



T.C.
BURSA ULUDAĞ
ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ TIBBİ BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI



***INULA VISCOSA* YAPRAKLARINDAN ELDE EDİLEN METANOL VE SU ÖZÜTLERİNİN
MALİGN MELANOM HÜCRE HATLARI ÜZERİNE SİTOTOKSİK VE
ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DİLARA KAMER ÇOLAK

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BURSA-2019



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Inula viscosa YAPRAKLARINDAN ELDE
EDİLEN METANOL VE SU
ÖZÜTLERİNİN MALİGN MELANOM
HÜCRE HATLARI ÜZERİNE
SİTOTOKSİK VE ANTİPROLİFERATİF
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DİLARA KAMER ÇOLAK
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DANIŞMAN:

Prof. Dr. ÜNAL EGELİ

KUAP(T) 2018/18

BURSA-2019

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak sunduğum “*Inula viscosa* Yapraklarından Elde Edilen Metanol ve Su Özütlelerinin Malign Melanom Hücre Hatları Üzerine Sitotoksik ve Antiproliferatif Etkilerinin Araştırılması” adlı çalışmamın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Adı Soyadı
Tarih ve İmza

Sıla Kemer GÖLAK

06.05.2019

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Dilara Kamer ÇOLAK tarafından hazırlanan "*Inula viscosa* Yapraklarından Elde Edilen Metanol ve Su Özütlерinin Malign Melanom Hücre Hatları Üzerine Sitotoksik ve Antiproliferatif Etkilerinin Araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans tezi ...19.../...08.../...2019...günü, ...10.00...-...11.00... saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Adı-Soyadı
Prof. Dr. Ünal Egele

İmza

Üye

Prof. Dr. Feray Korkar

Üye

Prof. Dr. Gülşah Çeçener

Üye

Üye

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun20.08.2019..... tarih ve2019/19..... sayılı toplantısında alınan18..... numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Gülşah ÇEÇENER
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

...06 / 09 / 2019

Adı Soyadı: Dilara Kamer ÇOLAK

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

Tez Konusu: *Inula viscosa* Yapraklarından Elde Edilen Metanol ve Su Özütlерinin Malign Melanom Hücre Hatları Üzerine Sitotoksik ve Antiproliferatif Etkilerinin Araştırılması

ÖZELLİKLER	UYGUNDUR	UYGUN DEĞİLDİR	ACIKLAMA
Tezin Boyutları	☒	☐	
Dış Kapak Sayfası	☒	☐	
İç Kapak Sayfası	☒	☐	
Kabul Onay Sayfası	☒	☐	
Sayfa Düzeni	☒	☐	
İçindekiler Sayfası	☒	☐	
Yazı Karakteri	☒	☐	
Satır Aralıkları	☒	☐	
Başlıklar	☒	☐	
Sayfa Numaraları	☒	☐	
Eklerin Yerleştirilmesi	☒	☐	
Tabloların Yerleştirilmesi	☒	☐	
Kaynaklar	☒	☐	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Ünal EGELİ

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak

İç Kapak

ETİK BEYAN

KABUL ONAY

TEZ KONTROL BEYAN FORMU

İÇİNDEKİLER.....	V
TÜRKÇE ÖZET	VII
İNGİLİZCE ÖZET	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Deri ve Melanosit.....	3
2.2. Melanogenez.....	5
2.3. Malign Melanom.....	7
2.3.1. MM İnsidansı ve Epidemiyolojisi	9
2.3.2. Risk Faktörleri	10
2.3.2.1. Ultraviyole (UV) Işın Maruziyeti.....	10
2.3.2.2. Nevüsler	12
2.3.2.3. Fenotipik Özellikler.....	13
2.3.2.4. Aile Öyküsü	14
2.3.2.5. Cinsiyet.....	14
2.3.3. Malign Melanomun Tanı, Evreleme ve Tedavisi.....	14
2.3.3.1. Cerrahi Yöntemler	20
2.3.3.2. Kemoterapi.....	20
2.3.3.3. Radyoterapi.....	21
2.3.3.4. İmmünoterapi.....	21
2.3.3.5. Hedefe Yönelik Terapi (Targeted Therapy)	22
2.3.4. Malign Melanomda Genetik ve Epigenetik Değişimler	24
2.3.4.1. Malign Melanomda Genetik Değişimler	24
2.4. Alternatif Tıp	28
2.4.1. <i>Inula</i> Cinsi	30
2.4.1.1. Türkiye’de yetişen <i>Inula</i> Türleri	30
2.4.2. <i>Inula</i> Türleri ve Tıp	32
2.4.3. <i>Inula</i> Cinsi ve Kanser	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Gereç	35
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	35
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar.....	35
3.2. Yöntem	36
3.2.1. <i>Inula viscosa</i> ’nın Taksonomik Analizi.....	36
3.2.2. <i>Inula viscosa</i> ’nın Ekstraksiyonu	36
3.2.2.1. <i>Inula viscosa</i> ’nın Metanol ve Su Özütünün Kromatografik Analizi.....	38

3.2.2.2. <i>Inula viscosa</i> 'nın Metanol ve Su Özütlerinin Antioksidan Aktivitesinin Değerlendirilmesi	38
3.2.3. Hücre Kültürü	39
3.2.3.1. Hücre Hatlarının Temini.....	39
3.2.3.2. Hücre Hatlarının Özellikleri	39
3.2.3.3. Besiyerlerinin Hazırlanması ve İnkübasyon Koşulları.....	39
3.2.3.4. Hücre Hatlarının Pasajlanması.....	39
3.2.3.5. Hücre Sayımı	40
3.2.3.6. Hücre Hatlarının Stoklanması.....	41
3.2.3.7. Stoklanan Hücre Hatlarının Çözdürülmesi	42
3.2.4. <i>Inula viscosa</i> 'nın Metanol ve Su Özütünün Sitotoksik ve Antiproliferatif Etkisinin Hücre Hatlarında Analizi.....	42
3.2.5. Hücre Ölümünün Morfolojik Analizi.....	45
3.2.5.1. Hücre Ölüm Morfolojisinin Acridine Orange-Etidyum Bromür (AO / EB) Floresan Boyaması İle Belirlenmesi	47
3.2.6. Apoptozun Belirlenmesi	48
3.2.6.1. <i>Annexin V</i>	48
3.2.7. Hücre Döngüsü Analizi	49
3.2.8. <i>Inula viscosa</i> 'nın Metanol Özütünün Tümörün Agresifliği Üzerine Etkisinin Yara İyileşmesi Testi (<i>Wound Healing Assay</i>) Uygulanarak Değerlendirilmesi	49
3.2.9. İstatistiksel Analiz	50
4. BULGULAR	51
4.1 <i>Inula viscosa</i> 'nın Taksonomik Analizi	51
4.2 <i>Inula viscosa</i> 'nın Metanol ve Su Özütlerinin Kromatografik Analizi	51
4.3 <i>Inula viscosa</i> 'nın Metanol Ve Su Özütlerinin Antioksidan Aktivitesinin Değerlendirilmesi	52
4.4 <i>Inula viscosa</i> 'nın Metanol Ve Su Özütlerinin A2058, Mewo ve Normal Fibroblast Hücre Hatları Üzerindeki Antiproliferatif ve Sitotoksik Etkisi	53
4.5 <i>Inula viscosa</i> 'nın Metanol Özütünün A2058, Mewo ve Normal Fibroblast Hücre Hatlarının Morfolojik Analizi.....	67
4.6 IV'nin Metanol Özütünün Hücrelerdeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi	71
4.7 <i>Inula viscosa</i> 'nın Metanol Özütünün Hücre Döngüsü Üzerine Etkisi.....	78
4.8 <i>Inula viscosa</i> 'nın Metanol Özütünün Tümörün Agresifliği Üzerine Etkisi	84
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	91
6. KAYNAKLAR.....	99
7. SİMGELER VE KISALTMALAR.....	108
8. TEŞEKKÜR	110
9. ÖZGEÇMİŞ.....	111

TÜRKÇE ÖZET

Malign melanom (MM) tedavisinde mevcut terapötik yaklaşımların çoğu, meydana gelen mutasyonlar sonucu etkinliğin devamlılığı nedeniyle tümör hücrelerinin aşırı proliferatif özellik sergilemesini sağlayan *MAPK* yolağındaki etkin kinazların inhibisyonunu hedefler ancak ne yazık ki hastalarda tedavi sonrası ilaçlara karşı direnç oluşmaktadır. Bu nedenle adjuvan olarak geliştirilebilecek yeni bitkisel çözümler araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Mevcut tez kapsamında *Inula viscosa* (IV) yapraklarından elde edilen metanol ve su özütlerinin MM hücre hatlarında (A2058 ve MeWo) ve normal fibroblast hücreleri üzerindeki olası sitotoksik ve antiproliferatif etkilerinin *in-vitro* değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Mevcut tez kapsamında öncelikle IV'nin taksonomik ve kromatografik analizi yapılmış, antioksidan aktivitesi değerlendirilmiştir. Bu analizleri takiben belirlenen süre ve dozlarda IV yapraklarından elde edilen metanol ve su özütlerinin A2058, MeWo ve normal fibroblast hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri WST-1 analizi ile belirlenmiştir. WST-1 bulgularına göre bir sonraki aşamalara *Inula viscosa*'nın metanol özütü (IVM) ile devam edilme kararı alınmıştır. IVM'nin apoptotik etkilerinin ve hücre siklusu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için Annexin-V ve hücre siklusu analizleri gerçekleştirilmiştir. Hücrelerde meydana gelen morfolojik değişimler akridin oranj-etidyum bromür (AO/EB) floresan boyaması ile görüntülenmiştir. Son olarak IV'nin metanol özütünün (IVM) hücre hatlarının metastatik yeteneklerini nasıl etkilediğini gözlemlemek için yara iyileşmesi testi uygulanmıştır.

Elde edilen bulgulara göre IV'nin metanol özütünün canlılığı sırasıyla en fazla MeWo, A2058 ve normal fibroblast hücre hattında inhibe ettiği tespit edilmiştir. Buna ilaveten IVM'nin MM ve normal fibroblast hücre hatlarında apoptotik ölümü indüklediği belirlenmiştir. Hücrelerin genomik profillerindeki farklılıktan dolayı IVM'nin uygulanan dozun miktarına bağlı hücrelerde oluşturulan DNA hasarının hücre döngüsünün farklı kontrol noktalarında tespit edilebildiği öngörülmüştür. Son olarak IVM'nin içerisinde çözündüğü varsayılan bileşenlerin literatürdeki bulgularına göre hücrelerin metastatik özelliğini çeşitli genleri regüle etmek vasıtasıyla inhibe edebileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Inula viscosa*, A2058, MEWO, antiproliferatif

İNGİLİZCE ÖZET

INVESTIGATING OF CYTOTOXIC AND ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS OF METHANOL AND WATER EXTRACTS OBTAINED FROM *INULA VISCOSA* ON MALIGNANT MELANOMA CELL LINES

Most of the therapeutic approaches that are available in the treatment of malignant melanoma (MM) target the inhibition of active kinases in the MAPK pathway, which allows the tumor cells to exhibit excessive proliferative properties due to the continuity of the activity resulting from mutations, but unfortunately patients develop resistance to drugs after treatment. Therefore, new herbal solutions that can be developed as adjuvants attract the attention of researchers. Within the scope of the present thesis, it was aimed *in vitro* evaluation of possible cytotoxic and antiproliferative effects of methanol and water extracts from *Inula viscosa* (IV) leaves on MM cell lines (A2058 and MeWo) and normal fibroblast cells.

Firstly, taxonomic and chromatographic analysis of water and methanol extract from IV leaves was performed and antioxidant activity was evaluated. Following these analyzes, the antiproliferative effects of methanol and water extracts obtained from IV leaves on A2058, MeWo and normal fibroblast cells were determined by WST-1. According to WST-1 findings, it was decided to continue the next steps with IVM. Annexin-V and cell cycle analyzes were performed for determination of apoptotic effects and at which check point of cell cycle they are arrested. Morphological changes in cells were visualized by inverted microscopy by fluorescent staining of acridine orange-ethidium bromide. Finally, a wound healing test was performed to observe how the methanol extract of IV affects the metastatic ability of these cell lines.

According to the findings, it was found that methanol extract of IV (IVM) inhibits viability of in MeWo more than A2058 and least normal fibroblast cell lines, respectively. In addition, the methanol extract of IV was found to induce apoptotic death in MM and normal fibroblast cell lines. Due to the differences in the genomic profiles of these cell lines, it is predicted that the DNA damage generated in the cells due to the amount of dose of IV administered can be arrested at different check points of the cell cycle. Finally, according to the literature findings it was concluded that the components assumed to be dissolved in IVM may inhibit the metastatic property of these cell lines by regulating various genes according to the literature findings.

Keywords: *Inula viscosa*, A2058, MEWO, antiproliferative

1. GİRİŞ

Melanom insidansı birçok kanser ile kıyaslandığında düşük olmasına rağmen son 50 yıldır hızla artmaktadır. Malign Melanom (MM) deri kanserlerinin yaklaşık %1'ini oluşturmaya rağmen en ölümcül olanıdır. Kutanöz melanom ise MM alt tiplerinden en yaygın olanıdır ve melanom vakalarının yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır (Ali ve ark., 2013). MM'un erken evrelerinde tespit edilmesi durumunda %90'ın üzerinde tedavi sağlanabilirken, ileri evre melanom hastalarında 5 yıllık sağ kalım oranı %20'nin altındadır (Parlak ve ark., 2014). MM'un tedavi limitasyonları; uygulanan tedavi yöntemlerinde tümör hücrelerine olan spesifitesinin eksikliği, kullanılan kimyasalların gastrointestinal sistemde ve deri üzerindeki zararlı etkileri ve buna ilaveten hedefe yönelik tedavi çeşitleri dahil tedavilere karşı oluşturulan dirençtir. Bu nedenle tedaviye karşı yeni yaklaşımların araştırıldığı çalışmalar MM'un güncel literatür verilerini oluşturmaktadır. Bu nedenle MM tedavisine güncel çalışmalar ile ışık tutulmaktadır.

Doğal ürünler 1800'li yıllardan beri ilaç geliştirilmesinde kullanılan önemli kaynaklardır. Bitkisel bileşenlerin kanser tedavisinde kullanılması sadece alternatif tıpla sınırlı kalmamakta, aksine FDA onayı alan ilaçların yaklaşık %50'sini, kanser tedavisinde kullanılan ajanların ise yaklaşık %70'ini bitkisel bileşenler oluşturmaktadır. Dört mevsimin yaşandığı, bitki çeşidi açısından zengin olan ülkemizin doğal kaynakları terapötik ajanların bilim dünyasına katılmasında bilim insanlarına geniş kapsamlı bir katalog sunmaktadır.

Dünya genelinde yaklaşık yüz türü bulunan *Inula* cinsinin Türkiye coğrafik sınırları içerisinde yedisi endemik olmak üzere yirmi yedi türü bulunmaktadır. *Inula* türleri üzerine yapılan çalışmalarda içeriğinin terpenik bileşikler, flavonoidler, glukolipitler ve antranilik asitten oluştuğu saptanmıştır. İçeriğindeki bu bileşenlerden dolayı antiproliferatif, antitümoral ve sitotoksik etkiler sergiliyor olması bu bitkilerin araştırma konusu olarak değerlendirmeye alınması gerekliliğini açığa çıkarmıştır (Bar-Shalom ve ark., 2019). Ülkemizde de farklı coğrafik bölgelerde yetişen *Inula viscosa*'nın (IV) antitümoral ve sitotoksik etkileri farklı kanser türlerinde bilimsel

alışmalar kapsamında incelenmiştir (Bar-Shalom ve ark., 2019; Danino ve ark., 2009; Gökbulut, 2011; Konishi ve ark., 2002; Lee ve ark., 2010; Rozenblat ve ark., 2009; Stojakowska ve ark., 2005; Zhao ve ark., 2006). Literatürdeki bulgular IV ztnn hangi çözücü kullanılarak elde edildiğine ve hangi koşullarda hangi hücreye verildiğine göre değişmektedir. Mevcut bulgular arasında MM kanseri ile ilgili bulgulara sadece bir yayında rastlanılmıştır. Bu yayında da IV zt birebir verilmemiş onun aksine içeriğindeki bileşenlerden birkaçının sitotoksik etkisi farklı MM hücre hatlarında değerlendirilmiştir (Rozenblat ve ark., 2009).

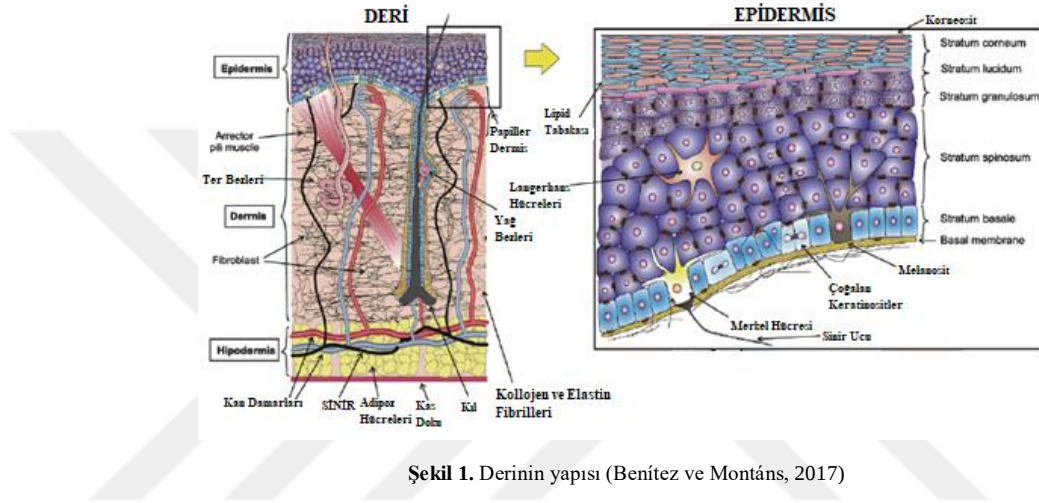
Bu verilere dayanarak mevcut tez çalışmasında, MM tedavisine yeni yaklaşımlar getirmek amacı ile IV'nin iki farklı ztnn MM hücre hatları üzerine antiproliferatif ve sitotoksik etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Tez alışması kapsamında Ege Bölgesi Manisa Akhisar Hasköy'den toplanan IV bitkisinin su ve metanol özütlerinin HPLC-DAD yöntemi ile kromatografik analizi gerçekleştirilmiş ve antioksidan aktivitesi değerlendirilmiştir. MM hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri WST-1 analizi ile değerlendirilmiş olup su özütünün antiproliferatif etkisinin kontrol gurubu ve doz uygulanan gruplar arasında anlamlı bir farklılığa neden olmamasından dolayı diğer analizlere *Inula viscosa*'nın metanol zt (IVM) ile devam edilmiştir. WST-1 analizi sonucu elde edilen verilerin desteklenmesi amacı ile IVM'nin hücre siklusu üzerindeki etkileri akım sitometrik Annexin V ve hücre siklusu analizleri ile değerlendirilmiştir. ztn neden olduğu ölüm tipinin morfolojisinin belirlenmesi için ise akridin oranj-etidyum bromür boyama yapılmıştır. Bu analizleri takiben IVM'nin yara iyileşmesi üzerine etkisi analiz edilmiştir.

Mevcut tez çalışmasında; IVM ve IV'nin su ztnn MM hücre hatları üzerindeki sitotoksik ve antiproliferatif etkileri ilk defa araştırılmıştır. Tez alışması sonucunda IV'nin metanol ztnn MM hücre hatları üzerine sitotoksik etkisi sonucu hücrelerde apoptotik ölüm yolunun indüklendiği gözlemlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri ve Melanosit

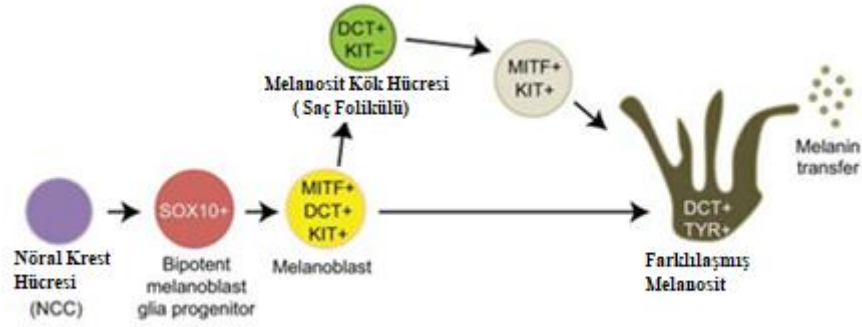
İnsan vücudunun en büyük organı olan deri, üç tabakadan oluşur. Dıştan içe doğru sıralanacak olursa bunlar; yüzey ektoderminden gelişen epidermis, mezenşimden gelişen dermis ve subkutandır (Benítez ve Montáns, 2017) (Şekil 1).



Şekil 1. Derinin yapısı (Benítez ve Montáns, 2017)

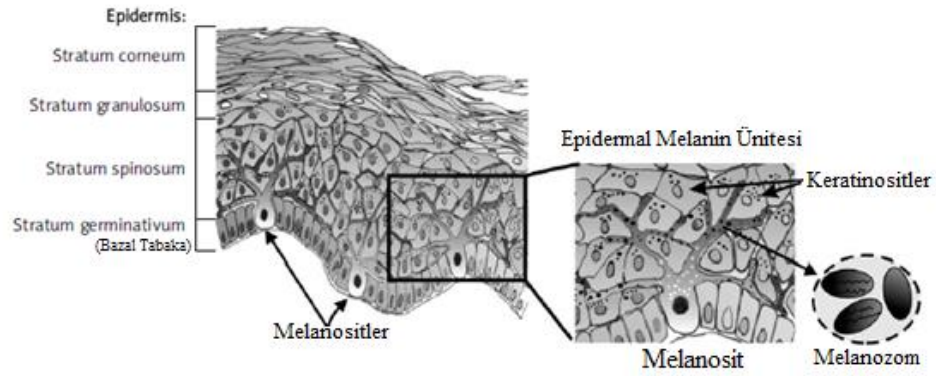
Subkutan doku çoğunlukla adiposit içerir. Orta kısımdaki dermis tabakası kollajen ve elastin gibi bağ doku elemanları ile kan damarları ve sinir ağlarından oluşmuştur. Epidermis ise keratinosit ve dendritik hücrelerden oluşur. Epidermisin tüm tabakalarında bulunan dendritik langerhans hücreleri hasarlı derideki antijenlere bağlanarak immün sistemi uyarmaktadırlar (Benítez ve Montáns, 2017). Epidermisin temel olarak 4 tabakası vardır. Bunlar dıştan içe, stratum korneum, stratum lusidum, stratum granulosum ve stratum germinativumdur (stratum spinozum ve stratum bazale) (Yagi ve Yonei, 2018).

İnsan vücudunda melanositler nöral krest hücrelerinden köken alır ve nöral krest hücrelerinin migrasyon yetenekleri çok yüksektir. Embriyolojik gelişim sırasında farklılaşır, çoğalarak ve göç ederek birçok özel yapı ve doku oluşturmaya devam eder (Mayor ve Theveneau, 2013). Melanositlerin nöral krestten gelişiminin asıl kontrolü ise MITF (microphthalmia-associated transcription factor) transkripsiyon faktörü tarafından gerçekleştirilir (Baxter ve ark., 2010).



Şekil 2. Melanosit Gelişimi (Mort ve ark., 2015)

Melanositler yalnızca epidermis ve saç foliküllerinde bulunmakla kalmaz aynı zamanda iriste, mukozada, kokleada, mezensefalonda ve diğer dokularda bulunur (Plonka ve ark., 2009) (Şekil 2). Melanositler, temel olarak melanin pigmenti üretmekten sorumludurlar (Miller ve ark., 2006). Ten rengini belirleyen pigmentler; melanin, hemoglobin (kırmızı), hemosiderin (kahverengi), karoten ve bilindir (sarı). Bunların arasında saç rengi ve deri renginin oluşumunda kilit rol oynayan molekül ise melanindir (Yamaguchi ve Hearing, 2014). Melanin pigmentleri biyosentetik yollarına göre iki ana gruba ayrılabilir; ömelanin(koyu kahverengi ve siyah; feomelanin (açık kahverengi, sarı ve kırmızı) (Hearing 2011; Kondo ve Hearing, 2011; Simon ve ark., 2009). Ömelanin ve Feomelanin melanozomlarda depo edilir ve melanozomlar olgunlaşma derecelerine bağlı olarak dört aşamaya ayrılabilir. Erken melanozomlar, özellikle evre I melanozomlar lizozomlara benzer; geç melanozomlar ise yapısal matriks ve oldukça yoğun melanin birikintileri içerir (Yamaguchi ve Hearing, 2014).



Şekil 3. Epidermis yapısının şeması. Melanosit, bazal tabaka hücreleri arasında bulunur ve dendritik çıkıntılarla epidermal melanin ünitesinde yaklaşık 30-40 keratinosit ile E- ve P-cadherinler aracılığı ile bağlantı kurar (Cichorek ve ark., 2013; Haas ve ark., 2005).

Melanositler; keratinosit ve dermal fibroblastlarla; salgılanan faktörler ve hücre-hücre etkileşimleri sayesinde bağ kurarlar (Yamaguchi ve ark., 2007). Bir melanositin birçok epidermal keratinosit ile bağ kurmak suretiyle oluşturduğu yapıya epidermal melanosit ünitesi denir (Şekil 3). Keratinositler parakrin büyüme faktörleri ve hücre-hücre bağlantıları aracılığı ile melanositleri kontrol eder (Haas ve Herlyn, 2005; Lee, 2012). Melanositler ve keratinositler ayrıca melanosit proliferasyonunu, melanogenez oluşumunu ve melanositik dendritlerin formasyonunu düzenleyen farklı hormonların lokal kaynağıdır (Sulaimon ve ark., 2003). Farklılaşmış melanosit dendritleri ve keratinositler arasındaki bağlantı, cilt rengini belirleyen melaninin keratinositlere aktarılması için önemli olduğu kadar deri hücrelerinin fotokorunması işlemiyle de ilişkilidir (Cichorek ve ark., 2013; Haas ve ark., 2005).

Pigmentasyon farklılıkları, melanosit sayısındaki değişiklikten değil melanozomların sayısındaki, büyüklüğündeki, bileşimindeki ve dağılımındaki değişkenlikten kaynaklanabilir (Lin ve Fisher, 2007).

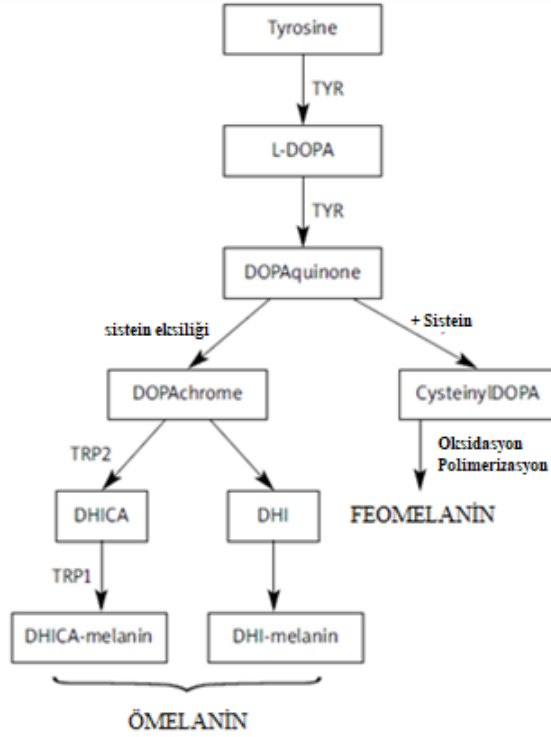
2.2. Melanogenez

Melanogenez melanin sentezinden sorumlu biyokimyasal bir yolaktır (Simon ve ark., 2009). Melanin sentezinin ilk adımı, tirozini dihidroksifenilalanine (DOPA) dönüştüren enzim tirozinaz tarafından katalizlenir. Aynı zamanda DOPA'nın DOPAKinona dönüştürülmesi de tirozinaz ile katalize edilir. Bu enzimin eksikliği albinizm ile sonuçlanır. Memelilerde ve kuşlarda melanin iki farklı formda bulunur; bunlar siyah veya koyu kahverengi olan ömelanin ve kırmızı veya sarı olan

feomelanindir. Bu iki pigment için iki ayrı biyosentetik yolak mevcuttur. Ömelanin ve feomelanin; DOPA'nın yolak boyunca aşağı yönlü akışında birbirinden ayrılır ve bu ayrım melanokortin reseptörü olan *MC1R*'nin sinyal aktivitesi ile belirlenir. Ömelanin, sistein veya glutatyon yokluğunda, spontan bir reaksiyonla veya dopachrome tautomeraz (önceden tirosinaz ile ilgili protein iki veya *TYRP2* olarak bilinen *DCT*) gerektiren bir reaksiyonla sentezlenir. Melanogenezin biyosentetik ara maddeleri toksiktir, bu da sentezin modife edilmiş lizozomla ilişkili bir organel olan melanozomda meydana gelmesinin bir nedenidir.

Çoğu melanosit, melanini bünyesinde barındırmaktan ziyade daha çok melanin granüllerini deri, saç veya tüyde bulunan transfer edildikleri keratinositlerden onlara yakın dendritlerin uçlarına mikrotübüller (kinezin ve dinein) boyunca taşır (Mort ve ark., 2015).

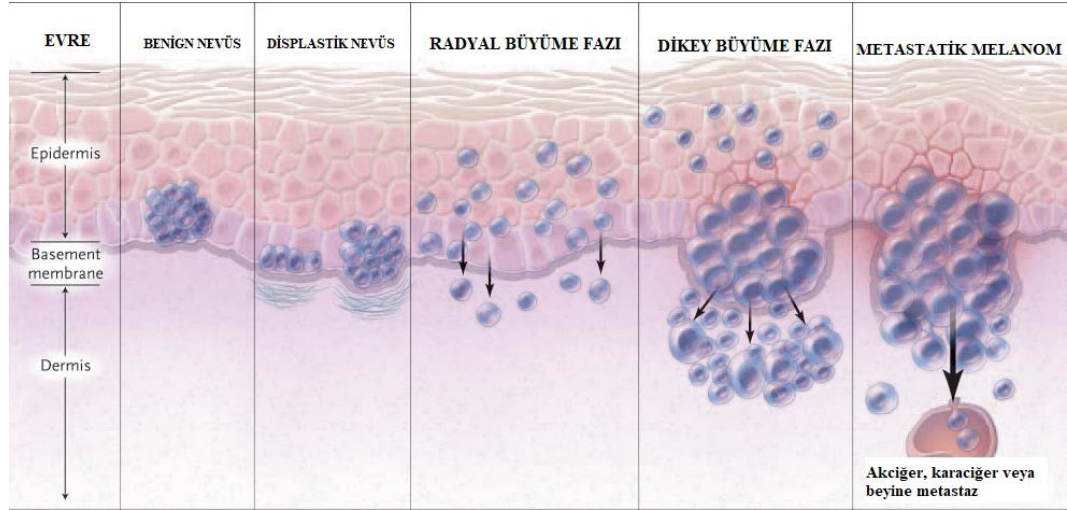
Ömelanin, sistein veya glutatyon yokluğunda, spontan bir reaksiyonla veya dopachrome tautomeraz (daha önce tirosinaz ile ilgili protein 2 veya *TYRP2* olarak bilinen *DCT*) gerektiren bir reaksiyonla sentezlenir. DOPAKinon; DOPACHrome'u üretmek için spontane olarak *DCT* tarafından sırayla hedeflenen oksidasyona uğrar. Feomelanin ise DOPAKinon sisteinlerle yüklendiğinde üretilir. Tirozinaz dışında, reaksiyonların geri kalanı spontane olarak gerçekleşir ve ek katalizör gerektirmez (Manga, 2018; Prota, 2000) (Şekil 4).



Şekil 4. Melanogenez sırasında melanositlerde melanin sentezinin basitleştirilmiş şeması. Tirozin, tirozinaz (TYR), tirozine bağlı protein 1 (TYRP1) ve tirozine bağlı protein 2 (TYRP2)(Cichorek ve ark., 2013).

2.3. Malign Melanom

Malign Melanom (MM); normal melanositlerin genetik ve çevresel faktörlerin birlikte etkileşimi nedeniyle transformasyona uğraması ile oluşur. Normal melanositler çeşitli fenotipik özellikler edinmek suretiyle aşamalı olarak MM'a dönüşürler ve vücut üzerinde bulundukları yerler; genellikle deridir fakat nadiren mukozalar, meninksler, göz ve iç organlarda da bulunabilirler (Rigel, 2005; Skender-Kalneas ve ark., 1995) (Şekil 5).



Şekil 5. Melanomun Gelişimi (Miller ve ark., 2006)

Dünyada melanom ile ilgili coğrafik bölgelere göre değişen risk faktörleri tanımlanmıştır. Ancak genel olarak MM gelişiminde rol oynadığı düşünülen başlıca risk faktörleri; deri tipi (açık ten), çevresel faktörler (ultraviyole maruziyeti), genetik zemin (*CDKN2A* gen mutasyonu), önceden var olan melanositik nevus sayısı, displastik nevus varlığı ve geçirilmiş melanom öyküsüdür (Baykal ve ark., 2015). Tanımlanan risk faktörleri dışında MM' un oluştuğu durumlar da gözlemlenebilir. Kutanöz melanomun klinik ve histopatolojik özelliklerine göre altı grup tanımlanmıştır (Tablo 1).

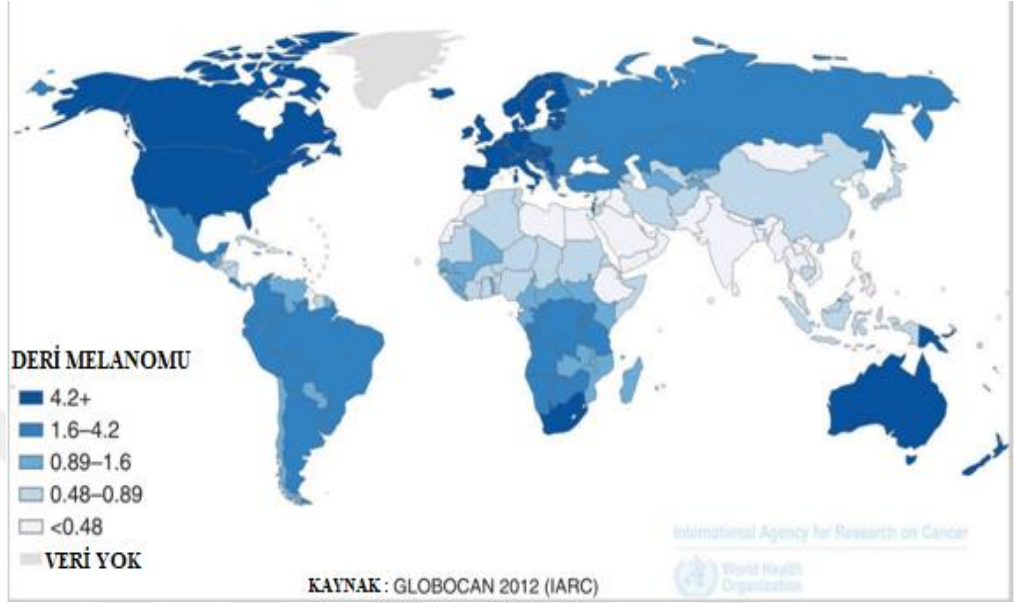
Tablo 1. Melanomun Alt Grupları (Ward ve ark., 2016).

MELANOM ALT GRUPLARI		
ALT GRUP		
Yüzeyel Yayılan Malign Melanom	%70	Nevüslerden kaynaklanır.
Nodüler Malign Melanom	%5	Radyal büyüme aşaması yoktur. Değişkenlik gösterir. Kuvvetli dikey invazyon yeteneği vardır.
Lentigo Malign Melanom	%4-15	Tipik olarak yavaş ilerleyen prognozla karşımıza çıkar. Sıklıkla güneşe maruz kalan bölgelerde gözlemlenir.
Akral Lentiginöz Malign Melanom	%5	Koyu cilt rengine sahip hastalarda görülme frekansı yüksektir. Avuç içi, taban ve cilt altı boşluklarında sıklıkla görülür.
Amelanotik Malign Melanom	%4	Karakteristik özelliği pigmentasyon yokluğudur. Oldukça nadirdir.
Dezmozplastik Malign Melanom	< %4	Erişkinlerde görülür. Yetersiz iş hücreleri ve minimal hücrel atipi ile karakterizedir. En nadir görülen melanom türüdür.

2.3.1. MM İnsidansı ve Epidemiyolojisi

MM tüm Dünya’da insidansı en hızlı artan kanser türlerinden biridir. Dünya’da her yıl 160,000 yeni melanom tanısı konmaktadır (Usher-Smith ve ark., 2014). Kutanöz tümörlerden kaynaklanan ölümlerin %90’ının melanom oluşturmaktadır (Garbe ve ark., 2016). Avrupa genelinde cinsiyet gözetmeksizin melanom insidansı <10-25/100.000 iken Amerika Birleşik Devletleri’nde ise bu oran 20-30/100.000 olarak karşımıza çıkmaktadır. Türkiye’de melanom insidansı erkeklerde 1,8/100.000; kadınlarda 1,2/100.000, yıllık mortalite ise 1,0/ 100.000 olarak tahmin edilmektedir (Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, 2017) (Şekil 6). Özellikle son yıllarda melanom insidansı hızla artmaktadır. ABD’de 1935’te yaşam boyu melanom riski 1/1500 iken, 1960’da 1/600 ve 2000’de ise 1/75’dir. Siegel ve ark. verilerine göre 2019 yılında tahmini olarak toplam 96,480 deri melanomu vakası ile karşılaşılacak ve bunlardan 7,230’u ölüm ile sonuçlanacaktır (Siegel ve ark., 2019). MM insidansı coğrafik

bölgelere, etnik kökene ve genetik yatkınlığa göre çeşitlilik göstermekle birlikte en fazla beyaz popülasyonlar arasında yaygındır.



Şekil 6. MM'un yaşa standardize edilmiş dünya genelindeki coğrafyaya göre insidans dağılımı (Her 100.000 kişide ifade edilmiştir.) (Globocan, 2012).

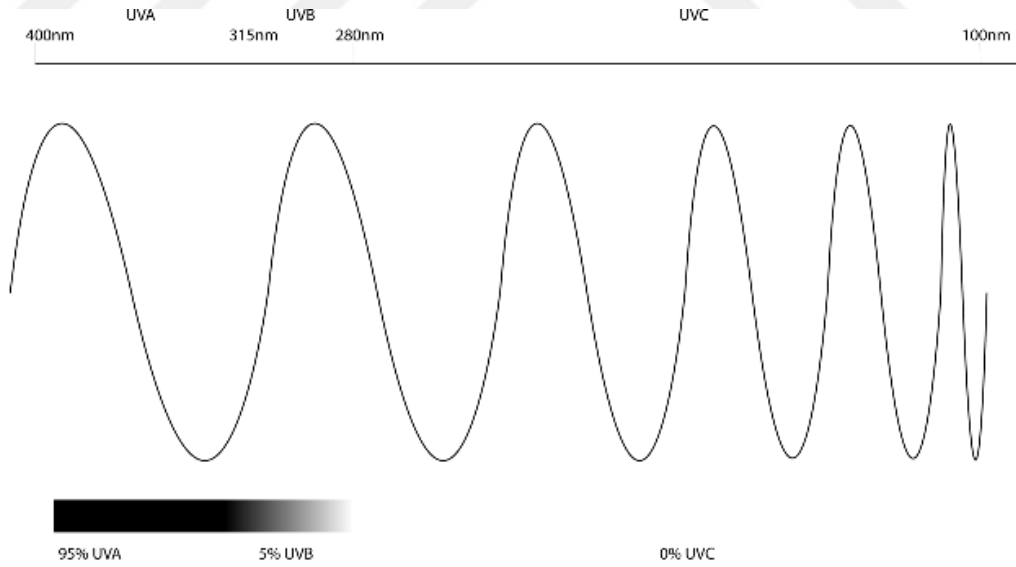
2.3.2. Risk Faktörleri

Tüm kanser türlerinde olduğu gibi çevresel faktörler, genetik faktörler veya ikisinin kombin etkisi MM' un genel risk faktörleri olarak ele alınır.

2.3.2.1. Ultraviyole (UV) Işın Maruziyeti

MM'un en önemli risk faktörü UV maruziyetidir. MM'un tüm tiplerinde melanositlerin UV maruziyeti sonrası neoplastik karakter kazandığı gözlemlenmektedir (Ivry ve ark., 2006; MacKie, 2006). Güneş UV-A ($\lambda = 320-400$ nm), UV-B ($\lambda = 280-320$ nm) ve UV-C ($\lambda = 200-280$ nm) ultraviyole ışınlarını yayar. UVC ışınları, oksijen ve ozon tarafından absorbe edildiği sürece ekolojik bir sorun oluşturmaz ancak daha uzun dalga boylu UV-B (280–315 nm) ve UV-A (315–400 nm) ışınlarının *biota* üzerinde önemli etkileri vardır (Volkovova ve ark., 2012) (Şekil 7). Dünya'nın yüzeyine ulaşan ultraviyole ışınlarının %98,7'si UV-A'dır (Hölzle ve ark., 2005; Madronich ve ark., 1998). Güneş ışığının dominant bileşeni olan UV-A, UV-B'den daha uzun dalga boylarına sahip olduğu için derinin en derin

tabakalarına kadar erişip daha etkili hasarlar meydana getirir (He ve ark., 2004, Hoffmann ve ark., 2000). UVA reaktif oksijen bileşenlerinin formasyonu yolu ile dolaylı yoldan DNA'ya zarar verirken, UVB DNA'ya direkt olarak zarar vererek keratinositlerin apoptozuna yol açar (Eskandarpour ve ark., 2003). UVA ışınlarına maruz kaldıktan sonra, moleküler oksijen, H₂O₂ (hidrojen peroksit), süperoksit ve hidroksil serbest radikallere dönüşür ve aralarından herhangi birinin etkileşimi hücre bileşenlerine zarar verir. UVB ışınları ise özellikle siklobütan pirimidin dimerlerinin (cyclobutane pyrimidine dimers, CPD) oluşumuna neden olur (Thrift ve Whiteman, 2013). UVB maruziyeti sonrası DNA'da timin ve sitozin bazları arasında olağandışı kovalent bağlar meydana gelir. DNA replikasyonu esnasında DNA polimeraz yanlış baz çiftleri arasında bağ kurar ve mutasyon oluşumu gözlemlenir. Aynı zamanda UVB ışınlarının sistemik veya lokal etkisinin immün reaksiyonların baskılanmasına ve antijen toleransının indüklenmesine neden olduğu hayvanlar üzerinde yapılan deneyler ile kanıtlanmıştır (Pejkova ve ark., 2016) Melanomun % 92'sinin dolaylı DNA hasarından; %8'inin ise doğrudan DNA hasarından kaynaklandığı gösterilmiştir (Davies ve ark., 2002).



Şekil 7. Dünya yüzeyine ulaşan UV radyasyon spektrumu (Budden, Bowden, 2013)

2.3.2.2. Nevüsler

MM oluşumu genellikle sağlıklı deriden meydana gelse de azımsanmayacak miktarda vakanın melanositik nevüslerden kaynaklandığı açığa çıkınca literatürde önemli bir risk faktörü olarak yerini almıştır. 100’den fazla klasik melanositik nevusu olan kişilerde melanom riskinin 3-10 kat arttığı düşünülmektedir (Baykal ve ark., 2015; Psaty ve ark., 2010). Nevüs, derideki renkli benign tümör olarak tanımlanır. Çoğu nevüs hiçbir hastalığa yol açmaz fakat bazı nevüs türlerine sahip bireylerde melanoma gelişimi daha olasıdır (The American Cancer Society, 2016). Melanomla ilişkili olan *MAPK* (Mitojen ile Aktifleştirilmiş Protein Kinaz) sinyal yolağı nevüslerde sürekli olarak aktiftir. Edinsel melanositik nevüslerde sıklıkla *BRAF* mutasyonuna; konjenital melanositik nevüs ve spitz nevüs ise sıklıkla *NRAS*, *GNAQ* ve *HRAS* genlerindeki değişimlerle ilişkilendirilmiştir (Roh, 2015). Melanositik nevüsler üç ana başlık altında toplanmaktadır (Tablo 2).

Tablo 2. Melanositik Nevüslerin Sınıflandırılması (Elder ve ark., 2005; Yavuz ve Yavuz, 2014)



Melanositik nevüslerin oluşumuna ve/veya gelişimine katkı sağlayan faktörler (Schaffer, 2006; Yavuz ve Yavuz, 2014):

- Işık teması (Aralıklı yoğun güneş teması vb.)
- Deri Teması
- Bül oluşturan süreçler (Epidermolizis bülloza-junctional vb.)
- Sikatriz oluşturan süreçler (Liken sklerozis)
- Sistemik immünsupresyon (İnsan immün yetmezlik virus infeksiyonu/edinsel immün yetmezlik sendromu vb.)
- Artan hormon seviyeleri (Hamilelik vb.)
- Diğer (Nöbetler veya elektroensefalografik anomaliler vb.)

2.3.2.3. Fenotipik Özellikler

Fenotipik özelliklerin birçoğu melanoma zemin oluşturmaktadır. Açık ten, sarı-kızıl saç, açık göz rengi ve aşırı çillenme gibi özellikler ultraviyole hasarının kolaylıkla oluşmasına zemin oluşturduğu için bu tip fenotipik özellikler MM riskini arttırmaktadır (Baykal ve ark., 2015; Watts ve ark., 2015). Bunun nedeni ise daha önce de belirtildiği gibi melanin üretiminin fazla olmasından dolayı teni koyu renk olan bireylerin, aynı zamanda melanin fazlalığının UV ışınlarından koruyucu etkisinden faydalananıy olmalarıdır. Dermatologlar deri tiplerini UV ışınlarına karşı hassasiyetlerine göre altı alt gruba ayırmışlardır. Bunlar;

TİP I: Ten rengi çok açık, sarı-kızıl saç tipi ve açık renk gözlere sahip olan bireylerin bulunduğu alt grup. Güneş ışığına en çok duyarlı olan bu alt grup bireyler güneş ışığına maruz kaldıklarından bronzlaşmak yerine kızarırlar. Tip I; melanom riski en yüksek olan alt gruptur. Bu grupta Kuzey Avrupalı ve İrlanda kökenli bireyler bulunurlar.

TİP II: Ten rengi açık olan bireylerin bulunduğu alt gruptur ve bronzlaşmayı denediklerinde ten renklerinde koyulaşma gözlenmez, direkt olarak yanarlar.

TİP III: Tip II gibi ten rengi açık olan bireylerin bulunduğu alt gruptur. Orta derecede yanarlar. Kafkasların çoğu tip II veya tip III alt gruplarına dâhildirler.

TİP IV: Güneş ışığına maruz kaldıklarında ten renkleri orta derecede kahverengi olacak şekilde bronzlaşabilirler. Hispaniklerin, Asyalıların ve Orta Doğu'dan gelenlerin çoğu tip IV veya tip V' tir.

TİP V: Kahverengi ten rengine sahip bireylerin dâhil olduğu grup. Nadiren yanarlar, yüksek derecede bronzlaşırlar. Hintliler ve bazı Afrika etnik kökenli bireyler bu grupta yer alırlar.

TİP VI: Koyu kahverengi ve siyah tenli bireylerin yer aldığı gruptur. Asla yanmazlar. UV ışınlarına karşı hassasiyetin en az olduğu gruptur. Afrikalı bireyler bu grupta yer alırlar.

Her ne kadar cilt tiplerine göre UV ışınlarına karşı hassasiyet değişmekte olsa da aşırı maruziyet deri hasarlarına ve hastalıklarına yol açmaktadır (Copyright © 2014 AIM at Melanoma Foundation. All rights reserved).

2.3.2.4. Aile Öyküsü

MM'un yaklaşık olarak %8-12'lik diliminde ailesel yatkınlığı olan hastalar bulunmaktadır. Bu yüzdelik dilimin içerisinde %40'ı 9p kromozomu ile ilişkilidir (Chaudru ve ark., 2004; Kumar ve ark., 1999; Volkovova ve ark., 2012). Ailesel geçişli melanom hastalarının yaklaşık %20-40'ı hücre döngüsünün düzenlenmesi ve hücre yaşlanmasının indüklenmesinde rol oynayan farklı iki proteini (*p16INK4* ve *p14ARF*) kodlayan, 9p21 lokasyonunda bulunan *CDKN2A* geninde germline mutasyon barındırır. *CDKN2A* mutasyon insidansı coğrafi konuma göre değişmektedir. Güneş ışığına fazla maruz kalan coğrafi bölgelerde *CDKN2A* mutasyonlu melanom insidansı diğer bölgelerle kıyaslanınca daha yüksektir (Hansson, 2010). Melanomla ilişkili bir diğer gen de siklin bağımlı bir kinazı kodlayan *CDK4* genidir. 12q14 lokasyonunda bulunur ve *p16INK4A* proteini ile etkileşim içerisindeydir.

2.3.2.5. Cinsiyet

15-30 yaş arası kadınlarda melanom görülme sıklığı erkeklerdekine kıyasla daha fazladır. 30 yaşından sonra ise erkeklerde görülme sıklığı kadınlarınkine kıyasla daha fazladır (Zell ve ark., 2008). 65 yaşından sonra ise kadınlarda melanom; erkeklerinkine kıyasla daha iyi prognozlu seyretmektedir (Konstantinos, 2008).

2.3.3. Malign Melanomun Tanı, Evreleme ve Tedavisi

MM'un doğru ve erken tanısı ile %100 tedavi sağlanabilmektedir. Erken evre MM'lu hasta popülasyonunun %80'ini sadece cerrahi müdahale ile tedavi edilebilirken; kalan %20'sinde metastatik melanom gelişmekte ve ortalama sağ kalım süresi ne yazık ki 6-9 ay ile sınırlı kalmaktadır (T.C Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, 2012; The Independent Community Advisory Board, 2012).

Pigmentli kutanöz lezyonların aşağıdaki parametrelerin herhangi birkaçını veya tamamını karşılıyor olması durumunda melanomdan şüphelenilebilir. Ancak klinik olarak şüphelenilen her pigmentli lezyondan tanının doğrulanması için farklı biyopsi yöntemleri kullanılmaktadır (Gökdemir ve ark., 2011; Parlak ve ark., 2016) (Tablo 3). Operatörler tarafından hangi biyopsi yönteminin tercih edileceği lezyonun boyutuna ve yerleşim yerine bağlıdır (Beksaç ve Beksaç, 2016).

A: Asimetri,

B: Border (sınır) irregüler oluşu,

C: Color (renk) çeşitliliği,

D: Diameter (çap).

Son zamanlarda E: evolving (gelişen) lezyon parametresinin de değerlendirme kapsamına alınması önerilmiştir (T.C Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, 2012; Tuong ve ark., 2012) (Şekil 8).



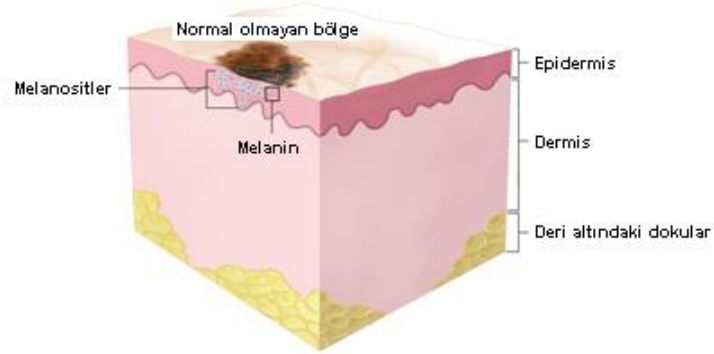
Şekil 8. Melanom teşhisinde kullanılan ABCDE sistemi (Ward ve ark., 2017).

Tablo 3. Melanom tanısında kullanılan biyopsi yöntemleri (Beksaç ve Beksaç, 2016).

EKSİZYONEL BİYOPSİ	Şüpheli pigmentli kutanöz lezyonların tanısında öncelikle kullanılan yöntemdir ve eksizyonun 1-3 mm sınır ile yapılması tanı ve tedavi planlaması için yeterli kabul edilmektedir.
İNSİZYONEL BİYOPSİ * Punch Biyopsi * Shave Biyopsi	Mukoza, akral bölge ve yüz gibi bölgelerde ve lezyonun geniş olması durumunda tercih edilen yöntemdir.

MM evrelemesi yapılırken dikkat edilmesi gereken en önemli unsur lezyonun invazyon derinliğidir. Günümüzde invazyon derinliğinin belirlenmesinde en çok Breslow kalınlığı buna ek olarak da Clark düzeyi kullanılır (Beksaç ve Beksaç, 2016). 2010 yılında Amerikan Kanser Komite Birliği (AJCC) tarafından güncelleştirilen TNM (primer tümör (T), rejyonel lenf nodu varlığı/yokluğu (N) ve uzak metastaz (M) sistemi ise en yeni evreleme sistemidir (Parlak ve ark., 2016).

Evre 0: Epidermiste anormal melanositlerin saptandığı ilk evredir. Anormal melanositlerin kansere neden olabileceği ve hatta metastatik yayılım gösterebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Evre 0 “Melanoma in Situ” olarak adlandırılır (Şekil 9).

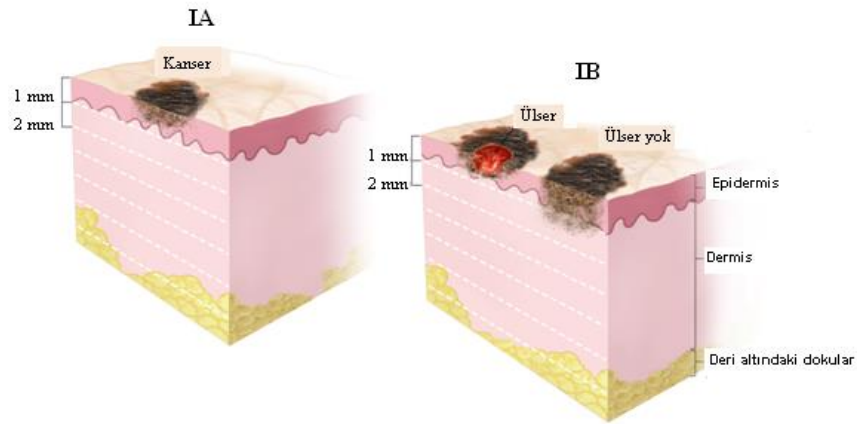


Şekil 9. Evre 0 Malign Melanom (Kızılbey ve Akdeste, 2013; National Cancer Institute, 2019).

Evre I: Rejyonel veya uzak metastazı olmayan düşük riskli tümörün varlığı gözlemlenir. Bu evrede kanser mevcuttur. Mitoz oranı, ülserasyon varlığı veya yokluğuna göre evre IA ve evre IB'ye ayrılmaktadır (Parlak ve ark., 2016) (Şekil 10).

*Evre IA: Tümör 1 mm'den daha incedir ve ülserasyonlu (kanama) olabilir veya olmayabilir.

*Evre IB: Tümör $1 < x < 2$ sınırları arasında olup, ülserasyonlu değildir.



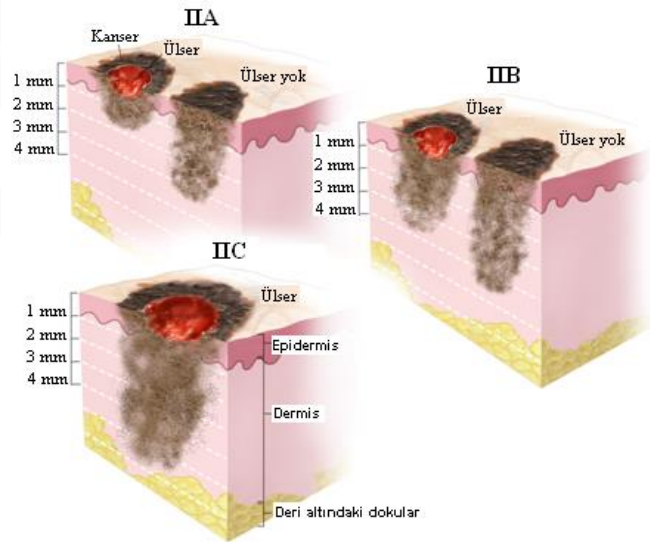
Şekil 10. Evre IA ve IB Melanom (Kızılbey ve Akdeste, 2013; National Cancer Institute, 2019)

Evre II: Lenfatik hastalık veya uzak metastazı olmayan, rekürrens açısından yüksek riski olan primer tümörün gözlemlendiği evredir (Parlak ve ark., 2016). IIA, IIB ve IIC evresi olarak üçe ayrılmaktadır (Şekil 11).

*Evre IIA: Evre IIA karşımıza 2 şekilde çıkabilir. Tümör 1 mm ile 2 mm arasında bir kalınlığa sahip olup ülserasyonlu olabilir veya 2 mm ile 4 mm kalınlığa sahip olup ülserasyonsuz olabilir.

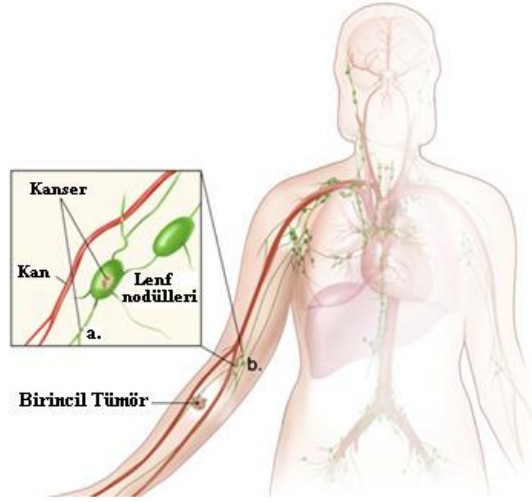
*Evre IIB: Aynı şekilde evre IIB de karşımıza 2 şekilde çıkabilir. Tümör 2 mm ile 4 mm arasında bir kalınlığa sahip olup ülserasyonlu olabilir veya 4 mm'den kalın olup ülserasyonsuz olabilir.

*Evre IIC: Tümör 4 mm'den büyük ve ülserasyonludur (National Cancer Institute, 2019).



Şekil 11. Evre II Melanom (Kızılbey ve Akdeste, 2013; National Cancer Institute, 2019).

Evre III: Herhangi bir kalınlıkta, ülserasyonlu ve ülserasyonsuz tümörden reyonel lenf nodu, intransit veya satellit metastazların gözlemlendiği evredir. Evre III; IIIA, IIIB, IIIC ve IIID olmak üzere 4 alt gruptan oluşmaktadır (Şekil 11).



Şekil 12. Evre III Melanom (Kızılbey ve Akdeste; 2013; National Cancer Institute; 2019)

Evre IIIA: Tümör 1 mm'den ince ve ülserasyonlu veya 2 mm'den ince olup ülserasyonsuzdur.

Evre IIIB: Kanser fiziksel tarama yöntemiyle veya görüntüleme yöntemleriyle bulunabilir. Bu evre karşımıza üç şekilde çıkabilir.

* Kanser bir lenf nodunda fiziksel muayene ile veya görüntüleme teknikleri kullanılarak saptanır veya derinin üzerinde ya da altında mikrosatellit tümörler, satellit tümörler veya in-transit metastazlar gözlemlenebilir.

* Tümör kalınlığı 1 mm'den ince ve ülserasyonludur veya 2 mm'den ince ve ülserasyonsuzdur. Kanser 1-3 lenf nodunda fiziksel muayene veya görüntüleme teknikleri yoluyla saptanabilir. Derinin üzerinde ya da altında mikrosatellit tümörler, satellit tümörler veya in-transit metastazlar gözlemlenebilir (National Cancer Institute; 2019).

Evre IIIC: Evre IIIC çok farklı şekillerde karşımıza çıkabilir.

1- Primer tümörün yeri ve ne zaman başladığı konusunda fikir yürütülemez.

- Kanser 2 ya da 3 lenf nodunda saptanabilir.

- Kanser 1 lenf nodunda bulunup derinin üzerinde veya altında mikrosatellit tümörler, satellit tümörler veya in-transit metastazlar gözlemlenebilir.

2- 2 mm'den ince ülserasyonlu veya ülserasyonsuz tümör veya 4 mm'den ince ülserasyonsuz tümörün varlığında;

- Kanser 1 lenf nodunda saptanır ve derinin üzerinde veya altında mikrosatellit tümörler, satellit tümörler veya in-transit metastazlar gözlemlenebilir.

- Kanser 4 veya daha fazla lenf nodunda gözlemlenebilir.

- Kanser 2 veya daha fazla lenf nodunda saptanır ve derinin üzerinde veya altında mikrosatellit tümörler, satellit tümörler veya in-transit metastazlar gözlemlenebilir.

3- Tümör 2 ile 4 mm arasında bir kalınlığa sahip ve ülserasyonlu olabilir veya 4 mm'den daha kalın olup ülserasyonsuz olabilir. Bu tip tümörün varlığında;

Kanser 1 veya daha fazla lenf nodunda saptanır ve derinin üzerinde veya altında mikrosatellit tümörler, satellit tümörler veya in-transit metastazlar gözlemlenebilir.

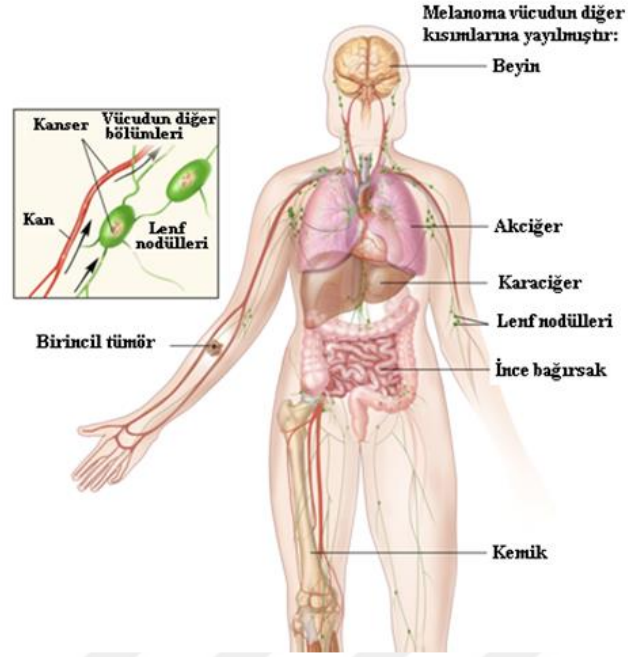
4- Tümör 4 mm'den büyük ve ülserasyonlu olduğu durumda kanser;

1 veya daha fazla lenf nodunda saptanabilir. Derinin üzerinde veya altında mikrosatellit tümörler, satellit tümörler veya in-transit metastazlar gözlemlenebilir (National Cancer Institute, 2019).

Evre IIID: Tümör 4 mm'den daha kalın ve ülserasyonludur.

Kanser 4 veya daha fazla lenf nodunda saptanabilir veya 2 veya daha fazla lenf nodunda saptanır ve derinin üzerinde veya altında mikrosatellit tümörler, satellit tümörler veya in-transit metastazlar gözlemlenir (National Cancer Institute, 2019).

Evre IV: Bu evrede kanser ilk başladığı yerden vücudun diğer bölümlerine sıçramıştır. Bu bölümler; akciğer, spinar kord, kemik, yumuşak dokular, gastrointestinal sistem ve/veya uzak lenf nodları, beyin gibi başladığı yerden oldukça uzak olabilirler (Şekil 13).



Şekil 13. Evre IV Melanom (Kızılbey ve Akdeste, 2013; National Cancer Institute 2019)

Melanom teşhisi konduktan sonra terapötik stratejinin belirlenmesinde birçok faktör göz önünde bulundurulmaktadır. 5 tip standart tedavi türü vardır.

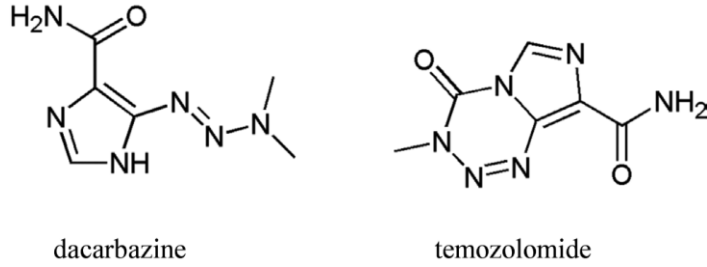
2.3.3.1. Cerrahi Yöntemler

Eğer tümör invaziv özellik kazanmadıysa, sadece lokal olarak etkinlik gösteriyorsa en az 5 mm cerrahi sınırla tümörün ekzizyonu önerilmektedir. Eksizyon uygun koşullarda yapıldıysa yeni bir cerrahi müdahaleye gerek görülmemektedir. Tümör invaziv özellik kazandıysa geniş çaplı ekzizyon önerilmektedir. Geniş çaplı ekzizyonun amacı, primer tümörün olası satellit lezyonlarının ve mikro metastatik yayılımlarının tamamıyla ortadan kaldırılmasıdır (Belgrano, 2019). Breslow tümör kalınlığı <1 mm ise 0,5 - 1 cm, Breslow tümör kalınlığı 1-2 mm ise 1 cm, Breslow tümör kalınlığı >2 mm ise 2 cm cerrahi sınır ile ekzizyon önerilir (Parlak ve ark., 2016).

2.3.3.2. Kemoterapi

Kemoterapi çeşitli ilaçların kullanılması ile kanserleşmiş hücrelerin çoğalmasının önlenmeye çalışıldığı bir tedavi türüdür. Uygulanış şekli kanser tipi ve evresine göre değişiklik gösterir. Ağız yoluyla, damara veya kas içine enjekte edilerek (sistemik kemoterapi) uygulanabildiği gibi doğrudan beyin omurilik

sıvısına, tümörün olduğu organa veya karın boşluğuna (bölgesel kemoterapi) da uygulanabilir (National Cancer Institute, 2019). MM için kullanılan kemoterapik ilaçlar Dacarbazine (DTIC), Temozolomide (TMZ), platinum ve paclitaxel bileşenleri bulunur (Tang ve ark., 2017) (Şekil 14).



Şekil 14. Dacarbazine ve Temozolomide'in kimyasal yapısı (Valko-Rokytovska ve ark., 2016)

2.3.3.3. Radyoterapi

Radyasyon tedavisi kanser hücrelerinin büyümesini engellemek veya öldürmek için yüksek enerjili X ışınlarının kullanıldığı bir tedavi yöntemidir. 2 çeşit radyasyon terapisi vardır.

- Harici radyasyon terapisi: Vücudun dışından bir cihaz yardımıyla tümörün bulunduğu bölgeye ışınların gönderilmesi şeklinde uygulanan yöntemdir.
- Dâhili radyasyon terapisi: Doğrudan tümörün bulunduğu bölgeye veya yakınlarına yerleştirilen iğne, katater vb. kanallar vasıtasıyla radyoaktif maddelerin vücuda aktarılması şeklinde uygulanan yöntemdir.

Melanom hastalarına uygulanan radyoterapi yöntemi ise harici (external radiotherapy) radyoterapidir.

2.3.3.4. İmmünoterapi

İmmünoterapi hastaların immün sistemi kullanılarak hastalığı tedavi etme yöntemidir. Bu nedenle aynı zamanda biyoterapi veya biyolojik terapi olarak da adlandırılmaktadır.

İmmün kontrol noktası inhibitörleri: T hücreleri gibi bazı immün sistem hücreleri ve bazı kanser hücreleri yüzeylerinde kontrol noktası (checkpoint) proteinleri olarak adlandırılan ve immün yanıtları kontrol altında tutan proteinlere sahiptirler. Bu proteinlerin kanser hücrelerinden fazla olması durumunda T hücreleri

kanser hücrelerine saldırıp öldürememektedirler. İmmün kontrol noktası inhibitörleri (Immune checkpoint inhibitors) kontrol noktası proteinlerini bloke ederler ve bu sayede T hücreleri artan kanser hücrelerini öldürebilirler.

Cerrahi müdahale ile tümörün çıkarılamadığı noktada ve ileri melanom hastalarında klinisyenler tarafından bu tip tedavi uygun görülmektedir.

Melanom tedavisinde kullanılan immün kontrol noktası inhibitörleri; PD-1 inhibitörleri, CTLA-4 inhibitörleridir.

PD-1 inhibitörleri: Pembrolizumab ve Nivolumab

CTLA-4 inhibitörleri: Ipilimumab

2.3.3.5. Hedefe Yönelik Terapi (Targeted Therapy)

Kanser hücrelerinin ilaçlar veya diğer maddeler tarafından direkt olarak hedeflenerek öldürülmeye çalışıldığı tedavi şeklidir. Bu terapi şeklinin kemoterapi ve radyoterapi ile kıyaslandığında sağlıklı hücelere çok daha az zarar verdiği gözlemlenmiştir.

Melanom hastalarında sinyal transdüksiyon inhibitör tedavisi: Sinyal transdüksiyon inhibitörleri, bir molekülden hücre içindeki başka bir moleküle aktarılan sinyalin bloke edilmesinden sorumludurlar ve blokaj yönteminin sonucu olarak kanser hücreleri ölürler. Bu tedavi yöntemi cerrahi müdahale ile tümörün çıkarılamadığı durumda ve ileri melanom hastalarında uygun görülmektedir.

Sinyal transdüksiyon inhibitörleri:

BRAF inhibitörleri (BRAFi) : Dabrafenib, Vemurafenib, Encorafenib

MEK inhibitörleri (MEKi) : Trametinib, Cobimetinib, Binimetinib

Mutasyon durumuna bağlı olarak, *BRAF* ve *MEK* inhibitör kombinasyonları metastatik MM için mevcut ilk basamak tedavilerdir (Gatzka, 2018; Ryu ve ark., 2017). Literatürdeki ilk *BRAF* inhibitörü vemurafenib, hemen ardından bulunan inhibitör ise dabrafenibtir ve vemurafenible benzer klinik fayda sağlamaktadır (Luke ve ark., 2017). Tek başına *BRAF* inhibitörü tedavisi hastalara klinik açıdan fayda sağlasa da tümör hücrelerinde inhibitöre karşı direnç meydana gelmektedir. *BRAF* inhibitörleri ile elde edilen başarılar ve *BRAF* sinyalizasyonunun *MEK1/2*'nin de aktivasyonuna bağlı olmasından dolayı, *MEK* inhibitörlerinin gelişimi bir öncelik haline gelmiştir (Luke ve ark., 2017). Trametinib kullanılan ilk *MEK* inhibitörüdür.

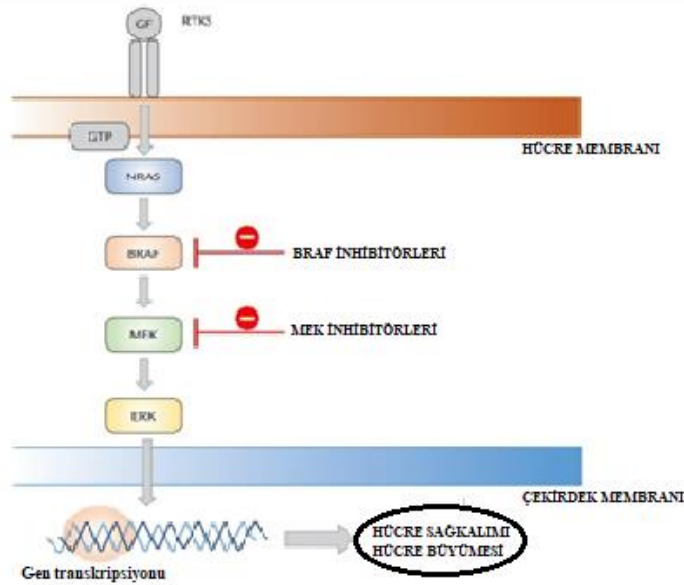
Trametinib; 2012 yılında METRIC Denemesi'nde (Faz III çalışması), melanom için kullanılan dacarbazine adlı kemoterapik ilaç ile birlikte kombin terapi olarak denenmiştir (Flaherty ve ark., 2012). *BRAF* ve *MEK* inhibitörlerinin klinik gelişimine paralel olarak, translasyonel incelemeler; *MAPK* yolağı boyunca moleküler sinyalizasyon mekanizmalarını ve *BRAF* inhibitör monoterapisine direnç mekanizmalarını aydınlatmaktadır. Bu nedenle METRIC, *MEK*'in *BRAF* inhibitör direncinde özel bir öneme sahip olarak tanımlanmasında ve *BRAF*-*MEK* inhibitörleri arasındaki potansiyel sinerjinin belirlenmesinde büyük bir rol almıştır. Bu çalışma *BRAF* mutasyonu olmayan keratinositlerde, *BRAF* inhibisyonu yoluyla *MAPK* yolağının "paradoksal aktivasyonu" olarak adlandırılan bir fenomenin keşfine sebep olmuştur (Solit ve Rosen, 2011). Bu keşif ise klinikte *BRAF* inhibisyonu ile ilişkili hiperproliferatif kutanöz bulguların bir kısmının bir *MEK* inhibitörü içeren kombinasyon terapisi ile hafifletilebileceğini ileri sürmüştür (Hatzivassiliou ve ark., 2010; Heidorn ve ark., 2010; Poulikakos ve ark., 2010; Su ve ark., 2012). Bu hipotezin hemen ardından dabrafenib ve trametinib kombinasyonunun tedaviyi nasıl şekillendirdiği incelenmiştir. Buna ek olarak da *BRAF* mutasyonlu melanomda, vemurafenib ve cobimetinib ikili tedavisinin etkileri incelemeye alınmıştır (Larkin ve ark., 2014). Fakat hem *BRAF* hem de *MEK* kinazların ikili inhibisyonu ile daha etkin tedavi planlanabilmesine rağmen tedavi süreci yine direnç ile sonuçlanmaktadır (Moriceau ve ark., 2015; Wang ve ark., 2018;). Yapılan bir çalışmada; *BRAF* ve *MEK* inhibitörüyle tedavi edilen hastaların tümör hücrelerinin, sadece *BRAF* inhibitörüyle tedavi edilen hastalarınkilerle aynı hayatta kalma ve proliferasyonu gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmaların sonucunda ilaç direncine etki eden mekanizmaların, adaptif epigenetik ve/veya post transkripsiyonel mekanizmalar olabileceği düşünülmüştür (Shi ve ark., 2014; Wellbrock ve ark., 2016).

MEK ve *BRAF* inhibitörleri metastatik melanom hastalarında birlikte kullanılmaktadır. Dabrafenib ve Trametinib, Vemurafenib ve Cobimetinib, Encorafenib ve Binimetinib kullanılan diğer kombin terapi çeşitleridir.

2.3.4. Malign Melanomda Genetik ve Epigenetik Değişimler

2.3.4.1. Malign Melanomda Genetik Değişimler

MM ile ilişkili olduğu belirlenen genetik yolları sırasıyla *RAS-RAF-ERK* yolu, *PI3K-AKT* yolu ve *p16INK4/CDK4/RB* yolu (Lee ve ark., 2011; Liu ve ark., 2014; Pejnova ve ark., 2016). Melanomda yapısal olarak aktive olan yolların arasında en etkili yol ise mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz (*MAPK*) yolu. *MAPK* yolunun aktivasyonu, fizyolojik durumlar altında büyüme faktörlerinin, ilgili hücre yüzey reseptörleriyle etkileşimi sonrası sinyallerin GTP bağlı *RAS* tarafından iletilmesi ile olur. *RAS* serin-treonin kinaz ailesinden olan *RAF*'ı ve sırasıyla *RAF* da *MEK1* ve *MEK2*'yi uyarak ardından *ERK1* ve *ERK2* aktivasyonu ile *MAPK* yolu işleve girmiş olmaktadır. Melanom'da yolu aktive edenler, kök hücre büyüme faktörü, hepatosit büyüme faktörü ve α -melanosit uyarı hormonu gibi mikro çevresel büyüme faktörleridir. Büyüme faktörlerinin bağlanması ile başlatılan tirozin kinaz (*RAS*) aktivitesi *ERK-PI3K-Akt* yolu, *Ras/Raf/MEK/MAPK* yolunu uyarak hücre proliferasyonunu ve apoptozdan kaçışı tetiklemektedir (Luke ve ark., 2017) (Şekil 15).



Şekil 15. *MAPK* yolu ve *BRAF* ve *MEK* inhibitörlerinin rolü. RTKS: reseptör tirozin kinazlar; GF: büyüme faktörü; GTP: guanozin trifosfat; NRAS: neuroblastoma RAS viral onkogen homolog; BRAF: V-Raf murine sarcoma viral onkogen homolog B; MEK: mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz enzimi; ERK: ekstrasellüler sinyal ile regüle edilen kinaz (Keiran, 2010)

Melanom gelişimi sırasında *MAPK* yolunda en çok mutasyona uğrayan gen 7q34 pozisyonunda bulunan *BRAF* geni olarak saptanmıştır. Melanom vakalarının %50-70'inde *BRAF* mutasyonlarına rastlanmaktadır ve mutasyonların en sık

rastlanılanı ise *BRAF*^{V600E} mutasyonudur. *BRAF*^{V600E} mutasyonu benign nevüslerin %80'inde bulunmaktadır (Davies ve ark., 2002; Omholt ve ark., 2002; Pejnova ve ark., 2016). Melanomda *BRAF* mutasyonlarını takiben en sık rastlanılan mutasyonlar ise *NRAS* ve *KIT* mutasyonlarıdır.

Melanom gelişimi ile ilişkili genetik değişikliklerin çoğu somatik olmasına rağmen vakaların %10'unu aile öyküsü olan bireyler oluşturmaktadır. Melanomla ilişkili yüksek penetranslı genlerden herhangi birinde (*CDKN2A*, *CDK4*, *POT1*, *ACD*, *TERF2IP* ve *TERT*) meydana gelen mutasyonlar ailesel geçişli melanom için önemli bir risk faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır (Goldstein ve ark., 2007).

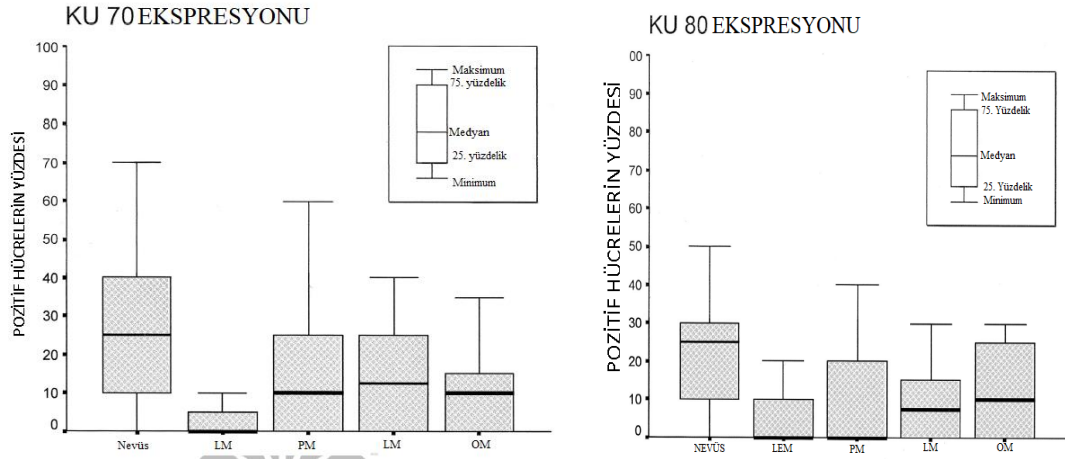
CDKN2A: Ailesel melanomla en çok ilişkilendirilen gen siklin bağımlı kinaz inhibitörü *CDKN2A*'dır (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A). 9p21 lokasyonlu 4 ekzon içeren gen, alternatif splice prosesiyle oluşturulan farklı transkriptlerin sonucunda birbiri ile ilişkisiz iki proteini kodlar. Siklin bağımlı kinaz 4 (*CDK4*) inhibitörü p16 (*p16INK4A*); 1 α , 2 ve 3. ekzonlarının α transkriptlerinden üretilirken *p14ARF* 1, 2 ve 3. ekzonlarının β transkriptlerinden üretilmektedir. *CDKN2A*'nın otozomal dominant mutasyonlarının kalıtımı coğrafi bölgelere göre değişmekle birlikte ailesel melanomun %20-40'ını oluşturmaktadır. *p16INK4A*'nın temel tümör baskılayıcı aktivitesi *CDK4* ve *CDK6*'nın inhibisyonudur. *p14ARF* *P53*'ün pozitif kontrolünden sorumludur dolayısıyla *p14ARF*'nin kaybı DNA hasarının birikime yol açarak hücrelerin yaşlanma bariyerinden kaçışına neden olur (Goldstein ve ark., 2006; Read, 2016) (Şekil 16).

CDK4: 12q14 lokasyonlu gende meydana gelen mutasyonların onkogenik etkisi kendisini hücre döngüsünün G1 fazında göstermektedirler. Ekzon 2'nin kodon 24'ünde meydana gelen tanımlanmış iki yaygın mutasyon (R24C ve R24H) dünya genelinde toplam 17 ailede saptanmıştır. R24C mutasyonu Avrupa ve Amerika sınırları içerisinde melanoma teşhisinin yapıldığı yaş ortalaması 39 olan 6 ailede, R24H ise Avrupa sınırları içerisinde kalan farklı ülkelerde ikamet eden 11 ailede görülmüştür.

Pirimidin dimerlerinin oluşumunu takiben görülen DNA hasarının en baskın etkeni solar ışınlardır. Bu hasarın enzimatik olarak tamiri ise nükleotid kesim tamiri mekanizması ile gerçekleşmektedir (nucleotide excision repair (NER)). Hodis ve arkadaşlarının (2013) gerçekleştirdiği çalışmada; melanom oluşumuna neden olan 21 gendeki 262 mutasyonun %37'sinin UVB maruziyeti sonucu ortaya çıkan C>T dönüşümü, %9'unun ise UVA maruziyeti sonucu ortaya çıkan G>T dönüşümü olduğu belirlenmiştir. Bu dönüşümlerin *BRAF* veya *NRAS*'ta meydana gelmesi bu dilimi %67' ye yükseltmektedir.

DNA tamir mekanizmasının melanom gelişimindeki önemi Kseroderma Pigmentoza hastalığının erken yaşta gelişen malign melanom dahil birçok deri kanseri ile ilişkilendirilmesi ile açıklanabilmektedir. Bu fikrin dayanağı ise UV ışınlarının indüklediği pirimidin dimerlerinin nükleotid kesim mekanizması ile tamirinde oluşan sorunlardan dolayı Kseroderma Pigmentoza oluşumudur.

Bunlara ilaveten KU70 ve KU80 proteinleri çift iplik kırıklarının tamirinde önemli rol oynamaktadır. Korabiowska ve ark. 2002 yılında yaptığı kapsamlı çalışmada nevüs, lentigo maligna, primer melanom ve metastatik melanomda önemli derecede KU70 ve KU80 ekspresyon farklılıklarının olduğunu ortaya koymuşlardır (Şekil 17).



Şekil 17. KU70 ve KU80'in nevüs, lentigo maligna (LEM), primer melanom (PM), lenfatik metastatik melanom (LM) ve organa metastaz olmuş melanomdaki (OM) ekspresyon farklılıkları (Korabiowska ve ark., 2002).

MM’de en sık değişime uğrayan onkogenler ve tümör baskılayıcı genler aşağıdaki Tablo 4’te gösterilmiştir.

Tablo 4. MM’de değişime uğrayan genler (Dhomen ve Marais, 2007; Pejnova ve ark., 2016)

Gen Türü	Gen	Değişim Sıklığı	Değişim Türü
Onkogenler	<i>BRAF</i>	50-70%	Mutasyon
	<i>NRAS</i>	15-30%	Mutasyon
	<i>AKT3</i>	43-60%	Ekspresyon
	<i>CCND1</i>	44%	çoğalma
	<i>MITF</i>	10-16%	�oğalma
Tümör Baskılayıcılar	<i>CDKN2A</i>	30-70%	Delesyon veya Mutasyon
	<i>PTEN</i> 20	20-40%	Delesyon veya Mutasyon
	<i>APAF-1</i>	40%	Kayıp
	<i>TP53</i>	10%	Kayıp veya Mutasyon

2.4. Alternatif Tıp

Genellikle kanser teşhisi alan hastaların tedavisi, kanserin türüne göre şekillenmektedir. İleri evre kanser hastalarının modern onkolojik tedavilere onay vermeleri ile birlikte kimyasalların yan etkilerini de kabul etmeleri ne yazık ki kaçınılmazdır. Bu yan etkilerin hafifletilmesi konusunda alternatif tıp ve tamamlayıcı tıp devreye girmektedir. Ulusal Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp Merkezi’ne (National Center for Complementary and Alternative Medicine; (NCCAM)) göre tamamlayıcı ve alternatif tıp 4 alt grup içermektedir.

1. Bitkisel ilaçlar (bitkisel ilaçlar, vitaminler ve mineraller gibi doğal takviyeler) (Tablo 3.)

2. Meditasyon, yoga, akupunktur gibi zihin-vücut müdahaleleri, zihin ve beden uygulamaları (nefes alma egzersizleri, hipnoterapi, qi gong vb.)

3. Vücut temelli yöntemler (Manip lasyonlar ve kayropratik, osteopatik manipülasyon ve masaj vb.)

4. Enerji tedavileri (mıknatıs tedavisi, ışık tedavisi, qi gong, Reiki vb.) ve geleneksel Çin Tıbbı ve Ayurveda gibi alternatif tıp sistemleri (Doğu ve ark., 2014).

Bitkiler ve bitkisel ürünler ise hastalar tarafından tercih edilen alternatif tıp yöntemlerinin önde gelenleridir. Doğadan elde edilen bileşenlerin ilaç yapımında kullanılması hayatın başlangıcından bu yana oldukça yaygındır. Piyasada bulunan insanlar tarafından kullanılması uygun görülmüş ilaçların yaklaşık %50'si, kanser karşıtı ajanların ise %70'i bitkisel orijinlidir (Chinembiri ve ark., 2014). Ticari olarak temin edilebilen ilk ilaç *Papaver somniferum*'dan elde edilen morfindir (Veeresham, 2012). Bu gelişme bitki özütlerinden ilaçların elde edildiği ve belirli dozlarla hastalara uygulandığı yeni bir çağı başlatmıştır (Balunas, Kinghorn, 2005; Li, Vederas, 2009). Son zamanlarda, tıbbi bitkiler dünya genelinde birçok ülkede kanser tedavisi için yaygın bir alternatif oluşturmaktadır (Newman, 2007). Kullanılan bitkiler ve özütleri kanser türlerine göre çeşitlilik göstermekle birlikte deri kanseri tedavisine alternatif bir yaklaşım olarak kullanılabilecek bileşikler Tablo 5'te gösterildiği gibidir.

Tablo 5. Deri kanserine karşı kullanılması uygun olan aktif doğal bileşikler (Diyet bileşenleri, fitokimyasallar ve ham özütlar) (Chinembiri ve ark., 2014).

Anti-proliferatiler	Apoptoz Düzenleyicileri	Anti-Metastatikler
Quercetin	Kaempferol	Amentoflavone
<u>Kaempferol</u>	EGCG	Hinokiflavone
EGCG	Apigenin	β -carotene
Apigenin	Vitamin A	Fucoxanthin
β -carotene	Vitamin C	Vitamin A
Fucoxanthin	Vitamin D	Vitamin C
Vitamin C	Vitamin E	Resveratrol
<i>Ganoderma lucidum</i> özütü	<i>Ganoderma lucidum</i> özütü	Sulforaphane
<i>Coriolus versicolor</i> özütü	<i>Coriolus versicolor</i> özütü	<i>Withania somnifera</i> özütü
Resveratrol	<i>Hypericum perforatum</i> özütü	<i>Viscum album</i> özütü
Curcumin	<i>Melaleuca alternifolia</i> özütü	
Sulforaphane	<i>Calendula officinalis</i> özütü	
<i>Melaleuca alternifolia</i> özütü	Emodin from <i>Aloe</i>	
<i>Zingiber officinale</i> özütü	Eupatilin from <i>Artemisia</i>	
<i>Withania somnifera</i> ’dan elde edilen Withaferin A	<i>Alpinia oxyphylla</i> özütü	
<i>Artemisia</i> ’dan elde edilen Eupatilin	<i>Alpinia galangal</i> özütü	
<i>Alpinia officinarum</i> ’dan elde edilen Galangin		

2.4.1. *Inula* Cinsi

Asteraceae familyasından *Inula* (*Compositae*), 100'den fazla türe sahip olan *Inuleae* ailesinin büyük bir cinsidir. Bu cins, çoğunlukla Afrika, Asya'da (20 türü Çin'de bulunmaktadır) ve Avrupa'da, ağırlıklı olarak Akdeniz bölgesinde bulunur.

2.4.1.1. Türkiye’de yetişen *Inula* Türleri

Türkiye’de ise 7’si endemik olmak üzere 27 türü bulunmaktadır (Gökbulut, 2011; TÜBİTAK Türkiye Taksonomik Tür Veritabanı; Zhao ve ark., 2006) (Tablo 6).

Tablo 6. Türkiye’de yetişen *Inula* Türleri (Davis, 1982; TÜBİTAK Taksonomik Tür Veritabanı).

Endemik Olmayan Türler	Endemik Türler
- <i>Inula acaulis</i> Schott et Kotschy ex Boiss.	- <i>Inula anatolica</i> Boiss.
- <i>Inula acaulis</i> var <i>acaulis</i>	- <i>Inula discoidea</i> Boiss.
- <i>Inula acaulis</i> var <i>caulescens</i>	- <i>Inula fragilis</i> Boiss. & Hausskn.
- <i>Inula aschersoniana</i> Janka	- <i>Inula helenium</i> L. subsp. <i>vanensis</i> Grierson
- <i>Inula aucherana</i> DC.	- <i>Inula macrocephala</i> Boiss. & Kotschy ex Boiss.
- <i>Inula britannica</i> L.	- <i>Inula sarana</i> Boiss.
- <i>Inula conyzae</i> (Griess.) Meikle	- <i>Inula sechmenii</i> Hartvig & Strid
- <i>Inula crithmoides</i> L.	
- <i>Inula ensifolia</i> L.	
- <i>Inula germanica</i> L.	
- <i>Inula graveolens</i> (Linnaeus) Desf.	
- <i>Inula helenium</i> L.	
- <i>Inula helenium</i> L. subsp. <i>orgyalis</i> (Boiss.) Grierson	
- <i>Inula helenium</i> L. subsp. <i>pseudohelenium</i>	
- <i>Inula helenium</i> L. subsp. <i>Turcoracemosa</i>	
- <i>Inula heterolepis</i> Boiss.	
- <i>Inula inuloides</i> (Fenzl) Grierson	
- <i>Inula mariae</i> Bordz.	
- <i>Inula montbretiana</i> DC.	
- <i>Inula oculus-christi</i> L.	
- <i>Inula orientalis</i> Lam.	
- <i>Inula peacockiana</i> (Aitch. & Hemsl.) Krovin	
- <i>Inula salicina</i> L.	
- <i>Inula thapsoides</i> (Bieb. ex Willd.) Sprengel	
- <i>Inula thapsoides</i> (Bieb. ex Willd.) Sprengel subsp. <i>australis</i>	
- <i>Inula thapsoides</i> (Bieb. ex Willd.) Sprengel subsp. <i>thapsoides</i>	
- <i>Inula viscidula</i> Boiss. & Kotschy	
- <i>Inula viscosa</i> (L.) Aiton	



Şekil 18. *Inula viscosa* (Bar-Shalom, 2019).

2.4.2. *Inula* Türleri ve Tıp

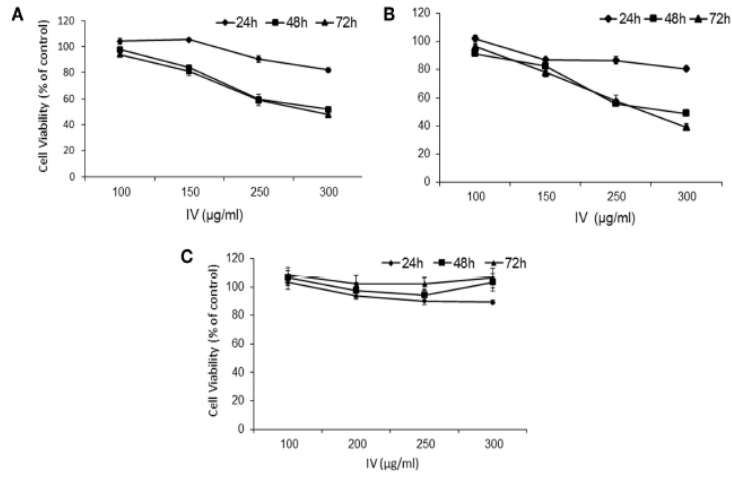
Inula cinsinin birkaç türü özellikle de Çin geleneksel tıbbında olmak üzere geleneksel tıpta kullanılmaktadır. Tıbbi önemi bilinen önemli türleri vardır. Örneğin, yaygın olarak *elecampane* olarak bilinen *Inula helenium* L, *Inula racemosa* Hook.f. ve *Etulapritannica* L. geleneksel tıpta sıklıkla kullanılmaktadır. Türkiye’de *I. helenium* Andız otu olarak bilinmektedir ve uygun koşullarda kurutulan köklerinin insan sağlığına birçok yönden iyi geldiği bilinmektedir. *I. heterolepis* Boiss. bitkisinin yapraklı dallarının iştah açıcı ve hemoroide karşı iyileştirici olarak kullanıldığı, toprak üstü kısımlarının ise solunum yolları rahatsızlıklarında ve mide hastalıklarında kullanıldığı bilinmektedir. Taze yapraklarının yaranın üzerine konulmak suretiyle iyileştirici etki gösterdiği bilinen bitki ise halk arasında yapışkan andız otu olarak anılan IV’dir (Baytop, 1999; Gökbulut, 2011; Honda ve ark., 1996) (Şekil 18).

Inula’nın etnomedikal kullanımının öneminden dolayı, birçok ticari bitkisel preparatta bulunmaktadır. Etiyofarmakolojik kullanımları nedeniyle *Inula* cinsinin bitkileri üzerinde artan sayıda çalışma yürütülmektedir. Bu bilimsel araştırmalar, geleneksel uygulamalarını kanıtlamak için aktif prensip ve farmakolojik değerlendirmelerin bulunması için fitokimyasal çalışmaları içermektedir.

2.4.3. *Inula* Cinsi ve Kanser

Asteraceae familyası teröpatik özelliklerinden dolayı başta kanser olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. *Inula* türlerinin zengin biyolojik aktiviteye sahip olduğu ve bu cinsin antibakteriyel, antiproliferatif, hepatoprotektif, antioksidan, antidiyabetik, antitumoral, antienflamatuvar vb. etkilerinden dolayı bilim insanları tarafından dikkatleri üzerine topladığı görülmektedir. Bu biyolojik aktiviteler arasından özellikle antiproliferatif ve sitotoksik etkilerinin en belirgin inceleme konusu olduğu gözler önüne serilmektedir (Danino ve ark., 2009; Gökbulut, 2011; Konishi ve ark., 2002; Lee ve ark., 2010; Stojakowska ve ark., 2005; Zhao ve ark., 2006;).

Merghoub ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; *I. viscosa*'nın heksanik ekstraktı, IV ve *Retama Monosperma*'nın diklorometan fraksiyonları, proliferasyonun inhibe edilmesi, kaspaz bağımlı apoptozun indüklenmesi ve mitokondri aracılı sinyal yolağının da dâhil edilmesi yoluyla servikal kanser hücre hatlarına karşı belirgin sitotoksik etkiler göstermiştir (Merghoub ve ark., 2011). Başka bir çalışmada ise; servikal kanser hücre hatlarında telomeraz aktivitesi ve apoptoz üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda; IV'nin telomeraz aktivitesini inhibe ettiği ve apoptozu indükleyerek antiproliferatif etki gösterdiği tespit edilmiştir (Merghoub ve ark., 2016). Diğer bir çalışmada ise IV'nin yapraklarından elde edilen tomentosin ve inuviscolide'in insan MM hücre hatlarında (SK-28, 624 mel ve 1363 mel) antitümöral potansiyeli doza ve zamana bağlı olacak şekilde değerlendirilmeye alınmıştır ve sonuç olarak bu bileşenlerin hücre siklusunu G2/M'de durdurmak suretiyle apoptotik hücre ölümüne sebep oldukları tespit edilmiştir. 24 saat IC₅₀ değerleri sırasıyla tomentosin için $31.6 \pm 1.2 \mu\text{M}$ 'dan $35.3 \pm 1.4 \mu\text{M}$ 'a; inulaviscolid için ise $37.2 \pm 2.1 \mu\text{M}$ 'dan $41.1 \pm 3.8 \mu\text{M}$ aralıklardır (Rozenblat ve ark., 2009). Bar-Shalom ve ark. (2019) yaptığı çalışmada IV'nin kolorektal kanser hücrelerinde doza ve zamana bağlı antiproliferatif etkileri tespit edilmiştir (Şekil 19).



Şekil 19. IV özütü muamelesi sonrası insan kolorektal hücrelerinin canlılık yüzdeleri. 2 farklı kanser hücre hattı ve bir normal fibroblast hücre hattı, IV özütü ile artan doz (100 µg/ml - 300 µg/ml) ve zaman aralıklarında (24-48-72 saat) muamele edilmiştir ve hücre canlılığı XTT assay kullanılarak tespit edilmiştir. A) HCT116 hücre hattının doza ve zamana bağlı canlılık grafiği. B) Colo320 hücre hattının doza ve zamana bağlı canlılık grafiği. C) Normal primer karaciğer fibroblastlarının doza ve zamana bağlı canlılık grafiği (Bar-Shalom, 2019).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- -150°C derin dondurucu (Panasonic, Japonya)
- -80 °C derin dondurucu (Nüve DF 490, Türkiye)
- -20°C derin dondurucu (Bosch, Türkiye)
- +4°C buzdolabı (Alaska, Türkiye)
- Laminer kabin
- Santrifüj (Nüve NF 800, Türkiye)
- CO₂ inkübatör (Panasonic, Japonya)
- Işık mikroskobu (Euromex, Hollanda)
- UV-Vis Spektrofotometre/ Nano Drop (Beckman Coulter, ABD)
- Muse® Cell Analyzer (Merck Millipore, Almanya)
- StepOnePlus™ System Real Time- PCR (Applied Biosystems, ABD)
- Soğutmalı Santrifüj (Beckman Coulter, ABD)
- Thermal Cycler (Biorad, ABD)
- Vorteks (Velp Scientifica, İtalya)
- Agilent 1200 HPLC (Agilent, ABD)
- Floresan Mikroskop (Eclipse i80, Nikon, ABD)
- Hassas terazi (A&D Company, Japonya)
- Hassas terazi (Radwag, ABD)

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

- Dulbecco's Modified Eagle's medium DMEM with high glucose, L-glutamine w/o sodium pyruvate, 500 ml - Fetal Bovine Serum, 500ml (SIGMA)
- FibroGRO LS complete Media Kit, 500 ml, (Millipore)
- Penisilin- Streptomisin, 10.000U/ml (Thermo Fisher)
- Tripsin-EDTA (Gibco)
- Sodyum-fosfat tamponu (PBS) (Capricorn Scientific)

- WST-1 Cell Proliferation Reagent (Biovision)
- Muse® Annexin V and Dead Cell Kit (Millipore)
- NucleoSpin® miRNA İzolasyon Kiti (MACHEREY-NAGEL)
- cDNA sentez kiti (BIOLABS)
- SYBR Green PCR Kit (200 rxn) (BIOLABS)
- miRNA PCR Assay (100 rxn) (QIAGEN)
- Etanol %99.9 HPLC saflıkta (Merck)
- Paraformaldehit (Sigma)
- DMSO (Sigma)
- Tripan mavi (Biochrom)
- Propidyum iyodid (PI) boyama solüsyonu (BD Biosciences)
- Acridine Orange - (Thermo Fisher Scientific)
- Ethidium Bromide Solution, 10 mg/ml (Vivantis)
- Kaempferol (25 mg) (SIGMA)
- Luteolin (1 gr) (FLUOROCHEM)
- Acetonitrile chromasolv gradient grade (2,5 L) (CARLO ERBA)
- Toz halinde IV (50 mg)

3.2. Yöntem

3.2.1. *Inula viscosa*'nın Taksonomik Analizi

SEYİT AHMET ANDIZ ÇAYI tarafından Ege Bölgesi Manisa Akhisar Hasköy'den Haziran-Kasım ayları arasında çiçekleri açmış halde toplanan IV bitkisi uygun koşullarda gölgede kurutulmuş ve ekstraksiyona hazır hale getirilmiştir. IV'nin taksonomik analizi Bursa UÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Botanik Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Hulusi Malyer tarafından gerçekleştirilmiştir. Toplanan örnekler usulüne uygun şekilde Bursa Uludağ Üniversitesi herberyumunda saklanmaktadır.

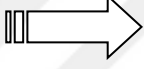
3.2.2. *Inula viscosa*'nın Ekstraksiyonu

Tez kapsamında Ege Bölgesi Akhisar Hasköy'den toplanan IV bitkisinin yaprak kısımları ayıklanarak toz haline getirildi. Erlen içerisinde çözdürülmek üzere 25'er gram alınarak 250 ml metanol ile ve 500 ml distile su ile oda koşullarında 18 saat ısıtıcı blokta karıştırılarak ekstrakte edildi. Ekstraksiyon işleminden sonra örnekler süzgeç kağıdı kullanılarak süzüldü. Metanol ile

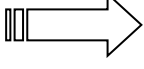
oluşturulan ekstraktın çözücüsü evaporatör yardımı ile, distile su ile oluşturulan ekstraktın çözücüsü ise liyafilizatör yardımı ile uçuruldu.

Metanol Özütünün stok konsantrasyonu 50 mg/ml, su özütünün stok konsantrasyonu ise 100 mg/ml olacak şekilde çözücüsü uçurulan kuru kalıntılar DMSO'da çözüldü.

Methanol Özütü Ana Stok(AS)

50.000 µg 1 ml		40 µl AS + 960µl Besiyeri = 2000 µg/ml
2000 µg x ml		
.....		
.....		
X = 40 µl		

Su Özütü Ana stok(AS)

100.000 µg 1 ml		40 µl AS + 960µl Besiyeri = 4000 µg/ml
4000 µg x ml		
.....		
.....		
X = 40 µl		

3.2.2.1. *Inula viscosa*'nın Metanol ve Su Özütünün Kromatografik Analizi

IV'nin metanol ve su özütünün kromatografik analizi, Bursa UÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Anabilim Dalı'nda Dr. Önder AYBASTIER tarafından HPLC-DAD ile değerlendirilmiştir. Fenolik bileşiklerin ayrımı, XBridge C18 (4.6X250MM, 3.5µm; Elstree, UK) kolon kullanılarak formik asitin (çözücü A) ve asetonitrilin (çözücü B) %1 H₂O içerisinde çözündürülmesi ile oluşan hareketli faz kullanılarak 0 ile 10 dakika arasında % 13 B, 10 ile 20 dakika arasında % 41.5 B, 20 ile 25 dakika arasında % 70 B ve 25 ile 35 dakika arasında % 10 B olmak üzere toplam 35 dakikada 10 µl'lik enjeksiyon hacminde 0.5 ml/dakika kolon akış hızında gerçekleştirilmiştir. Chemstation for LC (Agilent) kullanılarak veriler toplanmıştır. Fenolik standartların alıkonma süreleri ve UV spektralarının karşılaştırılması yolu ile her bir pikin hangi fenolik bileşiğe ait olduğu tespit edilmiştir. Bileşiklerin miktarları kromatogram alanları hesaplanarak belirlenmiştir.

3.2.2.2. *Inula viscosa*'nın Metanol ve Su Özütlerinin Antioksidan Aktivitesinin Değerlendirilmesi

IV'nin metanol ve su özütlerinin antioksidan aktivitesinin değerlendirilmesi Dr. Önder AYBASTIER tarafından UÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Antioksidan kapasite tayininde standart madde olarak troloks kullanılmıştır. Kalibrasyon grafiği oluşturmak için farklı konsantrasyonlarda troloks çözeltileri hazırlandı. Etanolde 6 mM ABTS stok çözeltisi hazırlanarak, analizler için 1:10 oranında saf su ile seyreltilerek kullanıldı. Analiz için 0,1 mL örnek/standart üzerine 3,9 mL etanol eklendi. Üzerine seyreltilmiş ABTS çözeltisinden 1 mL eklenerek 6 dk beklenip, 734 nm'de absorbansı ölçüldü. Antioksidan madde içermeyen kör örneğin absorbansına göre her bir numunenin % inhibisyon değeri hesaplandı. Troloks miktarına karşılık % inhibisyon grafiği çizilerek, en küçük kareler yöntemiyle doğru denklemi hesaplandı. Numuneler için antioksidan kapasite miktarları belirlenen kalibrasyon denklemi kullanılarak hesaplandı.

3.2.3. Hücre Kültürü

3.2.3.1. Hücre Hatlarının Temini

MM; MeWo ve A2058 hücre hatları Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Bölümü ve Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü tarafından ücretsiz olarak uygun koşullarda temin edilmiştir.

3.2.3.2. Hücre Hatlarının Özellikleri

Fibroblast hücre hattı kontrol olarak kullanılmak üzere laboratuvarımızda mevcut olan insan sağlıklı hücre hatlarından biridir ve MM ile çalışmak için kullanılan en yaygın hücre hatlarından biridir. A2058 melanomla ilişkisi oldukça yüksek olan *BRAF*^{V600E} mutasyonu dahil 989 adet mutasyona sahiptir. Özet çalışmalarında kullanılacak diğer hücre hattı MeWo ise *BRAF* mutasyonu hariç 12008 adet mutasyona sahip bir diğer MM hücre hattı olup A2058 gibi literatürdeki *in vitro* MM çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir hücre hattıdır.

3.2.3.3. Besiyerlerinin Hazırlanması ve İnkübasyon Koşulları

A2058 hücre hattına uygun olan besiyeri, sodyum bikarbonat ve L-glutamin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) medium, % 10 fetal bovine serum (FBS), 10.000 unite/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin eklenerek hazırlandı. MeWo hücre hattının geliştirildiği besiyeri ise DMEM medium içerisine % 10 fetal bovine serum (FBS), 10.000 unite/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin ve %1 MEM NEAA (MEM Non-essential Amino Acid Solution) eklenerek hazırlandı. Fibroblast besiyesi ise FibroGRO LS Complete Media Kit. A2058, MeWo ve sağlıklı fibroblast hücre hatları 25 cm²'lik filtreli flasklarda kendilerine has besiyerlerinde %5 CO₂ içeren 37°C'deki inkübatör içerisinde inkübe edildi.

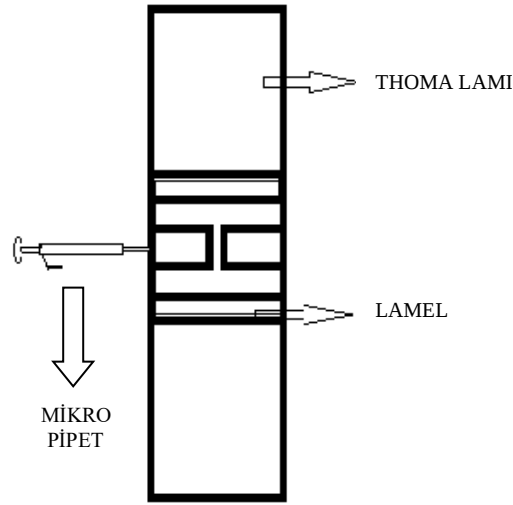
3.2.3.4. Hücre Hatlarının Pasajlanması

Çoğalmakta olan her bir hücre hattı >%80 doluluğa ulaştıncaya kadar pasajlandı. Pasajlama esnasında sırasıyla flaskların içerisindeki besiyeri pipetle alındı ve flaskın yüzeyindeki atıklar steril fosfat tampon solüsyonu (PBS) (25 cm² için 1,5 ml) ile yıkandı. Ardından PBS pipetle uzaklaştırıldı ve hücrelerin flask yüzeyinden kaldırılabilmesi için 2 ml 1X Trypsin/EDTA solüsyonu ilave edilerek inkübatörde

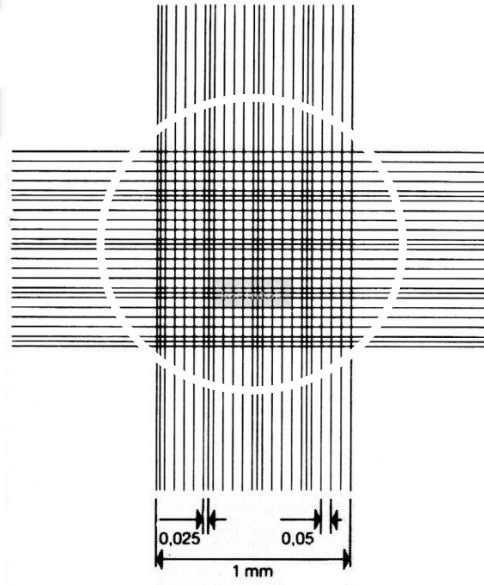
yaklaşık 5 dk bekletildi. Flask yüzeyindeki tüm hücrelerin kalktığından mikroskop altında gözlemlenerek emin olunmasının ardından süspansiyon halindeki hücre solüsyonuna Tripsin hacminin 2 katı hacimde besiyeri eklendi. Pipetaj yardımı ile süspansiyonun homojenitesi sağlandı. Flask içerisindeki solüsyon serolojik pipet yardımı ile 15 ml hacimli bir falkon içerisine alındı. Falkona alınan süspansiyon 1200 rpm’de 5 dk santrifüj edildi ve ardından tripsin EDTA solüsyonu uzaklaştırıldı. Hücreler oda sıcaklığındaki yeni steril besiyeri ile süspanse edilerek hücre yoğunluğuna uygun olarak 25 cm² ’lik flaska bölünüp yeniden pasajlandı. Yeniden pasajlanan hücreler 37°C’de %5 CO₂ ortamında inkübe edildi.

3.2.3.5. Hücre Sayımı

Tripsin-EDTA kullanılarak yüzeyden kaldırılan hücreler santrifüj edildi. Hücre pelleti 1 ml besiyeri ile süspanse edilip hücre süspansiyonundan 10 µl ependorf tüpe konuldu ve üzerine 90 µl tripan mavi boyası eklendi. Elde edilen karışımın 10 µl’si mikro pipet yardımıyla lamelle thoma lamının arasına yavaşça Şekil 20’de gösterildiği gibi aktarıldı. Şekil 21’ de sadece merkezde çizgilerin kesiştiği 1 mm²’lik alandaki 16 büyük karenin içindeki 25 küçük karenin üst ve sağ taraflarındaki kare çizgilerine teğet veya çizgileri kesen canlı hücreler ışık mikroskobu (EUROMEX, HOLLANDA) altında 40X büyütmede üç kere tekrar ederek sayıldı ve ortalamaları hesaplandı. Sonuç olarak 1 ml içerisindeki toplam hücre sayısı; 16 büyük karedeki hücre sayısının dilüsyon faktörü ve 10.000 ile çarpılması ile bulundu.



Şekil 20. Thoma Lamina hücre boya süspansiyonunun aktarımı



Şekil 21. Thoma lamında sayım yapılırken dikkate alınması gereken alanın gösterimi

3.2.3.6. Hücre Hatlarının Stoklanması

Her bir hücre hattının bulunduğu flask en az %80 doluluğa ulaşıncı hücreler ihtiyaç dâhilinde stoklanıp gerektiği zaman çözdürülebilir. Stoklama işlemi aşağıda belirtilen basamakların takip edilmesi ile gerçekleştirildi. Flaskların içerisindeki besiyeri pipetle alındı ve flaskın yüzeyindeki atıklar steril PBS ile yıkandı. Ardından PBS pipetle uzaklaştırıldı. Hücrelerin flask yüzeyinden kaldırılabilmesi için 1X

Trypsin/EDTA solüsyonu ilave edilerek inkübatörde yaklaşık 5 dk bekletildi. Flask yüzeyindeki tüm hücrelerin kalktığından mikroskop altında gözlemlenerek emin olunmasının ardından süspansiyon halindeki hücre solüsyonuna Trypsin/EDTA hacminin 2 katı hacimde besiyeri eklendi. Flask içerisindeki solüsyon serolojik pipet yardımıyla homojenize edilip 15 ml hacimli bir falkon içerisine alındı. Bu süre içerisinde kriyo tüplerin (vial) barkodlanması yapıldı. Falkona alınan süspansiyon 1200 rpm’de 5 dk santrifüj edildi ve ardından trypsin EDTA solüsyonu pellete zarar vermeden serolojik pipet yardımı ile uzaklaştırıldı. Pellet her bir hücre hattına özel 1:10 oranında stok solüsyonu (900 ml besiyeri ve 100 ml Dimetil Sülfoksit (DMSO)) ile tekrar süspansiyon edildi ve önceden hazırlanan kriyo tüplere barkodlarına göre nakledildi. Kriyo tüpler -150°C ‘ ye kaldırılmadan önce -20°C’de 30 ile 60 dk arası bekletildi ve daha sonra gerektiğinde 37°C’de çözölmek üzere - 150°C’de muhafaza edildi.

3.2.3.7. Stoklanan Hücre Hatlarının Çözödürölmesi

-150°C’de muhafaza edilen hücre hatları pasajlanmak üzere 37°C’de çözölmeye bırakıldı. DMSO’nun hücreler üzerindeki zararı göz önünde bulundurularak, hücreler çözölmür çözölmez 15 ml’lik falkona alınıp üzerine her hücre hattına spesifik besiyerinden 2-3 ml eklenerek santrifüj edildi ve süpernatantı uzaklaştırılan pellet taze besiyeri ile süspansiyon edilip 25 cm² ’lik flaska ekildi. Yeniden pasajlanan hücreler 37°C’de %5 CO₂ ortamında inkübe edildi.

3.2.4. *Inula viscosa*’nın Metanol ve Su Özütünün Sitotoksik ve Antiproliferatif Etkisinin Hücre Hatlarında Analizi

MeWo ve A2058 MM hücre hatlarında ve normal fibroblast hücre hattında, IV’nin sitotoksik etkisi, WST-1 hücre proliferasyon kiti kullanılarak 3 tekrarlı olarak değeriendirilmiştir. Sitotoksikite; maruz bırakılan hücre hattına, maruziyet süresine ve dozuna bağılı olarak etki gösteren maddenin ortaya çıkardığı hücre hattı açısından zararlı olan bir olaydır. Hücreler sitotoksik bir maddeye maruz kaldıkları durumda; apoptoz, otofaji ve nekroza giderek ölebilir veya sitostazis aracılığı ile proliferasyon özelliklerini kaybedebilirler (Galluzzi ve ark., 2009). Maruziyet sonrası hücre canlılığının belirlenmesi, sitotoksikite deneylerinin en önemli basamaklarından

biridir (Riss ve ark., 2006). Hücre canlılığının belirlenmesi için uygulanan bir çok sitotoksik çalışmanın tipi ne olursa olsun, önemli olan çalışmadaki canlılık miktarının doğru bir şekilde belirlenmesidir (Riss ve ark., 2006). Sitotoksik testler genel olarak kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik yöntemler olmak üzere 3'e ayrılır (Crouch ve ark., 1993; Fan ve Wood, 2007; Longo-Sorbello ve ark., 2006). Günümüzde yaygın olarak kullanılan yöntemler kolorimetrik yöntemlerdir. Bunlar;

*MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide),

*XTT(2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-carboxanilide-2H-tetrazolium, monosodium salt),

*MTS(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt),

*WST-1(2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) gibi yöntemlerdir.

Mevcut tez kapsamında IV'nin metanol ve su özütünün 3 farklı hücre hattındaki sitotoksik etkisini belirlemek için bu kolorimetrik yöntemler arasından WST-1 analiz yöntemi tercih edilmiştir. Analiz protokolü aşağıda belirtildiği gibi sırasıyla uygulanmıştır.

Hücre hatları 96 kuyucuklu plaklarda her bir kuyuda 100 µl hacimde 2×10^4 hücre olacak şekilde kendi besiyerleri ile süspanse edilerek 37° C, % 5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Ardından metanol özütü için 8 adet, su özütü için 11 adet doz 3 farklı zaman diliminde (24 saat, 48 saat ve 72 saat) aşağıda gösterilen plak düzenine uygun şekilde maruz bırakılmıştır (Şekil 22 ve Şekil 23).

IV'nin Metanol Özütü İçin Belirlenen Dozlar

10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	60 µg/ml	80 µg/ml	100 µg/ml	120 µg/ml	140 µg/ml
----------	----------	----------	----------	----------	-----------	-----------	-----------

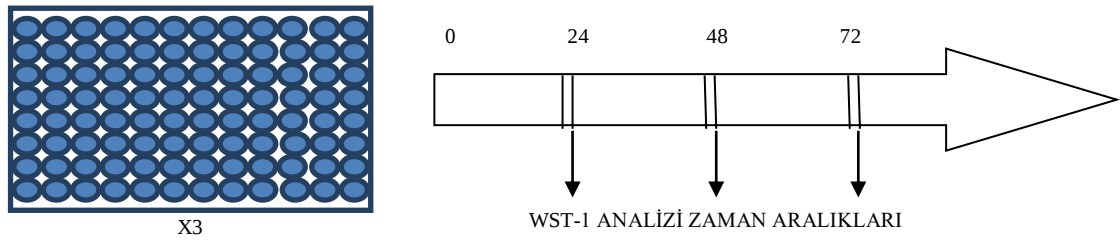
IV'nin Su Özütü İçin Belirlenen Dozlar

80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280
µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml

K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	M 20 µg/ml	M 20 µg/ml
M 20 µg/ml	M 20 µg/ml	M 40 µg/ml	M 40 µg/ml	M 40 µg/ml	M 40 µg/ml	M 60 µg/ml	M 60 µg/ml	M 60 µg/ml	M 60 µg/ml	M 80 µg/ml	M 80 µg/ml
M 80 µg/ml	M 80 µg/ml	M 120 µg/ml	M 120 µg/ml	M 120 µg/ml	M 120 µg/ml	M 140 µg/ml	M 140 µg/ml	M 140 µg/ml	M 140 µg/ml	M 160 µg/ml	M 160 µg/ml
M 160 µg/ml	M 160 µg/ml	M 200 µg/ml	M 200 µg/ml	M 200 µg/ml	M 200 µg/ml	S 80 µg/ml	S 80 µg/ml	S 80 µg/ml	S 80 µg/ml	S 100 µg/ml	S 100 µg/ml
S 100 µg/ml	S 100 µg/ml	S 120 µg/ml	S 120 µg/ml	S 120 µg/ml	S 120 µg/ml	S 140 µg/ml	S 140 µg/ml	S 140 µg/ml	S 140 µg/ml	S 160 µg/ml	S 160 µg/ml
S 160 µg/ml	S 160 µg/ml	S 180 µg/ml	S 180 µg/ml	S 180 µg/ml	S 180 µg/ml	S 200 µg/ml	S 200 µg/ml	S 200 µg/ml	S 200 µg/ml	S 220 µg/ml	S 220 µg/ml
S 220 µg/ml	S 220 µg/ml	S 240 µg/ml	S 240 µg/ml	S 240 µg/ml	S 240 µg/ml	S 260 µg/ml	S 260 µg/ml	S 260 µg/ml	S 260 µg/ml	S 280 µg/ml	S 280 µg/ml
S 280 µg/ml	S 280 µg/ml	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K

Şekil 22. 96 kuyucuklu plak düzeni (M: IV'nin metanol özütü; S: IV'nin su özütü)

Maruziyet süreleri sonunda (24 saat, 48 saat ve 72 saat); plaklardaki hücre süspansiyonlarının herbirinin üzerine 10 µl WST-1 solüsyonu eklendi ve 1,5 saat 37° C'de, % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. WST-1 reaktifi, hücresel dehidrojenazlar ile suda yüksek oranda çözünür formazan'a indirgenebilir ve inkübatörde gerçekleşen bu indirgenme tepkimesi sonrasında canlı hücrelerin dehidrojenaz aktivitelerinin az ve ya çok olmasına bağlı olarak plak kuyularında gözle görülebilir bir şekilde koyu ya da açık renk ayrımı oluşur. İnkübasyon süresi sonunda plaklar, TriStar² S LB 942 Modular Monochromator Multimode Reader spektrofotometre cihazı kullanılarak 420 – 650 nm dalga boylarında ölçüm gerçekleştirildi.



Şekil 23. 24, 48, 72 Saat Aralıklarla WST-1 İnkübasyon Çalışmasının Şeması

3.2.5. Hücre Ölümünün Morfolojik Analizi

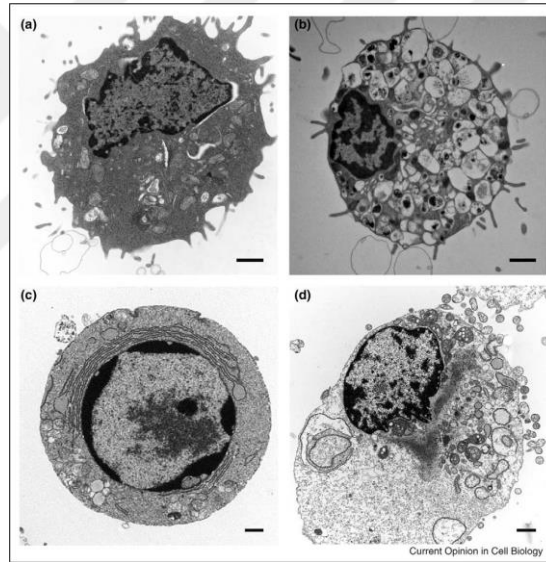
Hücre döngüsü, hücrenin kendisine iletilen sinyallere yanıt olarak bölünmeye başlamasından bir sonraki hücre bölünmesine kadarki sürede geçirilen çeşitli biyokimyasal ve morfolojik değişimlerin görüldüğü sürece verilen genel addır. 70'li yıllarda araştırmacıların merak konusu olan hücre ölümü; Kerr, Wyllie ve Currie'nin yayınladığı makale sayesinde kısmen yanıt bulmuştur. Söz konusu makalede genel olarak iki tip hücre ölümünden bahsedilir. Bunlar; genetik mekanizmalar tarafından kontrol edilen programlanmış hücre ölümü apoptoz ve programlanmamış hücre ölümü olarak tanımlanan nekrozdur (Kerr ve ark., 1972). 90'lı yıllarda ise Clarke'ın yayınladığı makaleye göre üç çeşit hücre ölüm tipi bulunmaktadır. Clarke'ın sınıflandırması lizozomların hücre ölümü esnasında rol alıp almaması esasına dayanır. İlk hücre ölüm tipi; ölen hücrelerin kendi lizozomlarının etkisi dışında gerçekleşir fakat bu hücrelerin fragmanları diğer hücrelerin sekonder lizozomları tarafından parçalanır. 2. hücre ölüm tipinde hücrelerin kendi lizozomları rol alır. 3. hücre ölüm tipinde ise lizozomların rolü hiçbir şekilde tanımlanmamıştır.

Tip I hücre ölüm “apoptoz” olarak adlandırılan, hem yaşlanma ve dokulardaki hücrelerin devamını sağlamak için karşımıza çıkan homeostatik bir mekanizma hem de hücre çevresel etkenler tarafından zarar gördüğü zaman yine hücrenin kendi kendine oluşturduğu bir savunma mekanizmasıdır (Eröz ve ark., 2012; Norbury ve ark., 2001) (Şekil 24 ve Şekil 25). Apoptotik hücrelerin temel morfolojik özellikleri; hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması, çekirdek içinde bulunan DNA'nın bozulması ve “apoptotik cisimlerin” parçalara ayrılmasıdır (Clarke, 1990; Gözüa ık ve Kimchi, 2007).

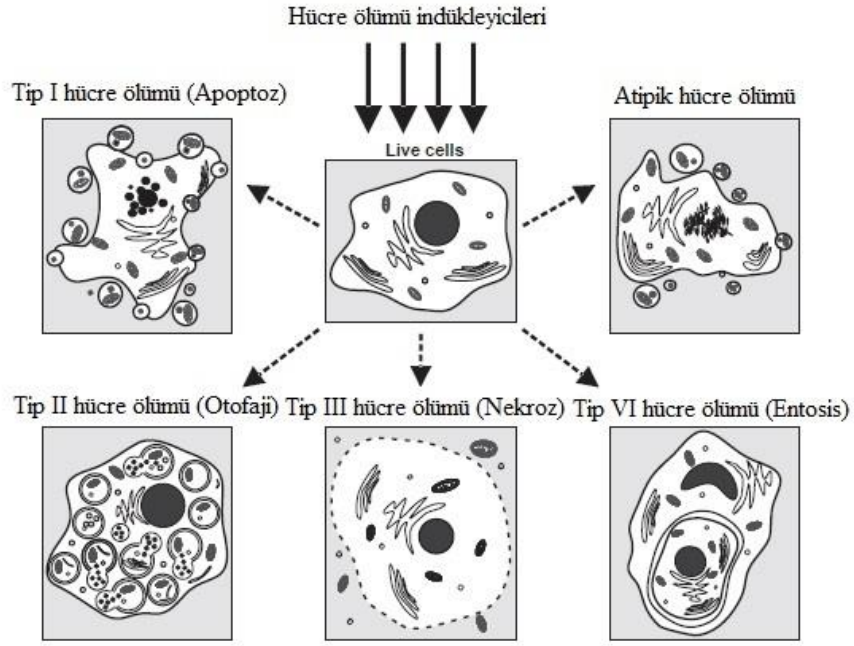
Clarke tarafından tip II hücre ölümü olarak tanımlanan ve kendi kendini yemek anlamına gelen “otofaji” ise çoğu araştırmacının düşüncesine göre apoptozun yeterli olmadığı durumlarda uyarıcının uzunluğuna, miktarına ve buna benzer etkilere bağlı olarak hücrenin hayatta kalma mekanizmasıdır (Gözüa ık ve Kimchi, 2007; Karada , 2016). Aynı zamanda apoptotik olmayan, apoptoza alternatif programlı hücre ölümü olarak da adlandırılabilir (Edinger ve Thompson, 2004). Mikrootofaji, makro otofaji, şaperon aracılı otofaji olmak üzere üç farklı tip otofaji vardır. Otofajik hücre ölümü tipindeki en büyük morfolojik değişiklik mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi

organeller ve/veya sitoplazmanın bir kısmının çift veya çok membranlı veziküller içine alınmasıdır (Karadağ, 2016).

Son olarak hücre şişmesi ve hücre parçalanması gibi morfolojik özelliklerle karakterize nekroz ise; hücre içi denetim mekanizmasından bağımsız, ani çevresel değişimlere yanıt olarak ortaya çıkan patolojik bir süreçtir (Kane,1995; Öniz, 2004). Yine 2000’li yılların başlarında nekrozun programlı bir hücre ölüm tipi olabileceği görüşü gündeme gelmiş ve araştırmacılar arasında fikir ayrılığı ortaya çıkmıştır (Cabadak, 2008). Martin ve ark. (2017) tarafından yapılan sınıflandırmada entosis ölüm tipi de görülmektedir. Entosis; kanser hücrelerinde gözlemlenen, rakip hücrelerden güçlü olanın zayıf olanın sitoplazmasına istila ederek zayıf olanı öldürmesi şeklinde tanımlanan bir ölüm tipidir.



Şekil 24. Normal, apoptotik, otofajik ve nekrotik hücrelerin morfolojik özellikleri. a) Normal hücre, b) Otofajik hücre, c) Apoptotik hücre, d) Nekrotik hücre (Edinger ve Thompson, 2004; Yurdacan, 2017).



Şekil 25. Hücre ölüm tipleri için önerilen yeni sınıflandırma (Martins ve ark., 2017)

3.2.5.1. Hücre Ölüm Morfolojisinin Acridine Orange-Etidyum Bromür (AO / EB) Floresan Boyaması İle Belirlenmesi

Hücresinin apoptoza girmesiyle başlayan süreçte hücre zarında bir takım değişimler meydana gelmektedir (Şekil 25). Hücre zarlarının apoptoz süreci ile ilgili değişikliklerini belirlemek için kullanılan yöntemlerden biri Acridine Orange (AO) ve Etidyum Bromür (EB) ile hücrelerin boyanmasıdır. Bu metod aynı zamanda hücrelerin apoptoza gitmesi durumunda, apoptozun hangi evresinde olduklarını belirleme özelliğine de sahiptir. Acridine orange canlı ve cansız hücreler tarafından absorbe edilip nükleik asitlerden herhangi birine bağlandığında yeşil renk floresan yaymaktadır. Etidyum bromürle muamele edilen hücreler canlı ise yeşil, ölü ise kırmızı floresan yaymaktadırlar (Yurdacan, 2017). AO bütün hücreler tarafından absorbe edilebilirken, hücrenin nekroza ya da apoptoza gitmediği durumlarda hücre zarı EB'nin geçişine müsaade etmez (Bagchi, 2016).

Tez kapsamında hücre ölüm morfolojisinin belirlenmesi için AO/EB boyaması; aşağıdaki basamaklar sırasıyla takip edilerek yapıldı.

6 kuyulu plaklara her bir kuyuda 1 ml besiyeri içerisinde 5×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat boyunca 37°C sıcaklıkta , % 5 CO_2 içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonrası A2058, MeWo ve normal fibroblast hücrelerinin her biri, WST-1 analizi sonucu belirlenen en etkin üç

doz (80, 100, 120 µg/ml) ile 24 saat boyunca muamele edildi. İnkübasyon süresi sonrası A2058, MeWo ve normal fibroblast hücrelerinin her biri, 500 µl % 4 paraformaldehit ile 15 dk boyunca fiksasyon işlemine tabii tutuldu. Her bir kuyu 2 kez 500'er µl PBS ile yıkandıktan sonra 1'er ml AO / EB boya solüsyonundan eklenerek 30 dk boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi tamamlanınca hücreler 2 kez PBS ile yıkandı ve sonuçlar Thermo Scientific Fluroscan Ascent FL cihazında analiz edildi.

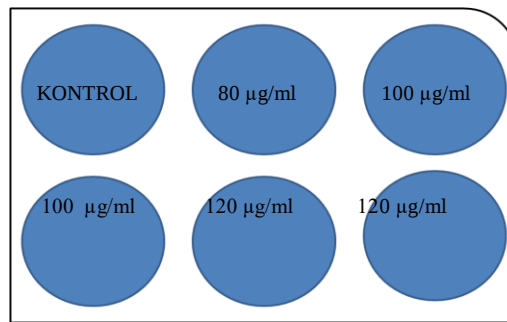
3.2.6. Apoptozun Belirlenmesi

3.2.6.1. Annexin V

WST-1 analiz sonuçlarına göre belirlenen IV'nin metanol özütünün etkin dozlarının (80 µg/ml, 100 µg/ml ve 120 µg/ml) hücrelerdeki apoptotik ölüm oranlarına etkisi Muse® Cell Analyzer cihazında Muse® Annexin V Dead Cell Kit kullanılarak değerlendirildi.

Hücrelerin apoptoz analizine hazırlık evresinde sırasıyla;

6 kuyulu plaklara her bir kuyuda 1 ml besiyeri içerisinde 5×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat boyunca 37° C'de , % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonrası A2058, MeWo ve normal fibroblast hücrelerinin her biri, WST-1 analizi sonucu belirlenen en etkin 3 doz ile 24 saat boyunca muamele edildi (Şekil 26).



Şekil 26. Annexin V analizi için hazırlanan 6 kuyulu plak düzeni.

Muamele işlemi sonrası besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler tripsin ile kaldırıldı. 2000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edildi ve santrifüj işleminin ardından 2 kere PBS ile yıkandı. Son olarak PBS solüsyonunda pipetaj yaparak homojenize bir şekilde oluşturulan hücre süspansiyonu, 1:1 oranında Annexin V & Dead Cell reaktifi

eklendi ve 45 dk oda sıcaklığında inkübasyona tabii tutuldu ve Muse® Cell Analyzer cihazı kullanılarak sonuçlar analiz edildi.

3.2.7. Hücre Döngüsü Analizi

Daimi olarak bölünme sinyalini alan hücrelerde hücre döngüsü, mitozu takiben bir sonraki mitozu kadar sırasıyla G₁-S-G₂ (interfaz) evrelerinden oluşur. Bölünme sinyalinin olmadığı durumlarda ise hücre G₀ evresinde bölünmeye hazırdır fakat herhangi bir bölünme sinyaline kadar istirahat evresindedir. Hücre, yaşam döngüsü sırasında kalıtım materyalinin aktarımının doğruluğundan emin olmak amaçlı sıklıkla kontrole tabii tutulmaktadır. Döngü içerisindeki G-S, G-M ve mitozda metafaz-anafaz geçişinde kontrol noktalarında hücrenin bölünüp bölünemeyeceği konusunda karar verilir (Vermeulen, 2003).

Tez kapsamındaki hücre döngüsü analizleri, Muse™ Cell Cycle Kit kullanılarak aşağıda belirtilen şekilde yapıldı.

6 kuyulu plaklara her bir kuyuda 1 ml besiyeri içerisinde 1×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat boyunca 37°C' de , %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonrası A2058, MeWo ve normal fibroblast hücrelerinin her biri, en etkin 3 doz ile 24 saat boyunca muamele edildi. Muamele işlemi sonrası besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler tripsin ile kaldırıldı. 2000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edildi ve santrifüj işleminin ardından 500 µl PBS ile yıkandı. PBS ile oluşturulan 50 µl hacimli hücre süspansiyonuna -20'de muhafaza edilen 0,7 ml %70'lik etanol nazıkçe eklendi ve -20°C' de 1 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sona erince Muse™ Cell Cycle Reaktifi eklendi. 30 dk oda sıcaklığında ve ışık almayan ortamda bekletildikten sonra Muse™ Cell Analyzer cihazında sonuçlar analiz edildi.

3.2.8. *Inula viscosa*'nın Metanol Özütünün Tümörün Agresifliği Üzerine Etkisinin Yara İyileşmesi Testi (Wound Healing Assay) Uygulanarak Değerlendirilmesi

A2058, MeWo ve normal fibroblast hücrelerinin her biri 6 kuyulu plaklara her bir kuyuda 1 ml besiyeri içerisinde 1×10^6 hücre olacak şekilde ekildi ve 24 saat boyunca 37°C'de , % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon

süresi sonrası her bir flaskın yüzeyine boydan boya 200 µl'lik pipet ucu ile nazıkçe tek bir çizik atıldı. A2058, MeWo ve normal fibroblast hücrelerinin her biri, en etkin 3 doz ile muamele edildi. 24 saat sonra hücrelerin pipet ucu ile oluşturulan çizige göçleri ve oluşan yara alanındaki değişiklik invert mikroskop altında görüntülendi.

3.2.9. İstatistiksel Analiz

A2058, MeWo ve normal fibroblast hücrelerinin hücre kültürü analizleri GraphPad Prism 6.01 (ABD) programı kullanılarak analiz edildi. Verilere ait standart sapma, yüzde ve sayısal değerler grafik şeklinde sunuldu. Gruplar arası farklılıkların normal dağılıp dağılmadığına normalite testi ile karar verilmesinin ardından, verilerin analizi ANOVA ile değerlendirildi. Elde edilen bulguların istatistiksel anlamlılığı $p<0,05$ ve $p<0,001$ olarak ifade edildi.

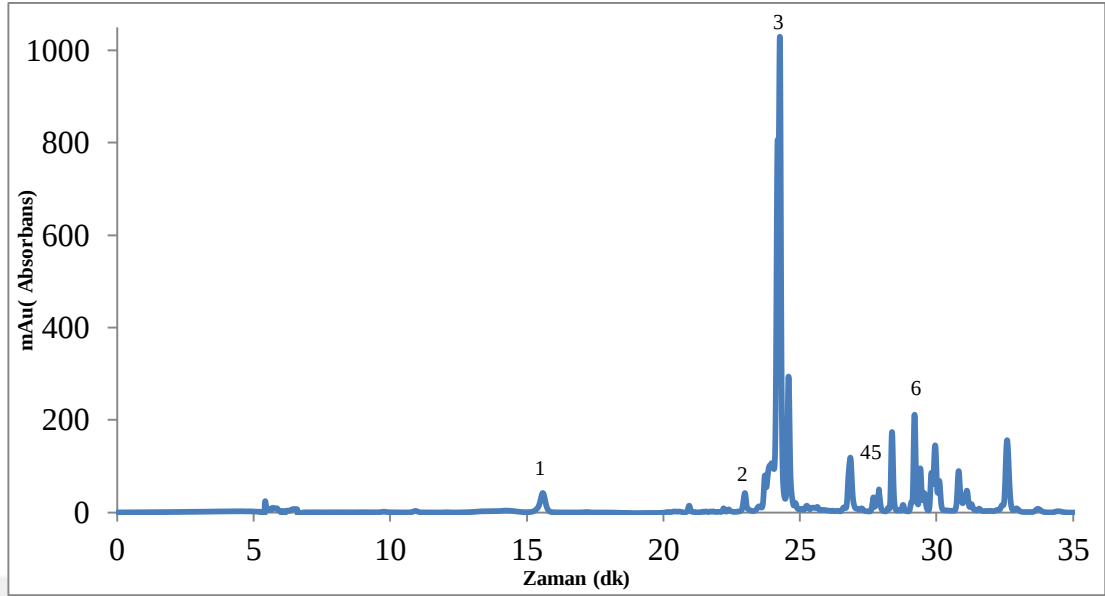
4. BULGULAR

4.1 *Inula viscosa*'nın Taksonomik Analizi

Ege Bölgesi Manisa Akhisar Hasköy'den çiçekli olarak toplanan IV bitkisinin Prof Dr. Hulusi Malyer tarafından gerçekleştirilen taksonomik analizinin sonuçlarına göre; *Inula viscosa* (L.) Aiton (yapışkanlı andız otu) 1 veya bazen 2 m'ye kadar boylanabilen, çalı görünüşlü, yapışkan ve kokulu bitkilerdir. Kapitulumlar çok sayıda ve ışınsaldır. Çiçekler sarı, dilsli ve tüpsü özellik gösterirler. IV bitkisi deniz seviyesinden 800 metreye kadar olan yüksekliklerde yayılış gösterebilmektedir. Türkiye coğrafyası içerisinde yol ve hendek kenarlarının yanı sıra bataklıklarda da yetişebilir. Güney ve Batı Anadolu'da yaygın olarak yetiştirmektedir (Baytop, 1999; Davis, 1975; Kaynak ve ark., 2005). Prof. Dr. Hulusi Malyer tarafından analiz edilen IV bitkisinin BULU numarası; 42445'tir.

4.2 *Inula viscosa*'nın Metanol ve Su Özütlerinin Kromatografik Analizi

IV'nin su ve metanol özütünün kromatografik analizi Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Dr. Önder AYBASTIER tarafından gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen analiz kapsamında IV'nin metanol ve su özütünde 16 adet fenolik bileşik her bir bileşik için ayrı ayrı hazırlanan standartlar ile HPLC-DAD cihazında belirlenmiştir. Analiz edilen fenolik bileşikler arasından kateşin, rutin, ferulik asit, luteolin, kuarsetin ve kamferolinin miktarları metanol özütünde anlamlı derecede fazla bulunmuştur (Tablo 7). Su özütünde tespit edilen aynı fenolik bileşiklerin miktarları oldukça azdır. Rosmarinik asit ve kafeik asit, protokatekuik asit, klorojenik asit, p-hidroksi benzoik asit, ellagik asit, p-kumarik asit, epikateşin, apigenin ise metanol ve su özütünde tespit edilememiştir (Şekil 27).



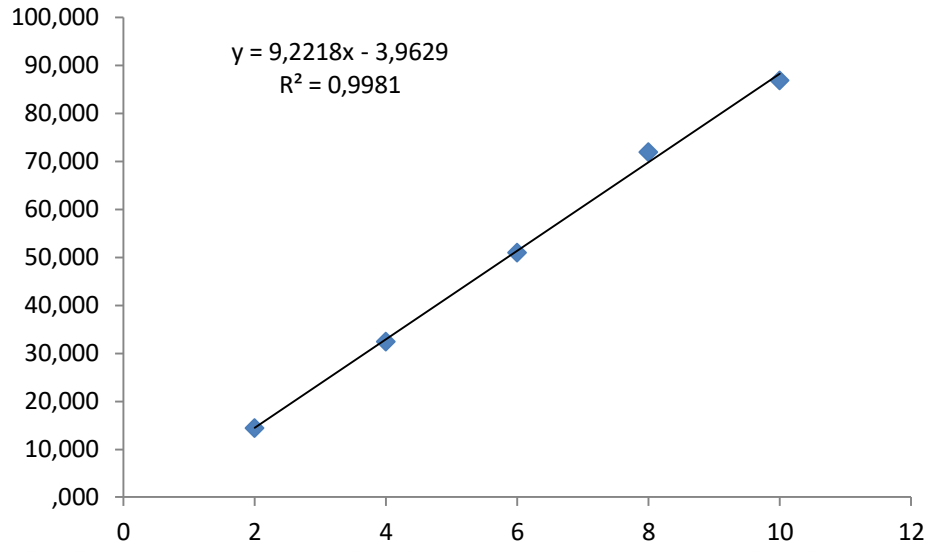
Şekil 27. IVM'nin içerisindeki fenolik bileşiklerin kromatogram görüntüsü. 1) Kateşin 2) Rutin 3) Ferulik asit 4) Luteolin 5) Kuarsetin 6) Kamferol

Tablo 7. IVM'nin içerisinde miktarı yüksek olan fenolik bileşikler

Kateşin	Rutin	Ferulik asit	Luteolin	Kuarsetin	Kamferol
1671,45 mg/ml	70,61 mg/ml	964,81 mg/ml	46,36 mg/ml	104,84 mg/ml	68,9 mg/ml

4.3 *Inula viscosa*'nın Metanol Ve Su Özütlerinin Antioksidan Aktivitesinin Değerlendirilmesi

IV'nin metanol ve su özütlerinin antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde Dr. Önder AYBASTIER tarafından yapılmıştır. Yapılan değerlendirme sonucu su özütünün antioksidan kapasitesinin daha düşük olduğu, metanol özütünün antioksidan kapasitesinin anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Su özütünün antioksidan kapasite değeri 3,25 mg trolox/mL iken metanol özütün 19,04 mg trolox/mL'dir. Kalibrasyon grafiği için troloks miktarına karşılık % inhibisyon grafiği çizilerek, en küçük kareler yöntemiyle doğru denklemi hesaplanmıştır (Şekil 28). Antioksidan kapasite değerleri kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 28. Troloks miktarına karşılık % inhibisyon grafiği

4.4 *Inula viscosa*'nın Metanol Ve Su Özütlerinin A2058, Mewo ve Normal Fibroblast Hücre Hatları Üzerindeki Antiproliferatif ve Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

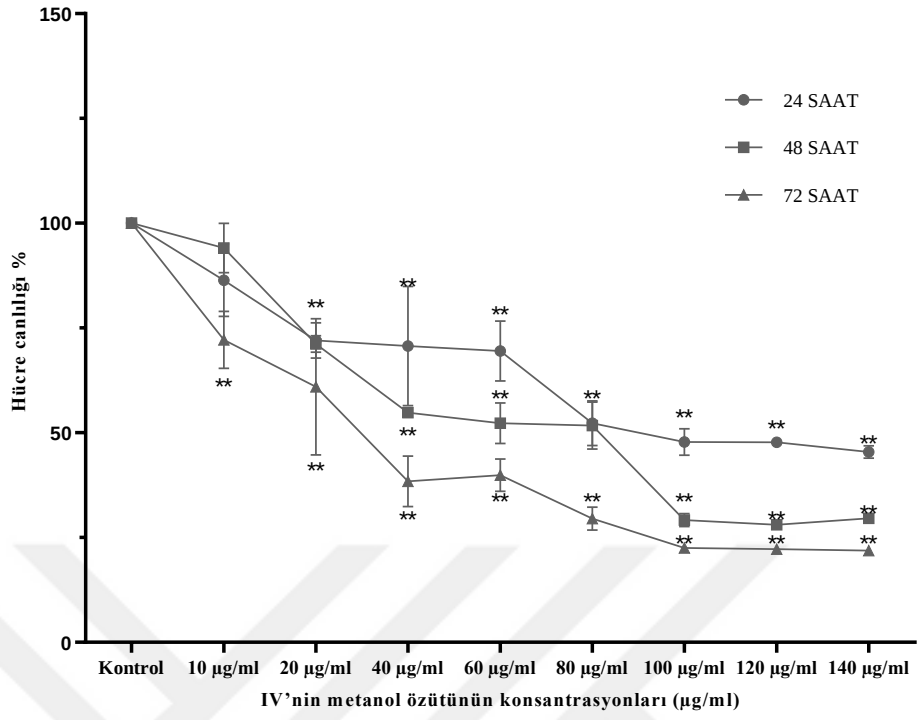
MM (A2058 ve MeWo) ve normal fibroblast hücre hatlarına 24, 48 ve 72 saatlik zaman aralıklarında 8 farklı doz uygulanmış olup IVM'nin hücre canlılığını zamana ve doza bağlı olarak nasıl etkilediği WST-1 analizi ile belirlenmiştir. 24, 48 ve 72 saat aralıklarında uygulanan 8 farklı dozun WST-1 analizi sonucu elde edilen absorbans değerleri (optical density; OD) ve absorbans değerlerinin hücre canlılığı yüzdesi olarak ifadesi Tablo 7, 8 ve 9'da gösterilmiş olup hücre canlılığının yüzde değişimleri ise Şekil 29, 30 ve 31'deki grafiklerde yer almaktadır. Her bir hücre hattı için 24 saat için IC_{50} değerleri hesaplanmış olup % inhibisyon grafiği Şekil 32'de verilmiştir. MeWo hücre hattının 24 saat için IC_{50} değeri 110,48; A2058 hücre hattının 122,28; normal fibroblast hücre hattının ise 149,22 olarak saptanmıştır.

Tablo 8. IVM'nin 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde muamelesinin MeWo hücre proliferasyonu üzerine etkisi

24 SAAT	Kontrol	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	60 µg/ml	80 µg/ml	100 µg/ml	120 µg/ml	140 µg/ml
OD 1		0,41	0,35	0,42	0,31	0,24	0,24	0,23	0,21
OD 2		0,45	0,36	0,30	0,31	0,28	0,23	0,23	0,22
OD 3		0,37	0,32	0,30	0,37	0,23	0,21	0,23	0,22
OD Ortalama	0,48	0,41	0,34	0,34	0,33	0,25	0,23	0,23	0,22
Canlılık Oranı 1	100,00	85,71	73,53	87,18	64,92	50,21	50,84	48,32	43,70
Canlılık Oranı 2	100,00	95,38	75,21	62,82	65,76	58,40	47,90	47,48	45,80
Canlılık Oranı 3	100,00	78,15	67,23	62,18	77,73	48,32	44,54	47,27	46,64
Canlılık Ortalama	100,00	86,41	71,99	70,73	69,47	52,31	47,76	47,69	45,38

48 SAAT	Kontrol	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	60 µg/ml	80 µg/ml	100 µg/ml	120 µg/ml	140 µg/ml
OD 1		0,70	0,58	0,43	0,38	0,38	0,24	0,22	0,24
OD 2		0,76	0,55	0,45	0,41	0,39	0,22	0,22	0,24
OD 3		0,79	0,57	0,43	0,46	0,46	0,24	0,23	0,23
OD Ortalama	0,80	0,75	0,57	0,44	0,42	0,41	0,23	0,22	0,24
Canlılık Oranı 1	100,00	87,70	72,77	54,08	47,68	48,18	30,36	27,60	29,99
Canlılık Oranı 2	100,00	95,11	69,01	56,21	51,82	48,68	27,35	27,73	29,99
Canlılık Oranı 3	100,00	99,37	71,77	54,20	57,34	58,22	29,74	28,86	28,86
Canlılık Ortalama	100,00	94,06	71,18	54,83	52,28	51,69	29,15	28,06	29,61

72 SAAT	Kontrol	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	60 µg/ml	80 µg/ml	100 µg/ml	120 µg/ml	140 µg/ml
OD 1		0,70	0,81	0,34	0,45	0,32	0,24	0,24	0,23
OD 2		0,85	0,69	0,46	0,38	0,35	0,24	0,24	0,24
OD 3		0,77	0,46	0,44	0,46	0,29	0,24	0,24	0,24
OD Ortalama	1,07	0,77	0,65	0,41	0,43	0,32	0,24	0,24	0,23
Canlılık Oranı 1	100,00	65,39	75,09	31,53	41,60	29,57	22,76	22,29	21,64
Canlılık Oranı 2	100,00	78,92	64,55	42,72	35,45	32,28	22,29	22,57	21,92
Canlılık Oranı 3	100,00	72,20	43,19	41,04	42,63	26,77	22,57	21,92	22,11
Canlılık Ortalama	100,00	72,17	60,95	38,43	39,89	29,54	22,54	22,26	21,89



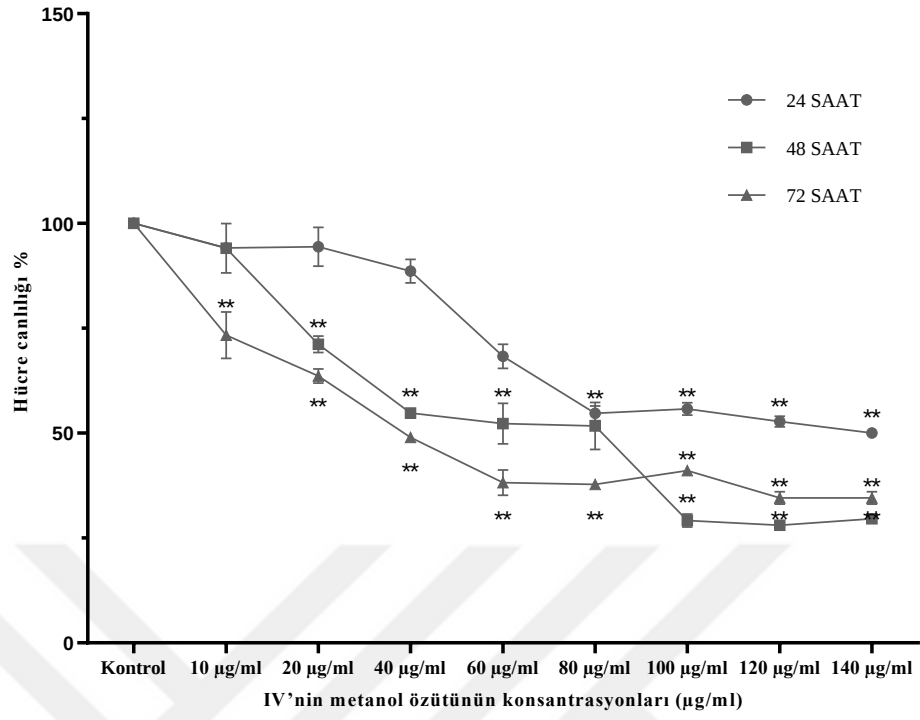
Şekil 29. IVM'nin 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde muamelesinin MeWo hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi (** $p < 0.01$)

Tablo 9. IVM'nin 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde muamelesinin A2058 hücre proliferasyonu üzerine etkisi

24 SAAT	Kontrol	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	60 µg/ml	80 µg/ml	100 µg/ml	120 µg/ml	140 µg/ml
OD 1		0,95	0,97	0,87	0,66	0,56	0,56	0,51	0,50
OD 2		0,95	0,89	0,87	0,68	0,55	0,57	0,53	0,50
OD 3		0,93	0,98	0,92	0,71	0,53	0,54	0,54	0,50
OD Ortalama	1,00	0,94	0,94	0,89	0,68	0,55	0,56	0,53	0,50
Canlılık Oranı 1	100,00	94,59	96,79	86,99	65,49	56,19	55,99	51,39	50,09
Canlılık Oranı 2	100,00	94,79	89,09	86,89	68,29	55,19	57,09	52,99	49,70
Canlılık Oranı 3	100,00	93,09	97,49	91,89	71,19	52,79	54,19	53,89	50,39
Canlılık Ortalama	100,00	94,16	94,46	88,59	68,33	54,73	55,76	52,76	50,06

48 SAAT	Kontrol	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	60 µg/ml	80 µg/ml	100 µg/ml	120 µg/ml	140 µg/ml
OD 1		0,98	0,99	0,80	0,63	0,67	0,60	0,47	0,54
OD 2		0,99	0,92	0,80	0,60	0,67	0,61	0,49	0,53
OD 3		1,12	0,92	0,81	0,63	0,66	0,60	0,57	0,55
OD Ortalama	1,42	1,03	0,94	0,80	0,62	0,67	0,60	0,51	0,54
Canlılık Oranı 1	100,00	68,66	69,79	56,41	44,01	46,83	42,32	33,17	38,10
Canlılık Oranı 2	100,00	69,44	64,44	56,06	42,25	47,39	42,61	34,72	37,04
Canlılık Oranı 3	100,00	79,01	65,07	57,18	44,58	46,55	41,97	40,35	38,45
Canlılık Ortalama	100,00	72,37	66,43	56,55	43,62	46,92	42,30	36,08	37,86

72 SAAT	Kontrol	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	60 µg/ml	80 µg/ml	100 µg/ml	120 µg/ml	140 µg/ml
OD 1		0,97	0,95	0,70	0,60	0,55	0,59	0,52	0,52
OD 2		1,09	0,91	0,73	0,52	0,54	0,60	0,48	0,48
OD 3		1,12	0,90	0,70	0,54	0,55	0,59	0,50	0,50
OD Ortalama	1,45	1,06	0,92	0,71	0,55	0,55	0,59	0,50	0,50
Canlılık Oranı 1	100,00	67,00	65,55	48,21	41,51	38,13	40,96	36,13	36,13
Canlılık Oranı 2	100,00	75,43	62,99	50,15	35,71	37,30	41,37	33,29	33,29
Canlılık Oranı 3	100,00	77,57	62,37	48,56	37,37	37,85	40,89	34,26	34,26
Canlılık Ortalama	100,00	73,33	63,64	48,97	38,20	37,76	41,08	34,56	34,56



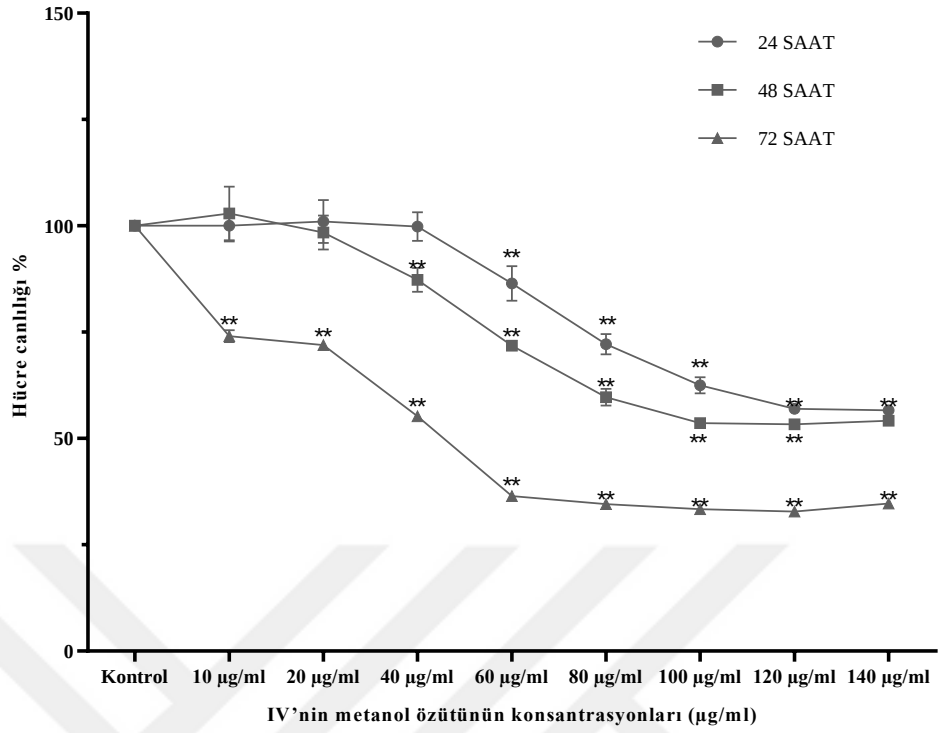
Şekil 30. IVM'nin 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde muamelesinin A2058 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

Tablo 10. IVM'nin 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde muamelesinin normal fibroblast hücre proliferasyonu üzerine etkisi

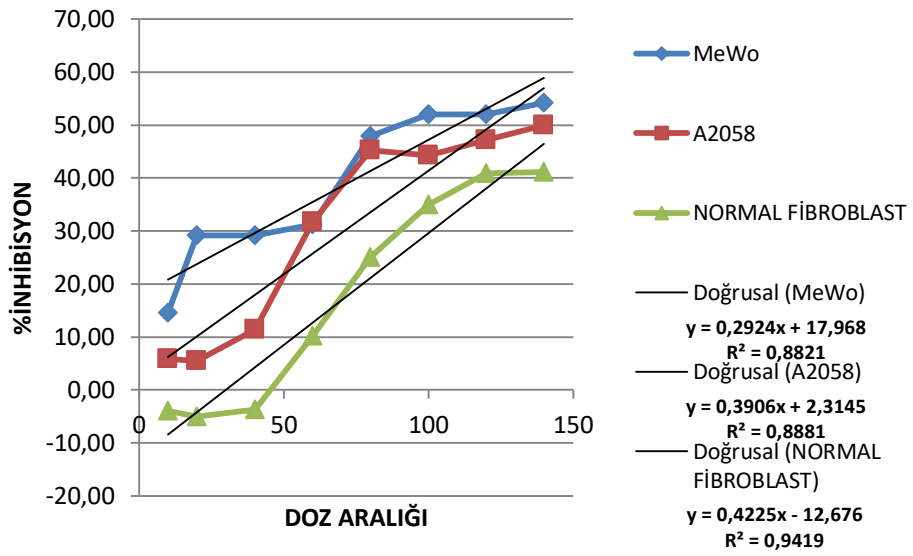
24 SAAT	Kontrol	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	60 µg/ml	80 µg/ml	100 µg/ml	120 µg/ml	140 µg/ml
OD 1		0,385	0,365	0,382	0,317	0,276	0,230	0,209	0,208
OD 2		0,361	0,359	0,358	0,305	0,259	0,238	0,210	0,209
OD 3		0,361	0,394	0,365	0,335	0,264	0,224	0,212	0,210
OD Ortalama	0,355	0,369	0,373	0,368	0,319	0,266	0,231	0,210	0,209
Canlılık Oranı 1	100,000	108,451	102,817	107,606	89,296	77,746	64,789	58,873	58,592
Canlılık Oranı 2	100,000	101,690	101,127	100,845	85,915	72,958	67,042	59,155	58,873
Canlılık Oranı 3	100,000	101,690	110,986	102,817	94,366	74,366	63,099	59,718	59,155
Canlılık Ortalama	100,000	103,944	104,977	103,756	89,859	75,023	64,977	59,249	58,873

48 SAAT	Kontrol	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	60 µg/ml	80 µg/ml	100 µg/ml	120 µg/ml	140 µg/ml
OD 1		0,39	0,41	0,34	0,29	0,24	0,21	0,22	0,21
OD 2		0,41	0,39	0,36	0,29	0,25	0,22	0,21	0,22
OD 3		0,44	0,38	0,36	0,29	0,23	0,22	0,22	0,22
OD Ortalama	0,40	0,41	0,40	0,35	0,29	0,24	0,22	0,22	0,22
Canlılık Oranı 1	100,00	96,77	102,73	84,12	72,95	59,55	53,10	53,35	52,85
Canlılık Oranı 2	100,00	102,48	97,77	88,09	71,46	61,79	53,60	53,10	55,09
Canlılık Oranı 3	100,00	109,43	94,79	89,58	70,97	57,82	54,09	53,60	54,59
Canlılık Ortalama	100,00	102,89	98,43	87,26	71,79	59,72	53,60	53,35	54,18

72 SAAT	Kontrol	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	60 µg/ml	80 µg/ml	100 µg/ml	120 µg/ml	140 µg/ml
OD 1		0,48	0,46	0,35	0,23	0,22	0,21	0,21	0,22
OD 2		0,47	0,46	0,36	0,23	0,22	0,21	0,21	0,22
OD 3		0,46	0,45	0,35	0,23	0,22	0,21	0,21	0,22
OD Ortalama	0,63	0,47	0,46	0,35	0,23	0,22	0,21	0,21	0,22
Canlılık Oranı 1	100,00	74,92	72,71	54,89	35,96	34,38	33,60	32,81	34,70
Canlılık Oranı 2	100,00	74,76	72,40	55,99	36,75	34,54	33,12	32,97	34,54
Canlılık Oranı 3	100,00	72,40	70,82	54,73	36,59	34,70	33,28	32,65	34,86
Canlılık Ortalama	100,00	74,03	71,98	55,21	36,44	34,54	33,33	32,81	34,70



Şekil 31. IVM'nin 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde muamelesinin normal fibroblast hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi (ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir. ** $p < 0.01$)



Şekil 32. Her bir hücre hattına IVM'nin 24 saat süre ile uygulanması sonucu %inhibisyon grafikleri

4.4.2 *Inula viscosa*'nın Su Özütünün Hücre Hattı Üzerindeki Antiproliferatif ve Sitotoksik Etkisi

MM hücre hatları (A2058 ve MeWo) ve normal fibroblast hücre hatlarına 24,48 ve 72 saatlik zaman aralıklarında 11 farklı doz uygulanmış olup IV'nin su özütünün hücre canlılığını zamana ve doza bağlı olarak nasıl etkilediği WST-1 analizi ile belirlenmiştir. WST-1 analizi sonucu elde edilen OD değerleri ve OD değerlerinin hücre canlılığı yüzdesi olarak ifadesi Tablo10, 11 ve 12'de gösterildiği gibi olup hücre canlılığının yüzdesel değişimleri ise Şekil 33, 34 ve 35'teki grafikte yer almaktadır.

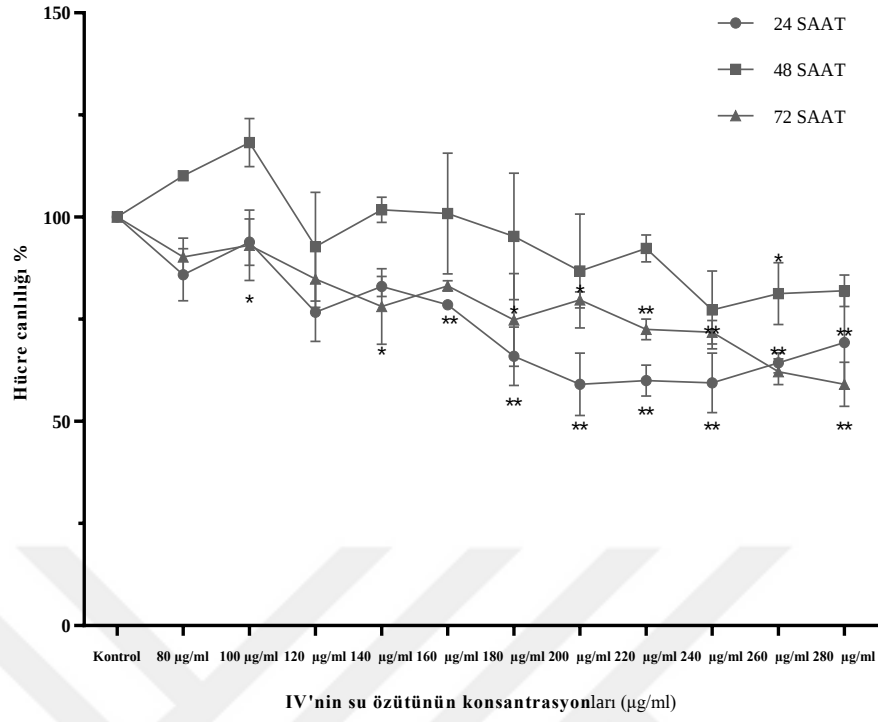


Tablo 10. IV'nin su özütünün 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde muamelesinin MeWo hücre proliferasyonu üzerine etkisi

24 SAAT	Kontrol	80 µg/ml	100 µg/ml	120 µg/ml	140 µg/ml	160 µg/ml	180 µg/ml	200 µg/ml	220 µg/ml	240 µg/ml	260 µg/ml	280 µg/ml
OD 1		0,44	0,47	0,40	0,39	0,37	0,28	0,29	0,29	0,32	0,31	0,28
OD 2		0,38	0,45	0,34	0,41	0,38	0,35	0,31	0,27	0,29	0,32	0,38
OD 3		0,41	0,42	0,35	0,39	0,37	0,32	0,24	0,30	0,25	0,29	0,33
OD Ortalama	0,48	0,41	0,45	0,37	0,40	0,37	0,31	0,28	0,29	0,28	0,31	0,33
Canlılık Oranı 1	100,00	92,02	99,16	84,87	81,72	77,52	58,61	60,50	59,87	66,18	64,92	57,98
Canlılık Oranı 2	100,00	79,20	94,54	71,43	85,92	79,62	72,90	65,97	56,30	60,50	66,39	80,67
Canlılık Oranı 3	100,00	86,55	87,82	73,95	81,51	78,57	66,18	50,84	63,87	51,68	61,55	69,33
Canlılık Ortalama	100,00	85,92	93,84	76,75	83,05	78,57	65,90	59,10	60,01	59,45	64,29	69,33

48 SAAT	Kontrol	80 µg/ml	100 µg/ml	120 µg/ml	140 µg/ml	160 µg/ml	180 µg/ml	200 µg/ml	220 µg/ml	240 µg/ml	260 µg/ml	280 µg/ml
OD 1		0,88	0,89	0,86	0,81	0,87	0,62	0,57	0,718	0,66	0,71	0,69
OD 2		0,87	0,97	0,71	0,79	0,87	0,80	0,79	0,766	0,53	0,59	0,65
OD 3		0,88	0,97	0,65	0,84	0,67	0,86	0,72	0,724	0,66	0,65	0,62
OD Ortalama	0,80	0,88	0,94	0,74	0,81	0,80	0,76	0,69	0,74	0,62	0,65	0,65
Canlılık Oranı 1	100,00	110,66	111,42	107,53	101,76	109,41	77,92	71,39	90,09	83,06	88,71	85,95
Canlılık Oranı 2	100,00	109,54	121,83	88,96	98,75	109,41	100,25	98,62	96,11	66,25	73,53	81,68
Canlılık Oranı 3	100,00	110,16	121,46	81,68	104,89	83,81	107,65	90,34	90,84	82,56	81,56	78,17
Canlılık Ortalama	100,00	110,12	118,24	92,72	101,80	100,88	95,27	86,78	92,35	77,29	81,26	81,93

72 SAAT	Kontrol	80 µg/ml	100 µg/ml	120 µg/ml	140 µg/ml	160 µg/ml	180 µg/ml	200 µg/ml	220 µg/ml	240 µg/ml	260 µg/ml	280 µg/ml
OD 1		1,02	0,89	0,99	0,83	0,88	0,82	0,88	0,75	0,74	0,67	0,63
OD 2		0,97	1,05	0,90	0,75	0,89	0,91	0,84	0,805	0,79	0,63	0,69
OD 3		0,92	1,05	0,84	0,94	0,91	0,67	0,85	0,776	0,78	0,70	0,58
OD Ortalama	1,07	0,97	1,00	0,91	0,84	0,89	0,80	0,85	0,78	0,77	0,67	0,63
Canlılık Oranı 1	100,00	94,87	83,12	92,35	76,96	82,18	76,49	82,00	69,96	68,56	62,87	58,49
Canlılık Oranı 2	100,00	90,11	97,95	83,58	69,50	82,65	85,26	78,36	75,09	73,88	58,68	64,74
Canlılık Oranı 3	100,00	85,63	98,32	78,64	87,87	84,61	62,69	78,82	72,39	73,04	64,83	54,01
Canlılık Ortalama	100,00	90,21	93,13	84,86	78,11	83,15	74,81	79,73	72,48	71,83	62,13	59,08



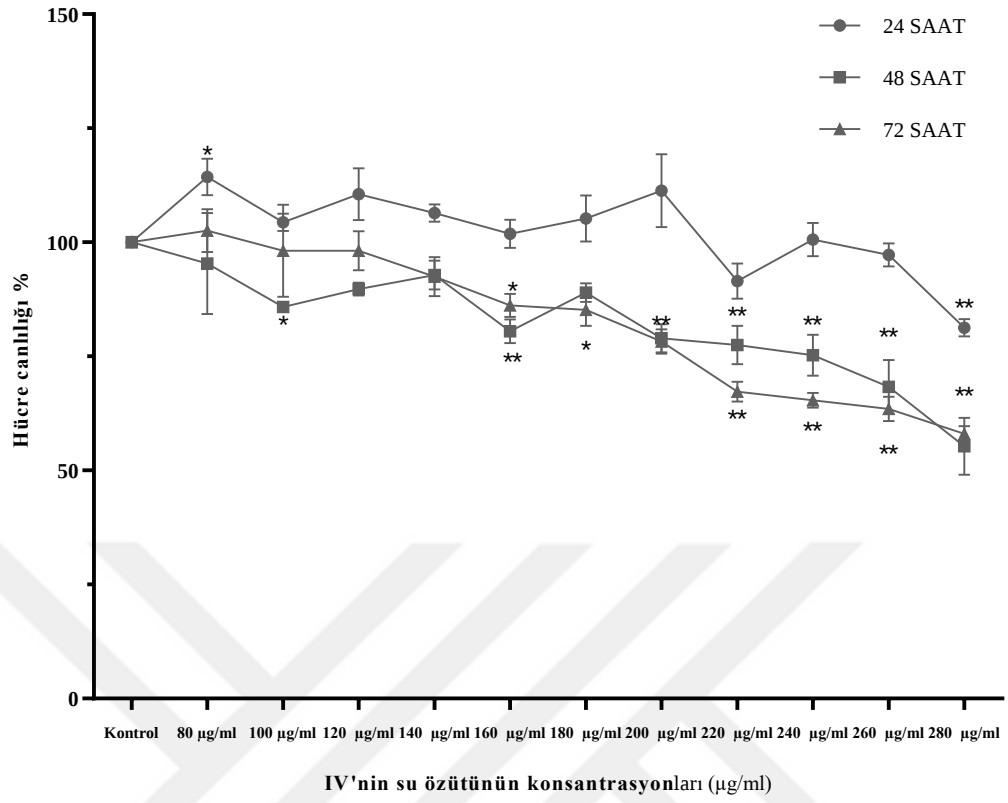
Şekil 33. IV'nin su özütünün 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde muamelesinin MeWo hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Tablo 11. IV'nin su özütünün 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde muamelesinin A2058 hücre proliferasyonu üzerine etkisi

24 SAAT	Kontrol	80 µg/ml	100 µg/ml	120 µg/ml	140 µg/ml	160 µg/ml	180 µg/ml	200 µg/ml	220 µg/ml	240 µg/ml	260 µg/ml	280 µg/ml
OD 1		1,10	1,03	1,16	1,08	1,04	1,07	1,03	0,88	1,01	0,95	0,83
OD 2		1,16	1,06	1,11	1,07	1,04	1,09	1,13	0,95	1,04	0,97	0,82
OD 3		1,17	1,04	1,05	1,04	0,98	0,99	1,19	0,92	0,97	1,00	0,79
OD Ortalama	1,00	1,14	1,04	1,11	1,06	1,02	1,05	1,11	0,92	1,01	0,97	0,81
Canlılık Oranı 1	100,00	109,69	102,69	116,29	107,69	103,59	107,29	102,79	87,69	101,19	94,99	82,69
Canlılık Oranı 2	100,00	116,39	106,39	110,49	107,29	103,79	108,89	112,49	95,39	103,89	96,79	82,09
Canlılık Oranı 3	100,00	116,89	103,99	104,89	104,19	98,29	99,39	118,69	91,49	96,69	99,99	79,09
Canlılık Ortalama	100,00	114,32	104,36	110,56	106,39	101,89	105,19	111,32	91,52	100,59	97,26	81,29

48 SAAT	Kontrol	80 µg/ml	100 µg/ml	120 µg/ml	140 µg/ml	160 µg/ml	180 µg/ml	200 µg/ml	220 µg/ml	240 µg/ml	260 µg/ml	280 µg/ml
OD 1		1,54	1,21	1,26	1,29	1,11	1,23	1,14	1,13	1,03	1,06	0,89
OD 2		1,26	1,21	1,27	1,37	1,19	1,28	1,15	1,03	1,14	0,90	0,73
OD 3		1,27	1,23	1,30	1,30	1,13	1,28	1,07	1,14	1,03	0,95	0,74
OD Ortalama	1,42	1,35	1,22	1,27	1,32	1,14	1,26	1,12	1,10	1,07	0,97	0,79
Canlılık Oranı 1	100,00	108,17	85,49	88,38	90,70	78,45	86,62	80,49	79,37	72,68	74,86	62,46
Canlılık Oranı 2	100,00	88,59	85,42	89,65	96,41	83,45	90,35	80,99	72,68	80,42	63,38	51,48
Canlılık Oranı 3	100,00	89,30	86,48	91,27	91,34	79,65	90,00	75,35	80,42	72,68	66,62	51,90
Canlılık Ortalama	100,00	95,35	85,80	89,77	92,82	80,52	88,99	78,94	77,49	75,26	68,29	55,28

72 SAAT	Kontrol	80 µg/ml	100 µg/ml	120 µg/ml	140 µg/ml	160 µg/ml	180 µg/ml	200 µg/ml	220 µg/ml	240 µg/ml	260 µg/ml	280 µg/ml
OD 1		1,42	1,25	1,45	1,38	1,28	1,25	1,11	1,01	0,94	0,88	0,85
OD 2		1,55	1,49	1,46	1,37	1,21	1,28	1,18	0,94	0,97	0,93	0,81
OD 3		1,48	1,52	1,35	1,27	1,26	1,18	1,11	0,97	0,93	0,95	0,86
OD Ortalama	1,45	1,48	1,42	1,42	1,34	1,25	1,23	1,13	0,97	0,95	0,92	0,84
Canlılık Oranı 1	100,00	97,95	86,55	100,36	95,39	88,27	86,06	76,88	69,56	65,00	60,51	58,78
Canlılık Oranı 2	100,00	107,34	103,06	100,85	94,42	83,37	88,14	81,30	65,14	67,14	64,31	56,02
Canlılık Oranı 3	100,00	102,30	104,78	93,18	87,52	86,82	81,37	76,60	67,14	63,96	65,62	59,20
Canlılık Ortalama	100,00	102,53	98,13	98,13	92,44	86,16	85,19	78,26	67,28	65,37	63,48	58,00



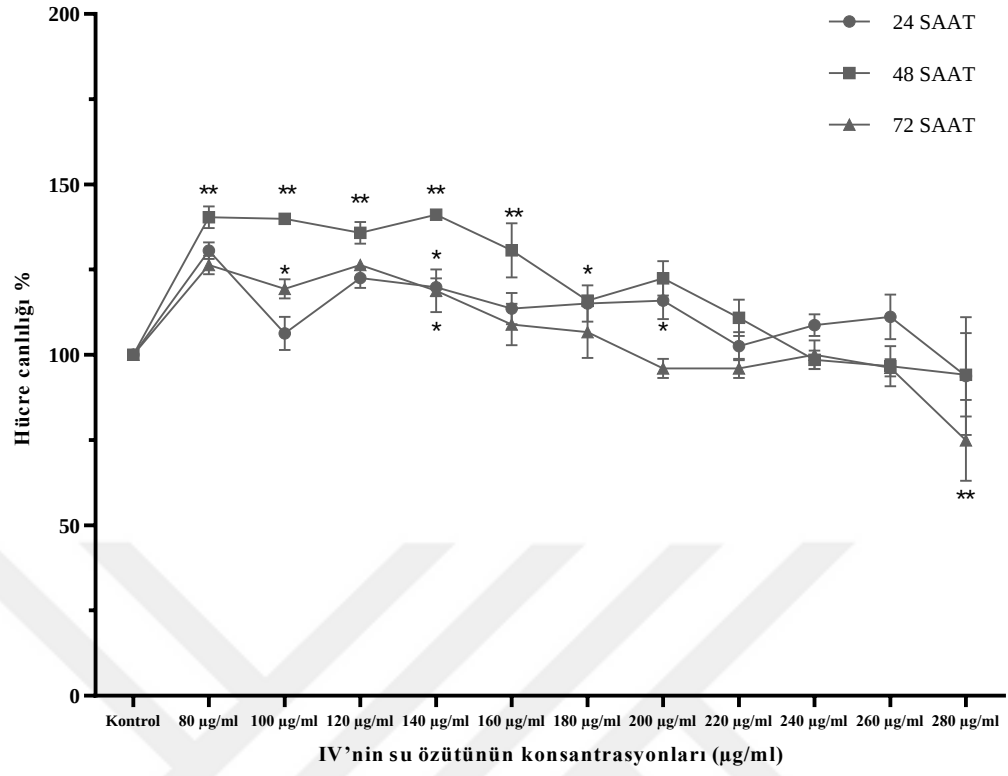
Şekil 34. IV'nin su özütünün 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde muamelesinin A2058 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Tablo 12. IV'nin su özütünün 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde muamelesinin normal fibroblast proliferasyonu üzerine etkisi

24 SAAT	Kontrol	80 µg/ml	100 µg/ml	120 µg/ml	140 µg/ml	160 µg/ml	180 µg/ml	200 µg/ml	220 µg/ml	240 µg/ml	260 µg/ml	280 µg/ml
OD 1		0,47	0,38	0,43	0,41	0,41	0,38	0,39	0,36	0,37	0,41	0,40
OD 2		0,45	0,36	0,42	0,42	0,40	0,41	0,41	0,37	0,38	0,40	0,29
OD 3		0,46	0,39	0,44	0,43	0,38	0,42	0,43	0,35	0,39	0,36	0,30
OD Ortalama	0,35	0,46	0,37	0,43	0,42	0,40	0,40	0,41	0,36	0,38	0,39	0,33
Canlılık Oranı 1	100,00	132,84	106,90	123,15	116,88	117,16	109,46	110,32	102,62	105,19	116,31	113,74
Canlılık Oranı 2	100,00	127,99	101,20	119,44	120,58	115,17	115,74	116,31	106,61	109,46	113,45	83,52
Canlılık Oranı 3	100,00	130,84	110,89	125,14	122,01	108,32	120,01	121,15	98,35	111,46	103,76	84,09
Canlılık Ortalama	100,00	130,56	106,33	122,58	119,82	113,55	115,07	115,93	102,53	108,70	111,17	93,79

48 SAAT	Kontrol	80 µg/ml	100 µg/ml	120 µg/ml	140 µg/ml	160 µg/ml	180 µg/ml	200 µg/ml	220 µg/ml	240 µg/ml	260 µg/ml	280 µg/ml
OD 1		0,545	0,54	0,52	0,54	0,52	0,44	0,45	0,44	0,38	0,39	0,38
OD 2		0,521	0,53	0,53	0,54	0,51	0,44	0,47	0,40	0,38	0,35	0,39
OD 3		0,534	0,53	0,50	0,53	0,46	0,44	0,48	0,43	0,36	0,36	0,30
OD Ortalama	0,38	0,53	0,53	0,52	0,54	0,50	0,44	0,47	0,42	0,37	0,37	0,36
Canlılık Oranı 1	100,00	143,42	140,79	135,79	141,05	137,37	116,05	117,37	115,26	101,05	103,42	100,79
Canlılık Oranı 2	100,00	137,11	138,95	138,95	142,63	132,89	116,05	122,63	105,00	98,95	92,63	101,58
Canlılık Oranı 3	100,00	140,53	140,00	132,63	139,74	121,84	115,53	127,37	112,37	95,53	93,95	80,00
Canlılık Ortalama	100,00	140,35	139,91	135,79	141,14	130,70	115,88	122,46	110,88	98,51	96,67	94,12

72 SAAT	Kontrol	80 µg/ml	100 µg/ml	120 µg/ml	140 µg/ml	160 µg/ml	180 µg/ml	200 µg/ml	220 µg/ml	240 µg/ml	260 µg/ml	280 µg/ml
OD 1		0,76	0,72	0,79	0,75	0,63	0,69	0,71	0,58	0,60	0,60	0,53
OD 2		0,80	0,76	0,79	0,77	0,71	0,61	0,64	0,61	0,65	0,61	0,38
OD 3		0,79	0,74	0,78	0,69	0,69	0,69	0,62	0,60	0,61	0,58	0,48
OD Ortalama	0,62	0,78	0,74	0,78	0,74	0,68	0,66	0,66	0,60	0,62	0,60	0,46
Canlılık Oranı 1	100,00	123,23	116,61	126,94	120,81	102,10	111,29	114,84	92,90	96,45	96,61	85,00
Canlılık Oranı 2	100,00	128,23	122,26	127,10	123,87	113,71	97,90	102,74	98,55	104,68	98,55	61,77
Canlılık Oranı 3	100,00	127,74	119,19	125,16	111,77	110,97	110,81	99,52	96,77	98,87	93,55	77,90
Canlılık Ortalama	100,00	126,40	119,35	126,40	118,82	108,92	106,67	105,70	96,08	100,00	96,24	74,89



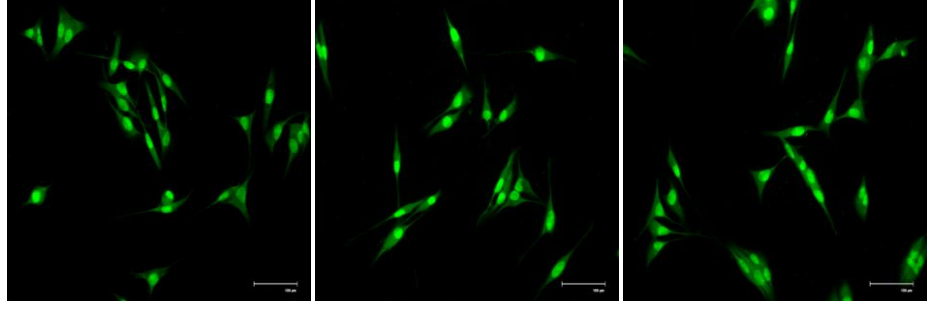
Şekil 35. IV'nin su özütünün 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde muamelesinin normal fibroblast hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

4.5 *Inula viscosa*'nın Metanol Özütünün A2058, Mewo ve Normal Fibroblast Hücre Hatlarının Morfolojileri Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

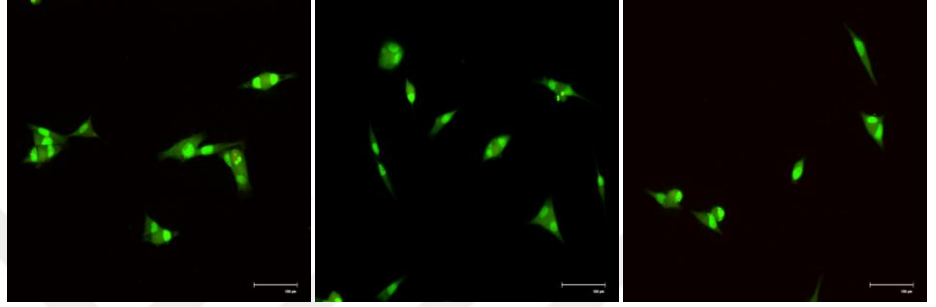
IV'nin metanol özütünün A2058, MeWo ve normal fibroblast hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi WST-1 analizi ile tespit edilmiş olup 80,100 ve 120 µg/ml doz miktarlarının 24 saat süre ile uygulanması sonucu A2058 ve MeWo hücre hatlarında programlı hücre ölüm tipi olan apoptotik ölüm gözlemlenmiştir. Hücrelerin yapısal değişimleri AO/EB boyaması ile belirlenmiştir (Şekil 36-38).

24 saat boyunca uygulanan dozların hücre proliferasyonunun azalmasına neden olduğu AO/EB boyaması ile de doğrulanmış olup nükleusta kromatin yoğunlaşması ve hücre membranında apoptotik ölümle karakterize olan yuvarlak çıkıntılar (tomurcuklanma) tespit edilmiştir. Aynı zamanda doza bağlı olarak nekrotik hücre ölüm tipi ile ölen hücre sayısındaki artış da nitel olarak belirlenmiştir. Normal fibroblast hücre hattında ise doza bağlı olarak apoptotik hücre ölümü ile birlikte sitoplazmik uzantıların kısaldığı, hücre-hücre ve hücre-yüzey etkileşimlerinin zayıfladığı gözlemlenmiştir. MM hücre hatlarına kıyasla normal fibroblast hücrelerinin özütün sitotoksik etkisine yanıtının daha az olduğu gözlemlenmiştir.

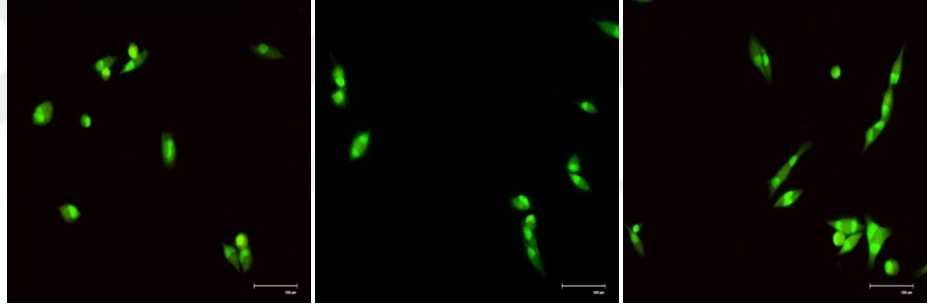
KONTROL



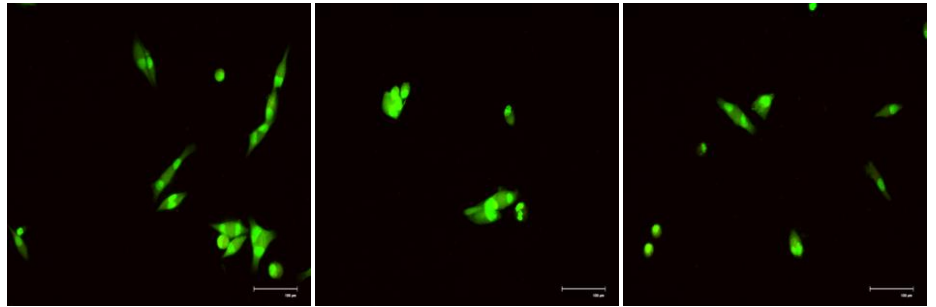
80 $\mu\text{g/ml}$



100 $\mu\text{g/ml}$

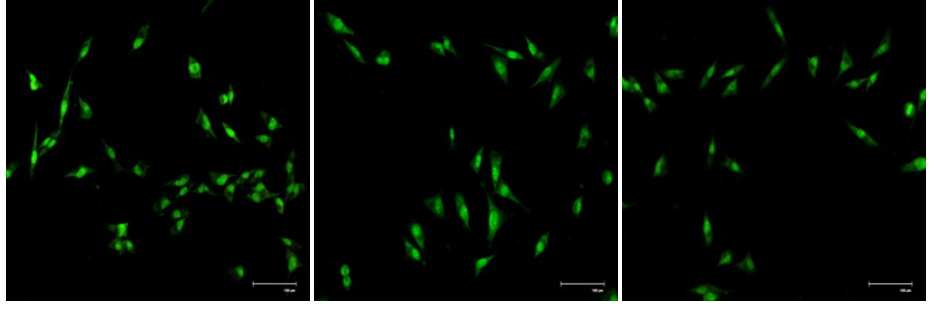


120 $\mu\text{g/ml}$

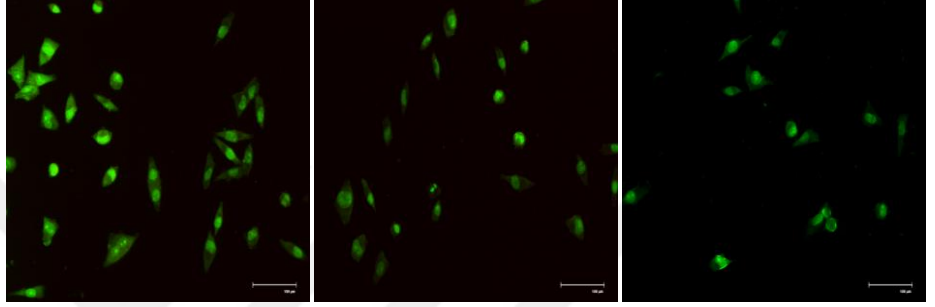


Şekil 36. IVM'nin MeWo hücre hattında oluşturduğu morfolojik değişimler

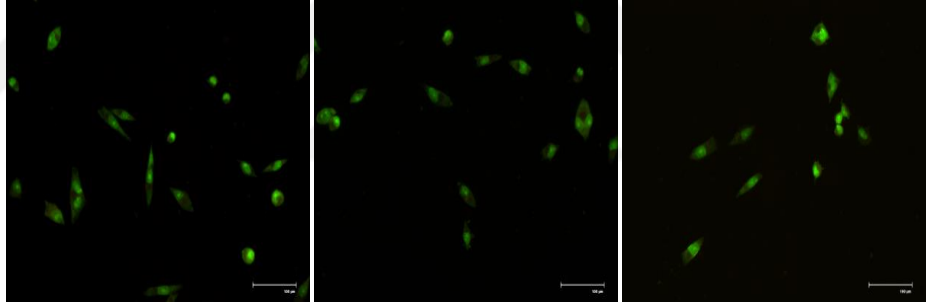
KONTROL



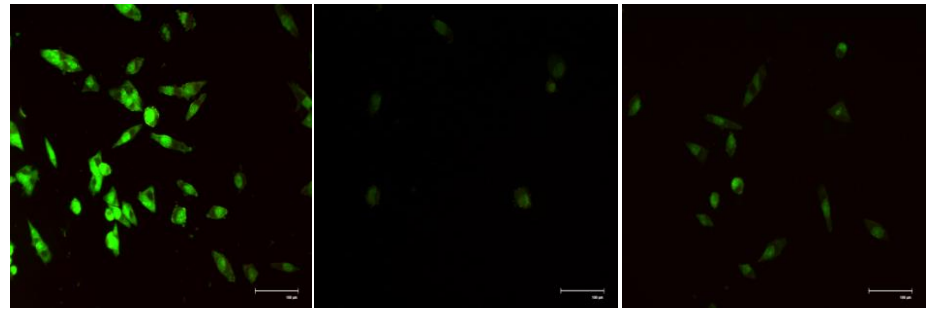
80 $\mu\text{g/ml}$



100 $\mu\text{g/ml}$

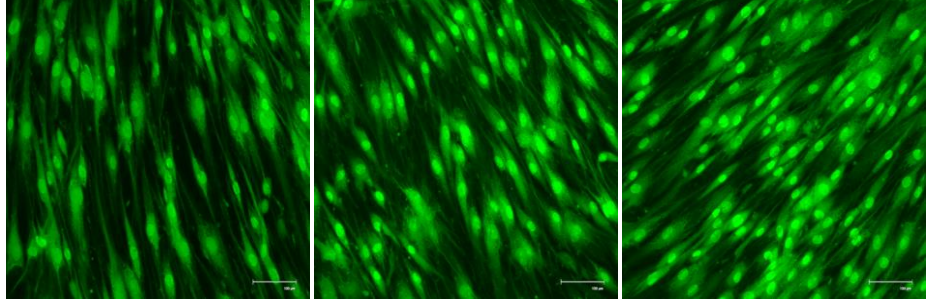


120 $\mu\text{g/ml}$

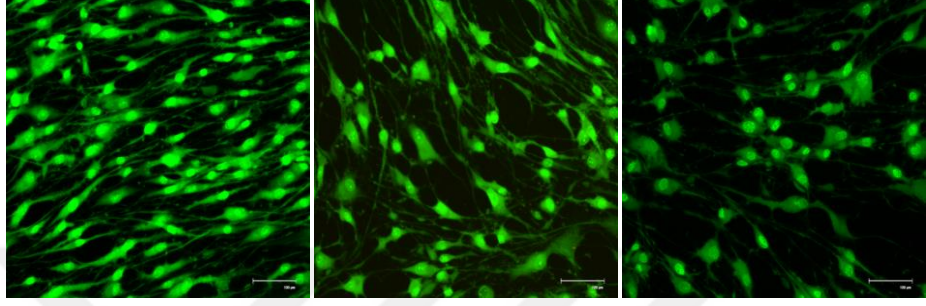


Şekil 37. IVM'nin A2058 hücre hattında oluşturduğu morfolojik değişimler

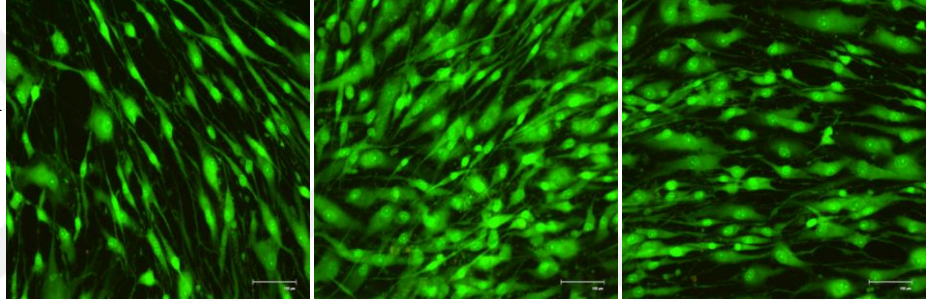
KONTROL



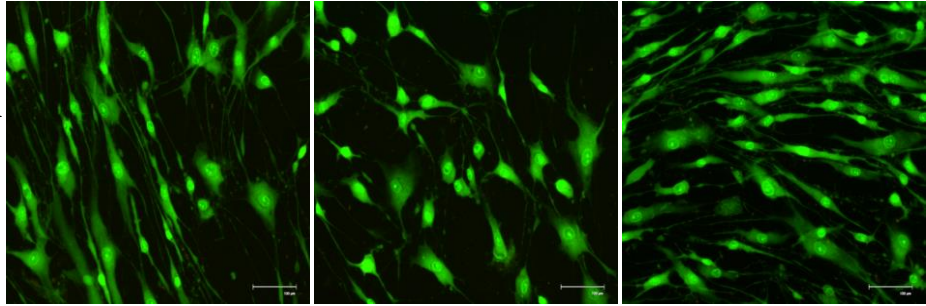
80 $\mu\text{g/ml}$



100 $\mu\text{g/ml}$



120 $\mu\text{g/ml}$



Şekil 38. IVM'nin normal hücre hattında oluşturduğu morfolojik değişimler

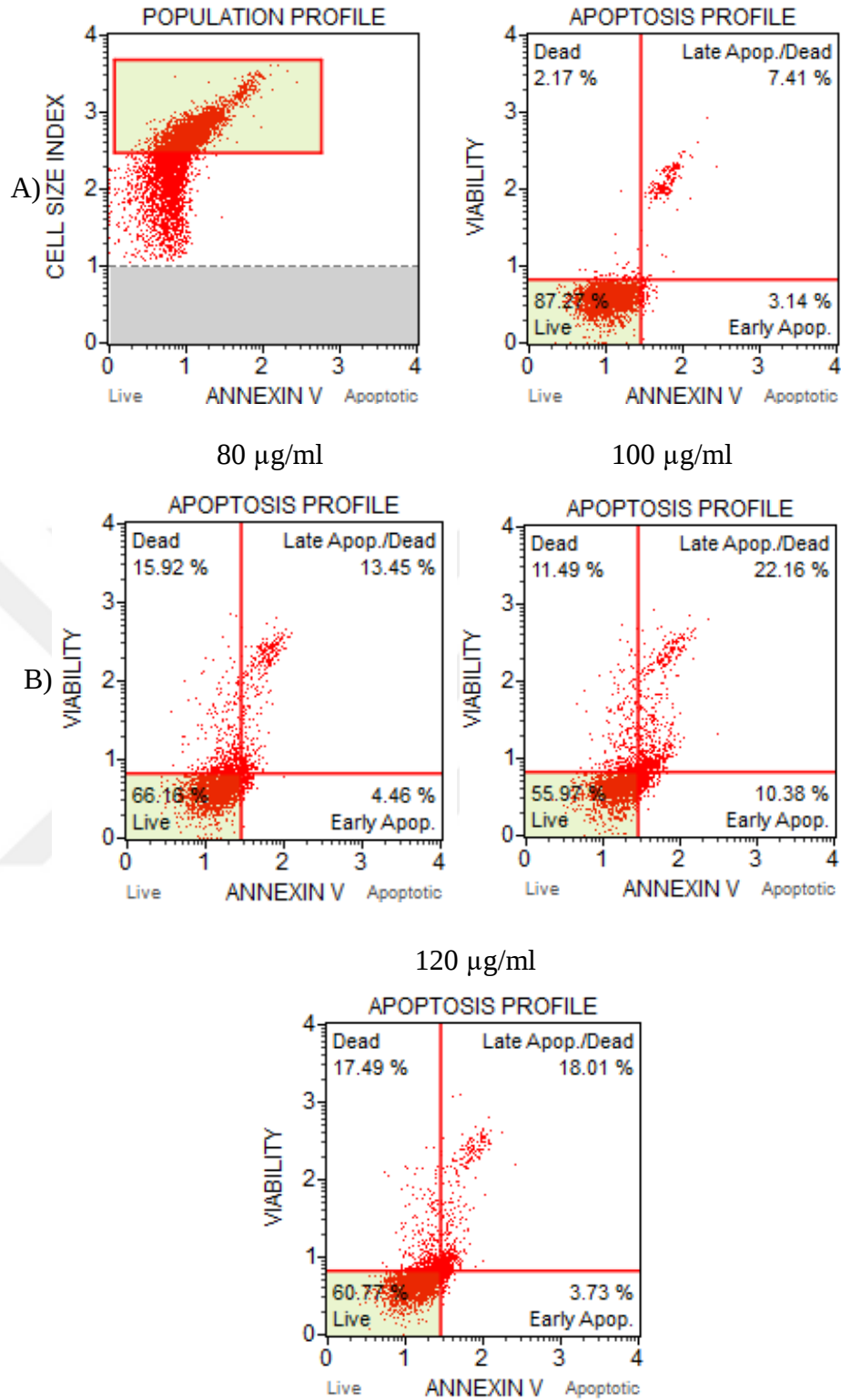
4.6 IV'nin Metanol Özüütünün Hücrelerdeki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

IVM'nin 24 saatlik süre zarfında belirli doz aralıklarında uygulanması sonucu A2058, MeWo ve normal fibroblast hücre hatları üzerindeki etkin sitotoksik dozların WST-1 analizi ile belirlenmesinin ardından uygulanan bu dozların hücre hatları üzerindeki apoptotik etkisi Muse® Cell Analyzer cihazında Muse® Annexin V Dead Cell Kit kullanılarak tespit edildi. Bulgular Şekil 39-45'te verilmiştir.

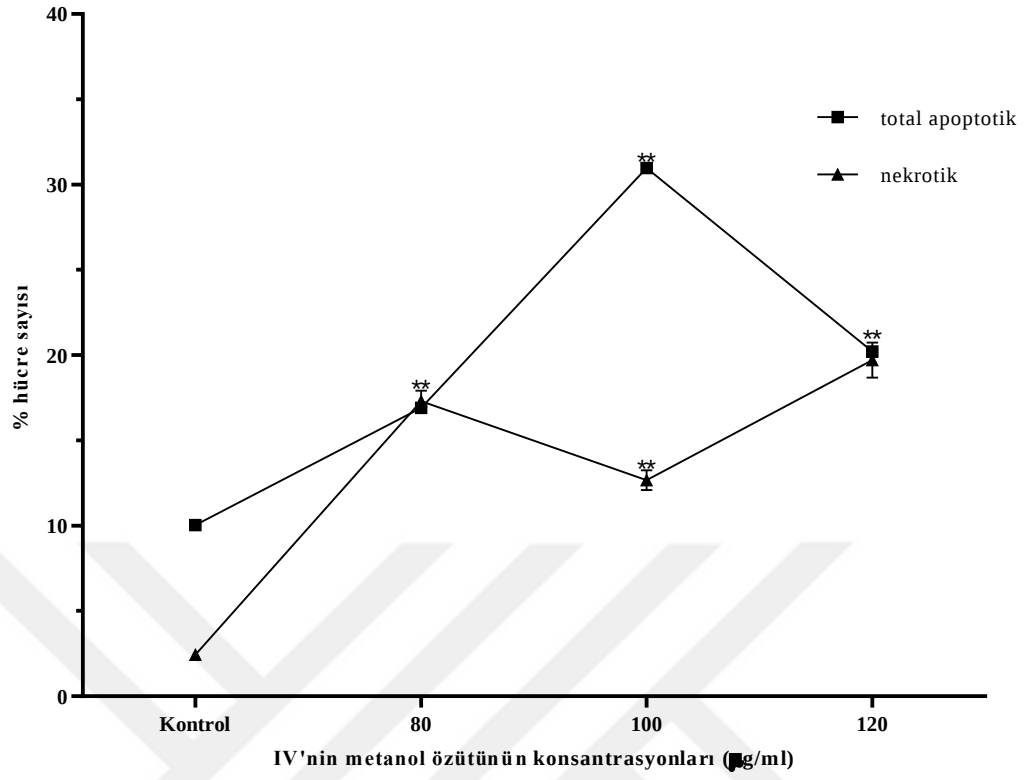
IVM'nin MeWo, A2058 ve normal fibroblast hücre hatlarındaki apoptotik etkisi aynı hücrenin doz uygulanmayan kontrol grubu ile kıyaslandığında 24 saat süresince doz uygulanan hücrelerdeki erken ve geç apoptotik ölüm oranları Tablo 13'te verilmiştir. Yapılan analizlere göre A2058 ve MeWo hücre hatlarında canlı popülasyonun doza bağlı olarak azaldığı ve apoptotik hücre ölümünün ise arttığı gözlemlenmiştir. Aynı dozların 24 saat boyunca normal fibroblast hücrelerine uygulanmasının ise hücre canlılığını MM hücre hatlarına oranla daha az etkilediği ve hücrelerin apoptotik ölümle birlikte nekrotik ölüm tipini de sergilediği tespit edilmiştir.

Tablo 13. IVM'nin 80, 100 ve 120 µg/ml uygulanması sonucu hücre hatlarındaki erken ve geç apoptotik ölüm oranları

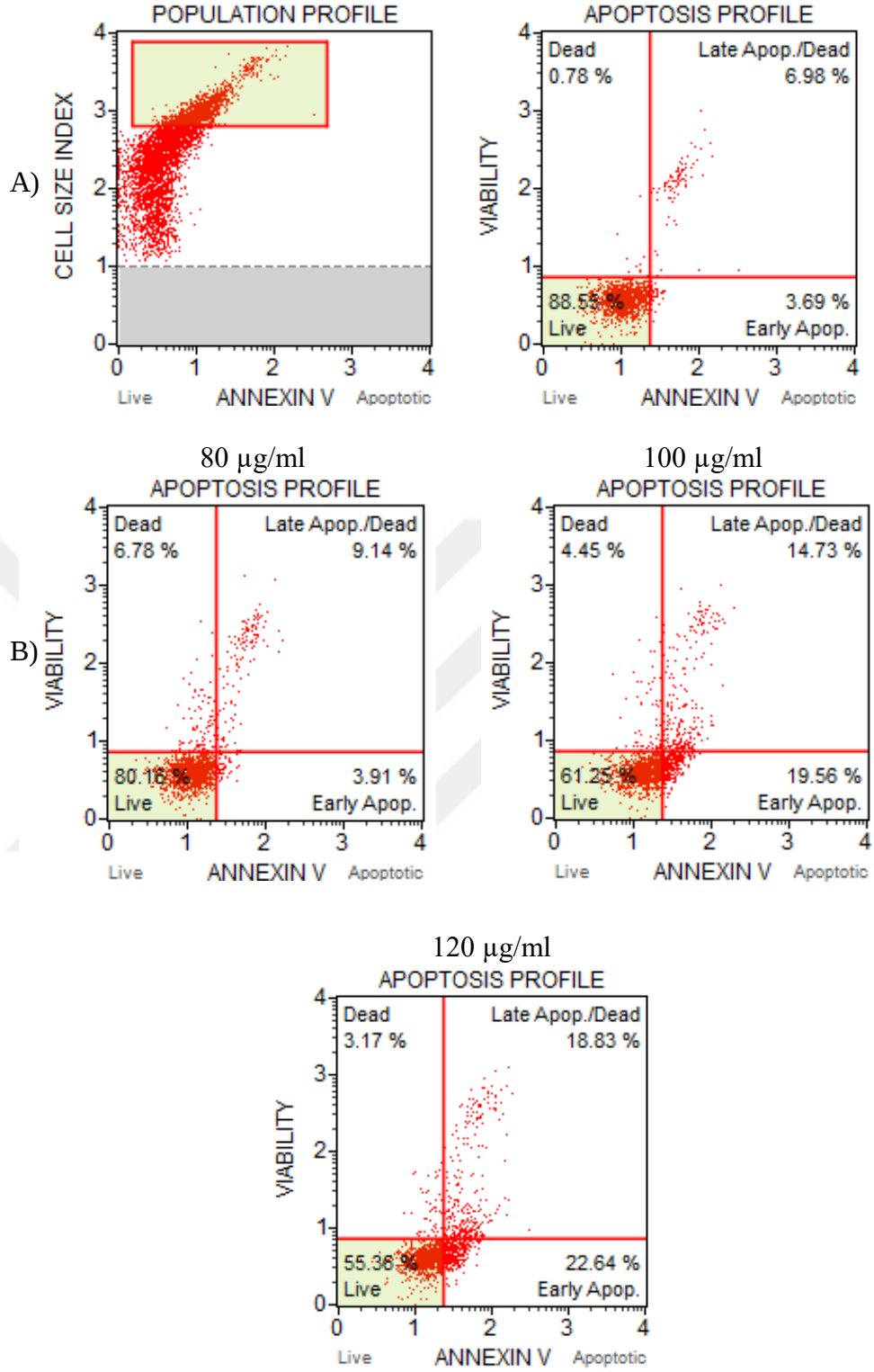
HÜCRE ADI	UYGULANAN DOZLAR	ERKEN APOPTOTİK	GEÇ APOPTOTİK
A2058	80 µg/ml	4,46	13,45
	100 µg/ml	10,38	22,16
	120 µg/ml	3,73	18,01
MeWo	80 µg/ml	3,91	9,14
	100 µg/ml	19,56	14,73
	120 µg/ml	22,64	18,83
Normal Fibroblast	80 µg/ml	2,59	4,42
	100 µg/ml	4,29	7,76
	120 µg/ml	3,19	6,07



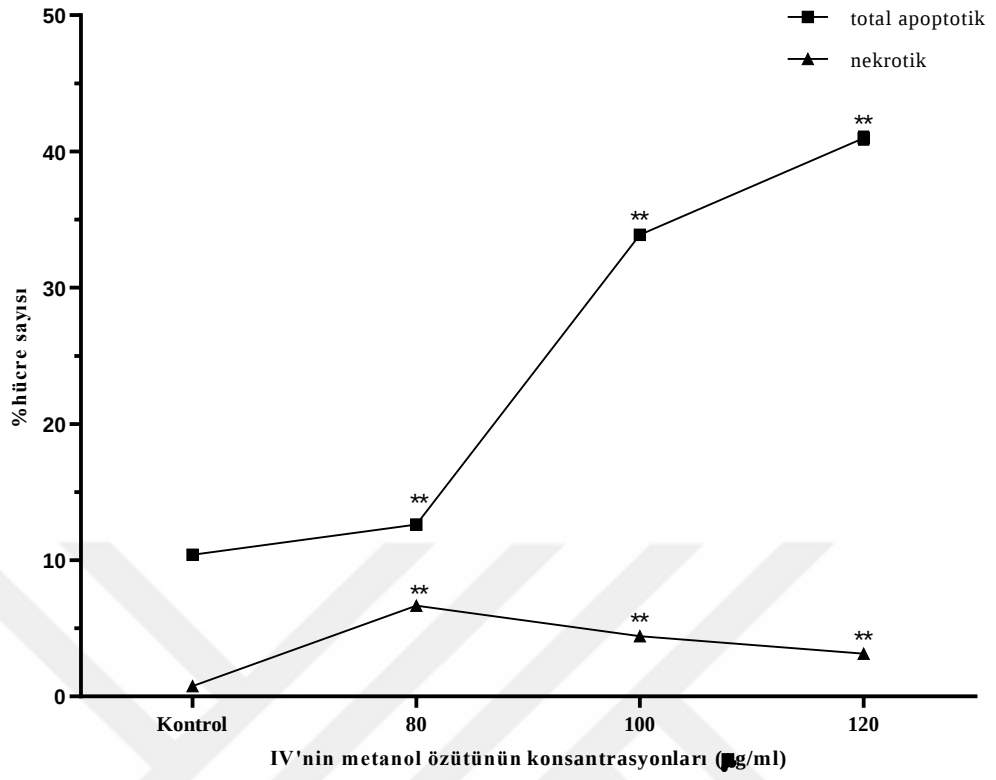
Şekil 39. A2058 hücre hattına belirli dozlarda IVM uygulanması sonrası Annexin V-PI analizinin sonuçları (A) Kontrol, (B) 80 µg/ml, 100 µg/ml, 120 µg/ml



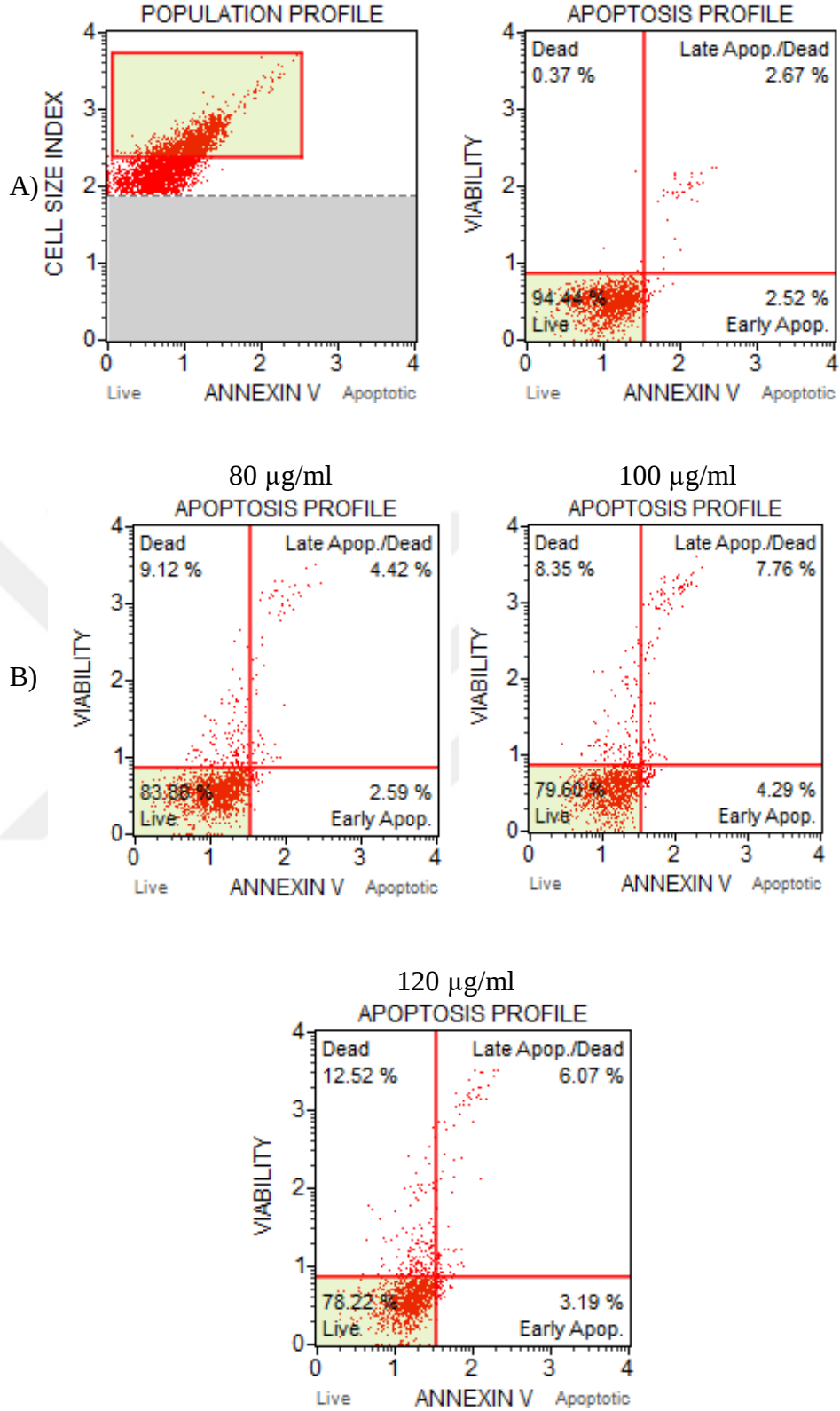
Şekil 40. IVM'nin 80, 100, 120 µg/ml uygulanması sonucu A2058 hücre hattının total apoptotik ve nekrotik ölüm oranları (ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).



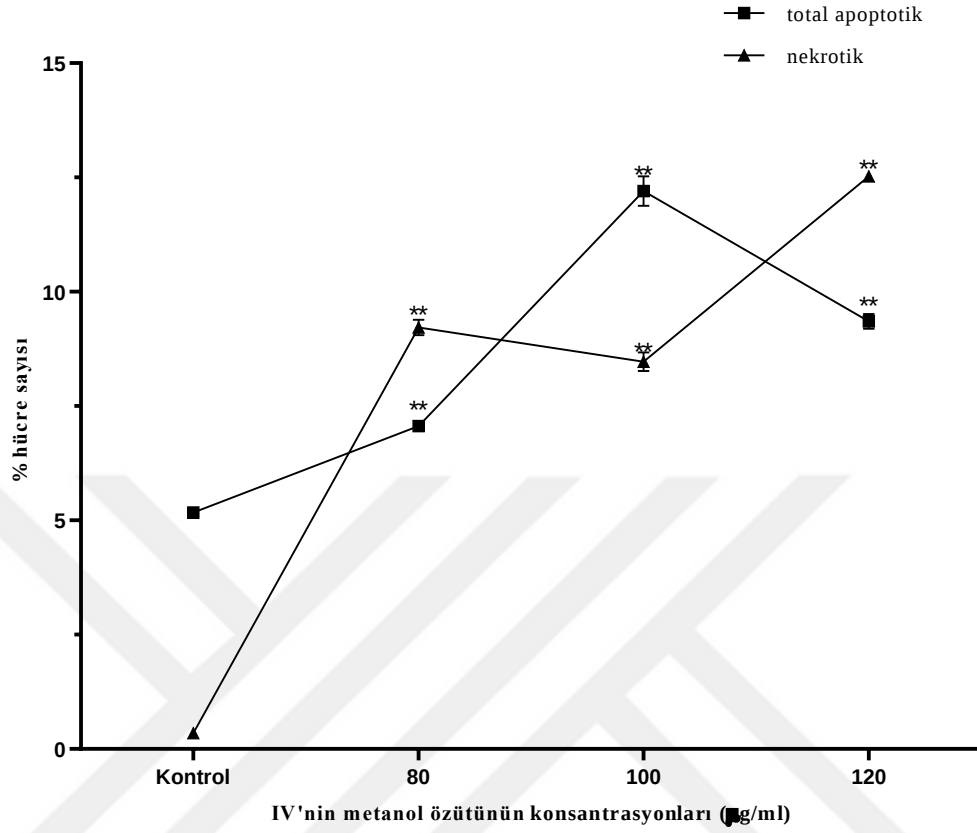
Şekil 41. MeWo hücre hattına belirli dozlarda IVM uygulanması sonrası Annexin V analizi sonucu elde edilen apoptotik ölüm oranları. (A) Kontrol, (B) 80 μ g/ml, 100 μ g/ml, 120 μ g/ml



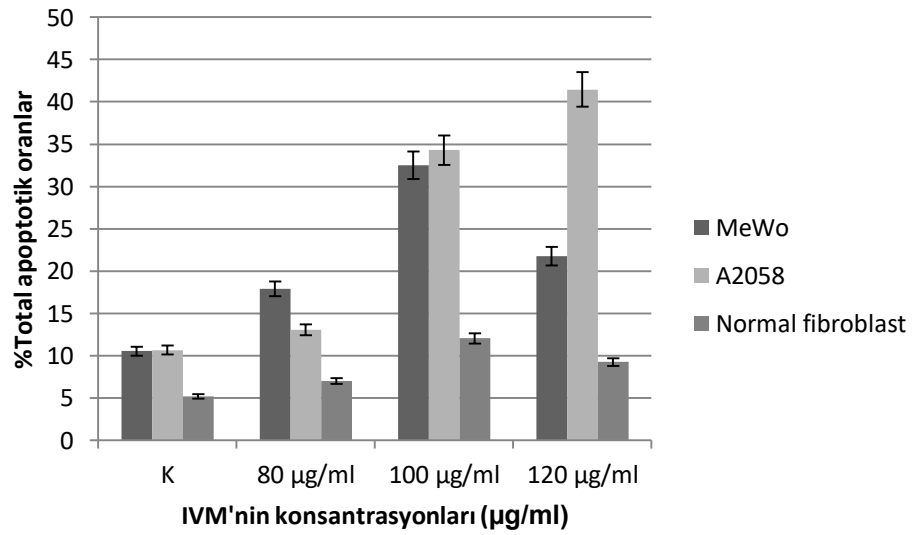
Şekil 42. IVM'nin 80, 100, 120 µg/ml uygulanması sonucu MeWo hücre hattının total apoptotik ve nekrotik ölüm oranları (ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir. ** $p < 0.01$).



Şekil 43. Normal fibroblast hücre hattına hücre hattına belirli dozlarda IVM uygulanması sonrası Annexin V analizinin sonuçları. (A) Kontrol, (B) 80 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 120 $\mu\text{g/ml}$



Şekil 44. IVM'nin 80, 100, 120 µg/ml uygulanması sonucu normal fibroblast hücre hattının total apoptotik ve nekrotik ölüm oranları. (ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

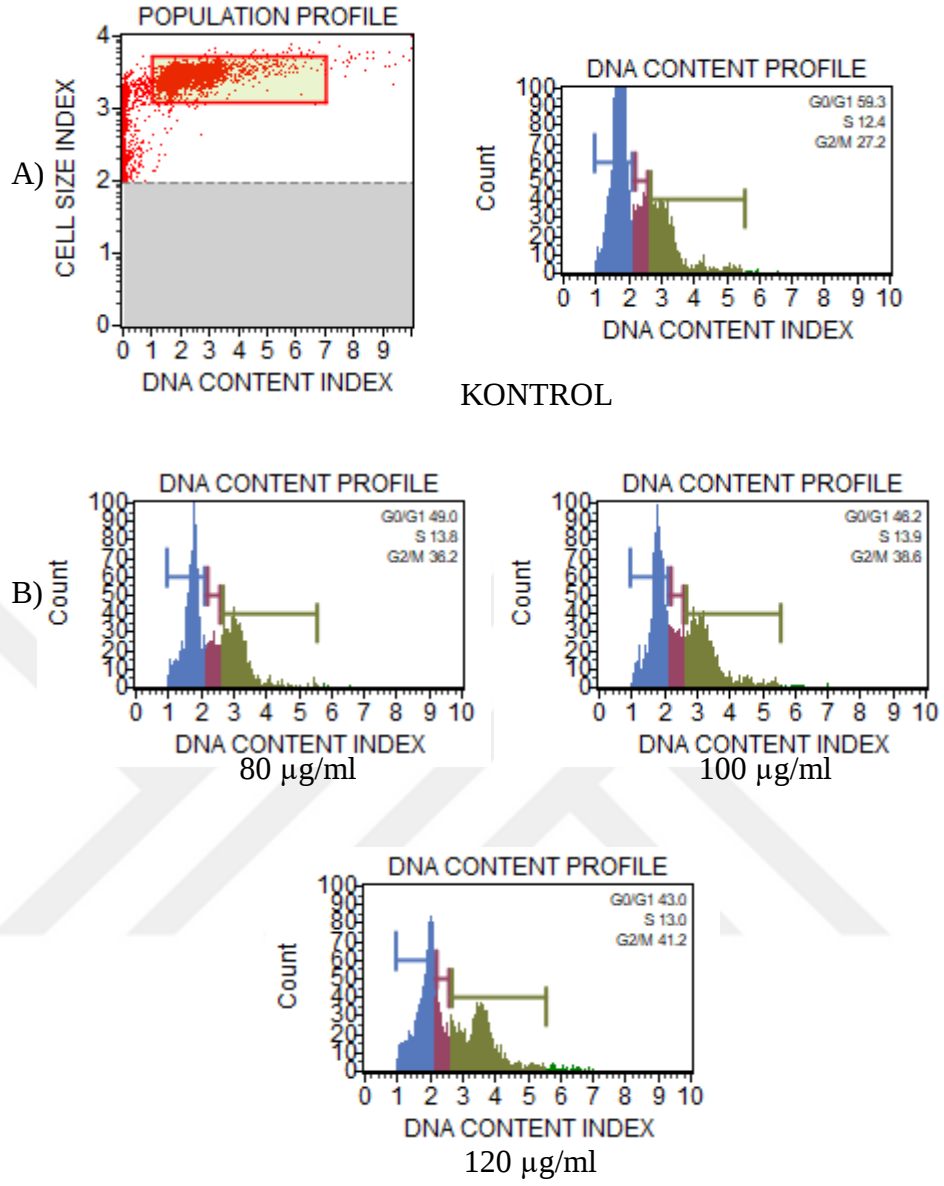


Şekil 45. IVM'nin 80, 100, 120 µg/ml uygulanması sonucu MM ve normal fibroblast hücre hatlarının karşılaştırmalı total apoptotik ölüm oranları

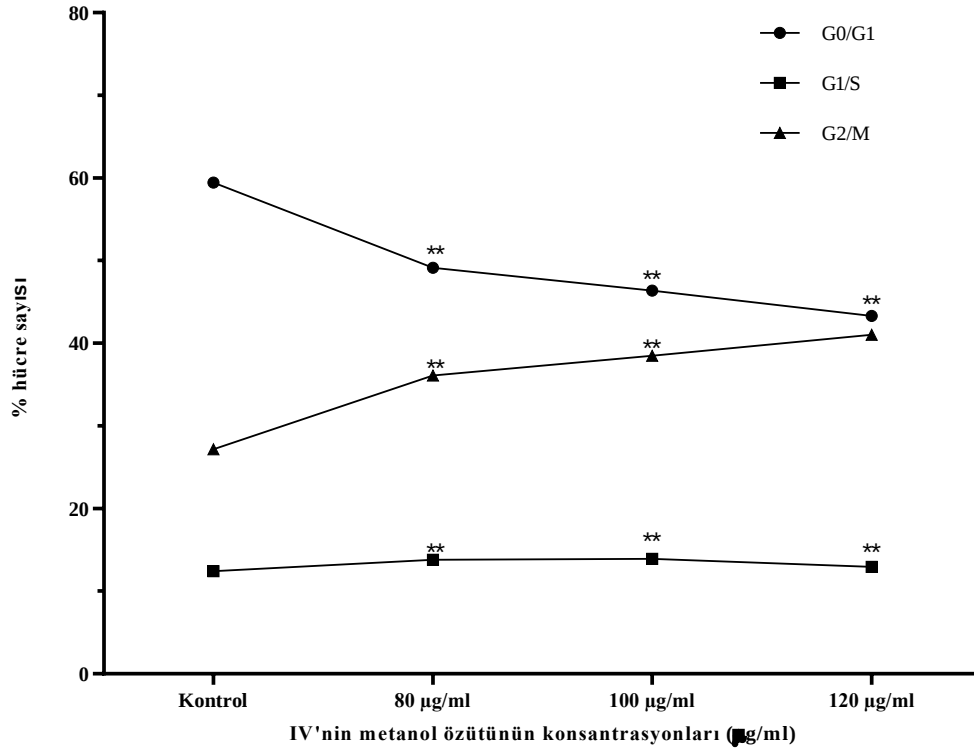
4.7 *Inula viscosa*'nın Metanol Özüünün Hücre Döngüsü Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

80, 100, 120 µg/ml IVM'nin MeWo, A2058 ve normal fibroblast hücrelerinde 24 saat süresince farklı dozlarda uygulanması sonucu farklı etkiler yarattığı gözlemlenmiştir.

MeWo hücre hattının canlı popülasyonunun; dozun artışına bağlı olarak hücre döngüsünün G2/M kontrol noktasında duraklatıldığı tespit edilmiştir. MeWo hücre hattının doz uygulanmamış olan kontrol grubunun hücre miktarlarının G0/G1'de %59,3; G1/S'de %12,4; G2/M'de %27,2 olduğu belirlenmiştir. 80, 100 ve 120 µg/ml IVM uygulanması sonucu doz artışına bağlı olarak G2/M'de artış gözlemlenmiştir (Şekil 46, 47). MeWo hücre hattının genomik profilinde tanımlanmış olan mutasyonlardan dolayı DNA'sı hasar gören hücrelerin G0/G1 kontrol noktasında farkedilmeyip G2/M'de duraklatılmış olabileceği düşünülmektedir.

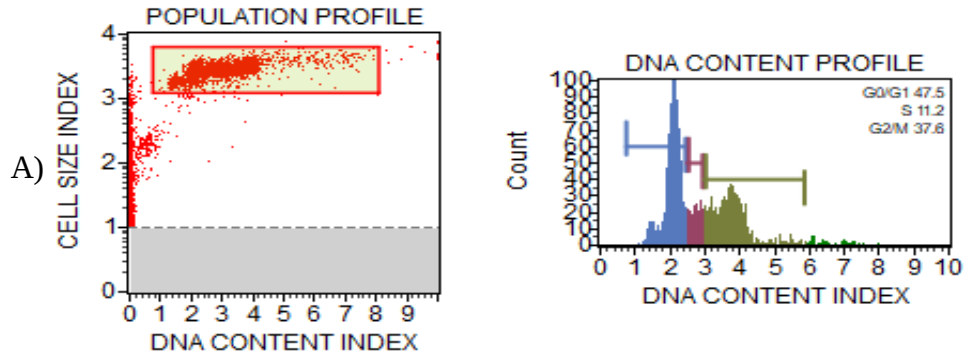


Şekil 46. IVM' nin 24 saat uygulanması sonucu MeWo hücre hattında hücre döngüsü evrelerine ait histogramlar. (A) Kontrol, (B) 80 µg/ml, 100 µg/ml, 120 µg/ml

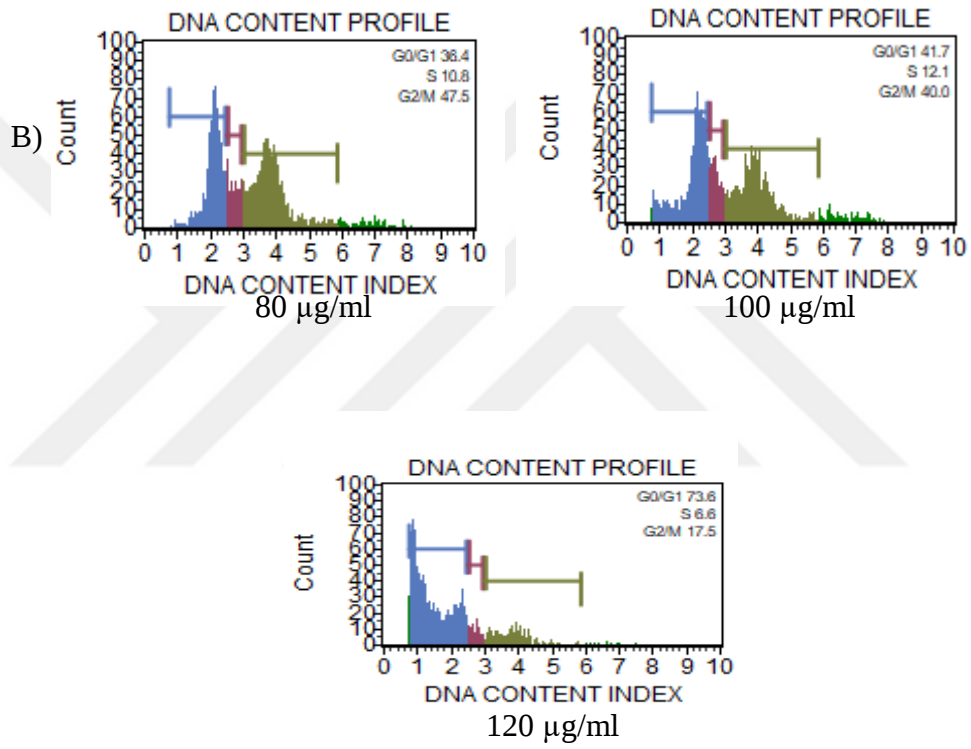


Şekil 47. IVM' nin MeWo hücre hattına 24 saat uygulanması sonucu hücre döngüsü evrelerindeki (G0/G1, S ve G2/M) hücre sayısına ait değişimler. (A) Kontrol, (B) 80 µg/ml, 100 µg/ml, 120 µg/ml (ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

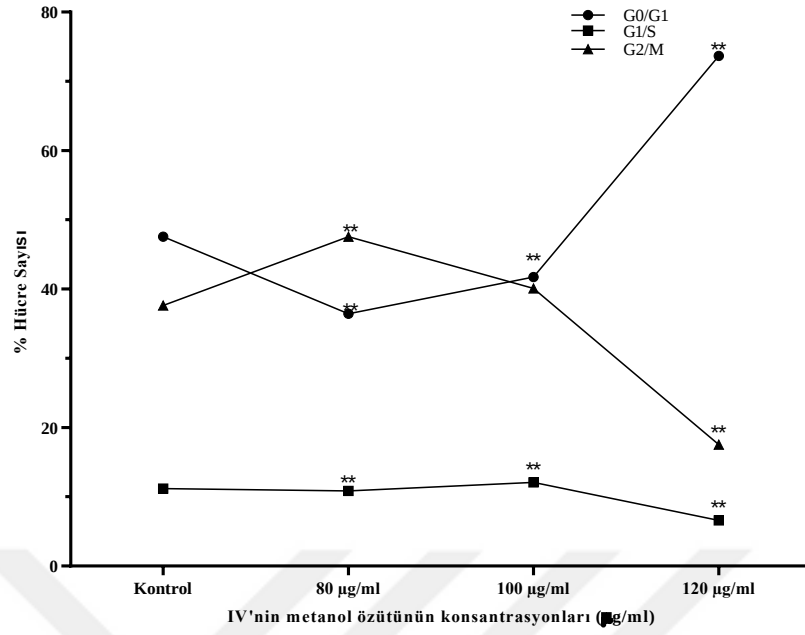
A2058 hücre hattının doz uygulanmamış kontrol grubunun hücre miktarlarının G0/G1'de %47,5; G1/S'de %11,2; G2/M'de %37,6 olduğu tespit edilmiştir. 24 saat süresince 80 µg/ml doz uygulandığında hücre miktarlarının G0/G1'de 36,4; G1/S'de %10,8; G2/M'de %47,5; 100 µg/ml doz uygulandığında hücre miktarlarının G0/G1'de 41,7; G1/S'de %12,1; G2/M'de %40; 120 µg/ml doz uygulandığında ise hücre miktarlarının G0/G1'de 73,6; G1/S'de %6,6; G2/M'de %17,5 olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak A2058 hücre hattına 24 saat 80 ve 100 µg/ml IVM uygulanması; hücrelerin G2/M kontrol noktasında; 120 µg/ml uygulunması ise G0/G1 kontrol noktasında tutulmasına neden olmaktadır (Şekil 48,49).



KONTROL

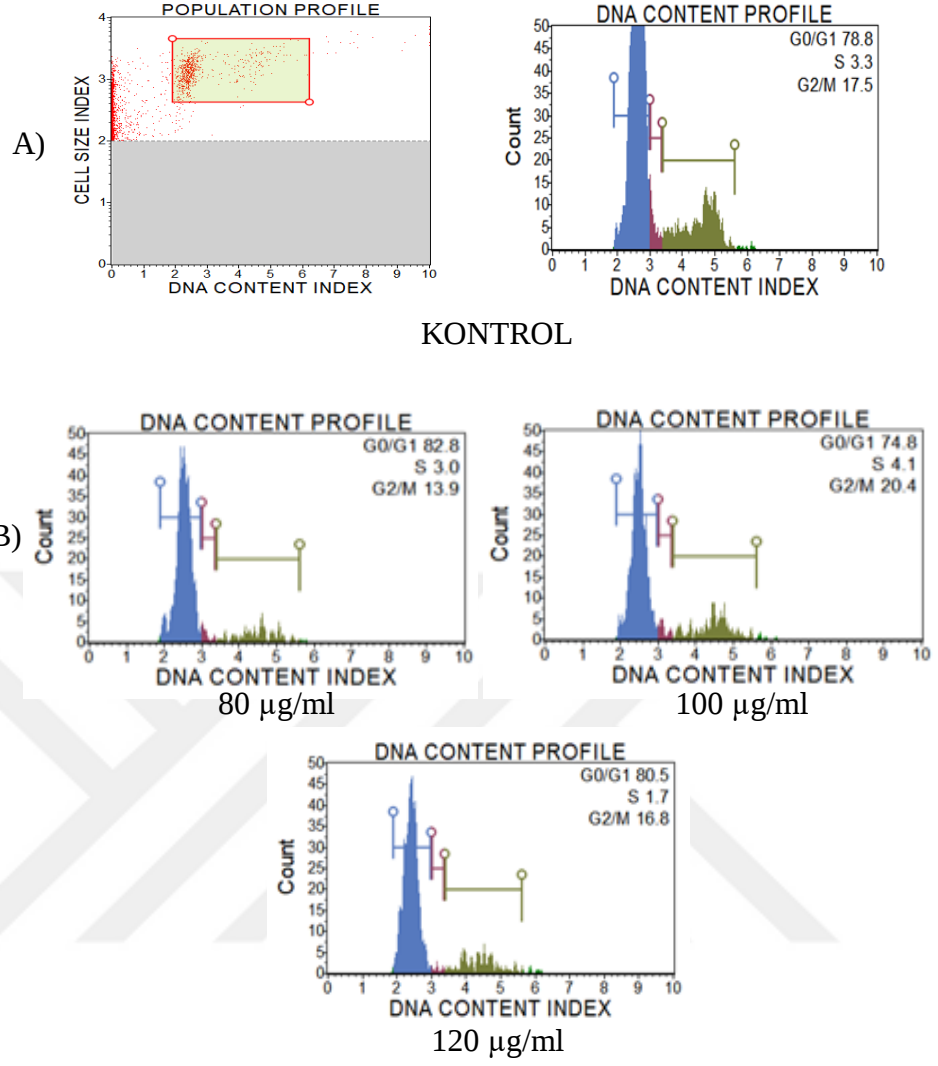


Şekil 48. IVM' nin 24 saat uygulanması sonucu A2058 hücre hattında hücre döngüsü evrelerine ait histogramlar. (A) Kontrol, (B) 80 µg/ml, 100 µg/ml, 120 µg/ml

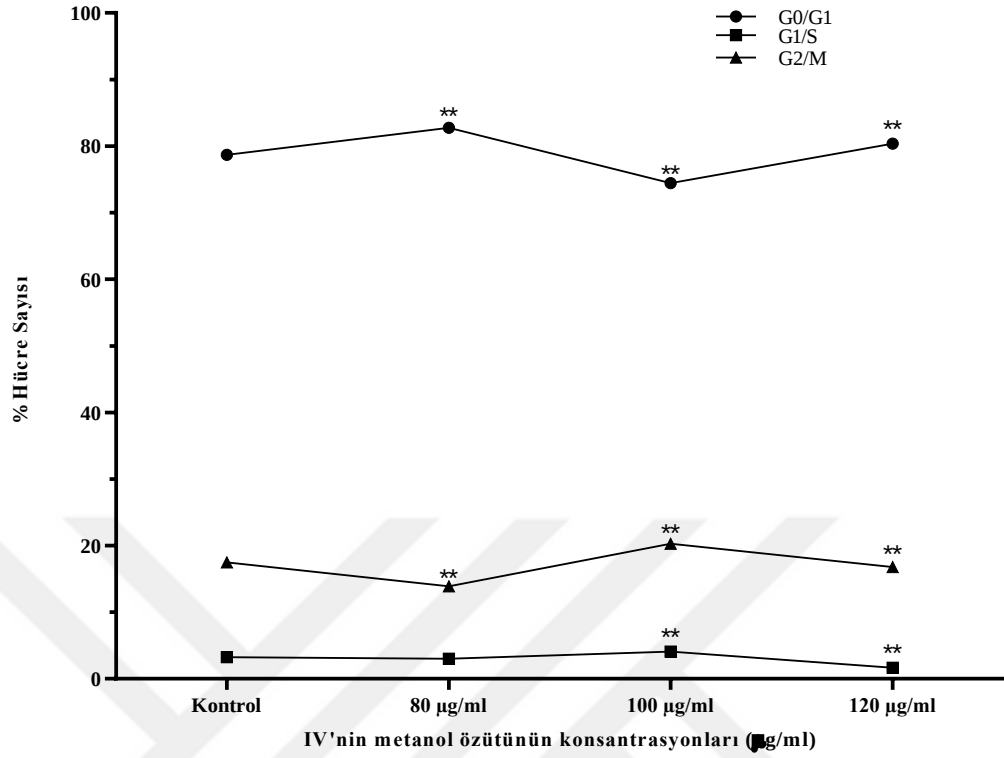


Şekil 49. IVM'nin A2058 hücre hattına 24 saat uygulanması sonucu hücre döngüsü evrelerindeki (G0/G1, S ve G2/M) hücre sayısına ait değişimler. (A) Kontrol, (B) 80 µg/ml, 100 µg/ml, 120 µg/ml (ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Normal fibroblast hücre hattının doz uygulanmamış kontrol grubunda ise G0/G1'de %78,8; G1/S'de %3,6; G2/M'de %17,5 olduğu tespit edilmiştir. 24 saat süresince 80 µg/ml doz uygulandığında hücre miktarlarının G0/G1'de 82,8; G1/S'de %3; G2/M'de %13,9; 100 µg/ml doz uygulandığında hücre miktarlarının G0/G1'de 74,8; G1/S'de %4,1; G2/M'de %20,4; 120 µg/ml doz uygulandığında ise hücre miktarlarının G0/G1'de 80,5; G1/S'de %1,7; G2/M'de %16,8 olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak normal fibroblast hücre hattına 24 saat 80 ve 100 µg/ml IVM uygulanması hücrelerin G2/M kontrol noktasında; 120 µg/ml uygulanması ise G2/M kontrol noktasında tutmaktadır (Şekil 50, 51).



Şekil 50. IVM' nin 24 saat uygulanması sonucu normal fibroblast hücre hattında hücre döngüsü evrelerine ait histogramlar. (A) Kontrol, (B) 80 µg/ml, 100 µg/ml, 120 µg/ml

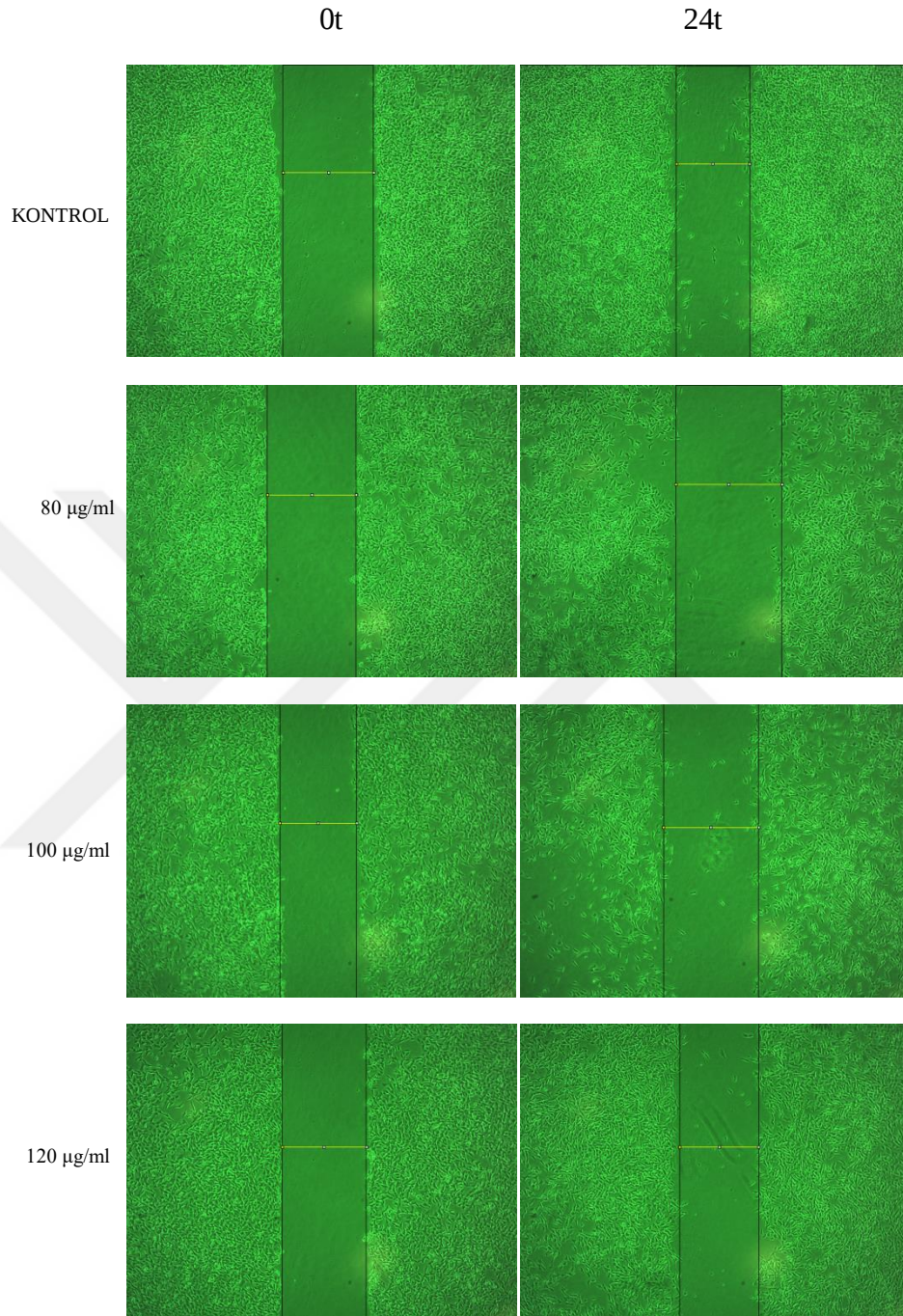


Şekil 51. IVM'nin normal fibroblast hücre hattına 24 saat uygulanması sonucu hücre döngüsü evrelerindeki (G0/G1, S ve G2/M) hücre sayısına ait değişimler. (A) Kontrol, (B) 80 µg/ml, 100 µg/ml, 120 µg/ml (ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir.* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

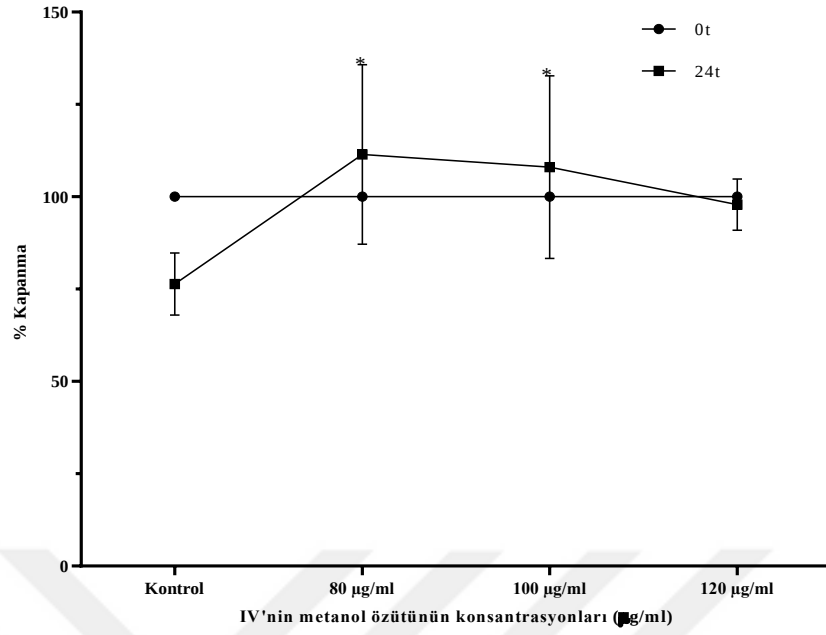
4.8 *Inula viscosa*'nın Metanol Özütünün Tümörün Agresifliği Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

A2058, MeWo ve normal fibroblast hücrelerinin 6 kuyulu plaklarına 200µl hacimli pipet ucu ile yara alanın oluşturulmasının ardından; IVM'nin belirlenen etkin dozları ile 24 saat boyunca muamele edilmesi sonucu A2058 ve MeWo hücre hatlarındaki yara alanlarında doza bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlemlenmiştir.

A2058 hücre hattında birbirinden bağımsız kurulan 3 farklı deney grubunda oluşturulan yara alanının IVM (80 µg/ml, 100 µg/ml ve 120 µg/ml) ile 24 saat süresince muamelesi sonrası kontrol grubunun yara alanı ortalama %23,61 kapanırken; 80 µg/ml doz uygulanan hücre grubunun yara alanı ortalama %11,41; 100 µg/ml doz uygulanan hücre grubunun yara alanı ortalama %7,98 açılmıştır. 120 µg/ml doz uygulanan hücre grubunun yara alanı ise %2,48 kapanmıştır (Şekil 52, 53).

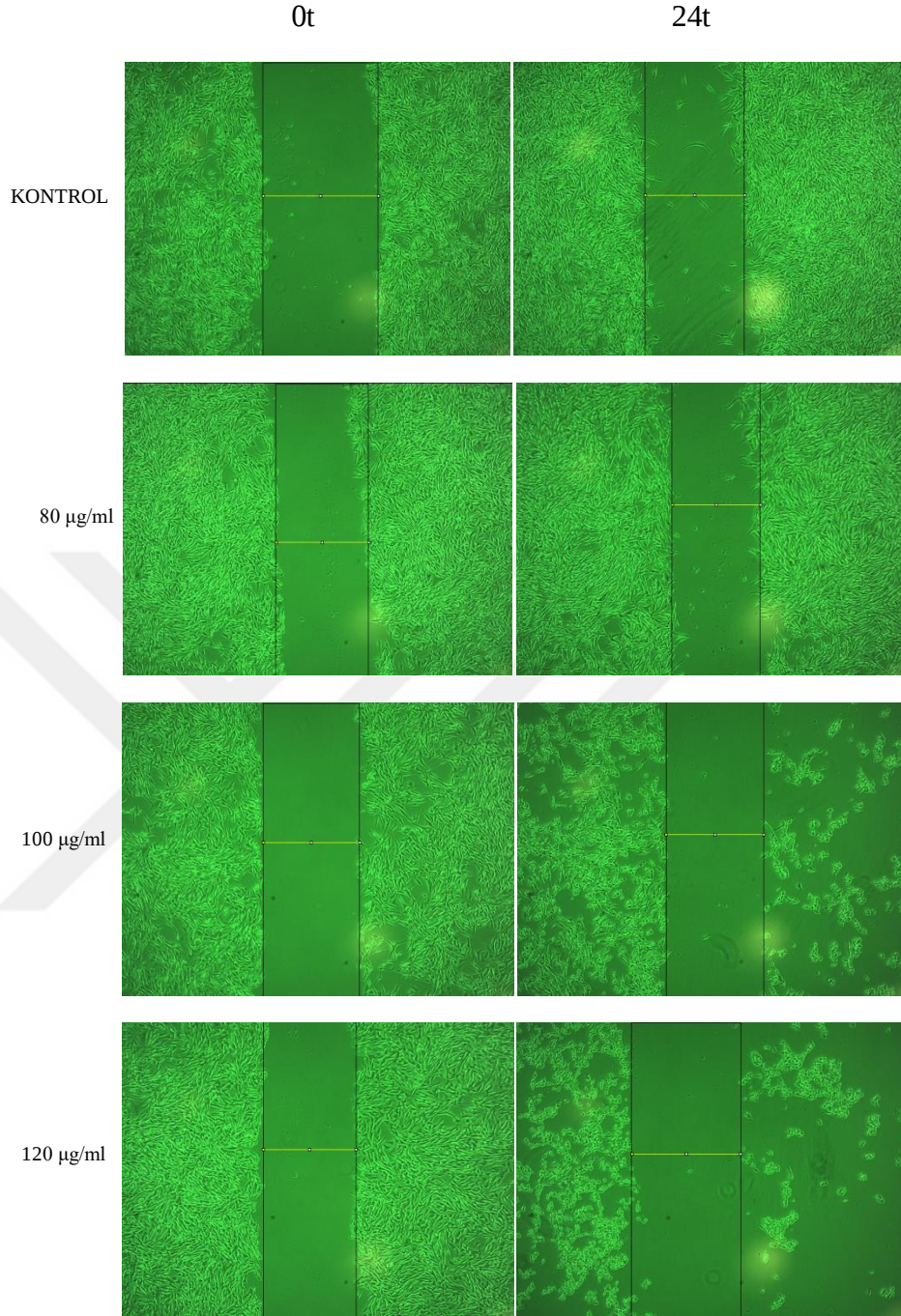


Şekil 52. IVM 'nin A2058 hücre hattına uygulanması sonucu 24 saat sonra yara alanlarındaki değişim

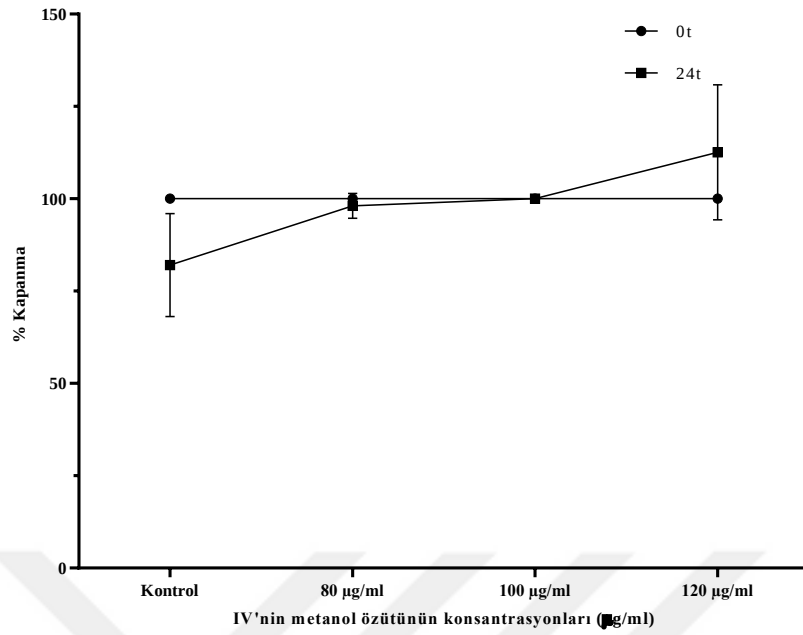


Şekil 53. IVM'nin 24 saat süresince 80, 100, 120 µg/ml uygulanması sonucu A2058 hücre hattının yara alanındaki ortalama yüzde değişimleri (ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir. * $p < 0.05$).

MeWo hücre hattında birbirinden bağımsız kurulan 3 farklı deney grubunda oluşturulan yara alanının IVM (80 µg/ml, 100 µg/ml ve 120 µg/ml) ile 24 saat süresince muamelesi sonrası kontrol grubunun yara alanı ortalama %17,96; 80 µg/ml doz uygulanan hücre grubunun yara alanı ortalama %1,96 kapanmış olup; 100 µg/ml doz uygulanan hücre grubunun yara alanında değişim saptanmamıştır. 120 µg/ml doz uygulanan hücre grubunun yara alanı ise 12,58 açılmıştır. Hücre popülasyonunu gözle görülür oranda azalmaktadır (Şekil 54, 55).

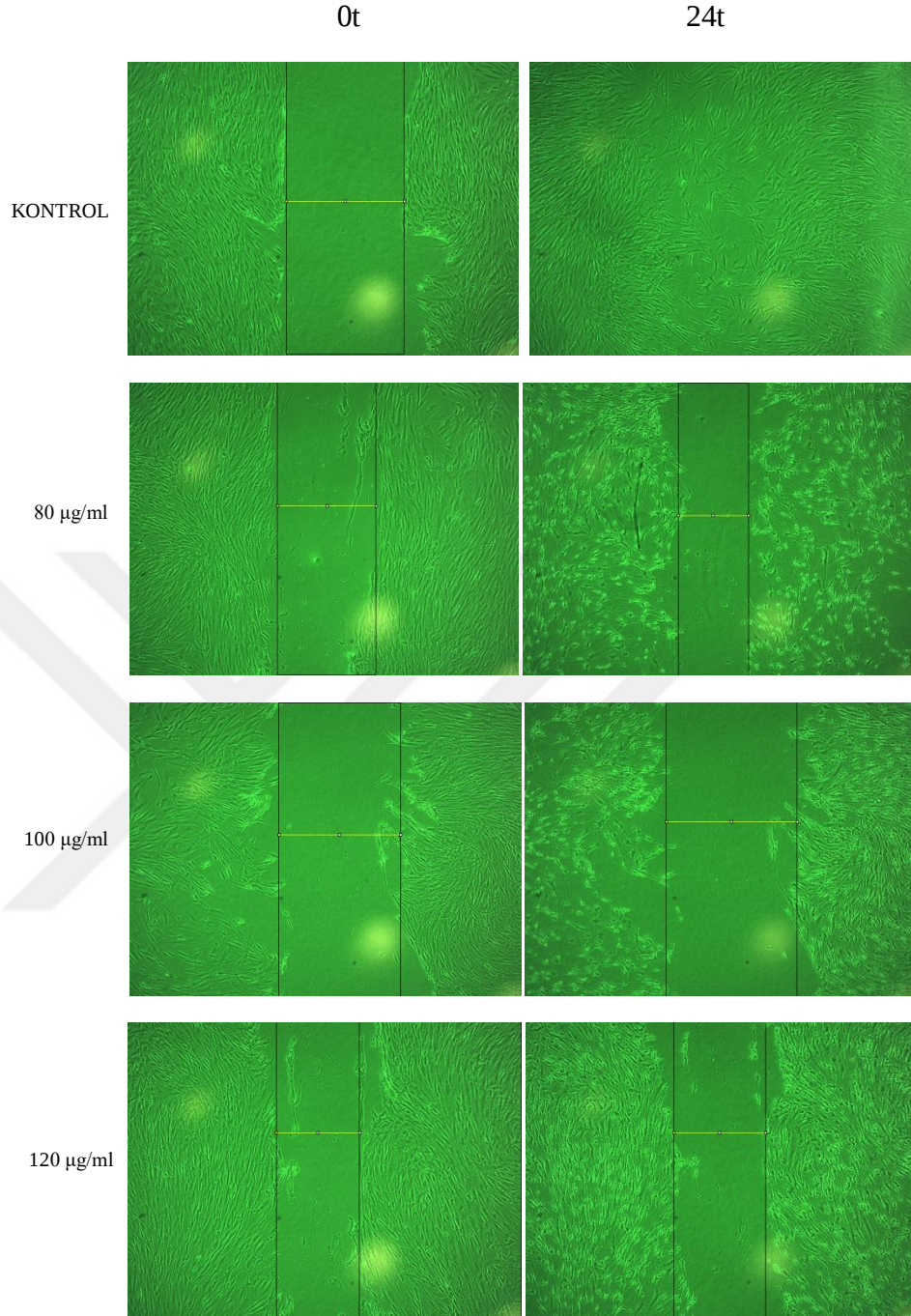


Şekil 54. IVM' nin MeWo hücre hattına 24 saat süresince uygulanması sonucu yara alanlarındaki değişim

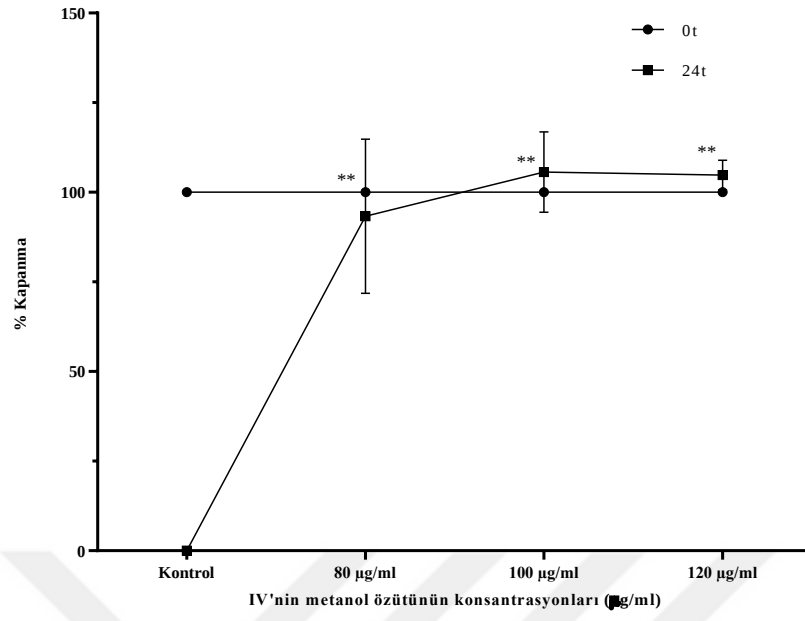


Şekil 55. IVM'nin 24 saat süresince 80, 100, 120 µg/ml uygulanması sonucu MeWo hücre hattının yara alanındaki ortalama yüzde değişimleri (ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Normal fibroblast hücre hattında birbirinden bağımsız kurulan 3 farklı deney grubunda oluşturulan yara alanının IVM (80 µg/ml, 100 µg/ml ve 120 µg/ml) ile 24 saat süresince muamelesi sonrası doz uygulanmayan kontrol grubunun yara alanı neredeyse tamamen kapanmıştır. Deneyin kurulması esnasında hücrelerin morfolojik özelliğinden dolayı yara alanının sınırları net bir şekilde belirlenememiştir. Ancak nitel olarak değerlendirildiğinde hücrelerin morfolojilerindeki ve proliferasyonundaki değişim oldukça açıktır. Yara alanlarında doza bağlı olarak artış gözlenmektedir (Şekil 56, 57).



Şekil 56. IVM' nin normal fibroblast hücre hattına 24 saat süresince uygulanması sonucu yara alanlarındaki değişim



Şekil 57. IVM'nin 24 saat süresince 80, 100, 120 µg/ml uygulanması sonucu normal fibroblast hücre hattının yara alanındaki ortalama yüzde değışimleri (** $p < 0.01$).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

MM malignitenin hızla artış gösterdiği çevresel faktörlerin ve genetik faktörlerin bir arada etki ettiği ölüm oranı en yüksek deri kanseri türüdür. Erken evrelerde tedavi oranı yüksek olmasına rağmen ileri evrelerde bu oran oldukça azalmaktadır. Klinisyenler tarafından erken evre MM hastaları için cerrahi müdahale yeterli görülmekte ancak ileri evre hastalar için cerrahi müdahaleyi takiben kemoterapik/radyoterapik tedavi ve gerekirse kombin hedefli ilaç tedavileri de uygulanmaktadır. Metastatik melanomda kemoterapik ilaçlara ve hedefli terapilere karşı kısa sürede direnç geliştiğinden dolayı kemoterapik ajanlara ilave olarak kullanılabilecek bitkisel ilaçlar ve etkin yolakları düzenleyebilecek kombin tedaviler *in vivo* ve *in vitro* çalışmaların güncel verilerini oluşturmaktadır.

Dünya sağlık örgütüne (WHO) göre insan popülasyonunun %65'i geleneksel tıbbın hastalıkların tedavisinde öncelikli olduğuna inanmaktadır. Doğal ürünlerin çeşitliliğine paralel olarak ürünlerin yapısal çeşitliliğinin de fazla olması yeni bileşiklerin keşfine olanak sunmaktadır. Karasal bitkiler gibi doğal ürünlerin yapısında bulunan aktif bileşikler ilaç olarak kullanılmak üzere keşfedilmeye hazır beklemektedirler. Bitkisel özütlerin ve özütlerin barındırdığı fenolik bileşikler gibi sekonder metabolitlerin sitotoksik etkisinin araştırıldığı çalışmaların fazlalığı geleneksel tıbbi destekler nitelikte kanser tedavisi üzerine çalışmalar arasında literatürün oldukça büyük bir kısmını oluşturmaktadır.

IV, keşfedilmiş yaklaşık 100'den fazla türü olan *Inula* cinsinin sitotoksik etkisi kanıtlanmış bit bitkidir. IV'nin çeşitli özütlerinin sitotoksik ve antiproliferatif özellikleri farklı kanser türlerinde araştırılmış olup MM hücre hatlarında IVM'nin sitotoksik ve antiproliferatif etkileri literatürde bulunmamaktadır (Bar-Shalom ve ark., 2019; Benbacer ve ark., 2012; Messaoudi ve ark., 2016; Rozenblat ve ark., 2008; Talib ve ark., 2012). Mevcut tez kapsamında IV bitkisinin metanol ve su özütünün MM ve normal fibroblast hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi değerlendirilmiş olup metanol özütünün apoptotik hücre ölüm tipini indüklediği tespit edilmiştir. Sitotoksik analiz yöntemleri antineoplastik özelliklere sahip bitki

özütlerini ayırt edebilmek için önemli verilerin elde edilmesinde büyük katkı sağlamaktadırlar.

Mevcut tez kapsamında öncelikle IV bitkisinin taksonomik analizi yapılmış olup herbaryum numarası belirlenmiştir (BULU42445). Ardından toplanan bitkiler uygun koşullarda kurutulmuştur. Bitkinin yaprak kısımlarının su ve metanol kullanılarak ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sonrası elde edilen özütün HPLC-DAD cihazı kullanılarak kromatografik analizi yapılmıştır. Kromatografik analiz sonucu elde edilen bulgulara göre, çözücü olarak su kullanılmasının fenolik içeriklerin çözünmesinde etkisinin az olduğu saptanmış olup metanolün kullanılması ile 6 farklı fenolik bileşiğin yüksek oranda çözündüğü saptanmıştır. Bu bileşiklerin total antioksidan aktivitesinin su özütüne göre, yaklaşık 6 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Hücre hatlarında gerçekleştirilen ilk analiz WST-1 proliferasyon deneyinden elde edilen bulgulara göre su özütünün 24 saatte MeWo ve A2058 hücre hatlarında hücre canlılığını %50'nin altına düşürmediği, fibroblast hücre hattında ise proliferatif etki gösterdiği saptanmıştır. Su özütünün 48 ve 72 saatlik muamelesi sonucu ise MeWo ve A2058 hücre hatlarında canlılık yaklaşık %80 olarak seyrederken, fibroblast hücrelerinde proliferatif etki gözlenmeye devam etmiştir. Metanol özütünün ise antioksidan aktivite analizini destekler şekilde 24 saat sonra alınan WST-1 analizi verilerine göre MeWo hücre hattında 80 µg/ml ve üstü dozlarda canlılığın %50'nin altına düştüğü, A2058 hücre hattında ise 140 µg/ml doz uygulandığında canlılığın yaklaşık olarak %50 olduğu tespit edilmiştir. Normal fibroblast hücre hattında ise canlılık maksimum dozda yaklaşık %59 olarak belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, IVM'nin sitotoksik etkisinin MM hücre hatlarından MeWo'da A2058'e kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kanser hücre hatlarındaki hücre canlılığı inhibisyon oranının ise normal fibroblast hücre hattına kıyasla daha yüksek olduğu bulunmuştur. MeWo hücre hattının 24 saat için IC₅₀ değeri 110,48; A2058 hücre hattının 122,28; normal fibroblast hücre hattının ise 149,22 olarak saptanmıştır.

Bu etkinin çözücünün türüne, araştırma yapılan hücre hattına ve farklı çözücülerde çözünebilen bileşenlere göre değiştiği gözlemlenmiştir.

IVM'nin içerisinde çözündüğü kromatografik analiz sonucu tespit edilen fenolik bileşenlerin antiproliferatif özellikleri olduğu kanıtlanmıştır. Bunun yanı sıra IVM içerisinde çözünen bileşiklerin kanser hücre hatlarında apoptozu düzenleyici özellikleri bulunmaktadır (Chen ve ark., 2017; Chinembiri ve ark., 2014; de Souza Rosa ve ark., 2018; Seelinger ve ark., 2008). Mevcut tez çalışmasında kromatografik analiz ile değerlendirilemeyen fakat metanol ekstraksiyonu ile özüt içerisinde çözülmüş olabileceği düşünülen sesquiterpen laktonlarından inulaviscolid ve tomentosinin de farklı hücre hatlarındaki sitotoksik ve apoptoz düzenleyici etkisi daha önceki çalışmalarda tespit edilmiştir (Benbacer ve ark., 2012; Lee ve ark., 2019; Rosenblat ve ark., 2008; Talib ve ark., 2012). Kromatografik veriler ve WST-1 proliferasyon analizi sonucunda elde ettiğimiz bulgular, metanol özütünün içerisinde çözünen bileşikler açısından daha zengin bir kaynak olabileceğini ve buna paralel MM hücrelerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkilerinin daha fazla olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle tez çalışması kapsamındaki diğer analizlere metanol özütü ile devam edilmiştir. Metanol özütünün fibroblast hücrelerine MM hücre hatlarından daha az zarar verdiği en etkin dozlar ise 80µg/ml, 100 µg/ml ve 120 µg/ml olarak seçilmiştir.

Sitotoksik analizi takiben AO/EB boyaması ile hücrelerin morfolojik analizi yapılmıştır. AO/EB analizi sonuçlarına göre hücre hatlarında IVM'nin hücre proliferasyonunu azalttığı doğrulanmış olup hücrelerin sitoplazmik uzantılarının kısaldığı, hücre-hücre etkileşimlerinin azaldığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda hücrelerin membranlarındaki tomurcuklanmalar ve nükleus fragmentasyonun gözlemlenmesi ile IVM'nin apoptotik hücre ölümünü indüklediği mikroskopik olarak tespit edilmiştir. Literatürde bulunan IV çalışmalarında da IV'nin farklı tür çözücülerle yapılan özütlerinin farklı kanser hücre hatlarında apoptotik ölüm tipini indüklediği gösterilmektedir. Rosenblat ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada, üç farklı melanom hücre hattında IV'nin su özütünden saflaştırılan inulaviscolid ve tomentosinin (sesquiterpen laktonlar) sitotoksik etkisini ve sesquiterpen laktonların hücrelerde apoptotik hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir. Inulaviscolid ve tomentosin ayrı olarak farklı oranlarda apoptotik etki göstermiş olup, her iki ajanın kanser hücrelerini hücre siklusunun G2/M kontrol noktasında tuttuğu belirlenmiştir.

Aynı şekilde IVM'nin içerisinde yüksek miktarlarda olduğu saptanan fenolik bileşiklerin de apoptoz indükleyici özellikleri literatürde tartışılmıştır.

AO/EB boyamalarında gözle görülür bir şekilde hücrelerin apoptotik ölüm yolağına sürüklendiği belirlenmiş ve bu analizleri takiben IVM'nin MM ve fibroblast hücre hatlarındaki, apoptotik etkisinin akış sitometrik analizi yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre MeWo hücre hattının sırasıyla 80 µg/ml doz uygulandığında total apoptotik oranının %13,05; 100 µg/ml doz uygulandığında %34,29 ve 120 µg/ml doz uygulandığında ise %41,47 olduğu tespit edilmiştir. Diğer MM hücre hattı A2058'de ise 80 µg/ml doz uygulandığında total apoptotik oranın %17,91; 100 µg/ml doz uygulandığında %32,54 ve 120 µg/ml doz uygulandığında ise %22,74 olduğu tespit edilmiştir. WST-1 proliferasyon analizi ve morfolojik analiz sonuçları ile uyumlu olarak uygulanan son dozun MeWo hücre hattı için daha toksik olduğu Annexin-V analizi ile de desteklenmiştir. Ek olarak son doz ile muamele edilen A2058 MM hücre hattında total apoptotik oran bir önceki doza göre daha az bulunmuş olmasına rağmen son doz grubu ve kontrol grubu kıyaslandığında apoptotik hücre oranındaki artışın anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.01$). Son dozdaki apoptotik oranın azalışı A2058 hücreleri için fazlasıyla toksik olduğundan nekrotik ölümdaki oranın artışıyla ilişkilendirilmiştir.

Normal fibroblast hücre hattının total apoptotik ölüm oranları 80 µg/ml doz uygulandığında %7,01; 100 µg/ml doz uygulandığında %12,05 ve 120 µg/ml doz uygulandığında ise %9,26 olarak belirlenmiştir. Fibroblast hücrelerine uygulanan son dozun nekrotik ölümü indüklenme oranı arttığı için apoptotik ölüm oranının yüzdesi azalmıştır. Elde edilen bulgulara göre MeWo hücre hattının IVM'nin sitotoksik etkisine duyarlılığı diğer hücre hatlarına göre daha yüksektir. MM hücre hatlarının kanser progresyonuna katkı sağlayan genlerdeki mutasyon profillerinin farklı olmasının mevcut bulgu ile ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir. A2058 hattı, MeWo hücre hattı ile kıyaslandığında daha az sayıda mutasyona sahip olmasına rağmen melanomla ilişkisi çok yüksek olan *BRAF*^{V600E} mutasyonuna sahiptir. Bu nedenle farklı genlerdeki farklı mutasyonlar ve hatta aktif kinazların farklılığının; hücre hatlarının özüte karşı yanıtını değiştirmesi olasıdır.

Özütün içerisinde bulunan bileşenlerin apoptozu indüklediği konusunda çalışmalar mevcut olmasına rağmen bileşenlerin bir arada bulunmasının birbirleri ile

sinerjik etki oluşturma olasılığı hesaba katılmalıdır. Bileşikler özütün içerisinde bir aradayken detekte edilen hücre miktarlarının farklı olması, deney esnasında erken ya da geç apoptozda olan hücrelerin miktarlarının değişebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

IVM'nin MM kanser hücre hatlarında hücre döngüsünü hangi kontrol noktasında durdurarak apoptozu indüklediğini belirlemek için akış sitometrik hücre döngüsü analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre MeWo hücre hattında doza bağlı olarak G2/M kontrol noktasında tutulan hücre miktarında artış gözlemlenmiştir. Kontrol grubunda ise oranlar sırasıyla G0/G1'de %59,3; G1/S'de %12,4; G2/M'de %27,2; 80 µg/ml doz uygulandığında G0/G1'de %49; G1/S'de %13,8; G2/M'de %36,2; 100 µg/ml doz uygulandığında G0/G1'de %46,2; G1/S'de %13,9; G2/M'de %38,6; 120 µg/ml doz uygulandığında G0/G1'de %43; G1/S'de %13; G2/M'de %41,2 olarak belirlenmiştir. 24 saatlik muamelenin sonunda tespit edilen bulgulara göre; doz artışına bağlı olarak G2/M kontrol noktasındaki hücre miktarının artışının MeWo hücre hattının G0/G1 kontrol noktasının anahtar proteini olan TP53 olarak bilinen transkripsiyon faktörünü kodlayan P53 geninde 9 adet missense mutasyonunun bulunması ile ilişkilendirilebileceği öngörülmektedir. P53'ün inaktif olması hücrelerin G0/G1 kontrol noktasından kaabildiğini ifade etmektedir (Russo ve ark., 2002).

A2058 hücre hattında ise doz uygulanmayan kontrol grubundaki hücre miktarlarının G0/G1'de %47,5; G1/S'de %11,2; G2/M'de %37,6; 80 µg/ml doz uygulandığında G0/G1'de %36,4; G1/S'de %10,8; G2/M'de %47,5; 100 µg/ml doz uygulandığında G0/G1'de %41,7; G1/S'de %12,1; G2/M'de %40; 120 µg/ml doz uygulandığında ise G0/G1'de %73,6; G1/S'de %6,6; G2/M'de %17,5 olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre uygulanan ilk dozlarda G2/M kontrol noktasındaki hücre miktarlarının arttığı fakat son dozda G0/G1 kontrol noktasındaki hücre miktarının kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak fazla olduğu dikkat çekmektedir ($p<0.05$). Literatürde MM hücre hatlarına IV'nin su özütünden saflaştırılan inulaviscolid ve tomentosinin apoptozu indükleyerek hücreleri G2/M kontrol noktasında duraklattığına yönelik çalışmalar mevcuttur (Rosenblat ve ark., 2008). MeWo ve A2058'in mutasyon profillerinin karşılaştırılması sonucu A2058 P53 geninde 4 adet missense mutasyon barındırdığı belirlenmiştir. Son dozda G0/G1

noktasındaki hücre miktarının artışı *P53*'ün inaktif olmasına rağmen hedeflediği genin *P53*'ten bağımsız olarak IV'nin metanol özütü ile aktive edilmiş olabileceği fikrini akla getirmektedir (Park ve ark., 2017).

Park ve arkadaşları *P53* geninin her iki allelini içeren ve içermeyen kolorektal kanser hücre hatlarına fucoidan uygulaması sonucu her iki hücre hattında da doz miktarındaki artışa bağlı olarak G0/G1 kontrol noktasındaki hücre miktarının arttığını gözlemlemişlerdir. Söz konusu çalışmada muamele edilen bileşiğin *P21*'in ekspresyon seviyesini doza bağlı olarak arttırdığını tespit etmişlerdir. Bu nedenle mevcut tez kapsamında kullanılan hücre hatlarının hücre döngüsünde görevli diğer genlerinin ekspresyonları ve mutasyonları dikkate alınmalıdır. Mevcut farklılığın kullanılan MM hücre hatlarının *P53*'ü de içeren hücre döngüsü genlerindeki mutasyon profillerinin farklı olmasından kaynaklanabileceği öngörülmektedir.

Normal fibroblast hücre hattında gerçekleştirilen hücre döngüsü analizinin bulgularına göre; kontrol grubundaki hücre miktarlarının G0/G1'de %78,8; G1/S'de %3,3; G2/M'de %17,5; 80 µg/ml doz uygulandığında G0/G1'de %82,8; G1/S'de %3; G2/M'de %13,9; 100 µg/ml doz uygulandığında G0/G1'de %74,8; G1/S'de %4,1; G2/M'de %20,4; 120 µg/ml doz uygulandığında ise G0/G1'de %80,5; G1/S'de %1,7; G2/M'de %16,8 olduğu gözlemlenmiştir. IVM normal fibroblast hücrelerinde apoptozu indükleyerek DNA hasarı tespit edilen hücrelerin G0/G1 kontrol noktasında yakalanmasına neden olmaktadır. Rosenblast ve arkadaşları doz uygulanmayan kontrol grubu ile kıyaslandığında 24, 48 ve 72 saat boyunca IV'nin su özütünün normal fibroblast hücrelerine uygulanmasının gruplar arası anlamlı farklılıklar oluşturmadığını rapor etmişlerdir (Rosenblat ve ark., 2008). Mevcut tez kapsamında kullanılan sağlıklı fibroblast hücrelerinin genom profilinde olağandışı bir değişiklik bulunmadığından hücrelerdeki DNA hasarının ilk kontrol noktasında saptandığı ve hücre döngüsünün aynı kontrol noktasında duraklatıldığı düşünülmektedir.

Mevcut tez kapsamında yapılan son analizde ise IVM'nin hücrelerin migrasyon yeteneklerini değiştirebilecek etkiye sahip olup olmadığını saptamak amacıyla 6 kuyucuklu plaklara her bir hücre hattından yaklaşık 1×10^6 hücre ekilmiştir. Her bir hücre hattı yeterli doluluğa ulaşmaya kadar inkübe edildikten sonra plaklarda pipet

ucu ile oluşturulan yara alanındaki değişimler invert mikroskop altında gözlemlenmiştir.

Elde edilen bulgulara göre; A2058 hücre hattının kontrol grubunun yara alanı ortalama %23,61 kapanırken; 80 µg/ml ve 100 µg/ml doz uygulanan hücre gruplarındaki yara alanı sırasıyla ortalama %11,41 ve %7,98 açılmıştır. 120 µg/ml doz uygulanan hücre grubunun yara alanı ise %2,48 kapanmıştır.

MeWo hücre hattında ise kontrol grubunda oluşturulan yara alanı ortalama %17,96; 80 µg/ml doz uygulanan hücre grubunun yara alanı ortalama %1,96 kapanmış olup; 100 µg/ml doz uygulanan hücre grubunun yara alanında değişim saptanmamıştır. Son olarak 120 µg/ml doz uygulanan hücre grubunun yara alanı ise 12,58 açılmıştır. MeWo'nun IVM'nin sitotoksik etkisine yanıtı diğer hücrelere kıyasla daha fazladır ve hücrenin genomik profili hücrelerin göç yeteneği ile ilişkili genlerdeki mutasyonlar açısından değerlendirilmelidir.

Sağlıklı fibroblast hücrelerinin doz uygulanmayan kontrol grubu yara alanını ölçülemeyecek seviyeye kadar kapatmış olduğundan duyarlı bir ölçüm gerçekleştirilememiş olup 80, 100 ve 120 µg/ml doz uygulanan hücre gruplarının yara alanlarındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$).

Metastaz kanser progresyonun ölümle sonuçlanmasının en önemli nedenleri arasındadır (Kramer ve ark., 2013). Hücrelerin göç yeteneğinin test edildiği yara iyileşme analizinin bulgularına göre; IVM'nin uygulanmasının kullanılan kanser hücrelerinin invaziv ve metastatik yeteneklerini azalttığı gözlemlenmiştir. Kanser hücrelerinin invaziv yeteneklerini ve metastatik özelliklerini arttıran birçok genetik ve epigenetik faktör mevcuttur. Mevcut tez çalışmasında kullanılan MM hücre hatlarının genomik profili birbirinden farklıdır. Özütün içerisinde çözünmüş olan bileşenlerin birkaçının farklı kanser hücrelerinin invaziv özelliğini baskıladığı çalışmalar literatürde mevcuttur. Ruan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2012) MM hücre hatlarına 1 gün boyunca belirli doz aralıklarında luteolin uygulanması sonucu integrinlerin seviyesi azaltılarak önemli bir epitelyal-mezenşimal dönüşüm (EMT) belirteci olan E-cadherinin seviyesi arttırmıştır. EMT patolojik ve fizyolojik koşullar altında hücrelerin morfolojik özelliklerinin ve gen ekspresyonlarının değişimine neden olan bir dönüşümdür. Melanomda EMT sadece kanser hücresinin morfolojisini değiştirmekle kalmaz aynı zamanda progresyonda da önemlidir

(Kushiro ve ark., 2012). Melanom hücrelerinde artan invaziv özellik EMT ile ilişkili genlerin (*SNAI1*, *MMP9*, *TWIST* ve *VIMENTIN*) ekspresyon seviyelerindeki artış ve buna ek olarak hücre-hücre adezyon proteini E-cadherin ve metastaz baskılayıcı gen *KISS1*'in down regülasyonu ile karakterizedir (Kushiro ve ark., 2012; Mani ve ark., 2008; Ruan ve ark., 2012; Toh ve ark., 2011). Lee ve ark. (2019) metanol özütünün içerisinde çözünmüş olabileceği varsayılan tomentosinin osteosarkom hücre hattında invazyon yeteneğini azalttığı bulgusunu elde etmişlerdir. Gao ve ark. (2018) yine IVM'nin içerisinde çözünmüş olan ferulik asidin, servikal kanser hücre hatlarında *MMP9* ekspresyon seviyesini azaltmak suretiyle hücrelerin invaziv özelliğini baskıladığını tespit etmişlerdir. Literatürde mevcut olan çalışmalar değerlendirilerek, oluşturulan yara alanlarının metastaz ilişkili genlerin regüle edilmesi ile değişikliğe uğramış olabileceği kanısına varılmıştır. Hücrelerdeki yara alanlarında oluşan farklılıkların daha önce de bahsedilen genomik profilin farklılığı ile ilişkili olabileceği öngörülmektedir.

Mevcut tez çalışmasında yapılan analizleri takiben elde edilen bulgulara göre, IVM'nin MM tedavisinde kullanılabilecek terapötik bir ajan olabileceği ortaya konmuştur. Metanol özütünden saflaştırılabilecek bileşenlerin MM'de moleküler etkilerinin araştırılması ve MM ile ilişkili genlerin ekspresyonuna etkisinin tespit edilmesinin MM tedavisi için umut vaat edeceği öngörülmektedir. Bunun yanında, mevcut sonuçların 3D kültür yöntemi gibi *in vivo* 'ya yakın kültür modelleri ve farklı *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Ali Z, Yousaf N, Larkin F (2013) Melanoma epidemiology, biology and prognosis. *EJC Suppl.* 11(2): 81-91.
- Aoude LG, Pritchard AL, Robles-Espinoza CD et al (2015) Nonsense Mutations in the Shelterin Complex Genes ACD and TERF2IP in Familial Melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 107(2): dju408
- Baek D, Villen J, Shin C (2008) The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455(7209):64-71.
- Bagchi B, Banerjee S, Kool A et al (2016) Synthesis of eucalyptus/tea tree oil absorbed biphasic calcium phosphate-PVDF polymer nanocomposite films: a surface active antimicrobial system for biomedical application. *Phys Chem Chem Phys.* 18(25): 16775-85.
- Balunas MJ, Kinghorn AD (2005) Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.* 78: 431-441.
- Bar-Shalom R, Bergman M, Grossman S et al (2019) Inula viscosa extract inhibits growth of colorectal cancer cells in vitro and in vivo through induction of apoptosis. *Front Oncol.* 10(9):2 27
- Baxter LL, Moreland RT, Nguyen AD et al (2010) A curated online resource for SOX10 and pigment cell molecular genetic pathways. *Database (Oxford)* 2010: 1-7
- Baykal C ve ark (2015) Malign melanoma: risk factors and major clinical findings. *Turk J Dermatol.* 1: 1-7
- Baytop T (1999) Türkiye’de bitkilerle tedavi. Noel Kitabevleri.
- Beksaç, Beksaç (2016) Surgical management of malignant melanoma. *Acta Oncol Tur.* 49(2): 111-122.
- Benbacer L, Merghoub N, El Btaouri H et al (2012) Antiproliferative effect and induction of apoptosis by Inula viscosa L. and retama monosperma L. extracts in human cervical cancer cells. *Topics on Cervical Cancer With an Advocacy for Prevention*, Rajamanickam Rajkumar, IntechOpen, DOI: 10.5772/30025. Available from: “<https://www.intechopen.com/books/topics-on-cervical-cancer-with-an-advocacy-for-prevention/antiproliferative-effect-and-induction-of-apoptosis-by>
- Benítez JM, Montáns FJ (2017) The mechanical behavior of skin: Structures and models for the finite element analysis. *Computers & Structures* 190: 75-107
- Budden T, Bowden NA (2013) The role of altered nucleotide excision repair and uvb-induced dna damage in melanomagenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 1132-1151
- Cabadak (2008) Hücre siklusu ve kanser. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 9(3): 51 – 61
- Chang AE, Karnell LH, Menck HR (1998) The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. *In Cancer* 83: 1664-1678
- Chaudru, Chompret, Bressac-de Paillerets et al (2004) Influence of genes, nevi, and sun sensitivity on melanoma risk in a family sample unselected by family history and in melanomaprone families. *J Natl Cancer Inst.* 96: 785-795.

- Chen V, Zhang A, Sha B et al (2017) Luteolin inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis via down-regulation of mitochondrial membrane potential in esophageal carcinoma cells EC1 and KYSE450. *Oncotarget*. 8(16): 27471–27480.
- Chinembiri TN, du Plessis LH, Gerber M et al (2014) Review of natural compounds for potential skin cancer treatment. *Molecules* 19: 11679-11721.
- Chou TC, Talalay P (1984) Quantitative analyses of dose effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul*. 22: 27-55.
- Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A et al (2013) Skin melanocytes: biology and development. *Postepy Dermatol Alergol*. 30(1):30-41.
- Copyright © 2014 AIM at Melanoma Foundation. All rights reserved. “<https://www.aimatmelanoma.org/melanoma-risk-factors/skin-types-and-risk/>”. (Erişim tarihi: 29.05.2019)
- Crouch SP, Kozlowski R, Slater KJ et al (1993) The use of ATP bioluminescence as a measure cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods* 160: 81-88.
- Danino O, Gottlieb EH, Grossman S (2009) Antioxidant activity of 1,3-dicaffeoylquinic acid from *Inula viscosa*. *Food Res. Int.* 42: 1273-1280.
- Davies H, Bignell GR, Cox C (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417: 949-954
- Davis PH (1975) *Flora of Turkey and the east Aegean Islands*. Edinburgh at the University press. Vol 5
- de Gruijla FR, van Kranenc HJ, Mullendersb LH (2001) UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 63: 19–27.
- de Souza Rosa L, Jordão NA, da Costa Pereira Soares N et al (2018) Pharmacokinetic, antiproliferative and apoptotic effects of phenolic acids in human colon adenocarcinoma cells using in vitro and in silico approaches. *Molecules*. 23(10): 2569.
- Dhomen N, Marais R (2007) New insight into BRAF mutations in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 17(1): 31–9.
- Edinger AL, Thompson CB (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*. 16(6): 663-9.
- Elder DE, Elenitsas R, Bennett J L et al (2005) *Lever's Histopathology of the Skin*, 9th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, pp: 28
- Eröz R, Karataş A, Alkoç OA ve ark (2012) Apoptozis hakkında bilinenler. *Düzce Tıp Dergisi* 14(2): 87-10
- Eskandarpour M, Hashemi J, Kanter L (2003) High gene mutation rate may contribute to hereditary skin cancers. *J Natl Cancer Inst*. 95: 790
- Fan F, Wood KV (2007) Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay Drug Dev Techn*. 5 (1): 127-136.
- Flaherty KT, Robert C, Hersey P (2012) Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N. Engl. J. Med*. 367: 107–114
- Flynn RL, Zou L (2010) Oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold proteins: a growing family of genome guardians. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 45: 266–75.

Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J et al (2009) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ.* 16: 1093-1107.

Gao J, Yu H, Guo W et al (2018) The anticancer effects of ferulic acid is associated with induction of cell cycle arrest and autophagy in cervical cancer cells. *Cancer Cell Int.* 18: 102

Garbe C, Peris K, Hauschild A et al (2016) Diagnosis and treatment of melanoma. *Eur J Cancer.* 63: 201-17

Gatzka MV (2018) Targeted tumor therapy remixed—an update on the use of small-molecule drugs in combination therapies. *Cancer* 10(6): 155

Gerson-Cwilich R, Serrano-Olvera A, Villalobos-Prieto A (2006) Complementary and alternative medicine (CAM) in Mexican patients with cancer. *Clin Transl Oncol.* 8(3):200-7.

GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet] 2013. [cited 2017 Apr 6]. Available from: <http://globocan.iarc.fr>. (Erişim tarihi: 17.06.19)

Goldstein AM, Chan M, Harland M (2006) High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. *Cancer Res.* 66: 9818–28.

Goldstein AM, Chan M, Harland M et al (2007) Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet.* 44: 99–106.

Gozuacik D, Kimchi A (2007) Autophagy And Cell Death. *Curr Top Dev Biol.* 78: 217-45.

Gökbulut A (2011) Türkiye'de Yetişen Bazı İnula L. Türleri Üzerinde Farmakognozok Araştırmalar, (Doktora Tezi), Ankara: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, s. 1.

Gökdemir A, Özden MG, Bek Y ve ark (2011) Melanositik ve non melanositik lezyonlarda dermoskopik ve histopatolojik tanı korelasyonu. *Türkiye Klinikleri J Dermatol.* 21(1): 7-16.

Haass NK, Smalley KS, Li L, et al. 2005. Adhesion, migration and communications in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res.* 18: 150-9.

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü (2017), https://hsqm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/2014RAPOR_uzuunu.pdf, (Erişim tarihi: 17.06.2019)

Hamaguchi T, Sudo T, Osada H (1995) RK-682, a potent inhibitor of tyrosine phosphatase, arrested the mammalian cell cycle progression at G1 phase. *FEBS Letters* 372; 54-58.

Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5): 646e74.

Hansson J (2010) Familial cutaneous melanoma. *Adv Exp Med Biol.* 685: 134-145.

Hatzivassiliou G, Song K, Yen I et al (2010) RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 464: 431–435.

He YY, Huang JL, Sik RH (2004) Expression profiling of human keratinocyte response to ultraviolet A: implications in apoptosis. *J Invest Dermatol.* 122: 533-43

Hearing VJ (2011) Determination of melanin synthetic path ways. *J Invest Dermatol* 131: 8–11.

- Heidorn SH, Milagre C, Whittaker S (2010) Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* 140: 209–221.
- Heinrich M, Gibbons S, Williamson E et al (2004) *Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy*, 1st ed, Churchill Livingstone, Edinburgh, UK
- Hepner A, Salgues A, Anjos CAD (2017) Treatment of advanced melanoma - A changing landscape. *Rev Assoc Med Bras.* 63(9): 814-823.
- Hodis E, Watson IR, Kryukov GV et al. (2012) A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 150, 251–263.
- Hoffmann K, Kaspar K, Altmeyer P et al (2000) UV transmission measurements of small skin specimens with special quartz cuvettes. *Dermatology* 201: 307-311
- Hölzle E, Hönigsmann H (2005) UV-radiation—sources, wavelength, environment. *J Dtsch Dermatol Ges.* 3(2):3-10
- Hulstaert E, Brochez L, Volders PJ et al (2017) Long non-coding RNAs in cutaneous melanoma: clinical perspectives. *Oncotarget* 27;8(26): 43470-43480.
- Ichimura A, Ruike Y, Terasawa K et al (2010) MicroRNA-34a inhibits cell proliferation by repressing mitogen-activated protein kinase kinase 1 during megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Mol Pharmacol.* 77(6): 1016-24.
- Ivry GB, Ogle CA, Shim EK (2006) Role of sun exposure in melanoma. *Dermatol Surg.* 32: 481-492.
- Kane AB (1995) Redefining cell death. *Am J Pathol.* 146: 1-2.
- Karadağ A (2016) Otofaji: Programlı Hücre Ölümü. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi* 15: 2
- Kızılbey K, Mustafaeva Akdeste Z (2013) Melanoma cancer. *Sigma* 31: 555-569
- Kondo T, Hearing VJ (2011) Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. *Expert Rev Dermatol.* 6: 97–108.
- Konishi T, Shimada Y, Nagao T (2002) Antiproliferative sesquiterpene lactones from the roots of *Inula helenium*. *Biol. Pharm. Bull.* 25: 1370-1372.
- Korabiowska M, Tscherny M, Stachura J et al (2002) Differential expression of DNA nonhomologous endjoining proteins KU70 and KU80 in melanoma progression. *Mod Pathol* 15(4): 426–433
- Kramer N, Walzl A, Unger C et al. (2013). In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 752: 10–24.
- Kumar R, Smeds J, Lundh Roz B (1999) Loss of heterozygosity at chromosome 9p21 (INK4-p14ARF locus): homozygous deletions and mutations in the p16 and p14ARF genes in sporadic primary melanomas. *Melanoma Res.* 9: 138-147.
- Kushiro K, Chu RA, Verma A et al (2012) Adipocytes promote B16BL6 melanoma cell invasion and the epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Microenviron* 5: 73–82.
- Larkin H, Ascierto PA, Dréno B et al (2014) Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma”, *N. Engl. J. Med.* 371:1867–1876.
- Lasithiotakis K, Leiter U, Meier F et al (2008) Age and gender are significant independent predictors of survival in primary cutaneous melanoma. *Cancer* 112(8): 1795-1780.

Lee J, Tae N, Lee JJ et al (2010) Eupatolide inhibits lipopolysaccharide-induced COX-2 and iNOS expression in RAW264.7 cells by inducing proteasomal degradation of TRAF6. *Eur. J. Pharmacol.* 636: 173-180

Lee JH, Choi JW, Kim YS (2011) Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br J Dermatol.* 164(4): 776–84.

Lee ML, Lee L, Nam MJ et al (2019) Tomentosin Displays anti-carcinogenic effect in human osteosarcoma MG-63 cells via the induction of intracellular reactive oxygen species. *Int J Mol Sci.* 20(6): 1508

Li JW, Vederas JC (2009) Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science* 325: 161-165.

Li R, Zhang L, Jia L et al (2014) Long non-coding RNA BANCR promotes proliferation in malignant melanoma by regulating MAPK pathway activation. *PLoS One* 26;9(6): e100893.

Lin JY, Fisher DE (2007) Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 22;445(7130): 843-50.

Liu J, Fukunaga-Kalabis M, Li L et al (2014) Developmental pathways activated in melanocytes and melanoma. *Arch Biochem Biophys.* 563: 13–21.

Long J, Luo J, Yin X (2018) miR-338 5p promotes the growth and metastasis of malignant melanoma cells via targeting CD82. *Biomed Pharmacother* 102: 1195-1202.

Longo-Sorbello GSA, Saydam G, Banerjee D (2006) Cytotoxicity and cell growth assays. Editor: Celis JE, *Cell biology: a laboratory handbook*, 3rd edition, Elsevier Academic Press, Burlington, pp:315-324

Lu Y, Ek WE, Whiteman D et al (2014) Most common ‘sporadic’ cancers have a significant germline genetic component. *Hum Mol Genet.* 23: 6112–18.

Luke JJ, Flaherty KT, Ribas A (2017) Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol.* 14(8): 463-482

MacKie RM (2006) Long-term health risk to the skin of ultraviolet radiation. *Prog Biophys Mol Biol.* 92:92-96

Madronich S, McKenzie RL, Björn LO et al (1998) Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth’s surface. *J Photochem Photobiol B.* 46: 5-19

Mahmoudi H, Hosni K, Zaouali W et al (2016) Comprehensive phytochemical analysis, antioxidant and antifungal activities of *inula viscosa* aiton leaves. *Journal of Food Safety* 36: 77-88.

Manga P (2018) *Molecular Biology of Albinism*. Editors: Kromberg, Manga *Albinism in Africa*, pp: 99-112.

Mani SA, Guo W, Liao MJ et al (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133: 704–15.

Marconi A, Quadri M, Saltari A (2018) Progress in melanoma modelling in vitro. *Exp Dermatol.* 27(5): 578-586.

Martins I, Raza SQ, Voisin L et al (2017) Entosis: The emerging face of non-cell-autonomous type IV programmed death. *Biomed J.* 40(3): 133-140.

Mayor R, Theveneau E (2013) The neural crest. *Development* 140: 2247-2251.

MellerAJ, Mihm MC Jr. (2006) Melanoma. *N Engl J Med* 355(1):51-65.

Merghoub N, Benbacer L, El Btaouri H et al (2011) In vitro antiproliferative effect and induction of apoptosis by *Retama monosperma* L. extract in human cervical cancer cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 15: 57.

Merghoub N, Btaouri H, Benbacer L (2016) *Inula viscosa* extracts induces telomere shortening and apoptosis in cancer cells and overcome drug resistance. *Nutrition and cancer* 0, NO. 0: 1–13

Messaoudi M, Chahmi N, El Mzibri M et al (2016) Cytotoxic effect and chemical composition of *inula viscosa* from three different regions of Morocco. *European journal of medicinal plants*. 16(4): 1-9

Mirzaei H, Gholamin S, Shahidsales S et al (2016) MicroRNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma. *Eur J Cancer* 53: 25-32.

Moriceau G, Hugo W, Hong A et al (2015) Tunable-combinatorial mechanisms of acquired resistance limit the efficacy of BRAF/MEK Co-targeting but result in melanoma drug addiction. *Cancer Cell* 27(2): 240–256.

Mort RL, Jackson IJ, Patton EE (2015) The melanocyte lineage in development and disease. *Development* 142: 620-632.

Mueller DW, Rehli M, Bosserhoff AK (2009) miRNA expression profiling in melanocytes and melanoma cell lines reveals miRNAs associated with formation and progression of malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 129(7): 1740e51.

Newman DJ, Cragg GM (2016) Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod*. 25;79(3): 629-61.

Omholt K, Karsberg L, Platz A et al (2002) Screening of Nras Codon 61 Mutations in Paired Primary and Metastatic Cutaneous Melanomas: Mutations Occur Early and Persist throughout Tumor Progression. *Clin Cancer Res*.8(11): 3468–74.

Öniz H (2004) Apoptoz: Ölmeyle Yatmak. *SSK Tepecik Hast Derg*.14(1): 1-20

Park HY, Park SH, Jeong JW et al (2017) Induction of p53-independent apoptosis and G1 cell cycle arrest by fucoidan in HTC116 human colorectal carcinoma cells. *Marine drugs*. 15: 154

Parlak A, Çayırılı M, Parlak N ve ark (2014) Melanoma genel bakış. *Konuralp Tıp Dergisi* 6(1): 22-27

PDQ® Adult Treatment Editorial Board. PDQ Melanoma Treatment. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Updated <05/21/2019>. Available at: <https://www.cancer.gov/types/skin/patient/melanoma-treatment-pdq>. Accessed <06/02/2019>. [PMID: 26389388]

Pejkova S, Dzokic G, Tudzarova-Gjorgova S et al (2016) Molecular biology and genetic mechanisms in the progression of the malignant skin melanoma *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)* 1;37(2-3): 89-97.

Plonka PM, Passeron T, Brenner M et al. (2009) What are melanocytes really doing all day long. . .? *Exp Dermatol*. 18: 799–819.

Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G (2010) RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 464(7287): 427-30.

Prota G (2000) Melanins, melanogenesis and melanocytes: looking at their functional significance from the chemist's viewpoint. *Pigment Cell Res*. 13(4): 283-93.

Psaty EL, Scope A, Halpern AC (2010) Defining the patient at high risk for melanoma. *Int J Dermatol*. 49: 362-76.

Raposo G, Marks MS (2007) Melanosomes—dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8: 786–797.

- Read J, Wadt KA, Hayward NK (2016) Melanoma genetics. *Med Genet.* 53: 1–14.
- Rigel DS (2005) The many faces of melanoma. Editor: Rigel DS, Friedman RJ, Dzubow LM, Reintgen DS, Bystryn JN, Marks R, Cancer of the skin. 1st edition, China Elsevier, Saunders, pp: 167-73.
- Riss T, Moravec R, O'brien M et al (2006) Homogeneous multiwell assays for measuring cell viability, cytotoxicity, and apoptosis. Editor: Minor LK, Handbook Of Assay Development In Drug Discovery, CRC Press, Florida, USA pp: 385-405.
- Robles-Espinoza CD, Harland M, Ramsay AJ (2014) POT1 loss-of-function variants predispose to familial melanoma. *Nat Genet.* 46: 478–81.
- Roh MR, Eliades P, Gupta S et al (2015) Genetics of melanocytic nevi. *Pigment Cell Melanoma Res.* 28(6): 661–672.
- Rozenblat S, Grossman S, Bergman M et al (2008) Induction of G2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines. *Biochemical Pharmacology* 75: 369–382
- Ruan JS, Liu YP, Zhang L et al (2012) Luteolin reduces the invasive potential of malignant melanoma cells by targeting $\beta 3$ integrin and the epithelial-mesenchymal transition. *Acta Pharmacologica Sinica* 33: 1325–1331.
- Russo A, Ficili B, Candido S et al (2014) Emerging targeted therapies for melanoma treatment (review). *Int J Oncol.* 45: 516-524.
- Russo P, Malacarne D, Falugi C et al (2002) RPR-115135, a farnesyltransferase inhibitor, increases 5-FU-cytotoxicity in ten human colon cancer cell lines: role of p53. *Int J Cancer.* 100: 266–75.
- Ryu S, Youn C, Moon AR et al (2017) Therapeutic inhibitors against mutated BRAF and MEK for the treatment of metastatic melanoma. *Chonnam Med J.* 53: 173-177
- Sánchez-Sendra B, Martínez-Ciarpaglini C, González-Muñoz JF et al (2018) Downregulation of intratumoral expression of miR-205, miR-200c and miR-125b in primary human cutaneous melanomas predicts shorter survival. *Sci Reports* 8: 17076.
- Seca AM, Grigore A, Pinto DC et al (2014) The genus *Inula* and their metabolites from ethno pharmacological to medicinal uses. *J Ethnopharmacol.* 11; 154(2): 286-310
- Seelinger G, Merfort I, Wölfl U et al (2008) Anti-carcinogenic effects of the flavonoid luteolin. *Molecules.* 13(10): 2628–2651.
- Selbach M, Schwanhauser B, Thierfelder N et al (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455(7209): 58-63.
- Shi H, Hugo W, Kong X et al (2014) Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discov.* 4: 80-93
- Shi J, Yang XR, Ballew B et al (2014) Rare missense variants in POT1 predispose to familial cutaneous malignant melanoma. *Nat Genet.* 46: 482–6.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2019) Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 69(1): 7-34.
- Simon JD, Peles D, Wakamatsu K et al (2009) Current challenges in understanding melanogenesis: Bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell Melanoma Res.* 22: 563–579.

Skender-Kalneas TM, English DR, Heenan PJ (1995) Benign melanocytic lesions: risk marker or precursors of cutaneous melanoma? *J Am Acad Dermatol.* 33: 1000-7.

Smalley KS (2010) Understanding melanoma signaling networks as the basis for molecular targeted therapy. *Journal of Investigative Dermatology* 130: 28–37

Solit DB, Rosen N (2011) Resistance to BRAF inhibition in melanomas. *N. Engl. J. Med.* 364: 772–774.

Stojakowska A, Kedzia B, Kisiel W (2005) Antimicrobial activity of 10-isobutyryloxy-8,9-epoxythymol isobutyrate. *Fitoterapia* 76: 687-690.

Su A, Viros C, Milagre K et al (2012) RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. *N. Engl. J. Med.* 366: 207–215.

T.C Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Melanom Çalışma Grubu (2012) Türkiye melanom yol haritası. “https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/yayinlar/raporlar/Melanom_Yol_Haritasi_II.pdf” (Erişim tarihi: 31.05.2019)

Talib WH, Zarga MH, Mahasneh AM (2012) Antiproliferative, antimicrobial and apoptosis inducing effects of compounds isolated from *Inula viscosa*. *Molecules.* 14;17(3): 3291-303.

Tang JQ, Hou XY, Yang CS et al (2017) Recent developments in nanomedicine for melanoma treatment. *Int J Cancer* 15;141(4):646-653.

Tascilar M, de Jong FA, Verweij J et al (2006) Complementary and alternative medicine during cancer treatment: beyond innocence.

The Independent Community Advisory Board. The melanoma white paper: Reshaping EU healthcare for melanoma patients. 2012.

Thrift AP, Whiteman DC (2013) Can we really predict risk of cancer? *Cancer Epidemiol.* 37(4): 349–52

Toh B, Wang X, Keeble J et al (2011) Mesenchymal transition and dissemination of cancer cells is driven by myeloid-derived suppressor cells infiltrating the primary tumor. *PLoS Biol.* 9: e1001162.

Tuong W, Cheng LS, Armstrong AW (2012) Melanoma: epidemiology, diagnosis, treatment, and outcomes. *Dermatol Clin.* 30(1): 113-24

Usher-Smith JA, Emery J, Kassianos AP et al (2014) Risk prediction models for melanoma: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 23: 1450-63.

Uysal A, Oltulu F, Çalık Kocatürk D ve ark (2016) Embryological development of skin and skin appendages. *GDD* 1(1): 1-10.

Valko-Rokytskaya M, Bruchata K, Simkova J et al (2016) Current trends in the treatment of malignant melanoma. *Neoplasma* 63(3): 333-41.

Veeresham C (2012) Natural products derived from plants as a source of drugs. *J Adv Pharm Technol Res.* 4: 200-1.

Vermeulen K, Berneman ZN, van Bockstaele DR (2003) Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif.* 36: 165-75.

Volkovova K, Bilanicova D, Bartonova A et al (2012) Associations between environmental factors and incidence of cutaneous melanoma. *HENVINET* pp:1-12

Wang L, Leite de Oliveira R, Huijberts S et al (2018) An acquired vulnerability of drug-resistant melanoma with therapeutic potential. *Cell* 173: 1–13

Ward WH, JH Farma (2017) Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy [Internet]. Editors: Ward WH, Farma JM, Clinical Presentation and Staging of Melanoma, Codon Publications, Brisbane (AU), pp: 84-87

Watts CG, Dieng M, Morton RL et al. (2015) Clinical practice guidelines for identification, screening and follow-up of individuals at high risk of primary cutaneous melanoma: a systematic review. *Br J Dermatol.*172: 33-47.

Wellbrock C, Arozarena I (2016) The Complexity of the ERK/ MAP-Kinase pathway and the treatment of melanoma skin cancer. *Front Cell Dev Biol.* 4: 33

Wozniak M, Sztiller-Sikorska M, Czyz M (2015) Diminution of miR-340-5p levels is responsible for increased expression of ABCB5 in melanoma cells under oxygen-deprived conditions. *Experimental and Molecular Pathology* 99: 707–716

Yagi M, Yonei Y (2018) Glycative stress and anti-aging:7. Glycative stress and skin aging.” *Glycative Stress Research* 5(1): 050- 054.

Yamaguchi Y, Hearing VJ (2014) Melanocytes and their diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1;4(5).

Zell JA, Cinar P, Mobasher M et al (2008) Survival for patients with invasive cutaneous melanoma among ethnic groups: the effects of socioeconomic status and treatment. *J Clin Oncol.* 26: 66-75.

Zhao YM, Zhang ML, Shi QW (2006) Chemical constituents of plants from the genus *Inula*. *Chem Biodivers.* 3: 371-384.

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

A2058:	Malign melanom hücre hattı
ACD:	Adeno Kortikal Displazi Homoloğu
AO/EB:	Acridine orange, Etidium Bromür
ASIP:	Agouti Sinyal Proteini
BRAF:	B-raf protoonkogen
CDK4:	Cyclin Dependent Kinase 4
CDKN2A:	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
CPD:	Cyclobutane Primidine Dimers
CTLA-4:	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4
DOPA:	Dihidroksifenilalanine
DTIC:	Dacarbazine
EMT:	Epitelyal Mezenşimal Transition
GNAQ:	G Protein Subunit Alpha Q
GTP:	Guanozin Trifosfat
HRAS:	HRas protoonkogen
IV:	<i>Inula viscosa</i>
IVM:	<i>Inula viscos</i> 'nın metanol özütü
KRAS:	KRAS Proto-Oncogene, GTPase
LEM:	Lentiga Maligna
LM:	Lenfatik Metastatik Melanom
MAPK:	Mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz
MC1R:	Melanocortin 1 Receptor
MeWo:	Malign melanom hücre hattı
MITF:	Melanocyte Inducing Transcription Factor
MM:	Malign Melanom
NRAS:	NRas protoonkogen
OM:	Organa metastaz olmuş melanom
PBS:	Sodyum-fosfat tamponu
PD-1:	Programmed cell death-1
PI3K-AKT:	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PM:	Primer Melanom
RAF:	Raf-1 Proto-Oncogene
RB:	Retinoblastoma

TERT: Telomerase Reverse Transcriptase

TMZ: Temozolomide

TP53: Tumor Protein P53

TYR: Tirozinaz

TYRP-1: Tirozinaz ile ilgili protein bir

TYRP-2: Tirozinaz ile ilgili protein iki



8. TEŞEKKÜR

Teşekkür metnime kadınlara eğitim öğretim hakkını veren tarihin gelmiş geçmiş en büyük lideri MUSTAFA KEMAL ATATÜRK'e saygılarımı ve minnetlerimi sunarak başlamak istiyorum. Yüksek lisans eğitimim boyunca, istisnasız her gün halimi hatrımı sorup, eğitimimle alakalı ilgisini her anlamda hissettiren, kişiliği ile örnek bir akademisyenlik sergileyen, gerek pratik gerekse teorik bilgilerini ders içi ve ders dışı tüm zamanlarda paylaşmaktan keyif duyan, kişisel gelişimim konusunda fikirlerini benimle paylaşan ve kısa süreli yurtdışı eğitimimde desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD Başkanı Sn. Prof. Dr. Ünal EGELİ'ye,

Haftanın her günü gülümsemesi suratından eksik olmayan, ders aşaması ve tez aşaması dahil ben ve bölümümüzde eğitim gören tüm arkadaşlarıma ailemizden daha çok vakit geçirmemize rağmen aile sıcaklığını hissettiren, bilgi ve teknik donanımı ile her konuda her zaman yardımları ile bizleri geliştirmeyi misyon edinmiş değerli hocalarımız Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Berrin TUNCA'ya ve Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER'e,

Taksonomik analiz için emeklerinden dolayı Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik AD Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hulusi Malyer'e, *Inula Viscosa*'nın tarafımıza iletilmesini sağlayan Rıfat OKUYANLAR'a ve kromatografik analizi takiben antioksidan aktivenin değerlendirilmesi aşamasında çok kısa bir sürede beni hiç kırmadan yardımlarını esirgemeyen Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Analitik Kimya AD Öğretim Üyesi Dr. Önder Aybastier'e,

Yüksek lisans eğitimime başladığım günden beri teknik donanımını adeta bir öğrenci yetiştirir gibi hiçbir detayı atlamadan benimle paylaşan, tez yazım ve deney sürecini aynı anda yürütmemde çok büyük yardımı dokunan, her düşüğümde elimden tutarak enerjisini daima yanımda hissettiren, gece gündüz 7/24 benimle ilgilenmekten vazgeçmeyen canım ablam Araş. Gör. Işıl Ezgi Eryılmaz'a ve aynı şekilde her zaman yanımda olduğunu hissettiren diğer ablam Araş. Gör. Seçil Ak'a,

Aile kavramının en güzel tanımını, sevgi ve saygının anlamını ve merhameti öğreten, sadece öğretmekle kalmayıp fikirlerime daima saygı duyan, en zor anımda daima yanımda olan mis kokulu ANNEM, evimizin tek erkeği BABAM ve ablasının biricik minik KARDEŞİM'e,

Tüm derdimi sıkıntımı benimle paylaşıp meditasyona gerek duymaksızın dinginliğe kavuşmamı sağladığı; çocuk yanımla beslemekten geri kalmayıp bir yandan da olgunlaşmamda büyük emeği olduğu için Hürkan ÖZEL'e ve aynı zamanda mutluluğu ve hüznü burada birlikte yaşadığım dönem arkadaşlarım Ecem EFENDİ, Melis MUTLU, Çağla Tekin ve Ufuk ÜNAL'a; yıllardır beni kardeşi gibi benimseyerek sevgilerini benimle paylaşan arkadaşlarıma kucak dolusu sevgilerimi gönderip, öncelikle değerli büyüklerime saygılarımı teşekkürlerimi sunmak isterim. Tezimi tüm sevdiklerime ithaf ediyorum.

9. ÖZGEÇMİŞ

13 Şubat 1994 yılında Sakarya'da doğdum. İlköğretimimi Ahmet Hamdi Tanpınar okulunda ve ortaöğretimimi İstanbul Anadolu Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2013 yılında Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ne yerleştim. 2017 yılında lisans derecesi ile bu bölümden mezun oldum. Aynı yıl Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD'nda yüksek lisans eğitimime başladım. 2018-2019 bahar döneminde Bursa Uludağ Üniversitesi Proje Yönetim Merkezi aracılığı ile Sapienza Üniversitesi'nde tez konum ile ilişkili 2 aylık staj eğitimi aldım. Halen Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD'nda Prof. Dr. Ünal EGELİ'nin danışmanlığı altında yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.