

**A549 HÜCRELERİNDE *Sideritis phrygia*
EKSTRESİNİN CİSPLATİN TOKSİSİTESİ
ÜZERİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nursenay ATEŞ

Danışman

Prof. Dr. Mustafa KARGIOĞLU

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK

ANABİLİM DALI

Kasım 2020

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**A549 HÜCRELERİNDE *Sideritis phrygia*
EKSTRESİNİN CİSPLATİN TOKSİSİTESİ
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Nursenay ATEŞ

Danışman

Prof. Dr. Mustafa KARGIOĞLU

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI**

Kasım 2020

TEZ ONAY SAYFASI

Nursenay ATEŞ tarafından hazırlanan “A549 Hücrelerinde *Sideritis phrygia* Ekstresinin Cisplatin Toksisitesi Üzerine Etkileri ” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 30 / 11 / 2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Mustafa KARGIOĞLU

Başkan : Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi

Üye : Prof. Dr. Mustafa KARGIOĞLU
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi

Üye : Doç. Dr. Recep LİMAN
Uşak Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
..... /..... /..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. İbrahim EROL
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI
Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

30 / 11 / 2020

Nursenay ATEŞ

ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

A549 HÜCRELERİNDE *Sideritis phrygia*
EKSTRESİNİN CISPLATİN TOKSİSİTESİ
ÜZERİNE ETKİLERİ

Nursenay ATEŞ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Mustafa KARGIOĞLU

Akciğer kanseri dünya genelinde hem erkek hem de kadınlarda kanser ölümlerinin birinci nedenleri arasındadır. Son yıllarda çok sayıda klinik çalışmalara rağmen, akciğer kanserinde belirgin bir iyileşme sağlanamamıştır.

Kemoterapik ajan olan cisplatin, kanser hücrelerinde gelişimi ilerlemeyi durdurucu etki gösterirken bununla birlikte sağlıklı hücreleri de yok etmektedir. Kemoterapik ilaçlarla birlikte fitoterapik bileşikler kullanılarak antikanser etkinin artırılması ve yan etkilerinin azaltılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır.

Tıbbi bitkiler sadece terapötik ajan olarak değil, farmakolojik araştırmalar ve ilaç geliştirme için önemlidir.

Sunulan çalışmada, akciğer kanserine etkileri araştırılan bitki endemik *Sideritis phrygia* dır. Böylelikle kemoterapetik ajan olarak kullanılan Cisplatin in akciğer kanseri hücre hattı olan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (A549) hücrelerinde, etkinliği ve *Sideritis phrygia* sulu ekstresinin muhtemel koruyucu etkinliği belirlenmeye çalışılmıştır. A549 hücre hattında *Sideritis phrygia* ekstresinin antikanserojenik etkinliği sitotoksosite ve genotoksosite parametreleriyle araştırılmıştır.

A549 hücre hattı üzerine *Sideritis phrygia* ekstraktlarının en etkin dozunun belirlenmesi amacıyla MTT yöntemi kullanılarak hücre canlılığı belirlendi. A549 hücre hattı üzerine

Sideritis phrygia ekstraktlarının sitotoksik olmayan dozları (100 µg/mL kadar olan) bulunmuş ardından genotoksite analizlerine geçilmiştir.

Bu tez çalışmasında *Sideritis phrygia* ekstraktlarının (10 µg/mL ve 1 µg/mL) genotoksik bir hasar oluşturmadığı görülmüştür. Cisplatin uygulanan gruplarda bir genotoksik hasar meydana gelmiştir ve kanser hücrelerinin sağ kalımını ortadan kaldırabildiği çalışmamızla da gösterilmiştir.

Cisplatin tarafından oluşturulmuş toksisiteyi engelleme amaçlı *Sideritis phrygia* ekstraktının 100 µg/mL ve 10 µg/mL uygulamalarının etkili olduğu görülmüştür. Uygun doz seçimlerinde cisplatin hem akciğerde hemde diğer dokularda genotoksitesini azaltmaya yönelik koruyucu tedavilere takviye edici olarak koruyucu etkisinin olduğu düşüncesini desteklemektedir.

Mikronükleus frekansları incelendiğinde gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

2020, xi + 81 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kanser, *Sideritis phrygia*, A549 hücre hattı, Cisplatin, Sitotoksosite, Genotoksosite.

ABSTRACT
M.Sc. Thesis

THE EFFECTS OF *Sideritis phrygia*
EXTRACT ON CISPLATIN TOXICITY
IN A549 CELLS

Nursenay ATEŞ

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of of Molecular Biology and Genetics Department

Supervisor: Prof. Mustafa KARGIOĞLU

Lung cancer is one of the leading causes of cancer deaths in both men and women worldwide. Despite numerous clinical studies in recent years, no significant improvement has been achieved in lung cancer.

Cisplatin, a chemotherapeutic agent, has an inhibitory effect on cancer cells and destroys healthy cells as well. Studies are carried out to increase the anticancer effect and reduce the side effects by using phytotherapy compounds together with chemotherapeutic drugs.

Medicinal plants are important not only as therapeutic agents, but also for pharmacological research and drug development.

In the presented study, the plant endemic *Sideritis phrygia* is its effects on lung cancer. Thus, the efficacy of Cisplatin used as a chemotherapeutic agent in non-small cell lung cancer (A549) cells, which is a lung cancer cell line, and the possible protective efficacy of *Sideritis phrygia* aqueous extract were tried to be determined. The anticarcinogenic efficacy of *Sideritis phrygia* extract in the A549 cell line was investigated by the cytotoxicity and genotoxicity parameters.

Cell viability was determined using the MTT method in order to determine the most

effective dose of *Sideritis phrygia* extracts on the A549 cell line. Non-cytotoxic doses (up to 100 µg / mL) of *Sideritis Phrygia* extracts were found on the A549 cell line, and then genotoxicity analyzes were started.

In this thesis study, it was observed that *Sideritis phrygia* extracts (10 µg / mL and 1 µg / mL) did not cause any genotoxic damage. A genotoxic damage occurred in the cisplatin applied groups, and our study has shown that it can eliminate the survival of cancer cells.

It has been observed that 100 µg / mL and 10 µg / mL applications of *Sideritis phrygia* extracts for the purpose of preventing toxicity caused by cisplatin are effective. In appropriate dose choices, cisplatin supports the idea that it has a protective effect as a supplement to preventive treatments aimed at reducing genotoxicity in both lung and other tissues.

When the micronucleus frequencies were examined, the differences between the groups were not found to be statistically significant.

2020, xi + 81 pages

Keywords: Cancer, *Sideritis phrygia*, Cisplatin, A549 cell line, Cytotoxicity, Genotoxicity.

TEŐEKKÖR

Bu araştırmanın konusu, bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen saygıdeğer, danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa KARGIOğLUNA, bilgi ve deneyimleriyle beni aydınlatarak sabrını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİğERCİ' ye, çalışmam sırasında bilgisini ve önerilerini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Ömer HAZMAN' a en içten teőekkürlerimi ve Őükranlarımı sunarım.

Her konuda koşulsuz sevgi ve sabırla yanımda olan, tüm zorluklara benimle birlikte göğüs geren, benden bir an olsun maddi manevi yardımlarını esirgemeyen, bugünlere gelmemde en büyük rol sahibi olan değerli annem Fatma ATEŞ, babam Bilal ATEŞ başta olmak üzere aileme sonsuz sevgi ve teőekkürlerimi sunarım.

Nursenay ATEŞ
Afyonkarahisar 2020

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	4
2.1 Kanser	4
2.1.1 Akciğer Kanseri	10
2.1.1.1 Dünyada Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi.....	12
2.1.1.2 Türkiye’de Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi	12
2.1.1.3 Akciğer Kanserinin Moleküler Mekanizması	13
2.1.1.4. Akciğer Kanserinde Tedavi.....	14
2.1.2 Akciğer Kanserinde Adenokarsinom Hücre Hattı Olarak A549 Hücre Hattı	14
2.2 Cisplatin Genel Özellikleri ve Moleküler Yapısı	15
2.2.1 Cisplatinin Toksik Etki Mekanizmaları	17
2.2.2 Cisplatin Toksisitesi	21
2.3 DNA Hasarı	22
2.3.1 DNA Hasarına Neden Olan Etkenler	24
2.3.1.1 DNA Hasarı Tipleri	25
2.3.2 DNA Tamiri	26
2.3.3 Tek Hücre Jel Elektroforez Testi (Comet Testi, SCGE).....	27
2.3.4 Mikronukleus Testi	31
2.4. Sideritis Türlerinin Genel Özellikleri ve Etkileri	33
2.4.1 <i>Sideritis phrygia</i> Bornm.	36
2.4.1.1 <i>Sideritis phrygia</i> Bornm. Üzerine Yapılan Bazı Çalışmalar	38
3. MATERYAL ve METOT	41
3.1 Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar.....	41

3.1.1 Cihazlar	41
3.1.2 Kimyasallar	42
3.2 <i>Sideritis Phrygia</i> Ekstraksiyonu	42
3.3 Hücre Kültürü	45
3.3.1 Hücre Kültürü Mediumunun Hazırlanması.....	47
3.3.2 A549 Hücrelerinin Kültüre Aktarılması	48
3.3.3 Hücrelerin Çoğaltılması (Pasajlanması).....	49
3.3.4 Hücrelerinin Sıvı Azotta Saklanması	50
3.3.5 Hücre Sayımı ve Hücre Canlılığının Belirlenmesi	50
3.4 MTT Hücre Viabilite Ölçüm Testi	51
3.4.1 MTT 'nin Hazırlanması	52
3.4.2 MTT Yöntemi ile <i>Sideritis phrygia</i> LD50 Dozunun Belirlenmesi	52
3.5 Comet Yöntemi.....	53
3.6 Mikronükleus Testi	55
3.7 İstatistiksel Analiz.....	57
4. BULGULAR	58
4.1 MTT Yöntemi ile <i>Sideritis phrygia</i> Ektresinin A549 Hücre Hattı Üzerine Olası Etkilerinin Değerlendirilmesi	58
4.2 DNA Hasar Düzeyleri ve MN Frekanslarının Değerlendirilmesi	58
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	61
6. KAYNAKLAR.....	65
ÖZGEÇMİŞ.....	81

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
CO_2	Karbondioksit
dH_2O	Distile su
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
mA	Miliamper
mL	Mililitre
mM	Milimolar
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
Mg	Miligram
NaCl	Sodyum klorür

Kısaltmalar

BID	BH-3 etkileşim bölgesi
BUN	Kan üre azotu
Cisplatin	cis-diamminedichloridoplatinum(II)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EMT	Epitel-mezenkimal geçişi
FBS	Fetal bovine serum
LMA	Düşük erime noktalı agaroz
MAPK	Mitojen aktive protein kinazlar
MOMP	Mitokondri dış membran geçirgenliği
mTOR	Rapamisinin memelilerdeki hedef
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)
NF- κ B	Nükleer faktör- kappaB
NMA	Normal erime noktalı agaroz
p53	Tümör protein 53
PBS	Fosfat tamponlu salin
ROT	Reaktif oksijen türleri
TNF	Tümör hücre ölüm faktörü
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Hanahan ve Weinberg'in 2000 yılında yayınladığı kanserin 6 özelliği	5
Şekil 2.2 2011'deki düzenlenmiş hali ile kanserin özellikleri	6
Şekil 2.3 Hücre bölünmeleri.	7
Şekil 2.4 Türkiye genelinde 2018 yılında en çok kanser görülen iller.	9
Şekil 2.5 TÜİK 2018 Yaş grubu ve cinsiyete göre seçilmiş ölüm nedenlerinin dağılımı	9
Şekil 2.6 2018'de her iki cinsiyet için en sık görülen 10 kanser türünün olguları ve ölümlerinin dağılımları.	11
Şekil 2.7 Cisplatinin moleküler yapısı ve fizikokimyasal özellikleri	16
Şekil 2.8 Cisplatinin oluşturduğu DNA hasarı ve oksidatif stres sonucunda oluşturulan apoptotik yanıt	19
Şekil 2.9 DNA Hasarlarına Hücresel Yanıtlar	26
Şekil 2.10 Comet analizinin aşamaları	29
Şekil 2.11 Görsel skorlama tekniği (AU) ile hücrelerin sınıflandırılması	30
Şekil 2.12 Mikronükleus meydana geliş aşamaları	32
Şekil 2.13 Klastojenler ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki MN'lar	33
Şekil 2.14 <i>Sideritis phrygia</i> Bornm.'nın yayılış gösterdiği alanları gösteren lokasyon haritası.	37
Şekil 2.15 <i>Sideritis phrygia</i> bitkisinin uçucu yağ ana bileşenleri	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan besiyerinin (medium) bileşenleri.....	47
Çizelge 3.2 Lizis çözeltisinin hazırlanması.....	54
Çizelge 3.3 Elektroforez çözeltisinin hazırlanması.....	54
Çizelge 3.4 Nötralizasyon çözeltisinin hazırlanması.....	54
Çizelge 3.5 KCl çözeltisinin hazırlanması.....	55
Çizelge 4.1 Comet ve MN değerlendirmesi.....	59

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 2.1 <i>Sideritis phrygia</i> Bornm.....	36
Resim 3.1 Kurutulan <i>Sideritis phrygia</i>	43
Resim 3.2 Çözücü ile toz haline getirilmiş bitkinin ekstaksiyon sırasındaki karışımı... 44	44
Resim 3.3 Süzgeç kâğıdından süzülen çözücü ile toz haline getirilmiş <i>S. phrygia</i>	44
Resim 3.4 <i>S. phrygia</i> su ekstraktları cam petrielerde kurutma işlemi.	45
Resim 3.5 Cam şişede muhafaza edilen kurumuş ekstraktlar.	45
Resim 4.1 A549 Hücre hattı üzerine <i>Sideritis phrygia</i> ekstraktı doz uygulamaları.....	58

1. GİRİŞ

Tarihte ilk kanseri tanımlayan ‘carcinoma’ ve ‘carcinoma’ kelimelerini ilk defa kullanan ve tümörlerin iyi huylu veya kötü huylu olması ile ilgili ilk ayrımı yapan Yunanlı bir hekim olan ve tıbbın babası olarak da bilinen kişi Hippocrates (MÖ:460-370)’tir. Fakat hastalığın ilk keşfi Hippocrates’ten çok daha eskilere dayanmaktadır. Örneğin eski Mısır’daki mumyalarda ve antik el yazmalarında M.Ö. 1600’lü yıllarda kemik kanserleri ile ilgili bilgilerin var olduğu yapılan incelemelerle tespit edilmiştir. Kanserle ilgili ilk bilgilerden birisi de meme kanseri ile ilgili M.Ö. 1500’lü yıllarda eski Mısır’daki kayıtlardır. Bu belgelerde meme kanserinin tedavi edilemeyen bir hastalık olduğundan bahsedilmektedir (Sudhakar 2009). Kanser terimi, ilk defa Hippokrat tarafından tümör etrafındaki şişmiş damarları yengecin bacaklarına benzettiği için kullanılmıştır. Yunan hekim Galen ise şişme anlamına gelen ‘oncos’ terimini kullanmıştır. Kanser, bir organizmadaki hücrelerin kontrolsüz şekilde bölünmesi, çoğalması ve birikmesi durumudur. Kanser tek bir organı etkileyebileceği gibi uzaktaki organları da yayılarak etkileyebilir. Günümüzde bazı standartlar belirlenmiş olsa da kanser türlerine özgü olarak farklı yaklaşımlar ve tedaviler uygulanmaktadır. Her insanın farklı DNA yapısına sahip olması çeşitli yaklaşımların oluşmasında büyük etkindir. Kanser tedavisinde kemoterapi, immünoterapi, radyoterapi, cerrahi, hedeflenmiş terapiler, hormon terapisi ve gen terapi gibi biyolojik terapiler birlikte ya da tek tek kullanılabilir.

Bir adenokarsinom hücre hattı olan A549 hücreleri, akciğer kanseri ve tedavisi ile ilgili çalışmalarda kullanılmaktadır. Ayrıca kanser olmayan fakat akciğerle ilişkili olabilecek hastalıklara bazı bioaktif maddelerin olası etkilerinin araştırılması amacıyla da kullanılmaktadır.

Kemoterapinin gerçek amacı kanser hücrelerini kemoterapötik ajanlar kullanarak öldürmektir, sitotoksik anti neoplastik ajanlar bu çeşit tedavilerin yapı taşıdır (Baykara 2016). Güçlü bir antineoplastik ilaç olan cisplatin akciğer, over, testis ve meme kanseri gibi kanser çeşitlerinin tedavisinde kemoterapötik ajan olarak sıklıkla kullanılır (Becit 2017). Cisplatin hücre tipine ve konsantrasyonuna bağlı olarak transkripsiyon veya

DNA replikasyon mekanizmasına müdahale ederek sitotoksositeyi indükler (Florea ve Büsselberg 2011). Yapılan güncel çalışmalar incelendiğinde kemoterapötik ilaçlara ek olarak çeşitli bitkisel kaynaklı bileşikler de kullanılmaktadır. Özellikle de fenolik bileşikler kullanılarak antikanser etkinin artırılması, sitotoksitenin azaltılması hedeflenmekte ve araştırma yapılmaktadır (In-Hyoung vd. 2014, Chen vd. 2015). Cisplatin'in kanser kemoterapisinde etkinliğini arttırmak, direnç gelişimini ve toksisitesini azaltmak için, diğer antikemoterapötikler ve antioksidan maddeler ile birlikte kullanımı olumlu sonuçlar doğurduğu yapılan çalışmalarda, araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur. Bununla birlikte Cisplatin'in antikanser tedavisini iyileştirme ve neden olduğu toksik etkilerin azaltılması için daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Florea ve Büsselberg 2011).

Ülkemiz tıbbi bitkiler yönünden zengin bir flora sahiptir. *Lamiaceae* bu florayı oluşturan familyalardan birisidir. *Lamiaceae* familyası, dünya genelinde yaklaşık 230 cins ve 7100 türden oluşur. Bu familyanın birçok türü tıpta, gıda endüstrisinde ve kozmetik alanlarındaki kullanımları ile çok önem arz etmektedir. *Lamiaceae* ailesine ait bazı cinsler *Salvia*, *Mentha* ve *Sideritis*'tir. *Sideritis* türleri, antiülserojenik, antimikrobiyal ve anti-inflamatuar özellikleri nedeniyle halk tıbbında kullanılmaktadır (Stagos vd. 2012). Anadolu'da yöreden yöreye değişmekle birlikte en çok 'dağ çayı', 'yayla çayı' veya 'çay otu' olarak isimlendirilen *Sideritis* türleri aromaların dan dolayı halk arasında daha çok çay olarak kullanılmaktadır.

Bitkisel kaynaklı besinler ve bunların aktif bileşenleri ile ilgili çalışmalar son yıllarda çok artmış olup özellikle kansere karşı korumadaki etkileri üzerine yoğun bir şekilde durulmakta ve çalışmalar yapılmaktadır (Yalçın vd. 2017). Yapılan bu çalışmalar fitokimyasal bileşiklerin kanser oluşumunu önlemede proflaktik olarak kullanımlarının yanında, oluşan kanseri tedavi etmeye yönelik olarak ta kullanıldığı bilinmektedir. Fitokimyasal bileşiklerden örneğin fenolik ve alkaloidler bileşiklerin özellikle kanser veya tümörü tedavi edici etki göstermeleriyle, karotenoidler ise kanser engelleyici etkileriyle öne çıkmaktadırlar (Ayan vd. 2006).

Ülkemiz bitki örtüsü çeşitliliği bakımından zengin ülkeler arasındadır. Bu zenginlik,

bize çok değerli endemik bitkiler sunmaktadır. Bunlardan biri de *Lamiaceae* ailesinden, *Sideritis phrygia* bitkisidir. Bu tez çalışmasında kemoterapetik ajan olarak kullanılan Cisplatin in akciğer kanseri hücre hattı olan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (A549) zerinde, etkinliği ve *Sideritis phrygia* sulu ekstresinin muhtemel koruyucu etkinliği belirlenmeye çalışılmıştır. A549 hücre hattında *Sideritis phrygia* ekstresinin antikanserojenik etkinliği sitotoksisite ve genotoksisite parametreleriyle araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalma, farklılaşmasının bloke edilmesi, azalmış apoptoz, değişmiş doku yapısı gibi karakteristik özelliklere sahip olmasıdır (Yağcı ve Güneş 2017). Dünya çapında önde gelen mortalite ve morbidite nedenlerinden biri olması sebebiyle günümüzde önemli halk sağlığı problemlerindendir (Silva ve Al-Jamal 2017). Ayrıca kanser vücudumuzun değişik bölgelerindeki hücrelerin edindikleri genetik ve epigenetik düzeydeki hatalar neticesinde büyüme avantajı kazanmaları ve kontrolsüz bölünmeleri sonucunda ortaya çıkar (Koutsogiannouli vd. 2013).

Vücut, temel yaşam birimleri olan birçok hücre tipinden oluşur. Bu hücreler vücudu sağlıklı tutmak için kontrollü bir şekilde büyümekte ve bölünmektedir. Hücreler yaşlandığında ya da hasar gördüğünde ölürlere ve programlanmış bir şekilde yeni hücrelerle değiştirilirler. Bu duruma apoptoz denir. Fakat bazen bu programlanmış hücre ölümünü kontrol eden mekanizmalarda bazı aksaklıklar veya hatalar oluşur. Apoptozun bozulması yaşanan veya hasar gördüğü için yapı ve fonksiyonlarını yapamayan hücrelerin bölünerek çoğalmaya olanak sağlar. Bundan dolayı yapı ve fonksiyon olarak bulunduğu doku ve organlara yararı olmayan, aksine kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya devam ederse zararlı olabilecek tümör adı verilen yapılar (kitleler) oluşmaya başlar (Baran 2018).

Kanser oluşumunda etkili olan tümörler iyi huylu tümör ve kötü huylu olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Hücreler kanserli değilse, tümör iyi huylu (benign) olarak ifade edilir. İyi huylu tümörler yakındaki dokuları istila etmezler veya vücudun diğer bölgelerine yayılma özelliği (metastaz) göstermezler. Bu durumda kitle, cerrahi yolla çıkartılarak tam tedavi sağlanabilir. Kötü huylu (malign) tümörlerin ise kanser hücrelerinden oluştuğu kabul edilmektedir. Kötü huylu tümörler dolaşım sistemi (kan ve lenf) yoluyla öncelikle yakındaki dokulara, sonrasında ise uzak dokulara yayılmaya başlar. Yani hücreleri etrafındaki dokuyu istila yeteneği kazanmışsa kanser olarak kabul edilir. Kanser hücrelerinin dolaşım yoluyla yakın veya uzak doku ve organlara yayılmasına metastaz denir (Tarini 2018).

Kanserlerin büyük bir çoğunluğunu epitel hücrelerden türevlenen karsinomalar oluşturur. Kanserler kemik, kas gibi mezoderm hücrelerden kökenlenmiş ise bunlara sarkoma, eğer meme gibi salgı dokulardan meydana geliyor ise bunlara da adenokarsinomalar denir (Hill vd. 2001).

2000 yılından bu yana Hanahan ve Winberg'in kanserin özellikleri ile ilgili yaptığı çeşitli çalışmalar kural gibi görülmekte ve çoğu araştırmacıya yön göstermektedir. Bunlar şekilde (Şekil 2.1) gördüğümüz gibi otonom büyüme sinyali, anti büyüme faktörlerine karşı duyarsızlık, apoptozdan kaçış, sınırsız replikasyon potansiyeli, anjiyogenez, invazyon ve metastazdır (Hanahan ve Weinberg 2000).



Şekil 2.1 Hanahan ve Weinberg'in 2000 yılında yayınladığı kanserin 6 özelliği (Hanahan ve Weinberg 2011).

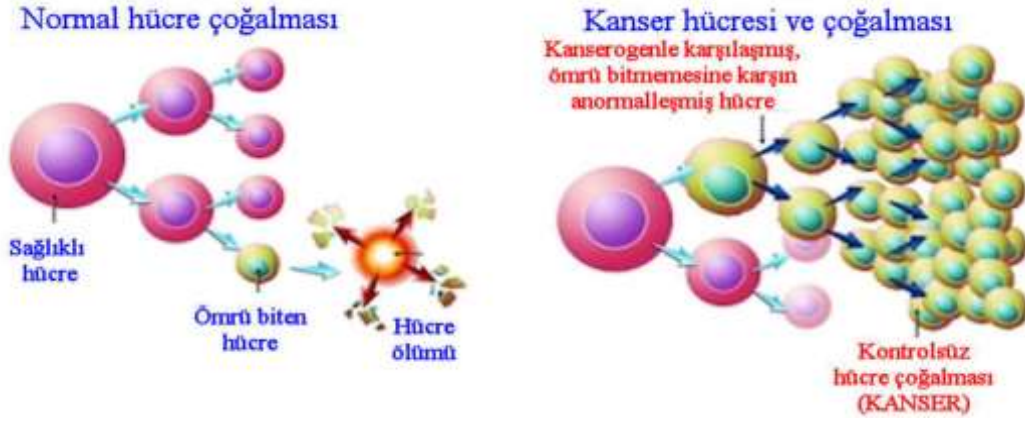
Yine bu araştırmacılar 2011 yılında yayımladıkları makalede altı maddenin yanına dört madde daha eklemişlerdir (Şekil 2.2). Bu eklenen yeni maddeler; genom instabilitesi, tümörü destekleyen inflamasyon ve mutasyon, İmmun yıkımdan kaçınmak ve enerji metabolizmasının yeniden programlanmasıdır (Hanahan ve Weinberg 2011).



Şekil 2.2 2011'deki düzenlenmiş hali ile kanserin özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2011).

Kanser hastalığı için iki grup risk faktörü öne çıkmaktadır. Bunlar, önlenebilir risk faktörleri ve önlenemeyen risk faktörleridir. Önlenemeyen risk faktörleri olarak yaş, cinsiyet, aile öyküsü ve diğer genetik faktörler sayılabilir. Önlenebilir risk faktörleri olarak ise çevresel etkenler sayılabilir. Kansere sebep olan çevresel faktörlere kanserojenler olarak isimlendirilmektedir. Kanserojenler kimyasal (organik ve inorganik moleküller), biyolojik (virüsler ve viroidler) ve fiziksel (UV ve iyonize ışınlar) kaynaklı olabilir. Kanserojenler konakçı hücrenin genetik bilgisini değiştirebilen ve mutajenik niteliği sayesinde kanser gelişimini tetikleyebilen çevresel faktörlerdir (Kalaycıoğlu vd. 2013).

Bütün kanserler, DNA dizisinde meydana gelen birtakım anormalliklerle oluşmaktadır (Şekil 2.3). Kanser çeşitlerinin %10-%15 arasında kalıtsal olduğu ve ebeveynlerden gelen genlerle aktarıldığı, geriye kalan %85-90' lık kısmını ise hayat boyunca canlı hücrelerdeki DNA'nın, mutajenlere maruz kalması, hücre DNA sıdındaki hafif progressif değişiklikler ve replikasyondan kaynaklı hataların oluşması ile şekillendiği düşünülmektedir. Bazı durumlarda oluşan bu mutasyonlardan biri, içinde bulunduğu hücrenin büyümesini ve bu hücreden türeyen kanser klonunun oluşmasını sağlar (Yokuş ve Çakır 2012).



Şekil 2.3 Hücre bölünmeleri.

Kansere neden olan faktör ne olursa olsun, sonuç olarak hücrenin genetik materyalinde bozulma meydana gelir. Tek bir gendeki mutasyondan çok, birkaç gende birden fazla oluşan hasar (hücre sayısının artması yönünde çalışan genler onkogenler, tümör önleyici genler ve DNA onarım genleri) kanser oluşumunda görev almaktadır (Yokuş ve Çakır 2012).

Kanser gelişim süreci başlangıçtan itibaren dört uzun zamanlı faz ile ele alınabilir (Adam vd. 2013). Kanser gelişimi ile ilişkili olarak söz konusu fazlar aşağıda maddeler halinde yazılmıştır:

- İndüksiyon fazı; 30 yıl veya daha uzun sürelidir. Radyasyon, toksinler gibi kanser yapıcı etkenlere maruziyet sonucu kanser oluşumunun başladığı fazdır. İnsan kanserinin de yaklaşık 3/4 ünün çevresel etkenler nedeniyle oluştuğu ifade edilmektedir (Adam et al. 2013).
- İnsüte fazı; bu fazda kanser gerçekten vardır. Ancak, başlangıç alanında bölgesel olarak kalır ve diğer dokulara yayılmaz.
- İnvazyon fazı; bu fazda, kanser hücreleri çoğalır ve yüzey alandan derin dokulara doğru ilerleme olur. Böylece damarlara ve lenfotik kanallara metastaz yapar.
- Disseminasyon fazı; doku içine tamamen girmiş olan kanser hücreleri, vücutta yer alan çeşitli doku ve organlara yayılma sağlar.

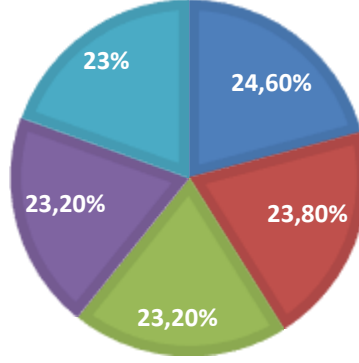
Başlangıç fazları olan induksiyon ve insüte fazları sonunda kanser gelişimi organizmada tamamlanmış olsa bile çoğunlukla hissedilen belirti durumları ortaya çıkmaz. Hastalığın bu döneminde olan hastalar, çoğunlukla düzenli tarama testleri yapılırken ya da başka bir hastalık nedeni ile analizler yapıldığında hastalıklarını öğrenebilmektedirler. Bu nedenle belirli yaştan sonra, özellikle toplumda sık görülen kanser türleri ile ilgili taramaların yapılması hem toplum sağlığı hem de kişi sağlığı açısından önemlilik arz etmektedir. Çünkü kanser gelişimi tanısının induksiyon fazında konması, erken tanı olarak tanımlanmakta ve hastalığın tedavisi daha rahat yapılabilmektedir. İnsüte fazda kanser gelişimini tamamlasa da diğer dokulara yayılmadığı (metastaz yapmadığı) için tedavisi daha kolaydır. Fakat gelişimi açısından üçüncü ve dördüncü faz olan invazyon ve disseminasyon fazlarına geçen kanser hastalığının tedavisi daha zor olmaktadır (Sarıova 2019).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO; World Health Organization) verilerine göre 2018 yılı içerisinde kanser, dünya genelinde ikinci ölüm nedenidir ve tahmini olarak 9,6 milyon insanın ölümünden sorumludur. Küresel olarak, her 6 ölümden 1'i kansere bağlıdır. Yine 2018 yılında WHO verisine göre en yaygın kanserler şunlardır: Akciğer (2,09 milyon vaka), Meme (2,09 milyon vaka), Kolorektal (1,80 milyon vaka), Prostat (1,28 milyon vaka), Cilt kanseri (melanom olmayan) (1,04 milyon vaka), Mide (1,03 milyon vaka) (İnt.Kyn.1).

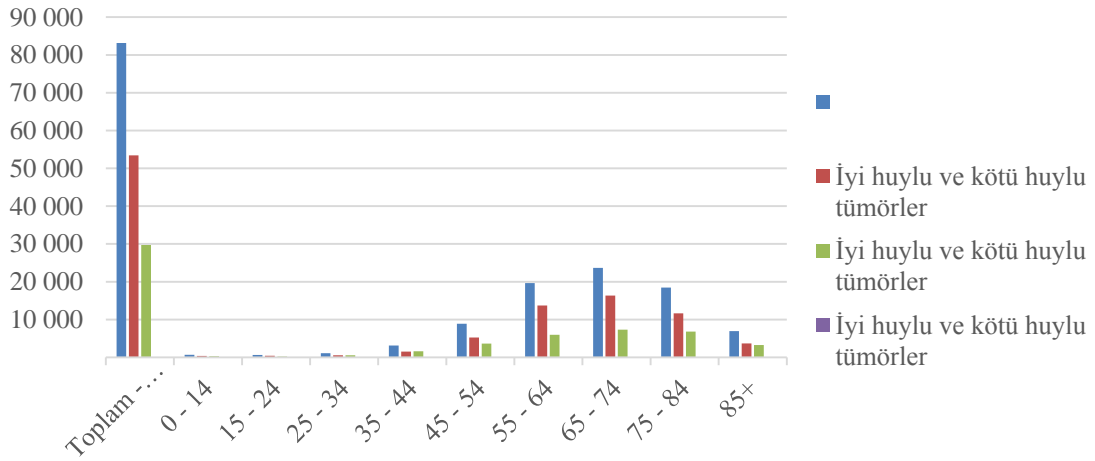
Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2018 verilerine göre, ölüm nedeni istatistiklerinde, iyi ve kötü huylu tümörlere bağlı ölümler bütün ölüm nedenleri arasında %19,7 ile ikinci sırada yer almaktadır. 2018 yılında ölümlerin toplam sayısı 81 bin 129 kişi olmuştur. Ayrıca ölümlerin %30,8'i gırtlak ve soluk borusu/bronş/akciğerin kötü huylu tümöründen kaynaklandığı bildirilmiştir. İkamet edilen illere göre ölüm oranları incelendiğinde; 2018 yılında iyi ve kötü huylu tümörler nedeniyle gerçekleşen ölümlerin en yüksek olduğu ilk beş il ise sırasıyla; %24,6 ile Kırklareli, %23,8 ile İstanbul, %23,2 ile Van ve Eskişehir, %23 ile Edirne oldu (Şekil 2.4) (İnt.Kyn.2).

ÖLÜM ORANLARI

■ Kırklareli ■ İstanbul ■ Van ■ Eskişehir ■ Edirne



Şekil 2.4 Türkiye genelinde 2018 yılında en çok kanser görülen iller.



Şekil 2.5 TÜİK 2018 Yaş grubu ve cinsiyete göre seçilmiş ölüm nedenlerinin dağılımı (İnt. Kyn. 2).

Yerleşmiş oldukları organ, dokuya ve köken aldıkları hücre çeşitlerine göre 100'ü aşkın kanser çeşidi tanımlanmış ve tahmini olarak 200'den fazla sayıda kanser türü olabileceği ifade edilmiştir (Sawyers vd. 2013).

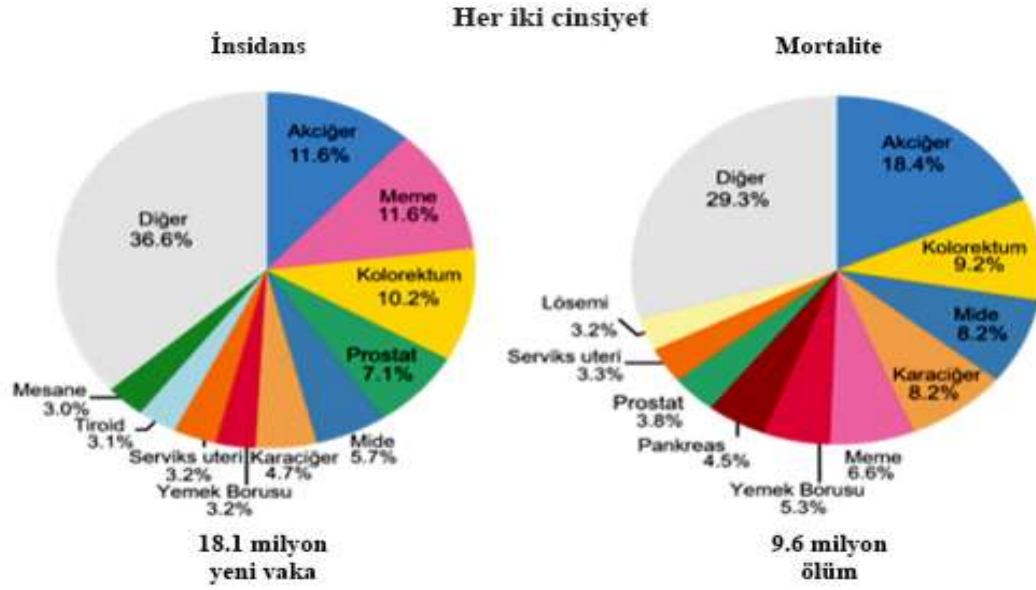
Farklı tipteki kanserler, farklı hızlarda büyüyüp farklı yayılma biçimleri gösterdikleri için her tipteki kanser tedaviye farklı cevaplar verir. Bu nedenle günümüzde kanser

hastalarının tedavisinde, kanser türüne göre farklı tedaviler uygulanabilmektedir. Kanser tedavisinde cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi olmak üzere esas olarak üç tedavi yaklaşımı kullanılmaktadır. Bazı kanserler cerrahi tedavi yöntemleri olmaksızın tedavi edilmezken diğerleri için kemoterapiye ek olarak daha farklı tedavi yaklaşımları uygun bir seçenek olabilmektedir (Barlak 2018). Mevcut durumdaki tedavi yöntemlerinin yan etkileri ve hastaların yaşam tarzına olumsuz etkileri sebebiyle konunun hissedarları ve bilim insanlarının daha doğal ve yan etkisi az olabilecek alternatif yöntemler araştırmaya, geliştirmeye teşvik etmiştir. Bu şartlarda bitkilerin ve bitkilerden elde edilen antikanser etkili olabilecek bileşenlerin etkileri öncelikle *in vivo* ve *in vitro* deney modelleri ile laboratuvarlarda, tedaviye etkisi olduğu gözlenenler ise kliniklerde gönüllüler üzerinde denenmeye başlanmıştır. Yapılan araştırmalar antioksidan özellikleri ile öne çıkan birçok bitki türünde bulunan aktif maddenin düşük dozlarda, organizmada koruyucu rol oynadığını göstermektedir. Yüksek dozlarda ise kanser hücreleri üzerinde öldürücü rol üstlenebileceğini göstermektedir (Sarıova 2019).

2.1.1 Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri hem erkek hem de kadınlarda dünya çapında kanser ölümlerinin önde gelen nedenlerinden biridir (Şekil 2.6) (Zappa ve Mousa 2016). Hayatımızda bu kadar tehlikeli hal alan bu kanser her yıl %3 oranında artmaktadır (Bingöl 2014).

Dünya Sağlık Örgütü akciğer kanserini iki geniş histolojik alt tipte sınıflandırır: Birincisi vakaların yaklaşık %85' ine sebep olan küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu ve ikincisi %15' ini oluşturan küçük hücreli akciğer karsinomu (Zappa ve Mousa 2016). Bununla birlikte, son yıllardaki terapötik gelişmeler, küçük hücreli olmayan akciğer karsinomunun alt sınıflandırılmasının yapılmasını gerekli kılmıştır. Böylelikle küçük hücreli olmayan akciğer kanseri türleri skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinomlar olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır (William ve Travis 2011, Malapelle vd. 2019).



Şekil 2.6 2018'de her iki cinsiyet için en sık görülen 10 kanser türünün olguları ve ölümlerinin dağılımları (Bray vd. 2018).

Akciğerlerin insan vücudunun temel solunum organı olması nedeniyle, akciğer kanseri için en önemli risk faktörleri solunan havanın kanserojen ihtiva ediyor olmasıdır. Bu durumdan dolayı, hava kirliliği, sigara içilmesi veya iş hayatına bağlı olarak kimyasal kanserojen maddelere solunum yoluyla maruziyet akciğer kanserinin gelişimini uyarabilmektedir. Sigara kullanımı akciğer kanserinin ve kansere bağlı ölümlerin birinci nedenidir. Nikotinin kendisi kanserojen olmamakla birlikte, sigara dumanında bulunan polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-bütanon kimyasal kanserojenler arasındadır. Bu kimyasallara kronik maruziyetler, DNA eklentilerinin oluşumuna ve bunu takip eden gen metilasyonuna, DNA sekansı değişikliklerine, DNA segmenti amplifikasyonunun silinmesine, tüm kromozom kazançları veya kayıplarına yol açar. Sigara içmeyenlere kıyasla sigara içenlerde akciğer kanseri göreceli riski 10 ila 30 kat arasında daha yüksek olabilmektedir. Risk derecesi günlük içilen sigara sayısına ve sigaranın ne kadar uzun süreli kullanıldığına bağlıdır. Sigarayı bırakanlarda 5 yıl içerisinde akciğer kanserine yakalanma riskinin azaldığı, 10-15 yılda sigara içmeyenlerde kansere yakalanma riskinin çok düşük olduğu bilinmektedir. Ancak bu akciğer kanserine yakalanma riskinin tamamen ortadan kalktığı anlamına gelmemektedir (Barta vd. 2019).

2.1.1.1 Dünyada Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi

Akciğer kanseri dünya çapında kanser nedenli ölümlerin başında gelmektedir (Cheng vd. 2020). Güney Avrupa, Orta Doğu, Kuzey Amerika ve Doğu Asya'da görülme sıklığı en yüksektir. Batı ve orta Afrika'da çok düşük oranlar tahmin edilmektedir. Genel olarak, kadınlarda görülme oranı erkeklerden daha düşüktür. Ancak akciğer kanseri şu anda kadınlar arasında dünya çapında en yaygın dördüncü kanserdir (513,000 vaka, tüm kanserlerin %8,5'i) ve kadınlarda kanser ölümlerinin (427.000 ölümle kansere bağlı ölümlerin %12,8'i) ikinci nedenidir. En yüksek akciğer kanseri insidansı Kuzey Amerika'da, görülme sıklığı en düşük Orta Afrika'dadır (Rafiemanesh vd. 2016).

Akciğer kanserinin bilinen en yaygın etiyoloji, Amerika Birleşik Devletleri'nde ve diğer ülkelerde vakaların %80'inden fazlasını tütün ürünlerinin kullanımı oluşturur. Sigara içmeyenlerde akciğer kanseri, kadınlarda ve Doğu Asya'da daha yaygındır bu durum pasif içicilik, kirlilik, mesleki kanserojenler ve kalıtsal genetik duyarlılığı arttıran çevresel risklerle ilişkilendirilmiştir (Herbst vd. 2018).

Akciğer kanseri vakalarının neredeyse yarısının (%49), İnsani Gelişme Endeksi'nde (İGE) orta ila düşük seviyelerde sıralanan ülkelerde meydana gelmesi nedeniyle önemlidir (Cheng vd. 2016).

2.1.1.2 Türkiye'de Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi

Ülkemizde akciğer kanseri en sık görülen ve ölüme sebep olan kanser türlerinden biridir. Sağlık Bakanlığı Kanser Daire Başkanlığı'nın 2018 yılındaki araştırmalarına göre akciğer kanseri ülkemizde hem tüm nüfusta hem de erkeklerde en sık görülen kanser türüdür. Kadınlarda ise beşinci sıradadır. Yine erkeklerde tüm kanserlerin %21,8'ini, kadınlarda ise %4,9'unu oluşturmaktadır. Türkiye'de akciğer kanserinin yaşa göre insidansı erkeklerde 100.000'de 60,4 nü oluşturur, kadınlarda ise 100.000'de 9,3 olarak bildirilmektedir. Ülkemizdeki akciğer kanserinin görülme sıklığı batı bölgelerinde daha fazladır. Yaş ilerledikçe bu kanserin görülme sıklığı artmaktadır.

Türk Toraks Derneği'nin 2009 yılında gerçekleştirdiği çalışma sonuçlarına göre Türkiye'de akciğer kanserine yakalanan hastaların yaş ortalaması 60 olup, %90,4'ü erkektir. En sık rastlanan tip skuamöz olmayan hücreli iken 45 yaş altı genç popülasyonda ve kadınlarda en sık adenokarsinoma saptanmaktadır. Olguların tanı konduğu sırada %47 gibi en büyük çoğunluğu metastatik evrede iken, %37'si lokal ileri evrede, sadece %16'sı operasyona uygun evrede yakalanmaktadır (Uluç ve vd. 2016).

2.1.1.3 Akciğer Kanserinin Moleküler Mekanizması

Akciğer kanserinin başlaması ve ilerlemesi, çevresel faktörlerden etkilenen dinamik epigenetik değişikliklerin yanı sıra nokta mutasyonları, delesyonlar, yer değiştirme veya amplifikasyonlar da içinde olmak üzere kalıcı genetik değişiklikler kombinasyonunun birikmesinin bir sonucudur. Epigenetik farklılıklar, hücrenin çekirdeğindeki bir protein ve DNA kompleksi olan ve replikasyon, onarım, rekombinasyon ve transkripsiyon gibi tüm DNA bağımlı işlemleri etkileyen kromatinin kalıtsal değişikliklerinin toplamını tanımlar. Kromatin aracılı transkripsiyon düzenleme, DNA metilasyonunu, histon modifikasyonlarını, nükleozom yeniden düzenlemesini, nükleer matriks ile etkileşimi ve küçük kodlayıcı olmayan RNA'lar yoluyla düzenlemeyi kapsar. Epitel-mezenkimal geçişi (EMT) ile ilişkili bir gen alt kümesinin, DNA metilasyonundan sonra küçük hücre dışı akciğer karsinomunu önemli ölçüde baskıladığı ve gen artışına özgü DNA metilasyonunun EMT ile korelasyon olduğu gösterilmiştir. EMT, hücre adezyonu kaybı ve artan hücre hareketliliği ile karakterize edilen temel ve korunan bir süreçtir. EMT, mezoderm oluşumu, nöral tüp oluşumu ve yara iyileşmesi de dâhil olmak üzere sayısız gelişimsel süreç için esastır. Bu durumla birlikte, metastazın başlatılması, hücre-hücre yapışması kaybı, hücre mobilitesinde artış ve invazyon da dâhil olmak üzere, EMT ile birçok yönden fenotipik benzerliğe sahiptir (Mehta vd. 2015).

Akciğer kanserini tetikleyen moleküler mekanizmalar kanserin başlaması, ilerlemesi, çevresel faktörlerden etkilenen dinamik ve epigenetik değişikliklerin yanı sıra nokta mutasyonları, delesyonlar, yer değiştirme veya amplifikasyonlar dâhil olmak üzere kalıcı genetik değişikliklerle kombinasyonları'nın birikmesi sonucu oluşur. Hücre içi sinyal iletimleri iyi tanımlanmış MAPK, mTOR, Notch, Hedgehog, Wnt gibi birçok sinyal yolları vardır ve bu sinyal iletim mekanizmaları üzerindeki bozulmalar da

kanser nedenlerinden biridir (Kaya 2019). Bu iyi tanımlanmış Hedgehog, Wnt ve Notch gibi sinyal yolları genellikle hücrelerin kendini yenilemesinde rol oynamaktadır. Böylelikle, bu yolları hedefleyen tedaviler hastalığın nüks etmesini, tekrarlamasını önlemeye yardımcı olabileceği düşünülmektedir (Prabavathy vd.2018).

2.1.1.4. Akciğer Kanserinde Tedavi

Akciğer kanserinin erken bir aşamada tespit edilmesi, bu hastalığa bağlı olarak meydana gelecek ölüm oranlarının azalmasına katkı sağlayacaktır (Çevik ve Dandıl 2019). Hedefe yönelik tedaviler, akciğer kanserinin yönetimini büyük ölçüde değiştirmektedir (Hirsch vd. 2016).

Son dönemlerde yapılan klinik çalışmalarda araştırılan yeni kemoterapi rejimlerine ve yeni sitotoksik kombinasyonlara rağmen, akciğer kanseri olan hastaların prognozunda belirgin bir iyileşme sağlanamamıştır (Spira ve Ettinger 2004). İnsidans ve ölüm oranlarına da bakıldığında tüm dünyada akciğer kanseri kanser türleri arasında ilk sırada yer almaktadır ve bu oranlar her yıl artma eğilimindedir. Akciğer kanserinde son 5 yılda hayatta kalma oranı ortaya konulduğunda bu oran sadece %16'dır. Akciğer kanser hücreleri genellikle geleneksel kemoterapi ve radyoterapiye dirençlilik gösterir (Alpay 2019). Bu nedenle akciğer kanserinin etiyojisi, önlenmesi, teşhisi ve tedavisi üzerine yapılan araştırmalar önemlidir ve acilen yeni, etkili tedavi yöntemleri ve ilaçlara ihtiyaç vardır (Li vd. 2018).

2.1.2 Akciğer Kanserinde Adenokarsinom Hücre Hattı Olarak A549 Hücre Hattı

Bir adenokarsinom hücre hattı olan A549 hücreleri, akciğer kanseri ve tedavisi ile ilgili çalışmalarda kullanılabildiği gibi, kanser olmayan fakat akciğerle ilişkili olabilecek hastalıklara bazı bioaktif maddelerin olası etkilerinin araştırılması amacıyla da kullanılmaktadır.

A549 hücre hattı, 1972 yılında sürekli çalışılabilecek bir hücre hattı soyu yaratmak için yapılan bir çalışmada akciğer adenokarsinomasından izole edilmiştir (Cooper et al.

2016).Kanserli akciğer doku kültürü pulmoner adenokarsinoması bulunan 58 yaşındaki bir Kafkasyalı erkekten alınmıştır. Bu hücreler tek tabakalı, yapışkan ve kültür flasklarında çoğaltılabilmektedir. A549 hücreleri tümör süpresör P53 geninin yabani-tipine (wild-type) sahiptir. A549 hücreleri %24 oranında 66 kromozoma sahip (%22 oranında 64 kromozom) hipotriploid bir insan hücre hattıdır. Çoğu hücrede iki X ve iki Y kromozomu vardır. Bununla birlikte, analiz edilen 50 hücrenin %40'ında bir veya her iki kromozom kaybolmuştur. Kromozom N2 ve N6, hücre başına tek kopyaya sahiptir ve N12 ve N17 genellikle 4 kopyaya sahiptir. Sitogenetik bilgi hücre hattının başlangıç stoğuna dayanmaktadır. Bu hücreler bir insan karyotipine sahiptir ve tek bir ana hücreden türetilmiş gibi görünmektedir (Lieber vd.1976).

Kanser araştırması için bir araç olarak geliştirilmesine rağmen, hücre hatları sonuç olarak insan akciğerinin Alveolar Tip II pnömositlerini temsil ediyor olması ile karakterize edildi. Bu nedenle hücre hattı yaklaşık kırk yıldır solunum yolu kanserlerinin araştırmasında temel noktayı oluşturmuştur (Cooper vd. 2016). A549 hücre hattı, akciğer adenokarsinomunun bir modeli ve pulmoner epitel hücreleri ile başka bir ifade ile solunum veya solunum hastalıkları ile ilişkili olabilecek *in vitro* birçok çalışmada yaygın olarak kullanılabilmektedir (Ulasli vd. 2013, Günay vd. 2016). A549 hücrelerinin diğer kullanım alanlarının içinde kanser araştırması, hava yolu fonksiyonu ve viroloji çalışmaları için distal akciğerin epitelyal modellerinin üretilmesi vardır (Kaya 2019).

2.2 Cisplatin Genel Özellikleri ve Moleküler Yapısı

Cisplatin, ağır bir metal olan platin (Pt) içeren geniş spektrumlu güçlü kemoterapötik bir ilaçtır (Florea ve Büsselberg 2011). Cisplatinin biyolojik etkileri 1965'de tesadüfen keşfedilmiştir. Sıvı ortamda platin elektrotlar ile oluşturulan elektriksel alanın *E. coli*'nin çoğalması üzerindeki etkisini incelemek üzere yapılan deneyler ve çalışmalar sırasında, platin elektrotlarından ortaya çıkan elektroliz ürünlerinin antibakteriyel ve antineoplastik etki yaptığı fark edilmiştir (Rosenberg vd.1965). Cisplatine ait yapılan çalışmalara ait bu bulgular yayınlandıktan sonra, yapılan ileri araştırmalar ile ilk keşfedilen platin türevi olan cisplatinin ve platin kompleksleri' nin antitümör ve karsinojenik etki gücü kanıtlanmıştır (Kellant 2007).

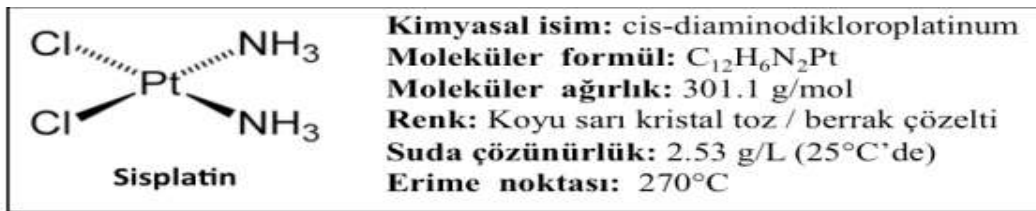
Cisplatin ile tedavi 1971 yılında başlamış, 1978 yılında FDA (Gıda ve İlaç İdaresi) tarafından platin grubu taşıyan kemoterapötiklerin kanser tedavisinde kullanımı onaylanmıştır (Boulikas ve Vougiouka 2003, Galluzzi vd. 2011). Yine aynı yıl testis ve yumurtalık kanserlerini tedavi etmek amacı ile kullanılmış ve ilk platin ajan olarak tarihe geçmiştir (Amptoulach ve Tsavaris, 2011). Cisplatin o zamandan bu zamana kanser savaşında en önemLi başarılarından biridir (El-Awady vd. 2011).

Cisplatin, platin temelli, alkilleyici ajanlar sınıfına giren bir kemoterapi ilacıdır. WHO tarafından 2016-2018 ‘Gerekli İlaçlar Listesi’nde yer almaktadır.

Geniş spektrumlu antineoplastik ilaç olan cisplatin, tek başına veya diğer antineoplastik ajanlarla ya da radyoterapi ile birlikte akciğer kanseri, özefagus, testis, mesane, prostat, over, serviks, ağız, baş-boyun kanserleri gibi solid tümörlerin tedavisinde sıklıkla kullanılan kemoterapötik bir ajandır (Boulikas ve Vougiouka 2003).

Kanser tedavisinde kemoterapötik bir ajan olarak kullanılan cisplatin (cis-diaminodichloroplatinium), kanser hücrelerinin çoğalmasını engelleyebilir ve aynı zamanda yan etkiler nedeniyle vücuttaki farklı dokulara ve organlara da zarar verebilir (Chirina vd.2009, Goyer vd.2001)

Cisplatin, (cis-diaminodikloroplatinyum, $(PtII(NH_3)_2Cl_2)$, CDDP) yatay düzlemde cis pozisyonunda platin atomuna bağlı klor ve amonyum içeren inorganik, suda çözünür bir moleküldür (Şekil 2.7). Sadece cis izomeri sitotoksik özelliğe sahiptir (Frezza vd. 2010, Dasari ve Tchounwou 2014).



Şekil 2.7 Cisplatinin moleküler yapısı ve fizikokimyasal özellikleri (Dasari ve Tchounwou 2014).

Cisplatinin antikanser etkisi DNA sarmalına çapraz bağlanıp DNA sentezini engelleyen kompleks oluşturmamasından dolayı meydana gelmektedir. Cisplatin, tümör hücresinde DNA onarım mekanizmasında interferasyona ve DNA hasarına neden olarak kanser hücrelerinde apoptozu indüklemektedir. Cisplatinin antikanser etki mekanizmasının dayandığı apoptozun indüksiyonu toksisite mekanizmasının da kökünü oluşturmaktadır (Florea ve Büsselberg 2011).

2.2.1 Cisplatinin Toksik Etki Mekanizmaları

Cisplatinin, başta nefrotoksisite olmak üzere, nörotoksisite, ototoksisite, hepatotoksisite, miyelosupresif etki, geçici lökopeni, trombositopeni ve anemi gibi doza bağımlı şekilde yan etkileri bulunmaktadır. Bu yan etkilere rağmen cisplatin güçlü kemoterapötik bir ajan olması nedeniyle günümüzde kullanımı devam etmektedir (Boulikas ve Vougiouka 2003, Hartmann ve Lipp 2003).

Cisplatinin sebep olduğu toksik etkilerin altında yatan temel mekanizmalar karmaşıktır ve aydınlatılamamıştır. Fakat bununla birlikte deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre; membran taşıyıcılarının rolü, cisplatinin toksik metabolitlerine dönüşümü, nükleer ve mitokondriyal DNA hasarı, oksidatif stres ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, apoptoz aktivasyonu, inflamatuvar yanıtın artması üzerindeki mekanizmalar değerlendirilmektedir (Kellant 2007, Florea ve Büsselberg 2011, Dugbartey vd. 2016).

Membran taşıyıcılarının rolü

Son yıllarda yapılan çalışmalarda cisplatinin nefrotoksisitesi ile ilişkili olduğu düşünülen iki farklı membran taşıyıcı sistem belirlenmiştir. Cisplatin, kolaylaştırılmış difüzyon ile taşınarak hedef organlarda orantısız biriktiği gösterilmiştir. Dolayısıyla bu olayın nefrotoksisiteye yol açabileceği düşünülmüştür. Yapılan çalışmalar cisplatinin proksimal tübüler epitel hücrelerinden alınması ile ilişkilendirilmiş bir bazolateral organik katyon taşıyıcısı (OCT) tanımlanmıştır. İnsanlarda tanımlanan 3 izoformu bulunmaktadır bunlar; OCT1, OCT2, OCT3 dır. OCT2, insanlarda ve hayvanlarda cisplatinin hücre içine alınmasından ve sitotoksisitesinden sorumlu ana organik

taşıyıcıdır. Günümüzde belirlenen diğer bir taşıyıcı ise bakır transport proteini “copper transporter 1” (CTR1)’dir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda CTR1’in cisplatinin sitotoksitesinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (Ishida vd. 2002, Wang ve Lippard 2005, Dugbartey vd. 2016).

Toksik metabolit oluşumu

Yapılan hayvan deneyleri sonucunda cisplatinin renal tübüler epitel hücrelerinde daha güçlü nefrotoksik etkili bir metabolitine dönüştüğü ve bu şekilde bir protoksin olduğu bildirilmektedir. Cisplatinin redükte glutasyon ile konjugasyonu sonucunda oluşan reaktif tiyollerin toksisiteye yol açabileceği belirtilmektedir (Dugbartey vd. 2016).

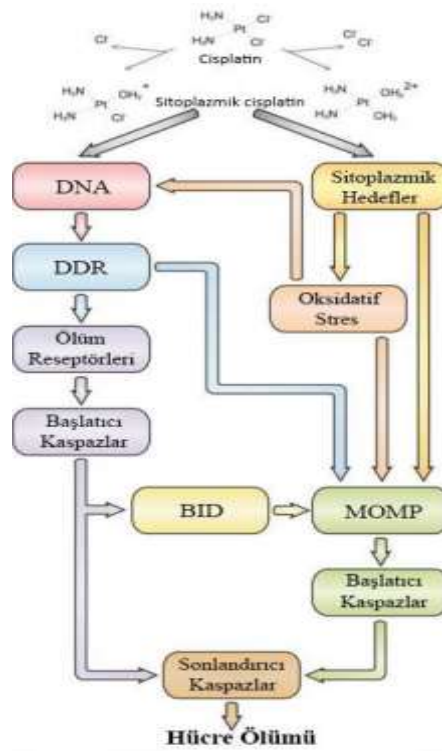
Bu mekanizmada cisplatin renal tübüler hücrelerde glutasyon-Stransferaz Pi (GSTP) enziminin katalizlemesi sonucu glutasyon konjugatlarına (Pt-GSH) dönüşür ve bu konjugat oldukça kararsız bir yapıdadır. Ardından glutasyon konjugatları tübüler hücrelerden geçer ve gama-glutamil transpeptidaz (GGT) ve aminotransferaz N (APN) enzimleri tarafından sisteinil-glisin konjugatları ve sistein konjugatlarına ayrılır. Sistein konjugatları proksimal tübüler hücre içine geçer ve orada sistein-Skonjugat beta liyaz (CCBL) aracılığı ile yüksek reaktif sistein tiyollere dönüştürülür. Reaktif sistein tiyollerinin proksimal tübüler hücrelerdeki esansiyel proteinlere bağlanması sonucu toksisiteye sebep olur (Town send vd. 2009).

DNA katım ürünü oluşturma

Cisplatin, pürinlerin N7 reaktif merkezine bağlanarak DNA’da sarmal içi ve sarmallar arası çapraz bağlar oluşturarak sitotoksik etkisini göstermektedir. Çapraz bağların büyük bir çoğunluğu 1,2 sarmal içi d(CpG) ve d(ApG) yapılarıdır. Cisplatinin oluşturduğu DNA hasarı hücre döngüsünü G2 ve S fazında durdurarak, nükleotid eksizyon onarımı (NER) ve yanlış eşleşme onarımı (MMR) gibi tamir mekanizmalarının devreye sokulmasını tetikler ve eğer DNA onarılamayacak kadar hasarlı bir halde ise Fas, p53, p73 ve Chk2 proteinlerinin aktivasyonu sağlanmakta ve

hücre apoptoz mekanizması aracılığı ile ölmektedir (Eastman 1987, Sancar vd. 2004, Vitale vd. 2011).

Cisplatinin sitotoksik etkisinin diğer nedeni de hücrelerde doz ve uygulanma süresi ile doğru orantılı bir şekilde oksidatif stres oluşturmasıdır. Tiyol grubu içeren antioksidanlar, hücrelerde serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesinde görev almaktadır. Cisplatin, tiyol grupları ile etkileşime girerek tiyil radikali oluşumuna neden olmaktadır (Brozovic vd. 2010).



Şekil 2.8 Cisplatinin oluşturduğu DNA hasarı ve oksidatif stres sonucunda oluşturulan apoptotik yanıt (Galluzzi vd. 2012).

Ayrıca sıçanlarda cisplatin ile indüklenen kardiyak toksisite modelinde hem nükleer hem mitokondriyal DNA'nın önemli derecede hasara uğradığı gösterilmiştir (El-Awady vd. 2011).

Oksidatif stres

Son zamanlarda yapılan araştırmalar oksidatif stresin, cisplatine bağlı hepatoksisitede önemli rol aldığını göstermiştir (Aleisa vd. 2007, Martins vd. 2008). Fakat cisplatinin hepatoksisite hakkında bilgi yetersizliği ve bunun altında yatan moleküler mekanizma tam olarak açıklanamamıştır (Pratibha vd. 2006, Aleisa vd. 2007).

Serbest oksijen radikal oluşumuna bağlı olarak, özellikle karaciğer ve böbrekteki lipid peroksidasyonunu arttırması ve oksidatif stres ile indüklenen DNA hasarı, cisplatinin toksisitesinden sorumlu tutulmuştur (Sabuncuoğlu vd. 2008, Dugbartey vd.2016).

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun cisplatin konsantrasyonu na ve maruz kalma süresine bağlı olduğu ve bu reaktif oksijen türlerinin hem ekstrinsik hem intrinsik yollar ile apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Brozovic vd. 2010, Florea ve Büsselberg 2011).

Kanser hücreleri, onkojenik uyarma, artan metabolik aktivite ve mitokondriyal kusur nedeniyle normal hücelere göre daha fazla oksidatif stres gösterir bu oksidatif stres, cisplatin toksisitesinde yer alan en önemli mekanizmalardan biridir. Oksidatif strese maruz kalmak biyolojik fonksiyonları bozabilir. Mitokondri, cisplatin ile indüklenen oksidatif stresin birincil hedefi olup mitokondriyal disfonksiyonuna, sinyal moleküllerinin aktivasyonuna, pro-apoptotik genlerin transkripsiyonuna ve sonuçta hücre ölümüne yol açan bir dizi olaya yol açabilmektedir (Dasari ve Tchounwou 2014).

İnflamatuvar yanıt

Son senelerde yapılan çalışmalarda, cisplatin toksisitesinde inflamatuvar yanıtın da önemli bir rolü olduğu tespit edilmiştir. Cisplatinin, proinflamatuvar sitokin olan TNF-alfa üretiminden sorumlu NF-κB translokasyonu dâhil olmak üzere birçok inflamatuvar sitokin ve kemokini arttırdığı pek çok çalışmada bildirilmektedir. Serbest oksijen radikallerinin yanı sıra sitokinlerin ve kemokinlerin cisplatin sitotoksitesini arttırdığı

ve toksik etkilerinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (Ramesh vd.2007, Dugbartey vd. 2016).

Sitotoksik etkili olduđu bilinen cisplatinin dűřuk dozlarda kaspaz bađımlı yolak ile apoptozu indűkleyebildiđi, daha yűksek dozlarda nekrotik hűcre ۆlűműne neden olduđu gösterilmiřtir (Dasari ve Tchounwou 2014).

Cisplatinin oluřturduđu reaktif oksijen bileřiklerinin neden olduđu oksidatif stres, apoptozu arttırmaktadır. Cisplatinin mitokondriyel iřlev bozukluđuna neden olarak hűcrenin elektron transport zincirini etkilediđi ve bu řekilde hűcreyi ATP kaybına uđrattıđı bilinmektedir. Cisplatinin dozunun artması, hűcrede ATP kaybının artmasına bađlı metabolik iřlevlerin bozulmasına ve bۆylelikle hűcre ۆlűműne neden olmaktadır (Hanigan ve Devarajan 2003, Siddik 2003).

Mitojen aktive protein kinazlar (MAPK), hűcrenel sinyalleri dűzenleyerek hűcre bűyűmesi ve canlılıđını dűzenleyen serin-teronin protein kinazlardan oluřan enzim ailesidir. Cisplatinin ۆzellikle kűçük hűcreli akciđer kanser hűcreleri olmak ۆzere çeřitli hűcrelerde, MAPK ailesinden c-Jun N-terminal kinaz (stres ile aktive protein kinaz, JNK) stres sinyal iletim yolaklarının aktivatۆrű olduđu gösterilmektedir. Diđer yandan, MAPK enzim ailesinden hűcreler arası sinyal dűzenleyici kinaz (ERK) aktivasyonunun ise p53 aracılıđı ile cisplatin tarafından indűklenen DNA hasarının onarılması için hűcre siklusunu duraklattıđı gösterilmiřtir (Dadhaniya 2011).

2.2.2 Cisplatin Toksisitesi

Bu ilacın klinik kullanımını sınırlandıran en ۆnemli yan etkisi nefrotoksisitedir (Anand ve Bashey 1993). Cisplatin nefrotoksisitesinin etiyolojisinde birden fazla faktۆrűn rolű sۆz konusudur. Bunlar esas olarak, ilacın tubuler hűcre DNA'sı ile etkileřimi, mitokondriyal bozukluklar, tubuler hűcrelerdeki Na⁺ K⁺ ATPaz aktivitesinin inhibisyonu, peroksidasyona karřı koruyucu enzim aktivitelerinde azalmalar, hemodinamik faktۆrlerde ve renin anjiotensin sisteminde oluřan deđiřikliklerdir (Kurt vd.2002).

Yüksek dozlarda cisplatine maruz kalan bir insanın, böbrek fonksiyonlarını tamamen bozabilecek bir nefrotoksin olarak değerlendirilmektedir. Cisplatin özellikle proksimal tübül hücrelerinde, diğer organlara göre daha fazla tutularak ciddi böbrek hasarına yol açar. İnsanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar cisplatinin kan üre azotu (BUN) düzeyinde artışa, elektrolit kaybını arttırdığı, renal kan akımında, glomerüler filtrasyon hızında ve renal klerenste doz ve zamana bağlı olarak azalmaya yol açtığı gözlenmiştir (Hanigan ve Devarajan 2003, Dasari ve Tchounwou 2014).

5 ile 10 mg/kg arasında dozlarda cisplatin uygulanan sıçanlarda doz-bağımlı BUN ve serum kreatinin düzeylerinde artış olmuştur. Histopatolojik olarak incelenen böbrek dokusunda da nekrotik oluşumu gözlenmiştir (Brozovic vd. 2010).

Birçok anti kanser ilacın sperm kromozomlarında anormalliklere sebep olduğu deneysel olarak gösterilmiştir. Ayrıca düşük doz cisplatinin Leyding hücre işlevlerinde herhangi bir olumsuz etkiye neden olmadığı, ancak kümülatif yüksek doz kemoterapinin kalıcı hasara yol açtığı bildirilmektedir (Hartmann ve Lipp 2003).

Cisplatin, plasentayı geçerek fetal hasara neden olmaktadır. Cisplatinin deney hayvanlarında yapılan çalışmada teratojenik ve embriyotoksik olduğu gösterilmiştir (Hartmann ve Lipp 2003).

Kardiyotoksitesi kemoterapi uygulamalarına bağlı kardiyovasküler komplikasyonlar sık karşılaşılmaktadır. Cisplatin tedavisi gören hastalarda ortalama yirmi yıl sonra kardiyotoksite tanımlanmıştır. Bunun yanı sıra vasküler endotelial hasar, akut miyokard infarktüsü, otonomik kardiyovasküler disfonksiyon, hipertansiyon ve hipotansiyonun da görüldüğü bildirilmiştir (Dugbortoy vd. 2016).

2.3 DNA Hasarı

DNA çeşitli reaktif moleküllerin hedefi olan, hasara duyarlılığı yüksek bir moleküldür. Genetik bilgi deposudur. DNA'nın yapısı durağan değildir. Hücrede endojen ve ekzojen kaynaklı birtakım etkenlere maruz kalan DNA'nın yapısı değişmektedir. DNA'daki bu değişiklikler enzimler tarafından tespit edilebilir, tamir edilebilir ve normale

döndürülebilir düzeyde ise bu durum ‘DNA Hasarı’ olarak adlandırılmaktadır. Fakat DNA hasarları DNA'nın temel dizisinde geri döndürülemez tamir edilemez durumlara yol açmışsa bunlar DNA'da mutasyonlara, kalıtsal hastalıklara, yaşlanmaya sebep olur (Hoeijmakers 2009, Ciccia ve Elledge 2010, Kumar vd. 2020).

Güneşten gelen ultraviyole ışınlar, iyonize radyasyon, sigara, hava kirliliği, parasetamol gibi bazı ilaç intoksikasyonları, pestisidler, mantar kaynaklı aflatoksinler, bazı kemoterapi ilaçları (cisplatin, nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin vb.), demir, bakır, nikel, krom, cıva gibi ağır metaller ve buna benzer etkenler DNA'nın yapısında değişikliklere neden olan ekzojen faktörlerdir. (Hoeijmakers 2009, Ciccia ve Elledge 2010, Dinçer ve Kankaya 2010, Kumar vd. 2020). Endojen faktörler ise hücre metabolitler, ROT'lar, NOT'lar, lipid peroksidasyon ürünleri, endojen alkilleyici ajanlar ve oksidatif stres ve hasardan kaynaklanabildiği gibi DNA'da kendiliğinden de oluşabilmektedir.

Fiziksel ajanların ilk sırasında iyonizan radyasyon gelir. Radyasyon enerjisinin doğrudan etkisi ile DNA zincir kırıkları oluşurken, radyasyonla açığa çıkan enerjiyle uyarılan moleküllerin (hidroksil radikalleri) DNA ile etkileşimi hem DNA zincir kırıklarına hem de oksidatif baz modifikasyonlarına sebep olmaktadır. Diğer fiziksel faktör olan UV ışınları DNA üzerinde çapraz bağlanmalara, pirimidin dimerleri oluşumuna ve zincir kırıklarına sebep olmaktadır. DNA hasarı oluşturan kimyasal ajanların başında gelen alkilleyici maddeler, nitroz asid, platinyum türevleri gibi çapraz bağlayıcılar ve sitokrom P450 sistemi ile metabolize edilen ksenobiyotikler (aromatik aminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aflatoksinler ve fenitoin, warfarin, rifampin gibi ilaçlar) gelmektedir. Bu kimyasallar bazları alkilleyerek, oksitleyerek, bazlar arasında çapraz bağlanmalar oluşturarak veya zincir kırıklarına neden olarak DNA hasarı oluştururlar. (De Bont ve van Larebeke 2004, Hoeijmakers 2009, Dinçer ve Kankaya 2010, Kumar vd. 2020).

Memeli genomunda her gün yaklaşık olarak 10^4 'ten fazla kodlanmayan veya yanlış kodlamaya neden olan hasar meydana gelmektedir (Slupphaug vd. 2003, Iyama ve Wilson 2013). Bu hasar mekanizması, karbon merkezli şeker radikallerinin ve OH- veya

H- bağlanmış heterosiklik baz radikallerinin oluşumuna yol açan, serbest radikallerin ayrılma ve birleşme tepkimelerinden ibarettir (Atmaca ve Aksoy 2009). DNA hasarı hücrede, hasarla başa çıkabilecek ya da bunu gerçekleştiremiyorsa programlı hücre ölümünü sağlayacak hücresele olayları tetikler (Kulaksız ve sancar 2007). DNA'daki hasarlar; tek baz değişimi (deaminasyon, depürinasyon, baz alkilasyonu, delesyon, insersiyon vs), tek veya çift zincir kırıkları, benzer veya farklı DNA zincirleri arasında çapraz bağlanma gibi çeşitli şekillerde olabilmektedir (Sancar vd. 2004, Ciccia ve Elledge 2010, Samarakkody vd. 2020). Hasarın yoğunluğuna ve tipine bağlı olarak; hücre döngüsünün durdurulması, gen ifadesinin değişmesi, DNA tamirinin uyarılması, programlı hücre ölümü, kanser ya da yaşlanma gibi olaylar meydana gelebilmektedir (Sancar vd. 2004, Hoeijmakers 2009, Sherman 2011). Hasar düşük seviyede ise DNA onarım mekanizmaları tarafından verimli bir şekilde onarılır. Ağır hasarlar apoptotik mekanizmaları uyararak hücre ölümüne sebep olur. Orta dereceli hasarlar çoğunlukla mutasyonla sonuçlanırlar (Dinçer ve Kankaya 2010).

2.3.1 DNA Hasarına Neden Olan Etkenler

- a) Spontan veya kalıtsal oluşan gen mutasyonları
- b) Çevresel faktörler
 - Ultraviyole Işık
 - İyonize radyasyon
 - Elektromanyetik dalgalar
 - Kimyasal ajanlar
 - Sigara alkol kullanımı
 - Hava kirliliği
 - Kötü beslenme alışkanlığı
- c) Doğal hücresele metabolizmadan kaynaklanan faktörler
 - Mitokondriden enerji üretim esnasında oluşan Serbest Radikaller
 - Enflamasyon
 - Detoksifikasyon işlemleri

Yukarıda belirtilen maddeler; hücre DNA hasarlarına farklı metabolik yollar ile cevap verir. Ağır DNA hasarları hücrenin apoptozis yolunu aktive ederek hücreyi ölüme kadar götürür. Hücre, DNA hasarlarını "DNA tamir mekanizmaları" ile tamir edebilir. DNA hasarı ikileşme sırasında tamir edilemezse mutasyona sebep olur sonuç olarak da genomik kararsızlığa, kanser ve yaşlanmaya neden olur. DNA tamir sisteminde 100'den fazla gen rol oynar ve bu genlerin kodladığı proteinler tamir mekanizmalarında görev alırlar. Her bir insan hücresinin DNA'sında günde yaklaşık olarak 500.000 adet kodlanmayan veya yanlış kodlamaya neden olabilen hasar meydana gelmektedir. DNA Hasarı sonunda DNA'nın yapısını ve diğer nesillere aktarılan genetik bilgiyi değiştirebilir. Küçük çaplı hasarlar çoğunlukla DNA onarım sistemleri tarafından onarılabilirken, orta derecedeki hasarların birikim durumu ise mutasyon ve kanser ile sonuçlanabilir. Yüksek düzeyde olan hasarlar ise apoptozisi uyararak "hücre ölümüne" yol açabilir ve böylelikle organizma kendini korumuş olur.

2.3.1.1 DNA Hasarı Tipleri

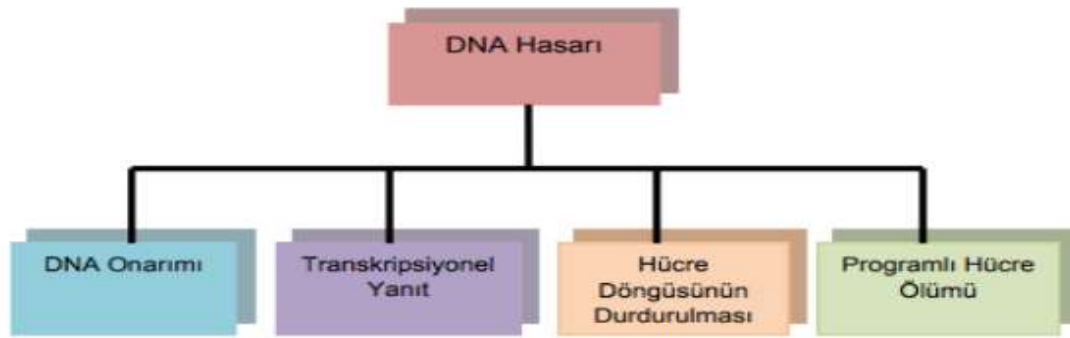
DNA çeşitli ya da farklı mutagenler tarafından hasara uğrayabilir. Bunun sonucu olarak da DNA dizisi değişebilir. Mutagenler arasında, yükseltgen (oksidleyici) etmenler, alkileyici etmenler ve yüksek enerjili elektromanyetik ışınlar (morötesi ışık ve X ışınları gibi) sayılabilir. DNA'da meydana gelen hasarın tipi mutagenin tipine bağlı bir durumdur. Örneğin, mor ötesi ışık timin dimerleri oluşturarak DNA'ya hasar verir (Douki vd. 2003). Bu durumun aksine, serbest radikaller veya hidrojen peroksit gibi yükseltgen etmenler farklı türden hasar oluşturabilirler. Bazı değişimi (özellikle guanozin) ve iki iplikçikli kırılmalar gibi (Cadet vd. 1999). Her insan hücrelerinde günde 500 baz yükseltgeyici zarar görür (Cathcart vd. 1984, Shigenaga vd.1989). Bu yükseltgeyici hasarlarından en zararlısı çift zincirli kırılmalarıdır. Çünkü bunların onarımı zordur. Bunlar DNA dizilerinde noktasal mutasyonlara, insersiyonlara ve delesyonlara ayrıca kromozomal translokasyonlara yol açabilir (Valerie ve Povirk 2003).

Başlıca hasar tipleri;

1. Deaminasyon

2. Depurinasyon
3. Alkilasyon
4. T-T ve T-C dimerleri oluşumu
5. Replikasyon hataları
6. Çift iplik kırıkları (DSB)
7. Oksidatif hasardır.

2.3.2 DNA Tamiri



Şekil 2.9 DNA Hasarlarına Hücresel Yanıtlar (Sancar vd. 2004).

Hücreler genomik bütünlüğü korumak amacı ile içi içe geçmiş, kompleks, bir dizi DNA onarım mekanizmalarına sahiptirler (Ciccia ve Elledge 2010, Jeppesen 2011). DNA onarımı nükleazlar, polimerazlar, helikazlar, topoizomerazlar, rekombinazlar, ligazlar, kinazlar, glikozilazlar, demetilazlar ve fosfatazların kimyasal olarak modifiye edilmiş enzimatik aktivitelerine göre gerçekleştirilmektedir. Ökaryotik hücreler doğru zamanda, yerde, doğru faktörleri aktive etmek için geliştirilmiş stratejilere sahiptir (Ciccia ve Elledge 2010).

DNA onarımında insanlarda 130'dan fazla genin görev aldığı düşünülmektedir, bu sayı muhtemelen daha yüksektir. Bu genlerden sadece %50'sinin fonksiyonu bilinmektedir. DNA onarımında sinyal iletimi ve onarımın düzenlenmesi ile ilgili genler hatalı eşleşme onarımı, baz çıkarma onarımı ve nükleotid çıkarma onarımı ile ilgili genlerdir (Slupphaug vd. 2003, Morita vd. 2010).

Kanser oluşumunda genotoksik hasarın en önemli faktör olduğu bilindiğinden risk grubundaki farklı DNA hasarları kontrol grubu ile karşılaştırılır. Bu amaçla

uygulanabilen pek çok genotoksisite testi bilinmektedir. Bu testler, genotoksik ajanlara maruz kalmayla oluşan riskin belirlenmesinde kullanılan sitogenetik biyogöstergelelerdir. Her yöntemin avantaj ve dezavantajlarını belirlemek önemlidir. Genetik sistemler ile genotoksisitesi test edilmek istenen maddelerin karsinojenik ve genotoksik potansiyelleri arasında ilişki kurulmasını sağlayan ve en yaygın olarak kullanılan standart *in vitro* ve *in vivo* genotoksisite testleri (Yükselten 2012); Tek zincir kırıkları ve baz değişimlerinde COMET assay (Tek Hücreli Jel elektroforezi), HALO Assay, TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), HPLC-MS (Yüksek 88 performanslı sıvı kromatografi-kütle spektrometresi), DBD-FISH (DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization), GC-MS (gaz kromatografisi-kütle spektrometresi), Protein XRCC1(X ışını onarım çapraz tamamlayıcı 1) ve elektrokimyasal yöntemler kullanılmaktadır. O6 alkil guanin eklentilerinde HPLC-MS, GC-MS ve IHC (immünohistokimya) yöntemleri kullanılmaktadır. Pirimidin dimerlerinde TDP-PCR (terminal transferaz bağımlı polimeraz zincir reaksiyonu), LM-PCR (ligasyon aracılı polimeraz zincir reaksiyonu), IC-PCR (immune-capture PCR), HPLC-MS, GC-MS, RIA (radyoimmünoassay), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ve elektrokimyasal yöntemler tercih edilmektedir. Delesyonlarda GC-MS kullanılırken, çift zincir DNA kırıklarında ise COMET, TUNEL, DBD-FISH, LAM-HTGTS (linear amplification-mediated high-throughout genome-wide translocation sequencing), protein Ku ve protein H2AX testleri kullanılmaktadır (Figueroa-Gonzalez ve Perez-Plasencia 2017).

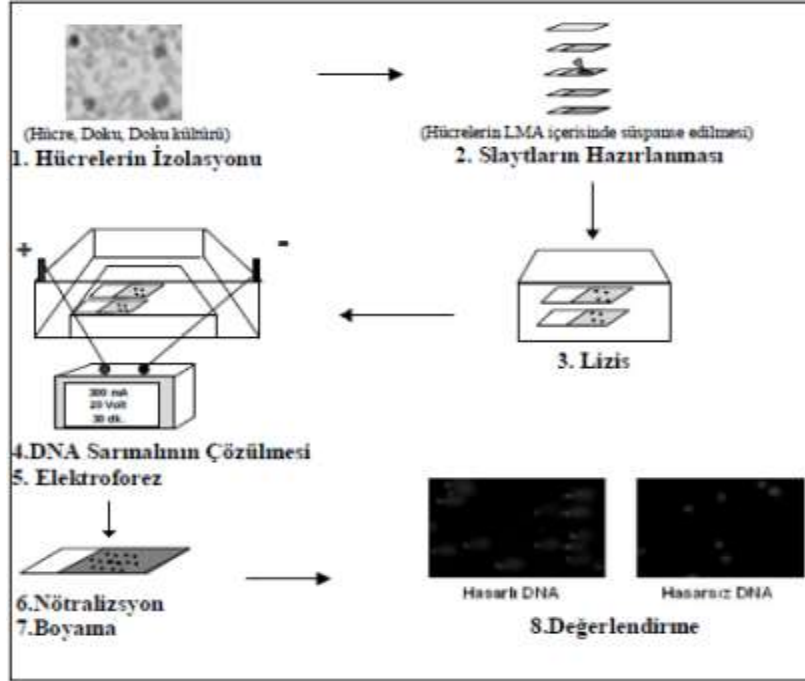
2.3.3 Tek Hücre Jel Elektroforez Testi (Comet Testi, SCGE)

Comet testi diğer adıyla tek hücreli jel elektroforezi (SCGE) ökaryotik hücrelerde DNA hasarlarından DNA'nın tek iplik kırılmaları (ssDNA Break) ve çift iplik kırılmalarının (dsDNA breaks) tespitinde kullanılan floresans tekniklerdendir (Collins vd. 2004, 2014). İplik kırıklarının dışında UV kaynaklı pirimidin dimerlerinin, okside bazlar'ın ve alkilasyon hasarlarının belirlenmesinde, antioksidan çalışmalarında, DNA onarım araştırmalarında, kansere duyarlılıkların tespitinde, kanser tedavilerin takibinde de bazı kalıtsal hastalıkların prenatal tanısında ve hastalıklarda artmış DNA hasarını belirlemede kullanılan bir biyoizlem testidir. (Figueroa-Gonzalez ve Perez-Plasencia

2017, Dinçer ve Kankaya, 2010, Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011). Ayrıca genotoksinleri ilk etki bölgelerde değerlendirebilmesi, hemen hemen tüm ökaryotik hücrelere uygulanabilmesi, düşük hasar seviyesini ölçebilmesi, koruma ve duyarlılıkla sağlam sonuçlar elde etmek için gerekli olan az sayıdaki hücre örneği gerektirdiği için hızlı, basit, ucuz bir yöntem olması sebebiyle geniş bir kullanım alanına sahiptir (Östling ve Johanson 1984, Şekeroğlu vd. 2011, Liman vd. 2018).

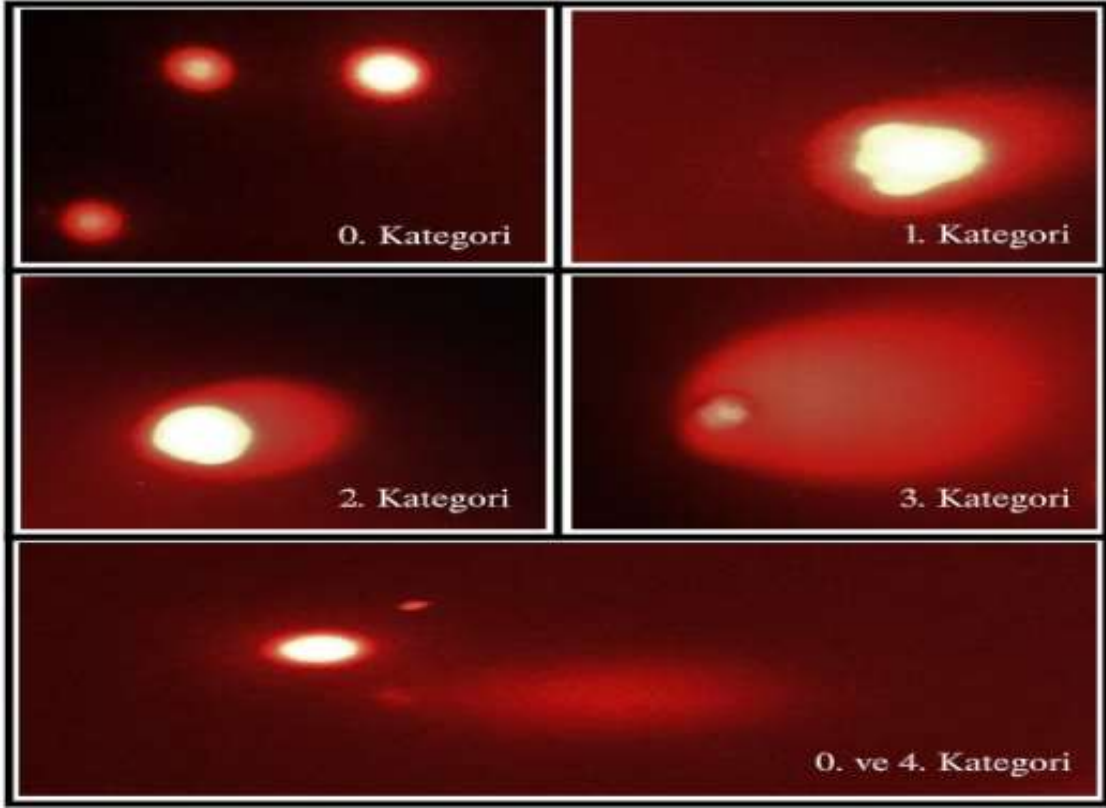
Bu özelliklerinin yanında tek bir dezavantajı bulunur. Comet testi sadece DNA onarım hızını ölçer, DNA onarım doğruluğunu ölçmez (Üstündağ vd. 2014).

Comet yöntemi, alkali pH'da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı göç etmeleri esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde, hücreler veya çekirdekçikler öncelikle agarozaya yerleştirilmekte, daha sonra lizis ve alkali elektroforez tamponunda yürütme ve nötralizasyon işlemlerinden geçirilerek floresan boya ile boyanmaktadır (Albertini vd. 2000, Östling ve Johanson 1984, McKelvey-Martin vd. 1993, Dinçer ve Kankaya 2010, Karabaş vd. 2019). DNA bağlayıcı boyalarla (akridin oranj, ethidium bromide, propidyum iyodür, DAPI gibi) bu boyalarla flüoresans renk oluşturulur (Fairbain vd.1995). DNA floresan boya ile boyandıktan sonra kuyruk ve baş yapılarından bir komet oluşur (Şekil 2.11) (Vandghanooni ve Eskandani 2011). Zincir kırılmasıyla oluşan baş ve kuyruktaki DNA miktarı orantılıdır (Hovhannisyan 2010).



Şekil 2.10 Comet analizinin aşamaları (Koçyiğit vd. 2005).

Floresan mikroskop ile incelenen preparatlarda zarar görmemiş DNA'lar comet (kuyruk) oluşturmazlar, hasar görmüş DNA moleküllerindeki fragmentler farklı moleküler ağırlıklarına ve farklı elektrik yüklerine sahip olacaklarından elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek çekirdekten dışarı doğru göç etmekte ve kuyruklu yıldız görünümü oluşturmaktadır (Albertini vd. 2000, Östling ve Johanson 1984, McKelvey-Martin vd. 1993, Dinçer ve Kankaya 2010, Karabaş vd. 2019). Hasarlı hücreler, oluşan hasarın derecesine göre DNA görüntüleri çeşitli alt kategoride sınıflandırılarak puanlandırma yapılır. Hasar bulunmayan DNA'lar 0, hasar olan DNA'lar hasarın derecesine göre 1'den 4'e kadar puanlandırılır ve sonuçlar görsel skorlama (AU) ile değerlendirilmesi yapılır (Şekil 2.12) (Yeni vd.2010).



Şekil 2.11 Görsel skorlama tekniği (AU) ile hücrelerin sınıflandırılması (0: hasarsız DNA görüntüsü, 1-4: hasarlı DNA'ları hasarın derecesine göre puanlanması) (Sındarov 2020).

Comet yönteminde DNA hasarının değerlendirilmesi durumu, hasarsız hücrelerin (lenfosit) incelemesinde yuvarlak, kenarları daha az yoğun olmak üzere ortası parlak bir ışık görünümü (çekirdek) vardır. Bu hücrelerin görünümü nonmigration (NM) olarak değerlendirilir. Eğer DNA hasarı oluşmaya başlamışsa, normalde düzgün kenarlı olan görüntü DNA kırıklarının çekirdek dışına göçünün de başlaması nedeni ile düzensiz kenarlı bir görünüm oluşur (stretch ya da yeni adı ile low migration). Hasar arttıkça lenfositler kuyruklu yıldız (comethigh migration) şeklini alırlar. Son aşamaya gelindiğinde ise apoptozis olur. Hasarın şiddetine göre merkezden kenara doğru uzama olur. Bu comet (kuyruk) uzunluğu hasar ile doğrudan ilişki göstermektedir. Ayrıca kuyruktaki floresan yoğunluğu da hasarın derecesi ile paralellik gösterir (Fairbairn vd.1995).

Kuyruk uzunluğu, kuyruktaki DNA ve DNA dağılımı comet analizinde kullanılan temel parametrelerdir. Kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu en sık kullanılanlar olmasına

rağmen, önerilen ve kullanımı gittikçe artan ölçüm parametresi kuyruk DNA yüzdesidir. Çünkü bu parametre cometlerin görünür kısmıdır ve DNA kırık frekansı ile doğru orantılıdır. Kuyruk momenti; kuyruk uzunluğu ve kuyruk içindeki toplam DNA oranının çarpımı olarak tanımlanmaktadır. Araştırmacı hangi ölçüm parametresini kullanırsa kullansın, parametreler çalışmalarda önemle not edilmelidir (Tice vd. 2000).

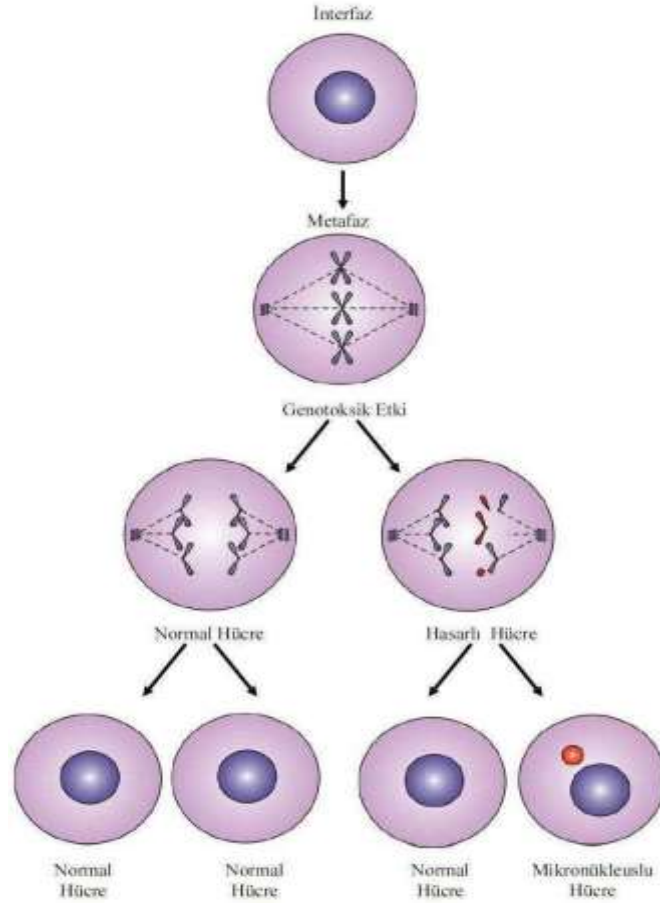
Son yıllarda değerlendirme kısımlarında Laser-scanning microscopy (LSM) teknolojisi kullanılarak DNA sarmal kırıklarındaki farklılıklar kolaylıkla tespit edilmektedir (Yeni vd.2010).

İyonlaştırıcı radyasyonun hücre DNA'sı ile etkileşimi çeşitli primer lezyonlara yol açar. Bu bağlamda comet analizi, DNA hasarını tespit etmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Karabaş vd. 2019).

2.3.4 Mikronukleus Testi

Mikronukleus testi (MN) 1950'li yıllarda bitki hücrelerinde kromozom hasarının kontrol edilmesinde, 1970'li yıllara gelindiğinde ise hayvan hücrelerinde ve kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kansere sebep olan kimyasalları tespit etmek amacıyla kullanılmaya başlanmıştır (Schmid 1975, Widel vd. 2001, Demirel ve Zamani 2002).

Mikronükleus'lar genellikle hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki eksiklerden, mitotik iğdeki hatalardan, kinetokordan veya mitotik aygıtın öteki parçalarından ve kromozomal hasarlardan kaynaklanan, hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, ana çekirdeğe dâhil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanların dan köken alan oluşumlardır (Şekil 2.13). Mikronükleusların sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu kromozom düzensizliklerinin ve somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın bir göstergesi olduğu kabul edilip değerlendirilmektedir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011, Sommer vd. 2020).

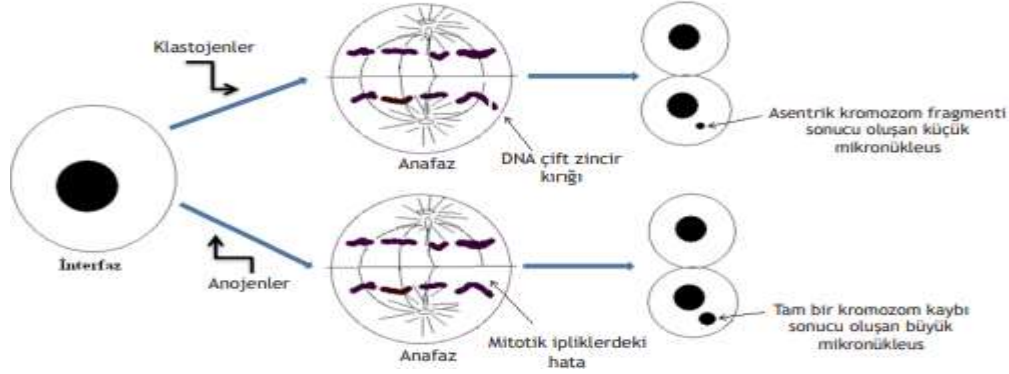


Şekil 2.12 Mikronükleus meydana geliş aşamaları (Ma 1981).

Mikronükleus yönteminin farklı hücre tiplerine uygulanması yoluyla popülasyonda ki genetik hasarın izlenmesi, genotoksik ilaçların araştırılması, radyasyona karşı tümör duyarlılığının tespiti ve radyasyon duyarlılığının değerlendirilmesi mümkün olmaktadır. Protokol farklılıklarına rağmen mikronükleus indüksiyonu, hastalıkların ve DNA hasarının indüksiyonu ile ilgili süreçlerde de etkili bir biomarker olarak belirtilmektedir (Fenech 2000, Börçek Kasurka 2019). Bu yöntemi, çevresel ajanlardan kaynaklanan genetik hasarın belirlenmesi için biyolojik bir belirteç olarak ya da nanopartikül ve ilaçlar gibi yeni ürünlerin biyolojik uyumluluğunu tanımlamak için de kullanılmaktadır (Coşkun vd. 2013).

Mikronükleus tekniği ile klastojen ve anojen maddeler tespit edilebilir (Şekil 2.14). Ayrıca immünokimyasal etiketleme sayesinde kinetokor, sentromer veya telomer gibi

spesifik nükleer elemanların MN doğası ve mekanizması üzerindeki görevi de incelenebilmektedir (Eastmond vd. 2009).



Şekil 2.13 Klastojenler ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki MN'lar (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011).

In vitro mikronükleus testinde, uygun ortamlarda inkübasyona bırakılan hücre kültürlerine, ilk mitozdan önce kültürün yaklaşık 44. saatinde sitokalsin-B maddesi ilave edilmektedir. Bu madde sitokinezi inhibe etmekte ve bir hücre siklusunu tamamlayan binükleat (çift nükleuslu) hücrelerin oluşumunu sağlamaktadır. İnkübasyon süresi sonunda kültürler protokollere uygun şekilde hasat edilmekte ve preparatlarda MN bulunduran binükleat hücrelerin oranı tespit edilmektedir (Fenech ve Morley 1986, Krishna ve Hayashi 2000). *In vivo* MN testinde ise, sitokinezi bloke edilmemiş memeli eritrosit hücrelerindeki MN sıklığı belirlenmektedir. Bu test sistemi ile genellikle kemik iliğinde ve periferal kan hücrelerindeki olgunlaşmamış (polikromatik) eritrositlerin MN oluşum analizi yapılmakta ve test edilen bileşiğin genetik bir hasar oluşturup oluşturmadığı tespit edilmektedir (Krishna ve Hayashi 2000, Hayashi vd.2000).

2.4. Sideritis Türlerinin Genel Özellikleri ve Etkileri

Lamiaceae familyası, özellikle Akdeniz ülkelerinde ve yaygın olarak ılıman iklim kuşağında yer alan, kültürü yapılan bitkilerin oluşturduğu, yaklaşık 245 kadar cins ve 7886 binin üzerinde türü içeren zengin bir familyadır (İnt. Kyn. 3). Bu familyaya ait bitkilerin çoğu antik çağlardan bu yana halk ilacı olarak çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmalarının yanı sıra, tıpta, gıda endüstrisinde, parfümeri ve kozmetikte

sektörlerinde yer alan bitkilerdir. Günümüzde rasyonel Fitoterapi’de kullanılan pek çok preparatta da bu familya bitkilerinin yer aldığı görülmektedir (Ayaz ve Duman 2009).

Dünyada 150’den fazla türe sahip olan *Sideritis*, *Lamiaceae* familyasının en önemli cinslerinden birisini oluşturmaktadır. Bu cins, Kuzey yarım kürenin ılıman ve tropikal bölgeleri olmak üzere Akdeniz ülkeleri, Kanarya adaları ve Kafkasya’ya kadar geniş bir dağılışı göstermektedir. İspanya ve Türkiye, en fazla *Sideritis* türüne sahip olan ülkelerdir (Barber vd. 2002, Gonzales vd. 2011). *Sideritis* türleri, yüksek endemizm oranı ve halk arasında çay şeklinde yaygın kullanımı sebebiyle Türkiye için önemli bitkiler arasındadır (Şahin vd. 2008). Ülkemizde halk ilacı ve bitkisel çay olarak geniş çapta kullanılmakta olan *Sideritis* türleri en çok dağ çayı, yayla çayı, sarıkız çayı, kuyruk çayı, çay otu gibi değişik yöresel isimlere sahiptirler (Aytaç ve Aksoy 2000, Kirimer vd. 2001, Ayaz 2008).

Sideritis türlerinin birçok etkisi bulunmaktadır. Yaygın olarak antioksidan, analjezik, antiproliferatif, anti-inflamatuar, anti-ülserojenik anti-viral ve anti-apoptotik gibi birçok biyolojik etkilere sahiptir (Gonzalez-Burgos vd. 2016, Erkan vd. 2011, Küpeli vd. 2007, Kirimer vd.2008, Gürbüz vd.2005). Halk tarafından sinir sistemi uyarıcısı, antiinflamatuar, antispazmodik, karminatif, analjezik, sedatif, antitussif, stomaşik ve antikonvulsan etkilerinden dolayı ve soğuk algınlıklarında öksürük kesici ve gastrointestinal hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Özer Sağır 2016). Ateş düşürücü, sinir uyarıcı, sindirim düzenleyici, idrar söktürücü, kanamayı durdurucu, yaralanmalarda kan durdurucu ve enfeksiyon hastalıklarında da kullanılmıştır (Çarıklı 2010).

Sideritis cinsinin antikanser etkilerini tespit etmek üzere çeşitli çalışmalar yapılmıştır. *Sideritis lycia* ve *Sideritis leptoclada* türleri diterpen bileşikleri yönünden incelenmiştir. Hekzan ve aseton ekstraktları çalışılmış ve bilinen 13 adet kauren tipi diterpen bileşiği elde edilmiştir. Bu bileşiklerden 7-epikandikandiol, sidol, siderol, sideridiol, linearol ve *S. lycia*’nın metanol ekstraktlarının A2780 (insan ovaryum kanser hücrelerinde), LU1 (insan akciğer kanseri), COL-2 (insan kolon kanseri), KB (insan epidermokanseri), LNCap (insan prostat kanseri) ve P-388 (fare lösemisi) üzerindeki sitotoksik aktiviteleri

incelenmiştir. 7- epikandikandiol'ün 5 farklı kanser hücrelerinden üçünde zayıf derecede, kolon kanser hücrelerine karşı ise orta derece aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Kılıç 2002).

Sideritis libanotica subsp. *linearis*' in (Ballica-Tokat) metanol ekstresi in vitro olarak antiproliferatif etkisinin incelenmesi için Vero, HeLa ve C6 hücrelerinde çalışılıp denenmiştir. Ekstre, Afrika yeşil maymun böbrek hücrelerinde (Vero), İnsan serviks adenokarsinoma (HeLa) ve sıçan beyin tümör hücrelerinde (C6) etkili olduğu tespit edilmiştir (Demirtaş vd. 2009).

Sideritis scardica (dağ çayı), Balkan Yarımadası'nda, geleneksel olarak kullanılan endemik bir bitkidir. *S. scardica* ekstraktlarının C6 sıçan glioma hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerine bakıldı. *S. scardica* ekstraktlarının, sıçan C6 glioma hücrelerinin, apoptoz indüksiyonu ve otofaji dâhil olmak üzere çeşitli şekillerde azalttığı tespit edilmiştir (Jeremic vd. 2013).

Sideritis leptoclada, (HT-144) insan melanom kanseri hücre hattıyla yapılan çalışma sonucu *S. leptocla* etanol özütü apoptotik hücre ölümünü tetiklediği hâlihazırda kullanılmakta olan kanser tedavilerine dirençli malign melanom kanserinin tedavisinde de kullanılabilir olduğu tespit edilmiştir (Aydoğmuş Öztürk vd. 2018).

2.4.1 *Sideritis phrygia* Bornm.

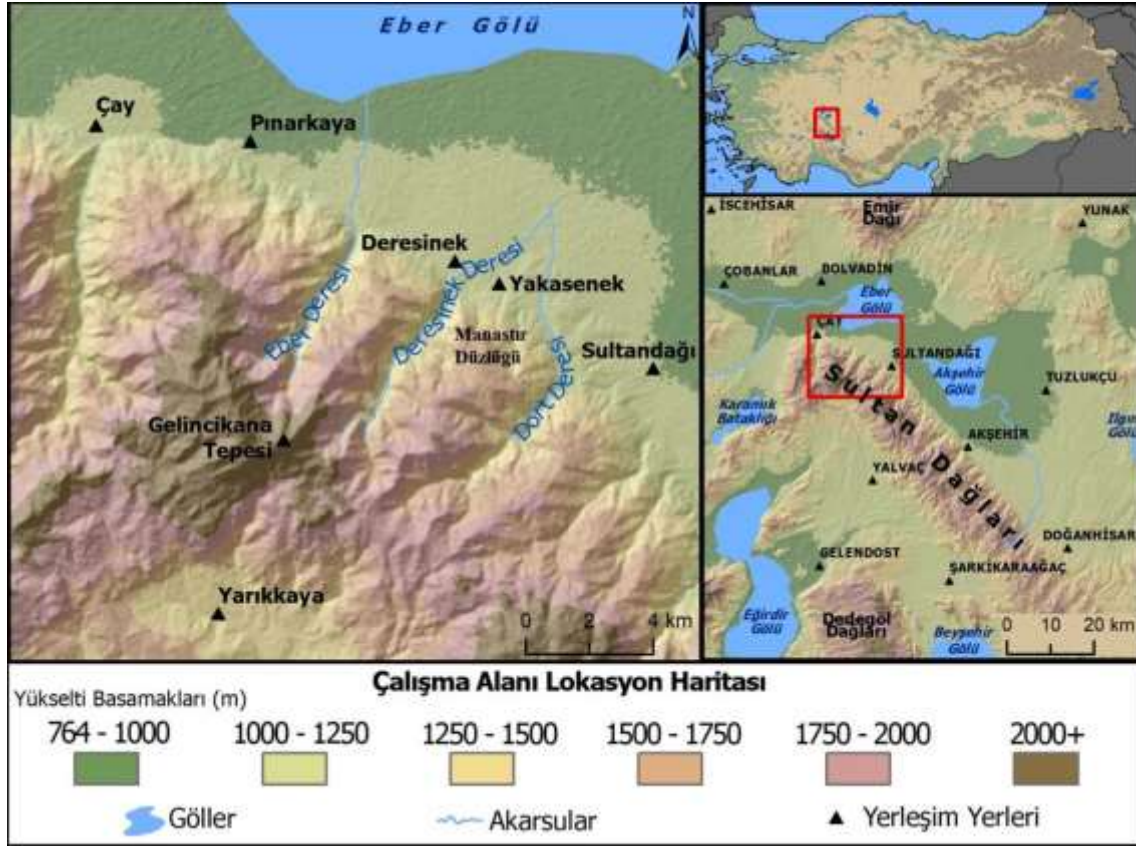


Resim 2.1 *Sideritis phrygia* Bornm.

Ballıbabagiller (Lamiaceae) ailesine ait *Sideritis* cinsi, Türkiye’ de tür ve tür altı dâhil 60 taksonla temsil edilmektedir (45 tür ve 15 alttür) (Güner vd. 2012).

Yöre halkı tarafından *Sideritis phrygia* ‘Dağ çayı’ veya ‘Çay otu’ olarak isimlendirilmekte (Yılmaz 2013).

Sideritis phrygia Bornm., Türkiye’ de sadece Afyonkarahisar, Isparta ve Konya illerinin ortak sınırında yer alan Sultandağları’ nın Kuzey yamaçlarında yayılış göstermektedir (Şekil 2.14). Bu tür ,güner ve ark tarafından yazılan Türkiye bitkiler listesi(damarlı bitkiler)kitabında taşlık çayı ismiyle yer almaktadır(Güner vd.2012). İran-Turan bitki coğrafyası bölgesinde yer alan bu tür Davis’ in Türkiye için belirlediği kareleme sistemine göre B3 karesinde yer almaktadır (Davis 1982). Türkiye’de yerel endemik tür olan *Sideritis phrygia* Bornm. IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources- Doğa ve Doğal Kaynakların Korunması için Uluslararası Birlik) tehlike sınıflandırmasına göre “NT” (Near Threatened-TehditeYakın) kategorisine girmektedir (Ekim vd. 2000).



Şekil 2.14 *Sideritis phrygia* Bormm.' nın yayılış gösterdiği alanları gösteren lokasyon haritası (Başhan 2019).

Sideritis phrygia Bormm. (Taşlıkçayı)'nın Tanımı:

Çok yıllık, 20-50 cm boyunda, basit veya dallanmış gövdeli, yatık, beyaz keçemsi tüylü, sıklıkla olgunlukta tüysüz bir bitkidir. Gövde yaprakları 4-6 çift, internodlar 3-6 cm, orta yapraklar dikdörtgenimsi-spatulat ve doğrusal-mızrak şeklinde, 4-6 cm uzunluğunda ve 0.5-1 cm genişliğinde, ince dişli, kısa sivri tepeli, sapsız veya 1 cm ye kadar saplıdır. Vertisillatlar 6-15 adet çiçekli ve vertisillatlar birbirine 1-4,5 cm uzaktadır. Orta brakteler yumurtamsı-yuvarlağımsı arası ve tabanı böbrek şeklinde, 1-1,5 cm uzunluğunda ve 0.8-1 cm genişliğindedir. Kaliks 8-10 mm, yoğun tüylü, dişler üçgenimsi mızrak şeklinde, 3-3.5 mm, dikenli uçludur. Korolla sarı, 12-13 mm, tüylü ve iç yüzünde kahverengi çizgili ya da çizgisizdir (Davis 1982).

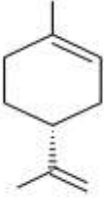
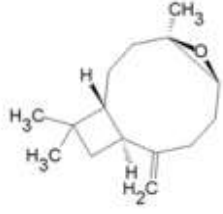
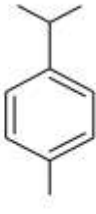
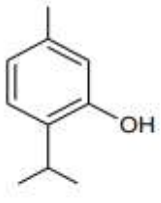
2.4.1.1 *Sideritis phrygia* Bornm. Üzerine Yapılan Bazı Çalışmalar

Sultan Dağları (Akşehir yukarısı)'ndan toplanan *S. phrygia* bitkisi HPLC ile fenolik yapıdaki maddeleri incelenmiştir. Petrol eteri ile defekte edilen bitki, metanolle ekstre edilmiştir. 19 standart madde ile karşılaştırma sonucunda bu türde de 6'şar fenolik madde tespit edilmiştir. Apigenin bu türde de en dikkat çekici maddedir. Ayrıca apigenin glikozit de *S. phrygia*'da bulunmuştur. Bu türde bulunan diğer maddeler: kateşin, kafeik asit, ferulik asit, luteolin'dir (Özer Sağır 2016).

Sultan Dağları (Akşehir yukarısı)'ndan toplanan *S. phrygia* türünün antioksidan etkileri incelenmiştir. Önce petrol eteri ile defekte edilen bitki metanolle ekstre edilmiştir. Antioksidan etkinin tayini için, toplam fenolik madde miktarı tayini, DPPH üzerinde serbest radikal süpürücü etki, indirgeme gücü testleri kullanılmış. Sonuçlar, standart olarak BHT (Bütildihidroksitoluen), ve BHA (Bütildihidroksianisol) ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak güçlü antioksidan aktivite göstermiştir. Toplam fenolik madde miktarı açısından daha yüksek olan *S. phrygia*'nın etkisinin kıyaslanılan *S. bilgerana*'ya göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Tekeli 2012).

Uçucu Yağ Analizlerinin Değerlendirilmesi;

Sultan Dağları (Akşehir yukarısı) Cankurtaran Köyü civarından toplanan *S. phrygia*'nın uçucu yağında toplam 42 farklı bileşik analiz edilmiştir. Bu bileşiklerin oranları %0,2 ile %11,4 aralığında değişirken, en yüksek değere %10,6 ile limonen maddesi sahiptir. Öne çıkan diğer maddeler %10,4 ile karyofilen oksit, %10,1 ile simen, %7,3 ile timol maddeleridir. 2-fenil furan, τ -terpinen ve γ -terpinen ise %0,2 ile en düşük orandaki maddelerdir. Belirlenen moleküller yapılarına göre sınıflandırıldığında bitkinin %46,4 monoterpen, %21,4 oksijenli seskiterpen, %17,1 oksijenli monoterpen, %8,3 seskiterpen, hidrokarbondan oluştuğu tespit edilmiştir.

			
Limonen	Karyofilen oksit	Simen	Timol

Şekil 2.15 *Sideritis phrygia* bitkisinin uçucu yağ ana bileşenleri (Özer Sağır 2016).

Sideritis phrygia bitkisinin aseton ekstresi flavonoid bileşikleri bakımından oldukça zengindir (Özer Sağır 2016).

Flavonol yapısında bir flavonoid olan kuersetagetin-3,6-dimetileter, ekstrede en fazla miktarda belirlenen bileşiktir. Bileşiğinin iltihaplanmayı doğrudan engelleme özelliği ile önemli bir iltihap önleyici aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Histamine ve diğer alerjik/iltihaplanmanın serbest bırakılmasını ve üretimini yavaşlatır. Serbest radikal yakalama özelliğinden dolayı güçlü bir antioksidandır. Kuersetagetin-3,6-dimetileter, flavonol bileşiği bunun yanı sıra, C vitamini gibi sitrat döngüsüne katılarak antioksidan özellik gösterir. Antikanserojen özellikte olması sebebiyle akut belirtiler için de kullanılmaktadır (Yalçın 2011).

Isorhamnetin bitkinin sadece aseton ekstresinden analiz edilen bir flavanol dur. Isorhamnetin ve kuersetin karaciğer toplam kolesterolünü azaltma etkisi göstermektedir (Igarashi ve Ohmuma 1995).

Sideritis phrygia bitkisinin hazırlanan ekstrelerinden yedi farklı fenolik asit analiz edilmiştir. En fazla bulunan klorojenik asit, en az bulunan ise kafeik asittir. Bitkinin hekzan ekstresi fenolik asit bakımından en fakir bulunurken, metanol ekstresi en zengin olarak bulunmuştur.

Sideritis phrygia Bornm. bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan hekzan, aseton ve metanol ekstrelerinden bilinen 7 terpen bileşiği izole edilmiştir. Elde edilen bileşiklerin yapıları (Özer Sağır 2016):

- ❖ Siderol (Ent-7 α -asetoksi,18-hidroksi-kaur-15-ene)
- ❖ Sideroxol (ent-7 α ,18-dihidroksi-15 β , 16 β -epoksikauran)
- ❖ Oleanolik asit (4aS,6aR,6As,6Br,8Ar,10S,12Ar,14bS)-10 hydroxy2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydrop, cene-4a-carboxylic acid)
- ❖ Sideridiol (ent-7 α , 18 β -dihidroksi kaur-15-en)
- ❖ Linearol (ent-3 β , 7 α -dihidroksi-18-asetoksikaur-16-en)
- ❖ 7- epicandicandiol (ent-7 α ,18-hidroksikaur-16-en)
- ❖ Athanolone (ent-7 α ,17,18-trihidroksi-9,11-(en)-12-on)

3. MATERYAL ve METOT

Bu bölümde çalışmada kullanılacak olan bitki materyalinin toplanması, ekstraksiyonu ve ekstraksiyon sonrasında bitki ekstraktı ve A549 hücreleri ile gerçekleştirilen uygulamalar ve laboratuvar analizlerine yer verilmiştir. Çalışmada kullanılan hücreler Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvar stoklarından tedarik edilmiştir. Çalışma sırasında kullanılan hücrelerin herhangi bir strese maruz kalmamaları amacıyla, hücrelerle temas edecek her türlü çözücü/çözeltinin 37°C’de olmasına, santrifüj işlemlerinin (800 rpm) 5 dakika süreyle yapılmasına önem verilmiştir. Çalışmada kullanılan malzeme ve teçhizat listesi aşağıda sunulmuştur.

3.1 Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

3.1.1 Cihazlar

- Hassas Terazi (Sartorius, Germany)
- Vortex (IKA, USA)
- Pikofüj (Roth, Taiwan)
- Floresan Mikroskop (Olympus, Japan)
- Vakum Pompası (KNF Neuberger, Germany)
- Mikroskop (Olympus, Japan)
- Santrifüj (Hettich, Germany)
- Saf Su Cihazı (GFL 2102, Germany)
- Laminer Kabin (JSR, Korea)
- CO2 İnkübatörü (Panasonic, Japan)
- Benmari (GFL, Germany)
- Canlı Hücre Görüntüleme Mikroskobu (JULI Br, Korea)
- Elektforez (Thermo Scientific EC 1000-90, USA)
- Otoklav (Jeio tech, Korea)
- pH metre (Hanna instruments, Romania)
- Soxhlet (FALC Instruments, Italy)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)

- Evaporatör Heidolph, 562-00000-00-0, Germany

3.1.2 Kimyasallar

- DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium, Serox, Germany
- FBS (Sigma, USA)
- Penisilin-streptomisin (Sigma, Israel)
- NEFA (Sigma, USA)
- Tripsin-EDTA solüsyonu (Sigma, USA)
- Tripan BLUE solüsyonu (Sigma, USA)
- DMSO (Sigma, China)
- PBS (Sigma, Germany)
- Etil alkol (Sigma-Aldrich, Germany)
- MTT (Sigma, USA)
- Beta Mercaptoetanol (Sigma, Germany)
- LMA (Sigma, USA)
- NMA (Sigma, USA)
- NaCl (Sigma-Aldrich, Germany)
- Etidyum bromür (Vivantis, USA)
- Aseton (Carlo Erba Reagenti, Italy)
- NaOH (AppliChem, Germany)
- EDTA (Sigma, USA)
- Trisma Base (Sigma, USA)
- Triton X-100 (Sigma, USA)

3.2 *Sideritis Phrygia* Ekstraksiyonu

Araştırma materyalini 2019 yılında toplanan *Sideritis phrygia* Bornm. örnekleri oluşturmaktadır (Resim 3.1). Araştırmamızın materyalini oluşturan *Sideritis phrygia* Bornm., Afyonkarahisar ili Sultandağı ilçesi, Deresineek havzası, kayalık-taşlık yamaçlarından ve yaklaşık 1500 m yüksekliklerden 10.07.2019 tarihinde toplanmıştır.

Bitkinin teşhisi Flora of Turkey and the East Aegean Islands adlı eserden faydalanılarak yapılmıştır (Davis 1982). Bitkinin tür isminin teşhisi Prof. Dr. Mustafa KARGIOĞLU tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu bitkiye ait herbaryum örneği Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Herbaryumunda AKU8848 kayıt numarası ile koruma altında tutulmaktadır. *S. phrygia* Bornm.'nın Türkçe isminin belirlenmesinde ise Türkiye Bitkiler Listesi (Damarlı Bitkiler) adlı eserden yararlanılmıştır (Güner vd. 2012).

Çalışmada kullanılan *S. phrygia* herbaryum laboratuvarında getirilerek karanlık ve serin bir ortamda kurumaları sağlandı. Kuruyan örneğin gövde, yaprak ve çiçeklerinden oluşan karışım bitki örnekleri blenderda öğütülerek toz haline getirildi. Toz haline getirilen bitki numunelerinden hassas terazi kullanılarak 50'şer gram tartıldıktan sonra 1 L'lik cam şişelere konuldu. *S. phrygia* su ekstraktını hazırlamak için 50 g tartılarak üzerine 500 mL (1:10 w/v oranında) hacminde (su) çözücü ilave edildi (Resim 3.2).



Resim 3.1 Kurutulan *Sideritis phrygia*.

Su banyosu 50°C sıcaklığına ayarlandı, sonra hazırlanan cam şişelerdeki bitki karışımı su banyosunda 1 saat bekletildi. Su banyosundan çözeltiler çıkartıldıktan sonra oda sıcaklığında 24 saat karanlıkta bekletildi. Hazırlanan ekstreler bitki parçalarından arındırmak için süzgeç kâğıdından süzülerek, ayrı bir şişede toplandı (Resim 3.3). Bu şekilde elde edilen. *S. phrygia* su ekstraktlarının çözücüleri vakum altında evaporatör cihazında uzaklaştırıldı.



Resim 3.2 Çözücü ile toz haline getirilmiş bitkinin ekstaksiyon sırasındaki karışımı.



Resim 3.3 Süzgeç kâğıdından süzülen çözücü ile toz haline getirilmiş *S. phrygia*.

Elde edilen ekstraktlar cam petri kaplara dökülerek oda sıcaklığında içindeki çözücünden daha iyi arınarak, kuruması için birkaç gün beklendi (Resim 3.4). Petri kaplarındaki iyice kuruyan *S. phrygia* su ekstraktları kazıyıcı ile kazınarak küçük cam şişelere kondu (Resim 3.5).



Resim 3.4 *S. phrygia* su ekstraktları cam petrilerde kurutma işlemi.



Resim 3.5 Cam şişede muhafaza edilen kurumuş ekstraktlar.

3.3 Hücre Kültürü

Günümüzde moleküler biyoloji, biyokimyasal ve sitogenetik çalışmalar için araştırma veya tanı amacıyla hücre kültürleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücre kültüründe amaç hücreleri yaşatmak, çoğaltmak ve ilerleyen zamanlarda kullanılmak üzere dondurup saklamaktır (Yükselten 2012).

Hücre kültürü, hayvan hücrelerinin canlı vücudunun dışında incelenebilmesi amacıyla Harisson tarafından 1907 yılında keşfedilmiştir. Harrison hayvan modeli olarak, ilk olarak kurbağayı seçerek doku parçalarının vücut dışında canlılığını koruyabilmesini amaçlamıştır. Bu çalışmalar daha sonra farklı araştırmacılar tarafından da devam ettirilmiştir. 1943 yılında Earle ve arkadaşları farelerde tümör hücresini izole edebilmeyi başarmış ve 1961 yılında Leonard Hayflick hücrelerin, kültür ortamında sınırlı yaşam süresine sahip olduklarını tespit etmiştir.

Vücut dışında hücrenin canlılığını devam ettirilmesinin çeşitli avantajları ve dezavantajları mevcuttur. *In vitro* hücre kültürünün en önemli avantajı sıcaklık, osmotik basınç, pH, O₂ ve CO₂ yoğunluğu gibi fizikokimyasal koşulların kültür ortamında kontrolünün sağlanabilmesi ve buna bağlı olarak fizyolojik koşulların sabit tutulabilmesidir. Bu şartların sağlanabilmesi için besiyerlerinde çeşitli maddelere gereksinim duyulmaktadır. Serum, hormon ve aminoasit gibi çeşitli maddelerin, hücre tipinin ihtiyacına göre gerekli miktarlarda kültür ortamına verilmesi çok önemlidir. Bir diğer önemli avantaj, araştırmacının özel bir hücre tipi üzerinde çalışmasına olanak sağlamasıdır. Dokular çeşitli hücre tiplerini içerebilmektedirler. Dokudan elde edilen hücrelerden, zaman içerisinde tekrarlanan pasajlama işlemleri ile istenilen ana homojen hücre elde edilebilmektedir. Hedeflenen hücreye ulaşıldıktan sonra, hücreler başka çalışmalar için ve tekrarlı deneylerde kullanılmak üzere uygun şartlar altında uzun yıllar saklanılabilmektedir. Bazı dezavantajları da mevcuttur. Kültür çalışmaları sırasında meydana gelen kontaminasyon, çalışma verimliliğinde azalmaya neden olan en önemli problemdir. Diğer ise, hücrelerin uzun süre pasajlanması durumunda, hücrelerin farklılaşma kapasiteleri ve heterojenite oranları artmaktadır. Bu sebeple, çalışmalar sırasında ilk birkaç kuşak hücrelerinin kullanılması oldukça önemlidir (Koçaklı vd. 2015).

Hücrelerin ideal kültür ortamının sağlanmasında besiyerleri önemlidir. Hücre kültür besiyerleri, hücrelerin normal metabolik aktivitelerini yerine getirebilmeleri için gerekli olan ortam koşullarını sağlamak üzere hazırlanmış besleyici solüsyonlardır (Butler ve Christie 1994). Besiyeri seçimi sırasında farklı hücrelerin farklı besin ihtiyaçları olacağı dikkate alınmalıdır. Bu sebeple tek bir hücre serisinin gelişmesine yönelik bir çalışma yapılacaksa bu özellikleri taşıyan besiyeri seçilmelidir (Yaylalı 2007).

Harry Eagle tarafından 1955’de hücre kültür ortamı olarak Eagle’ın Temel Besiyeri (Eagle’s Minimal Essential Medium, EMEM) geliştirilmiştir. Sığır, insan veya embriyo özütleri ile hazırlanan ve ticari olarak kullanılan ilk besiyerdir. Bu besiyerinin içeriğinde aminoasitler, tuzlar (CaCl₂, KCl, MgSO₄, NaCl ve monosodyum fosfat), glukoz ve vitaminler (folik asit, nikotinamid, riboflavin, B12) bulunmaktadır.

Günümüzde tek bir hücre serisinin geliştirilmesine yönelik en çok kullanılan Eagle'ın Temel Besiyeri (1959) ve Dulbecco tarafından modifiye edilen Eagle Besiyeri'dir (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM). Dulbecco's Modified Eagle's Medium, EMEM'in bir çeşididir ve orjinal formundan dört kat daha fazla vitamin ve aminoasit ile iki kat fazla glukoz içermektedir. Ayrıca, içerisinde demir ve fenol kırmızısı da bulunmaktadır (Pombinho vd.2004). İnsan, maymun, sıçan, hamster, fare ve tavuk olmak üzere pek çok hücre tipi için DMEM kullanılmaktadır (Yaylalı 2007).

3.3.1 Hücre Kültürü Mediumunun Hazırlanması

Hücrelerin çoğaltılması için kullanılacak olan medium (besiyeri) 0,22 µm gözenekli pess mebran filtreler (WVR) kullanılarak hazırlandı. Filtreye konacak komplete medium bileşenleri steril ortamda (flow kabinde) konuldu. 1 L medium hazırlamak için filtreye öncelikle %10 (v/v) oranında ısı ile inaktive edilmiş fetal buzağı serumu (FBS; Fetal bovine serum veya fetal calf serum), %1 (v/v) oranında penisilin streptomisin, %1 (v/v) oranında (1 mM) sodyum piruvat eklendi. İçeriğinde glutamin olan yüksek glukoz konsantrasyonuna sahip DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Serox, Germany) ile hacim 1 litreye tamamlandı. Böylelikle besiyerindeki DMEM oranı %88 oldu. (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan besiyerinin (medium) bileşenleri.

Bileşen	Oran (%)	Hacim (mL)
DMEM (glutaminli)	88	880
FBS	10	100
Penisilin Streptomisin	1	10
Sodyum Piruvat	1	10
Toplam	100	1000

Besiyeri elde etmek için hazırlanan karışım bir vakum pompası aracılığı ile filtreden (WVR, 0,22µm'lik pess membran filtre) geçirildi, kullanılan vakum pompası borusu flow kabin içine sokmadan önce %70'lik alkolden geçirilerek sterile edildi. Filtratta

toplanan besiyeri filtreden ayrılarak şişe içine alınıp kapağı kapatıldı. Hücrelerin çözdürülmesi, yıkanması, pasajlanması ve üretilmesi amacıyla kullanılacak besiyeri, steril 50 mL'lik falkonlara konularak, kullanım süresine kadar +4°C'ye kaldırıldı. Bu şekilde 50'lik falkonlarda kullanıma hazır edilen besiyeri, hücre ekimi yapılacağı veya manüplasyonlarda kullanılacakları zaman, önceden çıkarılarak 37°C'deki su banyosunda 20-30 dakika ısıtılmıştır.

3.3.2 A549 Hücrelerinin Kültüre Aktarılması

- Kabin içi sterilizasyonu için 40 dk önce UV ışığı açıldı ve kullanılacak malzemeler kabin içinde steril edildi.
- A549 hücreleri sıvı azotta kriotüpler içinde laboratuvara getirildi. Donmuş halde kriotüp içinde bulunan hücreler öncelikle sıvı azottan -20 °C ye alındı. 10 dakika beklendikten sonra 37 °C deki sıcak su banyosunda 2 dk süre ile inkübe edilerek çözülmeye bırakıldı.
- Bu arada 15 mL'lik bir falkona 3mL medium konulmuştur. Su banyosunda tamamı çözülmek üzere olan kriyotüpteki hücreler hazırlanan (içine medium konan) falkona alınmıştır. Sonrasında hafifçe pipetaj yapılarak 800 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Santifürüj sonunda falkon tabanında biriken hücrelere temas edilmeden medium pipetle çekildi. Hücre peleti üzerine tekrar 2 mL medium eklenerek ve hafifçe pipetaj yapılarak ikinci kez santrifüj işlemi yapılmıştır.
- Santrifüjden sonra hücrelerin üzerinde kalan medium tekrar çekildi. Anlatıldığı üzere çözdürülerek 2 yıkamada içeriğinde bulunan DMSO (dimetil sülfoksit)'dan arındırılan A549 hücreleri flaska ekilmek üzere son kez 1 mL medium içinde çözüldü.
- İçerisinde %20 FBS içeren 37°C' deki complete medium 75 mL'lik flaska 10 mL hacminde eklenir.
- Bu şekilde ekim için hazır hale getirilen flaska, ekim için çözdürülerek DMSO'dan arındırılarak hazırlanan A549 hücreleri yavaşça homojenize dağılması sağlanarak eklenir.

- 75cm² 'lik flaska ekimi yapılan hücreler üremesi için 37 °C ve %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılmıştır. Günlük olarak takibi yapılan hücrelerin besiyerleri, hücreler %80-90 konfluent oluncaya kadar, 2 günde bir değiştirilmiştir. 75cm² 'lik flask istenen oranda konfluent olunca birkaç tane 75cm² 'lik flaska pasajlanmıştır.

3.3.3 Hücrelerin Çoğaltılması (Pasajlanması)

Pasajlama hücrelerin ürediği bir flasktan, başka bir flaska hücrelere zarar vermeden transfer edilmesidir. Pasajlama işleminde flask tabanına yapışık halde (konfluent) bulunan hücrelere önce tripsinizasyon, sonrasında ise detripsinizasyon (tripsinden arındırma) işlemi uygulanmıştır. Böylelikle tekrar bir falkonun dibinde elde edilerek çözülen hücreler 75'lik flaska ekilmiştir. Hücrelerin pasajlanması sırasında kullanılan tripsinizasyon/detripsinizasyon yöntemleri şu şekilde uygulanmıştır:

- Flasklar içindeki hücrelerin konfluent oranı %80 olduğunda pasajlama işlemine geçilmiştir.
- Hücrelerin üzerindeki mediyum steril pipet yardımıyla alınıp atılmıştır.
- Hücrelerin üzerine 37 °C olan 3-4 mL tripsin EDTA (Serox) eklenmiş ve flask yüzeyinin her tarafına yayılması sağlanmıştır. Ardından flasklar 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılıp 5 dk inkübasyona tabi tutulmuştur.
- Flask tabanına yapışık haldeki hücrelerin bu sürede inkübasyonda büyük oranda tabandan ayrıldığı gözlemlendi. Ayrılmayanların ise flaska hafifçe vurularak tabandan ayrılması sağlandı.
- Hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldıkları gözlemlendiğinde flasktan alınarak içerisinde 3 mL mediyum olan 15 mL'lik bir falkona aktarılmıştır.
- Falkonlar 800 rpm' de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant atılıp pellet üzerine 3 mL medium eklenip, hafifçe pipetaj yapıp yıkanma işlemi yapılmıştır.
- Süpernatant atılıp pellet üzerine 2 mL medium eklenmiş ve hafifçe pipetaj yapılmıştır.

- Ardından içerisinde 10 mL medium bulunan 75 cm² 'lik flaslara 0,5 mL olacak şekilde paylaştırılmıştır.
- Flaslara 37⁰ C ve %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılmıştır.

3.3.4 Hücrelerinin Sıvı Azotta Saklanması

- Flask yüzeyinde hücre konfluent yoğunluğu %80 olduğunda medium atıldı.
- Hücrelerin üzerine 4 mL tripsin-EDTA eklenerek flask yüzeyinin her tarafına homojen yayılması sağlandı.
- Flaslara 37⁰ C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 5 dk inkübasyona bırakıldı.
- Hücreler flask yüzeyinden kalkınca içerisinde 4 mL mediyum bulunan falkonlara alındı.
- Falkonlar 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılarak pellet üzerine 4 mL medium eklendi ve pellet medium yardımıyla çözdürüldü.
- 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılarak pellet üzerine soğuk %5 DMSO içeren FBS eklendi.
- Hücreler damla damla buz içerisinde bulunan kryo tüpe alındı.
- Önce -20⁰ C soğutulup daha sonra sıvı azotta dondurularak ilerleyen zamandaki çalışmalar için saklandı.

3.3.5 Hücre Sayımı ve Hücre Canlılığının Belirlenmesi

- Flask yüzeyinde hücre konfluent yoğunluğu %80 olduğunda medium atıldı.
- Hücrelerin üzerine 4 mL tripsin-EDTA eklenerek flask yüzeyinin her tarafına homojen yayılması sağlandı.
- Flaslara 37⁰ C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 5 dk inkübasyona bırakıldı.
- Hücreler flask yüzeyinden kalkınca içerisinde 4 mL medium bulunan falkonlara alındı.
- Falkon 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.

- Süpernatant atılıp hücrelerin üzerine 2 mL medium eklendi ve hafifçe pipetaj yapıldı.
- Hücre süspansiyonundan 50 µL alınarak, 50 µL (dilüsyon oranı 2) tripan blue ile karıştırıldı.
- Karışım 5 dk inkübasyona bırakıldı.
- Hazırlanan tripan blue-hücre süspansiyonu karışımından pipetaj yapılarak, 10 µL alınarak Neubauer lamına uygun şekilde konuldu.

Tripan blue sadece canlı hücrelerin boyanmasını ve ışık altında parlak görünmesini sağlayan bir boyadır. Bu nedenle sayım yapılacak lama uygulanan ve tripan mavisi ile boyanmış canlı hücreler mikroskop altında parlak görülürken, ölü hücreler mavi-mat görülür. Sayım lamında her biri 16 kareden oluşan 4 sayım bölgesindeki hücreler sayılarak ortalamaları alınır.

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

Yukarıda ifade edilen formül kullanılarak medium-hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısı hesaplanır. Sayımın güvenilirliği açısından dilüsyon miktarı önemlidir. Genellikle ortalama hücre sayısının 50-150 arasında olması hücre süspansiyonunun ideal dilüsyona tabi tutulduğunun bir göstergesi kabul edilir. Şayet ortalama hücre sayısı çok yüksek çıkarsa tripan mavisi hücre karışımındaki hücre hacmi azaltılarak, tripan mavisi hacmi artırılarak daha dilüe hücre süspansiyonu elde ederek sayım tekrarlanır.

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

3.4 MTT Hücre Viabilite Ölçüm Testi

1983 yılında Mosmann tarafından tanımlanmıştır. Daha sonra Alley ve arkadaşları tarafından geliştirilen (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid) (MTT)

yöntemi hücrelerin verimlilik, uygulanabilirlik ve aktivasyonunu ölçen hassas, nicel ve güvenilir bir kolorimetrik yöntemdir. Bu yöntemin temeli, canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesine dayanmaktadır. Hücre canlılığını ileri derecede azaltan; fakat öldürmeyen özellikteki, sarı renkli, suda çözünebilen tetrazolium boyası (MTT), canlı hücrelere mitokondri tarafından parçalanması sonucu aktif olarak absorbe olur ve suda çözünmeyen koyu mavi renkli formazana indirgenir. Sonuç olarak, canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Formazan miktarı, direk olarak hücre hatlarındaki canlı hücre sayısı ile orantılıdır. Diğer bir ifade ile hücrelerin MTT indirgeme özelliği, hücre canlılığının ölçütü olarak alınır ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile bağıntı gösterir (Griffiths ve Doyle 1998, Freshney 2005).

Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Bu durum da hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilir ve spektrofotometrik olarak belirlenen değer, yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir (Koyuncuoğlu vd. 2013).

3.4.1 MTT 'nin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan MTT solüsyonu 5 µg/mL konsantrasyonunda hazırlandı. MTT' nin çözülmesinde pH 7,4 olan PBS kullanıldı. Hazırlanan MTT çözeltisi 0,22 µm filtreden geçirilerek steril hale getirildi. MTT solüsyonu her kullanımda taze hazırlandı.

3.4.2 MTT Yöntemi ile Sideritis Phrygia LD50 Dozunun Belirlenmesi

- 24 welle uygun hacimlerde (2 mL) mediyum konuldu.
- Hücre sayısı hesaplanmış süspansiyondan 24'lük plağın her bir kuyucuğuna 1×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı.
- Ekimin ardından plak 37^0 C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi.
- Hücrelerin plak yüzeyinde yoğunluğu %50-60 olduğunda *S. phrygia* ekstraktı 500, 250, 100, 50, 25, 10 ve 5 µg/mL olacak şekilde uygulandı.
- Kontrol olarak %1 DMSO kullanıldı.

- Plak inkübatöre kaldırılıp 37⁰ C ve %5 CO₂ ortamında 24 inkübasyona bırakıldı.
- 24 inkübasyon süresinden sonra MTT solüsyunu %10 olacak şekilde 200 µL eklendi ve 2-4 saat daha inkübe edilmiştir.
- Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası well plate tabanında oluşan mor renkli formazan kristallerine zarar vermeden pipet yardımıyla çekilip uzaklaştırıldı.
- Plaktaki kuyucuklara formazan kristallerini çözen DMSO 600 µL olacak şekilde eklendi.
- 10 dakika inkübe edilmiştir.
- Çözünen formazanlar mikropalak okuyucu spektrofotometre (µ- Quant, BioTek Instruments, USA) ile 540 nm absorbans değerinde 3 tekrarlı olarak ölçümleri yapıldı.
- *Sideritis phrygia* ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, her bir kuyucuktaki hücrelerin canlılık oranları % canlılık olarak belirlendi. Böylelikle kuyucuklarda bulunan hücrelere uygulanan *S. phrygia* ekstraktlarına ait her bir dozun A549 hücrelerindeki hücre canlılığına etkisi % canlılık oranı şeklinde belirlenmiş oldu.

3.5 Comet Yöntemi

Comet analizinin yapılabilmesi için ilk olarak gerekli çözeltiler hazırlandı. Bu amaçla hazırlanan lizis çözeltisi (Çizelge 3.2), elektroforez çözeltisi (Çizelge 3.3), nötralizasyon çözeltisi (Çizelge 3.4) hazırlamak için kullanılan yöntemler çizelgelerde sunulmuştur. Sonraki aşamada ise hazırlanan çözeltilerin kullanılmasıyla komet analizinin nasıl gerçekleştirildiği açıklanmaya çalışılmıştır.

Çizelge 3.2 Lizis çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktar
NaCl	29,4 g
EDTA	7,44 g
Trisma baz	0,24 g
Triton X-100	2mL
DMSO	20 mL

Hazırlanan kimyasallar dH₂O ile 200 mL'ye tamamlanarak pH 10 olacak şekilde ayarlandı.

Çizelge 3.3 Elektroforez çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktar
NaOH	6 g
EDTA	0,18g

Hazırlanan kimyasallar dH₂O ile 500 mL'ye tamamlanarak pH>13 olacak şekilde ayarlandı.

Çizelge 3.4 Nötralizasyon çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktar
Trisma baz	14,55 g

Hazırlanan kimyasal dH₂O ile 300 mL'ye tamamlanarak pH 7,5 olacak şekilde ayarlandı.

%1 NMA (Normal kaynama noktalı agaroz) hazırlanması için 0,03 g NMA 3 mL PBS ile bek alevinde prepara edilerek hazırlandı.

%0,8 LMA (Düşük kaynama noktalı agaroz) hazırlanması için 0,016 g LMA 2 mL PBS ile bek alevinde prepara edilerek hazırlandı.

Stok etidyum bromür hazırlanması için 5 mg etidyum bromür 25 mL dH₂O'da çözdürüldü. Çalışmada 10 kat dilüe edilerek kullanıldı.

- Uygulanan konsantrasyonlardaki hücreler flask yüzeyinden alınarak 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırılarak hücreler PBS ile süspanse edildi.
- Hücre süspanسیونundan 40 µL alınarak ependorf içerisinde 100 µL LMA ile karıştırıldı.
- Ependorf içindeki hücre-LMA karışımının hepsi alınarak bir gün önceden hazırlanmış NMA'lı lamLara preparat elde edildi.
- Preparatlar donmaları için buz kesetlerinin üzerine yerleştirildi.
- Donan preparatlar üzerindeki lameller yavaşça alınarak 60 dk lizis işlemine tabi tutuldu.
- Lizis işleminden sonra 20 dk alıştırma 20 dk yürütme olmak üzere 25 V 300 mA'de elektroforez işlemine tabi tutuldu.
- Elektroforezden alınan preparatlar nötralizasyon tamponuyla yıkandı.
- Yıkama işleminin ardından her bir preparat 70 µL etidyum bromür ile boyanarak lamelle kapatıldı.
- Araştırma kapsamında, her kültür için floresans mikroskopta 100 adet nükleoid DNA incelenerek DNA hasarları hesaplandı. Comet oluşumları, literatürden yararlanılarak gözlenen kuyruk uzunluklarına göre gruplara ayrılarak değişen oranlarda puanlandırıldı. Ayrıca, tüm bu işlemler, çevre kaynaklı DNA hasarını önlemek amacıyla karanlık ortamda yapıldı.

3.6 Mikronükleus Testi

Bu yöntemde kullanılan KCl çözeltisinin hazırlanması (Çizelge 3.5)'de sunulmuştur. Sonrasında ise analizlerde kullanılan fiksatiflerin, giemsa boyasının hazırlanmasından bahsedilmiştir. Son olarak ise mikronükleus analiz protokolü verilmiştir.

Çizelge 3.5 KCl çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktar
KCl	0,4 g

Distile su

100 mL

KCl ile dH₂O vorteksenerek homojenize edilir.

Fiksatiflerin Hazırlanışı:

Önce fix2 daha sonra fix1 hazırlanır. Çalışmaya başlamadan 2 saat önce fiksatifler hazırlanmalıdır.

Fix2 için; 40mL Glasiyal Asetik Asit + 200mL metanol (Son hacim: 240mL)

Fix1 için; 50mL Fix2 + 50mL %0,9 NaCl (Son hacim: 100mL)

%5'lik Giemsa boyası için;

5mL TamponA +5mL TamponB + 5mL Giemsa karıştırılır. Son hacim dH₂O ile 100 mL'ye tamamlandı. (ph:6,8) Hazırlanan bu karışım filtre kâğıdından geçirildi.

Mikronükleus analiz protokolü;

- Şale içerisine nitrözasetit veya distile su eklendi.
- Örnek sayısı kadar lam numaralandırılarak şale içerisine dizildi. Çalışma başlamadan 30 dk önce (+4 °C) buzdolabında bekletildi.
- Ependorf içerisindeki SP (*Sideritis phrygia* ekstresi), Cisplatin, SP+Cisplatin ve kontrol grubu örnekleri üzerine 1mL KCL eklendi, homojenize edildi ve 5dk beklendi.
- KCl eklenen örnekler santrifüje 5dk tabi tutuldu (1500rpm).
- Süpernatant atıldı, pellet üzerine fix1 eklendi ve 5dk yine santrifüj edildi(1500rpm).
- Süpernatant atıldı, pellet üzerine fix2 eklendi ve tekrar 5dk santrifüj edildi(1500rpm).
- Son santrifüj sonrası süpernatant yine atıldı, pellet kısmı şalelerdeki lamlara yayıldı.
- Bir gün sonra lamdaki kuruyan örnekler şale içerisinde giemsa boyasına 30 dk maruz bırakılarak boyanması sağlandı.

- Işık mikroskobu ile sayımlar 100x (immersiyon) objektifle yapıldı.
- Her preparattan 1000 hücre sayımı gerçekleştirildi.

3.7 İstatistiksel Analiz

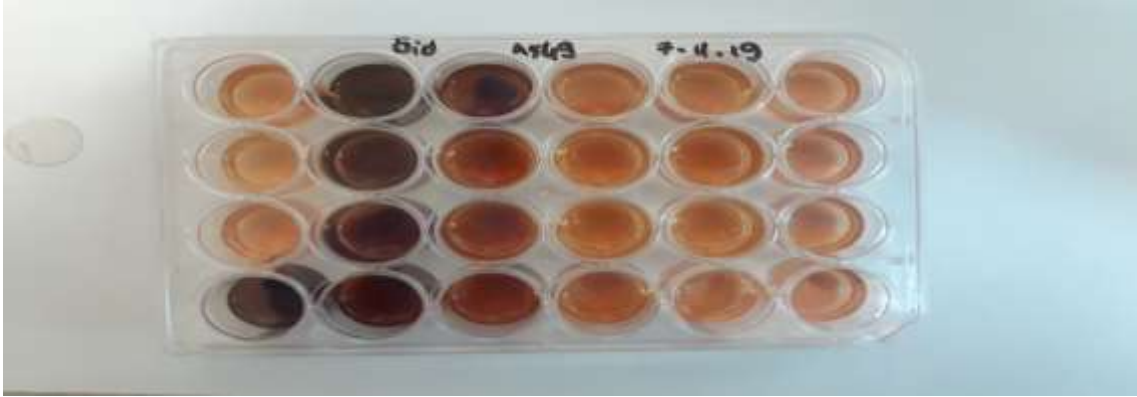
Kontrol grubu ile uygulama grupları arasındaki istatistiksel farklılıklar SPSS 18.0 Windows paket programı ile değerlendirildi. Comet ve mikronükleus analizinden elde edilen sonuçlarda grup ortalamalarının karşılaştırılması varyans analizi (ANOVA) ve Duncan post testi kullanılarak belirlendi ($p < 0.05$). Sonuçlar, ortalama \pm SH (standart hata) olarak verildi.

4. BULGULAR

4.1 MTT Yöntemi ile *Sideritis phrygia* Ektresinin A549 Hücre Hattı Üzerine Olası Etkilerinin Değerlendirilmesi

Sideritis phrygia türüne ait su ekstraktlarının A549 hücrelerindeki sitotoksisiteleri MTT yöntemi ile belirlendi. Ekstraktların sitotoksisitelerinin belirlenebilmesi için DMSO'da çözülen ekstraktlar hücrelere sekiz farklı konsantrasyon da (1µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL) uygulandı. 24 saat inkübasyon sonunda gerçekleştirilen MTT analizi sonucunda elde edilen absorbanslardan hareketle her bir dozun A549 hücre canlılığını ne oranda etkilediği belirlendi ve % hücre canlılığı şeklinde ifade edildi.

Sideritis phrygia ekstraktlarının sitotoksik olmayan dozları (100 µg/mL kadar olan) bulunmuştur. 1µg/mL, 10µg/mL, 100 µg/mL 3 doz belirlenerek hücrelere uygulanmıştır (Şekil 4.1) ve genotoksite analizlerine geçilmiştir.



Resim 4.1 A549 Hücre hattı üzerine *Sideritis phrygia* ekstraktı doz uygulamaları.

4.2 DNA Hasar Düzeyleri ve MN Frekanslarının Değerlendirilmesi

A549 hücrelerinde SP_{SU} ekstraktlarının genotoksisiteye etkisini belirleyebilmek için comet testi ile DNA hasarı düzeyleri belirlendi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Comet ve MN değerlendirmesi.

Deney Grupları (µg/mL)	Comet Skorları (AU)	MN Frekansları*
Kontrol	4,66 ± 2,08 ^b	3,00 ± 1,00
SP100	8,33 ± 1,15 ^{a,b}	2,00 ± 0,00
SP10	5,33 ± 2,08 ^b	3,33 ± 0,58
SP1	4,66 ± 0,58 ^b	3,33 ± 0,58
CP	18,00 ± 3,00 ^a	4,00 ± 1,00
CP+SP100	10,33 ± 1,53 ^{a,b}	2,66 ± 1,15
CP+SP10	12,66 ± 1,15 ^{a,b}	3,66 ± 0,58
CP+SP1	15,33 ± 0,58 ^a	3,33 ± 1,15
P	0,0000	0,2020

Veriler ortalama ± standard hata şeklinde ifade edildi (n=3).

^a: İstatistiki olarak kontrol grubundan farklılık gösteren verileri ifade etmektedir (p<0,05).

^b: İstatistiki olarak cisplatin grubundan farklılık gösteren verileri ifade etmektedir (p<0,05).

*: Gruplar arasında istatistiksel fark yoktur (p<0,05).

Kısaltmalar: SP 100 (*Sideritis phrygia* ekstraktı 100 µg/mL), SP 10 (*Sideritis phrygia* ekstraktı 10 µg/mL), SP 1 (*Sideritis phrygia* ekstraktı 1 µg/mL), CP(Cisplatin).

A549 hücre hattı kullanılarak yapılan comet testi frekanslarında kontrol gurubunda 4,66 ± 2,08, SP 100 8,33 ± 1,15, SP 10 3,33 ± 0,58, (*Sideritis phrygia* ekstraktı 1 µg/mL) 4,66 ± 0,58, CP 18,00 ± 3,00, CP+SP100 10,33 ± 1,53, CP+SP10 12,66 ± 1,15, CP+SP1 15,33 ± 0,58 olarak bulunmuştur.

Comet skorları değerlendirildiğinde SPsu 100 uygulama grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DNA hasar skorları artış göstermektedir. DNA hasar skorlarındaki bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bununla birlikte cisplatin uygulama grubunda DNA hasarı düzeyleri kontrol grubundan yüksek bulunmuştur. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Yine SP uygulamaları CP' nin oluşturduğu DNA hasar düzeyini, doza bağlı olarak azaltmış olup SP10 ve SP100 uygulamalarındaki değerler CP grubuna göre anlamlı bulunmuştur.

A549 hücre hattı kullanılarak yapılan mikronükleus frekanslarında kontrol gurubunda $3,00 \pm 1,00$, SP 100 $2,00 \pm 0,00$, SP 10 $3,33 \pm 0,58$, $3,33 \pm 0,58$, CP $4,00 \pm 1,00$, CP+SP100 $2,66 \pm 1,15$, CP+SP10 $3,66 \pm 0,58$, CP+SP1 $3,33 \pm 1,15$ olarak bulunmuştur.

Mikronükleus frekansları incelendiğinde gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hücre siklusu, birtakım makromoleküler olayları kapsayan hücre bölünmesini ve bunun sonucu olarak, birbirinin aynısı olan iki yeni hücrenin oluşması olarak tanımlanmaktadır (Canpolat 2016). Hücre siklusu sırasında, hücrenin siklus fazlarında düzenli olarak ilerlemesini sağlayan, kontrol noktaları adı verilen ve hücrenin siklusa devam edip etmeyeceğine karar veren siklinler, siklin bağımlı kinazlar, siklin bağımlı kinaz inhibitörleri gibi çeşitli düzenleyiciler vardır (Vermeulen vd. 2003). Bu düzenleyicilerde meydana gelen hasarlar kontrolsüz hücre bölünmesine yol açarak, kanser gelişimine sebep olmaktadır.

Akciğer kanseri, dünya çapında kansere bağlı ölümlerin en yaygın olanıdır. Bunun temel nedeni, erken teşhisin zorluğundan ve etkili tedavi yöntemlerinin bulunmamasından kaynaklanmaktadır, bu nedenle akciğer kanserine daha etkili tedavi seçeneklerine umutsuzca ihtiyaç duyulmaktadır (Gao vd. 2019).

Kemoterapi, kimyasal maddelerin kullanıldığı kanser tedavi yöntemi olarak adlandırılır. Bu kimyasal maddeler; alkilleyici ajanlar, antimetabolitler, antitümör antibiyotikleri, topoizomeraz inhibitörleri, mitotik inhibitörler, kortikosteroidler ve proteozom inhibitörleri olabilmektedir (Temel 2015).

Günümüzde organik bileşikler ve doğal ürünleri içeren birçok kemoterapi ilacı bulunmaktadır. Kemoterapi tedavisinde özellikle cisplatin, karboplatin, oksaliplatin ve satraplatin gibi farklı platin bazlı ilaçlar kullanılmaktadır (Akkoç 2020). Platin içeren bu ilaçların sadece belli tümörlerin tedavisinde kullanılabilmesi ve miyelosupresyon (kemik iliği aktivitesinde azalma), ototoksisite (işitme kaybı), nörotoksisite (sinir sistemi hasarı) ve nefrotoksisite (böbrek fonksiyonlarının azalması ve hasar) gibi birçok yan etkisinin olması (Yang vd. 2019) ve kemoterapötik kanser ajanlarına karşı ilaç direncinin artarak ve hızla büyümesi ciddi bir tıbbi problem oluşturmaktadır. Bu sebeple, kanser tedavisi için yeni, etkin ve güvenli kemoterapötik ilaç adaylarının geliştirilmesine büyük bir ihtiyaç vardır (Akkoç 2020).

Yapmış olduğumuz tez çalışması hücre kültürü çalışması olup kontrollü deneyler

içermektedir. Hücre kültürü çalışmaları çalışılan maddenin etkilerini hızlı ve kısa sürede göstermektedir. Ayrıca hücre kültürü çalışmalarında sınırsız çoğalan hücrelerin kullanılması, deney hayvanlarıyla çalışılırken karşılaşılan etik kurulu raporuna gerek bırakmamaktadır. Bu sebeple hücre kültürü çalışmaları dünya çapında kanser araştırmaları, biyokimya, sitogenetik ve moleküler biyoloji çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Tıbbi bitkilerin dünya çapında artan popülaritesi, güvenliği ve düşük maliyeti nedeniyle, kanser gibi karmaşık rahatsızlıkları olan hastaları tedavi etmek için kullanımları artmaktadır.

Çeşitli bitki türlerinden ikincil metabolitler, kanser de dâhil olmak üzere çeşitli hastalıklar için alternatif terapötik ajanlar olarak oldukça araştırılmıştır. Dikkat çekici bir şekilde, Amerika Birleşik Devletleri'nde 1983 ile 1994 yılları arasında onaylanan antikanser ilaçların %60'ından fazlası doğal kaynaklı olduğu bildirilmiştir (Stevigny vd.2005, Newman ve Cragg 2007).

Dünyada yaklaşık olarak 46 tür ve 53 taksonla temsil edilen ve hastalıklara olan etkileri nedeni ile ekonomik değeri her geçen gün artan sideritis türlerinin etkilerinin aydınlatılması ülkemizde inovatif ürünlerin oluşturulabilmesi açısından önemlidir (Gümüşçü ve Gümüşçü 2014). Çünkü dünyada bulunan sideritis türlerinin büyük bir çoğunluğu ülkemizde yetişmektedir. Türkiye'de yetişen farklı sideritis türlerinin 39 taksonu endemiktir. Bu türlerin çoğunun birincil aşama çalışmaları bile henüz yapılmamıştır. Bu türlerin etkileri henüz analiz edilmemiş olanlar belirlenerek farklı kanser hatlarında etkileri araştırılmalıdır. Ancak böylelikle klinik olarak etkili olabilecek türler belirlenerek, birçok dünya ülkesinde olduğu gibi ürüne dönüştürme çalışmalarına bağlanabilir. Unutulmamalıdır ki alternatif tıp ürünü olarak geliştirilen ürünlerin dünya ilaç sanayisi içindeki payı her geçen gün artmaktadır.

S. phrygia Bornm. Bitkisinin uçucu yağında toplam 42 farklı bileşik analiz edilmiştir. Bu bileşiklerin oranları %0,2 ile %11,4 aralığında değişirken, en yüksek değere %10,6 ile limonen maddesi sahiptir (Sağır 2016).

Nigella sativa dünya çapında doğal bir çare olarak yüzyıllardır yaygın olarak kullanılan tıbbi bir bitkidir. *N. sativa*. Uçucu yağ ana bileşenleri pinen, p-simen, timol (THY) ve ditiokinon (DTQ), yağının farmakolojik olarak aktif bileşikleridir. Karvakrol, karvon, 4-terpineol, limonenler ve sitronellol gibi diğer terpenoid bileşikler de yağında bulunmuştur. Kansere karşı akciğerler, böbrekler, prostat, karaciğer ve memedeki ve birçok kötü huylu hücre üzerindeki etkinliği gösterilmiştir (Mollazadeh vd. 2017).

Top navel portakal kabuğuyla yapılan bir çalışmada yirmi dört bileşen belirlenmiş olup bunlardan limonen (%74,6) maddesi yüksek değerde tespit edilmiştir. MTT testi uygulanan, bu madde insan akciğer kanseri hücresi A549 ve prostat kanseri hücresi 22RV-1'in proliferasyonunun inhibisyonu üzerinde olumlu bir etki gösterdiği tespit edilmiştir (Yang vd.2017).

Limonen, akciğer kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği ve çıplak farelerde nakledilen tümörlerin büyümesini bastırdığı tespit edilmiştir. D-limonen, otofajiyi teşvik ederek akciğer kanseri hücrelerinin apoptozunu indükleyebildiğinden akciğer kanseri üzerinde terapötik bir etkiye sahip olabileceği bildirilmiştir (Yu vd.2018).

Sideritis perfoliata L. geleneksel tıpta çeşitli kullanımları olan Doğu Akdeniz bölgesinin endemik bir türüdür. *S. perfoliata'nın* antiproliferatif aktivitesi, kanserli ve kanserli olmayan hücelere karşı insan serviks adenokarsinoma kanseri (HeLa), İnsan hepatosellüler karsinoma (HepG2) ve insan epidermoid karsinomu (A431) hatları üzerinde araştırılmıştır. Etanol özütü, kanserli olmayan hücre hatlarına karşı orta düzeyde toksisite gösterirken, kanserli hücre hatlarına karşı düşük toksisite gösterdiği kaydedilmiştir. Bununla birlikte, en umut verici antikanser aktivitesi, insan karaciğer kanseri hücrelerine karşı olduğu tespit edilmiştir (Lall vd.2019).

Bu tez çalışmasında *Sideritis phrygia* ekstralarının (10 µg/mL ve 1 µg/mL) genotoksik bir hasar oluşturmadığı görülmüştür. Cisplatin uygulanan gruplarda bir genotoksik hasar meydana gelmiştir ve kanser hücrelerinin sağ kalımını ortadan kaldıradığı çalışmamızla da gösterilmiştir.

Cisplatin tarafından oluşturulmuş toksisiteyi engelleme amaçlı *Sideritis phrygia* ekstrelerinin 100 µg/mL ve 10 µg/mL uygulamalarının etkili olduğu görülmüştür.

Uygun doz seçimlerinde cisplatin hem akciğerde hemde diğer dokularda genotoksitesini azaltmaya yönelik koruyucu tedavilere takviye edici olarak koruyucu etkisinin olduğu düşüncesini desteklemektedir.

Sonuç olarak, dünyada yaklaşık olarak 46 tür ve 53 taksonla temsil edilen ve hastalıklara olan etkileri nedeni ile ekonomik değeri her geçen gün artan *sideritis* türlerinin etkilerinin aydınlatılması ülkemizde inovatif ürünlerin oluşturulabilmesi açısından önemlidir (Gümüşçü ve Gümüşçü 2014). *Sideritis* türleri, yüksek endemizm oranı ve halk arasında çay şeklinde yaygın kullanımı sebebiyle Türkiye için önemli bitkiler arasındadır (Şahin vd. 2008). Özellikle stomaşık ve antikonvulsan etkilerinden dolayı ve soğuk algınlıklarında öksürük kesici ve gastrointestinal hastalıkların tedavisinde tercih edilmektedir (Özer Sağır 2016). Bu türlerin çoğunun birincil aşama çalışmaları bile henüz yapılmamıştır. Sunulan tez çalışmasında *S. phrygia* bitkisi için literatür taramaları ve yapılan analizler sonucunda elde edilen bulgular ışığında yola çıkarak farklı kanser hücre hatları üzerinde daha geniş kapsamlı araştırmalar yapılmasının uygun olduğu görüşündeyiz. Unutulmamalıdır ki alternatif tıp ürünü olarak geliştirilen ürünlerin dünya ilaç sanayisi içindeki payı her geçen gün artmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Adam B, Kıyıcı A, Ardiçoğlu Y, 2013, Temel ve Klinik Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri, 362, İstanbul.
- Akkoç S, 2020, HeLa ve Beas-2B Hücre Hatlarına Karşı Benzimidazolyum Tuzlarının İn Vitro Sitotoksik Aktivite Çalışmaları, Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 10, 5050–513.
- Albertini R J, Anderson D, Douglas G R, Hugmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan A T, Norppa H, Suhaker D E G, Tice R, Waters M D, Aitio A, 2000, IPCS Guidelines For the Monitoring Of Genetoxic Effects of Carcinogens In Humans, Mutat Res, 463, 11–172.
- Alaısa AM, AL-Majed A A, AL-Yahya A A, AL-Rejaie S S, Bakheet S A, Alshabanah O A, Sayed-Ahmed M M, 2007, Reversal of Cisplatin-Induced Carnitine Deficiency and Energy Starvation By Propionyl-L-Carnitine In Rat Kidney Tissues, Clinical and Experimental Pharmacology Physiology, 34, 1252–1259.
- Amptoulach S, Tsavaris N, 2011, Neurotoxicity Caused By The Treatment With Platinum Analogues, Chemotherapy Research and Practice, 5, 843019.
- Anand AJ, Bashey B, 1993, Newer Insights Into Cisplatin Nephrotoxicity, Ann Pharmacother, 23, 1519–27.
- Atmaca E, Aksoy A, 2009, Oksidatif DNA Hasarı ve Kromatografik Yöntemlerle Tespit Edilmesi, YYU Veteriner Fakültesi Dergisi, 20, 79 – 83.
- Ayan A K, Çalışkan Ö, Çırak C, 2006, Isırgan Otu (*Urtica* spp.) Ekonomik Önemi ve Tarımı, OMÜ Ziraat Fakültesi, 21, 357–363.
- Ayaz A, 2008, *Sideritis hololeuca* Boiss.&Heldr. apud Bentham ve *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *Violascens* Ekstraktlarının Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 70s, Konya.
- Aydoğmuş-Öztürk F, Günaydin K, Öztürk M, Jahan H, Duru M E, Choudhary M I, 2018, Effect of *Sideritis leptoclada* Against HT-144 Human Malignant Melanoma, Melanoma Research, 28, 502–509.

- Ayşenur Sarıova, 2019, Meme Kanseri (Mcf-7) Hücre Hattında Arbutinin Etkileri, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 87s, Afyonkarahisar.
- Aytaç Z, Aksoy A A, 2000, New Sideritis L. Species (Labiatae) From Turkey. Flora Meditt., 10, 181-184.
- Babür S, 2020, Verbascum Lasianthum Boiss. Ex Benth. Türünün Akciğer Kanseri (A549) Hücrelerine Etkisi, Yüksek Lisans,83s, Afyonkarahisar.
- Baran Y, 2018, Kanser Moleküler Biyolojisi, Cilt 536, Ankara, Kısayol Yayıncılık.
- Barber J C, Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, Turner K G, Jansen R K,2002, Origin Of Macaronesian Sideritis L. (Lamioideae: Lamiaceae) İnferred From Nuclear And Chloroplast Sequence Datasets, Mol. Phylogenet. Evol, 23, 3, 293–306.
- Barlak N, 2018, Metformin Larenks Kanseri Hücre Hattı HEP-2 Hücreleri Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi ve 5-Florourasil ile Sinerjistik Etkilerinin Araştırılması, Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 68s, Erzurum.
- Barta J A, Powell C A, Wisnivesky J P, 2019, Global Epidemiology of Lung Cancer, Annals of Global Health, 85, 1–16.
- Başhan Ö F, 2019, Deresine (Afyonkarahisar) Havzası Florası, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi,107s, Afyonkarahisar.
- Baykara O, 2016, Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar, Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi, 5, 154–165.
- Becit M, 2017, Pknogenol ve Kurkuminin Çeşitli Kanser Hücre Hatlarında Sisplatin Sitotoksitesine Etkilerinin İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Farmasötik Toksikoloji Programı,151s, Ankara.
- Boulikas T, Vougiouka M, 2003, Cisplatin and Platinum Drugs at the Molecular Level, Oncol Rep, 10, 1663–82.
- Börçek Kasurka C,2019, Geno-Sitotoksiste Çalışmalarına Sitom Yaklaşımı, Eskişehir Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi C- Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji, 8, 261 – 269.

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R L, Torre L A, Jemal A, 2018, Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates Of Incidence And Mortality Worldwide For 36 Cancers In 185 Countries, CA: A Cancer Journal for Clinicians, 68, 394–424.
- Brozovic A, Ambriović-Ristov A, Osmak M, 2010, The Relationship Between Cisplatin-Induced Reactive Oxygen Species, Glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin, Critical Reviews in Toxicology, 40, 347–359.
- Butler M, Christie A, 1994, Adaptation of mammalian cells to non-ammoniogenic media, Cytotechnology, 15, 87–94.
- Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget J, Ravanat J, Sauvaigo S, 1999, Hydroxyl radicals and DNA base damage, Mutat Res 424, 9–21.
- Canpolat F, 2016, Hücre Siklusu ve Apoptoz, Güncel Dermatoloji Dergisi, 1, 11–17.
- Cathcart R, Schwiers E, Saul R, Ames B, 1984, Thymine Glycol And Thymidine Glycol In Human And Rat Urine: A Possible Assay For Oxidative DNA Damage, Proc Natl Acad Sci USA 81, 5633–7.
- Chen J, Xu T, Chen, C, 2015, The Critical Roles of Mir-21 In Anti-Cancer Effects of Curcumin, Annals of Translational Medicine. 3, 330.
- Cheng Z Y, Hsiao Y T, Huang Y P, Peng S F, Huang W W, Liu K C, Hsia T C, Way T D, Chung J G, 2020, Casticin Induces DNA Damage and Affects DNA Repair Associated Protein Expression in Human Lung Cancer A549 Cells (Running Title: Casticin Induces DNA Damage in Lung Cancer Cells, Molecules, 25, 341.
- Chirina, Yolanda I, Jose Pedraza-Chaverri, 2009, Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity, Experimental and Toxicologic Pathology 61, 223–242.
- Ciccia A, Elledge S J, 2010, The DNA Damage Response: Making It Safe To Play With Knives, Mol Cell, 40, 179–204.
- Collins A R, 2004, The Comet Assay For DNA Damage And Repair: Principles, Applications, and Limitations, Mol Biotechnol, 26, 249–61.

- Collins A R, 2014, Measuring Oxidative Damage To DNA And Its Repair With The Comet Assay. *Biochim Biophys Acta*, 1840,794–800.
- Cooper J R, Abdullatif M B, Burnett E C, Kempzell, K E, Conforti F, Tolley H, Collins J E, Davies D E, 2016, Long Term Culture of the A549 Cancer Cell Line Promotes Multilamellar Body Formation and Differentiation towards an Alveolar Type II Pneumocyte Phenotype, *Plos one*,11, e0164438.
- Coskun M, Cayir A, Coskun M, Tok H, 2013, Evaluation of Background DNA Damage İn A Turkish Population Measured By Means of The Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay, *Mutat Res*, 757, 23–7.
- Çarıkcı S, 2010, Bazı Sideritis (Sideritis Niveotomentosa, Sideritis Hololeuca, Sideritis Brevıdens) Türlerinin Diterpenik Bileşenlerinin İzolasyonu ve Yapılarının Tayini, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, Doktora Tezi,193s, Balıkesir.
- Çevik K K, Dandıl E, 2019, BT Görüntüleri Kullanılarak Evrişimsel Sinir Ağları ile Akciğer Nodüllerinin Sınıflandırılması, 2nd International Turkish World Engineering and Science Congress.
- Dadhaniya P, Patel C, Muchhara J, Bhadja N, Mathuria N, Vachhani K, 2011, Safety Assessment of A Solid Lipid Curcumin Particle Preparation: Acute And Subchronic Toxicity Studies, *Food Chemistry Toxicology*, 49, 1834–42.
- Dasari S, Tchounwou P B, 2014, Cisplatin İn Cancer Therapy: Molecular Mechanisms of Action, *Eur J Pharmacol*, 740, 364–78.
- Davis P H (eds),1982, Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh University, Edinburgh, 7, 96–97.
- De bont R, Van larebeke N, 2004, Endogenous DNA Damage İn Humans: A Review of Quantitative Data, *Mutagenesis*, 19, 169–85.
- Debeleç Bütüner B, Kantarcı G, 2006. Mutasyon, Dna Hasarı, Onarım Mekanizmaları ve Kansere İlişkisi, *Ankara Ecz. Fak. Derg*,35, 149–170.
- Demirel S, Zamani A, 2002, MN Tekniği Ve Kullanım Alanları, *Genel Tıp Dergisi*, 12, 123–7.

- Demirtaş I, Sahin A, Ayhan B, Tekin S, Telci I, 2009, Antiproliferative Effects Of The Methanolic Extracts Of *Sideritis Libanotica* Labill. Subs. *Linearis*, *Rec Nat Prod* 3, 104–109.
- Dınçer Y, Kankaya S, 2010, DNA Hasarının Belirlenmesinde Comet Assay, *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 30, 1365–1373.
- Douki T, Reynaud-Angelin A, Cadet J, Sage E, 2003, Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation, *Biochemistry* 42, 9221–6.
- Dugbartey G J, Peppone L J, de Graaf I A, 2016, An İntegrative View of Cisplatininduced Renal And Cardiac Toxicities: Molecular Mechanisms, Current Treatment Challenges And Potential Protective Measures, *Toxicology*, 371, 58–66.
- Eastman A, 1987, The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes, *Pharmacology & Therapeutics*, 34, 155–166.
- Eastmond D A, Hartwig A, Anderson D, Anwar W A, Cimino M C, Dobrev I, 2009, Mutagenicity Testing For Chemical Risk Assessment: Update Of The WHO/IPCS Harmonized Scheme. *Mutagenesis*, 24, 341–9.
- Ekim T, Koyuncu M, Vural M, Duman H, Aytaç Z, Adıgüzel N, 2000, *Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı (Red Data Book of Turkish Plants)*, Türkiye Tabiatını Koruma Derneği ve Van 100. Yıl Üniversitesi, 1-149, Ankara.
- El-Awady el S E, Moustafa YM, Abo-Elmatty D M, Radwan A, 2011, Cisplatininduced cardiotoxicity: Mechanisms and cardioprotective strategies, *Eur J Pharmacol*, 650, 335–41.
- Erkan N, Çetin H, Ayrancı E, 2011, Antioxidant activities of *Sideritis congesta* Davis et Huber-Morath and *Sideritis arguta* Boiss et Heldr: identification of free flavonoids and cinnamic acid derivatives, *Food Res Int*, 44, 297–303.
- Fairban D W, Olive P L, O’neill K L, 1995, The Comet Assay: A Comprehensive Review, *Mutat. Res*, 339, 3759.

- Fairbain D W, Olive P L, O'Neill, K L, 1995, The Comet Assay: A Comprehensive Review. *Mutation Res*, 339, 37–59.
- Fenech M, 2000, The In Vitro Micronucleus Technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 455, 81-95.
- Fenech M, Morley A A, 1986, Cytokinesis-Block Micronucleus Method In Human Lymphocytes: Effect Of In Vivo Ageing And Dose X-Irradiation, *Mutat Res*, 161, 193–98.
- Figuroa-Gonzalez G, Perez-Plasencia C, 2017, Strategies For The Evaluation of DNA Damage and Repair Mechanisms In Cancer, *Oncol Lett*, 13, 3982–3988.
- Florea, A M, Büsselberg D, 2011, Cisplatin As An Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance And Induced Side Effects, *Cancers (Basel)*, 3, 1351–1371.
- Freshney R I, 2005, *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique*, 5th Edition, 359–372.
- Frezza M, Hindo S, Chen D, Davenport A, Schmitt S, Tomco D, Dou Q P, 2010, Novel Metals And Metal Complexes As Platforms For Cancer Therapy, *Curr Pharm Des*, 16, 1813–1825.
- Gao Y, Dorn P, Dorn P, Dorn P, Hall SRR, Peng RW, Schmid RA, Marti TM, 2019, Cisplatin-Resistant A549 Non-Small Cell Lung Cancer Cells Can Be Identified By Increased Mitochondrial Mass And Are Sensitive To Pemetrexed Treatment, *Cancer Cell Int.*, 19, 317.
- Griffiths J B, Doyle A, 1998, Cell and tissue culture. *Laboratory procedures in Biotechnology*, 62–64.
- Gümüşçü A, Gümüşçü G, 2014, Bazı Sideritis (Dağçayı) Türlerinde Çeliklerin Köklenmesine Hormonların Etkisi, *Harran Tarım ve Gıda BilimLeri Dergisi* 18, 49–55.

- Günay E, Çelik S, Ulasli S S, Özyürek A, Hazman Ö, Günay S, Özdemir M, Ünlü M, 2016, Comparison of the Anti-inflammatory Effects of Proanthocyanidin, Quercetin, and Damnacanthal on Benzo(a)pyrene Exposed A549 Alveolar Cell Line, *Inflammation*, 39, 744–51.
- Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babaç M T, (Edlr.), 2012, Türkiye Bitkiler Listesi (Damarlı Bitkiler), Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, İstanbul.
- Gürbüz İ, Özkan A M, Yeşilada E, Kutsal O, 2005, Anti-Ulserogenic Activity Of Some Plant Used In Folk Medicine Of Pınarbaşı (Kayseri, Turkey). *J Ethnopharmacol*, 101, 313–318.
- Hanahan D, Weinberg R A, 2000, The hallmarks of cancer, *Cell*, 100, 57-70.
- Hanahan D, Weinberg R A, 2011, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*, 144, 646–674.
- Hanigan M H, Devarajan P, 2003, Cisplatin Nephrotoxicity: Molecular Mechanisms. *Cancer Ther*, 1, 47–61.
- Hayashi M, Mac Gregor J T, Gatehouse D G, Adler I D, Blakey D H, Dertinger S, Krishna G, Morita T, Russo A, Sutou S, 2000, In Vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay: Aspects of Protocol Desing Including Repeated Treatments, Integration With Toxicity Testing, And Automated Scoring, A Report From The International Work Shop On Genotoxicity Test Procedures (IWGTP), *Environ Mol Mutagen*, 35, 234–52.
- Herbst R S, Morgensztern D, Boshoff C, 2018, The biology and management of non-small cell lung cancer, *Nature*, 553, 446–454.
- Hill C L, Zhang Y, Sigurgeirsson B, Pukkala E, Mellekjaer L, Airio A, Felson D T, 2001, Frequency Of Specific Cancer Types In Dermatomyositis And Polymyositis: A Population-Based Study, *Lancet*, 357, 96–100.
- Hirsch F R, Suda K, Wiens J, Bunn Jr P A, 2016, New and emerging targeted treatments in advanced non-small-cell lung cancer, *The Lancet*, 388, 1012–1024.

- Hoeijmakers J H, 2009, DNA Damage, Aging, And Cancer, *N Engl J Med*, 361, 1914.
- Hovhannisyan G G, 2010, Fluorescence In Situ Hybridization In Combination With The Comet Assay And Micronucleus Test In Genetic Toxicology, *Molecular Cytogenetics*, 3, 1–11.
- Igarashi K, Ohmuma M, 1995, Effects of isorhamnetin, rhamnetin, and quercetin on the concentrations of cholesterol and lipoperoxide in the serum and liver and on the blood and liver antioxidative enzyme activities of rats, *Biosci Biotechnol Biochem*, 59, 595–601.
- Ishid S, Lee J, Thiele D J, Herskowitz I, 2002, Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 14298–302.
- Iyama T, Wilson D M, 2013, DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells, *DNA Repair*, 12, 620–36.
- Jeppesen D K, Bohr V A, Stevnsner T, 2011, DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Prog Neurobiol*, 94,166–200.
- Jeremic I, Tadić V, Isakovic A, Trajkovic V, Markovic I, Redzic Z, Isakovic A, 2013, The Mechanisms of In Vitro Cytotoxicity of Mountain Tea, *Sideritis scardica*, against the C6 Glioma Cell Line, *Planta Med*, 79, 1516–1524.
- Kalaycıoğlu L, Serpek B, Nizamlıoğlu M, Başpınar N, Tiftik A M, 2013, *Biyokimya* (5 b.). Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık, 654s, İstanbul.
- Karabas H C, Ozcan I, Sener L T, Guler S D, Albeniz I, Erdem T L, 2019, Evaluation of Cell And Dna Damage Induced By Panoramic Radiography, *Niger J Clin Pract*, 22, 1041–1048.
- Kaya Ş, 2019, A549 Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücrelerinde CDK 4/6 İnhibitörü Palbociclib'in Enflamasyonu ile İlgili Etkilerinin Araştırılması, İstanbul Kültür Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 61s, İstanbul.
- Kelland L, 2007, The Resurgence Of Platinum Based Cancer Chemotherapy, *Nat Rev Cancer*, 7, 573–84.

- Kılıç T, 2002, Sideritis Lycia ve Sideritis Leptoclada Türlerinin Diterpen Bileşiklerinin İzolasyonu ve Karakterizasyonu, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 116s, Balıkesir.
- Kırimer N, Demirci B, Işcan G, Başer K H C, Duman H, 2008, Composition Of The Essential Oils of Two Sideritis Species From Turkey And Antimicrobial Activity, Chem Nat Compd 44, 121–123.
- Kirimer N, Tabanca N, Demirci B, Baser K H C, Duman H, & Aytac Z, 2001, The Essential Oil of A New Sideritis Species: Sideritis Ozturkii Aytac And Aksoy. Chemistry of Natural Compounds, 37, 234–237.
- Kirimer N, Tabanca N, Tümen G, Duman H, Başer K H C, 2000, Composition of the essential oils of four endemic Sideritis species from Turkey, Flavour and Fragrance Journal, 14, 421–425.
- Koçyigit A, Keles H, Selek S, Guzel S, Celik H, Erel O, 2005, Increased DNA Damage And Oxidative Stress In Patients With Cutaneous Leishmaniasis Mutation. Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 585, 71–78.
- Koutsogiannouli E, Papavassiliou A G, Papanikolaou N A, 2013, Complexity In Cancer Biology: Is Systems Biology The Answer, Cancer Med, 2, 164–77.
- Koyuncuoğlu F, Tekin S, Konar V, Sandal S, 2013, İnsan Meme Kanseri Hücre Serileri (MCF-7) Üzerine Apelin-13'un Etkilerinin Araştırılması: In Vitro Bir Çalışma, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 1, 23–28.
- Krishna G, Hayashi M, 2000, In Vivo Rodent Micronucleus Assay: Protocol, Conduct And Data Interpretation, Mutat Res, 455, 155–66.
- Kulaksız G, Sancar A, 2007, Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Kansere, Türk Biyokimya Dergisi, 32, 104–111.
- Kumar N, Morena N, Feltes B, Menck C F M, Houten B V, 2020, Cooperation And Interplay Between Base And Nucleotide Excision Repair Pathways: From DNA Lesions To Proteins, Genet mol biol, 2, 43, e20190104.

- Kurt E, Evrensel T, Gönüllü G, Kanat Ö, Demiray M, Arslan M, Ünlü Ö, Dilek K, Manavoğlu O, 2002, Cisplatin'e Bağlı Böbrek Toksikitesi ve Sentetik Oral Prostaglandin E1 Analogunun Etkinliğinin Değerlendirilmesi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 28, 17–20.
- Küpeli E, Şahin F P, Yeşilada E, Çalış İ, Ezer N, 2007, In Vivo Antiinflammatory And Antinociceptive Activity Evaluation of Phenolic Compounds From *Sideritis Stricta*. Z Naturforsch, 62c, 519–525.
- Lall N, Chrysagyris A, Lambrechts I, Fibrich B, Blom Van Staden A, Twilley D, de Canha MN, Oosthuizen CB, Bodiba D, Tzortzakis N, 2019, *Sideritis perfoliata* (subsp. *perfoliata*) Nutritive Value and Its Potential Medicinal Properties, Antioxidants, 8, 521.
- Lieber M, Smith B, Szakal A, Todoro G, Walter N R, 1976, A Continuous Tumor Cell Line From A Human Lung Carcinoma With Properties Of Type II Alveolar Epithelial Cells. Int J Cancer, 15:17, 62–70.
- Liman R, Ciğerci İ H, Gökçe S, 2018, Cytogenetic And Genotoxic Effects Of Rosmanic Acid On *Allium Cepa* L. Root Meristem Cells, Food and Chemical Toxicology, 121, 444–449.
- Ma T H, 1981, *Tredescantia* Micronucleus Bioassay and Polen Tube Chromatid Aberration Test For In Situ Monitoring And Mutagen Screening, Environmental Health Perspective, 37, 85–90.
- Malapelle U, Della Gravara L, Battiloro C, Avellino A, Rocco D, 2019, Personalized genomic medicine: non-small-cell lung cancer and anaplastic lymphoma kinase, Journal of Translational Genetics and Genomics, 3, 1–9.
- Martins N M, Santos N G, Curti C, Bianchi M L P, Santos A C, 2008, Cisplatin Induces Mitochondrial Oxidative Stress With Resultant Energetic Metabolism Impairment, Membrane Rigidification and Apoptosis In Rat Liver, Journal of applied toxicology: JAT, 28, 337– 344.
- McKelvey-Martin V J, Green M H, Schmezer P, Pool-Zobel B, De Meo M P, Collins A, 1993, The Single Cell Gel Electrophoresis Assay (Comet Assay): A European Review, Mutat Res, 288, 47–63.

- Mehta A, Dobersch S, Romero-Olmedo A J, Barreto G, 2015, Epigenetics in lung cancer diagnosis and therapy, *Cancer and Metastasis Reviews*, 34, 2292–41.
- Mollazadeh H, Afshari A R, Hosseinzadeh H, 2017, Review On The Potential Therapeutic Roles of *Nigella Sativa* In The Treatment of Patients With Cancer: Involvement of Apoptosis, *J Pharmacopuncture*, 20, 158–172.
- Morita R, Nakane S, Shimada A, 2010, Molecular Mechanisms of The Whole DNA Repair System: A Comparison of Bacterial And Eukaryotic Systems, *J Nucleic Acids*, 2010, 179594.
- Newman DJ, Cragg G M, 2007, Natural Products as Sources of New Drugs Over The Last 25 Years, *J. Nat. Prod*, 70, 461–477.
- Norbury C J, Hickson I D, 2001, Cellular Responses To DNA Damage, *Annu Rev Pharmacology, toxicology* 41, 367–401.
- Östling O, Johanson K J, 1984, Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages In Individual Mammalian Cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 123, 291–298.
- Pombinho A R, Laizé V, Molha D M, Marques S M, Cancela M L, 2004, Development Of Two Bone-Derived Cell Lines From The Marine Teleost *Sparus Aurata*, Evidence For Extracellular Matrix Mineralization And Cell-Type-Specific Expression Of Matrix Gla Protein And Osteocalcin, *Cell Tissue Res*, 315, 393-406.
- Prabavathy D, Swarnalatha Y, Ramadoss N, 2018, Lung Cancer Stem Cells-Origin, Characteristics And Therapy, *Stem Cell Investigation*, 5, 6.
- Pratibha R, Sameer R, Rataboli P V, Bhiwgade D A, Dhume C Y, 2006, Enzymatic Studies of Cisplatin Induced Oxidative Stress In Hepatic Tissue of Rats, *European Journal of Pharmacology*, 532, 290–293.
- Ramesh G, Kimball S R, Jefferson L S, Reeves W B, 2007, Endotoxin And Cisplatin Synergistically Stimulate TNF-Alpha Production By Renal Epithelial Cells, *Am J Physiol Renal Physiol*, 292, F812–9.

- Sabuncuoğlu S A, Baydar T, Giray B, Şahin G, 2008, Mikotoksinler: Toksik Etkileri, Degredasyonları, Oluşumlarının Önlenmesi Ve Zararlı Etkilerinin Azaltılması, Eczacılık Fakültesi Dergisi, 28, 63–92.
- Samarakkody A S, Shin N Y, Cantor A B, 2020, Role of RUNX Family Transcription Factors In Damage Response, Moll Cells, 43, 99–106.
- Sameer A S, Nissar S, Fatima K, 2014, Mismatch Repair Pathway: Molecules, Functions, And Role In Colorectal Carcinogenesis. European Journal of Cancer Prevention, 23, 246–57.
- Sancar A, Lindsey-Boltz L A, Ünsal-Kaçmaz K, Linn S, 2004, Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. Annual Review of Biochemistry, 73, 39–85.
- Schmid W, 1975, The micronucleus test, Mutant Res, 31, 9–15.
- Sherman M H, Bassing C H, Teitell M A, 2011, Regulation of Cell Differentiation By The DNA Damage Response, Trends Cell Biol, 21, 312–9.
- Shigenaga M, Gimeno C, Ames B, 1989, Urinary 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine As A Biological Marker of In Vivo Oxidative DNA damage, Proc Natl Acad Sci USA 86, 9697–701.
- Siddik Z H, 2003, Cisplatin: Mode of Cytotoxic Action And Molecular Basis Of Resistance. Oncogene, 22, 7265–79.
- Silva V L, Al-Jamal, W T, 2017, Exploiting the cancer niche: Tumor-associated macrophages and hypoxia as promising synergistic targets for nano-based therapy, Journal of Controlled Release, 253, 82–96.
- Slupphaug G, Kavli B, Krokan H E, 2003, The Interacting Pathways For Prevention And Repair of Oxidative DNA Damage, Mutat Res, 531, 231–51.
- Sommer S, Buraczewska I, Buraczewska I, 2020, Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions, Int. J. Mol. Sci, 21, 1534.

- Stago D, Portesis N, Spanou C, Mossialos D, Aligiannis N, Chaita E, Panagoulis C, Reri E, Skaltsounis L, Tsatsakis A M, Kouretas D, 2012, Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species, *Food and Chemical Toxicology*, 50, 4115–4124.
- Stevigny C, Bailly C, Quetin-Leclercq J, 2005, Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids, *Curr Med Chem Anti-Cancer Agents*, 5, 173–182.
- Sudhakar A, 2009, History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of cancer science & therapy*, 1, 1–4.
- Şekeroğlu Z A, Şekeroğlu V, 2011, Genetik Toksikite Testleri, *Tübav Bilim Dergisi*, 4(3), 221–229.
- Şekeroğlu Z A, Şekeroğlu V, Kolören Z, 2011, The *In Vitro* Alkaline Comet Assay In Genetic Toxicology, *JABS*, 5, 49–54.
- Tarini S, 2018, Tumors: Benign and Malignant, *Canc Therapy & Oncol Int J*, 10, 001-003.
- Tekeli Y, 2012, Antioxidant activities and phenolic compounds of two endemic taxa of Labiatae Sideritis. *Rev. Chim.* 63, 465–469.
- Temel MK, 2015, Sitotoksik Kemoterapötiklerin Yirminci Yüzyıldaki Gelişimi, *Türk Onkoloji Dergisi*, 30, 96–108.
- Tice R R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J C, Sasaki Y F, 2000, Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines For *In Vitro* And *In Vivo* Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 206–221.
- Townsend DM, Tew K D, He L, King J B, Hanigan M H, 2009, Role of glutathione S-transferase Pi in cisplatin-induced nephrotoxicity, *Biomed Pharmacother*, 63, 79–85.

- Ulasli S S, Celik S, Gunay E, Ozdemir M, Hazman O, Ozyurek A, Koyuncu T, Unlu M, 2013, Anticancer Effects of Thymoquinone, Caffeic Acid Phenethyl Ester and Resveratrol on A549 Non-Small cell lung Cancer Cells Exposed to Benzo(a)pyrene, *Asian Pac J Cancer Prev*, 14, 6159–6164.
- Üstündağ A, Şimşek K, Ay H, Dündar K, Süzen S, Aydın A, Duydu Y, 2014, Evaluation of the Genotoxic Effects of Patients Undergoing Hyperbaric Oxygen (HBO) Therapy, *Turk Journal Pharmacology Science*, 11, 203–208.
- Valerie K, Povirk L, 2003, Regulation and Mechanisms of Mammalian Double-Strand Break Repair, *Oncogene* 22 (37), 5792–812.
- Vandghanooni S, Eskandani M, 2011, Comet Assay: A Method To Evaluate Genotoxicity Of Nano-Drug Delivery System, *BioImpacts*, 1, 87–97.
- Vermeulen, K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR, 2003, Cell cycle and apoptosis, *Cell Prolif*, 36, 165–75.
- Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G, 2011, Mitotic Catastrophe: A Mechanism For Avoiding Genomic Instability, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12, 385.
- Wang D, Lippard S J, 2005, Cellular Processing Of Platinum Anticancer Drugs, *Nat Rev Drug Discov*, 4, 307–20.
- Widel M, Kolosza Z, Jedrus S, Lukaszczyk B, Raczek- Zwierzycka K, Swierniak A, 2001, Micronucleus assay in vivo provides significant prognostic information in human cervical carcinoma: The updated analysis, *Int J Radiat Biol*, 77, 631–6.
- William D, Travis M D, 2011, Classification of Lung Cancer, Elsevier Inc, 2, 177–186.
- Yağcı E, Güneş H V, 2017, Notch Sinyal Yolağı ve Karsinogenez, *Osmangazi Tıp Dergisi*, 39, 109–116.
- Yalçın A S, Yılmaz A M, Altundağ E M, Altundağ S, 2017, Kurkumin, Kuersetin ve Çay Kateşinlerinin Anti-Kanser Etkileri, *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21, 19–29.

- Yalçın B, 2011, Isırgan Otundaki (*Urtica Dioica*) Bazı Fenolik Bileşiklerin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, İzmir.
- Yang C, Chen H, Chen H, Zhong B, Luo X, Chun J, 2017, Antioxidant and Anticancer Activities of Essential Oil from Gannan Navel Orange Peel, *Molecules*, 22, 1391.
- Yang I H, Shin J A, Cho S D, 2014, Pycnogenol Induces Nuclear Translocation of Apoptosis-inducing Factor and Caspase-independent Apoptosis in MC-3 Human Mucoepidermoid Carcinoma Cell Line, *Journal Of Cancer Prevention*, 19, 265–72.
- Yang, Y., Guo, L., Ge, X., Shi, S., Gong, Y., Xu, Z., Zheng, X. ve Liu, Z, 2019, Structure-Activity Relationships for Highy Potent Half-Sandwich Organoiridium (III) Anticancer Complexes with C^N-Chelated Ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 191, 1–7.
- Yaylalı C, 2007, Tendon Kılıfı Fibroblastlarının Hücre Kültüründe Tenositlere Farklılaşması Ve Tenositlerin Sentezlediği Kollajen Tiplerinin Belirlenmesi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 89s, Ankara.
- Yeni D, Fidan A F, Gündoğan M, 2010, Spermatozoon'da tek hücre jel elektroforezi (SCGE) ile DNA hasarı tespiti. *F.Ü. Sağ Bil Vet Derg*, 24, 167–173.
- Yılmaz E, 2013, Toroslar 'da Yetişen 7 Endemik Sideritis Türünün Fenolik Maddeleri, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 251s, Ankara.
- Yokuş B, Çakır D Ü, 2012, Kanser Biyokimyası, *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 1, 7–18.
- Yu X, Lin H, Wang Y, Lv W, Zhang Y, Qian Y, Deng X, Feng N, Yu H, Qian B, 2018, D-Limonene Exhibits Antitumor Activity By Inducing Autophagy and Apoptosis In Lung Cancer, *Oncotargets And Therap*, 11, 1833–1847.
- Yükselten Y, 2012, Isırgan Otu (*Urtica dioica* L.) ve Isırgan Tohumu (*Fructus urtica piluliferae*) Ekstraktlarının Hücre Kültürü Ortamında Genotoksisite ve Oksidatif Durum Üzerine Etkilerinin Araştırılması, Harran Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 109s, Şanlıurfa.

İnternet Kaynakları

- 1- <https://who.int/>, 05.07.2020
- 2- <https://tuik.gov.tr/>, 08.09.2020
- 3- <http://theplantlist.org/>, 25.08.2020

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nursenay ATEŞ
Doğum Yeri ve Tarihi : Seyhan, Adana / 01.06.1994
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (Telefon / e-posta) : 5070829580 /nursenayates@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Hasan Adalı Lisesi (2008 –2012)
Lisans : Erzurum Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, (2014– 2018)
Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen BilimLeri Ens., Moleküler Biyoloji ve Genetik ABD, (2018 –2020)