmol/L fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış 10 mmol/L H₂O₂ ve 0,5 mL 1M HCl eklendi. Total tüpü içerisine 2,5 mL 50 mmol/L fosfat tamponu, 0,5 mL 1M HCl ve 0,1 mL test edilecek olan enzim çözeltisi eklendi. Son olarak reaksiyon tüpüne 50 mmol/L fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış 10 mmol/L H₂O₂ ve 0,1 mL test edilecek olan enzim çözeltisi eklendi. İki dakika sonra 0,5 mL 1M HCl çözeltisi eklenerek enzim substrat reaksiyonunun durması sağlandı ve 240 nm'de absorbanans değeri ölçüldü.

H₂O₂'in başlangıçtaki absorbanansını (A_s) belirlemek için kör tüpü içerisindeki çözeltinin absorbanansı ölçüldü. Proteinin neden olacağı absorbanansı (A_t) belirlemek için total tüpü içerisindeki çözeltinin absorbanansı ölçüldü.

Enzimatik aktiviteden dolayı absorbanans (A) değişiminde aşağıdaki formül kullanıldı.

$$A: (A_s + A_t) - A_r$$

A_s: H₂O₂'nin başlangıçtaki absorbanansı

A_t: Proteinin neden olacağı absorbanans

A_r: Reaksiyon tüpünün absorbanansı

Enzim aktivitesinin IU/ml cinsinden hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı.

$$Akt: (A \cdot V_t) / (\epsilon \cdot t \cdot V_e)$$

V_t: Toplam reaksiyon hacmi (mL)

V_e: Kullanılan enzim çözeltisinin hacmi (mL)

ε: H₂O₂'nin molar ekstinksiyon katsayısı (0,0396 cm²/μmol)

t: Reaksiyon zamanı (dakika)

Her bir örnekteki protein miktarı ölçülerek enzim aktivitesi IU/ μ g protein olarak hesaplandı.

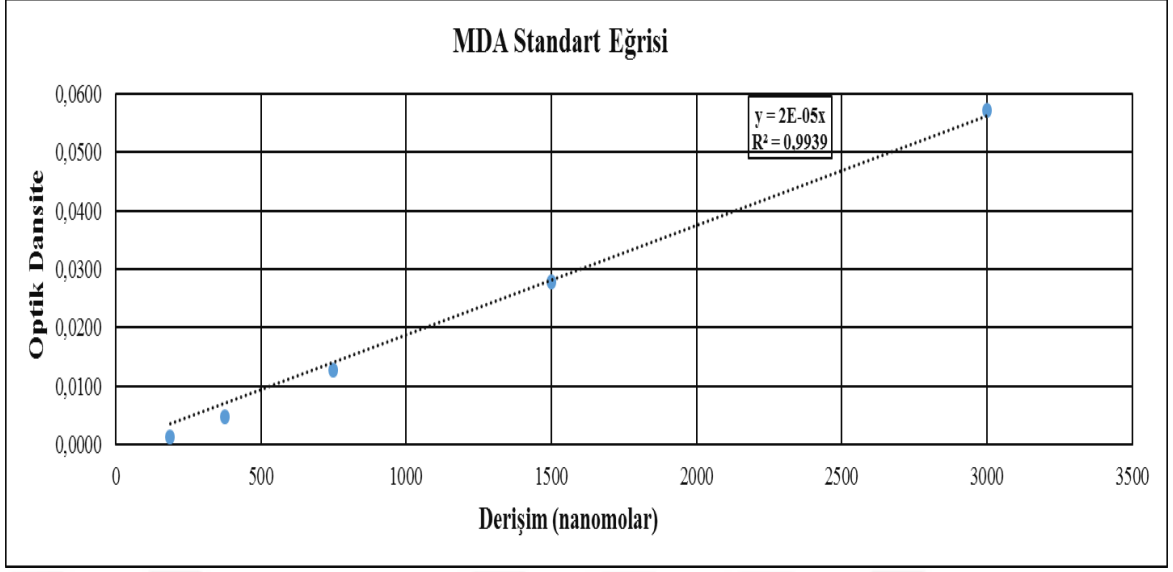
3.2.4.2. Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Belirlenmesi

MDA ölçümünde Sushil, K. J.(1986) tarafından bildirilen yöntem kullanılmıştır. Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, aerobik şartlarda pH: 3,5'te tiyobarbitürik asit ile 95 °C'de inkübasyonu sonucu pembe renkli bir kompleks oluşturur. Bu kompleksin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü ile MDA miktarı saptanır.

MDA düzeyinin belirlenmesi için gerekli çözeltiler;

- % 8,1' lik sodyum dodesil sülfat (SDS)
- % 20' lik asetik asit (pH 3,5)
- % 0.8 'lik tiyobarbitürik asit (TBA) (pH 3,5)
- n-bütanol/pridin çözeltisi (15/1)
- Standart: 1,1,3,3 tetraetoksipropan (d:0,92 g/ml)

İlk olarak 6000 nM hazırlanmış 1,1,3,3 tetraetoksipropan çözeltisi kullanılarak seri dilüsyonla 3000, 1500, 750, 375, 187.5, 93.75, 46.875, 23.43 ve 11.71 nM konsantrasyonlarda çalışma standartları hazırlandı. Standart çözeltilerin absorban değerleri 532 nm'de okutularak bir standart eğri grafiği oluşturuldu (Şekil 3.2) ve MDA miktarı nmol cinsinden belirlendi. Daha sonra her örnekteki protein miktarı ölçülerek MDA miktarı nmol/mg protein cinsinden hesaplandı.



Şekil 3. 2. MDA standart eğri grafiği

Her bir örnek için 1'er cam kapaklı tüp kullanıldı. Bu tüplere sırasıyla 1.5 mL örnek, 0.2 mL SDS, 1.5 mL asetik asit, 1.5 mL TBA ve 150 µL distile su eklendi. Kör tüpü, içerisine örnek dışında bütün çözeltiler eklenerek hazırlandı. Tüpler 95°C de 30 dakika inkübe edildi ve soğutulularak üzerine 5 mL n-bütanol/piridin çözeltisi ve 150 µL distile su ilave edildi ve tüplerin ağzı kapatılarak iyice çalkalandı. Daha sonra 4000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Üsteki süpernatant kısmı alınarak 96 kuyucuklu platenin her kuyusuna 200' er µL eklendi ve spektrofotometre (Thermo, Multiskan GO) ile 532 nm' de okutuldu.

3.2.5. İstatistiksel Analiz

Bu tez çalışmasında hücre canlılığının değerlendirilmesi GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc. USA) programı kullanılarak yapıldı. Deneyler üç defa tekrarlandı ve her tekrarında n=6 olacak şekilde çalışma yapıldı. Elde edilen veriler One-way analysis of variance, ANOVA yöntemiyle Dunnet testi yapılarak kıyaslandı. Tüm veriler kendi içinde kontrol grubu olan, hiç bir maddenin uygulanmadığı grup ile karşılaştırıldı ve p<0.05 değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

Oksidatif stres parametre analizlerinin değerlendirmelerinde SPSS 20 programı kullanıldı. Deneyler üç defa tekrarlandı. Verilerin analizleri Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı ve $p < 0.05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

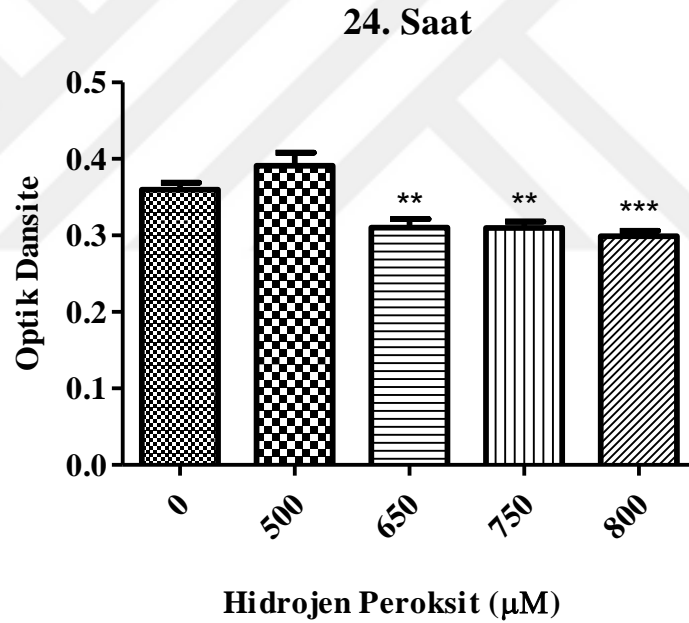


4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

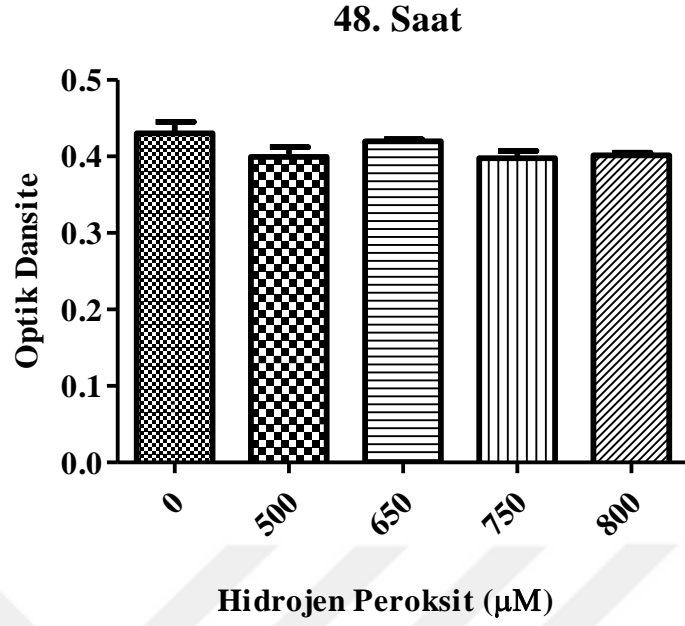
U-2 OS hücreleri, oksidatif stres modeli oluşturmak için uygun doz ve maruziyet süresi belirlemek amacıyla 0, 500, 650, 750 ve 800 μM dozlarında H_2O_2 'ye 24 ve 48 saat süreyle maruz bırakıldıktan sonra MTT yöntemiyle hücre canlılığı analizi yapıldı.

H_2O_2 'nin, U-2 OS hücrelerine 24 saatlik inkübasyonu sonunda 0 grubu ile karşılaştırıldığında 500 μM 'lık dozda anlamlı bir fark görülmezken 650, 750 ve 800 μM 'lık dozların hücre canlılığını anlamlı derecede azalttığı bulundu (sırasıyla $p<0.01$, $p<0.001$) (Şekil 4.1).



Şekil 4. 1. U-2 OS hücrelerinde 24 saatlik H_2O_2 maruziyeti sonucu hücre canlılığının değerlendirilmesi. İstatistiksel olarak anlamlılık * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ olarak ifade edilmiştir.

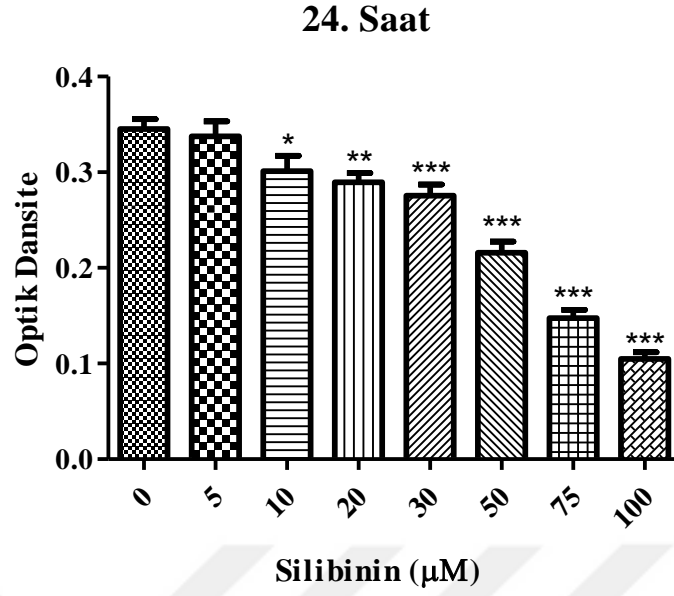
H_2O_2 'nin, U-2 OS hücrelerine 48 saatlik inkübasyonu sonunda 0 grubu ile karşılaştırıldığında hiçbir dozda hücre canlılığı üzerine anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2. U-2 OS hücrelerinde 48 saatlik H_2O_2 maruziyeti sonucu hücre canlılığının değerlendirilmesi.

U-2 OS hücreleri, silibinin için uygun dozu belirlemek amacıyla ise 0, 5, 10, 20, 30, 50, 75 ve 100 μM dozlarında silibinin maddesine 24 saat süreyle maruz bırakıldıktan sonra MTT yöntemiyle hücre canlılığı analizi yapıldı.

Silibinin maddesinin U-2 OS hücrelerine 24 saatlik inkübasyonu sonunda 5 μM 'lık dozda 0 grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmezken 10, 20, 30, 50, 75 ve 100 μM 'lık silibinin dozlarının hepsinin hücre canlılığını anlamlı derecede azalttığı bulundu (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$) (Şekil 4.3).



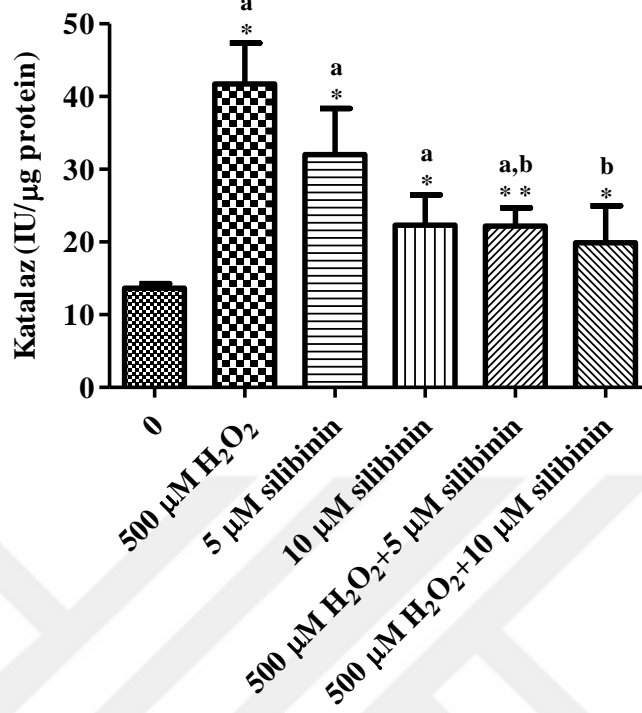
Şekil 4. 3. U-2 OS hücrelerinde 24 saatlik silibinin maruziyeti sonucu hücre canlılığının değerlendirilmesi
İstatistiksel olarak anlamlılık * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ olarak ifade edilmiştir.

4.2. Katalaz Enzim Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesi

500 µM H₂O₂, 650 µM H₂O₂, 5 µM silibinin, 10 µM silibinin, 500 µM H₂O₂+5 µM silibinin, 500 µM H₂O₂+10 µM silibinin, 650 µM H₂O₂+5 µM silibinin ve 650 µM H₂O₂+10 µM silibinine 24 saat süreyle maruz bırakılan hücrelerdeki katalaz ölçüm sonuçları değerlendirildi.

Kontrol grubu olarak H₂O₂ uygulanmayan (0 µM H₂O₂) grup alınıp, kontrolle her bir doz ayrı ayrı karşılaştırıldığında, 500 µM H₂O₂, 5 µM silibinin, 10 µM silibinin ve 500 µM H₂O₂+5 µM silibinin dozlarında katalaz enzim aktivite düzeyinde anlamlı bir artış gözlenirken (sırasıyla $p=0.034$, $p=0.014$ $p=0.05$, $p=0.034$), 500 µM H₂O₂+10 µM silibinin dozu ile karşılaştırıldığında, katalaz enzim aktivite düzeyinde anlamlı bir fark görülmedi ($p=0.48$) (Şekil 4.4 ve Çizelge 4.1). Kontrol grubu olarak 500 µM H₂O₂'ye (24 saat) maruz bırakılmış oksidatif stresli model alındığında ise, 500 µM H₂O₂+5 µM silibinin ve 500 µM H₂O₂+10 µM silibinin dozları ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında, 500 µM H₂O₂ dozuna göre katalaz enzim aktivite düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p=0.05$) (Şekil 4.4 ve Çizelge 4.1).

24. Saat

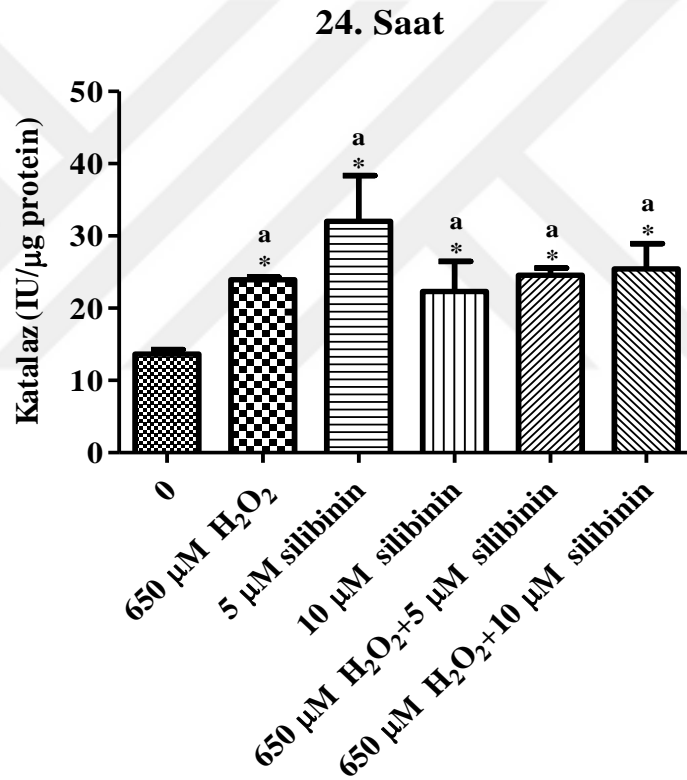


Şekil 4. 4. U-2 OS hücrelerinde 500 µM H₂O₂ maruziyeti sonucu katalaz enzim aktivite düzeyleri. 0 ile karşılaştırıldığında anlamlı fark olan gruplar a harfi ile gösterilmiştir. 500 µM H₂O₂ ile karşılaştırıldığında anlamlı fark olan gruplar b harfi ile gösterilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık *p<0.05, **p<0.01 ve ***p<0.001 olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4. 1. U-2 OS hücrelerinde 500 µM H₂O₂ maruziyeti sonucu katalaz enzim aktivite düzeyleri

| GRUPLAR | Ortalama ± Standart Sapma | Ortanca | p değeri (0 µM' a kıyasla) | p değeri (500 µM' a kıyasla) |
|--------------------------------------------------------|---------------------------|---------|----------------------------|------------------------------|
| 0 µM | 13.6629 ± 1.24010 | 13.6840 | - | 0.034 |
| 500 µM H ₂ O ₂ | 41.7131 ± 9.78020 | 38.3152 | 0.034 | - |
| 5 µM silibinin | 32.0308 ± 14.10929 | 30.7303 | 0.014 | 0.297 |
| 10 µM silibinin | 22.3156 ± 9.34004 | 21.9621 | 0.050 | 0.053 |
| 500 µM H ₂ O ₂ + 5 µM silibinin | 22.1748 ± 4.38395 | 21.3954 | 0.034 | 0.050 |
| 500 µM H ₂ O ₂ + 10 µM silibinin | 19.8809 ± 8.80744 | 21.0770 | 0.480 | 0.050 |

Kontrol grubu olarak H₂O₂ uygulanmayan (0 µM H₂O₂) grup alınıp, kontrolle her bir doz ayrı ayrı karşılaştırıldığında, 650 µM H₂O₂, 5 µM silibinin, 10 µM silibinin, 650 µM H₂O₂+5 µM silibinin ve 650 µM H₂O₂+10 µM silibinin dozlarında katalaz enzim aktivite düzeyinde anlamlı bir artış gözlemlendi (sırasıyla p=0.021, p=0.014, p=0.05, p=0.021, p=0.021) (Şekil 4.5 ve Çizelge 4.2). Kontrol grubu olarak 650 µM H₂O₂'ye (24 saat) maruz bırakılmış oksidatif stresli model alındığında ise, 650 µM H₂O₂+5 µM silibinin ve 650 µM H₂O₂+10 µM silibinin dozları ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında, katalaz enzim aktivite düzeylerinde anlamlı bir fark görülmedi (sırasıyla p=0.564, p=1.000) (Şekil 4.5 ve Çizelge 4.2).



Şekil 4. 5. U-2 OS hücrelerinde 650 µM H₂O₂ maruziyeti sonucu katalaz enzim aktivite düzeyleri. 0 ile karşılaştırıldığında anlamlı fark olan gruplar a harfi ile gösterilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık *p<0.05, **p<0.01 ve ***p<0.001 olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4. 2. U-2 OS hücrelerinde 650 μM H_2O_2 maruziyeti sonucu katalaz enzim aktivite düzeyleri.

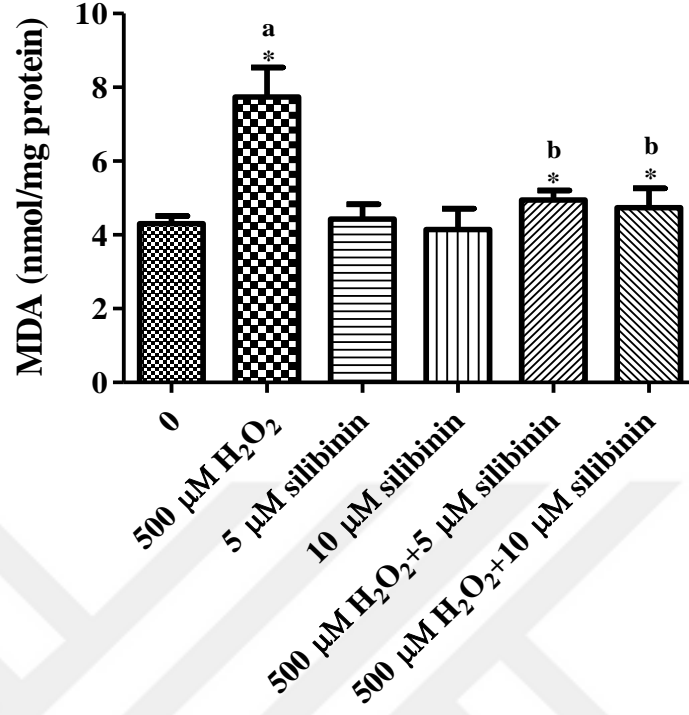
| GRUPLAR | Ortalama \pm Standart Sapma | Ortanca | p değeri (0 μM ' a kıyasla) | p değeri (650 μM ' a kıyasla) |
|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------|---------|-------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 0 μM | 13.6629 \pm 1.24010 | 13.6840 | - | 0.021 |
| 650 μM H_2O_2 | 23.9207 \pm 0.76561 | 24.1729 | 0.021 | - |
| 5 μM silibinin | 32.0308 \pm 14.10929 | 30.7303 | 0.014 | 0.624 |
| 10 μM silibinin | 22.3156 \pm 9.34004 | 21.9621 | 0.050 | 0.221 |
| 650 μM H_2O_2 + 5 μM silibinin | 24.5726 \pm 1.95368 | 25.0058 | 0.021 | 0.564 |
| 650 μM H_2O_2 + 10 μM silibinin | 25.4570 \pm 6.97276 | 23.3545 | 0.021 | 1.000 |

4.3. MDA Düzeylerinin Belirlenmesi

500 μM H_2O_2 , 650 μM H_2O_2 , 5 μM silibinin, 10 μM silibinin, 500 μM H_2O_2 +5 μM silibinin, 500 μM H_2O_2 +10 μM silibinin, 650 μM H_2O_2 +5 μM silibinin ve 650 μM H_2O_2 +10 μM silibinine 24 saat süreyle maruz bırakılmış hücrelerdeki MDA düzeyleri değerlendirildi.

Kontrol grubu olarak H_2O_2 uygulanmayan (0 μM H_2O_2) grup alınıp karşılaştırıldığında, 500 μM H_2O_2 dozunda MDA düzeyinde anlamlı bir artış gözlenirken ($p=0.05$), 5 μM silibinin, 10 μM silibinin, 500 μM H_2O_2 +5 μM silibinin ve 500 μM H_2O_2 +10 μM silibinin dozları ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında MDA düzeyinde anlamlı bir değişiklik görülmedi (sırasıyla $p=0.827$, $p=0.513$, $p=0.127$, $p=0.513$) (Şekil 4.6 ve Çizelge 4.3). Kontrol grubu olarak 500 μM H_2O_2 'ye (24 saat) maruz bırakılmış oksidatif stresli model alındığında ise, 500 μM H_2O_2 +5 μM silibinin ve 500 μM H_2O_2 +10 μM silibinin dozları ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında, 500 μM H_2O_2 dozuna göre MDA düzeyinde anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p=0.05$) (Şekil 4.6 ve Çizelge 4.3).

24. Saat

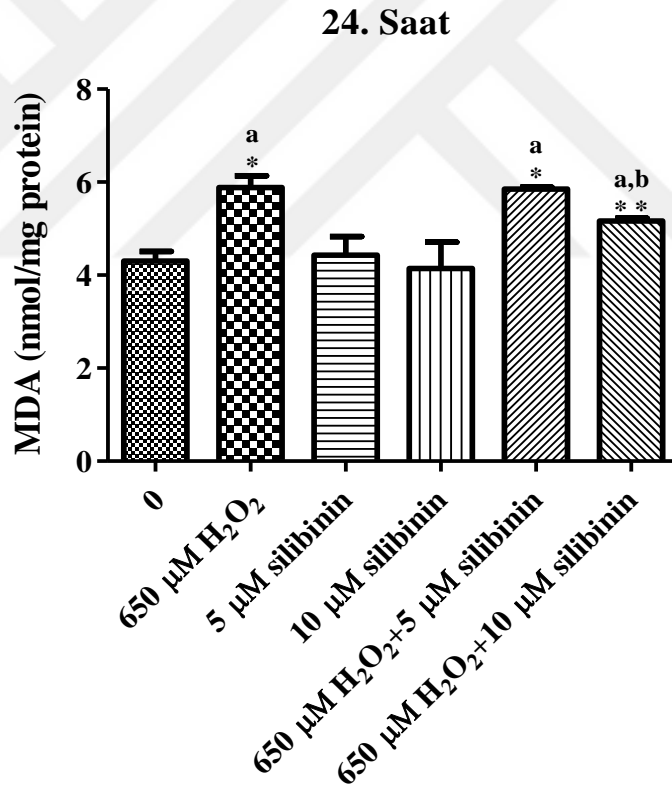


Şekil 4. 6. U-2 OS hücrelerinde 500 µM H₂O₂ maruziyeti sonucu MDA düzeyleri. 0 ile karşılaştırıldığında anlamlı fark olan gruplar a harfi ile gösterilmiştir. 500 µM H₂O₂ ile karşılaştırıldığında anlamlı fark olan gruplar b harfi ile gösterilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık *p<0.05, **p<0.01 ve ***p<0.001 olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4. 3. U-2 OS hücrelerinde 500 µM H₂O₂ maruziyeti sonucu MDA düzeyleri

| GRUPLAR | Ortalama ± Standart Sapma | Ortanca | p değeri (0 µM' a kıyasla) | p değeri (500 µM' a kıyasla) |
|--------------------------------------------------------|---------------------------|---------|----------------------------|------------------------------|
| 0 µM | 4.3048 ± 0.35558 | 4.1787 | - | 0.050 |
| 500 µM H ₂ O ₂ | 7.7356 ± 1.39608 | 8.4222 | 0.050 | - |
| 5 µM silibinin | 4.4314 ± 0.69402 | 4.2165 | 0.827 | 0.050 |
| 10 µM silibinin | 4.1455 ± 0.97716 | 3.7392 | 0.513 | 0.050 |
| 500 µM H ₂ O ₂ + 5 µM silibinin | 4.9435 ± 0.45265 | 4.7793 | 0.127 | 0.050 |
| 500 µM H ₂ O ₂ + 10 µM silibinin | 4.7383 ± 0.90553 | 4.2667 | 0.513 | 0.050 |

Kontrol grubu olarak H₂O₂ uygulanmayan (0 µM H₂O₂) grup alınıp, 650 µM H₂O₂, 650 µM H₂O₂+5 µM silibinin ve 650 µM H₂O₂+10 µM silibinin dozları ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında MDA düzeyinde anlamlı bir artış gözlenirken (p=0.05), 5 µM silibinin ve 10 µM silibinin dozları ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında MDA düzeyinde anlamlı bir değişiklik görülmedi (sırasıyla p=0.827, p=0.513) (Şekil 4.7 ve Çizelge 4.4). Kontrol grubu olarak 650 µM H₂O₂'ye (24 saat) maruz bırakılmış oksidatif stresli model alındığında ise, 650 µM H₂O₂+5 µM silibinin ve 650 µM H₂O₂+10 µM silibinin dozları ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında, 650 µM H₂O₂+5 µM silibinin dozunda MDA düzeyinde anlamlı bir değişiklik görülmezken (p=0.513), 650 µM H₂O₂+10 µM silibinin dozunda MDA düzeyinde anlamlı bir azalma gözlemlendi (p=0.05) (Şekil 4.7 ve Çizelge 4.4).



Şekil 4. 7. U-2 OS hücrelerinde 650 µM H₂O₂ maruziyeti sonucu MDA düzeyleri. 0 ile karşılaştırıldığında anlamlı fark olan gruplar a harfi ile gösterilmiştir. 650 µM H₂O₂ ile karşılaştırıldığında anlamlı fark olan gruplar b harfi ile gösterilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık *p<0.05, **p<0.01 ve ***p<0.001 olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4. 4. U-2 OS hücrelerinde 650 μM H_2O_2 maruziyeti sonucu MDA düzeyleri

| GRUPLAR | Ortalama \pm Standart Sapma | Ortanca | p değeri (0 μM' a kıyasla) | p değeri (650 μM' a kıyasla) |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| 0 μM | 4.3048 \pm 0.35558 | 4.1787 | - | 0.050 |
| 650 μM H_2O_2 | 5.8811 \pm 0.44447 | 6.1361 | 0.050 | - |
| 5 μM silibinin | 4.4314 \pm 0.69402 | 4.2165 | 0.827 | 0.050 |
| 10 μM silibinin | 4.1455 \pm 0.97716 | 3.7392 | 0.513 | 0.050 |
| 650 μM H_2O_2 + 5 μM silibinin | 5.8472 \pm 0.07268 | 5.8106 | 0.050 | 0.513 |
| 650 μM H_2O_2 + 10 μM silibinin | 5.1627 \pm 0.10848 | 5.1771 | 0.050 | 0.050 |

5. TARTIŞMA

Çocukluk ve gençlik çağında en sık görülen kötü huylu kemik tümörlerinden olan osteosarkom için en temel tedavi cerrahi ve sistemik kemoterapidir ancak günümüzde cerrahi tedaviden sonraki beş yıllık sağ kalım oranı yaklaşık sadece % 20'dir. Bu nedenle osteosarkom için yeni tedavi yaklaşımları ve yeni terapötik ajanların keşfedilmesi/araştırılması oldukça önemli hale gelmiştir.

Flavonoidler, bitkiler tarafından sentezlenen büyük bir polifenolik bileşik ailesidir ve esas olarak antioksidan özelliklerine bağlı birçok biyolojik etkiye sahiptirler (Rice-Evans ve ark. 1996). Silibinin özellikle anti-oksidan, hepatoprotektif ve anti-kanser özelliklerinden dolayı kapsamlı olarak çalışılan popüler diyet takviyelerinden biridir. Ancak bu maddenin kemik kanseri üzerine antioksidan etkileri araştırılmamıştır.

Biz bu tez çalışmasında, birçok doku ve hücre grubunda çeşitli biyoaktiviteleri ortaya konan silibinin maddesinin, insan kemik kanser hücre hattı olan U-2 OS hücreleri üzerindeki antioksidan aktivitesi ile bu maddenin U-2 OS'nin hücre proliferasyonu üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık. Bu amaçla U-2 OS hücre hattını farklı dozlarda H₂O₂ ye maruz bırakarak oksidatif stres oluşturup, daha sonra uygun dozlarda silibinin maddesi vererek bu maddenin katalaz enzim aktivitesi ile MDA (malondialdehit) seviyesi ve hücre proliferasyonu üzerine etkilerini araştırdık.

Çalışmamızda, U-2 OS hücreleri 0, 5, 10, 20, 30, 50, 75 ve 100 µM dozlarında silibinin maddesine 24 saat süreyle maruz bırakıldıktan sonra 5 µM'lık dozda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmezken 10, 20, 30, 50, 75 ve 100 µM'lık silibinin dozlarının hepsinin hücre canlılığını anlamlı derecede azalttığı bulduk. Yapılan birçok çalışmada, silibininin insan pankreatik karsinomu (Ge ve ark. 2011), insan mesane karsinomu (Varga ve ark. 2001), insan prostat adenokarsinomu (Singh ve Agarwal 2004, Mokhtari ve ark. 2008), insan meme ve serviks karsinomu (Singh ve Agarwal 2004), insan kolon kanseri (Hogan ve ark. 2007, Kauntz ve ark. 2012) hücreleri gibi çeşitli malign hücre hatlarına karşı güçlü anti-proliferatif etkisi olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda silibininin antioksidan etkilerini belirlemek için, katalaz enzim aktivitesi ile MDA düzeylerini değerlendirirken iki ayrı kontrol grubu kullandık. Birincisi H₂O₂ ile muamele edilmemiş (0 µM H₂O₂) hücre grubu diğeri sadece 500 ya da 650 µM H₂O₂ ile muamele edilmiş hücre grubu. Birincisi H₂O₂ ile oksidatif stresi uyarılmış hücrelerin,

uyarılmamış hücre grubuna göre katalaz enzim aktivitesi ve MDA düzeylerini belirlemek amacıyla kullanılırken, ikincisi silibininin antioksidan etkisini belirlemek amacıyla kullanıldı.

Hidrojen peroksidin suya ve moleküler oksijene dönüşümünü çok etkili bir şekilde katalizleyen katalaz, ortamda hidrojen peroksit konsantrasyonunun arttığı durumlarda optimum aktivite göstermektedir. Çalışmamızda 24 saat süreyle 500 μM ve 650 μM H_2O_2 'ye maruz bırakılan ve bırakılmayan U-2 OS hücrelerindeki katalaz enzim aktivite düzeylerini karşılaştırdığımızda anlamlı bir artış bulduk. Çok çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde ortaya çıkan hidrojen peroksit (H_2O_2), hücre hasarını artırabilir, aynı zamanda bir sinyal molekülü olarak hücre düzenleyici olabilir ve sinyal yollarını da aktive edebilir. Kanser hücrelerinde, onkogenik uyarıya bağlı olabilen redoks dengesinin bozulduğu bilinmektedir. Birçok kanserde SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimler ile ilgili sinyal yollarındaki değişiklikler açıkça görülmektedir (McEligot ve ark. 2005). Bu çalışmada U-2 OS hücreleri, H_2O_2 ile aynı anda silibinin maddesi ile muamele edildiğinde 500 μM H_2O_2 +5 μM silibinin dozunda H_2O_2 ile muamele edilmemiş (0 μM H_2O_2) hücrelerdekine göre katalaz enzim aktivite düzeylerinin arttığı gözlemlendi. Ayrıca 500 μM H_2O_2 +5 μM silibinin ve 500 μM H_2O_2 +10 μM silibinin dozlarında sadece 500 μM H_2O_2 dozuna göre anlamlı bir azalma gözlemlendi. Bulgularımızla uyumlu olarak, Vecchione ve ark. yaptığı çalışmada steatotik hepatic hücrelerinin 50 $\mu\text{mol/L}$ silibinin ile maruziyeti sonucu katalaz enzim aktivitesinin kontrol hücrelere göre anlamlı derecede azaldığını bulmuştur (Vecchione ve ark. 2016).

Guan ve ark. yaptığı çalışmada *Alpinia oxyphylla* çekirdeklerinden izole edilen fenolik bir bileşik olan 1.2 mM PCA (protokansik asit)'nin varlığında veya yokluğunda PC12 hücrelerini 24 saat boyunca 0.4 mM H_2O_2 'ye maruz bırakmışlardır. Tek başına PCA veya H_2O_2 , enzim aktivitesini etkilemezken, 24 saat boyunca H_2O_2 'ye maruz kalan 1.2 mM PCA ile muamele edilen gruptaki hücrelerde katalaz enzim aktivitesinin önemli ölçüde arttığını bulmuştur (Guan ve ark. 2006). Luo ve ark çalışmamızda kullandığımız hücre hattından, farklı bir hücre hattıyla yaptıkları çalışmada, MRC-5 hücreleri 6 saat süreyle 200 μM H_2O_2 'ye maruz bıraktıklarında katalaz enzim aktivitesinin azaldığını, ancak F2 (turp yaprağı ekstraktı) ile muamele ettiklerinde katalaz enzim aktivitesinin doza bağımlı bir şekilde arttığını bulmuştur. Luo ve ark çalışmalarında sırasıyla 12.5, 25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ F2

ile muamele edilen hücrelerde katalaz enzim aktivitesi, 1.52, 2.57 ve 3.45 kat artmış ve bu sayede redoks potansiyelini koruduğunu ortaya atmışlardır (Luo ve ark. 2018).

Özellikle kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalığın tedavisinde ve oluşumunun önlenmesinde, flavonoidlerin antioksidan etkilerinin araştırılması üzerine birçok çalışma yapılmıştır (Rice-Evans 2001). Antioksidanlar olarak işlev gören fenolik bileşikler, serbest radikal zincirlerinin sonlandırıcıları olarak ve lipid peroksidasyonunu katalize edebilen redoks-aktif metal iyonlarının kenetleyicileri olarak işlev görürler (Schroeter ve ark. 2002). Bilindiği gibi lipid peroksidasyonu oksidatif stresin yaygın bir sonucudur ve lipid peroksidasyonu yıkım ürünü olarak MDA oluşmaktadır. Flavonoidler, lipidleri çeşitli mekanizmalarla oksidatif hasara karşı korur (Halliwell ve Gutteridge 2015).

Bizim çalışmamızda da, 24 saat süreyle 500 μM H_2O_2 ve 650 μM H_2O_2 ·ye maruz bırakılan U-2 OS hücrelerinde MDA düzeylerinin H_2O_2 ile muamele edilmemiş (0 μM H_2O_2) gruba göre arttığı, H_2O_2 ile aynı anda silibinin maddesi ile muamele edildiğinde ise 650 μM H_2O_2 +5 μM silibinin ve 650 μM H_2O_2 +10 μM silibinin dozlarında MDA düzeylerinin yine bir artış olduğu ancak 500 μM H_2O_2 +5 μM silibinin ve 500 μM H_2O_2 +10 μM silibinin ile muamele edilen hücrelerde bir değişiklik olmadığı gözlemlendi. Ayrıca 500 μM H_2O_2 +5 μM silibinin ve 500 μM H_2O_2 +10 μM silibinin dozlarında sadece 500 μM H_2O_2 dozuna göre anlamlı bir azalma gözlemlendi. 650 μM H_2O_2 +10 μM silibinin dozunda ise sadece 650 μM H_2O_2 dozuna göre anlamlı bir azalma gözlenirken, 650 μM H_2O_2 +5 μM silibinin dozunda bir değişiklik olmadığı gözlemlendi. Dolayısıyla silibininin doza bağımlı olarak antioksidan etki gösterdiği gözlemlenmiş oldu.

Jiang ve ark. yaptığı çalışmada H_2O_2 uyarılı HepG2 hücrelerinde hücre içi ROS miktarına bağlı olarak MDA seviyesinde önemli bir artış olduğunu bulmuştur. Bu hücreler daha sonra bir antioksidan olan N-acetyl-serotonin (NAS) ile muamele ettiklerinde NAS'ın hücre içi ROS miktarında önemli değişikliklere sebep olduğu ve MDA miktarını azalttığını bulmuştur. H_2O_2 'nin, endojen antioksidan savunma mekanizmalarının dengesini bozarak HepG2 hücrelerinde ROS birikimini uyarabileceğini ve NAS'ın H_2O_2 ile indüklenen ROS üretimini etkili bir şekilde azalttığını gösterdiler (Jiang ve ark. 2014). Vecchione ve ark. farklı bir hücre hattıyla yaptıkları çalışmada steatotik hepatic hücrelerinin 50 $\mu\text{mol/L}$ silibinine 24 saat süreyle maruziyeti sonucu kontrol hücrelerine göre bulgularımızla uyumlu olarak MDA seviyesinde anlamlı bir azalma bulmuştur (Vecchione ve ark. 2016). Antioksidan özelliği olan flavonoid içeren bitki ekstraktının, çalışmamızdaki hücre

hattından farklı, H₂O₂ ile uyarılmış bir hücre hattında kontrol grubuna göre MDA düzeylerinde artışa neden olduğu bulunmuştur (Luo ve ark. 2018).



6. SONUÇ

Sonuç olarak çalışmamızda; silibinin molekülünün U-2 OS hücrelerinde anti-proliferatif etki yaptığı, doza bağımlı olarak katalaz enzim aktivitesi ve MDA düzeyinde azalmaya sebep olduğunu gösterdik.



7. KAYNAKLAR

1. **Abenavoli L, Capasso R, Milic N, Capasso F.** Milk Thistle in Liver Diseases: Past, Present, Future. *Phytotherapy Research*, **2010**, 24(10). s. 1423-1432.
2. **Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M.** Flavonoids as Antioxidants in Plants: Location and Functional Significance. *Plant Science*, **2012**, 196. s. 67-76.
3. **Agati G, Tattini M.** Multiple Functional Roles of Flavonoids in Photoprotection. *New Phytologist*, **2010**, 186(4). s. 786-793.
4. **Althagafy HS, Meza-Aviña ME, Oberlies NH, Croatt MP.** Mechanistic Study of the Biomimetic Synthesis of Flavonolignan Diastereoisomers in Milk Thistle. *The Journal of organic chemistry*, **2013**, 78(15). s. 7594-7600.
5. **Altınışık M.** Serbest Oksijen Radikalleri Ve Antioksidanlar. *ADÜ Tıp Fakültesi, Biyokimya AD., Aydın*, **2000**.
6. **Azad N, Rojanasakul Y, Vallyathan V.** Inflammation and Lung Cancer: Roles of Reactive Oxygen/Nitrogen Species. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, **2008**, 11(1). s. 1-15.
7. **Baykara O.** Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, **2016**, 5(3). s. 154-165.
8. **Bijak M.** Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum Marianum* L. Gaernt.)—Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. *Molecules*, **2017**, 22(11). s. 1942.
9. **Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O.** Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, **2012**, 5(1). s. 9.
10. **Borsari M, Gabbi C, Ghelfi F, Grandi R, Saladini M ve ark.** Silybin, a New Iron-Chelating Agent. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2001**, 85(2-3). s. 123-129.
11. **Broadhead ML, Clark J, Myers DE, Dass CR, Choong PF.** The Molecular Pathogenesis of Osteosarcoma: A Review. *Sarcoma*, **2011**, 2011.
12. **Bucci E.** Thermodynamic Approach to Oxygen Delivery in Vivo by Natural and Artificial Oxygen Carriers. *Biophysical chemistry*, **2009**, 142(1-3). s. 1-6.
13. **Cadenas E, Davies KJ.** Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress, and Aging. *Free Radical Biology and Medicine*, **2000**, 29(3-4). s. 222-230.
14. **Chhabra N, Buzarbaruah S, Singh R, Kaur J.** Silibinin: A Promising Anti-Neoplastic Agent for the Future? A Critical Reappraisal. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, **2013**, 3(3). s. 206.
15. **de Groot Hd, Rauhen U.** Tissue Injury by Reactive Oxygen Species and the Protective Effects of Flavonoids. *Fundamental & clinical pharmacology*, **1998**, 12(3). s. 249-255.
16. **Deep G, Agarwal R.** Antimetastatic Efficacy of Silibinin: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential against Cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, **2010**, 29(3). s. 447-463.
17. **Deep G, Singh R, Agarwal C, Kroll D, Agarwal R.** Silymarin and Silibinin Cause G1 and G2-M Cell Cycle Arrest Via Distinct Circuitries in Human Prostate Cancer Pc3 Cells: A Comparison of Flavanone Silibinin with Flavanolignan Mixture Silymarin. *Oncogene*, **2006**, 25(7). s. 1053.
18. **Dehmlow C, Erhard J, de Groot H.** Inhibition of Kupffer Cell Functions as an Explanation for the Hepatoprotective Properties of Silibinin. *Hepatology*, **1996**, 23(4). s. 749-754.
19. **Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F.** Flavonoids: Old and New Aspects of a Class of Natural Therapeutic Drugs. *Life sciences*, **1999**, 65(4). s. 337-353.
20. **Doyle LA.** Sarcoma Classification: An Update Based on the 2013 World Health Organization Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone. *Cancer*, **2014**, 120(12). s. 1763-1774.
21. **Durfee RA, Mohammed M, Luu HH.** Review of Osteosarcoma and Current Management. *Rheumatology and therapy*, **2016**, 3(2). s. 221-243.
22. **Fang Y-Z, Yang S, Wu G.** Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition*, **2002**, 18(10). s. 872-879.
23. **Fantel AG.** Reactive Oxygen Species in Developmental Toxicity: Review and Hypothesis. *Teratology*, **1996**, 53(3). s. 196-217.
24. **Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M ve ark.** The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA oncology*, **2015**, 1(4). s. 505-527.

25. **Friedberg EC, Meira LB.** Database of Mouse Strains Carrying Targeted Mutations in Genes Affecting Biological Responses to DNA Damage Version 7. *DNA repair*, **2006**, 5(2). s. 189-209.
26. **Fu H, Katsumura Y, Lin M, Hata K, Muroya Y ve ark.** Fast Repair Activities Towards Dgmp Hydroxyl Radical Adducts by Silybin and Its Analogues. *Journal of radiation research*, **2008**, 49(6). s. 609-614.
27. **Ge Y, Zhang Y, Chen Y, Li Q, Chen J ve ark.** Silibinin Causes Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Some Human Pancreatic Cancer Cells. *International journal of molecular sciences*, **2011**, 12(8). s. 4861-4871.
28. **Genestra M.** Oxyl Radicals, Redox-Sensitive Signalling Cascades and Antioxidants. *Cellular signalling*, **2007**, 19(9). s. 1807-1819.
29. **Gharagozloo M, Khoshdel Z, Amirghofran Z.** The Effect of an Iron (Iii) Chelator, Silybin, on the Proliferation and Cell Cycle of Jurkat Cells: A Comparison with Desferrioxamine. *European journal of pharmacology*, **2008**, 589(1-3). s. 1-7.
30. **Guan S, Bao Y-M, Jiang B, An L-J.** Protective Effect of Protocatechuic Acid from *Alpinia Oxyphylla* on Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Pc12 Cell Death. *European journal of pharmacology*, **2006**, 538(1-3). s. 73-79.
31. **Gupta RK, Patel AK, Shah N, Chaudhary A, Jha U ve ark.** Oxidative Stress and Antioxidants in Disease and Cancer. *Asian Pac Cancer Prev*, **2014**, 15. s. 4405-4409.
32. **Gültekin M, Boztaş G.** Türkiye Kanser İstatistikleri. *Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu*, **2014**, 43.
33. **Halliwell B.** Free Radicals, Antioxidants, and Human Disease: Curiosity, Cause, or Consequence? *The lancet*, **1994**, 344(8924). s. 721-724.
34. **Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ.** Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, **2002**, 13(10). s. 572-584.
35. **Hogan FS, Krishnegowda NK, Mikhailova M, Kahlenberg MS.** Flavonoid, Silibinin, Inhibits Proliferation and Promotes Cell-Cycle Arrest of Human Colon Cancer. *Journal of Surgical Research*, **2007**, 143(1). s. 58-65.
36. **Jabs T.** Reactive Oxygen Intermediates as Mediators of Programmed Cell Death in Plants and Animals. *Biochemical pharmacology*, **1999**, 57(3). s. 231-245.
37. **Jaffe N, Puri A, Gelderblom H.** Osteosarcoma: Evolution of Treatment Paradigms. *Sarcoma*, **2013**, 2013.
38. **Jiang J, Yu S, Jiang Z, Liang C, Yu W ve ark.** N-Acetyl-Serotonin Protects Hepg2 Cells from Oxidative Stress Injury Induced by Hydrogen Peroxide. *Oxidative medicine and cellular longevity*, **2014**, 2014.
39. **Jomova K, Valko M.** Advances in Metal-Induced Oxidative Stress and Human Disease. *Toxicology*, **2011**, 283(2-3). s. 65-87.
40. **Karabulut H, Gülay MŞ.** Serbest Radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **2016**, 4(1).
41. **Kauntz H, Bousserouel S, Gosse F, Marescaux J, Raul F.** Silibinin, a Natural Flavonoid, Modulates the Early Expression of Chemoprevention Biomarkers in a Preclinical Model of Colon Carcinogenesis. *International journal of oncology*, **2012**, 41(3). s. 849-854.
42. **Khan MS, Dwivedi S, Priyadarshini M, Tabrez S, Siddiqui MA ve ark.** Ribosylation of Bovine Serum Albumin Induces Ros Accumulation and Cell Death in Cancer Line (Mcf-7). *European Biophysics Journal*, **2013**, 42(11-12). s. 811-818.
43. **Kohen R, Nyska A.** Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic pathology*, **2002**, 30(6). s. 620-650.
44. **Kumar S, Pandey AK.** Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, **2013**.
45. **Kurkin V.** Phenylpropanoids from Medicinal Plants: Distribution, Classification, Structural Analysis, and Biological Activity. *Chemistry of natural compounds*, **2003**, 39(2). s. 123-153.
46. **Kurumu TSBHS.** Türkiye Kanser İstatistikleri 2016. *Erişim*, **2016**, 29. s. 2016.
47. **Landis GN, Tower J.** Superoxide Dismutase Evolution and Life Span Regulation. *Mechanisms of ageing and development*, **2005**, 126(3). s. 365-379.
48. **Lartillot S, Kedziora P, Athias A.** Purification and Characterization of a New Fungal Catalase. *Preparative biochemistry*, **1988**, 18(3). s. 241-246.
49. **Li C, Jackson RM.** Reactive Species Mechanisms of Cellular Hypoxia-Reoxygenation Injury. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **2002**, 282(2). s. C227-C241.

50. **Ligeret H, Brault A, Vallerand D, Haddad Y, Haddad P.** Antioxidant and Mitochondrial Protective Effects of Silibinin in Cold Preservation–Warm Reperfusion Liver Injury. *Journal of ethnopharmacology*, **2008**, 115(3). s. 507-514.
51. **Link MP, Goorin AM, Horowitz M, Meyer WH, Belasco J ve ark.** Adjuvant Chemotherapy of High-Grade Osteosarcoma of the Extremity. Updated Results of the Multi-Institutional Osteosarcoma Study. *Clinical orthopaedics and related research*, **1991**, (270). s. 8-14.
52. **Link MP, Goorin AM, Miser AW, Green AA, Pratt CB ve ark.** The Effect of Adjuvant Chemotherapy on Relapse-Free Survival in Patients with Osteosarcoma of the Extremity. *New England Journal of Medicine*, **1986**, 314(25). s. 1600-1606.
53. **Luo X, Zhang H, Duan Y, Chen G.** Protective Effects of Radish (*Raphanus Sativus* L.) Leaves Extract against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Damage in Human Fetal Lung Fibroblast (Mrc-5) Cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2018**, 103. s. 406-414.
54. **Maghrani M, Zeggwagh N-A, Lemhadri A, El Amraoui M, Michel J-B ve ark.** Study of the Hypoglycaemic Activity of Fraxinus Excelsior and Silybum Marianum in an Animal Model of Type 1 Diabetes Mellitus. *Journal of ethnopharmacology*, **2004**, 91(2-3). s. 309-316.
55. **Marina N, Gebhardt M, Teot L, Gorlick R.** Biology and Therapeutic Advances for Pediatric Osteosarcoma. *The oncologist*, **2004**, 9(4). s. 422-441.
56. **Marnett LJ.** Lipid Peroxidation—DNA Damage by Malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **1999**, 424(1). s. 83-95.
57. **Marnett LJ.** Oxyradicals and DNA Damage. *carcinogenesis*, **2000**, 21(3). s. 361-370.
58. **Matés JM, Pérez-Gómez C, De Castro IN.** Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical biochemistry*, **1999**, 32(8). s. 595-603.
59. **Matés JM, Sánchez-Jiménez F.** Antioxidant Enzymes and Their Implications in Pathophysiologic Processes. *Front Biosci*, **1999**, 4(4). s. 0339-345.
60. **McCord JM, Fridovich I.** Superoxide Dismutase an Enzymic Function for Erythrocyte (Hemocytin). *Journal of Biological chemistry*, **1969**, 244(22). s. 6049-6055.
61. **McEligot AJ, Yang S, Meyskens J, Frank L.** Redox Regulation by Intrinsic Species and Extrinsic Nutrients in Normal and Cancer Cells. *Annu. Rev. Nutr.*, **2005**, 25. s. 261-295.
62. **Memişoğulları R.** Diyabette Serbest Radikallerin Rolü Ve Antioksidanların Etkisi. **2005**.
63. **Mishra A, Sharma AK, Kumar S, Saxena AK, Pandey AK.** Bauhinia Variegata Leaf Extracts Exhibit Considerable Antibacterial, Antioxidant, and Anticancer Activities. *BioMed Research International*, **2013**, 2013.
64. **Mokhtari MJ, Motamed N, Shokrgozar MA.** Evaluation of Silibinin on the Viability, Migration and Adhesion of the Human Prostate Adenocarcinoma (Pc-3) Cell Line. *Cell biology international*, **2008**, 32(8). s. 888-892.
65. **Narayana KR, Reddy MS, Chaluvadi M, Krishna D.** Bioflavonoids Classification, Pharmacological, Biochemical Effects and Therapeutic Potential. *Indian journal of pharmacology*, **2001**, 33(1). s. 2-16.
66. **Noda N, Wakasugi H.** Cancer and Oxidative Stress. *Japan Medical Association Journal*, **2001**, 44(12). s. 535-539.
67. **Nordberg J, Arner ES.** Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System1. *Free radical biology and medicine*, **2001**, 31(11). s. 1287-1312.
68. **Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z.** Oksidatif Stres Ve Hücre İçi Lipit, Protein Ve DNA Yapıları Üzerine Etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, **2015**, 6(3).
69. **Panche A, Diwan A, Chandra S.** Flavonoids: An Overview. *Journal of nutritional science*, **2016**, 5.
70. **Pavlopoulou A, Spandidos DA, Michalopoulos I.** Human Cancer Databases. *Oncology reports*, **2015**, 33(1). s. 3-18.
71. **Pelter A, Hänsel R.** The Structure of Silybin (Silybum Substance E6), the First Flavonolignan. *Tetrahedron letters*, **1968**, 9(25). s. 2911-2916.
72. **Prokai L, Yan LJ, Vera-Serrano JL, Stevens Jr SM, Forster MJ.** Mass Spectrometry-Based Survey of Age-Associated Protein Carbonylation in Rat Brain Mitochondria. *Journal of mass spectrometry*, **2007**, 42(12). s. 1583-1589.
73. **Puerta R, Martinez E, Bravo L, Ahumada M.** Effect of Silymarin on Different Acute Inflammation Models and on Leukocyte Migration. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **1996**, 48(9). s. 968-970.
74. **Rainone F.** Milk Thistle. *American family physician*, **2005**, 72(7).

75. **Rao RSP, Møller IM.** Pattern of Occurrence and Occupancy of Carbonylation Sites in Proteins. *Proteomics*, **2011**, 11(21). s. 4166-4173.
76. **Rice-Evans C.** Flavonoid Antioxidants. *Current medicinal chemistry*, **2001**, 8(7). s. 797-807.
77. **Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G.** Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free radical biology and medicine*, **1996**, 20(7). s. 933-956.
78. **Scandalios JG.** The Rise of Ros. *Trends in biochemical sciences*, **2002**, 27(9). s. 483-486.
79. **Schroeter H, Boyd C, Spencer JP, Williams RJ, Cadenas E ve ark.** Mapk Signaling in Neurodegeneration: Influences of Flavonoids and of Nitric Oxide. *Neurobiology of aging*, **2002**, 23(5). s. 861-880.
80. **Shaker E, Mahmoud H, Mnaa S.** Silymarin, the Antioxidant Component and Silybum Marianum Extracts Prevent Liver Damage. *Food and Chemical Toxicology*, **2010**, 48(3). s. 803-806.
81. **Shinde A, Ganu J, Naik P.** Effect of Free Radicals & Antioxidants on Oxidative Stress: A Review. *Journal of Dental and Allied Sciences*, **2012**, 1(2). s. 63.
82. **Shirley BW.** Flavonoid Biosynthesis: 'New' functions for an 'Old' pathway. *Trends in plant science*, **1996**, 1(11). s. 377-382.
83. **Singh RP, Agarwal R.** Mechanisms and Preclinical Efficacy of Silibinin in Preventing Skin Cancer. *European journal of cancer*, **2005**, 41(13). s. 1969-1979.
84. **Singh RP, Agarwal R.** Prostate Cancer Prevention by Silibinin. *Current cancer drug targets*, **2004**, 4(1). s. 1-11.
85. **Skottova N, Krecman V.** Silymarin as a Potential Hypocholesterolaemic Drug. *Physiological research*, **1998**, 47. s. 1-8.
86. **Stadtman ER.** Protein Oxidation in Aging and Age-Related Diseases. *Annals of the new York Academy of Sciences*, **2001**, 928(1). s. 22-38.
87. **Storz P.** Reactive Oxygen Species in Tumor Progression. *Front Biosci*, **2005**, 10(1-3). s. 1881-1896.
88. **Storz P, Döppler H, Ferran C, TOKER A.** Functional Dichotomy of A20 in Apoptotic and Necrotic Cell Death. *Biochemical Journal*, **2005**, 387(1). s. 47-55.
89. **Trouillas P, Marsal P, Svobodová A, Vostalova J, Gažák R ve ark.** Mechanism of the Antioxidant Action of Silybin and 2, 3-Dehydrosilybin Flavonolignans: A Joint Experimental and Theoretical Study. *The journal of physical chemistry A*, **2008**, 112(5). s. 1054-1063.
90. **Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J.** Role of Oxygen Radicals in DNA Damage and Cancer Incidence. *Molecular and cellular biochemistry*, **2004**, 266(1-2). s. 37-56.
91. **Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M, Mazur M.** Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer. *Chemico-biological interactions*, **2006**, 160(1). s. 1-40.
92. **Varga Z, Czompa A, Kakuk G, Antus S.** Inhibition of the Superoxide Anion Release and Hydrogen Peroxide Formation in Pmnl's by Flavonolignans. *Phytotherapy Research*, **2001**, 15(7). s. 608-612.
93. **Vecchione G, Grasselli E, Voci A, Baldini F, Grattagliano I ve ark.** Silybin Counteracts Lipid Excess and Oxidative Stress in Cultured Steatotic Hepatic Cells. *World journal of gastroenterology*, **2016**, 22(26). s. 6016.
94. **Wei Y, Pang C.** The Role of Mitochondria in the Human Ageing Process. *National Health Research Institutes (NHRI-EX93-9120BN), Taiwan (Republic of China)*, **2005**.
95. **Wesołowska O, Kuźdzał M, Stańczak K, Mosiądz D, Dobryczycki P ve ark.** Influence of Silybin on Biophysical Properties of Phospholipid Bilayers. *Acta pharmacologica sinica*, **2007**, 28(2). s. 296.
96. **WHO.** World Healthy Organisation. <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Erişim Tarihi: 10.07.2018. **2018**.
97. **Wing Ying Cheung C, Gibbons N, Wayne Johnson D, Lawrence Nicol D.** Silibinin-a Promising New Treatment for Cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, **2010**, 10(3). s. 186-195.
98. **Wu D, Cederbaum AI.** Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Alcohol Research and Health*, **2003**, 27. s. 277-284.
99. **Yan L-J, Sohal RS.** Mitochondrial Adenine Nucleotide Translocase Is Modified Oxidatively During Aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1998**, 95(22). s. 12896-12901.
100. **Zhao J, Agarwal R.** Tissue Distribution of Silibinin, the Major Active Constituent of Silymarin, in Mice and Its Association with Enhancement of Phase II Enzymes: Implications in Cancer Chemoprevention. *Carcinogenesis*, **1999**, 20(11). s. 2101-2108.
101. **Zhao J, Dixon RA.** The 'Ins' and 'Outs' of Flavonoid Transport. *Trends in plant science*, **2010**, 15(2). s. 72-80.

102. **Zi X, Mukhtar H, Agarwal R.** Novel Cancer Chemopreventive Effects of a Flavonoid Antioxidant Silymarin: Inhibition of Mrna Expression of an Endogenous Tumor Promoter Tnfa. *Biochemical and biophysical research communications*, **1997**, 239(1). s. 334-339.



ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Trabzon'da doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimini Sakarya'da tamamladı. 2010 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2014 yılında mezun oldu. 2014 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyokimya ve Genetik (Tıp) Ana Bilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.

