



**DENEYSEL BEYİN TÜMÖRÜ MODELİNDE
Inula helenium EKSTRELERİNİN ANTİKANSER
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

Kübra KOÇ

Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Bilim Dalı

Prof. Dr. Fatime GEYİKOĞLU

2017

Her Hakkı Saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTOR TEZİ

DENEYSEL BEYİN TÜMÖRÜ MODELİNDE *Inula helenium*
EKSTRELERİNİN ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN
İNCELENMESİ

Kübra KOÇ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Zooloji Bilim Dalı

ERZURUM
2017

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

Deneysel Beyin Tümörü Modelinde *Inula helenium* Ekstrelerinin Antikanser Aktivitelerinin
İncelenmesi

Prof. Dr. Fatime Geyikoğlu danışmanlığında, Kübra KOÇ tarafından hazırlanan bu çalışma, 13/09/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Zooloji Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Fatime GEYİKOĞLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Ali ASLAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Hakan AŞKIN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Suat Çolak

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **21.09./2017** tarih ve **37.../...82...** nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

DENEYSEL BEYİN TÜMÖRÜ MODELİNDE *Inula helenium* EKSTRELERİNİN ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Kübra KOÇ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Zooloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Fatime GEYİKOĞLU

Inula helenium geleneksel tıpta bitki çayı formunda çeşitli hastalıkların tedavisi için yaygın şekilde kullanılan bir bitki türüdür. Bu bitkinin kök ekstrelerinin ve ekstrelerinden elde edilen spesifik bileşiklerin çeşitli kanser hücrelerinde antioksidan ve antiproliferatif özellikleri daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olmasına rağmen, söz konusu bitkinin toprak üstü kısımlarının anti kanser etkinlikleri insan beyin kanserinde çalışılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada, *I. helenium*'un toprak üstü kısımlarından hazırlanan sulu ekstrelerinin insan glioblastoma hücre hattına (U-87 MG) karşı antioksidan ve anti-proliferatif etkisi *in vitro* deney şartlarında değerlendirildi. Bu amaçla, sulu ekstreler, 0-500 mg/L olmak üzere değişen konsantrasyonlarda sağlıklı ve kanserli hücre hatlarına uygulandı. Hücre canlılığı ve hücre membran hasarı 48 saatliğine 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ve laktat dehidrogenaz (LDH) testleri kullanılarak belirlendi. Ayrıca oksidatif stresi belirlemek için TOD (total oksidatif durum) ve TAK (total antioksidan kapasite) seviyeleri ölçüldü. Bunun yanı sıra kültürlerden alınan örnekler üzerinde DNA hasarının tespiti için apürinik/apirimidinik endonükleaz 1 (APEX1) testi ve immünohistokimyasal 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) boyaması yapıldı. Beyin tümörü hücrelerinde *I. helenium*'un sulu ekstrelerinin verilen doza bağlı olarak antiproliferatif ve genotoksik etkiler gösterdiği ilk defa bu araştırmayla belirlendi. Diğer taraftan sağlıklı hücreler üzerindeki etkilerine bakıldığında TAK seviyesini artırdığı ve bu bitkinin güvenilir olduğu ancak artan dozlarda dikkatle kullanılması gerektiği tespit edildi. Mevcut araştırmanın sonuçları, beyin kanseri tedavisinde kullanılan ve yan etkileri fazla olan kemoterapötik ilaçlara alternatif olarak *I. helenium* toprak üstü kısımlarının kullanılabileceği konusunda temel teşkil etmektedir.

2017, 84 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Inula helenium*, U-87 MG hücre hattı, sulu ekstre, APEX1, LDH, MTT, oksidatif stres, 8-OHdG.

ABSTRACT

Phd. Thesis

DETERMINATION OF ANTICANCER ACTIVITIES OF *Inula helenium* EXTRACTS IN EXPERIMENTAL BRAIN TUMOR CELL LINE MODEL

Kübra KOÇ

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Department of Zoology

Supervisor: Prof. Dr. Fatime GEYİKOĞLU

Inula helenium is the plant species widely used for treatment of various diseases in the form of herbal tea in folk medicine. Although the antioxidant and antiproliferative properties of root extracts and the specific compound from extracts of this plant has been demonstrated in previous studies, anticancer activities of the aerial parts of the plant has not been yet investigated on human brain cancer. Therefore, in this study, antioxidant and antiproliferative effects of aqueous extract prepared from the aerial parts of *I. helenium* against human glioblastoma cell line (U-87 MG) were evaluated at *in vitro* experiment conditions. For this purpose, the aqueous extracts were applied to healthy and cancerous cell lines at varying concentrations of 0-500 mg/L. Cell viability and cell membrane damage were determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and lactate dehydrogenase (LDH) tests for 48 hours. TOS (total oxidative status) and TAC (total antioxidant capacity) levels were also measured to determine oxidative stress. Besides, apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APEX1) test and immunohistochemical 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) staining were performed to detect DNA damage on samples from cultures. It has been determined for the first time that aqueous extracts of *I. helenium* in the brain tumor cells show antiproliferative and genotoxic effects depending on the dose given. On the other hand, when looking at the effects on healthy cells, it has been found that it increased the level of TAC and that this plant was reliable, but that it should be used with caution in increasing doses. The results of present research is the basis for the use of *I. helenium* aerial parts as an alternative to chemotherapeutic drugs used in the treatment of brain cancer and having more side effects.

2017, 84 pages

Keywords: *Inula helenium*, U-87 MG cell line, aqueous extracts, APEX1, MTT, LDH, oxidative stress, 8-OHdG.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü laboratuvarları ve Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DAYTAM) yapılmıştır.

Doktora öğrenimim boyunca engin bilimsel tecrübesini benimle paylaşan, her konuda yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, sabrına, çalışkanlığına, anlayışına ve hayata bakış açısına hayran olduğum, tüm zorluklara karşı beni cesaretlendiren ve bana güveni olan, kendisini akademik hayatım boyunca örnek olarak alacağım, danışmanım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Fatime GEYİKOĞLU'na; sonsuz saygı ve teşekkürlerimi tüm içtenliğimle sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında ve tezimin hazırlanmasında gerekli tüm tavsiye ve yönlendirmeleri yapan, bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan Sayın Dr. Ferhunde AYSİN, Dr. Nihal ÖZEK ŞİMŞEK, Arş. Gör. Salim ÇERİĞ, Yrd. Doç. Dr. ALİ TAGHİZADEHGHJALEHJUGHİ; Yrd. Doç. Dr. Serkan YILDIRIM'a ve katkılarından dolayı diğer tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca tez yazımında yardımlarını gördüğüm sevgili kardeşlerim Araştırmacı Fadime DAMGACI ve Arş. Gör. Hilal KOÇ'a, bugüne gelmemde büyük emeği olan sevgili annem, babam ve diğer kardeşlerime görmüş olduğum maddi ve manevi her türlü destekten dolayı sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Kübra KOÇ

Ağustos, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Bitkilerin Kanserde Kullanımları ve Nedenleri.....	1
1.2. <i>Inula</i> Cinsinin Özellikleri ve Biyolojik Aktiviteleri.....	2
1.3. <i>Inula helenium</i> 'un Biyolojik Aktiviteleri	4
1.4. Beyin Anatomisi.....	6
1.4.1. Beyin hücreleri	7
1.5. Kanser.....	10
1.6. Hücre Döngüsü.....	12
1.7. Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi	14
1.7.1. Kontrol noktaları	14
1.7.2. Siklinler ve siklin bağımlı kinazlar (CDK'lar).....	14
1.7.3. Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CKI)	15
1.7.4. CDK substratları.....	16
1.8. Hücre Döngüsü Deregülasyonu ve Kanserle İlişkisi.....	16
1.9. Apoptoz	18
1.10. Apoptoz ve Kanserle İlişkisi	21
1.11. Oksidatif Stres	21
1.12. Oksidatif Stres ve Kanserle İlişkisi	22
1.13. Kanser Tedavisi	23
1.14. Beyin Tümörleri	24
1.14.1. Primer beyin tümörleri (Gliomlar)	24
1.14.2. Glioblastoma multiform (GBM)	25
1.14.3. GBM'lerin günümüzdeki standart tedavisi	27

2. KURAMSAL TEMELLER	32
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER	39
3.1. Hücre Kültürleri	39
3.2. Bitki Ekstresi	39
3.4. Kullanılan Laboratuar Gereçleri ve Cihazlar	39
3.5. Sitotoksikite Testleri	40
3.5.1. MTT testi.....	40
3.5.2. LDH testi	42
3.6. Biyokimyasal Analizler	44
3.6.1. Toplam antioksidan kapasite (TAK)	44
3.6.2. Toplam oksidan durum (TOD).....	45
3.7. Oksidatif DNA Hasar Analizi	46
3.7.1. APEX1 seviyesi.....	46
3.7.1. 8- OHdG immünohistokimya boyaması.....	47
3.8. İstatistiksel Yöntem	48
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	49
4.1. <i>I. helenium</i> 'un Hücre Canlılık Oranına Etkisi.....	49
4.2. <i>I. helenium</i> 'un Hücrelerde LDH Seviyesine Etkisi	51
4.3. <i>I. helenium</i> 'un Oluşturduğu TOD Seviyesi	53
4.4. <i>I. helenium</i> 'un Oluşturduğu TAK Seviyesi	55
4.5. <i>I. helenium</i> 'un Hücrelerde Oluşturduğu APEX1 Seviyesi	57
4.6. <i>I. helenium</i> 'un Hücrelerde Oluşturduğu 8-OHdG İmmünoreaktivitesi.....	59
5. TARTIŞMA	63
KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ	85

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µmol	Mikromol
µM	Mikromolar
mmol	Milimol
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
pg	Pikogram
pH	Potansiyel hidrojen
rpm	Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)

Kısaltmalar

DNA	Deoksiribonükleik asit
Kit	Kitotriosidaz
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
8-OH-dG	8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin
DMSO	Dimetil sülfoksit
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
FBS	Fetal bovine serum
FA	Fisodik asit
PBS	Fosfat tamponlu salin

U-87 MG	Uppsala-87 Malign Glioma
LDH	Laktat dehidrogenaz
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
EC ₅₀	Medyan etkili konsantrasyon
IC ₅₀	Medyan inhibitör konsantrasyonu
MSS	Merkezi sinir sistemi
NBM	Nörobazal medyum
PSSK	Primer sıçan serebral korteksi
CAK	CDK aktive edici kinaz
ROT	Reaktif oksijen türleri
RNA	Ribonükleik asit
S	Sentez
CDK	Siklin bağımlı kinaz
TMS	Tetrametilsilan
TAK	Toplam antioksidan kapasite
TOD	Toplam oksidan durum
UV	Ultraviyole
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Anteraksantin, 5-6-epoksi lutein ve β -karotenin kimyasal formülü	5
Şekil 1.2. Beynin anatomisi	7
Şekil 1.3. Bileşen parçalarını gösteren nöron diagramı	8
Şekil 1.4. Nöron Tipleri	9
Şekil 1.5. Kanserin belirteçleri.....	12
Şekil 1.6. Hücre döngüsü kontrol noktaları ve düzenleyici CDK/Siklin kompleksleri ..	13
Şekil 1.7. Cdc25 fosfatlarının hücre döngüsü düzenlemesi	17
Şekil 1.8. Apoptozun ekstresek ve intrinsek yolları	20
Şekil 1.9. Glioblastoma Multiform görüntüleri	26
Şekil 1.10. Karmustin waferin glioblastoma rezeksiyon boşluğuna yerleştirilmesi	29
Şekil 4.1. <i>I. helenium</i> ekstrelerinin konsantrasyonlara göre insan PSSK hücreleri üzerinde gözlenen hücre canlılık yüzdeleri	49
Şekil 4.2. <i>I. helenium</i> ekstrelerinin konsantrasyonlara göre insan U-87 MG hücreleri üzerinde gözlenen hücre canlılık yüzdeleri	50
Şekil 4.3. <i>I. helenium</i> ekstrelerinin konsantrasyonlara göre insan PSSK hücreleri üzerinde oluşturduğu LDH seviyeleri.....	51
Şekil 4.4. <i>I. helenium</i> ekstrelerinin konsantrasyonlara göre insan U-87 MG hücreleri üzerinde oluşturduğu LDH seviyeleri.....	52
Şekil 4.5. <i>I. helenium</i> ekstrelerinin konsantrasyonlara göre insan PSSK hücreleri üzerinde oluşturduğu TOS seviyeleri	53
Şekil 4.6. <i>I. helenium</i> ekstrelerinin konsantrasyonlara göre insan U-87 MG hücreleri üzerinde oluşturduğu TOS seviyeleri	54
Şekil 4.7. <i>I. helenium</i> ekstrelerinin konsantrasyonlara göre insan PSSK hücreleri üzerinde oluşturduğu TAK seviyeleri.....	55
Şekil 4.8. <i>I. helenium</i> ekstrelerinin konsantrasyonlara göre insan U-87 MG hücreleri üzerinde oluşturduğu TAK seviyeleri.....	56
Şekil 4.9. <i>I. helenium</i> ekstrelerinin konsantrasyonlara göre insan PSSK hücreleri üzerinde oluşturduğu APEX1 seviyeleri	57

Şekil 4.10. <i>I. helenium</i> ekstrelerinin konsantrasyonlara göre insan U-87 MG hücreleri üzerinde oluşturduğu APEX1 seviyeleri.....	58
Şekil 4.10. İnsan PSSK hücrelerinin normal görünümü.....	59
Şekil 4.11. <i>I. helenium</i> ekstrelerinin insan U-87 MG hücrelerinde 8-OHdG immunoreaktivitesi.....	61
Şekil 4.12. <i>I. helenium</i> ekstrelerinin insan U-87 MG hücrelerinde 8-OHdG immunoreaktivitesi.....	62



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Hücre döngüsü fazlarına özgü Siklin ve CDK'lar	15
Çizelge 3.1. Araştırmalar esnasında kullanılan aletler ve cihazlar	40
Çizelge 4.1. Hücre hatlarında 8-OHdG pozitif boyalı hücreler	60



1. GİRİŞ

1.1. Bitkilerin Kanserde Kullanımları ve Nedenleri

Bitkiler tüm dünyada yüzyıllardan beri çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporuna göre, dünya üzerinde tıbbi amaçlarla kullanılan yaklaşık 70.000 bitkinin 21.000 kadarı ilaç sanayinde kullanılmaktadır. Doğal kaynaklardan elde edilen bileşikler, ya doğrudan kullanılmakta ya da sentetik ilaç tasarlanmasında model molekül olarak yararlanılmaktadır. Bitkilerin sentetiklere göre yan etkilerinin olmaması ya da daha az olması; bitki esaslı ilaçların birden fazla etkiye sahip olması; sentetik ilaçların pahalı olması ve bazılarının tehlikeli yan etkiler göstermesi nedenlerinden dolayı sentetiklerden ziyade bitkilere olan ilgi artmıştır (Kaya 2010).

Günümüzde mevcut birçok ilacın hammaddesini bitki sekonder metabolitleri oluşturmaktadır. Sekonder metabolitler, bitkinin temel yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkisi olmayıp, primer metabolitler (protein, yağ, karbonhidrat, nükleik asit) kadar önemli olan ve bitkiler tarafından üretilen kimyasal maddelerdir. Bu maddelerin bitkilerde; herbivorlara ve mikroorganizmalara karşı savunma, çevresel faktörlerin oluşturduğu stres ortamına karşı koyma, ortama uyum sağlama, hayatta kalma, neslin devamını sağlama, bazı metabolik ve ekolojik işlevleri yerine getirme gibi özellikleri vardır (Babaoğlu 2001; Bouwmeester 2003; Siddiqui 2009). Sekonder metabolitler, alkaloidler, flavonoidler, uçucu yağlar, tanenler, glikozitler, fenoller, renk maddeleri ve reçineler gibi çok sayıda bileşiği içeren zengin bir gruptur. Bu grup içerisinde yer alan fenolik bileşikler fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılır. Fenolik asit ve flavonoidler bitkilerde hücre duvarının destek malzemesini oluşturur ve renkli olmaları nedeniyle tohum dağılımı ile tozlaşmada kuşlar ve böcekler için cazip edicilerdir. Bu bileşikler yaralanma, enfeksiyon, aşırı ışık veya UV ışınları gibi çevresel stres koşullarında bitki savunma mekanizmalarında rol oynar (Bennet 1994; Dixon 1995). Bunların dışında fenolik bileşiklerin antioksidan, antialerjik, anti-inflamatuar,

antikanserojen, antiviral ve antimikrobiyal etkiler göstererek insan sağlığı üzerinde olumlu etkilerinin olduğu bilinmektedir (Harborne 1994; Baydar 2004; Khalil 2007).

Kanser tedavisinde temel olarak cerrahi tedavi, kemoterapi, radyoterapi ve hormon tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Bu tedavilerin bazı yan etkilerinin olması ve tedavilerin uzun sürmesi nedeniyle hastalar başka arayışlar içerisine girebilmekte ve alternatif tedavileri uygulamaktadır (Reed *et al.* 2000; Yavuz 2001). Kanser tedavisinde kullanılan taxan grubu paclitaxel, docetaxel ve kamptotesin türevi irinotekan ve topotekan olmak üzere dünyada satılmakta olan antikanser ilaçların yaklaşık üçte biri doğal kaynaklı bileşiklerden oluşmaktadır. Örneğin *Phodophillum peltatum* bitkisinden izole edilen ve en önemli yarı sentetik ilaç hammaddelerinden olan podofillotoksin, tubulinlere bağlanarak güçlü antikanser etki yapmaktadır, ancak suda düşük çözünürlüğü ve yüksek toksisitesi nedeniyle yarı sentezlenmektedir. Podofillotoksinden kanser tedavisinde önemli olan etopozit ve tenipozit bileşikleri elde edilmektedir; etopozit, küçük hücreli akciğer kanseri, lenfomalar ve testikular kanserlerde, tenipozit ise beyin tümörlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hem yarısentetik türevi hem de kendisi kanser tedavisinde yaygın kullanılan *Taxus baccata* (porsuk ağacı)'dan elde edilen paclitaxel, yumurtalık ve meme kanserlerinde kullanılan önemli bir antikanser ajandır. Yarı sentetik türevi docetaxel'de suda çözünürlük arttırılmış, meme kanserleri ve küçük hücreli akciğer kanserlerinde kullanıma sunulmuştur (Kaya 2010). Bunların dışında kanser hücrelerinin enerji kaynağının devre dışı bırakılması amacıyla mitokondrinin ilaçlarla etkinliğini bozma çalışmaları yapılmaktadır. Laboratuvar çalışmalarında bazı bitkisel ürünlerin mitokondri hasarına neden olarak kanser hücrelerini öldürdüğü gösterilmiş ancak henüz yeterli etkinliğe sahip ilaç geliştirilmemiştir (Sezgin 2010).

1.2. *Inula* Cinsinin Özellikleri ve Biyolojik Aktiviteleri

Inula cinsi, Papatyagiller (Asteraceae) familyasına ait, yaklaşık 120 türü bulunan, Asya, Avrupa ve Afrika'da yayılış gösteren çok yıllık çiçekli bir bitkidir (Lack 2007). *Inula* cinsine ait birçok tür, folklorik bitkisel ilaçlarda kullanılmaktadır ve çeşitli biyolojik

etkinliklere sahip olduğu için bilim adamları bu bitkiyi çalışmaya yönelmiştir. Bunların arasında *Inula helenium* halk tıbbında en popüler olan türdür (Newall *et al.* 1996).

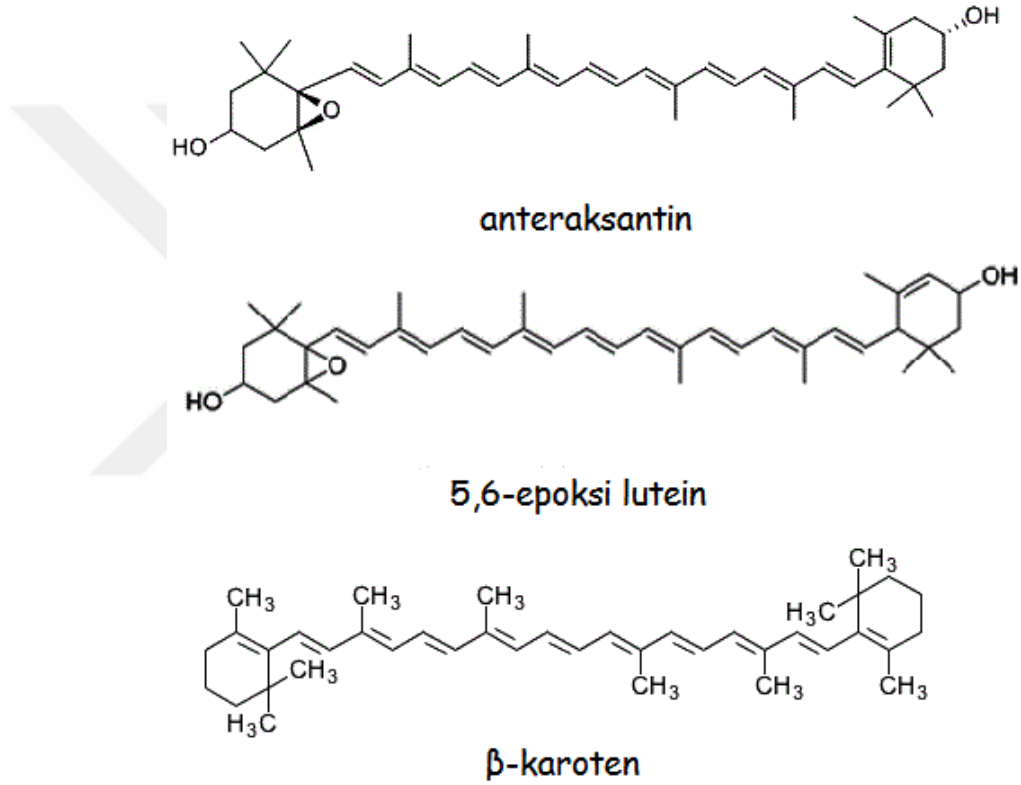
Inula'nın bilinen kimyasal bileşenleri monoterpenler, seskiterpenler, diterpenler, flavonoidler ve glikolipidler olup, bunların arasında da en baskın olanı timol türevlerinden siklik monoterpenlerdir (Park *et al.* 2000; Bai *et al.* 2003; Zhaoa *et al.* 2006). *Inula* cinsinin içerdiği bu sekonder metabolitlerin insan hastalıkları üzerinde birçok olumlu etkisinin olduğu yapılan araştırmalarda ortaya çıkmıştır. Örneğin *I. viscose*'dan izole edilen glikolipid bileşikler fare-kronik-dermatit modelinde multipli-dozda büyük bir etki göstermiştir (Manez *et al.* 1999). *I. britannica* çiçeklerinden izole edilen bazı flavonoid türevleri'nin HL-60 hücre kültürlerinde önemli ölçüde antioksidan özellik gösterdiği (Park *et al.* 2000) ve bu flavonoidlerin oksidatif strese neden olan glutamata karşı primer nöron kültürlerini etkin bir şekilde koruduğu bulunmuştur (Kim *et al.* 2002). *I. racemosa* köklerinin etanolik ekstresi kanserli bağırsak, ovaryum, prostat, akciğer ve lökosit hücre hatlarına uygulanmış ve sitotoksik olduğu rapor edilmiştir (Pal *et al.* 2010). Bu bitkinin içerdiği n-heksan fraksiyonunun dâhili ve harici yollarla apoptozise neden olabileceği ileri sürülmüştür. *I. britannica*, *I. salsoloides*, *I. hupehensis*, *I. oculus christi* ve *I. helianthus-aquatica*'dan izole edilen seskiterpen laktonların sitotoksik etkisinin olduğu kanıtlanmıştır (Zhou *et al.* 1994; Bai *et al.* 2003; Mosaddegha 2006). *Inula helianthus-aquatica* yaprak ve çiçeklerinden izole edilen bigelovinin antianjiyogenik ve bağışıklık düzenleyici etkisinin olduğu gösterilmiştir (Yue 2013). Ayrıca *I. britannica*, *I. salicina*, *I. bifrons*, *I. conyza* ve *I. spiraeifolia* gibi bazı *Inula* türlerinin içerdiği timol türevlerinin anti bakteriyel açıdan önemli kök bileşikler olduğu rapor edilmiştir (Bohlmann *et al.* 1978). *Inula hupehensis* kökü, bronşit, diyabet ve bağırsak ülseri gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır (Bokadia *et al.* 1986). Cantrell *et al.* (1999), bir radio-respirometrik testte *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı 11 doğal ve yarısentetik ödesmanolitlerin aktivitesini test ederek bunlardan bazılarının bakteri inhibisyonunu sağladığını ortaya çıkarmışlardır. Ayrıca bu timol türevlerinin anti-fungal etkileri de vardır, örneğin *I. hupehensis*'in köklerinden izole edilen bazı timol türevlerinin fitopatojenik funguslara karşı toksisite gösterdiği bulunmuş ve bunların arasından bir bileşiğin fungusit olarak

kullanılabileceği ilk kez ileri sürülmüştür (Zhao *et al.* 2010). *I. viscose*'nin de yapraklarından hazırlanan ekstresinin etkili bir antimikotik olduğu belirtilmiştir (Maoz *et al.* 2000; Jawdah *et al.* 2002). *Inula* türleriyle yapılan çalışmalar sonucunda hepatoprotektif etkiler görülmüştür; *I. britannica*'nın LPS/PA'nın neden olduğu karaciğer hasarlı farelerin hayatta kalma oranını artırdığı rapor edilmiştir. *I. britannica*'nın uygulaması karaciğer hasarı olan farelerin dalaklarında sitokin miktarındaki dalgalanmayı önemli ölçüde azalttığı ve Th1/Th2 kontrol etkisinin hepatik hasara karşı *I. britannica*'nın engelleyici etkisiyle ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Yapılan *In vitro* testler, *I. britannica*'nın Th1 farklılaşmasını önlediğini ve makrofaj IL-12 üretimini engelleyip ve IL-10 üretimini artırarak Th2 farklılaşmasını da uyardığını göstermiştir (Song *et al.* 2000). *I. britannica* çiçeklerindeki polisakkaritlerin de diyabetik farelerde hipoglisemik etkiye sahip olduğunu bildirilmiştir (Hong *et al.* 2012). *I. heterolepis*'in kökünden hazırlanan sulu bir ekstresi farelerde deneysel olarak oluşturulan alkolik hepatik hasarın tedavisinde test edilmiştir. Karaciğer, testis, böbrek, mide, bağırsak, kalp, akciğer ve idrar kesesi histopatolojik olarak çalışılmış ve bu kök ekstresinin farelerde karaciğer, böbrek ve testis hasarında çok hafif bir terapötik etkisinin olduğu, özelliklerde karaciğerin bitki ekstresiyle tedavisinden sonra anlamlı derecede etkilendiği ortaya çıkmıştır (Saygi *et al.* 2003).

1.3. *Inula helenium*'un Biyolojik Aktiviteleri

I. helenium bronşit, soğuk algınlığı, akciğer kanseri, tüberküloz, ülser, hazımsızlık, diyabet, enfeksiyon ve pediatrik hastalıklar gibi bir çok hastalığın tedavisinde halk tıbbında çay formunda kullanılmaktadır (Grimaud 2009; Huo *et al.* 2010; Ghedira *et al.* 2011; Ram *et al.* 2011). *I. helenium* kökleri baskın olarak seskiterpen lakton ödesmanolitleri içermektedir ve bunlar anti-tumor, anti-inflamator, anti-mikrobiyal, anti-proliferatif, anti-bakteriyel, anti-stresör ve sitotoksik gibi oldukça güçlü biyoaktif özelliklere sahiptir (Konishi *et al.* 2002; Nesterova *et al.* 2002; Guo and Yang 2005; Deriu *et al.* 2008; Trendafilova *et al.* 2010). Bu özelliklerinden dolayı *I. helenium* ticari bitkisel preparatlarda da kullanılmaktadır (Nikolaev *et al.* 2011). Bu farmakolojik nitelikleri içeriğinde bulunan önemli seskiterpen laktonlarına atfedilmektedir (Dirsch *et*

al. 2011; Stojakowska *et al.* 2006; Réthy *et al.* 2007; Ghantous *et al.* 2010; Jiang *et al.* 2011). Aslında seskiterpenoidler doğal terpenoidlerin en geniş grubudur ve geleneksel olarak kullanılan çeşitli tıbbi bitkilere biyolojik ve farmakolojik özelliğini kazandıran aktif bileşik olarak tanımlanmaktadır (Vasas and Hohmann 2011). Daha önceki çalışmalarda *I. helenium* köklerinden izole edilen bileşiklerin birçok kanser hattına karşı sitotoksik ve antiproliferatif etki gösterdiği iddia edilmiştir.



Şekil 1.1. Anteraksantin, 5-6-epoksi lutein ve β-karotenin kimyasal formülü

I. helenium önemli bir karotenoid kaynağıdır, karotenoid içeriği yaprakta 4.87 mg / 100 g'dan taç yapraklarda 47,7 mg /100 g arasında değişmektedir. *I. helenium*, özellikle α-karoten türevlerinin biyosentezine spesifik olan bitki sınıfına aittir. Dilsî çiçeklerde baskın bileşik, total karotenoidin %73,8' ni oluşturan 5,6-epoksi luteindir. Tüpsü çiçeklerde ise %36,9 oranında anteraksantin ve %28,4 oranında lutein bulunmaktadır. Buna karşın yapraklarda total karotenoidin %72'den daha fazlasını β-karoten ve lutein birlikte temsil etmektedir. Diğer taraftan bitkinin bütün toprak üstü kısımları düşük

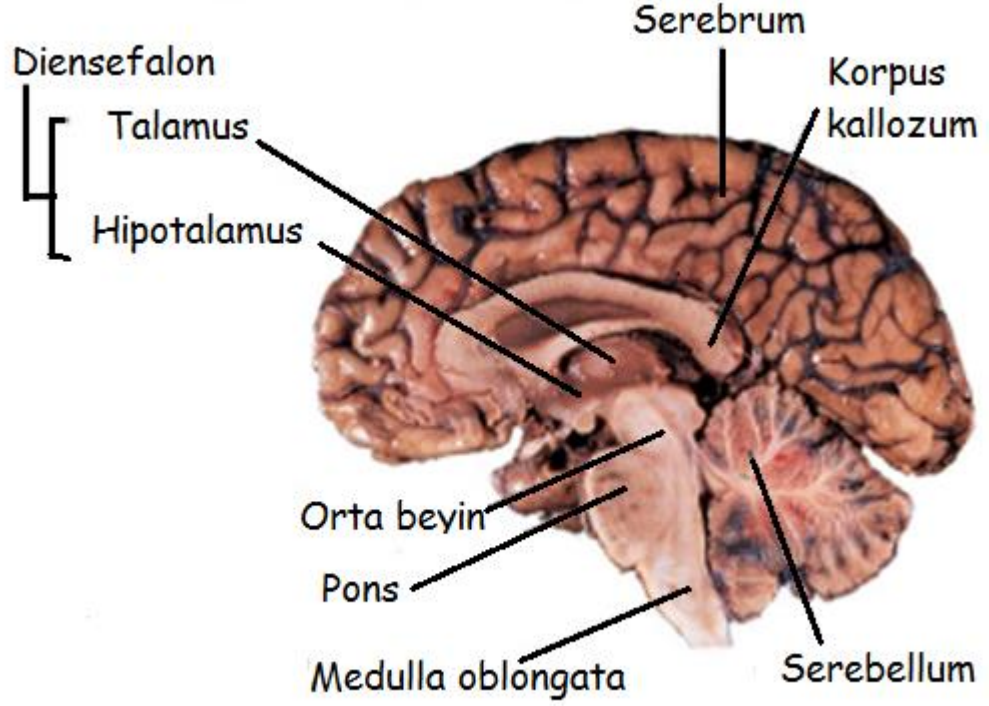
miktarda neoksantin ve violaksantin içermektedir (Nan *et al.* 2012). Şekil 1.1’de anteraksantin ve 5,6-epoksi luteinin kimyasal formülleri gösterilmiştir. Karotenoidlerin antioksidan (Liu 2004) ve antikanser (Cha *et al.* 2008) özelliklere sahip olduğu yapılan birçok araştırmalarda gösterilmiştir (Paiva and Russell 1999).

1.4. Beyin Anatomisi

Organizma tarafından, dış ortamdan gelen uyarıların duyu organları yardımı ile tanınması, değerlendirilmesi ve ilgili organa iletilmesini sağlayan sisteme sinir sistemi denilmektedir. Omurgalıların sinir sistemi; Merkezi Sinir Sistemi, Periferik Sinir Sistemi ve Otonomik Sinir Sistemi olmak üzere üç bölümde incelenmektedir. Merkezi Sinir Sistemi’ni beyin ve omurilik oluşturmaktadır. Beyin ve omuriliği birbirinden mutlak surette ayırmak mümkün değildir. Beyin, kafatası içerisinde, ince, örümceksi ve sert olmak üzere üç katlı zarla örtülmüş, kıvrımlı bir yapıya sahip olan, içinde milyarlarca nöron (sinir hücresi) bulunduran ve tüm vücudu kontrol eden bir organdır. Bu organ serebrum, serebellum ve beyin sapının birleşiminden oluşmaktadır (Anonymous 2016).

Beynin en geniş kısmı olan serebrum, sol ve sağ hemisferlerin birleşimidir. Serebrumun yüzeyi korteks diye adlandırılan katlı bir görüntüye sahiptir. 100 milyar sinir hücresinin yaklaşık %70’i kortekste bulunur. Serebrum; ön (frontal), yan (parietal), arka (occipital), alt (temporal) ve limbik (limbic) lob olmak üzere beş lobdan oluşmaktadır. Ön lob; karmaşık düşünce, çağrışımlar, sosyal görüş gibi motor kontrolleri kapsamaktadır. Yan lob algıların bulunduğu alanken, arka lob tüm görsel girdilerin işlendiği alandır. Alt lob hem işitme hem de tat alma duyu bölgesiyken, limbik lob ise duygu, öğrenme ve hafıza merkezidir (Felten 2015).

Serebrumun altında bulunan serebellum, kasların hareketlerini, duruş ve dengesini koordine eder. Beynin bir diğer bölümü olan beyin sapı; orta beyin, pons ve medulladan oluşur. Beyin sapı serebrum ve serebellumun omurilikle iletişimini sağlar ve birçok otomatik fonksiyonu gerçekleştirir (Anonymous 2016).



Şekil 1.2. Beynin anatomisi (Anonymous 2016)

1.4.1. Beyin hücreleri

Beyin nöron (sinir hücresi) ve glialar (Yunanca glue: yapıştırıcı kelimesinden gelmektedir) olmak üzere iki çeşit hücre yapısına sahiptir. Nöron ve dentritler gri madde, akson toplulukları ise ak madde olarak isimlendirilir.

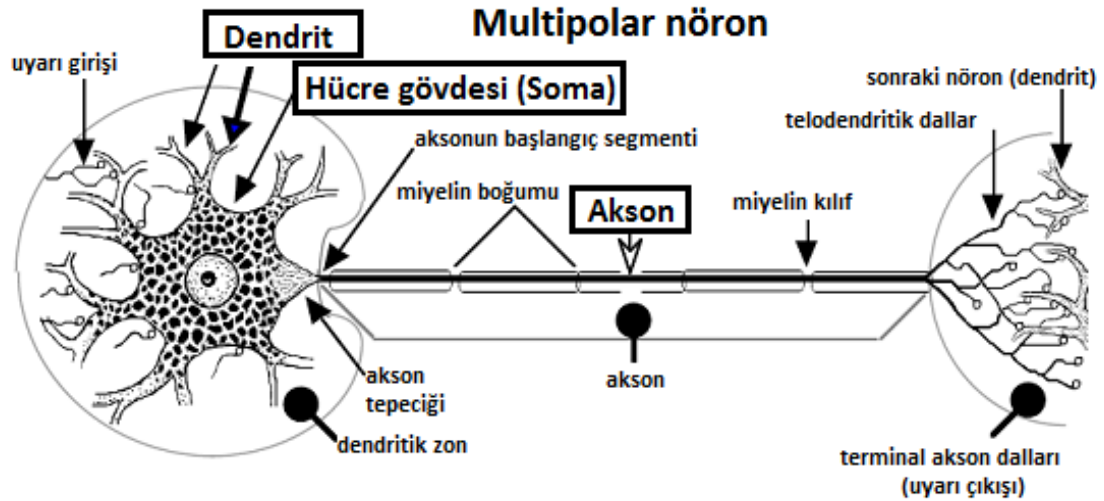
Glia hücreleri

Glia hücreleri, birçok nöron için koruma ve destek sağlar. Glia hücreleri beyindeki nöronlara beslenme, koruma ve yapısal destek sağlayan hücrelerdir. Sinir hücrelerinden yaklaşık 10 ila 50 kat daha fazla glia vardır ve beyin tümörlerinde rol oynayan en yaygın hücre türüdür (Anonymous 2016). Merkezi sinir sisteminde astrositler (astrocytes), oligodentrositler (oligodendrocytes) ve mikroglialar (microglia) olmak üzere üç tip glia hücresi mevcuttur. Beyin işlevinde aktif rol oynayan astrositler, nöronları aktive ederler. Bunlar nörotransmitterleri geri dönüştürmek, nöronların gelişim ve

korunmasını gösteren nörotropik faktörleri gizlemek, nöronal yüzeylerde biçimlenmiş sinapsların sayısını belirlemek ve yetişkin beyinlerdeki sinapsları modüle etmek, nöronları çevreleyen hücre dışı sıvısının uygun iyonik bileşimini sürdürmek gibi kritik görevlere sahiptirler. İkinci tip glia hücreleri olan oligodentrositler merkezi sinir sistemindeki schwann hücrelerinin benzeridir ve beyin ve omurilik aksonlarının etrafındaki miyelin kılıflarını biçimlendirmekten sorumludur. Üçüncü ve son glia hücreleri olan mikroglialar, glia hücrelerinin en küçüğüdürler. Bunlar, Merkezi Sinir Sistemi'nin esas bağışıklık dengeleyici hücrelerini temsil ederler. Mikroorganizmaların istilası ve merkezi sinir sisteminin hasarı sonrası, iltihap meydana getirerek tepki verirler (Felten 2015).

Nöronlar

Nöronlar, sinir sisteminin yapısal ve fonksiyonel birimidir. Nöronların morfolojik olarak dentrit, hücre gövdesi ve akson bileşenlerinden oluşmaktadır.

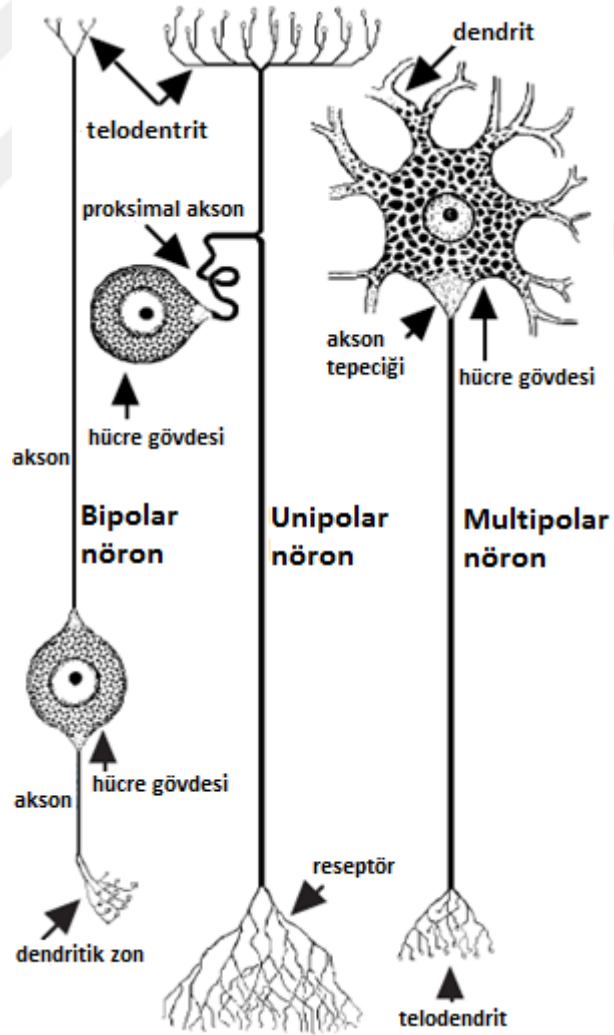


Şekil 1.3. Bileşen parçalarını gösteren nöron diagramı

Hücre gövdesi nükleus içeren nöronun genişletilmiş kısmıdır. Dentritler, hücre gövdesinin birçok uzantısından biridir. Reseptörler ya da diğer nöronlardan girdi almak

için özelleşmiştir. Aksonlar ise, tipik olarak nöronların yüzde biridir. İletken elektrik impulsları için özelleşmiş olan hücre gövdesinin bir eklentisidir (Felten 2015).

Nöron, elektriksel ve kimyasal sinyaller yoluyla bilgi aktarır. Bir nöron, enerjisini çevresindeki nöronlara iletir. Nöronlar enerjilerini ya da iletmek istediklerini bir sinaps denilen küçük bir boşluk boyunca birbirlerine iletirler. Bir nöronun, diğer sinir hücrelerinden gelen mesajları algılayan antenler gibi davranan dendritler adı verilen birçok kolu vardır. Bu mesajlar, mesajın birlikte geçip geçmeyeceğini belirleyen hücre gövdesine iletilir. Sinir iletimine nükleotransmitter içeren keselerin açılacağı akson ucuna önemli mesajlar iletilir. Sinir ileten moleküller sinapsı geçerek alıcı sinir hücresindeki özel reseptörlere uyarlar ve bu da hücrenin mesajı iletmesini sağlar (Felten 2015).



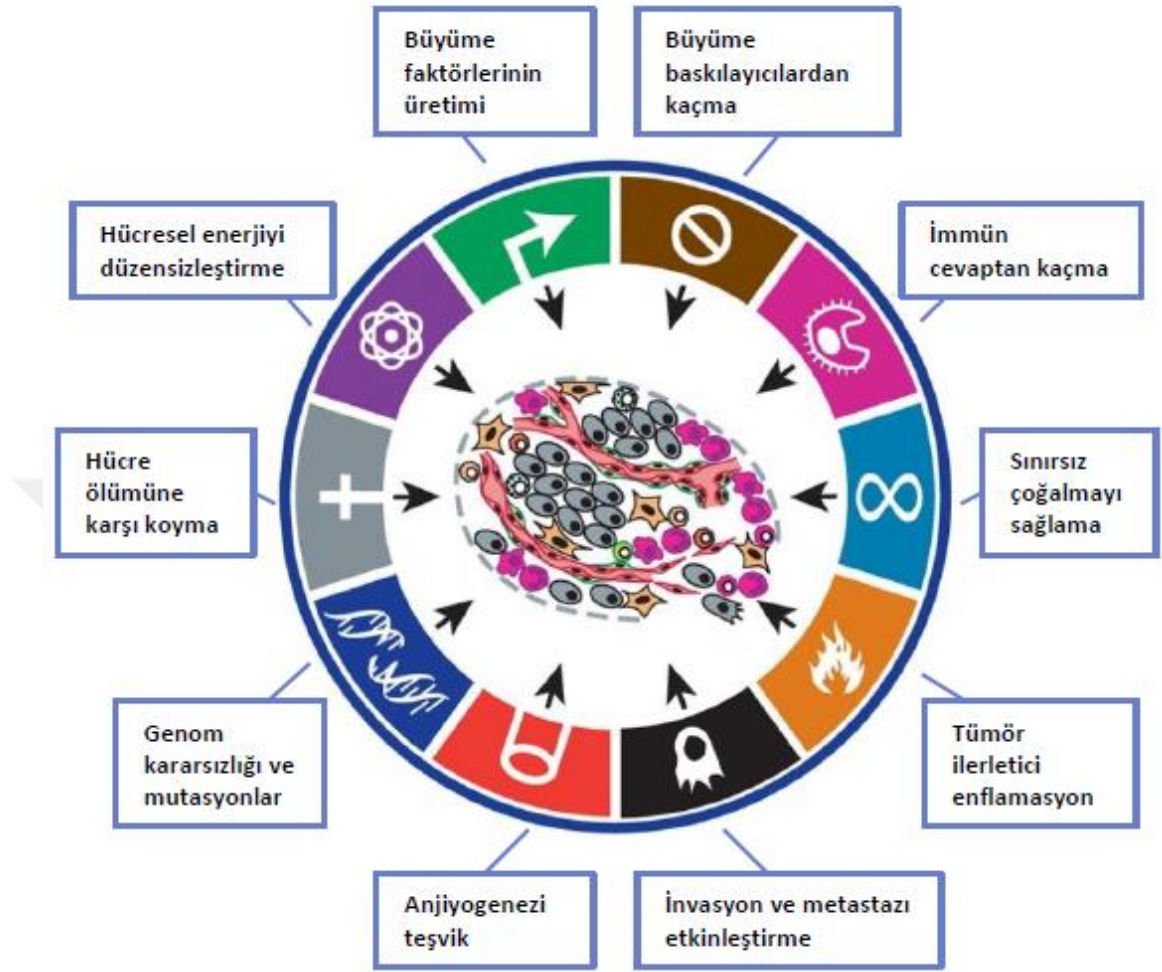
Şekil 1.4. Nöron Tipleri

1.5. Kanser

Kanser, hücresel büyümeyi kontrol eden genlerdeki anormalliklerin sebep olduğu kontrolsüz hücre çoğalması sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Genetik materyaldeki anormallikler, ortamda bulunan kanserojenler ve viral enfeksiyonlar gibi birçok faktör kansere neden olmaktadır. Normalde somatik hücrelerin hayatta kalması, çoğalması, farklılaşması ve ölümü, hücre içi programlar ve bu programları kontrol eden hücre dışı sinyal biyomolekülleri tarafından düzenlenmektedir. Ancak normal bir hücre kanserleşince bu sistem sinyallerinin bozulmasıyla somatik hücrelerden onu ayıran bazı özellikler kazanmaktadır (Hanahan and Weinberg 2011) (Şekil 1.5). Bu özellikler şunlardır;

1. Büyüme faktörlerinin üretimi: Genellikle normal hücreler, kültürde hayatta kalma ve çoğalma için mitojenik büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarken, kanser hücreleri, herhangi bir harici büyüme stimülasyonuna bağlı olmadan büyüyebilir ve kendi büyüme sinyallerini geliştirebilirler.
2. Büyüme baskılayıcılardan kaçış: Normal hücrelerin çoğalması, komşu hücrelerin yüzeyinde veya ekstraselüler matriste bulunan harici büyüme inhibitörlerine ek olarak dâhili büyüme inhibitörleri tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Ancak bir hücre kanserleştiğinde, hücre döngüsünü kontrol etmekle sorumlu olan pRB yolağını bozarak büyümeyi önleyici sinyallerden kolayca kaçabilir.
3. İmmün cevaptan kaçış: Bağışıklık sistemi kanser hücrelerini tanıyıp ortadan kaldırabilirken, bağışıklık tahribatına duyarlı olmayan tümör hücreleri kaçış evresine doğru geçerek bölünmeye ve büyümeye devam edebilirler (Teng *et al.* 2008).
4. Tümör ilerletici enflamasyon: İmmün hücreleri tümör hücreleri için hayati faktörler sağlayabilirler. Tümör ile ilişkili oluşan inflamasyon, tümör mikroçevresine anjiyogenezi teşvik eden faktörler, büyüme faktörleri ve hayatta kalma faktörlerini tedarik ederek tümör büyümesini teşvik edebilir (Grivennikov and Karin 2010).

5. Sınırsız çoğalmayı sağlama: Kanseri hücreleri, telomeraz enzimi sayesinde hücrenin çoğalmaya devam etmesini sağlayan kromozomların telomer bölgesinin kısalmasından dolayı limitsiz olarak bölünmeye devam ederler.
6. İnvazyon ve metastazı etkinleştirme: Kanseri hücreler komşu sağlıklı dokuları istila ve yok etme özelliğine sahiptir ve kan dolaşımı veya lenfatik sistem yoluyla çeşitli organlara yayılabilir. Bu süreç metastaz olarak adlandırılmaktadır. Tümörler iyi huylu (benign) ve kötü huylu (malin) olmak üzere iki tip olabilir. İyi huylu tümörler, genellikle kanser dışı olarak sınıflandırılır ve diğer organlara yayılmaz. Bununla birlikte kötü huylu tümörler, kanserlidir ve diğer organlara hızla yayılarak metastaz yapabilir.
7. Anjiyogenezi teşvik: Hücrelere besinleri taşıyan yeni kan damarlarının oluşumu anjiyogenezi olarak tanımlanmaktadır. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), anjiyogenezi ve vasküler geçirgenliğin artmasını sağlayan bir faktördür. Tümör hücrelerinde VEGF'nin aşırı ifade edildiği bulunmuştur, bu da tümörün hayatta kalmasına daha da yardımcı olan anjiyogenezi indüklemesine ve sürdürmesine olanak tanımaktadır (Lazebnik 2010).
8. Genom kararsızlığı ve mutasyonlar: Kanseri hücreleri, tümör süpresör genlerini inaktive etmektedirler. Hasarlı DNA ya sahip kanseri hücrelerinin bölünmeye devam etmesiyle mutasyonlar zamanla onkogene birikerek kanserin ilerleme riskini artırır.
9. Hücre ölümüne karşı koyma: Tümör hücreleri apoptotik sistemden yoksundur veya apoptozun üstesinden gelmesine yardımcı olan apoptotik yolları değiştirmiştir.
10. Hücresel enerjiyi düzensizleştirme: Kanseri hücreleri oksijenin varlığında bile mevcut glikozu laktata dönüştürerek ATP üretebilir ve böylece glikoz metabolitlerini hücre proliferasyonunu hızlandıran anabolik süreçlere yönlendirebilirler (Marie and Shinjo 2011).

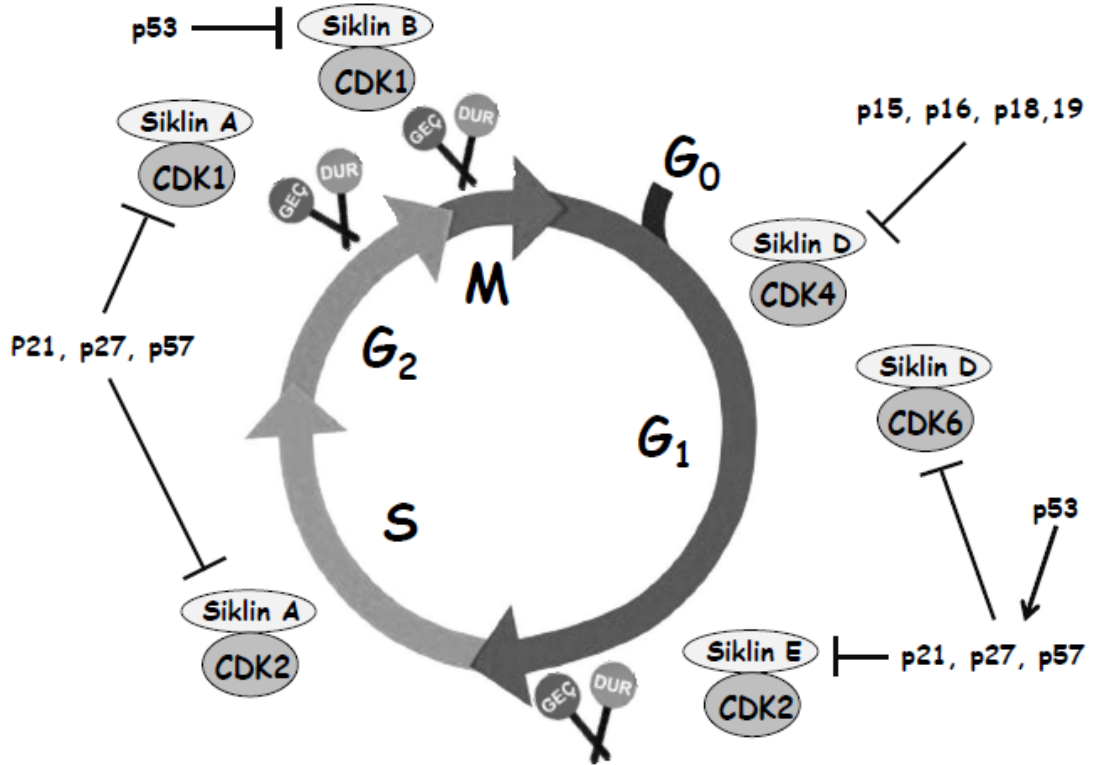


Şekil 1.5. Kanserin belirteçleri (Hanahan and Weinberg 2011)

1.6. Hücre Döngüsü

Normal hücre döngüsü, esas olarak DNA replikasyonu ve kromozomların ayrılması ile karakterize edilen iki ana süreçten oluşmaktadır. Hücre bölünmesi, hücre proliferasyonunu sınırlayan intraselüler mekanizmalar ve ekstraselüler mitojenler tarafından kontrol edilmektedir. Hücre döngüsü, Gap 1 (G1), Sentez (S), Gap 2 (G2) ve Mitoz (M) olmak üzere birbirini izleyen aşamaların gerçekleşmesiyle tamamlanır. Bu aşamalar, hücrenin bölünmeye başlamadan önce ekstraselüler sinyalleri algıladığı ve DNA sentezi için hazırlandığı G1 fazı; bölünme için gerekli olan yapı ve organellerle birlikte DNA'nın replikasyonunun gerçekleştiği S fazı; hücrenin mitoz için hazırlandığı G2 fazı ve çekirdeğin bölündüğü M fazıdır. Bunların dışında çoğu yetişkin doku

hücreleri, G1'den önce G0 diye adlandırılan ya kısa süreli ya da kalıcı olarak bir dinlenme halinde bulunmaktadır (Vermeulen *et al.* 2003) (Şekil 1.6). Birbirini takip eden bu fazlar, hücre döngüsünün ilerlemesini geciktirmek ve hücrenin, sonraki aksiyon evrelerini tamamlayabilmesi için gerekli faktörleri toplamasına imkân vermek için fonksiyoneldir. Hücre döngüsü süreçlerini düzenleyen mekanizmalar son derece karmaşıktır ve düzgün bir şekilde işlemesi gerekir. Bu bir dizi olay, genomda hataların oluşmasını önlemek için hayati önem taşımaktadır çünkü sonrasında bu hatalar ardışık kuşaklar boyunca yayılabilir. Meydana gelen hatalar (veya mutasyonlar), gen fonksiyonunu bozarak anormal gen aktivasyonuna veya bir gen ürününün kaybına neden olabilmektedir. Genetik bütünlüğün korunmasından sorumlu olan gen ürünlerinin kaybedilmesi veya anormal çoğalmayı sürdürebilen genlerin aktivasyonu, hücre döngüsünün bozulmasına neden olmaktadır (Sherr 1996).



Şekil 1.6. Hücre döngüsü kontrol noktaları ve düzenleyici CDK/Siklin kompleksleri

1.7. Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi

1.7.1. Kontrol noktaları

Hücre döngüsünün bir fazından diğerine geçişi, DNA sentezi ve kromozom ayrılmasında hataları algılayabilen bir dizi kontrol noktaları tarafından yürütülmektedir. Kontrol noktalarının görevi, çeşitli biyolojik yollardan gelen sinyal girişlerini entegre ettikten sonra hücre için "dur" veya "geç" sinyallerini sağlamaktır. Bu kontrol noktaları, hücrenin replikasyon için hazır olup olmadığının kontrol edildiği G1-S geçişi, hücrenin mitoz için uygun olup olmadığının kontrol edildiği G2-M geçişi ve kromozomların yerleşiminin kontrol edildiği Metafaz-Anafaz geçişlerinde bulunmaktadır (Şekil 1.6) (Novak *et al.* 1998). DNA hasarına cevap olarak, kontrol noktaları DNA onarımı için zaman sağlamak amacıyla hücre döngüsünü durdurmaktadır. G1/S kontrol noktasında, DNA hasarıyla indüklenen hücre döngüsünün durdurulması p53 genine bağlıdır. (Levine 1997). p53, bir sekans-spesifik DNA-bağlayıcı proteindir; herhangi bir sebeple oluşan DNA hasarında aktive olarak, ya hücre döngüsünü durdurmakta ya da hücre döngüsü kontrol noktalarında apoptotik sinyalleme yoluyla hücre ölümünü uyarmaktadır (Greenblatt *et al.* 1994).

1.7.2. Siklinler ve siklin bağımlı kinazlar (CDK'lar)

Kontrol noktalarında görevli olan başlıca anahtar düzenleyiciler, serin/treonin protein kinaz ailesine ait siklin bağımlı kinazlar (CDK)'dır. Normalde inaktif halde bulunan CDK'lar, siklinlere bağlandıktan sonra aktifleşerek heterodimerik kompleksler oluşturmaktadır. Tam ve kusursuz olarak zamanında CDK'ların düzenlenmesi, hatasız hücre bölünmesini sağlamak için kritik önem taşımaktadır. Aktifleşmiş CDK'lar hücre döngüsü fazlarına özgü proteinlerin fosforilatlanması yoluyla aşağı çekilmesine neden olmaktadır (Morgan 1995). Siklinler, hücre döngüsü boyunca her bir faza özgü olarak belirli bir ritimde sentezlenip yok edilerek hücre döngüsünün zamanlı ilerlemesini sağlamaktadırlar. Siklin D'lerin (siklin D1, siklin D2, siklin D3) CDK4'e ve CDK6'ya bağlanmasıyla ortaya çıkan CDK-siklin D kompleksleri, G1 fazına girişi yönetmektedir.

Siklin D, ayrıca siklin E geninin ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Siklin E ise, CDK2'ye bağlanarak G1'den S fazına geçişi düzenlemektedir. Siklin A'nın, CDK2'ya bağlanmasıyla oluşturduğu kompleks, S fazı süresince görev almaktadır. G2 fazında bulunan siklin A ve B, mitotik siklinlerdir ve CDK1 ile yaptıkları kompleksleri, G2-M fazı geçişinde etkili olmaktadır (Chan *et al.* 2000; Ohtsubo *et al.* 1995) (Şekil 1.6).

Çizelge 1.1. Hücre döngüsü fazlarına özgü Siklin ve CDK'lar

CDK	Siklin	Hücre Döngüsü Faz Aktivitesi
CDK4	Siklin D1, D2, D3	G1 fazı
CDK6	Siklin D1, D2, D3	G1 fazı
CDK2	Siklin E	G1/S faz geçişi
CDK2	Siklin A	S fazı
CDK1 (cdc2)	Siklin A	G2/M
CDK1 (cdc2)	Siklin B	Mitoz
CDK7	Siklin H	CAK, her hücre döngüsü fazı

1.7.3. Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CKI)

Hücre döngüsünün diğer düzenleyicileri; CDK inhibitörleri (CKI), tümör süpresörleri, protoonkogenler ve diğer sinyal yollarındaki bileşenlerdir. Bunların seçici sentezi ve indirgenmesi veya aktivasyonu ve bloke edilmesi yoluyla hücre döngüsü düzenlenmektedir. CDK'ların aktivitesi, CKI olarak adlandırılan hücre döngüsünü inhibe edici proteinler tarafından engellenebilir. CDK inhibitörleri, CDK'ye tek başına veya CDK-siklin kompleksine bağlanarak CDK aktivitesini düşürmektedirler.

CDK inhibitörlerinin INK4 ve Cip/Kip olmak üzere iki farklı ailesi vardır. INK4 ailesinin üyeleri; p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c) ve p19 (INK4d) inhibitörleridir ve bunlar özellikle G1 CDK'larını inaktive eder. Bu CKD inhibitörleri, sikline bağlanmasından önce CDK enzimi ile kararlı kompleksler oluşturarak Siklin D

ile birleşmeyi önlerler (Carnero and Hannon 1998). Cip/Kip ailesinin üyeleri ise p21 (Waf1, Cip1), p27 (Cip2) ve p57 (Kip2)'dir. Bu inhibitörler, tüm G1 CDK-siklin komplekslerinin ve CDK1-siklin B kompleksinin oluşumuna engel olarak hücre döngüsünün durmasını sağlamaktadır (Hengst and Reed 1998) (Şekil 1.6). Bunlar, siklin A/CDK2 ve siklin E/CDK2 komplekslerine bağlanıp pRb genin aktivasyonu yoluyla hücre gelişimine G1 fazında ket vurmaktadır. p21, tümör baskılayıcı bir gen olan p53 tarafından ekspresyonu sağlanarak aktivitesini göstermektedir (El Deiry *et al.* 1993).

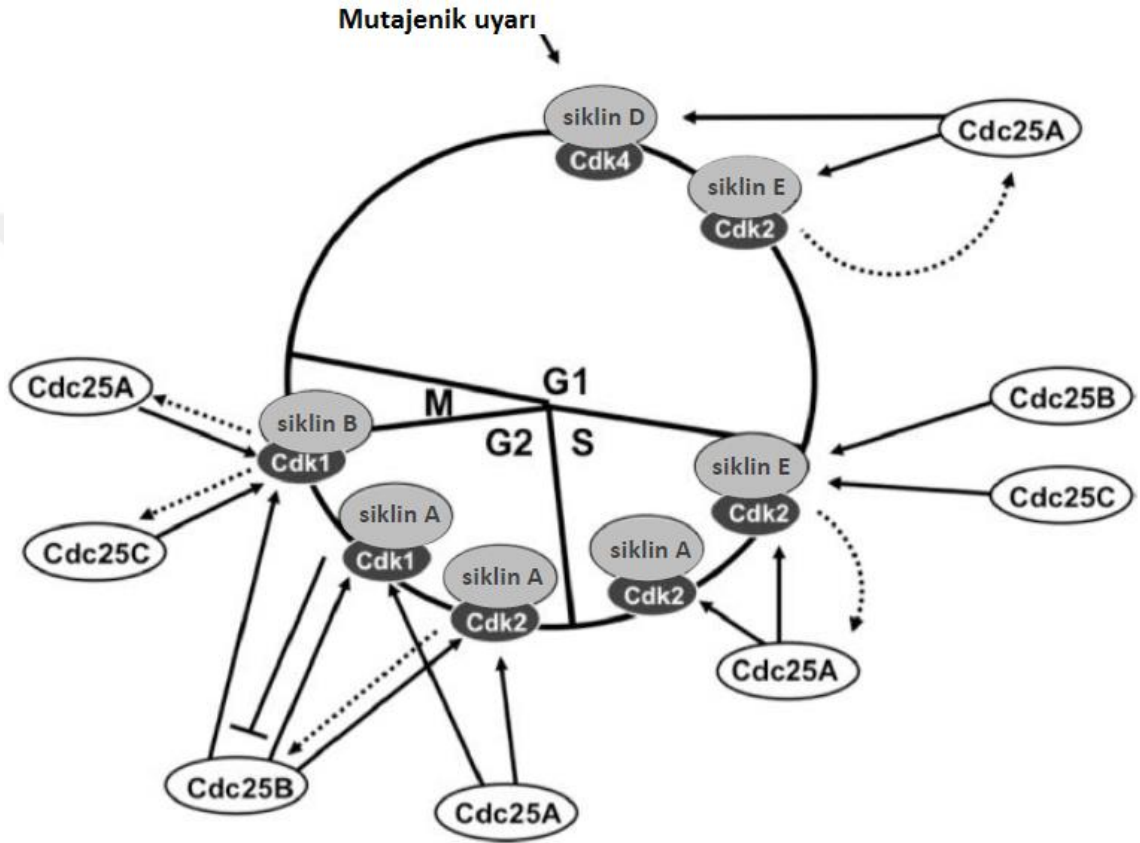
1.7.4. CDK substratları

Hücre döngüsü düzenlemesinde en fazla incelen, retinoblastoma tümörü süpresör geninin (pRb) ürünü olan CDK4/6-siklin D'nin substratıdır (Çizelge 1.1). G1'in erken döneminde pRb'nin fosforile olması, Siklin A, siklin E ve Cdc25 gibi S fazı süreci için gerekli olan ürünleri kodlayan genlerin transkripsiyonunu pozitif olarak düzenlemektedir (Kato *et al.* 1993). Doğru mitozun gerçekleşmesi için gerekli olan diğer CDK substratları CDK'nın kendi Wee1 ve Cdc25 düzenleyicileri ile nükleer laminler, mikrotübüller ve vimentin gibi sitoskeletal proteinlerdir (Courvalin *et al.* 1992; Hoffmann *et al.* 1993).

1.8. Hücre Döngüsü Deregülasyonu ve Kanserle İlişkisi

Kanserde sınırsız hücre çoğalmasının temeli, hücre bölünmesinin genetik kontrolünde oluşan bozukluklara dayanmaktadır. Mutasyonlar esas olarak proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler olmak üzere iki gen sınıfında ortaya çıkmaktadır. Protoonkogenler, hücre çoğalmasını kontrol eden ve herhangi bir mutasyon sonucunda onkogenlere dönüşen genlerdir. Normal hücrelerde proto-onkogenlerin kodladığı ürünler, hücre proliferasyonunu uyaran yolaklar için önemlidir ve farklı seviyelerde çalışmaktadır. Tümör baskılayıcı genler (anti-onkogenler), hücre proliferasyonunu inhibe eden veya geciktiren genlerdir. Bu genler, büyüme faktörünü baskılayarak tümör bölünmesini engelledikleri için inaktive olduklarında kansere neden olmaktadır. Kısacası kanser, onkogenlerin aşırı ekspresyonu ve tümör baskılayıcı genlerin

inaktivasyonu ile oluşmaktadır (Vermeulen *et al.* 2003). Kanserde mutasyonlar, siklinler, CDK'lar, CDK-aktive edici enzimler, CDK inhibitörleri, CDK substratları ve kontrol noktası proteinlerini kodlayan genlerde (pRb ve p53 gibi) gözlemlenmiştir (Sherr 1996; McDonald and el Deiry 2000).



Şekil 1.7. Cdc25 fosfatlarının hücre döngüsü düzenlemesi

Siklinlerden büyüme sensörü işlevi gören ve mitojenik uyarılar ile hücre döngüsü arasında bir bağlantı sağlayan Siklin D'nin, birçok kanser türünde anormal ifadesinin olduğu görülmüştür (Hall and Peters 1996).

CDK-aktive edici enzimleri, Cdc25 fosfataz ailesine ait enzimlerdir. Bunlardan Cdc25A, G1/S faz geçişinde önemli bir rol oynar; Cdc25B, S fazı sırasında aktivasyona girer ve Cdc25C, mitozaya girişte CDK1-siklin B'yi aktive eder. Cdc25'in bozulması veya aşırı ekspresyonu, CDK-siklinlerin programlanmamış aktivasyonu vasıtasıyla tümör

oluşumuna neden olur. Bu yüzden Cdc25A ve Cdc25B en yaygın potansiyel insan onkojenleridir (Şekil 1.7) (Nilsson and Hoffmann 2000).

Kontrol noktası proteinlerinin mutasyonları, her türlü kanserde sık görülmektedir. pRb, G1 sırasında en önemli CDK substratıdır ve yokluğunda veya fonksiyon kaybında sınırsız hücre döngüsü devam etmektedir birçok kanserde mutant haldedir. p53 geni, insan kanserinde en yaygın şekilde mutasyona uğramış gendir ve p53 inaktive edildiğinde DNA hasarına cevapta p21'in düzenlenmesi ortadan kalkarak hücrenin bölünmesi devam etmektedir (Sherr and McCormick 2002).

1.9. Apoptoz

Apoptoz, programlı hücre ölümü tiplerinden biridir. Apoptoz, gelişmenin düzenlenmesi, organizmanın bütünlüğünün korunması ve doku homeostazisinin sürdürülmesi gibi çeşitli fizyolojik düzenlemelerde hücreleri yok etmek için gerekli bir süreçtir. Apoptoz, Bcl-2 (B-cell Lymphoma) ailesinin üyeleri ve kaspazların aktivasyonu ile sürdürülür (Lowe and Lin 2000).

Kaspazlar, inaktif formda zimojen olarak sentezlenen sistein proteazlardır, bunlar ardarda birbirlerini aktifleştirerek kademeli bir şekilde apoptoz sürecini yürütürler. Apoptoz süreçlerinde rol alan kaspazlar, apoptotik sinyalin basamağındaki pozisyonuna göre başlatıcı (initiator) ve etkileyici (efektör) diye kategorize edilirler. Prokaspaz-2,-8,-9 ve -10, başlatıcı kaspazlardır ve sonraki aşamalarda rol alan kaspazların proteolitik aktivasyonuna yol açarlar. Kaspaz-3, -6 ve -7, etkileyici kaspazlardır ve spesifik substratları keserek hücre ölümünü gerçekleştirirler (Hengartner 2000).

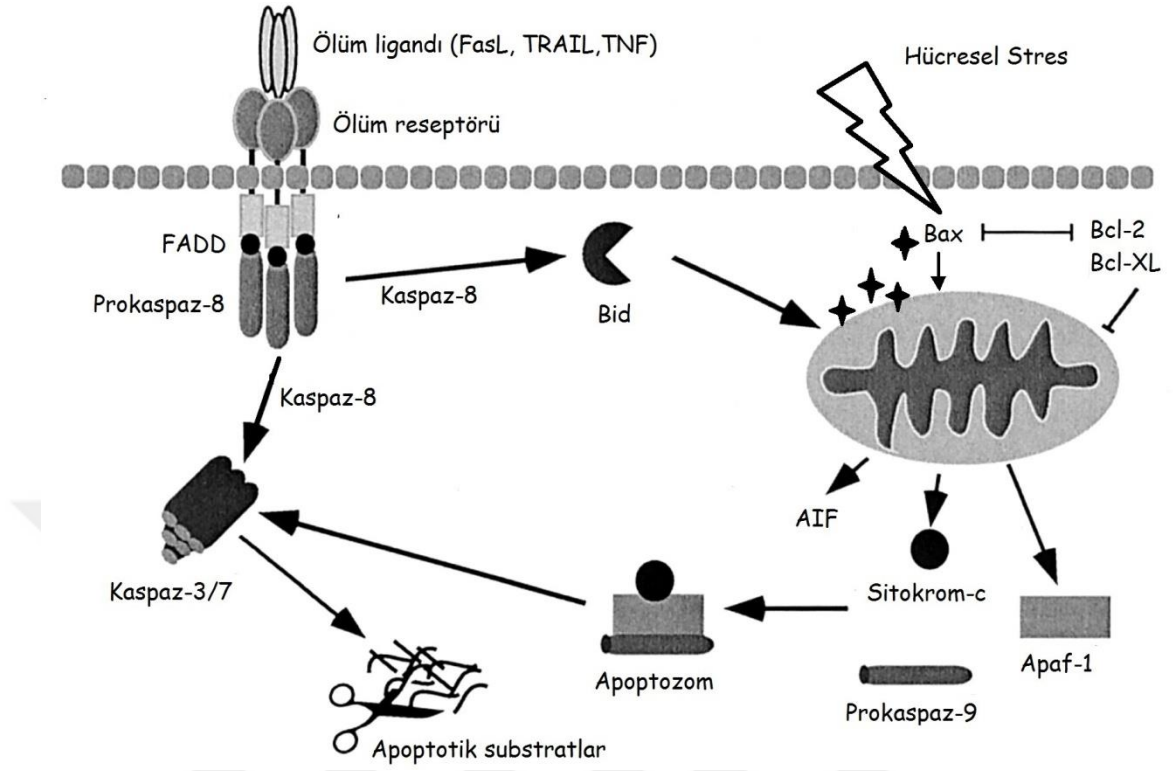
Bcl-2 protein ailesinin insanlarda pro-apoptotik veya anti-apoptotik işleve sahip 20'den fazla üyesi vardır. Bunlardan bazıları Bax, Bak, Bad, Bid, Bim, Bcl-Xs ve Noxa gibi apoptozu teşvik eden; Bcl-2, Bcl-X_L ve Mcl-1 gibi apoptozu bastıran proteinlerdir. Bcl-2 proteinlerinin homodimerler veya heterodimerler oluşturarak birbirleriyle fiziksel yönden antogonistik veya agonist etkileşime girerek mitokondrial membran

geçirgenliğini kontrol etmektedirler. Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerinden Bax ve Bak'ın aktivasyonunun artışı, hücrenin apoptozis nedeniyle ölmesine neden olurken; anti-apoptotik üyeleri Bcl-X_L ve Bcl-2'nin artışı hücrenin hayatta kalmasını sağlar (Antonsson and Martinou 2000; Guo *et al.* 2001).

Hücreleri apoptoza götüren iki önemli yolak vardır; bunlardan birisi ekstrensek veya reseptör-aracılı yolak, diğeri instrensek veya mitokondriyal yolaktır (Hajra and Liu 2004) (Şekil 1.8). Hücre içindeki pozitif veya negatif bir sinyal, instrensek yolağı başlatabilir. Negatif sinyaller büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonların eksikliğinde meydana gelir. Pozitif sinyaller ise ısı, radyasyon, toksinler, glukokortikoidler, hipoksi, viral enfeksiyonlar, artmış hücre içi Ca⁺² konsatrasyonu ve serbest radikallerdir. Toksinler, hormonlar, büyüme faktörleri ve nitrik oksit sitokinler, ekstrensek yolağı da başlatabilir (Saelens *et al.* 2004).

İntrensek yolak

DNA hasarı, iskemi, ER stres, yüksek sitosolik stres veya ROS nedeniyle oluşan hücresel stres sinyalinin tetiklemesi ile başlar ve kaspaz-9 aktivasyonu ile devam eder. Hücreye gelen sinyal doğrultusunda pro-apoptotik Bid ve Bim proteinleri sitoplazmada bulunan Bax'a bağlanarak Bax'ın mitokondriye geçmesini sağlar. Mitokondri membranlarına giren Bax, sitokrom c'nin salınımı artırır. Sitokrom c, Apaf-1(apotozisi aktive eden faktör) ve prokaspaz-9'a bağlanarak sitoplazmada bir "apoptozom" kompleksi oluşturur. Oluşan bu kompleks, kaspaz 9'un aktive olmasını sağlar. Aktif kaspaz-9, proteinleri keserek diğer kaspazları aktive etmeye başlar. Etkileyici kaspazların ard arda aktifleşmesi sonucunda sitoplazmik proteinler ve kromozomal DNA yıkılır (Ashkenazi and Dixit 1998). Ölüm sinyali ayrıca farklı bir yoldan mitokondri içi membran boşluklarında yer alan apoptoz indükleyici faktör (AIF) proteininin salınmasını da teşvik eder. Gelen ölüm sinyaliyle mitokondriden salınan AIF, farklı bir yolak ile çekirdeğe geçip DNA'nın yıkımını sağlayarak hücrenin parçalanıp ölmesine neden olur (Ricci *et al.* 2003).



Şekil 1.8. Apoptozun ekstrinsek ve intrinsek yolları

Ekstrinsek yolak

Hücre dışından bir ligandın (Fas ligand (fibroblast associated antigen), TNF (tümör nekrozis faktör), veya TRAIL) hücre yüzeyinde bulunan kendi ölüm reseptörlerine bağlanması ile tetiklenir ve kaspaz-8 aktivasyonu ile devam eder. Ligandın ölüm reseptörüne bağlanmasıyla reseptörün sitoplazmik yüzündeki adaptör molekülü FADD (Fas ilişkili ölüm domaini) ve TRADD (TNF 16 reseptör ilişkili ölüm domaini) aktive olur. FADD daha sonra prokaspaz 8 ile birleşerek, ölümle indüklenen sinyal kompleksi (DISC) oluşturup kaspaz-8'i aktive eder. Aktif kaspaz-8, kaspaz-3, -6 ve -7'yi aktive ederek hücre ölümünü gerçekleştirir. Kaspaz-8 ayrıca, Bax ve Bak1'in translokasyonunu, oligomerizasyonunu ve mitokondriyal membrandan girişini sağlamaktadır (Budihardjo *et al.* 1999).

1.10. Apoptoz ve Kanserle İlişkisi

Bir hücrenin DNA'sında oluşan hasar, tamir mekanizmaları ile düzeltilemezse, hasarlı hücre p53 ve Rb gibi tümör süpresör genlerinin aktivasyonu ile yok edilmektedir. Eğer bu genlerde de herhangi bir bozukluk varsa hücre apoptoza gidemediği için hasarlı bir şekilde bölünerek tümör oluşturmaya başlamaktadır. Proapoptotik p53 tümör süpresör genindeki mutasyonlarla regülasyonun düşmesi ve Bcl-2 ailesi proteinlerinin ekspresyonundaki artışlarla kanser hücrelerinin, apoptoz karşıtı olan genleri baskıladığı ve apoptotik yola dirençli olduğu görülmüştür (Evan and Vousden 2001).

1.11. Oksidatif Stres

Solunumun bir yan ürünü olarak, hücreler sürekli hidroksil radikal ($\text{OH}^\cdot$), süperoksit anyon ($\text{O}_2^\cdot$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türlerini (ROT) ortaya çıkarmaktadırlar. Bu moleküller başlıca mitokondri, peroksizom ve endoplazmik retikulumda gerçekleşen çeşitli metabolik reaksiyonlarda tüketilen oksijenden türevlenmektedir. ROT, esas olarak DNA'yı hedef alan DNA hasar ajanlarından farklı olarak, çeşitli hedeflere sahip olabilir (Ames 1998). ROT, biyolojik sistemlerde düzenleyici yolların yürütülmesi için sürekli üretilmekte ve elemine edilmektedir. Oksidatif stres, kimyasal ve fizyolojik lezyonlara neden olması yüzünden metabolik bozukluk ve hücre ölümüne yol açabilir. Normal fizyolojik şartlar altında hücreler, ROT seviyesini, ROT'un üretimi ve eliminasyonunu dengede tutarak kontrol altına almaktadır. Ancak oksidatif şartlar altında aşırı ROT hücre proteinlere, lipidlere ve DNA'ya zarar verebilmekte, bu da hücrelerde ölümcül lezyonlara yol açarak kanser de dâhil olmak üzere birçok insan hastalığının meydana gelmesine neden olmaktadır (Gupta *et al.* 2012). Mevcut ROT tip ve konsantrasyonuna bağlı olarak, hücreler bu streslerle başa çıkmak için farklı yöntemler geliştirmektedirler. DNA hasarının aksine, oksidatif stres, oksidan etkilere karşı koymak için daha belirgin bir transkripsiyonel tepki oluşturmaktadır.

Serbest radikallerin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarları sınırlandırmak için biyolojik sistemlerde çeşitli antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Antioksidanlar ve serbest radikal temizleyicileri ise lipid peroksidasyon ve ROT'un oluşumunu engelleyebilmektedirler. Bu nedenle oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki denge çok önemlidir. Antioksidanlar radikal süpürücü olmaları ve serbest radikal aracılı reaksiyonları inhibe etmeleri sebebiyle, insan vücudunu radikallerin neden olduğu hastalıklara karşı koruyabilirler (Tepe *et al.* 2006). Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere “antioksidanlar” ve bu olaya “antioksidan savunma” denir. İyi bir antioksidanda bulunması gereken özellikler; ortamdaki serbest radikalleri giderme, redoks metallerinin şelatörü olarak görev yapabilme, antioksidan sistemdeki diğer antioksidanlarla etkileşime girebilme, gen ekspresyonunda olumlu etkiler yapma, hızlı emilimi sağlama, dokulardaki ve biyolojik sıvılardaki konsantrasyonları fizyolojik açıdan uygun seviyelerde tutma, hem membranlarda hem de su içeren ortamlarda fonksiyonel olmasıdır (Valko *et al.* 2006).

1.12. Oksidatif Stres ve Kansere İlişkisi

Kanser hücreleri anormal çoğalma için ATP'lerini kolayca temin etmektedir. Ancak, bu kontrolsüz enerji üretiminin karanlık tarafı, hücrenin yaşamını sağlamak için temizleme mekanizmaları tarafından engellenmesi gereken ROS'un birikimidir. Birçok çalışma, ROS'un onkogenik olduğunda ve tümör baskılanması durumunda ROS seviyelerini ve prognozunu çeşitli koşullar altında değerlendirmiştir (Trachootham *et al.* 2009). ROT, genomik DNA'nın mutasyonunu ilerleterek veya sinyal moleküllerini aktive ederek tümör formasyonunu geliştirebilmektedir. Örneğin, ROT, tümör hücre gelişimi ve hayatta kalmasıyla bağlantılı olan mitojen aktive edici protein kinazların ve hücreler arası sinyal düzenleyici kinazların fosforilasyonunu, siklin D1 ekspresyonunu ve JUN N-terminal kinaz aktivasyonunu uyarabilir. ROT'un tümör supresörlerini inaktive edebildiği de gösterilmiştir (Ranjan *et al.* 2006).

Yüksek seviyedeki ROT, hücre ölümünü artırmaktadır. Kanser hücreleri, özellikle tümör gelişimin erken dönemlerinde ROT'un yüksek seviyeleriyle savaşmaktadır. Son araştırmalar, oksidatif stresi indükleyen koşulların, güçlü antioksidan mekanizmalar geliştirebilmek için pre-neoplastik hücreler üzerindeki selektif baskıyı artırdığını ortaya koymuştur. Yüksek ROS seviyeleri, hücre matrisinden ayrılarak da indüklenmektedir. Bu yaklaşım, uzak organlara göç sırasında hayatta kalmaya ihtiyaç duyan metastatik kanser hücreleri için bir mücadele sunmaktadır (Gorrini *et al.* 2013).

1.13. Kanser Tedavisi

Kanser tedavisinde geleneksel olarak kemoterapi, radyasyon terapisi ve cerrahi tedavi seçenekleri kullanılmaktadır. Tıp bilimindeki önemli ilerlemelerle son yıllarda gen terapisi, immünoterapi, fotodinamik terapi ve anti-anjiyogenez terapisi gibi daha yeni terapiler kullanılmaya başlanmıştır. Geçmişte kanser tedavisinde kullanılan tedavi yöntemleri, belirli bir proteine veya sinyalleme yollarının bir ürününe hedefli olmasından ziyade daha genel sitotoksik kemoterapötik ajanlara yönelik olmuştur. Bununla birlikte, son yıllarda çok sayıda proteinler veya mutasyona uğrayan ve kanser hücrelerinde de aşırı sentezlenen kinazlar gibi enzimleri hedefleyen kanser terapileri geliştirilmiştir. Kanser tedavisinde farklı bir yaklaşım da kanser kök hücrelerini hedef almaktadır. Kanser kök hücrelerinin kendini yenileme özelliği ve koruyabilme kapasitesinin olması göz önüne alınarak, kanser kök hücrelerine karşı monoklonal antitadilerin kanser kök hücrelerinin çoğalması ve sinyal yollarını kapatılmasına yol açacağı düşünülmektedir. Kanser tedavisine bir başka önemli yaklaşım, tümörün mikro ortamına yöneliktir ve özellikle tümörle birlikte olan fibroblastlar, makrofajlar ve düz kas hücreleri gibi stromal hücreler hedeftedir. Son yıllarda, anjiyogenezde önemli bir rol oynayan kolon VEGF'ye karşı antikorlar, kolon kanserinin tedavisinde kullanılmıştır (Felsher 2003; Sawyers 2004).

1.14. Beyin Tümörleri

Beyin tümörleri primer ve sekonder tümörler olmak üzere 2 grupta sınıflandırılmaktadırlar. Primer tümörler, beyinden köken alan tümörlerdir, sekonder tümörler ise vücudun beyin dışındaki bir bölgesinde ortaya çıkıp beyne sıçraması ile oluşan metastatik tümörlerdir. Sekonder beyin tümörleri, en fazla akciğer, meme, kalın bağırsak, mide, cilt ya da prostat gibi kanserlerden kaynaklanmaktadır. Beyin dokusu sıklıkla sistemik kanserlerin hedefi olduğu için kanser hastalarının yaklaşık %20-40'ında beyin metastazları görülmektedir. Bu oran tüm beyin tümörlerinin %10'unu oluşturmaktadır (Raizer and Abbey 2007).

1.14.1. Primer beyin tümörleri (Gliomlar)

Gliomlar, yetişkinlerde görülen en yaygın primer intrakranial tümörlerdir ve tüm malign beyin tümörlerinin %81'ni oluşturur (Ostrom *et al.* 2014). Bunlar Merkezi Sinir Sisteminin (MSS) herhangi bir yerinde oluşabilir ancak primer olarak beyinde glial dokunun türevleşmesiyle meydana gelir (Ostrom *et al.* 2013). Yetişkinlerin serebral hemisferlerini etkileyen bu yaygın gliomlar, beyin parankimi boyunca çabuk ve geniş alana sıçrama eğilimine sahip oldukları için "diffüz" gliomlar olarak adlandırılır. Diffüz gliomlar, histolojik olarak astrositlerden köken alan astrositom, oligodendrositlerden kaynaklanan oligodendrogliom ve bu iki tip hücrenin morfolojik özelliklerini taşıyan oligoastrositom (mikst gliomlar) tümörler olarak sınıflandırılırlar (Furnari *et al.* 2007). Bunların dışında ventrikülleri kaplayan ependimositlerden köken alan ependimom tümörler vardır ancak bunlar kötü huylu çoğalma oluşturan habis tümörlerden farklılık gösterir. Ependimomlar ayrıca, çocuklarda görülür ve diğerlerine nispeten insidansı çok düşüktür (Liberski 1995). Bu tümör tipleri arasında astrositomlar, gliomların ve birincil beyin tümörlerinin en sık görülen tipidir ve omurilik, beyin veya beyin sapı gibi merkezi sinir sistemi bölümlerinden herhangi birinde gelişebilir (Ostrom *et al.* 2014). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) habislik davranışına göre diffüz astrositik tümörleri; nükleer atipi, mitotik aktivite, mikrovasküler proliferasyon ve nekroza bağlı olarak 4 evre halinde derecelendirmiştir. Bunlar;

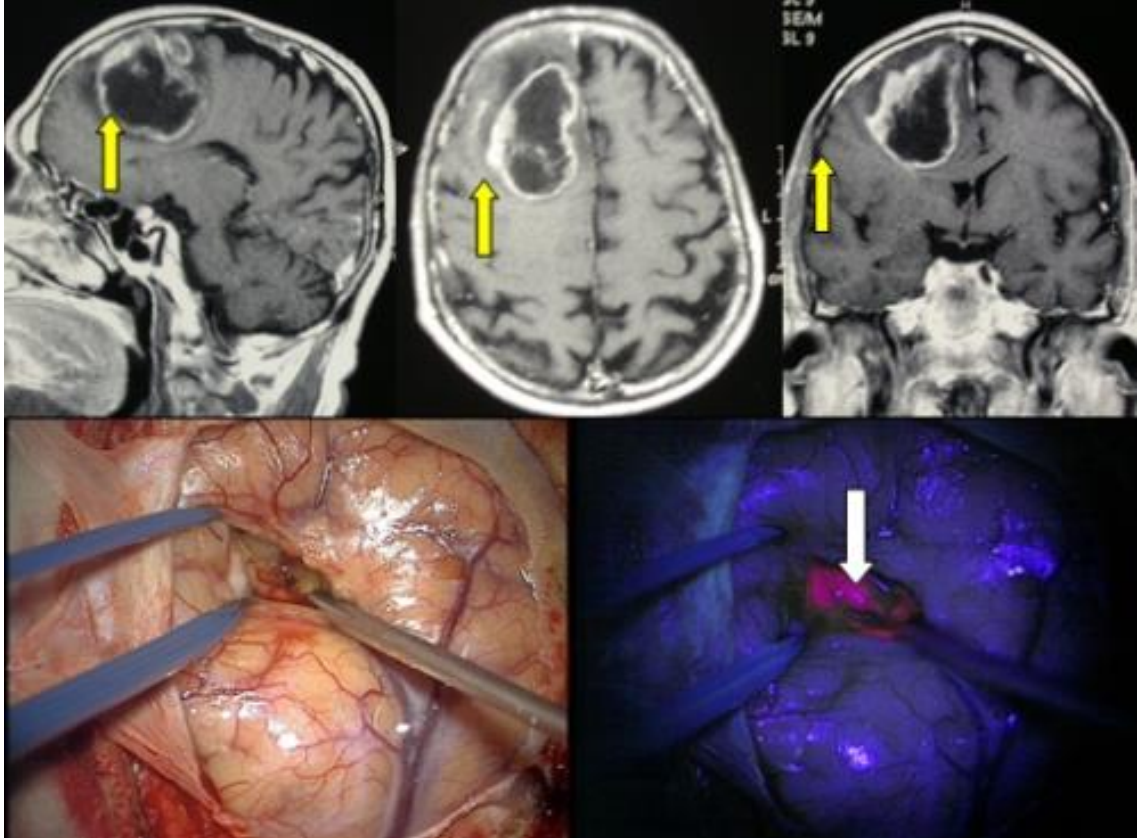
- Evre I pilositik astrositom (subependimal dev hücreli),
- Evre II diffüz astrositom,
- Evre III anaplastik astrositom,
- Evre IV glioblastoma multiform.

Evre I tümörleri, çok nadir görülür, biyolojik yönden iyi huyludur ve cerrahi olarak alındığında tedavi edilebilir. Evre II tümörleri, düşük dereceli malignitelerdir ve uzun süreli bir klinik takip gerektirir ancak bunların komşu dokuya diffüz infiltrasyonu, hastaları ameliyatla tedavi edilemez hale getirebilir. Evre III tümörleri, Evre II tümörlerine göre daha fazla anaplazi ve proliferasyon gösterdikleri için daha ölümcüldürler. Evre IV tümörleri, astrositomların en ileri evresi olan çok biçimli glioblastomdur. Bunlar, vasküler çoğalma ve nekroz gibi ileri malignite özellikleri taşırlar ve radyo-kemoterapiye dirençli olduklarından, genellikle 12 ay içerisinde ölümcül etki gösterirler (Furnari *et al.* 2007; Louis *et al.* 2007).

1.14.2. Glioblastoma multiform (GBM)

Glioblastoma multiform (GBM), astrositik soyların en agresif diffüz gliomasıdır. “multiform” olarak adlandırılmasının nedeni, tümör hücrelerinin morfolojik olarak farklılık göstermesi ve heterojen yapıda olmasıdır. GBM, çoğunlukla hemisferde olmak üzere beynin diğer bölgelerinde de ortaya çıkabilir. İnvaziv özelliğinden dolayı korpus kallozum aracılığı ile kısa sürede karşı hemisfere geçebilir. Beynin beyaz cevherinde özellikle ön (frontal) ve yan (temporal) beyin loblarında yerleşimi görülür. Bunun yanı sıra GBM, çok nadiren de olsa beyincikte görülebilir (Şekil 1.9). GBM hücrelerinde, VEGF aşırı ifade edildiği için anjiogenez de hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir (Krakstad and Chekenya 2010).

GBM'ler, malign primer beyin ve MSS tümörlerinin %45,2'sini, gliomların %54'ünü ve tüm primer beyin ve MSS tümörlerinin %16'sını oluşturan en yaygın beyin ve merkezi sinir sistemi maligniteleridir (Ostrom *et al.* 2013). Bazı genetik faktörler ve mesleki karsinojenler veya iyonize radyasyona maruz kalma (cep telefonları) gibi çevresel etmenlerin gliomlar için potansiyel risk faktörü olduğuna dair çalışmalar yapılmış olsa da gliomların asıl nedeni henüz net olarak ortaya konmamıştır (Ostrom *et al.* 2014). Akciğer kanseri, melanom, meme kanseri, renal kanser ve lenfoma gibi tümörlerin metastazıyla GBM ortaya çıkabilir ancak olguların %10'unda metastazın kaynağı belirlenememektedir (Raizer and Abbey 2007).



Şekil 1.9. Glioblastoma Multiforme görüntüleri (Anonymous 2017)

Klinik yönden GBM'ler primer veya sekonder olarak da iki alt bölüme ayrılır. Primer GBM yaşlı hastalarda GBM vakalarının büyük bir çoğunluğunu temsil ederken, sekonder GBM'ye oldukça nadir rastlanır ve 45 yaşın altındaki hastalarda görülme eğilimindedir. Primer GBM, ön semptomları göstermeden ya da daha öncesinde düşük

dereceli patolojik herhangi bir kanıtı olmadan akut tarzda kendiliğinden (de novo) ortaya çıkar. Sekonder GBM ise bunun aksine, her zaman düşük dereceli astrositomların ilerlemesi sonucu yüksek dereceye geçmesiyle meydana gelir. Daha açık bir ifadeyle bu geçiş, Evre II gliomların %70'nin, hastalık teşhisinden itibaren 5-10 yıl içerisinde Evre III/IV'e dönüşümüdür (Furnari *et al.* 2007).

Malin gliomlar, her yaş grubunda görülebilir ancak yaş ilerledikçe görülme sıklığı da artar. Bu tümörlerin insidansı; histolojik tip, tanı konma yaşı, cinsiyet, ırk ve ülke gibi değişkenler açısından belirgin farklılık gösterir. Malign gliomlara genelde erkeklerde kadınlara oranla daha sık rastlanır (Ostrom *et al.* 2014). İnsidans oranları, gelişmiş ülkelerde (erkeklerde 5.8/100.000, kadınlarda 4.4/100.000) az gelişmiş ülkelere (erkeklerde 3.2/100.000, kadınlarda 2.8/100.000) göre daha yüksektir. ABD'de her yıl yetişkinlerde yaklaşık 22.500 yeni malin primer beyin tümörü vakası bildirilmektedir ve bunların %70'i i malign gliomadır. GBM'ler ise yaklaşık olarak malign gliomların %60-70'i oluşturur (Ahmed *et al.* 2014; Louis *et al.* 2007)

1.14.3. GBM'lerin günümüzdeki standart tedavisi

GBM, medyan sağ kalım süresi 12 ay olan tedavi edilemez bir hastalık olmaya devam etmektedir. GBM'nin tedaviye oldukça direnç göstermesinin nedeni, kan-beyin bariyerinden dolayı düşük ilaç ulaşımı, heterojen hücre topluluğunun tek bir terapötik ajana yanıt vermemesi; tümörün invaziv özelliğinden dolayı diğer beyin bölgelerine kolay yayılması; kemo-radyoterapinin etkisini azaltan DNA tamir mekanizmalarının korunması nedenlerinden dolayı bir hedefe yönelik terapinin etkili olamamasından ileri gelmektedir. Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) yöntemiyle tespit edilebilen bu hastalığın tedavisi karmaşıktır ve başlangıçta güvenli bir cerrahi rezeksiyon, ardından ise 6 seferlik temozolomid (TMZ) kemoterapisi ile eş zamanlı radyoterapiden oluşur (Stupp *et al.* 2005). Bu uygulamanın dışında etkinliği kesin olarak kanıtlanmış başka bir tedavi seçeneği halen mevcut değildir.

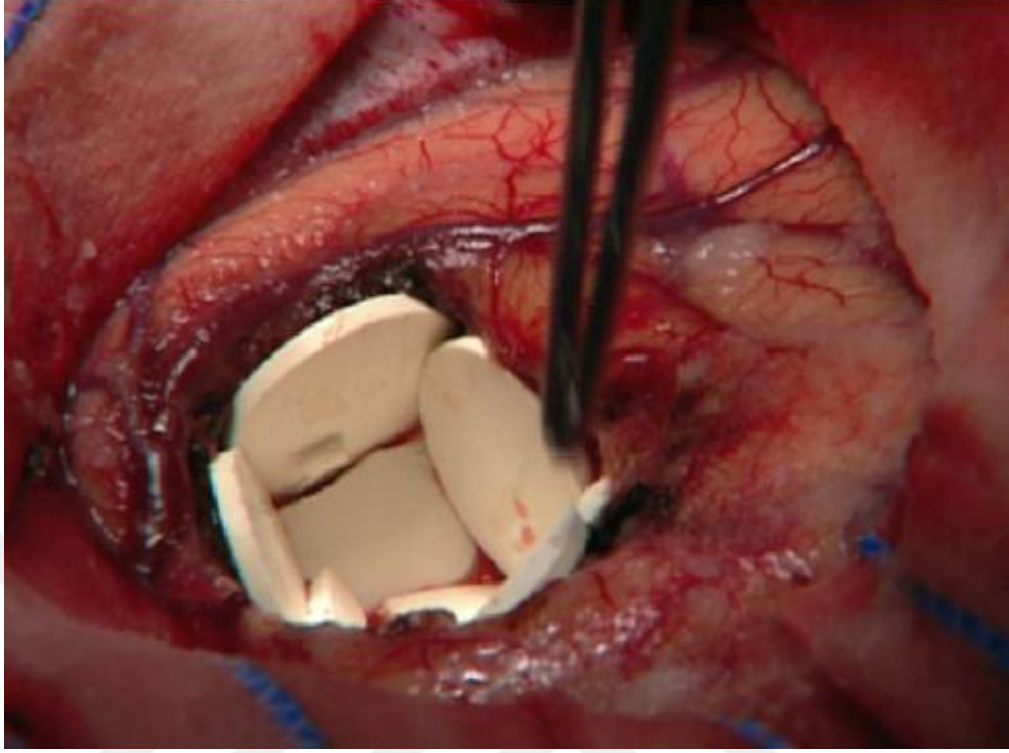
Cerrahi rezeksiyon:

Tümör kitlesinin cerrahi yöntemle çıkartılması hastaların yaşam süresini uzatmak için gereklidir (Sanai and Berger 2011). MG dokusunun intraoperatif tespiti için bazı nörocerrahi teknik ve ekipmanlardaki mevcut gelişmeler, glioblastoma hastalarının ameliyat güvenliğini artırmış ve cerrahi müdahaleyi yaygınlaştırmıştır (Stummer *et al.* 2006; Gasser *et al.* 2011). Ancak komşu dokuya sıçrama özelliğinden dolayı bu tümörün tamamının nöro-cerrahi rezeksiyonu mümkün değildir. Bu özellik, ameliyatın ardından kemoterapi ve radyoterapi gibi adjuvan tedavi yöntemlerinin uygulanmasını zorunlu hale getirir.

Kemoterapi:

Beyin tümörleri için sistemik kemoterapi ile ilgili temel problem, çoğu kemoterapötik ajanların tümör içindeki etkili doza erişiminde kan-beyin bariyerini veya kan-tümör bariyerini geçememesidir. Bu nedenle, sistemik kemoterapiye ek olarak CEDD (Convection-enhanced drug delivery) ve gliadel wafer gibi bölgesel yöntemler de uygulanır. CEDD, kan-beyin bariyerini geçmek için hedeflenen beyin parankimine veya dokusuna teropötik ajanın doğrudan verildiği bir baypas tekniğidir. Gliadel wafer ise ilaç emdirilmiş tabletlerin tümör çıkarıldıktan sonra rezeksiyon boşluğuna yerleştirilmesi yöntemidir, buradaki amaç yüksek toksisiteye sahip karmustin ilacının bu yöntemle yavaşça salınımının sağlanmasıdır (Şekil 1.10).

Standart sistemik adjuvan kemoterapi, ya nitrozoüreler yada TMZ benzeri kemoterapiye dayalı alkilleyici diğer ajanlara dayanır. Bu ajanlar, kan-beyin bariyerine nüfuz etme yeteneğine sahip olan sınırlı sayıdaki ilaç grubundandır. Bu özellikleri, beyin omurilik sıvısı ve beyin parankimindeki sitotoksik konsantrasyonu ayarlamaya olanak verir. Nitrozoüreler, DNA replikasyonunun inhibisyonu yoluyla DNA onarımını engellemek için alkilasyon işlemi başlatır. Alkilleyici ajanlar prokarbazin ve lomustin gibi diğer ajanlarla birlikte veya tek olarak verilebilir (Juratli *et al.* 2013).



Şekil 1.10. Karmustin waferın glioblastoma rezeksiyon boşluğuna yerleştirilmesi (Anonymous 2017)

TMZ, ağız yoluyla verilir ve tek başına veya kombinasyon halinde kullanıldığında iyi sonuçlar gösterir. Ancak bu ajanın tümör hücrelerini öldürmek için harekete geçirdiği hassas mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Alkilleyici ajanlara karşı tümörün direnci, MGMT proteininin (O6-metilguanin-DNA metil transferaz) aşırı ekspresyonuna bağlı henüz çözülmemiş bir problemdir. MGMT geni 10q26 kromozomu üzerinde bulunur ve DNA onarım proteinlerinden birini kodlar böylelikle DNA alkilasyonunun önemli bir bölgesi olan Guanin'in O6 pozisyonundan alkil gruplarını uzaklaştırır. DNA'nın onarımı, MGMT proteininin tüketimine neden olur, böylelikle MGMT proteininin hücre tarafından yeniden üretilmesi gerekir ama DNA onarılmadan kalırsa kemoterapi kaynaklı lezyonlar hücre apoptozunu tetikler (Ochs and Kaina 2000). Karmustin veya TMZ ile alkilleyici kemoterapi alan MG hastalarında metilasyonla MGMT geninin epigenetik baskılanması daha uzun genel sağ kalım ile ilişkilendirilir (Esteller *et al.* 2000; Juratli *et al.* 2013).

Radyoterapi:

Harici bir ışın radyasyonu uygulaması yeni teşhis edilmiş MG'nin tedavisinde etkili olabilmektedir. Radyaterapi, farklı işlemlerden arınık olan ameliyat tedavisine göre medyan sağ kalım süresin 9 aya kadar uzatabilir. MG hastalarının tedavisinde radyasyonun en uygun dozunu bulmak için farklı dozajlar denenmiştir. Ancak gliomların heterojenik dokuda olması ve çoğu hücresinin radyasyon tedavisine dirençli olması nedeniyle, klinik açıdan en iyi şekilde tolere edilen maksimum doz 60 Gy'dir. Bu dozun uygulanmasından sonra bile tümörler tamamen ortadan kaldırılamaz (Baumann *et al.* 2009).

Gen terapisi

Gen terapisi, hastanın somatik hücrelerine rekombinant nükleik asitten (DNA) oluşan veya bunu içeren aktif bir maddenin transferi işlemidir. Gen transferinde fiziksel, viral ve non-viral olmak üzere farklı metotlar kullanılır. Viral veya non-viral gen transferi metotlarında hücreye genetik materyalin yerleştirilmesi için biyolojik vektör (virüs) ve ya bir sentetik vektör (lipozom ve ya nanopartikül) kullanılır. Günümüzde beynin içine genetik materyalin yerleştirilmesinde üç farklı yöntem kullanılmaktadır. Bunlar; gen transfer vektörünün intraventriküler ve intravasküler olarak verilmesinin yanı sıra vektörün tümörün cerrahi olarak çıkarılmasından sonra kalan rezeksiyon boşluğu duvarların içine doğrudan enjeksiyonudur. Bu yöntemler içinde doğrudan intraserebral enjeksiyon en sık kullanılan stratejidir (Wirth and Ylä-Herttua 2006). Bugüne kadar MG tedavisi için farklı gen transfer vektörlerinin kullanımına dayalı çeşitli gen terapisi çalışmaları yapılmasına rağmen sadece birkaçı klinik araştırmalara kadar ilerleyebilmiştir (Wirth *et al.* 2009; Prins *et al.* 2010).

Nükseden GBM'ler için de hala belirlenmiş net bir standart koruma yoktur. Optimal tedaviye rağmen, neredeyse tüm GBM'ler ilk terapiden sonra nükseder ve çoğu hasta hastalığın yenilemesi tanısından sonra 36 haftadan fazla yaşayamaz (Hong *et al.* 2013).

Yukarıda kaydedilmiş literatür bulgularına göre, tek tip aktif tür içeren modern ilaçlardan farklı olarak bitki özütleri çok sayıda aktif bileşikler ihtiva etmektedir. Bu bitki özütlerinin içerdiği doğal bileşikler, insan vücudunda sinerjistik yolla aktive olarak yan etkisi olmayan ve ya çok az olan eşsiz bir tedavi sağlamaktadır (Kaufman 1998). Nitekim *I. helenium* cinsinin içerdiği sekonder metabolitlerden ötürü insan hastalıkları üzerinde çeşitli farmakolojik etkilerinin olduğu rapor edilmiştir (Chaadaeva *et al.* 2009). Diğer taraftan, güçlü antioksidan bileşiklere sahip olduğu bilinen *I. helenium*'un serbest radikalleri ortadan kaldırabileceği düşünülerek kanser tedavisinde etkili olabileceği söz konusu edilmiştir. Şu ana kadar yapılan çalışmalar ağırlıklı olarak bitkinin kök özütlerinden elde edilen ekstrele dayanmaktadır. Ancak söz konusu bitkinin toprak üstü kısımlarının tümüyle değerlendirildiği antikanser aktivitesiyle ilgili literatürde çok sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yüksek karotenoid içeriğe sahip toprak üstü organlarının ekstreleriyle beyin tümörü açısından antikanser özelliğine dair her hangi bir çalışma yapılmamıştır. Glioblastoma multiforme (GBM) erişkinlerde en sık rastlanan agresif beyin tümörüdür. Bilinen en hızlı seyirli ve ölümcül tümörlerdendir. GBM'de tedavi seçenekleri halen pek ümit verici değildir. GBM'de en etkili tedavi seçeneği cerrahi tedavi ile ardından uygulanan kemoterapi ve radyoterapidir ancak en iyi şartlarda bile medyan sağkalım genellikle bir yıldan azdır (Ohgaki *et al.* 2004; Filippini *et al.* 2008). GBM'de bu terapötik mücadelenin üstesinden gelmek için tümör gelişimini yavaşlatabilecek ve kanser hücre canlılığını azaltabilecek yeni terapötik ajanlara ihtiyaç vardır. Çalışmada, *I. helenium*'un toprak üstü kısımlarından elde edilen farklı konsantrasyonlardaki sulu ekstreler, glioblastoma multiform (U-87 MG) hücre hattı ile sağlıklı kontroller üzerine uygulanmış ve konsantrasyona bağlı olarak anti kanser etkinlikleri moleküler ve biyokimyasal parametreler ile ilk kez değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlarla *I. helenium* bitki özütünün beyin kanser hücrelerini inhibe edici ve öldürücü ve sağlıklı nöronları da koruyucu aktivitesinin olduğu anlaşılmış ve böylece literatüre önemli ölçüde katkıda bulunulmuştur.

2. KURAMSAL TEMELLER

Konishi *et al.* (2002), *I. helenium* köklerinden izole ettikleri 7 çeşit seskiterpenin ve MeOH ektresinin MK-1 (insan gastrik adenokarsinom), HeLa (insan ovaryum kanseri) ve B₁₆F₁₀ (fare melanoma) hücre hatlarına karşı yüksek sitotoksik ve inhibe edici aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Çalışmalarında 5-epoksialantolakton ve alantolakton maddelerinin diğerlerinden daha güçlü aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır.

Dorn *et al.* (2006), yaptıkları çalışmada *I. helenium* aseton ve metanol kök ekstraktlarının HT-29 (Kolon kanseri), MCF-7 (Göğüs kanseri), Capan-2 (Pankreatik kanser) ve G1 (Astrositom) olmak üzere çeşitli tümör hatlarına karşı mutajenik olmaksızın oldukça seçici bir toksisite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Diğer taraftan bu ekstraktların insan periferik kan lenfositlerine (PBLs) karşı çok daha az toksisite gösterdiklerini kaydetmişlerdir.

Yong *et al.* (2010), *I. helenium* köklerinden izole ettikleri beş tip seskiterpen laktonun U251SP (Glioma), HLE (Hepatoma), MM1-CB (Melanoma) ve HMV-1 (Malign Melanoma) hücre hatları üzerindeki antitümör etkisini MTT testini kullanarak araştırmışlardır. İzole ettikleri izolaktonun U251SP, HLE ve MM1-CB hücre hatlarının büyümesini belirli şekilde engellediğini rapor etmişlerdir. Ayrıca bu seskiterpenlerin yapılarıyla aktiviteleri arasında ilişki olduğunu ortaya çıkarmışlardır.

Li *et al.* (2011), *I. helenium* kökünden izole ettikleri çeşitli seskiterpen laktonların insan embriyonik akciğer fibroblast (HELFI) ve çeşitli jinekolojik kanser (HeLa, HEC-1, SHIN 3, HOC-21 ve HAC-2) hücre hatları üzerindeki antitümör aktivitesine bakmışlardır. MTT testi sonucu sisplatin (pozitif kontrol), izoalantolakton ve santamarinin HeLa hücreleri üzerinde doza bağlı güçlü antiproliferatif etki gösterdiği bulunmuştur (sırasıyla %66, %81, %86). Ayrıca izoalantolaktonun HEC-1, HOC-21, and HAC-2 hatlarına karşı belirgin antiproliferatif etkiye sahip olduğu ancak

izoalantolakton ve santamarinin HELF hücre hatları üzerinde herhangi bir toksik etki oluşturmadığı ortaya konmuştur. Bunun yanı sıra izoalantolaktonun fareler üzerindeki antitümör aktivitesine *in vivo* olarak bakıldığında izoalantolaktonun asit tümörlerinin (S180) gelişimini önlediği de rapor edilmiştir.

Khan *et al.* (2012), alantolaktonun çeşitli glioblastoma hücre hatları (U87, U373, and LN229) üzerinde doza ve zamana bağlı olarak büyümeyi etkili bir şekilde engellediğini ve apoptozisi tetiklediğini ortaya çıkarmışlardır. Alantolaktonun indüklediği apoptozun, Glutatyon (GSH) azalması, ROT üretimi, mitokondriyal membran potansiyelinin bozulması, kardiyolipin oksidasyonu, Bax ve p53'ün upregülasyonu, Bcl-2'nin azalması, sitokrom c salımı, kaspaz aktivasyonu (kaspaz 9 ve 3) ve poli (ADP-riboz) polimerazın ayrılması gibi etkenlere bağlı olabileceği bulunmuştur. Bu alantolakton kaynaklı apoptoz ve GSH azalmasının, bir tiol antioksidan olan N-asetil-L-sistein tarafından inhibe edildiği ortaya çıkmıştır. Alantolaktonun Glioma hücrelerinde NF- κ B' ye bağlı olmadan apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Çalışmalarında elde edilen bulgular, tümör hücrelerinin alantolaktona duyarlılığının GSH tükenmesi ve ROS üretiminden kaynaklandığını ortaya koymuştur. Ayrıca *in vivo* toksisite çalışmasıyla da alantolaktonun farelerde önemli hepatotoksisite ve nefrotoksisiteye neden olmadığı görülmüştür. Bu nedenle, alantolaktonun antiglioma tedavisinin geliştirilmesi için potansiyel bir öncü bileşik olabileceği ileri sürülmüştür.

Çınar (2012), çiçeklenme evresinde topladığı *I. helenium* taksonlarını doğal şartlarda oda sıcaklığında kuruttuktan sonra öğütüp toz haline getirmiştir ve bitki örneğinin metanol, etanol, su ve etil asetat ile ekstraktlarını hazırlamıştır. Çalışılan taksonların her birinin farklı çözücü ile elde edilen ekstraktlarının içerisinde sulu ekstraktları en yüksek verimi gösterirken, etil asetatlı ekstraktları en düşük ekstre verimi göstermiştir. Test edilen *I. helenium* taksonlarının metanol, etanol, su ve etil asetatlı ekstraktları yüksek toplam fenolik içerikleri ile yüksek antioksidan, antiradikal ve antimikrobiyal aktivite gösterdiğini rapor etmiştir.

Weng *et al.* (2015), izoalantolaktonun SKOV₃ (insan yumurtalık kanseri) üzerindeki hücre büyüme inhibisyonu ve bunun altında yatan hücre ölüm mekanizmalarına olan etkisini araştırmışlardır. İzalantolaktonun SKOV₃ hücrelerinin canlılığını ve çoğalmasını doza ve zamana bağlı olarak belirgin şekilde inhibe ettiği ortaya çıkmıştır. Mekanizma açısından izoalantolaktonun hücre döngüsü ile ilişkili olan siklin B1 ve CDK1 proteinlerinin ekspresyonlarını azalttığı ve G2/M fazında hücre döngüsüne ket vurduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca, izoalantolaktonun neden olduğu SKOV₃ hücrelerinin otofajisininin PEA-15 ekspresyonunun upregülasyonu ve ERK fosforilasyonunun aktivasyonu yoluyla gerçekleştirdiği görülmüş ve bulguların sonucunda da izoalantolaktonun yumurtalık kanseri tedavisinde potansiyel bir anti-tümör ajanı olduğunu ileri sürülmüştür.

Fallahzadeh *et al.* (2016), *I. helenium*'un yapraklarından hazırlanan hidroalkolik ekstrelerin antinosiseptif ve anti-inflamatuar etkilerini erkek sıçanlar üzerinde araştırmışlardır. Çalışmada ağrı ve anti-inflamatuar etki ayrı ayrı değerlendirilmiş ve sıçanlar önce iki büyük gruba ayrılmıştır. Ağrı değerlendirme testleri için sıçanlar kontrol grubu, ekstre ile muamele edilen gruplar (50, 100 ve 300 mg/kg), 300 mg/kg ekstre ile kombinasyonunda morfin ve nalokson grupları olmak üzere 6 gruba; anti-inflamatuar testler için ise kontrol grubu, ekstre ile muamele edilen gruplar (10, 50 ve 100 mg / kg) ve deksametazon grubu olmak üzere 5 gruba ayrılmıştır. Uygulanan 300 mg/kg ekstrenin belirgin antinosiseptif etki gösterdiği ve kullanılan formalin testinde ise 100 mg/kg ekstrenin kronik fazda ağrı oranını ciddi anlamda azalttığı tespit edilmiştir. 50 ve 100 mg/kg ekstrelerinin sıçanların kulaklarında inflamasyonu azalttığı ortaya çıkmıştır. *I. helenium*'un yapraklarının hidroalkolik ekstrelerinin antinosiseptif ve anti-inflamatuar etkiler açısından faydalı olabileceği ileri sürülmüştür.

Lee *et al.* (2016), lipopolisakkarid ile teşvik edilmiş primer mikrogial hücrelerde nitrik oksit (NO) üretimine karşı *I. helenium*'un toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanol ekstrelerinin *in vitro* antioksidan ve anti-nöroinflammatuar aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Lipopolisakkarid ile uyarılan BV-2 mikrogiallarda nitrik oksit (NO), indüklenebilir NO sentaz (iNOS) ve İnterkin-6 (IL-6) gibi inflammatuar

mediatörlerin üretimi ve ekspresyonu değerlendirilmiştir. Ekstreler lipopolisakkarid ile teşvik edilmiş BV-2 mikroglialarda doza bağlı (20, 40, 80 ve 100 µg/mL) bir şekilde aşırı NO üretimini inhibe etmiştir, bu da iNOS'un ekspresyonunun azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca ekstreler (40 ve 80 µg/mL) hücrelerde IL-6 düzeyindeki artışı baskılamıştır. *I. helenium* ekstrelerinin sahip olduğu antioksidan aktivitenin lipopolisakkarid ile uyarılmış BV-2 mikroglial hücrelerde nöroinflamatuvar süreçlerin iyileştirilmesinde kritik bir rol oynayabileceği kanısına varılmış, nörodejeneratif ve oksidatif strese bağlı hastalıkların tedavisi ve önlenmesinde bu bitkinin faydalı olabileceği ileri sürülmüştür.

Akthar *et al.* (2016), bazı *I. helenium* taksonlarının (*I. helenium* ssp. *orygalis*, *I. helenium* ssp. *pseudohelenium*, *I. helenium* ssp. *Turcarasemosa*, *I. helenium* ssp. *vanensis*) toprak üstü kısımlarından elde ettikleri sulu, etanol, metanol ve etil asetat ekstrelerinin antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini incelemişlerdir. Ekstrelerin β-karoten oksidasyonunu azaltmada önemli ölçüde etkili olduğu ve en yüksek radikal temizleme aktivitesinin *I. helenium* ssp. *orygalis*'nin metanol ekstresinde görüldüğü ortaya çıkmıştır. Dahası test edilen *I. helenium* taksonlarının önemli antibakteriyel aktivite gösterdiği de tespit edilmiştir.

Jiang *et al.* (2016), alantolaktonun HeLa (insan rahim kanseri) hücrelerinin apoptozunu indükleyebilme potansiyelini araştırmış ve potansiyel etki mekanizmalarını analiz etmişlerdir. 12 saat süreyle farklı dozlarda (0, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 µM) alantolakton ile muamele edilen HeLa hücrelerinin büyümelerinin doza bağlı olarak önemli ölçüde inhibe edildiği gözlemlenmiştir. HeLa hücrelerinin 0, 3, 6 ve 12 saat boyunca 30 µM alantolakton ile muamele edilmesiyle ROT oluşumunun belirgin şekilde indüklendiği ve HeLa hücrelerinde glutatyon (GSH) üretiminin doza bağlı olarak inhibe edildiği bulunmuştur. Alantolaktonun ayrıca HeLa hücrelerinde Bcl-2/Bax sinyal yolağını ciddi ölçüde inhibe ettiği, bu nedenle de alantolakton tedavisinin insan rahim kanseri hücrelerinin apoptozunu ROS oluşumu, GSH tükenmesi ve Bcl-2/Bax sinyal yolağının inhibisyonu aracılığıyla indüklediği ortaya çıkmıştır.

Zhou *et al.* (2016), geleneksel Çin tıbbında kullanılan bazı bitkilerin kronik akciğer hastalığı üzerindeki potansiyel terapötik etkisini inflamasyon ve oksidatif stres inhibisyonu bakımından değerlendirmişlerdir. Çalışılan bitkiler arasında *I. helenium* kökünün 24 saatlik süreyle Hepa 1c1c7 (Fare Hepatoma) hücrelerinde kuinon oksidoredüktaz (QR) indükleyici etkisinin ve RAW 264.7 (Fare makrofaj hücre hattı) hücre kültüründe de nitrik oksit (NO) inhibitör aktivitesinin olduğu rapor edilmiştir.

Sowndhararajan *et al.* (2016), *I. helenium* kökünden elde edilen esansiyel yağın solunum yoluyla alınmasının insan beyninde elektroensefalografik aktivitesine olan etkisini araştırmışlardır. Söz konusu yağın kokusunu soluma esnasında uyanıklığı ve konsantrasyon aktivitesini artırarak beyin fonksiyonlarını etkilediği ve psikofizyolojik hastalıkların tedavisinde aromaterapötik ajan olarak kullanılabileceği önerilmiştir.

Gao *et al.* (2017), *I. helenium* kökünden hazırlanan ve kimyasal içeriği analiz edilen seskiterpen laktonların anti-inflamatuar etkisini hücre ve hayvan modellerinde değerlendirmişlerdir. Bu ekstrelerin NF- κ B ve MAPK yollarının aktivasyonunu engelleyebildiği ve aktive edilmiş RAW 264.7 makrofajlar ve sinovyal fibroblastlardaki inflammatuar gen ifadelerini baskılayabildiği bulunmuştur. Daha da önemlisi ekstrelerin oral muamelesiyle, hem adjuvan hem de kollajenle teşvik edilmiş artritli sıçan modellerinde artrit şiddeti ve şişkinliği hafiflettiği ortaya konmuş ve romatoid artrit tedavisi ve önlenmesinde ekstrelerinin potansiyelinin olduğu kanısına varılmıştır.

Kim *et al.* (2017), *I. helenium* kökünden izole ettikleri alantolaktonun *in vitro* 3T3-L1 adiposit ve adiposit-makrofaj ko-kültür sistemi (3T3-L1-RAW 264.7) üzerinde iltihaplanma, yağ birikimi ve palmitata bağlı glukoz intoleransını azaltmadaki potansiyelini değerlendirmişlerdir. Palmitatın, glikoz alımını ve artmış yağ birikimini azalttığı ve bunun da, yetersiz lipid depolayan disfonksiyonel adipositlerin bir ifadesi olduğu belirtilmiştir. Diğer taraftan alantolakton uygulamasının bu değişiklikleri doza bağlı bir şekilde tersine çevirdiği tespit edilmiştir. Alantolakton tedavisinin c-Jun N-terminal kinaz ile ilişkili olan mitojenle aktive edilmiş protein kinaz yolağını seçici olarak düşürdüğü (hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinaz fosforilasyonu ve JNK), bununla

birlikte adipositlerdeki NF- κ B yolunu etkilemediği ortaya konmuştur. Buna ek olarak, Alantolaktonun toll benzeri reseptör-4 (TLR4) ve JNK yükseltici faktörün gen ekspresyonunun azalttığı ve alantolaktonun hem adiposit hem de adipositmekrofaj sistemindeki IL-6 ve MCP-1 mRNA düzeyleriyle ilişkili inflamasyonu azalttığı rapor edilmiştir. Palmitat uygulamasının adiposit disfonksiyonu ve makrofaj infiltrasyonuna neden olduğu ancak alantolakton tedavisiyle palmitata bağlı glukoz intoleransı ve iltihabın düzenlendiği ileri sürülmüştür. Alantolaktonun hedef dokularında obeziteye bağlı insülin direncini inhibe edebileceği ve glikoz homeostazını ve inflamasyonu iyileştirebileceği önerilmiştir.

Mazzio *et al.* (2017), çalışmalarında 1400'den fazla doğal bitkinin lipopolisakkarid (LPS)/Interferon gama (IFN γ) ile aktive edilmiş C6 glioma hücreleri üzerindeki anti-enflamatuar etkilerini high-through put (HTP) ile taramışlardır. *I. helenium* kökünün ve bu bitkilerin çok az bir kısmının etanol ekstraktlarının (230 ug/ml) iNOS üretimini azalttığı ve CINC-3 (cytokine-induced neutrophil chemo –attractant) salımını zayıflattığı rapor edilmiştir. Bu bitkilerin nörodejeneratif hastalıkları ve agresif glioma tümörü büyümesi ile ilişkili inflamator süreçlerini önleyebileceğini belirtmişlerdir.

Orhan *et al.* (2017), *I. helenium*, *I. montbretiana*, *I. peacockiana*, *I. thapsoides* ve *I. viscosa* türlerinin antidiyabetik ve antioksidan aktivitelerini *in vitro* olarak incelemişlerdir. Söz konusu bitkilerin kök, yaprak ve çiçek kısımlarının sulu, metanol ve etil asetat ekstraktları değerlendirildiğinde metanol ekstraktlarının diğerlerine göre daha yüksek α -glukozidaz inhibitör aktivite gösterdiği ve bu bitkilerin içinde de *I. helenium* kökünün en yüksek aktiviteye sahip olduğu kaydedilmiştir. *Inula* türlerinin antidiyabetik ve antioksidan aktivitelerinden dolayı diyabetik hastalarca potansiyel olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Seo *et al.* (2017), *I. helenium*' dan izole ettikleri alantolakton ve izoalantolaktonun A β 25–35- ile teşvik edilmiş fare kortikal nöron hücrelerindeki ve skopolamin ile teşvik edilmiş amnezi (hafıza kaybı) farelerindeki etkilerini araştırmışlar. Her iki bileşiğin fare serebral korteksinden türevlenen köken alan nöronlardaki A β 25–35 (10 μ M) in

sitotoksitesini etkili bir şekilde hafiflettiği ve ROS'un üretimini inhibe ettiği ortaya çıkmıştır. Ayrıca bu seskiterpenlerin skopolamin ile teşvik edilmiş cognitive impairments (kavramsal bozukluk) u tersine çevirdiği ve asetilkolinesteraz aktivitesini düşürdüğü belirtilmiştir. ROS ile ilişkili nörodejeneratif hastalıkların potansiyel terapötik ajanı olabileceği öne sürülmüştür.



3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Hücre Kültürleri

Bu çalışmada dondurulmuş sağlıklı primer sıçan serebral korteks (PSSK) ve U-87 MG glioblastoma hücre hattı, Atatürk Üniversitesi Farmakoloji bölümünden temin edilmiştir.

3.2. Bitki Ekstresi

I. helenium bitkisi EGE LOKMAN BİTKİ BOTANİK San. Tic. Ltd. Şti. firmasından satın alınmıştır. 0,6 g kurutulmuş bitki örneği 100 ml distile suda başlangıç sıcaklığı 98°C olacak şekilde 15 dakika süreyle tutuldu. Daha sonra ekstre Whatmann No.1 filtre kağıdı ile süzüldü ve süzüntü soğumaya bırakıldı. Elde edilen *I. helenium* sulu ekstresinin dozları, yapılan ön denemelerden elde edilen sonuçlar ve mevcut literatür bilgileri doğrultusunda tespit edildi. Sulu ekstre, 0, 30, 60, 125, 250 ve 500 mg/L olmak üzere farklı konsantrasyonlarda seyreltilerek kültürlerle uygulandı (Matić *et al.* 2013).

3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue-M5655) ve DMSO (Dimetilsülfoksit-D2650) Sigma® firmasından, LDH kiti Cayman Chemical Company'den, Mouse APE (APEX1-ab207616) kiti Abcam'den, 8-OHdG immüno boyaması (ab62623) Abcam'den; TAS ve TOS kitleri Rel Assay Diagnostics® firmasından temin edilmiştir.

3.4. Kullanılan Laboratuvar Gereçleri ve Cihazlar

Araştırmalar esnasında kullanılan aletlere ve cihazlara ait bilgiler Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırmalar esnasında kullanılan aletler ve cihazlar

Alet ve cihazlar	Temin edildikleri firmalar
Cam malzemeler	Isolab
Distile su cihazı	Easypure RF compact ultarpure ws, USA
Etüv	Heraeus FB 420, Germany
Hassas terazi	Sartorius AG, Germany
Hücre kültür flaskı / 25 cm ² , 75 cm ²	Sigma
Hücre kültür tüpü / 12 mL	Grenier Bio-One
Karbondioksitli inkübatör / Su yelekli	Napco
Laboratuvar standı / 3 ayaklı	Labor-teknik
Manyetik karıştırıcı	Boeco
Mikropipet / 0,1-2,5 µL, 0,5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL, 500-5000 µL	Eppendorf
Mikroplaka / 96 kuyucuklu	Costar
Mikroskop	Leika DFC450C, CH-9435
NMR spektrometre	Varian
Otomotik pipet	Finpipette Labsystems, Finland
pH metre	Handylab - 2BNC
Spektrofotometre	Beckman DU 500, USA
Santrifüj	Heraeus 4600, Germany
Su banyosu	Nüve
Ultraviyole (UV) lambası / 254-366 nm	Mineralight
Vorteks	IKA

3.5. Sitotoksisite Testleri

3.5.1. MTT testi

İlk olarak Mosmann (1983) tarafından tanımlanan ve daha sonra Alley *et al.* (1988), tarafından geliştirilen 3-(4,5 dimetylthiazol -2 -yl) – 2,5 diphenltetrazolium bromide (MTT) hücre canlılığının belirlenmesi için sıkça kullanılan bir yöntemdir. Hücre canlılığını ve üremesini ölçen bu yöntemin, diğer sitotoksik test yöntemlerine göre daha hassas ve tekrarlanabilir olması, uygulamasının kolay ve hızlı olması avantaj olarak

belirtilmiştir. Bu avantajlarının yanısıra MTT test yöntemi radyoaktif izotop kullanımında gerektirmemektedir. Wilson *et al.* (1990) MTT'den üreyen formazonun yoğunluğunun direkt olarak yaşayan hücrelerin sayısı ile bağlantılı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu yöntemi, kanserli hastaların tedavisinde kullanılan ilaçlar üzerinde deneyerek elde ettikleri klinik sonuçların, MTT sonuçlarıyla paralel olduğunu belirtmişlerdir. MTT, hücrelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondriye bağlı reaksiyonla renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenmeyen bir maddedir. Hücrelerin MTT indirgenme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınmaktadır. MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile korelasyon göstermektedir. MTT, sarı renkli olup hücrelere aktif olarak absorbe olur ve mitokondrial redüktaz enzimiyle suda çözünmeyen mor renkli formazana indirgenir. Oluşan bu renkli çözeltinin miktarı 500-600 nm dalga boylarında ölçüm yapılarak hesaplanır. Bu olay sadece canlı hücrelerde gerçekleşebildiği için bu test, hücre canlılığının ölçütü olarak alınır. Bu nedenle çalışmada *I. helenium* sulu ekstresinin farklı dozlarda (30, 60, 125, 250 ve 500 mg/L) sıçan nöron hücreleri ile U-87 MG hücrelerinin canlılıkları üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla MTT testi uygulandı. Bitki ekstresleriyle muamele edilmemiş hücreler, negatif kontrol; %1 'lik Triton-X kullanılan hücreler pozitif kontrol olarak değerlendirildi.

Test uygulaması ile ilgili olarak aşağıdaki işlemler yapıldı;

Krayo falkonlarda gelen hücreler, seri şekilde normal oda sıcaklığında çözündürüldü. Sıvı hale gelen hücre ve medyum 2 cc yeni medyumla karıştırılarak 1200 rpm +4 dereceli santrifüjde 5 dakika boyunca santrifüjlendi. Dibe çöken hücrelerin üstü atılarak yeni medyum ile (NBM, 1/10 FBS, 1/50 B27, 1/1000 antibiyotik) karıştırıldı ve 96 well platlere ekildi. Her 3 günde bir medyum ½ oranında yeni medyum ile değiştirildi. Hücreler 10. Günün sonunda yeterli şekilde dallandıktan sonra deneye alındı.

- Kuyucuk başına 5000/100 mikrolitre hücre olacak şekilde 96 kuyulu plakalara hem U-87 MG glioblastoma hücre hattından hem de sıçan nöron hücre kültüründen ekim yapıldı.

- Hücrelerin tutunması için plakalar, gece boyunca 37°C sıcaklıkta, %95 nemde ve %5 CO₂ şartlarında inkübatörde bekletildi. Daha sonra hücreler farklı dozlarda *I. helenium* sulu ekstraktları ile 48 saat muamele edildi.
- MTT solusyonu final konsantrasyon 5 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Bunun için 50 mg MTT tartıldı ve 5 ml PBS ile çözüldü (10 mg/ml). Sonra 5 ml PBS eklenerek en son konsantrasyon (5 mg/ml) elde edildi.
- İnkübasyon sonunda, kuyulara 20 µl MTT eklendi.
- Plakalar 37°C'de karanlıkta 4 saat inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda MTT ile muamele edilmiş tüm kuyulara 100 µl DMSO eklendi ve 570 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

Hücrelerin canlılık oranı aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$\text{Hücre Canlılığı (\%)} = (\text{Örnek Absorbansı} / \text{Kontrol Absorbansı}) \times 100$$

3.5.2. LDH testi

Laktat dehidrogenaz (LDH) tüm hücrelerde bulunan sabit sitoplazmik bir enzimdir ve NAD⁺'nın indirgenme reaksiyonlarında görev almaktadır. Hücre plazma membranı hasar gördüğünde veya sitolizis durumunda hücre kültürü süpernatantına salınmaktadır. Salınan sitoplazmik enzim aktivitesinin kolorimetrik ölçümü yapılarak sonuçların değerlendirilmesiyle sitotoksosite belirlenmektedir (Weyermann 2005; Bopp and Lettieri 2008; Moharamzadeh 2009). Bu nedenle *I. helenium* sulu ekstresinin farklı dozlarda, sıçan nöron hücreleri ile U-87 MG hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini ortaya koymak amacıyla, LDH salınım seviyeleri ticari LDH sitotoksosite kiti kullanılarak ölçüldü. Kite LDH ölçümünün ilk aşamasında, laktatın piruvata oksidasyonu esnasında LDH, NAD⁺'ın NADH ve H⁺'a indirgenmesini katalizlemektedir. Kitin ikinci aşamasında ise yeni oluşan NADH ve H⁺, LDH diaforaz tarafından renkli formazan bileşiği olan tetrazolium tuzunun indirgenmesini sağlamak amacıyla kullanılır. Meydana gelen bu bileşiğin miktarı, salınan LDH miktarı ile doğru orantılıdır.

LDH analizi için aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. Deney Tamponunun Hazırlanması: deney tampon tableti 100 mL distile suda çözülerek deney tampon çözeltisi hazırlandı.
2. LDH Diaforazın Hazırlanması: 96'lık plaka için LDH diaforaz, deney tampon çözeltisinin 150 μ L'sinde sulandırılarak hazırlandı.
3. LDH Reaksiyon Çözeltisinin Hazırlanması: 10 mL reaksiyon çözeltisi hazırlamak için 9,6 mL deney tampon çözeltisi içerisine 100'er μ L NAD^+ , laktik asit, INT ve LDH diaforaz eklenerek LDH reaksiyon çözeltisi elde edildi.

LDH Standardının Hazırlanması:

- Kit içerisinde bulunan standart, 1,8 mL deney tamponunda çözündürüldü.
- Altı adet deney tüpü hazırlanarak, ilgili hücre kültürü için önceden hazırlanmış taze medyumdan 475 μ L alınarak birinci tüpün içerisine, 250'şer μ L alınarak 2-6 numaralı tüplerin içerisine konuldu.
- 1. basamakta hazırlanan standarttan 25 μ L alınarak tüp 1'e eklendi ve karıştırıldı. Bu tüpte meydana gelen konsantrasyon " μ U/mL" cinsinden elde edildi.
- 250'şer μ L çözelti tüp 1'den alınıp tüp 2'ye, tüp 2'den tüp 3'e eklendi ve bu şekilde tüp 5'e kadar seri seyreltme işlemleri yapıldı. Tüp 6, kör olarak kullanılacağı için herhangi bir standart eklenmedi.

LDH Testi Uygulanması;

- 96'lık plaka kuyucuklarından ilgili olanların içerisine yukarıda bahsedildiği gibi oluşturulan LDH standardından 100'er μ L ve diğer kuyucuklara 48 saatlik inkübasyona bırakılan hücrelerin üzerindeki medyumlardan yine 100'er μ L konuldu.
- Her kuyucuğa önceden oluşturulan LDH reaksiyon çözeltisinden 100 μ L eklendi.

- Plaka, orbital çalkalayıcı aracılığı ile 30 dakika oda sıcaklığında hafif bir şekilde inkübe edildi.
- 490 nm dalga boyunda spektrofotometrik okuma gerçekleştirildi.
- Standart konsantrasyon-absorbans grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak her kuyucukta bulunan LDH konsantrasyonu hesaplandı.

3.6. Biyokimyasal Analizler

TAK ve TOD oksidatif stresin bir indikatörü olarak kullanılmakta olup *in vitro* veya *in vivo* şartlarda oksidanların çeşitli dokular üzerine olan direncini ortaya koymaktadır (Urso and Clarkson 2003; Maxwell *et al.* 2006). Son zamanlarda *in vitro* şartlarda yapılan pek çok araştırmada oksidatif strese karşı antioksidan sistemlerce oluşturulan toplam cevabı ve oksidatif hasarları belirlemek için çeşitli TAK ve TOD tespit yöntemleri kullanılmıştır (Lotito and Frei 2004; Bedaiwy *et al.* 2006). *I. helenium* sulu ekstresinin doza bağlı olarak 48 saatlik *in vitro* U-87 MG ve sağlıklı kültürleri üzerine biyokimyasal etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla toplam antioksidan kapasitesi (TAK) ve toplam oksidatif durum (TOD) ölçüldü.

3.6.1. Toplam antioksidan kapasite (TAK)

TAK düzeylerinin tespitinde Rel Assay Diagnostics® firması tarafından üretilen TAS (total antioxidant status) ticari kitleri kullanıldı (Erel 2004).

Kit Bileşenleri;

- Reaktif 1 Solüsyonu: 50 ml
- Reaktif 2 Solüsyonu: 10 ml
- Standard 1 Solüsyonu: 10 ml
- Standard 2 Solüsyonu: 10 ml

30 µl plazma örneğinin bulunduğu kuvartz küvete 500 µl Reaktif 1 solüsyonundan ilave edilerek 660 nm’de ilk absorbansı okundu. Daha sonra aynı küvete 75 µl Reaktif 2 solüsyonundan eklenerek oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. Bekleme sonunda 660 nm’de ikinci kez absorbansı okundu. Elde edilen absorbans değerleri ve aşağıdaki formül kullanılarak TAK düzeyleri mmol Trolox Equiv./L cinsinden tespit edildi.

$$\text{TAK (mmol Trolox Equiv./L)} = [(\Delta\text{Standart 1'in değeri}) - (\Delta\text{Örneğin değeri})] / [(\Delta\text{Standart 1'in değeri}) - (\Delta\text{Standart 2'nin absorbansı})] \times 20$$

3.6.2. Toplam oksidan durum (TOD)

TOD (total oksidan durum), tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir. İncelenen numunede bulunan oksidanlar ferroz iyon-o-dianisidin yapısını ferik iyon oksitler. Bu reaksiyonu ortamda bulunan gliserol yaklaşık üç kat hızlandırmaktadır. Asidik ortamda ferrik iyonlar “xylenol orange” ile renkli bir kompleks meydana getirirler. Numunede bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülerek değerlendirme yapılır. Araştırmamızda Rel Assay Diagnostics® firması tarafından üretilen TOS (total oxidant status) ticari kitleri kullanıldı.

Kit Bileşenleri;

- Reaktif 1 Solüsyonu: 50 ml
- Reaktif 2 Solüsyonu: 10 ml
- Standard 1 Solüsyonu: 10 ml
- Standard 2 Solüsyonu: 10 ml

75 µl plazma örneğinin bulunduğu kuvartz küvete 500 µl Reaktif 1 solüsyonundan ilave edilerek 530 nm’de ilk absorbansı okundu. Daha sonra aynı küvete 25 µl Reaktif 2 solüsyonundan eklenerek oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. Bekleme sonunda 530

nm'de ikinci kez absorbansı okundu. Elde edilen absorbans değerleri ve aşağıdaki formül kullanılarak mmol TOD düzeyleri Trolox Equiv./L cinsinden tespit edildi.

$$\text{TOD } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}) = (\Delta\text{Örneğin değeri}/\Delta\text{Standart 2'nin değeri}) \times (\text{Standart 2 değeri})$$

3.7. Oksidatif DNA Hasar Analizi

3.7.1. APEX1 seviyesi

APEX1, DNA ve RNA'ya bağlanan ve oksidatif strese verilen hücresel tepkide merkezi bir rol oynayan çok işlevli bir proteindir. APEX1'in en önemli iki fonksiyonundan biri DNA onarımı ve diğeri de transkripsiyon faktörlerinin redoks düzenlemesidir. APEX1, oksidatif ve alkile edici ajanlar tarafından indüklenen DNA lezyonlarının DNA tabanlı kesilip çıkarılarak tamir (BER) yolağında apürinik/apirimidinik (AP) endodeoksiribonükleaz olarak işlev görür.

Abcam'in APEX1 *in vitro* SimpleStep ELISA®, Enzim Bağlı Immunosorban deney kiti, hücre kültür süpernatantları, hücre ve doku özütlerinde APEX1 proteininin kantitatif ölçümü için tasarlanmıştır. Çalışmada bu kit APEX1 proteininin miktarındaki değişimlerin belirlenebilmesi amacıyla kullanıldı. Deneye başlamadan önce kullanılacak olan tüm çözeltileri oda sıcaklığına (18-25°C) getirildi. Standart eğrinin çizimi için, seri olarak seyreltilmiş standartlar, kullanımdan hemen önce hazırlandı. Hücre kültürü çözeltilisinin üstünden alınan numuneler için:

- Seyreltme serisi hazırlanırken stok standart çözeltisi kullanılarak 3000, 1500, 750, 375, 187.5, 93.75, 46.88 ve 0 pg/mL lik standartlar hazırlandı.
- Kalıntılardan kurtulmak için hücre kültürü ortamı 2.000 x g'de 10 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatantlar toplandı ve örnekler seyreltme çözeltisi ile seyreltilerek deneye başlandı.

- Tüm standartlar ve kontroller ikiye, örnekler ise en az üçer tekrarlı olacak şekilde hazırlandı. Tüm reaktifler, çalışma standartları ve örnekler prosedürde belirtildiği şekilde kullanıldı.
- Kit ile birlikte gelen 96 lık plaka şeritleri kullanıma hazır halde tedarik edildi ve 96 lık plakanın çerçevesi üzerine kullanılacak miktarda şerit yerleştirildi.
- Tüm kuyucuklara önceden hazırlanan 50 µL örnek veya standartlardan eklendi ve bunların üzerine de 50 µL hazır halde gelen antikor karışımı eklendi. Plaka sıkıca kapatıldı ve 400 rpm'e ayarlanmış bir plaka çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra her bir kuyucuk 3 kere 350 µl, 1X yıkama tamponu ile bağlanmamış her şeyden kurtulmak maksadıyla yıkandı. Son yıkamadan sonra plaka fazla sıvıyı uzaklaştırmak için temiz kağıt havluların üzerine ters çevrildi.
- Her kuyucuğa 100 µl substrat eklendi ve karanlıkta 400 rpm'e ayarlanmış bir plaka çalkalayıcıda 10 dakika inkübe edildi (mavi renk değişiminin bu esnada gözlenmesi gerekir). Sonrasında her bir oyuğa 100 µL durdurma solüsyonu eklendi ve 1 dakika plaka çalkalayıcıda sallanarak karıştırıldı (Bu aşamadan sonra mavi renk sarıya dönüşür). Sinyal, bağlı analitin miktarı ile orantılı üretilerek sinyal yoğunluğu 450 nm'de absorbans ölçülerek kaydedildi.
- Standart eğri kullanılarak, örneklerin miktarı hesaplandı.

3.7.1. 8- OHdG immünohistokimya boyaması

8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) oksidatif stresin derecesini göstermede yaygın olarak kullanılan bir belirteçtir. Cu^{+2} iyonları en çok G-C'ce zengin bölgelerde bulunduğu için pürin ve primidin bazıları içerisinde guanin en fazla oksidasyona maruz kalan bazdır. 8-OHdG, guaninin 8. karbon atomuna hidroksil radikali atakları sonucu oluşur ve DNA oksidasyonunda en fazla miktarda ortaya çıkan oksidatif baz hasar tamir ürünüdür. 8-OHdG içeren DNA, *in vitro* DNA sentezi sırasında kalıbın yanlış okunmasına ve GC—TA mutasyonuna sebep olur (Kasai *et al.* 1997).

8- OHdG immünohistokimya boyaması aşağıdaki işlemler yapıldı;

- Kuyucuklardan mediumlar döküldü ve altta kalan hücreler, alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek deparafinize ve rehidre edilip, %3'lük hidrojen peroksitte 5 dakika tutularak endojen peroksidaz aktivitesi blokladı.
- Formaldehit tespit solüsyonunun proteinler ile kurduğu kovalent bağları parçalamak amacı ile ısı altında sodyum sitrat tamponu ile antijen geri alınımı yapıldı.
- Özgül olmayan antijen antikör reaksiyonlarını engellemek için protein bloklama solüsyonunda 10 dakika tutulan kuyucuklar daha sonra 1 saat primer antikör ile muamele edildi.
- Kuyular biotinize sekonder antikorda 30 dakika ve avidin peroksidaz da 20 dakika inkube edildi.
- Kromojen olarak diaminobenzidin (DAB) veya etilkarbazol (AEC) kullanıldı.
- Gill's hematoxilen ile karşıt boyama yapıldı. Mikroskopta incelenen hücreler, 8-OHdG pozitif hücre sayısına göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

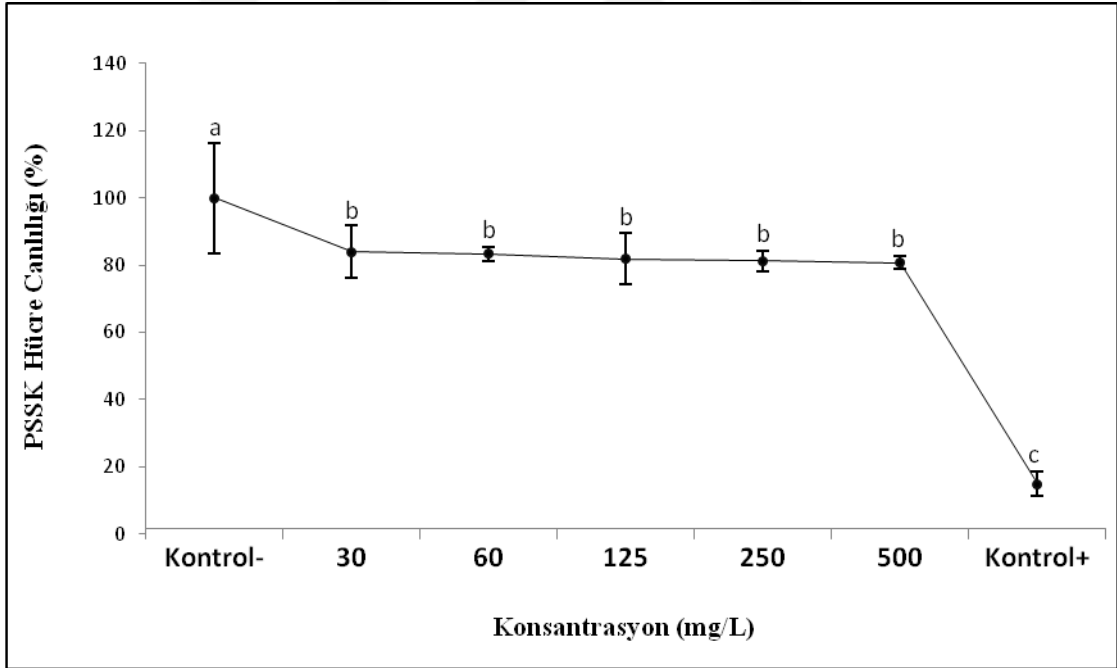
3.8. İstatistiksel Yöntem

Çalışmadan elde edilen bulguların istatistiksel yönden değerlendirilmesinde S.P.S.S 24 programı kullanıldı. Elde edilen test sonuçlarının istatistiksel açıdan anlamlılığı one way Anova testlerinden Duncan testi kullanılarak değerlendirildi. Histopatolojik incelemede semikantitatif olarak elde edilen verilerin gruplar arasındaki farklılıkların analizi için nonparametrik testlerden Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Elde edilen veriler 0,05 anlam seviyesi göz önünde bulundurularak yorumlandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *I. helenium* 'un Hücre Canlılık Oranına Etkisi

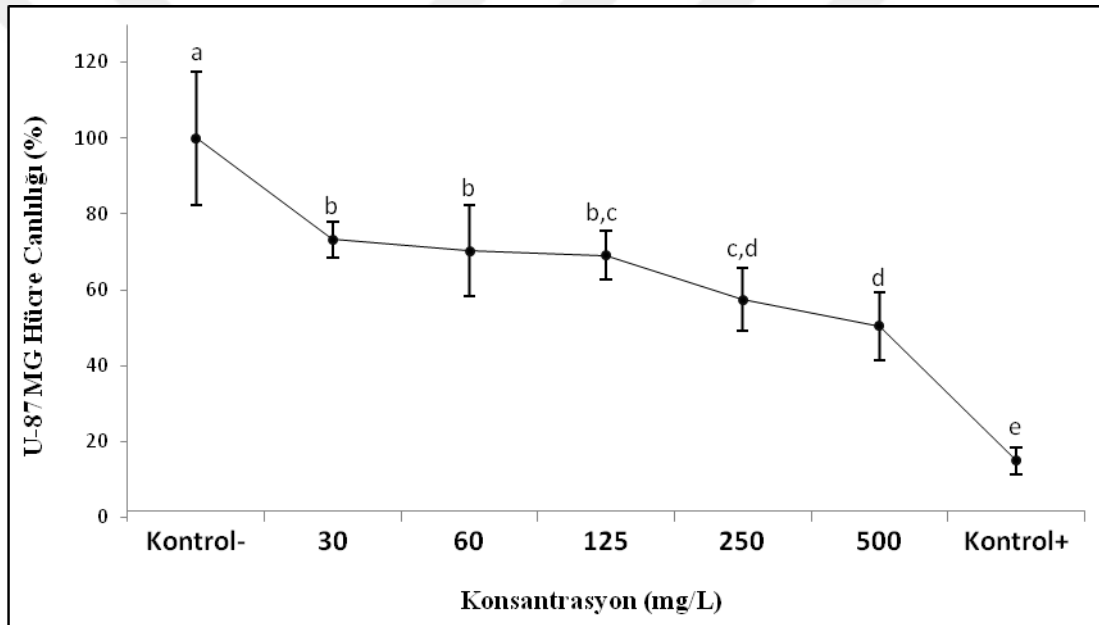
I. helenium'un toprak üstü kısımlarından elde edilen farklı konsantrasyonlardaki sulu ekstraktların muamele edildiği PSSK ve U-87 MG hücrelerinin 48 saat sonraki canlılık oranları MTT analizi kullanılarak tespit edilmiştir. Araştırma sonuçları, *I. helenium*'un çalışılan tüm dozlarda PSSK hücre proliferasyonunu kontrole göre azalttığını göstermiştir. Canlılık oranı bütün konsantrasyonlar için $83,95 \pm 7,75$ ve $80,73 \pm 1,92$ değerleri arasında bulunmuş ve gruplar arasında belirgin bir farklılık olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *I. helenium* ekstraktlarının konsantrasyonlara göre insan PSSK hücreleri üzerinde gözlenen hücre canlılık yüzdeleri

Hücre canlılığı yüzde olarak gösterilmiştir. Muamele edilmemiş hücreler, %100 canlı olarak kabul edilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur. Aynı kolondaki farklı üst indis harfleri, istatistiksel farklılıkları ifade etmektedir ($p < 0.05$, $n=5$). Kontrol⁻: Negatif kontrol; muamele edilmemiş hücreler, Kontrol⁺: Pozitif kontrol; Triton-X.

MTT analiz sonuçlarına göre *I. helenium* sulu ekstralarının konsantrasyonuna bağlı olarak U-87 MG hücrelerinin canlılık oranında belirgin bir düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. En fazla düşüşün 250 ve 500 mg/L konsantrasyonlarında olmak üzere sırasıyla $50,42 \pm 8,87$ ve $57,41 \pm 8,18$ değerlerinde olduğu gözlenmiştir. Sulu ekstraların MTT değerleri 30, 60 ve 125 konsantrasyonlarında sırasıyla $73,20 \pm 4,81$, $70,26 \pm 11,95$ ve $69,09 \pm 6,39$ olarak saptanmıştır. Ekstrelerin yüksek konsantrasyonları (250 ve 500 mg/L), kontrol grubuyla karşılaştırıldığında U-87 MG hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir antiproliferatif etkinin olduğunu ortaya çıkarmıştır (Şekil 4.2).

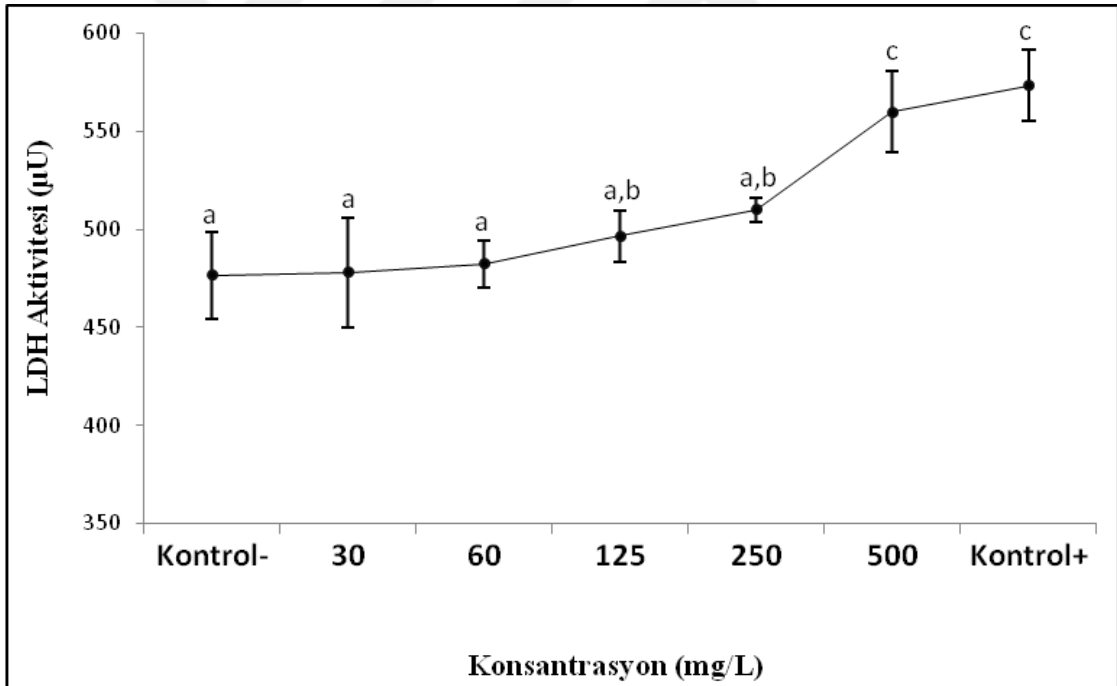


Şekil 4.2. *I. helenium* ekstralarının konsantrasyonlara göre insan U-87 MG hücreleri üzerinde gözlenen hücre canlılık yüzdeleri

Hücre canlılığı yüzde olarak gösterilmiştir. Muamele edilmemiş hücreler, %100 canlı olarak kabul edilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur. Aynı kolondaki farklı üst indis harfleri, istatistiksel farklılıkları ifade etmektedir ($p < 0.05$, $n=5$). Kontrol⁻: Negatif kontrol; muamele edilmemiş hücreler, Kontrol⁺: Pozitif kontrol; Triton-X.

4.2. *I. helenium*’un Hücrelerde LDH Seviyesine Etkisi

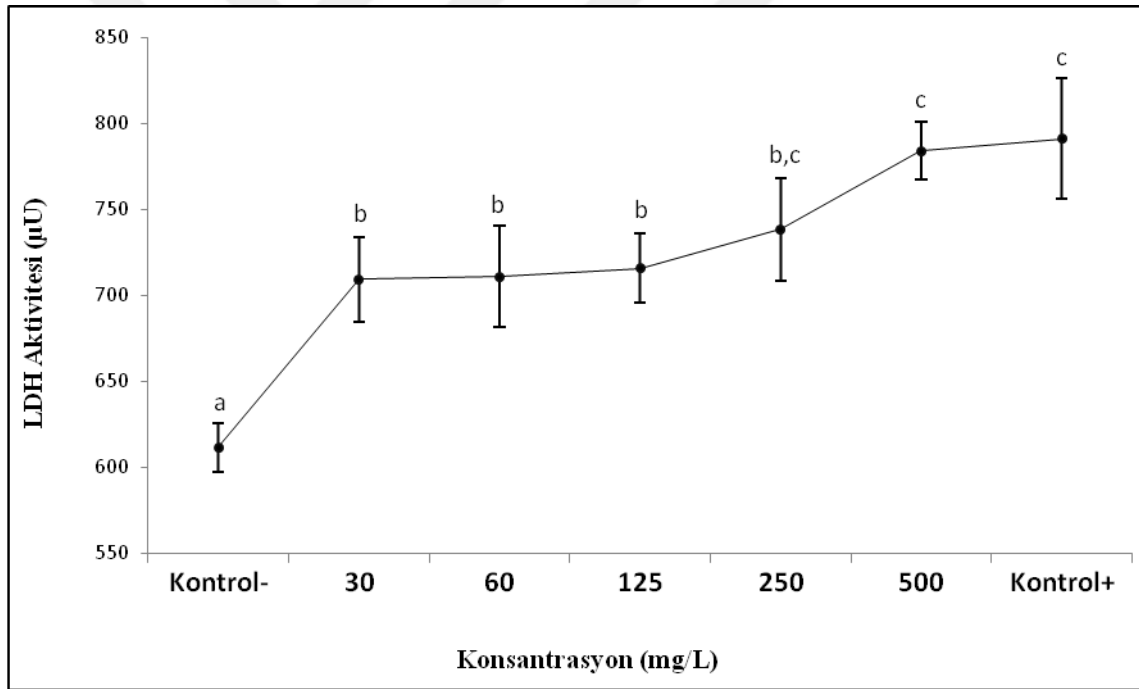
PSSK hücre medyumlarında LDH seviyelerinin *I. helenium*’un sulu ekstresinin farklı konsantrasyonlarıyla 48 saat muamele edilmesi sonucunda anlamı bir şekilde arttığı belirlenmiştir. Şekil 4.3’de görüldüğü gibi ekstrelerin en yüksek konsantrasyonunda (500 mg/L) LDH seviyesinin $560,01 \pm 21,1$ değerlerine yükseldiği ve pozitif kontrol seviyesiyle istatistiksel açıdan benzer olduğu tespit edilmiştir. Sulu ekstrelerin düşük konsantrasyonlarındaki (30, 60, 125, 250 mg/L) LDH seviyesinde sebep olduğu artışın kontrolden anlamlı olarak farklılık göstermediği ortaya çıkmıştır. 500 mg/L konsantrasyonunun kontrol grubuyla karşılaştırıldığında PSSK hücreleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etkisinin olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.3. *I. helenium* ekstrelerinin konsantrasyonlara göre insan PSSK hücreleri üzerinde oluşturduğu LDH seviyeleri

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur. Aynı kolondaki farklı üst indis harfleri, istatistiksel farklılıkları ifade etmektedir ($p < 0.05$, $n=5$). Kontrol⁻: Negatif kontrol; muamele edilmemiş hücreler, Kontrol⁺: Pozitif kontrol; Triton-X.

I. helenium'un sulu ekstresinin farklı konsantrasyonlarıyla 48 saat muamele edilmesi sonucunda U-87 MG hücre medyumlarında LDH seviyelerinin kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir. Şekil 4.4'de görüldüğü gibi çalışılan tüm konsantrasyonlarda, LDH seviyelerinin kontroldeki $611,66 \pm 14,23$ değerinden artarak ekstrenin en yüksek konsantrasyonunda (500 mg/L) $783,88 \pm 16,86$ değerine ulaştığı tespit edilmiştir. Artan dozların (250 ve 500 mg/L) LDH salınımını pozitif kontrolün düzeyi kadar belirgin şekilde artırdığı görülmüştür. LDH seviyelerine bakıldığında, kontrol grubuna kıyasla sulu ekstrelerin 250 mg/L konsantrasyonun PSSK hücrelerinde etkisi az iken U-87 MG hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etkisinin olduğu belirlenmiştir.

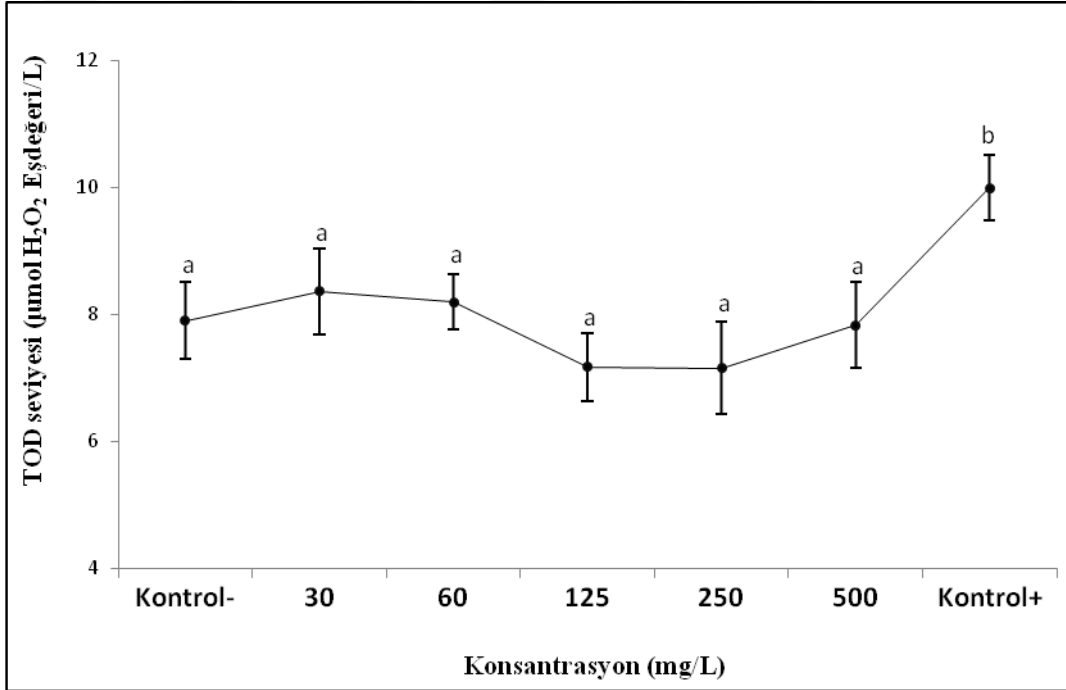


Şekil 4.4. *I. helenium* ekstrlerinin konsantrasyonlara göre insan U-87 MG hücreleri üzerinde oluşturduğu LDH seviyeleri

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur. Aynı kolondaki farklı üst indis harfleri, istatistiksel farklılıkları ifade etmektedir ($p < 0.05$, $n=5$). Kontrol⁻: Negatif kontrol; muamele edilmemiş hücreler, Kontrol⁺: Pozitif kontrol; Triton-X.

4.3. *I. helenium* 'un Oluşturduğu TOD Seviyesi

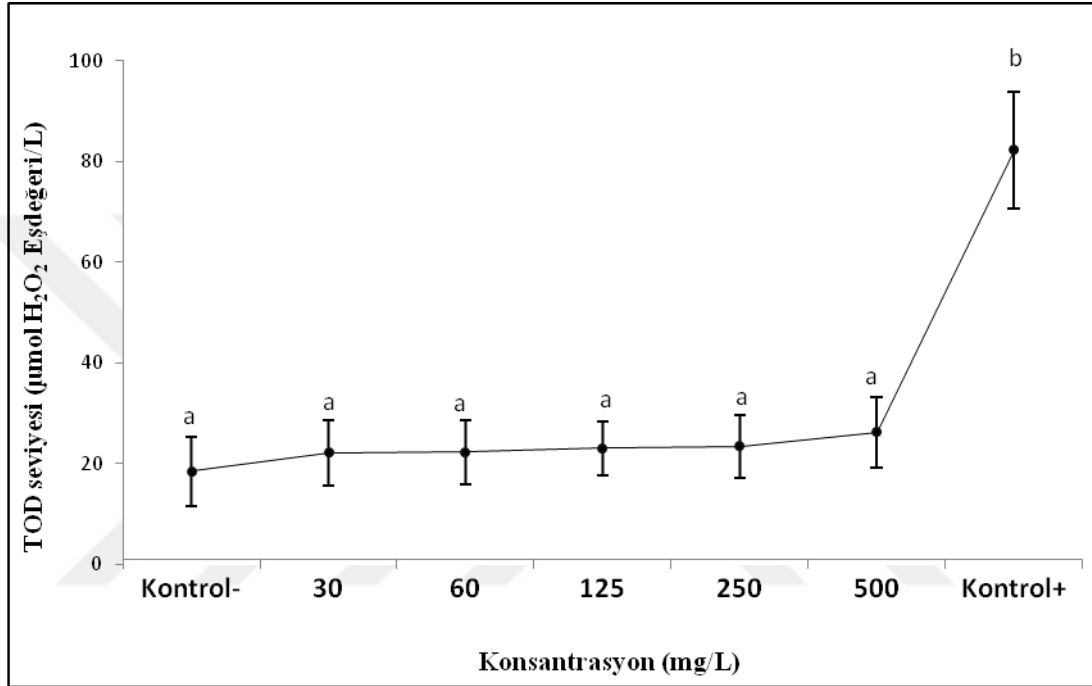
I. helenium sulu ekstrelerinin konsantrasyona bağlı olarak 48 saatlik U-87 MG ve PSSK hücre kültürleri üzerinde oluşturduğu oksidatif stresi belirlemek amacıyla TOD seviyeleri ölçülmüştür. Sulu ekstrelerin çalışılan tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna kıyasla her iki hücre tipi üzerinde TOS düzeyini istatistiksel anlamda belirgin şekilde etkilemediği sonucu ortaya çıkmıştır. *I. helenium* sulu ekstrelerinin PSSK hücre kültürlerinde konsantrasyonlara bağlı olarak ortaya koyduğu TOD değerleri Şekil 4.5’de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. *I. helenium* ekstrelerinin konsantrasyonlara göre insan PSSK hücreleri üzerinde oluşturduğu TOS seviyeleri

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur. Aynı kolondaki farklı üst indis harfleri, istatistiksel farklılıkları ifade etmektedir ($p < 0.05$, $n=5$). Kontrol⁻: Negatif kontrol; muamele edilmemiş hücreler, Kontrol⁺: Pozitif kontrol; Triton-X.

I. helenium sulu ekstralarının U-87 MG hücre kültürlerinde konsantrasyonlara bağlı olarak ortaya koyduğu TOD değerleri Şekil 4.6'de gösterilmiştir. Sulu ekstraların kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, U-87 MG hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir oksidatif stres oluşturmadığı ortaya çıkmıştır.

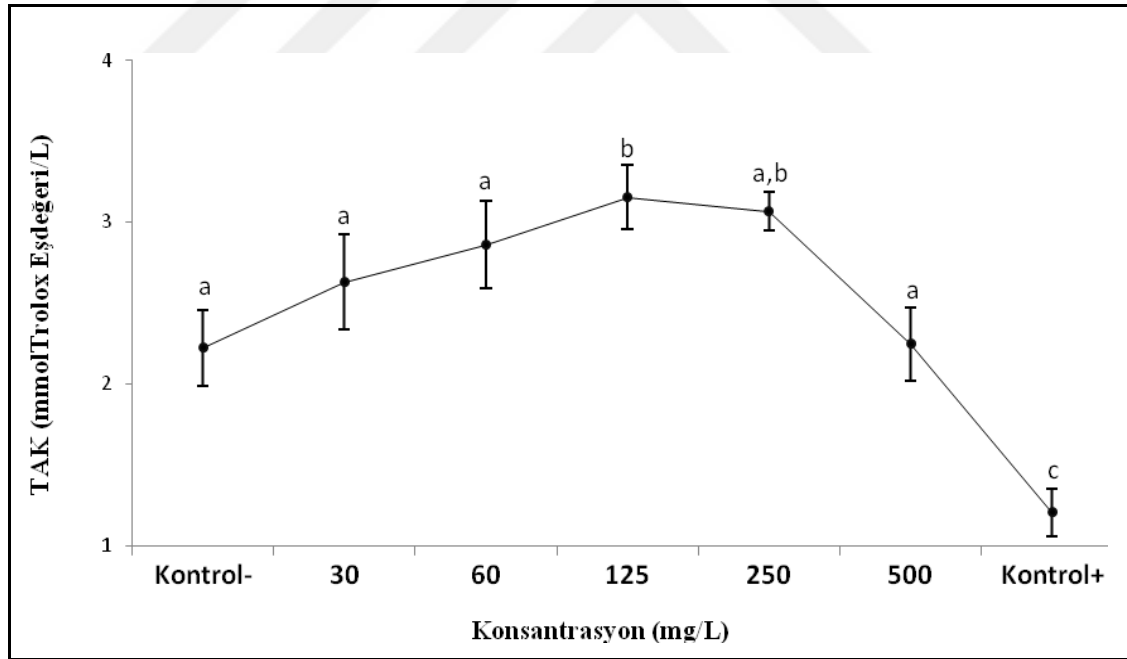


Şekil 4.6. *I. helenium* ekstralarının konsantrasyonlara göre insan U-87 MG hücreleri üzerinde oluşturduğu TOS seviyeleri

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur. Aynı kolondaki farklı üst indis harfleri, istatistiksel farklılıkları ifade etmektedir ($p < 0.05$, $n=5$). Kontrol⁻: Negatif kontrol; muamele edilmemiş hücreler, Kontrol⁺: Pozitif kontrol; Triton-X.

4.4. *I. helenium* 'un Oluşturduğu TAK Seviyesi

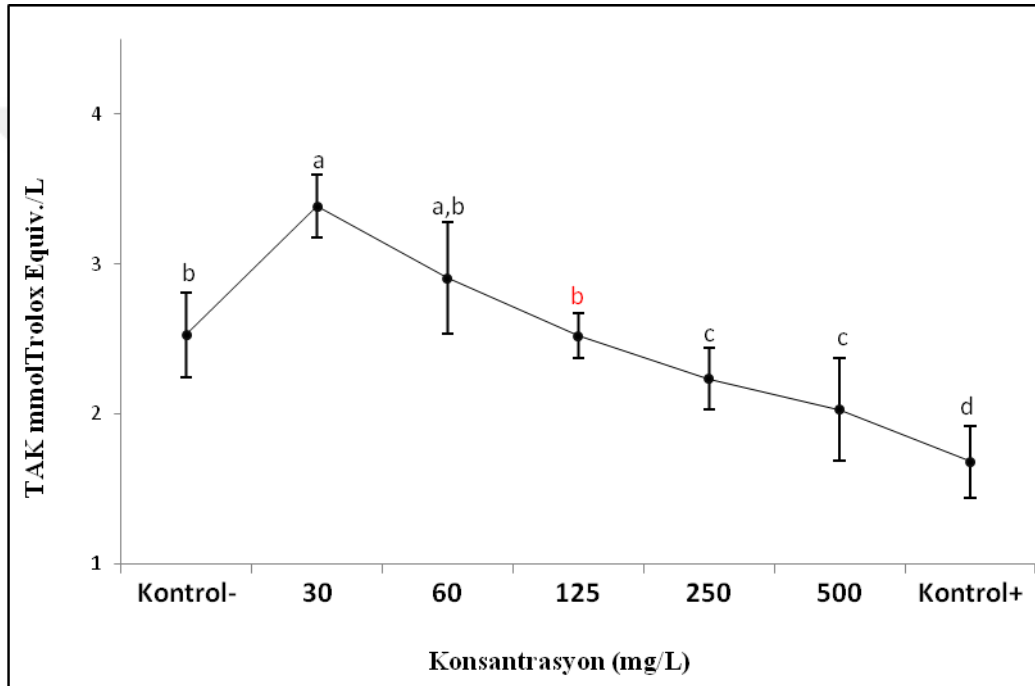
I. helenium sulu ekstrelerinin konsantrasyona bağlı olarak 48 saatlik U-87 MG ve PSSK hücre kültürleri üzerinde oluşturduğu antioksidan kapasiteyi belirlemek amacıyla TAK seviyeleri ölçülmüştür. Şekil 4.7'de görüldüğü gibi sulu ekstrelerin PSSK hücrelerinde kontrolle kıyaslandığında çalışılan düşük konsantrasyonlarında (30 ve 60 mg/L) TAK düzeylerini değiştirmedikleri belirlenmiştir. Sulu ekstrelerin 125 mg/L konsantrasyonunda ise TAK düzeyini $3,15 \pm 0,19$ değeri ile istatistiksel açıdan önemli derecede artırdığı ortaya konmuştur. Diğer taraftan ekstrelerin en yüksek konsantrasyonu olan 500 mg/L'de TAK seviyesini $2,24 \pm 0,22$ değerine istatistiki olarak düşürdüğü tespit edilmiştir. *I. helenium* sulu ekstrelerinin konsantrasyona bağlı olarak PSSK hücreleri üzerinde antioksidan etkisinin olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.7. *I. helenium* ekstrelerinin konsantrasyonlara göre insan PSSK hücreleri üzerinde oluşturduğu TAK seviyeleri

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur. Aynı kolondaki farklı üst indis harfleri, istatistiksel farklılıkları ifade etmektedir ($p < 0.05$, $n=5$). Kontrol⁻: Negatif kontrol; muamele edilmemiş hücreler, Kontrol⁺: Pozitif kontrol; Triton-X.

I. helenium sulu ekstralarının kontrolle kıyaslandığında 30 mg/L konsantrasyonunda U-87 MG hücrelerinde TAK seviyesini ($3,38 \pm 0,21$) istatistiksel olarak yükselttiği ve 60 mg/L konsantrasyonunda ise düşürmeye ($2,90 \pm 0,37$) başladığı tespit edilmiştir. 125, 250, 500 mg/L konsantrasyonlarında ise kontrolle kıyaslandığında konsantrasyona bağlı olarak istatistiksel anlamda belirgin bir şekilde $2,03 \pm 0,34$ değerine kadar TAK seviyesini düşürdüğü ortaya çıkmıştır.

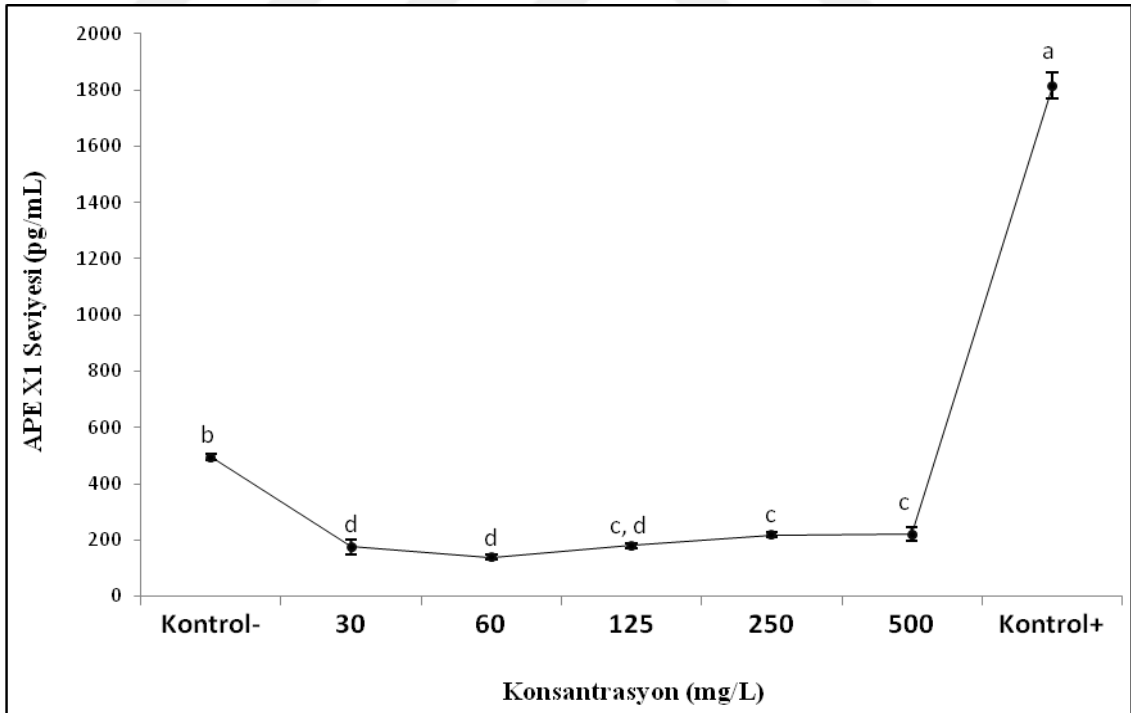


Şekil 4.8. *I. helenium* ekstralarının konsantrasyonlara göre insan U-87 MG hücreleri üzerinde oluşturduğu TAK seviyeleri

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur. Aynı kolondaki farklı üst indis harfleri, istatistiksel farklılıkları ifade etmektedir ($p < 0.05$, $n=5$). Kontrol⁻: Negatif kontrol; muamele edilmemiş hücreler, Kontrol⁺: Pozitif kontrol; Triton-X.

4.5. *I. helenium* 'un Hücrelerde Oluşturduğu APEX1 Seviyesi

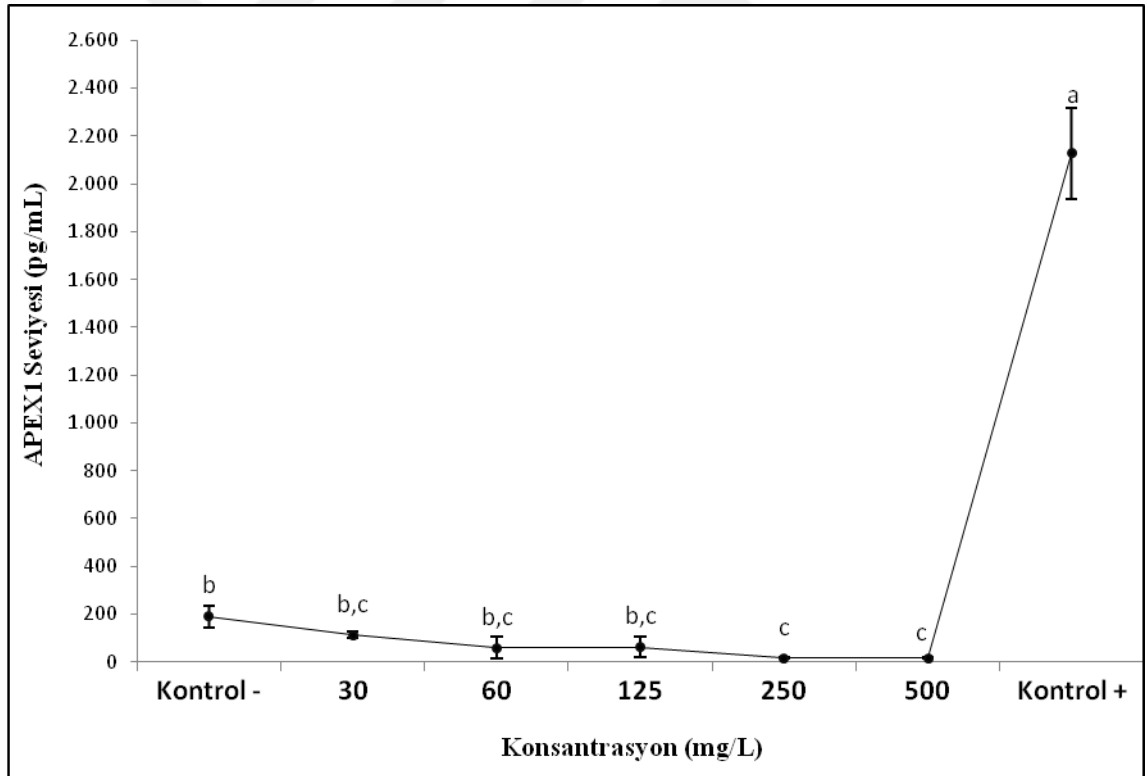
DNA hasarını belirlemek amacıyla kullanılan APEX1 testi sonucu, *I. helenium* sulu ekstralarının uygulanan tüm konsantrasyonlarda, APEX1 seviyelerini kontrolle kıyaslandığında belirgin şekilde azalttığı bulunmuştur. Sulu ekstraların APEX1 seviyesini PSSK hücrelerinde 30 ve 60 mg/L konsantrasyonlarda sırasıyla $175,25 \pm 25,09$ ve $138,58 \pm 8,86$, değerlerine düşürdüğü saptanmıştır. Bununla beraber 125 mg/L konsantrasyonundan başlayarak kullanılan en yüksek konsantrasyona kadar $179,41 \pm 10,10$ değerinden $221,08 \pm 26,02$ değerine kadar APEX1 seviyesinin anlamı bir şekilde arttığı belirlenmiştir. Ancak bu artışın kontrolün sahip olduğu $493,58 \pm 11,34$ değerine kadar ulaşamadığı tespit edilmiştir. Pozitif kontrol olarak değerlendirilen Triton-X seviyesinin, kontrole ve tüm sulu ekstre konsantrasyonlarındaki değerlere göre anormal bir artış sergilediği $1814,41 \pm 45,62$ değeriyle ortaya çıkmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. *I. helenium* ekstralarının konsantrasyonlara göre insan PSSK hücreleri üzerinde oluşturduğu APEX1 seviyeleri

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur. Aynı kolondaki farklı üst indis harfleri, istatistiksel farklılıkları ifade etmektedir ($p < 0.05$, $n=5$). Kontrol⁻: Negatif kontrol; muamele edilmemiş hücreler, Kontrol⁺: Pozitif kontrol; Triton-X.

I. helenium'un sulu ekstresinin farklı konsantrasyonlarıyla muamele edilen U-87 MG hücre medyumlarında belirlenen APEX1 seviyelerindeki değişim Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Sulu ekstrelerin APEX1 düzeylerini kontrolle karşılaştırıldığında konsantrasyona bağlı olarak istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde azalttığı görülmüştür. Sulu ekstrelerin APEX1 seviyesini kontrolde belirlenen $190,25 \pm 44,21$ değerinden kullanılan en yüksek konsantrasyondaki (500 mg/L) $16,91 \pm 1,90$ değerine kadar düşürdüğü saptanmıştır. Pozitif kontrol olarak değerlendirilen Triton-X seviyesinin ise kontrol ve tüm sulu ekstre konsantrasyonlarındaki değerlere göre anormal bir artış sergilediği $2128,41 \pm 190,94$ değeriyle ortaya çıkmıştır. *I. helenium*'un U-87 MG hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde DNA hasarına cevap veremediği ortaya çıkarmıştır.

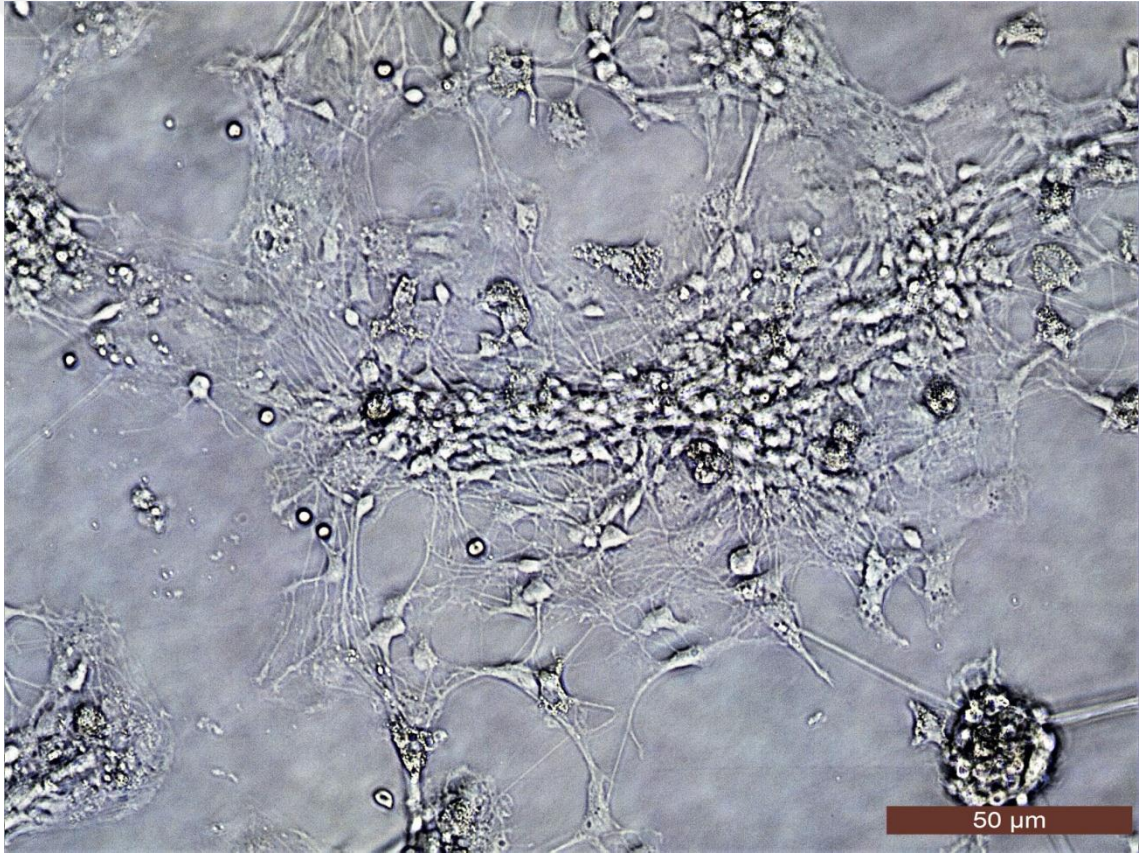


Şekil 4.10. *I. helenium* ekstrelerinin konsantrasyonlara göre insan U-87 MG hücreleri üzerinde oluşturduğu APEX1 seviyeleri

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur. Aynı kolondaki farklı üst indis harfleri, istatistiksel farklılıkları ifade etmektedir ($p < 0.05$, $n=5$). Kontrol⁻: Negatif kontrol; muamele edilmemiş hücreler, Kontrol⁺: Pozitif kontrol; Triton-X).

4.6. *I. helenium* 'un Hücrelerde Oluşturduğu 8-OHdG İmmünoreaktivitesi

Farklı konsantrasyonlarda *I. helenium* sulu ekstralarının 48 saat süre ile muamele edildiği insan PSSSK ve U-87 MG hücre kültürlerinde genotoksisitenin belirlenmesi için 8-OHdG immunohistokimya boyaması kullanılmıştır. Kontrol grubuna ait muamele yapılmamış sağlıklı nöronlarda herhangi bir 8-OHdG oluşumuna rastlanmamıştır (Şekil 4.11). *I. helenium* sulu ekstralarının insan PSSSK hücreleri üzerinde uygulanan tüm konsantrasyonlarının görüntüsü kontrole benzer olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).



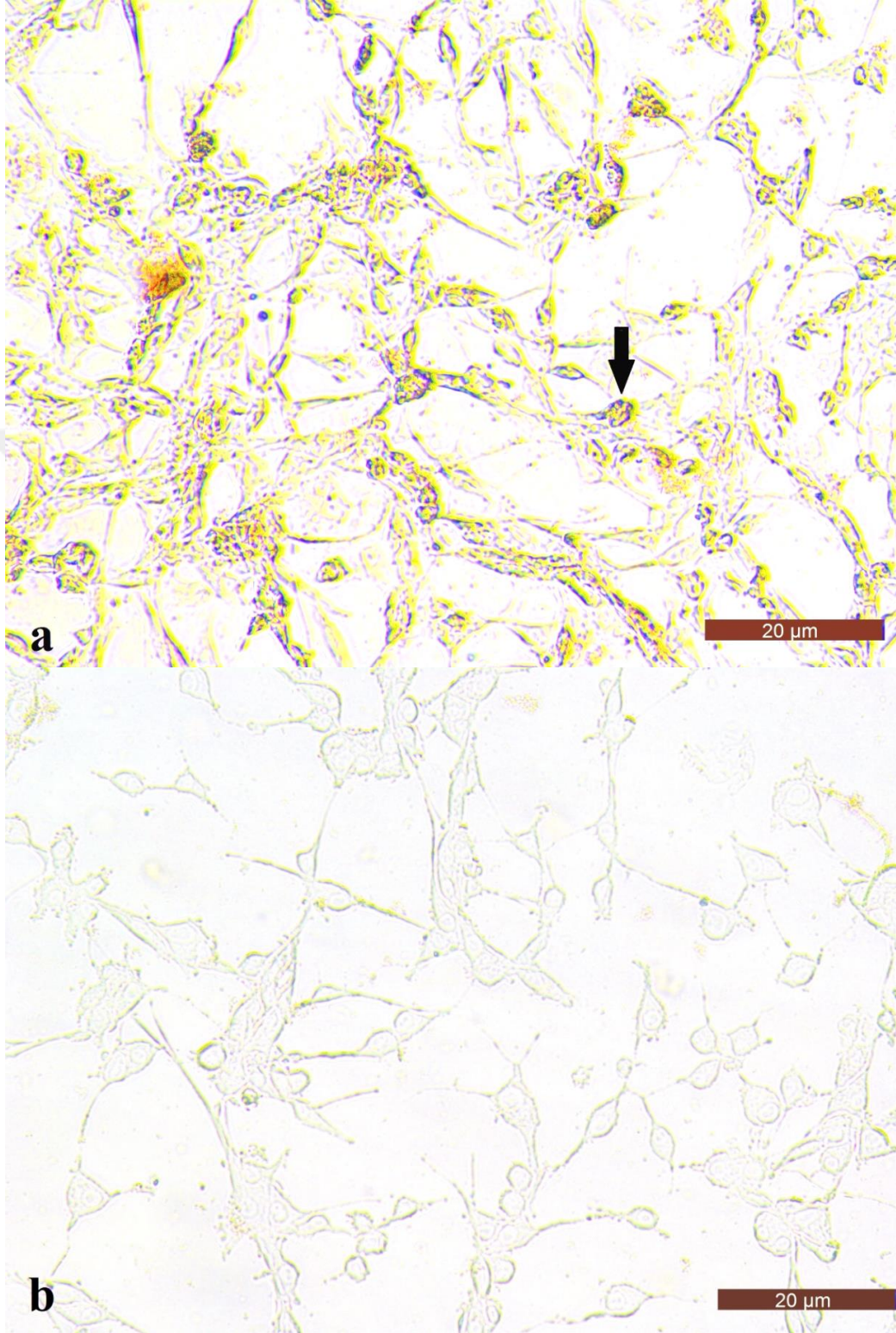
Şekil 1.11. İnsan PSSK hücrelerinin normal görünümü

Elde edilen sonuçlara göre herhangi bir işlem yapılmayan ve negatif kontrol olarak değerlendirilen U-87 MG hücrelerinde 8-OHdG oluşumunun fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 1.12.a). Triton-X'in eklendiği pozitif kontrol olarak değerlendirilen hücrelerde ise 8-OHdG belirtisi olmadığı ve hücrelerin öldüğü gözlenmiştir (Şekil 1.12.b). Sulu ekstrelerinin düşük dozlarının (30, 60, 125 mg/L) U-87 MG hücrelerinde negatif kontrolden farklı olarak herhangi bir değişiklik göstermediği tespit edilmiştir (Şekil 1.13.a). *I. helenium*'un sulu ekstrelerinin 250 ve 500 mg/L konsantrasyonlarında U-87 MG hücreleri üzerinde pozitif kontrole benzer etki gösterdiği ve 8-OHdG immunoreaktivitesinin olmadığı elde edilen görüntülerde ortaya çıkmıştır (Şekil 4.13.b). Çizelge 4.1'de PSSK ve U-87 MG hücre hatlarında 8-OHdG pozitif boyalı hücrelerin sayısına göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak ekstrelerin konsantrasyonları arasındaki farklılık gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Hücre hatlarında 8-OHdG pozitif boyalı hücreler

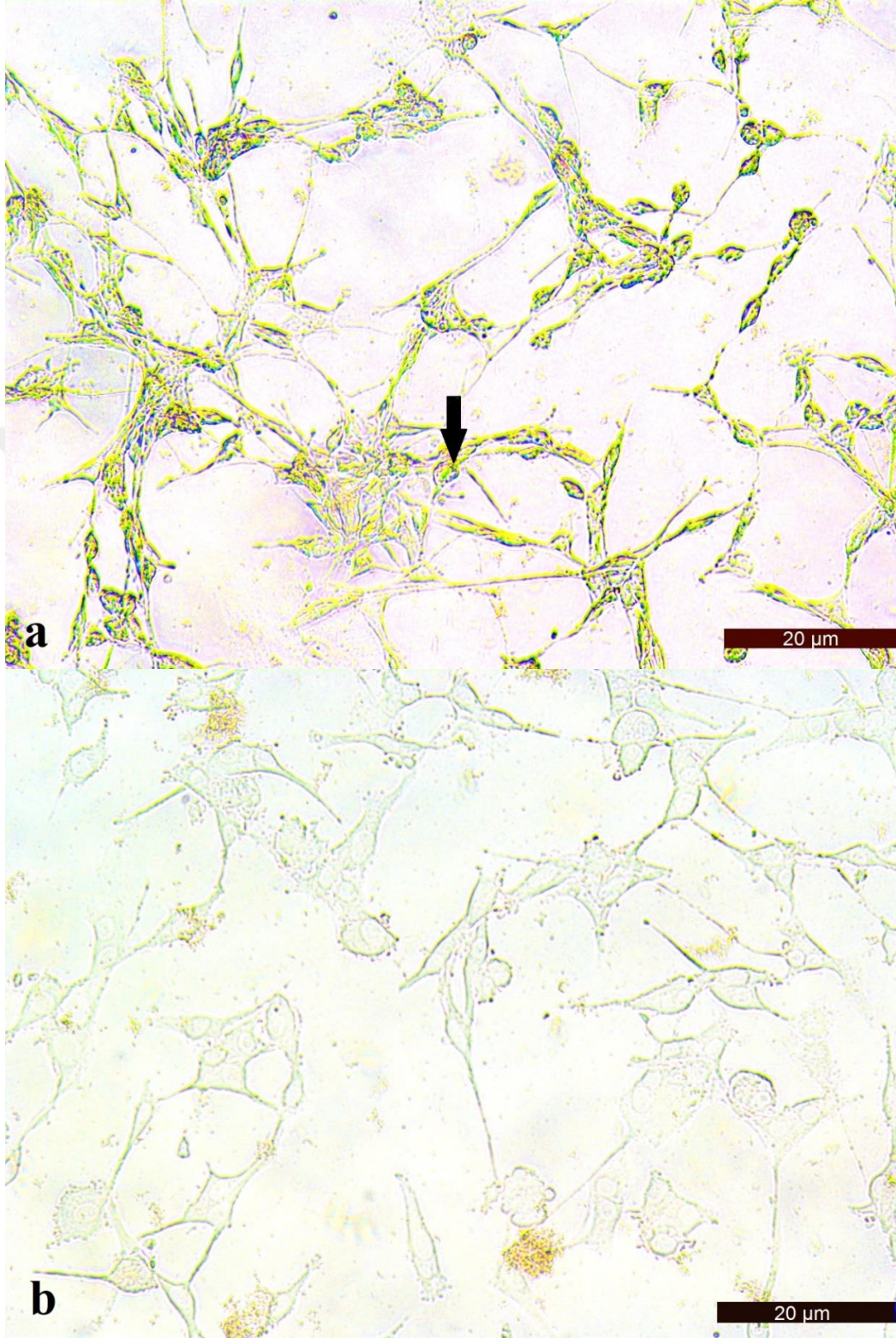
Konsantrasyon	Kontrol-	30 mg/L	60 mg/L	125 mg/L	250 mg/L	500 mg/L	Kontrol+
Hücre hatları							
PSSK	-	-	-	-	-	-	+
U-87 MG	+++	+++	+++	++	-	-	-

Her grup 6 örnek içerir. $P < 0.05$ Kruskal-Wallis test sonuçlarına göre gruplar arasında fark önemlidir.



Şekil 4.12. *I. helenium* ekstrelerinin insan U-87 MG hücrelerinde 8-OHdG immunoreaktivitesi

Sarı-kahverengi olarak görülen kısımlar, 8-OHdG'nin belirdiği bölgelerdir (Siyah ok), (a) Negatif Kontrol: muamele edilmemiş hücreler; (b) Pozitif Kontrol: Triton-X.



Şekil 4.13. *I. helenium* ekstrelerinin insan U-87 MG hücrelerinde 8-OHdG immunoreaktivitesi

Sarı-kahverengi olarak görülen kısımlar, 8-OHdG'nin belirttiği bölgelerdir (Siyah ok), (a) 60 mg/L; (b) 500 mg/L.

5. TARTIŞMA

Modern tıbbın insan hastalıklarına karşı tam tedaviyi sağlayabilecek kapasitede olmayışı ve istenmeyen yan etkilerin kaçınılmaz olması nedeniyle son yıllarda doğal ve bitkisel tedaviye dünya genelinde artan bir ilgi vardır. Dünya Sağlık Örgütüne göre (WHO) gelişmekte olan ülkelerde dünya nüfusunun yaklaşık %65-80'lik kısmında fakirlik ve modern tıbbın olanaklarına ulaşım zorluğu nedeniyle başlıca sağlık hizmeti, alternatif tıp olarak adlandırılan bitkilere dayanmaktadır (Phillipson 2007). Bitki özütlerinin içerdiği aktif bileşikler, binlerce yıldır varlığını koruyan geleneksel tedavi sistemlerinin temelini oluşturmaktadır. Günümüzde kansere karşı yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ve uygulanmasına karşın şu an ki mevcut kanser tedavileri nispeten etkisizdir. Bu yöntemler hem pahalı hem de toksiktir. Sistemik kemoterapi hematolojik, vasküler, nöral, gastrointestinal, renal, pulmonari ve otolojik toksisitelerin bir veya bir kaçına sebep olmakta ve hatta ölümle bile sonuçlanmaktadır. Bu yüzden tümör gelişimini inhibe edecek etkili ve düşük maliyetli yan etkisi az veya olmayan yöntemlere ihtiyaç vardır. Bitkisel ilaçlar her şeyden önce insanın bedeniyle bütünlük sağlayan canlı materyaller olması sebebiyle tercih edilmektedir. Kanser tedavisine yönelik yapılan çalışmalar, genelde bitki özütleri üzerinden ilaç keşiflerine dayanmaktadır ki; son yarım asırdan beri bitkinin sahip olduğu aktif bileşiklerinin türevleri, modern klinik uygulamalarda kansere karşı kullanılmaktadır (Mehta 2010). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, *I. helenium* köklerinin üstün terapötik niteliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu nitelikler; egzama, bakteriyel ve fungal dermatitlerde antiseptik; cilt lekelerinde kaşıntıyı önleme; idrar ve sindirim fonksiyonlarını kolaylaştırma; semptomik öksürük ve bronşit tedavisi; safrakesesi veya karaciğer yetersizliğinin tedavisi; hiperglisemi ve obezite ile mücadelede yardımcı madde olmasıdır (Ghedira *et al.* 2011). Geleneksel tedavide çay formunda tüketilen *I. helenium* bitkisinin, mevcut ticari bitkisel preparatlarda da kullanımı yaygındır (Nikolaev *et al.* 2011). Bu araştırmada ilk defa *I. helenium*'un toprak üstü kısımlarından sulu ekstratlar elde edilmiş ve insan glioma hücre kültürlerine uygulanarak özütün konsantrasyona bağlı antioksidan ve anti-kanserojen etkileri değerlendirilmiştir. Bitki özütünün tedavi

edici etkinliklerini ortaya koyma amacıyla oksidan/antioksidan, genotoksik, sitotoksik ve immünohistokimyasal çalışmalar yapılmıştır.

İnsan sağlığını korumak amacıyla, halk hekimliğinde kullanılan bitki özütleriyle tedavinin öncelikle olumlu ya da olumsuz etkisinin ve güvenilirliğinin canlı hücreler üzerinde değerlendirilmesi gerekmektedir. Bunun da en kısa ve etkili yolu hücre hatlarında çalışmaktır. *In vitro* hücre kültürleri doğal ve sentetik kemoterapötiklerin aktivitesini ve biyoyararlılığını hızlı bir şekilde test etmek için en uygun sistemlerdir (Monticone *et al.* 2010). Mevcut çalışmada U-87 MG hücre hattının seçilmesinin nedeni, bu hücre hattının birçok *in vitro* kanser araştırmasında kullanışlı bir hat olmasıdır. Beri taraftan glioblastom hücrelerinin etraflarındaki normal dokuyla hızlı bir şekilde etkileşerek yayıldığı ve bu yüzden de cerrahi rezeksiyon ve adjuvan kemo/radyoterapinin etkisiz kaldığı belirtilmiştir (Calgani *et al.* 2016). Günümüzde de antikanser ilaçların beyin tümörlerine ve özellikle de en sık ve agresif tip olan MG'ye hedefli olarak verilmesi, nanotıp alanındaki önemli hedeflerden birisidir (Shein *et al.* 2016). Bu noktada, kan beyin bariyeri glioblastoma kemoterapisinde aşılamayan bir problem olduğundan ilaçların etkili ve uygun dozlarının seçilmesinde *in vitro* GBM hatlarının kullanımı tercih edilmektedir (Fisusi *et al.* 2016).

I. helenium toprak üstü kısımlarından hazırlanan sulu ekstrelerinin tez kapsamında test edilen dozları arasında kanserli ve normal hücreler üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında 250 ve 500 mg/L konsantrasyonlarının yan etkisinin düşük seviyede olduğu ve kanserli hücreler üzerinde yüksek oranda sitotoksikite gösterdiği MTT yöntemi sonucu ortaya konulmuştur. Sulu ekstrelerden 500 mg/L dozunun sağlıklı nöronlar üzerinde zararlı bir etkisi olmadan glioma hücrelerinin %50'sinin canlılığını baskılayarak oldukça sitotoksik etki gösterdiği anlaşılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, *I. helenium* üzerine daha önce yapılan çalışmalarla uyumluluk göstermektedir. Örneğin *I. helenium*'dan izole edilen bileşiklerin MK-1, HeLa, ve B16F10 hücrelerine karşı *in vitro* antiproliferatif aktivitesinin olduğu rapor edilmiştir (Konishi *et al.* 2002). *I. helenium* kök özütünün astrositom da dâhil olmak üzere çeşitli tümör hatlarına karşı mutajenik olmaksızın oldukça seçici bir toksisite gösterdiği ve insan periferik kan

lenfositlerine karşı da toksisitesinin az olduğu rapor edilmiştir (Dorn *et al.* 2006). Dahası *I. helenium* kökünden izole edilen seskiterpen laktonların glioma ve diğer bazı hücre hatlarının büyümesini belirli şekilde engellediği ifade edilmiştir (Yong *et al.* 2010). Diğer taraftan *I. helenium* kökünün etanol ekstrelerinin iNOS üretimini azalttığı ve bitkinin nörodejeneratif hastalıkları ve agresif glioma tümörü büyümesi ile ilişkili enflamatuvar süreçlerini önleyebileceği belirtilmiştir (Mazzio *et al.* 2017; Lee *et al.* 2016). Zira tümör mikro çevresindeki enflamasyonun tümörün ilerlemesine katkı sağladığı bilinen bir gerçektir (Hanahan and Weinberg 2011). *I. helenium* toprak üstü kısımlarının sulu, etanol, metanol ve etil asetat ekstrelerinin antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin olduğu ve ekstrelerin β -karoten içeriğinin oksidasyonu azaltmada önemli ölçüde etkili olduğu belirtilmiştir (Akthar *et al.* 2016). Karotenoidlerin primer epitel hücre farklılaşmasını ve proliferasyonunu kontrol ederek göğüs kanserine karşı koruyuculuk sağlayabilecekleri tespit edilmiştir. Üstelik karotenoid tüketiminin (β -karoten ve α -karoten) reaktif oksijen türlerini ve diğer serbest radikalleri temizleyerek lipid peroksidasyonunu önleyebileceği ve *in vitro* şartlarda DNA hasarını düzelterek genomik dayanıklılık sağlayabileceği belirlenmiştir (Cocate *et al.* 2015; Maggio *et al.* 2015). Böylece, karotenoidler DNA onarım kapasitesini artırarak kanser ve vasküler hastalıklara karşı koruyuculuk sağlayabilmektedir (Slyskova *et al.* 2014). Diğer taraftan, kanser gelişimini engellemek için en çok kullanılan terapötik seçenek olan kemoterapide sentetik veya doğal ajanlar ve bunların kombinasyonlu kullanımı ile mevcut geleneksel ilaçlardan daha güvenli ve daha üstün seçeneklerin keşfedilmesi hedeflenmiştir. Bu noktada karotenoidler pozitif sonuçlar sunmuşlardır (Patel *et al.* 2017). β -karoten vitamin A, E ve C bakımından zengin besin temelli makro ve mikro besin öğelerinin yeterli miktarda alınması, akciğer kanseri hastalarının beslenme durumundaki bozulmayı önleyebilmekte ve genel sağlık durumlarını iyileştirebilmektedir (Limon-Miro *et al.* 2017).

LDH'nin inhibisyonu, kanserle mücadele için yenilikçi bir yaklaşım sunmaktadır, çünkü bu özel glikolitik metabolizma en invaziv tümör hücrelerinin karakteristiği olarak tanımlanmıştır (Granchi *et al.* 2017). Mevcut araştırmada, *I. helenium* sulu ekstrelerinin doza bağlı olarak glioma hücrelerinde LDH salınımını artırdığı gözlenmiştir. Artan

dozların (250 ve 500 mg/L) LDH salınımını pozitif kontrolün düzeyi kadar belirgin şekilde artırdığı tespit edilmiştir. LDH salınımının glioma hücrelerinde (T98G) indüklenmesinin antiproliferatif etki gösterdiği rapor edilmiştir (Schmidt *et al.* 2008). Ancak sağlıklı nöronlar üzerinde pozitif kontrole en yakın olan dozun 500 mg/L olduğu daha düşük dozların LDH salınımını belirgin olarak artırsa da pozitif kontrol değerine ulaşamadığı görülmektedir. LDH salınımındaki belirgin artışa bağlı olarak *I. helenium* bitkisinin GBM hücrelerinin zarlarını olumsuz bir şekilde etkilediği düşünülmüştür. Glia ve gliom hücre zarlarında doymamış yağ asitlerinin fazla olduğu ve bunların peroksidasyona uğramalarının zarın çift tabakalı yapısına zarar vereceği ve bu durumun membran akışkanlığı, geçirgenliği ve iyon transportu gibi önemli hücresel olayları olumsuz bir şekilde etkileyeceği belirtilmiştir (Schmidt *et al.* 2008). Böylece, söz konusu bitkinin yüksek dozlarının GBM hücreleri üzerinde toksik etkiye sahip olduğu LDH testi ile anlaşılmış ve bu bulgu yukarıda belirtilmiş, MTT testinin sonuçlarıyla da uyumluluk göstermiştir. Diğer taraftan insan glioblastomalarının yüksek derecede glikolitik olduğu ve glikoliz inhibitörlerinin bu ölümcül hastalığa karşı etkinliğinin önemli olabileceği rapor edilmiştir (Koukourakis *et al.* 2017). Fizyolojik olarak karotenoidlerin LDH inhibisyon özelliklerinin olması, onların A549 ve HeLa gibi glikolitik kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif etkinliklerini ortaya çıkarmıştır. Son on yıl içindeki çalışmalar, kanser hücrelerinin glikolitik metabolizmasına müdahale edebilen anti-glikolitik ajanların keşfedilmesine yöneliktir. Bu bağlamda, bu enzimin NAD^+ yenilenmesindeki temel rolü ve glikolizin sürdürülmesinin rolü göz önüne alındığında, LDH inhibisyonunun artırılması kanser hücrelerinin açlıktan ölmelerine neden olacaktır (Granchi *et al.* 2014).

Mevcut çalışmada *in vitro* şartlarda test ettiğimiz *I. helenium* sulu ekstraktlarının uygulanan tüm konsantrasyonlarının sağlıklı nöronlar üzerinde APEX1 düzeylerini kontrolle kıyaslandığında belirgin şekilde azalttığı bulunmuştur. Sulu ekstraktların APEX1 seviyesini düşük konsantrasyonlarda (30 ve 60 mg/L) azalttığı ve bununla beraber artan konsantrasyonlarda (125, 250, 500 mg/L) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırdığı gözlenmiştir. Ancak bu artışın herhangi bir uygulama yapılmamış sağlıklı kontrolün sahip olduğu seviyeye kadar ulaşamadığı tespit edilmiştir. AP

bölgeleri, kendiliğinden veya DNA hasarı sonucu meydana gelen pürin veya pirimidin bazlarını içermeyen DNA bölgeleridir. Bu AP lezyonları tamir edilmeden bırakılırsa mutajenik veya öldürücü olabilmektedir. AP bölgelerinin hücre içi seviyesi, baz modifikasyonlarının ve sonrasında da bunların tamirinin sonucunda yükselmektedir. APEX1, AP bölgelerini tanıyıp kesen DNA baz ekzisyon tamirinde rol alan kritik bir proteindir (Wilson and Barsky 2001). APEX1 proteininin mitokondri ve nükleusta bulunması onarım aktivitesi ile ilişkiliyken, sitoplazmadaki varlığı yeni sentezlenmiş transkripsiyon faktörlerinin redoks durumunu değiştiren düzenleyici aktivitesi ile alakalıdır (Frossi *et al.* 2002). Mevcut çalışmada, *I. helenium* sulu ekstrelerinin 48 saatlik glioma hücreleri üzerinde konsantrasyon artışına bağlı olarak APEX1 seviyesini azalttığı görülmüştür. Diğer taraftan sağlıklı nöronlarda APEX1 seviyesini pozitif kontrolden daha düşük seviyelerde tuttuğu gözlenmiştir. Buna bağlı olarak söz konusu bitkinin kanser hücreleri üzerinde seçici toksik özellik gösterdiği ve belirlenen konsantrasyonlarda sağlıklı hücelere zarar vermediği kanısına varılmıştır.

DNA tamir aktivitesinin yanı sıra APEX1'in transkripsiyonal regülasyon ve redoks düzenlemesi gibi fonksiyonlarının olduğu bilinmektedir (Bhakat *et al.* 2003). APEX1, hücre döngüsünün kontrolü, farklılaşma, gelişim, nöral uyarım ve apoptoz ile ilişkili birçok transkripsiyon faktörlerinin regülasyonu ve oksidatif strese cevap gibi önemli hücresel süreçlere katılan bir redüksiyon-oksidasyon proteini olarak çalışmaktadır (Evans *et al.* 2000). Bu özelliklerinden dolayı APEX1 aktivitesinin yükselmesi, kemoterapik ajanlara karşı kanser hücrelerinin direncini artırmaktadır. Bir çalışmada melanoma hücre hattında APEX1 seviyesinin düşmesi apoptozu artırırken, aşırı ekspresyonu kemoterapi veya hidrojen peroksit kaynaklı apoptozdan kanser hücrelerini koruduğu belirtilmiştir (Yang *et al.* 2005). LDH ve MTT yöntemleriyle *I. helenium* sulu ekstrelerinin 250 ve 500 mg/L konsantrasyonlarında kanserli hücrelerin yüksek oranda apoptozuna neden olduğu, bunun aksine aynı dozlarda APEX1 seviyelerini azalttığı gözlenmiştir. Normal hücrelerle karşılaştırıldığında glioblastoma tümör patojenezinde APEX1 in yüksek ekspresyonunun olduğu daha önceden rapor edilmiştir (Bobola *et al.* 2001). Bununla birlikte APEX1'in abazik bölgeleri tamir etmesi, insan GBM hücrelerinin karmustin ve TMZ kemoterapisine gösterdiği direnci artırmaktadır

(Bobola *et al.* 2012). Oysaki abazik bölgelerin tamir edilmeden kalması replikasyona güçlü bir şekilde ket vurmaktadır (Wilson and Barsky, 2001). Buna bağlı olarak DNA tamirinin durması kanserde hücre ölümünü artırabilmektedir (Madhusudan and Middleton 2005). Buna göre, baz eksizyon tamiri aktivitesini düşürmenin bir yolu olarak APEX1'in antisens bastırılması, glioma hücrelerinde karmustin ve TMZ sitotoksitesini güçlendirmektedir (Bobola *et al.* 2012). Mevcut çalışmanın bulgularından GBM hücre ölümünün *I. helenium*'un 250 ve 500 mg/L dozlarında APEX1'in aktivitesini engelleyip DNA replikasyonunu bloke ederek apoptoza neden olduğu sonucu çıkarılmıştır. Daha önceki çalışmalarda yüksek APEX1aktivitesi taşıyan glioma hücre hatlarında radyoaktif direncin de yüksek olduğu gözlenmiştir (Ono *et al.* 1995). Servikal karsinom ve hipoksik tümörlerde APEX1 seviyeleri ile intrinsik radyasyona duyarlılık arasında ters bir ilişki olduğu bildirmiştir (Herring *et al.* 1998; Nordsmark *et al.* 1996). Kemoterapiyle birlikte radyoterapi uygulanmasının zorunlu olduğu GBM tedavisinde, radyasyona direncinin düşürülmesi tedavinin daha etkin hale getirilebileceğini göstermiştir (Stupp *et al.* 2005). Zira APEX1 inhibitörlerinin beyin kanseri stratejisinde umut verici yeni bir hedef olabileceği yapılan araştırmalarda belirtilmiştir (Mohammed *et al.* 2011). Bu çalışmanın sonuçları, APEX1'in inhibisyonu ile kemo-radyoterapinin etkinliğinin artırılması, GBM tedavisine avantaj sağlayabileceğini düşündürmüştür.

Oksidatif DNA hasarını gösteren belirteçlerden birisi de 8-OHdG oluşumudur. 8-OHdG, serbest radikallerle indüklenen oksidatif lezyonlarının baskın formlarından biridir ve bu yüzden özellikle endojen oksidatif stresin derecesini göstermede yaygın olarak kullanılmaktadır (Kasai *et al.* 1997). Mevcut çalışmada, glioma hücrelerinde 8-OHdG immünoaktivitesinin fazla olduğu gözlenmiştir. Ancak *I. helenium*'un 250 ve 500 mg/L konsantrasyonlarının glioma hücrelerinde 8-OHdG oluşumuna neden olmadığı görülmüştür. 8-OHdG imünoaktivitesi esas olarak çekirdektedir ve 8-OHdG ekspresyonu DNA tamir enzimlerinden etkilenebilmektedir (Karihtala *et al.* 2011). Diğer taraftan sağlıklı nöronlar üzerinde çalışılan hiçbir dozda 8-OHdG oluşumuna rastlanmamıştır. Söz konusu bitki sağlıklı nöronlarda oksidatif DNA hasarına neden olmamıştır. 8-OHdG seviyesi, oksidatif DNA hasarındaki artış nedeniyle

yükselebilmektedir (Halliwell 1998). Hücresel DNA'daki 8-OHdG'nin kararlı haldeki seviyesi, hasar ve onarım oranı arasındaki dengenin sağlanmasıyla olmaktadır (Karihtala *et al.* 2011). Tamir edilmemiş oksidatif DNA lezyonlarının tümörogeneze veya apoptoza yol açtığı bildirilmiştir (Sakurai *et al.* 2003). Çeşitli raporlar, kanser hücrelerinin DNA'sında yüksek seviyelerde 8-OHdG varlığının, sağlıklı hücrelere kıyasla daha yüksek olduğunu göstermiştir (Okamoto *et al.* 1994; Oliva *et al.* 1997; Matsui *et al.* 2000).

I. helenium sulu ekstreleri, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında çalışılan konsantrasyonlarda sağlıklı ve kanserli beyin hücre kültürlerinde TOD seviyeleri üzerinde istatistiksel olarak herhangi bir etki göstermemiştir. Sulu ekstrelerin kontrolle kıyaslandığında TAK seviyesini sadece 30 mg/L konsantrasyonunda glioma hücrelerinde istatistiksel olarak belirgin bir şekilde yükselttiği, bunun aksine artan dozlarda (60, 125, 250, 500 mg/L) belirgin bir şekilde düşürdüğü tespit edilmiştir. Diğer taraftan sulu ekstrelerin 125 mg/L konsantrasyonunda sağlıklı nöron hücrelerinde kontrolle kıyaslandığında TAK düzeyini istatistiksel olarak önemli derecede artırdığı ve en yüksek konsantrasyonu olan 500 mg/L'de TAK seviyesini belirgin şekilde düşürdüğü tespit edilmiştir. Bu araştırma ile *I. helenium*'un konsantrasyona bağlı olarak sağlıklı nöronlar üzerinde antioksidan aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. Doğal bileşiklerin tümör başlangıcı, gelişimi ve ilerlemesini baskıladığı daha önceden gösterilmiştir. Fitokimyasalların antikanser etkilerinin moleküler mekanizması, onkojenik sinyal yollarının çeşitli moleküler hedefleri üzerindeki aktivasyonlarına dayalıdır (Aggarwal and Shishodia 2006). TAK ve TOD, oksidatif stresin bir indikatörü olarak kullanılmakta olup *in vitro* ve *in vivo* şartlarda oksidatif strese karşı antioksidan sistemlerce oluşturulan toplam cevabı ve oksidatif hasarları belirlemek için kullanılmaktadır (Lotito and Frei 2004; Bedaiwy *et al.* 2006). Kanserle ROT ilişkisini birçok nedenden dolayı anlamak zordur. ROT, kanserin başlangıcında ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır. Kanser hücreleri mitokondriyal işlev bozukluğu, artmış metabolik aktivite ve onkojenik stimülasyondan dolayı normal hücrelerdekinden daha fazla ROT stresine sahiptir. Kemoterapik ve radyoterapik ajanların çoğu ROT stresini artırarak kanser hücrelerini öldürmektedir. Kanser hücrelerinin hayatta kalmalarını

kolaylaştıran ROT mekanizmasının aynı zamanda bu hücrelerin ölümüne de neden olması dikkat çekici bir durumdur. Bu paradoks, kanser tedavilerinin geliştirilmesinde ROT stresinin kullanımını hedefleyen araştırmalar için mücadele edilmesi gereken bir sorundur. Yapılan son yıllardaki araştırmalarda ROT'un çeşitli fizyolojik olaylardaki rolünün, kendi seviyesine bağlı olduğu fark edilmiştir. Vasat düzeydeki ROT, tümörün gelişmesine neden olurken, aşırı seviyesi tümörü baskılamaktadır (Halliwell 2007). ROT, hücre sinyal yollarının integral bileşenlerindendir ve hücre transformasyonunu, hayatta kalmayı, proliferasyon, invazyon, anjiyojenez ve metastazı düzenlediği bilinmektedir. İkili rolü nedeniyle ROT'dan, hem pro-oksidan hem de antioksidan bazlı antikanser ajanlar geliştirilmiştir. Bununla birlikte, tek başına ROT sinyalizasyon modülasyonunun ideal bir yaklaşım olamadığı görülmektedir. Mevcut çalışmanın sonuçları *I. helenium* bitkisinin yüksek konsantrasyonlarda beyin kanseri hücreleri üzerinde oksidatif stres oluşturmada apoptoza sebep olduğunu ortaya çıkarmıştır. Dahası söz konusu bitkinin yüksek konsantrasyonlarında beyin tümör hücrelerinde antioksidan seviyesini düşürdüğü saptanmıştır. Bu sonuç bir avantaj olarak görülmüştür, zira kanser hücreleri karakteristik olarak ROS'u regüle edebilecek kadar yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğundan spesifik olarak kanser hücrelerini öldürebilecek yüksek antioksidan defans mekanizmasının azaltılması kanser tedavisinde yeni bir strateji olarak görülmektedir (Gorrini *et al.* 2013). Bazı kanserler ROT stresine çok adapte olmuşlardır ve kanser gelişimini destekleyen yollar karmaşıktır ve bazı ROT üreten antikanser ilaçların toksik yan etkileri vardır. Redoks adaptasyonunu bozabilen ajanlarla ROT üreten ajanların kombinasyonları, kanser hücresi sitotoksitesini artırma için daha iyi bir stratejisi olabilmekte ve kanser hücrelerini seçici olarak öldürmede bir avantaj sağlayabilmektedir (Gupta *et al.* 2012). Diğer taraftan, bu çalışmada glioma hücreleri üzerindeki oksidatif stres değerleri ile APEX1 aktivitesi arasında pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir. Nitekim yüksek oksidatif stresin hücre bileşenlerine hasar vererek beyin tümörü gelişimine neden olduğu (Iida *et al.* 2001; Hussain *et al.* 2003) ve de oksidatif stresin gliomalarda APEX1 aktivitesini artırarak BCNU ve TMZ'ye direncini kuvvetlendirdiği bildirilmiştir (Silber *et al.* 2002). Mevcut araştırmada, *I. helenium* oksidatif stresi ve 8-OHdG formasyonlarını artırmazken, APEX1 seviyesini belirgin bir şekilde azaltarak gliomlar üzerinde olumsuz etkiler sergilediği görülmüştür.

Biyoaktif fenolik antioksidantların rekatif oksijen ve nitrojen türlerini yok ettiği ve böylelikle DNA, protein ve lipidleri oksidatif hasardan koruduğu gösterilmiştir. Bu fitokimyasallarla oksidatif stresin azaltılması karsinogenezde ilk adımın başlaması ve enflamasyonun inhibe edilmesi için önemli olabilmektedir. Ancak fenollerin konsantrasyonlarına bağlı olarak antioksidan veya pro-oksidan aktivite gösterebilecekleri rapor edilmiştir. Bu yüzden bir antioksidanın pro-oksidan özelliğe sahip olması serbest radikal üretimini artırmasından kaynaklanabilmektedir (Juranić and Zizak 2005). Mevcut çalışma ile *I. helenium* sahip olduğu antioksidan kapasiteden dolayı sağlıklı nöronlarda koruyucu özellik gösterebileceği, diğer taraftan yüksek konsantrasyonlarda TAK seviyesini düşürdüğü için toksisiteye neden olabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları antitümör ve antioksidan aktivitenin arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermiştir. Bir diğer çalışmada *I. helenium*'dan izole edilen bileşiklerin fare nöron hücrelerinde teşvik edilmiş sitotoksisiteyi etkili bir şekilde hafiflettiği ve ROT üretimini inhibe ettiği ortaya çıkmıştır. Buna dayanılarak ROT ile ilişkili nörodejeneratif hastalıkların potansiyel terapötik ajanı olabileceği öne sürülmüştür (Seo *et al.* 2017). Dahası *I. helenium* kökünden elde edilen esansiyel yağın solunum yoluyla alınmasının beyin fonksiyonlarını etkilediği ve psikofizyolojik hastalıkların tedavisinde aromaterapotik ajan olarak kullanılabileceği başka bir çalışmada önerilmiştir (Sowndhararajan *et al.* 2016).

Günlük çay olarak tüketilen bitkilerin demleme yöntemiyle elde edilen sulu ekstralarının antiproliferatif etkisi çeşitli kanser hücre hatlarında gösterilmiştir (Matić *et al.* 2013). Genelde total fenolik içerik ve antioksidan aktivite arasında bir korelasyon vardır (Tabart *et al.* 2009). Bu çalışmanın sonuçları *I. helenium* sulu ekstresinin antioksidan etkisinin fenolik içeriğine bağlı olabileceğini düşündürmüştür. Nitekim araştırmacılar söz konusu bitkinin spesifik fenolik bileşiklerinin kimyasal yapısındaki hidroksil gruplarının varlığından ötürü radikal süpürücü aktivite sergilediğini belirlemişlerdir (Matić *et al.* 2013). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda bitkilerden elde edilen esansiyel yağ, etanol, su, hekzan ekstraları ve suda demlemeyle elde edilen çeşitli ekstraların insan adenokarsinoma gibi kanser hücreleri üzerinde inhibitör etkisinin olduğunu ortaya koymuştur (Akrouit *et al.* 2011). Bitkilerin metanolik veya sulu ekstralarının demleme

yöntemiyle hücre hatları üzerinde benzer aktivite gösterdiğiyle ilgili çalışmalar vardır (Dias *et al.* 2013). Bu çalışmanın *in vitro* sonuçları *I. helenium* bitkisinin suda demlemeyle geleneksel kullanımının klinik araştırmalarda da beyin kanserine karşı değerlendirilebilecek terapötik bir ajan olabileceğini göstermiştir.

Kanser kemoprevensiyonu, kötü huylu tümör gelişimini inhibe eden veya önleyen ilaçların ve beslenme ajanlarının keşfine odaklanan, hızla büyüyen bir disiplindir (Tanaka *et al.* 2012). *I. helenium*'un toprak üstü kısımlarından elde edilmiş sulu ekstrelerinin, insan beyin tümörü (U-87 MG) ve sağlıklı nöron kültürleri üzerindeki etkilerinin doza bağlı olarak araştırıldığı bu çalışmanın bulguları sayesinde, söz konusu bitkinin düşük konsantrasyonlarının hücrelerde oksidatif stres oluşturmadığı, aksine belirgin antioksidan aktivite sağladığı ve herhangi bir sitotoksik ve genotoksik etkisinin bulunmadığı anlaşılmıştır. Bunun yanı sıra 250 mg/L konsantrasyonda ekstrelerin sağlıklı hücreler üzerinde yan etkilerinin az olduğu, aksine 500 mg/L konsantrasyonda APEX1 aktivasyonuna bağlı olarak nöron kültürü üzerinde önemli sitotoksik ve genotoksik etkiler gösterdiği tespit edilmiştir. Kanserli hücre hattında ise, *I. helenium*'un artan konsantrasyonlarda (250 ve 500 mg/L) APEX1 inhibisyonunun bir sonucu olarak antiproliferatif etkiler sergilediği saptanmıştır.

KAYNAKLAR

- Aggarwal, B.B. and Shishodia, S., 2006. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical pharmacology*, 71 (10), 1397-1421.
- Ahmed, R., Oborski, M.J., Hwang, M., Lieberman, F.S. and Mountz, J.M., 2014. Malignant gliomas: current perspectives in diagnosis, treatment, and early response assessment using advanced quantitative imaging methods. *Cancer Management and Research*, 6, 149-170.
- Akrout, A., Gonzalez, L.A., El Jani, H. and Madrid, P.C., 2011. Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. *Food and Chemical Toxicology*, 49 (2), 342-347.
- Akthar, J., 2016. An antioxidant and antimicrobial activities of *Inula helenium*. *Technology*, 2 (3), 142-145.
- Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker R.H. and Boyd, M.R., 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research*, 48, 589-601.
- Ames, B.N., 1998. Micronutrients prevent cancer and delay aging. *Toxicology Letters*, 102, 5-18.
- Anonymous, 2016. Anatomy of the brain, <https://www.mayfieldclinic.com/PE-AnatBrain.htm> (15/06/2017).
- Anonymous, 2017. Glioma, <http://www.neurochirurgia-ire.it> (25/06/2017).
- Antonsson, B. and Martinou, J.C., 2000. The Bcl-2 protein family. *Experimental Cell Research*, 256 (1), 50-57.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V.M., 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281 (5381), 1305-1308.
- Babaoğlu, M., 2001. Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya.
- Bai, N.S., Zhou, B.N., Zhang, L., Sang, S.M., He, K. and Zheng, Q.Y., 2003. Three new sesquiterpene lactones from *Inula britannica*, *Oriental Foods and Herbs*, Ed: C.T. Ho, J.K. Lin, Q.Y. Zheng. ACS Symposium Series 859. American Chemical Society, Washington, 271-278.
- Baumann, M., Krause, M., Thames, H., Trott, K. and Zips, D., 2009. Cancer stem cells and radiotherapy. *International of Journal Radiat Biology*, 85 (5), 391-402.
- Baydar, N.G., Özkan, G. and Sağdıç, O., 2004. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control*, 15, 335-339.
- Bedaiwy, M., Agarwal, A., Said, T.M., Goldberg, J.M., Sharma, R.K., Worley, S. and Falcone, T., 2006. Role of total antioxidant capacity in the differential growth of human embryos in vitro. *Fertility and Sterility*, 86, 304-309.
- Bennet, R.C. and Wallsgrove R.M., 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*, 127, 617-633.
- Bhakat, K.K., Izumi, T., Yang, S.H., Hazra, T.K. and Mitra, S., 2003. Role of acetylated human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) in regulation of the parathyroid hormone gene. *EMBO J*, 22, 6299-6309.

- Bobola, M.S., Blank, A., Berger, M.S., Stevens, B.A. and Silber, J.R., 2001. Apurinic/Apyrimidinic endonuclease activity is elevated in human adult gliomas. *Clinical Cancer Research*, 7 (11), 3510-3518.
- Bobola, M.S., Kolstoe, D.D., Blank, A., Chamberlain, M.C. and Silber, J.R., 2012. Repair of 3-methyladenine and abasic sites by base excision repair mediates glioblastoma resistance to temozolomide. *Frontiers in Oncology*, 2, 176.
- Bohlmann, F., Mahanta, P.K., Jakupovic, J., Rastogi, R.C. and Natsu, A.A., 1978. New sesquiterpene lactones from *Inula* species. *Phytochemistry*, 17, 1165-1172.
- Bokadia, M.M., MacLeod, A.J., Mehta, S.C., Mehta, B.K. and Patel, H., 1986. The essential oil of *Inula racemosa*. *Phytochemistry*, 25, 2887-2888.
- Bopp, S.K. and Lettieri, T., 2008. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacology*, 8 (1), 8.
- Bouwmeester, J., Matusova, R., Zhongkui S. and Beale, M.H., 2003. Secondary Metabolite Signalling in Host-Parasitic Plant Interactions. *Current Opinion Plant Biology*, 6 (4), 358-364.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. and Wang, X., 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15 (1), 269-290.
- Calgani, A., Vignaroli, G., Zamperini, C., Coniglio, F., Festuccia, C., Di Cesare, E. and Botta, M., 2016. Suppression of SRC signaling is effective in reducing synergy between glioblastoma and stromal cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15 (7), 1535-1544.
- Cantrell, C.L., Abate, L., Fronczek, F.R., Franzblau, S.G., Quijano L. and Fischer, N.H., 1999. *Planta Medica*, 65, 351-355.
- Carnero, A. and Hannon, G.J., 1998. The INK4 family of CDK inhibitors. In *Cyclin Dependent Kinase (CDK) Inhibitors*. Springer Berlin, Heidelberg, 43-55.
- Cha, K.H., Koo, S.Y. and Lee, D.U., 2008. Antiproliferative effects of carotenoids extracted from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on human colon cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (22), 10521-10526.
- Chaadaeva, A.V., Tenkeeva, I.I., Moiseeva, E.V., Svirshchevskaya, E.V. and Demushkin V.P., 2008. Antitumor activity of the plant remedy peptide extract PE-PM in a new mouse T-lymphoma/eukemia model. *Biomeditsinskaya khimiya*, 55 (1), 81-88.
- Chan, T.A., Hwang, P.M., Hermeking, H., Kinzler K.W. and Vogelstein, B., 2000. Cooperative effects of genes controlling the G(2)/M checkpoint. *Genes & Development*, 14 (13), 1584-1588.
- Cocate, P.G., Natali, A.J., Alfenas, R.C.G., de Oliveira, A., Dos Santos, E.C. and Hermsdorff, H.H.M., 2015. Carotenoid consumption is related to lower lipid oxidation and DNA damage in middle-aged men. *British Journal of Nutrition*, 114 (2), 257-264.
- Courvalin, J.C., Segil, N., Blobel, G. and Worman, H.J., 1992. The lamin B receptor of the inner nuclear membrane undergoes mitosis-specific phosphorylation and is a substrate for p34cdc2-type protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 267 (27), 19035-19038.

- Çınar, A.E., 2012. Türkiye’de Yetişen *Inula helenium* L. (Asteraceae) Taksonlarının Biyoaktivitelerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, KAYSERİ.
- Da Rocha, A.B., Lopes, R.M. and Schwartzmann, G., 2001. Natural products in anticancer therapy. *Current Opinion Pharmacology*, 1 (4), 364-369.
- Deriu, A., Zanetti, S., Sechi, L.A., Marongiu, B., Piras, A. and Porcedda, S., 2008. Antimicrobial activity of *Inula helenium* L. essential oil against Gram-positive and Gram-negative bacteria and *Candida* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31 (6), 588-590.
- Dias, M.I., Barros, L., Dueñas, M., Pereira, E., Carvalho, A.M., Alves, R.C. and Ferreira, I.C., 2013. Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium* L. and bioactivity of the methanolic extract, infusion and decoction. *Food Chemistry*, 141 (4), 4152-4160.
- Dirsch, V.M., Stuppner, H. and Vollmar, A.M., 2001. Cytotoxic sesquiterpene lactones mediate their death-inducing effect in leukemia T cells by triggering apoptosis. *Planta Med*, 67 (6), 557-559.
- Dixon R.A. and Paiva N.L., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7, 1085-1097.
- Dorn, D.C., Alexenizer, M., Hengstler, J.G. and Dorn, A. 2006. Tumor cell specific toxicity of *Inula helenium* extracts. *Phytotherapy Research*, 20 (11), 970-980.
- El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M. and Vogelstein, B., 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75 (4), 817-825.
- Erel, O., 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37 (4), 277-285.
- Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S.N., Hidalgo, O.F., Vanaclocha, V. and Herman, J.G., 2000. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *The New England Journal of Medicine*, 2000 (343), 1350-1354.
- Evan, G.I. and Vousden, K.H. 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411 (6835), 342.
- Evans, A.R., Limp-Foster, M. and Kelley, M.R., 2000. Going APE over ref-1. *Mutation Research*, 461, 83-108.
- Fallahzadeh, A.R. and Mohammadi, S. 2016. An Investigation of the Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of Hydroalcoholic Extract of *Inula helenium* on Male Rats. *Journal of Babol University of Medical Sciences*, 18 (12), 57-63.
- Felsher, D.W., 2003. Opinion: cancer revoked: oncogenes as therapeutic targets. *Nature reviews. Cancer*, 3 (5), 375.
- Felten, D.L., Maida, M.S., O'Banion, M.K. and Maida, M.E., 2015. *Netter's atlas of neuroscience*. Elsevier Health Sciences.
- Filippini, G., Falcone, C., Boiardi, A., Broggi, G., Bruzzone, M.G. and Caldiroli, D., 2008. Prognostic factors for survival in 676 consecutive patients with newly diagnosed primary glioblastoma. *Neuro-oncology*, 10 (1), 79-87.
- Fisusi, F.A., Siew, A., Chooi, K.W., Okubanjo, O., Garrett, N., Lalatsa, K. and Satchi-Fainaro, R., 2016. Lomustine nanoparticles enable both bone marrow sparing

- and high brain drug levels—a strategy for brain cancer treatments. *Pharmaceutical Research*, 33 (5), 1289-1303.
- Frossi, B., Tell, G., Spessotto, P., Colombatti, A., Vitale, G. and Pucillo, C., 2002. H₂O₂ induces translocation of APE/Ref-1 to mitochondria in the Raji B-cell line. *Journal of Cellular Physiology*, 193 (2), 180-186.
- Furnari, F.B., Fenton, T., Bachoo, R.M., Mukasa, A., Stommel, J.M., Stegh, A. and Chin, L., 2007. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & Development*, 21 (21), 2683-2710.
- Gao, S., Wang, Q., Tian, X.H., Li, H.L., Shen, Y.H., Xu, X.K., Wu, G.Z., Hu, Z.L. and Zhang, W.D., 2017. Total sesquiterpene lactones prepared from *Inula helenium* L. has potentials in prevention and therapy of rheumatoid arthritis. *Journal of Ethnopharmacology*, 196, 39-46.
- Gasser, T., Szelenyi, A., Senft, C., Muragaki, Y., Sandalcioğlu, I.E. and Sure, U. 2011. Intraoperative MRI and functional mapping. *Acta Neurochir Suppl*, 109, 61-65.
- Ghantous, A., Gali-Muhtasib, H., Vuorela, H., Saliba, N.A., Darwich, N., 2010. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials?. *DDT.*, 15, 668-678.
- Ghedira, K., Goetz, P. and Le Jeune, R. 2011. *Inula helenium* L.(Asteraceae): aune. *Phytothérapie*, 9 (3), 176-179.
- Gorrini, C., Harris, I.S. and Mak, T.W., 2013. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature reviews. Drug Discovery*, 12 (12), 931.
- Granchi, C., Fancelli, D. and Minutolo, F., 2014. An update on therapeutic opportunities offered by cancer glycolytic metabolism. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24 (21), 491.
- Granchi, C., Fortunato, S., Meini, S., Rizzolio, F., Caligiuri, I., Tuccinardi, T. and Minutolo, F., 2017. Characterization of the Saffron Derivative Crocetin as an Inhibitor of Human Lactate Dehydrogenase 5 in the Antiglycolytic Approach against Cancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 5639-5649.
- Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M. and Harris, C.C. 1994. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research*, 54 (18), 4855-4878.
- Grimaud, F. 2009. Les Astéracées du Ladakh dans la médecine tibétaine. *Phytothérapie*, 7 (5), 255-261.
- Grivennikov, S.I. and Karin, M., 2010. Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. *Current Opinion in Genetics & Development*, 20 (1), 65-71.
- Guo, B., Godzik, A. and Reed, J.C. 2001. Bcl-G, a novel pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (4), 2780-2785.
- Guo, Q.L. and Yang J.S., 2005. Sesquiterpenes in *Inula* L. plants and their pharmacological activities. *Natural Product Research and Development*, 17 (6), 804.
- Gupta, S.C., Hevia, D., Patchva, S., Park, B., Koh, W. and Aggarwal, B.B. 2012. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxidants & Redox Signaling*, 16 (11), 1295-1322.
- Hajra, K.M., and Liu, J.R. 2004. Apoptosome dysfunction in human cancer. *Apoptosis*, 9 (6), 691-704.
- Hall, M. and Peters, G. 1996. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Advances in Cancer Research*, 68, 67-108.

- Halliwell, B., 1998. Can oxidative DNA damage be used as a biomarker of cancer risk in humans? Problems, resolutions and preliminary results from nutritional supplementation studies. *Free Radical Research*, 29 (6), 469-486.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144 (5), 646-674.
- Harborne, J.B., 1994. *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, London, UK, Chapman & Hall.
- Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407 (6805), 770.
- Hengst, L. and Reed, S.I. 1998. Inhibitors of the Cip/Kip family. In *Cyclin Dependent Kinase (CDK) Inhibitors*. Springer, Berlin, Heidelberg, 25-41.
- Herring, C.J., West, C.M., Wilks, D.P., Davidson, S.E., Hunter, R.D., Berry, P. and Hendry, J.H., 1998. Levels of the DNA repair enzyme human apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1, APEX, Ref-1) are associated with the intrinsic radiosensitivity of cervical cancers. *British Journal of Cancer*, 78 (9), 1128.
- Hoffmann, I., Clarke, P.R., Marcote, M.J., Karsenti, E., Draetta, G. 1993. Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2 – cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *EMBO J.*, 12, 53.
- Hong, B., Wiese, B., Bremer, M., Heissler, H.E., Heidenreich, F., Krauss, J.K. and Nakamura, M., 2013. Multiple microsurgical resections for repeated recurrence of glioblastoma multiforme. *American Journal of Clinical Oncology*, 36 (3), 261-268.
- Honga, T., Zhaoa, J., Donga, M., Mengb, Y., Mub, J. and Yang Z., 2012. Composition and bioactivity of polysaccharides from *Inula britannica* flower. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, 550-554.
- Huo, Y., Shi, H., Li, W., Wang, M., and Li, X. 2010. HPLC determination and NMR structural elucidation of sesquiterpene lactones in *Inula helenium*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51 (4), 942-946.
- Hussain, S.P., Hofseth, L.J. and Harris, C.C., 2003. Radical causes of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3 (4), 276-285.
- Iida, T., Furuta, A., Kawashima, M., Nishida, J. I., Nakabeppu, Y. and Iwaki, T., 2001. Accumulation of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and increased expression of hMTH1 protein in brain tumors. *Neuro-oncology*, 3 (2), 73-81.
- Jawdah, Y.A., Sobh, H. and Salameh, A., 2002. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3208.
- Jiang, H.L., Chen, J., Jin, X.J., Yang, J.L., Li, Y. and Yao, X.J., 2011. Sesquiterpenoids, alantolactone analogues, and seco-guaiene from the roots of *Inula helenium*. *Tetrahedron*, 67 (47), 9193-9198.
- Jiang, Y., Xu, H. and Wang, J., 2016. Alantolactone induces apoptosis of human cervical cancer cells via reactive oxygen species generation, glutathione depletion and inhibition of the Bcl-2/Bax signaling pathway. *Oncology Letters*, 11 (6), 4203-4207.
- Juranić, Z. and Žižak, Ž., 2005. Biological activities of berries: From antioxidant capacity to anti-cancer effects. *BioFactors*, 23 (4), 207-211.
- Juratli, T.A., Schackert, G. and Krex, D., 2013. Current status of local therapy in malignant gliomas—a clinical review of three selected approaches. *Pharmacology & Therapeutics*, 139 (3), 341-358.

- Karihtala, P., Kauppila, S., Puistola, U. and Jukkola-Vuorinen, A., 2011. Divergent behaviour of oxidative stress markers 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in breast carcinogenesis. *Histopathology*, 58 (6), 854-862.
- Kasai, H., 1997. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutation Research*, 387, 147-163.
- Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S.W., Ewen, M.E. and Sherr, C.J. 1993. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin d-dependent kinase CDK4. *Genes and Development*, 7, 331.
- Kaufman, P.B., Csake, L.J., Warber, S., Duke, J.A. and Brielmann, H.L., 1998. Natural products from plants. CRC Press, Boca Raton.
- Kaya, A., 2010. Tıbbi bitkiler ve etnobotanik alışmalar. Bitkilerle Tedavi Sempozyumu, İstanbul.
- Khalil, M.Y., Moustafa, A.A. and Naguib, N.Y., 2007. Growth, phenolic compounds and antioxidant activity of some medicinal plants grown under organic farming condition. *World Journal of Agricultural Sciences*, 3 (4), 451-457.
- Khan, M., Yi, F., Rasul, A., Li, T., Wang, N., Gao, H. and Ma, T., 2012. Alantolactone induces apoptosis in glioblastoma cells via GSH depletion, ROS generation, and mitochondrial dysfunction. *IUBMB Life*, 64 (9), 783-794.
- Kim, M., Song, K. and Kim, Y.S., 2017. Alantolactone improves palmitate-induced glucose intolerance and inflammation in both lean and obese states in vitro: Adipocyte and adipocyte-macrophage co-culture system. *International Immunopharmacology*, 49, 187-194.
- Kim, S.R., Park, M.J., Lee, M.K., Sung, S.H., Park, E.J., Kim, J., Kim, S.Y., Oh, T.H., Markelonis, G.J. and Kim, Y.C., 2002. *Free Radical Biology and Medicine*, 32, 596-604.
- Konishi, T., Shimada, Y., Nagao, T., Okabe, H., and Konoshima, T. 2002. Antiproliferative sesquiterpene lactones from the roots of *Inula helenium*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25 (10), 1370-1372.
- Koukourakis, M., Tsolou, A., Pouliliou, S., Lambrou, I., Papadopoulou, M., Ilemesoglou, M. and Giatromanolaki, A., 2017. Blocking LDHA glycolytic pathway sensitizes glioblastoma cells to radiation and temozolomide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Krakstad, C. and Chekenya, M., 2010. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Molecular Cancer*, 9, 135-148.
- Kusano, C. and Ferrari, B., 2008. Total antioxidant capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. *Journal of Cell Molecular Biology*, 7 (1), 1-15.
- Lack, H.W., 2007. Tribe Cichorieae Lam. & DC. The families and genera of vascular plants, 8, 180-189.
- Lazebnik, Y. 2010. What are the hallmarks of cancer?. *Nature reviews. Cancer*, 10 (4), 232.
- Lee, S.G. and Kang, H. 2016. Anti-neuroinflammatory effects of ethanol extract of *Inula helenium* L (Compositae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15 (3), 521-526.

- Levine, A.J., 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88 (3), 323-331.
- Li, Y., Ni, Z.Y., Zhu, M.C., Dong, M., Wang, S.M., Shi, Q.W. and Cong, B., 2012. Antitumour activities of sesquiterpene lactones from *Inula helenium* and *Inula japonica*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 67 (7-8), 375-380.
- Liberski, P.P., 1995. The ultrastructure of ependymoma: personal experience and the review of the literature. *Folia Neuropathologica*, 34 (4), 212-220.
- Limon-Miro, A.T., Lopez-Teros, V. and Astiazaran-Garcia, H., 2017. Dietary Guidelines for Breast Cancer Patients: A Critical Review. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 8 (4), 613-623.
- Liu, R.H., 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 134 (12), 3479S-3485S.
- Lotito, S.B. and Frei, F., 2004. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting *in vitro* and *in vivo* effects. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 201-211.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A. and Kleihues, P., 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*, 114 (2), 97-109.
- Lowe, S.W. and Lin, A.W., 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21, 485-495.
- Madhusudan, S. and Hickson, I.D., 2005. DNA repair inhibition: a selective tumour targeting strategy. *Trends in Molecular Medicine*, 11, 503-511.
- Maggio, M., de Vita, F., Lauretani, F., Bandinelli, S., Semba, R.D., Bartali, B. and Ferrucci, L., 2015. Relationship between carotenoids, retinol, and estradiol levels in older women. *Nutrients*, 7 (8), 6506-6519.
- Manez, S., Recio, M.C., Gil, I., Gomez, C., Giner, R.M., Waterman, P.G. and RSos, J.L., 1999. *Jornal of Naural. Products*, 62, 601.
- Maoz, M.I. and Neeman, J., 2000. Effect of *Inulaviscosa* extract on chitin synthesis in dermatophytes and *Candidaalbicans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 71 (3), 479-482.
- Marie, S.K.N. and Shinjo, S.M.O., 2011. Metabolism and brain cancer. *Clinics*, 66, 33-43.
- Matić, I.Z., Juranić, Z., Šavikin, K., Zdunić, G., Nađvinski, N. and Gođevac, D., 2013. Chamomile and marigold tea: chemical characterization and evaluation of anticancer activity. *Phytotherapy Research*, 27 (6), 852-858.
- Matsui, A., Ikeda, T., Enomoto, K., Hosoda, K., Nakashima, H., Omae, K. and Kitajima, M., 2000. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. *Cancer Letters*, 151 (1), 87-95.
- Maxwell, S.R., Dietrich, T. and Chapple, I.L.C., 2006. Prediction of serum total antioxidant activity from the concentration of individual serum antioxidants. *Clinica Chimica Acta*, 372, 188-194.
- Mazzio, E.A., Bauer, D., Mendonca, P., Taka, E. and Soliman, K.F., 2017. Natural product HTP screening for attenuation of cytokine-induced neutrophil chemo attractants (CINCs) and NO₂⁻ in LPS/IFN γ activated glioma cells. *Journal of Neuroimmunology*, 302, 10-19.
- McDonald, E.R. and El-Deiry, W.S., 2000. Cell cycle control as a basis for cancer drug development. *International Journal of Oncology*, 16 (5), 871-957.

- Mehta, R.G., Murillo, G., Naithani, R. and Pen, X., 2010. Cancer chemoprevention by natural products: How far have we come?. *Pharm Research*, 27, 950-961.
- Mohammed, M.Z., Vyjayanti, V.N., Laughton, C.A., Dekker, L.V., Fischer, P.M., Wilson, D.M. and Madhusudan, S. 2011. Development and evaluation of human AP endonuclease inhibitors in melanoma and glioma cell lines. *British Journal of Cancer*, 104 (4), 653.
- Moharamzadeh, K., Brook I.M. and Noort, R.V., 2009. Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. *Materials*, 2 (2), 514-548.
- Monticone, M., Biollo, E., Fabiano, A., Melotti, A., Corte, G., Fabbi, M. and Castagnola, P., 2010. Cell Cultures Used in Studies Focused on Targeting Glioblastoma Tumor-Initiating Cells-Response. *Molecular Cancer Research*, 1541-7786.
- Morgan, D.O., 1995. Principles of CDK regulation. *Nature*, 374 (6518), 131-134.
- Mosaddegha, M., Ostadb, S.N., Naghibia, F. and Moghadam M.H., 2006. Cytotoxic Effects of Five Species of *Inula* Against Some Tumor Cell Lines. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2 (4), 203-208.
- Mosmann, T., 1983. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of immunological methods*, 65, 55-63.
- Nan, M., Pinte, A., Bunea, A., Esianu, S., and Tamas, M. 2012. HPLC analysis of carotenoids from *Inula helenium* L. flowers and leaves. *Farmacia*, 60 (4), 501-509.
- Nesterova, I., Zelenskaia, K.L., Vetoshkina, T.V., Aksinenko, S.G., Gorbacheva, A.V. and Gorbatykh, N.A., 2002. Mechanisms of antistressor activity of *Inula helenium* preparations. *Eksp Klinicheskaia Farmakologia*, 66 (4), 63-65.
- Newall, C.A., Anderson, L.A. and Phillipson, D.J., 1996. *Herbal Medicine: A Guide for Health-Care Professionals*. London, The Pharmaceutical Press.
- Nikolaev, S.M., Nikolaeva, I.G., Razuvaeva, Y.G. and Dorzhiev, A.M., 2011. Antioxidant activity and flavonoid composition of the new pancreoprotective preparation Pancreophyt. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 45 (5), 279-281.
- Nilsson, I. and Hoffmann, I., 2000. Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Springer*, 107-114.
- Nordsmark, M., Overgaard, M. and Overgaard, J., 1996. Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiotherapy and Oncology*, 41 (1), 31-39.
- Novak, B., Csikasz-Nagy, A., Gyorffy, B., Chen, K. and Tyson, J.J., 1998. Mathematical model of the fission yeast cell cycle with checkpoint controls at the G1/S, G2/M and metaphase/anaphase transitions. *Biophysical Chemistry*, 72 (1), 185-200.
- Ochs, K. and Kaina, B., 2000. Apoptosis induced by DNA Damage O-Methylguanine is Bcl-2 and Caspase-9/3 regulated and Fas/Caspase-8 independent. *Cancer Research*, 60 (20), 5815-5824.
- Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T. and Di Patre P.L. 2004. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Research*, 64 (19), 6892-6899.

- Ohtsubo, M., Theodoras, A. M., Schumacher, J., Roberts, J.M. and Pagano, M., 1995. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Molecular and Cellular Biology*, 15 (5), 2612-2624.
- Okamoto, K., Toyokuni, S., Uchida, K., Ogawa, O., Takenawa, J., Takehi, Y., Kinoshita, H., Hattori-Nakakuki, Y., Hiai, H., and Yoshida, O., 1994. Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in human renal-cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 58 (6), 825-829.
- Oliva, M.R., Ripoll, F., Muñiz, P., Iradi, A., Trullenque, R., Valls, V. and Sáez, G.T. 1997. Genetic alterations and oxidative metabolism in sporadic colorectal tumors from a Spanish community. *Molecular Carcinogenesis*, 18 (4), 232-243.
- Ono, Y., Matsumoto, K., Furuta, T., Ohmoto, T., Akiyama, K. and Seki, S., 1995. Relationship between expression of a major apurinic/aprimidinic endonuclease (APEX nuclease) and susceptibility to genotoxic agents in human glioma cell lines. *Journal of Neuro-oncology*, 25 (3), 183-192.
- Orhan, N., Gökbulut, A., and Orhan, D.D. 2017. Antioxidant potential and carbohydrate digestive enzyme inhibitory effects of five *Inula* species and their major compounds. *South African Journal of Botany*, 111, 86-92.
- Ostrom, Q.T., Bauchet, L., Davis, F.G., Deltour, I., Fisher, J.L., Langer, C.E. and Wrensch, M.R. 2014. The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro-oncology*, 16 (7), 896-913.
- Ostrom, Q.T., Gittleman, H. and Farah, P., 2013. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006–2010. *Neuro-oncology*, 15 (6), ii1–ii56.
- Paiva, S.A. and Russell, R.M., 1999. β -Carotene and other carotenoids as antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, 18 (5), 426-433.
- Pal, H.C., Sehar, I., Bhushan, S., Gupta, B.D. and Saxena, A.K. 2010. Activation of caspases and poly (ADP-ribose) polymerase cleavage to induce apoptosis in leukemia HL-60 cells by *Inula racemosa*. *Toxicology in Vitro*, 24, 1599-1609.
- Park, E.J., Kim, Y. and Kim, J., 2000. Acylated flavonol glycosides from the flower of *Inula britannica*. *Journal of Natural Products*, 63, 34-36.
- Patel, S., Sarwat, M. and Khan, T.H., 2017. Mechanism behind the anti-tumour potential of saffron (*Crocus sativus* L.): The molecular perspective. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 115, 27-35.
- Phillipson, J.D., 2007. Phytochemistry and pharmacognosy. *Phytochemistry*, 68 (22), 2960-2972.
- Prins, R.M., Soto, H., Konkankit, V., Odesa, S.K., Eskin, A., Yong, W.H. and Liao, L.M. 2010. Gene expression profile correlates with T cell infiltration and survival in glioblastoma patients vaccinated with dendritic cell immunotherapy. *Clinical Cancer Research*, 2563.
- Raizer, J.J. and Abbey, L.E., 2007. *Brain Metastases* 1st.ed Springer.
- Ram, A., Balachandar, S., Vijayananth, P. and Singh, V.P., 2011. Medicinal plants useful for treating chronic obstructive pulmonary disease (COPD): current status and future perspectives. *Fitoterapia*, 82 (2), 141-151.
- Ranjan, P., Anathy, V., Burch, P.M., Weirather, K., Lambeth, J.D. and Heintz, N.H., 2006. Redox-dependent expression of cyclin D1 and cell proliferation by Nox1 in mouse lung epithelial cells. *Antioxidants & Redox signaling*, 8 (9-10), 1447-1459.

- Reed, F.C., Pettigrew, A.C. and King, M.O., 2000. Alternative and complementary therapies in nursing curricula. *Journal of Nursing Education*, 39, 133-139.
- Réthy, B., Csupor - Löffler, B., Zupkó, I., Hajdú, Z., Máthé, I. and Hohmann, J., 2007. Antiproliferative activity of Hungarian Asteraceae species against human cancer cell lines. Part I Phytotherapy Research, 21 (12), 1200-1208.
- Ricci, J.E., Waterhouse, N. and Green, D.R., 2003. Mitochondrial functions during cell death, a complex (I-V) dilemma. *Cell Death & Differentiation*, 10 (5), 488-492.
- Saelens, X., Festjens, N., Walle, L.V., Van Gurp, M., van Loo, G. and Vandenabeele, P., 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 23 (16), 2861.
- Sakurai, M., Nagata, T., Abe, K., Horinouchi, T., Itoyama, Y. and Tabayashi, K., 2003. Oxidative damage and reduction of redox factor-1 expression after transient spinal cord ischemia in rabbits. *Journal of Vascular Surgery*, 37 (2), 446-452.
- Sanai, N. and Berger, M.S., 2011. Extent of resection influences outcomes for patients with gliomas. *Revue neurologique*, 167 (10), 648-654.
- Sawyers, C., 2004. Targeted cancer therapy. *Nature*, 432 (7015), 294.
- Saygi, S., Konuklugil, B., Kutsal, O., Uzbay, I.T., Deniz, G. and Goren, Z., 2003. *Phytotherapy Research*, 17, 683.
- Schmidt, F., Knobbe, C.B., Frank, B., Wolburg, H. and Weller, M., 2008. The topoisomerase II inhibitor, genistein, induces G2/M arrest and apoptosis in human malignant glioma cell lines. *Oncology Reports*, 19 (4), 1061-1066.
- Seo, J.Y., Lim, S.S., Kim, J., Lee, K.W. and Kim, J.S., 2017. Alantolactone and Isoalantolactone Prevent Amyloid β 25–35-induced Toxicity in Mouse Cortical Neurons and Scopolamine-induced Cognitive Impairment in Mice. *Phytotherapy Research*, 31 (5), 801-811.
- Sezgin, C., 2010. Kanserle bitkilerle tedavide örnek uygulamalar. *Bitkilerle Tedavi Sempozyumu*, İstanbul.
- Shein, S.A., Kuznetsov, I.I., Abakumova, T.O., Chelushkin, P.S., Melnikov, P.A., Korchagina, A.A. and Chekhonin, V.P., 2016. VEGF-and VEGFR2-Targeted Liposomes for Cisplatin Delivery to Glioma Cells. *Molecular pharmaceutics*, 13 (11), 3712-3723.
- Sherr, C.J. and McCormick, F., 2002. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, 2 (2), 103-12.
- Sherr, C.J., 1996. Cancer cell cycles. *Science*, 274 (5293), 1672-1677.
- Siddiqui, S., Verma, A., Rather, A.A., Jabeen, F. and Meghvansi, M.K., 2009. Preliminary phytochemicals analysis of some important medicinal and aromatic plant. *Advances in Biological Research*, 3, 188-195.
- Silber, J.R., Bobola, M.S., Blank, A., Schoeler, K.D., Haroldson, P.D., Huynh, M.B., and Kolstoe, D.D., 2002. The apurinic/apyrimidinic endonuclease activity of Ape1/Ref-1 contributes to human glioma cell resistance to alkylating agents and is elevated by oxidative stress. *Clinical Cancer Research*, 8 (9), 3008-3018.
- Slyskova, J., Lorenzo, Y., Karlsen, A., Carlsen, M.H., Novosadova, V., Blomhoff, R. and Collins, A.R., 2014. Both genetic and dietary factors underlie individual differences in DNA damage levels and DNA repair capacity. *DNA repair*, 16, 66-73.
- Song, Q.H., Kobayashi, T., Iijima, K., Hong, T. and Cyong, J.C., 2000. *Phytotherapy Research*, 14, 180.

- Sowndhararajan, K., Cho, H., Yu, B., Song, J. and Kim, S., 2016. Effect of inhalation of essential oil from *Inula helenium* L. root on electroencephalographic (EEG) activity of the human brain. *European Journal of Integrative Medicine*, 8 (4), 453-457.
- Srivastava, J.K. and Gupta, S., 2007. Antiproliferative and apoptotic effects of chamomile extract in various human cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (23), 9470-9478.
- Stojakowska, A., Michalska, K. and Malarz, J., 2006 Simultaneous quantification of eudesmanolides and thymol derivatives from tissues of *Inula helenium* and *I. royleana* by reversed - phase high - performance liquid Chromatography. *Phytochemical Analysis*, 17 (3), 157-161.
- Stummer, W., Reulen, H.J., Meinel, T., Pichlmeier, U., Schumacher, W. and Tonn, J.C. 2008. Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery*, 62 (3), 564-576.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B. and Taphoorn, M.J. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 352, 987-996.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.O. and Dommes, J., 2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113 (4), 1226-1233.
- Tanaka, T., Shnimizu, M. and Moriwaki, H., 2012. Cancer chemoprevention by carotenoids. *Molecules*, 17 (3), 3202-3242.
- Teng, M.W., Swann, J.B., Koebel, C.M., Schreiber, R.D. and Smyth, M.J., 2008. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *Journal of Leukocyte Biology*, 84 (4), 988-993.
- Tepe, B., Akpulat, H. A., Sokmen, M., Daferera, D., Yumrutas, O., Aydin, E. and Sokmen, A. 2006. Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. *Food Chemistry*, 97 (4), 719-724.
- Trachootham, D., Alexandre, J. and Huang, P. 2009. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?. *Nature reviews. Drug Discovery*, 8 (7), 579.
- Trendafilova, A., Chanev, C. and Todorova, M., 2010. Ultrasound-assisted extraction of alantolactone and isoalantolactone from *Inula helenium* roots. *Pharmacognosy Magazine*, 6 (23), 234.
- Urso, M.L. and Clarkson, P.M., 2003. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189, 41-54.
- Valko, M., Rhodes C.J., Mancol J., Izakovic M. and Mazur M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1-40.
- Vasas, A. and Hohmann, J., 2011. Xanthane sesquiterpenoids: structure, synthesis and biological activity. *Natural Product Reports*, 28 (4), 824-842.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R. and Berneman, Z.N. 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, 36 (3), 131-149.
- Walker, M.D., Green, S.B., Byar, D.P., Alexander, E., Batzdorf, U. and Brooks, W.H., 1980. Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the

- treatment of malignant glioma after surgery. *The New England Journal of Medicine*, 303, 1323-1329.
- Wang, Q., Zhou, B.N., Zhang, R.W., Lin, Y.Y., Lin, L.Z., Gil, R.R. and Cordell, G.A., 1996. *Planta Medica*, 62 (2), 166-168.
- Weng, Z., Gao, H., Hu, J., Fan, Y., Wang, H. and Li, L. 2016. Isoalantolactone induces autophagic cell death in SKOV3 human ovarian carcinoma cells via upregulation of PEA-15. *Oncology Reports*, 35 (2), 833-840.
- Weyermann, J., Lochmann, D. and Zimmer, A., 2005. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*, 288, 369-376.
- Wilson, D.M. and Barsky, D. 2001. The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutation Research/DNA Repair*, 485 (4), 283-307.
- Wilson, J.K., Sargent, J.M., Elgie, A.W., Hill, J.G. and Taylor, C.G., 1990. A feasibility study of the MTT assay for chemosensitivity testing in ovarian malignancy. *British Journal of Cancer*, 62, 189-194.
- Wirth, T. and Ylä-Herttuala, S., 2006. Gene technology based therapies in the brain. *Advances and technical standards in neurosurgery*, Springer, Vienna, 3-32.
- Wirth, T., Samaranayake, H., Pikkarainen, J., Määttä, A.M. and Ylä-Herttuala, S., 2009. Clinical trials for glioblastoma multiforme using adenoviral vectors. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 11 (5), 485-492.
- Yang, S., Irani, K., Heffron, S.E., Jornak, F. and Meyskens Jr, F.L., 2005. Alterations in the expression of the apurinic/apyrimidinic endonuclease-1/redox factor-1 (APE/Ref-1) in human melanoma and identification of the therapeutic potential of resveratrol as an APE/Ref-1 inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4 (2005), 1923-1935.
- Yavuz, M., 2001. Hemsirelik Eğitiminde Alternatif ve Tamamlayıcı Terapiler. I. Uluslararası & V. Ulusal Hemsirelik Eğitimi Kongre Kitabı. 50 s, Nevşehir.
- Yong, L.I., Tie-ku, L.I., Shi-wang, W.E.N., Yue-feng, Z.H.A.N.G., Zi-qiang, T.I.A.N., Qing-wen, S.H.I. and Nobuo, S., 2010. In vivo and in vitro anti-tumor activity studies of five sesquiterpenoids from *Inula helenium* [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 1, 32.
- Yue, G.G.L., Chan, B.C.L., Kwoka, H.F., Wong, Y.L., Leung, H.W., Ji, C.J., Fung, K.P., Leung, P.C., Tan, N.H. and Lau, C.B.S., 2013. Anti-angiogenesis and immunomodulatory activities of an anti-tumor sesquiterpene bigelovin isolated from *Inula helianthus-aquatica*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 59, 243-252.
- Zhao, J., Li Y., Liu Q. and Gao, K., 2010. Antimicrobial activities of some thymol derivatives from the roots of *Inula hupehensis*. *Food Chemistry*, 120, 512-516.
- Zhao, Y.M., Zhanga, M.L., Shi, Q.W. and Kiyota, H., 2006. Chemical Constituents of Plants from the Genus *Inula*. *Chemistry & Biodiversity*, 3, 371-384.
- Zhou, B.N., Bai, N.S., Lin, L.Z. and Cordell, G.A., 1994. *Phytochemistry*, 36, 721-724.
- Zhou, M.X., Wei, X., Li, A.L., Wang, A.M., Lu, L.Z., Yang, Y., Ren, D.M., Wang, X.N., Wen X.S, Lou H.X. and Shen, T., 2016. Screening of traditional Chinese medicines with therapeutic potential on chronic obstructive pulmonary disease through inhibiting oxidative stress and inflammatory response. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16 (1), 360.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Erzurum’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2004 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2008’de başarıyla mezun oldu. 2008-2011 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde Zooloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı. 2011 yılında aynı alanda Doktora programına başladı. 2013 yılından itibaren Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünde Araştırma görevlisi olarak halen çalışmaktadır.