



**T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

***MYRTUS COMMUNIS* (MERSİN BİTKİSİ)'İN İNSAN
OSTEOSARKOMA HÜCRELERİNDE (SAOS-2)
PRO-APOPTOTİK VE ANTİ-METASTATİK
ETKİSİNİN İN-VİTRO KOŞULLARDA
ARAŞTIRILMASI**

Emira KURBASEVIC

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman

Prof. Dr. Sefa ÇELİK

2021-AFYONKARAHİSAR

T.C.

AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

***MYRTUS COMMUNIS* (MERSİN BİTKİSİ)'İN İNSAN
OSTEOSARKOMA HÜCRELERİNDE (SAOS-2) PRO-APOPTOTİK
VE ANTİ-METASTATİK ETKİSİNİN İN-VİTRO KOŞULLARDA
ARAŞTIRILMASI**

Emira KURBASEVIC

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman

Prof. Dr. Sefa ÇELİK

Bu çalışma; Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Birimi tarafından 19.LİS.008 kodlu proje ile desteklenmiştir.

2021-AFYONKARAHİSAR

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Yüksek Lisans Öğrencisinin

Danışmanın

Adı Soyadı: Emira KURBASEVIC

Adı Soyadı: Prof. Dr. Sefa ÇELİK

İmza:

İmza:

KABUL VE ONAY

.....danışmanlığındatarafından
hazırlanan “.....” adlı bu
çalışma jürimiz tarafından Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Lisansüstü
Eğitim Enstitüsü Anabilim Dalında yüksek
lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

..... / /

(Tez savunma sınav tarihi yazılacaktır.)

JÜRİ:

Başkan :(..... Üniversitesi).....

Üye :(..... Üniversitesi)

Üye :(..... Üniversitesi)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı
kararı ile onaylanmıştır.

..... / /

.....

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans hayatım boyunca ve tez hazırlama sürecimde destekleriyle hep yanımda olan; laboratuvar çalışmalarım ve akademik hayatım boyunca bilgisinden ve tecrübelerinden faydalandığım, birlikte çalışmaktan onur duyduğum, saygıdeğer tez danışmanım Prof. Dr. Sefa ÇELİK'e;

Yüksek lisans eğitimimde bilgi birikimlerinden faydalandığım Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ahmet KAHRAMAN'a ve diğer bölüm hocalarım olan Prof. Dr. Tülay KÖKEN, Doç. Dr. Halit BUĞRA KOCA ve Doç. Dr. Ayhan VURMAZ'a;

Yüksek lisans öğrenimim süresince laboratuvar teknik ve analizlerini öğrenmemi sağlayan Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı üyesi değerli hocam Doç. Dr. Ömer HAZMAN ve yüksek lisans öğrencisi Zehra Betül KUMRAL'a;

İstatistik analizlerde değerli bilgilerini benimle paylaşan Sayın Prof. Dr. İsmet DOĞAN'a;

Tez yazım süresince, her konuda eleştiri ve önerileriyle yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım, Öğr. Gör. Rumeysa BALI, Arş. Gör. Dr. Ayşe CİRİZ, Arş. Gör. Rumeysa ÇİNAR, Dr. Öğr. Üyesi Cemile YILMAZ, Uzm. Dt. Saliha Gülten SUNGUR, Saliha AKPINAR ve Ayşe Nur MYUMYUN'a, ayrıca yüksek lisans çalışmalarımı finansal anlamda 19.LİS.008 numaralı proje ile destekleyen Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne;

Dokuz sene boyunca her türlü sevinç ve üzüntülerimi paylaşan, her koşulda yanımda olan ve bu zorlu süreçte de beni yalnız bırakmayan, canım dostum Anela Hadzic'e;

Hayatım boyunca beni karşılık beklemeden destekleyen, her başarımın mimarı olan, hayattaki en büyük destekçilerim canım annem Fatima'ya, kardeşlerime ve zorlandığım zamanlarda ben bile kendime inanmazken bana inanan, pes etmemeyi öğreten ve her zaman ilham kaynağı olan canım rahmetli babam Deliya'ya;

Teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Emira KURBASEVIC

Afyonkarahisar, Haziran 2021

MYRTUS COMMUNIS (MERSİN BİTKİSİ)’İN İNSAN OSTEOSARKOMA HÜCRELERİNDE (SAOS-2) PRO-APOPTOTİK VE ANTİ-METASTATİK ETKİSİNİN İN-VİTRO KOŞULLARDA ARAŞTIRILMASI

Emira KURBASEVIC

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Haziran 2021

Danışman: Prof. Dr. Sefa ÇELİK

ÖZET

Kanser her geçen gün artan, yaşamı çok yönlü olarak tehdit eden, maddi ve manevi kayıplara neden olan günümüzün en önemli sağlık problemlerinden birisidir. Kanser tedavisi için kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemler kullanılmaktadır. Kemoterapi ile tedavi edilen hastalar önemli bazı olumsuz yan etkiler yaşayabilmektedir. Mide bulantısı, kusma, ishal, saç dökülmesi, iştah kaybı, yorgunluk, ateş, ağız yaraları, ağrı gibi çok değişik yan etkiler ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle, kanserin tedavisinde kemoterapiye alternatif ya da kemoterapinin yan etkilerini azaltmak amaçlı yeni tedavi stratejilerinin önemi artmaktadır. Çeşitli tümör tipleri üzerinde test edilen bitki kaynaklı bileşikler, daha ileri kanser tedavisi için stratejiler sağlayabilir. Sunulan bu tez çalışmasında *Myrtus Communis* L. (Mersin bitkisi) bitki ekstresi birincil kemik tümörlerinin en malignant ve en yaygın görünen türü olan osteosarkoma (Saos-2) hücre hattı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışmada apoptozis, inflamasyon ve oksidatif stres ile ilişkili mekanizmalar ve bu mekanizmalarda rol oynayan biyo moleküller incelenmiştir. Sitotoksikite analizleri için MTT (3-(4,5-dimetil-tiyazolil)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) testi, sitokin (TNF- α , IL-10, IL-12, IFN- γ) düzeylerinin belirlenmesi için ELISA testi, oksidatif stres (TAS ve TOS) için fotometrik testler, apoptoz için gerçek zamanlı PCR yöntemi kullanılmıştır. 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda *Myrtus Communis* özütleri ile muamele edilen Saos-2 hücrelerinde %50 inhibisyon yapan dozun (IC50) 1/1.28’lik dilüsyon olduğu tespit edildi. Bu konsantrasyonda uygulanan *Myrtus Communis* ekstresinin inflamatuvar sitokin (TNF- α , IL-12 ve IFN- γ) düzeylerini artırdığı, antiinflamatuvar sitokin IL-10 seviyesini azalttığı ve bu değişikliklerin istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı olduğu tespit edildi. Tedavi grubunda toplam antioksidan düzey (TAS), toplam oksidan düzey (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSİ) düzeylerinde anlamlı artışlar tespit edildi. Bitki ekstresinin, Bax, Bcl-2, Kaspaz-3, Kaspaz-9, p53, p21 genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerini ve Bax/Bcl-2 oranı ile belirlenen apoptotik indeksi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırdığı belirlendi. Metastazda rol oynayan MMP-2 geninin ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde artarken, MMP-9 gen ekspresyonu ise belirlenemedi.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar *Myrtus Communis*’in osteosarkom hücrelerinde apoptozu indüklemesinden dolayı hastalığın tedavisinde kemoterapötiklerle birlikte

kullanımının mümkün olabileceğini düşündürmektedir. Bu fikrin doğrulanması ve/veya desteklenebilmesi için, bu yönde yapılacak ileri düzeyde in vivo ve in vitro çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Kaspaz, Metastaz, Osteosarkom, Saos-2 hücre hattı, *Myrtus Communis*



INVESTIGATION OF THE PRO-APOPTOTIC AND ANTI-METASTATIC EFFECTS OF *MYRTUS COMMUNIS* (MYRONIC PLANT) ON HUMAN OSTEOSARCOMA CELLS (SAOS-2) UNDER IN-VITRO CONDITIONS

Emira KURBASEVIC

Afyonkarahisar University of Health Sciences Institute of Graduate Education

Department of Biochemistry Master Thesis

June 2021

Supervisor: Professor. Dr. Sefa CELIK

ABSTRACT

Cancer is one of the most important health problems of today, increasing day by day, threatening life in many ways and causing material and moral losses. Chemotherapy, radiotherapy and surgical methods are used for the treatment of cancer. Patients treated with chemotherapy may experience some significant adverse side effects. Various side effects such as nausea, vomiting, diarrhea, hair loss, loss of appetite, fatigue, fever, mouth sores, and pain may occur. For this reason, the importance of new treatment strategies to reduce the side effects of chemotherapy or as an alternative to chemotherapy in the treatment of cancer is increasing. Plant-derived compounds tested on various tumor types may provide strategies for further cancer therapy. In this thesis, the effect of *Myrtus Communis* L. (Myrtle) plant extract on the osteosarcoma (Saos-2) cell line, which is the most malignant and most common type of primary bone tumors, was investigated. In the study, the mechanisms associated with apoptosis, inflammation and oxidative stress and the biomolecules that play a role in these mechanisms were examined. MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) test for cytotoxicity analysis, ELISA test for determination of cytokine (TNF- α , IL-10, IL-12, IFN- γ) levels, Photometric tests for oxidative stress (TAS and TOS) and real-time PCR for apoptosis were used. It was determined that the 50% inhibiting dose (IC₅₀) was 1/1.28 dilution in Saos-2 cells treated with different concentrations of *Myrtus Communis* extracts for 24 hours. It was determined that *Myrtus Communis* extract applied at this concentration increased the levels of inflammatory cytokines (TNF- α , IL-12 and IFN- γ), decreased the level of the anti-inflammatory cytokine IL-10, and these changes were statistically significant. Significant increases were detected in the total antioxidant level (TAS), total oxidant level (TOS) and oxidative stress index (OSI) levels in the treatment group. It was determined that the plant extract statistically significantly increased the mRNA expression levels of Bax, Bcl-2, Caspase-3, Caspase-9, p53, p21 genes and the apoptotic index determined by Bax/Bcl-2 ratio. While the expression level of the MMP-2 gene, which plays a role in metastasis, increased at a statistically insignificant level, MMP-9 gene expression could not be determined.

The results obtained from this study suggest that it may be possible to use *M. Communis* together with chemotherapeutics in the treatment of the disease, since it induces apoptosis

in osteosarcoma cells. In order to confirm and/or support this idea, further in vivo and in vitro studies are needed in this direction.

Keywords: Cancer, Caspase, Metastasis, Osteosarcoma, Saos-2 cell line, *Myrtus Communis*.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	ii
KABUL VE ONAY	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLERİ	3
2.1. Hücre Siklusu	3
2.2. Kanser ve Oluşumu	4
2.3. Kanserde Hücre Ölüm Tipleri	6
2.3.1. Apoptozis	6
2.3.1.1. Apoptoz Mekanizması	7
2.3.1.2. Apoptoz Kontrolü	9
2.3.2. Otofajik Hücre Ölümü	10
2.3.3. Nekroz	11
2.3.3.1. Nekroz Tipleri	13
2.4. Matriks Metalloproteinazlar	13
2.4.1. Matriks Metalloproteinazların Moleküler Yapısı.....	14
2.4.2. Kanser ve Matriks Metalloproteinazlar.....	16
2.5. İnflamasyon.....	16
2.5.1. Akut İnflamasyon.....	17
2.5.2. Kronik İnflamasyon	17
2.5.3. İnflamasyonda Sitokinlerin Rolü	17
2.5.4. Sitokinlerin Sınıflandırılması	18
2.5.4.1. Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- α)	18

2.5.4.2. İnterlökin 10 (IL-10)	19
2.5.4.3. İnterlökin 12 (IL-12),	20
2.5.4.4. İnterferon Gama (IFN- γ)	20
2.6. Reaktif Oksijen Türleri ve Kanser	21
2.7. Osteosarkom.....	22
2.7.1. Metastatik Hastalık.....	22
2.7.2. Sınıflandırılması.....	23
2.7.3. Epidemiyoloji.....	24
2.7.4. Etyoloji.....	24
2.7.5. Lokalizasyon	25
2.7.6. Klinik Bulgu ve Semptomlar	25
2.8. Kanser Tedavisi.....	26
2.9. Bitki Özütlерinin Kanser Tedavisinde Kullanımı.....	26
2.10. <i>Myrtus Communis</i> L. (Mersin bitkisi)	29
2.11. <i>Myrtus Communis</i> 'in Antikanser Özelliği	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Hücre Kültürü.....	33
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Sarf Maddeler.....	33
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	34
3.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	35
3.2.1. Saos-2 Hücre Kültürü Mediumunun Hazırlanması.....	35
3.2.2. Lizis Tamponu Hazırlama.....	38
3.3. Hücrelerin Kültür Ortamında Çoğaltılması ve Deneylere Hazırlık	39
3.3.1. Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekilmesi	39
3.3.2. Hücrelere Uygulanan Tripsinizasyon/Detripsinizasyon İşlemleri	40
3.3.3. Hücre Çoğaltma (Pasajlama).....	41
3.3.4. Hücre Sayımı.....	41
3.4. Hücre Canlılık Ölçüm Testi (MTT Yöntemi)	43
3.5. Biyokimyasal Analizler.....	45
3.5.1. Hücre Lizatı Hazırlama	45
3.5.2. Total Protein Analizi	45
3.5.3. Sitokin (TNF- α , IL-10, IL-12, IFN- γ) Seviyelerinin Belirlenmesi	46

3.5.4. Total Antioksidan Düzey (TAS) Analizi	47
3.5.5. Total Oksidan Düzey (TOS) Analizi.....	48
3.5.6. Oksidatif Stres İndeksi (OSI) Seviyelerinin Belirlenmesi	49
3.6. Moleküler Analizler	49
3.6.1. RNA İzolasyonu.....	49
3.6.2. cDNA Sentezi.....	50
3.6.3. Real Time RT-PCR Analizleri	51
3.7. İstatistiksel Analizler	53
4. BULGULAR.....	54
4.1. <i>Myrtus Communis</i> 'in Saos-2 Hücrelerinde Sitotoksikite Etkisi	54
4.2. <i>Myrtus Communis</i> Saos-2 Hücrelerinde İnflamatuvar Belirteçlere Etkisi	54
4.3. <i>Myrtus Communis</i> 'in Saos-2 Hücrelerinde Oksidatif Strese Etkisi	57
4.4. <i>Myrtus Communis</i> 'in Saos-2 Hücrelerinde Apoptoz ile İlişki Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi	59
4.5. Saos-2 Hücre Hattı için <i>Myrtus Communis</i> 'in Metastatik Genler Olan MMP-2 ve MMP-9'un Ekspresyonu Üzerine Etkisi	61
5. TARTIŞMA	62
6. SONUÇ	73
KAYNAKLAR	74
EKLER.....	85
ÖZGEÇMİŞ	87

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

Simgeler

dH ₂ O	Distile su
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
μM	Mikromolar
mM	Milimolar
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre

Kısaltmalar

AIF	Apoptoz indükleyici faktör
BAD	Bcl-2 ile ilişki ölüm promotörü
BAX	Bcl-2 ile ilişki X protein
Bcl-2	B-hücre lenfoması 2
BAK	Bcl-2 homolog antagonist öldürücü
Bcl-XL	Büyük B- hücre lenfoması
CAT	Katalaz
CDK	Siklin bağımlı kinaz
Ct	Eşik döngüsü
cDNA	Komplementer DNA
DMSO	Dimetil sülfoksit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ELISA	Enzim-Linked Immuno Sorbent Assay
ECM	Ekstrasellüler matriks
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
FBS	Fetal bovine serum
IFN-γ	İnterferon Gama
IL-10	İnterlökin 10

IL-12	İnterlökin 12
MMP	Matriks metalloproteinazlar
OSI	Oksidatif stres indeksi
PBS	Phosphate buffered saline
p53	Tümör protein 53
p21	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü-1
ROS	Reaktif oksijen türleri
T _m	Erime sıcaklığı
TAS	Total antioksidan statü
TNF- α	Tümör nekroz faktörü alfa
TOS	Total oksidan statü
TIMP	Metalloproteinazların Spesifik Doku İnhibitörleri
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1: Apoptoz ve nekrozun kıyaslanması	12
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan besiyeri (medium) bileşenleri	37
Tablo 3.2: <i>Myrtus Communis</i> sulu ekstresinin içerik analiz sonuçları.....	38
Tablo 3.3: cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon bileşenleri	50
Tablo 3.4: Oligonükleotid primer dizileri ve RT-PCR programları.....	51
Tablo 3.5: RT-PCR deneyi için reaksiyon karışımı	52
Tablo 4.1: Proinflamatuvar stokin (TNF- α , IL-10, IL-12, IFN- γ) düzeyleri	55
Tablo 4.2: Hücre lizatlarına ait TAS, TOS ve OSI değerleri.	57
Tablo 4.3: <i>Myrtus Communis</i> 'in Bax ve Bcl-2 genlerinin mRNA ekspresyonları üzerine etkisi ve apoptotik indeks düzeyi.	59
Tablo 4.4: <i>Myrtus Communis</i> 'in Saos-2 hücrelerinde p21, p53, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 genlerinin mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.	60
Tablo 4.5: <i>Myrtus Communis</i> 'in MMP-2 ve MMP-9 gen ekspresyonları üzerine etkisi.	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Hücre döngüsü fazları.	4
Şekil 2.2: Apoptozis’de morfolojik değişiklikler.	7
Şekil 2.3: Apototik yollar	8
Şekil 2.4: Otofajın şematik gösterimi.	11
Şekil 2.5: MMP enzimlerinin molekül yapısı.....	14
Şekil 2.6: Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri....	21
Şekil 2.7: <i>Myrtus Communis</i> L.	29
Şekil 2.8: Mirtuomulon ve yarı mirtuomulon’in kimyasal yapısı.	30
Şekil 3.1: Flow kabin içinde medium hazırlama işlemi.....	36
Şekil 3.2: Saos-2 hücre hattının mikroskopik görüntüsü (10X).	40
Şekil 3.3: Hücre sayımında kullanılan hücre sayım lamı (Neubauer continuation chamber) ve hücre sayımı yapılan hücreler.	42
Şekil 3.4: MTT reaksiyonunda formazon kristallerinin oluşumu.....	43
Şekil 3.5: Formazan kristallerinin DMSO ile çözüldükten sonraki görüntüsü.....	44
Şekil 4.1: <i>Myrtus Communis</i> ’in çeşitli dilüsyonlarına göre elde edilen hücre canlılığı düzeyleri.....	54
Şekil 4.2: Gruplara göre hücre lizatlarında ölçülen TNF- α düzeyleri	55
Şekil 4.3: Gruplara göre hücre lizatlarında ölçülen IFN- γ düzeyleri.....	56
Şekil 4.4: Gruplara göre hücre lizatlarında ölçülen IL-12 düzeyleri	56
Şekil 4.5: Gruplara göre hücre lizatlarında ölçülen IL-10 düzeyleri.....	56
Şekil 4.6: Hücre lizatlarının TAS düzeyleri	57
Şekil 4.7: Hücre lizatlarının TOS düzeyleri	58
Şekil 4.8: Hücre lizatlarının OSI değerleri	58
Şekil 4.9: <i>Myrtus Communis</i> ’in Bcl-2 ve Bax genleri mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.	59

Şekil 4.10: *Myrtus Communis*'in p21, p53, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 genlerinin mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.60

Şekil 4.11: *Myrtus Communis*'in Saos-2 hücrelerinde MMP-2 mRNA ekspresyonu üzerine etkisi [ortalama (min-max)].....61



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kelime anlamı olarak kanser, bir organ veya dokudaki hücrelerin düzensiz olarak bölünüp çoğalmasıyla beliren kötü urlara denir. Genel anlamda ise kanser vücudumuzun çeşitli bölgelerindeki hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile oluşan 100'den fazla hastalık grubudur. Çok çeşitli kanser tipleri olmasına rağmen, hepsi anormal hücrelerin kontrol dışı çoğalması ile başlar. Tedavi edilmez ise ciddi rahatsızlıklara, hatta ölüme dahi neden olabilir (Bertram, 2000).

Kalp ve damar hastalıklarından sonra ölüm nedenleri sıralamasında ikinci sırada yer alan kanser hastalığı günümüzün en büyük sağlık sorunlarından biridir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, sadece 2012 yılında 8,2 milyon kişinin akciğer, karaciğer, mide başta olmak üzere çeşitli kanserler sebebiyle hayatını kaybettiği belirtiliyor. Dünya Sağlık Örgütü, gelişen teknoloji ve tedavi imkanlarına rağmen 2030 yılında kansere bağlı ölümlerin 13,1 milyon kişiye kadar çıkacağını öngörüyor. Durum böyleyken önleyici sağlıklı yaşam alışkanlıkları ve erken teşhis her şeyden önemli hale geliyor (Ferlay ve ark., 2015).

Kanser; her geçen gün artan, yaşamı çok yönlü olarak tehdit eden, maddi ve manevi kayıplara neden olan günümüzün en önemli sağlık problemlerinden birisidir. Kemoterapi, günümüzde kanser tedavisi için sık kullanılan yöntemlerden birisidir. Kemoterapötik ilaçlarla kanser hücrelerinin çoğalmasının önlenmesinde iki hedef mekanizma ön plana çıkmaktadır. Bunlar; hücre büyümesinin durdurulması ya da apoptozun aktiflenmesidir. Hücre döngüsünün durdurulması kanser hücrelerinin elimine edilmesinde etkili bir stratejidir. Apoptoz ise intrinsik ve ekstrinsik sinyal yollarındaki faktörlerin etkisiyle düzenlenmektedir (Liang ve ark., 2012).

Son yıllarda kanser hücrelerine karşı kullanılan antikanser ilaçlara karşı direnç gelişimi ve bu ilaçların kronik kullanımının normal hücrelerde de toksisite göstermesi sebebiyle yeni nesil antikanser ajanlar geliştirme konusu oldukça popüler bir araştırma alanı haline gelmiştir. Dünya Sağlık Örgütü tahminlerine göre gelişmiş ülkelerde yaşayan insanların yaklaşık %80'i primer sağlık sorunlarını gidermek için geleneksel tedaviye başvurmaktadır. Bu amaçla gerek sentetik, gerekse de doğal ürünler yeni nesil antikanser

ajan arařtırmalarında sıklıkla *in vitro* ve *in vivo* alıřmalarda denenmektedirler (Cenić-Milořević ve ark., 2013).

Osteosarkom en yaygın görülen kemik kanseri türü olmakla birlikte, genellikle çocuklarda ve gelişme çağındaki gençlerde kansere bağlı ölümlerin ikinci en sık nedenidir ve dünya genelinde her yıl milyonda 3,4 vaka görülme sıklığını göstermektedir (Denduluri ve ark., 2016). Kemoterapötik ajan seçenekleri metotreksat, sispilin, doksorubisin ve ifosfamid olmakla birlikte, metastatik hastalığı olan hastalar için ilk kemoterapötik olarak kullanılan ajan ise etoposid'dir (Lamoureux ve ark., 2007).

Cerrahi ve adjuvan tedavi seçeneklerinden olan kemoterapinin kombinasyonu hala osteosarkom hastaları için geleneksel tedavi yöntemidir. Ayrıca son on yılda tanı ve tedavi de önemli iyileşmelere rağmen, yaklaşık %60-70 osteosarkom hastası bu tedaviden fayda görmemiştir. Lokalize osteosarkomlu hastalarda 5 yıllık sağkalım yaklaşık %50, akciğer metastazı olan hastalarda beş yıllık sağkalım tahmini için sadece %15 olarak kalmıştır (Peng ve Jiang, 2018). Bu nedenle, osteosarkomun tedavisinde yeni ve etkili ajanların özellikle doğal bileşiklerin terapötik verimliliğinin araştırılmasına ve geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Günümüzde modern ilaçların %20'si geleneksel tıbbi bitkilerden hazırlanmaktadır. Bitkilerden 100.000'den fazla bileşik izole edilmiş ve bitkilerin sekonder metabolitleri olarak tanımlanan bu bileşiklerden bazılarının diğer canlılarda biyoaktif bileşenler olabileceği de tespit edilmiştir. Başta kanser olmak üzere pek çok hastalığın tedavisinde bitkisel kaynaklı maddelerden ilaç etken maddesi olarak yararlanılmaktadır (Sen ve ark., 2011).

Bu kapsamda kullanılan bitki türleri arasında *Myrtus Communis*'dur. *Myrtus Communis*'in moleküler düzeyde hücre kültürü üzerine etkisine dair yeterli çalışma bulunmamaktadır. Özellikle de osteosarkoma malignant hücresine *Myrtus Communis*'in uygulanması üzerine herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, *Myrtus Communis* (Mersin bitkisi)'in birincil kemik tümörlerinin en malignant ve en yaygın görünen türü olan osteosarkoma hücrelerinde apoptoz ve metastazdan sorumlu mekanizmalar ve moleküller üzerine etkisini araştırmaktır.

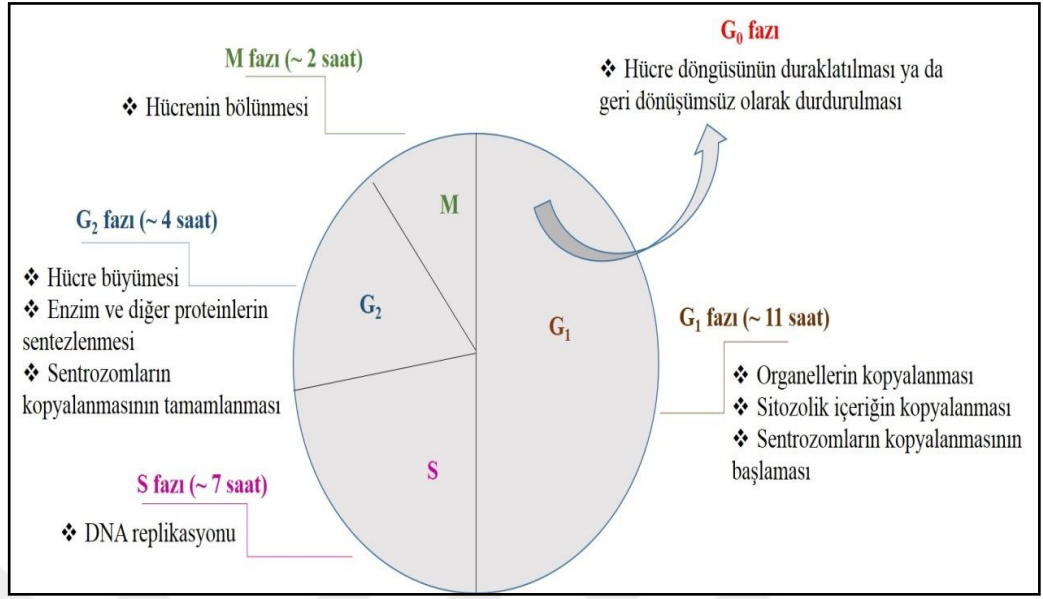
2. GENEL BİLGİLERİ

2.1. Hücre Siklusu

Hücre siklusu, hücrenin içeriğini iki katına çıkararak bölündüğü ve sonucunda aynı iki hücrenin oluştuğu oldukça organize ve sıkı bir şekilde düzenlenmiş kompleks bir süreçtir. Bu süreçte, hücresel çoğalma için siklin ve siklin bağımlı kinaz proteinleri, onkogenler ve tümör baskılayıcı genler, mitotik kontrol noktaları proteinlerini içeren birçok düzenleyici protein görev almaktadır (Wenzel ve Singh, 2018).

Son zamanlarda yapılan birçok araştırmada hücre siklusunu düzenleyen proteinler ve onkogenezis arasında kurulan bağlantıların sayısında önemli bir artış gözlenmektedir. Hücre siklusunun kontrol noktalarında ve düzenlenmesindeki anormallikler kanser gelişimine yol açar. Mutasyona ve overekspresyona uğramış hücre siklusu mekanizmasında yer alan bileşenler çeşitli kanser türlerinde belirlenmiştir. Bu mutasyona uğramış hücre siklusu bileşenlerinin bazıları onkogen ve tümör baskılayıcı gen (antionkogenler, hemerogenler, flatogenler) olarak da bilinir (Yokuş, 2012). Hücre siklusu; iki hücre bölünmesi arasındaki hücrede gözlemlenen çeşitli biyokimyasal olaylar ile morfolojik değişimleri ifade eden zaman döngüsüdür. Hücre bölünmesi tek hücrelilerde üremeyi, çok hücreli organizmalarda kalıtım materyalinin nesiller boyunca aktarılması ile organizmanın hayatını devam ettirebilmesi için gerekli metabolizmanın devamlılığını sağlar (Sherr, 2000).

Belirli bir program çerçevesinde gerçekleşen hücre siklusu kontrol edilmezse kontrolsüz hücre bölünmesi denilen kanser görülür. Bu nedenle tümör gelişimini baskılamak için hücre siklusunun kontrolü önem taşır. G1, G2 ve M evresinde bulunan kontrol noktaları dur ve devam et mesajıyla siklusta bir evre tamamlanmadan diğerine geçilmesini engeller. Hücre döngüsünün en temel görevi bir hücredeki kromozom DNA'sını iki katına çıkararak DNA'ları genetik olarak aynı olan iki kardeş hücre oluşturmaktır. Bu işlemler iki safhada gerçekleşir: S ve M fazları. Ökaryotik hücre döngüsünde 4 faz vardır: G1, S, G2 ve M fazları. G1 ve G2 fazları ara fazlardır. G1, S ve G2 fazları (Şekil 2.1) hücrenin büyümesi, protein ve organel miktarının iki katına çıkarılması ve bölünmeye hazırlanması için en önemli zaman aralığını oluşturur (Icard ve ark., 2019).



Şekil 2.1: Hücre döngüsü fazları (Hochegger ve ark., 2008).

G₀ fazı: Hücre siklusunun istirahat fazıdır. Bölünme sinyal almadıkları müddetçe siklus G₀'da kalır. Metabolik aktivite vardır.

G₁ fazı: G₀ fazındaki hücre büyüme uyarıları sonrası G₁ fazına geçer. Bu fazda DNA replikasyonu olmaz ayrıca RNA ve protein sentezi olur. G₁ evresi ilk bölünmede oluşan eş hücrelerin tekrar hücre bölünmesine girmeden S evresine hazırlandığı evredir.

S fazı: RNA ve protein sentezi devam etmektedir. DNA replikasyonu, kromozom çiftlenmesi bu fazda gerçekleşir.

G₂ fazı: Hücrede büyüme devam eder. DNA replikasyonu olmaz. RNA ve protein sentezi gerçekleşir.

M fazı: Kromozom ayrılması ve hücre bölünmesi gerçekleşir (Vermeulen ve ark., 2003).

2.2. Kanser ve Oluşumu

KontROLSÜZ olarak çoğalan hücrelerin başka dokulara yayılmasıyla karakterize olan kanser hastalığı, dünyada insidansı gittikçe artan önemli bir sağlık problemidir (Ferlay ve ark., 2015).

Kanser kelimesinin ilk olarak Hipokrat (MÖ 460-377) tarafından kullanıldığı bilinmektedir. Hipokrat tümör oluşumlarını tanımlarken "karkinos" veya "karkinoma" kelimelerini kullanmıştır. Bunun da nedeni, bu görünümüleri yengeçe benzetmesidir. İngilizce’de "cancer" kelimesinin bir diğer kelime anlamı da yengeçtir. Yunan tıbbına bakıldığı takdirde, “praeter naturam” denilen anormal patolojik büyüme durumu tümör olarak adlandırılmış olup; yalnızca kötü huylu tümörlere kanser denmiştir (Atici, 2007).

Tüm dünyada bilim ve teknolojiadaki gelişmelere karşın, günümüzün önemli sağlık sorunlarından biri olan kanser belirgin bir şekilde bireylerin yaşam tarzlarında, büyük değişimlere neden olmaktadır. Kanser büyük ekonomik sıkıntılara yol açan, kişinin işini devam ettirebilme veya sürdürebilmeyle ilgili kayıplara, duygusal zorlanmalara yol açmakta, yaşamında üstlendiği roller ve sorumluluklarda anlamlı ve önemli değişimler meydana getirmektedir. Bu değişim sürecinde hastalar zorlanmakta, yaşantılarına anlam vermeye çalışmakta ve yardım arayışı içine girmektedir (Holland, 2003).

Kanser, milyonlarca insan için ölüm nedeni olmasının yanında psikolojik bozuklukların ortaya çıkma olasılığının da yüksek olduğu bir hastalıktır. Kanser kronik bir hastalık olup hem hasta, hem de hastanın ailesi bu süreçten etkilenir. Kanser tanısı konan bir kişide en sık görülen tepki öfkedir. Temelde hastalığa karşı duyulan öfke doktorlara, sağlık personeline ve yakınlarla yansıtılmaktadır. Bir diğer sık görülen tepki ise suçluluk duygusudur. Kişi, bu hastalığı hak etmek için ne gibi bir hata yapmış olduğunu sorgulamaya başlar. Hastalığı, bir cezalandırma gibi görebilir (Ulutin, 2006).

Tüm kanserler, DNA dizisindeki birtakım anormalliklerle oluşmaktadır. Kanserlerin %10- 15’nin, kalıtsal olduğu yani ebeveynlerden gelen genlerle aktarıldığı, geriye kalan %85-90’ lık kısmını ise yaşam boyunca canlı hücrelerdeki DNA’nın, mutajenlere maruz kalması, hücre DNA’sındaki hafif progressif değişiklikler ve replikasyonda hatalar oluşması ile şekillendiği düşünülmektedir. Bazen oluşan bu mutasyonlardan biri, içinde bulunduğu hücrenin büyümesini ve bu hücreden türeyen bir kanser klonunun oluşmasını sağlar. Çevresel olarak maruz kaldığımız birçok kimyasal madde, kansere sebep olmaktadır. İlaçlar ve yağlı yiyecekler, bazı küfler (alfatoksinler), iyottan fakir diyet, kırmızı etten zengin diyetler, yanmış yağları içeren besinler de kansere sebep olan önemli çevresel faktörlerdendir. Sigara, alkol, hardal gazı, benzen, kömür tozu ve zifti, madeni

yağlar, naftalin ve asbestos da diğer kimyasal kanser yapıcı etkenlerdir (Yokuş ve Çakır, 2012).

2.3. Kanserde Hücre Ölüm Tipleri

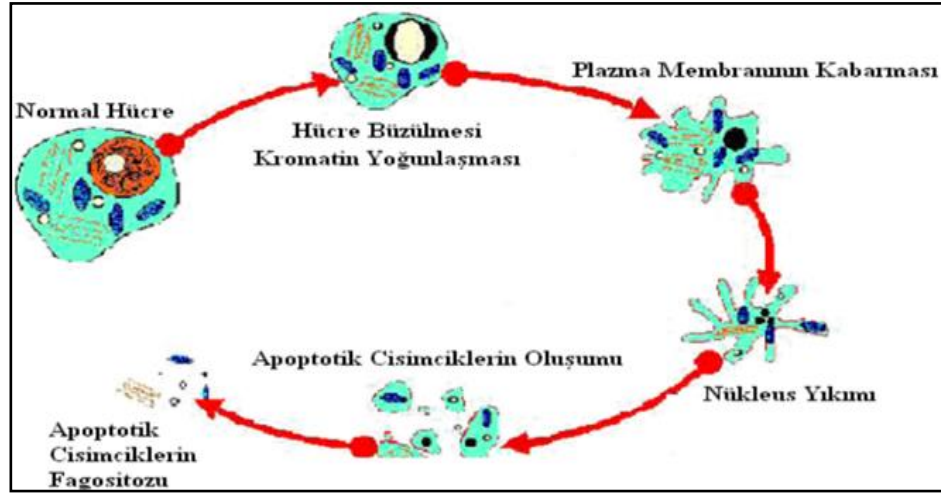
Hücre ölümü, hücrede oluşan aşırı hasarın bir sonucudur. Bu durum belirli sinyal yollarının aktifleşmesiyle gerçekleşir. Genellikle ölen hücrenin görünümü ile tanımlanan üç tip hücre ölümü vardır: Apoptozis (tip I), otofajik hücre ölümü (tip II) ve nekroz (tip III) (Galluzzi ve ark., 2007).

2.3.1. Apoptozis

Apoptozis birçok gen ile ilişkili aktif bir sistem olup, Yunancada apo (ayrı) ve ptosis (düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuş sonbaharda yaprak dökümünü tanımlayan bir kelimedir (Özvaran, 2004).

Apoptoz; fonksiyonları bozulmuş hücrelerin veya gereksinim duyulmayan hücrelerin çevresine zarar vermeden programlı olarak ölümleridir. Tek hücreli organizmalarda hücre ölümü yalnızca apoptoz ile gerçekleşirken gelişmiş organizmalarda, hücreler arası ilişkide ve doku homeostazının kontrolünde oldukça önemli bir rol oynar ve apoptoz direnci onkogenезin çok önemli bir basamağını oluşturur (Altunkaynak ve Özbek, 2008).

Bir hücre apoptoza giderken morfolojik bir seri değişikliğe uğrar. Apoptotik hücrede, nekrozun aksine en çarpıcı değişiklik çekirdekte meydana gelir. Hücre küçülür, yüzeyinde blebler (sitoplazmik çıkıntılar) meydana gelir. Sitoplazmada yoğunlaşma, hücre dansitesinde artma ve çekirdek membranına yakın bölgelerden başlayarak kromatinde yoğunlaşma görülür. Daha sonra tüm nükleus kondanse olur ve DNA'nın fragmentasyonu meydana gelir (Şekil 2.2) (McConkey, 1998).



Şekil 2.2: Apoptozis’de morfolojik değişiklikler (McConkey, 1998).

Apoptozun ileri safhasında, kaspaz adı verilen sistein proteaz ailesine ait bir grup enzimin aktivasyonu gerçekleşir (Verma ve ark., 2014). Bunlar merkezlerinde sistein yer aldığı için sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimdir. Hücrede zimojen (inaktif) olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. Hücrede düşük konsantrasyonlarda monomer halinde bulunurlar (Barreyro ve ark., 2015). Şu ana kadar 15 tanesi tanımlanmış olup farklı isimlerle de adlandırılmaktadırlar. 12 tanesi insanda tespit edilmiştir. Kaspaz-15 yeni belirlenmiş bir enzim olup, sadece plesantali memelilerden domuz ve köpekte tanımlanmıştır. İnsanda ve sıçanda bu enzim bulunmamaktadır (Denault ve Salvesen, 2002). Kaspazlar başlatıcı kaspazlar, efektör kaspazlar ve inflamatuvar kaspazlar olmak üzere 3’e ayrılırlar:

Başlatıcı kaspazlar (apoptozisi başlatanlar): Kaspaz 2, 8, 9, 10’ nu içermektedir,

Efektör kaspazlar (apoptozisi yürütenler): Kaspaz 3, 6, 7’ yi içermektedir,

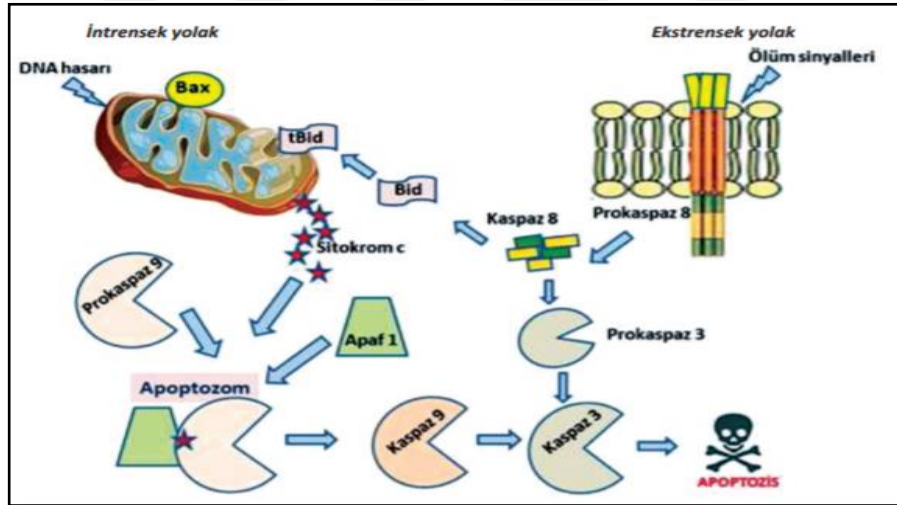
İnflamatuvar kaspazlar ise: Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14’ ü içermektedir (Roulston ve ark., 1999; Behnia ve ark., 2000).

2.3.1.1. Apoptoz Mekanizması

Programlı hücre ölümünün moleküler mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte hücrelerin genetik olarak belleklerinde var olan intihar programının çeşitli sinyallerle, patofizyolojik koşullarla ve oksidatif stres gibi olaylarla aktive olmasıyla başlamaktadır (Hampton ve Orrenius, 1998).

Apoptoz, oksidatif stres dahil olmak üzere çeşitli sinyaller ve patofizyolojik koşullar tarafından tetiklenebilen özel bir hücre ölümü şeklidir. Sistein proteazlarının kaspaz ailesinin üyelerinin aktivasyonu, apoptotik ölüm programında çok önemli bir olaydır. Kaspazlar, sistein proteazları olarak hücrenin redoks durumuna duyarlıdır ve aktiviteleri aşırı oksidatif stres tarafından bloke edilir. Bu nedenle hücre içi redoks durumundaki değişiklikler, oksidatif stresin ciddiyetine bağlı olarak apoptotik ölüm programını tetikleyebilir veya bloke edebilir (Hampton ve Orrenius, 1998).

Bugüne kadar yapılan araştırmalar dışsal (ölüm reseptör) yol ve içsel (mitokondriyal) yol olmak üzere iki ana apoptotik yol olduğunu göstermektedir. İki yolun birbirine bağlı olduğuna ve bir yoldaki moleküllerin diğerini etkileyebileceğine dair çalışmalar mevcuttur. Apoptoz, bu iki temel mekanizma tarafından aktifleştirilmektedir. Dışsal yol ölüm reseptörlerine ölüm ligandlarının bağlanması ile aktifleşirken, içsel yol ise hücre içi sinyaller ile aktifleşir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Apototik yollar (Favaloro ve ark., 2012).

Bu yolların her ikisi de bir seri kaspazı aktive ederek anahtar hücre proteinleri hedeflemekte ve bu hücreleri parçalamaktadırlar (Favaloro ve ark., 2012; Koff ve ark., 2015).

Dışsal apoptotik yol; aktive edilmiş T hücreler, doğal öldürücü (NK) hücreler ve makrofajların hedef hücrenin zarındaki ölüm reseptörlerine bağlanması ile başlatılır. Fas ve tümör nekroz faktör (TNF) reseptörü integral proteinlerdir. Komplementer ölüm aktivatörleri olan Fas ligandı (Fas-L) ve tümör nekroz faktör alfa'nın (TNF- α) reseptöre

bağlanması ile prokaspaz-8 kaspaz-8'e dönüşür. Böylece kaspaz-8 sırasıyla efektör kaspazların (3,6,7) aktivasyonunu başlatmış olur (Choo ve ark., 2019).

İçsel sinyal yolağında, mitokondriden sitoplazmaya sitokrom-c molekülü salınmakta ve apoptotik proteaz aktive eden faktör-1, deoksiadenozin trifosfat ve kaspaz-9 ile oligomerize olarak kaspaz-9'u aktive etmektedir. Bu yolların bozulması birçok hastalığın patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu hastalıklardan biri de kanserdir. Kanserde hücre proliferasyonu ile hücre ölümü arasındaki denge bozulmaktadır ve hücreler apoptozu gerçekleştirecek ölüm sinyallerini alamamaktadırlar. Bu durum apoptotik yolların herhangi bir adımında problem meydana getirebilmektedir (Bildik ve Bayar, 2018).

2.3.1.2. Apoptoz Kontrolü

Apoptozun düzenlenmesinde kalsiyum, seramid, Bcl-2, p53 ve kaspazlar gibi moleküller ile beraber mitokondride yer alır (Hengartner, 2000). Apoptozu düzenlemede en önemli role sahip olan Bcl-2 gen ailesidir. Bu grupta tanımlanan yaklaşık 25 genden bir kısmı pro-apoptotik yani apoptozu ilerleten ölüm aktivatörleri olarak görev yaparken bir kısmı ise antiapoptotik yani apoptozu engelleyen yaşam aktivatörleri olarak çalışırlar. Pro-apoptotik proteinler Bax, Bad, Bak, Bid, BclXs, Bim, Noxa ve Puma'dır. Bunlar mitokondriden sitokrom-c ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) salınımını artırarak apoptozu indüklerler. Anti-apoptotik proteinler ise Bcl-2, Bcl-Xl ve Mcl-1'dir. Bunlar özellikle hücredeki kalsiyum oranını kontrol ederler. AIF ve sitokrom-c salınımını bloke ederek apoptozu önlerler. Bcl-2 ekspresyon düzeyi apoptozu belirleyen faktörlerden birisidir. Hücreye apoptoz kararı verdiren Bax ve Bcl-2 dengesidir (Suzuki ve ark., 2000).

Apoptoz oranı ile hastalığın prognozu ve malignite düzeyi arasındaki ilişki tartışma konusu olmuştur (Zhivotovsky ve Orrenius, 2006). Bununla birlikte şu ana kadar yapılan çalışmalarda genellikle apoptoz oranındaki artış ile tümör büyümesi arasında ters orantı olduğu düşünülmüş, bu nedenle apoptozdaki artışın hastalığın prognozunu daha iyiye götürdüğüne inanılmıştır (Widlak ve Garrard, 2009).

Bir hücre apoptozu gideceğinde o hücredeki Bax/Bcl-2 oranı önem kazanır. Şöyleki, hücrede bax oranı fazla olduğunda hücre apoptozu giderken; Bcl-2 geni fazla ise apoptoz inhibe olur (Sakinah ve ark., 2007).

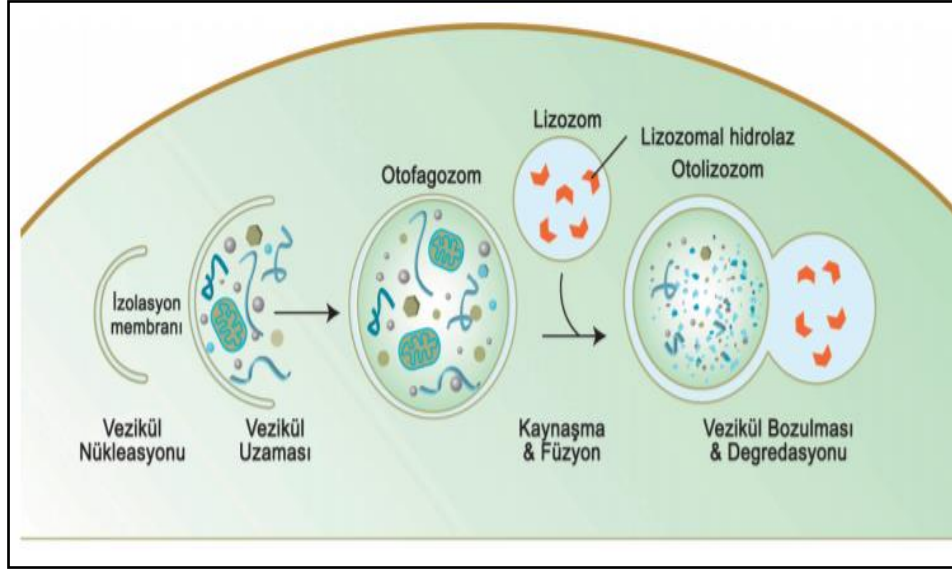
İyi bilinen bir tümör baskılayıcı olan p53, insan kanserlerinde sıklıkla mutasyona ya da delesyona uğramış durumdadır. Değişik hücrese streslere yanıtta p53 aktive edilir ve transkripsiyon faktörü olarak davranıp geniş çapta hedef genleri aktive eder. Bu şekilde Bax ve Bak gibi pro-apoptotik proteinlerin aktive edilmesi ile mitokondriyal ölüm yolu uyarılmış olur (Matt ve Hofmann, 2016) .

Hücrede p53 proteini DNA'yı bağlar ve p21 proteinini stimüle eder. p21, G1 fazında siklin bağımlı kinazları inhibe eder. Artmış p53 proteini, p21'in transkripsiyonunu arttırarak aktive edebilir veya p21, p53'den bağımsız olarak aktif olabilir. P53 geninde mutasyon olur ise bu protein DNA'ya uygun şekilde bağlanmaz ve dolayısı ile p21 üretiminde aksaklık olduğu için hücrenin çoğalması için durdurma sinyali oluşmaz. Dolayısı ile hücreler kontrolsüz şekilde çoğalmaya devam eder (D'Arcy, 2019).

2.3.2. Otofajik Hücre Ölümü

Tip II hücre ölümü olarak tanımlanmış olup bu hücre ölüm tipindeki en büyük morfolojik değişiklik mitokondri ve endoplazmik retikulum (ER) gibi organeller ve sitoplazmanın bir kısmının çift veya çok membranlı veziküller içine alınmasıdır. Bu veziküller lizozomlarla kaynaşırlar ve aynı hücrenin lizozomal enzimleri tarafından degradasyonu yapılır. Bu işlem Yunanca'da 'self-eating' anlamına gelen 'kendi kendini yeme' terimi olan otofaji olarak adlandırılmaktadır. Hücrenin açlıkla karşı karşıya kaldığı koşullarda besin ve enerji elde etmek için hücre içindeki yapıları parçaladığını ifade etmek için kullanılmıştır (Zheng ve ark., 2019).

Otofajinin; mikrootofaji, makrootofaji ve şaperon aracılı otofaji olmak üzere 3 farklı tipi vardır. Bunların tamamı sitozolik içeriklerin lizozomda proteolitik olarak parçalanmasını teşvik eder (Şekil 2.5).



Şekil 2.4: Otofajın şematik gösterimi (Karadağ, 2016).

Makrootofajide sitoplazmik kargo, otolizozomu oluşturmak için lizozom ile birleşen otofagozom olarak adlandırılan çift kat membran ile çevrili bir vezikül aracılığıyla lizozoma aktarılır. Bunun aksine mikrootofajide sitozolik içerikler lizozomal membranın invaginasyonu aracılığıyla lizozomun kendisi tarafından doğrudan alınır. Şaperon aracılı otofajide ise şaperon 10 proteinleri (Hsc-70 gibi), hedef proteinler ile kompleks bir şekilde lizozomal membrandan ayrılarak parçalanır. Makro ve mikrootofajide büyük yapılar seçici ve seçici olmayan mekanizmalar aracılığıyla kuşatılabilir (Glick ve ark., 2010).

2.3.3. Nekroz

Nekroz, genler tarafından kontrolü sağlanamayan bir hücre ölüm şeklidir. En yaygın nedeni hipoksi olmakla beraber, arsenik, siyanid, insektisitler gibi toksik maddeler ve ağır metaller, çeşitli fiziksel ve kimyasal olaylar nekroza neden olmaktadır. Nekroz sırasında sitoplazmik organeller özellikle mitokondri parçalanır veya hasarlanır. Hücre membranı seçici geçirgen özelliğini kaybeder, hücre şişer ve parçalanır (D'Arcy, 2019).

Hücre içeriği ise dış dokulara yayılarak inflamasyona neden olur. Nekroz sırasında mitokondriyal reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi artar, nonapoptotik proteazlar aktive olur, ATP üretimi azalır ve kalsiyum kanalları açılır (Nicotera ve Melino, 2004).

Apoptosis fizyolojik bir süreç olmasını karşın nekroz ise patolojik bir hücre ölüm şeklidir. Bu ikisinin temel farklılıkları Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

Tablo 2.1: Apoptoz ve nekrozun kıyaslanması (Coşkun ve Özgür, 2011).

ÖZELLİK	APOPTOZ	NEKROZ
Yol Açan Nedenler	Büyüme faktörü eksikliği	İskemi
	Hücre yaşlanması	Hipertermi
	HIV	Hipoksi
	Kanser ilaçları	Litik viral enfeksiyon
	Radyasyon	Toksik maddeler
	Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu	Ağır metaller
	Sitotoksik T lenfositler	Şiddetli oksidatif stress
Morfolojik Özellikleri	Hücre membranı sağlamdır	Hücre membranı bütünlüğü kaybolur
	Hücre küçülür	Hücre şişer
	Blebler oluşur	Büyük vakuoller oluşur
	Organeller sağlamdır	Organellerin parçalanır
	Apoptotik cisimcikler oluşur	Hücre lizisi gerçekleşir
	Erken evrede fosfatidil serin translokasyonu gözlenir	Fosfatidilserin translokasyonu yoktur
Biyokimyasal özellikleri	Programlıdır	İyon dengesi bozulur
	ATP gerektirir	ATP gerekmez
	DNA kırıkları merdiven şeklini alır (jel elektroforezinde ladder)	DNA rastgele parçalanır (jel elektroforezinde smear)
Diğer özellikleri	Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür	Hücreler gruplar halinde ölür
	Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir	Patolojik etkiler sonucu gerçekleşir
	Makrofajlar tarafından fagosite edilirler	Lizozomal enzimler salınır
	Enflamasyon görülmez	Enflamasyona neden olur

2.3.3.1. Nekroz Tipleri

- Koagülasyon nekrozu; en sık karşılaşılan nekroz türü olup her tür iskemik olayda gözlenir. Sitoplazma proteinleri koagülasyona uğrar, çekirdek kaybolur. Beyin hariç diğer tüm dokularda hipoksik ölümün karakteristiğidir.
- Likefaksiyon nekrozu (kolliküasyon nekrozu, erime nekrozu); dokunun enzimatik sindirimi ile gerçekleşir, en sık beyin dokusunda ve apselerde izlenir.
- Kazeöz nekroz; tüberküloz hastalığında ortaya çıkar, granülomların merkezinde eozinofilik heterojen hücre kitleleri birikir.
- Yağ nekrozu; hasarlı pankreas hücreleri ve makrofajlarda lipaz enzimi ile açığa çıkan yağ asitlerinin kalsiyumla birleşmesiyle oluşan beyaz tebeşirimsi bölgelerle karakterizedir.
- Gangrenöz nekroz; büyük ve derin yaralanmalarda dokuya implante olan bakterilerin etkisi ile oluşur.
- Fibrinoid nekroz; bağ dokusunda ve damarlarda gözlenir. Damar duvarında fibrin benzeri protein materyal birikimi izlenir (Coşkun ve Özgür, 2011).

2.4. Matriks Metalloproteinazlar

Matriksinler olarak da adlandırılan matriks metalloproteinazlar (MMP); ekstrasellüler matriks (ECM) ile bazal membran komponentlerini parçalama yeteneğine sahip olan ve aktif bölgesinde çinko içeren (Zn^{2+}), kalsiyum (Ca^{2+}), bağımlı homolog bir enzim ailesidir (Lattanzi ve ark., 2020). Günümüzde 28 farklı genin tüm insan MMP'lerini kodladığı saptanmıştır. 24 farklı çeşidi olmakla birlikte bunların 23'ü insanlarda doğuştan bulunmaktadır (Maskos, 2005).

MMP enzimleri genellikle 6 alt gruba ayrılırlar (Quintero-Fabián ve ark., 2019).

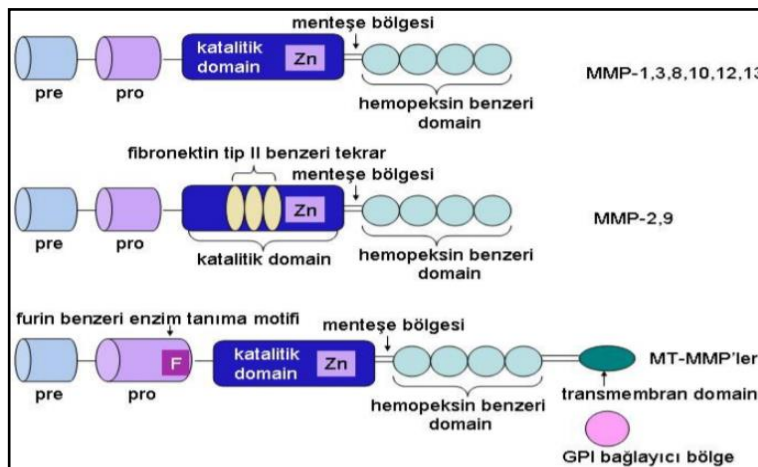
- Kollejenazlar: MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18
- Jelatinazlar: MMP-2, MMP-9

- Stromelisinler: MMP-3, MMP-10, MMP-11
- Matrilisinler: MMP-7, MMP-26
- Membran tip MMP'ler: MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25
- Diğerleri: MMP-12, MMP-19, MMP-20 (enamelysin, enamelin), MMP-23, MMP-27, MMP-28.

MMP-2 ve MMP-9 yapı ve substrat bakımından benzer olmalarına rağmen, gen transkripsiyon seviyeleri birbirinden tamamen farklıdır. Genellikle MMP-2, endotelial hücreler ve makrofajları içeren geniş bir hücre tipi tarafından üretilir (Scheau ve ark., 2019). MMP-9 ekspresyonu, büyüme faktörleri, kemokinler ve diğer uyarıcı sinyallerin kontrolü altında yüksek oranda teşvik edilir (Björklund ve Koivunen, 2005). MMP-9 normalde nötrofiller ve eozinofiller tarafından salgılanır. Bununla birlikte, inflamatuvar uyarı sonucu endotelial, alveolar ve diğer bağ doku hücreleri ile makrofajlar ve fibroblastlar MMP-9 salgırlar. Birçok malignan hücrede MMP-2 ve MMP-9 birlikte üretilir (Scheau ve ark., 2019).

2.4.1. Matriks Metalloproteinazların Moleküler Yapısı

Yapısal olarak incelendiğinde MMP'ler 5 ana kısımdan oluşur (Şekil 2.5) (Hidalgo ve Eckhardt, 2001).



Şekil 2.5: MMP enzimlerinin moleköl yapısı (Reel, 2006).

Bu kısımlar;

- ✓ Predomain (Sinyal peptit)
- ✓ Prodomain (Propeptit)
- ✓ Katalitik domain
- ✓ Hemopeksin benzeri bölge
- ✓ Transmembran bölge şeklinde sıralanabilir.

Predomain (Sinyal peptit): MMP'lerin tümü tipik olarak N terminalinde enzimin lider dizilimi olan pre-domain içerirler (Mook ve ark., 2004). 80-90 aminoasit içeren aminoterminal propeptiddir. Bu lider dizilim enzimin salgılanması sonrası kaybolur. Latent enzimde bulunmayan sinyal peptid dizisidir. Sinyal peptit içeren bu kısım endoplazmik retikulumdan ilk sentezlenen proteindir (Öncel, 2012).

Prodomain (Propeptit): İkinci bölge olan prodomain enzimin latent formda kalmasından sorumludur ve enzim aktivasyonunu takiben kaybolur. Bu işlemi, katalitik Zn^{+2} iyonu bağlayan bölgeyle etkileşerek enzimin inaktif formda kalmasını sağlayarak yapar. Tüm MMP'lerde enzimin kalıcı formda kalmasından sorumludur ve enzimin aktive olması sonrasında ortamdan uzaklaştırılır. Prodomainin çıkarılması inaktif proenzimin aktif forma dönüşmesini sağlar (Nagase ve Woessner, 1999).

Katalitik domain: Bu bölge, MMP'lerin enzimatik aktivitesini ve stabilitesini korumak için katalitik Zn^{+2} atomu ve buna ek olarak yapısal Zn^{+2} atomu ve 1 ya da 3 tane Ca^{+2} atomu içerir (Öncel, 2012). 160 aminoasitten meydana gelir. Bu bölge stabilize ve enzimatik aktivitenin oluşması için gereklidir. MMP-7 ve MMP-26 dışındaki diğer MMP'ler C terminalinde hemopeksin/fibronektin benzeri bölge içerirler. Bu bölge aslında "hem" bağlayan bir peptiddir ve endojen doku inhibitörleri olan TIMP'lerin jelatinaz grubu MMP'lere (MMP-2, MMP-9) ve MMP-13'e bağlanması ile ilişkilidir (Visse ve Nagase, 2003).

Hemopeksin benzeri bölge: Katalitik bölge hemopeksin benzeri bölgeye bağlayan peptit prolinden zengin olup, menteşe bölgesi adını alır. MMP-7 ve MMP-26'da hemopeksin benzeri bölge ve menteşe bölgesi bulunmaz. Jelatinaz enzimleri katalitik bölümünde 3 adet fibronektin Tip II benzeri ilave bir bölge bulundurlar. Bu kısım jelatinazların

jelâtin ve kollajene yüksek afinite ile bağlanmalarını sağlar. Böylece proteolitik aktivitelerini arttırır ve elastolitik aktivite için de temeldir (Reel, 2006).

Transmembran bölge: Bu yapısal özelliklere ek olarak MT-MMP'ler MMP-11, MMP-23, MMP-28 pro-domain ile katalitik bölge arasında yer alan ve enzimin hücre içi furin benzeri proteazlar tarafından tanınmasını sağlayan "furin benzeri enzim tanıma motifi " içerirler. MT-MMP'ler salgılanma öncesi bu motifi tanıyan proteazlar ile aktive edilirler. Ayrıca MT-MMP'lerden bazıları (MT1-MMP, 21 MT2-MMP, MT3-MMP ve MT5-MMP) Şekil 2.6' da görüldüğü gibi C terminalinde transmembran domain içerirken bazıları da (MT4-MMP ve MT6-MMP) glikozil fosfatidilinositol (GPI) bağlayıcı bölge içerir (Reel, 2006).

2.4.2. Kanser ve Matriks Metalloproteinazlar

MMP düzeyi ve klinikopatolojik ilişki konusunda pek çok çalışma yapılmış ve bu çalışmalar sonucunda MMP düzeyi ve tümör grade agresifliği arasında MMP ekspresyonu ve aktivitesi ile rekürrens ve metastaz riski arasında bağlantı olduğu gösterilmiştir. MMP'ların kanser gelişimindeki rolü, ekstrasellüler matriks komponentleri üzerindeki yıkıcı etkisinden daha karmaşıktır. MMP'lar tümör progresyonunun, hücre büyümesi, anjiogenez, invazyon, apoptozis ve metastaz olmak üzere her basamağında rol almaktadırlar. Kanserin erken evrelerinde, insulin benzeri büyüme faktörleri gibi biyoaktif moleküllerin MMP'lar tarafından proteolitik olarak salınması sonucunda malign transformasyon gerçekleşmektedir (Folgueras ve ark., 2004).

2.5. İnflamasyon

İnflamasyon, bağışıklık sisteminin organizmayı korumak amacıyla, patojenlere, hasarlı hücrelere, toksik bileşiklere, doku hasarına, fiziksel ve kimyasal ajanlara verdiği bir tepkidir. İnflamasyon, akut ve kronik olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Doku hasarı veya enfeksiyöz ajanlara karşı verilen ilk yanıt doğru süre ve şiddete sahip olursa hemostazi hızlı bir şekilde sağlanır (Wynn ve Vannella, 2016; Irimia ve Wang, 2018).

2.5.1. Akut İnflamasyon

Akut inflamasyon doğal bağışıklık sisteminin aktivasyonu ile ilişkilidir. Ayrıca adaptif bağışıklık sisteminin bileşenlerinden de yararlanmaktadır. Akut inflamasyon kendini sınırlayabilen bir süreçtir. Çünkü üretilen proinflamatuvar sitokinlerin yerini anti-inflamatuvar sitokinler almaktadır. Akut inflamasyon ile enfeksiyöz ajanlar veya doku hasarı ortadan kaldırılmazsa inflamatuvar süreç yeni bir karakteristik özellik kazanır. Akut inflamasyon hızlı başlayan ve kısa süren ödem ve lökositlerden zengin doku infiltrasyonudur. Akut inflamasyonda ilgili ajan uzaklaştırılınca olay sona ererken yanıtın yeterli olmadığı durumlarda kronik faza ilerleyebilir (Ferrero-Miliani ve ark., 2007).

2.5.2. Kronik İnflamasyon

Kronik inflamasyon, uzun süreli bir enfeksiyona, kan damarlarında proliferasyona, doku nekrozuna ve fibroze neden olabilir. Lenfosit ve makrofajların birikimine göre belirlenebilen uzun bir süreçtir. Kronik inflamasyon akut inflamasyondan sonra gelişebildiği gibi inflamatuvar yanıt başlangıçtan itibaren kronik olabilir (Furman ve ark., 2019). Kanseri, tip 2 diyabet, kronik böbrek hastalığı, AIDS, astım, kardiyovasküler hastalıklar ve alzheimer gibi birçok kronik hastalığın gelişiminde ve ilerlemesinde kritik rol oynamaktadır. Kronik inflamasyonda makrofajlar, lenfositler ve plazma hücreleri rol almaktadır (Chung ve ark., 2019).

Kronik inflamasyon esnasında nötrofiller, makrofajlar, monositler, lenfositler, fibroblastlar gibi hücrelerden salgılanan reaktif oksijen radikalleri (hidrojen peroksit vs.), reaktif azot bileşikler (nitrik oksit), diğer reaktif bileşikler ve matriks metalloproteinazları epitel hücrelerinde DNA hasarı ve mutasyonlara neden olabilirler. İnflamatuvar hücreler tarafından salgılanan sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri tümör hücrelerin bölünmesini, migrasyonunu, anjiyogenezi artırıp apoptozisi engelleyebilir (Yao ve Narumiya, 2019; Pahwa ve ark., 2020).

2.5.3. İnflamasyonda Sitokinlerin Rolü

Sitokinler, kimyasal haberciler veya bağışıklık sisteminin hormonları olarak bilinirler (Borovcanin ve ark., 2017). Sitokinler vücutta farklı hücreler tarafından sentezlenen çok yönlü fonksiyonel polipeptitlerdir. Haberci moleküller olarak işlev gören ve hücreler arası

iletişimden sorumlu olan sitokinler, bütün immün sistem hücrelerini aktive ederek uyarılmış lenfositler, monositler ve makrofajlar ile bazı somatik hücreler tarafından sentezlenirler (Yegin ve ark., 2013).

Sitokinler, immün efektör hücreleri ve tümör tarafındaki stromal hücreleri uyararak tümör hücrelerinin sitotoksik efektör hücrelerini uyarır. Sitokinler; akut ve kronik inflamasyonda inflamatuvar yanıtın yapısını, büyüklüğünü, süresini düzenlemede etkin rol oynayan moleküllerdir (Borovcanin ve ark., 2017).

2.5.4. Sitokinlerin Sınıflandırılması

Sitokinlerin sınıflandırılması çeşitli isimlendirme ve sınıflandırma sistemine göre yapılmıştır. Bu sınıflandırma sitokinler arasındaki fonksiyonel benzerliklere ve etki mekanizmalarına dayanmaktadır. Sitokinler başlıca şu ana gruplara ayrılmaktadır:

- Büyüme faktörleri (Epidermal büyüme faktörü, EGF; Platelet orijinli büyüme faktörü, PDGF; insülin benzeri büyüme faktörü-1, IGF-1; İnsülin benzeri büyüme faktörü-2, IGF-2; Sinir büyüme faktörü, NGF vb.)
- Lenfokinler (interlökin-1 α , IL-1 α ; II-1 β ; IL-2; IL-3; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-9; IL-10; IL-11; IL-12; IL-13; IL-14; IL-15)
- Koloni sitimle eden faktörler (Granülosit/makrofaj koloni sitimle eden faktör, GM-CSF; Granülosit-CSF; Multi-CSF; Eritropoietin, EPO; Lösemi inhibitör faktör, LIF)
- Transforme edici büyüme faktörleri (TGF- α ; TGF- β)
- Tümör nekroz faktörleri (TNF- α ; TNF- β)
- İnterferonlar (IFN- α ; IFN- β ; IFN- γ) (zbayer ve ark., 2018).

2.5.4.1. Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- α)

Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), T hücre aracılı doku hasarına neden olan inflamasyonda rol alan önemli bir sitokindir. TNF- α , esas olarak monosit ve makrofajlar tarafından üretilen, bazı durumlarda da T lenfosit, nötrofil, mast hücre, fibroblast ve endotel hücrelerinin de üretilmesinde etkili olan glikoprotein yapıda bir moleküldür. Doku hasarı ya da fiziksel stres sonrası kanda ilk saptanan sitokindir (Josephs ve ark., 2018).

TNF- α , çeşitli hücre tiplerinde bazı sinyal moleküllerini; fosfolipazlar, kinazlar, fosfatazlar gibi ikinci habercilerin oksijen radikallerini ve transkripsiyon faktörlerini aktive ederek, pek çok biyolojik ve patofizyolojik yolun önemli bir aracısı olarak işlev görmektedir. TNF- α 'nin *in vitro* koşullarada hücre çoğalmasını, morfolojik farklılaşmayı, sağ kalımı ve hücre ölümünü regüle edebildiği gösterilmiştir (Vandenabeele ve ark., 1995).

TNF- α , apoptozun yanı sıra hücre regülasyonu, proliferasyonu inflamasyon, bağışıklık, sepsis, şeker hastalığı, kanser, osteoporoz, multiple skleroz, romatoid artrit, inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve vasküler cevaplarda yüksek stimüle edici potansiyeli olan polipeptid yapıda bir sitokindir. İnsan hastalıklarının çok geniş bir spekturumunda temel aracı molekül olarak görev alır. TNF- α , birçok hücre tipi tarafından salgılanan ve kanserli hücrelerin yıkımını sağlayan bir sitokindir (Cruceiru ve ark., 2020).

Bu nedenle kanser hastalıklarının belirlenmesinde ve tedavisi amacıyla üzerinde oldukça yoğun çalışılan bir protein grubudur. Genel olarak TNF- α 'nın normal hücreler tarafından üretilmediği düşünülmektedir. Bu nedenle makrofaj ve monositlerin bakteriyel, viral ve parazitik organizmalar ve ürünleri karşısında lokal ve sistemik TNF- α cevap oluşturmalarının payı olduğu ispatlanmıştır (Ahmad ve ark., 2020).

2.5.4.2. İnterlökin 10 (IL-10)

IL-10, 18.000 dalton moleküler ağırlığında olan bir sitokindir. İmmün sistemin B hücreleri aktivasyonu sonrası T helper 2 hücreleri, T helper 1 hücreleri, monosit, keratinosit gibi hücreler tarafından salınır. IL-10, sitokin sentez inhibitör faktör olarak isimlendirilir. Aktive T lenfositlerden, natural killer hücrelerden, makrofajlardan sitokin sentezini inhibe eder ve interferon gamma inhibisyonu aracılığıyla T helper 1 proliferasyonunu engeller (Gao ve ark., 2009).

2.5.4.3. İnterlökin 12 (IL-12),

IL-12, proinflamatuvar bir sitokin olup aktive mononükleer fagositler ve dendritik hücrelerden salınır. İntrasellüler patojenlere karşı immün yanıtta etkilidir. T lenfosit ve doğal öldürücü NK hücrelerden IFN- γ salınımını artırır (Alkayyal ve ark., 2016). Önemli bir pro-inflamatuvar sitokin olan IL-12, 35 kDa (IL-12A) ve 40 kDa (IL-12B) olmak üzere iki disülfid bağlı alt birimden oluşur. IL-12, T yardımcı tip (Th1)/(Th2) sitokin dengesi üzerinde antagonistik bir etkiye sahiptir. Doğal olarak edinilmiş immün yanıtlar arasında işlevsel bir bağ sağlar (Zundler ve Neurath, 2015).

Antitümör bağışıklıkta önemli bir sitokin olan IFN- γ üretimi ile karakterizedir. IL-12 sadece hayvan modellerinde tümör hücrelerinin çoğalmasını inhibe etmekle kalmaz aynı zamanda bazı koşullarda virüs bulaşmış hücrelerin yok edilmesine neden olur. Bu nedenle, IL-12, virüs enfeksiyonu ve kanser gibi hücrel bağışıklığın önemli olduğu hastalıklar için büyük potansiyele sahiptir (Wei ve ark., 2014).

2.5.4.4. İnterferon Gama (IFN- γ)

IFN- γ , ana makrofaj aktive edici sitokindir. Aktive makrofajların fagosit ettikleri mikropları öldürmesini uyarır. IFN- γ aktive CD4⁺ veya CD8⁺ T hücreleri ve doğal öldürücü hücreler tarafından üretilen bir sitokin olup, adaptif bağışıklıkta oldukça önemlidir (Beatty ve Paterson, 2001).

IFN- γ 'nın virüslere veya hücreler arası patojenlere karşı savunmada ve immün sistemin çalışmasının ve gelişiminin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. (Deng ve ark., 2001).

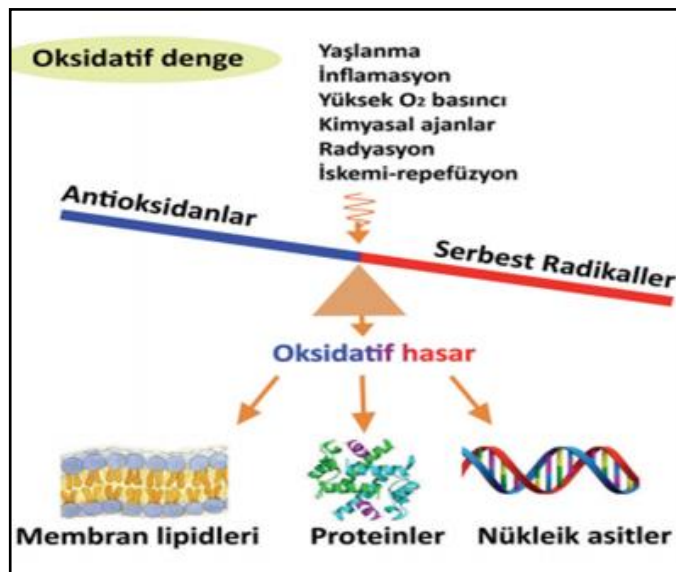
Endojen olarak üretilen IFN- γ , tümör oluşumunda önemli bir etkiye sahiptir ki bunu sadece tümörlere karşı koruyucu konak cevabı artırarak değil aynı zamanda tümörlerde immün saldırıdan kaçmayı kolaylaştıran cevapları düzenleyerek de yapar. Düşük seviyede IFN- γ üretimi, tümör gelişimini artırır; fakat yüksek seviyede IFN- γ üretimi, önemli antitümör etki göstermektedir (Mojic ve ark., 2018).

2.6. Reaktif Oksijen Türleri ve Kanser

İnsan vücudunda gerçekleşen bazı metabolik olaylar sonucunda serbest radikal denilen ürünler ortaya çıkmaktadır. Serbest radikaller, dış yörüngesinde eşleşmemiş elektron içeren reaktif bileşiklerdir. Diğer moleküllere elektron verebildiklerinden ya da onlardan elektron alabildiklerinden vücutta indirgeyici veya yükseltgeyici olarak davranırlar. Serbest radikaller oksijen ve nitrojen kaynaklı olabilirler. Bunlardan reaktif oksijen türleri (ROS) arasında süperoksit anyonu, hidroksil, peroksil, lipid peroksil ve alkoksil radikalleri sayılabilir. Reaktif nitrojen türlerini ise nitrik oksit ve nitrojen dioksit oluşturur. Serbest radikaller endojen ve eksojen kaynaklar tarafından meydana getirilir (Karabulut ve Gülay, 2016).

Canlıda serbest radikaller yoğunlukları arttığı durumlarda lipidler, proteinler ve nükleik asitler üzerinde yapısal bozukluklara neden olurlar ve bu özelliklerinden dolayı kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklar gibi kronik hastalıkların nedeni ve risk faktörü olarak görülmektedirler (Halliwell, 2006).

Buna karşın, organizmada serbest radikalleri ve verdiği zararları ortadan kaldırmak için çalışan antioksidan sistemler bulunmaktadır. Biyolojik sistemlerde serbest radikaller ile bunlara karşı süpürücü etkiye sahip antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması oksidatif stres olarak tanımlanır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri (Özcan ve ark., 2015).

Bu iki sistem normal fizyolojide dengeli bir şekilde çalışarak organizmanın zarar görmesini engellemektedir. Herhangi bir sebeple bu denge bozulur ve antioksidan sistem kapasitesi azalır ise oksidatif stres yükünün artması durumu gelişebilir. Bu şekilde ortaya çıkan oksidatif stres hücrelere zarar vererek çeşitli hastalıkların oluşmasına yol açmaktadır (Xiang ve ark., 2019).

Reaktif oksijen türleri oldukça yüksek reaktiviteye sahip moleküller olup başta mitokondriyum olmak üzere hücre organellerinde gerçekleşen normal metabolizmanın sonucu olarak veya iskemi-reperfüzyon, yaşlanma, radyasyon, yüksek oksijen basıncı, inflamasyon ve kimyasal ajanlara maruz kalma gibi sebeplere bağlı olarak üretilirler. Bozulan denge yüzünden vücutta artan serbest oksijen radikalleri ilk önce hücre zarında bulunan lipitlere saldırarak önce onların yapı ve fonksiyonlarını bozmakta ardından hücre içine girerek protein ve DNA'ya hasar vermektedirler (Liang ve ark., 2012).

2.7. Osteosarkom

Osteosarkom (OS) kemiğin en sık görülen birincil malign tümörüdür. Öncelikle çocukları ve gelişme çağındaki gençleri etkiler, bunun yanında genç erişkinlerde ve yaşlılarda da görülmektedir (Misaghi ve ark., 2018). İskelet büyüme süresinin kadınlara göre erkeklerde daha uzun olması nedeniyle osteosarkomun erkeklerde daha yaygın görüldüğü tespit edilmiştir (Rytting ve ark., 2000).

1970'lerden önce osteosarkom amputasyon ile tedavi edilmek zorunda kalınan, hayatta kalım süresi kısa olan ve hastaların %80'inin primer tümör yerine daha çok metastatik hastalık nedeniyle öldüğü bir hastalıktır. Cerrahi tekniklerdeki yeni buluşlar, indüksiyon ve adjuvan kemoterapi protokollerinin gelişmesi ve radyolojik evreleme çalışmalarındaki ilerlemelerle hastaların %90-95'i artık ekstremité koruyucu rezeksiyon ve rekonstrüksiyon ile tedavi görmekte ve bu hastaların uzun dönem yaşama şansı ve kür oranı, lokalize (metastaz olmayan) hastalıklarda, %60-80'lere kadar varan bir artış göstermektedir (Wittig ve ark., 2002).

2.7.1. Metastatik Hastalık

Osteosarkom en sık olarak akciğerlere metastaz yaptığı bilinen primer bir tümördür. Akciğer metastazına eğilimi olan bazı pediatrik tümörlerin tedavisinde tüm akciğere

radyoterapi uygulamasının faydalı olduğu gösterilmiştir. Bunun sonucu olarak da, 1970'lerin sonunda akciğer metastazı olan osteosarkomlarda ameliyat sonrası pulmoner profilaktik ışınlamanın yapıldığı rapor edilmiştir. Bu çalışmaların büyük bir kısmında, hastalar profilaktik pulmoner ışınlamadan tahmin edilenin aksine yeterince yarar görmemiştir (Whelan ve ark., 2002; Ando ve ark., 2013).

Bununla birlikte profilaktik akciğer ışınlamasında, solunum fonksiyonlarında değişiklik, artmış immün duyarlılık nedeni ile fırsatçı enfeksiyonların görülmesi gibi yan etkilerin meydana geldiği bilinmektedir. Bu bilgiler ışığında, osteosarkom için günümüzde profilaktik akciğer ışınlamasının net bir yararı olmadığı görülüp bu yöntemden uzaklaşmıştır (Ando ve ark., 2013).

Akciğer, meme ve prostat kanserleri, kemik metastazı yapma eğilimi en yüksek olan kanserlerdir ve ileri evre kanser olgularının üçte ikisinde kemik metastazı bulunur (Zhu ve ark., 2015).

Aksiyel iskelet metastazları appendiküler iskeletten daha sık ortaya çıkmaktadır. Bu durum aksiyel iskelettaki kemik iliği persistansı ile açıklanmaktadır. Kemik metastazları en sık omurga, kaburgalar, pelvis ve proksimal femura; daha az sıklıkla ise üst ekstremiteler ve kafa kemiklerine olur. Metastatik tutulum vertebrada %69 (sıklıkla anterior ve orta kolon), pelviste %41, femurda %25, üst ekstremitelerde %15, kraniyumda %14 olarak bildirilmiştir (Cirakli ve ark., 2016).

2.7.2. Sınıflandırılması

Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation–WHO) osteosarkomları dokusal özelliklerine göre çeşitli tiplere ayırmaktadır. Mikroskopik özelliklerine göre WHO osteosarkomları aşağıdaki şekilde sınıflandırmaktadır:

- Konvansiyonel osteosarkom (çok habis)
- Teleangiektatik osteosarkom (çok habis)
- Küçük hücreli osteosarkom (çok habis)
- Az habaset gösteren santral osteosarkom (düşük derecede kötü huylu)

- Sekonder osteosarkom (genelde çok habis)
- Paraossal osteosarkom (genelde az kötü huylu)
- Periostal osteosarkom (orta derecede habis)

En sık olanı konvansiyonel osteosarkomlardır. Tüm osteosarkomların %80 ile 90'ını oluşturan konvansiyonel osteosarkomlar WHO sınıflandırmasına göre alt gruplara da ayrılır. Diğer tüm osteosarkomlar nadiren görülür (her biri %5'ten daha az) (Klein ve Siegal, 2006).

2.7.3. Epidemiyoloji

İskelet büyümesinin hızlı olduğu ergenlik döneminde görülme sıklığı doruğa ulaşır. Dolayısıyla ergenlik öncesi osteosarkom olguları daha az beklenmektedir. Hastalar genelde erkek çocuklar olup uzun boyludurlar. Osteosarkom bimodal yaş dağılımı göstermektedir. Osteosarkom insidansı erkeklerde kadınlara göre daha sık görülmektedir (1.5/1 oranında). İnsidans siyah ırkta beyaz ırka göre daha yüksektir (Sadykova ve ark., 2020). İlk pik 10-14 yaş aralığında meydana gelirken ikinci pik 65 yaş üstünde meydana gelmektedir. İkinci pik genellikle Paget hastalığının sarkomatöz transformasyonu ile radyasyon, kemik infarktı ve bazı diğer benign kemik lezyonlarına sekonder gelişen sarkom olarak ortaya çıkmaktadır. Osteosarkom, bilateral retinoblastomlu hastalarda da gözlenmektedir. Onüçüncü kromozomdaki Rb genindeki (tümör supresör gen, resesif onkogen) delesyonlar ve yeniden gen düzenlenmeleri osteosarkoma yol açabilir (Simpson ve ark., 2017).

2.7.4. Etyoloji

Osteosarkomanın etiyolojisi ve risk faktörleri hala bilinmemektedir. Terapötik radyasyonun ve bazı kimyasalların osteosarkom ile ilişkisi bulunmuştur. Ayrıca Paget hastalığı olan kişilerde ve Li-Fraumeni sendromu, kalıtsal retinoblastoma ve Rothmund-Thomson Sendromu gibi kalıtsal birçok kanser yatkınlığı sendromunda daha sık görülür. Sporadik olarak ortaya çıkan sarkomlar için çok sayıda genetik anormallik tanımlanmıştır, ancak bunlar henüz herhangi bir nedene dayandırılmamıştır (Lokau ve ark., 2020).

2.7.5. Lokalizasyon

Genellikle uzun kemiklerin metafizyal büyüme plaklarına yakın lokalizasyondan köken almaktadır. Diyafizden köken alan tümörler yaygın değildir, epifizden köken alanlar ise oldukça nadirdir. Osteosarkoma herhangi kemikte gelişebilmekle birlikte, araştırma sonuçlarında en sık tutulan bölgeler femur (% 42, distal femurdaki tümörlerin % 75'i), tibia (% 19, proksimal tibiadaki tümörlerin % 80'i) ve humerusta (% 10'u proksimal humerustaki tümörler) olduğu rapor edilmiştir (Sadykova ve ark., 2020). Bu kemiklerde ergenlik döneminde artan büyüme hızını kolaylaştırmak için hücre bölünmesi hızlıdır (Gill ve ark., 2013).

2.7.6. Klinik Bulgu ve Semptomlar

Belirtiler ve şiddetleri hastadan hastaya değişebilir. Hastalarda yaygın olan belirtiler kemik ağrısı, tümörün bulunduğu bölgede şişme ve eklemlerin zayıflamış hareketidir. Eklemler sert veya düzgün hareket edemiyor olabilir veya topallama gelişebilir. Daha az yaygın ve nadir belirtiler yorgunluk, karıncalanma, kilo kaybı, yüksek sıcaklık veya ateş, gece terlemeleri ve nefes darlığını içerebilir. Bazı hastalarda ise kemiğin kırılmasıyla hastalık kendini belli eder. Bazı hastalarda kanser uzun bir süredir devam ediyor olsa da belirti görülmez (Widhe ve Widhe, 2000).

Klinik semptomlar arasında en sık artralji (%90), hareket kısıtlılığı (%45) kemikte şişlik (%50) ve patolojik kırık (%8) görülmekte ve bunun yanında biyokimyasal analizlerde ALP artışı da görülebilir ki (%50) bu da kemikte artmış yapım ve yıkımı gösterir. LDH'nın ilk başvuru anında yüksek olmasının ise relaps ile ilişkisi bulunmuş, dolayısıyla metastatik hastalarda da LDH seviyelerinin yüksekliği tespit edilmiştir (Hu ve ark., 2017).

Osteosarkom, hücre döngüsü mekanizmasındaki kalıtsal kusurlarla ilişkili olup, tümör örneklerinin yaklaşık %70'i kromozomal anormallik gösterir. Bu kromozomal anormallikler genellikle tümör baskılayıcı genlerdeki veya DNA helikazlarındaki mutasyonlardır. Fakat bir çok olgunun sporadik olarak da ortaya çıktığı bulunmuştur (Misaghi ve ark., 2018).

2.8. Kanser Tedavisi

Kanser tedavi yöntemlerinden biri olan kemoterapi, hastanın normal hücrelere zarar vermeden özellikle çoğalan hücrelere karşı seçici öldürücü etkileri olan, doğal veya sentetik kimyasal ve biyolojik ajanlarla yapılan tedavi şeklidir. Klinik çalışmalar ve preklinik çalışmalar bazı doğal ürünlerin kemoterapi ve radyoterapiye bağlı olumsuz yan etkileri azaltılabileceğini göstermektedir (Zhang, Q.-Y. ve ark., 2018).

İlaçlar kanserli hücrelerin gelişmesini ve çoğalmasını önlediği gibi normal (barsak ve ağız mukoza epiteliumu, kemik iliğinin hematopoietik hücreleri, kıl folikülü hücreleri vb) hücrelerin de gelişip çoğalmasını önlemektedir. Bu nedenle kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötikler tedavi etmenin yanında ağrı, yorgunluk, bulantı-kusma, iştahsızlık, ağızda yara, konstipasyon gibi semptomlara yol açmaktadır (Sadırlı ve Ünsar, 2009).

Kanserin tedavisinin yanı sıra, kansere neden olan etmenlerin bulunması, kanserin oluşmadan engellenmesi, sosyal ve psikolojik destekler ile hastanın ve hasta yakınlarının rahatlatılması kanseri son derece karmaşık ve büyük bir problem haline getirmektedir. Tüm bu sorunları çözmek adına onkoloji tıbbın farklı dallarını birlikte kullanır. Kanser tedavisinde radyoterapi, kemoterapi, cerrahi, immünoterapi, hormon terapisi hedeflenmiş terapiler ve gen terapi gibi biyolojik terapiler tek başına veya birlikte kullanılabilirler. İnsan vücudunu etkilediği bilinen 100'den fazla kanser türü bulunmaktadır (Pavlopoulou ve ark., 2015; Baykara, 2016).

Kemoterapiye dayanan mevcut tedavi seçeneklerinden sentetik ilaçlar kanserde sınırlı terapötik başarı sunar; çünkü bunlar son derece toksik etkiye sahiptir, pahalıdır ve hücre sinyal yolağının işleyişini değiştirmektedir. Doğal bileşikler, özellikle fitokimyasallar, mineraller ve vitaminler kanser yükünü azaltmak için umut verici ve pragmatik bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır (Amara ve ark., 2008).

2.9. Bitki Özütlerinin Kanser Tedavisinde Kullanımı

En ölümcül hastalık türlerinden biri olan kanser, düzensiz hücre popülasyonu genişlemesini içeren geniş bir sendrom grubunu kapsar. Kanserli hücreler kontrol edilemeyen çoğalma yeteneğinde olan hücrelerdir. Sonuç olarak metastatik olma potansiyeline sahip bu hücreler malign hücre tümörlerini oluşturur. Kanser tedavisi

sırasında kemoterapi, radyoterapi ve kimyasal olarak türetilmiş ilaçlar kullanılmaktadır. Kemoterapi ile tedavi edilen hastalar çok fazla zorlanmaya maruz kalabilir ve bu da kişinin sağlığına daha fazla zarar verirebilir. Bu yüzden, kansere karşı alternatif tedavilerin ve terapilerin önemi artmaktadır. Çeşitli tümör tipleri üzerinde test edilen bitki kaynaklı bileşikler, daha ileri kanser tedavisi için stratejiler sağlayabilir (Lin ve ark., 2020).

Bitkiler gibi doğal kaynaklardan türetilen moleküller, çoğu insan hastalığının tedavisi için geleneksel ilaçların keşfinde baskın bir rol oynar ve bu nedenle modern tıbbın temelini oluşturur. Son otuz yılda kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik etkiler açısından çok sayıda bitki ekstraktı taranmıştır ve bu da bazı önemli ilaçların ortaya çıkmasını sağlamıştır. Ek olarak, bazı ekstraktların farklı kanser hücre çizgileri arasında veya kanser ve kanser olmayan hücre çizgileri arasında sitotoksik seçici olduğu bu ekstraktların farklı mekanizmalarla fakat temel olarak hücre çoğalmasını inhibe ederek etki ettiği gösterilmiştir (Hrubik ve ark., 2012).

Şifalı bitkiler, ikincil metabolitler olarak çeşitli biyo-organik molekülleri sentezler. Bu bileşikler terpenoidler, fenoller, fenolik asitler, flavonoidler ve alkaloidler gibi çeşitli kimyasal yapılara sahiptir. Bitkilerdeki fizyolojik işlevleri nedeniyle, bu kimyasal moleküller antibakteriyel, antioksidan, antikanser ve antiinflamatuvar aktiviteler gibi çeşitli biyolojik özelliklerle dikkat çekmektedirler (Ghazghazi ve ark., 2014; El-Meghawry ve ark., 2016). Son yıllarda, şifalı bitkilerden ekstre edilen polifenoller ve flavonoidler gibi fenolik bileşiklerin ilginç antioksidan ve antiproliferatif etkiler gösterdiği bildirilmektedir (Bouyahya ve ark., 2018).

Flavonoidler, farklı gen türleri ve enzimler ile etkileşime girerek kansere karşı korunmaya yönelik birçok molekülerin etki mekanizmasında önemli bir rol oynar. Kanserojen inaktivasyonu, antiproliferasyon, hücre döngüsü durdurma, apoptoz indüksiyonu, anjiyogenezin inhibisyonu, antioksidan etki ve çoklu ilaç direncinin tersine çevrilmesi veya bu mekanizmaların kombinasyonu şeklinde birçok etki mekanizması tanımlanmıştır (Chahar ve ark., 2011).

Kanser, transformasyon, apoptozis düzensizliği, proliferasyon, invazyon, anjiyogenez ve metastazı içeren hiperproliferatif bir hastalıktır. Son 30 yıldaki kapsamlı araştırmalar,

kanserin biyolojisi hakkında çok şey ortaya çıkarmıştır. Çoğu kanseri tedavi etmek için kullanılan ilaçlar belirli hücre sinyal yollarını baskılamaktadır. Bu sinyal yolları şunlardır:

- ✓ Büyüme faktörü sinyal yolağı (Epidermal büyüme faktörü),
- ✓ Prostaglandin üretimi (COX-2),
- ✓ Enflamasyon (Enflamatuvar sitokinler: NF-kB, TNF, IL-1, IL-6, kemokinler),
- ✓ İlaç direnci gen ürünleri (Çoklu ilaç direnci),
- ✓ Hücre döngüsü proteinleri (Siklin D1 ve Siklin E),
- ✓ Anjiyogenez (Vasküler endotelyal büyüme faktörü),
- ✓ İnvazyon (Matriks metaloproteinazlar),
- ✓ Antiapoptoz (Bcl-2, Bcl-xl, XIAP, hayatta kalma, FLIP),
- ✓ Hücresel çoğalma (C-myc, AP-1, büyüme faktörleri) (Aggarwal ve ark., 2006).

Flavanon, kuersetin, kateşin, izoflavon, lignan, elajik asit, resveratrol, kırmızı şarap polifenolleri veya kurkumin gibi birçok polifenol, bazı kanser modellerinde farklı mekanizmalarla koruyucu etkiler göstermektedir (Brusselmans ve ark., 2005). Hücre çoğalmasının durdurulması ve hücre farklılaşmasının teşvik edilmesi, kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan bir tedavi stratejisidir. Fenolik bileşiklerin antioksidan özelliklerinin yanı sıra hücre çoğalmasını engelleyici etkisi de vardır. Hücre çoğalmasında teşvik edici görevi olan NF-kB ile ilgili yolağı durdurucu etkileri olan fenolik bileşikler vardır. Resveratrol, kurkumin ve epigallokateşin-3-gallat, apigen, kuersetin, kemferol gibi birçok fenolik bileşik, hücre çoğalmasını teşvik eden sinyalleri durdurur (Min ve Kwon, 2014).

Yapılan bir çalışma, kudret narından izole edilen BG-4 peptidinin ve özütün HCT-116 ve HT-29 kolon kanseri hücrelerinde Bcl-2 ekspresyonunu azaltıp, Bax ve kaspaz-3 ekspresyonlarını ise arttırarak apoptozu indüklediğini ortaya koymuştur (Dia ve Krishnan, 2016).

Yapılan başka bir çalışmada, Pepino bitki özütünün prostat (PC3, DU1445), mide (MKN45), karaciğer (QGY-7721, SK-HEP1), meme (MDA-MB-435), yumurtalık (OVCAR), kolon (HT29) ve akciğer (NCI-H209) kanser hücre hatlarında sitotoksik etki gösterdiği ve farelerde mide tümörünü küçültücü etki sergilediği rapor edilmiştir (Ren ve Tang, 1999).

Bir diğer çalışmada ise *Origanum compactum* bitkisinin etil asetat ekstraktının meme kanser (MCF-7) hücreleri üzerinde antikanser aktivite göstermiştir (Chaouki ve ark., 2010).

2.10. *Myrtus Communis* L. (Mersin bitkisi)

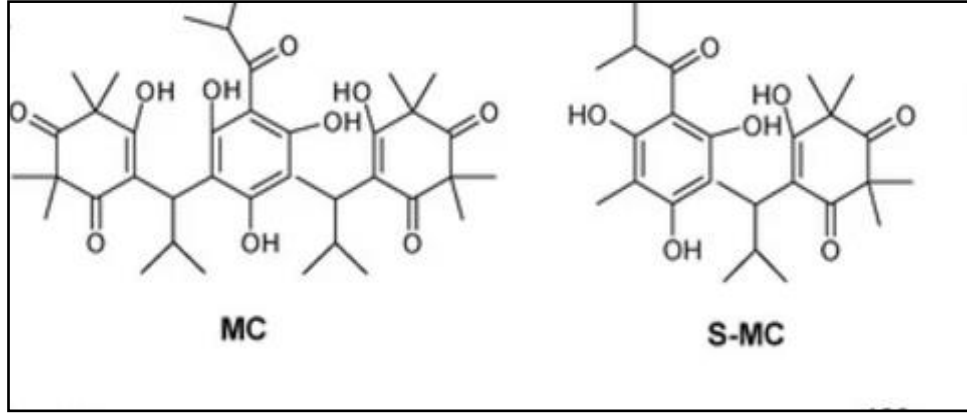
Latincesi *Myrtus Communis* L. (*Myrtus Communis* Linnaeus) olan Mersin bitkisi Akdeniz maki topluluğunun en önemli tıbbi ve aromatik bitkilerinden birisi olan Myrtaceae familyasına aittir. Türkiye; Avrupa, Asya ve Afrika kıtaları arasında geçiş konumunda bulunması, çeşitli iklim tiplerine sahip olması ve ekoloji farklılıkları nedeniyle önemli bir biyoçeşitliliğe sahiptir (Oğur, 1994). Hoş kokulu beyaz çiçekleri Mayıs ve Ağustos ayları arasında görülen, yenilebilen mavi-siyah meyvelerinin yazın olgunlaştığı bir bitkidir. Bitkinin kökü dallanmış, koyu yeşil yaprakları parlak, tüysüz, sert, zıt şekilde, eşli ve helezonik şekilde oval ve mızraksı şekildedir. Bitki orta boyda, 2 cm çapında, kalın sarı arterlere ve ince pedinküllerinin aksiller beyaz çiçeklere sahiptir. Myrtaceae familyasında yer alan Mersin bitkisi, her dem yeşil, genellikle kısa boylu, bazen de 1–3 m ve çalı formunda çok yıllık bir bitkidir (Şekil 2.7) (Oğur, 2014).



Şekil 2.7: *Myrtus Communis* L.

Myrtus türleri, uçucu yağlar, antosiyanin pigmentleri, flavonoidler, yağ asitleri açısından çok zengindir (Bazzali ve ark., 2012; De Oliveira ve ark., 2012). *Myrtus Communis L.* bitkisinin kurutulmuş yaprakları, 1,8-sineol, linalool, linalil asetat, terpineol, terpinolen, tanenler ve flavonoid bileşiklerini içerir. Yaprak ve çiçekleri esansiyel yağları, fenolik asitleri, flavonoidleri ve tanenleri bulundurur (Shahbazian ve ark., 2018; Özcan ve ark., 2020). Meyveler tanen, antosiyanin (%0.2-54), yağ ve organik asitlerce (% 9-52) zengindir (Messaoud ve Boussaid, 2011).

Mersin yapraklarında, antioksidan olarak görev yapabilen ve antibakteriyel aktivitelere sahip olabilen eşsiz, prenil olmayan, asilfloroglukinoller olan mirtuomulon (MC) ve yarı mirtuomulon (S-MC) bulunur (Şekil 2.8) (Tretiakova ve ark., 2008).



Şekil 2.8: Mirtuomulon ve yarı mirtuomulon'in kimyasal yapısı(Tretiakova ve ark., 2008).

Çok yıllık bir bitki olan *M. Communis*'in dalları, yaprakları ve meyveleri gibi farklı kısımları uzun süreden beri halk arasında gıda ve baharat amaçlı kullanılmaktadır. Aynı zamanda *Myrtus Communis* dünyada geleneksel tıpta kullanılan şifalı bir bitkidir. Bu bitkinin farklı kısımları, çeşitli hastalıkların tedavisi için yaygın bir şekilde kullanılmıştır. *Myrtus Communis L.* *in vitro* ve *in vivo* çalışmalardaki verilere göre ilaç olarak geliştirmede kullanılma potansiyeline sahiptir. Bu bitkinin farklı kısımları, çeşitli hastalıkların tedavisi için yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Bu bitkinin geleneksel kullanımlarının çoğu bilimsel açıdan doğrulanmıştır (Alipour ve ark., 2014).

Ayrıca, son literatür incelendiğinde *Myrtus Communis*'in anti-inflamatuar, antinosiseptif, antioksidan, antiiskemik, nöroprotektif ve antimikrobiyal etkileri bildirilmiş olup yaprak ve çiçekleri esansiyel yağlar, tanenler, fenolik asitler ve flavonoidler bakımından zengindir (Cioć ve ark., 2018).

Son yıllarda çeşitli hastalıklarının tedavisinde uzun ve kanıtlanmış geçmişleri olan geleneksel ilaçların kullanımına vurgu yapılmaktadır. Bu bağlamda Mersin bitkisinin diğerlerinin yanı sıra mikrobiyal, kardiyovasküler, gastrointestinal, dermatolojik ve nörolojik hastalıkların tedavisinde alternatif olarak potansiyel rollerini ortaya çıkarmak için daha ileri çalışmalar yapılması önerilmektedir (Alipour ve ark., 2014).

2.11. *Myrtus Communis*'in Antikanser Özelliği

Myrtus Communis'in tıbbi amaçlı olarak çok farklı kullanım alanı vardır. Aynı zamanda geleneksel tıpta antikanser amaçlı kullanımı hakkında da bazı bilgiler mevcuttur (Sisay ve Gashaw, 2017).

Yapılan bir çalışmada Mersin bitkisinin farklı ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri üzerinde çalışılmış olup bitkiden elde edilen ekstraktların oksidatif stresle ilişkili hastalıkların tedavisinde etkili olabileceği bildirilmiştir (Ogur, 2014). Aynı çalışmada, farklı bitkilerin uçucu yağlarının farklı kanser hücre hatlarına etkileri test edilmiştir. *Myrtus Communis*'in farklı konsantasyonları meme ve prostat kanseri hücre hatları üzerinde uygulanmış ve belirli zaman inkubasyondan sonra hücre canlılığında yüksek düzeyde inhibisyona neden olduğu belirlenmiştir (Ogur, 2014).

Yapılan başka bir çalışmada ise Mersin bitkisinin sitotoksik ve antioksidan aktivitesi ölçülmüş; antioksidan aktivitesinin zayıf olduğu, ancak murin mastositoma P-815 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatlarındaki apoptozla ilişkili bir mekanizma aracılığıyla sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Harassi ve ark., 2019).

Yapılan çalışmaların çoğu, bu şifalı bitkinin yukarıda belirtilen etkilerini geleneksel iddialarını doğrulamaktadır. Uzun vadede bu bitkinin diğer farmakolojik aktivitelerini ortaya çıkarmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. *Myrtus Communis*'in tıbbi özellikleri ile ilgili farklı çalışmalar bulunmasına rağmen çeşitli ekstraktları, esansiyel yağ asitleri ve yağın içeriğinde bulunan diğer kimyasal bileşenlerle ilgili yapılan anti-kanser çalışmaları yeterli sayıda değildir. Bu alanda yapılacak çalışmalar doğal ve sitotoksik etkisi olmayan ilaç araştırmalarına ışık tutacaktır.

Bu gerekçe ile yapılması planlanan bu çalışmanın amacı, *Myrtus Communis L.* (Mersin bitkisi)'in birincil kemik tümörlerinin en malignant ve en yaygın görünen türü olan

osteosarkoma hücrelerinde apoptozdan ve metastazdan sorumlu moleküller ve genetik mekanizmalar üzerine etkisinin belirlenmesidir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

İnsan Saos-2 kemik kanser hücre hattı, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hücre Kültürü Laboratuvarından temin edilmiştir. Saos-2 hücreleri nemli ortamda, %5 CO₂ inkübatöründe 37°C'de çoğaltmıştır. Hücrelerle temas edecek her türlü çözücü/çözeltinin 37°C'de olmasına, santifürüj işlemlerinin (1500 rpm) 5 dakika süreyle yapılmasına önem verilmiştir. Hücrelerin üretilmesi ve öngörülen deneysel model ile ilgili uygulamaların yapılması için gerekli malzemeler ve analizler ile ilgili bilgilere bu bölümde ayrıntılı bir şekilde yer verilmiştir.

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Sarf Maddeler

10, 200, 1000, 5000 µL'lik mikropipet uçları (Axygen, İngiltere),

15 ve 50 mL'lik santrifüj tüpleri (Isolab, Almanya),

25 ve 75 cm²'lik hücre kültür flaskları (Corning, Amerika),

1,5 mL'lik santrifüj tüp (Eppendorf, Almanya),

5 ve 10 mL'lik steril enjektör (Adana, Türkiye),

5, 10 ve 25 mL'lik tek kullanımlık serolojik pipet (Costar, Sigma-Aldrich, Almanya),

96 kuyucuklu hücre kültür plakası (Bio Tek, İsviçre),

Petri Kutuları (Lamteki, Amerika),

Vakum Pompası (Vwr, Amerika),

Cam Pastör Pipeti (Isolab, Almanya),

Filtre (Sartorius Stedim, Almanya),

Kriyo tüp (2mL) (Biosigma, Amerika),

Parafilm (Pechiney, Fransa),

Thoma Lamı (Marienfeld, Almanya),

MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide %98, Sigma-Aldrich, Almanya),

Fosfat tampon (PBS, Pan Biotech, Almanya),

Dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich, Almanya),

Fetal Bovine Serum (FBS, Biowest, Amerika),

Penisilin-streptomisin Solüsyonu (Isolab, Almanya),

Glutamin Solüsyonu (Sigma-Aldrich, Amerika),

Medium (DMEM; Euro Clone, İtalya),

Trypan Blue Solüsyonu (Sigma-Aldrich, ABD),

Trypsin-EDTA Solüsyonu (Sigma, ABD),

Etil alkol (Sigma-Aldrich, ABD),

Triton X-100 (Sigma-Aldrich, ABD),

Protein miktar tayini kiti (Fluka 51254, ABD),

cDNA sentez kiti (Thermo Fisher Scientific, ABD),

RNA sentez kiti (Ribospin, Kore),

ELISA kiti (Invitrogen, Kanada),

TAS ve TOS analiz ticari kitleri (Rell Assay, Gaziantep, Türkiye).

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Inverted mikroskop (Olympus, ABD),

Real Time PCR Cihazı (Biorad, ABD),

Pleyt okuyucusu (Bio Tek, Epoch, ABD),

Işık Mikroskobu (Leica, Almanya),

Mini Çalkalayıcı (Biosan, Ukrayna),

Laminar flow kabini (JSCB-1200SB, Kore),

Masaüstü soğutmalı santrifüj (Hettich, Almanya),

Hücre kültürü santrifüj (Nüve, Türkiye),

No-frost buzdolabı (Arçelik, Türkiye),

CO₂ inkübatörü (Binder, ABD),

Su banyosu (Daihan Wsb-22, Kore),

Sıvı azot tankı (Taylor Wharton RS- Series, ABD),

Hassas terazi (Ohaus, ABD),

Şarjlı pipetör (Brand, Almanya),

Farklı hacimlerde otomatik mikropipetler (Proline Plus, Eppendorf, Japonya),

Çok kanallı otomatik mikropipet (Thermo, FinnPet, Kanada),

Vorteks (Heidolph, Almanya),

-152°C dondurucu (PHCbi MDF-1156-PE, Japonya).

3.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.1. Saos-2 Hücre Kültürü Mediumunun Hazırlanması

Hücrelerin çoğaltılması için kullanılacak olan komple medium (besiyeri) bir vakum pompası aracılığı ile filtreden (WVR, 0,22µm'lik pess membran filtre) geçirildi. Medium bileşenleri steril ortamda (flow kabinde) eklendi ve filtre edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Flow kabin içinde medium hazırlama işlemi

1 L medium hazırlamak için filtreye öncelikle;

Bir miktar (~100ml) DMEM eklendi, sonra;

- ✓ %10 (v/v) oranında ısı ile inaktive edilmiş fetal buzağı serumu (FBS; Fetal bovine serum)
- ✓ %1 (v/v) oranında penisilin streptomisin ve
- ✓ %1 (v/v) oranında (1 mM) glutamin eklendi.

İçeriğinde glutamin olan düşük glukoz konsantrasyonuna sahip DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium,) ile hacim 1L'ye tamamlandı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan besiyeri (medium) bileşenleri

BİLEŞEN	ORAN (%)	HACİM (ml)
DMEM	88	880
FBS	10	100
Penisilin/Sreptomisin	1	10
Glutamin	1	10
TOPLAM	100	1000

Flow kabin içinde hazırlanan filtre düzeneğine vakum pompasının hortumu takıldı. Vakum pompasının çalıştırılarak medium karışımı filtre edildi ve steril medium kabına toplandı. Hücrelerin çözündürülmesi ve pasajlanması amacıyla kullanılacak besiyeri, steril 1L'lik şişeye konularak, kullanım süresine kadar +4°C'ye kaldırıldı. Bu şekilde hazırladığımız medium hücre kültürü çalışmalarında kullanılmadan önce 37°C'deki su banyosunda 20-30 dakika ısıtıldı.

Çalışmada kullanılacak olan bitki ekstresi *Ars Arthro Biyoteknoloji A.Ş.* (Cyberplaza B Blok 7.Kat No: B702A Bilkent/Ankara) laboratuvarında hazırlanmıştır. Yaprak, dal, meyve ve çiçeklerindeki kimyasal içerik ile bunların taze ya da kurutulmuş formlarındaki maddelerde yine benzer biçimde özdeş değildir. Ekstraksiyon işlemi kurutulmuş ince dal ve yapraklar kullanılarak yapılmış olup işlem sırasında etil alkol, etilasetat ya da aseton gibi çözücüler kullanılmamıştır. Ekstraksiyon temiz oda koşullarında ve laboratuvarda gerçekleştirilmiştir.

Ekstraksiyon öncesi bitkiler elekten geçirilmiş, parazit ve mantar enfeksiyonlarına karşı koruma amacı ile yerleştirildikleri otoklavdan çıkarıldıktan sonra su ile kaynatılarak beklemeye alınmışlardır. Bu süreç sırasında ürüne özel geliştirilen özel bir kapalı vakumla/kaynatma sistemi ile ekstraksiyon hızlı, etkili ve steril olarak yapılmıştır. *Myrtus Communis* bitkisinin Mersin ilinde yetişen varyetesine ait 2g yaprak kısmı önce mekanik parçalayıcıda küçültüldükten sonra pH 4.5 olan distile su içerisinde 98°C'de 22 dakika bekletilmektedir. Bu şekilde hazırlanan çözelti soğumaya bırakılmakta ardından tampon çözelti olarak Na₂HPO₄ kullanılarak asitliği dengelenmektedir. Bitki ekstresinin içeriği aşağıda verilmiştir (Tablo 3.2).

Tablo 3.2: *Myrtus Communis* sulu ekstresinin içerik analiz sonuçları.

Etken madde	Miktar (ppb)
Gallik asit	246
Kateşin	27
Klorojenik asit	30
4-hidroksibenzoik asit	28
Protokateşik asit	3
Vanilik asit	5
p-kumarik asit	1
Ellagic asit	133
Kersetin	6
Naringenin	35
TOPLAM	514

3.2.2. Lizis Tamponu Hazırlama

Lizis tampon şu karışımdan hazırlandı;

- ✓ 500 mL dH₂O içerisine %1 triton-X-100(v/v),
- ✓ 50mM HEPES tampon pH 7.2, 10mM EDTA,
- ✓ 100mM NaH₂PO₄x2H₂O,
- ✓ %8 oranında (40mL) proteaz inhibitör kokteyli (Roche).

Lizis tamponunun hacmi dH₂O ile 500 mL'ye tamamlandı. İyice çalkalanarak homojen bir karışım oluşması sağlandı.

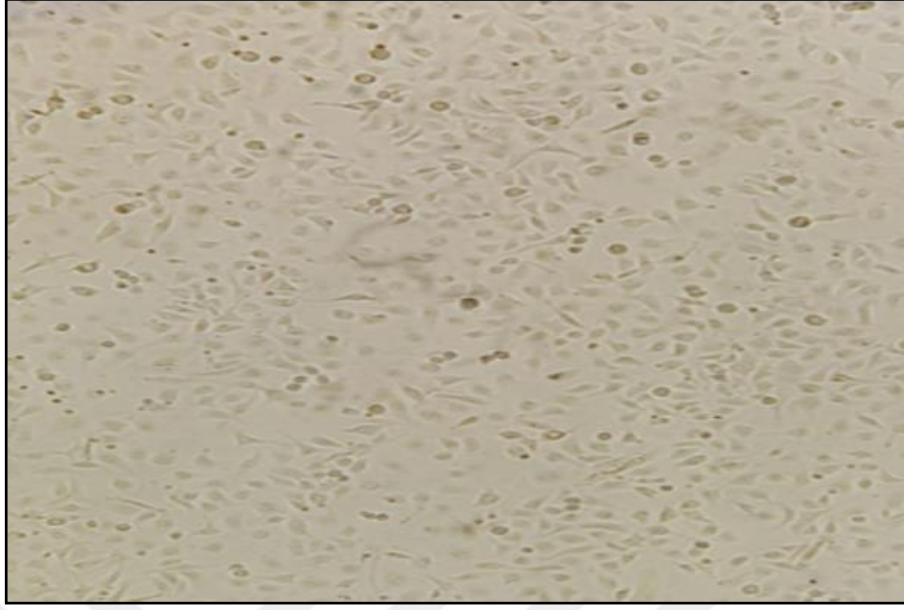
3.3. Hücrelerin Kültür Ortamında Çoğaltılması ve Deneylere Hazırlık

3.3.1. Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekilmesi

Ekimi yapılacak hücre sayısı 500-600 binden az ise ekim sonrasında flask fazla sallanmaz. Hücrelerin birbirine yakın olması adherent hücre kültüründe özellikle hücre sayısının az olduğu durumlarda, hücre bölünmesini pozitif yönde etkiler.

Yöntem:

- ✓ Sıvı azotta kriotüpler içinde dondurmuş halde saklanan hücreler öncelikle sıvı azottan 20°C'ye alındı ve 5-10 dakika beklendikten sonra 37°C'deki sıcak su banyosunda 3 dk süre ile ısıtılarak çözülmeye bırakıldı ve bu arada 15mL'lik bir falkona 1-1,5mL medium konuldu.
- ✓ Çözünen hücre falkon tüpe alındı, daha sonra kibarca pipetaj yapılarak hemen santrifüj (1500rpm, 5dk) edildi ve santrifüj sonunda falkon tabanında biriken hücrelere temas edilmeden medium pastör pipetle çekildi.
- ✓ Hücre peleti üzerine tekrar 2 mL medium eklenerek ve nazikçe pipetaj yapılarak ikinci kez yıkama işlemi yapıldı ve santrifüjden sonra hücrelerin üzerinde kalan medium tekrar çekilip atıldı.
- ✓ Bu şekilde yapılan 2 yıkama ile DMSO (dimetil sülfoksit)'dan arındırılan Saos-2 hücreleri flaska ekilmek üzere son defa 1 mL medium içinde çözüldü ve ekim için hazırlanan medium 25cm²'lik flaska 5 mL hacminde eklendi.
- ✓ 25cm²'lik flaska ekimi yapılan hücreler, üremesi için 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı.
- ✓ Günlük olarak takibi yapılan hücrelerin besiyeri, hücreler %80-90 konfluent oluncaya kadar (Şekil 3.2) 2 günde bir değiştirildi. 25cm²'lik flask istenen oranda konfluent olunca 75cm²'lik flaska pasajlandı.



Şekil 3.2: Saos-2 hücre hattının mikroskopik görüntüsü (10X).

3.3.2. Hücrelere Uygulanan Tripsinizasyon/Detripsinizasyon İşlemleri

Tripsinin bir proteaz enzim olduğu düşünülürse uzun süreli inkübasyonlar hücreye zarar vermeye başlar. Bu nedenle tripsinle inkübasyon süresinin 10 dakikayı geçmemesine özen gösterildi.

Yöntem:

- ✓ Flask tabanında %80-90 konfluent oranında bulunan hücrelerin üzerindeki medium steril pipet yardımıyla atıldı.
- ✓ Hücrelerin üzerine 1-1,5 mL tripsin EDTA eklendi ve 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılıp 5-8 dk inkübasyona bırakıldı.
- ✓ Flask tabanına yapışık haldeki hücrelerin bu süre inkübasyonda büyük oranda tabandan ayrıldığı gözlemlendi. Ayrılmayanların ise flaska hafifçe vurularak tabandan ayrılması sağlandı.
- ✓ Hücrelerin tamamı tabandan kaldırıldığında flaskın içine 3-5 mL medium eklendi. Böylelikle ortamdaki tripsin dilüe edilerek detripsinizasyona kadar hücrelere verebileceği zarar en aza indirildi.
- ✓ Flaskın içindeki tripsinize hücre-medium süspansiyonu steril bir falkona alınarak detripsinizasyon için santifürüj (1500 rpm, 5 dk) edildi.

- ✓ Süpernatant atılıp hücre pelleti üzerine 1 mL medium eklendi ve hafifçe pipetaj yapılarak hücreler tekrar ekim için hazır hale getirildi.

Bu şekilde hazırlanan hücreler, içerisinde 10 mL medium bulunan 75 cm²'lik flaska ekimi yapıldı. Flasklar 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyona bırakılan flasklar her gün takip edildi ve 2 günde bir mediumu 10 mL taze medium ile değiştirdi. %80-90 oranında konfluent olunca hücreler tekrar tripsinizasyon/detripsinizasyon işlemlerine tabi tutuldu. Bu şekilde tekrar ekilebilecek duruma getirilen ve bir 75cm²'lik flasktan elde edilmiş olan Saos-2 hücreleri isteğe bağlı olacak şekilde 1:4-1:10 arasındaki pasaj oranlarında (split ratio) yeni 75'lik flasklara ekildi.

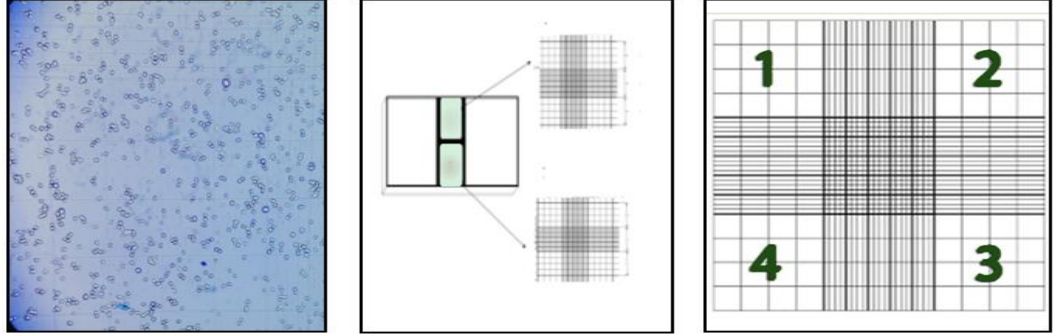
3.3.3. Hücre Çoğaltma (Pasajlama)

Pasajlama hücrelerin ürediği bir flasktan, başka bir flaska hücrelere zarar vermeden transfer edilmesidir. Pasajlama işleminde flask tabanına yapışık halde (konfluent) bulunan hücrelere önce tripsinizasyon, sonrasında ise detripsinizasyon (tripsinden arındırma) işlemi uygulandı. Hücreleri çoğaltmak amacıyla yaklaşık cm²'de 4x10⁴ hücre yoğunluğu olacak şekilde 75 cm²'lik flasklara 3x10⁶ hücre 10 mL besiyeri içeren kültür kabına (150-mm flask) konarak 2-3 gün süreyle inkübasyona bırakıldı.

3.3.4. Hücre Sayımı

Analizlerde kullanılmak amacıyla well plate veya flasklara hücre ekilirken, her bir flaska veya well plate aynı/yakın sayıda hücre ekilmesi esastır. Bu nedenle sunulan çalışmada yarı maksimum inhibitör konsantrasyonun (IC₅₀) dozları belirlenirken well platelere hücreler ekilmeden önce mL'de ne kadar hücre olduğu belirlenmiş, yani hücreler sayılmıştır. Bu amaçla tripan blue hücre sayım yöntemi (Louis ve Siegel, 2011) kullanılmıştır.

Tripan mavisi canlı hücrelerin ışık altında parlak görünmesini sağlayan bir boyadır. Sayım yapılacak lama uygulanan ve tripan mavisi ile boyanmış canlı hücreler mikroskop altında parlak görülürken, ölü hücreler mavi/mat olarak görülür. Sayım lamında her biri 16 kareden oluşan 4 sayım bölgesindeki (Şekil 3.3) hücreler sayılarak ortalamaları alınır ve hücre sayımı yapılmış olur.



Şekil 3.3: Hücre sayımında kullanılan hücre sayım lamı (Neubauer counting chamber) ve hücre sayımı yapılan hücreler.

Sonrasında ise formül kullanılarak medium-hücre süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısı hesaplanır. Sayımın güvenilirliği açısından dilüsyon miktarı önemlidir. Ortalama hücre sayısının 50-150 arasında olması hücre süspansiyonunun ideal dilüsyona tabi tutulduğunun bir göstergesidir. Şayet ortalama hücre sayısı çok yüksek çıkarsa hücre süspansiyonu azaltılarak ya da tripan mavisi hacmi artırılarak daha dilüe hücre süspansiyonu elde edilir ve sayım tekrarlanır (Hazman ve ark., 2021).

Bu durumda dilüsyon oranı da artacaktır. Hücre sayısının çok yoğun olduğu durumlarda 20 µL hücre süspansiyonu, 80 µL tripan mavisi (dilüsyon oranı 5) alınarak sayım yapılabilir. mL'deki hücre sayısını belirlemek amacıyla aşağıda sunulan formül kullanılmaktadır.

$$\text{mL'deki canlı hücre sayısı} = (\text{Ortalama Hücre Sayısı}) \times (10^4) \times (\text{Dilüsyon Faktörü})$$

Yöntem:

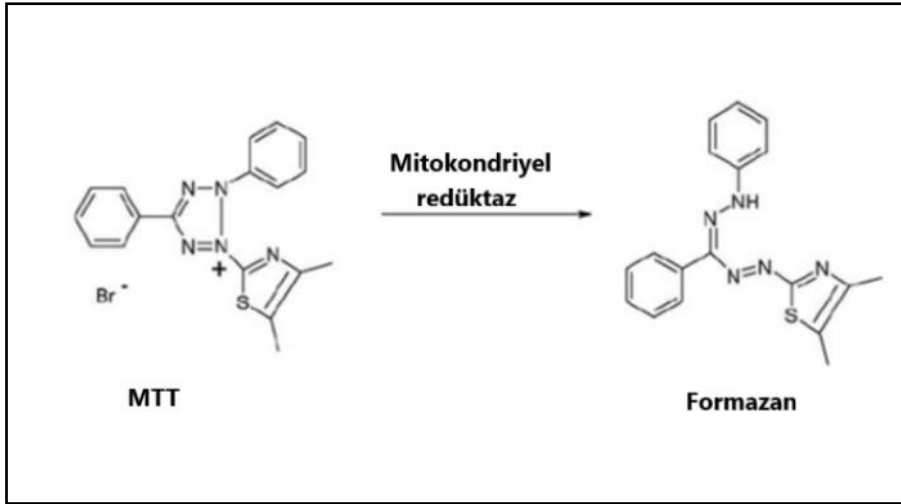
- ✓ Flask tabanından tripsinizasyon ile kaldırılıp detripsinizasyon ile tripsinden arındırılan hücreler yoğunluğuna göre 2-5 mL aralığında istenen hacimde çözülür.
- ✓ Hücre süspansiyonundan 100 µL alınarak, 100 µL tripan blue ile (dilüsyon oranı 2) karıştırıldı.
- ✓ Hücrelerin sayımında kullanılacak lam ve lamel (Neubauer counting chamber) hazırlandı ve hazırlanan tripan blue-hücre süspansiyonu karışımından pipetaj yapılarak, 20 µL alınarak neubauer lamına uygun şekilde konuldu.

- ✓ Sayım bölgelerinde sayılan hücrelerin ortalamaları alınarak hücre süspansiyonunun mL’inde kaç adet hücre olduğu formül yardımı ile bulundu.
- ✓ Sonrasında uygulamalarda kullanılacak hücre sayısına göre hücre süspansiyonundan kaç mL alınması gerektiği hesaplanarak, hücrelerle yapılacak işlemlere geçildi.

3.4. Hücre Canlılık Ölçüm Testi (MTT Yöntemi)

Sitotoksik etkiler, sitotoksitenin değerlendirilmesinde devamlı olarak kullanılan enzimatik testlerden biri olan MTT yöntemi ile belirlendi. MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) sarı renkli bir boyadır. Yöntemin işleyiş mekanizması sağlıklı hücrelerde mitokondriyal süksinik dehidrojenazın MTT tetrazolyum tuzunun formazan kristallerine dönüştürmesine dayanmaktadır (Şekil 3.4) (Michaelis ve ark., 2004).

Bu yöntemde, MTT canlı hücrelere aktif olarak absorbe olur ve reaksiyon mitokondriyal süksinat dehidrojenaz tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir (Şekil 3.5).

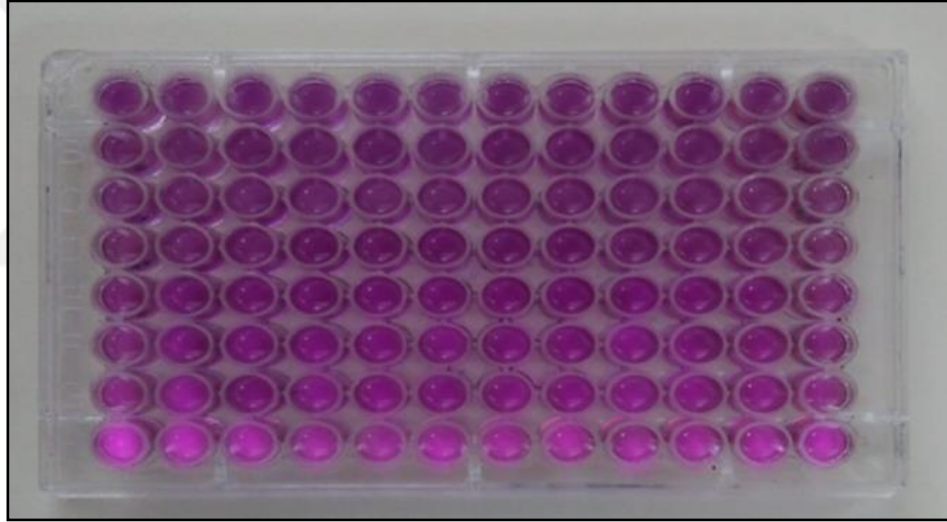


Şekil 3.4: MTT reaksiyonunda formazon kristallerinin oluşumu.

Dolayısı ile ölçülen absorbans değerleri canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Böylelikle elde edilen absorbans değerleri kullanılarak ve kontrol grubu ile kıyaslama yaparak vellerdeki hücrelerin canlılık oranları hesaplanabilir.

Yöntem:

- ✓ MTT analizleri 96 kuyucuklu well platelerde yapıldı.
- ✓ Her bir kuyucuğa 200µl medium içerisinde 2×10^4 sayıda hücre ekildi ve inkübatöre kaldırdı.
- ✓ En az %50 konfluent olan hücrelere bitki ekstraktları belirlenen dilüsyonlarda/konsantrasyonlarda uygulandı.
- ✓ 37°C’de 24 saatlik inkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 20 µL MTT çözeltisi (5mg/mL, PBS içerisinde) eklendi ve 37°C’de 2-4 saat inkübe edildi.
- ✓ Süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 200 µL DMSO eklendi ve 5 dakika inkübe edildi.



Şekil 3.5: Formazan kristallerinin DMSO ile çözüldükten sonraki görüntüsü.

Renk değişimi, ELISA plaka okuyucusunda 570 nm dalga boyunda belirlendi. *M. Communis* ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları basit orantı ile belirlendi. % canlılık belirlenirken aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{örneğin absorbans değeri} / \text{kontrolün absorbans değeri}) * 100$$

MTT uygulamaları sonucunda kontrol grubuna göre hücre canlılığını %50 oranında azaltan *Myrtus Communis* dozu IC₅₀ dozu olarak kabul edildi. Biyokimyasal ve moleküler analizler için *M. Communis* IC₅₀ dozu kullanıldı.

3.5. Biyokimyasal Analizler

Deney gruplarına yapılan uygulamalar sonrası elde edilen hücre lizatlarında gerçekleştirilen total protein, proinflatuvar stokin seviyelerin ve oksidatif stres düzeyleri analizinde kullanılan metodoloji özetlenerek bundan sonraki başlıklarda sunulmuştur.

3.5.1. Hücre Lizatı Hazırlama

Yöntem:

- ✓ İnkübasyonlar sonrasında hücrelerin tabana yapışmış olduğu flask zemininden kaldırmak için flasklara tripsin (1mL %0.25) eklenerek çok kısa süre sonra hafif vurma hareketleri ile hücreler kaldırıldı.
- ✓ Süspansiyonlar pipet aracılığı ile toplanarak kapaklı tüpler içerisinde 25°C, 400 xg devirde 5 dakika süreyle santrifüj edilerek pelet elde edildi.
- ✓ Hücre peleti PBS ile yıkandıktan sonra (tekrar santrifüj) üzerine hücre lizis tamponu eklendi.
- ✓ Lizis tamponu deney gruplarındaki her bir flasktan elde edilen hücre peletinin üzerine 500 µL hacminde eklendi, pipetaj yapıldı. Sonrasında 20 sn vorteks işlemine tabi tutuldu. 40 sn beklendi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.
- ✓ Vorteks işleminden sonra 12000xg, 4°C’de 10 dakika süre ile santrifüj edilerek çöktürme yapıldı.
- ✓ Bu şekilde elde edilen süpernatantlar hücre lizatı olarak biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere -20°C’de saklandı.

3.5.2. Total Protein Analizi

Hücre lizatında çalışılacak parametrelerin sonuçlarının hesaplanmasında kullanılan total protein seviyeleri ticari kit (Fluka 51254) ile ölçüldü. Çalışmada kullanılan kit Bradford metodunu esas almaktadır (Bradford, 1976). Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250, negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif

yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ve mavi formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Kit prosedürüne göre yapılan işlem sonunda uygun dalga boyunda pleyt okuyucuda (Bio Tek, Epoch) absorbanslar ölçüldü. Numunelere ait olan total protein seviyeleri biyokimyasal analizlerde elde edilen verilerin normalize edilmesinde kullanıldı. Bu şekilde her bir numuneye ait oksidatif stres parametreleri ve proinflatuvar stokinlerin düzeyleri, her bir numunenin kendi total protein düzeyine bölünerek ham veriler elde edildi.

Yöntem:

- ✓ Yapılan analizde total protein içeriği bilinmeyen 6 µL numune ve 32-4000 µg/mL konsantrasyonu aralığındaki (32 µg/mL, 63 µg/mL, 125µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL, 2000 µg/mL ve 4000 µg/mL) 8 standart 96'lık kuyucuklara eklendi.
- ✓ Multikanal pipetle 300 µL Coomassie brilliant blue reaktifi eklendi.
- ✓ 1dk oda sıcaklığında bekletildi
- ✓ Kuyucuklarda oluşan mavi renkli komplekslerin absorbansları 570 nm'de ölçüldü.
- ✓ Hesaplama sonrasında lizat protein düzeyleri mg/ml şeklinde ifade edildi. Sitokin (TNF-α, IL-10, IL-12, IFN-γ) Seviyelerinin Belirlenmesi

3.5.3. Sitokin (TNF-α, IL-10, IL-12, IFN-γ) Seviyelerinin Belirlenmesi

Myrtus Communis'in Saos-2 hücrelerinde inflamatuvar sürece etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla TNF-α, IL-10, IL-12 ve IFN-γ (Invitrogen) düzeyleri spesifik ELISA kitleri kullanılarak ölçüldü. Kitlerle birlikte verilen standartlar kullanılarak her bir analiz için ayrı bir kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Sonrasında oluşturulan kalibrasyon eğrileri kullanılarak hücre lizatlarındaki stokin seviyeleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar her bir numunenin total protein seviyelerine bölünerek normalize hale getirildi. Sitokin seviyeleri pg/mg-protein olarak ifade edildi.

3.5.4. Total Antioksidan Düzey (TAS) Analizi

Oksidatif stres parametresi olarak TAS seviyeleri spektrofotometrik yöntemle çalışan ticari kitler (Rell Assay, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. TAS seviyelerinin belirlenebilmesi amacıyla standart olarak 5-20 mmol aralığında Trolox kullanıldı. Bu amaçla 3 standart kullanılarak (5-10-20 mmol) ELISA okuyucudan alınan kalibrasyon grafiğine göre TAS düzeyleri belirlendi. Seviyeleri belirlenen serum TAS düzeyleri numunelerin total protein düzeylerine bölünerek mmol Trolox Equivalent/mg-protein şeklinde ifade edildi (Erel, 2004).

Bu yöntemde TAS düzeyi ölçülürken Fe^{2+} o-dianisidin kompleksi hidrojen peroksit ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak OH radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü indirgenerek düşük pH'da renksiz o-dianisidin molekülüyle reaksiyona girer ve kahverengi-sarı renkli dianisidil radikalleri oluşur. Dianisidil radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumunu artırır. Ancak örneklerdeki antioksidan bileşikler bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu azaltmaktadır. Bu düşüş spektrofotometrik olarak ölçülerek TAS sonuçları belirlendi.

Yöntem:

- ✓ 96 kuyucuklu plakada, kuyucuklara 250'şer μ L tampon solüsyonu eklendi.
- ✓ Kendi kuyucuklarına numune ve standartlardan 15'er μ L eklendi ve 660nm'de absorbanslar okundu. (İlk absorbans değerleri).
- ✓ Tüm kuyucuklarına substrat solüsyonundan 38 μ L eklendi ve 5dk 37°C'de bekletildi.
- ✓ Sonra yine 660 nm'de absorbanslar okundu. (İkinci absorbans değerleri). Absorbanslar formülde yerine konularak hesaplama yapıldı.

$$\Delta Ab_{\text{örnek}} = (Abs2 - Abs1)_{\text{örnek}}$$

$$\Delta Ab_{\text{standart}} = (Abs2 - Abs1)_{\text{standart}}$$

$$\Delta Ab_{\text{Sonuç}} (\mu\text{mol TroloxEqui/mg-prot}) = (\Delta Ab_{\text{H}_2\text{O}}) - (\Delta Ab_{\text{örnek}}) / (\Delta Ab_{\text{H}_2\text{O}}) - (\Delta Ab_{\text{standart}})$$

3.5.5. Total Oksidan Düzey (TOS) Analizi

Oksidatif stres parametresi olarak TOS seviyeleri spektrofotometrik yöntemle çalışan ticari kitler (Rell Assay, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. Bulunan TOS sonuçlarının birimi μM hidrojen peroksit equivalent litre ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L) olarak bulundu. Daha sonra elde edilen sonuçlar her bir numunenin kendi total protein düzeyine bölünerek hücrelerdeki TOS seviyeleri $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./mg protein şeklinde belirlendi (Erel, 2005). Bu yöntemde numunede bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidin kompleksini ferik iyonla oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarır. Ferrik iyonlar asidik ortamda “xylenol orange” ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla orantılı olarak oluşan rengin şiddeti otoanalizörde spektrofotometrik olarak ölçülerek TOS sonuçları elde edildi.

Yöntem:

- ✓ 96 kuyucuklu plakada, kuyucuklara 250’şer μl tampon solüsyonu eklendi.
- ✓ Kendi kuyucuklarına numune ve standartlardan 37,5’er μL eklendi ve 530nm’de absorbanslar okundu. (İlk absorbans değerleri).
- ✓ Tüm kuyucuklarına substrat solüsyonundan 12,5 μl eklendi ve 5dk 37°C’de bekletildi.
- ✓ Sonra yine 530 nm’de absorbanslar okundu. (İkinci absorbans değerleri). Absorbanslar formülde yerine konularak hesaplama yapıldı.

$$\Delta\text{Abs}_{\text{örnek}} = (\text{Abs2} - \text{Abs1})_{\text{örnek}}$$

$$\Delta\text{Abs}_{\text{standart}} = (\text{Abs2} - \text{Abs1})_{\text{standart}}$$

$$\Delta\text{Abs}_{\text{Sonuç}}(\mu\text{molH}_2\text{O}_2\text{Equiv./mg-prot})=(\Delta\text{Abs}_{\text{örnek}})/(\Delta\text{Abs}_{\text{Standart}})\times\text{Standart Konsantrasyonu}$$

3.5.6. Oksidatif Stres İndeksi (OSI) Seviyelerinin Belirlenmesi

Oksidatif stres İndeksi (OSI) bir ortamda oksidatif stresi ifade etmede tercih edilen bir parametredir. Bu nedenle oksidatif stresi etkileyen tüm oksidan ve antioksidanların etkilerinin hesaba katılarak hesaplanması esastır. Bu nedenlerle numunelerdeki antioksidanların genel bir ifadesi olarak belirlenen TAS seviyeleri ve numunelerdeki oksidanların genel bir ifadesi olarak belirlenen TOS seviyeleri dikkate alınarak OSI düzeyleri belirlendi. OSI düzeyleri kit protokolüne uygun olacak şekilde aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı (Esen ve ark., 2012).

$$\text{Oksidatif Stres İndeksi (OSI)} = [(TOS/TAS) \times 100]$$

3.6. Moleküler Analizler

3.6.1. RNA İzolasyonu

Reverz Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile yapılan gen ekspresyonu analizlerinde kullanılan total RNA, hazır ticari kit (Ribospin) kullanılarak izole edildi. RNA izolasyonu sırasında kullanılan bütün malzemeler RNAase free bir ortam oluşturabilmek adına uygun çözeltilerle (RNase Away) önceden temizlenerek hazır hale getirildi. Elde edilen RNA'ların miktarı nanodropta optik dansitelerinden hareketle ($OD_{260/280}$) belirlendi. $OD_{260/280}$ oranı 1.7-2,1 arasında olan RNA'lar çalışmada kullanıldı. *M. Communis*'in IC50 dozu ile muamele edildikten 24 saat sonra hücrelerde total RNA izolasyonu yapıldı. İşlemin basamakları aşağıdaki gibidir.

- Yaklaşık 5×10^6 sayıda hücre üzerine 400 μ L lizis tamponu konuldu ve kazıyıcı ile hücreler kaldırılıp steril ependorf tüplere konuldu.
- Vortekste 5sn karıştırıldı, daha sonra 5dk oda sıcaklığında bekletildi ve en son spin kolona konuldu.
- 10.000 xg 30sn +4⁰C'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra alt kısım atıldı ve kolon boş tüpe yerleştirildi.
- 500 μ L GWR1 tampon konuldu, daha sonra 10.000 xg 30sn +4⁰C'de santrifüj edildi. Alt kısım atıldı ve kolon tüpe yerleştirildi.

- 700 µL RNW tampon kolona konuldu, daha sonra 10.000 xg 30sn +4⁰C’de santrifüj edildi. Sonra 10.000 xg 1dk +4⁰C’de tekrar santrifüj edildi.
- Spin kolon 1,5 mL ependorfa konuldu, üzerine 50 µL RNAase içermeyen su eklendi ve 1dk oda sıcaklığında bekletildi, daha sonra 10.000 xg 1dk +4⁰C’de santrifüj edildi.
- En son toplama tüpü içinde saf total RNA örneği elde edildi. RNA örneklerinin konsantrasyonu Nanodrop spektrofotometre işlevi olan BioTek Epoch (ABD) cihazında Take 3 pleyt kullanılarak ölçüldü. Örnekler, cDNA sentezi yapılmaya kadar -80°C’de derin dondurucuda saklandı.

3.6.2. cDNA Sentezi

Hücrelerden izole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi için cDNA Sentez kiti (Thermo) kullanıldı. Bu doğrultuda, her bir örnek için Tablo 3.3’te belirtilen 11 µL son hacimdeki reaksiyon karışımı hazırlandı ve 42°C’de 60dk ve 70°C’de 5 dakika olmak üzere örnekler inkübasyona bırakıldı. Bu inkübasyon aşamaları 96 kuyucuklu termal döngü cihazı yardımıyla gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA örnekleri -20°C’de muhafaza edildi.

Tablo 3.3: cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon bileşenleri.

BİLEŞEN	MİKTAR
Total RNA	0,3 µg
Oligo (dT) ₁₈	1 µL
Reaction Buffer	4 µL
Ribolock RNase inhibitor	1 µL
dH ₂ O	RNA miktarına göre değişken
dNTP	2 µL
Rever Ait Revers Transkriptaz	1 µL
Toplam	11µL

3.6.3. Real Time RT-PCR Analizleri

Elde edilen her bir numuneye ait cDNA'dan 1 µl kullanılarak üzerine SYBR Green PCR Master Mix (10 µL) ve primer çifti (oligonükleotid) protokollere uygun miktarlarda eklendi. Primerler her bir transkripsiyon analizi için spesifik olup Tablo 3.4'te gösterilmiştir. RT-PCR reaksiyonunda 100 ng düzeyinde kullanıldı.

Tablo 3.4: Oligonükleotid primer dizileri ve RT-PCR programları.

GEN	PRİMER DİZİSİ (5' → 3')	PCR PROGRAMI	DÖNGÜ
β-Aktin	F- 5'CACCCCAGCCATGTACGTTGC'3 R-5'CCGGAGTCCATCACGATGCCA'3	95 ° 10dk/ 94°-10sn / 61 °-1 dk/ 72°-30sn	35
Kaspaz-3	F5'GGAAGCGAATCAATGGACTCTGGA'3 R-5'CCTGAGGTTTGCTGCATCGAC'3	95 ° 10dk/ 94°-1dk 58 °-1 dk/ 72°-1dk	40
Kaspaz-9	F-5'TACAGCTGTTTCACTCTAGTA'3 R-5'AAATATGTCCTGGGGTAT'3	95 ° 10dk/ 95°-30 sn 60°-1 dk/ 72°-1dk	40
Bcl-2	F-5'GACGGGCTACGAGTGGGATGC'3 R-5'GGAGGAGAAGATGCCCGGTGC'3	95 ° 10dk/ 95°-30 sn 59°-1 dk/ 72°-30sn	35
Bax	F-5'CGCCTCACTCACCATCTGGAA'3 R-5'CCTCAAGGTAGAGCTTGGGCA'3	95 ° 10dk/ 95°-1 dk /58° -1dk/ 72°-1 dk	40
P53	F-5'CGGAGGTCGTGAGACGCTG'3 R-5'CACATGTACTTGTAGTGGATGGTG'3	95 °10dk/ 95°-30 sn /58°-1 dk/ 72°-30sn	40
P21	F-5'CCGTGAGCGATGGAACCTTCGC'3 R-5'TGGGAAGGTAGAGCTTGGGCA'3	95 ° 10dk/ 95°-1 dk / 60° -1dk/ 72°-1 dk	40
MMP-9	F-5'GGCAGAGGAATACCTGTACCGCTA'3 R-5'GCAGGGACAGTTGCTTCTGGA'3	95°10dk/95°-30sn/ 55 -1dk/72°-1 dk	40
MMP-2	F-5'TGGATGATGCCTTTGCTTGTGC'3 R-5'AAGGGGTATCACTCGCCATGG'3	95 ° 10dk/ 95°-30sn/ 55° -1dk/ 72°-1 dk	40

Her bir tüpteki PCR reaksiyonu için aşağıdaki tabloda belirtilen pipetlemeler yapıldı (Tablo 3.5).

Tablo 3.5: RT-PCR deneyi için reaksiyon karışımı

MATERYAL	HACIM
SYBR Green Karışımı (2X)	10 µL
İleri Primer (10 µM)	1 µL
Geri Primer (10 µM)	1 µL
cDNA	1 µL
DEPC Water	7 µL
Toplam	20 µL

Hazırlanan reaksiyon karışımları, RT-PCR deneyi için özgül olan 96 kuyucuklu reaksiyon plakasına yüklendi. Denatürasyon, primer yapışması ve zincir uzatma olmak üzere üç basamaktan oluşan amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerlerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu (Pfaffl, 2001) ile hesaplandı ve mRNA ekspresyon düzeyi misli olarak azalma ya da artış şeklinde belirlendi. Hesaplamalar REST 2009 yazılımı kullanılarak yapıldı. Bu hesaplamada;

$$\Delta\Delta C_t = (C_{t\text{hedef gen}} - C_{t\text{beta actin}})_{\text{denek grubu}} - (C_{t\text{hedef gen}} - C_{t\text{beta actin}})_{\text{kontrol grubu}}$$

formülü kullanıldı.

Endojen kontrol olarak beta aktin geni kullanıldı ve her bir örneğe ait beta aktin gen düzeyine göre diğer genlerin ekspresyon düzeylerinde düzeltme (normalizasyon) uygulandı. PCR çalışmalarında her gruptan 6 örnek rastgele seçildi ve bunların 3 tekrarı yapılarak ortamları alındı. Bcl-2, Kaspaz 3, Kaspaz 9, p21, p53, Bax, MMP-2 ve MMP-9 mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemi ile analiz edildi.

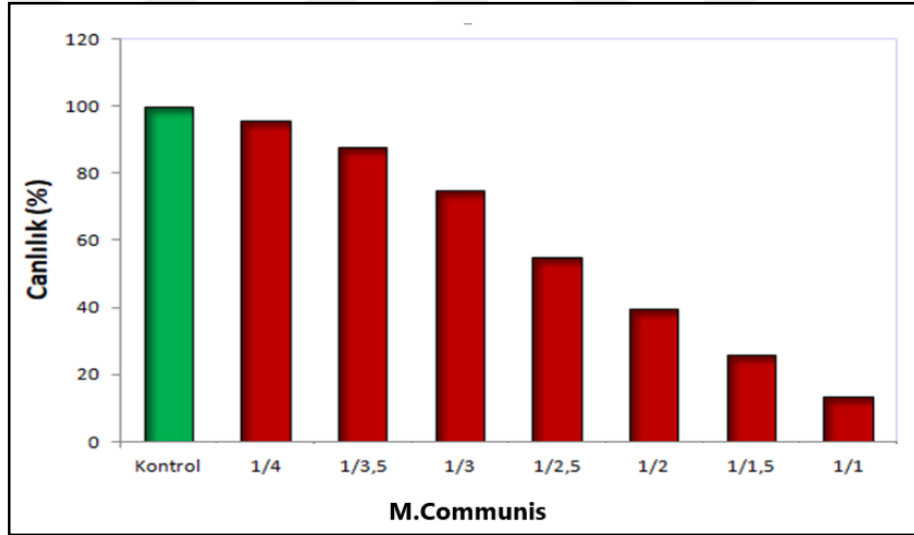
3.7. İstatistiksel Analizler

Araştırmadan elde edilen bulguların istatistiksel analizleri SPSS 22.0 (2011) paket programı ile gerçekleştirildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi kullanılarak yapıldı. Normal dağılım gösteren TOS analizinde gruplar arası farklılık student T testi, normal dağılım göstermeyen TNF- α , TNF- γ , IL-10, IL-12, TAS ve OSI analizlerinde ise gruplar arası farklılık Mann Whitney U testi ile belirlendi. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak sunuldu. Yapılan istatistiksel analizlerden elde edilen sonuçlardan $P<0.05$, $P<0.01$ ve $P<0.001$ olan değerler önemli kabul edildi (Conover, 1980).

4. BULGULAR

4.1. *Myrtus Communis*'in Saos-2 Hücrelerinde Sitotoksikite Etkisi

Myrtus Communis'in kemik kanseri (Saos-2) hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi MTT analizi ile belirlenmiştir. 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda *Myrtus Communis* özütleri ile muamele edilen Saos-2 hücrelerinde belirlenen hücre canlılığı yüzdelерinden hareketle IC₅₀ değeri hesaplandı. Hücrelerin %50'sını öldüren konsantrasyonun 1/1.28'lik dilüsyon olduğu tespit edildi. 1/1 ve 1/4'lük aralıkta yapılan dilüsyonlardan elde edilen hücre canlılığı sonuçlar Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1: *Myrtus Communis*'in çeşitli dilüsyonlarına göre elde edilen hücre canlılığı düzeyleri.

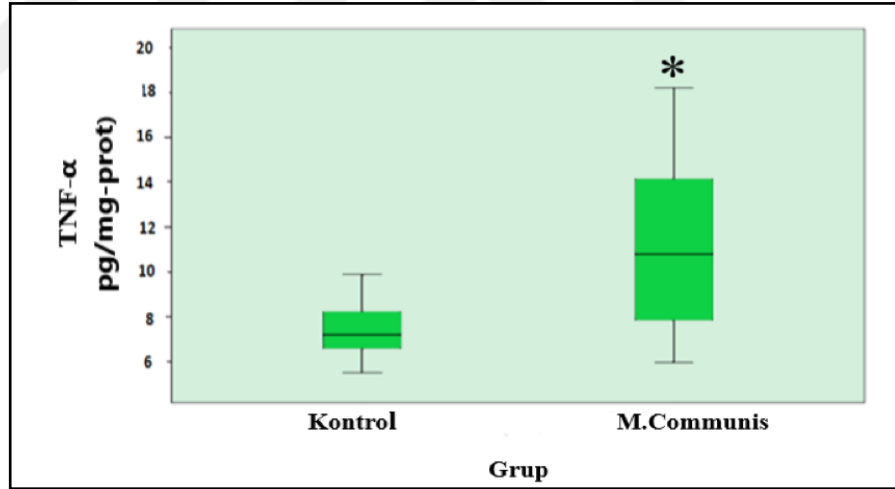
4.2. *Myrtus Communis* Saos-2 Hücrelerinde İnflamatuvar Belirteçlere Etkisi

Myrtus Communis'in Saos-2 hücrelerinde inflamasyona etkisinin belirlenebilmesi amacıyla proinflamatuvar stokinlerden (TNF- α , IL-10, IL-12, IFN- γ) bazılarının seviyeleri hücre lizatlarında analiz edildi. Yapılan analizler sonucunda deney gruplarına ait stokin düzeyleri arasında farklılıklar olduğu ve bu farklılıkların istatistiki düzeyde anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 4.2, 4.3, 4.4, 5.5 ve Tablo 4.2).

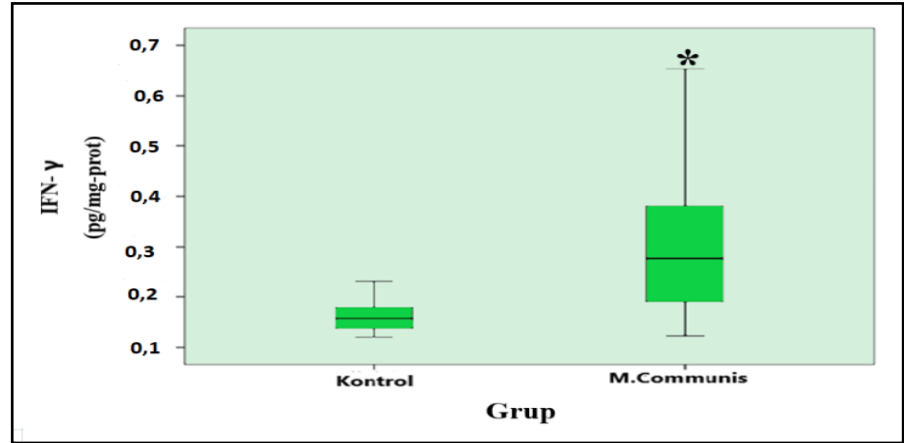
Tablo 4.1: Proinflatuvar stokin (TNF- α , IL-10, IL-12, IFN- γ) düzeyleri

Deney Grupları	TNF- α (pg/mg-prot)	IFN- γ (pg/mg-prot)	IL-12 (pg/mg-prot)	IL-10 (pg/mg-prot)
Kontrol	8,223 $\pm$ 2,692	0,162 $\pm$ 0,0298	0,079 $\pm$ 0,047	2,137 $\pm$ 1,220
<i>M. Communis</i>	11,164 $\pm$ 3,521	0,317 $\pm$ 0,161	0,172 $\pm$ 0,121	1,153 $\pm$ 1,238
P	0,000	0,000	0,000	0,000

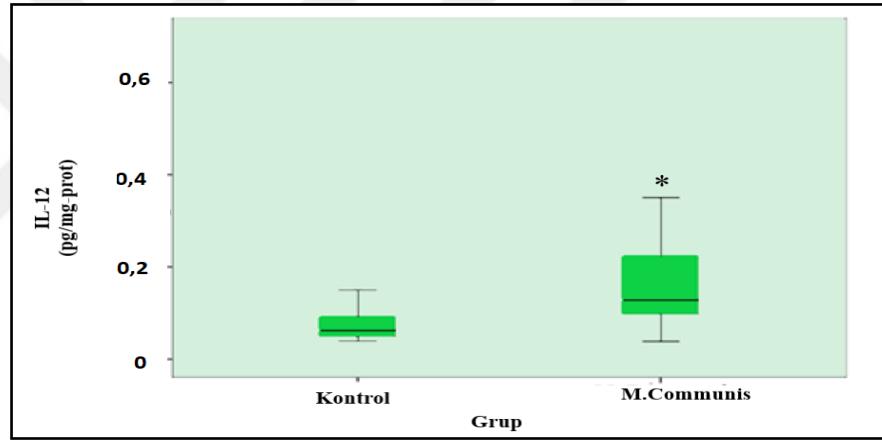
M. Communis grubunda kontrol grubuna göre TNF- α , IL-12 ve IFN- γ düzeyleri artarken IL-10 azalış göstermiştir olup bu farklıklar istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı bulunmuştur (p=0,000).



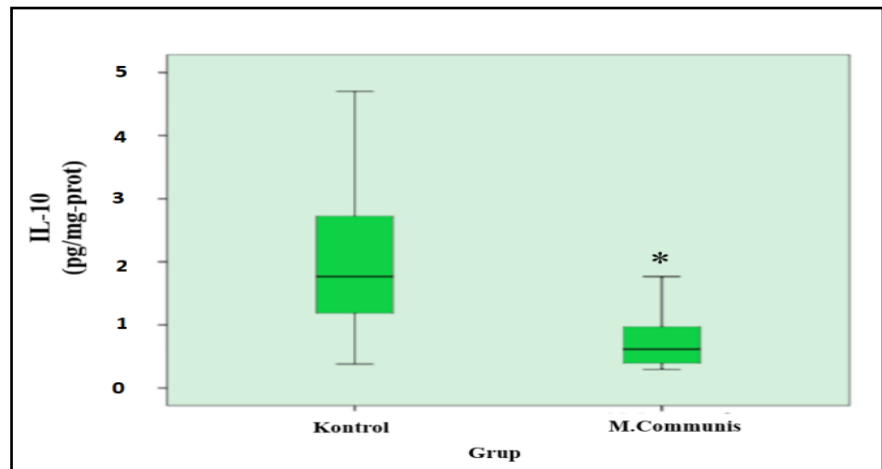
Şekil 4.2: Gruplara göre hücre lizatlarında ölçülen TNF- α düzeyleri (*p=0,000).



Şekil 4.3: Gruplara göre hücre lizatlarında ölçülen IFN- γ düzeyleri (*p=0,000).



Şekil 4.4: Gruplara göre hücre lizatlarında ölçülen IL-12 düzeyleri (*p=0,000).



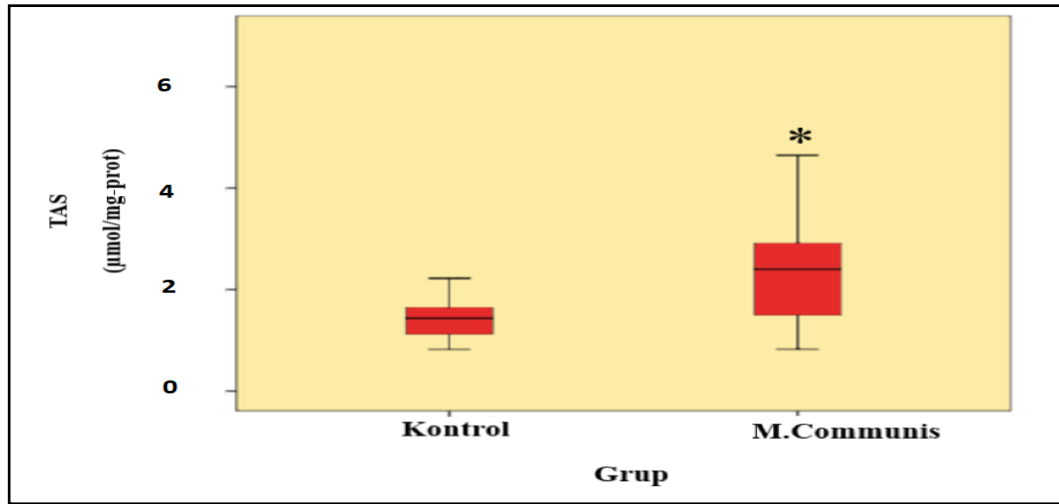
Şekil 4.5: Gruplara göre hücre lizatlarında ölçülen IL-10 düzeyleri (*p=0,000).

4.3. *Myrtus Communis*'in Saos-2 Hücrelerinde Oksidatif Strese Etkisi

Kontrol ve *M. Communis* gruplarında oksidatif stres düzeylerinin belirlenebilmesi amacıyla hücre lizatlarında ölçülen total antioksidan düzeyleri (TAS), total oksidan düzeyleri (TOS) ve bunlardan hareketle hesaplanan oksidatif stres indeksi (OSI) değerleri Şekil 4.6, 4.7, 4.8 ve Tablo 4.3'te verilmiştir.

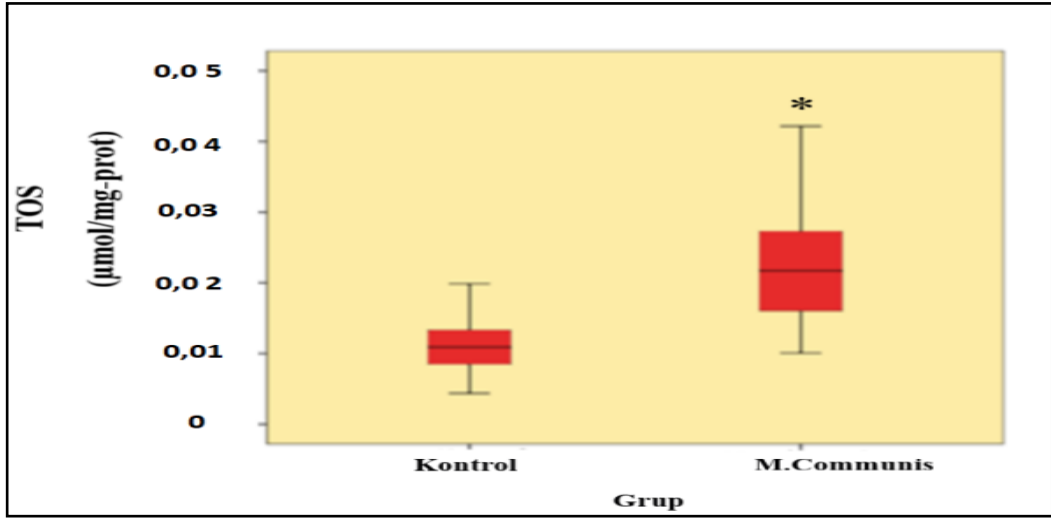
Tablo 4.2: Hücre lizatlarına ait TAS, TOS ve OSI değerleri.

Grup	TAS ($\mu\text{mol/mg-prot}$)	TOS ($\mu\text{mol/mg-prot}$)	OSI
Kontrol	1,472 $\pm$ 0,444	0,011 $\pm$ 0,003	0,812 $\pm$ 0,288
<i>M. Communis</i>	2,501 $\pm$ 1,265	0,023 $\pm$ 0,007	1,160 $\pm$ 0,723
P	0,000	0,000	0,050



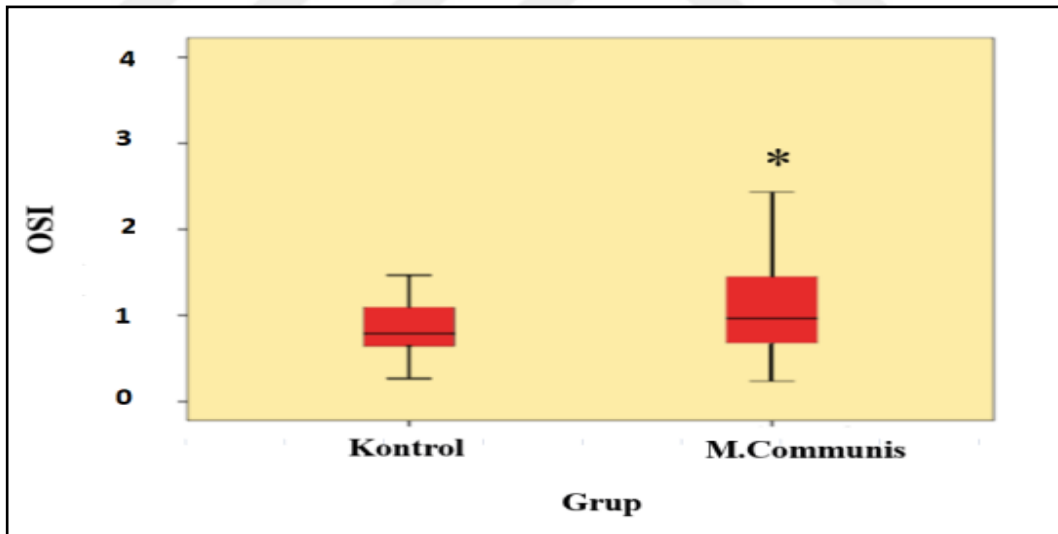
Şekil 4.6: Hücre lizatlarının TAS düzeyleri (*: p=0,000).

M. Communis uygulanan grupta TAS değeri kontrol grubunun değerinden istatistik anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur (*p=0,000).



Şekil 4.7: Hücre lizatlarının TOS düzeyleri (*: $p=0,000$).

M. Communis uygulanan grupta TOS değeri kontrol grubunun değerinden istatistik anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur (* $p=0,000$).



Şekil 4.8: Hücre lizatlarının OSİ değerleri (*: $p=0,05$).

M. Communis uygulanan grupta OSİ değeri kontrol grubunun değerinden istatistik anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur (* $p=0,05$).

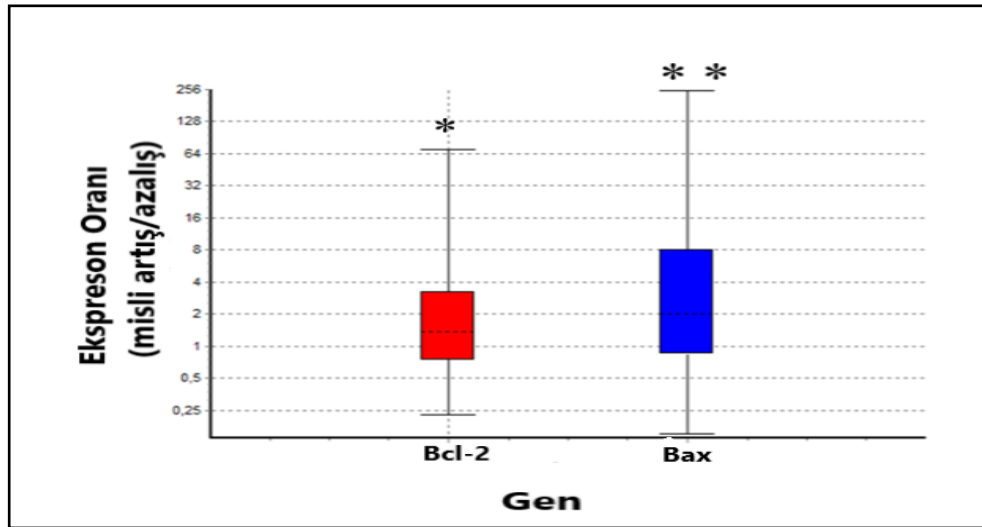
4.4. *Myrtus Communis*'in Saos-2 Hücrelerinde Apoptoz ile İlişki Genlerin mRNA Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi

Myrtus Communis muamele edilen Saos-2 hücrelerinde kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında Bax ve Bcl-2 genlerinin ekspresyon seviyesinin anlamlı bir şekilde artmış olduğu tespit edilmiştir. Bcl-2 ekspresyonu *Myrtus Communis*'in etkisi ile 1,773 misli ($p=0,043$); Bax ekspresyonu ise 2,640 misli ($p=0,0017$) artmıştır (Tablo 4.4 ve Şekil 4.9).

Tablo 4.3: *Myrtus Communis*'in Bax ve Bcl-2 genlerinin mRNA ekspresyonları üzerine etkisi ve apoptotik indeks düzeyi.

Gen adı	mRNA Ekspresyon Düzeyi (misli artış/azalış)	P	Sonuç
Bax	2,640 (0,521- 14,487)	0,017	Artış
Bcl-2	1,773 (0,622- 4,934)	0,043	Artış
Apoptotik indeks $[100 \times (Bax/Bcl-2)]$			149

Apoptotik bir belirteç olan Bax/Bcl-2 oranının kontrol grubuna kıyasla *M. Communis* grubunda %149 arttığı görülmektedir. Apoptozun pro- ve anti-apoptotik genler arasındaki dengeye bağlı olarak gerçekleştiği göz önünde bulundurulursa, *Myrtus Communis*'in Saos-2 kemik kanseri hücrelerinde apoptozu tetiklediğini göstermektedir.



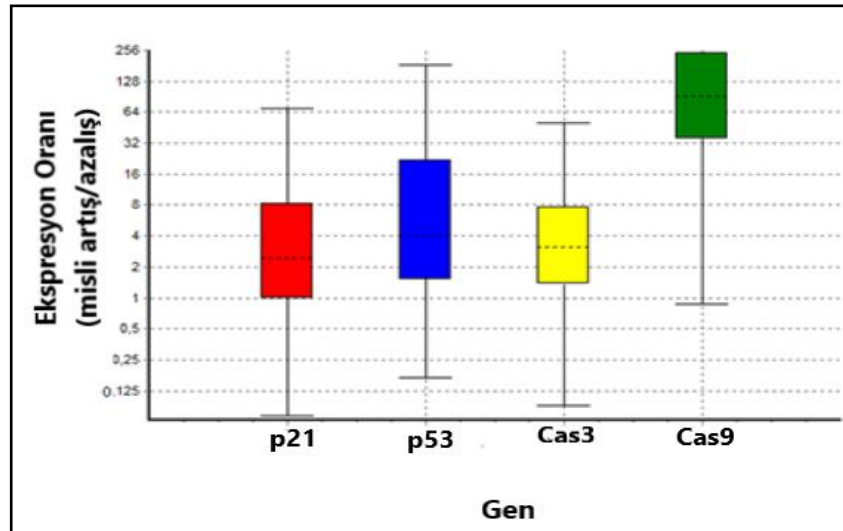
Şekil 4.9: *Myrtus Communis*'in Bcl-2 ve Bax genleri mRNA ekspresyonları üzerine etkisi. (*: Kontrole göre istatistik anlamlı, $p=0,043$; **: Kontrole göre istatistik anlamlı, $p=0,017$).

Saos-2 hücrelerinde apoptozla ilişkili diğer genlerden p21, p53, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9'un mRNA ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında *M. Communis* uygulanan grupta p21, p53, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 mRNA ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde uyarıldığı tespit edilmiştir. p21 ekspresyonu *Myrtus Communisin* etkisi ile 2,732 misli, p53 ekspresyonu 2,640 misli, Kaspaz 3 ekspresyonu 3,111 misli ve Kaspaz 9 ekspresyonu ise 89,989 misli artmıştır (Tablo 4.5 ve Şekil 4.10).

Tablo 4.4: *Myrtus Communis*'in Saos-2 hücrelerinde p21, p53, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 genlerinin mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.

Gen	mRNA Ekspresyon Düzeyi (misli artış/azalış) (ort. ; min-max)	P	Sonuç
p21	2,732 (0,683- 13,578)	0,006	Artış
p53	5,393 (0,895- 38,394)	0,000	Artış
Kaspaz 3	3,111 (0,877- 12,562)	0,003	Artış
Kaspaz 9	89,989 (20,787- 400,358)	0,000	Artış

M. Communis uygulanan grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında p21, p53, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 mRNA ekspresyon düzeylerinin istatistik anlamlı düzeyde arttığı belirlendi.



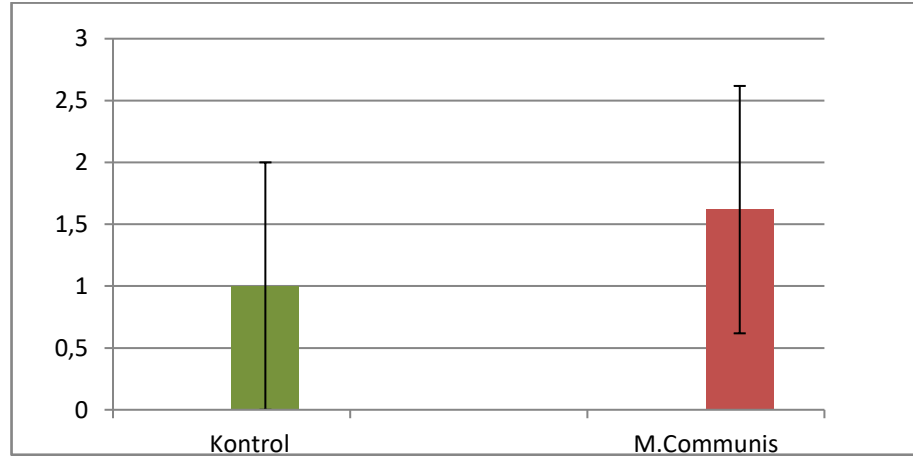
Şekil 4.10: *Myrtus Communis*'in p21, p53, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 genlerinin mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.

4.5. Saos-2 Hücre Hattı için *Myrtus Communis*'in Metastatik Genler Olan MMP-2 ve MMP-9'un Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Myrtus Communis'in Saos-2 hücrelerinde metastaz üzerine etkisini belirlemek amacıyla MMP-2 ve MMP-9 genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri analiz edildi. *M. Communis* muamele edilen Saos-2 hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MMP-2 geninin mRNA ekspresyon seviyesinin 1,618 misli arttığı, ancak istatistik anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 4.6 ve Şekil 4.11). Buna nazaran, MMP-9 geni ile ilgili olarak hem kontrol hem de *Myrtus Communis* grubunda herhangi bir ekspresyon tespit edilmemiştir.

Tablo 4.5: *Myrtus Communis* 'in MMP-2 ve MMP-9 gen ekspresyonları üzerine etkisi.

Gen adı	mRNA Ekspresyon Düzeyi (misli artış/azalış) Ort. (min-max)	P	Sonuç
MMP-2	1,618 (0,263- 8,568)	0,256	Artış
MMP-9	Tespit edilemedi		



Şekil 4.11: *Myrtus Communis*'in Saos-2 hücrelerinde MMP-2 mRNA ekspresyonu üzerine etkisi [ortalama (min-max)].

5. TARTIŞMA

Yapılan alışmalar sağlık alanında ortaya çıkan en önemli sorunun kanser olduğunu göstermiştir. Ölüm nedeni ile ilgili yapılan araştırmalarda kanserin hızla artış gösterdiği ifade edilmiş ve milyonlarca insanın bu hastalık sonucu ldği tespit edilmiştir. Kanser, etkilediği popülasyonlar, önlenmesi muhtemel sebeplerinin araştırılması, tarama, tanı ve tedavi amaçlı yüksek bütçe harcamaları ve ölüm oranlarının artan sebebi olması açısından ciddi bir halk sağlığı sorununu teşkil etmektedir. Her geçen gün yeni takip, tanı ve tedavi yöntemleri bulunması ve yapılan çalışmaların umut vadetmesine rağmen kansere bağlı ölümler, halen ölümün başlıca nedenleri arasında yer almaktadır. Bu nedenle, kanserle ilgili yeni kimyasal, biyolojik, farmakolojik ve hedefe yönelik farklı ajanlarla ilgili araştırmaların artarak devam etmesi gerekmektedir. Toplumlarda hem maddi hem de manevi kayıp ve zorluklara yol açmaktadır. Yayınlanan verilere göre ölüm nedenleri arasında kanser dünyada birinci sırada yer almaktadır (Ferlay ve ark., 2015).

Kanser tüm dünyada en çok üzerine çalışılan hastalıklardan biri olmasına rağmen ana umut kaynağının doğal ve özellikle bitki kaynaklı ürünler olduğu görülmektedir. Modern tıbbın en önemli ilaç kaynağını doğal veya doğal türevli ürünler oluşturur. Yapılan çalışmalarda antikanser bileşiklerinin %74'ünün doğal ve bu doğal ürünlerin türevleri olduğu gösterilmiştir. Bu da doğal ve doğal türevli ürünlerin kanser araştırmalarındaki baskın rolünü ortaya koymaktadır (Ogur, 2014).

Kanser vücut hücrelerinin kontrol dışı çoğalması ile metastazına bağlı oluşan ve çağımızın en büyük halk sağlığı sorunlarından birini teşkil eden önemli bir problemidir. Bunun yanında kanser, kronik inflamasyon ve immün sistemin zayıflaması ile karakterize bir hastalıktır (Bashraheel ve ark., 2020).

Gelişen teknolojiye karşın doğal ürünlerin kanserde tanı ve tedavi amaçlı kullanımı halen n plandadır. şıfalı bitkilerden elde edilen doğal ürünler çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde olduğu gibi kanser araştırmalarında da kullanılmaktadır. Doğal maddelerden ham formlarında ya da saflaştırılmış bileşik olarak elde edilen bu ürünler, yeni ilaçların keşfi için yol gösterici olmuştur. Ancak doğal ürünlerdeki kimyasal çeşitlilik araştırmaları güçleştirmiş ve esas etkili bileşiğin belirlenmesine yönelik ilgi ve talebi küresel olarak attırmıştır. Bu bağlamda, kimyasal olarak sentezlenen moleküller ve bitki

özleri, dünya çapında antikanser ve antibakteriyel aktivite açısından *in vitro* koşullarda araştırılmaya devam etmekte ve kanser tedavisi açısından önemini korumaktadır (Shati ve ark., 2020).

Osteosarkom, ergenlerde ve çocuklarda en sık görülen primer kemik tümörüdür ve vakaların %70'inden fazlası 10-25 yaş grubunda görülür. Çocukluk çağı osteosarkomu vakalarında mevcut tedavi stratejileri kullanılmasına rağmen %35 mortalite oranı belirlenmiştir. Primer osteosarkomu olan erişkin hastalarda kemoterapötik ajanlar kemorezistans gelişimi nedeniyle genellikle etkisizdir. Kemoterapi ve radyasyon tedavisi de dahil olmak üzere osteosarkom tanısı ve tedavisinde ilerleme kaydedilmiştir. Erken metastaz gelişiminden dolayı ve kemoterapötik ajanlara karşı direnç nedeniyle, yeni tanı ile prognostik biyobelirteçler ve takviye tedavilerinin keşfedilmesine ihtiyaç vardır (Zhang, S. ve ark., 2018).

Myrtus Communis, geleneksel tıp alanında dünya çapında tanınmış ve tedavi edici özelliği ispatlanmış önemli bir bitkidir. Bu bağlamda diare, peptik ülser, hemoroit, iltihap, kanama, baş ağrısı, çarpıntı, üretrit, burun kanaması, aşırı terleme, pulmoner hastalıklar ve cilt hastalıklarının tedavisi için de geleneksel olarak kullanılmaya devam edilmektedir. Buna karşın klinik ve deneysel çalışmalar bu bitkinin daha geniş bir farmakolojik ve terapötik etki yelpazesine sahip olduğunu göstermektedir (Alipour ve ark., 2014).

Tüm bu hastalıkların yanında *Myrtus Communis* kanser üzerindeki etkileri de araştırılmış ve antikanserojen etkisinin araştırılması kanser çalışmalarında öncü olmuştur. İlerleyen zamanlarda bu bitkinin çeşitli kanser türleri üzerindeki etkisi incelenmiş ve farklı kanser türlerinde yapılan çalışmalar Mersin ekstraktlarının kanserli hücreleri apaptoza götürdüğü tespit edilmiştir. Örneğin, 2008'de Tretiakova ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *M. Communis* farklı kanser hücrelerini mitokondriyal yoldan apoptoza götürdüğü saptanmıştır (Tretiakova ve ark., 2008).

Myrtus Communis yaprak ve meyvelerinin metanol, etanol ve sulu ekstraktlarının toplam fenolik içeriği yapılan araştırmalarda hesaplanmıştır. Toplam fenolik bileşik içeriğinin her bir çözücü için yaprak özlerinde meyve özütlerinden çok daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca fenolik bileşiklerin konsantrasyonlarının su ekstraktlarında en

yüksek seviyede olduğu bununla birlikte yaprak ve meyve etanol ekstraktlarının fenolik konsantrasyonlarının en düşük seviyede olduğu bildirilmiştir (Amensour ve ark., 2009).

Myrtus Communis'in osteosarkom üzerindeki olası terapötik etkisine ilişkin henüz bir çalışma bulunmadığı gözlemlenmiştir. *Myrtus Communis* (Mersin bitkisi)'ün birincil kemik tümörlerinin en malignant ve en yaygın görünen türü olan osteosarkom hücreleri üzerindeki apoptik ve antiapoptik genler ile metastatik etkisinden sorumlu olan genlerin mRNA ekspresyonları üzerine olan etkilerinin araştırıldığı bu çalışmadan elde edilen bulguların literatüre önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada ilk olarak *Myrtus Communis*'ün sitotoksositeye etkisini saptamak üzere MTT proliferasyon testi kullanılmıştır. Yapılan literatür taraması sonucunda, Mersin bitkisi yaprağı sulu ekstraktın farklı hücre hatlarında sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Mothana ve ark., 2011; Hrubik ve ark., 2012). Fakat kemik kanseri hücre hattı üzerinde Mersin bitkisi yaprağı sulu ekstraktının sitotoksik aktivitesi ile ilgili yapılan bir çalışmaya rastlanılmamıştır. 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda *Myrtus Communis* özütleri ile muamele edilen Saos-2 hücrelerinde belirlenen hücre canlılığı yüzdelерinden hareketle IC₅₀ değeri hesaplandı. Hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyonun 1/1.28'lik dilüsyon olduğu tespit edildi.

Myrtus Communis esansiyel yağ ekstraktı ile insan kolon kanseri (CCD 841 CoN, HT-29) hücre hatları ve karaciğer kanseri hücreler (HepG2) ile yapılan bir çalışmada, 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda *Myrtus Communis* ile muamele edilen kanser hücrelerinin hücre proliferasyonunun baskılandığı ve hücre canlılığının azaldığı rapor edilmiştir (Myszka ve ark., 2020).

Yapılan başka bir çalışmada da akciğer kanseri (A549) hücre hattında farklı konsantrasyonlarda *Myrtus Communis* uygulanmasının hücre büyümesini inhibe ettiği belirtilmiştir (Bilgic ve Duran, 2020). Çalıştığımız kanser türü olan osteosarkom hücre hatları MG-63, U-2OS, T1-73 143B, Saos-2, HOS ve normal osteoblast hücreleri, hFOB 1.19'a ile yapılan başka bir bitkisel çalışmada Ludartin bitkisinin etkisi araştırılmış ve farklı konsantrasyonlarda yapılan çalışmada MTT uygulamasında hücre proliferasyonunu inhibe eden etkin dozlar saptanmıştır (Zhang, S. ve ark., 2018).

Bir diğerk çalışmada ise, Mersin bitkisi yaprağı farklı ekstraktlarla (metanol, etil asetat, n-bütanol ve su) meme kanseri (MCF-7 ve MDA-MB-231) hücre hatlarında 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda muamele edilmesi sonucu hücre canlılığının azaldığı görülmüş ve farklı IC₅₀ düzeyleri tespit edilmiştir. *Myrtus Communis*'un etil asetat ile ekstraksiyonunda IC₅₀ dozu 21,8 µg/mL olarak bulunmuş, bu dozun ise MCF-7 hücre hattı üzerindeki çoğalmayı önleyici etkisi en yüksek seviyede gözlemlenmiştir. Metanol ve n-bütanol ekstraktlarının IC₅₀ dozları sırasıyla 40,1 ve 22,4 µg/mL olup daha az belirgin sitotoksositeye neden olmuştur. Su ekstraktı için belirlenen IC₅₀ değeri ise 50,5 µg/mL'de en az sitotoksik etki göstermiştir (Hrubik ve ark., 2012). Osteosarkom hücrelerinde adaçayı etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada, adaçayı infüzyonunun sitotoksik etkisi U-2OS hücrelerinde araştırılmıştır. 1/1000, 1/100, 1/75, 1/50 ve 1/25 (v/v) oranlarında verilen adaçayı infüzyonunda, hücre canlılığı normale göre sırasıyla %3, %4, %26, %27 ve %29 oranlarında azalmıştır. Denenen konsantrasyonlar arasından optimum hücre ölümüne neden olan adaçayı infüzyon oranının 1/75 olduğu görülmüştür (Göktürk, 2018). Daha önce bildirilen bu sonuçlar bizim elde ettiğimiz sonuçlar ile uyumludur fakat konsantrasyon düzeyleri farklılık göstermektedir. Bu durumun *Myrtus Communis*'in kullanılan formundan, *Myrtus Communis* içeriğindeki aktif bileşenlerden ve hücre hattından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda MTT testi akabinde osteosarkom kanser hücrelerinde oksidatif stres ve sitokin seviyeleri araştırılmıştır. Antioksidanların, bitkisel bileşenlerin antioksidan kapasitelerini belirlemek için birçok yöntem kullanılmaktadır. Kullanılan bu yöntemlerde oksidanların hedefleri, reaksiyon şekilleri ve elde edilen sonuçlar birbirinden farklı sonuçlar göstermiştir. Antioksidanların etki mekanizmaları, bir antioksidanın aromatik halkasına bağlı hidroksil grubu ve sayısına, konjuge yapısına bağlıdır. Bu nedenlerden dolayı, bitkisel çalışmalar üzerine yapılan farklı çalışmalarda sonuçları karşılaştırmak çok zordur (Gülcin, 2012).

Yapmış olduğumuz çalışmanın ikinci kısmında *Myrtus Communis* yaprak su ekstresi antioksidan, oksidan aktivite ve inflamatuvar süreç arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla TAS ve TOS düzeyi ile inflamatuvar sitokinlerin düzeyleri analiz edildi.

Kanser hücrelerinin redoks durumunun normal hücrelerden farklılık gösterdiği kanıtlanmıştır ve yüksek ROS seviyelerinin genellikle hücreler için zararlı olduğu

bilinmektedir. Bu nedenle kanserli hücreler ROS düzeylerini düşük sitotoksik düzeyin üstünde fakat sitotoksik olacak seviyelerin altında, orta dereceli yüksek tümörojenik seviyede tutarlar (Mittler, 2017). Kanser riskinin, oksidatif stresin ve inflamasyonun artmasıyla ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. ROS üretiminin; hayatta kalmak, metabolik aktivasyonu devam ettirebilmek ve proliferasyonun devamlılığı için tümörlü hücrelerde normalin üstünde arttığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, kanserli hücrelerin hücre ölümünü tetikleyebilecek seviyede ROS birikimini engellemek için normalin üstünde antioksidan aktivite gösterdiği bilinmektedir. Bu bakımdan normal hücre ve kanserli hücredeki oksidatif stres seviyeleri farklılık göstermektedir (Özer ve ark., 2019).

Oksidatif stresin gelişiminin belirlenmesi için kullanılan pek çok parametre vardır. Malondialdehit (MDA), glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi birçok bağımsız parametrenin ölçülmesi zaman alıcıdır ve ekonomik olmayan bir yöntemdir. Bununla birlikte TOS ve TAS gibi vücudun toplam oksidan-antioksidan dengesi hakkında bilgi sağlayan ölçümler daha pratik ve ekonomiktir. Vücuttaki tüm bu antioksidan sistemlerin birlikte serbest radikallere karşı koruduğu bilinmektedir. TOS-TAS ölçümlerinin kullanılması vücudun antioksidan savunma kapasitesini anlamak için en gerçekçi analizlerden biri olarak kabul edilir.

Antioksidanlar, insan vücudunu serbest radikallerden ve ROS etkilerinden koruyabilir ve lipid peroksidasyonunu önler, böylece birçok kronik hastalığın ilerlemesini geciktirir. Son yıllarda, doğal ve güvenli besinsel ve bitkisel antioksidanlara olan ilgi artmıştır (Gulcin, 2020).

Daha önce yürütülen araştırmalarda, Mersin bitkisinin yaprak ekstraktının antioksidan etkili fenolik bileşenler, flavonoidler ve esansiyel yağ asitleri bakımından zengin olduğu tespit edilmiştir (Anwar ve ark., 2017; Henna ve ark., 2018).

Başka çalışmada Mersin yaprak ekstraktında bulunan flavonoidlerden mirisetin-3-o-galaktozid ve mirisetin-3-o-ramnozidin oksidatif stres ve DNA onarımında rol oynayan genlerin ifadesini etkileyerek antioksidan ve antigenotoksik etki gösterdikleri bildirilmiştir (Hayder ve ark., 2008).

Myrtus Communis'in esansiyel yağının ana bileşenlerinden olan Linalool'un anti-karsinogenik mekanizması ile ilgili yapılan daha önceki bir çalışmada Linalool'un kansere

özgü oksidatif stres yoluyla HCT 116 (insan kolorektal kanser) hücre hattında apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Iwasaki ve ark., 2016). Yapılan başka bir çalışmada *M. Communis*'in etil asetat ekstraktı kronik miyelojenöz lösemi (K562) hücre hattında kullanılmış ve MDA (malondialdehit) düzeyleri analiz edilmiştir. Sonuç olarak K562 hücre hattı kültüründe reaktif oksijen türlerinin oluşumunun önemli ölçüde yükseldiği bulunmuştur (Ines ve ark., 2012). Bu çalışma kronik miyelojenöz lösemi hastalarda artmış oksijen radikallerinin yol açtığı antioksidan defans sisteminde önemli değişiklikler olduğunu göstermiştir.

Myrtus Communis'in Saos-2 hücrelerinde oksidatif stres üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi amacıyla hücre lizatlarında TAS, TOS ve OSI düzeyleri analiz edilmiştir. TAS, TOS ve OSI analizlerinde elde edilen verilere göre IC₅₀ dozunun oksidatif stres üzerinde anlamlı bir etkisi olduğu istatistiksel olarak gözlenmiş ve TAS, TOS ve OSI düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda, *Myrtus Communis*'ün oksidan ve antioksidan seviyelerini güçlü şekilde arttırıcı etkisi olduğu gösterilmiş, ayrıca apoptozu indükleyici etki göstererek teröpatik ajan potansiyelinin olduğu kanıtlanmıştır.

Antianser bir ilaç olarak kullanılabilen Bleomisine bağlı pulmoner fibrozisin geliştiği hayvan modelinde yapılan bir çalışmada, Mersin yaprağı ekstraktlarının etkisi incelenmiş ve bleomisin tarafından teşvik edilen oksidatif stresin Mersin muamelesi ile tersine döndürülebileceği gösterilmiştir. Aynı zamanda, ekstre grubunda enflamasyonda ve fibrozda iyileşmeye götürücü etkisi kanıtlanmıştır (Samareh Fekri ve ark., 2018).

Sıçanlarla yapılan bir çalışmada *Myrtus Communis*'in uçucu yağının IL-6 ve TNF- α 'yı azaltarak hasarlı dokuya lökosit göçünü azalttığı ve anti-inflamatuar aktivite sergilediği kanıtlanmıştır (Maxia ve ark., 2011). *Myrtus Communis*'ün anti-inflamatuar etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada Mersin bitkisi yapraklarında bulunan prenile olmayan bir asilfloroglukinol olan Myrtucommulone (MC), pençe ödemi olan farelere intraperitoneal olarak uygulanmış ve doza bağımlı bir şekilde fare karragenan kaynaklı pençe ödeminin gelişimini azalttığı gözlenmiştir (Rossi ve ark., 2008).

İnsanlarda yaban Mersini tüketimi, IL-6, IL-12 ve yüksek duyarlılıklı C reaktif proteinin serum seviyelerinin azalmasıyla ile karakterize olan azalmış inflamasyon skoru ile ilişkilidir (Kolehmainen ve ark., 2012).

Yaban mersini, acai ve siyah soya fasulyesinde bulunan cyanidin-3-glukozit (C3G), serbest oksijen radikallerini temizleyerek epidermal hücre hatlarında antioksidan aktivite sergilemiştir. Bu çalışmada C3G, indüklenen cilt tümörlerinin ve ayrıca ksenograft implante insan akciğer karsinom hücrelerinin murine çalışmalarında tümörijenik hücre dönüşümünü önlemiş ve *in vivo* tümör yükünü azaltmıştır (Ding ve ark., 2006). Anti-tümör immünomodülatör etkileri hakkında çok az bilgi olsa da, çalışmalar C3G'nin romatoid artriti hafiflettiği ve aynı anda IL-10, Tregs ve IL-6, IFN- γ ve NK hücre aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (Wang ve ark., 2019).

Yapılan bir çalışmada 4 hafta boyunca günlük 1 L yaban mersini suyu tüketiminin dolaşımdaki hsCRP, IL - 6, IL - 15 ve IFN - γ düzeylerini düşürdüğü ve tümör nekroz faktörü α (TNF- α) düzeylerini artırdığı gösterilmiştir (Karlsen ve ark., 2010).

IFN- γ gibi diğer sitokinler de bazı polifenoller tarafından inhibe edilebilir. Örneğin, kaempferol, dalak hücrelerinde ve T hücre hatlarında IFN- γ üretimini doza bağlı azaltmaktadır (Okamoto ve ark., 2002). Bazı polifenoller, kuersetin ve kateşinler gibi pro-ve antiinflamatuvar sitokinlerin üretimi arasındaki denge üzerinde etkilerini gösterir, TNF- α ve IL-1'i inhibe ederken IL-10 salımını artırırlar. İnflamatuvar sitokinlerin modülasyonu, genel olarak polifenollerin immünomodülatör etkilerini sergilediği yaygın mekanizmalardan biridir (Okamoto ve ark., 2002; Yahfoufi ve ark., 2018).

Sunulan bu çalışmada *M. Communis* uygulandığında proinflamatuvar sitokin (TNF- α , IL-12 ve IFN- γ) düzeylerinin önemli bir şekilde artarak apoptozun şekillenmesinde rol oynadığı söylenebilir. Fakat IL-10 düzeyi azalış göstermektedir. Birçok kanser türünün ve çeşitli otoimmün hastalıkların başlangıç aşamasının inflamasyon süreci olması nedeniyle, çalışmamızda kullandığımız bu maddelerin kansere karşı korunmada ve inflamasyonun önlenerek çeşitli kronik hastalıkların önüne geçilmesinde etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuçlar değerlendirildiğinde apoptozun uyarılmasında inflamatuvar ve oksidatif stresin rol oynadığı söylenebilir. Saos-2 hücrelerinde apoptoza etkileri ve ilişkili olabilecek mekanizmalarla ilgili herhangi bir bilgi literatürde rastlanılamamıştır. Bu açıdan değerlendirildiğinde elde edilen sonuçların yeni araştırmalara ışık tutacağı söylenebilir.

Bununla beraber farklı hücre hatlarında *M. Communis*'in apoptoza etkilerine ilişkin bazı bulgular mevcuttur.

Apoptoz temel olarak iki yolla başlatılır: dışsal yol ve içsel yol. Mitokondri aracılığıyla düzenlenen hücre içi yol aslında hücre dışı ve hücre içi etkenlerin ortaklaştığı bir mekanizma oluşturur. Yürüttüğümüz çalışmanın son aşamasında Saos-2 üzerinde *M. Communis* yaprak ekstraktının apoptozu baskılayan ve hücreyi apoptoza götüren bazı genlerin ekspresyon düzeylerini nasıl etkilediğini inceledik. Çalışmamızda apoptozun bu yolaklarında yer alan Bax, Bcl-2, Kaspaz 3, Kaspaz-9, p53 ve p21 genlerinin ekspresyon düzeyleri analiz edildi.

İçsel ve dışsal yolaklardaki gen ekspresyonu düzeylerini analiz etmek için kanser hücre hattı olan Saos-2'ye *M. Communis*'in yaprak ekstraktının uygun IC₅₀ dozu uygulandıktan sonra RT-PCR metodu ile gerçek zamanlı olarak gen ekspresyonlarındaki değişimlere bakılmıştır.

Yapılan bir çalışmada da kolon kanser (HT-29) hücre hattında, bir flavonoid olan genisteinin farklı konsantrasyonlarına bağlı olarak Bax geni ifadesinin artmasına sebep olduğu bulunmuştur. Fakat Bcl-2 genin ekspresyonunu azalttığı görülmüştür. Bu sonuçlar, kolon tümörünün önlenmesinde genisteinin rolünün olduğunu ve kolon tümörü büyümesini azaltabileceğini göstermiştir (Yu ve ark., 2004).

Çalışmamızda apoptotik etkiyi değerlendirmek için apoptozu baskılayan Bcl-2 geni ile apoptozu uyaran Bax geninin ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. Bax ve Bcl-2 gen ekspresyonlarındaki değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu; hem Bax hem de Bcl-2 gen ekspresyonlarının arttığı tespit edilmiştir.

Myrtus Communis ile tedavi edilen hücre ölümünün apoptoz yoluyla olduğunu doğrulamak için apoptotik indeks hesaplanmıştır. Apoptotik bir belirteç olan Bax/Bcl-2 oranının kontrol grubuna kıyasla *M. Communis* grubunda %149 arttığı görülmüştür. Bu nedenle Mersin bitkisinin, Saos-2 hücrelerindeki, Bax/Bcl-2 sisteminde Bax genini uyarak apoptotik etkiye katkıda bulunduğu söylenebilir.

Bu çalışmada, başlatıcı kaspazlardan olan kaspaz-9 ve efektör kaspaz olan kaspaz-3'ün ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. Analiz sonuçlarına göre kaspaz-9, ve kaspaz-3'ün

ekspresyonundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. *M. Communis*'in, kanser hücre hattı olan Saos-2 hücrelerinde apoptozda hem içsel yolak hemde dışsal yolak üzerinden etkisi olabileceği gösterilmiştir.

Tümör baskılayıcı bir gen olan p53'ün kanserdeki başlıca rolü, hücre döngüsünün G1/S fazında tutulmasıdır. p21 geni, p53'e bağlı ve p53 geninden bağımsız yollarla kontrol edilebilen hücre döngüsü inhibitörüdür. p21'e atfedilen diğer bazı önemli fonksiyonlar arasında transkripsiyonel düzenleme ve apoptoz inhibisyonu bulunur. p21'in normal hücreler ve kanser hücrelerindeki işlevi hakkında ortaya çıkan güncel bilgiler, birçok araştırma alanına yeni kapılar açmış ve yeni terapötik stratejilerin gelişimine katkıda bulunmuştur (El-Deiry, 2016).

Yapılan bir çalışmada, *Myrtus Communis* yağ asitleri farklı konsantrasyonlarla akciğer kanseri (A549) hücre hatında uygulanmış kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9, Bcl-2 ve p21 genlerinin ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. İçsel yolun arabulucuları olan kaspaz-3, kaspaz-9 genlerinin ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı olarak artmıştır (sırasıyla, $p=0.0129$ ve $p=0.0180$). P21 geninin ekspresyon seviyesi *Myrtus Communis*'in uçucu yağlarının farklı konsantrasyonların önemli ölçüde artmıştır ($p=0.0002$). Fakat kaspaz-8 ve Bcl-2 mRNA ekspresyonunda herhangi bir değişiklik bulunmamıştır (Bilgic ve Duran, 2020).

Başka bir çalışmada, *Myrtus Communis* farklı konsantrasyonları bronşial kanseri (BEAS-2B) hücre hattına uygulanmış ve RT-PCR analizi ile elde edilen mRNA sonuçlarına göre p21 seviyelerinde kontrol grubuna göre 10,9 misli düzeyinde önemli bir artışın olduğu bildirilmiştir (Ulutaş ve Duran, 2020). Yapılan aynı çalışmada *Myrtus Communis* uygulanan BEAS-2B hücrelerinde apoptozisi yürüten kaspaz-3 (2.6 misli) ve apoptozisi başlatan kaspaz-9 (2.19 misli) genlerin ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir.

Bizim yaptığımız çalışmada ise p21 ekspresyonu *Myrtus Communis*'in etkisi ile 2,732 misli artış gösterdi. Kaspaz 3 ekspresyonu 3,111 misli ve Kaspaz 9 ekspresyonu ise 89,989 misli artmış, tüm sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Yapılan başka bir çalışmada flavonoidlerin ikincil metaboliti olarak sınıflandırılan Myrecitin'in akciğer kanseri (A549) hücre hatındaki antikanser etkisi hücresel ve moleküler çalışmalar ile araştırılmıştır. Myrecitin, hücre siklusunu ve apoptoz yoluyla da

A549 hücre gelişimini baskılamıştır. Bununla birlikte p53'ün uyarılması ve Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) geninin baskılanması, Myrecitin kansere karşı gösterdiği etkiyi doğrulamıştır. Yapılan çalışma Myricetin'in akciğer kanseri tedavisinde umut verici bir ajan olabileceğini düşünmüştür (Rajendran ve ark., 2021). Bizim yaptığımız çalışmada da literatürdeki çalışmalara benzer sonuçlar elde ettik. *Myrtus Communis* etkisi ile Saos-2 hücre hattındaki p53 ekspresyonunun artmış olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur.

Myricetin'in kolon karsinom hücrelerinin çoğalmasını engellediği (Shiomi ve ark., 2013), ekstrasellüler sinyal ilişkili kinaz (ERK) fosforilasyonu ve matris metalloproteinaz (MMP) enzim aktivitesini baskıladığı ve kolon kanseri hücrelerinin invazyonunu önlediği değişik çalışmalarla ortaya konulmuştur (Ko ve ark., 2005).

Myrtus Communis ile aynı bitki ailesinde olan *Rhodomirtus tomentosa* (Aiton) Hassk.'ın yapraklarından izole edilen biyoaktif bir bileşik olan rhodomirtone'un epidermoid karsinom (A431) hücre hattındaki kanser metastazı üzerindeki inhibitör etkisi ve bu olayda rol oynayan moleküller araştırılmış; *Rhodomirtus* son zamanlarda A431 hücresinde yapılan çalışmalarda cilt kanseri tedavisi için antimetastatik bir ajan olarak karakterize edilmiştir. *Rhodomirtus* subsitotoksik konsantrasyonlarda tümör hücrelerinin göçlerini ve invaziv yeteneklerini azaltmıştır. Moleküler düzeyde de enzim aktivitelerinin azaltılmasına ve matris metalloproteinaz MMP-2 ve MMP-9'un ifadesinde rol oynayan protein kinaz B (AKT), c-Raf, ERK1/2 ve p38'in odak yapışma kinazını (FAK) ve fosforilasyonunun baskılanmasına neden olmuştur. Ayrıca, sırasıyla MMP-9 ve MMP-2 inhibitörleri olan TIMP-1 ve TIMP-2'nin ekspresyonunu artırmıştır (Tayeh ve ark., 2017).

Çalışmamızın son kısmında metastaz ile ilişkili genler olan MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonu analiz edildi. Analiz sonucunda MMP-2 genin ekspresyon düzeyinin istatistiki anlamlı olmayan düzeyde arttığı ($p=0.256$) görüldü. Fakat MMP-9 geninin hem kontrol grubu hem de bitki ekstresi uygulanan grup hücrelerinde herhangi bir ekspresyonu saptanmamıştır. Bu sonuçlar *M. Communis*'in metastazdan sorumlu genler üzerinde bir etki göstermediğini ortaya koymaktadır.

Kanser hücrelerinde apoptozun uyarılması ve apoptotik moleküler yolağının aydınlatılması kanseri yenebilmek için çok önemlidir. Bu konuda çok fazla *in vivo*

alışmalar bulunmaktadır. CD1 farelerde enjekte edilmiş Ehrlich tümörü zerine *M. Communis* yağının antikanser etkileri araştırılmıştır. *M. Communis* yağı için maksimum tolerans dozu 2 mL/kg, LD50 değeri ise 2.5 mL/kg olarak belirlenmiştir. Ayrıca *M. Communis* yağının deney hayvanlarının hayatta kalma süresini anlamlı düzeyde arttırdığını tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada Ehrlich asit tümörü enjekte edilen farelerle *Myrtus Communis* su ekstraktının hayvanlarda yaşam süresini uzattığı belirtilmiştir (Ogur 2014). *Myrtus Communis*'in kanserde önemli etkilere neden olduğunu gösteren *in-vivo* sonuçlar ve bizim *in-vitro* alışmalardan elde ettiğimiz bulgular *Myrtus Communis* apoptozu uyarak kanserde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Hem osteosarkom hem de diğer kanser çeşitlerinin tedavisinde yan etkileri nedeniyle toksik ve çok hedefli olmayan, ilaç direnci oluşturmayacak yeni tedavi protokollerine olan ihtiyaç artmaktadır. Bu yüzden toksik etkisi sınırlı olan bitkisel ilaçlar tedavi için alternatif olmayı sürdürmektedir. Nitekim bu alanda yapılan araştırmalar doğal aktif bileşenlerin kanserle mücadelede yeni yaklaşımların gelişimine olanak sağlayabileceğini göstermektedir. Bu bağlamda, sunulan bu çalışmada kemik kanseri hücrelerinde *Myrtus Commuunis* olası etkileri *in-vitro* bir modelle tespit edilmeye çalışılmıştır. Osteosarkom hücrelerinde ilk defa çalışılan *Myrtus Commuunis*'in kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar için potansiyel etkiye sahip olduğu çalışmamızla gösterilmiştir. Elde edilen bulguların klinisyenlere ve literature önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Mersin bitkisi, tüm dünyada geleneksel bir bitkisel ilaç olarak kullanılmaktadır. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalardan elde edilen verilere göre Mersin bitkisi ilaç olarak geliştirmede kullanılma potansiyeline sahiptir. Bu bitkinin geleneksel kullanımlarının çoğu yapılan bilimsel çalışmalarla bir bakış açısıyla doğrulanmıştır. Son yıllarda, çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde uzun ve kanıtlanmış geçmişe sahip geleneksel ilaçların kullanımına vurgu yapılmaktadır. 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda *M. Communis* özütleri ile muamele edilen Saos-2 hücrelerinde belirlenen hücre canlılığı yüzdelерinden hareketle IC₅₀ değeri hesaplandı. Belirlenen doz hücrelerin %50'sını öldüren konsantrasyonun 1/1.28'lik dilüsyon olduğu tespit edildi. Bu dilüsyonda uygulanan *M. Communis* ekstresinin inflamatuvar sitokin (TNF- α , IL-12 ve IFN- γ) düzeylerini artırdığı, buna nazaran antiinflamatuvar sitokin olan IL-10'da azalmaya neden olduğu değişimin istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı olduğu tespit edilmiştir (p=0,000). TAS, TOS ve OSİ düzeylerinde anlamlı artış tespit edildi (p=0.000, p=0.000, p=0.05; sırasıyla). Bax, Bcl-2, Kaspaz-3, Kaspaz-9, p53 ve p21 genlerin ekspresyon seviyelerinin de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir (p=0.017, p=0.043, p=0.003, p=0.000, p=0.000, p=0.006; sırasıyla), Bax/Bcl-2 oranı ile belirlenen apoptotik indeksin *Myrtus Communis* grubundan arttığı belirlenmiştir. Metastazda rol oynayan MMP-2 geninin ekspresyon seviyesinin arttığı, fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiş; MMP-9 gen ekspresyonu ise tespit edilememiştir (p=0.000).

Sunulan bu çalışmada, *Myrtus Communis* su ekstresinin Saos-2 hücreleri üzerinde antikanser potansiyele sahip olduğu sonucuna varıldı. Bu çalışmada incelenen apoptotik mekanizmalar, *Myrtus Communis* tedavisine bağlı olarak gen düzeyinde tetiklenen veya duraklatılmış süreçlerin araştırılmasına yardımcı olacaktır. Bununla birlikte, bunu kesin olarak göstermek için ek *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Aggarwal, B. B., ve ark. (2006) 'From traditional Ayurvedic medicine to modern medicine: identification of therapeutic targets for suppression of inflammation and cancer'. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 10(1), pp. 87-118.
- Ahmad, M. M., Farah Parveen, N. A., Siddiqui, J. A., Shukla, N. K., Husain, S. A. (2020) 'Genetic polymorphism in TNF- α -308 G/a and TNF- β + 252 a/G, as prognostic biomarker in breast cancer patients among Indian population'. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 21(2), pp. 301.
- Alipour, G., Dashti, S., Hosseinzadeh, H. (2014) 'Review of pharmacological effects of *Myrtus communis* L. and its active constituents'. *Phytotherapy Research*, 28(8), pp. 1125-1136.
- Alkayyal, A. A., Mahmoud, A. B., Auer, R. C. (2016) 'Interleukin-12-expressing oncolytic virus: A promising strategy for cancer immunotherapy'. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 11(3), pp. 187-193.
- Altunkaynak, B., Özbek, E. (2008) 'Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz nedir'. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6(2), pp. 93-104.
- Amara, A., El-Masry, M., Bogdady, H. (2008) 'Plant crude extracts could be the solution: extracts showing in vivo antitumorigenic activity'. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(2).
- Amensour, M., Sendra, E., Abrini, J., Bouhdid, S., Pérez-Alvarez, J. A., Fernández-López, J. (2009) 'Total phenolic content and antioxidant activity of myrtle (*Myrtus communis*) extracts'. *Natural Product Communications*, 4(6), pp. 1934578X0900400616.
- Ando, K., Heymann, M.-F., Stresing, V., Mori, K., Rédini, F., Heymann, D. (2013) 'Current therapeutic strategies and novel approaches in osteosarcoma'. *Cancers*, 5(2), pp. 591-616.
- Anwar, S., Crouch, R. A., Awadh Ali, N. A., Al-Fatimi, M. A., Setzer, W. N., Wessjohann, L. (2017) 'Hierarchical cluster analysis and chemical characterisation of *Myrtus communis* L. essential oil from Yemen region and its antimicrobial, antioxidant and anti-colorectal adenocarcinoma properties'. *Natural Product Research*, 31(18), pp. 2158-2163.
- Atici, E. (2007) 'Cancer and leukemia in the history of medicine'. *Turkish Journal of Oncology*, 22(4).
- Barreyro, F. J., ve ark. (2015) 'The pan-caspase inhibitor Emricasan (IDN-6556) decreases liver injury and fibrosis in a murine model of non-alcoholic steatohepatitis'. *Liver International*, 35(3), pp. 953-966.
- Bashraheel, S. S., Domling, A., Goda, S. K. (2020) 'Update on targeted cancer therapies, single or in combination, and their fine tuning for precision medicine'. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 125 pp. 110009.
- Baykara, O. (2016) 'Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlar'. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), pp. 154-165.

- Bazzali, O., Tomi, F., Casanova, J., Bighelli, A. (2012) 'Occurrence of C8–C10 esters in Mediterranean *Myrtus communis* L. leaf essential oil'. *Flavour Fragrance Journal*, 27(5), pp. 335-340.
- Beatty, G. L., Paterson, Y. (2001) 'Regulation of tumor growth by IFN- γ in cancer immunotherapy'. *Immunologic Research*, 24(2), pp. 201-210.
- Behnia, M., Robertson, K. A., Martin II, W. J. (2000) 'Lung Infections'. *Chest*, 117(6), pp. 1771-1777.
- Bertram, J. S. (2000) 'The molecular biology of cancer'. *Molecular Aspects of Medicine*, 21(6), pp. 167-223.
- Bildik, A., Bayar, İ. (2018) 'Kanserde Apoptotik Yolakların İnhibisyonu'. *Türkiye Klinikleri Veteriner Bilimleri Dergisi*, 9(2), pp. 42-51.
- Bilgic, N., Duran, G. G. (2020) 'Chemical Composition of *Myrtus communis* L. and Proapoptotic Effects on the A549 Cell Line'. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23(6), pp. 1283-1295.
- Björklund, M., Koivunen, E. (2005) 'Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells'. *Biochimica et Biophysica Acta -Reviews on Cancer*, 1755(1), pp. 37-69.
- Borovcanin, M. M., ve ark. (2017) 'Interleukin-6 in schizophrenia is there a therapeutic relevance?'. *Frontiers in Psychiatry*, 8 pp. 221.
- Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Asseman, I. C. C., Abrini, J., Dakka, N. (2018) 'In vitro antiproliferative activity of selected medicinal plants from the North-West of Morocco on several cancer cell lines'. *European Journal of Integrative Medicine*, 18 pp. 23-29.
- Bradford, M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding'. *Anal Biochem* 72 pp. 248-254.
- Brusselmans, K., Vrolix, R., Verhoeven, G., Swinnen, J. V. (2005) 'Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity'. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), pp. 5636-5645.
- Cenić-Milošević, D., ve ark. (2013) 'Antiproliferative effects of some medicinal plants on HeLa cells'. *Archives of Biological Sciences*, 65(1), pp. 65-70.
- Chahar, M. K., Sharma, N., Dobhal, M. P., Joshi, Y. C. (2011) 'Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs'. *Pharmacognosy Reviews*, 5(9), pp. 1.
- Chaouki, W., Leger, D. Y., Eljastimi, J., Beneytout, J.-L., Hmamouchi, M. (2010) 'Antiproliferative effect of extracts from *Aristolochia baetica* and *Origanum compactum* on human breast cancer cell line MCF-7'. *Pharmaceutical Biology*, 48(3), pp. 269-274.
- Choo, Z. e., Loh, A. H. P., Chen, Z. X. (2019) 'Destined to Die: Apoptosis and Pediatric Cancers'. *Cancers*, 11(11), pp. 1623.
- Chung, H. Y., ve ark. (2019) 'Redefining chronic inflammation in aging and age-related diseases: proposal of the senoinflammation concept'. *Aging Disease*, 10(2), pp. 367.

- Cioć, M., Szewczyk, A., Żupnik, M., Kalisz, A., Pawłowska, B. (2018) 'LED lighting affects plant growth, morphogenesis and phytochemical contents of *Myrtus communis* L. in vitro'. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 132(3), pp. 433-447.
- Cirakli, A., Dabak, N., Gocer, H. (2016) 'The analysis of operative metastatic tumors in the skeleton'. *Journal of Turgut Ozal Medical Center*, 23(4).
- Conover, W. (1980) 'Practical Nonparametric Statistics, by John Wiley and Sons Inc'. New York.
- Coşkun, G., Özgür, H. (2011) 'Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması'. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(3), pp. 145-158.
- Cruceriu, D., Baldasici, O., Balacescu, O., Berindan-Neagoe, I. (2020) 'The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches'. *Cellular Oncology*, 43(1), pp. 1-18.
- D'Arcy, M. S. (2019) 'Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy'. *Cell biology international*, 43(6), pp. 582-592.
- De Oliveira, C. B., ve ark. (2012) 'Phenolic enriched extract of *Baccharis trimera* presents anti-inflammatory and antioxidant activities'. *Molecules*, 17(1), pp. 1113-1123.
- Denault, J.-B., Salvesen, G. S. (2002) 'Caspases: keys in the ignition of cell death'. *Chemical reviews*, 102(12), pp. 4489-4500.
- Denduluri, S. K., ve ark. (2016) 'Molecular pathogenesis and therapeutic strategies of human osteosarcoma'. *Journal of Biomedical Research*, 30(1), pp. 5.
- Deng, J. C., Tateda, K., Zeng, X., Standiford, T. J. (2001) 'Transient transgenic expression of gamma interferon promotes legionella pneumophila clearance in immunocompetent hosts'. *Infection and Immunity*, 69(10), pp. 6382-6390.
- Dia, V. P., Krishnan, H. B. (2016) 'BG-4, a novel anticancer peptide from bitter melon (*Momordica charantia*), promotes apoptosis in human colon cancer cells'. *Scientific Reports*, 6(1), pp. 1-12.
- Ding, M., ve ark. (2006) 'Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity'. *Journal of Biological Chemistry*, 281(25), pp. 17359-17368.
- El-Deiry, W. S. (2016) 'p21 (WAF1) mediates cell-cycle inhibition, relevant to cancer suppression and therapy'. *Cancer Research*, 76(18), pp. 5189-5191.
- El-Meghawry, E., Rahman, H., Abdelkarim, G., Najda, A. (2016) 'Natural products against cancer angiogenesis'. *Tumor Biology*, 37(11), pp. 14513-14536.
- Erel, O. (2004) 'A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions'. *Clinical Biochemistry*, 37(2), pp. 112-119.
- Erel, O. (2005) 'A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status'. *Clinical Biochemistry*, 38(12), pp. 1103-1111.
- Esen, Ç., Alkan, B. A., Kırnap, M., Akgül, Ö., Işıkoğlu, S., Erel, Ö. (2012) 'The effects of chronic periodontitis and rheumatoid arthritis on serum and gingival crevicular fluid total antioxidant/oxidant status and oxidative stress index'. *Journal of Periodontology*, 83(6), pp. 773-779.

- Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., De Laurenzi, V. (2012) 'Role of apoptosis in disease'. *Aging*, 4(5), pp. 330.
- Ferlay, J., ve ark. (2015) 'Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012'. *International Journal of Cancer*, 136(5), pp. E359-E386.
- Ferrero-Miliani, L., Nielsen, O., Andersen, P., Girardin, S. (2007) 'Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation'. *Clinical Experimental Immunology*, 147(2), pp. 227-235.
- Folgueras, A. R., Pendas, A. M., Sanchez, L. M., Lopez-Otin, C. (2004) 'Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies'. *International Journal of Developmental Biology*, 48(5-6), pp. 411-424.
- Furman, D., ve ark. (2019) 'Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span'. *Nature Medicine*, 25(12), pp. 1822-1832.
- Galluzzi, L., ve ark. (2007) 'Cell death modalities: classification and pathophysiological implications'. *Cell Death Differentiation*, 14(7), pp. 1237.
- Gao, Q.-J., ve ark. (2009) 'Polymorphisms of some cytokines and chronic hepatitis B and C virus infection'. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 15(44), pp. 5610.
- Ghazghazi, H., Aouadhi, C., Riahi, L., Maaroufi, A., Hasnaoui, B. (2014) 'Fatty acids composition of Tunisian Ziziphus lotus L.(Desf.) fruits and variation in biological activities between leaf and fruit extracts'. *Natural Product Research*, 28(14), pp. 1106-1110.
- Gill, J., Ahluwalia, M. K., Geller, D., Gorlick, R. (2013) 'New targets and approaches in osteosarcoma'. *Pharmacology Therapeutics*, 137(1), pp. 89-99.
- Glick, D., Barth, S., Macleod, K. F. (2010) 'Autophagy: cellular and molecular mechanisms'. *The Journal of Pathology*, 221(1), pp. 3-12.
- Göktürk, D. (2018) 'Adaçayı bitkisinin osteosarkoma (U-2OS) hücre hattındaki sitotoksik etkisinin İncelenmesi'. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 18(2), pp. 420-425.
- Gulcin, İ. (2020) 'Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview'. *Archives of Toxicology*, 94(3), pp. 651-715.
- Gülcin, I. (2012) 'Antioxidant activity of food constituents: an overview'. *Archives of Toxicology*, 86(3), pp. 345-391.
- Halliwell, B. (2006) 'Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now?'. *Journal of Neurochemistry*, 97(6), pp. 1634-1658.
- Hampton, M. B., Orrenius, S. (1998) 'Redox regulation of apoptotic cell death'. *Biofactors*, 8(1-2), pp. 1-5.
- Harassi, Y., ve ark. (2019) 'Phytochemical analysis, cytotoxic and antioxidant activities of Myrtus communis essential oil from Morocco'. *Journal of Complementary Integrative Medicine*, 16(3).
- Hayder, N., ve ark. (2008) 'In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-o-galactoside and myricetin-3-o-rhamnoside from Myrtus communis:

- modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray'. *Toxicology in Vitro*, 22(3), pp. 567-581.
- Hazman, Ö., Evin, H., Bozkurt, M. F., Ciğerci, İ. H. (2021) 'Two Faces of Arbutine in Hepatocellular Carcinoma (HepG2) Cells: Anticarcinogenic Effect in LD50 Dose and Protective Effect Against Cisplatin Toxication Through its Antioxidant and Anti-inflammatory Activity in LD0 Dose'.
- Hengartner, M. O. (2000) 'The biochemistry of apoptosis'. *Nature*, 407(6805), pp. 770-776.
- Hennia, A., Miguel, M. G., Nemmiche, S. (2018) 'Antioxidant activity of *Myrtus communis* L. and *Myrtus nivellei* Batt. & Trab. extracts: a brief review'. *Medicines*, 5(3), pp. 89.
- Hidalgo, M., Eckhardt, S. G. (2001) 'Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy'. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(3), pp. 178-193.
- Hochegger, H., Takeda, S., Hunt, T. (2008) 'Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(11), pp. 910-916.
- Holland, J. C. (2003) 'American Cancer Society Award Lecture. Psychological Care of Patients: Psycho-Oncology's Contribution'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of The American Society of Clinical Oncology*, 21(23), pp. 253.
- Hrubik, J. D., Kaišarević, S. N., Glišić, B. D., Jovin, E. Đ., Mimica-Dukić, N. M., Kovačević, R. Z. (2012) 'Myrtus comunis and Eucalyptus camaldulensis cytotoxicity on breast cancer cells'. *Zbornik Matice srpske za Prirodne nauke*, pp. 65-73.
- Hu, K., ve ark. (2017) 'Three hematological indexes that may serve as prognostic indicators in patients with primary, high-grade, appendicular osteosarcoma'. *Oncotarget*, 8(26), pp. 43130.
- Icard, P., Fournel, L., Wu, Z., Alifano, M., Lincet, H. (2019) 'Interconnection between metabolism and cell cycle in cancer'. *Trends in Biochemical Sciences*, 44(6), pp. 490-501.
- Ines, S., ve ark. (2012) 'In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of 3, 5-O-di-galloylquinic acid extracted from *Myrtus communis* leaves and modulation of cell gene expression by H₂O₂'. *Journal of Applied Toxicology*, 32(5), pp. 333-341.
- Irimia, D., Wang, X. (2018) 'Inflammation-on-a-chip: probing the immune system ex vivo'. *Trends in Biotechnology*, 36(9), pp. 923-937.
- Iwasaki, K., ve ark. (2016) 'Anticancer effect of linalool via cancer-specific hydroxyl radical generation in human colon cancer'. *World Journal of Gastroenterology*, 22(44), pp. 9765.
- Josephs, S. F., ve ark. (2018) 'Unleashing endogenous TNF-alpha as a cancer immunotherapeutic'. *Journal of Translational Medicine*, 16(1), pp. 1-8.
- Karabulut, H., Gülay, M. Ş. (2016) 'Serbest radikaller'. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1).

- Karadağ, A. (2016) 'Otofaji: programlı hücre ölümü'. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 15(2), pp. 19-26.
- Karlsen, A., ve ark. (2010) 'Bilberry juice modulates plasma concentration of NF- κ B related inflammatory markers in subjects at increased risk of CVD'. *European journal of nutrition*, 49(6), pp. 345-355.
- Klein, M. J., Siegal, G. P. (2006) 'Osteosarcoma: anatomic and histologic variants'. *American Journal of Clinical Pathology*, 125(4), pp. 555-581.
- Ko, C.-H., Shen, S.-C., Lee, T. J., Chen, Y.-C. (2005) 'Myricetin inhibits matrix metalloproteinase 2 protein expression and enzyme activity in colorectal carcinoma cells'. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(2), pp. 281-290.
- Koff, J. L., Ramachandiran, S., Bernal-Mizrachi, L. (2015) 'A time to kill: targeting apoptosis in cancer'. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(2), pp. 2942-2955.
- Kolehmainen, M., ve ark. (2012) 'Bilberries reduce low-grade inflammation in individuals with features of metabolic syndrome'. *Molecular Nutrition Food Research*, 56(10), pp. 1501-1510.
- Lamoureux, F., ve ark. (2007) 'Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption'. *Cancer Research*, 67(15), pp. 7308-7318.
- Lattanzi, S., Di Napoli, M., Ricci, S., Divani, A. A. (2020) 'Matrix metalloproteinases in acute intracerebral hemorrhage'. *Neurotherapeutics*, pp. 1-13.
- Liang, C.-H., ve ark. (2012) '5-epi-Sinuleptolide induces cell cycle arrest and apoptosis through tumor necrosis factor/mitochondria-mediated caspase signaling pathway in human skin cancer cells'. *Biochimica et Biophysica Acta -General Subjects*, 1820(7), pp. 1149-1157.
- Lin, S. R., ve ark. (2020) 'Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: Preclinical evidence'. *British Journal of Pharmacology*, 177(6), pp. 1409-1423.
- Lokau, J., Schoeder, V., Garbers, C. (2020) 'Die Rolle von Interleukin-11 beim Osteosarkom'. *Der Pathologe*, pp. 1-5.
- Louis, K. S., Siegel, A. C. (2011) 'Cell viability analysis using trypan blue: Manual and automated methods'. In: *Mammalian Cell Viability*. Springer, pp. 7-12.
- Maskos, K. (2005) 'Crystal structures of mmps in complex with physiological and pharmacological inhibitors'. *Biochimie*, 87(3-4), pp. 249-263.
- Matt, S., Hofmann, T. G. (2016) 'The DNA damage-induced cell death response: a roadmap to kill cancer cells'. *Cellular*, 73(15), pp. 2829-2850.
- Maxia, A., Frau, M. A., Falconieri, D., Karchuli, M. S., Kasture, S. (2011) 'Essential oil of Myrtus communis inhibits inflammation in rats by reducing serum IL-6 and TNF- α '. *Natural Product Communications*, 6(10), pp. 1934578X1100601034.
- McConkey, D. J. (1998) 'Biochemical determinants of apoptosis and necrosis'. *Toxicology Letters*, 99(3), pp. 157-168.

- Messaoud, C., Boussaid, M. (2011) 'Myrtus communis berry color morphs: A comparative analysis of essential oils, fatty acids, phenolic compounds, and antioxidant activities'. *Chemistry Biodiversity*, 8(2), pp. 300-310.
- Michaelis, M., Suhan, T., Cinatl, J., Driever, P. H., Cinatl, J. (2004) 'Valproic acid and interferon- α synergistically inhibit neuroblastoma cell growth in vitro and in vivo'. *International Journal of Oncology*, 25(6), pp. 1795-1799.
- Min, K.-j., Kwon, T. K. (2014) 'Anticancer effects and molecular mechanisms of epigallocatechin-3-gallate'. *Integrative Medicine Research*, 3(1), pp. 16-24.
- Misaghi, A., Goldin, A., Awad, M., Kulidjian, A. A. (2018) 'Osteosarcoma: a comprehensive review'. *Sicot-j*.
- Mittler, R. (2017) 'ROS are good'. *Trends In Plant Science*, 22(1), pp. 11-19.
- Mojic, M., Takeda, K., Hayakawa, Y. (2018) 'The dark side of IFN- γ : its role in promoting cancer immunoevasion'. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), pp. 89.
- Mook, O. R., Frederiks, W. M., Van Noorden, C. J. (2004) 'The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis'. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1705(2), pp. 69-89.
- Mothana, R. A., Kriegisch, S., Harms, M., Wende, K., Lindequist, U. (2011) 'Assessment of selected Yemeni medicinal plants for their in vitro antimicrobial, anticancer, and antioxidant activities'. *Pharmaceutical Biology*, 49(2), pp. 200-210.
- Myszka, K., ve ark. (2020) 'Studies on the anti-proliferative and anti-quorum sensing potentials of Myrtus communis L. essential oil for the improved microbial stability of salmon-based products'. *LWT - Food Science and Technology*, 127.
- Nagase, H., Woessner, J. F. (1999) 'Matrix metalloproteinases'. *Journal of Biological chemistry*, 274(31), pp. 21491-21494.
- Nicotera, P., Melino, G. (2004) 'Regulation of the apoptosis–necrosis switch'. *Oncogene*, 23(16), pp. 2757-2765.
- Ogur, R. (2014) 'Studies with Myrtus communis L.: anticancer properties'. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 3(4), pp. 135.
- Oğur, R. (1994) 'Mersin bitkisi (Myrtus communis L.) hakkında bir inceleme'. *Çevre Dergisi*, 10(1), pp. 21-25.
- Okamoto, I., ve ark. (2002) 'The flavonoid Kaempferol suppresses the graft-versus-host reaction by inhibiting type 1 cytokine production and CD8⁺ T cell engraftment'. *Clinical Immunology*, 103(2), pp. 132-144.
- Öncel, M. (2012) 'Matriks metalloproteinazlar ve kanser'. *Eur J Basic Med Sci*, 2(3), pp. 91-100.
- Özbayer, C., Yağci, E., Hülyam, K. (2018) 'Obezite, tip 2 diyabet ve İnsülin direnci arasındaki bağlantı: İnflamasyon'. *Tıp Fakültesi Klinikleri Dergisi*, 1(2), pp. 27-36.
- Özcan, M. M., Al Juhaimi, F., Ahmed, I. A. M., Babiker, E. E., Ghafoor, K. (2020) 'Antioxidant activity, fatty acid composition, phenolic compounds and mineral

- contents of stem, leave and fruits of two morphs of wild myrtle plants'. *Journal of Food Measurement Characterization*, 14(3), pp. 1376-1382.
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., Yönden, Z. (2015) 'Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA'. *Clin Exp Invest*, 6(3), pp. 331-336.
- Özer, Ö. F., Güler, E. M., Selek, Ş., Çoban, G., Türk, H. M., Koçyiğit, A. (2019) 'Akciğer, meme ve kolon kanserli hastalarda oksidatif stres parametrelerinin değişimi'. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 16(2), pp. 235-240.
- Özvaran, M. K. (2004) 'Malign mezotelyomada gen tedavisi'. *Toraks Dergisi*, 5(2), pp. 110-115.
- Pahwa, R., Goyal, A., Bansal, P., Jialal, I. (2020) 'Chronic inflammation'. *Stat Pearls*.
- Pavlopoulou, A., Spandidos, D. A., Michalopoulos, I. (2015) 'Human cancer databases'. *Oncology reports*, 33(1), pp. 3-18.
- Peng, L., Jiang, D. (2018) 'Resveratrol eliminates cancer stem cells of osteosarcoma by STAT3 pathway inhibition'. *PloS one*, 13(10), pp. e0205918.
- Pfaffl, M. W. (2001) 'A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR'. *Nucleic Acids Research*, 29(9), pp. e45-e45.
- Quintero-Fabián, S., ve ark. (2019) 'Role of matrix metalloproteinases in angiogenesis and cancer'. *Frontiers in oncology*, 9 pp. 1370.
- Rajendran, P., ve ark. (2021) 'Myricetin: versatile plant based flavonoid for cancer treatment by inducing cell cycle arrest and ROS-reliant mitochondria-facilitated apoptosis in A549 lung cancer cells and in silico prediction'. *Molecular Cellular Biochemistry*, 476(1), pp. 57-68.
- Reel, B. (2006) 'Matriks metalloproteinaz enzimleri ve ateroskleroz'. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 26(5), pp. 527-537.
- Ren, W., Tang, D. G. (1999) 'Extract of Solanum muricatum (Pepino/CSG) inhibits tumor growth by inducing apoptosis'. *Anticancer Research*, 19(1A), pp. 403-408.
- Rossi, A., ve ark. (2008) 'Myrtucommulone From Myrtus Communis Exhibits Potent Anti-Inflammatory Effectiveness In Vivo'.
- Roulston, A., Marcellus, R., Branton, P. (1999) 'Apoptosis and viruses'. *Annu. Rev. Microbiol.*, 53 pp. 577-628.
- Rytting, M., ve ark. (2000) 'Osteosarcoma in preadolescent patients'. *Clinical Orthopaedics Related Research*, 373 pp. 39-50.
- Sadirli, S. K., Ünsar, S. (2009) 'Kanserli hastalarda Edmonton Semptom Tanılama Ölçeği (ESTÖ); Türkçe geçerlilik ve güvenilirlik çalışması'. *Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 4(1), pp. 79-95.
- Sadykova, L. R., ve ark. (2020) 'Epidemiology and risk factors of osteosarcoma'. *Cancer Investigation*, pp. 1-14.
- Sakinah, S. S., Handayani, S. T., Hawariah, L. A. (2007) 'Zerumbone induced apoptosis in liver cancer cells via modulation of Bax/Bcl-2 ratio'. *Cancer Cell International*, 7(1), pp. 1-11.

- Samareh Fekri, M., ve ark. (2018) 'Protective effect of standardized extract of *Myrtus communis* L.(myrtle) on experimentally bleomycin-induced pulmonary fibrosis: biochemical and histopathological study'. *Drug Chemical Toxicology*, 41(4), pp. 408-414.
- Scheau, C., ve ark. (2019) 'The role of matrix metalloproteinases in the epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma'. *Analytical Cellular Pathology*.
- Sen, S., Chakraborty, R.,De, B. (2011) 'Challenges and opportunities in the advancement of herbal medicine: India's position and role in a global context'. *Journal of Herbal Medicine*, 1(3-4), pp. 67-75.
- Shahbazian, D., Karami, A., Eshghi, S.,Maggi, F. (2018) 'Variation in the essential oil yields and compositions of Myrtle (*Myrtus communis* L.) Populations collected from natural habitats of Southern Iran'. *Journal of Essential Oil Research*, 30(5), pp. 369-378.
- Shati, A. A., ve ark. (2020) 'Secondary Metabolites of *Saussurea costus* Leaf Extract Induce Apoptosis in Breast, Liver, and Colon Cancer Cells by Caspase-3-Dependent Intrinsic Pathway'. *BioMed Research International*, 2020.
- Sherr, C. J. (2000) 'The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited'. *Cancer Research*, 60(14), pp. 3689-3695.
- Shiomi, K., Kuriyama, I., Yoshida, H.,Mizushima, Y. (2013) 'Inhibitory effects of myricetin on mammalian DNA polymerase, topoisomerase and human cancer cell proliferation'. *Food Chemistry*, 139(1-4), pp. 910-918.
- Simpson, S., Dunning, M. D., de Brot, S., Grau-Roma, L., Mongan, N. P.,Rutland, C. S. (2017) 'Comparative review of human and canine osteosarcoma: morphology, epidemiology, prognosis, treatment and genetics'. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59(1), pp. 71.
- Sisay, M.,Gashaw, T. (2017) 'Ethnobotanical, ethnopharmacological, and phytochemical studies of *Myrtus communis* Linn: A popular herb in Unani system of medicine'. *Journal of Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*, 22(4), pp. 1035-1043.
- Suzuki, M., Youle, R. J.,Tjandra, N. (2000) 'Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization'. *Cell death*, 103(4), pp. 645-654.
- Tayeh, M., Nilwarangoon, S., Mahabusarakum, W.,Watanapokasin, R. (2017) 'Anti-metastatic effect of rhodomyrtone from *Rhodomyrtus tomentosa* on human skin cancer cells'. *International Journal of Oncology*, 50(3), pp. 1035-1043.
- Tretiakova, I., ve ark. (2008) 'Myrtucommulone from *Myrtus communis* induces apoptosis in cancer cells via the mitochondrial pathway involving caspase-9'. *Apoptosis*, 13(1), pp. 119-131.
- Ulutaş, H. Z.,Duran, G. G. (2020) 'Antioxidant Effects of *Myrtus communis* L.'s Essential Oils in BEAS-2B Cells Induced by Oxidative Stress with Hydrogen Peroxide'. *Acta Medica Alanya*, 4(1), pp. 21-28.
- Ulutin. (2006) 'Kanserli hastada psikolojik sorunlar'. *Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Bilimleri Dergisi*, 9 pp. 39-41.

- Vandenabeele, P., Declercq, W., Beyaert, R., Fiers, W. (1995) 'Two tumour necrosis factor receptors: structure and function'. *Trends in cell biology*, 5(10), pp. 392-399.
- Verma, R., ve ark. (2014) 'Apoptosis (Programmed cell death)-A review'. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 3(4), pp. 1854-1872.
- Vermeulen, K., Berneman, Z. N., Van Bockstaele, D. R. (2003) 'Cell cycle and apoptosis'. *Cell Proliferation*, 36(3), pp. 165-175.
- Visse, R., Nagase, H. (2003) 'Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry'. *Circulation Research*, 92(8), pp. 827-839.
- Wang, H., Li, S., Zhang, G., Wu, H., Chang, X. (2019) 'Potential therapeutic effects of cyanidin-3-O-glucoside on rheumatoid arthritis by relieving inhibition of CD38+ NK cells on Treg cell differentiation'. *Arthritis Research Therapy*, 21(1), pp. 1-19.
- Wei, L., ve ark. (2014) 'Interleukin-12 gene adjuvant increases the immunogenicity of virus-like particles of human papillomavirus type 16 regional variant strain'. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 18(1), pp. 65-70.
- Wenzel, E. S., Singh, A. T. (2018) 'Cell-cycle checkpoints and aneuploidy on the path to cancer'. *In Vivo*, 32(1), pp. 1-5.
- Whelan, J., Burcombe, R., Janinis, J., Baldelli, A., Cassoni, A. (2002) 'A systematic review of the role of pulmonary irradiation in the management of primary bone tumours'. *Annals of Oncology*, 13(1), pp. 23-30.
- Widhe, B., Widhe, T. (2000) 'Initial symptoms and clinical features in osteosarcoma and Ewing sarcoma'. *JBJS*, 82(5), pp. 667.
- Widlak, P., Garrard, W. (2009) 'Roles of the major apoptotic nuclease-DNA fragmentation factor-in biology and disease'. *Cellular Molecular Life Sciences*, 66(2), pp. 263-274.
- Wittig, J. C., ve ark. (2002) 'Osteosarcoma: a multidisciplinary approach to diagnosis and treatment'. *American Family Physician*, 65(6), pp. 1123.
- Wynn, T. A., Vannella, K. M. (2016) 'Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis'. *Immunity*, 44(3), pp. 450-462.
- Xiang, M., ve ark. (2019) 'Sera total oxidant/antioxidant status in lung cancer patients'. *Medicine*, 98(37).
- Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., Matar, C. (2018) 'The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols'. *Nutrients*, 10(11), pp. 1618.
- Yao, C., Narumiya, S. (2019) 'Prostaglandin-cytokine crosstalk in chronic inflammation'. *British Journal of Pharmacology*, 176(3), pp. 337-354.
- Yegin, S. C., Yur, F., Ceylan, E. (2013) 'Effect of lycopene application in rats with experimental diabetes using lipoprotein, paraoxonase and cytokines'. *The Journal of Membrane Biology*, 246(8), pp. 621-626.
- Yokuş, B., Çakır, D. Ü. (2012) 'Kanser biyokimyası'. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1, pp. 7-18.

- Yu, Z., Li, W., Liu, F. (2004) 'Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by genistein in colon cancer HT-29 cells'. *Cancer Letters*, 215(2), pp. 159-166.
- Zhang, Q.-Y., Wang, F.-X., Jia, K.-K., Kong, L.-D. (2018) 'Natural product interventions for chemotherapy and radiotherapy-induced side effects'. *Frontiers in Pharmacology* 9 pp. 1253.
- Zhang, S., ve ark. (2018) 'The effects of ludartin on cell proliferation, cell migration, cell cycle arrest and apoptosis are associated with upregulation of p21WAF1 in Saos-2 osteosarcoma cells in vitro'. *Medical science monitor: International Medical Journal of Experimental Clinical Research*, 24 pp. 4926.
- Zheng, Y., Qiu, Y., Grace, C. R., Liu, X., Klionsky, D. J., Schulman, B. A. (2019) 'A switch element in the autophagy E2 Atg3 mediates allosteric regulation across the lipidation cascade'. *Nature Communications*, 10(1), pp. 1-14.
- Zhivotovsky, B., Orrenius, S. (2006) 'Carcinogenesis and apoptosis: paradigms and paradoxes'. *Carcinogenesis*, 27(10), pp. 1939-1945.
- Zhu, X.-C., ve ark. (2015) 'Advances in cancer pain from bone metastasis'. *Drug Design, Development*, 9 pp. 4239.
- Zundler, S., Neurath, M. F. (2015) 'Interleukin-12: Functional activities and implications for disease'. *Cytokine Growth Factor Reviews*, 26(5), pp. 559-568.

EKLER

EK-1 ETİK KURUL ONAYI



T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Birimi : Tıbbi Etik Kurul Başkanlığı
Kodu : 2011-KAEK-2
Sayı : 2020/145
Konu : Tıbbi Etik Kurul Kararı

06.03.2020

Sayın; Prof. Dr. Sefa ÇELİK
Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD
AFYONKARAHİSAR

İlgi: Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 06.03.2020 tarih ve 2020/114 sayılı kararı.

21.02.2020 tarihli dilekçenize ilişkin alınan ilgi sayılı Etik Kurul Kararı ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Dağıstan Tolga ARIÖZ
Etik Kurul Başkanı

EK:
1-İlgi sayılı karar (1 sayfa)

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARLARI

Toplantı Tarihi	06.03.2020	Toplantı Numarası	2020/3	Toplantı Saati	09:00	Etik Kurul Kodu
						2011-KAEK-2

114-Prof. Dr. Sefa ÇELİK'in 21.02.2020 tarihli dilekçesi incelendi. Araştırma protokolüne uyularak, Sağlık Bakanlığı'nın 13.04.2013 tarih 28617 sayılı Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmeliği ve yayımlanan kılavuzlarında belirtilen hususlar dikkate alınarak, sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere araştırmanın yapılmasında etik sakınca olmadığına toplantıya katılan üyelerin **oy birliği** ile karar verildi.


06.03.2020
Dr. Öğr. Üyesi Gynim Sina ARKAN
Raporlar

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : Emira KURBASEVIC
Uyruğu : Sırbistan
Doğum Tarihi ve Yeri: 10.02.1994
Medeni durum : Bekar
E-posta : kurbasevic1@hotmail.com

EĞİTİM

Lisans: Uşak Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü
.....(2013-2017)

Yüksek Lisans: Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Lisansüstü Eğitim
Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı(2017-2021)

YABANCI DİL

İngilizce

BİLİMSEL ETKİNLİK

Çelik, S., Kurbaşevic, E., Tosun, M., Therapeutic Potential of Bee Venom in the
Treatment of Testicular Cancer,1.EBAT, 27-30 October 2018, Antalya.