



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**HYPERİCUM PERFORATUM (St. JOHN' S
WORT)' UN BURKİTT LENFOMA HÜCRE
DİZİLERİNDE (DAUDİ VE NAMALWA)
SİTOTOKSİK, ANTİPROLİFERATİF VE
APOPTOTİK ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. ÖZLEM ÖZ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa BİRİNCİOĞLU

AYDIN-2011

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**HYPERİCUM PERFORATUM (St. JOHN' S
WORT)' UN BURKİTT LENFOMA HÜCRE
DİZİLERİNDE (DAUDİ VE NAMALWA)
SİTOTOKSİK, ANTİPROLİFERATİF VE
APOPTOTİK ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. ÖZLEM ÖZ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa BİRİNCİOĞLU

AYDIN-2011

Bu araştırma ADÜ Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TPF-11008 nolu
proje olarak desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

FARMAKOLOJİ uzmanlık eğitimim süresince bilimsel görüşleri, manevi desteği ve büyük emeği ile beni aydınlatan değerli hocam, rektörümüz Sayın Prof. Dr. Mustafa BİRİNCİOĞLU' na en derin teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimimde katkıları olan sayın hocalarım Doç. Dr. Turhan DOST, Yrd. Doç. Dr. İbrahim TUĞRUL, Yrd. Doç. Dr. Buket DEMİRCİ ve Yrd. Doç. Dr. Ömer DEMİR' e teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca fikirleri ile bana yol gösteren, ilgi ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim değerli hocalarım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı' ndan Sayın Yard. Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN' e ve Biyokimya Anabilim Dalı' ndan Sayın Prof. Dr. Leyla Didem KOZACI' ya en içten teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Ayrıca bugünlere gelmemde emeği geçen tüm hocalarıma da teşekkürlerimi sunarım. Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım arkadaşlarım Uzm. Dr. Hakan ÖZKAYRAN' a, Uzm. Dr. Filiz GÖKALP' e ve Uzm. Dr. Serpil ÇEÇEN' e teşekkürlerimi sunarım. Deney hayvanları laboratuvarından Sevinç TOMBUL' a da teşekkür ederim.

Hayatımın her anında bana destek olan, eğitim hayatımın bu zorlu süreçlerinde gizli kahramanlar olarak görev yapan ve iyi ki varsınız dediğim sevgili annem Emine ÖZ' e, sevgili babam Hasan ÖZ' e ve sevgili ağabeyim Mustafa Fatih ÖZ' e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Özlem ÖZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLO DİZİNİ	VI
ŞEKİL DİZİNİ	VII
RESİMLER DİZİNİ	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hypericum perforatum' un Özellikleri	3
2.2. Hypericum perforatum' un Aktif Bileşikleri	4
2.2.1. Naftodiantronlar	6
2.2.2. Flavonoidler	6
2.2.3. Floroglusinoller	7
2.3. Hypericum perforatum' un Farmakolojik Etkileri	8
2.3.1. Hiperisin ve Farmakolojik Etkileri	8
2.3.1.1. Hiperisinin Antidepresan Etkileri	8
2.3.1.2. Hiperisinin Antitümöral Etkileri	9
2.3.1.3. Hiperisinin Antiviral Etkileri	11
2.3.1.4. Hiperisinin Hepatoprotektif Etkisi	11
2.3.2. Hiperforin ve Farmakolojik Etkileri	12
2.3.2.1. Hiperforinin Antidepresan Etkileri	12
2.3.2.2. Hiperforinin Nörolojik Etkileri	13

2.3.2.3. <i>Hiperforinin Antiinflamatuvar Etkileri</i>	13
2.3.2.4. <i>Hiperforinin Antibakterial Etkileri</i>	14
2.3.2.5. <i>Hiperforinin Antitümöral Etkileri</i>	15
2.4. <i>Lenfoma</i>	16
2.4.1. <i>Non-Hodgkin Lenfoma</i>	17
2.4.1.1. <i>Non-Hodgkin Lenfoma' nın Epidemiyolojisi</i>	19
2.4.1.2. <i>Non-Hodgkin Lenfoma' nın Etyopatogenezi</i>	19
2.4.1.3. <i>Non-Hodgkin Lenfoma' nın Sınıflandırılması</i>	20
2.5. <i>Burkitt Lenfoma</i>	22
2.5.1. <i>Genetik Özellikleri</i>	23
2.5.2. <i>Sınıflama</i>	23
2.5.3. <i>Semptom ve Bulgular</i>	24
2.5.4. <i>Tanı</i>	25
2.5.5. <i>Evreleme</i>	25
2.5.6. <i>Prognostik Faktörler</i>	26
2.5.7. <i>Tedavi</i>	27
2.5.8. <i>Komplikasyonlar</i>	29
3. <i>GEREÇ VE YÖNTEM</i>	30
3.1. <i>Kullanılan Cihazlar, Aletler, Steril Malzemeler ve Kimyasallar</i>	30
3.1.1. <i>Kullanılan Cihazlar ve Aletler</i>	30
3.1.2. <i>Kullanılan Steril Malzemeler</i>	31
3.1.3. <i>Kullanılan Kimyasallar</i>	31
3.2. <i>Hücre Dizileri ve Özellikleri</i>	32
3.3. <i>Hücre Kültürü Yönteminin Temel Aşamaları</i>	33

3.3.1. Besiyerinin Hazırlanması	33
3.3.2. Hücrelerin Çözülmesi	33
3.3.3. Hücrelerin Dondurulması	33
3.3.4. Hücrelerin Sayımı	34
3.3.5. Hücre Kültürü	35
3.4. Hypericum Perforatum Ekstresinin Hazırlanması	36
3.5. Deney Grupları	36
3.6. Hücre Canlılığı Değerlendirme Testi (Tripın Mavisi Testi)	37
3.7. WST-1 Testi	37
3.8. LDH Sitotoksosite Testi	38
3.9. BrdU Testi	39
3.10. Tunel Testi	41
3.11. ANNEXİN V Testi	42
3.12. İstatiksel Analiz	43
4. BULGULAR	44
4.1. Namalwa ve Daudi Hücrelerinde Hypericum Perforatum' un Tripın Mavisi Boyama Yöntemi ile Viabilitenin Değerlendirilmesi	44
4.2. Namalwa ve Daudi Hücrelerinde Hypericum Perforatum' un WST-1 Testi ile Metabolik Aktivitenin Değerlendirilmesi	47
4.3. Namalwa ve Daudi Hücrelerinde Hypericum Perforatum' un LDH Testi ile Sitotoksitenin Değerlendirilmesi	50
4.4. Namalwa ve Daudi Hücrelerinde Hypericum Perforatum' un BrdU Testi ile Proliferasyonun Değerlendirilmesi	53
4.5. Namalwa ve Daudi Hücrelerinde Hypericum Perforatum' un Annexin V Testi ile Apoptozisin Değerlendirilmesi	55
4.6. Namalwa ve Daudi Hücrelerinde Hypericum Perforatum' un Tunel Testi ile Apoptozisin Değerlendirilmesi	59

5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	73
7. ÖZET	75
8. SUMMARY	77
9. KAYNAKLAR	79

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1: H. perforatum' un bileşenleri ve yüzde (%) oranları	5
Tablo 2: WHO' ya göre non-Hodgkin lenfomaları içeren lenfoproliferatif hastalıkların sınıflandırılması	21
Tablo 3: Burkitt Lenfoma' nın sınıflaması ve klinik özellikleri	24
Tablo 4: NHL St. Jude evrelemesi	26
Tablo 5: NHL' da prognozu etkileyen faktörler	26
Tablo 6: Burkitt Lenfoma tedavisi için kemoterapi rejimleri	28
Tablo 7: Namalwa ve Daudi Hücrelerinin Özellikleri	33

ŞEKİL DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1: H. perforatum' un içerdği naftodiantronların kimyasal yapısı	6
Şekil 2: H. perforatum' un içerdği flavonoidlerin kimyasal yapısı	7
Şekil 3: H. perforatum' un içerdği floroglusinollerin kimyasal yapısı	7
Şekil 4: B ve T hücre diferansiasyonunda meydana gelen fenotipik ve genotipik değişikliklerin şematik resmi	18
Şekil 5: Neubauer lamı sayım alanı	34
Şekil 6: Namalwa hücrelerinde Hypericum perforatum' un 24, 48, 72 saat inkübasyon sonrası gözlenen % viabilite değerlerinin (ortalama±standart sapma) grafiksel olarak gösterilmesi	44
Şekil 7: Daudi hücrelerinde Hypericum perforatum' un 24, 48, 72 saat inkübasyon sonrası gözlenen % viabilite değerlerinin (ortalama±standart sapma) grafiksel olarak gösterilmesi	46
Şekil 8: Namalwa hücrelerinde Hypericum perforatum' un 24, 48, 72 saat inkübasyon sonrası ölçülen % metabolik aktivite değerlerinin (ortalama±standart sapma) grafiksel olarak gösterilmesi	48
Şekil 9: Daudi hücrelerinde Hypericum perforatum' un 24, 48, 72 saat inkübasyon sonrası ölçülen % metabolik aktivite değerlerinin (ortalama±standart sapma) grafiksel olarak gösterilmesi	49
Şekil 10: Namalwa hücrelerinin Hypericum perforatum ile 24, 48, 72 saat inkübasyonu sonucunda ölçülen LDH aktivitesinin (ortalama±standart sapma) grafiksel olarak gösterilmesi	51
Şekil 11: Daudi hücrelerinin Hypericum perforatum ile 24, 48, 72 saat inkübasyonu sonucunda ölçülen LDH aktivitesinin (ortalama±standart sapma) grafiksel olarak gösterilmesi	52
Şekil 12: Namalwa hücrelerinde Hypericum perforatum' un 24, 48, 72 saat inkübasyon sonrası gözlenen hücre proliferasyon değerlerinin (ortalama±standart sapma) grafiksel olarak gösterilmesi	53
Şekil 13: Daudi hücrelerinde Hypericum perforatum' un 24, 48, 72 saat inkübasyon sonrası gözlenen hücre proliferasyon değerlerinin (ortalama±standart sapma) grafiksel olarak gösterilmesi	54

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 1: <i>Hypericum perforatum</i> L.' nin genel görünümü	3
Resim 2: Namalwa hücrelerinin 0,5 mg/ml konsantrasyonda <i>H. perforatum</i> ile 24 saat inkübasyon sonrası floresans mikroskop görüntüleri (Annexin V) A) Kontrol grubu (x20) B) DMSO grubu (x20) C) 0,5 mg/ml konsantrasyon grubu (x40)	56
Resim 3: Daudi hücrelerinin 0,5 mg/ml konsantrasyonda <i>H. perforatum</i> ile 24 saat inkübasyon sonrası floresans mikroskop görüntüleri (Annexin V) A) Kontrol grubu (x20) B) DMSO grubu (x20) C) 0,5 mg/ml konsantrasyon grubu (x40)	58
Resim 4: Namalwa hücrelerinde <i>H. perforatum</i> ile inkübasyon sonrası floresans mikroskop görüntüleri (DAPI, TUNEL x40) A) Kontrol B) DMSO C) 0,5 mg/ml <i>H. perforatum</i> konsantrasyon grubu	60
Resim 5: Namalwa hücrelerinin 0,5 mg/ml konsantrasyonda <i>H. perforatum</i> ile inkübasyon sonrası floresans mikroskop görüntüleri A) DAPI, TUNEL x20 B) DAPI, TUNEL x100	61
Resim 6: Daudi hücrelerinde <i>H. perforatum</i> ile inkübasyon sonrası floresans mikroskop görüntüleri (DAPI, TUNEL x40) A) Kontrol B) DMSO C) 0,5 mg/ml <i>H. perforatum</i> konsantrasyon grubu	62
Resim 7: Daudi hücrelerinin 0,5 mg/ml konsantrasyonda <i>H. perforatum</i> ile inkübasyon sonrası floresans mikroskop görüntüleri A) DAPI, TUNEL x20 B) DAPI, TUNEL x100	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMPA: α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropionik asid

ATCC: American Type Culture Collection

BrdU: Bromo-deoxy-Uridine

cAMP: Cyclic adenosine monophosphate

CD: Cluster of Differentiation

COMT: Katekol- O-metil-transferaz

CRF: Corticotropin-Releasing Factor

CYP: Sitokrom enzimleri

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DBBHL: Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma

dk: Dakika

DMSO: Dimetilsülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asid

EBV: Epstein-Barr virus

FBS: Fetal Bovine Serum

g: Gravity

GABA: Gama-aminobütirik asit

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1- ethanesulfonic acid sodium salt

HIV: Human Immunodeficiency Virus

HL: Hodgkin lenfoma

iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

KLL: Küçük Lenfositik Lenfoma

LDH: Laktat dehidrogenaz

MAO: Monoamin oksidaz

MAP: Mitojen Aktiflenmiş Protein

µl: Mikrolitre

mg: Miligram

mM: Milimolar

NAD: Nikotinamid adenin dinükleotid

NCI: National Cancer Institute

NHL: Non-Hodgkin Lenfoma

NMDA: N-Metil D-Aspartik Asit

NO: Nitrik Oksid

PBS: Phosphate Buffered Saline

PKC: Protein kinaz C

REAL: Revised European-American Lymphoma

RNA: Ribonükleik asid

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

TdT: Terminal deoksinükleotidil transferaz

TRAIL: Tümör Nekrozis Faktör-Aracılı Apoptozis İndükleyeci Ligand

Tunel: Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling

WST-1: Water-soluble tetrazolium salt, 2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-[2,4-disulfophenyl]-2H tetrazolium monosodium salt

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Burkitt Lenfoma, c-myc onkogeninin disregölasyonu ile sonuçlanan orta boy B hücre proliferasyonu gösteren Non-Hodgkin lenfoma grubunda oldukça agresif bir tümördür. Endemik, sporadik ve immün yetmezlik ilişkili klinik subgrupları mevcuttur. Daha çok çocuklarda yaygın olarak görülür ve tüm çocukluk çağı lenfomalarının % 30-40' ını kapsar. Ancak yetişkinlerde de her yaşta görülebilmektedir (1,2).

Burkitt Lenfoma tedavisinde genel olarak kemoterapi (Siklofosamid, Vinkristin, Doksorubisin, Metotreksat, Fosfamide, Etoposid, Citarabin), kök hücre/ kemik iliğı transplantasyonu, immunoterapi ve radyoterapi yöntemleri kullanılmaktadır. Geçen yıllarda yapılan çalışmalarla B hücre lenfomalı hastaların tedavisinde gözle görülür ilerleme kaydedilmesine rağmen tedavi edilemeyen hastalar halen mevcuttur. Bu nedenle çalışmalar tedavinin etkinliğini artırmaya ve özellikle tedaviye bağı toksisitenin azaltılmasına yönelik immunoterapi (monoklonal antikor ya da immün modülasyon sağılayan ilaçların kullanımı) veya apoptotik yolları hedef alarak anti tümör aktivite gösteren ilaçların ve küçük moleküllerin kullanımına odaklanmıştır (3).

Hypericum perforatum, ondan fazla değışik türde biyokimyasal bileşik madde içermekte olup; naftodiantron türevleri, flavonoidler ve floroglusinol türevleri *H. perforatum*' da en fazla bulunan biyokimyasal bileşiklerdir ve bitkinin geleneksel kullanımında tıbbi etkiden asıl sorumlu ajanlar olarak tarif edilmektedir. *H. perforatum*' un çeşitli kanser hücrelerinde büyümeyi inhibe edici etkisi ve apoptozisi teşvik edici etkisi olduğı ortaya konmuştur. *H. perforatum*' un etkin maddesi olan hiperforinin proapoptotik yani apoptozisi teşvik edici etkisi olduğı B hücreli kronik lenfositik lösemi hastalarından alınan lösemi hücrelerinde de gösterilmiştir. Hatta hiperforinin sağılıklı donörlerden alınan normal B lenfosit hücrelerine oranla kanserli hücrelerde daha etkili olduğı yine aynı çalışmada ortaya konmuştur (4). Bunun dışında yine *H. perforatum*' un çeşitli lösemi hücre dizilerinde (K572, U937, Jurkat) büyümeyi inhibe edici etkisi olduğı ve aynı zamanda kaspas aktivasyonunu tetikleyerek apoptozisi indüklediğı gösterilmiştir (5, 6).

Ancak *H. perforatum*' un Burkitt Lenfoma üzerinde etkisi olup olmadığı henüz bilinmemektedir ve bu konuda literatürde de boşluk bulunmaktadır. Bu çalışmada, antitümoral etkiye sahip olduğı bilinen *H. perforatum* ekstresi kullanılarak orijinal olarak

Burkitt Lenfoma hastalarından elde edilen iki hücre dizisi Daudi (ATTC no: CCL-213) ve Namalwa (ATTC no: **CRL-1432**) üzerinde sitotoksik, antiproliferatif ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ileride H. perforatum ile ilgili yapılacak olan çalışmalara yön verecek ve katkıda bulunacaktır. Aynı zamanda Burkitt Lenfoma tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Hypericum Perforatum*' un Özellikleri

Hypericum perforatum L. Hypericaceae familyasından, Avrupa, Asya, Kuzey Afrika ve Kuzey Amerika' da yaygın olarak yetişen çok yıllık otsu bir bitki türüdür. Boyu 50-60 cm' ye kadar ulaşabilmekte olup, çok dallıdır ve sapları ayrı olduğu halde bir şemsiye biçimindeki çiçekleri beş parçalı, korolla altın sarısı renkli ve kenarları siyah renkli guddeli tüyler ile çevrilidir. Bitkinin yapraklarının üzerinde bulunan ve ışığa tutulduğunda açık bir şekilde görünen, yarı saydam noktacıklarından yağ çıkartılabilmektedir. Bu guddeler iki parmak arasında sıkıştırıldığında kırmızı bir boya çıkarmakta olup bu boya hiperisince zengindir (7).



Resim 1: *Hypericum perforatum* L.' nin genel görünümü (8)

Çiçekleri bitkinin uç kısımlarında demet şeklinde açmaktadırlar. Genellikle çiçeklerin açtığı dönemde veya hemen öncesinde toplanmaktadır. Hasat sonrası bioaktif bileşiklerin degradasyonunu önlemek için hızlı bir şekilde kurutulmaktadır. Bitkinin geleneksel olarak tedavide kullanılan kısmı kurutulmuş çiçekleri, yaprakları ve uç kısımlarından oluşmaktadır (9).

Dünyada 400 kadar türle temsil edilen Hypericaceae familyasına bağlı *Hypericum* L. cinsinin Türkiye’de 84 türü bulunmaktadır. Ülkemiz *hypericum* türleri bakımından önemli bir gen merkezidir (10).

Tarla, yol ve orman kıyılarında, tepelerde ve çayırarda temmuzdan eylüle kadar çiçeklenen ve Türkiye’de kantaron, binbirdelik otu, kılıç otu, mayasıl otu, yara otu, kuzu kıran, kan otu gibi yöresel adlara da sahip olan şifalı bir bitkidir. İngilizce’de St. John’s Wort adıyla bilinmektedir. Geleneksel tıpta antidepresan olarak kullanılmakla birlikte çeşitli Avrupa ülkelerinde fitoterapi alanında yoğun bir şekilde talep görmektedir (11).

Hristiyan mistiziminde bu bitkinin önemli bir yeri vardır. Yaklaşık 1300 yıldan beri Hristiyan geleneğinin sembolik bir bitkisi olarak kabul görmektedir. Rivayetlere göre St. John Wort ismi Yahya (Johannas) peygamberden gelmektedir. İncil’ de geçen bir olaydan ötürü Yahya Peygamber, Hristiyanlar için mucizevi bir bitki getirmiştir ve bu bitki *Hypericum perforatum*’ dur. Diğer bir rivayet ise haçlı seferleri sırasında yaralanan St. John şövalyelerinin yaralarının tedavisi bu bitki ile yapıldığından bu ismi aldığı şeklindedir (12).

1525 yılında İsveçli hekim Paracelsus tarafından *H. perforatum*’ un, psikiyatrik rahatsızlıkların tedavisinde kullanılabileceğinin saptanmasından sonra geleneksel batı tıbbında nöralji, anksiyete, nevroz ve depresyonu tedavi etmek için kullanılmıştır (13). *H. perforatum* yüzyıllardır enfeksiyonlara karşı mücadelede, respiratuar ve inflamatuvar hastalıkların, peptik ülserin ve cilt yaralarının tedavisinde de kullanılmaktadır (7). Türkiye’ de geleneksel tedavi olarak halk arasında yaygın bir şekilde *H. perforatum*, zeytinyağı içerisinde değişik konsantrasyonlarda çözülerek yara ve peptik ülserin tedavisinde kullanılmaktadır (14).

2.2. *Hypericum Perforatum*’ un Aktif Bileşikleri

H. perforatum, ondan fazla değişik türde biyokimyasal bileşik madde içermekte olup; bunlardan en önemlileri naftodiantron türevleri, flavonoidler (quersitrin, quersitin, rutin), floroglusinol türevleri, prosiyanidinler, taninler, esansiyel yağlar (carophyllene, pinen, limonen, myrcene), amino asitler, fenilpropanlar, ksantonlar ve diğer suda çözünebilir bileşikler (organik asitler, peptidler ve polisakkaridler), Vitamin C ve resindir (Tablo 1). Naftodiantron türevleri, flavonoidler ve floroglusinol türevleri *H. perforatum*’ da en fazla

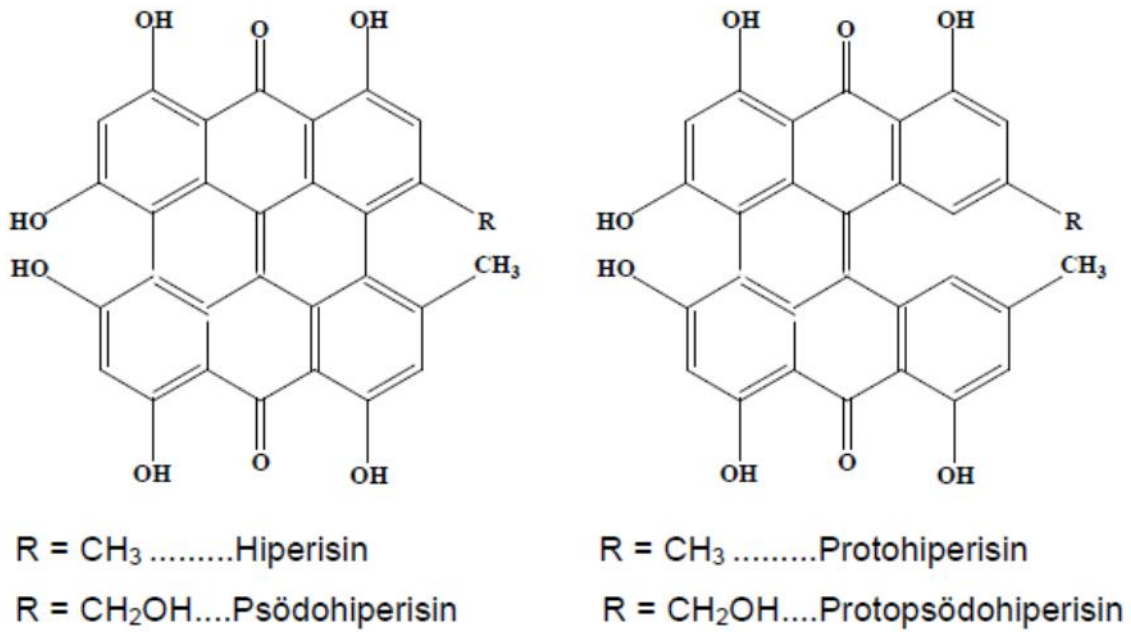
bulunan biyokimyasal bileşiklerdir ve bitkinin geleneksel kullanımında tıbbi etkiden asıl sorumlu ajanlar olarak tarif edilmektedir (9,11).

Tablo 1. *H. perforatum*' un bileşenleri ve yüzde (%) oranları (11)

Naphtodianthrone türevleri	0,05-0,15
Hypericin, pseudohypericin, protohypericin, Protopseudohypericin	
Flavanoidler	2,0-5,0
Hyperoside (% 0,5-2)	
Rutin (% 0,3-1,6)	
Quercitrin (% 3)	
İzoquercitrin (%0,3)	
Qercetin	
Biflavonlar	
Biapigenin (yaklaşık % 0,26)	
Amentoflavone	
Phloroglucinol türevleri	
Hyperforin, adhyperforin ve bazı türevler (% 4 kadar)	
Xanthone' lar	
Phenolic asitler	
caffeic asit, chlorogenic asit, ferulic asit	
hyperforin, p-cumaric asit, p-hydroxybenzoic asit, vanillic asit	
Uçucu yağ	0,05-1,0
Esas olarak yüksek n-alkanlar	
Steroller	
B-sitosterol	
Vitaminler	
C vitamini, A vitamini	

2.2.1 Naftodiantronlar

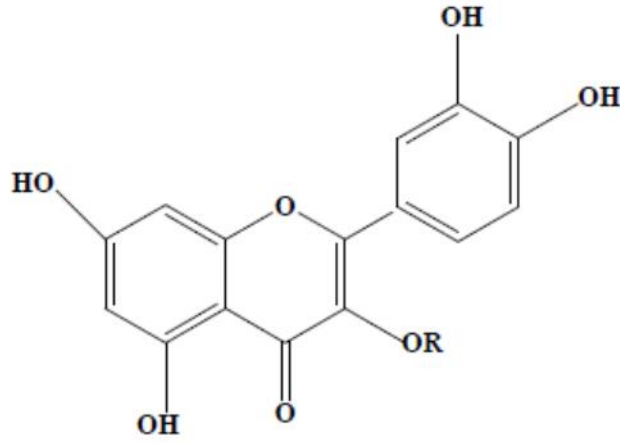
H. perforatum' un karakteristik bileşiklerinden olan naftodiantronlar özellikle bitkinin çiçek ve tomurcuklarında % 0,05-0,15 oranında bulunur. Hiperisin, psödohiperisin ve bu bileşiklerin biyosentetik prekürsörleri olan protohiperisin ve protopsödohiperisin ve eser miktarda bulunan siklopsödohiperisin naftodiantron türevi bileşikler sınıfındadır (Şekil 1) (15).



Şekil 1: *H. perforatum*' un içerdği naftodiantronların kimyasal yapısı (15)

2.2.2 Flavonoidler

Bitkinin yaprak, sap, çiçek ve tomurcuk gibi toprak üstü kısımlarında quersitin, hiperozid, quersitrin, izoquersitrin, rutin gibi flavonoid glikozidler % 2-5 oranında bulunmaktadır (Şekil 2) (15).

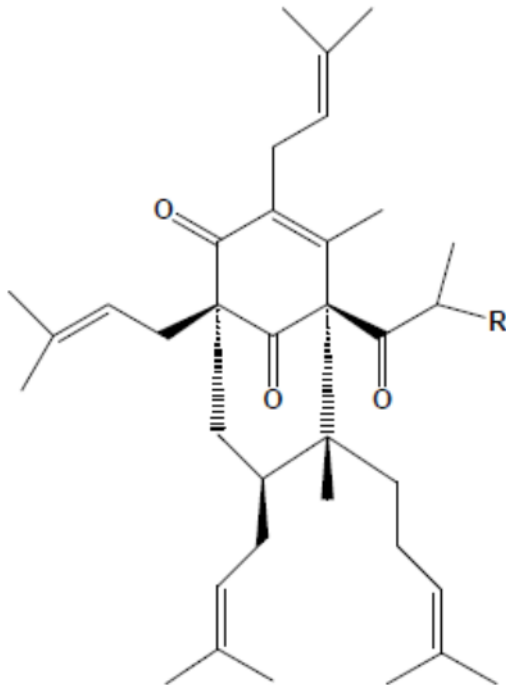


R = Glikoz-Ramnoz....	Rutin
R = Galaktoz.....	Hiperozit
R = Glikoz.....	İzokersitrin
R = Ramnoz.....	Kersitrin
R = H.....	Kersetin

Şekil 2: H. perforatum' un içerdği flavonoidlerin kimyasal yapısı (15)

2.2.3 Floroglusinoller

H. perforatum' un başlıca floroglusinol türevi bileşikleri hiperforin (% 2-4,5) ve adhiperforindir (% 0,2-1,8) (Şekil 3). Bu iki bileşiğin de stabilitelerinin düşük olması nedeniyle bitkide oksitlenmiş türevleri de bulunmaktadır (15).



R = H	Hiperforin
R = CH ₃	Adhiperforin

Şekil 3: H. perforatum' un içerdği floroglusinollerin kimyasal yapısı (15)

2.3. *Hypericum Perforatum*' un Farmakolojik Etkileri

2.3.1. *Hiperisin ve Farmakolojik Etkileri*

Hiperisinin keşfi ve özelliklerinin saptanması, büyük miktarda *hypericum* yetişen otlaklarda beslenen sığırlarda deri sensivitesi gözlenmesi üzerine hiperisizme neden olan içeriklerin araştırılmasına dayanmaktadır. Ölçülen 36 *hypericum* türünden 27' sinde hiperisin saptanmıştır ve bu bitkinin önemli sekonder metabolitlerinden biridir (16).

Lipofilik yapıda olduğundan dolayı hücre membranındaki fosfolipid yapılarla birleşir. Biyolojik sıvılara geçebilmektedir. İnsan serum albümini ve lipoproteinler gibi plazma proteinlerine bağlanabilmektedir. İnsan immünoglobulin G' ye bağlanmamaktadır (17).

2.3.1.1. *Hiperisinin Antidepresan Etkileri*

H. perforatum' un antidepresan özelliği uzun zamandır bilinmektedir ve geleneksel tıpta kullanılagelmiştir. Birçok ülkede fitoterapi alanında ve geleneksel tıpta antidepresan olarak kullanılmaktadır. *H. perforatum*' un antidepresan aktivitesinin sadece hiperforinden kaynaklı olmadığı aynı zamanda bir naftodiantron olan hiperisinin de etkisinin olduğu ve bu etkinin hipotalamik-hipofiz-adrenal aktivitesini düşürmesine bağlı olabileceği düşünülmüştür. Şiddetli hipotalamik-hipofiz-adrenal aktivite genellikle depresyonla ilişkilendirilmekte ve bu aktivitenin düzenlenmesinde kortikotropin salım faktörü (CRF) rol oynamaktadır. Simmen ve ark. yaptıkları deneyde hiperisin, psödohiperisin ve hiperforinin CRF1 reseptörlerini antagonize etme etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla rekombinant Çin hamster ovaryum hücrelerindeki CRF1 uyarımlı cAMP oluşumu ölçülmüş ve sadece psödohiperisinin selektif CRF1 reseptör antagonist etkisi tespit edilmiş ve sonuç olarak antidepresan aktivitede hiperforinin yanı sıra hiperisin ve psödohiperisinin de rol oynadığı belirlenmiştir (16,18).

Hiperisin ve pseudohiperisin MAO (monoamin oksidaz) inhibitörü olarak bilinir. Bu iki madde sentetik antidepresanlara benzer farmakolojik etki göstermektedir. Ayrıca hiperisin, GABA-A (gama-aminobütirik asit), benzodiazepin ve serotonin reseptörlerine nörotransmitterlerin bağlanmasını potansiyelize etmektedir (19).

Bilia ve ark. yaptıkları araştırmada, *H. perforatum*' un monoaminerjik nörotransmitterlerin geri alım inhibisyonu etkisiyle antidepresan etki gösterdiğini

belirtmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada *H. perforatum*' un adenosin, serotonin, GABA-A, GABA-B, benzodiazepin, inozitol trifosfat, MAO-A ve MAO-B için önemli ölçüde reseptör afinitesi gösterdiği tespit edilmiştir. İzole edilen psödohiperisinin dopamin- β -hidroksilaz enzimini inhibe ettiği, flavonoid ve ksantonların da MAO-A' ya karşı güçlü selektif inhibitör etki gösterdiği belirtilmiştir. Flavonoid içeren fraksiyonlarının COMT (katekol- O-metil-transferaz)' a karşı inhibisyon oluşturduğu tespit edilmiştir. Antidepresan aktivite ile ilgili yapılan çalışmalar hayvan deney modelleri üzerinde denenmiş imipramin ve fluoksetin gibi antidepresan ilaçlara kıyasla *H. perforatum*' un etkinliği kanıtlanmıştır. Aynı şekilde ekstreden izole edilen bileşiklerin de aktiviteleri değerlendirilmiş, flavonoidlerle naftodiantronların ancak kombine kullanıldığında antidepresan etki oluşturduğu, naftodiantronların tek başına etkisinin bulunmadığı tespit edilmiştir (13,16).

2.3.1.2. Hiperisinin Antitümoral Etkileri

Hiperisin güneş ışığına duyarlılığı artırır. Hiperisin, bugüne kadar tanımlanmış en güçlü doğal bir fotosensitizör ve etkin bir PKC (protein kinaz C) ve Erk1/2 MAP kinaz inhibitörü olarak malign tümörlerin terapi uygulamalarında güncellik kazanmıştır. Fotodinamik tedavide, dolaşımdaki ya da hedeflenen dokudaki fotosensitif boya, uygun dalga boyu ile uyarılır ve ortama salınan serbest radikaller yoluyla vazooklüzyon ve doku hasarı gerçekleşir (20).

Hiperisinin fotositotoksik etkisinin, antitümöral özellikler gösterdiği solid organ tümörlerinin hücre dizilerinde ve hayvan modellerinde gösterilmiş ve bunun mitokondrial fonksiyonlarda bozulma neticesinde ortaya çıktığı belirtilmiştir. Schempp ve ark. *H. perforatum*' un ışığa karşı duyarlı pigmenti hiperisinin neoplastik hücre dizilerinde sitotoksik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada Jurkat hücre dizisinde, hiperisinin ışığa bağlı apoptozis mekanizmasını bir antitümör bileşik olan paklitakselle kıyaslamışlardır. Işıkla aktive edilen hiperisinin, paklitakselle benzer etki göstererek kaspas-8 ve kaspas-3 aktivitesini arttırdığı ve bu durumun da Jurkat hücrelerinin proliferasyonunu tamamen bloke ettiği saptanmıştır (21,22).

Kanser hücre serilerinde farklı floresan organel işaretleyicileri ile yapılan hücresel lokalizasyon çalışmaları hiperisinin endoplazmik retikulum ve golgi kompleksinde biriktiğini göstermiştir. Benzer şekilde Caco-2 kolon kanser hücrelerinde hem plazmada hem de çekirdek zarlarında birikim görülmüştür (11).

Peebles ve ark., naftodiantron bileşiği olan hiperisinin HL-60 insan lösemi hücre dizilerindeki DNA topoizomeraz II α üzerindeki inhibisyon etkisini araştırmışlardır. Sonuçlar, hiperisinin DNA topoizomeraz II α 'nın katalitik inhibisyonu ile lösemi hücrelerine karşı toksik etkisinin olduğunu göstermiştir (23).

Martarelli ve ark., serotonin geri alım inhibitörlerinin antiproliferatif etkisini göz önünde bulundurarak *H. perforatum*'un metanollü ekstresinin prostat kanserine karşı in vivo ve in vitro etkisini araştırmışlardır. *H. perforatum* ekstresinin PC-3 insan prostat adenokarsinoma hücre dizilerine 1,41 mg/ml derişimde uygulanmasının hücre gelişimini % 80 oranında inhibe ettiği saptanmıştır. İn vivo deney modelinde altı haftalık fareler kullanılmış ve farelerin karnına tümör hücre süspansiyonu enjekte edilerek kanser oluşturulmuş, 10 gün sonra tedavi amacıyla *H. perforatum* ekstresi 15 mg/kg dozda intraperitoneal yolla uygulanmış, tedavi 25 gün sürmüştür. Sonuçlar, *H. perforatum* ekstresinin tümör gelişimini % 70 oranında azalttığını göstermektedir (17).

EMT-6 fare meme kanseri hücrelerinde mitokondrial fonksiyonları deprese ettiği, insan glioma hücreleri üzerinde de toksik etkisini mitokondrial fonksiyonları bozarak gösterdiği ortaya konmuştur. Bu çalışmalar hiperisinin fototoksitesinin mitokondrial enerji mekanizmaları üzerinden olduğu kanaatini oluşturmuştur. AY-27 sıçan mesane karsinoma hücrelerinde sitotoksitesini apoptozis ile gösterirken lösemi hücre dizilerinde, özellikle HL 60 gibi myeloid dizilerde apoptozisten nekroza kadar geniş bir spektrumda etkilerinin olduğuna dair sonuçlar mevcuttur. Yine insan servikal karsinoma HeLa ve fare T hücre hibridoma serilerinde mitokondrial sitokrom c' nin sitozole salınmasını uyararak apoptozis ile sitotoksite oluşturduğu gözlenmiştir. Jurkat lösemi hücrelerinde ise daha çok TRAIL (Tümör Nekrozis Faktör-Aracılı Apoptozis İndükleyeci Ligand) reseptörü üzerinden apoptotik mekanizmalar aktive olduğu tespit edilmiştir (16).

Kemirgenlerdeki in-vivo tümör çalışmalarında *Hypericum* ekstraktları ve hiperisin ile umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Hopfner ve ark. özofagus adenokarsinoma hücre serilerinde hiperisin ile fotodinamik tedavinin etkinliğini belirtmişlerdir (24). Bruggisser ve ark. MCF-7 insan meme kanser hücre serilerinde *hypericum* ekstraktı ile toksik veriler elde etmişlerdir (25). Hostanska ve ark. ise K-562 ve U- 937 lösemi ve LN-229 glioblastoma hücrelerinde sitotoksik etki oluşturduğunu rapor etmişlerdir (26). Shiono ve ark. insan megakaryoblastik lösemi hücre serisinde protein kinaz C yolağı üzerinden sitotoksik

etkilerini saptamışlardır (27). Kim ve ark. U-937 hiperisinin insan histiyositik lenfoma hücrelerinde diferansiyasyon- apoptozis mekanizmasında etkin olduğunu bulmuşlardır (28). Hwang ve ark. tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise insan over karsinoma hücrelerinde hiperisinin tirozin kinaz-MEG/ERG yolağını aktive ederek etkin olduğu ortaya konmuştur (29).

2.3.1.3. Hiperisinin Antiviral Etkileri

Hiperisin ve kimyasal benzeri psödohiperisin hem laboratuvar hem de hayvan deneylerinde, HIV-1, hepatit B, sindbus virüs, murin sitomegalo virüs (MCMV), influenze A ve B, herpes simplex I ve II ve radyasyon lösemi virüsü (rad LV) gibi virüslerin replikasyonunu inhibe ettiği saptanmıştır. Hiperisinin antiviral etkisinin AZT (3-azido-3-deoksitimidin) ve diğer nükleozid analoglarından farklı bir mekanizma ile olduğu ortaya çıkmıştır (30).

Son bulgular bu bileşiğin hem RNA hem de DNA virüslerinden sadece lipid zarfı olanlara etkili olduğu yönündedir. Zarflı virüslerin lipid olan zarf yapısı direkt olarak hiperisin tarafından parçalanır, antijenik özelliğini kaybeden virüs inaktive olur. Hiperisin proteaz aktivitesini etkileyerek gag (p24 geni) tarafından poliproteinlerin uzaklaştırılması ile poliproteinlerin sentezine engel olarak veya bu ptoteinlere bağlanarak viral nükleik asidin içine paketlenmesini engellemektedir. Böylece bozuk veya immatür yapı oluşumuna sebep olmaktadır (31).

2.3.1.4. Hiperisinin Hepatoprotektif Etkisi

Öztürk ve ark. tarafından yapılan çalışmada hiperisinin hepatoprotektif etkisi kanıtlanmıştır. Bu çalışmada karbon tetraklorür ile deneysel hepatik dejenerasyon oluşturulan sıçanlarda, intraduodenal H. perforatum injeksiyonu ile safra sekresyonunun arttığı ve safra içeriğinde hiperisin varlığı saptanmıştır. (32). Hiperisinin bu etkiyi steroid pregnan X reseptör aktivasyonu ile gerçekleştirdiği ileri sürülmüştür. Bitkinin fraksiyonlanarak etkinin izlendiği ön denemelerde hiperisince zengin fraksiyonlarda hepatoprotektif etkinin daha fazla olduğu gözlenmiştir (33).

2.3.2. Hiperforin ve Farmakolojik Etkileri

H. perforatum' da çok miktarda bulunan floroglusinol türevi olan, lipofilik bir bileşiktir. Hiperforin, taze kantaron otunun yaprak ve çiçeklerinin kuru ağırlıklarının % 4' ünden fazlasını oluşturur, ışığa ve havaya maruz kaldığında kararsızdır. Hiperisin, piridin ve diğer organik bazlarda kırmızı renkli floresans özellikli çözelti verecek şekilde çözünür. Genellikle birçok organik çözücüde çözünmezken alkali sulu çözücülerde çözünür; çözeltisi pH 11. 5' un altında kırmızı, pH 11. 5' un üzerinde ise yeşil renklidir. Hiperforin sıcaklığa duyarlı, fotodegradasyona hassas ve n-hegzan gibi apolar çözücülerde hızla parçalanmaktadır (16,34).

Hiperforin, kolayca bozulabilen bir bileşik olmasından dolayı üzerinde çalışılması zordur. Aslında hiperforin hava oksidasyonuna meyillidir ve çoğu organik solvent içinde kararsızdır. Buna rağmen hiperforinin disikloheksilammonium tuzu daha karardır. Hiperforinin kristal formu, ratlarda antidepresan etkisine yönelik yapılan çalışmalarda ve kanser invazyonu ve metastaz araştırmaları için yapılan çalışmalarda başarıyla kullanılmıştır (9).

H. perforatum' un antidepresan etkilerinde ana aktif komponent olduğu dikkat çekilmiştir. Son yıllarda hiperforinin diğer farklı etkilerini vurgulayan birçok veri elde edilmiştir. Diğer taraftan hiperforine olan bu ilgi hiperforinin diğer biyoaktivitelerinin ortaya çıkmasına ve sınıflandırılmasına yardımcı olmuştur. Hiperforin antidepresan etkilerine ek olarak nörolojik, antienflamatuar, antibakteriyel, antitümoral, antiangiogenik etkilere de sahiptir (16).

2.3.2.1. Hiperforinin Antidepresan Etkisi

Hiperforin, Hypericum ekstraktlarında antidepresan etkiden sorumlu ana bileşenlerden biri olduğu saptanmıştır. Birçok antidepresan ilaç, bir veya daha fazla nörotransmitter (çoğunlukla serotonin) maddenin az veya çok geri alınımını engellemek için seçici bir inhibitör olarak davranır. Bu etkisini geri alımda rol alan taşıyıcı proteinlerin transmitter bağlanma noktalarında kompetitif inhibisyon yaparak gerçekleştirir. Hiperforin; serotonin, dopamin ve noradrenalin hem de GABA ve glutamatın geri alınımını engellemede yaygın bir inhibitör etki

gösterir. Bu yaygın etki tam olarak hiperforinin olası yeni etki mekanizmalarının varlığına işaret etmektedir (7,35).

Nörotransmitter geri alınımında rol alan farklı taşıyıcı proteinlerin ortak bir noktası bulunmaktadır; bunların hepsi sodyum gradientini sürücü güç olarak kullanır, hiperforin ise iyon kanalları aracılığıyla sodyum gradientini azaltarak etki göstermektedir (36). Buna ilave olarak hiperforin GABA, NMDA (N-Metil D-Aspartik Asit) ve AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolepropionik asid) reseptörleri aracılı cevapları dolaylı olarak engeller ve presinaptik kalsiyum kanallarının açılmasını düzenler, intersinaptik aralığa nörotransmitterlerin salınımına öncülük eder (7,36).

2.3.2.2. *Hiperforinin Nörolojik Etkileri*

Hiperforinin β -amyloid öncül proteinleri üzerine özel bir etkisi olduğu düşünülmektedir. Alzheimer hastalarının amyloid plakları içinde ekstraselüler kümelenen amyloid prekürsör proteinler, β -sekretaz ve γ -sekretaz enzimleri aracılığıyla 39 ile 43 amino asit uzunluğunda β -amyloid peptitlerine dönüştürülür ve bu peptitler beyinde nörotoksik etki yapmaktadırlar (37).

Hiperforin, amyloid öncül proteinlerin oluşum sürecinde hızlı bir etkiye sahiptir, intrasellüler öncül protein konsantrasyonunu azaltmakta ve sekresyon oranını arttırmaktadır. Mevcut bilgiler hiperforinin aslında α -sekretazlar üzerinde öncelikli etkisi olduğunu göstermektedir. Fakat β -sekretazlar üzerindeki etkisini de göz ardı etmemek gerekir. Hiperforinin α -sekretaz/ β -sekretaz oranları üzerinde arttırıcı etkisi doğrulandığı takdirde Alzheimer hastalığında hiperforinin potansiyel önleyici rolü olup olmadığı açığa kavuşmuş olacaktır (9,38).

2.3.2.3. *Hiperforinin Antiinflamatuvar Etkileri*

H. perforatum' un antidepresan etkisi üzerine çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen antiinflamatuvar etkisinin moleküler temeli hakkında çok az bir bilgi vardır. H. perforatum' un lipofilik ekstraktlarının, yüzeysel yara, skar, yanık ve deri iltihabındaki bölgesel uygulamalarda iyileştirici etkisi olduğu bilinmekte ve önerilmektedir. H. perforatum' un

antiinflamatuvar etkilerinin esas olarak quersetinin proinflamatuvar sinyal transdüksiyon yolaklarında inhibitör etkisine bağlı olduğu düşünülmektedir. Tedeschi ve ark tarafından kronik inflamatuvar hastalıklarda etki mekanizmasının iNOS-NO yolağı üzerinden olduğu iddia edilmiştir (27).

Hiperforinin, farklı epidermal hücrelerine lenfosit reaksiyonu üzerinde ve T lenfositlerin proliferasyonu üzerinde inhibitör etkisi olduğu gösterilmiştir. Klinik çalışmalarda, hiperforinin hafif ve orta şiddetli atopik dermatitlerin topikal tedavilerinde belirgin bir şekilde deri iltihabını azaltıcı önemli faydaları ispatlanmıştır (39).

Diğer taraftan, hiperforin son zamanlarda bildirilen en güçlü siklooksijenaz-1 ve 5- lipoksijenaz inhibitörlerini doğal olarak içeren bileşiklerden biridir. Bu ikili inhibitör etki *H. perforatum*' un ve hiperforinin inflamatuvar deri hastalıklarında topikal tedavi için kullanılma endikasyonlarını açıklayabilmektedir. Ayrıca hiperforinin spesifik siklooksijenaz ve lipoksijenaz inhibitör etkilerine bağlı olarak görülebilen gastrik yan etkilerinden yoksun olmasından dolayı daha ileride diğer alerjik ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde potansiyel kullanımının söz konusu olabileceği öne sürülmektedir. Son zamanlarda, hiperforinin, reaktif oksijen radikalleri oluşumunun inhibisyonuna ve elastaz enziminin salınımı dahil olmak üzere lökositlerin diğer proinflamatuvar cevaplarına karıştığı rapor edilmiştir. Bu etkiler hiperforinin, G-protein sinyal yolları aracılığıyla reseptör aracılı kalsiyum mobilizasyonunun supresyonuna neden olması sonucu açığa çıkmaktadır (40,41).

2.3.2.4. Hiperforinin Antibakteriyel Etkileri

H. perforatum' un enfeksiyonlara karşı geleneksel kullanımındaki antibakteriyel özellikleri uzun zaman önce rapor edilmiştir. 70'li yılların başlarında bir Rus bilim grubu *H. perforatum* ekstraktlarının antibiyotik bir madde içerdiğini ortaya koydu ve ortaya konan bu antibiyotiğe "Hiperforin" olarak adlandırdılar. Aynı grup tarafından 1975'de hiperforinin kimyasal yapısı da aydınlatıldı. Hiperforin multi-rezistans *Staphylococcus aureus* ve diğer gram pozitif bakterilere karşı etkili antibakteriyel etki göstermesine karşın Gram-negatif bakterilere veya *Candida albicans*'a karşı büyümlerinde inhibitör etkisi olmadığı gösterilmiştir (9).

2.3.2.5. *Hiperforinin Antitümoral Etkileri*

Son zamanlarda yapılan birçok çalışma hiperforinin antikarsinojenik, antiproliferatif, proapoptotik, antiinvaziv ve antimetastatik etkilerine dayanarak antineoplastik potansiyeli olduğunu göstermiştir. Son zamanlarda *H. perforatum* ekstraktlarının ve biyoaktif bileşiklerinin bazılarının, hiperforin de dahil olmak üzere insanlarda major insan prokarsinojen aktifleyici enzim olan CYP1A1 izoformunun potansiyel inhibitörü olduğu ortaya çıkarılmıştır. Hiperforin, pregnan X reseptörüne bağlanarak sitokrom P-450 izoformu olan CYP3A4 ekspresyonunu artırmaktadır. Reçetelenen ilaçların % 60' ı CYP3A4 bağımlı yolk tarafından metabolize edilmekte ve vücuttan atılmaktadır. Hiperforin, ilacın metabolizasyonu sonucu oluşan maddelerin inaktivasyon hızını arttırmakta ve böylece farmakolojik etkilerini azaltmaktadır (9,42).

Hiperforinin meme kanseri (MT-450, MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri), skuamöz karsinom (A-431), malign melanom (HT-144), malignan glioma (LN-229), fibrosarkom (HT-1080), kronik myeloid lösemi (K562) ve lenfoma (U937 ve Jurkat hücreleri) yı içeren çok sayıda memeli kanser hücre dizilerinde proliferasyonu azaltıcı etkisi gösterilmiştir (26).

Tümörün büyüme hızı, hücrelerin proliferasyon ve ölüm oranları arasındaki dengeye bağlıdır. Bu yüzden etkili bir antitümoral bileşiğin tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmesi veya tümör hücrelerinde apoptozisi teşvik etmesi gerekmektedir. Hiperforinin tümör hücrelerinde apoptozisi arttırdığı gösterilmiştir. Tümör hücrelerinde hiperforin aracılı apoptozis sırasında ilk gerçekleşen olay mitokondrial membranlar arası geçirgenlik potansiyeli hızlı bir şekilde azalmaktadır. Sonrasında geçirgenliği etkileyerek ve mitokondriden sitokrom c salınımına yol açarak morfolojik olarak değişimlere sebep olmaktadır. Test edilen bütün tümör hücrelerinde hiperforin, programlı hücre ölümüne yol açan enzim olarak adlandırılan kaspas 3' ü aktive etmektedir. Ayrıca bazı tümör hücrelerinde hiperforin aynı zamanda kaspas 9' u, bazılarında ise kaspas 8' i aktive etmektedir (26,43).

Hiperforinin kararlı bir türevi olan disikloheksilamonyum tuzu, hiperforinin antiinvaziv etkisi ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada, submikromolar konsantrasyonlarında tümör hücrelerinde bazal membran boyunca tümör kemoinvazyonunu inhibe ettiği açık bir

şekilde gösterilmiştir. Bu antiinvaziv etki daha çok doz bağımlı olmakla birlikte elastaz, katepsin G ve ürokinaz gibi ekstrasellüler matriks degradasyonunda rol alan proteinaz enzimlerin nonkompetitif inhibisyonuna bağlı gerçekleşmektedir. Üstelik hiperforin, matriks metalloproteinaz 2 ve 9' un ve diğer anahtar rol oynayan ekstrasellüler matriks remodeling (yapılanma) enzimlerinin salınımını belirgin bir şekilde azaltmakta ve yapısal ekstrasellüler sinyal kinaz 1/2' yi inhibe etmektedir. Sonuç olarak in vivo kanser metastaz modellerinde günlük 300 nmol intraperitoneal hiperforin uygulanması, inflamatuvar infiltrasyonun fark edilir şekilde azalmasına neden olmakla beraber metastaz sayısını ve büyüklüğünü azaltmaktadır (44).

Kanserin özelliklerinden biri olarak tarif edilen anjiogenezis; tümör gelişimi, yayılımı ve tümörün diğer organlara metastazında önemli rol oynamaktadır. Normal olan endotelial hücreler, anjiogenik sinyal tarafından aktive edildiklerinde bio-sinyallerde değişiklik oluşturarak anjiogenik fenotipin ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Bu uyarı ekstrasellüler matriks enzimlerin salınımı, endotelial hücre proliferasyonu, migrasyonu, invazyonu ve sonuçta yeni damarların oluşumu için gerekli değişimlere neden olmaktadır. Hiperforinin in vitro ve in vivo ortamda anjiogenezisi inhibe ettiği ispatlanmıştır (45).

2.4. Lenfoma

Lenfositler, hematopoetik kök hücrelerden gelişirler ve hücre yüzey reseptörlerine göre farklı morfolojiler gösterirler. Lenfomalar lenfositik seri hücrelerinin malign proliferasyonu sonucu oluşur (46). Lenfomalar iki gruba ayrılır:

- 1) Hodgkin lenfoma (HL)
- 2) Non- Hodgkin lenfomalar (NHL)

Genel olarak lenfomaların % 60' ını NHL, % 40' ını HL oluşturur. Her ikisi de lenfoid dokudan köken alsa da HL, lezyonlarda Reed-Sternberg (RS) dev hücrelerinin olması ve etkilenen lenf gangliyonlarında non-neoplastik iltihabi hücrelerin RS hücrelerinin oluşturduğu neoplastik elemanlardan daha fazla olması nedeniyle diğerlerinden ayrı tutulur (47).

RS hücresi geniş, genellikle hafif eozinofilik bir sitoplazmaya sahiptir ve çapı 15-45 nm arasında değişmektedir. Bu hücre ya multilobüler bir nükleusa sahip olmasıyla ya da büyük yuvarlak belirgin nükleollere sahip multinükleer bir hücre olması ile ayırt edilir. Asıl karakteristik özelliği ise, çevresinde berrak bir alan bulunan, büyük asidofilik bir nükleole sahip, birbirinin ayna görüntüsü olan iki adet nükleusu ve nükleer membranın belirgin olmasıdır. Tedavi seçiminin ve prognozun hastalığın yayılımı ile yakından ilişkili olduğu için HL’ da evreleme çok büyük bir klinik öneme sahiptir (47,48).

2.4.1. Non-Hodgkin Lenfoma

NHL, biyolojik, morfolojik, klinik ve genetik özellikleri farklı olan tümörlerin heterojen bir grubunu oluşturur. NHL; B, T ve doğal öldürücü (NK) hücrelerden köken alan, klonal lenfoid sistem tümörleridir. NHL, lenfoid dokudan gelişmekle birlikte genellikle lenf ganglionlarında (% 65) ya da daha az sıklıkla parenkimal organların lenfoid dokularında (% 35) gelişirler (47,48).

Tümörün kaynaklandığı hücre tipi, genellikle tümör hücrelerinin fenotipik ve moleküler özelliklerine dayanılarak saptanır. NHL’ ların çoğu (% 80-85) B hücre kökenlidir, geri kalanın büyük bir kısmı ise T hücreli tümörlerdir. Histiyosit ya da makrofaj kaynaklı tümörler oldukça nadir olarak görülür, T ve B hücreli tümörler diferansiasyon aşamalarından birinde kalmış olan hücreleri içerirler (Şekil 4). Bu şekil aynı zamanda T ve B hücreleri arasında ayırım yapabilmeyi sağlayan, tümörlerin alt gruplamasının yapılmasında da yararlı olabilecek genotipik ve fenotipik özellikleri de göstermektedir (47).

Lenfositlerin gelişimleri sırasında kazandıkları antijen niteliğinde ve glukoprotein yapısındaki bu moleküllere günümüzde “ Cluster of Differentiation ” (CD) adı verilmektedir. CD2, CD3, CD4, CD7 ve CD8 T hücrelerini ve bu hücrelerin tümörlerini tanımada yararlıdır. CD10, CD19, CD20 ve yüzey immunoglobülin (Ig) ise B hücre belirleyicileridir. Bunlara ek olarak, CD16 ve CD56 NK hücre belirleyicileri iken, CD13, CD14, CD15 ve CD64 myeloid hücre antijenleridir. CD34 pluripotent kök hücrelerinde eksprese edilir ve en erken dönem lenfoid ve myeloid öncü hücrelerde bulunur (47,49).

2.4.1.1. Non-Hodgkin Lenfoma' nın Epidemiyolojisi

NHL insidansı; yaş, coğrafi bölge, ırksal faktörler ve enfeksiyöz etkenlere maruziyet ile değişmektedir. Yaşla birlikte insidans artmakla beraber her yaşta görülebilmekte ve erkeklerde kadınlardan daha sık görülmektedir. Son yıllarda NHL insidansı artmakta ve HDL insidansında artış, gelişmiş ülkelerde ve batı toplumlarında Asya ve Afrika' dan daha fazladır NHL batı ülkelerinde tüm maligniteler arasında % 3-4 oranında görülürken, ülkemizde bu oran % 8' e, Ortadoğu ülkelerinde ise % 12' ye kadar yükselmektedir (51).

NHL histolojik alt tiplerine göre dağılımı coğrafi bölgelere göre farklılık göstermektedir. Diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL) tüm dünyada en sık görülen histolojik tiptir. Amerika ve Avrupa' da tüm lenfomaların % 26-40' ını oluştururken, Asya ve Ortadoğu ülkelerinde bu oran % 59' lara kadar çıkmaktadır (46).

Batı ülkeleri ile karşılaştırıldığında Türkiye' de NHL ile daha genç yaşta karşılaşmaktadır. Türkiye' de de erkeklerde daha sık görülmektedir. Beş büyük merkezin verileri toplandığında 3704 hastanın % 79.1' i NHL, % 20.9' u HL olarak bildirilmiştir. Tüm lenfomalar içerisinde en sık görülen histopatolojik tipler sırası ile DBBHL (% 30.1), Küçük Lenfositik Lenfoma (KLL) (%10.4), Folliküler Lenfoma (% 5.6) olduğu bildirilmiştir (52).

2.4.1.2. Non-Hodgkin Lenfoma' nın Etyopatogenezi

NHL etiyojisinde çevresel ajanlar ve kazanılmış genetik bozukluklar suçlanmaktadır. Konjenital ve kazanılmış immün yetmezlik durumları, otoimmün hastalıklar, enfeksiyöz ajanlar, fiziksel ve kimyasal ajanlar gelişen NHL' nın riskini arttırmaktadır (46).

Konjenital immün yetmezlik, Ataksi telenjektazi, Wiscott Aldridge sendromu, subakut kombine immün sistem yetmezliği ve X' e bağlı lenfoproliferatif sendromlar artmış agresif lenfoma gelişme riski ile ilişkilidir. Bu hastalarda sıklıkla Epstein Barr Virüs (EBV) varlığı saptanmıştır. Primer immün sistem yetmezliği sendromlarının görülme sıklığı ise nadirdir. Kalıtsal faktörler NHL insidansındaki artışı açıklamakta yetersiz kalmaktadır (53).

Romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, Sjögren sendromu, Hashimoto tiroiditi gibi otoimmün hastalıklarda ve Çölyak hastalığında NHL görülme sıklığı artmıştır. Bu artış; kullanılan bağışıklık sistemini baskılayan tedavilerden çok, otoimmün süreçlerde devam eden yangısal durumun ve bozulmuş T hücre fonksiyonlarının neden olduğu lenfoma gelişme riskinde artış ile açıklanmaktadır. Bağışıklık sistemi sağlam bireylerde EBV ilişkili lenfosit hücre çoğalması; sitotoksik T hücreleri, antikor aracılı hücresel bağışıklık, NK

aktivitesi ve endojen interferon ile engellenir. Başışıklık sistemi baskılanmış bireylerde ise bu fonksiyonlar bozulmuştur, EBV ile enfekte B hücreleri çoğalırlar ve bu hücrelerin yüksek mitotik hızları, mutasyon olasılığını arttırmaktadır. Başışıklık sisteminin baskılandığı durumlarda EBV ile enfekte lenfositler lenfoma gelişiminde rol oynamaktadır (51, 53)

Birçok değişik kimyasal ve fiziksel ajanlar, lenfomanın gelişme riskini arttırmaktadır. Difenilhidantoin lenfoid hiperplazi ya da psödolenfomayı indükleyebilir ve bu lenfomaları diğer lenfomalardan ayırmak çok zordur. Fenoksiherbisit ve organofosfat gibi diğer kimyasal ajanlar da lenfomanın gelişimini indüklemektedir. Benzen, stiren, trikloroetilen, perkloroetilen, arsenat, formaldehit, boya tinerleri, makine yağları gibi solventler ve kimyasallar NHL riskini arttırmaktadır. Kullanılan saç boyaları da lenfoma riskini arttıran diğer etkenlerdir. Nükleer patlamalar ve reaktör kazaları lenfoma gelişimini indüklemektedir (46,53).

Onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir mekanizmaları kanser gelişiminde önemli rol oynar. Kromozomal translokasyonlar NHL olgularının % 90' ında gösterilmiştir. Moleküler düzeyde, eşlik eden kromozomal delesyonlar ve mutasyonlar olsun olmasın, bu translokasyonlar onkogen aktivasyonunu veya tümör baskılayıcı gen inaktivasyonunu hızlandırır. En sık görülen kromozom anomalileri t(8;14), t(14;18)' dir (51, 53).

2.4.1.3. Non-Hodgkin Lenfoma' nın Sınıflandırılması

NHL' ları, prognoz veya hücre kökeni açısından farklı türlere ayırabilen, tedaviye yön verebilen değişik patolojik sınıflamalar yapılmıştır. NHL, özellikle biyolojik ve immünolojik çalışmaların ilerlemesi ile birlikte daha kolay sınıflanabilir hale gelmesine rağmen halen tam netleşmemiştir. şimdiye kadar lenfomalar için yapılan sınıflama sistemleri şunlardır:

Rappaport (1966)

Lukes-Collins (1974)

Kiel (1974)

WHO (Dünya Sağlık Örgütü) Sınıflaması (1976)

Working Formulation for Clinical Usage (1982)

REAL (Revised European-American Lymphoma) sınıflaması (1994)

WHO (Dünya Sağlık Örgütü) Sınıflaması (1998)

WHO (Dünya Sağlık Örgütü) Sınıflaması (2001)

Son yıllarda Uluslararası Lenfoma Çalışma grubunun yapmış olduğu WHO sınıflaması kullanılmaktadır (Tablo 2) (54, 55, 56).

Tablo 2: WHO’ ya göre non-Hodgkin lenfomaları içeren lenfoproliferatif hastalıkların sınıflandırılması (56)

<i>B- Hücre Neoplazileri</i>	<i>T- Hücre ve NK- Hücre Neoplazileri</i>
Prekürsör B- Hücre Neoplazi	Prekürsör T- Hücre Neoplazi
-Prekürsör B- lenfoblastik lösemi/lenfoma	-Prekürsör T- lenfoblastik lösemi/lenfoma
Matür B- Hücre Neoplazileri	Matür T- Hücre ve NK- Hücre Neoplazileri
-Foliküler lenfoma	-T- hücreli prolenfositik lösemi
-Burkitt lenfoma/lösemi	-T- hücreli büyük granüler lenfositik lösemi
-Kronik lenfositik lösemi/küçük lenfositik lenfoma	-Agresif NK- hücreli lenfoma
-B- hücreli prolenfositik lösemi	-Erişkin T- hücreli lösemi/lenfoma
-Lenfoplazmasitik lenfoma	-Ekstranodal NK/T- hücreli lenfoma, nazal tip
-Splenic marjinal zone B- hücreli lenfoma	-Enteropati tipi T hücreli lenfoma
-‘Hairy cell’ lösemi	-Hepatosplenik T hücreli lenfoma
-Plasma hücreli myelom	-Subkutan pannikülit benzeri T hücreli lenfoma
-Önemi belirlenmemiş monoklonal gammapati	-Mikozis Fungoides
-Kemiğin soliter plazmasitomu	-Sezary sendromu
-Ekstraosseöz plazmasitom	-Primer kutanöz anaplastik büyük hücreli lenfoma
-Primer amiloidozis	-Anaplastik büyük hücreli lenfoma
-Ağır zincir hastalıkları	-Anjioimmünoblastik T hücreli lenfoma
-Ekstranodal marjinal zone B- hücre lenfoması	-Periferik T hücreli lenfoma
-Nodal marjinal zone B- hücreli lenfoma	
-‘Mantle cell’ lenfoma	
-Diffüz büyük B hücreli lenfoma	
-Mediastinal (timik) büyük B hücreli lenfoma	
-İntravasküler büyük B hücreli lenfoma	
-Primer effüzyon lenfoması	

NHL çocukluk çağı kanserlerinin yaklaşık % 10' unu oluşturmaktadır (46). Çocukluk çağı NHL' lar üç ana grup olarak sınıflandırılmaktadır. Burkitt Lenfoma (BL), Büyük Hücreli Lenfoma (LCL) ve Lenfoblastik Lenfoma (LL)' dan oluşmaktadır (54).

2.5. Burkitt Lenfoma

Burkitt lenfoma (BL), ilk defa 1958 yılında patolog Denis Burkitt tarafından Afrikalı çocuklarda özellikle çenede görülen, oldukça hızlı gelişen hemen daima ölümcül seyredabilen bir lenfoma türü olarak tanımlanmıştır. 1962' de Lurie and King hastalığın endemik karakterini ortaya koyduktan sonra 1965' de Dorfman ve 1967' de Burkitt Afrika kıtasının dışında erişkinlerde görülen sporadik formunu tanımladılar. 1973' de Levine tarafından iki farklı BL tipi tanımlandı:

- 1) *Afrika Tipi*: Özellikle erkek çocuklarda yaklaşık birkaç aylık başlangıç semptomlarından sonra klinik olarak tanınan formu;
- 2) *Amerikan Tipi*: Özellikle erişkinlerde semptomların ortaya çıkmasından aylar sonra SSS, batın ve sıkça lösemik tutulum gösterebilen formudur (57).

BL, diffüz orta büyüklükteki, katlanmamış küçük çekirdekli, germinal merkez B hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Çocukluk çağı lenfomalarının % 40 ile 50' sini oluşturur. BL sıklıkla ektranodal bölgelerde bulunan ya da akut lösemi olarak başlayan agresif bir neoplazidir. Erkek/ kız oranı 2-3/1' dir (58).

BL az görülen bir neoplazi olmasına rağmen, yüksek mitotik indekse sahiptir. İkiye katlanma zamanı yaklaşık 12–24 saattir (33). Genellikle çocuklar ve genç yetişkinlerde görülen, insanlarda görülen tümörlerin en hızlı büyüyenlerinden ve en agresiflerinden biri olan BL; genotipik, virolojik, morfolojik ve klinik özellikleriyle NHL' lar içinde önemli bir yer tutmaktadır (59,60).

Multipl nükleollü olan bu hücreler sık mitoz içerir. Sitoplazma bazofilik olup genellikle lipid vakuoller içerir. Apoptotik tümör hücrelerini sindirmiş çok sayıda benign makrofajlar eşlik ederek yıldızlı gökyüzü manzarası oluşturur. BL CD19+, CD20+, CD22+, CD10+, bcl-6+, yüzey IgM +, bcl-2-, TdT-, Ki-67>% 95 şeklinde immunfenotip gösterir (50, 61).

2.5.1. Genetik Özellikleri

Sitogenetik olarak BL' da c-myc onkogenini içeren translokasyon söz konusudur. c-myc onkogeni hücre siklusunda görev almaktadır. Transkripsiyon faktörü olarak görev yaparak hücrelerin çoğalmasına ve değişimine neden olur. Hücre döngüsünün G1 fazından S fazına kadar olan bölümünde c-myc proteini, diğer bir transkripsiyon proteini olan Max proteini ile birleşerek transkripsiyonun aktifleşmesini sağlamaktadır Endemik tipte 8' inci kromozom üzerinde yer alan c-myc' nin kırılma bölgesi genin dışında olup, sporadik tipte genin içindedir c-myc geninin 8' inci kromozomdan 14' cü kromozoma translokasyonu t(8;14), uygunsuz ve kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olmaktadır. t(8;14) translokasyonu dışında t(2;8)(p12;q24), t(8;22)(q24;q11) translokasyonları daha nadir olarak saptanabilmektedir (59, 62).

2.5.2. Sınıflama

Dünya sağlık örgütüne göre BL, endemik (Afrika tipi), sporadik (Amerikan) ve immün yetersizlikle ilişkili tip olarak sınıflandırılmaktadır.

- 1) *Endemik tip:* Ekvatorial Afrika bölgesinde yaşayan çocuklarda çene ve yüz bölgesinde tutulumla karakterli olan BL tipidir.
- 2) *Sporadik tip:* Herhangi bir yaşta görülebilen ve sıklıkla abdominal bölgelerde tutulum gösteren BL tipidir.
- 3) *İmmün yetmezlikle ilişkili tip:* İmmün yetmezliği olan hastalarda görülen BL tipidir.

Klinikopatolojik olarak endemik ve sporadik tip arasında farklılıklar bulunmaktadır. Klinik olarak endemik tipte yüz kemikleri (özellikle çene ve maksilla) tutulurken, sporadik tipte gastrointestinal (özellikle ileoçekal bölge), böbrek ve over tutulumu daha ön plandadır. İmmünyetmezlik ilişkili formunda nodal ve kemik iliği tutulumu sıktır. Waldeyer halkası ve mediastinal tutulum seyrektr (63-66) (Tablo 3).

Tablo 3: Burkitt Lenfoma' nın sınıflaması ve klinik özellikleri (66)

Tip	Yaş	Cinsiyet	Tutulum bölgesi *	Evre
Endemik (Afrika)	8 (ortanca) <15 nadir	Çoğunlukla erkeklerde	Yüz, abdomen, SSS, lenf nodları, kemik iliği	İleri (% 30-50)
Nonendemik (Amerikan)	10 (ortanca) >15 (% 25)	Çoğunlukla bayanlarda	Abdomen (en sık ileoçekal bölge ve overler), lenf nodları, SSS	İleri (yaklaşık % 60)
AIDS ilişkili	Genç erişkin	Çoğunlukla erkeklerde	Lenf nodları, kemik iliği	İleri (yaklaşık % 75)
AIDS: Kazanılmış İmmün Yetmezlik Sendromu; SSS: Santral Sinir Sistemi * En sık tutulan bölgeden en az tutulan bölgeye doğru sıralanmıştır.				

EBV, olguların çoğunda hastalığın oluşmasında önemli rol oynamaktadır. Endemik tipte EBV enfeksiyonu % 90 olguda gösterilmesine rağmen, sporadik tipte % 20 olguda gösterilebilmektedir. HIV ilişkili BL' da % 40 oranında EBV enfeksiyonu gösterilebilmektedir (46, 53).

2.5.3. Semptom ve Bulgular

Çocukluk çağı NHL olgularında klinik bulgular tümörün yerleşim bölgesine göre değişmektedir. NHL daha çok lenf nodu dışı lenfoid dokulardan kaynaklanmaktadır. Tümörün en sık kaynaklandığı bölge karındır. Bunların % 35 'inde ilk çıkış yeri ilioçekal bölge, appendiks, çıkan kolon ve overdir (54).

Tutuluma bağlı olarak hastalarda karın ağrısı ve şişliği, bulantı, kusma, apandisit, invajinasyon, gastrointestinal kanama, sarılık meydana gelebilmektedir. Altı yaşından büyük çocuklarda invajinasyonun en sık nedeni lenfomadır. Lenfomanın kaynaklandığı diğer önemli bölge baş ve boyundur. Burkitt lenfoma'nın endemik tipinde % 60 olguda çene tutulumu sonucu dişlerde (özellikle molar) dökülme oluşmaktadır. Genellikle birden fazla çene kemiğinde tutulum meydana gelir. Bazen orbita ile ilişkili olup, kraniyel sinir tutulumuna yol

açabilir. Endemik tipte % 15 olguda parapleji oluşmaktadır. Paraplejinin nedeni extradural kitlenin spinal korda direk basısı veya o bölgeyi besleyen damarların tutulmasına bağlıdır. Sporadik olgularda parapleji oldukça nadirdir. Sporadik tipte baş ve boyun tutulumu olarak unilateral tonsil, nazal sinüs, tükürük bezi ve tiroid tutulumu daha siktir. Daha nadir olarak kemik, böbrekler, epidural aralık, merkezi sinir sistemi tutulumu olabilmektedir (48, 54, 59).

2.5.4. Tanı

BL' de anamnez ve fizik muayene, kan sayımı, periferik yayma, biyokimya (özellikle LDH ve ürik asit) değerlerinin yanı sıra, kesin tanı için kitleden örneklerin alınması gerekmektedir. Kemik iliği tutulumu ve sitogenetik çalışma için kemik iliği aspirasyonu, doku tanısı için biyopsinin yanı sıra uygun radyolojik görüntülemenin de yapılması gerekmektedir. Direkt grafi, bölgesel ultrasonografi ilk basamak görüntüleme yöntemi iken, ayrıntılı bölgesel görüntüleme için bilgisayarlı tomografi tercih edilmelidir. Perikardiyal effüzyonu değerlendirmek için ekokardiografik inceleme yapılmalıdır (67).

Galyum-67 (⁶⁷Ga) vücut sintigrafisi hastalığın yayılımını saptamada önemlidir. ⁶⁷Ga sintigrafisi aynı zamanda hastaların tanı dışında izleminde de önemlidir. Kemik tutulumu açısından Teknesium-99m kemik sintigrafisi yapılmalıdır. Son yıllarda kullanıma giren pozitron emisyon tomografisinin (PET) hastalığın takibinden daha çok rezidüel kitlenin saptanmasında ⁶⁷Ga sintigrafisine göre daha üstün olduğu gösterilmiştir (68).

2.5.5. Evreleme

Tedavi yöntemi seçiminde klinik evreleme önemlidir. NHL' da anatomik olarak tutulmuş bölgelere göre evreleme yapılmaktadır. Bu sınıflamada kötü prognozu gösteren kemik iliği ve santral sinir sisteminin tutulmasıdır. Tablo 4' de NHL' de kullanılan St. Jude evrelemesi verilmiştir (54).

Tablo 4: NHL St. Jude evrelemesi (54).

Evre 1: Tek ektranodal veya nodal bölge tutulumu (mediasten ve batin dışı)
Evre 2: Tek ektranodal tümör ile bölgesel lenf nodu tutulumu, veya diafragmanın aynı bölgesinde iki veya daha fazla bölge tutulumu, veya diafragmanın aynı bölgesinde bölgesel lenf nodu tutulumu olsun veya olmasın iki ektranodal tümör varlığı, veya mezenterik lenf nodu tutulumu olsun veya olmasın çıkarılabilir primer gastrointestinal tümör (genellikle ileoçekal bölge)
Evre 3: Diafragmanın iki tarafında ektranodal iki tümör varlığı, veya diafragmanın iki tarafında nodal iki tümör varlığı, veya tüm primer toraks içi (mediasten, plevral, timik) tümörler, veya tüm ilerlemiş primer intraabdominal tümörler, veya tüm paraspinal, epidural tümörler
Evre 4: Yukarıdaki tutulumlar ile beraber başlangıç döneminde santral sinir sistemi ve/veya kemik iliği tutulumu olması

2.5.6. Prognostik faktörler

BL’ da en önemli prognostik faktör, kemoterapi tedavisine olan yanıttır. Sağ kalım artmakla birlikte kemoterapi sırasında oluşan komplikasyonlara yönelik destek tedavileri prognozunu iyileşmesini sağlayan en önemli faktörlerdir. Prognozu olumlu ve olumsuz yönde etkileyen faktörler Tablo 5’ de gösterilmektedir (54).

Tablo 5: NHL’da prognozu etkileyen faktörler (54).

Olumlu faktörler Evre 1 ve 2, tutulum bölgesi: Baş, boyun (parameningeal tutulum hariç), Periferik lenf nodu tutulumu, Abdominal bölge tutulumu: 2 yıllık sağ kalım oranı % 80 veya daha fazladır.
Olumsuz faktörler Evre 3 ve 4, Evre 4 ve santral sinir tutulumu, Tutulum bölgesi: Evre 2 (parameningeal tutulum ile birlikte), baş ve boyun bölgesindeki tüm ektranodal tutulumlar (sinüs, çene, orbita, skalp), Evre 3 BL’ da plevral effüzyon varlığı, Tedaviye yanıt: 2 aylık tedaviye rağmen yetersiz remisyon sağlanması, Tümör yükünü gösteren bulgular: Soluble IL-2>1000 U/ml, LDH>1000 U/L, kan ürik asit>7,1 mg/dl olması, EBV erken antijen miktarı (EBNA1, EBNA2)

2.5.7. Tedavi

Tedavi hastanın fizyolojik durumu, histolojik tip, klinik evre ve prognoza etkili faktörler göz önüne alınarak yapılır. Temel tedavi seçenekleri kemoterapi ve radyoterapidir. Bu lenfomaların tedavisi ileri evre agresif lenfomalar gibi agresif multidrog rejimlerle yapılmalıdır. BL' da yoğun dönüşümlü bir rejim olan CODOX-M/IVAC' in (Siklofosfamid, Vinkristin, Doksorubisin, Metotreksat, Fosfamide, Etoposid, Citarabin) kullanılmaktadır (3).

Erişkinlerde kullanılan dört kemoterapi rejimi Tablo 6' da görülmektedir. 1970 ve 80' llerde kullanılan NCI ve Stanford kemoterapi rejimleri birbirine benzemekle birlikte temel olarak siklofosfamid ve SSS profilaksisine (Stanford rejiminde bulky hastalığa radyoterapi) dayalı CHOP (siklofosfamid, hidroksidaunomisin; doksorubisin, onkovin; vinkristin ve prednizon) tipi rejimlerdir. Vanderbilt rejiminde siklofosfamid dozu artırılmış ve yüksek doz etoposid kullanılmıştır. Vanderbilt rejiminin ikinci siklusunda tedaviye doksorubisin (adriamisin) eklenmiştir. İyi prognozlu hastalarda bu rejimin tedavi sonuçları prognozda iyileşme sağlarken, kötü prognozlu hastalardaki iyileşme daha çok yüksek doz siklofosfamid yaklaşımına bağlanmıştır. Bu rejimdeki alkilleyici ajan dozlarının etkinliği, daha düşük doz siklofosfamid kullanılan MACOP-B (metotreksat, doksorubisin, siklofosfamid, vinkristin, prednizon ve bleomisin) rejimi ile desteklenmiştir. 1989-1996 yılları arasında yapılan NCI çalışmasında uygulanan daha kompleks ve daha yoğun bir tedavi rejimi ilgi konusu olmuştur. CODOX-M/IVAC adı verilen bu kür dönüşümlü verilen siklofosfamid, doksorubisin, vinkristin ve yüksek doz metotreksat ile ifosfamid, etoposid ve yüksek doz sitozin arabinozidden oluşmaktadır (1, 66).

Tablo 6: Burkitt Lenfoma tedavisi için kemoterapi rejimleri (66)

Kaynak	Rejim	Hasta sayısı	Tam yanıt	DFS	Yüksek riskli hastalarda sağ kalım
NCI	Siklofosfamid, Vinkristin, Adriablastin, Prednizon, IT MTX, IT ARA-C	72	89	56	% 30 LDH>1000IU/L, kemik iliği pozitif % 33 yaygın intraabdominal
Stanford	Siklofosfamid, Vinkristin, MTX, Abdominal kitle 10 cm’ den büyükse radyoterapi	18	71	67	% 38 Evre D % 20 LDH>500 IU/L
Vanderbilt	(1. siklus) Siklofosfamid, Etoposid, Vinkristin, Bleomisin (MTX ile SSS profilaksisi)	20	85	60	Sağ kalım risk faktörlerine göre gruplandırılmamış
NCI (CODOX-M/IVAC)	(2. siklusa Adriamisin eklenir.) CODOX-M (IT ARA-C, IT MTX, MTX, Vinkristin, Adriamisin) IVAC ile dönüşümlü (Yüksek doz ARA-C, Ifosfamid, IT MTX, Etoposid)	41	95	92	Evre 4 hastalarda % 80 hastalıksız sağ kalım (Kemik iliği veya SSS)
* 33 çocuk, 39 erişkin; MTX: Metotreksat; ARA-C: Sitozin Arabinosid; IT: İntratekal					

Son yıllarda nüks saptanan veya tedaviye yanıtı olmayan olgularda kemoterapi protokollerine eklenen anti-CD20, yani rituximab tedavisi kullanılmaktadır (1). BL oldukça agresif bir tümördür. Tedavisinde en önemli prognostik faktör kemoterapi yanıtıdır. Tedaviye olabildiğince erken başlanmalıdır. Hastaların % 70’ i evre III-IV olarak karşımıza çıkar. Relaps olursa ilk yılda görülür. İlk iki yılda relaps olmayan olgular tedavi edilmiş kabul edilebilir. Hastaların çoğunda ilaç tedavisi hastalığı sadece baskılamakta, ilaca bağlı

komplkasyonlar ve beraberinde ölümle sonuçlanmaktadır Tedavinin başarısında destek tedavinin yanı sıra toksik ölümlere neden olan enfeksiyon, tümör lizis sendromu ve akut böbrek yetmezliğinin azaltılmasının da önemli olduğu anlaşılmıştır (1, 69).

Genel olarak radyoterapinin tedavide yeri yoktur. Radyoterapinin olası endikasyonları; gastrointestinal sistemde obstrüksiyona ve spinal kord basısına neden olan bulky kitleler, superior vena kava sendromu, trakeal ve faringeal obstrüksiyondur. Santral sinir sistemi tutulumu olan hastalarda da radyoterapi yerine üçlü intratekal tedavi (Siklofosfamid, yüksek doz metotreksat ve sitozin arabinosid) önerilmektedir (65, 56). Düşük evreli, tümörün total veya totale yakın çıkarılabileceği olgularda cerrahi tedavi yapılabilir. Lenfomanın geniş yayılım gösterdiği olgularda cerrahinin yeri yoktur (66).

2.5.8. Komplkasyonlar

BL' da gözlenen başlıca komplkasyonlar şunlardır:

Tümör lizis sendromu: Burkitt ve Burkitt-benzeri lenfomada kemoterapi sonucu hücre yıkımı ile açığa çıkan metabolitlere bağlı bir durumdur. Hiperürisemi, hiperfosfatemi, hipokalsemi, hiperkalemi görülmektedir.

Gastrointestinal komplkasyonlar: Tümör hücreleri tarafından gastrointestinal sistemin herhangi bir yerinde meydana gelebilir. Özellikle BL' da ileum ve çekumun tutulmasına bağlı invajinasyon, tıkanıklık ve perforasyon meydana gelebilir (54, 59, 69).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, insan Burkitt lenfomaya özgül, Namalwa (ATTC no: **CRL-1432**) ve Daudi (ATTC no: CCL-213) hücre serileri kullanılmıştır. Bu hücrelerde, ilk olarak H. perforatum ekstresinin etkin dozlarını saptamak ve viabiliteyi göstermek amacı ile tripan mavisi boyama yöntemi ile canlılık deneyi yapılmıştır. Hücrelere belirlenen dozlarda uygulanan H. perforatum ekstresi daha sonra, metabolik aktiviteyi değerlendirmek için WST-1 testi, aynı zamanda paralel olarak sitotoksisiteyi ölçmek için LDH (Laktat dehidrogenaz) salınım testi, antiproliferatif etkiyi saptamak için BrdU Hücre Proliferasyon Testi, erken ve geç apoptozisi göstermek için Annexin-V FLUOS ve Tunel testleri ile çalışmalar yapılmıştır.

3.1. Kullanılan Cihazlar, Aletler, Steril Malzemeler ve Kimyasallar

3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Aletler

Biyogüvenlik kabini Class 2 (ESCO)

CO₂ inkübatörü (Nuaire)

Su banyosu (Memmert)

Ultra saf su cihazı (Simplicity)

Otomatik pipet (Thermo)

Neubauer lamı (Spencer)

Buz dolabı (Arçelik)

Derin dondurucu, -80° C (Nuaire)

Santrifüj cihazı (Hettich)

Hassas terazi (Scaltec)

Vortex (IKA)

Otoklav (Hirayama)

Etüv (Memmert)

Işık mikroskobu (Olympus)

Invert mikroskobu (Olympus)

Fluoresan mikroskop (Olympus)

Fotoğraf makinası (Olympus)

Spektrofotometre (Thermo)

3.1.2. Kullanılan Steril Malzemeler

10 cm² petri (Corning)

25 cm² ve 75 cm² filtreli kapaklı flask (Corning)

5, 10 ve 15 ml' lik pipet (Axygen)

15 ve 50 ml' lik santrifüj tüpü (Corning)

6, 24 ve 96 kuyucuklu plak (Corning)

2 ml dondurma tüpü (Corning)

Beyaz, sarı ve mavi pipet uçları (Axygen)

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

Hypericum perforatum dry extract (Indena S.p.A., Italy)

RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) besiyeri (Sigma)

Penicilin- streptomycine (Sigma)

L-glutamine (Sigma)

PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma)

FBS (Fetal Bovine Serum, Sigma)

DMSO (Dimetil sülfoksit, Sigma)

Paraformaldehid (Sigma)

Glutaraldehid (Sigma)

Metanol (Riedel-de Haën)

Sodyum sitrat (Sigma)

Triton X-100 (Sigma)

Trypan Blue (Sigma)

Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche)

LDH Cytotoxicity Detection Kit (Roche)

Tunel In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche)

DAPI (Roche)

Cell Proliferation ELISA, BrdU, colorimetric (Roche)

Annexin-V-FLUOS (Roche)

3.2. Hücre Dizileri ve Özellikleri

Çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı' nın Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Namalwa hücresi ATCC' nin katalog bilgilerine göre Burkitt Lenfoma tanısı olan üç yaşındaki bayan hastadan alınarak hazırlanmış bir hücre dizisi olup hücre tipi B lenfositlerden oluşmuştur. Yine ATCC' de belirtilen bilgiye göre Daudi hücresi ise Burkitt Lenfoma tanısı olan on altı yaşındaki erkek hastanın periferik kan hücrelerinden elde edilmiştir. Hücre tipi B lenfoblastlardan oluşmaktadır (Tablo 7).

Tablo 7: Namalwa ve Daudi Hücrelerinin Özellikleri

	ATTC no	Hastalık	Cinsiyet	Yaş	Hücre tipi	Büyüme tipi
Namalwa	CRL-1432	Burkitt Lenfoma	Kadın	3	B lenfosit	Süspanse
Daudi	CCL-213	Burkitt Lenfoma	Erkek	15	B lenfoblast	Süspanse

3.3. Hücre Kültürü Yönteminin Temel Aşamaları

3.3.1. Besiyerinin Hazırlanması

Hücrelerin canlılıklarını idame etmelerini sağlamak amacıyla RPMI 1640 (2 mM L-glutamin, 1.5 g/l sodyum bikarbonat, 4,5 g/l glukoz, 10 mM HEPES, ve 1.0 mM sodyum piruvat) tamponlanmış tuz solüsyonu içeren besiyeri kullanılmıştır. RPMI 1640 besiyerinin hazırlanması için önce 500 ml ticari olarak elde edilmiş hazır besiyeri üzerine % 10 FBS, 100 IU/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin ve 2 mM L-glutamin ilave edilerek karıştırılmıştır.

3.3.2. Hücrelerin Çözülmesi

Hücreler -196°C' den alınıp su banyosunda, 37°C' de çözüldükten hemen sonra, DMSO' yu uzaklaştırmak için 4 ml RPMI 1640 besiyeri ilave edilerek 300 g, 4°C' de, 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldıktan sonra hücre sayısı 5×10^5 /ml olacak şekilde RPMI-1640 besiyeri ile dilüe edilmiştir. Hücreler steril kültür kaplarına aktararak 37°C ve % 5 CO₂ içeren ortamda kültüre alınmıştır.

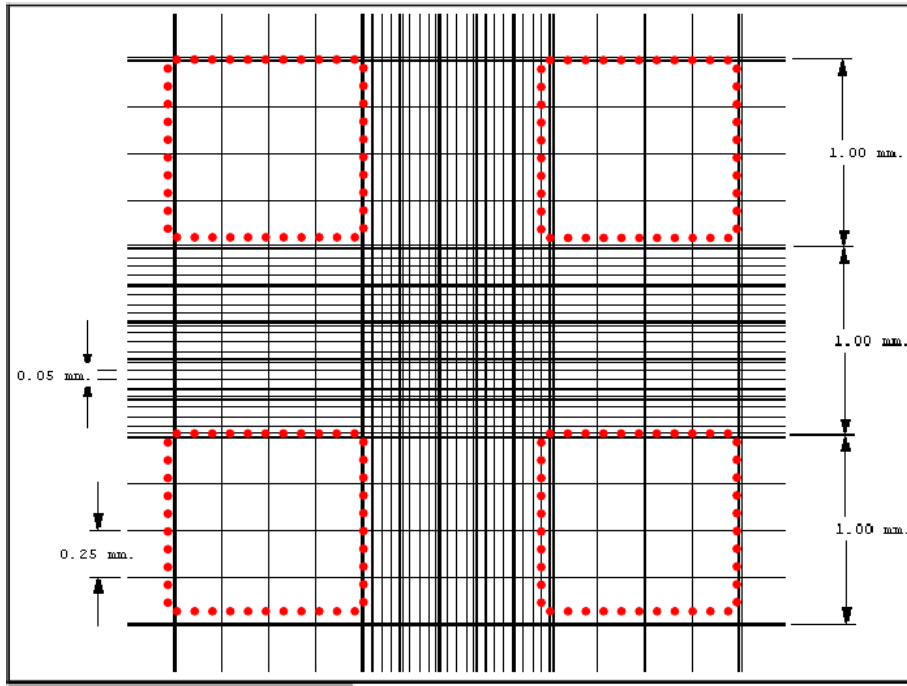
3.3.3. Hücrelerin Dondurulması

Kanser hücreleri devamlı çoğalma özelliğine sahiptirler. Hücrelerin daha sonra yapılacak olan çalışmalarda kullanılabilmesi amacıyla dondurularak uygun şartlarda saklanması mümkündür. Hücreleri dondurmak için öncelikle % 5 DMSO ve % 95 besiyeri olacak şekilde dondurma

besiyeri hazırlanmıştır. Kültür kaplarındaki hücreler yine 300 g, 4°C’ de, 5 dk santrifüj edilmiştir. Supernatan kısım atıldıktan sonra 6×10^6 hücre/ml olacak şekilde üzerine dondurma besiyeri eklenerek homojen hale getirilmiştir. Dondurma besiyeri ortamı içerisindeki hücreler ilk 24 saat Mr. Frosty adlı kademeli soğutma kabında (ısı dakikada 1°C düşürülerek kademeli olarak soğutma sağlanır), -80°C’ de bir gece depolandıktan sonra likid nitrojen tankına alınarak -196°C’ de saklanmıştır.

3.3.4. Hücrelerin Sayımı

Hücre kültürü testlerinde her kuyucukta eşit sayıda hücre olmalıdır. Çalışma öncesinde ml’ deki canlı hücre sayısının hesaplanarak belirlenen sayıda hücrenin kuyucuklara alınması gerekmektedir. Bu amaçla hücreler tripan mavisini ile boyanarak canlı- ölü hücre sayımı yapılmaktadır.



Şekil 5: Neubauer lamı sayım alanı

Hücrelerin sayımı için Neubauer lamı kullanılmıştır. Neubauer lamı kalın, düz, sayım odacıklıdır. Neubauer lamı üzerinde 16’ şar kareden oluşan, hacmi 0,1 µl olan toplam dört alan bulunmaktadır. Toplam dört alandaki seçili kare çizgisi içindeki hücreler sayılır ve ortalamaları alınarak alan başına düşen ortalama hücre sayısı hesaplanır. Hücrelerin çok

yoğun olduğu zamanlarda süspansiyon dilüe edilir ve yapılan hesaplamaya dilüsyon faktörü de dahil edilir. Neubauer lamında dört büyük karedeki hücreler sayılıp ortalaması alındıktan sonra mililitredeki hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$1 \text{ ml' deki hücre sayısı} = \text{Ortalama canlı hücre sayısı} \times \text{Dilüsyon Faktörü} \times 10^4$$

(hücre/ml)

Tripan mavisı boyama yöntemi ile canlı-ölü hücrelerin sayısı ve canlı-ölü hücrelerin yüzdesi belirlenebilir. Ölü hücrelerde meydana gelen membran hasarı sonucunda hücreler tripan mavisıyle boyanmaktadır. Hücre süspansiyonu tripan blue ile dilüe edildiğinde canlı hücreler küçük, yuvarlak ve refraktil olarak görünürler. Ölü hücreler şiş, büyük ve koyu mavi hale gelirler. Canlı hücrelerde membran intakt durumda olduğundan dolayı herhangi bir boyanma söz konusu değildir. Bu metodun temel prensibi, canlı hücreler boyayı almaz iken ölü hücreler yani membranı hasar görmüş hücreler boyayı alarak maviye boyanmasıdır (70).

3.3.5. Hücre Kültürü

Namalwa ve Daudi hücrelerinin RPMI 1640 besiyerinde, 37°C' de ve % 5 CO₂ içeren ortamda 75 cm²' lik steril hücre kültür kaplarında canlılığı sürdürülmüştür. Hücreler haftada iki defa 1 ml' de canlı hücre sayısı 5x10⁵ olacak şekilde pasajlanmıştır. Pasajlama işlemi için flask içerisindeki hücreler 15 ml' lik falkon tüplere aktarılmıştır. Daha sonra hücreler 300 g' de, 4° C' de, 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası falkon tüpün üzerindeki süpernatant kısmı pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Falkon tüpünün dip kısmında kalan pelletlerin üzerine 5 ml PBS eklendi ve pipetle alt üst edilerek homojen hale getirilmiştir. Tekrar 300g' de, 4° C' de, 5 dk santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi sonrasında falkon tüp içerisindeki PBS ortamdan uzaklaştırılarak tüp içerisinde kalan pelletlere 5 ml RPMI 1640 besiyeri ilave edilmiştir. Pipet yardımıyla tekrar süspansiyon edildikten sonra mililitredeki canlı hücre sayısı Bölüm 3.3.4.' de belirtilen şekilde hesaplanmıştır. Hücre dansitesine bağlı olarak iki ile üç günde bir besiyeri değiştirilerek taze besiyeri eklenmiştir.

3.4. Hypericum Perforatum Ekstresinin Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan standardize hiperforin ve hiperisin içeren H. perforatum ekstresi Indena firması tarafından sağlanmıştır. H. perforatum ekstresi % 0.3 hiperisin, % 3 hiperforin içermektedir. H. perforatum ekstresi konsantrasyonu 75 mg/ml olacak şekilde DMSO ve RPMI 1640 besiyeri içerisinde çözülerek stok solüsyon hazırlanmıştır. Stok solüsyonun hazırlanması için toz halinde bulunan H. perforatum ekstresinden 150 mg tartılmıştır. Üzerine 1 ml DMSO eklenerek çözülmesi sağlanmış ve daha sonra üzerine 1 ml RPMI 1640 besiyeri ilave edilerek H. perforatum ekstresi ½ oranında dilüe edilmiştir. Sonra stok solüsyon steril ortamda 0,22 µm' lık steril filtrelerden geçirilmiştir. Hazırlanan stok solüsyon + 4°C' de saklanmıştır.

3.5. Deney Grupları

Çalışmada kontrol grubu, çözücü olarak kullandığımız DMSO grubu ve altı farklı konsantrasyonda tedavi uygulama grupları olmak üzere toplam grup sayısı sekiz olarak belirlenmiştir. Uygulama dozları olarak aşağıda belirtilen konsantrasyonlarda H. perforatum ekstresi uygulanmıştır.

D1: 0,01 mg/ml

D2: 0,025 mg/ml

D3: 0,05 mg/ml

D4: 0,1 mg/ml

D5: 0,25 mg/ml

D6: 0,5 mg/ml

Çözücü özelliği nedeni ile kullanılan DMSO grubu için ise en yüksek doz olan 0,5 mg/ml' deki DMSO miktarı baz alınmıştır. Bunun için DMSO, RPMI 1640 besiyeri içerisinde 1/300 oranında seyreltilerek uygulanan diğer gruplar arasına eklenmiştir. Uygulama süresi olarak 24 saat (t_1), 48 saat (t_2) ve 72 saat (t_3) süreleri tespit edilmiştir. Kontrol grubundaki hücreler H. perforatum ekstresi uygulanmadan aynı sürelerde kültürde bekletilmiştir.

3.6. Hücre Canlılığını Değerlendirme Testi (Tripın Mavisi Testi)

Hücre canlılığını değerlendirmek için en genel ve rutin kullanılan en ucuz metod tripan mavisi testidir. Hücrelerde H. perforatum ekstresinin Bölüm 3.5.' de belirlenen dozlarda ve sürelerde viabilite üzerine etkisini ortaya çıkarmak amacıyla ilk olarak tripan mavisi testi yapılmıştır. Öncelikle süspanse hücreler mililitrede $2,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde 24 kuyucuk içeren plaklara aktarılmıştır. Her bir kuyucukta $1,25 \times 10^4$ hücre ve toplam 500 µl olacak şekilde hücre süspansiyonu kuyucuklara alınmıştır. Denemeler kontrol, DMSO ve her farklı uygulama dozu için üç tekrar şeklinde ve 24, 48 ve 72 saat olmak üzere her bir tedavi uygulama süresi için ayrı bir plak çalışılmıştır. 24, 48 ve 72 saat sonunda her bir kuyucuktaki hücre süspansiyonu pipetle alt üst edilerek homojen hale getirilmiştir. Daha sonra süspansiyondan 50 µl alınarak ½ oranında % 4' lük tripan mavisi ile dilüe edilmiş ve tekrar pipet yardımıyla homojen hale getirilmiştir. Sonra bu solüsyondan 10 µl alınarak Neubauer lamı ile ışık mikroskopunda 100x büyütmede canlı ve ölü hücreler ayrı ayrı sayılarak yüzde viabilite değerleri aşağıdaki formül kullanılarak tayin edilmiştir.

$$\% \text{ Viabilite: } \frac{\text{Canlı hücre sayısı}}{\text{Canlı hücre sayısı} + \text{ölü hücre sayısı}} \times 100$$

3.7. WST-1 Testi

Hücre proliferasyonunu değerlendirmek için yapılan WST-1 (Water-soluble tetrazolium salt) testi canlı hücrelerden tetrazolium tuzlarının ayrıştırılmasına dayanan non-radyoaktif, spektrofotometrik, kolorimetrik bir testir. Tetrazolium tuzları hücrel enzimler tarafından formazan tuzlarına dönüştürölmektedir. Canlı hücre sayısındaki artış örneklerdeki mitokondrial dehidrogenaz aktivitesinde artmaya yol açmaktadır. Enzim aktivitesinin güçlenmesiyle birlikte kültürdeki hücrelerde metabolik olarak aktif halde bulunan hücrelerin miktarı ile doğrudan korele olarak formazan ile boyanan hücre formunda artış olmaktadır. Formazan boya metabolik olarak aktif olan hücreler tarafından üretilmekte olup, spektrofotometri ile belirtilen dalga boyunda boyanan hücrelerin absorbansı ölçölmektedir (70).

Hücrelerde belirlenen dozlarda ve sürelerde *H. perforatum* ekstresinin metabolik aktivite üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla WST-1 testi yapılmıştır. Bu amaçla 96 kuyucuklu plaklara her bir kuyucuğa 100 µl volüm içerisinde $1,5 \times 10^4$ hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu aktarılmıştır. Her bir grup için üç ayrı kuyucukta çalışma yapılmıştır. Bölüm 3.5.' de belirtilen süre ve dozlarda *H. perforatum* ekstresi uygulandıktan sonra deneyin sonunda her bir kuyucuğa 10 µl WST-1 solüsyonundan eklenerek hücreler 2 saat 37° C, % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası oluşan renk değişimi spektrofotometre de 450 nm' de ölçülmüştür. Ölçülen absorbans değerleri aşağıdaki formüle göre % metabolik aktivite sonuçları olarak hesaplanarak grafiğe aktarılmıştır.

$$\% \text{ Metabolik aktivite} = \frac{A_{\text{hyp}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100$$

A_{hyp} : *Hypericum perforatum* uygulanan grubun absorbans değeri

A_{hyp} : Kontrol grubunun absorbans değeri

3.8. LDH Sitotoksite Testi

LDH stabil bir stoplazmik protein olmakla birlikte bütün hücrelerde sabit konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Hücre membranı hasarlandığı zaman hücrelerden hücre kültürü supernatantının içerisinde LDH salınımı gözlenmektedir. Bundan dolayı daha yüksek oranda enzim aktivitesi salınımı, daha büyük oranlarda hücre ölümleri yani kültür canlılığının kaybı aynı periyod içinde gerçekleşir. Kültürün supernatantı içinde LDH ölçümü canlı hücre kayıpları için kantitatif değer alır. LDH aktivitesi pirüvattan laktata indirgenmesiyle ölçülebilir. İndirgenme spektrofotometrede NADH' ın NAD⁺ a yükseltgenmesi izlenerek bağlanır. Dengenin bir tarafında NAD⁺ ve laktat vardır. NADH 340 nm'de NAD⁺ ile kıyaslandığında yüksek absorbansa sahip olduğu için reaksiyon 340 nm' de ölçülür (70).

Sitotoksik etkiyi değerlendirmek için yapılan LDH testi non-radyoaktif, kolorimetrik bir testtir. Ölü hücrelerden ve lizise uğrayan hücrelerin sitozolünden salınan

LDH aktivitesi ölçümüne dayanan bir testtir. Bu amaçla 96 kuyucuklu plaklara her bir kuyucuğa 100 µl volüm içerisinde $1,5 \times 10^4$ hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu aktarılmıştır. Her bir grup için üç ayrı kuyucukta çalışma yapılmıştır. Bölüm 3.5.' de belirtilen süre ve dozlarda *H. perforatum* ekstresi uygulanmıştır. Uygulama süresinin sonuna kadar hücreler 37° C, % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Deneyin sonunda RPMI 1640 besiyerinde LDH aktivitesini değerlendirmek amacıyla background kontrol grubu için üç kuyucuk ayrılmış ve içerisine sadece RPMI 1640 besiyeri eklenmiştir. Testin doğru çalışıldığının tespit edilmesi için low ve high kontrol gruplarının absorbansları değerlendirilmiştir. *H. perforatum* ekstresi uygulanmayan hücrelerden spontan olarak salınan LDH aktivitesini değerlendirmek amacıyla low kontrol grubu için de üç kuyucuk ayrılmıştır. *H. perforatum* ekstresi uygulanan hücrelerden maksimum miktarda salınan LDH aktivitesini değerlendirmek amacıyla high kontrol grubu için de üç kuyucuk ayrılmıştır. Önce reaksiyonun gerçekleşmesini sağlayacak katalist solüsyonu hazırlanmıştır. Bunun için liyofilizat 1 ml double distile su içerisinde iyice karıştırılmıştır. Sonra yukarıda hazırladığımız katalist solüsyonundan 250 µl alarak üzerine 11,25 ml. dye solüsyonu ilave edilmiştir. Böylece reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. High kontrol grubu için ayırdığımız kuyucuklara Lizis solüsyonundan 2,5 µl eklenmiştir. Sonra hücreler 37° C, % 5 CO₂ içeren inkübatörde 15 dk bekletilmiştir. LDH aktivitesini belirlemek için reaksiyon karışımından 50 µl bütün kuyucuklara eklenmiştir. Hücreler oda sıcaklığında, karanlıkta, 5 dk bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyonu durdurmak için stop solüsyonundan bütün kuyucuklara 25 µl eklenmiştir. Hücrelerdeki LDH aktivite ile 490 nm' de ölçülerek değerlendirilmiştir. Ölçülen absorbans değerleri LDH aktivitesi şeklinde grafiğe aktarılmıştır.

3.9. BrdU Testi

Hücre proliferasyonu genomik DNA replikasyonu ile belirlenebilir. DNA sentezi hücre proliferasyonunda indirekt bir parametredir. Replikasyon olan hücrelerdeki DNA ölçümünde timidin kullanılmaktadır. Hücre proliferasyonunu değerlendirmek için yapmayı planladığımız BrdU (5-bromodeoksiüridin) testi, proliferasyon gösteren hücrelerdeki DNA' ya BrdU bağlanmasını saptayan bir testtir. Klor, brom ve iyot atomlarının bağlanma özellikleri metil grubunun (CH₃) bağlanma özellikleri ile büyük benzerlik gösterir. Bunun sonucu olarak, halojenli pirimidinler grubunda yer alan BrdU, yapısında bulunan halojen grupları yüzünden,

DNA molekülünün normal yapı taşı olan timidine yapısında bulunan metil grubu ile çok benzemektedir. Bu halojenli pirimidinler, DNA sentezi sırasında timidin molekülünün yerini alarak DNA zincirinin yapısına girebilirler. Bu nedenle bu maddelere ‘timidin analoğu’ adı verilir. Proliferasyon olan hücrelerin DNA’ sındaki timidinle BrdU yer değiştirmektedir. Bu yöntem, sadece S fazındaki hücrelerin BrdU ile işaretlenmesi ve bu işaretli hücre grubunun hücre siklusundaki ilerlemesinin izlenmesine dayanır. Nonradyoaktif timidin analoğu olan bromodeoksiüridin S fazındaki hücrelerin DNA’ sına bağlanması sonucunda anti-BrdU antikorlarının kullanımı ile S fazındaki hücrelerin ortaya çıkarılması sağlanır. Anti-BrdU-peroksidaz antikorları eklendikten sonra oluşan immün kompleksler spektrofotometrede ölçülerek değerlendirilmektedir (71).

Hücrelerde Bölüm 3.5.’ de belirlenen dozlarda ve sürelerde *H. perforatum* ekstresinin uygulanması ile proliferasyona olan etkisini değerlendirmek amacı ile 96 kuyucuklu plaklara her bir kuyucuğa 100 µl volüm içerisinde $1,5 \times 10^4$ hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu aktarılmıştır. Her bir grup için üç ayrı kuyucukta çalışma yapılmıştır. Yukarıda belirtilen süre ve dozlarda *H. perforatum* ekstresi uygulanmıştır. Uygulama süresinin sonuna kadar hücreler 37° C, % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir. Deneme süresi olarak belirlenen 24, 48, 72 saat sonrasında 96 kuyucuk içeren plaklarda üretilen hücreler üzerine, her bir kuyucuğa final konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde 10 µl BrdU labeling solüsyonundan eklenerek 2 saat 37° C, % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir. Daha sonra BrdU labeling solüsyonu uzaklaştırmak için hücreler 300 g’ de, 10 dk santrifüj edilmiştir. Sonra pipet yardımıyla üstteki süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücreler 15 dk saç kurutucu ile kurutulmuştur. Her bir kuyucuğa 200 µl Fix Denat solüsyonu eklendikten sonra oda sıcaklığında, 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra Fix Denat solüsyonu pipetle aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Her bir kuyucuğa 100 µl anti-BrdU-POD working solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında, 90 dk bekletilmiştir. Sonra pipetle solüsyon uzaklaştırılmış, her bir kuyucuğa 200 µl yıkama solüsyonu eklenerek üç defa kuyucuklar yıkanmıştır. Her bir kuyucuğa 100 µl substrat solüsyonu eklenerek, oda sıcaklığında 5-30 dk arasında renk reaksiyonu oluşuncaya kadar beklenilmiştir. Sonra her bir kuyucuğa 25 µl stop solüsyonu eklenerek spektrofotometrede 450 nm’ de absorbans değerleri ölçülmüştür.

3.10. Tunel Testi

Hücre ölümünün iki farklı hali olan apoptozis ve nekroz, ölen hücrelerin moleküler, biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerine dayanarak birbirinden ayrılabilir. Programlanmış hücre ölümü veya apoptozis, ökaryotik hücre ölümünün en sık rastlanan şeklidir. Bu, homeostazı koruyan bir fizyolojik intihar mekanizmasıdır. Hücre ölümü homeostaz içindeki normal doku döngüsünde olur (72).

Genelde, apoptozise giden hücreler, plazma zarının hızlı bozulması ve çekirdeğin parçalanması da dahil olmak üzere, çekirdek ve sitoplazmada belirgin örnek oluşturacak şekilde yapısal değişiklikler gösterirler. Çekirdeğin yapısının bozulması, kromatinin ağır hasarı ve kalsiyuma bağlı endojen nükleazların etkin hale gelmesinden sonra DNA' nın parçalara ayrılması ile ilişkilidir. Çekirdek DNA' sının oligonükleozom boyutunda parçalanması ile sonuçlanan endonükleolizis, apoptozisin önemli biyokimyasal olgusu olarak kabul edilir. Böylece bu olgu sıklıkla, elektroforez sırasında agaroz jeller üzerinde tipik "DNA merdiveni" ile değerlendirilmesi için kullanılır. Ancak bu yöntem tek tek hücrelerdeki apoptozisi veya apoptozisin histolojik yerleşimini veya hücre farklılaşmasındaki ilişkisi ile ilgili bilgi sağlamaz. Bu, apoptozis ile uyarılmış DNA dizi kırılmasının enzimatik in situ işaretlenmesi ile yapılır (73,74).

Tunel (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) apoptozise uğrayan hücreleri tespit etmek için yapılan bir testtir. Bu test ile apoptozisin ileri evrelerinde belirleyici olarak rol alan apoptotik hücrelerdeki nüklear kromatin fragmentasyonu saptanmaktadır. Tunel testi metod olarak DNA kırıklarının sonuna polimeraz terminal deoksinükleotidil transferaz eklenerek işaretlenmesi prensibine dayanan bir testtir. Bu yöntem temelinde apoptotik hücrelerdeki DNA sarmal kırıklarını, serbest 3'-OH uçlarında enzimatik bir reaksiyon ile tespit etmeye dayanarak apoptozise giden hücrelerin görüntülenmesini sağlamaktadır (72). Tunel testinde kullanılan solüsyonlar aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

Fiksasyon solüsyonu: 5 ml % 2 paraformaldehid

5 ml metanol

25 µl glutaraldehid

Permeabilizasyon solüsyonu: 100 mg Na sitrat

100 ml saf su

100 µl Triton X-100

Tunel reaksiyon solüsyonu: 5 µl Tunel solüsyonu

45 µl Label solüsyonu

Hücrelerde en yüksek konsantrasyon olan 0,5 mg/ml dozu ve 48 saat inkübasyon süresince *H. perforatum* ekstresinin uygulanması ile meydana gelen apoptozisi değerlendirmek amacı ile her bir kuyucuk içerisinde 5×10^5 hücre ve her bir kuyucukta 1 ml olacak şekilde hücre süspansiyonu altı kuyucuk içeren plaklara aktarılmıştır. Belirlenen süre ve dozlarda hücrelere *H. perforatum* ekstresi uygulanarak hücreler 37° C, % 5 CO₂ içeren ortamda uygulama süresinin sonuna kadar inkübe edilmiştir. Deneme süresi sonrasında 6 kuyucuk içeren plaklardan alınan hücreler boyama işlemi için lamlara aktarılmıştır. Bunun için hücreler cytospin yöntemi ile 200g' de, 4°C' de, 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında supernatan kısım atıldıktan sonra hücreler PBS ile üç defa yıkanılmıştır. 150 µl fiksasyon solüsyonu eklendikten sonra oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra fiksasyon solüsyonu uzaklaştırılmıştır. Tekrar PBS ile iki defa yıkandıktan sonra hücrelerin üzerine permeabilizasyon solüsyonundan 500 µl eklenmiştir. Buz üzerinde 2 dk bekletildikten sonra permeabilizasyon solüsyonu uzaklaştırılmıştır. PBS ile bir defa yıkama işlemi yapılmıştır. Negatif kontrol grubuna, her biri için 50 µl Label solüsyonundan diğer çalışma gruplarına ise hazırladığımız Tunel reaksiyon solüsyonundan her bir lam için 50 µl olacak şekilde hücrelere eklenmiştir. 1 saat, 37° C' de, % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir. Preparatlara nükleusları görüntülemek amacıyla mavi immunofloresan bir boya olan 100 µl DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) de uygulanarak karanlıkta, oda sıcaklığında, 5 dk bekletilmiştir. Daha sonra lamaların üzerine lameller kapatılarak floresan mikroskopta 515-565 nm yeşil dalga boyunda görüntülenmiştir.

3.11. ANNEXİN V Testi

Apoptozisin erken dönemlerinde hücre yüzeyinde bazı değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Plazma membran değişikliklerinden birisi de plazma membranının iç kısmından dış kısmına

doğru fosfotidilserin translokasyonudur. Annexin-V Ca^{+2} bağımlı fosfolipid bağlayıcı protein olup, fosfotidilserine yüksek afinite ile bağlanmaktadır (75, 76). Bu test ile süspanse hücrelerdeki apoptotik hücrelerin membranlarının dış yüzeyindeki fosfotidilserine Annexin-V' in bağlanmasıyla flow sitometri veya floresans mikroskopu kullanılarak apoptotik hücrelerin ayırt edilmesi ve kantitatif olarak ölçülmesi mümkündür. Hücre membran bütünlüğünün bozulması ile de nekrotik hücrelerden fosfotidilserin açığa çıkmaktadır. Apoptotik hücrelerin nekrotik hücrelerden ayrılması gerekmektedir (76). Annexin V testi ile apoptozisin erken dönemlerinde hücrelerde meydana gelen değişikliklerin saptanması planlanmıştır.

Hücrelerde etkinin en fazla görüldüğü doz olan 0,5 mg/ml konsantrasyonda ve 24 saat inkübasyon süresince H. perforatum ekstresinin uygulanması ile hücrelerde meydana gelen apoptozisi değerlendirmek amacı ile her bir kuyucuk içerisinde 3×10^5 hücre ve her bir kuyucukta 1 ml olacak şekilde hücre süspansiyonu 6 kuyucuk içeren plaklara aktarılmıştır. Her bir grup için üç ayrı kuyucukta çalışılması planlanarak yukarıda belirtilen süre ve dozlarda H. perforatum ekstresi uygulanmıştır. Uygulama süresinin sonuna kadar hücreler $37^{\circ}C$, % 5 CO_2 içeren ortamda inkübe edilmiştir. Deneme süresi sonunda 6 kuyucuk içeren plaklarda üretilen hücreler ependorflara alınarak 200 g' de, $4^{\circ}C$ ' de, 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında supernatan kısım atıldıktan sonra hücreler soğuk PBS ile iki defa yıkanmıştır. Sonra hücreler 500 μl Annexin Binding buffer ile resüspanse edilmiştir. Hücreler cytopspin yöntemiyle 200 g' de, $4^{\circ}C$ ' de, 5 dk santrifüj edilerek lamlara aktarılmıştır. Hücreler oda sıcaklığında, 15 dk inkübe edilmiştir. Preparatlara 100 μl DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) uygulanarak karanlıkta, oda sıcaklığında, 5 dk daha bekletilmiştir. Hazırlanan örnekler floresans mikroskopta 515- 565 nm dalga boyunda görüntülenmiştir.

3.12. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizin yapılmasında bilgisayar programı olarak Origin Graph 8.0 kullanılmıştır. Sayısal değişkenler “ortalama $\pm$ standart sapma” şeklinde grafiğe aktarılmıştır. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi sırasında gruplar arasındaki anlamlı farkların belirlenmesinde One-way ANOVA testi, iki grup arasındaki farkın belirlenmesinde ise Two sample T test kullanılmıştır. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

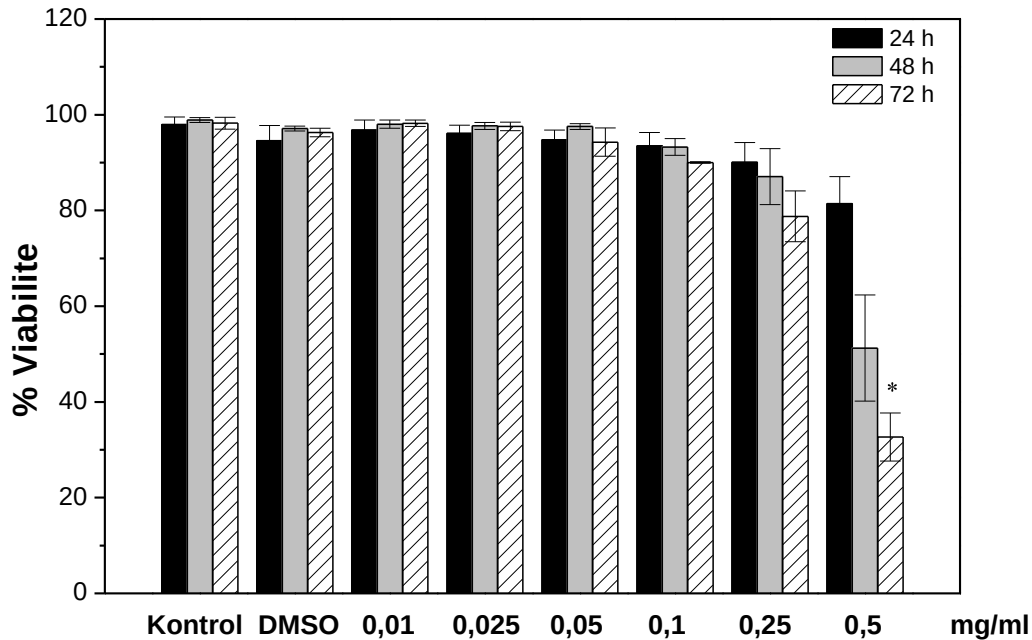
4. BULGULAR

4.1. Namalwa ve Daudi Hücrelerinde Hypericum Perforatum' un Tripan Mavisi Boyama Yöntemi ile Viabilitenin Değerlendirilmesi

H. perforatum ekstresinin Namalwa ve Daudi hücrelerinde etkisinin varolup olmadığını araştırmak amacıyla ilk olarak Tripan mavisi boyama yöntemi ile canlı ve ölü hücre sayılarak viabilite ortaya çıkarılmıştır. Bu amaçla Namalwa ve Daudi hücreleri 24 kuyucuklu plaklara $12,5 \cdot 10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde alındıktan sonra hücreler kontrol, DMSO ve 0,01- 0,025- 0,05- 0,1- 0,25- 0,5 mg/ml şeklinde farklı H. perforatum konsantrasyonlarıyla 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresinin sonunda tüm gruplarda viabilitenin değerlendirilmesi için aşağıdaki formülasyon kullanılmıştır.

$$\% \text{ Viabilite} = \frac{\text{Canlı hücre sayısı}}{\text{Canlı hücre sayısı} + \text{ölü hücre sayısı}} \times 100$$

Şekil 6' da 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda Hypericum perforatum ekstresinin Namalwa hücrelerinde viabilite üzerine etkisi gözlenmektedir.

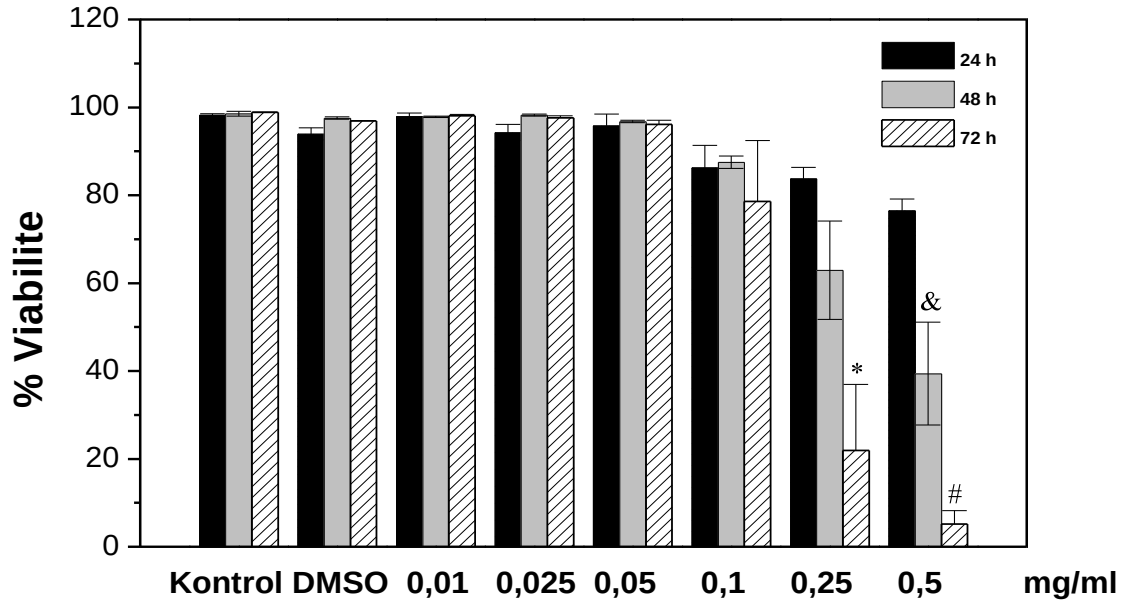


Şekil 6: Namalwa hücrelerinde Hypericum perforatum' un 24, 48, 72 saat inkübasyon sonrası gözlenen % viabilite değerlerinin (ortalama±standart sapma) grafiksel olarak gösterilmesi

Bu sonuçlara göre, Namalwa hücrelerinde kontrol grubu ile DMSO grubu arasında 24, 48 ve 72. saatte viabilite açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). 0,01- 0,025- 0,05- 0,1 mg/ml konsantrasyonları ve kontrol grubu beraber karşılaştırıldığında viabilite değerlerinde belirgin bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). 0,25 mg/ml konsantrasyonunda zamana bağlı olarak viabilite değerlerinde azalma saptanmıştır. Viabilite 24. saatte % 90 (± 4) olarak gözlenirken 48. saatte % 87 (± 5)' a, 72. saatte ise % 78 (± 5)' e kadar azaldığı saptanmıştır. 72. saatte kontrol grubu ile 0,25 mg/ml konsantrasyon grubu karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($p=0.0035$). En yüksek doz olan 0,5 mg/ml konsantrasyonda da zamana bağlı olarak viabilitede azalma gözlenmiştir. Buna göre 24. saatte viabilite % 81 (± 5)' in, 48. saatte % 51 (± 11)' nin, 72. saatte ise % 32 (± 5)' in altına kadar indiği saptanmıştır. 48. saatte kontrol grubu ile 0,5 mg/ml konsantrasyon grubu karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($p=0.0004$) Benzer şekilde 72. saatte kontrol grubu ile 0,5 mg/ml konsantrasyon grubu karşılaştırıldığında yine istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanmıştır (* $p=0.0002$) (Şekil 6).

Sonuç olarak H. perforatum ekstresinin Namalwa hücrelerinde viabilite üzerine etkisi tripan mavisi boyama yöntemi ile ölçüldüğünde etkinin 48. saatte 0,5 mg/ml konsantrasyonda başladığı ve bu etkinin 72. saatte en belirgin olduğu bulunmuştur.

Şekil 7' de 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda H. perforatum ekstresinin Daudi hücrelerinde viabilite üzerine etkisi gözlenmektedir.



Şekil 7: Daudi hücrelerinde *Hypericum perforatum*' un 24, 48, 72 saat inkübasyon sonrası gözlenen % viabilite değerlerinin (ortalama±standart sapma) grafiksel olarak gösterilmesi

Daudi hücrelerinde yapılan viabilite deney sonuçlarına göre kontrol grubu ile DMSO grubu arasında 24, 48 ve 72. saatte viabilite açısından değerlendirildiğinde farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). 24, 48 ve 72. saatlerde 0,01-0,025-0,05-0,1 mg/ml konsantrasyonları ve kontrol grubu beraber karşılaştırıldığında viabilite değerlerinde belirgin bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). 0,1 mg/ml konsantrasyonunda ise viabilite değeri 24 saatte % 86 (± 5), 48. saatte % 87 (± 1) iken 72. saatte % 78 (± 13) olarak saptanmıştır. 0,25 mg/ml konsantrasyonunda viabilite değerinin ilk 24 saatte % 83 (± 2) olarak tespit edildiği 48. saatte ise % 62 (± 11) düzeyine, 72. saatte ise % 21 (± 15)' e indiği saptanmıştır. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde ise 48. saatte 0,25 mg/ml konsantrasyon grubu ile 48. saat kontrol grubu karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farklılık olduğu tespit edilmiştir ($p=0.001$). Aynı şekilde 72. saatte 0,25 mg/ml konsantrasyon grubu ile 72. saat kontrol grubu karşılaştırıldığında da anlamlı farklılık saptanmıştır (* $p=0.0002$) En yüksek konsantrasyon olan 0,5 mg/ml konsantrasyon grubunda 24. saatte viabilite değeri % 76 (± 2), 48. saatte % 39 (± 11) civarında iken 72. saatte ise etkinin çok daha belirgin olduğu görülmüş ve viabilitenin % 5 (± 3)' in altına düştüğü saptanmıştır. 48. saatte 0,5 mg/ml konsantrasyon grubu ile 48. saat

kontrol grubu karşılaştırıldığında yine istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0.0002$) Benzer şekilde 72. saatte 0,5 mg/ml konsantrasyon grubu ile 72. saat kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p=0.000001$) (Şekil 7).

Bu sonuçlara göre *H. perforatum* ekstresinin Daudi hücrelerinde viabilite üzerine etkisi tripan mavisi boyama yöntemi ile ölçüldüğünde ilk olarak etkinin 48. saatte 0.25 mg/ml konsantrasyonda başladığı ve bu etkinin 72. saatte daha da arttığı saptanmıştır. En yüksek etkinin ise 72. saat sonunda 0.5 mg/ml konsantrasyonda görüldüğü tespit edilmiştir.

4.2. Namalwa ve Daudi Hücrelerinde *Hypericum Perforatum*' un WST-1 Testi ile Metabolik Aktivitenin Değerlendirilmesi

H. perforatum' un Namalwa ve Daudi hücrelerinde konsantrasyon ve zamana bağlı olarak etkin olduğu tripan mavisi boyama yöntemi ile saptanmıştır. Ancak tripan mavisi sadece canlı ve ölü hücre sayısına dayanarak ölçme yapan bir yöntemdir. Günümüzde çok daha hassas yöntemler bulunmaktadır. Bunlardan biri de etken maddenin hücrelerdeki metabolik aktivite üzerine etkisini ölçen WST-1 testidir. Bu amaçla çalışmanın devamında *H. perforatum*' un Namalwa ve Daudi hücrelerinin metabolik aktivitesi üzerine etkisi WST-1 testi ile ölçülmüştür.

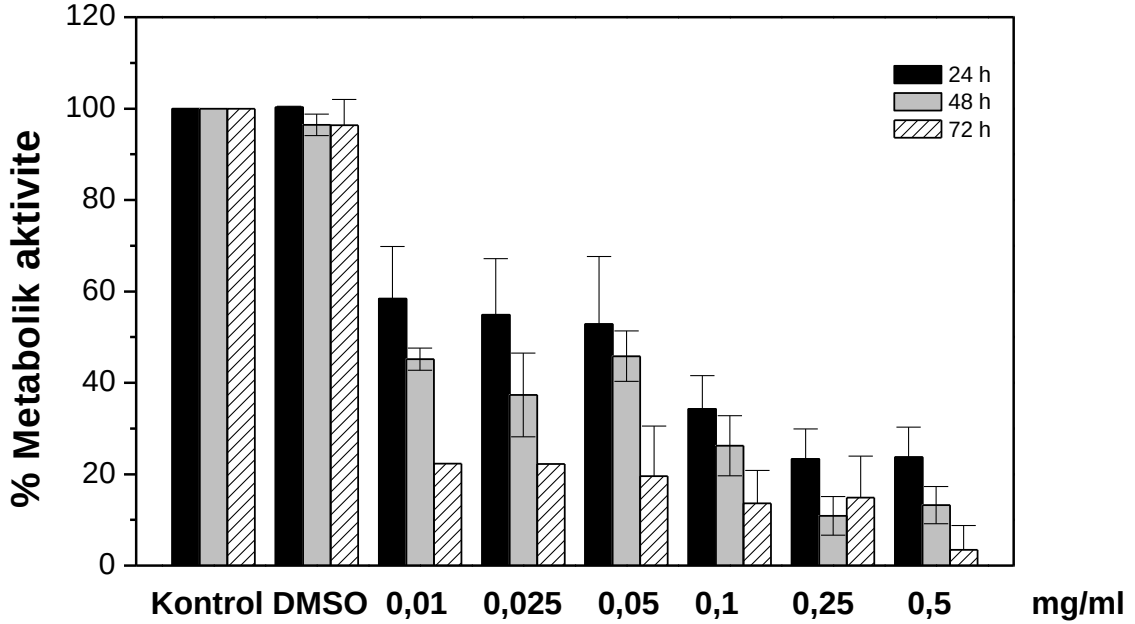
İlk olarak 96 kuyucuklu plaklara $1,5 \times 10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde Namalwa ve Daudi hücreleri alınmıştır. Kontrol, DMSO grupları ve 0,01-0,025-0,05-0,1-0,25-0,5 mg/ml *H. perforatum* konsantrasyonlarından oluşan gruplar 24, 48 ve 72 saat süresince 37°C ' de, % 5 CO_2 içeren ortamda inkübe edilmiştir. Metabolik aktivitenin değerlendirilmesinde aşağıdaki formülasyon kullanılmıştır.

$$\% \text{ Metabolik aktivite: } \frac{A_{\text{hyp}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100$$

A_{hyp} : *Hypericum perforatum* uygulanan grubun absorbans değeri

A_{kontrol} : Kontrol grubunun absorbans değeri

Şekil 8’ de Namalwa hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonucunda *H. perforatum* ekstresinin metabolik aktivite üzerinde etkisi gözlenmektedir.



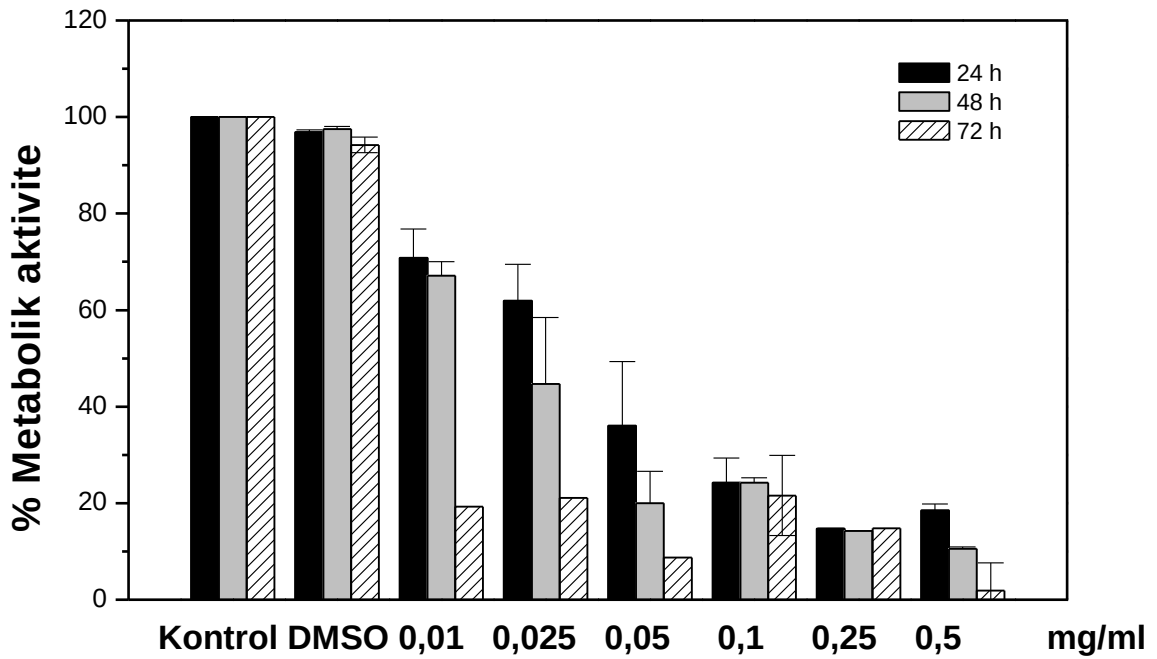
Şekil 8: Namalwa hücrelerinde *Hypericum perforatum*’ un 24, 48, 72 saat inkübasyon sonrası gözlenen % metabolik aktivite değerlerinin (ortalama±standart sapma) grafiksel olarak gösterilmesi

WST-1 testi sonucunda Namalwa hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonrasında kontrol grubu ile DMSO grubu karşılaştırıldığında metabolik aktivite açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). 24. saatte ise 0,01-0,025-0,05 mg/ml konsantrasyonlarında metabolik aktivitenin yaklaşık % 56 (± 12)’ ya kadar düştüğü tespit edilirken, 48. saatte aynı konsantrasyonlarda metabolik aktivitenin yaklaşık % 42 (± 5) ve 72. saatte ise % 21 (± 3)’ e kadar düştüğü tespit edilmiştir. Konsantrasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamış ($p>0.05$) ancak belirtilen konsantrasyonlar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0.05$). Daha yüksek konsantrasyonlarda (0,1-0,25 ve 0,5 mg/ml) ise metabolik aktivite değerinin ilk 24. saatte % 30 (± 6)’ a kadar indiği görülürken, 48. saatte tüm konsantrasyonlarda metabolik aktivitenin % 10 oranında daha da azaldığı ve 72. saatte metabolik aktivitenin % 90 (± 5) kadar düştüğü tespit edilmiştir. Bu gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında aralarında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0.05$). En düşük konsantrasyon olan 0,01 mg/ml ile en yüksek konsantrasyon olan 0,5 mg/ml için 72. saat sonunda ölçülen metabolik aktivite

değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0.003$) (Şekil 8).

Sonuç olarak yapılan WST-1 testi ile elde edilen veriler *H. perforatum* ekstresinin Namalwa hücrelerinin metabolik aktivitesinde azalmaya neden olduğunu göstermektedir. Bu etkinin zamana bağlı olarak düşük (0,01-0,025-0,05 mg/ml) ve yüksek (0,1-0,25-0,5 mg/ml) konsantrasyon grupları olarak farklı iki grupta, ancak kendi aralarında benzer patern göstererek ortaya çıktığı görülmektedir. Origin Graph 5.0 programı kullanılarak hesaplanan IC_{50} değeri Namalwa hücresi için 0,028 mg/ml olarak bulunmuştur.

Şekil 9’ da Daudi hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonucunda *H. perforatum* ekstresinin metabolik aktivite üzerinde etkisi gözlenmektedir.



Şekil 9: Daudi hücrelerinde *Hypericum perforatum*’ un 24, 48, 72 saat inkübasyon sonrası ölçülen % metabolik aktivite değerlerinin (ortalama±standart sapma) grafiksel olarak gösterilmesi

Yapılan WST-1 testi sonucunda Daudi hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonrasında kontrol grubu ile DMSO grubu karşılaştırıldığında metabolik aktivite açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). 24. saatte metabolik aktivitede konsantrasyona ve zamana bağlı olarak azalma gözlenmiştir. Tüm inkübasyon sürelerinde kontrol grubu için elde edilen değerler ile 0,01-0,025-0,05-0,1-0,25-0,5 mg/ml konsantrasyonları için elde edilen değerler ayrı ayrı karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptanmıştır ($p_{24}<0.0001$, $p_{48}<0.0001$, $p_{72}<0.0001$). 0,01 mg/ml

konsantrasyonunda metabolik aktivitede 24 ve 48. saatte % 30 (± 5) azalma gözlenirken, 72. saatte % 80 azalma saptanmıştır. Benzer şekilde 0,025 mg/ml konsantrasyonunda metabolik aktivitede ilk 24 saatte % 40 (± 7), 48. saatte % 56 (± 13), 72. saatte % 80 azalma saptanmıştır. 0,05 mg/ml konsantrasyonunda ilk 24 saatte metabolik aktivitede % 64 (± 3), 48. saatte % 80 (± 6), 72. saatte % 90 azalma tespit edilmiştir. 0,1 mg/ml konsantrasyonunda metabolik aktivitenin zamandan bağımsız olarak % 76 (± 5) oranında azaldığı tespit edilmiştir. Benzer etkinin 0,25 mg/ml konsantrasyonunda görüldüğü, zamandan bağımsız olarak metabolik aktivitede % 85 azalma olduğu saptanmıştır. 0,5 mg/ml konsantrasyonunda ise metabolik aktivitenin zamana bağlı olarak azaldığı; 24. saatte % 18 (± 1), 48. saatte % 10 ve 72. saatte % 1 (± 5)' e kadar indiği görülmüştür (Şekil 9).

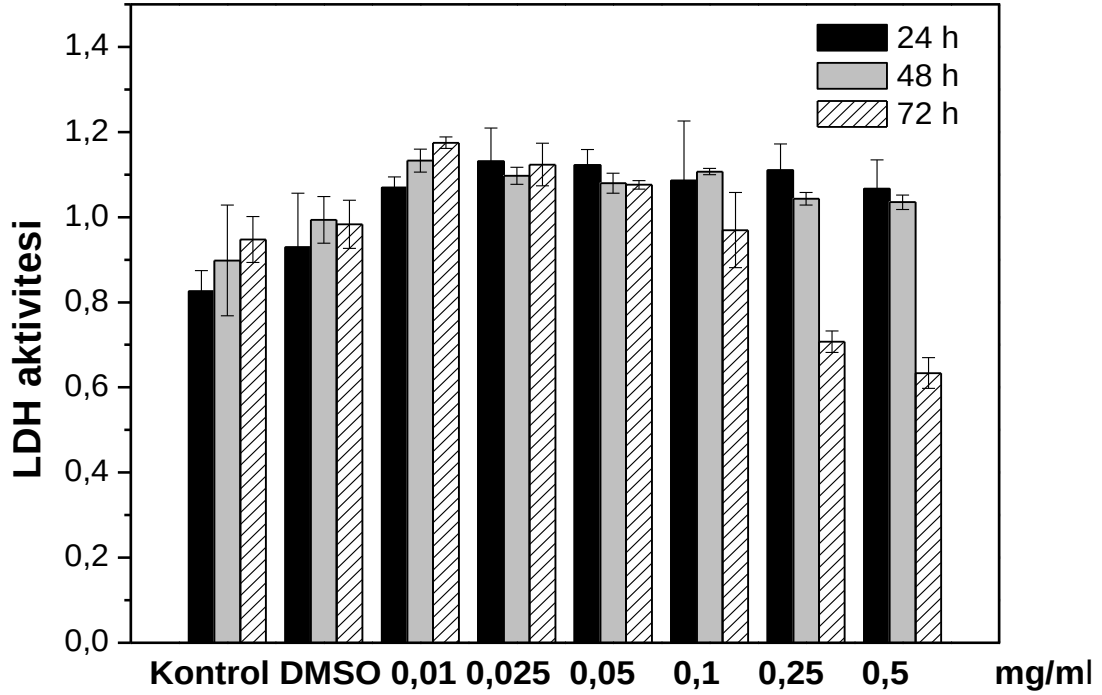
Sonuç olarak yapılan WST-1 testinden elde edilen veriler *H. perforatum* ekstresinin doz ve zaman bağımlı olarak Daudi hücrelerinde de metabolik aktivitede azalmaya neden olduğunu göstermektedir. En yüksek konsantrasyon olan 0,5 mg/ml' de metabolik aktivitenin 72. saat sonunda % 1' e kadar indiği tespit edilmiştir. Origin Graph 5.0 programı kullanılarak göre hesaplanan IC₅₀ değeri de Namalwa hücreleriyle aynı şekilde 0,028 mg/ml olarak bulunmuştur.

4.3. Namalwa ve Daudi Hücrelerinde *Hypericum Perforatum*' un LDH Testi ile Sitotoksitenin Değerlendirilmesi

Namalwa ve Daudi hücrelerinde *H. perforatum* ekstresinin sitotoksik etkisinin olup olmadığını ortaya çıkarmak amacıyla WST-1 testine paralel olarak LDH salınımı testi yapılmıştır. Bu test ile *H. perforatum* ekstresinin hücrelerde meydana getirdiği membran hasarı sonucu stoplazmadan salınan LDH miktarı ölçülerek LDH aktivitesindeki artış sitotoksik etki olarak değerlendirilmiştir.

96 kuyucuklu plaklara $1,5 \times 10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde Namalwa ve Daudi hücreleri alınarak kontrol, DMSO grupları ve 0,01-0,025-0,05-0,1-0,25-0,5 mg/ml olmak üzere farklı *H. perforatum* konsantrasyonlarından oluşan gruplar 24, 48 ve 72 saat süresince 37° C' de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir.

Şekil 10' da *H. perforatum* ekstresinin Namalwa hücrelerinde LDH salınımına etkisi 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda görülmektedir.



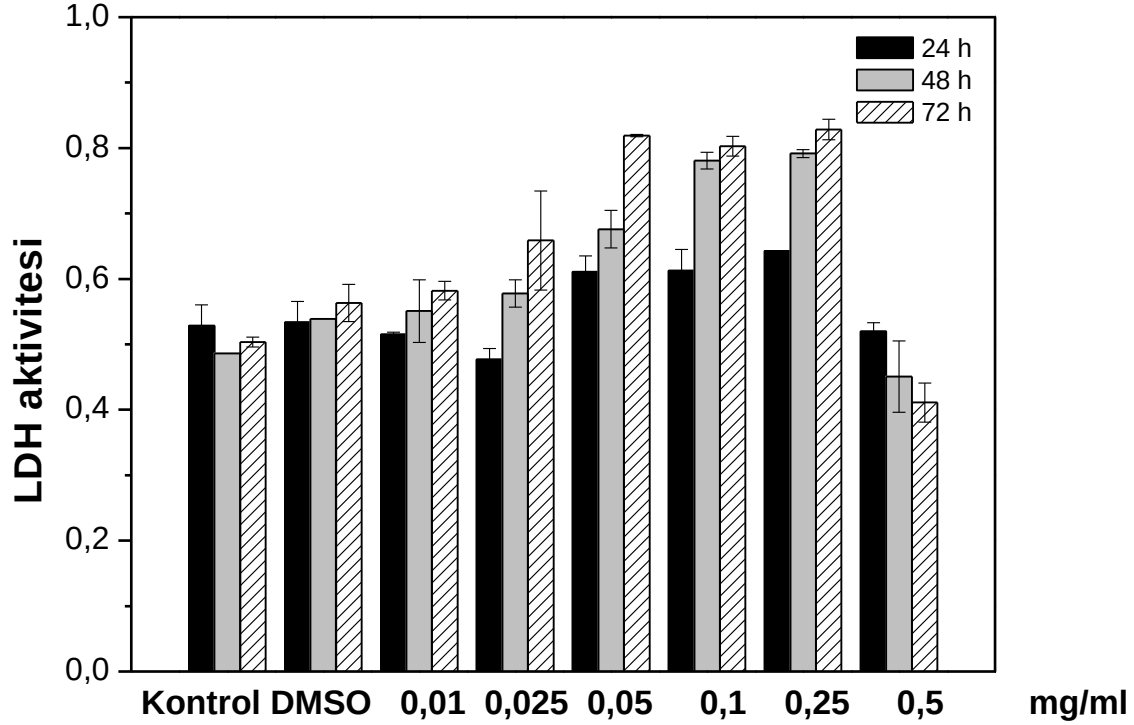
Şekil 10: Namalwa hücrelerinin *Hypericum perforatum* ile 24, 48, 72 saat inkübasyonu sonucunda ölçülen LDH aktivitesinin (ortalama±standart sapma) grafiksel olarak gösterilmesi

Buna göre, Namalwa hücrelerinde 24, 48 ve 72. saatlerde kontrol grubu hücrelerinden salınan LDH miktarı ile DMSO grubundaki hücrelerden salınan LDH miktarı karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). 24 ve 48. saatlerde 0,01-0,025-0,05-0,1-0,25-0,5 mg/ml konsantrasyonlarında hücrelerden salınan LDH düzeyi kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunmazken kontrol grubuyla karşılaştırıldığında artış gösterdiği ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Diğer taraftan 72. saatte hücrelerden salınan LDH miktarının 0,01 mg/ml konsantrasyonunda en üst düzeye ulaştığı ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki farklılığın anlamlı olduğu saptanmıştır ($p=0.002$). Ancak 72. saatte LDH düzeyinde 0,01 mg/ml konsantrasyonundan itibaren doza bağımlı olarak azalmaya başladığı görülmektedir. 0,25 ve 0,5 mg/ml konsantrasyonlarında da aynı azalma etkisi görülmüştür (Şekil 10).

Sonuç olarak Namalwa hücrelerinde yapılan LDH testinden elde edilen veriler *H. perforatum* ekstresinin LDH aktivitesinde artışına neden olduğu görülmüştür. 72. saatte artan

dozlarda canlı hücre sayısının giderek azalmasına bağlı olarak LDH aktivitesinde düşme saptanmıştır.

Şekil 11’ de *H. perforatum* ekstresinin Daudi hücrelerinde LDH salınımına etkisi 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda görülmektedir.



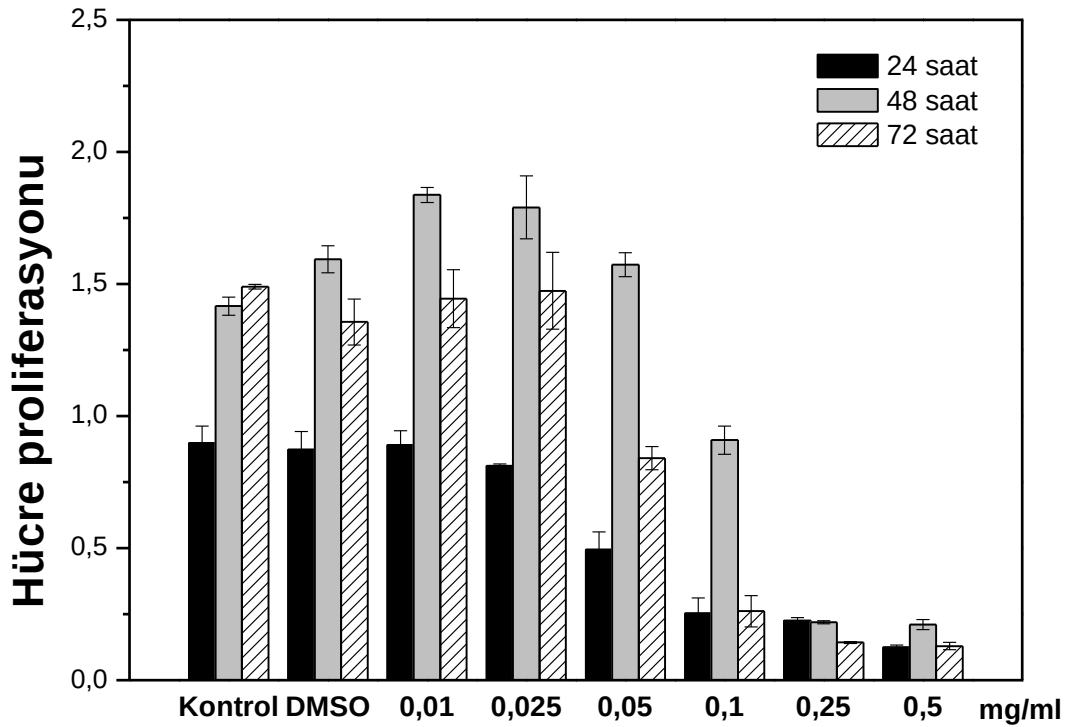
Şekil 11: Daudi hücrelerinde *Hypericum perforatum*’ un 24, 48, 72 saat inkübasyon sonucunda ölçülen LDH aktivite değerlerinin (ortalama±standart sapma) grafiksel olarak gösterilmesi

Daudi hücrelerinde 24, 48 ve 72. saatlerde kontrol grubundaki hücrelerden salınan LDH miktarı ile DMSO grubundaki hücrelerden salınan LDH miktarı karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$). LDH seviyesinin 48. saatte 0,01 mg/ml konsantrasyonundan itibaren artış gösterdiği ve en yüksek seviyeye 0,25 mg/ml konsantrasyonunda ulaştığı saptanmış ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0.05$). 0,025-0,05-0,1 ve 0,25 mg/ml konsantrasyonlarının doza ve zamana bağlı olarak LDH aktivitesinde artışa yol açtığı tespit edilmiştir. 0,025-0,05-0,1 ve 0,25 mg/ml konsantrasyonları kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık saptanmazken kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0.05$). En yüksek LDH aktivitesi her dört doz için 72. saatte ölçülmüştür. En yüksek konsantrasyon olan 0,5 mg/ml *H. perforatum* ekstresinin LDH aktivitesinde zamana bağlı olarak azalmaya yol açtığı görülmüştür (Şekil 11).

Bu sonuçlara göre Daudi hücrelerinde yapılan LDH testinden elde edilen veriler H. perforatum ekstresinin LDH aktivitesinde doz ve zaman bağımlı olarak artışa neden olduğu görülmüştür. En yüksek konsantrasyon olan 0,5 mg/ml’ de ise canlı hücre sayısının giderek azalmasından dolayı zamana bağımlı olarak LDH aktivitesinde düşme saptanmıştır.

4.4. Namalwa ve Daudi Hücrelerinde Hypericum Perforatum’ un BrdU Testi ile Proliferasyonun Değerlendirilmesi

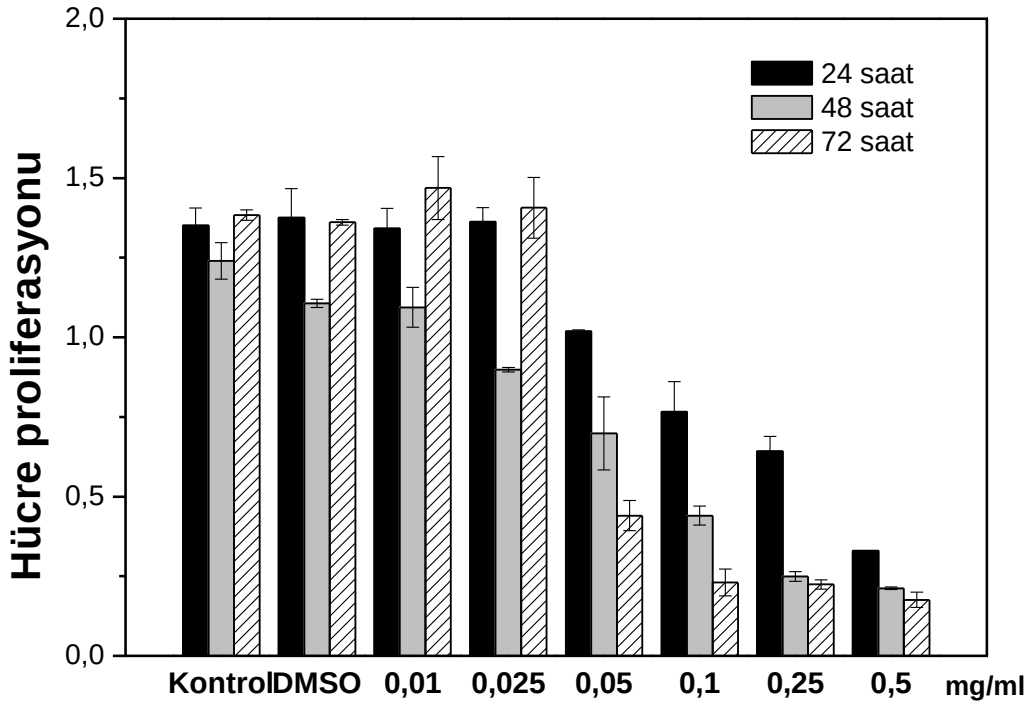
Namalwa ve Daudi hücrelerinde H. perforatum ekstresinin proliferasyona etkisinin olup olmadığını ortaya çıkarmak amacıyla BrdU testi yapılmıştır. Bu test ile H. perforatum ekstresinin proliferasyon gösteren hücrelerdeki DNA’ya BrdU bağlanmasının saptanması ile proliferasyon değerlendirilmiştir. 96 kuyucuklu plaklara $1,5 \times 10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde Namalwa ve Daudi hücreleri alınmıştır. Kontrol, DMSO grupları ve 0,01- 0,025- 0,05- 0,1- 0,25- 0,5 mg/ml dozlarında farklı H. perforatum konsantrasyonlarından oluşan gruplar 24, 48 ve 72 saat süresince 37° C’ de, % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir. Şekil 12’ de Namalwa hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda H. perforatum’ a cevabı gözlenmektedir.



Şekil 12: Namalwa hücrelerinde Hypericum perforatum’ un 24, 48, 72 saat inkübasyon sonrası gözlenen hücre proliferasyon değerlerinin (ortalama±standart sapma) grafiksel olarak gösterilmesi

Buna göre, Namalwa hücrelerinde 24, 48 ve 72. saatlerde kontrol grubu ile DMSO grubu arasında hücre proliferasyonu açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). 24. saatte 0,05-0,1-0,25 ve 0,5 mg/ml konsantrasyonlarında hücre proliferasyonunda azalma görülürken kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0.05$). 48. saatte 0,01-0,025-0,05 mg/ml konsantrasyonları kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$) 48. saatte hücre proliferasyonunda 0,1- 0,25 ve 0,5 mg/ml konsantrasyonlarında azalma gözlemlendi ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0.05$). 72. saatte hücre proliferasyonunda 0,05 mg/ml konsantrasyonundan itibaren artan konsantrasyonlarda azalma görülmüştür ve kontrol grubu ile 0,05-0,1-0,25 ve 0,5 mg/ml konsantrasyonları karşılaştırıldığında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0.05$). 72. saatte 0,1-0,25 ve 0,5 mg/ml konsantrasyonlarında hücre proliferasyonu açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 12).

Sonuç olarak Namalwa hücrelerinde *H. perforatum* ekstresinin proliferasyon üzerine doz ve zaman bağımlı olarak etki gösterdiği görülmüştür. En yüksek konsantrasyonlar olan 0,25 mg/ml ve 0,5 mg/ml’ de hücre proliferasyonunun tamamen azaldığı saptanmıştır. Şekil 13’ de Daudi hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonucunda *H. perforatum*’ a cevabı gözlenmektedir.



Şekil 13: Daudi hücrelerinde *Hypericum perforatum*’ un 24, 48, 72 saat inkübasyon sonrası gözlenen hücre proliferasyon değerlerinin (ortalama±standart sapma) grafiksel olarak gösterilmesi

Daudi hücrelerinde 24, 48 ve 72. saatlerde kontrol grubu ile DMSO grubu arasında hücre proliferasyonu açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). 24 ve 72. saatlerde kontrol grubu ile 0,01 ve 0,025 mg/ml konsantrasyon grupları karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). 48. saatte 0,025 mg/ml konsantrasyonundan itibaren artan konsantrasyonlarda proliferasyonda azalma tespit edilmiş ve gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldıklarında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0.05$). 24. saatte kontrol grubu ile 0,05-0,1-0,25 ve 0,5 mg/ml konsantrasyonları karşılaştırıldığında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0.05$). 72. saatte hücre proliferasyonunda 0,05 mg/ml konsantrasyonundan itibaren artan konsantrasyonlarda azalma saptanmış ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0.05$). 0,1-0,25 ve 0,5 mg/ml konsantrasyonlarında hücre proliferasyonunu açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 13).

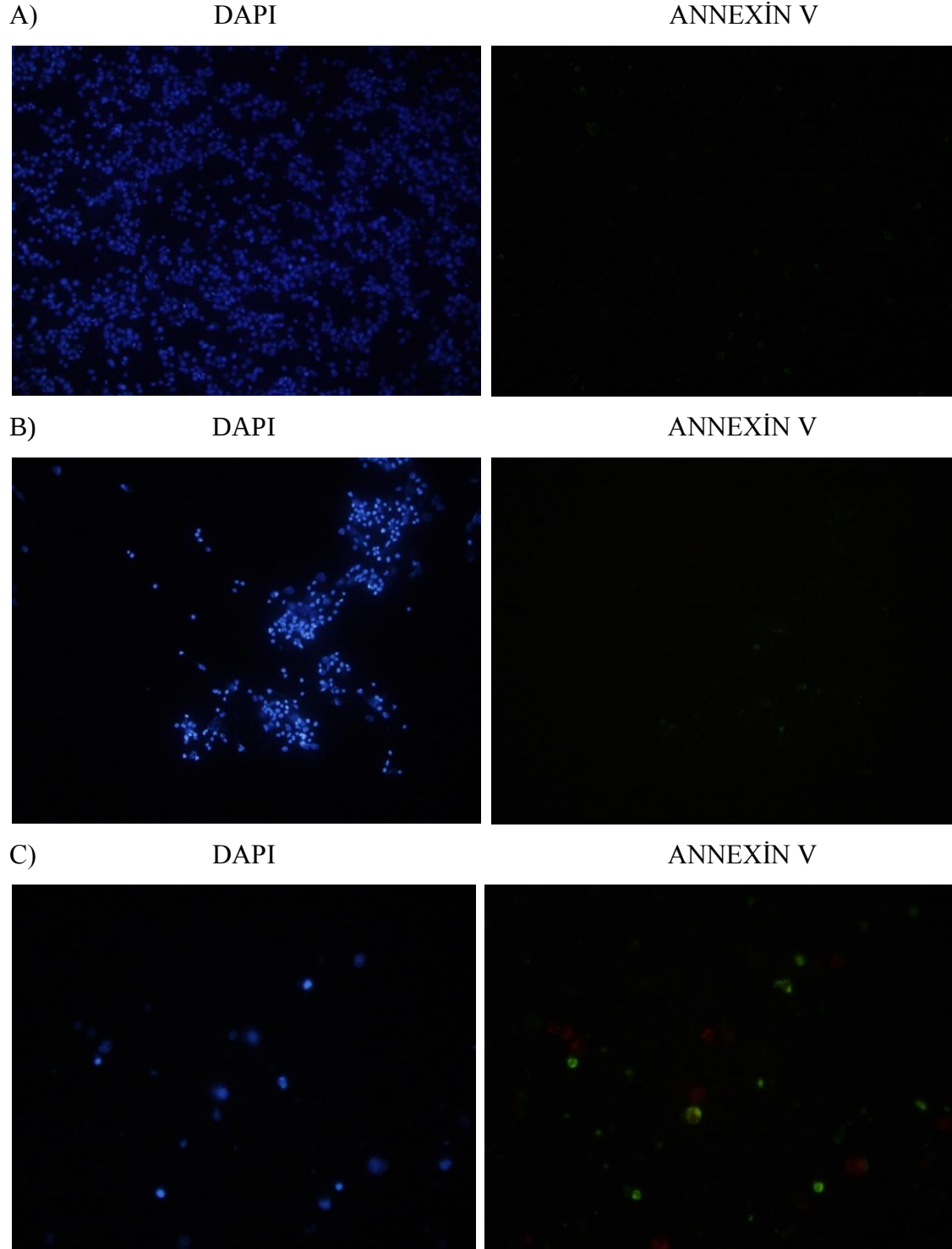
Sonuç olarak Daudi hücrelerinde *H. perforatum* ekstresinin proliferasyon üzerine doz ve zaman bağımlı olarak etki gösterdiği görülmüştür. En yüksek konsantrasyon olan 0,5 mg/ml’ de hücre proliferasyonunun tamamen azaldığı saptanmıştır.

4.5. Namalwa ve Daudi Hücrelerinde *Hypericum Perforatum*’ un Annexin V Testi ile Apoptozis Değerlendirilmesi

Namalwa ve Daudi hücrelerinde *H. perforatum* ekstresinin erken apoptotik etkisinin olup olmadığını ortaya çıkarmak amacıyla Annexin V testi yapılmıştır. Bu test ile *H. perforatum* ekstresinin hücrelerde apoptozisin erken dönemlerinde meydana getirdiği değişikliklerin saptanmasıyla değerlendirilmiştir. Ayrıca DAPI boyama ile hücrelerdeki nükleusların mavi görüntülenmesi sağlanmıştır.

6 kuyucuklu plaklara 3×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde Namalwa ve Daudi hücreleri alınarak kontrol, DMSO ve 0,5 mg/ml *H. perforatum* konsantrasyon grubu 24 saat süresince 37°C ’ de, %5 CO_2 içeren ortamda inkübe edilmiştir.

Resim 2’ de *H. perforatum* ekstresinin Namalwa hücrelerine 24 saat inkübasyon sonrasında erken apoptotik etkisi Annexin V ile pozitif olarak boyanan (yeşil) hücrelerin varlığı ile görülmektedir.

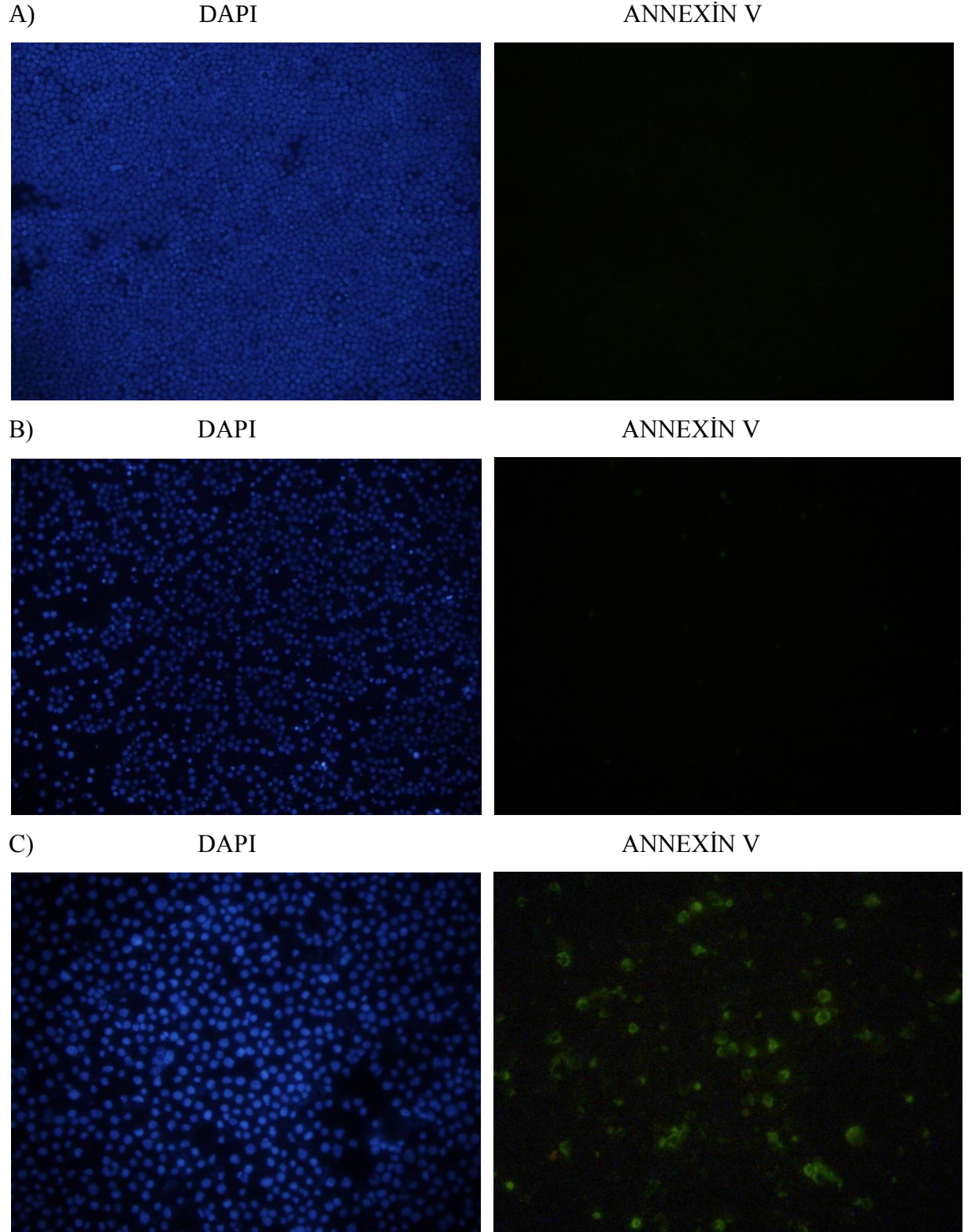


Resim 2: Namalwa hücrelerinin 0,5 mg/ml konsantrasyonda *H. perforatum* ile 24 saat inkübasyon sonrası floresans mikroskop görüntüleri (Annexin V) A) Kontrol grubu (x20) B) DMSO grubu (x20) C) 0,5 mg/ml konsantrasyon grubu (x40)

Namalwa hücrelerinde *H. perforatum* ekstresi ile 24 saat inkübasyon sonucunda Annexin V boyama yöntemi ile yapılan floresans mikroskop incelemesinde kontrol ve

DMSO grubunda apoptotik hücre gözlenmemiştir. Diğer taraftan H. perforatum ekstresinin 0,5 mg/ml konsantrasyonda uygulandığı hücrelerde ise apoptotik cisimciklerin varlığı yine Annexin V ile pozitif (yeşil) boyanan hücrelerin varlığıyla tespit edilmiştir.

Resim 3’ de H. perforatum ekstresinin Daudi hücrelerine 24 saat inkübasyon sonrasında erken apoptotik etkisi görülmektedir.



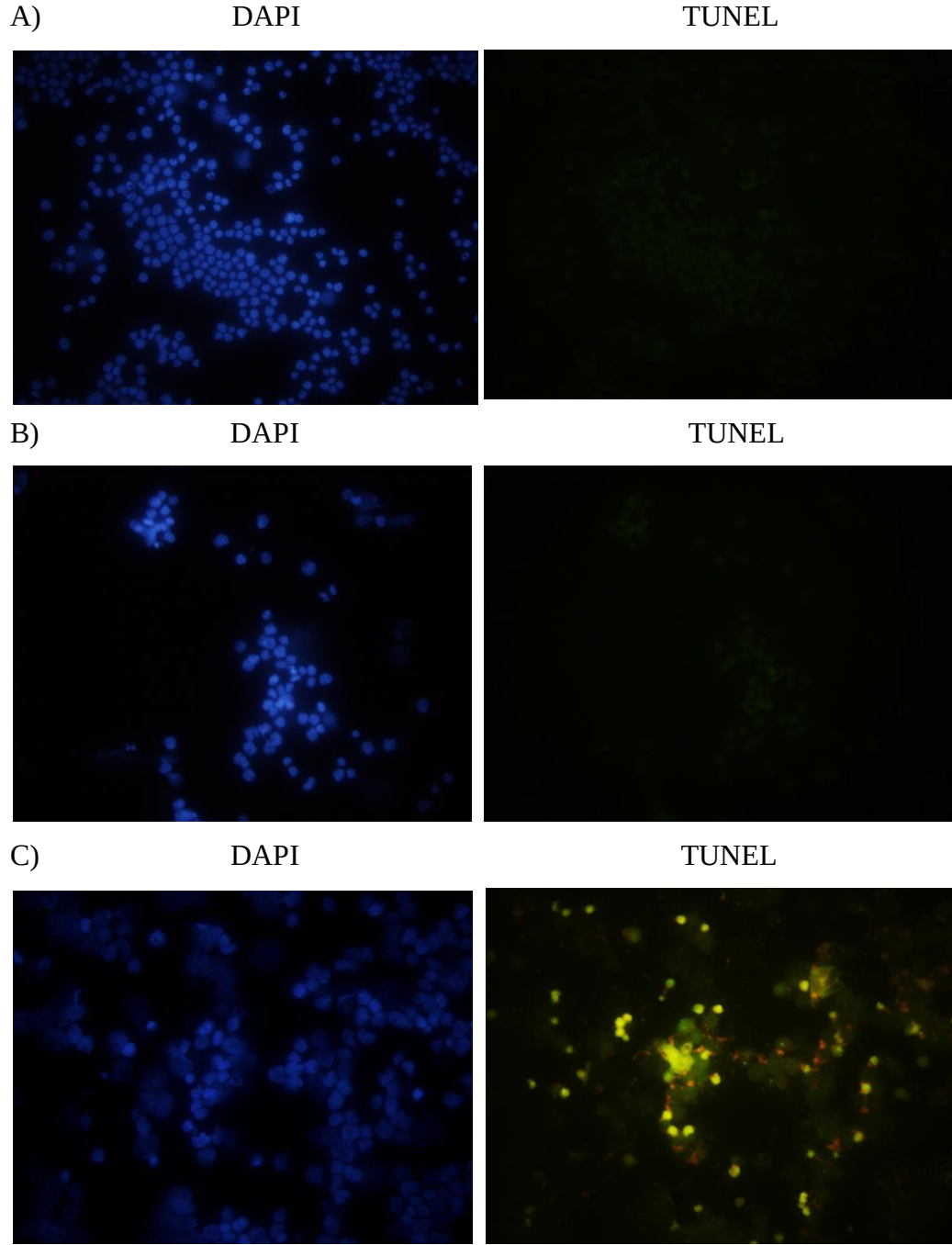
Resim 3: Daudi hücrelerinin 0,5 mg/ml konsantrasyonda *H. perforatum* ile 24 saat inkübasyon sonrası fluoresans mikroskop görüntüleri (Annexin V) A) Kontrol grubu (x20) B) DMSO grubu (x20) C) 0,5 mg/ml konsantrasyon grubu (x40)

Yapılan Annexin V testine göre Daudi hücrelerinde H. perforatum ekstresi ile 24 saat inkübasyon sonucunda fluoresans mikroskop incelemesinde kontrol ve DMSO grubunda apoptotik hücre gözlenmemiştir. Diğer taraftan H. perforatum ekstresinin 0,5 mg/ml konsantrasyonda uygulandığı hücrelerde ise apoptotik cisimciklerin varlığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak H. perforatum ekstresinin en yüksek konsantrasyon olan 0,5 mg/ml’ de, erken dönemde Namalwa ve Daudi hücrelerinde apoptozise yol açtığı görülmüştür.

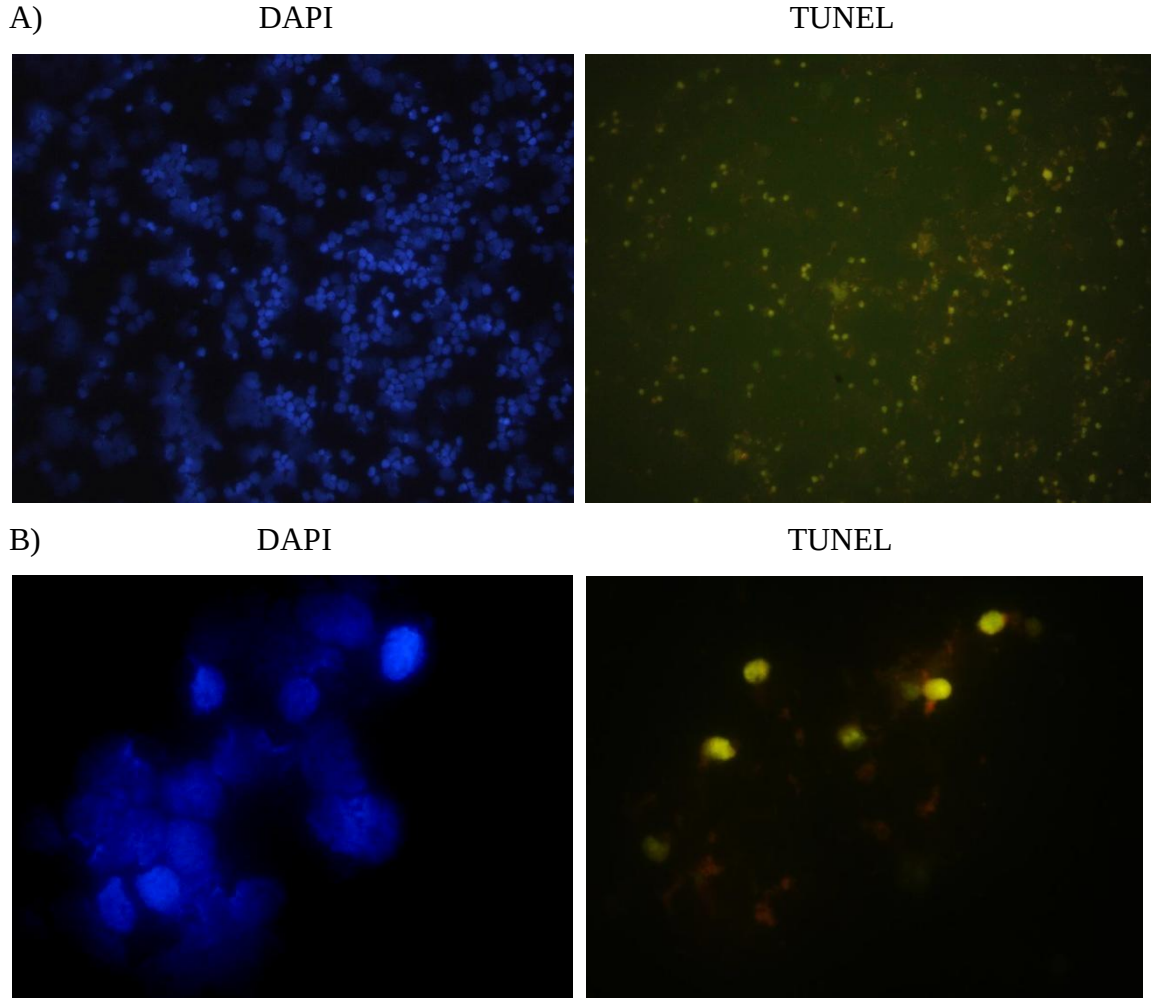
4.6. Namalwa ve Daudi Hücrelerinde Hypericum Perforatum’ un Tunel Testi ile Apoptozis Değerlendirilmesi

Namalwa ve Daudi hücrelerine H. perforatum ekstresinin etkisine yönelik geç dönemde meydana gelen apoptozisin araştırılması amacıyla Tunel testi yapılmıştır. Bu test ile apoptozise uğrayan hücrelerdeki nüklear kromatin fragmentasyonu saptanarak hücreler görüntülenmiştir. Ayrıca DAPI boyama ile hücrelerdeki nükleusların görüntülenmesi sağlanmıştır. 6 kuyucuklu plaklara 5×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde Namalwa ve Daudi hücreleri alınmıştır. Kontrol, DMSO grupları ve hücrelerde H. perforatum ekstresinin etkin olarak gözlemlendiği 0,5 mg/ml konsantrasyon grubu 48 saat süresince 37° C’ de, % 5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir.

H. perforatum ve içeriğinde bulunan aktif bileşiklerden biri olan hiperisin, 548-640 nm dalga boyları aralığında ışığı absorbe edebilme özelliğine sahiptir (77). Bu nedenle fluoresan mikroskopta H. perforatum uygulanan hücrelerin ışığı absorbe ederek kırmızıya boyandığı resimlerde görülmektedir. Resim 4 ve 5’ de Namalwa hücrelerinin 48 saat inkübasyon sonucunda H. perforatum’ a cevabı görülmektedir.



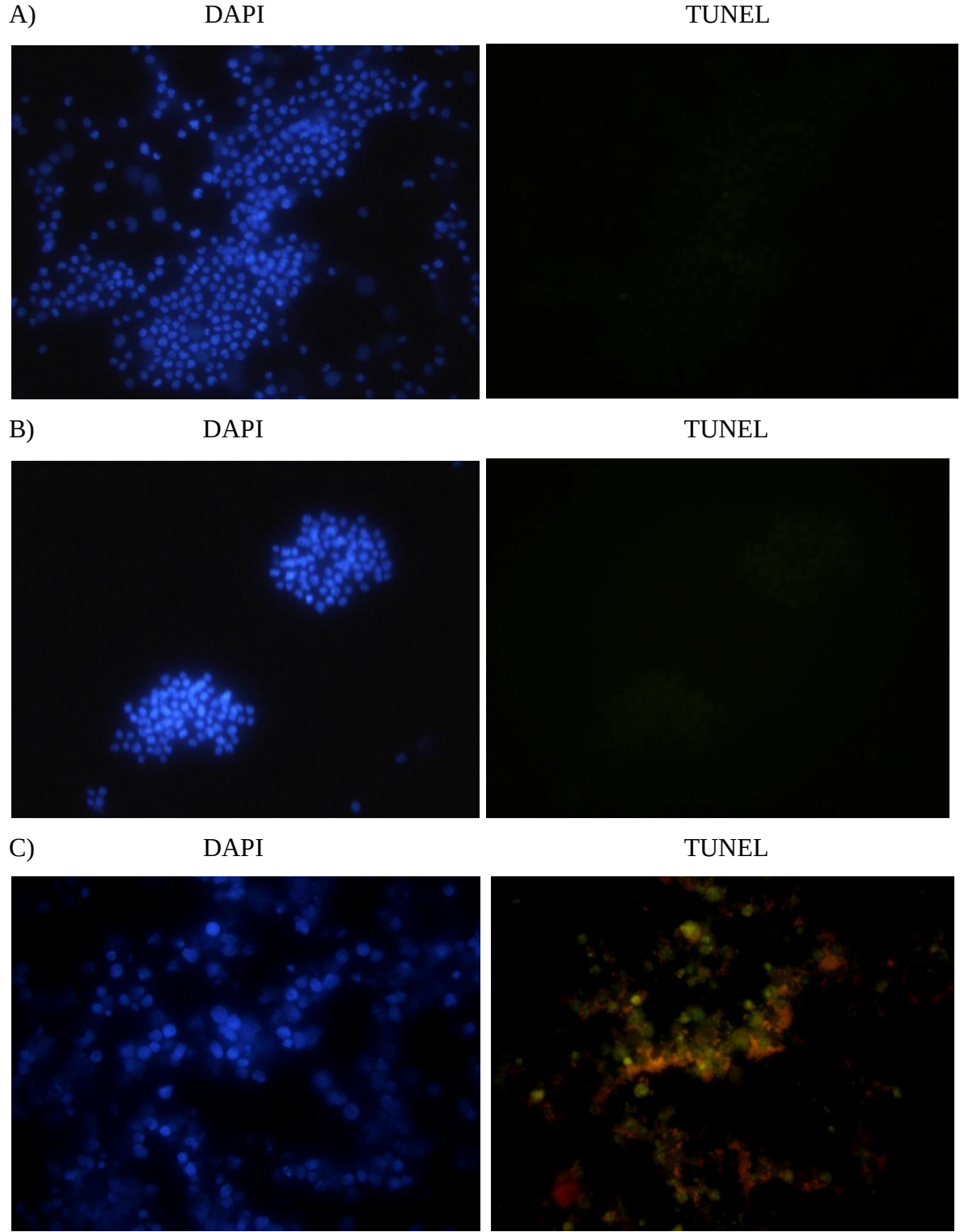
Resim 4: Namalwa hücrelerinde *H. perforatum* ile inkübasyon sonrası fluoresans mikroskobu görüntüleri (DAPI, TUNEL x40) A) Kontrol B) DMSO C) 0,5 mg/ml *H. perforatum* konsantrasyon grubu



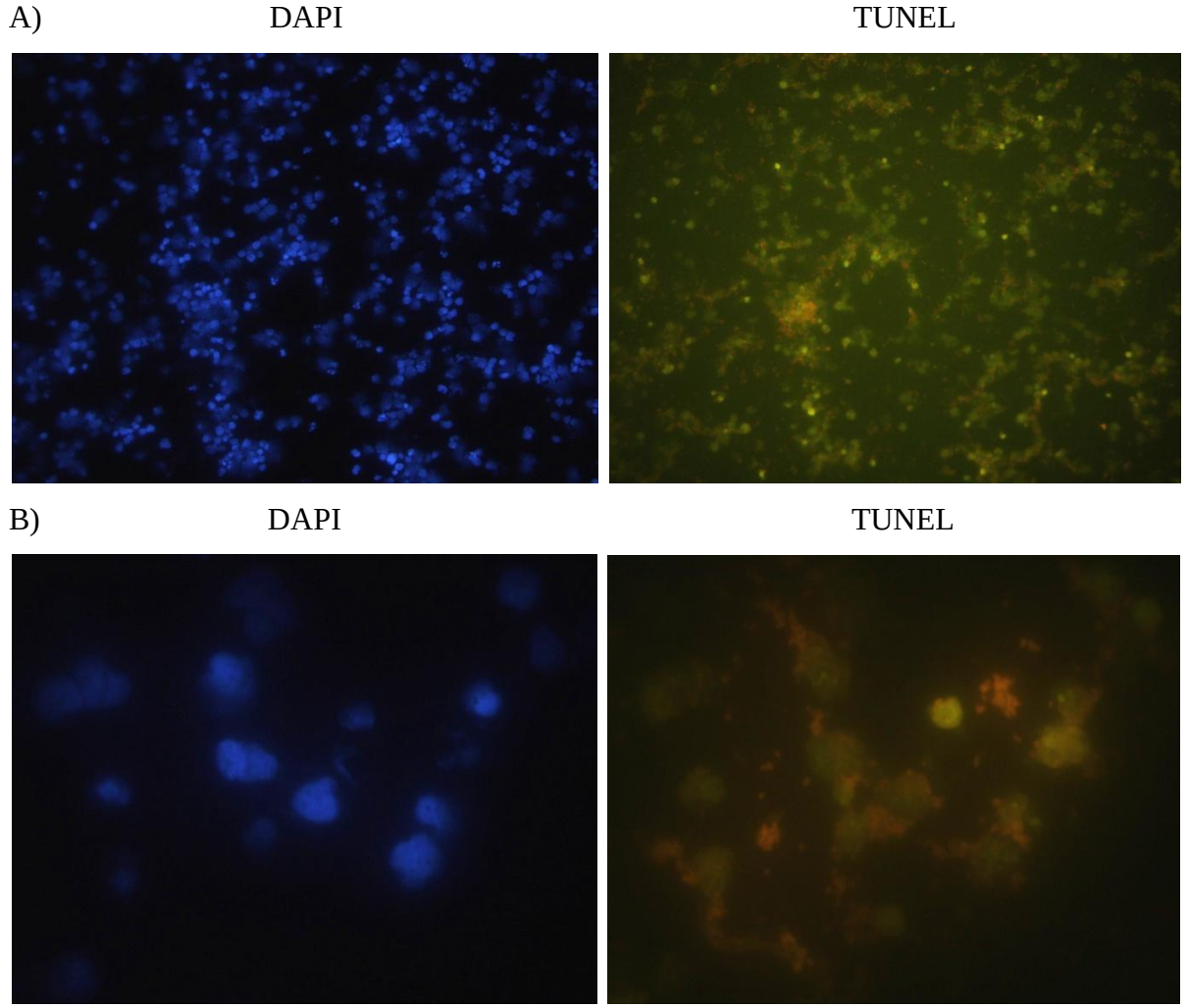
Resim 5: Namalwa hücrelerinin 0,5 mg/ml konsantrasyonda *H. perforatum* ile inkübasyon sonrası fluoresans mikroskop görüntüleri A) DAPI, TUNEL x20 B) DAPI, TUNEL x100

Namalwa hücrelerinde *H. perforatum* ekstresi ile 48 saat inkübasyon sonucunda kontrol ve DMSO grubunda apoptotik hücre gözlenmemiştir. Diğer taraftan *H. perforatum* ekstresinin 0,5 mg/ml konsantrasyonda uygulandığı hücrelerde apoptotik cisimciklerin varlığı bu hücrelerin yeşil-sarı boyanmasıyla tespit edilmiştir.

Resim 6 ve 7' de Daudi hücrelerinin 48 saat inkübasyon sonucunda *H. perforatum*' a cevabı görülmektedir.



Resim 6: Daudi hücrelerinde *H. perforatum* ile inkübasyon sonrası fluoresans mikroskop görüntüleri (DAPI, TUNEL x40) A) Kontrol B) DMSO C) 0,5 mg/ml *H. perforatum* konsantrasyon grubu



Resim 7: Daudi hücrelerinin 0,5 mg/ml konsantrasyonda *H. perforatum* ile inkübasyon sonrası fluoresans mikroskop görüntüleri A) DAPI, TUNEL x20 B) DAPI, TUNEL x100

Daudi hücrelerinde *H. perforatum* ekstresi ile 48 saat inkübasyon süresi sonrasında kontrol ve DMSO grubunda apoptotik hücre gözlenmemiştir. Ancak *H. perforatum* ekstresinin 0,5 mg/ml konsantrasyonunda hücrelerde apoptotik cisimciklerin varlığı yine bu hücrelerin yeşil-sarı boyanmasıyla tespit edilmiştir.

Çalışmamızdan elde edilen verilere göre *H. perforatum* ekstresinin Namalwa ve Daudi hücrelerinde neden olduğu sitotoksik etkisinin hücre ölümünden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Buna göre *H. perforatum* ekstresi uygulanmış hücrelerde gerçekleşen bu hücre ölümünün erken ve geç apoptotizis sonucu meydana geldiği anlaşılmıştır.

5. TARTIŞMA

Burkitt lenfoma, c-myc onkogeninin disregölasyonu ile sonuçlanan orta boy B hücre proliferasyonu gösteren Non- Hodgkin lenfoma grubunda oldukça agresif bir tümördür. Temel tedavi seçenekleri kemoterapi ve radyoterapidir. Tedaviye olabildiğince erken başlanmalıdır. Hastaların çoğunluğu tanı konulduğunda ileri evrede karşımıza çıkmaktadır (1,2).

Tedavi hastanın fizyolojik durumu, histolojik tip, klinik evre ve prognoza etkili faktörler göz önüne alınarak yapılır. Bu lenfomaların tedavisi ileri evre agresif lenfomalar gibi agresif multidrog rejimlerle yapılmalıdır (3).

Genel olarak kanser hastalarının sadece % 10' unda kemoterapi ile tam bir remisyon elde edilebilmektedir. Hastaların çoğunda ilaç tedavisi hastalığı sadece baskılamakta, ilaca bağlı komplikasyonlar ve beraberinde ölümle sonuçlanmaktadır. Ortalama olarak bu hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranı % 40 kadardır (78).

Fitoterapi, tedavide kullanılmakta olan kimyasal ajanlara destek vermekte ve diğer taraftan tedavi süresince gözlenen komplikasyonları azaltmaktadır. Gerek insan sağlığı gerek doğa ve çevre sağlığı fitoterapiye duyulan ihtiyacı güçlendirmektedir. Bugün dünya nüfusunun çoğunluğu için bitkiler en seçkin ilaç kaynaklarıdır. Büyük farmasötik firmalar yeni yapılar için bir kaynak olarak bitkilere yeniden ilgi göstermektedir (8).

Geleneksel tedavide doğal ürünlerin kullanılması insanlık tarihi kadar eski olmakla birlikte günümüzde dünya nüfusunun ve gelişmekte olan ülkelerde ise insan nüfusunun çoğunluğu tedavi gereksinimlerini büyük ölçüde tıbbi bitkilerden sağlamaktadır. Eski çağlardan beri hem geleneksel tedavide hem de modern tıp sistemlerinde pek çok hastalığın tedavisinde yaygın kullanılan türlerden biri Hypericum türleridir. H. perforatum yapısındaki bileşenlerin oldukça çeşitli olması dolayısıyla Hypericum cinsi içerisinde en fazla kullanılan tür olma özelliğini taşımaktadır. Halk arasında antispazmodik, antiülser, astrenjan, sakinleştirici, antiseptik ve yara iyileştirici amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (8, 11).

H. perforatum antidepresan etkilerine ek olarak nörolojik, antienflamatuar, antibakteriyel, antitümoral, antiangiogenik etkiler gibi çok geniş biyolojik aktivitelere sahip olduğu bilinmektedir (16). H. perforatum' un etkin maddesi olan hiperforinin çeşitli kanser hücrelerinde büyümeyi inhibe edici etkisi ve apoptozisi teşvik edici etkisi olduğu ortaya konmuştur. H. perforatum' un meme karsinoma (MT-450, MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve

MCF-7), skuamoz hücre karsinoma (A-431), malign melanom (HT-144), malign glioma (LN229), fibrosarkom (HT-1080), kronik myeloid lösemi (K562) ve T hücreli lenfoma (U937 ve Jurkat hücreleri) gibi çok sayıda memeli hücre dizilerinde etkin bir şekilde proliferasyon hızını azalttığı gösterilmiştir (9).

Hiperforinin proapoptotik yani apoptozisi teşvik edici etkisi olduğu B hücreli kronik lenfositik lösemi hastalarından alınan lösemi hücrelerinde de gösterilmiştir. Hatta hiperforinin sağlıklı donörlerden alınan normal B lenfosit hücrelerine oranla kanserli hücrelerde daha etkili olduğu yine aynı çalışmada ortaya konmuştur (4).

Ancak H. perforatum' un Burkitt Lenfoma üzerinde etkisi olup olmadığı henüz bilinmemekte ve bu etkisine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada H. perforatum' un Burkitt Lenfoma hücre dizilerinde antiproliferatif, sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla altı farklı dozda (D1: 0,01 mg/ml D2: 0,025 mg/ml D3: 0,05 mg/ml D4: 0,1 mg/ml D5: 0,25 mg/ml D6: 0,5 mg/ml) H. perforatum ekstresi verilerek 24, 48 ve 72 saatlik gruplarda etkisi araştırıldı.

Bu Namalwa ve Daudi hücrelerinde ilk olarak H. perforatum' un etkisini göstermek amacıyla tripan mavisi boyama yöntemi ile viabilite testi yapıldı. H. perforatum ekstresinin Namalwa hücrelerinde viabilite üzerine etkisi değerlendirildiğinde etkinin 48. saatte 0,5 mg/ml konsantrasyonda başladığı ve bu etkinin 72. saatte en belirgin olduğu bulunmuştur. Namalwa hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en yüksek doz olan 0,5 mg/ml konsantrasyonda zamana bağlı olarak viabilitede azalma gözlenmiştir. 0,5 mg/ml konsantrasyonda 24. saatte viabilite % 81, 48. saatte % 51, 72. saatte % 32 olarak saptanmıştır. 48 ve 72. saatlerde kontrol grubu ile 0,5 mg/ml konsantrasyon grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

H. perforatum ekstresinin Daudi hücrelerinde viabilite üzerine etkisi tripan mavisi boyama yöntemi ile ölçüldüğünde ilk olarak etkinin 48. saatte 0.25 mg/ml konsantrasyonda başladığı ve bu etkinin 72. saat sonunda 0.5 mg/ml konsantrasyonda en yüksek düzeye ulaştığı tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 0,25 mg/ml konsantrasyonunda 72. saatte viabilitenin % 21' e indiği gözlenmiştir. 0,5 mg/ml konsantrasyonda zamana bağlı olarak viabilitede azalma gözlenmiştir. 0,5 mg/ml konsantrasyonda 24. saatte viabilite değeri % 76, 48. saatte % 39 civarında iken 72. saatte % 5' in altında saptanmıştır. 48 ve 72. saatlerde kontrol grubu ile 0,5 mg/ml konsantrasyon grubu karşılaştırıldığında istatistiksel

olarak anlamlı bulunmuştur. Bu sonuçlar H. perforatum' un Burkitt Lenfoma hücreleri üzerinde viabilite açısından değerlendirildiğinde etkili olduğunu göstermektedir.

H. perforatum' un antitümöral özellikleri olduğu solid organ tümörlerinin hücre dizileri ve hayvan modellerinde gösterilmiş ve bunun mitokondrial fonksiyonlarda bozulma neticesinde ortaya çıktığı gösterilmiştir. Hiperisinin ışık ile aktivasyonu sonucunda protein kinaz C ve diğer protein kinazları stimüle eden büyüme faktörlerini inhibe etmekte, membran lipidlerinin peroksidasyonunu indüklenmekte, süperoksit dismütaz aktivitesinin arttırmakta ve hücrel glutatyon seviyesini azaltmakta ve böylece mitokondriyal fonksiyonlarda azalma saptanmaktadır (16).

Metabolik olarak aktif halde bulunan hücrelerin miktarı ile korele olarak enzim aktivitesi artmaktadır. Canlı hücre sayısındaki artış örneklerdeki mitokondrial dehidrogenaz aktivitesinde artmaya yol açmaktadır. Hücrelere belirlenen dozlarda uygulanan H. perforatum ekstresinin metabolik aktiviteye etkisini değerlendirmek için WST-1 testi yapılmıştır. Çalışmamızda WST-1 testi ile elde edilen veriler H. perforatum ekstresinin Namalwa hücrelerinin metabolik aktivitesinde azalmaya neden olduğunu göstermektedir. Bu etkinin zamana bağlı olarak düşük (0,01-0,025-0,05 mg/ml) ve yüksek (0,1-0,25-0,5 mg/ml) konsantrasyon grupları olarak farklı iki grupta, ancak kendi aralarında benzer patern göstererek ortaya çıktığı görülmektedir. Tüm deneme sürelerinde ve konsantrasyonlarda metabolik aktivite değerlerinde kontrol grubuna göre azalma saptanmıştır. Bu gruplar kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. 0,5 mg/ml konsantrasyonunda hücrelerde metabolik aktivitenin 72. saatte % 95 azaldığı gözlenmiştir.

Daudi hücrelerinde ise H.perforatum ekstresinin doz ve zaman bağımlı olarak metabolik aktivitede azalmaya neden olduğu saptanmıştır. 72. saatte 0,1 mg/ml ve konsantrasyonunda metabolik aktivitenin % 76 oranında, 0,25 mg/ml konsantrasyonunda ise % 85 azaldığı tespit edilmiştir. En yüksek konsantrasyon olan 0,5 mg/ml' de metabolik aktivitenin 72. saat sonunda % 1' e kadar indiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar düşük dozlarda hücrelerde viabilitenin gözlenmesine rağmen H. perforatum ekstresinin hücrelerin metabolik aktivitesinde azalmaya neden olduğunu göstermektedir. Hücrelerin her ikisinde de IC₅₀ değeri 0,028 mg/ml olarak saptanmıştır. Diğer çalışmalarda farklı kanser hücrelerinde saptanan IC₅₀ değeri ile çalışmamızda saptanan IC₅₀ değeri karşılaştırıldığında, bu çalışmalarda saf hiperisin

ya da hiperforin kullanılmasına bağı olarak daha düşük konsantrasyonlarda etkili olduğu tespit edilmiştir.

Kapsokalyvas ve ark. *H. perforatum*' un metanollü ekstresi ve polar metanol fraksiyonunun ışığa duyarlılık özelliğine dayanarak lösemi hücre dizisi HL-60 ve kord kan hücrelerinin fotodinamik tedavisindeki etkisini denemişler, bu amaçla *H. perforatum* toprak üstü kısımlarının metanollü ekstresi hazırlanmış, polar metanol fraksiyonu ise metanollü ekstrenin petrol eteriyle sıvı-sıvı ekstraksiyonu yöntemiyle elde edilmiştir. Hücreler Nd-Yvo lazer radyasyonuna tabi tutulmadan önce değişik konsantrasyonlarda ekstrelerle inkübe edilmiştir. *Hypericum* metanollü ekstresi ve polar metanol fraksiyonu varlığında lazer radyasyon uygulaması HL-60 lösemi hücrelerinin ölümüne neden olmuş ve bu etkinin doza bağımlı olduğu saptanmıştır. Fotodinamik tedavinin *Hypericum* polar metanol fraksiyonu ile uygulandığında kord kan hücrelerinde de etkili olduğu tespit edilmiştir (79).

Ali ve ark., yaptıkları çalışmada hipokrellin A, hipokrellin B ve *H. perforatum*' un naftodiantron bileşiği olan hiperisin gibi ışığa duyarlı özellikteki bileşiklerin etkisini, insan nazofaringeal karsinoma, mukozal kolon ve mesane hücre dizileri üzerinde yapılan fotodinamik tedavide denemişler ve üç bileşiğin de kanser hücrelerinin gelişimini inhibe etme etkisine sahip olduğunu tespit etmişlerdir (80).

Hostanska ve ark., *H. perforatum*' un ana bileşenlerinden biri olan hiperforinin ve polifenolik bileşiği olan prosiyanidin B2' nin lösemi ve beyin glioblastoma hücreleri ile normal insan astrositlerinin gelişimini engelleyici etkisini araştırmışlar. Prosiyanidin B2 lösemi hücrelerine karşı 12 μM konsantrasyonda 48 saatlik inkübasyonda, glioblastoma hücreleri ile insan astrositlerine karşı ise sırayla 103,1 ve 96,7 μM konsantrasyonlarda etkili olduğu bulunmuştur. Hiperforinin hücre gelişim engelleyici derişiminin ise 14,9 ila 19,9 μM arasında değiştiği ve hiperisinle sinerjik etki göstererek etkiyi arttırdığı tespit edilmiştir. Hücrelerde doza bağımlı olarak membran fosfolipid kaybı gözlenmiş, sonuçlar, hiperforinin hiperisinle beraber tümör gelişimini engelleyici özelliğinin olduğunu göstermektedir (26).

Özen ve ark., *H. perforatum* ekstraktı ile hiperisinin HL-60 lösemik hücre dizilerinde sitotoksik etkilerini MTT testi ile karşılaştırmışlar. Bu çalışmaya göre *H. perforatum* ekstraktının IC_{50} değerinin 1/10 000 dilüsyon, hiperisinin ise doz ve zamana bağımlı olarak etki gösterdiği ve IC_{50} değerinin 0,5 μM olduğu saptanmıştır (81).

Sitotoksosite; hücre ölümü sonucunda sentezlenen kimyasal maddeler, doğal olarak açığa çıkan toksinler ve immün sistem aracılığıyla ortamda görülen mediatör hücreler

olan sitotoksik T lenfositler ve naturel öldürücü hücrelerin özelliği olarak tanımlanmaktadır. LDH stabil bir stoplazmik protein olmakla birlikte bütün hücrelerde sabit konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Hücre membranı hasarlandığı zaman hücrelerden hücre kültürü supernatantının içerisine LDH salınımı gözlenmektedir. Bundan dolayı daha yüksek oranda LDH salınımı, daha büyük oranlarda hücre ölümleri yani hücre kültürü canlılığının kaybı aynı periyod içinde gerçekleşir (70).

Hücrelere belirlenen dozlarda uygulanan *H. perforatum* ekstresinin sitotoksosite açısından değerlendirmek için LDH salınım testi yapılmıştır. Çalışmamızda Namalwa hücrelerinde yapılan LDH testinden elde edilen veriler *H. perforatum* ekstresinin LDH aktivitesinde artışına neden olduğu görülmüştür. 24 ve 48. saatlerde 0,01-0,025-0,05-0,1-0,25-0,5 mg/ml konsantrasyonlarında hücrelerden salınan LDH düzeyi kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunmazken kontrol grubuyla karşılaştırıldığında artış gösterdiği ve istatistiksel olarak farklılığın anlamlı olduğu tespit edilmiştir. 72. saatte 0,25 ve 0,5 mg/ml konsantrasyonlarında LDH düzeyi kontrol grubuna göre azalmaktadır. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Daudi hücrelerinde yapılan LDH testinin sonuçlarına göre *H. perforatum* ekstresinin LDH aktivitesinde doz ve zamana bağımlı olarak artışa neden olduğu görülmüştür. LDH aktivitesinin 48. saatte 0,01 mg/ml konsantrasyonundan itibaren artış gösterdiği ve en yüksek seviyeye 0,25 mg/ml konsantrasyonunda ulaştığı saptanmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmıştır. En yüksek konsantrasyon olan 0,5 mg/ml’ de ise canlı hücre sayısının giderek azalmasından dolayı burada da LDH aktivitesinde 72. saatte düşme saptanmıştır. 72. saatte LDH aktivitesinde görülen azalmanın aslında *H. perforatum* ekstresinin artan dozlarında canlı hücre sayısının giderek azalması ve özellikle 72. saatte neredeyse hiç bulunmamasına bağlı olarak LDH aktivitesinde bir azalma var gibi görünmektedir. Ancak bu durumun 72. saat sonunda artık hiç canlı hücre kalmaması ve hücreler artık tamamen parçalandığı için yani salınan LDH aktivitesi ölçülemediğinden dolayı olduğu düşünülmektedir.

Peebles ve ark., *H. perforatum* naftodiantron bileşiği olan hiperisinin HL-60 insan lösemi hücre dizilerindeki DNA topoizomeraz II α üzerindeki inhibisyon etkisini araştırmışlardır. Sonuçlar, hiperisinin DNA topoizomeraz II α enziminin katalitik inhibisyonu aracılığıyla lösemi hücrelerine karşı toksik etkisinin olduğunu göstermiştir (23).

Zou ve ark., yaptıkları çalışmada PC12 rat feokromasitoma hücrelerinde hidrojen peroksitle indüklenmiş apoptozis oluşturarak flavanoidden zengin *H. perforatum* ekstresinin

koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada hidrojen peroksit maruz bırakılan hücrelerde viabilitede belirgin bir azalma ve LDH salınımında belirgin bir artış tespit edilmiştir. Hidrojen peroksit maruziyet öncesinde *H. perforatum* ekstresi uygulanan hücrelerde ise viabilitede artışla birlikte apoptotik hücrelerde ve LDH salınımında azalma saptanmıştır. Bu sonuçlar gelecekte *H. perforatum*' un oksidatif stres aracılı nörodejeneratif hastalıklarda kullanılabileceğini göstermektedir (82).

Hücrelere belirlenen dozlarda uygulanan *H. perforatum* ekstresinin antiproliferatif etkisini saptamak için BrdU hücre proliferasyon testi yapılmıştır. Namalwa hücrelerinde *H. perforatum* ekstresinin proliferasyon üzerine doz ve zamana bağımlı olarak etki gösterdiği görülmüştür. En belirgin etkinin en yüksek konsantrasyonlar olan 0,25 mg/ml ve 0,5 mg/ml' de görüldüğü, hücre proliferasyonunun tamamen azaldığı saptanmış ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmıştır. Daudi hücrelerinde yapılan BrdU testi sonuçlarına göre *H. perforatum* ekstresinin proliferasyon üzerine doz ve zaman bağımlı olarak etki gösterdiği görülmüştür. En yüksek konsantrasyon olan 0,5 mg/ml' de hücre proliferasyonunun tamamen azaldığı ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmıştır.

Schempp ve ark.'nın yaptığı bir araştırmada *H. perforatum*' un floroglusinol türevi bir bileşiği olan hiperforinin, memeli kanser hücre dizilerine karşı antiproliferatif etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Söz konusu hücre dizileri meme adenokarsinoma, over karsinoma, malign melanoma, glioblastoma, squamöz hücreli karsinom ve lenfoma hücrelerini içermektedir. Bu çalışmada hücre proliferasyonu BrdU testi ile değerlendirilmiş ve IC₅₀ değerlerinin 3-15 µM aralığında olduğu tespit edilmiştir. Meme adenokarsinoma hücrelerinde hiperforinin daha düşük dozlarda antiproliferatif etki gösterdiği ve hiperforine diğer kanser hücrelerine göre daha hassas olduğu bulunmuştur (43).

Stavropoulos ve ark., *H. perforatum* polar metanollü ekstresinin T24 ile RT4 insan mesane kanser hücreleri üzerindeki etkisini fotodinamik tedavi yöntemi kullanarak değerlendirmişlerdir. Hücre kültür inkübasyonunun hemen ardından polar metanollü fraksiyon 630 nm lazer ışığına maruz bırakılmış, her iki hücre dizisinde 60 µg/ml derişim ile *H. perforatum* % 80- % 86 oranında hücre yıkımına neden olmuş, 20 µg/ml derişim etkili bulunmamıştır. Sonuçlar *H. perforatum*' un kanserin fotodinamik tedavisinde etkili olduğunu ve mesane kanser hücrelerinde antiproliferatif etkisi olduğunu göstermektedir (83).

Martarelli ve ark., serotonin geri alım inhibitörlerinin antiproliferatif etkisini göz önünde bulundurarak *H. perforatum*' un metanolik ekstresinin prostat kanserine karşı in vivo ve in vitro etkisini araştırmışlardır. Çalışmada, bu tez çalışmasında kullanılan WST-1 testinin ilk versiyonu olan MTT testi ile hücrelerde *H. perforatum*'un etkisi ölçülmüştür. *H. perforatum* ekstresinin 1,41 mg/ml derişimde uygulanmasının üçüncü gün sonunda PC-3 insan prostat adenokarsinoma hücre dizilerinde % 80 oranında hücre gelişimini inhibe ettiği saptanmıştır. İn vivo deney modelinde altı haftalık farelere, karından tümör hücre süspansiyonu enjekte edilerek kanser oluşturulmuş, 10 gün sonra tedavi amacıyla *H. perforatum* ekstresi 15 mg/kg dozda intraperitoneal yolla uygulanmıştır. Sonuçlar, *H. perforatum* ekstresinin tümör gelişimini % 70 oranında azalttığını göstermektedir (17). Çalışmamızda WST-1 testiyle elde edilen sonuçlara göre Namalwa hücrelerinde 72. saatte, 0,5 mg/ml konsantrasyonunda metabolik aktivitenin % 95' e kadar düştüğü tespit edilirken, Daudi hücrelerinde ise 72. saatte 0,5 mg/ml konsantrasyonunda metabolik aktivitenin % 99 azaldığı tespit edilmiştir. Çalışmamıza göre prostat adenokarsinoma hücreleriyle karşılaştırıldığında Namalwa ve Daudi hücrelerinde daha düşük dozlarda hücre proliferasyonu üzerine etkili olduğu bulunmuştur.

Sıklıkla programlı hücre ölümüne eşdeğer olarak kabul edilen apoptozis, çok hücreli organizmaların genetik şifrelerinde bulunan “hücre intiharı” programlarının gelişimsel ve/veya çevresel uyarımlarla etkinleşmesi sonucu ortaya çıkan, gelişim ve farklılaşma sırasında organ yapısı ve işlevlerinin aktif değişimini sağlayan fizyolojik hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Apoptozis sürecinde hücrelerde küçülme ve cepciklerin oluşumu, yuvarlaklaşma, nükleusta kromatin kondensasyonu ve marjinasyonu ile organellerde belli bir küçülme ve morfolojik olarak keşfedilemeyen değişiklikler ve sonuçta inflamasyon yanıtların oluşumuna izin vermeden hücre fragmentlerinin fagositozu görülmektedir. Apoptozisin en erken belirtisi membran fosfolipidi olan fosfatidilserinin plazma membranının iç tarafından dış bölümüne translokasyonudur. Fosfatidilserin ekstrasellüler alana çıktığı an, Annexin-V fosfatidilserine yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Bu nedenle Annexin-V, apoptozun erken belirtecidir (72,74).

H. perforatum' un ana bileşenlerinden biri olan hiperisinin ışığa duyarlılık özelliğinden hareketle tümörlerin fotodinamik tedavideki etkisine yönelik çok sayıda çalışma mevcuttur. Tümör hücre dizilerinde hiperisinin radyasyon uygulanmasıyla birlikte kanser hücrelerine karşı fototoksik etki göstererek apoptozis ve nekrozu tetiklediğini tespit

etmişlerdir. Ayrıca, hiperisinle kombine edilen fotodinamik tedavinin hücre ölüm programını hızlandırdığı belirlenmiştir (16). Hiperisinin oluşturduğu apoptozis ilk olarak insan malign glioma hücrelerinde tanımlanmıştır. Bu hücreler hiperisin ve ışığa maruz bırakıldığında DNA fragmentasyonu ve hızlı bir apoptotik hücre ölümü olduğu gösterilmiştir. Bu tür hiperisin aracılı apoptoziste protein kinaz C (PKC) inhibisyonunun tetikleyici olduğu ileri sürülmüştür (84).

Daha sonraki çalışmalarla hypericum aracılı apoptozisin sinyalizasyonunda PKC inhibisyonun yeterli olmadığı ortaya çıkmıştır. Apoptozisin gerçekleşmesindeki ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere iki sinyal yolunun da etkili olabileceği, hatta ekstrinsik ve intrinsik yol arasında bağlantı olan bir yolun da olduğu belirtilmiştir (85). Çeşitli çevresel uyarılar veya DNA hasarından kaynaklanan uyarılar mitokondri seviyesinde gelişim programlarını uyararak intrinsik yolu tetikler ve mitokondri iç zarında sitokrom-c ve diğer apoptotik proteinler sitozole salınır. Sitokrom-c, apaf-1, prokaspas-9, dATP/ATP apoptozom kompleksinin oluşumu ile kaspas-9 aktive olur ve aktive kaspas-9 da efektör kaspasların (kaspas-3, 6, 7) aktivasyonunu neden olur. Bu kaspaslar da vital proteinleri parçalayarak klasik apoptotik görünümünün oluşması sağlar. Gerek intrensik gerekse ekstrensik yolda kaspas proteazlarının aktivasyonu hücreyi apoptozise sokmaktadır (86).

H. perforatum ekstresinin Namalwa ve Daudi hücrelerinde antiproliferatif etkisinin saptanmasından sonra bu etkinin apoptozis aracılığıyla gerçekleşip, gerçekleşmediğini göstermek amacıyla apoptozise yönelik testler yapıldı. Hücrelere belirlenen dozlarda uygulanan H. perforatum ekstresinin erken ve geç apoptozis göstermek için sırasıyla Annexin-V FLUOS ve Tunel testleri ile çalışmalar yapıldı.

Çalışmamızda Annexin V testine göre Daudi hücrelerinde H. perforatum ekstresi ile 24 saat inkübasyon sonucunda fluoresans mikroskop incelemesinde kontrol ve DMSO grubunda apoptotik hücre gözlenmemiştir. H. perforatum ekstresinin 0,5 mg/ml konsantrasyonda uygulandığı hücrelerde ise apoptotik cisimciklerin varlığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak H. perforatum ekstresinin en yüksek konsantrasyon olan 0,5 mg/ml’ de, erken dönemde Namalwa ve Daudi hücrelerinde apoptozise yol açtığı görülmüştür.

Geç apoptozisin saptanması amacıyla yapılan Tunel testinden elde edilen sonuçlara göre Namalwa ve Daudi hücrelerinde H. perforatum ekstresi ile 48 saat inkübasyon sonucunda kontrol ve DMSO grubunda apoptotik hücre gözlenmemiştir. H. perforatum ekstresinin 0,5 mg/ml konsantrasyonda uygulandığı hücrelerde apoptotik cisimciklerin varlığı

tespit edilmiştir. Bu test ile *H. perforatum* ekstresinin Namalwa ve Daudi hücrelerinde geç dönemde apoptozise neden olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak Hostanska ve ark., *H. perforatum*' un K-562, U-937 lösemi ve LN-229 glioblastoma hücrelerinde apoptozisi indüklemesine yönelik yaptıkları çalışmada, Annexin V testi ile 24. saatte hücrelerde apoptozis oluşturduğunu rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada apoptozis mekanizmasında kaspas 3,8 ve 9' un da yer aldığı gösterilmiştir (26).

Schempp ve ark. *H. perforatum*' un ışığa karşı duyarlı pigmenti hiperisinin neoplastik hücre dizilerinde sitotoksik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada Jurkat hücre dizisinde, hiperisinin ışık nedenli apoptozis mekanizmasını bir antitümör bileşik olan paklitakselle kıyaslamışlardır. Işıkla aktive edilen hiperisinin, paklitakselle benzer etki göstererek kaspas-8 ve kaspas-3 aktivitesini arttırdığı ve bu durumun da Jurkat hücrelerini tamamen bloke ettiği saptanmıştır (21).

H. perforatum' un apoptozisi düzenleyen bir etkisinin olup olmadığını tespit etmek amacıyla Di Carlo ve ark., hücrelerin fizyolojik bir aktivitesi olan programlanmış hücre ölümünü ayarlamakla görevli çeşitli uyarılar, hormonlar ve sitokinlerin bulunduğunu ve bu etkilerin yangı bağımlı olmadığını belirtmişlerdir. Çalışmalarında bu amaçla bitkinin 30 ve 100 mg/kg dozları bir grup fareye oral yolla 14 gün boyunca uygulanmış ve splenik lenfositlerde apoptozisin oluşumunda Fas-Ag ve bcl-2 sinyal transdüksiyon yolağının rol alıp almadığı araştırılmıştır. Sonuçlar, *H. perforatum* uygulanan farelerin plasebo ile tedavi gören farelere nazaran Fas-Ag ekspresyonunda azalma, bcl-2 ekspresyonunda ise artış olduğu ve apoptozise karşı daha dirençli olduğunu göstermiştir (87).

Fox ve ark., fotoaktif hiperisinin malign T hücreli lenfoma hücre dizilerinde antiproliferatif etkisine yönelik olarak yaptıkları çalışmalarında *H. perforatum*' un apoptozisi yüksek oranda indüklediğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada apoptozisi saptamak amacıyla 10 µM derişimde hiperisin ile 24 saat inkübasyon sonrasında yapılan Tunel testine göre malign T hücreli lenfoma hücre dizilerinde apoptozis saptanmıştır (88). Çalışmamızda ise Fox ve ark. nın yaptıkları çalışmanın sonucuyla uyumlu olarak hem Namalwa hem de Daudi hücrelerinde, 48. saatte *H. perforatum* ekstresinin 0,5 mg/ml konsantrasyonunda apoptozis saptanmış ve geç dönemde *H. perforatum*' un apoptozis aracılığıyla etkili olduğu gösterilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

H. perforatum ekstresinin Burkitt Lenfoma hücre dizilerinde (Namalwa ve Daudi) antiproliferatif, sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmış ve aşağıda belirtilen sonuçlar elde edilmiştir.

H. perforatum ekstresinin Namalwa hücrelerinde viabilite üzerine etkisi tripan mavisi boyama yöntemi ile ölçüldüğünde etkinin 48. saatte 0,5 mg/ml konsantrasyonda başladığı ve bu etkinin 72. saatte en belirgin olduğu bulunmuştur. Daudi hücrelerinde ise bu etkinin ilk olarak 48. saatte 0.25 mg/ml konsantrasyonda başladığı ve bu etkinin 72. saatte daha da arttığı saptanmıştır. En yüksek etkinin ise 72. saat sonunda 0.5 mg/ml konsantrasyonda görüldüğü tespit edilmiştir.

WST-1 testi ile elde edilen veriler H. perforatum ekstresinin Namalwa hücrelerinin metabolik aktivitesinde azalmaya neden olduğunu göstermektedir. Bu etkinin zamana bağlı olarak düşük (0,01-0,025-0,05 mg/ml) ve yüksek (0,1-0,25-0,5 mg/ml) konsantrasyon grupları olarak farklı iki grupta, ancak kendi aralarında benzer patern göstererek ortaya çıktığı görülmektedir. Daudi hücrelerinde H.perforatum ekstresinin doz ve zaman bağımlı olarak metabolik aktivitede azalmaya neden olduğu saptanmıştır. En yüksek konsantrasyon olan 0,5 mg/ml’ de metabolik aktivitenin 72. saat sonunda tamamen azaldığı tespit edilmiştir. Origin Graph 5.0 programı kullanılarak hesaplanan IC₅₀ değerleri her iki hücre için 0,028 mg/ml olarak bulunmuştur.

Namalwa hücrelerinde yapılan LDH testinden elde edilen veriler H. perforatum ekstresinin LDH aktivitesinde artışına neden olduğu görülmüştür. Daudi hücrelerinde H. perforatum ekstresinin LDH aktivitesinde doz ve zaman bağımlı olarak artışa neden olduğu görülmüştür. Her iki hücrede 72. saatte en yüksek konsantrasyon olan 0,5 mg/ml’ de canlı hücre sayısının giderek azalmasına bağlı olarak LDH aktivitesinde düşme saptanmıştır.

Namalwa ve Daudi hücrelerinde BrdU testine göre H. perforatum ekstresinin doz ve zamana bağımlı olarak proliferasyon üzerine etki gösterdiği görülmüştür. Namalwa hücrelerinde çalışmamızda kullandığımız en yüksek konsantrasyonlar olan 0,25 mg/ml ve 0,5 mg/ml’ de hücre proliferasyonunun tamamen azaldığı saptanmıştır. Daudi hücrelerinde en yüksek konsantrasyon olan 0,5 mg/ml’ de hücre proliferasyonunun tamamen azaldığı saptanmıştır.

Namalwa ve Daudi hücrelerinde H. perforatum ekstresi ile 24 saat inkübasyon sonucunda erken apoptozisi saptamak için Annexin V boyama yöntemi ile yapılan fluoresans

mikroskop incelemesinde kontrol ve DMSO grubunda apoptotik hücre gözlenmemiştir. H. perforatum ekstresinin 0,5 mg/ml konsantrasyonda uygulandığı hücrelerde ise apoptotik cisimciklerin varlığı saptanmıştır.

Geç dönem apoptozisi tespit edilmesi amacıyla yapılan Tunel testinin sonuçlarına göre Namalwa ve Daudi hücrelerinde H. perforatum ekstresi ile 48 saat inkübasyon sonucunda kontrol ve DMSO grubunda apoptotik hücre gözlenmemiş, diğer taraftan H. perforatum ekstresinin 0,5 mg/ml konsantrasyonda uygulandığı hücrelerde apoptotik cisimciklerin varlığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızdan elde edilen verilere göre H. perforatum ekstresinin Namalwa ve Daudi hücrelerinde neden olduğu sitotoksik ve antiproliferatif etkinin hücre ölümünden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Buna göre H. perforatum ekstresi uygulanmış hücrelerde gerçekleşen bu hücre ölümünün en yüksek konsantrasyon olan 0,5 mg/ml’ de erken ve geç apoptotizis sonucu meydana geldiği anlaşılmıştır.

H. perforatum ekstresinin neden olduğu sitotoksitenin ve antiproliferatif etkinin doza ve zamana bağlı olarak artması, ayrıca bu etkisini apoptozise yol açarak göstermesi daha önce bu yönde yapılmış çalışmalarla uyumluluk göstermektedir. Özellikle Burkitt Lenfoma hücrelerinin H. perforatum ekstresine duyarlılık gösterdiğinin literatürde ilk kez saptanması çalışmamızın en önemli sonucunu oluşturmaktadır. Planlanacak daha ileri çalışmalarda elde edilecek sonuçlar, H. perforatum’ un klinik kullanımına yönelik yeni değerlendirmelerin yapılmasında önemli bir kaynak oluşturacaktır.

7. ÖZET

Hypericum perforatum (St. John' s wort)' un Burkitt Lenfoma Hücre Dizilerinde (Daudi ve Namalwa) Sitotoksik, Antiproliferatif ve Apoptotik Etkileri

Hypericum perforatum L. (St. John's wort) peptik ülser, cilt yanıkları, enfeksiyonlar, respiratuar ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde geleneksel tıpta yüzyıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır. *H. perforatum* naftodiantronlar; hiperisin ve psödohiperisin, flavonoidler ve floroglusinoller; hiperforin ve adhiperforin olmak üzere çok sayıda biyolojik aktiviteleri saptanmış bileşik içermektedir. Yapılan son çalışmalarda, *H. perforatum*' un farklı insan kanser hücre dizilerinde antitümöral etkileri kanıtlanmıştır. Bu çalışmada, *H. perforatum* ekstraktının Burkitt Lenfoma hücreleri (Namalwa ve Daudi) üzerine antiproliferatif, sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılması planlanmıştır.

Bu amaçla, *H. perforatum* ekstraktının altı farklı dozu (0,01-0,025-0,05-0,1-0,25-0,5 mg/ml) 24, 48 ve 72 saat süresince hücrelere uygulandı. Tripan mavisi boyama yöntemi ile viabilite, canlı hücreler tarafından tetrazolium tuzunun parçalanmasına dayanan WST-1 testi ile metabolik aktivite değerlendirildi. LDH (laktat dehidrogenaz) salınım testi ile sitotoksikite ve BrdU testi ile hücre proliferasyonu değerlendirildi. Erken apoptozis Annexin V testi ve geç apoptozis Tunel (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick-end labeling) testi ile flouresan mikroskopta incelendi.

Tripan mavisi boyama yöntemine göre elde edilen viabilite değerlerinin *H. perforatum* ekstraktının 0,5 mg/ml konsantrasyonunda, 72 saat inkübasyon sonrası Namalwa hücrelerinde % 32 ve Daudi hücrelerinde % 5' e indiği, bu gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Sonra *H. perforatum* ekstresinin hücrelerdeki metabolik aktivite üzerine etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre metabolik aktivitenin 0,5 mg/ml konsantrasyonda, 72 saat inkübasyon sonrası Namalwa hücrelerinde % 5 ve Daudi hücrelerinde % 1' e düştüğü saptanmıştır. Metabolik aktiviteye paralel olarak her iki hücrede LDH aktivitesi de ölçülmüştür. En yüksek LDH aktivitesi Namalwa hücrelerinde 72. saatte *H. perforatum* ekstraktının 0,01 mg/ml konsantrasyonunda ve Daudi hücrelerinde ise 72. saatte *H. perforatum* ekstraktının 0,25 mg/ml konsantrasyonunda saptanmıştır. Hücre proliferasyonu metabolik aktivite sonuçlarına benzer şekilde doz ve zamana bağımlı olarak azalmıştır. Erken apoptozis Annexin V testi ile 24 saat inkübasyon süresinin sonunda ve geç apoptozis Tunel testiyle 48. saatte *H. perforatum*

ekstraktının 0,5 mg/ml konsantrasyonunda floresan mikroskopta apoptotik hücreler gözlenerek saptanmıştır.

Sonuç olarak *H. perforatum* ekstraktının Namalwa ve Daudi hücrelerinin her ikisinde de doz ve zamana bağımlı olarak antiproliferatif ve sitotoksik etkilerinin olduğu ortaya çıkarılmıştır. *H. perforatum* ekstraktının 0,028 mg/ml IC₅₀ dozunda Namalwa ve Daudi hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği saptanmıştır. *H. perforatum* ekstraktının en yüksek konsantrasyonunda (0,5 mg/ml) Burkitt Lenfoma hücrelerinde 24 ve 48. saatlerde olmak üzere erken ve geç apoptozisi uyardığı bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: *Hypericum perforatum*, Burkitt Lenfoma, apoptozis

İletişim adresi: ozlemdroz@hotmail.com

8. SUMMARY

The Cytotoxic, Antiproliferative and Apoptotic Effects of *Hypericum Perforatum* (St. John's wort) on Burkitt Lymphoma Cells (Namalwa and Daudi)

Hypericum perforatum L. (St. John's wort) is widely used for treatment of peptic ulcers and skin wounds, infections, respiratory and inflammatory diseases in traditional medicine for centuries. *Hypericum perforatum* contains numerous compounds such as naphthodianthrones hypericin and pseudohypericin, flavonoids, and the phloroglucinols hyperforin and hyperforin with documented biological activity. In recent studies, *H. perforatum* has been proven to have antitumoral effects on several human cancer cell lines. In this study we aimed to investigate the antiproliferative, cytotoxic and apoptotic effects of *H. perforatum* extract on human Burkitt Lymphoma cells (Namalwa and Daudi).

For this purpose, six different doses of *H. perforatum* extract (0,01-0,025-0,05-0,1-0,25-0,5 mg/ml) is experimented in cells for 24, 48 and 72 hours. Viability was measured by tripan blue dye exclusion method, metabolic activity was measured by WST-1 assay which analyze the number of viable cells by the cleavage of tetrazolium salts. Cytotoxicity was assessed by LDH (lactate dehydrogenase) release test and cell proliferation was assessed with BrdU test. Early apoptosis was assessed by Annexin V assay and late apoptosis was assessed by tunel (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick-end labeling) assay with fluorescent microscopy.

Viability values which are gained according to tripan blue exclusion method, showed that after 72 hours incubation with 0,5 mg/ml concentration of *H. perforatum* extract was decreased the viability to % 32 in Namalwa cells and % 5 in Daudi cells which were found to be significantly different compared with control groups ($p < 0.05$). Next, the effect of *H. perforatum* extract on the metabolic activity of cells were determined. According to the results metabolic activity was decreased to % 5 in Namalwa cells and % 1 in Daudi cells after 72 hours incubation with 0,5 mg/ml concentration of *H. perforatum* extract. In parallel LDH activity was also determined in both cells. The highest level of LDH activity was observed at 0,01 mg/ml concentration after 72 hours in Namalwa cells and 0,25 mg/ml concentration after 72 hours in Daudi cells. Similar to metabolic activity results, cell proliferation was decreased in a time and dose dependent manner. Early apoptotic cells were observed by Annexin V test

after 24 hours and late apoptotic cells were observed by Tunel test after 48 hours treatment with 0,5 mg/ml concentration of *H. perforatum* extract by fluorescent microscopy.

According to our results, we have shown that *H. perforatum* extract showed antiproliferative and cytotoxicity effects on both of Namalwa and Daudi cells in a time and dose dependent manner. *H. perforatum* extract inhibited the growth of Namalwa and Daudi cells with IC_{50} value of 0,028 mg/ml. It was found that the highest concentration of *H. perforatum* extract (0,5 mg/ml), induced early and late apoptosis on Burkitt Lymphoma cells within 24h and 48h, respectively.

Key words: *Hypericum perforatum*, Burkitt Lymphoma, apoptosis

e-mail: ozlemdroz@hotmail.com

KAYNAKLAR

- 1) Okur FV, Oguz A, Karadeniz C. Refractoriness to rituximab monotherapy in a child with relapsed/refractory Burkitt non-Hodgkin lymphoma. *Pediatr Hematol Oncol* 2006; 23: 25–31.
- 2) Gascoyne RD, Skinnider BF. In: Kaushansky K, Beutler E, Lichtman M, Collier BS, Kipps TJ, Seligsohn U. *Williams Hematology*. 8th ed. New York: Mc Grae Hill, 2010: 1589-1593.
- 3) Bears MH, Berkow R. *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*. 17th ed. West Point. Merck & Co 1999: 847-1000.
- 4) Quiney C, Billard C, Faussat AM, Salanoubat C, Ensaf A, Nait-Si Y, Fourneron JD, Kolb JP. Pro-apoptotic properties of hyperforin in leukemic cells from patients with B- cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2006; 20 (3): 491-7.
- 5) Hostanska K, Bommer S, Weber M, Krasniqi B, Saller R. Comparison of the growth-inhibitory effect of *Hypericum perforatum* L. extracts, differing in the concentration of phloroglucinols and flavonoids, on leukaemia cells. *J Pharm Pharmacol*. 2003; 55 (7): 973-80.
- 6) Hostanska K, Reichling J, Bommer S, Weber M, Saller R. Aqueous ethanolic extract of St. John' s wort (*Hypericum perforatum* L.) induces growth inhibition and apoptosis in human malignant cells in vitro. *Pharmazie*. 2002; 57 (5): 323-31.
- 7) Di Carlo G, Borrelli F, Ernst E, Izzo A.A. St John's wort: prozac from the plant kingdom. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2001; 22 (6): 292–297.
- 8) Baytop T. *Türkiye' de Bitkiler ile Tedavi Geçmişte ve Bugün*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 1999: 142-144.
- 9) Medina M.A, Martínez-Poveda B, Amores-Sánchez M.I, Quesada A.R. Hyperforin: More than an antidepressant bioactive compound? *Life Sciences* 2006; 79: 105–111.
- 10) Kaçar O, Azkan N. Bursa'da Doğal Florada Bulunan Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum* L.) Populasyonlarında Farklı Yüksekliklerin Hiperisin Oranı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi. *Uludağ. Üniv. Ziraat. Fak. Derg.* 2005; 19(1): 77- 89.
- 11) Hışıl Y, Şahin F, Omay S. Kantaronun (*Hypericum perforatum* L.) Bileşimi ve Tıbbi Önemi. *International Journal of Hematology and Oncology* 2005; 15: 212-16.

- 12) Üstün Ç. Santral sinir sistemi üzerine etkili tıbbi bitkilerin tarihsel süreç içinde ve günümüzde tedavideki yeri. İzmir, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enst. Doktora Tezi, 1998.
- 13) Bilia AR, Gallori S, Vincieri FF. St. John's wort and depression: Efficacy, safety and tolerability-an update. *Life Sciences*. 2002; 70: 3077–96.
- 14) Dost T, Ozkayran H, Gokalp F, Yenisey C, Birincioglu M. The Effect of *Hypericum Perforatum* (St. John's Wort) on Experimental Colitis in Rat. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1214-1221.
- 15) Butterweck V, Schmidt M. St. John's wort: Role of active compounds for its mechanism of action and efficacy. *Wien Med Wochenschr* 2007; 157/13–14: 356–361
- 16) Agostinis P, Vantieghem A, Merlevede W, de Witte PA. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 221-241.
- 17) Martarelli D, Martarelli B, Pediconi D, Nabissi M.I, Perfumi M, Pompei P. *Hypericum perforatum* methanolic extract inhibits growth of human prostatic carcinoma cell line orthotopically implanted in nude mice. *Cancer Lett*. 2004; 210: 27–33.
- 18) Simmen U, Bobirnac I, Ullmer C, Lubbert H, Buter KB, Schaffner W, Schoeffter P. Antagonist effect of pseudohypericin at CRF1 receptors *Eur J Pharmacol* 2003; 458: 251– 6.
- 19) Linde K, Ramirez G, Mulrow C.D, Pauls A, Weidenhammer W, Melchart D. St John's wort for depression- an overview and meta-analysis of randomised clinical trials. *Bmj* 1996; 313 (7052): 253–58.
- 20) Kiesslich T, Krammer B, Plaetzer K. Cellular mechanisms and prospective applications of hypericin in photodynamic therapy. *Curr Med Chem* 2006; 13: 2189-2204.
- 21) Schempp CM, Haarhaus BS, Termeer CC, Simon JC. Hypericin photo-induced apoptosis involves the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and activation of caspase-8. *FEBS Lett* 2001; 493: 26-30.
- 22) Theodossiou A, Hothersall S, Witte P, Pantos A, Agostinis P. The Multifaceted Photocytotoxic Profile of Hypericin. *Molecular Pharmaceutics* 2009; 6: 1775-1789.

- 23) Peebles KA, Baker RK, Kurz EU, Schneider BJ, Kroll DJ. Catalytic inhibition of human DNA topoisomerase II α by hypericin, a naphthodianthrone from St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Biochem pharmacol* 2001; 62: 1059-70.
- 24) Hopfner M, Maaser K, Theiss A, Lenz M, Sutter AP, Kashtan H. Hypericin activated by an incoherent light source has photodynamic effects on esophageal cancer cells. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18(3): 239-47.
- 25) Bruggisser R, von Daeniken K, Jundt G, Schaffner W, Tullberg-Reinert H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Med* 2002; 68(5): 445-8.
- 26) Hostanska K, Reichling J, Bommer S, Weber M, Saller R. Hyperforin a constituent of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards human malignant cell lines. *Eur J Pharm Biopharm* 2003; 56(1): 121-32.
- 27) Shiono Y, Shiono N, Seo S, Oka S, Yamazaki Y. Effects of polyphenolic anthrone derivatives, resistomycin and hypericin, on apoptosis in human megakaryoblastic leukemia CMK-7 cell line. *Z Naturforsch* 2002; 57(9-10): 923-9.
- 28) Kim JI, Park JH, Park HJ, Choi SK, Lee KT. Induction of differentiation of the human histocytic lymphoma cell line U-937 by hypericin. *Arch Pharm Res* 1998; 21(1): 41-5.
- 29) Hwang MS, Yum YN, Joo JH, Kim S, Lee KK, Gee SW. Inhibition of c-erbB-2 expression and activity in human ovarian carcinoma cells by hypericin. *Anticancer Res* 2001; 21: 2649-55.
- 30) Miskovsky P. Hypericin- A New Antiviral and Antitumor Photosensitizer: Mechanism of Action and Interaction with Biological Macromolecules. *Current Drug Targets* 2002; 3: 55-84.
- 31) Liebes L, Mazur Y, Freeman D, Lavie D, Lavie G, Kudler N, Mendoza S, Levin B, Hochster H, Meruelo D. A method for the quantitation of hypericin, an antiviral agent, in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 1991; 195(1): 77-85.
- 32) Öztürk Y, Aydın S, Baser K, Kırimer N, Kurtar-Öztürk N. Hepatoprotective activity of *Hypericum perforatum* L. alcoholic extracts in rodents. *Phytother. Res.* 1992; 6 (1): 44-46.

- 33) Moore L.B, Goodwin B, Jones S.A, Wisely G.B, Serabjit-Singh C.J, Willson T.M, Collins J.L, Kliewer S.A. St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97 (13): 7500–7502.
- 34) Vandenbogaerde AL, Kamuhabwa A, Delay E, Himpens BE, Merlevede WJ, De Witte PA. Photocytotoxic effect of pseudohypericin versus hypericin. *J Photochem Photobiol B Biol* 1998; 45: 87- 94.
- 35) Muller W.E. Current St John's wort research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacological Research* 2003; 47 (2): 101–109.
- 36) Singer A, Wonnemann M, Muller W.E. Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's Wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na^{+1} . *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1999; 290 (3): 1363–1368.
- 37) Froestl B, Steiner B, Muller W.E. Enhancement of proteolytic processing of the beta-amyloid precursor protein by hyperforin. *Biochemical Pharmacology* 2003; 66 (11): 2177–2184.
- 38) Tedeschi E, Menegazzi M, Margotto D, Suzuki H, Forstermann U, Kleinert H. Anti-inflammatory actions of St. John's wort: inhibition of human inducible nitric-oxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1alpha (STAT-1alpha) activation. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2003; 307 (1): 254–261.
- 39) Schempp C.M, Hezel S, Simon C. Topical treatment of atopic dermatitis with *Hypericum* cream: a randomised, placebo-controlled, doubleblind half-side comparison study. *Hautarzt* 2003; 54: 248–253.
- 40) Albert D, Zundorf I, Dingermann T, Muller W.E, Steinhilber D, Werz O. Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase. *Biochemical Pharmacology* 2002; 64 (12): 1767–1775.
- 41) Feisst C, Werz O. Suppression of receptor-mediated Ca^{+2} mobilization and functional leukocyte responses by hyperforin. *Biochemical Pharmacology* 2004; 67(8): 1531–1539.
- 42) Schwarz D, Kisselev P, Roots I. St. John's wort extracts and some of their constituents potently inhibit ultimate carcinogen formation from benzo [a]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1. *Cancer Research* 2003; 63 (22): 8062-8068.

- 43) Schempp C.M, Kirkin V, Simon-Haarhaus B, Kersten A, Kiss J, Termeer C.C, Gilb B, Kaufmann T, Borner C, Sleeman J.P, Simon J.C. Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. *Oncogene* 2002; 21 (8): 1242-1250.
- 44) Dona M, Dell'Aica I, Pezzato E, Sartor L, Calabrese F, Della Barbera M, Donella-Deana A, Appendino G, Borsarini A, Caniato R, Garbisa S. Hyperforin inhibits cancer invasion and metastasis. *Cancer Research* 2004; 64 (17): 6225–6232.
- 45) Martinez-Poveda B, Quesada A.R, Medina M.A. Hyperforin, a bioactive compound of St. John's wort, is a new inhibitor of angiogenesis targeting several key steps of the process. *International Journal of Cancer* 2005; 117(5): 775–780.
- 46) Fisher S G, Fisher R I. The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene* 2004; 23: 6524-6534.
- 47) Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Basic Pathology*. 6th. ed. İstanbul, Nobel Tıp Kitap Evleri, 2000: 362-373.
- 48) Gascoyne RD, Skinnider BF. In: Beutler E, Lichtman M, Collier BS, Kipps TJ, Seligsohn U. *Williams Hematology*. 6th ed. New York, Mc Grae Hill, 2001: 1237-1262.
- 49) Lippman SM, Miller TP, Spier CM, Slymen DJ, Grogan TM. The prognostic significance of the immunotype in diffuse large-cell lymphoma. A comparative study of the T-cell and B-cell phenotype. *Blood* 1988; 72(2): 436-441.
- 50) Perkins SL. Work-up and diagnosis of pediatric non-Hodgkin's lymphomas. *Pediatr Dev Pathol* 2000; 3: 374–90.
- 51) Yamaç K. Hodgkin-dışı lenfoma. İçinde İliçin G, Biberoğlu K, Süleymanlar G, Ünal S. *İç Hastalıkları*. Ankara, Güneş Kitabevi, 2005: 1913-1928.
- 52) THD, WHO sınıflamasına genel bakış *Epidemiyoloji ve Türkiye Dökümü*. Klinisyen patoloğ ortak lenfoma kursu, 2004: 14-17.
- 53) Müller A, Ihorts G, Mertelsmann R, Engelhart M. Epidemiology of NHL: trends, geographic distribution, and etiology. *Ann Hematol*. 2005; 84: 1-12.
- 54) Lanzkowsky P. Non-Hodgkin's lymphoma. In: Lanzkowsky P, ed. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*. 4th ed. New York: Elsevier; 2005: 491–512.

- 55) Harris NL, Jaffe ES, Stein H. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84: 1361–92.
- 56) Chan KCJ. The New World Health Organization Classification of Lymphomas. *Hematol Oncol*. 2001; 19: 129-50.
- 57) Murphy SB, Fairclough DL, Hutchison RE. Non-Hodgkin's lymphomas of childhood: an analysis of the histology, staging, and response to treatment of 338 cases at a single institution. *J Clin Oncol* 1989; 7: 186–93.
- 58) Jaffe ES, Diebold J, Harris NL, Muller-Hermelink HK. Burkitt's lymphoma: a single disease with multiple variants. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. *Blood* 1999; 93(3): 1124.
- 59) Perkins SL, Morris SW. Biology and Patology of Pediatric Non-Hodgkin Lymphoma. In: Weinstein H, Hudson MM, Link MP, eds. *Pediatric Lymphomas*. Springer. 2007; 91–140.
- 60) Mükerrerem S. Burkitt lenfoma patolojisi, Klinisyen-Patalog Ortak Lenfoma Kursu, İstanbul 2004: 85-93.
- 61) Frost W, Newell J, Lones MA, Tripp SR. Comparative immunohistochemical analysis of pediatric Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2004; 121(3): 384-92.
- 62) Goldsby RE, Carroll WL. The molecular biology of pediatric lymphomas. *J Pediatr Hematol Oncol* 1998; 20: 282-96.
- 63) Brousse N, Vasiliu V, Michon J, Canioni D. Pediatric non-Hodgkin lymphomas. *Ann Pathol*. 2004; 4(6): 574-86.
- 64) Cairo MS, Sposto R, Perkins SL. Burkitt's and Burkitt-like lymphoma in children and adolescents: a review of the Children's Cancer Group Experience. *Br J Haematol* 2003; 120: 660–70.
- 65) Yustein JT, Dang CV. Biology and treatment of Burkitt's lymphoma. *Curr Opin Hematol* 2007; 144: 375–81
- 66) Cetin M. Burkitt lenfoma, Klinisyen-Patalog Ortak Lenfoma Kursu, İstanbul 2004: 76-84.

- 67) Magrath I. B-Cell Lymphoma/Burkitt Lymphoma. In: Weinstein H, Hudson MM, Link MP, eds. *Pediatric Lymphomas*. 1st ed. Berlin: Springer. 2007: 141–74.
- 68) Divgi C. Imaging: staging and evaluation of lymphoma using nuclear medicine. *Semin Oncol* 2005; 32 (1): 11–8.
- 69) Weitzman S, Suryanarayan K, Weinstein HJ. Pediatric non-Hodgkin's lymphoma: clinical and biologic prognostic factors and risk allocation. *Curr Oncol Rep*. 2002; 4(2): 107-13.
- 70) Doyle A, Griffiths JB. *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. John Wiley&Sons. 1998; 57(61): 62-64.
- 71) Toshikazu H, Zitsch R.P, Gluckman J.L. Cell kinetics study of upper aerodigestive tract squamous cell carcinoma using bromodeoxyuridine. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1993: 102.
- 72) Lockshin R.A, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004; 36: 2405-19.
- 73) Hanahan D, Weinberg R. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 2000; 100: 57-70.
- 74) Alles A, Alley K, Barrett JC. Apoptosis: a general comment. *FASEB J* 1991; 5: 2127-2128.
- 75) Sgonc R, Boeck G, Dietrich H, Gruber J, Recheis H, Wick G. Simultaneous determination of cell surface antigens and apoptosis. *Trends Gene*. 1994; 10(2): 41-2.
- 76) MBL Catalog International Corporation, Apoptosis detection by annexin-V. 2003: 12.
- 77) **Skalkos D, Gioti E, Stalikas C.D, Meyer H, Papazoglou Th. G, Filippidis G.** Photophysical properties of *Hypericum perforatum* L. extracts- novel photosensitizers for PDT. *J Photochem Photobiol B* 2006; 82: 146–151.
- 78) Mycek M, Richard H, Champe P, Oktay S. *Farmakoloji, Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, 1998: 373-398.
- 79) Kapsokalyvas D, Dimitriou H, Skalkos D, Konstantoudakis G, Filippidis G, Stiakaki E, Papazoglou T, Kalmanti M. Does *Hypericum perforatum* L. extract show any specificity as photosensitizer for HL-60 leukemic cells and cord blood hemopoietic progenitors during photodynamic therapy? *J Photochem Photobiol B* 2005; 80: 208–216.
- 80) Ali SM, Chee SK, Yuen GY, Olivo M. Hypericin and hypocrellin induced apoptosis in human mucosal carcinoma Cells. *J Photochem Photobiol B* 2001; 65: 59-73.

- 81) Özen K.P, Sahin F, Avcı C.B, Hısıl Y, Gündüz C, Saydam G. Hypericum perforatum extract (St. John's Wort) and hypericin induce apoptosis in leukemic HL-60 cells by effecting h TERT activity. Turk J Hematol 2007; 24: 127-133.
- 82) Zou Y.P, Lu Y.H, Wei D.Z. Protective effects of a flavonoid-rich extract of Hypericum perforatum L. against hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. Phytother Res. 2010; 6-10.
- 83) Stavropoulos NE, Kim A, Nseyo UU, Tsimaris I, Chung TD, Miller TA. Hypericum perforatum L. extract-Novel photosensitizer against human bladder cancer cells. J Photochem Photobiol B 2006; 84: 64–9.
- 84) Couldwell W.T, Gopalakrishna R, Hinton D.R, He S, Weiss M.H, Law R.E, Apuzzo M.L, Law R.E. Hypericin: a potential antiglioma therapy. Neurosurgery 1994; 35: 705–710.
- 85) Fadeel B, Zhivotovsky B, Orrenius S. All along the watchtower: on the regulation of apoptosis regulators. FASEB J. 1999; 13: 1647–1657.
- 86) Green D.R, Reed J.C. Mitochondria and apoptosis. Science 1998; 281: 1309-1312.
- 87) Di Carlo G, Nuzzo I, Capasso R, Sanges MR, Galdiero E, Capasso F, Carratelli CR. Modulation of apoptosis in mice treated with Echinacea and St. John's wort. Pharmacol Res 2003; 48: 273–7.
- 88) Fox F.E, Niu Z, Tobia A, Rook A.H. Photoactivated hypericin is an anti-proliferative agent that induces a high rate of apoptotic death of normal, transformed and malignant T lymphocytes: implications for the treatment of cutaneous lymphoproliferative and inflammatory disorders. J Invest Dermatol 1998; 111: 327-332.