

***VERBASCUM LASIANTHUM* BOISS. EX BENTH.
TÜRÜNÜN AKCIĞER KANSERİ
(A549) HÜCRELERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bobur SINDAROV

Danışman

Doç. Dr. Ömer HAZMAN

KİMYA ANABİLİM DALI

Temmuz 2020

Bu tez çalışması 19.FEN.BİL.50 numaralı proje ile AKÜ-BAPK tarafından desteklenmiştir.

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***VERBASCUM LASIANTHUM* BOİSS. EX BENTH.
TÜRÜNÜN AKCİĞER KANSERİ
(A549) HÜCRELERİNE ETKİSİ**

Bobur SINDAROV

Danışman

Doç. Dr. Ömer HAZMAN

KİMYA ANABİLİM DALI

Temmuz 2020

TEZ ONAY SAYFASI

Bobur SINDAROV tarafından hazırlanan “*Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. Türünün Akciğer Kanseri (A549) Hücrelerine Etkisi” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 21/07/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Ömer HAZMAN

Başkan : Doç. Dr. Buğra KOCA
Afyon Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya AD

Üye : Doç. Dr. Laçine AKSOY
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü

Üye : Doç. Dr. Ömer HAZMAN
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
..... /..... /2020 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.

21/07/2020

Bobur SINDAROV

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***VERBASCUM LASIANTHUM BOISS. EX BENTH* TÜRÜNÜN AKCİĞER KANSERİ (A549) HÜCRELERİNE ETKİSİ**

Bobur SINDAROV

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ömer HAZMAN

Sığırkuyruğu (mullein) olarak bilinen *Verbascum L.* (Scrophulariaceae) türleri mukolitik etkileri nedeni ile özellikle üst solunum yollarını rahatlatmak amacıyla bir çok dünya ülkesinde sıklıkla tercih edilmektedir. Bununla birlikte farklı coğrafyalarda farklı *Verbascum L.* Türleri; yaraların iyileştirilmesinde, egzama, hemoroid, diyare gibi hastalıklarda geleneksel olarak kullanılabilir. Bu nedenle çoğu ülke eczanelerinde ve marketlerinde kurutulmuş *Verbascum L.* Türlerine ait yaprak ve çiçekleri, yağlı ekstraktları, alkollü tentürleri, kapsülleri alternatif tıp ürünü olarak satılmaktadır. Dünyada yaklaşık 360 farklı türü vardır. Bu türlerin büyük çoğunluğu Türkiye'nin endemik zenginlikleri arasındadır. Bu türlerden çoğunun antioksidan, antimikrobiyal veya antikanserojen etkileri henüz araştırılmamıştır.

Sunulan tez çalışmasında akciğer kanserine etkileri araştırılan bitki ise *Verbascum L.* Türlerinden birisi olan *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türüdür. Bu bağlamda sunulan çalışmada *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türünden elde edilen aseton (VL_{aseton}) ve metanol ($VL_{metanol}$) ekstraktları kullanılmıştır. Böylelikle *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türünün bir akciğer kanseri hücre hattı olan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (A549) hücrelerinde, sitotoksisite, genotoksisite, oksidatif stres ve inflamasyona etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca sunulan çalışmayla $VL_{metanol}$ ve VL_{aseton} ekstraktlarında bulunan bazı fitokimyasalların tür ve miktar tayinleri de yapılmıştır.

Bitki ekstraktlarındaki bazı fitokimyasalların türleri ve miktarları LC-MS/MS sistemi yardımıyla, 53 farklı standart kullanılarak belirlendi. *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türünün A549 hücrelerindeki sitotoksosite düzeyleri ise MTT analizleri ile belirlendi. Lethal dozlar (Lds) belirlendikten sonra deney grupları (Grup 1: Kontrol, Grup 2: LD₀ dozunda VL_{metanol} uygulanan grup, Grup 3: LD₅₀ dozunda VL_{metanol} uygulanan grup, Grup 4: LD₀ dozunda VL_{aseton} uygulanan grup, Grup 5: LD₅₀ dozunda VL_{aseton} uygulanan grup) oluşturuldu. Deney gruplarında total antioksidan statü (TAS), total oksidan statü (TOS), oksidatif stres indeksi (OSI), proinflamatuvar stokin düzeyleri (TNF- α , TGF- β 1), beta defensin-2 (DEF- β 2) seviyeleri ve DNA hasarı (comet testi ile) skorları belirlendi.

Yapılan analizler sonucunda VL_{aseton} ekstraktındaki üç, VL_{metanol} ekstraktında ise yirmi bir farklı fitokimyasalın tür ve miktarı belirlendi. MTT analizlerinden elde edilen veriler sonucunda *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türüne ait metanol ve aseton ekstraktlarının her ikisinin de A549 hücrelerinde sitotoksik etkili olabileceği görüldü. VL_{metanol} ekstraktının VL_{aseton} ekstraktına oranla daha sitotoksik olduğu belirlendi. Bununla birlikte VL_{metanol} ve VL_{aseton} ekstraktlarının A549 hücrelerinde oksidatif stres ve inflamasyonu azalttığı bulundu. Bu nedenle VL_{metanol} ve VL_{aseton} ekstraktlarının A549 hücrelerinde oksidatif stres ve inflamasyon dışında bir yolla sitotoksosite oluşturduğu anlaşıldı. Nitekim yüksek dozlarda VL_{metanol} ve VL_{aseton} ekstraktlarının A549 hücrelerinde DNA hasarını artırdığı belirlendi. *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türünün aktif bileşenlerinden birisi veya bir kaçı DNA sarmalı ile etkileşerek hasar gelişmesine aracılık etmiş olabilir. Fakat bunun söylenebilmesi için konuyla ilişkili ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Bu veriler *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türüne ait metanol ve aseton ekstraktlarının A549 hücrelerindeki sitotoksosite/antikanserojen etkinliğini oksidatif stres ve inflamasyon aracılığıyla değil de, DNA hasarı aracılığı ile göstermiş olabileceğini ifade etmektedir. Elde edilen verilerin *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türünün etnofarmakolojik etkilerini açıklamak adına literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2020, xii + 82 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kanser, *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth., A549 hücre hattı, Oksidatif stres, İnflamasyon, Sitotoksosite, Genotoksosite.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

***VERBASCUM LASIANTHUM BOISS. EX BENTH* EFFECT OF TYPE ON LUNG CANCER (A549) CELLS**

Bobur SINDAROV

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Ömer HAZMAN

Verbascum L., commonly known as mullein (Scrophulariaceae) species are often preferred in many countries of the world due to their mucolytic effects, especially in order to relieve the upper respiratory tract. However, different types of *Verbascum L.* In different geographies traditionally used in diseases such as wounds healing, eczema, haemorrhoids, diarrhoea. For this reason, leaves, flowers, oily extracts, alcoholic tinctures, capsules belonging to *Verbascum L.* Species are sold as alternative medicine products in pharmacies and markets of most countries. There are about 360 different species in the world. The majority of these species are endemic among the wealth of Turkey. The antioxidant, antimicrobial or anticancer effects of many of these species have not yet been investigated.

In the presented thesis study, the plant whose effects on lung cancer was investigated is *Verbascum lasianthum* Boiss. Ex Benth., one of the *Verbascum L.* Species. In this study, acetone (VL_{aseton}) and methanol (VL_{methanol}) extracts from *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. species were used. Thus, it was aimed to determine the effects of the *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. species on cytotoxicity, genotoxicity, oxidative stress and inflammation in non-small cell lung cancer (A549) cells, which is a lung cancer cell line. In addition, the study was conducted to determine the type and quantity of phytochemicals of VL_{methanol} and VL_{aseton} extracts.

The types and quantities of some phytochemical components in plant extracts were determined, using 53 different standards with the help of the LC-MS/MS system.

Verbascum lasianthum Boiss. ex Benth. cytotoxicity levels were determined by MTT analyses in A549 cells. After the lethal doses (lds) were determined, experimental groups (Group 1: control, group 2: administered VL_{methanol} at LD₀ dose, group 3: administered VL_{methanol} at LD₅₀ dose, Group 4: administered VL_{aseton} at LD₀ dose, group 5: administered VL_{aseton} at LD₅₀ dose) were formed. Total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS), oxidative stress index (OSI), proinflammatory stokin levels (TNF- α , TGF- β 1), beta defensin-2 (DEF- β 2) levels and DNA damage (with comet test) scores were determined in experimental groups.

Three phytochemical components in acetone extract and twenty-one phytochemical components in methanol extract were determined as a result of the analyses. As a result of the data obtained from MTT analysis, it was observed that both the methanol and acetone extracts of the *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. species may be cytotoxic in A549 cells. VL_{methanol} extract was found to be more cytotoxic than VL_{acetone} extract. However, VL_{methanol} and VL_{acetone} extracts were found to reduce oxidative stress and inflammation in A549 cells. Therefore, it was found that VL_{methanol} and VL_{acetone} extracts produced cytotoxicity in A549 cells in a way other than oxidative stress and inflammation. Indeed, high doses of VL_{methanol} and VL_{acetone} extracts were determined to increase DNA damage in A549 cells. One or more of the active ingredients of the *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. species may have mediated the development of DNA damage by interacting with the DNA helix. However, in order to say this, further studies related to the subject are required.

These data indicate that the methanol and acetone extracts of *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. species may have demonstrated their cytotoxicity/anticarcinogen activity in A549 cells, not through oxidative stress and inflammation, but by DNA damage. It is thought that the data obtained will contribute to the literature in order to explain the ethnopharmacological effects of the *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. species.

2020, xii + 82 pages

Keywords: Cancer, *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth., A549 cell line, Oxidative stress, Inflammation, Cytotoxicity, Genotoxicity.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi, yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkı ve fedakarlıklarından dolayı, maddi ve manevi destekte bulunan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Ömer HAZMAN'a, laboratuvar çalışma imkanları, yapmış olduğu maddi manevi desteklerinden dolayı Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. İbrahim EROL'a, her konuda öneri ve eleştirileriyle, araştırma ve yazım süresince yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ahmet BÜYÜKBEN'e, lisansüstü öğrenimim boyunca her türlü maddi manevi destekte bulunan Kimya Bölümü hocalarına, genotoksisite analizlerinde yardımda bulunan Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ'ye, laboratuvar çalışmalarında ve bu tezin yazım aşamasında, her konuda eleştirileriyle ve önerileriyle yardımlarını esirgemeyen değerli laboratuvar arkadaşlarım Zehra Betül KUMRAL ve Mehmet SAVRIK'a ve tüm arkadaşlarıma, ayrıca yüksek lisans çalışmalarına finansal anlamda 19.FEN.BİL.50 numaralı proje ile destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na teşekkür ederim.

Öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen bana doğru yolu gösteren anneme babama, bana mutluluk veren kardeşlerime, zorlu zamanlarımda hep yanımda olan kardeşim Alişer SINDAROV'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bobur SINDAROV
Afyonkarahisar 2020

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	4
2.1 Kanser Gelişimine Sebep Olan Risk Faktörleri.....	6
2.1.1 Kanserde Önlenebilen Risk Faktörleri.....	7
2.1.2 Kanserde Önlenebilir (Çevresel) Risk Faktörler (Kanserojenler).....	8
2.2 Kanser Türlerinin Görülme Sıklıkları (İnsidans) ve Ölüm Oranları (Mortalite)..	10
2.3 Akciğer Kanseri	12
2.3.1 Akciğer Kanserin Risk Faktörleri.....	13
2.3.2 Akciğer Kanseri Sınıflandırılması.....	16
2.3.2.1 Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Türleri	17
2.3.2.2 Küçük Hücreli Akciğer Kanseri	19
2.3.3 İn-Vitro Araştırmalarda Kullanılan Akciğer Kanseri Hücre Hatları.....	19
2.3.3.1 Akciğer Kanseri Adenokarsinom Hücre Hattı Olarak A549 Hücre Hattı.....	21
2.3.4 Akciğer Kanseri Tedavi Yöntemleri	21
2.3.4.1 Akciğer Kanseri Cerrahi Tedavi Yaklaşımları	22
2.3.4.2 Akciğer Kanseri Radyasyon ile Tedavi	23
2.3.4.3 Akciğer Kanseri Kemoterapi ile Tedavi.....	24
2.3.4.4 Akciğer Kanseri Hedefe Yönelik ve İmmünoterapi Tedavi Yöntemleri	24
2.4 Akciğer Kanseri ve Oksidatif Stres	27
2.5 Akciğer Kanseri ve İnflamasyon	29

2.6 <i>Verbascum L.</i> (Sığırkuyruğu) Türlerinin Genel Özellikleri	30
3. MATERYAL ve METOT	34
3.1 Bitki Materyali	35
3.1.1 Bitki Materyalinin Ekstraksiyonu.....	36
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Bitki Ekstraktlarına ve MTT Tuzuna Ait Çözeltilerin Hazırlanması	37
3.1.3 Ekstraktların Bileşen Analizlerinin Yapılması.....	38
3.1.3.1 Kromatografi ve Kütle Spektrometre Şartları	38
3.2 Hücrelerin Çoğaltılması için Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması	40
3.3 Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekilmesi.....	41
3.4 Hücrelerin Çoğaltılması (Pasajlanması)	42
3.5 Hücrelere Uygulanan Tripsinizasyon/Detripsinizasyon	43
3.6 Hücrelerin Sayılması	44
3.7 MTT Hücre Viabilite Ölçüm Testi	45
3.8 Biyokimyasal Analizlerde Kullanılacak Hücre Lizatlarının Hazırlanması ve Yapılan Biyokimyasal Analizler	48
3.8.1 Hücre Lizatlarında Total Protein Analizi	48
3.8.2 Total Antioksidan Statü (TAS) Düzeyleri Analizi	49
3.8.3 Total Oksidan Statü (TOS) Düzeyleri Analizi	49
3.8.4 Oksidatif Stres İndeksi (OSI) Seviyelerinin Belirlenmesi.....	50
3.8.5 İnflamatuvar Stokin (TNF- α , IL-6 ve TGF- β 1) ve β Defensin-2 Seviyelerinin Belirlenmesi	50
3.8 Komet Testi ile Genotoksisite Düzeylerinin Belirlenmesi	51
3.9 İstatistik Analizler.....	52
4. BULGULAR	54
4.1 <i>Verbascum lasianthum Boiss. ex Benth.</i> Metanol ve Aseton Ekstraktlarının Fenolik Bileşen Türleri ve Miktarları	54
4.2 A549 Hücrelerinde <i>Verbascum lasianthum Boiss. ex Benth.</i> Ekstraktlarının Sitotoksisite Düzeyleri	57
4.3 <i>Verbascum lasianthum Boiss. ex Benth.</i> Ekstraktlarının A549 Hücrelerinde Oksidatif Strese Etkisi.....	60

4.4 <i>Verbascum lasianthum</i> Boiss. ex Benth. Ekstraktlarının A549 Hücrelerinde DNA Hasarına Etkisi	61
4.5 <i>Verbascum lasianthum</i> Boiss. ex Benth. Ekstraktlarının A549 Hücrelerinde İnflamasyona Etkisi.....	63
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	65
6. KAYNAKLAR.....	74
ÖZGEÇMİŞ.....	82

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
CO ₂	Karbondioksit
OH [·]	Hidroksil radikali
μM	Mikromolar
mM	Milimolar
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre

Kısaltmalar

ATCC	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
BHNC	Büyük hücreli nöroendokrin karsinom
CAT	Katalaz
DEFβ2/DEFB2	Beta defensin-2
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ELISA	Enzim bağlı immunosorbent deney
ERS	Avrupa Solunum Derneği
FBS	Fetal bovine serum
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IFN-γ	İnterferon gama
IL-6	İnterlökin altı
LD	Lethal doz
LAG-3	Lenfosit aktivasyon geni üç
MTT	3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid
OSI	Oksidatif stres indeksi
p53	Tümör protein 53 (EC :2.7.1.37)
PBS	Fosfat tamponu
RNS	Reaktif azot türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
SHK	Skuamöz hücreli karsinom
SOD	Superoksit dismutaz
STAT	Sinyal transdüseri ve transkripsiyon faktörünün aktivatörü
TAS	Total antioksidan statü (Total antioksidan kapasite)
TOS	Total oksidan statü (Total oksidan kapasite)
TGF-β1	Tümör growth faktör beta bir
TNF-α	Tümör hücre ölüm faktörü alfa (Tümör nekrozis factor α)
VL	<i>Verbascum lasianthum</i> Boiss. ex Benth.
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 İyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) tümörlerin gelişimi ve özellikleri. .	5
Şekil 2.2 Kansere neden olan risk faktörleri.	6
Şekil 2.3 Bazı kanserojenlerin kimyasal yapısı	9
Şekil 2.4 Dünya genelinde 2018 yılında en çok görülen kanser türleri ve oranları.	11
Şekil 2.5 Dünyada 2018 yılında erkeklerde görülen kanser türlerinin insidans ve mortaliteleri.	11
Şekil 2.6 Dünyada 2018 yılında kadınlarda görülen kanser türlerinin insidans ve mortaliteleri.	12
Şekil 2.7 İmmunoterapide rol oynayan olası moleküler mekanizmalar.	27
Şekil 3.1 Farklı 53 fitokimyasal maddenin miktarsal analizi için valide edilmiş metodun standart kromotogramı.	39
Şekil 3.2 Canlı hücre sayımında kullanılan neubauer lamı	44
Şekil 3.3 DNA hasar dereceleri	51
Şekil 3.4 Çalışmanın başlangıcından bulguların elde edilmesine kadar yapılan iş-akış diyagramı.	53
Şekil 4.1 VL _{metanol} ekstraktının fenolik bileşen analizi sonrasında LC-MS/MS sisteminden elde edilen kromogram.	56
Şekil 4.2 VL _{Aseton} ekstraktının fenolik bileşen analizi sonrasında LC-MS/MS sisteminden elde edilen kromogram.	57
Şekil 4.3 Farklı dozlardaki VL _{Aseton} ekstraktının A549 hücrelerinde % hücre canlılığına etkisi.	58
Şekil 4.4 Farklı dozlardaki VL _{Metanol} ekstraktının A549 hücrelerinde % hücre canlılığına etkisi.	58
Şekil 4.5 Deney gruplarına ait hücre ve komet testi mikroskop görüntüleri.	62
Şekil 5.1 A549 hücrelerinde VL _{metanol} ve VL _{aseton} ekstraktlarının sitotoksosite düzeyleri.	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 Erkek ve kadınlarda, yaş ile akciğer kanseri insidansı arasındaki ilişki.	14
Çizelge 2.2 Akciğer kanseri ile ilişkili mesleki maruziyete yol açan maddeler.....	15
Çizelge 2.3 Akciğer kanseri türlerinin sınıflandırılması.	17
Çizelge 2.4 Laboratuvar çalışmalarında kullanılan akciğer kanseri hücre hatları.	20
Çizelge 3.1 Deneysel aşamada kullanılan malzeme ve teçhizat listesi.	34
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan besiyerinin (medium) bileşenleri.....	40
Çizelge 3.3 Çalışmada oluşturulan deney grupları ve yapılan uygulamalar.	47
Çizelge 4.1 Metanol ve aseton ekstraktlarındaki bazı fenolik bileşenlerin türleri ve miktarları.....	55
Çizelge 4.2 $VL_{Metanol}$ ve VL_{Aseton} ekstraktlarının A549 hücrelerine ait lethal dozlar (LD).	59
Çizelge 4.3 $VL_{Metanol}$ ve VL_{Aseton} ekstraktlarının A549 Hücrelerinde TAS, TOS ve OSI düzeylelerine etkileri.	60
Çizelge 4.4 $VL_{Metanol}$ ve VL_{Aseton} ekstraktlarının A549 hücrelerinde DNA hasarına etkisi.....	61
Çizelge 4.5 $VL_{Metanol}$ ve VL_{Aseton} ekstraktlarının A549 hücrelerinde İnflamasyona etkisi.	63

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 2.1 Sığırkuyruğu (<i>Verbascum lasianthum</i> Boiss. ex Benth.).....	30
Resim 2.2 Yünlü Sığır Kuyruğu (<i>Verbascum lasianthum</i> Boiss. ex Benth.) türü ve etkileri.....	32
Resim 3.1 <i>Verbascum lasianthum</i> Boiss. ex Benth.'in toplanması.....	35
Resim 3.2 <i>Verbascum lasianthum</i> Boiss. ex Benth. türünün yerinde teşhis edilmesi. ...	36
Resim 3.3 Çalışmada kullanılan besiyerinin hazırlanması için oluşturulan düzenek. ...	41

1. GİRİŞ

Organizmada bulunan doku ve organları oluşturan hücreler yaşlandıkça veya hasar gördüğünde çoğunlukla ölür ve ölen bu hücrelerin yerini yeni hücreler alır. Sağlıklı hücreler vücudun ihtiyaç duyduğu yeni hücreleri oluşturmak için büyür ve kontrollü bir şekilde bölünür. Vücudumuzda ömrünü tamamlamış yaşlı veya hasarlı hücrelerin programlı bir şekilde öldürülmesini sağlayan mekanizmalarda veya sağlıklı hücrelerden yeni hücrelerin kontrolsüz ve aşırı bir şekilde üretilmeye başlamasına neden olan mekanizmalarda bir sorun olması durumlarında kanser adı verilen hastalık gelişmeye başlar (Baran 2018).

Kanser, tüm dünyada mortalite ve morbidite açısından önde gelen hastalıklardan birisidir. Kanser yüzyılın başlarında ölüme sebep olan hastalıklar sıralamasında yedinci sırada iken, son yıllarda Türkiye dâhil birçok ülkede, ölüm nedeni olarak kalp ve damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almaktadır (Erdem vd. 2015).

Akciğer kanseri dünyada ve Türkiye’de kanser hastalıkları içinde en önde gelen kanser tipidir. Akciğer kanserinin Türkiye’de en önde gelen 3 kanser türünden biri olduğu bilinmektedir. Akciğer kanseri erkeklerde, tüm kanser hastalıkları içinde birinci sırada iken kadınlarda dördüncü sırada yer almaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalara göre kadınlarda sigara tüketiminin artması ve havanın kirlenmesi nedeniyle akciğer kanserinin görülme oranının daha da arttığı bilinmektedir (Özsu ve Özlü 2013).

Kanserin tedavisinde radyoterapi, kemoterapi, cerrahi yöntem gibi geleneksel tedavi yöntemlerinin yanında, immünoterapi, hormon terapisi, hedef gen terapileri gibi yeni tedavi yaklaşımları tek başına yada birlikte kullanılabilirler. Bununla birlikte mevcut tedavi yöntemlerinin yan etkileri ve hastaların yaşam tarzına olumsuz etkileri nedeniyle, bilim insanları tarafından doğal ve yan etkisi az olabilecek alternatif yöntemler araştırılmaya devam etmektedir. Bu bağlamda bitkilerin ve bitkilerden elde edilen antikanser etkili olabilecek bileşenlerin etkileri öncelikle in-vivo ve in-vitro deney modelleri ile laboratuvarlarda analizleri yapılmıştır, tedaviye etkisi gösterenler kliniklerde gönüllüler üzerinde denenmeye başlanmıştır (Hazman 2018).

Birçok batı ülkesinde *Verbascum Thapsus* gibi verbascum türleri üst solunum yolları ile ilişkili hastalıklarda kullanılabilir. Türkiye dünyada bulunan *Verbascum* türlerinin çoğunluğunu bulunduran tek ülkedir. Fakat Türkiye’de bulunan *Verbascum* türlerinin halk arasında çeşitli hastalıklarda kullanımı mevcut olsa da bu konularda yapılan bilimsel çalışma yok denecek kadar azdır.

Bu çalışmada *Verbascum* türü olarak kullanılan bitki türü endemik olmasa da Türkiye’de yetişebilen *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türüdür. Bu bitki türü ile yapılan son çalışmalar *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türünün kanser hücreleri üzerinde antikanserojen etkili olabileceğine işaret etmektedir (Hazman vd. 2018). Bu nedenle sunulan çalışmada *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türünün, bir akciğer kanseri hücre hattı olan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (A549) hücreleri üzerindeki antikanserojen etkinliği incelenmiş olup, antikanserojen etkinliğin oluşmasında etkili olabilecek muhtemel mekanizmaların bazılarının (DNA hasarı, oksidatif stres ve inflamasyon aracılı etkiler) araştırılması amaçlanmıştır.

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. Bu tür biyoaktif maddelerin sitotoksikite analizleri ile belirlenen LD₅₀ dozları antikanserojen etkinlik açısından araştırmalara konu olurken, LD₀ dozu gibi düşük konsantrasyondaki dozların kanserin oluşturduğu yan etkileri gidermedeki etkinliği veya akciğerle ilişkili kanser dışındaki hastalıklardaki olası yararları/zararları araştırmalara konu olabilmektedir.

Bu kapsamda sunulan çalışma ile *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türünün yüksek dozlardaki antikanserojen etkinliğinin yanında, düşük dozlarda akciğer hücrelerindeki olası tedavi edici etkileri de araştırılmaya çalışılmıştır.

Bu kapsamda sunulan tez metninde öncelikle literatür bilgi kısmında kanser, akciğer kanseri sınıflandırılması ve tedavi yöntemleri, oksidatif stres, inflamasyon ile ilgili konular ele alınmış, bu konularda yapılan güncel çalışmalar kullanılarak teorik zemin

oluşturulmuştur. Ayrıca literatür özetinde kısmında A549 hücrelerinde antikanserojenik etkileri araştırılan *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türünün genel özellikleri ve *Verbascum* türleriyle yapılan güncel çalışmalara yer verilmiştir. Literatür bilgileri sunulduktan sonra çalışmada kullanılan materyaller ve analizlerde kullanılan metotlar verilmiştir. Laboratuvar analizlerinden elde edilen ham verilerin istatistik programları ile analiziyle elde edilen verilere, sunulan tezin bulgular kısmında değinilmiştir. Bulgular ışığında elde edilen tüm sonuçlar, tartışma ve sonuç ana başlığı altında sunulmuş olup, elde edilen veriler ile literatür özetinde sunulan bilgiler ilişkilendirilerek çalışmanın özgünlüğü ifade edilmeye çalışılmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

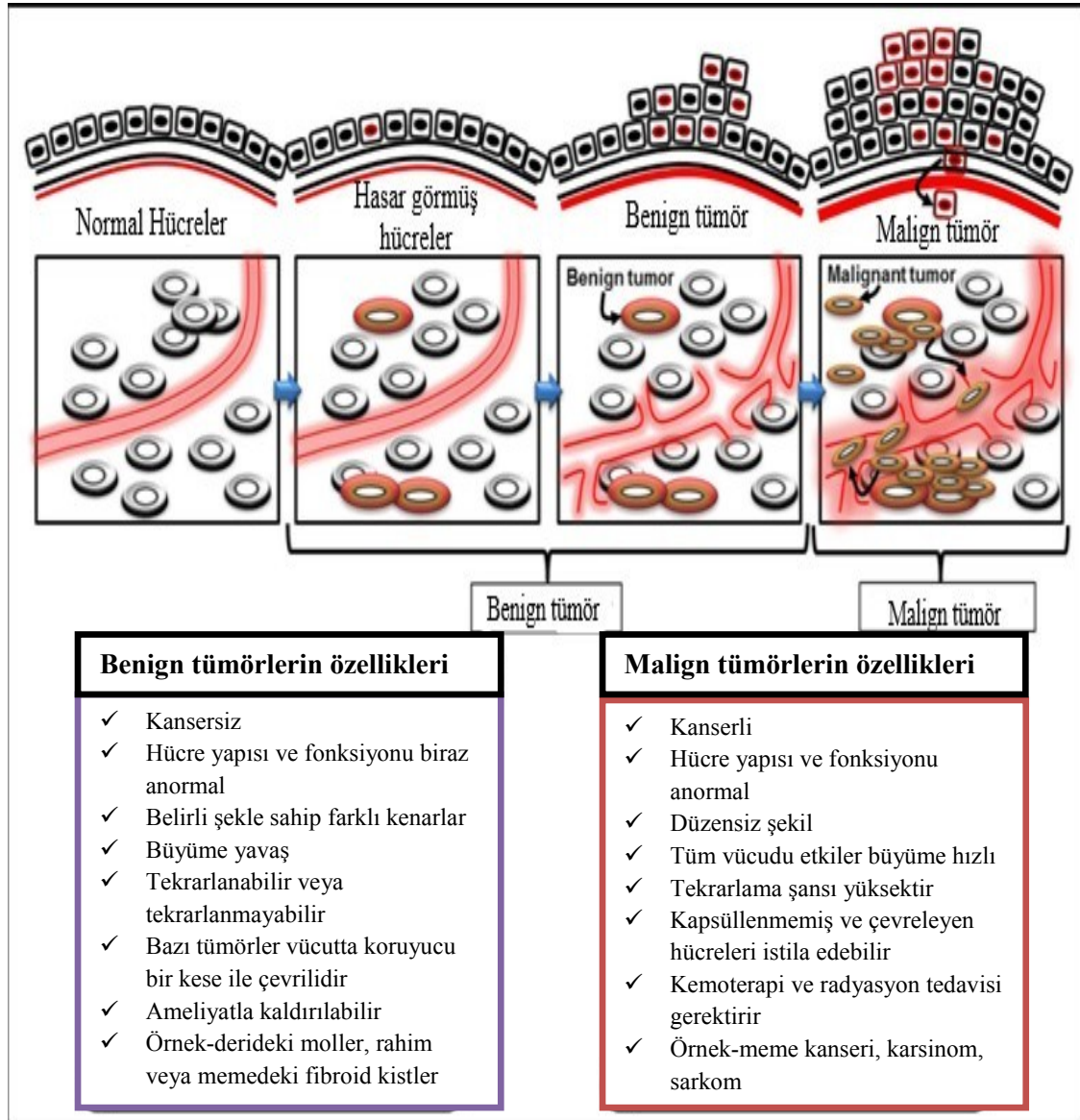
Kanser ilk kez Hipokrat (M.Ö 460-370) tarafından “karkinos” terimi ile tanımlamıştır. Yunanca’da karkinos terimi yengeç anlamına gelmekte olup, vücut yüzeyinde ortaya çıkan, büyüyen, kırmızı, ağrı hissettiren farklı biçimdeki şişliklere karkinos adı verilmiştir. Romalı tıp doktoru Celsus (MÖ. 26-MS. 50) bu kelimeyi Latince yengeç anlamına gelen “kanser” terimine çevirmiştir. Romalı tıp doktoru Galen (M.S. 130-200) ise tümörleri tanımlamak için Yunanca şişlik anlamına gelen “oncos” sözcüğünü kullanmıştır (Baran 2018). Türk tıp tarihinde ise kansere “seretan” adı verilmektedir. Tarsuslu Osman Hayri Efendi’nin “Kenzüsihhatül Ebdaniye” (1298) adlı eserinde seretan, fındık ya da küçük yumru büyüklüğünde, ağırlı, etrafı damarlı bir oluşum olarak tanımlanmaktadır (Atıcı 2007).

Günümüzde elde edilen bilgiler ışığında kanser yapı ve fonksiyonu bozulan hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile başlayan ve buldukları doku, organ veya organizmanın çalışmasında olumsuzlukların başlamasına neden olan ve hücrelerin tüm organizmayı tehdit eden bir hale gelmesine neden olan bir hastalık grubudur. Kanser oluşum süresi kanser türlerine göre değişkenlik göstermekle beraber ortalama 15-20 yıl sürmektedir (Kaya 2020).

Vücut, temel yaşam birimleri olan birçok hücre tipinden oluşur ve bu hücreler vücudu sağlıklı tutmak için kontrollü bir şekilde büyür ve bölünür. Hücreler yaşlandığında veya hasar gördüğünde ölürler ve programlanmış bir şekilde yeni hücrelerle değiştirilirler. Bu sürece apoptoz denir. Ancak, 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 çoğalmasına olanak sağlar. Böylelikle 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

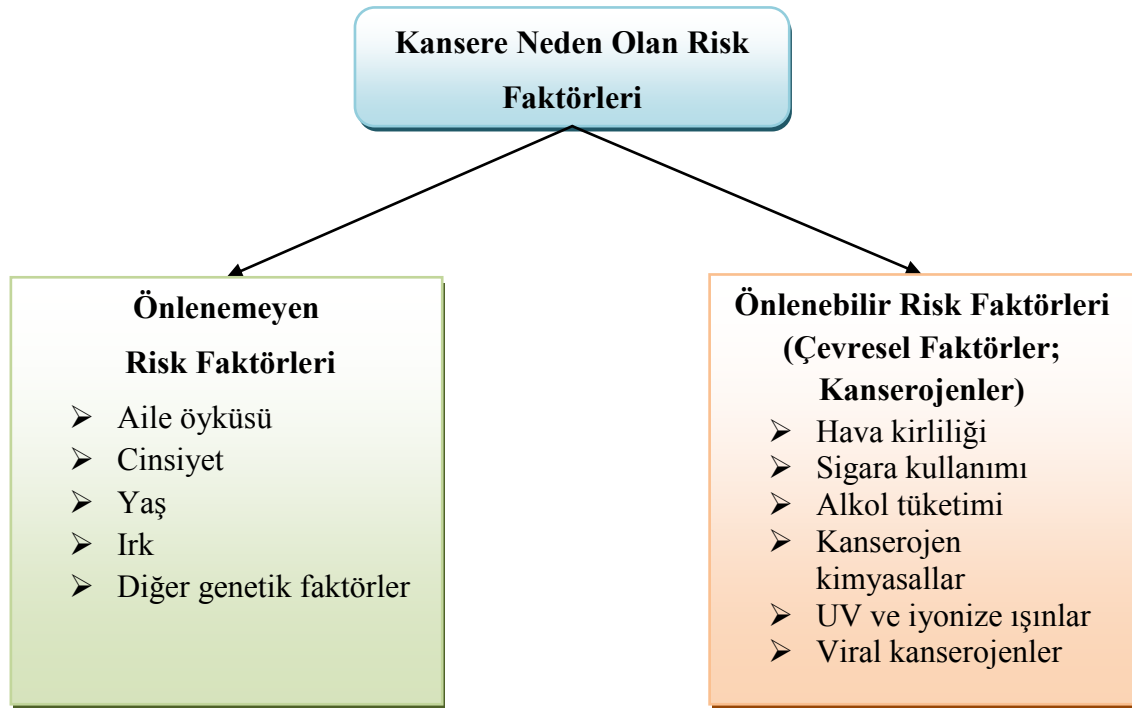
edilir. İyi huylu tümörler yakındaki dokuları istila etmezler veya vücudun diğer bölgelerine yayılma özelliği (metastaz) göstermezler. Kötü huylu (malign) tümörlerin ise kanser hücrelerinden oluştuğu kabul edilmektedir. Kötü huylu tümörler dolaşım sistemi (kan ve lenf) yoluyla öncelikle yakındaki dokulara, sonrasında ise uzak dokulara yayılmaya başlar. Kanser hücrelerinin dolaşım yoluyla yakın veya uzak doku ve organlara yayılmasına metastaz denir (Tarini 2018). İyi huylu ve kötü huylu tümörler arasında birçok önemli fark Şekil 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.1 İyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) tümörlerin gelişimi ve özellikleri (Kumar vd. 2015).

2.1 Kansere Gelişimine Sebep Olan Risk Faktörleri

Kanser hastalığı için iki grup risk faktörü öne çıkmaktadır. Bunlar, önlenabilir risk faktörleri ve önlenemeyen risk faktörleridir (Şekil 2.2). Önlenemeyen risk faktörleri olarak yaş, cinsiyet, aile öyküsü ve diğer genetik faktörler sayılabilir. Önlenabilir risk faktörleri olarak ise çevresel etkenler sayılabilir (Kalaycıoğlu vd. 2013).



Şekil 2.2 Kansere neden olan risk faktörleri.

Çevresel, eksojen ve endojen faktörlerin yanı sıra genetik yatkınlık da dahil olmak üzere bireysel faktörler kanserin gelişmesine katkıda bulunur. Malign tümörlerin gelişimi üzerine epidemiyolojik araştırmalar yıllar boyunca kanser insidansı ve mortalitesinin çevresel ve genetik faktörlerinin belirleyicilerine odaklanmıştır.

Kansere sebep olan çevresel faktörlere kanserojenler adı verilmektedir. 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).

2.1.1 Kanserde Önlenemeyen Risk Faktörleri

Bireylerin atalarından aldıkları genetik miras sonucu var olabilecek risk faktörleri ile yaş, cinsiyet gibi faktörler kanserde önlenemeyen risk faktörleri olarak kabul edilir. Bununla beraber son çeyrek asırda gelişen teknolojinin yardımıyla özellikle gelişmiş ülkelerde topluma uygulanan kanser tarama programları, önlenemeyen risk faktörlerine bağlı ortaya çıkabilecek kanser vakalarının erken dönemde tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Böylelikle kanser erken dönemde teşhis edilerek, tedavisi yapılabilmektedir.

Yapılan araştırmalar kanser türlerinde insidans ve mortalitenin cinsiyete göre farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. Örneğin; prostat kanserinin erkeklerde, meme kanserinin ise kadınlarda daha baskın görüldüğü bilinmektedir. Genetik ve moleküler çalışmalarda kanser hastalığına yatkınlık cinsiyete göre farklılıklar göstermektedir. Erkekler ve kadınlar arasındaki genetik farklılıklar çeşitli kanser insidansındaki farklılıklara katkı da bulunur. Bu açıdan değerlendirildiğinde erkeklerde mesane kanseri insidansı kadınlardan daha fazladır (Kim vd. 2018).

Yaş tüm kanser epidemiyolojisi çalışmalarında kullanılır ve kanser için en çok çalışılan risk faktörlerinden biridir. Kanser yaşa bağlı bir hastalık olarak kabul edilebilir, çünkü çoğu kanser insidansı yaşla birlikte artar. Orta yaştaki sağlık, yaşamın ilerleyen dönemlerindeki sağlık ve uzun ömürlülüğün temelini oluşturur. Çünkü orta yaş, kanser ve diğer hastalıklar için iyi bilinen bazı risk faktörlerinin (örneğin, tütün kullanımı, fiziksel aktivite eksikliği, yetersiz beslenme, aşırı alkol tüketimi, bazı kronik enfeksiyonlar) yaşamın içine en çok dahil edildiği yaş dilimidir (White vd. 2014). Bu nedenle çocukluktan başlayarak, gençlikte ve orta yaşta, yaşam biçimine çevresel risk faktörleri ne kadar fazla dahil edilirse kanserin ortaya çıkma ihtimali, ilerleyen yaşlarda daha da artar. Çünkü orta yaştan itibaren immun sistem yavaş yavaş zayıflamaya başlar.

Epidemiyolojik çalışmalar, kansere duyarlılıkta belirleyici faktörlerden birisinin de ırk olabileceğine işaret etmektedir. Çünkü genetik polimorfizm ve mutasyonların yaygınlığı, çeşitli kanser türleri için irksal farklılıklar göstermektedir (Özdemir ve Dotto

2017). Kansere duyarlılıkta diğerk bir risk faktörü ise aile öyküsünün olmasıdır. Çoğukanser türünde aile öyküsü genetik yatkınlık konusunda sorgulanması gereken bir faktördür. Özellikle toplumda en sık görülen akciğerk, prostat, meme kanseri gibi kanser türleri için genetik yatkınlığın, bireyler için önemli bir risk faktörü olarak geçerliliğini koruduğubilinmektedir.

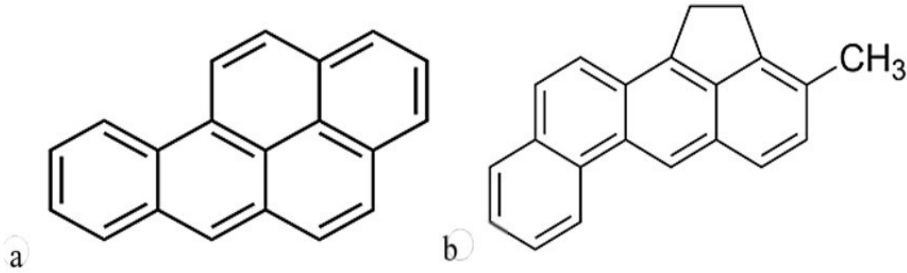
2.1.2 Kanserde Önlenebilir (Çevresel) Risk Faktörler (Kanserojenler)

Malign tümörlerin başka bir ifade ile kanserlerin %80-90'ına kanserojenler neden olmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar, insanlar arasında malign neoplazi (kötü huylu tümör) gelişiminden sorumlu ana faktörlerin, insan davranışından kaynaklanan çevresel faktörler olduğunu kanıtlamıştır. Sigara içme, aşırı alkol tüketimi, diyet ve hareketsiz yaşamın insan popülasyonunda malign neoplazi gelişimi için önemli risk faktörü olabileceğidoğrulanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, 2020'de kanserle ilişkili olarak gelişmekte olan ülkelerde 7-8 milyon, gelişmiş ülkelerde ise yaklaşık 2-3 milyon olmak üzere yaklaşık 10 milyon ölüm olabileceğifade edilmektedir (Lewandowska vd. 2019).

Kanserde önlenebilir çevresel risk faktörlerinin başında kimyasal karsinojenler gelmektedir. Kimyasal kanserojenlere; sigara kullanımı, alkol tüketimi, hava kirliliğiveya çalışma/yaşam şartlarına bağılı olarak kimyasallara maruz kalma örnek olarak gösterilebilir. Sigara dumanına maruziyet, akciğerkanseri oluşma riskini %90'a kadar arttırabilmektedir. Alkol kullanımı ise mide ve kolon kanseri riskini artırabilir. Fabrikalarda sanayi bölgelerinde çalışırken kanserojen kimyasallara maruziyetten kaçınmak gerekir. Bu tür maddelerin kullanımı gerekli ise koruyucu ekipman ve uygun çalışma şartları sağlandıktan sonra kullanılmalıdır.

Günümüzde günlük yaşamda veya iş yaşamında insanların maruz kaldığı birçok kimyasal kanserojen bulunmaktadır. Bu kimyasal kanserojenler arasında; benzopren, metilkolantren, heterosiklik aromatik aminler, asbest, ağır metaller, azo boyalar, su ve gıda kaynaklarımızın plastik ve pestisitler (tarım zararlılarına karşı kullanılan ilaçlar) aracılığı ile kontaminasyonu, kanserojen yağlar gibi birçok kanserojen sayılabilir.

Kimyasal kanserojenler arasında ilk olarak 3,4-benzopren ve 3-metilkolantrenin (Şekil 2.3) kanserojen etkiye sahip olduğu keşfedilmiştir (Kalaycıoğlu vd. 2013). 3,4-benzopren taşkömürü katranı ile patlamalı motorlarda, yakıtın tam yanmaması sonunda çıkan egzoz gazlarında ve en önemlisi sigarada bulunur. 3-metilkolantren orman yangınlarında, çok yüksek sıcaklıklarda organik bileşiklerin tepkimeye girmesinden oluşan bir maddedir.



Şekil 2.3 Bazı kanserojenlerin kimyasal yapısı; (a) 3,4 benzopren (b) 3-metilkolantren.

Kanserojen yağlar, skrotum (testis) kanseri ile ilişkilendirilmiştir. Kalp ve damar hastalıklarının meydana gelmesinde, doymuş yağ asitlerinin yanı sıra trans yağ asitlerinin de risk oluşturduğu bilinen bir gerçektir. Doymamış yağ asitlerinde meydana gelen trans izomerlerin doymuş yağ asitleri gibi davrandığı bilinmektedir. Trans yağ asitlerinin esansiyel yağ asitleri metabolizmasını etkileyerek, bazı kanser türlerinin gelişimine zemin hazırlayabileceği belirtilmektedir (Demirci 2010).

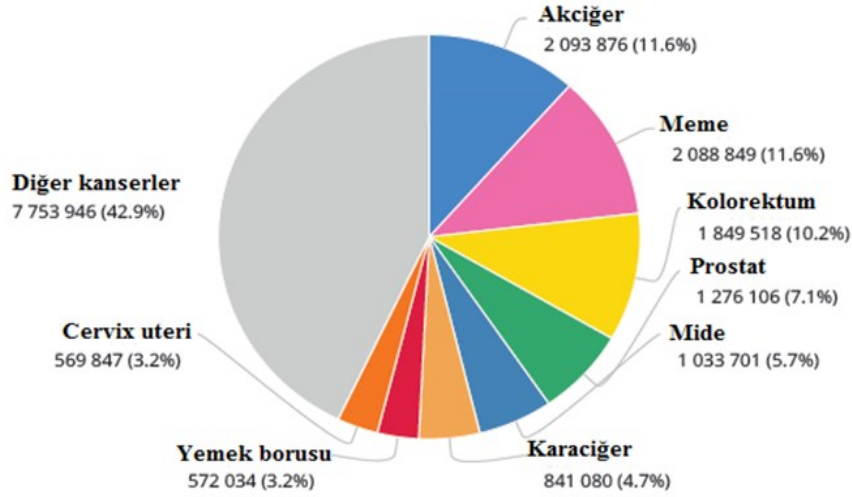
Benzidin ve 2-naftilamin gibi heterosiklik aromatik amin bileşikleri mesane (idrar kesesi) kanserine neden olabilir. Heterosiklik aromatik aminler pişmiş ette, özellikle iyi pişmiş etlerde bulunan bir grup mutajenik bileşiklerdir. Bugüne kadar 25'den fazla mutajenik kanserojen heterosiklik aromatik amin pişmiş besinlerden izole edilmiştir. Bu bileşikler etlerin yüksek sıcaklıkta pişirilmesi ile kreatin/kreatinin, aminoasit ve şekerin birbiri ile reaksiyonu sonucu oluşmaktadır (Kızıl ve Besler 2012). Bu nedenle özellikle et gibi protein içeriği yüksek olan besinler, yüksek sıcaklıklarda veya direk ateşe temasla değil, haşlama gibi daha uygun yöntemlerle servise hazırlanmalıdır.

Kimyasal kanserojenler dışında kanser için risk oluşturan diğer çevresel faktörlerden birisi de fiziksel kanserojenlerdir. Günlük hayatta çeşitli sebeplerle ultraviyole ışınlar (290-320 nm) ve radyasyona maruz kalma, organizmada serbest radikal adı verilen; hidroksi, epoksit ve peroksit radikallerinin vücutta oluşum miktarını artırır. Miktarları kabul edilebilir düzeyin üzerine çıkan bu radikaller hücrelerde DNA'nın yapısının bozulmasına (mutasyonlara) sebep olabilir. Bu tür zararlı mutasyonlar ise hücre yapı ve fonksiyonunun bozulmasına neden olarak, kanser gelişimini uyarabilir (Kalaycıoğlu vd. 2013).

Kanser olgularının yaklaşık %16'sının oluşmasında biyolojik kanserojenler olan onkojenik virüslerin sorumlu olduğu bildirilmektedir (Butel 2000). Bu onkojenik virüsler arasında hepatit (hepatit B ve hepatit C) virüsleri, herpes virüsü, merkel hücreli polyomavirüsü, insan papilloma virüsü gibi virüsler sayılabilir. Bir örnek vermek gerekirse, hepatit B virüsü ve hepatit C virüsü etkisiyle oluşan hepatoselüler karsinom (karaciğer kanseri) en yaygın primer malign tümörlerden biridir ve tüm primer karaciğer kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturur. Karaciğer kanseri için hepatit B ve hepatit C virüsü enfeksiyonları dışındaki risk faktörleri olarak ise aşırı alkol tüketimi ve aflatoksin B1'e maruz kalma sayılmaktadır (Petruzzello 2018). Bununla birlikte viral etiyojisi olan kanserlerde, virüs tümör gelişimi için gerekli, ancak tek başına yeterli değildir. Virüsler genellikle tam kanserojen olarak davranmaktan ziyade başlatıcı veya teşvik edici faktörler arasında yer almaktadırlar. Virüsler özellikle vücut immün sistemini zayıflatarak kanser gelişimini daha ileri aşamalara geçmesine neden olurlar.

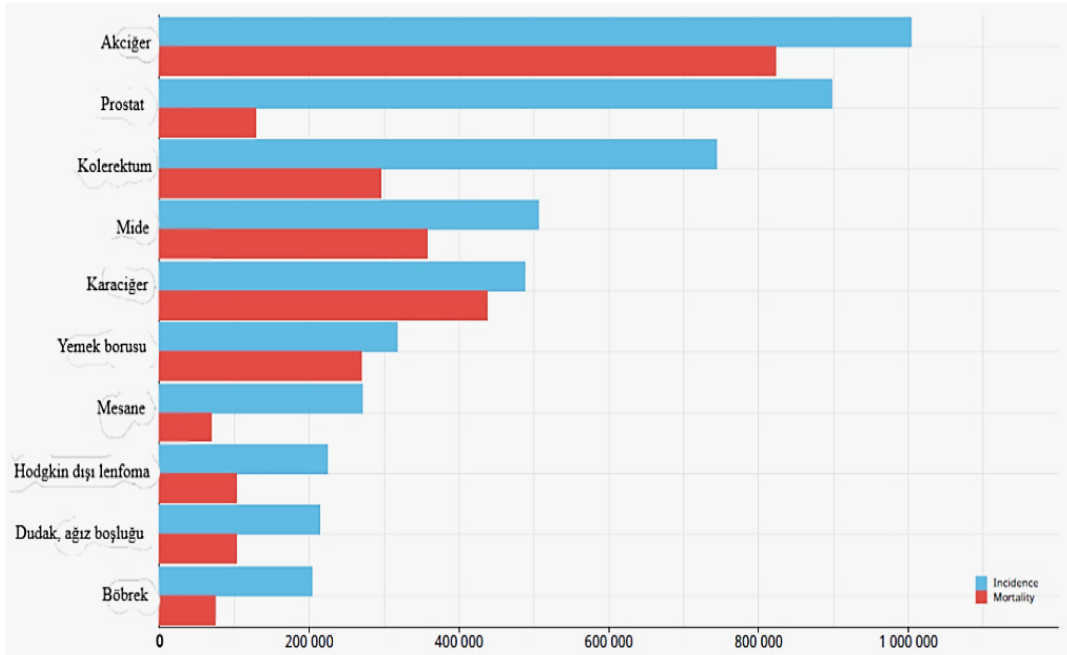
2.2 Kanser Türlerinin Görülme Sıklıkları (İnsidans) ve Ölüm Oranları (Mortalite)

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) 2018 verilerine göre: Dünya çapında 5 erkekten biri ve 6 kadından birinin yaşamları boyunca kansere yakalanmakta olduğu ve 8 erkekten biri ve 11 kadından birinin kanser hastalığı nedeniyle öldüğü ifade edilmektedir. Akciğer, meme ve kolorektal kanserleri oranları açısından ilk üç kanser türüdür ve ölümlülük açısından ilk beşte yer almaktadır (Şekil 2.4). Bu üç kanser türü, dünya çapında kanser oranı ve ölümlülük yükünün üçte birinden sorumludur (Int. Kyn. 3).



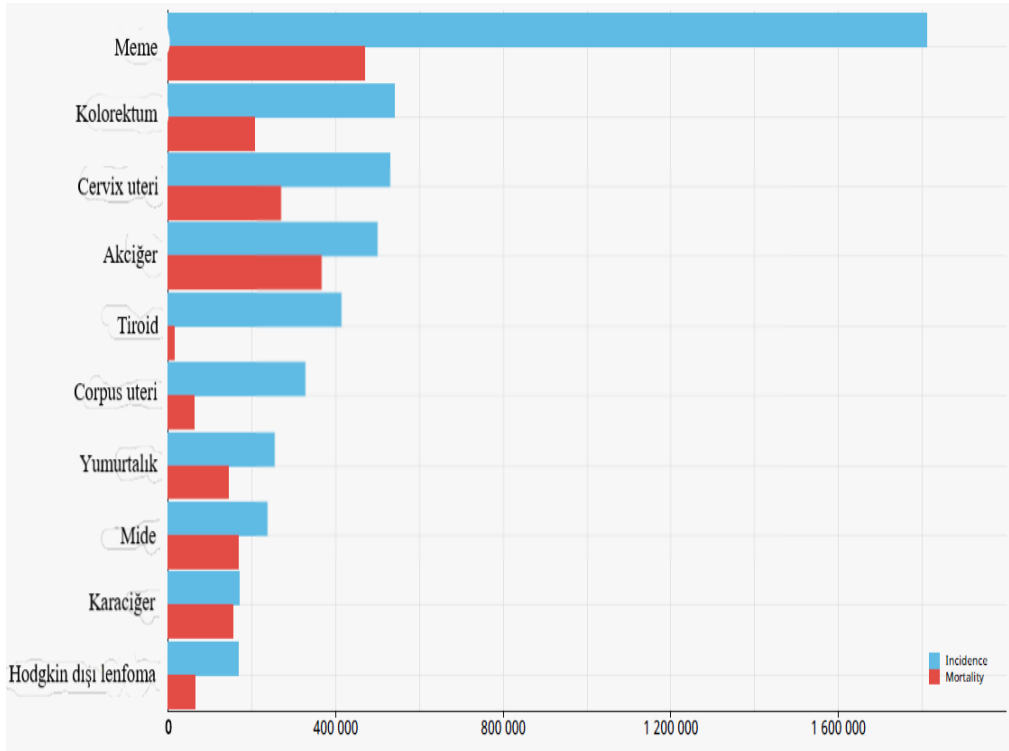
Şekil 2.4 Dünya genelinde 2018 yılında en çok görülen kanser türleri ve oranları.

Akciğer kanseri, erkeklerde en sık teşhis edilen (erkeklerde toplam vakaların %14.5'i ve kadınlarda %8.4) kanser türüdür. Erkeklerde kansere bağlı ölümlerin yaklaşık beşte biri (%22'si) akciğer kanserine bağlı gerçekleşen ölümlerdir. Erkeklerde diğer kanser türlerinin mortalite oranlarının prostat kanseri için %13.5, kolorektal kanser için %10.9, karaciğer kanseri için %10.2 ve mide kanseri için %9.5 şeklinde olduğu (Şekil 2.5) belirtilmektedir (Int. Kyn. 3).



Şekil 2.5 Dünyada 2018 yılında erkeklerde görülen kanser türlerinin insidans ve mortaliteleri.

Meme kanseri kadınlarda en sık teşhis edilen kanserdir. 2018 yılı verilerine göre dünya çapında kadınlarda teşhis edilen tüm yeni kanser vakalarının yaklaşık 4'te biri (% 24.2'si) meme kanseridir. Meme kanseri aynı zamanda kadınlarda kansere bağlı ölümlerin (mortalite) %15'ini oluşturmaktadır (Şekil 2.6). Kadınlarda teşhis edilen kanser türlerinde kolorektal kanseri ikinci, serviks kanseri üçüncü, akciğer kanseri ise dördüncü sıradadır (Int. Kyn. 3).



Şekil 2.6 Dünyada 2018 yılında kadınlarda görülen kanser türlerinin insidansı ve mortaliteleri.

2.3 Akciğer Kanseri

Dünya çapında, akciğer kanseri, kanser insidansı ve mortalitesinin önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir. Genel olarak, kadınlarda görülme oranı erkeklerden daha düşüktür. Ancak akciğer kanseri şu anda kadınlar arasında dünya çapında dördüncü en yaygın kanser türüdür (513.000 vaka, tüm kanserlerin %8.5'i) ve kadınlarda kanser ölümlerinin (427.000 ölümlerle kansere bağlı ölümlerin %12.8'i) ikinci nedenidir (Rafiemanesh vd. 2016, Bray vd. 2018).

Akciğer kanserleri, küçük hücreli akciğer karsinomu ve küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu olmak üzere iki alt türe ayrılır. Bunlar arasında küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu, toplam akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır (Alberg ve Samet 2003, Yamanaka 2009).

Akciğer kanserlerinin tedavisinde cerrahi yaklaşım, kemoterapi ve radyoterapi dahil olmak üzere bir çok tedavi yöntemi kullanılabilir. Fakat mevcut tedavi yöntemlerinin etkinliği özellikle küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu tedavisinde çok yetersiz kaldığı ifade edilmektedir. Kemoterapi akciğer kanseri geçiren hastaların çoğunluğu için temel stratejidir. Bununla birlikte kemoterapötik ajanların oluşturdukları sistemik toksisite ve ilaca karşı gelişebilen direnç, en önemli dezavantajlarını oluşturmaktadır. Bu nedenle, akciğer kanseri için yeni kemoterapötiklerin veya başka muhtemel tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi önem arz etmektedir (Zou vd. 2015).

2.3.1 Akciğer Kanserinin Risk Faktörleri

Akciğer kanseri için risk faktörleri olarak olumsuz yaşam tarzı, çevresel ve mesleki maruziyetler öne çıkmaktadır. Bu risk faktörlerinin kanser gelişimi açısından oynadığı roller; coğrafi konuma, cinsiyet ve ırk özelliklerine, genetik yatkınlığa ve bunların dış faktörleri ile etkileşimlerine bağlı olarak değişir. Akciğer kanserinin kadın ve erkekler arasında, 40 yaşın altındaki kişilerde insidansı düşüktür ve çoğu popülasyonda 75-80 yaşına (Çizelge 2.1) doğru artar (Malhotra vd. 2016).

Akciğerlerin insan vücudunun temel solunum organı olması nedeniyle, akciğer kanseri için en önemli risk faktörleri solunan havanın kanserojen ihtiva ediyor olmasıdır. Bu anlamda hava kirliliği, sigara içilmesi veya iş hayatına bağlı olarak kimyasal kanserojen maddelere solunum yoluyla maruziyet akciğer kanserinin gelişimini uyarabilmektedir. Sigara içmek akciğer kanseri gelişimi için en çok bilinen risk faktörüdür. 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 ise gibi yakalanma riskinin çok düşük olduğu bilinmektedir. Ancak bu akciğer kanserine yakalanma riskinin tamamen ortadan kalktığı anlamına gelmemektedir (Barta vd. 2019).

Çizelge 2.1 Erkek ve kadınlarda yaş ile akciğer kanseri insidansı arasındaki ilişki (Müsellim 2007).

Yaş	100000' de insidans	
	Erkek	Kadın
0-4	0.0	0.0
5-9	0.0	0.0
10-14	0.1	0.1
15-19	0.1	0.1
20-24	0.3	0.2
25-29	0.5	0.4
30-34	1.5	1.0
35-39	4.0	3.0
40-44	12.1	7.8
45-49	31.4	17.3
50-54	72.0	29.0
55-59	137.5	46.8
60-64	218.9	64.5
65-69	296.2	82.3
70-74	354.4	89.2
75-79	356.3	84.4
80-84	317.7	80.7

Sağlıklı bir yaşamın en önemli olmazsa olmazları arasında, insanın yaşamında en çok tükettiği maddelerin sağlık için uygun olması gelmektedir. Bir insanın yaşamı boyunca en çok tükettiği temel yaşam maddeleri hava, su ve günlük beslenmesinde kullandığı

besinlerdir. Günlük olarak tükettiğimiz su ve besinlerin yanında, sürekli soluduğumuz havanın temiz olması sağlıklı yaşamın olmazsa olmazları arasındadır.

Açık veya kapalı alanlardaki hava kirliliği akciğer kanseri için önemli bir çevresel risk faktörüdür. Fabrikalar, otomobiller, pişirme dumanları veya iç mekan dekorasyonundan kaynaklanan tiner, formaldehit gibi kimyasalların neden olduğu kirli havaya uzun süreli maruz kalma, akciğer kanseri riskini arttırmaktadır. Yapılan çalışmalar, akciğer kanserinin %50'sinden fazlasının kentsel alanlarda meydana geldiğini göstermektedir. Kentlerdeki hava kirliliği çoğunlukla araç egzozundan, klima ve ısıtma sistemlerinden ve endüstriyel olarak üretilen gaz atıklardan kaynaklanmaktadır. Fosil yakıtların (milyonlarca yıl yerin derinliklerinde kaya ve toprak altında kalmış, ısı ve basınç altında fosilleşmiş bitki ve hayvanlardan oluşan enerji kaynakları) yanmasıyla polisiklik aromatik hidrokarbonlar, arsenik, nikel ve krom gibi kimyasal kanserojenler oluşabilmekte ve önlem alınmaz ise havayı kirletebilmektedir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada mono-azot oksitlerin nitrik oksit ve azot dioksitin araç egzozundan çıkan ana kanserojen ajanlar olduğu belirtilmektedir (Mao vd. 2016).

İşyerlerinde çalışılan ortamdaki olası risklerde akciğer kanseri gelişimine neden olabilmektedir. Akciğer kanseri meslek hastalığı olarak görülen en yaygın kanser türlerinden birisidir. Mesleki hastalık olarak akciğer kanserinin gelişimi açısından kanserojene maruziyet yoğunluğu ve süresi önemli rol oynamaktadır (Spyratos vd. 2013). Çeşitli mesleklerin icra edilmesi sırasında kullanılan ve akciğer kanserine yol açabilme olasılığı olan kanserojenlerden bazıları Çizelge 2.2 de verilmiştir.

Çizelge 2.2 Akciğer kanseri ile ilişkili mesleki maruziyete yol açan maddeler (Müsellim 2007).

Karsinojen	Risk oranı	İlgili meslek
Asbest		Madenciler, çimento, tekstil, izolasyon, tersane
Uranyum		Uranyum maddeleri
Kömür kurumu	2-6	Havagazı işçileri, asfalt, madenciler
Katran		
Hardal gazı	2-36	Hardal gazı işçileri
Vinil klorür	4	Plastik sanayi işçileri
Arsenik	3-8	Maden ve kaynak işçisi, böcek öldürücüler, Petrokimya işçileri
Krom	3-40	Çamaşır suyu üretimi, cam-seramik, itfaiyeciler

Akciğer kanserinde diğer çoğu kanser türünde olduğu gibi aile öyküsü de çok önemli bir risk faktörü olarak görülmektedir. Akciğer kanserine yakalanan kişilerin çocuklarında ve kardeşlerinde akciğer kanseri riski diğer insanlardan daha yüksektir. Çünkü akciğer kanserinin gelişiminde genetik miras etkili olabilmektedir. Çünkü bazı genler akciğer kanseri öyküsü olan bazı ailelerde önemli bir rol oynayabilmektedir. Örneğin, kromozom 6'daki spesifik DNA değişikliklerini miras alan bireyler sigara içmeseler bile daha yüksek akciğer kanseri riski altındadır. Ayrıca, ailede astım, tüberküloz gibi iyi huylu akciğer hastalıkları teşhisi konmuş kişilerde de akciğer kanseri riski daha yüksektir (Gandomani vd. 2017).

2.3.2 Akciğer Kanseri Sınıflandırılması

Geleneksel olarak akciğer kanserleri küçük hücreli akciğer karsinomu ile küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu olmak üzere iki ana grupta incelenmiştir. Bununla birlikte, son yıllardaki terapötik gelişmeler, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin 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).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO; World Health Organization) önderliğinde 2004 yılında yapılan çalışmalarla akciğer tümörlerinin histolojik sınıflandırması için uluslararası bir standart oluşturulmuştur. WHO çatısı altında yapılan Uluslararası Akciğer Kanseri Birliği (IASLC) çalışmaları, Amerikan Toraks Derneği (ATS) ve Avrupa Solunum Derneği (ERS) katılımıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar sonucunda akciğer kanserinde skuamöz hücreli kanserde dahil olmak üzere dört ana histolojik akciğer kanseri türü tanımlanmıştır. Bunlar skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom, küçük hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom şeklinde sıralanabilir. Ayrıca belirlenen dört akciğer kanseri türü için daha spesifik alt kanser türleri de sınıflandırılmıştır (Travis vd. 2015). Hem geleneksel anlamda hem de 2004 yılında standardize edilmiş olan akciğer kanserinin sınıflandırılması Çizelge 2.3'te özetlenmeye çalışılmıştır.

Çizelge 2.3 Akciğer kanseri türlerinin sınıflandırılması.

		Sınıflandırma	
		Genel Sınıflandırma	Akciğer Kanseri Türlerine Ait Varyant
Akciğer Kanseri Türleri	Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri	Skumöz Hücreli Karsinom	Papiller
			Şeffaf hücreli
			Küçük hücreli
			Bazaloid
		Adenokarsinom	Asiner
			Papiller
			Bronkioloalveolar karsinom(BAK)
			Non-müsinöz (clara hücresi tip II pnömosit tipi)
			Müsinöz (goblet gücre tipi)
			Mikst müsinöz ve nonmüsinöz (clara hücresi tip II pnömosit ve goblet hücre tipi veya belirsiz)
	Büyük Hücreli Karsinom	Müsin yapan solid adenokarsinom	
		Büyük hücreli nöroendokrin karsinom	
		Kombine büyük hücreli nöroendokrin karsinom	
		Bazaloid karsinom	
		Lenfoepitelyoma benzeri karsinom	
		Şeffaf hücreli karsinom	
		Rabdoid fenotip içeren büyük hücreli karsinom	
		Adenoskuamöz karsinom	
		Sarkomatoid karsinom	
		Pleomorfik karsinom	
Küçük Hücreli Karsinom	İğsi hücreli karsinom		
	Dev hücreli karsinom		
Diğer	Karsinosarkom		
	Blastom (pulmoner blastom)		
	Kombine küçük hücreli karsinom		
	Karsinoid tümör		
	Tipik karsinoid		
	Atipik karsinoid		
	Tükruk bezi karsinomları		
	Mukoepidermoid karsinom		
Adenokistik karsinom			
Diğerleri			

2.3.2.1 Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Türleri

Küçük hücreli olmayan akciğer kanserine küçük hücre dışı akciğer kanseri de denilebilmektedir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri türleri tüm akciğer kanseri olgularının %80-85 kadarından sorumlu olup, başlıca üç tipi vardır. Bunlar skuamöz hücreli (epidermoid) kanser, adenokarsinomlar ve büyük hücreli kanser tipleridir.

Skumöz hücreli karsinom (SHK), bronşiyal epitelyal hücrelerden skuamöz metaplazi/displazi yoluyla ortaya çıkan ve bu nedenle en yaygın özellikleri olan

keratinizasyon ve/veya hücreler arası köprülerle karakterize edilen tümörlerdir. Patoloji amacıyla alınan numunelerde SHK'ya özgü farklılaşma özellikleri en az %10 gözleniyor olması SHK tanısı için gereklidir. 2004 Dünya Sağlık Örgütü sınıflandırmasında dört farklı SHK varyantını tanımlanmıştır. Bunlar; saydam (şeffaf) hücreli, küçük hücreli, papiller ve bazaloid varyantları başka bir ifade ile alt grup olarak tanımlanan kanser türleridir. Papiller varyant, bazen sınırlı intraepitelyal yayılım ile endobronşiyal obstrüktif büyüme gösterir ve invazyonun değerlendirilmesi zor olabilir. Bazaloid varyant, bazal bronşiyal kök hücre proliferasyonu ile karakterize edilir, baskın olarak bazaloid paterni ve minimal skuamöz farklılaşma alanları gösterir (Pablo vd. 2012).

Bir akciğer kanseri türü olan ve genel sınıflandırmada küçük hücreli olmayan akciğer kanseri türleri arasında sayılabilen adenokarsinomlar, akciğer kanserlerinin %40'ından fazlasını oluşturmaktadırlar. Adenokarsinomların küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri içindeki oranı ise yaklaşık %60 olarak ifade edilmektedir. Adenokarsinomlar cerrahi olarak rezeke edilen (kansere nedeniyle akciğerin bir kısmının alınması) vakaların %70'inden fazlasını oluşturan en yaygın akciğer kanseri türüdür. Adenokarsinom insidansı son yıllarda sürekli artan bir akciğer kanseri türü olarak bilinmektedir. Akciğer adenokarsinomu genellikle santral fibrozis ve plevral büzüşmeli periferik yerleşimli bir kitle oluşturur. Ayrıca, merkezi konumdaki kitle, yaygın lobar konsolidasyonu, bilateral multinodüler dağılım ve plevral kalınlaşma dahil olmak üzere çeşitli görünümlere sahip olabilir. Tanım olarak, akciğer adenokarsinomu, glandüler farklılaşma veya mütin üretilmesi ile malign bir epitelyal neoplazmdir.

Akciğer adenokarsinom hücreleri genellikle pnömositik belirteçleri ekspres eder. Adenokarsinomlarda çoklu gen değişiklikleri meydana gelebilir, hasta sağlığını iyileştirmek için onaylanmış moleküler hedefe yönelik tedavi yöntemleri mevcuttur (Min 2016).

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri türlerinden üçüncüsü ise büyük hücreli nöroendokrin karsinom (BHNK) olarak bilinen akciğer kanseridir. BHNK nöroendokrin tümörlerin %15'ini ve tüm akciğer kanserlerinin %3'ünü oluşturur.

Bu kanser türü nadir görülmekle birlikte, kötü huylu bir potansiyele sahiptir ve oldukça agresif bir tümördür. BHNK sigara içenlerde, erkeklerde ve ileri yaşta daha sık teşhis edilmektedir. BHNK histolojik olarak heterojendir ve adenokarsinom veya skuamöz hücreli karsinom gibi diğer akciğer kanseri tipleriyle kombinasyonlar halinde de görülebilir (Kupeli ve Koseoglu 2018).

2.3.2.2 Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

Küçük hücreli karsinom tüm akciğer kanseri olgularının %15 kadarını oluşturan, hemen tüm olgularda sigara ile ilişkili, tanı anında çoğu olgunun ileri evre olduğu akciğer kanseri türüdür. Tümör hücreleri tipik olarak ezilme, çekilme, yığılma artefaktı oluşturan, yüksek mitotik aktivite gösteren ince granüler kromatine sahip, nükleolü belirsiz, yuvarlak ya da fuziform küçük nükleuslu, dar sitoplazmalıdır (Yener ve Apa 2014).

Küçük hücreli akciğer kanserlerinde balgam ve/veya bronkoskopi ile alınan numunelerde tanı imkanı çok yüksektir. Biyopsi örneklerinde nekroz siktir ve canlı tümör hücreleri çekirdeklerinin birbirinin kenarlarına yapışarak oluşturdukları nükleer “molding” sık izlenen bir histomorfolojik bulgudur (Aydiner vd. 2010).

2.3.3 İn-Vitro Araştırmalarda Kullanılan Akciğer Kanseri Hücre Hatları

Mevcut biyomedikal kanser araştırmaları geniş insan tümör materyal kaynaklarını gerektirir. Günümüzde hayvan ve insan hücre kültürleri, canlı biliminin birçok dalında yaygın olarak kullanılan önemli araçlardır. Hücre kültürleri çeşitli hastalıkların modellenmesinde, In-vitro fertilisation teknolojisinde, kök hücre ve kanser araştırmalarında, monoklonal antikor üretimi, rejeneratif tıp ve terapötik protein üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır (Gazdar vd. 2010, Silicka 2017).

1951 yılında Dr. Jones, servikal biyopsi yaparak Henrietta Lacks adlı hastasına serviks (rahim ağzı) kanseri teşhisini koydu. Doku örneğinden izole edilen hücrelerde ortalama her 20 saatte bir hücre bölünmesini izleyen ve bu bölünmenin sürekliliğini gösteren Dr.

Jones in-vitro çalışmalarda kullanılabilir ilk hücre hattını da keşfetmiş oldu. Bu yeni hücre hattına biyopsi numunesinin alındığı hastanın isminin (**Henrietta Lacks**) ilk harfleri kullanılarak Hela adı verildi. Hela adı verilen bu yeni hücre hattı, salk aşısının (çocuk felci aşısı) üretiminde kullanılan poliovirüsü geliştirmenin yolunu açtı (Hernández vd. 2014).

Akciğer kanseri hücreleri, Hela hücrelerinin izolasyonundan yaklaşık 25 yıl sonra başarıyla kültürlendi. Bugüne kadar 250'den fazla akciğer kanseri hattı tanımlanmış olup, 200'den fazla hücre hattı ATCC (American Type Culture Collection) veri tabanında bulunmaktadır (Gazdar vd. 2010). Günümüzde ATCC hücre hatlarının tedariki konusunda dünyadaki önde gelen kuruluşlardan olmakla birlikte, ATCC dışında da birçok kurum ve şirket artık farklı hücre hatlarının izolasyonu, çoğaltılması ve satışını rahatlıkla yapabilmektedir. Veri tabanında tanımlanmış ve nasıl izole edilerek in-vitro olarak hücre kültürü laboratuvarlarında çoğaltılabileceği belirlenmiş olan hücre hatlarına bilimsel araştırma yapacak kişiler tarafından kolayca ulaşılabilmektedir. Çizelge 2.4'te skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinomun dahil olduğu küçük hücreli olmayan kanser türlerinden izole edilen hücre kültürü çeşitleri sunulmuştur.

Çizelge 2.4 Laboratuvar çalışmalarında kullanılan akciğer kanseri hücre hatları (İnt. Kyn. 1).

Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Hücre Hatları	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri Hücre Hatları
A549, PÇ9, LO68, LUDLU-1, COR-L105, sklu1, SKMES1, NCI-H727, LC-2 /MS, NCIH358, chago-K-1, MOR/CPR, MOR/0.4R, MOR/0.2R, NCIH-322	H69, H69V, CORL-47, CORL51, CORL88, DMS53, DMS79, DMS454, COR-L311, COR L303, COR- L95, NCI-H69/CPR, NCI-H69/LX4, NCI-H69/LX10, NCI-H69/LX20 , SHP-77, NCIH510A, DMS92, DMS153, COR-L279, DMS 273

2.3.3.1 Akciğer Kanserinde Adenokarsinom Hücre Hattı Olarak A549 Hücre Hattı

İlk kez 1971'de Japonya'da küçük hücreli karsinom hücreleri başarılı bir şekilde kültürlendi. Sunulan çalışmada kullanılan ve küçük hücreli olmayan bir kanser hücre hattı olan A549 hücre hattı ise ilk olarak, 1972 yılında D.J. Giard ve arkadaşları tarafından 58 yaşındaki bir beyaz ırk erkeğin adenokarsinomik akciğer dokusundan biyopsi yaparak alınmış ve 1976'da kültürlenmiştir (Gazdar vd. 2010, İnt. Kyn. 2).

A549 hücre hattı hipotriploid alveoler bazal epitel hücreleridir. Bu adenokarsinomik hücre dizisi, küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu olarak kategorize edilir, küçük hücreli akciğer karsinomundan daha az agresif olma ve daha az hızla yayılma eğilimindedir. Ancak daha yaygın olduğu kanıtlanmıştır. A549 hücreleri tüm akciğer kanseri vakalarının %85-88'inde görülebilen hücrelerdir (Gazdar vd. 2010 İnt. Kyn. 2). A549 hücre hattı, akciğer adenokarsinomunun bir modeli ve pulmoner epitel hücreleri ile başka bir ifade ile solunum ve/veya solunum hastalıkları ile ilişkili olabilecek in vitro birçok çalışmada yaygın olarak kullanılabilir (Ulasli vd. 2013, Günay vd. 2016).

2.3.4 Akciğer Kanseri Tedavi Yöntemleri

Akciğer kanseri daha önce de ifade edildiği üzere insidansı en yüksek olan kanser türü olup, akciğer kanseri tanısı konulan hastaların yarısından fazlası tanı konduktan sonra bir yıl içinde öldüğü bilinmektedir. 5 yıllık sağ kalım oranı %17,8 civarındadır (Zappa ve Mousa 2016). Bunun nedeni akciğer kanserinin yaşamı ve sağlığı etkileyecek ciddi semptomlar oluşturmadan son evresine kadar ilerleyebilmesi ile ilişkilidir. Bu nedenle sigara içenlerin ve/veya diğer risk faktörlerine haiz bireylerin, özellikle orta yaşlardan sonra, düzenli periyotlarla akciğer kanseri ve diğer kanser türlerine ilişkin taramalarını düzenli aralıklarla yapmaları gerektiği önerilmektedir.

Akciğer kanseri için tedavi yöntemleri arasında cerrahi yaklaşım, radyasyon tedavisi, kemoterapi, immünoterapi ve hedefli tedavi yer alır. Tedavi yöntem önerileri, kanserin türü ve evresi dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlıdır. Geleneksel tedavi yöntemleri

olan cerrahi yaklaşım, radyoterapi ve kemoterapi, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarının tedavisinde en çok kullanılan yöntemlerdir. Hastalığın durumuna göre tek başına yada kombine olarak kullanılabilir (Aydiner vd. 2010, Alaoui vd. 2015).

2.3.4.1 Akciğer Kanserinde Cerrahi Tedavi Yaklaşımları

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tanısında, evrelemesinde cerrahi tedavi önemli bir rol oynamaktadır. Akciğer kanserinin tedavisi, cerrahi tedavinin yanı sıra doğru tanı ve evreleme üzerine odaklanmaktadır. Küçük hücreli akciğer kanseri nadiren cerrahi yöntem ile tedavi edilirken, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde çoğunlukla cerrahi rezeksiyon tercih edilebilen bir yöntemdir. Özellikle küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde rezeksiyon, evre I, II ve IIIA için birincil tedavi yöntemidir (Lackey ve Donington 2013).

Akciğer kanserini tedavi etmek için üç ana cerrahi ameliyat türü yapılmaktadır. Bu yöntemler tümörün büyüklüğüne ve yerine bağlı olarak, sadece kanserli ve yakınındaki dokunun çıkarılmasından bir akciğerin tamamen çıkarılmasına kadar değişmektedir.

- **Kama rezeksiyonu (segmental rezeksiyon):** Tümör ve tümörün çevresindeki dokuların bir kısmının çıkarılmasını içerir. Bu ameliyat genellikle akciğer kanserinin teşhisi erken evrede yapılmış ise kullanılır.
- **Lobektomi:** Akciğer kanserinin tedavisinde kullanılan en yaygın ameliyat türüdür. Akciğerlerde sağ akciğerde 3, sol akciğerde 2 olmak üzere toplam 5 lob vardır. Lobektomi ameliyatı ile akciğerin bir lobu çıkarılır.
- **Pnöminektomi:** Pnöminektomi yapılabilecek en büyük akciğer rezeksiyonudur. Bütün bir akciğerin rezeksiyonundan oluşur. Çoğunlukla santral tümörleri, ana bronş, sol veya sağ pulmoner arter ve hem üst hem de alt pulmoner ven tutulumu olan hastalarda kullanılır (Lazdunski 2013).

2.3.4.2 Akciğer Kanserinde Radyasyon ile Tedavi

Radyoterapi, akciğer kanserinde temel tedavi yöntemlerinden biri olarak kullanılmaktadır. Klinik ilerlemenin her aşamasında, hem küçük hücreli olmayan hem de küçük hücreli akciğer kanserlerinde kullanılır. Epidemiyolojik çalışmalara göre, gelişmiş olan ülkelerde küçük hücreli olmayan akciğer kanseri vakalarının %61-76'sında hastalıklarının belirli bir aşamasında radyoterapi yöntemlerinden birine ihtiyaç duyulmaktadır. Hastalığın erken aşamalarında, hastanın ameliyat olma durumu planlanmadığında, stereotaktik radyoterapi uygulanır. Lokal ileri evrelerde ise radyokemoterapi veya radikal radyoterapi kullanılır. Hastalığın ileri evrelerinde veya hastalık çeşitli tıbbi nedenlerle radikal olarak tedavi edilemediğinde, radyoterapi palyatif bir tedavi olarak da tercih edilebilmektedir (Maciejczyk vd. 2014).

Akciğer kanserinde farklı radyasyon terapi türleri kullanılabilir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisinde en yaygın kullanılan iki ana tip radyasyon tedavi türü vardır. Bunlar; geleneksel dış ışın radyasyon tedavisi ve brakiterapi (iç radyasyon tedavisi) olarak ifade edilmektedir.

Dış ışın radyasyon tedavi: Genellikle doğrusal bir hızlandırıcı (genellikle önden ve arkadan) kullanarak iki boyutlu ışınlar yoluyla radyasyon verilmesini içerir. Dış ışın radyasyon tedavisinde, planlama (simülasyon) tanısal bir X-ışını makinesi kullanılarak yapılır ve bu simülasyon (X-ışını) görüntülerine dayanarak radyasyon verilir. Ayrıntılı anatomik görünüm (üç boyutlu bilgisayarlı tomografi [BT] gibi) mevcut değildir. Bu nedenle hedefe ve çevresindeki normal yapılara doz dağılımı hakkında doğru bilgi edinilemez. İyi bir sonuç alınmadığı için dış ışın radyasyon tedavinin diğer alternatif stereotaktik vücut radyasyon tedavisi (Stereotactic body radiation therapy SBRT) kullanılmaya başlandığı belirtilmektedir (Parashar vd. 2013).

Brakiterapi: Uygulamalarda radyoaktif kaynakları geçici veya kalıcı olarak akciğerdeki malign bir tümörün içine veya yakınına yerleştirilir. Brakiterapi tedavi yöntemi daha erken sonuç alınması ve radyum tedavisinden daha güvenli olduğu için çok yönlü hale gelmiştir. Brakiterapi tek başına veya ameliyatla veya dış ışın radyasyonu (external-beam Radiation EBR) ile birlikte kullanılabilir (Yuchan vd. 2019).

2.3.4.3 Akciğer Kanserinde Kemoterapi ile Tedavi

Kemoterapi; kanser hücrelerini öldürücü özelliğe sahip olan sitotoksik (hücre öldürücü) etkili ilaçların tedavide kullanılması şeklinde tanımlanabilir. Kemoterapi akciğer kanserinde genelde kullanılan bir tedavi yöntemidir. Özellikle küçük hücreli akciğer kanserinde kemoterapi ana tedavi olarak kullanılır (Islam vd. 2019).

Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin tedavisinde kemoterapi genellikle performans skoru 0 ve 1 olan hastalarda, yani hastalığın erken evrelerde teşhis edildiği durumlarda iyi sonuç vermektedir. Kemoterapi skoru 2 olan ve ileri derece akciğer kanseri olarak tanımlanan küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde de sıklıkla tercih edilebilir. Fakat bu grupta yapılacak kemoterapi uygulamalarının makul düzeyde zinde olan ve günün en az %50'sinde uyanık kalabilen hastalara yapılabileceği önerilmektedir. Palyatif bakımın tercih edildiği performans skoru 3 ve 4 olan akciğer kanseri hastalarında ise kemoterapi nadiren tercih edilmektedir (Alaoui vd. 2015).

2.3.4.4 Akciğer Kanserinde Hedefe Yönelik ve İmmünoterapi Tedavi Yöntemleri

Hedefli tedavi terimi genellikle tüm kanser tedavileri için geçerlidir. Gelecekte yan etkisi daha az olan kanser tedavi protokollerinin geliştirilebilmesi adına umut vaat eden yöntemlerden birisidir. Çünkü normalde kullanılan tedavilerdeki sitotoksik etkili ajanlar kanser hücrelerini öldürürken belirli oranlarda sağlıklı hücelere zarar vermekte, bu nedenle ciddi yan etkiler gelişebilmektedir. Hedefli tedavi yöntemlerinde ise sadece kanser hücrelerine etki gösterebilecek aktif maddelerin kullanılması ön plandadır. Bu nedenle tedaviyi planlamanın birinci basamağını, sadece tedavi edilmesi öngörülen kanser hücrelerinde bulunan moleküler hedeflerin belirlenmesi oluşturur. Moleküler hedefler belirlendikten sonra bu moleküler hedefin uyarılmasını/baskılanmasını sağlayacak bir aktif maddenin tasarlanması/hazırlanması gerekir. Hazırlanacak ilaç aktif maddeler tümörlere özgü bir şekilde etki edebilmeli, kanser hücrelerinin ölümünü sağlamalı veya tümörü hastanın yararına olacak şekilde mutasyona uğratabilmelidir.

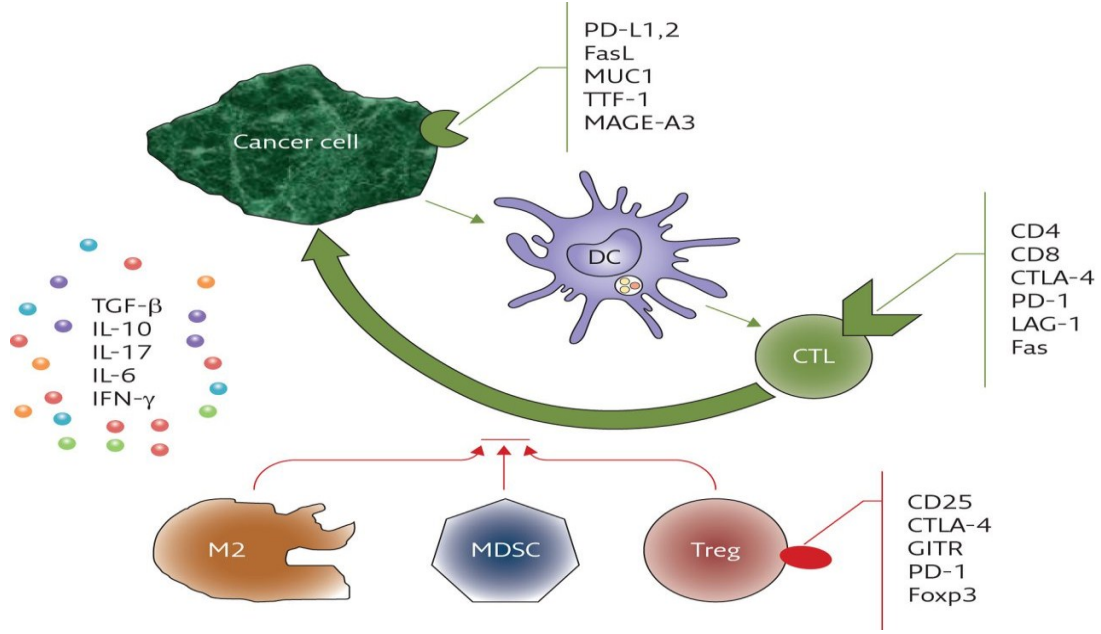
Genomik tıbbın ortaya çıkmasıyla geliştirilen hassas onkolojik tedavi yöntemleri, geleneksel kemoterapiye kıyasla tedavi sonuçlarının ve yaşam kalitesinin iyileştirilmesine yardımcı olmuştur. Tedavide kullanılan moleküler sinyal yollarını bloke etmek için yeni geliştirilen ilaçlar konusundaki ilerlemeler ve genetik lezyonları tespit etme teknolojileri, hekimlerin tedavi seçeneklerini uyarlamasına olanak sağlamıştır. Akciğer kanserlerinde hedeflenebilir ana sinyal yolları olarak EGFR-PI3K / Akt / mTOR-RAS-MAPK sinyal yolu ile NTRK/rosl yolu son yıllarda tercih edilen moleküler yollardır. Bu yolları hedefleyen birçok ilaç geliştirilmiş ve klinik faydaları gösterilmiştir (Yuan vd. 2019).

İmmünoterapi; sistemik malignitelerin tedavisinde yeni bir yaklaşımdır. Pasif ve adaptif immünoterapi, malign melanom, renal hücreli karsinom ve yumurtalık kanseri gibi çok çeşitli katı tümörlerin tedavisinde uygulanmıştır. İmmünoterapi yönteminin kullanımı çok eskilere dayanmaktadır. İmmünoterapi ilk olarak William Coley tarafından 1890’larda Alman bir göçmen olan Fred Stein adlı yüz sarkomu hastasının ameliyatı sonrasında kullanıldı. Bu ilk çalışmada bakteriyel izolatlarla enfekte edilen tümör bölgelerinde iyileşmeler olabileceği görüldü. Coley’in sonraki yıllarda başka hastaları ile de yaptığı benzer çalışmalar neticesinde *Streptococcus pyogen* ve *Serratia marcesens* bakteri kültürlerinden elde edilen bir karışım olan “Coley'nin toksini” şeklinde adlandırılarak bazı kliniklerde kullanılmaya başlandı (Murala vd. 2010). Coley bakterilerle oluşturulan enfeksiyona karşı vücudun oluşturduğu immun yanıtın tümörü iyileştirmiş olabileceğini öne sürdü. O dönemlerde bu fikir çok kabul görmese de, günümüzde kanser immünoterapisinin babası olarak Coley gösterilmektedir.

Gelişen teknoloji ve yapılan yeni araştırmalar insan immün sisteminin kansere karşı vücudu nasıl savunabileceği, hatta immun sistemin kanser hücrelerinin ölümüne nasıl aracılık edebileceği konularında yeni bilgiler edinmemizi sağlamıştır. Elde edilen bilgiler akciğer kanserinde etkili bir immünoterapinin gelişmesine yol açmıştır. Immun sistem aracılı antitümör savunmasının özellikle tümör ilerlemesinin ilk adımında baskın olabileceği belirtilmektedir. İmmun sistemdeki sitotoksik hücrelerin (CD8⁺ ve CD4⁺ lenfositleri, doğal öldürücü (NK) hücreleri ve NKT-hücreleri) uyarılması ve

kanser hücrelerini bu sitotoksik hücreler için hedef haline getirmek immunoterapinin temelini oluşturmaktadır (Şekil 2.7). İmmünoterapi, kanser hücrelerinin kendilerinden ziyade konakçı bağışıklık sistemini hedefleyerek kanser tedavisinde önemli bir yöntem olarak kullanılmaya başlamıştır. Son on yılda yapılan çalışmalar ışığında sitotoksik T-lenfosit ilişkili protein 4 (CTLA-4) veya programlanmış hücre ölüm proteini 1 (PD-1) yolunu hedefleyen bağışıklık kontrol noktası inhibitörü (ICI) immünoterapileri, farklı kanser türlerinin tedavisinde etkileyici bir başarı elde etmiştir. 2018 yılında kanser immünolojisi alanında James P. Allison ve Tasuku Honjo'nun negatif bağışıklık regülasyonunun inhibisyonu yoluyla kanser tedavisini keşfettikleri için Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü almıştır (Smyth ve Teng 2018, Altmann 2018).

Bağışıklık sistemindeki dendritik hücreler; kanser hücrelerinde bulunan antijenleri tanıyarak, tümör mikroortamındaki sitotoksik lenfositlerin (CTL) kanser hücrelerini tanımasına ve onlara sitotoksik etkilerini göstermelerine aracılık eder. Bu immun yanıtın oluşması interferon (IFN) γ aracılığı ile uyarılırken, tip-2 makrofajlar (M2), miyeloid türevi baskılayıcı hücreler (MDSC'ler) ve düzenleyici T hücreleri (Tregler) tarafından inhibe edilebilir. Metabolik sinyalizasyon tümör growth faktör (TGF) β , interlökin (IL) -10 ve IL-17 gibi sitokinler tarafından güçlendirilir. Lenfositlerin kanser hücrelerine etkileri, dentritik hücrelerin kanser hücrelerini tanımasını sağlayan antijenlerin (PD-L1-2, fasl, MUC1, TTF-1, MAGE-A3) ekspresyon düzeylerinin uyarılmasıyla artar. Eş zamanlı olarak sitotoksik etkili olan lenfositlerden olan CD3 ve CD8, sitotoksik T-lenfosit antijeni (CTLA)-4 ve programlanmış hücre ölüm proteini (PD) -1, apoptotik faktör Fas ve son olarak da LAG-3 (lenfosit aktivasyon geni 3)'ün ekspresyon düzeyleride artarak immun sistem aracılı antikanserojen etkiler (Şekil 2.7) oluşmaya başlar (Kulawik ve Raniszewska 2017).



Şekil 2.7 İmmunoterapide rol oynayan olası moleküler mekanizmalar.

2.4 Akciğer Kanseri ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres, hücre metabolizma sırasında hidroksil radikali, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) artışı ile onları detoksifiye eden antioksidanların yetersizliği sonucu oksidatif dengenin bozulması olarak tanımlanır. Oksidatif streste seviyeleri artan ROS ve RNS türleri eksik olan elektronlarını tamamlamak için, hücre içi lipit ve protein yapılarının çift bağ içeren gruplarına ve DNA'daki bazların çift bağlarına saldırır. Bu çift bağa sahip doymamış yapılardan bir hidrojen atomu koparabilme yeteneğindeki serbest radikaller kendileri kararlı duruma geçerken, hidrojen aldıkları moleküllerin radikale dönüşmesine neden olur. Bu durum birçok doymamış (çift bağlı molekül içeren) yapının bulunduğu ortamlarda zincirleme oksidasyon reaksiyonlarını başlatır. Sonuçta hücre içi protein, lipit, DNA gibi biyomoleküllerde hasarlar oluşmaya başlar. Bu hasar onarılamaz ise hücrenin zarar görmesine ya da hücre ölümüne neden olur (Özcan vd. 2015). Oksidatif stresin hücre ve dokularda oluşturduğu hasarın durum ve derecesine göre organizmada başta diyabet, ateroskleroz, tansiyon, kalp hastalığı, parkinson, alzheimer, kanser gibi birçok hastalığın gelişmesinde rol oynayabileceği bilinmektedir.

Metabolizmanın normal işleyişi sırasında her zaman organizmada serbest radikaller oluşmaktadır. Hatta gerektiğinde serbest radikaller/oksidan moleküller immun hücreler tarafından üretilerek vücut savunmasında kullanılır. Bu durumlar olağan bir hal olup, oluşan serbest radikaller gerek görüldüğünde hücre ve dokularda bulunan antioksidan moleküller ve sistemler aracılığı ile zararsız hale getirilirler. Serbest radikaller sadece aşırı miktarda oluştuğunda/bulduğunda yıkıcıdır. Çünkü aşırı ve hızlı bir şekilde serbest radikal oluşumunu organizmanın antioksidan sistemi detoksifiye edemeyebilir. Böylesi durumlarda oksidatif stresin artmasına paralel olarak hücreler ve dokularda patolojik değişiklikler oluşabilir.

Yapılan birçok çalışma kanser gelişiminde oksidatif stresin etkili bir şekilde rol alabileceğini göstermektedir. Çünkü kanser gelişimine neden olan çoğu kanserojenin etkilerini gösterdiği temel mekanizmalardan birinin oksidatif stres olduğu bilinmektedir. Çevresel çoğu kanserojen aynı zamanda organizma için toksiktir. Bu toksisitenin oluşmasındaki majör yollar genellikle oksidatif stres ve inflamasyon aracılığı ile şekillenir. Başka bir ifade ile çevresel kanserojenlerin etkisiyle olsun veya olmasın gelişen kanserin başlama ve ilerleme evrelerinde oksidatif stres ve inflamasyon başrolde olan aktörler arasındadır. Özellikle hücre bölünmeden önce oksidatif stresin DNA'ya verdiği hasar sonucunda ortaya çıkan mutasyonların hücre çoğalmasıyla sürdürülmesinin kansere neden olabileceği öngörülmektedir.

Kanser hücrelerinin taşıyabileceği hasarı izlemek ve öğrenmek için ROS seviyeleri bir belirteç olarak kullanılabilir. ROS regülasyonu için alınan sonuçlar kanser tedavisinde son derece önemlidir. Çünkü yaygın olarak kullanılan radyo ve kemoterapötik ilaçlar ROS modülasyonu yoluyla tedavinin geleceğini belirler. Çoğu radyo ve kemoterapötik tedavi ROS indüksiyonuna dayanır. Spesifik bir tümördeki ROS seviyeleri her hasta için en iyi tedavinin tanımlanmasına yardımcı olur. Bununla birlikte bazı kanser türlerinde ROS'a karşı direnç gelişebilir. Kanser hücrelerinin ROS'a direnci, küçük bir kanser kök hücreleri (CSC; cancer stem cells) popülasyonundan kaynaklanıyor olabilir. Çünkü CSC'ler, aerobik solunumu önleyerek ve glikolizi artırarak ROS oluşumunu önleyebilmektedirler (Sosa vd. 2013).

Oksidatif stresle sonuçlanan oksidan-antioksidan dengesindeki bozukluklar, kronik inflamasyona katkıda bulunan ana faktörlerden biri olarak tanınmış ve yoğun bir şekilde araştırılmıştır. Nitekim inflamatuvar bir hastalık olan kronik akciğer iltihabının sigara içme durumuna bakılmaksızın akciğer kanseri için ana risk faktörlerinden belki de en önemlisi olduğu belirtilmektedir. Aynı zamanda sigara dumanının (aktif veya pasif içiciler için) da reaktif oksijen türlerinin oluşumunu destekleyen ve böylece inflamatuvar ilişkili hava yolu yaralanmalarını indükleyen ana ekzojenik belirleyici olduğu bilinmektedir (Zabłocka-Slavinska vd. 2019).

2.5 Akciğer Kanseri ve İnflamasyon

İnflamasyon; vücudun çeşitli zararlı etkilere (enfeksiyon, toksik maddeler, çevresel faktörler) maruziyeti sonucunda oluşabilen, hasarlı hücreler veya tahriş ediciler gibi zararlı etken maddeleri vücuttan uzaklaştırmak, hücre hasarının ilk nedenini ortadan kaldırmak ve inflamatuvar süreçten zarar gören nekrotik hücreleri ve dokuları temizlemek ve doku onarımını başlatmak şeklinde tanımlanabilir. İnflamasyon, beş klasik inflamatuvar belirtiyi gösterir. Bunlar kızarıklık, şişme, ısı, ağrı ve daha sonra organ fonksiyonunun kaybı şeklinde sıralanabilir (Hawiger ve Zienkiewicz 2019).

İnflamasyon akut veya kronik olarak iki grupta sınıflandırılabilir. Vücudun zararlı uyaranlara verdiği ilk tepkisine akut inflamasyon denir. Akut inflamasyon plazma ve lökositlerin (özellikle granülositler) kandan yaralı dokulara artan hareketi ile elde edilir. Uzun süreli iltihaplanma kronik inflamasyon olarak bilinmektedir. Kronik inflamasyonun nedeni olarak; doğuştan ve edinilmiş bağışıklık sistemlerinin anormal aktivasyonunun sık görüldüğü otoimmün, nörodejeneratif, vasküler ve metabolik hastalıklar ile kanser gibi organizmayı zayıflatıcı hastalıklar gösterilmektedir (Yao ve Narumiya 2019).

Sunulan çalışmada oluşturulan in-vitro modellemede öngörülen uygulamalar yapıldıktan sonra elde edilen numunelerde hem oksidatif stres hem de inflamasyon düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca hücrelerdeki DNA hasar dereceleri de

belirlenerek terapi amacıyla kullanılan bitki türünün küçük hücreli olmayan adenokarsinom A549 hücre hattında olası teröpatik etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

2.6 *Verbascum Lasianthum*. (Sığırkuyruğu) Türlerinin Genel Özellikleri

Türkiye’de Sığırkuyruğu olarak bilinen *Verbascum L* cinsinin, Türkiye florasında 196 tanesi endemik olan 232 türü yetişmektedir. *Verbascum L* Haziran Ağustos aylarında sarı renkli çiçekler açan boyları 20 ile 150 cm aralığında olan iki yıllık otsu bir bitkidir. *Verbascum L* daha çok dağlık, ekilmemiş yerlerde ve yol kenarlarında çok bulunurlar. Gövdesi dik bazen dallanmış yünüksü tüylerle kaplıdır. Yaprakları gövdenin alt kısımlarında rozet (dairesel) halinde dizilmiş olup yünüksü tüylüdür. Çiçekler gövdenin ucunda sık veya seyrek az veya çok uzun bir salkım (rasemoz), başak ya da birleşik salkım şeklinde olur (Resim 2.1). Çiçeklerin çanak ve taç yaprakları beşer parçalıdır. Meyveler yuvarlakça olup, çok tohumludur (Huber Morath vd. 1978, Güner vd. 2012).



Resim 2.1 Sığırkuyruğu (*Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth.)

Türk tıbbında *Verbascum* türleri, bronşit ve tüberkülozdaki kuru öksürükler ve astım gibi solunum problemlerini tedavi etmek için kullanılır. Solunum sistemi üzerinde balgam söktürücü, mukolitik ve yatıştırıcı etkileri vardır. *Verbascum* çiçekleri, ürogenital organları etkileyen prutik durumlar için harici olarak uygulanır. Bu türlerin

hafif idrar söktürücü ve anti-inflamatuvar etkileri aracılığıyla idrar yolu üzerinde yatıştırıcı etkileri olduğu bildirilmektedir. Çiçeklerden yapılan yağ, egzama ve diğer inflamatuvar cilt rahatsızlıkları için harici olarak uygulanabilir. Ek olarak, hemoroid, romatizmal ağrı, yüzeysel mantar enfeksiyonları, yaralar ve ishali tedavi etmek için de yaygın olarak çeşitli *Verbascum* türleri kullanılır. Ayrıca geleneksel olarak karın ağrılarını hafifletmek için çay olarak tüketildiği de belirtilmektedir (Tatlı vd. 2008).

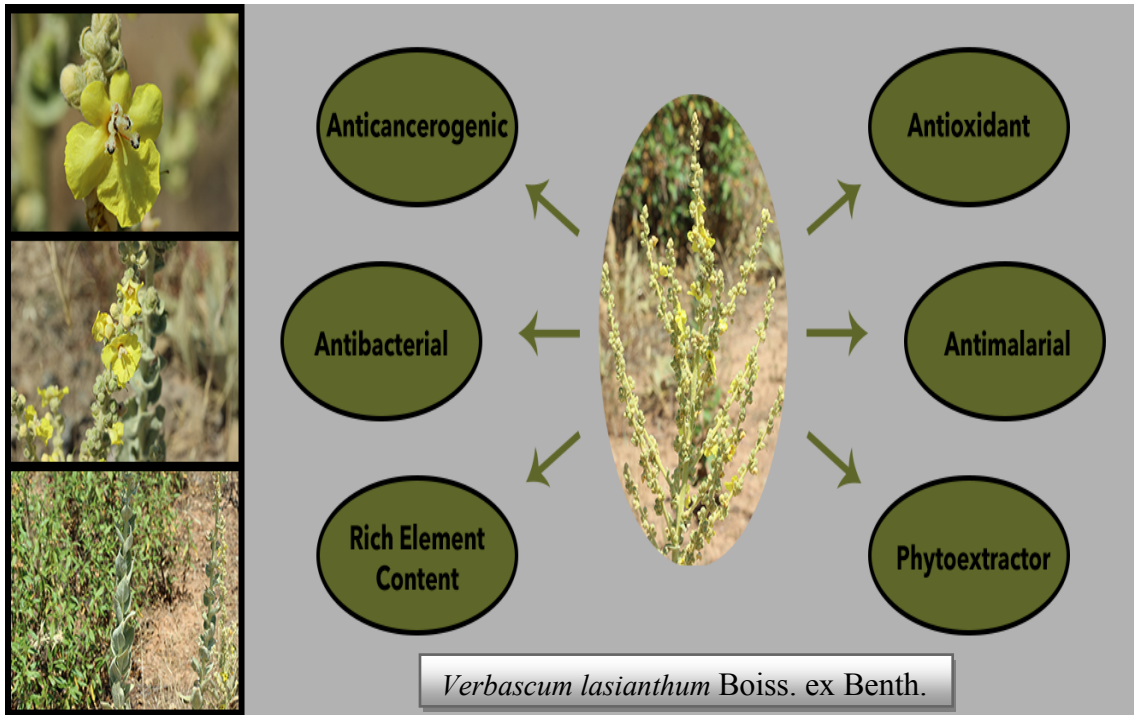
Verbascum L. Türlerinden olan *Verbascum densiflorum* Bertol, *Verbascum phlomoides L* ve *Verbascum thapsus* 'un yaprakları, çiçekleri ve tüm hava kısımları, egzama ve diğer enflamatuvar cilt durumlarını tedavi etmek ve yaraları iyileştirmek için kullanılır (Süntar vd. 2010). Ayrıca, bu bitkilerin ekstraktları tümörlerin, inflamasyonun, migrenlerin ve spazmodik öksürüğün tedavisinde kullanılmıştır. *Verbascum* cinsi bitkiler üzerinde yapılan çalışmalar fitokimyasal maddeler, saponinler, iridoid glikozitler, feniletanoid glikozitler, flavonoidler, steroidler gibi çok sayıda kimyasal maddeler ve fenolik asitlerin olduğunu göstermiştir (Anil vd. 2016).

Verbascum L ailesinin bir üyesi olan *Verbascum antiochium* Boiss'te ana kimyasal bileşenlerin iridoid glikozitler, flavonoidler ve saponinler olduğu ve bu türe ait metanol ekstratların antibakteriyal etkiye sahip olduğu ifade edilmektedir (Ozcan vd. 2010). *Verbascum thapsus* ile yapılan çalışmalarda ise bitkinin sulu ve metanolik ekstraktlarında bileşen olarak farklı oran ve miktarlarda flavonoidler, saponinler, tanenler, terpenoidler, glikozitler, karbonhidratlar, proteinler, yağlar ve sabit yağların varlığı tespit edilmiştir. Bitkinin ham sulu metanolik ekstraktının antispazmodik (spazm çözücü) ve antihelmintik (solucan düşürücü) aktivitelerinin olduğu ifade edilmektedir (Ali vd. 2012). *Verbascum pinetroum* Boiss.'in heksan ekstraktının ise az sayıda mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği, bununla birlikte, diklorometan, metanol ve metanol/kloroform ekstratlarının çok çeşitli mikroorganizmalar üzerinde etkili olabileceği belirlenmiştir (Ozcan 2011).

Türkiye'de yetişebilen *Verbascum lasianthum* Boiss. Ex Benth. türü ile yapılan son çalışmalar sonucunda türün aseton ve metanol ekstraktlarının antioksidan özellikleri belirlenmiştir (Hazman vd. 2018). İlgili çalışmada ayrıca *Verbascum lasianthum* Boiss.

ex Benth. türünün biyoelement içeriği de saptanmıştır. İlgili çalışmada elde edilen bulgular; *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türünün yüksek bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Bitki türünün içerdiği fenolik asitlerin söz konusu antioksidan aktivitenin oluşmasına katkı sağlamış olabileceği ifade edilmekte, ve söz konusu bitki bileşenlerinin ileri araştırmalara konu olabileceği önerilmektedir.

Ayrıca ICP-OES cihazı ile yapılan analizlerde *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türünün zengin bir mineral içeriğine sahip olduğu ifade edilmektedir. Ancak bitki türünün Cu, Zn, Mn gibi esansiyel iz elementlerin yanında toksisitesi yüksek olan elementleri (kurşun, kadmilyum gibi) de içerebileceği belirtilmektedir. Bunun çevre kirliliği ve bitki türünün fitoekstraktör etkinliği ile ilişkili olabileceği literatürde (Resim 2.2) öne sürülmektedir (Hazman vd. 2018).



Resim 2.2 Yünlü Sığırkuyruğu (*Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth.) türü ve etkileri (Hazman vd. 2018).

Bu bağlamda literatürden elde edilen bilgiler *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türünün sahip olduğu antioksidan aktivite ve içerdiği esansiyel iz elementler nedeniyle klinik anlamda yararlı olabileceğini göstermektedir. Fakat terapötik amaçla kullanılması

düşünülen *Verbascum L* türlerinin toprak kirliliği görülmeyen veya organik tarım yapılan bölgelerden tedarik edilmesi önerilebilir.

Ayrıca literatürde *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türünün antikanserojen etkili olabileceğine de işaret edilmektedir. Bu nedenle sunulan çalışmada *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türünün, bir akciğer kanseri hücre hattı olan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (A549) hücreleri üzerindeki antikanserojen etkinliği incelenmiş olup, antikanserojen etkinliğin oluşmasında etkili olabilecek muhtemel mekanizmaların bazılarının (DNA hasarı, oksidatif stres ve inflamasyon aracılı etkiler) araştırılması amaçlanmıştır.

3. MATERYAL ve METOT

Bu bölümde çalışmada kullanılan 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 esnasında kullanılan hücrelerin herhangi bir strese maruz kalmamaları amacıyla, hücrelerle temas edecek her türlü çözücü/çözeltilinin 37°C’de olmasına, santrifüj işlemlerinin (800 rpm) 5 dakika süreyle yapılmasına önem verilmiştir. Çalışmada kullanılan malzeme ve teçhizat listesi Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

Çizelge 3.1 Deneysel aşamada kullanılan malzeme ve teçhizat listesi.

Kullanılan alet ve cihazlar	Marka
Biyogüvenlik kabini	Biohazard safety cabinet 140407-15 Korea
Blender	Waring 32BL80, Connecticut, USA
DEF β 2, TNF- α , IL-6, TGF- β 1 ELİSA kiti	Elabscience, China
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium, Serox, Germany
ELISA plaka okuyucu	Biotek ELx800 USA
Evaporatör	Heidolph, 562-00000-00-0, Germany
Görüntüleme cihazı (mikroskop)	Juli Br NanoEnTek SC041308-011 Korea
Hassas terazi	Labart, FA2004N, Italy
İnkübatör	Panasonic MCO-18AC, Japan
Kolon fırını	CTO-10ASvp
LC-MS	Shimadzu LC/MS-8040
MTT tuzu	Sigma Aldrich, USA
Proteaz inhibitör kokteyl	Roche Complete Tablet, Germany
Santrifüj	Heraeus 75008150 Germany
Sonikatör	Bandelin, GM2070, Germany
Su banyosu	GFL D-30938 Burgwedel Germany
Süzgeç kâğıdı	Whatman, Grade 589/1
TAS, TOS analiz ticari kitler	Rell Assay Gaziantep, Türkiye
Total protein seviyeleri ticari kit	Sigma-Aldrich, USA
Tripsin	EDTA Serox
UHPLC	Shimadzu-Nexera
Vorteks	Isolab, 622.01.001, Germany

3.1 Bitki Materyali

Verbascum lasianthum Boiss. ex Benth. bitki örnekleri Afyonkarahisar İli Bayat İlçesi Koroğlubeli Mevkiinden 2019 Temmuz ayının 10'unda toplanmıştır (Resim 3.1). Bitkinin teşhisi (Resim 3.2) Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa Kargioğlu tarafından bitki toplanmadan önce yerinde yapılmıştır. Bitki örneğinin Türkçe ismi Güner vd. (2012)'den alınmıştır, cins ve tür tanımı ise Huber-Morath ve Davis (1978)'e göre yapılmıştır.



Resim 3.1 *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth.'in toplanması.



Resim 3.2 *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türünün yerinde teşhis edilmesi.

3.1.1 Bitki Materyalinin Ekstraksiyonu

Çalışmada kullanılan Sığırkuyruğu (*Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth.) bitkisinin gövde, yaprak ve çiçeklerinden oluşan karışım öncelikle musluk suyuyla iyice yıkandıktan sonra saf sudan geçirildi ve küçük parçalara ayrılıp oda sıcaklığında gölgede kurutuldu. İyice kurutulduktan sonra *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth bitki örnekleri blenderde (Waring 32BL80, Connecticut, USA) öğütülerek toz haline getirildi.

Toz haline getirilen bitki örneklerinden aseton/metanol ekstratları hazırlandı. Bu amaçla toz haline getirilen bitki numunelerinden hassas terazi (Labart, FA2004N, Italy) kullanılarak 50'şer gram tartıldıktan sonra 1 L'lik borsilikat cam şişelere konuldu.

Verbascum lasianthum Boiss. ex Benth.'in metanol/aseton ekstraktini hazırlamak için 50 g tartılarak üzerine 500 mL (1:10 w/v oranında) hacminde (metanol/aseton) çözücü ilave edildi. Su banyosu 50°C sıcaklığına ayarlandı, sonra hazırlanan cam şişelerdeki bitki çözücü karışımları su banyosunda 1 saat bekletildi. Su banyosundan çözeltiler çıkartıldıktan sonra oda sıcaklığında 24 saat karanlıkta bekletildi. Hazırlanan ekstratler bitki parçalarından arındırmak için süzgeç kâğıdından (Whatman, Grade 589/1) süzülerek, ayrı bir balonda toplandı. Bu şekilde elde edilen *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth.'in metanol/aseton ekstraktlarının çözücüleri vakum altında evaporatör cihazında (Heidolph, 562-00000-00-0, Germany) uzaklaştırıldı. Elde edilen ekstratlar cam petri kaplara dökülerek oda sıcaklığında içindeki çözücülerden daha iyi arınarak, kuruması için birkaç gün beklendi. Petri kaplarındaki iyice kuruyan *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. kazıyıcı ile kazınarak küçük cam şişelere kondu.

3.1.2 Çalışmada Kullanılan Bitki Ekstraktlarına ve MTT Tuzuna Ait Çözeltilerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth.'e ait aseton ve metanol ekstraktları hücrelere DMSO (dimetil sülfoksit) içerisinde çözümlenerek uygulandı. Hücrelere DMSO içerisinde çözümlenerek farklı dozlarda uygulanan bitki ekstraktları son konsantrasyondan 100 kat daha konsantre hazırlanarak uygulama hacimleri toplam hacmin %1'i olacak şekilde eklenmiştir. Bu bağlamda MTT analizlerinde kullanılmak üzere bitki ekstraktlarından 2.5 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL, 50 mg/mL ve 100 mg/mL konsantrasyonlarında stok çözeltiler hazırlandı. Metanol ve aseton ekstraktlarından hazırlanan stok çözeltiler hücrelere %1 hacim oranında uygulandığında, son *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. konsantrasyonları 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 500 µg/mL ve 1000 µg/mL şeklinde ayarlanmış oldu.

Sitotoksikite analizlerinde kullanılan MTT çözeltisi, ticari olarak elde edilen MTT tuzu (Sigma Aldrich, USA) kullanılarak hazırlandı. Bu amaçla MTT tuzu pH'ı 7,4'e ayarlanmış fosfat tamponunda (PBS) 5 mg/mL konsantrasyonunda çözüldü. Hazırlanan

MTT çözeltisi analiz süresine kadar ışıktan korunarak +4°C’de saklandı. Hücrelere uygulanmadan önce ise su banyosunda 37°C’de ısıtıldı.

3.1.3 Ekstraktların Bileşen Analizlerinin Yapılması

Bitki ekstraktlarında bulunan fenolik bileşenlerin türü ve miktarları Dicle Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından daha önce validasyonu yapılmış bir metot kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan analiz yönteminde 53 fitokimyasal maddenin miktarsal analizi için Shimadzu-Nexera model UHPLC cihazına bağlı tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS sistemi) kullanılmıştır (Yılmaz, 2020).

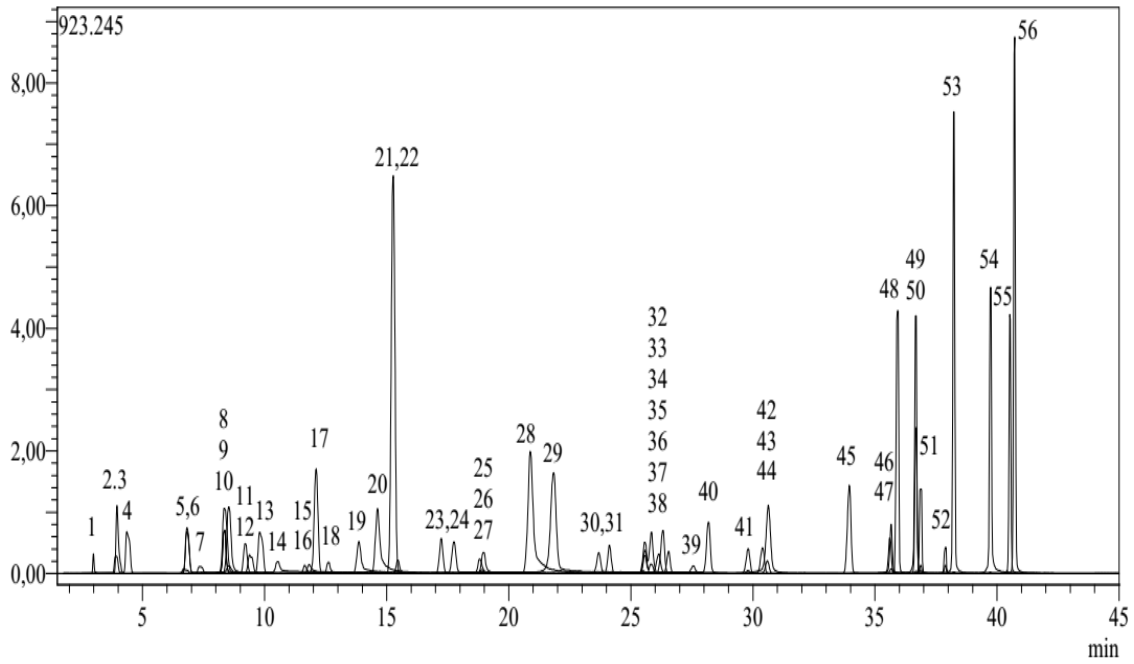
3.1.3.1 Kromatografi ve Kütle Spektrometre Şartları

Analizlerde tercih edilen LC-MS/MS sisteminde kullanılan ters faz UHPLC sistemi; bir otoörnekleyici (SIL-30AC model), bir kolon fırını (CTO-10ASvp model), gradient pompa sistemi (LC-30AD model) ve bir degazer (DGU- 20A3R model) bileşenlerinden oluşmuştur. Kromatografik ayırım (Agilent Poroshell 120 EC-C18 model) (150 mm×2.1 mm, 2.7 µm) bir kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı 40°C’ye ayarlıdır. Elüsyon gradiyenti mobil faz A (ultrasaf su+5 mM amonyum format+0.1% formik asit) ve mobil faz B (ultrasaf su+5 mM amonyum format+0.1% formik asit)’den oluşmuştur. Kullanılan gradiyent elüsyon profili şu şekildedir: 20-100% B (0-25 dk), 100% B (25-35 dk), 20% B (35-45 dk). Ayrıca mobil faz akış hızı ve enjeksiyon hacmi sırasıyla 0.5 mL/min ve 5 µL olarak belirlenmiştir (Yılmaz 2020).

Kullanılan LC-MS/MS sisteminin kütle spektrometre dedeksiyonu için hem pozitif hem de negatif modda çalışan bir elektrosprey iyonlaşma kaynağı ile donanmış Shimadzu LCMS-8040 model sıralı kütle spektrometresi kullanılmıştır. LC-ESI-MS/MS verileri LabSolutions yazılımı (Shimadzu) ile alınmış ve işlenmiştir. Fitokimyasalların kantitasyonu için MRM (multiple reaction monitoring/Çoklu Reaksiyon Görüntüleme) modu kullanılmıştır. MRM metodu, belirli ana iyon-parçalanma iyonu geçişlerinin taranmasına dayalı olarak fitokimyasalların seçici olarak tespit edilip miktarsal tayininin yapılması için optimize edilmiştir. Optimum fitokimyasal fragmentasyonu ve arzulanan

parçalanma iyonlarının maksimal geçişini elde etmek için çarpışma enerjileri (CE) optimize edilmiştir. Uygulanan MS çalışma şartları: kurutucu gaz (N₂) akışı, 15 L/dk; nebulizer gaz (N₂) akışı, 3 L/dk; DL sıcaklığı, 250°C; heat block sıcaklığı, 400°C ve arayüz sıcaklığı, 350°C olarak belirlenmiştir.

LC-MS/MS sisteminde belirtilen kromatografi ve kütle spektrometre şartları altında 53 farklı standart kullanılarak elde edilmiş olan kromatogram kullanılarak bitki ekstraktlarındaki bazı fenolik bileşenlerin türleri ve miktarları belirlenmiştir (Şekil 3.1). Ekstraktlar içerisinde miktarları belirlenen fenolik asit türlerinin miktarları mg-analit/g-extract şeklinde ifade edilmiştir (Yılmaz 2020).



Şekil 3.1 Farklı 53 fitokimyasal maddenin miktarsal analizi için valide edilmiş metodun standart kromatogramı.

Şekil 3.1’de sunulan standart kromatogramda 56 maddeye ait pik tanımlanmıştır. Bu piklerden ekstraktlarda aranan 53 farklı bileşene ait standarta, 3’ü (Ferulic acid-D3-IS^h, Rutin-D3-IS^h, 46; Quercetin-D3-IS^h) ise cihazın çalışmasının optimizasyonunu belirlemek için kullanılan standartlara aittir. Şekil 3.1’de numaralarla ifade edilen standartlar şu şekilde sıralanabilir. 1; Quinic acid, 2; Fumaric acid, 3; Aconitic acid, 4; Gallic acid, 5; Epigallocatechin, 6; Protocatechuic acid, 7; Catechin, 8; Gentisic acid, 9; Chlorogenic acid, 10; Protocatechuic aldehyde, 11; Tannic acid, 12; Epigallocatechin

gallate, 13; 1,5-dicaffeoylquinic acid, 14; 4-OH Benzoic acid, 15; Epicatechin, 16; Vanilic acid, 17; Caffeic acid, 18; Syringic acid, 19; Vanillin, 20; Syringic aldehyde, 21; Daidzin, 22; Epicatechin gallate, 23; Piceid, 24; p-Coumaric acid, 25; Ferulic acid-D3-IS^h, 26; Ferulic acid, 27; Sinapic acid, 28; Coumarin, 29; Salicylic acid, 30; Cynarside, 31; Miquelianin, 32; Rutin-D3-IS^h, 33; Rutin, 34; isoquercitrin, 35; Hesperidin, 36; o-Coumaric acid, 37; Genistin, 38; Rosmarinic acid, 39; Ellagic acid, 40; Cosmosiin, 41; Quercitrin, 42; Astragalin, 43; Nicotiflorin, 44; Fisetin, 45; Daidzein, 46; Quercetin-D3-IS^h, 47; Quercetin, 48; Naringenin, 49; Hesperetin, 50; Luteolin, 51; Genistein, 52; Kaempferol, 53; Apigenin, 54; Amentoflavone, 55; Chrysin, 56; Acacetin.

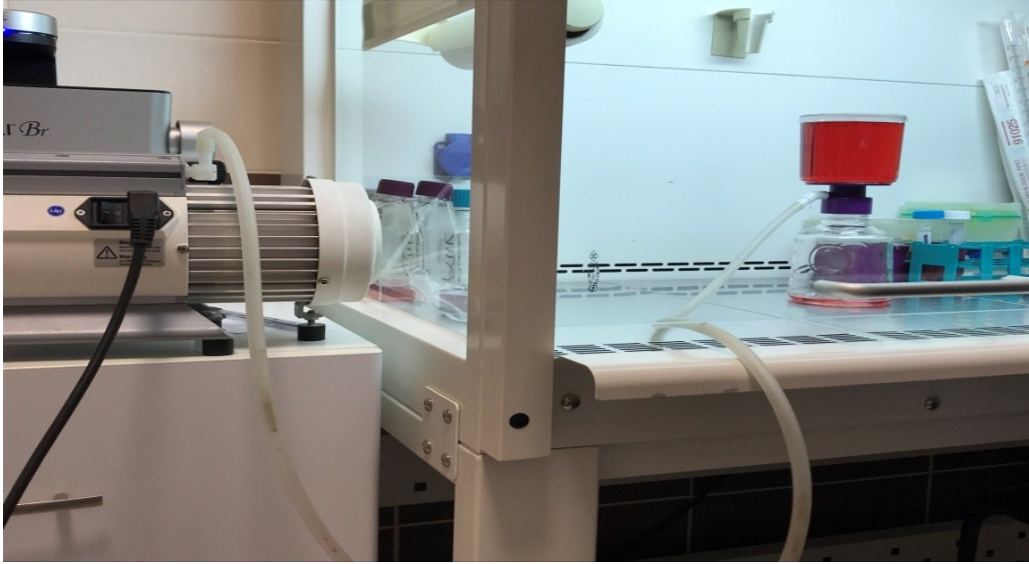
3.2 Hücrelerin Çoğaltılması için Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

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 3.2).

Çizelge 3.2 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, 0,22 μ m'lik pess membran filtre) geçirildi (Resim 3.3), 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.



Resim 3.3 Çalışmada kullanılan besiyerinin hazırlanması için oluşturulan düzenek (Besiyeri elde etmek için hazırlanan karışımı WVR, 0,22 μ m'lik pess membran filtreden geçirmek için kullanılan vakum pompası sistemi).

3.3 Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekilmesi

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı olan A549 hücreleri sıvı azotta karyotüpler içinde laboratuvara getirildi. Donmuş halde karyotüp içinde bulunan hücreler öncelikle sıvı azottan -20 °C ye alındı. 10 dakika beklendikten sonra 37 °C deki sıcak su banyosunda 1-2 dk süre ile inkübe edilerek çözülmeye bırakıldı. Bu arada 15 mL'lik bir falkona 5mL medium konuldu. Su banyosunda tamamı çözülmek üzere olan karyotüpteki hücreler hazırlanan (içine medium konan) falkona alındı. Sonrasında hassas pipetaj yapılarak hemen santrifüj edildi. Santrifürüj sonunda falkon tabanında biriken hücrelere

temas edilmeden medium pipetle çekildi. Hücre peleti üzerine tekrar 2 mL medium eklenerek ve nazikçe pipetaj yapılarak ikinci kez yıkama işlemi yapıldı. Santrifürijden sonra hücrelerin üzerinde kalan medium tekrar çekildi. Anlatıldığı üzere çözdürülerek 2 yıkamada içeriğinde bulunan DMSO'dan arındırılan A549 hücreleri flaska ekilmek üzere son defa 1 mL medium içinde çözüldü.

Hücreler dondurulup çözüldüklerinde strese girerler. Hücrelerin stresten daha kolay çıkarak tekrar kısa zamanda bölünme yeteneğine kavuşabilmesi için hücrelerin besiyerinin temel protein unsuru olan FBS oranı %15-20 oranında olmalıdır. Halbuki standart olarak kullanılan besiyerinin FBS oranı %10'dur. Bu nedenle mevcut olan besiyerinden belirli bir hacimde alınarak, üzerine enjektör filtresinden geçirilerek steril hale getirilen FBS eklenerek, besiyeri içindeki FBS oranının %20 olması sağlandı. İlk ekim için hazırlanan ve %20 FBS içeren 37°C'deki besiyeri 75cm²'lik flaska 10 mL hacminde eklenir. Bu şekilde ekim için hazır hale getirilen flaska, ekim için çözdürülerek DMSO'dan arındırılarak hazırlanan A549 hücreleri yavaşça eklendi. Ekimi yapılacak hücre sayısı 500-600 binden az ise hücreler eklendikten sonra, hücreler fazla ayrı düşmesin diye flask fazla sallanmaz. Çünkü hücrelerin birbirine yakın olması adherent hücre kültüründe özellikle hücre sayısının az olduğu durumlarda, hücre bölünmesini pozitif yönde etkiler. Hücre sayısının çok olması durumunda (özellikle de 1-2 milyondan fazla) ekim yapılan 75cm²'lik flask ekim sonrası kibarca sallanarak hücrelerin flask içine homojen dağılması sağlanabilir. Bu işlem hücrelerin daha kısa sürede konfluent olmasına katkı sağlandı. Bununla birlikte çözdürülerek ekilmesi düşünülen hücre sayısı çok ise ilk pasaj iki tane 75 cm²'lik flaska da yapılabilir. 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.

3.4 Hücrelerin Çoğaltılması (Pasajlanması)

Pasajlama hücrelerin ürettiği 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.

3.5 Hücrelere Uygulanan Tripsinizasyon/Detripsinizasyon

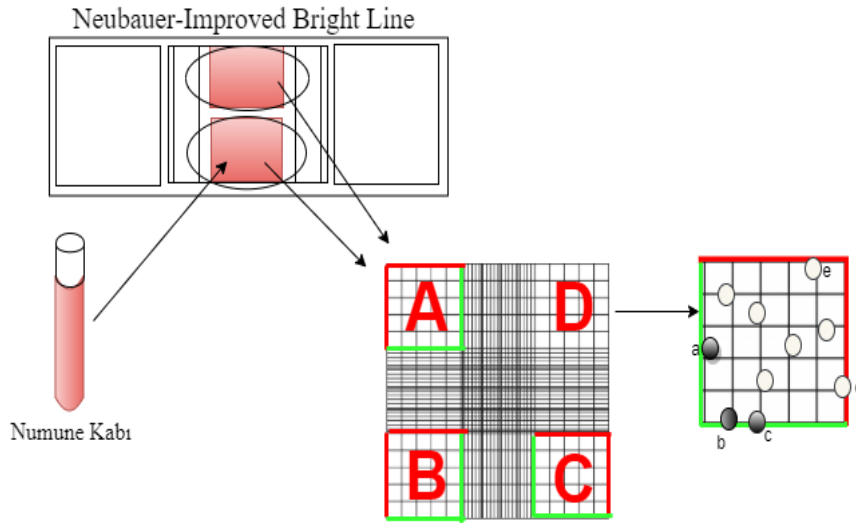
Flask tabanında %80-90 konfluent oranında bulunan hücrelerin üzerindeki besiyeri steril pipet yardımıyla alınıp atılmıştır. Hücrelerin üzerine 37 °C olan 3-4 mL tripsin EDTA (Serox) eklenmiş ve flask yüzeyinin her tarafına yayılması sağlanmıştır. Ardından flasklar 37 °C'de % 5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılıp 5-8 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.

Tripsinin bir proteaz enzim olduğu düşünülürse uzun süreli inkübasyonlar hücreye zarar vermeye başlar. Bu nedenle tripsinle inkübasyon süresinin 10 dakikayı geçmemesine özen gösterildi. Hücrelerin tamamı tabandan kaldırıldığında flaskın içine 5 mL besiyeri eklendi. Böylelikle ortamdaki tripsin dilüe edilerek detripsinizasyona kadar hücrelere verebileceği zarar en az indirildi. Flaskın içindeki tripsinize hücre-besiyeri süspansiyonu steril bir falkona alınarak detripsinizasyon için santrifüj (800 rpm, 5 dk) edildi. Santrifüj işleminin ardından olası kalıntı tripsinden hücreleri tamamen arındırmak için hücreler tekrar 2 mL besiyeri ile yıkanmıştır. Süpernatant atılıp hücre pelleti üzerine 1 mL besiyeri eklenmiş ve hafifçe pipetaj yapılarak hücreler tekrar ekim için hazır hale getirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan hücreler, içerisinde 10 mL besiyeri bulunan 75 cm²'lik flaska ekimi yapılmıştır. Flasklar 37 °C ve % 5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılmıştır.

İnkübasyona bırakılan 75cm²'lik flask her gün takip edilmiş ve 2 günde bir besiyeri 10 mL taze medium ile değiştirilmiştir. 75cm²'lik flask da % 80-90 oranında konfluent olunca hücreler tekrar tripsinizasyon/detripsinizasyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Bu şekilde tekrar ekilebilecek duruma getirilen ve bir 75cm²'lik flasktan elde edilmiş olan A549 hücreleri isteğe bağlı olacak şekilde 1:4-1:10 arasındaki bölünme oranlarında (split ratio) yeni 75cm²'lik flasklara ekilebilir. Ekim işlemi istenirse bir flasktan elde edilen hücrelerin toplam sayısı belirlendikten sonra da yapılabilir.

3.6 Hücrelerin Sayılması

Analizlerde kullanılmak amacıyla wellplate veya flasklara hücre ekilirken, her bir flaska veya wellplate aynı/yakın sayıda hücre ekilmesi esastır. Bu nedenle sunulan çalışmada LD dozları belirlenirken wellplatelere hücreler ekilmeden önce mL’de ne kadar hücre olduğu belirlenmiş, yani hücreler sayılmıştır. Bu amaçla tripan mavisi hücre sayım yöntemi kullanılmıştır. Tripin blue canlı hücrelerin ışık altında parlak görünmesini sağlayan bir boyadır. Sayım yapılacak lama uygulanan ve tripan mavisi ile boyanmış canlı hücreler mikroskop altında parlak görülürken, ölü hücreler mavi/mat olarak görülür. Sayım lamında her biri 16 kareden oluşan 4 sayım (A-D) bölgesindeki hücreler sayılarak ortalamaları alınır ve hücre sayımı yapılmış olur. Canlı hücre sayımında kullanılan lam Şekil 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3.2 Canlı hücre sayımında kullanılan neubauer lamı.

Sonrasında ise formül kullanılarak medium-hücre süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısı hesaplanır. Sayımın güvenilirliği açısından dilüsyon miktarı önemlidir. Ortalama hücre sayısının 50-150 arasında olması hücre süspansiyonunun ideal dilüsyona tabi tutulduğunun bir göstergesidir. Şayet ortalama hücre sayısı çok yüksek çıkarsa tripan mavisi – hücre karışımındaki hücre hacmi azaltılarak, tripan mavisi hacmi artırılarak daha dilüe hücre süspansiyonu elde ederek sayım tekrarlanır. Bu durumda dilüsyon

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

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

Sunulan çalışmalarda hücrelerin sayımı şu şekilde yapıldı. Flask tabanından tripsinizasyon ile kaldırılıp, detripsinizasyon ile tripsinden arındırılan hücreler, hücre yoğunluğuna göre 2-6 mL aralığında istenen hacimde çözülür. Bu çalışmada ise ortalama bir değer olarak hücreler 4 mL mediumda çözüldü. Hücre süspansiyonundan 50 µL alınarak, 50 µL tripan mavisi ile (dilüsyon oranı 2) karıştırıldı. Hücrelerin sayımında kullanılacak lam ve lamel (Neubauer counting chamber) hazırlandı. Hazırlanan tripan mavisi-hücre süspansiyonu karışımından pipetaj yapılarak, 10 µL alınarak Neubauer lamına uygun şekilde konuldu. Sayım bölgelerinde sayılan hücrelerin ortalamaları alınarak hücre süspansiyonunun mL'sinde kaç adet hücre olduğu formül yardımı ile bulundu. Sonrasında uygulamalarda kullanılacak hücre sayısına göre hücre süspansiyonundan kaç mL alınması gerektiği hesaplanarak, hücrelerle yapılacak manipülasyonlara geçildi.

3.7 MTT Hücre Viabilite Ölçüm Testi

Sitotoksik etkiler, sitotoksitenin değerlendirilmesinde devamlı olarak kullanılan enzimatik testlerden biri olan MTT yöntemi ile belirlendi. Bu yöntemde, MTT canlı hücrelere aktif olarak absorbe olur ve reaksiyon mitokondriyal suksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Dolayısı ile ölçülen absorbans değerleri canlı hücre sayısı çok olan kuyucuklarda yüksek iken, canlı hücre sayısı azaldıkça absorbans değerlerinde de düşme gözlenir. Böylelikle elde edilen absorbans değerleri kullanılarak ve kontrol grubu ile kıyaslama yaparak welllerdeki hücrelerin canlılık oranları hesaplanabilir.

Bu kapsamda sunulan çalışmada *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth.'in akciğer kanseri A549 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi şu şekilde belirlendi. MTT analizleri 96 kuyucuklu mikropalakalarla yapıldı. 2×10^4 hücre/mL de olacak şekilde hazırlanan hücre süspansiyonundan, 200 μ L alınarak 96 kuyulu mikropalaka kabının her kuyucuğuna aktarıldı. Uygun konsantrasyonlarda (uygulama dozlarınının 100 katı konstrasyonda) olacak şekilde DMSO de çözülerek hazırlanan *Verbascum lasianthum* Boiss. Ex Benth. çözeltileri, önceden planlanan kuyucuklara (kuyucuklarda bulunan hacmin %1 olacak hacimde) 2 μ L hacminde eklendi. Böylelikle A549 hücrelerine uygulanan son *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. konsantrasyonları 25 μ g/mL, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL, 200 μ g/mL, 500 μ g/mL ve 1000 μ g/mL şeklinde ayarlanmış oldu. Kontrol kuyucuklarına ise ekstraktlarda çözücü olarak kullanılan DMSO aynı hacimde (2 μ L) eklendi. Hücreler bu şekilde 37°C'de 24 saat süreyle inkübatörde (Panasonic MCO-18AC, Japan) inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa herbir kuyucuğun toplam hacminin yaklaşık %10'u hacminde (22 μ L) MTT boyası (5mg/mL) ilave edildi. MTT boyası eklenen hücreler 37°C'de 2-4 saat daha inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası well plate tabanında oluşan mor renkli formazan kristallerine zarar vermeden uzaklaştırıldı. Sonrasında her bir kuyucuğa 200 μ L DMSO eklenerek formazan kristallerinin çözünmesi sağlandı. Kuyucuklarda oluşan renk değişimi, ELISA plaka okuyucusunda (Biotek ELx800) 540 nm dalga boyunda belirlendi. *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, her bir kuyucuktaki hücrelerin canlılık oranları % canlılık olarak belirlendi (Günay vd. 2016, Ulaşlı vd. 2013). Böylelikle kuyucuklarda bulunan hücrelere uygulanan *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. ekstraktlarına ait her bir dozun A549 hücrelerindeki hücre canlılığına etkisi % canlılık oranı şeklinde belirlenmiş oldu.

MTT analizlerinden elde edilen *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. ekstraktlarına ait her bir dozun A549 hücrelerinde % canlılık oranları kullanılarak lethal dozlar (LD) belirlendi. Biyokimyasal ve genotoksisite analizleri için gerekli numunelerin temini için *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. dozu olarak LD₀ ile LD₅₀ dozları kullanılmıştır.

MTT uygulamaları sonucunda kontrol grubuna göre hücre canlılığını etkilemeyen *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. dozu LD₀ dozu olarak, MTT uygulamaları sonucunda kontrol grubuna göre hücre canlılığını %50 oranında azaltan *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. dozu ise LD₅₀ dozu olarak kabul edilmiştir. MTT uygulamaları sonucunda lethal dozlar belirlendikten sonra deney grupları oluşturulmuş ve biyokimyasal ve genotoksisite analizleri için gerekli olan numunelerin eldeleri için gerekli olan in-vitro uygulamalara geçilmiştir. Çalışmada oluşturulan gruplar ve ilgili gruplara yapılan uygulamalar Çizelge 3.3’de sunulmuştur.

Çizelge 3.3 Çalışmada oluşturulan deney grupları ve yapılan uygulamalar.

Gruplar*	Hücelere Yapılan Uygulamalar
Grup 1: Kontrol	Hücelere <i>Verbascum lasianthum</i> Boiss. ex Benth. ekstraktlarının çözücüsü olarak kullanılan DMSO uygun hacimde eklendi.
Grup 2: VL _{Metanol} (LD ₀)	DMSO’da çözülen <i>Verbascum lasianthum</i> Boiss. ex Benth. LD _{0(Metanol)} dozu uygulandı.
Grup 3: VL _{Metanol} (LD ₅₀)	DMSO’da çözülen <i>Verbascum lasianthum</i> Boiss. ex Benth. LD _{50(Metanol)} dozu uygulandı.
Grup 4: VL _{Aseton} (LD ₀)	DMSO’da çözülen <i>Verbascum lasianthum</i> Boiss. ex Benth. LD _{0(Aseton)} dozu uygulandı.
Grup 5: VL _{Aseton} (LD ₅₀)	DMSO’da çözülen <i>Verbascum lasianthum</i> Boiss. ex Benth. LD _{50(Aseton)} dozu uygulandı.

* Her bir grup 5 adet flaska ekilen hücrelerden oluşturulmuştur. Biyokimyasal ve genotoksisite analizleri için gerekli hücreler 75 cm²’lik flasklarda çoğaltılmıştır. Hücelere DMSO içerisinde çözülerek farklı dozlarda uygulanan bitki ekstraktları uygulama hacimleri toplam hacmin % 1’i olacak şekilde eklenmiştir, VL_{Metanol}; *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. metanol ekstraktı, VL_{Aseton}; *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. aseton ekstraktı, LD₀; Hücrelerde herhangi bir sitotoksisiteye neden olmayan doz, LD₅₀; Hücrelerin %50’sinin ölmesine neden olan doz.

A549 hücrelerinde *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth.’in oksidatif strese, genotoksisiteye ve inflamasyona etkilerinin belirleyebilmek amacıyla oluşturulan deney modelinde, hücrelerden oluşturulan 5 deney grubuna öngörülen uygulamalar (Çizelge 3.3) yapılmıştır. Her bir grupta en az 5 tekrar yapılarak laboratuvar analizlerinde kullanılan numuneler (hücre lizatlarının) hazırlanmıştır. Ayrıca hücrelerin üretilmesi ve öngörülen deneysel model ile ilgili uygulamaların yapılması için gerekli malzemeler ve analizler ile ilgili bilgilere bu bölümde ayrıntılı bir şekilde yer verilmiştir.

3.8 Biyokimyasal Analizlerde Kullanılacak Hücre Lizatlarının Hazırlanması ve Yapılan Biyokimyasal Analizler

Deney gruplarına yapılan uygulamalar, tripsinizasyon ve detripsinizasyon sonrası 15mL'lik falkonların dibinde elde edilen hücre peletleri son olarak PBS ile yıkandı. Sonrasında hücre peletleri üzerine lizis tamponu eklendi. Kullanılan lizis tamponu PBS tamponu (pH 7,4) içerisine %8 oranında proteaz inhibitör kokteyli (Roche Complete Tablet, Germany) eklenerek hazırlanmıştır. Hücre peleti üzerine 1 mL lizis tamponu konduktan sonra pipetaj yapılarak ve numuneler vorteksenerek (Isolab, 622.01.001, Germany) homojen bir karışım oluşması sağlandı. Sonrasında 20 saniye sonikasyona (Bandelin, GM2070, Germany) tabi tutuldu. 40 saniye beklendi. Sonikasyon işlemi bu şekilde 10 tur tekrarlandı. Sonikasyon işlemi soğuk zincirde gerçekleştirildi.

Sonikasyon sonucunda hücre/organel içi sıvıların lizis tamponuna geçmesi sağlandı. Tüm uygulamalara rağmen lizis tamponunda çözünmeyen proteinler 8500 rpm'da, 4°C'de 10 dakika süre ile santrifüj edilerek çöktürüldü. Bu şekilde elde edilen süpernatantlar hücre lizatı olarak biyokimyasal analizlerde kullanıldı. Analizlerde blank olarak lizis tamponu kullanıldı. Oksidatif stres parametreleri olan TAS, TOS analizleri ticari kitler (Rell Assay, Gaziantep Türkiye) kullanılarak spektrofotometrik olarak yapıldı. Proinflamatuvar sitokin düzeyleri ise human spesifik ELISA kitleri (Elabscience) kullanılarak, mikropate okuyucuda (Biotek ELx800) 540 nm'de belirlendi.

Deney gruplarında yapılan uygulamalar sonrası elde edilen hücre lizatlarında gerçekleştirilen total protein, oksidatif stres düzeyleri, genotoksisite ve proinflamatuvar stokin seviyelerinin analizinde kullanılan metodoloji özetlenerek bundan sonraki başlıklarda sunulmuştur.

3.8.1 Hücre Lizatlarında Total Protein Analizi

Hücre lizatında çalışılacak parametrelerin sonuçlarının hesaplanmasında kullanılan total protein seviyeleri ticari kit (Sigma-Aldrich, USA) ile ELİSA (Biotek ELx800, Vermont, US) cihazında ölçüldü. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250, negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın

kırmızı ve mavi formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Yapılan analizde total protein içeriği bilinmeyen 6 µL numune ve 62,5-4000 µg/mL konsantrasyonu aralığındaki (62,5 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL, 2000 µg/mL ve 4000 µg/mL) 7 standart 96'lık plaktaki wellere eklendi. Üzerlerine zaman geçirmeden multikanal pipetle 300 µL Coomassie brilliant blue reaktifi eklendi. Microwellerde oluşan mavi renkli komplekslerin absorbansları 595 nm de ölçüldü. Bu şekilde belirlenen protein düzeyleri g/L veya mg/mL şeklinde ifade edildi.

Numunelere ait olan total protein seviyeleri biyokimyasal analizlerde elde edilen verilerin normalize edilmesinde kullanıldı. Bu amaçla her bir numuneye ait oksidatif stres parametreleri ve proinflatuvar stokinlerin analizler sonucu elde edilen veriler, her bir numunenin kendi total protein düzeyine bölünerek ham veriler elde edildi.

3.8.2 Total Antioksidan Statü (TAS) Düzeyleri Analizi

Oksidatif stres parametresi olarak TAS seviyeleri spektrofotometrik yöntemle çalışan ticari kitler (Rell Assay, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. TAS seviyelerinin belirlenebilmesi amacıyla standart olarak 0,5-2 mmol aralığında Trolox kullanıldı. Bu amaçla kitle birlikte tedarik edilen üç standart kullanılarak (0,5 mmol trolox, 1mmol trolox ve 2 mmol trolox) ELISA okuyucudan alınan kalibrasyon grafine göre TAS düzeyleri belirlendi. Seviyeleri belirlenen serum TAS düzeyleri numunelerin total protein düzeylerine bölünerek mmol Trolox Equivalent/g-protein şeklinde ifade edildi.

3.8.3 Total Oksidan Statü (TOS) Düzeyleri Analizi

Oksidatif stres parametresi olarak TOS seviyeleri spektrofotometrik yöntemle çalışan ticari kitler (Rell Assay, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak kit protokolünde verilen ve aşağıda sunulan formül kullanılarak TOS seviyeleri hesaplandı.

$$\text{TOS } (\mu\text{M hidrojen peroksitEquiv./L}) = \left[\frac{(\Delta\text{Absnumune})}{(\Delta\text{Absstandart})} \right] \cdot 20$$

Bulunan TOS sonuçlarının birimi μmol hidrojen peroksit equivalent litre ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L) olarak bulundu. Daha sonra elde edilen sonuçlar her bir numunenin kendi total protein düzeyine bölünerek hücrelerdeki TOS seviyeleri $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./g protein şeklinde belirlendi (Hazman vd. 2016).

3.8.4 Oksidatif Stres İndeksi (OSI) Seviyelerinin Belirlenmesi

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

$$\text{Oksidatif Stres İndeksi (OSI)} = \left[\frac{\text{TOS}}{\text{TAS}} \right]$$

3.8.5 İnflamatuvar Stokin (TNF- α , IL-6 ve TGF- β 1) ve Beta Defensin-1 Seviyelerinin Belirlenmesi

Verbascum lasianthum Boiss. Ex Benth.'e ait aseton ve metanol ekstraktlarının LD₀ ve LD₅₀ dozlarında A549 hücrelerinde inflamatuvar/antiinflamatuvar etkilerinin olup olmadığını belirlemek amacıyla TNF- α , IL-6, TGF- β 1 (Elabscience, China) düzeyleri ELISA cihazıyla (Biotek ELx800, US) spesifik ELISA kitleri kullanılarak belirlendi.

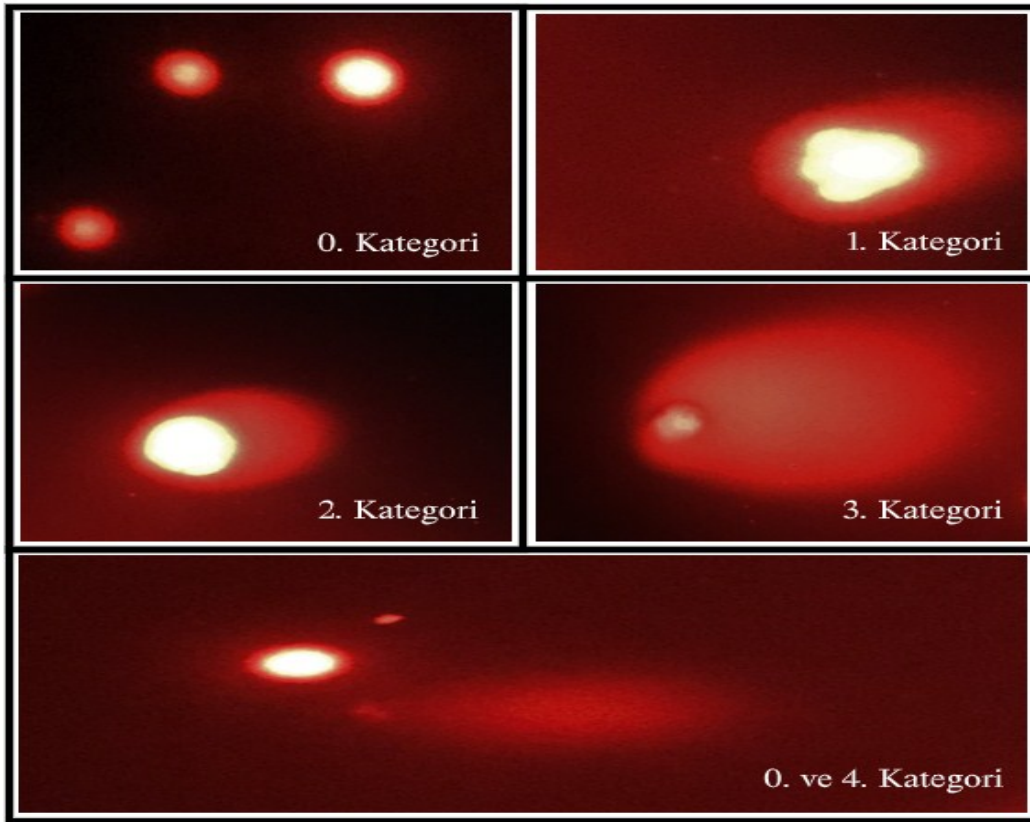
Ayrıca sunulan çalışmada proinflamatuvar moleküllerin etkisiyle özellikle akciğer epitel hücreleri ve immun hücrelerinde sentez ve salınımı artarak antimikrobiyal ve antikanserojen etkileri olabilen Beta-Defensin-2 (DEF- β 2) düzeyleri de human spesifik ticari ELISA kiti (Elabscience, China) yardımıyla analiz edilmiştir (Schutte ve McCray 2002, Álvarez vd. 2018).

Kitlerle birlikte verilen standartlar kullanılarak her bir analiz için ayrı bir kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Sonrasında oluşturulan kalibrasyon eğrileri kullanılarak hücre

lizatlarındaki stokin seviyeleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar her bir numunenin total protein seviyelerine bölünerek normalize edildi. Stokin seviyeleri pg/mg-protein olarak ifade edildi.

3.8 Komet Testi ile Genotoksisite Düzeylerinin Belirlenmesi

Komet testi tek hücreli jel elektroforezi (SCGE) olarak da bilinmektedir. Agaroz jel içinde gömülmüş hücrelerin parçalanmasından sonra elektroforez işlemi ile yürütülmesine dayanır. Elektroforez işlemi anında hasar görmemiş DNA'lar oldukları yerde kalırken, kırıklar ilerler. Kırılmış DNA parçaları kuyruklu yıldız şeklinde bir yapı oluşturarak anoda doğru uzanır. Daha sonra bu kuyruklu yıldız şeklindeki DNA, DNA bağlayıcı bir boya (örneğin etidyum bromür) kullanılarak görünür hale getirilir. DNA'da oluşmuş hasarın derecelerini değerlendirmek için kuyruklu yıldızın şekli, boyutu ve içindeki DNA miktarı ölçülür. Komet testi analiz protokolü çeşitleri DNA çapraz bağları, tek iplik kırıkları ve çift iplik kırıklarının ölçülmesidir. (Şekil 3.3)'de DNA hasar dereceleri gösterilmiştir.



Şekil 3.3 DNA hasar dereceleri.

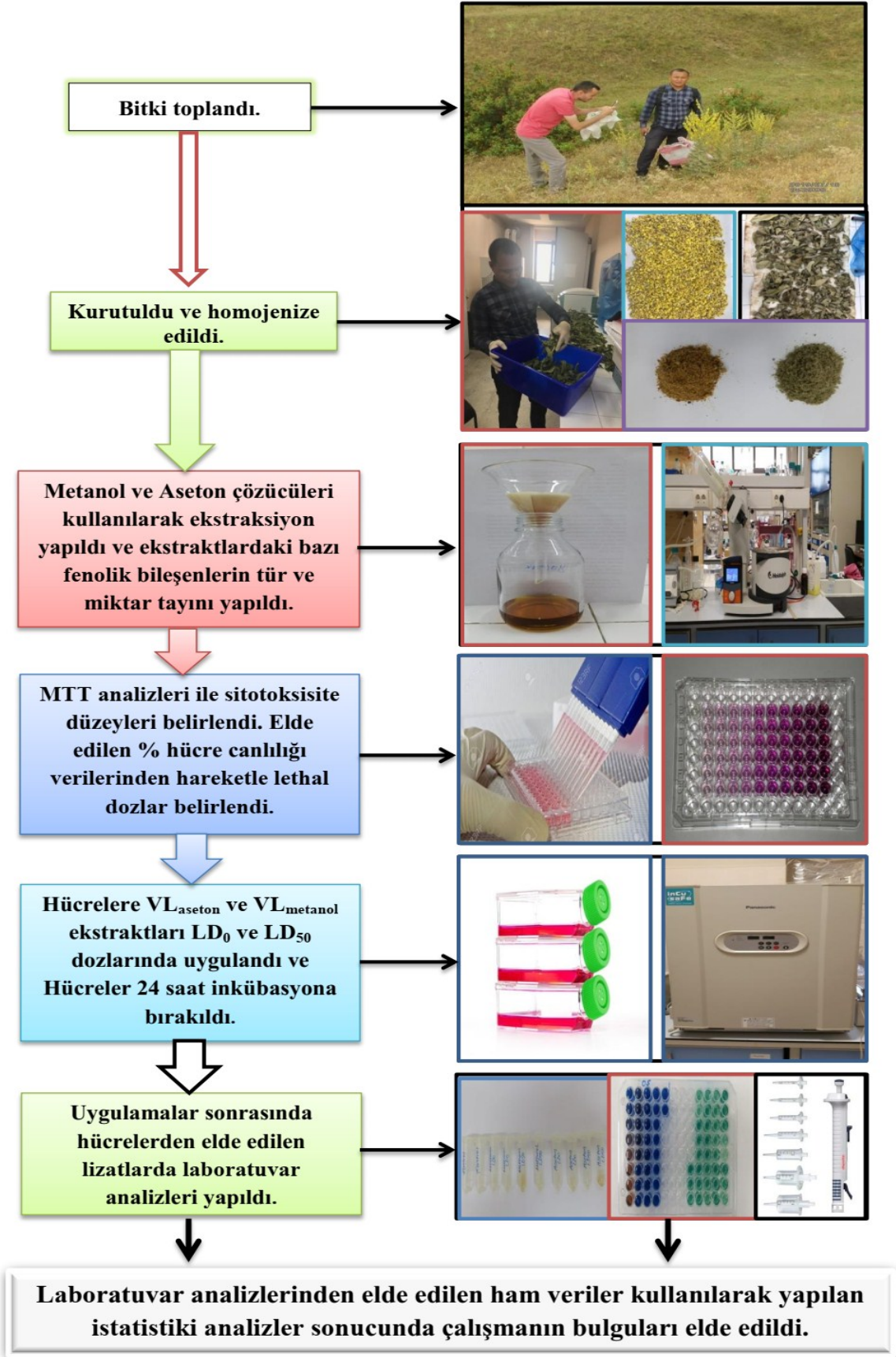
Hasar derecesi sınıf (0) olan DNA'nın sadece kafa kısmı bulunur. Hasar derecesi sınıf (1) olan DNA'nın kafa kısmı ile birlikte kuyruk kısmı az belirmiş şekilde görülür. Hasar derecesi sınıf (2) olan DNA'da ise kafa kısmı kadar kuyruk uzunluğu da görülmektedir. Sınıf (3) derecesine sahip olan hasarlı DNA ise kafa kısmı oldukça küçülmüş, kuyruk kısmı oldukça uzun görülür. Sınıf (4) derecesine sahip olan hasarda ise DNA gözlenemeyecek derecede veya çok az gözlenebilir duruma gelir.

A549 hücrelerine *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth.'e ait aseton ve metanol ekstraktlarının LD₀ ve LD₅₀ dozlarında uygulandığı zaman genotoksisiteyi nasıl etkilediğini belirlemek Çizelge 3.2'de belirtilen deney gruplarına gerekli uygulamalar yapıldıktan 24 saat sonra hücreler tripsinizasyon ve detripsinizasyonla flask tabanından toplanmıştır. 1 mL PBS içinde oluşturulan deney gruplarına ait hücre süspansiyonları pipetajla kibarca homojenize edildikten sonra analizlerde kullanılmıştır.

Bu amaçla hücre süspansiyonundan 20 µL alınarak ependorf içerisinde 100 µL low melting agaroz (LMA) ile karıştırıldı. Ependorf içindeki hücre-LMA karışımının hepsi alınarak bir gün önceden normal melting agaroz (NMA) ile muamele edilerek hazırlanmış lamlara prepara edildi. Liziz ve elektroforez aşamalarını takiben her bir preparat boyandı. Boyanan preparatlar floresans mikroskopta 100 hücre olacak şekilde sayılarak skorlandı (Singh vd. 1988).

3.9 İstatistik Analizler

Elde edilen veriler ortalama ± standart sapma (SD) şeklinde tanımlandı. MTT analizlerinden elde edilen % hücre canlılığı verileri yardımı ile Epa Probit Analiz Programı (Sürüm 1.5) kullanılarak LD/EC dozları (LD₅₀, LD₀ gibi) belirlendi. Biyokimyasal ve genotoksisite ile ilişkili verilerin değerlendirilmesinde ise SPSS 18 programı kullanıldı. Elde edilen verilerde gruplar arasında istatistik farklılığın olup olmadığı parametrik testlerden birisi olan ANOVA testi yardımıyla belirlendi. İstatistik farklılık olduğu anlaşılan parametrelerde ise hangi gruplar arasında istatistik açıdan farklılık olduğu Duncan post testi kullanılarak belirlendi. Çalışmanın başlangıcından itibaren bulgular elde edilinceye kadar yapılan uygulamalarla ilişkin iş-akış şeması Şekil 3.4'te sunulmuştur.



Şekil 3.4 Çalışmanın başlangıcından bulguların elde edilmesine kadar yapılan iş-akış diyagramı.

4. BULGULAR

Sunulan çalışmada yapılan laboratuvar analizleri 4 aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada metot kısmında belirtilen şekilde toplanarak ekstraksiyonu gerçekleştirilen *Verbascum lasianthum* Boiss. Ex Benth. Türüne ait aseton ekstraktı (VL_{aseton}) ve metanol ekstraktı ($VL_{metanol}$) kullanılarak fenolik bileşen analizi gerçekleştirilmiştir. İkinci aşamada küçük hücreli olmayan akciğer adenokarsinom (A549) hücrelerinde VL_{aseton} ve $VL_{metanol}$ ekstraktlarının sitotoksosite düzeyleri belirlenmiştir. Üçüncü aşamada sitotoksosite analizleri sonucunda elde edilen verilerden yola çıkılarak hesaplanan VL_{aseton} ve $VL_{metanol}$ ekstraktlarına ait uygun lethal dozlar (LD_0 ve LD_{50} dozları) A549 hücrelerine uygulanmıştır. Dördüncü ve son aşamada ise LD_0 ve LD_{50} dozlarında VL_{aseton} ve $VL_{metanol}$ ekstraktları uygulanan hücrelerden elde edilen numunelerde oksidatif stres, inflamasyon ve genotoksosite düzeylerini belirlemeye yönelik laboratuvar analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar kaydedilmiş ve istatistiksel yöntemlerle değerlendirilmiştir. Bulgular başlığı altında laboratuvar analizlerinden elde edilen verilerin değerlendirmeleri sırasıyla sunulmuştur.

4.1 *Verbascum Lasianthum* Boiss. ex Benth. Metanol ve Aseton Ekstraktlarının Fenolik Bileşen Türleri ve Miktarları

Bitki ekstraktlarındaki bazı fenolik bileşenlerin türleri ve miktarları sunulan tez metninin metaryal metot kısmında ifade edildiği üzere LC-MS/MS sistemi yardımıyla, 53 farklı standart kullanılarak geliştirilen ve validasyonu yapılmış bir yöntem kullanılarak belirlenmiştir (Yılmaz 2020). Ekstraktlar içerisinde miktarları belirlenen ve Çizelge 4.1’de sunulan fenolik asit türlerinin miktarları mg-analit/g-ekstrakt şeklinde ifade edilmiştir.

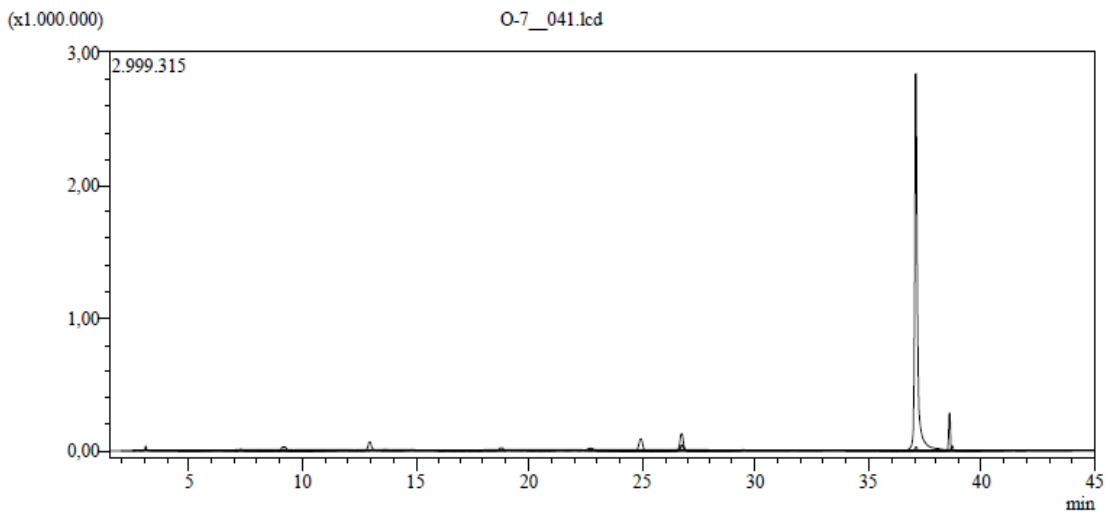
Çizelge 4.1 genel anlamda incelendiğinde VL_{aseton} ekstraktındaki bileşen sayısının $VL_{metanol}$ ekstraktına oranla çok az miktarda (sadece 3 bileşen) tespit edildiği görülmektedir. Bunun anlamı VL_{aseton} ekstraktında varlığı ve varsa hangi miktarda olduğu araştırılan 53 standart bileşenden sadece 3’ünün belirli oranlarda var olduğudur. Bu standartların dışında kalan birçok maddenin $VL_{metanol}$ ekstraktına oranla VL_{aseton} ekstraktında daha fazla olabileceği düşünülebilir.

Çizelge 4.1 Metanol ve aseton ekstraktlarındaki bazı fitokimyasalların türleri ve miktarları.

Sıra No	Analizi Gerçekleştirilen Bileşenler	Konsantrasyon (mg analit/g ekstrakt)	
		VL _{Aseton} Ekstraktı	VL _{Metanol} Ekstraktı
1	Quinic acid	2,614	2,368
2	Caffeic acid	0,004	0,399
3	O-Coumaric acid	0,019	0,042
4	Vanillin	Tespit Edilemedi	0,257
5	Hesperidin	Tespit Edilemedi	2,508
6	Fumaric acid	Tespit Edilemedi	1,258
7	Protocatechuic acid	Tespit Edilemedi	0,243
8	Protocatechuic aldehyde	Tespit Edilemedi	0,125
9	Chlorogenic acid	Tespit Edilemedi	0,663
10	p-Coumaric acid	Tespit Edilemedi	0,764
11	Salicylic acid	Tespit Edilemedi	0,056
12	Cyanoside	Tespit Edilemedi	2,599
13	isoquercitrin	Tespit Edilemedi	0,035
14	Rutin	Tespit Edilemedi	2,623
15	Cosmosiin	Tespit Edilemedi	0,181
16	Quercetin	Tespit Edilemedi	0,076
17	Luteolin	Tespit Edilemedi	9,431
18	Hesperetin	Tespit Edilemedi	0,010
19	Naringenin	Tespit Edilemedi	0,032
20	Kaempferol	Tespit Edilemedi	0,015
21	Apigenin	Tespit Edilemedi	0,410
22	Daidzin	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
23	Piceid	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
34	Coumarin	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
35	Aconitic acid	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
26	Gallic acid	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
27	Gentisic acid	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
28	Epigallocatechin	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
29	Catechin	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
30	Tannic acid	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
31	4-OH Benzoic acid	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
32	Epigallocatechin gallate	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
33	Cynarin	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
34	Vanilic acid	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
35	Epicatechin	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
36	Syringic acid	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
37	Syringic aldehyde	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
38	Epicatechin gallate	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
39	Sinapic acid	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
40	Chrysin	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
41	Miquelianin	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
42	Genistin	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
43	Ellagic acid	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
44	Rosmarinic acid	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
45	Fisetin	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
46	Quercitrin	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
47	Astragalin	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
48	Nicotiflorin	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
49	Daidzein	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
50	Genistein	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
51	Amentoflavone	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
52	Acacetin	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi
53	Ferulic acid	Tespit Edilemedi	Tespit Edilemedi

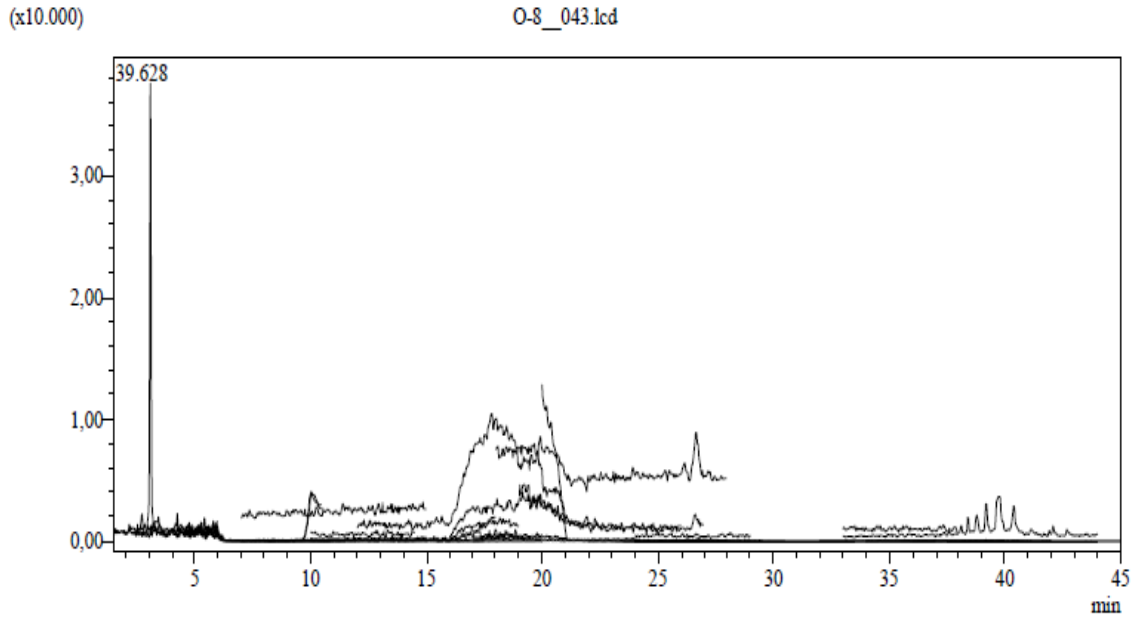
Kısaltmalar: VL_{Metanol}; *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. metanol ekstraktı, VL_{Aseton}; *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. aseton ekstraktı.

VL_{aseton} ekstraktında varlığı belirlenen bileşenler (quinik asit, kafeik asit ve o-kumarik asit) arasında quinik asit miktarlarının (2,614 mg analit/g-ekstrakt) diğerlerine oranla daha çok olduğu belirlendi. VL_{metanol} ekstraktında ise 53 bileşenden 21'inin farklı oranlarda varlığı ve miktarları belirlendi. Çizelge 4.1 incelendiğinde VL_{metanol} ekstraktında binde bir (% 0,1) başka bir ifade ile bir gram ekstrakta bir mg ve üzeri düzeylerde bulunan altı adet fenolik bileşenin varlığı tespit edildi. Bunlar büyükten küçüğe sırasıyla; luteolin (9,431 mg analit/g-ekstrakt), rutin (2,623 mg analit/g-ekstrakt), cyranoside (2,599 mg analit/g-ekstrakt), hesperidin (2,508 mg analit/g-ekstrakt) quinik asit (2,368 mg analit/g-ekstrakt) ve fumarik asit (1,258 mg analit/g-ekstrakt) şeklinde sıralanabilir. VL_{metanol} ekstraktında sekiz fenolik bileşenin ise 1-0,1 mg analit/g-ekstrakt düzeyinde olduğu belirlendi. Bu bileşenler bulunma miktarları büyükten küçüğe olacak şekilde sırasıyla p-kumarik asit, klorojenik asit, apigenin, kafeik asit, vanilin, protokateşik asit, kozmosin (apigetrin) ve protokateşik aldehit şeklinde sıralanabilir. VL_{metanol} ekstraktında varlığı ve miktarı belirlenen 7 fenolik bileşenin ise ekstrakt içerisinde 0,1 mg analit/g-ekstrakt düzeyinden daha düşük miktarlarda olacak şekilde (eser düzeylerde) olduğu belirlendi. Bir gram ekstrakta 100 µg'dan daha az düzeyde bulunan fenolik bileşenler bulunma miktarları büyükten küçüğe olacak şekilde sırasıyla quersetin, salisilik asit, o-kumarik asit, izoquersitrin, naringenin, kaempferol ve hesperetin şeklinde sıralanabilir. VL_{metanol} ve VL_{aseton} ekstraktlarının fenolik bileşen analizi sonrasında LC-MS/MS sisteminden elde edilen kromogramlar Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de sunulmuştur.



Şekil 4.1 VL_{metanol} ekstraktının fenolik bileşen analizi sonrasında LC-MS/MS sisteminden elde edilen kromogram.

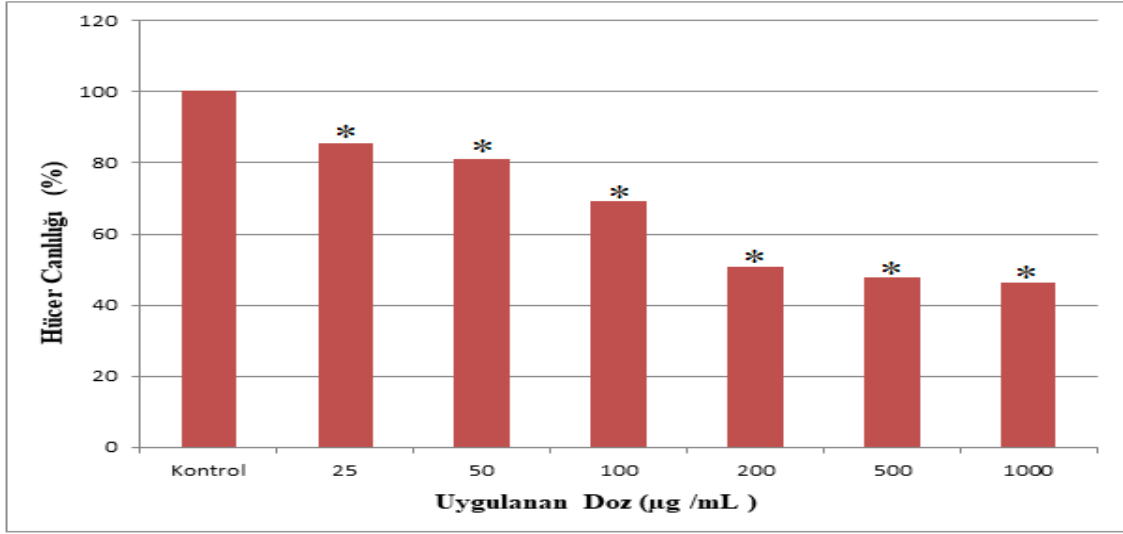
Kromotogramların incelenmesinden de anlaşılacağı üzere yapılan analizler sonucunda varlığı araştırılan 53 fenolik bileşenden 32'sinin VL_{metanol} ekstraktında olmadığı (Çizelge 4.1) varsa bile LC-MS/MS sisteminde tespit edilebilme limitlerinin altında olduğu ve bu nedenle ihmal edilebilir seviyelerde kaldığı (Şekil 4.1) belirlenmiştir. VL_{aseton} ekstraktına ait kromotogram (Şekil 4.2) incelendiğinde ise sadece 3 bileşene ait pik olduğu LC-MS/MS sisteminde tespit edilebilmiştir.



Şekil 4.2 VL_{Aseton} ekstraktının fenolik bileşen analizi sonrasında LC-MS/MS sisteminde elde edilen kromogram.

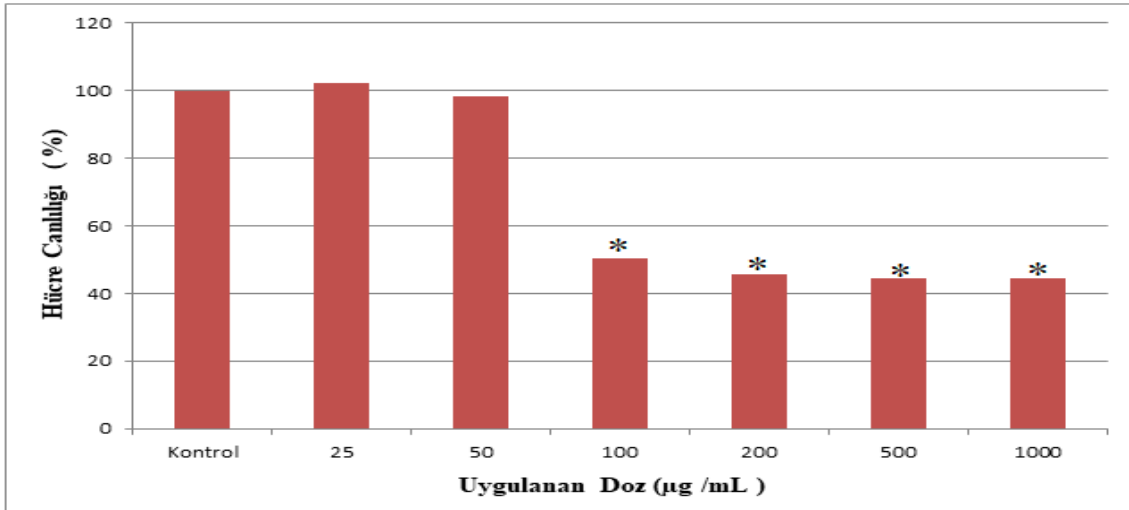
4.2 A549 Hücrelerinde *Verbascum Lasianthum* Boiss. ex Benth. Ekstraktlarının Sitotoksosite Düzeyleri

Verbascum lasianthum Boiss. Ex Benth. Türüne ait aseton ve metanol ekstraktlarının A549 hücrelerindeki sitotoksisiteleri MTT yöntemi ile belirlendi. Ekstraktların sitotoksisitelerinin belirlenebilmesi için DMSO'da çözülen ekstraktlar hücrelere altı farklı konsantrasyonda (25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 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 (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).



Şekil 4.3 Farklı dozlardaki VL_{Aseton} ekstraktının A549 hücrelerinde % hücre canlılığına etkisi. * Hücre canlılığının kontrol grubuna göre istatistiki (p<0,05) düzeyde farklı olduğunu ifade etmektedir.

A549 hücrelerine farklı dozlarda VL_{aseton} ekstraktı uygulandığında toksisitenin 25 µg/ml dozundan itibaren kontrol grubuna göre sitotoksik etkili olduğu ve söz konusu sitotoksitenin artan doza paralel olacak şekilde artış gösterdiği (Şekil 4.3) belirlendi. Hürelere VL_{metanol} ekstraktı uygulandığında ise toksisitenin 100 µg/ml dozundan sonra istatistiki düzeyde (p<0,05) kontrol grubuna göre farklılık gösterdiği belirlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Farklı dozlardaki VL_{Metanol} ekstraktının A549 hücrelerinde % hücre canlılığına etkisi. * Hücre canlılığının kontrol grubuna göre istatistiki (p<0,05) düzeyde farklı olduğunu ifade etmektedir.

MTT analizlerinde elde edilen veriler yardımıyla Epa Probit Analiz programı (Version 1.5) kullanılarak VL_{metanol} ve VL_{aseton} ekstraktlarının A549 hücrelerindeki lethal dozları (Çizelge 4.2) hesaplanmıştır. Hesaplanan lethal dozlardan ikisi (LD₀ ve LD₅₀ dozları) VL_{metanol} ve VL_{aseton} ekstraktlarının A549 hücrelerindeki etkilerinin araştırılması amacıyla kullanılmıştır.

Çizelge 4.2 VL_{Metanol} ve VL_{Aseton} ekstraktlarının A549 hücrelerine ait lethal dozlar (LD).

Lethal Dozlar* (LD_s)	VL_{metanol} ekstraktına ait lethal dozlar (µg/mL)	VL_{aseton} ekstraktına ait lethal dozlar (µg/mL)
LD ₀	4,023	0,432
LD ₅	15,057	3,342
LD ₁₀	30,433	9,947
LD ₁₅	48,932	20,768
LD ₅₀	364,238	466,321

* VL_{Metanol} ve VL_{Aseton} ekstraktlarının A549 hücrelerindeki lethal dozları yardımıyla Epa Probit Analiz programı (Version 1.5) kullanılarak hesaplanmıştır. Kısaltmalar: VL_{Metanol}; *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. metanol ekstraktı, VL_{Aseton}; *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. aseton ekstraktı.

Sunulan çalışmada kullanılan lethal dozlardan olan LD₅₀ dozu, hücrelerin en az yarısının ölmesine sebep olan bitki ekstraktı dozudur. Başka bir ifade ile antikanserojenik dozdur. LD₀ dozu ise 24 saat inkübasyon sonunda herhangi bir ölüm veya proliferasyona neden olmayan bitki ekstraktı dozunun konsantrasyonunu ifade etmektedir. Bu doz kanser hücrelerinde herhangi bir proliferasyona neden olmadığı için, organizmada diğer hücrelerde kanser nedeniyle oluşmuş olan oksidatif stres, inflamasyon vb. Durumları düzeltmek amacıyla, başka bir ifade ile kanser hücrelerine uygulanan bir tedavinin yan etkilerini azaltmak için tercih edilebilecek dozudur. Çünkü daha düşük dozlardaki antioksidan etkili maddeler kanser hücrelerinin üremesine pozitif katkı sağlamaktadır. Bu nedenle kanser hastası olan bireyler bitkisel/antioksidan takviyeler ile tedaviye katkı sağlama yolunda bir uzman gözetiminde olmalı ve alınacak takviye kliniklerde tedaviye faydası kanıtlanmışsa uygulamaya alınmalıdır. Aksi takdirde kanser hastalarında tedavi olumsuz etkilenebilir. Bu nedenle bitkiler/aktif maddelerle in-vivo ve in-vitro modellemelerle yapılan kanser araştırmaları her zaman tedaviye katkı sağlayabilecek bilgilerin oluşturulması/geliştirilmesi açısından önem arz etmektedir.

4.3 *Verbascum Lasianthum* Boiss. ex Benth. Ekstraktlarının A549 Hücrelerinde Oksidatif Strese Etkisi

Sunulan çalışmada A549 hücrelerinde VL_{metanol} ve VL_{aseton} ekstraktlarına ait iki doz kullanılarak (LD₀ ve LD₅₀ dozları) hem antikanser etkileri belirlenmeye çalışılmış, hem de düşük doz uygulamalarında VL_{metanol} ve VL_{aseton} ekstraktlarının tedavi edici etkilerinin varlığı/yokluğu belirlenmeye çalışılmıştır. Söz konusu tedavi edici etkilerin belirlenebilmesi amacıyla VL_{metanol} ve VL_{aseton} ekstraktlarının A549 hücrelerinde oksidatif strese etkileri incelenmiştir. A549 hücrelerine VL_{metanol} ve VL_{aseton} ekstraktı uygulanan deney gruplarında oksidatif stres düzeylerinin belirlenebilmesi amacıyla hücre lizatlarında TAS, TOS ve OSI düzeyleri analiz edilmiştir. Elde edilen bulgular Çizelge 4.3'te paylaşılmıştır.

Çizelge 4.3 VL_{Metanol} ve VL_{Aseton} ekstraktlarının A549 Hücrelerinde TAS, TOS ve OSI düzeylerine etkileri.

Deney Grupları	TAS (mmolTrolox Equiv./g- protein)	TOS (µmol H ₂ O ₂ -Equiv./g- protein)	OSI (Arbitrary Unit)
Kontrol	0,26 ± 0,03 ^c	9,46 ± 1,25 ^b	36,63 ± 6,09 ^c
VL _{Methanol} (LD ₀)	0,11 ± 0,01 ^a	3,42 ± 0,18 ^a	30,64 ± 3,39 ^b
VL _{Methanol} (LD ₅₀)	0,12 ± 0,01 ^{a,b}	3,46 ± 0,31 ^a	27,05 ± 0,92 ^{a,b}
VL _{Aseton} (LD ₀)	0,12 ± 0,01 ^{a,b}	3,58 ± 0,40 ^a	28,43 ± 3,65 ^{a,b}
VL _{Aseton} (LD ₅₀)	0,14 ± 0,01 ^b	3,55 ± 0,28 ^a	25,16 ± 3,15 ^a
P	0,000	0,000	0,001

* Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir (n=5)

^{a,b,c}: Aynı sütunda farklı üslü ifadeleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p < 0,05). Kısaltmalar: TAS; Total antioksidan statü, TOS; Total oksidan statü, OSI; Oksidatif stres indeksi, VL_{Metanol}; *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. metanol ekstraktı, VL_{Aseton}; *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. aseton ekstraktı, LD₀; Hücrelerde herhangi bir sitotoksositeye neden olmayan doz, LD₅₀; Hücrelerin %50'sinin ölmesine neden olan doz

Veriler incelendiğinde kontrol grubu TAS, TOS ve OSI düzeylerinin diğer gruplara oranla istatistiksel düzeyde farklı ve yüksek olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber VL_{metanol} ve VL_{aseton} ekstraktlarının A549 hücrelerine LD₀ veya LD₅₀ dozunda uygulanması sonrasında TAS, TOS ve OSI düzeylerini fazla değiştirmedikleri, başka bir ifade ile farklı dozlarda VL_{metanol} ve VL_{aseton} ekstraktlarının kullanılmasının oksidatif stres üzerinde herhangi bir farklılık oluşturmayacağı belirlenmiştir.

4.4 *Verbascum Lasianthum* Boiss. ex Benth. Ekstraktlarının A549 Hücrelerinde DNA Hasarına Etkisi

A549 hücrelerinde VL_{metanol} ve VL_{aseton} ekstraktlarının genotoksisiteye etkisini belirleyebilmek için komet testi ile DNA hasarı düzeyleri belirlendi (Çizelge 4.4). Veriler incelendiğinde LD₀ dozunda VL_{metanol} ve VL_{aseton} uygulanan deney gruplarına ait DNA hasar skorlarının kontrol grubundan istatistiki düzeyde bir farkı olmadığı görüldü.

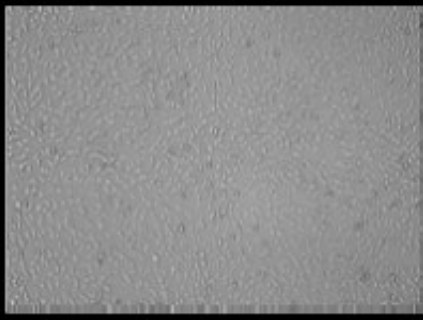

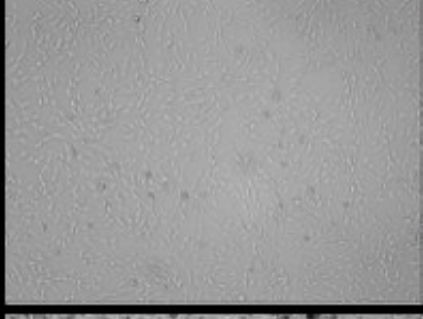

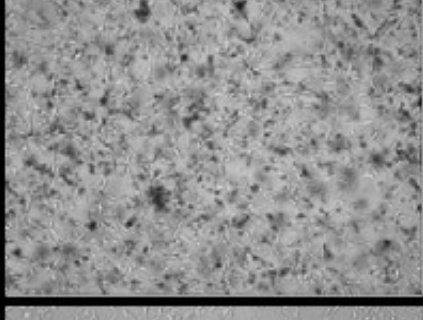
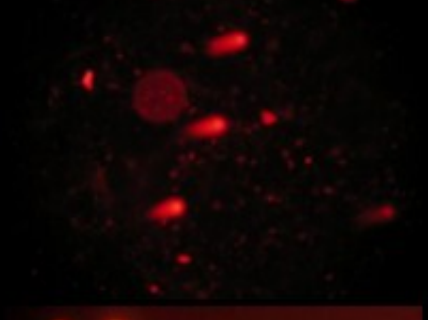
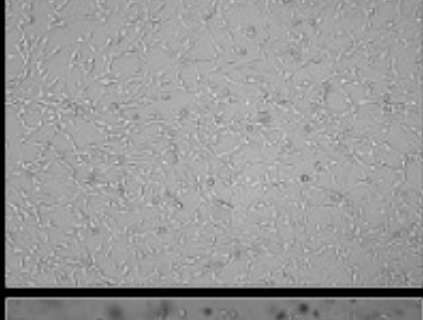
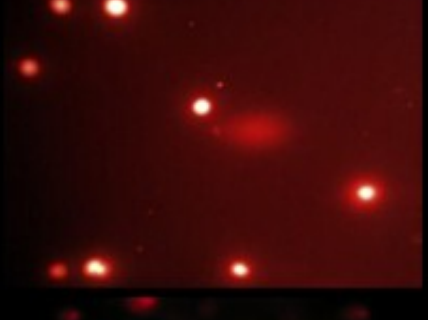
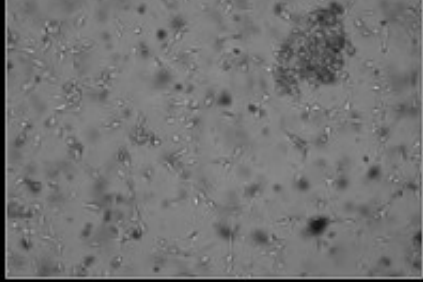
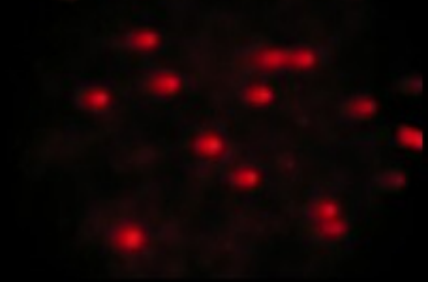
Çizelge 4.4 VL_{Metanol} ve VL_{Aseton} ekstraktlarının A549 hücrelerinde DNA hasarına etkisi.

Deney Grupları	Comet Skorları (AU)
Kontrol	6,67±2,31 ^a
VL _{Methanol} (LD ₀)	7,34±2,08 ^a
VL _{Methanol} (LD ₅₀)	10,67±1,53 ^{a,b}
VL _{Aseton} (LD ₀)	8,34±1,55 ^{a,b}
VL _{Aseton} (LD ₅₀)	12,00±3,46 ^b
P	0,071

Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir (n=5)

a,b,c: Aynı sütunda farklı üslü ifadeleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p < 0,05). Kısaltmalar: VL_{Metanol}; *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. metanol ekstraktı, VL_{Aseton}; *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. aseton ekstraktı, LD₀; Hücrelerde herhangi bir sitotoksisiteye neden olmayan doz, LD₅₀; Hücrelerin %50'sinin ölmesine neden olan doz.

A549 hücrelerine VL_{metanol} ekstraktı LD₅₀ dozunda uygulandığında ise kontrol grubuna oranla DNA hasarı düzeyleri artış göstereceği bu artışın istatistiki düzeyde bir fark oluşturmadığı görüldü. Bununla birlikte VL_{aseton} ekstraktı A549 hücrelerine LD₅₀ dozunda uygulandığında DNA hasarı düzeylerinin kontrol grubundan istatistiki düzeyde farklı ve yüksek olduğu belirlendi. Deney gruplarına ait hücrelerin mikroskop görüntüleri ile komet testinin değerlendirilmesinde kullanılan preparatların mikroskop görüntüleri Şekil 4.5'te sunulmuştur.

Deney Grupları	Hücelere ait mikroskop görüntüleri	Comet testinde kullanılan mikroskop görüntüleri
Grup 1 <i>Kontrol</i>		
Grup 2 <i>VL(LD0)Metanol</i>		
Grup 3 <i>VL(LD50)Metanol</i>		
Grup 4 <i>VL(LD0)Aseton</i>		
Grup 5 <i>VL(LD50)Aseton</i>		

Şekil 4.5 Deney gruplarına ait hücre ve komet testi mikroskop görüntüleri.

4.5 *Verbascum Lasianthum* Boiss. ex Benth. Ekstraktlarının A549 Hücrelerinde İnflamasyona Etkisi

Sunulan çalışma kapsamında A549 hücrelerinde ve akciğerde inflamasyonun gelişmesinde etkili olabileceği literatürde gösterilmiş olan TNF- α , IL-6, TGF- β 1 ve DEF- β 2 düzeyleri hücre lizatlarında analiz edilmiştir. Elde edilen analizler sonucunda hücre lizatlarında IL-6 düzeyleri tespit edilememiş, bunun üzerine analiz tekrarlanmıştır. Kullanılan ELİSA yönteminde standart ve kontrol kuyucuklarında beklenen optik dansiteler oluşurken, numunelerin olduğu kuyucuklarda absorbansların, blank kuyucuklarından daha düşük çıkması nedeniyle, numunelerde herhangi bir konsantrasyonda IL-6 olmadığı ve bu nedenle tespit edilemediği düşünülmektedir.

Analizi gerçekleştirilen diğer parametreler olan TNF- α , TGF- β 1 ve DEF- β 2 düzeyleri Çizelge 4.5'te sunulmuştur. Veriler incelendiğinde kontrol grubu TNF- α , TGF- β 1 ve DEF- β 2, düzeylerinin diğer gruplara oranla istatistiki düzeyde farklı ve yüksek olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.5 VL_{Metanol} ve VL_{Aseton} ekstraktlarının A549 hücrelerinde İnflamasyona etkisi.

Gruplar	TGF- β 1 (pg/mg-protein)	DEF- β 2 (pg/mg-protein)	TNF- α (pg/mg-protein)
Kontrol	73,78 \pm 8,43 ^c	96,27 \pm 24,75 ^b	32,96 \pm 2,94 ^c
VL _{metanol} (LD ₀)	21,30 \pm 8,06 ^b	27,36 \pm 5,27 ^a	11,56 \pm 0,56 ^a
VL _{metanol} (LD ₅₀)	13,76 \pm 1,08 ^a	28,25 \pm 1,72 ^a	11,39 \pm 0,92 ^a
VL _{aseton} (LD ₀)	21,12 \pm 5,06 ^b	26,04 \pm 4,57 ^a	12,18 \pm 0,42 ^a
VL _{aseton} (LD ₅₀)	14,80 \pm 2,92 ^a	26,00 \pm 5,27 ^a	14,39 \pm 1,13 ^b
P	0,000	0,000	0,000

* Veriler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir (n=5)

^{a,b,c}: Aynı sütunda farklı üslü ifadeleri taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p < 0,05). Kısaltmalar: TGF- β 1; Tumor growth faktör-1 β , TNF- α ; Tumor nekrozis faktör- α , DEF- β 2; β -Defensin 2, VL_{Metanol}; *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. metanol ekstraktı, VL_{Aseton}; *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. aseton ekstraktı, LD₀; Hücrelerde herhangi bir sitotoksositeye neden olmayan doz, LD₅₀; Hücrelerin %50'sinin ölmesine neden olan doz.

A549 hücrelerine farklı dozlarda VL_{Metanol} ve VL_{Aseton} ekstraktları uygulandığında uygulanan ekstrakt dozu arttıkça TGF- β 1 düzeylerinin düştüğü belirlendi. Başka bir ifade ile LD₀ dozunda VL_{Metanol} uygulanan deney grubuna ait TGF- β 1 düzeyleri, LD₅₀

dozunda $VL_{Metanol}$ uygulanan deney grubuna göre daha yüksektir. Benzer bir şekilde LD_0 dozunda VL_{Aseton} uygulanan deney grubuna ait TGF- β 1 düzeyleri de, LD_{50} dozunda VL_{Aseton} uygulanan deney grubuna göre daha yüksektir. Yani A549 hücrelerine uygulanan bitki ekstraktı dozu arttıkça TGF- β 1 düzeyleri azalmaktadır.

$VL_{Metanol}$ ve VL_{Aseton} ekstraktlarının A549 hücrelerine LD_0 veya LD_{50} dozunda uygulanması sonrasında DEF- β 2 düzeylerini fazla değiştirmediği, başka bir ifade ile farklı dozlarda $VL_{Metanol}$ ve VL_{Aseton} ekstraktlarının kullanılmasının DEF- β 2 düzeyleri üzerinde herhangi bir istatistiki farklılık ($p < 0,05$) oluşturmadiği belirlenmiştir. TNF- α düzeyleri incelendiğinde ise LD_0 dozunda VL_{Aseton} uygulanan deney grubuna ait TNF- α düzeylerinin, LD_{50} dozunda VL_{Aseton} uygulanan deney grubuna göre daha yüksek kaldiğı görölmüştür.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Verbascum türleri bir çok dünya ülkesinde mullein çiçeği olarak bilinmekte olup tek başına veya diğer tıbbi ve aromatik bitkilerle karıştırılarak bitkisel çay olarak kullanılabilir. Mukolitik etkileri nedeni ile çeşitli hastalıklarda, özellikle de üst solunum yollarını rahatlatmak amacıyla yurt dışında sıklıkla tercih edilen bir bitki türüdür. Amerika Birleşik Devletleri'nde kolaylıkla marketlerde bile bulunabilen kurutulmuş *Verbascum sp.* yaprak ve çiçekleri, yağlı ekstraktları, alkollü tentürleri (oral olarak kullanılabilen veya çaya, suya eklenerek, cilde ise sürülerek kullanılabilen bitkisel karışım), kapsülleri başta solunum sistemi hastalıklarında yatıştırıcı olmak üzere birçok hastalıkta tercih edilmektedir (Turker ve Gurel 2005, Luca vd. 2018).

Günümüzde medikal kullanımı en yaygın olan ve batılı ülkelerin birçoğunda hazır preparatları (drog halinde) satılan bir *Verbascum sp.* türü olan *Verbascum thapsusun trichomoniasis* adı verilen ve cinsel yollarla da bulaşabilen bir hastalığa etkisi araştırılmıştır. *Verbascum thapsusun* bu hastalığa sebep olan tiny paraziti olarak bilinen ve *Trichomonas vaginalis* olarak ifade edilen parazite karşı etkili olduğu ifade edilmektedir (Kashan vd. 2015). Yine *Verbascum thapsus* ile in vitro (laboratuvar ortamında) ve in vivo (canlı organizma üzerinde) olarak planlanan başka bir çalışmada da, *Verbascum thapsusun* ratlarda slimarinle oluşturulan nefrotoksisite sonucu gelişen lipid peroksidasyonu azalttığı, antioksidan madde (CAT, SOD, redükte GSH) düzeylerini ise artırarak koruyucu rol oynayabileceği belirtilmektedir. Bu etkinin oluşmasında ise sahip olduğu antioksidan gücün rol oynadığı ifade edilmektedir. Nitekim aynı çalışmada yapılan in vitro çalışmalar *Verbascum thapsusun* yaprakları kullanılarak elde edilen metanolik ekstraktlarında DPPH radikali ve NO süpürücü etkisinin (DPPH radikali ve NO için IC₅₀ dozu yaklaşık 80-160 µg/mL arası) yüksek olduğunu göstermektedir (Pal vd. 2013). *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. metanol ve aseton ekstraktları ile yapılan çalışmada ise *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth'tin daha yüksek dozlarda DPPH radikalini inaktive ettiği belirlenmiştir (Hazman vd. 2018).

Verbascum sp. türlerinin çoğunun antimikrobiyal etkili olduğu bir çok çalışma ile ortaya konmuştur. Bu çalışmalardan birinde *Verbascum georgicum benthamii* metanol ekstraktı kullanılarak 56 bakteri türüyle yapılan araştırmada, bu türün antimikrobiyal etkili olduğu disk-difüzyon ve mikrodilüsyon (MIC; Minimum Inhibitory Concentration) yöntemleri ile belirlenmiştir (Şengül vd. 2005). Solunum yolu üzerindeki yatıştırıcı etkileri nedeni ile kullanımı tercih edilen *Verbascum phlomoides* ait ekstraktlarda yapılan DPPH radikal süpürücü etkisi sonuçlarına göre EC₅₀ (IC₅₀) değeri 7,09 mg/mL bulunmuştur (Grigore vd. 2013). *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türü ile yapılan çalışmalar Hazman vd. (2018) ile Grigore vd. (2013) yaptıkları çalışmadaki *Verbascum phlomoides* DPPH radikal süpürücü etkileri karşılaştırıldığında birbirine yakın bir değerlerde olduğu görülmektedir. *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türü ile yapılan çalışmalar DPPH radikalini inhibe etmede aseton ekstraktının IC₅₀ değeri 17,07 mg/mL, metanol ekstraktının ise 6,44 mg/mL olarak belirlenmiştir. Yani *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türünün aseton ekstraktının radikal süpürücü etkisi daha yüksek bulunmuştur. Bu etkinin α-tokoferol (24,29 mg/mL) ve BHT (23,58 mg/mL) gibi antioksidanların radikal süpürücü etkilerine göre düşük olduğu belirlenmiştir. Analizi yapılan bitki ekstraktları ile antioksidanların IC₅₀ değerlerine göre DPPH radikal süpürücü aktiviteleri sıralandığında elde edilen sonuç VL_{metanol} > VL_{aseton} > BHT > α-tokoferol şeklinde olduğu belirtilmektedir Başka bir ifade ile *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türünün metanolik ve aseton ekstraktlarının DPPH radikal süpürücü aktiviteleri BHT ve α-tokoferole göre daha yüksek bulunduğu ifade edilmektedir (Hazman vd. 2018).

Bu türün medikal etkilerinin sahip olduğu yüksek fenolik içerik ve sekonder metabolitlerin çeşitliliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çoğu *Verbascum* türü fenolik içerik (feniletanoidler, flavonoidler, neolignan glikozitler, fenolik asitler gibi fenoller) dışında iridoid bileşikleri (ajugol, aucubin, lasianthoside I, catalpol vb.), saponinler gibi biyoaktif bileşenleri de yüksek oranda içerebilmektedir (Kahraman vd. 2010, Luca vd. 2018). *Verbascum* türleri içerisinde *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. ile ilgili bileşen türlerinin belirlendiği çalışmalar genellikle iridoid glikozitlerinin tanımlanması üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir. Akdemir vd. (2004a; 2004b) yaptıkları çalışmalarda *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. kökleri kullanılarak

metanolik ekstraktı hazırlanmış ve içerdiği iridoid ve feniletanoid glukozit formları tanımlanmıştır. Metanolik ekstraktlarda iridoid glikozit bileşiği olan catalpol türevi bileşikler olan 6-*O*-(α -L-rhamnopyranosyl)-catalpol, verbascoside A, pulveruloside, buddlejoside A₅ bileşikleri ile aucubin ve bir aucubin türevi bileşik olan unduloside III bileşiklerinin olduğu ifade edilmektedir (Akdemir vd. 2004a). Yapılan başka bir çalışmada da yine *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. köklerinden elde edilen metanolik ekstraktlarda iridoid glikozitler olan 8-*O*-acethylharpagide, harpagoside ve 6-*O*-vanilloylajugol bileşikleri ile feniletanoid glikozitleri olan verbascoside ve poliumosid bileşikleri izole edilerek karakterize edilmiştir (Akdemir vd. 2004b). Ayrıca *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. çiçekleri kullanılarak elde edilen metanolik ekstraktlarda da bileşen olarak iridoid glukozitlerin bulunduğu belirtilmektedir. Yapılan analizlerde 6-*O*-(4-*O*-*trans*-*p*-coumaroyl)- α -L-rhamnopyranosylaucubin, 6-*O*-(4-*O*-*trans*-*p*-methoxycinnamoyl)- α -L-rhamnopyranosylaucubin, sinuatol, aucubin, geniposidic acid, catalpol, ajugol, ilwensisaponin A iridoid glukozitlerinin izole edilerek tanımlandığı belirtilmektedir (Tatlı vd. 2006). Buraya kadar sunulan literatür bilgilerinden anlaşılacağı üzere *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türünden elde edilen ekstraktların bileşen analizleri ile bitkinin genellikle içerdiği iridoid türevi bileşikler tanımlanmıştır. Literatürde *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türünden elde edilen ekstraktlarda fenolik bileşenlerin tür ve miktar tanımlanması ile ilişkili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

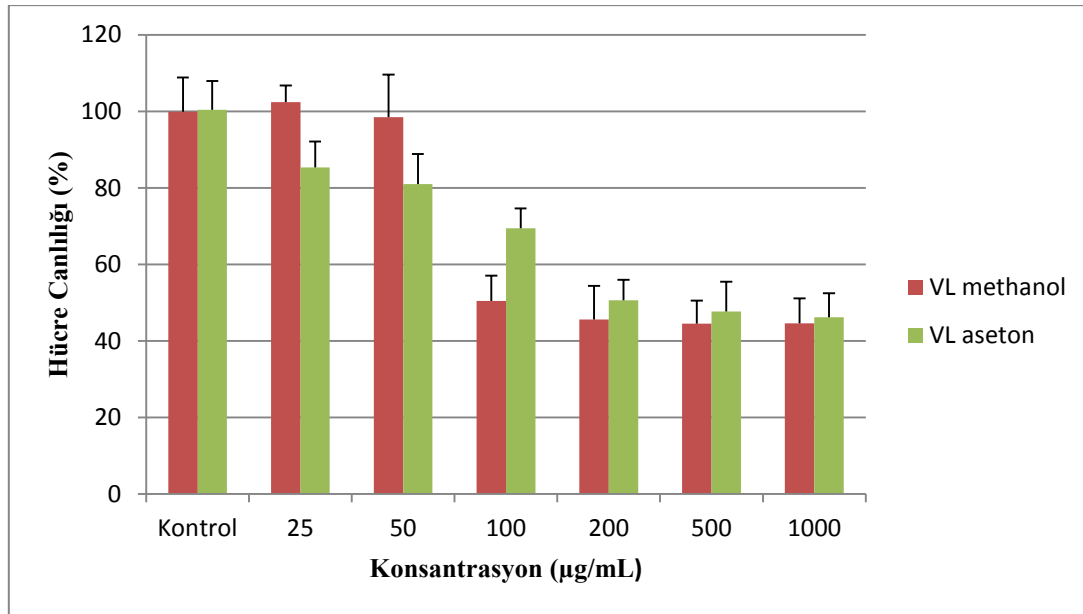
Bir bitki türünün antioksidan özelliklerinin oluşmasında içerdiği biyoaktif metabolitlerin türü ve miktarı önemli rol oynar. Antioksidan aktivitenin oluşmasında etkili olan sekonder metabolitlerin başında bitki türünün içerdiği fenolik asit miktarı gelmektedir. Literatürde *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türünün aseton ekstraktının fenolik madde miktarı (64,47 μ g GAE/mg bitki ekstraktı) metanol ekstraktına (30,82 μ g GAE/mg bitki ekstraktı) göre daha yüksek olduğu ifade edilmektedir (Hazman vd. 2018). Fakat *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. türü metanol ve aseton ekstraktlarının içerdiği bileşenlerle ilgili herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu kapsamda sunulan tez çalışmasında LC-MS/MS sistemi yardımıyla *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. ekstraktlarında 53 standart bileşenin varlığı ve varsa da miktarı belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan analizlerde VL_{aseton}

ekstraktında 3 fenolik bileşenin, VL_{metanol} ekstraktında ise 21 fitokimyasal bileşenin varlığı ve miktarları belirlendi (Çizelge 4.1). VL_{aseton} ekstraktında varlığı belirlenen bileşenler (quinik asit, kafeik asit ve o-kumarik asit) arasında majör (1 gram ekstrakta 1 mg'dan daha çok olan) bileşen olan quinik asit miktarlarının 2,614 mg analit/g-ekstrakt olduğu görüldü. VL_{metanol} ekstraktında ise 6 fenolik majör bileşen türü ve miktarı belirlendi. VL_{metanol} ekstraktında olduğu tespit edilen majör bileşenler ve miktarları büyükten küçüğe sırasıyla; luteolin (9,431 mg analit/g-ekstrakt), rutin (2,623 mg analit/g-ekstrakt), cyranoside (2,599 mg analit/g-ekstrakt), hesperidin (2,508 mg analit/g-ekstrakt) quinik asit (2,368 mg analit/g-ekstrakt) ve fumarik asit (1,258 mg analit/g-ekstrakt) şeklinde sıralanabilir. Ayrıca VL_{metanol} ekstraktında düşük konsantrasyonlarda olsa da 15 fenolik bileşenin (p-kumarik asit, klorojenik asit, apigenin, kafeik asit, vanilin, protokateşik asit, kozmosin, protokateşik aldehit, quersetin, salisilik asit, o-kumarik asit, izoquersitrin, naringenin, kaempferol ve hesperetin) türü ve miktarları belirlenmiştir. Bunlar arasında quersetin, kafeik asit, naringenin gibi çok etkili antioksidan metabolitlerin de olduğu anlaşılmıştır.

Bazı *Verbascum* türlerinin içerdiği zengin fenolik ve iridoid türevi bileşikler nedeniyle genotoksik etkiler gösterebileceği bu nedenle bazı kanser türlerinin tedavileri açısından yararlı olabileceği düşünülebilir. Fakat literatürde *Verbascum* türlerinin antikanserojenik etkileri ile ilgili sınırlı sayıda çalışma yapıldığı görülmektedir. Dünyadaki *Verbascum* çeşitliliğinin büyük bir çoğunluğunu barındırmakta olan Türkiye'de bu konuda yapılacak araştırmalar bu türün fitoterapik etkinliğini anlamamıza katkı sağlayabilir. *Verbascum* türleri ile yapılan çalışmaların birinde *Verbascum ovalifolium* türünün sitogenotoksik etkileri araştırılmıştır (Luca vd. 2018). Söz konusu araştırmada *Verbascum ovalifolium*'un metanolik ekstraktı ve fraksiyonlarının bileşenleri de analiz edilmiş olup, ilgili *verbascum* türünün 50'den fazla biyoaktif sekonder metabolit içerdiği belirlenmiştir.

Malignant melanoma hücreleri olan SK-MEL-2 hücre hattı ve fibroblast hücreleri olan V79 hücre hattı kullanılarak yapılan araştırmada, ham metanolik ekstraktın sitotoksitesinin sınırlı da olsa yüksek dozlarda görüldüğü belirtilmektedir. Metanolik ekstraktın farklı fraksiyonlarının (hexzan, etil asetat, bütanol fraksiyonları gibi) ise sitotoksitesilerinin daha fazla olabileceği belirlenmiştir (Luca vd. 2018).

A549 hücre hattı ile yapılan in-vitro bir araştırmada bir *Verbascum* türü olan *Verbascum thapsus*'tan izole edilen bileşiklerin antikanserojenik etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar özellikle *Verbascum thapsus*'ta bulunan luteolin ve 3-O-fucopyranosylsaikogenin F bileşiklerinin A549 hücrelerinde hem antiproliferatif hemde apoptotik etkili olduğunu göstermektedir (Zhao vd. 2011). Sunulan tez metninin bulgular kısmı tekrar incelenecek olursa VL_{metanol} ekstraktında en fazla miktarda olduğu belirlenen fenolik bileşen luteolindir. Bu bağlamda VL_{metanol} ekstraktının da A549 hücrelerinde sitotoksik etkiler göstermesi olasıdır. Nitekim sunulan çalışmada A549 hücrelerine VL_{metanol} ve VL_{aseton} ekstraktları uygulandığında hem VL_{metanol} hem de VL_{aseton} ekstraktlarının sitotoksik etkili olduğu belirlenmiştir (şekil 5.1). VL_{metanol} ve VL_{aseton} ekstraktlarının A549 hücrelerindeki sitotoksosite düzeyleri karşılaştırıldığında ise VL_{metanol} ekstraktının VL_{aseton} ekstraktına oranla daha toksik olduğu görülmüştür. Çünkü A549 hücreleri için VL_{metanol} ekstraktının LD₅₀ dozu 364,2 µg/mL iken VL_{aseton} ekstraktının LD₅₀ dozu 466,3 µg/mL konsantrasyonunda bulunmuştur (izelge 4.2).



şekil 5.1 A549 hücrelerinde VL_{metanol} ve VL_{aseton} ekstraktlarının sitotoksosite düzeyleri.

Verbascum lasianthum Boiss. ex Benth. türüne ait ekstraktların (VL_{metanol} ve VL_{aseton}) A549 hücrelerinde göstermiş olduğu sitotoksitedeki lethal dozlarının çok yüksek olmaması, µg/mL konsantrasyon düzeylerinde olması, bu bitki türünün antikanserojenik etkilerini nasıl oluşturduğunu belirlemenin yararlı olabileceğine işaret etmektedir. Bu

bağlamda sunulan tez çalışması ile VL_{metanol} ve VL_{aseton} ekstraktlarına ait düşük ve yüksek dozlarının A549 hücrelerinde oksidatif stres, inflamasyon ve DNA hasarına etkileride araştırılarak, antikanserojenik etkileri açıklanmaya çalışılmıştır.

Bu bağlamda A549 hücrelerine VL_{metanol} ve VL_{aseton} ekstraktları uygulandığında oksidatif stres düzeylerini düşürdüğü belirlenmiştir (Çizelge 4.3). VL_{metanol} ve VL_{aseton} ekstraktlarının bu etkilerini ortamda bulunan oksidan molekülleri etkisiz hale getirerek (TOS düzeylerini düşürerek) gerçekleştirdiği belirlenmiştir. VL_{metanol} ve VL_{aseton} ekstraktlarının içeriğinde bulunan antioksidan etkili fenolik bileşenlerin (quinic asit, kafeik asit, kumarik asit, quersetin, hesperidin, luteolin vb.) varlığı düşünülürse (Çizelge 4.1) elde edilen sonuç olası görünmektedir. Bu veriler VL_{metanol} ve VL_{aseton} ekstraktlarının A549 hücrelerindeki sitotoksitesinin oluşmasında oksidatif stresin rol almadığını göstermektedir. Aksine A549 hücre hattının bir malign kanser hücre hattı olduğu ve kanserli doku/hücrelerde oksidatif stresin belirli ölçüde yükseldiği düşünülürse, VL_{metanol} ve VL_{aseton} ekstraktları kanserin neden olduğu oksidatif stresi azalttığı söylenebilir.

Verbascum türlerinin antioksidan etkilerinin yanında antiinflamatuvar etkilerinin de olduğu bilinmektedir. Grigore vd. (2013)'nin yaptığı in-vitro ve in-vivo deney modellerinde *Verbascum phlomoides*in HUVEC hücrelerinde TNF- α aracılı ICAM-1 ekspresyonunu azaltarak inflamasyonu azaltırken, deney hayvanlarında inflamasyona etkisi olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar *Verbascum phlomoides*in yüksek antioksidan ve düşük antiinflamatuvar etkinliğinin sahip olduğu yüksek polifenol içeriginden kaynaklanabileceğini göstermektedir. Çünkü ilgili çalışmada *Verbascum phlomoides*e ait ekstraktların % 4,18 oranında polifenoller içerdiği ifade edilmektedir. Bu fenoller arasında rosmarinik asit (14.93mg/g), kafeik asit (39.96mg/g), ferulik asit (29.61mg/g), quersetin (17.29mg/g), aucubin (0.028mg/g) gibi bileşenlerin olduğu ifade edilmektedir (Grigore vd. 2013). Benzer şekilde başka bir *verbascum* türü olarak *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth.'inde antioksidan aktivitesinin ve fenolik içeriğinin yüksek olduğu düşünülürse antiinflamatuvar etkili olabileceği de öngörülebilir.

Sunulan çalışmada yapılan laboratuvar analizleri *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth.'in kanser hücrelerinde inflamasyonu azalttığını göstermektedir. Bu kapsamda yapılan analizlerde LD₀ ve LD₅₀ dozlarında A549 hücrelerine uygulanan VL_{metanol} ve VL_{aseton} ekstraktlarının TNF- α , TGF- β 1 ve DEF- β 2 düzeylerini düşürerek antiinflamatuvar etkili olduğu görüldü. Bu verileri literatürde *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. kullanılarak farklı deney modelleriyle yapılan araştırma sonuçları da desteklemektedir.

Bu çalışmalardan birinde *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth.'in metanol ve sulu ekstraktları ile metanolik ekstraktlardan izole edilen glikoterpenoid bileşiklerin antiinflamatuvar ve antinosiseptif (doku hasarı sonucu oluşan ağrıyı giderici) etkinliğinin deney hayvanları (fare) kullanılarak oluşturulan deneysel bir modelde araştırıldığı belirtilmektedir (Kupeli vd. 2007). İlgili çalışmada deney hayvanlarında deneysel olarak inflamasyon (carrageenan-induced hind paw edema model) ve doku hasarına bağlı ağrı (p-benzoquinone-induced writhing test) modelleri oluşturularak *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth.'in metanol ve sulu ekstraktlarının ve iridoid glikozit yapıdaki glikoterpenoid bileşenlerinin (aucubin, sinuatol, geniposidic asit, catalpol, ajugol, ilwensisaponin A gibi) etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda metanolik ekstraktın ve metanolik ekstraktan elde edilen iki iridoid glikozit (aucubin, ilwensisaponin A) bileşiğinin carrageenan-induced hind paw edema model ile oluşturulan inflamasyonu azaltırken, sulu ekstraktın diğer metanolik ekstrakt bileşenlerinin inflamasyonu azaltmada etkili olmadığı ifade edilmektedir. p-benzoquinone ile nosiseptif ağrı modeli oluşturulan farelerde ise hem sulu ekstraktın, hem metanolik ekstraktın hem de metanolik ekstraktan elde edilen antiinflamatuvar etkili iki iridoid glikozit (aucubin, ilwensisaponin A) bileşiğinin ağrıyı belirli oranlarda inhibe edebileceği belirlenmiştir (Kupeli vd. 2007). Bununla beraber 13 farklı *verbascum* türünün yara iyileşmesi (wound healing) üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth.'in metanolik ekstraktının yara iyileştirici etkisinin kontrol grubuna oranla istatistiksel fark oluşturacak düzeyde olmadığı belirtilmektedir (Süntar vd. 2010).

Verbascum türlerinin egzema ve diğer antiinflamatuvar durumlarda yara iyileştirici etkilerinin araştırıldığı çalışmada deney hayvanlarının (ratların) sırt kısmındaki tüyleri traş

edildikten sonra, 5 cm boyunda 2 kesik oluşturulmuş ve kesikler 1 cm aralıklarla dikiş atılarak kapatılmıştır. Oluşturulan farklı deney gruplarına yara iyileştirmede kullanılan referans ilaç (madecassol) ve araştırmada kullanılan 13 verbascum türünün metanolik ekstraktı yara bölgesine sürülerek 9 gün boyunca uygulanmış, 10.gün ratlar sakrafiye edilmiştir (Süntar vd. 2010). İlgil çalışmada kullanılan 6 verbascum (*Verbascum olympicum*, *Verbascum stachydifolium*, *Verbascum Uschackense*, *Verbascum latisepalum*, *Verbascum mucronatum*, *Verbascum pterocalycinum var. mutense*) türünün yara iyileştirici etkinliği olduğu belirlenirken, *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth.'inde dahil olduğu 7 verbascum türünün (*Verbascum chionophyllum*, *Verbascum cilicicum Boiss*, *Verbascum dudleyanum*, *Verbascum lasianthum Boiss*, *Verbascum pycnostachyum*, *Verbascum salviifolium Boiss*, *Verbascum splendidum Boiss.*) yara iyileştirici etkisinin çok az olduğu belirtilmektedir (Süntar vd. 2010).

İnflamasyonla ilgili oluşturulan in-vivo modellerden birinde VL_{metanol} ekstraktının antiinflamatuvar etkinliğinin gözlenmesi Kupeli vd. (2007)'ye göre, diğerinde ise antiinflamatuvar etkiliğinin gözlenmemesi Süntar vd. (2010)'a göre VL_{metanol} ekstraktının inflamasyonun oluşmasına aracılık eden mediatörleri farklı şekillerde etkileyebileceğine işaret etmektedir. Bu nedenle verbascum türlerinin antiinflamatuvar etkileri incelenirken, in-vitro veya in-vivo modellemelerde genel inflamasyon sonucu oluşan semptomlara etkisiyle birlikte, inflamasyona aracılık eden mediatörler olan bazı kemokin ve stokin düzeylerinin araştırılması da önerilebilir. Böylelikle *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth.'in hangi mediatörler aracılığıyla inflamasyonu baskıladığı/baskılamadığı belirlenebilir. Bu bağlamda sunulan çalışmada inflamasyona aracılık eden bazı proinflamatuvar stokin düzeyleri ve inflamatuvar yanıtı cevap olarak akciğer epitelyum hücrelerinde üretilen ve hücrelerin savunmasında görev alan β -Defensin-2 (DEF β 2) düzeyleri analiz edilmiştir. Bu kapsamda yapılan analizlerde daha önce de ifade edildiği üzere LD₀ ve LD₅₀ dozlarında A549 hücrelerine uygulanan VL_{metanol} ve VL_{aseton} ekstraktlarının, kanser hücrelerinin tabiatı gereği A549 hücrelerinde zaten var olan düşük dereceli kronik inflamasyonu TNF- α , TGF- β 1 ve DEF- β 2 düzeylerini düşürerek azalttığı belirlenmiştir.

Literatürde *verbascum* türleri ile yapılan çalışmalar ve sunulan çalışmadan elde edilen bulgular, *verbascum* türlerinin antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal etkileri

sayesinde hastalıkların tedavisi sırasında tek başlarına veya uygulanan tedavi protokollerini takviye edici olarak tercih edilebileceğini göstermektedir. Bununla beraber yapılan bir çalışmada da belirtildiği üzere toprak kirliliği olan bölgelerde yetişen *verbascum* türlerinin belirli miktarda ağır metal içerebileceği de gözardı edilmemelidir (Hazman vd. 2018). Çünkü literatürde *verbascum* türlerinin fitoekstraksiyon ve fitostabilisasyon edici özelliklerinin olması nedeni ile ağır metalleri topraktan alarak daha az zararlı hale getirdiği için toprak kirliliğini azaltmak amacıyla kullanım potansiyelleri olduğu belirtilmektedir (Čudić vd. 2016, Morina vd. 2016). Bu nedenle tedavi edici etkileri nedeni ile kullanılması düşünülen *verbascum* türlerinin, toprak kirliliği görülmeyen veya organik tarım yapılan bölgelerden tedarik edilmesi gerekmektedir. Bu bağlamda yol kenarlarında veya yerleşim alanlarına yakın olan bölgelerde yetişen *verbascum* türlerinin toplanarak çeşitli amaçlarla kullanılmaması gerektiği ilgililere ve yöre halklarına duyurulması önerilebilir.

Sonuç olarak, dünyada yaklaşık olarak 360 türle temsil edilen ve hastalıklara olan etkileri nedeni ile ekonomik değeri her geçen gün artan *Verbascum sp* türlerinin etkilerinin aydınlatılması ülkemizde inovatif ürünlerin oluşturulabilmesi için önemlidir. Çünkü dünyada bulunan *Verbascum* türlerinin büyük bir çoğunluğu ülkemizde yetişmektedir. Türkiye’de yetişen 246 farklı *Verbascum* türünün 195 tanesi endemik, 129 tanesi hibrit tür olup, endemizim oranı %80 olarak ifade edilmektedir (Aytaç ve Duman 2012, Güner vd. 2012). Bu türlerin çoğunun birincil aşama çalışmaları bile henüz yapılmamıştır. Bu türlerden etkileri henüz analiz edilmemiş olan türlerin belirlenerek etkileri araştırılmalıdır. Ancak böylelikle klinik olarak etkili olabilecek türler belirlenerek, birçok dünya ülkesinde olduğu gibi ürüne dönüştürme çalışmalarına başlanabilir. Unutulmamalıdır ki alternatif tıp ürünü olarak geliştirilen ürünlerin dünya ilaç sanayisi içindeki payı her geçen gün artmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Akdemir Z S, Tatli I I, Bedir E, Khan I A, 2004a, Acylated iridoid glycosides from *Verbascum lasianthum*, *Turk J Chem*, 28, 101-110.
- Akdemir Z S, Tatli I I, Bedir E, Khan I A, 2004b, Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Verbascum lasianthum*, *Turk J Chem*, 28, 227-234.
- Alaoui H L, Hassan O, Yang Y W, Buchanan P, 2015, Lung cancer: biology and treatment options, *Biochim Biophys Acta*, 1856, 189-210.
- Alberg A J, Samet J M, 2003, Epidemiology of lung cancer, *Chest*, 123, 21-49.
- Ali N, Ali Shah S W, Shah Ahmed G, Ghias M, Khan I, Ali W, 2012, Anthelmintic and relaxant activities of *Verbascum Thapsus Mullein*, *BMC Complement Altern Med*, 30, 12-29
- Altmann D M, 2018, A Nobel Prize-worthy pursuit: cancer immunology and harnessing immunity to tumour neoantigens, *Immunology*, 155, 283–284.
- Álvarez Á H, Martínez Velázquez M, Prado Montes de Oca E, Álvarez Á H, vd, 2018, Human β -defensin 1 update: Potential clinical applications of the restless warrior, *Int J Biochem Cell Biol*, 104, 133-137.
- Anil S, Dosler S, Mericli A H, 2016, Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Verbascum caesareum* *Verbascum caesareum*, *Chemistry of Natural Compounds*, 52, 125-126.
- Atıcı E, 2007, Tıp tarihinde kanser ve lösemi, *Türk Onkoloji Dergisi*, 22, 197-204.
- Aydiner A, Ece T, Topuz, E, 2010, Akciğer Kanseri Tanı-Tedavi-Takip, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.
- Aytaç Z, Duman H, 2012, *Verbascum hasbenlii* (Scrophulariaceae), a new species from Turkey, *Turk J Bot*, 36, 322-327.
- Baran Y, 2018, *Kanser Moleküler Biyolojisi*, Cilt 536, Ankara, Kısayol Yayıncılık.
- Barta J A, Powell C A, Wisnivesky J P, 2019, Global Epidemiology of Lung Cancer, *Annals of Global Health*, 85, 1-16.

- 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.
- Butel J S, 2000, Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease, Carcinogenesis, 21, 405-426.
- Čudić V, Stojiljkovic D, and Jovovic A, 2016, Phytoremediation potential of wild plants growing on soil contaminated with heavy metals, Arh Hig Rada Toksikol, 67, 229-239.
- Demirci M, 2010, Gıda Kimyası, 292s, İstanbul.
- Erdem S S, Yılmaz M, Mayda A S, 2015, Bir Üniversite Hastaneside 2013 Yılındaki Kanser, Düzce Tıp Fakültesi Dergisi, 17, 105-110.
- Gandomani S H, Tarazoj A A, Ghonchen M, Yousefi S M, Delaram M, Salehiniya H, 2017, Lung Cancer in The World: The Incidence, Mortality Rate And Risk Factoros, World Cancer Research Journal, 4, s.e911.
- Gazdar A F, Girard L, Lockwood W W, Lam W L, Minna J D, 2010, Lung Cancer Cell Lines as Tools for Biomedical Discovery and Research, J Natl Cancer Inst, 102, 1310–1321.
- Grigore A, Colceru-Mihul S, Litescu S, Panteli M and Rasit I, 2013, Correlation between polyphenol content and anti-inflammatory activity of Verbascum phlomoides (mullein), Pharm Biol, 51, 925-929.
- 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, 2012, Türkiye Bitkiler Listesi (Damarlı Bitkiler). İstanbul, Nezhat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmalar Derneği Yayını.
- Hawiger J, Zienkiewicz J, 2019, Decoding inflammation, its causes, genomic responses, and emerging countermeasures, Scand J Immunol, 90, e12812.

- Hazman Ö, 2018, MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde Krosinin İnflamasyon ve Oksidatif Strese Etkileri. Proje No: 16.KARIYER.160, 1-48s, Afyonkarahisar.
- Hazman Ö, Aksoy L, Büyükben A, 2016, Effects of crocin on experimental obesity and type-2 diabetes, Turk J Med Sci, 46, 1593-1602.
- Hazman Ö, Erol İ, Aksoy L, Büyükben A, 2018, Verbascum Lasianthum Boiss.ex Benth. (Yünlü Sığır Kuyruğu) Türünün incelenerek Antioksidan özelliklerinin ve Mineral Madde İçeriğinin Araştırılması, Proje NO:16.ALTYP.01. Afyonkarahisar.
- Hernández C O, García S E, Sandoval C O, Castillo F Y, Muro A L, Gonzalez F J, vd, 2014, Cell Culture: History, Development and Prospects, International Journal of Current Research and Academic Review, 2, 188-200.
- Huber Morath A, Davis P H, 1978, Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Cilt 6, Edinburgh, University Press.
- Islam KM, Anggondowati T, Deviany PE, vd, 2019, Patient preferences of chemotherapy treatment options and tolerance of chemotherapy side effects in advanced stage lung cancer, BMC Cancer, 19, 835.
- Kahraman C, Tatli I, Orhan I E and Akdemir Z S, 2010, Cholinesterase inhibitory and antioxidant properties of Verbascum mucronatum Lam. and its secondary metabolites, Z Naturforsch C, Zeitschrift für Naturforschung. C Journal of biosciences, 65, 667-674.
- Kalaycıoğlu L, Serpek B, Nizamlıoğlu M, Başpınar N, Tiftik A M, 2013, Biyokimya (5 b.). Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık, 654s, İstanbul.
- Kashan Z F, Arbabi M, Delavari M, Hooshyar H, Taghizadeh M, and Joneydy Z, 2015, Effect of Verbascum thapsus ethanol extract on induction of apoptosis in Trichomonas vaginalis in vitro, Infect Disord Drug Targets, 15, 125-130.
- Kaya H, 2020, Karaciğer karsinomu (HepG2) hücrelerinde, cisplatin toksikasyonuna arbutinin etkileri, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstusu, Yüksek Lisans Tezi, 1-82 sayfa, Afyonkarahisar.

- Kızıllı M, Besler T, 2012, Heterosiklik Aromatik Amin Oluşumunun Önlenmesi veya Azaltılması, *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 40, 191-196.
- Kim H I, Lim H, Moon A, 2018, Sex Differences in Cancer: Epidemiology, Genetics and Therapy, *Biomolecules Therapeutics*, 26, 335-342.
- Kulawik J D, Raniszewska A, 2017, How to evaluate the immune status of lung cancer patients before immunotherapy, *Breathe*, 13, 291-296.
- Kumar D, Sharma S, Verma S, Kumar P, Ambasta R K, 2015, Molecular Signalling Saga in Tumour Biology, *Journal of Tumor*, 3, 309-313.
- Kupeli E, Tatlı I I, Akdemir Z S, Yesilada E, Kupeli E, 2007, Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory and antinociceptive glycoterpenoids from the flowers of *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Benth. *J Ethnopharmacol*, 110, 444-50.
- Kupeli M, Koseoglu R D, 2018, Large Cell Carcinoma with Adenocarcinoma in Lung, *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*, 28, 240-242.
- Lackey A, Donington J S, 2013, Surgical management of lung cancer. *Semin Intervent Radiol*, 30, 133-140.
- Lazdunski L L, 2013, Surgery for nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir Rev*, 22, 382-404.
- Lewandowska A M, Rudzki M, Rudzki S, Lewandowski T, Laskowska B, 2019, Environmental risk factors for cancer, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 26, 1-7.
- Luca S V, Miron A, Aprotosoiaie A C, Mihai C T, Vochita G, Gherghel D, Ciocarlan N, Skalicka-Wozniak K, 2018, HPLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS/MS profiling of *Verbascum ovalifolium* Donn ex Sims and evaluation of its antioxidant and cytogenotoxic activities, *Phytochem Anal*, 30, 34-45.
- Maciejczyk A, Skrzypczyńska I, & Janiszewska M, 2014, Radiotherapy in lung cancer: Actual methods and future trends, *Rep Pract Oncol Radiother*, 19, 353-360.
- Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, Vecchia C, Boffetta P, 2016, Risk factors for lung cancer worldwide, *Eur Respir J*, 48, 889-902.
- Mao Y, Yang D, He J, Krasna M J. 2016, Epidemiology of Lung cancer, 25, 439-445.

- Min Z, 2016, Classification and Pathology of Lung Cancer, *Surg Oncol Clin N Am*, 25, 447-468.
- Morina F, Jovanovic L, Prokic L, Veljovic-Jovanovic S, Smith J A C, 2016, Physiological basis of differential zinc and copper tolerance of *Verbascum* populations from metal-contaminated and uncontaminated areas, *Environ Sci Pollut Res Int*, 23, 10005-20.
- Murala S, Alli V, Kreisel D, Gelman A E, Krupnick A S, 2010, Current status of immunotherapy for the treatment of lung cancer, *J Thorac Dis*, 2, 237–244.
- Müsellim B, 2007, Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi ve Etyolojisi, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, 58, 113-118.
- Ozcan B E M, 2011, Antimicrobial and antioxidant activities of the various extracts of *Verbascum pinetorum* Boiss. O. Kuntze (Scrophulariaceae), *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 15, 900-5.
- Ozcan B, Yilmaz M, Caliskan M, 2010, Antimicrobial and antioxidant activities of various extracts of *Verbascum antiochium* Boiss. (Scrophulariaceae), *J Med Food*, 13, 1147-52.
- Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z, 2015, Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri, *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6, 331-336.
- Özdemir B C, Dotto G P, 2017, Racial differences in cancer susceptibility and survival: More than the color of the skin? *Trends Cancer*, 3, 181-197.
- Özsu S, Özlü T, 2013, Türkiye’de Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi, *Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi*, 1, 7-11.
- Pablo P M, Brambilla E, Thomas R, Soria J C, 2012, Squamous Cell Carcinoma of the Lung: Molecular Subtypes and Therapeutic Opportunities, *Clin Cancer Res*, 18, 2443–2451.
- Pal H, Kumar T, Karki H, 2013, In Vitro Antioxidant and Renoprotective. Potential of Methanolic Extracts of *Verbascum Thapsus* Leaf In Rats, *Der Pharmacia Sinica*, 4, 113-122.

- Parashar B, Arora S, Wernicke A G, 2013, Radiation Therapy for Early Stage Lung Cancer, *Semin Intervent Radiol*, 30, 185-190.
- PetruzzIELLO A, 2018, Epidemiology of Hepatitis B Virus (HBV) and Hepatitis C Virus (HCV) Related Hepatocellular Carcinoma, *The Open Virology Journal*, 12(Suppl-1, M3), 26-32.
- Rafiemanesh H, Mehtarpour M, Khani F, Hesami S M, Shamlou R, Towhidi F, vd, 2016, Epidemiology, incidence and mortality of lung cancer and their relationship with the development index in the world, *J Thorac Dis*, 8, 1094-1102.
- Schutte B C, McCray P B, 2002, Beta1-defensins in lung host defense, *Annu Rev Physiol*, 64, 709-748.
- Silicka M J, 2017, History of Cell Culture, *New Insights into Cell Culture Technology*, 3, 1-45.
- Singh N P, McCoy M T, Tice R R, Schneider E L, 1988, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res*. 175, 184–191.
- Smyth M J, Teng M W, 2018, 2018 Nobel Prize in physiology or medicine Clinical, *Translational Immunology*, 7, e1041.
- Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart M E, 2013, Oxidative stress and cancer: An overview, *Ageing Research Reviews*, 12, 376-390.
- Spyratos D, Zarogoulidis P, Porpodis K, 2013, Occupational exposure and lung cancer, *J Thorac Dis*, 5(Suppl 14), 440–445.
- Süntar I, Tatlı I, Akkol E K, Keles H, Kahraman Ç, Akdemir Z, 2010, An ethnopharmacological study on *Verbascum* species: From conventional wound healing use to scientific verification, *Journal of Ethnopharmacology*, 132, 408-413.
- Şengül M, Öğütçü H, Adıgüzel A, Şahin F, Kara A A, Karaman İ, Güllüce M, 2005, Antimicrobial Effect of *Verbascum georgicum* Bentham Extract, *Turk J Biol*, 29, 105-110.

- Tarini S, 2018, Tumors: Benign and Malignant, *Canc Therapy & Oncol Int J*, 10, 001-003.
- Tatlı I, Akkol E K, Yesilada E, Akdemir Z S, 2008, Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Seven Endemic *Verbascum* Species Growing in Turkey, *Pharmaceutical Biology*, 46, 781-788.
- Tatlı İ, Khan I A, Akdemir Z S, 2006, Acylated Iridoid Glycosides from the Flowers of *Verbascum lasianthum* Boiss ex Benth, *Z Naturforsch*, 61b, 1183-1187.
- Travis W D, Brambilla E, Nicholson A G, Yatabe Y, Austin J H, Beasley M B, vd, 2015, The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors, *Journal of Thoracic Oncology*, 10, 1243–1260.
- Turker A U, Gurel E, 2005, Common mullein (*Verbascum thapsus* L.): recent advances in research, *Phytother Res*, 19, 773-739.
- 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.
- White M C, Holman D M, Boehm J E, Peipins L A, Grossman M, Henley S J, 2014, Age and Cancer Risk: A Potentially Modifiable Relationship, *Am J Prev Med*, 46, 7–15.
- William D, Travis M D, 2011, *Classification of Lung Cancer*, Elsevier Inc, 2, 177-186.
- Yamanaka R, 2009, Medical management of brain metastases from lung cancer (review), *Oncol Rep*, 22, 1269-1276.
- Yao C, Narumiya S, 2019, Prostaglandin-cytokine crosstalk in chronic inflammation, *British Journal of Pharmacology*, 176, 337–354.
- Yener N A, Apa D D, 2014, Akciğer Kanserinde Morfolojik Tanı ve Sınıflama, *Türk Radyoloji Derneği*, 2, 281-289.
- Yilmaz M A, 2020, Simultaneous quantitative screening of 53 phytochemicals in 33 species of medicinal and aromatic plants: A detailed, robust and comprehensive LC–MS/MS method validation, *Industrial Crops & Products*, 149, 112347.

- Yuan M, Huang L L, Chen J H, Wu J, Xu Q, 2019, The emerging treatment landscape of targeted therapy in non-small-cell lung cancer, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4, 1-14.
- Yuchan W, Gengbiao Y, Changyi L, Lifeng R, Wei Y, 2019, Current Recommendations of Radioactive Seed ~ (125)I Implantation in Lung Brachytherapy: Moving Forward in Medical Care, *Int J Cancer Clin Res*, 6, 1-5.
- Zabłocka-Słowińska K, Płaczkowska S, Sko'rska K, Prescha A, 2019, Oxidative stress in lung cancer patients is associated with altered serum markers of lipid metabolism, *PLoS One*, 14, e0215246.
- Zappa C, Mousa S A, 2016, Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances, *Transl Lung Cancer Res*, 5, 288-300.
- Zhao Y L, Wang S F, Li Y, He Q X, Liu K C, Yang Y P, Li X L, Zhao Y L, vd, 2011, Isolation of chemical constituents from the aerial parts of *Verbascum thapsus* and their antiangiogenic and antiproliferative activities, *Arch Pharm Res*, 34, 703-707.
- Zou Y, Qin X, Xiong H, Zhu F, Chen T, Wu H, 2015, Apoptosis of human non-small-cell lung cancer A549 cells triggered by evodiamine through MTDH-dependent signaling pathway, *Tumor Biol*, 36, 5187–5193.

İnternet Kaynakları

- 1 - <http://sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/lung-cancer-cell-lines0.html>, 15.02.2020
- 2 - <http://a549.com/>, 18.03.2020
- 3 - <http://gco.iarc.fr/>, 01.12.2020

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Bobur SINDAROV
Doğum Yeri ve Tarihi : Özbekistan, Semerkand 02/01/1994
Yabancı Dili : Rusça
İletişim (Telefon / e-posta) : 05537894776 / bobursindarov1@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Sam DTI Akademik Lisesi (2010 – 2013)
Lisans : Semerkant DeVLet Üniversitesi, Kimya Biyoloji
Fakültesi Kimya Bölümü, (2014– 2018)
Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Ens, Kimya
Anabilim Dalı, (2018 – 2020)