

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



GOJİ BERRY MEYVESİNİN KARNİTİN GIDA TAKVİYESİ İLE BİRLİKTE
KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Haniyeh BEHROUZIZAD

Gıda Güvenliği Anabilim Dalı

Gıda Güvenliği Programı

Eylül, 2018

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



GOJİ BERRY MEYVESİNİN KARNİTİN GIDA TAKVİYESİ İLE BİRLİKTE
KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Haniyeh BEHROUZIZAD

(Y1413.210015)

Gıda Güvenliği Anabilim Dalı

Gıda Güvenliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ayhan Bilir

Eylül, 2018



T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

Yüksek Lisans Tez Onay Belgesi

Enstitümüz Gıda Güvenliği Ana Bilim Dalı Gıda Güvenliği Tezli Yüksek Lisans Programı **Y1413.210015** numaralı öğrencisi **HANIYEH BEHROUZIZAD**'ın "**GOJİBERRY MEYVESİNİN KARNİTİN GIDA TAKVİYESİ İLE BİRLİKTE KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**" adlı tez çalışması Enstitümüz Yönetim Kurulunun 28.08.2018 tarih ve 2018/16 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından ile Tezli Yüksek Lisans tezi olarak edilmiştir.

KABUL


01 BİRLİĞİ

Öğretim Üyesi Adı Soyadı

İmzası

Tez Savunma Tarihi : 14/09/2018

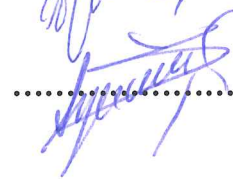
1) Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ayhan BİLİR


.....

2) Jüri Üyesi : Prof. Dr. Tülay İREZ


.....

3) Jüri Üyesi : Prof. Dr. A. Şükrü AYNACIOĞLU


.....

Not: Öğrencinin Tez savunmasında **Başarılı** olması halinde bu form **imzalanacaktır**. Aksi halde geçersizdir.

YEMİN METNİ

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “GOJİ BERRY MEYVESİNİN KARNİTİN GIDA TAKVİYESİ İLE BİRLİKTE KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI”adlı çalışmanın, tezin proje safhasından sonuçlanmasına kadarki bütün süreçlerde bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurulmaksızın yazıldığını ve yararlandığım eserlerin Bibliyografya ’da gösterilenlerden oluştuğunu, bunlara atıf yapılarak yararlanılmış olduğunu belirtir ve onurumla beyan ederim. (13/08/2018)

Haniyeh BEHROUZIZAD



*Bu tez
tüm yaşıantım süresince her konuda desteğini benden hiç esirgemeyen anneme,
babama, dedeme ve babaanneme ithaf olunmuştur.*

ÖNSÖZ

Bu çalışmada bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ayhan Bilir'e, konunun belirlenmesi, şekillenmesi ve tezin yürütülmesinde her türlü desteğini benden esirgemeyen İstanbul Aydın Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Mine ERGÜVEN'e, Flow sitometride yardımlarını benden esirgemeyen İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar DETAE İmmünoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Esin Aktaş'a, ELIZ A testlerinde ELIZA okuyucunun kullanımında bana yardımcı olan İstanbul Aydın Üniversitesi SHMYO Tıbbi Laboratuvar Teknikleri elemanı Sayın Msc. Sevilay Zora'ya, maddi-manevi olarak hep yanımda olan anneme, babama, dedeme ve babaanneme teşekkürlerimi, saygılarımı ve sevgilerimi içtenlikle sunarım.

Eylül, 2018

Haniyeh BEHROUZIZAD

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Kronik Myeloid Lösemi	4
2.2 Goji Berry	5
2.3 Yağ Asitleri, Yağ Asitleri Metabolizması ve L-Karnitin, Kanser	7
2.3.1 Yağ asitlerinin metabolizması ve L-Karnitin	9
2.3.2 Yağ asitlerinin metabolizması, L-Karnitin ve kanser metabolizması ilişkisi	10
3. MATERYAL ve METOD.....	12
3.1 Çalışma Cihazları, Aletleri, Kimyasalları ve Sarf Malzemeleri	12
3.2 Deneylerde Kullanılan Fitoterapotik Ajan: Goji Berry.....	14
3.3 Goji berry Ekstraktının Yapımı.....	15
3.4 Antioksidan Kapasite Tayini Deneyleri	15
3.4.1 Total fenolik bileşik miktarı tayini.....	15
3.4.2 Total flavonoid miktar tayini	15
3.5 L-Karnitin.....	16
3.6 Süspansiyon Hücre Kültürü	16
3.6.1 K562 hücre soyu	16
3.6.2 K562 süspansiyon hücre kültürü	17
3.7 Süspansiyon Hücre Kültürü ile Yapılan Deneyler	17
3.8 Total Hücre Sayısı.....	18
3.9 Canlılık ve Apoptoz Tayini	18
3.9.1 Protein konsantrasyonlarının saptanması.....	19
3.9.1.1 Kaspaz-3 konsantrasyonu değerlendirilmesi	20
3.9.1.2 Kaspaz-8, Kaspaz-9, Bax ve Bcl-2 konsantrasyonlarının değerlendirilmesi	20
3.10 İstatistiksel Değerlendirme.....	21
4. BULGULAR	22
4.1 Goji Berry’de Fenolik-Flavonoid Miktar Tayini	22
4.2 Total Hücre Sayısı	22
4.3 Hücre Canlılığı ve Apoptoz Değerlendirme Bulguları	23
4.3.1 Canlı lösemi hücre oranları	24
4.3.2 Apoptotik lösemi hücre oranları.....	25
4.3.3 Ölü lösemi hücre oranları.....	26

4.4 Apoptotik ve Anti-apoptotik Protein Konsantrasyonları Değerlendirme	
Bulguları	27
4.4.1 Kaspaz-3 protein konsantrasyonları	27
4.4.2 Kaspaz-8 protein konsantrasyonları	29
4.4.3 Kaspaz-9 protein konsantrasyonları	30
4.4.4 Bax protein konsantrasyonları.....	32
4.4.5 Bcl-2 düzeyleri	33
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	36
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ.....	45



KISALTMALAR

Ac-DEVD-Pna	: Asetil-Asp-Glu-Val-Asp nitroanilidin
Akt	: Protein kinaz B
ALK	: Anaplastik lenfoma kinaz
AML	: Akut myeloid lösemi
Anneksin-V-FITC	: Anneksin-V-Fluoresan isotiyosiyanat
ATCC	: Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu
ATCC	: Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu
Bax	: Bcl-2-bağlantılı X protein
BCA	: Biçinkromik Asit
BF	: Blast fazı
BSA	: Sığır serum albümin
CACT	: Karnitin-açilkarnitin translokaz
CAE	: Meyve ağırlığının her gramı için kateşin ekivalanı
CDK	: Sikline bağlı kinaz
CPT	: Karnitin palmitoiltransferaz
DTT	: Ditiyotretol
EC	: Ekstre edilebilen bileşik miktarı
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ELIZA	: Enzim bağlantılı immünosorbent test
FBS	: Fötal sığır serumu
GAE	: Meyve ağırlığının her gramı için gallik asit ekivalanı
GB	: Goji berry
GBP	: Goji berry polisakkaridleri
HDAC	: Histon deasetilaz
HF	: Hızlandırılmış faz
HRP	: Yaban turpu peroksidazı
IFN-α	: İnterferon- α
JAK	: Janus kinaz
KF	: Kronik faz
KML	: Kronik myeloid lösemi
L	: Lycium
LB	: Lycium barbarum
LK	: L-Karnitin
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
PI	: Propidyum iodid
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
pNA	: P-nitroanilinin
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SD	: Standart sapma
STAT	: Sinyal transdüserleri ve transkripsiyon aktive edicileri
tGBF	: Total GB flavonoidleri

TGF-β	: Tumor büyüme faktörü- β
TK	: Tirozin kinaz
TMB	: 3,3',5,5,-tetrametilbenzidin
TRAIL	: Tumor nekroz edici faktör (TNF)-bağımlı apoptozu indükleyici ligand
YA	: Yağ asidi
YAO	: Yağ asidi oksidasyonu



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 2.1** : Goji berry meyvesi (A) Yaş GB meyvesi, (B) Kurutulmuş GB meyvesi. 6
- Şekil 2.2** : Yağ asidi ve trigliseridler [40] 8
- Şekil 2.3** : L-Karnitin [40] 9
- Şekil 2.4** : Mitokondride Yağ Asidi Oksidasyonu ve L-Karnitin [40] 10
- Şekil 3.1** : K562 lösemi hücreleri (Orijinal büyütme x30) 17
- Şekil 3.2** : Süspansiyon hücre kültürü. GB ve LK insertler kullanılarak KML hücrelerine 72 saat boyunca uygulandı. 18
- Şekil 3.3** : Flow sitometri aşamaları. A. Flow sitometri için test kiti kullanılarak hazırlanan numuneler, B. Flow sitometri cihazı, C. Flow sitometri cihazında ölçülmeye başlanan test tübü, D. Cihaza uygun programla görülen hücre popülasyonları ve canlı, erken ve geç apoptotik ve ölü hücre yüzdelelerini gösteren histogramlar 19
- Şekil 3.4** : ELIZA a) BCA yöntemi ile ELIZA yapılacak örnekteki Bax protein miktarını saptamada kullanılan Bax standart eğrisi, b) Ham absorbans verileri..... 21
- Şekil 4.1** : Total hücre sayısını gösteren grafik. 22
- Şekil 4.3** : Anneksin-V-FITC/PI dual boyama ile flow sitometrik canlılık ve apoptoz değerlendirilmesi. A. Canlı KML hücre sayısındaki değişiklikleri gösteren grafik, B. Apoptoza uğramış KML hücre sayılarını gösteren grafik C. Ölü KML hücrelerini gösteren grafik. Grafiklerdeki sonuçlar ortalama (n:6)± SD olarak gösterildi. Deneyler 3 defa tekrarlandı.K, Kontrol grubu, GB, Goji berry, LK, L-Karnitin, GB+LK, Kombinasyon grubu..... 24
- Şekil 4.3** : Kaspaz-3 protein konsantrasyonlarında meydana gelen değişiklikleri gösteren grafik. Grafiklerdeki sonuçlar ortalama (n:6)± SD olarak gösterildi. Deneyler 3 defa tekrarlandı. K, Kontrol grubu, GB, Goji berry, LK, L-Karnitin, GB+LK, Kombinasyon grubu. 28
- Şekil 4.4** : Kaspaz-8 protein konsantrasyonlarında meydana gelen değişiklikleri gösteren grafik. Grafiklerdeki sonuçlar ortalama (n:6)± SD olarak gösterildi. Deneyler 3 defa tekrarlandı. K, Kontrol grubu, GB, Goji berry, LK, L-Karnitin, GB+LK, Kombinasyon grubu. 29
- Şekil 4.5** : Kaspaz-9 protein konsantrasyonunda meydana gelen değişiklikleri gösteren grafik. Grafiklerdeki sonuçlar ortalama (n:6)± SD olarak gösterildi. Deneyler 3 defa tekrarlandı. K, Kontrol grubu, GB, Goji berry, LK, L-Karnitin, GB+LK, Kombinasyon grubu. 31
- Şekil 4.6** : Bax protein konsantrasyonlarında meydana gelen değişiklikleri gösteren grafik. Grafiklerdeki sonuçlar ortalama (n:6)± SD olarak gösterildi. Deneyler 3 defa tekrarlandı. K, Kontrol grubu, GB, Goji berry, LK, L-Karnitin, GB+LK, Kombinasyon grubu. 32

Şekil 4.7 : Bcl-2 protein konsantrasyonlarında meydana gelen değişiklikleri gösteren grafik. Grafiklerdeki sonuçlar ortalama (n:6)± SD olarak gösterildi. Deneyler 3 defa tekrarlandı. Kontrol grubu, GB, Goji berry, LK, L-Karnitin, GB+LK, Kombinasyon grubu. 34



GOJİ BERRY MEYVESİNİN KARNİTİN GIDA TAKVİYESİ İLE BİRLİKTE KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: Diyetten elde edilen ya da böbrekte, karaciğere ve beyindeki lizin ve metioninden endojen olarak sentezlenen bir yardımcı faktör olan L-karnitin (LK), uzun zincirli yağlı asitlerini (YA'ler), sitrik asit döngüsü üzerinden ATP üretimi için mitokondriyal matraste taşır. YA'lerinin blokajına bağlı olan tedavi uygulamaları, LK seviyelerindeki düşüş, kanser regresyonuna yol açar. Akut miyeloid lösemi (AML) dahil olmak üzere çeşitli kanser tiplerine tekli veya kombinasyon halinde LK uygulanması, apoptozun indüksiyonu yoluyla inhibisyon etkisi gösterir. Bununla birlikte LK'nın kansere neden olduğu ve kanser hücrelerini tedavilerin verdiği zarardan koruduğu hakkında bazı tartışmalı çalışmalar da bulunmaktadır. Bir Çin tıbbi gıda takviyesi olan antioksidan ve apoptotik etki gösteren Goji berry (GB) lösemi de dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerini önlemek veya tedavi etmek için kullanılmaktadır. Çalışmamızda, GB ve LK'nin tek başına ve birlikte kullanımının kronik miyeloid lösemi (KML) üzerindeki etkisini sinyal iletim yolu ile birlikte araştırmayı hedefledik.

Gereç ve yöntem: Antioksidan kapasiteleri bilinen GB meyvelerinin ekstraktları, K562 lösemi hücrelerine tekli olarak ve LK ile birlikte 72 saat boyunca uygulanmıştır. Bu uygulamaların etkileri, hücre sayısı, hücre canlılığı ve apoptotik hücre oranı (flow sitometri), apoptotik (Kaspazlar-3,8,9, bax) ve anti-apoptotik (bcl-2) proteinlerin (ELIZA) seviyeleri ile belirlendi. Anova testi kullanıldı ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Hücre sayısında ve canlılığında en yüksek azalma kombinasyon grubunda bulundu ($P_{GB+LK} < 0.05$). Kombinasyon grubu, apoptotik hücre oranında en yüksek artışla uyumlu olarak kaspazlar-3,8 seviyelerinde de en yüksek artışa neden oldu ($P_{GB+LK} < 0.05$). GB, kombinasyon grubundan sonra hücre sayısı ile birlikte hücre canlılığını bax düzeyleri ile birlikte kaspaz-9'daki en yüksek artış ve bcl-2 düzeylerinde en yüksek azalma ile kaspaz-3 düzeylerini artırarak etkili olarak azalttı ($P_{GB} < 0.05$). LK, hücre sayısı üzerinde en düşük inhibisyon etkiyi en yüksek hücre viabilitesi ile birlikte gösterdi ($P_{LK} < 0.05$). LK, kaspaz-3,8 seviyelerindeki en düşük artış ile apoptotik hücre oranındaki en düşük artışa neden oldu ($P_{LK} < 0.05$).

Sonuç: Bu çalışmada, GB ve LK'nin sırasıyla intrinsik ve ekstrinsik apoptoz yoluyla KML hücrelerinde proliferasyonu inhibe edici bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Buna ek olarak, ilk defa GB ile kombine edilmiş LK'nın, ekstrinsik apoptozdaki artış yolu ile sinerjik bir etkisi olduğunda gösterildi.

Anahtar Kelimeler: *Goji berry, L-Karnitin, Kronik Myeloid Lösemi, Yağ asidi, Apoptoz.*

THE INVESTIGATION OF THE USE OF GOJÍ BERRY FRUIT WITH THE FOOD SUPPLEMENT CARNITINE

ABSTRACT

Objective: A co-factor L-carnitine (LC) obtained from the diet or synthesized endogenously from lysine and methionine in the kidney, liver and brain transports long-chained fatty acids (FAs) into the mitochondrial matrix for ATP generation via the citric acid cycle. The treatment modalities dependent on the blokage of FAs, i.e. the decrease in LC levels, lead to cancer regression. The application of LC in single or in combination to several cancer types including acute myeloid leukemia (AML) shows inhibitory effect via the induction of apoptosis. However, there are also some controversial studies on LC causing cancer and protecting cells from the deterioration of therapies. A Chinese medical dietary supplement as Goji berry (GB) with an antioxidant and apoptotic effect is used to prevent or treat various cancer types including leukemia. In our study, we targeted to investigate the effects of GB and LC in single and in combination with each other on chronic myeloid leukemia (CML) with their signal transduction pathway.

Materials and methods: Antioxidant capacity known GB fruits' extracts were applied to K562 leukemia cells in single and in combination with LC for 72 h. The effects of these applications were determined by cell number, cell viability and apoptotic cell rate (flow cytometry), the levels of apoptotic (Caspases-3,8,9, bax) and anti-apoptotic (bcl-2) proteins (ELISA). Anova test was used and $p < 0.05$ was accepted statistically significant.

Results: Highest decrease at cell number and viability were found at the combination group ($P_{GB+LC} < 0.05$). The combination group led to the highest increase in apoptotic cell rate in concomitant with the highest increase in the levels of caspases-3,8 ($P_{GB+LC} < 0.05$). GB decreased cell number with cell viability potently after the combination group through the increase of caspase-3 levels via the highest increase in caspase-9 with bax levels and the highest decrease in bcl-2 levels ($P_{GB} < 0.05$). LC showed the lowest inhibitory effect on cell number with the highest cell viability ($P_{LC} < 0.05$). LC led to the lowest increase in apoptotic cell rate through the lowest increase in the levels of caspases-3,8 ($P_{LC} < 0.05$).

Conclusion: In the current study, it's detected that GB and LC have a proliferation inhibitory effect on CML cells via intrinsic and extrinsic apoptosis, respectively. In addition to this, it's shown firstly that GB combined with LC shows a synergistic effect through the increase in extrinsic apoptosis.

Keywords: *Goji berry, L-Carnitine, Chronic Myeloid Leukemia, Fatty acids, Apoptosis.*

1. GİRİŞ

Kronik miyeloid lösemi (KML), BCR-ABL1 füzyon geninin [kromozom translokasyonu t (9:22) (q34, q11)] varlığı ile ilişkili bir miyeloproliferatif neoplazidir [1,2]. KML lösemilerin yaklaşık dörtte biridir ve her 100.000 kişiden 1 veya 2'sinde bu kanser tipine rastlanır. BCR-ABL1 füzyon geni, tirozin kinaz (TK) aktivitesi yüksek ve KML oluşum nedeni olarak saptanan Bcr-Abl1 adlı anormal bir proteini meydana getirir. Bu gen-protein sinyal kaskadı ile görevlerini yerine getiremeyen kontrolsüz çoğalan anormal beyaz kan hücreleri meydana gelir [2]. BCR-ABL geni ve proteini sinyal sistemi hücre çoğalması ve büyümesinde etkili RAS, Janus kinaz/sinyal transdüserleri ve transkripsiyon aktive edicileri (JAK/STAT), fosfatidilinositol 3-kinaz/protein kinaz B (PI3K/Akt), nükleer faktör kappa B (NF-κB) gibi yolları uyararak, BCL-XL6 ve MCL-17 ekspresyonlarını artırarak ve TRAIL'i engelleyerek iç ve dış apoptotik yollara karşı direnç oluşturmaktadır [2, 3].

KML'nin imatinib mesilat gibi tirozin kinaz inhibitörlerine dayalı kemoterapi uygulamalarına duyarlı olduğu ve tedavilerin genel olarak başarılı sonuç verdiği görülse de hücre tarafından geliştirilen direnç mekanizmaları yenilikçi anti-kanser kombinasyonlarının ve yeni anti-neoplastik ilaçların bulunmasını gerekli kılmıştır [2, 4, 5]. Plazma ve hücrede tedavi edici ilaç konsantrasyonlarına ulaşmak için verilen yüksek konsantrasyonda ilaç veya ilaç kombinasyonları yüksek toksisiteye neden olmakta, birçok hasta kanserden değil kemoterapi yan etkilerinden hayatını kaybetmektedir [6]. Günümüzde birçok klinisyen ve araştırmacı doğal olarak elde edilen, yüksek aktivite ancak düşük toksisiteye sahip olan antineoplastik ilaçlara yönelmektedir. Anti-kanser özelliklere sahip olan Goji berry'nin (GB) içinde olduğu geleneksel Çin otları, son yıllarda oldukça büyük ilgi görmektedir [5].

Goji berry (Goji çileği veya kurt üzümü), Asya ülkelerinde geleneksel tıbbi gıda olarak kullanılan *Lycium barbarum* L'nin meyvesidir [5, 7]. Goji meyveleri, polisakkaritlerin, B ve C vitamin kompleksleri ile vitamin E'nin kaynağı olmasının yanı sıra sekiz esansiyel eksojen amino asidin de dahil olduğu çeşitli amino asitlerin ve polifenol (kateşin veya hiperosid) ve ferulik veya klorojenik asit ve türevleri gibi organik asitleri

ve çinko, demir, bakır, kalsiyum, selenyum ve germanyum gibi eser elementleri de içerir [5,7]. Yaşlanma karşıtı etkileri, nöroproteksiyon, dayanıklılığın artırılması, metabolizmanın artırılması, glukoz ve diğer diabet semptomlarının daha iyi kontrol edilmesi, anti-glokom etkileri, immünomodülasyon, anti-tümör aktivite ve sitoproteksiyon gibi in vivo ve çalışmalarda gösterilen birçok biyolojik etkiye sahiptir [5,7].

Yağ asit oksidasyonu (YAO), yağ asidi (YA) moleküllerinin mitokondride asetil-CoA'ya metabolize olduğu biyokimyasal bir süreçtir. Asetil CoA, solunum zincirinde elektron verici olarak görev alan NADH ve FADH₂'nin üretimi ile birlikte sitrik asit döngüsüne girer. Bunun sonucunda YAO ile hücre için enerji üretimi sağlanmış olur [8,9]. Yağ asitlerinin metabolizması, YAO, ko-faktör olan karnitine ihtiyaç duyar. L-Karnitin (LK, 4-trimetil-amino-3-hidroksibütirik asit) besin yoluyla veya böbrekte, karaciğerde ve beyinde lizin ve metionin aminoasitleri kullanılarak endojen olarak sentezlenir [8, 9]. Diğer hücreler, hücre zarı üzerinde bulunan aktif bir karnitin taşıma sistemi vasıtasıyla plazmadan alım yoluyla karnitini kullanabilirler [8,9]. Karnitin palmitoiltransferaz (CPT)-1 enziminin uzun zincirli açıl-KoA'yı karnitin ile bağlaması sonucunda karnitin-açilkarnitin translokaz (CACT) ile sitozolden mitokondri matriksine taşınan uzun zincirli açıl karnitin oluşur [8,9]. Mitokondride uzun zincirli açilkarnitin Karnitin palmitoiltransferaz 2 (CPT2) tarafından karnitinden ayrılarak tekrardan uzun zincirli açıl-KoA'ya dönüştürülür ve asetil-KoA oluşturmak üzere birden fazla oksidasyon turuna girer [8,9]. YAO'nun, karbonhidratlar dışında (Aerobik glikoliz ve Warburg etkisi) kanser hücre çoğalmasını, büyümesini ve hayatta kalmayı (direnci) destekleyen önemli bir enerji yolu olduğu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [9-12]. Buna göre, YA'lerinin mitokondri içine girerek YAO'ya uğramasını engelleyecek CPT1 enziminin engellenmesi ile LK seviyelerinin düşürülmesi gibi tedavi modelleri tercih edilmeye başlanmıştır [9-11, 13].

Bunun yanısıra LK'nın tek başına uygulandığı bazı kanser tiplerinde apoptoz aracılı antiproliferatif etki gösterdiği ve birlikte kullanıldığı bazı kanser ilaçlarının ise etkilerini artırdığına dair çalışmalar bulunmakla birlikte tam tersi kansere neden olduğu ve birlikte kullanıldığı kanser ilaçlarının veya radyoterapi gibi farklı tedavi modellerinin etkisini azalttığına dair daha fazla çalışma bulunmaktadır [14-22]. Ancak LK eksikliğinin, bazı kanser tiplerinin patogenezinde obezite ve insan vücudundaki yağ miktarı ile ilgisi olmayan bir mekanizma ile rol aldığını gösteren çalışmalar da

mevcuttur [22]. Sitokinlerin de dahil olduğu çok faktörlü ve kompleks bir süreç olan kansere bağlı yorgunluk ve kaşeksi patogenezi ile LK eksikliği arasında bağlantı olduğuna ve olmadığına dair çalışmalar da bulunmaktadır [23,24].

GB'nin lösemide inhibisyon etkileri akut myeloid lösemide (AML) çalışılmış olup KML üzerinde yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır [25,26]. LK ile de lösemi kanser tipinde yapılan çalışmalar çoğunlukla AML ve diğer lösemi tiplerinde olup KML ile ilgili inhibitör etkisini çok az sayıda çalışmada saptanmıştır [9, 27, 28]. Esansiyel yağ asitleri de dahil olmak üzere yağ asidi içeriği yüksek GB ile YA taşıyıcısı LK'nın birlikte kullanıldığı lösemi hücrelerinde özellikle de hedef aldığımız KML'de hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmayı yapmaktaki hedefimiz GB'nin tek başına ve LK ile birlikte KML'deki kullanımının etkilerini sinyal yolları ile birlikte araştırmaktır. Bu kombinasyonun, klinikte KML'de düşük sitotoksiteli adjuvan (yardımcı) ajan olarak kullanılacak yeni bir tedavi protokolü oluşturmasını hedeflemekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kronik Myeloid Lösemi

Kronik miyeloid lösemi (KML), 9. ve 22'nci kromozomların birer parçasının karşılıklı yer değiştirmesi [translokasyon, t (9:22) (q34, q11)] sonucu değişikliğe (mutasyona) uğrayarak oluşan Philadelphia kromozomu (mutant 22. kromozom) ve oradaki BCR-ABL1 füzyon geninin varlığı ile ilişkili bir kan ve kemik iliği neoplazisidir [1, 2]. KML lösemilerin yaklaşık dörtte birini oluşturur ve her 100.000 kişiden 1 veya 2'sinde bu hastalık görülür [2].

BCR-ABL1 füzyon geni, TK aktivitesi yüksek ve KML oluşum nedeni olarak saptanan Bcr-Abl1 adlı anormal bir proteini meydana getirir. Bu gen-protein sinyal kaskadı ile görevlerini yerine getiremeyen kontrolsüz çoğalan anormal beyaz kan hücreleri meydana gelir [2]. Bcr-abl1, kompleks bir sinyal iletim kaskadının başlatılmasına katılan birden fazla domenden oluşan bir proteindir. Onkoprotein BCR kısmı, serin ve treonin kinaz aktivitesine sahip bir domen ve Src homoloji-2 (SH2) domenlerine bağlanan bölgeleri içerirken c-ABL kısmı SH3, SH2 ve tirozin kinaz (SH1) domenlerine ek olarak dört prolin açısından zengin domen, bir nükleer translokasyon sinyaline, bir DNA ve bir aktin bağlayıcı domen içerir [2]. KML'nin gelişim süreci üç evreyi kapsamaktadır: kronik, hızlandırılmış ve blast fazları. Kronik fazda (KF), olgun granüositlerin aşırı üretimi ile sonuçlanan lösemik kök hücrelerin büyük bir kısmı farklılaşmaya yönelir. Hızlandırılmış fazda (HF) farklılaşma durdurulur ve şiddetli hastalık fenotipi, blast fazında (BF) artan olgunlaşmamış blastların çoğalması ile görülür [2].

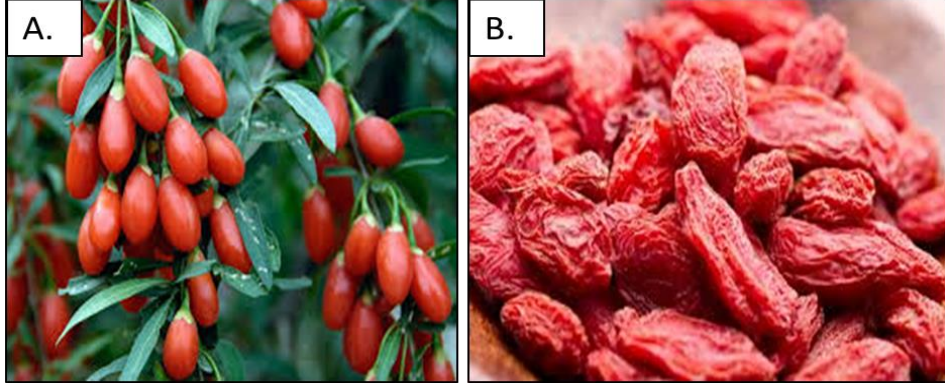
Bcr-abl1'in aktin filamentlere bağlanmasının transformasyona katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Burada önemli olan nokta, TK aktivitesinin Bcr-Abl1'in transformasyon potansiyeli için gerekli olduğudur [2]. BCR-ABL geni ve proteini sinyal sistemi hücre çoğalması ve büyümesinde etkili RAS, JAK/STAT, PI3K/Akt, NF-κB gibi yolları uyatarak, BCL-XL6 ve MCL-17 ekspresyonlarını artırarak ve Tümör nekroz edici

faktör (TNF)-bağlantılı apoptozu indükleyici ligandı (TRAIL) engelleyerek iç ve dış apoptotik yollara karşı direnç oluşturmaktadır [2, 3].

KML'nin imatinib mesilat gibi tirozin kinaz inhibitörlerine dayalı kemoterapi uygulamalarına duyarlı olduğu ve tedavilerin genel olarak başarılı sonuç verdiği görülse de BCR-ABL geni amplifikasyonunun, hücre içi ilaç konsantrasyonunu azaltan ve onkogenik/direnç alternatif sinyal yollarının aktivasyonunu artırdığı hücre tarafından geliştirilen direnç mekanizmaları yenilikçi anti-kanser kombinasyonlarının ve yeni anti-neoplastik ilaçların bulunması gerekli kılmıştır [2, 4, 5]. Plazma ve hücre içinde tedavi edici ilaç konsantrasyonlarına ulaşmak için verilen yüksek konsantrasyonda ilaç veya ilaç kombinasyonları yüksek toksisiteye neden olmakta birçok hasta kanserden değil kemoterapi ve radyoterapi yan etkilerinden hayatını kaybetmektedir [6]. Günümüzde birçok klinisyen ve araştırmacı doğal olarak elde edilen yüksek aktivite ancak düşük toksisiteye sahip olan antineoplastik ilaçlara yönelmektedir.

2.2 Goji Berry

Lycium (L.), Kuzey ve Güney Amerika, Afrika ve Avrasya'daki kurak ve yarı kurak ortamlarda yaygın olarak bulunur. Son yıllarda, L. barbarum (LB, Goji berry) ve L. chinense, sağlıkla alakalı başarılı hastalık önleyici ve tedavi özellikleri nedeni ile "süper gıda" olarak ilan edildi [5]. Lycium L. cinsinin birçok türünün meyve, yaprak, kök kabuğu ve genç sürgünü uzun zamandır yerel gıdalar ve/veya ilaçlar olarak kullanılmıştır [5]. Goji berry (Goji çileği veya kurt üzümü), Asya ülkelerinde geleneksel tıbbi gıda olarak kullanılan Lycium barbarum L'nin meyvesidir [5, 7]. Lycium barbarum L'nin meyveleri, dikdörtgen veya oval şekilli, genel olarak 4-20 tane tohuma sahip, kırmızı, kahverengi/turuncu-sarı renkte, 2 mm büyüklüktedir [5].



Şekil 2.1: Goji berry meyvesi (A) Yaş GB meyvesi, (B) Kurutulmuş GB meyvesi

Goji berry meyveleri, polisakkaritlerin, B ve C vitamin kompleksleri ile vitamin E'nin kaynağı olmasının yanısıra sekiz esansiyel eksojen amino asidin de dahil olduğu çeşitli amino asitlerin ve polifenol (kateşin veya hiperosid) ve ferulik veya klorojenik asit ve türevleri gibi organik asitleri ve çinko, demir, bakır, kalsiyum, selenyum ve germanyum gibi eser elementleri de içerir [5,7]. Cilt koruması da dahil olmak üzere yaşlanma karşıtı etkileri, nöroproteksiyon, dayanıklılığın artırılması, metabolizmanın artırılması, glukoz ve diğer diabet semptomlarının daha iyi kontrol edilmesi, antiglokoma etkileri, hepatoproteksiyon, retinal proteksiyon, üreme sağlığı proteksiyonu (spermatogenez), immünomodülasyon, yorgunluk giderici, nöroproteksiyon, hipotansif, anti-aterosklerotik, antitümör aktivite ve sitoproteksiyon, antioksidan gibi in vivo, in vitro ve klinik çalışmalarda gösterilen birçok biyolojik aktiviteye sahiptir [5,7].

GB çeşitli kanser tiplerinde anti-kanser özelliklerini antioksidan etki ile reaktif oksijen türleri (ROT) merkezli sinyal yollarını baskılayarak, apoptozu indükleyerek (Bax ve kaspaz-3 seviyelerini artırıp bcl-2 seviyelerini azaltarak), epitelyal mezenşimal geçişi azaltarak, östrodiol gibi hormonların sinyal yollarını baskılayarak, p53 (p53 için ERK yolu aktivasyonu) gibi tümör baskılayıcı gen ekspresyonlarını artırarak, G0+G1 ve S fazında hücre tutulumu yaparak, PI3K/AKT sinyal yolunu baskılayarak gerçekleştirdiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [4, 29-37]. GB'nin kullanımı immunoterapi gibi diğer antineoplastik kanser protokolleri ile de sinergistik etki göstermiştir [38,39] GB'nin lösemide inhibisyon etkileri akut myeloid lösemide (AML) çalışılmış olup KML üzerinde yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır [25,26].

2.3 Yağ Asitleri, Yağ Asitleri Metabolizması ve L-Karnitin, Kanser

2.3.1 Yağ asitleri ve Trigliseridler (Triaçilgliseroller)

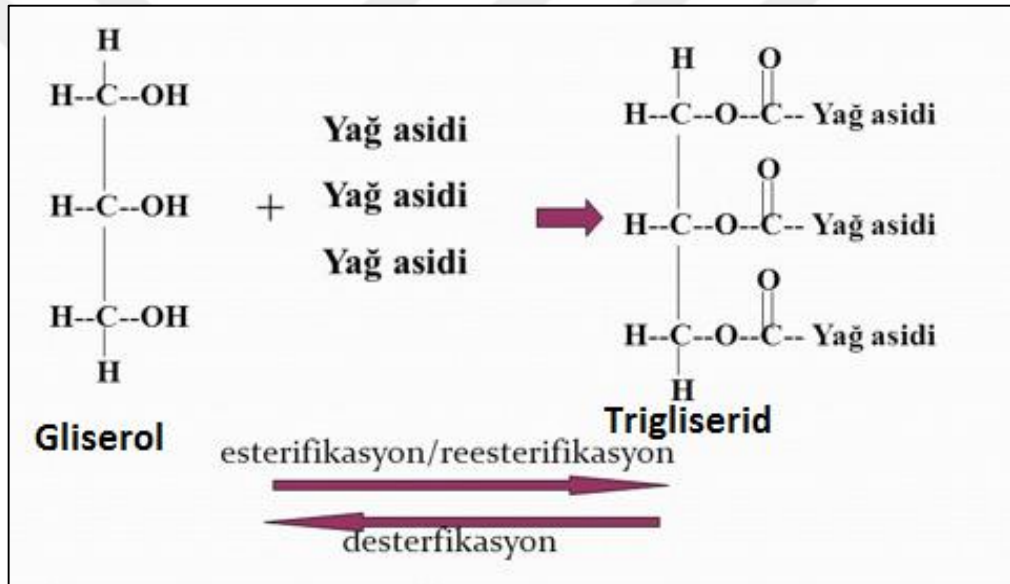
Lipidler içerdikleri kimyasal gruplara göre beş ana sınıfa ayrılır. Bunlar 1) YA'leri (Kısa, orta ve uzun zincirli yağ asitleri ve eikosanoidler), 2) Gliserol türevleri (Trigliseridler, mumlar ve gliserofosfolipidler), 3) Sfingozin türevleri (Sfingofosfolipidler, glikolipidler), 4) Lipoproteinler, 5) İzopren türevi lipidler (Terpenler ve steroller) (Şekil 2.2) [40].

YA'lerinin büyük bir bölümü organizmada hücrenin yapısal bileşeni olarak yağ açıl esterleri olarak, az bir bölümü ise serbest halde yer almaktadır [40]. Yağ açıl esterleri çok kompleks moleküller olup triaçilgliseroller, fosfolipidler, glikolipidler, sfingolipidler, prostaglandinler ile kolesterol esterleri gibi çeşitli bileşiklerin yapısında yer alır [40]. Serbest yağ asitlerinin bütün hücre ve dokularda konsantrasyonu değişiktir (plazmada 35 mg / dL). Serbest yağ asitleri albümine bağlanarak dolaşımda taşınır ve enerji sağlamak amacıyla oksidasyon ile dokularda kullanılır [40].

YA'lerinin karboksil grubu bir uçta, uzun hidrokarbon (H ve C karbon atomları) zinciri ortada ve metil grubu bir uçta olmak üzere yapısal bir şekle sahiptir [40]. YA'nin karboksil grubu pH 7'de iyonize haldedir ve suya afinitesi vardır. YA karboksil grubunun pKa değeri 4.8 dir, bu nedenle serbest YA'leri vücut sıvılarında iyonize halde bulunur [40]. Uzun hidrokarbon zincirin bir ucunda bulunan hidrofilik karboksil grubu sulu ortamla etkilenirken, hidrofobik uzun hidrokarbon zincir, polar olmayan ortama yönelerek moleküle suda erimeme özelliği kazandırır [40]. Bu suyu seven ve sevmeyen bölgelerin bir arada olması nedeniyle yağ asitleri amfipatik özelliktedir. Bu moleküller plazmada proteinlere bağlı olarak taşınır [40]. YA'lerinde 2-34 kadar karbon yer almaktadır. YA molekülünde karbon sayısı 6 dan az ise "kısa", 6-11 arasında ise "orta", 12 ve daha fazla ise "uzun zincirli" YA'leri olarak adlandırılır. Ayrıca YA, hidrokarbon zincirlerinde yer alan çift bağa göre doymuş veya doymamış YA'leri olarak da adlandırılır. Çift bağ içeriyorsa bunlara "doymamış YA'leri" denir. Doymamış bağların sayısı bir veya daha fazla olabilir ve doymamış YA'leri çeşitli yöntemlerle çift bağ yapısı ortadan kaldırılarak doyurulabilir. Doymamış yağ asitleri, doymuşlara oranla çok kolay oksidasyona uğrayabilirler. Çift bağ sayısı ne kadar fazla olursa oksidasyon o kadar kolay gerçekleşir [40]. İnsan vücudunda 9.-10. karbondan sonra çift bağ oluşturacak enzim sistemleri bulunmamaktadır. Bu nedenle, vücutta

sentezlenemeyen ve diyetle almamız gereken, metabolizma için gerekli doymamış YA'leri bulunmaktadır. Bu YA'lerine esansiyel YA'leri denir. Linoleik ve linolenik YA'leri bu gruba girmektedir [40].

Üç molekül YA'nin gliserol ile yaptıkları esterler sonucunda trigliseridler oluşur (Şekil 2.2). Bunlara basit lipidler, nötral yağlar veya triaçilgliseroller de denir. Gliserolün bir YA ile esterleşmesinden monoaçilgliserol, iki YA ile esterleşmesinden diaçilgliserol ve üç YA ile esterleşmesinden ise triaçilgliseroller oluşur [40]. YA'leri organizmada başlıca gliserol esterleri yani trigliseridler olarak bulunur, depolanır ve hidrofobik yapıdadır. Depo lipidlerin temel bileşeni olan trigliseridler, hücrelerin sitozolünde yağ damlacıkları olarak bulunur ve yağ dokusunda (adipoz doku) depolanırlar [40].



Şekil 2.2: Yağ asidi ve trigliseridler [40]

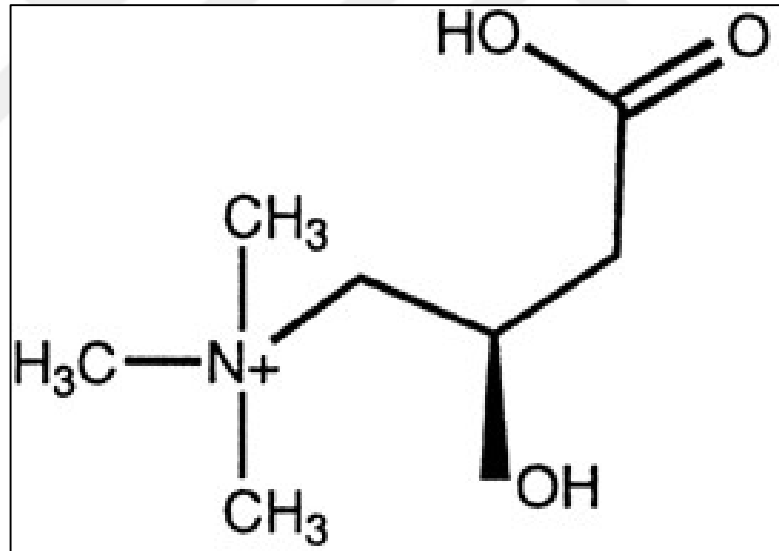
Besinle alınan trigliseridler nötral pH'da lipaz enzimi ile hidroliz edilirler. Lipaz enzimi katalizi ile ince bağırsakta besinsel yağların sindiriminden açığa çıkan YA'leri, yakıt olarak diğer dokular tarafından kullanılır, gliserol ise karaciğere giderek metabolik reaksiyonlara katılır. Yakıt olarak kullanılmayan YA'leri, trigliseridler olarak organizmada ince bağırsak mukoza hücreleri, meme, yağ doku ve karaciğerde sentezlenir. Besinlerle alınan karbonhidrat ve proteinlerin enerjiye dönüşmeyecek fazla miktarları YA'lerine dönüşerek yine trigliseridler olarak depolanır.

Trigliseridlerden sağlanan enerji, karbonhidratlardan sağlanandan iki katı daha fazladır [40].

2.3.1 Yağ asitlerinin metabolizması ve L-Karnitin

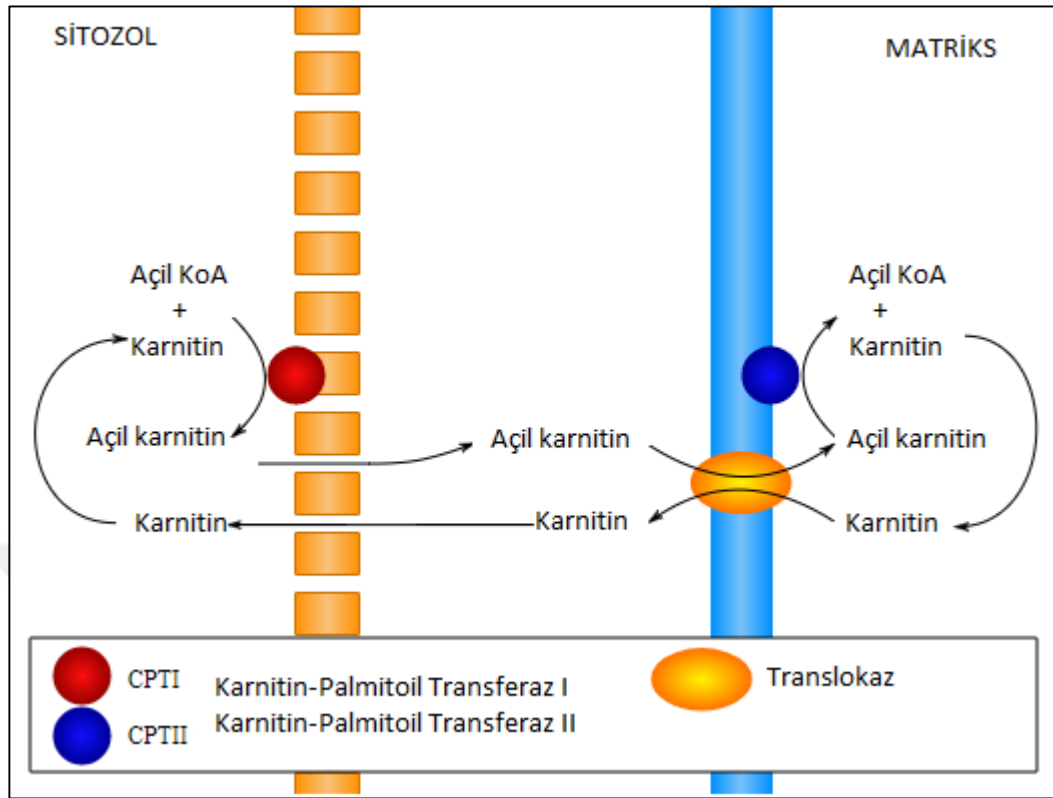
YAO, YA moleküllerinin mitokondride asetil-CoA'ya metabolize olduğu biyokimyasal bir süreçtir. Asetil CoA, solunum zincirinde elektron verici olarak görev alan NADH ve FADH₂'nin üretimi ile birlikte sitrik asit döngüsüne girer. Bunun sonucunda YAO ile hücre için enerji üretimi sağlanmış olur [8,9].

YA'lerinin metabolizması, YAO, ko-faktör olan karnitine ihtiyaç duyar. LK (4-trimetil-amino-3-hidroksibütirik asit) besin yoluyla veya böbrekte, karaciğerde ve beyinde lizin ve metionin aminoasitleri kullanılarak endojen olarak sentezlenir [8, 9]. Diğer hücreler, hücre zarı üzerinde bulunan aktif bir karnitin taşıma sistemi vasıtasıyla plazmadan alım yoluyla LK kullanabilirler (Şekil 2.3) [8,9].



Şekil 2.3: L-Karnitin [40]

CPT1 enziminin uzun zincirli açil-KoA'yı karnitin ile bağlaması sonucunda CACT ile sitozolden mitokondri matriksine taşınan uzun zincirli açil karnitin oluşur [8,9]. Mitokondride uzun zincirli açilkarnitin CPT2 tarafından karnitinden ayrılarak tekrardan uzun zincirli açil-KoA'ya dönüştürülür ve asetil-KoA oluşturmak üzere birden fazla oksidasyon turuna girer (Şekil 2.4) [8,9].



Şekil 2.4: Mitokondride Yağ Asidi Oksidasyonu ve L-Karnitin [40]

2.3.2 Yağ asitlerinin metabolizması, L-Karnitin ve kanser metabolizması ilişkisi

YAO'nun, karbonhidratlar dışında (Aerobik glikoliz ve normoksik koşullar altında yüksek bir glikoliz oranı görülen Warburg etkisi) kanser hücre çoğalmasını, büyümesini ve hayatta kalmayı (direnci) destekleyen önemli bir yol olduğu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [9-12]. YAO, kanser hücresi sağkalımı için ATP formunda enerji sağlamanın yanısıra kanser hücreleri tarafından oksidatif strese karşı koymak için redoks gücünü sağlayan sitozolik indirgeyici güç olan nikotinamid adenin dinükleotit fosfatı (NADPH) sağlar [8]. YAO, CPT ekspresyonlarını da artırarak tümör kemorezistansında da etkilidir [8]. Kanser hücrelerinin, glikoz tüketimi ve hipoksi (oksijensiz ortam) ile karakterize metabolik stress koşullarını aşmasını sağlar [8]. CPT1'in aynı zamanda uzun zincirli yağ açıl KoA, palmitoil KoA, seramid gibi hücreyi apoptoza götüren sitotoksik yağların işlevini engellediği de gösterilmiştir [8]. Bcl-2 CPTII'nin üzerinden apoptozu inhibe ettiği de saptanmıştır [8]. Buna göre, YA'lerinin mitokondri içine girerek YAO'ya uğramasını engelleyecek CPT1

enziminin engellenmesi ile LK seviyelerinin düşürülmesi gibi tedavi modelleri tercih edilmeye başlanmıştır [9-11, 13].

Bunun yanısıra LK'nın tek başına uygulandığı bazı kanser tiplerinde apoptoz aracılı antiproliferatif etki gösterdiği ve birlikte kullanıldığı bazı kanser ilaçlarının ise etkilerini artırdığına dair çalışmalar bulunmakla birlikte tam tersi kansere neden olduğu ve birlikte kullanıldığı kanser ilaçlarının veya radyoterapi gibi farklı tedavi modellerinin etkisini azalttığına dair daha fazla çalışma bulunmaktadır [14-22]. Ancak LK eksikliğinin, bazı kanser tiplerinin patogenezinde obezite ve insan vücudundaki yağ miktarı ile ilgisi olmayan bir mekanizma ile rol aldığını gösteren çalışmalar da mevcuttur [22]. Sitokinlerin de dahil olduğu çok faktörlü ve kompleks bir süreç olan kansere bağlı yorgunluk ve kaşeksi patogenezi ile LK eksikliği arasında bağlantı olduğuna ve olmadığına dair çalışmalar da bulunmaktadır [23,24].

LK ile de lösemi kanser tipinde yapılan çalışmalar çoğunlukla AML ve diğer lösemi tiplerinde olup KML ile ilgili inhibitör etkisini çok az sayıda çalışmada saptanmıştır [9, 27, 28].

3. MATERYAL ve METOD

GB ve LK ile planlanmış deneysel çalışmalar hücre kültüründe K562 KML hücreleri ile yapılmıştır. Goji berrymeyvesi teşhisi ve ekstraktlarının yapılması antioksidan kapasite tayini İstanbul Üniversitesi (İ.Ü) Eczacılık Fakültesi, monolayer hücre kültürü deneyleri ve flow sitometri analizleri İ.Ü Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (ASDETAE) İmmunoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. İstanbul Aydın Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya Laboratuvarı'nda, Enzim bağlantılı immünosorbent test (ELIZA) çalışmaları yapıldı.

3.1 Çalışma Cihazları, Aletleri, Kimyasalları ve Sarf Malzemeleri

Deneyselerde Kullanılan Sentetik Gıda Takviyesi

- L-Karnitin (Carnipure™, Now, IL, Amerika Birleşik Devletleri)

Deneyselerde Kullanılan Hücre Soyu

- K562 KML hücresi (ATCC ® CCL-243™, Amerika Birleşik Devletleri)

Kullanılan Cihazlar

- Laminar akım kabini (CESNA, Almanya)
- CO2'li İnkübatör (THERMO, Darmstadt, Almanya)
- Soğutmalı Santrifüj (VWR, Almanya)
- Flow Sitometri (BD, Heidelberg, Almanya)
- ELIZA reader (Thermo Scientific Multiskan GO UV/Vis)
- Orbital sallayıcı (Orbital Shaker-Stuart, SSL1, Viena, Avusturya)
- -80 °C Derin dondurucu (Thermo, Bosch,)
- Vorteks (İka, Wilmington, Amerika Birleşik Devletleri)
- Rotaevaporatör (Buchi R-210, VWR, Almanya)
- -4 °C Laboratuvar Tipi Soğutucu (Arctiko, Esbjerg, Danimarka)

- Bidistile su arıtma cihazı (Labconco, Fort Scott, KS, Amerika Birleşik Devletleri)
- pH ölçer (Hyxooy, Radiometer PHM 92, Kerava, Finlandiya)
- Hassas terazi (AND HM 200, CA, Amerika Birleşik Devletleri)
- Işık mikroskobu (Olympos, Hamburg, Almanya)

Deneyleerde Kullanılan Kimyasallar

- Fötal Sığır Serumı (Sigma-Aldrich 12106C, St. Louis, MO, Amerika Birleşik Devletleri)
- Mikoplazma önleyici solüsyon (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Amerika Birleşik Devletleri)
- Antimikotik ve antibiyotik karışımı solüsyon (Sigma-Aldrich A5955, St. Louis, MO, Amerika Birleşik Devletleri)
- Antibiyotik (Sigma-Aldrich 4333, St. Louis, MO, Amerika Birleşik Devletleri)
- Piruvik asit sodyum tuzu solüsyonu (Sigma-Aldrich S8636, St. Louis, MO, Amerika Birleşik Devletleri)
- Hücre dondurma solüsyonu (Sigma-Aldrich C616, St. Louis, MO, Amerika Birleşik Devletleri)
- RPMI Kültür medyumı (Gibco 11875085, Schwerte, Almanya)
- Petrol eteri (Merck Chemicals 1.01775.5000, Darmstadt, Almanya)
- Kloroform (Sigma-Aldrich 34854, St. Louis, MO, Amerika Birleşik Devletleri)
- Metil alkol (Sigma-Aldrich 34885, St. Louis, MO, Amerika Birleşik Devletleri)
- Derişik hidroklorik asid (Merck 100314, Darmstadt, Almanya)
- Brom (Merck 101945, Darmstadt, Almanya)
- Gallik asid (Sigma G7384, St. Louis, MO, Amerika Birleşik Devletleri)
- Sodyum hidroksit (Merck 106462, Darmstadt, Almanya)
- Kateşin (Fluka 22110, Almanya)
- Absolü Etanol (Merck 100983 Darmstadt, Almanya)
- CHAPS hücre liziz solüsyonu (Invitrogen ZC10003)
- Dimetil sülfoksid (Hybri-Max™ D2650, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Amerika Birleşik Devletleri)

Deneyleerde Kullanılan Sarf Malzemeler

- Membran bariyerler (ThinCert™-Greiner Bioone 657640, 662640)
- Filtreli pipet uçları (Eppendorf, Hamburg, Almanya)
- DNA saklama kutusu (Cryotechnics 5400948, Waardenburg, Hollanda)
- Şırınga (5 cc, 10 cc ve 50 ml'lik, Set Inject, Türkiye)
- Şırınga için membran süzme filtresi (TPP 99722, Trasadingen, İsviçre)
- Dondurma tübü 2 ml (TPP 89020, Trasadingen, İsviçre)
- Flask (TPP 90075, TPP 90025, Trasadingen, İsviçre)
- Steril hücre kültür kabı (TPP 92006, TPP 92024, Trasadingen, İsviçre)
- Steril plastik pipet (TPP 94010, TPP 94005, Trasadingen, İsviçre)
- Steril plastik pasteur pipeti (LP Italiana 135138, Milano, İtalya)
- Falkon tüpleri (TPP 91015, TPP 91050, Trasadingen, İsviçre)
- FACS Flow (BD 342003, Almanya)

Apoptotik ve anti-apoptotik sinyal yolaklarında belirlenmesinde kullanılan test kitleri

- Canlılık ve apoptoz saptama kiti (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Pharmingen-556570, Almanya)
- Kaspaz-3 protein konsantrasyonu deteksiyon kiti (Sigma-Aldrich CASP-3C, St. Louis, MO, Amerika Birleşik Devletleri)
- Kaspaz-8 protein konsantrasyonu deteksiyon kiti (USCN SEA853Hu, Almanya)
- Kaspaz-9 protein konsantrasyonu deteksiyon kiti (USCN SEA627Hu, Almanya)
- Bcl-2 protein konsantrasyonu deteksiyon kiti (USCN SEA778Hu, Almanya)
- Bax protein konsantrasyonu deteksiyon kiti (USCN SEB343Hu, Almanya)

3.2 Deneyleerde Kullanılan Fitoterapotik Ajan: Goji Berry

Mevcut çalışmada araştırılan GB'nin meyveleri Çin'de yetiştirilmiş olup bir web sitesi aracılığı ile alındı. Meyveler genellikle açık kutularda ve güneşte kurutulmuş küçük paketlerde satılmakla birlikte meyve suları, konsantre ekstratlar ve enfüzyonlarının yanı sıra kapsülleri de bulunmaktadır [6].

3.3 Goji berry Ekstraktının Yapımı

GB meyveleri oda sıcaklığında, steril ortamda ve karanlıkta 30 gün boyunca kurutuldu ve neşter ile kesilerek çok küçük parçalara ayrıldı. 30 g parçalanmış meyvelere 100 ml metanol, 30 ml petrol eteri, 50 ml kloroform kullanılarak hemen hemen 24 saat boyunca Soxhlet cihazında geri akış (reflüks) ile ekstraksiyon yapıldı. Karışımdan metanol, petrol eteri ve kloroform rotaevaporatör aracılığı ile uzaklaştırıldı. Ekstre edilebilen bileşik miktarı (EC) tespit edildi. Elde edilen GB ekstraktı hemen hücrelere uygulanmayacağı için küçük cam şişelere kondu ve -20°C’de saklandı [30,41].

3.4 Antioksidan Kapasite Tayini Deneyleri

3.4.1 Total fenolik bileşik miktarı tayini

Ekstraktların total fenolik bileşik miktarı, kolorimetrik Slinkard ve Singleton yönteminde Folin-Ciocalteu solüsyonu kullanılarak bazı küçük modifikasyonlar yapılarak belirlendi [41]. Falcon tüplere 40 mg/mL konsantrasyonda ekstraktlar kondu ve 25 saniye ultrasonik tipte banyoda çözülmesi sağlandı. Ekstreler çözücüler ile 3 farklı konsantrasyonda (20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL) dilüe edildi. Bu dilüe ekstraktlar ile deneyler gerçekleştirildi.

Ekstraktlar (8µl) mikropılaka kuyularına kondu. Sonra sırasıyla 260 µL hacimde distile su, 8 µL hacimde Folin-Ciocalteu solüsyonu ve 24 µL hacimde sodyum karbonat çözeltisinden (% 2) eklendi, karıştırıldı ve karanlıkta 2 saat bekletildikten sonra konsantrasyon gradiyentine göre değişen absorbans, distile su olarak belirlenen köre karşı, 760 nm dalga boyunda okundu, raporlandı ve değerlendirildi [41].

Elde edilen sonuçlar gallik asid standart eğri denklemi ile “mg gallik asid ekivalanları/g meyve” olarak değerlendirildi[41].

3.4.2 Total flavonoid miktar tayini

Ekstraktların total flavonoid miktar tayini Kim ve arkadaşları (2003) tarafından bulunan standart kolorimetrik yöntemde bazı küçük modifikasyonlar yapılarak saptandı [41].

Falkon tüplere 40 mg/mL konsantrasyonda ekstraktlar kondu ve 25 saniye ultrasonik tipte banyoda çözülmesi sağlandı. Ekstreler çözücüler ile 3 farklı konsantrasyonda (20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL) dilüe edildi. Bu dilüe ekstraktlar ile deneyler gerçekleştirildi [41].

Ekstraktlar (25 µL) ve kateşinden hazırlanan standartlar (25 µL) mikroplaka kuyularına kondu. Sonra sırasıyla 125 µL hacimde distile su, 7.5 µL hacimde % 5 oranında sodyum nitrit solüsyonu, % 10 oranında 15 µL hacimde alüminyum triklorür ve 50 µL hacimde 1 M konsantrasyonda sodyum hidroksid, 27.5 µL distile su eklenerek karıştırıldı ve karanlıkta 2 saat bekletildikten sonra konsantrasyon gradiyentine göre değişen mavi rengin absorbansı, distile su olarak belirlenen köre karşı, 510 nm absorbansda okundu, raporlandı ve değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar kateşin standart eğri denklemi ile “mg kateşin ekivalanları/g meyve” olarak değerlendirildi [41].

3.5 L-Karnitin

Deneyde kullanılan gıda takviyesi L-Karnitin (Carnipure™, Now, IL, Amerika Birleşik Devletleri) 1 tableti 1.0 g olup içinde 1.0 g L-Karnitin tartarat ve ayrıca selüloz, bitkisel kaynaklı stearik asit ve magnezyum stearat, silis ve bitkisel kaplama içermektedir.

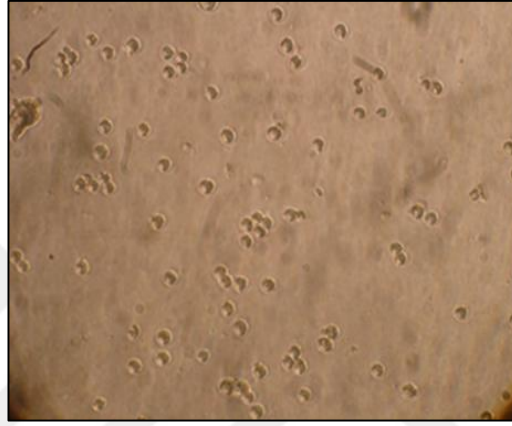
3.6 Süspansiyon Hücre Kültürü

3.6.1 K562 hücre soyu

K562 KML insan hücre soyu (ATCC® CCL-243™) hücre bankasından [Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu (ATCC, Manassas, VA, A.B.D)] satın alındı. Bu banka, terminal evredeki 53 yaşındaki KML teşhisi konmuş kadın hastadan bu hücreleri izole etti ve çoğalttı [2,42]. K562 KML hücre soyu yüksek farklılaşmadan kalma yeteneğine sahip granülosit serisidir. KML, insan eritrolösemi hücre soyudur. K562 blastları multipotensiyel, hematopoietik ölümcül hücrelerdir ve spontan olarak eritrositik, granulositik ve monositik serilerin öncü hücrelerine (progenitör) farklılaşabilir. Bu hücrelerde Philadelphia kromozomu bulunmaktadır [2,42].

3.6.2 K562 süspansiyon hücre kültürü

KML hücre soyunu çoğaltmak amacıyla kullanılan medyum antibiyotik-antimikotik solüsyonu (%1), sodyum piruvat (1.0 mM), sodyum bikarbonat (1.5 g/L), fetal sıgır serumu (% 10, FBS) ilave edilmiş RPMI-1640'dır (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc.). Hücreler çeşitli büyüklükteki flasklarda nemli ortama sahip inkübatör (37 °C , % 5 CO₂) içinde üretildi (Şekil 3.1) [2, 42].



Şekil 3.1: K562 lösemi hücreleri (Orijinal büyütme x30)

3.7 Süspansiyon Hücre Kültürü ile Yapılan Deneyler

300.000 KML hücresi 3 ml RPMI-1640 medyum bulunan 3 kuyuya ekildi ve inkübatörde 1 saat kadar tutuldu. Daha sonra GB ve LK ayrı ayrı ve birarada hücrelere uygulandı (Şekil 3.2). Test grupları 1. Kontrol grubu (Sadece steril distile su verilen grup), 2. GB grubu, 3. LK grubu, 4. GB ve LK'nın birlikte uygulandığı kombinasyon grubu.

Grupların KML hücreleri üzerine etkileri toplam hücre sayısına, hücre canlılığına, hücre ölüm tipine [Apoptoz belirleme yöntemi: Flow sitometrik Anneksin-V-Fluoresan isotiyosiyanat/propidyum iodid (Anneksin-V-FITC/PI) ikili boyaması], intrinsek ve ekstrinsek apoptotik sinyal yolu [Kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9, Bcl-2-bağlantılı X protein (Bax)] ve anti-apoptotik sinyal yolu protein seviyelerine (bcl-2) (ELIZA yöntemi) bakılarak 72 saat boyunca değerlendirildi.



Şekil 3.2: Süspansiyon hücre kültürü. GB ve LK insertler kullanılarak KML hücrelerine 72 saat boyunca uygulandı.

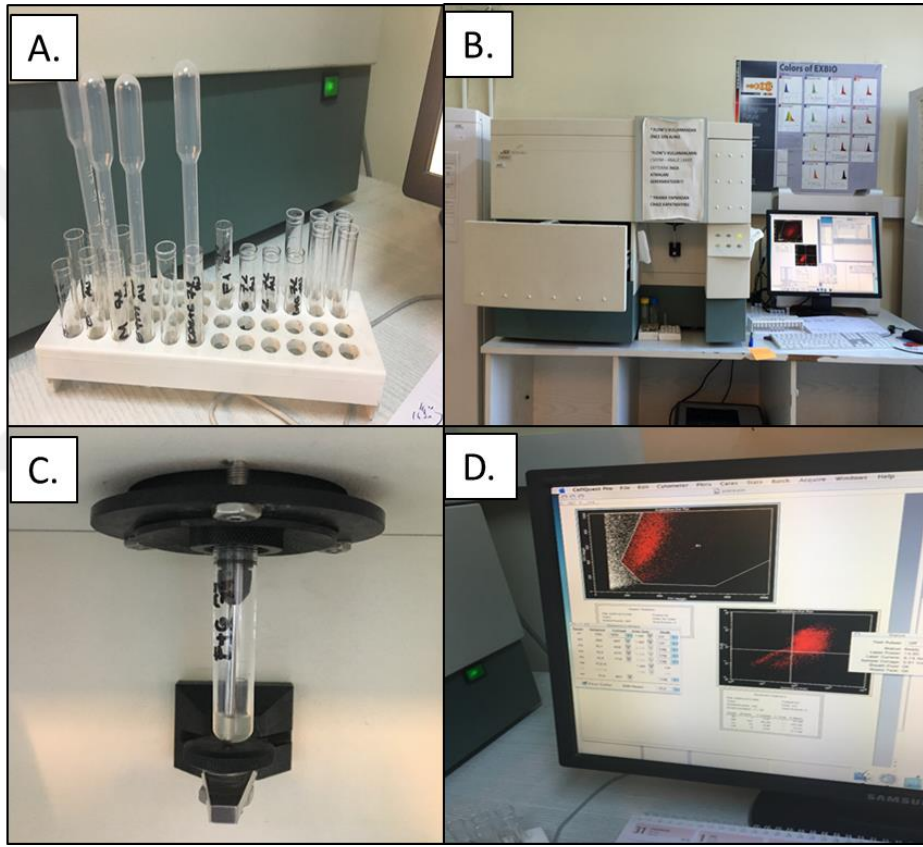
3.8 Total Hücre Sayısı

Total hücre sayısını saptamak için 500.000 K562 hücresi RPMI-1640 medyumunu içeren kuyulara ekildi ve inkübatörde 72 saat boyunca bekletildi [43,44]. Total hücre sayısı PI boyaması esasına dayanan ve liziz çalışma solüsyonu, stabilizasyon solüsyonu ve kasetler bulunan ticari kit (A starter kit, ChemoMetec A/S, Allerod, Denmark) kullanılarak otomatik hücre sayacı ile saptandı. 24 ve 72 saat sonunda K562 hücreleri yıkandı ve parçalayıcı solüsyon ile stabilizasyon solüsyonu kullanılarak parçalandı [43,44]. Parçalanmış, DNA'ları açığa çıkmış hücreler PI kaplanmış olan özel kasetlere aktarıldı ve DNA'larına PI bağlandı ve boyandı. Hücre sayıcıda PI floresansı ölçülerek hücrelerin sayısı saptandı ve raporlandı [43,44].

3.9 Canlılık ve Apoptoz Tayini

Çalışmamızda hücre canlılığı ve apoptoz oranlarını saptamak için Anneksin-V-FITC ve PI ikili boyamasına dayalı test kitinin uygulama prensipleri bazı minör modifikasyonlar yapılarak izlendi [43,44]. Deneyleerde 300.000 lösemi hücresi 24. ve 72. saatler esas alınarak 3 ml RPMI-1640 medyumunu yer alan 3 kuyuya ekildi ve inkübatörde 1 saat tutuldu. Uygulamalar yapıldıktan sonra 24. ve 72. saatlerde hücreler sayıldı. Sayımdan sonra yıkanarak içine HEPES, sodyum klorür, kalsiyum klorürden oluşan bağlama tamponu kondu ve süspansiyon

oluşturuldu. 100.000 hücre/100 µl bağlama solüsyonu olacak şekilde ayarlanan süspansiyona Annexin V-FITC ve PI kondu, 22 °C’de ve karanlıkta 15-20 dakika tutuldu. Floresans ölçümü için flow sitometri cihazına kondu, ölçümler alındı ve CellQuest ve WinMDI programları analiz edildi [43,44]. Elde edilen flow sitometri histogramlarında, sol alt kısım canlı hücreleri (Annexin V-, PI-), sağ alt kısım erken apoptotik hücreleri (Annexin V+, PI-), sağ üst kısım geç apoptotik hücreleri (Annexin V+, PI+) ve sol üst kısım ise ölü hücre popülasyonlarını göstermekle birlikte toplam apoptotik hücre yüzdeleri erken ve geç apoptotik hücre oranları birlikte değerlendirilerek elde edildi [43,44].



Şekil 3.3: Flow sitometri aşamaları. A. Flow sitometri için test kiti kullanılarak hazırlanan numuneler, B. Flow sitometri cihazı, C. Flow sitometri cihazında ölçülmeye başlanan test tübü, D. Cihaza uygun programla görülen hücre popülasyonları ve canlı, erken ve geç apoptotik ve ölü hücre yüzdelerini gösteren histogramlar

3.9.1 Protein konsantrasyonlarının saptanması

ELIZA yapılacak numunelerin protein konsantrasyonlarının değerlendirilmesi için Biçinkromik Asit (BCA) yöntemi, mikropılaka yöntemi ile birlikte uygulandı.

[43,44]. Bu yöntem için çalışma aralığı 20-2000 µg/ml olarak belirlendi. Portein standartlar sığır serum albumin (BSA) kullanılarak hazırlandı [43,44] .

Numune ve standartlardan (25 µL) kuyulara pipetlendikten sonra içinde sodyum hidroksit. Sodyum karbonat, sodyum bikarbonat, biçinkromik asit, sodyum tartarat ve bakır sülfat bulunan 200 µl BCA çalışma solüsyonu eklendi ve 37 °C'lik etüvde 35 dk tutuldu. Absorbans değerleri (A) 540 nm dalga boyunda okundu ve raporlandı. ELIZA yapılacak örneklerin protein konsantrasyonları BSA standart eğri grafiği ve R² değerleri değerlendirilerek belirlendi[43,44].

3.9.1.1 Kaspaz-3 konsantrasyonu değerlendirilmesi

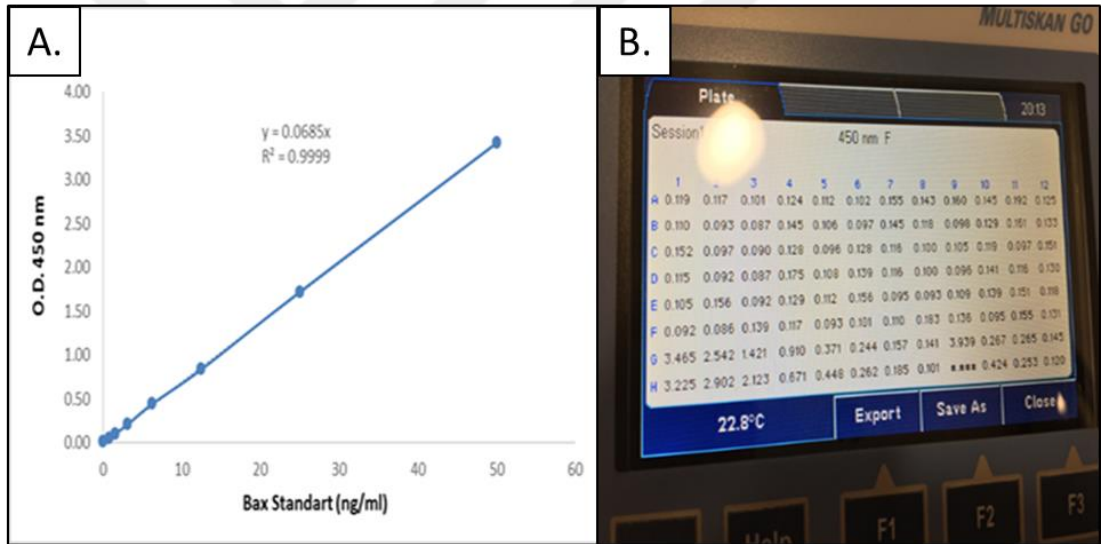
Çalışmamızda Kaspaz-3 konsantrasyonlarını saptamak için test kitinin uygulama prensipleri bazı minör modifikasyonlar yapılarak izlendi [43,44]. Kaspaz-3 enzim konsantrasyonlarının değerlendirilmesi asetil-Asp-Glu-Val-Asp nitroanilidini (kaspaz-3 peptid substratı, Ac-DEVD-pNA) parçalaması ile oluşan ürün p-nitroanilininin (pNA) kolorimetrik olarak ölçülmesi ile gerçekleştirildi [43,44].

Numuneler mikropalakalara kondu ve üzerine 4-(2-hidroksietil) -1-piperazin etansülfonik asit (HEPES; pH:7.4), Dimetil [3- (propil) azaniumil} propan-1-sülfonat (CHAPS), ditiyotretol (DTT), etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren deney tamponu ve sonra 2mM Ac-DEVD-pNA eklendi. p-NA'den 10 µM-200 µM konsantrasyon aralığında standartlar hazırlandı. Absorbanslar 1-4 dakika içinde 405 nmde ELIZA okuyucuda ölçüldü ve raporlandı. pNA standart eğrilerinden elde edilen kalibrasyon denklemleri ile absorbanslar konsantrasyona (nmol) çevrildi[43,44] .

3.9.1.2 Kaspaz-8, Kaspaz-9, Bax ve Bcl-2 konsantrasyonlarının değerlendirilmesi

Çalışmamızda Kaspaz-8, Kaspaz-9, Bax ve Bcl-2 seviyelerindeki değişiklikleri araştırmak için test kitinin uygulama prensipleri bazı minör modifikasyonlar yapılarak izlendi [43,44]. Protein standartları ve numuneler Kaspaz-8, Kaspaz-9, Bax ve Bcl-2 kaplanmış olan kuyularına kondu ve 95 dakika 37 °C'lik etüvde bekletildi. Standartlar test kiti tarafından belirlenen uygulama konsantrasyon aralıklarına (Kaspaz-8'de 0-40 ng/ml, Kaspaz-9'da 0-20 ng/ml, Bcl-2'de 0-100 ng/ml, Bax'da 0-25ng/ml) hazırlandı (Şekil 3.4) [43,44].

Numuneler kuyulardan uzaklaştırıldıktan sonra birincil antikorunu içeren deteksiyon solüsyonu A eklenerek ve 1 saat 37 °C'lik etüvde tutuldu. Sonra, ikincil antikor ile streptavidine bağlanmış yaban turpu peroksidazı (HRP) bulunan saptama solüsyonu B eklendi ve 45 dakika 37 °C'lik etüvde bekletildi [43,44]. Kromojen substratı olan 3,3',5,5,-tetrametilbenzidin (TMB) eklendi ve karanlıkta 37 °C'lik etüvde bekletildi. Bunun sonucunda 5-15 dakika içinde bazı uygulamalarda pozitif reaksiyon belirteci olan konsantrasyon gradiyentine göre farklılaşan mavi renk görüldü [43,44]. Kromojen ile meydana gelen reaksiyonu durdurmak için reaksiyon sonlandırıcı (stop) solüsyon eklendi ve sarı rengin oluşması ile 2-4 dakika içinde absorbanslar 450 nm'de ELIZA okuyucuda ölçüldü ve raporlandı [43,44]. Örneklerin protein konsantrasyonları protein standart eğri grafikleri ile R² değerleri değerlendirilerek belirlendi. Absorbanslar ng/ml, pg/ml ve µmol olmak üzere konsantrasyon birimlerine dönüştürüldü (Şekil 3.4) [43,44].



Şekil 3.4: ELIZA a) BCA yöntemi ile ELIZA yapılacak örnekteki Bax protein miktarını saptamada kullanılan Bax standart eğrisi, b) Ham absorbans verileri.

3.10 İstatistiksel Değerlendirme

GB, LK ve kombinasyon gruplarının kontrole ve birbirlerine göre değerlendirilmesi SPSS Statistics 22 (SPSS, Türkiye) programı ile Shapiro Wilks testi (normal dağılım yapıp yapmadığı) ve Anova testi (gruplar arasındaki fark) kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki fark, $p < 0.05$ altında bulunduğu anda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

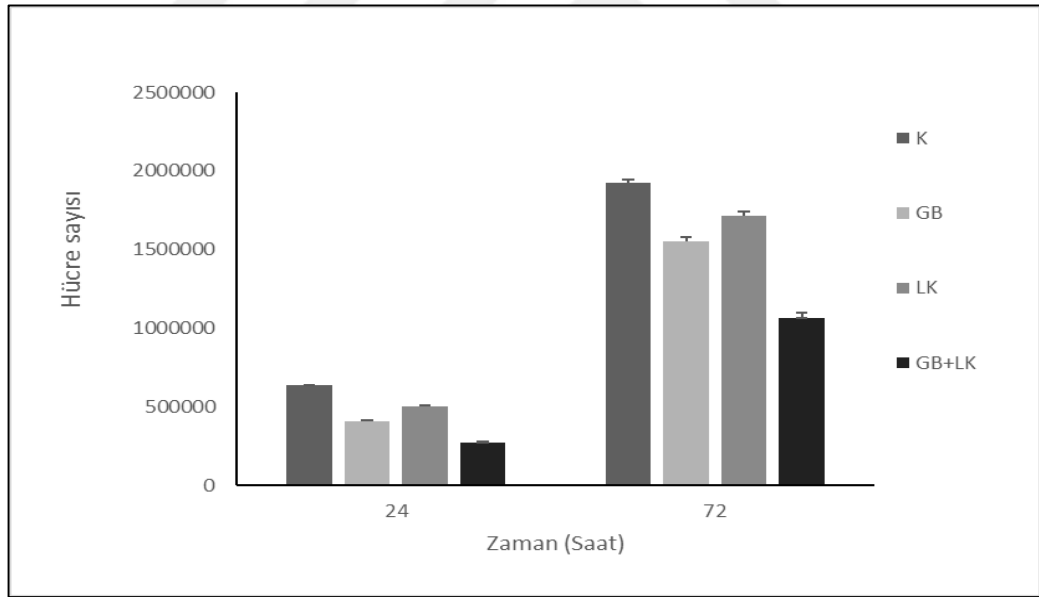
4. BULGULAR

4.1 Goji Berry'de Fenolik-Flavonoid Miktar Tayini

Anti-oksidan kapasite fenolik ile flavonoid içerik miktar tayini ile belirlendi. Fenolik bileşik miktarı [GB ağırlığının her gramı için gallik asit ekivalanı (GAE)] 3.45 ± 0.44 mg GAE/g ekstre ve flavonoid bileşik miktarı [GB ağırlığının her gramı için kateşin ekivalanı (CAE)] 2.5 ± 0.27 mg CAE/g ekstredir.

4.2 Total Hücre Sayısı

GB, LK ve kombinasyon gruplarının 72 saat boyunca toplam hücre sayısı üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1: Total hücre sayısını gösteren grafik.

Grafiklerdeki sonuçlar ortalama ($n:6$) \pm SD olarak gösterildi. Deneyler 3 defa tekrarlandı. K, Kontrol grubu, GB, Goji berry, LK, L-Karnitin, GB+LK, Kombinasyon grubu.

72 saat boyunca hücre sayılarında görülen değişikliklerin kontrol grubuna göre kıyaslanması

- Deneysel gruplarının 24. saatteki ortalama hücre sayıları, kontrole göre düşük saptandı ($P_{GB} < 0.001$, $P_{LK} < 0.01$, $P_{GB+LK} < 0.0001$).
- Deneysel gruplarının 72. saatteki ortalama hücre sayıları, kontrole göre yine düşük saptandı ($P_{GB} < 0.001$, $P_{LK} < 0.01$, $P_{GB+LK} < 0.00001$).

72 saat boyunca hücre sayılarında görülen değişikliklerin gruplar arası kıyaslanması

24 saat sonunda değerlendirme

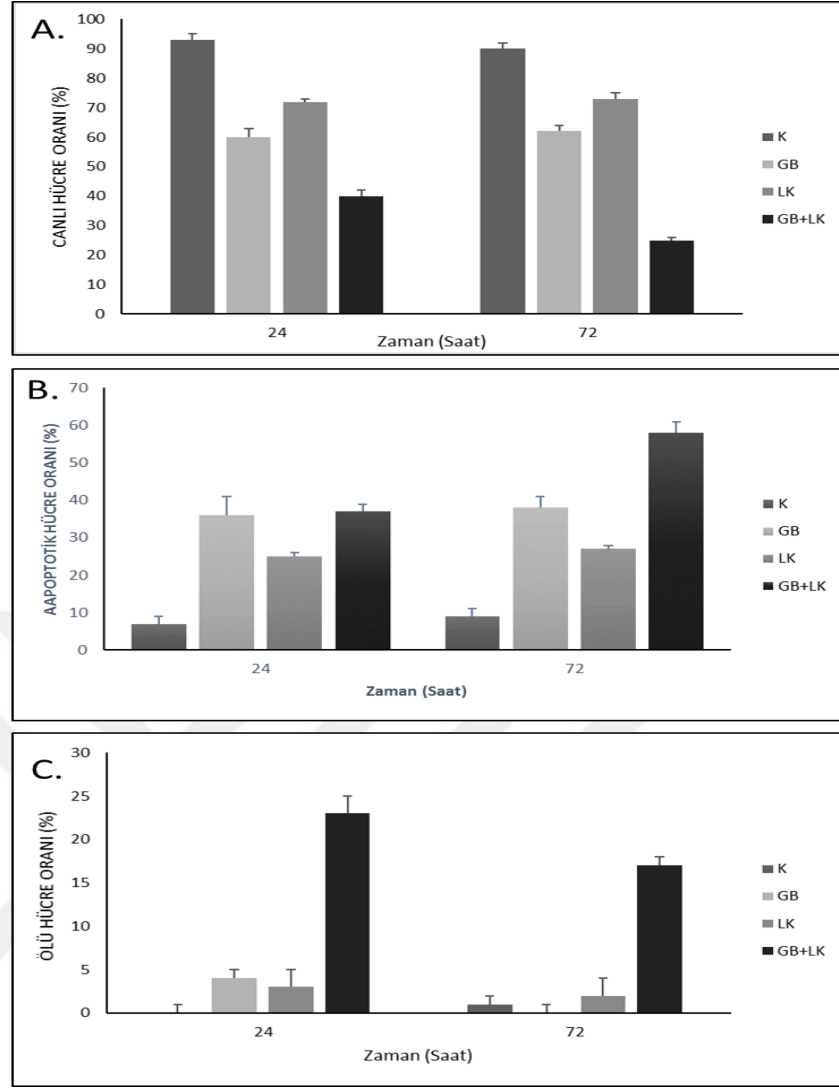
- GB'nin hücre sayısı ortalaması, LK'nin ortalamasından düşük saptandı ($P_{LK} < 0.05$), GB+LK'nin ortalamasından ise yüksek saptandı ($P_{GB+LK} < 0.01$).
- LK'nin hücre sayısı ortalaması, GB'nin ortalamasından yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.05$), GB+LK'nin ortalamasından da yüksek saptandı ($P_{GB+LK} < 0.001$).
- GB+LK'nin hücre sayısı ortalaması, GB'nin ortalamasından düşük saptandı ($P_{GB} < 0.01$), LK'nin ortalamasından da düşük saptandı ($P_{LK} < 0.001$).

72 saat sonunda değerlendirme

- GB'nin hücre sayısı ortalaması, LK'nin ortalamasından düşük saptandı ($P_{LK} < 0.05$), GB+LK'nin ortalamasından ise yüksek saptandı ($P_{GB+LK} < 0.0001$).
- LK'nin hücre sayısı ortalaması, GB'nin ortalamasından yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.05$), GB+LK'nin ortalamasından da yüksek saptandı ($P_{GB+LK} < 0.000001$).
- GB+LK'nin hücre sayısı ortalaması, GB'nin ortalamasından düşük saptandı ($P_{GB} < 0.0001$), LK'nin ortalamasından da düşük saptandı ($P_{LK} < 0.000001$).

4.3 Hücre Canlılığı ve Apoptoz Değerlendirme Bulguları

GB, LK ve kombinasyon gruplarının 72 saat boyunca canlılık ve apoptoz üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3: Anneksin-V-FITC/PI dual boyama ile flow sitometrik canlılık ve apoptoz değerlendirilmesi. A. Canlı KML hücre sayısındaki değişiklikleri gösteren grafik, B. Apoptoza uğramış KML hücre sayılarını gösteren grafik C. Ölü KML hücrelerini gösteren grafik. Grafiklerdeki sonuçlar ortalama (n:6)± SD olarak gösterildi. Deneyler 3 defa tekrarlandı. K, Kontrol grubu, GB, Goji berry, LK, L-Karnitin, GB+LK, Kombinasyon grubu.

4.3.1 Canlı lösemi hücre oranları

72 saat boyunca canlı hücre oranlarında görülen değişikliklerin kontrol grubuna göre kıyaslanması (Şekil 4.2 A)

- Deneysel gruplarının 24. saatteki canlı hücre oranları, kontrole göre düşük saptandı ($P_{GB} < 0.000001$, $P_{LK} < 0.00001$, $P_{GB+LK} < 0.0000$).

- Deneş gruplarının 72. saatteki canlı hücre oranları, kontrole grubuna göre düşük saptandı ($P_{GB} < 0.0000001$, $P_{LK} < 0.0001$, $P_{GB+LK} < 0.0000$).

72 saat boyunca canlı hücre oranlarında görülen değişikliklerin gruplararası kıyaslanması (Şekil 4.2 A)

24 saat sonunda değerlendirme

- GB'nin canlı hücre oranı ortalaması, LK'nın ortalamasından düşük saptandı ($P_{LK} < 0.01$), GB+LK'nın ortalamasından ise yüksek saptandı ($P_{GB+LK} < 0.000001$).
- LK'nın canlı hücre oranı ortalaması, GB'nin ortalamasından yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.01$), GB+LK'nın ortalamasından da yüksek saptandı ($P_{GB+LK} < 0.0000001$).
- GB+LK'nın canlı hücre oranı ortalaması, GB'nin ortalamasından düşük saptandı ($P_{GB} < 0.000001$), LK'nın ortalamasından da düşük saptandı ($P_{LK} < 0.0000001$).

72 saat sonunda değerlendirme

- GB'nin canlı hücre oranı ortalaması, LK'nın ortalamasından düşük saptandı ($P_{LK} < 0.01$), GB+LK'nın ortalamasından ise yüksek saptandı ($P_{GB+LK} < 0.0000$).
- LK'nın canlı hücre oranı ortalaması, GB'nin ortalamasından yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.01$), GB+LK'nın ortalamasından da yüksek saptandı ($P_{GB+LK} < 0.0000$).
- GB+LK'nın canlı hücre oranı ortalaması, GB'nin ortalamasından düşük saptandı ($P_{GB} < 0.0000$), LK'nın ortalamasından da düşük saptandı ($P_{LK} < 0.0000$).

4.3.2 Apoptotik lösemi hücre oranları

72 saat boyunca apoptotik hücre oranlarında görülen değişikliklerin kontrol grubuna göre kıyaslanması (Şekil 4.2 B)

- Deneş gruplarının 24. saatteki apoptotik hücre oranları, kontrole göre yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.0000001$, $P_{LK} < 0.00001$, $P_{GB+LK} < 0.0000001$).
- Deneş gruplarının 72. saatteki apoptotik hücre oranları, kontrole göre yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.0000001$, $P_{LK} < 0.00001$, $P_{GB+LK} < 0.0000001$).

72 saat boyunca apoptotik hücre oranlarında görülen değişikliklerin gruplar arası kıyaslanması (Şekil 4.2 B)

24 saat sonunda değerlendirme

- GB'nin apoptotik hücre oranı ortalaması, LK'nın ortalamasından yüksek saptandı ($P_{LK}<0.01$), GB+LK'nın ortalamasından ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan seviyede düşük saptandı ($P_{GB+LK}>0.05$).
- LK'nın apoptotik hücre oranı ortalaması, GB'nin ortalamasından düşük saptandı ($P_{GB}<0.01$), GB+LK'nın ortalamasından da düşük saptandı ($P_{GB+LK}<0.001$).
- GB+LK'nın apoptotik hücre oranı ortalaması, GB'nin ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı olmayan seviyede yüksek saptandı ($P_{GB}>0.05$), LK'nın ortalamasından da yüksek saptandı ($P_{LK}<0.001$).

72 saat sonunda değerlendirme

- GB'nin apoptotik hücre oranı ortalaması, LK'nın ortalamasından yüksek saptandı ($P_{LK}<0.0001$), GB+LK'nın ortalamasından ise düşük saptandı ($P_{GB+LK}<0.0000001$).
- LK'nın apoptotik hücre oranı ortalaması, GB'nin ortalamasından düşük saptandı ($P_{GB}<0.0001$), GB+LK'nın ortalamasından da düşük saptandı ($P_{GB+LK}<0.0000001$).
- GB+LK'nın apoptotik hücre oranı ortalaması, GB'nin ortalamasından yüksek saptandı ($P_{GB}<0.0000001$), LK'nın ortalamasından da yüksek saptandı ($P_{LK}<0.0000001$).

4.3.3 Ölü lösemi hücre oranları

72 saat boyunca ölü hücre oranlarında görülen değişikliklerin kontrol grubuna göre kıyaslanması (Şekil 4.2C)

- Deneysel gruplarının 24. saatteki ölü hücre oranları, kontrole göre yüksek saptandı ($P_{GB}<0.001$, $P_{LK}<0.001$, $P_{GB+LK}<0.0000$).
- Deneysel gruplarının 72. saatteki ölü hücre oranları, kontrole göre yüksek saptandı ($P_{GB}<0.0001$, $P_{LK}<0.01$, $P_{GB+LK}<0.0000$).

72 saat boyunca ölü hücre oranlarında görülen değişikliklerin gruplar arası kıyaslanması (Şekil 4.2C)

24 saat sonunda değerlendirme

- GB'nin ölü hücre oranı ortalaması, LK'nın ortalamasından yüksek saptandı ($P_{LK} < 0.01$), GB+LK'nın ortalamasından ise düşük saptandı ($P_{GB+LK} < 0.0000$).
- LK'nın ölü hücre oranı ortalaması, GB'nin ortalamasından düşük saptandı ($P_{GB} < 0.01$), GB+LK'nın ortalamasından da düşük saptandı ($P_{GB+LK} < 0.0000$).
- GB+LK'nın ölü hücre oranı ortalaması, GB'nin ortalamasından yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.0000$), LK'nın ortalamasından da yüksek saptandı ($P_{LK} < 0.0000$).

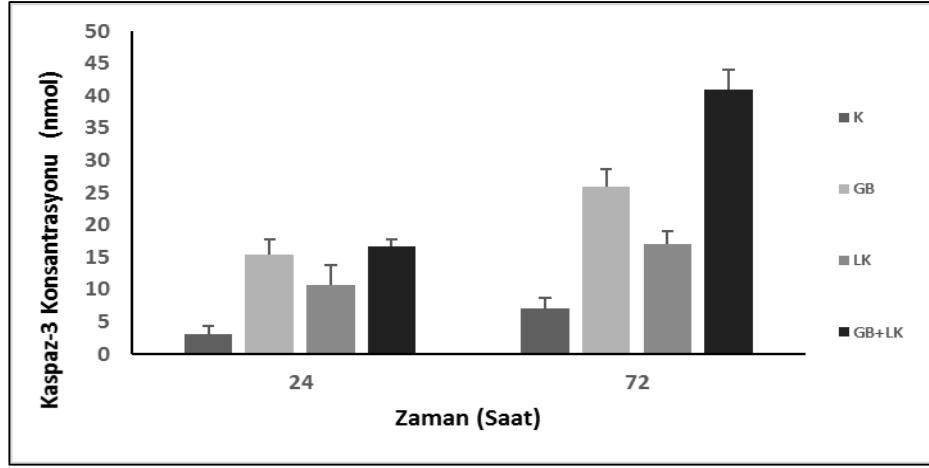
72 saat sonunda değerlendirme

- GB'nin ölü hücre oranı ortalaması, LK'nın ortalamasından düşük saptandı ($P_{LK} < 0.01$), GB+LK'nın ortalamasından da düşük saptandı ($P_{GB+LK} < 0.0000$).
- LK'nın ölü hücre oranı ortalaması, GB'nin ortalamasından yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.01$), GB+LK'nın ortalamasından da düşük saptandı ($P_{GB+LK} < 0.0000$).
- GB+LK'nın ölü hücre oranı ortalaması, GB'nin ortalamasından yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.0000$), LK'nın ortalamasından da yüksek saptandı ($P_{LK} < 0.0000$).

4.4 Apoptotik ve Anti-apoptotik Protein Konsantrasyonları Değerlendirme Bulguları

4.4.1 Kaspaz-3 protein konsantrasyonları

GB, LK ve kombinasyon gruplarının 72 saat boyunca Kaspaz-3 konsantrasyonu üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3: Kaspaz-3 protein konsantrasyonlarında meydana gelen değişiklikleri gösteren grafik. Grafiklerdeki sonuçlar ortalama (n:6)± SD olarak gösterildi. Deneyler 3 defa tekrarlandı. K, Kontrol grubu, GB, Goji berry, LK, L-Karnitin, GB+LK, Kombinasyon grubu.

72 saat boyunca kaspaz-3 konsantrasyonlarında görülen değişikliklerin kontrole göre kıyaslanması

- Deney gruplarının 24. saatteki kaspaz-3 konsantrasyonları, kontrole göre yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.000001$, $P_{LK} < 0.0001$, $P_{GB+LK} < 0.000001$).
- Deney gruplarının 72. saatteki kaspaz-3 konsantrasyonları, kontrole göre yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.000001$, $P_{LK} < 0.0001$, $P_{GB+LK} < 0.0000$).

72 saat boyunca kaspaz-3 konsantrasyonlarında görülen değişikliklerin gruplar arası kıyaslanması

24 saat sonunda değerlendirme

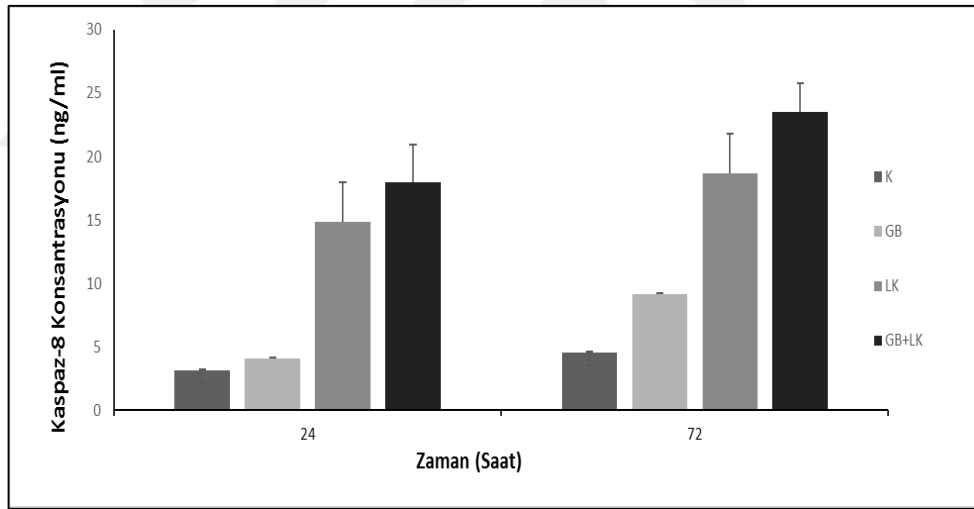
- GB'nin kaspaz-3 konsantrasyonu ortalaması, LK'nın ortalamasından yüksek saptandı ($P_{LK} < 0.001$), GB+LK'nın ortalamasından ise düşük saptandı ($P_{GB+LK} < 0.05$).
- LK'nın kaspaz-3 konsantrasyonu ortalaması, GB'nin ortalamasından düşük saptandı ($P_{GB} < 0.001$), GB+LK'nın ortalamasından da düşük saptandı ($P_{GB+LK} < 0.05$).
- GB+LK'nın kaspaz-3 konsantrasyonu ortalaması, GB'nin ortalamasından yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.001$), LK'nın ortalamasından da yüksek saptandı ($P_{LK} < 0.05$).

72 saat sonunda değerlendirme

- GB'nin kaspaz-3 konsantrasyonu ortalaması, LK'nın ortalamasından yüksek saptandı ($P_{LK}<0.01$), GB+LK'nın ortalamasından ise düşük saptandı ($P_{GB+LK}<0.00001$).
- LK'nın kaspaz-3 konsantrasyonu ortalaması, GB'nin ortalamasından düşük saptandı ($P_{GB}<0.01$), GB+LK'nın ortalamasından da düşük saptandı ($P_{GB+LK}<0.000001$).
- GB+LK'nın kaspaz-3 konsantrasyonu ortalaması, GB'nin ortalamasından yüksek saptandı ($P_{GB}<0.00001$), LK'nın ortalamasından da yüksek saptandı ($P_{LK}<0.000001$).

4.4.2 Kaspaz-8 protein konsantrasyonları

GB, LK ve kombinasyon gruplarının 72 saat boyunca Kaspaz-8 konsantrasyonları üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4: Kaspaz-8 protein konsantrasyonlarında meydana gelen değişiklikleri gösteren grafik. Grafiklerdeki sonuçlar ortalama ($n:6$)± SD olarak gösterildi.

Deneyler 3 defa tekrarlandı. K, Kontrol grubu, GB, Goji berry, LK, L-Karnitin, GB+LK, Kombinasyon grubu.

72 saat boyunca kaspaz-8 konsantrasyonlarında görülen değişikliklerin kontrole göre kıyaslanması

- Deney gruplarının 24. saatteki kaspaz-8 konsantrasyonları, kontrole göre yüksek saptandı ($P_{GB}<0.05$, $P_{LK}<0.0000001$, $P_{GB+LK}<0.00000001$).

- Deneş gruplarının 72. saatteki kaspaz-8 konsantrasyonları, kontrole göre yüksek saptandı ($P_{GB}<0.01$, $P_{LK}<0.0000.$, $P_{GB+LK}<0.0000.$).

72 saat boyunca kaspaz-8 konsantrasyonlarında görülen değişikliklerin gruplar arası kıyaslanması

24 saat sonunda değerlendirme

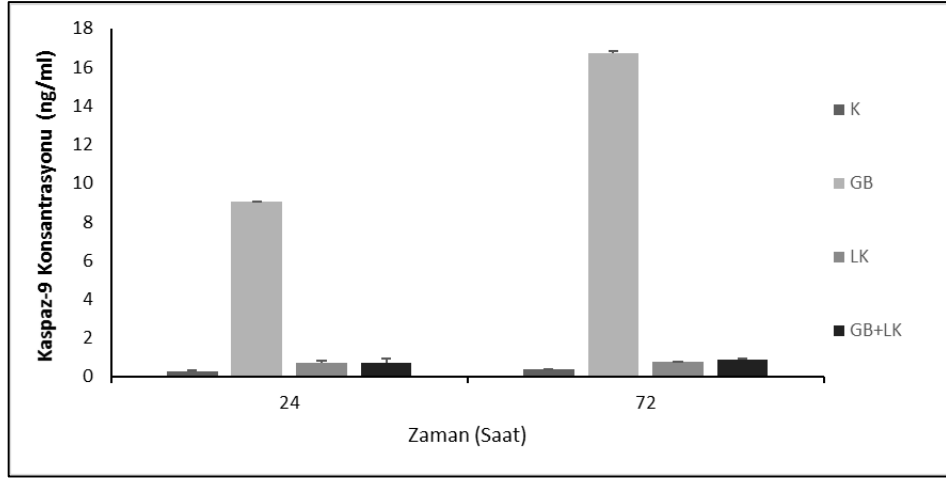
- GB'nin kaspaz-8 konsantrasyonu ortalaması, LK'nin ortalamasından düşük saptandı ($P_{LK}<0.00001$), GB+LK'nin ortalamasından ise düşük saptandı ($P_{GB+LK}<0.000001$).
- LK'nin kaspaz-8 konsantrasyonu ortalaması, GB'nin ortalamasından yüksek saptandı ($P_{GB}<0.00001$), GB+LK'nin ortalamasından da düşük saptandı ($P_{GB+LK}<0.01$).
- GB+LK'nin kaspaz-8 konsantrasyonu ortalaması, GB'nin ortalamasından yüksek saptandı ($P_{GB}<0.000001$), LK'nin ortalamasından da yüksek saptandı ($P_{LK}<0.01$).

72 saat sonunda değerlendirme

- GB'nin kaspaz-8 konsantrasyonu ortalaması, LK'nin ortalamasından düşük saptandı ($P_{LK}<0.00001$), GB+LK'nin ortalamasından ise düşük saptandı ($P_{GB+LK}<0.0000001$).
- LK'nin kaspaz-8 konsantrasyonu ortalaması, GB'nin ortalamasından yüksek saptandı ($P_{GB}<0.00001$), GB+LK'nin ortalamasından da düşük saptandı ($P_{GB+LK}<0.01$).
- GB+LK'nin kaspaz-8 konsantrasyonu ortalaması, GB'nin ortalamasından yüksek saptandı ($P_{GB}<0.0000001$), LK'nin ortalamasından da yüksek saptandı ($P_{LK}<0.01$).

4.4.3 Kaspaz-9 protein konsantrasyonları

GB, LK ve kombinasyon gruplarının 72 saat boyunca Kaspaz-9 protein konsantrasyonu üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 4.5'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5: Kaspaz-9 protein konsantrasyonunda meydana gelen değişiklikleri gösteren grafik. Grafiklerdeki sonuçlar ortalama (n:6)± SD olarak gösterildi. Deneyler 3 defa tekrarlandı. K, Kontrol grubu, GB, Goji berry, LK, L-Karnitin, GB+LK, Kombinasyon grubu.

72 saat boyunca kaspaz-9 konsantrasyonlarında görülen değişikliklerin kontrole göre kıyaslanması

- Deney gruplarının 24. saatteki kaspaz-9 konsantrasyonları, kontrole göre yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.00000001$, $P_{LK} < 0.05$, $P_{GB+LK} < 0.05$).
- Deney gruplarının 72. saatteki kaspaz-9 konsantrasyonları, kontrol grubuna göre yüksek saptandı ($P_{GB} < 0.0000$., $P_{LK} < 0.05$, $P_{GB+LK} < 0.05$).

72 saat boyunca kaspaz-9 konsantrasyonlarında görülen değişikliklerin gruplar arası kıyaslanması

24 saat sonunda değerlendirme

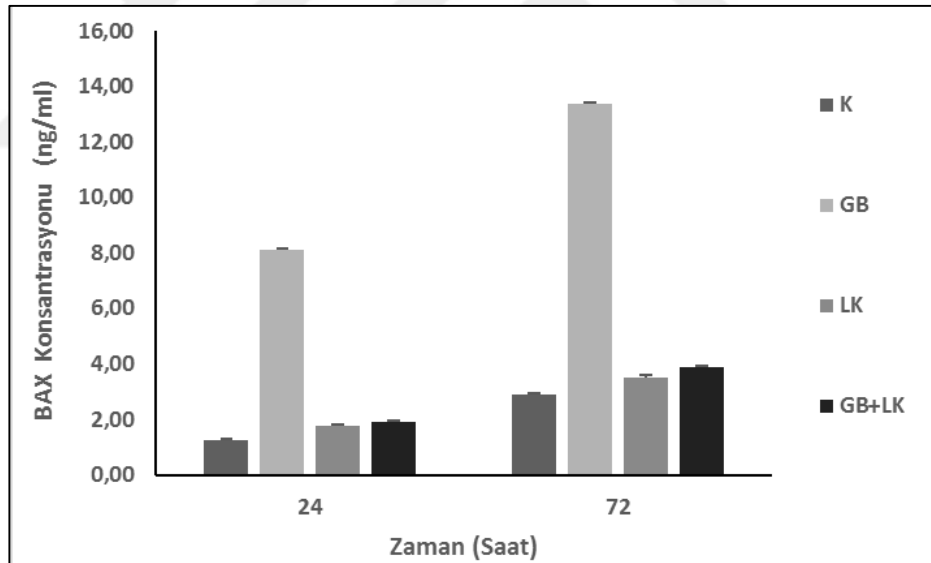
- GB'nin kaspaz-9 konsantrasyonu ortalaması, LK'nın ortalamasından yüksek saptandı ($P_{LK} < 0.0000001$), GB+LK'nın ortalamasından da yüksek saptandı ($P_{GB+LK} < 0.0000001$).
- LK'nın kaspaz-9 konsantrasyonu ortalaması, GB'nin ortalamasından düşük saptandı ($P_{GB} < 0.0000001$), GB+LK'nın ortalamasından da düşük saptandı ($P_{GB+LK} > 0.05$).
- GB+LK'nın kaspaz-9 konsantrasyonu ortalaması, GB'nin ortalamasından düşük saptandı ($P_{GB} < 0.0000001$), LK'nın ortalamasından da yüksek saptandı ($P_{LK} > 0.05$).

72 saat sonunda değerlendirme

- GB'nin kaspaz-9 konsantrasyonu ortalaması, LK'nın ortalamasından yüksek saptandı ($P_{LK} < 0.0000.$), GB+LK'nın ortalamasından da yüksek saptandı ($P_{GB+LK} < 0.0000.$).
- LK'nın kaspaz-9 konsantrasyonu ortalaması, GB'nin ortalamasından düşük saptandı ($P_{GB} < 0.0000.$), GB+LK'nın ortalamasından da düşük saptandı ($P_{GB+LK} > 0.05.$).
- GB+LK'nın kaspaz-9 konsantrasyonu ortalaması, GB'nin ortalamasından düşük saptandı ($P_{GB} < 0.0000.$), LK'nın ortalamasından da istatistiksel olarak anlamlı olmayan seviyede yüksek saptandı ($P_{LK} > 0.05.$).

4.4.4 Bax protein konsantrasyonları

GB, LK ve kombinasyon gruplarının 72 saat boyunca Bax protein konsantrasyonu üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6: Bax protein konsantrasyonlarında meydana gelen değişiklikleri gösteren grafik. Grafiklerdeki sonuçlar ortalama ($n:6$) \pm SD olarak gösterildi. Deneyler 3 defa tekrarlandı. K, Kontrol grubu, GB, Goji berry, LK, L-Karnitin, GB+LK, Kombinasyon grubu.

72 saat boyunca Bax konsantrasyonlarında görülen değişikliklerin kontrole göre kıyaslanması

- Deneş gruplarının 24. saatteki Bax konsantrasyonları, kontrol grubuna göre yüksek saptandı ($P_{GB}<0.00000001$, $P_{LK}<0.05$, $P_{GB+LK}<0.001$).
- Deneş gruplarının 72. saatteki Bax konsantrasyonları, kontrol grubuna göre yüksek saptandı ($P_{GB}<0.0000.$, $P_{LK}<0.05$, $P_{GB+LK}<0.0001$).

72 saat boyunca Bax konsantrasyonlarında görülen değişikliklerin gruplar arası kıyaslanması

24 saat sonunda değerlendirme

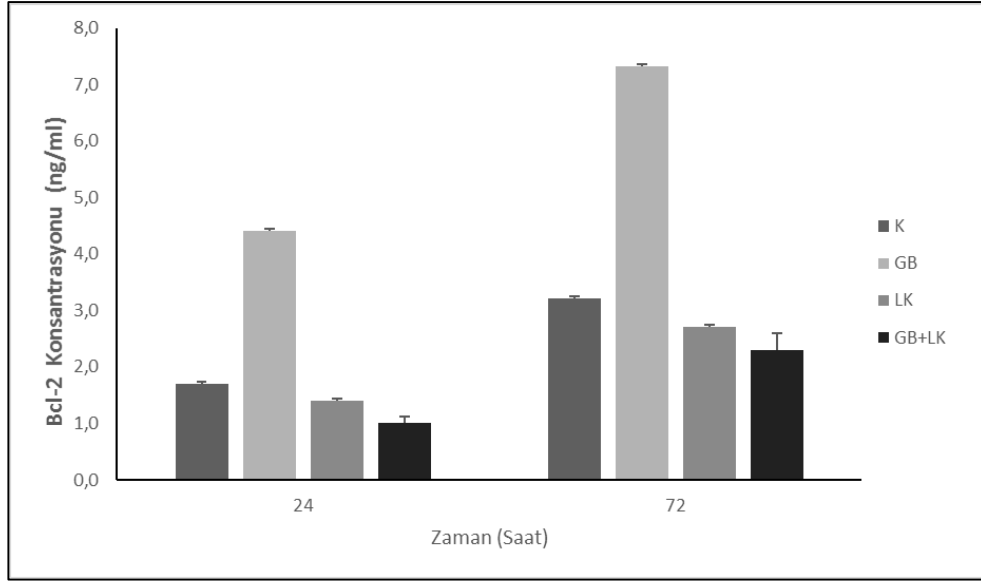
- GB'nin Bax konsantrasyonu ortalaması, LK'nin ortalamasından yüksek saptandı ($P_{LK}<0.00000001$), GB+LK'nin ortalamasından da yüksek saptandı ($P_{GB+LK}<0.00000001$).
- LK'nin Bax konsantrasyonu ortalaması, GB'nin ortalamasından düşük saptandı ($P_{GB}<0.00000001$), GB+LK'nin ortalamasından da düşük saptandı ($P_{GB+LK}<0.05$).
- GB+LK'nin Bax konsantrasyonu ortalaması, GB'nin ortalamasından düşük saptandı ($P_{GB}<0.00000001$), LK'nin ortalamasından da yüksek saptandı ($P_{LK}<0.05$).

72 saat sonunda değerlendirme

- GB'nin Bax konsantrasyonu ortalaması, LK'nin ortalamasından yüksek saptandı ($P_{LK}<0.00000001$), GB+LK'nin ortalamasından da yüksek saptandı ($P_{GB+LK}<0.00000001$).
- LK'nin Bax konsantrasyonu ortalaması, GB'nin ortalamasından düşük saptandı ($P_{GB}<0.00000001$), GB+LK'nin ortalamasından da düşük saptandı ($P_{GB+LK}<0.05$).
- GB+LK'nin Bax konsantrasyonu ortalaması, GB'nin ortalamasından düşük saptandı ($P_{GB}<0.00000001$), LK'nin ortalamasından da yüksek saptandı ($P_{LK}<0.05$).

4.4.5 Bcl-2 düzeyleri

GB, LK ve kombinasyon gruplarının 72 saat boyunca Bcl-2 protein konsantrasyonu üzerine etkilerinin sonuçları Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7: Bcl-2 protein konsantrasyonlarında meydana gelen değişiklikleri gösteren grafik. Grafiklerdeki sonuçlar ortalama (n:6)± SD olarak gösterildi. Deneyler 3 defa tekrarlandı. Kontrol grubu, GB, Goji berry, LK, L-Karnitin, GB+LK, Kombinasyon grubu.

72 saat boyunca Bcl-2 konsantrasyonlarında görülen değişikliklerin kontrole göre kıyaslanması

- LK ve GB+LK gruplarının 24. saatteki Bcl-2 konsantrasyonları, kontrol grubuna göre düşük saptandı ($P_{LK}<0.05$, $P_{GB+LK}<0.001$). GB grubunun 24. saatteki Bcl-2 konsantrasyonları, kontrol grubuna göre yüksek saptandı ($P_{GB}<0.00001$).
- LK ve GB+LK gruplarının 72. saatteki Bcl-2 konsantrasyonları, kontrol grubuna göre düşük saptandı ($P_{LK}<0.001$, $P_{GB+LK}<0.000001$). GB grubunun 72. saatteki Bcl-2 konsantrasyonları, kontrol grubuna göre yüksek saptandı ($P_{GB}<0.00000001$).

72 saat boyunca Bcl-2 konsantrasyonlarında görülen değişikliklerin gruplar arası kıyaslanması

24 saat sonunda değerlendirme

- GB'nin Bcl-2 konsantrasyonu ortalaması, LK'nın ortalamasından yüksek saptandı ($P_{LK}<0.00001$), GB+LK'nın ortalamasından da yüksek saptandı ($P_{GB+LK}<0.0000001$).

- LK'nin Bcl-2 konsantrasyonu ortalaması, GB'nin ortalamasından düşük saptandı ($P_{GB} < 0.00001$), GB+LK'nin ortalamasından da yüksek saptandı ($P_{GB+LK} < 0.01$).
- GB+LK'nin Bcl-2 konsantrasyonu ortalaması, GB'nin ortalamasından düşük saptandı ($P_{GB} < 0.0000001$), LK'nin ortalamasından da düşük saptandı ($P_{LK} < 0.01$).

72 saat sonunda değerlendirme

- GB'nin Bcl-2 konsantrasyonu ortalaması, LK'nin ortalamasından yüksek saptandı ($P_{LK} < 0.0000.$), GB+LK'nin ortalamasından da yüksek saptandı ($P_{GB+LK} < 0.0000.$).
- LK'nin Bcl-2 konsantrasyonu ortalaması, GB'nin ortalamasından düşük saptandı ($P_{GB} < 0.0000.$), GB+LK'nin ortalamasından da yüksek saptandı ($P_{GB+LK} < 0.01$).
- GB+LK'nin Bcl-2 konsantrasyonu ortalaması, GB'nin ortalamasından düşük saptandı ($P_{GB} < 0.0000.$), LK'nin ortalamasından da düşük saptandı ($P_{LK} < 0.01$).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmada GB'in KML hücrelerinin çoğalması üzerine inhibisyon etkisi yaptığını gördük. LK'da da aynı etkiyi saptamış olsak da LK'nın inhibisyon gücü GB'den zayıftı. Yağ asidi içeriği yüksek GB ile yağ asidi konsantrasyonunun oksidasyon ile azaltan LK'nın birlikte kullanımı sinergistik etki göstererek KML hücre proliferasyonunu en yüksek düzeyde inhibe etti.

GB'nin tek başına ve kemoterapi, immunoterapi ve radyoterapi gibi çeşitli tedavi protokolleri ile farklı kanser türlerinde terapotik etki göstermesinin yanısıra terapotik etkiyi de artırdığı birçok çalışmada gösterilmiştir [4, 25, 26, 29-37, 45-47]. Örneğin, Hsu ve ark. Lycium barbarum L.'den karotenoid ekstraktlarından ve kendisinden nanoemülsiyon formlarını hazırlayarak HT-29 kolon kanser hücrelerinde denediler [47]. Hem karotenoid ekstraktlarından ve kendisinden yapılan nanoemülsiyon formlarının kolon kanser hücrelerinin büyümesini engellediğini saptadı. İnhibisyonu tümör supressor genler olan p53 ve p21 ekspresyonlarını artırıp sikline bağlı kinaz (CDK) 1 ve 2 ile siklin A ve B ekspresyonlarını azaltarak G2/M fazında hücre döngüsü tutulumu üzerinden yaptığı gösterilmiştir. Zhu ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada ise GB'nin etkilerini yeni saptadıkları 4 tane GB fenolik amidi de dahil olmak üzere toplamda 13 tane GB'nin fenolik amidini glioma kök hücre üzerinde araştırmışlar ve 13 tane fenolik bileşik için çeşitli derecelerde inhibisyon etkisi saptamışlardır [30]. Chen ve arkadaşları, GB'yi (polisakkaridler) immün terapi ajanı sitokin interferon- α (IFN- α) ile kombine ederek böbrek karsinoma hücrelerinde denemiş ve GB'nin sinergistik inhibisyon etkisini hücre büyümesini ve siklin D1, c-Myc ve bcl-2 seviyelerini azaltıp bax seviyelerini artırmak suretiyle apoptozu indükleyerek gerçekleştirdiğini saptamıştır [46]. Lu ve Chen, GB'yi (polisakkaridler), akciğer kanserinde tek başına ve radyasyon tedavisi ile birlikte denemiş tek başına GB'nin akciğer kanseri inhibisyonunda etkisi olmadığını ancak radyoterapi ile birlikte akut hipoksik hücre oranını artırarak sinergistik etki gösterdiğini saptadı [48].

Zhang ve arkadaşları, GB'nin (polisakkaridler) hepatoma hücrelerinde apoptoz indüksiyonu ve G0+G1 ve S fazlarında tutulum yaparak inhibisyon etkisini gerçekleştirdiğini saptamıştır [37]. Zhu ve Zhang'ın, insan servikal kanser hücrelerinde yaptığı çalışmada ise GB'nin (polisakkaridler) HeLa hücrelerinin proliferasyonunu intrinsek (iç, mitokondri kaynaklı) apoptotik yol ile baskıladığı saptamıştır [34]. Luo ve arkadaşları, prostat kanser hücrelerinde GB'nin (polisakkaridler) DNA kırılması ile intrinsek apoptotik yol aktivasyon ligandı Bax'ın ekspresyonlarını artırıp intrinsek apoptotik yol inhibitörü olan Bcl-2'in ekspresyonunu azaltarak apoptotik yol indüksiyonu ile anti-kanser etkisi gösterdiğini saptamıştır [48]. Gan ve ekibinin AML hücrelerinde yaptığı çalışmada GB'nin kaspaz-3 aktivitesi indüklenmesi ile apoptoza neden olduğu gösterildi [25].

Yaptığımız çalışmada, GB'nin KML proliferasyon inhibisyonunda kombinasyon grubundan sonra 2. en etkili grup olduğunu saptadık. GB'nin farklı kanser tiplerinde daha önce yapılan çalışmalarla [34,48] uyumlu olarak KML hücre çoğalmasını intrinsek apoptoz indüksiyonu ile inhibe ettiğini saptadık. Flow sitometrik olarak saptadığımız apoptoz deteksiyonundan sonra ELIZA ile yaptığımız saptamada kaspaz-3 aktivasyonunun bax seviyelerinin artırılması ile bcl-2 seviyelerinin azaltılması ve bunu izleyen kaspaz-9 aktivasyonu ile gerçekleştiğini saptadık. Buna ek olarak GB'nin içerdiği hücrenin enerji ihtiyacını gören YA'lerinin yanında yine içerdiği seramid gibi sitotoksik YA'leri üzerinden de etkisini gösterebileceği kanaatindeyiz [8].

Bunun yanısıra LK'nın tek başına uygulandığı bazı kanser tiplerinde apoptoz aracılı antiproliferatif etki gösterdiği ve birlikte kullanıldığı bazı kanser ilaçlarının ise etkilerini artırdığına dair çalışmalar bulunmakla birlikte tam tersi kansere neden olduğu ve birlikte kullanıldığı kanser ilaçlarının veya radyoterapi gibi farklı tedavi modellerinin etkisini azalttığına dair daha fazla çalışma bulunmaktadır [14-22]. Örneğin, Park ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada karnitinin Tümör nekroz edici faktör (TNF)-bağlantılı apoptozu-indükleyici ligand (TRAIL) dirençli kanser hücrelerini (akciğer kanser hücrelerini, kolon karsinoma hücrelerini ve meme karsinoma hücrelerini) Bax ekspresyonlarını artırarak TRAIL tarafından indüklenen hücre ölümüne (ektrinsek apoptoz yolu) duyarlı hale getirdiği saptanmıştır [14].

Fan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada LK'nın karaciğer kanserinde Fas ligand aracılı apoptozu indüklediği ve Bcl-2 ekspresyonunu da azalttığı saptanmıştır [15]. Fas ve arkadaşları, bu inhibisyon mekanizmasını, LK uygulamasının bu hücrelerde hem ekstrinsek hem de intrinsek apoptotik yolları kullanarak yaptığı şeklinde sonuca bağlamışlardır [15]. Roscilli ve arkadaşları, LK ve kurkumini tek başına ve kombine ederek kolon kanser hücreleri üzerinde uygulamışlar ve sinergistik etki saptayarak ilerlemiş adenoma lezyonlarının gelişimini tamamiyle durduğunu saptamışlardır [19]. Huang ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada histon deasetilaz (HDAC) inhibitörü LK ve proteazom inhibitörü bortezomidi birlikte hepatoma hücreleri üzerine kullanmış ve ikisinin birlikte sinergistik inhibisyon etkisi gösterdiğini in vitro ve in vivo da belirlemişlerdir [21].

Bu çalışmaların aksine İbrahim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada LK'nın tamoksifen ile birlikte uygulanmasının Ehrlich asit karsinoma taşıyan farelerin ömrünü uzattığı ancak tamoksifenin antitümör etkisini de apoptozu engellemek suretiyle azalttığını saptamıştır [16]. Tas ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada LK'nın kolonik mukoza hücrelerini abdominopelvik radyoterapi etkilerinden koruduğu saptanmıştır [17]. Altun ve arkadaşlarının neuroblastomada yaptığı çalışmada sisplatinin yaptığı toksisiteye ve oksidatif strese karşı apoptozu inhibe etmek suretiyle LK'nın koruyucu etki gösterdiği saptandı [20]. Zhu ve arkadaşları ise kanserde yaygın olarak kullanılan siklofosfamidin erkek germ hücreleri üzerine toksik etkisini araştırdı ve LK kullanımının apoptoz inhibisyonu ve otofaji modülasyonu ile siklofosfamidin etkisini azalttığını saptadı. Yapılan çalışma kanser üzerine olmasa da kanser üzerine yapılan çalışmalardaki anti-apoptotik etkiyi destekledi [18].

LK ile de lösemi kanser tipinde yapılan çalışmalar çoğunlukla AML ve diğer lösemi tiplerinde olup KML ile ilgili inhibitör etkisini çok az sayıda çalışmada saptanmıştır [9, 27, 28]. Thomadaki ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada LK, tek başına ve dinükleer bakır (II) kompleksi ile birlikte AML ve KML hücrelerine uygulandı ve bu ayrıca bakır klorid dihidrat ile de karşılaştırıldı [28]. Her iki hücre soyunda tek başına uygulanan LK'e ve bakır klorid dihidrata göre farklı mekanizmalarla gerçekleşen konsantrasyona bağlı artmış inhibisyon etkisi görüldü: AML hücrelerinin çoğalma etkinliğinin azaldığı ve KML hücrelerinin ise nekrotik görünümünün arttığı saptandı [28]. Rogalidou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada terapi öncesi ve sonrasında (çeşitli zamanlarda) açıl karnitin seviyelerine bakılmış akut lösemilerde çocuklarda karnitin seviyelerinde

düşüş saptanmıştır ve kemoterapi esnasında karnitin takviyesi yapılmasının uygun olacağı görüşüne varılmıştır [27]. Wu ve arkadaşlarının tarafından yapılan çalışmada AML hücrelerinde karnitin taşıyıcısı olan CT2 aşırı eksprese edildiği ve geninin susturulmasının AML hücrelerinin büyümesini ve canlılığını azalttığı saptanmıştır [26].

Yaptığımız çalışmada LK, KML hücre inhibisyonunda tüm uygulamalar içerisinde en az etkili grup olarak saptandı. LK'nın diğer gruplarda olduğu gibi kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptoz indüksiyonu yaptığı ancak bu inhisyonu kaspaz-8 üzerinden gerçekleştirdiği yani ektrensek apoptotik yolu kullandığını saptadık. Bax seviyelerin de en düşük anlamlı artış, bcl-2 seviyelerin de en düşük anlamlı düşüş görülse de bunların konsantrasyonlarının düşük olması ve kaspaz-8 konsantrasyonlarının yüksek olması, kaspaz-9 konsantrasyonlarının ise kaspaz-8 konsantrasyonlarına göre çok düşük olması LK'nın Fas ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada olduğu gibi her iki yolu kullandığı ihtimalini ortadan kaldırdı [15]. LK'nın bu etkisini YA'lerinin sitoplazmada yağ damlacıkları şeklinde birikerek daha sonra kanser hücreleri tarafından enerji deposu olarak kullanılmasını önleyerek ve seramid gibi sitotoksik YA'lerinin taşınmasını artırarak da gerçekleştirebileceği kanaatindeyiz [8].

Çalışmamızda LK ile GB'nin kombinasyonunun KML hücre proliferasyon inhibisyonunda ve hücre canlılığını azaltmada sinerjistik etki göstererek tekli uygulanan gruplara göre en etkili grup olduğunu saptadık. Kombinasyon grubunun tekli gruplarda olduğu gibi kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptoz indüksiyonu yaptığı ancak LK ile aynı yolu kullanarak bu inhisyonu kaspaz-8 üzerinden gerçekleştirdiği yani ektrensek apoptotik yolu kullandığını saptadık. Bax seviyelerin de GB'den sonra 2. anlamlı artış, bcl-2 seviyelerin de 2. anlamlı düşüş görülse de bunların konsantrasyonlarının düşük olması ve kaspaz-8 konsantrasyonlarının yüksek olması, kaspaz-9 konsantrasyonlarının ise kaspaz-8 konsantrasyonlarına göre çok düşük olması kombinasyonda LK'nın Fas ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada olduğu gibi her iki yolu kullandığı ihtimalini ortadan kaldırdı [15]. İlginç olarak, kombinasyon grubundan sonra en etkili 2. grup olan GB'nin intrinsek apoptotik yol ve LK'nın ise ekstrinsek apoptotik yol üzerinden etkilerini gösterirken kombinasyon grubunun ekstrinsek yol üzerinden etki göstermiş olmasını Bcl-2 ve Bax seviyelerindeki değişiklik nedeniyle olduğu görüşündeyiz.

Sonuç olarak bu çalışmada,

1. GB'nin KML hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve hücre canlılığını azalttığını bunu da intrinsek apoptotik yol aktivasyonu ile gerçekleştirdiğini gösterdik.

2. LK'nın KML hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve hücre canlılığını azalttığını bunu da ekstrinsek apoptotik yol aktivasyonu ile gerçekleştirdiğini gösterdik.

3. GB ve LK'nın KML'de kombine kullanımının sinergistik etki gösterdiğini ve bu etkiyi ekstrinsek apoptotik yolu indükleyerek gerçekleştirdiğini saptadık.

Gelecekte bu kombinasyonun KML'de ve diğer kanser tiplerinde ilaç toksisitesini azaltarak klinikte adjuvan tedavi aracı olarak kullanılacağı ve buna ek olarak, bu kombinasyonun aynı zamanda kanserin yanı sıra çoklu tedavi (kansere öncesi veya sonrasında veya kanser süresince görülebilen kısırlık, depresyon v.b. diğer hastalıkların) protokollerinde de yerini alacağı inancındayız.

KAYNAKLAR

- [1] **Lee, JY, Lee, SM, Yoon, HK, Kim, KH, Choi, MY, Lee, WS.** (2017), ‘A case of synchronous multiple myeloma and chronic myeloid leukemia.’ *Blood Res.*, vol. 52, no.3, pp. 219-221.
- [2] **Pereira, WO, De Carvalho, DD, Zenteno, ME, Ribeiro, BF, Jacysyn, JF, Sardinha, LR, Zanichelli, MA, Hamerschlak, N, Jones, GE, Pagnano, KB, Castro, FA, Calle, Y, Amarante-Mendes, GP.** (2017), ‘BCR-ABL1-induced downregulation of WASP in chronic myeloid leukemia involves epigenetic modification and contributes to malignancy.’ *Cell Death Dis.*, vol. 8, no. 10, pp. e3114.
- [3] **Deininger, MW, Goldman, JM, Melo, JV.** (2000), ‘The molecular biology of chronic myeloid leukemia.’ *Blood.*, vol. 96, no.10, pp.3343-56.
- [4] **Zhang, XJ, Yu, HY, Cai, YJ, Ke, M.** (2017), ‘Lycium barbarum polysaccharides inhibit proliferation and migration of bladder cancer cell lines BIU87 by suppressing Pi3K/AKT pathway.’ *Oncotarget.*, vol. 8, no. 4, pp. 5936-5942.
- [5] **Yao, R, Heinrich, M, Weckerle, CS.** (2017), ‘The genus Lycium as food and medicine: A botanical, ethnobotanical and historical review.’ *J Ethnopharmacol.*, vol. 212, pp. 50-66.
- [6] **O'Brien, ME, Borthwick, A, Rigg, A, Leary, A, Assersohn, L, Last, K, Tan, S, Milan, S, Tait, D, Smith, IE.** ‘Mortality within 30 days of chemotherapy: a clinical governance benchmarking issue for oncology patients.’ *Br J Cancer.*, (2006), vol. 95, no. 12, pp. 1632-6.
- [7] **Jeszka-Skowron, M, Zgoła-Grześkowiak, A, Stanis, E, Waśkiewicz, A.** (2017), ‘Potential health benefits and quality of dried fruits: Goji fruits, cranberries and raisins.’ *Food Chem.*, vol.221, pp. 228-236.
- [8] **Qu, Q, Zeng, F, Liu, X, Wang, QJ, Deng, F.** (2016), ‘Fatty acid oxidation and carnitine palmitoyltransferase I: emerging therapeutic targets in cancer.’ *Cell Death Dis.*, vol. 7, pp. e2226.
- [9] **Wu, Y, Hurren, R, MacLean, N, Gronda, M, Jitkova, Y, Sukhai, MA, Minden, MD, Schimmer, AD.** (2015), ‘Carnitine transporter CT2 (SLC22A16) is over-expressed in acute myeloid leukemia (AML) and target knockdown reduces growth and viability of AML cells.’ *Apoptosis.*, vol. 20, no. 8, pp. 1099-108.
- [10] **Shao, H, Mohamed, EM, Xu, GG, Waters, M, Jing, K, Ma, Y, Zhang, Y, Spiegel, S, Idowu, MO, Fang, X.** (2016), ‘Carnitine palmitoyltransferase 1A functions to repress FoxO transcription factors to allow cell cycle progression in ovarian cancer.’ *Oncotarget.*, vol.7, no. 4, pp. 3832-46.
- [11] **Pucci, S, Zonetti, MJ, Fisco, T, Polidoro, C, Bocchinfuso, G, Palleschi, A, Novelli, G, Spagnoli, LG, Mazzarelli, P.** (2016), ‘Carnitine palmitoyl transferase-1A (CPT1A): a new tumor specific target in human breast cancer.’ *Oncotarget.*, vol. 7, no.15, pp.19982-96.

- [12] **Deep, G, Schlaepfer, IR.** (2016), ‘Aberrant Lipid Metabolism Promotes Prostate Cancer: Role in Cell Survival under Hypoxia and Extracellular Vesicles Biogenesis.’ *Int J Mol Sci.*, vol. 17, no. 7.
- [13] **Chen, Y, Wang, Y, Huang, Y, Zeng, H, Hu, B, Guan, L, Zhang, H, Yu, AM, Johnson, CH, Gonzalez, FJ, Huang, M, Bi, H.** (2017), ‘PPAR α regulates tumor cell proliferation and senescence via a novel target gene carnitine palmitoyltransferase1C.’ *Carcinogenesis.*, vol. 38, pp. 474-483.
- [14] **Park, SJ, Park, SH, Kim, JO, Kim, JH, Park, SJ, Hwang, JJ, Jin, DH, Jeong, SY, Lee, SJ, Kim, JC, Kim, I, Cho, DH.** (2012), ‘Carnitine sensitizes TRAIL-resistant cancer cells to TRAIL-induced apoptotic cell death through the up-regulation of Bax.’ *Biochem Biophys Res Commun.*, vol. 428, no. 1, pp. 185-90.
- [15] **Fan, JP, Kim, HS, Han, GD.** (2009), ‘Induction of apoptosis by L-carnitine through regulation of two main pathways in Hepalclc 7 cells.’ *Amino Acids.*, vol. 36, no. 2, pp. 365-72.
- [16] **Ibrahim AB, Mansour HH, Shouman SA, Eissa AA, Abu El Nour SM.** (2014), ‘Modulatory effects of L-carnitine on tamoxifen toxicity and oncolytic activity: in vivo study.’ *Hum Exp Toxicol.* vol. 33, no. 9, pp. 968-79.
- [17] **Tas, S, Ozkan, OF, Cikman, O, Kiraz, A, Akgun, Y, Karaayvaz, M.** L-carnitine has a protective effect on the colonic mucosa during abdominopelvic radiotherapy in rats. *Acta Cir Bras.* (2016), vol. 31, no. 9, pp. 615-620.
- [18] **Zhu, B, Zheng, YF, Zhang, YY, Cao, YS, Zhang, L, Li, XG, Liu, T, Jiao, ZZ, Wang, Q, Zhao, ZG.** (2015), ‘Protective effect of L-carnitine in cyclophosphamide-induced germ cell apoptosis.’ *J Zhejiang Univ Sci B.*, vol. 16, no. 9, pp. 780-7.
- [19] **Roscilli G, Marra E, Mori F, Di Napoli A, Mancini R, Serlupi-Crescenzi O, Virmani A, Aurisicchio L, Ciliberto G.** (2013), ‘Carnitines slow down tumor development of colon cancer in the DMH-chemical carcinogenesis mouse model.’ *J Cell Biochem.*, vol. 114, no. 7, pp. 1665-73.
- [20] **Altun, ZS, Güneş, D, Aktaş, S, Erbayraktar, Z, Olgun, N.** (2010), ‘Protective effects of acetyl-L-carnitine on cisplatin cytotoxicity and oxidative stress in neuroblastoma.’ *Neurochem Res.*, vol. 35, no. 3, pp. 437-43.
- [21] **Huang, H, Liu, N, Yang, C, Liao, S, Guo, H, Zhao, K, Li, X, Liu, S, Guan, L, Liu, C, Xu, L, Zhang, C, Song, W, Li, B, Tang, P, Dou, QP, Liu, J.** (2012), ‘HDAC inhibitor L-carnitine and proteasome inhibitor bortezomib synergistically exert anti-tumor activity in vitro and in vivo.’ *PLoS One.* vol. 7, no. 12, pp. e52576.
- [22] **Arioz, DT, Kanat-Pektas, M, Tuncer, N, Koken, T, Unlu, BS, Koken, G, Yilmazer, M.** (2015), ‘L-Carnitine: a new insight into the pathogenesis of endometrial cancer.’ *Arch Gynecol Obstet.*, vol. 291, no. 5, pp. 1147-52.
- [23] **Sakamoto, A, Tsukahara, Y, Gomi, D, Fukushima, T, Kobayashi, T, Matsushita, H, Sekiguchi, N, Mamiya, K, Koizumi, T.** (2017), ‘Plasma L-carnitine levels in terminally ill cancer patients receiving only palliative care.’ *Ann Palliat Med.* vol. 6 no. suppl 1, pp. S52-S57.
- [24] **von Haehling, S, Anker, SD.** (2015), ‘Treatment of cachexia: An overview of recent developments.’ *Int J Cardiol.* vol.184, pp. 736-42.
- [25] **Gan, L, Wang, J, Zhang, S.** (2001), ‘Inhibition the growth of human leukemia cells by Lycium barbarum polysaccharide.’, *Wei Sheng Yan Jiu.*, vol.30, no. 6, pp.333-5.

- [26] **Huang, Y, Tan, A, Shen, Y, Lu, J.** (1998), 'Scavenging effect of total flavonoids of *lyceum barbarum* L on active oxygen radicals and inhibitory effects on heat output from L1210 cells.' *Wei Sheng Yan Jiu.*, vol. 27, no. 2, pp.109-11, 115.
- [27] **Rogalidou, M, Evangeliou, A, Stiakaki, E, Giahnakis, E, Kalmanti, M.** (2010), 'Serum carnitine levels in childhood leukemia'. *J Pediatr Hematol Oncol.*, vol. 32, no. 2, pp. e61-9.
- [28] **Thomadaki, H, Karaliota, A, Litos, C, Scorilas, A.** (2008), 'Enhanced concentration-dependent cytotoxic effect of the dinuclear copper(II) complex of L-carnitine [Cu₂(L-carnitine)₂Cl₂(H₂O)₂]Cl₂, compared to L-carnitine or copper chloride dihydrate, in human leukemic cell lines.' *J Med Chem.*, vol. 51, pp. 3713-9.
- [29] **Wawruszak, A, Czerwonka, A, Okła, K, Rzeski, W.** (2016), 'Anticancer effect of ethanol *Lycium barbarum* (Goji berry) extract on human breast cancer T47D cell line.' *Nat Prod Res.*, vol. 30, no.17, pp. 1993-6.
- [30] **Zhu, PF, Dai ,Z, Wang, B, Wei, X, Yu, HF, Yan, ZR, Zhao, XD, Liu, YP, Luo, XD.** (2017), 'The Anticancer Activities Phenolic Amides from the Stem of *Lycium barbarum*.' *Nat Prod Bioprospect.*, vol. 7, no.6, pp. 421-431.
- [31] **Jiao, R, Liu, Y, Gao, H, Xiao, J, So, KF.** (2016), 'The Anti-Oxidant and Antitumor Properties of Plant Polysaccharides.' *Am J Chin Med.*, vol. 44, no. 3, pp. 463-88.
- [32] **Ceccarini MR, Vannini S, Cataldi S, Moretti M, Villarini M, Fioretti B, Albi E, Beccari T, Codini M.** (2016), 'In Vitro Protective Effects of *Lycium barbarum* Berries Cultivated in Umbria (Italy) on Human Hepatocellular Carcinoma Cells.' *Biomed Res Int.*, vol. 2016, pp. 7529521.
- [33] **Shen, L, Du, G.** (2012), '*Lycium barbarum* polysaccharide stimulates proliferation of MCF-7 cells by the ERK pathway.' *Life Sci.*, vol. 91, no. 9-10, pp. 353-7.
- [34] **Zhu, CP, Zhang, SH.** (2013), '*Lycium barbarum* polysaccharide inhibits the proliferation of HeLa cells by inducing apoptosis.' *J Sci Food Agric.*, vol. 93, no. 1, pp. 149-56.
- [35] **Mao F, Xiao B, Jiang Z, Zhao J, Huang X, Guo J.** (2011), 'Anticancer effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on colon cancer cells involves G0/G1 phase arrest.' *Med Oncol.*, vol. 28, no. 1, pp. 121-6.
- [36] **Li, G, Sepkovic, DW, Bradlow, HL, Telang, NT, Wong, GY.** (2009), '*Lycium barbarum* inhibits growth of estrogen receptor positive human breast cancer cells by favorably altering estradiol metabolism.' *Nutr Cancer.*, vol. 61, no. 3, pp. 408-14.
- [37] **Zhang, Q, Lv, X, Wu, T, Ma, Q, Teng, A, Zhang, Y, Zhang M.** (2015), 'Composition of *Lycium barbarum* polysaccharides and their apoptosis-inducing effect on human hepatoma SMMC-7721 cells.' *Food Nutr Res.*, vol. 59, pp. 28696.
- [38] **Cao, GW, Yang, WG, Du, P.** (1994), 'Observation of the effects of LAK/IL-2 therapy combining with *Lycium barbarum* polysaccharides in the treatment of 75 cancer patients.' *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.*, vol. 16, no. 6, pp. 428-31.

- [39] **Gong, H, Shen, P, Jin, L, Xing, C, Tang, F.** (2005), 'Therapeutic effects of Lycium barbarum polysaccharide (LBP) on irradiation or chemotherapy-induced myelosuppressive mice.' *Cancer Biother Radiopharm.*, vol. 20, no. 2, pp. 155-62.
- [40] **Tıbbi Biyokimya Kitabı**, Editor Figen Gürdol, Bölüm 17, 267-308.
- [41] **Bitis, L, Kultur, S, Melikoglu, G, Ozsoy, N, Can, A.** (2010), 'Flavonoids and antioxidant activity of Rosa agrestis leaves.' *Nat Prod Res.*, vol. 24, pp. 580-9.
- [42] **K562 hücre hattı.** https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-243.aspx?geo_country=tr., Son erişim tarihi: 13.08.2018.
- [43] **Erguven, M, Oktem, G, Kara, AN, Bilir, A.** (2016), 'Lithium chloride has a biphasic effect on prostate cancer stem cells and a proportional effect on midkine levels.' *Oncol Lett.*, vol. 12, no. 4, pp. 2948-2955.
- [44] **Erguven, M, Yazihan, N, Aktas, E, Sabanci, A, Li, CJ, Oktem, G, Bilir, A.** (2010), 'Carvedilol in glioma treatment alone and with imatinib in vitro.' *Int J Oncol.*, vol. 36, pp. 857-66.
- [45] **Hsu, HJ, Huang, RF, Kao, TH, Inbaraj, BS, Chen, BH.** (2017), 'Preparation of carotenoid extracts and nanoemulsions from Lycium barbarum L. and their effects on growth of HT-29 colon cancer cells.' *Nanotechnology.*, vol. 28, no. 13, pp. 135103.
- [46] **Chen, S, Liang, L, Wang, Y, Diao, J, Zhao, C, Chen, G, He, Y, Luo, C, Wu, X, Zhang, Y.** (2015), 'Synergistic immunotherapeutic effects of Lycium barbarum polysaccharide and interferon- α 2b on the murine Renca renal cell carcinoma cell line in vitro and in vivo.' *Mol Med Rep.*, vol. 12, no. 5, pp. 6727-37.
- [47] **Lu, CX, Cheng, BQ.** (1991), 'Radiosensitizing effects of Lycium barbarum polysaccharide for Lewis lung cancer.' *Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.*, vol. 11, no. 10, pp. 611-2, 582.
- [48] **Luo, Q, Li, Z, Yan, J, Zhu, F, Xu, RJ, Cai, YZ.** (2009), 'Lycium barbarum polysaccharides induce apoptosis in human prostate cancer cells and inhibits prostate cancer growth in a xenograft mouse model of human prostate cancer.' *J Med Food.*, vol. 12, no. 4, pp. 695-703.

ÖZGEÇMİŞ



1. Adı Soyadı : Haniyeh Behrouzizad

İletişim Bilgileri

Adres : İstanbul Aydın Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Beşyol Mahallesi, İnönü Caddesi, No:38, 34295 Küçükçekmece, İstanbul.

Telefon :90 536 741 31 37

E-mail : hanieh.behrouzi@yahoo.com

2. Doğum Tarihi : 21/09/1991

3. Unvanı : Gıda Mühendisi

4. Öğrenim Durumu : Lisans

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Gıda Mühendisliği	İran Azad Üniversitesi	2010-2014
Yüksek Lisans	Gıda Güvenliği	İstanbul Aydın Üniversitesi	2014-2017
Doktora			

5. Akademik Unvanlar :

6. Yönetilen Yüksek Lisans ve Doktora Tezleri :

6.1. Yüksek Lisans Tezleri :

6.2. Doktora Tezleri:

7. Yayınlar:

7.1. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler:

7.2. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceeding) basılan bildiriler:

7.3. Yazılan Uluslararası kitaplar veya kitaplarda bölümler:

7.4. Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler:

7.5. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiri kitabında basılan bildiriler:

7.6. Diğer Yayınlar:

8. Projeler

9. İdari Görevler:

10. Bilimsel Kuruluşlara Üyelikleri

11. Ödüller