

T.C
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



MELATONİN TAKVİYESİNİN GOJİBERRY MEYVESİ İLE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zülküf YILMAZ

Gıda Güvenliği Anabilim Dalı

Gıda Güvenliği Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mine ERGÜVEN

Ağustos 2017



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 **Y1413.210010** numaralı öğrencisi **Zülküf YILMAZ**'ın "**MELOTONIN TAKVİYESİNİN GOJİBERRY MEYVESİ İLE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**" adlı tez çalışması Enstitümüz Yönetim Kurulunun 15.08.2017 tarih ve 2017/18 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından ile Tezli Yüksek Lisans tezi olarak edilmiştir.

ayb. - 19:

kabul

Öğretim Üyesi Adı Soyadı

İmzası

Tez Savunma Tarihi : 23/08/2017

1) Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mine ERGÜVEN

2) Jüri Üyesi : Prof. Dr. Tülay İREZ

3) Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Erdem TEZCAN

.....
.....
.....

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

YEMİN METNİ

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “**Melatonin Takviyesinin Gojiberry Meyvesi ile Etkisinin İncelenmesi**” 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. (15/08/2017)

Zülküf YILMAZ

ÖNSÖZ

Bu çalışmada başta bilgisine, çözüm bulma yeteneğine ve sabrına hayran olduğum ve empatisini takdir ettiğim tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Mine ERGÜVEN'e, Bölüm Başkanım ve Enstitü Müdürüm Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR'a, İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar DETAE İmmünoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Esin Aktaş'a, Prof. Dr. Hasan Hüseyin BALIK'a, yüksek lisans sürecince her türlü desteği sağlayan büyüğüm Yrd. Doç. Dr. Musa ÇIBUK ve eşi ablam hemşire Yonca ÇIBUK'a, tez süresince gerek çevirilerde gerek literatür taramalarımnda yardımcı olan ve her türlü desteği veren ingilizce öğretmeni Hilal AYDIN'a, en önemlisi hayatımda attığım her adımı korkmadan atmamı sağlayan annem Raife YILMAZ'a, gerek maddi gerekse manevi olarak hep yanımda olan babam emekli öğretmen Ekrem YILMAZ'a teşekkürü bir borç bilir saygılarımı sunarım.

Ağustos 2017

Zülküf YILMAZ

(Araştırma Görevlisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	i
KISALTMALAR	i
ŞEKİL LİSTESİ	iii
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Giriş ve Amaç	1
1.2. Genel Bilgiler	3
1.2.1. Melatonin	3
1.2.1.1. Melatonin ve yapısı.....	3
1.2.1.2. Melatoninin metabolizması.....	4
1.2.1.3. Melatoninin yararları.....	6
1.2.1.4. Melatoninin moleküler etki mekanizması.....	6
1.2.1.5. Melatoninin savunma sistemi üzerine etkileri.....	7
1.2.1.6. Melatoninin beslenme davranışı üzerine etkileri	8
1.2.1.7. Melatoninin uyku üzerine etkisi.....	8
1.2.1.8. Melatonin ağrı kontrolü üzerine etkileri	8
1.2.1.9. Melatoninin antioksidan mekanizma üzerine etkileri	10
1.2.1.10. Melatonin kanser üzerine etkileri.....	11
1.2.1.11. Melatoninin apoptoz üzerine etkileri	12
1.2.2. Goji berry	13
1.2.2.1. Goji berry'nin kimyasal içeriği ve besin değeri.....	13
1.2.2.2. Etki ve kullanışı	14
1.2.2.3. Goji berry ve kanser ilişkisi	15
1.2.3. Lösemi (Kan Kanseri)	16
1.2.3.1. Lösemi türleri	16
1.2.3.2. Lösemi belirtileri.....	17
1.2.3.3. KML'nin oluşum mekanizması.....	18
2. MATERYAL ve METOD	23
2.1. Kullanılan Cihazlar, Aletler, Kimyasal ve Sarf Malzemeler	23
2.2. Bitki Materyali	26
2.2.1. Gojiberry özütünün hazırlanması.....	26
2.3. Antioksidan Aktivite Deneyleri	26
2.3.1. Total fenolik bileşik miktarı tayini.....	26
2.3.2. Kullanılan çözeltiler	26
2.3.3. Deneyin Yapılışı	26
2.3.4. Gallik asid standart eğri denkleminin elde edilmesi	27
2.3.5. Total flavonoid miktar tayini	27
2.3.6. Kullanılan çözeltiler	27
2.3.7. Deneyin yapılışı	28

2.3.8. Kateşin standart eğri denkleminin elde edilmesi.....	28
2.4. Gıda Takviyesi: Melatonin.....	28
2.5. İki Boyutlu Hücre Kültürü ile Gerçekleştirilen Deneyleer	28
2.5.1. İki boyutlu hücre kültürü.....	28
2.5.2. Deney modeli	29
2.5.3. Hücre çoğalma indeksi.....	30
2.5.4. Canlı, apoptotik ve ölü hücre oranları.....	30
2.5.5. Hücre döngüsü.....	31
2.6. Apoptotik ve Anti-Apoptotik (Direnc) Protein Seviyeleri Üzerine Etkileri Protein Miktarının Biçinkromik Asit (BCA) Protein Tayin Yöntemi ile Saptanması	31
2.6.1. Kaspaz-3 seviyeleri	32
2.6.2. Kaspaz-8, Kaspaz-9, Bax ve Bcl-2 seviyeleri.....	33
2.6.3. İstatistiksel analiz.....	34
3. BULGULAR	35
3.1. Gojiberry Meyve Özütu Antioksidan Tayini (Fenolik Bileşikler ve Flavonoidler İçerik Tayini)	35
3.2. Hücre Çoğalma İndeksi.....	35
3.3. Canlı, Apoptotik ve Ölü Hücre Oranları	37
3.3.1. Canlı hücre oranları.....	38
3.3.2. Toplam apoptotik hücre oranları.....	39
3.3.3. Ölü hücre oranları.....	40
3.4. Hücre Döngüsü.....	41
3.5. Apoptotik, Nekroapoptotik ve Antiapoptotik (Direnc) Protein Seviyeleri	43
3.5.1. Kaspaz-3 seviyeleri	43
3.5.2. Kaspaz-9 seviyeleri	45
3.5.3. Kaspaz-8 seviyeleri	46
3.5.4. Bax seviyeleri.....	48
3.5.5. Bcl-2 seviyeleri	50
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	53
KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	65

KISALTMALAR

ALL	: Akut Lenfositik Lösemi
AML	: Akut Myeloid Lösemi
BCA	: Biçinkromik Asit
BCR	: Breakpoint Cluster Region
cAMP	: Siklik adenzin monofosfat
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EC	: Ekstre Edilebilen Bileşik Miktarı
GB	: Goji berry
GBM	: Glioblastoma
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
KKH	: Kanser kök hücresi
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
KML	: Kronik Myeloid Lösemi
KuA	: Kukoamin A
LOX	: Lipoksijenaz
MLT	: Melatonin
MT1	: Melatonin reseptörü 1
MT2	: Melatonin reseptörü 2
MT3	: Melatonin reseptörü 3
NK	: Natural killer
SCG	: Servikal Gangliyon
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TD	: Tarfid diskinezi
TKI	: Tirozin Kinaz İnhibitörü
TNFR	: Tümör Nekroze Edici Faktör Reseptörü
TRAIL	: Tümör Nekroze Edici Faktör İlişkili Ligand

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: MLT'nin yapısal formülü ($C_{13}H_{16}N_2O_2$)	4
Şekil 1.2: MLT'nin sentezi	5
Şekil 1.3: Lösemi oluşum mekanizması	17
Şekil 2.4: BCR/ABL füzyon proteini etki mekanizması	19
Şekil 2.1: KML lösemi hücrelerinin hücre kaplarında çoğalma aşamaları	29
Şekil 2.2: GB ve MLT uygulanmış KML kültürleri.....	30
Şekil 2.3: ELIZA	34
Şekil 3.1: Hücre sayıları	35
Şekil 3.2: Canlı, Apoptotik ve Ölü Hücre Oranları	37
Şekil 3.3: Hücre döngüsü oranları	41
Şekil 3.4: Kaspaz-3 seviyeleri	43
Şekil 3.5: Kaspaz-9 seviyeleri	45
Şekil 3.6: Kaspaz-8 seviyeleri	47
Şekil 3.7: Bax seviyeleri	48
Şekil 3.8: Bcl-2 seviyeleri.....	50

MELATONİN TAKVİYESİNİN GOJİ BERRY MEYVESİ İLE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Amaç: Pineal bez hormonu melatonin (MLT), sağlıklı hücrelerde antioksidan ve antiapoptotik etkilere sahiptir. Buna zıt olarak MLT, birçok kanser tipinde antiproliferatif, antianjiogenik ve immünomodülatör etkilerinin yanında prooksidan etki gösterir. Geleneksel Çin besin takviyesi Goji berry (GB), antiproliferatif ve antiapoptotik etkileri ile lösemi dâhil kanserde terapötik ya da yardımcı bir ajandır. Bu çalışmanın amacı, GB ile kombine edildiğinde MLT etkilerini ve bunun altında yatan mekanizmayı kültürde kronik myeloid lösemi hücrelerinde araştırmaktır.

Materyal ve metod: GB meyve özütleri, hücre kültüründe tek başına ve MLT ile birlikte K562 lösemi hücrelerine 72 saat boyunca uygulandı. Bunların etkileri hücre sayısı ve canlılığı, apoptotik indeks ve hücre döngüsü analizi (akan hücre ölçer), apoptotik (Kaspazlar-3,8,9; bax) ve antiapoptotik (bcl-2) protein seviyeleri (ELIZA) ile araştırıldı. Sonuçların değerlendirilmesinde Anova testi kullanıldı ve $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Tüm gruplar hücre sayısı ve canlılığını azaltmasına rağmen ($p<0.05$), en yüksek azalmaya kombinasyon grubu neden oldu ($p<0.05$). Kombinasyon grubu, apoptotik ve ölü hücre oranları ile kaspaz-3, kaspaz-9 ve bax seviyelerinde en yüksek artışa yol açtı ($p<0.05$). Bcl-2 seviyelerindeki en yüksek azalma, kombinasyon grubunda saptandı ($p<0.05$). En yüksek G0/G1 tutulumunu ve diğer fazlarda azalmayı kombinasyon grubu gösterdi ($p<0.05$).

Sonuç: Bu çalışmada ilk defa, GB ile MLT birlikte kullanımın iç (intrensek, mitokondri ile indüklenen) apoptoz yolu üzerinden sinerjistik etki gösterdiği saptandı.

Anahtar kelimeler: *Gojiberry, Melatonin, Kronik Myeloid Lösemi, İntrensek apoptotik yol, Sinergistik etki*

THE INVESTIGATION OF A SUPPLEMENT MELATONINS' EFFECT WITH GOJI BERRY FRUIT

ABSTRACT

Objectives: Melatonin (MLT), a pineal hormone, possesses potent antioxidant and antiapoptotic actions in healthy cells. In contrast to this, M shows pro-oxidant effect as well as antiproliferative, antiangiogenic, and immunomodulatory effect in many cancer types. A traditional Chinese dietary supplement as Goji berry (GB) with an anti-proliferative and an anti-apoptotic effects is a therapeutic or an adjuvan agent for cancer including leukemia. The aim of the study was to investigate the effect of MLT in combination with GB and the underlying mechanism of their effect at chronic myeloid leukemia cells in vitro.

Materials and methods: The extracts of GB in single and in combination with MLT were applied to K562 leukemia cells for 72 h. Their effects were evaluated by cell number and viability, apoptotic index and cell cycle analysis (flow cytometry), the levels of apoptotic (Caspases-3,8,9; bax) and antiapoptotik (bcl-2) proteins (ELISA). Anova test was used and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results: All groups decreased cell number and cell viability ($p < 0.05$), however the combination group led to the highest decrease ($p < 0.05$). The combination group induced the highest increase in apoptotic and dead cell rates, the levels of caspase-3, caspase-9 and bax ($p < 0.05$). The highest decrease in Bcl-2 levels were also detected in the combination group ($p < 0.05$). The combination group showed the highest G0/G1 arrest and the decrease in other phases ($p < 0.05$).

Conclusion: In current study, it's detected for the first time that the combination of GB with MLT shows synergistic effect via intrinsic (mitochondria induced) apoptotic pathway.

Keywords: *Goji berry, Melatonin, Chronic myeloid leukemia, Intrinsic apoptotic pathway, Synergistic effect*

1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

Kanser hücrelerin mutasyon gibi faktörlere bağlı olarak kontrolsüz olarak çoğalması ve büyümesidir ve günümüzde hala daha tedavi başarısızlıkları ile kanser direncini yenebilecek gelişmiş tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır [1].

Kronik myeloid lösemi (KML), Abelson onkogeninin (ABL1) breakpoint cluster region (BCR) geni ile kaynaşmasını kapsayan genetik translokasyon t(9;22) (q34;q11.2) ile karakterize tüm dünyada önde gelen ölüm nedenlerinden biri olan kötü huylu bir kan hastalığıdır [1]. Yaygın olarak kullanılan ve fazla tercih edilen tüm kanser tedavi modellerinin (kemoterapi, radyoterapi, cerrahi, hormon terapisi, immunoterapi) başka hastalıklara neden olan yan etkileri (mide toksisitesi, iltihap, kalp hastalığı, saç kaybı, kellik, kas atrofisi, üreme sağlığının bozulması v.s.) bulunmaktadır [2]. Bu nedenle yan etkileri azaltmak ve hayat kalitesini artırmak için bitkisel kaynaklı terapotik ajanlar kanser tedavileri için tercih edilmekte ve klinik olarak test edilmiş yaygın olarak kullanılan birçok antineoplastik ajan bitki, baharat ve sebzelerden üretilmektedir [2].

Goji berry (GB; *Lycium barbacum*), proteoglikanları (GB polisakkaridleri), fitoaleksini (Skopoletin), vitamin C analogunu (2-O-b-D-Glukopiranosil-L-askorbik asid (AA-2bG), vitaminleri (B1, B2, B3, B6, C, E), amino asitleri (tüm 8 esansiyel amino asit dahil olmak üzere 18 çeşit amino asit), protein yapısına girmeyen amino asitleri (Taurin, c-aminobütirik asit, betain), iz elementleri (çinko, demir, bakır, kalsiyum, germanyum, selenyum ve fosfor gibi 21 iz mineral), esansiyel yağları ve esansiyel yağ asitleri (Hekzadekanoik asit, linoleik asit, b-elemen, miristik asit, etilhekzadekanoat), karotenoidleri (Zeaksantin dipalmitat, b-kriptoksantin palmitat, zeaksantin monopalmimat, zeaksantin, b-karoten, b-kriptoksantin), flavonoidleri (Mirisetin, kuersetin, kampferol) ve diğerleri (b-sitosterol, daukositerol, p-koumarik asit, lisiumid A,

L-monomentil süksinat) içeren geleneksel Çin tıbbi bitkisi ve gıda takviyesidir [3]. GB'nin yaşlanma karşıtı, immünomodülatör, nöroproteksiyon, sitoproteksiyon, metabolik hızı artırma, glukoz-yağ seviyelerini dengeleyerek semptomlarını kontrol altına alma, uyku düzenini sağlama gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri bulunmaktadır [3]. GB'nin lösemiye de kapsayan beyin, kolon gibi çeşitli kanser tipleri için terapötik (antikanser), tedavi yan etkilerini azaltma ve çeşitli kanser terapilerinin (radyoterapi, kemoterapi ve immünoterapi..vb.) terapötik etkilerini artırma gibi görevleri bulunmaktadır [4]. Anti-kanser ve ilişkili etkilerini anti-oksidan mekanizma, apoptoz indüksiyonu, hücre döngüsü tutulumu ve immünomodülasyon yolu ile göstermektedir [4].

Melatonin [(MLT), N-asetil-5-metoksitriptamin] bir indolamin olup kronobiyolojik ritimlerin ve endokrin fonksiyonların düzenlenmesinde görev alan bir hormondur. MLT, triptofan amino asidinden sentezlenir, sentezin ara basamağında mutluluk hormonu serotonin oluşur ve sentezin son basamağındaki metabolit ise 6-sulfatoksimeletonin'dir. MLT'nin %80'i karanlığa yanıt olarak özellikle geceleri pineal bezden salınmaktadır [13-16] . Geceleri kullanılan yapay ışıklandırmanın ve gece işçilerinin, sirkadyen ritmin ve MLT üretiminin bozulmasına bağlı olarak kanser gelişiminin yanısıra diğer metabolik bozukluklara yakalandığı çalışmalarda gösterilmiştir [15]. MLT, sağlıklı hücrelerde antioksidan ve antiapoptotik etkilere sahiptir [16]. Buna zıt olarak MLT'nin, birçok kanser tipinde antiproliferatif, apoptotik antianjiojenik, sentisizan, immünomodülatör, hematopoietik etkilerinin yanında prooksidan etki gösterdiği de saptanmıştır [16-26]. MLT'nin ayrıca aynı zamanda başka kanser ilaçları ile de sinerjistik etki gösterdiği ve tedavi başarısını da artırdığı saptanmıştır [22, 27].

GB'nin antiproliferatif etkisi kültürde yapılan 3 farklı lösemi hücresinde (HL-60 [insan akut myeloid lösemi (AML)], L1210 (fare lenfositik lösemi hücresi), bazofilik hücreler) gösterilmiştir [4, 11, 12]. KML üzerine GB'nin etkileri tam olarak bilinmemektedir. MLT'nin AML ve CLL olmak üzere lösemi de antiproliferatif ve apoptotik etki gösterdiği saptanmıştır [20, 22, 23]. Ancak yapılan çalışmalar, MLT'nin KML kanser tipinde etkilerinin kısıtlı veya etkisiz olabileceği de gösterilmiştir[28-30]. Bu çalışmadaki amaçlarımız,

- 1) Bitkisel gıda takviyesi GB'nin KML kanser tipinde etkisini ve etki sinyal yollarını araştırmak,
- 2) Kimyasal yapılı ajan MLT'nin ML kanser tipinde etkisini ve etki sinyal yollarını araştırmak,
- 3) Kronolojik ritim ve endokrin işlevlerde sorun yaşayan bireyler ile aynı anda kanser rahatsızlığı tehlikesi olan ve/veya kansere yakalanmış ve/veya kanser tedavisi sonlanmış olan bireyler için yüksek antioksidan kapasiteye sahip kimyasal yapılı ajan MLT ile bitkisel ajan GB'nin birlikte kullanılmasının KML'de etkilerini ve etki sinyal yollarını araştırmaktır.

1.2. Genel Bilgiler

1.2.1. Melatonin

1.2.1.1. Melatonin ve yapısı

Kimyasal formülü N-asetil-5-metoksitriptamin olarak ifade edilen MLT, küçük ve lipofilik bir moleküldür. Pineal bezin (epifiz) en önemli ürünüdür ve salgısı sirkadyen bir ritim göstermektedir. Ortamda bulunan ışığa duyarlı olan MLT hormonu, geceleri gündüze göre 7-10 kat daha fazla salgılanır. Günün aydınlanması ile retinadaki reseptörler uyarılır, optik sinir aracılığıyla bu uyarılar suprakiazmatik çekirdekteki (SCN) hücrelere nakledilir, bu hücrelerden çıkan baskılayıcılar (inhibitörler) ise üst servikal gangliyon (SCG) hücrelerinin uyarı üretmesini engel olur. Dolayısıyla SCG'den pineal beze giden adrenerjik yollar aydınlık ortamda uyarı oluşturmaz. Ancak gece ortamın kararmasıyla SCG üzerindeki inhibitörün baskısı kalkar ve pineal bezi hem α hem de β adrenerjik yollar ile uyarır. Gelen uyarılar pineal bezin asıl hücreleri olan pinealositlerde, G proteinleri aracılığıyla N-asetil transferaz (NAT) enziminin aktiveştirir. Pinealositlerce gün boyu aktif transportla kandan alınıp işlenerek serotonine dönüştürülen triptofan aminoasidi, gece karanlığında aktiveşen bu NAT enzimi ile tetiklenen zincirleme reaksiyonlar MLT'ye dönüşür. Meydana gelen bu MLT yüksek lipofilik özelliği sayesinde serbest difüzyonla hücre zarını rahatlıkla geçer ve kanda % 60-70 oranında albümine bağlanarak taşınır. Yarılanma ömrü yaklaşık 20-40 dakika sürer [31].

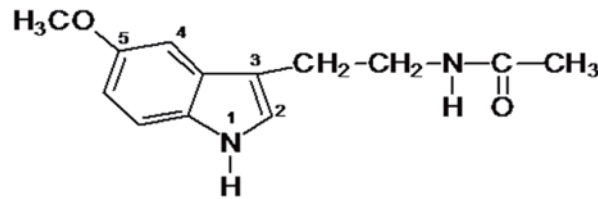
MLT'nin hormonal, yaş, çevresel vb. faktörlere bağlı olarak dağılımı değişebilir. Birçok dokuda yer alabilir. Özellikle santral sinir sisteminde MLT reseptörleri çok fazla bulunur. MLT, reseptör çeşitliliği yönüyle birçok molekülden farklı bir özelliğe sahiptir. MLT'nin hücre zarı, sitoplazması ve çekirdeğinde bulunan üç farklı reseptör tipi tanımlanmıştır ve bunların da alt tipleri vardır. Hücre zarında G protein ile etki gösteren yüksek afiniteli MLT reseptörü 1 (MT1) ve düşük afiniteli MLT reseptörü 2 (MT2), sitoplazmada Ca-kalmodulin reseptörleri, çekirdeğinde ise retinoid Z ve O reseptörleri olarak ayrılmıştır. Bu reseptör çeşitliliğinden dolayı MLT farklı dokularda farklı işlevler gösterebilen çok yönlü bir molekül olarak dikkat çekmiştir. İşlev ve etkileri arasından günümüze kadar bulunmuş olanlardan ön plana çıkanları uyku düzenleyici, kronobiyolojik düzenleyici, kan basıncı düzenleyici, immün sistem düzenleyici, üreme fonksiyonları düzenleyici olması, antioksidan olması ile kanser önleyici olması şeklindedir [32].

MLT vücutta doğal olarak bulunur. MLT karanlıkta salgılanır. MLT hormonu, pineal bezde triptofan amino asidinin serotonine, onun da MLT'ye dönüşmesiyle meydana gelir. Pineal bezden iki grup endojen madde salgılanır: İndolaminler ve peptidler. İndolaminlerin en önemlisi 232 molekül ağırlıklı MLT olarak bilinen N-asetil-5-metoksitriptamindir [33].

MLT'nin sirkadyen ritimler, ruhsal durum, uyku, mevsimsel üreme fizyolojisi ve üreme davranışlarında ve retinal fizyolojide güçlü bir biyolojik düzenleyici olduğu görülmüştür. MLT'nin yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı rahatsızlıklarda güçlü bir antioksidan olduğu saptanmıştır [33].

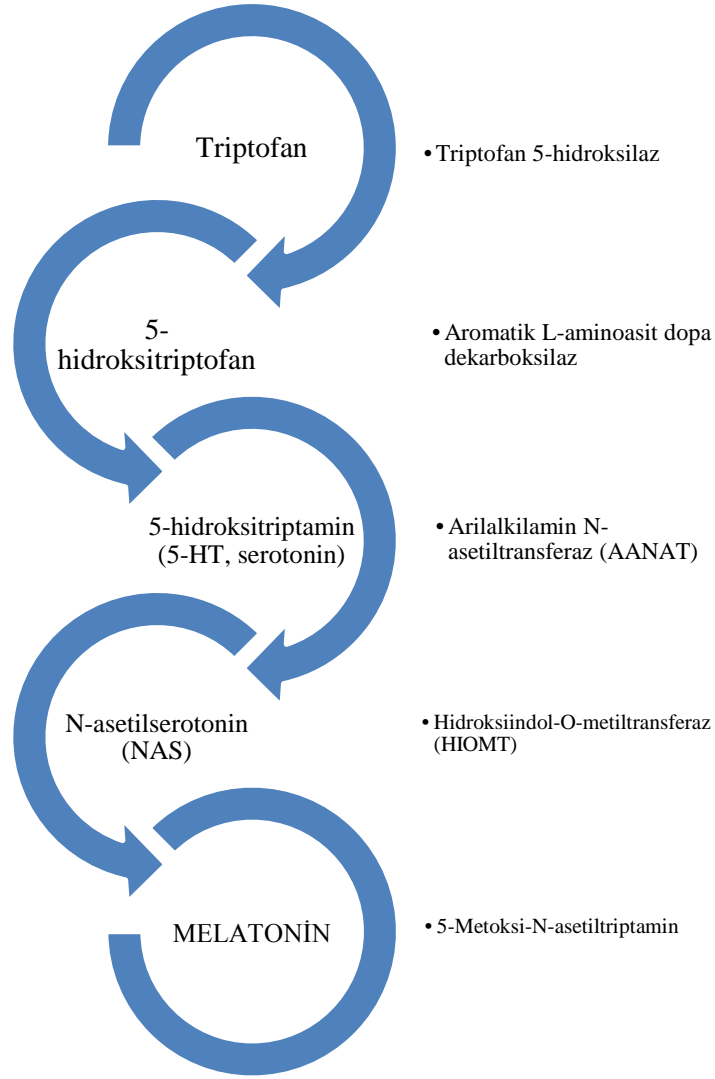
1.2.1.2. Melatoninin metabolizması

MLT (N-Asetil-5-Metoksitriptamin) pineal bezde sentezlenip salgılanan ve çeşitli biyolojik önemli fonksiyona sahip bir nörohormondur (Şekil 1.1).



Şekil 1.1: MLT'nin yapısal formülü (C₁₃H₁₆N₂O₂) [40].

MLT hormonu, pineal bez tarafından karanlıkta özellikle gece üretilen bir hormondur. MLT pinealositlerde Şekil 1.2’de gösterildiği gibi triptofandan sentezlenir. Pineal bezin endokrin aktivitesi fotoperiyodik çevrenin kontrolünde meydana gelir. Çevresel birçok nedenden dolayı canlılarda duygusal ve metabolik olarak birçok değişiklik oluşturabilir. Mevsimsel gün ışığı etkisi, birçok memeli türünün endojen endokrin ritimlerini etkilemektedir. Sempatik eferent lifler, ışık uyarılarını beze taşıdığı zaman, karanlıkta norepinefrin pinealosit membranında adrenerjik reseptöre bağlanır ve reaksiyon meydana gelir. Membranda adenil siklaz (AC) aktivitesi ve dolayısıyla cAMP yapımı uyarılır. Bunun neticesinde MLT ve diğer indolaminleri sentezleyen enzimlerin aktivasyonu meydana gelir [40].



Şekil 1.2: MLT'nin sentezi [40].

1.2.1.3. Melatoninin yararları

Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bulgulara göre MLT'nin başlıca yararlarını aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- 1) Akciğer, böbrek, meme, mide karaciğer, pankreas ve kolon tümörleri gibi hastalıklarla mücadelede etkili olduğu saptanmıştır.
- 2) Baş ağrısının azaltır ve önler.
- 3) Otizm ve zihinsel geriliği olan çocuklarda uyku düzenini sağlar.
- 4) Uykusuzluk problemine iyi gelir.
- 5) Jet lag (eş zamanlama bozukluğu) durumundaki insanlar için uyanıklık hali sağlar.
- 6) Tarfid diskinezi (TD) denilen bir hareket bozukluğunun belirtilerini hafifletir.
- 7) Ameliyat öncesi anksiyeteyi azaltır.

1.2.1.4. Melatoninin moleküler etki mekanizması

İndolaminler, etkilerini reseptörler vasıtasıyla başlatırlar. MLT etkisini başlıca cGMP ve prostoglandinler aracılığı ile gösterir. Ayrıca merkezi sinir sistemi (MSS), karaciğer ve bağırsaklarda MLT reseptörleri, çekirdekte bulunur. MLT, dişi genital sisteminde membran reseptörlerindeki adenilat siklazı aktif hale getirirken, testiste cAMP yapımını artırır [31,33].

Günümüze kadar 3 tip memeli reseptörü klonlanmış veya saflaştırılmıştır. Bunlardan ikisi G proteini ile birleşen reseptörlerdir ve MT1/MT2 olarak adlandırılırlar ancak son yıllarda saflaştırılmış olan MT3 protein kinon redüktaz sınıfında yer alırlar. MT1 reseptörlerinin yüksek affinitede bağlanma yerleri olup a, b, c alt tipleri belirtilmiştir. MT2 reseptörü ise düşük affinitedeki bağlanma yerleri ile belirtilmiştir. MT3 ise MT2'ye benzer bağlanma şekli gösterir [32,33].

MT1 reseptörlerinin aktivasyonu, G proteini üzerinden adenilat siklazı inhibe etme suretiyle hedef hücrelerde cAMP düzeyini düşürür. Bu reseptörler, retinal fonksiyonların, sirkadyen ritimlerin ve üremenin regülasyonunda görev alır. MT2 reseptörlerinin aktivasyonu, fosfoinozidid hidrolizini uyarır. MLT hücre içine kolaylıkla geçip buradaki yapısal proteinlerle de etkileşebilir ya da direkt olarak sitozolik kalmodüline bağlanarak, kalsiyum sinyali oluşturarak etkisini

gösterir. Ayrıca, MLT'nin nükleer retinoid Z reseptörlerinin de bir ligandı olduğu saptanmıştır. Bu bağlanma, düşük nanomolar konsantrasyonlarda gerçekleşir [34].

1.2.1.5. Melatoninin savunma sistemi üzerine etkileri

MLT'nin savunma sistemi, özellikle de hücresel savunma sistemini hem doğrudan hem yan yollardan etkileyebileceği görülmüştür. Laboratuvar çalışmalarında hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda MLT uygulaması sonrasında immün fonksiyonlarında artış gözlenmiştir. MLT'nin bundan dolayı özellikle hücresel immünitinin aktivasyonuna etkili olduğuna düşünülmektedir [31,35].

Bağışıklık yetmezliği oluşturulan durumlarda MLT uygulandığında, anlamlı şekilde MLT'nin savunma sistemi aktivasyonunu artırdığı saptanmıştır. Akut strese ve savunma sistemi baskılayıcı farmakolojik ajanlara bağlı oluşan savunma sistemi yetmezlik tablolarının MLT ile kontrol edilebilir olduğu çalışmalarda gösterilmiştir [31,35].

Doğal savunma dışardan MLT takviye edilmesi ile düzenlenebilir olduğu görülmüştür. NK hücre aktivitesinin farelerde pineal bezin çıkartılmasına bağlı olarak azaldığı saptanmıştır. MLT'nin, kemik iliğinde de bulunması NK hücrelerinin ve monositlerin gelişmesi üzerine düzenleyici etkisi olduğunu göstermektedir. Genç erkek farelere eksojen MLT verildikten 7-14 gün sonra hem NK hücrelerinde, hem de monosit sayılarında artış olduğu görülmüştür. Ek olarak, MLT makrofaj üretimi ve fonksiyonuna düzenleyici rol oynamaktadır [36].

Ağızdan verilen çinko tedavisinin de benzer şekilde savunma sistemi yanıtını artırıcı etkisinden bahsedilmektedir. Pineal bez, beyinde çinko bakımından en zengin yerdir. Organizmada çinko dönüşümü çeşitli hormonlar ve sitokinler aracılığıyla düzenlenmektedir. MLT çinko düzeylerine de etki ederek, timik fonksiyonları düzenlemektedir [31]. Aynı zamanda MLT sentezi için çok önemli bir madde olan serotoninin yapısında çinkonun bulunması MLT ile çinko arasındaki ilişkinin tek yönlü olmadığını bir ispatıdır [33].

1.2.1.6. Melatoninin beslenme davranışı üzerine etkileri

MLT'nin gıda alımı üzerine etkisi, farklı çalışmalarla gösterilmiştir. Bazı araştırmacılar MLT'nin sıçanlarda, tavuklarda, hamsterlarda (cırlak sıçan) ve balıklarda gıda alımını azalttığını söylerken, bazı araştırmacılar da MLT'nin sıçanlarda gıda alımı üzerine etkisinin olmadığını söylemiştir. Fakat kemirgenlerde yapılan çalışmalarda gıda alımının, eksojen MLT veya agonistlerinin verilmesi ile artış gösterdiği saptanmıştır [37].

Damar içi glikoz uygulamasından sonra yükselen kan glikoz düzeyinin, uyku döneminde tekrar azaldığı saptanmıştır. MLT'nin kan glikoz düzeyindeki bu azalmada aktif olarak rol aldığı gösterilmiştir [34].

Pineal bezin çıkartılıp dışardan MLT verilmesinin leptin hormonu üzerine olan etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, pineal bezin çıkartılmasının leptin salınımını artırdığı anca pineal bezin çıkartılması sonrası eksojen MLT ilavesinin ise bu etkiyi tersine çevirdiği görülmüştür. Sonuç olarak MLT ile leptin ekspresyonları arasında birbirine zıt bir ilişki olduğu görülmüştür [39].

1.2.1.7. Melatoninin uyku üzerine etkisi

Uyku, insan gelişiminde önemli bir yere sahiptir. Uyku düzeninde asıl mekanizma, aydınlık- karanlık döngüsüdür. Işık uyarımı, retinadan başlayarak beyindeki hipotalamik alana kadar sinir sistemi iletilir. Hipotalamik alanda bulunan SCN, beynin diğer bölgelerine giden hormonlar ile vücut ısısını, uyku veya uyanıklılık hissini kontrol eden sinyalleri uyarır. Tüm vücudu etkileyen aktivitelerin düzenlenmesinden sorumlu bir “biyolojik saat” gibi çalışır [40,41]. Karanlık olduğunda SCN tarafından oluşturulan MLT salınımını engelleyen baskılayıcı sinyaller ortadan kalktığı için pineal bez aktiflenir ve MLT üretimi başlar. MLT düzeyleri arttıkça daha az uyarının algılanmaya başlandığı ve uyku hissini arttığı saptanmıştır [40,41]. MLT'nin, toplam uyku süresinden çok uykunun başlangıcı, gizil (latent) evresi ve kalitesiyle ilişkisi olduğu görülmüştür. MLT'nin uyku üzerindeki bu etkilerinin, ısı düzenleyici olması (ısıyı düşürücü) ile ilişkili olabileceği görülmüştür [40,41].

1.2.1.8. Melatoninin ağrı kontrolü üzerine etkileri

Ağrı ve kaygı, birçok zararlı veya zehirli uyarana karşı en sık gösterilen nörolojik tepkilerdir ve klinik olarak özellikle algoloji (Ağrı bilimi) ve

psikiyatri birimlerinde bile kontrol edilmeleri oldukça zordur. Sıklıkla kullanılan morfin içerikli ilaçların, nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçların (NSAID) ve asetaminofenin çoğu, ağrı tedavisinde etkili olurken, bu ilaçlar istenmeyen çeşitli yan etkilere de yol açabilir. Kronik ağrı sendromları sıklıkla sirkadiyen ve biyolojik ritimlerin senkronizasyonu ile ilişkilidir ve uyku-uyanıklık döngüsündeki bozulmalar buna neden olabilir. MLT aracılı ağrı kesici (analjezik) etkiler, β -endorfinleri, gama-aminobutirik asit (GABA) ve opioid reseptörlerini, nitrik oksit (NO)-arjinin yolağını içermektedir. MLT'nin, ağrı kesici olması ile bunaltı gideren, hipnotik ve uyku verici (anksiyolitik) etkileri çeşitli hayvan modellerinde gösterilmiştir. Bunun sonucunda, MLT klinikte çeşitli patolojik koşullarda ve ameliyat geçiren hastalarda kullanılmaya başlamıştır. MLT'nin, bu vakaların çoğunda, bunaltı giderici ve ağrı kesici bir madde olarak etkili olduğu da hayvan çalışmalarında olduğu gibi saptanmıştır [40].

MLT, pitüiter bezden β -endorfinin salınımını artırır ve β -endorfinin opioid reseptörlerine bağlanmasını engelleyen naloksonun (opioid reseptörü antagonisti olan ilaç), MLT kaynaklı ağrı iletici (nosiseptif) etkileri engelleyebileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. MLT aynı zamanda MSS'de ve ayrıca omuriliğin dorsal boynuzunda bulunan opioidergik, benzodiazepinerjik, muskarinik, nikotinerjik, serotonerjik ve $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ -adrenerjik reseptörlerle etkileşerek ağrı kesici etkinliğe aracılık eder [42,43]. Buna ek olarak, MLT'nin neden olduğu uzun süreli ağrı kesici etkinin nalokson engellenebileceği gösterildiği için opioid reseptörleri MLT aktivitesinin gerçekleşmesi için gereklidir. Fibromiyalji, iltihabik (inflamatuvar) bağırsak sendromu ve migren gibi çeşitli kronik ağrı görülen koşullarında, MLT'nin ağrıyı azaltmada etkili olduğu bulunmuştur.

MLT'nin operasyon öncesi (perioperatif) dönemde ağrı kesici etki gösterdiği ve anksiyeteyi engellediği görülse de etkinliği tartışmalıdır. Birkaç deneysel hayvan ağrısı modelinde, MLT'nin bu yönde etkili olduğu gösterilmiştir. Elektrikle indüklenen ağrı modellerinde, MLT'nin intraperitoneal (i.p.) enjeksiyonu, 210 dakikaya kadar ağrılı uyarıyı azaltma veya durdurma (anti-nosiseptif etki) başardı. Farelerde ağrı uyarımının sıcak plaka ile gerçekleştiği bir modelde, MLT'nin akşamları farelere verildiğinde maksimum etkileri

olduğu ve MLT'nin bu etkilerinin nalokson veya sinirlilik/huzursuzluk (anksiyete) ve onunla ilişkili bozukluklarda 1960 yılından beri kullanılan benzodiazepinler grubundan flurmazenil tarafından bloke edildiği görülmüştür. Bu da bir önceki deneylerde olduğu gibi opioid reseptörleri üzerinden MLT aktivitesinin bir kanıtıdır. Bir başka nöropatik ağrı modeli olan pençe çekme testinde, MLT'nin uygulamasına bağlı olarak bir saatlik bir sürede ağrının kesildiği görülmüştür. İnsanlarda da kimyasal olarak indüklenen akut ağrının, MLT ile azaltıldığı saptanmıştır. MLT'nin, indüklenebilir NO sentaz (iNOS) ve NO-Cgmp sinyal yolları üzerinden NO üretimini bloke ederek iltihabı ve ağrıyı azalttığı da daha önceki çalışmalarda gösterildi [40, 42].

Uyku ve baş ağrısı arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır. MLT'nin uyku bozukluklarını düzenleyebilmesi de baş ağrısını iyileştirmede yararlı olabilmektedir. MLT uygulamasının sirkadiyen ritim uykusu rahatsızlığı ve baş ağrısına sahip hastalarda ağrı azalmasında etkili olduğu, ancak sirkadyen ritim uykusuna ve baş ağrısına sahip hastanın küçük bir kısmında hafif baş ağrısının görüldüğü saptanmıştır. Birincil başağrısı olan çocuklara günde iki kez 3 mg'lık bir dozda verilen MLT'nin, baş ağrısı ataklarının sayısını, yoğunluğunu ve süresini azaltmayı başardığı görülmüştür.

MLT'nin, migrenli çocuklarda etkili bir önleyici (profilaktik) ilaç olarak da kullanılabileceği görülmüştür [40, 42]. Şiddetli baş ağrısı, nörolojik işlev bozukluğu, uyku bozuklukları ve ağrısız aralıklarla tanımlanan migren, en fazla 10-40 yaş arası kadınlarda görülmektedir. Migren geçiren 34 hastayla yapılan çalışmada, yatmadan 30 dakika önce verilen 3 mg'lık MLT'nin, baş ağrısı yoğunluğunun yanında sıklığını ve süresini de azalttığı saptandı. Yakın zamanda yayımlanan başka bir çalışmada, MLT agonisti olan agomelatinin, migren hastalarının migren atak sıklığı ve süresinin azaltılmasında da etkili olduğu bulunmuştur [40, 42].

1.2.1.9. Melatoninin antioksidan mekanizma üzerine etkileri

MLT'nin en belirgin özelliklerinden birtanesi de antioksidan olmasıdır. Çeşitli kimyasal etkenle veya başka faktörlerle tetiklenen oksidatif stres reaksiyonları kanserleşme yolundaki DNA hasarlarına yol açabilir. Kuvvetli antioksidan

aktiviteye sahip olan MLT'nin bu DNA hasarlarını önleyerek oluşabilecek kanseri engelleyebileceği saptanmıştır [41,42].

MLT'nin antioksidan etkisini iki ana başlık altında toplayabiliriz: İlki reseptörden bağımsız olarak oksidan maddeye elektron sağlaması yolu üzerinden gerçekleşen doğrudan süpürücü etki, ikincisi ise endojen antioksidan mekanizmaları reseptör bağımlı olarak harekete geçirmek yoluyla gösterdiği dolaylı etkidir. Doğrudan süpürücü etkisiyle süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit radikali (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^{\cdot}), peroksinitritler ($ONOO^-$) gibi çeşitli radikal ve reaktif metabolik ürünleri zararsız hale getirdiği gösterilmiştir. Dolaylı etkisini ise süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonlarını artırarak ve peroksinitritlerin artışına neden olabilen indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) enzimini de engelleyerek gerçekleştirdiği gösterilmiştir. MLT birçok yönüyle klasik antioksidanlardan farklıdır. Klasik antioksidanlar etkilerini gösterdikten sonra prooksidan maddelere dönüşürler. Buna zıt olarak MLT'nin, birçok kanser tipinde antiproliferatif, apoptotik antianjiyojenik, sentisizan, immünomodülatör, hematopoietik etkilerinin yanında prooksidan etki gösterdiği de saptanmıştır [16-26, 42].

1.2.1.10. Melatonin kanser üzerine etkileri

Birçok besinsel, hormonal ve çevresel faktör kemirgenlerde oluşturulan tümörlerin büyümesini ve karsinogenezi etkiler. Serbest radikal süpürücü (scavenger) etkisine ek olarak MLT'nin kanser büyümesinin doğrudan inhibitörü olduğu bilinmektedir. Günlük 10-50 mg arasında MLT takviyesinin karaciğer kanseri, metastatik renal karsinoma, meme kanseri ve beyin tümörlerine karşı engelleyici etkisi olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür [36].

Pineal bezin çıkartılması veya sabit ışığa maruz bırakma ile pineal fonksiyonun engellenmesinin karsinogenezi uyardığı, ancak ışık kısıtlamasının karsinogenezi engellediği görülmüştür [37].

Deney hayvanlarında pineal bezin cerrahi olarak çıkarılmasının tümör metastazı yanında birincil tümör büyümesini uyardığı, pineal özüt ilavesinin ise tümörün

ölümcül hale gelmesini engellediği yapılan çalışmalarda saptanmıştır. Hayvan deneyleri MLT'nin, meme kanserini ve melanoma büyümesini *in vivo* ve *in vitro* olarak engellediğini gösterir. Son zamanlardaki çalışmalar, nokturnal MLT seviyelerinin meme, prostat ve endometriyum kanserlerinin başlangıcında azaldığı göstermiştir [36,37].

Araştırma sonuçları MLT'nin, interlökin-2, interferon-gamma gibi sitokinlerin salgısını artırarak savunma sistemin en önemli üyelerinden biri olan T yardımcı lenfositlerin aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Özellikle kansere karşı savunmada önemli bir bağışıklık sistem hücresi olan doğal öldürücü hücrelerin de artışına sebep olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte granülosit-monosit koloni uyarıcı faktörün salgısını artırdığı, IL-1, tümör nekroze edici faktör (TNF)-alfa, transforme edici büyüme faktörü (TGF)-beta, kök hücre faktörü gibi sitokinlerin gen ekspresyonlarını kontrol ettiği ve bağışıklık sistemi hücrelerinin ölümünü (apoptozis) güçlü bir şekilde engellediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [38].

1.2.1.11. Melatoninin apoptoz üzerine etkileri

MLT'nin normal (sağlıklı) hücrelerde antiapoptotik etkilere sahip olduğu, ancak bazı tümör hücrelerinde apoptotik yolları aktive edebildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [4]. İnsan AML hücreleri olan HL-60'da, MLT'nin apoptoz üzerindeki etkisini değerlendiren çalışmalarda 1 mM uygulanan MLT'nin kaspaz-3,9 aktivitelerinde anlamlı bir artışa neden olduğu saptandı. MLT'nin kaspazların aktivasyonu üzerine etkisinin zamana bağlı olduğu ve 12 saatlik uyarımdan sonra etkisinin maksimuma ulaştığı ve daha sonra 72 saat sonunda en düşük seviyeye ulaştığı saptandı. Bu çalışmada, MLT'nin mitokondriyal membran depolarizasyonu ve por geçirgenliğini artırdığı ve 72 saatten sonra apoptozu arttırdığı gösterildi. Ayrıca MLT uygulaması apoptotik proteinler olan Bax ve Bid'in seviyelerinde de artışlara neden olmuştur. Bu çalışma sonucunda MLT'nin, HL-60'da proapoptotik ve/veya onkostatik etkilere sahip olduğu sonucuna varılmıştır [40,42].

MLT'nin apoptozdan normal hücreleri koruduğu, bunun tersine çeşitli kanser hücrelerinde apoptoza neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [4]. MLT'nin, insan AML hücreleri olan HL-60'da, B-lenfoma hücreleri HT-29

insan kolorektal kanseri hücrelerinde ve fare hipofiz prolaktin salgılayan tümör hücreleri de dâhil olmak üzere çeşitli kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü arttırdığı gösterilmiştir [42]. Bu çalışmaların aksine *in vitro* ve *in vivo* yapılan bazı çalışmalar, MLT'nin tümör hücrelerinin apoptozunu önlediğini de göstermiştir [40]. MLT'nin mitokondri üzerinden etki gösterdiği çalışmalarda gösterilmiştir. Özellikle MLT'nin lipofilik bir molekül olması en önemli avantajlarından biri olup sıkı korunan mitokondri dâhil olmak üzere diğer zarlı hücre içi organellere kolayca ulaşmasının anti-kanser etkisi dâhil tüm etkilerini gösterme de önemli bir rol oynadığı çalışmalarda saptanmıştır [40,42].

1.2.2. Goji berry

GB (Latince ismi: *Lycium Barbarium*) uzakdoğuda yetişen bir meyve türü olup *Solanaceae* (patlıcangiller) familyası üyelerinden biridir. Geleneksel Çin tıbbında 2000 yıldan beri kullanılmaktadır. Kuvvetli bir antioksidan kapasiteye sahiptir. *Lycium barbarum L.* ve *Lycium chinense L.* ismiyle iki türü bilinmektedir. Goji berry'nin genellikle meyvesi kullanılmakla birlikte kök ve yaprak kısmı da kullanılmaktadır. GB'nin kanserle mücadele, uyku bozukluğu, cinsel gücü artırma, , yüksek kolesterol gibi hastalıkları önleme ve tedavi edici yönü saptanmıştır [43]. GB meyvesi hem taze hem de kurutulmuş olarak tüketilmekle birlikte marmelat ve meyve suyu olarakta değerlendirilip kullanılmaktadır [44].

1.2.2.1. Goji berry'nin kimyasal içeriği ve besin değeri

GB proteoglikanları (GB polisakkaridleri), fitoaleksini (Skopoletin), vitamin C analogunu (2-O-b-D-Glukopiranosil-L-askorbik asid (AA-2bG), vitaminleri (B1, B2, B3, B6, C, E), amino asitleri (tüm 8 esansiyel amino asit dahil olmak üzere 18 çeşit amino asit), protein yapısına girmeyen amino asitleri (Taurin, c-aminobütirik asit, betain), iz elementleri (çinko, demir, bakır, kalsiyum, germanyum, selenyum ve fosfor gibi 21 iz mineral), esansiyel yağları ve esansiyel yağ asitleri (Hekzadekanoik asit, linoleik asit, b-elemen, miristik asit, etilhekzadekanoat), karotenoidleri (Zeaksantin dipalmitat, b-kriptoksantin palmitat, zeaksantin monopalmat, zeaksantin, b-karoten, b-kriptoksantin), flavonoidleri (Mirisetin, kuersetin, kampferol) ve diğerleri (b-sitosterol, daukositerol, p-koumarik asit, lisiumid A, L-monomentil süksinat)

içermektedir [3,6]. 100 gram kuru meyvede 7 mg beta karoten, 2,4 mg zeaksantin, 1,3 mg B2 vitamini, 29-148 mg arası değişen miktarlarda C vitamini, 112 mg kalsiyum, 1132 mg potasyum, 9 mg demir, 2 mg çinko, 50 µg selenyum bulunmaktadır. Meyve eti ağırlığının % 31'i kadar polisakkarid içerir [45,46].

1.2.2.2. Etki ve kullanışı

Cortex lycii radidis, GBinin kurutulmuş kök kabuğudur, çoklu rahatsızlıklarda kullanılan geleneksel bir Çin tıbbı otudur. GBM hücreleri üzerinde büyüme inhibisyonu etkisine sahiptir. Bir spermin alkaloidi olan ve *Cortex lycii radidis*'in ham özütünde bulunan Kukoamin A (KuA) antioksidan ve antiinflamatuvar (iltihap önleyici) işlevlere sahiptir. KuA'nın insan GBM hücreleri üzerindeki büyüme ve göç (migrasyon) engelleyici etkisi ve bunun aktivitesinin olası mekanizması yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. KuA tedavisinden sonra, GBM hücrelerinin çoğalması ve koloni oluşturma yeteneği önemli ölçüde azalmıştır, apoptotik hücreler artmış, hücre döngüsü G0/G1 fazında durdurulmuştur. Ayrıca göç ve yayılma azalmış, GBM hücrelerinden başlatılan tümörlerin büyümesi de önemli ölçüde engellenmiştir.

5-Lipoksijenaz (5-LOX) ekspresyonları azalmış, apoptotik proteinler olan Bax ve kaspaz-3 seviyeleri artmış ve antiapoptotik protein olan Bcl-2 seviyesi ise önemli ölçüde azalmıştır. KuA ile tedavi edilen GBM hücreleri ve tümör dokularında E-kaderin ekspresyonu anlamlı olarak artarken, CCAAT / arttırıcı bağlayıcı protein β (C / EBPβ), N-caderin, vimentin, snail+ slug ifadelerinin bunun tersine önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. KuA, 5-LOX ve C/EBP ekspresyonlarını azaltarak apoptoz tetikleme gerçekleştirilmiş ve epitelial mezenkimal geçişi engelleyerek insan GBM hücre büyümesini ve göçünü kültür ve hayvan modellerinde engellemiştir [5].

GB'den izole edile polisakkaridler de antioksidan özellik gösterir. Kavernöz sinir hasarını takiben bu polisakkaritlerin oksidatif stres kaynaklı nöronal hasarı engellediği hipotezi üzerine yapılan sıçan modelleri kullanılarak yapılan çalışmada, kavernöz sinir yaralanmasının 1. 7. ve 14. günlerinde 2 hafta süreyle GB polisakkaritleri uygulanmıştır. Serum SOD ve GP-X aktivitelerinin yaralanmadan 1 ve 2 hafta sonra belirgin şekilde arttığı gözlenmiştir. Serum

malondialdehit (MDA) seviyelerinin ise 2. ve 4. haftada azaldığı görülmüştür. 12. haftada, intrakavernöz basınç, miyelinli akson sayısı ve nikotinamid adenine dinükleotit fosfat (NADP)-diaforaz pozitif sinir lifleri, fosfoendotelyal NOS proteini ve 3-nitrotirozin seviyeleri yaralanmadan sonraki 1 güne kıyasla daha yüksek olarak saptandı. Bu bulgular, kavernöz sinir ezilme hasarını takiben GB polisakkaritlerin uygulanmasının sinir rejenerasyonunu ve erektil fonksiyonel iyileşmeyi etkili bir şekilde desteklediğini göstermektedir [5].

1.2.2.3. Goji berry ve kanser ilişkisi

GB, bir iz minerali olan kanser önleyici görevleri bulunan Germanyum içeren tek meyvedir. Germanyumun inorganik formunun çok zararlı olmasına rağmen organik formlarının sayısız faydası olduğu gösterilmiştir. Germanyum çok güçlü bir antioksidandır. Savunma sistemini güçlendirir ve vücuttan toksin maddelerin atılımını sağlar. Yaşlanmayı geciktirici etkileri de vardır. GB kandaki pH, potasyum, kalsiyum, trigliserid, bilirubin ve ürik asit seviyelerinin normal seviyelere gelmesinde, tiroid bezinin düzgün çalışmasını sağlamada ve damarların tıkanmasını önlemede etkili bir rol oynar [47]. Düzenli olarak kullanılan GB, kanı toksinlerden arındırır akyuvarları sağlıklı hale getirir. İçeriğindeki özel polisakkaritler ve antioksidan maddeler sayesinde kansere sebep olan genetik DNA bozulmalarını önler [47].

GB, Beta-karoten bakımında çok zengindir. Beta-karoten hücrelerin sağlıklı gelişmesinde, kemik oluşumunda, derinin korunması ve yenilenmesinde görev alır. Vücudu serbest radikallerden dolayı oluşabilecek zararlardan korur. Kalp hastalıkları ve kansere karşı korunmakta önemi büyüktür. Deriyi güneş ışığına karşı koruyarak cilt kanseri olma riskini düşürür [47]. Bu vitamin için günlük önerilen doz, 2-4 miligram olmakla birlikte GB içeriğinde bulunan miktar çok daha yüksek olup 7.4 – 12.6 mg civarındadır. GB içindeki karotenoidler cildi genç tutmakla birlikte aynı zamanda cilt kanserine karşı da korur.

Genel olarak gojiberryinin faydaları,

- 1) Bu meyvenin sap kısmından, yaprağından, meyve kısmından ve posasından beslenme için faydalanılabilir. Meyve %13 oranında protein içerir. İyi bir protein kaynağıdır. Sağlıklı ve uzun yaşam kaynağı olarak uzak doğu ülkelerinde kullanılmaktadır.

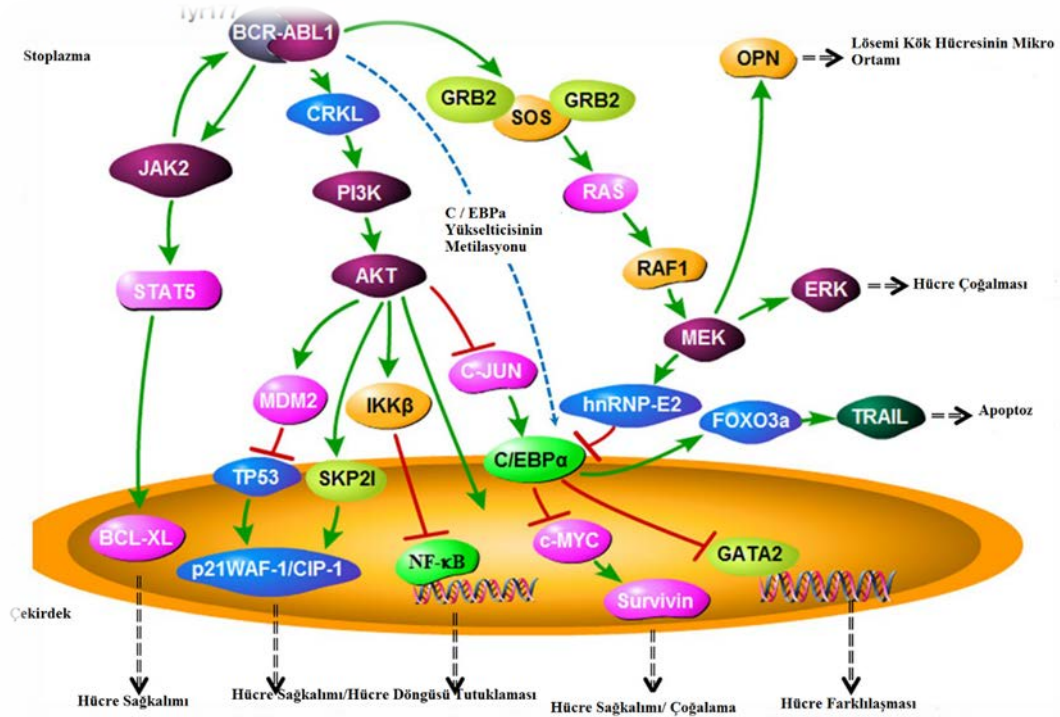
- 2) İyi bir antioksidan kaynağıdır. En yüksek seviyede antioksidan içeriğe sahip bitkilerden biridir, buna bağlı olarak yaşlanma karşıtı, antikanser ve birçok metabolik etki gösterir. Yüksek seviyede C vitamini içerir. GB %8 oranında E vitamini ve B vitamini bulundurur.
- 3) Beta-sitosterol içerdiğinden dolayı kolesterol düşürücü etkisi vardır.
- 4) Solavetivon içeriği ile antimikrobiyal etki gösterir.
- 5) Fizalin ile özellikle lösemi türlerinde diğer bir anti-kanser etki gösterir DNA'yı koruyucu etkisi vardır. Bu da anti-kanser, yaşlanma karşıtı etkileri için oldukça önemlidir.
- 6) Zeaksantin ile göz sağlığı (göz retinasını korur) için oldukça faydalıdır.
- 7) Cinsel sağlığın sürdürülmesinde etkilidir (Yumurta ve sperm oluşumu).
- 8) GB savunma sistemi güçlenmesi için gerekli içeriğe sahip olduğundan, vücudun bağışıklık sistemini güçlendirir [47].

1.2.3. Lösemi (Kan Kanseri)

Lösemi, kan ve kemik iliğindeki lökositlerin gelişimi ve kontrolsüz çoğalmasıyla oluşan ölümcül bir hastalıktır. Lösemili bir hastanın kemik iliğinde akyuvar oluşumu sağlıklı bir bireye göre aşırı denebilecek kadar fazladır. Normal şartlarda akyuvarlar hastalıkları önler ve savunma sistemi direnç mekanizmasını geliştirir, ancak lösemi durumunda akyuvarların çok fazla olması patolojik bir durum oluşturur. Bundan ötürü oluşan akyuvarlar görevini yerine getiremezler [48]. Kan hücreleri pluripotent hematopoetik kök hücrelerden köken alıp hematopoiez (kan yapımı) olarak bilinen süreç içerisinde çoğalarak olgun lenfosit, granülosit, monosit, megakaryosit, trombosit ve eritrosit gibi periferik kan hücrelerine dönüşmektedir. Buna göre lösemi oluşumunda kök hücrelerde meydana gelen mutasyon büyük önem kazanmaktadır [49].

1.2.3.1. Lösemi türleri

Lösemiler etkilenen akyuvar hücrelerin tipine (lenfoid, myeloid) ve hastalığın oluşumuna (akut, kronik) göre sınıflandırılır. Şekil 1.3'te lösemi oluşum mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 1.3: Lösemi oluşum mekanizması [67]

Akut lösemi “blast” adı verilen erken evredeki hücrelerden meydana gelirken, kronik lösemiler olgun hücrelerden meydana gelirler. Akut lösemi hücreleri hızlı gelişim gösterip hızlı bölünürken kronik lösemi hücreleri yavaş gelişim gösterip bölünmeyip birikirler. Miyeloid lösemiler (ML) miyeloid hücre serisinden oluşmaktadır. ML’ler kronik myeloid lösemi (KML) ve akut myeloid lösemi (AML) olmak üzere ikiye ayrılır. Lenfositik lösemiler ise kemik iliğindeki lenfoblastlar veya lenfositlerden gelişip kronik lenfositik lösemi (KLL) ve akut lenfositik lösemi (ALL) olmak üzere iki farklı sınıfa ayrılırlar [50-51].

1.2.3.2. Lösemi belirtileri

Enfeksiyonla mücadele eden lökositlerde işlev ve sayı kaybı yaşanacağından ateşli enfeksiyon sıklıkla görülmektedir. Kemik iliğinde oksijen taşıyan alyuvarlarda da bozukluk meydana geldiğinden dolayı lösemili kişilerde nefes alıp verme güçlüğü ve ten renklerinde solukluk görülebilmektedir. Trombosit kan hücrelerinin yapısını da negatif etkilendiği için en ufak çarpmalarda bile vücutta morarmalar ve sürekli, durdurulamayan kanamalar meydana gelebilir [52]. Aşağıdaki belirtilerden bir veya birkaçı lösemi vakalarında sıklıkla görülür:

- Yüksek ateş veya titreme
- Aşırı yorgunluk, güçsüzlük
- Sıklıkla hastalıklara yakalanma
- Kilo kaybı
- Lenf düğümlerinde şişme, dalakta veya karaciğerde büyüme
- Vücutta kolay kanama ve morarma ciltte ufak kırmızı lekeler
- Geceleri aşırı terleme
- Kemiklerde ağrı veya hassasiyet

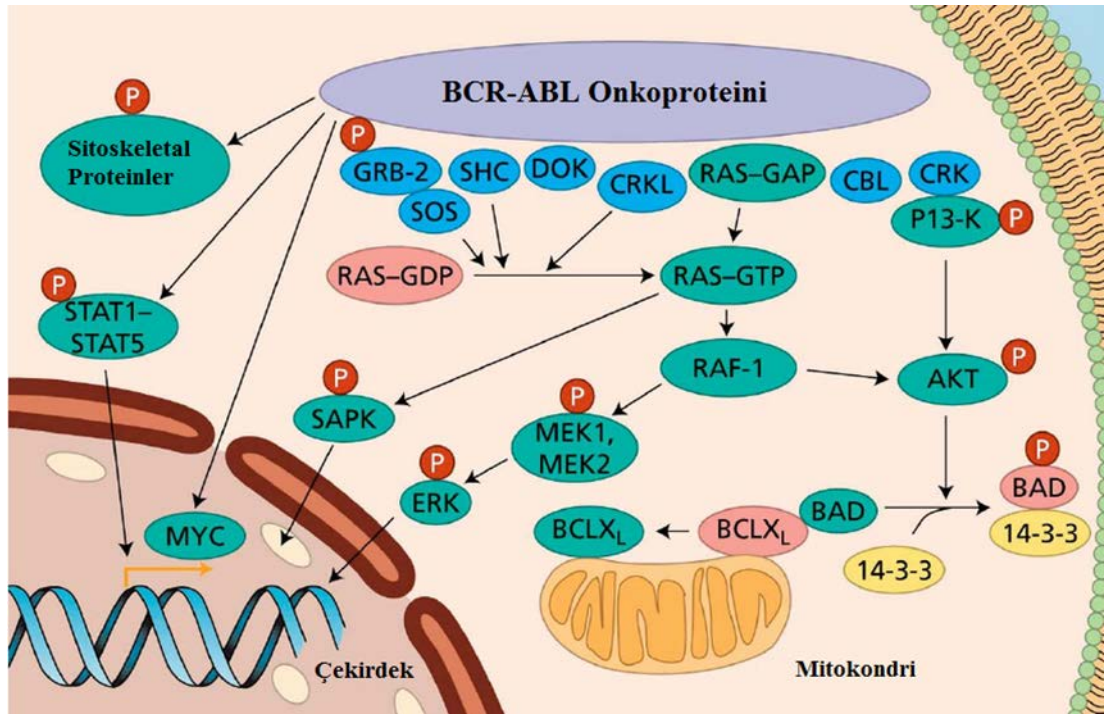
1.2.3.3. KML'nin oluşum mekanizması

9q34 bölgesinde yer alan ABL geninin ekspresyonu sonucunda molekül ağırlığı 145 kDa olan, 11 ekzona sahip ABL proteini oluşur. ABL proteini bir tirozin kinaz olup sinyal iletimi ve hücre çoğalmasının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Proteinin ilk ekzonunda farklı değişik birleşmeler (füzyon, translokasyon vs) gerçekleşir. ABL proteininin yapısında bulunan 3 farklı SRC homoloji alanı (SH1-SH3), proteinin NH₂ ucunda bulunur. SH1 alanı, tirozin kinaz fonksiyonuna sahip iken SH2 ve SH3 alanları ABL proteinlerinin diğer proteinlerle etkileşimine yardımcı olur. Mutasyona uğramamış normal ABL proteini hücre döngüsünü, programlı hücre ölümünü, hücre büyüme ve çoğalmasını ve hücrelerin strese yanıtını kontrol eder [52].

22. kromozom üzerinde bulunan BCR geni, 160 kDa ağırlığında BCR adlı bir protein üretir. BCR proteininin NH₂ ucundaki ilk ekzon, 14-3-3 protein ailesinin bir üyesi olan Bap-1 proteinini ve BCR proteinini hedefleyen serin treonin kinazı kodlamaktadır. BCR proteininin merkezinde Rho-Guanidin bağlanma bölgesi yer alır. Rho-Guanidin faktörleri, NF-κB gibi transkripsiyon faktörlerini aktive eder. BCR proteininin C- ucu GTPaz işlevine sahiptir. BCR proteini, 177. tirozin amino asidi başta olmak üzere birçok tirozin kalıntısından fosforlanabilir. Bu durum BCR'nin RAS sinyal yolağı'nın aktivitesini etkileyen GRB-2 proteinine bağlanmasını sağlar [52].

Yapılan moleküler genetik incelemeler sonucunda 9. kromozomun 9q34 bölgesinde bulunan ABL geninin, 22. kromozoma translokasyon yolu ile geçtiği görülmüştür. 22. kromozomdaki kırılma noktalarının DNA'nın 5-6 kb'lık bir bölümünde meydana geldiği bulunmuş ve bu noktaya kırılma

noktasının kümeleşmiş bölgesi breakpoint cluster region (BCR) denilmiştir. Doğal c-ABL proteini çekirdek içinde bulunur ve kinaz aktivitesi hücrenin gereksinimlerine göre düzenlenir. BCR-ABL füzyonu ise hiperaktif bir sitoplazmik tirozin kinaz aktivitesi ile sonuçlanır. Bu tirozin kinaz farklılaşmayı engelleyemez ancak myeloid serisi hücrelerin yaşam kabiliyetini ve çoğalmasını artırır. Ph translokasyonu sırasında ABL geni üzerindeki kırık her zaman ABL ekzon 2'nin 5'ucunda 300 kb'lık bir alanda gerçekleşirken, BCR geni üzerindeki kırık çeşitli bölgelerde oluşabilir ve farklı büyüklükte anormal füzyon tirozin kinaz genlerinin oluşumu ile sonuçlanabilir. BCR/ABL füzyon proteininin etkisi 4 temel mekanizma ile Şekil 1.'da gösterildiği gibi gerçekleşmektedir [52].



Şekil 2.4: BCR/ABL füzyon proteini etki mekanizması [67]

KML öncül (progenitör) hücrelerinin, kemik iliği stroma hücreleri ve ekstraselüler matrikse adezyonu azalır. Son araştırmalar stroma ile öncül hücreler arasındaki etkileşimde dış ortamdan hücre içine sinyal iletimini başlatma yeteneğine sahip adezyon (tutunma) proteinlerinden β -integrinlerin, önemli rolü olduğunu göstermiştir. KML hücrelerinin, β 1-integrinin normal öncül hücrelerde bulunmayan bir varyantını eksprese ettikleri gösterilmiştir [52,53].

BCR-ABL onkoproteini RAS, JAK/STAT, PI3K/Akt ve NF-κB gibi birçok mitojenik sinyal yolağının aktivasyonuna sebep olur ve hücre çoğalmasını, apoptozun baskılanmasını ve ekstraselüler matriks ile stroma arasındaki anormal etkileşimi uyarır. Etkileşimlerin birçoğu adaptör proteinlerin BCR-ABL'ye bağlanması ve tirozin fosforillenmesi aracılığıyla sağlanır [52,53].

Wnt sinyalinin anormal aktivasyonu da diğer mekanizmalar gibi lösemik kök hücrelerin oluşumu ve devamlılığı ile ilişkilendirilmiştir. KML'nin kronik fazından blastik kriz fazına geçişine granülosit-makrofaj progenitör (GMP) hücreleri, glikojen sentaz kinaz (GSK)-3 mutasyonları ve katenin stabilizasyonu öncülük eder. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, KML kök hücrelerinde Wnt sinyal yolağı üzerine tirozin kinaz inhibitörünün (TKI) baskılayıcı etkisi olmasına rağmen bu hastalarda Wnt yolağının yeniden aktive olmasıyla birlikte hastalarda nükslerin meydana geldiği gösterilmiştir. TKI ile tedavi CD70 promotör metilasyonu ile ilişkili olarak miR29'un ifadesini azaltmıştır. CD70'in yüksek düzeyde ifade olması, Wnt sinyal yolağının bir aktivatörü olarak bilinen CD27'nin transkripsiyonunu artırdığı bilinmektedir.

Wang ve arkadaşları, AML lösemik kök hücrelerinde katenin ifadesi ile birlikte Wnt sinyalinin anormal düzeylerde olduğunu göstermişlerdir [52]. B-hücreli akut lenfoblastik lösemi (B-ALL) hücrelerinin tedavisinde kullanılan küçük moleküller, katenin ve koaktivatörü olan CBP'nin arasındaki ilişkiyi engellemiştir. Bunun sonucunda, hücreler farklılaşmaya gitmiş ve "kendini yenileme (self renewal)" yeteneklerinde kayıp görülmüştür. ICRT14, katenin-TCF ilişkisini bozan bir inhibitör olup Wnt hedef genlerinin ifadelerinde azalmaya yol açmaktadır. ICRT14, kemoterapi ile birlikte uygulandığı zaman ALL hücrelerinin canlılık yüzdesini düşürdüğü ve tedaviye dirençli hastaları ilaca duyarlı hale getirdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [52].

Araştırmacılar, kanser kök hücrelerine (KKH) odaklanarak, bu hücreleri tanımlayabilecekleri molekül ve yollar üzerine çalışmalar yapmışlardır. Sağlıklı kök hücre (SKH) ve KKH genellikle benzer hücre yüzey belirteçlerini eksprese eder. Yapılan çalışmalarda meme kanserinde spesifik belirteçler eksprese eden KKH benzeri hücreler karakterize edilmiştir. Bu hücreler CD44 yüzey belirtecini yüksek, CD24 yüzey belirtecini düşük olarak eksprese etmektedir. Hem CD44 hem de CD24 hücre yüzey belirteçleri, Wnt'nin hedef

genleridir. CD44, LRP6 aktivitesi üzerinden Wnt sinyal yolağının pozitif düzenleyicisi olarak görev yapar. Ayrıca hücre yüzeyinde katenin ile bağlantılı halde bulunan E-kaderinin düşük düzeyde ekspresyonunun olması kateninin çekirdek translokasyonunu ve buna bağlı olarak Wnt sinyal yolu aktivasyonunu uyarır. Bunlara ek olarak çok sayıda Wnt/-katenin hedef geni yayılma, ve göç ile ilişkilendirilmiştir [52].

Wnt sinyalinin anormal aktivasyonu, epigenetik mekanizma ile de gerçekleşebilmektedir. Çalışmalarda çeşitli Wnt sinyal yolağı inhibitörlerinin ALL ve AML'de metil gruplarının artışı (hipermetilasyon olduğu) bulunmuştur [52].

İnsan hücre hatlarında BCR/ABL ekspresyonunun, yüksek tirozin kinaz aktivitesi ve RAS onkogeninin aktifleşmesi ile büyüme faktörü eksikliğinden kaynaklanan apoptozun oluşumunu engellediği ve direnç gelişimde etkili gösterilmiştir [52,53]. BCR/ABL, hücre içi dengeyi hücrenin büyümesi ve çoğalması yönüne çevirirken apoptozu da engeller. BCR/ABL füzyon proteini, mitokondriden sitokrom-c salınımını önleyerek kaspazların aktivasyonunu engeller, Bcl-2 geninin ekspresyonunu da RAS veya PI3K yolu ile kontrol eder. BCR/ABL geni ile transfekte edilen hücrelerde BCR/ABL proteininin Fas reseptörü/Fas ligand sistemi ile apoptozu engellediği gösterilmiştir. BCR-ABL'nin tirozin kinaz aktivitesi Crk-L gibi çeşitli hücrel substratların fosforillenmesine de katkıda bulunur ve bu yolla hücre çoğalması ve yaşamını kontrol eden sinyal yollarının aktifleşmesi sağlanır [52,53].

2. MATERYAL ve METOD

Çalışmamız in vitro koşullarda yapılmış deneysel bir çalışma olup GB [Lycium barbarum (L. Barbarum); kurt üzümü] meyvesi özütleri İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognози Anabilim Dalı'nda, GB meyve özütü antioksidan tayini (Fenolik bileşikler, Flavonoidler) içerik tayini İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda hücre ve doku kültürü deneyleri ile akım sitometrik hücre ölümü ve hücre döngüsü analizleri İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (ASDETAЕ) İmmunoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Enzim bağlantılı immünosorbent test (ELIZA) deneyleri ise İstanbul Aydın Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

2.1. Kullanılan Cihazlar, Aletler, Kimyasal ve Sarf Malzemeler

1) Kullanılan Gıda Takviyesi

- a) Melatonin (Gonadosan AG, Almanya)

2) Kullanılan Hücre Soyu

- a) K562 insan kronik myeloid lösemi (ATCC ® CCL-243™)

3) Kullanılan Cihazlar

- a) Laminar akım hücre kültür kabini (CESNA)
- b) CO₂'li İnkübatör (THERMO)
- c) Santrifüj Cihazı (VWR)
- d) Akım Sitometri Cihazı (Becton Dıckınson)
- e) Mikroplaka ve Küvet Spektrofotometresi (Thermo Scientific Multiskan GO UV/Vis)
- f) Çalkalayıcı (Orbital Shaker-Stuart, SSL1)
- g) -80°C Derin dondurucu (Thermo)
- h) Vorteks (İka)
- i) Rotavapor (Buchi R-210)
- j) Buzdolabı (Arçelik)

- k) 20°C Derin dondurucu (Bosch)
- l) Distile su cihazı (Labconco)
- m) pH metre (Radiometer PHM 92)
- n) Hassas terazi (AND HM 200)
- o) Işık mikroskobu (Nikon)

4) Kullanılan Kimyasallar

- a) Fötal Sığır Serum (Sigma-Aldrich 12106C, St. Louis, MO, USA)
- b) LookOut® Mycoplasma Erase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- c) Antimikotik-antibiyotik (Sigma-Aldrich A5955, St. Louis, MO, USA)
- d) Penisilin-Streptomisin (Sigma-Aldrich 4333, St. Louis, MO, USA)
- e) Sodyum piruvat solüsyon (Sigma-Aldrich S8636, St. Louis, MO, USA)
- f) Dondurma medyumu (Sigma-Aldrich C616, St. Louis, MO, USA)
- g) RPMI-1640 (Gibco 11875085)
- h) Petrol eteri (Merck Chemicals 1.01775.5000, Damstadt, Germany)
- i) Kloroform (Sigma-Aldrich 34854, St. Louis, MO, USA)
- j) Metanol (Sigma-Aldrich 34885, St. Louis, MO, USA)
- k) Sodyum karbonat (Na_2CO_3 ; Merck 106398)
- l) Sodyum wolframmat ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Merck 106672)
- m) Sodyum molibdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Merck 386521)
- n) %85'lik fosforik asid (H_3PO_4 ; Merck 100564)
- o) Derişik hidroklorik asid (HCl ; Merck 100314)
- p) Lityum sülfat (Li_2SO_4 ; Merck 105694)
- q) Brom (Br_2 ; Merck 101945)
- r) Gallik asid (3,4,5-hidroksibenzoik asid; Sigma G7384)
- s) Sodyum nitrit (NaNO_2 ; Merck 106544)
- t) Alüminyum klorür ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Merck 101083)
- u) Sodyum hidroksit (NaOH ; Merck 106462)

- v) Kateşin (Fluka 22110)
- w) Etanol (100983-Merck)
- x) CHAPS liziz solüsyonu (ZC10003-Invitrogen)
- y) Dimetil sülfoksit (DMSO)-Hybri-Max™ (D2650; Sigma-Aldrich)

5) Kullanılan Sarf Malzemeler

- a) İnsert (ThinCert™-Greiner Bioone 657640; ThinCert™-Greiner Bioone 662640)
- b) Racklı pipet uçları (20-200 ul; 100-1000 ul; 0.1-10 ul; 20-200 ul; Eppendorf)
- c) DNA saklama kabı (5 ml; Cryotechnics 5400948)
- d) Enjektör (5 cc, 10 cc ve 50 ml'lik; Set Inject)
- e) 0.2 mikronluk Enjektör filtre (TPP 99722)
- f) Kriyo tüp 2 ml (TPP 89020)
- g) 75 cm²'lik hücre kültür flaskı (TPP 90075)
- h) 25 cm²'lik hücre kültür flaskı (TPP 90025)
- i) 6 kuyucuklu steril hücre kültür kabı (TPP 92006)
- j) 24 kuyucuklu steril hücre kültür kabı (TPP 92024)
- k) 10 ml'lik tek kullanımlık steril pipet (TPP 94010)
- l) 5 ml'lik tek kullanımlık steril pipet (TPP 94005)
- m) 3.0 ml'lik tek kullanımlık pasteur pipeti (LP Italiana 135138)
- n) 15 ml'lik santrifüj tüpü (TPP 91015)
- o) 50 ml'lik Santrifüj tüpü dibi konik TPP 91050

6) Kullanılan kitler

- a) Hücre sayısı saptama kiti (A starter kit, M1293-0020)
- b) Apoptoz Saptama Kiti-(FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Pharmingen-556570)
- c) Hücre döngüsü saptama kiti (Cell Cycle Kit, BD Pharmingen 558662)
- d) Kaspaz-3 ELIZA kiti (Sigma-Aldrich CASP-3C)
- e) Kaspaz-8 ELIZA kiti (USCN SEA853Hu)
- f) Kaspaz-9 ELIZA kiti (USCN SEA627Hu)
- g) Bcl-2 ELIZA kiti (USCN SEA778Hu)
- h) Bax ELIZA kiti (USCN SEB343Hu)

2.2. Bitki Materyali

Çalışmamızda kullanılan GB bitkisinin meyveleri ticari bir web sitesinden alınmış olup İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı tarafından teşhis edildikten sonra bitki özütü hazırlandı.

2.2.1. Gojiberry özütünün hazırlanması

GB meyveleri aktif bileşenlerin ısı ile bozulmasını önlemek için laboratuvarında steril ortamda, gölgede 30 gün kurutuldu ve ufak parçalara ayrıldı. 30 g kurutulmuş GB meyveleri, makasla küçük parçalara ayrıldı. Meyve parçaları metanol (100 ml), petrol eteri (30 ml) ve kloroform (50 ml) ile yaklaşık olarak 24 saat Soxhlet aparatında reflüks edildi. Elde edilen karışım rotaevaporatöre konularak metanol, petrol eteri ve kloroform ekstreden uzaklaştırıldı. Ekstre edilebilen bileşik miktarı (EC) tayin edildi. Elde edilen ekstre daha sonra kullanılmak üzere ufak cam kaplara konularak -20°C’de saklandı [55,56].

2.3. Antioksidan Aktivite Deneyleri

2.3.1. Total fenolik bileşik miktarı tayini

Metanollü ekstrelerinin total fenolik bileşik miktarı Folin-Ciocalteu ayırıcı ile kolorimetrik olarak tayin edildi [55,56].

2.3.2. Kullanılan çözeltiler

%2’lik Na₂CO₃: 2 g Na₂CO₃ distile su ile çözülüp 100 mL’ye tamamlandı. Folin-Ciocalteu Ayırıcı: 1500 mL’lik balona 100 g Na₂WO₄.2H₂O, 25 g Na₂MoO₄.2H₂O, 700 mL distile su, 50 mL %85 H₃PO₄ ve 100 mL derişik HCl konularak geri soğutucu altında 10 saat kaynatıldı. Karışıma 150 g Li₂SO₄, 50 mL distile su ve birkaç damla Br₂ ilave edildi. Çeker ocak altında 15 dakika kaynatılarak soğutulduktan sonra hacmi distile su ile 1000 mL’ye tamamlandı. Ayıraç kullanılmadan önce 1/3 oranında distile su ile seyreltildi.

2.3.3. Deneyin Yapılışı

Ekstreler 40 mg/mL olacak şekilde eppendorf tüplerine konuldu ve ultrasonik banyoda 20 saniye tutularak çözüldü. Uygun çözücülerle uygun oranlarda

seyreltilerek (20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL) elde edilen çözeltilere deney uygulandı.

Değişik konsantrasyonlarda hazırlanan ekstrelerden kuyucuklara 8 µL konularak üzerine 260 µL distile su ilave edildi. 8 µL Folin-Ciocalteu ayıracağı ve 24 µL %2'lik Na₂CO₃ çözeltisinden ilave edildi. Mikroplaka 2 saat karanlıkta bekletildikten sonra meydana gelen mavi rengin absorbansı, distile su içeren köre karşı, 760 nm'de ELISA mikro-plaka okuyucuda ölçüldü.

Sonuçlar gallik asid standart eğri denklemi kullanılarak "mg gallik asid ekivalanları/g meyve" olarak ifade edildi. Sonuçlar, ayrıca "mg gallik asid ekivalanları/g kuru meyve ağırlığı (DW)" olarak da hesaplandı. Deneyler 3 kez tekrarlandı ve elde edilen sonuçların aritmetik ortalamaları hesaplandı.

2.3.4. Gallik asid standart eğri denkleminin elde edilmesi

Gallik asid standart eğri denkleminin elde edilmesi için önce gallik asidin 5 mg/mL'lik stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.125 mg/mL 0.0625 mg/mL ve 0.03125 mg/mL olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere modifiye edilmiş Folin-Ciocalteu deneyi uygulandıktan sonra oluşan renklerin absorbansları 760 nm'de ELISA mikro-plaka okuyucuda ölçüldü. Deney 6 kez tekrarlandı ve bulunan değerler ile gallik asid standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi.

2.3.5. Total flavonoid miktar tayini

Meyvelerinin metanollü ekstrelerinin total flavonoid miktarları tarafından tanımlanan standart kalorimetrik ölçümde bazı değişiklikler yapılarak tayin edildi [55,56].

2.3.6. Kullanılan çözeltiler

% 5'lik NaNO₂: 5 g NaNO₂ distile su ile çözülerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.

% 10'luk AlCl₃: 10 g AlCl₃ distile su ile çözülerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.

1 M NaOH: 4 g NaOH distile su ile çözülerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.

2.3.7. Deneyin yapılışı

Ekstreler 40 mg/mL olacak şekilde eppendorf tüplerine konuldu ve ultrasonik banyoda 20 saniye tutularak çözüldü. Uygun çözücülerle seyreltilen çözeltilerle (20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL) deney yapıldı.

25 µL ekstre veya standart olarak kullanılan kateşin çözeltileri üzerine 125 µL distile su eklendi. 7.5 µL %5'lik NaNO₂ ilave edildikten 5 dakika sonra 15 µL %10'luk AlCl₃ ilave edildi ve karışım 5 dakika bekletildikten sonra 50 µL 1 M NaOH ilave edildi. Karışım üzerine 27.5 µL distile su ilave edilerek karıştırıldı. Oluşan rengin absorbansı 510 nm'de ayıraç körüne (distile su) karşı ölçüldü. Sonuçlar kateşin standart eğri denklemi kullanılarak mg kateşin ekivalanları/g meyve olarak ifade edildi. Deneyler 3 kez tekrarlandı ve aritmetik ortalamaları hesaplandı.

2.3.8. Kateşin standart eğri denkleminin elde edilmesi

Kateşinin 2,5 mg/mL'lik stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin distile su ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları 0.25 mg/mL, 0.125 mg/mL, 0.0625 mg/mL, 0.03125 mg/mL ve 0.015625 mg/mL olan çözeltiler elde edildi. Çözeltilere deney uygulandıktan sonra oluşan renklerin absorbansları 510 nm'de ELISA mikro-plaka okuyucuda ölçüldü. Deney 6 kez tekrarlandı ve bulunan değerler ile kateşin standart eğrisi çizildi ve regresyon denklemi elde edildi.

2.4. Gıda Takviyesi: Melatonin

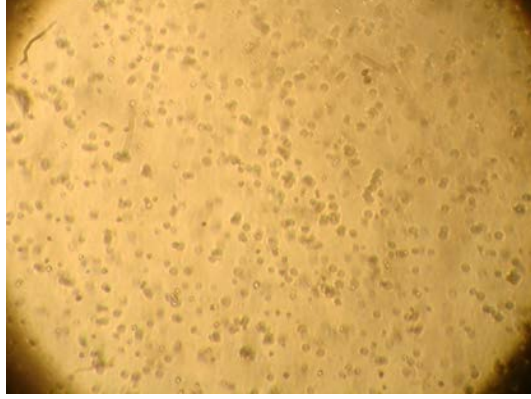
Deneyde kullanılan Melatonin gıda takviyesi (Now, IL, Amerika Bileşik Devletleri) buğday, soya, gluten, süt, yumurta, balık, kabuklu deniz hayvanı, ağaçfıstığı ve jelatin içermemekle birlikte 1 kapsül 5 mg olup 5 mg melatonin, selüloz, bitki polisakkaridi (kapsül) ve magnezyum stearat (bitki takviyesi) içermektedir.

2.5. İki Boyutlu Hücre Kültürü ile Gerçekleştirilen Deneyler

2.5.1. İki boyutlu hücre kültürü

Çalışmada kullanılan K562 KML hücre soyu (ATCC® CCL-243™) Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu hücre bankasından (Manassas, VA, A.B.D) alındı

(Şekil 2.1). KML hücre soyu için besi ortamı olarak %1 antibiyotik-antimikotik solüsyon, 1.0 mM sodyum piruvat, 1.5 g/L sodyum bikarbonat, inaktive edilmiş %10 fetal sığır serumu (FBS) eklenmiş RPMI-1640 (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) kullanıldı. Hücreler bu besi ortamını içeren 25cm² ve 75cm²'lik flasklarda, sıcaklığı 37 °C ve iç ortamı %5 CO₂, %95 nem olan rutubetli inkübatör ortamına uyum sağlayıp çoğalması sağlandı [57].



Şekil 2.1: KML lösemi hücrelerinin hücre kaplarında çoğalma aşamaları (Orijinal büyütme x30)

2.5.2. Deney modeli

Deneyleerde tek hücre süspansiyonundan 3x10⁵ KML hücresi bütün zaman aralıkları (24 ve 72 saatler) için 3'er ml RPMI-1640 besiyeri içeren 3'er kuyucuğa ekildi ve inkübatör ortamında tutuldu. Bu aşamadan sonra, Gojiberry (GB) ve Melatonin (MLT) tek tek ve birlikte hücrelere uygulandı. Deney grupları şu şekilde belirlendi:

1. Kontrol grubu (Hiçbir uygulama yapılmamış grup)
2. GB grubu
3. MLT grubu
4. Kombinasyon grubu

Uygulamaların etkileri hücre çoğalması (toplam hücre sayısı), hücre canlılığı/programlı hücre ölümü/ölü hücre oranı ve hücre döngüsü faz oranları [Akan hücre ölçer ile Anneksin-V-Fluoresan isotiyosiyanat/propidyum iodid (Anneksin-V-FITC/PI) yöntemi] ile apoptotik (kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9, bax) ve anti-apoptotik/direnç proteinlerin seviyeleri (bcl-2) (ELIZA yöntemi) ile değerlendirildi. Kuyucuklu kültür kaplarında insertler aracılığı ile hücrelere uygulanmış GB ve MLT Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2: GB ve MLT uygulanmış KML kültürleri

2.5.3. Hücre çoğalma indeksi

Deneylerde 5×10^5 K562 hücresi bütün zaman aralıkları (24. ve 72. saatler) için 5'er ml RPMI-1640 medyumu içeren 3'er kuyucuğa ekildi ve inkübatör ortamında tutuldu. Hücre sayısı değişiklikleri propidyum iodid (PI) boyamasını baz alan ve içinde liziz tamponu, stabilizasyon tamponu ve nükleokasetler bulunan ticari bir kit (A starter kit; ChemoMetec A/S, Allerød, Denmark) kullanılarak otomatik hücre sayıcı ile belirlendi. 24. ve 72. saatler sonunda K562 hücresi santrifüj tekniğiyle toplandı. Hücreler liziz tamponu ve stabilizasyon tamponu ile 5-8 dakika muamele edilerek tek tek hale getirilip parçalandı. Parçalanmış hücreler PI kaplı nükleokasetlere yüklendi ve çekirdeklerinin PI boyanması sağlandı. Hücre sayma aracında 30-35 saniye içinde PI floresansı baz alınarak sayıldı, kite özel bir yazılım ile analiz edildi ve raporlandı [58].

2.5.4. Canlı, apoptotik ve ölü hücre oranları

Canlı, apoptotik ve ölü hücre oranlarının akan hücre ölçer ile tespiti için Anneksin-V-FITC ve PI ikili boyamasına dayalı kitin uygulama talimatları küçük değişiklikler yapılarak uygulandı. Deneylerde 3×10^5 K562 hücresi bütün zaman aralıkları (24. ve 72. saatler) için 3'er ml RPMI-1640 medyumu içeren 3'er kuyucuğa ekildi ve inkübatör ortamında tutuldu. 24. ve 72. saat sonunda hücreler toplandı, sayma kamerası ile sayıldı, PBS ile iki defa yıkandı ve apoptoz kitinde bulunan bağlama tamponu (0.01 M HEPES, 0.14 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2) eklenerek süspansiyon haline getirildi. Bağlama solüsyonu içindeki hücre süspansiyonuna (100 μ l bağlama solüsyonu içinde 1×10^5 hücre) 5 μ l

FITC-etiketli Anneksin V-FITC ve vital boya olan PI eklenerek oda ısısında karanlıkta 15 dakika bekletildi. Sonra Anneksin-V-FITC) ve PI ile verdiği floresans akan hücre ölçer ile ölçüldü. Sonuçlar CellQuest ve WinMDI adlı analiz programları ile değerlendirildi ve kontrol grubuna göre ilaçların ölü, canlı ve apoptotik hücre oranları üzerine etkileri saptandı [58].

2.5.5. Hücre döngüsü

Deneyleerde 3×10^5 K562 hücresi bütün zaman aralıkları (24. ve 72. saatler) için 3'er ml RPMI-1640 medyumunu içeren 3'er kuyucuğa ekildi ve inkübatör ortamında tutuldu. Deneyleer, tekrar 72 saat için gerçekleştirildi. Bu saatler sonunda hücreler toplandı ve toplanan hücreler kit içinde yer alan sodyum sitrat, sükröz ve dimetilsülfoksit içeren 1 ml tampon solüsyonu ile oda ısısında 5 dakika bekletildi 400xg'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki sıvı atıldı. Bu işlemden sonra hücre lizizi için 250 µl spermin tetrahidroklorid deterjan tamponu içinde yer alan tripsin ile 20 dakika oda ısısında bekletildi. Hücre parçalanmasını durdurmak ve RNA'yı parçalamak için üzerine 200 µl spermin tetrahidroklorid içeren sitrat stabilize edici tampon içinde tripsin inhibitörü ve ribonükleaz A ile oda ısısında 20 dakika bekletildi. Daha sonra 200 µl spermin tetrahidroklorid içeren sitrat stabilize edici tampon içinde PI ile 4°C'de karanlıkta 20 dakika bekletildi. En son aşamada 500 µl tampon solüsyonu eklendi ve DNA'ların PI ile verdiği floresans akan hücre ölçer cihazı ile ölçüldü. Sonuçlar, CellQuest adlı analiz programı ile değerlendirildi ve raporlandı [58].

2.6. Apoptotik ve Anti-Apoptotik (Direnc) Protein Seviyeleri Üzerine Etkileri

Protein Miktarının Biçinkromik Asit (BCA) Protein Tayin Yöntemi ile Saptanması

Örneklerin protein miktarlarının tayini için Biçinkromik Asit (BCA) Protein Miktar Tayin Yöntemi tercih edildi [3]. Bu yöntemde örnek çalışma ayıracı oranı 1:8 ve protein miktar çalışma aralığı 20-2000 µg/ml olarak belirlendi. Mikroplaka yönteminde 96 kuyucuklu mikroplaka kullanıldı. Standartları hazırlamak için sığır serum albumin (BSA) kullanıldı [63].

Bu çalışmada protein miktar çalışma aralığı 125-2000 µg/ml olarak belirlendi. Bu noktada mikropılaka kuyucuklarına her bir örnek ve standarttan 25 µL kondu. Çalışma solüsyonu, 50 kısım 0.1 M sodyum hidroksit içinde sodyum karbonat, sodyum bikarbonat, biçinkromik asit, sodyum tartarattan oluşan çalışma çözeltilisi A ve 1 kısım % 4 bakır sülfattan oluşan çalışma çözeltilisi B örnek ve standart sayısına göre karıştırılarak hazırlandı. Bu aşamadan sonra çok kanallı mikropipet kullanılarak her bir kuyucuğa 200 µl çalışma solüsyonu eklendi ve üzeri kapatıldı. Mikropılaka sallayıcıda 40 saniye karıştırıldı ve 37 °C’de 30 dakika tepkime oluşması için bekletildi. Daha sonra mikropılaka oda ısısına ulaşması (20-22 °C) için 10-15 dakika laboratuvar ortamında bekletildi. Örneklerin absorbans değerleri (A) 540 nm dalga boyunda okundu ve kaydedildi. Örneklerin protein miktarlarının BSA standartlarına göre hesaplanması amacıyla standart eğri grafiği oluşturuldu [68].

2.6.1. Kaspaz-3 seviyeleri

Bu protein seviyelerinin tespiti için kitin uygulama talimatları değişiklikler yaparak izlendi [5]. Kaspaz -3 seviyeleri, kaspaz-3 enzimi tarafından peptid substratı asetil-Asp-Glu-Val-Asp nitroanilidinin (Ac-DEVD-pNA) hidroliz edilmesi sonucunda açığa çıkan p-nitroanilin (pNA) kolorimetrik olarak saptanması esasına dayanır. 5 µl BCA ile protein konsantrasyonları belirlenmiş gruplara ait örnekler 96’lık mikropılakalara kondu. Sonra içinde 85 µl 1x konsantrasyonda 200 mM HEPES (pH:7.4), %1 CHAPS, 50 mM DTT, 20 mM EDTA bulunan deney tamponu kondu. Daha sonra 10 µl 2mM kaspaz-3 substratı (Ac-DEVD-pNA) kondu, 37 °C’de 120 dakika her 30 dakikada bir 1 dakika orbital sallayıcıda 500 rpmde çalkalanarak bekletildi. p-nitroanilinden 200 µM stok solüsyon kullanılarak 200 µM da dahil olmak üzere deney tamponu ile seyreltilerek 10 µM, 20 µM, 50 µM 100 µM konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı. Herbir örneğin konduğu mikropılakaya ayrıca 100 µl bu p-nitroanilin standartlarından kondu. Mikropılakalarda örneklerin absorbans değerleri 5 dakika içinde 405 nmde mikropılaka okuyucuda okundu ve kaydedildi bundan sonra Excel 2016’da çizilen p-nitroanilinden gelen kalibrasyon eğrileri denklemleri kullanılarak absorbanslar konsantrasyona (µmol) çevrildi [59].

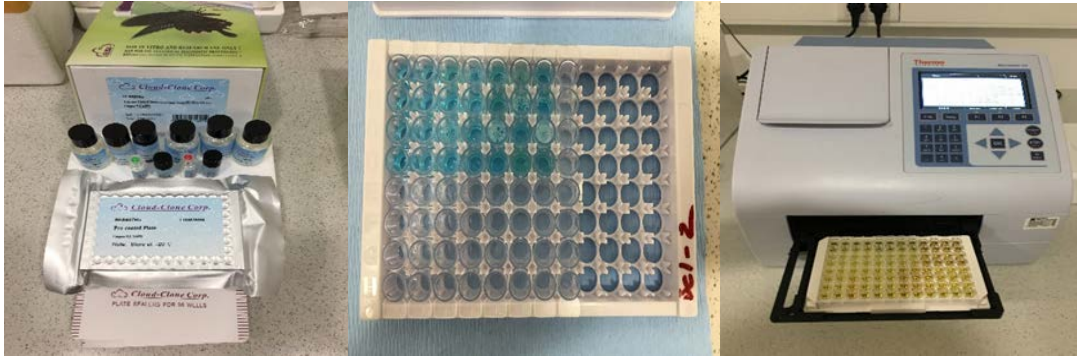
2.6.2. Kaspaz-8, Kaspaz-9, Bax ve Bcl-2 seviyeleri

Bu protein seviyelerinin tespiti için kitlerin uygulama talimatları küçük değişiklikler yapılarak uygulandı [5]. Buna göre protein standartları ve BCA ile protein konsantrasyonları belirlenmiş örnekler Kaspaz-8, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2, RIPK ve nf-kappaB kaplanmış olan 96'lık mikro plakalara 100 µl'de eklendi ve 90 dakika

37 °C'de 30 dakikada bir 1 dakika orbital sallayıcıda 500 rpmde çalkalanarak bekletildi. Standartlar Kaspaz-8 0-40 ng/ml (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0 ng/ml), Kaspaz-9 0-20 ng/ml (20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0 ng/ml), Bcl-2 0-100 ng/ml (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0 ng/ml) ve Bax 0-25ng/ml (25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0 ng/ml) olarak belirlendi [68].

Daha sonra örnekler uzaklaştırıldıktan sonra yıkama yapılmadan proteine özgü primer antikorun bulunduğu deteksiyon solüsyonu A 100 µl eklendi ve 60 dakika 37 °C'de 30 dakikada bir 1 dakika orbital sallayıcıda 500 rpmde çalkalanarak bekletildi. Bu aşamadan sonra mikroplakalar 4 defa 300 µl yıkama solüsyonu kullanılarak yıkandı. Sonra mikroplakalara primer antikora özgü sekonder antikor ve buna bağlı streptavidin bağlı yaban turpu peroksidazı (HRP) bulunan 100 µl deteksiyon solüsyonu B eklendi ve 40 dakika 37 °C'de 20 dakikada bir 1 dakika orbital sallayıcıda 500 rpmde çalkalanarak bekletildi [59].

Yıkama aşaması 5 defa tekrar edildi ve karanlıkta 90 µl 3,3',5,5;-tetrametillbenzidin (TMB) kromojen ilave edildi, 37 °C'de bekletildi ve 10-20 dakika içinde bazı kuyucuklarda reaksiyon pozitifliğini gösteren mavi renk oluşumu gözlemlendi. Bu kromojen üzerine reaksiyonu durdurmak için 50 µl durdurucu solüsyon eklendi ve rengin sarıya dönmesi gözlemlendi (Şekil 3). Mikroplakalarda örneklerin absorbans değerleri 3-5 dakika içinde 450 nmde mikrolaka okuyucuda okundu ve kaydedildi. Bundan sonra Excel 2016'da çizilen standart eğrilerden gelen denklemler kullanılarak absorbanslar konsantrasyona (ng/ml, pg/ml, µmol) çevrildi [63]. Çalışmada kullanılan Bcl-2 ELIZA kiti, 96 kuyucuklu protein kaplanmış mikro plakalarda kromojen konduktan sonra oluşan konsantrasyona göre değişimi ve kullanılan mikro plaka okuyucu cihaz Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



(a)

(b)

(c)

Şekil 2.3: ELIZA

(a) Bcl-2 ELIZA kiti, (b) Protein kaplanmış mikro plakalarda kromojen konduktan sonra konsantrasyona göre değişen mavi renk, (c) Mikro plaka okuyucu

2.6.3. İstatistiksel analiz

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilks testi ile değerlendirilmiştir. Tüm deneyler(n:6) 3 kez tekrarlandı ve elde edilen veriler ortalama \pm standart sapma (SD) olarak gösterildi. Test edilen maddelerin arasındaki farkın değerlendirilmesinde Anova testinden yararlanıldı. İstatistik değerlendirme açısından anlamlılık sınırı olarak $p < 0.05$ kabul edildi.

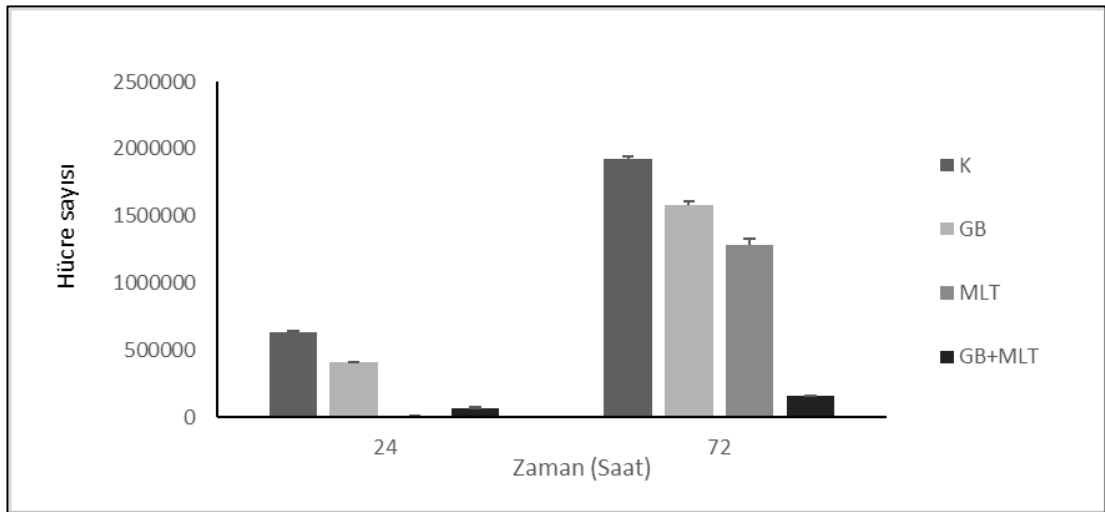
3. BULGULAR

3.1. Gojiberry Meyve Özütü Antioksidan Tayini (Fenolik Bileşikler ve Flavonoidler İçerik Tayini)

Fenolik bileşiklerin (Meyve ağırlığının her gramı için gallik asit ekivalanı (GAE) olarak) ve flavonoid (Meyve ağırlığının her gramı için kateşin ekivalanı (CAE) olarak) miktarları sırasıyla 3.35 ± 0.23 mg GAE/g ekstre ve 1.7 ± 0.18 mg CAE/g ekstre) olarak belirlenmiştir.

3.2. Hücre Çoğalma İndeksi

Farklı deneysel gruplarda 24 ve 72. saatlere ilişkin olarak saptanan ortalama hücre sayılarının değerlendirilmesi Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1: Hücre sayıları

Sonuçlar ortalama (n:18) \pm standart sapma (SD) olarak gösterildi. K, Kontrol; GB, Gojiberry; MLT, Melatonin; GB+MLT, Kombinasyon grubu

Şekil 3.1’de gösterilen K, Kontrol grubu; GB, Gojiberry; MLT, Melatonin; GB+MLT, Kombinasyon grubu. Grafiklerdeki sonuçlar ortalama \pm SD olarak gösterilmiştir.

Farklı deneysel gruplarda 24. ve 72. saatlere ilişkin olarak saptanan ortalama hücre sayılarının gruplar arası analizi sonucunda

- Deneysel gruba hücre sayıları, kontrol grubu hücre sayıları ile kıyaslandığında 24. saat hücre sayısı ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{GB} < 0.00001$, $P_{MLT} < 0.00000001$, $P_{GB+MLT} < 0.000001$).
- Deneysel gruba hücre sayıları, kontrol grubu hücre sayıları ile kıyaslandığında 72. saat hücre sayısı ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{GB} < 0.00001$, $P_{MLT} < 0.000001$, $P_{GB+MLT} < 0.000000001$).

24. saatte

- GB grubunda saptanan hücre sayısı ortalaması, MLT ve GB+MLT gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{MLT} < 0.0000001$, $P_{GB+MLT} < 0.00001$).
- MLT grubunda saptanan hücre sayısı ortalaması, bu saatteki en düşük ortalama olup, GB ve GB+MLT gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{GB} < 0.0000001$, $P_{GB+MLT} < 0.01$).
- GB+MLT grubunda saptanan hücre sayısı ortalaması bu saatteki düşük 2. ortalama olup GB grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük, MLT grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB} < 0.0000001$, $P_{MLT} < 0.01$).

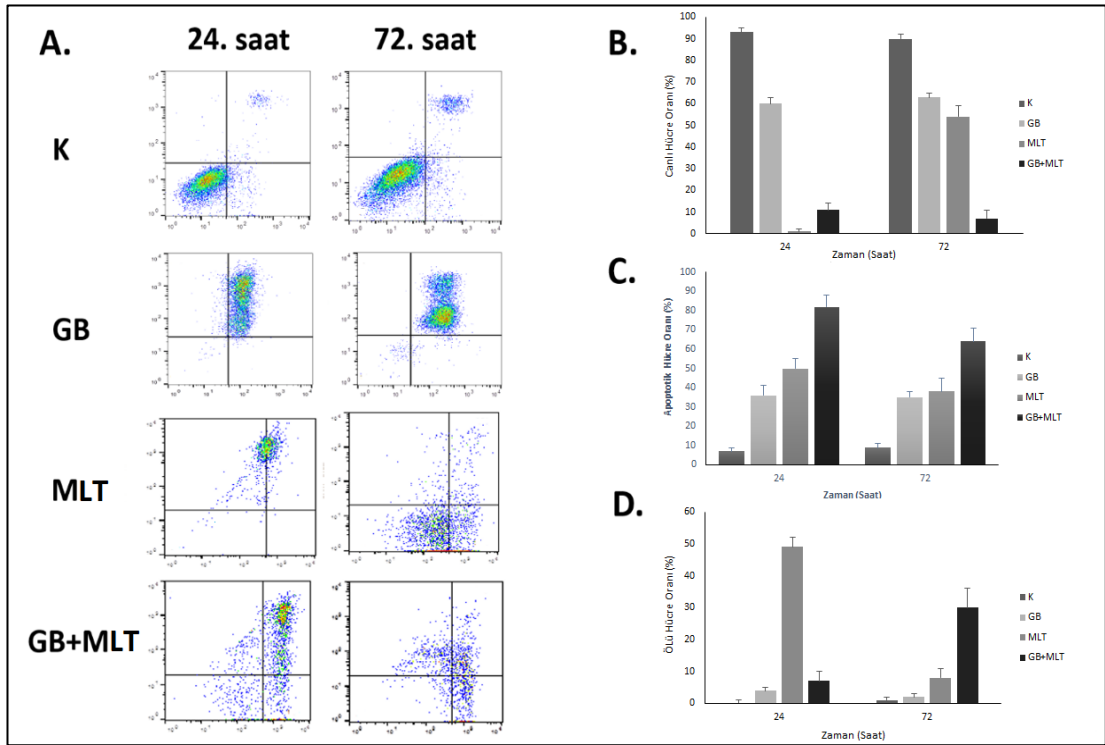
72. saatte

- GB grubunda saptanan hücre sayısı ortalaması, MLT ve GB+MLT gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{MLT} < 0.0001$, $P_{GB+MLT} < 0.0000001$).
- MLT grubunda saptanan hücre sayısı ortalaması bu saatteki düşük 2. ortalama olup GB grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük, MLT grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB} < 0.0001$, $P_{GB+MLT} < 0.000000001$).
- GB+MLT grubunda saptanan hücre sayısı ortalaması bu saatteki en düşük ortalama olup, GB ve MLT gruplarının ortalamalarından

istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{GB} < 0.0000001$, $P_{MLT} < 0.000000001$).

3.3. Canlı, Apoptotik ve Ölü Hücre Oranları

Akan hücre ölçer ile analiz sonucu farklı deneysel gruplarda saptanan 24 ve 72. saatlere ilişkin canlı, toplam apoptoz ve ölü lösemi hücre oranlarının değerlendirilmesi Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2: Canlı, Apoptotik ve Ölü Hücre Oranları

Şekil 3.2’de gösterilen: **A.** Akan hücre ölçer analizi sonucu farklı deneysel gruplarda saptanan 24 ve 72. saatlere ilişkin ortalama canlı, toplam apoptotik ve ölü lösemi hücre oranlarının kullanılan ticari kit esas alınarak paneller ile gösterimi: sol alt taraftaki bölümdeki yoğunluk noktaları canlı hücreleri (annexin V-; PI-), sağ alt taraftaki bölümdeki yoğunluk noktaları erken apoptotik hücreleri (annexin V+; PI-), sağ üst taraftaki bölümdeki yoğunluk noktaları geç apoptotik hücreleri (annexin V+; PI+) ve sol üst taraftaki bölümdeki yoğunluk noktaları ise ölü hücreleri göstermektedir; **B.** Farklı deneysel gruplarda saptanan 24 ve 72. saatlere ilişkin canlı lösemi hücre oranları grafiği; **C.** Farklı deneysel gruplarda saptanan 24 ve 72. saatlere ilişkin toplam apoptotik lösemi hücre oranları (erken apoptoz ve geç apoptoz

oranlarının toplamı) grafiği; **D.** Farklı deneysel gruplarda saptanan 24 ve 72. saatlere ilişkin ölü lösemi hücre oranları grafiği. **K**, Kontrol grubu; **GB**, Gojiberry; **MLT**, Melatonin; **GB+MLT**, Kombinasyon grubu. Grafiklerdeki sonuçlar ortalama±SD olarak gösterilmiştir.

3.3.1. Canlı hücre oranları

- Deneysel gruba canlı hücre oranları, kontrol grubu canlı hücre oranları ile kıyaslandığında 24. saat ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{GB} < 0.00001$, $P_{MLT} < 0.000000001$, $P_{GB+MLT} < 0.0000001$).
- Deneysel gruba canlı hücre oranları, kontrol grubu canlı hücre oranları ile kıyaslandığında 72. saat ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{GB} < 0.00001$, $P_{MLT} < 0.00001$, $P_{GB+MLT} < 0.00000001$).

24. saat

- GB grubunda saptanan canlı hücre oranı ortalaması, MLT ve GB+MLT gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{MLT} < 0.000000001$, $P_{GB+MLT} < 0.00000001$).
- MLT grubunda saptanan canlı hücre oranı ortalaması, bu saatteki en düşük ortalama olup, GB ve GB+MLT gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{GB} < 0.00000001$, $P_{GB+MLT} < 0.001$).
- GB+MLT grubunda saptanan canlı hücre oranı ortalaması, bu saatteki düşük 2. ortalama olup GB grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük, MLT grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB} < 0.000000001$, $P_{MLT} < 0.001$).

72. saat

- GB grubunda saptanan canlı hücre oranı ortalaması, MLT ve GB+MLT gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{MLT} < 0.05$, $P_{GB+MLT} < 0.0000001$).
- MLT grubunda saptanan canlı hücre oranı ortalaması, bu saatteki düşük 2. ortalama olup GB grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük, MLT grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB} < 0.05$, $P_{GB+MLT} < 0.0000001$).

- GB+MLT grubunda saptanan canlı hücre oranı ortalaması, bu saatteki en düşük ortalama olup, GB ve GB+MLT gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{GB} < 0.0000001$, $P_{MLT} < 0.0000001$).

3.3.2. Toplam apoptotik hücre oranları

- Deney grubu toplam apoptotik hücre oranları, kontrol grubu canlı hücre oranları ile kıyaslandığında 24. saat ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB} < 0.00001$, $P_{MLT} < 0.00001$, $P_{GB+MLT} < 0.00000001$).
- Deney grubu canlı hücre oranları, kontrol grubu canlı hücre oranları ile kıyaslandığında 72. saat ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB} < 0.00001$, $P_{MLT} < 0.00001$, $P_{GB+MLT} < 0.0000001$).

24. saat

- GB grubunda saptanan toplam apoptotik hücre oranı ortalaması en düşük ortalama olup MLT ve GB+MLT gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{MLT} < 0.01$, $P_{GB+MLT} < 0.0000001$).
- MLT grubunda saptanan toplam apoptotik hücre oranı ortalaması, bu saatteki düşük 2. ortalama olup GB grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek, GB+MLT grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{GB} < 0.01$, $P_{GB+MLT} < 0.00001$).
- GB+MLT grubunda saptanan toplam apoptotik hücre oranı ortalaması, bu saatteki en yüksek ortalama olup, GB ve MLT gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB} < 0.0000001$, $P_{MLT} < 0.00001$).

72. saat

- GB grubunda saptanan toplam apoptotik hücre oranı ortalaması en düşük ortalama olup MLT ve GB+MLT gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{MLT} < 0.05$, $P_{GB+MLT} < 0.00001$).

- MLT grubunda saptanan toplam apoptotik hücre oranı ortalaması, bu saatteki düşük 2. ortalama olup GB grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek, GB+MLT grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{GB}<0.05$, $P_{GB+MLT}<0.000001$).
- GB+MLT grubunda saptanan toplam apoptotik hücre oranı ortalaması, bu saatteki en yüksek ortalama olup, GB ve MLT gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB}<0.00001$, $P_{MLT}<0.05$).

3.3.3. Ölü hücre oranları

- Deney grubu ölü hücre oranları, kontrol grubu canlı hücre oranları ile kıyaslandığında 24. saat ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB}<0.05$, $P_{MLT}<0.0000000001$, $P_{GB+MLT}<0.0001$).
- Deney grubu ölü hücre oranları, kontrol grubu canlı hücre oranları ile kıyaslandığında 72. saat ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB}<0.05$, $P_{MLT}<0.01$, $P_{GB+MLT}<0.000001$).

24. saat

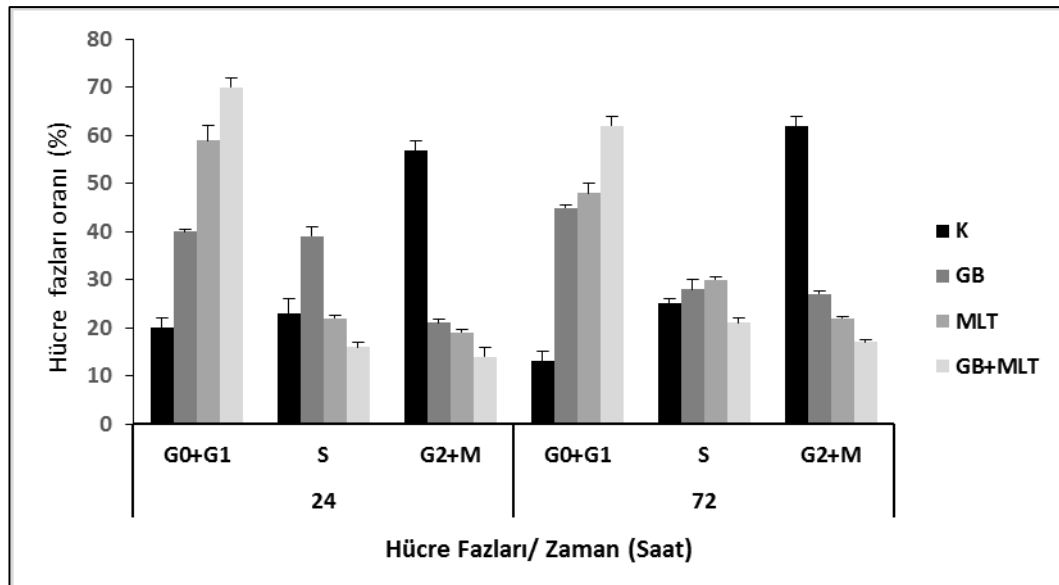
- GB grubunda saptanan ölü hücre oranı ortalaması en düşük ortalama olup MLT ve GB+MLT gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{MLT}<0.000000001$, $P_{GB+MLT}<0.05$).
- MLT grubunda saptanan ölü hücre oranı ortalaması, bu saatteki en yüksek ortalama olup GB ve GB+MLT grupları ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB}<0.000000001$, $P_{GB+MLT}<0.0000001$).
- GB+MLT grubunda saptanan ölü hücre oranı ortalaması, GB+MLT grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük, GB grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB}<0.05$, $P_{MLT}<0.0000001$).

72. saat

- GB grubunda saptanan ölü hücre oranı ortalaması, bu saatteki en düşük ortalama olup, GB ve GB+MLT gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{MLT} < 0.001$, $P_{GB+MLT} < 0.0000001$).
- MLT grubunda saptanan ölü hücre oranı ortalaması, bu saatteki 2. düşük ortalama olup, GB grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu, GB+MLT grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{GB} < 0.001$, $P_{GB+MLT} < 0.0000001$).
- GB+MLT grubunda saptanan ölü hücre oranı ortalaması, bu saatteki en yüksek ortalama olup GB ve MLT grupları ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB} < 0.001$, $P_{MLT} < 0.0000001$).

3.4. Hücre Döngüsü

Farklı deneysel gruplarda 24 ve 72. saatlere ilişkin olarak saptanan hücre döngüsü fazlarının değerlendirilmesi Şekil 3.3'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3: Hücre döngüsü oranları

Sonuçlar ortalama (n:18) \pm standart sapma (SD) olarak gösterildi. K, Kontrol; GB, Gojiberry; MLT, Melatonin; GB+MLT, Kombinasyon grubu

G0+G1 fazı oranı

Kontrol grubuna göre incelendiğinde, 24. saatte tüm grupların G0+G1 fazı oranını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığı saptandı ($P_{GB} < 0.000001$,

$P_{MLT} < 0.000001$, $P_{GB+MLT} < 0.0000001$). 72. saatte tüm grupların G0+G1 fazı oranını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığı saptandı ($P_{GB} < 0.000001$, $P_{MLT} < 0.000001$, $P_{GB+MLT} < 0.0000001$).

S fazı oranı

Kontrol grubuna göre incelendiğinde, 24. saatte MLT ve GB+MLT grubunun S fazı oranını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı, GB grubunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığı saptandı ($P_{GB} < 0.0000001$, $P_{MLT} < 0.05$, $P_{GB+MLT} < 0.000001$). 72. saatte, GB ve MLT gruplarının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığı, ancak kombinasyon grubunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde S fazı oranını azalttığı saptandı ($P_{GB} < 0.05$, $P_{MLT} < 0.05$, $P_{GB+MLT} < 0.001$).

G2+M oranı

Kontrol grubuna göre incelendiğinde, 24. saatte tüm grupların G2+M fazı oranını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı saptandı ($P_{GB} < 0.000001$, $P_{MLT} < 0.000001$, $P_{GB+MLT} < 0.0000001$). 72. saatte yine tüm grupların G2+M fazı oranını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı saptandı ($P_{GB} < 0.000001$, $P_{MLT} < 0.0000001$, $P_{GB+MLT} < 0.0000001$).

Farklı deneysel gruplarda 24. ve 72. saatlere ilişkin olarak saptanan hücre döngüsü fazları gruplararası analizi sonucunda

G0+G1 fazı oranı

24. saatte en yüksek G0+G1 fazı oranı kombinasyon grubunda ($P_{GB} < 0.00000001$, $P_{MLT} < 0.0000001$), en düşük oran ise GB grubunda saptandı ($P_{GB+MLT} < 0.00000001$, $P_{MLT} < 0.000001$). 72. saatte yine en yüksek oran ve en düşük oran sırasıyla kombinasyon grubu ($P_{GB} < 0.00000001$, $P_{MLT} < 0.00000001$) ve GB grubunda ($P_{GB+MLT} < 0.000001$, $P_{MLT} < 0.05$) saptandı.

S fazı oranı

24. saatte en yüksek S fazı oranı GB grubunda ($P_{GB+MLT} < 0.00000001$, $P_{MLT} < 0.0000001$), en düşük oran ise kombinasyon grubunda ($P_{GB} < 0.00000001$, $P_{MLT} < 0.000001$) saptandı. 72. saatte ise en yüksek S fazı oranı MLT grubunda

($P_{GB+MLT} < 0.0000001$, $P_{GB} < 0.05$), En düşük oran ise kombinasyon grubunda ($P_{GB} < 0.000001$, $P_{MLT} < 0.0000001$) saptandı.

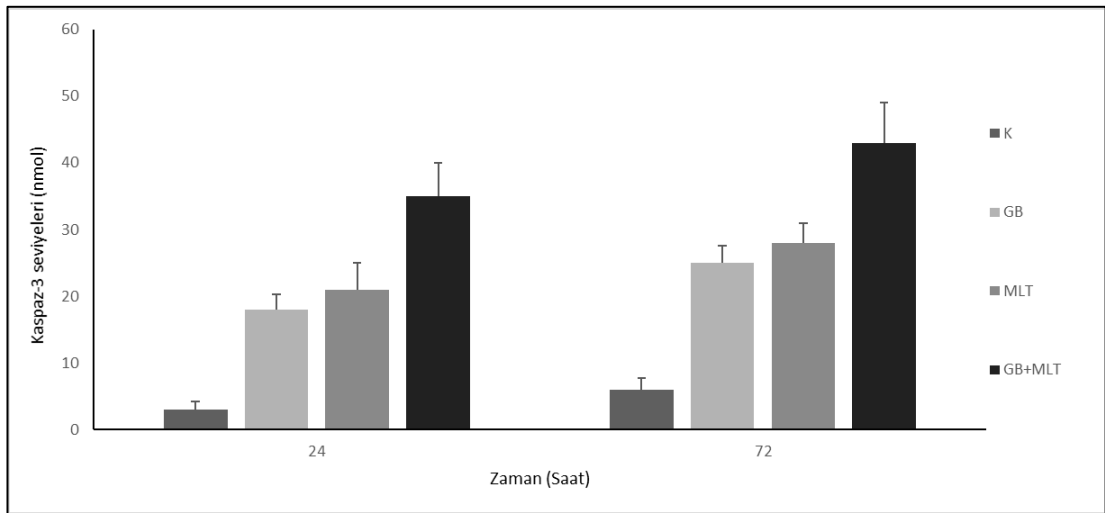
G2+M oranı

24. saatte en yüksek G2+M fazı oranı GB grubunda ($P_{GB+MLT} < 0.001$, $P_{MLT} < 0.05$), en düşük oran ise kombinasyon grubunda saptandı ($P_{GB} < 0.001$, $P_{MLT} < 0.01$). 72. saatte ise yine aynı sonuçlar tespit edildi. En yüksek G2+M fazı oranı GB grubunda ($P_{GB+MLT} < 0.00001$, $P_{MLT} < 0.01$), en düşük oran ise kombinasyon grubunda saptandı ($P_{GB} < 0.00001$, $P_{MLT} < 0.05$).

3.5. Apoptotik, Nekroapoptotik ve Antiapoptotik (Direnç) Protein Seviyeleri

3.5.1. Kaspaz-3 seviyeleri

Farklı deneysel gruplarda 24 ve 72. saatlere ilişkin olarak saptanan Kaspaz-3 düzeylerinin değerlendirilmesi Şekil 3.4'te gösterilmiştir.



Şekil 3.4: Kaspaz-3 seviyeleri

Sonuçlar ortalama (n:18) \pm standart sapma (SD) olarak gösterildi. K, Kontrol; GB, Gojiberry; MLT, Melatonin; GB+MLT, Kombinasyon grubu

- Deneysel grubu kaspaz-3 seviyeleri, kontrol grubu kaspaz-3 seviyeleri ile kıyaslandığında 24. saat kaspaz-3 seviyeleri ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB} < 0.00001$, $P_{MLT} < 0.000001$, $P_{GB+MLT} < 0.000000001$).
- Deneysel grubu kaspaz-3 seviyeleri, kontrol grubu kaspaz-3 seviyeleri ile kıyaslandığında 72 saat kaspaz-3 seviyeleri ortalamaları istatistiksel

olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB} < 0.000001$,
 $P_{MLT} < 0.000001$,
 $P_{GB+MLT} < 0.000000001$).

Farklı deneysel gruplarda 24. ve 72. saatlere ilişkin olarak saptanan Kaspaz-3 düzeyi gruplararası analizi sonucunda

24. saat

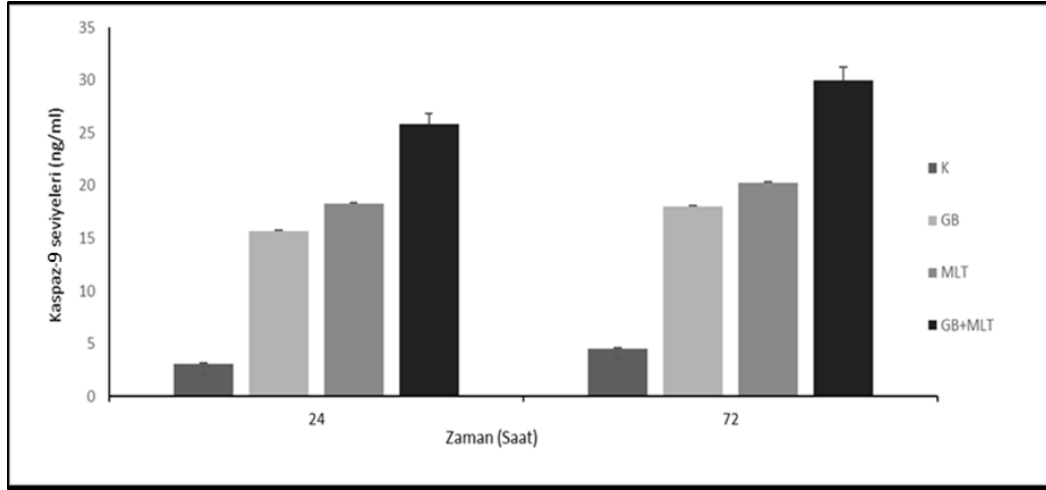
- GB grubunda saptanan kaspaz-3 seviyeleri ortalaması en düşük ortalama olup MLT ve GB+MLT gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{MLT} < 0.001$, $P_{GB+MLT} < 0.0000001$).
- MLT grubunda saptanan kaspaz-3 seviyeleri ortalaması, bu saatteki 2. düşük ortalama olup, GB grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu, GB+MLT grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{GB} < 0.001$, $P_{GB+MLT} < 0.000001$).
- GB+MLT grubunda saptanan kaspaz-3 seviyeleri ortalaması, bu saatteki en yüksek ortalama olup GB ve MLT grupları ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB} < 0.0000001$, $P_{MLT} < 0.000001$).

72. saat

- GB grubunda saptanan kaspaz-3 seviyeleri ortalaması en düşük ortalama olup MLT ve GB+MLT gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{MLT} < 0.05$, $P_{GB+MLT} < 0.00001$).
- MLT grubunda saptanan kaspaz-3 seviyeleri ortalaması, bu saatteki 2. düşük ortalama olup, GB grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu, GB+MLT grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{GB} < 0.05$, $P_{GB+MLT} < 0.00001$).
- GB+MLT grubunda saptanan kaspaz-3 seviyeleri ortalaması, bu saatteki en yüksek ortalama olup GB ve MLT grupları ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB} < 0.00001$, $P_{MLT} < 0.00001$).

3.5.2. Kaspaz-9 seviyeleri

Farklı deneysel gruplarda 24 ve 72. saatlere ilişkin olarak saptanan Kaspaz-9 düzeylerinin değerlendirilmesi Şekil 3.5’de gösterildi.



Şekil 3.5: Kaspaz-9 seviyeleri

Sonuçlar ortalama (n:18) ± standart sapma (SD) olarak gösterildi. K, Kontrol; GB, Gojiberry; MLT, Melatonin; GB+MLT, Kombinasyon grubu

- Deneysel grubu kaspaz-9 seviyeleri, kontrol grubu kaspaz-9 seviyeleri ile kıyaslandığında 24. saat kaspaz-9 seviyeleri ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB} < 0.000001$, $P_{MLT} < 0.000001$, $P_{GB+MLT} < 0.0000000001$).
- Deneysel grubu kaspaz-9 seviyeleri, kontrol grubu kaspaz-9 seviyeleri ile kıyaslandığında 72. saat kaspaz-9 seviyeleri ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB} < 0.000001$, $P_{MLT} < 0.000001$, $P_{GB+MLT} < 0.0000000001$).

Farklı deneysel gruplarda 24. ve 72. saatlere ilişkin olarak saptanan Kaspaz-8 düzeyi gruplararası analizi sonucunda

24. saat

- GB grubunda saptanan kaspaz-9 seviyeleri ortalaması en düşük ortalama olup MLT ve GB+MLT gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{MLT} < 0.05$, $P_{GB+MLT} < 0.0000001$).

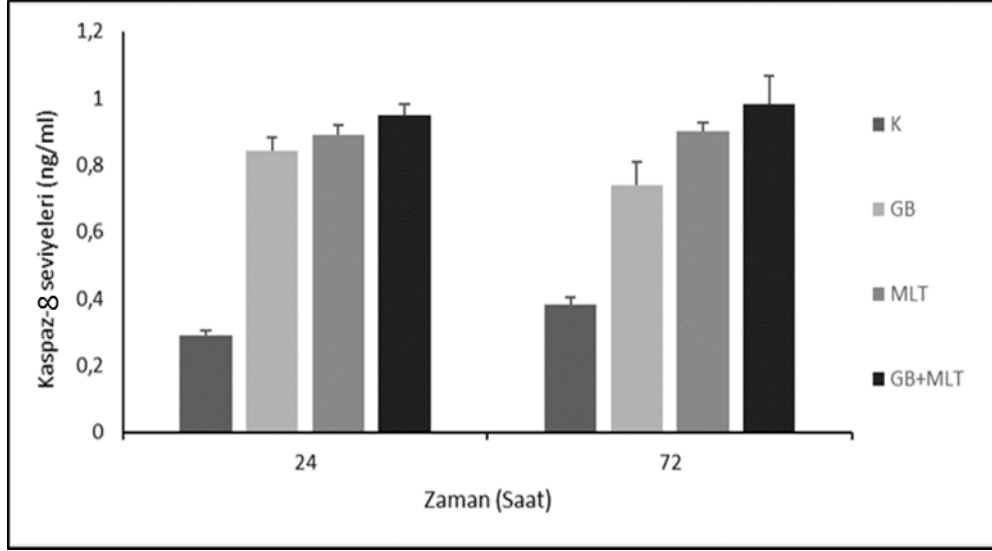
- MLT grubunda saptanan kaspaz-9 seviyeleri ortalaması, bu saatteki 2. düşük ortalama olup, GB grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu, GB+MLT grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{GB}<0.05$, $P_{GB+MLT}<0.000001$).
- GB+MLT grubunda saptanan kaspaz-9 seviyeleri ortalaması, bu saatteki en yüksek ortalama olup GB ve MLT grupları ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB}<0.0000001$, $P_{MLT}<0.000001$).

72. saat

- GB grubunda saptanan kaspaz-9 seviyeleri ortalaması en düşük ortalama olup MLT ve GB+MLT gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{MLT}<0.01$, $P_{GB+MLT}<0.00001$).
- MLT grubunda saptanan kaspaz-9 seviyeleri ortalaması, bu saatteki 2. düşük ortalama olup, GB grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu, GB+MLT grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{GB}<0.01$, $P_{GB+MLT}<0.00001$).
- GB+MLT grubunda saptanan kaspaz-9 seviyeleri ortalaması, bu saatteki en yüksek ortalama olup GB ve MLT grupları ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB}<0.00001$, $P_{MLT}<0.00001$).

3.5.3. Kaspaz-8 seviyeleri

Farklı deneysel gruplarda 24 ve 72. saatlere ilişkin olarak saptanan Kaspaz-8 düzeylerinin değerlendirilmesi Şekil 3.6'da gösterilmiştir.



Şekil 3.6: Kaspaz-8 seviyeleri

Sonuçlar ortalama (n:18) ± standart sapma (SD) olarak gösterildi. K,Kontrol; GB, Gojiberry; MLT, Melatonin; GB+MLT, Kombinasyon grubu

- Deneysel gruba kaspaz-8 seviyeleri, kontrol grubu kaspaz-8 seviyeleri ile kıyaslandığında 24. saat kaspaz-8 seviyeleri ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB} < 0.0000001$, $P_{MLT} < 0.0000001$, $P_{GB+MLT} < 0.0000001$).
- Deneysel gruba kaspaz-8 seviyeleri, kontrol grubu kaspaz-8 seviyeleri ile kıyaslandığında 72. saat kaspaz-8 seviyeleri ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB} < 0.0001$, $P_{MLT} < 0.00001$, $P_{GB+MLT} < 0.000001$).

Farklı deneysel gruplarda 24. ve 72. saatlere ilişkin olarak saptanan Kaspaz-8 düzeyi gruplararası analizi sonucunda

24. saat

- GB grubunda saptanan kaspaz-8 seviyeleri ortalaması en düşük ortalama olup MLT ve GB+MLT gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{MLT} < 0.05$, $P_{GB+MLT} < 0.01$).
- MLT grubunda saptanan kaspaz-8 seviyeleri ortalaması, bu saatteki 2. düşük ortalama olup, GB grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu, GB+MLT grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{GB} < 0.05$, $P_{GB+MLT} < 0.05$).

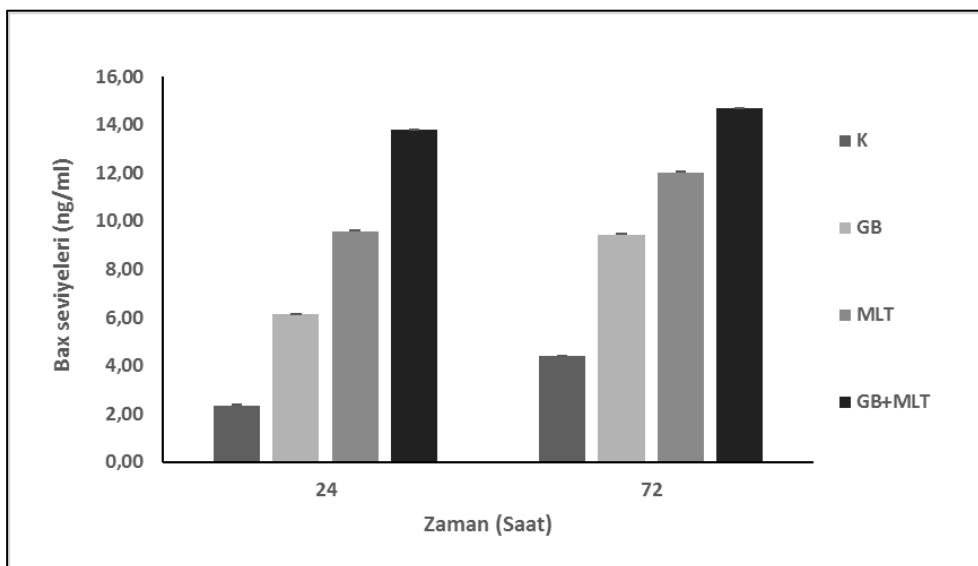
- GB+MLT grubunda saptanan kaspaz-8 seviyeleri ortalaması, bu saatteki en yüksek ortalama olup GB ve MLT grupları ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB} < 0.01$, $P_{MLT} < 0.05$).

72. saat

- GB grubunda saptanan kaspaz-8 seviyeleri ortalaması en düşük ortalama olup MLT ve GB+MLT gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{MLT} < 0.0001$, $P_{GB+MLT} < 0.00001$).
- MLT grubunda saptanan kaspaz-8 seviyeleri ortalaması, bu saatteki 2. düşük ortalama olup, GB grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu, GB+MLT grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{GB} < 0.0001$, $P_{GB+MLT} < 0.05$).
- GB+MLT grubunda saptanan kaspaz-8 seviyeleri ortalaması, bu saatteki en yüksek ortalama olup GB ve MLT grupları ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB} < 0.00001$, $P_{MLT} < 0.05$).

3.5.4. Bax seviyeleri

Farklı deneysel gruplarda 24 ve 72. saatlere ilişkin olarak saptanan Bax düzeylerinin değerlendirilmesi Şekil 3.7’de gösterilmiştir.



Şekil 3.7: Bax seviyeleri

Sonuçlar ortalama (n:18) \pm standart sapma (SD) olarak gösterildi. K,Kontrol; GB, Gojiberry; MLT, Melatonin; GB+MLT, Kombinasyon grubu

Farklı deneysel gruplarda 24. ve 72. saatlere ilişkin olarak saptanan Bax düzeyi gruplararası analizi sonucunda

- Deneysel gruba bax seviyeleri, kontrol grubu bax seviyeleri ile kıyaslandığında 24. saat Bax seviyeleri ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB} < 0.0001$, $P_{MLT} < 0.0000001$, $P_{GB+MLT} < 0.0000000001$).
- Deneysel gruba bax seviyeleri, kontrol grubu Bax seviyeleri ile kıyaslandığında 72. saat Bax seviyeleri ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB} < 0.00001$, $P_{MLT} < 0.000001$, $P_{GB+MLT} < 0.0000001$).

24. saat

- GB grubunda saptanan Bax seviyeleri ortalaması en düşük ortalama olup MLT ve GB+MLT gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{MLT} < 0.001$, $P_{GB+MLT} < 0.000000001$).
- MLT grubunda saptanan Bax seviyeleri ortalaması, bu saatteki 2. düşük ortalama olup, GB grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu, GB+MLT grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{GB} < 0.001$, $P_{GB+MLT} < 0.00001$).
- GB+MLT grubunda saptanan Bax seviyeleri ortalaması, bu saatteki en yüksek ortalama olup GB ve MLT grupları ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB} < 0.000000001$, $P_{MLT} < 0.00001$).

72. saat

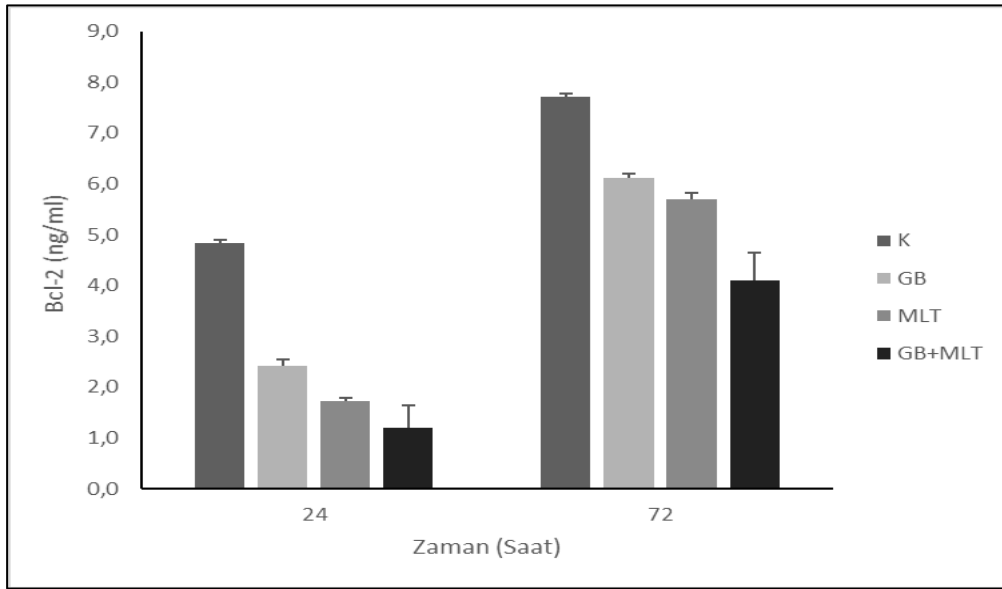
- GB grubunda saptanan Bax seviyeleri ortalaması en düşük ortalama olup MLT ve GB+MLT gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{MLT} < 0.0001$, $P_{GB+MLT} < 0.000001$).
- MLT grubunda saptanan Bax seviyeleri ortalaması, bu saatteki 2. düşük ortalama olup, GB grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu, GB+MLT grubu ortalamasından istatistiksel

olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{GB} < 0.0001$, $P_{GB+MLT} < 0.000001$).

- GB+MLT grubunda saptanan Bax seviyeleri ortalaması, bu saatteki en yüksek ortalama olup GB ve MLT grupları ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB} < 0.000001$, $P_{GB+MLT} < 0.000001$).

3.5.5. Bcl-2 seviyeleri

Farklı deneysel gruplarda 24 ve 72. saatlere ilişkin olarak saptanan Bcl-2 düzeylerinin değerlendirilmesi Şekil 3.8’de gösterilmiştir.



Şekil 3.8: Bcl-2 seviyeleri

Sonuçlar ortalama (n:18) ± standart sapma (SD) olarak gösterildi. K, Kontrol; GB, Gojiberry; MLT, Melatonin; GB+MLT, Kombinasyon grubu

- Deneysel grubun Bcl-2 seviyeleri, kontrol grubunun Bcl-2 seviyeleri ile karşılaştırıldığında 24. saat Bcl-2 seviyeleri ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{GB} < 0.00001$, $P_{MLT} < 0.000001$, $P_{GB+MLT} < 0.0000001$).
- Deneysel grubun Bcl-2 seviyeleri, kontrol grubunun Bcl-2 seviyeleri ile karşılaştırıldığında 72. saat Bcl-2 seviyeleri ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{GB} < 0.0001$, $P_{MLT} < 0.00001$, $P_{GB+MLT} < 0.00000001$).

Farklı deneysel gruplarda 24. ve 72. saatlere ilişkin olarak saptanan Bcl-2 düzeyi gruplararası analizi sonucunda

24. saat

- GB grubunda saptanan Bcl-2 seviyeleri ortalaması en yüksek ortalama olup MLT ve GB+MLT gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{MLT}<0.01$, $P_{GB+MLT}<0.00001$).
- MLT grubunda saptanan Bcl-2 seviyeleri ortalaması, bu saatteki 2. yüksek ortalama olup, GB grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu, GB+MLT grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB}<0.01$, $P_{GB+MLT}<0.00001$).
- GB+MLT grubunda saptanan Bcl-2 seviyeleri ortalaması, bu saatteki en düşük ortalama olup GB ve MLT grupları ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{GB}<0.00001$, $P_{MLT}<0.00001$).

72. saat

- GB grubunda saptanan Bcl-2 seviyeleri ortalaması en yüksek ortalama olup MLT ve GB+MLT gruplarının ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{MLT}<0.05$, $P_{GB+MLT}<0.000001$).
- MLT grubunda saptanan Bcl-2 seviyeleri ortalaması, bu saatteki 2. yüksek ortalama olup, GB grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu, GB+MLT grubu ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($P_{GB}<0.05$, $P_{GB+MLT}<0.00000001$).
- GB+MLT grubunda saptanan Bcl-2 seviyeleri ortalaması, bu saatteki en düşük ortalama olup GB ve MLT grupları ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($P_{GB}<0.05$, $P_{MLT}<0.00000001$).

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda GB'nin ve MLT'nin tek başına ve birlikte kullanımı ile KML hücreleri üzerine etkisini araştırıldı. KML hücrelerinin çoğalması üzerine özellikle de kullanılan K562 hücresi üzerine kısıtlı etki ve/veya etkisiz olduğu gösterilen MLT'nin yine diğer lösemi tiplerinde inhibisyon etkisi olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [30,29]. Rubio ve ark. MLT'nin insan AML hücreleri olan HL-60 hücrelerinin büyümesini, G1 hücre fazından S fazına geçişi engelleyerek ve birincil olarak Bax/Bcl-2 ekspresyonunu düzenleyerek yani Bax seviyelerini artırıp Bcl-2 seviyelerini azaltarak iç (mitokondrial) apoptotik yolu tetikleyerek durdurduğunu göstermiştir [20]. Rana ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise 24 CLL hastasında MLT seviyelerine bakılmış ve sağlıklı bireylerle kıyaslandığında bu hastalarda MLT seviyelerinin belirgin olarak azaldığı saptanmıştır [23]. MLT, GB'ye göre K562 hücre sayısını ve hücre canlılığını daha fazla azaltmıştır.

Buna göre herhangi bir yayın veya çalışma olmayan GB'nin KML hücrelerine etkisi inhibisyon etki olarak değerlendirildi. Gan ve arkadaşları GBP) çeşitli konsantrasyonlarda (20, 100, 500, 1000 mg/L) AML hücreleri olan HL-60 hücrelerinde denemiş ve hücre büyümesini doza dayalı olarak ve zar akışkanlığını azaltarak durdurduğunu saptanmışlardır [4]. Huang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada total GB flavonoidlerinin (tGBF) fare lenfositik lösemi hücreleri olan L1210 hücrelerinde ısı çıkışına etkileri araştırılmış ve TF'nin ısı çıkışını engellediği saptanmıştır [11]. Zhu ve ark. tarafından insan servikal karsinoma hücrelerinde (HeLa) GBP etkisini araştıran çalışmada GB'nin iç apoptoz yolağı üzerinden etkisini gösterdiği saptanmıştır [10]. Bu çalışmaya ek olarak, Luo ve arkadaşlarının yine GBP'yi PC-3 ve DU-145 prostat kanser hücrelerine denediği bir çalışmada sırasıyla % 42 ve % 35 olmak üzere yüksek apoptotik oranlar saptanmıştır ve bunu Bcl-2/Bax oranlarının düzenlenmesi üzerinden iç apoptotik yolağı aktifleyerek oluşturduğu görülmüştür [64]. Ceccarini ve ark. GB fenolik bileşenlerinin oksidatif stres,

çoğalma, apoptoz ve kanser gen ekspresyonlarını düzenlediğini HepG2 hücrelerinde düzenlediğini göstermiştir [6].

Çalışmamızda hücre sayısında ve hücre canlılığında en düşük azalma ile bu verilere uyumlu olarak apoptotik ve ölü hücre oranları ile kaspaz-3, kaspaz-8 ve bax seviyelerinde en düşük artış GB grubunda saptandı. Özellikle akan hücre ölçerden elde edilen apoptotik hücre sonuçları ile kaspaz-9 seviyeleri üzerinden kaspaz-3 aktivasyonu olması GB'nin etkisinin iç (mitokondriyal) apoptotik yolak üzerinden gerçekleştiğini bize göstermiştir. Apoptoz inhibisyonu yapan direnç protein Bcl-2 seviyelerinde en düşük azalma GB grubunda saptandı. Çalışmamızda en düşük G0/G1 tutulumu ile diğer fazlarda azalma da yine GB grubunda görüldü. Bu veriler, önceki yapılan çalışmalar ile uyumlu olarak GB'nin KML üzerindeki antiproliferatif etkisinin iç apoptoz yolağının aktivasyonu ve hücre döngüsü tutulumu ile gerçekleştiğini göstermektedir. GB KML hücrelerinde bir çoğalmaya neden olmamış, inhibisyon yapmış ancak bu inhibisyonda diğer ajanlar kadar da etkili olmamıştır.

Chen ve ark. yaptığı çalışmada GBP'lerin IF- α 2b ile birlikte mürin Renka böbrek karsinoma hücre soyuna in vitro ve in vivo uygulanması sonucunda sinergistik immunoterapotik etki görüldü [65]. Bu hücre sayısında belirgin azalma, hücre büyümesini durdurma ve apoptozu indükleme sağlayan bu etkinin sinergistik olarak siklin D1, c-Myc ve bcl-2 seviyelerini azaltma ve bax seviyelerini artırma yolu ile gerçekleştiği de aynı çalışmada gösterildi [65]. Xin ve ark. GB'nin kalbi doksorobisin (DXR) toksisitesinden DXR-kaynaklı oksidatif stresden engelleyerek gerçekleştirdiğini gösterdi ve GB'nin DXR ile birlikte kullanılabilceği sonucuna vardı [66]. Sitokinler ya da antineoplastik ajanlar ile başarılı kombinasyon etkilerinin yanısıra, Lu ve ark. yaptığı çalışmada GBP'lerin Lewis akciğer kanseri transplante edilen C57 BL fare modelinde radyosensitizan etki gösterdiği ancak tek başına GBP'nin tümörde bir gerileme yapmadığı görüldü [8]. Gao ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada GBP'lerin PC12 hücrelerinde 6-hidroksidopaminin olduğu apoptozu engellediği ve koruyucu etki yaptığı saptandı [63].

Lösemi hücrelerinde yapılan çalışmalarda MLT'nin yaygın kullanılan antineoplastik ajanlar ile birlikte kullanımında da genelde sinerjistik etki saptanmıştır [22-28]. KOH tarafından yapılan çalışmada da MLT'nin

puromisinin kaspaz-3 ve AMPK aktivasyonu ile HL-60 hücrelerinde oluşturduğu apoptoza karşı sensitizasyonu artırdığı gösterildi [14]. Yamanishi ve ark. MLT ile yaptığı çalışmada klofarabine dirençli NALM6/P (İnsan B hücresi lenfoblastik lösemisinin ana hücre dizisi) ve SKW3/P (İnsan T hücresi lenfoblastik lösemisinin ana hücre dizisi) hücrelerine MLT uygulanmış, MLT'nin klofarabine dirençli hücrelerde klofarabin sitotoksitesini artıran asetilasyon mekanizması üzerinden artırdığı görülmüştür [26]. Zhelev ve ark. kanser ilaçları olan everolimus ve barasertibi MLT ile birlikte kullanmış lösemi lenfositlerini öldürmede apoptotik yolu artırıp ROT'u azaltarak sağlıklı lenfositlere zarar vermeden sinerjistik etki yakalamayı başarmıştır. Aynı çalışmada, doksorubisin ile de MLT kullanılmış apoptoz baskılanması, düşük ROT ve protein-karbonil seviyeleri ile birlikte aditif etki görülmüştür [27]. Todisco MLT'i siklofosfamid, somatostatin, bromokriptin, retinoidler ve ACTH ile birlikte 4 tane daha önce tedavi edilmemiş progesterin seviye I Rai CCL hastalarına uygulamış, bunun sonucunda 2 ay sonunda toksisite görülmeden kısmi bir gerileme saptanmış ancak kanser tekrar oluşumu görülmeden sağkalıma ulaşamamışlardır (125, 121, 73 ve 21 ay) [68]. Kemoterapik tedaviler dışında da sinerjistik etki gösterimi Quintana ve ark. tarafından gösterilmiştir. Yaptıkları çalışmaya göre MLT'nin hipertermi kaynaklı apoptotik yanıtı hücre tipine bağlı olarak düzenlediğini saptamışlardır. MLT'nin HL-60 AML hücrelerinde çeşitli kaspazlarda (kaspaz-2,3,8,9) aktivasyonuna ve mitokondriden sitokrom C salınımına neden olmuş, K562 KML ve MOLT-3 hücrelerinde ise bu etkiyi yaratmamıştır [28].

Çalışmamızda kombinasyon grubundan sonra hücre sayısında ve hücre canlılığında en yüksek 2. azalma ile bu verilere uyumlu olarak apoptotik ve ölü hücre oranları ile kaspaz-3, kaspaz-9 ve bax seviyelerinde en yüksek 2. artış MLT grubunda saptandı. Özellikle akan hücre ölçerden elde edilen apoptotik hücre sonuçları ile ELIZA testi ile saptanan kaspaz-9 seviyeleri üzerinden kaspaz-3 aktivasyonu olması MLT'nin etkisinin iç (mitokondriyal) apoptotik yolak üzerinden gerçekleştiğini bize göstermiştir. Çalışmamızda Bcl-2 seviyelerinde 2. en yüksek azalma MLT grubunda saptanmıştır. Çalışmamızda 2. en yüksek G0/G1 tutulumu ve diğer fazlarda azalma da yine MLT grubunda görüldü. Bu veriler, önceki yapılan çalışmalar ile uyumlu olarak MLT'nin KML

üzerindeki antiproliferatif etkisinin iç apoptoz yolağının aktivasyonu ve hücre döngüsü tutulumu ile gerçekleştiğini göstermektedir. Çalışmamızda, MLT KML hücre sayısı azalmasında tek uygulanan gruplar arasında en etkili grup olmasına rağmen bu etkisi kombinasyon grubundan yüksek bulunmamıştır.

Birçok çalışma, MLT'nin reseptöre bağlı ve reseptörden bağımsız mekanizmalar ile onkostatik etkilere neden olduğunu gösterdi [17]. MTNR1A tarafından kodlanan MT1 reseptörü ve MTNR1B tarafından kodlanan MT2 reseptörü G-proteine bağlı reseptör (GPCR) grubu içerisinde yer aldığı ve MLT'nin alt sinyal yolağını düzenlediği geçmiş çalışmalarda gösterildi [69, 25]. Bu reseptörlerin AC'nin ve siklik adenzin monofosfatın (cAMP) inhibisyonunda etkisi olduğu bunun da linoleik asidin hücreye alınmasında azalmaya neden olduğu saptandı. MLT'nin antiproliferatif etkisinin linoleik asidin hücre içerisine alınmasının engellenmesi ile gerçekleştiği görüldü [18-19]. GB'nin linoleik asit içeriğinin yüksek olması ve MLT'nin ise linoleik asit inhibisyonu üzerinden etkisini gerçekleştiriyor olması birlikte kullanımının antagonist etki gösterebileceği düşüncesi üzerine yoğunlaşmamızı sağladı. Ancak çalışmamızda K562 KML hücrelerinde yaptığımız kombinasyon sonucunda iç apoptotik yolak üzerinden sinerjistik etki gösterdiğini saptadık.

MLT'nin fitoterapik bir ajanla sinerjistik etki gösterdiği ilk defa yaptığımız bu çalışmada gösterilmiştir. Çalışmamızda en yüksek hücre sayısında ve hücre canlılığında azalma ile bu verilere uyumlu olarak apoptotik ve ölü hücre oranları ile kaspaz-3, kaspaz-9 ve bax seviyelerinde en yüksek artış kombinasyon grubunda yer aldı. Özellikle akan hücre ölçerden elde edilen apoptotik hücre sonuçları ile ELIZA üzerinden kaspaz-9 seviyeleri üzerinden kaspaz-3 aktivasyonu olması bu sinerjistik etkinin iç apoptotik yolak üzerinden gerçekleştiğini bize göstermiştir. Bcl-2 proteinindeki en yüksek azalma yine kombinasyon grubunda saptandı. Çalışmamızda en yüksek G0/G1 tutulumu ve diğer fazlarda azalma da yine kombinasyon grubu görüldü. Bu veriler, kombinasyon grubunun KML üzerindeki antiproliferatif etkisinin iç apoptoz yolağının aktivasyonu ve hücre döngüsü tutulumu ile gerçekleştiğini kanıtlamaktadır.

Sonuç olarak, GB'nin tek başına ve MLT ile birlikte KML özellikle de K562 hücre soyu üzerine inhibisyon etkisi olduğu ve etkilerin iç (mitokondriyal)

apoptotik yolak üzerinden gerekleŖtiđine dair mekanizma ilk defa alıŖmamızda gösterildi. alıŖmamızda oklu olarak kısırlık, kanser özellikle de KML kanser tipi ya da uyku bozukluğu gibi hastalıklara sahip bir kiŖinin, bu ajanların birarada kullanmasının bir risk oluŖturmayacađı aksine tedavi baŖarısını artırabileceğini gstermiŖtir. Örneğin, kanser olan bir kiŖide görülen kısırlık, depresyon veya uyku bozukluğu hem tedavi sırasında hem de tedavi sonrası bu ajanlar birlikte kullanılarak güvenle tedavi edilebilir. alıŖmamız in vitro olarak yapıldığı iin in vivo ve klinik alıŖmalar ile sonuların ayrıca doğrulanması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] **Kang, Z.J., Liu, Y.F. L.Z. Xu, Z.J. Long, D. Huang, Y. Yang, B. Liu, J.X. Feng, Y.J. Pan, J.S. Yan, Q. Liu,** (2016).“The Philadelphia chromosome in leukemogenesis”, Chin J Cancer., vol. 35, pp. 48.
- [2] **S.S. Yi, E. Hwang, H.K. Baek, T.H. Kim, H.H. Lee, H.S. Jun, S.J Kim,** (2015) “Application of Bioactive Natural Materials-based Products on Five Women's Diseases.” J Menopausal Med., vol. 21, pp.121-5.
- [3] **N.P. Seeram,** (2008) “Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease.”, J Agric Food Chem., vol.56, pp.627-9.
- [4] **Gan L., Wang J., Zhang S.,** (2001) “Inhibition the growth of human leukemia cells by Lycium barbarum polysaccharide.”, Wei Sheng Yan Jiu., vol.30, pp.333-5.
- [5] **Wang Q., Li H., Sun Z., Dong L., Gao L., Liu C., Wang X.,** (2016) “Kukoamine A inhibits human glioblastoma cell growth and migration through apoptosis induction and epithelial-mesenchymal transition attenuation.”, Sci Rep., vol.6, pp.36543.
- [6] **Ceccarini M.R., 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.
- [7] **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, pp.121-6.
- [8] **Lu C.X., Cheng B.Q.,** (1991) “Radiosensitizing effects of Lycium barbarum polysaccharide for Lewis lung cancer.”, Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi., vol.11, pp.611-2, 582,.
- [9] **Zhang Q., Lv X., Wu T., Ma Q., Teng, A. Zhang Y., Zhang M.,** (2011) “Composition of Lycium barbarum polysaccharides and their apoptosis-inducing effect on human hepatoma SMMC-7721 cells.”, Food Nutr Res., vol. 59, pp. 28696,.
- [10] **Zhu C.P., Zhang S.H.,** (2013) “Lycium barbarum polysaccharide inhibits the proliferation of HeLa cells by inducing apoptosis.”, J Sci Food Agric., vol. 93, pp. 149-56,.
- [11] **Huang Y., Tan A., Shen Y., Lu J.,** (1998) “Scavenging effect of total flavonoids of lycium barbarum L on active oxygen radicals and inhibitory effects on heat output from L1210 cells.”, Wei Sheng Yan Jiu., vol. 27,pp. 109-11, 115,.

- [12] **Yamada P., Nemoto, M. Shigemori H., Yokota S., Isoda H.,** (2011) "Isolation of 5-(hydroxymethyl)furfural from *Lycium chinense* and its inhibitory effect on the chemical mediator release by basophilic cells.", *Planta Med.*, vol.77, pp.434-40,.
- [13] **Stehle J.H., Von Gall C., Korf H.W.,** (2003) "Melatonin: A clock-output, a clock-input.", *Neuroendocrinol.* vol. 15, pp. 383-389,.
- [14] **Slominski R.M., Reiter R.J., Schlabritz-Loutsevitch N., Ostrom R.S., Slominski A.T.,** (2012) "Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions.", *Mol Cell Endocrinol.*, vol. 351, pp.152-166,
- [15] **Zubidat A.E., Haim A.,** (2017) "Artificial light-at-night-a novel lifestyle risk factor for metabolic disorder and cancer morbidity.", *J Basic Clin Physiol Pharmacol.*,vol. 28, pp. 295-313,.
- [16] **Sainz R.M., Mayo J.C., Rodriguez C., Tan D.X., Lopez-Burillo S., Reiter R.J.,** (2003) "Melatonin and cell death: Differential actions on apoptosis in normal and cancer cells.", *Cell Mol Life Sci.*, vol. 60, pp.1407-1426
- [17] **Srinivasan V., Spence D.W., Pandi-Perumal S.R., Trakht I., Cardinali D.P.,** (2008) "Therapeutic actions of melatonin in cancer: Possible mechanisms.", *Integr Cancer Ther.*, vol. 7, pp.189-203,.
- [18] **Jung B., Ahmad N.,** (2006) "Melatonin in cancer management: Progress and promise.", *Cancer Res.*, vol. 66, pp. 9789-9793,
- [19] **Zamfir Chiru A.A., Popescu C.R., Gheorghe D.C.,** (2014) "Melatonin and cancer.", *J Med Life.*, vol. 7, pp.373-4,.
- [20] **Rubio S., Estévez F., Cabrera J., Reiter R.J., Loro J., Quintana J.,** (2007) "Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by melatonin in human myeloid HL-60 cells.", *J Pineal Res.*, vol. 42, pp.131-8,.
- [21] **Gurer-Orhan H., Ince E., Konyar D., Saso L., Suzen S.,** (2007) "The role of oxidative stress modulators in breast cancer.", *Curr Med Chem.*,
- [22] **Koh W., Jeong S.J, Lee H.J., Ryu H.G., Lee E.O., Ahn K.S., Bae H., Kim S.H.,** (2011) "Melatonin promotes puromycin-induced apoptosis with activation of caspase-3 and 5'-adenosine monophosphate-activated kinase-alpha in human leukemia HL-60 cells.", *J Pineal Res.*, vol. 50, pp.367-73,.
- [23] **Rana S., Shahid A., Ullah H., Mahmood S.,** (2014) "Lack of association of the NPAS2 gene Ala394Thr polymorphism (rs2305160:G>A) with risk of chronic lymphocytic leukemia.", *Asian Pac J Cancer Prev.*, vol. 15, pp.7169-74,.
- [24] **Hill S.M., Belancio V.P., Dauchy R.T., Xiang S., Brimer S., Mao L., Hauch A., Lundberg P.W., Summers W., Yuan L., Frasc T., Blask D.E.,** (2015) "Melatonin: An inhibitor of breast cancer.", *Endocr Relat Cancer.*, vol. 22, pp. R183-R204,
- [25] **Deming S.L., Lu W., Beeghly-Fadiel A., Zheng Y., Cai Q.Y., Long J.R., Shu X.O, Gao Y.T., Zheng W.,** (2012) "Melatonin pathway genes and breast cancer risk among Chinese women.", *Breast Cancer Res Tr.*, vol. 132, pp. 693-699,.

- [26] **Yamanishi M., Narazaki H., Asano T.**, (2015)“Melatonin overcomes resistance to clofarabine in two leukemic cell lines by increased expression of deoxycytidine kinase.”, *Exp Hematol.*, vol. 43, pp.207-14,.
- [27] **Zhelev Z., Ivanova D., Bakalova R., Aoki I., Higashi T.**, (2017) “Synergistic cytotoxicity of melatonin and new-generation anticancer drugs against leukemia lymphocytes but not normal lymphocytes.”, *Anticancer Res.*, vol. 37, pp.149-159,.
- [28] **Quintana C, Cabrera J, Perdomo J, Estévez F, Loro JF, Reiter RJ, Quintana J.**, (2016) Melatonin enhances hyperthermia-induced apoptotic cell death in human leukemia cells. *J Pineal Res.*;61:381-95. 4
- [29] **Büyükavci M, Ozdemir O, Buck S, Stout M, Ravindranath Y, Savapan S.**, (2006) Melatonin cytotoxicity in human leukemia cells: relation with its pro-oxidant effect. *Fundam Clin Pharmacol.*;20:73-9.
- [30] **Büyükavci M, Ozdemir O, Buck S, Ravindranath Y, Savapan S.** (2011) Effect of melatonin on the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in human leukemia cells. *In Vivo.*;25:405-9.
- [31] **Reiter RJ.** a.g.y. (2008)Pineal melatonin Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endoc Rev* 1991, Reiter RJ. Melatonin: Clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 200, Reiter RJ, Korkmaz A.Clinical aspects of melatonin. *SMJ*.
- [32] **Erlich ve ark. a.g.y.** (1979) Circulating Melatonin in Man: Episodic Secretion throughout the Light-Dark Cycle *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 48, Issue 1, 1 January 1979, Pages 114–118;
- [33] **Beyer ve ark.** (1998), Antioxidant properties of melatonin—an emerging mystery *Biochemical Pharmacology* Volume 56, Issue 10, Pages 1265-127
- [34] **Witt-Enderby ve ark.** (2003), Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms; *Life Sciences* Volume 72, Issue 20, Pages 2183-2198
- [35] **Becker-Andre ve ark.** (1994), Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily, The orphan nuclear receptor ROR{alpha} is a negative regulator of the inflammatory response *EMBO Rep.* 2001 2: 42.
- [36] **Hotchkiss ve ark** (2002) Melatonin and Immune Function: Hype or Hypothesis?; *Critical Reviews™ in Immunology* Volume 22, 2002 Issue 5 DOI: 10.1615/CritRevImmunol.v22.i5-6
- [37] **Anisimov a.g.y.** (2003) Effects of Exogenous Melatonin; *Toxicologic Pathology*, 31:589–603, Copyright C by the Society of Toxicologic Pathology ISSN: 0192-6233 print / 1533-1601.
- [38] **Reiter RJ. a.g.y** (2006) Melatonin: Clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003 Miller SC, Pandi-Perumal SR, Esquifino AI, Cardinali DP, Maestroni GJ. The role of melatonin in immuno-enhancement: potential application in cancer. *Int J Exp Pathol*

- [39] **Canpolat ve ark. a.g.y.** (2001) Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on serum leptin levels in male rat, *European Journal of Pharmacology* Volume 428, Issue 1, 28 September 2001, Pages 145-148
- [40] **Bejarano I., Redondo P.C., Espino J., Rosado J.A., Paredes S.D., Barriga C., Reiter R.J., Pariente J.A., Rodr guez. A.B.,** (2010) Melatonin Reduces Apoptosis Induced by Calcium Signaling in Human Leukocytes: Evidence for the Involvement of Mitochondria and Bax Activation; *Journal of Membrane Biology* , Volume 233, Issue 1–3, pp 105–118
- [41] **Scheer F, Czeisler CA.,** (2008) Melatonin, sleep, and circadian rhythms. *Sleep Med Rev* 2005, Tsuzuki K, Okamoto-Miunu K, Mizuno K. Effects of humid heat exposure on sleep, thermoregulation, melatonin and microclimate. *J Therm Biol*
- [42] **Korkmaz A, Topal T, Oter S, Tan DX, Reiter RJ.,** (2008) Hyperglycemia-related pathophysiologic mechanisms and potential beneficial actions of melatonin. *Mini Rev Med Chem.*
- [43] **Potterat a.g.y.** (2010) Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, Pharmacology and Safety in the Perspective of Traditional Uses and Recent Popularity, *Planta Med* 2010; 76(1): 7-19 DOI: 10.1055/s-0029-1186218
- [44] **Yılmaz ark. a.g.y ,** (2013) The effects of farnesyltransferase inhibit r 1-744,832 and radiotherapy on h-ras(svr a221a) cell line; *Nobel Medicus* ISSN 1305-2381
- [45] **Bucheli ve ark. a.g.y.** (2010) LC–high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns Volume 397, Issue 3, pp 943–951.,
- [46] **Wang S., Suh J., Zheng X., Wang Y., Ho CT.,** (2010) Multiple Berry Types Prevent N-nitrosomethylbenzylamine-Induced Esophageal Cancer in Rats, *Pharmaceutical Research*, Volume 27, Issue 6, pp 1138–114
- [47] **Yılmaz ve Kınay** (2016) JAFAG, Prof. Dr. G lay Hergen  “Beslenme, Sağlık ve Hastalıkta Bitkiler”, Do . Dr. H sniye Kayalar - Yrd. Do . Dr. Eren Ak i ek /Tıbbi bitkilerden bitkisel ila lara, Dr. Ender Sara  21 G nde G bekten Kurtulma Diyeti, anonim
- [48] **Swerdlow S., Campo E., Lee Haris N., Jaffe E.S., Pileri S., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W.,** (2008) WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues
- [49] **Alberts, B., Johnson, A., Lewia, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.** (2005) H crenin molek ler biyolojisi
- [50] **Pokharel** (2007) Community Forestry: Conserving Forests, Sustaining Livelihoods and Strengthening Democracy, *Journal of Forest and Livelihood* 6
- [51] **Ghia P., Ferreri A.J.M., Caligaris-Cappio F.,** (2002) Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22, *European Journal of Immunology* Volume 32, Issue 5, pages 1403–1413.
- [52] **Altundağ E. M. ;Yal ın A. S.,** (2005) Kronik Myeoloid L semi H crelerinde (K562) Apoptotik S re  ve Reaktif Oksijen T rleri Arasındaki İlişkinin Araştırılması;

- [53] **Hu ve Kavanagh**, (2003); Murphy ve Martin, 2003; Fischer ve Schulze-Osthoff,
- [54] **Wyllie, Kim, Murphy, Martin, Shi**, (2003) Melatonin promotes puromycin-induced apoptosis with activation of caspase-3 and 5'-adenosine monophosphate-activated kinase-alpha in human leukemia HL-60 cells. *J Pineal Res.* ;50(4):367-73.
- [55] **Can A, Akev N, Ozsoy N, Bolkent S, Arda BP, Yanardag R, Okyar A.**, (2004) Effect of Aloe vera leaf gel and pulp extracts on the liver in type-II diabetic rat models. *Biol Pharm Bull.* May;27(5):694-8
- [56] **Bitis L, Kultur S, Melikoglu G, Ozsoy N, Can A.**, (2010) Flavonoids and antioxidant activity of *Rosa agrestis* leaves. *Nat Prod Res.* Apr;24(6):580-9.
- [57] **Edalati Fathabad M, Karimipoor M, Alizadeh S, Abdoli A, Atashi A, Sayadi M.**, (2017) miR-155 effectively induces apoptosis in K562 Philadelphia positive cell line through upregulation of p27kip1. *Bioimpacts.*;7(2):109-114.
- [58] **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.*;36(4):857-66
- [59] **Erguven M, Bilir A, Yazihan N, Ermis E, Sabanci A, Aktas E, Aras Y, Alpman V.**, (2011) Decreased therapeutic effects of noscapine combined with imatinib mesylate on human glioblastoma in vitro and the effect of midkine. *Cancer Cell Int.*;11(1):18.
- [60] **Zhu CP, Zhang SH.** (2013) *Lycium barbarum* polysaccharide inhibits the proliferation of HeLa cells by inducing apoptosis. *J Sci Food Agric.* Jan 15;93(1):149-56.
- [61] **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- γ on the murine Renca renal cell carcinoma cell line in vitro and in vivo. *Mol Med Rep.* Nov;12(5):6727-37.
- [62] **Xin YF, Zhou GL, Deng ZY, Chen YX, Wu YG, Xu PS, Xuan YX.**, (2007) Protective effect of *Lycium barbarum* on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Phytother Res.* Nov;21(11):1020-4.
- [63] **Gao K, Liu M, Cao J, Yao M, Lu Y, Li J, Zhu X, Yang Z, Wen A.**, (2014) Protective effects of *Lycium barbarum* polysaccharide on 6-OHDA-induced apoptosis in PC12 cells through the ROS-NO pathway. *Molecules.* Dec 24;20(1):293-308.
- [64] **Todisco M.**, (2009) Chronic lymphocytic leukemia: long-lasting remission with combination of cyclophosphamide, somatostatin, bromocriptine, retinoids, melatonin, and ACTH. *Cancer Biother Radiopharm.*;24(3):353-5.
- [65] **Reppert S.M.**, (1997) "Melatonin receptors: Molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors.", *J Biol Rhythm.*, vol. 12, pp.528-531,.
- [66] **Lichtor T.**, (2013) ISBN 978-953-51-1058-3, 652 pages, Publisher: InTech, Chapters published , under CC BY 3.0 license DOI: 10.5772/45956

- [67] **Hoffbrand** (2001)Molecularly targeted treatment of chronic myeloid leukemia: Beyond the imatinib era -Scientific Figure on ResearchGate. Available from: /7614675_fig1_Figure-2-Signal-transduction-pathways-involved-in-CML-Schematic-representation-of-the Alýndýđý tarih: 14.07.2017 Adres: <https://www.researchgate.net>
- [68] **Stephen W. G.**, (2016) A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process Gabriel Ichim & Tait Nature Reviews Cancer 16, 539–548 doi:10.1038/nrc.2016.5

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Zülküf YILMAZ
Doğum Tarihi ve Yeri : 05/04/1985 - Ergani
E-posta : z.yilmaz@beu.edu.tr



ÖĞRENİM DURUMU:

Lisans : Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Ziraat Mühendisliği
2013

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 1) Bitlis Eren Üniversitesi, Sağlık Yüksekokulu, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Araştırma Görevlisi (Devam Ediyor)

AKADEMİK YAYINLAR VE SUNUMLAR

- 1) Yaşam Boyu Sağlık Zirvesi 2015 Lisans Öğrencilerinin GDO hakkında düşünceleri adlı çalışma
- 2) 1. Uluslar Arası Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Kongresi Lisans Öğrencilerinin Beslenme Alışkanlıkları
- 3) 1. Uluslar Arası Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Kongresi Sağlık Yüksek Okulu Öğrencilerinin Beslenme Alışkanlıkları ve Etkileri

