



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**THYMOQUINONE VE CYTOSİNE ARABİNOSİDE'İN  
AKUT MİYELOİD LÖSEMİ HÜCRE HATTINDA  
APOPTOZİS VE HÜCRE ÇOĞALMASINA ETKİLERİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Aslı ALTUN**

**Samsun  
Haziran-2018**





**ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**THYMOQUINONE VE CYTOSİNE ARABİNOSİDE'İN  
AKUT MİYELOİD LÖSEMİ HÜCRE HATTINDA  
APOPTOZİS VE HÜCRE ÇOĞALMASINA ETKİLERİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Aslı ALTUN**

**Danışman  
Prof. Dr. Nurten KARA  
II. Danışman  
Doç. Dr. Şengül TURAL**

**Samsun  
Haziran-2018**

**T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Aslı ALTUN tarafından Prof. Dr. Nurten KARA Danışmanlığında hazırlanan Thymoquinone ve Cytosine Arabinoside'in Akut Miyeloid Lösemi Hücre Hattında Apoptozis ve Hücre Çoğalmasına Etkileri başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından ..... /..... /..... tarihinde yapılan sınav ile Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan :

Üye :

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 başından sonuna kadar destekleyen, bana yol gösteren, hiçbir zaman güler yüzünü esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Nurten KARA'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda yardım ve desteğini esirgemeyen ikinci danışman hocam Doç. Dr. Şengül TURAL'a teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasında ve çalışmamda bana her zaman destek olan, bilgi ve deneyimini esirgemeyen değerli hocam Çocuk Alerji Bilim Dalı Başkanı, Çocuk Alerji ve İmmünoloji Flow laboratuvarı sorumlusu Prof. Dr. Alişan YILDIRAN'a teşekkür ederim.

İstatistiksel analizlerimizin yapılmasında katkılarını esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Ü. Leman TOMAK'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bana destek olan ve hoşgörü gösteren tüm Flow laboratuvarı çalışanı arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca, her adımda yanımda olan ve bana her türlü desteği vererek bu günlere gelmemi sağlayan, haklarını asla ödeyemeyeceğim sevgili anneme, babama ve eşime sonsuz teşekkür ve sevgilerimle.

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.TIP.1904.15.001 proje numarası ile desteklenmiştir.

## ÖZET

### THYMOQUINONE VE CYTOSİNE ARABİNOZİDE'İN AKUT MİYELOİD LÖSEMİ HÜCRE HATTINDA APOPTOZİS VE HÜCRE ÇOĞALMASINA ETKİLERİ

**Amaç:** Akut miyeloid lösemi (AML) tedavisi güç olan hematolojik bir kanserdir. Kullanılan kemoterapik ilaçlara direnç gelişmesi tedaviyi engellemektedir. AML'de kullanılan sitozin arabinozid (Ara-C) apoptotik etkili bir ilaçtır. Timokinon (TQ) ise antioksidan, antienflamatuvar ve antikanserojen etkili, doğal bir ürün olan çörek otunun ekstraktıdır. Bu çalışmada amaç AML hücre hatlarında kemoterapik ajan olan sitozin arabinozid ve doğal bir antikanserojen olan TQ'nun birlikte ve ayrı ayrı kullanılarak hücre çoğalmasının baskılanıp hücreleri apoptoza götürmek üzerine etkileri araştırılarak sonuçları gözlemlemektir.

**Materyal ve Metod:** Çalışmada Kasumi- 6 AML hazır hücre hatları kullanıldı. Özgün besi ortamına alınan hücrelere 48 ve 72 saatlik süreler için üç ayrı konsantrasyonda sitozin arabinozid ve timokinon uygulandı. Annexin V ve PI boyama sonrası flow sitometride her bir grup için apoptoz, viabilite ve hücre çoğalması değerlendirildi.

**Bulgular:** Çalışmada 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde değerlendirilen her iki grupta da etken maddelerin tek başlarına ve birlikte kullanımları sonucunda apoptozda artış, viabilite de ise azalma olması, hücre çoğalmasının baskılandığını ve istatistiksel olarak sonuçların anlamlı ( $p<0,001$ ) olduğunu göstermiştir.

**Sonuç:** Yaptığımız çalışmamızda TQ ve Ara-C uygulanan her grupta gözlemlediğimiz apoptozun artması, viabilitenin ise azalması bize hücre çoğalmasının baskılandığını göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Akut miyeloid lösemi; Apoptozis; Sitozin arabinozid; Timokinon

Aslı ALTUN, Yüksek Lisans Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi – Samsun, Haziran - 2018

## ABSTRACT

### THE EFFECTS OF THYMOQUINONE AND CYTOZINE ARABINOSIDE ON APOPTOSIS AND CELL PROLIFERATION IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA CELL LINE

**Aim:** Acute myeloid leukemia (AML) is a hematologic cancer that is difficult to treat. Resistance to used chemotherapeutic drugs prevents treatment. The Cytosine Arabinoside (Ara-C) is used in AML is an apoptotic drug. Thymoquinone (TQ) is an extract of natural black cumin has antioxidant, anti-inflammatory and anticancer effect. The aim of this study was to investigate the effects of a chemotherapeutic agent Ara-C, and a natural anticancer agent of TQ, on apoptosis and cell proliferation of AML cell lines both alone and in combination.

**Material and Method:** In this study, Kasumi-6 AML cell line was used. The Ara-C and TQ were applied to the cell at three different concentrations for 48 and 72 hours. After annexin V and PI staining, apoptosis, viability and cell proliferation were evaluated for each group by flow cytometry.

**Results:** In the study, AML cell lines showed a statistically significant on single use of the active substances and their combined use showed increase in apoptosis and decrease in viability in both groups at 48 and 72 hour incubation times ( $p < 0.001$ ).

**Conclusion:** In this study, in each group AML cell line TQ and Ara-C were applied, it was observed that apoptosis was increased and viability decreased and consequently cell proliferation was suppressed.

**Keywords:** Acute myeloid leukemia; Apoptosis; Cytosine arabinoside; Thymoquinone

Ash ALTUN, Master Thesis

Ondokuz Mayıs University - Samsun, June-2018

## **SİMGELER ve KISALTMALAR**

|               |                                              |
|---------------|----------------------------------------------|
| <b>AIF</b>    | : Apoptoz indükleyici faktör                 |
| <b>AML</b>    | : Akut miyeloid lösemi                       |
| <b>ARA-C</b>  | : Sitozin arabinozid (Sitarabin)             |
| <b>CAD</b>    | : Kaspaz aktive edici DNaz                   |
| <b>DMSO</b>   | : Dimetil sülfoksit                          |
| <b>DNA</b>    | : Deoksiribo Nükleik Asit                    |
| <b>FAB</b>    | : French-American-British                    |
| <b>ICAD</b>   | : İnaktif kaspaz aktive edici DNaz           |
| <b>KASPAZ</b> | : Sistein bağımlı aspartata spesifik proteaz |
| <b>ml</b>     | : Mililitre                                  |
| <b>MPO</b>    | : Myeloperoksidaz                            |
| <b>PI</b>     | : Propidium iyodür                           |
| <b>SBB</b>    | : Sudan Black B                              |
| <b>TQ</b>     | : Timokinon                                  |
| <b>WHO</b>    | : Dünya Sağlık Örgütü                        |
| <b>μmol</b>   | : Mikromol                                   |
| <b>μM</b>     | : Mikromolar                                 |
| <b>μl</b>     | : Mikrolitre                                 |

## İÇİNDEKİLER

|                                                              |            |
|--------------------------------------------------------------|------------|
| <b>ÖZET .....</b>                                            | <b>iv</b>  |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                         | <b>v</b>   |
| <b>SİMGELER ve KISALTMALAR.....</b>                          | <b>vi</b>  |
| <b>İÇİNDEKİLER .....</b>                                     | <b>vii</b> |
| <b>1. GİRİŞ .....</b>                                        | <b>1</b>   |
| <b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>                                | <b>4</b>   |
| 2.1. Hematopoez.....                                         | 4          |
| 2.2. Programlı Hücre Ölümü ( Apoptoz ) .....                 | 4          |
| 2.2.1. Apoptotik Hücrede Görülen Değişiklikler .....         | 5          |
| 2.2.2. Apoptotik Sinyal Yolakları.....                       | 6          |
| 2.2.3. Apoptoz Mekanizması.....                              | 8          |
| 2.2.4. Apoptozun Düzenlenmesi .....                          | 9          |
| 2.2.5. Apoptoz'un belirlenmesinde kullanılan yöntemler ..... | 10         |
| 2.3. Akut Miyeloid Lösemi (AML).....                         | 11         |
| 2.3.1. Epidemiyoloji .....                                   | 11         |
| 2.3.2. Etyoloji .....                                        | 11         |
| 2.3.3. Sınıflandırma .....                                   | 12         |
| 2.3.4. AML' de Genetik Etkenler .....                        | 16         |
| 2.3.5. AML' de Uygulanan Standart Tedaviler .....            | 17         |
| <b>3. MATERYAL VE METOD .....</b>                            | <b>21</b>  |
| 3.1. Materyal .....                                          | 21         |
| 3.1.1. AML Hücre Dizisi.....                                 | 21         |
| 3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler .....               | 21         |
| 3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....                     | 21         |
| 3.2. Metod .....                                             | 22         |

|                                          |           |
|------------------------------------------|-----------|
| 3.2.1. Hücre Canlılığının Ölçülmesi..... | 22        |
| 3.2.2. Çözeltilerin Hazırlanması.....    | 23        |
| 3.2.3. Hücre Kültürü.....                | 24        |
| <b>4. BULGULAR.....</b>                  | <b>27</b> |
| 4.1. Hücre Kültürü.....                  | 27        |
| 4.2. Akım Sitometri Sonuçları .....      | 28        |
| 4.2.1. Flow Sitometri Görüntüleri .....  | 29        |
| <b>5. TARTIŞMA.....</b>                  | <b>38</b> |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>         | <b>41</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                   | <b>42</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>                    | <b>51</b> |

## 1. GİRİŞ

Akut miyeloid lösemi, normal hücrelere göre proliferasyon hızı artmış, apoptozisi azalmış hücrelerin kontrolsüz ve klonal proliferasyonu ile ortaya çıkan ve hızla çoğalan bu hücrelerin kemik iliğini işgal etmesi ile ortaya çıkan bir malign hastalıklar grubudur (Anak ve Uysaolol, 2012). Lökositleri meydana getiren hücrelerden granülosit ve monositler kemik iliğindeki blast adı verilen genç hücrelerin olgunlaşması sonucu oluşurlar. Meydana gelen bu olgun hücreler blastların aksine işlev gören hücreler olup mikroplarla mücadele eder ve bağışıklık sisteminde önemli rol oynamaktadırlar (Türk Hematoloji Derneği, 2010).

Akut miyeloid lösemide, normal olgunlaşma süreci bozulur ve blast adı verilen genç hücreler olgunlaşamaz. Blastlar kemik iliği ve periferik kanda hızla birikmeye başlarlar. Nötrofil, monosit gibi olgun kan hücreleri meydana gelemediğinden vücut mikroplara karşı savunmasız kalır. Miyeloblastların anormal çoğalması sonucu kemik iliğinde eritrosit, lökosit ve trombosit yapımı bozulur. Buna bağlı olarak da bu hücrelerin sayısında azalma meydana gelir (Öztürk, 2018).

AML'nin tedavisi için ana düşünce sitozin arabinozid ile kemoterapinin etkili bir kombinasyonu olduğudur. Kemoterapide amaç normal kan hücrelerinin üretimini onarma ve hastada tam remisyon elde edilmesidir. Ancak kemoterapi normal sağlıklı hücrelerin de ölümüne yol açar ve bu nedenle AML hastalarında bulantı, halsizlik, yüksek enfeksiyon riski gibi yan etkiler görülür. Bu tedavi sonrası hastaların önemli bir kısmı remisyona girer. Ancak bu remisyon süresi genellikle kısa olduğundan ilave tedaviye ihtiyaç duyulur. Standart tedavi yüksek oranda toksiktir ve kullanılan kemoterapik ilaçlara direnç gelişmesi tedaviyi engellemektedir. Bu nedenle AML hastalarındaki sonuçlarda ilerleme kaydetmek için yeni terapötik ajanların ve protokollerin gelişmesi acil bir ihtiyaçtır. AML'de kullanılan sitozin arabinozid apoptotik etkili bir ilaçtır. Timokinon ise antikanserojen etkili, doğal bir ürün olan çörek otunun ekstraktıdır. Tohumları baharat olarak ve geleneksel tıpta birçok hastalığın tedavisinde kullanılabilmektedir. Kanser hastalarında kemoterapiyle birlikte alternatif tıpta kullanılabileceği bildirilmektedir (Khader ve Eckl, 2014). Timokinon, yan etkisi olmayan bitkisel kaynaklı bir antikanserojen maddedir. Timokinon kanserli hücrelerde tümör hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermesi açısından önemli bir etkiye sahiptir (Ivankovic ve ark., 2006). AML hücre hatlarıyla yapılacak çalışmalar sonucunda anti

kanserojen bitkisel ajanların olumlu etkileri göz önüne alınarak yardımcı tedavi olarak kullanılabilmesi açısından önem kazanacaktır. Böylece AML hastalarında tedavi ve iyileşme sürecindeki başarı da artacaktır.

Apoptozis, mitokondrial membran bütünlüğünün kaybolmasına, hücre membranının bozulmasına, nükleer kromatin yoğunlaşmasına, hücre büzülmesine, apoptotik yapıların oluşumuna ve fagositik hücreler tarafından bu apoptotik hücrelerin fagositozuna sebep olan, kaspaz aktivasyonu ile karakterize olmuş programlı hücre ölümüdür (Baharetha ve ark., 2013).

Apoptozis bir genetik program tarafından kontrol edilmektedir ki bu program kayda değer bir biçimde gelişim, değişim içinde korunmaktadır. Şu anda kullanılan tüm sitotoksik ilaçlar apoptozisi tetikleyerek tümör ölümünü başlatır. Buna rağmen birçok tümörde apoptozisi kontrol eden genler mutasyona uğradığı için tümör oluşmakta ve aynı zamanda onları kemoterapik ajanlara karşı dirençli kılmaktadır (Konopleva ve ark., 2000).

Timokinon, çörek otu (*Nigella Sativa*) olarak da bilinen ve geleneksel tıpta da kullanılan çok tanınan bir bitkidir (Baharetha ve ark., 2013). TQ, *Nigella sativa* uçucu yağ özütünden çıkarılan aktif maddedir. Çeşitli çalışmalar, iltihaplanma, kanser, şeker hastalığı ve ateroskleroz gibi çeşitli hastalıklarda TQ' nun terapötik rolünü göstermek için yapılmıştır. Bir dizi çalışmada, özellikle farelerde kimyasal-indüklenmiş karsinogenezde, bir anti-tümör ajanı olarak timokinon kullanılmıştır. Timokinon'un glioma/glioblastoma, meme kanseri, lösemi, akciğer kanseri, osteosarkoma, pankreas ve prostat kanseri gibi birçok kanser türünde yayılmayı engelleyen etkisi olduğu belirtilmiştir (Khan ve ark., 2011; Baharetha ve ark., 2013).

Timokinonun deneysel otoimmün ensefalomyelit modelinde NF-Kappa' nın aktivasyonunu engellediği rapor edilmiştir. İnsan kronik miyeloid lösemi hücrelerinde, timokinon fosforilasyon ve gerçek nükleer translokasyon inhibisyonu yoluyla TNF kaynaklı NF-kappa-B aktivasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Bir fare tümör modelinde, TQ NF-kappa-B de aktivasyon ile tümör büyümesini engellediği ve romatoid artrit modelinde TNF-alfa ve IL-1 beta üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir. TQ ayrıca pankreas kanserinde NF-kappa-B aktivasyonu ve TNF-alfa üretimini engellediği ispatlanmıştır. Bir başka çalışmada da timokinonun lösemi hücrelerinde, TNF-baskılanmış apoptosise duyarlı olduğunu göstermiştir (Sakalar ve ark., 2013).

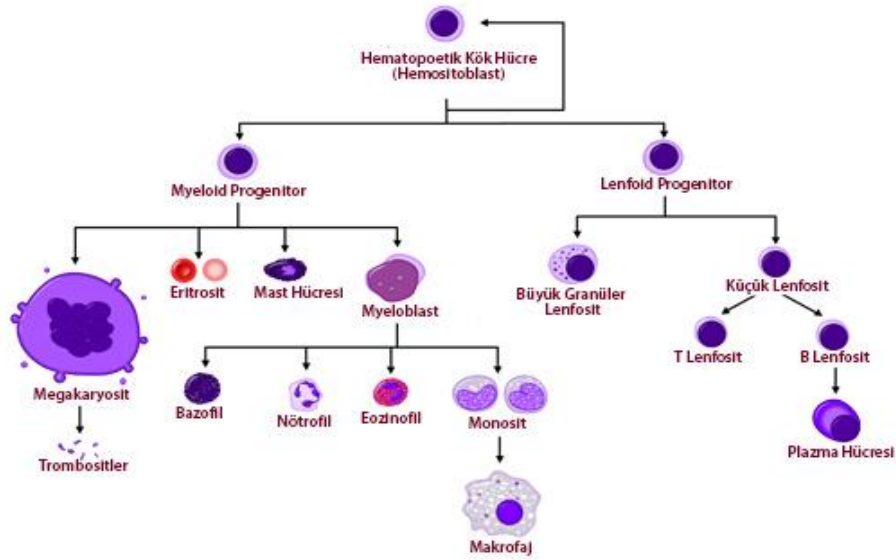
Amacımız, Kasumi-6 AML hücre hatlarında, doğal bir antikanserojen madde olan timokinon ve kemoterapik bir ilaç olan sitozin arabinozid'in tek başına ve birlikte uygulandıklarında apoptozis ve hücre çoğalmasına etkileri ve tedaviye olabilecek katkısını değerlendirmektir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hematopoez

Hematopoez, kemik iliğinde bulunan multipotent özellikteki hematopoietik kök hücrelerin farklılaşarak kan dokusunun tüm hücresel bileşenlerini oluşturma sürecidir (Speck ve Gilliland, 2002). Hematopoietik süreç uzun ömürlü pluripotent hücrelerin oluşumu ile başlar. Tüm kan hücrelerinin öncülü multipotent hematopoietik kök hücrelerdir. Hematopoietik kök hücreler, farklılaşma işaretlerine yanıt olarak kendini yenileme özelliği taşımayan multipotent öncülleri (MPÖ) oluştururlar. Bu öncüller ise daha sonra farklılaşarak aslında en yüksek özelleşme ve farklılaşma sergileyen olgun kan hücrelerini oluştururlar. Bu kan hücrelerinden monositler, makrofajlar, nötrofiller, bazofiller, eozinofiller, eritrositler, megakaryositler/plateletler, dendritik hücreler miyeloid öncü hücrelerden farklılaşırken, T -hücreleri, B-hücreleri, NK hücreleri ise lenfoid öncül hücrelerden farklılaşır (Jude ve ark., 2008). Embriyogenez ile başlayan hematopoietik kök hücre yapımı timus, fetal karaciğer ve kemik iliğinde devam eder ve tüm yaşam boyunca da kan hücrelerinin yapımı kemik iliğinde gerçekleşmektedir (Huang ve ark., 2007).



Şekil 1: Hematopoez ([http://www.allthingsstemcell.com/wp-content/uploads/2009/02/hematopoiesis\\_simple1.png](http://www.allthingsstemcell.com/wp-content/uploads/2009/02/hematopoiesis_simple1.png)' den uyarlanmıştır)

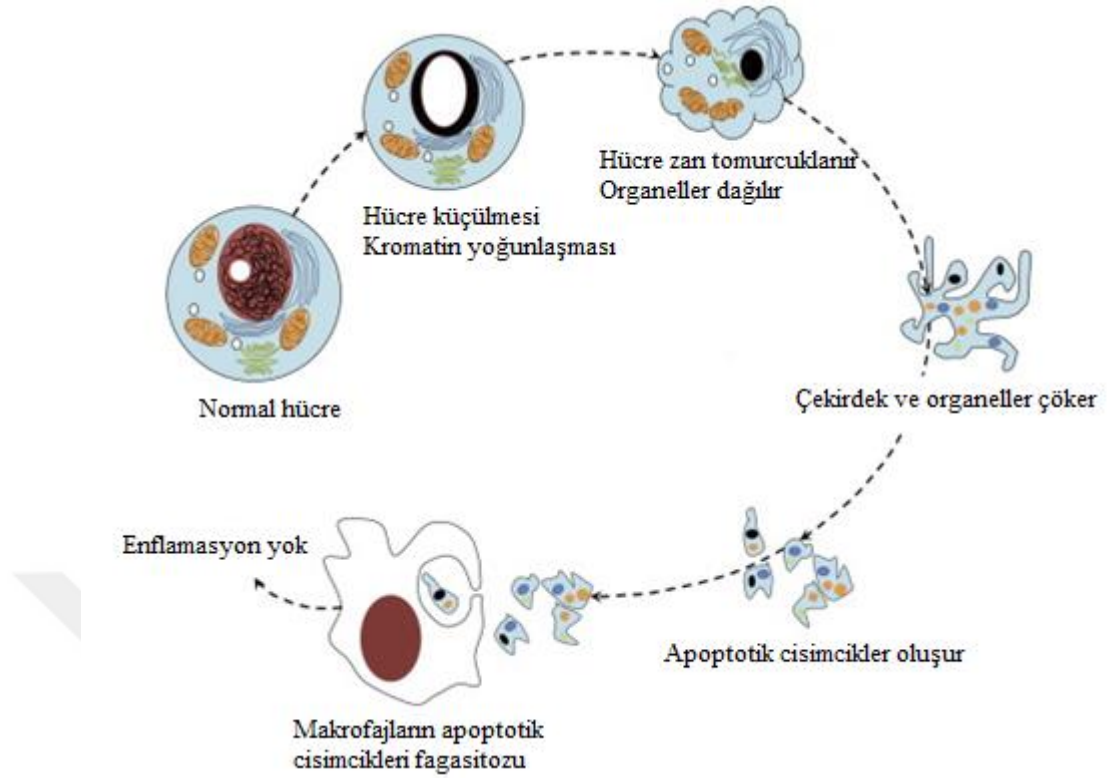
### 2.2. Programlı Hücre Ölümü( Apoptoz )

Programlı hücre ölümü anlamına gelen “apoptoz”, hücresel homeostazisin sürekliliği, hücre çoğalması ve hücre farklılaşmasında çok önemli olan hücre

eliminasyonu için gerekli olan fizyolojik bir olaydır. Apoptozis ile hasar görmüş olan hücreler, çevreye zarar vermeksizin ortadan kaldırılır. Apoptozis çok hücreli organizmalarda embriyogenezis sırasında, erişkinlerde birçok dokuda hücrel çöğalma ve yenilenme arasındaki homeostatik dengenin ve doku içeriğinin kararlılığının korunması için gerekmektedir (Arino ve ark., 1995; Cawthon, 2002; Şahaboğlu, 2006). Apoptozis ilk kez İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır (Ulukaya, 2001).

### **2.2.1. Apoptotik Hücrede Görülen Değişiklikler**

Apoptotik hücre membranları yoğunlukla fosfolipid içeren koruyucu yapılarını hemen kaybetmezler. Bu koruyucu yapı, hücre bileşenlerinin salınmasının önüne geçer (Uguz, 2009). Apoptoza uğrayan bir hücrede laminin ve aktin filamentlerinin kesilmesi sonucu sitoplâzma çekilmeye ve küçülmeye başlar. Kromatin ve çekirdekte bulunan yapısal proteinlerin parçalanması sonucu çekirdekte yoğunlaşma başlar ve çoğu zaman çekirdek, kromatinin çekirdek membranının iç yüzüne yerleşmesi nedeniyle atnalı biçiminde görülür. Hücre büzülmeye ve küçülmeye devam ederek makrofajların tanıyabileceği ve normal hücrelerden daha kolay ayırt edilebileceği membranla çevrili küçük parçalara ayrılır. İçlerinde sitoplâzma ve sıkıca paketlenmiş organeller ve bazılarında çekirdek parçaları da mevcut olan apoptotik cisimcikler meydana gelir (Gandini ve ark., 2000). Oluşan apoptotik cisimcikler, plazma zarındaki değişiklikler sayesinde fagositik hücreler tarafından tanınabilmektedir. Bu değişikliklerden en önemlisi fosfatidil serinin yerleşimidir. Normal şartlarda plazma zarının iç yüzeyinde bulunan fosfatidil serin, apoptozisin erken evresinde zarın dış yüzeyine yerleşir. Bu değişim sayesinde komşu hücreler ve makrofajların reseptörleri, fosfatidil serinin hücrenin dış yüzeyine çıkması ile hücreyi tanır ve apoptotik cisimciklerin fagositozu gerçekleştirilir (Yıldırım, 2012). Apoptotik hücrede gerçekleşen değişimler Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2: Apoptoziste görülen morfolojik değişimler (Abou-Ghali ve Stiban, 2015’den uyarlanmıştır)

### 2.2.2. Apoptotik Sinyal Yolakları

Apoptozis mekanizması tam olarak bilinmese de çeşitli hücre dışı ve hücre içi sinyallerle başlamaktadır (Reed, 2000). Apoptozis intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik (ölüm reseptör yolağı) yolak olmak üzere iki yolla gerçekleşir. Ölüm uyarısı hücrenin içinden geliyorsa intrinsik yolak, hücrenin dışındaki kaynaktan geliyorsa ekstrinsik yolak seçilir (Şekil 3).

#### İntrinsik (Mitokondriyal) Yolak

İntrinsik yolak, hücre içi uyarılar sonucu ve mitokondrinin de katılımıyla gerçekleşen apoptozis mekanizmalarından biridir. Apoptozise giden hücrede, mitokondri dış zarında transmembran potansiyelin düşmesi sonucunda permeability transition pore (PT) olarak adlandırılan por oluşumu gözlenir ve normalde mitokondrinin membranlar arası bölgesinde bulunan iki protein grubunun sitozole salınmasına neden olur (Elmore, 2007; Dipak, 2012).

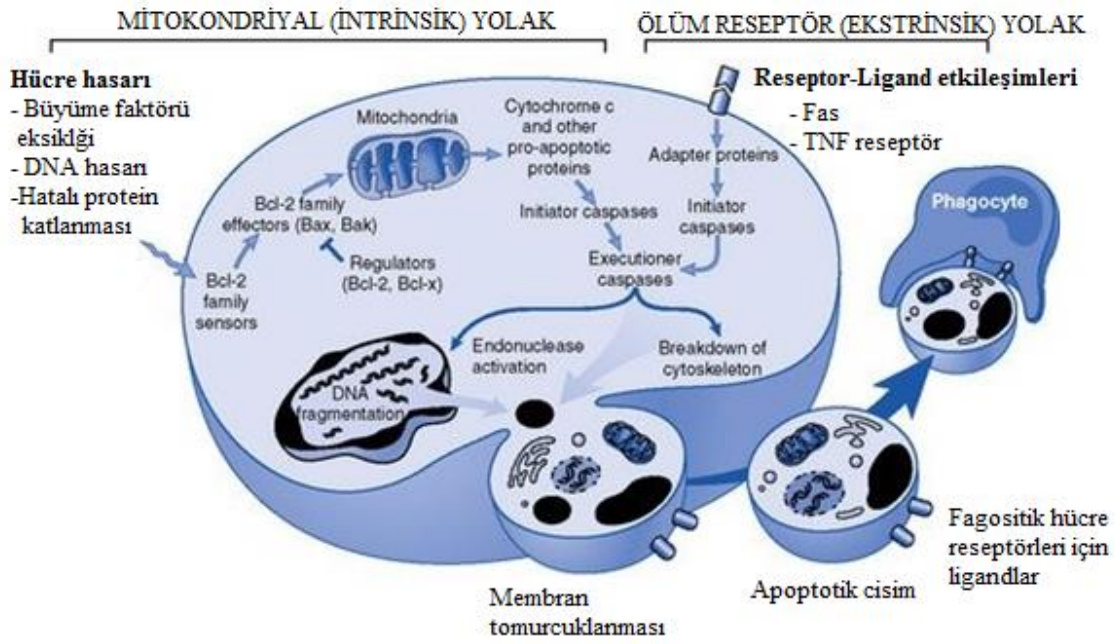
Bu gruplardan ilki, sitokrom c, serin proteaz, HtrA2/Omi ve Smac/DIABLO, ikinci grup proteinler ise, endonükleaz G, AIF (Apoptoz indükleyici faktör) ve CAD (Kaspaz aktive edici DNaz)’dır. Sitokrom c, Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) olarak isimlendirilen proteine bağlanarak apoptozom oluşumunu ve Apaf-1 ile

birlikte kaspaz-9'un aktif hale gelmesini sağlar (Elmore, 2007). Apoptozom kaspaz-9'u keserek aktifleştirir. Kaspaz-9 da prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3 haline getirir. Aktif kaspaz-3 de ICAD (İnaktif kaspaz aktive edici DNaz)'ı inaktifleştirerek CAD'ı serbestleştirir. CAD ise çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nukleozomal alt birimler halinde fragmente olmasına neden olur (Palmer, 2000; Smaili ve ark., 2000; Adams, 2001). Bcl-2 gen ailesi üyeleri, kendi içlerinde birbirlerine antagonist çalışarak apoptozu uyaran veya engelleyen bcl-2 proteinlerini kodlarlar. Bu proteinlerden pro-apoptotik olanlar (Bax, Bak, Bok, Bad, bid, Bim, Bmf) apoptozu uyarırken anti-apoptotik olanlar (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w) apoptozu engellerler.

### **Ekstrinsik Yolak**

Bir diğer yolak da ölüm reseptörlerinin aracılık yaptığı hücre dışı uyaranlar aracılığı ile oluşur. Bu reseptörler Fas (CD95), TNF-R1, DR-3 (Apo-3, WSL-1, TRAMP), DR-4 (TRAIL-R1), DR-5 (TRAILR2), DR-6, EDA-R (ektodermal displazi reseptörü) ve NGF-R'dir. Ölüm reseptörüne kendi ligantlarının bağlanması hücre içinde adaptör proteinin de (FADD) reseptöre bağlanmasına yol açar. FADD, bu kompleks içerisinde sırasıyla pro-kaspaz-8 ve -10'un çalışmasına olanak verir. DISC (death-inducible signaling complex)'teki bu proenzimlerin yakın ilişkisi bunların katalitik aktivitesine, muhtemelen bir allosterik mekanizma tarafından pro-kaspaz-8 veya -10 molekülleri arasındaki dimerizasyona neden olur. Prokaspaz 8 aktif hale geçince kaspaz-8 oluşur ve kaspaz-8 direkt hedef proteinleri bölerek apoptoza yol açan kaspaz-3'ü aktive eder. DISC içindeki kaspazların aktivasyonu hücre içi proteinlerden FLICE-inhibitör proteini (cFLIP) tarafından inhibe edilebilir. Bu proteinler hem DISC'i çalıştırabilir hem de kaspaz-8 ve -10'un aktivasyonunu baskılar (Tomatır ve ark., 2003; Philchenkov ve ark., 2004; Sprick ve ark., 2004; Aydoğdu ve ark., 2005; Orrenius ve ark., 2007).

Ekstrinsik yollardan biriside sfingolipid yoludur. Sfingomyelin, hücre zarı yapıtaşlarından biridir. Radyasyon, kemoterapi, ölüm reseptörleri ile aktive olan sfingomyelinaz, sfingomyelini seramid'e dönüştürür. Seramid iseseramidaz ile sfingozine dönüşür. Sfingozin de Bid yapımını artırarak apoptozu tetikler.



**Şekil 3:** Apoptotik sinyal yolları (<http://genelpatoloji.blogspot.com/2015/09/hucre-olumu-apoptozis-Apoptosis.html>' den uyarlanmıştır)

### 2.2.3. Apoptoz Mekanizması

Kaspazlar (CASPASE; Cysteine-dependent ASpartate spesifik proteASEs, sistein bağımlı aspartata spesifik proteaz), apoptoz sürecinin başlatılmasından sonlandırılmasına kadar her basamağında anahtar görev alan sistein proteazlardır (Chang ve Yang, 2000). Memelilerde tespit edilmiş 14 farklı kaspaz vardır. Bunların 11 tanesi insanda bulunur ve bunlardan 7 tanesi apoptozda görev almaktadır. Apoptotik kaspazlar, başlatıcı kaspazlar ve sonlandırıcı kaspazlar olarak iki farklı grupta incelenmektedir. Başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, 8, 9, 10) apoptozun başlatılmasından, sonlandırıcı kaspazlar (kaspaz-3, 6, 7) ise apoptotik sürecin sonlandırılmasından sorumludur (Riedl ve Shi, 2004). Apoptozu başlatıcı (initiator) kaspazlar, çeşitli hücre-içi ya da hücre-dışı sinyalleri proteolitik aktiviteye çevirip aktifleşerek kaspaz kaskadının başlatılmasından sorumlu olan kaspazlardır. Hücre dışı sinyallerle aktifleşen başlatıcı kaspazlar (örneğin kaspaz-8) ekstrinsik yolağı, hücre içi sinyaller aracılığı ile aktifleşen başlatıcı kaspazlar ise (örneğin kaspaz-9) intrinsik yolağı başlatarak kaspaz kaskadını tetiklemektedir. Apoptozu sonlandırıcı (executioner) kaspazlar (kaspaz-3, 6, 7) ise; hücre içerisindeki spesifik polipeptid hedeflerini proteolitik olarak keserler. Ayrıca inflamatuvar kaspazlar (-1, 4, 5, 11, 12 ve 14) pro-inflamatuvar sitokinlerin

inflamasyon sürecinde görev alan kaspazlar olarak sınıflandırılmaktadır (Kumar, 1999; Salvesen, 2002; Heath-Engel ve Shore, 2006; Kim ve ark., 2006).

Kaspaz-3, ICAD'ı keserek serbest kalan CAD enzimi ile DNA (Deoksiribonükleik asit)'nin fragmantasyonunun gerçekleşmesini sağlar. Kaspaz-3'ün, ayrıca aktin kesici enzim gelsolin'i keserek aktifleştirmesi, plazma membranında tomurcuklanmaya neden olmaktadır. Kaspaz-3 aynı zamanda pek çok protein kinaz enziminin inhibitör bölgelerini keserek bu enzimlerin aktivasyonunu sağlamaktadır. Bu protein grubundan biri olan proteinkinaz C enziminin aktivasyonu ile fosfatidilserinin plazma membranının iç kısmından dış kısmına dönüşünü gerçekleştiren "phospholipid scramblase" enzimi aktifleşir. Hücre membranının fosfolipid yapısındaki bu değişim apoptozun karakteristik göstergelerinden biridir ve makrofajların yüzeylerinde bulunan fosfatidilserin reseptörleri tarafından apoptotik hücrelerin tanınması ile fagositozu gerçekleştirmektedir (Emeto ve ark., 1995; Choen, 1997; Salvesen ve Dixit, 1999; Wolf ve Green, 1999; Frasn ve ark., 2000; Hoffman ve ark., 2001)

#### **2.2.4. Apoptoz'un Düzenlenmesi**

##### **Kalsiyum (Ca)**

Apoptozise giden hücre içine sürekli kalsiyum girişı olur. Kalsiyum iyonları; endonükleaz, proteaz ve transglutaminaz aktivasyonunda, hücre iskeleti organizasyonunda ve gen regülasyonunda rol alır.

##### **Bcl-2 Ailesi**

Bcl-2 ailesi antiapoptotik ve proapoptotik etkiye sahip birbirine zıt 2 gruptan oluşur (Coşkun ve Özgür, 2011). Hücrede proapoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoza eğilimli, antiapoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoza daha az eğilimlidir. Proapoptotik üyeler Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Noxa'dır. Proapoptotik proteinler sitozolde inaktif halde bulunurlar. Aktive edildiklerinde sitokrom c ve AIF 'in salınımını artırarak apoptozisi indüklerler. Antiapoptotik üyeler mitokondrinin dış membranında, çekirdek zarında ve endoplazmik retikulumda bulunur ve por oluşumunu sağlayarak iyon transportunu düzenlerler (Adams, 2001). Anti-apoptotik proteinler etkilerini, sitokrom-c veya AIF'in mitokondriden çıkmasını engelleyerek göstermektedir ve bu grubun en iyi bilinen üyeleri Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1'dir (Hockenbery, 1992; Virkajarvi ve ark., 1998).

## **P53**

Apoptozda kritik öneme sahiptir. Hücrede DNA hasarı oluştuğunda hücre siklusunun G1'den S fazına geçişini bloke eder. Böylece DNA tamiri için hücreye zaman kazandırır. Tamir mümkün değilse hasarlı hücre apoptozla yok edilir (Cregan ve ark., 1999).

### **2.2.5. Apoptoz'un belirlenmesinde kullanılan yöntemler (Galluzi ve ark.'dan, 2006)**

#### **Morfolojik görüntüleme yöntemleri**

1. Işık Mikroskobu
  - a. Hematoksilen Boyama
  - b. Giemsa Boyama
2. Floresan Mikroskobu / Lazerli Konfokal Mikroskop
  - a. Propidium İyodür (PI)
  - b. Hoechst Dye
3. Elektron Mikroskobu
4. Faz Kontrast Mikroskobu

#### **İmmunohistokimyasal yöntemler**

1. Anneksin V Yöntemi
2. TUNEL Yöntemi
3. M30 Yöntemi
4. Kaspaz-3 Yöntemi

#### **Biyokimyasal yöntemler**

1. Agaroze Jel Elektrofözezi
  - DNA fragmentasyonu
2. "Western Blotting"
  - Substrat kırılmaları
  - Aktif kaspaz'ın belirlenmesi
  - Sitokrom c salıverilmesi
3. "Flow" Sitometri

#### **İmmunolojik yöntemler**

1. ELISA
  - DNA Fragmentasyonu

- M30 Düzeyi

## 2. Fluorimetrik Yöntem

- Kaspaz Aktivasyonu

### **Moleküler biyoloji yöntemleri**

- DNA Microarrays

### **2.3. Akut Miyeloid Lösemi (AML)**

AML, erken hematopoetik kök hücrelerde gerçekleşen bir dizi genetik değişiklik sonucunda normal hematopoetik büyüme ve farklılaşmanın bozulması sonucunda, kemik iliği ve periferik kanda çok sayıda anormal olgunlaşmamış miyeloid hücrenin (miyeloblast) birikimi ile sonuçlanan bir hastalıktır (Stone ve ark., 2004).

#### **2.3.1. Epidemiyoloji**

AML en sık görülen lösemi türüdür ve 40 yaşından itibaren yaşla artar, prevalansı 100 binde 2,4'den, yaş ile 100 binde 17,9'a yükselir, erkeklerde kadınlara göre daha sıktır (3:2). İnsidans oranları gelişmiş ülkeler ve endüstrileşmiş şehirlerde daha fazladır (Estey ve Dohner, 2006). Akut lösemiler tüm kanserlerin yaklaşık olarak %3'ünü oluşturur. On yaş altı çocuklarda AML insidansı %10'dan azdır (Siegel ve ark., 2015). Akut lenfoblastik lösemi (ALL), 15 yaşın altındaki çocuklarda en sık görülen kanser türüdür ve teşhis edilen her 5 ALL vakasına karşılık sadece 1 AML teşhis edilmektedir. Çocukluk AML'si en sık hayatın birinci yılında ortaya çıkmakta, daha sonra 4 yaşına kadar azalmakta ve erişkinlik boyunca sabit kalmaktadır (Gurney ve ark., 1995).

#### **2.3.2. Etyoloji**

Akut lösemili hastalarda çok sayıda somatik mutasyon oluşur ve bu mutasyonlar hücrelere proliferasyon ve yaşam avantajı kazandırmaktadır. AML'nin patogenezinde çeşitli çevresel ajanlar da rol oynamaktadır (Levine ve Bloomfield, 1992).

AML çevresel faktörler, genetik anomaliler ve benign ya da malign hematolojik hastalıklar sonucu oluşabilir. Tablo 1'de AML'ye yatkınlık oluşturan durumlar gösterilmiştir (Schwartz ve Cohen, 1988).

**Tablo 1.** AML gelişiminde rol oynayan faktörler (Schwartz ve Cohen, 1988'den uyarlanmıştır)

|                                              |                                               |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Radyasyon/<br>Çevresel Faktörler/<br>İlaçlar | İyonize radyasyon                             |
|                                              | Kimyasallar                                   |
|                                              | Benzen ve türevleri                           |
|                                              | Sigara, Alkol                                 |
|                                              | Alkilleyici ajanlar (Melfalan, karmustin vb.) |
|                                              | Topoizomera II inhibitörleri (Etoposid vb.)   |
|                                              | Diğer ilaçlar (fludarabin, prokarbozin vb.)   |
| Genetik anomaliler                           | Down Sendromu                                 |
|                                              | Fankoni anemisi                               |
|                                              | Bloom Sendromu                                |
|                                              | Ailesel RUNX1 mutasyonları                    |
|                                              | Kostmann sendromu                             |
|                                              | Diamond-Blackfan Sendromu                     |
|                                              | Konjenital amegakaryositik trombositopeni     |
|                                              | Diskeratosis konjenita                        |
|                                              | Nörofibromatöz                                |
|                                              | Werner sendromu                               |
|                                              | Noonan Sendromu                               |
|                                              | Shwachman sendromu                            |
|                                              | Klinefelter Sendromu                          |
|                                              | Turner Sendromu                               |
|                                              | Xeroderma Pigmentosu                          |
| Hematolojik hastalıklar                      | Paroksizmal nokturnal hemoglobinüri           |
|                                              | Aplastik anemi                                |
|                                              | Myelodisplastik Sendrom                       |
|                                              | İdiyopatik miyelofibrozis                     |
|                                              | Primer trombositemi                           |
|                                              | Polistemia vera                               |
|                                              | Kronik myeloid lösemi                         |

### 2.3.3. Sınıflandırma

İlk kez 1976 yılında bir grup Fransız, Amerikan ve İngiliz bilim adamı tarafından oluşturulan French-American-British (FAB) sınıflaması 1985 yılında tekrar düzenlenmiştir. FAB sınıflaması temel olarak morfolojik bulgular ve histokimyasal boyama yöntemlerine göre yapılır ve AML 8 alt gruba ayrılır (Deschler ve Lübbert, 2006), (Tablo 2). FAB sınıflamasında AML'de morfoloji ve immünofenotiplendirme

arasındaki ilişki kuvvetli değildir ve bu sınıflamada AML tanısı için kemik iliğindeki hücrelerin en az %30'unun blastlardan oluşması gerekmektedir. Günümüzde akut lösemilerde sitogenetik ve moleküler genetik anomalilerin daha iyi tanımlanması ve bunların prognostik önem gösterdiklerinin belirlenmesiyle yeni bir sınıflandırma ihtiyacı doğmuştur. 2001 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılan sınıflamada (Tablo 3) morfoloji, immünofenotipleme, sitogenetik ve moleküler biyolojik özellikler değerlendirmeye alınmıştır (Vardiman ve ark., 2002).

### **FAB Sınıflaması**

**AML-M0 (Farklılaşma göstermeyen akut myeloid lösemi):** AML vakalarının yaklaşık %3'ünü oluşturur. Morfolojik olarak ALL'ye benzer. Blastların %3'ünden azında myeloperoksidaz (MPO) veya Sudan black B (SBB) pozitifdir. Yalnızca morfolojik değerlendirme ile ALL'den ayrımını yapmak zordur. AML-M0 alt tipi genellikle kötü prognozludur.

**AML-M1 (Olgunlaşma göstermeyen akut myeloid lösemi):** AML vakalarının %15-20'sini oluşturur. Myeloblastik lösemilerdendir. Blastların %3'den fazlasında MPO ve SBB pozitifdir. Hastaların yaklaşık %50'sinde lösemik hücrelerde kazanılmış genetik anomalilere rastlanır.

**AML-M2 (Olgunlaşma gösteren akut myeloid lösemi):** AML-M2 en sık rastlanan AML alt tipidir ve tüm AML olgularının %25-30' unu oluşturur. Myeloblastik lösemilerdendir. Blastlar kuvvetli MPO ve SBB pozitifliği gösterir. AML-M2 vakalarının yaklaşık %50'sinde t(8;21)(q22;q22) translokasyonu tespit edilmektedir.

**AML-M3 (Akut promyelositik lösemi):** Tüm AML hastalarının yaklaşık %5-10'unu oluşturur. Kemik iliği ve periferik kanda anormal (atipik) promyelosit hakimiyeti vardır. Kuvvetli MPO ve SBB pozitifliği gösterir. AML-M3 olgularında, hastaların genç olması, kanama, spesifik kromozom anormallliği spesifik özelliğidir. AML-M3'de karakterisitk translokasyon, 15. ve 17. kromozomun uzun kolları arasındaki resiprokal t(15;17)(q22;q21) translokasyondur. AML-M3'ün 2 varyantı vardır.

**Hipergranüler Varyant:** AML-M3 vakalarının yaklaşık olarak %75'ini oluşturmaktadır. Hipergranüler varyantta genellikle lökopeni ön plandadır.

**Mikrogranüler Varyant (M3v):** AML-M3 vakalarının yaklaşık %25'ini oluşturmaktadır. Mikrogranüler varyantta lökositöz ön plandadır.

**AML-M4 (Akut Myelomonositik Lösemi):** Hem granulositik hem de monositik seride gerçekleşen farklılaşma ile karakterize AML tipidir. Tüm AML hastalarının %5-10'unu oluşturur. Kemik iliğinde blast oranı %20' den fazladır. AML-M4 vakalarında splenomegali (%30), lenfadenopati (%19-30), dişeti tutulumu ve ekstramedüller tutulum gözlenmektedir. Spesifik bir sitogenetik anomalisi yoktur. Alt tipi olan M4Eo de kemik iliğinde büyük bazofilik granüllü anormal eozinofiller bulunur.

**AML-M5 (Akut Monositik Lösemi):** AML'lerin %5-9'ini oluşturur. Karaciğer, dalak ve lenf nodu gibi ekstramedüller tutulumlar diğer AML'lere göre daha sık gözlenir. AML-M5 vakalarının çoğunda yüksek lökosit sayısı gözlenir. Blastik hücreler MPO ile negatif, SBB ile pozitif boyanmaktadır. AML-M5'de t(9;11) translokasyonu görülür. AML-M5 kötü prognozludur. AML-M5a ve AML-M5b olmak üzere 2 alt tipi vardır.

**AML-M5a:** Kemik iliğindeki noneritroid hücrelerin %80'den fazlasını monoblastlar oluşturur. Daha genç yaşta görülür.

**AML-M5b:** Kemik iliğinde noneritroid hücrelerin %80'inden fazlasını monosit, promonosit ve monoblastlar oluşturur. Genellikle ileri yaşlarda görülür.

**AML-M6 (Akut Eritroid Lösemi):** AML'lerin %5'ini oluşturur. Eritroid hücreler baskın olarak bulunur. Kemik iliği hücrelerinin en az %50'sini eritroblastlar oluşturur. MPO ve SBB negatiftir. Tanı koyabilmek için non-eritroid hücrelerin en az %30'u blastik hücre olmalıdır. AML-M6 kötü prognoz ile ilişkilidir. İleri yaşlarda sık görülür.

**AML-M7 (Akut megakaryositik lösemi):** AML'lerin %3-5'ini oluşturur. Blastların %30'undan fazlası megakaryositik seri oluşturur. MPO ve SBB negatiftir. Tanı için akım sitometrik inceleme gerekir. AML-M7 kötü prognozludur.

**Tablo 2.** Akut miyeloid lösemide FAB sınıflaması (Deschler ve Lübbert'den, 2006)

| AML Tipi |                                             |
|----------|---------------------------------------------|
| M0       | Farklılaşma göstermeyen akut myeloid lösemi |
| M1       | Olgunlaşma göstermeyen akut myeloid lösemi  |
| M2       | Olgunlaşma gösteren akut myeloid lösemi     |
| M3       | Akut promyelositik lösemi                   |
| M4       | Akut Myelomonositik Lösemi                  |
| M5       | Akut Monositik Lösemi                       |
| M6       | Akut Eritroid Lösemi                        |
| M7       | Akut megakaryositik lösemi                  |

### **Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Sınıflaması**

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) sınıflaması prognostik ve tedaviye yönelik anlamı olan translokasyonların varlığına göre AML'leri ayırmaktadır. Aynı şekilde bu sınıflamada myelodisplastik sendromların varlığı ve daha önce kemoterapi görmüş olmak (tedaviye bağlı AML) gibi faktörler de yer almaktadır. WHO sınıflamasının FAB'dan önemli bir farkı FAB'da % 30 olan kemik iliğindeki blastik oranının bu sınıflamada % 20'ye indirilmiş olmasıdır (Kern, 2004).

**Tablo 3.** Akut miyeloid lösemide WHO sınıflaması (Kern'den, 2004)

|                                                                                    |
|------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Tekrarlayan genetik anomalilerle seyreden AML                                   |
| - t(8;21)(q22;q22); (AML1/ETO) ilişkili AML. RUNX1-RUNX1T1                         |
| - t(15;17) (q22;q12) ile ilişkili AML ve varyantları; PML/RAR $\alpha$             |
| - inv(16)(p13.1q22) veya t(16;16)(p13.1;q22); CBF $\beta$ -MYH11                   |
| - 11q23 (MLL) anomalileri ile ilişkili AML                                         |
| - t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL                                                      |
| - t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214                                                      |
| - inv(3)(q21q26.2) veya t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1                               |
| - t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1                                                     |
| - NPM-1 mutasyonu ile ilişkili AML                                                 |
| 2. Çoklu dizi displazisi gösteren AML: Genellikle kötü prognozludur.               |
| - Öncesinde MDS olan AML                                                           |
| - Öncesinde MDS olmayan AML                                                        |
| 3. İlaça bağlı AML ve MDS (myelodisplastik sendrom): Genellikle kötü prognozludur. |
| - Alkilleyici ajanlarla ilişkili AML                                               |
| - Topoizomeras II inhibitör ile ilişkili AML                                       |
| 4. Sınıflandırılmayan grup                                                         |
| - Minimal farklılaşma gösteren AML                                                 |
| - Olgunlaşma göstermeyen AML                                                       |
| - Olgunlaşma gösteren AML                                                          |
| - Akut miyelomonositik lösemi                                                      |
| - Akut monositik lösemi                                                            |
| - Akut eritroid lösemi                                                             |
| - Akut megakaryositik lösemi                                                       |
| - Akut bazofilik lösemi                                                            |
| - Miyelofibroza giden akut panmiyeloz                                              |
| - Myeloid sarkom                                                                   |

#### **2.3.4. AML’de Genetik Etkenler**

AML hastalarında prognoz ile ilişkili en önemli parametre sitogenetik analizlerdir. Yeni tanı almış olan erişkin AML hastalarının yaklaşık %55’inde kromozom anomalileri tespit edilmektedir (Grimwade, 2001; Mrozek ve ark., 2004). AML hastalarının yaklaşık % 45’i klonal kromozomal anomalilerden yoksundur ve normal bir karyotipe sahiptir. Bariz bir sitogenetik anomali göstermeyen AML’ler “intermediate” (orta) prognoza sahip hastalıklar olarak sınıflandırılmaktadır (Fröhling ve ark., 2005). Fakat yapılan çalışmalar bu sınıftaki AML vakalarının moleküler

seviyede heterojenite gösterdiği ve bu hastaların yalnızca %40'ının uzun dönem sağ kalımının mümkün olduğu ortaya konmuştur. Bu nedenle bu hastaların prognozlarının takibi, nüks öngörüsü ve uzun süreli takipleri için moleküler belirteçlere ihtiyaç vardır (Özbek, 2006).

AML ön tanıli hastalarda tanı sırasında sitogenetik anomalilerin tesbiti hem sınıflandırmada hem de tedavi yönetiminde son derece önemlidir. Erişkin AML hastalarında t(8;21) varlığı iyi prognozla ilişkilidir. AML hastalarının %7'sinde t(8;21)(q22;q22) translokasyonu tespit edilmiştir. Yeni tanı AML hastalarının yaklaşık %7' sinde inv(16)(p13.1;q22) veya t(16;16)(p13.1;q22) tespit edilmektedir. Bu anomali genç hastalarda görülür ve iyi prognoz ile ilişkilidir. AML hastalarında iyi prognozla ilişkili diğer bir translokasyon ise AML-M3 olgularının ortalama %13'ünde saptanan t(15;17)(q22;q12)'dir (Grimwade ve ark., 2010). Intermediate prognoz ile ilişkili olan t(9;11)(p22;q23) monositik AML'de görülür ve çocuklarda daha yaygındır. İki'den fazla kromozomda sitogenetik anomali, kromozom 5 veya 7 monozomisi, 5. kromozomun uzun kol delesyonu veya 3. kromozomun uzun kolunda anomali kötü prognozla ilişkilidir (Verhaak ve ark., 2005).

### **2.3.5. AML'de Uygulanan Standart Tedaviler**

AML tedavisi zor bir hastalıktır. Çocuklarda tedavi şansı erişkinlere oranla daha yüksektir. Erişkinlerin çoğunda iyileşme sağlanmaz. Fakat son yıllarda tedaviden olumlu sonuçlar alınmaktadır.

Üç tip AML tedavisi vardır ve bunlar indüksiyon tedavisi, konsolidasyon ve intensifikasyon tedavisi olarak adlandırılır.

**İndüksiyon tedavisi:** İndüksiyon tedavisi kemoterapinin ilk parçasıdır. İndüksiyon tedavisinin amacı mümkün olduğu kadar fazla AML hücrelerini öldürmek, kan sayımını normale çevirmek ve hastalığın tüm belirtilerini uzun süre ortadan kaldırmaktır.

**Konsolidasyon ve İntensifikasyon Tedavisi:** Daha fazla kemoterapi ve bazı vakalarda kök hücre transplantı AML'deki intensifikasyon ve konsolidasyon tedavisinin parçalarıdır. Yapılacak işleme hastanın hangi risk grubuna girdiğine göre karar verilir.

**Kemoterapi:** Kanser hücrelerinin ilaçlarla öldürüldüğü ve ya harap edildiği tedavidir. AML hücrelerini öldürmek için çeşitli ilaçlar verilir. Her ilaç farklı yollarla hücreleri öldürür. AML tedavisinde kullanılan bazı ilaçlar şunlardır; danorubisin,

doksorubisin, idarubisin, mitoksantron, sitarabin, kladribin, fludarabin, etoposid, teniposid, azasitidin, desitabin etken maddeliler (Hematoloji Uzamanlık Derneği, 2017).

### **Sitozin Arabinozid**

Cryptothetya crypta adlı bakteriden elde edilen sitozin arabinozid, cytidine ve deoksicytidine nükleosidlerinin analogu olup DNA replikasyonunun potent bir inhibitörüdür. İlk defa sentez edildiği 1959 yılından itibaren akut lösemi tedavisinde kullanılmakta olan en etkili ilaçlardan birisi olan sitozin arabinozid, öncelikle AML hastalarının tedavisi için oluşturulan remisyon indüksiyonu ve konsolidasyon protokollerinde standart, orta ya da yüksek doz şeklinde en önemli yeri almıştır (Peters ve ark., 1988; Berkoviç ve ark., 1997; Cole ve Gibson, 1997; Nakamura ve ark., 1997; Smith ve ark., 1997; Burke ve ark., 1999). İlk defa 1979 yılında, standart remisyon indüksiyonu tedavisi neticesinde başarısız kalınmış ve relaps olmuş AML’li olgulara, daha yüksek dozda Ara-C tatbikinin faydalı olduğu görülmüştür (Peters ve ark., 1988). Sitozin arabinozid, akut lösemilerin ve lenfomanın tedavisinde kullanılan, deoksisitidinin arabinosid nükleozid analogudur. Sitarabin, intraselüler metabolik aktivasyonun ardından DNA polimerazı inhibe ederek ve DNA’nın yapısına katılarak DNA replikasyonunu ve tamirini bozar. Sitarabinin kullanıldığı doz ve şemaya bağlı olarak, DNA yapısına katılarak zincir uzamasını durdurabilir, önceden replike olmuş DNA segmentlerini tekrar uzatabilir ya da DNA zincirinde kırıklar oluşturabilir (Burke ve ark., 1982; Kufe ve ark., 1984; Vaughan ve ark., 1984; Grant, 1998).

**Radyasyon Tedavisi:** Bazen omurga veya beyinde kloroma olarak adlandırılan büyük hacimli AML hücresi kitlelerini tedavi etmek için radyasyon tedavisi kullanılabilir.

**Hematopoietik Kök Hücre Nakli:** Hematopoetik kök hücre nakli (transplantasyonu) (HKHN) için kök hücreler kemik iliğinden, periferik kandan ve ya kordon kanından elde edilebilir. Kök hücre vericisine göre allojenik ve otolog olmak üzere iki tipi vardır.

**Allojenik Kök Hücre Nakli:** Hastaya ilk olarak yüksek doz kemoterapi ve/veya, radyasyon tedavisi verilir. Donörden kök hücreler alınır. Donör erkek veya kız kardeş olabilir. Donör, kök hücreleri hastanın hücreleriyle “eşleşen” HLA (doku) uyumlu başka bir kişi olabilir.

**Otolog Kök Hücre Nakli:** Tedaviye iyi cevap vermeyen hastalarda uygulanır. Kemoterapi başlamadan önce kök hücreler hastanın kanı veya kemik iliğinden alınır ve bu hücreler depolanır. Kemoterapi bittikten sonra bu hücreler hastanın kanına yeniden infüze edilir (Hematoloji Uzmanlık Derneği, 2017).

**Alternatif Tedavi Yöntemleri:** AML’de kullanılan kemoterapötik ilaçlara direnç gelişmesi tedaviyi engellemektedir. Kemoterapötik ilaçlar tümör hücrelerinin büyümesine ve çoğalmasına engel olarak tümörün ölümüne neden olurlar. Diğer taraftan bu ilaçlar vücudumuzda bazı yerlerdeki normal hücreleri de etkileyerek çeşitli yan etkilere yol açarlar. Bu nedenle alternatif tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

#### **Nigella sativa (Çörek otu)**

Ranunculacea (Düğünçiçeğigiller) familyasında yer alan, Güney Batı Asya, Avrupa, Kuzey Afrika’da yetişen ve ülkemizde çoğunlukla Afyon, Isparta, Burdur ve Konya yörelerinde yetiştirilen “çörek otu” olarak bilinen *Nigella sativa* L. 20-30 cm uzunluğunda çiçekli yıllık bir bitkidir (Forouzanfar ve ark., 2014; Khader ve Eckl, 2014), (Şekil 4). *Nigella sativa* için ülkemizde kullanılan diğer isimler; çörekotu, ekilen çörek otu, kara çörek otu ve siyah kimyondur (Baytop, 1984). Çörek otu tohumunun yapısında başlıca doymuş/doymamış sabit yağlar (%31-35,5), uçucu yağlar (%0,4-0,45), karbonhidratlar (%33-34), proteinler (%16-19,9), amino asitler, alkaloidler, tanenler, saponinler, lifler, mineraller (kalsiyum, çinko, fosfat), vitaminler (askorbik asit, tiamin, niasin, pridoksin ve folik asit) bulunmaktadır (El-Tahir ve ark., 2006). Çörek otu, çoğu Orta Doğu ve Uzak Doğu ülkelerinde 2000 yılı aşkın süredir birçok hastalığın tedavisinde kullanılan şifalı bir bitkidir (Mahfouz ve El-dakhkhny, 1960).



**Şekil 4:** Çörek otu bitkisi ve tohumu (<http://www.saturn.web.tr/post-1.asp?no=35> dan)

### Timokinon

Timokinon ( $C_{10}H_{12}O_2$ ; 2-izopropil-5-metil-1,4-benzokinin), çörek otu uçucu yağının en önemli biyoaktif bileşeni olup; çörek otu uçucu yağında %18,4-24 oranında bulunur (Şekil 5). 164,2 g/mol molekül ağırlığında koyu sarı renkli kristallere sahip uçucu bir maddedir (Arslan ve ark., 2005; Cooper, 2010).

Yapılan çalışmalarda çörek otu tohumu ve bileşenlerinin antitümoral, antikanserojenik, antibakteriyel, antiülserojenik, antienflamatuar ve analjezik antioksidan, hipoglisemik ve bağışıklık sistemini güçlendirici gibi birçok etkilerinin olduğunu göstermektedir (Abdel-Fattah ve ark., 2000; Badary ve ark., 2003; Salem, 2005; Kaseb ve ark., 2007; Kanter, 2008; Halawani, 2009). Çörek otunun çeşitli kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkili olduğu, hücrel aktivasyonu ve tümöre özel antikorların üretimini artırdığı bildirilmiştir (Medenica ve ark., 1993; Swamy ve Tan, 2000).

Çörek otu'nun en önemli biyoaktif bileşeni olan TQ'nun potansiyel bir kemoterapötik ve kemopreventif bir bileşen olduğu, TQ'nun antiproliferatif etkisiyle hücrel döngüde büyük önemi olan apoptozu uyardığı bildirilmiştir (El-Mahdy ve ark., 2005).



Şekil 5: Çörek otunun kimyasal yapısı (www.coreklen.com' dan)

### **3. MATERİYAL VE METOD**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. AML Hücre Dizisi**

Hücre kültürü çalışmalarında Kasumi-6 (ATCC No:CRL-2775) miyeloblast hücreleri kullanılmıştır. Kasumi-6 hücre dizisi, akut miyeloid lösemili (AML-M2), 64 yaşında erkek hastanın periferik kanından elde edilerek hazırlanmış bir miyeloid hücre dizisidir.

##### **3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler**

- BDFACS Calibur (2 lazer, 4 renk)
- BIO-RAD TC10™ Automated Cell Counter
- Su banyosu (Memmert)
- Buzdolapları ve dondurucular (+4 °C, -20 °C ve -80 °C)  
(Arçelik, Altus,)
- Soğutmalı santrifüj (Nüve NF 1000R)
- Masa üstü mini santrifüj (Heraeus Labofuge Ae)
- Hassas terazi (Kern)
- Çeker ocak (Holten Lamin Air)
- Laminar akışlı steril kabin (Nuaire Biological Safety Cabinets)
- Karbondioksit (CO<sub>2</sub>)' li inkübatör (Heracell 240i)
- Invert mikroskop (Zeiss Axiovert 100)
- Mikro pipetler (Discovery)
- Plate 12 kuyucuklu hücre kültür kabı
- Pipet ucu (10,100 mikrolitrelik) (poşet)
- Hücre sayma kamerası Thoma Lamı
- Filtreli pipetler (2,5,10 ml'lik)
- Cam Kaplar (100,500,1000 ml'lik )
- Vorteks (Nüve)

##### **3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

- Thymoquinone 99% ( Nigella sativa) (Sigma)
- Cytarabin (Sitozin arabinozid) 100 mg (Sigma)
- FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen)

- Trypanblue (%4) steril (Sigma)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma)
- RPMI-1640 besi ortamı (Hepes Buffer içeren) (Sigma)
- Fetal Bovin Serum (Heat Inactivated FBS) 100ml (gibco)
- Penicilin- Streptomycin (Sigma)
- L-glutamine 100x (gibco)
- DMSO (CryoSure-WAK)

### 3.2. Metod

#### 3.2.1. Hücre Canlılığının Ölçülmesi

Kasumi hücreleri, 37°C' de su banyosunda çözündürüldü. Çözünme işleminden sonra 15 ml'lik falkon tüpüne alındı üzerine sıgır serumu (FBS) ve antibiyotik içeren 1 ml RPMI 1640 besiyeri ilave edildi. 2 kez 1200 rpm' de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve elde edilen pellet üzerine 1 mililitre (ml) antibiyotiksiz besiyerinden eklendi. Bu süspansiyondan 10 mikrolitre (µl) alınıp thoma lamına pipetlendi. Üzerine aynı oranda tripan blue ilave edilerek canlılık tayini yapıldı. Canlı ve ölü hücre oranları, Bio-Rad Automated Cell Counter cihazında ölçüldü. Ölçüm sonucunda %22 oranında canlılık tespit edildi.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{\text{Total canlı hücre sayısı} \times 100}{\text{Total hücre sayısı}}$$

Cihazla yapılan ölçüm sonucunda; Total hücre =  $4,68 \times 10^6$  cells/ml

Live count =  $1,02 \times 10^6$  cells/ml

Live cells = %22

Hazır gelen hücre hattının, canlı hücre sayısı  $1,02 \times 10^6$  hücre/ml olarak ölçüldü. Antikanserojen uygulaması öncesi, hücreleri çoğaltmak için yapılan normal hücre kültürü sonucunda toplam  $7 \times 10^6$  hücre/ml elde edildi. Kasumi-6 AML hücre hattı için önerilen granulocyte macrophage colony stimulating factor (GMCSF) satın alınamadığı için hücre çoğalması beklenilenin altındaydı. Hücre sayısının az olması sebebiyle çalışmamız bir örnek bir kontrol şeklinde devam ettirildi.

### 3.2.2. Çözeltilerin Hazırlanması

#### Thymoquinone ve Ara-C solisyonlarının hazırlanması;

Thymoquinone : 5 gr ( $C_{10}H_{12}O_2$ ) MA: 164,20 gr/mol

Stok TQ = 100 mM/ml= 100  $\mu$ M/ $\mu$ l

1Molar -----1000 ml-----164,20 gr

0,1 Molar-----1 ml ----- x

$$x = 164,20 \times 0,1 / 1000 = 0,0164 \text{ gr}$$

Sitozin arabinozid : 100 mg ( $C_9H_{13}N_3O_5$ ) MA:243,22 gr/mol

Stok Ara-C = 100 mM/ml= 100  $\mu$ M/ $\mu$ l

1Molar -----1000 ml-----243,22 gr

0,1 Molar-----1 ml ----- x

$$x = 243,22 \times 0,1 / 1000 = 0,0243 \text{ gr/mol}$$

#### DMSO (Dimetil sülfoksit)'nun hazırlanması (%100'lük)

980 $\mu$ l su + 20 $\mu$ l DMSO=1 ml

#### Thymoquinone hazırlanması;

%100'lük DMSO içinde 10 gr TQ çözdürüldü.

(1 ml DMSO içerisine 10 gr TQ)

#### Sitozin arabinozidin hazırlanması;

%1' lik DMSO içinde 0,0243 gr/mol Ara-C çözdürüldü.

#### Besi Ortamı (medium)

1mL HepesBuffer içeren 87 mL RPMI 1640

10 mL Fetal Bovin Serum

1 mL penisilin streptomisin

1 mL L-glutamin

### 3.2.3. Hücre Kültürü

AML hücre kültürü çalışmaları Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Doku Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirildi. Yeterli hücre sayısına ulaşmak için üç günde bir pasaj yapılarak iki ay süren hücre kültürü yapıldı.

AML hücreleri, 4'er ml'lik RPMI 1640 besiyerinde iki flask içerisine ekildi. Kültüre edilen hücreler 37 °C'de %5' lik CO<sub>2</sub> inkübatöründe çoğalmaya bırakıldı. İnkübatörde çoğalmaya bırakılan hücrelerin, günlük olarak mikroskopik kontrolü yapıldı. Besiyeri değişikliğine karar verilen hücreler, falkon tüplerine aktarıldı. 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, tüp dibindeki hücreler elle hafifçe vurularak kaldırıldı. Hücrelerin üzerine 5 ml besiyeri konuldu ve tekrar flasklara ekildi. Üç gün sonra aynı işlemler tekrarlanarak her bir flasktan yeni birer pasaj yapıldı. İki aylık hücre kültürü sonucunda toplam 8 flaskta çoğalttığımız hücrelerimiz mikroskopta kontrol edilip hücre yoğunluklarına bakıldı. Bütün flasklar tek bir falkon tüpünde birleştirildi ve daha önce uygulanan yıkama prosedürüne uygun olarak yıkandı. Tüp dibinde kalan hücrelerin üzerine 36 ml besiyeri eklendi. İçerisinden 10 µl alınıp canlılık tayini için Bio-Rad Automated Cell Counter cihazında ölçüm yapıldı. Canlı hücre sayısı beklenilenin altında olduğu için iki örnek bir kontrol grubu olarak planlanan çalışma bir örnek bir kontrol şeklinde hazırlandı (Tablo 4). Besi ortamı ile süspanse edilen hücreler 12 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ml'de  $2 \times 10^5$  hücre olacak biçimde 1'er ml her bir kuyucuğa ekim yapıldı ve 24 saat boyunca hiçbir madde eklenmeden inkübatörde bırakıldı.

**Tablo 4.** Etken madde, inkübasyon süresi ve konsantrasyonlarına göre deney grupları

| Deney grubu/ İnkübasyon süresi | Konsantrasyon | Örnek         | Kontrol grubu (DMSO) |
|--------------------------------|---------------|---------------|----------------------|
| AML-M2+TQ                      | 48 saat       | 25µM          |                      |
|                                |               | 50 µM         |                      |
|                                |               | 100 µM        |                      |
| AML-M2+TQ                      | 72.saat       | 25 µM         |                      |
|                                |               | 50 µM         |                      |
|                                |               | 100 µM        |                      |
| AML-M2+ARA-C                   | 48.saat       | 0,1 µmol      |                      |
|                                |               | 0,5 µmol      |                      |
|                                |               | 1 µmol        |                      |
| AML-M2+ARA-C                   | 72.saat       | 0,1 µmol      |                      |
|                                |               | 0,5 µmol      |                      |
|                                |               | 1 µmol        |                      |
| AML-M2+TQ+ARA-C                | 48.saat       | 25µM/0,1µmol  |                      |
|                                |               | 50 µM/0,5µmol |                      |
|                                |               | 100 µM/1 µmol |                      |
| AML-M2+TQ+ARA-C                | 72.saat       | 25µM/0,1µmol  |                      |
|                                |               | 50 µM/0,5µmol |                      |
|                                |               | 100 µM/1 µmol |                      |

Örneklerin tümüne 24. saatin sonunda belirlenen oranlarda TQ (25, 50, 100'er µM ) ve Ara-C (0,1, 0,5, 1'er µmol), kontrol gruplarına ise aynı oranlarda DMSO ilave edildi. Tekrar etüve kaldırıldı ve 48. saatin sonunda 48 saatlik olan kültürler falkon tüplerine alınarak akım sitometrik analiz ile apoptoz ve canlılık tayini için boyama yapılmak üzere hazırlandı. 72. saatin sonunda da aynı işlemler 72 saatlik olan gruplar için tekrarlandı.

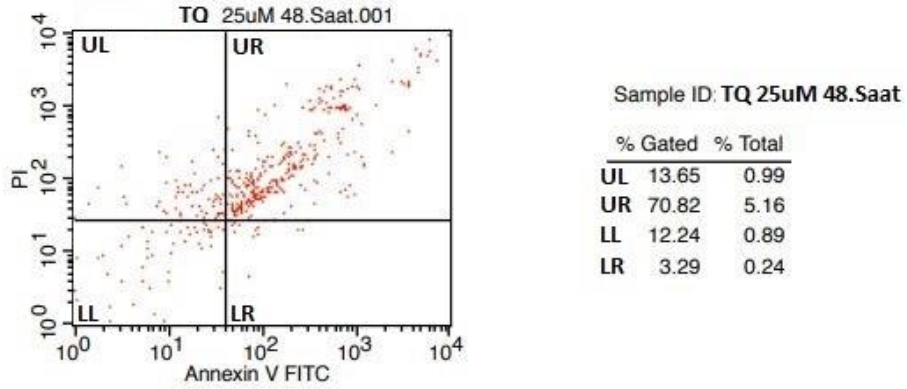
#### **Flow (Akım) Sitometrik Analiz**

Akım sitometrik analizler, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Alerji ve İmmünoloji, Flow laboratuvarında gerçekleştirildi.

### Annexin V Boyama Prosedürü

- Hücreler 2 defa soğuk PBS ile yıkanır.
- 1XBağlama Tamponu (Binding Buffer) içinde süspansiyon haline getirilir.
- Elde edilen süspansiyondan 100 µl 5 ml' lik kültür tüplerine aktarılır.
- 5 µl Annexin V ve 5 µl PI pipetlenir. Yavaşça vortekslenir.
- 15 dk, oda ısısında, karanlıkta inkübe edilir.
- Her bir tüpe 400 µl 1X Binding Buffer eklenir.
- 1 saat içinde okutulur.

Bu boyama tekniği ile dört ayrı fenotip belirlenir; canlı hücreler (annexin-V ve PI ile boyanmayan), erken apoptotik (sadece annexin-V ile boyanan), geç apoptotik (annexin-V ve PI ile boyanan) ve ölü/hasarlı hücreler (sadece PI ile boyanan) (Dikmen ve ark., 2010), (Şekil 6).



**Şekil 6:** Flow sitometrik analiz **UL:** Nekrotik hücreler, **UR:** Geç apoptotik hücreler, **LL:** Canlı hücreler, **LR:** Proapoptotik hücreler

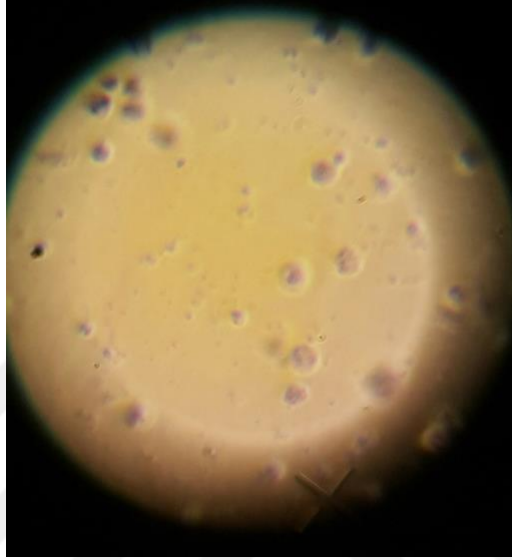
### İstatistik Analiz

MİNİTAB Statistical Software 15.0 Twoproportion (iki oran testi) test uygulanmıştır.  $p < 0,05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir.

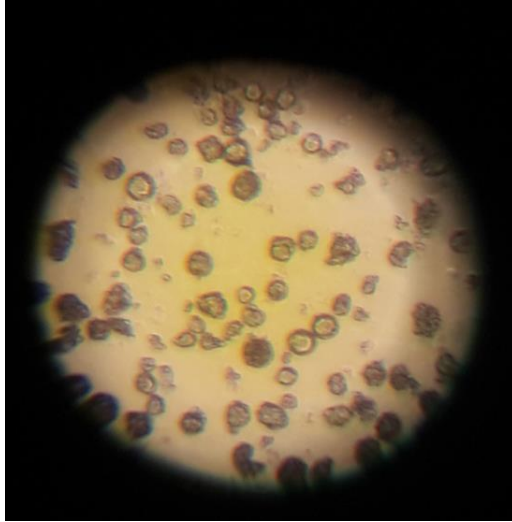
#### 4.BULGULAR

##### 4.1. Hücre Kültürü

Hazır gelen hücre hattının, canlı hücre sayısı  $1,02 \times 10^6$  hücre/ml olarak ölçüldü. Antikanserojen uygulaması öncesi, hücreleri çoğaltmak için yapılan normal hücre kültürü sonucunda toplam  $7 \times 10^6$  hücre/ml elde edildi. Mikroskop görüntüleri Şekil 7a ve 7b' de verilmiştir.



**Şekil 7a:** Akut miyeloid lösemi (AML-M2) hücre kültürünün 3.gündeki mikroskop görüntüsü



**Şekil 7b:** Akut miyeloid lösemi (AML-M2) hücre kültürünün 10.gündeki mikroskop görüntüsü

#### 4.2. Akım Sitometri Sonuçları

Her bir deney grubunun farklı konsantrasyonlardaki apoptotik (Annexin V) ve canlı (PI) hücre sayıları kendi kontrolleriyle karşılaştırılarak istatistiksel olarak değerlendirildi (Tablo 5).

TQ uygulanan üç farklı konsantrasyona (25, 50, 100'er  $\mu$ M) sahip deney grubundaki hücrelerin, birinci mitoz geçirdikleri 48.saatte apoptotik hücre sayılarının kontroller ile karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde arttığı ( $p<0,001$ ), viabilitenin ise deney gruplarında kontrollere göre azaldığı gözlemlendi ( $p<0,001$ ), (Şekil 8, Tablo 5). Bu grubun 72. saatlik inkübasyonunda, deney grupları kontroller ile karşılaştırıldığında aynı şekilde apoptotik hücre sayısının arttığı ( $p<0,001$ ) viabilitenin ise azaldığı gözlemlendi ( $p<0,001$ ) (Şekil 9, Tablo 5).

Ara-C uygulanan üç farklı konsantrasyona (0,1, 0,5, 1'er  $\mu$ mol) sahip deney grubundaki hücrelerin, birinci mitoz geçirdikleri 48.saatte apoptotik hücre sayılarının kontroller ile karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde arttığı ( $p<0,001$ ), viabilitenin ise deney gruplarında kontrollere göre azaldığı gözlemlendi ( $p<0,001$ ), (Şekil 10, Tablo 5). Bu grubun 72. saatlik inkübasyonunda, deney grupları kontroller ile karşılaştırıldığında aynı şekilde apoptotik hücre sayısının arttığı ( $p<0,001$ ) viabilitenin ise azaldığı gözlemlendi ( $p<0,001$ ) (Şekil 11, Tablo 5).

TQ ve Ara-C' nin birlikte uygulandığı üç farklı konsantrasyona sahip deney grubundaki hücrelerin, birinci mitoz geçirdikleri 48.saatte apoptotik hücre sayılarının kontroller ile karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde arttığı ( $p<0,001$ ), viabilitenin ise deney gruplarında kontrollere göre azaldığı gözlemlendi ( $p<0,001$ ), (Şekil 12, Tablo 5). Bu grubun 72. saatlik inkübasyonunda da aynı şekilde kontroller ile karşılaştırıldığında apoptotik hücre sayısının arttığı ( $p<0,001$ ) viabilitenin ise azaldığı gözlemlendi (Şekil 13, Tablo 5).

Her üç grupta da gözlemlendiğimiz apoptozun atması viabilitenin ise azalması bize hücre çoğalmasının baskılandığını göstermiştir.

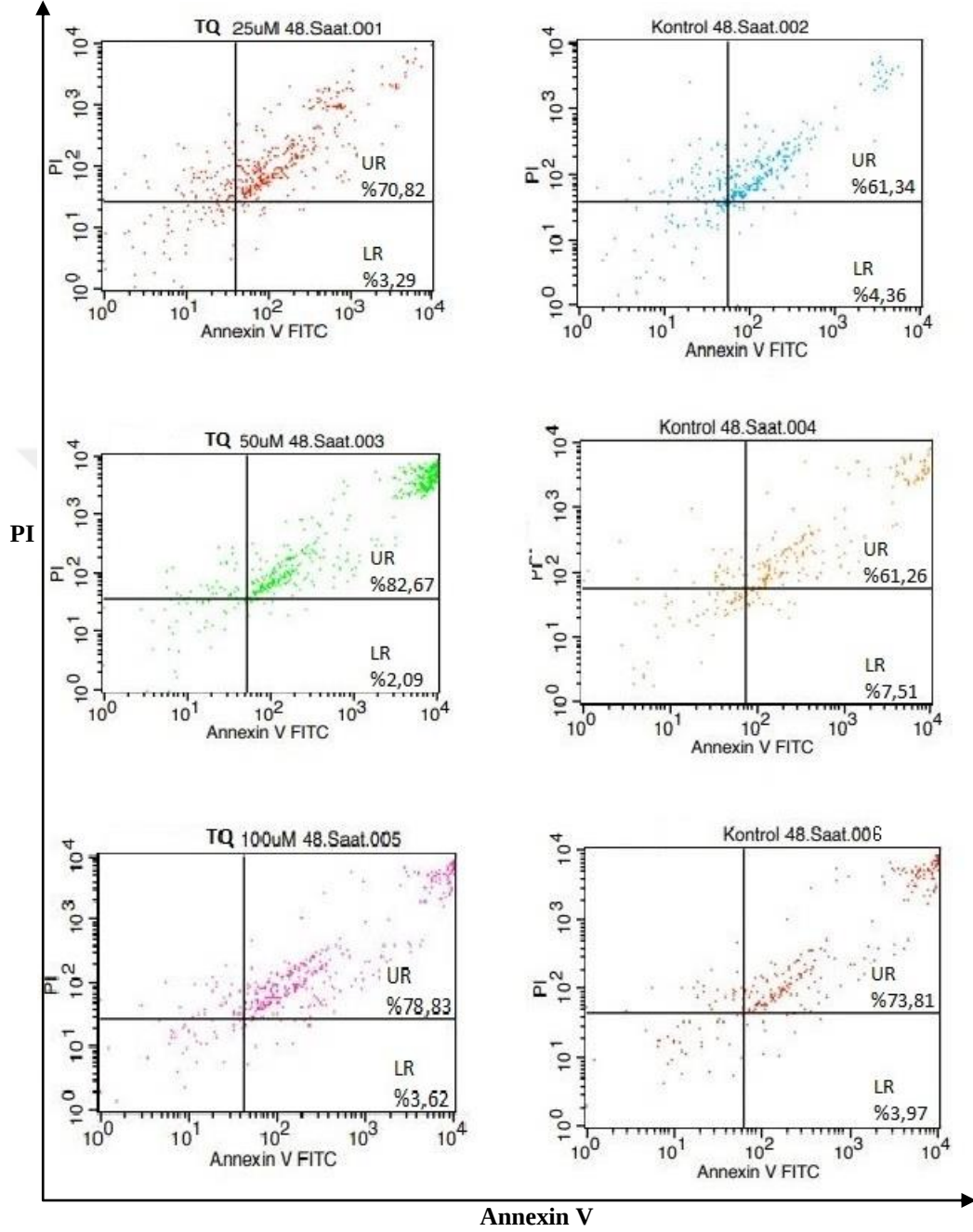
Aynı etken maddeyi içeren deney gruplarının 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde kendi aralarında yapılan karşılaştırmalarında tablodaki sonuçlar elde edildi (Tablo 6).

TQ uygulanan farklı konsantrasyonlardaki deney gruplarının 48. ve 72. saatleri kendi aralarında karşılaştırıldığında birinci mitozun tamamlandığı 48. saatte apoptotik hücre sayısının 72 saate göre daha fazla arttığı gözlemlendi ( $p<0,001$ ). Viabilitenin ise, her iki inkübasyon süresi karşılaştırıldığında 72. saatteki canlı hücre sayısının 48. saate göre daha fazla olduğu gözlemlendi ( $p<0,001$ ), (Şekil 8 ve 9), (Tablo 6).

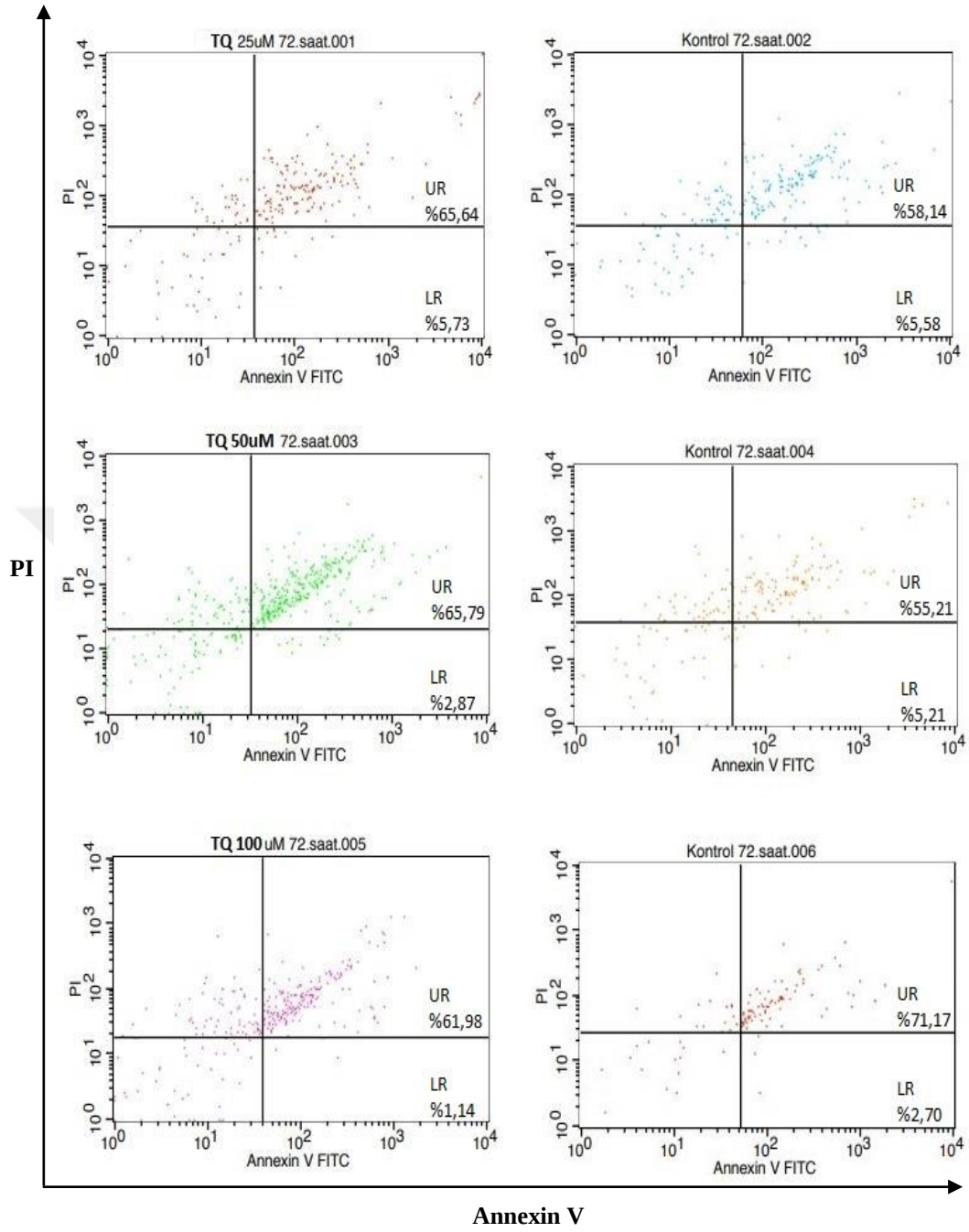
Ara-C uygulanan farklı konsantrasyonlardaki deney gruplarının 48. ve 72. saatleri karşılaştırıldığında 48. saatte apoptotik hücre sayısının 72 saate göre daha fazla arttığı gözlemlendi ( $p<0,001$ ). Viabilitenin ise, her iki inkübasyon süresi karşılaştırıldığında 72. saatteki canlı hücre sayısının 48. saate göre daha fazla olduğu gözlemlendi ( $p<0,001$ ), (Şekil 10 ve 11), (Tablo 6).

TQ ve Ara-C' nin birlikte uygulandığı farklı konsantrasyonlardaki deney gruplarının 48. ve 72. saatleri karşılaştırıldığında 48. saatte apoptotik hücre sayısının 72 saate göre daha fazla arttığı gözlemlendi ( $p<0,001$ ). Viabilitenin ise, her iki inkübasyon süresi karşılaştırıldığında 72. saatteki canlı hücre sayısının 48. saate göre daha fazla olduğu gözlemlendi ( $p<0,001$ ), (Şekil 12 ve 13), (Tablo 6) .

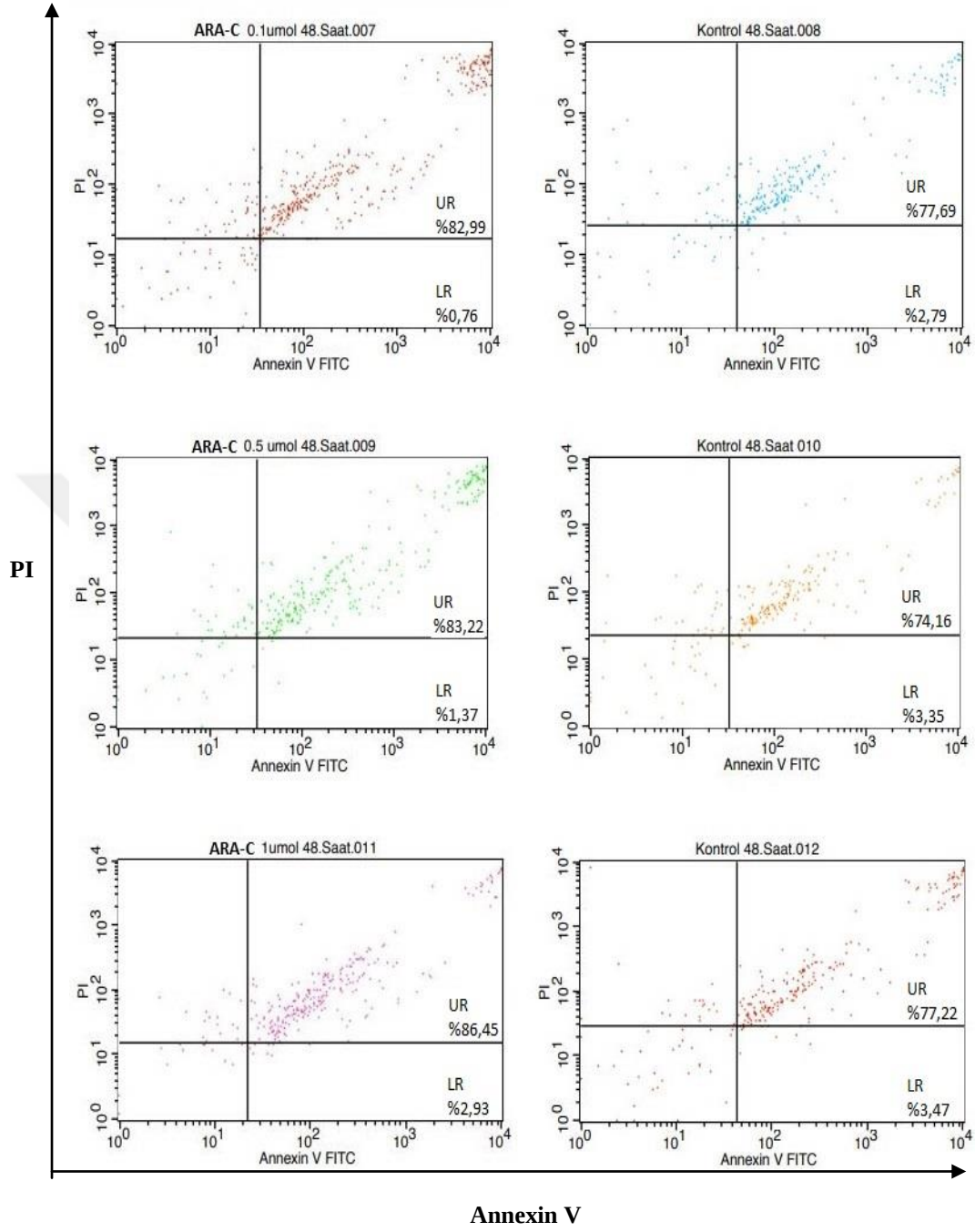
#### 4.2.1. Flow Sitometri Görüntüleri



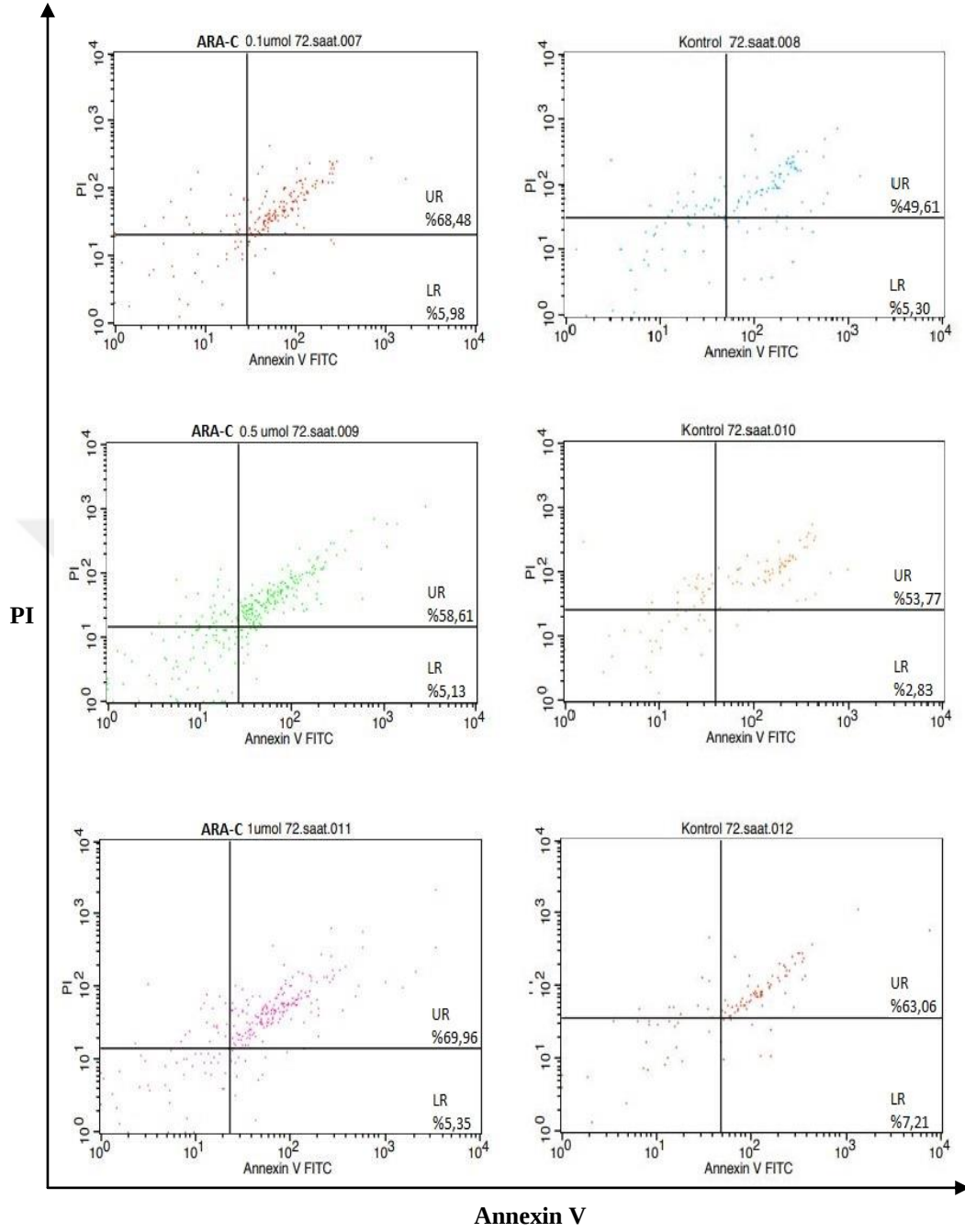
**Şekil 8:** Timokinon (TQ) ile muamele edilen Akut miyeloid lösemi (AML-M2) hücrelerinde apoptozun flow sitometri görüntüsü UR: geç apoptotik hücrelerin yüzdesi, LR: proapoptotik hücrelerin yüzdesi



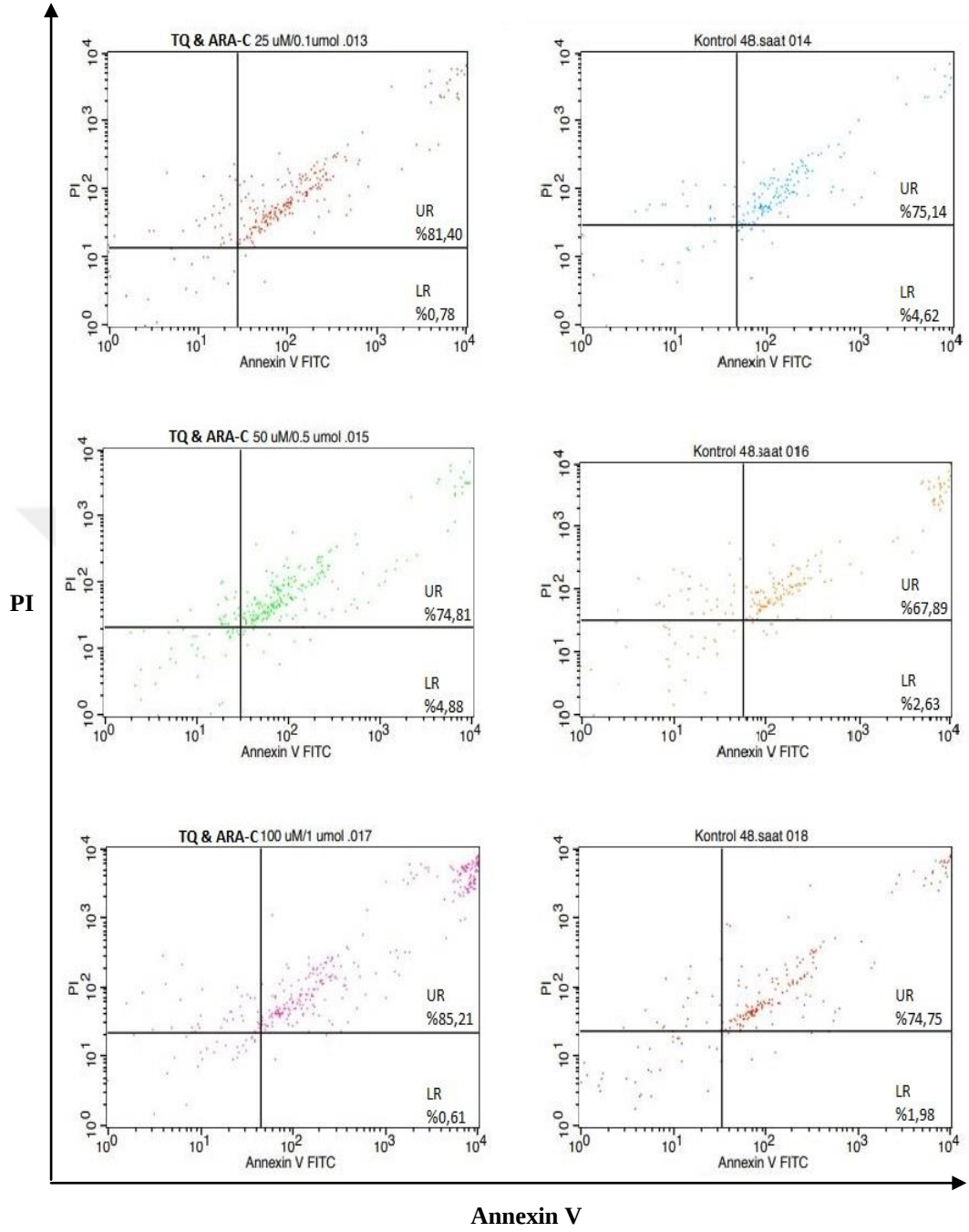
**Şekil 9:** Timokinon (TQ) ile muamele edilen Akut miyeloid lösemi (AML-M2) hücrelerinde apoptozun flow sitometri görüntüsü UR: geç apoptotik hücrelerin yüzdesi, LR: proapoptotik hücrelerin yüzdesi



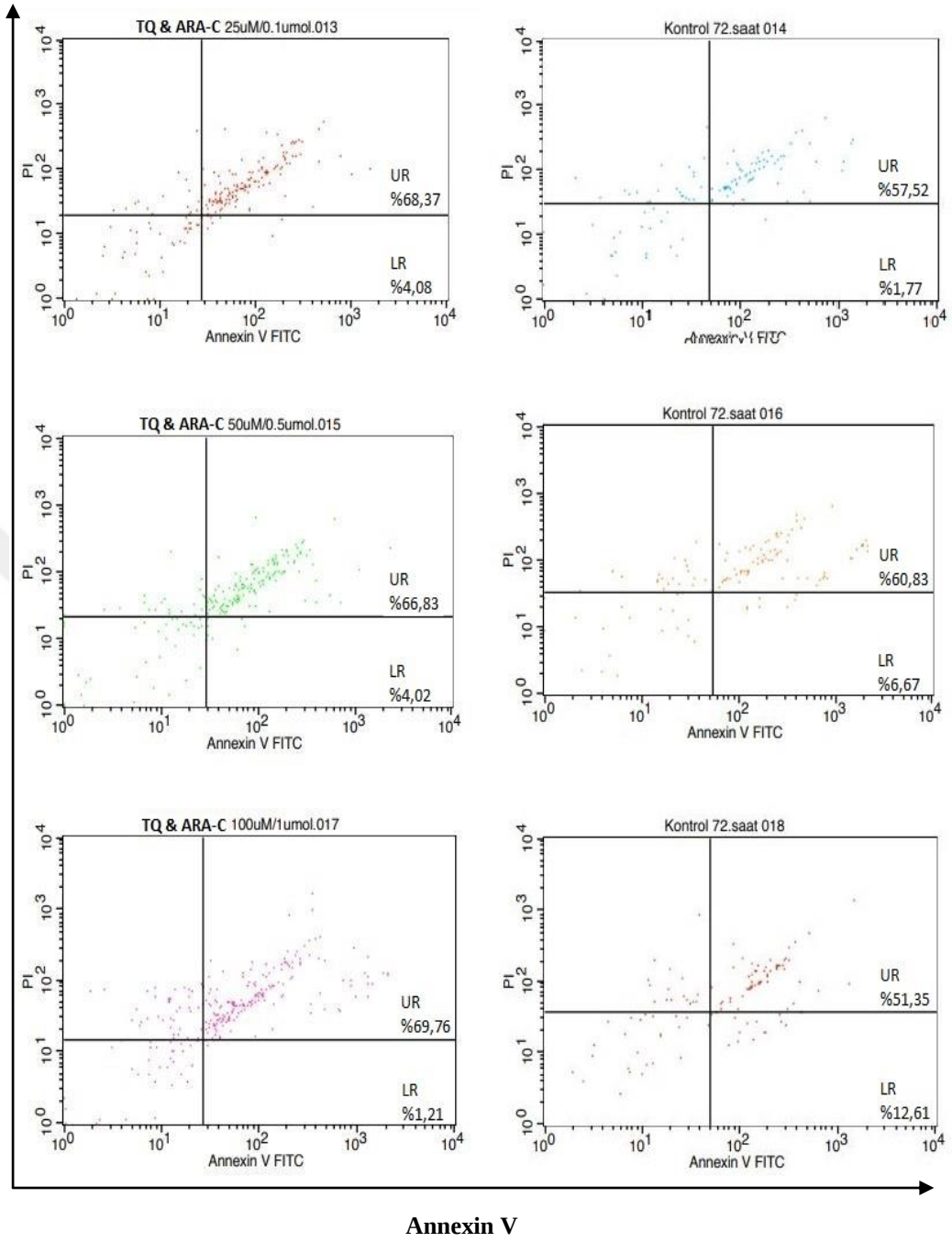
**Şekil 10:** Sitozin arabinozid (Ara-C) ile muamele edilen Akut miyeloid lösemi (AML-M2) hücrelerinde apoptozun flow sitometri görüntüsü UR: geç apoptotik hücrelerin yüzdesi, LR: proapoptotik hücrelerin yüzdesi



**Şekil 11:** Sitozin arabinozid (Ara-C) ile muamele edilen Akut miyeloid lösemi (AML-M2) hücrelerinde apoptozun flow sitometri görüntüsü UR: geç apoptotik hücrelerin yüzdesi, LR: proapoptotik hücrelerin yüzdesi



**Şekil 12:** Timokinon (TQ) ve Sitozin arabinozid (Ara-C) ile muamele edilen Akut miyeloid lösemi (AML-M2) hücrelerinde apoptozun flow sitometri görüntüsü UR: geç apoptotik hücrelerin yüzdesi, LR: proapoptotik hücrelerin yüzdesi



**Şekil 13:** Timokinon (TQ) ve Sitozin arabinozid (Ara-C) ile muamele edilen Akut miyeloid lösemi (AML-M2) hücrelerinde apoptozun flow sitometri görüntüsü UR: geç apoptotik hücrelerin yüzdesi, LR: proapoptotik hücrelerin yüzdesi

**Tablo 5:** Farklı konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinde apoptoz ve canlı hücre sayılarının deney grupları ve kontrollerle karşılaştırılması.

| Deney Grubu/ İnkübasyon Süresi<br>10000 hücre /ml |         | Uygulanan Konsantrasyon | AML Apoptoz N: hücre | AML Kontrol (DMSO) Apoptoz N:hücre | p      | AML Viabilite N: hücre | AML Kontrol (DMSO) Viabilite N: Hücre | p      |
|---------------------------------------------------|---------|-------------------------|----------------------|------------------------------------|--------|------------------------|---------------------------------------|--------|
| AML-M2+TQ                                         | 48 saat | 25 µM                   | 7400                 | 6500                               | <0,001 | 1200                   | 1600                                  | <0,001 |
|                                                   |         | 50 µM                   | 8500                 | 6800                               | <0,001 | 800                    | 2000                                  | <0,001 |
|                                                   |         | 100 µM                  | 8300                 | 7800                               | <0,001 | 1000                   | 1300                                  | <0,001 |
| AML-M2+TQ                                         | 72 saat | 25 µM                   | 7200                 | 6400                               | <0,001 | 1600                   | 1800                                  | <0,001 |
|                                                   |         | 50 µM                   | 6900                 | 6000                               | <0,001 | 1700                   | 2100                                  | <0,001 |
|                                                   |         | 100 µM                  | 6300                 | 7400                               | <0,001 | 1400                   | 1700                                  | <0,001 |
| AML-M2+ARA-C                                      | 48 saat | 0,1 µmol                | 8400                 | 8100                               | <0,001 | 800                    | 1000                                  | <0,001 |
|                                                   |         | 0,5 µmol                | 8400                 | 7700                               | <0,001 | 600                    | 1100                                  | <0,001 |
|                                                   |         | 1 µmol                  | 8900                 | 8000                               | <0,001 | 400                    | 1200                                  | <0,001 |
| AML-M2+ARA-C                                      | 72 saat | 0,1 µmol                | 7400                 | 5900                               | <0,001 | 1400                   | 2000                                  | <0,001 |
|                                                   |         | 0,5 µmol                | 6400                 | 5700                               | <0,001 | 2400                   | 2800                                  | <0,001 |
|                                                   |         | 1 µmol                  | 7500                 | 7000                               | <0,001 | 1700                   | 2100                                  | <0,001 |
| AML-M2+TQ+ARA-C                                   | 48 saat | 25 µM/0,1 µmol          | 8200                 | 8000                               | <0,001 | 700                    | 900                                   | <0,001 |
|                                                   |         | 50 µM/0,5 µmol          | 8000                 | 7100                               | <0,001 | 1300                   | 1600                                  | <0,001 |
|                                                   |         | 100 µM/1 µmol           | 8600                 | 7700                               | <0,001 | 600                    | 1400                                  | <0,001 |
| AML-M2+TQ+ARA-C                                   | 72 saat | 25 µM/0,1 µmol          | 7200                 | 6000                               | <0,001 | 1900                   | 2100                                  | <0,001 |
|                                                   |         | 50 µM/0,5 µmol          | 7100                 | 6800                               | <0,001 | 1800                   | 2000                                  | <0,001 |
|                                                   |         | 100 µM/1 µmol           | 7100                 | 6400                               | <0,001 | 1300                   | 2200                                  | <0,001 |

p<0,05 anlamlı olarak kabul edilmiştir.

**Tablo 6:** AML deney grubunda farklı inkübasyon sürelerinde apoptoz ve canlı hücre sayılarının karşılaştırılması.

| Deney Grubu/ İnkübasyon Süresi<br>10000 hücre/ml |            | Uygulanan<br>Konsantrasyon | AML<br>Apoptoz<br>N: hücre | p      | AML<br>Viabilite<br>N: hücre | p      |
|--------------------------------------------------|------------|----------------------------|----------------------------|--------|------------------------------|--------|
| AML-M2+TQ                                        | 48<br>saat | 25 µM*                     | 7400                       | <0,001 | 1200                         | <0,001 |
|                                                  |            | 50 µM*                     | 8500                       | <0,001 | 800                          | <0,001 |
|                                                  |            | 100 µM*                    | 8300                       | <0,001 | 1000                         | <0,001 |
| AML-M2+TQ                                        | 72<br>saat | 25 µM                      | 7200                       |        | 1600                         |        |
|                                                  |            | 50 µM                      | 6900                       |        | 1700                         |        |
|                                                  |            | 100 µM                     | 6300                       |        | 1400                         |        |
| AML-M2+ARA-C                                     | 48<br>saat | 0,1 µmol*                  | 8400                       | <0,001 | 800                          | <0,001 |
|                                                  |            | 0,5 µmol*                  | 8400                       | <0,001 | 600                          | <0,001 |
|                                                  |            | 1 µmol*                    | 8900                       | <0,001 | 400                          | <0,001 |
| AML-M2+ARA-C                                     | 72<br>saat | 0,1 µmol                   | 7400                       |        | 1400                         |        |
|                                                  |            | 0,5 µmol                   | 6400                       |        | 2400                         |        |
|                                                  |            | 1 µmol                     | 7500                       |        | 1700                         |        |
| AML-M2+TQ+ARA-C                                  | 48<br>saat | 25 µM/0,1 µmol*            | 8200                       | <0,001 | 700                          | <0,001 |
|                                                  |            | 50 µM/0,5 µmol*            | 8000                       | <0,001 | 1300                         | <0,001 |
|                                                  |            | 100 µM/1 µmol*             | 8600                       | <0,001 | 600                          | <0,001 |
| AML-M2+TQ+ ARA-C                                 | 72<br>saat | 25 µM/0,1 µmol             | 7200                       |        | 1900                         |        |
|                                                  |            | 50 µM/0,5 µmol             | 7100                       |        | 1800                         |        |
|                                                  |            | 100 µM/1 µmol              | 7100                       |        | 1300                         |        |

AML-M2 Hücre Hattı (Kasumi-6 ATCC No: CRL-2775)

p<0,05 anlamlı olarak kabul edilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

AML tedavisinde farklı stratejiler uygulanmaktadır. Kanser hücrelerinde apoptoz, zorunlu olarak uygulanan bazı kimyasal ilaçların kullanımı ile gerçekleştirilmektedir (Bauer ve ark., 1995). Antikanserojen kimyasal ilaçlar ile yapılan tedaviler sırasında hastalarda belirgin problemler gözlenmiştir. Doğal ürünlerin antikanserojen potansiyelleri klinisyenler ve temel bilimcilerin dikkatini çekmektedir (Çakır ve ark., 2010).

Doğal bitkisel ürünlerin insan üzerinde uygulanması antikanserojen ilaçlara göre daha avantajlıdır. Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan fitokimyasalların sentetik ilaçlara iyi bir alternatif olduğu gözlenmiştir. Son yıllarda diyetle alınan antikarsinojenik ve antimutajenik bir bitkisel ürün olan timokinon'un yapılan çalışmalarda hücre çoğalmasını baskıladığı saptanmıştır (Rajput ve ark., 2013). Timokinon'un antitümör etkisi, akciğer (Jafri ve ark., 2010), pankreas (Banerjee ve ark., 2009), prostat (Kaseb ve ark., 2007) ve kolon (Gali-Muhtasib ve ark., 2008) kanserlerini kapsayan birçok çalışmada bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda, akut miyeloid lösemi (Kasumi-6 hücre hattı) hücre dizilerinde Ara-C ile birlikte doğal bitkisel bir ürün olan TQ'nun apoptozis, viabilite ve hücre çoğalmasına etkileri incelenmiştir.

Kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesi ve çoğalması, karsinogeneizde önemli bir özellik olup, tümör boyutunda artışa ve tedavide sorunlara yol açmaktadır. Hücre döngüsünün ilerlemesi ve hücre çoğalmasının düzenleyicilerinin ifadesi ve/veya aktivitesinin TQ tarafından engellenebildiği gösterilmiştir (Darakhshan ve ark., 2015). TQ'nun hücre çoğalmasını baskılayıcı etkisi, ilaca dirençli hücre hatları da dahil olmak üzere çeşitli hücre hatlarında ve tümörlerde gösterilmiştir (El-Mahdy ve ark., 2005; Richards ve ark., 2005; Li ve ark., 2008; Effenberger-Neidnicht ve Schobert, 2011; Woo ve ark., 2011). Woo ve ark. (2011), TQ'nun MCF-7, MDA-MB-231 ve BT-474 dahil olmak üzere çeşitli meme kanseri hücre hatlarının büyümesini baskılayabildiği gözlenmiştir (Baharetha ve ark., 2013).

Çalışmamızda, AML (Kasumi-6) hücre dizilerine 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde TQ (25, 50, 100'er  $\mu$ M) ve Ara-C (0,1, 0,5, 1'er  $\mu$ mol) için üç farklı dozda uygulama yapılmıştır. TQ ve Ara-C 'nin tek başına ve birlikte kullanıldıklarında apoptoz ve hücre çoğalmasına etkileri incelenmiştir. Üç farklı konsantrasyonda etken maddelerin uygulandığı, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde örnekler kendi kontrol

grupları ile karşılaştırıldığında apoptoz artmış ( $p<0,001$ ) viabilite ise azalmıştır ( $p<0,001$ ), (Tablo 5). Bunun yanı sıra, hücre çoğalması da baskılanmıştır.

Yapılan bazı çalışmalarda timokinon ile birlikte farklı ilaç kombinasyonları kullanılmıştır. TQ ve doksorubisin kombinasyonunun, bu ajanların tek tek kullanımından daha büyük bir etkiye sahip olduğu görülmüştür (Woo, 2013). Benzer bir bulgu da TQ ve 5-fluorouracil (Lei ve ark., 2012), TQ ve cisplatin (Jafri ve ark., 2010) kombinasyonları için bildirilmiştir. Ancak bizim çalışmamızda TQ ile birlikte ilk kez kullanılan Ara-C kombinasyonunun iki maddenin tek başına kullanıldığı örneklerde olduğu gibi etkin olmadığı saptanmıştır.

TQ'nun prostat kanseri hücreleri üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, TQ'nun G1'den S fazına geçişi sağlayan düzenleyici proteinler üzerinde etkili olduğu ve G1'den S fazına geçen hücreleri bloke ettiğini gözlenmiştir (Kaseb, 2007). Benzer şekilde TQ'nun hücre döngüsünün G1 fazındaki baskılayıcı etkisi kanser hücre hatlarıyla yapılan daha önceki çalışmalarda da gözlenmiştir (Gali-Muhtasib ve ark., 2004). AML'nin tedavisinde kullanılan antikanserojen Ara-C ile yapılan çalışmalarda ise Ara-C'nin, kullanıldığı örneklerde doza bağlı olarak DNA polimerazı inhibe ettiği, DNA replikasyonunu ve tamirini bozduğu bildirilmiştir. Ara-C'nin DNA yapısına katılması DNA sentezinin sadece sentez fazında (S fazı) meydana gelir (Burke ve ark., 1982; Kufe ve ark., 1984; Vaughan ve ark., 1984; Grant, 1998).

Çalışmamızda AML hücre dizilerinin TQ, Ara-C ve TQ+Ara-C kombine grupları için oluşturulan 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri ve üç farklı konsantrasyon uygulamasının karşılaştırmaları yapıldığında 48.saatte, 72.saate göre apoptotik hücre sayısının daha fazla arttığı ve viabilitenin de aynı şekilde daha fazla azaldığı gözlenmiştir ( $p<0,001$ ), (Tablo 6). Yapılan çalışmalarda, TQ uygulamasının 48. saatte, sitoplazmada sitokromun salıverilmesi, membran potansiyeli çalışmaları ile teyit edilen mitokondriyal bozukluğa yol açtığı, apoptozu indüklediği ve ayrıca, pro-apoptotik (Bad ve Bax) ve anti-apoptotik proteinlerin (örneğin, Bcl-2 ve survivin) oranlarını, sitokromc'nin mitokondri tarafından serbest bırakılmasını da düzenlediği belirtilmiştir (Kirkin ve ark., 2004; Yuan ve ark., 2012).

Rajput ve ark. (2013) da bizim bulgularımıza benzer şekilde TQ'nun diğer inkübasyon sürelerinden farklı olarak ilk 48. saatte belirgin bir apoptotik etkisinin olduğunu saptamışlardır.

Timokinonun hem pH hem de ışığın belirgin etkileriyle sulu çözeltilerde son derece kararsız olduğu gösterilmiştir (Salmani ve ark., 2014). Timokinonu çözdüremede %100 DMSO kullanmamıza rağmen besi ortamının sulu fazı nedeniyle TQ, 72 saatlik inkübasyon süresinde, 48 saatteki kadar apoptotik etkisini tam olarak gösterememiş olabilir.

Bu çalışmada, TQ ve Ara-C tarafından indüklenen AML hücre dizilerinde apoptoz'un arttığı ve viabilitenin azaldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte hücre çoğalmasında azalmıştır. Çalışmamızın sonuçları diğer çalışmalarla uyumludur, örneğin, insan miyeloblastik lösemi (El-Mahdy MA. ve ark., 2005), insan kolon kanseri (El-Najjar ve ark., 2010), karaciğer kanseri (Rooney ve Ryan, 2005) hücre hattı gibi diğer bazı hücre hatlarında TQ'nun apoptozu uyardığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak elde ettiğimiz bulgular, TQ'nun antikansorejen bir fitokimyasal olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Ancak Ara-C ile birlikte kullanıldığında etkin bir tamamlayıcı etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan fitokimyasalların sentetik ilaçlara iyi bir alternatif olduğu gözlenmiştir. Bunu destekleyen çalışmamızda, TQ ve Ara-C tarafından indüklenen AML hücre dizilerinde apoptoz'un arttığı, viabilitenin ise azaldığı ve buna bağlı olarak hücre çoğalmasının da baskılandığı gözlenmiştir.

Bu çalışmada AML (Kasumi-6) hücre dizilerine 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde TQ (25, 50, 100'er  $\mu$ M) ve Ara-C (0,1, 0,5, 1'er  $\mu$ mol) için üç farklı dozda uygulama yapılmıştır. TQ ve Ara-C 'nin tek başına ve birlikte kullanıldıklarında apoptoz ve hücre çoğalmasına etkileri incelenmiştir. Üç farklı konsantrasyonda etken maddelerin uygulandığı, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde örnekler kendi kontrol grupları ile karşılaştırıldığında apoptoz artmış ( $p<0,001$ ) viabilite ise azalmıştır ( $p<0,001$ ), (Tablo 5). Bunun yanı sıra hücre çoğalması da baskılanmıştır. AML hücre dizilerinin TQ, Ara-C ve TQ+Ara-C kombine grupları için oluşturulan 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri ve üç farklı konsantrasyon uygulamasının karşılaştırmaları yapıldığında 48.saatte, 72.saate göre apoptotik hücre sayısının daha fazla arttığı ve viabilitenin de aynı şekilde daha fazla azaldığı gözlenmiştir ( $p<0,001$ ), (Tablo 6).

TQ ile birlikte Ara-C ilk kez bu çalışmada kullanılmıştır. Etken maddelerin tek başına kullanıldığında gözlenen apoptoz, viabilite ve hücre çoğalmasına etkileri TQ ve Ara-C'nin birlikte kullanıldığı örneklerde de aynıdır. TQ ve Ara-C'nin birlikte kullanımının apoptoza sinerjistik bir etkisinin olmadığı saptanmıştır.

AML hücre dizilerinde, TQ ve Ara-C ile yapılan antiapoptotik ve antikanserojenik uygulamanın invivo olarak da AML oluşturulmuş deney hayvanlarında olası etkilerinin gözlenmesi bu tip çalışmaların güvenilirlik ve faydalı etkisinin ortaya konmasını sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

- Abdel-Fattah AM, Matsumoto K, Watanabe H. Antinociceptive effects of Nigella sativa oil and its major component, thymoquinone in mice. *Eur J Pharmacol* 2000; 400(1):89-97.
- Abou-Ghali M, Stiban J. Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis. *Sau J Biol Sci* 2015; 22(6):760-772
- Adams JM, Cory S. Life or death decisions by the Bcl-2 family. *Trends Biochem Sci* 2001;26:61-66.
- Anak S, Uysalol E. Akut Miyeloid Lösemi (AML). *J Child* 2012; 12(4):153-158.
- Arino O, Kimmel M, Webb G. Mathematical modelling of the loss of telomere sequences. *J Theor Biol* 1995; 177:45-57.
- Arslan SO, Gelir E, Armutcu F, Coşkun O, Gürel A, Sayan H, Çelik IL. The protective effect of thymoquinone on ethanol-induced acute gastric damage in the rat. *Nutr Res* 2005; 25(7):673-680.
- Aydoğdu N, Kaymak K, Yalçın Ö. Sıçanlarda Böbrek İskemi/Reperfüzyon Hasarında N-asetilsisteinin Etkileri. *Fırat Tıp Dergisi* 2005; 10(4):151-155.
- BadaryOA, Taha RA, Gamal El-Din AM, Abdel-Wahab MH. Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem Toxicol* 2003; 26(2):87-98.
- Baharetha HM, Nassar ZD, Aisha AF, Ahamed MB, Al-Suede FS, Abd Kadir MO, İsmail Z, Majid AM. Proapoptotic and antimetastatic properties of supercritical CO<sub>2</sub> extract of Nigella sativa Linn. Against Breast Cancer Cells. *J Med Food* 2013; 16(12):1121-1130.
- Banerjee S, Kaseb AO, Wang Z, Kong D, Mohammad M, Padhye S, Sarkar FH, Mohammad RM. Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2009; 69(13): 5575-5583.
- Bauer J, Wekerle H, Lassmann H. Apoptosis in brain-specific autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* 1995; 7(6):839-843.
- Baytop T. Türkiye’de bitkiler ile tedavi. İstanbul, İÜ Yayınları 1984; 136-138.
- Berkoviç D, Fleer EA, Breass S, Pfortner J, Schleyer E, Hiddemann W. The influence of ARA-C on the metabolism of phosphatidylcholine in human leukemic HL-60 and Raji cells. *Leukemia* 1997; 11:2079-2086.

- Burke GA, Estlin ES, Lowis SP. The role of pharmacokinetic and pharmacodynamic studies in the planning of protocols for the treatment of childhood cancer. *Cancer Treat Review* 1999; 25:13-27.
- Burke PJ, Karp JE, Vaughan WP, Sanford PL. Recruitment of quiescent tumor by humoral stimulatory activity: requirements for successful chemotherapy. *Blood Cells* 1982; 8(3):519-533.
- Cawthon R.M. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30:47.
- Cregan SP, MacLaurin JG, Craig CG, Robertson GS, Nicholson DW, Park DS, Slack R. Bax-dependent caspase-3 activation is a key determinant in p53-induced apoptosis in neurons. *J NeuroSci* 1999; 19(18):7860-7869.
- Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64(4):821-846.
- Choen GM. Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326:1-16.
- Cole N, Gibson BE. High-dose cytosine arabinoside in the treatment of acute myeloid leukaemia. *Blood Rev* 1997; 11:39-45.
- Cooper C. *Organic Chemist's Desk Reference*. 2nd ed. Boca Rotan, CRC Press, 2010; 140.
- Coşkun G, Özgür H. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi. Arşiv, 2011; 20: 145.
- Çakır Z, Saydam G, Şahin F, Baran Y. The roles of bioactive sphingolipids in resveratrol-induced apoptosis in HL60: acute myeloid leukemia cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137(2):279-286.
- Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer* 2006; 107(9):2099-2107.
- Dikmen M, Canturk Z, Ozturk Y, Tunalı Y. Investigation of the apoptotic effect of curcumin in human leukemia HL-60 cells by using flow cytometry. *Cancer Bio Radiopharm* 2010; 25(6):749-755.
- Effenberger-Neidnicht K, Schobert R. Combinatorial effects of thymoquinone on the anti-cancer activity of doxorubicin. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 67(4): 867-874.
- El-Mahdy MA, Zhu Q, Wang QE, Wani G, Wani AA. Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells. *Int J Cancer* 2005; 117(3):409-417.

- Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 2007; 35:495-516.
- El-Najjar N, Chatila M, Moukadem H, Vuorela H, Ocker M, Gandesiri M, Gali-Muhtasib H. Reactive oxygen species mediate thymoquinone-induced apoptosis and activate ERK and JNK signaling. *Apoptosis* 2010; 15(2):183-195.
- El-Tahir KEDH, Bakeet DM. The black seed *Nigella sativa* L. a min for multi cure: a plea for urgent clinical evaluation of its volatile oil. *J Taibah Univ Med Sci* 2006;1:1-19.
- Emeto Y, Monome Y, Meinhardt G, Kisaki H, Kharbanda S, Robertson M, Ghayur T, Wong WW, Kamen R, Weichselbaum R. Proteolytic activation of protein kinase-C by an ICE-like protease in apoptotic cells. *EMBO J* 1995; 14(24):6148-6156.
- Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 2006; 368:1894-1907.
- Frasch SC, Henson PM, Kailey JM, Richter DA, Janes MS, Fadok VA, Bratton DL. Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase C delta. *J Biol Chem* 2000; 275:23065-23073.
- Forouzanfar F, Bazzaz BS, Hosseinzadeh H. Black cumin (*Nigella sativa*) and its constituent (thymoquinone): a review on antimicrobial effects. *Iran J Basic Med Sci* 2014; 17(12):929-938.
- Fröhling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol* 2005; 23(26):6285-6295.
- Gali-Muhtasib HU, Abou Kheir WG, Kheir LA, Darwiche N, Crooks PA. Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anticancer Drugs* 2004; 15(4):389-399.
- Gali Muhtasib H, Ocker M, Kuester D, Krueger S, El-Hajj Z, Diestel A, Evert M, Peters B, Stock R. Thymoquinone reduces mouse colon tumor cell invasion and inhibits tumor growth in murine colon cancer models. *J Cell Mol Med* 2008;12(1):330-342.
- Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Bazan NG, Borner C, Castedo M. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Diff* 2009; 16(8):1093-1107.
- Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; 15(4):830-839.
- Ghatage DD, Gosavi SR, Ganvir SM, Hazarey VK. Apoptosis: Molecular mechanism. *J Orofac Sci* 2012; 4:103-107.

- Grant S. Ara-C: cellular and molecular pharmacology. *Adv Cancer Res* 1998; 72: 197–233.
- Grimwade D. The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; 14(3):497-529.
- Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett AK. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010; 116(3):354- 365.
- Gurney JG, Severson RK, Davis S, Robison LL. Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type. *Cancer* 1995; 75(8):2186-2195.
- Halawani E. Antibacterial activity of thymoquinone and thymohydroquinone of *Nigella sativa* L. and their interaction with some antibiotics. *Advances in Biol Res* 2009; 3(5-6):148-152.
- Heath-Engel HM, Shore GC. Mitochondrial membrane dynamic, cristae remodelling and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1763:549-560.
- Hematoloji Uzmanlık Derneği . Akut Miyeloidenöz Lösemi  
[http://www.kanhastaliklari.org.tr/files/pdf/AML\\_tr.pdf](http://www.kanhastaliklari.org.tr/files/pdf/AML_tr.pdf), 2011. Erişim tarihi: 04.17.2017
- Hockenbery DM. The bcl-2 oncogene and apoptosis. *Semin Immunol* 1992;4: 413-420.
- Hoffman P, deCathelineau AM, Ogden CA, Leverrier Y, Bratton DL, Daleke DL, Ridley AC, Fadok VA, Henson PM. Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell Biol* 2001; 155:649-659.
- Huang X, Cho S, Spangrude GJ. Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal. *Cell Death Diff* 2007; 14(11):1851-1859.
- Ivankovic S, Stojkovic R, Jukic M, Milos M, Jurin M. The antitumor activity of thymoquinone and thymohydroquinone in vitro and in vivo. *Exp Oncol* 2006; 28 (3):220–224.
- Jafri SH, Glass J, Shi R, Zhang S, Prince M, Kleiner-Hancock H. Thymoquinone and cisplatin as a therapeutic combination in lung cancer: In vitro and in vivo. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29:87

- Jude CD, Gaudet JJ, Speck NA, Ernst P. Leukemia and hematopoietic stem cells: balancing proliferation and quiescence. *Cell Cycle* 2008; 7(5):586–591
- Kanter M. *Nigella sativa* and derived thymoquinone prevents hippocampal neurodegeneration after chronic toluene exposure in rats. *Neurochem Res* 2008; 33(3):579-588.
- Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, Sivanandam A, Tejwani S, Menon M, Dou QP, Reddy GP. Androgen receptor and E2F-1 targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 2007; 67:7782-7788.
- Kern WF. PDQ Hematoloji (çeviri: Ferhanoğlu B), 1. Baskı, İstanbul, İstanbul Medikal Yayıncılık. 2004; 254-260.
- Kesici Z. Çörek Otu. <http://www.saturn.web.tr/post-1.asp?no=35>, 2018
- Khader M, Eckl PM. Thymoquinone: an emerging natural drug with a widerange of medical applications. *Iran J Basic Med Sci* 2014; 17(12):950-957.
- Khan MA, Chen HC, Tania M, Zhang DZ. Anticancer activities of *Nigella sativa* (Black cumin). *Afr J Tradit Comp Altern Med* 2011; 8(5):226-232.
- Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S, Uchida Y, Arihiro K. Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *J Pathol* 2006; 208(3):319-326.
- Kirkin V, Joos S, Zörnig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644:229–249.
- Konopleva M, Tsao T, Ruvolo P, Estrov Z, Zhao S, Harris D, Chang S, Suh N. Novel triterpenoid CDDO-Me is a potent inducer of apoptosis and differentiation in acute myelogenous leukemia. *Blood* 2002; 99(1):326-335.
- Kufe D, Spriggs D, Egan EM, Munroe D. Relationships among Ara-CTP pools, formation of(Ara-C) DNA, and cytotoxicity of human leukemic cells. *Blood* 1984; 64(1):54–58.
- Kumar S. Mechanisms of caspase activation in cell death. *Cell Death Differ* 1999; 6: 1060-1066.
- Lei X, Lv X, Liu M, Yang Z, Ji M, Guo X, Dong W. Thymoquinone inhibits growth and augments 5-fluorouracil-induced apoptosis in gastric cancer cells both in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 417(2):864-868.
- Levine EG, Bloomfield CD. Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation, and environmental exposure. *Semin Oncol* 1992; 19(1):47-84.

- Li QX, Yu DH, Liu G, Ke N, McKelvy J, Wong-Staal F. Selective anticancer strategies via intervention of the death pathways relevant to cell transformation. *Cell Death Differ* 2008; 15(8):1197–1210.
- Mahfouz M, El-Dakhakhny M. Isolation of a crystalline active principle from *Nigella sativa* seeds. *J Pharmacol Sci* 1960; 9(1):9-19.
- Medenica R, Mukerjee S, Huschart T, Koffsky J, Corbit W. *Nigella sativa* plant extract increases number and activity of immune component cell in humans. *Exper Hematol* 1993; 21:1186
- Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 2004; 18(2):115-136.
- Nakamura T, Tagauji R, Kamiya K, Kawai Y. Intracellular pharmacodynamics of Ara-C and flowsitometric analysis of cell cycle progression in leukemia chemotherapy. *Leukemia* 1997; 11(3):548-551.
- Orrenius S. Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *DrugMetab Rev* 2007; 39:443-455.
- Öztürk A. Akut Myeloblastik Lösemi  
<http://hematolojika.com>. 2018. Erişim tarihi : 12.03.2018
- Özbek U. Lösemilerde moleküler genetik ve prognoz <http://www.thd.org.tr>. 2006. Erişim tarihi: 06.10.2017.
- Palmer AM, Green GR, Pass PM, Cavalla D. The role of mitochondria in apoptosis. *Drug News & Perspectives* 2000; 13(6):378-384.
- Pari L, Sankaranarayanan C. Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Life Sci* 2009; 85(23-26):830-834.
- Peters WG, Colly LP, Willemze R. High-dose cytosine arabinoside: pharmacological and clinical aspects. In: Peters WG ed. High-dose cytosine arabinoside: clinical and experimental aspects 1th ed., Den Haag, CIP-DATA Koninklijke Bibliotheek 1988; 9-27.
- Philchenkov A. Caspases: potential targets for regulating cell death, *J Cell Mol Med* 2004; 8(4):432-444.
- Rajput S, Kumar BN, Dey KK, Pal I, Parekh A, Mandal M. Molecular targeting of Akt by thymoquinone promotes G1 arrest through translation inhibition of cyclin D1 and induces apoptosis in breast cancer cells. *Life Sci* 2013; 93(21):783-790.
- Reed JC. Mechanisms of Apoptosis. *Am J Pathol* 2000; 157: 1415-1430.

- Richards L, Jones P, Hughes J, Benghuzzi H, Tucci M. The physiological effect of conventional treatment with epigallocatechin-3-gallate, thymoquinone, and tannic acid on the LNCaP cell line. *Biomed Sci Instrum* 2005; 42:357-362.
- Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5(11):897-907.
- Rooney S, Ryan MF. Modes of action of alpha-hederin and thymoquinone, active constituents of *Nigella sativa*, against HEp-2 cancer cells. *Anticancer Res* 2005; 25(6B):4255–4259.
- Sakalar C, Yuruk M, Kaya T, Aytekin M, Kuk S, Canatan H. Pronounced transcriptional regulation of apoptotic and TNF–NF- $\kappa$ -B signaling genes during the course of thymoquinone mediated apoptosis in HeLa cells. *Mol Cell Biochem* 2013; 383:243–251.
- Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Int Immunopharmacol* 2005; 5(13-14):1749-1770.
- Salvesen GS. Caspases and apoptosis. *Essays Biochem* 2002; 38: 9-19.
- Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: The induced proximity model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:10964-10967.
- Schwartz CL, Cohen HJ. Preleukemic syndromes and other syndromes predisposing to leukemia. *Pediatr Clin North Am* 1988; 35:853-871.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015; 65(1):5–29.
- Siitonen T, Koistinen P, Savolainen ER. Increase in Ara-C cytotoxicity in the presence of valproate, a histone deacetylase inhibitor, is associated with the concurrent expression of cyclin D1 and p27 (Kip 1) in acute myeloblastic leukemia cells. *Leukemia Res* 2005; 29(11):1335-1342.
- Smaili S, Hsu Y, Youle RS, Russell JT. Mitochondria in  $\text{Ca}^{2+}$  apoptosis. *J Bioener and Biomem* 2000; 32(1):35-46.
- Smith OP, Hann IM, Eden OB. Acute myeloid leukemia. In: Pinkerton CR, Plowman PN, editors. *Pediatric oncology*. 2<sup>rd</sup> ed. London, Chapman&Hall, 1997:237-258.
- Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(7):502-513.
- Sprick MR, Walczak H. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644:125-132.

- Stone RM, O'Donnell MR, Sekeres MA. Acute myeloid leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2004; 98-117.
- Swamy SM, Tan BK. Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of *Nigella sativa* L.seeds. J Ethnopharmacol 2000; 70(1):1-7.
- Timmer JC, Salvesen GS. Caspase substrates. Cell Death Diff 2007; 14:66–72.
- Tomatır AG. Apoptoz: Programlı hücre ölümü. T Klin Tıp Bilimleri 2003; 23:499-508.
- Türk Hematoloji Derneği. Akut Miyeloid Lösemi  
<http://www.thd.org.tr/> akut miyeloid,2010. Erişimtarihi : 12.03.2018
- Uguz AC, Naziroglu M, Espino J, Bejarano I, Gonzalez D, Rodriguez AB. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and -9 activities. J Membr Biol 2009; 232(1-3):15-23.
- Ulukaya E. Hücre Siklusu ve Apoptozis. Engin K, Özyardımcı N. Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavide Temel ilkeler ve Uygulamalar. 1.Baskı, İstanbul, Avrupa Tıp Kitapçılık.2001; 26-38.
- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. Blood 2002; 100(7):2292-2302.
- Vaughan WP, Karp JE, Burke PJ. Two-cycle-timed-sequential chemotherapy for adult acute nonlymphocytic leukemia. Blood 1984; 64(5):975-980.
- Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hagens W, Uitterlinden AG, Erpelinck CA, Delwel R, Löwenberg B, Valk PJ. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. Blood 2005; 106(12): 3747-3754.
- Virkajarvi N, Paakkö P, Soini Y. Apoptotic index and apoptosis influencing proteins Bcl-2, Mcl-1, Bax and caspases 3, 6 and 8 in pancreatic carcinoma. Histopathology 1998; 33(5):432-443.
- Wolf BB, Green DR. Suicidal Tendencies: Apoptotic cell death by caspase family proteinases. J Biol Chem 1999; 274(29):20049-52.
- Woo CC, Loo SY, Gee V, Yap CW, Sethi G, Kumar AP, Tan KH. Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: possible involvement of PPAR- $\gamma$  pathway. Biochem Pharmacol 2011; 82(5):464-475.

- Woo CC, Hsu A, Kumar AP, Sethi G, Tan KH. Thymoquinone inhibits tumor growth and induces apoptosis in a breast cancer xenograft mouse model: The role of p38 MAPK and ROS. PLoS ONE 2013; 8(10):e75356
- Yıldırım İH, Koçak N, Yıldırım SC. Programlı Hücre Ölümü. Literatür Bilgilerinin Türkçe Derlemesi. Dicle Üniv Vet Fak Dergisi 2012; 2(3):58-66.
- Yuan L, Wang J, Xiao H, Xiao C, Wang Y, Liu X. Isoorientin induces apoptosis through mitochondrial dysfunction and inhibition of PI3K/Akt signaling pathway in HepG2 cancer cells. Toxicol Appl Pharmacol 2012; 265(1):83–92.



## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Aslı ALTUN

Doğum Yeri: Samsun

Doğum Tarihi: 08.03.1982

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu: Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi

Biyoloji-2005

Çalıştığı Kurum: OMÜ Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD 2009-2013

OMÜ Tıp Fakültesi, Çocuk Alerji ve İmmünoloji Laboratuvarı.  
2013-Çalışıyor

E-posta: aslimutlu55@hotmail.com