

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# ÇOCUKLUK ÇAĞI TÜMÖRLERİNDE SESKİTERPEN LAKTONLARIN ETKİSİ

AYLİN EROL

TEMEL ONKOLOJİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2019

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2017970106

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# ÇOCUKLUK ÇAĞI TÜMÖRLERİNDE SESKİTERPEN LAKTONLARIN ETKİSİ

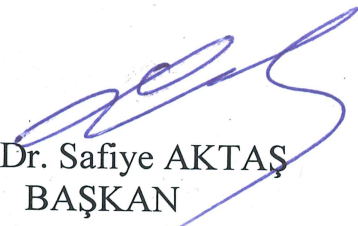
TEMEL ONKOLOJİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYLİN EROL

Danışman Öğretim Üyesi: Prof.Dr. Safiye AKTAŞ

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2017970106

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Anabilim Dalı, Temel Onkoloji Yüksek Lisans programı öğrencisi AYLİN EROL, Çocukluk Çağı Tümörlerinde Seskiterpen Laktonların Etkisi konulu yüksek lisans tezini 11.01.2019 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

  
Prof. Dr. Safiye AKTAŞ  
BAŞKAN  
(Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü)

  
Prof. Dr. Hatice Nur OLGUN  
ÜYE

(Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü) (Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi )

  
Doç.Dr. Gülден DİNİZ  
ÜYE

Prof. Dr. Zekiye SULTAN ALTUN  
YEDEK ÜYE

(Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü) (Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi)

Doç.Dr. Nüket ELİYATKIN  
YEDEK ÜYE

## İÇİNDEKİLER TABLOSU:

|                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----|
| İÇİNDEKİLER TABLOSU: .....                                                  | i   |
| ŞEKİL DİZİNİ.....                                                           | iii |
| KISALTMALAR.....                                                            | iii |
| TEŞEKKÜR.....                                                               | v   |
| ÖZET .....                                                                  | 1   |
| ABSTRACT .....                                                              | 3   |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ .....                                                      | 1   |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                                     | 3   |
| 2.1. PEDIATRİK TÜMÖRLER.....                                                | 3   |
| 2.2. FİTOTERAPİ.....                                                        | 9   |
| 2.3. SESKİTERPEN LAKTONLAR .....                                            | 13  |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM .....                                                    | 18  |
| 3.1. ARAŞTIRMANIN TİPİ.....                                                 | 18  |
| 3.2. ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI.....                                       | 18  |
| 3.3. ARAŞTIRMANIN EVRENİ VE ÖRNEKLEMİ.....                                  | 18  |
| 3.4. ÇALIŞMA MATERYALİ .....                                                | 18  |
| 3.5. ARAŞTIRMANIN DEĞİŞKENLERİ .....                                        | 18  |
| 3.6. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI .....                                            | 19  |
| 3.6.1. Hücre Kültürü.....                                                   | 19  |
| 3.6.2. Hücrelerin Çözdürülmesi .....                                        | 20  |
| 3.6.3. Hücrelerin Kültür Ortamlarının Yenilenmesi.....                      | 21  |
| 3.6.4. Hücre hatlarının Pasajlanması .....                                  | 21  |
| 3.6.5. Hücre Hatlarının Dondurulması .....                                  | 22  |
| 3.6.6. <i>Inula viscosa</i> Bitkisinin Ekstraksiyonu .....                  | 22  |
| 3.6.7. DPPH Radikali Yakalama Yöntemi İle Antioksidan Aktivite Tayini ..... | 23  |
| 3.6.8. Alüminyum Klorür Yöntemi İle Toplam Flavonoid Madde Analizi.....     | 25  |
| 3.6.9. Folin Ciocalteu Yöntemi İle Toplam Fenolik Madde Analizi .....       | 26  |
| 3.6.10. İnce Tabaka Kromatografi Analizi.....                               | 27  |
| 3.6.11. MTT ile Hücre Proliferasyon Analizi .....                           | 28  |

|                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.6.12. Flow Sitometrik AnnexinV FITC-PI Boyaması ile Apoptoz Analizi..... | 28        |
| 3.6.13. Immunohistokimyasal Analizler .....                                | 29        |
| 3.6.14. Toluidin Mavisi ile Morfolojik Analiz .....                        | 29        |
| <b>3.7. ARAŞTIRMANIN TAKVİMİ.....</b>                                      | <b>30</b> |
| <b>3.8. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ .....</b>                              | <b>30</b> |
| <b>3.9. ARAŞTIRMANIN SINIRLILIKLARI.....</b>                               | <b>30</b> |
| <b>4. BULGULAR.....</b>                                                    | <b>31</b> |
| 4.1. DPPH İle Antioksidan Aktivite Tayini Bulguları .....                  | 31        |
| 4.2. Alüminyum Klorür İle Toplam Flavonoid Madde Analizi Bulguları .....   | 32        |
| 4.3. Folin Ciocalteu Yöntemi İle Toplam Fenolik Madde Analizi .....        | 32        |
| 4.4. İnce Tabaka Kromatografi Analizi Bulguları.....                       | 33        |
| 4.5. MTT Bulguları.....                                                    | 35        |
| 4.6. Annexin V- PI Bulguları .....                                         | 37        |
| 4.7. İmmünohistokimya Bulguları .....                                      | 39        |
| 4.8. Toluidin Mavisi Bulguları.....                                        | 41        |
| <b>5. TARTIŞMA.....</b>                                                    | <b>42</b> |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>                                          | <b>51</b> |
| <b>7. KAYNAKLAR .....</b>                                                  | <b>52</b> |
| <b>8. DİPNOTLAR .....</b>                                                  | <b>59</b> |
| <b>9. EKLER .....</b>                                                      | <b>60</b> |
| 9.1. Etik Kurul Raporu .....                                               | 60        |

## ŞEKİL DİZİNİ

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1: Pediatrik solid tümörlerin orjinlenmesi.....                           | 4  |
| Şekil 2: <i>Inula viscosa</i> sp: .....                                         | 12 |
| Şekil 3: SL kimyasal yapısı: .....                                              | 13 |
| Şekil 4: Seskiterpen Lakton antioksidan etki mekanizması : .....                | 16 |
| Şekil 5: Dehidrolökodinin kimyasal yapısı: .....                                | 17 |
| Şekil 6: KELLY hücre hattı: .....                                               | 20 |
| Şekil 7: SK-ES hücre hattı: .....                                               | 20 |
| Şekil 8: HEPG-2 hücre hattı : .....                                             | 20 |
| Şekil 9: <i>Inula viscosa</i> bitkisinin ekstraksiyonu: .....                   | 23 |
| Şekil 10: DPPH Radikalı Yakalama Yöntemi İle Antioksidan Aktivite Tayini: ..... | 24 |
| Şekil 11: Toplam Flavonoid Madde Analizi: .....                                 | 25 |
| Şekil 12: Toplam Fenolik Madde Analizi: .....                                   | 26 |
| Şekil 13: Ekstraktların İTK plağındaki görüntüsü: .....                         | 27 |
| Şekil 14: 254nm dalga boyunda İTK plağının incelenmesi: .....                   | 33 |
| Şekil 15: 366nm dalga boyunda İTK plağının incelenmesi: .....                   | 33 |
| Şekil 16: Gün ışığında İTK plağının incelenmesi: .....                          | 34 |
| Şekil 17: KELLY Hücre Hattı 24h Yüzde Canlılık Değerleri: .....                 | 35 |
| Şekil 18: HEP-G2 Hücre Hattı 24h Yüzde Canlılık Değerleri: .....                | 36 |
| Şekil 19: SK-ES Hücre Hattı 24h Yüzde Canlılık Değerleri: .....                 | 36 |
| Şekil 20: KELLY Hücre Hattı Apoptoz ve Nekroptoz Oranları: .....                | 38 |
| Şekil 21: HEP-G2 Hücre Hattı Apoptoz ve Nekroptoz Oranları: .....               | 38 |
| Şekil 22: SK-ES Hücre Hattı Apoptoz ve Nekroptoz Oranları: .....                | 38 |
| Şekil 23: Toluidin Mavisi Boyası ile Hücrelerin Morfolojik Görünümleri: .....   | 41 |

## TABLO DİZİNİ

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 1: Hücre kültüründe kullanılan cihaz ve markalar: .....          | 19 |
| Tablo 2: Araştırma takvimi: .....                                      | 30 |
| Tablo 3: DPPH % inhibisyon değerleri: .....                            | 31 |
| Tablo 4: Kersetine ekivalen toplam flavonoid % miktarları: .....       | 32 |
| Tablo 5: Gallik asit ekivalen toplam fenolik madde % miktarları: ..... | 32 |
| Tablo 6: KELLY hücre hattı için % pozitiflik oranları: .....           | 39 |
| Tablo 7: HEP-G2 hücre hattı için % pozitiflik oranları: .....          | 40 |
| Tablo 8: SK-ES hücre hattı için % pozitiflik oranları: .....           | 40 |
| Tablo 9: Seskiterpen laktonların klinikteki yeri: .....                | 46 |

## **KISALTMALAR**

CDDP: Sisplatin

DhL: Dehidrolökodin

ES: Ewing Sarkom

MTT: (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid)

NB: Nöroblastom

PTEN: Primitif Nöroektodermal Tümör

SL: Seskiterpen Lakton

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

HL: Hepatoblastom

HCC: Hepatosellüler Karsinom

NGS: Yeni Nesil Sekanslama

TNM: Tümör Nod Metastazı

MYCN: Nöroblastom türevli homolog

DER: İlaç Ekstrakt Oranı

EMA: Avrupa İlaç Ajansı

HMPC: Bitkisel Tıbbi Ürünler Komitesi

FBS: Fetal Bovin Serum

PBS: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi

MBE: Metanol Çözücülü Ekstrakt

N-HEG: n-Hegzan Çözücülü Ekstrakt

ETOAc: Etil Asetat Çözücülü Ekstrakt

CAM: Tamamlayıcı Alternatif Tıp

GSH: Hücre İçi Serbest Glutasyon

NFKB: Nuklear Faktör Kappa Beta

MAPK: Mitojen Aktif Protein Kinaz

TNF: Tümör Nekroz Faktör

TRAIL: Apoptoz İndükleyici Ligand

SMAC: Mitokondriyal Türevli Kaspaz Aktivatörü

## TEŞEKKÜR

Başta henüz bölümde stajyer olarak başladığım günden itibaren yeni fikirlerimi her zaman sabırla dinleyen ve bana yol gösterip bilgisini paylaşan, bilimsel merakımı takdir edip bu çalışmayı yapmama olanak sağlayan değerli tez danışmanım sayın Prof.Dr.Safiye Aktaş olmak üzere Onkoloji Enstitüsü müdürümüz sayın Prof.Dr.Nur Olgun ‘a , farmakognozi alanında farkındalığımı ve bilgimi arttıran sayın Prof.Dr.Hüsniye Kayalar hocama teşekkürlerimi sunarım.

Her durumda ilk günden beri yanyana olduğum, çok şey öğrendiğim ve öğrettiğimi düşündüğüm , en zorlu durumların bile kolaylıkla birlikte içinden çıkabildiğim,çok ağladığım çok güldüğüm herşeyimi paylaştığım sevgili lab partnerim Elif Özde Gökbayrak’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Desteklerini ve sevgilerini benden hiç esirgemeyen sevgili annem Melek Erol , babam Mümtaz Erol ve abim Alper Erol ve ablam Pelin Önder Erol’ a çok teşekkür ederim.

Hayatımın en büyük neşe kaynağı biricik yeğenim Nil Erol ‘ a benimle hep güzel enerjisini paylaştığı için teşekkür ederim.

Ve son olarak yüksek lisans eğitimime başladığım günden beri beni her zaman destekleyen, kendime ve bilime olan inancımı arttırmamı sağlayan , fikirleriyle ufkumu açan canım yol arkadaşım Deniz Sarda’ya hep yanımda olduğunu hissettirdiği için teşekkür ederim.

**AYLİN EROL**

## ÖZET

### Çocukluk Çağı Tümörlerinde Seskiterpen Laktonların Etkisi

Aylin EROL

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,  
TEMEL ONKOLOJİ Anabilim Dalı, 35340 İnciraltı-İzmir

**Giriş:** Çocukluk çağı kanserleri, tedavi ve sağkalım oranlarında ilerleme görülmesine karşın, yeni tedavi stratejilerine gereksinim duyulan bir kanser grubudur. Seskiterpen laktonlar (SL) 100'den fazla çiçekli bitki familyasında bulunan çeşitli doğal ürünler grubudur. SL'lar geleneksel olarak kullanılan birçok tıbbi bitkinin aktif bileşenleridir. SL'lerin değişik kanser gruplarında anti-kanser etkisi kanıtlanmış olup, çocukluk çağı kanserlerinde bu konuyla ilgili yapılmış çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı ; dehydroleucodine(DhL) ve yapısında bir çok aktif SL bulunduğu bilinen *Inula viscosa* (Yapışkan Andız Otu) bitkisinin ekstraktlarının etkisinin sisplatin (CDDP) ile karşılaştırılmalı olarak çocukluk çağı kanserlerinde araştırılmasıdır.

*In vitro* çalışmada, nöroblastom hücre hattı olan KELLY, Ewing sarkom hücre hattı olan SK-ES ve çocukluk çağı karaciğer kanseri hücre hattı olan Hep-G2 hücreleri kullanılmıştır. DhL ve CDDP ticari olarak satın alınmıştır. *Inula viscosa* Ağustos 2018' de Manisa Spil Dağı'ndan toplanmıştır. Tür tayini Ege Üniversitesi Botanik Bahçesinde yapılmıştır. Bitkinin ekstraktı, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde katı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle elde edilmiştir. Ekstraktlardan DPPH yöntemi ile antioksidan aktivite , alüminyum klorit yöntemi ile total flavonoid miktarı ve Folin Coicalteu yöntemi ile total fenolik madde tayinleri yapılmıştır. İnce tabaka kromatografi yöntemi ile ekstraktların analiz ve görüntülenmesi yapılmıştır. Hücre hatları kültüre edilip, 96 well platede dört farklı çözücü ile hazırlanmış ekstrakt, DhL ve CDDP'in LD50 dozları MTT hücre canlılık testi ile saptanmıştır. Etkin bulunan LD50 dozları 6 well platede tüm hücre hatlarına uygulanmış, canlılık ve sonra akım

sitometride Annexin V+PI testi ile apoptoz ve nekroz yüzdeleri saptanmıştır. Toluidin mavisi boyaması ile hücrelerdeki morfolojik değişiklikler incelenmiştir. Bu kapsamda proliferasyon indeksi olarak Ki67, apoptoz mekanizmasını belirleme amacıyla Kaspaz 3,8,9 ile immünohistokimyasal incelemeler yapılmıştır.

Bulgularımız Mann Whitney U testi ile  $p < 0,05$  düzeyinde karşılaştırılmıştır. Nöroblastom hücre hattı Kelly için CDDP proliferasyon ve apoptoz üzerinde beklenen güçlü etkiyi göstermiştir. DhL ve Metanol çözücülü bitki ekstraktı (MBE) 'nin ise CDDP 'ye göre proliferasyonu daha az azalttığı halde hücreleri apoptoza sürüklediği görülmüştür. Çocukluk çağı karaciğer kanseri hücre hattı HEP-G2 için CDDP, MBE, DhL 'nin proliferasyonda benzer miktarda azalmaya sebep olduğu , her üç ajanında hücreleri apoptoza sürüklediği ve apoptotik intrinsik yolağı daha çok kullandığı görülmüştür. Ewing sarkom hücre hattı SK-ES için DhL ve MBE 'nin proliferasyonu CDDP' e göre daha az azalttığı fakat hücreleri bariz biçimde apoptoza sürüklediği görülmüştür.

Klinikte tedavide kullanılan bir ajan olan CDDP kıyasla bakıldığında her iki madde benzer ve istatistiksel olarak anlamlı şekilde anti-kanser aktivite göstermiştir. Ve bu etkiyi apoptoz ve nekroptoz üzerinden yapmıştır. Bu ajanlarla ilgili *in vivo* deneylerin de planlanması gerekmektedir. *In vivo* deneylerinin tamamlanması ve moleküler mekanizmalarının tam olarak açıklanması sonrasında ülkemizde doğal olarak bulunan bu bitki klinikte işlevsel olarak kullanılan bir, pediatrik anti-kanser ajan olma adaydır.

**Anahtar Kelimeler:**Çocukluk çağı tümörleri,Seskiterpen Lakton,*Inula viscosa*,

## **The Effect of Sesquiterpene Lactone in Childhood Cancer**

Aylin EROL

Dokuz Eylul University, Graduate School of Health Sciences,  
Oncology Institute, Basic Oncology Department, 35340, Inciralti, Izmir

### **ABSTRACT**

**Background:** Childhood cancer, although there is a progress in treatment and survival rates, is a cancer group in which new strategies for treatment are required. Sesquiterpene lactones (SLs) are a group of natural products found in more than 100 flowering plant families. SLs are active components of many conventional medicinal plants. The anti-cancer effect of SLs had been proved, yet there has not been any related research conducted in childhood cancer. The aim of this study is to investigate the effects of dehyroleucodine (DhL) and extracts of *Inula viscosa*, which contains high levels of active SLs, on childhood cancers comparatively with cisplatin (CDDP) used in classical chemotherapy.

In *in vitro* study; Neuroblastoma cell line KELLY, Ewing sarcoma cell line SK-ES and Hepatocellular Carcinoma cell line Hep-G2 cells were used. DhL and CDDP were commercially purchased. *Inula viscosa* was gathered from Spil Mountain in Manisa, in August 2018. Identification of the species was conducted in Ege University Botanical Garden. The extract of the plant was obtained by solid-liquid extraction method at Ege University Faculty of Pharmacy. The antioxidant activity was determined by DPPH method, total flavonoid amount by aluminum chloride method and total phenolic substance determination by using Folin Coicalteu method. Thin layer chromatography method was used to analyze and visualize the extracts. Cell lines were cultured and 96 well-plated extracts prepared with four different solvents, LD50 doses of DhL and CDDP were determined by MTT cell viability test. Active LD50 doses were applied to all cell lines in 6 well-plates and viability and apoptosis and necrosis percentages were determined by Annexin V + PI test in flow cytometry. Morphological changes in cells were investigated with Toluidine Blue staining. In this context, Ki67 as a proliferation index, Caspase 3, 8, 9 for identifying apoptosis mechanism and immunohistochemical studies were performed.

Our results were compared with Mann Whitney U test at  $p < 0.05$  level. For Kelly, a Neuroblastoma cell line, CDDP showed the expected strong effect on proliferation and apoptosis. It was observed that DhL and plant extract with methanol solvent (MBE) led to apoptosis although it reduced the proliferation less than CDDP.

It is found that CDDP, MBE, and DhL, for childhood liver cancer cell line HEP-G2, caused a similar reduction in proliferation, the three agents led to apoptosis in cells and used apoptotic intrinsic pathway further. For SK-ES, an Ewing sarcoma cell line, DhL and MBE have been shown to reduce proliferation less than CDDP, but evidently, lead to apoptosis.

When compared to CDDP, a drug used in the cancer treatment, both items showed similar and statistically significant anti-cancer activity. They also demonstrated this effect via apoptosis and necroptosis. In vivo experiments related to these agents should also be planned. This plant, which is naturally found in our country, after completion of in vivo experiments and full disclosure of molecular mechanisms, is a candidate for being a pediatric anti-cancer agent functionally used in the clinic.

**Keywords:** Childhood cancer, Sesquiterpene Lactone, *Inula viscosa*,

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çocukluk çağında kanser nadir görülen bir durumdur ve tüm kanserlerin yalnızca % 0.5'i 15 yaş altında saptanır<sup>12</sup>. Dünya geneline bakıldığında 15 yaş altı kanser insidansı yılda 180000 kadardır fakat her yıl 15 yaş altında kanser sebebiyle 90000 çocuk kaybedilmektedir<sup>3</sup>.

Çocukluk çağı kanserleri ICCC'ye göre 12 sınıfta incelenmektedir<sup>4</sup>;

1. Lösemiler, myeloproliferatif ve myelodisplastik hastalıklar
2. Lenfomalar ve retiküloendotelyal neoplaziler
3. Beyin ve spinal kanal tümörleri
4. Nöroblastom ve diğer periferik sinir hücreli tümörler
5. Retinoblastoma
6. Böbrek tümörleri
7. Karaciğer tümörleri
8. Kemik tümörleri
9. Yumuşak doku ve diğer kemik dışı sarkomları
10. Germ hücreli tümörler, trofoblastik tümörler ve gonad neoplazileri
11. Diğer malign epitelyal neoplazmlar ve malign melanom
12. Diğer sınıflanamamış malign neoplaziler

Ewing sarkoma(ES), çocukluk çağında en sık görülen ikinci kemik tümörü olup, çocuklarda tüm primer malign kemik tümörünün yaklaşık % 10'unu oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından tanımlanmış olan ilkel nöroektodermal tümör(PNET) grubunun bir üyesi olduğu düşünülmektedir. ES en çok uzun kemikler ve pelvislerde görülmektedir.<sup>5</sup>

Nöroblastom (NB) pediatrik dönemde en çok rastlanan ekstrakraniyal solid tümörüdür. İnfant dönemdeki malign hastalıklar arasında birinci sıradadır. Genel olarak pediatrik kanserlerin %8-10'unu, infant dönemi malign hastalıklarının ise üçte birini oluşturur. Çocuklarda kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %15'inden sorumludur.<sup>6</sup>

Primer pediatrik karaciğer maligniteleri, tüm pediatrik tümörlerin% 1-2'sini içermektedir. Pediatrik dönemde karaciğer malignitelerinin büyük bir çoğunluğunu % 43'lük bir insidansla hepatoblastom(HBL) oluşturmaktadır.Hepatoselüler karsinoma(HCC)çocukluk çağında oldukça nadir olarak ortaya çıkar ve tüm pediatrik malignitelerin% 0.5'inden daha azını oluşturur. Görülme sıklığı milyonda 0.5-1.0 'dır. Yaşça daha büyük çocuklarda ve gençlerde bebeklerden daha sık görülür. En sık rastlanan klinik işaret, karın ağrısı ile ilişkili olan hepatomegalidir.HBL tedavi anlamında daha yüksek başarıya sahip olmasına rağmen , HCC genellikle% 25-30 oranında kemoterapi dirençli olup beklenilenden daha kötü kür oranlarına sahiptir.<sup>78</sup>

Seskitergen laktonlar(SLs) 100 den fazla çiçekli bitki familyasında bulunmasına rağmen karakteristik olarak Astraceae familyasına ait bitkilerde bulunan ikincil metabolitlerdir.Günümüzde tanımlanmış 5000 den fazla farklı seskitergen lakton bilinmektedir.<sup>9</sup> Seskitergen laktonlar , geleneksel tıpta inflamasyon ve kansere karşı sıklıkla kullanılan bileşiklerdir.<sup>10</sup> Geçmişten günümüze geleneksel tıpta sıkça kullanılıyor olması yeni tedavi hedefleri için seskitergen laktonları güçlü bir aday haline getirmekte ve son yıllarda yapılan çalışmaların sayısı hızla artmaktadır. *Inula viscosa*(ortak yerel adı: Yapışkan Andız Otu), Akdeniz'in farklı bölgelerinde de yetişen çok yıllık bir bitkidir. Geleneksel tıpta, gastroduodenal bozuklukların tedavisine ek olarak antinflamatuar, antihelmintik, antipiretik, antiseptik ve antiflojistik aktiviteleri de içeren birçok kullanıma sahiptir.<sup>11</sup>.

Bu çalışmada *Artemisia douglasiana* bitkisinden elde edilmiş bir SL olan Dehidrolökodinin(DhL) ve içerisinde çok sayıda aktif SL içerdiği bilinen *Inula viscosa* bitkisinin farklı çözücülerle hazırlanmış ekstraktlarının çocukluk çağı kanserlerinden olan nöroblastom, ewing sarkom ve hepatoselüler karsinom üzerine olan sitotoksik,antiproliferatif ve apoptotik etkilerinin *in vitro* olarak incelemesi yapılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. PEDIATRİK TÜMÖRLER

Son 25 yılda kaydedilen ilerlemeler daha çok meme, kolon, akciğer ve prostat kanseri gibi yaygın görülen erişkin solid tümörlerinin anlaşılmasına yöneliktir. Ancak çocukluk çağı solid tümörleri hakkında henüz çok az şey aydınlatılabilmektedir, çünkü bu tümörler nadirdir ve fetal gelişim esnasında organogenezden orjinlenirler<sup>12</sup>.

Çocuklarda ve adolesanlarda görülen kanser vakalarında uygulanan tedavilerdeki ilerlemeler, çocukluk çağı kanserlerinin genel olarak 5 yıllık sağ kalım oranını yaklaşık % 80'e kadar yükseltmiştir. Fakat kanser hala 5 ile 14 yaş arasındaki çocuklarda kazalara bağlı ölümlerden sonra ikinci en sık görülen ölüm nedenidir<sup>13</sup>. 2018 yılında 0-14 yaş grubunda Amerika'da 10.590 çocuk kanser teşhisi almıştır.<sup>14</sup>

Pediyatrik solid tümörler, hücresel kökenlerini yansıtan çeşitli moleküler ve hücresel özelliklere sahiptir. 1000'den fazla pediyatrik solid tümör genomunun dizi analizi tamamlandıktan sonra mezodermal, ektodermal ve endodermal türevli çocukluk çağı kanserlerinin genomik tablosu daha da netlik kazanmıştır<sup>12</sup>.

Çocukluk çağı kanserleri moleküler, hücresel veya genetik özelliklerden ziyade anatomik lokasyonlarına göre sınıflandırılır. Hematolojik maligniteler kan, kemik iliği ve lenfoid sistem kanserleridir<sup>15</sup>.

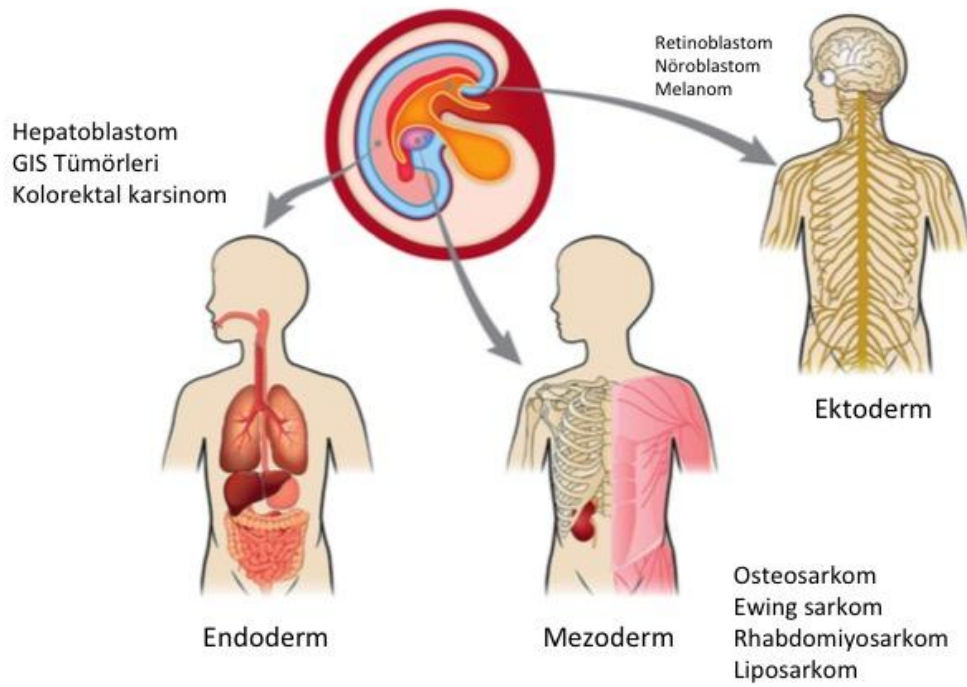
Beyin tümörleri merkezi sinir sisteminin intrakraniyal tümörleridir ve solid tümörler ekstrakraniyal hematolojik olmayan kanserlerdir. Pediyatrik solid tümörler, epitelyal hücrelerden (örneğin, adrenokortikal karsinom) ve mezenşimal hücrelerden (örneğin Ewing sarkomundan) türetilen sarkomlardan türetilen karsinomlardır. Hematolojik malignitelerden veya beyin tümörlerinden farklı olarak, üçlü germ tabaka olan mezoderm, endoderm veya ektodermden herhangi birinde solid tümör ortaya çıkabilir<sup>15</sup>.

Pediyatrik solid tümör genomuyla ilgili son gelişmeler, yeni nesil sekanslama(NGS) teknolojilerinin kullanımı ve pediyatrik solid tümörlerde kompleks somatik mutasyonları tanımlamak için etkin veri analiz tabanlarının oluşturulmasıyla aktif hale gelmiştir<sup>16</sup>.

Pediyatrik solid tümörlerin köken aldığı hücreleri anlayabilmek için genellikle hücresel özellikler incelenmektedir. Ayrıca tümör oluşumunu başlatan ve destekleyen onkogenler ve

tümör baskılayıcı genler de normal gelişim sürecinde önemli rol oynamaktadır<sup>15</sup>.Tekrarlayan veya metastatik nöroblastom, osteosarkom, Ewing sarkomu ve rabdomiyosarkomu olan çocuklar için genel sağkalım oranı% 30'un altındadır<sup>17</sup>.

Çocuk kanserlerini teşhis etmek için NGS teknolojisinin yaygın kullanımı ile klinik açıdan somatik ve soy hattı mutasyonlarını tanımlamak için çeşitli çalışmalar sürdürülmektedir. Bununla birlikte, bu araştırma imkanları yeni ortaya çıkan bir alandır ve pediatrik solid tümörlerin genomik analizinin kanser tedavisini bireyselleştirmek için nasıl kullanılabileceği henüz net değildir<sup>15</sup>.



### Şekil 1: Pediatrik solid tümörlerin orjinlenmesi

Pediatrik solid tümörler çeşitli gelişimsel kökenlere sahiptir. Hematolojik malignitelerden ve beyin tümörlerinden farklı olarak, pediatrik solid tümörler embriyodaki üçgerm tabakasından herhangi birinde ortaya çıkabilir. Bu görsel kaynak<sup>15</sup>’den alıntıdır.

### 2.1.1.EWING SARKOM

Ewing sarkomu (ES) çocukluk çağında yaygın olarak görülen ikincil kanser olmakla birlikte, en yaygın görülen birincil kemik kanseridir. Ancak bu tümörlerin önemli bir yüzdesi dış iskelet bölgelerinde görülmektedir<sup>18</sup>. En yüksek insidans aralığına bakıldığında bu dönem yaklaşık olarak yaşamın ikinci on yılına denk gelmektedir ve Birleşik Devletler nüfusunda yapılan araştırmalarda yılda milyonda 3 vaka görülme sıklığı ile karşılaştırıldığında 10–19 yaş arası hastalarda yılda milyonda yaklaşık 9–10 vaka görülmüştür<sup>19</sup>. ES genellikle kemik dokuda gözlemlenirken ve yumuşak dokuda da görülme sıklığı % 30'a kadar çıkmaktadır<sup>20</sup>. İskelette görülen ES en sık uzun kemiklerin diyafiz veya meta-diyafiz bölgesini içerir. Pelvis, kaburga ve omurga da yaygın olarak yer alır<sup>212223</sup>. Klinik olarak bakıldığında, hastalar sıklıkla lokalize olmuş bir ağrı ve şişlik ile hekime başvurur. Hastalarda ayrıca palp şeklinde bir kitle, patolojik bir kırık olgusu veya ateş, halsizlik, kilo kaybı veya anemi gibi yapısal semptomlar da görülebilir<sup>24</sup>.

#### 2.1.1.1 ES'de Patoloji

Kabaca bakıldığında, tümör kitlesi infiltratif sınırları ile gri-tan bir görünüm vermekle birlikte, mikroskopik olarak bakıldığında ES, çeşitli derecelerde nöral farklılaşma içinde olan, histolojik yapı olarak farklılık gösteren bir tümör grubudur. Tipik olarak ES, temelde üç ana histolojik alt tipe ayrılır: klasik ES, PNET ve atipik ES. ES hasta olgularının büyük çoğunluğunu oluşturan grup klasik ES'dir. Bu tipte histolojik bulgular yuvarlak veya oval çekirdekli, düzgün nükleer konturlara sahip olan, ince bir kromatin, küçük boyutta nükleoller, hafif derecede eozinofilik veya berrak sitoplazma ile karşımıza çıkmaktadır<sup>21</sup>.

Nöral farklılaşma sürecinin bir kanıtı olan tümörler klasik olarak ilkel nöroektodermal tümör (PNET) olarak adlandırılır. Mikroskopik bakı değerlendirildiğinde Homer Wright rozetleri (katı nörofibriler çekirdekli hücre kümeleri) veya nöral farklılaşmanın immünohistokimyasal olarak ortaya konması, olguya PNET teşhisini koymada güçlü bir destek sağlamaktadır<sup>2125</sup>.

Atipik ES, nükleer genişleme ve pleomorfizm, nükleer membranda görülen düzensizlik , vesiküler ya da sıralanmış kromatin dokusu ve nükleolid gibi klasik ES'de tarif edilen özelliklerden farklı görünen tümörleri kapsamaktadır <sup>26</sup>.

### **2.1.1.2 Genetik Yeniden Düzenlenmeler**

ES, genetik tanımlama olarak EWSR1 genini (lokus 22q12) ve transkripsiyon faktörlerinin, en sık FLI1 veya ERG ailesinin ETS ailesini içeren dengeli bir translokasyon ile anlatılabilir <sup>27</sup>.

EWSR1-ETS kimerik proteini, aşağı yönde hedef genleri düzensizliğe sürükleyen mekanizmaları ile onkogenezi destekleyen anormal bir transkripsiyon faktörü olarak rol oynar <sup>28</sup>.ES'de çeşitli kromozomal anormallikler bulunabilir. Bunlara örnek olarak, kromozom 8, kromozom 12 ve 1q'deki kazanımlar ES'de görülen ortak kopya sayısı değişimleridir <sup>29</sup>.

### **2.1.1.3 Prognoz**

ES'de prognoz, hali hazırda çoklu model tedavinin 5 yıllık sağ kalım oranı ile % 65 civarında olduğunu göstermiştir <sup>30</sup>.

Olumsuz prognostik faktörleri temsil eden en önemli özelliklerden biri, tanı anında veya erken tümör nüksünde metastazın varlığıdır. Bu grup için 5 yıllık sağkalım% 25–30'dur <sup>31</sup>.

Diğer önemli prognostik faktörlere bakıldığında , anatomik yerleşim yeri, tümör boyutu ve tedaviye bağlı tümör nekrozu da bu süreci belirlemede önemli bir rol oynar <sup>32</sup>.

Moleküler yöntemlerdeki ilerlemeler ile birlikte, şüphesiz ki tanı kriterleri iyileşmeye başladıkça farklılaşmamış yuvarlak hücreli sarkomların biyolojik alt yapısına yeni bir bakış açısı kazandıracak ve yeni genetik mekanizmaların keşfedilmesi açısından bilim insanlarına yardımcı olacaktır <sup>21</sup>.

## **2.1.2 .HEPATOSELLÜLER KARSİNOM**

HCC, kanserin beşinci en yaygın nedenidir ve hepatobilier kanserin en sık görülen türüdür. HCC, yılda 250.000 kişinin ölümüne neden olmaktadır ve 500.000'den fazla yeni HCC vakası mevcuttur<sup>33</sup>. HCC, hücre döngüsünde kontrolsüzlük, anormal anjiyogenez süreci ve apoptozdan kaçma ile karakterize edilen oldukça anjiyogenik bir solid tümördür<sup>34</sup>. HCC'nin moleküler patojenezi, çok sayıda genetik ve epigenetik değişikliği, kromozomal anormallikleri, gen mutasyonlarını ve değişikliğe uğramış moleküler yollarını içeren oldukça karmaşık bir süreçtir<sup>35</sup>. Anjiyogenez süreci, HCC'nin büyüme, invazyon ve metastatik potansiyelinde önemli bir yere sahiptir. Tümörün bu anjiyogenik doğası, aynı zamanda, onun belirleme yöntemine de katkıda bulunur<sup>34</sup>.

### **2.1.2.1 Evreleme**

HCC'nin doğru şekilde evrenmesi, terapötik seçenekleri ve genel prognozu belirlemek ve olguya bir çerçeve çizmek açısından oldukça önem taşır. Çoklu evreleme sistemlerine göre; HCC için yaygın olarak kullanılan evreleme sistemleri klinik özellikleri değerlendirir. Buna göre; tümör boyutu, lokal tümör boyutu, karaciğer dışı metastazlarının varlığı, karaciğer hastalığının şiddeti ve hastanın performans durumu gibi bazı parametrelere göre değerlendirme yapılır. Tümör özelliklerini ve metastazlarını karakterize eden ve bu özellikleri bir araya getirip hastalığın şiddeti ve hastanın fonksiyonel olarak nasıl bir durumda olduğunu değerlendiren Tümör Nod Metastazı (TNM) değerlendirmesi kullanılır<sup>36</sup>. TNM sistemi hem karaciğer rezeksiyonu hem de transplant için onaylanmış bir sistemdir.

### **2.1.2.2 Prognoz**

HCC'nin prognozu hakkında bilgi edinmek oldukça değişkendir, çünkü prognozu çoklu belirleyicilerleir. Birden çok evreleme sistemi ve prognostik sistem gelişmesine rağmen, hayatta kalmayı öngörmek için hiçbir evrensel olarak uygulanabilir kabul edilemez<sup>37</sup>.

TNM değerlendirmesine bakıldığında rezeksiyon uygulanan hastalar için 5 yıllık sağ kalım oranları sırasıyla evre I, II ve III için 55, 37 ve % 16'dır <sup>38</sup>.Diğer puanlama sistemlerine kıyasla, TNM sistemi 3 yıllık, 5 yıllık ve rekürrenssiz sağ kalım sonrası transplantasyonun öngörölmesi açısından en doğru bulunmuştur<sup>39</sup>.

### **2.1.2.3 Tedavi**

HCC tedavisinde cerrahi seçenekler dahil olmak üzere radyofrekansablasyonu veya etanol enjeksiyonu gibi çoklu tedavi modaliteleri mevcuttur <sup>40</sup>.Mevcut tedavi yaklaşımlarının sayısı çoktur. Sorafenib gibi yeni ajanların denenmesi bir umut vaad etse de, yine de bu yeni yaklaşımların yanında radyasyon, rezeksiyon ve klasik diğer tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Ancak bu tedavi seçeneklerinin birbirleri arasında kıyaslanması gerekmektedir. Karaciğer hasarının tümör evresi ve derecesi, uygun bir HCC tedavi stratejisinin değerlendirilmesinde anahtar faktörlerdir <sup>34</sup>.

### **2.1.3. NÖROBLASTOM**

Nöroblastom; adrenal medulla ya da sempatik nöronlardaki nöral krestten köken alan hücrelerin diferansiasyonun bozulmasına bağlı olarak oluşan ve en sık rastlanan pediatrik solid tümördür <sup>41</sup>. Nöroblastom (NB) tüm çocukluk çağı kanserlerinin % 8-10'unu oluşturmaktadır ve çocukluk çağı kanserlerinde ölüm nedeni olarak ilk sıraya yerleşmektedir<sup>42</sup>.Nöroblastik tümörler genelde olguların %70'inde batin bölgesinde yer almaktadır<sup>43</sup>.

#### **2.1.3.1 Klinik Açıdan Nöroblastom**

Nöroblastom temel olarak, 10 yaşımdan küçük hastaları, 19 aylık hasta ortalamasını etkilemektedir <sup>43</sup>.Hastaların yaklaşık % 37'si bebek,% 50'si iki yaşımd altında ve % 90'ı tanı anında beş yaşımdan küçüktür <sup>44</sup>. Olgularda en sık rastlanan abdominal kitle varlığıdır. Adrenal bez en sık görülen primer bölge (% 40) olmakla beraber, bunu diğer abdominal (% 25), torasik (% 15), servikal (% 5) ve pelvik sempatik gangliyon (% 5) izlemektedir <sup>45</sup>.

Nöroblastomun histolojisi, ince fibrovasküler septa ve değişken miktarda Schwannianstroma ile ayrılan çeşitli farklılaşma evrelerinde nöroblastların kümelendiği lokalizasyonu gösterir<sup>43</sup>. Farklılaşmamış NB, histolojik olarak tanımlanmış olan “olumsuz histoloji” grubuna dahil olan bir olgudur. Bu durum, farklılaşmamış küçük yuvarlak hücreli tümör veya prognostik nükleollü bir tümör olarak karşımıza çıkabilir ve sıklıkla kötü prognostik faktörler, kötü klinik sonuç ve MYC proteininin ekspresyonu ile ilişkilidir<sup>46</sup>.

### 2.1.3.3 Genetik Değişiklikler

Hastanın yaşı, tümör evresi ve histopatolojik sınıflandırmasına ek olarak v-mycavianmyelocytomatosisviralonkojen NB türevli homologun (MYCN) amplifikasyonu, nöroblastomda en sık görülen genetik değişiklik olup, tutarlı prognostik belirteçlerden biri olarak kabul edilmektedir<sup>47</sup>.

## 2.2. FİTOTERAPİ

Bitkiler geçmişten günümüze tüm çağlar boyunca tedavi ediciler olarak kullanılmışlardır. Tıbbi bitkilerin ilaç endüstrisindeki yerinin önemi tartışmasıdır. Özellikle Avrupa ülkelerinde tıbbi bitki temelli bir çok preparat ilaç olarak pazarlanmaktadır. Bu ürünlerin çoğu bitki ekstrelerinden veya saflaştırılmış, güçlendirilmiş bitki ekstraktlarından hazırlanmaktadır. Kanser için bakıldığında şu anda mevcut olan kanser kemoterapi rejimleri, yetersiz etkinlik, ciddi olumsuz etkiler ve çoklu ilaç direncinin geliştirilmesi gibi birçok kritik problemle sahiptir. Bu nedenle, bu problemleri çözmek için yeni anti-kanser ajanların keşfedilmesiyle daha etkili tedavilerin geliştirilmesi istenmektedir. Fitoteröpatik ürünler ve bunların yarı sentetik türevleri, yaygın ve etkili bir şekilde anti-kanser ajanlar olarak kullanılmıştır. Doğal ürünler ile ilişkili anti-kanser ilaç keşfinde ; Vinca bisindol alkaloidler, epipodofilotoksin analogları, taksanlar ve kamptotesinler dahil olmak üzere bitki kaynaklı ajanlar, klinikte en yaygın kullanılan kanser kemoterapötikleri arasındadır ve bu ajanlara ve diğer doğal ürünlerin kanserle mücadelede önemleri artmaktadır<sup>48</sup>

20. yüzyılın ikinci yarısında, gelişmiş ülkelerde doğal kökenli ürünlere olan ilgi hızla artmıştır. Bu ilgi, bitkisel ürünlerin neden şu anda gitgide önem kazanmaya devam etmesini açıklamaktadır. ABD ve Avrupa'da, yetişkin nüfusun büyük bir kısmı (% 30-80) kendi ilaçlarının bir parçası olarak alternatif (= sentetik olmayan) preparatları kullanmaktadır. Fitoterapötik ürünler en sık kullanılan alternatif yöntemler arasındadır<sup>49</sup>.

Modern fitoterapötik preparatlar genellikle bitki ekstratlarından hazırlanır. Ve sentetiklerin aksine, bir ürün çok çeşitli bitki özlerinin bir kombinasyonunu içerir. Fitoterapötiklerde bitkisel özlerin kullanımının çeşitli avantajları vardır. İlk olarak, ekstraksiyon, post-mortem enzimatik proseslerin ürünün bileşimini değiştirmemesini ve ekstraktların mikrobiyolojik stabilitesinin korunmasını sağlar. İkinci olarak, konsantre ekstraktlar hazırlanırsa, çok büyük miktarda bitki materyalinidaha fazla faydalanacak uygun bir şekilde tüketimine imkan tanır.

Konsantrasyon ölçümü ilaç-ekstrakt oranı (DER) ile karakterizedir. DER 1 gr ekstrakt üretimi için kaç gram bitki materyali kullanıldığını gösterir. Örneğin, DER 5: 1 ise, 5 g bitki materyalinden 1 g ekstrakt hazırlanır. Bazı durumlarda, DER bir aralık olarak verilir, örn. 5-10:1 arasındadır. Bunun sebebi, farklı yerlerde ve farklı zamanlarda bitkisel hammaddelerin bileşimleri büyük ölçüde değişir ve belirli bir kaynaktan elde edilebilecek özüt miktarı da buna göre değişiklik gösterir<sup>49</sup>.

Avrupa birliğinde , tıbbi ürünler Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından tescil ve kontrol edilmektedir.Bu hedeflere göre Bitkisel Tıbbi Ürünler Komitesi (HMPC) tıbbi bitki ürünleri ile ilgili sorular ve problemlerle baş etmek için EMA'nın bir parçası olarak 2004 yılında kurulmuştur.HMPC, bitkisel ekstraktların hazırlanması ve sınıflandırılmasıyla ilgili çalışmaları yürütmektedir<sup>4950</sup>.

Bu komite terapötik aktivitesi veya aktif olan bileşenleri bilinmeyen bitkisel maddelerin tanımlanmaları ve daha sonrasında üretim süreci ve özelliklerini de belirlemiştir<sup>51</sup>.

WHO bilgilerine göre dünyada 20.000 civarında tıbbi bitki mevcuttur. Ancak bazıları lokal olarak kullanıldığından tam anlamıyla listelenememişlerdir. Bu yüzden bu sayının aslında 75.000 kadar olduğu belirtilmektedir. Bugün kullanılan tıbbi bitkilerin tahmini olarak

%70'inin doğadan toplandığı, %30'unun ise kültürünün yapıldığı tahmin edilmektedir<sup>52</sup>. Dünya sağlık örgütü yayınladığı deklarasyonlar ile geleneksel, tamamlayıcı ve alternatif tıbbın politika, güvenlik, etkinlik, kalite, erişim ve rasyonel kullanımı konularıyla ilgilenmektedir.<sup>52</sup>

Fakat tüm bu kurumlara ve alınan önlemlere rağmen bilinçsiz bir şekilde yan etkileri tanımlanmamış bitkilerin kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Fitoterapi ile ilgili yapılan çalışmaların artırılması, halk tarafından çoğu zaman ilaç tedavisinin bile yerine kullanılan bitkilerinin mekanizmalarının ve kimyasal içeriklerinin tam olarak açıklanması gerekmektedir.

Söz konusu tıbbi bitkilerin çocukluk döneminde tedavi amacıyla kullanımı ise çok daha hassas ve dikkat edilmesi gereken bir konudur. Yapılan çalışmalar tamamlayıcı alternatif tıp (CAM) uygulamalarının pediatrik onkoloji hastalarında da kullanım oranının arttığını göstermektedir<sup>53</sup>. Ancak unutmamak gerekir ki bitkisel terapi, diğer tedavilerle etkileşime girme potansiyeline sahiptir, bu nedenle sağlık görevlilerinin hastaların faydalarını optimize etmek ve riskleri azaltmak için aldıkları bütün takviyeleri bilmeleri önemlidir.<sup>53</sup>

### 2.2.1.*Inula viscosa*

*Inula viscosa* Ait (Asteraceae), Akdeniz Havzası'nda yaygın olarak bulunan, sürekli yeşil ve kendiliğinden yetişen bir bitkidir. Halk arasında yapışkan andız otu ya da kanser otu olarak bilinmektedir. *Inula* türlerinin kimyasal terpenikler (monoterpenler, seskiterpenler, diterpenler ve triterpenler), flavonoidler, glikolipitler ve antranilik asit türevleri içerdiği tespit edilmiştir<sup>54</sup>. Geçmişten günümüze geleneksel tıpta çok farklı hastalıkların tedavisi için kullanılan bu bitki ;deri hastalıkları, mide ülseri, bronşiyal enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanmıştır.<sup>11</sup> Yapılan çalışmalarda ise anti-inflamatuvar, anti-fungal ve anti-mikrobiyal etkinliği kanıtlanmıştır.<sup>55</sup> Son çalışmalar, *Inula viscosa* yapraklarından ve çiçeklerinden izole edilen esansiyel yağın ana bileşenlerinin, seskiterpenler, fenoller, hidrokarbonlar, monotерpenler, aldehydler, ketonlar, diterpenler, alkoller ve tetraterpenler olduğu ve bu yağın ana bileşeninin yüksek oranda seskiterpen içerdiği ortaya konmuştur.<sup>56</sup>

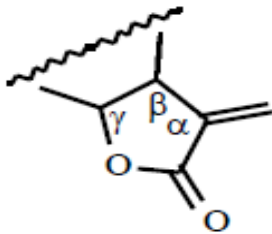


**Şekil2:** *Inula viscosa* sp.

### 2.3. SESKİTERPEN LAKTONLAR

Seskiterpen laktonlar(SLs) geleneksel tıpta kullanılan çeşitli tıbbi bitkilerin aktif bileşenleridir<sup>57</sup>. SLs, birkaç karakteristik halkada düzenlenmiş üç izoprenil grubunun ortak birleşimiyle birlikte 15 karbon, bir veya daha fazla lakton halkası içeren çok sayıda doğal ürünü temsil etmektedir<sup>48</sup>.

Bitkiler aleminde, özellikle Asteraceae familyası ikincil metabolitler olarak nitelendirilen 5000'den fazla SLs içermektedir. Asteraceae familyasına ait bitkiler, ana sekonder metabolitleri olarak, özellikle SLs olmak üzere çok çeşitli seskiterpenoid bileşikler üretirler<sup>58</sup>. Güncel literatürde SL'lerin anti-kanser ve anti-inflamatuvar özelliklerini bildiren 1500 den fazla yayın bulunmaktadır. *Thapsia garganica*'dan elde edilen thapsigargin, *Artemisia annua* 'dan elde edilen artemisinin ve artesunatin faz I-II kanser klinik çalışmaları devam etmektedir. Bu SL 'lar, normal hücreleri korurken, tümör hücrelerini ve kanser kök hücrelerini hedefleyen özelliklere sahiptir. Ayrıca farklı kanserleri veya inflamatuvar koşulları da etkiler. Örneğin, thapsigargin, ilerlemiş solid tümörlere (meme, böbrek ve bağırsak) karşı umut veren sonuçlar gösterirken, partenolidin kan ve lenf düğümleri tümörleri üzerinde etkili olmuştur. Artemisinin, metastatik meme ve kolorektal kansere karşı etkinliğini gösterirken , klinik kanıtlar ise artesunatin küçük hücreli dışı akciğer kanseri, metastatik uveal melanom ve laringeal skuamöz hücreli karsinoma karşı etkili olduğunu ortaya koymuştur.<sup>58</sup>Bütün SL'ler karboksilik skeletonun C6-C7 veya C8-C7 pozisyonuna cis- ya da trans füzyonu olan bir  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lakton halkası içerir.



**Şekil 3:SL kimyasal yapısı**

$\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lakton halkası

Seskiterpen laktonların biyolojik aktivitesi bu bileşiklerin üç biyokimyasal özelliğine bağlıdır:

1. alkilasyon merkezi reaksiyonu,
2. Yan zinciri ve lipofilisite,
3. moleküler geometri ve elektronik özellikler.

Seskiterpen laktonların bu aktiviteleri  $\alpha$ -Metilen- $\gamma$ -laktonun yapısından kaynaklanır<sup>59</sup>. SL'ların biyoaktivitesinin,  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -laktonveya  $\alpha,\beta$ -doymamış siklopentenonlar gibi doymamış karbonil yapıları aracılığıyla nükleofillerin alkilasyonuna aracılık ettiği düşünülür<sup>58</sup>. Bu yapı elemanları, nükleofiller, özellikle de sistein sülfhidril grupları ile Michael tipi ekleme ile reaksiyona girer. Bu nedenle, proteinlerdeki sistein alıntıları gibi tiyol gruplarının ve hücre içi serbest GSH(glutatyon)'nin, SL'lerin ana hedefleri olduğu düşünülmektedir. Kanser hücrelerinde GSH seviyeleri, normal hücrelerden daha yüksektir. Bu nedenle, SL'ler hücre içi GSH azaltarak kanser hücrelerinin apoptosisine neden olabilir<sup>60</sup>.

SL'ler ve protein tiyol grupları veya GSH arasındaki etkileşim, enzim aktivitesinin azalmasına yol açar veya hücre içi redoks dengesinin kurulmasını sağlar<sup>61</sup>.

SL'lerin kimyasal yapısı ve biyoaktivitesi arasındaki ilişki, özellikle sitotoksiste, anti-inflamatuvar ve antitümör aktivitesi bakımından çeşitli sistemlerde incelenmiştir. İçerikte bulunan laktondaki ekzo-metilen grubunun sitotoksiste için gerekli olduğuna inanılmaktadır, çünkü metilen gruba doyma veya ekleme gibi yapısal modifikasyonlar, sitotoksiste ve tümör inhibisyonu kaybına yol açmaktadır<sup>62</sup>.

Bir diğer çalışmada ise yapı-aktivite ilişkisi incelenen 28 SL'sinin yapı-aktivite ilişkisinin NF-kB aktivasyonu üzerinde ki etkisine bakılmıştır. Bilgisayar temelli bir moleküler modelleme yapılan bu çalışmada SL'lerin NF-kB üzerindeki spesifik olarak etkisi açıklanmaya çalışılmıştır ve sonuç olarak SL'lerin NF-kB üzerindeki inhibitör etkisi ortaya konmuştur<sup>63</sup>.

Bazı SL'lerin aynı zamanda NF-kB'ye ek olarak, hücre dışı sinyal iletimi içinde kritik rol oynayan MAPK yolağını hedeflediği de ortaya çıkarılmıştır<sup>64,65</sup>.

Hormonların anormal ekspresyonunun, meme kanseri gibi bazı kanserlerin gelişiminde önemli bir etiyolojik faktör olduğu iyi bilinmektedir. Hormon sentezini katalize eden bazı anahtar enzimlerin SL'lerin moleküler hedefleri olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda guaianolidler gibi bazı SL'lerin östrojen sentezinde katalitik enzim olan aromatazı inhibe edebileceğini açıklamıştır.<sup>66</sup>

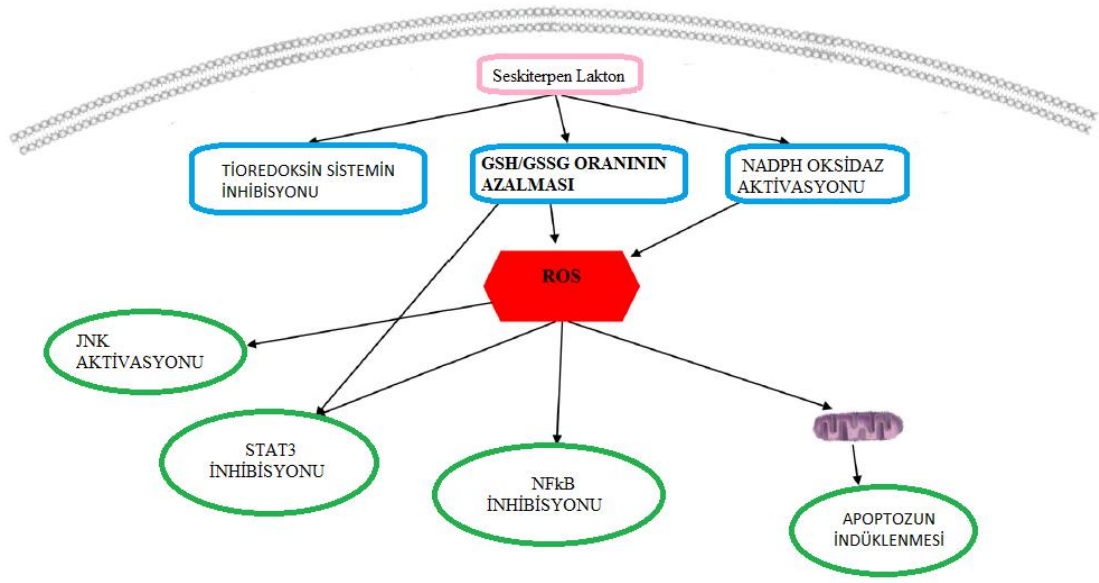
Apoptotik hücre ölüm sinyalizasyonu iki ana yolu içermektedir: hücre ölüm reseptörü yolu ve mitokondriyal yol. Hücre ölüm reseptörü yolunda, hücre ölüm sinyali, TNF ve TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) gibi hücre ölüm ligandlarının ligasyonundan kaynaklanır.

Bu ligasyon, kaspaz 8 in aktivasyonunu sağlar.Kaspaz 8'in aktivasyonu, apoptotik işlemleri yürüten kaspaz 3 gibi efektör kaspazı doğrudan hedefler. Diğer taraftan, mitokondriyal yol, DNA hasarı gibi hücre içi hücre ölüm sinyalleri tarafından tetiklenir ve sitokrom c ve Smac gibi mitokondriyal apoptotik proteinlerin salınmasını içerir.Kaspaz 3'ü aktive etmek için kaspaz 9 ve Apaf-1 ile koordinasyon içinde çalışır.Apoptozun doku homeostazını koruyabilmek için kritik olduğu ve kanser hücresiapoptozunun indüksiyonu yoluyla birçok kanser terapötik ajanın etkili olduğu iyi bilinmektedir<sup>67</sup>.

Yapılan araştırmalar, SL'ların yan zincirinin daha yüksek lipofilikliğinin hücreye daha kolay girişini sağladığını, bunun da yüksek sitotoksiste ile sonuçlandığını göstermektedir <sup>68</sup>.

Son çalışmalar SL'ların hücrenin redoks dengesinde değişikliklere ve hücrelerde oksidatif stresin azaltılmasını sağladığını göstermiştir.Oksidatif stres, içinde serbest birikmesine ve bu da kanserin yayılmasına neden olabilir. Öte yandan, serbest radikallerin artması, mitokondriyal etkiler yoluyla apoptozu indükleyebilir. Bir tip SL olan partenolid üzerine yapılan çalışmalar, bu bileşiğin, NF-kB ve STAT3 aktivasyonu P53'ün inhibisyonu yoluyla serbest radikalleri arttırdığını göstermiştir <sup>60</sup>. Yapılan bir diğer çalışma, alantolaktonun, tioredoksin redüktaz enzimini inhibe ederek antikanser ajan olarak etki ettiğini göstermiştir. Bu bileşik, enzimin okside olmuş şeklini tioredoksin redüktaz inhibisyonu ile artırır ve ayrıca serbest radikal oksijen miktarını artırarak HeLa hücrelerinde apoptozu indüklemiştir <sup>69</sup>. Yakın zamanda yapılan bir çalışma da ise partenolidinin, NADPH oksidazları aktive

ederek hidrojen peroksit üretimini arttırdığını göstermiştir. Üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde bu bileşiklerle işlemden sonraki erken saatlerde süperoksit anyonlarının ve reaktif oksijen türlerinin seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir<sup>70</sup>.

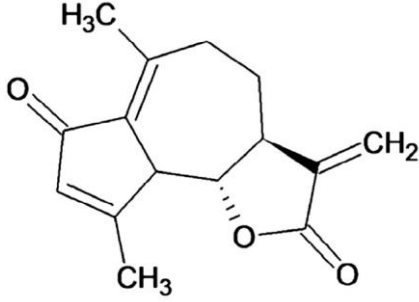


**Şekil 4:** Seskitерpen Lakton antioksidan etki mekanizması

### 2.3.1. Dehidrolökodin

Guaniolide tip bir seskitерpen lakton olan dehidrolökodin(DhL) *Artemisia douglasiana* bitkisinin ekstraktından elde edilmiştir. *Artemisia douglasiana* geleneksel kullanımda çok sık başvurulmuş bir tıbbi bitkidir. Anti-inflamatuar, anti-tümörjenik, anti-proliferatif etkileri yapılan çalışmalarla açıklanmıştır<sup>71</sup>. Yapılan bir çalışmada DhL'nin kanser hücrelerinde  $\gamma$ H2AX ve 53BP1 DNA hasar belirteçlerinin birikmesini sağladığı anlaşılmıştır. DhL ile indüklenen kanser hücrelerinin apoptoza sürüklendiği ve hızla yaşlandığı görülmüştür.

Guaianolid tip bir SL olan DhL' nin kimyasal yapısı incelendiğinde, ekosiklik alfa, beta-doymamış siklopentenon halkasına kaynaşmış olan yedi atomlu halkaya bağlı bir alfa-metilen bütirogamma halkasına sahip olduğu görülmektedir.



**Şekil 5:** Dehidrolökodin kimyasal yapısı

Faz I klinik çalışmaları devam eden bir SL olan Thapsigargin, sarko / endoplazmik retikulum kalsiyum ATPaz (SERCA) pompasının inhibisyonu ve sitokrom c 'nin mitokondrinden salınmasını içeren sinyaller yoluyla apoptozu indüklemektedir. DhL ve thapsigargin aynı siklik karbon iskeletine sahiptir. Ancak, DhL ile aktive edilen moleküler yolların sadece ER / mitokondri ve sitoplazma ile sınırlı olmadığı tespit edilmiştir. DNA hasar birikimi de apoptoz ve yaşlanma programları için tetikleyici olmaktadır <sup>71</sup>.

DhL' nin DNA ve proteinlerle etkileşime girerek etki gösterdiği bilinmektedir. İn vitro genotoksisite analizleri kullanarak DhL' nin normal lenfositlerdeki potansiyel genotoksik etkilerini incelenmiştir. 24 saat boyunca DhL' ye maruz bırakılan lenfositlerde kanser hücrelerinin aksine, test edilen hiçbir konsantrasyonda canlılıkta bir azalma görülmemiştir

<sup>72</sup>.

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. ARAŞTIRMANIN TİPİ**

Araştırma Deneysel (in vitro) laboratuvar çalışmasıdır.

#### **3.2. ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI**

Bu çalışma 10.2017 ‘de literatür taraması ile başlamış olup 11.01.2019’ da tez bitirme sınavı ile sonlanmıştır. Çalışma 9 Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı’nda tamamlanmıştır.

#### **3.3. ARAŞTIRMANIN EVRENİ VE ÖRNEKLEMİ**

Araştırmanın evreni SK-ES, HEP-G2 ve Kelly hücre hatlarıdır.

#### **3.4. ÇALIŞMA MATERYALİ**

Araştırmada hücre hatları olarak nöroblastom hücre hattı olan KELLY , Hepatoselüler karsinom hücre hattı HEP-G2 , Ewing sarkom hücre hattı SK-ES kullanılmıştır. Kimyasal ajan olarak bir seskiterpen lakton(SL) olan dehidrolökodin(DhL) , Inula viscosa bitkisinin metanol, n-hegzan, etilasetat, diklormetan ile yapılmış ekstraktları ve pediatrik tümörlerde güncel tedavide uygulanan sisplatin(CDDP) kullanılmıştır.

#### **3.5. ARAŞTIRMANIN DEĞİŞKENLERİ**

Bu çalışmada bağımlı değişken olarak canlılık değerleri, protein miktarları,apoptoz değerleri, bağımsız değişken olarak Kelly,HEP-G2,SK-ES hücre hatları, dehidrolökodin ve bitkisel ekstraktlar bulunmaktadır.

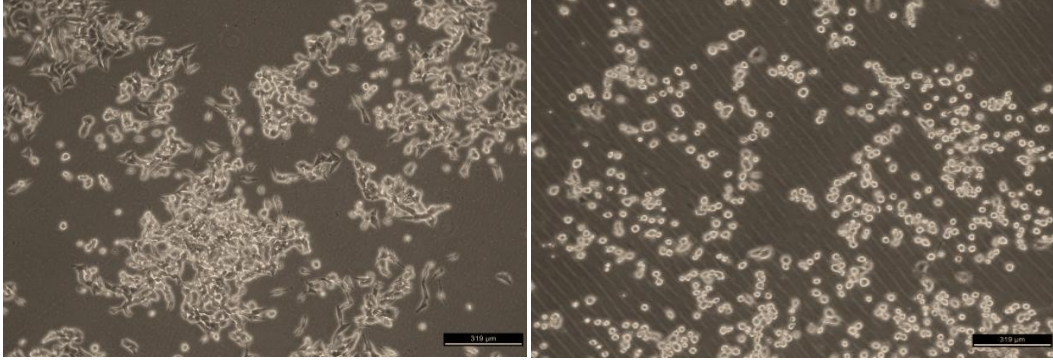
### 3.6. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI

#### 3.6.1. Hücre Kültürü

| Malzeme/Cihaz Adı                          | Marka           |
|--------------------------------------------|-----------------|
| FETAL DANA SERUMU (FBS)                    | CEGROGEN        |
| DMEM                                       | CEGROGEN        |
| PRMI 1640                                  | CEGROGEN        |
| Penisilin/Streptomisin                     | BIOCHROM        |
| Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS) (10X)  | BIOCHROM        |
| Tripsin/EDTA                               | BIOCHROM        |
| Dimetil sülfoksit (DMSO)                   | MERCK           |
| CO <sub>2</sub> İnkübatörü                 | Thermo          |
| 25 cm <sup>2</sup> 'lik Hücre Kültürü Kabı | Greiner Bio-one |
| 75 cm <sup>2</sup> 'lik Hücre Kültürü Kabı | Greiner Bio-one |
| Steril Tüp (15 mL)                         | Greiner Bio-one |
| Steril Tüp (50 mL)                         | Greiner Bio-one |
| Laminar Akımlı Kabinet                     | ESCO            |
| Derin Dondurucu -80 <sup>0</sup> C         | Thermo          |
| Buzdolabı +4 <sup>0</sup> C                | Ariston         |
| Otoklav                                    | Hirayama        |
| L-Glutamin                                 | BIOCHROM        |
| Derin Dondurucu -20 <sup>0</sup> C         | Ariston         |

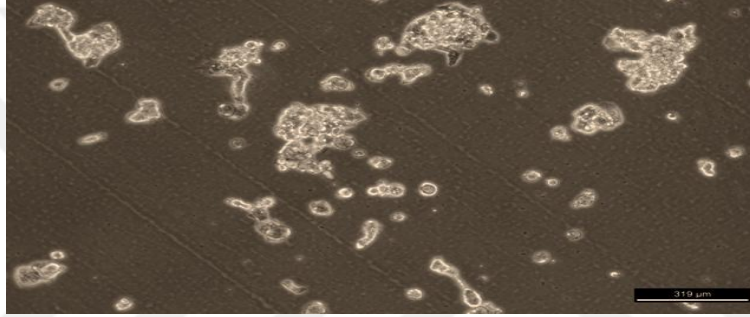
**Tablo 1:** Hücre Kültüründe kullanılan cihaz ve markalar

KELLY , SK-ES hücre hatlarında hücre kültürü için RPMI 1640 kültür ortamı içerisine %10 fetal dana serumu ilave edildi. [RPMI 1640 + 2mM Glutamine + 1% penisilin/streptomisin + 10% Fetal Bovine Serum (FBS)] HEP-G2 hücre hattı için %10 fetal dana serumu ilave edilen DMEM kültür ortamı [DMEM + 2mM Glutamine + 1% penisilin/streptomisin + 10% Fetal Bovine Serum FBS] kullanıldı. Hücreler ilk olarak 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara ekildi. Bir sonraki gün kültür kabına tutunmayan ve ölü hücreler uzaklaştırılarak hücrelerin ortamları değiştirildi. Tüm hücreler haftada 2 kez % 0.25 konsantrasyonda Tripsin/EDTA ile kültür kabından kimyasal olarak kaldırılarak pasajlandı. Hücre kültürü işlemlerinin tüm aşamaları laminar akım tip-iki kabinet içerisinde gerçekleştirildi ve hücreler %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'de inkübatörde kültüre edildi.



**ŞEKİL 6:**KELLY Hücre Hattı

**ŞEKİL 7:** SK-ES Hücre Hattı



**ŞEKİL 8:**HEP-G2 Hücre Hattı

### 3.6.2. Hücrelerin Çözdürülmesi

1. Komplete halde önceden hazırlanmış 10% FBS içeren DMEM ve RPMI ortamların kuru etüvde 37°C ısınması sağlandı.
2. Çözdürülecek olan hücreler için 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklar hazırlandı.
3. -80°C'de bulunan kriyovialler içerisindeki hücreler su banyosunda çözdürüldü.
4. Tamamen çözünmüş olan hücreler 15 mL'lik steril falkon tüplere alındı ve üzerlerine 5mL besi ortamı eklenerek pipetaj yapıldı.
5. Falkon tüpler 1300 rpm'de 7 dk santrifüjlendi.
6. Süpernatant atıldıktan sonra , dipte kalan pellet 1 ml büyüme ortamı ile süspanse edildi ve 25cm<sup>2</sup>'lik flasklara toplam hacim 5ml olacak şekilde alındı.
7. 24 saat sonra hücreler faz kontrast mikroskop ile morfolojik olarak değerlendirildi.

### **3.6.3. Hücrelerin Kültür Ortamlarının Yenilenmesi**

1. Flasklara ekimi yapılan hücreler hergün düzenli olarak mikroskop ile kontrol edildi.
2. Ortamın rengindeki sararma pH değişiminden kaynaklı olmaktadır ve hücrelere yeterli besin kalmadığı anlamına gelmektedir.
3. Sararmış olan eski ortamlar steril pipet yardımıyla flasktan uzaklaştırıldı. Canlı olmayan hücreleri uzaklaştırmak için 37°C'ye ısıtılmış steril 2% penisilin/streptomisin içeren PBS ile flasklar temizlendi.
4. Flasklara hücrelere uygun olan ortamlar steril pipet ile eklendi.
5. Hücreler % 85-90 konfluensiye ulaştığında hücreler pasaj işlemine alındı.

### **3.6.4. Hücre hatlarının Pasajlanması**

1. Flaskların içerisindeki eski ortam steril pipet ile uzaklaştırıldı ve flask PBS ile yıkandı.
2. Önceden 37°C'ye ısıtılmış Tripsin/EDTA 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara 2 mL eklendi.
3. Tripsin eklenen hücre kültür kapları yakalışık 1-2 dakika, %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'deki inkübatörde bekletildi.
4. Hücrelerin flask yüzeyinden kalktığı mikroskopta gözlemlendikten sonra Tripsin/EDTA solüsyonunu inaktive etmek için flasklara 4 mL besiy ortamı eklendi.
5. Yapılan pıptajla birlikte hücreler 15 mL'lik falkon tüplerine aktarıldı.
6. Falkon tüpler 1300 rpm'de 7 dakika santrifüjlendi.
7. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve elde edilen pellet miktarına göre hücreler besiy ortamlarıyla süspanse edildi.
8. Elde edilen hücre süspansiyonu, uygun flasklara alındı.
9. Flaskların üzerine hücre hattının adı, pasaj sayısı ve pasajlanma tarihi yazılarak hücreler 37°C'deki %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre kaldırıldı.

### 3.6.5. Hücre Hatlarının Dondurulması

1. HEP-G2 hücre hattı için DMEM + %5 dimetilsülfoksit (DMSO) + 10% FBS, Kelly hücre hattı için RPMI 1640 + 10% dimetilsülfoksit (DMSO) + 10% FBS, SK-ES hücre hattı için RPMI 1640 + 5% dimetilsülfoksit (DMSO) + 10% FBS içeren dondurma ortamları hazırlandı.
2. Süspanse edilen pelletler, en fazla  $10^6$  hücre/ml olacak şekilde kriyoviallere alındı.
3. 1 saat  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilen kriyovialler sonra  $-80^{\circ}\text{C}$ 'ye veya  $-180^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırıldı.

### 3.6.6. *Inula viscosa* Bitkisinin Ekstraksiyonu

*Inula viscosa* bitkisi Ağustos 2018 'de Manisa Spil Dağı'ndan toplanıp, tür tayini Ege Üniversitesi Botanik Bahçesi'nde Tuğkan Özdöl tarafından yapılmıştır.

1. *Inula viscosa* bitkisinin topraküstü kısımları (herba) çiçek açma döneminde (ağustos) toplanıp yabancı maddelerden temizlendi.
2. Temzilenen bitki küçük parçalara ayrılarak oda ısısında gölgede kurutuldu.
3. Kurutulan bitkisel materyal Retsch marka değirmende toz hale getirildi.
4. Kurutulup toz edilmiş bitkisel materyal total 350 g olarak tartıldı.
5. Perkolatör de metanol ile katı sıvı ekstraksiyona tabi tutuldu. Bu işlem sırasında toplam 6 litre metanol harcandı.
6. Metanollü kısım alçak basınçta rotavaporda kuruluğa kadar uçuruldu.
7. Bakiye olarak 56 g total metanol ekstresi elde edildi (Ekstre yüzde verimi: %16). Metanollü kısım  $4 \times 100$  ml N-hegzan ile ekstre edildi.
8. N- hegzan ve metanollü kısım olmak üzere iki bakiye ele geçti. (N- hegzan ekstresi yüzde verimi %16 olarak hesaplandı)
9. Metanollü bakiye 500mL suda çözülüp sırasıyla  $4 \times 100$  mL diklormetan ve etil asetat ile sıvı sıvı partisyona tabi tutuldu.
10. Çözücüler alçak basınçta kuruluğa kadar rotavaporda uçuruldu.
11. Sonuç olarak 22.64 g diklormetan ekstresi ve 15.50 g etilasetat ekstresi elde edildi.



**Şekil 9:** *Inula viscosa* bitkisinin ekstraksiyonu

### 3.6.7. DPPH Radikali Yakalama Yöntemi İle Antioksidan Aktivite Tayini

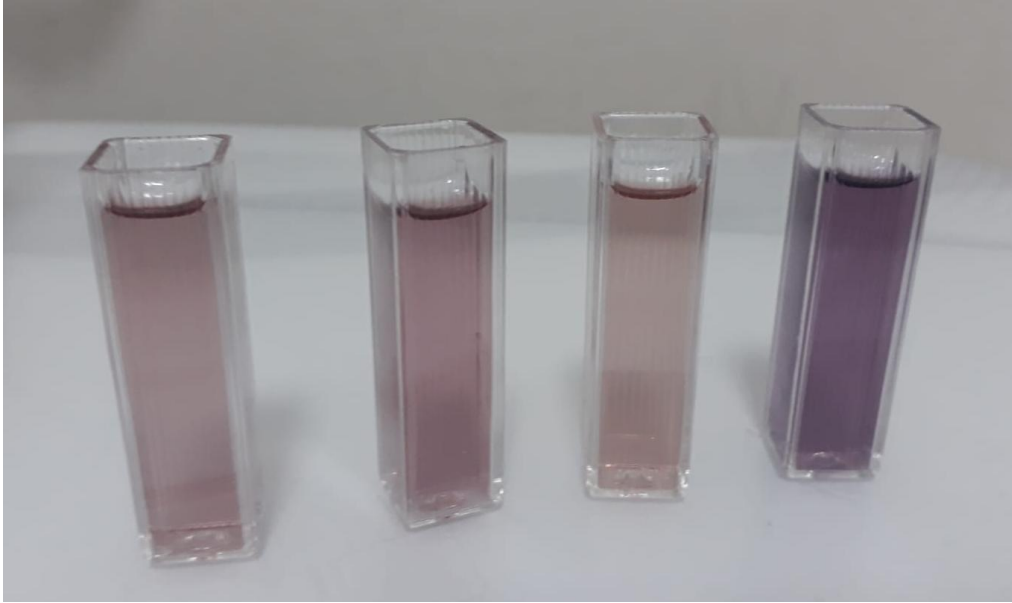
1. Tüm ekstraktlardan kendi çözücülerini ile 10 mg/ml konsantrasyonda çözelti hazırlandı.
2. Hazırlanan çözeltiden 200  $\mu$ L alınıp 1 ml'e metanol ile tamamlandı.
3. 1 ml ekstrakt üzerine 4 ml DPPH'nın stok çözeltisinden (4mg DPPH/100 ml metanol) ilave edilerek final konsantrasyonu 400  $\mu$ g /ml olacak şekilde hazırlandı.
4. Ekstrakt içermeyen kör örnek ise 1ml metanol ve 4 ml DPPH stok çözeltisi karışımı ile hazırlandı.
5. 30 dk karanlıkta bekletildikten sonra ekstraktların 517 nm dalga boyunda absorpsanları Optima SP 3000 Nano Spektrofotometresinde metanole karşı ölçüldü.

6. K r  rneęin absorbans değerine karŗı ekstraktların 517nm ' deki absorbansları kullanarak % inhibisyon değerleri hesaplandı.
7.  -tokoferol ile hazırlanan standart ölçü eğrisi kullanarak, örneklerin  -tokoferole eŗdeęer antioksidan aktivite değerleri hesaplandı.

### **% DPPH inhibisyonu: [ ( A-B/A) ] x 100**

A= K r  rneęin absorbansı

B= Ekstraktın 517nm 'deki absorbansı



**ŗekil 10:** DPPH Radikali Yakalama Yöntemi İle Antioksidan Aktivite Tayini

DPPH deneyinde k r  z lti koyu mor renklidir. Ekstraktın antioksidan değeri ne kadar yüksekse DPPH  z ltisinin rengi o kadar çok açılır.

### 3.6.8. Alüminyum Klorür Yöntemi İle Toplam Flavonoid Madde Analizi

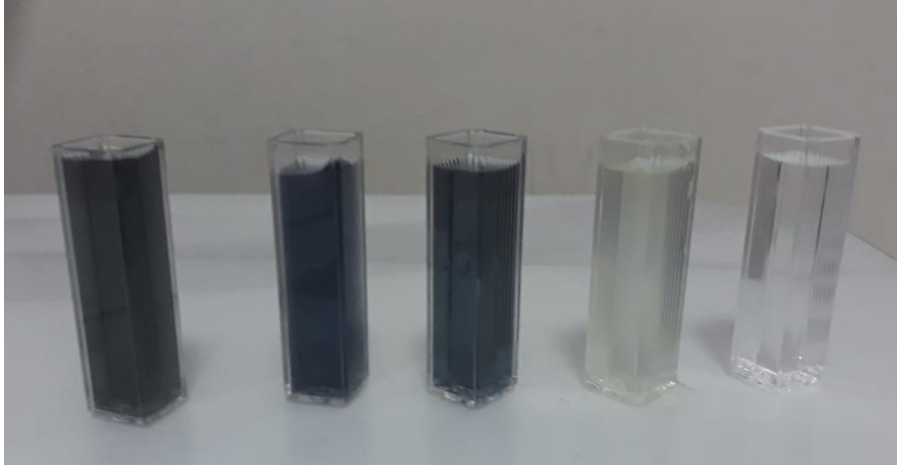
1. 10 mg/ml konsantrasyondaki örneklerden 0.5ml alındı,üzerine 1.5ml %96 etanol, 0,1ml %10 etanollü alüminyumklorür çözeltisi ve 2.8ml deiyonize su ilave edildi.
2. 40dk oda ısısında karanlıkta bekletildi.
3. 415nm dalga boyunda Optima SP 3000 Nano Spektrofotometresinde absorbensları ölçüldü.
4. Toplam flavonoid tayini de kersetin ile çizilen standart ölçü eğrisi ve hesaplanan regresyon denklemi olan  $y = 0.0274x - 0.021$  denklemine göre hesaplandı ve değerler kersetine ekivalen toplam flavonoid değerleri olarak bulundu.



**Şekil 11:** Toplam Flavonoid Madde Analizi

### 3.6.9. Folin Ciocalteu Yöntemi İle Toplam Fenolik Madde Analizi

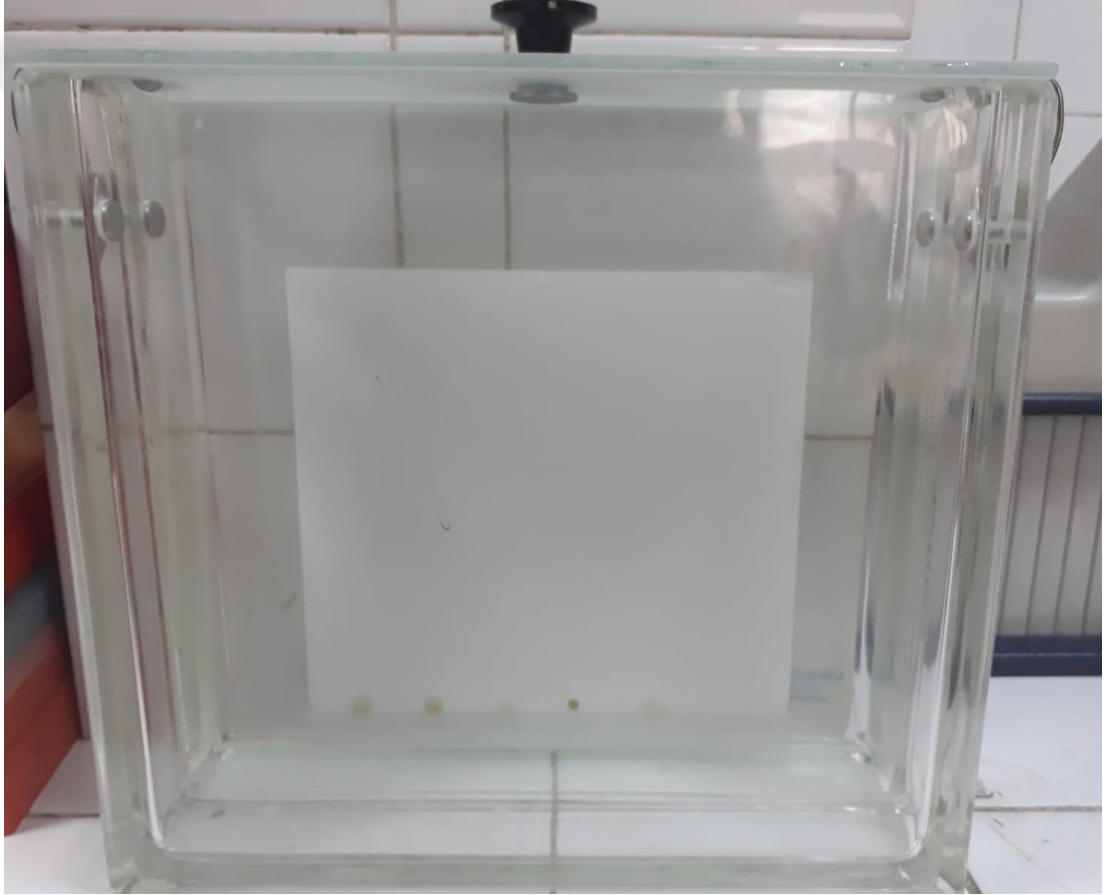
1. 10 mg/ml konsantrasyondaki örnekler üzerine, 2.8 ml deiyonize su ve 2ml %2 sodyum karbonat ilave edilip 1dk bekletildi.
2. Karışım üzerine 0,1ml %50 Folin Ciocalteu reaktifi eklenip 25°C’de 30 dk karanlıkta bekletildi.
3. Karışımın absorbansı 750 nm’de ölçüldü.
4. Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarı % olarak gallik asit ile çizilen ölçü egrisi ve regresyon denklemi olan  $y = 0.0728x + 0.1785$  ‘e göre hesaplandı.



**Şekil 12:** Toplam Fenolik Madde Analizi

### 3.6.10. İnce Tabaka Kromatografi Analizi

1. Ekstraktlar ( metanol, etil asetat, diklormetan ve hegzan fraksiyonları) Silikajel 60 F 254 İnce Tabaka Kromatografisi plağına Hamilton enjektör vasıtasıyla tatbik edildi.
2. Kloroform: metanol: su (61:32:7) çözücü sisteminde develope edildi.
3. Şahit olarak kersetin etanollü çözeltisi plağa tatbik edildi.
4. UV 254 ve 366 nm dalga boyundaki ışık altında lekeler görüntülendi ve fotoğrafları çekildi.



**Şekil 13:** Ekstraktların İTK plağındaki görüntüsü

### 3.6.11. MTT ile Hücre Proliferasyon Analizi

Farklı çözücülerle hazırlanmış *Inula viscosa* ekstraktları, dehidrolökodin ve sisplatinin hücre proliferasyonuna olan etkisi MTT (AppliChem, Lot 5H008900) ile analiz edildi.

1. Toz haldeki MTT 5mg/mL olacak şekilde PBS ile seyreltildi ve filtrenip vortekslendi.
2. 96 well-plate içerisinde ajanlarla muamele edilen hücrelerin deney süresi sonunda her bir kuyucuğuna 10 µL MTT verildi.
3. Hücreler 4 saat boyunca 37°C’de ve karanlıkta olacak şekilde inkübatöre kaldırıldı.
4. İnkübasyon süresi sonunda DMSO yıkaması yapıldı. Her kuyucuktan 50 µL içerik uzaklaştırıldı ve yerine 50µL DMSO eklendi. Well-plate 15 dakika boyunca orbital çalkalayıcıda bırakıldı.
5. DMSO yıkaması sonrasında well-plate Elisa okuyucuda 562 nm’de okutuldu ve absorbans değerleri elde edildi.
6. Elde edilen absorbanslardan örneklerin canlılığı kontrole oranlanarak verildi.

### 3.6.12. Flow Sitometrik AnnexinV FITC-PI Boyaması ile Apoptoz Analizi

Farklı çözücülerle hazırlanmış *Inula viscosa* ekstraktları, dehidrolökodin ve sisplatin apoptotik hücre ölüm oranlarının analizi için Annexin V-FITC/PropidiumIodide (PI) (BD apoptoz deteksiyon kiti) boyaması yapılmıştır.

1. Well-platelere her kuyucukta  $1 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekim yapıldı.
2. Ajan uygulamaları sonrasında deney süresi dolan hücreler platelerden hücre kazıyıcı ile kaldırıldı.
3. 1300rpm’de 7 dakika boyunca sentrifüjlendi.
4. Süpernatant uzaklaştırıldı.
5. Kitin protokolüne uygun olarak pelletler iki kez PBS ile ardından kit içerisindeki solüsyon ile yıkandı.

6. Pelletlerin üzerine 100µL solüsyon ve ardından 5 µL AnnexinV FITC ve 5 µL PI ilave edildikten sonra karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.
7. Örnekler filtreden geçirilip akımsitometri tüplerine alındı.
8. Akımsitometri cihazında AnnexinV ve PI pozitifliklerine bakıldı ve canlı hücre, apoptoz, nekropitoz oranları belirlendi.

### **3.6.13. Immunohistokimyasal Analizler**

1. Flasklarda ajanlarla muamele edilen hücreler deney süresi sonunda hücre kazıyıcı ile flask yüzeyinden kaldırıldı. 1300rpm 7 dk santirfüjlendi. Pellet yoğunluğuna göre hacimde ortamla pipetaj yapıldı.
2. Hazırlanan süspansiyondan 10 µL alınarak lizinli lamlara yayıldı.
3. Lamaların üzerindeki hücrelerin fiske olması için metanol damlatıldı ve kuruması beklendi.
4. Otomatik IHK boyama yapan Ventana Discovery cihazında gerekli protokol oluşturuldu. Bu sırada antikor uygun dilisyonda hazırlandı ve lam başına 100µL olacak şekilde uygulandı.
5. Cihaz boyama işlemini tamamladığında önce deterjan ve çeşme suyu ardından distile su ile yıkama yapıldı.
1. Yıkanan lamalar artan alkol serilerinde ( %20, %40, %60, %80 ve %100) yedi dakika bekletildi.
2. Alkol serisi tamamlandıktan sonra lamalar bir saat ksilolde bekletildi.
3. Ksilolden çıkarılan lamaların üzerine entellan ile lamel kapatılarak mikroskopta değerlendirme için hazır hale geldi.

### **3.6.14. Toluidin Mavisi ile Morfolojik Analiz**

Toluidin mavisi vital ve bazik bir boyadır. Hücrelerin ajan uygulamalarından sonra morfolojik olarak değerlendirilmesinde kullanılır.

Hücreler lamlara yayılıp fiske edildi. Viescor marka otomatik lam boyama cihazında toluidin mavisi ile boyandı.

### 3.7. ARAŞTIRMANIN TAKVİMİ

|                                      | 2017 |       | 2018 |            |      | 2019 |
|--------------------------------------|------|-------|------|------------|------|------|
| AYLAR                                | 10   | 11-12 | 1-4  | 5          | 6-12 | 1    |
| Literatür Tarama                     | X    | X     | X    |            |      |      |
| Etik Kurul İzni                      |      |       |      | 17.05.2018 |      |      |
| Ön Çalışmaların Yapılması            |      |       |      | X          |      |      |
| Veri Toplama                         |      |       |      |            | X    |      |
|                                      |      |       |      |            |      |      |
| Verilerin Analizi ve Rapor Hazırlama |      |       |      |            | X    |      |
| Tez Savunması                        |      |       |      |            |      | X    |

**Tablo 2:** Araştırma takvimi

### 3.8. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Veriler SPSS 22.0 programı ile non-parametrik Mann-Whitney-U testi kullanılarak değerlendirildi. Ortalama değerler, Student t testi ile değerlendirilip,  $P < 0.05$  istatistiksel anlamlı kabul edildi.

### 3.9. ARAŞTIRMANIN SINIRLILIKLARI

Çalışmanın *in vitro* olarak devam etmesi, *in vivo* çalışma modelinin henüz tasarlanmamış olması en temel sınırlılığı oluşturmaktadır. Diğer bir kısıtlılık ise standart madde olmayışı nedeniyle bitkisel ekstraktların bu aşamada detaylı kantitatif analizlerinin yapılamamış olmasıdır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. DPPH İle Antioksidan Aktivite Tayini Bulguları

|                             | DPPH % İnhibisyon Değerleri | $\alpha$ -tokoferole Eşdeğer Antioksidan Aktivite ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) |
|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Metanol Ekstresi</b>     | 59,50 $\pm$ 0.120           | 11,37                                                                           |
| <b>Etil Asetat Ekstresi</b> | 51,39 $\pm$ 0.069           | 9,81                                                                            |
| <b>Diklormetan Ekstresi</b> | 39,86 $\pm$ 0.490           | 7,59                                                                            |
| <b>Hegzan Ekstresi</b>      | 2,80 $\pm$ 0.075            | 0,44                                                                            |

**Tablo 3:** DPPH %inhibisyon değerleri (aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma) ve  $\alpha$ -tokoferole eşdeğer antioksidan aktivite ( $\mu\text{g} / \text{ml}$  )

Üç tekrarlı olarak gerçekleştirilen DPPH analiz sonucunda antioksidan aktivite sıralaması en yüksekten düşüğe doğru: Metanol> etilasetat>diklormetan> hegzan ekstreleri şeklinde tespit edilmiştir.

Metanol ekstresinin serbest radikal süpürücü etkisi diğer ekstrelerden daha yüksektir.

400  $\mu\text{g} / \text{ml}$  konsantrasyonda metanol ekstresi %59,50 DPPH inhibisyonu ile 11,37  $\mu\text{g} / \text{ml}$  tokofenolün yaptığı antioksidan aktiviteye eşdeğer aktivite göstermiştir.

#### 4.2. Alüminyum Klorür İle Toplam Flavonoid Madde Analizi Bulguları

Toplam flavonoid tayini kersetin ile çizilen standart ölçü eğrisi ve hesaplanan regresyon denklemi olan  $y = 0.0274x - 0.021$  denklemine göre hesaplanmış ve değerler kersetine ekivalen toplam flavonoid değerleri olarak bulunmuştur.

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| <b>Metanol Ekstresi</b>     | % 12,69 |
| <b>Etil Asetat Ekstresi</b> | %20,16  |
| <b>Diklormetan Ekstresi</b> | %8,51   |
| <b>Hegzan Ekstresi</b>      | %1,40   |

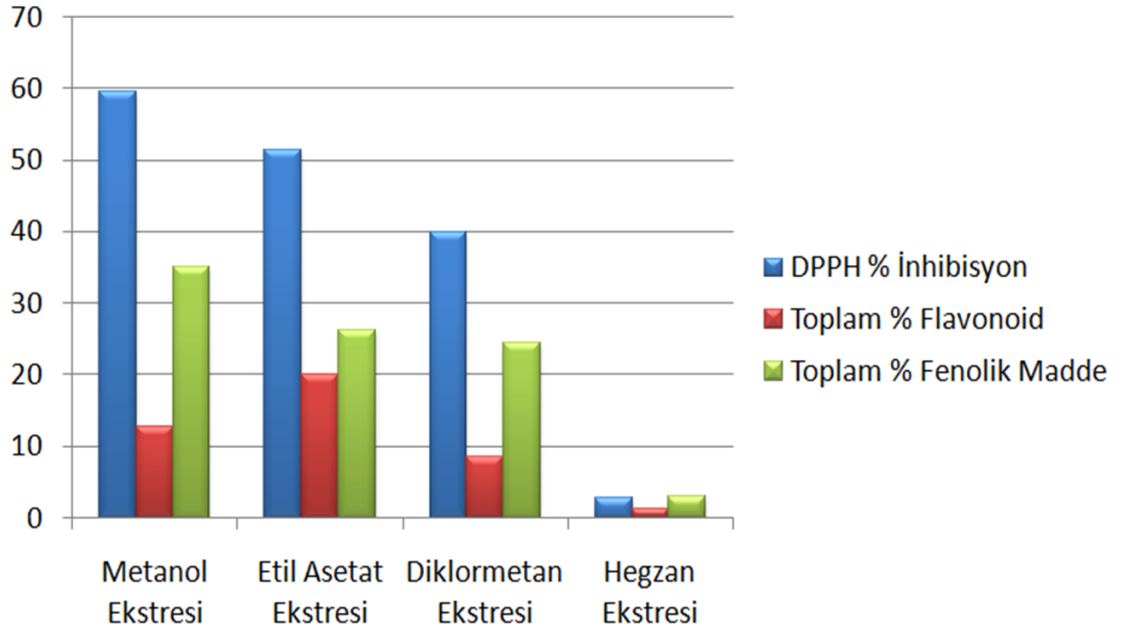
**Tablo 4:** Kersetine ekivalen toplam flavonoid % miktarları  
En yüksek toplam flavonoid miktarı etil asetat ekstresinde bulunmuştur.

#### 4.3. Folin Ciocalteu Yöntemi İle Toplam Fenolik Madde Analizi

Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarı % olarak gallik asit ile çizilen ölçü eğrisi ve regresyon denklemi olan  $y = 0.0728x + 0.1785$  'e göre hesaplandı.

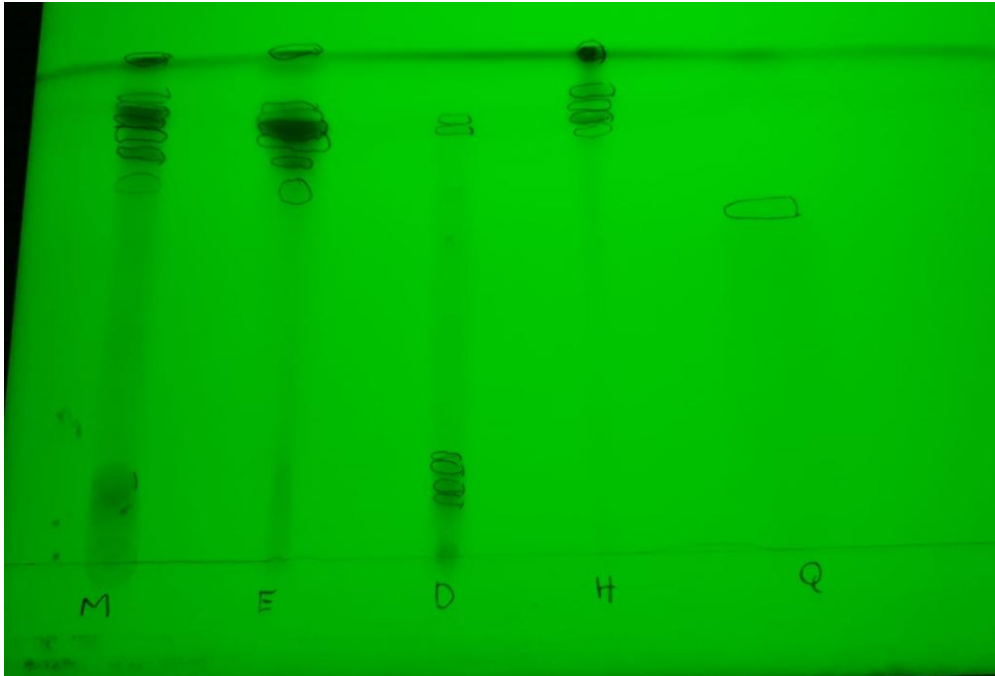
|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| <b>Metanol Ekstresi</b>     | % 35,01 |
| <b>Etil Asetat Ekstresi</b> | % 26,18 |
| <b>Diklormetan Ekstresi</b> | % 24,55 |
| <b>Hegzan Ekstresi</b>      | % 3,01  |

**Tablo 5:** Gallik asit ekivalen toplam fenolik madde % miktarları  
En yüksek fenolik madde içeriği metanol ekstresinde bulunmuştur.

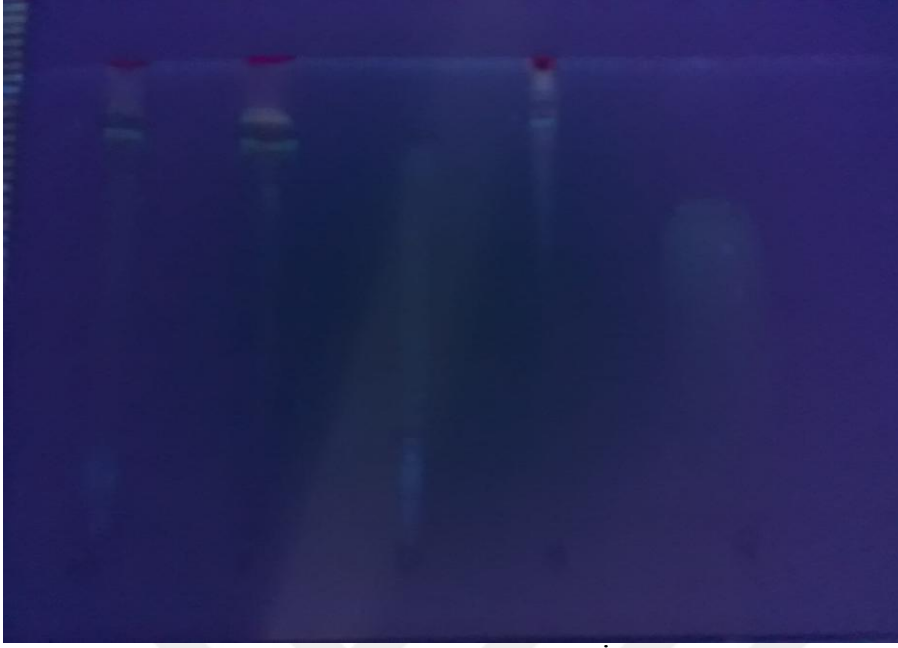


Inula viscosa ekstreleri aktivite yüzdeleri

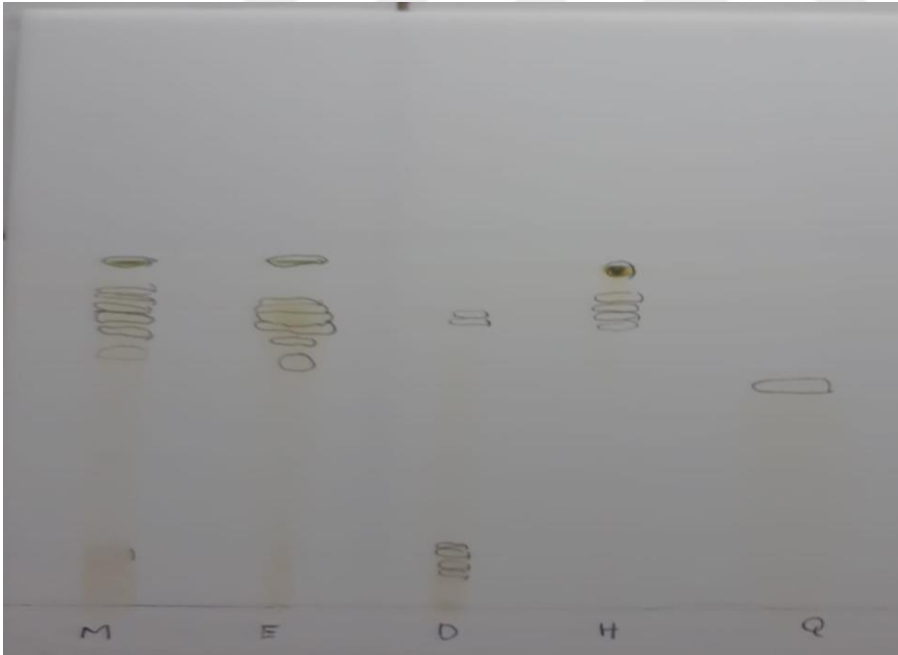
#### 4.4. İnce Tabaka Kromatografi Analizi Bulguları



Şekil 14: 254 nm dalga boyunda İTK plağının incelenmesi



**Şekil 15:** 366 nm dalga boyundaki ışık altında İTK plağının incelenmesi



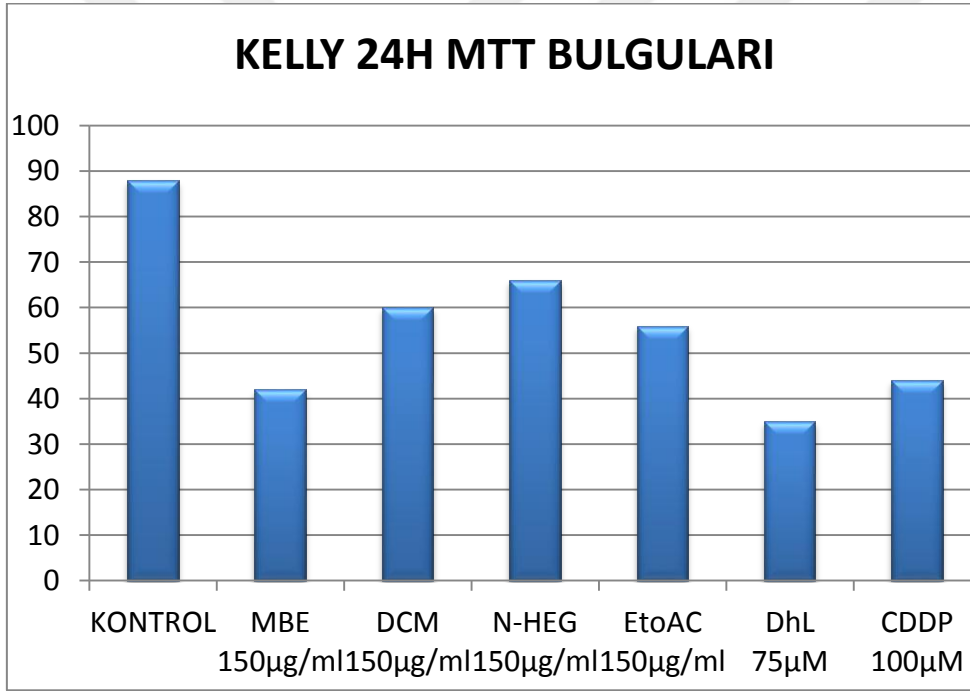
**Şekil 16:** Gün ışığında İTK plağının incelenmesi

Metanol, etil asetat, diklormetan, hegzan ve kersetin İTK profil incelemesi yapıldığında; metanol ve etil asetat için benzer İTK profiline sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu sonuç total fenolik ve flavonoid madde miktarı sonuçları ile uyum sağlamaktadır.

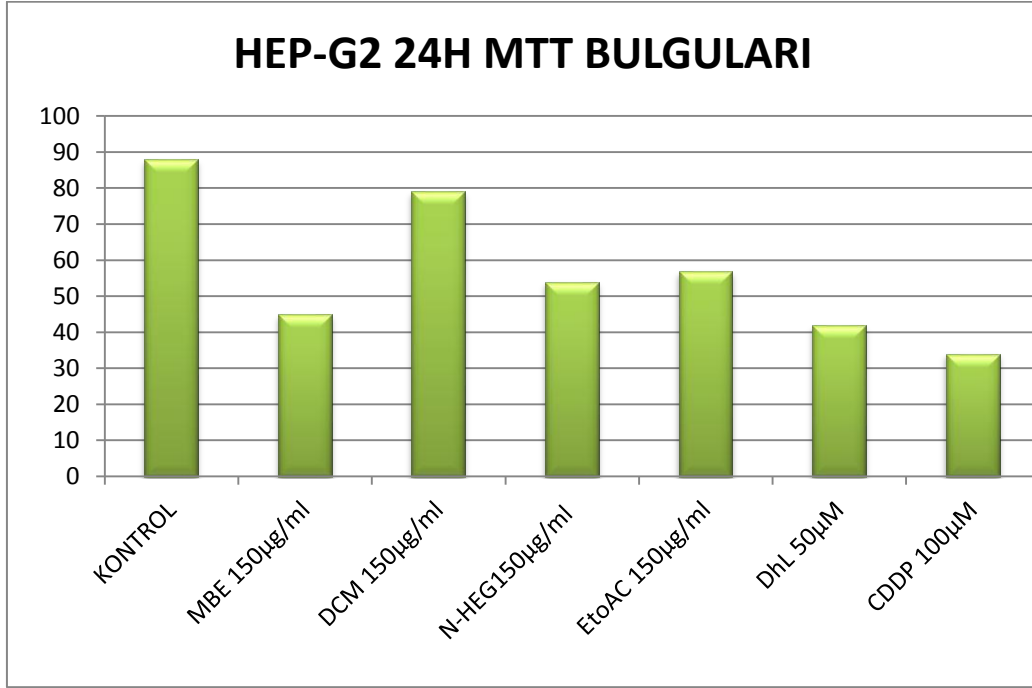
#### 4.5. MTT Bulguları

Her üç hücre hattı içinde altı farklı dozda altı farklı ajan 24 48 ve 72 saat boyunca uygulandı.

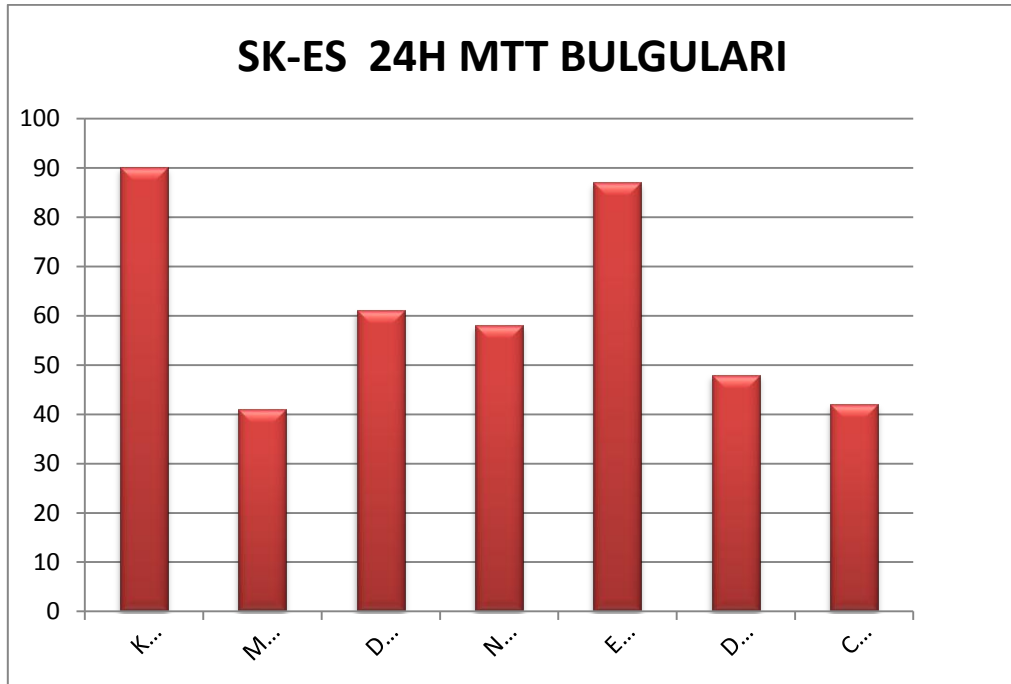
Alınan MTT sonuçlarında 24 saatin bütün hücreler için uygun olduğuna karar verildi. Metanol çözücülü ekstrakt(MBE), diklormetan çözücülü ekstrakt (DCM), n-hegzan çözücülü ekstrakt(N-HEG) ve etil asetat çözücülü ekstrakt (ETOAc) içerisinde ilk MTT sonuçlarına göre en güçlü sitotoksik etkiyi gösteren MBE ile sonraki deneylere devam edilmiştir. Gelecek çalışmada daha geniş doz aralıklarıyla tekrarlamayı planlamaktayız.



**ŞEKİL 17:..KELLY HÜCRE HATTI 24H YÜZDE CANLILIK DEĞERLERİ**



**ŞEKİL 18:** HEP-G2 HÜCRE HATTI 24H YÜZDE CANLILIK DEĞERLERİ



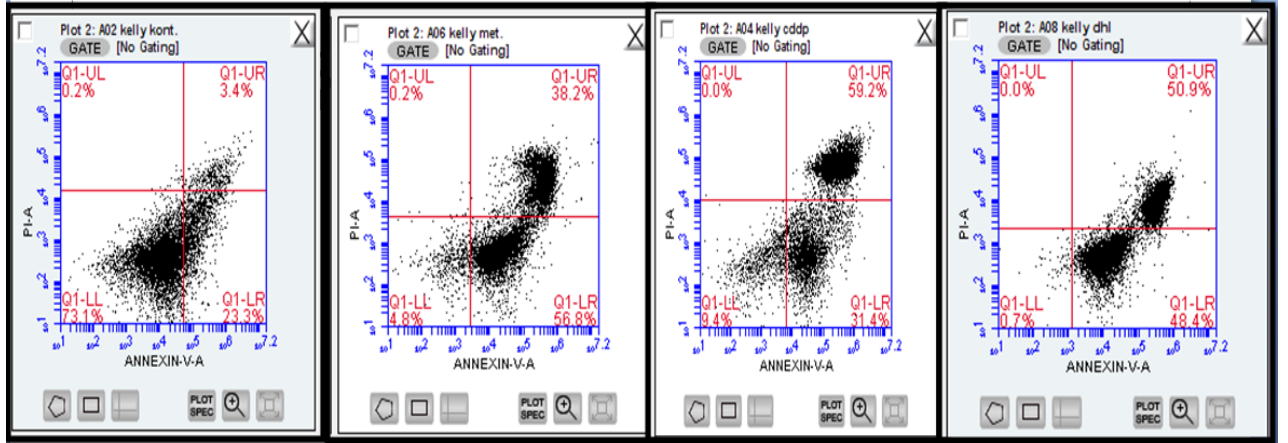
**ŞEKİL 19:** .SK-ES HÜCRE HATTI 24H YÜZDE CANLILIKDEĞERLERİ

#### 4.6. Annexin V- PI Bulguları

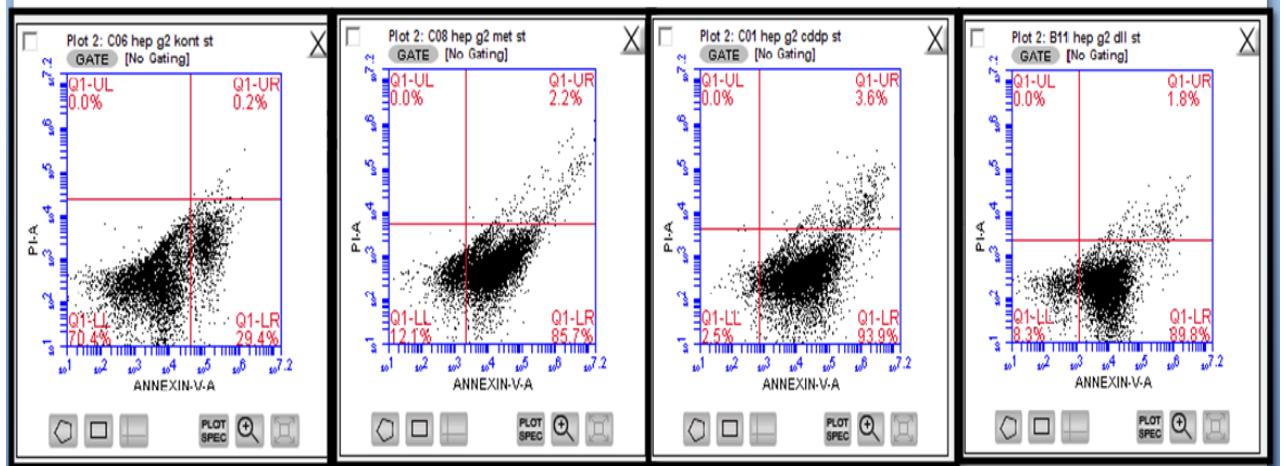
KELLY hücre hattı için; kontrol grubu CDDP ile karşılaştırıldığında CDDP için hem apoptotik(31,4%) hem de nekroptotik(59,2%) etki saptanmıştır. Nekroptotik etkinin daha fazla oluşu literatür bilgisi ile uyumludur. MBE ile CDDP karşılaştırıldığında benzer düzeyde hücre ölüm oranı tespit edilmiştir.MBE ‘nin hem apoptotik(56,8%) hem de nekropitotik (38,2%) etki gösterdiği ve apoptoz oranının CDDP den yüksek olduğu tespit edilmiştir. DhL ile CDDP karşılaştırıldığında ise DhL’nin hem apoptotik (48,4%) hem de nekropitotik (50,9%) etkisi olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda hem MBE hem de DhL’nin yüksek apoptoz ve nekroptoz oranlarıyla agresif N-MYC+ kelly hücre hattı için anti-kanser etkisi kanıtlanmış oldu.

HEP-G2 hücre hattı için ; kontrolde var olan canlılığın (70,4%) uygulanan ajanlar ile belirgin biçimde azaldığını gördük. CDDP’ nin canlılığın azalmasına etkisinin belirgin biçimde apoptoz (93,4% ) üzerinden olduğu tespit edilmiştir. MBE ve DhL içinde var olan etkinin apoptoz üzerinden olduğu tespit edildi. HCC için MBE ve DhL ‘nin anti-tümöral etkisi ortaya konmuş oldu. Karaciğerde bulunan bir kanserin belirgin olarak apoptotik yolağı kullanarak yok edilmesi, nekrotik fragmanların çok fazla ortaya çıkmamış olması HCC anti-kanser ajan adayı olarak MBE ve DhL’ye dikkat çekmektedir.

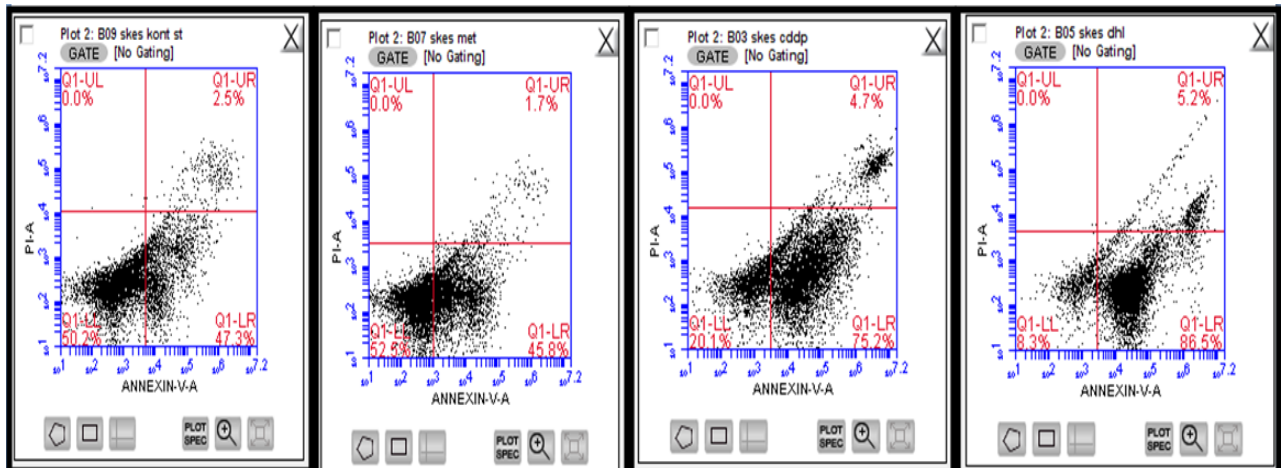
SK-ES hücre hattı için ; CDDP , MBE ve DhL’nin hücre canlılığı azaltma yönündeki eğilimlerine bakıldığında, CDDP etkin olarak bulunmuştur ve bu etkisini apoptoz (75,2%) üzerinden sağladığı tespit edilmiştir. DhL’inde belirgin olarak canlılığı düşürdüğü ve bu etkisini apoptoz (86,5%) üzerinden gerçekleştirdiğini tespit ettik. MBE için bakıldığında ise hücre ölümünü daha az oranda sağladığı bulunmuştur. MBE için gelecek çalışmalarda daha geniş doz aralığı kullanarak tekrarlanması ve toksik doz sınırlarının çalışılması planlanmıştır.



ŞEKİL 20: KELLY hücre hattı apoptoz ve nekrotoz oranları



ŞEKİL 21: HEP-G2 hücre hattı apoptoz ve nekrotoz oranları



Şekil 22: SK-ES hücre hattı apoptoz ve nekrotoz oranları

#### 4.7. Immünohistokimya Bulguları

Immunohistokimya(IHC) analizi için ; Kİ67 proliferasyon indeksi

Kaspaz 3 tipik ortak apoptoz belirteci<sup>73</sup>

Kaspaz 8 ekstrinsik apoptoz belirteci

Kaspaz 9 intrinsik apoptoz belirteci

**Tablo 6 : KELLY hücre hattı için % pozitiflik oranları**

|                 | KONTROL | CDDP | MBE | DhL |
|-----------------|---------|------|-----|-----|
| <b>Kİ67</b>     | 50%     | 3%   | 20% | 20% |
| <b>KASPAZ 3</b> | 3%      | 90%  | 70% | 60% |
| <b>KASPAZ 8</b> | 5%      | 90%  | 10% | 60% |
| <b>KASPAZ 9</b> | 2%      | 80%  | 20% | 25% |

Kelly için Ki67 proliferasyon indeksine bakacak olursak aday ajanlarımızın CDDP'ye göre proliferasyonu daha az azalttığı asıl etkiyi hücreleri apoptoza sürükleyerek yaptığı düşünülmektedir. Proliferasyon indekslerinin CDDP'ye göre daha düşük olması kemoterapi ile kombine tedavi modellerinde daha etkili olacağını düşündürmektedir.

Ortaya çıkan apoptotik etkinin hangi yolak üzerinden olduğunu sorguladığımızda CDDP literatüre uygun olarak hem intrinsik hem ekstrinsik yolları kullanmaktadır. DhL ekstrinsik , MBE için daha çok intrinsik yolağı kullandığı belirlenmiştir.

**Tablo 7 : HEP-G2 hücre hattı için % pozitiflik oranları**

|                 | KONTROL | CDDP | MBE  | DhL |
|-----------------|---------|------|------|-----|
| <b>Ki67</b>     | 60%     | 10%  | 20%  | 20% |
| <b>KASPAZ 3</b> | 20%     | 45%  | 55%  | 40% |
| <b>KASPAZ 8</b> | 20%     | 20%  | 20%  | 30% |
| <b>KASPAZ 9</b> | 20%     | 80%  | 100% | 70% |

HEP-G2 için Ki67 proliferasyon indeksine baktığımızda kontrole göre her üç ajanda benzer oranda proliferatif azalma gözlemlenmiştir.

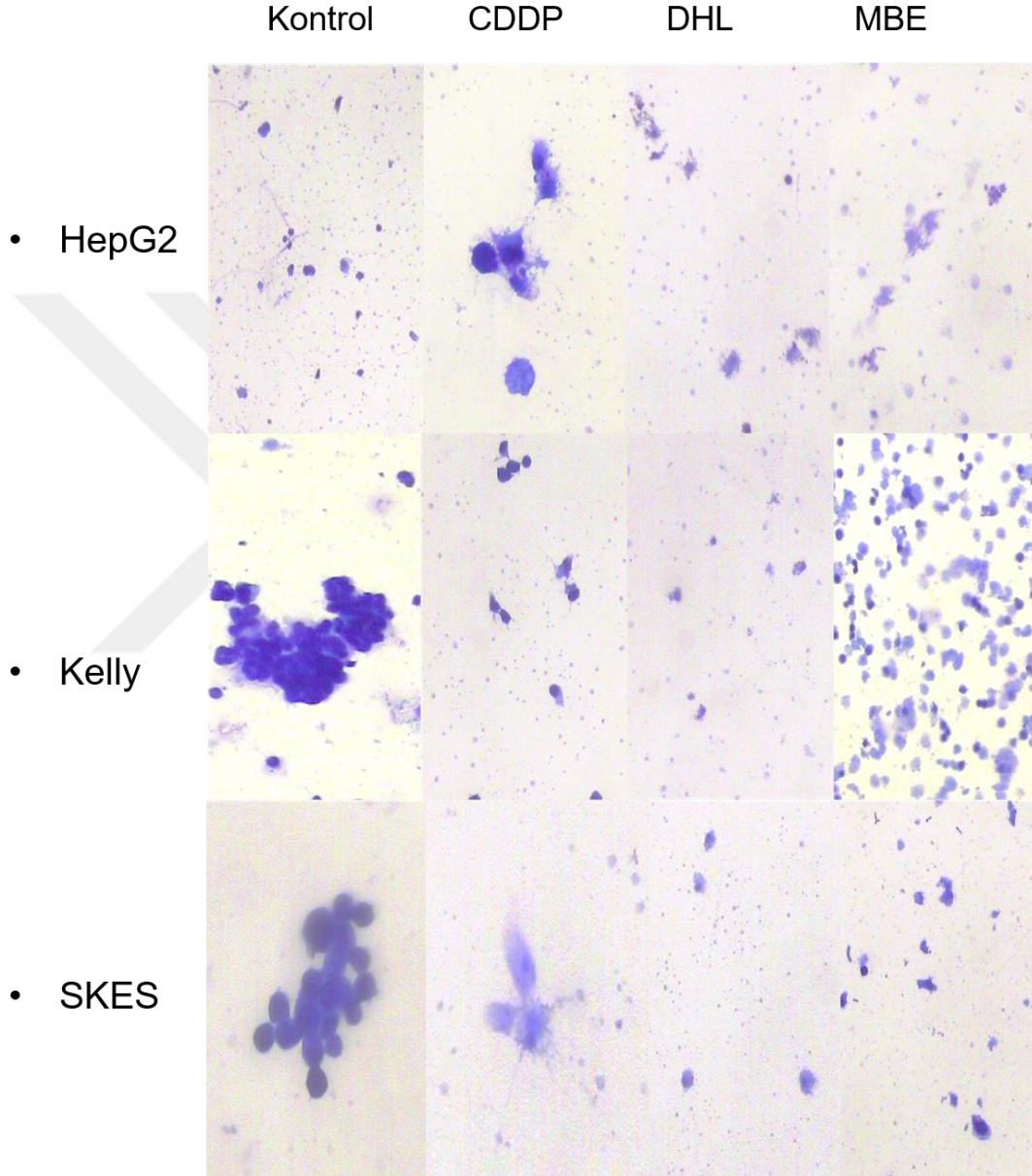
Kaspaz 3,8,9 için değerlendirme yapıldığında her üç ajanında intrinsik apoptotik yolağı kullandığı görülmektedir.

**Tablo 8 :SK-ES hücre hattı için % pozitiflik oranları**

|                 | KONTROL | CDDP | MBE | DhL |
|-----------------|---------|------|-----|-----|
| <b>Ki67</b>     | 60%     | 20%  | 40% | 30% |
| <b>KASPAZ 3</b> | 10%     | 50%  | 30% | 20% |
| <b>KASPAZ 8</b> | 5%      | 60%  | 5%  | 30% |
| <b>KASPAZ 9</b> | 4%      | 90%  | 80% | 90% |

SK-ES hücre hattı için Ki67 proliferasyon indeksine baktığımızda CDDP'nin hücre proliferasyonunu azalttığını, apoptotik etkisini daha çok intrinsik yolağı kullanarak yaptığını, DhL ve MBE 'nin de proliferasyonu kontrole göre azalttığını fakat CDDP kadar belirgin bir azalma olmadığını, hücre ölümünü intrinsik apoptotik yolak üzerinden gerçekleştirdiğini gözlemledik.

#### 4.8. Toluidin Mavisi Bulguları



**ŞEKİL 23:** Toluidin Mavisi Boyası ile madde uygulama sonrası her üç hücre hattında hücrelerin morfolojik görünömleri.

(CDDP: Sisplatin, DHL: Dehidrolökodin, MBE: metanol çözöcölü bitkisel ekstrakt)

## 5. TARTIŞMA

Çocukluk çağında kanser erişkinlerde görülen kanserlere kıyasla nadirdir, ancak bebeklikten 15 yaşına kadar olan çocuklar arasında yaralanmalar dışında herhangi bir faktörden daha fazla ölüme neden olmaktadır. Yıllık çocukluk kanseri insidansı son 30 yılda azda olsa artış göstermiştir ; Bununla birlikte, ölüm oranları , büyük ölçüde tedavideki gelişmelerden dolayı birçok kanser için önemli ölçüde azalmıştır <sup>6869</sup>. Seskiterpen laktonlar, yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda kanser hücresi üzerindeki sitotoksitesisi ve antineoplastik etkinliği dahil olmak üzere güçlü biyoaktiviteleri nedeniyle sıklıkla çalışmalarda kullanılan bitkilerin sekonder metabolitleridir.<sup>70</sup>

*Inula* cinsinin üyeleri, halk arasında şifalı bir bitki olarak bilinmekte ve eski zamanlardan beri kullanılmaktadır. Bu cinsin üyeleri, antioksidan, antienflamatuar, antiviral, antibakteriyel, antifungal, antitümör, antidiyabetik, antiastımatik, anti-alerjik ve sitotoksik özellikleri de dahil olmak üzere uzun bir tıbbi kullanım listesine sahiptir <sup>717211</sup>.

*Inula viscosa* halk arasında yapışkan andız otu ya da kanser otu olarak isimlendirilmektedir. Yapılan çalışmalar anti-tümör aktivitesini farklı kanser türleri için ortaya koymuş olmasına rağmen uygulanma şekli ve dozu açısından ciddi problemler vardır.

Güncel tedavide kullanılan bir çok ilacın bitkilerden elde edildiğini düşündüğümüzde ise bilinçsiz şekilde bitkilerin kullanılmasının beklenen pozitif etkisinin aksine negatif etkiler yaratabileceği açıkça görülmektedir.

Örneğin bir kanser hastasının *Inula viscosa* bitkisinin çayını kullanması kemoterapide kullanılan ilaçlarla antagonistik bir etki yaratarak hastanın kaybedilmesiyle sonuçlanabilir. Bu yüzden özellikle de halk arasında alternatif tedavi olarak sıklıkla kullanılan bitkilerin moleküler mekanizmalarının çalışılması, ilaç etkileşimlerinin saptanması ve klinik kullanıma uygun duruma gelmesi oldukça büyük önem taşımaktadır.

Isil Bavunoglu ve ark. 2018 yılında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nde bitkisel ürünlerin kullanımının kanser tedavileri üzerindeki olumsuz etkileri konusunda farkındalık yaratmak için yaptığı vaka çalışmasında <sup>74</sup>, 40 yaşında kadın hasta yüksek ateş,

halsizlik ve uyku hali nedeniyle hastaneye yatırıldı. Tıbbi öyküsüne göre myometrial sarkom ve cerrahi operasyonu kaydedildi. Herhangi bir kemoterapötik tedavi olmadan sürekli nötropeni, durumunu şüpheli hale getirdi. Hasta yapılan görüşmeler sonucunda bitkisel bir ürünü kanser ilacı olarak kullandığını itiraf etti. Bitkiden alınan örnek için toksikolojik analiz yapıldı. Ekstraksiyondan sonrasında, ince tabaka kromatografisi numuneye uygulandı, daha sonra saflaştırılmış madde, Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi ile analiz edildi. Bulunan ana bileşiklerden biri, *Inula viscosa* nın varlığını gösteren Inuviscolide' dir. Bu bitkinin düzenli kullanımı muhtemelen miyelosüpresyona ve nötrofillerin apoptozisine yol açmıştır. *Inula viscosa* nın anti-kanser, anti-bakteriyel, sitotoksik etki gibi birçok özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. Fakat bu tarz oldukça aktif metabolitler içeren bitkilerin bilinçsiz kullanımının bitkinin terapötik etkilerinden daha zararlı etkiler yaratabileceği dikkate alınmalıdır. Durumdan da anlaşılacağı gibi, bir bitkinin klinik çalışmaları belirli bir hastalık için etkili sonuçlar sunsa bile, o bitki her zaman bu hastalığın her türü için uygun değildir. Bu nedenle hastalar, özellikle kanser gibi ölümcül hastalıklarda bitkisel ürünlerin kullanımı konusunda daha dikkatli olmalıdırlar. Öte yandan, doktorlar, hastaların hayatlarını kurtarmak veya uzatmak için çok önemli olacak bitkisel ürün kullanımı konusunda daha fazla farkındalık yaratmalıdır. Olumsuz etkilerin ortadan kaldırılması için bitkisel ilaç pazarı ile ilgili yeni mevzuat ve standartlar oluşturulmalıdır. Buna ek olarak, sözde satılan ürünlerin satış ve reklamlarının çoğunun bu durumda olduğu gibi internet üzerinden yapılması da dikkate alındığında, tanıtım web sitelerini kapsayan gerekli düzenlemelerin yapılması farkındalıkta önemli bir adım olacaktır. Son olarak, bu vakada hekime danışmadan *Inula viscosa* kullanımı, anti-tümör terapisinde bir gecikmenin yanı sıra ciddi bir tıbbi duruma neden olmuştur.

Bu çalışma için çok sayıda aktif SL'lar içerdiği literatürde kanıtlanmış olan *Inula viscosa* bitkisinin kullanılmasının temel amacı budur. Üstelik farklı kanserler için etkinliği kanıtlanırsa bile çocukluk çağında *Inula viscosa* ve SL'lerin etkisiyle ilgili literatür çalışması yapıldığında bu konuda doldurması gereken ciddi bir boşluk olduğu görülmektedir. *Inula viscosa* bitkisinin farklı çocukluk çağı kanserleri üzerinde anti-kanser etkileri yaptığımız ilk çalışmalar ile kesinleşmiş olup hedef bir tedavi ajanı ya da kombine bir tedavi hedefinde kullanılabilineceğini kanıtlamıştır.

Bu çalışmanın amacı; çocukluk çağı kanserlerinde SL’lardan; dehydroleucodine(DhL) ve yapısında aktif olarak çok miktarda SL’lar bulunan *Inula viscosa* (Yapışkan Andız Otu) bitkisinin ekstraktlarının etkisini sisplatin (CDDP) ile karşılaştırılmalı olarak araştırmaktır.

CDDP, iyi bilinen bir kemoterapötik ilaçtır. Mesane, baş ve boyun, akciğer, yumurtalık ve testis kanserleri dahil olmak üzere birçok insan kanserinin tedavisi için kullanılmaktadır. Karsinomalar, germ hücreli tümörler, lenfomalar ve sarkomlar dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerine karşı etkilidir. CDDP, DNA’daki pürin bazlarıyla çapraz bağlanma yaparak, DNA onarım mekanizmalarına müdahale etmekte, DNA hasarına neden olmakta ve daha sonra kanser hücrelerinde apoptozu indüklemektedir. Fakat ilaç direnci başta olmak üzere, şiddetli böbrek problemleri, alerjik reaksiyonlar, enfeksiyonlara karşı bağışıklık, gastrointestinal bozukluklar, kanama ve işitme kaybı gibi sayısız istenmeyen yan etkisi bilinmektedir<sup>75</sup>.

Çocukluk çağı kanserlerinde CDDP kaynaklı ototoksikite genellikle ilk önce yüksek frekansları etkileyen bilateral ve simetrik sensorinöral işitme kaybıdır. Oluşan bu sitotoksikite geri dönüşümsüzdür, CDDP uygulamasından hemen sonra ortaya çıkar ve ilacın tekrarlanan dozlarından sonra kötüleşir<sup>76</sup>.

CDDP gösterdiği ototoksik etkilere rağmen, çocukluk çağı kanserleri için hala klinikte kullanılan etkinliği kanıtlanmış bir kemoteropatik olduğu için aday ajanlarımızın etkilerini karşılaştırma amaçlı olarak kullanılmıştır.

Ağustos 2018’ de Manisa Spil Dağı’ndan toplanan *Inula viscosa*’nın toprak üstü kısmı metanol, n-hegzan, etil asetat ve diklormetan ile farklı ekstraktları katı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle elde edildikten sonra antioksidan aktivite, toplam flavonoid madde miktarları ve toplam fenolik bileşik oranları incelenip bu sonuçlar İTK ile de konfirme edilmiştir. Analizleri yapılan ekstraktlar üç farklı çocukluk çağı kanseri üzerinde en etkin sitotoksik etkiyi göstereni saptanmak üzere farklı dozlarda üç tekrarlı olarak çalışılmıştır. Yapılan MTT analizi sonucunda metanollü bitki ekstraktı (MBE) en etkin anti-proliferatif etkiyi göstermiştir. Kimyasal içerik analizlerinin de MBE nin en çok aktif bileşeni içerdiğini ortaya koymuş olup ilk aşama çalışmaları için uygun olduğu tespit edilmiştir.

Kelly NB hücre hattı için yapılan incelemelerde hem DhL hem de MBE' nin hücre ölümünü bariz olarak tetiklediği görülmüştür.

SK-ES hücre hattı için yapılan incelemelerde DhL'nin CDDP'den bile daha fazla apoptoza neden olduğu, MBE için bakıldığında ise hücre ölümünün olduğu, sitoplazmik ve nükleer membranın bütünlüğünün bozulduğu dağılmış hücreler gözlemlenmiştir.

HEP-G2 hücre hattı için yapılan incelemelerde CDDP ile proliferasyonun ve selülitinin azaldığı, DhL ve MBE içinse MBE'nin DhL ye göre hücreleri daha çok apoptoza sürükleyip öldürdüğü görülmüştür.

Farklı hücre hatları için aynı dozlar uygulandığında MBE ve DhL için farklı sonuçlar alındığı gözlemlenmiştir. Farklı hücre hatları için eksprese edilen proteinlerin ve devrede olan moleküler mekanizmaların farklı olduğunu düşünecek olursak bu mekanizmaların tam olarak ifade edilmesi yapılacak olan aday ajan denemeleri için daha başarılı sonuçlar sağlayacaktır.

Güncel literatürde *Inula viscosa*, SL' lar ve DhL ile farklı hücre hatlarında yapılmış bir çok çalışma bulunmaktadır. Bu hedef ajanların çocukluk çağı kanserlerinde ki etkilerinin anlaşılması için bu çalışmalar büyük önem taşımaktadır. Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar incelenecek olursa ;

Akram Ghantous ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada <sup>10</sup>SL'lerin klinik kullanımında yapılan çalışmaları üzerinde durulmuştur. SL'ların kanser ilacı keşfinde umut verici adaylar olmasına rağmen SL'ların bazı dezavantajlara sahip oldukları açıklamıştır. İzolasyonlarının sınırlı doğal ürün kaynaklarına dayanıyor olması, plazma proteinleriyle çok fazla etkileşim gösteriyor olmaları ve hidrofobiklikleri nedeniyle zayıf biyoyararlanıma sahip olabilecekleri vurgulanmıştır. Ek olarak SL'lerin, hayati öneme sahip protein ve proteinlerin tiyol gruplarıyla etkileşimi yoluyla alerjik özelliklere ve hedef dışı etkilere sahip olabileceği, bu yüzden daha fazla SL'nin formülasyonunun ortaya konulabilmesi için farmakologların, kanser araştırmacılarının ve klinisyenlerin yakın işbirliği yapması gerektiği belirtilmiştir.

| <b>SESKİTERPEN LAKTONLARIN KLİNİKTEKİ YERİ</b> |                                                                                                   |                                                                                          |
|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>SL Türevi</b>                               | <b>Etki Ettiği Kanser</b>                                                                         | <b>Klinik Çalışması</b>                                                                  |
| <b>Artemisinin</b>                             | Metastatik meme kanseri<br>Kolorektal kanser                                                      | ClinicalTrials.gov:<br>NCT00764036<br>Colorectal cancer<br>Isrctn.org:<br>ISRCTN05203252 |
| <b>Artesunate</b>                              | Küçük hücreli dışı akciğer kanseri<br>Metastatik uvea melanomu<br>Larink skuamöz hücreli karsinom | 78<br>79<br>80                                                                           |
| <b>Arthemether</b>                             | Hipofiz makroadenom                                                                               | 81                                                                                       |
| <b>Dimethyl-aminoparthenolide (LC-1)</b>       | Akut lenfoblastik lösemi<br>Akut myeloblastik lösemi                                              | 82                                                                                       |
| <b>Thapsigargin (G-202)</b>                    | Solid Tümörler                                                                                    | ClinicalTrials.gov:<br>NCT01056029                                                       |

**Tablo 9 :** Seskiterpen Laktonların Klinikteki Yeri

1999 yılında Peter Rüngeler ve ark. yaptığı çalışmada SL'lerin NF- $\kappa$ B aktivasyonunu inhibe ettiği, farklı yapıda ki SL'lerin değişik inhibitör aktivite gösterdiği tespit edilmiştir <sup>63</sup>.

Keiichi Tabata ve ark. 2015 yılında yaptığı çalışma<sup>83</sup> bizim çalışmamız açısından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada *Saussurea lapa* bitkisinden elde edilen dehidrocostus lakton ve costunolidin isimli SL'ların nöroblastom üzerinde ki etkisini araştırmaktadır. Her iki bileşik de nöroblastom hücre hatları IMR-32, NB-39, SK-N-SH ve LA-N-1'e karşı sitotoksik aktivite göstermiştir. SL ile muamele sonucunda nükleer yoğunlaşma ve membran inversiyonu gibi hücresel apoptozun kanıtları gözlenmiştir. Her iki bileşiğin de, kaspaz-7 aktivasyonu ve PARP klevajını uyardığı Western blotlama ile kanıtlanmıştır. Ayrıca, SL'lerin hücrelerin invazyon ve migrasyon yeteneklerini baskıladıkları gözlenmiştir. Bu sonuçlar dehidrocostus lakton ve costunolidin, nöroblastoma karşı etkili yeni anti-kanser ajanlar olarak geliştirilmeleri için umut verici adaylar olduğunu göstermektedir.

Martin Chadwick ve ark. 2013 yılında yaptığı çalışmada,<sup>9</sup> farklı SL'ların bitki ve insanlara olan faydaları incelenmiştir. Bu çalışmada JNK ve p38 aktivasyon yollarının bir SL olan parthenolid tarafından engellenmediğini fakat MAPK/MEKK1 sinyal yolunun çalışmasının engellendiği belirtmiştir. Memeli tümörlerinin yaklaşık %30'u MAPK / MEKK1 yolu ile etkiyen Ras protoonkojen mutasyonlarını içerdiği için bu önemli bir buluştur.

Katarzyna Gach ve ark. 2012 yılında yaptığı çalışmada <sup>60</sup> SL'ların anti-kanser aktivitesinin oksidatif stres ile olan bağlantısı çalışılmıştır. Mitokondriyal bağımlı yolla apoptozu başlatan reaktif oksijen türleri (ROS), kanserde üretilebiliyorsa kanser hücrelerini öldürmek için de kullanılabilir olduğu düşünülmektedir. Hücrelerdeki redoks dengesinin en önemli düzenleyicilerinden biri azaltılmış glutatyondur (GSH). Kanser hücrelerinde GSH düzeyleri normal hücrelere göre daha yüksektir. Bu nedenle SL, hücre içi GSH seviyelerini azaltarak kanser hücrelerinin apoptozunu indükleyebilir. Hücre içi redoks sinyal yollarını etkileyebilecek SL kullanımının, kanser tedavisi için ilginç bir yaklaşım olarak kabul edilebilir olduğu açıklanmıştır.

Sharon Rozenblat ve ark. 2008 yılında yaptığı çalışmada <sup>84</sup>*Inula viscosa* bitkisinden elde ettiği SL' lar olan Tomentosin ve Inuviscolide' nin melanom hücrelerinde ki anti-kanser etkisi araştırılmıştır. Bu SL' ların , G2 / M'de hücre döngüsünün durmasına neden olduğu ve apoptotik hücre ölümünün göstergesi olan G0 fraksiyonunun ortaya çıktığı belirtilmiştir. Apoptozun indüksiyonu, membran fosfolipidlerindeki değişiklikler, mitokondriyal membran potansiyelindeki değişiklikler ve kaspaz-3 aktivitesinin saptanmasıyla da doğrulanmıştır.Tomentosin veInuviscolide ile apoptozun indüklenmesinin farmakolojik değeri yüksektir ve bu SL 'ların melanom tedavisi için yeni ajanlar olarak geliştirilebileceği anlamına gelmektedir.

2007 yılında Fontana ve ark. yaptığı çalışmada<sup>85</sup>*Inula viscosa* ' nın seskiterpenik bileşikleri irdelenmiştir. Yapısında aktif olarak İzokostik asit, Carabrone ve Tomentosin ve iki yeni seskiterpenik bileşik, 2,5-dihidroksi-izokostik asit ve 2,3-dihidroksi kostik asit tespit edilmiştir.

Nawal Merghoub ve ark. 2016 yılında yaptığı çalışmada <sup>86</sup> telomerazın, insan papilloma virüsü (HPV) pozitif rahim ağzı kanserinde aktive edilmesi ve telomerlerin hedeflenmesinin yeni bir anti-kanser terapötik hedefi sunduğu vurgulanmaktadır. Bu çalışmada, *Inula viscosa* ekstraktlarından heksan (IV-HE) ve diklorometan (IV-DF) fraksiyonlarının proapoptotik etkileri, sitotoksik ve telomer hedefleme özellikleri insan servikal HeLa ve SiHa kanser hücreleri üzerinde incelenmiştir. Veriler, IV-HE ve IV-DF ekstraktlarının HeLa ve SiHa hücrelerinde doza bağlı bir şekilde hücre büyümesini önleyebildiğini göstermektedir. IV-HE ve IV-DF özleri, sırasıyla telomerik tekrar amplifikasyon protokolü ve TTAGGG telomer uzunluğu deneyi ile gösterildiği gibi telomeraz aktivitesini inhibe edebilmektedir ve telomer kısalmasını indükleyebilmektedir.Bu çalışma, IV-HE ve IV-DF'nin apoptozu indüklediğinin ve tümör hücrelerinde ilaç direncinin yenildiğinin ilk kanıtını sunmaktadır.

Wamidh H. Talib ve ark. 2012' de yaptığı çalışmada <sup>11</sup>*Inula viscosa* bitkisinden elde edilmiş 13 farklı bileşik incelenmiştir. Bu bileşiklerin antiproliferatif, antimikrobiyal ve apoptoz indüksiyon aktiviteleri test edilmiştir. İçerikte bulunan dört flavonoidte antiproliferatif aktivite gözlenmiştir. Bunlar ; nepetin, 3,3'-di-O-metilqueretin, hispidulin ve 3-O-metilqueretin dir. 3,3'-di-OMethylquercetin ve 3-O-metilquercetin MCF-7 hücrelerine karşı seçici antiproliferatif aktivite göstermiştir. Her iki bileşik de, DNA fragmantasyonu, nükleer yoğunlaşma ve kanser hücrelerinde apoptotik cisimlerin oluşumu ile belirtildiği gibi apoptozu indükleyerek antiproliferatif etkilerini sergilemiştir.

Paola E. Ordonez ve ark. yaptığı çalışmada <sup>87</sup>; bir SL olan dehidrolökodinin (DhL) insan lösemi hücreleri üzerinde yaptığı sitotoksik etki incelenmiştir. Bu lösemi hücrelerine karşı aktivite sergileyen ekstrakttan iki SL izole edilmiştir: bunlardan ilki DhL 'idi ve belirgin sitotoksik aktivite göstermiştir. İkinci SL olan lökodinin ise ayırt edilebilir bir aktiviteye sahip olmadığı anlaşılmıştır.

Horacio A. Priestap ve ark. 2012' de yaptığı çalışmada <sup>88</sup> ; Bilinen bir SL olan dehidrolökodin(DhL) ve yeni bir guaiane tip seskiterpen asit olan dehidroparishin-B, *Artemisia douglasiana*' dan hazırlanan kloroform ekstraktından elde edilmiştir. Yapılan çalışmalar hem dehidroparishin-B'nin hem DhL' nin, B16 melanom hücrelerinin hücre proliferasyonunu bloke ettiğini ve hücre migrasyonunu inhibe ettiğini ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, DhL ve dehidroparishin-B'nin metastatik melanomların tedavisi için potansiyel adaylar olabileceğini kanıtlamıştır.

Valeria V. Costantino ve ark. yaptığı çalışmada <sup>71</sup> ; Daha önce, bir SL olan DhL 'in insan tümör hücrelerinde H2AX ve 53BP1 gibi DNA hasar belirteçlerinin birikmesini desteklediği belirlenmiştir. Ayrıca DhL'nin, HeLa ve MCF7 hücrelerinde konsantrasyona bağlı bir şekilde hücre yaşlanmasını ve apoptozu tetiklediği gösterilmiştir. Bu çalışmada ise , DhL'nin B16F0 fare melanom hücreleri üzerindeki etkilerinin in vitro ve klinik öncesi melanom modelinde değerlendirilmesi yapılmıştır. DhL, konsantrasyona bağlı bir şekilde yaşlanma veya apoptozu indükleyerek B16F0 hücrelerinin çoğalmasını inhibe etmiştir. Aynı zamanda, hayatta kalan hücrelerin, hücre döngüsü proteinleri siklin D1 ve B1 ve apoptoz protein

inhibitörü ekspresyonunu azaltmıştır. B16F0 hücrelerinin C57 / BL6 farelerine deri altından enjekte edilmesi ile üretilen melanomlarda, preventif ve terapötik protokollerde 20 mg DhL / Kg / gün ile tedavi, tümör hacimlerini sırasıyla% 70,% 60 ve% 50 oranında azaltmıştır. DhL tedavileri yaşlanma ve apoptotik tümör hücrelerinin sayısını arttırırken çoğalma oranlarını azaltmıştır. DhL'nin uzun vadeli etkilerini açıklayabilmek için deneysel verilere uygun bir matematiksel model uygulanmıştır. Deneysel olarak preventif ve terapötik protokolleri içeren DhL uygulamasının, tümör büyümesini sınırlamada DhL ile eşzamanlı tedavilerden daha etkili olduğu düşünülmektedir.

Natalia Bailon-Moscoso ve ark. DhL ile ilgili yaptığı çalışmada <sup>72</sup> ; İnsan serebral astrositoma hücresi D384 ugulanan DhL içeren ekstraktın hücre döngüsünün durmasını tetikleyerek, apoptoz ve DNA hasarını tetikleyerek hücre ölümüne neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca hücre ölümünün CDKN1A ve BAX proteinlerinin ekspresyonunun artmasıyla sonuçlandığı tespit edilmiştir. DhL'ye maruz kalan D384 hücrelerinde, toplam TP73 ve fosforile edilmiş TP53, TP73 ve  $\gamma$ -H2AX protein seviyelerinde belirgin bir indüksiyon gözlenmiş olup, toplam TP53 seviyelerinde bir artış saptanmamıştır. Genel olarak, bu çalışmalar, DHL'nin insan kaynaklı astrositoma hücrelerinin, TP73 'ün ifade edilmesi ve TP53'ün fosforilasyonu yoluyla sağkalımın azalması üzerinde belirgin bir etki gösterdiğini açıklamaktadır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak yapılan laboratuvar çalışmaları sonucunda; DhL ve MBE ‘nin aktif anti-kanser etkisi çocukluk çağıının farklı kanserleri üzerinde de literatüre uygun olarak etkin bulunmuştur. Bu bulgular ışığında çalışması yapılan bitkisel metabolitlerin ön verileri çocukluk çağı için potansiyel tedavi edici ajan olabileceklerini göstermiştir.

*In vitro* çalışmalarının tamamlanması sonrasında *in vivo* ex vivo çalışmalarının yapılması hedeflenmektedir. Yaptığımız bu çalışma sonrasında anti-kanser etkinliği ortaya konan DhL ve *Inula viscosa* bitkisi ekstraktı için *in vitro* ve *in vivo* olarak daha geniş doz aralığıyla LD50 ve IC50 dozların daha hassas olarak belirlenmesi, farklı özellikteki kanser hücre hatlarında ve deney hayvanlarında yapılacak olan moleküler testlerle etki mekanizmasının eksiksiz olarak açıklanması planlanmaktadır. Farklı SL’ ların çocukluk çağı kanserleri için yeni tedavi

Bir diğer hedef olarak ise elde ettiğimiz bitkisel ekstraktın detaylı kantitatif analizlerinin yapılarak kimyasal içeriğinin belirlenmesi ve içerikteki hedef olarak ön görülen kimyasal bileşenlerin de ayrıca tek tek çalışmalarının tamamlanmasıdır.

Halk arasında bilinçsizce kullanımı yapılan bu tarz çok fazla aktif içeriğe sahip bitkilerin çalışmalarının yapılması hem halk sağlığı hem de yeni anti-kanser tedavi hedeflerinin belirlenmesi açısından önem taşıdığı açıktır. Ayrıca anti-inflamatuvar , anti-mikrobiyal, anti-proliferatif özellikleri yapılan deneylerle ortaya konulmuş olan bitkilerin preventif etkilerinin de incelenmesi gerekmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Kutluk, T. Çocukluk Çağı Kanserlerinin Epidemiyolojisi. *Mayıs* 11–15 (2006).
2. Stiller, C. A. Epidemiology and genetics of childhood cancer. *Oncogene* **23**, 6429–6444 (2004).
3. Parkin, D. M., Stiller, C. A., Draper, G. J. & Bieber, C. A. The international incidence of childhood cancer. *Int. J. Cancer* **42**, 511–520 (1988).
4. Steliarova-Foucher, E., Stiller, C., Lacour, B. & Kaatsch, P. International classification of childhood cancer, third edition. *Cancer* **103**, 1457–1467 (2005).
5. Sharma.et.al. Primary Ewing’s Sarcoma of Cranium in a Pediatric Patient. *J. Pediatr. Neurosci.* 273–5 (2017). doi:10.4103/jpn.JPN
6. Olgun, N. & Çeçen, E. Nöroblastom. *Kanser Gündemi* **4**, 120 (2016).
7. Allan, B. J. *et al.* A review of 218 pediatric cases of hepatocellular carcinoma. *J. Pediatr. Surg.* **49**, 166–171 (2014).
8. Czauderna, P. *et al.* Hepatocellular carcinoma in children: Results of the first prospective study of the International Society of Pediatric Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* **20**, 2798–2804 (2002).
9. Chadwick, M., Trewin, H., Gawthrop, F. & Wagstaff, C. Sesquiterpenoids lactones: Benefits to plants and people. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 12780–12805 (2013).
10. Ghantous, A., Gali-Muhtasib, H., Vuorela, H., Saliba, N. A. & Darwiche, N. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? *Drug Discov. Today* **15**, 668–678 (2010).
11. Talib, W. H., Abu Zarga, M. H. & Mahasneh, A. M. Antiproliferative, antimicrobial and apoptosis inducing effects of compounds isolated from *Inula viscosa*. *Molecules* **17**, 3291–3303 (2012).
12. Stewart, E. *et al.* The Childhood Solid Tumor Network: A new resource for the developmental biology and oncology research communities. *Dev. Biol.* **411**, 287–293 (2016).
13. Ward, E. & DeSantis, C. Childhood and Adolescent Cancer Statistics, 2014. **64**, 83–103 (2014).
14. Society, A. C. Cancer Facts and Figures 2018. *Am. Cancer Soc.* (2018). doi:10.1182/blood-2015-12-687814

15. Chen, X., Pappo, A. & Dyer, M. A. Pediatric solid tumor genomics and developmental pliancy. *Oncogene* **34**, 5207–5215 (2015).
16. Downing R, J., Wilson K, R. & Zhang, J. The Pediatric Cancer Genome Project. *Nature* **1**, 233–245 (2012).
17. Malempati, S. & Hawkins, D. S. Rhabdomyosarcoma: Review of the Children's Oncology Group (COG) soft-tissue Sarcoma committee experience and rationale for current COG studies. *Pediatr. Blood Cancer* **59**, 5–10 (2012).
18. Granowetter, L., Womer, R. & Devidas, M. Dose-Intensified Compared With Standard Chemotherapy for Nonmetastatic Ewing Sarcoma Family of Tumors: A Children's Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol.* **27**, (2009).
19. Esiashvili, N., Goodman, M. & Marcus, R. B. Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **30**, 425–430 (2008).
20. Applebaum, A. M., Worch, J. & Matthay, K. K. Clinical features and outcomes in patients with extraskeletal Ewing sarcoma. *Cancer* **117(13)**, 3027–3032 (2011).
21. Choi, E. Y. K., Gardner, J. M., Lucas, D. R., McHugh, J. B. & Patel, R. M. Ewing sarcoma. *Semin. Diagn. Pathol.* **31**, 39–47 (2014).
22. SEER. Cancer Epidemiology in Older Adolescents and Young Adults 15 to 29 Years of Age. *Cancer* 1975–2000 (2000).
23. Jemal, A. *et al.* Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2014, Featuring Survival. *J. Natl. Cancer Inst.* **109**, 1–22 (2017).
24. Zuberi, J. *et al.* A typical Presentation of Ewing Sarcoma in a Pediatric Patient : A Case Report. **1**, 8–11 (2018).
25. Rani, P. S. V., Shyamala, K., Girish, H. C. & Murgod, S. Pathogenesis of Ewing sarcoma: A review. *J. Adv. Clin. Res. Insights* **2**, 164–168 (2015).
26. Folpe, A. L. *et al.* Morphologic and immunophenotypic diversity in Ewing family tumors: a study of 66 genetically confirmed cases. *Am.J.Surg.Pathol.* (2005). doi:00000478-200508000-00005 [pii]
27. Delattre, O. *et al.* Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* **359**, 162 (1992).
28. De Alava, E. & Pardo, J. Ewing tumor: Tumor biology and clinical applications. *Int.*

- J. Surg. Pathol.* **9**, 7–17 (2001).
29. Armengol, G. *et al.* Recurrent gains of 1q, 8 and 12 in the Ewing family of tumours by comparative genomic hybridization. *Br. J. Cancer* **75**, 1403–1409 (1997).
  30. Linabery, A. & Ross, J. Childhood and Adolescent Cancer Survival in the U.S. by Race and Ethnicity (Diagnostic Period 1975–1999). *Cancer* **113**(9), 261–267 (2008).
  31. Ludwig, J. A. Ewing sarcoma: Historical perspectives, current state-of-the-art, and opportunities for targeted therapy in the future. *Current Opinion in Oncology* (2008). doi:10.1097/CCO.0b013e328303ba1d
  32. Picci, P. *et al.* Chemotherapy-induced tumor necrosis as a prognostic factor in localized Ewing's sarcoma of the extremities. *J. Clin. Oncol.* (1997). doi:10.1200/JCO.1997.15.4.1553
  33. Steel, J. L., Nadeau, K., Olek, M. & Carr, B. I. Preliminary Results of an Individually Tailored Psychosocial Intervention for Patients with Advanced Hepatobiliary Carcinoma. *J. Psychosoc. Oncol.* (2007). doi:10.1300/J077v25n03\_02
  34. Schlachterman, A., Craft, W. W., Hilgenfeldt, E., Mitra, A. & Cabrera, R. Current and future treatments for hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **21**, 8478–8491 (2015).
  35. Farazi, P. A. & DePinho, R. A. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 674 (2006).
  36. Manghisi, G. *et al.* A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: A retrospective study of 435 patients. *Hepatology* **28**, 751–755 (1998).
  37. Marrero, J. A. *et al.* Prognosis of hepatocellular carcinoma: Comparison of 7 staging systems in an American cohort. *Hepatology* (2005). doi:10.1002/hep.20636
  38. Edge, S. B. & Compton, C. C. The american joint committee on cancer: The 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of Surgical Oncology* (2010). doi:10.1245/s10434-010-0985-4
  39. Vauthey, J. N. *et al.* Outcomes of Liver Transplantation in 490 Patients with Hepatocellular Carcinoma: Validation of a Uniform Staging after Surgical Treatment. *J. Am. Coll. Surg.* **204**, 1016–1027 (2007).
  40. Tangkijvanich, P. *et al.* Alpha-L-fucosidase as a serum marker of hepatocellular carcinoma in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **30**, 110–114

- (1999).
41. Castleberry, R. P. Biology and treatment of neuroblastoma. *Pediatric Clinics of North America* (1997). doi:10.1016/S0031-3955(05)70537-X
  42. Brodeur, G. & Maris, J. In: Principles and Practice of Pediatric Oncology. Pizzo PA, Poplack DG, Ed. Lippincott, Williams Wilkins; Philadelphia (2010). doi:10.1002/jcp.10260
  43. Ahmed, A. A., Zhang, L., Reddivalla, N. & Hetherington, M. Neuroblastoma in children: Update on clinicopathologic and genetic prognostic factors. *Pediatr. Hematol. Oncol.* **34**, 165–185 (2017).
  44. Maris, J. M., Hogarty, M. D., Bagatell, R. & Cohn, S. L. Neuroblastoma Seminar. *Lancet* **369**, (2007).
  45. Alexander, F. NEUROBLASTOMA. **27**, (2000).
  46. Wang, L. L. *et al.* Neuroblastoma of undifferentiated subtype, prognostic significance of prominent nucleolar formation, and MYC/MYCN protein expression: A report from the Children's Oncology Group. *Cancer* **119**, 3718–3726 (2013).
  47. Katzenstein, H. M. *et al.* Prognostic significance of age, MYCN oncogene amplification, tumor cell ploidy, and histology in 110 infants with stage D(S) neuroblastoma: The pediatric oncology group experience - A pediatric oncology group study. *J. Clin. Oncol.* (1998). doi:10.1200/JCO.1998.16.6.2007
  48. Ren, Y., Yu, J. & Douglas Kinghorn, A. Development of Anticancer Agents from Plant-Derived Sesquiterpene Lactones. *Curr. Med. Chem.* **23**, 2397–2420 (2016).
  49. Reviewed, C. *Phytotherapy*. (2015).
  50. European Medicines Agency. Traditional herbal medicinal products, Directive 2001/83/EC on the Community code relating to medicinal products for human use. *Off. J. Eur. Union* 85–90 (2004).
  51. European Parliament, C. of the E. U. REGULATION (EC) No 726/2004. *Off. J. Eur. Communities L* **269**, 1–15 (2000).
  52. WHO. Traditional Medicine Strategy. *World Heal. Organ.* (2005).
  53. Quimby, E. L. The use of herbal therapies in pediatric oncology patients: Treating symptoms of cancer and side effects of standard therapies. *J. Pediatr. Oncol. Nurs.* **24**, 35–40 (2007).

54. Topakci, N. Sticky Elecampane , *Inula viscosa* ( L .) Aiton ( Asteraceae ). *Int. J. Agric. Innov. Res.* **5**, 413–416 (2016).
55. Máñez, S., Hernández, V., Giner, R. M., Ríos, J. L. & Recio, M. del C. Inhibition of pro-inflammatory enzymes by inuviscolide, a sesquiterpene lactone from *Inula viscosa*. *Fitoterapia* **78**, 329–331 (2007).
56. Alalan, L. Research Article Analysis of the chemical composition of essential oil extracted from Syrian *Inula viscosa* ( L ). **i**, 861–864 (2015).
57. Bohlmann, F., Mahanta, P. K., Jakupovic, J., Rastogi, R. C. & Natsu, A. A. New sesquiterpene lactones from *Inula* species. *Phytochemistry* (1978). doi:10.1016/S0031-9422(00)94308-5
58. Zhang, S., Won, Y.-K., Ong, C.-N. & Shen, H.-M. Anti-Cancer Potential of Sesquiterpene Lactones: Bioactivity and Molecular Mechanisms. *Curr. Med. Chem. Agents* (2005). doi:10.2174/1568011053765976
59. babaei, G., Aliarab, A., Abroon, S., Rasmi, Y. & Aziz, S. G. G. Application of sesquiterpene lactone: A new promising way for cancer therapy based on anticancer activity. *Biomed. Pharmacother.* **106**, 239–246 (2018).
60. Gach, K., Długosz, A. & Janecka, A. The role of oxidative stress in anticancer activity of sesquiterpene lactones. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (2015). doi:10.1007/s00210-015-1096-3
61. Lee, K. H. *et al.* Sesquiterpene antitumor agents: Inhibitors of cellular metabolism. *Science* (80-. ). (1977). doi:10.1126/science.191909
62. Kupchan, S. M., Eakin, M. A. & Thomas, A. M. Tumor inhibitors, Structure-cytotoxicity relationships among the sesquiterpene lactones. *J. Med. Chem.* **14**, 1147–1152 (1971).
63. Rüngeler, P. *et al.* Inhibition of transcription factor NF-κB by sesquiterpene lactones: A proposed molecular mechanism of action. *Bioorganic Med. Chem.* **7**, 2343–2352 (1999).
64. Seger, R. & Krebs, E. G. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* (1995). doi:10.1096/fasebj.9.9.7601337
65. Kyriakis, J. M. Making the connection: coupling of stress-activated ERK/MAPK (extracellular-signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase) core

- signalling modules to extracellular stimuli and biological responses. *Biochem. Soc. Symp.* **64**, 29—48 (1999).
66. Hiscox, S., Davies, E. L. & Barrett-Lee, P. Aromatase inhibitors in breast cancer. *Maturitas* **63**, 275–279 (2009).
  67. Sartorius, U., Schmitz, I. & Krammer, P. H. Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* (2001). doi:10.1080/09553000701436810
  68. Woods, J. R., Mo, H., Bieberich, A. A., Alavanja, T. & Colby, D. A. Amino-derivatives of the sesquiterpene lactone class of natural products as prodrugs. *Medchemcomm* **4**, 27–33 (2013).
  69. Zhang, J. *et al.* Inhibition of thioredoxin reductase by alantolactone prompts oxidative stress-mediated apoptosis of HeLa cells. *Biochem. Pharmacol.* **102**, 34–44 (2016).
  70. Carlisi, D. *et al.* Parthenolide and DMAPT exert cytotoxic effects on breast cancer stem-like cells by inducing oxidative stress, mitochondrial dysfunction and necrosis. *Cell Death Dis.* **7**, e2194-13 (2016).
  71. Costantino, V. V. *et al.* Dehydroleucodine inhibits tumor growth in a preclinical melanoma model by inducing cell cycle arrest, senescence and apoptosis. *Cancer Lett.* **372**, 10–23 (2016).
  72. Bailon-Moscoso, N. *et al.* Phytometabolite Dehydroleucodine induces cell cycle arrest, apoptosis, and DNA damage in human astrocytoma cells through p73/p53 regulation. *PLoS One* **10**, 1–18 (2015).
  73. Porter, A. G. & Jänicke, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* **6**, 99 (1999).
  74. Bavunoglu, I. *et al.* The Negative Effects of Inula Viscosa L. Use on a Cancer Treatment Case Report. **2**, 19–24 (2018).
  75. Shaloam, D. & Tchounwou, P. B. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* (2014). doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025.Cisplatin
  76. Coradini, P. P., Cigana, L., Selistre, S. G. A., Rosito, L. S. & Brunetto, A. L. Ototoxicity from cisplatin therapy in childhood cancer. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* (2007). doi:10.1097/MPH.0b013e318059c220
  77. Gökbulut, A. TÜRKİYE’DE YETİŞEN BAZI INULA L. TÜRLERİ ÜZERİNDE

FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR. (2011).

78. Zhang, Z. Y. *et al.* Artesunate combined with vinorelbine plus cisplatin in treatment of advanced non-small cell lung cancer: A randomized controlled trial. *J. Chinese Integr. Med.* (2008). doi:10.3736/jcim20080206
79. Berger, T. G. *et al.* Artesunate in the treatment of metastatic uveal melanoma - First experiences. *Oncol. Rep.* (2005). doi:10.3892/or.14.6.1599
80. Singh, N. P. & Verma, K. B. Case report of a laryngeal squamous cell carcinoma treated with artesunate. *Arch. Oncol.* (2002). doi:10.2298/AOO0204279S
81. Singh, N. P. & Panwar, V. K. Case report of a pituitary macroadenoma treated with artemether. *Integr. Cancer Ther.* (2006). doi:10.1177/1534735406295311
82. Zabalova, R. . *et al.* Drugs that kill cancer stem-like cells. *Cancer Stem Cells Theor. Pract.* 361–378 (2011). doi:10.5772/582
83. Tabata, K. *et al.* Sesquiterpene lactones derived from *Saussurea lappa* induce apoptosis and inhibit invasion and migration in neuroblastoma cells. *J. Pharmacol. Sci.* **127**, 397–403 (2015).
84. Rozenblat, S. *et al.* Induction of G2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines. *Biochem. Pharmacol.* **75**, 369–382 (2008).
85. Fontana, G., La Rocca, S., Passannanti, S. & Paternostro, M. P. Sesquiterpene compounds from *Inula viscosa*. *Nat. Prod. Res.* (2007). doi:10.1080/14786410701415681
86. Merghoub, N. *et al.* *Inula viscosa* extracts induces telomere shortening and apoptosis in cancer cells and overcome drug resistance. *Nutr. Cancer* **68**, 131–143 (2016).
87. Ordóñez, P. E. *et al.* Dehydroleucodine, a Sesquiterpene Lactone from *Gynoxys verrucosa*, Demonstrates Cytotoxic Activity against Human Leukemia Cells. *J. Nat. Prod.* **79**, 691–696 (2016).
88. Priestap, H. A. *et al.* Dehydroleucodine and dehydroparishin-B inhibit proliferation and motility of B16 melanoma cells. *Phytochem. Lett.* **5**, 581–585 (2012).

## 8.DİPNOTLAR

### SS021 - The Effect of Dehydroleucodine on Neuroblastoma

(11-14 EKİM 2018)

Safiye Aktaş<sup>1</sup>, Aylin Erol<sup>1</sup>, Özde Gökbayrak<sup>1</sup>, Efe Özgür Serinan<sup>1</sup>, Hüsnüye Kayalar<sup>2</sup>, Nur Olgun<sup>1</sup>

*1 Dokuz Eylül University Institute of Oncology Department of Basic Oncology, Izmir, Turkey*

*2 Ege University Faculty of Pharmacy Department of Pharmacognosy, Izmir, Turkey*

Neuroblastoma is the most common extracranial solid tumor of childhood. Cisplatin (CDDP) is widely used in neuroblastoma. Dehydroleucodine (DhL) is a guaiane-type Sesquiterpene lactone (SL), known to be active in the chemical structure of many plants, with biological properties such as antimicrobial, cytotoxic, anti-inflammatory and antifungal. The Sesquiterpene Lactones have been proven to be effective in different types of cancer. However their effects on childhood tumors have not yet been fully understood. The aim of this study was to investigate the efficacy of DhL in neuroblastoma cell lines with different prognostic features and to compare with the effect of CDDP, a commonly used agent in neuroblastoma.

In this study, well-prognostic SH-SY5Y and LAN-5, poor prognostic Kelly, CHP-134 cell lines were cultured for 50-400  $\mu$ M CDDP and 5-50  $\mu$ M DhL doses in 96-well plate as three replicates and its effect on DhL was investigated in comparison with CDDP. It was determined that DhL was most effective at 10-25  $\mu$ M, CDDP 50-100  $\mu$ M dose range, 24h for Kelly, CHP-134, LAN-5 cell line and 72h for SH-SY5Y cell line. CDDP 50  $\mu$ M, DhL 10  $\mu$ M, CHP-134 CDDP 100  $\mu$ M, and DhL 25  $\mu$ M were found to be effective for the SH-SY5Y cells at 72 h for CDDP 100  $\mu$ M, DhL 10  $\mu$ M, 24 h for CDDP, 24 h for CDDP 50  $\mu$ M, DhL 10  $\mu$ M for LAN-5 cells. 24, 48, and 72 hours of study, it was determined that the effect of DhL was longer than CDDP.

In this study, we investigated the effect of DhL in comparison to CDDP in four neuroblastoma cell line with different prognostic features. We conclude that DhL has a cytotoxic effect on neuroblastoma and is a candidate anticancer agent. It is planned to investigate the effect of different SLs on childhood tumors

## 9.EKLER

### 9.1. Etik kurul Raporu;

|                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                  |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| KARAR BİLGİLERİ             | Karar No:2018/12-30                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Tarih:17.05.2018 |
|                             | Prof.Dr. Safiye Aktaş'ın sorumlusu olduğu "Çocukluk Çağı Tümörlerinde Seskiterpen Laktonların Etkisi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir. |                  |
| <b>ETİK KURUL BİLGİLERİ</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                  |
| ÇALIŞMA ESASI               | Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi<br>İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu                                                                                                                                                                                                                           |                  |
| <b>ETİK KURUL ÜYELERİ</b>   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                  |

| Unvanı/Adı/Soyadı                     | Uzmanlık Alanı                                       | Kurumu                                                             | Cinsi yet | Araştırma ile ilişkili mi?                                       | İmza      |
|---------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-----------|------------------------------------------------------------------|-----------|
| Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)         | Tıbbi Biyokimya                                      | DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı                    | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | Ayıldır   |
| Prof.Dr.Gül ERGÖR (Başkan Yardımcısı) | Halk Sağlığı                                         | DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.                                | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | Gül Ergör |
| Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU           | Kalp Damar Cerrahisi                                 | DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı               | Erkek     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | Kep       |
| Prof.Dr. Mehmet Refik MAS             | Geriatri                                             | DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı                    | Erkek     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | Katılmadı |
| Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKUTUK            | Tıbbi Mikrobiyoloji                                  | DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı                | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | Öz        |
| Prof.Dr.Müge KIRAY                    | Fizyoloji                                            | DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı                          | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | Müge      |
| Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER             | Anesteziyoloji                                       | DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.               | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | Katılmadı |
| Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU                | Patoloji                                             | DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D                               | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | Katılmadı |
| Prof.Dr.Bilge KARA                    | Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon                       | DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu                    | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | Bilge     |
| Prof.Dr.Ayhan ABACI                   | Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları | DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı      | Erkek     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | Ayhan     |
| Doç.Dr.M.Aylin ARICI                  | Tıbbi Farmakoloji                                    | DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı                  | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | Arıcı     |
| Doç.Dr.Murat BEKTAŞ                   | Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği            | DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği | Erkek     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | Bektaş    |
| Doç.Dr.Yasemin SOYSAL                 | Tıbbi Biyoloji ve Genetik                            | Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı             | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | Katılmadı |
| Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN               | Hukuk                                                | DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D                                         | Erkek     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | Bilgin    |
| Mehmet Erhan ÖZKUL                    | Sağlık mensubu olmayan üye                           | D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler                               | Erkek     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | Erhan     |

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ**  
**GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI**

|                            |                                                                                       |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ETİK KOMİSYONUN ADI</b> | <b>DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ</b><br><b>GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU</b> |
| <b>AÇIK ADRES</b>          | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR               |
| <b>TELEFON</b>             | 0 232 412 22 54-0 232 412 22 58                                                       |
| <b>FAKS</b>                | 0 232 412 22 43                                                                       |
| <b>E-POSTA</b>             | etikkurul@deu.edu.tr                                                                  |

|                          |                                                         |                                                                                                                                                                                                      |  |                                       |
|--------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|---------------------------------------|
| <b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b> | DOSYA NO:                                               | 3887-GOA                                                                                                                                                                                             |  |                                       |
|                          | ARAŞTIRMA                                               | UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/> MÜNFERİT ARAŞTIRMA <input type="checkbox"/> ÖÇM <input type="checkbox"/><br>YÜKSEKLİSANS <input checked="" type="checkbox"/> DOKTORA <input type="checkbox"/> |  |                                       |
|                          | ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI                                   | Çocukluk Çağı Tümörlerinde Seskiterpen Laktonların Etkisi                                                                                                                                            |  |                                       |
|                          | ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU                                 |                                                                                                                                                                                                      |  |                                       |
|                          | SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI | Prof.Dr. Safiye Aktaş<br>Temel Onkoloji A.D                                                                                                                                                          |  |                                       |
|                          | DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ                             | -                                                                                                                                                                                                    |  |                                       |
|                          | DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ              | -                                                                                                                                                                                                    |  |                                       |
|                          | ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER                           | TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>                                                                                                                                                       |  | ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/> |

| <b>DEĞERLENDİRİLEN BELGELER</b> | <b>Belge Adı</b>                    | <b>Tarihi</b> | <b>Versiyon Numarası</b> | <b>Dili</b>                                                                                                  |
|---------------------------------|-------------------------------------|---------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                 | ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ                 | Mevcut        |                          | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                                 | ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR      | Mevcut        |                          | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input checked="" type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                                 | BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU | Mevcut        |                          | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                                 | OLGU RAPOR FORMU                    | Mevcut        |                          | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk.  
Sayı : 501

17.05.2018

Sayın Prof.Dr. Safiye Aktaş,

Kurulumuz tarafından 17.05.2018 tarih ve 3887-GOA protokol numaralı 2018/12-30 karar numarası ile görüşülen “Çocukluk Çağı Tümörlerinde Seskiterpen Laktonların Etkisi” konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

  
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL  
Başkan

---

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi Inciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE  
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

## 9.2. Özgeçmiş



**AYLİN EROL**

### Kişisel Bilgiler

#### İletişim Bilgileri

|                 |                       |
|-----------------|-----------------------|
| Kimlik Numarası | 20984447110           |
| Doğum Tarihi    | 07/08/1992            |
| İletişim Adresi |                       |
| Telefon         |                       |
| E-posta         | aylinnnn.er@gmail.com |
| Web Adresi      |                       |

#### Eğitim Bilgileri

05 Eylül 2017 - Şu Anda (1 yıl 4 ay)  
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TEMEL ONKOLOJİ (YL)  
Diploma Numarası: -  
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.69 / 4.0

### Ar-Ge Yetkinlik

#### Bildiriler

A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, M. AYDIN, Ö. BEKİOĞLU, H. E. KOLATAN, Ö. E. GÖKBAYRAK, A. EROL, O. YILMAZ, Z. S. ALTUN & S. AKTAŞ, Optimisation On Xenograft Cancer Modelling In Mice, Sözlü Sunum, 7. Multidisipliner Kanser Araştırma Ve 1. Temel Onkoloji Kongresi, 11 Ekim 2018, 14 Ekim 2018.

A. EROL, Ö. E. GÖKBAYRAK, S. AKTAŞ, E. Ö. SERİNAN, H. KAYALAR & H. N. OLGUN, The Effect Of Dehydroleucodine On Neuroblastoma, Sözlü Sunum, 7. Multidisipliner Kanser Araştırma Ve 1. Temel Onkoloji Kongresi, 11 Ekim 2018, 14 Ekim 2018.

T. AKTAŞ, E. Ö. SERİNAN, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, M. AYDIN, Ö. E. GÖKBAYRAK, A. EROL, S. AKTAŞ, Z. S. ALTUN & H. N. OLGUN, Molecular Heterogeneity In Neuroblastoma (on Behalf Of Turkish Paediatric Oncology Group), Poster Sunumu, 25th Biennial Congress Of The European Association For Cancer Research, 30 Haziran 2018, 03 Temmuz 2018.

Ö. E. GÖKBAYRAK, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, A. EROL, E. KAYAR DOĞAN & S. AKTAŞ, Silymarinin Ewing Sarkom Kök Hücrelerindeki Etkisi, Sözlü Sunum, 1. Temel Onkoloji Sempozyumu Tümör Biyolojisi Ve Genetiği, 09 Mayıs 2018, 11 Mayıs 2018.

## TÜBİTAK Burs ve Destekleri

### Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

|                                    |               |          |          |
|------------------------------------|---------------|----------|----------|
| Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı | ARDEB/BİDEB 0 | TEYDEB 0 | Toplam 0 |
| İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı     | ARDEB/BİDEB 0 | TEYDEB 0 | Toplam 0 |
| Raportörlük Sayısı                 | ARDEB/BİDEB 0 | TEYDEB 0 | Toplam 0 |