



**T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**VINCA TÜRLERİNDEN ELDE EDİLEN
EKSTRAKTLARIN, VİNCRİSTİN VE
VİNBİLASTİN İLE KARŞILAŞTIRMALI
OLARAK MULTİPLE MİYELOMA HÜCRE
HATLARI ÜZERİNE SİTOTOKSİK VE
APOPTOTİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Ela Nur ŞİMŞEK SEZER

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

**Aralık - 2017
KONYA
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ KABUL VE ONAYI

Ela Nur ŞİMŞEK SEZER tarafından hazırlanan “*Vinca* Türlerinden Elde Edilen Ekstraktların, Vincristin ve Vinblastin ile Karşılaştırmalı Olarak Multiple Miyeloma Hücre Hatları Üzerine Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması” adlı tez çalışması 19/12/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Prof. Dr. Ferit AVCU

Danışman

Prof. Dr. Tuna UYSAL

Üye

Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL

Üye

Prof. Dr. Yahya BÜYÜKAŞIK

Üye

Prof. Dr. Rüstem DUMAN

İmza



Yukarıdaki sonucu onaylarım.



Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
FBE Müdürü

Bu tez çalışması S.Ü. BAP Koordinatörlüğü tarafından 15101005 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.



İmza

Ela Nur ŞİMŞEK SEZER

Tarih: 19.12.2017

ÖZET

DOKTORA TEZİ

VİNCA TÜRLERİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN, VİNCRİSTİN VE VİNBİLASTİN İLE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK MULTİPLE MİYELOMA HÜCRE HATLARI ÜZERİNE SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ela Nur ŞİMŞEK SEZER

**Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Tuna UYSAL

2017, 141 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Tuna UYSAL

Prof. Dr. Ferit AVCU

Prof. Dr. Rüstem DUMAN

Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL

Prof. Dr. Yahya BÜYÜKAŞIK

Multipl miyelom, kemiklerde ve kemik iliğinde kanserojen hücrelerin birikimine neden olan patolojik plazma hücreleri ile karakterize edilen sistemik bir hastalıktır. Yeni ilaçların geliştirilmesi ve bitkisel preparatların tedaviye destek olarak kullanılmalarına rağmen multipl miyelom hala tam tedavi edilemez bir hastalıktır.

Bu tez çalışmasında *Vinca* türlerinden (*Vinca herbacea* Waldst. & Kit. ve *Vinca soneri* Koyuncu) elde edilen ekstraktların multipl miyelom üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri, kanser tedavisinde kemoterapide sıklıkla tercih edilen *Catharanthus roseus* bitkisinden elde edilen vinka alkaloidlerinden vincristin ve vinblastin ile karşılaştırmalı olarak ortaya konulmaya çalışılmıştır. Ekstraktların alkaloid içeriği daha önce belirlenmiş olmasına rağmen fenolik madde içeriği ilk kez bu çalışmada HPLC tekniği ile belirlenmiştir. Çalışmamızda, farklı doz ve zaman aralıklarında uygulanan ekstraktların multipl miyelom hücreleri üzerindeki sitotoksik ve anti-proliferatif etkilerini belirlemek için WST-1 testi, apoptotik etkilerini ortaya koymak için ise DNA fragmentasyonu, Real Time PCR, kaspaz enzim aktivitesi ve flow sitometri teknikleri kullanılmıştır. HPLC analizi ile ekstraktlarda 17 fenolik madde için miktar tayini yapılmıştır. WST-1 testi sonucunda *Vinca* ekstraktlarının özellikle *V. herbacea*'den elde edilen ekstraktın multipl miyelom hücreleri üzerinde doza ve zamana bağımlı sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra DNA'da fragmentasyon, BAX, BIK, p53, kasp3 gibi pro-apoptotik gen ekspresyonlarında ve kaspaz 3 enzim aktivitesinde artış gözlenmesi ekstraktların multipl miyelom hücrelerini apoptoza yönlendirdiğini göstermektedir. Sonuç olarak, *Vinca* türlerinden elde edilen ekstraktların multipl miyelom hücreleri üzerinde önemli oranlarda sitotoksik ve apoptotik etkileri olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, Cezayir menekşesi, endemik, Multipl miyelom, sitotoksikite.

ABSTRACT

PhD THESIS

THE INVESTIGATION OF COMPARATIVE CYTOTOXIC AND APOPTOTIC EFFECTS OF THE EXTRACTS OBTAINED FROM *VINCA* SPECIES, VINCRISTINE AND VINBLASTINE ON MULTIPLE MYELOMA CELL LINES

Ela Nur ŞİMŞEK SEZER

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK
UNIVERSITY
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN BIOLOGY

Advisor: Prof. Dr. Tuna UYSAL

2017, 141 Pages

Jury

Prof. Dr. Tuna UYSAL

Prof. Dr. Ferit AVCU

Prof. Dr. Rüstem DUMAN

Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL

Prof. Dr. Yahya BÜYÜKAŞIK

Multiple myeloma is a systemic disease characterized by pathological plasma cells that cause the accumulation of carcinogenic cells in the bones and bone marrow. Despite the development of new drugs and the use of herbal preparations as treatment support, multiple myeloma remains untreatable.

In this thesis, the cytotoxic and apoptotic effects of extracts from *Vinca* species (*Vinca herbacea* Waldst. & Kit. And *Vinca soneri* Koyuncu) on multiple myeloma have been tried to be compared with vinca alkaloids which extracted from *Catharanthus roseus*, vincristine and vinblastine which are frequently preferred in chemotherapy. Although, the alkaloid content was determined previous studies, the phenolic content of the extracts was determined by HPLC technique for the first time in this study. In our study, WST-1 test was used to determine the cytotoxic and anti-proliferative effects of extracts applied on myeloma cells at different doses and time intervals, and DNA fragmentation, Real Time PCR, caspase enzyme activity and flow cytometry techniques were used to reveal apoptotic effects. Quantitative determination of 17 phenolic substances in the extracts were made by HPLC analysis. The result of WST-1 test, it was found that *Vinca* extracts, especially *V. herbacea* extract, had a dose and time-dependent cytotoxic effect on multiple myeloma cells. In addition, DNA fragmentation, an increase in pro-apoptotic gene expressions such as BAX, BIK, p53, casp3 and an increase in caspase 3 enzyme activity indicate that the extracts direct apoptosis of multiple myeloma cells. As a result, it has been determined that extracts from *Vinca* species have cytotoxic and apoptotic effects on multiple myeloma cells.

Keywords: Apoptosis, cytotoxicity, endemic, Multiple myeloma, periwinkle.

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasını gerçekleştirmemde bana yardımcı olan, tecrübe ve yardımlarını benden esirgemeyen, her takıldığımda yanımda olduğunu hissettiren ve bir baba gibi sabırla çalışmalarına destek olan danışman hocam Prof. Dr. Tuna UYSAL'a,
Tezimin önemli bir bölümünde verdiği değerli bilgiler, teknik destek ve yardımlarından dolayı hocam Prof. Dr. Ferit AVCU'ya,
Tezime olan değerli katkı ve desteklerinden dolayı hocam Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL'a,
Bir dost olarak hem güncel hayatta hem de laboratuvar çalışmalarımda benden desteğini esirgemeyen arkadaşım Uzman Dr. Meryem BOZKURT'a,
Tez çalışmam esnasında sürekli fikir alışverişinde bulunduğum arkadaşlarım Arş. Gör. Burcu YILMAZ ÇITAK ve Arş. Gör. Emrah ŞİRİN'e,
Laboratuvar çalışmalarım esnasında benden yardımlarını esirgemeyen Yüksek Lisans öğrencisi Ahmet Emre CEYLAN'a,
Tezimin her aşamasında sevgi ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen sevgili eşim Ahmet Yasin SEZER'e ve oğlum Emir Kaan SEZER'e,
Hayatımın her anında yanımda olan, benden sevgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürler.

Ela Nur ŞİMŞEK SEZER
KONYA-2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.1.1. Kanser Neden Olan Etmenler	6
2.1.2. Kanserden Korunma.....	7
2.1.3. Apoptoz	7
2.1.4. Apoptoz ve Nekroz.....	10
2.1.5. Apoptoz ile İlişkili Gen Bölgeleri	11
2.2. Multipl Miyelom	16
2.3. Kanser Tedavisinde Bitkilerin Kullanımı	19
2.3.1. Anti-Kanser Aktiviteye Sahip Bitkisel Bileşikler	22
2.3.2. FDA onaylı bitki kaynaklı antikanser ajanlar	26
2.3.3. Multipl miyelom ve bitkisel yaklaşımlar	28
2.4. Genel Bilgiler	36
2.4.1. <i>Vinca L.</i>	36
2.4.2. <i>Vinca herbacea</i> Waldst. & Kit	36
2.4.3. <i>Vinca soneri</i> Koyuncu	37
2.4.4. Çalışılan <i>Vinca</i> Türlerinde Bulunan Alkoloidler	38
2.5. Yöntemler.....	39
2.5.1. Sitotoksitite Testleri	39
2.5.2. Real Time PCR.....	41
2.5.3. Flow Sitometri.....	43
3. MATERYAL VE METOT	45
3.1. Materyal	45
3.1.1. Materyal eldesi	45
3.1.2. Kullanılan Hücre Hatları	45
3.2. Metot	46
3.2.1. Bitkisel ekstraktların hazırlanması	46
3.2.2. HPLC Yöntemi.....	46
3.2.3. GC- MS/ MS Yöntemi	48
3.2.4. Hücre kültürünün hazırlanması	48

3.2.5.Kullanılacak ekstrakt konsantrasyonlarının hazırlanması.....	48
3.2.6.Hücre sayımı	49
3.2.7.Hücrelerin testler için hazırlanması.....	49
3.2.8. Kandan mononükleer hücre eldesi	50
3.2.9.WST-1 testi	50
3.2.10. DNA izolasyonu.....	51
3.2.11. RNA izolasyonu ve Real Time PCR.....	51
3.2.12. Kaspaz 3 enzim aktivitesinin ölçülmesi	53
3.2.13. Flow Sitometri.....	54
3.2.14. Hücre İnvazyon Testi	54
3.2.15. İstatistiksel analizler	55
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	56
4.1. Fenolik bileşiklerin HPLC ile karakterizasyonu	56
4.2. Ekstraktların GC- MS/MS ile karakterizasyonu	60
4.3. Ekstraktların sitotoksik etkilerinin WST-1 Testi ile Ölçülmesi	63
4.4. DNA fragmentasyon analizi.....	74
4.5. Real-Time PCR	77
4.6. Kaspaz-3 enzim aktivitesi	102
4.7. Flow Sitometri.....	105
4.8. İnvazyon Testi.....	109
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	113
KAYNAKLAR.....	116
ÖZGEÇMİŞ.....	137

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: yüzde
°C	: santigrat derece
cm ²	: santimetrekaare
mm ²	: milimetrekaare
µg	: mikrogram
mg	: miligram
µl	: mikrolitre
ml	: mililitre

Kısaltmalar

AIF	: Apoptotik uyarıcı faktör (Apoptosis inducing factor)
ALL	: Akut lenfoblastik lösemi (Acute lymphoblastic leukemia)
ANOVA	: Varyans analizi
APAF-1	: Apoptoz Proteaz Aktive Edici Faktör (Apoptosis protease activating factor 1)
ATCC	: Amerikan Tip kültür koleksiyonu (American type culture collection)
ATP	: Adenozin tri fosfat
BA	: Betülinik asit
BAD	: Bcl-2 ilişkili ölüm düzenleyicisi (Bcl-2-associated death promoter)
BAK	: Bcl-2 homolog antagonist katili (Bcl-2 homologous antagonist killer)
BAX	: Bcl-2 ilişkili X proteini (Bcl-2 associated X protein)
BCL-2	: B- hücre lenfoma 2 (B- cell lenfoma 2)
BID	: BH3 ilişkili ölüm domaini (BH3 interacting-domain death agonist)
BIK	: Bcl2 ilişkili öldürücü (Bcl-2 interacting killer)
CAD	: Kaspaz yoluyla aktifleşen deoksiribonükleaz (Caspase activated deoxyribonuclease)
c-AMP	: Siklik adenozin monofosfat (Cyclic adenosine monophosphate)
CAPE	: Kafeik asit fenil ester (Cafeic acid phenyl ester)
CASP3	: Kaspaz 3 geni (Caspase 3 gene)
cDNA	: Komplementer deoksiribonükleik asit (Complementary deoxyribonucleic acid)
DED	: Ölüm etkili bölge (Death effector domain)
DISC	: Ölüm indükleyici sinyal kompleksi (Death inducing signal complex)
DMSO	: Dimetil sülfoksit (Dimethyl sulfoxide)
DNA	: Deoksiribonükleik asit (Deoxyribonucleic acid)
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit (Ethylenediaminetetraacetic acid)
EGCG	: Epigallokateşin gallat (Epigallocatechin gallate)
FADD	: Fas bağlantılı ölüm bölgesi (Fas associated death domain)
FBS	: Fetal dana serumu (Fetal bovine serum)
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and drug agency)
GADD45	: İndüklenen büyüme durması ve DNA hasarı genleri (The Growth

	Arrest and DNA Damage)
GAPDH	: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
HDAC	: Histon deasetilaz (Histone deacetylase)
HDI	: İnsani Gelişme Endeksi (Human development index)
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High pressure liquid chromatography)
IAP	: Apoptoz inhibitörü (Inhibitor of apoptosis)
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (International agency research on cancer)
IC ₅₀	: Hücre canlılığını %50 inhibe eden konsantrasyon (The half maximal inhibitory concentration)
ICAD	: Kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü (Inhibitor of caspase activated DNase)
IL-6	: İnterlökin-6 (interleukin 6)
MDM2	: Mouse double minute 2
MGUS	: Monoklonal gammopati (monoclonal gammopathy)
MM	: Multipl miyelom (Multiple myeloma)
MOMP	: Mitokondriyal dış membran geçirgenliği (Mitochondrial outer membrane permeability)
mRNA	: Mesajcı RNA (Messenger RNA)
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
PARP	: poly ADP riboz polimeraz (poly ADP-ribose polymerase)
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi (Phosphate buffer saline)
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
PI	: Propidyum iyodür (Propidium iodide)
PUMA	: p53 ilişkili apoptoz modülatörü (p53 upregulated modulator of apoptosis)
qRT-PCR	: Kantitatif gerçek zamanlı PCR (Quantitative real time PCR)
R-HPLC	: Ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (Revers HPLC)
RNA	: Ribonükleik asit (Ribonucleic acid)
ROS	: Reaktif oksijen türleri (Reactive oxygen species)
RT-PCR	: Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (Revers transcriptase PCR)
TNFR-1	: Tümör nekroz faktör reseptörü (Tumor necrosis factor receptor)
TRADD	: Tümör nekroz faktör reseptörü bağlantılı ölüm bölgesi (Tumor necrosis factor receptor associated death domain)
VBL	: Vinblastin (Vinblastine)
VCR	: Vinkristin (Vincristine)
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (World health agency)
WST-1	: Suda çözünabilir tetrazolyum tuzu

1. GİRİŞ

Kanser, dünyada ölümlerin önde gelen ikinci nedenidir ve 2015 yılında yaklaşık 8.8 milyon insan kanser hastalığı nedeniyle yaşamını yitirmiştir.

Dünya sağlık örgütü tarafından hazırlanan rapora göre; Türkiye de her yıl 150.000 yeni vakanın ortaya çıktığı tahmin edilmektedir. Erkeklerde en sık rastlanan kanserler akciğer ve solunum yolları (%33), mide (%9), mesane (%9), kolon ve rektum (%8), prostat (%6) ve larinks (%6) kanserleridir. Kadınlarda en sık rastlanan kanserler meme (%24), kolon ve rektum (%9), mide (%7), yumurtalık (%6), nefes borusu, bronş ve akciğer (%6), lösemi (%5) ve serviks (%5) kanserleridir ([Boyle ve Levin, 2008](#)).

Hematolojik maligniteler, epidemiyolojik özellikler, klinik davranış ve prognoz bakımından birbirlerinden oldukça farklılık gösteren bir hastalık grubudur. 2012'de dünya çapında 900.000 yeni hematolojik malignite vakası ve buna bağlı 570.000 ölüm gerçekleşmiştir.

Multipl miyelom (MM), kemik iliğindeki monoklonal plazma hücrelerinin proliferasyonu ile karakterize edilen ikinci en yaygın hematolojik malignitedir. Plazma hücrelerinden türetilen B hücreli habis lenfoid neoplazmı olan multipl miyelom, tüm kanser vakalarının % 0.8'inden ve dünya üzerindeki tüm kanser ölümlerinin % 1'inden sorumlu tutulmaktadır ([Ferlay ve ark., 2015](#)). Neoplastik klonu ve mikro çevreyi hedef alan, yeni ajanların ortaya çıkmasına rağmen tedavi sonrasındaki iyileşme ve relaps fazları ve sonunda gözlenmesi muhtemel tedaviye direnç ve hasta ölümüyle sonuçlanan multipl miyelom, hala tedavisi oldukça zor bir kanser türüdür.

Tıbbi bitkiler yüzyıllardır Dünyanın çeşitli yerlerinde sayısız hastalığın tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra bitki kaynaklı kürler etkili bir anti kanser ajanı kaynağı olarak önemli bir role sahiptirler. Günümüzde ekonomi ve teknolojiye gelişmelerin yanı sıra geleneksel tıbbi ilaçlar halen birçok ülkede temel sağlık hizmeti olarak kullanılmaktadır. Özellikle bitki kaynaklı doğal ürünlere olan ilginin artmasıyla birlikte gelişmiş ülkelerde tamamlayıcı ve alternatif tıp kullanımı hızla artış göstermektedir. Doğal ürünlerden elde edilen biyoaktif maddeler için anti kanser tarama deneyleri mevcut birçok araştırmanın odağındadır.

Fitokimyasallar, yarım yüzyılı aşkın süredir, multipl miyelomda kemoterapinin etkinliğini arttırmak için antineoplastik ilaçların ve yeni kemoterapi yardımcılarının önemli bir parçası haline gelmiştir.

Son yıllarda bitki kaynaklı doğal ürünler, çoklu biyoaktiviteleri ve daha düşük toksisite göstermeleri nedeniyle anti-miyelom tedavisi alanında artan bir ilgi görmektedir. Çoklu hedefleri bağlama kapasiteleri nedeniyle doğal ürünler, çok yönlü anormalliklerle multipl miyelom tedavisinde rasyonel olarak tasarlanmış mono hedefli ajanlara göre daha avantajlıdır ([Prasad ve ark., 2011](#)).

Bu tez çalışmasında genel yayıllı *Vinca herbacea* Waldst. & Kit ve endemik *Vinca soneri* Koyuncu türlerinden elde edilen ekstraktların multipl miyelom hücre hatları üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri, kanser kemoterapisinde sıklıkla tercih edilen vinka alkaloidlerinden vincristin ve vinblastin ile karşılaştırmalı olarak ortaya konulmaya çalışılmıştır.



2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser

Kanser, ölüm hızının yüksek olması nedeniyle çağımızın en korkutucu sağlık sorunlarından biridir. Kanser oluşumu, ilerlemesi ve yeni tedavi seçeneklerinin biyolojik temelleri ile ilgilenen araştırma gruplarının sayısının artması ve kanser araştırması alanındaki bilginin genişlemesi ile birlikte, maalesef kanser Dünyada halen kardiyovasküler hastalıklardan sonra önde gelen ölüm nedenlerinden biridir ([Jemal ve ark., 2011](#)). Globocan 2008 verilerine göre, günümüzde dünya çapında her yıl yaklaşık 12 milyon insan bu hastalığa yakalanmakta ve hastaların yaklaşık 7 milyonu (~% 60) aynı yıl içinde hayatını kaybetmektedir ([Jemal ve ark., 2011](#)). Ayrıca, kanser istatistikleriyle ilgili önemli sayıda bilimsel araştırma, tüm kanser tiplerinin görülme oranlarının gün geçtikçe arttığını ve hastalığın teşhis ve tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi için birçok uzmanlaşmış alanın işbirliğinin gerekliliğini ortaya koymaktadır ([Parkin ve ark., 2005](#); [Boyle ve Levin, 2008](#); [Jemal ve ark., 2011](#)).

2012 yılında yapılan bir araştırmaya göre dünya çapında erkeklerde 7.4 milyon ve kadınlarda 6.7 milyon olmak üzere yaklaşık 14 milyon yeni kanser vakası tespit edilmiştir ([Ferlay ve ark., 2015](#)). 2012 yılında dünyada yaklaşık 8.2 milyon insan kanser nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Dünya genelinde kanser kaynaklı ölümlerin neredeyse % 70'i İnsan Gelişim Endeksinin (HDI) düşük veya orta düzeyde olduğu ülkelerde görülmektedir.

En sık görülen kanserler akciğer, karaciğer, mide ve bağırsak kanserleridir ve bu kanserler, kanser kaynaklı ölümlerin neredeyse yarısını oluşturmaktadır. Dünyadaki tüm kanser ölümlerinin yüzde % 20'sini akciğer kanserleri oluşturmaktadır. Yeni kanser vaka sayısının önümüzdeki 20 yılda yaklaşık % 70 oranında artması beklenmektedir. Dünya genelinde 2030 yılına kadar her yıl 23.6 milyon yeni kanser vakası olacağı öngörülmektedir.

Kanser terimi, vücudun herhangi bir bölümünü etkileyebilecek geniş bir hastalık grubu için kullanılan genel bir terimdir. Kanser, hücrelerin normal özelliklerini temel olarak değiştiren bir dizi moleküler olaydan kaynaklanmaktadır.

Kanser terimi aynı zamanda düzensiz, anormal hücre büyümesi ile karakterize edilen bir dizi hastalık için kullanılmaktadır. Kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesi, çevredeki dokuları kendi orijin noktasından istila etmesine ve vücudun diğer bölgelerine yayılmasına yol açarak ikincil büyüme bölgelerini oluşturmaktadır ([King ve Robins, 2006](#); [Lieberman ve Marks, 2009](#)).

İnsan vücudu trilyonlarca canlı hücreden oluşmaktadır. Normal vücut hücreleri düzenli bir şekilde büyür, bölünür ve ölürler. İnsan hayatının ilk yıllarında normal hücreler kişinin büyümesine izin vermek için daha hızlı bölünürler. Yetişkin olduktan sonra hücrelerin çoğu, yıpranmış veya ölen hücreleri değiştirmek veya yaraları onarmak için bölünür. Yeni hücre büyümesi ve eski hücre ölümü oranları dengede tutulur. Aksine, kanser hücrelerinin büyümesi normal hücrelerin büyümesinden çok farklıdır. Kanser hücreleri ölmek yerine, büyümeye ve yeni anormal hücreler oluşturmaya devam etmektedir. Normal hücrelerde kontakt inhibisyonu olarak adlandırılan hücre büyümesini durdurma, doğal sürecin bir sonucudur. Bu mekanizma, hücrelerin çoğalmasını durdurmak için en önemli kontrol mekanizmalarından biridir ve hücrelerin sadece bir hücre kalınlığında tek katmanlı bir tabaka oluşturmalarını sağlar. Öte yandan, kanser hücrelerinin davranışı oldukça farklıdır. Kanser hücrelerinde hücrenin aşırı büyümesini ve diğer dokuları işgalini (invazyon) önleyen normal kontrol sistemleri devre dışı kalmıştır. Bu hücreler büyüme uyarıcı sinyaller gerektirmez ve büyümeyi önleyici sinyallere karşı dirençlidirler. Normal hücrelerde büyüme ve bölünme sıkı bir şekilde düzenlenirken, kanser hücreleri düzensiz bir şekilde bölünmeye devam eder ve bir hücre kümesi oluşturur. Kanserli dokularda hücrelerin oluşumu ve yok edilmesi arasındaki denge tamamen bozulmuş durumdadır. Üstelik kanser hücreleri, eski veya hasar görmüş hücrelerin normal olarak kendilerini tahrip etme mekanizması olan apoptoza (programlanmış ölüm prosesi) karşı dirençlidir. Kanser hücreleri sonsuz çoğalma kapasitesine sahiptirler ve yaşlanmazlar ([Alberts ve ark., 2008](#); [Lieberman ve Marks, 2009](#); [NCI, 2011](#)).

Karsinogenezis, kanserin geliştiği süreç, hayati düzenleyici yollardaki hataların birikiminden kaynaklanan çok aşamalı bir mekanizmadır. Tek bir hücrede başlatılır, daha sonra bu hücre çoğalır ve komşu hücrelere kıyasla hayatta kalma avantajı sağlayan ek değişiklikler elde eder. Kanserdeki anormal çoğalma paterni, çoğalma, farklılaşma ve hücrelerin hayatta kalmasından sorumlu olan genlerde gerçekleşen birçok mutasyondan kaynaklanmaktadır. Kanser hücreleri artık bu genetik değişiklikler nedeniyle büyüme önleyici sinyallere cevap vermezler ([Lieberman ve Marks, 2009](#)). Normal bir hücre bölünmesinde, bir hücrenin DNA'sı zarar görürse, hücre ya hasarı onarır ya da apoptoza (programlanmış hücre ölümü) yönelir; bununla birlikte, kanser hücrelerinde, hasar görmüş DNA tamir edilmez,

daha da kötüsü, hücre olması gerektiği gibi ölüme yönelmez. Bunun yerine, bu kanser hücresi vücudun ihtiyaç duymadığı yeni hatalı kopyalar üretmeye devam eder. Bu nedenle eğer mutasyon tamir edilmezse ve bölünme devam ederse mutasyona uğramış hücreler, kanserli dokuyu teşkil eden milyarlarca hücre üretmek için çoğalırlar ([King ve Robins, 2006](#); [Lieberman ve Marks, 2009](#))

Kanser hücrelerinde görülen anormallikler, genellikle hücre bölünmesini düzenleyen proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Zamanla daha çok gen mutasyon geçirmektedir. Normalde DNA hasarını onaran proteinleri oluşturan genler, mutasyona uğradığında işlevini kaybetmektedir. Sonuç olarak, hücrede mutasyon oranı giderek artmakta ve bu durum hücrede ve çevre hücrelerde başka anormalliklere neden olmaktadır. Mutasyona uğramış hücrelerin bazıları ölürken, hücrelerde meydana gelen değişiklikler anormal hücrenin normal hücrelere kıyasla çok daha hızlı çoğalmasına izin veren seçici bir avantaj sağlayabilmektedir ([King ve Robins, 2006](#)).

Kanserin tanımlayıcı özelliklerinden biri de, olağan sınırlarının ötesinde büyüyen ve vücudun bitişik bölümlerine istila edebilen ve diğer organlara yayılabilen anormal hücrelerin hızla oluşmasıdır, bu durum metastaz olarak adlandırılır. Metastazlar, kansere bağlı ölümlerin önemli bir nedenidir. Kanser, neoplazma adı verilen ve tümörlerin oluşmasını sağlayan anormal hücrelerin, kontrol dışı bir şekilde büyümesi olarak tanımlanmaktadır. İki tip tümör vardır. Bunlar; vücutta yayılma göstermeyen, olduğu bölgede lokalize olan iyi huylu (benign) tümörler ve metastatik özellikte yani bulunduğu doku veya organdan çevre dokulara geçiş yapabilen kötü huylu/ habis/malignant tümörlerdir ([Ogden, 1998](#)). En sık rastlanan tümörler, deride epitel hücrelerde, gastrointestinal sistemde ve iç organlarda ortaya çıkan karsinomlar yani kötü huylu tümörlerdir. Sarkomalar ise yumuşak doku (kaslar, kan damarları, yağ dokusu) ve kemik dokusu kaynaklıdır ([Boyle ve Levin, 2008](#)).

Kanser hücrelerinde bulunan altı önemli kriter kanserin özellikleri hakkında bilgi vermektedir ([Hanahan ve Weinberg, 2000](#)). Bunlar;

- Büyüme sinyallerindeki kendine yeterlilik,
- Anti-büyüme sinyallerine karşı duyarsızlık,
- Apoptozdan kaçınma,
- Sınırsız replikasyon potansiyeli,
- Sürekli anjiyogenez,
- Doku invazyonu ve metastazı olarak sıralanmaktadır.

2.1.1. Kansere Neden Olan Etmenler

Kanser, normal bir lezyondan malign bir tümöre kadar ilerleyen çok aşamalı bir süreçte normal hücrelerin tümör hücrelerine dönüşmesinden kaynaklanmaktadır. Kansere neden olan genetik (biyolojik) faktörler, yaş, obezite, azalan bağışıklık sistemi yanıtı, kimyasallara ve / veya radyasyona maruz kalma gibi birden fazla risk faktörü olmasına rağmen, böcek ilacı ve virüs, çevre ve yaşam tarzı gibi faktörlerinde kanser oluşumu için önemli bir etkisi olduğu bilinmektedir. Yapılan araştırmalar kansere bağlı tüm ölümlerin yaklaşık % 5 ila 10'unun genetik faktörlerden kaynaklandığını, geri kalan yaklaşık % 90 ila 95'inin yaşam tarzı ve çevre faktörlerinden kaynaklandığını göstermektedir ([Irigaray ve ark., 2007](#); [Anand ve ark., 2008](#)). Günümüzde kanser etiyojisi ile ilgili olduğu düşünülen beş faktörün varlığı bilinmektedir; bunlar genetik faktörler, kimyasal faktörler, fiziksel faktörler, viral ajanlar ve immünolojik faktörlerdir ([Yamazhan ve Tunçel, 2003](#)).

WHO'ya bağlı kanser araştırma ajansı olan, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) kansere neden olan ajanlar sınıflandırmasını sürdürmektedir. Hücrelerde meydana gelen bu değişikliklerin, kişinin genetik alt yapısı ile çevresel faktörlerin etkileşiminin bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Çevresel faktörler, ultraviyole ve iyonlaştırıcı radyasyon gibi fiziksel kanserojenler, asbest, tütün dumanı bileşenleri, aflatoksin ve arsenik gibi kimyasal kanserojenler ve bazı virüs, bakteri veya parazitler vasıtasıyla oluşan enfeksiyonlar gibi biyolojik kanserojenlerdir. Öte yandan yaşlanma, kanser gelişiminde bir diğer temel faktördür. Kanser insidansı, muhtemelen yaşla birlikte artış göstermektedir. Spesifik kanserler için risk, organizmada oluşan mutasyonların birikimi nedeniyle yaşla birlikte belirgin şekilde yükselmektedir. Bu risk, kişinin yaşı ilerledikçe hücresel onarım mekanizmalarının daha az etkili olma eğilimi ile birleştirilmektedir.

2.1.2. Kanserden Korunma

Kanserden korunma üç başlık altında incelenebilir. İlk olarak alınması gereken önlem, kanser oluşum mekanizmasını tetikleyecek, karsinogenezis işlemini başlatabilecek olan her türlü kanser yapıcı (karsinojenik) madde ve oluşumla teması engellemektir. İkincil olarak yapılması gereken tarama ve erken tanı yoluyla olgularda kanseri erken evrede yakalayıp tedavi olanaklarını arttırabilmektir. Son olarak ise kanserli hastanın gerekli tedavisini yaparak, bu hastalık nedeniyle ve/ veya tedavi komplikasyonlarına bağlı olarak beklenenden erken ölmesini önlemektir. Yapılan çalışmalara göre kanser mortalitesi, diyetle yağı azaltıp selülozu arttırarak % 8, sigarayı bırakarak % 8-15, tarama ve erken tanı programlarıyla % 3, güncel tedavilerle % 10-25 oranlarında indirgenebilmektedir ([Dinçer, 2000](#)).

2.1.3. Apoptoz

Kanser hücrelerinde apoptozun indüksiyonu, sitotoksik antitümör ajanların en önemli belirteçlerinden bir tanesidir. Hücre ölümü, normal gelişim ve olgunlaşma sürecinin ayrılmaz bir parçasıdır. Bu sürecin önemine rağmen, hücre ölümünün altında yatan esas mekanizmalar halen iyi bir şekilde ortaya konulamamıştır. Hücre ölümü, kanser gelişiminde, kanseri önlemede ve kanser terapisinde oldukça önemli bir değişkendir ([Zerban ve ark., 1994](#); [Schulte-Hermann ve ark., 1997](#)).

Hücre ölüm şekillerinden biri olan apoptoz, çoklu fizyolojik faktörlere yanıt olarak oluşan programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Doğal olarak ortaya çıkan apoptoz, organizmanın uygun embriyonik gelişiminin yanı sıra immün yanıtın sürdürülmesi için oldukça önem arz etmektedir. Apoptozu başlatan diğer faktörler ise, toksik maddelerin varlığı, DNA hasarı, indüklenen ölüm reseptörü sinyali, nükleer onkojenlerin ektopik ekspresyonu ve büyüme faktörleri, sitokinler, hormonlar gibi hayatta kalma sinyallerinin kaybıdır ([May ve May, 1999](#)).

Farklı hücreler, çeşitli apoptoz uyaranlarına farklı tepkiler sergiler. Örneğin splenik lenfositler, iyonize radyasyona maruz kaldıklarında kolaylıkla apoptozise yönelirken, miyositler benzer maruziyette apoptozise karşı direnç göstermektedir ([Sionov ve ark., 2001](#)).

Apoptoz, hücre iskeletinin depolimerizasyonu, kromatin yoğunlaşması, nükleer parçalanma ve fosfatidilserinin hücre yüzeyine translokasyonu ve DNA fragmentasyonu ile karakterize edilen bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptozise uğrayan hücreler, çevre hücreler tarafından hızla fagosite edilmektedir. Apoptotik cisimcikler ışık mikroskobu

yardımla kolaylıkla görülebilmektedir. Apoptozun önemli karakteristik özelliklerinden birisi olan DNA fragmantasyonu, 80-120 baz çifti DNA fragmanlarının merdiven şeklinde bir oluşumu olarak agaroz jel elektroforezinde görülebilmektedir. DNA fragmantasyonu apoptozun erken morfolojik bir işaretidir ve apoptoz tayininde sıklıkla kullanılmaktadır ([Save ve ark., 2004](#)).

Apoptoz, kaspaz kaskad aktivasyonu ve hücre ölümüne yol açan çoklu sinyal yollarını başlatan bir takım uyarılar sonucu ortaya çıkmaktadır. Apoptotik aktivitedeki artışlar, AIDS, nörodejeneratif bozukluklar, insüline bağımlı diyabet, miyokard enfarktüsü ve ateroskleroz gibi çeşitli hastalıklara işaret edebilmektedir. Apoptozis, embriyolojik gelişim sürecinde ve erişkin doku gelişiminin sürdürülebilirliğinde önemli rol oynamaktadır ([Cooper, 1994](#)). Yetişkin bir insanda hergün yaklaşık 50 ila 70 milyar hücre apoptoz nedeniyle ölmektedir ([Karam, 2009](#)). Hücrenin hayat devri boyunca yapım ve yıkım arasında kontrollü bir denge mevcuttur. Bu dengenin bozulması, birçok önemli hastalığın patogeneğinde rol oynamaktadır. Kusurlu apoptoz süreçleri çeşitli hastalıklara yol açmaktadır. Aşırı apoptoz atrofiye neden olurken, yetersiz miktarda apoptoz kanser gibi kontrol edilemeyen hücre çoğalmasıyla sonuçlanmaktadır.

Apoptozis, organizma için tehlikeli olabilecek veya hasar görmüş hücrelerin yok edilmesi mekanizmasıdır. Örneğin virüsle enfekte olmuş hücreler bu şekilde ortadan kaldırılmaktadır. DNA'da meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı DNA'yı içeren hücrelerin apoptozis yolu ile yok edilmesi oldukça büyük önem arz etmektedir ([Cooper, 1994](#); [Perkins ve Stern, 1997](#)).

Apoptozis, doku gelişim sürecinde istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılmasında da rol oynamaktadır. Örneğin, böcek ve amfibilerin metamorfozu esnasında larva dokusunun yok edilmesi apoptoz ile gerçekleşmektedir. Diğer bir örnek de memelilerde sinir sisteminin gelişimi esnasında programlanmış hücre ölümünün görülmesidir. Fazla sayıda üretilen nöronların % 50'den fazlası programlanmış hücre ölümü yoluyla yok edilmektedir ([Cooper, 1994](#)).

Çeşitli genler apoptozu artırıcı veya baskılayıcı olarak görev alabilmektedir. Özellikle kaspazların hücre ölümünün düzenlenmesi yanında, farklı apoptotik uyarıcılar olarak anahtar rol oynadıkları bilinmektedir ([Stermicke ve Salvesen, 1998](#); [Harada ve Grant, 2003](#)).

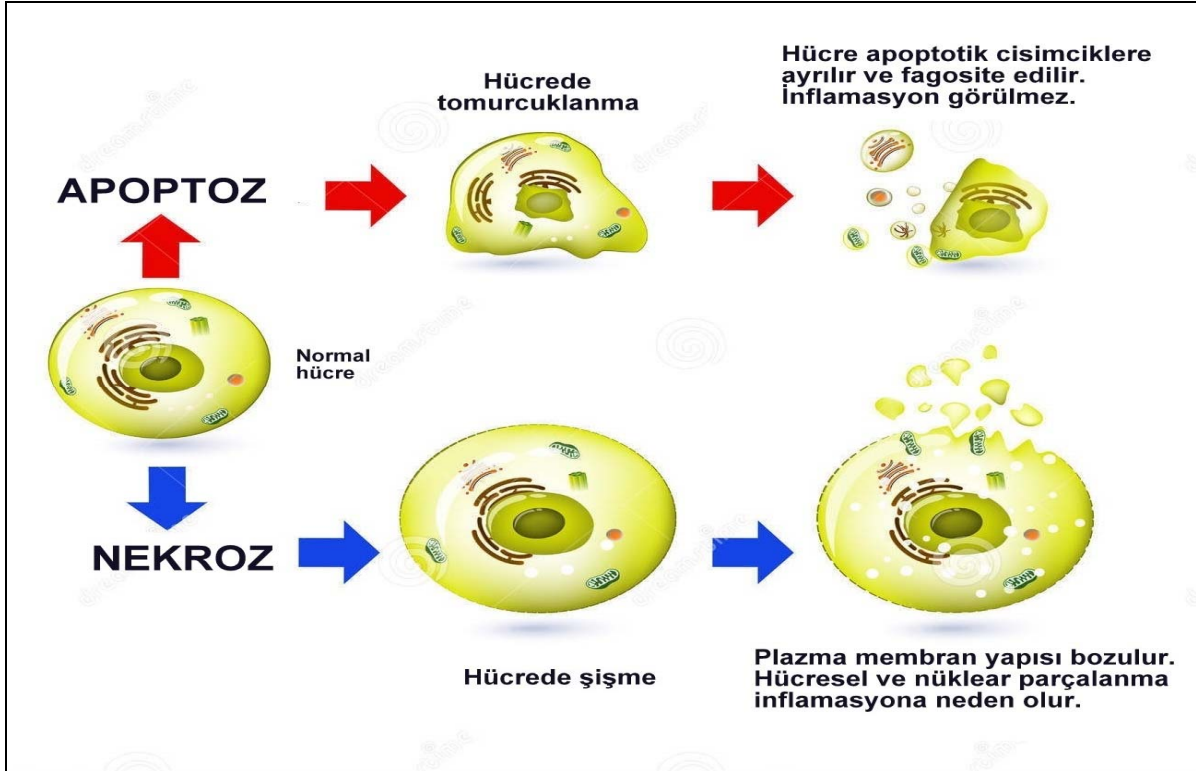
Hücreler ölüm uyarılarını aldıktan sonra iki yolak ile apoptoza yönelirler. Bu yollardan birisi intrinsik yolak; hücre içi uyarılarla tetiklenen mitokondri aracılı apoptoz, diğeri ise ekstrinsik yolak; hücre dışından kaynaklanan ölüm uyarıları ile tetiklenen reseptör aracılı apoptozdur.

İntrinsik yolda, DNA hasarı, iyonize radyasyon, oksidatif stres, büyüme faktör eksikliği sitotoksik ilaçlar gibi birçok nedenle ortaya çıkabilen ölüm sinyali, Bcl-2 ailesinin sadece BH-3 domaini içeren üyeleri (BİD, BAD, BİM, PUMA, NOXA) tarafından mitokondriye taşınır. Mitokondri dışı membran geçirgenliğinde görülen artış, intrinsik yolun en önemli basamağıdır. Ölüm sinyalinin, membrandaki geçirgenlik artışını gerçekleştirebilmesi, öncelikle apoptozu başlatan sitokrom-c 'nin mitokondriden salınımına neden olur ([Barnes, 2004](#)). Sitokrom-c; Apaf-1 ve pro-kaspaz 9'a bağlanarak apoptozom adı verilen kompleks yapıyı (Apaf-1 + sitokrom-c + ATP + Prokaspaz 9) oluşturmaktadır. Aktifleşen kaspaz 9, pro-kaspaz 3'ü aktive eder. Aktif kaspaz 3, ICAD'ı yani kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü inaktif hale getirir. Böylece ICAD'ın baskıladığı CAD (kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz) serbest hale gelir. CAD, apoptozun karakteristik bulguları olan kromatin yoğunlaşması ve oligonükleozomal DNA parçalanmasına neden olur. Ayrıca aktif kaspaz 3, aktin veya fodrin, lamin A, PARP gibi ilgili proteinleri parçalayarak, apoptotik hücre morfolojisinin oluşmasını da sağlar ([Sakahira ve ark., 1998](#)).

Ekstrinsik yolda ise apoptoz, hücre ölüm reseptörleri olan Fas ve TNF-R1'in kendi ligandları ile etkileşime girmesi sonucu başlar. Fas ligandı (Fas L), doğal öldürücü hücrelerde ve sitotoksik T lenfositlerde bulunur. TNF-R1'in ligasyonu, TNF'nin TNF-R1'e bağlanması ile gerçekleşir. TNF-R1 ve Fas kendi ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısını almış olurlar. Fas reseptörü, komşu iki Fas ligandının birbirine bağlanması sonucu trimer yapıdan hekzamer yapıya dönüşür. Daha sonra, Fas reseptörü intrasitoplazmik ölüm bölgesi olan FADD ile TNF-R1 ise TRADD ile etkileşime girer. Böylece DISC (ölüm indükleyici sinyal kompleksi) oluşur. Bu kompleks, prokaspaz 8'in efektör ölüm bölgesi olan DED ile birleşerek prokaspaz 8'in kaspaz 8'e dönüşümüne neden olur. Kaspaz 8; ya Bcl-2 ailesi üyelerinden biri olan Bid'in c-terminal bölgesini keserek tBid'in oluşmasına ve böylece apoptozun intrinsik yola doğru yönelmesine ya da prokaspaz 3'ü aktif hale getirerek, programlı hücre ölümüne neden olmaktadır ([Li ve ark., 1998](#)).

2.1.4. Apoptoz ve Nekroz

Yapılan araştırmalar sonucunda, hücre ölümünün iki alternatif yolla meydana geldiği söylenebilir: apoptoz, programlanmış, yönetilen bir hücre ölümü şekli olarak adlandırılırken, nekroz, rutin olmayan ve kazara bir şekilde hücre ölümü olarak nitelendirilmektedir ([Manning ve Zuzel, 2003](#)).



Şekil 2.1. Apoptotik ve nekrotik hücre ölümleri arasındaki farklılıklar ([Dreamstime, 2017](#)).

Apoptoz ve nekroz, morfolojik ve biyokimyasal olarak birbirinden tamamen farklıdır ([Zeiss, 2003](#)). Apoptozu tetikleyen uyaranlar patolojik veya fizyolojik özellikte olabilirken, nekroz için bu uyaranlar her zaman patolojiktir. Apoptotik hücre ölümünde hücrenin enerjiye ihtiyacı varken, nekrotik hücre ölümü için enerji gerekmez. Nekrotik hücre ölümü, mitokondriye bağımlı değildir ve sitokrom c salımında rol almaz. Nekrozda apoptozun aksine herhangi bir kaspaz aktivasyonu olmazken, bunun yerine proinflamatuvar sinyalizasyon ve sitokin üretimi vardır. Böylece nekrotik yanıtta, lizozomal enzimler sızıntı olan bölgede bir enflamatuvar yanıt üretir ve ölü hücreler makrofajlar ve nötrofiller tarafından yutulur. Nekrozda morfolojik olarak hücre ve organeller şişer, kromatin yoğunlaşır ve membran asimetrisi kaybolur ve hücre zarı patlar ([Searle, 1982](#); [Proskuryakov ve ark., 2003](#)).

2.1.5. Apoptoz ile İlişkili Gen Bölgeleri

2.1.5.1. p53

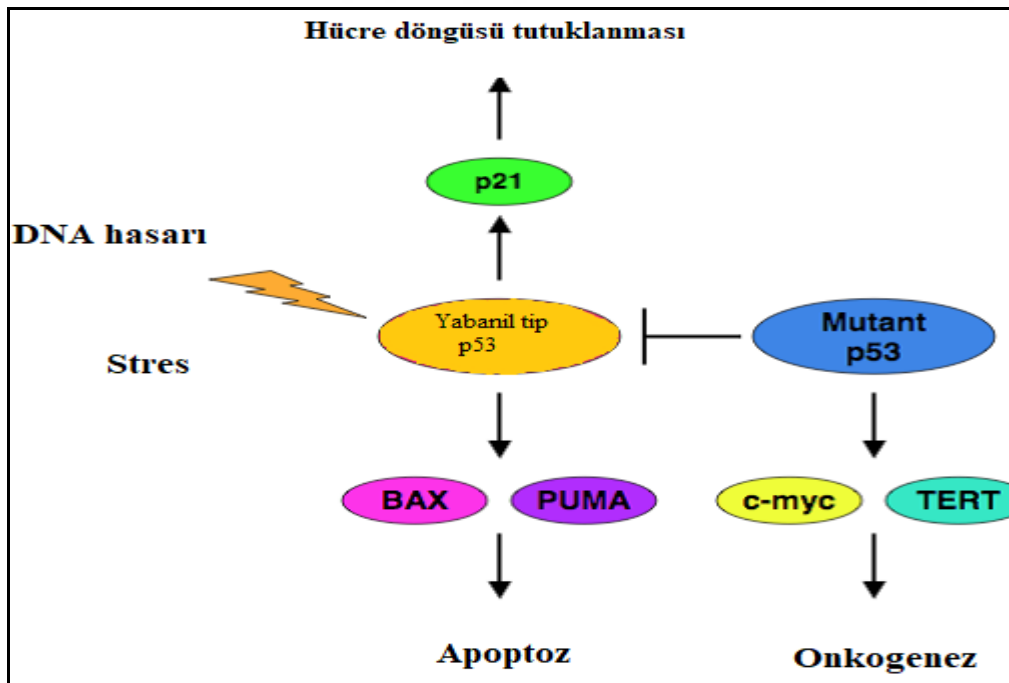
p53 bir nükleer transkripsiyon faktörüdür ve hücre döngüsünün tutuklanması ve / veya apoptozun indüksiyonu ile ilgili birçok hedef geni aktive eder ([Prives ve Hall, 1999](#); [Sionov ve ark., 2001](#); [Vousden ve Lu, 2002](#); [Lacroix ve ark., 2006](#)). Normal koşullar altında, p53, hücrede düşük bir seviyede ifade edilir. DNA hasarı gerçekleştiği zaman p53, fosforilasyon ve asetilasyon gibi translasyon sonrası modifikasyonlarla hücre çekirdeğinde birikmeye neden olmaktadır. Bu kimyasal modifikasyonlar p53'ü inaktif formdan aktif forma dönüştürür, bu da MDM2'nin p53'ten ayrılmasına bağlıdır ([Prives ve Hall, 1999](#); [Sionov ve ark., 2001](#); [Vousden ve Lu, 2002](#); [Lacroix ve ark., 2006](#)).

İntrinsik E3 ubiquitin protein ligaz aktivitesine sahip olan MDM2, p53'ün ekspresyon seviyesini ubiquitin / proteazom bağımlı degradasyonu hedef alarak kontrol altında tutar ([Haupt ve ark., 1997](#); [Honda ve ark., 1997](#); [Kubbutat ve ark., 1997](#)). Barak ve arkadaşları çalışmalarında MDM2'yi p53'ün doğrudan transkripsiyonel hedefi olarak tanımlamışlardır ([Barak ve ark., 1993](#)).

Fonksiyonel olarak aktif p53, DNA hasarının büyüklüğüne ve türüne bağlı olarak hücre döngüsünün tutuklanmasını ve / veya apoptoza yönlendirilmesini indüklemek için hedef genlerin uygun bir setini transaktive eder ([Prives ve Hall, 1999](#); [Sionov ve ark., 2001](#); [Vousden ve Lu, 2002](#); [El-Deiry, 2003](#); [Lacroix ve ark., 2006](#)). p53 aracılı hücre döngüsü tutuklaması, hücrelerin hasar görmüş DNA'yı onarmasını sağlar. DNA tamiri tamamlandığında, hücreler normal hücre döngüsüne yeniden girerler. Buna karşılık, hücrelerde ciddi DNA hasarı meydana geldiyse p53, hasarlı hücreleri ortadan kaldırmak ve böylece hasar gören DNA'nın yeni nesil hücrelere transferini önlemek için pro-apoptotik işlevini uygular. p53 geni genomun bütünlüğünü ve devamlılığını koruma özelliğine sahiptir.

p53 hedefli genler arasında, mitokondriyal proteinleri kodlayanlar oldukça önemlidir, çünkü p53'e bağlı apoptoz mitokondriyal yolak boyunca ilerlemektedir. BAX (Bcl2-ilişkili X proteini) erken p53 yanıt genidir ([Selvakumaran ve ark., 1994](#)). BAX, oldukça korunmuş iki Bcl2 homoloji 1 ve 2 (BH1 ve BH2) domainlerini içerir ve Bcl2 üzerinde baskın-negatif bir etki göstermektedir. Apoptotik uyaranlar üzerine, mitokondri dış zarı üzerinde bulunan BAX, mitokondriyal dış membranın geçirgenliğini arttırmakta ve mitokondriyal ara membrandan sitozole sitokrom c'nin salınımını indüklemektedir ([Green, 2005](#)). Bu şekilde hasarlı hücrenin ortadan kaldırılması için apoptotik süreç başlatılmış olur. Kapsamlı mutasyon araştırmaları,

insan kanserlerinin % 50'sinden fazlasının p53 geninde fonksiyon kaybı mutasyonları taşıdıklarını ortaya koymuştur ([Baker ve ark., 1989](#); [Kelman ve ark., 1989](#); [Nigro ve ark., 1989](#); [Takahashi ve ark., 1989](#); [Hollstein ve ark., 1990](#); [Vogelstein, 1990](#); [Hollstein ve ark., 1991](#); [Vogan ve ark., 1993](#)). Yapılan bir araştırmada p53 eksik farelerde spontan kanserlerin geliştiği saptanmıştır ([Donehower ve ark., 1992](#)). Görülen mutasyonların % 95' inin p53'ün DNA bağlama alanını kodlayan genomik bölgede olduğu tespit edilmiştir ([Vousden ve Lu, 2002](#)). p53'ün transaktivasyon yeteneği pro-apoptotik fonksiyonla sıkı bir şekilde ilişkilidir ([El-Deiry ve ark., 1992](#); [Pietenpol ve ark., 1994](#)). Mutant p53, hasar görmemiş oligomerizasyon domainleri vasıtasıyla yabanıl p53 ile hetero-oligomer oluşturur ve yabanıl tip p53'e karşı dominant-negatif bir inhibitör gibi davranır ([Herskowitz, 1987](#); [1989](#)). Kısa ömürlü yabanıl tip p53'ün aksine, mutant p53 daha uzun ömürlüdür ve onkojenik potansiyele sahiptir ([Crawford ve ark., 1984](#); [Cattoretti ve ark., 1988](#); [Chen ve ark., 1990](#)). p53 mutasyonu taşıyan kanserler bazen kemoterapiye dirençli fenotip gösterirler; bu durum, p53'ün DNA hasar yanıtının düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığını göstermektedir ([Vogelstein ve Kinzler, 1992](#); [Velculescu ve El-Deiry, 1996](#); [Vogelstein ve ark., 2000](#)). Bu nedenle, etkin kemoterapi olarak mutant p53'ün yabanıl tip p53 üzerindeki negatif etkisini ortadan kaldırmak için yeni bir strateji geliştirilmesi oldukça önemlidir.



Şekil 2.2. p53 aracılı apoptotik yolak ([Ozaki ve Nakagawara, 2011](#))

p53 yıllarca tek başına bir gen ürünü olarak düşünülmüştür. Klonlama teknolojilerinin gelişmesi ile Kaghad ve ark. tarafından p73 olarak adlandırılan ilk p53 homologunu tanımlanmıştır ([Kaghad ve ark., 1997](#)). Sonrasında Yang ve ark., tarafından p63 olarak adlandırılan ikinci p53 homologu keşfedilmiştir ([Yang ve ark., 1998](#)). Hücre temelli çalışmalar, p73 ve p63'ün örtüşen p53 hedef gen setini transaktive eden ve aynı zamanda, kanserli hücrelerde hücre döngüsü tutuklanmasını ve / veya apoptotik hücre ölümünü indüklemeye kabiliyetine sahip transkripsiyon faktörleri olarak hareket ettiğini göstermiştir ([Melino ve ark., 2002](#); [Ozaki ve Nakagawara, 2005](#)). p53 gibi p73 ve p63'te DNA hasarı oluşturan maddelere yanıt olarak indüklenmektedir ([Irwin ve ark., 2003](#); [Suenaga ve ark., 2009](#)).

2.1.5.2. Bcl-2 ailesi

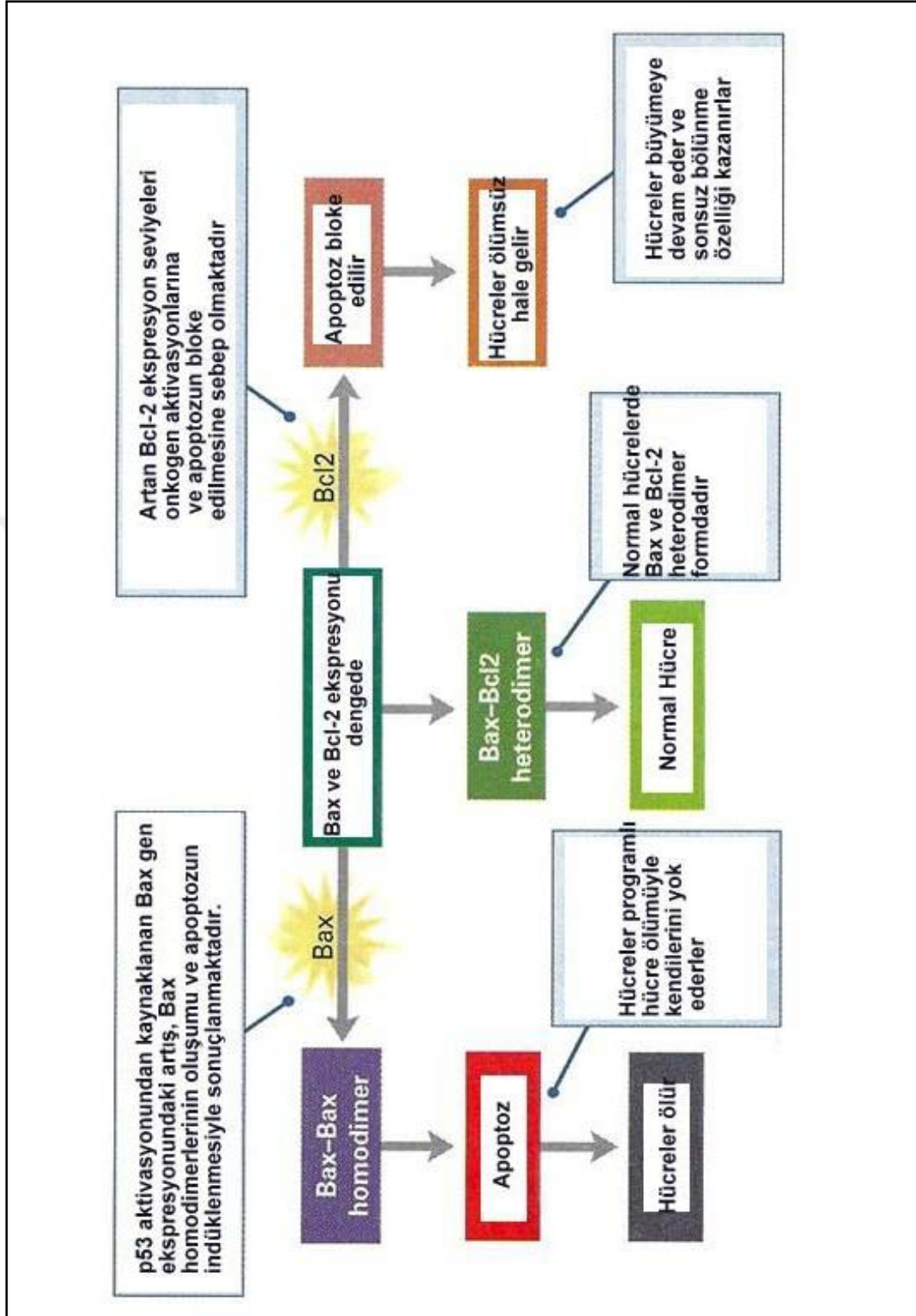
BCL-2 gen bölgesi B-hücresi foliküler lenfomalarında 14. Kromozomda t (14; 18) kromozom translokasyon kırılma noktasında yer alan ve kromozom üzerindeki enhansırlar tarafından indüklenen bir gen bölgesi olarak keşfedilmiştir ([Bakhshi ve ark., 1985](#); [Tsujimoto ve ark., 1985](#); [Cleary ve ark., 1986](#)).

Karsinogenez için yeni bir paradigmayı ortaya çıkartan önemli bir keşif, BCL-2'nin aşırı ekspresyonunun önceden keşfedilen onkogenlerin çoğunun yaptığı gibi hücre proliferasyonunu arttırmadığı ancak BCL-2'nin aşırı ekspresyonunun hücre ölümünü inhibe ettiği ortaya konmuştur ([Vaux ve ark., 1988](#)).

Bcl-2 ailesi üyeleri programlanmış hücre ölümü/apoptozisi düzenlemekle görevlidir. BCL-2 ailesi üyeleri klasik olarak üç gruba ayrılmıştır. Birinci grup, apoptozu inhibe eden genlerden oluşmaktadır. Bunlar; BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL1, BCL-B (BCL-2L10) ve A1 (BCL-2A1) gen bölgeleridir. İkinci grup apoptoza yönlendiren, proapoptotik genlerden oluşmaktadır. En bilinen üyeleri, BAX, BAK ve BOK (MTD) gen bölgeleridir. Üçüncü grup ise sadece BH-3 domaini bulunduran genler olan; BAD, BIK (BLK/ NBK), BID, HRK (DP5), BIM (BOD), BMF, NOXA ve PUMA (BBC3) 'dan oluşmaktadır. Bu grupta bulunan genler korunmuş BH-3 domaini sayesinde apoptozu teşvik etmek için anti-apoptotik BCL-2 proteinlerine bağlanma ve düzenleme yapabilmektedirler. Pro-apoptotik aile üyeleri BAX ve BAK dış mitokondriyal membranın permeabilizasyonunu arttırmada ve ardından kaspaz aktivasyonunu sağlayan apoptojenik moleküllerin (sitokrom c ve DIABLO (SMAC olarak da bilinir) salınmasında önemli role sahiptirler.

BCL-2 ve BCL-XL gibi anti-apoptotik aile üyeleri, BAX ve BAK'ı inhibe eder. Yapılan araştırmalar, sadece BH-3 domaini bulunduran proteinlerin, BCL-2 ve diğer anti-apoptotik aile üyelerinin inhibisyonu ile apoptozu tetiklediğini göstermektedir ([Willis ve ark., 2007](#)). Bununla beraber, BH-3 domaini bulunduran bazı proteinlerinde (özellikle BIM, tBID ve PUMA) BAX ve BAK'ın direkt aktivasyonunu sağladığı rapor edilmiştir ([Youle, 2007](#)).

BAX ve BAK mitokondriye etki ederek kaspaz aktivasyonunu teşvik ederler. Bu iki proapoptotik BCL-2 ailesi üyesi iç ve dış mitokondri membranları arasından proteinlerin salınmasını direkt veya dolaylı olarak indüklemektedir ([Newmeyer ve Ferguson-Miller, 2003](#)). Sonrasında bu süreç sitokrom c ve diğer çözünebilen proteinlerin sitoplazmaya salınması ile devam eder. Mitokondri dış membranının geçirgenlik kazanması ile çözünebilen proteinler ara membrandan sitozole geçerler ve burada kaspaz aktivasyonunu teşvik ederler. Bu proteinlerden en çok çalışılan APAF'a bağlanarak, prokaspaz 9'ı bağlayabilen ve konformasyonel bir değişimle aktive eden apoptozom yapısının oluşumuna öncülük eden sitokrom c 'dir ([Wang, 2001](#); [Shi, 2006](#)). BCL-2 proteini, hücrenin ölümsüzlük veya programlanmış hücre ölümü (apoptoz) arasında dengesini sağlamak için BAX proteini ile birlikte hareket eder. Aşırı BAX varlığında hücre apoptoza yönlendirilirken, aşırı BCL-2 varlığında, hücre ölümsüz hale dönüşebilir. Normal hücrelerde, iki gen ürünü dengede bulunur ve BAX / BCL-2 heterodimerleri oluşur. Bu heterodimer yapısı, apoptozu teşvik eden BAX / BAX homodimerlerinin ve ölümsüzlüğü sağlayan BCL-2'nin aktivasyonunu önlemektedir ([Werner-Washburne ve Szauter, 2013](#)).

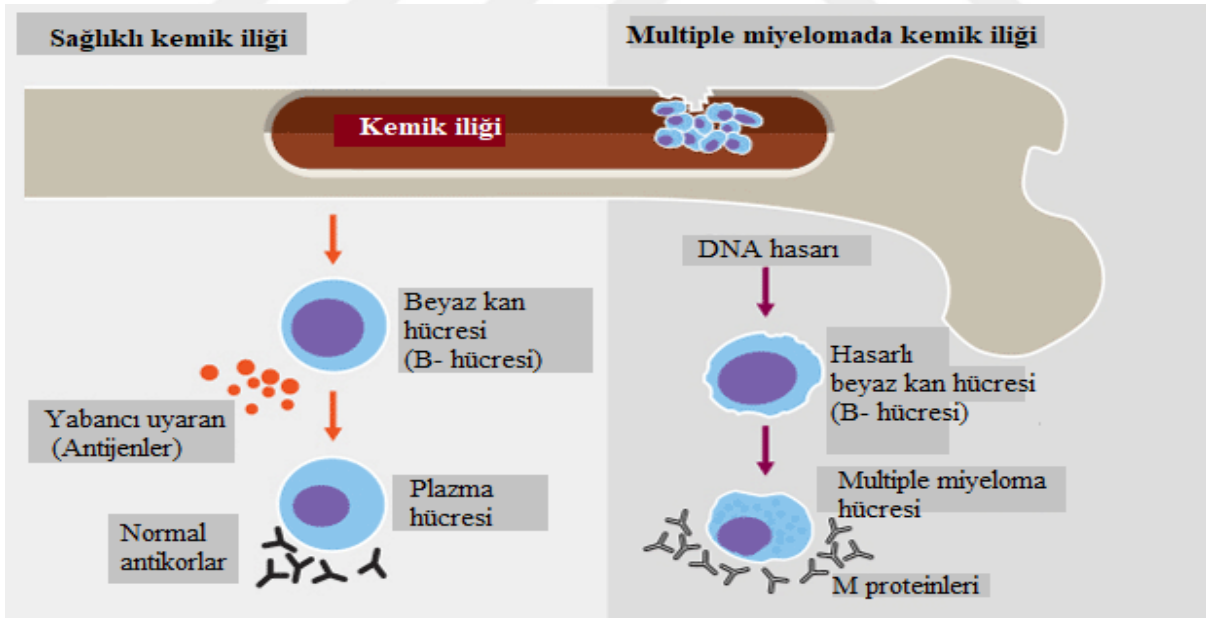


Şekil 2.3. Apoptoz ve BCL-2 ailesi arasındaki ilişki (Werner-Washburne ve Szauder, 2013)

2.2. Multipl Miyelom

Multipl miyelom (MM) kemik iliğindeki malign monoklonal B-lenfositlerin genişlemesi ile karakterize, genellikle ilerleyici kemik lezyonlarına yol açan, tedavi edilemez bir hematolojik malignitedir. Multipl miyelom (MM) hastalığı, kemik iliğinde ortaya çıkan habis plazma hücrelerinin kontrolsüz çoğalması ile tanınır ve genellikle önceden belirlenemeyen önemi olan monoklonal gammopati (MGUS) olarak adlandırılan premalign bir evre ile başlamaktadır.

MM, yavaş yavaş büyük ölçüde immüoglobülinlerin ve osteolitik lezyonların üretilmesiyle, esasen kemik iliğindeki bu tümör hücrelerinin çoğalması ile bilinmektedir. Miyelomda, antikör üreten normal plazma hücreleri kötü huylu miyelom hücrelerine dönüşür. Miyelom hücreleri, çok miktarda, monoklonal (M) proteini denenen bir antikör (veya immüoglobulin) üretir. Bu kötü huylu hücreler, kemik iliğindeki normal kan hücrelerine ve antikorlara yer bırakmaz ve üretilmelerini engeller. Ayrıca, miyelom hücre grupları kemiğin katı kısmının kemik iliğindeki diğer hücreler tarafından ortadan kaldırılmasına ve osteolitik lezyonların veya kemikte yumuşak noktaların oluşmasına neden olmaktadır.



Şekil. 2.4. Sağlıklı kemik iliği ve multipl miyelomda kemik iliği (Ratain ve ark., 1997)

Multipl miyelom epidemiyolojik olarak, lenfomadan sonraki ikinci en sık rastlanan hematolojik kanser türüdür. 2013 yılında ABD'de 20.450 yeni MM tanısı konmuş ve 11.090 vakanın yaşamını yitirdiği rapor edilmiştir. Son istatistikler MM'li hastaların 5 yıllık sağkalım oranının hala % 42 olduğunu göstermektedir ([Siegel ve ark., 2013](#)). İleri yaş hastalığı olup ortalama tanı yaşı yaklaşık olarak 65 olarak belirlenmiştir. Hastalık insidansı 5.7/100.000, yıllık yeni vaka sayısı 27.500 olarak bildirilmiştir ([Silvestris ve ark., 2007](#)). Miyelom erkeklerde kadınlardan daha fazla görülmektedir.

MM insidansı Afrika kökenli Amerikalılar ve beyaz ırkta en yüksek iken Asyalılarda en düşük seviyededir. Yaş, miyelom için en büyük risk faktörüdür; MM'li hastaların % 55'inden fazlası 60 yaşında veya daha yaşlıdır; 40 yaşın altındaki hastalarda MM'nin görülme oranı % 3'ten azdır ([Bataille ve Harousseau 1997](#)). Yeni tedavilerin klinik uygulamaya girmesi hastalıkta sağ kalım oranını arttırmaktadır. Hastalık globulin düzeyinde artış, hiperkalsemi, miyelom bağlı böbrek yetersizliği ve litik kemik lezyonu gelişimi ile sonuçlanan malign plazma hücre klonal ekspansiyonu ile karakterizedir Hastaları hekime götüren şikâyetler; anemiye ait semptomlar, enfeksiyona yatkınlık ve litik kemik lezyonlarına bağlı şiddetli ağrı gibi durumlardır.

MM, agresif ve şu an için tedavi edilemez, sistemik bir hastalıktır. Epidemiyolojik veriler hem hastalığın görülme sıklığının arttığını hem de hastalığın başlangıç yaşının daha erken yaşlara indiğini göstermektedir. Sistemik terapiler ve yeni maddeler tek başına veya diğer maddelerle birlikte bu bozukluğun tedavisi için gereklidir. MM tedavisinde muazzam ilerlemeler olmasına rağmen, tedavi edilemez bir hastalık olmaya devam etmektedir. MM tedavisinin geçmişi 1960'lı yıllara dayanmaktadır. Hastalarda başlangıçta tedaviye cevap alındığı halde tekrar nüksettiği bilinmektedir. Anjiogenez plazma hücre proliferasyonunu hızlandırarak MM kütesinin genişlemesini desteklemektedir. Miyelom plazma hücreleri, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF2), matriks metalloproteinaz-2 ve -9 (MMP-2 ve MMP-9) salgılanması yoluyla anjiyogenezi indükler ([Vacca ve Ribatti, 2006](#)).

MM'nin ölümcül sonuçları, malign plazma hücrelerinde apoptozu seçici olarak indükleyen biyolojik temelli tedavi stratejilerinin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır ([Feinleib ve Macmahon, 1960](#); [Alsina ve ark., 1996](#)).

Multipl miyelom tedavisinde Vinka alkaloidlerinden biri olan vinkristin ve doxorubisin ve deksametazon ile kombine olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, terapiye bağılı miyelodisplastik sendromlar gibi sekonder hematolojik malignitelerin gelişme riskinin arttığı gösterilmiştir. Yüksek doz kemoterapiyi hemopoiyetik kök hücre transplantasyon desteği ile birleştiren alternatif terapötik stratejiler, genç hastalarda yaşlılara göre daha etkilidir. Dolayısıyla, MM'nin tüm yaş gruplarında etkin tedavisi için yeni terapötik ajanların geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır ([Cuendet ve ark., 2004](#); [Dispenzieri ve Kyle, 2005](#); [Ishii ve ark., 2006](#); [Ding ve ark., 2014](#)).

Mevcut kemoterapötik tedaviler ve otolog transplantasyon ile hastaların genel sağkalımında bir iyileşme görülmesine rağmen, MM halen tedavi edilemez bir hastalıktır ve ortalama sağ kalım süresi sadece üç yıldan beş yıla kadardır ([Rajkumar ve Kyle, 2005](#)). Bu nedenle, kanserli MM hücrelerinin hedef alınmasına ve seçici şekilde öldürülmesine izin veren bir yaklaşım son derece arzu edilir olmaya devam etmektedir ([Gullo ve ark., 2010](#)).

2. 3. Kanser Tedavisinde Bitkilerin Kullanımı

Şifalı bitkiler, binlerce yıldır çeşitli hastalıkları önlemek ve tedavi etmek için kullanılmaktadır. Aynı zamanda modern ilaçların keşfi ve gelişimi de şifalı bitkilere dayanmaktadır ([Saklani ve Kutty, 2008](#)). Kanser tedavisinde bitkilerin kullanımı çok eski zamanlara kadar uzanır. Gıda, meyve, baharat ve sebzeler gibi çeşitli bitki türlerinin kanser önleme özelliklerine dair güçlü kanıtlar mevcuttur ([Lyman, 1992](#); [Montesano ve Hall, 2001](#); [Moyad ve Carroll, 2004](#); [Kruk, 2007](#); [Dossus ve Kaaks, 2008](#)).

Kanser hastalarını tedavi etmek için bitkisel preparatların kullanımı, Ortadoğu, Avrupa, İsrail ve diğer gelişmiş ülkelerde önde gelen yöntemlerden biridir. En son Dünya Sağlık Örgütü raporlarına göre, geleneksel bitki tedavilerinin gelişmiş ülkelerde de çok tercih edildiği ve bitkisel kökenli preparatların kullanım oranlarının Belçika (% 31), Avustralya (% 48), Fransa (% 49), Kanada (% 70) ve Almanya'da (% 77) olduğu görülmüştür ([WHO, 2017](#)). Son yirmi yılda kullanılan ham ilaçların % 25'i bitkisel kaynaklıdır ve biyoaktif bileşikler açısından sadece % 5-15'i araştırılmıştır. Yapılan son anketlere göre standart kanser tedavilerinde görülen başarısızlıklar yanında bitkisel preparatların nispeten düşük toksik veya toksik olmayan anti-tümör özellikleri ve tedavi yöntemlerinin yan etkilerini en aza indirmeleri, kanser tedavisinde fitokimyasal kullanımını ön plana çıkarmaktadır ([Ahmad ve ark., 2017](#)).

Kanser hücrelerine karşı izlenmesi gereken iki önemli yol vardır: bunlardan biri tümör hücre çoğalmasını inhibe etmek (sitostatik etki), diğeri ise tümör hücrelerinin ölümünü indüklemek (sitosidal etki)'tir ([Kovacs, 2010](#)). Kanser terapisinde asıl hedeflenen tümör hücrelerinde apoptozun indüklenmesidir. Bu nedenle güçlü ve selektif etki gösteren, potansiyel terapötik anti tümör ilaçların geliştirilmesi oldukça önemlidir.

Özellikle meyve ve sebze ağırlıklı beslenme alışkanlıkları, kanser riskini azaltan çeşitli koruyucu önlemlerin geliştirilmesine büyük katkı sağlamaktadır ([Kurhashi ve ark., 2009](#); [Wu ve ark., 2009](#)). Meyve ve sebzelerde bulunan çeşitli fitokimyasallar potansiyel antikanser veya kemopreventif etkinlikleri açısından incelenmektedir ([Ramos, 2008](#)). Herhangi bir yan etki yaratmayan zengin vitamin, mineral ve lif kaynağı olan, meyve ve sebzeler, kanser riskini düşürmek ve aynı zamanda genel sağlık durumunu korumak için en iyi seçenek haline gelmiştir.

Bitkiler, kanserin temel nedeni olan ve yaşlanma, genetik yatkınlık ve kanserojen ürün çeşitlerine maruz kalma sonucu ortaya çıkan DNA hasarına karşı kullanılmaktadır.

Serbest radikaller ve farklı toksinler, DNA ile etkileşim yoluyla kanser gelişiminde ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır. Bitkilerde bulunan çok sayıda fitokimyasal, kansere karşı potansiyel olarak güçlü koruyucu ajanlar olarak kullanılmaktadır. Etkileri vücuttaki zehirli kimyasalların aşırı üretimini önleyerek, vücudun detoksifikasyon süreçlerini iyileştirmek olarak ortaya çıkmaktadır. Bitkiler sadece kanser gelişim riskini azaltmakta değil aynı zamanda kanser için etkili tedaviler olarak da kullanılmaktadır. Bitkisel preparatlar radyoterapi ve kemoterapi gibi geleneksel kanser tedavilerinin olumsuz yan etkilerini en aza indirmektedir. Yenilebilir sebzeler, meyveler, baharatlar ve tam tahıllar, içerdikleri önemli miktarda sağlığa faydalı biyoaktif fitokimyasal sayesinde temel beslenmenin ötesinde kronik hastalık ve karsinogenez riskini azaltmada rol oynarlar ([Liu, 2004](#)).

Çoğu kanser türünü tedavi etmek için tam olarak etkili ilaçlar mevcut değildir. Yüksek oranda etki gösteren aynı zamanda düşük toksisiteye sahip ve sadece uygulandığı bölgede etkisi olan yeni ilaçların geliştirilmesi gereklidir ([Cai ve ark., 2004](#)). Bitkilerden elde edilen doğal bileşikler kanserin önlenmesi ve tedavisinde önemli rol oynamaktadır. Günümüzde klinik tedavilerde kullanılan önemli sayıda antitümör ajan doğal kaynaklıdır.

Kanser tedavisi için tıbbi bitki ekstraktlarının kullanımı, hızla gelişmekte olup, bu ekstraktların yan etkileri sınırlıdır veya hiç yoktur. Ekstraktlarda bulunan aktif bileşenlerin, çok aşamalı karsinogenez sürecini sinerjistik bir şekilde etkili bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Bitki veya tıbbi bitki özlerinden türetilmiş potansiyel anti-kanser aktivitesine sahip bileşenlerin tanımlanması ve karakterizasyonu oldukça önemlidir ([Prasad ve ark., 2011](#)).

Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından, bugüne kadar yapılan çalışmalara dayanarak kanser önleyici özelliklere sahip yaklaşık 40 yenilebilir bitki türü tespit edilmiştir ([Aggarwal ve Shishodia, 2006](#)). Meyveler, sebzeler, tahıllar ve diğer bitkilerde çoğunlukla fenolik, karotenoid, vitaminler, alkaloidler, azot içeren bileşikler ve organosülfür bileşikler olarak sınıflandırılan 5,000'den fazla fitokimyasalın tespit edildiği tahmin edilmektedir. Fitokimyasalların büyük yapısal çeşitliliği arasında fenolik bileşikler, geniş çeşitlilikteki biyoaktiviteleri açısından büyük ilgi çekmiştir ([Han ve ark., 2007](#)). Doğal fenolik bileşikler, kanserin önlenmesi ve tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalar birçok fenolik bileşiğin az veya çok antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ve antikanser veya antikarsinogenik / antimutagenik, antiaterosklerotik, antibakteriyel, antiviral ve anti-inflamatuar etkinliklere sahip olduğunu göstermiştir ([Owen ve ark., 2000](#); [Veeriah ve ark., 2006](#); [Báidez ve ark., 2007](#); [Han ve ark., 2007](#)).

Fenolik bileşiklerin çeşitli biyoaktiviteleri, kemopreventif özelliklerinden (örn., antioksidan, antikarsinojenik veya antimutagenik ve anti-inflamatuar) kaynaklanmaktadır ve bu bileşikler hücre döngüsünü durdurarak, kanserojen metabolizmasını düzenleyerek ve ontogenez ifadesini düzenleyerek, DNA bağlanmasını, hücre adezyonunu, migrasyonunu, proliferasyonu veya farklılaşmasını inhibe ederek ve sinyal mekanizmalarını bloke ederek apoptozun başlamasına katkıda bulunurlar ([Huang ve ark., 2010](#)).

Kanser tedavisinde kullanılan, Paclitaxel ([Wani ve ark., 1971](#)), kamptotesin ([Wall, 1998](#)), combrestatin ([Cirla ve Mann, 2003](#)), epipodofilotoksin ([Canel ve ark., 2000](#)) ve Vinka alkaloidleri (vinblastin, vinkristin) ([Johnson ve ark., 1963](#)) bitkisel kökenli kanser tedavilerinin bazı örnekleridir.



2.3.1. Anti-Kanser Aktiviteye Sahip Bitkisel Bileşikler

2.3.1.1. Fenolik asitler ve Analogları

Fenolik asitler, fenolik bileşiklerin başlıca sınıfı olup, bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır ([Cai ve ark., 2004](#)). En bilinen fenolik asitler, hidroksibenzoik asitler (örneğin, gallik asit, p-hidroksibenzoik asit, protokateşuik asit, vanilik asit ve şiringik asit) ve hidroksisinnamik asitler (örneğin, ferulik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, klorojenik asit ve sinapik asit) dir ([Cai ve ark., 2006](#)).

Ferulik asit, kafeik asit, p-kumarik asit birçok tıbbi bitkide, baharatlarda meyve ve sebzelerde bulunmaktadır ([Cai ve ark., 2004](#)). Klorojenik asitler kafeik asitlerin esteridir ve özellikle elma ve patateslerde kahverengileşmeye neden olan enzimatik oksidasyon için bir substrat görevi görürler. Ayrıca, klorojenik asidin, özellikle tıbbi bitkiler içerisinde en çok *Apocynaceae* ve *Asclepiadaceae* türlerinden elde edilen önemli bir fenolik asit olduğu rapor edilmiştir ([Huang ve ark., 2008](#)).

Fenolik asitler ve analogları, kanser önlemede rol oynayabilecek geniş biyoaktiviteye sahiptir. Çoğu fenolik asit antioksidan kapasiteye sahiptir ve fenolik asitlerin radikal süpürme kabiliyeti, moleküllerdeki hidroksil gruplarının ve metoksi ikame edicilerinin sayısına ve konumuna bağlıdır ([Cai ve ark., 2006](#)). Ek olarak, fenolik asitler ve analogları, tümör hücrelerini inhibe edebilir ve hücre döngüsü tutuklamasını indükleyerek, sinyal iletim yollarını düzenleyerek, bazı enzimleri indükleyerek ve/veya inhibe ederek ve detoksifikasyonu arttırarak apoptozu indükleyebilirler. Bazı fenolik asitler ve analogları ayrıca antibakteriyel, antifungal, antiviral, antimutagenik ve anti-inflamatuar etkinliklere sahiptirler ([Chaubal ve ark., 2005](#); [Larrosa ve ark., 2006](#); [Han ve ark., 2007](#); [Raghavendra ve ark., 2007](#); [Silici ve ark., 2007](#)). Sinnamik asit, rosmarinik asit, gingerol, paradol ve hidroksitirazol gibi birçok fenolik asit ve analogu anti-inflamatuar etkilere sahiptir ve bağışıklık fonksiyonlarını artırmaktadır ([Fresco ve ark., 2006](#)). Hem klorojenik asit hem de kafeik asit antioksidan özellik gösterir ve in vitro olarak mutajenik ve karsinojenik N-nitrozo bileşiklerinin oluşumunu inhibe eder ([Han ve ark., 2007](#)).

Klorojenik asit aynı zamanda DNA tek iplik kırılmalarının oluşumunu engelleyebilir ([Takahama ve ark., 2007](#)). Ayrıca, üzüm ekstraktı ve şaraplarında bulunan bazı fenolik asitlerin (kafeik asit, ferulik asit, gallik asit, protokateşuik asit vb.) meme, akciğer ve gastrik kanser gibi çeşitli kanser türlerine karşı etkili oldukları rapor edilmiştir ([Ren ve ark., 2003](#); [Stagos ve ark., 2006](#)).

2.3.1.2. Flavonoidler

Flavonoidler, bitkilerde doğal olarak bulunan 4.000'den fazla fenolik bileşikten oluşan bir gruptur ([Ren ve ark., 2003](#)). Doygunluk seviyesine ve merkezi piran halkasının açılmasına göre, temel olarak flavonlar, flavonoller, flavanonlar ve flavanonoller, flavanoller antosiyaninler, kalkonlar izoflavonoidler, neoflavonoidler ve biflavonoidler olarak sınıflandırılırlar ([Iwashina, 2000](#); [Ren ve ark., 2003](#); [Cai ve ark., 2004](#); [Cai ve ark., 2006](#)). Farklı flavonoid türleri pratik olarak meyve ve sebzeler gibi besin olarak tüketilen bitkilerde ve şifalı bitkilerde bulunmaktadır ([Cai ve ark., 2003](#); [Cai ve ark., 2004](#); [Bao ve ark., 2005](#); [Shan ve ark., 2005](#); [Cai ve ark., 2006](#); [Surveswaran ve ark., 2007](#); [Huang ve ark., 2008](#); [Huang ve ark., 2010](#)).

En yaygın flavonlar, luteolin, apigenin, baicalein, chrysin ve glikozitleri (örn. Apigenin, vitexin ve baicalin), **Labiatae**, **Asteraceae** ve yakın akrabalarında örneğin, *Scutellaria baicalensis* Georgi köklerinde, *Chrysanthemum morifolium* Ramat. çiçek durumlarında (infloresens) ve *Artemisia annua* L.'nin toprak üstü kısımlarında bulunmaktadır. Quercetin, kaempferol, mirsetin, morin, galangin ve bunların glikozitleri (örneğin, rutin, quercitrin ve astragalin) baskın flavonollardır. Flavonollar antikanser özelliği bilinen birçok şifalı bitki örneğinde, örneğin *Sophora japonica* L. ve *Rosa chinensis* Jacq.'in çiçeklerinde, *Artemisia annua*'nın toprak üstü kısımlarında, *Alpinia officinarum*'un rizomlarında ve *Crataegus pinnatifida*'nın meyvelerinde (alıç) gibi bulunmaktadır ([Cai ve ark., 2004](#); [Shan ve ark., 2005](#)).

Naringenin, hesperetin, eriodictyol ve bunların glikosidleri (örn. Naringenin, hesperidin ve likiritin) ve flavanonoller (taxifolin) gibi flavanonlar çoğunlukla narenciye (portakal, limon ve aurantium), üzüm ve **Rutaceae**, **Rosaceae**, **Leguminosae** türlerinde bulunmaktadır ([Ren ve ark., 2003](#); [Cai ve ark., 2004](#)). Yaygın olarak bilinen flavanoller örneğin; kateşin, epikateşin, epigallokateşin, epikateşin gallat (ECG) ve epigallokateşin gallat (EGCG), şifalı bitkilerde ve diyet bitkilerinde (örneğin, çay, elma, çilek ve kakao) geniş çapta bulunmaktadır ([Ren ve ark., 2003](#); [Fresco ve ark., 2006](#)). Antosiyaninler, antosiyanidinler (örn., siyanidin, delphinidin, malvidin, peonidin, pelargonidin, vb.) ve bunların glikozitlerini içermektedir. Antosiyaninler, *Prunella vulgaris* çiçek durumları ve *Rosa chinensis* çiçekleri gibi şifalı bitkilerde yaygın olarak bulunurlar ([Cai ve ark., 2004](#)).

Kalkonlar (örn., butein, filoretin, sappan kalkon, kartamin, vb.) *Rhus verniciflua*, *Caesalpinia sappan* ve *Carthamus tinctorius* gibi tıbbi bitkilerde bulunmaktadır. Daidzein, genistein, glisitin, formononetin ve bunların glikozitlerini (örn., genistin, daidzin) içeren

izoflavonlar grubu çoğunlukla soya fasulyesinden, baklagillerden ve kırmızı yoncadan ve aynı zamanda **Leguminosae** familyasından *Astragalus mongholicus*'un köklerinde bulunmaktadır ([Cai ve ark., 2004](#); [Cai ve ark., 2006](#)).

Genel olarak flavonoidler, geniş bir yelpazede reaktif süpürücü (örn., Hidroksil radikalleri, peroksil radikalleri, hipokloröz asit ve süperoksit radikalleri) özellikleri ile in vitro olarak güçlü antioksidan etkiye sahiptirler ve kanser de dahil olmak üzere birçok büyük kronik hastalık riskini azaltmakla bağlantılıdır (Hollman ve Arts, 2000). Daha fazla hidroksil grubu ihtiva eden flavonoller, çok yüksek radikal temizleme etkinliği sergiler; örneğin, mirsetin, quersetin, rutin ve quercitrin iyi bilinen antioksidanlardır. Flavonoidler, kanserojen metabolik aktivasyonu engelleme, hücre döngüsünü durdurarak apoptozu başlatma, farklılaşmayı teşvik etme, çoklu ilaç direncini modüle etme ve proliferasyonu ve anjiyogenik süreci inhibe etme gibi işlevleri üstlenirler (Hollman ve Arts, 2000; Ahmad ve ark., 2006; Tsuji ve Walle, 2006; Shih ve ark., 2007).

Genistein, luteolin, quercetin, EKG, EGCG ve silmarinin yanı sıra apigeninde antianjiyogenik ve antimitotik özellikler göstermektedir (Johnson, 2007).

İnsan pro-myelositik HL-60 lösemi hücre hattında genistein kaynaklı apoptoz indüksiyonu, flow sitometrik analizler kullanılarak tespit edilmiştir. Genistein tirozin kinazları ve anjiyogenezisi engelleyerek hücre döngüsünü G2 / M fazında durdurur (Wheat ve Currie, 2008).

Quercetin en güçlü antioksidanlardan biridir ve in vitro veya in vivo antioksidan, anti-inflamatuar, antiproliferatif veya apoptotik etkilere sahiptir. Moleküler düzeyde, quercetin, hücre döngüsünün, proteinlerin, onkogenlerin ve antionkogenlerin modülasyonu yoluyla bir anti-kanser ajanı olarak görev yapmaktadır (Levy ve ark., 1984). Quercetin sitoplazmaya sitokrom- c salınımı ve kaspaz 9'un aktive edilmesi vasıtasıyla apoptozu indüklemektedir (Taraphdar ve ark., 2001).

2.3.1.3. Tanenler

Tanenler, moleküler ağırlıkları değişkenlik gösteren, doğal, suda çözünebilen, polifenolik bileşiklerdir. Genellikle hidrolizlenebilir tanenler (gallo- ve ellagi-tanenler) ve yoğunlaştırılmış tanenler (proantosiyanidinler) olarak 2 sınıfa ayrılırlar ([Cai ve ark., 2004](#)).

Tanenler, diyet bitkilerinde ve şifalı bitkilerde geniş çapta bulunan bir polifenol sınıfıdır. Üzüm çekirdeğinde, kabuğunda ve çam kabuğunda yaygın olarak bulunan oligomerik proantosiyaninler, en güçlü antioksidanlar olarak kabul edilir ve sağlık alanında özellikle kanser tedavisinde sıklıkla kullanılırlar ([Huh ve ark., 2004](#)).

Birçok meyve (elma suyu, çilek, narenciye, nar, ceviz, şeftali, böğürtlen, zeytin ve erik), sebzeler (örneğin nohut, kara bezelye, mercimek ve fasulye) ve baharatlar (karanfil ve tarçın) yüksek düzeyde proantosiyanidin veya elagitannin içermektedir ([Shan ve ark., 2005](#); [Han ve ark., 2007](#)). *Euphorbia hirta*, *Glycyrrhiza glabra* ve *Rhus succedanea*'da bazı gallotanninler tespit edilmiştir. *Terminalia chebula* meyvelerinden ve *Punica granatum* kabuklarından birçok elagitannin (örn., corilagin, casuarictin) izole edilmiştir. *Camellia sinensis* ve *Areca catechu* sırasıyla proantosiyanidinleri ve lökoantosiyanidinleri içermektedir. Bazı bitki türleri (örn., *Acacia catechu*, *Salvia officinalis*, *Rosa chinensis* ve *P. granatum*) hem hidrolize edilebilir hem de yoğunlaştırılmış tanenler içeren kompleks karışımlar üretebilirler ([Cai ve ark., 2004](#); [Surveswaran ve ark., 2007](#)).

Hidrolize edilebilir tanenler ve yoğunlaştırılmış tanenler birçok hidroksil grubuna özellikle birçok orto-dihidroksil veya galloil gruplarına sahip olmaları nedeniyle güçlü antioksidan ajanlardır. Büyük tanin molekülleri daha fazla galloil ve orto-hidroksil grubuna sahiptir ve etkileri daha güçlüdür ([Cai ve ark., 2006](#)). Buna ek olarak, bu taninler aynı zamanda güçlü antibakteriyel, antiülser, anti-inflamatuar, antitümör, enzim düzenleyici, sinyal iletim yollarını bloke edici ve apoptotik etkiler sergilerler. Bu nedenle, kanser tedavisi için oldukça dikkat çekicidirler ([Nomura ve ark., 2005](#); [Larrosa ve ark., 2006](#); [Joanisse ve ark., 2007](#); [Souza ve ark., 2007](#)).

Örneğin, gallotannin, kolon kanseri dâhil olmak üzere birçok hayvan modelinde antikanserojenik aktiviteler göstermiştir. *Terminalia arjuna* L. (*Combretaceae*) kabuğundan izole edilen hidrolize edilebilir bir tanen olan casuarinin, insan göğüs adenokarsinom hücrelerinde, G0 / G1 evresindeki hücre döngüsü ilerlemesini bloke ederek ve apoptozu indükleyerek hücre proliferasyonu inhibe edebildiği rapor edilmiştir ([Kuo ve ark., 2005](#)).

2.3.2. FDA onaylı bitki kaynaklı antikanser ajanlar

Klinik olarak kullanılan bitki kökenli antikanser ajanlar dört gruba ayrılmaktadır. Bunlar; Vinca alkaloidleri, taksanlar, podofilotoksin ve kampoteşinlerdir ([Balunas ve Kinghorn, 2005](#)).

2.3.2.1. Vinca alkaloidleri

İlk antikanser ajanlardan olan *Vinca* alkaloidleri Vinblastin (VBL) and Vincristin (VCR) 1960 yılında klinik olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu bitkisel kompleksler *Catharanthus roseus* G. Don. (*Apocynaceae*) türünden izole edilmiştir ([Jordan, 2002](#); [Cragg ve Newman, 2005](#)).

Vinca alkaloidlerinin anti tümör mekanizmaları, mikrotübüllerin oluşumunu engelleyerek tübülün etkileşimi ve parçalanması yoluyla hücre bölünmesinin sona ermesi şeklinde ortaya çıkmaktadır ([Duflos ve ark., 2002](#)). Mikrotübüller, hücre iskeletinin vazgeçilmez bileşenleri olup, hücre içi organel transportu, hücre göçü, hücre sinyali ve mitoz gibi ökaryotik hücresel fonksiyonlarda önemli rol oynamaktadır ([Perez, 2009](#)). Mikrotübüllere müdahale edebilen ilaçlar hücre döngüsünü durdurabilir ve apoptozun indüksiyonu yoluyla hücre ölümüne neden olabilir ([Islam ve Iskander, 2004](#)). Vinblastin meme kanseri, Hodgkin Lenfoma ve Kaposi sarkomunun tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Vinkristin, çoğunlukla multipl miyelom tedavisinde diğer kemoterapötik maddelerle birlikte kullanılan bir kemoterapötik maddedir. Vinkristin tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder ve CCS bloklayıcı olarak mitotik iğ ipliği oluşumunu bloke eder ve hücre döngüsünü G2 / M fazında durdurur ([El Alaoui ve ark., 1997](#); [Lin ve ark., 1998](#); [Mastbergen ve ark., 2000](#); [Harmsma ve ark., 2004](#)). Vinkristin, akut lenfoblastik lösemi, non Hodgkin Lenfoma, Hodgkin Lenfoma ve Wilms tümörü tedavisinde de kullanılmaktadır. Vinorelbin ise, küçük hücreli akciğer kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapötiktir.

2.3.2.2. Taksanlar

Taksanlar günümüzde kullanılan en etkili anti tümör ajanları olarak düşünülmektedir. Çeşitli klinik deneyler ve deneysel araştırmalar, yan etkilerine ve sudaki düşük çözünürlüklerine rağmen taksanlar, meme, yumurtalık, akciğer ve diğer metastatik kanserleri tedavi etmek için ilk tercih edilen ilaçlar olduklarını göstermektedir.

Taksanlar, Paclitaxel (Taxol) ve Docetaxel (Taxotere) ve taksan homologları *Taxus brevifolia*'dan elde edilmiştir. 1971 yılında yapılan bir çalışmada bitkiden elde edilen ekstraktın tümör hücreleri üzerinde önemli sitotoksik etkileri olduğu gösterilmiştir ([Wheat ve Currie, 2008](#)). Bu bitkisel kompleksin etki mekanizması 1979 yılında keşfedilmiştir. Bu bitkisel ilaç meme kanseri ve yumurtalık kanseri ve Kaposi sarkomunu tedavi etmek için kullanılmıştır.

Vinca alkaloidleri gibi taksanlarda mikrotübül fonksiyonlarına müdahale ederek etki etmektedir. Taksanlar, mikrotübüllerin depolimerizasyonunu engellerler, diğer bir deyişle, taksanlar, mitozu metafaz ve anafazda durdurarak hücre proliferasyonunu engeller. Vinca alkaloidleri ve taksanlar bazen iğ zehirleri olarak adlandırılır; bunların her biri farklı mekanizmalar yoluyla hareket eder ([Hagiwara ve Sunada, 2004](#)).

2.3.2.3. Podofilotoksinler ve Kampoteşinler

Hint podofillum (*Podophyllum peltatum* L.) köklerinden ekstrakte edilen epipodofilotoksin, podofilotoksin ailesinin bir izomeridir. Etoposid ve teniposid epipodofilotoksinin iki aktif ve yarı-sentetik bileşenidir. Bu tür bileşenler hücrede topoizomera II'yi baskırlar. Etoposid, koryokarsinom, akciğer kanseri, yumurtalık ve testis kanserleri, lenfoma ve akut miyeloid lösemi tedavisinde kullanılan FDA onaylı bir bileşendir. Teniposid ise daha çok merkezi sinir sistemi tümörleri, lenfoma ve mesane kanserlerinde kullanılmaktadır ([Shoeb ve 2006](#); [Nobili ve ark., 2009](#)).

Kamptoteşinler, *Camptotheca acuminata*, *Ophiorrhiza pumila* veya *Mapia foethida*'dan izole edilen alkaloidlerdir. Kamptoteşin, DNA topoizomera I'i inhibe eder. Kamptoteşin, topotekan ve irinotekanın yarı sentetik analogları klinik olarak kullanılır. Topotekan, yumurtalık ve küçük hücreli akciğer kanserlerinin tedavisinde, irinotekan ise kolorektal kanser tedavisinde kullanılmaktadır ([Oberlies ve Kroll, 2004](#); [Balunas ve Kinghorn, 2005](#)).

2.3.3. Multipl miyelom ve bitkisel yaklaşımlar

Fitokimyasallar, yarım yüzyılı aşkın süredir, multipl miyelomda kemoterapinin etkinliğini arttıran yeni kemoterapi yardımcı maddeleri ve antineoplastik ilaçların önemli bir parçası olarak kullanılmaktadır. Çoklu hedeflere yönelik kapasiteleri nedeniyle bitkilerden elde edilen doğal ürünler, tek hedefli ajanlara kıyasla daha avantajlıdır ve çok yönlü anormallilere sahip multipl miyelom tedavisinde kullanılabilirler ([Prasad ve ark., 2011](#)).

Yapılan birçok çalışmada bitki kaynaklı doğal ürünlerin, hem in vivo hem de in vitro apoptoz indüksiyonu, hücre döngüsünün inhibisyonu, osteoklastogenezin inhibisyonu, anjiyogenezin bastırılması ve ilaç direncinin tersine çevrilmesi dahil olmak üzere birden fazla anti-miyelom aktivitesine sahip oldukları gösterilmiştir ([Fu ve ark., 2016](#)).

[Rzeski ve ark. \(2006\)](#) tarafından yapılan çalışmada *Betula alba* L. bitkisinden elde edilen ve antiviral, antiparazitik, antibakteriyel ve anti-inflamatuar etkinlikler de dahil olmak üzere geniş bir biyolojik etki sergileyen ve özellikle kanser hücrelerinin büyümesini engelleyen Betulinik asiti (BA), nöroblastoma, rabdomiyosarkom-medulloblastoma, glioma, tiroid, göğüs, akciğer ve kolon karsinoması, lösemi ve multipl miyelom dahil tümör hücre kültürlerinin yanı sıra yumurtalık karsinoması, servikal karsinoma ve glioblastoma multiforme'den izole edilen primer kültürlerle de uygulayarak antikanser etkileri araştırılmıştır. Çalışmada MTT testi, hücre migrasyon testi, Western blotting ve RT-PCR teknikleri kullanılmıştır. Çalışma sonunda BA'nın konsantrasyona bağlı bir şekilde büyümeyi tutuklayarak ve apoptozu indükleyerek etkili bir anti-kanser ajanı olarak hareket ettiği tespit edilmiştir. Apoptoza, bcl-2 ve siklin D1 genlerinin ekspresyonlarının azalması ve Bax gen ekspresyonunun artması eşlik etmiştir. Çalışmada elde edilen bulgular, betulinik asidin antikanser potansiyelini ve farklı doku orijinli kanserlerin tedavisinde destekleyici bir ajan olarak dikkate alınabileceğini göstermektedir.

[Parvathy ve Umamaheshwari \(2007\)](#) tarafından yapılan çalışmada *Moringa oleifera* Lam. bitkisinin yapraklarından çeşitli çözücülerle (metanol, etanol, etil asetat ve kloroform) elde ettikleri ekstraktların multipl miyelom hücre hattı U266B1 üzerine sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada ekstraktların sitotoksik etkisini belirlemek için neutral Red yöntemi kullanılmıştır. Sonuç olarak elde edilen dört farklı ekstraktında multipl miyelom hücreleri üzerine sitotoksik etki gösterdiği ancak en etkili ekstraktın metanol ekstraktı olduğu tespit edilmiştir.

[Rao ve ark. \(2009\)](#) yılında yaptıkları çalışmada *Strychnos nux-vomica* L. bitkisinden elde ettikleri ekstraktları multipl miyelom hücre hattı RPMI-8226 üzerine uygulayarak antiproliferatif ve sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. Bitkinin kökünden elde edilen ekstraktın multipl miyelom hücreleri üzerinde doza ve zamana bağımlı sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Sitotoksititeyi belirlemek amacıyla MTT testi kullanılmıştır. Morfolojik gözlemlerin yanı sıra flow sitometrik analizler ile de hücrelerin apoptotik hücre ölümüne yönlendiği ve mitokondriyal membran bütünlüğünün bozularak, sitozole sitokrom c salınımı olduğu tespit edilmiştir.

[Koru ve ark. \(2009\)](#) tarafından yapılan çalışmada farklı tümör hücreleri üzerinde sitotoksik, apoptotik ve antiproliferatif etkisi olduğu bilinen ve propolisin aktif içeriği olan kafeik asit fenil esterinin (CAPE) multipl miyelom hücre hattı ARH-77 üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmada MTT testi ve tripan blue testi kullanılmıştır. IL-6 aktivitesi Elisa okuyucu kullanılarak tayin edilmiştir. Çalışma sonunda CAPE'nin büyümeyi ve IL-6 sekresyonunu engellediği ve multipl miyelom hücrelerini doza ve zamana bağlı olarak apoptotik hücre ölümüne götürdüğü tespit edilmiştir. CAPE ile ilgili daha fazla çalışma olması halinde multipl miyelom karşı etkili bir ajan olarak değerlendirilebileceği vurgulanmıştır.

[Kovacs \(2010\)](#) çalışmasında ökse otundan *Viscum album* L. QuFrF (VAQuFrF) dan elde edilen sulu ve fermente olmayan ekstrakt ve vincristinin, altı multipl miyelom hücre hattı (Molp-8, LP-1, RPMI-8226, OPM-2, Colo-677, ve KMS-12-BM) üzerindeki sitotoksik etkilerine bakmıştır. Ekstraktların sitotoksik etkileri WST-1 testi kullanılarak saptanmaya çalışılmıştır. Çalışma sonunda her iki maddenin de hücreler üzerinde proliferasyonu engelleyici (sitostatik) ve hücre ölümünü artırıcı (sitosidal) etki gösterdiği tespit edilmiştir. VAQuFrF ekstraktının Molp-8, LP-1 ve RPMI-8226 hücre hatlarında proliferasyonu inhibe etmede vincristinden daha etkili olduğu görülmüştür. Çalışma sonunda elde edilen veriler, VAQuFrF ekstraktının multipl miyelom tedavisinde yeni bir ilaç olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

[Han ve ark. \(2010\)](#) tarafından yapılan çalışmada, çeşitli kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptosisi teşvik ettiği bilinen, geleneksel Çin baharatı *Sophora flavescens*'te bulunan temel bir alkaloid olan matrinin multipl miyelom hastaları için yeni bir terapötik madde olarak kullanılabilmek potansiyeli araştırılmıştır. Çalışmada U266 ve RPMI 8226 hücre hatlarının yanı sıra hastalardan yeni izole edilmiş hücrelerden elde edilen primer kültürlerde kullanılmıştır. Çalışmada edinilen veriler, matrinin, miyelom hücre hatlarının yanı sıra yeni izole edilmiş miyelom hücrelerinde çoğalmasında doza ve zamana

bağımlı olarak inhibe ettiğini göstermiştir. Matrin, miyelom hücrelerini güçlü bir şekilde apoptoza yönlendirmiştir. Multipl miyelom hücrelerine 24 saatlik matrin uygulaması doza bağımlı olarak mitokondriyal membran potansiyelinde azalmaya ve sitokrom c'nin mitokondriden sitozole salınmasına neden olmuştur. Ayrıca 48 saat boyunca matrin uygulanan miyelom hücrelerinde Bcl-2 / Bax proteininin oranında azalma ve aktiveleştirilmiş kaspaz-3 yüzdesinde artış saptanmıştır. Çalışma sonunda elde edilen bulgular, matrin'in MM'ye karşı kemoterapötik bir ajan olarak faydalı bir aday olabileceği görüşünü desteklemektedir.

[Li ve ark. \(2010\)](#) tarafından yapılan çalışmada tıbbi amaçlı kullanılan bir bitki olan *Nigella sativa*'nın temel biyoaktif bileşeni olan timokinonun multipl miyelom hücrelerinde (U266 ve RPMI 8226) STAT3 sinyal yoluna etkileri araştırılmıştır. Çalışmada timokinonun MM hücrelerinde, hem öncül hem de IL-6 ile uyarılan STAT3 aktivasyonu, ilişkili protein kinazlar, STAT3 ile düzenlenen gen ürünlerinin proliferasyonu, canlılık ve anjiyogenez, hücresel proliferasyon ve apoptoza etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda timokinonun c-Src ve JAK2 aktivasyonunun inhibisyonu vasıtasıyla, öncül ve IL-6-indüklenebilir STAT3 fosforilasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ek olarak timokinonun aynı zamanda siklin D1, Bcl-2, Bcl-xL, survivin, Mcl-1 ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi STAT3 ile düzenlenen gen ürünlerinin ekspresyonunun azalmasına neden olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak timokinon multipl miyelom hücrelerinin proliferasyonunu engellemiş bunun yanı sıra hücrelerin apoptoza yönelmelerini sağlamıştır. Çalışmada STAT3 sinyalizasyonunun timokinonun bir hedefi olduğu tespit edilmiş ve bu nedenle multipl miyelom ve diğer kanserlerin önlenmesi ve tedavisinde potansiyel bir fitokimyasal olduğu ortaya konmuştur.

[Ming Zhao ve ark. \(2011\)](#) çalışmalarında çok çeşitli tümörlerde ve hematolojik kanserlerde proliferasyonu baskıladığı bilinen ve en bilinen flavonoidlerden biri olan apigenin flavonoidinin multipl miyelom hücre hatları (U266 ve RPMI 8226) ve primer multipl miyelom hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Yapılan hücre canlılık analizleri apigeninin hem hücre hatları üzerinde hem de primer kültürler üzerinde sitotoksik aktivite sergilediğini göstermiştir. Hücrelere apigenin muamelesinden sonra yapılan kinaz testleri, immüno-presipitasyon ve Western blotlama analizleri CK2 kinaz aktivitesinin inhibe olduğunu ve Cdc37 fosforilasyonunun azaldığını ortaya koymuştur. Ayrıca apigenin uygulamasının, Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL, XIAP ve Survivin gibi antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunu düşürerek multipl miyelom hücrelerinde apoptoza indüklediği tespit edilmiştir.

[Yang ve ark. \(2012\)](#) çalışmalarında bazı katı tümörlerde ve hematolojik malignitelerde güçlü antikanser aktivitesi gösterdiği bilinen ve *Garcinia hanburryi* ağacından salgılanan reçinenin ana aktif maddesi olan Gambogik asit (GA) 'in multipl miyelom hücre hattı RPMI-8226 üzerindeki anti kanser aktivitesini araştırmıştır. Çalışmada MTT testi, Hoechst boyama ve ROS seviyesi belirleme analizleri yapılmıştır. GA'nın RPMI-8226 hücrelerinde büyüme inhibisyonu ve apoptoz indüksiyonu üzerinde doza bağımlı olarak etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu etkinin GA uygulanan RPMI-8226 hücrelerinde apoptoz yanında kaspaz-3'ün aktivasyonuna ve poli (ADP-riboz) polimerazın (PARP) parçalanmasına katkıda bulunan reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Çalışmada aynı zamanda yüksek ekspresyon seviyeleri ile kanser hücrelerinin kemoterapi ve iyonize radyasyondan korunmalarını sağlayan SIRT1 genide çalışılmıştır. SIRT1 gen ekspresyon seviyesinin ROS birikimi ile azalma gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, çalışma GA'nın RPMI-8226 hücrelerinde apoptozu tetiklediği bunuda hücrelerde ROS birikimi, kaspaz 3 aktivasyonu, PARP parçalanması ve SIRT1 gen ekspresyonunun azalması yoluyla gerçekleştirdiğini ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, GA'nın MM hücrelerinde sadece apoptozu teşvik etmek değil, aynı zamanda MM'nin relaps hızını azaltma potansiyeline sahip olduğunu düşündürmektedir.

[Kim ve ark. \(2012\)](#) tarafından yapılan çalışmada *Caesalpinia sappan* L. bitkisinden izole edilen ve antienflamatuvar, antibakteriyel etkileri bilinen bir kimyasal bileşik olan brazilin'in, multipl miyelom hücre hattı U266 üzerine antikanserojen etkileri araştırılmıştır. Çalışmada MTT testi, Real Time PCR, Western blotlama ve flow sitometri analizleri yapılmıştır. Çalışma sonucunda brazilin'in, U266 hücrelerinde apoptozun düzenlenmesinde ve hücre döngüsünün tutuklanmasında rol oynayan transkripsiyon faktörleri olan histon deasetilazları (HDAC'lar) önemli ölçüde inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca brazilin'in U266 hücrelerinde kaspaz-3'ü aktive ettiği ve Bax, Bcl-xL ve Bcl-2 dahil olmak üzere Bcl-2 familyası proteinlerinin ekspresyonunu düzenlediği saptanmış ve bu veriler brazilin'in hücrelerde mitokondri bağımlı yolak ile apoptoza neden olduğunu göstermiştir. Çalışmadan elde edilen bulgular ışığında brazilinin tek başına veya multipl miyelom tedavisi için kullanılan bir anti kanser ajan ile birlikte kullanılabilme potansiyeline sahip olabileceği vurgulanmıştır.

[Ma ve ark. \(2013\)](#) tarafından yapılan çalışmada *Strychnos* cinsinde bulunan alkaloidlerden biri olan brusin'in multipl miyelom hücre hattı U266 üzerindeki apoptotik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada apoptoz tayini için RT-PCR ve flow sitometri teknikleri, antiproliferatif etkiyi tayin etmek için ise MTT testi kullanılmıştır. Çalışma sonucunda brusin'in doza ve zamana bağlı olarak apoptotik etki gösterdiği ve U266 hücrelerinde gösterdiği anti-proliferatif etkinin apoptoz kaynaklı olduğu tespit edilmiştir. Hücreler üzerine brusin uygulandıktan sonra alınan RT-PCR sonuçları kaspaz 3 ve c-Jun gen ekspresyonlarında artma olduğunu göstermiştir. Çalışma sonunda elde edilen veriler, U266 hücrelerinde brusin'in indüklediği apoptozun, JNK sinyal yolağı ve c-Jun'ın fosforilasyonu yoluyla oluştuğunu ortaya koymuştur.

[Darcansoy İşeri ve ark. \(2013\)](#) tarafından yapılan çalışmada, dünya jüt (bir çeşit lif) üretiminde endüstriyel öneme sahip olan *Corchorus olitorius* L. (Malvaceae) türünden elde edilen yaprak ve tohum ekstraktlarını, multipl miyelom hücre hattı ARH-77 üzerine uygulayarak sitotoksik ve genotoksik etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada sitotoksititeyi belirlemek için MTT testi, DNA hasarını belirlemek için Comet testi kullanılmıştır. Çalışma sonucunda Comet testi her iki ekstraktında multipl miyelom hücre hattı ARH-77'da genotoksik hasarı tetiklediğini göstermiştir. Her iki ekstraktta 48 saatlik uygulama sonucunda konsantrasyonla artan genotoksik hasara neden olmuştur. Elde edilen veriler multipl miyelom hücreleri üzerinde tohumdan elde edilen ekstraktın yaprağa göre daha fazla sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur.

[Zhang ve ark. \(2013\)](#) çalışmalarında *Scutellaria baicalensis*'den elde edilen ve çeşitli kanser hücre dizilerinde hücre çoğalmasını inhibe ettiği ve / veya apoptozu indüklediği bildirilen bir flavinoid olan wogonin'in insan multipl miyelom hücre hattı (RPMI-8226) üzerindeki antikanser etkilerini ve ilişkili mekanizmaları araştırmışlardır. Çalışmada MTT, TUNEL, Flow sitometri ve Western blotlama deneyleri yapılmıştır. Çalışma sonunda multipl miyelom hücre büyümesinin wogonin konsantrasyonuna (70.4-352.0 μ M) bağlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Hücre döngüsü analizi ve TUNEL analizi, wogonin ile muamele edilen hücrelerde apoptozun arttığını göstermiştir. Artan apoptoze, toplam PARP seviyesinde azalma, PARP bölünmesinin ortaya çıkması, Bax proteininde önemli artış ve azalan Bcl-2 protein seviyesi eşlik etmiştir. Ayrıca wogonin ile muamele edilmiş hücrelerde Akt aktivitesi baskılanmış ve Ser 473 fosforilasyonu azalmıştır. Çalışma sonunda wogonin hücrelerde apoptozunun teşvik edilmesinde Akt modülasyonu ile Bax ve Bcl-2'ye bağlı intrinsik apoptotik yolağı aktive ederek etkili olduğu için, multipl miyeloma karşı potansiyel bir terapötik madde olabileceği öngörülmüştür.

[Li ve ark. \(2015b\)](#) tarafından yapılan çalışmada proteaz inhibitör etkileri olan, ucuz ve doğal bir bitki içeriği kurkuminin multipl miyelom (MM) RPMI 8226 hücre hattı üzerindeki inhibe edici etkilerini analiz etmek ve RPMI 8226 hücrelerinin apoptoza teşvikinde altta yatan mekanizmayı ortaya çıkarmak amaçlanmıştır. Çalışmada farklı konsantrasyonlarda kurkumin'in RPMI 8226 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edici etkisini analiz etmek için MTT testi kullanılmıştır. P53, Bax ve MDM2 genlerinin mRNA ekspresyonu kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak tespit edilmiştir. Kurkumin uygulaması sonrası MM RPMI 8226 hücrelerinde p53 proteininin ifadesi, western blotting ve ELISA ile de tespit edilmiştir. Elde edilen veriler kurkuminin, RPMI 8226 hücrelerinin proliferasyonunu doz ve zamana bağlı olarak inhibe ettiğini ortaya koymuştur kurkumin uygulanan hücrelerde, p53 ve Bax genlerinin ekspresyonu artarken, MDM2 geninin ekspresyonu azalmıştır. Çalışma sonucunda kurkumin'in p53 protein ekspresyonunu indükleyerek MM hücrelerinde apoptozu teşvik edebileceği önerilmiştir.

[Khan ve ark. \(2016\)](#) yılında yaptıkları çalışmada, çeşitli biyoaktif etkilere sahip ve geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılan tarçın kabuğu tozundan elde ettikleri ekstraktın (CBPE), multipl miyelom hücreleri üzerindeki anti-proliferatif potansiyelini araştırmışlardır. Çalışmada MTT, TUNEL, RT-PCR ve Western blotting yöntemleri kullanılmıştır. Çalışma sonunda ekstraktın RPMI-8226 hücre hattı üzerinde proliferasyonu inhibe edici etkileri olduğu tespit edilmiştir. CBPE uygulaması, mRNA'da anjiyojenik faktörlerin ve siklooksijenazın ekspresyonunu inhibe ettiği ve protein düzeyinde de zamana bağlı bir inhibisyona neden olduğu saptanmıştır. Tarçın uygulamasının hücre döngüsünü G0/G1 fazında zamana bağlı olarak tutukladığı ve DNA fragmentasyonunu indükleyerek, hücreleri apoptoza yönlendirdiği görülmüştür. Sonuç olarak, tarçın ekstraktının kanser önleyici etkilerinin, çoklu mekanizmalar aracılığı ile ortaya çıktığı ve multipl miyelom hücrelerinde anjiyogenezis inhibisyonu, inflamasyon ve apoptoz indüksiyonu gibi etkiler gösterdiği görülmüştür. Ekstraktın, miyelom hücrelerinin büyümesini kısıtlamak için umut verici bir aday olarak kabul edilebileceği öngörülmüştür.

[Kiraz ve ark. \(2016\)](#) tarafından yapılan çalışmada *Punica granatum*'un yenilmeyen kısımlarından elde edilen ekstraktların, U266 multipl miyelom hücreleri üzerine antiproliferatif ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada MTT testi ve flow sitometrik analizler kullanılmıştır. Çalışma sonunda *Punica granatum*'dan elde edilen ekstraktların doza bağımlı olarak antiproliferatif etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, kök, yaprak, çiçek ve meyveden elde edilen ekstraktlar uygulandıktan sonra, çiçekten elde edilen ekstraktın, mitokondriyal membran potansiyelini arttırmada, yapraklar ve kökten elde edilen ekstraktlara nazaran daha az etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Hücre ölümünün apoptoz yoluyla olup olmadığı Annexin V boyası ile flow sitometride teyit edilmiştir. Çalışma sonucunda *Punica granatum*'dan elde edilen ekstraktların multipl miyelom hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerini, mitokondriyal membran potansiyelini değiştirerek ve hücre döngüsünü tutuklayarak ortaya koydukları tespit edilmiştir.

[Canturk ve ark. \(2016\)](#) tarafından yapılan çalışmada, resveratrol, rutin ve rosmarinik asidin multipl miyelom hücre hattı ARH-77 üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada MTT testi ve Neutral Red testi kullanılmıştır. Çalışma sonucunda kontrole kıyasla resveratrolün mitokondriyal ve lizozomal aktivitede azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Resveratrol, rutin ve rosmarinik aside göre daha yüksek sitotoksitite göstermiştir. Çalışma sonuçlarına göre resveratrol, rutin ve rosmarinik asit gibi polifenolik bileşiklerin, multipl miyelom tedavisinde, ileri çalışmalarda umut verici olduğu rapor edilmiştir.

[Tibullo ve ark. \(2016\)](#) tarafından yapılan çalışmada organik asitler, vitaminler, şekerler, fenolik bileşenler gibi bir dizi potansiyel aktif bileşik içeren ve tümör hücrelerinde pro-apoptotik etki gösteren nar suyunun (*Punica granatum* L.) multipl miyelom hücre hatları (KMS26, MM1S ve U266) üzerine antiproliferatif ve anti anjiyogenik etkilerini araştırmışlardır. MTT testi, Flow sitometrik analizler, hücre invazyon /migrasyon testleri ve gen ekspresyon (Real Time PCR) analizlerinden elde edilen veriler PGJ'nin multipl miyelom hücrelerinde anti-proliferatif potansiyeli olduğunu ve bunu hücre döngüsünü G0 / G1 evresinde durdurma özelliği ve anti-anjiyojenik etkileri ile ortaya koyduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca sırasıyla yapılan wound-healing ve transwell testleri sonucunda hücrelerde migrasyon kapasitesinin azaldığı ve invazyonun inhibe edildiği saptanmıştır. Endotel hücrelerinde yapılan anjiyojenik gen ekspresyonunun analizi, narın anti-anjiyojenik özelliklerini doğrulamıştır. Sonuç olarak, nar suyu ile MM tedavisinin gelecekteki terapötik yaklaşımlar için önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir.

[Zhong ve ark. \(2016\)](#) tarafından yapılan çalışmada sentetik bir flavinoid olan V8'in multipl miyelom hücreleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada CCK-8 testi, flow sitometri, Real Time PCR ve Western blotlama yöntemleri kullanılmıştır. Çalışmada V8 uygulanan hücrelerde BAX ve BID ekspresyonunda artma ve BCL-2 ve BCL-XL ekspresyonunda azalma ve yapılan florometrik testler ile kaspaz 3, 8 ve 9 aktivitesinde artma tespit edilmiştir. Buna ek olarak, western blotlama ile mitokondriyal sitokrom c'nin sitosol içine salınmasının V8 tarafından desteklendiği ortaya konulmuştur. Çalışma sonunda V8'in RPMI-8226 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak ve mitokondri aracılı yollar vasıtasıyla apoptozu indüklediği tespit edilmiştir.

Bitkisel ekstraktlar ve /veya aktif fitokimyasalların kullanıldığı bu çalışmalar, tek başına veya diğer ilaçlarla kombinasyon halinde doğal ürünlerin kullanımının, ilaç direncinin üstesinden gelmede ve multipl miyelom ile mücadele için yeni tedavi alternatifleri geliştirmede umut vadeden bir yaklaşım olduğunu göstermektedir.

2.4. Genel Bilgiler

2.4.1. *Vinca L. (Cezayir menekşesi)*

Vinca L. (Apocynaceae) cinsi Avrupa, Kuzey Afrika ve Güneybatı Asya'da yayılış gösteren, yedi türle temsil edilmektedir. Bu türler, *Vinca difformis* Pouret, *V. erecta* Regel ve Schmalh, *V. herbacea* Waldst. & Kit., *V. soneri* Koyuncu, *V. major* L., *V. minor* L. ve *V. ispartensis* Koyuncu & Ekşi olup; son beş tür Türkiye'de yetişmektedir ([Stearn, 1972](#); [Stearn, 1973](#); [Stearn, 1978](#); [Güner, 2012](#); [Koyuncu, 2012](#); [Koyuncu ve ark., 2015](#)).

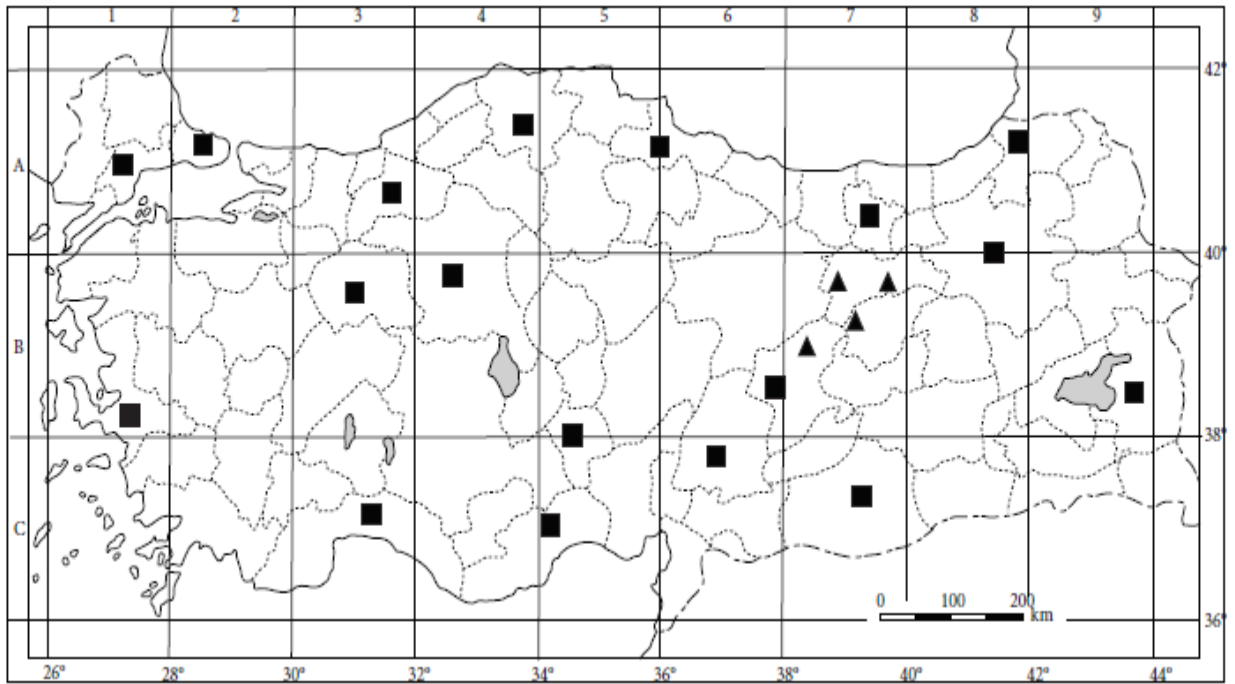
Vinca L. cinsinde yer alan bitkiler, alçak, sürünücü veya dik özellikte, herdem yeşil ya da yaprak döken, çok yıllık, yarı çalimsı ya da otsu bitkilerdir. Yaprakları karşılıklı olarak yer almaktadır. Çiçekleri büyük ve uzun pediselli, yaprağın koltuğunda ve tek tek yer almaktadır. Korolla huni şeklinde, korolla boğazında eksiz, fakat stamenlerin bağlandığı kısmın üstünde tüylü bir bölge ve tabanda korolla parçalarının bağlantı yerlerinde alçak çıkıntılar bulunmaktadır. Petaller yaygın durumdadır. Stamenler korolla tüpünün yaklaşık yarısına kadar bağlı ve korolla tübünün içinde, filamentler kısa, geriye doğru eğik durumdadır. Anterler yassı, dil şeklinde, uçta bir ek taşır. Çiçek tablası 2 adet gland taşır. Tohumlar pürüzsüz, oblong ve tepede tüy demeti taşımazlar ([Stearn, 1978](#)).

2.4.2. *Vinca herbacea* Waldst. & Kit (Bikir çiçeği)

Bitki her kış rizomlarına kadar tamamen kuruyan, otsu ve çok yıllıktır. Yaprakları otsu, dökülücü, ovat, eliptik-lanseolat, dar eliptik gibi farklı şekillerde, tepesi akut, yaprak kenarları düz, sert kısa tüylü ya da kısa kirpimsi tüylü özelliktedir. Yaprak sapı 1-4 mm'dir. Sepaller 3- 10 mm uzunluğunda, kısa sert tüylü ya da tüysüz ve pürüzsüzdür. Petaller soluk mavi-morumsu mavi, korolla tüpü 1-2 cm, petaller 1-2 cm uzunluktadır. Meyve 2,5-3,5 cm boyutlarında folikül özellik göstermektedir. Tohumlar yaklaşık 11-14 mm'dir. Çiçeklenme dönemi 3-5. aylardadır. Açık güneşli yamaçlar, kumlu çakıllı, taşlı toprak yığınlarında, nadasa bırakılmış tarlalarda, kayalık, çalılık ve çok açık ormanlık alanlarda, 400-2000 m'de yetişir. Dağınık halde Türkiye ve Ege Adaları'nda yayılış göstermektedir ([Stearn, 1978](#)).

2.4.3. *Vinca soneri* Koyuncu (Osman çiçeği)

Çok yıllık, odunsu, yarı çalimsı, dik bitkilerdir. Kök, dik, basit ve piloz, 25-50 cm boyundadır. Yapraklar, karşılıklı, dökülücü, sapsız veya kısa saplı, basit, parçalanmamış, ovat eliptik 5-8x2.5-3.5 cm boyutlarında, taban ve apeks akut, pürüzsüz, damarlar orta kısımdan 10-12'ye ayrılır; yaprak sapı 0-1 mm uzunluğundadır. Çiçekler büyük, aksillerde tek, kaliks 8-10 mm; doğrusal tüysüz lobludur. Korolla infundibular, mavi veya soluk mavi, loblar beyaz-mavi, 1,2-1,5 cm uzunlukta, tüp uzunluğu 2-2.7 cm'dir. Filamentler 2 mm, stilus zayıf ve anter yüksekliğinden biraz daha kısadır; stigma baş kısmında tüylü, kapitat özelliktedir. Foliküller 5-7 cm; tohumlar 1-3, 10-12 mm uzunlukta, tüberkülatır. Çiçeklenme zamanı 5 ve 6. aylardır. Kuru kayalık yamaçlarda, 1200-2800 m yükseklikte yayılış göstermektedir ([Koyuncu, 2012](#))



Şekil 2.5. *Vinca herbacea* Waldst. & Kit ve *Vinca soneri* M. Koyuncu türlerinin ülkemizde yayılış alanları (*Vinca herbacea* (■), *Vinca soneri* (▲)) ([Koyuncu, 2012](#)).

2.4.4. Çalışılan *Vinca* Türlerinde Bulunan Alkoloidler

Çalışma konusu cins alkoloidleri bakımından iyi karakterize edilmiş cinslerden birisi olup, ekstrakte edildiği bilinen en az 150 alkaloid vardır. Çalışmamızda kullanılan *V. herbacea* ve *V. soneri* türlerinin alkoloid içeriğiyle ilgili yapılmış aşağıdaki çalışmalar mevcuttur.

[Boğa ve ark. \(2011\)](#) yaptıkları çalışmada *Vinca herbacea* türünün alkoloid içeriğini ortaya koymuşlardır. Çalışmada alkoloidlerin tespiti, antioksidan etkileri, antikolinesteraz aktiviteleri ve sitotoksik etkilerine bakılmıştır. *Vinca herbacea*'de daha önce varlığı tespit edilen, pikrinin ([Batista ve ark., 1996](#)), burnamin ([Petitfrere-Auvray ve ark., 1981](#); [Yamauchi ve ark., 1990](#)), kaboksin A ([Titeux ve ark., 1975](#)) ve elegante ([Bhattacharyya ve Pakrashi, 1972](#)) alkoloidlerinin yanı sıra 10-methoksiraukaffrinolin ve 11-methoxyburnamine olmak üzere iki yeni alkoloid varlığı tespit edilmiştir. Elde edilen alkoloidlerden 10-methoksiraukaffrinolin, pikrinin ve elegantinin antioksidan etki göstermediği ancak antikolinesteraz aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir. Sitotoksik etkileri araştırmak amacıyla 10-methoksiraukaffrinolin, 11-methoxyburnamine, burnamin ve elegantin alkoloidleri MCF-7 ve HT-29 kanser hücrelerine uygulanmış ancak sitotoksik etki gözlenmemiştir.

[Bahadori \(2011\)](#) tarafından yapılan doktora tezinde Türkiye'de yetişen üç *Vinca* türünün (*V. minör* L., *V. majör* L. ve *V. soneri* Koyuncu) alkaloidlerinin izolasyonu ve yapılarının tayini yapılmıştır. Çalışmada kromatografik yöntemlerle bitkilerin içerdikleri alkaloidler izole edilerek kimyasal yapıları modern NMR (¹H ve ¹³C NMR, BB, APT, DEPT, COSY, gHSQC ve gHMBC) ve kütle spektroskopisi başta olmak üzere analitik yöntemlerle tayin edilmiştir. Çalışmada ülkemiz için endemik ve yeni bir tür olan, aynı zamanda çalışmamızda kullanılan *V. soneri*'de Vallesiachotamine, α -Yohimbine, β -Yohimbine, Pikrinin alkoloidlerinin varlığı rapor edilmiştir.

Vinca türlerinde bulunan bu alkoloidler çeşitli kanserlerin tedavisinde vincristin ve vinblastin gibi kemoterapötik olarak kullanılan ajanlara muadil nitelikte olabilmesinin yanı sıra yapılacak klinik çalışmalarla desteklendiği takdirde tedavide tercih edilebilir.

2.5. Yöntemler

2.5.1. Sitotoksitite Testleri

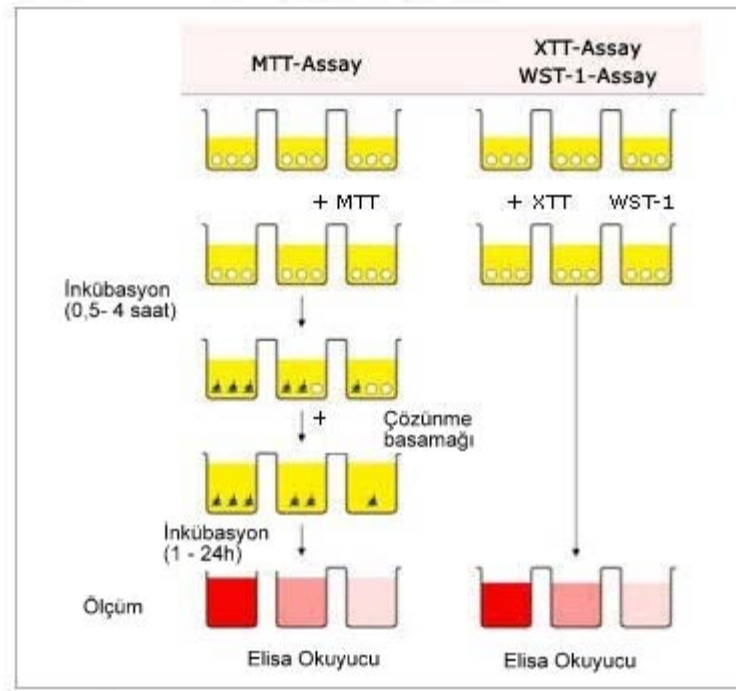
Hücre canlılığının tespitinde çeşitli tetrazolyum bileşikleri kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılan testler MTT, MTS, XTT ve WST-1 testleridir. Bu bileşikler iki gruba ayrılmaktadır, bunlardan ilki pozitif yüklü ve ökaryotik canlı hücrelere penetre olan MTT, ikinci gruptakiler negatif yüklü ve hücreye penetre olmayan MTS, XTT ve WST-1 testleridir. İkinci grupta (MTS, XTT, WST-1) tipik olarak, tetrazolyumun renkli formazan ürününe indirgenmesini kolaylaştırmak için sitoplazmadan veya plazma membranından elektronları aktarabilen bir ara elektron alıcısı kullanılmaktadır ([Riss ve ark., 2016](#)).

Kantitatif kolorimetrik bir test olan MTT testi, *in vitro* koşullarda hücre canlılığına dayanarak sitotoksititeyi ölçmek için kullanılmaktadır ([Holst-Hansen ve Brünner, 1998](#)). NAD(P)H'ye bağlı hücresel oksidoredüktaz enzimleri, tanımlanan koşullar altında, mevcut canlı hücrelerin sayısını yansıtır. Bu enzimler, tetrazolyum boyası olan MTT'yi mor renge sahip olan suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüştürmektedir. Çözünmeyen mor formazanı çözünür hale getirmek için bir çözücü (genellikle dimetil sülfoksit, izopropanol, asitlendirilmiş bir etanol çözeltisi veya seyreltilmiş hidroklorik asit içindeki deterjan sodyum dodesil sülfat çözeltisi) eklenmektedir. Bu renkli çözeltinin absorbanı belirli bir dalga boyunda (nm arasında) spektrofotometre ile ölçülür.

Tetrazolyum testleri potansiyel tıbbi ajanlar ve toksik materyallerin sitotoksitesini (canlı hücrelerin kaybı) veya sitostatik aktiviteyi (proliferasyondan sessizliğe geçiş) ölçmek için de kullanılabilir. MTT testi yüksek oranda doğruluğa sahip, kolay ve hızlı bir testtir. MTT reaktifinin ışığa duyarlı olması nedeniyle MTT testi genellikle karanlıkta yapılır. Günümüzde birçok kaynakta refere edilen MTT testi, diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında önemli bir standart olarak görülmektedir ([Fotakis ve Timbrell, 2006](#)).

Çözünmeyen formazan kristalleri farklı özelliklere sahip alternatif tetrazolium tuzları içeren kitlerin geliştirilmesine sebep olmuştur. MTT'nin yerine alternatif olarak XTT testi de kullanılmaktadır. Bu test daha yüksek hassasiyet ve daha yüksek bir dinamik aralık verir. Oluşturulan formazan boyası, suda çözünür ve ek bir çözme basamağına gerek yoktur ([Aniara, 2010](#)). Diğer alternatif testler ise MTS ve WST-1 testleridir ([Fotakis ve Timbrell, 2006](#)).

MTS testi, MTT testindeki aralıklı basamaklar olmaksızın, doğrudan doğruya hücre kültürüne reaktif ilâve etme kolaylığını sunan tek adımlı MTT testi olarak tarif edilmektedir. Bununla birlikte, bu kolaylık, MTS testini, kolorimetrik enterferansa duyarlı hale getirir; çünkü MTT testindeki aralıklı basamaklar, renkli bileşiklerin izlerini ortadan kaldırır; bu renkli bileşikler MTS testinde mikrotitrasyon plakasında kalır. Bu test kullanıldığında hassasiyet sağlamak için bazı önlemler gereklidir ve mikroskop altında nitel gözlemleri kullanarak MTS sonuçlarını doğrulamak gerekir ([Cory ve ark., 1991](#)).



Şekil. 2.6. MTT testi ve diğer testlerin karşılaştırılması

WST testleri (Suda çözünebilir tetrazolyum tuzları) oluşan formazanlardan farklı absorpsiyon spektrumu vermek üzere geliştirilen MTT testlerine alternatif olarak geliştirilmiştir ([Interchim, 2013](#)). WST-1 ve WST-8, PMS elektron medyatörü ile kombine edildiğinde çözünebilir bir formazan oluşturması bakımından MTT'den avantajlıdır. WST-1 testi, MTT testine göre daha kesin ve kullanışlı bir yöntem olarak bilinmektedir. XTT ve MTS gibi ek bir çözme basamağı olmadan ölçülebilen suda çözünebilir ürünlerin oluşmasına neden olur. WST-1'in diğer bir avantajı ise saklama koşullarıdır. WST-1 testi, MTT testine göre daha kararlı yapıdadır, bu nedenle, WST-1, kullanıma hazır olarak 2 ila 8 °C arasında birkaç hafta bozulmadan saklanabilmektedir. Ayrıca, WST-1 daha geniş bir ölçüm doğrusal aralığına sahiptir ve fenolik madde içeriğinden minimum düzeyde etkilenmektedir.

2.5.2. Real Time PCR

PCR tabanlı teknikler, çok düşük sayıda hedef kopyadan başlayarak, nükleik asit sekanslarının spesifik amplifikasyonu yoluyla genetik bilgi elde edilmesini sağlamaktadır. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-time PCR), DNA amplifikasyonu ile aynı zamanda artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesi ile nicel olarak sonuç alınabilen bir PCR yöntemidir.

Seçilen genlerin ifade seviyesi, gerçek zamanlı PCR ile çok yüksek doğrulukla ölçülebilir ([Bustin, 2000](#); [2002](#); [Dyrskjot, 2003](#)). Gerçek zamanlı PCR'in geliştirilmesi nükleik asitlerin kantitasyonunu önemli derecede geliştirmiş ve basitleştirmiştir. Bu teknoloji, özellikle moleküler teşhis alanında bilim adamları için paha biçilmez bir araç haline gelmiştir ([Bernard ve Wittwer, 2002](#); [Ginzinger, 2002](#); [Klein, 2002](#); [Walker, 2002](#)).

Gerçek zamanlı PCR, kompleks bir biyolojik örnekte spesifik bir DNA'nın miktarını belirlemek için kullanılan en hassas yöntemdir ([Klein, 2002](#); [Liss ve Roeper, 2004](#)). Gerçek zamanlı PCR ile oluşan ürünün miktarı floresan sinyaller kullanılarak devam eden amplifikasyon sırasında ölçülmektedir. Bu reaksiyonlar, hedef sekansların logaritmik bir amplifikasyonu ile karakterizedir; yani, PCR kopyalarının arttırılması, bunu takiben siklus başına kopya sayısı artışının sıfıra hızlı bir düşüş gösteren plato fazı izlemektedir. Buna göre, PCR çalışmasının bitimindeki spesifik DNA ürün miktarı, orijinal numunede bulunan hedef kopyaların sayısı ile hiçbir korelasyon göstermez. Bununla birlikte, tıptaki veya bilimsel araştırmalardaki birçok uygulama, hücrenin veya hücre popülasyonunun bir uyarıya tepkisini incelemek ve farklı numunelerin gen profilini karşılaştırmak için numunedeki spesifik hedef sayısının sayısallaştırılmasını gerektirmektedir. PCR analizi genlerin biyolojik olarak aktif ürünleriyle (proteinler) ilgili hiçbir bilgi vermese de, fonksiyonel genomik çalışmalar bir proteinin fonksiyonu ve genin ifade kalıpları arasında sıkı bir korelasyon olduğunun göstermiştir ([Brown ve Botstein, 1999](#)).

Temel araştırmalarda, farmako-genomik ve moleküler teşhis konusundaki gen ekspresyonu nicelleştirilmesi yöntemlerinin temel önemi, güncel teknolojilerin geliştirilmesine yönelik çabaların yanı sıra yeni teknolojilerin geliştirilmesini de yönlendirmesidir. Bununla birlikte, ters transkripsiyon (RT)-PCR tabanlı analizler şu anda gen ekspresyon kalıplarının karakterize edilmesi veya doğrulanması ve farklı numune popülasyonlarındaki gen seviyelerinin karşılaştırılması için kullanılan en yaygın yöntemdir.

Gerçek zamanlı PCR kavramının temel prensibi, biriken PCR ürünlerinin saptanmasından oluşur ([Higuchi ve ark., 1992](#)). Mevcut qrt-PCR sistemleri, tekniğin yüksek özgüllüğünü açıklayan bir dizi prob ve primere dayanmaktadır. Floresan problemlerin geliştirilmesi, daha önceki sistemlerde yapılan PCR sonrası işlemlere olan gereksinimini ortadan kaldırmıştır ([Lee ve ark., 1993](#)). Floresans emisyonu oluşturmak için sırasıyla uzatma veya bağlanma basamağını kullanan iki ana teknik bulunmaktadır ([Lie ve Petropoulos, 1998](#); [Didenko, 2001](#)). Her iki durumda da, floresan sinyali her bir PCR amplifikasyon döngüsü ile birlikte artar. Floresansın, başlangıçtaki floresans emisyonunun standart sapmasının on katının eşiğine ulaştığı PCR döngüsü sayısı niceliksel ölçüm için kullanılır. Bu döngü sayısına eşik döngüsü (Ct) denir ve hedef genetik materyalin başlangıç miktarı ile ters orantılıdır.

Her ters transkripsiyon reaksiyon tüpüne eklenen genetik materyal miktarı ve kalitesi, başlangıç materyalini ölçmek için güvenilir parametreler olmadığından, endojen bir kontrol geninin kopya sayısına yani housekeeping genlere ihtiyaç duyulmaktadır. Verilerin normalizasyonu için geçerli bir referansın (housekeeping gen) tanımlanması qRT-PCR deneysel tasarımında çok önemli bir konudur. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) en popüler housekeeping genlerinden biridir, ancak özellikle aynı patolojik koşullar altında GAPDH mRNA düzeylerinin her zaman sabit olmadığı belgelendirilmiştir ([Goidin ve ark., 2001](#); [Zhu ve ark., 2001](#)). Birçok çalışmada housekeeping gen olarak β -aktin kullanılmaktadır ([Kammula ve ark., 2000](#); [Seeger ve ark., 2001](#)). B-aktin geninin düzenlenmesi ve pseudogen varlığı ile ilgili konular gündeme getirilmesine rağmen zamanla elde edilen sonuçların tutarlılığı, bu referans genin kullanımını desteklemektedir. ([Raff ve ark., 1997](#); [Selvey ve ark., 2001](#)). Bazı araştırmacılar son zamanlarda her bir housekeeping genin potansiyel değişkenlik özelliğini en aza indirmek için, qRT-PCR verisinin bir dizi referans geninin geometrik ortalamasıyla normalizasyonunu önermişlerdir ([Vandesompele ve ark., 2002](#)). Gen ekspresyon seviyelerinin ölçülmesi, araştırmacılara kanser davranışının altında yatan moleküler mekanizmaları incelemek için değerli bilgiler sağlayabilir. Bu amaca yönelik olarak, qrt-PCR, yalnızca araştırma alanında değil aynı zamanda klinik ortamda da uygun hale getiren yüksek güvenilirlik ve pratik kolaylığa ulaşmıştır. Üstelik qrt-PCR çok yönlülüğü, kullanıcı dostu yüksek teknoloji moleküler biyoloji araçlarının araştırılmasında yeni yollar açmaktadır ([Mocellin ve ark., 2003](#)).

2.5.3. Flow Sitometri

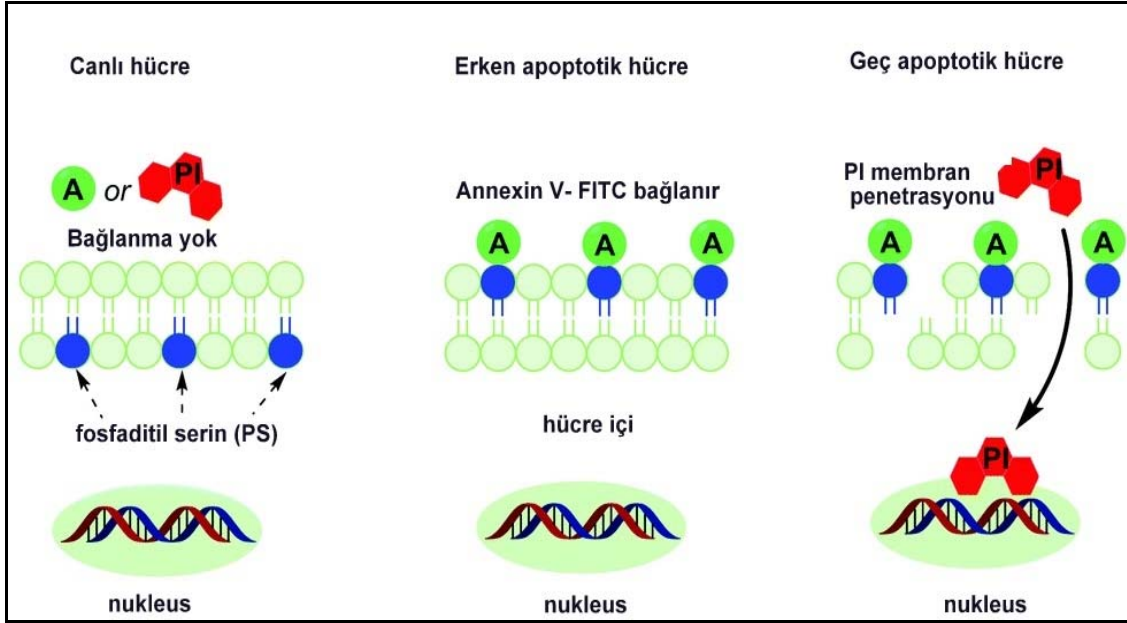
Flow sitometri, hücre veya partiküllerin karakteristik özelliklerinin bir akışkanın içindeyken ölçülmesi yöntemidir. Flow sitometri ile süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller, lazer ışığı ile aydınlatılan bir bölümden geçirilmekte ve lazer ışıktan geçerken hücrelerin verdikleri sinyaller toplanarak değerlendirilmektedir. Hücrelerin boyutları, granüllü olup olmaması gibi fiziksel özelliklerin yanı sıra; hücreye bağlanan çeşitli fluorokrom boyalarda oluşan sinyallerin kaynağı olabilmektedir. Böylece flow sitometri ile bir hücre popülasyonunda bulunan her hücre ya da partikülün, DNA içeriği, enzim aktivitesi, membran potansiyeli ve canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir ([Dunphy, 2004](#); [Karaboz ve ark., 2008](#)).

Akım sitometrisi, tek hücre üzerinde çoklu özellikleri ilişkilendirmek için güçlü bir tekniktir. Akım sitometri, tam kan, kemik iliği, seröz boşluk sıvısı, beyin omurilik sıvısı, idrar ve katı dokular dahil olmak üzere çeşitli örneklerin immünojenotiplenmesi için kullanılmaktadır ([Brown ve Wittwer, 2000](#)).

Flow sitometrinin kullanıldığı birçok alan olmakla birlikte hücre kültürü çalışmalarında hücre döngüsü analizleri ve apoptoz tayininde sıklıkla kullanılmaktadır. Hücrelerde apoptozu tayin etmenin farklı yolları (DNA fragmentasyonu, Real Time PCR, Western blotlama vs.) yanında apoptozun daha doğru ölçülmesi için, tek hücre seviyesinde gerçekleşen apoptotik olayları belirleyebilecek yöntemlere gereksinim duyulduğu anlaşılmıştır ([Schmid ve ark., 1992](#); [Gorczyca ve ark., 1993](#); [Gong ve ark., 1994](#); [Vermes ve ark., 1995](#); [Darzynkiewicz ve ark., 1997](#); [Van Engeland ve ark., 1998](#); [Herault ve ark., 1999](#)). Flow sitometrik teknikler hücre yüzey antijenlerinin ekspresyonu ile tanımlanan apoptotik hücrelerin fenotipik olarak eş zamanlı olarak belirlenip miktarlarının ortaya konmasını mümkün kılmıştır.

Flow sitometri yardımıyla, apoptozda eksprese olduğu bilinen her hangi bir hücre yüzey proteininin, floresan bir madde ile işaretli antikorlar kullanılarak saptanması mümkün olabilmektedir ([Güleş ve Ülker, 2008](#)). Flow sitometri yönteminde erken apoptotik hücrelerin saptanması için anneksin V boyası kullanılmaktadır. Apoptotik hücrelerde fosfatidil serin (PS) hücre içinden dış membrana göç etmektedir ([Devaux, 1991](#); [Zachowski, 1993](#); [Koopman ve ark., 1994](#)). Annexin V fosfatidilserine bağlanarak floresan ışımaya oluşturmaktadır ([Fadok ve ark., 1993](#)). Florokrom etiketli rekombinant çözünür anneksin V'in mevcudiyeti, erken sitoplazmik apoptotik hücrelerin saptanması ve ölçülmesi için yararlı bir araçtır ([Koopman ve ark., 1994](#); [Vermes ve ark., 1995](#); [Van Engeland ve ark., 1998](#)).

Annexin V-işaretleme yönteminde erken ve geç apoptotik hücreleri ve nekrotik hücreleri tanımlamak için 7-amino-aktinomisin D (7AAD) ([Schmid ve ark., 1992](#)) veya propidyum iyodür (PI) gibi boyalar kullanılmaktadır.



Şekil. 2.7. Flow sitometride Annexin V/ PI boyanmasına göre hücreler ([Cini ve ark., 2017](#))

Flow sitometrik yaklaşımlar, apoptozun erken aşamalarında apoptotik lezyonlara maruz kalmış hücreleri tanımlaması ve nicelendirilmesinde ve canlı, nekrotik ve geç apoptotik hücrelerin ayrımı ile ilgili önemli bilgiler vermektedir. Flow sitometri kolay uygulanabilir bir yöntem oluşu, işlemlerin uzun sürmemesi ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinik ve bilimsel çalışmalarda apoptozun belirlenmesi için oldukça kullanışlı bir yöntemdir.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Materyal eldesi

Çalışmamızda kullandığımız *Vinca* türleri (*Vinca herbacea* ve *Vinca soneri*) Tablo 3.1’de verilen lokalitelerden toplanmıştır. Örneklerin teşhisi Prof. Dr. Tuna UYSAL tarafından yapılmıştır. Bitkilere ait herbaryum örnekleri KNYA herbaryumunda muhafaza edilmektedir.

Tür İsmi	Lokale	Toplanma tarihi	Toplayıcı numarası
<i>Vinca herbacea</i>	C4 Konya; Kulu, Akın köyü güneydoğu yönünde 6 km, ekin tarlaları kenarı.	16.06.2015	TU-3260A-KE
<i>Vinca soneri</i>	B6 Sivas; Zara-Divriği yolu, Bolucan köyü civarı, 1500m, Anakaya serpantin. (Orijinal yayınlı aynı lokalite)	23.07.2015	TU- 3261-KE

Tablo 3.1. *Vinca* türlerinin lokaliteleri

3.1.2. Kullanılan Hücre Hatları

Çalışmamızda iki farklı multipl miyelom hücre hattı kullanılmıştır. Kullanılan hücre hatlarından RPMI-8226 Gülhane Askeri Tıp Akademisi Araştırma ve Geliştirme Merkezi Tıbbi ve Kanseri Araştırma laboratuvarından, ARH-77 hücre hattı ise Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Prof. Dr. Güner Hayri ÖZSAN’dan temin edilmiştir.

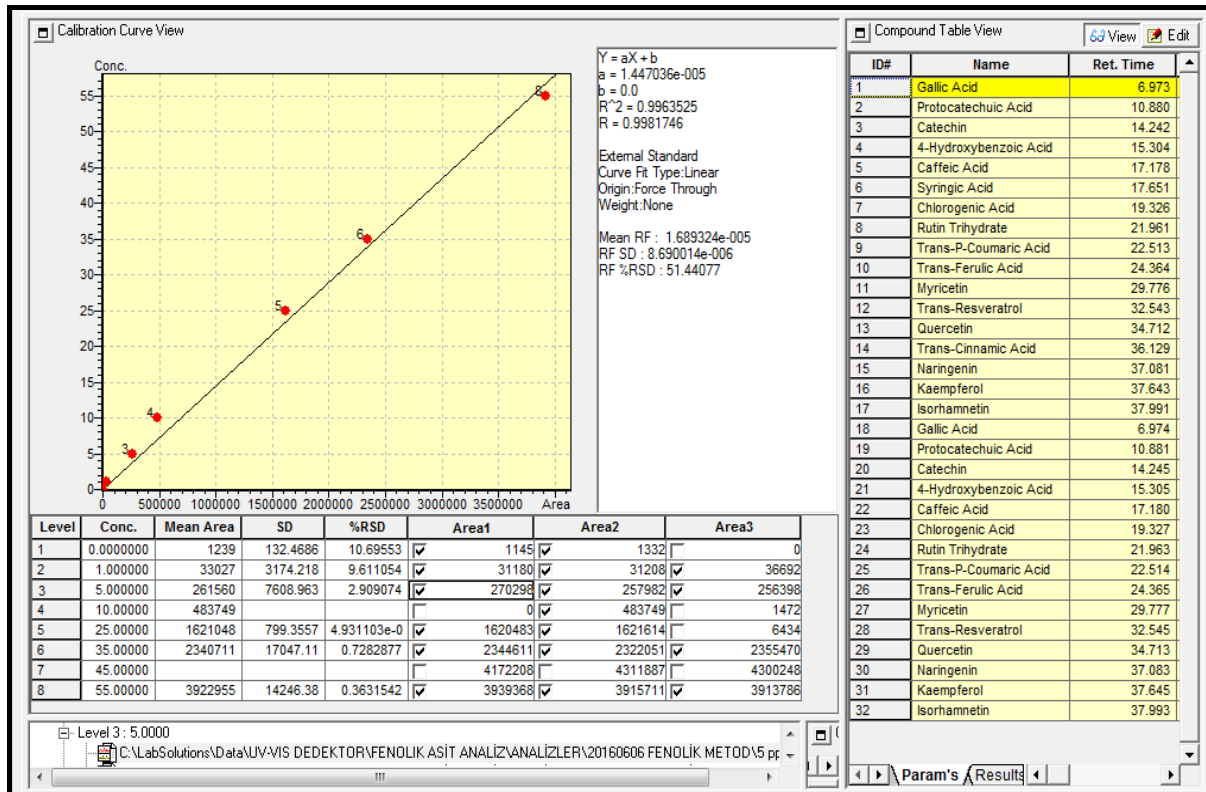
3.2. Metot

3.2.1. Bitkisel ekstraktların hazırlanması

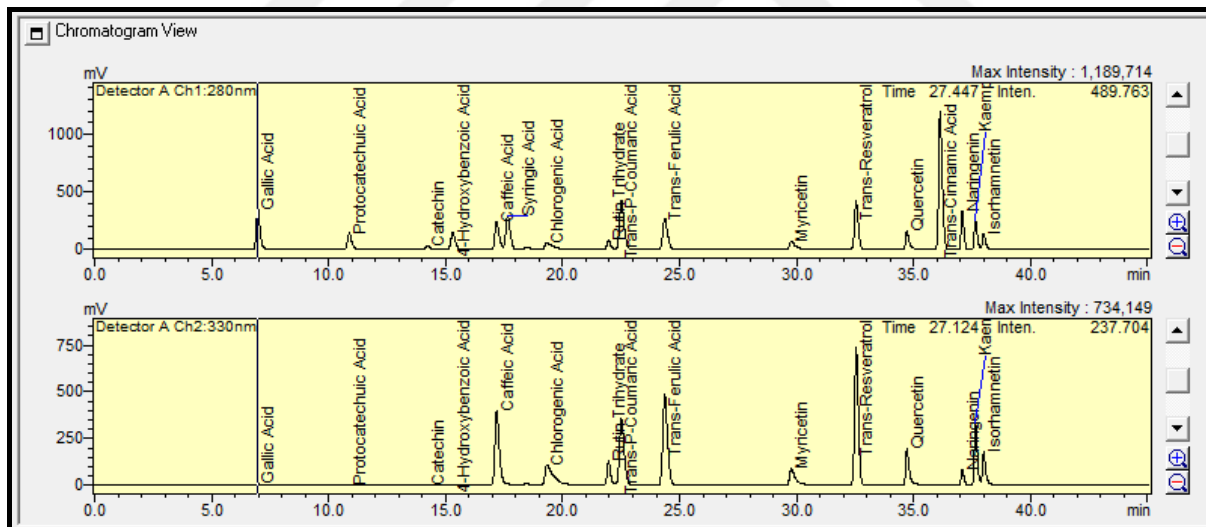
Araziden toplanan *Vinca* türlerinin toprak üstü kısımları güneş görmeyen ortamda oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulan bitki örnekleri değirmende öğütülerek toz haline getirilmiştir. Bu işlemi takiben bitki tozları yaklaşık 15'er gr tartıldıktan sonra kartuşa yerleştirilmiş ve soklet apareyi ile metanol kullanılarak 6-8 saat ekstraksiyona tabii tutulmuştur. Ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstraktlar +4 ° C' de muhafaza edilmiş daha sonra, rotari evaporatörde 40°C'de buharlaştırılarak çözücüsünden uzaklaştırılmıştır. Ekstraktlar kullanılıncaya kadar aktivite kaybını önlemek amacıyla -20°C'de tutulmuştur. Çalışmada kullanılan vincristin ve vinblastin 1mg/ml konsantrasyonda ticari olarak temin edilmiştir.

3.2.2. HPLC Yöntemi

Ekstraksiyon işlemleri sonrasında çözücüsü uçurulan ekstrakt 5 mg/ml olacak şekilde metanolde çözülüp 0.22µ'luk filtreden geçirildikten sonra HPLC analizi için Selçuk Üniversitesi Araştırma ve Geliştirme merkezine götürülmüştür. Analizler Shimadzu marka cihazda INERTSIL ODS-3V (5µm; 4.6 x 250 mm) kolonu kullanılarak yapılmıştır. Çalışma 30 °C sıcaklıkta, 1,0 ml/min akış hızında ve 280-330 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. 20 µl enjeksiyon hacmi ile çalışılmıştır. Çalışmada ekstraktlarımızda 17 fenolik madde taraması ve miktar tayini yapılmıştır. Kullanılan standartlar; Gallik Asit, Protokateşuik Asit, Kateşin, 4-Hidroksibenzoik Asit, Kafeik Asit, Siringik Asit, Klorogenik Asit, Rutin Trihidrat, Trans-P-Kumarik Asit, Trans-Ferulik Asit, Mirsetin, Trans-Resveratrol, Quercetin, Trans-Cinnamic Asit, Naringenin, Kaempferol ve Isorhamnetindir. Standartlar metanolde çözünerek hazırlanmıştır. Toplam analiz süresi yaklaşık 45 dakikadır. HPLC metoduna ait kalibrasyon ve standartlara ait veriler Şekil 3.1 ve 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Fenolik Metot Kalibrasyon Verileri



Şekil 3.2. Fenolik Metot Standart Verileri

3.2.3. GC- MS/ MS Yöntemi

Ekstraktlar 5 mg/ml olacak şekilde metanolle çözülerek hazırlanmış, 0.22µ'luk filtreden geçirildikten sonra analiz edilmiştir. *Vinca herbacea* ve *Vinca soneri* bitkilerinin yapraklarından elde edilen ekstraktlar FID dedektör içeren Shimadzu marka GC-MS/MS cihazı (QP-2010 ULTRA) kullanılarak analiz edilmiştir. Analizler RTX-5MS (0.25µm; 30m x 0.25 mm) kolonu ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma GC'de 40 °C sıcaklıkta, 40,8 ml/min akış hızında ve 500-900 bar basınçla Helyum gazı kullanılarak çalışılmıştır. MS'te 200 °C sıcaklıkta 0.3 kV voltajla argon gazı ile çalışılmıştır. Toplam analiz süresi yaklaşık 58 dakika sürmüştür. Elde edilen pikler ve sonuçlar tablo halinde gösterilmiştir.

3.2.4.Hücre kültürünün hazırlanması

Her iki hücre hattı için de kullanılması tavsiye edilen RPMI-1640 besiyeri ortamı kullanılmıştır. Besiyeri ortamı % 10 Fetal dana serumu (FBS) ve % 1 penisilin-streptomisin ilave ile hazırlanmıştır. Hücreler önce 25 cm²'lik daha sonra 75 cm²'lik flasklarda % 95 nem ve % 5 CO₂'li gaz ortamında ve 37 °C'de kültüre edilmiştir. CO₂ inkübatöründe inkübe edilen hücreler invert mikroskopta belirli zaman aralıklarıyla kontrol edilmiş ve yoğun flasklardan hücreler sürekli pasajlanarak çoğaltılması sağlanmıştır. Besiyeri ortamı her 2-3 günde bir yenisiyle değiştirilmiştir.

3.2.5.Kullanılacak ekstrakt konsantrasyonlarının hazırlanması

Kullanılacak ekstraktlar birim hacimde DMSO ile çözüldükten sonra DMSO'nun toksik olmadığı en yüksek oran göz önüne alınarak stok çözeltiler hazırlanmıştır. Stok doz olarak ekstraktlar 1/500 oranında seyreltilerek hazırlanmış sonrasında diğer dozlar stok çözeltiden seyreltme yoluyla elde edilmiştir. Çalışmada 1/1000, 1/2500, 1/5000 ve 1/10000lik dozlar uygulanmıştır. Her iki ekstrakt içinde dozlar, steril ortamda bazal hücre medyumumu ile seyreltildikten sonra 0.22µ'luk filtreden geçirilerek kullanılmıştır.

Doz hazırlama ve seyreltme çalışmaları ekstraktlarda görülmesi muhtemel aktivite kaybını engellemek amacıyla buz üzerinde yapılmıştır. Aynı zamanda vinka alkaloidlerinden vincristin ve vinblastinde elimizdeki stoktan yine bazal hücre medyumumu ile seyreltilerek kullanılmıştır. Her iki kemoterapötik için uygulanan dozlar literatür göz önüne alınarak 25

μM , 50 μM , 75 μM ve 100 μM olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan dozlar hücreler üzerine uygulanıncaya kadar $+4^\circ\text{C}$ de muhafaza edilmiştir.

3.2.6.Hücre sayımı

Yapılacak ekstrakt uygulamalarında belirli sayıda hücrenin 96 lık plakalara dağıtılabilmesi için hücre süspansiyonda mililitrede ne kadar hücre olduğunun belirlenmesi önemlidir. Tripa blue yönteminin esası, membran bütünlüğü bozulmuş yani ölü hücrelerin uygulanan boyayı hücre içine alması veya canlı ve membran bütünlüğü bozulmamış hücrelerin ise boyayı almamasına dayanır.

Bu amaçla; önce 75 cm^2 'lik flaskların tüm içeriği pipetaj yapmak suretiyle 50ml'lik falkon tüplere alınmıştır. Kullandığımız hücre hatları süspanse yani yüzen hücre hatları oldukları için hücreler herhangi bir muamele yapılmadan direkt olarak pipetleme ile flasktan toplanmıştır. Daha sonra santrifüj edilerek hücrelerin dibe çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj işleminden sonra pellete zarar vermeden supernatant kısmı atılmıştır. Bu işlemten sonra tüp içerisine 1 ml besiyeri eklenmiş ve hücre pelleti tamamen çözünür hale getirilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonundan, 10 μl alınarak, ependorf tüp içerisinde 10 μl trypan blue ile karıştırılmıştır. Thoma lamı üzerine 10 μl süspansiyon konarak ışık mikroskopunda (Olympus) boya almayan hücreler sayılmış ve 1ml'de bulunan canlı hücre sayısı belirlenmiştir.

1ml'deki hücre sayısı = kare başına ortalama sayı x seyreltme faktörü x 10^4 formülü ile hesaplanmıştır.

3.2.7.Hücrelerin testler için hazırlanması

Hücre sayımı yapıldıktan sonra WST-1 testi için gereken hücre sayısına göre seyreltme yapılmıştır. Sonrasında hücreler 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına her kuyucukta 200-400 canlı hücre/100 μl olacak şekilde hücre süspansiyonu aktarılmıştır. Hücrelerin yeni ortama uyumu için 37°C 'de 24 saat inkübasyon sağlanmıştır. 24 saat sonra hücreler üzerine ekstraktların istenen final konsantrasyonlarını içeren besiyerleri (1/1000, 1/2500, 1/5000 ve 1/10000) ilave edilip 24, 48 ve 72 saat 37°C 'de CO_2 inkübatöründe inkübe edilmiştir. Final konsantrasyonlar plakada bulunan hücre kültürü ortamının miktarına dikkat ederek hesaplanmıştır.

3.2.8. Kandan mononükleer hücre eldesi

İlk olarak 6 ml insan kanı EDTA içermeyen tüpe alınarak, pıhtılaşmasına izin verilmeden 1'e 1 hacimde serum fizyolojikle sulandırılmıştır. Falkon tüpü içerisine son hacmin üçte biri olacak şekilde fikoll ayırıcı konduktan sonra üzerine kan ve SF karışımı yavaşça tabakalandırılmıştır. 25 dakika 1800 rpmde santrifüj yapıldıktan sonra beyaz renkli tabaka yeni bir falkon tüpüne alınıp, 10 dakika daha santrifüj yapılmıştır. Süpernatant atılıp, dipteki pellet dolu besiyeri ile (1ml) sulandırılarak thoma lamıyla hücre sayımı yapılmıştır. Daha sonra WST-1 testi için gereken sayıda hücre hazırlanıp, her kuyucukta 200-400 canlı hücre/100 µl olacak şekilde, 96 kuyucuklu plakalara dağıtılmıştır. Multipl miyelom hücre hatları üzerine uygulanan ekstraktlar, aynı oranlarda mononükleer hücreler üzerine de uygulanmıştır.

3.2.9.WST-1 testi

24 – 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinin sonunda hücre besiyerlerinden herhangi bir aktarım yapmadan üzerlerine direkt WST-1 eklenmiştir. Plakalar daha sonra tekrar 37°C'de 2-3 saat CO₂ inkübatöründe inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda plakalardaki hücrelerin optik dansite ölçümleri ELISA reader cihazında 420-480 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Ekstraktlar ve vinka alkaloidleri ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı % 100 olarak kabul edilerek, hücrelerin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Bu test 3 kez tekrar edilmiştir ([Mosmann, 1983](#)).

$$\% \text{ viyabilite} = (\text{test kuyucuğunun absorbansı} / \text{kontrol kuyucuğunun absorbansı}) \times 100$$

Kontrole göre % 50 oranında sitotoksik etki gösteren konsantrasyon sitotoksik doz olarak kabul edilmiştir (IC₅₀).

3.2.10. DNA izolasyonu

Yapılan WST-1 testi sonucu her bir ekstrakt için optimal olarak 48 saatlik uygulama için IC₅₀ konsantrasyonu (hücre canlılığını % 50 inhibe eden konsantrasyon) hesaplanmıştır.

Her bir ekstrakt ve kontrol grubu için 12 kuyucuklu plakalara aynı sayıda hücre ekimi yapılmış ve 24 saat sonra her bir ekstraktın final IC₅₀ konsantrasyonu ve kontrol grubuna ise sadece ekstraktların içerdiği miktar kadar DMSO içeren bazal medyum eklenerek 48 saat inkübe edilmiştir. 48 saatin sonunda tüm kuyucuklarda bulunan medyum (ortam) pipetaj yapılarak falkon tüpüne toplanmış ve sonra santrifüjleme ile dibe çöktürülmüştür. Elde edilen hücre pelletlerinden Fermentas Genomic DNA purification kiti aracılığıyla DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla dibe çöktürülen hücre pelletleri 200 µl TE tamponu içinde çözüldükten sonra üzerine 400 µl lizis solusyonu eklenmiş, 65°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında tüplere 600 µl kloroform eklenerek birkaç kez ters düz edilmiştir. Tüpler 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra üst faz yeni tüpe alınarak üzerine 800 µl presipitasyon solusyonu eklenmiş, oda sıcaklığında birkaç dakika bekletilip tekrar 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Üst faz atıldıktan sonra pellet NaCl ile tamamen çözünmüş, üzerine soğuk etanol eklenmiştir. Tüpler DNA presipitasyonu için -20 C'de 15 dakika bekletilmiştir. 10.000 rpm'de 3-4 dakika santrifüjden sonra pellet % 70'lik alkolle yıkanmış ve takiben steril saf suda çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen DNA'ların kalite ve konsantrasyon değerleri Nanodrop 2000 cihazında ölçülmüştür. Ardından % 2'lik (w/v) agaroz jelde yürütülerek DNA fragmentasyonu olup olmadığı saptanmaya çalışılmıştır.

3.2.11. RNA izolasyonu ve Real Time PCR

Her bir ekstrakt ve kontrol grubu için 12 kuyucuklu plakalara aynı sayıda hücre ekimi yapılmış ve 24 saat sonra her bir ekstraktın IC₅₀ konsantrasyonu ve kontrol grubuna ise sadece ekstraktların içerdiği miktar kadar DMSO eklenerek inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda tüm kuyucuklarda bulunan medyum (ortam) pipetaj yapılarak falkon tüpüne toplanmış ve sonra santrifüjle dibe çöktürülmüştür. Pelletlerden, Axygen RNA izolasyon Kiti aracılığıyla üreticinin verdiği basamaklar takip edilerek total RNA izolasyonu yapılmıştır.

Süspansiyon içinde 2×10^6 - 1×10^7 hücre sayılarak 2000g'de 5 dk santrifüj edilmiş, supernatant atılmıştır. Sonrasında kitin sağladığı R-I tamponundan 400 µl eklenerek, pipetleme yoluyla homojen hale gelmesi sağlanmıştır. Tüpler üzerine 150 µl R-II tamponu eklenmiş, vorteks ile karıştırılmıştır. 12.000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Takiben

supernatant yeni bir tüpe alınmış ve üzerine 250 µl izopropanol eklenerek iyice karışması sağlanmıştır. Kitin içerisinde bulunan spin/vac kolonu yeni bir 2 ml'lik tüpe konduktan sonra elimizdeki karışım kolona aktarılmıştır. 6.000 g'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Alttaki süzöntü atıldıktan sonra kolona 500 µl W1A tamponu eklenmiş ve 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Alttaki süzöntü tekrar atıldıktan sonra 700 µl W2 tamponu eklenerek 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrar edildikten sonra kolona herhangi bir tampon eklenmeden boş olarak 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. İşlem sonunda kolon yeni bir tüpe alınarak içine 70-100 µl TE tamponu eklenmiştir. 1 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen RNA'lar -86 °C'de saklanmıştır. Total RNA'ların, konsantrasyonları ve saflık dereceleri Nanodrop 2000 cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Alınan konsantrasyon değerleri göz önünde bulundurularak PCR sonuçlarının daha objektif olarak değerlendirilmesi için eşit konsantrasyonda (0,5 mikrogram) total RNA, Fermentas First Strand cDNA kit aracılığıyla ters transkripsiyona uğratarak cDNA'ya çevrilmiştir. Sonrasında Real Time PCR ile apoptotik gen bölgelerinin amplifikasyonu yapılmıştır. Her örnek için hazırlanan karışım miktarları tablo 3.2 'de verilmiştir.

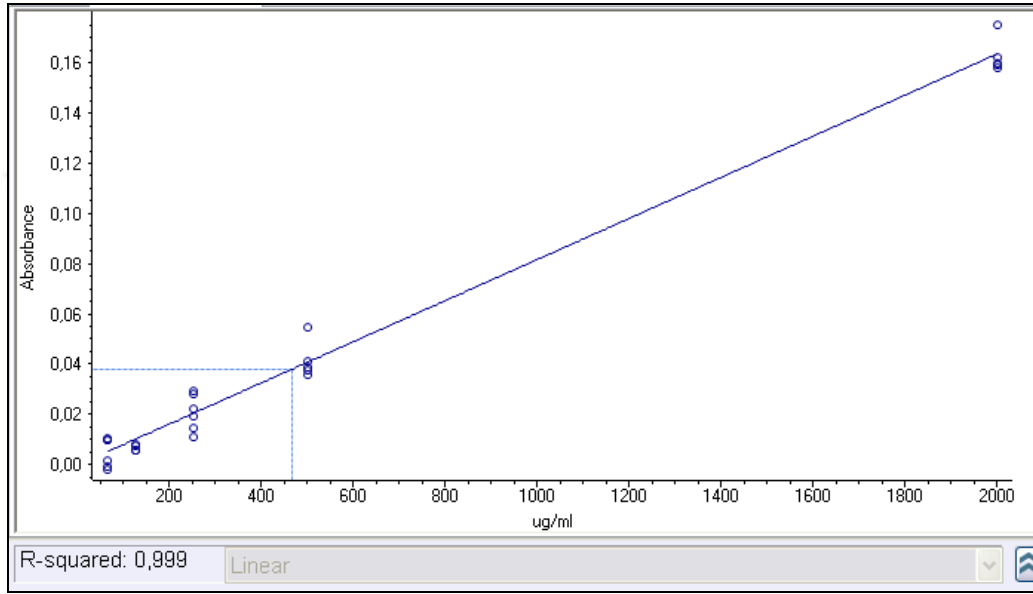
Komponent	Miktar
cDNA	1µl
Primer	1µl
dH ₂ O	3µl
Cybergreen master mix	5µl

Tablo 3.2. Real Time PCR'da kullanılan komponent miktarları

Çalışmamızda 18 apoptotik ve 3 housekeeping gen bölgesinin amplifikasyonu yapılmıştır. Elde edilen veriler Excel programında değerlendirilerek grafikler haline dönüştürülmüştür.

3.2.12. Kaspaz 3 enzim aktivitesinin ölçülmesi

Kaspaz 3 enzim aktivitesi Ab Caspase 3 Assay Kit aracılığıyla değerlendirilmiştir. Her örnek için $1-5 \times 10^6$ hücre sayıldıktan sonra, hücreler 50 µl doku lysis (parçalama) tamponuyla süspansiyon edilmiş sonrasında buz üzerinde 10 dakika bekletilmiştir. Homojenat 10.000 g'de santrifüj edildikten sonra süpernatant yeni tüpe alınarak protein konsantrasyonu ölçülmüştür. Protein konsantrasyonunu ölçmek için Bradford yöntemi kullanılmıştır.



Şekil 3.3. Bradford deneyinde kullanılan standartların absorbans ölçümleri

Protein konsantrasyonları belirlendikten sonra tüpler içerisinde 50- 200 µg protein olacak şekilde 50 µl doku lysis (parçalama) tamponunda dilüte edilmiştir. Tüplere sonrasında 50 µl 2X buffer eklendikten sonra 5'er µl 4 mM DEVD- PNA eklenmiştir. 37 °C'de 1-2 saat inkübe edildikten sonra Elisa Reader'da 400-405 nm'de okutulmuştur. Elde edilen sonuçlar, kontrol grubuna oranlanarak kaspaz 3 enzim aktivitesi belirlenmiştir. Veriler Excel programı kullanılarak grafik haline getirilmiştir.

3.2.13. Flow Sitometri

Her bir ekstrakt ve kontrol grubu için 12 kuyucuklu plakalara kitte belirtilen miktarda ($10^5 - 10^6$ /ml) hücre dağıtılmış ve 24 saat sonra her bir ekstraktın final IC₅₀ konsantrasyonu ve kontrol grubuna ise sadece ekstraktların içerdiği miktar kadar DMSO eklenerek 24- 48 saat inkübasyon sağlanmıştır. Süre sonunda kuyucuklardaki örnekler pipetleme yapılarak 2ml'lik endorff tüpe toplanmış, 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatantlar dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldıktan sonra soğuk PBS ile işlem tekrarlanmıştır. Takiben her tüpe 96 µl 1X Annexin- V binding buffer eklenmiş, üzerine 1 µl Annexin V-FITC konjugat ve 12,5 µl Propidyum iyodür eklenmiştir. Örnekler buz üzerinde 10 dakika bekletildikten sonra 1X Annexin- V binding buffer ile son hacim olan 250 µl'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan örnekler vakit kaybetmeden analiz edilmiştir. Analiz için BD-Facs-Aria III cihazı kullanılmıştır. Çalışmanın analiz kısmı hizmet alımı karşılığı Selçuk Üniversitesi Araştırma ve Geliştirme merkezinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.14. Hücre İnvazyon Testi

12 kuyucuklu plakalara yerleştirilen hücre kültürü insertleri serum içermeyen hücre medyumunu ile rehidre edilmiştir. Serum içermeyen besiyeri ortamında hücre süspansiyonları $0,5-1 \times 10^6$ hücre /ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra insert içindeki rehidratasyon solüsyonu dikkatlice aspire edilmiştir. Ardından her insert içine 300 µl hücre süspansiyonu ve ekstraktların IC₅₀ dozları eklenmiştir. İnsertlerin yerleştirildiği plakaya ise serum içeren besiyeri ortamı konmuştur. Hücreler bu şekilde 37 ° C'de % 5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. Süre sonunda insert içindeki besiyeri ortamı dikkatlice aspire edilmiştir. Pamuk swablar ile insertin iç kısmı non-invaziv hücrelerden arındırılmıştır. Sonrasında insert yeni cell stain solüsyonu içeren plakaya transfer edilmiştir. 10 dk bekletildikten sonra insertler birkaç kez su ile çalkalanmıştır. Ardından insertler kurumaya bırakılmıştır. Sonrasında her insert boş bir kuyucuğa konup 200 µl ekstraksiyon tamponu eklenmiş 10 dakika orbital çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Her insert içinden 100'er µl örnek 96 kuyucuklu plakaya aktarıldıktan sonra 560 nm'de Eliza Reader'da ölçüm yapılmıştır. Alınan sonuçlar kontrol grubu ile kıyaslanarak hücrelerin invazyon kapasiteleri hesaplanmıştır. Veriler Excel programı kullanılarak grafik haline getirilmiştir.

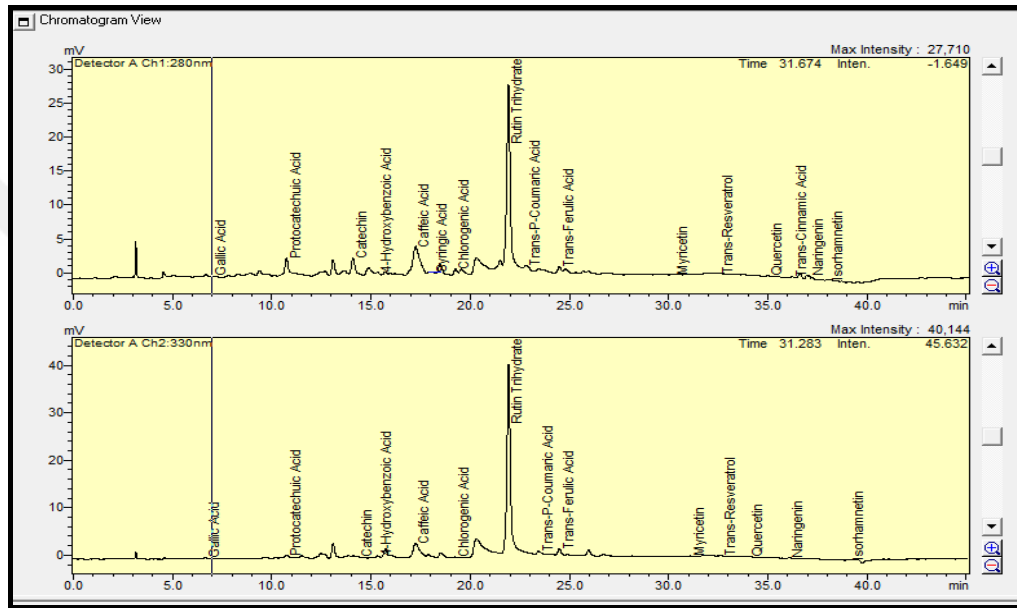
3.2.15. İstatistiksel analizler

Absorbans ölçümlerine ait değerler her hücre hattının kendi kontrol grubunun absorbans değerine oranlanarak % viyabilite olarak ifade edilmiştir. Deney sonuçlarının değerlendirilmesinde Graph Prism 7 programı kullanılmıştır. Ayrıca, ham verilerin bilgisayarda toplanması ve istatistiksel değerlendirmesi yapılmış verilerden grafiklerin hazırlanmasında Microsoft Excel (Office 2010) programından yararlanılmıştır. Ekstrakt uygulanan gruplar ve kontrol grubu arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ve Dunnett testi uygulanarak istatistiksel değerlendirme altına alınmıştır. $p < 0.05$ düzeyinde sonuçlar arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir. Grafikler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı kabul edilen veriler * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$, *** $p < 0.002$, **** $p < 0.001$ olarak gösterilmiştir.

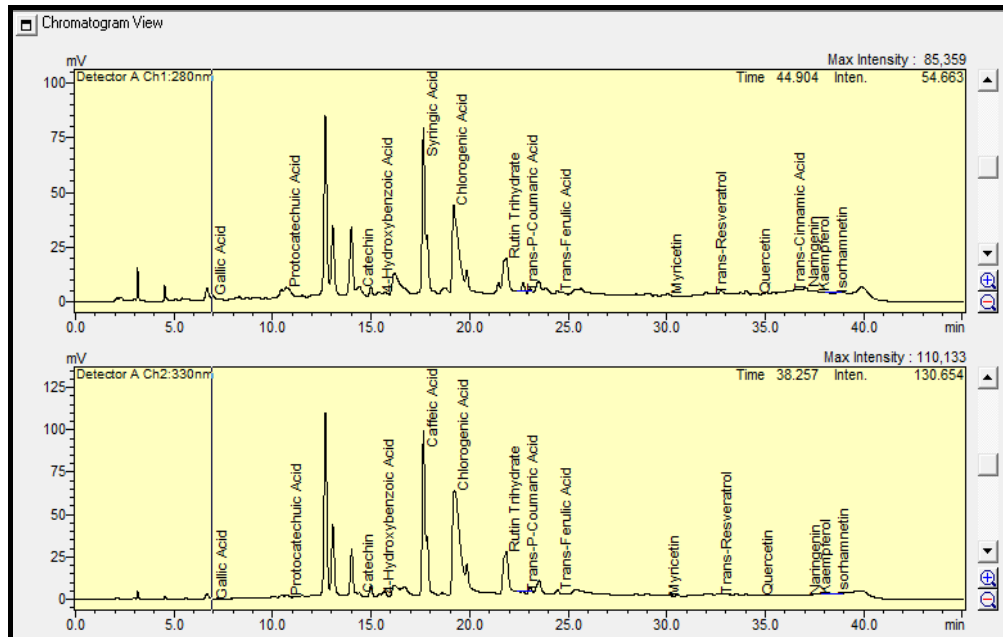
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Fenolik bileşiklerin HPLC ile karakterizasyonu

V. herbacea ve *V. soneri* türlerinin toprak üstü kısımlarından elde edilen metanolik ekstraktların HPLC (Yüksek basınçta sıvı kromatografisi) kromatogram görüntüleri ve karşılaştırmalı olarak fenolik madde analizlerini gösteren sonuçlar Şekil 4.1. ve 4.2.'de ve Tablo.4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. *Vinca herbacea* ekstraktının kromatogram görüntüsü



Şekil 4.2. *Vinca soneri* ekstraktının kromatogram görüntüsü

Bileşik İsmi	<i>V. herbacea</i> (mg/100g bitki)	Standart Sapma	<i>V.soneri</i> (mg/100g bitki)	Standart Sapma
Gallik Asit	3,25	1,13	6,42	0,84
Protokateşuik Asit	66,30	9,30	64,05	0,92
Kateşin	245,31	14,43	246,28	4,10
4-Hidroksibenzoik Asit	15,33	5,35	29,41	2,30
Kafeik Asit	107,75	10,66	18,27	1,12
Siringik Asit	6,42	1,75	128,14	2,16
Klorogenik Asit	25,27	8,23	401,23	7,83
Rutin Trihidrat	1280,25	105,94	277,89	66,82
Trans-P-Kumarik Asit	8,69	9,66	7,31	1,89
Trans-Ferulik Asit	10,46	6,37	12,77	0,50
Mirsetin	9,05	7,68	55,01	5,22
Trans-Resveratrol	4,66	3,65	8,31	1,30
Quersetin	2,85	0,91	18,36	4,87
Trans-Cinnamic Asit	0,29	0,04	8,35	3,04
Naringenin	2,82	0,67	26,48	12,03
Kaemferol	-	-	33,35	4,45
Isorhamnetin	2,74	0,86	1,54	0,26

Tablo.4.1. *V. herbacea* ve *V.soneri* ekstraktlarının karşılaştırmalı fenolik madde içerikleri

HPLC analizleri ile *V.herbacea* ekstraktında 16, *V.soneri* ekstraktında ise 17 fenolik madde varlığı tespit edilmiştir. *V.herbacea* ekstraktında kaemferol flavinoidi tespit edilememiştir. *V.herbacea* ekstraktının fenolik içeriğine bakıldığında miktar olarak sırasıyla rutin trihidrat, kateşin, kafeik asit ve protokateşuik asitin fazla miktarlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Endemik bir tür olan *V. soneri* ekstraktında miktar olarak sırasıyla klorojenik asit, rutin trihidrat, kateşin ve protokateşuik asitin bulunduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen veriler doğrultusunda ekstraktlar içinde yer alan biyoaktif fitokimyasalların miktarlarında bazı farklılıklar gözlenmiştir. Örneğin; kafeik asit ve rutin trihidrat miktarları *V.herbacea*'dan elde edilen ekstraktta fazla iken, şiringik asit, klorojenik asit, mirsetin, quersetin ve kamferol miktarları *V.soneri*'den elde edilen ekstraktta fazla oranda bulunmuştur. Böylece her iki ekstraktın içeriğinde kanser hücreleri üzerinde özellikle anti proliferatif ve apoptotik etkileri olduğu bilinen bileşenlerin yer aldığı tespit edilmiştir. Örneğin; her iki ekstrakt içeriğinde bulunan fenolik maddelerden kafeik asit ve klorojenik asitin antioksidan özellik gösterdiği ve in vitro olarak mutajenik ve karsinojenik N-nitrozo bileşiklerinin oluşumunu inhibe ettiği rapor edilmiştir ([Han ve ark., 2007](#)). Aynı zamanda ekstraktlarda bulunan quercetin, kamferol, mirsetin ve bunların glikozitleri (örneğin, rutin) antikanser özelliği bilinen birçok şifalı bitki örneğinde, *Sophora japonica* ve *Rosa chinensis*'in çiçeklerinde, *Artemisia annua*'nın toprak üstü kısımlarında, *Alpinia officinarum*'un rizomlarında ve *Crataegus pinnatifida*'nın (alıç) meyvelerinde bulunmaktadır ([Cai ve ark., 2004](#); [Shan ve ark., 2005](#)). Ekstraktların içeriğinde bulunan gallik asidin hem mitokondriyal yolak (intrinsik yolak) hemde Fas/FasL yolları (ekstrinsik yolak) ile apoptozu indüklediği rapor edilmiştir ([Verma ve ark., 2013](#)). Kateşinin multipl miyelom hücre hattı RPMI-8226 üzerindeki apoptoz indükleyici etkileri daha önce rapor edilmiştir([Qian ve ark., 2012](#)).

Her iki ekstraktta farklı oranlarda bulunan quercetinin multipl miyelom hücreleri üzerindeki anti-miyelom, proliferasyonu baskılayıcı ve apoptoz indükleyici etkileri daha önce yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir ([Ma ve ark., 2014](#); [Guo ve ark., 2015](#); [He ve ark., 2016](#)).

[Nishibe ve ark. \(1996\)](#) tarafından yapılan çalışmada *Catharantus roseus* ve *Vinca minor* bitkilerinin yaprak kısımlarından elde edilen ekstraktların fenolik içeriği belirlenmiştir. *Catharantus roseus* yaprağında başlıca kamferol, mauritianin ve klorojenik asit, *Vinca minor* yaprağında ise kamferol, dihidroksi benzoik asit ve

klorojenik asit varlığı tespit edilmiştir. İçerikte bulunan kamferol ve klorojenik asit varlığı açısından çalışmamızla uyum göstermektedir.

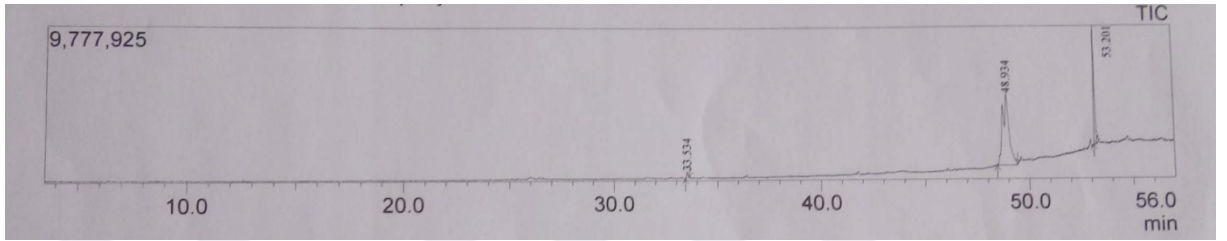
[Rao ve Ahmed \(2014\)](#) tarafından yapılan çalışmada vinka alkaloidlerinin elde edildiği bitki türü olan *Catharantus roseus*'un fenolik madde içeriği, HPLC metodu ile belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmada bitki içeriğinde antioksidan aktiviteye sahip fenolik bileşenlerden, rutin, quersetin ve kamferol varlığı tespit edilmiştir. Saptanan rutin, quersetin ve kamferol oranları sırasıyla % 21.59, % 0.12 ve % 0.028 'dir. Çalışmamızda elde edilen HPLC verileri *V.herbacea*'den elde edilen ekstraktta yüksek oranda rutin varlığını gösterirken (% 71.4) bunun yanı sıra ekstrakt içeriğinde quersetininde (% 0.15) yer aldığını göstermiştir. *V.soneri*'den elde edilen ekstraktta rutin, quersetin ve kamferol varlığı tespit edilmiştir. Miktarları sırasıyla % 20.6, % 1.36 ve % 2.48 olarak saptanmıştır (Tablo 4.1.).

[Proestos ve ark. \(2005\)](#) tarafından yapılan çalışmada *Vinca rosea*'da RP-HPLC yöntemi ile ferrulik asit (1.1–280 mg/100 g), kafeik asit (1.2–60 mg/100 g) ve gallik asit (1-21 mg/100g) varlığını tespit etmişlerdir. Çalışmamızda *V.herbacea* ve *V.soneri* bitkilerinde kafeik asit ve gallik asit varlığı HPLC yöntemi ile belirlenmiştir. Miktarları sırasıyla gallik asit 3,25-6,42 mg/100 g ve 107,75-6,42 mg/100 g olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.1.).

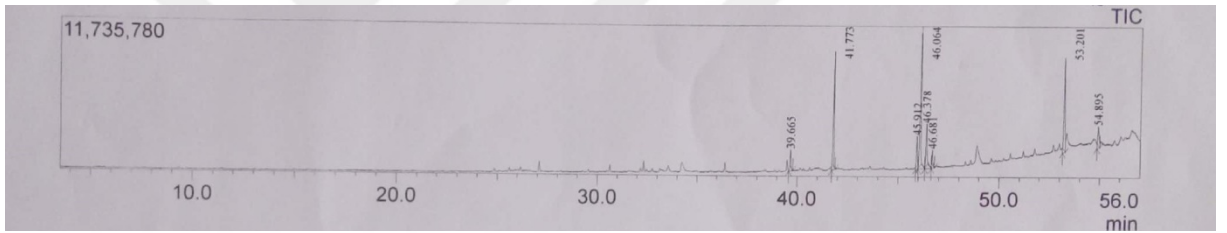
[Saraç ve ark. \(2015\)](#) tarafından yapılan çalışmada *Vinca major* subsp. *hirsuta*'nın fenolik içeriği belirlenmiştir. RP-HPLC-UV metoduyla çiçek, gövde ve yaprakta fenolik bileşiklerden, gallik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit ve p-kumarik asit varlığı ve miktarları tespit edilmiştir. Yapraktan elde edilen ekstraktta klorojenik asit miktarının fazla olduğu tespit edilmiştir. Sözü geçen çalışmada 17 fenolik madde taraması yapılmış ve ekstraktların içeriğinde 5 fenolik madde belirlenmiş ve tespit edilen fenolik bileşenler çalışmamızla uygunluk göstermekle birlikte miktar açısından belirgin farklılıklar görülmüştür; örneğin yapraktan elde edilen sonuçlar klorojenik asit miktarının 5344,93 µg/g, kafeik asit miktarının 119,87 µg/g ve gallik asit miktarının 9,22 µg/g olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra çalışmada çiçek ve yaprakta tespit edilen vanilik asit yapmış olduğumuz analizlerde tespit edilmemiştir.

4.2. Ekstraktların GC- MS/MS ile karakterizasyonu

GC-MS/MS analizi ile araştırma konusu olan ekstraktlar uçucu yağlar açısından incelenmiş ve içerikte en fazla oranda bulunan bileşenler dikkate alınmıştır. GC-MS/MS analizi sonucunda elde edilen kromotogramlar Şekil 4.3 ve 4.4'te, ekstraktların içerdiği uçucu yağlar Tablo 4.2 ve 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.3. *V. herbacea* ekstraktına ait GC-MS/MS kromotogramı



Şekil 4.4. *V. soneri* ekstraktına ait GC-MS/MS kromotogramı

Pik	Retansiyon zamanı	Alan	Alan Yüzdesi	Ağırlık	Ağırlık Yüzdesi	Alan / Ağırlık	Bileşen İsmi
1	33.534	1719770	1.36	394279	3.14	4.36	1,4-Metanobenzensik lodecan
2	48.934	98670595	77.84	4550635	36.22	21.68	Tetrapentakontan
3	53.201	26377727	20.81	7618350	60.64	3.46	Fenol, 2.2'-metilenbis
		126768092	100.0	12563264	100.0		

Tablo.4.2. *V. herbacea* ekstraktı GC-MS/MS sonuç tablosu

Pik	Retansiyon zamanı	Alan	Alan Yüzdesi	Ağırlık	Ağırlık Yüzdesi	Alan / Ağırlık	Bileşen İsmi
1	39.665	5705684	4.01	1701594	4.38	3.35	2- Pentadekanon
2	41.773	28879622	20.29	9274711	23.88	3.11	Hekzadekanoik asit
3	45.912	8625021	6.06	2607430	6.71	3.31	9,12- Oktadekadioenik asit
4	46.064	41069063	28.85	11100585	28.59	3.70	6- oktadekanoik asit
5	46.378	16585337	11.65	3525045	9.08	4.71	Fitol izomer
6	46.681	5624973	3.95	1472724	3.79	3.82	Metil stearat
7	53.201	27669470	19.44	7442334	19.17	3.72	Fenol, 2.2'- metilenbis
8	54.895	8174202	5.74	1706478	4.39	4.79	Tetrapentakontan
		142333372	100.0	38830901	100.0		

Tablo. 4.3. *V. soneri* ekstraktı GC-MS/MS sonuç tablosu

GC-MS/MS analiz sonuçları değerlendirildiğinde her iki ekstrakt içeriğinde yağ asitleri bakımından belirli farklılıklar olduğu görülmektedir. *V. herbacea* ekstraktında temel olarak üç komponent mevcuttur, bunlar; 1,4-Metanobenzensiklodecan, Tetrapentakontan ve Fenol, 2.2'- metilenbistir. Ekstrakt içinde en dikkat çekici olan yaklaşık %78 oranında bulunan tetrapentakontandır. Tetrapentakontan doymuş alifatik bir hidrokarbondur. Ekstraktta fenol, 2.2'- metilenbis ise yaklaşık % 21 oranında bulunmaktadır.

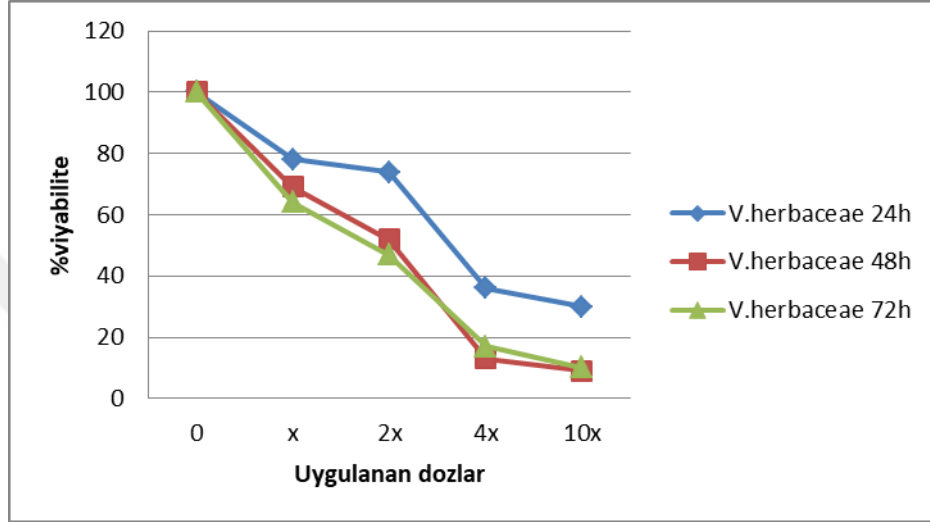
V. soneri ekstraktının GC-MS/MS sonuçlarına baktığımızda *V. herbacea*'den farklı olarak 2- Pentadekanon, hekzadekanoik asit, 9,12- Oktadekadioenik asit, 6- oktadekanoik asit, fitol izomer ve metil stearat varlığı tespit edilmiştir. Ekstrakt içinde en fazla miktarda bulunan bileşen 6- oktadekanoik asittir. Ekstraktta fenol, 2.2'- metilenbis %~20 ve Tetrapentakontan %~6 oranlarında bulunmaktadır.

Her iki ekstraktta da değişen oranlarda ortak olarak bulunan tetrapentakontan kanser hücreleri üzerinde sitotoksik ve apoptotik etki gösteren birçok bitkinin içeriğinde bulunan bir bileşiktir. *Sida rhombifolia* L. bitkisinden elde edilen hekzan ekstraktının GC/MS analizi sonucunda % 4.68 oranında tetrapentakontan içerdiği tespit edilmiştir. Çalışmada ekstraktın aynı zamanda SNU-1 ve HepG2 hücre hatları üzerinde sitotoksik etkileri olduğu ve bitkinin alternatif tıpta kullanılabilir olduğu rapor edilmiştir ([Mah ve ark., 2017](#)). *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng bitkisinden elde edilen ekstraktlar GC/MS ile analiz edildiğinde metanolik ekstraktta % 11.32 oranında, hekzan

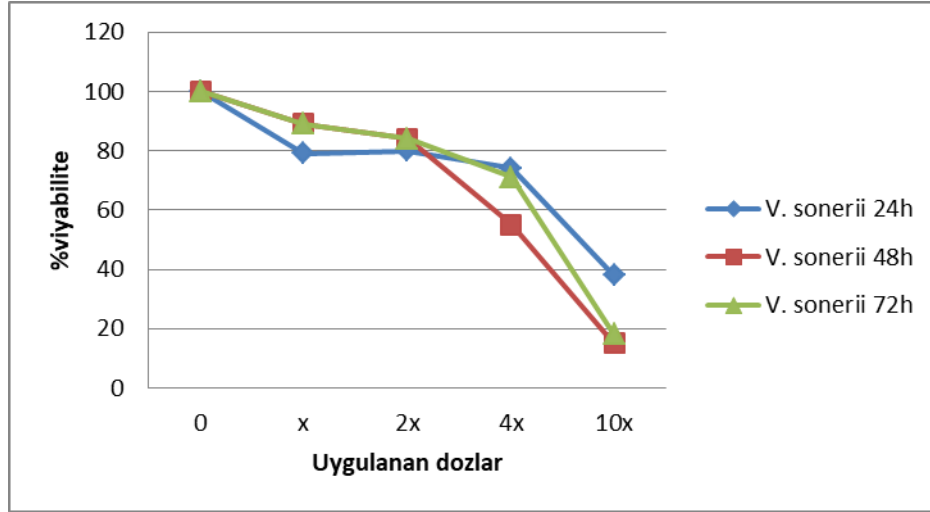
ekstraktında ise % 13.77 oranında tetrapentakontan varlığı tespit edilmiştir([Swamy ve ark., 2017](#)). *Plectranthus amboinicus* bitkisinin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi daha önce rapor edilmiştir([Yulianto ve ark., 2016](#)) Bitkinin neoplastik ([Brandao ve ark., 2013](#)) ve apoptotik etkilerini gösteren ([Dev ve Menon, 2017](#)) çalışmalar mevcuttur. *Mallotus tetracoccus* (Roxb.) Kurz bitkisinin yapraklarından elde edilen etanolik ekstrakt içeriği GC/MS yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışmada tespit edilen tetrapentakontan oranı % 2.9'dur ([Ramalakshmi ve Muthuchelian, 2011](#)). Aynı zamanda bitkinin göğüs kanserinde nano ilaç geliştirilmesinde kullanılabilir olduğu rapor edilmiştir ([Subbiah ve Muthuchelian, 2016](#)). Tetrapentakontanın multipl miyelom üzerine tek başına etkileri konusunda herhangi bir rapor bulunmamaktadır. Çalışmamızda GC- MS/ MS analizleri yapılan ekstraktlarda bulunan tetrapentakontan miktarları bu çalışmalardan farklılık gösterse de özellikle kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösteren bitkilerde aynı bileşenin bulunuyor olması dikkat çekicidir.

4.3. Ekstraktların sitotoksik etkilerinin WST-1 Testi ile Ölçülmesi

Her iki hücre hattı için 4 farklı doz (1/10000, 1/5000, 1/2500, 1/1000) ve 3 zaman aralığında (24, 48, 72 saat) gerçekleştirilen WST-1 analizi sonuçları % viyabilite (canlılık) grafiği olarak gösterilmiştir. Ekstraktların ARH-77 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerini gösteren grafikler Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.'da verilmiştir.



Şekil.4.5. ARH-77 hücre hattı *V.herbacea* ekstraktı WST-1 sonuçları (x=1/10.000, 2x=1/5000, 4x=1/2500, 10x=1/1000)

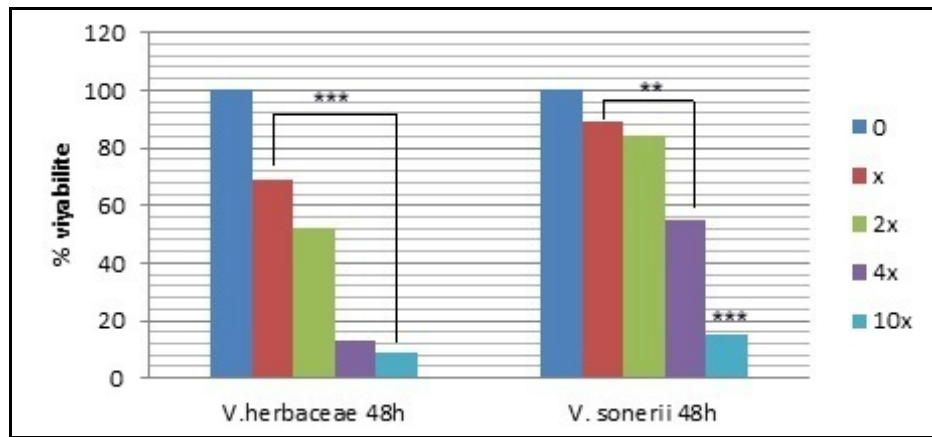


Şekil. 4.6. ARH-77 hücre hattı *V.soneri* WST-1 sonuçları (x=1/10.000, 2x=1/5000, 4x=1/2500, 10x=1/1000)

ARH-77 hücre hattı için WST-1 testi sonuçlarımız değerlendirildiğinde, *V.herbacea* ekstraktı 24 saatlik uygulama sonunda, 1/10000lik dozda % 22, 1/5000lük dozda % 26, 1/2500lük dozda % 64 ve en yüksek dozda 1/1000'de % 70, *V.soneri*'den

elde edilen ekstrakt, 24 saatlik uygulama sonunda, 1/10000lik dozda % 21, 1/5000lük dozda % 20, 1/2500lük dozda % 36 ve 1/1000'de % 62 oranında hücre ölümüne neden olmuştur. Uygulanan ekstraktların 48 saat sonundaki etkilerine baktığımızda *V.herbacea*'nin 1/10000lik dozda % 31, 1/5000lük dozda % 48, 1/2500lük dozda % 87 ve en yüksek dozda % 91, *V.soneri*'nin 1/10000lik dozda % 11, 1/5000lük dozda % 16, 1/2500lük dozda % 45 ve 1/1000'de % 85 oranında hücre ölümüne yol açtığı tespit edilmiştir. Ekstraktların 72 saatlik uygulama sonrası etkilerine baktığımızda ise *V.herbacea*'nin 1/10000lik dozda % 36, 1/5000lük dozda % 53, 1/2500lük dozda % 83 ve 1/1000'de % 90 oranlarında hücre ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir. 72 saatlik uygulama sonunda ise 1/10000lik dozda % 12, 1/5000lük dozda % 16, 1/2500lük dozda % 30 ve 1/1000'de % 88 oranında hücre ölümüne sebep olduğu görülmüştür. Ekstraktların IC₅₀ dozları 24 saat için *V.herbacea* 1/3750, *V.soneri* 1/1500, 48 saat için sırasıyla 1/5000 ile 1/2500 ve 72 saat için 1/5000 ile 1/ 1750 olarak hesaplanmıştır.

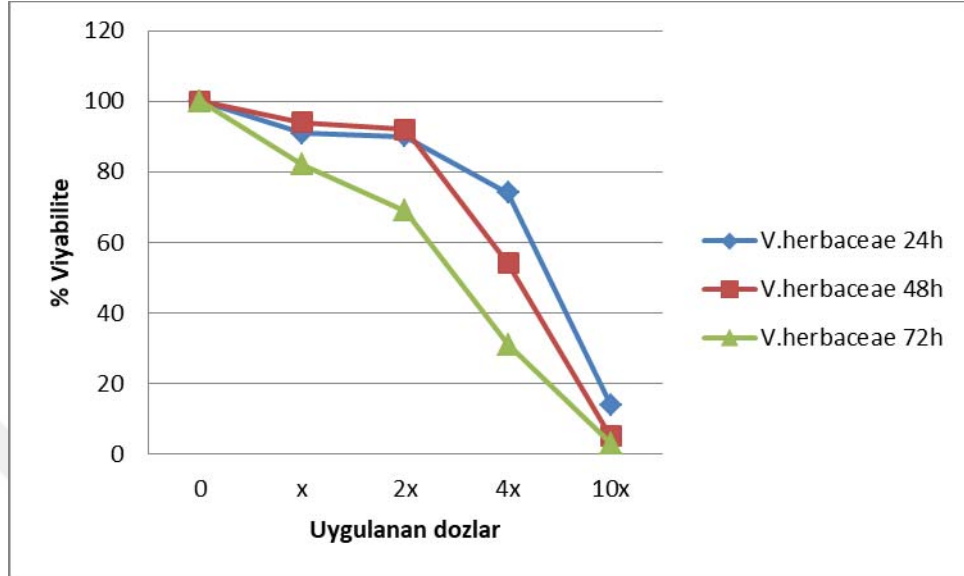
ARH-77 hücre hattı için WST-1 sonuçlarını genel olarak ele aldığımızda kullanılan ekstraktlardan *V.herbacea* ekstraktının hücreleri ölüme götürmede *V.soneri* ekstraktından daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra kullanılan her iki ekstraktta multipl miyelom hücreleri üzerinde doza ve zamana bağlı sitotoksik etki göstermiştir. Ekstraktların optimal 48 saatlik uygulamalarına ait WST-1 testi sonuçları kıyaslandığında ekstraktlar arasındaki etkisel fark açık olarak görülmektedir (Şekil 4.7).



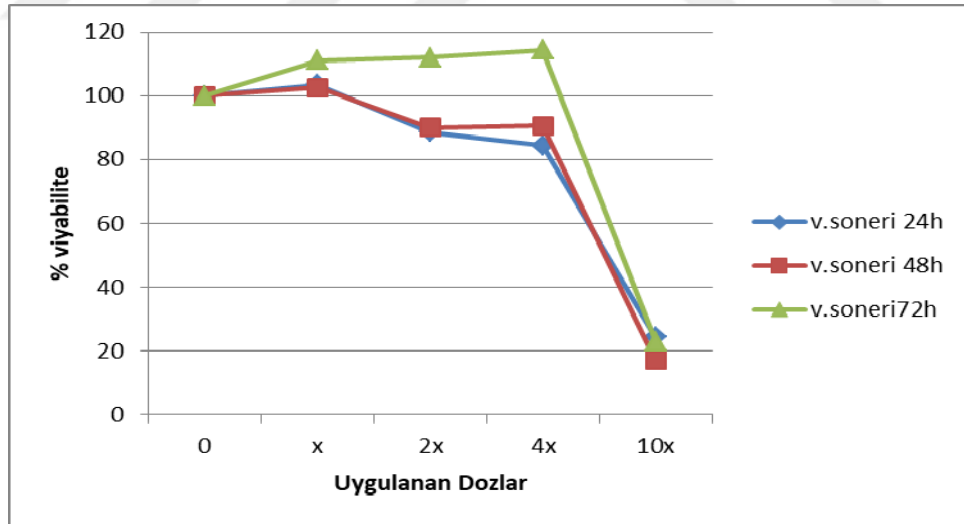
Şekil 4.7. ARH-77 hücre hattı 48 saatlik WST-1 sonuçları (x=1/10.000, 2x=1/5000, 4x=1/2500, 10x=1/1000)

Diğer taraftan, elde ettiğimiz ekstraktların RPMI-8226 hücre hattı üzerindeki etkilerine baktığımızda ARH-77 hücre hattına nazaran daha az hücre ölümü gözlenmiştir. Buradan diğer hücre hattına kıyasla RPMI-8226'nın, uygulanan bitkisel

ekstraktlara daha dirençli bir multipl miyolem hattı olduğu söylenebilir. Ekstraktların RPMI-8226 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerini gösteren grafikler Şekil 4.8. ve Şekil 4.9. 'da verilmiştir.



Şekil. 4.8. RPMI-8226 hücre hattı *V. herbacea* ekstraktı WST-1 sonuçları ($x=1/10.000$, $2x=1/5000$, $4x=1/2500$, $10x=1/1000$)

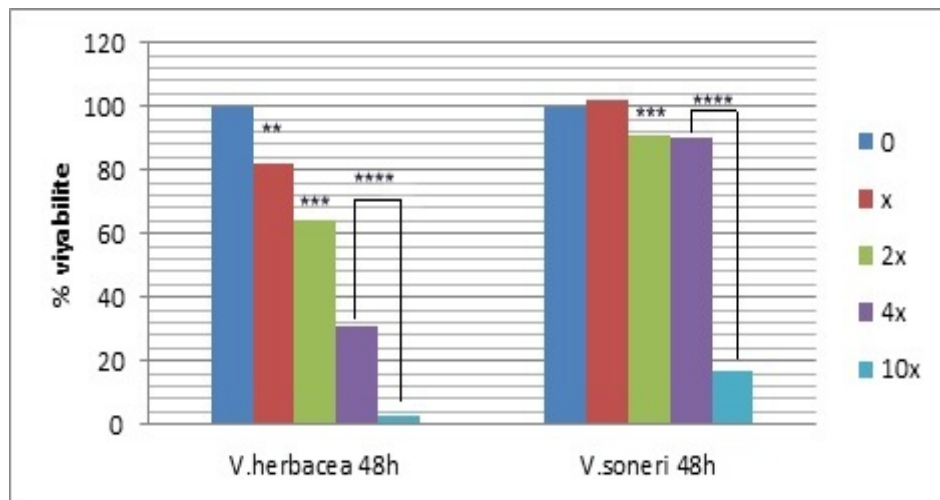


Şekil. 4.9. RPMI-8226 hücre hattı *V. soneri* ekstraktı WST-1 sonuçları ($x=1/10.000$, $2x=1/5000$, $4x=1/2500$, $10x=1/1000$)

RPMI-8226 hücre hattı için WST-1 testi sonuçlarımız değerlendirildiğinde, *V. herbacea* ekstraktı 24 saatlik uygulama sonunda, $1/10000$ lik dozda %11, $1/5000$ lük dozda % 10, $1/2500$ lük dozda % 26 ve en yüksek dozda $1/1000$ 'de % 84, *V. soneri*'den elde edilen ekstrakt, 24 saatlik uygulama sonunda, $1/10000$ lik dozda hücre ölümüne

neden olmazken, 1/5000lük dozda % 12, 1/2500lük dozda % 16 ve 1/1000'de % 76 oranında hücre ölümüne neden olmuştur. Uygulanan ekstraktların 48 saat sonundaki etkilerine baktığımızda *V.herbacea*'nin 1/10000lik dozda % 28, 1/5000lük dozda % 31, 1/2500lük dozda % 69 ve en yüksek dozda % 95, *V.soneri*'den elde edilen ekstrakt en düşük dozda hücre ölümüne sebep olmazken, 1/5000lük dozda % 10, 1/2500lük dozda % 12 ve 1/1000'de % 83 oranında hücre ölümüne yol açtığı görülmüştür. Ekstraktların 72 saatlik uygulama sonrası etkilerine baktığımızda ise *V.herbacea*'nin 1/10000lik dozda % 6, 1/5000lük dozda % 8, 1/2500lük dozda % 46 ve 1/1000'de % 97 oranlarında hücre ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir. 72 saatlik uygulama sonunda *V.soneri*'den elde edilen ekstrakt en yüksek dozda % 77 oranında hücre ölümüne neden olmuştur. Ekstraktların IC₅₀ dozları 24 saat için *V.herbacea* 1/1750, *V.soneri* 1/1500, 48 saat için sırasıyla 1/3750 ile 1/1500 ve 72 saat için 1/2500 ile 1/1750 olarak hesaplanmıştır.

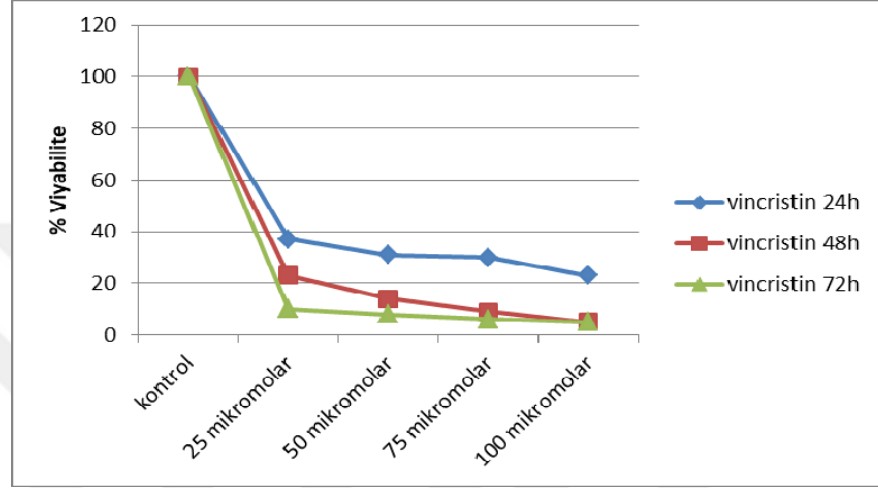
RPMI-8226 hücre hattı için WST-1 sonuçlarını genel olarak ele aldığımızda aynı ARH-77 hücre hattında olduğu gibi *V.herbacea* ekstraktının hücreleri ölüme götürmede *V.soneri* ekstraktından daha etkili olduğu tespit edilmiştir. *V. soneri*'den elde edilen ekstraktın RPMI-8226 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi yüksek dozlarda ortaya çıkmaktadır. Her iki ekstraktta multipl miyelom hücreleri üzerinde doza ve zamana bağlı sitotoksik etki göstermiştir. Ekstraktların 48 saatlik etkileri kıyaslandığında, *V.herbacea*'nin daha etkili olduğu ve *V.soneri*'den elde edilen ekstraktın RPMI-8226 hücre hattında, düşük dozlarda önemli bir etki göstermezken hücrelerin direncini yüksek dozlarda inhibe edebildiği görülmüştür (Şekil 4.10).



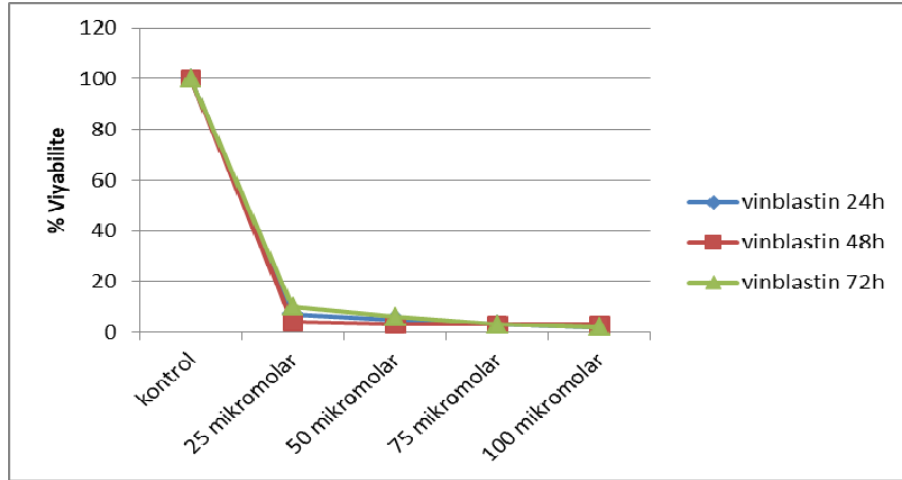
Şekil. 4.10. RPMI-8226 hücre hattı 48 saatlik WST-1 sonuçları (x=1/10.000, 2x=1/5000, 4x=1/2500, 10x=1/1000)

Çalışmamızda *Catharanthus roseus* bitkisinden izole edilen ve kanser hastalığında kemoterapötik olarak kullanılan ajanlardan vincristin ve vinblastin iki hücre hattına da uygulanarak sitotoksik etkileri WST-1 testi ile araştırılmıştır.

ARH-77 hücre hattına 4 farklı dozda (25, 50, 75 ve 100 μ M) ve 3 farklı zaman aralığında (24, 48, 72 saat) vincristin ve vinblastin uygulandıktan sonra alınan WST-1 verilerine göre oluşturulan grafikler Şekil 4.11 ve Şekil 4.12’de verilmiştir.



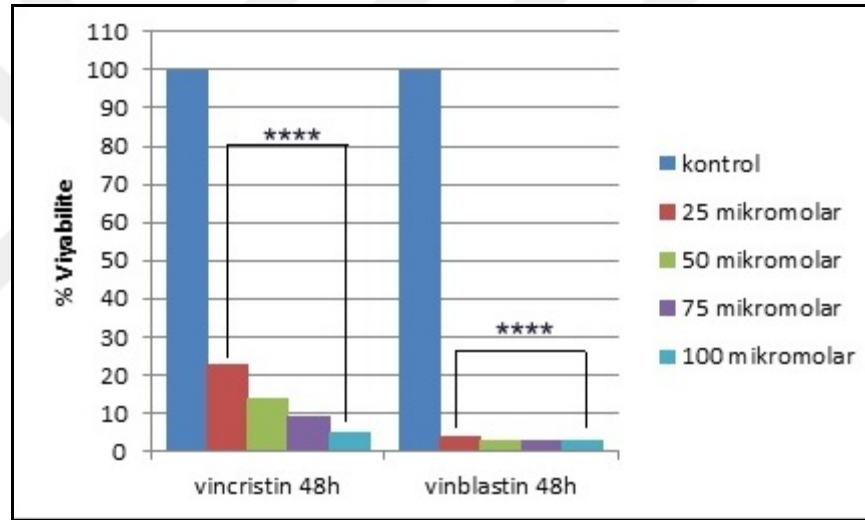
Şekil 4.11. ARH-77 hücre hattı Vincristin WST-1 sonuçları



Şekil 4.12. ARH-77 hücre hattı Vinblastin WST-1 sonuçları

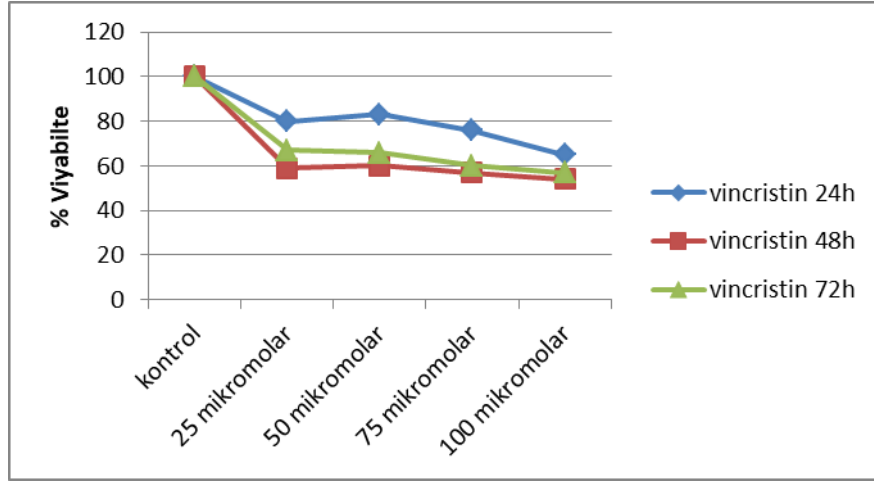
Vincristin ve Vinblastin ARH-77 hücre hattı üzerinde güçlü sitotoksik etki göstermiştir. En düşük dozdan itibaren yüksek oranda hücre ölümü gözlenmiş, en yüksek dozda (100 μ M) ve en uzun zaman aralığında (72 saat) ise, vincristinde yaklaşık % 95, vinblastinde yaklaşık % 97 oranında hücre ölümü gözlenmiştir.

48 saatlik vincristin ve vinblastin uygulamaları değerlendirildiğinde iki ajanında ARH-77 hücre hattı üzerinde doza bağlı olarak bir sitotoksik aktivite gösterdikleri ve vinblastinin hücreleri ölüme götürmede vincristinden daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu durum tedavide sıklıkla tercih edilen vincristin yerine vinblastinin kullanılabilir olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan uyguladığımız ekstraktlardan elde edilecek etken madde hücreler üzerine sitotoksik etki göstermesi açısından bu ajanlara alternatif nitelikte olabilir.

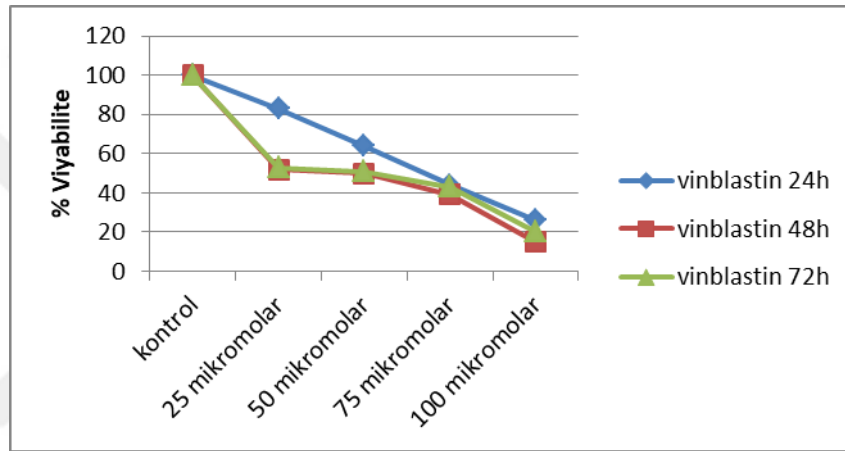


Şekil 4.13. ARH-77 hücre hattı 48 saatlik WST-1 sonuçları

Çalışmada kullandığımız diğer hücre hattı RPMI-8226 üzerine vincristin ve vinblastin uygulandıktan sonra alınan WST-1 verilerine göre oluşturulan grafikler şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te verilmiştir.



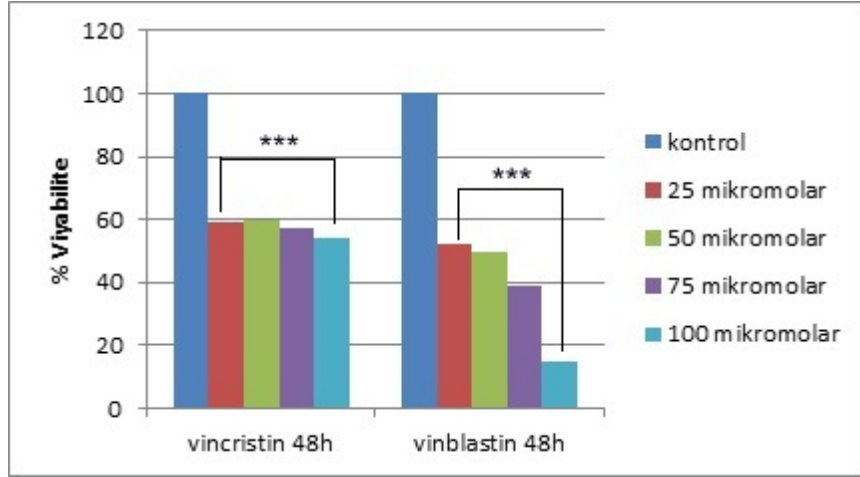
Şekil. 4.14. RPMI-8226 hücre hattı Vincristin WST-1 sonuçları



Şekil.4.15. RPMI-8226 hücre hattı Vinblastin WST-1 sonuçları

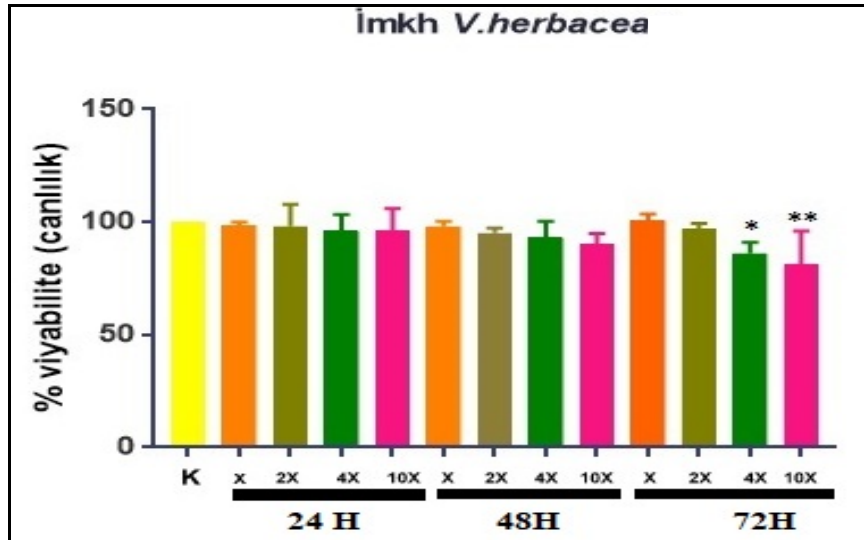
RPMI-8226 hücre hattı üzerine Vincristin ve Vinblastinin sitotoksik etkileri ARH-77 hücre hattına göre daha düşüktür. RPMI-8226 hücre hattı dirençli bir hat olup, kemoterapötiklere karşı direnç göstermektedir. Vincristin, en yüksek doz (100µM) ve 72 saatte, yaklaşık % 43 oranında hücre ölümüne sebep olurken, vinblastin ise yaklaşık % 80 oranında hücre ölümüne neden olmuştur.

Her iki kemoterapötik için 48 saatlik veri grafikleri göz önüne alındığında doza bağımlı sitotoksik etki gösterdikleri ve vinblastinin, vincristine nazaran her iki hücre hattı üzerinde daha düşük dozda daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Bu verilere göre, multipl miyelom üzerine vinblastinin düşük dozda daha etkin olması ve sağlıklı hücreler üzerine etkisinin ise vinkristin ile benzerlik göstermesi, vinblastinin klinik uygulamalarda vincristinin yerini almada bir potansiyel olduğunu ortaya koymakla birlikte, uygun olup olmayacağı sonraki in vivo çalışmalarla ortaya konacaktır.

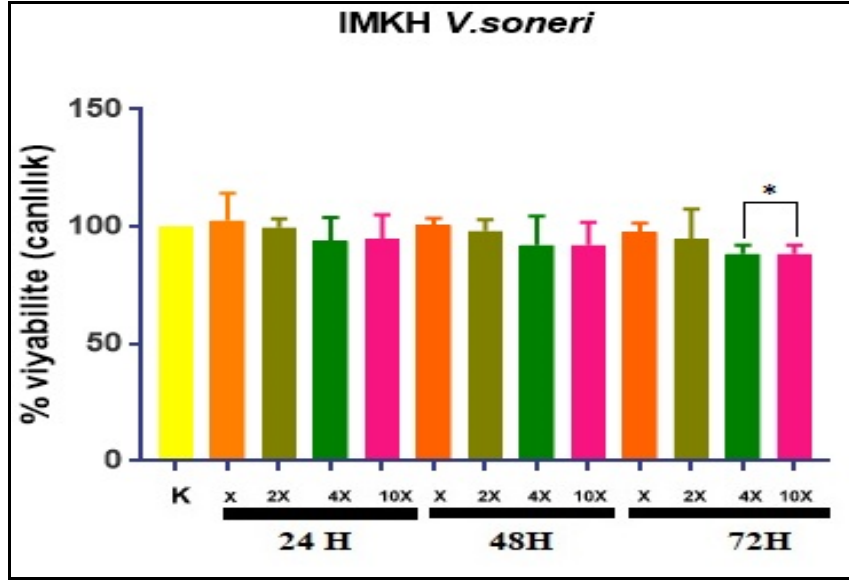


Şekil.4.16. RPMI-8226 hücre hattı 48 saatlik WST-1 sonuçları

Elde ettiğimiz ekstraktların özellikle *V.herbacea*'den elde edilen ekstraktın bu hücre hattındaki sitotoksik etkileri vincristin ve vinblastine oranla daha yüksektir. Bu durum elde ettiğimiz ekstraktların içeriğinde bulunan fitokimyasal ve/veya fitokimyasalların tek başına veya sinerjistik etkisi sonucu ortaya çıkmış olabilir. Aynı zamanda elde edilen ve multipl miyelom hücre hatları üzerine uygulanan ekstraktların normal kan hücrelerine olan etkilerine de bakılmıştır. Ekstraktların mononukleer kan hücreleri üzerine etkilerini gösteren grafikler Şekil 4.17'de verilmiştir.



Şekil. 4.17. İMKH *V.herbacea* ekstraktı WST-1 sonuçları



Şekil.4.18. İMKH *V.soneri* ekstraktı WST-1 sonuçları

Vinca türlerinden elde edilen ekstraktlar ARH-77 ve RPMI-8226 hücre hatları üzerinde istatistiksel olarak anlamlı oranlarda hücre ölümüne sebep olurken, normal hücrelere zararı, kanser hücrelerine kıyasla yok denecek kadar az düzeydedir. Normal kan hücrelerinde sadece en uzun zaman aralığı ve en yüksek dozlarda hücre ölümünün ortaya çıkmış olması DMSO etkisi olarak değerlendirilebilir.

WST-1 sonuçlarını genel olarak değerlendirdiğimizde her iki hücre hattı için, uyguladığımız iki ekstraktında sitotoksik etki gösterdiği ve özellikle *V.herbacea*'den elde edilen ekstraktın *V.soneri*'den elde edilen ekstrakta nazaran daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Özellikle RPMI-8226 hücre hattında vincristin ve vinblastin uygulaması ile yakın sonuçlar elde etmemiz söz konusu ekstraktların tedavide alternatif olarak kullanılabilirliğinin bir göstergesi olabilir. Bunun yanı sıra her iki hücre hattında da vinblastinin vincristinden daha etkili olması multipl miyelom tedavisinde vincristin yerine vinblastinin kullanılabilirliğini göstermektedir.

[Rao ve ark. \(2009\)](#) yılında yaptıkları çalışmada *Strychnos nux-vomica* L. bitkisinin kökünden elde ettikleri ekstraktları multipl miyelom hücre hattı RPMI-8226 üzerine uygulayarak antiproliferatif ve sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada 5,5-100 mg/ml doz aralığında 3 farklı zaman diliminde uygulanan ekstraktın sitotoksitite ölçümü için MTT testi kullanılmıştır ve ekstraktın doza ve zamana bağımlı sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. 48 saatlik uygulama sonucunda en yüksek dozda yaklaşık % 80 oranında hücre ölümü gözlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan hücre

hattı ve alınan etkinin doza ve zaman bağılı olarak değişimi açısından çalışmamızla korrelasyon göstermektedir.

[Kovacs \(2010\)](#) tarafından yapılan çalışmada ökse otundan *V. album* QuFrF (VAQuFrF) dan elde edilen sulu ve fermente olmayan ekstrakt ve vincristinin, altı multipl miyelom hücre hattı (Molp-8, LP-1, RPMI-8226, OPM-2, Colo-677, ve KMS-12-BM) üzerindeki sitotoksik etkilerine karşılaştırmalı olarak bakılmıştır. Çalışmada antiproliferatif etkiyi ölçmek amacıyla WST-1 testi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan hücre hattı, sitotoksitite testi ve ekstraktın etkisinin vincristin ile kıyaslanması açısından çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Çalışmada 5-100µM konsantrasyon aralığında uygulanan vincristinin RPMI-8226 üzerindeki sitotoksik etkisi çalışmamızla uyum göstermektedir.

[Gulcin ve ark. \(2012\)](#) tarafından yapılan çalışmada, *Vinca herbacea*'den elde edilen majdin ve izomajdinin apoptotik, antioksidan ve antiradikal etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda *V. herbacea*'den izole edilen iki bileşenin antioksidan ve antiradikal etkilerinin yanı sıra özellikle apoptotik etkileri olduğu saptanmıştır. Çalışmada majdin ve izomajdin 5-200 µM konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Çalışmamızda *V. herbacea*'den elde ettiğimiz total ekstraktların hücreleri apoptotik hücre ölümüne yönlendirmesi bu çalışma ile benzerlik göstermektedir. Bu çalışmada majdin ve izomajdinin neden olduğu apoptotik etkinin mitokondriyal olmayan (ekstrinsik) yolakla gerçekleştiği rapor edilmiştir. Uygulanan materyal ve testler çalışmamızla farklılık göstermektedir. Çalışmamızda da *V. herbacea*'den elde edilen total ekstraktın apoptozu hem intrinsik hem de ekstrinsik yolakla indüklediği tespit edilmiştir.

[Khanavi ve ark. \(2010\)](#) yaptıkları çalışmada *Vinca minor* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstraktın HT-29 (kolon karsinom), Caco-2 (kolorektal adenokarsinom), T47D (göğüs duktal karsinom) ve NIH/3T3 (fare embriyo fibroblast) hücre hatları üzerine sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada tüm alkaloid fraksiyonların hücre hatlarında doza bağımlı bir sitotoksik etki gösterdiğini ancak normal hücre olarak tercih edilen NIH / 3T3 hücrelerinin büyümesi ve çoğalmasının, diğer hücre hatlarına kıyasla daha az etkilenmiş olduğu rapor edilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz ekstraktlar multipl miyelom hücre hatları üzerine güçlü sitotoksik etki gösterirken kandan izole edilen hücreler üzerindeki toksik etkisinin göz ardı edilebilir düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma aynı cinse mensup bir türün kullanılması ve gözlenen doza bağımlı sitotoksik etki açısından çalışmamızla uyum göstermektedir.

[Ma ve ark. \(2014\)](#) tarafından yapılan çalışmada quersetinin U266, KM3 and RPMI8226 hücre hatları ve dört multipl miyelom hastasından alınan hücreler üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada quersetin 0, 40, 80, 160, 320 $\mu\text{mol/L}$ dozlarda ve 24, 48 ve 72 saat zaman aralığında çalışılmıştır. 48 saatlik etkiler göz önüne alındığında RPMI-8226 hücre hattında yaklaşık % 60 oranında hücre ölümü gözlenmiştir. Çalışma sonunda quersetinin MM hücreleri üzerinde proliferasyonu baskılayıcı etkileri olduğu rapor edilmiştir. Quersetinle yapılan bir diğer çalışmada quersetin tek başına ve dexametazon ile kombine olarak multipl miyelom hücreleri üzerine uygulanarak apoptotik etkilerine bakılmıştır. Çalışmada RPMI8226, ARP-1 ve MM.1R hücre hatları üzerine 20-160 μM konsantrasyon aralığında uygulanan quersetinin G2/M fazında hücre döngüsünü tutukladığı ve apoptozu indüklediği rapor edilmiştir ([He ve ark., 2016](#)). 48 saatlik uygulama sonucunda RPMI-8226 hücre hattında en yüksek dozda % 60 hücre ölümü gözlenmiştir. Sonuç olarak quersetinin tek başına veya dexametazon ile kombine kullanımının multipl miyelom tedavisinde etkili bir terapi olabileceği vurgulanmıştır.

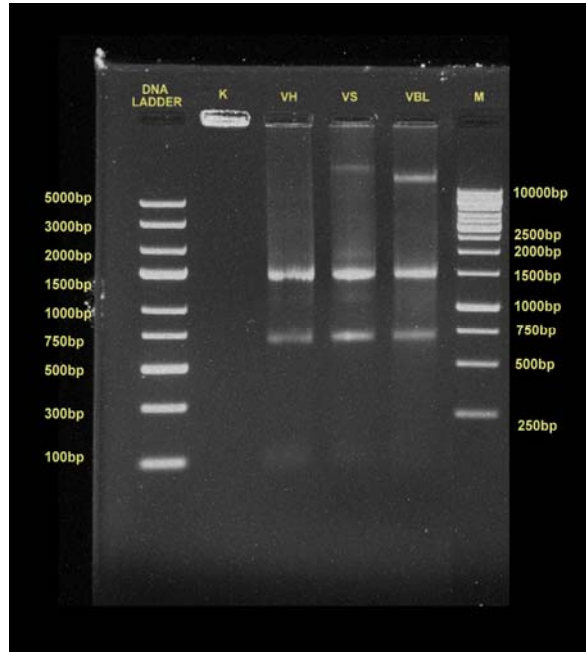
4.4. DNA fragmentasyon analizi

V.herbacea ve *V.soneri*'den elde edilen ekstraktların ve vinblastinin IC₅₀ dozları multipl miyelom hücre hatları üzerine uygulandıktan sonra yapılan DNA izolasyonlarının sonuçları Tablo 4.4'te verilmiştir.

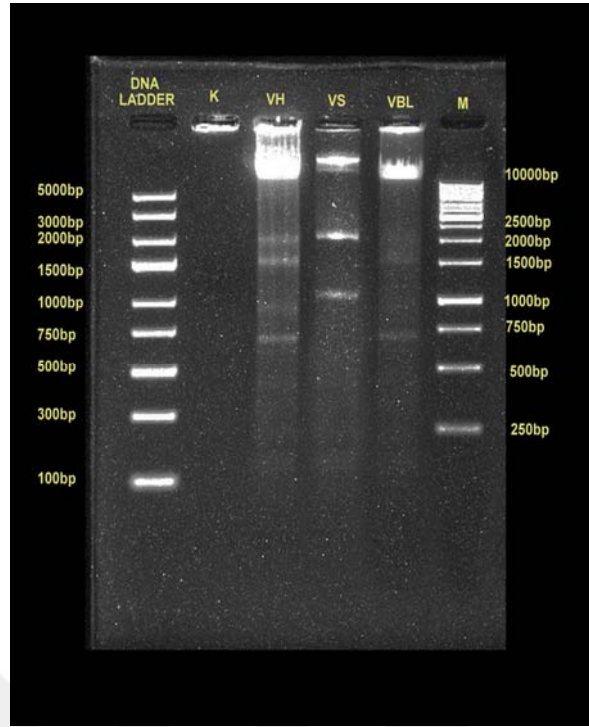
Örnek adı	Nükleik asit konsantrasyonu	A260	A280	DNA Saflığı 260/280
RPMI8226 kontrol	23,5 ng/μl	0,47	0,232	2,03
RPMI8226 vh	32,5 ng/μl	0,651	0,361	1,8
RPMI8226 vs	36,9 ng/μl	0,738	0,386	1,91
RPMI8226 vbl	13,7 ng/μl	0,273	0,151	1,81
ARH-77 kontrol	97,7 ng/μl	1,955	1,053	1,86
ARH-77 vh	112 ng/μl	2,241	1,157	1,94
ARH-77 vs	16,1 ng/μl	0,323	0,179	1,81
ARH-77 vbl	70,1 ng/μl	1,402	0,681	2,06

Tablo. 4.4. DNA izolasyon sonuçları

Elde edilen DNA'lar % 2'lik agaroz jele yüklenerek DNA'da fragmentasyon olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20).



Şekil 4.19. ARH-77 hücre hattından izole edilen DNA'ların agaroz jel görüntüsü



Şekil 4.20. RPMI-8226 hücre hattından izole edilen DNA'ların agaroz jel görüntüsü

DNA fragmentasyonu, yani internükleozomal DNA kırılması apoptotik hücre ölümü için belirteç olarak kullanılan biyokimyasal bir olgudur. Yapılan birçok çalışmada, farklı koşullar altında ve çok çeşitli hücre ve dokularda apoptoz sırasında internükleozomal DNA fragmentasyonu olduğu rapor edilmiştir. DNA fragmentasyonu, kromozomlardaki histonlar arasındaki bağlayıcı bölgedeki DNA'yı kesen endojen bir endonükleazın aktivasyonu ile oluşmaktadır. Hücrelerde gerçekleşen DNA fragmentasyonu (internükleozomal veya büyük DNA parçalanmaları) apoptozun en iyi işaretçisidir ([Bortner ve ark., 1995](#)).

Elde ettiğimiz agaroz jel görüntüleri ekstrakt uygulanan multipl miyelom hücrelerinde DNA'da fragmentasyon olduğunu göstermektedir. DNA fragmentasyonu apoptotik hücre ölümünü gösteren bir bulgu olmakla birlikte Real Time PCR ve protein çalışmaları ile desteklendiği zaman daha değerli hale gelmektedir.

[Gulcin ve ark. \(2012\)](#) tarafından yapılan çalışmada, *Vinca herbacea*'den elde edilen majdin ve izomajdinin apoptotik, antioksidan ve antiradikal etkileri araştırılmıştır. Çalışmada 5-200 μ M konsantrasyonlarda uygulanan majdin ve izomajdinin hücrelerde apoptoza neden olup olmadığı WST-1 testi ve DNA fragmentasyonu ile belirlenmeye çalışılmıştır. İzomajdinin 100 μ M ve 200 μ M gibi

yüksek dozlarda DNA fragmentasyonuna sebep olduğu ve majdinininde uygulanan her dozda DNA fragmentasyonuna neden olduğu rapor edilmiştir.

[Khan ve ark. \(2016\)](#) tarafından yapılan çalışmada, çeşitli biyoaktif etkilere sahip ve geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılan tarçının multipl miyelom hücreleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Tarçın kabuğu tozundan elde edilen ekstrakt RPMI-8226 hücre hattı üzerine uygulanarak anti-proliferatif potansiyeli belirlenmiştir. Tarçın uygulamasının hücre döngüsünü G0/G1 fazında zamana bağlı olarak tutukladığı ve DNA fragmentasyonunu indükleyerek, hücreleri apoptoza yönlendirdiği görülmüştür.

Çalışmamızda da uyguladığımız ekstraktlar multipl miyelom hücrelerinde DNA fragmentasyonuna neden olmuştur. Yapılan diğer testlerle uyumlu olarak ekstraktların içeriğinde bulunan bileşenlerin biri veya birkaçının hücrelerde apoptozu harekete geçirdiği düşünülmektedir.

4.5. Real-Time PCR

V.herbacea ve *V.soneri*'den elde edilen ekstraktların ve vinblastinin IC₅₀ dozları multipl miyelom hücre hatları üzerine uygulandıktan sonra yapılan RNA izolasyonlarının sonuçları Tablo 4.5.'te verilmiştir.

Örnek adı	RNA konsantrasyonu	A260	A280	260/280
RPMI8226 kontrol	317,7 ng/μl	7,942	3,806	2,09
RPMI8226 vh	318,3 ng/μl	7,957	3,813	2,09
RPMI8226 vs	293,3 ng/μl	7,333	3,53	2,08
RPMI8226 vbl	230 ng/μl	5,751	2,763	2,08
ARH-77 kontrol	169,3 ng/μl	4,232	2,054	2,06
ARH-77 vh	181,9 ng/μl	4,548	2,19	2,08
ARH-77 vs	190,7 ng/μl	4,767	2,304	2,07
ARH-77 vbl	131,9 ng/μl	3,298	1,579	2,09

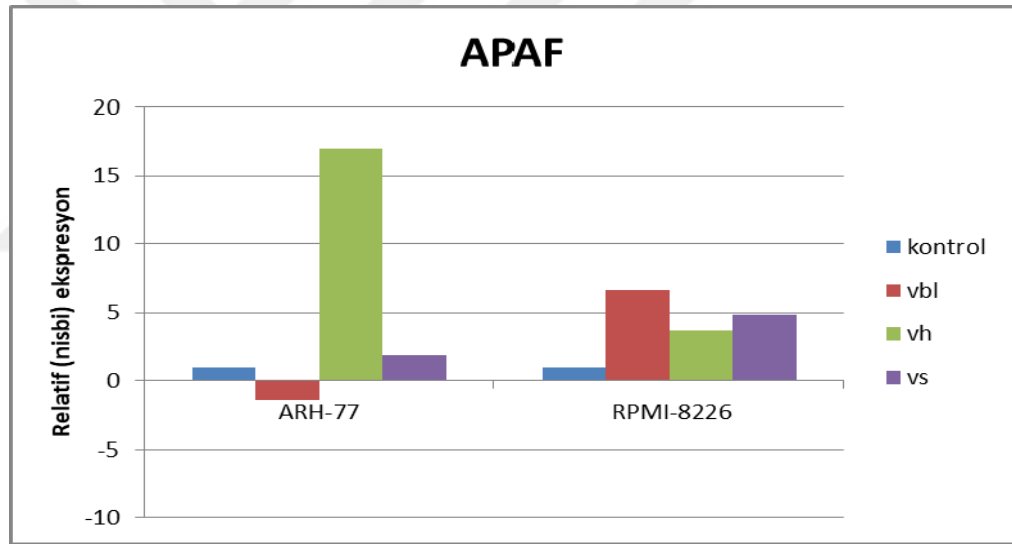
Tablo. 4.5. RNA izolasyon sonuçları

Elde edilen RNA'lar revers transkriptaz enzimi ile cDNA'ya çevrilmiştir. Daha sonra uygun primerler kullanılarak Real Time PCR ile apoptotik gen bölgelerinin ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Çalışmamızda apoptoz başlatıcısı APAF-1, genomun gardiyanı p53 ve p73, proapoptotik BAX, BAK, BIK, GADD45A, HRK, DFFA, CIDEA, antiapoptotik BCL-2, MCL-1, myd88 gen bölgelerinin yanı sıra ekstrinsik apoptotik yolda yer alan Fas, FasL, FADD ve TNF gen bölgeleri ve hem intrinsik yolağın hem de ekstrinsik yolağın son basamağı olan kaspaz 3 gen bölgesinin amplifikasyonları yapılmıştır. ARH-77 ve RPMI-8226 hücre hattında yapılan Real Time PCR analiz sonuçları grafiklerle gösterilmiştir.

APAF

Apoptozun başlatıcısı olarak bilinen Apaf-1'in rolü, kanser hücrelerinin apoptotik sinyallere verdikleri yanıt üzerinde arttırıcı etki göstermesidir. Apoptoz proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1), mitokondriyal apoptoz yolağının kilit düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır. Apaf-1 aktivitesinin analizi, bu "adaptör proteininin" mitokondriyal ölüm mekanizmasının merkezi unsurunu oluşturduğunu göstermiştir; apikal kaspazların işlenmesinde gerekli olan bir allosterik aktivatör olarak görev aldığı bildirilmiştir ([Zou ve ark., 1997](#)).

[Kannan ve ark. \(2001\)](#) tarafından yapılan çalışmada p53 yolağında yer alan genlerin cDNA mikroarray analizi sonucunda Apaf-1'in p53 tarafından indüklenen pro-apoptotik genlerden birisi olduğunu gösterilmiştir. Çalışmamızda Real Time PCR ile amplifiye edilen APAF geni ekspresyon seviyeleri Şekil 4.21'de gösterilmiştir.



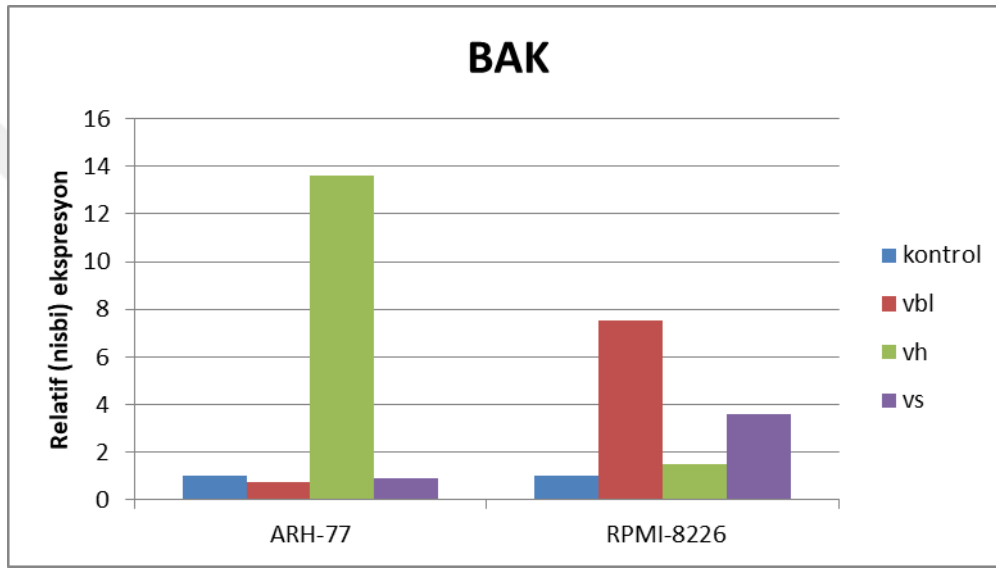
Şekil.4.21. ARH-77 ve RPMI-8226 hücre hatlarına ekstrakt ve vinblastin uygulanması sonrasında APAF gen ekspresyon seviyeleri

Çalışmamızda ARH-77 hücre hattına ekstrakt uygulamasından sonra *V. herbacea* ve *V. soneri* ekstraktı uygulanan gruplarda APAF ekspresyonunda artışlar saptanmıştır. *V. herbacea*'de bu artış yaklaşık 16 kat iken, *V. soneri*'de 1,8 katlık bir artış gözlenmiştir. Vinblastin uygulanan grupta ise kontrole kıyasla APAF ekspresyonunda yaklaşık 1,3 kat azalma tespit edilmiştir. Bu durum kullandığımız ekstraktların APAF aktivitesini tetikleyici etkisi olduğunu ve vinblastinin etki mekanizmasının aynı olmadığını göstermektedir. Diğer taraftan RPMI-8226 hücre hattı APAF sonuçları açısından değerlendirildiğinde kontrole kıyasla tüm gruplarda APAF ekspresyonunda

artış olduğu saptanmıştır. En çok artış Vinblastin uygulanan grupta yaklaşık 7 kat iken, *V.soneri* ekstraktı uygulanan grupta yaklaşık 5 kat artış ve son olarak *V.herbacea* ekstraktı uygulanan grupta yaklaşık 4 kat artış saptanmıştır. Her iki hücre hattı için APAF sonuçlarını değerlendirdiğimizde *V.herbacea* ve *V.soneri* ekstraktlarına maruz bırakılan multipl miyelom hücrelerinde APAF ekspresyonunun arttığı ve ekstraktların hücrelerin apoptoza yönelmesini teşvik ettiği sonucuna varılmaktadır. Vinblastin uygulaması ile ARH-77 hücre hattında azalan APAF ekspresyonunun RPMI-8226 hücre hattında artış göstermesi, aynı kökenden de olsa, uygulanan ekstraktların farklı hücre hatlarında farklı sonuçlar verebileceğini göstermektedir. Özellikle ARH-77 hücre hattında *V. herbacea* ekstraktının APAF gen ekspresyonunda belirgin bir artış göstermesi nedeni ile bu ekstrakt içinde yer alan hangi molekülün bu artışa sebep olduğunun ileri çalışmalar ile ortaya konması uygun olacaktır.

BAK

BAK, mitokondriyal dış membranda yer alan ve apoptotik uyarılara yanıt olarak konformasyonu değiştirmek ve oligomerik kompleksleri oluşturmakla görevli bir pro apoptotik proteindir. Oligomerize BAX ve BAK, mitokondriyal membranlardan sitoplazmaya sitokrom c'nin salınmasını kolaylaştırır ve burada Apaf-1'e bağlanır. Çalışmamızda Real Time PCR ile amplifiye edilen BAK geni ekspresyon seviyeleri Şekil 4.22.'de gösterilmiştir.



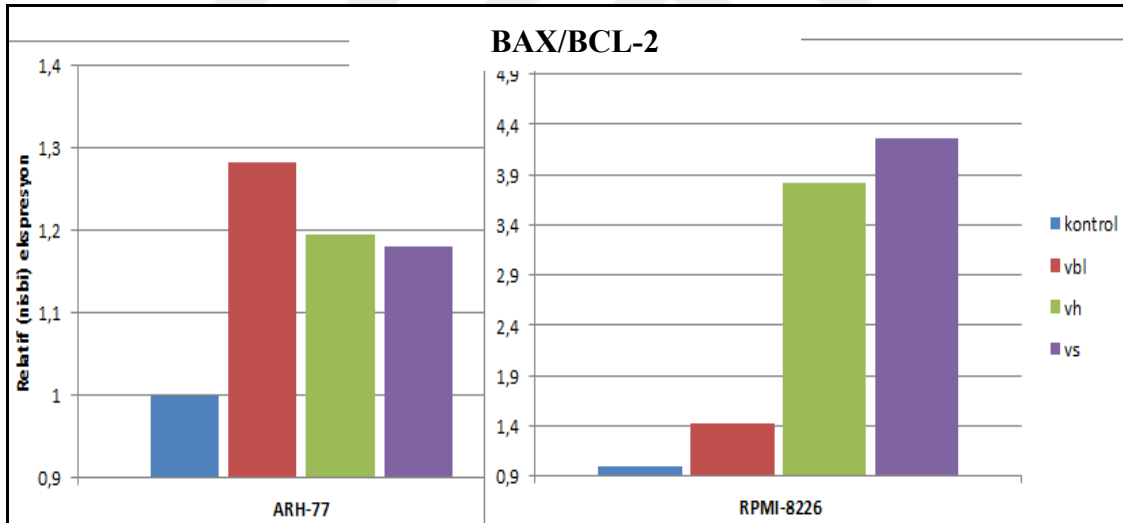
Şekil.4.22. ARH-77 ve RPMI-8226 hücre hatlarına ekstrakt ve vinblastin uygulanması sonrasında BAK gen ekspresyon seviyeleri

Pro apoptotik bir gen bölgesi olan BAK ekspresyonuna baktığımızda ARH-77 hücre hattında Vinblastin ve *V.soneri* ekstraktı uygulanan gruplarda kontrole oranla önemli bir farklılık gözlenmezken *V.herbacea* ekstraktı uygulanan grupta gen ekspresyonunda belirgin bir artış gözlenmiştir. Bu artış *V.herbacea* ekstraktı uygulanan ARH-77 hücrelerinde BAK ekspresyonunun ciddi ölçüde teşvik edildiğini göstermektedir. Ekstrakt içinde yer alan hangi molekülün bu artışa sebep olduğunun ileri çalışmalar ile ortaya konması uygun olacaktır. RPMI-8226 hücre hattında BAK gen ekspresyon seviyelerine baktığımızda ise tüm gruplarda gen ekspresyonunda artış meydana geldiği görülmektedir. Vinblastin ve *V.soneri* ekstraktı uygulanan gruplarda saptanan artış *V.herbacea* ekstraktı uygulanan gruba oranla daha fazladır. Bu farklılığın ekstraktların içeriklerindeki aktif bileşenlerin miktarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

BAX/BCL2

Normal bir hücrelerde hücre bölünmesinde BAX ve BCL2 proteinlerinin inaktif heterodimerleri meydana getirilerek miktarları bu şekilde denge halinde tutulmaktadır. Bcl-2 miktarındaki artış, Bcl-2 homodimerlerinin artmasına ve hücrenin apoptozdan kaçmasına neden olur. Bcl-2 miktarında gözlenen artış, kanser hücrelerinin kemoterapiye ve radyoterapiye karşı direnç göstermesine yol açmaktadır. Bax proteininde meydana gelen artış, Bax homodimerlerinde de bir artışa yol açar ve hücre programlı hücre ölümüne yani apoptoza yönlendirilir ([Klug ve Cummings, 2011](#)).

BAX/BCL2 gen ekspresyon oranı apoptoz için kilit rol oynamaktadır. Bu oranın değişmesi hücrenin apoptoza gidip gitmeme kararını ortaya koyar. Bu oranda gerçekleşen artış, hücre için ölümcül, azalma ise hücre için hayatta kalım ve apoptozdan kaçış anlamı taşımaktadır ([Hengartner, 2000](#)). Çalışmamızda Real Time PCR ile amplifiye edilen BAX/BCL2 gen ekspresyon oranları Şekil 4.23'te gösterilmiştir.



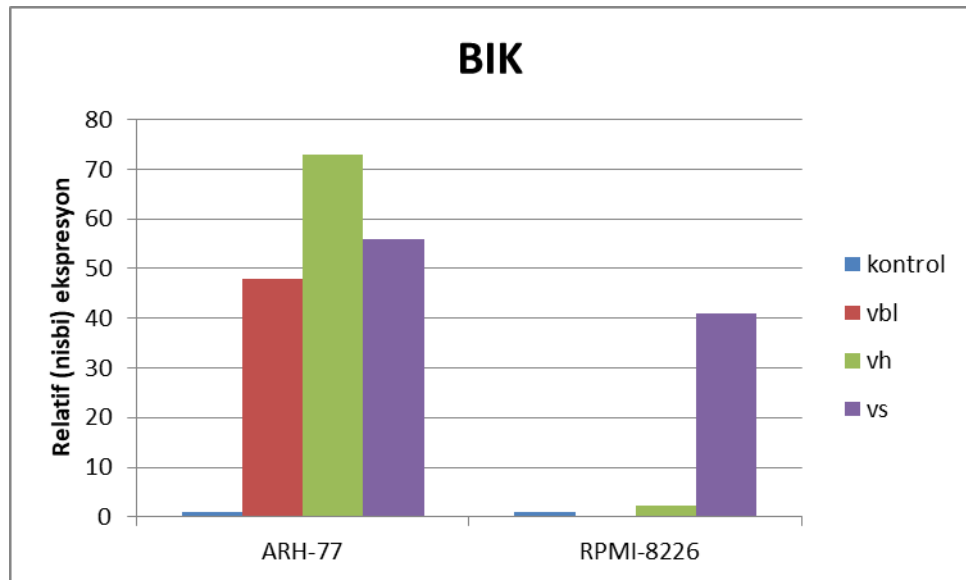
Şekil.4.23. ARH-77 ve RPMI-8226 hücre hatlarına ekstrakt ve vinblastin uygulanması sonrasında BAX/BCL2 gen ekspresyon seviyeleri

Çalışmamızda ekstrakt ve Vinblastin uygulanan ARH-77 hücrelerinde BAX/BCL2 gen ekspresyon oranlarında artış olduğu saptanmıştır. Bu dengenin BAX yönüne kaymış olması uygulanan ekstraktların multipl miyelom hücrelerini programlı hücre ölümüne yönlendirdiğinin en önemli göstergesidir. RPMI-8226 hücre hattında da aynı durum gözlenmiştir. Ancak bu hücre hattında BAX/BCL2 oranları ARH-77 hücre

hattı ile kıyaslandığında daha belirgin bir artış gözlenmiştir. RPMI-8226 hücre hattında BAX/BCL2 dengesinin BAX yönünde bozulmasında *Vinca* türlerinden elde ettiğimiz ekstraktların vinblastinden daha etkili olduğu tespit edilmiştir. *V.herbacea* ekstraktı uygulaması 3,8 katlık bir artışa sebep olurken *V.soneri* ekstraktı uygulaması yaklaşık 4,5 katlık bir artışa sebep olmuştur. Gen ekspresyonlarında gözlenen bu artışlar hücrelerde mitokondriyal yolak aracılığı ile apoptozun tetiklendiğinin en önemi göstergelerinden biridir.

BIK

BIK (BCL interacting killer), sadece BH3 içeren pro-apoptotik proteinlerin ilk üyesidir ([Boyd ve ark., 1995](#)). BIK aracılı apoptoza, BAX'ın selektif aktivasyonu aracılık etmektedir. BIK proapoptotik bir tümör baskılayıcı gendir. BIK, toksinler, sitokinler ve virüs enfeksiyonu tarafından uyarılan apoptozda kritik bir efektör olarak görev almaktadır. BIK, tedavisi zor kanser tiplerinin tedavisinde gen terapisine dayalı yaklaşımlarda terapötik bir molekül olarak da kullanılmaktadır. Çalışmamızda Real Time PCR ile amplifiye edilen BIK geni ekspresyon seviyeleri Şekil 4.24.'te gösterilmiştir.



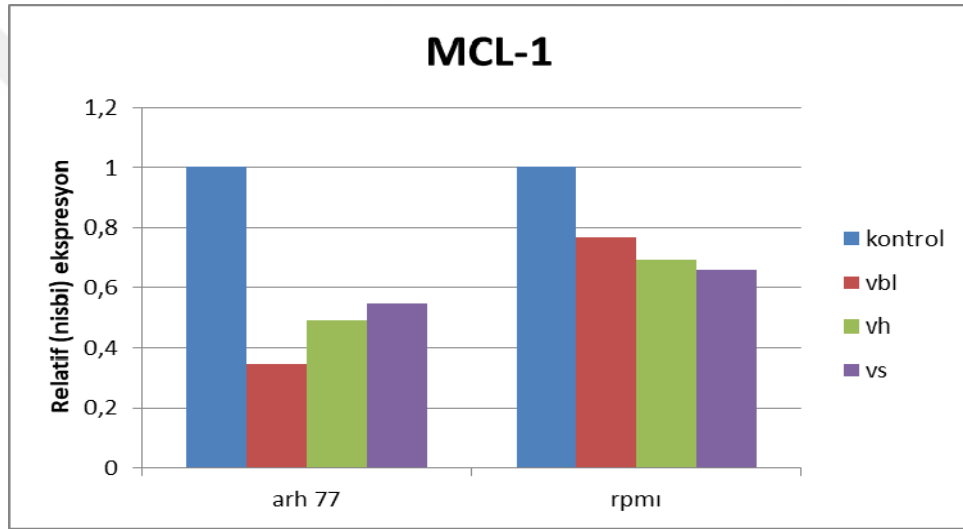
Şekil.4.24. ARH-77 ve RPMI-8226 hücre hatlarına ekstrakt ve vinblastin uygulanması sonrasında BIK gen ekspresyon seviyeleri

Çalışmamızda ekstrakt ve vinblastin uygulanan multipl miyelom hücrelerini BIK gen ekspresyon seviyelerine göre değerlendirdiğimizde ARH-77 hücre hattında BIK gen ekspresyonunun çok belirgin oranlarda artış gösterdiği görülmektedir. Özellikle *V.herbacea* ekstraktı uygulanan ARH-77 hücre hattında BIK gen ekspresyonunda yaklaşık 70 katlık bir artış gözlenirken, *V.soneri* ekstraktı uygulanan grupta kontrole oranla 56 kat, vinblastin uygulanan grupta ise 48 katlık bir artış saptanmıştır. Diğer taraftan RPMI-8226 hücre hattı BIK gen ekspresyonları açısından değerlendirildiğinde Vinblastin ve *V.herbacea* ekstraktı uygulanan gruplarda önemli bir değişim gözlenmezken *V.soneri* ekstraktı uygulanan grupta kontrole kıyasla yaklaşık 41 katlık bir artış saptanmıştır. Özellikle bu hücre hattında *V. soneri* ekstraktının BIK gen ekspresyonunda belirgin bir artış göstermesi, bu ekstrakt içinde yer alan hangi molekülün bu artışa sebep olduğunun ileri çalışmalar ile ortaya konmasının gerekliliğini göstermektedir.

BIK gen bölgesi apoptozu tetikleme açısından oldukça önemli bir gen bölgesidir ve özellikle uyguladığımız ekstraktların moleküler seviyede bu gen bölgesinin ekspresyonunda artışa sebep olması terapötik olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Özellikle tedavisi zor olan kanser türlerinde bu gen bölgesini hedef alabilecek fitokimyasalların ortaya çıkarılması önem arz etmektedir.

MCL1

Bir Bcl-2 (B-hücreli lenfoma-lösemi 2) homologu olan MCL1 (miyeloid hücre lösemi 1)'in, bir anti-apoptotik protein olarak işlev gördüğü bilinmektedir. Artmış Mcl-1 ekspresyonu, bazı tümör hücrelerinde habis bir fenotipe de katkıda bulunmaktadır. MCL1 aynı zamanda multipl miyelomda önemli bir hayatta kalma faktörüdür. Birçok çoklu miyelom hücre hattının IL-6'ya bağımlı hayatta kalması için Mcl-1'in artmış ekspresyonu gereklidir. Azalan MCL1 ekspresyon seviyelerinin apoptozu indüklediği rapor edilmiştir ([Zhang ve ark., 2002](#)). Çalışmamızda Real Time PCR ile amplifiye edilen MCL1 geni ekspresyon seviyeleri Şekil 4.25.'te gösterilmiştir.



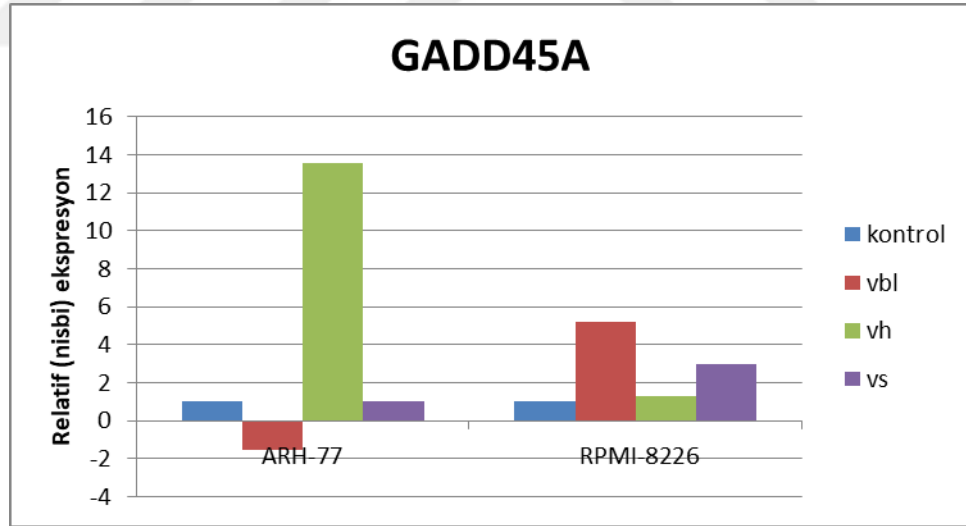
Şekil.4.25. ARH-77 ve RPMI-8226 hücre hatlarına ekstrakt ve vinblastin uygulanması sonrasında MCL1 gen ekspresyon seviyeleri

Çalışmamızda MCL-1 gen ekspresyon seviyelerini her iki hücre hattı açısından değerlendirdiğimizde anti apoptotik bir gen bölgesi olan MCL-1 ekspresyonunun tüm gruplarda azalma gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durum özellikle multipl miyelom için kritik bir gen bölgesi olan MCL-1'in ekspresyonunu azaltmak için elde edilen ekstraktların kullanılabilirliğini göstermektedir. MCL-1 ekspresyonunda azalma tümör hücrelerinin apoptoza direncinin kırılmasında oldukça önemlidir. Elde ettiğimiz verilere göre, özellikle daha dirençli olan multipl miyelom hücre hattı RPMI-8226'da apoptoza direncin kırılmış olması önem arz etmektedir. Bahsedilen hücre hattında uyguladığımız ekstraktlar MCL-1 gen ekspresyonunu azaltmada vinblastinden daha fazla etki göstermiştir.

GADD45A

Büyümeyi tutuklama ve DNA hasarını uyarda görevli GADD45 proteinleri, DNA onarımı, hücre döngüsü kontrolü, yaşlanma ve genotoksik stres dahil olmak üzere birçok hücre fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bununla birlikte, pro-apoptotik özellikte olması, GADD45'i onkogenez açısından önemli hale getirmektedir. GADD45 proteinlerinin çeşitli uyarılara yanıt olarak tümör baskılayıcı olarak hizmet ettiği bilinmektedir. GADD45a, mitokondri aracılı hücre ölümü ile de bağlantılıdır. GADD45a uzatma faktörü 1-a (EF1-a) ile etkileşime girmekte ve mikrotübüllerle ilişkili bileşenlerden Bim 'in ayrışmasında ve mitokondride translokasyona neden olan hücre iskeletinin stabilitesinin bozulmasında rol almaktadır.

GADD45a'nın Bcl-2 ile olan etkileşiminin, Bax gen ekspresyonunu desteklediği, sitoplazmada sitokrom-c'yi arttırdığı ve dolayısıyla HeLa hücrelerinin apoptozunu indüklediği rapor edilmiştir ([Tong ve ark., 2005](#)). Çalışmamızda Real Time PCR ile amplifiye edilen GADD45a gen ekspresyon seviyeleri Şekil 4.26.'da gösterilmiştir.



Şekil.4.26. ARH-77 ve RPMI-8226 hücre hatlarına ekstrakt ve vinblastin uygulanması sonrasında GADD45A gen ekspresyon seviyeleri

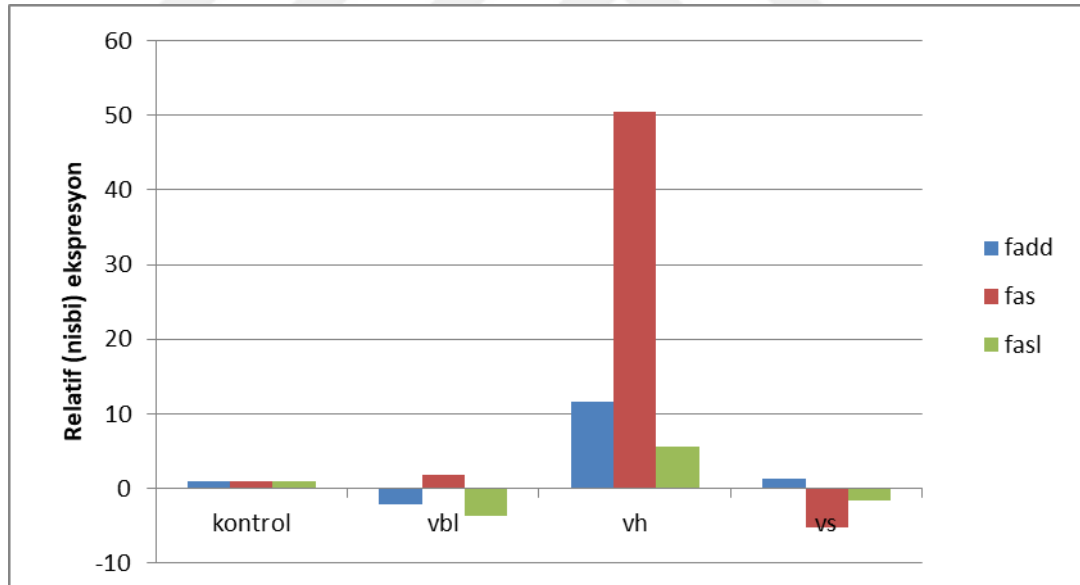
Çalışmamızda elde edilen GADD45a gen ekspresyonu sonuçlarına baktığımızda ARH-77 hücre hattında vinblastin uygulanan grupta gen ekspresyonunda azalma olduğu saptanmıştır. *V.soneri* ekstraktı uygulanan grupta çok anlamlı bir değişim gözlenmezken *V.herbacea* ekstraktı uygulanan ARH-77 hücrelerinde GADD45a gen ekspresyonunda

belirgin bir artış saptanmıştır. Bu durum *V.herbacea* ekstraktının hücrelerde BAX/BCL2 bağımlı olarak sitokrom c salınımını arttıracak bir etki gösterdiğini ve sonrasında programlı olarak hücre ölümüne yönlendirdiğini göstermektedir.

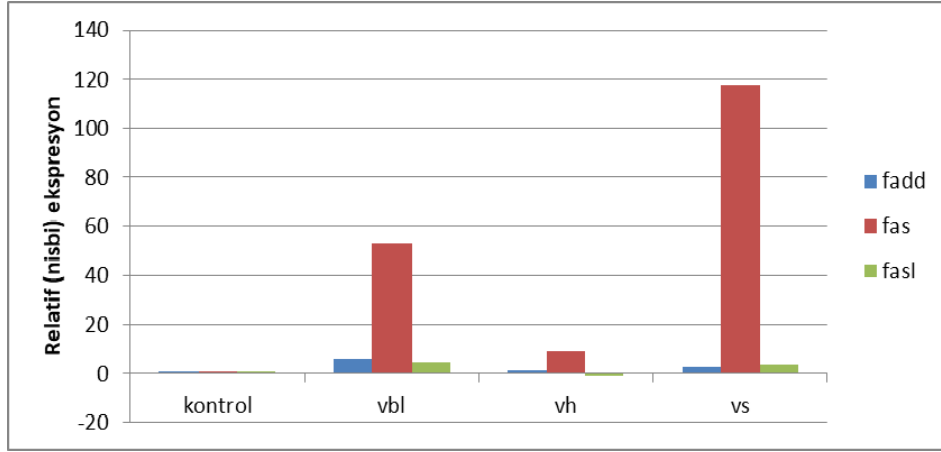
RPMI-8226 hücre hattına baktığımızda bu hücre hattında ekstrakt ve vinblastin uygulamasının GADD45a ekspresyon seviyelerini arttırdığı görülmektedir. En belirgin artış vinblastin uygulanan grupta gözlenmiştir. RPMI-8226 hücre hattında GADD45a gen ekspresyonunda *V.soneri* ekstraktı uygulanan grupta *V.herbacea* uygulanan gruptan daha fazla artış gözlenmiştir. Bu durum *V.soneri* ekstraktının içeriğinde bulunan bir bileşenin RPMI-8226 hücre hattı üzerine GADD45a ekspresyonunu artırıcı ve apoptozu indükleyici etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. APAF ve GADD45a gen ekspresyonlarındaki değişimler göz önüne alındığında iki gen bölgesinin korrelasyon gösterdiği ve eşdoğrusal nitelikte oldukları görülmektedir.

FAS/FASL ve FADD

Hücre yüzeyi Fas reseptörü (Fas), tümör nekroz faktörünün (TNF) bir üyesidir. Hücre ölüm yüzey reseptörü Fas'ın Fas ligandı (FasL) ile bağlanması kaspaz aktivasyonunun aracılık ettiği apoptotik hücre ölümüyle sonuçlanmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, Fas reseptörünün hücre hasarını takiben, özellikle de DNA hasarlayıcı ajanlar tarafından oluşan hücre hasarı durumunda arttığını göstermektedir. DNA hasarını takiben Fas reseptörünün artışının p53'e bağımlı olduğu tespit edilmiştir. FADD, apoptoz sırasında ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşturmak üzere Fas-reseptörü gibi tümör nekroz faktörü reseptör süper ailesinin üyelerini prokaspaz 8 ve 10'a köprüleyen bağdaştırıcı bir proteindir. FADD artışı apoptozu indükleyici rol oynamaktadır. Çalışmamızda Real Time PCR ile amplifiye edilen FAS/FASL ve FADD gen ekspresyon seviyeleri Şekil 4.27. ve Şekil 4.28'de gösterilmiştir.



Şekil.4.27. ARH-77 hücre hattına ekstrakt ve vinblastin uygulanması sonrasında FAS/FASL ve FADD gen ekspresyon seviyeleri



Şekil.4. 28. RPMI-8226 hücre hattına ekstrakt ve vinblastin uygulanması sonrasında FAS/FASL ve FADD gen ekspresyon seviyeleri

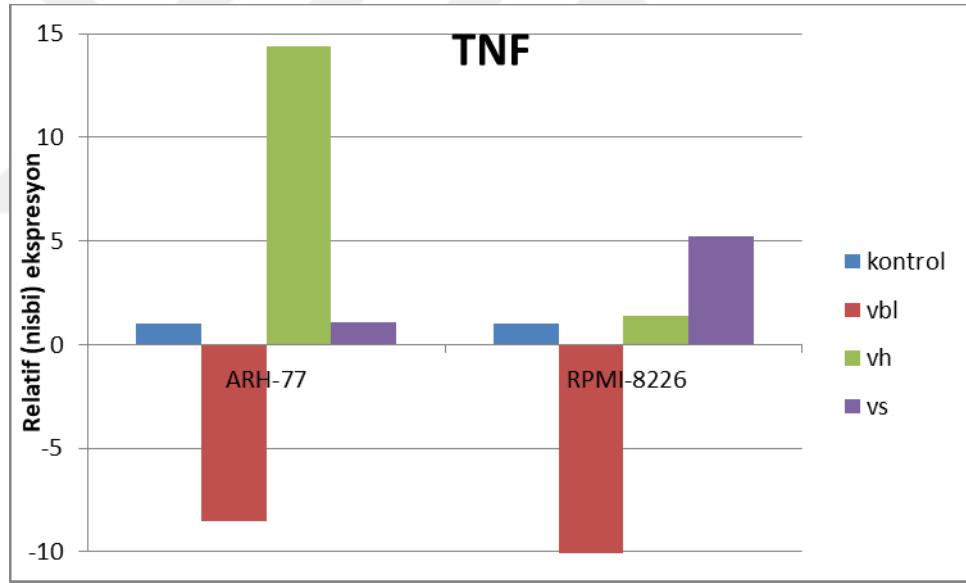
Çalışmamızda her iki hücre hattında FAS/FASL gen ekspresyonları değerlendirildiğinde ARH-77 hücre hattında vinblastin uygulanan grupta azda olsa FAS ekspresyonunun artmasına karşın FASL ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. Bu durum vinblastinin FAS/FASL yolağı ile apoptoza neden olmadığını göstermektedir. *V.soneri* ekstraktı uygulanan grupta hem FAS hemde FASL azalma göstermiştir ancak kontrole oranla çok anlamlı bir değişim değildir. Bu grupta FAS/FASL bağımlı apoptoz gerçekleşmediği görülmektedir. Son olarak *V.herbacea* ekstraktı uygulanan grupta belirgin oranda FAS ve FASL artışı gözlenmiştir. Bu durum ekstraktın ekstrinsik yolak aracılığı ile apoptozu indüklediğini göstermektedir. FADD gen ekspresyonları değerlendirildiğinde FAS/FASL oranları ile uyumlu olarak *V.herbacea* ekstraktı uygulanan grupta FADD ekspresyonunda belirgin artış olduğu saptanmıştır. Diğer gruplarda FADD ekspresyon seviyesi anlamlı bir farklılık göstermemiştir.

RPMI-8226 hücre hattında FAS/FASL gen ekspresyonu değerlendirildiğinde hem ekstrakt uygulanan hem de vinblastin uygulanan multipl miyelom hücrelerinde FAS gen ekspresyonunda artış saptanmıştır. Buna karşın *V.herbacea* ekstraktı uygulanan grupta FASL ekspresyonunda azalma olması ekstraktın diğer hücre hattında ekstrinsik yolak ile apoptozu indüklemesine karşın bu hücre hattında aynı etkiye neden olmadığını göstermektedir. *V. soneri* ekstraktı ve vinblastin uygulanan gruplarda ise FASL ekspresyonunda az miktarda bir artış gözlenirse de FAS ve FADD gen ekspresyonları ile korelasyon göstermemektedir. RPMI-8226 hücre hattında FADD ekspresyonları en çok vinblastin uygulanan grupta artış göstermiştir. *V.soneri* ve *V.herbacea* ekstraktı uygulanan multipl miyelom hücrelerinde FADD gen

ekspresyonunda gözlenen değişim vinblastine oranla daha azdır. Bu durum RPMI-8226 hücre hattında Fas/FasL artışı ile desteklenmediği için tek başına anlam ifade etmemektedir.

TNF

Tümör nekrozu faktörü (TNF), çeşitli hücre tipleri tarafından salgılanan ve kanser hücrelerinin yok edilmesini sağlayan bir sitokindir. TNF genel olarak, apoptozu uyarmak için opsiyonel bir kapasiteye sahiptir. TNF, ölüm alanını içeren ölüm domainleri TRADD ve FADD'ı (Fas ile ilişkili ölüm domaini) ve ayrıca FADD ile ilişkili başlatıcı kaspaz olan kaspaz-8'i içeren kaspaz aracılı apoptozu indüklemektedir ([Wajant, 2003](#)). Çalışmamızda Real Time PCR ile amplifiye edilen TNF gen ekspresyon seviyeleri Şekil 4.29.'da gösterilmiştir.



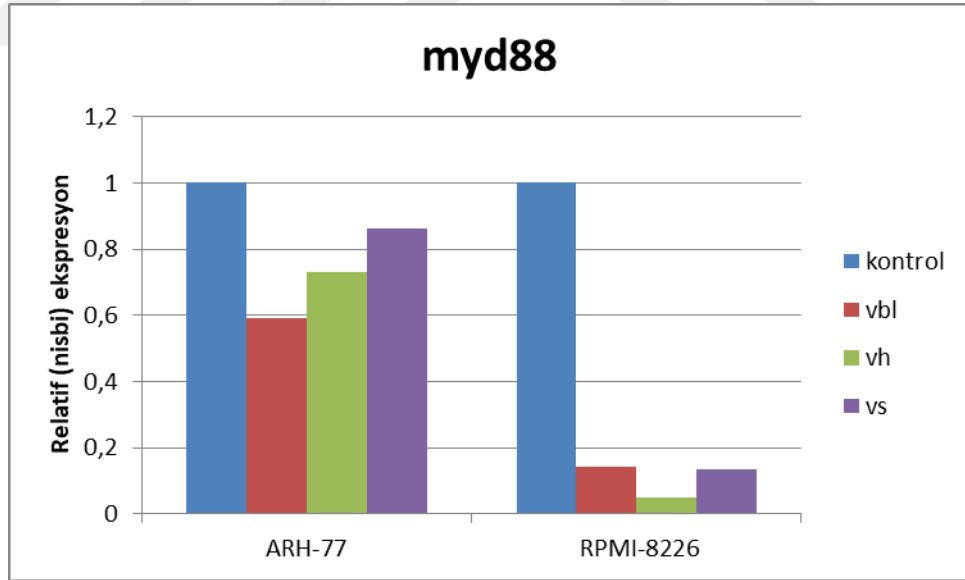
Şekil.4. 29. ARH-77 ve RPMI-8226 hücre hatlarına ekstrakt ve vinblastin uygulanması sonrasında TNF gen ekspresyon seviyeleri

Çalışmamızda her iki hücre hattı TNF gen ekspresyonu açısından değerlendirildiğinde vinblastin uygulamasının TNF gen ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Bu durum vinblastinin ölüm reseptörü aracılı yolağı etkilemediğinin bir göstergesidir. Diğer taraftan *V.herbacea* ve *V.soneri* ekstraktı uygulanan multipl miyelom hücrelerinde TNF gen ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Bu durum ekstraktlar içerisinde bulunan bileşenlerden biri veya birkaçının TNF gen

ekspresyonunu indüklediğini göstermektedir. TNF gen ekspresyonunu pozitif yönde indükleme açısından, *V.herbacea* ekstraktı ARH-77 hücre hattında, *V.soneri* ekstraktı ise RPMI-8226 hücre hattında daha iyi sonuç vermiştir.

myd88

Tümör gelişimine ve kemoterapiye dirençle ilişkili myd88 geninin aşırı ekspresyonu, çeşitli kanser türlerinde daha önce bildirilmiştir. Mide, kolon ve akciğer primer insan kanser dokularında, myd88'in yüksek ekspresyon seviyelerine sahip olduğu tespit edilmiştir ([Coste ve ark., 2010](#)). Kolorektal kanserde myD88'in yüksek ekspresyonunun karaciğer metastazı ve kanser hastalarının kötü prognozuyla ilişkili olduğu rapor edilmiştir ([Wang ve ark., 2010](#)). MyD88'in upregülasyonu aynı zamanda yumurtalık kanseri hücrelerinde ve dokularında da tespit edilmiştir ([Kelly ve ark., 2006](#); [Szajnik ve ark., 2009](#)). myd88 ekspresyonunun baskılandığı durumlarda ise apoptoz gelişmektedir. Çalışmamızda Real Time PCR ile amplifiye edilen myd88 gen ekspresyon seviyeleri Şekil 4.30.'da gösterilmiştir.



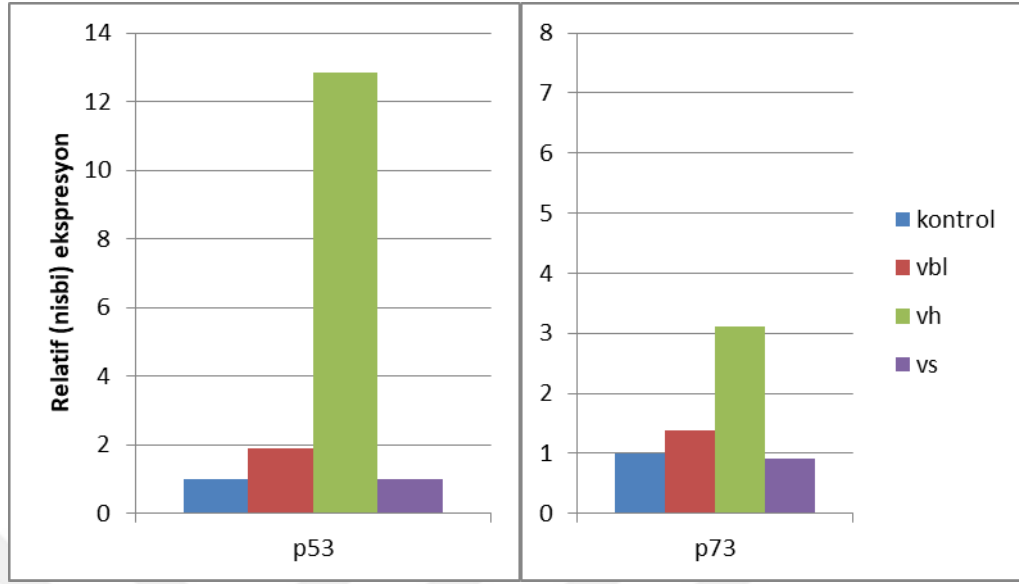
Şekil.4. 30. ARH-77 ve RPMI-8226 hücre hatlarına ekstrakt ve vinblastin uygulanması sonrasında myd88 gen ekspresyon seviyeleri

Çalışmamızda kullanılan ARH-77 hücre hattını myd88 gen ekspresyonu açısından değerlendirdiğimizde kontrole oranla tüm gruplarda myd88 gen ekspresyonunda azalma saptanmıştır. Vinblastin uygulanan grupta gen ekspresyonunda

en fazla baskılanma veya azalma görülürken, *V.soneri* ekstraktı uygulanan grupta kontrole oranla daha az bir baskılama veya azalma söz konusudur. RPMI-8226 hücre hattına bakıldığında myd88 gen ekspresyonunun yüksek oranlarda azaldığı tespit edilmiştir. Vinblastin ve *V.soneri* ekstraktı uygulanan grupta kontrole oranla hemen hemen eşit inhibisyon gözlenirken, *V.herbacea* ekstraktı uygulanan hücrelerdeki inhibisyonun çok daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu durum *V. herbacea* ekstraktının myd88 gen ekspresyonunu tetiklemede *V. soneri*'den elde edilen ekstraktan daha etkili olduğunu göstermektedir. Ekstraktlar ve vinblastinin myd88 üzerindeki baskılayıcı etkileri göz önüne alındığında multipl miyelom hücrelerinde tümörün agresifleşmesini ve metastazını önleyebilecek bir etkiye sahip olduklarını görülmektedir.

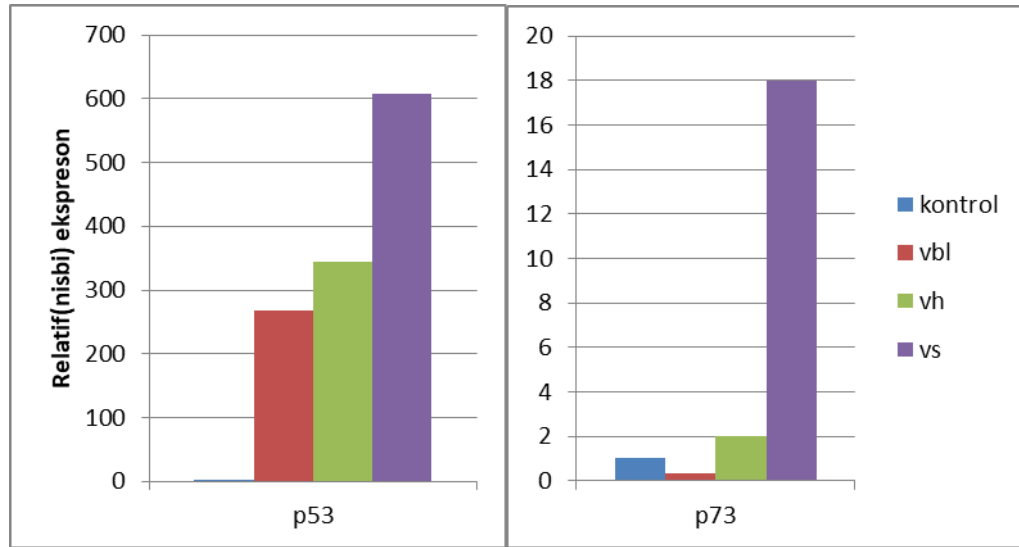
p53 ve p73

p53, çok hücreli organizmalarda hücre döngüsünü düzenleyen ve kanseri önlemede rol oynayan önemli bir tümör baskılayıcı gen olarak işlev görmektedir. Bu nedenle, p53, genomda mutasyon oluşumunu önleyerek genomik istikrarın korunmasındaki rolüne atıfta bulunarak "genomun gardiyanı" olarak tanımlanmıştır. p53, apoptoz, genetik istikrar ve anjiyojenezin inhibisyonunda rol oynar. p53, kanseri önleme aşamasında birkaç mekanizma ile çalışır: DNA'nın hasar görmesi durumunda DNA tamir proteinlerini aktive edebilir. DNA hasarının tanınması üzerine hücre döngüsünü G1 / S kontrol noktasında tutarak hücre döngüsünü durdurabilir. DNA hasarının onarılamaz olduğu kanıtlanırsa, apoptozu, programlanmış hücre ölümünü başlatabilir ([Naga Deepthi, 2011](#)). p53 gibi p73 ve p63'te DNA hasarı oluşturan maddelere yanıt olarak indüklenmektedir ([Irwin ve ark., 2003](#); [Suenaga ve ark., 2009](#)). p73 homoloğu olan tümör baskılayıcı p53 gibi birçok hücre tipinde apoptozu indüklemeye yeteneğine sahiptir. Bu özellik kanser gelişiminde ve tedavide p73'in rol oynamasında önemlidir. P73'in aşırı ekspresyonu, tipik p53 yanıt genlerini aktive edebilir ve p53 gibi apoptozu indükleyebilir. Buna ek olarak, p73'in aktivasyonu, anormal hücre çoğalması ve bazı DNA hasar biçimleri tarafından indüklenen apoptotik hücre ölümüyle ilişkilendirilmiştir ([Stiewe ve Putzer, 2001](#)). Çalışmamızda Real Time PCR ile amplifiye edilen p53 ve p73 gen ekspresyon seviyeleri Şekil 4.31. ve Şekil 4.32.'de gösterilmiştir.



Şekil.4. 31. ARH-77 hücre hattına ekstrakt ve vinblastin uygulanması sonrasında p53 ve p73 gen ekspresyon seviyeleri

Çalışmamızda Real-Time PCR ile amplifikasyonu yapılan p53 ve p73 gen ekspresyonlarını ARH-77 hücre hattında değerlendirdiğimizde *V.herbacea* ekstraktı ve vinblastin uygulanan multipl miyelom hücrelerinde p53 gen ekspresyon seviyesinde artış olduğu saptanmıştır. *V.soneri* ekstraktı uygulanan grupta p53 ekspresyonunda bir farklılık gözlenmezken, *V.herbacea* ekstraktı uygulanan grupta ekspresyonda önemli oranda artış gözlenmiştir. Genomun gardiyanı olarak adlandırılan p53 gen ekspresyonunun artması multipl miyelom hücrelerinde DNA hasarına karşı apoptotik yanıtın oluştuğunun bir kanıtıdır. *V.herbacea* ekstraktının içerisinde bulunan komponent veya komponentlerin p53 yolağını tetiklemesi, ekstraktın *V.soneri* ekstraktından daha etkili olduğunu göstermektedir. ARH-77 hücre hattında p73 gen ekspresyon seviyelerine baktığımızda ise p53 gen ekspresyon seviyeleri ile korelasyon göstermektedir. *V.soneri* ekstraktı uygulanan grupta yine önemli bir farklılık gözlenmezken en fazla değişim *V.herbacea* ekstraktı uygulanan grupta gözlenmiştir. Bu durum ARH-77 hücre hattında *V.soneri* ekstraktının etki yolağının *V.herbacea*'den farklı olduğunu ortaya koymaktadır. Her iki ekstraktında intsrinsik apoptotik yolağı tetiklediği ancak *V.soneri* ekstraktının bu etkiyi p53 üzerinden gerçekleştirmediği görülmektedir.

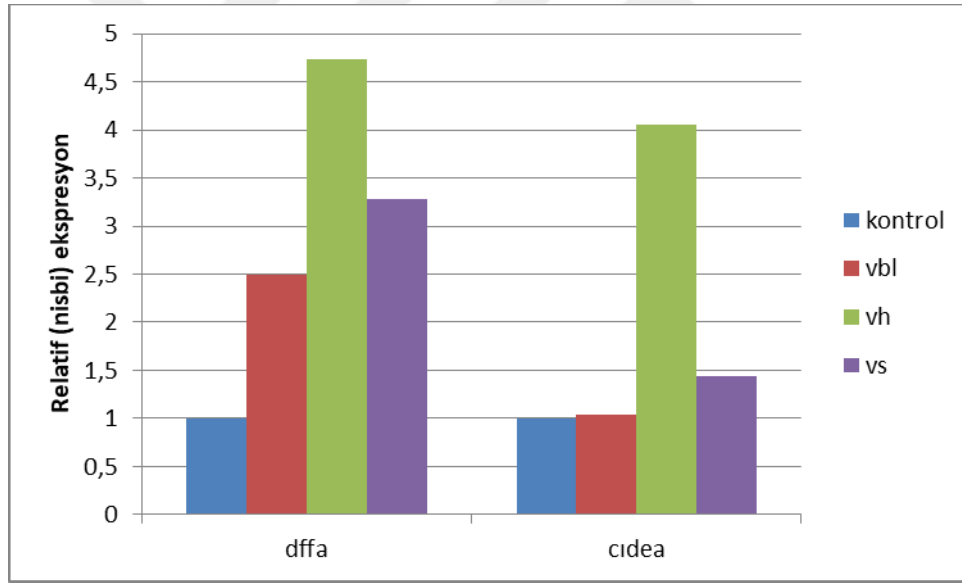


Şekil.4. 32. RPMI-8226 hücre hattına ekstrakt ve vinblastin uygulanması sonrasında p53 ve p73 gen ekspresyon seviyeleri

Çalışmamızda Real-Time PCR ile amplifikasyonu yapılan p53 ve p73 gen ekspresyonlarını RPMI-8226 hücre hattında değerlendirdiğimizde ARH-77 hücre hattıyla kıyaslandığında p53 gen ekspresyonlarının tüm gruplarda önemli oranda artış gösterdiği saptanmıştır. Ekspresyon seviyelerinde en önemli artış *V.soneri* ekstraktı uygulanan grupta gözlenirken, en az artış vinblastin uygulanan grupta gözlenmiştir. Bu durum ekstraktların ve vinblastinin, p53 yolağını aktive ederek hücrelerde apoptotik cevabının oluşmasını sağladığını göstermektedir. Bu hücre hattında p73 gen ekspresyon seviyelerine bakıldığında *V.herbacea* ve *V.soneri* ekstraktı uygulanan multipl miyelom hücrelerinde p73 gen ekspresyonunun p53 gen ekspresyonu ile korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan vinblastinin p53 gen ekspresyonu üzerinde yaptığı artışı p73 üzerinde göstermediği ve aksine kontrole oranla p73 gen ekspresyonunda azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir. Bu durum vinblastinin p53 yolağını tetiklediği ancak p73 yolağı üzerinde olumlu etkisi olmadığını göstermektedir. Ekstraktların hem p53 hem p73 gen ekspresyonları üzerinde artışa neden olmaları ve apoptotik yanıt oluşmasını sağlamaları terapötik açıdan oldukça önemlidir. Diğer taraftan ARH-77 hücre hattında p53 ekspresyonu üzerinde herhangi bir etki yapmayan *V.soneri* ekstraktının daha dirençli olan bu hücre hattında p53 ekspresyonunu güçlü bir şekilde arttırmış olması oldukça önemlidir. Gelecek çalışmalar ile ekstrakt içeriğinde bulunan ve ekstraktın iki hücre hattında farklı etkiler göstermesine neden olan etken madde veya maddelerin ortaya çıkarılması uygun olacaktır.

DFFA (DNA fragmentasyon faktör A) ve CIDEA (hücre ölümü indükleyen DFA benzeri efektör A)

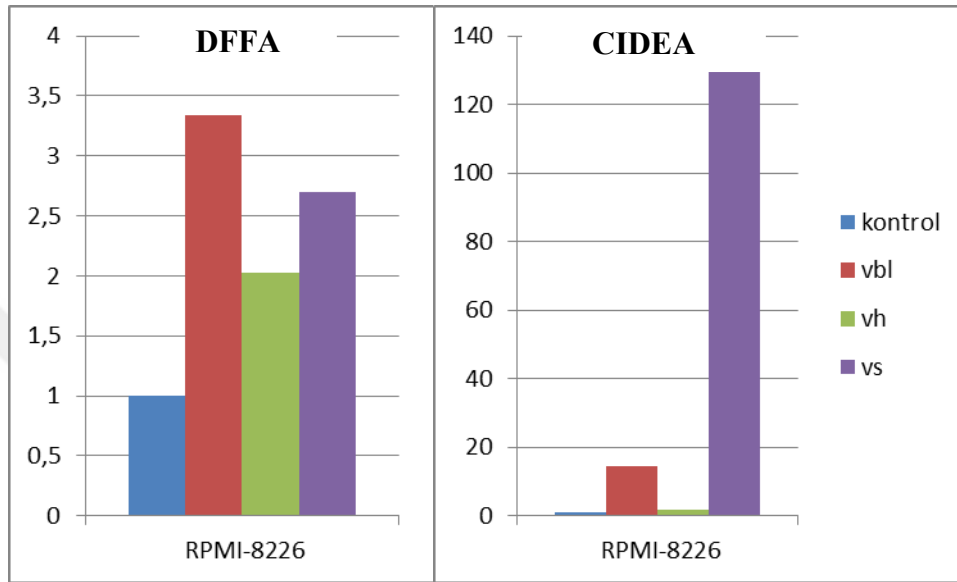
Apoptoz, memeli gelişiminde toksik ve / veya yararsız hücreleri ortadan kaldıran bir hücre ölüm sürecidir. Apoptotik sürece, hücrelerin ve çekirdeklerin büzülmesi ve parçalanması ve kromozomal DNA'nın nükleozomal birimler haline dönüşümü eşlik eder. DNA parçalanma faktörü (DFF), 40 kD (DFFB) ve 45 kD (DFFA) altbirimlerinden oluşan heterodimerik bir proteindir. DFA, kaspaz-3 için substrattır ve apoptoz sırasında DNA fragmentasyonunu tetiklemektedir. DFA kaspaz-3 tarafından ayrıldığında DFF aktive olur. CIDEA, DFA benzeri etki eden ve apoptozu indükleyen bir gen bölgesidir. Ekspresyon seviyelerindeki artış apoptozla ilişkilendirilmektedir. Çalışmamızda Real Time PCR ile amplifiye edilen DFA ve CIDEA gen ekspresyon seviyeleri Şekil 4.33. ve Şekil 4.34.'de gösterilmiştir.



Şekil.4. 33. ARH-77 hücre hattına ekstrakt ve vinblastin uygulanması sonrasında DFA ve CIDEA gen ekspresyon seviyeleri

ARH-77 hücre hattında DFA gen ekspresyonları değerlendirildiğinde tüm gruplarda kontrole oranla değişen seviyelerde artış saptanmıştır. En önemli artış *V. herbacea* ekstraktı uygulanan hücrelerde gözlenmiştir. *V. herbacea* ekstraktı uygulanan grupta yaklaşık 5 kat, *V. soneri* ekstraktı uygulanan grupta yaklaşık 3,5 kat ve vinblastin uygulanan grupta ise 2,5 katlık bir artış saptanmıştır. Diğer taraftan CIDEA gen ekspresyonlarına bakıldığında DFA gen ekspresyonları ile korelasyon

göstermektedir. Tüm gruplarda gen ekspresyonunda artış gözlenirken, gen ekspresyonunun artmasında en etkili olan grubun *V.herbacea* ekstraktı uygulanan grup olduğu tespit edilmiştir. Vinblastin uygulanan multipl miyelom hücrelerinde kontrole oranla az miktarda değişim gözlenirken elde ettiğimiz ekstraktların ilgili gen bölgelerinin ifade seviyeleri üzerinde daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır.



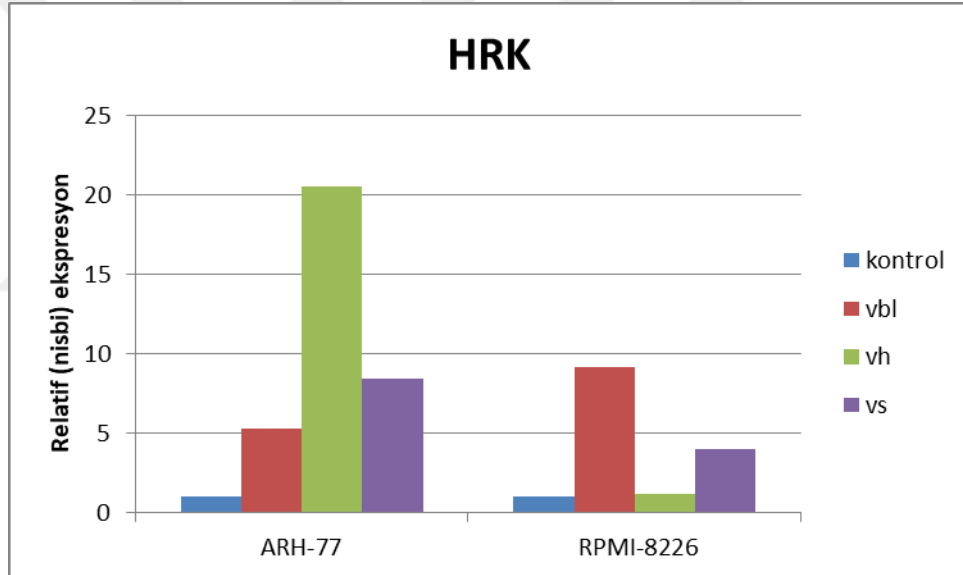
Şekil. 4. 34. RPMI-8226 hücre hattına ekstrakt ve vinblastin uygulanması sonrasında DFFA ve CIDEA gen ekspresyon seviyeleri

RPMI-8226 hücre hattı DFFA ve CIDEA gen ekspresyonları açısından değerlendirildiğinde DFFA ekspresyonunda tüm gruplarda kontrole oranla azda olsa artış saptanmıştır. Bu hücre hattında ARH-77 hücre hattına göre daha az değişim gözlenmiştir. Vinblastin uygulanan hücrelerde DFFA gen ekspresyonu yaklaşık 3,5 kat, *V.soneri* ekstraktı uygulanan grupta yaklaşık 3 kat ve *V.herbacea* ekstraktı uygulanan grupta ise 2 katlık bir ekspresyon artışı söz konusudur. CIDEA gen ekspresyonlarına bakıldığında *V.herbacea* ekstraktı uygulanan grupta çok az bir değişim gözlenirken en fazla değişim *V.soneri* ekstraktı uygulanan grupta gözlenmiştir.

Genel olarak DFFA ve CIDEA gen ekspresyon seviyelerine baktığımızda ekstrakt ve vinblastin uygulanan gruplarda belirgin bir artış gözlenmiştir. Real Time PCR sonuçlarımız DNA fragmentasyon analizi sonuçlarımız ile uyumludur. Bu durum uygulanan ekstraktların ve vinblastinin hücrelerde DNA fragmentasyonuna neden olduğunun ve hücre ölümünün apoptoz ile gerçekleştiğinin bir göstergesidir.

HRK (Harakiri)

HRK, apoptozu mitokondriyal yol boyunca iletken Bcl-2 ailesinin proapoptotik bir üyesidir. HRK proteini, apoptotik inhibitörler olan BCL-2 ve BCL-XL ile BH3 yoluyla etkileşerek apoptozu teşvik etmektedir. HRK normal dokularda eksprese edilir, ancak azalmış ekspresyon seviyeleri melanoma, prostat kanseri ve astrositik tümörler gibi birçok kanser türünde rapor edilmiştir (Nakamura ve ark., 2008; Xu ve ark., 2013). HRK'nın baskılanması insan tümörlerinin gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır (Nakamura ve ark., 2008). Bu genin intrinsik apoptotik yoldaki önemi göz önüne alındığında, ekspresyonundaki herhangi bir kusurun onkogeneze için etkili bir rol oynayabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda Real Time PCR ile amplifiye edilen HRK gen ekspresyon seviyeleri Şekil 4.35.'de gösterilmiştir.



Şekil.4. 35. ARH-77 ve RPMI-8226 hücre hatlarına ekstrakt ve vinblastin uygulanması sonrasında HRK gen ekspresyon seviyeleri

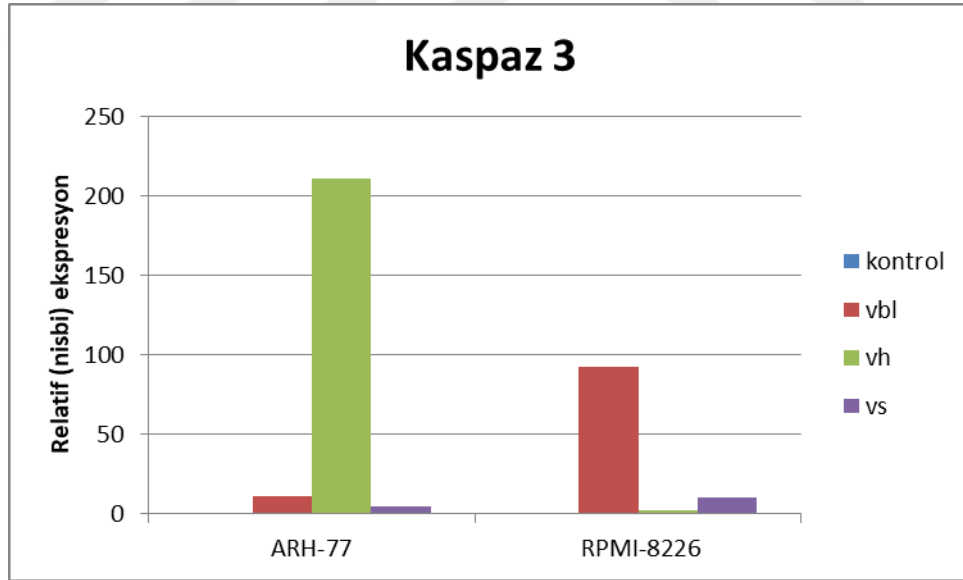
Çalışmamızda HRK gen ekspresyon seviyelerine baktığımızda ARH-77 hücre hattında tüm gruplarda artma gözlenirken, RPMI-8226 hücre hattında vinblastin ve *V.soneri* ekstraktı uygulanan hücrelerde HRK gen ekspresyonunda artış saptanmıştır. ARH-77 hücre hattında HRK gen ekspresyonu en fazla *V.herbacea* ekstraktı uygulanan grupta değişim gösterirken aynı ekstrakt diğer hücre hattında anlamlı bir fark yaratmamıştır. Bu durum uygulanan ekstrakttaki bileşen veya bileşenlerin farklı hücre hatlarında farklı etki gösterebileceğini desteklemektedir.

ARH-77 hücre hattında HRK gen ekspresyonunun değişiminde ekstraktlar daha etkili olurken, RPMI-8226 hücre hattında vinblastin daha etkili olmuştur.

HRK gen ekspresyonlarında gözlenen bu artış multipl miyelom hücrelerinde baskılanan HRK ekspresyonunun bu baskıyı kırarak tekrar normal düzeylere çıktığının bir göstergesidir. Aynı zamanda apoptozun intrinsik yolak aracılığı ile gerçekleştiğini göstermektedir.

Kaspaz 3

Kaspazlar, programlanmış hücre ölümünün (apoptoz) önemli araçlarıdır. Bunların arasında, kaspaz-3, birçok önemli hücre proteinin spesifik olarak parçalanmasını katalize eden, sıklıkla aktive edilmiş bir ölüm proteazıdır. Kaspaz-3 normal olarak hücrelerin sitozolik fraksiyonunda, hücrelerde apoptoz işaret edildiğinde proteolitik olarak aktive edilen, aktif olmayan bir prekürsör olarak mevcuttur ([Schlegel ve ark., 1996](#); [Wang ve ark., 1996](#)). Çalışmamızda Real Time PCR ile amplifiye edilen kaspaz-3 gen ekspresyon seviyeleri Şekil 4.36.'da gösterilmiştir.



Şekil.4. 36. ARH-77 ve RPMI-8226 hücre hatlarına ekstrakt ve vinblastin uygulanması sonrasında Kaspaz-3 gen ekspresyon seviyeleri

Kaspaz-3 gen ekspresyonlarını ARH-77 hücre hattı için değerlendirdiğimizde tüm gruplarda gen ekspresyonunda artış saptanmıştır. En dikkat çeken artış *V.herbacea* ekstraktı uygulanan grupta yaklaşık 200 kat ile gözlenmiştir. *V.soneri* ekstraktı

uygulanan grupta yaklaşık 5 katlık bir artış gözlenirken, Vinblastin uygulanan grupta ise yaklaşık 12 katlık bir artış saptanmıştır. Bu durum uygulanan ekstraktların ve vinblastinin kaspaz 3 gen ekspresyonu üzerinde indükleyici etkisi olduğunu göstermektedir.

RPMI-8226 hücre hattında kaspaz-3 gen ekspresyonu seviyeleri değerlendirildiğinde en önemli artış vinblastin uygulanan grupta gözlenmiştir. Vinblastin uygulanan grupta yaklaşık 92 katlık bir artış, *V.soneri* ekstraktı uygulanan grupta yaklaşık 11 katlık bir artış gözlenirken, *V.herbacea* ekstraktı uygulanan grupta yaklaşık 2,5 katlık bir artış gözlenmiştir.

Kaspaz 3 gen ekspresyon seviyelerini bir bütün olarak ele aldığımızda tüm gruplarda değişken seviyelerde de olsa gen ekspresyonlarında artış gözlenmesi hücre ölümünün apoptotik hücre ölümü aracılığı ile gerçekleştiğini göstermektedir. Kaspaz-3'ün apoptotik hücre ölümünde hem ekstrinsik (ölüm ligandı) hem de intrinsik (mitokondriyal) yolaklar tarafından aktive edildiği bilinmektedir ([Adams ve Cory, 2001](#); [Curtin ve Cotter, 2003](#); [Spierings ve ark., 2004](#)). Sonuç olarak ekstraktların içeriğinde bulunan bileşenlerden bazıları intrinsik yolağı aktive etmede bazıları ise ekstrinsik yolağı aktive etmede rol oynamış olabilir. Bu durum hücre ölümü şeklinden ziyade yolağı değiştirse de kanser hücrelerinde apoptozun indüklenmesi istenen bir durumdur. Elde ettiğimiz ekstraktların bu bağlamda kanser hücrelerinin fitoterapide alternatif olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

Real Time PCR verilerini bir bütün olarak değerlendirdiğimizde ise söz konusu ekstraktların ve vinblastinin gen ifadesi ve regülasyonu açısından birbirinden farklı fakat çok yönlü etkilerinin olduğu ortaya çıkmaktadır. Moleküler açıdan apoptozun teşvikinde ARH-77 hücre hattında *V.herbacea* ekstraktı daha etkili olurken RPMI-8226 hücre hattında *V.soneri* ekstraktının daha etkili olduğu bulunmuştur. Diğer taraftan vinblastinin her iki hücre hattında da intrinsik apoptozu tetikleyen gen bölgelerinin ekspresyonları üzerinde olumlu etkilere yol açtığı tespit edilmiştir. Tüm gen ekspresyonlarındaki değişimleri gösteren Tablo 4.6 ve 4.7'de verilmiştir.

ARH-77 Hücre hattı	<i>V.herbacea</i>	<i>V.soneri</i>	Vinblastin
APAF	↑	↑	↓
BAK	↑	↔	↔
BAX/BCL2	↑	↑	↑
BIK	↑	↑	↑
MCL1	↓	↓	↓
GADD45A	↑	↔	↓
MYD88	↓	↓	↓
FAS	↑	↓	↑
FASL	↑	↓	↓
FADD	↑	↔	↓
TNF	↑	↑	↓
DFFA	↑	↑	↑
CIDEA	↑	↑	↔
HRK	↑	↑	↑
P53	↑	↔	↑
P73	↑	↔	↑
CASP3	↑	↑	↑

Tablo 4.6. ARH-77 hücre hattında gen ekspresyonlarının değişimi (↑= artma, ↓= azalma, ↔= değişim yok)

RPMI-8226 Hücre hattı	<i>V.herbacea</i>	<i>V.soneri</i>	Vinblastin
APAF	↑	↑	↑
BAK	↑	↑	↑
BAX/BCL2	↑	↑	↑
BIK	↑	↑	↔
MCL1	↓	↓	↓
GADD45A	↑	↑	↑
MYD88	↓	↓	↓
FAS	↑	↑	↑
FASL	↔	↔	↑
FADD	↔	↔	↑
TNF	↑	↑	↓
DFFA	↑	↑	↑
CIDEA	↔	↑	↑
HRK	↑	↑	↑
P53	↑	↑	↑
P73	↑	↑	↔
CASP3	↑	↑	↑

Tablo 4.7. RPMI-8226 hücre hattında gen ekspresyonlarının değişimi (↑= artma, ↓= azalma, ↔= değişim yok)

Bitkisel ekstraktların kanser hücrelerine uygulanması sonrasında Real Time PCR veya klasik PCR yöntemleriyle moleküler seviyede apoptotik ve anti apoptotik gen ekspresyonlarında meydana gelen değişiklikleri ortaya koyan birçok çalışma mevcuttur.

[Rzeski ve ark. \(2006\)](#) tarafından yapılan çalışmada *Betula alba* bitkisinden elde edilen Betulinik asiti (BA), nöroblastoma, rabdomiyosarkom-medulloblastoma, glioma, tiroid, göğüs, akciğer ve kolon karsinoması, lösemi ve multipl miyelom dahil tümör hücre kültürlerinin yanı sıra yumurtalık karsinoması, servikal karsinoma ve glioblastoma multiforme'den izole edilen primer kültürlerle de uygulayarak antikanser etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonunda BA'nın konsantrasyona bağlı bir şekilde büyümeyi tutuklayarak ve apoptozu indüklediği rapor edilmiştir. Bcl-2 ve siklin D1 genlerinin ekspresyonlarının azaldığı ve Bax gen ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir.

[Han ve ark. \(2010\)](#) tarafından yapılan çalışmada, geleneksel Çin baharatı *Sophora flavescens*'te bulunan temel bir alkaloid olan matrinin multipl miyelom hücre hatları üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan hücre hatlarından RPMI-8226 hücre hattı çalışmamızda da kullanılmış olup alınan sonuçlar benzerlik göstermektedir. 48 saat boyunca matrin uygulanan miyelom hücrelerinde Bcl-2 / Bax proteinin oranında azalma ve aktive edilmiş kaspaz-3 yüzdesinde artış saptandığı rapor edilmiştir.

[Li ve ark. \(2010\)](#) yılında yapılan çalışmada tıbbi amaçlı kullanılan bir bitki olan *Nigella sativa*'nın temel biyoaktif bileşeni olan timokinonun multipl miyelom hücrelerinde siklin D1, Bcl-2, Bcl-xL, survivin, Mcl-1 ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi STAT3 ile düzenlenen gen ürünlerinin ekspresyonda azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak timokinon multipl miyelom hücrelerinin proliferasyonunu engellemiş bunun yanı sıra hücrelerin apoptoza yönelmelerini sağlamıştır. [Ming Zhao ve ark. \(2011\)](#) çalışmalarında çok çeşitli tümörlerde ve hematolojik kanserlerde proliferasyonu baskıladığı bilinen ve en bilinen flavonoidlerden biri olan apigenin flavonoidinin multipl miyelom hücre hatlarında Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL, XIAP ve survivin gibi antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunu düşürerek apoptozu indüklediği tespit edilmiştir. Çalışmamızda da ekstrakt uygulanan multipl miyelom hücrelerinde Bcl-2 ve Mcl-1 gen ekspresyonlarında azalma saptanmıştır. İlgili gen ekspresyonlarında görülen azalma kanser hücrelerinde apoptoza karşı geliştirilen direncin olumlu yönde bozulduğunu göstermektedir. Bu değişim sayesinde kontrolsüz çoğalan kanser hücreleri programlı olarak hücre ölümüne yönlenecektir.

[Ma ve ark. \(2013\)](#) tarafından yapılan çalışmada *Strychnos* cinsinde bulunan alkaloidlerden biri olan brusin'in multipl miyelom hücre hattı U266 üzerindeki apoptotik etkileri araştırılmıştır. RT-PCR sonuçları kaspaz 3 ve c-Jun gen ekspresyonlarında artma olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda ekstrakt uygulanması sonrasında kaspaz 3 enzim aktivitesinde hem gen hem protein seviyesinde artış gözlenmiştir. Sonuçlarımızda gözlenen kaspaz 3 aktivitesinde gözlenen artış bu çalışma ile uyumludur.

[Zhang ve ark. \(2013\)](#) çalışmalarında *Scutellaria baicalensis*'den elde edilen ve çeşitli kanser hücre dizilerinde hücre çoğalmasını ve / veya apoptozu indüklediği bildirilen bir flavinoid olan wogoninin insan multipl miyelom hücre hattı (RPMI-8226) üzerindeki antikanser etkilerini ve ilişkili mekanizmaları araştırmışlardır. Artan apoptozise, toplam PARP seviyesinde azalma, PARP bölünmesinin ortaya çıkması, Bax proteininde önemli artış ve azalan Bcl-2 protein seviyesi eşlik etmiştir. Çalışmamızda aynı hücre hattı kullanılmıştır. PARP seviyesi değerlendirilmemiş olsa da BAX ve BCL-2 gen ekspresyonlarındaki değişiklikler ve uygulanan ekstraktlar ile multipl miyelom hücrelerinde apoptozun teşvik edilmiş olması bu çalışma ile uyum göstermektedir.

[Li ve ark. \(2015b\)](#) tarafından yapılan çalışmada proteaz inhibitör etkileri olan, ucuz ve doğal bir bitki içeriği kurkuminin multipl miyelom (MM) RPMI 8226 hücre hattı üzerindeki inhibe edici etkilerini analiz etmişlerdir. Çalışmada, p53 ve Bax genlerinin ekspresyonu artarken, MDM2 geninin ekspresyonu azalmıştır. Çalışma sonucunda kurkumin'in p53 protein ekspresyonunu indükleyerek MM hücrelerinde apoptozu teşvik edebileceği önerilmiştir. Çalışmamızda protein seviyesinde p53 değerlendirilmemiştir ancak p53 gen ekspresyonunun yüksek oranlarda artış göstermiş olması apoptotik hücre ölümüne işaret etmektedir.

Kanser tedavisinde bitkisel ekstrakt veya fitokimyasalların moleküler olarak hangi mekanizmaları aktive ettiğinin ortaya konması için bu çalışmalar oldukça önemlidir. Bu sayede sitotoksik etki gösteren bir bitkisel ekstrenin moleküler yollardan hangisi veya hangilerini etkilediği belirlenebilecek ve hedefe yönelik tedavi yöntemleri geliştirilebilecektir.

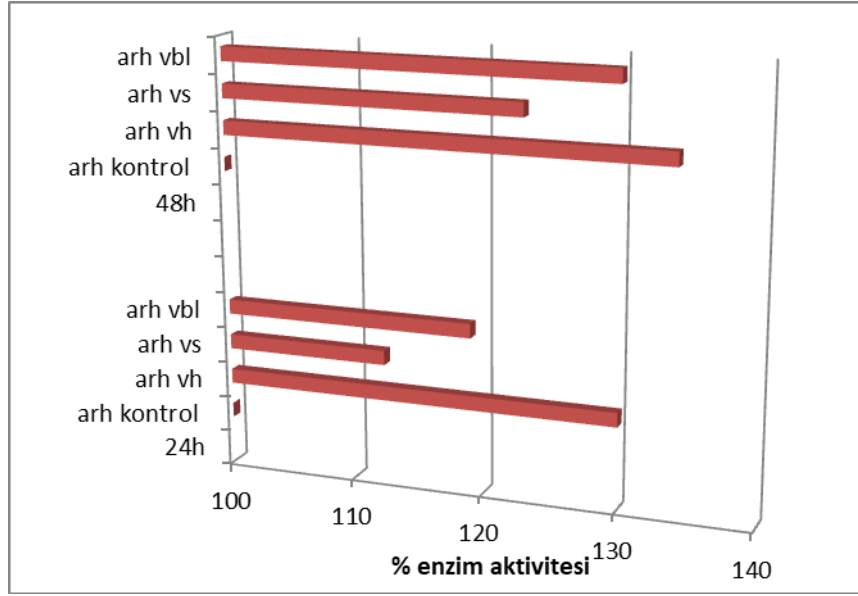
4.6. Kaspaz-3 enzim aktivitesi

Kaspaz 3 aktivitesi Real Time PCR tekniğinin yanı sıra enzim düzeyinde de ölçülmüştür. Bu amaçla hücreler 24-48 saat zaman aralıkları ile ekstraktların ve vinblastinin IC₅₀ dozuna maruz bırakıldıktan sonra protein izolasyonları yapılmıştır. Yapılan protein izolasyonuna ait sonuçlar Tablo 4.8. 'de verilmiştir.

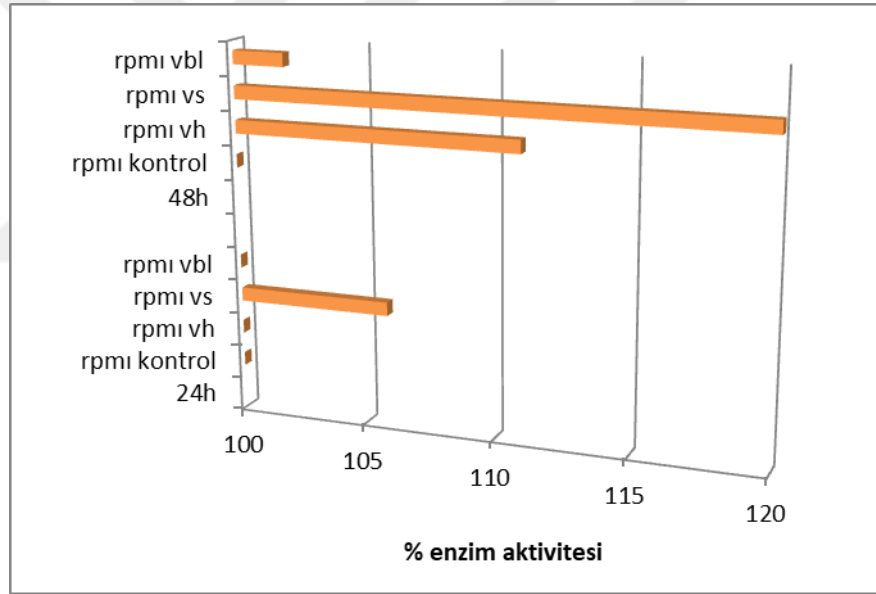
Örnek Adı	Protein konsantrasyonu	Birim	Uygulama süresi
ARH-77 Kontrol	5681,18	ug/ml	24H
ARH-77 VH	4799,276	ug/ml	24H
ARH-77 VS	5623,788	ug/ml	24H
ARH-77 VBL	4644,056	ug/ml	24H
ARH-77 Kontrol	1866,268	ug/ml	48H
ARH-77 VH	713,372	ug/ml	48H
ARH-77 VS	3139,076	ug/ml	48H
ARH-77 VBL	1106,464	ug/ml	48H
RPMI-8226 Kontrol	5298,676	ug/ml	24H
RPMI-8226 VH	5355,408	ug/ml	24H
RPMI-8226 VS	6349,32	ug/ml	24H
RPMI-8226 VBL	5017,468	ug/ml	24H
RPMI-8226 Kontrol	2726,108	ug/ml	48H
RPMI-8226 VH	2791,888	ug/ml	48H
RPMI-8226 VS	2202,396	ug/ml	48H
RPMI-8226 VBL	2294,848	ug/ml	48H

Tablo. 4.8. ARH-77 ve RPMI-8226 hücre hatları protein izolasyon sonuçları

Protein izolasyonunu takiben kaspaz 3 kiti aracılığı ile kaspaz 3 enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Her iki hücre hattı için enzim aktivitelerini gösteren grafikler Şekil 4.37 ve Şekil 4.38'de verilmiştir.



Şekil.4. 37. ARH-77 hücre hattına ekstrakt ve vinblastin uygulanması sonrasında kaspaz3 enzim seviyeleri



Şekil.4. 38. RPMI-8226 hücre hattına ekstrakt ve vinblastin uygulanması sonrasında kaspaz3 enzim seviyeleri

Elde edilen grafikler değerlendirildiğinde 24 saatlik periyotta ARH-77 hücre hattında kontrole oranla tüm gruplarda kaspaz 3 enzim aktivitesinde artış gözlenmiş olup, kaspaz 3 enzim aktivitesi açısından en fazla artış gösteren grubun *V. herbacea* ekstraktı uygulanan grup olduğu tespit edilmiştir. 48 saatlik periyotta ARH-77 hücre hattında tüm gruplarda kaspaz 3 enzim aktivitesinin artış gösterdiği görülmüştür. Yine en fazla artış gösteren grup *V. herbacea* ekstraktı uygulanan gruptur.

Diğer taraftan, 24 saatlik uygulama sonrasında RPMI-8226 hücre hattında enzim aktivitesine bakıldığında sadece *V.soneri* uygulanan grupta kontrole kıyasla artış gözlenirken, 48 saatlik uygulama sonrasında RPMI-8226 hücre hattında enzim aktivitesi değerlendirildiğinde tüm gruplarda artış saptanmış ve yine en fazla artışın *V.soneri* ekstraktı uygulanan grup olduğu tespit edilmiştir.

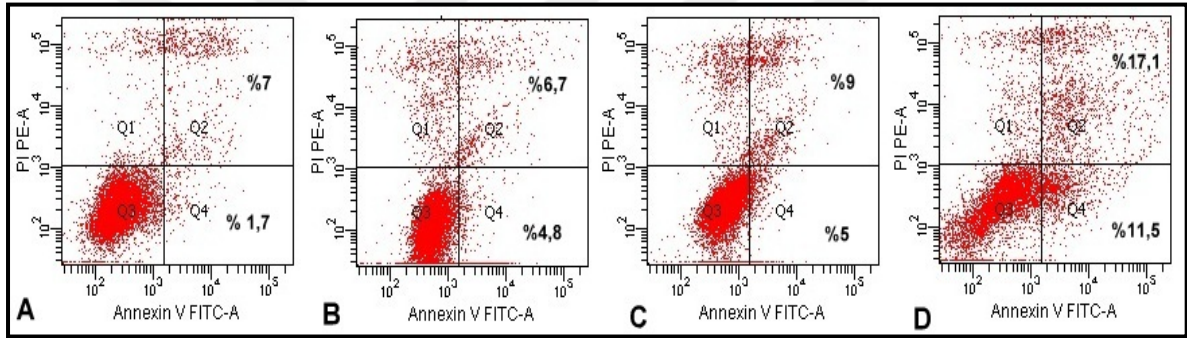
Genel olarak kaspaz 3 enzim aktivitesi sonuçlarına bakıldığında tüm gruplarda kaspaz 3 enzim aktivitesinde artış saptanmış olması, Real Time PCR sonuçlarımızla uyum göstermektedir. Kaspaz 3 gen ifadesinde gözlenen artış miktarlarının protein seviyesinde daha az olması, post-translasyonel modifikasyonların varlığına işaret etmektedir. Kaspaz 3 enzim aktivitesindeki artış uygulanan ekstraktların multipl miyelom hücrelerini programlı hücre ölümüne yönlendirdiğinin en önemli göstergelerinden biridir. Apoptozda intrinsik yolda, mitokondrideki sitokrom c, kaspaz-9, apoptoz-aktif edici faktör 1 (Apaf-1) ve prokaspaz-3'ile kombinasyon halinde çalışmaktadır. Ekstrinsik yolda ise Fas/FasL etkileşimi sonrasında kaspaz8 kaspaz 3'ü aktive etmektedir. Her iki yolağında son basamağı olan kaspaz 3'ün tetiklenmiş olması oldukça önemlidir.

4.7. Flow Sitometri

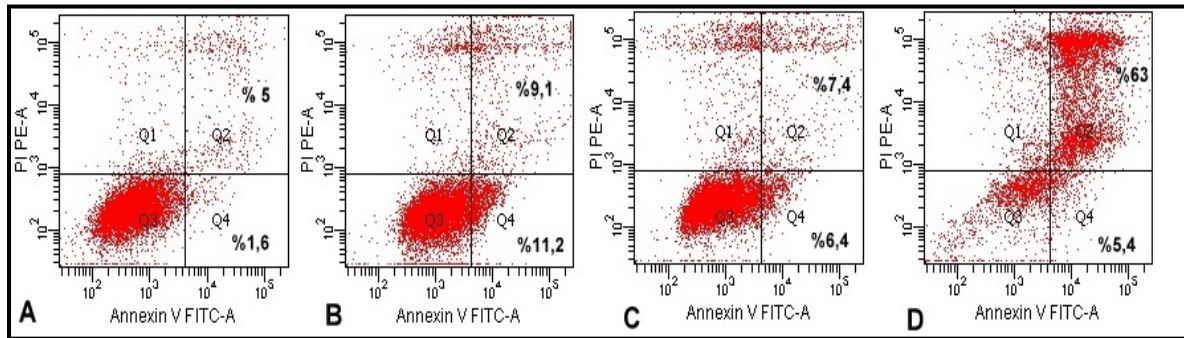
Flow sitometri, hücre kültürü çalışmalarında hücre döngüsü analizleri ve apoptoz tayininde oldukça tercih edilen bir yöntemdir. Hücrelerde apoptozu tayin etmenin farklı yolları (DNA fragmentasyonu, Real Time PCR, Western blotlama vs.) yanında apoptozun değerlendirilmesinde kullanılmaktadır.

Çalışmamızda yapılan diğer apoptoz belirleme yöntemlerine ek olarak, ekstrakt ve vinblastin uygulanan multipl miyelom hücrelerinde apoptotik hücre oranlarının (erken ve geç apoptotik hücreler) belirlenebilmesi için flow sitometri tekniği kullanılmıştır.

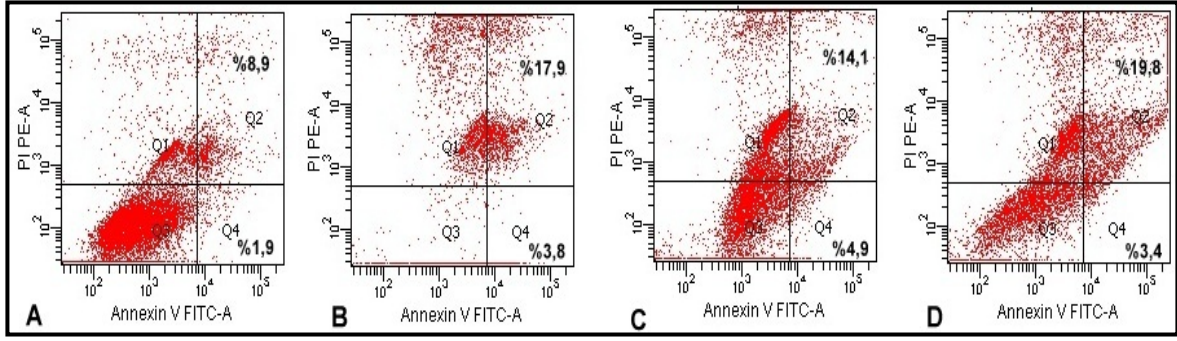
Annexin-V ve PI boyama ile elde edilen flow sitometri dot-blot grafikler Şekil 4.39. - Şekil 4.42.'de verilmiştir.



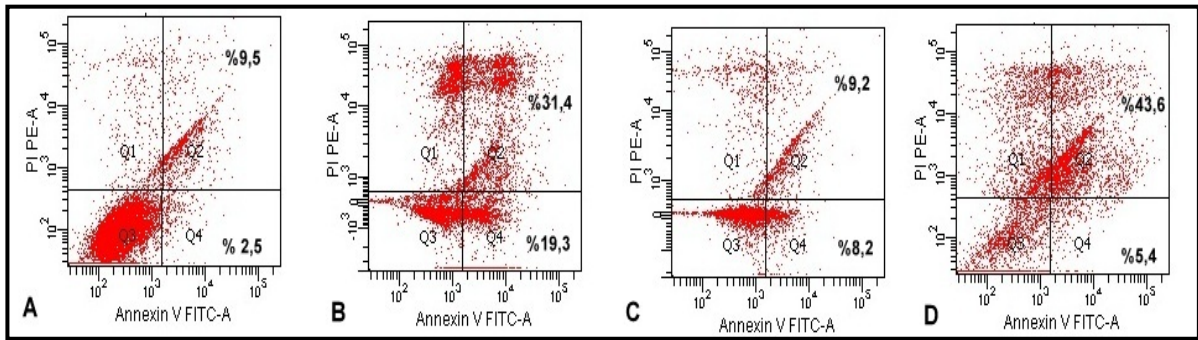
Şekil 4.39. ARH-77 hücre hattına 24 saat ekstrakt ve vinblastin uygulanması sonrasında alınan flow sitometri grafikleri (A: Kontrol, B: *V. herbaceae*, C: *V. soneri*, D: Vinblastin)



Şekil 4.40. ARH-77 hücre hattına 48 saat ekstrakt ve vinblastin uygulanması sonrasında alınan flow sitometri grafikleri (A: Kontrol, B: *V. herbaceae*, C: *V. soneri*, D: Vinblastin)



Şekil 4.41. RPMI-8226 hücre hattına 24 saat ekstrakt ve vinblastin uygulanması sonrasında alınan flow sitometri grafikleri (A: Kontrol, B: *V. herbaceae*, C: *V. soneri*, D: Vinblastin)



Şekil 4.42. RPMI-8226 hücre hattına 48 saat ekstrakt ve vinblastin uygulanması sonrasında alınan flow sitometri grafikleri (A: Kontrol, B: *V. herbaceae*, C: *V. soneri*, D: Vinblastin)

ARH-77 hücre hattında 24 saat için erken apoptotik hücre oranlarının sırasıyla % 1.7, % 4.8, % 5 ve % 11.5 iken 48 saatlik oranların sırasıyla % 1.2, % 11.6, % 6.4 ve % 5.4 olduğu tespit edilmiştir. RPMI-8226 hücre hattında 24 saat için erken apoptotik hücre oranlarının sırasıyla % 1.9, % 3.8, % 4.9 ve % 3.4 iken 48 saatlik oranların sırasıyla % 2.5, % 19.3, % 8.2 ve % 5.4 olduğu tespit edilmiştir. Flow sitometri sonuçlarını değerlendirdiğimizde ekstrakt ve vinblastin uygulanan multipl miyelom hücrelerinde apoptotik hücre oranlarının kontrole oranla arttığı tespit edilmiştir. Bu durum yapılan DNA fragmentasyonu, Real Time PCR ve kaspaz enzim aktivitesi sonuçlarımızı destekler niteliktedir. Özellikle erken apoptotik hücre oranlarındaki artış, ekstraktların hücreler üzerinde apoptozu teşvik edici etkisini net olarak ortaya koymaktadır.

Bitkisel ekstraktların çeşitli kanser hücreleri üzerinde hücre döngüsü ve apoptoz üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla flow sitometri tekniğini kullanan birçok çalışma mevcuttur.

[Engel ve ark. \(2014\)](#) tarafından yapılan çalışmada, Afrika'da yayılış gösteren dört bitki türünden elde ettikleri ekstraktların MCF-7 hücre hattı üzerine proapoptotik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada flow sitometri kullanılarak, Annexin- V /PI boyama ile apoptotik/nekrotik hücre tayini yapılmıştır. Kullanılan dört farklı ekstrakt sonrasında elde edilen erken apoptotik hücre oranları % 0.15 ila % 1.52 arasında değişirken geç apoptotik hücre oranları % 0 ila % 7 aralığında değişim göstermektedir. Kontrole göre erken apoptotik hücre oranı artış gösteren ekstraktların apoptozu teşvik ettiği rapor edilmiştir. Çalışmamızda ekstrakt ve vinblastin uygulaması yapılan tüm multipl miyelom hücrelerinde kontrole oranla hem erken, hem de geç apoptotik hücre oranlarında artış tespit edilmiştir. [Yang ve Zhao \(2017\)](#) tarafından yapılan çalışmada polydatinin multipl miyelom hücre hattı RPMI-8226 üzerindeki proliferatif, apoptotik ve otofajik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan diğer testlerin yanı sıra apoptotik hücre oranını belirlemek için flow sitometri tekniği kullanılmıştır. Sonuç olarak 0- 50- 100 ve 200 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyonda 24 saat uygulanması sonucu apoptotik hücre oranlarının doza ve zamana bağlı artış gösterdiği rapor edilmiştir. [Farha ve ark. \(2013\)](#) tarafından yapılan çalışmada *Elephantus scaber* bitkisinin kloroform ekstraktından izole edilen bir seskiterpen lakton olan izodeoksielefantofin'in (IDOE), nazofaringeal kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada apoptoz tayini için kullanılan metodlardan bir tanesi de flow sitometridir. Çalışma sonucunda farklı dozlarda uygulanan IDOE, erken apoptotik hücre oranlarını % 4.6 ile % 6.7 arasında değiştirmiştir. Geç apoptotik hücre oranları ise artan dozla birlikte % 5.95'ten % 45.97'ye yükselmiştir. Sonuç olarak apoptoz belirlemede kullanılan diğer testlerin yanı sıra flow sitometrik analizlerde uygulanan seskiterpenin nazofaringeal kanser hücrelerini apoptoza yönlendirdiğini doğrulamıştır. Çalışmamızda da aynı durum söz konusudur. Hem moleküler veriler hem de flow sitometri sonuçlarımız uyguladığımız ekstraktların multipl miyelom hücrelerini apoptoza yönlendirdiğini göstermektedir. [Bhatia ve ark. \(2015\)](#) tarafından yapılan çalışmada *Origanum dayi* ve *Ochradenus baccatus* bitkilerinden elde edilen sulu ekstraktların HepG2 hücreleri üzerinde apoptoz indükleyici etkileri araştırılmıştır. Flow sitometride Annexin- V /PI boyaması sonucunda 24 saatte *O.dayi* için erken apoptotik hücre oranları artan dozlar için (2-5mg/ml) sırasıyla % 6.2 ve % 3.7, *O. baccatus* için %12.6 ve % 1.5 olarak ölçülmüştür. 48 saate baktığımızda *O.dayi* için erken apoptotik hücre oranları artan dozlar için sırasıyla % 0 ve % 30.8, *O. baccatus* için % 63 ve % 8 olarak ölçülmüştür.

Çalışma sonunda gen ekspresyon seviyeleri ile de desteklenerek ekstraktların HepG2 hücrelerinde apoptozu teşvik ettiği rapor edilmiştir.

[Nair ve ark. \(2014\)](#) tarafından yapılan çalışmada *Costus speciosus* bitkisinin yapraklarından elde edilen metanolik ekstraktın HepG2 hücre hattı üzerindeki apoptotik ve hücre döngüsü üzerine inhibe edici etkileri araştırılmıştır. Çalışmada ekstraktın 100µg/ml dozda 48 saat uygulanması sonucunda HepG2 hücrelerinde % 14.7 erken apoptotik hücre oranı tespit edilmiştir. Çalışmada flow sitometri için tek doz ve tek zaman aralığı kullanılmıştır.

[Yırtıcı ve ark. \(2017\)](#), yaptıkları çalışmada *Centaurea fenzilii*'den elde ettikleri ekstraktların MCF-7 hücre hattı üzerine sitotoksik ve apoptotik etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada apoptoz tayininde flow sitometri ve Western blotlama kullanılmıştır. Flow sitometri analizleri 48 saat süre ile ekstraktın etil asetat fraksiyonunun IC₅₀ dozu ile muamele edildikten sonra Annexin-V/PI boyama ile yapılmıştır. Çalışma sonunda erken apoptotik hücre oranı % 5.8 iken geç apoptotik hücre oranı % 62.3 olarak saptanmıştır. Elde edilen ekstraktların özellikle etil asetat fraksiyonunun apoptotik etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir.

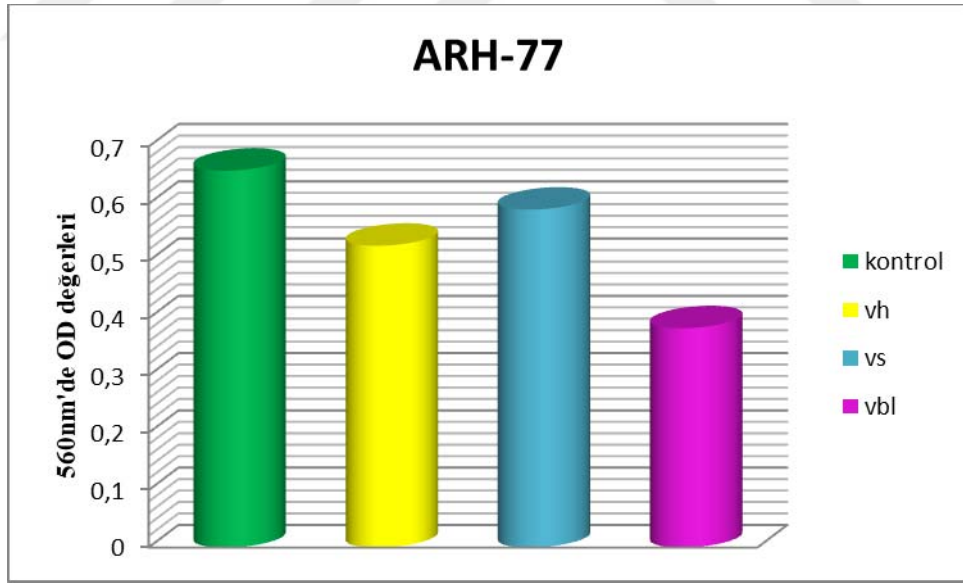
[Li ve ark. \(2015a\)](#) tarafından yapılan çalışmada *Juglans regia* bitkisinin yapraklarından elde edilen hekzan ekstraktının PC-3 hücre hattı üzerinde antitümör ve apoptoz indükleyici etkileri araştırılmıştır. Çalışmada MTT testi ve flow sitometri kullanılmıştır. Flow sitometride 48 saat süre ile 5, 50 ve 100 µg/ml dozlarda uygulandıktan sonra erken apoptotik hücre oranlarının % 9.5, % 15.5 ve % 26.3 olduğu ve geç apoptotik hücre oranlarının ise % 5.2, %11.2 ve % 18.9 olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonunda *Juglans regia* bitkisinden elde edilen ekstraktın prostat kanseri hücrelerini apoptoza yönlendirdiği rapor edilmiştir.

Apoptotik hücre oranları farklılık gösterse de bitkisel ekstraktlarının kanser hücrelerini apoptotik hücre ölümüne yönlendirmesi açısından bu çalışmalar çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Bitki kökenli ekstraktların kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerinin moleküler yöntemlerle ortaya konmasının yanı sıra flow sitometri ile de teyidi oldukça önemlidir.

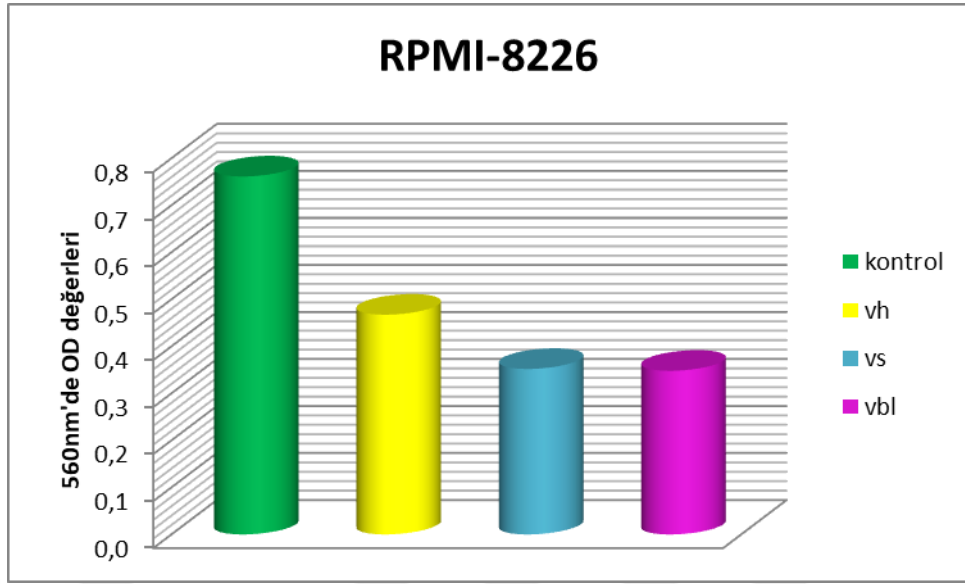
4.8. İnvazyon Testi

Metastaz veya kanserin vücuttaki yayılımı çok aşamalı bir olgudur; kanser hücreleri onları çevreleyen dokuları ve kan veya lenfatik damarları aracılığıyla istila ederek ve uzak organlara ulaşarak metastatik koloniler oluşturmaktadır. Metastaz, primer tümör büyümesinden ziyade, kanser hastalarında ölümün ana nedenidir. Tümör progresyonunun ayırıcı özelliklerinden biri olan invazivlik, tümörün çeşitli kompleks biyokimyasal ve biyomekanik süreçler vasıtasıyla konak dokuya genişleme kabiliyetini temsil etmektedir ([Guiot ve ark., 2007](#)). Kanser hücrelerinde invazyon metastaz için önemli bir adımdır ve tedavide önemli bir terapötik hedef olarak düşünülmektedir ([Thompson ve Price, 2002](#)).

Bitkisel kaynaklı ekstraktların veya içerdikleri fitokimyasalların kanser hücrelerini apoptoza yönlendirmelerinin yanı sıra tümör hücrelerinin bulundukları bölgeden farklı bir bölgeye göç etmelerini engellemeleri oldukça önemlidir. Multipl miyelom hücrelerine ekstrakt ve vinblastin uygulaması yapıldıktan sonra elde edilen invazyon sonuçları Şekil 4.43 ve Şekil 4.44'te verilmiştir.



Şekil 4.43. ARH-77 hücre hattına ekstrakt ve vinblastin uygulandıktan sonra elde edilen invazyon grafiği



Şekil 4.44. RPMI-8226 hücre hattına ekstrakt ve vinblastin uygulandıktan sonra elde edilen invazyon grafiği

Multipl miyelom hücre hatları üzerine ekstrakt ve vinblastin uygulaması sonucu alınan grafikleri değerlendirdiğimizde her iki hücre hattının invazyon kapasitesinde azalma olduğu saptanmıştır. Terapide oldukça önemli bir basamak olan invazyonun inhibe edilmesi oldukça dikkate değerdir. ARH-77 hücre hattında invazyonu azaltmada en fazla etki sırasıyla vinblastin uygulanan grupta sonra ise *V.herbacea* ekstraktı uygulanan grupta gözlenirken, *V.soneri* ekstraktı uygulanan ARH-77 hücrelerinde diğer gruplara nazaran çok daha az değişim gözlenmiştir. Bu durum sitotoksitite ve moleküler sonuçlarımızda olduğu gibi *V.herbacea* ekstraktının ARH-77 hücre hattında *V.soneri* ekstraktından daha etkili olduğunu net bir biçimde ortaya koymaktadır.

Diğer taraftan RPMI-8226 hücre hattında invazyonu değerlendirdiğimizde bu hücre hattı için invazyon kapasitelerinde meydana gelen olumlu değişimin ARH-77 hücre hattından daha fazla olduğu saptanmıştır. Hem ekstrakt uygulamalarımız hem de vincristin ve vinblastin uygulaması sonuçlarımıza dayanarak daha dirençli olduğunu düşündüğümüz bu hücre hattında invazyonun engellenmiş olması terapötik açıdan dikkate değer bir bulgudur. Etkisel olarak baktığımızda diğer hücre hattında en fazla engelleyici etki gösteren vinblastin için bu hücre hattında da aynı durum söz konusudur ancak ekstraktlarımızdan *V.soneri* ile etkisi hemen hemen aynı orandadır. *V.herbacea* ekstraktının etkisinin *V.soneri* ve vinblastine nazaran daha az olduğu saptanmıştır.

İnvazyon sonuçları bir bütün olarak değerlendirildiğinde uygulanan ekstraktların kanser hücrelerinin invazyonunu inhibe etmiş olmaları oldukça önemlidir. Bitkiden elde edilen ekstraktların gösterdiği sitotoksik ve apoptotik etkinin yanı sıra invazyonu engelleyici etki, total ekstraktların veya ekstraktlardaki etken maddenin terapide alternatif olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Özellikle RPMI-8226 hücre hattında moleküler açıdan olumlu sonuçlar aldığımız *V.soneri* ekstraktının invazyon üzerinde vinblastin ile yakın etki göstermesi, bu hücre hattında fitoterapi için önemli bir ümit kaynağı ve potansiyel olmaktadır.

[Sun ve ark. \(2006\)](#) tarafından yapılan çalışmada resveratrolün multipl miyelom hücre hattı RPMI-8226'da proliferasyon, invazyon ve apoptoz üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada VEGF ile indüklenen hücre invazyonunun resveratrol uygulaması sonucu doza bağımlı olarak azaldığı rapor edilmiştir. En yüksek doz resveratrol uygulamasında (50 µmol/L) invazyon oranı yaklaşık % 45 oranında azalma göstermiştir.

[Tibullo ve ark. \(2016\)](#) tarafından yapılan çalışmada *Punica granatum*'dan elde edilen ekstraktların multipl miyelom hücre hatları (KMS26, MM1S and ve U266) üzerine antiproliferatif ve anjiyojenik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada yapılan invazyon testi sonucunda % 3 oranında ekstrakt uygulanan multipl miyelom hücrelerinde invazyonu yaklaşık % 40 oranlarında azalttığı rapor edilmiştir.

[Kang ve ark. \(2015\)](#) tarafından yapılan çalışmada curcumin ve carboplatin sinerjik olarak uygulanarak akciğer kanseri üzerindeki apoptotik ve metastatik etkileri araştırılmıştır. Yapılan invazyon testi sonucunda 10 µM curcumin ile 100 µM carboplatin birlikte uygulandığında invazyonu yaklaşık % 70 oranında engellediği saptanmıştır. Çalışmada curcumin ve carboplatin kombinasyonunun hücre proliferasyonu ve apoptozun yanı sıra invazyon ve migrasyon üzerindede terapötik etkileri olduğu rapor edilmiştir.

[Do Thi ve Hwang \(2014\)](#) tarafından yapılan çalışmada *Porphyra tenera* bitkisinden elde edilen ekstraktların SK-Hep1 (hepatoma kanseri) hücre hattı üzerinde proliferasyon, invazyon ve metastaz üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada yapılan invazyon testi sonucunda elde edilen ekstrakt en yüksek dozda (400g/ml) uygulandığında kanser hücrelerinde yaklaşık % 27 oranında invazyonu azalttığı rapor edilmiştir. Çalışma sonunda ekstraktın SK-Hep1 insan hepatom kanseri hücrelerinin yapışmasını, invazyonunu ve metastazını inhibe ettiği rapor edilmiştir.

[Kandouz ve ark. \(2010\)](#) tarafından yapılan çalışmada *Teucrium polium* bitkisi ekstraktlarının prostat kanseri hücre hattı PC-3 ve DU-145 üzerinde proliferasyon, apoptoz, invazyon ve migrasyon üzerine etkilerinin yanı sıra hücre invazyonu ve metastazının önemli bir regülatörü olan E-cadherin / catenin kompleksinin ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. Çalışmada bitki özütünün hücre proliferasyonunu inhibe edebildiği ve PC-3 ve DU-145 hücrelerinin hücre döngüsü ilerlemesini düzenleyebileceği ve apoptoz indüksiyonuna neden olduğu rapor edilmiştir. Aynı zamanda ekstraktların her iki hücre hattı üzerinde epitelyal bir fenotipe farklılaşmaya neden olduğu ve böylece hücre invazyonunu ve migrasyonunun engellediği rapor edilmiştir.

[Van Slambrouck ve ark. \(2007\)](#) tarafından yapılan çalışmada medikal amaçlı kullanılan 7 bitkiden elde edilen ekstraktların kanser hücrelerinin büyümesi ve invazyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. MCF-7/AZ hücre hattı üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar kullanılan bitki türlerinden *Rubus idaeus* L. ve *Juniperus communis* L., 'in doza bağımlı sitotoksik etki gösterdiği buna karşın *Capsicum annuum* L., *Thymus vulgaris* and *Larrea tridentata* türlerinin herhangi bir sitotoksik etkiye neden olmadıkları rapor edilmiştir. İnvazyon testleri *Juniperus communis* L. ve *Anemopsis californica* bitkilerinden elde edilen ekstraktların MCF-7/AZ hücrelerinde hücre invazyonunu önemli ölçüde azaltmış olduğunu bildirilmiştir. Çalışmada invazyon oranlarının % 70 ila 75 oranında azalma gösterdiği rapor edilmiştir.

[Lirdprapamongkol ve ark. \(2008\)](#) tarafından yapılan çalışmada *Eclipta prostrata* bitkisinin suyu, metanolik ve sulu ekstraktları HCC-S102 (hepatoselüler karsinoma) hücre hattı üzerine uygulanarak invazyon, migrasyon ve adhezyon kapasitelerinin değişimi araştırılmıştır. İnvazyon testi sonucunda bitkiden elde edilen ekstraktlara nazaran bitki suyunun invazyonu bloke etmede daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Bitki suyunun ekstraktlara nazaran daha etkili olması içerikte yüksek oranlarda biyoaktif bileşenlerin bulunması ile açıklanmıştır. Bitki suyu invazyonun yanı sıra metastazı da baskımlarken, hücre adezyonu üzerinde herhangi bir etkiye sebep olmamıştır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz invazyon verileri bu çalışmalarla benzerlik göstermekle birlikte oransal olarak farklılıklar görülmektedir. Bitkinin içeriği, ekstraksiyon metodu ve hücre hattı gibi değişkenler invazyon oranlarında farklılığa yol açsa da kanser hücrelerinin yayılımının bitki kaynaklı ekstraktlar veya ajanlar ile engellenmesi terapi için oldukça önemli bir olgudur.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan birçok çalışma bitki kaynaklı doğal ürünlerin hem in vivo hem de in vitro apoptoz indüksiyonu, hücre döngüsünün inhibisyonu, osteoklastogenezin inhibisyonu, anjiyogenezin bastırılması ve ilaç direncinin tersine çevrilmesi de dâhil olmak üzere birden fazla anti-miyelom aktivitesine sahip olduklarını göstermiştir. Mevcut anti-miyelom kemoterapisi ve ajanlarıyla karşılaştırıldığında, doğal ürünler, normal hücrelere yan etkileri en aza indirmek ve ilaç direncini tersine çevirmek gibi iki önemli avantaj sunmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmalar, tek başına veya diğer ilaçlarla kombinasyon halinde kullanılan doğal ürünlerin, ilaç direncinin üstesinden gelmek ve MM'deki hasta sonuçlarını iyileştirmek için yeni ve umut vadeden bir yaklaşım olduğunu göstermektedir.

Bu çalışma ile *Vinca* türlerinden elde edilen metanolik ekstraktların sitotoksik ve apoptotik etkileri vincristin ve vinblastinle kıyaslamalı olarak ortaya konulmuştur.

Herhangi bir ekstraktın tıbbi açıdan herhangi bir etkisinin olup olmadığının belirlenmesinde öncelikli olarak içerikte bulunan uçucu yağ kompozisyonunun, fenolik bileşiklerin ve alkaloidlerinin belirlenerek taranması oldukça önem arz etmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarla alkaloid içeriği belirlenmiş olan *V.herbacea* ve *V.soneri* türlerinden elde edilen metanolik ekstraktların fenolik madde içeriği açısından analizleri ve karakterizasyonu ilk kez bu tez çalışması ile ortaya konulmuştur.

Aynı zamanda belirli bir hastalık için faydalı olabileceği öngörülen bir molekülün terapötik amaçlı kullanılabilmesi için önce klinik öncesi çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu aşamada önce in vitro yöntemler (hücre ve doku kültürleri) sonrasında da in vivo (deney hayvanları) çalışmalar ile etken maddenin etkileri ile ilgili araştırmaların yapılması oldukça önemlidir. Çalışmamızda elde edilen ekstraktların multipl miyelom hücre hatları üzerindeki etkileri in vitro olarak değerlendirilmiştir.

Kullanılan ekstraktların iki farklı hücre hattı üzerinde, sitotoksite, gen ifadesi, enzim aktivitesi ve invazyon açısından birbirinden farklı, fakat çoğunlukla pozitif etkilerinin olduğu görülmektedir.

V.herbacea ve *V.soneri* türlerinden elde edilen ekstraktların hem ARH-77 hemde RPMI-8226 multipl miyelom hücre hatları üzerinde doza ve zamana bağlı sitotoksik

etki göstermiş olmaları, ekstraktların terapide kullanılabilme potansiyelini ortaya koymaktadır.

Diğer taraftan ülkemiz için yeni ve endemik bir tür olan *Vinca soneri*'den elde edilen ekstraktın multipl miyelom hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermiş olması bitkide bulunan ve kanser tedavisinde de novo olabilecek bir bileşenin tespit edilmesini sağlayabilir. Bu bitkiden elde edilen ekstraktın daha önce hiçbir kanser hücresi üzerine çalışılmamış olması açısından çalışmamız bir ildir. Ayrıca çalışmamızda *Vinca* türlerinden elde edilen ekstraktların normal kan hücreleri üzerine olumsuz bir etki göstermemekle birlikte, multipl miyelom hücre hatlarında güçlü bir sitotoksik etki göstermiş olması oldukça önemlidir.

RPMI-8226 hücre hattında *V. herbacea*'den elde ettiğimiz ekstraktın vincristin ve vinblastinden daha fazla sitotoksik etki göstermiş olması, klinik uygulamalarda bir alternatif belki de kemoterapide kullanılan ilaçlar ile sinerjistik olarak kullanılacak bir etken maddenin ortaya çıkarılmasına imkân sağlayabileceğini düşünüyoruz. Ekstraktta bulunan asıl etken bileşenin ne olduğu konusunda çalışmalarımız in vivo ve in vitro olarak devam edecektir. Sitotoksikite sonuçlarına göre multipl miyelom hastalığının tedavisinde geniş çapta kullanılan vincristin yerine elde ettiğimiz sonuçlarla etkisinin daha fazla olduğu gözlenen vinblastinin kullanılması önerilebilir.

Gözlenen sitotoksik etkinin yanı sıra ekstraktların, apoptoz indükleyici kapasiteye sahip olduklarının tespit edilmiş olması oldukça önemlidir. Her iki hücre hattında ekstrakt uygulaması sonrasında gen seviyesinde birtakım farklılıklar gözlenmiş olup, bu durum gen ifadesi ve regülasyonu açısından uygulanan *Vinca* ekstraktlarının ve vinblastinin birbirinden farklı olmakla birlikte çok yönlü etkilerinin olduğunu ortaya çıkarmaktadır.

ARH-77 hücre hattında *V. herbacea*'den elde edilen ekstraktın FAS, FASL ve FADD gen ekspresyonları gibi ekstrinsik yolda yer alan gen ekspresyonlarında artışa neden olması, ekstraktın bu hücre hattında ekstrinsik yolağı harekete geçirdiğinin bir göstergesidir. Diğer taraftan, aynı ekstraktın intrinsik yolda görev alan BCL-2, MCL-1 gibi antiapoptotik, BAX, BAK, BIK, HRK, p53 gibi proapoptotik gen bölgelerinin ekspresyonlarında yol açtığı değişim hücre ölümünün aynı zamanda intrinsik yolla da gerçekleştiğini göstermektedir. Bu durum *V. herbacea* ekstraktı içerisinde bulunan fitokimyasalların apoptozu farklı yollarla (intrinsik- ekstrinsik) kontrol ettiğini net biçimde ortaya koymaktadır. *V. soneri* ekstraktı ve vinblastinin sadece intrinsik yolda

görev alan genlerin ekspresyonlarını etkilemiş oldukları ve ekstrinsik yolak üzerinde herhangi bir etkilerinin olmadığı görülmektedir.

RPMI-8226 hücre hattında gen ekspresyon sonuçları *Vinca* ekstraktlarının ve vinblastinin intrinsik yolak vasıtasıyla apoptozu indüklediğine işaret etmekte olup, ARH-77 hücre hattına nazaran daha dirençli olan bu hücre hattında gen ifade seviyeleri *V.soneri*'den elde edilen ekstraktın *V.herbacea*'dan elde edilen ekstrakttan daha etkili olduğunu ortaya koymuştur. Çalışmamızda ilk kez kullanılan bu ekstraktın özellikle dirençli multipl miyelom hücre hattında daha etkin olması, tedaviye direnç gösteren multipl miyelom hastalarının terapisi için önemli bir alternatif umudu taşımaktadır.

Kaspaz 3 aktivitesinde gen ifadesinde görülen değişimin enzim sonuçlarıyla da desteklenmiş olması apoptotik hücre ölümünün son süpürücüleri olan kaspazların aktive edildiğinin ve hücre ölümünün apoptoz ile gerçekleştiğinin diğer bir göstergesi olarak sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

Hücre invazyonunun blokajı bitkisel ekstraktların hedef aldığı bir diğer mekanizma olup, ekstrakt ve vinblastin uygulanan multipl miyelom hücre hatlarında hücre yayılmasının engellenmiş olması oldukça önemlidir. ARH-77 hücre hattında *V.herbacea*'dan elde edilen ekstrakt *V.soneri*'den daha etkili olurken dirençli olan hücre hattında *V.soneri*'den elde edilen ekstraktın daha etkili olmuş olması, gen ekspresyonları ile de uyum göstermektedir. Özellikle dirençli olan hücre hattında hücrelerin invazivliğinde gözlenen bu azalma kanser hücrelerinin çeşitli doku ve organlara yayılmasının engellenmesi ve hastalığın tedavisi açısından önem arz etmektedir.

Bitkisel tedavi yöntemlerinin kanserle mücadelede her geçen gün artan bir potansiyelinin ve öneminin olduğu bu çalışma ile bir kez daha ortaya çıkmaktadır. Özellikle yabani bitki kaynaklarından elde edilen ekstrakt veya droglardan aktif ve etken maddelerin belirlenmesini ve farmasötik açıdan potansiyellerini ortaya koymaya çalışan bu tip çalışmalar gelecekte yapılacak daha spesifik çalışmalar açısından oldukça önem arz etmektedir.

Devam eden çalışmalarımızda etken maddeyi bulabilmek amacıyla elde ettiğimiz ekstraktlarda bulunan rutin trihidrat, klorojenik asit, gallik asit gibi fenolik bileşenlerin yanı sıra her iki bitkide ortak olarak bulunan pikrinin alkaloidinin ayrı olarak çalışılması, farklı multipl miyelom hücre hatları ile çalışılması ve in vivo olarak çalışmalara devam edilmesi planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Adams, J. M. ve Cory, S., 2001, Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family, *Trends in biochemical sciences*, 26 (1), 61-66.
- Aggarwal, B. B. ve Shishodia, S., 2006, Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer, *Biochem Pharmacol*, 71 (10), 1397-1421.
- Ahmad, H., Li, J., Polson, M., Mackie, K., Quiroga, W. ve Patil, B. S., 2006, Citrus limonoids and flavonoids: Enhancement of phase II detoxification enzymes and their potential in chemoprevention, In, Eds: ACS Publications, p.
- Ahmad, R., Ahmad, N., Naqvi, A. A., Shehzad, A. ve Al-Ghamdi, M. S., 2017, Role of traditional Islamic and Arabic plants in cancer therapy, *J Tradit Complement Med*, 7 (2), 195-204.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. ve Walter, P., 2008, Molecular Biology of the Cell, 5th edition, *New York*, Garland Science, p.
- Alsina, M., Boyce, B., Devlin, R. D., Anderson, J. L., Craig, F., Mundy, G. R. ve Roodman, G. D., 1996, Development of an in vivo model of human multiple myeloma bone disease, *Blood*, 87 (4), 1495-1501.
- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Sung, B. ve Aggarwal, B. B., 2008, Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes, *Pharm Res*, 25 (9), 2097-2116.
- Aniara, 2010, Why should I use XTT instead of MTT, www.aniara.com: [22.09.2017].
- Bahadori, F., 2011, Isolation and Structure Elucidation Of Vinca Alkaloids From *Vinca* Species And Investigation of Cytotoxic Activity of Vinorelbine Loaded Nanodrug Delivery Systems, Doktora Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi*, İstanbul.
- Báidez, A. G., Gómez, P., Del Río, J. A. ve Ortuño, A., 2007, Dysfunctionality of the xylem in *Olea europaea* L. plants associated with the infection process by *Verticillium dahliae* Kleb. Role of phenolic compounds in plant defense mechanism, *Journal of agricultural and food chemistry*, 55 (9), 3373-3377.
- Baker, S. J., Fearon, E. R., Nigro, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., VanTuinen, P., Ledbetter, D. H., Barker, D. F. ve Nakamura, Y., 1989, Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas, *Science*, 244 (4901), 217-221.
- Bakhshi, A., Jensen, J. P., Goldman, P., Wright, J. J., McBride, O. W., Epstein, A. L. ve Korsmeyer, S. J., 1985, Cloning the chromosomal breakpoint of t (14; 18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18, *Cell*, 41 (3), 899-906.
- Balunas, M. J. ve Kinghorn, A. D., 2005, Drug discovery from medicinal plants, *Life Sci*, 78 (5), 431-441.

- Bao, J., Cai, Y., Sun, M., Wang, G. ve Corke, H., 2005, Anthocyanins, flavonols, and free radical scavenging activity of Chinese bayberry (*Myrica rubra*) extracts and their color properties and stability, *J Agric Food Chem*, 53 (6), 2327-2332.
- Barak, Y., Juven, T., Haffner, R. ve Oren, M., 1993, mdm2 expression is induced by wild type p53 activity, *EMBO J*, 12 (2), 461-468.
- Barnes, P. J., 2004, Alveolar macrophages as orchestrators of COPD, *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 1 (1), 59-70.
- Bataille, R. ve Harousseau, J.-L., 1997, Multiple Myeloma, *New England Journal of Medicine*, 336 (23), 1657-1664.
- Batista, C. V. F., Schripsema, J., Verpoorte, R., Rech, S. B. ve Henriques, A. T., 1996, Indole alkaloids from *Rauwolfia sellowii*, *Phytochemistry*, 41 (3), 969-973.
- Bernard, P. S. ve Wittwer, C. T., 2002, Real-time PCR technology for cancer diagnostics, *Clin Chem*, 48 (8), 1178-1185.
- Bhatia, D., Mandal, A., Nevo, E. ve Bishayee, A., 2015, Apoptosis-inducing effects of extracts from desert plants in HepG2 human hepatocarcinoma cells, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5 (2), 87-92.
- Bhattacharyya, J. ve Pakrashi, S., 1972, Elegantine, a new oxindole alkaloid from *Vinca elegantissima* Hort., *Tetrahedron Letters*, 13 (2), 159-162.
- Boğa, M., Kolak, U., Topçu, G., Bahadori, F., Kartal, M. ve Farnsworth, N. R., 2011, Two new indole alkaloids from *Vinca herbacea* L., *Phytochemistry Letters*, 4 (4), 399-403.
- Bortner, C. D., Oldenburg, N. B. ve Cidlowski, J. A., 1995, The role of DNA fragmentation in apoptosis, *Trends Cell Biol*, 5 (1), 21-26.
- Boyd, J. M., Gallo, G. J., Elangovan, B., Houghton, A. B., Malstrom, S., Avery, B. J., Ebb, R. G., Subramanian, T., Chittenden, T. ve Lutz, R. J., 1995, Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins, *Oncogene*, 11 (9), 1921-1928.
- Boyle, P. ve Levin, B., 2008, World Cancer Report 2008, *International Agency for Research on Cancer (IARC)*.
- Brandao, E. M., Brandão, P. H., Souza, I. A., Paiva, G. S., Carvalho, M. d. C. ve Lacerda, C. M., 2013, Antineoplastic effect of aqueous extract of *Plectranthus amboinicus* in Ehrlich ascites carcinoma, *Journal of Cancer*, 4 (7), 573.
- Brown, M. ve Wittwer, C., 2000, Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology, *Clin Chem*, 46 (8 Pt 2), 1221-1229.
- Brown, P. O. ve Botstein, D., 1999, Exploring the new world of the genome with DNA microarrays, *Nat Genet*, 21 (1 Suppl), 33-37.

- Bustin, S. A., 2000, Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays, *J Mol Endocrinol*, 25 (2), 169-193.
- Bustin, S. A., 2002, Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems, *J Mol Endocrinol*, 29 (1), 23-39.
- Cai, Y., Sun, M. ve Corke, H., 2003, Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae, *J Agric Food Chem*, 51 (8), 2288-2294.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. ve Corke, H., 2004, Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer, *Life Sci*, 74 (17), 2157-2184.
- Cai, Y. Z., Mei, S., Jie, X., Luo, Q. ve Corke, H., 2006, Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants, *Life Sci*, 78 (25), 2872-2888.
- Canel, C., Moraes, R. M., Dayan, F. E. ve Ferreira, D., 2000, Podophyllotoxin, *Phytochemistry*, 54 (2), 115-120.
- Canturk, Z., Dikmen, M., Artagan, O., Ozarda, M. G. ve Ozturk, N., 2016, Cytotoxic Effects of Resveratrol, Rutin and Rosmarinic Acid on ARH-77 Human (Multiple Myeloma) Cell Line, *NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS*, 11 (10), 1441-1444.
- Cattoretti, G., Rilke, F., Andreola, S., D'Amato, L. ve Delia, D., 1988, p53 expression in breast cancer, *International Journal of Cancer*, 41 (2), 178-183.
- Chaubal, R., Mujumdar, A., Misar, A. ve Deshpande, N., 2005, Isolation of phenolic compounds from *Acacia nilotica* with topical antiinflammatory activity, *Asian Journal of Chemistry*, 17 (3), 1595.
- Chen, P.-L., Chen, Y., Bookstein, R. ve Lee, W.-H., 1990, Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene, *Science*, 250 (4987), 1576-1580.
- Cini, M., Bradshaw, T. D. ve Woodward, S., 2017, Using titanium complexes to defeat cancer: the view from the shoulders of titans, *Chemical Society Reviews*, 46 (4), 1040-1051.
- Cirla, A. ve Mann, J., 2003, Combretastatins: from natural products to drug discovery, *Natural product reports*, 20 (6), 558-564.
- Cleary, M. L., Smith, S. D. ve Sklar, J., 1986, Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t (14; 18) translocation, *Cell*, 47 (1), 19-28.
- Cooper, G., 1994, Programmed cell death, In: The Cell, Eds: GM, C., *Washington: ASM Pres*, p. 592-596.
- Cory, A. H., Owen, T. C., Barltrop, J. A. ve Cory, J. G., 1991, Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture, *Cancer communications*, 3 (7), 207-212.

- Coste, I., Le Corf, K., Kfoury, A., Hmitou, I., Druillennec, S., Hainaut, P., Eyche, A., Lebecque, S. ve Renno, T., 2010, Dual function of MyD88 in RAS signaling and inflammation, leading to mouse and human cell transformation, *The Journal of clinical investigation*, 120 (10), 3663.
- Cragg, G. M. ve Newman, D. J., 2005, Plants as a source of anti-cancer agents, *J Ethnopharmacol*, 100 (1-2), 72-79.
- Crawford, L., Pim, D. ve Lamb, P., 1984, The cellular protein p53 in human tumours, *Molecular biology & medicine*, 2 (4), 261-272.
- Cuendet, M., Christov, K., Lantvit, D. D., Deng, Y., Hedayat, S., Helson, L., McChesney, J. D. ve Pezzuto, J. M., 2004, Multiple myeloma regression mediated by bruceantin, *Clinical cancer research*, 10 (3), 1170-1179.
- Curtin, J. F. ve Cotter, T. G., 2003, Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis, *Cellular signalling*, 15 (11), 983-992.
- Darcansoy İşeri, Ö., Yurtcu, E., Sahin, F. I. ve Haberal, M., 2013, *Corchorus olitorius* (jute) extract induced cytotoxicity and genotoxicity on human multiple myeloma cells (ARH-77), *Pharmaceutical biology*, 51 (6), 766-770.
- Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T. ve Traganos, F., 1997, Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis), *Cytometry*, 27 (1), 1-20.
- Dev, L. ve Menon, D. B., 2017, Essential Oil Extracted from *Plectranthus amboinicus* Induces Apoptosis in the Lung Cancer Cells via Mitochondrial Pathway, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 9 (2), 83-89.
- Devaux, P. F., 1991, Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes, *Biochemistry*, 30 (5), 1163-1173.
- Didenko, V. V., 2001, DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications, *Biotechniques*, 31 (5), 1106-1116, 1118, 1120-1101.
- Dinçer, M., 2000, Kanserden korunma, *Klinik Onkoloji* (06), 59-62.
- Ding, J. H., Yuan, L. Y., Huang, R. B. ve Chen, G. A., 2014, Aspirin inhibits proliferation and induces apoptosis of multiple myeloma cells through regulation of Bcl-2 and Bax and suppression of VEGF, *Eur J Haematol*, 93 (4), 329-339.
- Dispenzieri, A. ve Kyle, R. A., 2005, Multiple myeloma: clinical features and indications for therapy, *Best practice & research Clinical haematology*, 18 (4), 553-568.
- Do Thi, N. ve Hwang, E.-S., 2014, Effects of laver extracts on adhesion, invasion, and migration in SK-Hep1 human hepatoma cancer cells, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 78 (6), 1044-1051.

- Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Butel, J. S. ve Bradley, A., 1992, Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours, *Nature*, 356 (6366), 215-221.
- Dossus, L. ve Kaaks, R., 2008, Nutrition, metabolic factors and cancer risk, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* (22), 551–571.
- Dreamstime, 2017, <https://www.dreamstime.com/stock-illustration-apoptosis-necrosis-difference-apoptotic-versus-necrotic-morphology-form-cell-death-structural-changes-cells-image47670498>. : [29.09.2017].
- Duflos, A., Kruczynski, A. ve Barret, J. M., 2002, Novel aspects of natural and modified vinca alkaloids, *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2 (1), 55-70.
- Dunphy, C. H., 2004, Applications of flow cytometry and immunohistochemistry to diagnostic hematopathology, *Arch Pathol Lab Med*, 128 (9), 1004-1022.
- Dyrskjot, L., 2003, Classification of bladder cancer by microarray expression profiling: towards a general clinical use of microarrays in cancer diagnostics, *Expert Rev Mol Diagn*, 3 (5), 635-647.
- El-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W. ve Vogelstein, B., 1992, Definition of a consensus binding site for p53, *Nature genetics*, 1 (1), 45-49.
- El-Deiry, W. S., 2003, The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity, *Oncogene*, 22 (47), 7486-7495.
- El Alaoui, S., Lawry, J. ve Griffin, M., 1997, The cell cycle and induction of apoptosis in a hamster fibrosarcoma cell line treated with anti-cancer drugs: its importance to solid tumour chemotherapy, *J Neurooncol*, 31 (1-2), 195-207.
- Engel, N., Falodun, A., Kühn, J., Kragl, U., Langer, P. ve Nebe, B., 2014, Pro-apoptotic and anti-adhesive effects of four African plant extracts on the breast cancer cell line MCF-7, *BMC complementary and alternative medicine*, 14 (1), 334.
- Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Bratton, D. L., Cohen, J. J., Noble, P., Riches, D. W. ve Henson, P. M., 1993, The ability to recognize phosphatidylserine on apoptotic cells is an inducible function in murine bone marrow-derived macrophages, *Chest*, 103 (2), 102S.
- Farha, A., Geetha, B., Mangalam, S., Dhanya, S., Latha, P. ve Remani, P., 2013, Apoptosis mediated cytotoxicity induced by isodeoxyelephantopin on nasopharyngeal carcinoma cells, *Asian J Pharm Clin Res*, 6, 51-56.
- Feinleib, M. ve Macmahon, B., 1960, Duration of survival in multiple myeloma, *J Natl Cancer Inst*, 24, 1259-1269.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D. ve Bray, F., 2015, Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in Globocan 2012, *International Journal of Cancer*, 136 (5), E359-E386.

- Fotakis, G. ve Timbrell, J. A., 2006, In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicology letters*, 160 (2), 171-177.
- Fresco, P., Borges, F., Diniz, C. ve Marques, M. P., 2006, New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols, *Med Res Rev*, 26 (6), 747-766.
- Fu, R., Lv, W., Guo, Q. ve Wu, Z., 2016, Potential therapeutic effects of natural extracts in multiple myeloma, *Cancer Cell & Microenvironment*, 3 (3).
- Ginzinger, D. G., 2002, Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream, *Exp Hematol*, 30 (6), 503-512.
- Goidin, D., Mamessier, A., Staquet, M. J., Schmitt, D. ve Berthier-Vergnes, O., 2001, Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations, *Anal Biochem*, 295 (1), 17-21.
- Gong, J., Traganos, F. ve Darzynkiewicz, Z., 1994, A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry, *Analytical biochemistry*, 218 (2), 314-319.
- Gorczyca, W., Gong, J. ve Darzynkiewicz, Z., 1993, Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays, *Cancer research*, 53 (8), 1945-1951.
- Green, D. R., 2005, Apoptotic pathways: ten minutes to dead, *Cell*, 121 (5), 671-674.
- Guiot, C., Pugno, N., Delsanto, P. P. ve Deisboeck, T. S., 2007, Physical aspects of cancer invasion, *Physical biology*, 4 (4), P1.
- Gulcin, I., Beydemir, S., Topal, F., Gagua, N., Bakuridze, A., Bayram, R. ve Gepdiremen, A., 2012, Apoptotic, antioxidant and antiradical effects of majdine and isomajdine from *Vinca herbacea* Waldst. and kit, *J Enzyme Inhib Med Chem*, 27 (4), 587-594.
- Gullo, C., Koh, L. K., Pang, W. L., Ho, K. T., Tan, S. H. ve Schwarz, H., 2010, Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in multiple myeloma cell lines by CD137 ligand signaling, *PLoS One*, 5 (5), e10845.
- Guo, X., He, D., Yang, L., Li, Y., Chen, Q., Chen, J., Zhang, E., Lin, X., He, J. ve Yang, Y., 2015, Quercetin Displays Anti-Myeloma Activity and Synergistic Effect with Dexamethasone in Vitro and In Vivo Xenograft Models, *Am Soc Hematology*.
- Güleş, Ö. ve Ülker, E., 2008, Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19 (2), 73-78.
- Güner, A., 2012, Türkiye bitkileri listesi:(damarlı bitkiler), ANG Vakfı, p.
- Hagiwara, H. ve Sunada, Y., 2004, Mechanism of taxane neurotoxicity, *Breast Cancer*, 11 (1), 82-85.

- Han, X., Shen, T. ve Lou, H., 2007, Dietary polyphenols and their biological significance, *International Journal of Molecular Sciences*, 8 (9), 950-988.
- Han, Y., Zhang, S., Wu, J., Yu, K., Zhang, Y., Yin, L. ve Bi, L., 2010, Matrine induces apoptosis of human multiple myeloma cells via activation of the mitochondrial pathway, *Leuk Lymphoma*, 51 (7), 1337-1346.
- Hanahan, D. ve Weinberg, R. A., 2000, The hallmarks of cancer, *Cell*, 100 (1), 57-70.
- Harada, H. ve Grant, S., 2003, Apoptosis regulators, *Reviews in clinical and experimental hematology*, 7 (2), 117-138.
- Harmsma, M., Gromme, M., Ummelen, M., Dignef, W., Tussenius, K. J. ve Ramaekers, F. C., 2004, Differential effects of *Viscum album* extract IscadorQu on cell cycle progression and apoptosis in cancer cells, *Int J Oncol*, 25 (6), 1521-1529.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. ve Oren, M., 1997, Mdm2 promotes the rapid degradation of p53, *Nature*, 387 (6630), 296-299.
- He, D., Guo, X., Zhang, E., Zi, F., Chen, J., Chen, Q., Lin, X., Yang, L., Li, Y. ve Wu, W., 2016, Quercetin induces cell apoptosis of myeloma and displays a synergistic effect with dexamethasone in vitro and in vivo xenograft models, *Oncotarget*, 7 (29), 45489.
- Hengartner, M. O., 2000, The biochemistry of apoptosis, *Nature*, 407 (6805), 770-776.
- Herault, O., Colombat, P., Domenech, J., Degenne, M., BREMOND, J. L., Sensebe, L., BERNARD, M. C. ve Binet, C., 1999, A rapid single-laser flow cytometric method for discrimination of early apoptotic cells in a heterogenous cell population, *British journal of haematology*, 104 (3), 530-537.
- Herskowitz, I., 1987, Functional inactivation of genes by dominant negative mutations, *Nature*, 329 (6136), 219-222.
- Herskowitz, I., 1989, A regulatory hierarchy for cell specialization in yeast, *Nature*, 342 (6251), 749-757.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. ve Griffith, R., 1992, Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences, *Biotechnology (N Y)*, 10 (4), 413-417.
- Hollman, P. C. H. ve Arts, I. C. W., 2000, Flavonols, flavones and flavanols–nature, occurrence and dietary burden, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (7), 1081-1093.
- Hollstein, M., Metcalf, R., Welsh, J., Montesano, R. ve Harris, C., 1990, Frequent mutation of the p53 gene in human esophageal cancer, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87 (24), 9958-9961.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. ve Harris, C. C., 1991, p53 mutations in human cancers, *Science*, 253 (5015), 49-53.
- Holst-Hansen, C. ve Brünner, N., 1998, MTT-cell proliferation assay, *Cell Biology: a Laboratory Handbook. 2nd ed. Academic Press, San Diego*, 16-18.

- Honda, R., Tanaka, H. ve Yasuda, H., 1997, Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53, *FEBS Lett*, 420 (1), 25-27.
- Huang, W. Y., Cai, Y. Z., Xing, J., Corke, H. ve Sun, M., 2008, Comparative analysis of bioactivities of four Polygonum species, *Planta Med*, 74 (1), 43-49.
- Huang, W. Y., Cai, Y. Z. ve Zhang, Y., 2010, Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention, *Nutr Cancer*, 62 (1), 1-20.
- Huh, Y. S., Hong, T. H. ve Hong, W. H., 2004, Effective extraction of oligomeric proanthocyanidin (OPC) from wild grape seeds, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 9 (6), 471-475.
- Interchim, 2013, Water Soluble Tetrazolium Salts (WSTs), interchim.com: [22.03.2017].
- Irigaray, P., Newby, J. A., Clapp, R., Hardell, L., Howard, V., Montagnier, L., Epstein, S. ve Belpomme, D., 2007, Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview, *Biomed Pharmacother*, 61 (10), 640-658.
- Irwin, M. S., Kondo, K., Marin, M. C., Cheng, L. S., Hahn, W. C. ve Kaelin, W. G., Jr., 2003, Chemosensitivity linked to p73 function, *Cancer Cell*, 3 (4), 403-410.
- Ishii, Y., Hsiao, H.-H., Sashida, G., Ito, Y., Miyazawa, K., Kodama, A., Ohyashiki, J. H. ve Ohyashiki, K., 2006, Derivative (1; 7)(q10; p10) in multiple myeloma. A sign of therapy-related hidden myelodysplastic syndrome, *Cancer genetics and cytogenetics*, 167 (2), 131-137.
- Islam, M. ve Iskander, M. N., 2004, Microtubulin binding sites as target for developing anticancer agents, *Mini reviews in medicinal chemistry*, 4 (10), 1077-1104.
- Iwashina, T., 2000, The structure and distribution of the flavonoids in plants, *Journal of Plant Research*, 113 (3), 287-299.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. ve Forman, D., 2011, Global cancer statistics, *CA Cancer J Clin*, 61 (2), 69-90.
- Joanisse, G. D., Bradley, R. L., Preston, C. M. ve Munson, A. D., 2007, Soil enzyme inhibition by condensed litter tannins may drive ecosystem structure and processes: the case of *Kalmia angustifolia*, *New Phytol*, 175 (3), 535-546.
- Johnson, I. S., Armstrong, J. G., Gorman, M. ve Burnett, J. P., 1963, The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents, *Cancer research*, 23 (8 Part 1), 1390-1427.
- Johnson, I. T., 2007, Phytochemicals and cancer, *Proc Nutr Soc*, 66 (2), 207-215.
- Jordan, M. A., 2002, Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin, *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2 (1), 1-17.

- Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J. C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J. M., Dumont, X., Ferrara, P., McKeon, F. ve Caput, D., 1997, Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers, *Cell*, 90 (4), 809-819.
- Kammula, U. S., Marincola, F. M. ve Rosenberg, S. A., 2000, Real-time quantitative polymerase chain reaction assessment of immune reactivity in melanoma patients after tumor peptide vaccination, *J Natl Cancer Inst*, 92 (16), 1336-1344.
- Kandouz, M., Alachkar, A., Zhang, L., Dekhil, H., Chehna, F., Yasmeen, A. ve Al Moustafa, A.-E., 2010, *Teucrium polium* plant extract inhibits cell invasion and motility of human prostate cancer cells via the restoration of the E-cadherin/catenin complex, *Journal of ethnopharmacology*, 129 (3), 410-415.
- Kang, J. H., Kang, H. S., Kim, I. K., Lee, H. Y., Ha, J. H., Yeo, C. D., Kang, H. H., Moon, H. S. ve Lee, S. H., 2015, Curcumin sensitizes human lung cancer cells to apoptosis and metastasis synergistically combined with carboplatin, *Experimental Biology and Medicine*, 240 (11), 1416-1425.
- Kannan, K., Kaminski, N., Rechavi, G., Jakob-Hirsch, J., Amariglio, N. ve Givol, D., 2001, DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1, *Oncogene*, 20 (26), 3449-3455.
- Karaboz, İ., Kayar, E. ve Akar, S., 2008, Flow Sitometri ve Kullanım Alanları *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 6 (2), 1-18.
- Karam, J., 2009, Apoptosis in carcinogenesis and chemotherapy, *Netherlands*, Springer, p.
- Kelly, M. G., Alvero, A. B., Chen, R., Silasi, D.-A., Abrahams, V. M., Chan, S., Visintin, I., Rutherford, T. ve Mor, G., 2006, TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer, *Cancer research*, 66 (7), 3859-3868.
- Kelman, Z., Prokocimer, M., Peller, S., Kahn, Y., Rechavi, G., Manor, Y., Cohen, A. ve Rotter, V., 1989, Rearrangements in the p53 gene in Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia, *Blood*, 74 (7), 2318-2324.
- Khan, R., Sharma, M., Kumar, L., Husain, S. A. ve Sharma, A., 2016, Cinnamon extract exhibits potent anti-proliferative activity by modulating angiogenesis and cyclooxygenase in myeloma cells, *Journal of Herbal Medicine*, 6 (3), 149-156.
- Khanavi, M., Pourmoslemi, S., Farahanikia, B., Hadjiakhoondi, A. ve Ostad, S. N., 2010, Cytotoxicity of *Vinca minor*, *Pharm Biol*, 48 (1), 96-100.
- Kim, B., Kim, S. H., Jeong, S. J., Sohn, E. J., Jung, J. H., Lee, M. H. ve Kim, S. H., 2012, Brazilin induces apoptosis and G2/M arrest via inactivation of histone deacetylase in multiple myeloma U266 cells, *J Agric Food Chem*, 60 (39), 9882-9889.
- King, R. J. B. ve Robins, M. W., 2006, Cancer biology, *Harlow, England ; New York*, Pearson/Prentice Hall, p.

- Kiraz, Y., Neergheen-Bhujun, V. S., Rummun, N. ve Baran, Y., 2016, Apoptotic effects of non-edible parts of *Punica granatum* on human multiple myeloma cells, *Tumor Biology*, 37 (2), 1803-1815.
- Klein, D., 2002, Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations, *Trends Mol Med*, 8 (6), 257-260.
- Klug, S. W. ve Cummings, M. R., 2011, Concepts of Genetics, *Oxford*, Printice Hall, p.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C., Kuijten, G., Keehnen, R., Pals, S. ve Van Oers, M., 1994, Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis, *Blood*, 84 (5), 1415-1420.
- Koru, Ö., Avcu, F., Tanyüksel, M., Ural, A. U., Araz, R. E. ve Şener, K., 2009, Cytotoxic effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the human multiple myeloma cell line, *Turkish Journal of Medical Sciences*, 39 (6), 863-870.
- Kovacs, E., 2010, Investigation of the proliferation, apoptosis/necrosis, and cell cycle phases in several human multiple myeloma cell lines. Comparison of *Viscum album* QuFrF extract with vincristine in an in vitro model, *ScientificWorldJournal*, 10, 311-320.
- Koyuncu, M., 2012, A new species of *Vinca* (Apocynaceae) from eastern Anatolia, Turkey, *Turkish journal of botany*, 36 (3), 247-251.
- Koyuncu, M., Ekşi, G. ve Özkan, A. M. G., 2015, *Vinca ispartensis* (Apocynaceae), a new species from Turkey, *Annales Botanici Fennici*, 340-344.
- Kruk, J., 2007, Lifetime physical activity and the risk of breast cancer: a casecontrol study. , *Cancer Detect Prev.* (31), 18-28.
- Kubbutat, M. H., Jones, S. N. ve Vousden, K. H., 1997, Regulation of p53 stability by Mdm2, *Nature*, 387 (6630), 299-303.
- Kuo, P. L., Hsu, Y. L., Lin, T. C., Lin, L. T., Chang, J. K. ve Lin, C. C., 2005, Casuarinin from the bark of *Terminalia arjuna* induces apoptosis and cell cycle arrest in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells, *Planta Med*, 71 (3), 237-243.
- Kurahashi, N., Inoue, M., Iwasaki, M., Tanaka, Y., Mizokami, M. ve Tsugane, S., 2009, Vegetable, fruit and antioxidant nutrient consumption and subsequent risk of hepatocellular carcinoma: a prospective cohort study in Japan, *British journal of cancer*, 100 (1), 181-184.
- Lacroix, M., Toillon, R.-A. ve Leclercq, G., 2006, p53 and breast cancer, an update, *Endocrine-related cancer*, 13 (2), 293-325.
- Larrosa, M., Tomas-Barberan, F. A. ve Espin, J. C., 2006, The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway, *J Nutr Biochem*, 17 (9), 611-625.
- Lee, L. G., Connell, C. R. ve Bloch, W., 1993, Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes, *Nucleic Acids Res*, 21 (16), 3761-3766.

- Levy, J., Teuerstein, I., Marbach, M., Radian, S. ve Sharoni, Y., 1984, Tyrosine protein kinase activity in the DMBA-induced rat mammary tumor: inhibition by quercetin, *Biochem Biophys Res Commun*, 123 (3), 1227-1233.
- Li, F., Rajendran, P. ve Sethi, G., 2010, Thymoquinone inhibits proliferation, induces apoptosis and chemosensitizes human multiple myeloma cells through suppression of signal transducer and activator of transcription 3 activation pathway, *Br J Pharmacol*, 161 (3), 541-554.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.-j. ve Yuan, J., 1998, Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis, *Cell*, 94 (4), 491-501.
- Li, W., Li, D.-Y., Wang, H.-D., Zheng, Z.-J., Hu, J. ve Li, Z.-Z., 2015a, *Juglans regia* hexane extract exerts antitumor effect, apoptosis induction and cell cycle arrest in prostate cancer cells in vitro, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 14 (3), 399-405.
- Li, W., Wang, Y., Song, Y., Xu, L., Zhao, J. ve Fang, B., 2015b, A preliminary study of the effect of curcumin on the expression of p53 protein in a human multiple myeloma cell line, *Oncol Lett*, 9 (4), 1719-1724.
- Lie, Y. S. ve Petropoulos, C. J., 1998, Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays, *Curr Opin Biotechnol*, 9 (1), 43-48.
- Lieberman, M. ve Marks, A. D., 2009, Marks' Basic Medical Biochemistry, A Clinical Approach 3rd edition, *Lippincott Williams & Wilkins, A Wolter Kluwer Business*.
- Lin, C. K., Nguyen, T. T., Morgan, T. L., Mei, R. L., Kaptein, J. S., Kalunta, C. I., Yen, C. F., Park, E., Zou, H. Y. ve Lad, P. M., 1998, Apoptosis may be either suppressed or enhanced with strategic combinations of antineoplastic drugs or anti-IgM, *Exp Cell Res*, 244 (1), 1-13.
- Lirdprapamongkol, K., Kramb, J.-P., Chokchaichamnankit, D., Srisomsap, C., Surarit, R., Sila-Asna, M., Bunyaratvej, A., Dannhardt, G. ve Svasti, J., 2008, Juice of *Eclipta prostrata* inhibits cell migration in vitro and exhibits anti-angiogenic activity in vivo, *in vivo*, 22 (3), 363-368.
- Liss, B. ve Roeper, J., 2004, Correlating function and gene expression of individual basal ganglia neurons, *Trends Neurosci*, 27 (8), 475-481.
- Liu, R. H., 2004, Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action, *The Journal of nutrition*, 134 (12), 3479-3485.
- Lyman, G., 1992, Risk factors of cancer, *Prim Car* (19), 465-479.
- Ma, Y., Li, Z., Wang, Y. ve Feng, J., 2013, Brucine induces the apoptosis of U266 multiple myeloma cells by phosphorylation of c-Jun, *Mol Med Rep*, 7 (2), 481-484.
- Ma, Y., Jin, Z., Huang, J., Zhou, S., Ye, H., Jiang, S. ve Yu, K., 2014, Quercetin suppresses the proliferation of multiple myeloma cells by down-regulating IQ motif-containing GTPase activating protein 1 expression and extracellular signal-regulated kinase activation, *Leukemia & lymphoma*, 55 (11), 2597-2604.

- Mah, S. H., Teh, S. S. ve Ee, G. C. L., 2017, Anti-inflammatory, anti-cholinergic and cytotoxic effects of *Sida rhombifolia*, *Pharmaceutical biology*, 55 (1), 920-928.
- Manning, F. ve Zuzel, K., 2003, Comparison of types of cell death: apoptosis and necrosis, *Journal of Biological Education*, 37 (3), 141-145.
- Mastbergen, S. C., Duivenvoorden, I., Versteegh, R. T. ve Geldof, A. A., 2000, Cell cycle arrest and clonogenic tumor cell kill by divergent chemotherapeutic drugs, *Anticancer Res*, 20 (3A), 1833-1838.
- May, P. ve May, E., 1999, Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein, *Oncogene*, 18 (53), 7621-7636.
- Melino, G., De Laurenzi, V. ve Vousden, K. H., 2002, p73: Friend or foe in tumorigenesis, *Nat Rev Cancer*, 2 (8), 605-615.
- Ming Zhao, Jian Ma, Hai-Yan Zhu, Xu-Hui Zhang, Zhi-Yan Du, Xu, Y.-J. ve Yu, X.-D., 2011, Apigenin inhibits proliferation and induces apoptosis in human multiple myeloma cells through targeting the trinity of CK2, Cdc37 and Hsp90, *Molecular Cancer*, 10 (1), 104.
- Mocellin, S., Rossi, C. R. ve Marincola, F. M., 2003, Quantitative real-time PCR in cancer research, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 51 (5), 301-313.
- Montesano, R. ve Hall, J., 2001, Environmental causes of human cancers, *European Journal of Cancer*, 37, 67-87.
- Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of immunological methods*, 65 (1-2), 55-63.
- Moyad, M. A. ve Carroll, P. R., 2004, Lifestyle recommendations to prevent prostate cancer, part I: time to redirect our attention?, *Urologic Clinics of North America*, 31 (2), 289-300.
- Naga Deepthi, C., 2011, Role of tumor suppressor protein p53 in apoptosis and cancer therapy, *J Cancer Sci Ther S*, 17, 001.
- Nair, S. V., Hettihewa, M. ve Rupasinghe, H., 2014, Apoptotic and inhibitory effects on cell proliferation of hepatocellular carcinoma HepG2 cells by methanol leaf extract of *Costus speciosus*, *BioMed research international*, 2014.
- Nakamura, M., Shimada, K. ve Konishi, N., 2008, The role of HRK gene in human cancer, *Oncogene*, 27, S105-S113.
- NCI, 2011, National Cancer Institute, <http://www.cancer.gov/>: [26.09.2017].
- Newmeyer, D. D. ve Ferguson-Miller, S., 2003, Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death, *Cell*, 112 (4), 481-490.
- Nigro, J. M., Baker, S. J., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Hosteller, R., Cleary, K., Signer, S. H., Davidson, N., Baylin, S. ve Devilee, P., 1989, Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types, *Nature*, 342 (6250), 705-708.

- Nishibe, S., Takako, T., Takahiko, F., Yasukawa, K., Takido, M., Yasujiro, M. ve Akira, H., 1996, Bioactive Phenolic Compounds from *Catharanthus roseus* and *Vinca minor*, *Nat. med.*, 50, 378-383.
- Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E. ve Capaccioli, S., 2009, Natural compounds for cancer treatment and prevention, *Pharmacol Res*, 59 (6), 365-378.
- Nomura, M., Tsukada, H., Ichimatsu, D., Ito, H., Yoshida, T. ve Miyamoto, K., 2005, Inhibition of epidermal growth factor-induced cell transformation by tannins, *Phytochemistry*, 66 (17), 2038-2046.
- Oberlies, N. H. ve Kroll, D. J., 2004, Camptothecin and Taxol: Historic Achievements in Natural Products Research, *Journal of natural products*, 67 (2), 129-135.
- Ogden, G., 1998, Field cancerisation in the head and neck, *Oral diseases*, 4 (1), 1-3.
- Owen, R., Giacosa, A., Hull, W., Haubner, R., Spiegelhalder, B. ve Bartsch, H., 2000, The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil, *European Journal of Cancer*, 36 (10), 1235-1247.
- Ozaki, T. ve Nakagawara, A., 2005, p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world, *Cancer Sci*, 96 (11), 729-737.
- Ozaki, T. ve Nakagawara, A., 2011, Role of p53 in Cell Death and Human Cancers, *Cancers (Basel)*, 3 (1), 994-1013.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. ve Pisani, P., 2005, Global cancer statistics, 2002, *CA Cancer J Clin*, 55 (2), 74-108.
- Parvathy, M. ve Umamaheshwari, A., 2007, Cytotoxic effect of *Moringa oleifera* leaf extracts on human multiple myeloma cell lines, *Trends in Medical Research*, 2 (1), 44-50.
- Perez, E. A., 2009, Microtubule inhibitors: Differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance, *Mol Cancer Ther*, 8 (8), 2086-2095.
- Perkins, A. ve Stern, D., 1997, Apoptosis, In: Cancer Principle and Practice of Oncology, Eds: Devita VT, H. S., Rosenberg SA, *Philadelphia*: Lippincott-Raven, p. 96-100.
- Petitfrere-Auvray, N., Vercauteren, J., Massiot, G., Lukacs, G., Sevenet, T., Le Men-Olivier, L., Richard, B. ve Jacquier, M.-J., 1981, Alkaloids of *Alstonia lanceolifera*, *Phytochemistry*, 20 (8), 1987-1990.
- Pietenpol, J. A., Tokino, T., Thiagalingam, S., El-Deiry, W. S., Kinzler, K. W. ve Vogelstein, B., 1994, Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91 (6), 1998-2002.

- Prasad, S., Pandey, M. K., Yadav, V. R. ve Aggarwal, B. B., 2011, Gambogic acid inhibits STAT3 phosphorylation through activation of protein tyrosine phosphatase SHP-1: potential role in proliferation and apoptosis, *Cancer Prev Res (Phila)*, 4 (7), 1084-1094.
- Prives, C. ve Hall, P. A., 1999, The p53 pathway, *The Journal of pathology*, 187 (1), 112-126.
- Proestos, C., Chorianopoulos, N., Nychas, G.-J. ve Komaitis, M., 2005, RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity, *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (4), 1190-1195.
- Proskuryakov, S. Y., Konoplyannikov, A. G. ve Gabai, V. L., 2003, Necrosis: a specific form of programmed cell death?, *Experimental cell research*, 283 (1), 1-16.
- Qian, Y., Zhang, L., Chen, Q.-s., Zhang, Y., Xiao, D., Wen, X.-q. ve Zhao, W.-l., 2012, Catechins induce apoptosis of multiple myeloma RPMI 8226 cells and its mechanism, *Tumor*, 32 (1), 1-6.
- Raff, T., van der Giet, M., Endemann, D., Wiederholt, T. ve Paul, M., 1997, Design and testing of beta-actin primers for RT-PCR that do not co-amplify processed pseudogenes, *Biotechniques*, 23 (3), 456-460.
- Raghavendra, M. P., Kumar, P. R. ve Prakash, V., 2007, Mechanism of inhibition of rice bran lipase by polyphenols: a case study with chlorogenic acid and caffeic acid, *J Food Sci*, 72 (8), E412-419.
- Rajkumar, S. V. ve Kyle, R. A., 2005, Multiple myeloma: diagnosis and treatment, *Mayo Clinic Proceedings*, 1371-1382.
- Ramalakshmi, S. ve Muthuchelian, K., 2011, Analysis of bioactive constituents from the leaves of *Mallotus tetracoccus* (roxb.) Kurz, by gas chromatography-mass spectrometry, *International Journal of Pharmaceutical Sciences And Research*, 2 (6), 1449.
- Ramos, S., 2008, Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways, *Molecular nutrition & food research*, 52 (5), 507-526.
- Rao, A. S. ve Ahmed, M. F., 2014, Simultaneous Determination Of Phenolic Compounds In Catharanthus Roseus Leaves By Hplc Method, *International Journal of Pharmaceutical Sciences And Research*, 5 (3), 977-981.
- Rao, P. S., Ramanadham, M. ve Prasad, M. N. V., 2009, Anti-proliferative and cytotoxic effects of *Strychnos nux-vomica* root extract on human multiple myeloma cell line–RPMI 8226, *Food and chemical toxicology*, 47 (2), 283-288.
- Ratain, M., Grever, M., Chabner, B., Erlichman, C., Loprinzi, C., Teicher, B., O'Dwyer, P., Johnson, S., Hamilton, T. ve Allegra, C., 1997, Pharmacology of cancer chemotherapy, In: Cancer: Principles and Practices of Oncology. DeVita VT Jr, Hellman S and Rosenberg SA (eds.). Philadelphia, Lippincott-Raven, Eds, p. 375-498.

- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L. ve Zhang, L., 2003, Flavonoids: promising anticancer agents, *Med Res Rev*, 23 (4), 519-534.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J. ve Minor, L., 2016, Cell viability assays.
- Rzeski, W., Stepulak, A., Szymański, M., Sifringer, M., Kaczor, J., Wejksza, K., Zdzisińska, B. ve Kandefer-Szerszeń, M., 2006, Betulinic acid decreases expression of bcl-2 and cyclin D1, inhibits proliferation, migration and induces apoptosis in cancer cells, *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 374 (1), 11-20.
- Sakahira, H., Enari, M. ve Nagata, S., 1998, Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis, *Nature*, 391, 96.
- Saklani, A. ve Kutty, S. K., 2008, Plant-derived compounds in clinical trials, *Drug discovery today*, 13 (3), 161-171.
- Saral, Ö., Şahin, H. ve Karaköse, M., 2015, *Vinca major* subsp. *hirsuta*'nın antioksidan aktivitesinin ve RP-HPLC-UV ile fenolik bileşenlerinin belirlenmesi, *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 16 (2).
- Save, V., Hall, P. A. ve Coates, P. J., 2004, Detecting and Quantifying Apoptosis in Tissue Sections, In: *Methods in Molecular Biology. Apoptosis Methods and Protocols.*, Eds: Brady, H. J.: Humana Press, p.
- Schlegel, J., Peters, I., Orrenius, S., Miller, D. K., Thornberry, N. A., Yamin, T.-T. ve Nicholson, D. W., 1996, CPP32/apopain is a key interleukin 1 converting enzyme-like protease involved in Fas-mediated apoptosis, *Journal of Biological Chemistry*, 271 (4), 1841-1844.
- Schmid, I., Krall, W. J., Uittenbogaart, C. H., Braun, J. ve Giorgi, J. V., 1992, Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry, *Cytometry*, 13 (2), 204-208.
- Schulte-Hermann, R., Bursch, W., Low-Baselli, A., Wagner, A. ve Grasl-Kraupp, B., 1997, Apoptosis in the liver and its role in hepatocarcinogenesis, *Cell Biol Toxicol*, 13 (4-5), 339-348.
- Searle, J., 1982, Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance, *Pathol Annu*, 17, 229-259.
- Seeger, K., Kreuzer, K. A., Lass, U., Taube, T., Buchwald, D., Eckert, C., Korner, G., Schmidt, C. A. ve Henze, G., 2001, Molecular quantification of response to therapy and remission status in TEL-AML1-positive childhood ALL by real-time reverse transcription polymerase chain reaction, *Cancer Res*, 61 (6), 2517-2522.
- Selvakumaran, M., Lin, H. K., Miyashita, T., Wang, H. G., Krajewski, S., Reed, J. C., Hoffman, B. ve Liebermann, D., 1994, Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways, *Oncogene*, 9 (6), 1791-1798.

- Selvey, S., Thompson, E. W., Matthaei, K., Lea, R. A., Irving, M. G. ve Griffiths, L. R., 2001, Beta-actin--an unsuitable internal control for RT-PCR, *Mol Cell Probes*, 15 (5), 307-311.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M. ve Corke, H., 2005, Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents, *J Agric Food Chem*, 53 (20), 7749-7759.
- Shi, Y., 2006, Mechanical aspects of apoptosome assembly, *Curr Opin Cell Biol*, 18 (6), 677-684.
- Shih, P. H., Yeh, C. T. ve Yen, G. C., 2007, Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis, *J Agric Food Chem*, 55 (23), 9427-9435.
- Shoeb, M. ve 2006, Anticancer agents from medicinal plants, *Bangladesh J Pharmacol*, 1, 35-41.
- Siegel, R., Naishadham, D. ve Jemal, A., 2013, Cancer statistics, 2013, *CA: a cancer journal for clinicians*, 63 (1), 11-30.
- Silici, S., Unlu, M. ve Vardar-Unlu, G., 2007, Antibacterial activity and phytochemical evidence for the plant origin of Turkish propolis from different regions, *World J Microbiol Biotechnol*, 23 (12), 1797-1803.
- Silvestris, F., Lombardi, L., De Matteo, M., Bruno, A. ve Dammacco, F., 2007, Myeloma bone disease: pathogenetic mechanisms and clinical assessment, *Leukemia research*, 31 (2), 129-138.
- Sionov, V., Hayon, R. ve Haupt, Y., 2001, The regulation of p53 growth suppression, in Cell Cycle Checkpoints and Cancer, *Landes Bioscience*, 106– 125. .
- Souza, S. M., Aquino, L. C., Milach, A. C., Jr., Bandeira, M. A., Nobre, M. E. ve Viana, G. S., 2007, Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemao (Anacardiaceae) in rodents, *Phytother Res*, 21 (3), 220-225.
- Spierings, D. C., de Vries, E. G., Vellenga, E., van den Heuvel, F. A., Koornstra, J. J., Wesseling, J., Hollema, H. ve de Jong, S., 2004, Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52 (6), 821-831.
- Stagos, D., Kazantzoglou, G., Theofanidou, D., Kakalopoulou, G., Magiatis, P., Mitaku, S. ve Kouretas, D., 2006, Activity of grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* against mutagenicity induced by bleomycin and hydrogen peroxide in *Salmonella typhimurium* strain TA102, *Mutat Res*, 609 (2), 165-175.
- Stearn, W., 1972, Vinca L. , In: Flora Europea, Eds: Tutin TG, H. V., Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM & Webb DA: Cambridge University Press, p. 69.
- Stearn, W., 1978, Vinca L. , In: Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Eds: PH, D., *Edinburgh: Edinburgh University Press*, p. 161-163.

- Stearn, W. T., 1973, Synopsis of the genus *Vinca* including its taxonomic and nomenclatural history, In: The *Vinca* alkaloids; botany, chemistry, pharmacology, Eds: Taylor, W. ve Farnsworth, N., p. 19-94.
- Stermicke, H. ve Salvesen, G., 1998, Properties of the Caspase, *Biochim Biophys Acta*, 1387 (1-2), 17-31.
- Stiewe, T. ve Putzer, B. M., 2001, p73 in apoptosis, *Apoptosis*, 6 (6), 447-452.
- Subbiah, R. ve Muthuchelian, K., 2016, Development of Nanodrug for Treatment of Breast Cancer Using *Mallotus Tetracoccus* Leaves-Standardisation, Synthesis and Characterisation, *Nano Biomedicine & Engineering*, 8 (2).
- Suenaga, Y., Ozaki, T., Tanaka, Y., Bu, Y., Kamijo, T., Tokuhisa, T., Nakagawara, A. ve Tamura, T. A., 2009, TATA-binding Protein (TBP)-like Protein Is Engaged in Etoposide-induced Apoptosis through Transcriptional Activation of Human TAp63 Gene, *J Biol Chem*, 284 (51), 35433-35440.
- Sun, C., Hu, Y., Liu, X., Wu, T., Wang, Y., He, W. ve Wei, W., 2006, Resveratrol downregulates the constitutional activation of nuclear factor- κ B in multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and invasion, arrest of cell cycle, and induction of apoptosis, *Cancer genetics and cytogenetics*, 165 (1), 9-19.
- Surveswaran, S., Cai, Y.-Z., Corke, H. ve Sun, M., 2007, Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants, *Food Chemistry*, 102 (3), 938-953.
- Swamy, M. K., Arumugam, G., Kaur, R., Ghasemzadeh, A., Yusoff, M. M. ve Sinniah, U. R., 2017, GC-MS Based Metabolite Profiling, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Different Solvent Extracts of Malaysian *Plectranthus amboinicus* Leaves, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017.
- Szajnik, M., Szczepanski, M. J., Czystowska, M., Elishaev, E., Mandapathil, M., Nowak-Markwitz, E., Spaczynski, M. ve Whiteside, T. L., 2009, TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide or paclitaxel regulates tumor survival and chemoresistance in ovarian cancer, *Oncogene*, 28 (49), 4353-4363.
- Takahama, U., Ryu, K. ve Hirota, S., 2007, Chlorogenic acid in coffee can prevent the formation of dinitrogen trioxide by scavenging nitrogen dioxide generated in the human oral cavity, *Journal of agricultural and food chemistry*, 55 (22), 9251-9258.
- Takahashi, T., Nau, M. M., Chiba, I., Birrer, M. J. ve Rosenberg, R. K., 1989, p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer, *Science*, 246 (4929), 491.
- Taraphdar, A., Roy, M. ve Bhattacharya, R., 2001, Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention, *Curr Sci*, 80 (11), 1387-1396.
- Thompson, E. W. ve Price, J. T., 2002, Mechanisms of tumour invasion and metastasis: emerging targets for therapy, *Expert opinion on therapeutic targets*, 6 (2), 217-233.

- Tibullo, D., Caporarello, N., Giallongo, C., Anfuso, C. D., Genovese, C., Arlotta, C., Puglisi, F., Parrinello, N. L., Bramanti, V., Romano, A., Lupo, G., Toscano, V., Avola, R., Brundo, M. V., Di Raimondo, F. ve Raccuia, S. A., 2016, Antiproliferative and Antiangiogenic Effects of *Punica granatum* Juice (PGJ) in Multiple Myeloma (MM), *Nutrients*, 8 (10).
- Titeux, F., Le Men-Olivier, L. ve Le Men, J., 1975, Structure des caboxines: Alcaloïdes oxindoliques du *Cabucala fasciculata*, *Phytochemistry*, 14 (2), 565-568.
- Tong, T., Ji, J., Jin, S., Li, X., Fan, W., Song, Y., Wang, M., Liu, Z., Wu, M. ve Zhan, Q., 2005, Gadd45a expression induces Bim dissociation from the cytoskeleton and translocation to mitochondria, *Molecular and cellular biology*, 25 (11), 4488-4500.
- Tsuji, P. A. ve Walle, T., 2006, Inhibition of benzo[a]pyrene-activating enzymes and DNA binding in human bronchial epithelial BEAS-2B cells by methoxylated flavonoids, *Carcinogenesis*, 27 (8), 1579-1585.
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E. ve Croce, C. M., 1985, Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma, *Science*, 228, 1440-1444.
- Vacca, A. ve Ribatti, D., 2006, Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma, *Leukemia*, 20 (2), 193-199.
- Van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B. ve Reutelingsperger, C. P., 1998, Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure, *Cytometry*, 31 (1), 1-9.
- Van Slambrouck, S., Daniels, A. L., Hooten, C. J., Brock, S. L., Jenkins, A. R., Ogasawara, M. A., Baker, J. M., Adkins, G., Elias, E. M. ve Agustin, V. J., 2007, Effects of crude aqueous medicinal plant extracts on growth and invasion of breast cancer cells, *Oncology reports*, 17 (6), 1487-1492.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. ve Speleman, F., 2002, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol*, 3 (7), RESEARCH0034.
- Vaux, D. L., Cory, S. ve Adams, J. M., 1988, Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells, *Nature*, 335 (6189), 440-442.
- Veeriah, S., Kautenburger, T., Habermann, N., Sauer, J., Dietrich, H., Will, F. ve Pool-Zobel, B. L., 2006, Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics, *Molecular carcinogenesis*, 45 (3), 164-174.
- Velculescu, V. E. ve El-Deiry, W. S., 1996, Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene, *Clinical chemistry*, 42 (6), 858-868.
- Verma, S., Singh, A. ve Mishra, A., 2013, Gallic acid: molecular rival of cancer, *Environ Toxicol Pharmacol*, 35 (3), 473-485.

- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. ve Reutellingsperger, C., 1995, A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V, *Journal of immunological methods*, 184 (1), 39-51.
- Vogan, K., Bernstein, M., Leclerc, J.-M., Brisson, L., Brossard, J., Brodeur, G. M., Pelletier, J. ve Gros, P., 1993, Absence of p53 gene mutations in primary neuroblastomas, *Cancer research*, 53 (21), 5269-5273.
- Vogelstein, B., 1990, Cancer. A deadly inheritance, *Nature*, 348 (6303), 681–682.
- Vogelstein, B. ve Kinzler, K. W., 1992, p53 function and dysfunction, *Cell*, 70 (4), 523-526.
- Vogelstein, B., Lane, D. ve Levine, A. J., 2000, Surfing the p53 network, *Nature*, 408 (6810), 307-310.
- Vousden, K. H. ve Lu, X., 2002, Live or let die: the cell's response to p53, *Nature Reviews Cancer*, 2 (8), 594-604.
- Wajant, H., 2003, Death receptors, *Essays in biochemistry*, 39, 53-71.
- Walker, N. J., 2002, Tech.Sight. A technique whose time has come, *Science*, 296 (5567), 557-559.
- Wall, M. E., 1998, Camptothecin and taxol: discovery to clinic, *Medicinal research reviews*, 18 (5), 299-314.
- Wang, E., Qian, Z.-R., Nakasono, M., Tanahashi, T., Yoshimoto, K., Bando, Y., Kudo, E., Shimada, M. ve Sano, T., 2010, High expression of Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88 signals correlates with poor prognosis in colorectal cancer, *British journal of cancer*, 102 (5), 908-915.
- Wang, X., Zelenski, N. G., Yang, J., Sakai, J., Brown, M. S. ve Goldstein, J. L., 1996, Cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) by CPP32 during apoptosis, *The EMBO journal*, 15 (5), 1012.
- Wang, X., 2001, The expanding role of mitochondria in apoptosis, *Genes Dev*, 15 (22), 2922-2933.
- Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P. ve McPhail, A. T., 1971, Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*, *Journal of the American Chemical Society*, 93 (9), 2325-2327.
- Werner-Washburne, M. ve Szauter, P., 2013, From Mendel To The Human Genome Project, <http://www.discoveryandinnovation.com/BIOL202/notes/lecture20.html>: [30.09.2017].
- Wheat, J. ve Currie, G., 2008, Herbal medicine for cancer patients: An evidence based review. , *Int J Altern Med.*, 5 (2).
- WHO, 2017, World Health Organisation, <http://www.who.int/en/>: [26.09.2017].

- Willis, S. N., Fletcher, J. I., Kaufmann, T., van Delft, M. F., Chen, L., Czabotar, P. E., Ierino, H., Lee, E. F., Fairlie, W. D., Bouillet, P., Strasser, A., Kluck, R. M., Adams, J. M. ve Huang, D. C., 2007, Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak, *Science*, 315 (5813), 856-859.
- Wu, H., Dai, Q., Shrubsole, M. J., Ness, R. M., Schlundt, D., Smalley, W. E., Chen, H., Li, M., Shyr, Y. ve Zheng, W., 2009, Fruit and vegetable intakes are associated with lower risk of colorectal adenomas, *The Journal of nutrition*, 139 (2), 340-344.
- Xu, M., Chen, X., Chen, N., Nie, L., Li, X., Li, Q., Zeng, H. ve Zhou, Q., 2013, Synergistic silencing by promoter methylation and reduced AP-2 α transactivation of the proapoptotic HRK gene confers apoptosis resistance and enhanced tumor growth, *The American journal of pathology*, 182 (1), 84-95.
- Yamauchi, T., Abe, F., Chen, R.-F., Nonaka, G.-I., Santisuk, T. ve Padolina, W. G., 1990, Alkaloids from the leaves of *Alstonia scholaris* in Taiwan, Thailand, Indonesia and the Philippines, *Phytochemistry*, 29 (11), 3547-3552.
- Yamazhan, T. ve Tunçel, M., 2003, Bakteri Kanseri İlişkisi, *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, 17 (1), 117-121.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M. D., Dotsch, V., Andrews, N. C., Caput, D. ve McKeon, F., 1998, p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities, *Mol Cell*, 2 (3), 305-316.
- Yang, B. ve Zhao, S., 2017, Polydatin regulates proliferation, apoptosis and autophagy in multiple myeloma cells through mTOR/p70s6k pathway, *OncoTargets and therapy*, 10, 935.
- Yang, L. J., Chen, Y., He, J., Yi, S., Wen, L., Zhao, S. ve Cui, G. H., 2012, Effects of gambogic acid on the activation of caspase-3 and downregulation of SIRT1 in RPMI-8226 multiple myeloma cells via the accumulation of ROS, *Oncol Lett*, 3 (5), 1159-1165.
- Yırtıcı, Ü., Göger, F., Sarimahmut, M. ve Ergene, A., 2017, Cytotoxic and apoptotic effects of endemic *Centaurea fenizlii* Reichardt on the MCF-7 breast cancer cell line, *Turkish Journal of Biology*, 41 (2), 370-377.
- Youle, R. J., 2007, Cell biology. Cellular demolition and the rules of engagement, *Science*, 315 (5813), 776-777.
- Yulianto, W., Andarwulan, N., Giriwono, P. E. ve Pamungkas, J., 2016, HPLC-based metabolomics to identify cytotoxic compounds from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng against human breast cancer MCF-7Cells, *Journal of Chromatography B*, 1039, 28-34.
- Zachowski, A., 1993, Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement, *Biochemical Journal*, 294 (Pt 1), 1.
- Zeiss, C., 2003, The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice, *Veterinary Pathology*, 40 (5), 481-495.

- Zerban, H., Radig, S., Kopp-Schneider, A. ve Bannasch, P., 1994, Cell proliferation and cell death (apoptosis) in hepatic preneoplasia and neoplasia are closely related to phenotypic cellular diversity and instability, *Carcinogenesis*, 15 (11), 2467-2473.
- Zhang, B., Gojo, I. ve Fenton, R. G., 2002, Myeloid cell factor-1 is a critical survival factor for multiple myeloma, *Blood*, 99 (6), 1885-1893.
- Zhang, M., Liu, L. P., Chen, Y., Tian, X. Y., Qin, J., Wang, D., Li, Z. ve Mo, S. L., 2013, Wogonin induces apoptosis in RPMI 8226, a human myeloma cell line, by downregulating phospho-Akt and overexpressing Bax, *Life Sci*, 92 (1), 55-62.
- Zhong, Y., Zhang, Y., Wang, P., Gao, H., Xu, C. ve Li, H., 2016, V8 induces apoptosis and the endoplasmic reticulum stress response in human multiple myeloma RPMI 8226 cells via the PERK-eIF2 α -ATF4 signaling pathway, *Oncol Lett*, 12 (4), 2702-2709.
- Zhu, G., Chang, Y., Zuo, J., Dong, X., Zhang, M., Hu, G. ve Fang, F., 2001, Fudenine, a C-terminal truncated rat homologue of mouse prominin, is blood glucose-regulated and can up-regulate the expression of GAPDH, *Biochem Biophys Res Commun*, 281 (4), 951-956.
- Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A. ve Wang, X., 1997, Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3, *Cell*, 90 (3), 405-413.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ela Nur ŞİMŞEK SEZER
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : ANKARA 26.06.1986
Telefon : 5313791658
Faks : -
e-mail : simsekela@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Akın Gönen Anadolu Lisesi, Niğde	2005
Üniversite	: Selçuk Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Konya	2009
Yüksek Lisans	: Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Konya	2012
Doktora	: Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Konya	-

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2007	Gülhane Askeri Tıp Akademisi/Mikrobiyoloji Laboratuvarı	Stajyer
2008	Gülhane Askeri Tıp Akademisi/Tıbbi Genetik Laboratuvarı	Stajyer
2011 - 2016	Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD	Araştırma Görevlisi
2016 -	Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü	Araştırma Görevlisi

YABANCI DİLLER: İngilizce, Almanca

YAYINLAR

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

1. Tuna Uysal, Meryem Bozkurt, Osman Tugay, Kuddisi Ertuğrul, **Ela Nur Şimşek Sezer**, Yavuz Bülent Köse. **2017**. Karyomorphology of Turkish species in *Centaurea* sections *Centaurea* and *Phalolepis* (Asteraceae) and implications for taxonomy. Plant Biosystems 151(6): 949–964.

2. Tuna Uysal, **Ela Nur Şimşek Sezer**, Meryem Bozkurt, Osman Tugay, Kuddisi Ertuğrul, Hakkı Demirelma, Hüseyin Dural. **2016**. Karyomorphological study of five Turkish endemic *Rhaponticoides* Vaill. (Asteraceae, Cardueae) species. *Caryologia* 69 (3): 207-214.
3. Tuna Uysal, Meryem Bozkurt, **Ela Nur Şimşek Sezer**, Kuddisi Ertuğrul, Osman Tugay. **2015**. Karyological studies of four endemic *Centaurea* L. species. *Caryologia*. 68 (4): 339-346.
4. **Şimşek, Ela Nur**, Uysal, Tuna. **2013**. In vitro Investigation of Cytotoxic and Apoptotic Effects of *Cynara* L. Species in Colorectal Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14 (11), 6791-6795.(Yüksek Lisans Tezinden)

Diğer hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. Durmaz, Fatih., Aktaş, Sinan & **Sezer, Ela Nur Şimşek**, *Bovista plumbea* Pers.'nın Yağ Asit İçeriklerinin İncelenmesi. *Mantar Dergisi*, 8(2), 104-108.
2. Ali Kahraman, Tuna Uysal, Meryem Bozkurt, **Ela Nur Şimşek Sezer**, Ercan Ceyhan, Zuhal Ozkan **2016** Classification of Bean Genotypes by Protein Profiles *Selcuk J Agr Food Sci*, 30(1):29-33.
3. Eda Güneş, **Ela Nur Şimşek Sezer**, Meryem Bozkurt, Tuna Uysal **2015**. The Determination of Boric Acid Effects on Different Developmental Stages of *Drosophila melanogaster* By SDS-PAGE. *Journal of Biochemistry International*. 1(1): 1-5.

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

1. **Ela Nur Şimşek Sezer**, Tuna Uysal. Phenolic Characterization of Extracts from *Vinca* Species and Their's Cytotoxic Effects on Multiple Myeloma. MESMAP-3, Girne-Turkish Republic of Northern Cyprus. April 13th - 16th, **2017 (SS)** (Doktora tezinden).
2. Tuna UYSAL, Betül Sena TEKKANAT, **Ela Nur Şimşek Sezer**, Rahim ADA, Meryem BOZKURT, Karyotype Analysis Of Some Lines And Varieties Belonging *Carthamus tinctorius* L. species. 3rd International Conference On Science, Ecology And Technology Rome, ITALY 14-16 August **2017 (SS)**.
3. Tuna UYSAL, Osman TUGAY, Hüseyin DURAL, Hakkı DEMİRELMA, Meryem BOZKURT, Deniz ULUKUŞ, **Ela Nur Şimşek Sezer**, Kuddisi

- ERTUĞRUL Karyomorphological analysis of the Stenocephalae section (Cousinia, Asteraceae) from Turkey. The 3rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2017). July 05-08, **2017 (SS)**.
4. Tuna UYSAL, Osman TUGAY, Meryem BOZKURT, Hüseyin DURAL, Hakkı DEMİRELMA, Deniz ULUKUŞ, **Ela Nur Şimşek Sezer**, Kuddisi ERTUĞRUL Karyomorphological analysis of the Cynaroidae section (Cousinia, Asteraceae) from Turkey. The 3rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2017). July 05-08, **2017 (SS)**.
 5. Tuna UYSAL, Hüseyin DURAL, Kuddisi ERTUĞRUL, Osman TUGAY, Hakkı DEMİRELMA, Meryem BOZKURT, **Ela Nur Şimşek Sezer**, Türkiye *Myogalum* altcinsine ait *Ornithogalum* L. Taksonlarının Tehlike Kategorileri ve Koruma Önerileri / Conservation recommendations and Threat Categories of *Ornithogalum* L. taxa belonging to Subgenus *Myogalum* in Turkey. XIII. Uluslararası Katılımlı Ekoloji ve Çevre Kongresi. Edirne, Türkiye. 12-15 Eylül **2017(SS)**.
 6. **Ela Nur Şimşek Sezer**, Tuna Uysal, Meryem Bozkurt, Osman Tugay, Kuddisi Ertugrul, Hakkı Demirelma, Hüseyin Dural, Karyomorphological Analysis of Five Rhaponticoides Vaill. Species (Asteraceae) from Turkey. The International Conference On Science, Ecology And Technology I (Iconsete'2015 – Vienna). 25 – 28 August **2015**, Vienna, Austria (SS).
 7. Tuna Uysal, Meryem Bozkurt, **Ela Nur Şimşek Sezer**, Hüseyin Dural, Kuddisi Ertuğrul, Hakkı Demirelma, Osman Tugay, Karyomorphological Analysis of Fifty eight *Ornithogalum* L. Taxa (Liliaceae) from Turkey. The International Conference On Science, Ecology And Technology I (Iconsete'2015 – Vienna). 25 – 28 August **2015**, Vienna, Austria (SS).
 8. Meryem Bozkurt, Tuna Uysal, Osman Tugay, **Ela Nur Şimşek Sezer**, Hakkı DEMİRELMA, Kuddisi ERTUĞRUL, Hüseyin DURAL, Phylogenetic Analysis of the Turkish Rhaponticoides Vaill. Species. The International Conference On Science, Ecology And Technology I (Iconsete'2015 – Vienna). 25 – 28 August **2015**, Vienna, Austria (SS).
 9. Ertuğrul K., Bozkurt M., **Şimşek E.N.** ve Uysal T. Threat Categories Of The Genus *Psephellus* Cass. In Turkey And The Genetic Diversity in *Psephellus brevifimbriatus* (Hub.- Mor.) Wagenitz (Compositae). The Second International

Symposium on the Biology of Rare and Endemic Plant Species. April 24-27 2012, Fethiye, Muğla, Turkey (SS).

10. **Şimşek Ela Nur**, Uysal Tuna, Enginar Türlerinden Elde Edilen Bitkisel Ekstraktların DLD-1 Hücre Dizisi Üzerine Etkileri. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi. 3-7 Eylül 2012, Ege Üniversitesi, İzmir (SS) (Yüksek Lisans Tezinden).
11. Meryem Bozkurt, **Ela Nur Şimşek Sezer**, Eray Tulukçu, Tuna Uysal Investigation Of Cytotoxic Effects of Some Ethnobotanic Plants On Colorectal Cell Line. MESMAP-3, Girne-Turkish Republic of Northern Cyprus. April 13th - 16th, 2017(PS).
12. Emine Gelinci, Hakkı Demirelma, **Ela Nur Şimşek Sezer**, Tuna Uysal Cytotoxic Effects of *Sideritis öztürkii* Aytaç & Aksoy. XIII. Uluslararası Katılımlı Ekoloji ve Çevre Kongresi. Edirne, Türkiye. 12-15 Eylül 2017(PS).
13. Emine Gelinci, Hatice Türk Dağı, **Ela Nur Şimşek Sezer**, Hakkı Demirelma, Antimicrobial Effect of *Sideritis öztürkii* Aytaç & Aksoy, XIII. Uluslararası Katılımlı Ekoloji ve Çevre Kongresi. Edirne, Türkiye. 12-15 Eylül 2017(PS).
14. Kuddisi ERTUĞRUL, **Ela Nur Şimşek Sezer**, Meryem BOZKURT, Tuna UYSAL, Hüseyin DURAL, Hakkı DEMİRELMA, Osman TUGAY. Türkiye Berllis altcinsine ait bazı Ornithogalum türlerinin tohum yüzey morfolojilerinin incelenmesi / Investigation of the seed surface morphologies of some Ornithogalum species belonging to subgenus Berllis in Turkey. XIII. Uluslararası Katılımlı Ekoloji ve Çevre Kongresi. Edirne, Türkiye. 12-15 Eylül 2017(PS).
15. Tuna UYSAL, Osman TUGAY, Meryem BOZKURT, Kuddisi ERTUĞRUL, Hüseyin DURAL, Hakkı DEMİRELMA, Deniz ULUKUŞ, **Ela Nur Şimşek Sezer** Türkiye Cousinia boissieri Buhse türünün Karyomorfolojik analizi / Karyomorphological analysis of Cousinia boissieri Buhse in Turkey. XIII. Uluslararası Katılımlı Ekoloji ve Çevre Kongresi. Edirne, Türkiye. 12-15 Eylül 2017(PS).
16. Tuna Uysal, **Ela Nur Şimşek Sezer**, Meryem Bozkurt, Hüseyin Dural, Kuddisi Ertuğrul, Osman Tugay, Hakkı Demirelma, Türkiye Ornithogalum (Hyacinthaceae) Türlerinin Filogenetik Analizi. 23. Ulusal Biyoloji Kongresi, 5-9 Eylül 2016, Gaziantep Üniversitesi, Gaziantep, Türkiye (PS).

17. **Şimşek Sezer Ela Nur**, Uysal Tuna. *Viscum album* sbsp. *album* 'dan Elde Edilen Ekstraktın Kolon Ve Prostat Hücre Hatları Üzerine Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması. 23. Ulusal Biyoloji Kongresi, 5-9 Eylül **2016**, Gaziantep Üniversitesi, Gaziantep, Türkiye **(PS)**.
18. T. Uysal, M. Bozkurt, **E. N. Şimşek Sezer**, H. Dural, K. Ertuğrul, O. Tugay & H. Demirelma, Phylogenetic analysis of the Turkish *Ornithogalum* species (Liliaceae). XV OPTIMA Meeting, Montpellier (France), 6-11 June **2016 (PS)**.
19. Meryem Bozkurt, Tuna Uysal, Kuddisi Ertuğrul, **Ela Nur Şimşek Sezer**. Genetic Diversity of the Endemic *Psephellus gracillimus* (Wagenitz) Wagenitz with respect to *matK* gene region. Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2015). 01-05 June **2015**, Baku, Azerbaijan **(PS)**.