

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

**A549 KÜÇÜK HÜCRE DIŞI AKCİĞER KANSERİ HÜCRE
HATTINDA DAHA ÖNCE ETKİNLİĞİ TANIMLANMAMIŞ
TÜRKİYE ENDEMİĞİ OLAN 3 BİTKİNİN ANTİTÜMÖRAL
AKTİVİTELERİ AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Selda UÇAR

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2015

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İç Hastalıkları Anabilim Dalı**

**A549 KÜÇÜK HÜCRE DIŞI AKCİĞER KANSERİ HÜCRE
HATTINDA DAHA ÖNCE ETKİNLİĞİ TANIMLANMAMIŞ
TÜRKİYE ENDEMİĞİ OLAN 3 BİTKİNİN ANTİTÜMÖRAL
AKTİVİTELERİ AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Selda UÇAR

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Prof.Dr. Hasan Şenol COŞKUN**

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2015

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma, jürimiz tarafından İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 20/02/2015

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Hasan Şenol COŞKUN**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Üye : **Prof. Dr. Mine GENÇ**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı

Üye : **Doç. Dr. Hasan MUTLU**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun / / tarih ve / sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmada, Türkiye endemiği olan *Dorystoechas hastata*, *Stachys aleurites* ve *Anthemis ammophila* türlerinden elde edilen ekstreler A549 küçük hücre dışı akciğer kanseri, HeLa serviks kanseri ve insan fibroblast hücreleri üzerinde test edilmiştir.

Doğal ortamlardan toplanan bitkilerin toprak üstü kısımlarından çözücü olarak metanol kullanılarak maserasyon yöntemi ile ekstreler hazırlanmıştır. Elde edilen ekstrelerin antitümöral etkileri incelenmiştir. Büyüme baskılanmasına MTT testi yöntemi ile bakılmıştır. Tüm deneyler üç tekrarlı yapılmıştır. Uygulanan tüm bitki ekstrelerinin incelenen bütün hücrelerde sitotoksik etki gözlenmiştir. *Anthemis ammophila* ekstrenin sitotoksik aktivitesi diğer türlerden daha aktif bulunmuştur.

Bu çalışma ile *Dorystoechas hastata*, *Stachys aleurites* ve *Anthemis ammophila* türlerinin antitümöral aktivite sonuçları ilk kez ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Dorystoechas hastata*, *Stachys aleurites*, *Anthemis ammophila*, MTT, Sitotoksisite.

ABSTRACT

In this study, effects of Turkey plants, which is endemic of *Dorystoechas hastata*, *Stachys aleurites* and *Anthemis ammophila* were tested on A549 non-small cell lung cancer, Hela cervix cancer, and human fibroblast cells.

Extracts were prepared via maceration of plant aerial parts, collected from its natural habitat, using methanol as solvent. The antitumoral activity of the extracts were investigated. Growth inhibition was tested by the MTT assay. All the experiments were repeated three times. Cytotoxic effects of all plant extracts were observed in all cells examined. Cytotoxic activity of the *Anthemis ammophila* extract was found to be higher than that other plants.

Antitumoral activity of *Dorystoechas hastata*, *Stachys aleurites* and *Anthemis ammophila* aerial parts are shown for the first time.

Key Words: *Dorystoechas hastata*, *Stachys aleurites*, *Anthemis ammophila*, MTT, Cytotoxicity.

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleşmesi için olanak sağlayan, bilgisini ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hasan Şenol Coşkun'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden her türlü desteğini esirgemeyerek tecrübe ve bilgisi ile bana her zaman yardımcı olan, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hakan Bozcuk'a,

Ekstre yapımı için gerekli ortamı sağlayan Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümü hocalarından Prof. Dr. Fatih Topçuoğlu'na,

Ekstrelerin elde edilmesi sırasında her an bana bilgisi ve tecrübesi ile yol göstererek destek olan çok değerli abim Oktay Aykurt'a,

Botanik araştırmalarında yardımını esirgemeyen Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümü hocalarından Doç. Dr. R. Süleyman Göktürk'e ve saygıdeğer abim Uzman Mehmet R. Tunç'a,

Sitotoksik deneylerde yardımını gördüğüm Dr. Durmuş Burgucu'ya,

Araştırmamın başlangıcından bitimine kadar her aşamada yardımlarını esirgemeyen ve tüm bölüm olanaklarından yararlandığım Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı'na ve üyelerine,

Öğrenciliğim sırasında her konuda desteklerini esirgemeyen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Beni her zaman destekleyen, maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen aileme ve sevgili eşim Cemal Uçar'a,

Çalıştığım zamanlarda beni hiç üzmeyen ve uslu duran canım kızım Ayşe Deniz Uçar'a,

Ve son olarak bu çalışmada emeği geçen adı geçmeyen tüm arkadaşlarıma,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Botanik Özellikler	3
2.1.1. Lamiaceae(Labiatae, Ballıbabagiller) Familyası	3
2.1.2. <i>Dorystoechas</i> Boiss.&Heldr. ex Bentham corr. Bentham Cinsi	3
2.1.3. <i>Dorystoechas hastata</i> Boiss.&Heldr. ex Bentham Türü	3
2.1.3.1. Yayılışı	4
2.1.4. <i>Stachys</i> L. Cinsi	4
2.1.5. <i>Stachys aleurites</i> Boiss. & Heldr. apud Bentham in DC Türü	5
2.1.5.1. Yayılışı	5
2.1.6. Asteraceae (Compositae / Papatyagiller) Familyası	5
2.1.7. <i>Anthemis</i> L. Cinsi	6
2.1.8. <i>Anthemis ammophila</i> Boiss. & Heldr. Türü	6
2.1.8.1. Yayılışı	6
2.2. Türlerde Yapılan Fitokimyasal ve Biyoaktivite Çalışmaları	7
2.2.1. <i>Dorystoechas hastata</i> Boiss.&Heldr. ex Bentham ile yapılan Çalışmalar	7
2.2.2. <i>Stachys aleurites</i> BOİSS. ET HELDR. APUD BENTHAM ile yapılan çalışmalar	7
2.2.3. <i>Anthemis ammophila</i> Boiss. & Heldr. ile yapılan çalışmalar	8
2.3 Akciğer Kanseri	8
2.3.1. Epidemiyoloji ve Etiyoloji	8
2.3.2. Patolojisi	10
2.4. Serviks Kanseri	10

2.4.1.	Epidemiyoloji ve Etiyoloji	10
2.4.2.	Patolojisi	11
GEREÇLER VE YÖNTEMLER		12
3.1.	Kullanılan Bitkisel Materyal, Kimyasal Maddeler ve Aletler	12
3.1.1.	Bitkisel materyal	12
3.1.2.	Kimyasal maddeler	12
3.1.2.1.	Ekstraksiyon İşlemi	12
3.1.2.2.	Hücre Kültürü ve Sitotoksiste deneyleri	12
3.1.3.	Kullanılan aletler	13
3.2.	DeneySEL Çalışma	13
3.2.1.	Ekstrelerin Hazırlanışı	13
3.2.2.	Kullanılan Hücreler	14
3.2.2.1	A549 Hücreleri	14
3.2.2.2.	HeLA Hücreleri	14
3.2.2.3.	Human Fibroblast Hücreleri	15
3.2.3.	Hücrelerin Testler İçin Hazırlanması	15
3.2.4.	MTT Sitotoksiste Deneyi	16
3.2.5.	Apoptoz Tayini	17
3.2.6.	İstatistiksel Analizler	17
BULGULAR ve TARTIŞMA		18
4.1.	Ekstraksiyon İşlemi	18
4.2.	MTT Testi Sonuçları	18
4.2.1.	A549 Hücre Hattı MTT Sonuçları	19
4.2.2.	HeLA Hücre Hattı MTT Sonuçları	20
4.2.3.	Human Fibroblast Hücre Hattı MTT Sonuçları	21
SONUÇ ve ÖNERİLER		22
KAYNAKLAR		24
ÖZGEÇMİŞ		30

SİMGELER VE KISALTMALAR

NCI	:	Ulusal Kanser Enstitüsü
CCNSC	:	Kanser Kemoterapi Ulusal Servisi
GC-MS	:	Gaz Kromatografisi –Kütle Spektrometrisi
DPPH	:	1,1,-difenil-2-pikrilhidrazil
TBARS	:	Thiobarbituric Acid Reactive Substances
MeOH	:	Metil alkol
WHO	:	Dünya Sağlık Örgütü
HPV	:	Human papilloma virüsü
DMSO	:	Dimetilsülfoksit
MTT	:	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	:	Fetal Bovin Serum
A549	:	Akciğer adenokarsinom hücresi
ANOVA	:	Varyans analizi (Analysis of Variance)
EDTA	:	Etilen-diamintetra asetik asit
HeLa	:	Serviks adenokarsinom hücresi
KHDAK	:	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
PI-TPα	:	Fosfotidilinositol transfer proteini alfa
PI-TPβ	:	Fosfotidilinositol transfer proteini beta
SPSS	:	Sosyal bilimler için istatistik programı (Statistical Package for Social Sciences)
Annexin V	:	Vasküler Antikoagülant alfa proteini
DNA	:	Deoksiribonükleik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. <i>Dorystoechas hastata</i> Boiss.&Heldr. ex Bentham Türünün Çiçeklenme zamanındaki görünümü	4
2.2. <i>Stachys aleurites</i> Boiss. & Heldr. apud Bentham in DC Türünün çiçeklenme zamanının görünüşü	5
2.3. <i>Anthemis ammophila</i> Boiss. & Heldr. Türünün çiçeklenme zamanındaki görünüşü	6
2.4. Dünya Sağlık Örgütü 2008 yılı kanser nedenli ölüm oranları	8
3.1. Yoğunlaştırma işleminin yapıldığı rotavapor aleti	14
3.2. MTT'nin formazan kristallerine dönüşüm tepkimesinin şeması	16
3.3. MTT testi sonucunda oluşan mavi formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü	16
4.1. A549 Hücre hattında bitki ekstrelerinin % Canlılık Oranları	20
4.2. HeLA hücre hattında bitki ekstelerinin % Canlılık Oranları	20
4.3. Human Fibroblast hücre hattında bitki ekstrelerinin % Canlılık Oranları	21

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
2.1. Akciğer kanseri hücre tipi ve görülme sıklıkları	10
3.1. Hücrelere uygulanan tedavi grupları	15
4.1. Elde edilen ekstre verimleri	18
4.2. <i>Antemis ammophila</i> 'nın 1µg/ml dozunda 72 saat sonunda 570 nm dalga boyunda spektrofotometrede MTT ölçüm sonuçlarının absorbans değerleri	18
4.3. <i>Dorystoechas hastata</i> 'nın 1µg/ml dozunda 72 saat sonunda 570 nm dalga boyunda spektrofotometrede MTT ölçüm sonuçlarının absorbans değerleri	19
4.4. <i>Stachys aleurites</i> 'in 1µg/ml dozunda 72 saat sonunda 570 nm dalga boyunda spektrofotometrede MTT ölçüm sonuçlarının absorbans değerleri	19
4.5. LD50 (% Hücre Ölümü/Sitotoksisite) Sonuçları	19

GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, günümüz dünyasında insan yaşamını, kalp ve damar hastalıklarından sonra, tehdit eden unsurların başında gelmektedir ve bilim dünyası, bilimsel teknolojilerle son yıllarda yapılan atılımlar ile kanserin meydana getirdiği olumsuz etkileri ortadan kaldırmak için çeşitli araştırmalara yönelmektedir. Bu nedenle, kanser çalışmaları multidisipliner boyutlarda, birçok farklı araştırmacının birliktelikleri ile oluşturulan geniş katımlı araştırma grupları tarafından yürütülmektedir. Biyoaktif bitkiler üzerinde günümüzde gerçekleştirilen araştırmaların büyük bölümü esas olarak kansere karşı ilaç geliştirme çabalarıdır. Bitkisel kaynaklı bileşenlerin anti-tümör ajan olarak kullanılmasına ilişkin bilimsel araştırmalar 1950'li yılların sonuna doğru Amerika Bileşik Devletleri'nde Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) bünyesinde bulunan Kanser Kemoterapi Ulusal Servisi (CCNSC) çatısı altında başlamıştır. Bu proje kapsamında *Taxus baccata* isimli bitkiden çıkarılan ekstraktlar kullanılarak ilk bitkisel kökenli kemoterapötik ilaç elde edilmiştir. Günümüzde meme, rahim ve akciğer kanseri tedavisinde kullanılan ilaç bu alanda yapılan çalışmaların hızlı bir şekilde artmasında önemli bir katkı sağlamıştır (1). Paclitaxel olarak isimlendirilen ilaç, hızlı bölünen ve çoğalan tümör hücrelerinin hücre iskeletini, özellikle tubulin proteinini, hasara uğratarak anti-mitotik etki ve hücrenin ölümünü sağlamaktadır. Kanser oluşumunda etkin olan mekanizmalar dört grupta toplanabilir. Bunlar; proto-onkogenlerin kontrolsüz aktivasyonu, tümör baskılayıcıların fonksiyonlarını yapamaması, apoptoz mekanizmalarının çalışmaması ve hücre yaşlanmasının baskılanmasıdır. Bu dört etken birlikte ya da tek başına kontrolsüz hücre çoğalmasına sebep olur (2). Günümüzde modern kanser tedavisinde kullanılan ajanların yaklaşık %30'u bitkisel kaynaklıdır. Dünyada ki bitkisel kaynakların ancak %10'u gibi bir kısmı anti-tümoral etkisi bakımından taranabilmiştir (3). Özellikle endemik bitkilere dair veriler çok daha sınırlıdır.

Türkiye florasında 11.000'i aşkın damarlı bitki kayıtlıdır, Orta Doğu ve Avrupa ülkeleri içinde hem tür sayısı hem de endemik tür bakımından en zengin ülkelerden biridir (4). İklimsel çeşitlilikler, topografik çeşitlilikler, Jeolojik ve jeomorfolojik çeşitlilikle deniz, göl ve akarsu gibi farklı sucul ortam çeşitlilikleri, 0-5000 m'ler arasında değişen yükseklik farklılıkları, üç farklı bitki coğrafyası bölgesinin birleştiği yerde olması gibi önemli özellikler ülkemizde bulunan endemik tür sayısının fazla olmasında önemli rol oynar. Ülkemizde altmış üç familya'ya ait 2651 endemik takson bulunmaktadır. Bazı türlerin alttür veya varyeteleri de endemiktir. Bu sebepten bu sayı alttür ve varyete düzeyinde 3090'a ulaşır. Endemizm oranı ise % 33,5'tur (5).

Bu projenin amacı, daha önce anti-tümoral aktiviteleri bakımından çalışılmamış, Antalya iline özgü Türkiye endemiği olan *Dorystoechas hastata* ve

Anthemis ammophila ile Türkiye endemiği olan *Stachys aleurites*'in, anti-tümoral aktivite bakımından in-vitro sitotoksisite testi ile tez kapsamında belirtilen A549 küçük hücre dışı akciğer kanseri hücre hattına ek olarak, HeLa serviks kanseri ve insan fibroblast hücre hattında taranmasıdır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Botanik Özellikler

2.1.1. Lamiaceae (Labiatae, Ballıbabagiller) Familyası

Otsu bitkiler veya çalılar, genellikle salgı tüyleri taşır ve aromatik bitkilerdir. Gövdeler dört köşeli veya değildir. Yapraklar stipulasız, basit, bazen pennat, daima karşılıklıdır. Çiçek durumu üst yapraklar veya braktelerin koltuklarında ortaya çıkan simoz durumunda ve genellikle vertisillastrumdur. Vertisillastrumlar spika, baş, rasemoz veya simoz oluşturabilir. Ginodioik bitkilerde çiçekler erdişi veya erkek kısırır. Brakteler belirgin şekilde yapraklardan farklıdır veya yapraklara benzemektedir. Brakteoller bulunabilir veya yoktur. Kaliks genellikle üstte 3 dişli veya altta 2 dişli olmak üzere 5-lobludur ya da kaliks aktinomorfudur. Damarlar 5-20 tanedir. Korolla gamopetal, zigomorfudur; genellikle üst dudak 2-loblu falkat, düz veya az çok konkavdır; alt dudak 3 lobludur. Nadiren üst dudak indirgenmiş ve alt dudak 5-lobludur veya bir üst ve 4 alt loblu veya korolla aktinomorfudur. Stamenler korolla ile adnattır, 4 ve didinamdır veya 2'dir ve staminotlar genellikle bulunmaktadır, anter tekaları 2 veya 1 hücrelidir, paralel veya birbirinden uzaklaşan şekildedir; nadiren (Salvia'daki gibi) uzamış konnektifler ile ayrılır. Ovaryum üst durumlu, 2-karpelli ve 4 ovüllü, 4 lobludur. Stilus ginobazik; nadiren değildir, yukarıda kısa bifiddir. Meyva 4 (nadiren daha az) kuru (çok nadir taze) fındıkçıktan oluşur. Isıtıldığında müsilaçlı veya değildir (6).

Kozmopolit olan familya yaklaşık 200 cins ve 3000 kadar tür içerir. Ülkemizde 45 cins ve 546'dan fazla türü vardır (7).

2.1.2. *Dorystoechas* Boiss.&Heldr. ex Benth corr. Bentham Cinsi

Odunsu çalılardır. Yapraklar basit ve hastat şeklindedir. Çiçek durumu ince, uzun, dik, silindirik, bir spika ve vertisillat durumludur. Çiçekler biseksüel. Kaliks bilabiata, dudak bazen eşit büyüklükte, tüpler kampanulat, 8-11 damarlı, ağzı kapalı, birbirine yaklaşan dudaklar meyva ile birleşmiştir. Korolla bilabiata, dudaklar açıktır. Stamenler 2, nadiren 3 tane, biraz dışarıdadır. Anterler eğik ve uçta, teka ile örtülü, staminotlar genellikle yoktur. Disk kırmızı. Stilus 2 loblu. Nutletler tüysüz, üç köşeli, düz ve linear-oblong şeklindedir (8).

2.1.3. *Dorystoechas hastata* Boiss.&Heldr. ex Bentham Türü

Tüm kısımları kuvvetli aromatik, 40-100 cm boyunda çalılardır. Yapraklar 2.8-7.5x1.5-3 cm, basit, saplı, grimsi yeşil, lanseolat, krenulat, lamina hastat, ana damar ve sapın bulunduğu bölge rugoz. Petiol 1-3.6 cm, yay şeklindedir. Çiçek durumu sık terminal spika, 6-17 cm, dik, çok çiçekli (10-25 tane), bir sonraki mevsime kadar dayanır, meyvada ise vertisillat dizilişli. Çiçek yaprakları ise

lanseolattır ve çabuk olgunlaşır. Kaliks, uzun tüpsü, 3-4.5 mm, meyvada 6-10 mm kadar eksene yapışıktır. Üst dudağı az gelişmiş, 3 loblu, alt dudak ise tüpsü, çok kısa (2mm), 2 loblu, boğazı kapalıdır. Korolla, 4-6 mm, tüpü hemen hemen kalikse eşit ve diktir. Stamenler 2-3 tane ve kısmen dışarıdadır. Anterler eğik, 2 tekali, tekalar geniştir. Genellikle staminot yoktur. Ovüller portakal kırmızısı, disk üzerinde belirgindir. Nutletler geniş ve uzunca 3x1 mm, kahverengi, tüysüz, üst kısmı gaga şeklinde, dikensiz, tatlı fakat ıslandığında müsilajımsı değildir (8).

2.1.3.1. Yayılışı

Yurdumuzda yalnızca Antalya ilinde yetişen endemik bir bitkidir. Güney-batı Anadolu, C3: Antalya; Tahtalı dağı, Çukuryayla yakını, 1525m, Termesos Milli Parkı, 1000 m, Kemer, Yerin deresi, 650 m yüksekliğinde, kaya aralarında, kızıl çam ve servi ormanlarında, meşe çalılıklarında yetişmektedir. Çiçeklenme zamanı; Mayıs-Haziran aylarıdır (8, 9). **Şekil 2.1'** de türün çiçeklenme zamanında bitkinin fotoğrafı yer almaktadır.

Antalya çevresinde geniş yayılımı olan bitkiye köylüler tarafından "Çalba" denmektedir ve adaçayı gibi aromatik çay hazırlanmasında kullanılmaktadır (10).



Şekil.2.1. *Dorystoechas hastata* Boiss.&Heldr. ex Bentham Türünün Çiçeklenme zamanındaki görünümü

2.1.4. *Stachys* L. Cinsi

Bir veya çok yıllık otsular, nadiren çalimsılardır. Yapraklar basit, kenarları dişlidir. Kaliks tüpsü veya çan şeklinde, 5-10 damarlı, korolla genellikle kırmızı pembe, sarı veya beyaz renkte, 2 dudaklıdır. Stamenler 4. Kozmopolit olan cins yaklaşık 200 tür içerir. Ülkemizde 76 türü vardır (7).

2.1.5. *Stachys aleurites* Boiss. & Heldr. apud Benthäm in DC Türü

50-60 cm boyunda otsu çalılardır. Çiçek sapları basit, dalsız, ince tüylü, olgunlukta bazen tüysüzdür. Sapın alt yaprakları, ovat, ovat-lanseolat, 1.5 x 1-2.5 cm büyüklüğünde, kademeli olarak kısadır. Üreme döneminde 8-12 çiçeklidir, 1-2 çiçek üstünde de olabilir. Brakteoller lanseolat, 9-12 x 1.5-2 mm büyüklüğündedir. Kaliks tüp şeklinde ve 11- 13.5 mm büyüklüğünde ve dikenlidir. Korolla, mor-pembe renkte 13-15 mm büyüklüğündedir. Nutletler obovoit şeklinde, 2-2.5 mm büyüklüğündedir (20).

2.1.5.1. Yayılışı

Genellikle kıyı kenarlarındaki kalkerli kayalıklarda, 10-600 m yükseklikte yayılış göstermektedir. Ülkemizde C3 bölgesinde Antalya bölgesinde, Konyaaltı bölgesinde 10 m'de, Köprülü Kanyon Milli Parkı 600 m'de ve Söğüt Yaylası 300 m'de yetişmektedir (20).



Şekil 2.2. *Stachys aleurites* Boiss. & Heldr. apud Benthäm in DC Türünün çiçeklenme zamanının görünüşü

2.1.6. Asteraceae (Compositae / Papatyagiller) Familyası

Bazıları süt içeren otsular, çalılar veya nadiren ağaç veya tırmanıcılar şeklindedir. Yapraklar genellikle alternat veya karşılıklı, nadiren dairesel, basit veya birleşik, tam kenarlı, loblu veya değişik şekilde parçalanmış olabilir. Çiçekler kapitulum durumunda, kapitulumun çevresi 1- çok serili involukrum brakteleri ile örtülmüş, erdişi veya tek eşeyli, ışınsal veya zigomorf simetridir. Kaliks genellikle papus halini almış veya hemen hemen yoktur. Petaller 4-5 birleşiktir. Korolla 2 şekilde, tüpsü ve dilsî; tüpsü korolla uçta belirgin 5 dişli, dilsî korolla 3-5 dişli veya dişler belirgin değildir. Satamenler 5, petallere bağlı, flamentler serbest, anterler birleşiktir. Pistil 1, ovaryum alt durumlu, tek lokuluslu, 2 karpelli, ovül tek, anatrop,

presentasyon bazaldır. Meyve aken ve ucunda genellikle bir papus veya kaliks kalıntısı taşır (7).

Kozmopolit olan familya yaklaşık 1100 cins ve 2500 kadar tür içerir. Ülkemizde 133 cins ve 1156 kadar türü bulunmaktadır (7).

2.1.7. *Anthemis L. Cinsi*

Bir, iki veya çok yıllık otsular veya nadiren odunsu veya alçak çalılardır. Yapraklar genellikle 1-3 pinnat, nadiren basittir. Kapitula tek, radiat, veya diskoiddir. İnvokrum brakteleri genellikle 3 serili ve imbrikat, çiçek tabanı palealıdır. Dilsî çiçekler genellikle beyaz ve sarıdır. Avrupa ve Akdeniz bölgesinde yayılış gösterir ve yaklaşık 130 tür içerir. Ülkemizde 50 türü bulunur (7).

2.1.8. *Anthemis ammophila* Boiss. & Heldr. Türü

Küçük, eğilmiş yada bazen dik konumlu, tüylü ve tek yıllıktır. Gövde 4-10 cm uzunluğunda, genellikle dallar tabandan yayılan şekildedir. Yapraklar 0.5-1.5 cm büyüklüğünde, ana hat içinde dardır. Kapitula radiat, pedinküller kalınlaşmıştır. Işınsal simetrik çiçekler 12 mm boyundadır. Disk korollalar 3mm boyundadır (21).

2.1.8.1. Yayılışı

Türkiye C3 Antalya bölgesinde yayılış göstermektedir. Güney Batı Anadolu'da C3 Antalya: Kemer, Lara, ve C3/4 Antalya: Alanya, 5 m'de yetişmektedir (21).



Şekil 2.3. *Anthemis ammophila* Boiss. & Heldr. Türünün çiçeklenme zamanındaki görünüşü

2.2. Türlerde Yapılan Fitokimyasal ve Biyoaktivite Çalışmaları

2.2.1. *Dorystoechas hastata* Boiss.&Heldr. ex Bentham ile yapılan çalışmalar

Yapılan literatür araştırmalarında *Dorystoechas hastata* ile çalışmalara rastlanmıştır. Çalışmalardan ilki 1986 yılında yapılmıştır. Termasos 1000 m'den toplanan bitkinin uçucu yağlarını analiz edilmiş ve içeriğindeki ana bileşenler, α -terpineol, kafur ve terpinen-4-ol olarak belirlenmiştir (11). Başka bir çalışmada uçucu yağ distilasyon yöntemi ile elde ettikten sonra içeriğini GC (gaz kromatografisi) ve GC-MS (gaz kromatografisi –kütle spektrometrisi) yoluyla analiz etmişler ve majör bileşenleri 1-8 sineol, α - pinen, borneol, guaiol, kamfen ve kafur olarak bulmuşlardır (12). Fitokimyasal ilk çalışmalardan bir diğerinde, bitki sırasıyla petrol eteri ve etanol ile ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Petrol eteri ekstresinde karnosol ve rosmanol adı verilen diterpenoidler, etanol ekstresinde ise falavonoidlerden, luteolin, luteolin 7- glukozit, 6-metoksiluteolin 7-glukozit, fenolik asitlerden olan kafeik asit ve klorogenic asit tespit edilmiştir (13). *Dorystoechas hastata* yapraklarından elde edilen su, etanol ve dietil eter ekstralarının, DPPH (1,1,-difenil-2-pikrilhidrazil) radikalini süpürücü etkisine, indirgeme gücüne, toplam fenol miktarlarına bakılmıştır. Yapılan deneylerin sonucunda ekstraların kuvvetli antioksidan özellikleri saptanmıştır ve in vivo olarak araştırılması gerektiği belirtilmiştir (14). Bir diğer çalışmada bitkiden, metanol, petrol eteri ve su ekstraları elde edilmiş, ekstraların aktivitesine, DPPH radikalini süpürücü etki, toplam fenol miktarı, ABTS•+ radikalini süpürücü etki ve TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) deneyleri ile bakılmıştır. Metanol ekstresi çalışılan diğer ekstralardan daha kuvvetli antioksidan özelliği bulunmuştur (15). *Dorystoechas hastata* ile yapılan sitotoksik çalışma bulunmamaktadır.

2.2.2. *Stachys aleurites* BOISS. ET HELDR. APUD BENTHAM ile yapılan çalışmalar

Türkiye endemiği olan *Stachys aleurites* ile yapılan çalışmada bitkininin toprak üstü kısımlarından, su distilasyonu yöntemi ile uçucu yağını elde etmişlerdir. Elde edilen yağın GC/MS yöntemiyle içeriğine bakmışlar ve içeriğinde sırasıyla, β -karyofilen (%33,7), bisiklogermakren, germakren ve α -pinen olduğunu tespit etmişlerdir (16).

Stachys ' in farklı türleriyle yapılan araştırmada, uçucu yağlarının antioksidan aktiviteleri kuvvetli bulunmuştur. Ayrıca uçucu yağların, çeşitli insan kanser hatlarında sitotoksik özelliklerine bakılmıştır ve sırasıyla, *S. germanica*, *S. palustris* and *S. spinosa*, 100 μ g/ml dozda %81, %77 ve % 73 inhibisyonda kuvvetli antiproliferatif etki göstermiştir (17). Farklı *Stachys* türlerinin %80'lik MeOH ekstresi ile yapılan çalışmada ekstralar değişik insan tümör hücre hatlarında in vitro MTT testine tabi tutulmuşlardır ve hücreleri % 25-%50 civarında inhibe ettikleri ortaya konmuştur (18) . *Stachys aleurites* ile yapılan sitotoksik bir çalışma bulunmamaktadır.

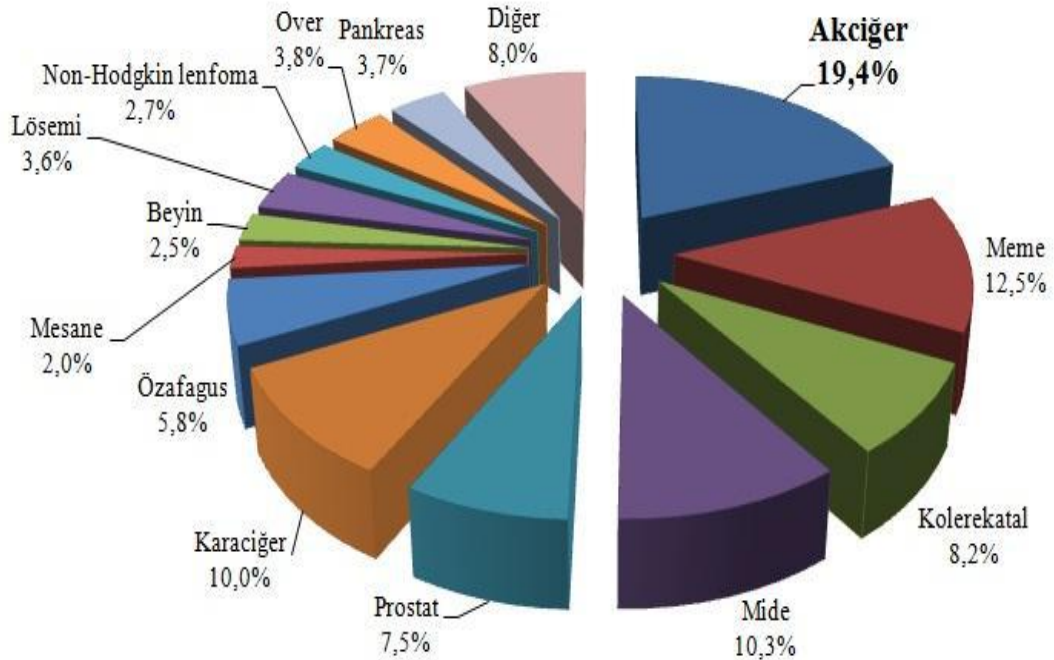
2.2.3. *Anthemis ammophila* Boiss. & Heldr. ile yapılan çalışmalar

Yapılan literatür araştırmalarında *Anthemis ammophila* ile yapılan bir çalışma bulunmamıştır. Buna karşılık farklı *Anthemis* türleri ile yapılan çalışmalar bulunmaktadır. *Anthemis maritima* ile yapılan bir çalışmada, bitkinin etil asetat ekstresinden Antheminone A, Antheminone B ve Antheminone C adı verilen siklohekzanları izole etmişlerdir. Daha sonra izole ettikleri bileşiklerin insan kanser hücrelerinde sitotoksik aktivitelerine bakmışlardır. Antheminone A ve C bileşiği, B'den daha aktif bulunmuştur (19).

2.3. Akciğer Kanser

2.3.1. Epidemiyoloji ve Etiyoloji

Akciğer kanseri, 20. yüzyılın başlangıcında nadir görülen bir hastalık iken, 1950 yılından itibaren sıklığı belirgin olarak artmıştır. Günümüzde, kadınlarda ve erkeklerde en sık görülen ve en fazla ölüme yol açan kanserlerin başında yer almaktadır. Erkeklerde kansere bağlı ölümlerin % 31'i akciğer kanserine bağlıdır. Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin % 25'inden akciğer kanseri sorumludur (22). Akciğer kanserine bağlı ölümlerin oranı kolon, meme ve prostat kanserine bağlı ölümlerin toplamından daha fazladır (23). 2010 yılı içerisinde akciğer kanseri nedeniyle gerçekleşen, toplamda 1.4 milyon ölüm vakası kayıt edilmiştir (24). Dünya Sağlık rgtnn raporuna göre kanser ölümlerinin tanıya göre dağılımı **şekil 2.4'** te gösterilmiştir (25).



şekil 2.4. Dünya Sağlık Örgütü 2008 yılı kanser nedenli ölüm oranları (25)

Akciğer kanseri için genel beş yıllık sağkalım oranı esas olarak sadece %15'dir, çünkü hastalık genellikle ortaya çıktığında ilerlemiştir. Eğer erken evrede bulunursa beş yıllık sağ kalım oranı %60 ile %70'e yaklaşmaktadır(26).

Akciğer kanserinde, sigara, hava kirliliği gibi çevresel faktörler, mesleki karsinojenler, diyet, viral enfeksiyonlar, geçirilmiş akciğer hastalıkları, genetik ve immünolojik faktörler başlıca etiyolojik faktörlerdir (27).

Bu faktörler içerisinde sigara içilmesi, akciğer kanserlerinin %80'inden fazlasında primer etiyolojidir (26). Sigara kanser ilişkisi ilk kez 1761'de yapılan bir çalışmada buruna çekilen tütün tozunun burunda polip oluşumuna neden olduğunun saptanmasına dayanmaktadır (28). Sigara dumanında 4000'den fazla kimyasal madde bulunur ve 60'dan fazlasının kanıtlanmış karsinojen özelliği vardır. Bunlardan radon, kurşun, bizmut ve polonyum radyoaktif özellikte iken polisiklik hidrokarbonlar ve N-nitrozamin prokarsinojenik olarak tanımlanmıştır. Sigara dumanının kimyasal bir bileşeni olan benzo(a)pirenin p53 tümör baskılayıcı geninin 3 spesifik lokusuna zarar verdiği ve primer akciğer kanseri olan hastaların %60'ında bu gen anormalliğinin tespit edildiği saptanmıştır (29). Tütün dumanında bulunan diğer polisiklik aromatik hidrokarbonların ise akciğer kanserine yol açabilecek diğer mutasyonel bölgeleri etkileyebilme kapasitesine sahip oldukları saptanmıştır(30). Sigara içenlerde yapılan iki ayrı çalışmanın sonuçlarına göre ise akciğer kanseri görülme sıklığı Olak ve ark.'larına göre %20, Kopper ve Timar'a göre ise %10-15'dir(31,32). Akciğer kanseri tüm dünyada, sigara alışkanlığı erkeklerde daha fazla olduğu için erkeklerde daha sık görülmektedir, ancak kadınlarda sigara içme oranının artmasıyla insidans erkeklere göre daha hızlı artmaktadır (33).

Parsons ve arkadaşlarının yaptıkları meta analiz çalışmasında, sigarayı bırakmanın erken evrede tespit edilen akciğer kanserli hastalarda olumlu etkileri olduğunu, buna karşılık erken evrede tanı konan ancak, sigara içmeye devam eden akciğer kanserli hastalarda mortalite oranlarında ve ikinci bir primer tümörün oluşma oranında artış olduğunu belirlemişlerdir (34).

Akciğer kanseri riskini artıran çok sayıda mesleki ve çevresel karsinojen vardır. Bunlar arasında en iyi bilinenler asbest, radon, arsenik maruziyeti, diklorometil eter, krom, formaldehit, iyonize radyasyon, nikel, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, ağır metal tozları ve vinil kloriddir (35).

Beslenme diyetindeki eksiklikler akciğer kanseri gelişiminde etkili olabilir. Vitamin A ve beta karotenden fakir beslenmenin hayvan modellerinde akciğer kanseri riskini artırdığı gösterilmiştir. İnsanlardaki çalışmalarda da diyetinde betakaroten/retinol miktarı yüksek olanlarda akciğer kanseri riskinin %40 azaldığını tespit etmiştir. Beta karoten, A vitamininin öncülüdür ve turunçgiller, yeşil sebzeler ile balıkta bulunur. Ayrıca yüksek yağlı diyetle beslenen sigara içicilerde kanser riski daha yüksektir. Sarı-yeşil sebze ve meyvelerin yeterli alımı riski azaltır. Çayın (özellikle yeşil çay) koruyucu olduğuna dair de bazı bulgular mevcuttur(36).

Bununla birlikte sebze ve meyve yönünden zengin beslenmenin akciğer kanserine karşı koruyucu bir etkisi olduğuna ilişkin sınırlı bulgular bulunmaktadır. Özellikle krusifer grubu sebzelerin tüketilmesinin, muhtemelen içerdikleri izotiyosiyanatlar nedeniyle koruyucu etkisi olduğu öne sürülmüştür. Tahıllar, baklagiller, et, yumurta, süt ve süt ürünleri gibi başka gıdaların tüketilmesiyle ilgili birçok çalışma yapılmış olmasına karşın, kanserojen veya koruyucu bir etki bulunduğuna dair bulgular bir değerlendirme yapmaya izin verecek ölçüde yeterli değildir (26).

2.3.2. Patolojisi

Akciğer kanseri için ilk standart sınıflandırmadan 1967 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından düzenlenen toplantıda bahsedilmiştir. Bu sınıflandırma zamanla revize edilmiştir. En son olarak, WHO tarafından, 2004 yılında akciğer kanseri ile ilgili moleküler verileri içeren sürüm yayınlanmıştır (38). Hücre tipi ve görülme sıklıkları **Çizelge 2.1**' de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Akciğer kanseri hücre tipi ve görülme sıklıkları

Hücre Tipi	Görülme Sıklığı (%)
Küçük hücreli dışı akciğer kanseri	
Adenokarsinom	32
Bronkoalveoler	3
Skvamöz hücreli karsinom	29
Büyük hücreli karsinom	9
Büyük hücreli nöroendokrin	2
Diğerleri	12
Küçük hücreli akciğer kanseri	20

2.4. Serviks Kanseri

2.4.1. Epidemiyoloji ve Etiyoloji

Geçmişte jinekolojik kanserlere bağlı ölümlerin önde gelen sebeplerinden biri olan serviks kanserinin görülme sıklığı hastalığın erken evrede saptanmasını sağlayan pap smear tarama yönteminin yaygın kullanımı sayesinde belirgin olarak azalmıştır (39). Günümüzde serviks kanseri meme kanserinden sonra kadınlarda kansere bağlı ölümün en sık ikinci sebebidir. Her yıl beşyüzbin yeni vakanın tanı aldığı tahmin edilmektedir. Çevresel faktörlerin etkisi ve tarama yöntemleriyle lezyonların saptanma sıklığının değişmesi nedeni ile serviks kanserinin insidansı toplumlar arasında belirgin farklılık göstermektedir (40,41). Serviks kanserinin epidemiyolojisi ve moleküler biyolojisi iyi bilinmektedir. Human papilloma virüsü(HPV) ile yakın ilişkisi serviks kanserinin önlenebilir bir hastalık olarak kabul edilmesine yol açmıştır. Serviks kanserli vakaların %95'inde yüksek riskli HPV tipleri(örneğin;Tip16) pozitifdir. HPV hastalığın doğal seyrinin ve immün sistem ile ilişkisinin anlaşılmasını sağlamıştır. Hastalığın gelişim sürecinin ve immün sistem ile

ilişkinin iyi biliniyor olması serviks kanserinin standart tedavilerin yanı sıra immünoterapiler için de iyi bir aday olduğunu ortaya koymaktadır (42).

2.4.2. Patolojisi

Serviks kanserlerinin %85-90'ı yassı epitel hücreli karsinomlardır. Büyük hücreli nonkeratinize, büyük hücreli keratinize ve küçük hücreli olarak alt gruplarına ayrılır. En sık büyük hücreli nonkeratinize olan tip görülür. Serviks kanserlerinin %10-15'ini ise adenokarsinomlar oluşturmaktadır (43).

GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Bitkisel Materyal, Kimyasal Maddeler ve Aletler

3.1.1. Bitkisel materyal

Tezde incelenen bitkilerden *Dorystoechas hastata* Termesos Milli Parkı, 1000 m'den, *Stachys aleurites* bitkisi ülkemizde C3 bölgesinde Antalya bölgesinin, Konyaaltı bölgesinde 10 m'den ve *Anthemis ammophila* bitkisi Türkiye C3 Antalya, Lara bölgesindeki deniz kenarı kumsallarından toplanarak kurutulmuştur ve ekstraksiyon işlemi için hazırlanmıştır. Bitkiler herhangi bir insektisit ya da pestisit bulaşığı olmaması için doğal ortamlarından toplanarak uygun ortamlarda kurutulmuşlardır.

Bitkilerin tür tayinleri Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü tarafından yapılmıştır.

3.1.2. Kimyasal maddeler

Deneyisel çalışmalarda kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik kalitede, kullanılan su ultra saf bidistile sudur.

3.1.2.1. Ekstraksiyon İşlemi

Ekstraksiyon işlemi için kullanılan metanol analitik saflıkta olup ve Merck firmasından temin edilmiştir.

3.1.2.2. Hücre Kültürü ve Sitotoksiste deneyleri

- Dimetilsülfoksit-d⁶((CD₃)₂SO): MTT testinde kullanıldı. Analitik saflıkta, Sigma-Aldrich firmasından temin edildi.
- MTT(3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue): Sigma firmasından temin edilmiştir.
- Non-essential Tyrpsin-EDTA (%0.25)

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium): %10 fetal dana serumu ve %1 penisilin/streptomisin içeren besiyeridir. Gentamisin
- FBS (Fetal Bovine Serum): Sigma firmasından temin edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan aletler

Santrifüj(Beckmann)

Mikro santrifüj(Beckmann)

Biyogüvenlik kabini Class II LaminAir(Hera)

Işık mikroskobu (Nikon)

CO₂ inkübatörü-%5 CO₂(Thermo)

Buzdolabı (+4, Siemens)

Laboratuar tipi derin dondurucu(-86 Revco)

Vortex(Memmert)

Su banyosu(Memmert)

Otoklav(Hera)

Derin dondurucu (-20, Siemens)

SpektrofotometreThermo

Flow sitometre(Beckmann)

Rotavapor (Heidolph)

3.2. Deneysel Çalışma

3.2.1. Ekstrelerin Hazırlanışı

Bitkisel materyalin ekstraksiyonu katı bir ortamdan katı bileşiklerin ayrılması esasına dayanır. “Katı-sıvı ekstraksiyonu” olarak bilinen bu tip ekstraksiyonda katı bir sıvı ile ekstre edilir. Bu aşamada yüksek ekstre verimini sağlamak için seçilen çözücü çok önemlidir (44). Bitkilerin toprak üstü kısımları tartılarak, ayrı ayrı metanol ile literatürde tanımlandığı şekilde (ağırlık/ağırlık; 15 gr bitki/ 60 gr Solvent) katı- sıvı ekstraksiyon yöntemiyle ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuşlardır. Elde edilen ekstreler vakum altında rotavaporda (**Şekil 3.1**) (< 65 °C) kurutulup, yoğunlaştırılmıştır. Tüm ekstreler analiz anına kadar -20 °C'de karanlıkta saklanmıştır (45).



Şekil 3.1. Yoğunlaştırma işleminin yapıldığı rotavapor aleti(46)

3.2.2. Kullanılan Hücreler

3.2.2.1. A549 Hücreleri

A549 hücresi (Adenokarsinomik insan alveolar bazal epitelyum hücresi) ilk olarak 58 yaşındaki erkek bir akciğer kanseri hastasının tümör dokusundan Dr. D. J. Giard tarafından alınarak kültüre edilmiştir. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinin (KHDAK) üç ana tipinden biri olan ve erkeklerde en sık görülen squamöz hücreli tipe girmektedir. A549 hücresi su ve elektrolitlerin akciğer alveollerinden geçişine izin vermektedir. A549 hücreleri in vitro koşullarda yüzeye yapışarak çoğalırlar. Hücrenin bir diğer karakteristiği, yüksek seviyede lesitin ve doymuş yağ asidi sentezlediğinden dolayı, membran fosfolipidlerinin korunmasını sağlamaktadır. Böylece hücre dirençli bir hal kazanmaktadır. İlaç metabolizması modeli olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır(47). Hücreler Akdeniz Üniversitesi Fizyoloji Anabilimdalı'ndan elde edilmiştir.

3.2.2.2. HeLA Hücreleri

İzole edilen ilk insan kaynaklı epitel kanseridir. Serviks epitel adenokarsinom hücreleridir. Scherer tarafından 1952 yılında 31 yaşında Henrietta Lacks adında bir kadından alınmıştır (48). Bu hücreler oksidatif stresin hücresel etkilerinin incelenmesi açısından uygun bir modeldir (49). Sitozolik bir enzim olan açılfosfataz HeLa hücreleri için güçlü bir apoptoz indükleyicidir (50). HeLa hücrelerinde mitokondride kalsiyum birikimi diğer epitel hücrelerine göre daha hızlıdır. Mitokondri, nükleer tübülün hem içine hemde dışına hareket edebilmektedir (51,52). Hücreler Akdeniz Üniversitesi Fizyoloji Anabilimdalı'ndan elde edilmiştir.

3.2.2.3. Human Fibroblast Hücreleri

Human fibroblast hücrelerinde fosfatidilinositol transfer proteinlerinin α ve β (PI-TP α ve PI-TP β) olmak üzere iki formu da bulunmaktadır. Bu proteinler nükleusa yerleşmiş, sitoplazmada golgi sistemi ile bağlantılıdır. PI-TP α hücreyi apoptozise karşı korurken, PI-TP β ise hücreyi apoptozise karşı duyarlı hale getirmektedir (53,54). Hücreler Akdeniz Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan elde edilmiştir.

3.2.3. Hücrelerin Testler İçin Hazırlanması

Hücreler, deneyler için yeterli sayıya eriştiklerinde tripsinlenerek toplanmış ve toma lamı ile sayılarak ml'de 250 000 hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. MTT yöntemi için 96 kuyucuklu plakalara 0,1 ml hücre süspansiyonu (25 000 hücre) ekilip, hücrelerin plaka kuyucuklarının tabanına yapışmaları için 24 saat bekletilmiştir. Süre sonunda hücrelerin üzerlerindeki besiyerleri plakaların ters çevrilmesi suretiyle uzaklaştırılıp, üzerlerine test maddelerinin istenen konsantrasyonlarını içeren taze besiyerleri ilave edilmiştir.

Dorystoechas hastata'nın toprak üstü bölgesinden elde edilen metanol ekstresi için 10-100ng/ml, 1 μ g/ml, *Anthemis ammophila*'nın toprak üstü bölgesinden elde edilen metanol ekstresi için 10-100ng/ml, 1 μ g/ml, *Stachys aleurites*'in toprak üstü bölgesinden elde edilen metanol ekstresi için 10-100ng/ml, 1 μ g/ml dozları hazırlanmıştır. Tüm maddelerde çözücü olarak Dimetilsülfoksit (DMSO) kullanılmıştır.

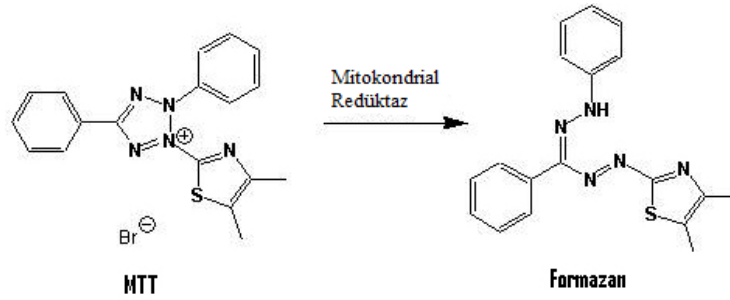
Bu konsantrasyonlarda besiyerinde hazırlanan test maddelerinin konsantrasyonları, kontrol grubu (boş besiyeri) ve %0.1 DMSO içeren çözücü kontrol grubu da teste eklenmiştir. Test maddeleri içeren besiyerleri 96 kuyucuklu plakaların kuyucuklarına 72 saat sayımları için 0.3 ml, koyularak gerekli sürelerde inkübasyona bırakılıp, bu süreler sonunda hücelere gerekli boyama yöntemleri uygulanmıştır. Uygulanan tedavi grupları Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir. Referansa uygun olarak tedavi grupları çalışılmıştır (55).

Çizelge 3.1. Hücelere uygulanan tedavi grupları

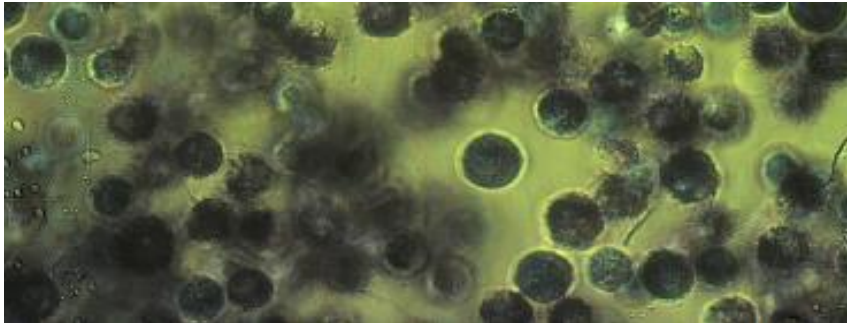
1	2	3	4	5
Eksrakt 10ng/mL	Eksrakt 100ng/mL	Eksrakt 1 μ g/mL	Kontrol	DMSO (%0,1)

3.2.4. MTT Sitotoksosite Deneyi

MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) yöntemi ile bir hücre topluluğundaki canlı hücreler kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam mitokondrianın MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır(56, 57). MTT testi hücre kültürü esasına dayanan indirekt olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan bir ilaç duyarlılığı testidir(58). En yaygın kullanılan kolorimetrik substrat olan MTT, suda çözünen birtetrazolium tuzu olup fenol kırmızısı içermeyen medium veya tuz çözeltilerinde hazırlandığında sarımtırak bir çözelti oluşturur. Tetrazolium halkasının dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu MTT mor renkli çözünmez formda formazana dönüşür(Şekil 3.2, 3.3). Bu dönüşüm canlı hücrelerin mitokondrileri aracılığı ile olur. Tetrazolium tuzunun sadece metabolik aktivitesi olan hücreler tarafından renkli formazanlara indirgenmesinden dolayı bu yöntem sadece canlı hücreleri saptar. Oluşan bu formazan kristalleri, izopropanol veya başka bir çözücü yardımı ile çözünür hale getirilir ve oluşan rengin klasik mikropate okuyucusunda (maximum absorbans) 570 nm’de miktarı belirlenebilir (59).



Şekil 3.2. MTT'nin formazan kristallerine dönüşüm tepkimesinin şeması(60)



Şekil 3.3. MTT testi sonucunda oluşan mavi formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü(61)

Hücre kültürlerinin inkübasyonu sonunda 96 well içinde bulunan hücrelere her bir kuyucuğa 20 µL of 5 g/mL MTT(Sigma, St. Louis, MO, USA) eklenmiştir ve 4 saat 37 °C’de %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir. Dört saatin sonunda MTT ile oluşan formazon kristallerini çözmek için kuyucuklara 150µL DMSO eklenerek

10 dakika 37 °C’de CO₂ inkübatöründe bekletilip her bir kuyucuk 570 nm dalga boyunda spektrofotometrede okutulmuş ve okunan absorbans değerine göre sitotoksite düzeyi belirlenmiştir. Sitotoksite düzeyleri aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır;

$$LD50 (\%Hücre Ölümü)=[1-(Test kuyucuğunun absorbanısı / Kontrol kuyucuğunun absorbanısı) x100]$$

Yaşayan hücreler koyu mavi formazan ürünü oluştururken, ölü hücrelerde boya gözlenmez. Kontrol (ilaçsız) hücreleriyle karşılaştırarak, hücrelerin yüzde ölüm oranları belirlenir.

3.2.5. Apoptoz Tayini

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. 1990 yılında Andree ve arkadaşları tarafından Vasküler Antikoagülant alfa proteini keşfedilmiştir. Keşfedilen bu protein daha sonra Annexin V olarak yeniden isimlendirilmiştir (62). Anneksin- V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir (63, 64, 65). FITC-Anneksin-V kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri ile ölçülebilmektedir (66, 67, 68).

Apoptoz tayini çalışmamızdaki teknik problemler sebebiyle yapılamamıştır.

3.2.6. İstatistiksel Analizler

Deney grupları, uygulamalara ve zamana bağlı olarak kontrole ve birbirlerine göre değerlendirilmiştir. Bu amaçla elde edilen değerlere tek yönlü ANOVA testi uygulandı. Grupların kontrol grubuna göre anlamlılıkları student t-testi ile değerlendirildi. Anlamlılık değeri olarak p<0,05 seviyesi temel alındı. İstatistiksel analiz için SPSS 18.0 programı kullanılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Ekstraksiyon İşlemi

Bitkilerin toprak üstü kısımları tartılarak, ayrı ayrı metanol ile literatürde tanımlandığı şekilde (ağırlık/ağırlık; 15 gr bitki/ 60 gr Solvent) katı- sıvı ekstraksiyon yöntemiyle ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuşlardır. Yapılan ekstraksiyon işlemi sonucunda en yüksek ekstre verimi *Dorystoechas hastata* bitkisinden elde edilirken, en düşük ekstre verimi *Stachys aleurites* bitkisinden elde edilmiştir. Toplam elde edilen ekstre verimleri Çizelge 4.1.'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. Elde edilen ekstre verimleri

Ekstre Elde Edilen Bitki	Elde Edilen Ekstre Verimi (%)
<i>Dorystoechas hastata</i>	% 9,2
<i>Anthemis ammophila</i>	% 2,9
<i>Stachys aleurites</i>	% 0,6

4.2. MTT Testi Sonuçları

Dorystoechas hastata, *Anthemis ammophila* ve *Stachys aleurites* bitkilerinin %100'lük metanol ekstresi uygulanan hücrelerde MTT ölçüm sonuçlarında 10ng/ml, 100ng/ml dozlarında 72 saat sonunda sitotoksik aktivite DMSO ile yakındır (yani aktivite gözlenmemiştir). Bu dozlarda uygulanan ekstreler ile kontrol grubunun arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$). Bu yüzden her iki dozun sonuçları değerlendirilmeye alınmadı. Sitotoksik aktivite ekstrelerin 1µg/ml dozunda gözlemlendi. *Dorystoechas hastata*, *Anthemis ammophila* ve *Stachys aleurites* bitkilerinin %100'lük metanol ekstresi 1µg/ml dozu uygulanan hücrelerde 72 saat sonunda 570 nm dalga boyunda spektrofotometrede MTT ölçüm sonuçlarının absorbans değerleri Çizelge 4.2, 4.3 ve 4.4'de gösterilmektedir. Yapılan istatistiksel analizler sonucu, kontrol grubu ile deney gruplarının hepsi arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 4.2. *Antemis ammophila*'nın 1µg/ml dozunda 72 saat sonunda 570 nm dalga boyunda spektrofotometrede MTT ölçüm sonuçlarının absorbans değerleri

	<i>Antemis ammophila</i> %100MeOH Ekstresi	Kontrol	DMSO
<i>HeLA</i>	0,517*	1,51	1,631
<i>A549</i>	0,63*	1,45	1,55
<i>Human Fibroblast</i>	0,615*	1,23	1,176

* $p<0,05$ (kontrolle göre anlamlılık)

Çizelge 4.3. *Dorystoechas hastata*'nın 1µg/ml dozunda 72 saat sonunda 570 nm dalga boyunda spektrofotometrede MTT ölçüm sonuçlarının absorbans değerleri

	<i>Dorystoechas hastata</i> %100MeOH Ekstresi	Kontrol	DMSO
<i>HeLA</i>	0,85*	1,51	1,631
<i>A549</i>	0,749*	1,45	1,55
<i>Human Fibroblast</i>	0,89*	1,23	1,176

* p<0,05(kontrolle göre anlamlılık)

Çizelge 4.4. *Stachys aleurites*'in 1µg/ml dozunda 72 saat sonunda 570 nm dalga boyunda spektrofotometrede MTT ölçüm sonuçlarının absorbans değerleri

	<i>Stachys aleurites</i> %100MeOH Ekstresi	Kontrol	DMSO
<i>HeLA</i>	0,84*	1,51	1,631
<i>A549</i>	0,817*	1,45	1,55
<i>Human Fibroblast</i>	0,96*	1,23	1,176

* p<0,05(kontrolle göre anlamlılık)

Kontrol (ilaçsız) hücreleriyle karşılaştırarak, hücrelerin yüzde ölüm oranları,

$$LD50 (\%Hücre \text{ Ölümü}) = [1 - (\text{Test kuyucuğunun absorbansı} / \text{Kontrol kuyucuğunun absorbansı}) \times 100]$$

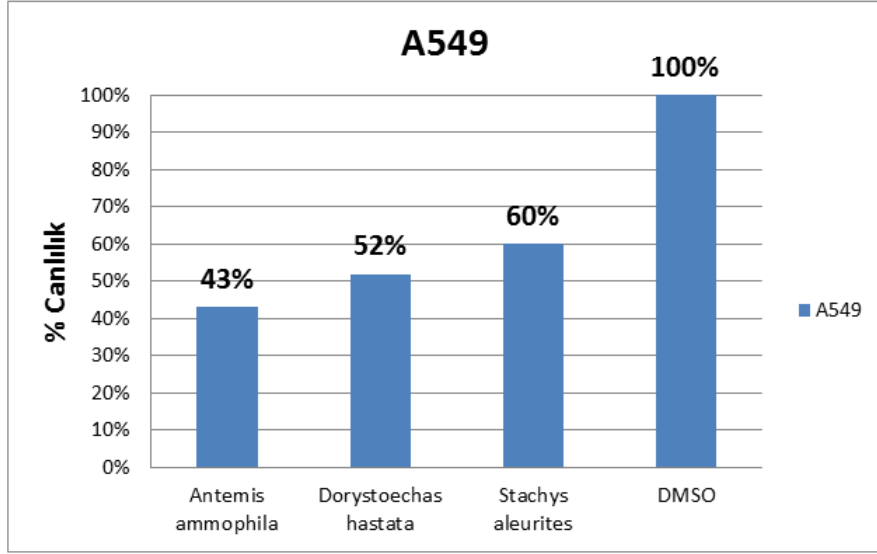
formülü kullanılarak belirlenmiştir ve sonuçlar Çizelge 4.5.'de gösterilmektedir. Tüm deney gruplarının kontrol grubuna göre istatistiksel analizler ile anlamlılığına bakılmıştır.

Çizelge 4.5. LD50 (% Hücre Ölümü/Sitotoksosite) Sonuçları

	<i>Antemis ammophila</i>	<i>Dorystoechas hastata</i>	<i>Stachys aleurites</i>	DMSO
<i>HeLA</i>	%66	%44	%44	%0
<i>A549</i>	%57	%48	%40	%0
<i>Human Fibroblast</i>	%50	%28	%22	%0

4.2.1. A549 Hücre Hattı MTT Sonuçları

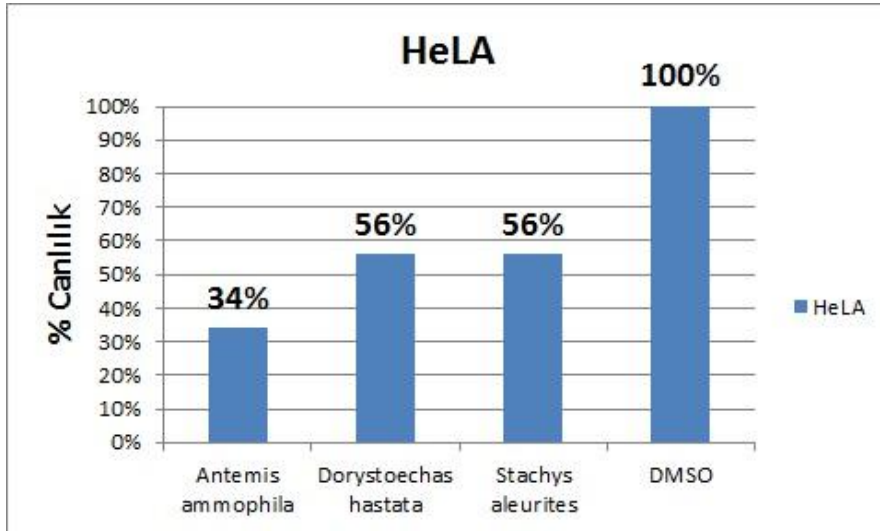
Dorystoechas hastata, *Anthemis ammophila* ve *Stachys aleurites* bitkilerinin %100'lük metanol ekstresi uygulanan hücrelerde MTT ölçüm sonuçlarında 10ng/ml, 100ng/ml dozlarında 72 saat sonunda sitotoksik aktivite DMSO ile yakındır (yani aktivite gözlenmemiştir). Sitotoksik aktivite ekstrelerin 1µg/ml dozunda gözlenmiştir. Ekstrelerin hepsinde sitotoksik etki gözlenirken, maksimum sonuç *Anthemis ammophila* ekstresinde 72 saat sonra gözlenmiştir (%43) (p<0,05). Ekstrelerin % canlılık oranları Şekil 4.1' de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. A549 Hücre hattında bitki ekstralarının % Canlılık Oranları

4.2.2. HeLA Hücre Hattı MTT Sonuçları

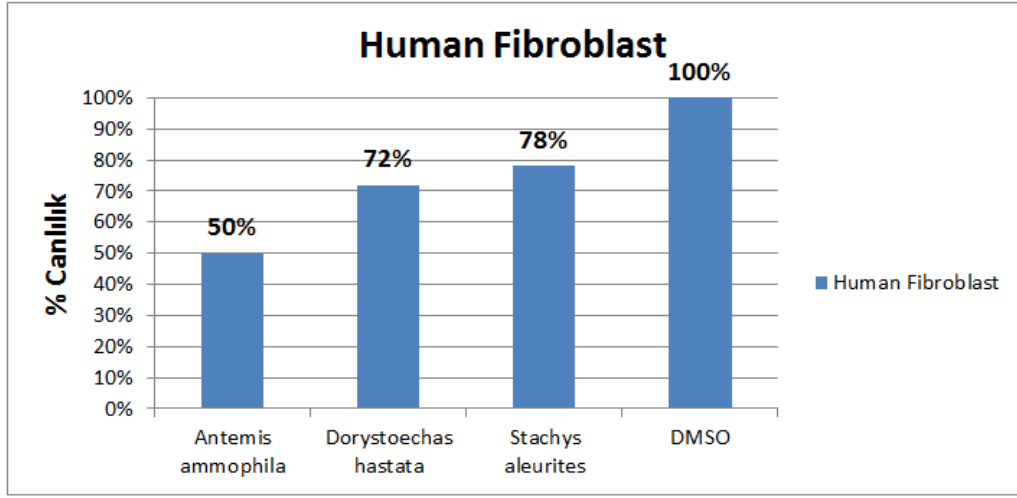
Dorystoechas hastata, *Anthemis ammophila* ve *Stachys aleurites* bitkilerinin %100'lük metanol ekstresi uygulanan hücrelerde MTT ölçüm sonuçlarında 10ng/ml, 100ng/ml dozlarında 72 saat sonunda sitotoksik aktivite DMSO ile yakındır. Sitotoksik aktivite ekstraların 1µg/ml dozunda gözlenmiştir. *Dorystoechas hastata* ve *Stachys aleurites* ekstraların sitotoksik etkileri arasında anlamlı bir fark bulunamazken ($p>0,05$), maksimum sonuç *Anthemis ammophila* ekstresinde 72 saat sonra gözlenmiştir (%34). Bulunan sonuçlar arasında ki farklar anlamlıdır ($p<0,05$). Ekstrelerin % canlılık oranları Şekil 4.2' de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. HeLA hücre hattında bitki ekstralarının % Canlılık Oranları

4.2.3. Human Fibroblast Hücre Hattı MTT Sonuçları

Dorystoechas hastata, *Anthemis ammophila* ve *Stachys aleurites* bitkilerinin %100'lük metanol ekstresi uygulanan hücrelerde MTT ölçüm sonuçlarında 10ng/ml, 100ng/ml dozlarında 72 saat sonunda sitotoksik aktivite DMSO ile yakındır. Sitotoksik aktivite ekstrelerin 1µg/ml dozunda gözlenmiştir. *Dorystoechas hastata* ekstresinin sitotoksik aktivitesi (%72) *Stachys aleurites* ekstresinden (%78) daha yüksek gözlenirken, maksimum sonuç *Anthemis ammophila* ekstresinde 72 saat sonra gözlenmiştir(%50). Bulunan sonuçlar arasında ki farklar anlamlıdır ($p<0,05$). Ekstrelerin % canlılık oranları Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Human Fibroblast hücre hattında bitki ekstelerinin % Canlılık Oranları

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada kullanılan bitkilerden *Dorystoechas hastata*'nın yapraklarından elde edilen ekstralarının, daha önceden yapılmış olan çalışmalarla antikanser aktiviteyi destekleyici olarak, kuvvetli antioksidan aktivitelerinin olduğu araştırmacıların raporlarıyla bildirilmiştir (14, 15). Ancak türle ilgili sitotoksik bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışılan diğer türlerle ilgilide bugüne kadar yayınlanmış biyoaktivite çalışması bulunmamaktadır. *Stachys aleurites* bitkisinin uçucu yağları ile yapılan fitokimyasal çalışmada antioksidan aktivitelerinin yüksek olduğu bilinen β -karyofilen (%33,7), bisiklogermakren, germakren ve α -pinen olduğunu tespit etmişlerdir(16, 69, 70, 71). Ayrıca, yapılan literatür araştırmalarında *Anthemis ammophila* ile yapılan bir çalışma bulunmamıştır. Buna karşılık farklı *Anthemis* türleri ile yapılan sitotoksik çalışmalar bulunmaktadır (19,72). Bu gözlemlerin çalıştığımız bitkilerin antikanser özellikler taşıyabileceğinin kanıtı olmasından dolayı, toprak üstü bölgelerinden hazırlanan ekstraların kanser hücreleri olan A549 küçük hücre dışı akciğer kanseri, HeLa serviks kanser hücreleri ve normal hücre olan insan fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

Her üç tür, ekstralarından elde edilen bulgulara göre sitotoksik etkileri açısından değerlendirilmiştirler. *Dorystoechas hastata* ve *Stachys aleurites* bitkilerinin sitotoksik etkilerinin benzer olduğu gözlenirken, buna karşılık *Anthemis ammophila*'nın sitotoksik aktivitesi diğerlerinden belirgin bir şekilde daha yüksek bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.5). A549 hücrelerinde *D. hastata* ekstresi *S. aleurites* ekstresinden %8 daha etkili bulunmuştur. *A. ammophila* ekstresi ise hücrelerin %57'sini öldürmüştür. HeLA hücrelerinde *D. hastata* ekstresi ve *S. aleurites* ekstresi aynı miktarda hücreyi öldürmede etkili olmuşlardır (%44). Buna karşılık *A. ammophila* ekstresi tüm hücreler içerisinde en yüksek sitotoksik etkiyi bu hücrelerde göstermiştir (%66). İnsan fibroblast hücrelerinde de durum benzer gözlemlenmiştir. *D. hastata* ekstresi ve *S. aleurites* ekstresi arasında %6'luk bir fark gözlemlendiği için, sitotoksik aktivite bakımından her iki bitki benzerdir diyebiliriz. Bunun yanında *A. ammophila* ekstresi hücrelerin yarısını öldürmüştür (%50). *D. hastata* ekstresi ve *S. aleurites* ekstresinin benzer etkilerinin sebebi, her iki bitki de, aynı aileye (Lamiaceae Familyası) ait olduğu için yapılarında aynı etken maddeleri bulunduruyor olabilirler. *A. ammophila* ekstresinin belirgin farklı olması çok büyük bir olasılıkla bitkinin başka bir aileye ait olması ve bu sebepten ekstrenin bileşiminin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Ne var ki, çalışılan ekstraları fitokimyasal bileşenleri hakkında henüz bilgi sahibi olunamaması nedeniyle daha detaylı yorum yapmak olası değildir. Tüm bu gözlemlerin ekstraların fitokimyasal analizi ile pekiştirilmesi gerekmektedir. Ayrıca *A. ammophila* ekstresinin antikanser aktivite açısından önemli olabileceği ve kanser tedavisi için bitkilerin bir kaynak oluşturabileceği fikri uyanmaktadır. Ancak, bu fikrin gerçeğe dönüşebilmesi için yapılması gereken çok fazla araştırma bulunmaktadır:

Daha önceden de belirtildiği gibi *A. ammophila* bitkisinin antikanser, özellikler taşıdığı görülmektedir. Burada temel sorun bitkide hangi bileşenlerin olduğu ve bu bileşenlerin birlikte mi, yoksa tek başına mı etkili olduğunun bilinmemesidir. Bu nedenle *A. ammophila* bitkisinde etkin madde ve/veya maddelerin kromotografik yöntemlerle belirlenmeleri, bitki ekstresinden belirlenen bileşenlerin izolasyonları, daha önceden keşfedilmeyen bileşenler ise adlandırılmaları gerekmektedir. Tespit edilen, tanımlanan ve izole edilen bileşenlerin ya da bileşiğin özellikle antikanser, apoptotik, antianjiojenik ve antimetastatik etkileri açısından detaylı bir taramadan geçirilmesi gerekmektedir.

A. ammophila ile yapılmış prelinik bir çalışma bulunmadığından dolayı, yukarıda belirtilen etkiler ve bununla bağlantılı olarak kanser konusundaki net yararın anlaşılabilmesi için çeşitli tümörleri taşıyan hayvan modelleri ile in vivo çalışmalara gereksinim vardır. *A. ammophila* ile ilişkili olarak başka in vitro ve in vivo kanser modellerinin kullanılması gerekecektir. Örneğin matrigel, rozet formasyonu ve koloni formasyonu gibi teknikler ile ekstrelerin kanserin anjiyogenez/metastaz özellikleri, malignite kapasitesi ve DNA yapısı özellikleri üzerine etkileri gibi hususların araştırılması gerekmektedir (73, 74).

A. ammophila saflaştırılmış aktif maddelerin uygun sentetik ve kimyasal süreçler sonucunda, ilaç haline getirilip akciğer ve serviks kanserinde tedavi amaçlı kullanılabilinecekleri gibi, fibroblast inhibisyonu gösterdikleri için, fibroblastların rol aldığı hastalıklarla ilgili süreçlerde(örneğin aterosklerozis gibi) izole edilecek etken maddenin test edilebileceğini ve tedavide etkin bir role sahip olabileceğini düşünebiliriz.

Sonuç olarak, çalışılan bitkilerin sitotoksik etkileri ile ilgili ilk çalışma olan bu tez çalışması ile *A. ammophila* ekstresinden elde edilen bulguların farklı yöntemlerle irdelenmesi zorunludur. Ekstredeki bileşiklerin neler olduğunun belirlenerek tanımlanması, farklı kimyasal yapılarla sahip yeni antikanser etkili ilaçların geliştirilebilmesi için önemli bir adım olacaktır.

KAYNAKLAR

- 1- Goodman, J., Walsh, V., The Story of Taxol: Nature and Politics in the Pursuit of an Anti-Cancer Drug. Cambridge University Press. , 17, 2001.
- 2- Engelman J.A. , Luo J., Cantley L.C., The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism, Nat Rev Genet, 7, 606-619, 2006.
- 3- DeVita, V.T., Lawrence, T. S., Rosenberg, S.A., DeVita, Hellman and Rosenberg's, Cancer Principles and Practice of Oncology, Lippincott Williams and Wilkins, a Wolters Kluwer Bs. Pres, Vol 2, 2953-2954, Philadelphia, USA, 2008.
- 4- Davis, P.H. , Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh: Edinburgh University Press, .Vol. 10, 210, 1988.
- 5- Yusuf, K., Özkan, A., Endemik Bitkilerin Dünya ve Türkiyedeki Dağılımı, Erzincan Eğitim Fakültesi Dergisi Cilt:7, Sayı:1, 2005.
- 6- Davis PH. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh, UK: Edinburg University Press. 7: 349-382, 1982.
- 7- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L., Leblebici, E., Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No:116, İzmir, 276, 278, 296, 298, 2000.
- 8- Davis PH. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh, UK: Edinburg University Press. 7: 461-462, 1982.
- 9- www.turkherb.ibu.edu.tr
- 10- Baytop, T., Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi , İstanbul Üniv. Yay. No.2355, Ecz.Fak. No.40, İstanbul, 217,1984.
- 11- Meriçli, F. And Meriçli, A.H.: The Essential Oil of *Dorystoechas hastata*, Planta Med., 52,: 506,1984.
- 12- Başer, K. H. C., Öztürk, N., Composition of the Essential Oil of *Dorystoechas hastata*, A Monotypic Endemic from Turkey, J. Ess. Oil Rsrch, 369-374, 1991.
- 13- Venturella, P., Venturella, G., Marino, M. L., Mericli, A. H., & Çubukcu, BPhytochemical investigation of the Labiatea *Dorystoechas hastata*. Gior. Bot. Italiano, 122, 291-29, 1988.

- 14- Karagözler, A.A., Erdağ, B., Emek, Y. Ç., Uygun, D.A., Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*, Food Chem.111, 400-407, 2008.
- 15- Ayranci, E., Erkan, N., Akgonen, S., Ovat, S., Goksel, G., Phenolic compounds profile and antioxidant activity of *Dorystoechas hastata* L. Boiss et Heldr., Food Research Int., 44, 3013-3020, 2011.
- 16- Flamini, G., Cioni, P.L., Morelli, I., Celik, S., Gokturk, R.S., Unal, O, Essential oil of *Stachys aleurites* from Turkey, Biochem. Syst. Ecol., 33, 61–66, 2005.
- 17- Conforti, F., Menichini, F., Formisano, C., Rigano*, D., Senatore, F., Arnold N. A., Piozzi, F., Comparative chemical composition, free radical-scavenging and cytotoxic properties of essential oils of six *Stachys* species from different regions of the Mediterranean Area, Food Chem.,116, 898-905, 2009.
- 18- Radnai, E. H , Rethy, B., Czige, Sz., Zupko, I., Weber E.,Martinek, T., Falkay, Gy., Mathe, I., Cytotoxic activities of *Stachys* species, Fitoterapia, 79, 595-597, 2008.
- 19- Collu, F., Bonsignore, L., Casu, M., Floris, C., Gertsch, J., and Cottiglia, F., New cytotoxic saturated and unsaturated cyclohexanones from *Anthemis maritima*, Bioorg. & Med. Chem. Letters, 18,1559–1562, 2008.
- 20- Davis PH. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh, UK: Edinburg University Press. 7: 246, 1982.
- 21- Davis PH. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh, UK: Edinburg University Press. 5: 200, 1975.
- 22- Gundrum, J. D., Go, R. S., Cancer in the oldest old in the United States: Current statistics and projections, J. Ger. Onc. 3, 299 – 306, 2012.
- 23- Jemal A, Tiwari RC, Murray T et al. Cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 52: 23-47, 2002.
- 24- World Health Organization. Cancer, fact sheet no. 297Æ <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/æ>, accessed February, 2012.
- 25- WHO histological classification of tumours of the lung. World Health Organization Classification of Tumours, pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC press, ed by Travis WD, Brambilla E, Müller-Hemerlink HK, Haris CC, 2004.
- 26- Feig, B.W., Berger, D.H., Fuhrman, G.M., M.D. Anderson Cerrahi Onkoloji El Kitabı, 167-169, 2009.

- 27- Alberg AJ, Ford JG, Samet JM. Epidemiology of lung cancer; ACCP Evidence-based clinical practice guidelines (2th edition). Chest; 132: 29-55, 2007.
- 28- Crofton J, Douglas A. Lung cancer. In: Crofton J, Douglas A, eds. Respiratory diseases. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science 631-69; 1981.
- 29- Denissenko MF, Pao A, Tang M. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. Science. 274:430; 1996.
- 30- Smith LE, Denissenko MF, Bennett WP, et al. Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons. J Natl Cancer Inst 92: 803; 2000.
- 31- Olak J, Colson Y. Gender differences in lung cancer: have we really come a long way, baby? The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 128(3): 346-351, 2004.
- 32- Kopper L, Timar J. Genomics of lung cancer may change diagnosis, prognosis and therapy. Pathology Oncology Research;11(1): 5-10, 2005.
- 33-Spitz MR, Hong WK, Amos CI, Wu X, Schabath MB, Dong Q, Shete S, Etzel CJ. A risk model for prediction of lung cancer. J Natl Cancer Inst;99: 715-26, 2007.
34. Parsons A, Daley A, Begh R. Influence of smoking cessation after diagnosis of early stage lung cancer on prognosis: systematic review of observational studies with meta-analysis. BMJ.; 340:5569, 2010.
- 35-Chen CL, Hsu LI, Chiou HY, et al. Ingested arsenic, cigarette smoking, and lung cancer risk: A follow-up study in arseniasis-endemic areas in Taiwan. JAMA; 292:2984, 2004.
- 36- Müsellim, B., İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi ve Etyolojisi, Sempozyum Dizisi No:58; s.113-118, 2007.
- 37-Boyle, P.,Levin B.,Dünya Sağlık Örgütü, Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu, Dünya Kanser Raporu, Lyon, 2008.
- 38- Pass, H.I., Carbone, D.J., Johnson, D.H., Minna, J.D., Turrisi, A.T., Lung Cancer Principles and Practice, 19, 231-254, 2005.
- 39-Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. Cancer statistics. CA Cancer J Clin. 56(2):106-30,2006.
- 40- Pettersson F., Annual report on the results of treatment in gynecological cancer. Radiumhemmet, Stocholm. Sweden. International Federation Gynecology and Obstetrics (FIGO). 132-168,1994.

41-Meland MR, Flehinger BJ., Early incidence rates of precancerous cervical lesions in women using contraceptives. *Gynecol Oncol* 1: 290-294,1973.

42-Ursin G, Peters RK, Henderson BE, d'Ablaing G, Monroe KR, Pike MC. Oral contraceptive use and adenocarcinoma of cervix. *Lancet* 19;344(8934):1390-4,1994.

43- Bosch FX, Muñoz N, de Sanjosé S, Izarzugaza I, Gili M, Viladiu P, Tormo MJ, Moreo P, Ascunce N, Gonzalez LC., Risk factors for cervical cancer in Colombia and Spain. *Int J Cancer* 11;52(5):750-8,1992.

44- Lawrence, B.M., The isolation of aromatic materials from natural plant product, In: *A manual on the Essential Oils and Industry*, K. Tuley De Silva (Ed.), United Nations Industrial Development Organization, Vienna, Austria, 57-154, 1995.

45- Benkebil N. Free radical scavenging capacity and antioxidant properties of some selected onions and garlic extracts. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48, 753-759, 2005.

46- <http://www.bergman.no/rotavapor/r-ii-article378-204.html>

47- http://en.wikipedia.org/wiki/A549_cell

48-Macville, M., Schrock, E., Padilla-Nash, H., Keck, C., Ghadimi, B. M., Zimonjic, D., Popescu, N., Ried, T., Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping, *Cancer Res.*, 59 (1), 141-150, 1999.

49-Horakova, K., Sovcikova, A., Seemannova, Z., Syrova, D., Busanyova, K., Drobna, Z., Ferencik, M., Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants, *Free Radic. Biol. Med.*, 30 (6), 650–664, 2001.

50-Giannoni, E., Cirri, P., Paoli, P., Flaschi, T., Camici, G., Manao, G., Raugei, G., Ramponi, G., Acylphosphatase is a strong apoptosis inducer in HeLa cell line, *Mol. Cell Biol. Res. Commun.*, 3, 264–270, 2000.

51- Lui, P. P. Y., Chan, F. L., Suen, Y. K., Kwok, T. T., Konga, S. K. The nucleus of HeLa cells contains tubular structures for Ca²⁺ signaling with the involvement of mitochondria, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 308, 826–833, 2003.

52- Varadi, A., Cirulli, V., Rutter, G. A., Mitochondrial localization as a determinant of capacitative Ca²⁺ entry in HeLa cells, *Cell Calcium* 36, 499–508, 2004.

53- Jainchill, J., L., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Murine sarcoma and leukemia viruses: Assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells, *J. Virol.*, 4 (5), 549-553, (1969).

54- van Tiel, C.M., Schenning, M., Snoek, G.T., Wirtz, K.W.A., Overexpression of

phosphatidylinositol transfer protein β in NIH3T3 cells has a stimulatory effect on sphingomyelin synthesis and apoptosis, *Biochim. Biophys. Acta*, 1636, 151–158, 2004.

55-H. Bozcuk, M. Özdoğan, O. Aykurt, F. Topçuoğlu, H. Öztürk, D. Ekinçi, A. Karadeniz, A. Mutlu, D. Burgucu, *Urginea maritima* (L.) Baker (Liliaceae) extract induces more cytotoxicity than Standard chemotherapeutics in the A549 non small cell lung cancer (NSCLC) cell line, *Turk J. Med. Sci.*, 101-108, 41(1), 2011.

56- McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, Mahboubi A, Shi Y, Mogil RJ, Nishioka WK, Green DR., The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro, Schwartz LM, Osborne BA (Ed.): *Methods in Cell Biology, Cell Death*. Academic Press. San Diego, 46, 150-181 1995.

57-Şemin GENÇ, Mustafa AKHİSAROĞLU, Kürşad GENÇ, Eritropoetin'in PC12 hücre hattında amiloid-beta peptid ile oluşturulan nörotoksisiteye karşı koruyucu etkisi, *Turk. J. Geriat.* 5 (1): 1-6, 2002.

58-Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55, 1983.

59- Doyle A., Griffiths J.B., *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. John Wiley & Sons. 57-61: 62-64, 1998.

60-http://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay

61- <http://lulelaboratory.blogspot.com/2012/08/mtt-assay.html>

62-Andree, H. A. M., Reutelingsperger C.P., Hauptmann R., Hemker, H.C., Hermens W.T., Willems G.M., Binding of Vascular Anticoagulant α (VAC α) to Planar Phospholipid Bilayers. *The Journal of Biological Chemistry* 265, 9, 4923-4928, 1990.

63- Kopman G., Reutelingsperger C. P., Kuijten G. A., Keehnen R. M., Pals S. T., Van Oers N. H., Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis, *Blood.*, 84: 1415–1420, 1994.

64-Bratton D. L., Fadok V. A., Richter D. A., Kailey J. M., Guthrie A., Henson P. M., Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flipflop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J. Biol. Chem.*, 272: 26159–26165, 1997.

65-Gatti R., Belletti S., Orlandini G., Bussolatio O., Dall'asta V., Gazzola G. C., Comparison of Annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 46: 895–900, 1998.

66-Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*. ;13(8):795-808, 1992.

67-Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C., A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol. Methods*.17;184(1):39-51,1995.

68-Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Haanen C. Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays, *Apoptosis*.3(2):115-21, 1998.

69-Singh H.P., Batish D.R., Kaur S., Arora K., α -Pinene Inhibits Growth and Induces Oxidative Stress in Roots, *Ann Bot*. 98(6): 1261–1269,2006.

70- Hatice Basmacıoğlu Malayoğlu, Biberiyenin (*Rosmarinus officinalis* L.) Antioksidan Etkisi, *Hayvansal Üretim* 51(2): 59-67, 2010.

71-Calleja M.A., Vieites J.M. Meterdez T.M., Torres M.I., Faus M.J., Gil A., Suarez A., The antioxidant effect of β -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation, *Br.J.Nutr*,109(3):394-401,2013.

72-Zaghloul A. M., Yusufoglu H.S., Salkini M.A., Ayman A., Alam A., Aftab Alam New cytotoxic sesquiterpene lactones from *Anthemis scrobicularis* J. *As. Nat. Pro. Rsc*, 16, 9, 922-929,2014.

73-Kurt Y.G., Çaycı T., Aydın F.N., Ağılı M., The deficits of matrigel plug assay, *J Res Med Sci*.,19(10): 1018,2014.

74- Belvedere R., Bizzarro V., Popolo A., Piaz D.A., Vasaturo M., Picardi, Luca Parente P., and Petrella A., Role of intracellular and extracellular annexin A1 in migration and invasion of human pancreatic carcinoma cells, *BMC Cancer*, 16, 14, 961, 2014.

ÖZGEÇMİŞ

Selda UÇAR, 1982 yılında Antalya Serik'te doğdu. İlköğretim ve lise öğrenimini Serik'te tamamladı. 2000 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 2004 yılında mezun oldu. 2004-2005 öğretim yılı bahar döneminde Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Anabilim dalında yüksek lisansa başladı. 2009 yılında mezun oldu. 2012 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları Anabilim dalı Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Bilim dalında Yüksek lisansa başladı. Yabancı dili İngilizcedir.