



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ-ALLERJİ ANABİLİM DALI

***INULA VISCOSA* EKSTRAKTI VE CYTOSINE
ARABINOSIDE'İN AKUT MİYELOİD LÖSEMİ HÜCRE
HATTINDA ANTİPROLİFERATİF VE APOPTOZ
TETİKLEME ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Shiva MARZI

**Samsun
Haziran-2019**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ-ALLERJİ ANABİLİM DALI

**INULA VISCOSA EKSTRAKTI VE CYTOSINE
ARABINOSIDE'İN AKUT MİYELOİD LÖSEMİ HÜCRE
HATTINDA ANTİPROLİFERATİF VE APOPTOZ
TETİKLEME ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Shiva MARZI

**Danışman
Prof. Dr. Afişan YILDIRAN**

**Samsun
Haziran-2019**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Shiva MARZI tarafından Prof. Dr. Afişan YILDIRAN danifşmanlığında hazırlanan “*Inula Viscosa* Ekstraktı ve Cytosine Arabinoside’in Akut Miyeloid Lösemi Hücre Hattında Antiproliferatif ve Apoptoz Tetikleme Etkilerinin Karşılaştırılması” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından ... / ... / tarihinde yapılan sınav ile İmmünoloji ve Allerj Anabilim Dalında **YÜKSEK LİSANS** Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan :

Üye :

Üye :

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.. / .. /

Prof. Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgi ve deneyimleriyle beni yetiştiren, büyük sabırla bana yol gösteren, ufkumu geliştiren, bana güven ve cesaret veren, tez çalışmalarımı yuruttuğumuz bu zorlu yolculukta her konuda ve karşılaştığım her problemin çözümünde bana yardım ve desteğini büyük özveriyle gösteren, benim ileride bilimsel gelişme yolumu sağlayan çok değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Alişan YILDIRAN'a öncelikle teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim, laboratuvar çalışmalarım ve tez çalışmalarım süresince bana destek olan ve hoşgörü gösteren tüm Flow Laboratuvarı çalışanları Canan ÖZDEMİR, Aslı ALTUN ve Neriman BALTA'ya en içten teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımda, *Inula viscosa* bitkisini sağlayan değerli hocam Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkiler Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Kudret KEVSEROĞLU ve Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsünden Dr. Unal KARİK'a teşekkür ederim. Ayrıca, bitki ekstraktının hazırlanmasında bilgi, deneyim ve zamanını esirgemeyen hocam Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Prof. Dr. İlkey KOCA ve Doktora Öğrencisi Mohamed Ghellam'a teşekkür ederim. Kimya hesaplamalarında bana zaman ayıran güler yüzlü hocam Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyesi Dr. Hilal AY'a da teşekkür ederim. İstatistiksel analizde katkıda bulunan Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Ve Tıbbi Bilişim bölümü Araştırma Görevlisi Işıl UNALDI'ya çok teşekkür ederim.

Ayrıca, her kararında yanımda olan ve bana maddi manevi desteği vererek bu günlere gelmemi sağlayan, haklarını asla ödeyemeyeceğim sevgili anneme, babama ve kardeşime sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Bu çalışma, PYO.TIP.1904.18.014 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

INULA VISCOSA EKSTRAKTI VE CYTOSINE ARABINOSIDE'İN AKUT MİYELOİD LÖSEMİ HÜCRE HATTINDA ANTİPROLİFERATİF VE APOPTOZ TETİKLEME ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Amaç: Akut Miyeloid Lösemi (AML), hematopoetik sistemin çok yaygın bir malign tümörüdür. AML tedavisinde Cytosine Arabinoside apoptotik etkili bir ilaçtır. Akdeniz havzasının yabani bir otu olan *Inula viscosa* (L.) Aiton, antikanser, antiinflamatuvar, antimikrobiyal ve diğer birçok özelliğinden dolayı yıllarca geleneksel tıpta kullanılmıştır. Bu çalışmada *Inula viscosa* etil alkol ekstraktının Akut Miyeloid Lösemi hücre hattı üzerinde apoptotik etkisinin değerlendirilmesi ve Cytosine Arabinoside (Ara-C) ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: *Inula viscosa* yaprak ve çiçeklerinden ayrı ayrı etil alkol ekstraktı elde edildi. AML-M2 hücre hattı (Kasumi-6) üzerinde Ara-C, *Inula viscosa* yaprağı ve çiçeği ekstraktlarının apoptotik etkisi doza ve zamana bağımlı bir şekilde Annexin V / PI boyaması ile Flow sitometride değerlendirildi.

Bulgular: Çalışmada 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde değerlendirilen *Inula viscosa*'nın hem yaprak hem de çiçek ekstraktı apoptozu arttırmış, canlılığı azaltmış, hücre çoğalmasını bastırmış ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bulunmuştur. Ancak *Inula viscosa*'nın bu apoptoz indükleyici etkisi Ara-C'ye göre belirgin olarak daha azdır.

Sonuç: *Inula viscosa*'nın hem yaprak ve hem çiçek ekstraktı AML hücre hattında apoptozu indüklemiş, ancak Ara-C'den belirgin şekilde daha azdır.

Anahtar Kelimeler: Akut miyeloid lösemi; Apoptoz; Cytosine Arabinoside; *Inula viscosa*

**Shiva MARZI, Yüksek Lisans Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Haziran-2019**

ABSTRACT

COMPARISON OF ANTIPROLIFERATIVE AND APOPTOSIS INDUCING EFFECTS OF *INULA VISCOSA* EXTRACT AND CYTOSINE ARABINOSIDE ON ACUTE MYELOID LEUKEMIA CELL LINE

Aim: Acute Myeloid Leukemia (AML) is a very common malign tumor of the hematopoietic system. The Cytosine Arabinoside is a drug have an apoptotik effect in Acute Miyeloid Leukemia treating. *Inula viscosa* (L.) Aiton, a wild herb of Mediterranean Region, has been used in traditional medicine for years due to its anticancer, anti-inflammatory, antimicrobial and many other properties. We aimed to evaluate the apoptotic effect of *Inula viscosa* ethyl alcohol extract on Acute Myeloid Leukemia cell line and compare with Cytosine Arabinoside (Ara-C).

Material and Method: Ethanol extracts of leaves and flowers of *Inula viscosa* was obtained separately. The apoptotic effects of Ara-C, *Inula viscosa* leaves and flowers extracts on AML M2 cell line (Kasumi-6) was assessed by Annexin V / PI staining in Flow cytometry as dose and time dependent manner.

Results: In the study, both leaf and flower extracts of *Inula viscosa*, which was evaluated at incubation times of 24, 48 and 72 hours increased apoptosis, decreased viability, suppressed cell proliferation and the results were statistically significant ($p < 0,05$). However, this apoptosis-inducing effect of *Inula viscosa* extract markedly lower than those of Ara-C.

Conclusion: Both leaf and flower extracts of *Inula viscosa* induced apoptosis on AML cell line, however, these increasing markedly lower than those of Ara-C.

Keywords: Acute miyeloid leukemia; Apoptosis; Cytosine Arabinoside; *Inula viscosa*

Shiva MARZI, Master Thesis,
Ondokuz Mayıs University – Samsun, June-2019

SİMGELER VE KISALTMALAR

µgr	: mikrogram
µmol	: mikromol
ADP	: Adenosin Difosfat
AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome; kazanılmış bağışıklık yetmezliği sendromu
AIF	: Apoptosis-inducing factor; Apoptoz Uyarıcı Faktör
APC	: Allophycocyanin
AML	: Akut Miyeloid Lösemi
APAF1	: Apoptotik Proteaz Aktive edici Faktör 1
Apo-1	: Apoptoz antijen-1
Ara-C	: Cytosine Arabinoside; Sitozin Arabinozid; Sitarabin
Ara-CMP	: Ara-C Monofosfat
Ara-CTP	: Ara-C Trifosfat
Ara-U	: Uridin Arabinozid
Ara-UMP	: Uridin Arabinozid Monofosfat
ATCC	: American Type Cell Culture; Amerika Hücre Kültür Koleksiyonu
ATP	: Adenozin Trifosfat
Bax	: Bcl-2 associated x; Bcl2 ilişkili x
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2; B hücreli lenfoma 2
BH	: Bcl-2 homoloji
BIR	: Baculovirus IAP Repeat; bakülovirüs IAP tekrar
Ca	: Kalsiyum

CD	: Cluster of Differentiation; farklılaşma kümesi
CI	: Cervical Intraepithelial Neoplasia; servikal intraepitelyal neoplazi
CSF	: Colony-Stimulating Factor; koloni uyarıcı faktörler
d-CTP	: Deoksisitidin trifosfat
DED	: Death Efektor Domain; ölüm efektör domain
DIABLO	: Direct IAP-Binding protein with Low PI; düşük pI ile direkt IAP bağlayıcı proteini
DISC	: Death-Inducing Signaling Complex; ölüm indükleyici sinyal kompleksi
dk	: dakika
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DR1	: Death Receptor 1; ölüm reseptörü 1
ENDO G	: Endonükleaz G
ER	: Endoplazmik Retikulum
FADD	: Fas-Associated Death Domain protein; Fas ilişkili ölüm domain proteini
Fas	: CD95; Apo-1
FasL	: Fas Ligand
FBS	: Fetal Bovine Serum; Fetal sığır serum
FITC	: Floresan İzotiyosiyanat
G₀	: Gap 0
G₂	: Gap 2 Aralık 2
HtrA₂	: High Temperature Requirement Protein A2; yüksek ısı gereksinimi protein A2; Omi

IAP	: Inhibitor of Apoptosis protein, apoptoz inhibitörü proteini
ICAD	: Caspase-Activated Deoxyribonuclease Inhibito; kaspazla aktiflenen deoksiribonükleaz inhibitörünü
IGF	: Insulin-like Growth Factor; insülin benzeri büyüme faktörü
IL-2	: İnterlukin-2
IVÇE	: Inula viscosa Çiçek Ekstraktı
IVYE	: Inula viscosa Yaprak Ekstraktı
K	: Konsantrasyon
KİT	: Kemik İliği Nakli
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
KRAS	: Kirsten Rat Sarcoma viral proto-oncogene
M	: Mitoz
MDS	: Miyelodisplastik Sendromu
ml	: mililitre
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
NGF	: Nerve Growth Factor; sinir büyüme faktörü
NGFR	: NGF Reseptörü
OMÜ	: Ondokuz Mayıs Üniversitesi
pH	: Power of Hydrogen; Hidrojenin Gücü
PI	: Propidiyum İyodür
PS	: Fosfatidilserin
RB1	: Retinoblastoma transcriptional corepressor 1

rhGM-CSF	: İnsan rekombinant granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktörü
RPMI 1640	: Roswell Park Memorial Institute 1640
S	: Sentez
SL	: Seskiterpen Lakton
Smac	: Second mitochondria-derived activator of caspases; ikincil mitokondriyum-kaynaklı kaspaz aktivatörü
STAT3	: Signal Transducer and Activator of Transcription 3; Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3
SV40	: Simian Virüs 40
TBI	: Traumatic Brain Injury; Travmatik Beyin Hasarı
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TNFR-1	: Tümör Nekroz Faktör Reseptörü-1
TP53	: Tümör Protein p53
TRADD	: TNFR1-Associated Death Domain protein TNFR-1 ilişkili ölüm domain proteini
TRAF2	: TNFR-associated Factor 2; TNFR-ilişkili faktör 2
TRAIL-1	: TNF-related apoptosis-inducing ligand 1; TNF-ilişkili apoptoz-indükleyici Ligand reseptör 1
UV	: Ultraviolet; morötesi

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	x
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.1.1. Kanser Genetiği	3
2.2. Apoptoz.....	5
2.2.1. Apoptoz ve Nekroz Özelliklerinin Karşılaştırılması	7
2.2.2. Apoptozda Morfolojik Değişimler	8
2.2.3. Apoptozda Biokimyasal Değişimler	8
2.2.4. Apoptotik Sinyaller	9
2.2.5. Apoptoz Mekanizması Yolakları	9
2.2.6. Kaspazlar	11
2.2.7. Apoptozun Regülasyonu	13
2.2.8. Apoptoz ve Karsinogenezis	14
2.2.9. Kanser Tedavisinde Apoptozu Hedefleme	17
2.3. Bitkisel Tıp	18
2.4. <i>Inula viscosa</i> (L.) Aiton.....	19
2.4.1. <i>Inula viscosa</i> 'nın Terapötik Özellikleri.....	20
2.4.2. <i>Inula viscosa</i> Bileşikleri.....	21
2.5. Akut Miyeloid Lösemi'de Tedavi	23
2.5.1. Sitozin Arabinozid.....	24
3. MATERYAL VE METOT.....	26
3.1. Materyal	26
3.1.1. Çalışma ve Kontrol Grupların Oluşturulması.....	26
3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	26
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	27

3.2. Metot	28
3.2.1. Ortamın ve Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu ve Temizliği	28
3.2.2. <i>Inula viscosa</i> Bitkisinin Etil Alkol Ekstraktının Hazırlanması	28
3.2.3. Etken Maddelerin Stok Solüsyonlarının Hazırlanması	31
3.2.4. Hücreler için Tam Büyüme Ortamının Hazırlanması	32
3.2.5. Hücre Dondurucu Solüsyonunun Hazırlanması	33
3.2.6. Hücre Hattının Kültürü	33
3.2.7. Hücre Kültürü Mikroplakalarına Hücre Ekimi	36
3.2.8. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	37
3.2.9. Test Maddelerin Uygulanmaya Hazırlanması	38
3.2.10. Hücrelerin Test Maddeler ile Maruziyeti	38
3.2.11. Apoptoz Ölçümü için Hücrelerin Boyanması	39
3.2.12. İstatistiksel Analiz	41
4. BULGULAR	42
4.1. <i>Inula viscosa</i> Ekstraktı	42
4.2. Kültüre Edilen Hücrenin Sayısı	42
4.3. Flow Sitometri Sonuçları	42
4.4. İstatistik Sonuçları	54
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	64
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	74

1.GİRİŞ

Dünya yıllık ölümlerinin % 2-3'ü farklı kanser türlerinden kaynaklanmaktadır. Günümüzde, mevcut ilaçlar ile kanserin tedavisi yetersizdir ve birçok kanser türünün etkin bir terapisi yoktur. Son zamanlarda, tıbbi bitkilerin özü doğal ürün olarak kanser tedavisinde daha fazla dikkat çekmektedir (Zhang ve ark., 2017). Öte yandan literatür bolluğu, kanser tedavisinde apoptoz indüklemesinin uygun hedef olduğu fikrini ileri sürmektedir (Wong, 2011). Örneğin çin otu *Rabdosia rubescens*'ten ekstrakte edilen tetrasiklin diterpenoidin yapılı doğal bir bileşik olan oridonin'in pankreas kanseri hücrelerinin apoptozunu etkili bir şekilde uyarabildiği bildirilmiştir (Qi ve ark., 2012). Diğer bir örnek *Inula viscosa*'dan izole edilen Tomentosin'in SiHa ve HeLa servikal kanser hücrelerinde sitotoksik etki oluşturduğunun kanıtlanmasıdır. Bu madde sitotoksik etkisini telomer tetikleme, hücre döngüsünü G₂/M (Gap 2/Mitoz) fazında tutuklama, mitokondriyal membran potansiyelini düşürme ve kaspaz bağımlı apoptoz indüksiyonu yoluyla yapmaktadır (Merghoub ve ark., 2017).

Apoptoz genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Apoptoz, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlar. Apoptoz yollarının her hangi bir noktasında bozukluk apoptozun azalması, olmaması veya aşırı olmasını sağlayarak çeşitli hastalıklara sebep olur. Kanser hücrelerin aşırı ve kontrolsüz çoğalmasıyla ortaya çıktığından aşırı apoptoz kanser gelişimine yol açmaktadır. Çift taraflı bir kılıç gibi, apoptotik yollardaki her kusur veya anormallik, kanser tedavisinde ilginç bir hedef olabilir. Literatürün bolluğu, kanser tedavisinde apoptozu hedeflemenin uygun olduğunu ileri sürmektedir (Wong, 2011).

Solid olmayan kanserlerden biri lösemilerdir. Erişkinlerde akut löseminin en sık görülen tipi Akut Miyeloid Lösemi (AML)'dir. Çocuklarda ise ikinci sırada yer almaktadır. Yoğun kemoterapi ve kök hücre transplantasyonuna rağmen, AML genç hastaların yaklaşık yarısında ve yaşlı hastaların yaklaşık % 80'inde birincil ilaç direnci, relaps veya tedavi ilişkili mortalite nedeniyle hala ölümcüldür. Son 40 yıldır birçok AML hastası için Cytosine Arabinoside (sitozin arabinosid, sitarabin, Ara-C) ana güdümlü endüksiyon tedavisi olarak tedavinin her aşamasında yaygın şekilde uygulanmaktadır. Kemik İliği Nakli (KİT) de ilaç tedavisi ile birlikte başarılı yöntemlerden biridir. Ancak başarı oranı tedavi yöntemine bağımsız olarak 60 yaş

altındaki hastalarda % 35-40 ve ileri yaşıta %5-10 civarındadır (Yalnız Kayım, 2017). Çünkü yoğun kemoterapi rejimleri yaşlı hastalar tarafından tölere edilememektedir (Dohner ve ark., 2015). Dolayısıyla AML zor bir hastalık olmaya devam etmektedir ve bu nedenle yeni tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Örneğin *Epimedium koreanum* nakai bitkisi kökünden saflaştırılmış olan Icariside II'nin STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3, Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3) sinyalleşmesini hedefleyerek AML U937 hücrelerini apoptoza duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Kang ve ark., 2012). Akdeniz bölgesinin doğal bir yabancı otu olan *Inula viscosa* ekstraktının geleneksel tıpta kullanılan anti-enflamatuvar, anti-kanserojen, antiseptik ve antipiretik özellikleri fitokimyasal araştırmalarda farklı hastalıklara karşı değerlendirilmiştir (Fontana ve ark., 2007; Çelik ve Aslantürk, 2010; Musthaba ve ark., 2011). Literatöre bakıldığında *Inula viscosa*'nın servikal, meme vs. gibi kanserler üzerinde antikanser etkisi araştırılmıştır fakat AML üzerinde hiç bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bu araştırma bir ilk olacaktır.

Sunulan çalışmada Türkiye Akdeniz bölgesinin doğal yabancı otu olan *Inula viscosa* ekstraktının apoptotik etkisinin AML hücre hattı üzerinde (M₂ alt tipi) değerlendirilmesi ve AML için bir konvensiyonel ilaç olan Ara-C ile karşılaştırılması amaçlanmıştır ve *Inula viscosa* ekstraktının apoptozu tetikleme beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, yüzyıllar öncesinden beri seretan gibi günümüzde de aramızdaki varlığını sürdürmekte ve insanlığı geçmişten daha fazla tehdit etmektedir. Tıp tarihi boyunca hiçbir hastalığın kanser kadar araştırmalara konu olmadığını söylemek yanlış değildir. Kanser hastalarında ölüm, bakteri ve mantar enfeksiyonları ile % 35, kanama ve enfeksiyon ile % 27 ve kanserin ilerlemesi ile %18 oranındadır. Gelişmiş ülkelerin en önemli sağlık sorunlarının başında kanser ve kanserin tedavisidir.

Kanserde, hücreler aşırı, kontrolsüz ve zamansız çoğalır. İmmün sistemin gözetiminden kaçır, savaşıır veya uyum sağlar. Nihai olarak da uzaktaki dokuları istila ederek metastazlar oluşturur. Bu özellikleri metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirerek edinir. Ancak, bu hastalık bir hastadan diğerine çok değişir. Aynı heterojenliği ve çeşitliliği hücrel ve moleküler düzeyde de gösterir (Çetin, 2013).

Bir kanser hücresi birçok açıdan hücrenin normal hayatını yöneten kurallardan kaçarak bağımsız bir sağkalım özelliğinde eden serseri bir hücredir. Hücre sınırsız çoğalmaya başlar ve yeni hücrelere bozuklukları aktararak bir klon oluşur. Eğer organizma bu klonu tolere ederse çoğalmaya devam edebilir. Böylece bir kitle uzun süre asemptomatik kalabilir. Bu süreç içindekitle hücreleri gitgide artan sayıda modifikasyon biriktirir. Böylece bozulmuş bu süreçte, sadece en uyumlu ve en saldırgan hücreler hayatta kalacak ve daha örgütsüz hücrelerin yerini alacaktır. Tümörler bu şekilde malign olurlar. Sonunda büyüyerek ve fizyolojik işlevleri altüst ederek çok sayıda semptoma ve yayılmasına yol açacaktır (Merlo ve ark., 2006).

2.1.1. Kanser Genetiği

Kansere yatkınlığını artıran genetik durumlar 3 grupta yer alabilir: Bunlar otozomal dominant kalıtsal kanser sendromları, DNA (Deoksiribonükleik asit) onarım defekti sendromları ve ailesel kanserlerdir. Ancak genetik yatkınlığı arttığı çoğu durumda, kanser oluşması için çevresel etkenler de gereklidir (çevresel etkenler, genetik yatkınlığı olan kişileri daha fazla etkiler). Kanser görülme sıklığı cinsiyet, bölge, sosyo-ekonomik düzey, beslenme, yaşam tarzı ve meslek gibi faktörlere bağlı olarak değişiklikler göstermektedir.

DNA kimyasal, fiziksel ya da toksikolojik ajanlarla tepkimeye girerek değişikliğe uğrar (karsinojenler, Mor ötesi ışınları, İyonlaştırıcı radyasyonlar vb.). Ancak, DNA hasarının asıl nedeni, DNA kopyalanması ve onarılması süreçlerinde “hıçkırmalardır”. Her hücre bölündüğünde, DNA’nın 3 milyar baz çiftinin mükemmel bir doğru kopyasını yapması gerekir (DNA, düzeltme ve onarma sistemleriyle kontrol edilir). Eğer hatalar onarılmadan kalırsa ve bu hata kanserde rol oynayan bir gendeyse, hücrelere regülasyonu bozulmuş sistemin içinde yaşamaya daha uyumlu olmalarını sağlayacak yeni bir özellik verebilir (Çetin, 2013).

Bir kanserli hücrenin gelişmesi için 3 temel kuralın ihlal edilmesi gerekir. Birincisi, hücrelerin sadece doğru sinyali aldıklarında bölünmeleridir. Bu kuralı ihlal etmek için, hücre, normal bölünme sinyalını aldıktan sonra bölünmeyi kalıcı hale getirir. İkinci kural, genlerin hasar görebileceği yanlış koşullarda DNA replikasyonunu başlatmak yerine apoptozu aktive etmeleridir. Bu kuralı ihlal etmek için, hücrelerin aşırı hücre bölünmesini engelleyen frenlerden kurtulması gerekir. Bu frenler iki ana gen tarafından kontrol edilmektedir: RB1 (Retinoblastoma transcriptional corepressor 1) ve TP53 (Tümör protein p53) genleri. Bu iki frenin mutasyonu ile hücreler sadece apoptozdan kaçınmakla kalmaz, aynı zamanda aşırı bölünmüş de olurlar. Üçüncü kural, hücrelerin sınırlı ve belli sayıda bölünmeleridir. Her kromozomun ucunda telomer adlı özel bir yapı nedeniyle sınırlı sayıda DNA replikasyonu yapılarak hücre bölünebilir. Telomer bir seri tekrardan oluşan küçük DNA dizilimidir. Her hücre bölünmesinde bir tekrarı kopup gider. Telomer kısaldığında, hücre artık bölünemez (yaşlanır). Kanseri hücrede, telomeraz enzimi kromozomların ucuna yeni tekrarlar eklenebilmesini sağlar ve böylece hücre sınırlı sayının ötesinde bölünebilir (sonsuz gençlik). Bu değişikliklerin her biri ayrı ayrı gerçekleştiğinde, normal hücre işlevi altüst olduğu için apoptoz gerçekleşemez. Mutasyonlar ve çevresel değişiklikler buna yol açabilir. Mutasyonlar, hücreye aynı anda değişiklikleri daha çok yapabilme yeteneği verir. Çevresel değişiklikler, normal hücrelere göre anormal hücrelerin rahatsız koşullarda daha uyumlu görünerek sağ kalımlarına izin verir. Ancak moleküler bakış açısından bu roller birbirlerinden ayrılamaz (Hanahan ve Weinberg, 2000).

Onkogenler ve Tümör Baskılayıcı Genler

Kanser oluşumu için bir hücre, normal sınırının çok ötesinde onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde birkaç değişiklik (mutasyon) geçirmelidir.

Onkogenlerde mutasyon, genin protein ürününü etkinleştirerek hücre çoğalmasını hızlandırır. Örneğin, KRAS (Kirsten Rat Sarcoma Viral Proto-Oncogene) geninin protein ürünü normalde hücre bölünmesini başlatmak için hücre yüzeyindeki büyüme faktörlerinin büyüme sinyallerini reseptörleri ile hücre çekirdeğine gönderir, ancak mutasyon sonucunda hücre büyüme sinyalini arttıran bir proteine dönüşür (kolorektal kanser vakaların % 30-40'ında, akciğer adenokarsinoma vakaların % 20-30'unda vb.).

Tümör baskılayıcı genlerde mutasyon, genin protein ürününü etkisizleştirir. Örneğin, TP53 geninde bir mutasyon, yanlış hücre bölünmesini engellemek için doğal bir acil fren mekanizması olan proteini bozarak gerektiğinde hücrelerin çoğalmasını durduramaz (hemen hemen tüm kanserlerde) (Çetin, 2013).

Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler, kanser yerine ve nedenine bağlı olmaksızın fark göstermektedir. Ancak hepsi hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını etkilemek için birlikte çalışan bir ağın parçalarıdır. Öte yandan epigenetik değişiklikler de kanserin bir özelliğidir (Baylin ve Ohm, 2006). Epigenetik değişiklikler, DNA dizisini bozmadan gen ekspresyonunda kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanmaktadır (Yalnız Kayım, 2017). Bu değişiklikler metilasyon ve demetilasyon ile sırasıyla onkogenleri (bunlar düzeltmeye ve kopyalanmaya kapalıdır) açarak ve tümör baskılayıcı genleri (hücre bunları kopyalayarak proteinleri üretebilir) kapatarak kansere neden olabilirler. Kanserde epigenetik değişiklikler mutasyonlara göre daha fazla geni etkiler (Schuebel ve ark., 2007). Hem genetik hem de epigenetik değişimler insan kanserinde hep vardır. Birbirlerine tepki vererek ve birbirlerini etkileyerek, kanserli hücre özelliklerini nasıl edineceğini belirleyen bir seri değişiklik oluştururlar.

2.2. Apoptoz

Organizma sürekli bir denge halindedir. Bu dengeyi korumak için bir taraftan yeni hücreler sentezlenirken, diğer yandan var olan hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kaldırılmaktadır. İmmün sistemin hemostazının ve maturasyonunun temel bir başlangıcı olan apoptoz, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür (Öztürk, 2002).

Apoptozun altında yatan mekanizmanın anlaşılması, birçok hastalığın patogenezinde önemli bir rol oynadığı için önemlidir. Bazı hastalıklar, çok fazla

apoptozdan kaynaklanırken (dejeneratif hastalıklar), diğerlerinde çok eksik apoptoz suçludur (kanser). Hastalık durumundaki apoptozu anlamak çok önemlidir, çünkü hastalığın patogenezi anlatırken, nasıl tedavi edilebileceği konusunda da ipucu bırakabilir (Wong, 2011).

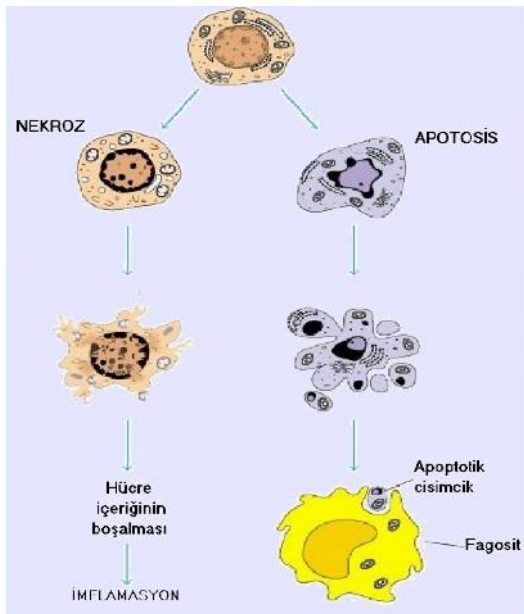
Apoptoz tanımlandığından beri, biyolojik araştırmalarda en çok araştırılan süreçlerden biri olmaya devam etmektedir (Kerr ve ark., 1972). Apoptoz işlevi intrauterin dönemden itibaren başlar. Fizyolojik olarak apoptoz, embriyonik dönemde homeostazinin korunmasında, ekstremitelerin ve içi boş organların oluşumunda, dişi fetüste Wolf ya da erkek fetüste Müller kanallarının körelmesi sırasında ve merkezi sinir sistemi gelişiminde nöron sayısının düzenlenmesinde rol almaktadır. İntrauterin dönemde, immün sistemin maturasyonu esnasında, santral lenfoid organlardaki otoreaktif lenfositlerin ortadan kaldırılmasını sağlar. Böylece periferik lenfoid ve myeloid kompartmanların aşırı büyümesi kısıtlanır. Sinir sistemi gelişirken; aksonları hedef organlara ulaşamayan nöronların ortadan kaldırılmasını ve böylece nöronlarla hedef organlar arasında oluşan bağlantı hatalarının onarılmasını sağlar. Dahası, insan embriyosunun el parmakları arasında bulunan perdeleri oluşturan hücreler apoptoz sonucu kaybolarak parmaklar daha işlevsel hale gelmektedir.

Doğumdan sonra ise T ve B lenfositlerin seçiminde temel bir işlev yürütmektedir. Büyüme faktörlerinin ortamdan çekildiği koşullarda (emzirme sonunda meme bezi, doğum sonrası uterus) organlarda gerçekleşen küçülmenin de temel mekanizması, hücrelerin apoptozisidir (Öztürk, 2002). Ayrıca dokularda hücre homeostazinin sağlanmasında, bağırsaktaki kripte epitellerinin sürekli yenilenmesinde, endometriyumun dökülmesinde, timus'un involüsyonunda fizyolojik olarak temel bir rol üstlenmektedir (Ürküp, 2017).

İmmün reaksiyonlarda, bağışıklık reddinde, virüsle enfekte olan ya da DNA'sı ağır hasar gören hücrelerde, viral hepatitte, graft versus host reaksiyonlarında, hücrelerin herhangi bir nedenle hasarlanmaları durumunda (ısı, radyasyon, yaşlılık, antikanser ilaçlar ve hipoksi gibi), atrofi, kazanılmış bağışıklık yetmezliği sendromu (AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome), Alzheimer, Parkinson ve Miyokard İnfarktüs gibi durumlarda da apoptoz mekanizması patolojik olarak devreye girmektedir (Öztürk, 2002). Apoptoz süresi hücre türüne, uyarana ve apoptotik yolağına bağlıdır fakat birkaç saati geçmez.

2.2.1. Apoptoz ve Nekroz Özelliklerinin Karşılaştırılması

Hücre ölümünün iki tipi vardır. Bunlar; apoptoz ve nekrozdur. Apoptoza nekroza benzeyen bozulmaya uğrayacakları için sekonder nekroz da denir (Ziegler ve Groscurth, 2004). Nekroz; hipoksi, aşırı ısı değişiklikleri, toksinler gibi hücre dışından gelen çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler sonucunda gelişen travmatik hücre ölümüdür. Apoptoz ise yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Nekroz patolojik bir olaydır. Apoptoz ise fizyolojik veya patolojik uyaranlarla oluşabilir (Öztürk, 2002). Nekroz hücredeki aşırı travma ya da hasarın bir sonucu olarak gelişmektedir ve akut işlevsel bozukluğa bağlı olarak hücrenin ölümü gerçekleşir. Hücrede iyon akışının kontrolü hızla kaybedildiği için pasif ve yıkıcı bir süreç olarak değerlendirilmektedir. Nekrozda iyon akış kontrolünün kaybedilmesi hücre içerisine fazla miktarda su girişine, hücre ve organellerin enerji harcamasına gerek kalmadan şişerek sitolize uğramalarına neden olmaktadır. Ölen hücre içeriğinin ekstraselüler alanlara akması ve proenflamatuvar hücrelere infiltrasyonu ile komşu hücrelerin ölmesi ve doku hasarının yaygınlaşması meydana gelmektedir (Samali ve Orrenius, 1998). Apoptozda ise morfolojik ve biokimyasal değişiklikler meydana gelir ve hücre içeriği ekstraselüler Alana akmazsızın apoptotik cisimlere parçalanır (Ürküp, 2017) (Şekil 1).



Şekil 1. Apoptoz ve nekrozun karşılaştırması (Didem Yalcın'dan, 2019)

2.2.2. Apoptozda Morfolojik Değişimler

Apoptoz sürecinde morfolojik değişimler, kromatin yoğunlaşması, nükleer parçalanması, hücrenin yuvarlanması, hücresel hacmin azalması (piknoz) ve psödopodların geri çekilmesidir. Kromatin yoğunlaşması, nükleer zarın çevresinden başlar ve hilal veya halka benzeri bir yapı oluşturur. Kromatin, sağlam zarlı hücre içinde kırılana (karyoreksis) kadar daha da yoğunlaşır. Sonradan membran blebingi (salgısı), sitoplazmik organellerin ultrastrüktürel değişikliği ve membran bütünlüğünün kaybedilmesi gibi değişiklikler gözlenir (Kroemer ve ark., 2005). Plazma zarı, tüm işlem boyunca bozulmamaktadır. Sonunda hücre, intact mitokondri, ribozom, nükleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotik cisimlere parçalanır. Genellikle fagositik hücreler, apoptotik cisimler oluşmadan önce apoptotik hücreleri yutarlar. Bu apoptotik cisimlerin görülmemesi için apoptozun keşfedilmesi çok geç olmuştur (1972), ancak in vitro özel koşullar altında apoptotik cisimler görülmüştür çünkü fagosit hücre ortamda yok (Wong, 2011).

2.2.3. Apoptozda Biokimyasal Değişimler

Genel olarak apoptozda üç ana tip biyokimyasal değişiklik gözlenebilir: 1) kaspaz aktivasyonu, 2) DNA ve protein parçalanması ve 3) membran değişiklikler ve fagositik hücreler tarafından tanınma (Kumar ve ark., 2010).

Apoptozun başlangıcında hücre zarının dış katmanlarında fosfatidilserin (PS) ekspresyonu olur. Bu, proenflamatuvar hücresel bileşenlerin serbest bırakılması olmadan makrofajlara ölü hücrelerin tanınmasına olanak sağlar ve fagositoza neden olur. PS ekspresyonundan sonra DNA 50 ila 300 kilobazlık parçalara bölünür (Vaux ve Silke, 2003). Bu özellik apoptozun karakteristiği olmasına rağmen, agaroz jel elektroforezinde tipik DNA merdivenin (nekrotik hücrelerde de görüldüğü gibi) görülmesi spesifik değildir (McCarthy ve Evan, 1998), zira apoptoz oligonükleozomal DNA parçalanması olmaksızın da oluşabilir. Bunun için DNA fragmentasyonunun biyokimyasal analizleri apoptozu tanımlamak için kullanılamaz (Galluzi ve ark., 2007). Daha sonra endonükleazlar ile, DNA parçaları yeniden 180 ila 200 çift bazlık oligonükleosomlara bölünür. Ayrıca normalde bir hücre birbirini takip eden 7 kırılma onarabilirken, apoptozda yaklaşık 300.000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı tam yapılamaz ve apoptoz süreci başlanır (Akşit ve Bildik, 2008).

Apoptozun diğerk bir özelliği, sistein proteaz familyasına ait olan kaspaz enzim grubunun aktivasyonudur. Aktive edilmiş kaspazlar bir çok hayati hücresele proteini parçalayıp nükleer ve hücre iskeletini de parçalamaktadır. Ayrıca nükleer DNA'yı daha da indirgeyen DNAaz'ı aktive eder. Biyokimyasal değişiklikler kısmen morfolojik değişikliklerin bir kısmını açıklamaktadır. Kaspaz aktivasyonunun da biokimyasal analizleri apoptozu tanımlamak için kullanılamaz, zira apoptoz kaspaz- bağımsız da oluşabilir (Galluzi ve ark., 2007).

2.2.4. Apoptotik Sinyaller

Hücrenin apoptozu gidebilmesi için ilk önce, ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir sinyalde karşılaşması gerekir. Bu sinyal hücre içinden (intrinsik) veya hücre dışından (ekstrinsik) gelebilir (Herrmann ve Kalden, 2003).

Hücre içi sinyalleri, hücre içi Kalsiyum⁺⁺ (Ca⁺⁺) düzeyi artışı, hücre içi pH (power of hydrogen, Hidrojenin Gücü) azalması, metabolik ve/veya hücre siklüs bozuklukları, sitokinler, Tümör Nekroz Faktör (TNF), DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpressör gen olan p53'ün aktive olması, viral-bakteriyel enfeksiyonlar ve onkogenlerdir (Avi, 2008).

Çevresel yaşam sinyaller ve büyüme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, Fas-FasL (CD95, Apo-1 (apoptoz antijeni-1)-Fas Ligand) aracılı apoptoz, TNF aracılı apoptoz, sitotoksik T lenfosit aracılı apoptoz, koloni uyarıcı faktörler (CSFs: Colony-Stimulating Factors), sinir büyüme faktörü (NGF: Nerve Growth Factor), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF: Insulin-like growth Factor), IL-2 (interlukin-2) gibi maddelerin ortamda azalması, glukokortikoidler, ve iskemi, toksinler, radyasyon, ilaçlar ve çeşitli antijenler gibi dış etmenler hücre dışı sinyallerdir (Ürküp, 2017).

2.2.5. Apoptoz Mekanizması Yolakları

Apoptoz sürecinde kaspazlar hem başlatıcı hem yürütücü ve hem sonlandırıcı oldukları için apoptoz mekanizmasının merkezinde yer alırlar. Kaspazların etkinleşmesi için üç yolak vardır. intrinsik (içsel, mitokondrial) ve ekstrinsik (dışsal, ölüm reseptörü) yolakları, sonuçta ortak infaz yolağa götürülür. Üçüncü yolak daha az bilinen intrinsik endoplazmik retikulum yolağıdır (O'Brien ve Kirby, 2008).

Ekstrinsik Yolak

DNA hasarı, hücre içi Ca^{++} seviyesinde artış, hücre içi pH azalması ve hücre siklus bozuklukları bu yolağın başlangıcını tetikler. Ölüm reseptörlerinden olan Fas ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in sırasıyla ilgili ligandlarına, yani FasL ve TNF ile etkileşime girmeleri sonucu apoptozun ekstrinsik yolağı indüklenir. Fas ve TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı olarak bir seri protein-protein interaksiyonlarından geçerler. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan TRADD (TNFR1-Associated Death Domain protein, TNFR-1 ilişkili ölüm domain proteini) ve FADD (Fas-Associated Death Domain protein, Fas ilişkili domain proteini) adaptör proteinlerin ölüm efektör domain (DED: Death Efektor Domain) bölgeleri ile interaksiyona girerler (ligand-reseptör-adaptör protein kompleksi). Böylece ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC: Death-Inducing Signaling Complex) oluşur (Kaufmann ve ark., 2012). Bu kompleks kaspaz-8 veya -10'u doğrudan aktive eder (Lou ve ark., 1998). Kaspaz-8 hem doğrudan kaspaz-3'ü aktive eder, hem de mitokondriyal geçirgenliği değiştiren ekstrinsik ve intrinsik yolları birbirine bağlayan pro-apoptotik Bid'in aktif formu olan tBid'e dönüşmesini sağlar (Kaufmann ve ark., 2012).

İntrinsik Yolak

Onarılamaz genetik hasar, hipoksi, sitosolik Ca^{++} 'un aşırı yüksek konsantrasyonu ve aşırı oksidatif stres gibi iç uyarılar bu yolağın başlangıcını tetikler (Öztürk, 2002). Mitokondri, hücre içinde ATP (adenozin trifosfat) üretiminin kaynağı (enerji deposu) olmasının yanı sıra, ölüm programını aktive eden faktörleri sitoplazmaya salarak apoptozda da büyük rol oynamaktadır. Mitokondri iç ve dış zarla çevrili yapıda olarak zar potansiyeline sahip bir organeldir. Dış zar geçirgenliğindeki artış sonucu dış zar hızlı bir şişmeye başlar ve iki zar arasında bulunan çeşitli apoptotic proteinler hücre sitoplazmasına çıkar. Bu proteinlerden biri olan sitokrom-c, sitoplazma proteini olan Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör 1)'e bağlanarak prokaspaz-9'u aktive eder ve böylece 'apoptozom' kompleksini (sitokrom-c-Apaf1-kaspaz 9) oluşturur. Apoptozom sonlandırıcı kaspaz olan kaspaz 3'ü aktive ederek ortak infaz yolağı girer (Herrmann ve Kalden, 2003).

Mitokondriyal intermembran boşluğundan sitoplazmaya salınan diğer apoptotik faktörler, Apoptoz Uyarıcı Faktör (AIF: Apoptosis-Inducing Factor), ikincil mitokondriyal kaynaklı kaspaz aktivatörü (Smac: Second Mitochondria-derived Activator of Caspases) / ENDO G (Endonükleaz G) adlı bir DNaz enzimi, düşük pI ile

direkt IAP (Inhibitor of Apoptosis protein, apoptoz inhibitör proteini) bağlayıcı proteini (DIABLO: Direct IAP-Binding protein with Low PI), Omi/HtrA₂ (High Temperature Requirement Protein A2, yüksek ısı gereksinimi protein A2) ve çok sayıda prokaspazı (-2, -3 ve -9) içerir. Smac, DIABLO veya Omi/HtrA₂, ayrı ayrı IAP'lere bağlanarak IAP'lerin kaspaz-3 veya -9 ile etkileşiminde bozulmaya neden olup apoptoz inhibesini engeller ve böylece kaspaz-3 veya -9'un aktivasyonunu sağlar (Kroemer ve ark., 2007).

Ortak İnfaz Yolağı

İçsel yolakta kaspaz-9 ve dışsal yolakta kaspaz-8, kaspaz-3'ü aktive eder. Kaspaz 3, nükleer apoptozdan sorumlu olan ve kaspazla aktiflenen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD: Caspase-Activated Deoxyribonuclease Inhibitor) parçalar, ve protein kinazlar, hücre iskeleti proteinler, DNA onarım proteinler ve endonükleaz ailesi inhibitör altbirimlerinin bölünmesine neden olur (Ghobrial ve ark., 2005).

İntrinsik Endoplazmik Retikulum Yolak

İntrinsik endoplazmik retikulum (ER) yolağı, kaspaz-12 bağımlı ve mitokondri-bağımsız olduğu düşünülmektedir (Szegezdi ve ark., 2003). Hipoksi, serbest radikaller veya glikoz açlığı gibi hücrel stresler ile ER'ye zarar geldiğinde, protein katlanması ve sentezinde yetmezlik oluşur, ve TNFR-ilişkili faktör 2 (TRAF2: TNFR-associated Factor 2) prokaspaz-12'den ayrılarak onu aktive eder (O'Brien ve Kirby, 2008).

2.2.6. Kaspazlar

Kaspazlar, hücre içi sistein proteaz ailesinin en önemli bölümünü oluştururlar (Ozawa ve ark., 2002). Kaspazlar normalde sitoplazmada inaktif zimojenler olarak bulunurlar (prokaspaz). Ancak proteolitik parçalanmadan sonra aktifleşirler.

Günümüze kadar 14 memeli kaspazı tespit edilmiş ve Tablo 1'de gösterildiği gibi biyolojik fonksiyonlarına göre 3 ana grupta yer alırlar (Keane ve ark., 2001).

Tablo 1. Biyolojik fonksiyonlarına göre kaspaz grupları (Ürküp'den uyarlanmıştır, 2017)

Kaspaz grubu	Kaspaz türü
Enflamatuar kaspazlar	Kaspaz 1 (ICE)
	Kaspaz 4 (ICErel-II, TX, ICH 2)
	Kaspaz 5 (ICErel-III, TY)
	Kaspaz 11 (ICH-3)
	Kaspaz 12
	Kaspaz 13 (ERICE)
	Kaspaz 14 (MICE)
Apoptoz başlatıcı kaspazlar	Kaspaz 2 (ICH-1)
	Kaspaz 8 (FLICE, MACH, Mch 5)
	Kaspaz 9 (ICE-LAP 6, Mch 6)
	Kaspaz 10 (Mch 4, FLICE 2)
Efektör kaspazlar	Kaspaz 3 (CPP32, Yama, Apopain)
	Kaspaz 6 (Mch 2)
	Kaspaz 7 (Mch 3, ICE-LAP 3, CMH-1)

Enflamatuar Kaspazlar

Enflamatuar kaspazlar, sitokin sekresyonu, inflamasyon ve lenfokin üretiminden sorumlulardır. Tetrapeptid yapıda olan kaspaz-1, -4 ve-5 kendi kendilerine aktive olabilmektedirler (Keane ve ark., 2001).

Başlatıcı Kaspazlar

Apoptoz sürecinde ilk görev alan kaspazlar başlatıcı kaspazlardır ve bunların uzun öncül bölgeleri bulunur. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Başlatıcı kaspazların üç önemli özelliği vardır; farklı şekillerde gelen uyarıları genel bitirici faza taşırlar, yeterli miktarda sonlandırıcı kaspazın aktiveleştirerek apoptotik sinyalin çoğalmasını sağlarlar, ve ölümün en son basamağında bir kontrol noktası olarak bulunurlar (Ürküp, 2017).

Efektör Kaspazlar

Efektör kaspazlar, apoptozda sonlandırıcı kaspazlar olarak görev almaktadırlar. Bunlar başlatıcı kaspazlardan farklı olarak kısa bir N-terminal peptid (23-28 aminoasitlik) bulundurulur. Substrat ve inhibitör özgüllüğünde kaspaz 3 ve 7 genellikle

benzerdir. Efektör kaspazlar ilgili proteinleri (örneğin, hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan poli ADP-riboz polimeraz (ADP: Adenosin difosfat)) parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar.

Kaspaz 3 apoptozun efektör fazındaki en önemli kaspaz rolünü üstlenir. DNA fragmantasyonunda, DNAase aktivasyonuna sebep olan kaspaz 3'ün direk rolü olduğu düşünülmektedir. Kaspaz-3 geni kromozom 8 üzerinde lokalizedir. Bu gen embriyonun 4. günden itibaren gelişimden sorumludur. Kaspaz-3'teki eksiklik 3 haftalık embriyoda ölüme neden olabilmektedir (Boatright ve Salvesen, 2003).

Kaspazların Aktivasyon Yolları

Kaspazların en az 3 yolla aktive edilebildiği (dimerizasyonu) gösterilmiştir: Otoaktivasyon, transaktivasyon ve non-kaspaz proteazları ile proteoliz (Ürküp, 2017). Prokaspazlar düşük fakat saptanabilir bir proteolitik aktiviteye ve belli koşullar altında otoaktivasyon potansiyeline sahiptir. Wild tip kaspazların aşırı salınımı ile prokaspaz 8 veya prokaspaz 9 arasındaki protein etkileşimi aracılığıyla oligomerler oluşturulur. Prokaspazların oligomerizasyonu otoaktivasyon için gereklidir. Başlangıç kaspazları bir kez aktive olduğunda diğer prokaspazları transaktive eder. Kaspaz aktivasyonu için diğer bir mekanizmada non-kaspaz proteazları ile direk proteolizdir. Örnek olarak sitotoksik T hücre proteinazı, granzim-B, bir aspartat-spesifik serin proteinazı prokaspaz 3 ve 7'nin etkin bir aktivatörüdür. Granzim-B ayrıca prokaspaz 8, 9 ve 10'un aktivasyonunda da görev alır (Keane ve ark., 2001).

2.2.7. Apoptozun Regülasyonu

Apoptozun regülasyonu Bcl-2/Bax (B-cell lymphoma 2/Bcl-2 associated x, B hücreli lenfoma 2/Bcl2 ilişkili x) gen ailesi ile sağlanır. Bu genlerin protein ürünleri, apoptoz düzenlenmesinde, mitokondriyum düzeyinde hareket ettiği için özellikle intrinsik yolağında rol alıyorlar. Tüm Bcl-2 üyeleri dış mitokondrial membranda bir iyon kanalı ya da gözenekler oluşturarak zar geçirgenliğinden sorumlu dimmerlerdir (Minn ve ark., 1997) ve fonksiyonları ve Bcl-2 homoloji (BH) domainlerine göre üç gruba ayrılmıştır. Birinci grup, dört BH domainin tümünü içeren anti-apoptotik proteinlerdir (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, A1/Bfl-1, ve Bcl-B/Bcl2L10). İkinci grup, BH3 domain ile sınırlı pro-apoptotik proteinlerdir (Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad, Bmf,

Hrk, ve Bik). Üçüncü grup, dört BH domainin tümünü içeren pro-apoptotik proteinlerdir (Bax, Bak ve Bok / Mtd) (Wong, 2011).

Hücrede antiapoptotik Bcl-2 ve Bcl-x, aynı aileden olan Bad, Bim, Bmf, Bid ve BH-3 gibi proapoptotik genler tarafından baskılanır. proapoptotik proteinler normal koşullarda inaktif durumdadır, bu nedenle mitokondriyal zar geçirgenliği Bcl-2 ve benzerlerinin etkisi sayesinde değişmez. Ancak çeşitli uyarılar proapoptotik grubun aktifleşmesine yol açarlar. Örneğin; büyüme faktörünün uzaklaştırılması Bad'ı aktif kılar, kalsiyum artışı Bim'i ve UV (Ultraviolet, morötesi) ışını Bmf'nin aktifleşmesini sağlar. Sonuçta Bcl-2, proapoptotik aile üyeleri tarafından baskılanır. Bcl-2 tarafından inaktif durumda tutulan ve yine aynı aileden olan Bak ve Bax proteinleri etkinleşerek mitokondri dış zarında permeabilite geçiş gözeneklerinin oluşumuna ve zar potansiyelinin değişimine yol açar Böylece apoptotik proteinler intramembran boşluğundan sitozola geçerek apoptoz başlanır (Xu ve ark., 2005).

2.2.8. Apoptoz ve Karsinogenezis

Kanser apoptozun çok az meydana geldiği senaryolarından biridir ve ölümü olmayacak malign hücelere neden olur. Kanserde, hücre bölünmesi ile hücre ölümü arasında bir denge kaybı var (ölmesi gereken hücreler bunu yapmak için gerekli sinyalleri almaz). Apoptozun mekanizması karmaşıktır ve birçok yolak kapsamaktadır. bu yollar boyunca herhangi bir noktada, Kusur ortaya çıkabilir, bu da etkilenen hücrelerin malign transformasyonuna, tümör metastazına ve anti kanser ilaçlarına karşı dirence yol açar.

Genellikle, apoptozdan kaçınılmaya neden olan mekanizmalar, 1) pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin dengesinin bozulması, 2) kaspaz fonksiyonunun azalması ve 3) ölüm reseptörü sinyalleşmesinin bozulması şeklinde olabilir.

Pro-apoptotik ve Anti-apoptotik Proteinlerin Dengesinin Bozulması

Hücre ölümü düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan faktör, saf miktar olmasa da pro- ve anti-apoptotik proteinlerin oranıdır. Bcl2 ailesi proteinler, p53 ve IAPs gibi bazı genlerinin (düzenleyici proteinleri üreten genler) fazla veya az ifadesinin, kanser hücrelerinde apoptozu düşürerek karsinogeneziste katkıda bulunduğu bulunmuştur.

Bcl2 ailesi proteinler

Bcl-2 ailesinin anti- ve pro-apoptotik üyelerinin dengesinde bozulma olduğu zaman, etkilenen hücrelerde düzensiz apoptozis ortaya çıkar. Bunun nedeni, bir veya daha fazla anti-apoptotik proteinin aşırı ekspresyonu veya bir veya daha fazla pro-apoptotik proteinin az ifade edilmesi veya bu ikisinin bir kombinasyonu olabilir (Wong, 2011).

Örneğin Bcl-2'nin aşırı ifadesinin prostat kanseri hücrelerini apoptozdan koruması gösterilmiştir (Raffo ve ark., 1995). KLL (kronik lenfositik lösemi) malign hücreleri in vivo durumunda yüksek Bcl-2 ve düşük Bax düzeyler ile anti-apoptotik fenotipe sahiptir. İn vivo durumunda KLL lökemogenezisi proliferasyonun artmasından ziyade azalmış apoptozise bağlıdır (Goolsby ve ark., 2005).

P53

53 kDa ağırlıkta olan p53 proteini, kromozom 17'nin kısa kolunda (17p13.1) bulunan tümör süpresör TP53 geni tarafından kodlanan en iyi bilinen tümör baskılayıcı proteinlerden biridir. İlk olarak 1979'da Simian Virüs 40 (SV40)'ın büyük T antijenine sıkıca bağlanan kanser hücrelerinin çekirdeğinde birikmiş bir transformasyon-bağımlı hücre protein olarak tanımlandı. Başlangıçta zayıf-onkogen olarak tanımlandı. Daha sonra onkogenik özelliğinin, p53 mutasyonundan kaynaklandığı keşfedildi (onkogenik fonksiyon kazancı). P53 tümör süpresör genindeki bozukluklar insan kanserlerinin % 50'sinden fazlasına bağlanmıştır (Bai ve Zhu, 2006). P53 sadece apoptozun indüksiyonunda yer almakla kalmaz, aynı zamanda hücre döngüsü regülasyonu, gelişimi, farklılaşması, gen amplifikasyonu, DNA rekombinasyonu, kromozomal ayrımı ve hücre yaşlanmasında da önemli bir oyuncudur (genom koruyucusu) (Lane, 1992).

Son zamanlarda, Avery-Kieida ve ark. (2011), p53'ün bazı hedef genlerinin melanoma hücrelerinde sapkın şekilde eksprese olarak p53'ün anormal aktivitesine ve bu hücrelerin proliferasyonuna katkıda bulunduğunu bildirmiştir.

Apoptoz İnhibitörü Proteinler (IAPs)

IAP'ler, bakülovirüs IAP tekrar (BIR: Baculovirus IAP Repeat) protein domainine sahip ve ayrıca yapısal ve fonksiyonel olarak apoptozu, sitokinezi ve sinyal iletimini düzenleyen proteinlere benzer bir gruptur. Bugüne kadar 8 IAP bulunmuştur: NAIP (BIRC1), c-IAP1 (BIRC2), c-IAP2 (BIRC3), X-bağlantılı IAP (XIAP, BIRC4), Survivin (BIRC5), Apollon (BRUCE, BIRC6), Livin / MLIAP (BIRC7) ve IAP-benzeri

protein 2 (BIRC8). IAP'ler muhafaza edilmiş BIR domainlerini kaspazların aktif alanlarına bağlayıp aktif kaspazların bozulmasını teşvik ederek veya kaspazları substratlarından uzak tutarak, kaspaz aktivitesini inhibe edebilirler (Wong, 2011).

Birçok kanserde düzensiz IAP ekspresyonu bildirilmiştir. Örneğin, Lopes ve ark. (2007), pankreas kanseri hücrelerinde IAP ailesinin anormal ifadesi olduğunu ve kemoterapiye direncinden sorumlu olduğunu göstermişlerdir (en fazla cIAP-2 ile bağlantılı). Small ve ark. (2010), Survivin'i aşırı eksprese eden transgenik farelerin hematolojik malignitelere daha yüksek riskli ve apoptoza daha az duyarlı olduğunu gözlemlemişlerdir. Öte yandan, Livin'in melanoma ve lenfomada yüksek ekspresesi (Ashhab ve ark., 2001), Apollon'un da gliomlarda yüksek seviyelerde düzenlendiği ve sisplatin ve kamptotesin direncinden sorumlu olduğu saptanmıştır (Chen ve ark., 1999).

Kaspaz Fonksiyonunun Azalması

Kaspaz aktivasyonunun inhibitörleri, sitokrom c'nin mitokondriden salınımını bloke etmez ancak ardışık kaspaz aktivasyonunu bloke ederek, hücre ölümünü önler. Kaspazlar, ya hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile ya da kaspaz 9 bağlayıcı protein olan Apaf-1'in oligomerizasyonu ile aktive olurlar. Başlangıçta, kaspazlar mitokondride membran hasarı oluşturur ve bu olayların sonucunda; zar değişimleri, hücre iskeleti ve çekirdek değişimine yol açan hasarlar ortaya çıkar (Öztürk, 2002). Başlangıç kaspazları bir kez aktive olduğunda diğer prokaspazları aktive eder. Proteolitik olarak birbirlerini aktifleştiren kaspazlar bir kaskad şeklinde işlerler (Chou ve ark., 2000). Böylece kaspazlar apoptozun başlatılma, yürütme ve sonlandırılmasında önemli oyuncularlardır. Bu nedenle kaspazların düşük seviyesinin veya fonksiyonlarında bozulmanın, apoptoz azalmasına ve karsinojenezise yol açabileceğine inanmak mantıklıdır (Wong, 2011).

Bir çalışmada, caspase-9'un azalması, evre II kolorektal kanserli hastalarda sık görülen bir olay olarak bulunmuştur ve kötü klinik sonuçla ilişkilidir (Shen ve ark., 2010). Devarajan ve ark. (2002), caspase-3-eksikli MCF-7 meme kanseri hücrelerinin apoptotik anti-kanser ilaçlarına yanıtta kaspaz-3 ekspresyonunu düzelterek apoptozise uğrama duyarlılığını arttırdığını gözlemlemişlerdir.

Ölüm Reseptörünün Sinyalleşmesinin Bozulması

Ölüm reseptörleri, TNFR1 (DR1: Death Receptor 1, ölüm reseptörü 1), Fas (DR2/CD95/APO-1), DR3 (APO-3), DR4 (APO-2/TRAIL-1: TNF-related apoptosis-inducing ligand 1, TNF-ilişkili apoptoz-indükleyici Ligand reseptör 1), DR5 (TRAIL-2), DR6, ektodisplazin A reseptörü (EDAR) ve NGF Reseptörü (NGFR)'nü içerir. Ölüm reseptörleri ve ilgili ligandları, apoptozun dışsal yolağında anahtar oyuncularıdır. Bu reseptörler bir ölüm domainına sahiptir ve bir ölüm sinyali tarafından tetiklendiğinde, ölüm domainına bir kaç molekül çekilir ve bu da bir sinyalleme kaskadının aktivasyonu ile sonuçlanır. Bununla birlikte, ölüm ligandları bir ölüm domainına sahip olmayan tuzak ölüm reseptörlerine de bağlanabilir ve sinyalleme kompleksleri oluşturmayı başaramaz. Ölüm reseptörlerinin azalması, fonksiyonunun bozulması ve ya ölüm sinyallerinin azalması, sinyal bozukluğuna ve dolayısıyla apoptozun azalmasına katkıda bulunmaktadır (Wong, 2011).

Örneğin, tedaviye dirençli lösemi (Friesen ve ark., 1997) veya nöroblastoma (Fulda ve ark., 1998) hücrelerinde azalmış bir CD95 ekspresyonunun rol oynadığı bulunmuştur. Reesink-Peters ve ark. (2004), servikal intraepitelyal neoplazi (CIN: Cervical Intraepithelial Neoplasia) kanser dizisinde Fas kaybı ve FasL, DR4, DR5, ve TRAIL'in disregülasyonunu karsinogeneze sorumlu olduğu sonucuna varmıştır.

2.2.9. Kanser Tedavisinde Apoptozu Hedefleme

Çift taraflı bir kılıç gibi, apoptotik yollardaki her kusur veya anormallik, kanser tedavisinde ilginç bir hedef olabilir. Literatürün bolluğu, kanser tedavisinde apoptozu hedeflemenin uygun olduğunu ileri sürer. Apoptotik sinyal yollarını normale döndürebilen ilaçlar veya tedavi stratejileri, bu kusurlara-bağlı canlı kalan kanser hücrelerini yok etme potansiyeline sahiptir. Birçok yeni ve önemli bulgu, yeni anti kanser potansiyeline sahip ilaç sınıfları için yeni kapılar açmıştır.

Literatür zenginliği, apoptotik yollardaki kusurların karsinogeneze önemli bir rol oynadığını ve apoptozu hedefleyen birçok yeni tedavi stratejisinin uygulanabilir olduğunu ve çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılabileceğini önermektedir. Bu bulguların bazıları pre-klinik ve diğerleri zaten klinik araştırmalara girmiş durumdadır. Öte yandan, apoptozu hedefleyen yeni moleküller spesifik olarak tek bir yolak veya protein üzerinde hareket ediyorsa, klinik yarar sağlayacaktır. Bununla birlikte, klinik deneylere giren moleküllerin çoğunun çeşitli hedefleri vardır ve bunlar Bcl-2 ailesi proteinlerinin birçok inhibitörünü ve bazı pan-IAP inhibitörlerini içerir (Wong, 2011).

2.3. Bitkisel Tıp

Eski çağlarda, mevcut tek ilaç bitkilerdi (Tobyn ve ark., 2011). Aslında, bitkilerin terapötik gücü insanlık kadar eskidir (Seca ve ark., 2014). Parlak kokulu ve tıbbi özelliklere sahip çok sayıda bitki eski Mısırlılar, Romalılar ve Yunanlılar tarafından bilinmiş ve kullanılmıştır (Topkaçı, 2016). Dünya Sağlık Örgütü raporları, küresel nüfusun yaklaşık % 80'inin hala botanik ilaçlara dayandığını ve çeşitli bitkisel ilaçların günümüzde klinik kullanıma girdiğini gösteriyor (Seca ve ark., 2014).

Yerdeki 250.000-500.000 bitki türünün sadece %1-10'u, potansiyel tıbbi değerine göre kimyasal ve farmakolojik olarak incelenmiştir (Verpoorte, 2000). Geleneksel tıp sistemlerinde 2000'den fazla bitki listelenmiştir (Seca ve ark., 2014). Bununla birlikte, bu bitkilerin olası tıbbi uygulamaları hakkında çok az bilgi bilinmektedir.

Yabani otlardan elde edilen biyoaktif metabolitler, sağlık yararları nedeniyle gıda ve ilaç endüstrilerinin ilgisini çekmiştir. Tarım arazilerinde, bahçelerde, yol kenarlarında büyüyen ve hayatta kalmaları için insan müdahalesine bağlı olmayan yabani otlar, ekim gerektirmedikleri için ucuz bitkisel madde kaynaklarıdır ve düşük maliyetli ürünlere yol açabilir (Trimech ve ark., 2014). Bununla birlikte, yabani otların biyoaktif sekonder metabolitlerde nispeten zengin olduğu hipotezini destekleyen kanıtlar vardır ve bu nedenle ilaç keşfi için umut verici kaynaklar olabilir (Güçlütürk ve ark., 2012). sentetik kimyanın son zamanlarda hakim olmasına rağmen, hastalık tedavisi ve önlenmesinde ilaç keşfetmek ve üretmek için biyoaktif bitkilerin veya ekstraktlarının bir yöntem olarak yeni ürünler sunma potansiyeli hala çok büyüktür (Kviecinski ve ark., 2008). Bitki ekstraktları içerisinde bulunan aktif ilkelerin araştırılması çoğu durumda bilimsel bilgiyle birleştirilir ancak geleneksel kullanımın onaylanması gerekir.

Günümüzde bitki ürünleri sıklıkla sentetik ilaçlardan daha az zehirli ve daha az yan etkiye sahip olduğu düşünülmekte ve sonuç olarak halk tarafından çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Seca ve ark., 2014). Son zamanlarda, minimal toksisite ile kanser tedavisi için doğal olarak oluşan kemoterapötik bileşiklerin tanımlanması üzerine daha çok özen yoğunlaşmıştır (Merghoub ve ark., 2017). alkaloidler, fenilpropanoidler ve terpenoidler gibi bitki kaynaklı doğal ürünler, Antitümör özelliklere sahip gruplardır (Park ve ark., 2007).

Son yıllarda, *Inula* türleri biyolojik faaliyetleri nedeniyle dikkat çekmiştir; dolayısıyla, ekstraktları veya kimyasal bileşimlerinin araştırılması başlanmıştır (Topkaçı, 2016). Literatüre ilk bakışta, *Inula viscosa*'nın hem ekstraktlarının hem de saf izole edilmiş sekonder metabolitlerinin biyolojik aktivite değerlendirmelerinin analiz edilmesinde ciddi bir büyük eksikliğin var olduğu sonucuna varıyoruz (Seca ve ark., 2014).

2.4. *Inula viscosa* (L.) Aiton

Inula viscosa (L.) Aiton, Inuleae takımından Compositae (Asteraceae) ailesinde yüzü aşkın türü olan geniş *Inula* cinsinin bir üyesi olarak yaprak dökmeyen ve doğal olarak yetişen bir bitkidir (Topkaçı, 2016). Eş anlamlıları, *Cupularia viscosa* (L.) Godr. & Gren.; *Erigeron viscosus* L.; *Inula viscosa* (L.) Aiton; ve *Jacobaea viscosa* (L.) Merino'yu kapsar. Bazen sahte sarı kafa, aromatik inula ve yapışkan fleabane olarak da tanılır (Trimech ve ark., 2014). Araplar tarafından "Taioon" ismi kullanılır (Saad ve Said, 2011) ve Türkdilinde "yapışkan andız otu (elecampane)" olarak adlandırılmaktadır. Ancak, *Dittrichia* cinsinin taksonomik revizyonu, *Inula viscosa* (L.) Aiton'un, Kabul edilen *Dittrichia viscosa* (L.) W.Greuter (Brullo ve Marco, 2000) ismine eş anlamı olduğunu göstermiştir ve bu taksonomik değişiklik online "Bitki Listesi" veritabanında doğrulanmıştır (Seca ve ark., 2014). Ayrıca dikkate değer olan, *Inula viscosa* isminin kabul edilen taksonomik değişimden sonra dahi yayınlarda görünmeye devam etme gerçeğidir (Talib ve ark., 2012).

Asteraceae ailesi kozmopolit bir aile olarak neredeyse dünyanın dört bir yanına yayılmıştır; özellikle Güneybatı Amerika, Meksika, Güney Brezilya, Andes, Akdeniz Bölgesi, Güneybatı Asya, Orta Asya, Güney Afrika ve Avustralya'da yayılmıştır. Bu aile türü yaklaşık 1100 cins ve 2500 tür içerir. Bunlardan 133 cins ve 1156 tür doğal olarak Türkiye'de bulunmaktadır (Topkaçı, 2016). *Inula viscosa* Akdeniz Havzasında yaşayan çok yıllık tıbbi ve aromatik bir Saldırgan yabani ottur (Çelik ve Aslantürk, 2010). *Inula viscosa*'nın temel yetişme yerleri nemli habitatlarda çakıl nehir yatakları, dağ yamacında yassı çakıllar, kumlu topraklar ve kayalık kıyılardaki volkanik cürüflardır; İkincil yetişme yerleri ise yol kenarları, terk edilmiş alanlar ve duvarlardır (Topkaçı, 2010).

Bitki uzun ömürlü, tabanında otsu, dikey saplı, yoğunca glandüler, kıllı ve daima yeşillenmiş (yaprak dökmeyen) bir çalıdır (Brullo ve Marco, 2000) (Şekil 2). 40-

130 cm yükseklik (daha az sıklıkta 2 metre) ve 1 m genişliğe sahiptir (Trimech ve ark., 2014).



Şekil 2. *Inula viscosa* (L.) Aiton

2.4.1. *Inula viscosa*'nın Terapötik Özellikleri

Inula viscosa antik çağlardan beri antienflamatuar, antipiretik ve sakinleştirici özelliklerine sahip olduğu için ilaç olarak kullanılmıştır (Saad ve Said, 2011). *Inula viscosa*'nın antiülserojenik etkileri vardır (Alkofahi ve Atta, 1999), düşüğe sebep olur (Farnsworth ve ark., 1975), memelilerde zigot implantasyonunu engeller (Al-Dissi ve ark., 2001), patojen mantarların büyümesini önler (Maoz ve Neeman, 2000), ve güçlü bir antioksidan aktiviteye sahiptir (Schinella ve ark., 2002). *Inula viscosa* sedef hastalığına karşı kullanılan geniş şifalı ot paletine de dahildir (Musthaba ve ark., 2011).

Ürdün geleneksel tıbbı *Inula viscosa*'ya balgam söktürücü, diüretik, romatizmal ağrı için lapa, bronşit, tüberküloz ve anemi tedavisi gibi çeşitli kullanımlar atfeder, ayrıca çiçeklerinin dekoksasyonu kas gevşetici (Hudaib ve ark., 2008) ve anti-paraziter (Afifi-Yazar ve ark., 2011) özelliklere sahiptir ve akciğer kanseri için kullanılmaktadır (Wamidh ve ark., 2010).

Fas halk tıbbında romatizmal ağrı ve tüberküloz için lapa olarak, bronşit tedavisinde balgam söktürücü olarak, anti-paraziter ve anti-anemik olarak, ve ayrıca hava kısmı dekoksasyonu renal hastalıkların tedavisinde diüretik olarak kullanılmıştır (Merghoub ve ark., 2016). Ayrıca Fas'ın Güney Doğu bölgesinde *Inula viscosa* yaprak ve kökleri dekoksasyonu hipertansiyonu tedavi etmek için geleneksel tıpta (Tahraoui ve ark., 2007) kullanırken, yaprak ve çiçekleri dekokasyonu *Inula helenium* ve *Inula*

konyza ile birlikte diabet mellitus tedavisinde kullanılan şifalı bitkiler listesine dahil edilmiştir (Eddouks ve ark., 2007).

Greko-Arap ve İslamik geleneksel tıbbında *Inula viscosa* kökleri, antiseptik ve balgam söktürücü madde olarak öksürük ve katarrh (nezle)'a karşı da kullanılmıştır (Saad ve Said, 2011). Araplar, *Inula viscosa*'yı en önemli tıbbi bitkilerden biri olarak görüyorlar, çünkü 40 farklı rahatsızlığı iyileştiriyor (Seca ve ark., 2014).

Güney İtalya'nın bazı bölgelerinde, *Inula viscosa* köklerinin kaynatılmışı, alerjik kökenli cilt tahrişlerinin tedavisinde ve hava kısımlarının kesim kanamasını durdurmak için kullanıldığı bildirilmiştir (Passalacqua ve ark., 2007).

Filistin'de *Inula viscosa* yaprakları, kas gevşemesi ve kısırlığı tedavi etmek için kullanılır (Kaileh ve ark., 2007).

İspanyol halk hekimliğinde bu bitki gastroduodenal bozuklukların tedavisinde kullanılmıştır (Lastra ve ark., 1993).

Türkiye'de yeşil yaprakları yaraları iyileştirmek için kullanılmaktadır (Topkaçı, 2010).

2.4.2. *Inula viscosa* Bileşikleri

Inula viscosa'nın yaprak, çiçek ve hava kısımlarından şimdiye kadar Kostik asit, İzokostik asit (Cohen ve ark., 2006), Tomentosin, İnüviskolide, İlisik asit (Merghoub ve ark., 2016), 7-O-Methylaromadendrin, Sakuranetin, Hispidulin, 3-Acetyl-7-O-methylaromadendrin, 3-O-Methylquercetin, 3,3'-di-O-Methylquercetin, ve Nepetin (6-metoksiluteolin) (Seca ve ark., 2014) gibi farmakolojik olarak aktif bileşikler izole edilmiştir. Bunlar fenolikler, flavonoidler, terpenoidler, seskiterpen asitleri, seskiterpen laktonlar (Cohen ve ark., 2006), ve azulenler (Lauro ve Rolih, 1990) sınıflarında yer almaktadır. Uçucu yağın ana bileşenleri ise Seskiterpenler (en yüksek), Fenoller, Hidrokarbonlar, Monoterpenler, Aldehitler, Ketonlar, Diterpenler, Alkoller ve Tetraterpenler olarak açıklanmıştır (Alalan ve ark., 2015).

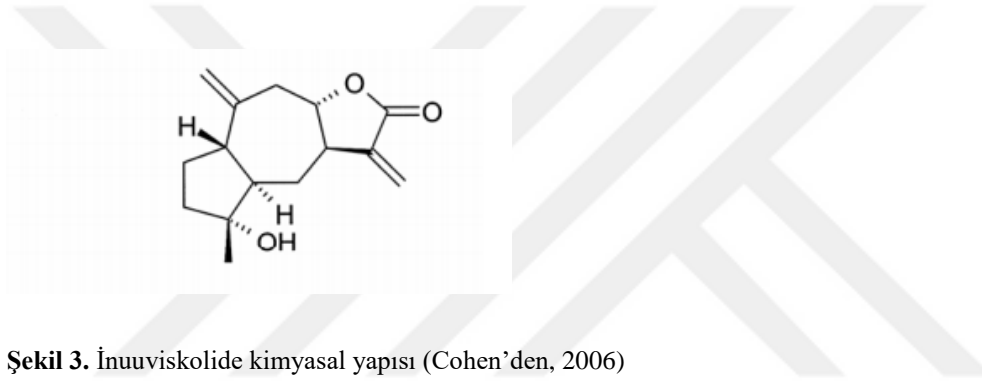
Seskiterpen Laktonlar

Seskiterpen laktonlar (SL'ler) son zamanlarda anti-neoplastik ve kemoterapik ajanlar olarak farmakolojik özelliklerinden dolayı incelenmiştir (Rozenblat ve ark., 2007). Bu bitki ekstraktlarının anti kanser etkisi seskiterpen bileşiklerine atfedilebilir (Merghoub ve ark., 2017). Ayrıca SL'ler, antienflamatuar ve mantar öldürücü özellikleri

ile de geleneksel tıpta kullanılan çeşitli tıbbi bitkilerin aktif bileşenleri olarak tanımlanmıştır (Hwang ve ark., 1996). SL'lerin dört iskelet tipi, Eudesmanolidler, Guaianolidler, Pseudoguaianolidler ve Germakranolidler olarak asıl anti-tümörlü aktif bileşikleridir (Seca ve ark., 2014).

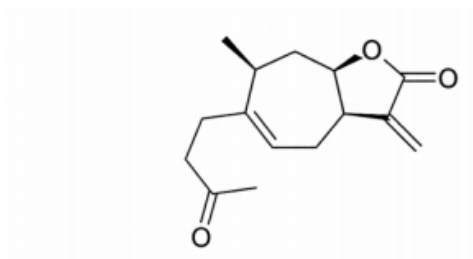
İnuviskolide

İnuviskolide (Şekil 3) *Inula viscosa* biyolojik özelliklerinden sorumlu olan Guaianolidler sınıfından bir SL türü bileşiktir (Seca ve ark., 2014). İnuviskolide'nin anti-enflamatuar (Abrham ve ark., 2010) ve antimikrobiyal aktivitelere sahip olduğu, bazı kanser hücre hatlarına karşı sitotoksikite sergilediği ve cilt hastalıklarına karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Hernandez ve ark., 2001).



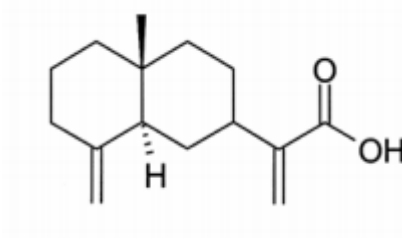
Tomentosin

Diğer bir SL olan Tomentosin (Şekil 4), anti-enflamatuar (Hernandez ve ark., 2007), hipoglisemik, hipolipidemik (Zeggwagh ve ark., 2006), antibakteriyel, antifungal (Maoz ve Neeman, 1998) ve antimalaryal (Joshi ve ark., 1997) etkileri, ve çeşitli insan kanser hücre dizileri üzerinde anti-proliferatif etkinliği (Talib ve Mahasneh, 2010) ile bildirilmiştir.



Kostik Asit

Kostik asit (Şekil 5), *Spodoptera littoralis* kaynaklı Sf9 hücrelerine selektif sitotoksik etkiler göstermiştir (Merghoub ve ark., 2016).



Şekil 5. Kostik asit kimyasal yapısı (Cohen'den, 2006)

Flavonoidler

Flavonoidler ile azalmış kanser riski arasındaki ilişki, flavonoidlerle zengin sebze ve meyvelerin tüketimi ile bildirilmiştir. Flavonoidlerin kanser hücrelerinde apoptozu indükledikleri iddia edilmiştir (Park ve ark., 2007). *Inula viscosa*'dan izole edilen flavonoidlerden olan 7-O-Methylaromadendrin, Sakuranetin, 3-Acetyl-7-O-methylaromadendrin, 3,30 -di-O-Methylquercetin, Nepetin antikanser, antienflamatuar, antidiabetik ve antioksidan aktiviteler gibi ilginç biyolojik özellikleri gösteren çok önemli bileşiklerdir, ve muhtemelen geleneksel tıpta kullanımını destekleyen bazı faaliyetlerden sorumlu bileşenler olabilir (Hernandez ve ark., 2007).

2.5. Akut Miyeloid Lösemi'de Tedavi

Tedavinin esası sitoredüksiyon ve remisyonun sağlanması için yapılacak kemoterapilere dayanır. 1970'lerden beri Ara-C ve antrasiklinler (genellikle daunomycin kullanılır) AML tedavisinin temelini oluşturmaktadırlar. Etoposide, amsacrine, dexamethasone, 6-thioguanine, cyclophosphamide, mitoxantrone diğer kullanılan ilaçlardır. Kemoterapi, remisyon indüksiyon, MSS (Merkezi Sinir Sistemi) profilaksisi ve post remisyon tedavisi evrelerinden oluşur. Remisyon sağlandıktan sonra postindüksiyon tedaviler gerekmektedir, yapılmazsa % 90 hastada relaps olur.

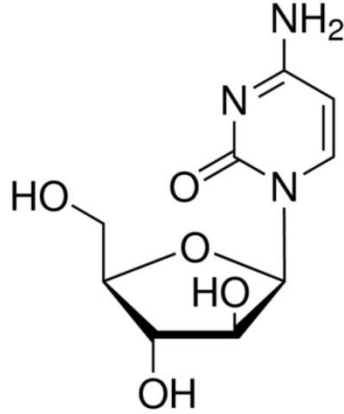
Risk grubuna göre ve uygun verici varlığında kemik iliği transplantsyonu (KİT) yapılabilir. KİT yapılmazsa Ara-C, etoposide, mitoxantrone ve yüksek doz sitozin arabinosid ile L-asparaginase'dan oluşan konsolidasyon kürleri uygulanır (Altun, 2018).

Radyasyon terapi yaşamsal bası yapan ve daimi hasar riski olan kloromalarda kullanılmaktadır. Radyasyon terapinin önemli indikasyonları Spinal kord basısı, vena cava superior sendromu, mediastinal kitleye bağlı solunum yolu basısıdır. Bu komplikasyonlar steroidler ve kemoterapi ile giderilir. Düzelmeyen MSS tutulumunda kranial radyoterapi uygulanır (Anak ve Uysalol, 2012).

2.5.1. Sitozin Arabinozid

Sitozin arabinozid (sitarabin, Ara-C) (Şekil 6) deoksisitidinin arabinosid nükleozid analogu olarak akut lösemilerin ve lenfomanın tedavisinde kullanılmaktadır. Sitarabin, intraseluler metabolik aktivasyonundan sonra DNA polimerazı inhibe eder ve DNA'nın yapısına katılarak DNA replikasyonunu ve tamirini bozar. Sitarabin'in geniş doz aralığı ve şeması mevcuttur.

Doz ve şemasına bağlı olarak zincir uzamasını durdurabilir, önceden replike olmuş DNA segmentlerini tekrar uzatabilir ya da DNA zincirinde kırıklar oluşturabilir (Vaughan ve ark., 1984). Bu olay DNA sentezinin sadece sentez fazında (S fazı) meydana gelir. Sitarabine daha uzun süre maruziyet, daha fazla sayıda hücreyi etkiler (Örel, 2011).



Şekil 6. Sitarabin'in kimyasal yapısı (sigma-aldrich'den, 2019)

Sitarabin nükleozid aracılı hücre içine girer ve intraselüler kinazlar tarafından ardışık üç fosforilasyon ile aktif nükleotidi olan Ara-C trifosfata (Ara-CTP) çevrilir. Ara-CTP doğal bir madde olan deoksisitidin trifosfat (d-CTP) ile DNA sentez ve tamir enzimlerinin yapısına girmek için yarışır. Bu sırada sitarabin ve Ara-C monofosfat (Ara-CMP) hücre içinde deaminazlar (sitidin deaminaz gibi) tarafından inaktif formları

olan uridin arabinozid (Ara-U) ve uridin arabinozid monofosfat (Ara-UMP)'a dönüştürülür (ilaç eliminasyonu) (Ho ve Frei, 1971). İlacın kanser hücresi içine alınması ve metabolik yollardaki değişiklikler (hücre zarı geçirgenliğinde azalma, deoksisitidin aktivitesinde düşme, sitidin deaminaz yıkım aktivitesinde artış) ilaç direnciyle sonuçlanır (Grant, 1998).

Sitarabin Arabinozid'in Toksikitesi

Sitarabinin konvansiyonel dozlarda toksik yan etkileri; kemik iliği baskılanması, bulantı, kusma ve gastrointestinal mukozal hasardır (Stentoft, 1990). Çocuklarda yüksek ateş, yorgunluk, myalji, kas ve kemik ağrısı, döküntü, konjunktivit ve göğüs ağrısıyla seyreden bir sendrom da rapor edilmiştir. Sitarabin ile birlikte kortikosteroid kullanımı bu semptomları önlemektedir (Örel, 2011).

Sitarabinin yol açtığı nörotoksosite yüksek doz tedavi ile ilişkilidir. İleri yaş ve hepatik ya da renal disfonksiyonu nörotoksosite gelişiminde diğer risk faktörlerdir. Sitarabin nörotoksitesini en sık akut serebellar sendrom şeklinde ortaya çıkar (Baker ve ark., 1991). Serebellar sendromunda disartri, disdiadokinezi, dismetri ve ataksi başlıca bulgulardır. Sitarabinin serebellar toksisitesine karşı etkin bir tedavi yöntemi yoktur. Ancak en erken bulguları (ataksi ve nistagmus) görüldüğünde ilaç tedaviden çıkarılır ve destek tedavi başlatılır. Birçok olguda semptomlar ilacın kesilmesinden sonra bir hafta içinde düzelirken; hastaların %30'u tam olarak serebellar fonksiyonları geri kazanamaz (Örel, 2011).

Sitarabin ile ilişkili diğer nörolojik toksisiteler, nöbetler, ensefalopati, Periferik Nöropati, geçici bilateral rektus kas palsisi, Broca afazisi, Parkinsonizm, araknoidit (intratekal tedavi ile) ve brakial pleksopatidir (Baker ve ark., 1991).

Ayrıca yüksek dozda dermatolojik ve oküler toksik bulgular da görülebilir (Stentoft, 1990).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma ve Kontrol Grupların Oluşturulması

Deney Grupları

3 maruziyet süresi (24, 48 ve 72 saat) grubunda kültüre edilmiş AML M₂ alt tipi olan Kasumi-6 hücrelere Ara-C, *Inula viscosa* Yaprak Ekstraktı (IVYE) ve Çiçek Ekstraktı (IVÇE) solüsyonları farklı 3 konsantrasyonda uygulandı. Konsantrasyonlar IVYE ve IVÇE için 25, 50 ve 100 µg/ml ve Ara-C için 0,1, 0,5 ve 1 µmol'dı (Altun, 2018). Ayrıca testin kontrolleri paralel olarak aynı miktarlarda içerikler olarak (test maddesi hariç) her grup için oluşturuldu.

Negatif Kontrol

Hücre süspansiyonuna diğer gruplarda olduğu gibi sadece %1 oranında %10'luk DMSO (dimetil sülfoksit) eklendi. Ancak hiç bir test maddesi eklenmedi. Bu kontrol apoptotik ve ölü hücrelerin bazal seviyesini tanımlamak için kullanıldı. Çünkü, indüklenen apoptozun yokluğunda bile, çoğu hücre popülasyonu apoptoz için pozitif olan küçük bir yüzdeyi içerir. Apoptoza uğrayan hücrelerin yüzdesini belirlemek için, bu popülasyondaki apoptotik yüzdesi test maddelere maruz bırakılan popülasyondaki apoptotik yüzdesinden çıkarıldı. Ayrıca %10'luk DMSO'nun nihayi konsantrasyonunun (% 1) hücreye zararsız olduğu da kontrol edildi.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Bu çalışmada kullanılan cihazlar ve sarf malzemelerin listesi aşağıda sunulmuştur. Bu cihaz ve teknik malzemeler, Ondokuz Mayıs Üniversitesi (OMÜ), Tıp Fakültesi, İmmünoloji-Alerji Anabilim Dalı, Çocuk İmmünoloji ve Alerji Laboratuvarına aittir.

-80°C derin dondurucu (ULT U100)

-20°C derin dondurucu (Siemens)

+4°C soğutucu (Vestel)

Sıvı azot tankı (Thermo SCIENTIFIC BIOCANNE 20)

Santrifüj (nüve NF 800)

Mikrobiyolojik güvenlik kabin klas II (nüve MN 090)
İnkübatör (nüve EC 160)
İnverted mikroskop (LEICA DMi1)
Hücre sayma cihazı (Countess™ II Automated Cell Counter)
Su banyosu (nüve ST 30)
Şarjlı Pipetör (LABSOLUTE)
Otomatik pipet (DRAGONLAB)
Flow Sitometri cihazı (Becton Dickinson FACS Calibur)
Hassas terazi (KERN ABJ 220-4NM)
Vorteks (Labnet Vx100)
Steril polistiren konik tüpü (BD Falcon™)
Steril enderörf tüpü (KIRGEN)
Steril yuvarlak dipli polistiren test tüpü (FALCON^R)
Steril plastik otomatik pipet ucu (BIOLOGIX)
Steril hücre kültür flaskı (Orange Scientific)
Steril pipet (Costar^R)
Steril hücre kültür plakası (SPL Life Science)

Ayrıca OMÜ, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Araştırma Laboratuvarında Soxhlet cihazı ve Rotary Evaporatör cihazı (BÜCHI) kullanıldı.

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar aşağıda verilmiştir:

Etil alkol (ISOLAB chemicals)

Steril damıtılmış su (Polifarma)

L-glutamin solüsyonu (Diagnovum)

İnsan rekombinant granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktörü (rhGM-CSF)
(STEMCELL)

Penisilin ve streptomisin solüsyonu 100X (Capricorn Scientific)

Fetal sığır serum (FBS: Fetal Bovine Serum) şurubu (Diagnovum)

RPMI 1640 (RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) besiyeri 1X
(gibco)

DMSO (SIGMA Life Science)

Kasumi-6 (ATCC® CRL-2775™)

Ara-C (SIGMA-ALDRICH)

Inula viscosa (Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü)

FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen)

Anti CD45 (2D1) APC (Allophycocyanin) monoklonal Antikor (BD)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Biological Industries)

Trypan Blue Solution (SIGMA Life Science)

3.2. Metot

3.2.1. Ortamın ve Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu ve Temizliği

Ekstrakt işleminde kullanılan Soxhlet ve Rotary Evaporatör cihazına bağlı cam malzemeler musluk su ile 7-8 defa çalkalandılar ve çamaşır suyu içeren distile su kovalarında 1 gece bekletildiler. Çamaşır suyundan tamamen uzaklaştırılması için sonraki gün tekrar musluk suda 7-8 defa yıkandılar ve 1 gece distile su içeren kovada bekletildiler. Ertesi gün 40°C'lik etüvde kurutuldular. Sonra 180°C'de kuru sıcak hava sterilizasyonuna 2 saat tabi tutuldular. Laboratuvarın çalışma alanları, laminar kabinin ve inkübatör içi %70'lik alkol ile çalışma öncesi ve sonrası temizlendi. Ayrıca çalışma öncesi ve sonrasında belli süreler ile hücre kültürü laboratuvarı, güvenlik kabini ve inkübatör UV lambalar ile steril edildi. Çalışma sırasında temiz önlük, maske, tek kullanımlık galoş ve eldiven kullanıldı.

3.2.2. *Inula viscosa* Bitkisinin Etil Alkol Ekstraktının Hazırlanması

Inula viscosa ekstraktı ve bileşikleri ticari olarak satılmamaktadır bunun için ham ekstrakt alma işlemi laboratuvar ortamında yapıldı. *Inula viscosa* doğal olarak Akdeniz bölgesi florasında bulunmaktadır.

Bitkinin Toplanması, Kurutulması ve Öğütülmesi

Bitki; çiçeklenme döneminde (Eylül 2017) Akdeniz bölgesinden (Türkiye, İzmir) Dr. Ünal KARIK (Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü) tarafından toplandı. 7 gün süreyle kuru ve karanlık ortamda kurutuldu. Tür tespiti Dr. Ünal KARIK ve Prof. Dr. Kudret KEVSEROĞLU (OMÜ, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü) tarafından yapıldı. Ayrıca bir adet kurutulmuş materyal (herbarium) 'KK18' numara ile OMÜ Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümünde muhafaza edilmektedir (Şekil 6). Bitkinin

çiçek ve yaprakları ayrıldıktan sonra ayrı ayrı öğütüldü ve ekstrakt işlemi başlanılana kadar oda sıcaklığında karanlık ve nemsiz ortamda saklandı.



Şekil 6. *Inula viscosa* toplanması ve kurutulması

Bitki Ekstraktının Alınması ve Saklanması

Bu işlem OMÜ, Mühendislik Fakültesi, Gıda mühendisliği Bölümü, Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Toz haline gelen 10 gr yaprak ve 10 gr çiçek hassas terazi ile tartıldı. Tartılan yaprak ve çiçekler ayrı ayrı filtre kağıdına konuldu ve Soxhlet cihazında 500 ml etil alkol çözücü ile 24 saat boyunca muamele edildi. Etil alkolün buharlaşmasını sağlayan sıcaklık su banyosu ile temin edildi. Sıcaklık 50°C'yi geçmedi. Cihazdaki etil alkol kaynama noktasına (78.37°C) gelince buharlaşmaya başladı. Gaz halindeki etil alkol problerden yukarı çıkarak soğuk çiçek veya yapraklara temas etti ve sıvı haline döndü. Bu işlem tekrarlanınca mahfaza doldu ve belli noktasına geldikten sonra sifon yaptı. Kaç sifondan sonra etil alkol çözücüsü içinde ekstrakt elde edildi (Şekil 7).



Şekil 7. Soxhlet cihazı ile *Inula viscosa* yaprak ve çiçeğinden ekstrakt alma

Ham bir ekstrakt elde etmek için Rotary Evaporatör cihazıyla elde edilen etil alkollü ekstraktın etil alkolü uçuruldu. Su banyosu sıcaklığı ile ekstraktın etil alkolü buharlaştı. Gaz halindeki etil alkol problarla cihazın diğer bölümüne geçerek soğuk su dolaşan probalara temas etti ve sıvı haline döndü ve ayrı atık mahfezesine damla damla döküldü (Şekil 8). Bu işlem 5 saat devam edildi. Sıcaklık 50°C'yi geçmedi. Liyofilize işlemi in vivo çalışmaları için bu aşamadan sonra yapılır. Ham ekstrakt bu in vitro çalışmasına uygundur. Elde edilen ham ekstrakt kullanılana kadar +4°C'de saklandı.



Şekil 8. Rotary evaporatör cihazı ile ham ekstrakt elde etme

3.2.3. Etken Maddelerin Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

Bu aşamadan itibaren çalışma OMÜ, Tıp Fakültesi, İmmünoloji-Alerji Anabilim Dalı, Çocuk İmmünoloji ve Alerji Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmanın mikrobiyal güvenlik kabini altında katı steril koşullarında yapılmasına özen gösterildi.

%10'luk ve %2'lik DMSO Hazırlanması

100 µl DMSO, 900 µl steril distile suya eklendi (%10).

20 µl DMSO, 980 µl steril distile suya eklendi (%2).

IVYE Stok Solüsyonunun Hazırlanması

1 mg IVYE, 1 ml %10'luk DMSO içinde çözüldü. Stok solüsyonunun konsantrasyonu (10^3 µg/ml) uygulanan standart konsantrasyonunun 10 katıdır.

IVÇE Stok Solüsyonunun Hazırlanması

1 mg IVÇE, 1 ml %10'luk DMSO içinde çözüldü. Stok solüsyonunun konsantrasyonu (10^3 µg/ml) uygulanan standart konsantrasyonunun 10 katıdır.

Ara-C Stok Solüsyonunun Hazırlanması

24,322 mg Ara-C, 1 ml %2'lik DMSO'da çözüldü (Formül 1). Bu stok (100 µmol) uygulanan standardın 100 katıdır.

Formül 1. $M = n \cdot MA$ $M = 100 \mu\text{mol} \cdot 243,22 \text{ gr/mol} = 24,322 \text{ mg}$

3.2.4. Hücreler İçin Tam Büyüme Ortamının Hazırlanması

Kasumi-6 (ATCC® CRL-2775™) hücre hattı için gereken besiyeri, RPMI 1640, Gibco'dan satın alındı ve kullanılabildiği kadar +4°C'de saklandı. Bu besiyeri 2 mM L-glutamin, 1.5 g/L sodyum bikarbonat, 4.5 g/L glikoz, 10 mM HEPES ve 1.0 mM sodyum piruvat içermektedir. Ancak tam büyüme ortamı elde etmek için RPMI 1640, 20% FBS ve 2 ng/ml rhGM-CSF ile takviye edildi. Hücre kültürü sırasında kontaminasyonu engellemek için %1 Penisilin ve streptomisin antibiyotikleri de eklendi. FBS, rhGMCSF ve antibiyotiklerin eklenmesi aşağıda anlatılmıştır.

FBS

100 ml FBS, Diagnostics'ın satın alındı ve kullanıma kadar -20 °C'de saklandı. Kullanım sırasında 37 °C su banyosunda çözüldü. Bu solüsyondan 100 ml besiyeri hazırlamak için %20 oranında, 20 ml, alındı ve gerisi 20'şer ml steril polistiren konik tüplerinde sonraki kullanılmaya kadar -20 °C'de stoklandı.

Penisilin ve Streptomisin

100 ml penisilin ve streptomisin Capricorn'dan satın alındı ve kullanılabildiği kadar -20°C'de saklandı. Kullanım sırasında 37 °C su banyosunda çözüldü. Bu solüsyondan 100 ml besiyeri hazırlamak için %1 oranında, 1 ml, alındı ve gerisi 1'er ml steril endüstriyel tüplerinde sonraki kullanılmaya kadar -20 °C'de stoklandı.

rhGM-CSF

100 µgr rhGM-CSF Stemcell'den satın alındı ve kullanılabildiği kadar -80 °C'de saklandı. Stok solüsyonu hazırlanmasında -80 °C'den çıkarıldı. Açılmadan önce içeriğinin dibine çökmesi için 5 dk 130 x g'de santrifüj edildi. Liyofilize halinde olan rhGM-CSF tam aktivitesini tekrar elde etmek için 1 ml steril damıtılmış su içinde sulandırıldı. Su vialın duvarından vial içine koyuldu. Vorteks yapılmadı. Kaç dakika içinde tüm içerik homojen olarak suda çözüldü. Bu stok solüsyonunun konsantrasyonu

10⁵ ng/ml'dir. 100 ml besiyeri hazırlamak için bu stoktan 2 µl alındı (Formül 2) ve gerisi steril epandorf tüplerinde 2 µl olarak sonraki kullanıma kadar -80 °C'de stoklandı.

Formül 2. $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ $10^5 \text{ ng/ml} \cdot V_1 = 2 \text{ ng/ml} \cdot 100 \text{ ml}$ $V_1 = 2 \text{ µl}$

Sonuç olarak 20 ml FBS, 1 ml penisilin ve streptomisin, 2 µl GM-CSF ve 78.98 ml RPMI 1640 ile 100 ml tam büyüme ortamı elde edildi ve kullanılmaya kadar +4 °C'de saklandı ancak 1 ayı geçmedi ve renk değişikliği görünmedi.

3.2.5. Hücre Dondurucu Solüsyonunun Hazırlanması

Dondurucu solüsyonu %10 oranında DMSO içeren tam büyüme ortamıdır. 900 µl tam büyüme ortamına 100 µl DMSO konuldu.

3.2.6. Hücre Hattının Kültürü

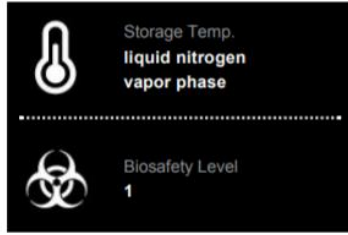
Tüm hücre kültürü işlemleri laminar kabini altında katı steril koşullarda yapıldı.

Hücre Dizilerinin Temini ve Saklanması

Kasumi-6 (ATCC® CRL-2775™) hücre hattı Amerika Hücre Kültür Koleksiyonu (American Type Cell Culture, ATCC) bankasından satın alındı. Tüm kapları sızıntı veya kırılma açısından kontrol edildi. Kuru buz ambalajından çıkarıldı ve kullanıma hazır olana kadar (3 hafta) -80 °C'de saklandı. Hücre hattı özellikleri Şekil 9'da sunulmuştur:



Please read this FIRST



Description

Organism: *Homo sapiens*, human
Tissue: peripheral blood
Disease: acute myeloid leukemia, subtype M2
Cell Type: myeloblast
Age: 64 years adult
Gender: male
Morphology: myeloid leukemia
Growth Properties: suspension
DNA Profile:
Amelogenin: X,Y
CSF1PO: 10,12
D13S317: 8,12
D16S539: 9,10
D5S818: 11
D7S820: 9,11
TH01: 6,9
TPOX: 8,9
vWA: 17
Cytogenetic Analysis: 45, XY,-9,add(12)(p11),add(13)(p11)

Şekil 9. Kasumi-6 (ATCC® CRL-2775™) özellikleri (ATCC'den, 2019)

Dondurulmuş Hücrelerin Çözünülmesi

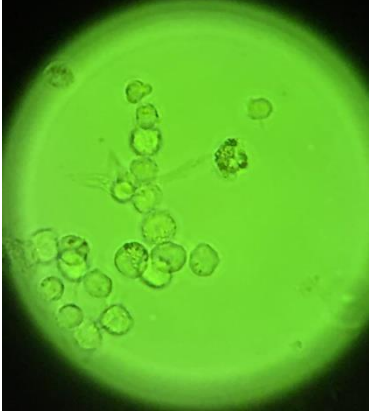
Hücre viyalı 37 °C su banyosunda 2 dk hafifçe çalkalayarak çözüldü. Kontaminasyon olasılığını azaltmak için, kapağı sudan uzak tutuldu. Çözülür çözülmez su banyosundan çıkarıldı ve %70 etanola daldırılarak dekontamine edildi. Hücre süspansiyonundan 10 µl hücre sayımı için alındı.

Kriyoprotektif Ajanın Çıkarılması

Kriyoprotektif ajanın çıkarılması için hücre süspansiyonu 8 dk 125 x g'de santrifüj edildi ve süpernatantı atıldı.

Hücrelerin Flaska Aktarılması ve Kültüre Başlanması

Hücre pelleti 25 cm²'lik flaskta 10 ml taze tam büyüme ortamı ile tekrar süspansiyon edildi. İnvrted mikroskopta incelendikten sonra (Şekil 10) inkübatöre yatay olarak yerleştirildi. Tam büyüme ortamının normal pH (7.0-7.6)'e erişmesini sağlamak için içeren flask önceden 15 dk inkübatöre yerleştirildi. İnkübatör önceden hava atmosferinde %5 CO₂ ve 37 °C'ye ayarlandı ve su mahfezesi steril damıtılmış su ile döldürüldü.



Şekil 10. Hücrelerin inverted mikroskopta ilk görünümü

Hücrelerin Sayılması ve Canlılık yüzdesinin Belirlenmesi

Hücrelerin sayılması hücre sayımı Countess™ II Automated Cell Counter cihazında gerçekleştirildi. Canlı hücreler tripan mavisini hücre içine almazken, ölü hücreler bozulmuş hücre membranlarından dolayı boyayı hücre içerisine alabilirler.

10 µl hücre süspansiyonu 10 µl tripan mavisini ile karıştırıldı. 10 µl bu karışımdan cihaza ait özel lamının uygun yerine konuldu ve cihaza takıldı.

Hücrelerin sayılması ayrıca etken maddeleri uygulamadan ve hücreleri dondurmadan önce de yapıldı.

Hücrelerin İnkübasyonu

Hücre inkübasyonu hücreler çoğalana kadar devam edildi. Her gün flask görsel olarak mikrobiyal kontaminasyon ve besiyerin renk değişikliği açısından kontrol edildi. Ayrıca hücre yoğunluğu ve mikrobiyal kontaminasyonu kontrol etmek üzere faz kontrast optik donatımlı inverted mikroskop ile incelendi. İnkübatörün ayarları ve CO₂ mahzeni de kontrol edildi.

Hücre Kültürünün Devamlılığının Sağlanması

Hücre kültürünün devamlılığını sağlamak için her 2-3 günde bir hücre yoğunluğuna bağlı olarak 3 işlem yapıldı: besiyeri yenilenmesi, besiyeri eklenmesi ve pasajlaması ve tekrar inkübatöre yerleştirildi.

Pasajlama

İnverted mikroskopta hücre yoğunluğu flaskın %75'ini kapladığında pasajlama yapıldı. Flask içeriği 10 ml'lik tek kullanımlı pipet ve otomatik pipetör kullanılarak 15

ml'lik steril polistiren konik tüpüne aktarıldı. 8 dk 125 x g'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Hücre pelleti iki steril 25 cm³'lik flaska her birinde 10 ml taze besiyeri olacak şekilde aktarıldı.

Besiyeri Yenilenmesi

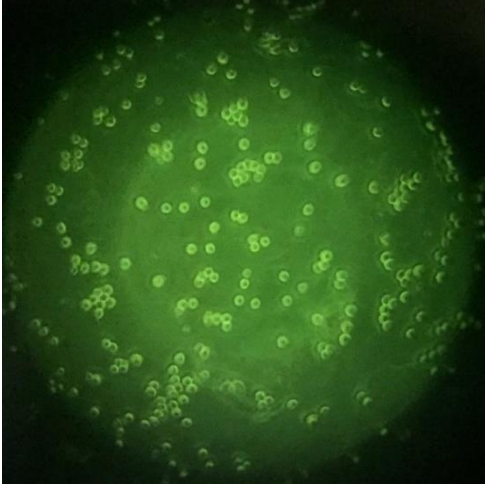
Besiyeride renk değişimi olduysa veya inverted mikroskop yardımı ile hücre yoğunluğu flaskın yarısını kapladığında besiyeri yenilendi. Flask içeriği 10 ml'lik tek kullanımlı pipet ve otomatik pipetör kullanılarak 15 ml'lik steril polistiren konik tüpüne aktarıldı. 8 dk 125 x g'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Hücre pelleti yeni bir steril 25 cm³'lik flaska 10 ml taze besiyeri olacak şekilde aktarıldı.

Besiyeri Eklenmesi

Inverted mikroskopta 3. günde hücre yoğunluğu flaskın yarısından azını kapladığında ve flaskın kapasitesi izin verdiyse besiyeri eklendi. 10 ml taze besiyeri 10 ml'lik tek kullanımlık pipet ve otomatik pipetör kullanarak flaska eklendi.

3.2.7. Hücre Kültürü Mikroplakalarına Hücre Ekimi

Kültürden 3 pasaj sonrası çok miktarda hücre (yaklaşık 6 . 10⁶ hücre/ml) elde ettikten sonra (Şekil 11) hücre ekimi yapıldı. Hücre süspansiyonu 8 dk 125 x g'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Hücre pelletine 54 ml taze besiyeri eklendi. Şekil 12'de gösterildiği gibi bitki ekstraktı kuyucuklarına 900  l, Ara-C Doz₁ kuyucuğuna 999  l, Ara-C Doz₂ kuyucuğuna 995  l, Ara-C Doz₃ kuyucuğuna 990  l ve kontrol kuyucuklarına 990  l hücre süspansiyonu konuldu (kuyucuk başına en az 10⁵ hücre). Diğer kuyucuklara besiyerinin buharlaşmasını azaltmak amacıyla 1ml steril distile su konuldu. Her maruziyet süresi için bir kültür plakası hazırlandı (toplam 3 plaka). Hücrelerin kuyucuklarda düzenli ve eşit şekilde dağılıp dağılmadıkları ve sağlıklı olup olmadıkları inverted mikroskopta incelendi. Plakalar 24 saat boyunca 37  C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi.



Şekil 11. Hücrelerin çoğaldıktan sonra inverted mikroskopta görünümü

	Doz1	Kontrol 1	Doz2	Kontrol 2	Doz3	Kontrol 3
IVYE	900 µl besiyeri	990 µl besiyeri	900 µl besiyeri	990 µl besiyeri	900 µl besiyeri	990 µl besiyeri
IVÇE	900 µl besiyeri	990 µl besiyeri	900 µl besiyeri	990 µl besiyeri	900 µl besiyeri	990 µl besiyeri
Ara-C	999 µl besiyeri	990 µl besiyeri	995 µl besiyeri	990 µl besiyeri	990 µl besiyeri	990 µl besiyeri
	steril distile su	steril distile su	steril distile su	steril distile su	steril distile su	steril distile su

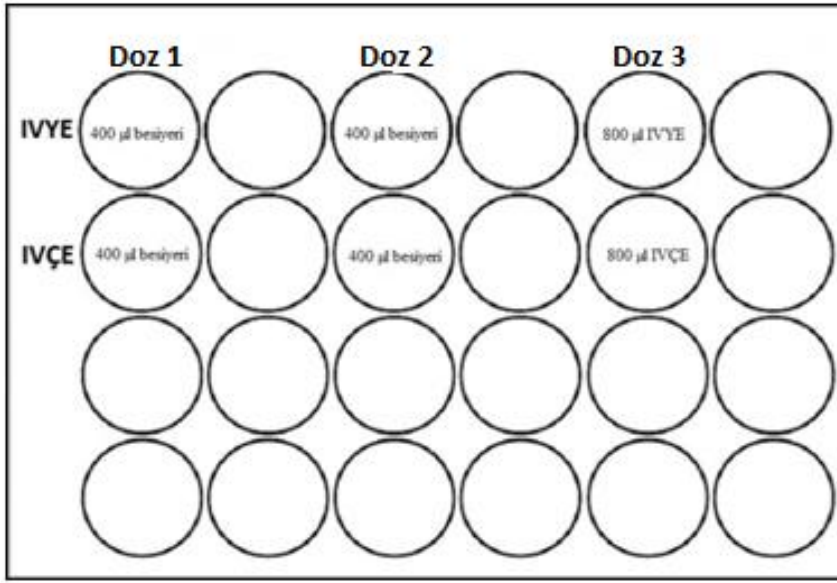
Şekil 11. Plakalarda Hücre ekimi düzeni; IVYE: *Inula viscosa* Yaprak Ekstraktı, IVÇE: *Inula viscosa* Çiçek Ekstraktı, Ara-C: Sitarabin. IVYE-Doz1, IVYE-Doz2, IVYE-Doz3, IVÇE-Doz1, IVÇE-Doz2, IVÇE-Doz3 kuyucuklarına 900 µl besiyeri, AraC-Doz1 kuyucuğuna 999 µl besiyeri, AraC-Doz2 kuyucuğuna 995 µl besiyeri, AraC-Doz3 ve tüm kontrol kuyucuklarına 990 µl besiyeri, kalan diğer kuyucuklara steril distile su konuldu.

3.2.8. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Hücre ekiminden sonra kalan hücreler 1 ml döndürücü solüsyonunda sıvı azot tankında (-130 °C) donduruldu.

3.2.9. Test Maddelerin Uygulanmaya Hazırlanması

Bitki ekstraktı için 1:2 oranında seyreltme yapıldı. Bunun için Şekil 13’de gösterildiği gibi Doz₃ kuyucuklarına 800 µl IVYE ve IVÇE konuldu. Doz₂ ve Doz₁ kuyucuklarına 400 µl besiyeri konuldu. Doz₃ kuyucuklarından 400 µl Doz₂ kuyucuklarına aktarıldı. Yine iyice pipetaj yapıldı ve 400 µl bu kuyucuklardan Doz₁ kuyucuklarına aktarıldı ve iyice karıştırıldı. Doz₁ kuyucuğundan 400 µl atıldı.



Şekil 13. *Inula viscosa* yaprak ve çiçek ekstraktının dizi seyreltmeleri (1:2 oranında). IVYE: *Inula viscosa* Yaprak Ekstraktı, IVÇE: *Inula viscosa* Çiçek Ekstraktı, Ara-C: Sitarabin. Doz₃ kuyucuklarına 800 µl IVYE ve IVÇE, Doz₂ ve Doz₁ kuyucuklarına 400 µl besiyeri konuldu. Doz₃ kuyucuklarından 400 µl Doz₂ kuyucuklarına aktarıldı. 400 µl bu kuyucuklardan Doz₁ kuyucuklarına aktarıldı ve iyice karıştırıldı. Doz₁ kuyucuklarından 400 µl atıldı.

3.2.10. Hücrelerin Test Maddeler ile Maruziyeti

Hücre ekimi yapılmış plakalara 24 saat inkübasyondan sonra seyreltmeleri yapılmış bitki ekstraktlarından 100'er µl uygun kuyucuklara uygulandı. Aynı zamanda 1:10 oranında seyreltilmiş oldu. Ara-C için Doz₁, Doz₂ ve Doz₃ kuyucuklarına stok Ara-C solüsyonundan sırasıyla 1, 5 ve 10 µl konuldu (Formül 3).

Formül 3. $M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$ $100 \mu\text{mol} \cdot V_1 = 0,1 \mu\text{mol} \cdot 1000 \mu\text{l}$ $V_1 = 1 \mu\text{l}$
 $100 \mu\text{mol} \cdot V_1 = 0,5 \mu\text{mol} \cdot 1000 \mu\text{l}$ $V_1 = 5 \mu\text{l}$
 $100 \mu\text{mol} \cdot V_1 = 1 \mu\text{mol} \cdot 1000 \mu\text{l}$ $V_1 = 10 \mu\text{l}$

Ayrıca kontrol gruplarına 10'er μl %10'luk DMSO eklendi. Son konsantrasyonlar şekil 14'te gösterilmiştir. Plakalar gruplara göre 24, 48 ve 72 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi.

	Doz 1	Kontrol 1	Doz 2	Kontrol 2	Doz 3	Kontrol 3
IVYE	25 $\mu\text{g/ml}$	% 0,001 DMSO	50 $\mu\text{g/ml}$	% 0,001 DMSO	100 $\mu\text{g/ml}$	% 0,001 DMSO
IVÇE	25 $\mu\text{g/ml}$	% 0,001 DMSO	50 $\mu\text{g/ml}$	% 0,001 DMSO	100 $\mu\text{g/ml}$	% 0,001 DMSO
Ara-C	0,1 μmol	% 0,001 DMSO	0,5 μmol	% 0,001 DMSO	1 μmol	% 0,001 DMSO
	steril distile su	steril distile su	steril distile su	steril distile su	steril distile su	steril distile su

Şekil 14. Maruziyet plakasında son konsantrasyonlar. IVYE: *Inula viscosa* Yaprak Ekstraktı, IVÇE: *Inula viscosa* Çiçek Ekstraktı, Ara-C: Sitarabin.

3.2.11. Apoptoz Ölçümü için Hücrelerin Boyanması

Apoptoz tayini üreticinin önerileri doğrultusunda FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen) kullanılarak, BD FACSCalibur flow sitometresinde değerlendirildi. apoptozun erken döneminde hücre zarının iç yüzeyinde bulunan lipid tabakasındaki fosfatidilserin hücre zarının dış lipid tabakasına geçiş yapar. Annexin V fosfatidilserine bağlanabilen bir FITC (floresan izotiyosiyanat) işaretli proteindir ve fosfatidilserine bağlanarak apoptotik hücreyi görünür hale getirir. Bu bağlanma oranı flow sitometri ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerde de annexin bağlanması

görülebileceği için ayrıca vital bir boya olan propidiyum iyodür (PI) ile de boyama yapılır. Canlı hücreler zarları sağlam olduğundan PI boyası ile boyanmazlar.

Hücrelerin Annexin V / PI ile Boyaması:

Hücreler protokola göre Annexin V, PI ve CD-45 ile boyandı. Kısacası, hücre suspansiyonu;

5 ml'lik test tüplerine aktarıldı.

2 defa 1ml soğuk PBS ile yıkandı.

1X Bağlama Tamponu içinde yeniden süspansiyon haline getirildi (10^6 hücre/ml).

Bu suspansiyondan 100 μ l (10^5 hücre/ml), 5 ml'lik tüplerine aktarıldı.

5 μ l FITC Annexin V, 5 μ l PI ve 5 μ l APC CD-45 eklendi.

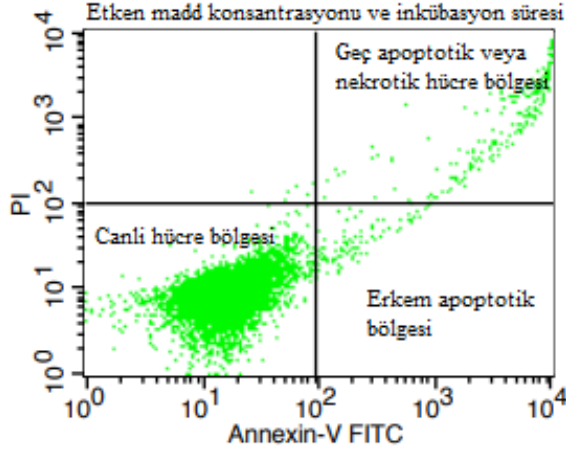
Yavaşça vortekslendi.

15 dk karanlıkta ve oda sıcaklığında (25 °C) inkübe edildi.

Her bir tüpe 400 μ l 1X Bağlama Tamponu eklendi.

Apoptotik Hücrelerin Flow Sitometresinde Sayılması

Numunelerin 1 saat içinde akış sitometresinde Annexin V ve PI yüzdeleri belirlenerek apoptoz oranı elde edildi. Her örnekte en az 10.000 hücre değerlendirildi. Canlı hücreler FITC (-) / PI (-), erken apoptotik hücreler FITC (+) / PI (-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler FITC (+) / PI (+) olarak ayırt edildi. Erken ve geç apoptotik bölgelerin yüzdesi, apoptoz olarak kabul edildi (Şekil 15). Bu tahlil, apoptotik ölüme maruz kalan hücreler ile nekrotik bir yolun sonucu ölen hücrelerin arasında ayırım yapmaz, çünkü her iki durumda da ölü hücreler hem FITC Annexin V hem de PI ile lekelenir.



Şekil 15. Flow sitometri sonucu analizi; Erken apoptotik, geç apoptotik, nekrotik ve canlı hücreler bölgesi ayrılması

3.2.12. İstatistiksel Analiz

Varsayımlar sağlanmadığından sınamalarda non-parametrik testler kullanılmıştır. Gruplar arasındaki istatistik farklılıklar, Wilcoxon testi ve Friedman testi ile paket program SPSS 18.0. kullanarak belirlendi. Farklar $p < 0,05$ 'de anlamlı kabul edildi. Grafikler Microsoft Excel ile çizildi.

4. BULGULAR

4.1. *Inula viscosa* Ekstraktı

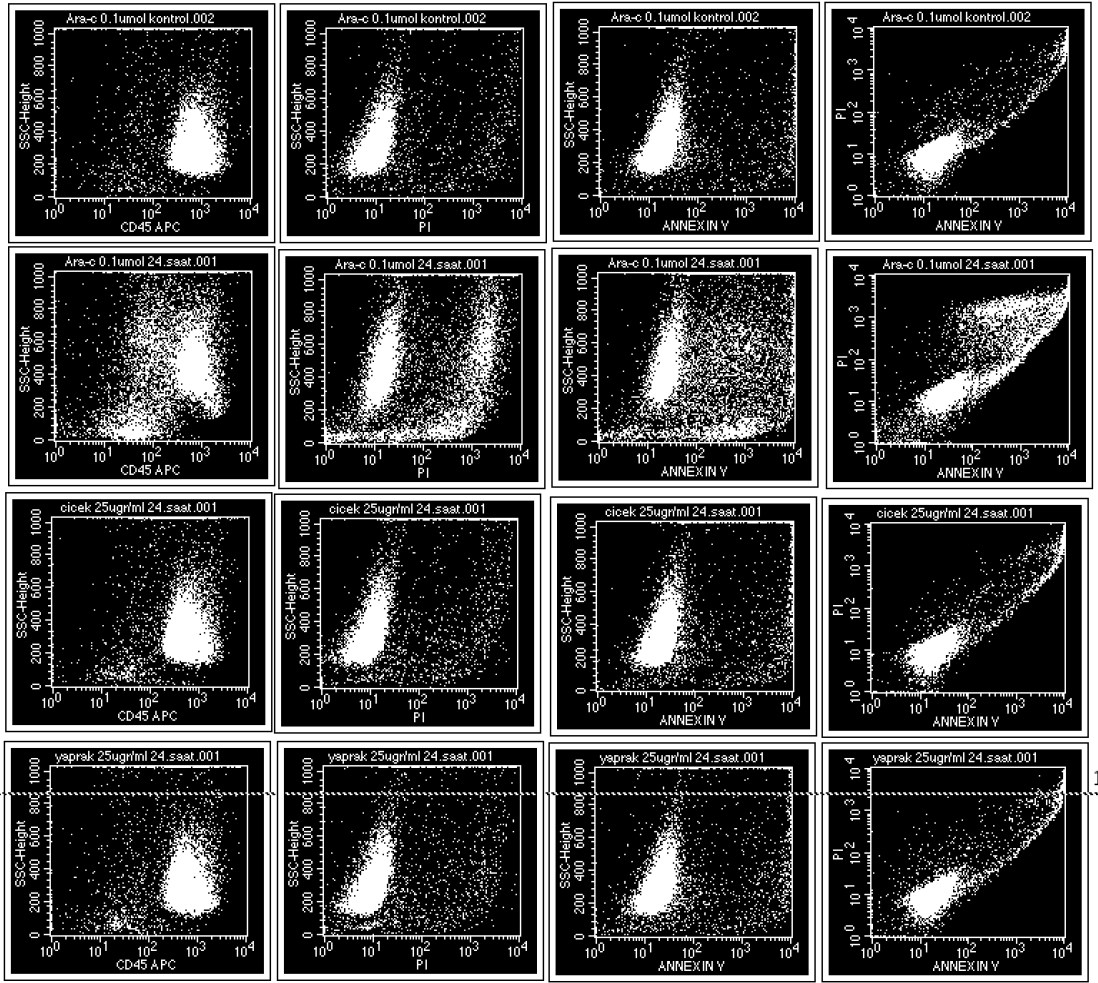
10 gr *Inula viscosa* yaprağından 2,3 gr ekstrakt (%23 verim) ve 10 gr çiçeğinden 1,2 gr ekstrakt (%12 verim) elde edildi.

4.2. Kültüre Edilen Hücrenin Sayısı

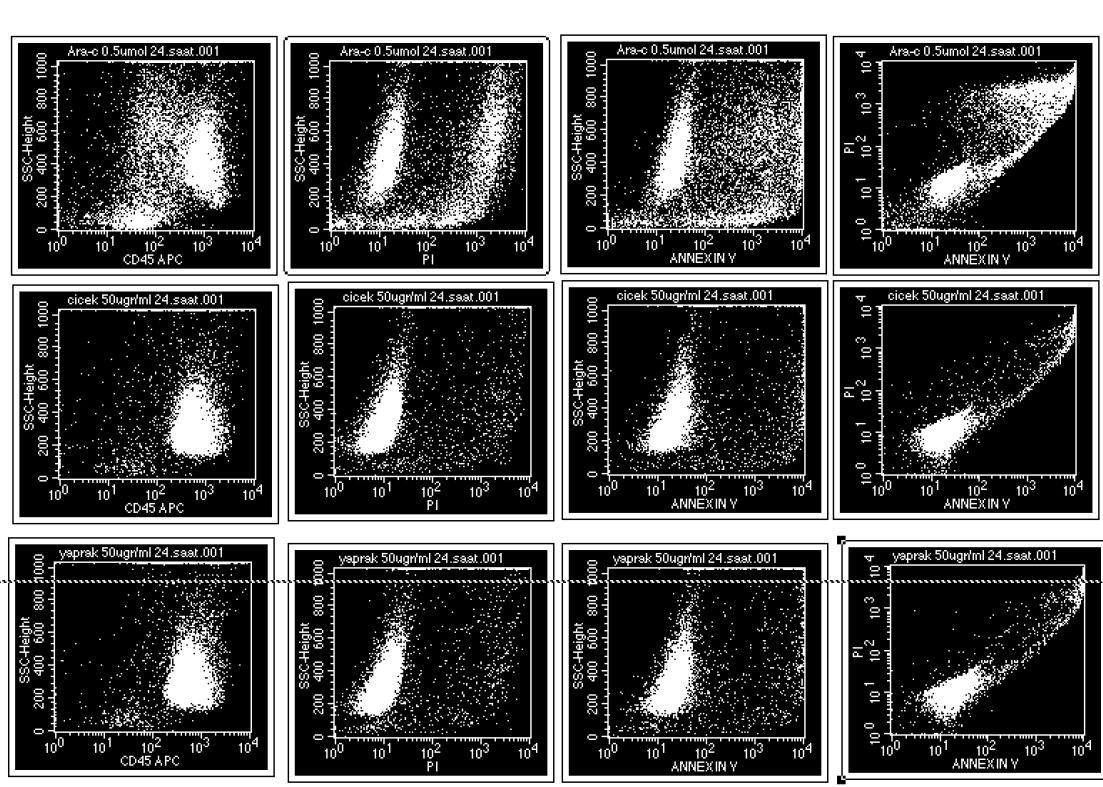
6 . 10⁶ hücre/ml total hücreden 5,5 . 10⁶ hücre/ml (%92) canlı hücre sayıldı.

4.3. Flow Sitometri Sonuçları

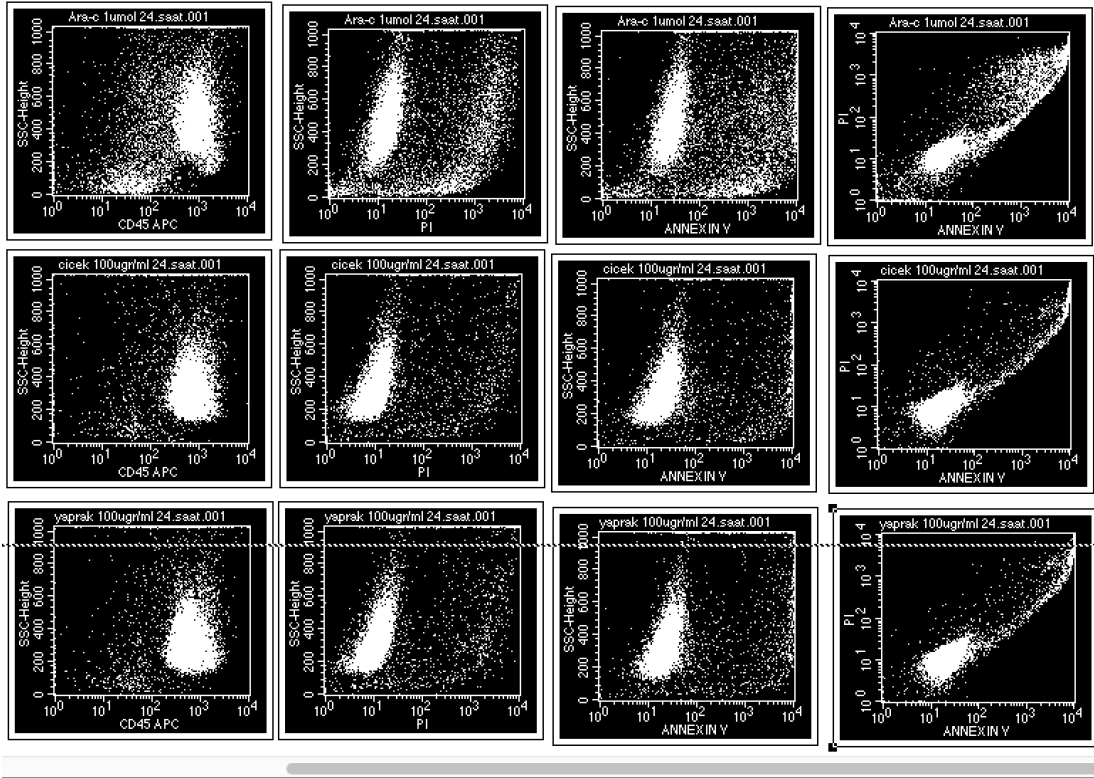
AML-M₂ alttipi (Kasumi-6) hücre hattı üzerinde Ara-C, *Inula viscosa* yaprak ve çiçeği etanolik ekstraktının apoptoz, viabilite ve hücre çoğalmasına etkileri araştırılmıştır. 0,1, 0,5 ve 1 µmol Ara-C (sitarabin), 25, 50 ve 100 µg/ml *Inula viscosa* Yaprak Ekstraktı (IVYE) ve *Inula viscosa* Çiçek Ekstraktı (IVÇE)'ye 24, 48 ve 72. saat maruz bırakıldıktan sonra APC Anti CD-45, FITC Annexin V ve PI (propidiyum iyodür) ile boyanan 10000 AML hücrenin Flow sitometrik görüntüleri şekil 16-24'te ve apoptotik ve canlı hücre sayıları Tablo 2'de gösterilmiştir. IVYE ve IVÇE, AML hücre hattını kontrole göre kısmen ve aynı oranda apoptoza sokabilmekte, ancak Ara-C'ye göre bu apoptoz oranı oldukça düşük kalmaktadır (Şekil 16-24).



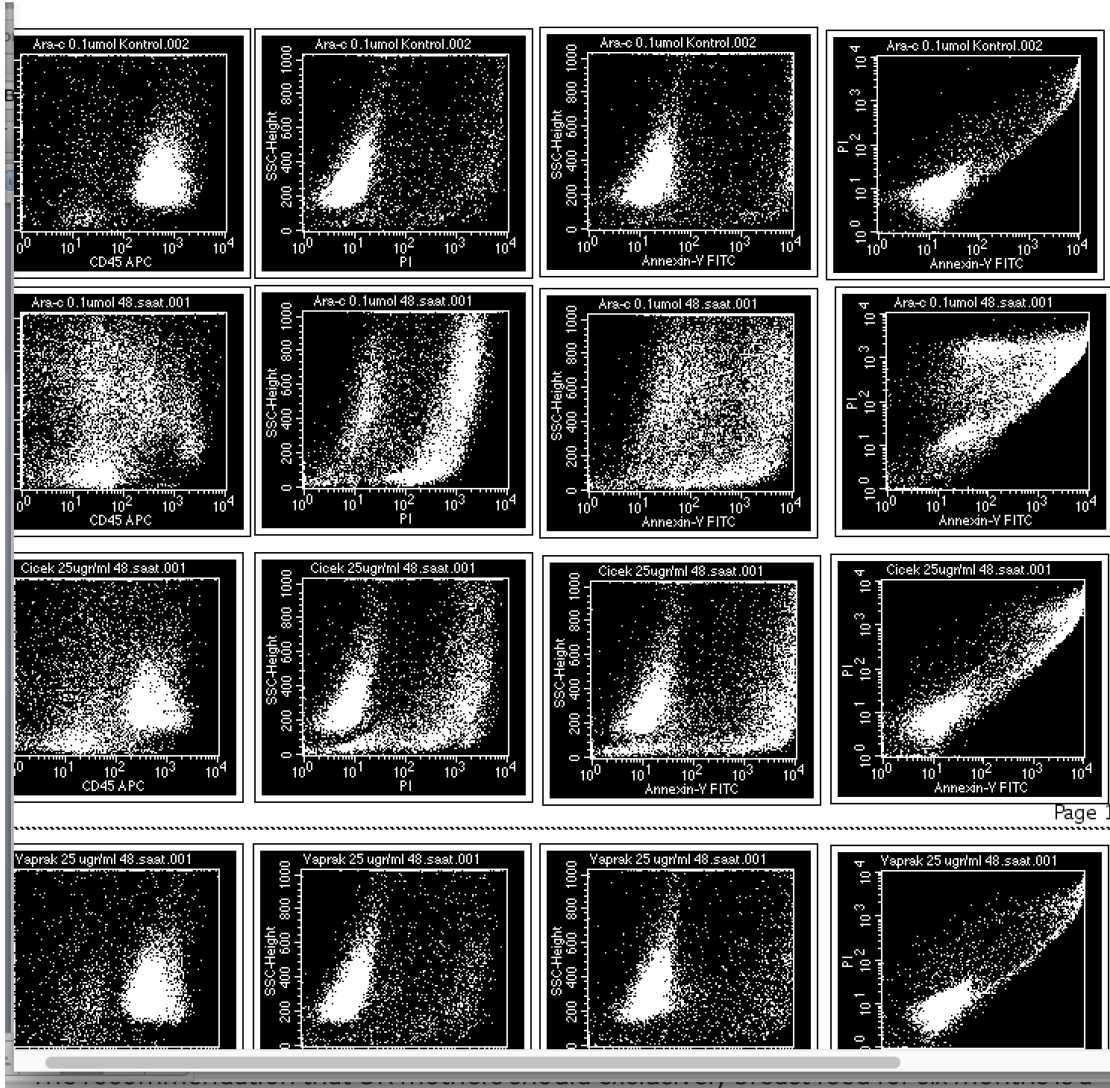
Şekil 16. 24. saatte 0,1 μmol Ara-C (sitarabin), 25 $\mu\text{g/ml}$ IVYE (Inula viscosa Yaprak Ekstraktı) ve IVÇE (Inula viscosa Çiçek Ekstraktı) etken maddelere maruz bırakılan 10000 AML (Akut Miyeloid Lösemi) hücrelerinin Anti CD-45, Annexin V ve PI (Propidiom İodid) ile Calibur flow sitometrisinde ayrılması



Şekil 17. 24. saatte 0,5 µmol Ara-C (sitarabin), 50 µg/ml IVYE (Inula viscosa Yaprak Ekstraktı) ve IVÇE (Inula viscosa Çiçek Ekstraktı) etken maddelere maruz bırakılan 10000 AML (Akut Miyeloid Lösemi) hücrelerinin Anti CD-45, Annexin V ve PI (Propidiom İodid) ile Calibur flowsitometrisinde ayrılması

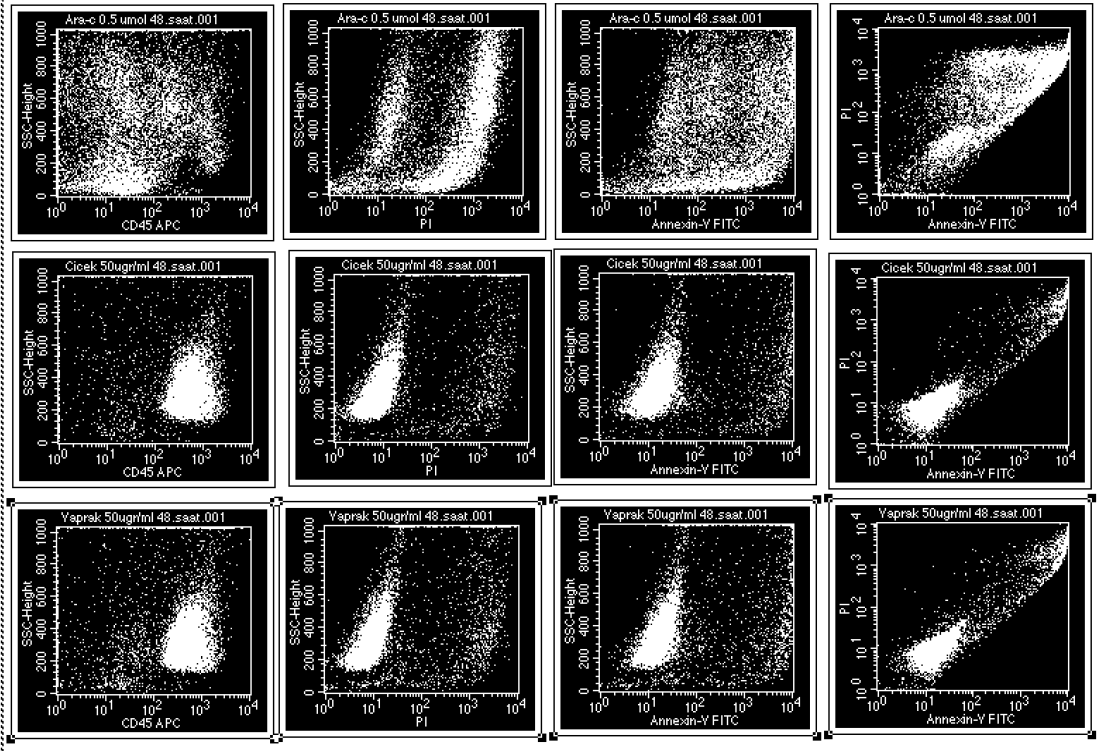


Şekil 18. 24. saatte 1 µmol Ara-C (sitarabin), 100 µg/ml IVYE (Inula viscosa Yaprak Ekstraktı) ve IVÇE (Inula viscosa Çiçek Ekstraktı) etken maddelere maruz bırakılan 10000 AML (Akut Miyeloid Lösemi) hücrelerinin Anti CD-45, Annexin V ve PI (Propidium İodid) ile Calibur flowsitometrisinde ayrılması



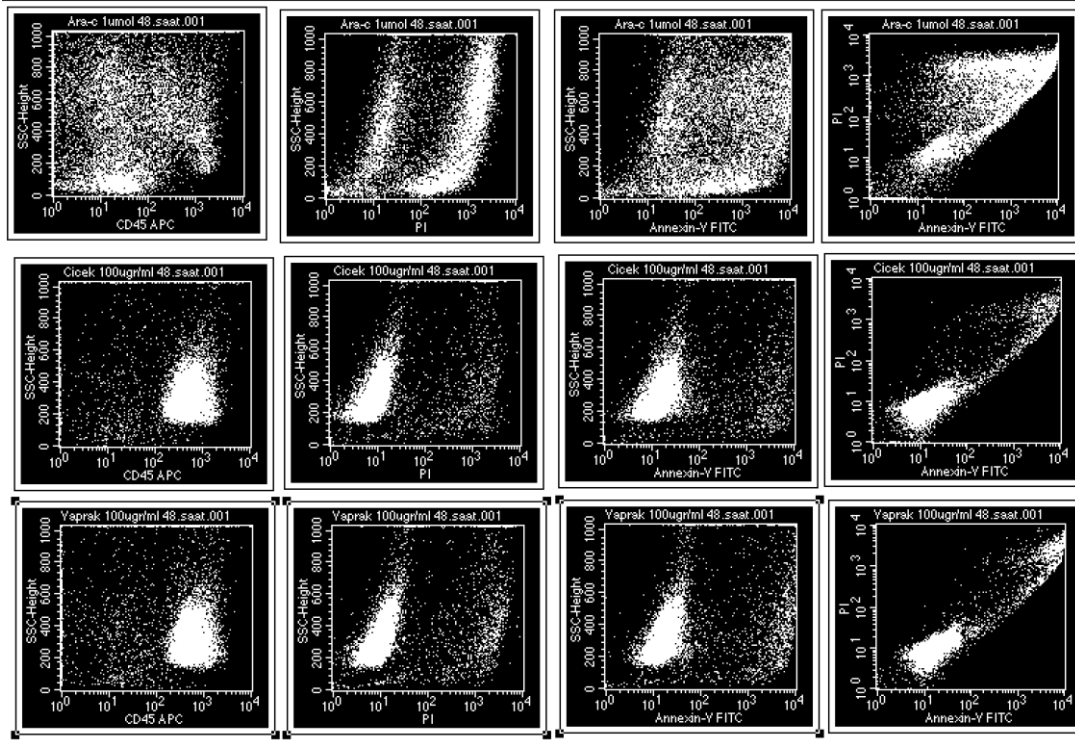
Page 1

Şekil 19. 48. saatte 0,1 μmol Ara-C (sitarabin), 25 μg/ml IVÇE (Inula viscosa Yaprak Ekstraktı) ve IVÇE (Inula viscosa Çiçek Ekstraktı) etken maddelere maruz bırakılan 10000 AML (Akut Miyeloid Lösemi) hücrelerinin Anti CD-45, Annexin V ve PI (Propidiom İodid) ile Calibur flowsitometrisinde ayrılması

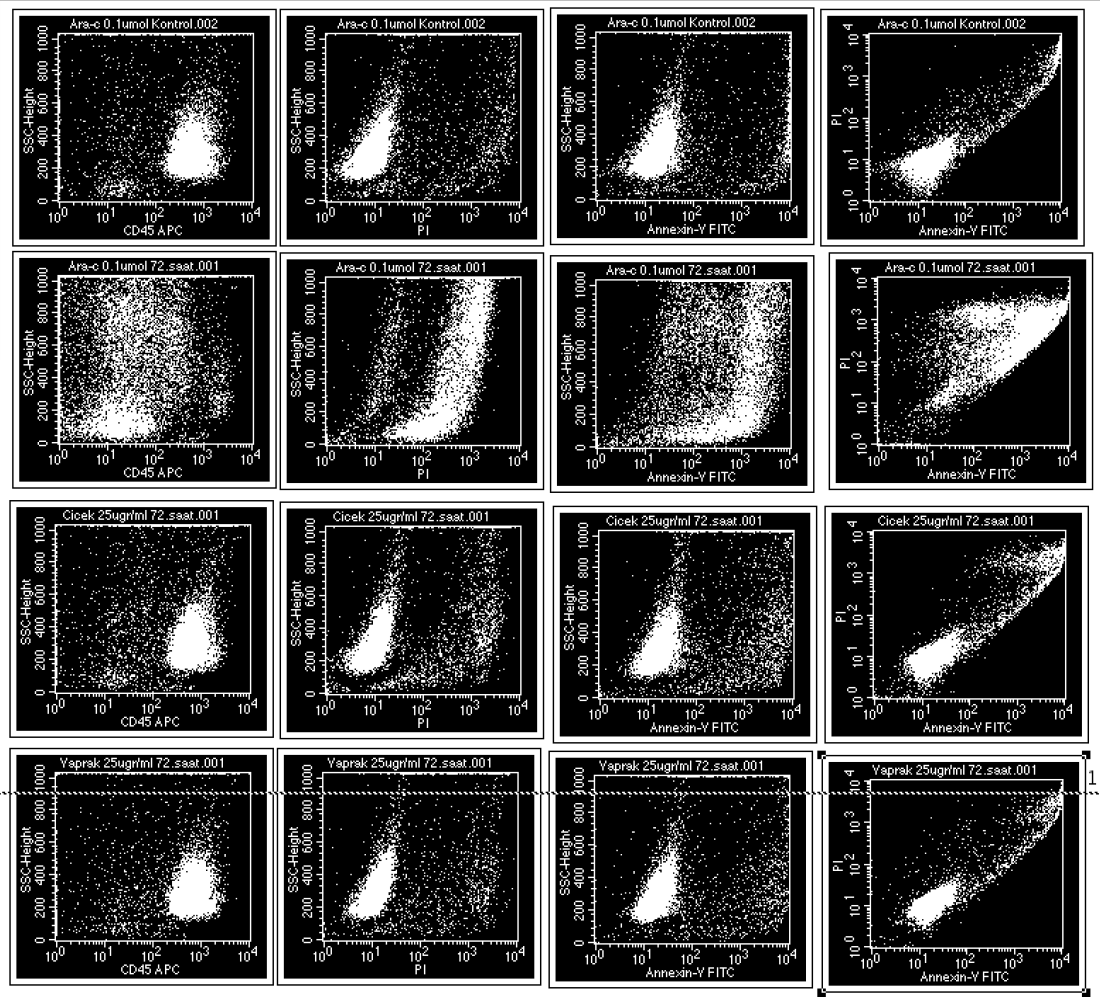


Page 3:

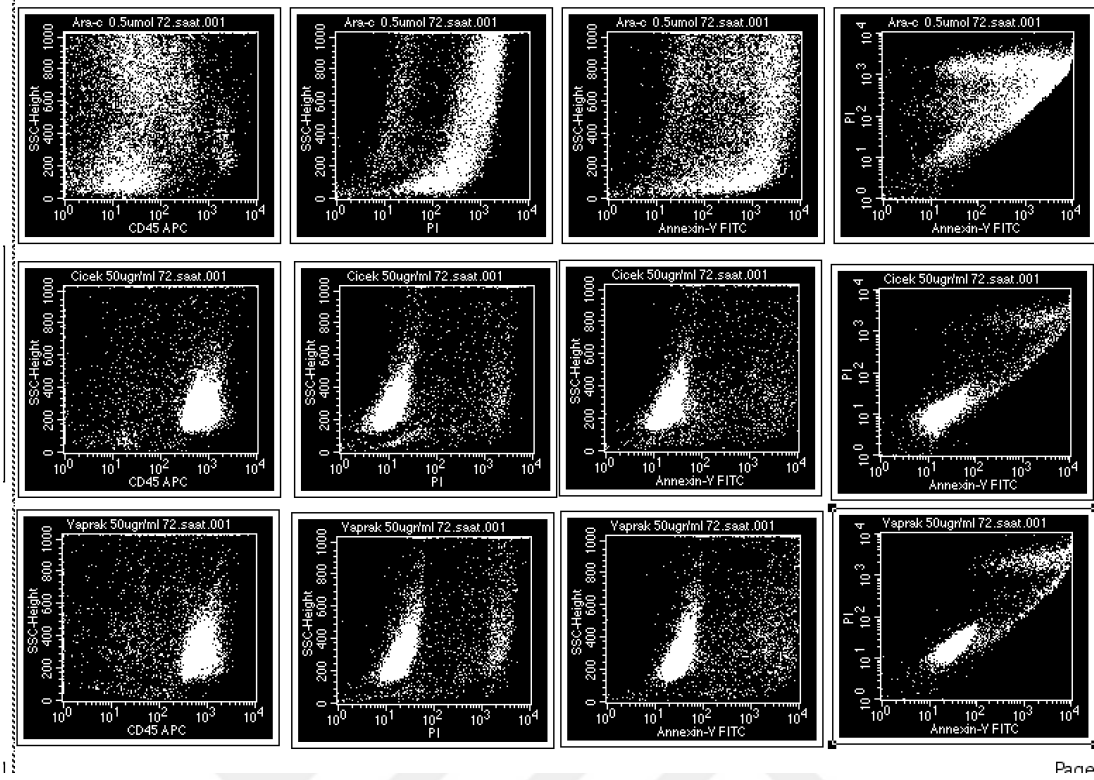
Şekil 20. 48. saatte 0,5 µmol Ara-C (sitarabin), 50 µg/ml IVYE (Inula viscosa Yaprak Ekstraktı) ve IVÇE (Inula viscosa Çiçek Ekstraktı) etken maddelere maruz bırakılan 10000 AML (Akut Miyeloid Lösemi) hücrelerinin Anti CD-45, Annexin V ve PI (Propidiom İodid) ile Calibur flowsitometrisinde ayrılması



Şekil 21. 48. saatte 1 µmol Ara-C (sitarabin), 100 µg/ml IVYE (Inula viscosa Yaprak Ekstraktı) ve IVÇE (Inula viscosa Çiçek Ekstraktı) etken maddelere maruz bırakılan 10000 AML (Akut Miyeloid Lösemi) hücrelerinin Anti CD-45, Annexin V ve PI (Propidiom İodid) ile Calibur flowsitometrisinde ayrılması

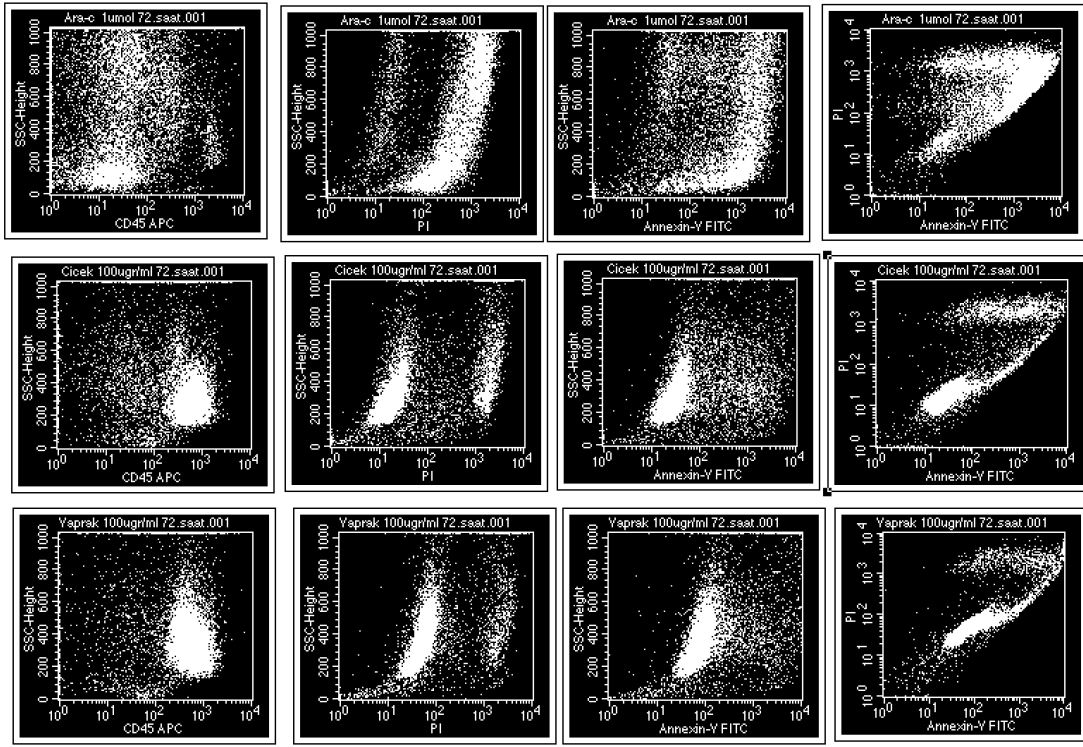


Şekil 22. 48. saatte 0,1 μmol Ara-C (sitarabin), 25 $\mu\text{g/ml}$ IVYE (*Inula viscosa* Yaprak Ekstraktı) ve IVÇE (*Inula viscosa* Çiçek Ekstraktı) etken maddelere maruz bırakılan 10000 AML (Akut Miyeloid Lösemi) hücrelerinin Anti CD-45, Annexin V ve PI (Propidiom İodid) ile Calibur flowsitometrisinde ayrılması



Page 3

Şekil 23. 48. saatte 0,5 µmol Ara-C (sitarabin), 50 µg/ml IVYE (Inula viscosa Yaprak Ekstraktı) ve IVÇE (Inula viscosa Çiçek Ekstraktı) etken maddelere maruz bırakılan 10000 AML (Akut Miyeloid Lösemi) hücrelerinin Anti CD-45, Annexin V ve PI (Propidiom İodid) ile Calibur flowsitometrisinde ayrılması



Page 5

Şekil 24. 48. saatte 1 µmol Ara-C (sitarabin), 100 µg/ml IVYE (Inula viscosa Yaprak Ekstraktı) ve IVÇE (Inula viscosa Çiçek Ekstraktı) etken maddelere maruz bırakılan 10000 AML (Akut Miyeloid Lösemi) hücrelerinin Anti CD-45, Annexin V ve PI (Propidiom İodid) ile Calibur flowsitometrisinde ayrılması

Tablo 2. Deney grupları ve kontrollerin farklı konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinde apoptotik ve canlı hücrelerinin flow sitometride sayıları

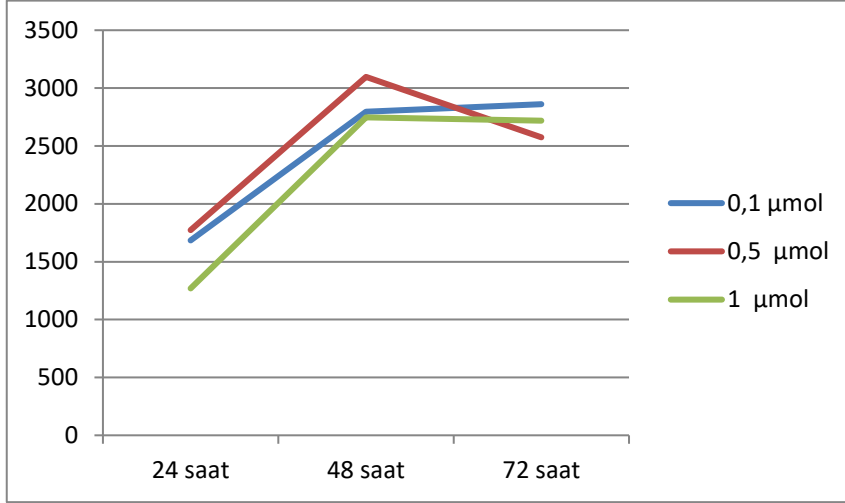
Etken madde (10000 hücre/ml)	İnkübasyon süresi	Etken madde konsantrasyonu	Apoptotik AML hücre sayısı	Canlı AML hücre sayısı	Kontrol apoptotik hücre sayısı	Kontrol canlı hücre sayısı
AML/Ara-C	24 saat	0,1 µmol	1684	5996	159	9320
		0,5 µmol	1773	5531	134	9275
		1 µmol	1269	7215	103	9425
AML/Ara-C	48 saat	0,1 µmol	2796	844	248	9057
		0,5 µmol	3097	771	270	8309
		1 µmol	2747	1005	215	8960
AML/Ara-C	72 saat	0,1 µmol	2861	303	176	9188
		0,5 µmol	2576	324	143	9292
		1 µmol	2718	320	165	9220
AML/IV-YE	24 saat	25 µg/ml	296	8999	103	9393
		50 µg/ml	199	9369	66	9505
		100 µg/ml	202	9205	132	9213
AML/IV-YE	48 saat	25 µg/ml	266	8671	66	9243
		50 µg/ml	273	8788	51	8985
		100 µg/ml	223	8761	77	9277
AML/IV-YE	72 saat	25 µg/ml	240	8850	66	8683
		50 µg/ml	203	8675	47	9530
		100 µg/ml	337	8442	61	9425
AML/IV-ÇE	24 saat	25 µg/ml	246	9268	80	9458
		50 µg/ml	166	9427	92	9434
		100 µg/ml	185	9291	104	9426
AML/IV-ÇE	48 saat	25 µg/ml	1756	5674	99	9064
		50 µg/ml	177	8824	101	9233
		100 µg/ml	215	8999	107	9265
AML/IV-ÇE	72 saat	25 µg/ml	356	8416	78	9414
		50 µg/ml	238	9080	54	9450
		100 µg/ml	358	7753	58	9461

Ara-C uygulanan deney grubunda 0,5 µmol dozu apoptozu en iyi şekilde tetiklemiştir ve en çok apoptoz 48. Saatte 0,5 dozunda gözlemlenmiştir. AraC'nin her üç konsantrasyonu 48. Saatte 24. Saate göre bir artış ve 72. Saatte bir düşüş göstermiştir. Aynı saatlerde Ara-C dozu arttıkça apoptoz artmamıştır (Şekil 25).

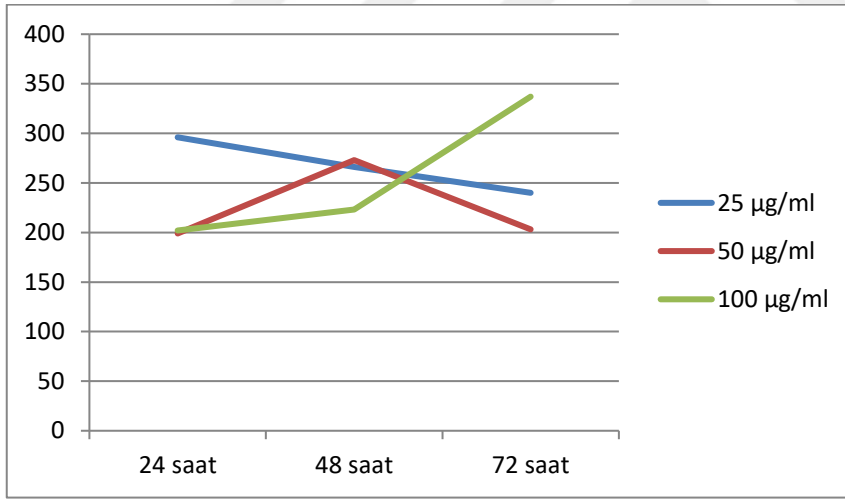
IVYE'nin en fazla apoptozu 100 µg/ml konsantrasyonda 72. saatte tespit edilmiştir. 100 µg/ml IVYE apoptozu zamana bağımlı bir şekilde tetiklemiştir. IVYE'nin 25 µg/ml dozunda zaman arttıkça apoptoz azalmıştır. Aynı saatlerde IVYE dozu arttıkça apoptoz artmamıştır (Şekil 26).

IVÇE'nin en fazla apoptozu 25 µg/ml konsantrasyonda 48. saatte indüklenmiştir. Bu dozda apoptoz 48. Saatte artış ve 72. Saatte düşüş göstermiştir.

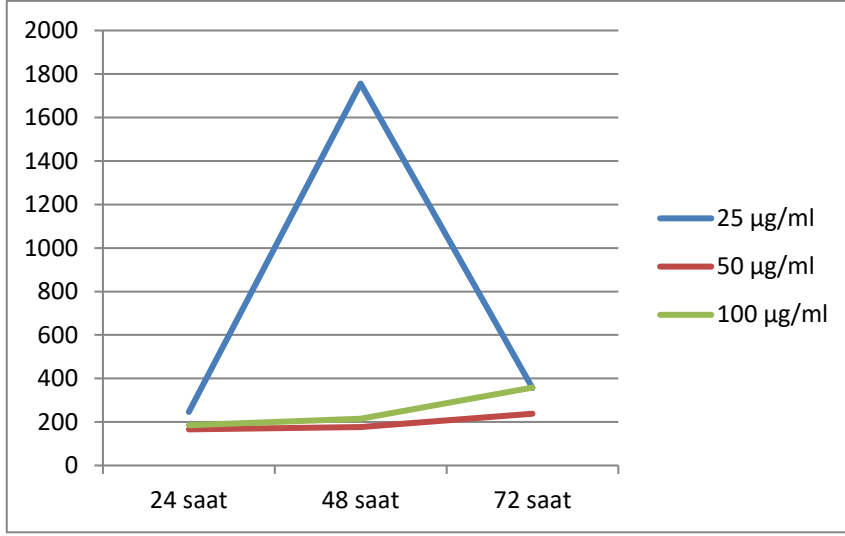
Diğer iki doz ise (50 ve 100 µg/ml) apoptozu zamana bağlı bir şekilde tetiklemiştir. Aynı saatlerde IVÇE dozu arttıkça apoptoz artmamıştır (Şekil 27).



Şekil 25. Ara-C'nin zaman ve konsantrasyona göre 10000 AML hücresinde apoptoz seyri



Şekil 26. IVYE'nin zaman ve konsantrasyona göre 10000 AML hücresinde apoptoz seyri



Şekil 27. IVÇE'nin zaman ve konsantrasyona göre 10000 AML hücresinde apoptoz seyri

4.4. İstatistik Sonuçları

Her bir deney grubunun farklı konsantrasyonlardaki apoptotik (Annexin V) ve canlı (PI) hücre sayıları kendi kontrolleriyle karşılaştırılarak istatistiksel olarak değerlendirildi (Tablo 3).

Inula viscosa Yaprak Ekstraktı (IVYE) uygulanan üç farklı konsantrasyona (25, 50 ve 100 µg/ml) sahip deney grubundaki hücrelerin, birinci mitoz geçirdikleri 24. saatte apoptotik hücre sayılarının kontroller ile karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde arttığı ($p < 0,05$), viabilitenin ise deney gruplarında kontrollere göre azaldığı gözlemlendi ($p < 0,05$). Bu grubun 48. saatlik inkübasyonunda, deney grupları kontroller ile karşılaştırıldığında aynı şekilde apoptotik hücre sayısının arttığı ($p < 0,05$), viabilitenin ise azaldığı gözlemlendi ($p < 0,05$). 72. saatlik inkübasyonunda ise, deney grupları kontroller ile karşılaştırıldığında yine aynı şekilde apoptotik hücre sayısının arttığı ($p < 0,05$), viabilitenin ise azaldığı gözlemlendi ($p < 0,05$) (Tablo 3).

Inula viscosa Çiçek Ekstraktı (IVÇE) uygulanan üç farklı konsantrasyona (25, 50 ve 100 µg/ml) sahip deney grubundaki hücrelerin, birinci mitoz geçirdikleri 24. saatte apoptotik hücre sayılarının kontroller ile karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde arttığı ($p < 0,05$), viabilitenin ise deney gruplarında kontrollere göre azaldığı gözlemlendi ($p < 0,05$). Bu grubun 48. saatlik inkübasyonunda, deney grupları kontroller ile karşılaştırıldığında aynı şekilde apoptotik hücre sayısının arttığı ($p < 0,05$), viabilitenin ise azaldığı gözlemlendi

($p<0,05$). 72. saatlik inkübasyonunda ise, deney grupları kontroller ile karşılaştırıldığında yine aynı şekilde apoptotik hücre sayısının arttığı ($p<0,05$), viabilitenin ise azaldığı gözlemlendi ($p<0,05$) (Tablo 3).

Ara-C uygulanan üç farklı konsantrasyona (0,1, 0,5 ve 1 μmol) sahip deney grubundaki hücrelerin, birinci mitoz geçirdikleri 24. saatte apoptotik hücre sayılarının kontroller ile karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde arttığı ($p<0,5$), viabilitenin ise deney gruplarında kontrollere göre azaldığı gözlemlendi ($p<0,05$). Bu grubun 48. saatlik inkübasyonunda, deney grupları kontroller ile karşılaştırıldığında aynı şekilde apoptotik hücre sayısının arttığı ($p<0,05$), viabilitenin ise azaldığı gözlemlendi ($p<0,05$). 72. saatlik inkübasyonunda ise, deney grupları kontroller ile karşılaştırıldığında yine aynı şekilde apoptotik hücre sayısının arttığı ($p<0,05$), viabilitenin ise azaldığı gözlemlendi ($p<0,05$) (Tablo 3).

Her üç grupta da gözlemlendiğimiz apoptozun atması viabilitenin ise azalması bize hücre çoğalmasının baskılandığını göstermiştir. IVYE ve IVÇE'nin apoptotik etkisi karşılaştırıldığında aynı ve antiproliferatif etkisi ise IVÇE daha etkin bir ekstrakttır.

Tablo 3. Deney grupları ve kontrollerin farklı konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinde apoptoz ve canlı hücre sayılarının istatistiksel karşılaştırılması.

Etken madde (10000 hücre/ml)	İnkübasyon süresi	Etken madde konsantrasyonu	Apoptotik AML hücre sayısı	Kontrol apoptotik hücre sayısı	P değeri	Canlı AML hücre sayısı	Kontrol canlı hücre sayısı	P değeri
AML/Ara-C	24 saat	0,1 µmol	1684	159	<0,5	5996	9320	<0,5
		0,5 µmol	1773	134	<0,5	5531	9275	<0,5
		1 µmol	1269	103	<0,5	7215	9425	<0,5
AML/Ara-C	48 saat	0,1 µmol	2796	248	<0,5	844	9057	<0,5
		0,5 µmol	3097	270	<0,5	771	8309	<0,5
		1 µmol	2747	215	<0,5	1005	8960	<0,5
AML/Ara-C	72 saat	0,1 µmol	2861	176	<0,5	303	9188	<0,5
		0,5 µmol	2576	143	<0,5	324	9292	<0,5
		1 µmol	2718	165	<0,5	320	9220	<0,5
AML/IV-YE	24 saat	25 µg/ml	296	103	<0,5	8999	9393	<0,5
		50 µg/ml	199	66	<0,5	9369	9505	<0,5
		100 µg/ml	202	132	<0,5	9205	9213	<0,5
AML/IV-YE	48 saat	25 µg/ml	266	66	<0,5	8671	9243	<0,5
		50 µg/ml	273	51	<0,5	8788	8985	<0,5
		100 µg/ml	223	77	<0,5	8761	9277	<0,5
AML/IV-YE	72 saat	25 µg/ml	240	66	<0,5	8850	8683	<0,5
		50 µg/ml	203	47	<0,5	8675	9530	<0,5
		100 µg/ml	337	61	<0,5	8442	9425	<0,5
AML/IV-ÇE	24 saat	25 µg/ml	246	80	<0,5	9268	9458	<0,5
		50 µg/ml	166	92	<0,5	9427	9434	<0,5
		100 µg/ml	185	104	<0,5	9291	9426	<0,5
AML/IV-ÇE	48 saat	25 µg/ml	1756	99	<0,5	5674	9064	<0,5
		50 µg/ml	177	101	<0,5	8824	9233	<0,5
		100 µg/ml	215	107	<0,5	8999	9265	<0,5
AML/IV-ÇE	72 saat	25 µg/ml	356	78	<0,5	8416	9414	<0,5
		50 µg/ml	238	54	<0,5	9080	9450	<0,5
		100 µg/ml	358	58	<0,5	7753	9461	<0,5

Aynı inkübasyon sürelerinde deney grupları arasında yapılan apoptoz ve canlı hücre karşılaştırmalarının sonuçları Tablo 4, 5 ve 6'de gösterilmiştir.

24. saatte Ara-C ve IVYE grupları arasında yapılan apoptoz ve canlılık karşılaştırılması istatistiksel olarak anlamlı gözlemlendi ($P < 0,5$) (Tablo 4). Aynı şekilde 24. saatte Ara-C ve IVÇE grupları arasında yapılan Apoptoz ve canlılık karşılaştırılması da istatistiksel olarak anlamlı gözlemlendi ($P < 0,5$) (Tablo 5). Ancak 24. Saatte IVYE ve IVÇE gruplarının apoptoz ve canlılık karşılaştırılması anlamlı gözlenmedi ($p=1$) (Tablo 6).

48. saatte Ara-C ve IVYE grupları arasında yapılan apoptoz ve canlılık karşılaştırılması istatistiksel olarak anlamlı gözlemlendi ($P < 0,5$) (Tablo 4). Aynı şekilde 48. saatte Ara-C ve IVÇE grupları arasında yapılan Apoptoz ve canlılık karşılaştırılması

da istatistiksel olarak anlamlı gözlemlendi ($P < 0,5$) (Tablo 5). Ancak 48. Saatte IVYE ve IVÇE gruplarının apoptoz ve canlılık karşılaştırılması anlamlı gözlenmedi ($p=1$) (Tablo 6).

72. saatte Ara-C ve IVYE grupları arasında yapılan apoptoz ve canlılık karşılaştırılması istatistiksel olarak anlamlı gözlemlendi ($P < 0,5$) (Tablo 4). Aynı şekilde 72. saatte Ara-C ve IVÇE grupları arasında yapılan Apoptoz ve canlılık karşılaştırılması da istatistiksel olarak anlamlı gözlemlendi ($P < 0,5$) (Tablo 5). Ancak 72. Saatte IVYE ve IVÇE gruplarının apoptoz ve canlılık karşılaştırılması anlamlı gözlenmedi ($p=1$) (Tablo 6).

Her inkübasyon süresinde Ara-C'nin uygulandığı grup apoptoz ve canlılık bakımından IVYE ve IVÇE'ye göre anlamlı gözlemlendi ($P < 0,5$) (Tablo 4 ve 5). Ancak IVYE ve IVÇE grupları arasında apoptoz ve canlılık karşılaştırılması anlamlı değildi ($P=1$) (Tablo 6).

Tablo 4. Ara-C (sitarabin) ve IVYE (Inula viscosa Yaprak Ekstraktı)'nin apoptotik ve canlı AML hücre sayılarının istatistiksel karşılaştırılması

Etken madde (10000 hücre/ml)	İnkübasyon süresi	Etken madde konsantrasyonu	Apoptotik AML hücre sayısı	P değeri	Canlı AML hücre sayısı	P değeri
AML/Ara-C	24 saat	0,1 μmol	1684	<0,5	5996	<0,5
		0,5 μmol	1773	<0,5	5531	<0,5
		1 μmol	1269	<0,5	7215	<0,5
AML/IV-YE	24 saat	25 $\mu\text{g/ml}$	296		8999	
		50 $\mu\text{g/ml}$	199		9369	
		100 $\mu\text{g/ml}$	202		9205	
AML/Ara-C	48 saat	0,1 μmol	2796	<0,5	844	<0,5
		0,5 μmol	3097	<0,5	771	<0,5
		1 μmol	2747	<0,5	1005	<0,5
AML/IV-YE	48 saat	25 $\mu\text{g/ml}$	266		8671	
		50 $\mu\text{g/ml}$	273		8788	
		100 $\mu\text{g/ml}$	223		8761	
AML/Ara-C	72 saat	0,1 μmol	2861	<0,5	303	<0,5
		0,5 μmol	2576	<0,5	324	<0,5
		1 μmol	2718	<0,5	320	<0,5
AML/IV-YE	72 saat	25 $\mu\text{g/ml}$	240		8850	
		50 $\mu\text{g/ml}$	203		8675	
		100 $\mu\text{g/ml}$	337		8442	

Tablo 5. Ara-C (sitarabin) ve IVÇE (Inula viscosa Çiçek Ekstraktı)'nin apoptotik ve canlı AML hücre sayılarının istatistiksel karşılaştırılması

Etken madde (10000 hücre/ml)	İnkübasyon süresi	Etken madde konsantrasyonu	Apoptotik AML hücre sayısı	P değeri	Canlı AML hücre sayısı	P değeri
AML/Ara-C	24 saat	0,1 µmol	1684	<0,5	5996	<0,5
		0,5 µmol	1773	<0,5	5531	<0,5
		1 µmol	1269	<0,5	7215	<0,5
AML/IV-ÇE	24 saat	25 µg/ml	246		9268	
		50 µg/ml	166		9427	
		100 µg/ml	185		9291	
AML/Ara-C	48 saat	0,1 µmol	2796	<0,5	844	<0,5
		0,5 µmol	3097	<0,5	771	<0,5
		1 µmol	2747	<0,5	1005	<0,5
AML/IV-ÇE	48 saat	25 µg/ml	1756		5674	
		50 µg/ml	177		8824	
		100 µg/ml	215		8999	
AML/Ara-C	72 saat	0,1 µmol	2861	<0,5	303	<0,5
		0,5 µmol	2576	<0,5	324	<0,5
		1 µmol	2718	<0,5	320	<0,5
AML/IV-ÇE	72 saat	25 µg/ml	356		8416	
		50 µg/ml	238		9080	
		100 µg/ml	358		7753	

Tablo 6. IVÇE (Inula viscosa Çiçek Ekstraktı) ve IVYE (Inula viscosa Yaprak Ekstraktı)'nin apoptotik ve canlı AML hücre sayılarının istatistiksel karşılaştırılması

Etken madde (10000 hücre/ml)	İnkübasyon süresi	Etken madde konsantrasyonu	Apoptotik AML hücre sayısı	P değeri	Canlı AML hücre sayısı	P değeri
AML/IV-YE	24 saat	25 µg/ml	296	1	8999	1
		50 µg/ml	199	1	9369	1
		100 µg/ml	202	1	9205	1
AML/IV-ÇE	24 saat	25 µg/ml	246		9268	
		50 µg/ml	166		9427	
		100 µg/ml	185		9291	
AML/IV-YE	48 saat	25 µg/ml	266	1	8671	1
		50 µg/ml	273	1	8788	1
		100 µg/ml	223	1	8761	1
AML/IV-ÇE	48 saat	25 µg/ml	1756		5674	
		50 µg/ml	177		8824	
		100 µg/ml	215		8999	
AML/IV-YE	72 saat	25 µg/ml	240	1	8850	1
		50 µg/ml	203	1	8675	1
		100 µg/ml	337	1	8442	1
AML/IV-ÇE	72 saat	25 µg/ml	356		8416	
		50 µg/ml	238		9080	
		100 µg/ml	358		7753	

Aynı etken maddeyi içeren deney gruplarının 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde kendi aralarında yapılan karşılaştırmalarında Tablo 7'deki sonuçlar elde edildi.

IVYE uygulanan farklı konsantrasyonlardaki deney gruplarının 24. 48. ve 72. saatleri kendi aralarında karşılaştırıldığında 48. saatte 24. saate göre ve 72. Saatte 48. Saate göre apoptotik hücre sayısının arttığı gözlenmedi ($p=1$), viabilitenin ise, aynı şekilde anlamlı fark göstermedi ($p=1$) (Tablo 7).

IVÇE uygulanan farklı konsantrasyonlardaki deney gruplarının 24. 48. ve 72. saatleri kendi aralarında karşılaştırıldığında 48. saatte 24. saate göre ve 72. Saatte 48. Saate göre apoptotik hücre sayısının arttığı gözlenmedi ($p=1$), viabilitenin ise, aynı şekilde anlamlı fark göstermedi ($p=1$) (Tablo 7).

Ara-C uygulanan farklı konsantrasyonlardaki deney gruplarının 24. 48. ve 72. saatleri kendi aralarında karşılaştırıldığında 48. saatte 24. saate göre ve 72. Saatte 48. Saate göre apoptotik hücre sayısının arttığı gözlenmedi ($p=1$), viabilitenin ise, aynı şekilde anlamlı fark göstermedi ($p=1$) (Tablo 7).

Tablo 7. Etken maddelerin kendi içerisinde farklı inkübasyon süreleri arasında (24-48 saat, ve 48-72 saat süreleri arasında) apoptotik ve canlı AML hücre sayılarının karşılaştırılması

Etken madde (10000 hücre/ml)	İnkübasyon süresi	Etken madde konsantrasyonu	Apoptotik AML hücre sayısı	P değeri	Canlı AML hücre sayısı	P değeri
AML/Ara-C	24 saat	0,1 µmol	1684	1	5996	1
		0,5 µmol	1773	1	5531	1
		1 µmol	1269	1	7215	1
AML/Ara-C	48 saat	0,1 µmol	2796	1	844	1
		0,5 µmol	3097	1	771	1
		1 µmol	2747	1	1005	1
AML/Ara-C	72 saat	0,1 µmol	2861		303	
		0,5 µmol	2576		324	
		1 µmol	2718		320	
AML/IV-YE	24 saat	25 µg/ml	296	1	8999	1
		50 µg/ml	199	1	9369	1
		100 µg/ml	202	1	9205	1
AML/IV-YE	48 saat	25 µg/ml	266	1	8671	1
		50 µg/ml	273	1	8788	1
		100 µg/ml	223	1	8761	1
AML/IV-YE	72 saat	25 µg/ml	240		8850	
		50 µg/ml	203		8675	
		100 µg/ml	337		8442	
AML/IV-ÇE	24 saat	25 µg/ml	246	1	9268	1
		50 µg/ml	166	1	9427	1
		100 µg/ml	185	1	9291	1
AML/IV-ÇE	48 saat	25 µg/ml	1756	1	5674	1
		50 µg/ml	177	1	8824	1
		100 µg/ml	215	1	8999	1
AML/IV-ÇE	72 saat	25 µg/ml	356		8416	
		50 µg/ml	238		9080	
		100 µg/ml	358		7753	

5. TARTIŞMA

AML tedavisi için farklı stratejiler uygulanmaktadır. Bir strateji, apoptozu tetiklemektir (Bauer ve ark., 1995). Antikanserojen kimyasal ilaçlar ile tedaviler sırasında hastalarda belirgin problemler ve yan etkiler gözlenmektedir ve sağkalım oranı düşüktür. Geleneksel tıp sistemlerinde listelenen 2000 bitkinin olası tıbbi uygulamaları hakkında çok az bilgi bilinmektedir (Seca ve ark., 2014). Tarım arazilerinde, bahçelerde, yol kenarlarında büyüyen ve hayatta kalmaları için insan müdahalesine bağlı olmayan yabancı otlar, ekim gerektirmedikleri için ucuz bitkisel madde kaynaklarıdır ve düşük maliyetli ürünlere yol açabilir (Trimech ve ark., 2014). Ayrıca bitki ürünlerinin sentetik ilaçlardan daha az yan etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (Seca ve ark., 2014). Alkaloidler, fenilpropanoidler ve terpenoidler gibi bitki kaynaklı doğal ürünler, Antitümör özelliklere sahip gruplardır (Park ve ark., 2007). Son yıllarda, biyolojik etkileri nedeniyle *Inula türlerinin* araştırılması başlanmıştır (Topkaçı, 2016). Literatüre ilk bakışta, *Inula viscosa*'nın hem ekstraktlarının hem de saf izole edilmiş sekonder metabolitlerinin biyolojik aktivite değerlendirmelerinde büyük bir eksikliğin var olduğu sonucuna varılmıştır (Seca ve ark., 2014).

Çalışmalarda *Inula viscosa*'nın hipoglisemik (Zeggwagh ve ark., 2006), antihipertansif (Kattouf ve ark., 2009), antibakteriyel (Oskay ve ark., 2009; Vieira ve ark., (2017); Rhimi ve ark., 2017), antifungal (Rhimi ve ark., 2017) ve antioksidan (Trimech ve ark., 2014) etkisi, düşüğe sebep olması (Al-Dissi ve ark., 2001) ve antikanser özelliği tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda da *Inula viscosa*'nın antikanser etkisi AML'ye karşı tespit edildi. Kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalması, karsinogenezde önemli bir özellik olarak tedavide sorunlara yol açmaktadır. Hücre döngüsünün ilerlemesi ve hücre çoğalmasının düzenleyicilerinin ifadesi ve/veya aktivitesinin *Inula viscosa* ekstraktı veya metabolitleri tarafından engellenebildiği gösterilmiştir.

Rozenblat ve ark. (2007), *Inula viscosa* yapraklarından elde edilen Tomentosin ve Inüviscolide'nin insan melanoma hücre hatları (SK-28, 624 mel ve 1363 mel) üzerinde doza bağımlı bir şekilde antiproliferatif etkisini bildirmiştir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde *Inula viscosa*'nın yaprak ve çiçeği etanolik ekstraktlarının apoptotik ve antiproliferasyon etkisi AML-M₂ alttipi olan kasumi-6 hücre hattında gözlemlendi ancak doza bağımlı değildi.

Talib ve ark. (2010), *Inula viscosa*'nın farklı ekstraktlarının antiproliferatif etkilerini Hep-2 (larinks karsinoması), MCF-7 (meme epitelyal adenokarsinoması) ve Vero (Afrikan yeşil maymunu böbreği) hücre hatlarına karşı değerlendirmiştir. Bu çalışmada *Inula viscosa* çiçeklerinin metanol fraksiyonu MCF-7 hücrelerine karşı en aktifti ve diğer hücre hatlarına karşı daha az toksikti. Bizim çalışmamızda ise AML-M₂ alttipe olan kasumi-6 hücre hattına karşı *Inula viscosa*'nın sadece etanolik ekstraktının apoptotik ve antiproliferasyon etkisi tespit edildi. Ayrıca *Inula viscosa*'nın çiçek ekstraktı yaprak ekstraktına göre daha etkindi.

Talib ve ark. (2012), başka bir çalışmada *Inula viscosa*'dan izole edilen 13 bileşiğin antiproliferatif ve apoptotik etkilerini Hep-2, MCF-7 ve Vero hücre hatlarına karşı test etmiştir. 4 flavonoidde (Nepetin, 3,3'-di-O-Methylquercetin, Hispidulin ve 3-O-Methylquercetin) antiproliferatif aktivite gözlemiştir ve en güçlü bileşik, Nepetin'dir. Ancak 3,3'-di-O-Methylquercetin ve 3-O-Methylquercetin MCF-7 hücrelerine karşı seçici anti-proliferatif etkilerini apoptozu indükleyerek göstermiştir. Metillenmiş quercetinlerin diğer flavonoidlere kıyasla artmış antikanser özelliğine sahip olarak potansiyel antikanser ajan olduğu sonucuna varılmıştır. Bizim çalışmamızda *Inula viscosa*'nın sadece etanolik ekstraktı bileşikleri izole edilmeden AML-M₂ alttipe olan kasumi-6 hücre hattına karşı değerlendirildi ve apoptotik ve antiproliferasyon etkisi gözlemlendi.

Merghoub ve ark. (2016), *Inula viscosa* ekstraktının hekzan ve diklorometan fraksiyonlarının sitotoksik ve pro-apoptotik etkilerini insan servikal HeLa ve SiHa kanseri hücreleri üzerinde araştırmıştır. Bu çalışmada ekstraktların HeLa ve SiHa hücrelerinin çoğalmasını doza bağımlı bir şekilde inhibe edebildiği gösterilmiştir. Bu çalışma, *Inula viscosa* ekstraktının telomerleri hedefleyerek apoptozu indüklediğini ve tümör hücrelerinde ilaç direncinin üstesinden geldiğini gösteren ilk kanıttır. Bizim çalışmamızda *Inula viscosa* yaprak ve çiçeğinin sadece etanolik ekstraktı AML-M₂ alttipe olan kasumi-6 hücre hattına karşı değerlendirildi ve benzer bir şekilde apoptotik ve antiproliferasyon etkisi gözlemlendi ancak doza bağımlı değildi ve apoptozu hangi mekanizma ile tetiklediği araştırılmadı. Bizim çalışma da AML'ye karşı *Inula viscosa*'nın antikanser etkisini değerlendiren ilk araştırmadır.

Merghoub ve ark. (2017), başka bir çalışmada *Inula viscosa*'dan saflaştırılmış Tomentosin'in anti-proliferatif, telomer kısaltması ve apoptotik etkilerini HeLa ve SiHa

hücre hatları üzerinde araştırmıştır ve Tomentosin'in doz ve zamana bağlı olarak SiHa ve HeLa hücre çizgilerinin büyümesini inhibe ettiğini bulmuştur. Bu çalışma Tomentosin'in telomer makine üzerinde bir hedefi olduğunu ve serviks kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediğinin ilk kanıtını ve Tomentosin-kaynaklı apoptozun altında yatan moleküler mekanizmanın mitokondriyum aracılı bir sinyal yolu içerdiğini sunmuştur. Bizim çalışmamızda *Inula viscosa*'nın sadece etanolik ekstraktı bileşiklerine izole edilmeden AML-M₂ alttipi olan kasumi-6 hücre hattına karşı apoptotik ve antiproliferasyon etkisi benzer şekilde gözlemlendi ancak apoptozu hangi mekanizma ile tetiklediği araştırılmadı.

Bizim çalışmamızda AML hücre dizilerinde *Inula viscosa* ve Ara-C tarafından indüklenen apoptozun arttığı, viabilitenin ise azaldığı ve buna bağlı olarak hücre çoğalmasının da baskılandığı gözlenmiştir ($p < 0,05$). Çalışmamızın sonuçları diğer çalışmalarla uyumlu olarak antikanser etkisini göstermiştir. Bu çalışmada ilk kez AML hücre hattına karşı *Inula viscosa*'nın apoptoz indükleyici etkisi araştırılmıştır. *Inula viscosa*'nın yaprak ve çiçekleri AML hücre hattını kontrole göre kısmen ve aynı oranda apoptoza sokabilmekte, ancak Ara-C'ye göre bu apoptoz oranı oldukça düşük kalmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda *Inula viscosa* antikanser özellik sergilediğinden bunun sebebi ekstraksiyon yöntemi veya çözücüsü olabilir.

Sonuç olarak elde ettiğimiz bulgular, *Inula viscosa*'nın AML'ye karşı antikansorejen bir ekstrakt olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Inula viscosa'nın yaprak ve çiçekleri AML hücre hattını kontrole göre kısmen ve aynı oranda apoptoza sokabilmekte, ancak Ara-C'ye göre bu apoptoz oranı oldukça düşük kalmaktadır.

Daha önce yapılan çalışmalarda *Inula viscosa* antikanser özellik sergilediğinden bunun sebebi ekstraksiyon yöntemi veya çözücüsü olabilir.

AML hücre dizilerinde, *Inula viscosa*'nın apoptotik ve antikanserojenik etkilerinin yeterince olmadığından saf bileşiklerine (Tomentosin, İnoviskolide, Nepetin ve metilenmiş kuarsetinler) izole edilerek araştırılabilir.

Ayrıca AML'nin başka bir alttipi olan HL-60 hücre hattında (AML-M3) *Inula viscosa*'nın apoptotik etkisi araştırılabilir.

AML hücre dizilerinde, *Inula viscosa* ile yapılan apoptotik ve antikanserojenik etkilerinin yeterince olmadığından *in vivo* olarak AML oluşturulmuş deney hayvanlarında araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- Abraham G, Dovrat S, Bessler H, Grossman S, Nir U, Bergman M. Inhibition of inflammatory cytokine secretion by plant-derived compounds inulaviscoside and tomentosin: the role of NFκB and STAT1. *The Open Pharmacology Journal* 2010;14:36-44.
- Afifi-Yazar FU, Kasabri V, Abu-Dahab R. Medicinal plants from Jordan in the treatment of cancer: traditional uses vs. in vitro and in vivo evaluations-Part 1. *Planta Medica* 2011;(77):1203-1209.
- Akşit H, Bildik A. Apoptosis. *YYÜ Vet Fak Derg* 2008;19(1):55-63.
- Alalan L, Al-Shammaa I, Al-nouri AS. Analysis of the chemical composition of essential oil extracted from Syrian *Inulaviscosa* (L). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 2015;7(12):861-864.
- Al-Dissi NM, Salhab AS, Al-Hajj HA. Effects of *Inulaviscosa* leaf extracts on abortion and implantation in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2001;77(1):117-121.
- Alkofahi A, Atta AH. Pharmacological screening of the anti-ulcerogenic effects of some Jordanian medicinal plants in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 1999;67(3):341-345.
- Altun A. Thymoquinone ve Cytosine Arabinoside'in Akut Miyeloid Lösemi Hücre Hattında Apoptosis ve Hücre Çoğalmasına Etkileri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Yüksek Lisans Tezi 2018;17-25.
- Anak S, Uysalol E. Akut Miyeloid Lösemi (AML). *Çocuk Dergisi*, DOI:10.5222/j.child.2012.153.
- Ashhab Y, Alian A, Polliack A, Panet A, Ben Yehuda D. Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern. *FEBS Lett* 2001;495(1-2):56-60.
- ATCC. Kasumi-6 (ATCC® CRL-2775™). https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2775.aspx?geo_country=tr#documentation , 2019.
- Avery-Kiejda KA, Bowden NA, Croft AJ, Scurr LL, Kairupan CF, Ashton KA, Talseth-Palmer BA, Rizos H, Zhang XD, Scott RJ, Hersey P. p53 in human melanoma fails to regulate target genes associated with apoptosis and the cell cycle and may contribute to proliferation. *BMC Cancer* 2011;11:203-220.
- Avi A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2008;19(3-4):325-331.

- Bai L, Zhu WG. Structure, function and therapeutic applications. *J Cancer Mol* 2006;2(4):141-153.
- Baker WJ., Royer GL., Weiss RB. Cytarabine and neurologic toxicity. *J Clin Oncol* 1991;9:679-693.
- Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 2006;6(2):107-116.
- Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15(6):725-731.
- Brullo SG, Marco D. Taxonomical Revision of the genus *Dittrichia* (Asteraceae). *Portugaliae Acta Biol* 2000;19:341-354.
- Chen Z, Naito M, Hori S, Mashima T, Yamori T, Tsuruo T. A human IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264(3):847-854.
- Cheson BD. Standard and low-dose chemotherapy for the treatment of myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 1998;22:17-21.
- Chou KC, Tomasselli AG, Heinrikson RL. Prediction of the tertiary structure of a caspase-9/inhibitor complex. *FEBS Lett* 2000;470:249-256.
- Cohen Y, Wang W, Daniel B, Ben-Daniel BH, Ben-Daniel Y. Extracts of *Inula viscosa* control downy mildew of grapes Caused by *Plasmopara viticola*. *The American Phytopathological Society* 2006;96(4):417-424.
- Çelik T, Aslantürk Ö. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of mulaviscosa leaf extracts with *Allium Test*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010;2010:189252. DOI:10.1155/2010/189252.
- Çetin A. Kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Kayseri, Bitirme Ödevi, 2013;3-43.
- Devarajan E, Sahin AA, Chen JS, Krishnamurthy RR, Aggarwal N, Brun AM, Sapino A, Zhang F, Sharma D, Yang XH, Tora AD, Mehta K. Downregulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene* 2002;21(57):8843-8851.
- Didem Yalcın A. Apoptosis. <https://www.slideshare.net/ArzuDidemYALCIN/apoptosis-41886244> , 2019.
- Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2015;373(12):1136-1152.

- Eddouks M, Ouahidi ML, Farid O, Moufid A, Khalidi A, Lemhadri A. The use of medicinal plants in the treatment of diabetes in Morocco. *Phytotherapie* 2007;5:194-203.
- Farnsworth NR, Bingel AS, Cordell GA, Crane FA, Fong HS. Potential value of plants as sources of new antifertility agents II. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1975;64(5):717-754.
- Fontana G, LaRocca S, Passannanti S, Paternostro M. Sesquiterpene compounds from *Inulaviscosa*. *Natural Product Research* 2007;2:824–827.
- Friesen C, Fulda S, Debatin KM. Deficient activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in drug resistant cells. *Leukaemia* 1997;11:1833-1841.
- Fulda S, Los M, Friesen C, Debatin KM. Chemosensitivity of solid tumour cells in vitro is related to activation of the CD95 system. *Int J Cancer* 1998;76(1):105-114.
- Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* 2007;14(7):1237-1243.
- Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 2005;55(3):178-194.
- Goolsby C, Paniagua M, Tallman M, Gartenhaus RB. Bcl-2 regulatory pathway is functional in chronic lymphocytic leukaemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2005;63B(1):36-46.
- Grant S. Ara-C: cellular and molecular pharmacology. *Adv Cancer Res* 1998;72:197-233.
- Güçlütürk I, Detsi A, Weiss EK, Ioannou E, Roussis V, Kefalas P. Evaluation of antioxidant activity and identification of major polyphenolics of the invasive weed *Oxalis pes-caprae*. *Phytochem Anal* 2012;23:642-646.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
- Hernandez V, del Carmen Recio M, Manez S, Prieto JM, Giner RM, Rios JL. A mechanistic approach to the in vivo anti-inflammatory activity of sesquiterpenoid compounds isolated from *Inulaviscosa*. *Planta Med* 2001;67(8):726-731.
- Hernandez V, Recio MC, Manez S, Giner RM, Riou JF. Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inulaviscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism. *Life Sci* 2007;81:480-488.
- Herrmann M, Kalden JR. Apoptosis and autoimmunity: From Mechanisms to Treatments. 1st edition, Hoboken, New Jersey, Wiley-Blackwell. 2003:50-59.

- Ho DHW, Frei E. Clinical pharmacology of 1-b-D-arabinofuranosylcytosine. *ClinPharmacol Ther* 1971;12:944-954.
- Hudaib M, Mohammad M, Bustanji Y, Tayyem R, Yousef M, Abuirjeie M, Aburjai T. Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Jordan, Mujib Nature Reserve and surrounding area. *Journal of Ethnopharmacol* 2008;120:63-71.
- Hwang D, Fischer NH, Jang BC, Tak H, Kim JK, Lee W. Inhibition of the expression of inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines by sesquiterpene lactones in macrophages correlates with the inhibition of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226(3):810-818.
- Joshi SP, Rojatkari SR, Nagasampagi BA. Antimalarial activity of *Xanthium strumarium*. *J Med Arom Plant Sci* 1997;19:366-368.
- Kaileh M, Berghe WV, Boone E, Essawi T, Haegeman G. Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. *Journal of Ethnopharmacology* 2007;113:510-516.
- Kang S, Jeong S, Kim S, Kim J, Jung J, Koh W, Kim J, Kim D, Chen C, Kim S. Icariside II Induces Apoptosis in U937 Acute Myeloid Leukemia Cells: Role of Inactivation of STAT3-Related Signaling. *PLoS ONE* 2012;7(4):e28706. DOI:10.1371/journal.pone.0028706.
- Kattouf J, Belmoukhtar M, Harnafi H, Mekhfi H, Ziyat A, Aziz M, Bnouham M, Legssyer A. Antihypertensive effect of an aqueous extract of *Inula viscosa* leaves. *Phytotherapie* 2009;7:1-4.
- Kaufmann T, Strasser A, Jost PJ. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death and Differentiation* 2012;19(1):42-50.
- Keane RW, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea JR, Krajewski S, Reed JC, Dietrich WD. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60(5):422-429.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 239-257.
- Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovskiy B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 2005;12:1463-1467.
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007;87(1):99-163.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robins and Cotran pathologic basis of disease*. 8th edition, Philadelphia, Saunders, Elsevier. 2010;25-32.

- Kviecinski MR, Felipe KB, Schoenfelder T, de Lemos Wiese LP, Rossi MH, González E, Felicio JD, Filho DW, Pedrosa RC. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. *J Ethnopharmacol* 2008;117(1):69-75.
- Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15-16.
- Lastra C, Lopez A, Motilva V. Gastroprotection and prostaglandin E2 generation in rats by flavonoids of *Dittrichia viscosa*. *Planta Medica* 1993;59(6):497-501.
- Lauro L, Rolih C. Observations and research on an extract of *Inula viscosa*. *Bollettino della Societa Italiana di Biologia Sperimentale* 1990;66(9):829-834.
- Lopes RB, Gangeswaran R, McNeish IA, Wang Y, Lemoine NR. Expression of the IAP protein family is dysregulated in pancreatic cancer cells and is important for resistance to chemotherapy. *Int J Cancer* 2007;120(11):2344-2352.
- Lou J, Lenke LG, Ludwig FJ, O'Brien MF. Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord* 1998;36(10):683-690.
- Maoz M, Neeman I. Antimicrobial effects of aqueous plant extracts on the fungi *Microsporium canis* and *Trichophyton rubrum* and on three bacterial species. *Lett Appl Microbiol* 1998;26(1):61-63.
- Maoz M, Neeman I. Effect of *Inula viscosa* extract on chitin synthesis in dermatophytes and *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology* 2000;71(3):479-482.
- McCarthy NJ ve Evan GI. Methods for detecting and quantifying apoptosis. *Curr Top Dev Biol* 1998;36:259-278.
- Merghoub N, El Btaouri H, Benbacer L, Gmouh S, Trentesaux C, Brassart B, Terryn C, Attaleb M, Madoulet C, Benjouad A, Amzazi S, El Mzibri M, Morjani H. *Inula viscosa* extracts induces telomere shortening and apoptosis in cancer cells and overcome drug resistance. *Nutr Cancer* 2016;68(1):131-43.
- Merghoub N, El Btaouri H, Benbacer L, Gmouh S, Trentesaux C, Brassart B, Attaleb M, Madoulet C, Wenner T, Amzazi S, Morjani H, El Mzibri M. Tomentosin induces telomere shortening and caspase-dependant apoptosis in cervical cancer cells. *J Cell Biochem* 2017;118(7):1689-1698.
- Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* 2006;6:924-935.
- Minn AJ, Vélez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M, Thompson CB. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 1997;385:353-357.

- Musthaba SM, Athar MT, Kamal YT, Baboota S, Ali J, Ahmad S. Fast analysis and validation of rutin in anti-psoriatic ayurvedic formulation by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2011;34:446-455.
- O'Brien MA, Kirby R. Apoptosis: a review of pro-apoptotic and antiapoptotic pathways and dysregulation in disease. *J Vet Emerg Crit Care* 2008;18(6):572-585.
- Oskay M, Oskay D, Kalyoncu F. Activity of Some plant extracts of some plant extracts some plant extracts plant extracts extracts against multi-drug resistant human pathogens -drug resistant human pathogens. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2009;8(4):293-300.
- Ozawa H, Keane RW, Marcillo AE, Diaz PH, Dietrich WD. Therapeutic strategies targeting caspase inhibition following spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 2002;177(1):306-313.
- Örel B. Deneysel hayvan modellerinde resveratrolun sitozin arabinozide bağlı serebellar ve oküler toksisiteye karşı koruyucu etkisinin araştırılması, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir, Uzmanlık Tezi, 2011;5-10.
- Öztürk F. Apoptoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2002;9(2):143-148.
- Park HJ, Kim MJ, Ha E, Chung JH. Apoptotic effect of hesperidin through caspase 3 activation in human colon cancer cells, SNU-C4. *Phytomedicine* 2007;15(1-2):147-151.
- Passalacqua NG, Guarrera PM, De Fine G. Contribution to the knowledge of the folk plant medicine in Calabria region (Southern Italy). *Fitoterapia* 2007;78:52-68.
- Qi X, Zhang D, Xu X. Oridonin nano suspension was more effective than free oridonin on G2/M cell cycle arrest and apoptosis in the human pancreatic cancer PANC-1 cell line. *Int. J. Nanomedicine* 2012;7:1793-1804.
- Raffo AJ, Perlman H, Chen MW, Day ML, Streitman JS, Buttyan R. Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Res* 1995;55(19):4438-4445.
- Reesink-Peters N, Hougardy BM, van den Heuvel FA, Ten Hoor KA, Hollema H, Boezen HM, de Vries EG, de Jong S, van der Zee AG. Death receptors and ligands in cervical carcinogenesis: an immunohistochemical study. *Gynaecol Oncol* 2005;96(3):705-713.
- Rhimi W, Salem IB, Immediato D, Saidi M, Boulila, Cafarchia C. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of Crude *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter leaf extracts. *Molecules* 2017;22(7):942-955.

- Rozenblat S, Grossman S, Bergman M, Gottlieb H, Cohen Y, Dovrat S. Induction of G2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines. *Biochem Pharm* 2007;75(2):369-382.
- Saad B, Said O. *Greco-Arab and Islamic Herbal Medicine: Traditional System, Ethics, Safety, Efficacy and Regulatory Issues*. 1. Baskı. Hoboken, New Jersey. John Wiley & Sons Ed. 2011;541.
- Samali A, Orrenius S. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress and Chaperones*. *Nature* 1998;3(4):228-236.
- Schinella GR, Tournier HA, Prieto JM, Mordujovich P, Rios JL. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sciences* 2002;70(9):1023-1033.
- Schuebel KE, Chen W, Cope L, Glökner SC, Suzuki H, Yi JM, Chan TA, Van Neste L, Van Crieking W, Bosch S, England M, Ting AH, Jair K, Yu W, Toyota M, Imai K, Ahuja N, Herman JG, Baylin SB. Comparing the DNA hypermethylome with gene mutations in human colorectal cancer. *PLoS Genet* 2007;3(9):1709-1723.
- Seca A, Grigore A, Pinto D, Silva A. The genus *Inula* and their metabolites: From ethnopharmacological to medicinal uses. *Journal of Ethnopharmacology* 2014; 154:286-310.
- Shen XG, Wang C, Li Y, Wang L, Zhou B, Xu B, Jiang X, Zhou ZG, Sun XF. Downregulation of caspase-9 is a frequent event in patients with stage II colorectal cancer and correlates with poor clinical outcome. *Colorectal Dis* 2010;12(12):1213-1218.
- SIGMA-ALDRICH 2019. Cytarabine.
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/cytarabine2432214794411?lan=en®ion=TR> 2019. Erişim tarihi: 22.05.2019.
- Small S, Keerthivasan G, Huang Z, Gurbuxani S, Crispino JD. Overexpression of survivin initiates haematologic malignancies in vivo. *Leukaemia* 2010;24:1920-1926.
- Stentoft J. The toxicity of cytarabine. *Drug Saf* 1990;5:7-27.
- Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali. Caspase-12 and ER stress mediated apoptosis: the story so far. *Ann NY Acad Sci* 2003;1010:186-194.
- Tahraoui A, El-Hilaly J, Israili ZH, Lyoussi B. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidi province). *Journal of Ethnopharmacology* 2007;110:105-117.
- Talib WH, Mahasneh AM. Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. *Sci Pharm* 2010;78(1):33-46.

- Talib WH, Zarga MH, Mahasneh AM. Antiproliferative, antimicrobial and apoptosis inducing effects of compounds isolated from *Inula viscosa*. *Molecules* 2012;17:3291-3303.
- Tobyn G, Denham,A, Whitelegg M. The Western Herbal Tradition, 2000 Years of Medicinal Plant Knowledge. 1. Baskı. Londra. Churchill Living stone Ed. 2011;201-210.
- Topkaçı N. Sticky Elecampane, *Inulaviscosa* (L.) Aiton (Asteraceae). *IJAIR* 2016;5(3):2319-1473
- Trimech I, Weiss E, Chedea V, Marin D, Detsi A, Ioannou E, Roussid V, Kefalasa P. Evaluation of anti-oxidant and acetylcholinesterase activity and identification of polyphenolics of the invasive weed *Dittrichia viscosa*. *Phytochem Anal* 2014;25:421-428.
- Ürküp R. Çevresel sigara dumanı maruziyetinin çocuklarda oksidatif stress durumuna ve apoptozis belirteci olan kaspaz 3 ve kaspaz 7 aktivitesine etkisi. Harran Üniversitesi Tıp fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Uzmanlık Tezi, 2017;9-29.
- Vaughan WP., Karp JE., Burke PJ. Two-cycle-timed sequential chemotherapy for adult acute nonlymphocytic leukemia. *Blood* 1984;64:975-980.
- Vaux D, Silke J. Mammalian mitochondrial IAP-binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304(3):449-504.
- Verpoorte R. Pharmacognosy in the new millenium: leadfinding and biotechnology. *J Pharm Pharmacol* 2000;52(3):253-262.
- Vieira M, Bessa LJ, Martins MR, Arantes S, Teixeira APS, Mendes A, Costa PM, Belog ADF. Chemical composition, antibacterial, antibiofilm and synergistic properties of essential oils from *Eucalyptus globulus* LABILL. and seven Mediterranean aromatic plants. *Chem. Biodiversity* 2017;14(6):e1700006. DOI: 10.1002/cbdv.201700006.
- Wamidh H, TalibA, Mahasneh M. Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. *Sci Pharm* 2010;78(1):33-45.
- Wong RSY. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment, Wong *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2011;30:87-101. DOI: 10.1186/1756-9966-30-87.
- Xu C, Bailly MB, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 2005;115(10):2656-2664.

Yalnız Kayım Z. Akut miyeloid lösemili hastalarda aurora gen ailesinin rolünün araştırılması, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Doktora Tezi, 2017;5-11.

Zeggwagh NA, Ouahidi ML, Lemhadri A, Eddouks M. Study of hypoglycaemic and hypolipidemic effects of *Inula viscosa* L. aqueous extract in normal and diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2006;108(2):223-227.

Zhang Y, Wang L, Zi Y, Zhang L, Guo Y, Huang Y. Oridonin effectively reverses the drug resistance of cisplatin involving induction of cell apoptosis and inhibition of MMP expression in human acute myeloid leukemia cells. *Saudi Journal of Biological Sciences* 2017;24:678–686.

Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News PhysiolSci* 2004;19:124-128.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Shiva MARZI

Doğum Yeri: Khoy / İran

Doğum Tarihi: 24.12.1988

Medeni Hali: Bekar

Bildiği Yabancı Diller: Farsça, Azerice, İngilizce, Arapça

Eğitim Durumu:

Yüksek Lisans: Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İmmünoloji-Allerji Bölümü (2016 - devam)

Yüksek Lisans: Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Bölümü (2015 - bırakıldı)

Lisans: Urumiye Tıp Bilimleri ve Sağlık Hizmetleri Üniversitesi, Tıp Bilimleri Fakültesi, Tıbbi Laboratuvar Bilimleri Bölümü (2012)

Çalıştığı Kurumlar:

Özel Tıbbi Laboratuvar, Khoy / İran (2015)

Sağlık Bakanlığı, Tıbbi Laboratuvar, Urumiye / İran (2012 - 2014)

E-posta: shiva.marzi@gmail.com