



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Pelargonium quercetorum Agnew.
**METANOL EKSTRAKTININ AKCİĞER KANSERİ HÜCRE SOYLARI
ÜZERİNE SİTOTOKSİK AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nazlıhan AZTOPAL

Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2013
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Nazlıhan AZTOPAL tarafından hazırlanan “*Pelargonium quercetorum* Agnew. Metanol Ekstraktının Akciğer Kanseri Hücre Soyları Üzerine Sitotoksik Aktivitesinin Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Engin ULUKAYA
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Ferda ARI
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Serap KASIMOĞULLARI (ÇELİKLER)
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali Osman Demir
Enstitü Müdürü

.././.....

U.Ü. 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.

26/07/2013



Nazlıhan AZTOPAL

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Pelargonium quercetorum Agnew.
**METANOL EKSTRAKTININ AKCİĞER KANSERİ HÜCRE SOYLARI
ÜZERİNE SİTOTOKSİK AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nazlıhan AZTOPAL

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE

Akciğer kanseri halen çok ciddi bir sağlık sorunudur ve tedavisinde kullanılan yeni kemoterapi rejimlerine rağmen tam bir başarı sağlanamamıştır. Bu nedenle, akciğer kanseri hastalarında kullanılacak yeni tedavi yaklaşımları gerekmektedir. Bu çalışma, *Pelargonium quercetorum* ekstraktının akciğer kanseri hücreleri üzerindeki anti-kanser etkisini belirlemeye yöneliktir. Bu amaçla ilk basamak olan in vitro sitotoksiteyi belirlemede kullanılan MTT ve ATP canlılık testlerinden faydalanılmıştır. *Pelargonium quercetorum* ekstraktının hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinden sorumlu hücre ölümü (apoptozis/nekrozis) mekanizmasının belirlenmesi amacıyla M30 ve M65-antijen yöntemi kullanılmıştır. Hücrelerde apoptozis varlığı Annexin-V ve Hoechst 33342 boyama yöntemleri ile floresan mikroskopta görüntülenerek gösterilmiştir. Ayrıca Western blot yöntemiyle de sonuçlar desteklenmiştir. Sonuç olarak, *Pelargonium quercetorum* ekstraktının hücrelerde sekonder nekrozis/geç apoptozisi indükleyerek sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Ekstraktın kanser tedavisinde tamamlayıcı bir yaklaşım olarak kullanılabilmesi öngörüsüyle ileri analizleri yapılarak etken maddenin araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Pelargonium quercetorum*, akciğer kanseri, sitotoksite, apoptozis.

2013, ix + 85 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF CYTOTOXIC EFFECT OF METHANOL EXTRACT OF *Pelargonium quercetorum* Agnew. AGAINST LUNG CANCER CELL LINES

Nazlıhan AZTOPAL

Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Egemen DERE

Lung cancer is still a very significant health problem and there is not enough success in its treatment despite new chemotherapy regimens. Therefore, novel treatment approaches are required for better management for lung cancer patients. The aim of this study is to determine the anticancer activity of *Pelargonium quercetorum* extract on lung cancer cell lines. For this purpose, MTT and ATP cell viability tests are utilized to determine *in vitro* cytotoxicity. M30 and M65-antigen methods are used to determine the cell death mechanism (apoptosis/necrosis) of cytotoxic effects of *Pelargonium quercetorum* extract on cells. Presence of apoptosis is demonstrated by Annexin-V and Hoechst 33342 staining methods with fluorescence microscope. Furthermore, results are supported with Western blot method. In conclusion, it has been determined that *Pelargonium quercetorum* extract has a cytotoxic effect on cells and inducing secondary necrosis/ late stage of apoptosis. In conclusion there is need for further analyses to determine the active ingredient and the prediction of usage of extract as a complementary approach in the treatment of cancer.

Keywords: *Pelargonium quercetorum*, lung cancer, cytotoxicity, apoptosis.
2013, ix + 85 pages.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarında danışmanlığımı yapan, eğitimimin düzenli işleyişi için büyük bir özveri gösteren ve her konuda desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE'ye,

Alanımda yetişmeme yönelik emekleri bulunan bölüm başkanım Prof. Dr. Şükran DERE'ye ve bölüm hocalarıma,

Tez konumun bulunması, planlanması ve çalışmamın yürütülmesi süresince her aşamada bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, çalışma alanımla ilgili deneyim kazanmamı sağlayan, hem manevi hem maddi desteğini esirgemeyerek geleceğime yön veren ve mesleki açıdan iyi birer bilim insanı olarak yetişmemiz için büyük emek harcayan, her zaman ilgi, anlayış ve desteğini gördüğüm, yanında çalışmaktan onur duyduğum değerli hocam Sayın Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya,

Çalışmalarında her zaman deneyimlerinden yararlandığım ve yakın ilgilerini hiç esirgemeyen hocaları Sayın Doç. Dr. Ferda ARI ve Sayın Doç. Dr. Arzu YILMAZTEPE ORAL'a,

Çalışmamda yer alan bitkiyi toplayan Sayın Arş. Gör. Mehmet FIRAT'a, bitkinin sağlanmasına katkısı bulunan Sayın Yrd. Doç. Dr. Ayşegül ÇEBİ'ye, bitkinin ekstraksiyon aşamasında yardımlarından dolayı Sayın Doç. Dr. Serap ÇELİKLER'e, bitkinin içerik analizini yapan Sayın Doç. Dr. Mustafa ÖZEL'e, hücre hatlarını temin eden Sayın Prof. Dr. Hakan AKÇA'ya,

Tez çalışmam boyunca bana her konuda yardımcı olan, benden moral ve desteklerini esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan çok büyük keyif aldığım meslektaşlarım Mehmet SARIMAHMUT, Buse CEVATEMRE, Didem KARAKAŞ ve Merve ERKISA'ya,

Çalışmamın her aşamasında bana güç veren, beni cesaretlendiren, her zaman maddi ve manevi desteğini, hoşgörüsünü, sabrını ve güler yüzünü benden hiç esirgemeyen kıymetli arkadaşım Ömer Emre BOZDOĞAN'a,

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, hayatım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayıp her zaman yanımda olan ve aldığım her kararda beni destekleyen, bugünlere gelmemde en büyük emeğin sahibi ve başarılarımın esin kaynağı sevgili aile fertlerime sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışması Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı (UAP(F)-2012/17) numaralı proje tarafından desteklenmiştir.

Nazlıhan AZTOPAL

26/07/2013

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
GİRİŞ	1
1. KAYNAK ÖZETLERİ	3
1.1.Karsinogenezis.....	3
1.1.1.Kanser Hücrelerinin Özellikleri.....	4
1.1.2.Kanser Oluşumunda Etkili Olan Genler.....	5
1.1.2.1.Onkogenler.....	5
1.1.2.2.Tümör Baskılayıcı Genler.....	6
1.2.Akciğer Kanseri.....	8
1.2.1.Görülme Sıklığı ve Risk Faktörleri.....	8
1.2.2.Akciğer Kanserinin Moleküler Biyolojisi.....	11
1.3.Apoptozis.....	12
1.3.1.Apoptozisin İndüklenmesi.....	13
1.3.1.1.Kaspazların Apoptozisdeki Rolü.....	13
1.3.1.2.Mitokondrinin Apoptozisdeki Rolü.....	14
1.3.1.3.Bcl-2 Ailesinin Apoptozisdeki Rolü.....	15
1.3.2.Apoptozisin Mekanizmaları.....	15
1.3.2.1.Ekstrinsik Yolak.....	15
1.3.2.2.İntrinsik Yolak.....	17
1.3.2.3.Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptozis Oluşturulması.....	19
1.3.3.Hücre Ölümünde Gerçekleşen Morfolojik Değişiklikler.....	19
1.4.Tıbbi Bitkiler.....	20
1.4.1.Bitkisel Kökenli Anti-kanser Ajanlar.....	22
1.4.1.1.Klinik Olarak Kullanılan Bazı Bitkisel Kaynaklı Anti-kanser İlaçlar.....	22
1.5. <i>Pelargonium</i> Cinsinin Sistematik Sınıflandırılması.....	23
1.5.1. <i>Pelargonium</i> Türlerinin Dağılımı.....	24
1.5.2. <i>Pelargonium</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	25
1.5.3. <i>Pelargonium</i> Türlerinin Biyolojik Aktiviteleri.....	26
2.MATERYAL VE YÖNTEM	29
2.1.Materyal.....	29
2.1.1.Kimyasal Maddeler.....	29
2.1.2.Sarf Malzemeler.....	29
2.1.3.Cihazlar.....	29
2.2.Yöntem.....	30
2.2.1. <i>Pelargonium quercetorum</i> 'un Toplanması ve Tanımlanması.....	30
2.2.2. <i>Pelargonium quercetorum</i> 'un Ekstraksiyon İşlemleri.....	30
2.2.3. <i>Pelargonium quercetorum</i> Ekstraktının Hazırlanması.....	31
2.2.4. Hücre Kültürü.....	31
2.2.4.1.Hücre Soylarının Stoktan Çıkarılması.....	32
2.2.4.2.Hücre Soylarının Pasajlanması.....	33
2.2.4.3.Hücre Soylarının Stoklanması.....	33

2.2.4.4.Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması.....	33
2.2.4.5.Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı.....	34
2.2.5.MTT (Metiltiazotetrazolium) Canlılık Metodu.....	34
2.2.6.ATP (adenozin trifosfat) Canlılık Metodu.....	35
2.2.6.1.ATP Ölçümünün Yapılması.....	36
2.2.7.M30 Antijen (Kaspazla Kırılmış Sitokeratin 18) ve M65 Antijen Metodu...	37
2.2.8.Floresan Boyama Yöntemi ile Ölüm Modunun Belirlenmesi.....	39
2.2.8.1.Aneksin-V Boyama Metodu.....	39
2.2.8.2.Hoechst 33342 Boyama Metodu.....	40
2.2.9.Western Blot Analizi.....	41
2.2.9.1.Protein İzolasyonu.....	44
2.2.9.1.1.Çözeltiler.....	44
2.2.9.2.Proteinlerin BCA Yöntemi ile Konsantrasyonlarının Ölçülmesi.....	44
2.2.9.2.1.Çözeltiler.....	44
2.2.9.2.2.BSA Standartlarının Hazırlanması.....	44
2.2.9.2.3.BCA Ölçümünün Yapılması.....	45
2.2.9.3.Western Blot Yöntemi ile Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Aktarılması.....	45
2.2.9.3.1.Çözeltiler.....	45
2.2.9.3.2.Proteinlerin Yüklenmesi ve Jelde Yürütülmesi.....	46
2.2.9.3.3.Proteinlerin Transferi.....	46
2.2.9.3.4.β-Aktin Proteinlerinin Belirlenmesi.....	46
2.2.9.3.4.1.Bloklama.....	46
2.2.9.3.4.2.Birincil Antikor.....	46
2.2.9.3.4.3.İkincil Antikor.....	46
2.2.9.3.4.4.Görüntüleme.....	46
2.2.9.3.5.PARP Proteinlerinin Belirlenmesi.....	47
2.2.9.3.5.1.Birincil ve İkincil Antikorların Membrandan Uzaklaştırılması.....	47
2.2.9.3.5.2.Bloklama.....	47
2.2.9.3.5.3.Birincil Antikor.....	47
2.2.9.3.5.4.İkincil Antikor.....	47
2.2.9.3.5.5.Görüntüleme.....	47
2.2.9.3.6.Keratin 18 Proteinlerinin Belirlenmesi.....	48
2.2.9.3.6.1.Birincil ve İkincil Antikorların Membrandan Uzaklaştırılması.....	48
2.2.9.3.6.2.Bloklama.....	48
2.2.9.3.6.3.Birincil Antikor.....	48
2.2.9.3.6.4.İkincil Antikor.....	48
2.2.9.3.6.5.Görüntüleme.....	48
2.2.10.İstatistiksel Analiz.....	49
3.BULGULAR.....	50
3.1.MTT Canlılık Testi Bulguları.....	50
3.2.ATP Canlılık Testi Bulguları.....	54
3.3.M30-Antijen (Kaspazla Kırılmış Sitokeratin 18) ve M65 Antijen Bulguları...	55
3.4.Floresan Mikroskobu İle Yapılan Değerlendirmeler.....	58
3.4.1.Aneksin-V Boyama Yöntemi Bulguları.....	58
3.4.2.Hoechst 33342 Boyama Yöntemi Bulguları.....	60
3.5.Western Blot Bulguları.....	62
4.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	64
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	85

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ADK	:Adenokarsinom
AIF	:Apoptozis İndükleyici Faktör (Apoptosis inducing factor)
ATP	:Adenozin Trifosfat (Adenosine triphosphate)
BHK	:Büyük Hücreli Karsinom
CARD	:Kaspaz Takviye Alanı (Caspase recruitment domain)
CSF	:Koloni Uyarıcı Faktör (Colony Stimulating Factor)
DED	:Ölüm Etkileyici Alan (Death effector domain)
DD	:Ölüm Alanı (Death domain)
DR	:Ölüm Reseptörü (Death Receptor)
DISC	:Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi (Death inducing signalling complex)
DMEM	:Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	:Dimetil Sülfoksit (Dimethyl sulfoxide)
DNA	:Deoksi Ribonükleik Asit (Deoxyribonucleic acid)
EndoG	:Endonükleaz D
FADD	:Fas İlişkili Ölüm Alanı (Fas associated death domain)
FBS	:Fetal Sığır Serumumu (Fetal bovine serum)
GDP	:Guanin Difosfat
GEF	:Guanin Değişim Faktörleri (Guanine Exchange Factor)
GTP	:Guanin Trifosfat
ICAD	:Kaspazla aktive edilmiş DNaz inhibitörü (inhibitor of caspase-activated DNase)
IGF	:İnsülin benzeri Büyüme Faktörü (Insuline-like Growth Factor)
KHAK	:Küçük Hücreli Karsinom
KHDAK	:Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
MOMP	:Mitokondri Dış Membran Permeabilizasyonu (mitochondrial outer membrane permeabilization)
MTT	:(3-(4,5-dimetiltiyazol -2)-2,5-difenil tetrazolyum bromid
NCI	:Ulusal Kansere Enstitüsü (National Cancer Institute)
NGF	:Nöron Büyüme Faktörü (Neuron Growth Factor)
PAGE	:Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Polyacrylamide gel electrophoresis)
PARP	:Poli (ADP-riboz) polimeraz (Poly ADP-ribose polymerase)
PBS	:Fosfat Tuz Tamponu (Phosphate buffered saline)
PI	:Propidyum İyodür (Propidium iodide)
PS	:Fosfatidil Serin (phosphatidylserine)
PQE	: <i>Pelargonium quercetorum</i> Ekstraktı
Rb	:Retinoblastoma
RNA	:Ribo Nükleik Asit (Ribonucleic acid)
RIP	:Reseptörle Etkileşen Protein (Receptor Interacting Protein)
ROCK 1	:Rho ilişkili Sarmal oluşturan Kinaz 1 (Rho-associated coiledcoil forming kinase I)
RPMI	:Roswell Park Memorial Institute Medium
SDS	:Sodyum Dodesil Sülfat (Sodium dodecyl sulfate)
SHK	:Skuamöz Hücreli Karsinom
TNF	:Tümör nekroz Faktörü (Tumor Necrosis Factor)
TNFR	:Tümör Nekroz Faktör Reseptörü (Tumor Necrosis Factor Receptor)
TRAIL	:TNF-ilişkili Apoptozis İndükleyici Ligand (TNF-related apoptosis inducing ligand)
WHO	:Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.Kanser gelişim sürecinde çeşitli genetik modeller	4
Şekil 1.2.Kanser hücrelerinin özellikleri	5
Şekil 1.3.Ras proteinlerinin regülasyonu	6
Şekil 1.4.p53 proteininin hücre siklusu ve apoptozis sürecindeki rolü	8
Şekil 1.5.Türkiye’de en sık görülen kanserlerin yaşa standardize insidans hızları	10
Şekil 1.6.Kaspazların aktifleşme mekanizması	14
Şekil 1.7.Reseptör aracılı kaspaz aktivasyonu	16
Şekil 1.8.Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis oluşturulması	18
Şekil 1.9.Apoptozis ve nekrozisin şematik karşılaştırılması	20
Şekil 1.10. <i>Pelargonium</i> cinsinin dünya çapında dağılımı	24
Şekil 1.11. <i>Pelargonium</i> türlerinin; <i>P. endlicherianum</i> ● <i>P. quercetorum</i> * Türkiye’de dağılımı	25
Şekil 1.12. <i>Pelargonium</i> cinsinin Türkiye’de bulunan iki türü	25
Şekil 2.1.Lusiferin/lusiferaz biyoluminesans tepkimesi	36
Şekil 2.2.Sitokeratin 18’in kaspazlar aracılığıyla kesimi ve bu bölgenin M30 ve M65 antikorları ile tanınmasının şematik gösterimi	37
Şekil 2.3.Apoptotik hücrelerde fosfotidil serin translokasyonu	40
Şekil 2.4.Western Blot Aşamalarının Şematik Gösterimi	43
Şekil 3.1.PQE uygulanan A549, PC3 ve H1299 hücre soylarının canlılık yüzdelerinin grafiği	50
Şekil 3.2.MTT testi uygulamasından önce A549, PC3 ve H1299 hücrelerinin morfolojik görüntüleri	52
Şekil 3.3.MTT testi uygulamasından sonra A549, PC3 ve H1299 hücrelerinin morfolojik görüntüleri	53
Şekil 3.4.PQE uygulanan A549, PC3 ve H1299 hücre soylarının canlılık yüzdelerinin grafiği	54
Şekil 3.5.A549 ve PC3 hücre soyları ile yapılan çalışmanın M30-Antijen standart eğri grafiği	55
Şekil 3.6.H1299 hücre soyu ile yapılan çalışmanın M30-Antijen standart eğri grafiği	56
Şekil 3.7.100µg/ml PQE ve 3,18µM Paklitaksel muamelelerinin 48 saatte A549, PC3 ve H1299 hücre soylarında M30-Antijen üzerine etkisi.	56
Şekil 3.8.M65-Antijen standart eğri grafiği	57
Şekil 3.9.100µg/ml PQE ve 3,18µM Paklitaksel muamelelerinin 48 saatte A549, PC3 ve H1299 hücre soylarında M65-Antijen üzerine etkisi	57
Şekil 3.10.A549 hücrelerinin 24 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri	58
Şekil 3.11.PC3 hücrelerinin 24 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri	59
Şekil 3.12.H1299 hücrelerinin 24 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri	59
Şekil 3.13.100µg/ml PQE uygulanan hücrelerin 48 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri	61
Şekil 3.14. BSA standart eğri grafiği	62
Şekil 3.15.Anti-aktin, anti-PARP ve anti-keratin 18 antikorları ile yapılan Western blot sonucu bant profilleri	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. <i>Pelargonium quercetorum</i> ekstraktının içerik analizi	28
Çizelge 3.1.PQE uygulanan hücre soylarının 48 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri	51
Çizelge 3.2. PQE uygulanan hücre soylarında MTT canlılık testi sonuçlarına göre IC ₅₀ ve IC ₉₀ değerleri	51
Çizelge 3.3. PQE uygulanan hücre soylarının 48 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri	54
Çizelge 3.4.PQE uygulanan hücre soylarında ATP canlılık testi sonuçlarına göre IC ₅₀ ve IC ₉₀ değerleri	55
Çizelge 3.5.Örneklerin protein konsantrasyonları (mg/ml)	62

GİRİŞ

Akciğer kanseri 20. yüzyılın başlarında nadir rastlanan bir hastalık iken bugün dünyada yaygın olarak görülen ve yüksek ölüm oranına sahip kanser türlerinden biridir. Dünyada her yıl akciğer kanseri sebebiyle bir milyondan fazla kişi ölmektedir. Erken evrelerde beş yıllık sağkalım %60-70 iken, ileri evre olgularda bu oran %5'in altına düşmektedir (Travis ve ark. 1996, Mountain 1997, Ginsberg 2005). Akciğer kanserinin kabul gören en iyi tedavi şekli cerrahi operasyondur. Başarı ise ancak hastalığa erken evrede tanı konulması ile mümkün olmaktadır. Ancak akciğer kanserlerinin birçoğu erken dönemde bulgu vermediği için, teşhiste geç kalınmaktadır. Mortalitesi oldukça yüksek olan bu kanser türünde lokal ve sistemik adjuvan tedavilerdeki gelişmelere rağmen, ölümlerin çoğu tedaviye dirençli metastazlardan kaynaklanmaktadır (Ginsberg ve Rubinstein 1995, Shields 2000, Myrdal ve ark. 2001). Bu şekilde farklı organlarda ve aynı organın farklı bölgesinde oluşan metastazların cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi ile tamamen yok edilmesi neredeyse imkansız olup özellikle cerrahi şansını yitirmiş hastalar için kemoterapiyi destekleyici yeni tedavi yaklaşımları büyük önem taşımaktadır.

Fitoterapi, bitkiler kullanılarak yapılan tedavi yaklaşımı olup bitkilerin sağlığı korumak ya da geri kazanmak için tarihin her döneminde, her toplum tarafından kullanıldığı bilinmektedir. Günümüz tıbbında da bitkisel ilaçlarla tedaviye olan ilgi giderek artmaktadır. Dünya sağlık örgütü (WHO; World Health Organization) 2000 yılındaki raporunda, Avrupa, Avustralya ve Kuzey Amerika'da yaşayan insanların yaklaşık %50'sinin destekleyici tedavi metodlarından birini kullandıklarını ve en çok kullanılanın ise bitkisel ilaçlar olduğunu açıklamıştır (Gürün ve Süzer 2005).

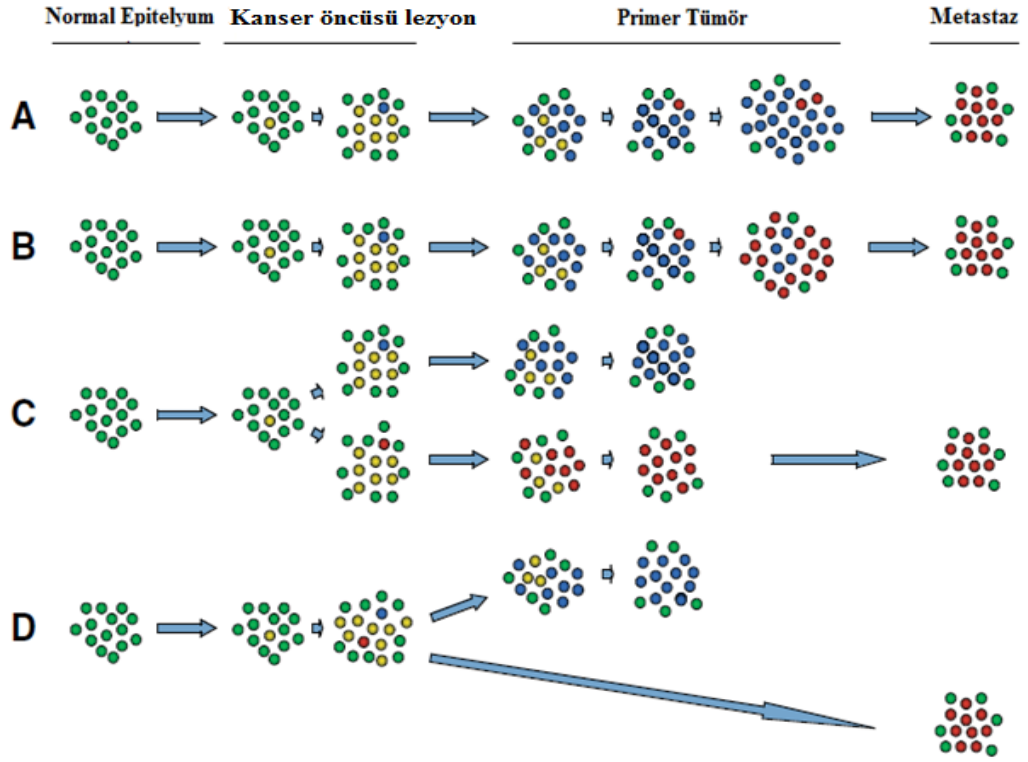
Geraniaceae ailesinin üyeleri, doğal olarak geleneksel tedavilerde kullanılan bitki gruplarından birisidir. Geraniaceae ailesine ait bitkilerin köklerinden elde edilen ekstraktlar Güney Afrika'da yerli bitkisel ilaçlar olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır (Seidel and Taylor, 2004). Geraniaceae ailesine ait olan ve geleneksel tedavide yaygın kullanımı olan *Pelargonium* türleri, oldukça değerli esansiyel yağlara sahiptir. Monoterpenik uçucu yağlar ise kanser oluşumunu ve ilerlemesini geriletken anti-tümoral aktiviteye sahiptir. *Pelargonium* kaynaklı Geranium monoterpen yağları, inflamasyon, dizenteri, ağır adet kanamaları ve kanser tedavisinde kullanılmaktadır (Fayed 2009). Ayrıca *Pelargonium* türlerinin ham ekstraktlarının anti-mikrobiyal, anti-fungal, anti-oksidan, anti-malaryal ve anti-kanser etkileri olduğu bilinmektedir (Datta ve ark. 1998, Lalli ve Jacqueline 2006). Fakat literatürde *Pelargonium quercetorum*'un biyolojik

aktivitesinin gösterildiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu alışma, *Pelargonium quercetorum* bitkisinden elde edilen ekstraktın akciğer kanseri hücre soyları (A549, PC3 ve H1299) zerindeki sitotoksik/apoptotik etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

1.KAYNAK ÖZETLERİ

1.1.Karsinogenezis

Normal hücreler sınırlı sayıda bölünme yeteneğine sahip olup yaşlandıklarında veya hasar gördüklerinde ölümlerini yeni hücreler almaktadır. Bazen bu süreç doğru işlememekte ve bu hasarlı ya da yaşlanmış hücreler ölmeyerek bölünmeye devam etmektedir. Kansere, hücrelerin doğal büyüme sürecinden çıkarak aşırı ve kontrolsüz çoğalmaları sonucu oluşan tümörlerin genel adı olup kontrolsüz bir şekilde çoğalan bu hücrelerin komşu dokuları işgali (invazyon) ve/veya kaynağını aldığı organdan vücudun diğer kısımlarına kan-lenf yoluyla yayılmasıyla (metastaz) sonuçlanabilmektedir (National Cancer Institute 2012). Kansere olgularında, hücreler bu denli hızlı çoğalırken aynı oranda hücre kaybı olmaması sonucunda hücreler birikmeye başlamakta ve bu durum hem kansere hücrelerindeki genetik anormalliklerden hem de immün sistemin bu hücreleri tanımada ve yok etmedeki başarısızlığından kaynaklanmaktadır. Bu sayede biriken kitlelere tümör adı verilmektedir (Yılmaz ve Altunok 2011). Tümör gelişiminin başlangıç aşamasında tek bir hücrenin anormal çoğalmasına yol açan genetik değişikliklerin rol aldığı düşünülmektedir. Sonrasında ise hücre çoğalması (proliferasyon) ile klonal bir şekilde tümör hücrelerinin popülasyonu artmakta ve yine bu hücrelerde meydana gelen ek mutasyonlar ile tümör gelişimi ilerlemektedir. Ayrıca oluşan bu mutasyonlardan bazıları hücrelere daha hızlı büyüebilmeleri için seçici bir avantaj sağlamakta ve bu şekilde mutasyon taşıyan hücreler tümör popülasyonu içerisinde baskın hale gelmektedir. Mutasyona uğramış tek bir hücreden gelişen ilk hücre kitlesi (tümör) iyi huylu (benign) tümör olarak sınıflandırılmakta ve bu tümör hücrelerinin büyüme kontrolünde azalmalar olup vücudun diğer bölümlerine yayılma kabiliyetleri bulunmamaktadır. Ancak ilerleyen proliferatif (çoğalma) süreçte kötü huylu (malign) tümörlere dönüşerek başka dokulara yayılabilme yeteneği kazanmakta ve dolaşım sistemi yoluyla gittiği dokularda kansere neden olmaktadır (Şekil 1.1). Hem malign hem de benign tümörler, köken aldıkları doku ve hücre türüne göre sınıflandırılmaktadır. Karsinomlar, epitel hücrelerden köken alan malignitelerken, bağ dokusu ya da kas hücrelerinden köken alan solid tümörler sarkom olarak adlandırılır. Kan yapıcı hücrelerden türeyen lösemiler ise bu iki ana kategoriye de girmezler (Clark 1991, Yokota 2000, Alberts ve ark. 2002, Yokota ve Kohno 2004).



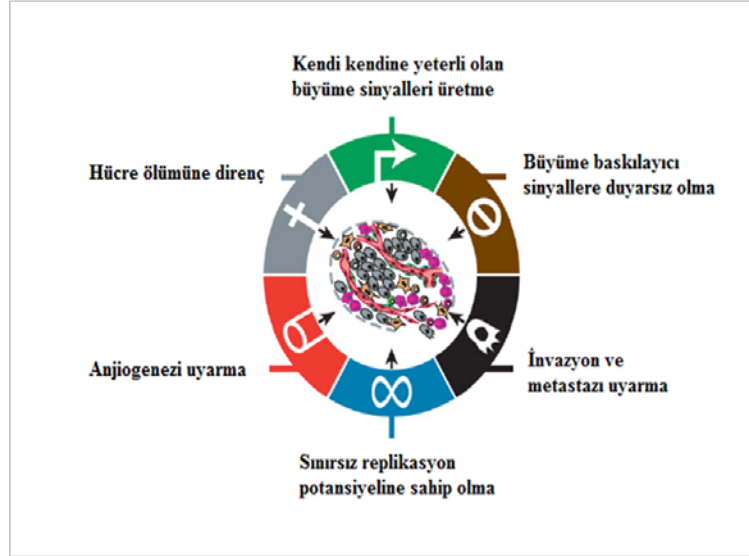
Şekil 1.1. Kanser gelişim sürecinde çeşitli genetik modeller. ● Normal epitelyal hücreler ● Kanser öncüsü hücreler ● Metastaz yeteneği olmayan kanser hücreleri ● Metastaz yeteneği olan kanser hücreleri. A ve D modellerinde yalnızca metastaz yeteneği olan kanser hücreleri gösterilirken, B ve C modellerinde metastaz yeteneğine ek olarak primer kısımda baskın büyüme yeteneği olan kanser hücreleri gösterilmiştir (Yokota ve Kohno 2004).

1.1.1.Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Kanser gelişimi çok basamaklı bir süreç olup bu süreçte rol alan kanser hücrelerinin;

- Kendi kendine yeterli olan büyüme sinyalleri üretme,
- Büyüme baskılayıcı sinyallere duyarsız olma,
- Hücre ölümüne direnç,
- Sınırsız replikasyon potansiyeline sahip olma,
- Anjiogenezi uyarma
- İnvazyon ve metastazı uyarma gibi öne çıkan altı farklı biyolojik yeteneği

vardır. Son yıllarda, kavramsal ilerlemeyle birlikte enerji metabolizmasını yeniden programlama ve bağışıklık tahribinden kaçınma özellikleride bu listeye eklenmiştir (Şekil 1.2) (Hanahan ve Weinberg 2011).



Şekil 1.2. Kanser hücrelerinin özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2011).

1.1.2.Kanser Oluşumunda Etkili Olan Genler

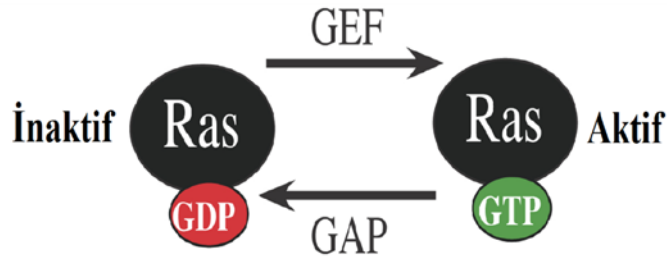
1.1.2.1.Onkogenler

Onkogenler; hücre büyümesi, çoğalması ve farklılaşmasının kontrolü ile ilişkili protoonkogen olarak isimlendirilen normal genlerin mutasyona uğraması veya anormal ifade edilmesiyle oluşur. Büyüme faktörleri, reseptörler, hücre içi sinyal iletilicileri, hücre döngüsünü kontrol eden proteinler ve transkripsiyon faktörleri protoonkogen grubunda yer alır. Onkogenler; kanser gelişimini doğrudan ve dolaylı olarak etkileyen, ekspresyonları tümör gelişimine neden olabilen genlerdir ve ürünleri; transkripsiyon faktörleri, kromatin değiştiriciler, büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri, sinyal dönüştürücüler ve apoptozis düzenleyicileridir (Dilsiz 2004, Cooper ve Hausman 2006, Croce 2008).

▪ Ras Geni

Ras proteinleri normal olarak hücrede çoğalma, farklılaşma, büyüme, adezyon, yer değiştirme, hücre iskeleti bütünlüğü ve canlı kalma ile ilgili bir çok hücre gelişimin düzenlenmesinden sorumludur (Rajalingam ve ark. 2007). Memelilerde ras onkogen gen ailesi p21s olarak adlandırılan molekül ağırlığı 21kDa olan proteinleri kodlayan üç üyeden (H-, K- ve N-ras) oluşmaktadır. p21s, sitoplazmik membranın iç yüzeyinde lokalize olmuş küçük Guanin Trifosfat (GTP) bağlayıcı proteinlerdir. Ras ailesi proteinleri GTP bağlı (aktif) veya Guanin Difosfat (GDP) bağlı (inaktif) formları ile hücre içerisindeki çeşitli proteinlerin fosforillenmelerine yol açarak hücre içi sinyal iletimini tetiklerler. Guanin Değişim Faktörleri (GEF; Guanine Exchange Factor) Ras'a bağlanan GTP'nin hidrolizinden sonra, proteine bağlı kalan GDP'nin uzaklaştırılması

için gereklidir. GEF proteinleri Ras-GDP ile etkileştiğinde GDP'yi proteinden uzaklaştırarak, Ras'ın GTP'yi bağlayabilmesine olanak tanır. Bağlanan GTP, Ras'ın içsel GTPaz aktivitesi ile ve bunun yanı sıra, Ras'a bağlanan GTPaz Aktive edici Proteinler'in (GAP) etkisi ile hidrolize uğrar (Şekil 1.3). GTPaz'ın bozuk olması, molekülün GTP formunun devamlı olarak aktif kalmasına yol açtığından nükleus proteinleri ve DNA transkripsiyonu devamlı olarak aktive edilir (Lowitz ve Casciato 2000, Martinez ve ark. 2003, Telkoparan ve Tazebay 2011).



Şekil 1.3. Ras proteinlerinin düzenlenmesi (regülasyon) (Sundaram 2006).

▪ c-Myc

Bir transkripsiyon faktörü olan c-Myc, pek çok insan tümöründe anormal şekilde düzenlenmektedir. İnsan c-Myc proteini 439 aminoasitten meydana gelir. Nükleusta yer alır ve kısa bir ömrü vardır. c-Myc; metabolizma, protein biyosentezi, hücre siklus düzenlenmesi, apoptozis (Bcl-2'yi aşağı yönde düzenleyerek), hücre adezyonu ve sitoskelet yapısını sağlayan belirli gen sınıflarıyla düzenli olarak etkileşim halindedir. Protoonkogen olan c-myc'nin hatalı düzenlenmesi, hücre proliferasyonunu (siklinleri yukarı ve p21'i aşağı yönde düzenleyerek) ve neoplastik transformasyonu teşvik eder (Dang 1999).

1.1.2.2. Tümör Baskılayıcı Genler

Hücre büyümesinin negatif regülatörü (düzenleyici) olarak işlev gören yani hücrelerin bölünmesine engel olan ve kanser gelişimini baskılayan genler tümör baskılayıcı genler veya antionkogenler olarak adlandırılırlar (Osborne ve ark. 2004). Tümör baskılayıcı genlerin kaybı veya inaktivasyonu hücreleri negatif büyüme sinyallerinden mahrum bırakır ve malignan transformasyona sebep olur. Tümör baskılayıcı genlerin hücre üzerindeki etkileri genetik değişiklikler sonrasında ortadan kalkmaktadır. Onkogenlerle tümör baskılayıcı genlerin aktivasyon sürecindeki fark; onkogenlerin dominant karakterli, tümör baskılayıcı genlerin ise resesif (çekinik) karakterli olmasıdır. Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunda her iki allelde de mutasyon olması gerekir ve bu

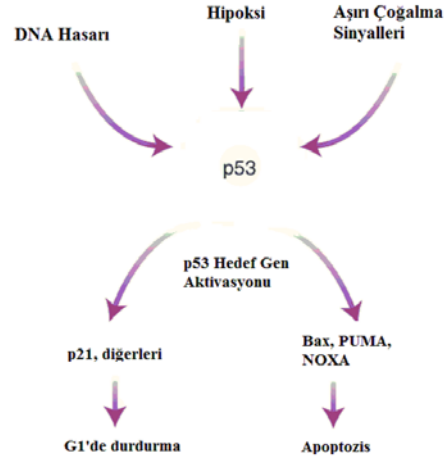
şekilde hücre üzerindeki etkileri tamamen ortadan kalkar. İnaktivasyon sonrasında ise hücre üzerindeki kısıtlayıcı etkilerinin yok olmasına bağlı olarak kanser gelişimi gözlenir (Diamandis 1997, Yılmaz ve Altunok 2011).

- **Rb Geni (Retinoblastoma geni)**

İlk bulunan tümör baskılayıcı gen olan Rb insanlarda 13. kromozomun üzerinde bulunur. Rb proteini (pRb), Rb gen ürünü olup hücre siklusunu düzenlemede önemli role sahip nükleer bir fosfoproteindir. pRb, S fazında hücresel replikasyonda yer alan nükleer transkripsiyon faktörü olan E2F proteini ile etkileşime girerek E2F'nin transkripsiyon faktörü olarak işlev görmesini önlemektedir. Rb proteininin fosforile formu inaktif, defosforile formu ise aktiftir. Fosforlanmamış Rb, E2F'ye bağlanarak E2F tarafından kontrol edilen genlerin transkripsiyonunu baskılar. G1'in sonunda Cdk4, 6 ve siklin D kompleksleri tarafından fosforillenip E2F'den ayrılır. E2F ise hücre döngüsünün S fazına girebilmesi için gerekli proteinleri kodlayan hedef genlerin ekspresyonunu uyarır. Böylece DNA sentezi başlamış olur. Rb mutantlar (yapısal fosforile olmuş ve E2F bağlanmamış), S fazı restriksiyon bölgesinde kontrolsüz hücre bölünmesine neden olmaktadır. Dolayısıyla hücreler tümörojenik olabilmektedir (Kopnin 2000, Liu ve ark. 2004, Ahlander ve Bosco 2009).

- **p53 Süpressör Gen**

Nükleer fosfoprotein p53 geni, insanda 17. kromozomun kısa kolunda (17p 13,1) yer alır ve hücre siklusunun ilerleyişi ile apoptozis gibi iki ana süreçte önemli rol oynar (Şekil 1.4). Aktivitesi bir transkripsiyon faktörü olan Mdm2 tarafından kontrol edilir. Normalde Mdm2 p53'e bağlanarak onun aktivitesini baskılamakta, DNA'da hasar oluştuğunda p53'ün fosforilasyonu artar ve Mdm2'den ayrılır (Ozaki ve Nakagawara 2011). p53; DNA hasarı, hipoksemi, onkogen aktivasyonu, oksidatif hasar ve nükleotid düzensizliği gibi birçok hücresel strese yanıt olarak hızlıca çekirdekte birikir ve G1'de hücre döngüsünü durdurur. Bu şekilde DNA hasarı olan hücrede ya onarım sağlanır ya da hücre apoptozise yönlendirilir. DNA hasarının onarılamadığı durumlarda Bax, Puma, Noxa ve p53AIP1 genleri p53 tarafından aktive edilirler ve mitokondriyal zar potansiyelinin bozulmasına katkıda bulunurlar. Mutant p53'e sahip hücrelerde ise DNA tamiri olmaksızın kontrolsüz bir çoğalma görülür. p53 insan kanserlerinde en sık bozulan genidir ve mesane, meme, kolon, akciğer, karaciğer, prostat ve cilt kanserlerini de içeren kanserlerin %50'den fazlası p53 mutasyonu ile ilişkilidir (Cachot ve ark. 1998, Sandal 2002, Köktürk ve ark. 2003, Ozaki ve Nakagawara 2011).



Şekil 1.4. p53 proteinin hücre siklusu ve apoptozis sürecindeki rolü (Attardi ve DePinho 2004'den değiştirilerek alınmıştır).

1.2.Akciğer Kanseri

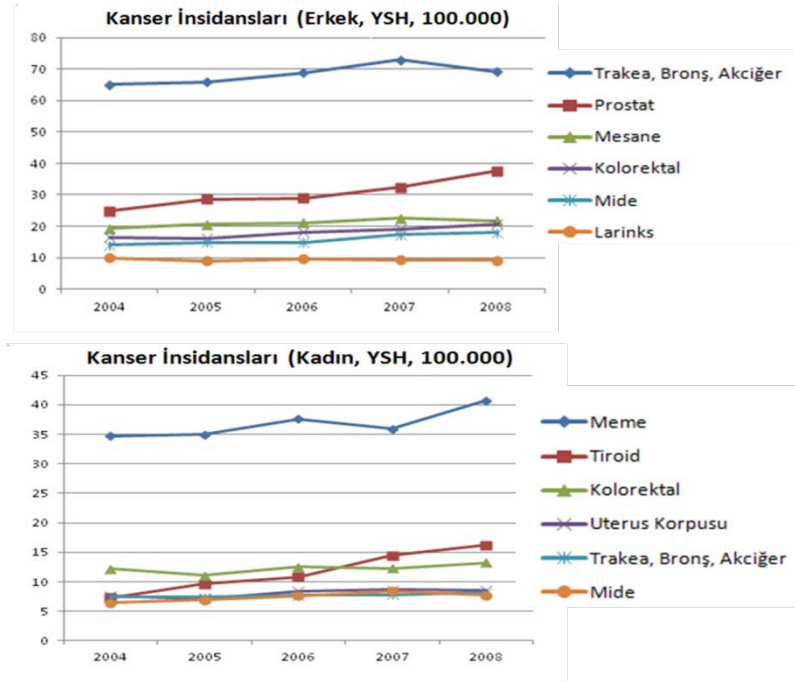
Akciğer kanseri, akciğer dokularındaki hücrelerin kontrolsüz çoğaldığı bir hastalıktır ve bu kontrolsüz çoğalma, hücrelerin çevredeki dokuları istila etmeleri veya akciğer dışındaki organlara yayılmaları (metastaz) ile sonuçlanabilir. Akciğer tümörlerinin %95'i Adenokarsinom (ADK), yassı (Skvamöz, epidermoid) Hücreli Karsinom (SHK), Büyük Hücreli Karsinom (BHK) ve Küçük Hücreli Karsinomdan (KHAK) oluşmaktadır (Zeren 2000). ADK, SHK ve BHK benzer klinik ve biyolojik karakter gösterdiği için Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri olarak (KHDAK) isimlendirilmektedir. SHK'da hücreler büyük, basık ve tabakalı, çekirdek (nükleus) oranı yüksek, tek sitoplazmalıdır ve akciğer tümörlerinin yaklaşık %30'u skuamöz hücreli karsinom (SHK) dur (WHO 1981). ADK'da hücreler belirgin nükleoluslu (çekirdekcik), veziküler nükleuslu ve geniş sitoplazmalı olup metastaz yeteneğine sahiptir. Sigara içimi ile daha az bağlantılı olan tümör tipidir ve %25 oranında görülür (Ertürk 2006). BHK, tüm akciğer kanserlerinin %9'unu oluşturmaktadır ve hücreler büyük nükleuslu, belirgin nükleolusludur. Yoğun nükleuslu, dar sitoplazmalı, düzenli küçük hücrelerden oluşan KHAK, genellikle sigara içenlerde görülmekte ve akciğer kanserlerinin %20-25'ini oluşturmaktadır (Zeren 2000).

1.2.1.Görülme Sıklığı ve Risk Faktörleri

Akciğer kanseri gelişmiş ülkelerdeki kanser ilişkili hastalıklar temel alındığında hem kadınlarda hem de erkeklerde son yıllardaki en önemli ölüm nedenidir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) raporuna göre de akciğer kanseri tüm dünyada, erkeklerde en sık

ölüme neden olan birinci, kadınlarda ise ikinci kanser türü olup her yıl yaklaşık 1,3 milyon ölüme neden olmaktadır (WHO 2004, 2008).

Akciğer kanseri 20. yüzyılın başlarında nadir görülen bir hastalık iken, endüstrileşme ve sigara içiminin artmasıyla birlikte 1950'li yıllardan günümüze görülme sıklığı (insidans) giderek artmıştır. Kadınlarda bu artış daha da belirgin gözlenmekte olup görülme yaşı da düşmektedir. Ölüm oranı (mortalitesi) oldukça yüksek ve tedaviye rağmen hastaların sadece %10-15'inde 5 yıllık sağkalımın sağlandığı bir hastalıktır (Dunagan ve ark. 2001, Jemal ve ark. 2002, Köktürk ve ark. 2004, Pauk ve ark. 2005). Akciğer kanserinin küresel insidans artış hızı yılda %0,5 iken, özellikle kadınlarda her yıl %4,1 artış söz konusudur. Erkeklerde en yüksek insidans oranları Doğu ve Batı Avrupa, Kuzey Amerika, Mikronezya, Polinezya ve Doğu Asya ülkelerinde görülürken kadınlarda Kuzey Amerika, Kuzey Avrupa ve Avustralya/Yeni Zelanda ülkelerinde görülmektedir. Gelişmiş ülkelerde önceden kanserden ölümlerin %34'ünden akciğer kanserleri sorumlu iken, günümüzde %28'inden sorumludur. Bu azalmaların nedeni gelişmiş ülkelerde sigara kullanımında belirgin azalma ve sigara içeriğinde yapılan değişikliklere bağlanmaktadır. Ancak gelişmekte olan ülkelerde sigara kullanımında azalma olmaması ve aksine artması sonucunda hem erkeklerde hem de kadınlarda tüm kanser ölümleri içinde önemli yerini korumakta ve belirgin artış gözlenmektedir (Akkoçlu 2006, Jemal ve ark. 2011). Türkiye'de de akciğer kanserine sık rastlanmaktadır. Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1999-2008 yılları arasında ülkemizdeki kanser insidansı giderek artış göstermiştir ve 2008 yılındaki kanser insidansı da 280,5/100,000 şeklinde bildirilmiştir. 2004-2008 yılları arasında 9 ilde yapılan inceleme sonucunda akciğer kanserinin erkeklerde 69,2/100,000'lik insidansla ilk sırada yer aldığı ve kadınlarda 8,2/100,000 insidans ile dördüncü sırada yer aldığı saptanmıştır (Şekil 1.5) (Anonim 2013).



Şekil 1.5. Türkiye'de en sık görülen kanserlerin yaşa standardize insidans hızları (YSH) (Anonim 2013).

Akciğer kanseri için birçok risk faktörü belirlenmiştir. Bunların arasında sigara içimi akciğer kanseri olgularının %85-90'ından sorumludur. Polisiklik hidrokarbonlar, vinil klorid, nikel, aldehidler, peroksitler, nitrozaminler ve benzopiren sigara dumanında tanımlanmış olan 40 kadar karsinojenden birkaçı olup akciğer kanseri olgularının kadınlarda %78, erkeklerde ise yaklaşık %90 oranında direkt sigara içimi ile ilişkili olduğu tahmin edilmektedir (Alberg ve Samet 2003, Özlü ve Bülbül 2005). Akciğer kanseri gelişimi, sigara içen bireylerde içmeyenlere oranla 10-25 katlık bir artış gösterir ve sigara kullanımı, akciğer kanserinin tüm histopatolojik tiplerinin gelişme riskini arttırır. Bu risk, sigaranın bırakılması ile birlikte progresif olarak azalır ve 15-30 yıllık sigarasız bir dönemden sonra hiç sigara içmemiş popülasyonla yaklaşık eşit düzeye gelir. İçilen sigara miktarı ve süresi, erken yaşlarda sigaraya başlamış olmak, sigaradaki katran ve nikotin içeriği akciğer kanseri gelişimine ilişkin yüksek risk faktörleridir (Loeb ve ark. 1984, Akkoçlu 2006). Pasif sigara içiciliği (sigara içilen ortamda bulunularak sigara dumanına maruz kalma) bile sigara kullanmak gibi akciğer kanseri açısından risk faktörüdür. Bununla beraber akciğer kanseri, sigara içmeyenlerde de görülebilmektedir. Akciğer kanserli erkeklerin %10 ve kadınların ise %20-25'sinde gelişen kanser sigara ile ilişkili değildir (Palmarini ve Fan 2001, Thun ve ark. 2008). Sigara kullanımı dışında hava kirliliği, diyet, genetik ve mesleki faktörler akciğer

kanserinde potansiyel risk faktörleridir. Hava kirliliğinin tüm akciğer kanser olgularının %1-2' sinden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (Doll ve Peto 1981, Kabir ve ark. 2007, Gorlova ve ark. 2007). Mesleki faktörlere bağlı olarak gelişen akciğer kanserli olguların yarısından fazlası asbest maruziyeti ile ilişkilidir. Asbest; gemi, uçak, otomobil, inşaat ve tekstil sektöründe kullanılmakta olan doğada bulunan, ısıya ve kimyasal maddelere dayanıklı bir grup fibröz silikatın genel adıdır. Akciğer kanseri asbest liflerinin inhalasyonuna bağlı olarak gelişebilmekte ve bu risk kümülatif asbest maruziyetiyle orantılı olarak artmaktadır. Sigara ile beraber asbest maruziyeti akciğer kanseri riskini sinerjistik olarak arttırmaktadır (Craighead ve Mossman 1982, O'Reilly ve ark. 2007, Attanoos 2010). Asbestin dışında mesleki olarak radon, krom, nikel, kömür, kadmiyum, uranyum parçalanma ürünleri, demir, arsenik, alüminyum, polisiklik hidrokarbonlar ve formaldehite maruz kalmak da akciğer kanseri riskini arttırmaktadır (Ruano-Ravina ve ark. 2003). Akciğer kanseri gelişiminde, genetik aktarım, sigaradan sonra en önemli risk faktörüdür. Sitokrom P-450, glutatyon transferaz, aril-hidrokarbon hidroksilaz sistemlerinin hepsi sigara dumanında bulunan karsinojen maddelerin inaktivasyonu ve metabolik detoksifikasyonundan sorumludur ve bu enzim sistemlerinin karsinojenlere karşı az veya daha fazla başarılı olmasının genetik aktarım ile ilgili olduğu ileri sürülmektedir (Sellers ve ark. 1990, Hecht 1999, Bouchardy 2001). Onkogenler, tümör supressör genler, DNA tamirinden sorumlu olan genlerde meydana gelen bazı değişikliklerin akciğer kanseri ile olan ilişkisi yapılan moleküler çalışmalarla ortaya konulmuştur (Economou ve ark. 1994, Lynch ve ark. 2004, Alberg ve ark. 2005).

1.2.2. Akciğer Kanserinin Moleküler Biyolojisi

Karsinogenezin temelini genetik hasar oluşturur. Genetik hasarın asıl hedefi olan genler; büyümeyi uyaran protoonkogenler, büyümeyi inhibe eden kanser baskılayıcı genler ve hasara uğrayan DNA'nın onarımını düzenleyen genlerdir. Akciğer karsinogenezinde rol alan moleküler mekanizmalar şöyle sıralanabilir;

- Onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu,
- Tümör baskılayıcı genlerin aktivasyon kaybı,
- Hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler,
- DNA onarımında görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler ve
- Büyüme faktörleri ile reseptörlerine ilişkin değişiklikler (Fong ve Minna 2002).

Ras ailesini oluşturan H-ras, K-ras ve N-ras genlerindeki nokta mutasyonlar GTPase aktivitesini değiştirip sürekli sinyal aktiviteleri ortaya çıkararak malign dönüşüme sebep olurlar. Küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinin %15-50'si K-ras mutasyonu içerir ve sağkalımda azalma görülür (Jacopson 1999). Myc ailesi, C-myc, N-myc ve L-myc'den oluşur ve hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında etkili olup DNA sentezinin başlamasında rol almaktadırlar. Myc genleri, sinyal artışı ve transkripsiyonel bozukluklar ile onkogen haline dönüşmektedir. Küçük hücreli akciğer kanserlerinin (KHAK) %18-31'i, KHDAK'lerinin ise %8-20'sinde myc aktivasyonu bulunmaktadır. C-myc'in, tümör büyüme hızında artış ve sağkalımda kısalma ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir (Mabry 1998, Hussain ve Harris 2000). Akciğer kanseri gelişiminde rol alan bir diğer gen retinoblastom (Rb) geni olup hücrel farklılaşmada çok önemli bir role sahiptir. Rb ailesi, hücre siklusunu G1 fazında durdurarak hücre bölünmesini kontrol eder ve bu yoldaki proteinlerin fonksiyon bozukluğu mitojenik aktivite ile sonlanır. Rb protein yokluğu KHAK'lerinin hemen hepsinde görülürken, KHDAK'lerinin sadece %10-30'unda görülmektedir (Fong ve Minna 2002). Tümör baskılayıcı bir gen olan p53'ün mutasyonu tüm kanserlerin %50'sinde görülürken, KHAK'lerinin %90'ında, yassı hücreli akciğer kanserlerinin %65'inde, büyük hücreli kanserlerin %60'ında ve adenokarsinomların %33'ünde gösterilmiştir (Mabry 1998, Hussain ve Harris 2000).

1.3.Apoptozis

Apoptozis ya da programlı hücre ölümü, çok hücreli canlıların gelişimi ve devamlılığında rol alan hücrel bir olaydır. Vücutta ihtiyaç duyulmayan, foksiyonları bozulan, fazla üretilmiş, yaşlanmış, düzensiz gelişmiş veya DNA'sında hasar olan hücreler çevreye zarar vermeden programlı yani düzenli bir yol izleyerek ölürler. Hücrelerin içeriden ve dışarıdan gelen çeşitli uyarılara yanıt olarak aktifleştirdiği fizyolojik bir mekanizma olup hücrenin kendisi tarafından kontrol edilen aktif bir süreçtir (Meier ve ark. 2000, Öktem ve ark. 2001, Ulukaya 2001). Çevreden gelen uyarılara yanıt olarak hücreler önce oluşan DNA hasarlarını onarmaya çalışır ve onarılamaması durumunda apoptozis sürecine girer. Böylece hasarlı hücrelerin çoğalması engellenerek tümör oluşumu gibi anormal gelişimlerin önüne geçilir (Altunkaynak ve Özbek 2008). Apoptozisi başlatan hücre dışı uyarılar arasında; Tümör Nekroz Faktörü (TNF), Koloni Uyarıcı Faktörler (CSF), Nöron Büyüme Faktörü (NGF), İnsülin benzeri Büyüme Faktörü (IGF), glukokortikoidler, sfingolipidler,

radasyon, ilaçlar ve çeşitli antijenler bulunur. Hücresel stres, radasyon, kimyasallar ya da viral enfeksiyonlar ise apoptozisi başlatan iç sinyaller arasında sayılabilir (Ulukaya 2001, Kandaş 2004, Akşit ve Bildik 2008).

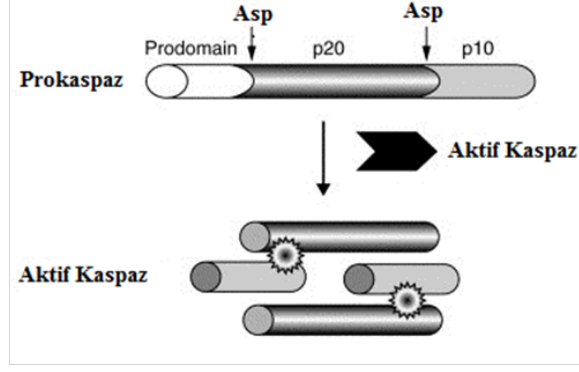
Apoptozisin gelişim, farklılaşma, proliferasyon ve homeostaz, immun sistemin dzenlenmesi ve işlevi, hasarlı ve zararlı hücrelerin ortadan kaldırılması gibi süreçlerdeki biyolojik önemi büyüktür. Bu nedenle, apoptozis sürecinde oluşacak bir hata; kanser, otoimmün hastalıklar ve viral enfeksiyonların yayılması ile sonuçlanabilmektedir. Apoptozisin çok fazla gerçekleştiği durumlarda ise Alzheimer, Parkinson, İnsüline bağımlı tip diyabet (tip 1 diyabet), Hepatit C enfeksiyonu ve miyokard enfarktüsü gibi hastalıklar gelişebilmektedir (Fadeel ve ark.1999, Evan ve Vousden 2001, Gewis, 2003).

1.3.1.Apoptozisin İndüklenmesi

1.3.1.1.Kaspazların Apoptozisdeki Rolü

Kaspazlar, zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein içeren, sistein proteazlar olarak adlandırılan enzimlerdir ve etkilerini, hedef proteinleri aspartik asit rezidülerinden keserek gösterirler. şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve bunların çoğu apoptozisde rol almaktadır. Bazıları başlatıcı kaspazlar (2, 8, 9, 10) olarak bilinirken, bazıları da ilerletici (efektör) kaspazlar (3, 6, 7) olarak bilinir. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek preteolitik bir kaskada (şelale tarzı reaksiyon dizisi) neden olurlar (Zhang ve ark. 2003, Oliver ve Valette 2005, Elmore 2007).

Kaspazlar; bir “prodomain”, bir p20 büyük alt birim ve bir p10 küçük alt birim içeren inaktif zimojenler şeklinde sentez edilirler. Aktivasyonları ise zimojenlerin proteolitik kesimi sonucu büyük ve küçük alt birimlerin ayrılması ve “prodomain”lerin uzaklaştırılması ile olur (şekil 1.6). Kaspazlar, substratlarında birbirini takip eden en az dört amino asit (P4–P3–P2–P1) yapısını tanırlar ve C-terminal rezidüsünden (P1) sonra kırarlar. Bu ise genellikle Asp (aspartik asit) rezidüsüdür (Fuentes-Prior ve ark. 2004, Timmer ve Salvasen 2007).



Şekil 1.6. Kaspazların aktifleşme mekanizması (Budd 2001'den değiştirilerek alınmıştır).

Başlatıcı kaspazlar, protein-protein etkileşim motiflerini barındıran uzun bir “prodomain” içerir. Bu motifler, ya ölüm etkileyici alan (DED; death effector domain) ya da kaspaz takviye alanıdır (CARD; caspase recruitment domain). Kaspazlar bu motifler sayesinde adaptör moleküllerle etkileşimlerini sağlarlar. İlerletici kaspazlar, kısa bir “prodomain” içerirler ve apoptozisin ilerlemesini sağlamak için çok çeşitli hücrel substratları kırarlar (Lamkanfi 2011).

Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir şelaleyi oluştururlar. Başlatıcı kaspazlar, ölüm sinyalini ilerletici kaspazlara iletirler. İlerletici kaspazların bazıları lamin, hücre içi iskelet ve çekirdek zarı proteinlerini parçalar. Kaspaz 3, DNA onarımında görevli olan PARP'ı kırarak inaktive eder ve DNA onarımını engeller. Bazıları ise bir dizi DNaz'ı aktive ederek DNA'nın parçalanmasına yol açar (Ulukaya 2001, Oliver ve Valette 2005). IAP'lar (apoptozis inhibitörleri) sitozolde bulunur ve kaspazların inaktif veya aktif formlarına bağlanarak fonksiyonlarını baskılar. Smac/DIABLO ise mitokondrinin iç zarında bulunur ve IAP bağlanma motifi içerir. Apoptozis sürecinde sitokrom-c ile beraber salınarak IAP'ları baskılar ve böylece kaspaz aktivasyonunu sağlar (Zimmermann ve Green 2001a, Zhang ve ark. 2003).

1.3.1.2.Mitokondrinin Apoptozisdeki Rolü

Hücre ölümünün düzenlenmesinde mitokondri önemli bir rol oynar. Mitokondri, Apoptozis İndükleyici Faktör (AIF), Smac/DIABLO ve sitokrom c gibi birçok pro-apoptotik proteini içermektedir. Bu faktörlerin mitokondriden salınmaları mitokondriyal membranda por oluşumu yoluyla gerçekleşmektedir. Bu porların; hücrel stres, serbest radikal hasarı veya büyüme faktörü yoksunluğu gibi apoptotik sinyaller ile aktive olan bcl-2 ailesi proteinlerinin pro-apoptotik üyelerinin (Bax, Bad gibi) aktivitesi yoluyla

oluştugu düşünölmektedir. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri olan bcl-2 ailesi mitokondri üzerindeki etkilerini ya sitokrom c'nin sitozole salınmasını sağlayıp apoptozisi uyararak ya da sitokrom c salınımına engel olup apoptozisi baskılayarak gösterir (Palmer ve ark. 2000, Suh 2002).

1.3.1.3.Bcl-2 Ailesinin Apoptozisdeki Rolü

Bcl-2 ailesi üyeleri apoptozis düzenleyici faktörlerin önemli bir grubunu oluşturmaktadır. Bcl-2 özellikle mitokondri dış membranda bulunmaktadır ve iyon transportunu düzenlemektedir. Bcl-2 proteinlerinin bazıları anti-apoptotik (bcl-2, bcl-XL, Mcl-1) bazıları da pro-apoptotiktir (Bax, bcl-Xs, Bad, Bim, Bak, Bok, Bid). Apoptotik uyarılara karşı hücrelerin duyarlılığı pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin arasındaki dengeye bağlıdır. Pro-apoptotik proteinler fazla eksprese edildiğinde hücreler apoptoza daha duyarlı, anti-apoptotik proteinler daha fazla eksprese edildiğinde hücreler apoptoza daha dirençli olmaktadır. Pro-apoptotik bcl-2 proteinleri hücrel hasar ya da stresin algılayıcıları olarak görev yapar ve genellikle sitozolde bulunur. Hücrel stresi takiben, anti-apoptotik proteinlerin bulunduğu mitokondri yüzeyine doğru yer değiştirmektedirler. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki etkileşim, anti-apoptotik bcl-2 proteinlerinin normal fonksiyonunu bozar ve mitokondride porların oluşumuna, sitokrom c ve diğer pro-apoptotik moleküllerin zarlar arası bölgeden salınımına neden olur. Bu da apoptozom oluşumu ve kaspaz kaskadı aktivasyonuna yol açmaktadır (Robertson ve Orrenius 2000, Fan ve ark. 2005).

1.3.2.Apoptozisin Mekanizmaları

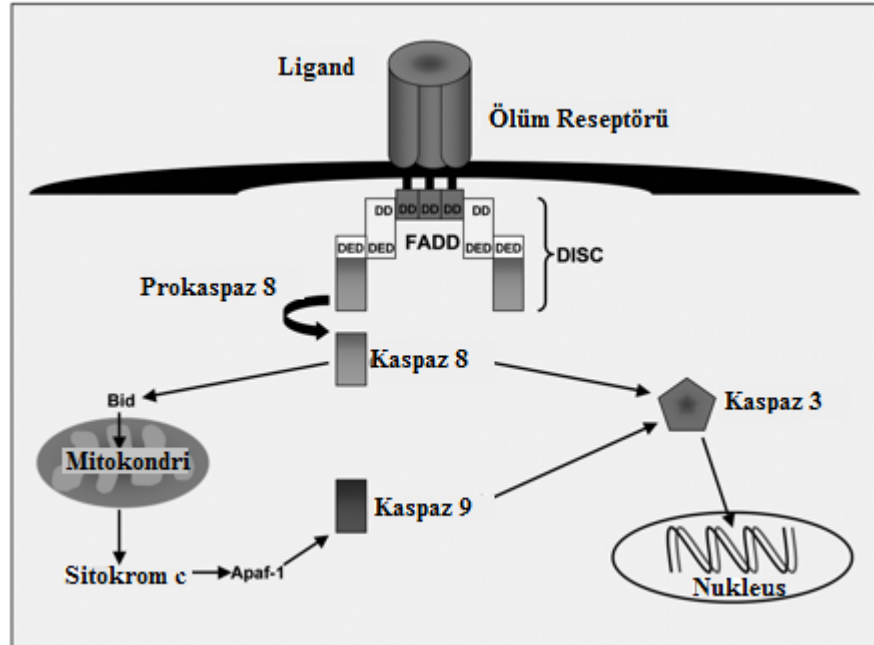
Apoptozisin indüklenmesinde üç sinyal yolunun rol aldığı bilinmektedir;

1. Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri ile tetiklenme/ Ekstrinsik (dışsal) yolak
2. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis oluşturulması/ İntrensik (içsel) yolak
3. Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis oluşturulması

1.3.2.1.Ekstrinsik Yolak

Ölüm reseptörleri (DR) olarak bilinen ve Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü (TNFR) geni ailesinin üyesi olan; TNFR-1, Fas/CD95/APO-1 ve Tnf-İlişkili Apoptozis İndükleyici Ligand (TRAIL) reseptörleri olan DR-3 (TRAMP), DR-4 (TRAIL-R1) ve DR-5 (TRAIL-R2)'in ilgili ligandlarla etkileşime girmesi sonucunda apoptozis indüklenir. TNFR süper ailesi üyeleri, tip I transmembran proteinleri olup hepsi sistein bakımından zengin ekstrasellüler subdomainler içermektedirler. Bu özellik TNFR süper

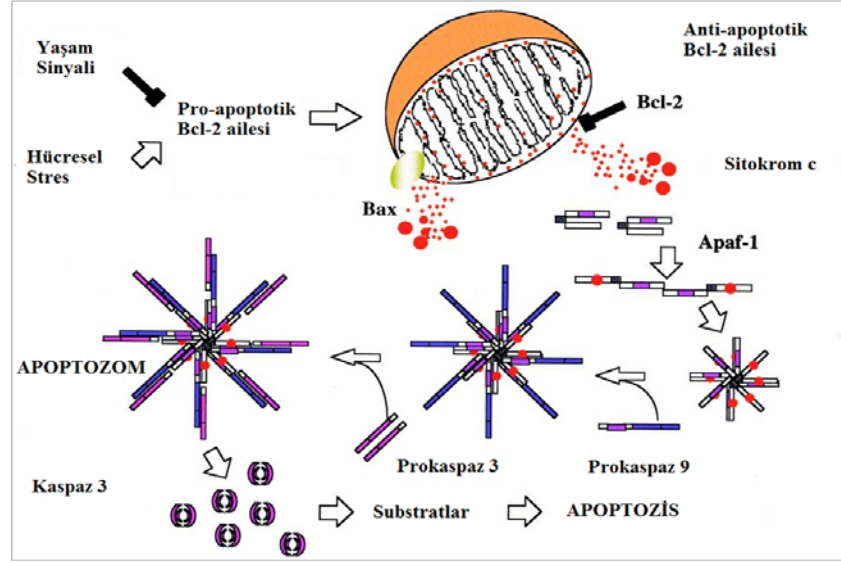
ailesi üyelerinin kendilerine özgü ligandları tarafından tek tek tanınmasını sağlamaktadır. Ölüm reseptörleri ayrıca apoptotik sinyalin transdüksiyonu için gerekli olan 80 aminoasit uzunluğunda intraselüler Ölüm Domaini (DD; Death Domain) içerir. Ölüm reseptörlerine bağlanan ligandlar (FasL, TNF, TRAIL) yapı olarak reseptörler ile ilişkili proteinler olup TNF süperailmesine aittirler. Bu ölüm ligandları tip II transmembran proteinleri gibi eksprese edilirler. Bazı durumlarda, bu proteinler proteolitik kırılabilir ve serbest kalabilirler (Ghobrial ve ark., 2005; Guicciardi ve ark., 2009). Ölüm reseptörlerinin ligandları yani aktivatörleri reseptörlerin oligomerizasyonuna yol açarak aktifleşmelerine neden olmaktadır. Reseptörlerin aktivasyonu, Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi (DISC) denilen ve proteinlerden meydana gelen bir kompleks oluşumuna sebep olur. DISC, adaptör protein Fas ilişkili ölüm alanını (FADD) ve TNFR-1 ilişkili ölüm bölgesi proteinini (TRADD) içerir. Bu ölüm bölgeleri prokaspaz-8'i aktifleştirmektedir. DISC yapısında yer alan prokaspaz 8'in aktivasyonunu takiben kaspaz 8 sırasıyla kaspaz 3, 6 ve 7'nin aktive olduğu bir kaspaz kaskatını harekete geçirir. Kaspaz 8'in aktif hale geçmesi ayrıca Bid'in aktive olmasına neden olur. Kırılmış Bid (tBid) sonrasında mitokondriye geçer ve sitokrom c, SMAC ve kalsiyum salınımını uyarır (Şekil 1.7) (Elmore 2007, Solakoğlu 2009, Dickens ve ark. 2012).



Şekil 1.7. Reseptör aracılı kaspaz aktivasyonu (Straszewski-Chavez ve ark. 2005'den değiştirilerek alınmıştır).

1.3.2.2.İntrinsik Yolak

İçsel/mitokondriyal yolak, pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri olan Bcl-2/Bax gen ailesi ile düzenlenmekte olup uyarıldığında mitokondriden sitokrom-c salınımına ve böylece ölüm sinyaline sebep olur. İki yol da (dışsal ve içsel), düzenleyici ve yapısal molekülleri kıran ve bunun sonucunda hücrenin ölümüne sebep olan kaspaz denilen proteaz kaskadının aktivasyonunu içeren ortak bir yolda birleşir (Ghobrial ve ark. 2005). Anti-apoptotik üyeler olan Bcl-2 ve Bcl-XL, kaspazların öncü formlarını durdurarak ya da apoptogenik faktörlerin mitokondriden salınımını engelleyerek hücrenin yaşamasını teşvik ederken; Bax, Bad, Bim, Bid gibi pro-apoptotik üyeler hücreyi apoptozise teşvik ederler. Normal durumda Bax ve Bak proteinleri Bcl-2 tarafından inaktif halde tutulur. Apoptotik sinyal oluştuğunda Bcl-2 inaktif hale geçerken aktifleşen Bax ve Bak mitokondri dış membranında porların oluşmasına ve zar potansiyelinde değişime neden olurlar. Mitokondriyal yolun kilit olayı Mitokondri Dış Membran Permeabilizasyonudur (MOMP) ve sonucunda; sitokrom c, mitokondri türevli kaspaz aktivatörü/IAP bağlayıcı protein Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, AIF ve endonükleaz D (EndoG) gibi mitokondri membran proteinleri sitozole salınır. Mitokondri iç membran yüzeyinden sitokrom c'nin sitozole salınması ile sitokrom c, sitoplazmik protein olan Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1 (Apaf-1)'e bağlanır ve onu aktive eder, dATP/ATP'nin de ortamda bulunması ile Apaf-1/sitokrom c kompleksi heptamerik bir yapıya oligomerize olur. Bu yapının oluşması, prokaspaz 9'un Apaf-1 ile etkileşimini mümkün kılar ve apoptozom kompleksi oluşur (Şekil 1.8). Apoptozomun görevi, başlatıcı kaspaz olan kaspaz 9'u aktive etmektir ve aktif kaspaz 9, kaspaz-3'ü veya diğer ilerletici kaspazları aktive ederek kaspaz kaskadına aracılık eder.



Şekil 1.8. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis oluşturulması (Zimmermann ve ark. 2001b).

Aktif kaspaz 3, kaspazla aktive edilmiş DNaz inhibitörü (ICAD; inhibitor of caspase-activated DNase) poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP, DNA tamir enzimi), Rho ilişkili sarmal oluşturan kinaz I (ROCKI; Rho-associated coiledcoil forming kinase I), aktin, fodrin ve lamin gibi hücresel substratları kırarak apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlar. CAD normal hücrelerde ICAD'üne bağlı ve inaktif halde bulunur ve aktif hale geçtiğinde kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nükleozomal fragmentlere kesilmesine neden olur. Ayrıca kaspaz aktivitesini inhibe eden ve aktiviteleri Smac veya Omi/HtrA2 gibi fonksiyonel analoglar ile engellenmiş birçok IAP'lar (apoptozis inhibitörleri) vardır. Ölen hücrelerde Smac ve Omi/HtrA2 (mitokondriyel proteinler, pro-apoptotik proteinler) mitokondriden salındığında IAP'lar inaktifte olmakta ve böylece ilerletici kaspazların inhibisyonu engellenip hücrelerin apoptozise gitmeleri sağlanmaktadır (Ulukaya 2001, Zhang ve ark. 2003, Riedl ve ark. 2007, Li ve Yuan 2008, Akşit ve Bildik 2008, Duprez ve ark. 2009).

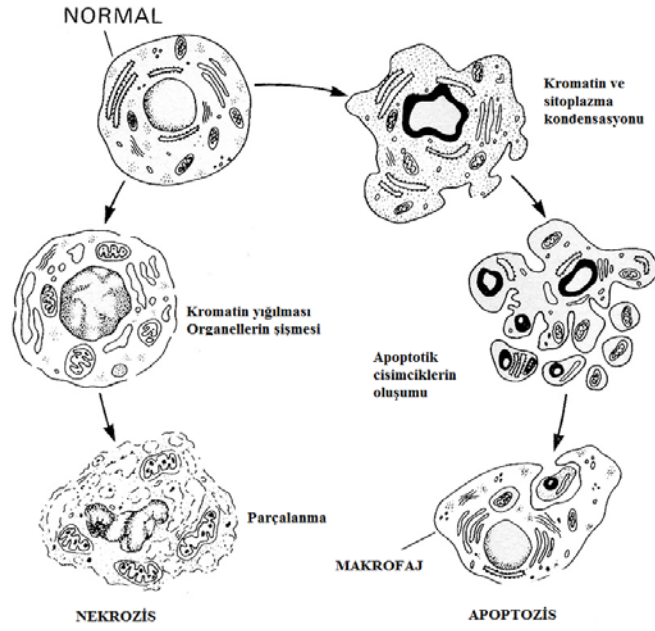
Bu içsel ve dışsal yol mekanizmaları kaspaz-bağımlı apoptozisi göstermektedir. Ayrıca kaspazlardan bağımsız olarak apoptozise neden olduğu düşünülen kaspaz aktivasyonunun gerçekleşmediği bir mekanizma da bulunmaktadır. Bu mekanizmada AIF (apoptozis indükleyici faktör) mitokondriden salınıp nükleusa geçmekte ve nükleazları aktifleştirerek DNA hasarına yol açmaktadır. AIF, steroidler, granzyme B ve endonukleaz G kaspazlardan bağımsız olarak apoptozise neden olmaktadır (Ulukaya, 2003, Dash 2007).

1.3.2.3.Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptozis Oluşturulması

Son zamanlarda amiloid β nörotoksisitesine katkıda bulunan kaspaz 12'ye bağımlı Endoplazmik Retikulum (ER) aracılı apoptotik yol tarif edilmiştir (Nakamura ve ark. 2000, Keane ve ark. 2001). Bu yol mitokondrial/sitokrom-c ve ölüm reseptör aracılı apoptozisten farklı bir yol olup kaspaz 12, ER membranında lokalize halde bulunur ve ER aracılı apoptozis için gerekli bir kaspazdır. Son çalışmalar göstermiştir ki Ca^{++} seviyelerinin yükselmesi ve kalpainin endoplazmik retikulumu etkilemesi ile prokaspaz 12 aktifleşir. Aktifleşen kaspaz 12 sitoplazmaya yönelerek kaspaz 9 ile etkileşir ve sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder (Rao ve ark. 2001).

1.3.3.Hücre Ölümünde Gerçekleşen Morfolojik Değişiklikler

Apoptotik hücreler, piknoz (hücre çekirdeğinin küçülmesi), nükleer fragmentasyon, deformasyon ve komşu hücrelerle temas kaybı gibi tipik morfolojik özellikler ile tanımlanırlar. Kromatin kondanse olarak nükleer membranın altında konumlanır ve plazma membranı bleblenir. Son olarak hücre sitozol, kondanse kromatin ve organelleri içeren membranla çevrili yapılara yani “apoptotik cisimcikler”e parçalanır. Apoptotik cisimcikler; makrofajlar, parankimal hücreler veya neoplastik hücreler tarafından fagosite edilir ve dokudan herhangi bir inflamatuvar yanıt oluşmadan uzaklaştırılırlar. Bu morfolojik değişiklikler, apoptotik bir hücrede meydana gelen karakteristik moleküler ve biyokimyasal olayların neticesidir. Sitoplazma ve organellerin şekil ve bütünlüğünü belirleyen bazı protein substratların ve DNA'nın oligonükleozomal parçalanmasını sağlayan proteolitik enzimlerin aktivasyonu, bu olaylardan öne çıkanlardır (Saraste ve Pulkki 2000, Gewis 2003, Kepp ve ark 2011). Diğer bir hücre ölüm şekli olan nekrozis hücrenin yaralanmalar sonucu zarar görerek şişip, patlayarak ölmesi olarak tanımlanır (Şekil 1.9). Apoptozis gibi programlı fizyolojik bir mekanizma olmadığı ve kontrolsüz gerçekleştiği kabul edilmektedir. Ancak nekrotik ölümden anahtar düzenleyiciler olan Reseptör Etkileşim Protein (RIP; receptor interacting protein) kinazlar ve PARP'ın keşfiyle programlı nekrozis kavramı kabul görmeye başlamıştır. Programlı nekrozisin potansiyel sinyal bileşenleri olarak RIP kinazlar, poli (ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP1), NADPH oksidazlar ve kalpainler tanımlanmıştır. Hücre bu yolla ölüme gittiğinde hücrenin membran bütünlüğü bozularak hücre içeriği dışarıya yayılır. Komşu hücreler bu durumdan zarar görürler ve dokuda güçlü bir inflamatuvar yanıt oluşur (Golstein ve Kroemer 2007, Galluzzi ve Kroemer 2008, Ouyang ve ark. 2012).



Şekil 1.9. Apoptozis ve nekrozisin şematik karşılaştırılması (Anonim, 2011'den değiştirilerek alınmıştır).

1.4. Tıbbi Bitkiler

Fitoterapi, bitkileri kullanarak hastaları tedavi etme yaklaşımı olup terim ilk kez Fransız hekim Henri Lenclerc (1870-1953) tarafından kullanılmıştır. Bitkilerin sağlığı korumak ya da geri kazanmak için tarihin her döneminde, her toplum tarafından kullanıldığı bilinmektedir. Bu konuda ilk yazılı belge M.Ö. 3000 yıllarına ait Ninova tabletleri olup, Mezopotamya'da kurulan Sümer, Akat, Asur medeniyetlerinde bitkisel ve hayvansal ilaçlarla tedavilerin mevcut olduğunu kanıtlamaktadır. Çin ve Hint tıbbında da bitkilerin önemli bir yeri vardır. Yunan tıbbının önemli isimlerinden Hipokrat'ın kitabında bitkisel ürünlerden söz edilmektedir. İslam uygarlığında İbn-i Sina ve Al Gafini'nin bitkisel tıp konusunda önemli eserleri bulunmaktadır. Günümüzde ise kimya ve biyokimya alanındaki gelişmeler sonucunda bitkilere ilişkin toksikolojik, farmakolojik ve klinik çalışmalar yapılabilme imkanı artmış olup çalışmalarda etkinlik, zararsızlık ve kalite prensipleri benimsenerek tıbbın gereksinimlerine yanıt veren pek çok ilaç geliştirilmiştir (Sarışen ve Çalışkan 2005). Dünya Sağlık Örgütü tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitkilerin sayısının 20,000 civarında olduğunu ve yaklaşık 4 milyar insanın sağlık sorunlarını ilk etapta bitkisel ilaçlarla gidermeye çalıştıklarını bildirmektedir (Naranjo 1995, Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2011). Ayrıca gelişmiş ülkelerde reçeteli ilaçların %25'inin etken maddesinin bitkisel kökenli olduğu bilinmektedir (Farnsworth ve ark. 1985).

Bitkiler geniş fonksiyonları olan birincil (primer) ve ikincil (sekonder) metabolitleri üretmektedirler. Aminoasitler, basit şekerler, nükleik asitler ve lipitler hücrel süreçler için gerekli olan primer metabolitlerdir. Sekonder metabolitler ise bitkilerin metabolizması sonucu oluşan organik moleküllerdir (Croteau ve ark. 2000). Küçük molekül yapıları sekonder metabolitler; alkaloidler, terpenoidler ve fenolik bileşikler içerisinde yer almakta olup şu ana kadar 150'den fazla bitki familyasında 12,000'den fazla alkaloid tespit edilmiştir. Alkaloidlerin günlük olarak tüketilen kafein, analjezik olan morfin ve kodein, kas gevşetici tükürarın, anti-kanser ajanı vinblastine ve gut tedavisinde kullanılan kolçisin gibi üyeleri vardır (Ramawat ve ark. 2009). Fenolik bileşikler içerisinde flavonoid ve izoflavonoid gibi grupları barındırmakla beraber izoflavon bileşikler fitoöstrojen, anti-anjiyogenik, antioksidan ve anti-kanser özellik gösterebilirler (Dixon ve Ferreira 2002, Dixon ve Sumner 2003). Bitkiler arasında en yüksek çeşitlilik terpen gruplarında olup şu ana kadar belirlenen 30,000'den fazla terpen bileşiği, monoterpen, seskiterpen, diterpen, triterpen ve tetraterpen grupları altında bulunmaktadır. Ayrıca; bitkisel steroidler, saponinler ve kalp glikozitleri triterpen gruplarından üretilirler. Taksol grubu bileşiklerin (diterpen) de dahil olduğu terpen bileşiklerinin bütün gruplarında anti-tümöral etki gösteren pek çok bileşik tespit edilmiştir (Zwenger ve Basu 2008, Salminen ve ark. 2008). Tıbbi bitkilerin ve onlardan elde edilen doğal ürünlerin, kardiyovasküler, analjezik, tansiyon, deri, solunum, gastrointestinal, nöromusküler, kadın hastalıkları ve malignite gibi pek çok hastalığın tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (Ahmad ve ark. 1998, Datta ve ark. 1998, Abo ve ark. 2000, Lovkova ve ark. 2001, Lampronti ve ark. 2006).

En çok bilinen ve yaygın olarak kullanılan bazı örnekleri şöyle sıralanabilir:

- *Salix caroliniana* ve ilişkili türleri; aspirin,
- *Papaver somniferum*; morfin ve kodein,
- *Digitalis latana*; digoksin (kalp ilacı),
- *Allium sativum*; bağışıklık arttırıcı, kan basıncı ve kolesterol düşürücü,
- *Taxus brevifolia*; taxol (anti-kanser ilaç),
- *Catharanthus roseus*; vinblastin ve vinkristin (anti-kanser ilaç),
- *Aloe vera*; dermatolojik ilaçlar (Kendler 1987, Youngkin ve Israel 1996, O'Hara ve ark. 1998, Raskin ve ark. 2002, Halberstein 2005).

Türkiye 174 familyaya ait 1251 cins ve 12,000'den fazla tür ve alt tür taksonu içeren oldukça zengin bir floraya sahiptir (Davis 1988, Güner ve ark. 2000). Bu taksonların 234'ü yabancı kaynaklı ve kültür bitkisi olup geriye kalan türler yurdumuzda doğal yayılış gösteren bitkilerdir. Endemik bitkiler (yeryüzünün yalnızca belirli bölgelerinde yayılış gösteren) bakımından da Türkiye oldukça zengindir ve tüm Avrupa ülkelerindeki toplam endemik takson sayısı yaklaşık 2750 iken ülkemizdeki endemik tür sayısı 2891' dir. Türkiye'de tıbbi olarak kullanılan bitkilerin sayısının 500 civarında olduğu tahmin edilmektedir ve yaklaşık 200 tıbbi ve aromatik bitkinin ihrac potansiyelinin olduğu belirtilmektedir (Güner ve ark. 2000, Aydın, 2004, Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2011).

1.4.1.Bitkisel Kökenli Anti-kanser Ajanlar

Bitkiler etkili anti-kanser ilaçların keşfinde önemli bir yer tutmakta olup kanser tedavisinde kullanımları uzun bir geçmişe sahiptir. Şu anda kullanılmakta olan anti-kanser ilaçların %60'ından fazlası bitkileri, deniz canlılarını ve mikroorganizmaları içeren doğal kaynaklardan türevlenmektedir (Newman ve ark. 2003, Cragg ve Newman 2005). Bitkisel kaynaklar kullanılarak yapılan anti-kanser ilaç araştırmaları 1950'lerde vinka alkaloidleri, vinblastin ve vinkristinin keşfi ile başlamıştır. United States Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI; National Cancer Institute) 1960'larda ağırlıklı olarak ılıman bölgeleri kapsayan kapsamlı bir bitki toplama programı başlatmış ve bu çalışmalarla taksanları ve kamptotesinleri kapsayan sitotoksik aktivite gösteren türler keşfedilmiştir. Bunların klinik olarak aktif şekilde üretimi 30 yıllık bir süreci (1960-1990) kapsamaktadır (Cassady ve Douros, 1980). Bu bitki toplama programı 1982'de sonlandırılmış olup 1986'da yeni tarama teknolojilerinin gelişimini takiben bitki ve diğer organizmaların araştırılması devam etmiştir. Ancak yeni bitkisel kaynaklı anti-kanser ajan keşfedilememiş olup çoğu ajan klinik öncesi (preklinik) gelişim aşamasındadır (Cragg ve Newman, 2005).

1.4.1.1.Klinik Olarak Kullanılan Bazı Bitkisel Kaynaklı Anti-kanser İlaçlar

Vinblastin (VLB) ve Vinkristin (VCR); Endemik bir bitki olan *Catharanthus roseus* G. Don. (*Apocynaceae*) (Madagaskar menekşesi)'den izole edilmiş olup çeşitli kültürlerde diyabet tedavisinde kullanılmaktadır (Gueritte ve Fahy, 2005). Yapılan çalışmalarda ekstraktın ratlarda akyuvar sayısını azalttığı ve kemik iliği baskılanmasına neden olduğu bulunmuştur. Böylece aktif ajanlar olarak vinblastine (VLB) and vinkristine (VCR) izole edilmiştir. Vinorelbin (VRLB) ve vindesin (VDS) bu ajanların

yarı sentetik analoglarıdır. Bu ajanlar kemotörapatik ilaçlarla kombine edilerek lösemi, lenfoma, meme ve akciğer kanseri gibi çeşitli kanserlerin tedavisinde primer olarak kullanılmaktadırlar (Noble 1990, Cragg ve Newman, 2005).

Etoposit (VM 26) ve Teniposit (VP 16-213); Etoposit ve teniposit doğal bir ürün olan epipodophyllotoksinin (podophyllotoksin izomeri) kanser tedavisinde kullanılan yarı sentetik türevleridir. *Podophyllum* türlerinin (Podophyllaceae), cilt kanseri, siğiller gibi hastalıkların tedavisinde klinik olarak kullanımı uzun bir geçmişe dayanmaktadır. Yapılan kapsamlı araştırmalar sonucunda *Podophyllum* (Podophyllaceae) türlerinden izole edilen Podophyllotoxinlerle geliştirilen etoposit ve tenoposit küçük hücreli akciğer kanseri, lenfoma, bronş ve testis kanserlerinde kullanılmaktadır (Canel ve ark. 2000, Meresse ve ark. 2004, Cragg ve Newman, 2005).

Paklitaksel (taxol®) ve Doseetaksel; Paklitaksel *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) (Pasifik porsuk ağacı) kabuğundan izole edilen terpen temelli bir moleküldür. Paklitaksel'in anahtar öncüllerinden biri olan baccatinler çeşitli *Taxus* türlerinin yapraklarında bulunur ve yarı sentetik dönüşümle Doseetaksel gibi Paklitaksel'in aktif analogları elde edilebilir. Paklitaksel; meme, yumurtalık, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisinde kullanılırken, doseetaksel primer olarak meme ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisinde kullanılmaktadır (Rowinsky 1997, Cragg 1999, Cragg ve Newman, 2005).

Irinotekan (CPT-11; Camptosar) ve Topotekan; Çin süs ağaçlarından (Chinese ornamental tree), *Camptotheca acuminata* Decne (Nyssaceae)'den izole edilen camptotesin molekülünün semisentetik türevleri olan topotekan (hycamptamine) ve irinotekan (CPT-11) da klinik uygulamaları bulunan alkaloid yapıdaki anti-kanser ajanlardandır (Rahier et al., 2005). Topotekan ovaryum ve küçük hücreli akciğer kanseri tedavisinde kullanılırken, irinotekan kolorektal kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır (Cragg ve Newman, 2005, Gurib-Fakim 2006).

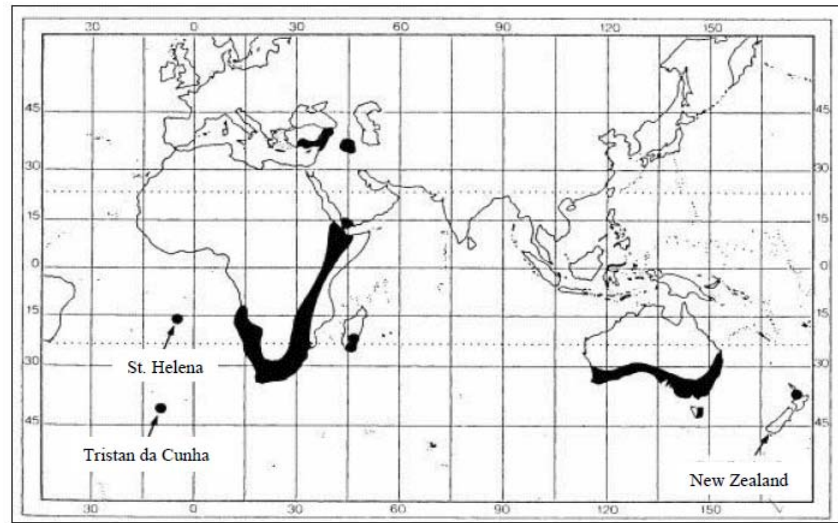
1.5. *Pelargonium* Cinsinin Sistemik Sınıflandırması

Taksonomik sınıflandırmada tüm bitkiler familyalara ayrılır. Bu çalışmada kullanılan bitki türü Geraniaceae familyasına aittir. Geraniaceae familyası; *Erodium*, *Geranium*, *Monsonia*, *Pelargonium* ve *Sarcocaulon* olarak isimlendirilen beş alt gruba (cins) ayrılır. *Pelargonium* cinsi büyük çoğunluğu Güney Afrika'da bulunan yaklaşık 250 tür içerir ve Cape Floristic Bölgesinin (CFR; Cape Floristic Region) en büyük üçüncü angiosperm cinsi olarak sınıflandırılır (Williams ve ark. 2000, Goldblatt ve Manning

2000). Filogenetik olarak tanımlanmış 16 şubeye ayrılır ve taksonomik olarak 24 tür içerir (van der Walt 1985, Bakker ve ark. 2004). *Pelargonium* cinsi Türkiye’de ise Jenkinsonia şubesine ait iki tür ile temsil edilmektedir: *P. endlicherianum* Fenzl, ve *P. quercetorum* Agnew (Davis 1988).

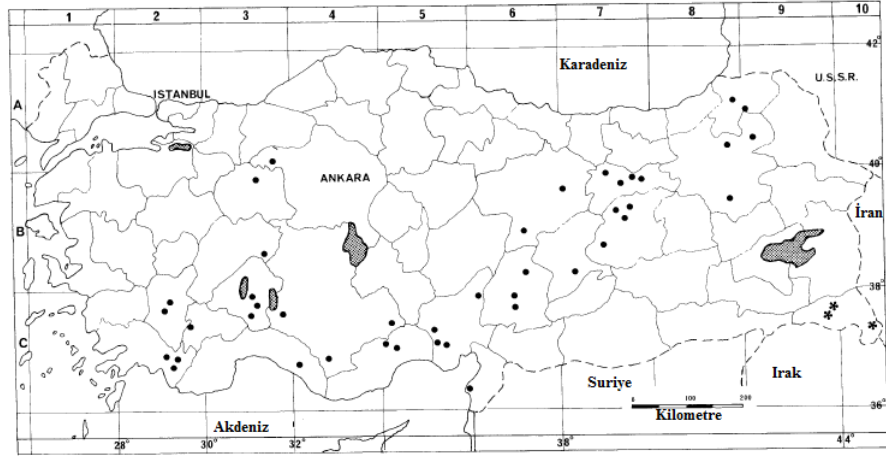
1.5.1. *Pelargonium* Türlerinin Dağılımı

İlk *Pelargonium* türü olan *Pelargonium triste*, 1632 yılında John Tradescant tarafından Cape’den toplanmıştır. *Pelargonium cucullatum* Paul Hermann tarafından 1672’de Table Dağından toplanmıştır. Yaklaşık 200 *Pelargonium* türü Güney Afrika’da bulunur. Çoğu türe Namib çölünden Cape’ye (güney) ve doğu sahile uzanan geniş kıyı bölgesinde rastlanır. Diğer 50 *Pelargonium* türü doğu tropikal Afrika, Arabistan, Suriye, batı Hindistan, Avustralya ve Yeni Zelanda’da ve bir endemik türü St Helena’da bulunmaktadır (Şekil 1.10). *Pelargonium* türleri ayrıca İspanya, İtalya ve Kaliforniya’da doğal olarak yetişebilmektedir (van der Walt ve Vorster 1983, Lalli ve Jacqueline 2006).



Şekil 1.10. *Pelargonium* cinsinin dünya çapında dağılımı (Lalli ve Jacqueline 2006).

P. endlicherianum’un Türkiye’de geniş bir dağılım gösterir ve Akdeniz ile İran-Turan bölgeleri arasında rastlanır. *P. quercetorum* ise Irak’ta geniş dağılım gösterir ve Türkiye’deki dağılımı İran ve Irak’a yakın güneydoğu köşelerinde sınırlıdır (Şekil 1.11) (Johnson ve Özhatay 1988).



Şekil 1.11. *Pelargonium* türlerinin; *P. endlicherianum* ● *P. quercetorum* * Türkiye’de dağılımı (Johnson ve Özhatay 1988).

1.5.2. *Pelargonium* Cinsinin Genel Özellikleri

Pelargonium cinsi yıllık ya da çok yıllık bitkilerin bir grubudur. Sapları tabanda odunsu, sukkulent, sıklıkla yapışkan ve aromatik, genellikle glandular ve değişik tüylüdür. Bütün türler saplı yapraklara sahiptir, hemen hemen her lob şeklini barındırır ve dişlidir. Bazı yapraklar yumuşak, küçük, ipeksi tüylü ve bazen de yapışkandır. Çiçekleri beş petallidir. İki arka spatula veya ters yumurtamsı yaprak (obovat) üç ön yaprakdan daha büyük ve geniştir. Çiçek rengi; beyaz, pembe, pembemsi-mor ya da mor olabilir. Bitişik nektar tüpü en karakteristik özelliğidir ve çoğu türde var olan aromatik yağlar tanımlanması için önemli bir yoldur (Webb 1984, van der Walt, 1985, Miller 2002). *P. endlicherianum*; dayanıklı rizom köklü, büyük ve çekici eflatun-kırmızı çiçekli, uzun saplı, tüylü ve elsi yapraklıdır. Türkiye’deki yaygın ismi solucan otudur. *P. quercetorum* *P. endlicherianum*’a göre daha büyük ve daha çok sayıda yaprağa sahiptir ve daha az tüylüdür (Şekil 1.12) (Johnson ve Özhatay 1988).



Şekil 1.12. *Pelargonium* cinsinin Türkiye’de bulunan iki türü A. *P. endlicherianum* B. *P. quercetorum* (Anonim 2010, Anonim 2011a).

1.5.3. *Pelargonium* Türlerinin Biyolojik Aktiviteleri

Doğal *Pelargonium* türlerinin pek çoğu, hibritleri ve kültür bitkileri esansiyel yağlar üretmektedir ve yüksek kaliteli bu yağlar kokulu *Pelargonium*'ların yaprak, gövde ve saplarında bulunmaktadır (Williams and Harborne 2002). *Pelargonium*'a yönelik araştırmalar uçucu yağlarının kimyasal kompozisyonuna odaklı çalışmalardır ve uçucu yağlarının yaklaşık 230 bileşeni belirlenmiştir. 120'nin üzerinde Pinen, phellandren, myrcen, limonen, germacren, caryophyllen gibi monoterpenler ve terpenler, alkoller, esterler, aldehitler, ketonlar, fenoller vb. olarak sınıflandırılan diğer organik bileşenler *Pelargonium* türlerinden izole edilmiştir.(Vernin ve ark.1983, Williams ve Harborne 2002, Kiran ve Kaul 2005).

Güney Afrika'da çeşitli *Pelargonium* türleri yara ve apselerde, ateş düşürücü, kolik, nefrit ve ürin baskılayıcı olarak, soğuk algınlığı, boğaz ağrısı, basur tedavisinde ve ayrıca insektisit olarak kullanılmaktadır (Lis-Balchin 1996). "Umckaloabo" *P. sidoides* ve *P. reniforme* köklerinden elde edilen bir ilaç olup gastrointestinal, karaciğer ve solunum yolu rahatsızlıklarında kullanılmaktadır (Kolodziej 2002, Seidel ve Taylor 2004). Halk arasında *P. endlicherianum*'un taze yaprakları kurt dökücü olarak, *Pelargonium radens* yaprakları iç organ neoplazmasının tedavisinde, *P. betulinum* taze yaprakları karın ağrısında, *P. cucullatum* böbrek hastalıkları, ateş, öksürük ve göğüs sorunları için kullanılmaktadır (Hirose ve Shibata 1978, Bozan ve ark. 1999, May 2000, Lawrence ve Notten 2001).

Monoterpenik uçucu yağlar kansere karşı aktif doğal antioksidanlardır ve monoterpenler tümör oluşumunu önleyen ve kanser oluşumunu veya ilerlemesini geriletan anti tümoral aktiviteye sahiptir (Yanishlieva ve ark. 1999, Kris-Etherton ve ark. 2002, Saraswathi ve ark. 2011). *Pelargonium* kaynaklı Geranium monoterpen yağları, inflamasyon, dizenteri, ağır adet kanamaları ve kanser tedavisinde kullanılmaktadır (Fayed 2009). Geranium'dan elde edilen ve yağda çözülebilen bir bileşik olan sitronelol'un anti-kanser ve anti-inflamatuvar özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Zhuang ve ark. 2009). Bir başka çalışmada Geranium esansiyel yağlarından Geraniol'un kolon kanser hücrelerinde ilacın sitotoksik etkisini arttırarak 5-FU tedavisine duyarlı hale getirdiği ve kanser oluşumunu tetikleyen poliamin biyosentezinin anahtar enzimi olan ornitin dekarboksilaz aktivitesinde %50 azalmaya yol açtığı belirtilmiştir (Carnesecchi ve ark. 2002). Geranium'un esansiyel yağlarının anti-kanser aktivitesi iki insan promyelosit lösemi hücre soyunda (HL-60 ve NB4) yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Fayed, 2009). Pek

çok çalışma *P. graveolens* 'ın servikal neoplaziye karşı potansiyel anti-tümör etkisini göstermiştir (De Moura ve ark., 2002). Ayrıca *Pelargonium* türlerinin anti-bakteriyel, antifungal ve anti-oksidan aktivitelerinin olduğu bilinmektedir (Deans ve Ritchie 1987, Lis-Balchin ve Deans 1996, Lis-Balchin ve Roth, 2000, Deans 2002). *Pelargonium graveolens*'den izole edilen geranium yağı 25 farklı bakteri cinsinde denenmiş ve test edilen çoğu mikroorganizmada büyümeyi inhibe edici aktivite göstermiştir (Dorman ve Deans 2004). Tepe ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada *P. endlicherianum*'un metanol ekstraktının güçlü bir anti-oksidan aktivite sergilediği gösterilmiştir (Tepe ve ark. 2006). *Pelargonium* türlerinin anti-mikrobiyal ve anti-oksidan aktivitelerinin yanı sıra in vitro toksisitesine yönelik çalışmalarda bulunmaktadır. Transforme insan böbrek epitel hücrelerinde yapılan bir toksisite çalışmasında *P. sublignosum* ve *P. citronellum* 'un aseton ekstraktlarının yüksek toksik etkisi gösterilmiştir ($IC_{50}=11,89\pm1,54$ µg/ml ve $IC_{50}=19,14\pm0,98$ µg/ml) (Lalli ve ark. 2008).

Yukarıda özetlendiği üzere Geraniaceae familyasına ait *Pelargonium* türlerinin biyolojik aktivitesine ilişkin literatürde çeşitli çalışmalar bulunmakla birlikte *Pelargonium quercetorum*'un biyolojik aktivitesine yönelik herhangi bir çalışma yoktur. Bu nedenle *Pelargonium quercetorum* bitkisinden elde edilen ekstraktın akciğer kanseri hücre soyları (A549, PC3 ve H1299) üzerindeki sitotoksik/apoptotik etki mekanizmaları araştırılmıştır. *Pelargonium quercetorum*'un içerik analizi York Üniversitesi, Kimya Bölümünde Doç. Dr. Mustafa Özel tarafından GCXGC-TOF/MS sistemi kullanılarak belirlenmiş olup isimlendirmeler NIST 2005 kütle spektral kütüphanesine göre yapılmıştır (Çizelge 1.1).

Bileşik ^a	¹ t _R ^b	² t _R ^b	% Alan ^c
Asetik asit	430	1.30	0.65
2,5-Dimetil pirazin	510	2.05	0.61
Butirolakton	545	2.68	0.47
2-Metil-3-etil pirazin	655	2.06	0.33
Benzenasetaldehit	740	2.35	0.11
2,5-Dimetil-4-hidroksi-3(2H)-furanon	760	2.27	0.15
2-Pirolidon	805	3.17	2.70
5-Hidroksimetildihidrofuran-2-one	1025	3.19	0.36
Hexahidrofarnesil aseton	1980	1.54	0.73
Okzalik asit, allyl oktadesil ester	2000	1.37	0.57
n-Tridecan-1-ol	2045	1.57	0.94
Ylangene	2075	1.70	1.36
Metil 14-metilpentadecanoat	2090	1.52	0.14
17-Oktadesinoik asit, trimetilsilyl ester	2220	1.81	0.33
Trimetilsilyl palmitat	2220	1.42	0.86
Nerolidol	2490	1.96	0.11
Farnesan	2810	1.37	0.68
Heneicosyl asetat	2825	1.50	0.51
Eicosan	2900	1.42	5.15
n-Tetracosanol-1	2920	1.56	2.61
3,7-Dimetilnonan	2965	1.48	0.70
1-Hexadecanol	2990	1.45	1.06
Oktadecanol asetat	3005	1.53	2.63
Heneicosan	3075	1.56	16.23
2-Metileicosan	3150	1.45	12.37
Tetracosan	3235	1.59	40.92
Oleik Asit	3315	3.81	0.85
Bilinmeyen			5.85
			100.00

Çizelge 1.1. *Pelargonium quercetorum* ekstraktının içerik analizi

^a GCxGC-TOF/MS yazılımı kullanılarak belirlenmiştir; isimlendirmeler NIST 2005 kütle spektral kütüphanesine göre yapılmıştır.

^{b1} t_R ve ²t_R, birinci ve ikinci boyutta tutulum süreleri.

^c Her bir bileşiğin yüzdesi, analitin doruk noktasının alanı total iyon kromatogram doruk noktasının alanına bölünüp 100'le çarpılarak hesaplandı.

2.MATERYAL ve YÖNTEM

2.1.Materyal

2.1.1.Kimyasal maddeler

- MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid), Sigma
- Fetal sığır serumu (FBS), Biochrom AG
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin), Gibco
- Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Gibco
- Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), Hyclone
- % 0,05 Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco
- Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma
- Triton X-100, Sigma
- Adenosine 5'-triphosphate (ATP) Chemosensitivity Assay, Dcs Innovative Diagnostic Systeme, Hamburg, Almanya
- Tripan mavisi (% 0,5), Biological Industries

2.1.2.Sarf malzemeler

- 25cm² ve 75cm² lik flask, Orange Scientific
- 6 kuyulu plate, Orange Scientific
- 96 kuyulu flat plate, Orange Scientific
- 5ml ve 10ml hacimlerinde enjektörler, Set inject
- 10µl'lik pipet uçları, Biohit
- 100µl'lik pipet uçları, Expell
- 1000µl'lik pipet uçları, Ayset
- Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Orange Scientific
- Steril santrifüj tüpleri (15ml), Orange Scientific
- Steril santrifüj tüpleri (50ml), Nest
- Thoma lamı, Bright –Line, Hausser Scientific Horsham, PA, USA
- Kriyovial, Corning Incorporated Corning

2.1.3.Cihazlar

- Spektrofotometre (FLASHScan S12, Analytik Jena, Almanya)
- Hassas terazi, SHIMADZU AUW220D
- Luminometre (FL_x800 Mikroplate Floresans Okuyucu)
- CO₂ inkübatörü, Sanyo, Japonya
- Mikroplate inkübatör ve çalkalayıcı, Heidolph, Almanya

- Buharlı sterilizatör (Otoklav), Nüve OT4060, Türkiye
- Steril kabin, ESCO, Singapur
- Multipipet cihazı, Multipette eppendorf, Hamburg, Almanya
- Inverted mikroskop, Olympus CKX41, Japonya
- Aspiratör, Rocker 300, Tayvan
- Kuru hava sterilizatörü, Elektro-mag M 420, Türkiye
- Santrifüj, Rotina 35R, Almanya
- 10µl, 100µl ve 1000µl'lik pipet seti, Orange Scientific
- 0,5-5ml pipet, Brand
- 10ml pipet, Eppendorf
- 5-5µl Transferpipet, Thermo Scientific
- Pipet boy, ISO fill
- 20-200µl Transferpipet, Brand, Almanya

2.2.Yöntem

2.2.1.Pelargonium quercetorum'un Toplanması ve Tanımlanması

Pelargonium quercetorum Türkiye: C9: Hakkâri, 1300m'den 16 Haziran 2006 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olan Mehmet Fırat (toplayıcı numarası: MF.10111) tarafından toplanmıştır ve 'Flora of Turkey and The East Aegean Islands' kitabından yardım alınarak teşhis edilmiştir (Davis 1988).

2.2.2.Pelargonium quercetorum'un Ekstraksiyon İşlemleri

Pelargonium quercetorum'un toprak üstü kısımlarından (gövde+çiçek+yaprak) 30g tartılarak 150ml metanol (MeOH) ile Soxhlet ekstraktöründe, ısıtıcı metanolün kaynama noktasına kadar ısınmasını sağlayacak şekilde ayarlanarak, ekstraksiyon işlemleri yapıldı (24 saat). Elde edilen ekstraksiyonların çözücüleri (MeOH) evaporatör cihazında 50°C'deki su banyosunda vakum altında ekstrakte maddelerden tamamen uzaklaştırıldı (25-30 dakika). Ekstraktlar -80°C'de muhafaza edildiler. Donmuş haldeki ekstraktlar kuru hale getirilmek üzere vakum altında, uygun koşullarda ve sıcaklıklarda liyofilize edildiler (41-42 saat). Elde edilen kuru haldeki ekstraktlar deneylerde test edilen maddeler olarak kullanılmak üzere hazır hale getirildiler ve -80°C'de muhafaza edildiler.

2.2.3. *Pelargonium quercetorum* Ekstraktının Hazırlanması

Pelargonium quercetorum ekstraktının (PQE) stok çözeltisi 100mg/ml (0,05gr bitki ekstraktı + 0,5ml DMSO) olacak şekilde DMSO ile çözülmesi sağlandı. Bu çözünmüş stoktan 20'şer µl olacak şekilde alikot yapılarak -80°C'de saklandı. Çalışmalar için gerekli seyreltmeler ise besiyeri ile yapıldı.

2.2.4. Hücre Kültürü

Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında görev yapan Prof. Dr. Hakan Akça'dan temin edilen A549, PC3 (JCRB; Japanese Collection Research Resources Bank, Osaka Japan) ve H1299 insan akciğer kanseri hücre soyları kriyovial denen kaplar içerisinde -80°C dolaplarda saklandı. Kullanılan hücre soylarının özellikleri aşağıda belirtilen şekildedir:

A549 Hücre Soyu: ► Adenokarsinom

- p53, yabani tip
- Rb, aberasyon yok
- p16, homozigot delesyon
- K-Ras, Mutasyon (Ser12)
- PTEN, aberasyon yok
- EGFR, yabani tip

- PC3 Hücre Soyu:**
- ▶ Adenokarsinom
 - ▶ p53, mutant
 - ▶ Rb, aberasyon yok
 - ▶ p16, homozigot delesyon
 - ▶ K-Ras, aberasyon yok
 - ▶ PTEN, aberasyon yok
 - ▶ EGFR, protein üretimi var ancak ERK stimule edilemiyor.

- H1299 Hücre Soyu:**
- ▶ Adenokarsinom
 - ▶ p53, yoksun (null)
 - ▶ Rb, yabancı tip
 - ▶ p16, yoksun (null)
 - ▶ K-Ras, yabancı tip
 - ▶ PTEN, inaktif
 - ▶ EGFR, yabancı tip

2.2.4.1.Hücre Soylarının Stoktan Çıkartılması

Hücreleri çoğaltmak amacıyla kriyovialler -80°C den alınarak sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözüldü. Hücre süspansiyonu; % 10 FBS, % 1 penisilin-streptomisin ve % 1 L-glutamin (Gibco) içeren 5ml RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) besiyeri içerisine alındı. Falcon tüp 800rpm'de 5dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım aspire edildi ve hücre peleti üzerine 1ml besiyeri ilave edilerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlandı ve hücre süspansiyonu içerisinde 5ml besiyeri bulunan 25cm^2 'lik flasklara (Thermo Scientific) alınarak 37°C 'de, % 5 CO_2 içeren ortamda inkübe edildi.

2.2.4.2.Hücre Soylarının Pasajlanması

Deneyleerde kullanılan hücre soyları, flask yüzeyini %60-70 kapladıklarında (konfluent olduklarında) flask içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücrelerin serumdan arındırılması için 25cm²'lik flask içerisine 2ml 1X PBS (Gibco) ilave edildi ve hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0,5ml %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda 5dk inkübe edildi. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için on katı kadar besiyeri ilave edildi. Böylece tripsinin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına zarar vermeye başlaması engellenmiş oldu. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan 15ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800rpm'e 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve elde edilen hücre peleti 1ml hücre besiyerinde çözüldükten sonra hücre süspansiyonu 75cm²'lik flasklara alınarak 37°C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde hücreler istenilen sayıya gelene kadar çoğalmaları sağlandı.

2.2.4.3.Hücre Soylarının Stoklanması

Hücreler konfluent olduklarında flask içerisindeki besiyeri aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler 1X PBS ile hafifçe yıkandıktan sonra PBS aspire edilerek uzaklaştırıldı ve hücrelerin flask yüzeyinden kalkmalarını sağlamak için %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu eklendi. Hücreler 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda 5dk inkübasyona bırakıldı. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için on katı kadar besiyeri ilave edildi. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu içerisinde besiyeri bulunan 15ml'lik falkon tüp (Orange Scientific) içerisine alındı. 800rpm'de 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve pelet üzerine her bir kriyovial için 1.5ml dondurucu medium (5ml DMSO + 5ml FBS + 40ml DMEM) karanlık ortamda ilave edildi. Hücre süspansiyonu kriyovialler içerisine dağıtılarak -80°C'ye kaldırıldı.

2.2.4.4.Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

A549, PC3 ve H1299 hücre soyları için kullanılan besiyeri ortamı için %10 Fetal Bovine Serum (Hyclone USA), %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin, Gibco), %1 L-glutamin (Gibco) içeren RPMI 1640 (Hyclone USA) besiyeri kullanıldı.

2.2.4.5.Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı

Hücreleri sayabilmek amacıyla tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 10µl 0,5ml'lik tüpe alındı ve üzerine eşit miktarda %0,5 tripan mavisi (Biological Industries) konarak iyice karışması sağlandı. Hematositometre distile su ile iyice temizlendi. Bu karışımdan 10µl alınarak thoma lamına koyuldu ve mikroskopta bu lam üzerinde beş alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1ml besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplandı.

2.2.5.MTT (Metiltiazotetrazolium) Canlılık Metodu

MTT yöntemi, ilk kez Mosmann ve ark. tarafından 1983 yılında belirlenmiştir ve hücre kültüründe büyütülen hücrelerdeki mitokondriyel dehidrogenaz enzim aktivitesinin kolorimetrik ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Mossman 1983). Bu enzim aktivitesi yaşayan hücrelerde gözlenirken, ölen hücrelerde ise gözlenmemektedir. Ortama konulan bileşiğe yanıt olarak eğer hücreler ölürse enzim aktivitesinin azaldığı veya kaybolduğu görülmektedir. Bu nedenle hücreler mitokondriyel dehidrogenaz enziminin değişime uğrattığı MTT maddesine (tetrazolyum (3-(4,5-dimetiltiyazol -2)-2,5-difenil tetrazolyum bromid) maruz bırakılırlar. MTT, sarı renkli suda çözünebilir tetrazolium tuzu olup canlı hücreler tarafından alınır ve mitokondriyel süksinat dehidrogenaz enzimleri tarafından suda çözünmeyen koyu mavi-mor renkli formazan kristallerine dönüştürülür. Sitotoksik bileşiklerin hücrelere zarar vermesi MTT tetrazoliumun formazana indirgenmesini azaltmaktadır. Sonuç olarak; canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mavi-mor renkte boyanmakta, ölü veya mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler ise boyanmamaktadır. Daha sonra oluşan bu formazan kristalleri SDS (%10 sodyum dodesil sülfat+steril distile su + 0,01N HCl) kullanılarak suda çözünür hale getirilir ve oluşturdukları renk şiddeti 570nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülür. Sonuç olarak; başlangıçta aynı sayıda ekilmiş hiç ilaç uygulanmamış kontrol hücrelerindeki renk şiddeti ile ilaca maruz bırakılmış hücrelerdeki renk şiddeti oranlanarak ilaca maruz bırakılmış hücrelerdeki canlılık oranı (yüzdesi) hesaplanmış olur.

MTT testi için, *Pelargonium quercetorum* ekstraktının (PQE) farklı konsantrasyonları (3,13-100µg/ml) hazırlanarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına uygulandı. A549, PC3 ve H1299 hücreleri sayılarak 100µl besiyeri içerisinde 1×10^4 hücre olacak şekilde her bir kuyuya ilave edildi. Hücrelerde, ölümün negatif kontrolü (maksimum canlılık, MO) olarak sadece besiyeri ortamı içerisinde ekilen hücreler kullanıldı. Kör için ayrılan

kuyular içerisinde ise 200µl besiyeri ilave edildi. Ardından hücreler, 48 saat 37⁰C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

MTT kimyasalı, 5mg/ml PBS tamponu içerisinde pH=7,2 olacak şekilde stok olarak hazırlandı. Hazırlanan MTT çözeltisi filtre edilerek steril hale getirildi. 48 saat sonunda her bir kuyucuğa 20µl MTT boyası eklendikten sonra hücreler 37⁰C'de 4 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Oluşan formazan kristallerini çözünür hale getirmek için bütün kuyucukların üzerine %10'luk SDS solüsyonundan 100µl eklenerek 18 saat 37⁰C'de %5'lik CO₂'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerde oluşan renk şiddeti spektrofotometrede (FLASHScan S12, Jena, Almanya) 570nm dalga boyunda ölçüldü ve okunan absorbanslar kullanılarak hücrelerin canlılık oranları belirlendi.

% Canlılık hesabı:

İlaç uygulanmamış kontrol hücre (MO) canlılığı %100 olarak kabul edilerek, ilaç uygulanan hücrelerin canlılık oranları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı. Deney içerisinde her bir konsantrasyon birbirinden bağımsız üç farklı kuyuda tekrarlandı.

% Canlılık=[100×(Bileşik ile muamele edilen hücre absorbansı ortalaması-kör ortalaması)/(Kontrol hücre absorbansı ortalaması-kör ortalaması)] olarak hesaplandı.

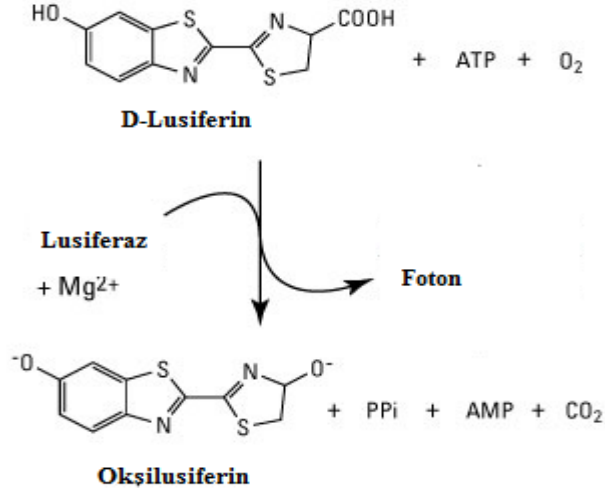
2.2.6.ATP (adenozin trifosfat) Canlılık Metodu

MTT yöntemi, sıklıkla kullanılan ucuz bir yöntem olmasına rağmen ATP yöntemi, luminesans temelli yöntemle bağılı olarak teknolojik açıdan daha gelişmiştir ve *in vitro* sitotoksite ölçümlerini MTT yöntemine göre çok daha hassas ve güvenilir yapabilmektedir.

ATP hücre içerisindeki en önemli enerji deposudur ve biyolojik sentez, sinyal iletimi, taşıma, hareket gibi süreçler için kullanılmaktadır. Hücre ATP hücre canlılığını ölçmede en hassas parametrelerden biridir. Bu yöntemin prensibi hücre kültüründe büyütülen kanser veya normal hücrelerdeki intraselüler ATP içeriğinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. İntraselüler ATP içeriğinin seviyesi yaşayan hücrelerin sayısının belirlenmesinde kullanılan bir göstergedir (Maehara ve ark. 1987, Andreotti ve ark. 1995, Dexter ve ark. 2003, Ulukaya ve ark. 2008).

Hücrelerde örneğin; kemoterapötik ajanlar veya mitokondriyal toksinler ile öldürücü hasarlar oluştuğunda ATP seviyesi önemli ölçüde azalmaktadır. Bu amaçla, bileşiklerle muamele edilmiş hücrelerdeki intraselüler ATP içeriği belirlenerek total hücre sayısı belirlenmeye çalışıldı.

ATP yöntemi; lüsiferinin Mg^{+2} ve ATP varlığında lüsiferaz enzimi ile oksilüsiferine katalize olup lüminesans sinyal oluşturmasına dayanmaktadır (Şekil 2.1). Lüminesans sinyal (ATP konsantrasyonu) ile hücre sayısı arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır (Andreotti ve ark. 1995, Mueller ve ark. 2004, Wadhawan ve ark. 2010).



Şekil 2.1. Lusiferin/lusiferaz biyoluminesans tepkimesi (Anonim 2011b'den değiştirilerek alınmıştır).

2.2.6.1.ATP Ölçümünün Yapılması

ATP testi için, PQE'nin farklı konsantrasyonları (3,13-100 μ g/ml) hazırlanarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına uygulandı. A549, PC3 ve H1299 hücreleri sayılarak 100 μ l besiyeri içerisinde 1×10^4 hücre olacak şekilde her bir kuyuya ilave edildi. Ardından hücreler, 48 saat 37⁰C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

Negatif kontrol (maksimum canlılık, MO, muamele uygulanmamış hücre kontrolü) için 200 μ l besiyeri içerisine 1×10^4 hücre ekildi. *Pozitif kontrol* (minimum canlılık, MI, %100 öldüren doz) olarak, 100 μ l hücre süspansiyonu içerisine hücre ölümünü %100 indüklediği bilinen %1'lik Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO) çözeltisinden 100 μ l ilave edildi. Hücreler 37⁰C'de %5'lik CO₂'li etüvde 48 saat inkübasyona bırakıldı.

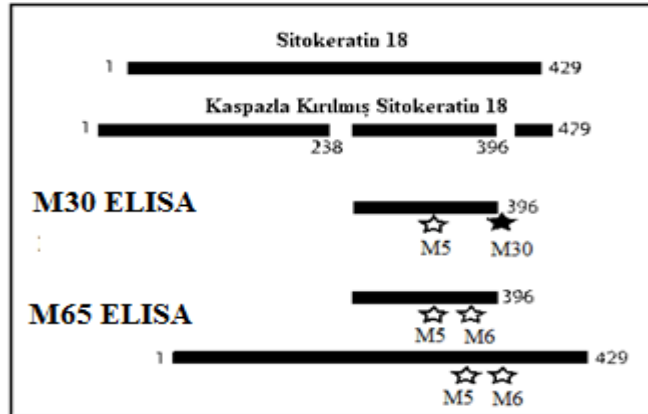
İnkübasyon sonrasında her kuyudan 150 μ l atılarak 50 μ l ATP kitinin (Sigma FLASC-1KT Adenosine 5' triphosphate bioluminescent+somatic cell assay kit, St. Louis, MO) içinde yer alan hücre lizis tamponu (2X) eklendi ve hücre içerisindeki ATP'nin hücre dışına çıkması sağlandı. 20 dakikalık bekleme süresini takiben, 50 μ l hücre süspansiyonu beyaz renkli 96 kuyucuklu ekim kaplarına aktarıldı ve ardından 50 μ l/kuyucuk lusiferin-lusiferaz enzimi içeren solüsyon ilave edildi. Reaksiyon sonunda oluşan ATP miktarı (lusiferin-lusiferaz bioluminesans reaksiyonu yardımıyla), ölçme

zamani 1 saniye olacak şekilde luminometre (Bio-Tek, Winooski, USA) kullanılarak ölçüldü. Böylece bileşiklerle muamele edilen ve edilmeyen hücrelerin RLU değerlerine göre, bileşiklerin sitotoksik/sitostatik etkileri hakkında bilgi edinildi. % Canlılık aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

% Canlılık=[100×(Bileşik ile muamele edilen hücre absorbansı ortalaması-MI)/(Kontrol hücre absorbansı ortalaması-MI)] olarak hesaplandı.

2.2.7.M30 Antijen (Kaspazla Kırılmış Sitokeratin 18) ve M65 Antijen Metodu

Sitokeratinler (CK), kanser tanısında kullanılan intermediyat filament protein ailesine ait proteinlerdir. Apoptozis esnasında sitoskeletonin önemli bir protein olan CK18 sadece apoptotik hücrelerde aktifleşen bir enzim grubu olan kaspazların etkisiyle kırılarak, kırılmış CK18'i (CK18-Asp396) oluşturmaktadır (Leers ve ark. 1999). M30 monoklonal antikor, özellikle CK18'in Asp396'da kırılan fragmanını (M30 antijen) tanıyarak CK'lerin apoptotik bir belirteç olarak kullanımını sağlamaktadır (Şekil 2.2) (Ueno ve ark. 2003). Böylece apoptozise özgü bir belirteç olan kırılmış CK18, ELISA yöntemiyle saptanmaktadır. Bu özel CK18'i tanıyan M30 antikorunu, hücrelerin bulunduğu ortamla temas ettirilirse ve eğer ortamda apoptotik hücreler de var ise, apoptozisin varlığı gösterilmiş olur. M65 Elisa yönteminde ise hem kaspazla-kırılmış hemde nekrozis esnasında hücrelerden salınan intakt CK18'i ölçülür (Schutte ve ark. 2004).



Şekil 2.2. Sitokeratin 18'in kaspazlar aracılığıyla kesimi ve bu bölgenin M30 ve M65 antikorları ile tanınmasının şematik gösterimi (Olofson ve ark. 2007'den değiştirilerek alınmıştır).

Basit olarak, ELISA metoduyla M30 ve M65-Antijen fragmentini belirlemek için, A549, PC3 ve H1299 hücreleri sayılarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 200µl içerisinde 1×10^4 hücre olacak şekilde (3 tekrarlı) ekim yapıldı. 24 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyonu takiben hücreleri zedelemekten 100µl besiyeri

uzaklaştırıldı. PQE'nın konsantrasyonu 100µl içerisinde 200µg/ml (son konsantrasyon 100µg/ml) olacak şekilde hücrelerin üzerlerine uygulandı. Negatif kontrol kuyularından 100µl besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 100µl taze besiyeri ilave edildi. Hücrelerde apoptozisin pozitif kontrolü olarak kullanılan Paklitaksel, 3,18µM dozunda kullanıldı (Park ve ark. 2004). İlaç uygulamalarını takiden hücreler 48 saat 37⁰C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

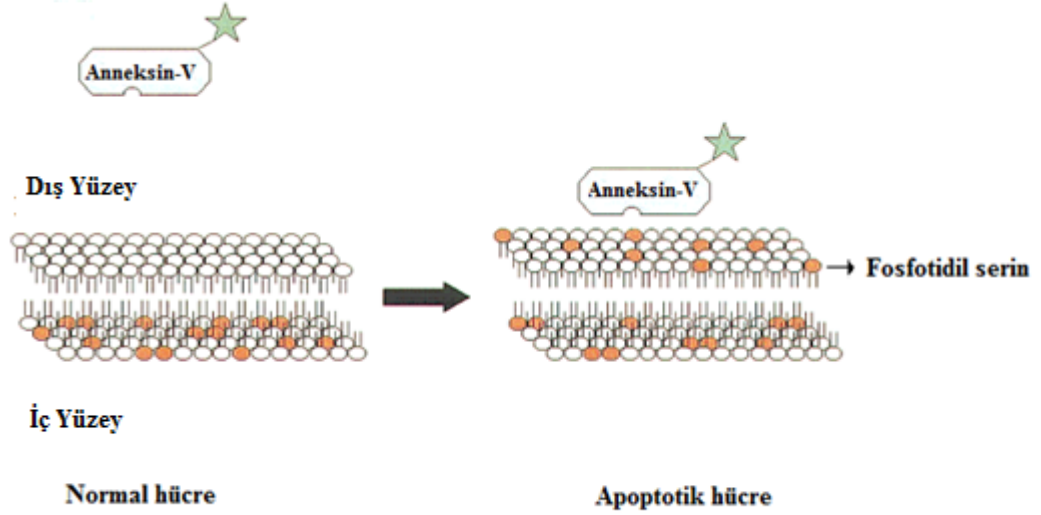
48 saatlik inkübasyon sonunda tüm kuyulara 10µl %10'luk NP-40 (Sigma, St. Louis, MO) ilave edildi. 15 dakika oda sıcaklığında 600rpm çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Tüm kuyulardaki supernatant toplandı ve 2000rpm'de 30 saniye santrifüj edilip M30 Apoptosense ELISA (M30-Apoptosense ELISA kit, Peviva, Bromma, Sweden) kit içeriğine uygun olarak çalışıldı. Supernatantlar, kitin içerisinde yer alan CK18'i tanıyan fare monoklonal M30 antikoru kaplı striplere 25µl pipetlendi. Tüm örnekler üzerine 75µl horseradish peroksidaz konjugatı eklendi. 4 saat boyunca 600rpm çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda örnekler 250µl yıkama solüsyonu ilave edilerek 5 kez yıkama yapıldı ve hemen ardından 200µl TMB substratı ilave edilerek 20 dakika karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi. Reaksiyonu durdurmak için 1N H₂SO₄ içeren 50µl stop çözeltisi ilave edildi ve oluşan renk şiddeti, spektrofotometrik olarak 450nm'de (FLASHScan S12, Jena, Almanya) okundu.

48 saatlik inkübasyon sonunda M65 ELISA kit (M65 ELISA kit, Peviva, Bromma, Sweden) içeriğini çalışmak için ise tüm kuyulardan supernatantlar toplanarak 2000rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Supernatantlar, fare monoklonal keratin 18 antikoru (M6) kaplı striplere 25µl pipetlendi. Tüm örnekler üzerine 75µl M65 horseradish peroksidaz konjugatı eklendi. 2 saat boyunca 600rpm çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Örnekler 250µl yıkama solüsyonu ilave edilerek 5 kez yıkama yapıldı ve hemen ardından 200µl TMB substratı ilave edilerek 20 dakika karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi. Reaksiyonu durdurmak için 1N H₂SO₄ içeren 50µl stop çözeltisi ilave edildi ve oluşan renk şiddeti, spektrofotometrik olarak 450nm'de (FLASHScan S12, Jena, Almanya) okundu.

2.2.8.Floresan Boyama Yöntemi ile Ölüm Modunun Belirlenmesi

2.2.8.1.Annexin-V Boyama Metodu

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptozisle ölürse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar (Şekil 2.3). Bu yer değiştirme apoptotik hücrelerde henüz membran bütünlüğünün bozulmadığı yani ölümün erken dönemlerinde meydana gelir. Annexin-V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücreler görünür hale getirilir ve floresan mikroskobu ile incelenebilir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Annexin-V bağlanması görülebildiği için yöntem çalışılırken ikinci boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir. Propidyum iyodür (PI), sadece membran hasarlı hücrelere girebilen, dolayısıyla tüm ölü hücreleri (primer nekrotik veya geç apoptotik/sekonder nekrotik) boyayabilen floresan nükleik asit boyasıdır. Bu boya canlı hücreler tarafından dışarı atılmaktadır. Primer nekrozis (hücre hacminin artması fakat fragmente ya da piknotik nükleusların gözlenmemesi) toksik koşullar (hipoksi, iskemi, hipertermi, vb.) altında gerçekleşen klasik ölüm şeklidir. Sekonder nekrozis ise, piknotik ya da fragmente nükleus ile karakterize olup, apoptozisin geç safhasıdır. Hücre kültürü ortamında apoptozise giden hücrelerin membranları intakt (erken apoptozda) olmasına rağmen daha ileri dönemlerde geç apoptozis/sekonder nekrozun gelişmesi ile hücrelerin membran bütünlükleri bozulmaktadır. Sekonder nekroz aşamasına kadar olan süre içinde hücreler non-vital boyalar denilen (PI) boyalar ile boyanacak olurlarsa apoptozis başlamış olmasına rağmen membran intakt olmasından dolayı bu boya ile boyanamazlar. Sekonder nekroz geliştikten sonraki aşamalarda hücreler membran bütünlüklerinin bozulması ile non-vital boyalar ile boyanmaya başlarlar. Dolayısıyla PI pozitif ve Hoechst pozitif boyanmaktadırlar. Hücreler eş zamanlı olarak Annexin-V-Fluorescein (yeşil floresan) ve non-vital boya olan propidyum iyodür (kırmızı floresan) ile boyanır. Canlı hücreler; FITC-/PI-, erken apoptotik hücreler; FITC+/PI- ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler; FITC+/PI+ boyanırlar ve bu şekilde birbirlerinden ayırt edilebilirler (Güleş ve Eren 2008, Ulukaya ve ark. 2011).



Şekil 2.3. Apoptotik hücrelerde fosfotidil serin translokasyonu (Van Engeland ve ark. 1988'den değiştirilerek alınmıştır).

A549, PC3 ve H1299 hücreleri sayılarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 200µl içerisinde 1×10^4 hücre olacak şekilde (3 tekrarlı) ekim yapıldı. 24 saat 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyonu takiben hücreleri zedelemekten uzaklaştırıldı ve sonrasında PQE'nin konsantrasyonu 100µg/ml olacak şekilde hücrelerin üzerlerine uygulandı. Negatif kontrol kuyularından 100µl besiyeri uzaklaştırıldı ve yerine 100µl taze besiyeri ilave edildi. İlaç uygulamalarını takiden hücreler 24 saat süreyle 37°C , %5 CO_2 'li ortamda inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sürelerinin sonunda hücreleri zedelemekten uzaklaştırılarak tüm besiyeri (yaklaşık 180µl) uzaklaştırılarak Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Roche, Mannheim, Germany) içeriğine uygun olarak çalışıldı. 500µl Incubation Buffer içerisine 5µl Annexin-V-Fluorescein ve 5µl Propidyum İyodür boyası pipetlendi. Ayrıca hücrelerin nükleus morfolojisini de bakmak amacıyla Hoechst 33342 (200µg/ml) boyası son konsantrasyonu 5µg/ml (40X sulandırılarak) olacak şekilde bu karışıma eklendi. Her kuyuya boya karışımından 30µL pipetlenerek yarım saat oda ısısında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda ekstraktın hücrelerde sebep olduğu ölüm şekli floresan mikroskop altında değerlendirildi.

2.2.8.2.Hoechst 33342 Boyama Metodu

Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilmektedir. Hoechst 33342, DNA'ya bağlanabilen dolayısıyla hücre membranından nüfuz edebilen bir boyadır. Canlı ve ölü (apoptotik/

nekrotik) hücrelerin çekirdeklerini boyamak için kullanılmaktadır. Hoechst boyama yöntemi kullanılarak ekstraktla muamele uygulanmış hücrelerin ölüm şekilleri, nükleus morfolojisine bakılarak yapılabilir. Apoptotik hücrelerde; çekirdeğin normal hücrelere göre daha küçük olma özelliği aranırken, nekrotik hücrelerde ise çekirdeğin normal hücrelerden biraz daha büyük olması ve daha az boya alması özelliği aranmaktadır.

Hoechst boyama yöntemi için; ilk olarak 96 kuyulu plate de her kuyuda 100µl içerisinde 1×10^4 hücre/ml olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyonu takiben PQE'nın konsantrasyonu 100µg/ml olacak şekilde hücrelerin üzerlerine uygulandı. Ardından hücreler, 48 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. 48 saat ilaç uygulamasını takiben hücrelere zarar vermeden üzerlerinden 50µl uzaklaştırıldı. 5µl Hoechst (Cell Viability Imaging Kit; nuclei dye, Roche, Mannheim, Germany) 5ml PBS içerisine pipetlendi ve kısa bir vorteks yapıldı. Her kuyuya 50µl hazırlanmış olan bu karışımdan ilave edildi ve hücreleri kaldırmamaya dikkat edilerek pipetaj yapıldı. 37°C, %5 CO₂ 'li ortamda 30 dakika inkübasyon sonrasında floresan mikroskop altında değerlendirildi.

2.2.9. Western Blot Analizi

Western blot analizi hücrelerden elde edilen bir protein karışımında, aranan (hedef) proteinin varlığını göstermek ve molekül ağırlığını belirlemek amacıyla kullanılan özel bir protein-protein hibridizasyon tekniğidir. İmmüno blotlama olarak da adlandırılan tekniğin uygulanabilmesi için öncelikle hedef proteini tanıyarak ona bağlanabilen bir antikor mevcut olmalıdır. Western blotlama temel olarak dört aşamada gerçekleştirilir:

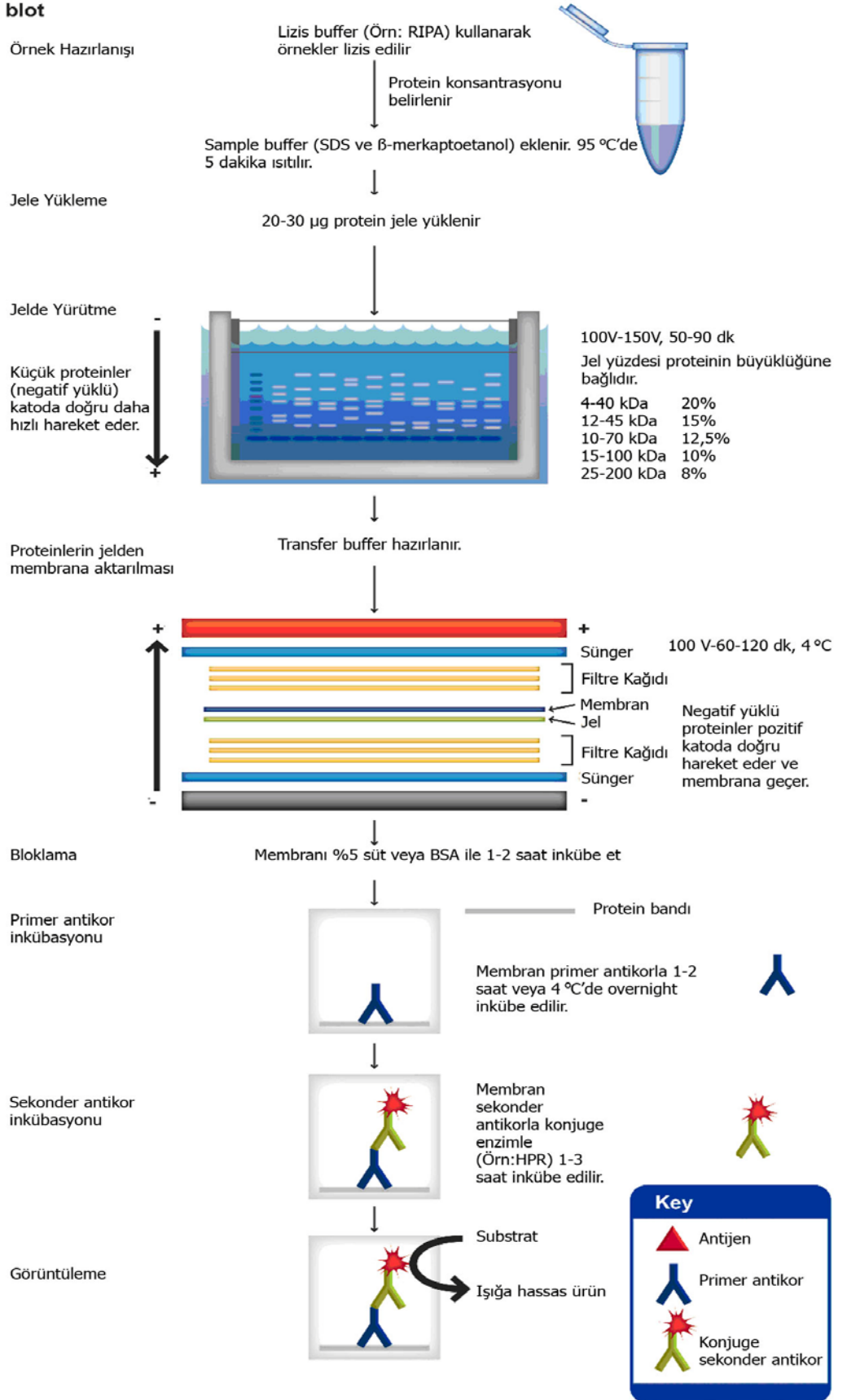
- i. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) yöntemiyle örnek karışımında bulunan proteinlerin jel üzerinde birbirlerinden ayrılmaları sağlanır.
- ii. Jelde büyüklüklerine göre ayrılarak bantlar oluşturan protein molekülleri, elektrotransfer tekniği ile nitroselüloz membrana aktarılırlar.
- iii. Membrana sırasıyla, hedef proteine özgü antikor, bu antikoru tanıyan ve yapısına enzim ilave edilmiş ikincil bir antikor ile muamele uygulanır.
- iv. Son olarak söz konusu enzimin substratı ile muamelesi sonucunda meydana gelen ışık aracılığı ile hedef proteinin membran üzerinde görüntülenmesi sağlanır (Şekil 2.4).

Proteinlerin saflığının kontrolü ve moleküler ağırlıklarının saptanması amacıyla kullanılan SDS-PAGE yöntemi Western blot analizinin ilk aşamasını oluşturur. Western blot yönteminde toplayıcı jel ve ayırıcı jel olmak üzere iki farklı agaroz jel kullanılır.

Toplayıcı jel hafif asidik (pH: 6,8) olup düşük akrilamid konsantrasyona sahiptir ve bu sayede gözenekli jel oluşur. Ayırıcı jel baziktir (pH:8,8) ve yüksek poliakrilamid içeriği ile jel gözenekleri daha dardır. Proteinler bu sayede büyüklüklerine göre ayrılır ve büyük proteinlere kıyasla küçük proteinler daha kolay ve hızlı ilerler.

SDS-PAGE yöntemi ile ayrılmak istenilen proteinlerin sadece büyüklüklerine göre ayrımını sağlamak için önce ısı ile denatüre edilmeleri ve sonra Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ile muamele edilmeleri gereklidir. Anyonik bir deterjan olan SDS, proteinlere bağlanıp negatif yüklü hale getirerek lineer forma dönüşmelerini sağlar. SDS sayesinde negatif yük ile yüklenen proteinler elektroforez sırasında anoda göç ederler. Elektroforez işlemi tamamlandığında farklı büyüklükteki proteinler jel boyunca ilerlerken ayrılarak farklı protein bantları halinde odaklanırlar. SDS-PAGE işleminden sonra jeldeki protein bantlarının görüntülenmesi için kemiluminesans prensibinden yararlanılır (Coşkun-Arı 2003, Mahmood ve Yang 2012).

Western blot



Şekil 2.4. Western Blot Aşamalarının Şematik Gösterimi (Abcam 2010).

A549, PC3 ve H1299 hücreleri yeterli miktarda üretildikten sonra ilaç uygulaması için 25cm²'lik flasklara ekim yapıldı. Hücreler %70-80 doluluk oranına ulaştıklarında 1. flask negatif kontrol, 2. flask PQE (100µg/ml), 3. flask pozitif kontrol, A549 ve PC3; Sisplatin (20µM), H1299; Etoposit (5µM) olmak üzere ilaç uygulandı. A549 ve PC3; Sisplatin (20µM), H1299; Etoposit (5µM) PARP-kırılmasını görebilmek amacıyla pozitif kontrol olarak seçildi (Chiu ve ar. 2005, Dasgupta ve ark. 2006, Zhang ve ark. 2007). 37°C'de %5 CO₂'li ortamda 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda protein izolasyonu aşamasına geçildi.

2.2.9.1. Protein İzolasyonu

2.2.9.1.1. Çözeltiler

Lizis tamponu: 3ml lizis tamponu (RIPA lysis buffer, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) için 30µl 200mM PMSF (Santa Cruz, CA, USA), 30µl 100mM sodyum ortovanadat (Santa Cruz, CA, USA), 45µl proteaz inhibitör kokteyl (Santa Cruz, CA, USA) eklendi. Solüsyon karanlıkta hazırlandı.

Bu aşamada, ilaç uygulanan flaskların süpernatantları, buz üzerinde tutulan 15ml'lik falkonlara toplandı ve negatif kontrol flaskının süpernatantı uzaklaştırıldı. Flasklara 10ml soğuk PBS ilave edilip hücreler "scraper" (Corning) ile kaldırıldı ve ilgili falkonlara aktarıldı. Süspansiyon +4°C'de 1000g'de 5 dakika santrifüj (Hettich Zentrifugen, Almanya) edildi. Santrifüj sonrası falkonların süpernatantları uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 0,5ml lizis tamponu pipetlendi. Falkonlar, karanlıkta 30 dakika buz üzerinde bekletildi ve bu esnada 10 dakikada bir pipetaj yapılarak karıştırıldı. Süre bitiminde solüsyonlar 1,5ml'lik tüplere aktarıldı ve +4°C'de 10,000g'de 10 dakika santrifüj edildi (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Süpernatantları 0,5ml'lik tüplere toplandı ve protein miktarları ölçüldü.

2.2.9.2. Proteinlerin BCA Yöntemi ile Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

2.2.9.2.1. Çözeltiler

Bicinchoninic Acid Kit (Sigma, St. Louis, MO)

Bovine Serum Albumin (BSA, Amresco, Solon, OH, USA) Standardı

2.2.9.2.2. BSA Standartlarının Hazırlanması

BCA ile protein miktarlarını ölçebilmek için sığır serum albumin (BSA) proteininin değişik konsantrasyonları ultrasaf dH₂O ile hazırlanarak bir standart eğri grafiği çizildi. ml'inde 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2mg BSA bulunan standartlar hazırlandı.

2.2.9.2.3.BCA Ölçümünün Yapılması

Biçinkoninik asit (BCA) protein tayin yönteminde bakır sülfat, BCA solüsyonuna eklendiğinde oluşan kompleks elma yeşili bir renk alır. Bu solüsyon, protein solüsyonuna ilave edildiğinde, proteinin peptit bağları ile etkileşir ve Cu^{++} iyonları Cu^+ iyonlarına dönüşür. Neticesinde kompleksin rengini mora çevirir. Bu yöntem hızlı, hassas ve kesindir ancak deterjan ve organik solventlerle etkileşimlerine dikkat etmek gerekmektedir.

Ölçüm için Biçinkoninik Asit Kit (Sigma, St. Louis, MO) ve 96 kuyuluk plate (Orange Scientific) kullanıldı. Her bir kuyuya 0, 20, 40, 60, 80 ve 100µl standart ve 10µl konsantrasyonu bilinmeyen örnekler pipetlendi. Konsantrasyonu bilinmeyen örnekler 10 kere ultrasaf dH_2O ile seyreltilerek ölçüm yapıldı, bu nedenle 10µl örnekler 90µl, standartlar ise 100µl'ye tamamlanacak şekilde ultrasaf dH_2O ile tamamlandı ve bu seyreltme katsayısı, hesaplamalarda dikkate alındı. Kuyuların üzerine 200µl çalışma ayırıcı pipetlendi ve plate 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda oluşan renk şiddeti, spektrofotometrede 570nm'de (FLASHScan S12, Jena, Almanya) okundu.

2.2.9.3.Western Blot Yöntemi ile Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Aktarılması

2.2.9.3.1.Çözeltiler

MES SDS Running Buffer (Nu-PAGE, 20X, İnvitrogen, CA, USA): 30ml Running buffer, 570ml ultra saf H_2O ile tamamlandı.

Nu-PAGE LDS Sample Buffer (4X, İnvitrogen, CA, USA)

Nu-PAGE Sample Reducing Agent (10X, İnvitrogen, CA, USA)

Nu-PAGE Antioksidant (İnvitrogen, CA, USA)

Kaleidoscope Prestained Standarts (Biorad, CA, USA)

%4-12 gradient, NuPAGE Bis-Tris Mini Gels, 1mm, 12 kuyucuk (İnvitrogen, CA, USA)

10X pH:7,6 TBS-T (Tris-Buffer Saline-Tween20): Tris base 24,23g (Scharlau, Barcelona, Spain) NaCl (Merck, Darmstadt, Germany) 80,06g ve 5ml Tween20 (Dako, CA, USA) 1L ultrasaf H_2O ile çözüldü.

Chemiluminescent Detection Kit, Mouse (Amersham, Buckinghamshire, UK)

Phototope®-HRP Western Blot Detection System (Cell signalling, MA, USA)

2.2.9.3.2. Proteinlerin Yüklmesi ve Jelde Yürütülmesi

Örnekler istenen hacimlerde toplam protein miktarı 20µg (BCA yöntemiyle belirlenen) ve sample buffer ve reducing agent 1X olacak şekilde 0,5ml'lik tüplere pipetlendi. Ardından tüpler su banyosunda bekletildi. Bu esnada jel, elektroforez tankına yerleştirildikten sonra SDS running buffer, doluluk sınırına kadar eklendi. Hazır jelde bulunan koruma sıvısı pipet yardımıyla al-ver yapılarak uzaklaştırıldıktan sonra 500µl antioksidan eklendi. Marker, yüklenmeden önce 40°C'de 1 dakika bekletildi. Daha sonra marker (5µl) ve örnekler kuyulara pipet yardımıyla belirlenen miktarlarda yüklendi. Yükleme işlemi sonunda 60 dakika 150V yürütme yapıldı.

2.2.9.3.3. Proteinlerin Transferi

Transfer işlemi için I-Blot jel transfer cihazına (Invitrogen, CA, USA) sırasıyla anot bakır (+), jel, filtre kağıdı (ultra saf H₂O ile ıslatılır), katot bakır (-) ve sünger yerleştirildi. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda 8 dakika transfer işlemi gerçekleştirildi.

2.2.9.3.4.β-Aktin Proteinlerinin Belirlenmesi

2.2.9.3.4.1. Bloklama

β-Aktin için, TBS-T içerisinde %5'lik süt (Santa Cruz, CA, USA) çözeltisi hazırlandı ve 60 dakika oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

2.2.9.3.4.2. Birincil Antikor

Anti-Aktin antikor (Cell signalling, MA, USA), 1:1000 olacak şekilde %5'lik BSA çözeltisi içerisinde hazırlandı ve 18 saat +4°C'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

2.2.9.3.4.3. İkincil Antikor

β-Aktin için, Anti-Rabbit (Cell Signaling, MA, USA) 1:2000, Anti-biotin (Cell Signaling, MA, USA) 1:1000 olacak şekilde %5'lik süt çözeltisi içerisinde hazırlandı ve çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

2.2.9.3.4.4. Görüntüleme

Görüntüleme için; Lumiglo reagent A (20X, Cell Signaling, MA, USA) ve Peroksidaz reagent B (20X, Cell Signaling, MA, USA) iki kat seyreltilerek kullanıldı. Membranlar hazırlanan solüsyon ile 1 dakika inkübe edildikten sonra açığa çıkan kemiluminesans sinyal, Fusion FX-7 (Vilber Lourmat, Torcy, France) cihazı kullanılarak görüntülendi. Bu şekilde nitroselüloz membran üzerine transfer edilmiş olan proteinlere bağlanan antikorlar görüntülendi.

2.2.9.3.5.PARP Proteinlerinin Belirlenmesi

2.2.9.3.5.1.Birincil ve İkincil Antikorların Membrandan Uzaklaştırılması

Birincil ve ikincil antikorları membrandan uzaklaştırmak (Stripping) için üretici firmanın (Cell Signaling, MA, USA) Western blot yeniden işaretleme (reprobing) protokolü kullanıldı. Stripping solüsyonu hazırlamak için; 100ml ultrasaf su içerisine 0,76g Tris-base (Scharlau, Barcelona, Spain), 2g SDS (Appllichem, Darmstadt, Germany) ve 700µl β-merkaptolanol (Merck, Schuchard, Germany) eklendi (1X, pH:6,8). Membran 4 kez 5 dakika TBS-T ile yıkandıktan sonra stripping solüsyonu eklenerek 150-300rpm, 37⁰C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda 2 kez 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı ve membranda sinyal olup olmadığını kontrol etmek amacıyla görüntüleme yapıldı. Görüntüleme sonunda membranlarda sinyal yoksa 4 kez 5 dakika TBS-T ile yıkama yapılarak bloklama aşamasına geçildi.

2.2.9.3.5.2.Bloklama

PARP için, TBS-T içerisinde %5'lik süt (Santa Cruz, CA, USA) çözeltisi hazırlandı ve 60 dakika oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

2.2.9.3.5.3.Birincil Antikor

Anti-PARP antikor (Cell Signaling, MA, USA), 1:1000 olacak şekilde %5'lik BSA çözeltisi içerisinde hazırlandı ve 18 saat +4⁰C'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

2.2.9.3.5.4.İkincil Antikor

PARP için, Anti-Rabbit (Cell Signaling, MA, USA) 1:2000, Anti-biotin (Cell Signaling, MA, USA) 1:1000 olacak şekilde %5'lik süt çözeltisi içerisinde hazırlandı ve çalkalayıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

2.2.9.3.5.5.Görüntüleme

Görüntüleme için; Lumiglo reagent A (20X, Cell Signaling, MA, USA) ve Peroksidaz reagent B (20X, Cell Signaling, MA, USA) iki kat seyreltilerek kullanıldı. Membranlar hazırlanan solüsyon ile 1 dakika inkübe edildikten sonra açığa çıkan kemiluminesans sinyal, Fusion FX-7 (Vilber Lourmat, Torcy, France) cihazı kullanılarak görüntülendi. Bu şekilde nitroselüloz membran üzerine transfer edilmiş olan proteinlere bağlanan antikorlar görüntülendi.

2.2.9.3.6.Keratin 18 Proteinlerinin Belirlenmesi

2.2.9.3.6.1.Birincil ve İkincil Antikorların Membrandan Uzaklaştırılması

Birincil ve ikincil antikorları membrandan uzaklaştırmak (Stripping) için üretici firmanın (Cell Signaling, MA, USA) Western blot yeniden işaretleme (reprobing) protokolü kullanıldı. Stripping solüsyonu hazırlamak için; 100ml ultrasaf su içerisine 0,76g Tris-base (Scharlau, Barcelona, Spain), 2g SDS (Appllichem, Darmstadt, Germany) ve 700µl β-merkaptoetanol (Merck, Schuchard, Germany) eklendi (1X, pH:6.8). Membran 4 kez 5 dakika TBS-T ile yıkandıktan sonra stripping solüsyonu eklenerek 150-300rpm, 37⁰C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda 2 kez 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı ve membranda sinyal olup olmadığını kontrol etmek amacıyla görüntüleme yapıldı. Görüntüleme sonunda membranlarda sinyal yoksa 4 kez 5 dakika TBS-T ile yıkama yapılarak bloklama aşamasına geçildi.

2.2.9.3.6.2.Bloklama

Keratin 18 için, TBS-T içerisinde %5'lik süt çözeltisi hazırlandı ve 60 dakika oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Süre sonunda, 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

2.2.9.3.6.3.Birincil Antikor

Anti-Keratin 18 antikorunu (Cell Signaling, MA, USA), 1:2000 olacak şekilde %5'lik süt çözeltisi içerisinde hazırlandı ve 18 saat +4⁰C'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

2.2.9.3.6.4.İkincil Antikor

Keratin 18 için, Anti-Mouse (Amersham, Buckinghamshire, UK) 1:2000, Anti-biotin (Cell Signaling, MA, USA) 1:2000 olacak şekilde %5'lik süt çözeltisi içerisinde hazırlandı ve 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı.

2.2.9.3.6.5.Görüntüleme

Lumiglo reagent A (20X, Cell Signaling, MA, USA) ve Peroksidaz reagent B (20X, Cell Signaling, MA, USA) iki kat seyreltilerek kullanıldı. Membranlar hazırlanan solüsyon ile 1 dakika inkübe edildikten sonra Fusion FX-7 (Vilber Lourmat, Torcy, France) cihazı kullanılarak nitroselüloz membran üzerine transfer edilmiş olan proteinlere bağlanan antikorlar görüntülendi.

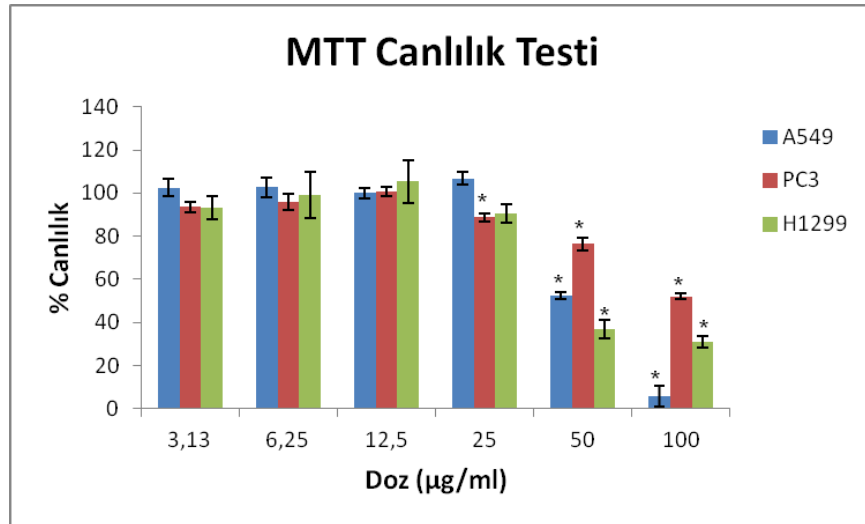
2.2.10.İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler SPSS 20.0 bilgisayar paket programı kullanılarak yapıldı. Yüzde canlılık değerleri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak hesaplandı. 3 tekrarlı yapılan tüm analizlerin sonuçları ortalama ve standart sapma ile verildi. İstatistiksel olarak anlamlı veriler $p<0.05$ değerine göre belirlendi.

3.BULGULAR

3.1.MTT Canlılık Testi Bulguları

PQE'nin farklı konsantrasyonlarının (3,13-100µg/ml) A549, PC3 ve H1299 hücre soylarının canlılığı üzerine olan etkisini belirleyebilmek için MTT canlılık testi yapıldı. Hücre soylarına 48 saat süre ile PQE uygulamasını takiben elde edilen sonuçlar şekil 3.1'de gösterildi. PQE'nin uygulandığı hücre soylarında konsantrasyon arttıkça hücrelerin canlılık yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi ($p<0.05$). PQE uygulanan hücre soylarının 48 saatlik tedavi sonrasında hesaplanan canlılık yüzde değerleri çizelge 3.1'de verildi. PQE uygulanan A549, PC3 ve H1299 hücre soylarının IC_{50} (kontrol hücrelerine kıyasla ekstraktla muamele sonrası hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon) ve IC_{90} (kontrol hücrelerine kıyasla ekstraktla muamele sonrası hücrelerin %90'ını öldüren konsantrasyon) değerleri ise çizelge 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.1. PQE uygulanan A549, PC3 ve H1299 hücre soylarının canlılık yüzdesinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir.

* Aynı doz içinde hücre soyları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0.05$) ifade etmektedir.

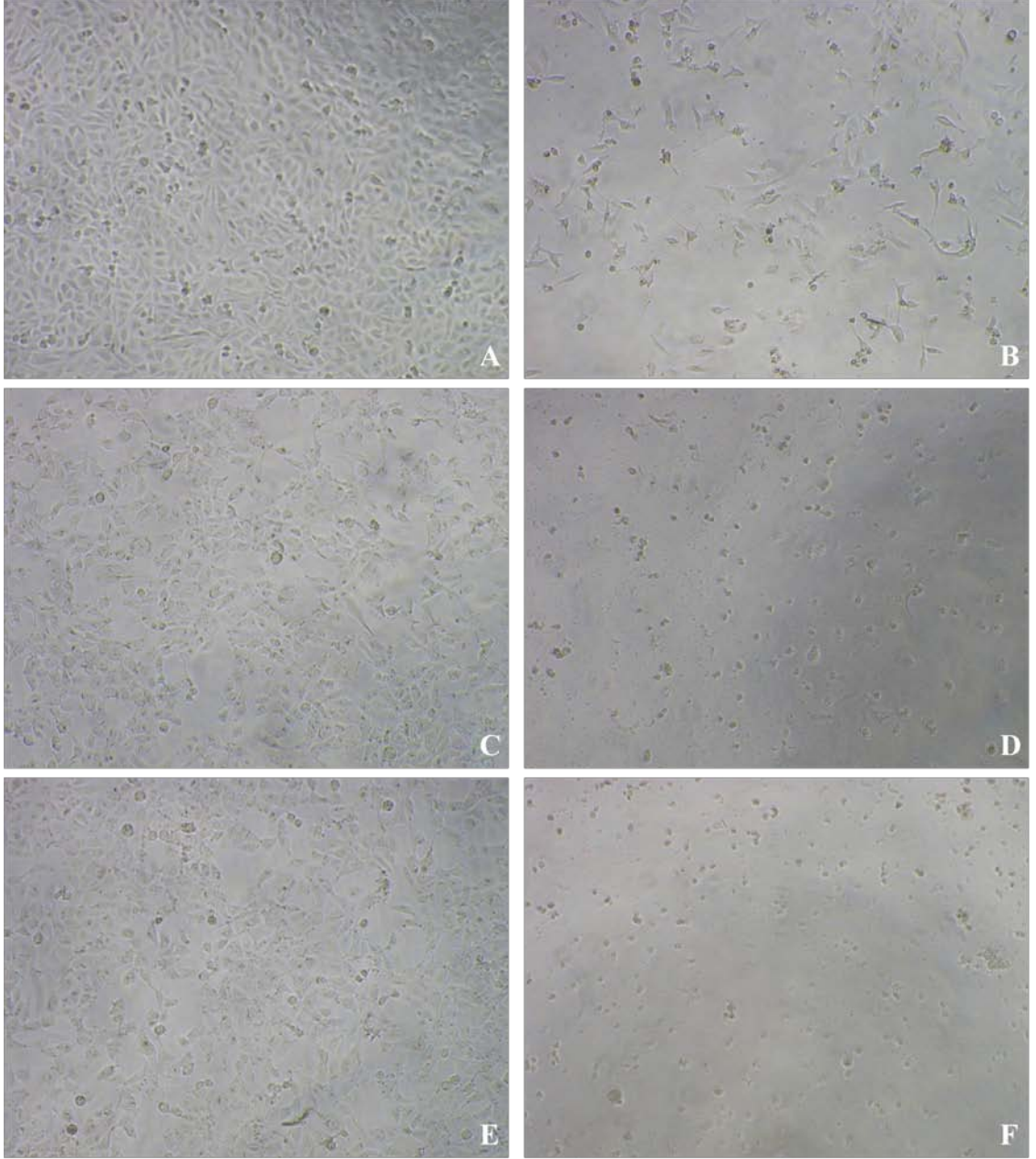
Dozlar ($\mu\text{g/ml}$)	A549 % Canlılık	PC3 % Canlılık	H1299 % Canlılık
3,13	102,40	93,50	93,20
6,25	102,64	95,81	99,16
12,5	99,98	100,76	105,32
25	106,85	88,74	90,49
50	52,56	76,46	36,86
100	5,69	52,12	30,94

Çizelge 3.1. PQE uygulanan hücre soylarının 48 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri.

Doz ($\mu\text{g/ml}$)	A549	PC3	H1299
IC ₅₀	52,73	>100	43,87
IC ₉₀	95,40	>100	>100

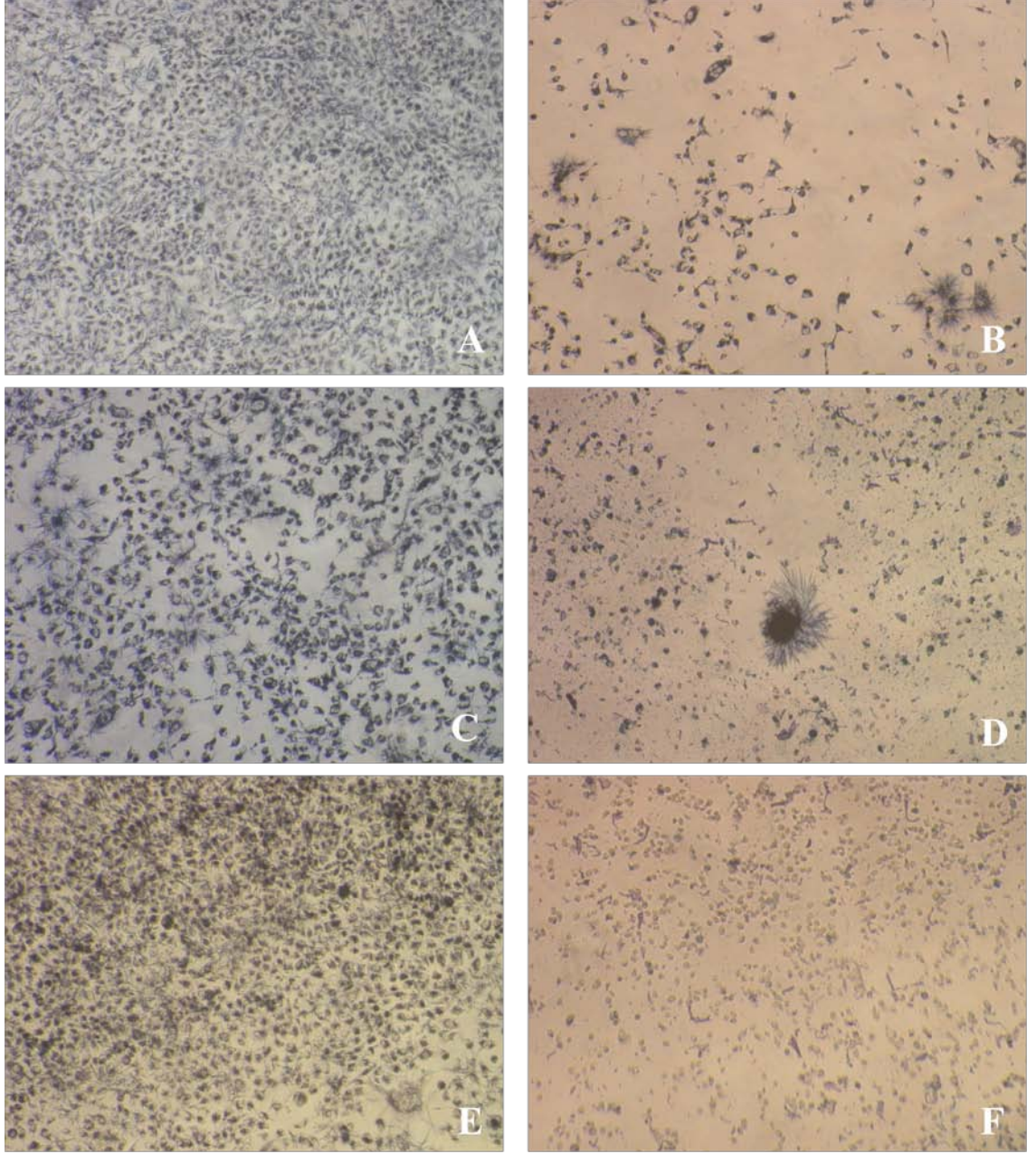
Çizelge 3.2. PQE uygulanan hücre soylarında MTT canlılık testi sonuçlarına göre IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri.

MTT canlılık testi uygulaması aşamasında; PQE'nin 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunun 48 saatlik tedavi sonrasında hücreler üzerindeki etkileri MTT koyulmadan önce morfolojik olarak faz-kontrast mikroskopunda görüntülendi (Şekil 3.2). Ayrıca PQE'nin 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunun 48 saatlik tedavi sonrasında hücreler üzerindeki etkileri MTT koyulduktan 4 saat sonra da morfolojik olarak faz-kontrast mikroskopunda görüntülendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.2. MTT testi uygulamasından önce A549, PC3 ve H1299 hücrelerinin morfolojik görüntüleri.

A: A549 kontrol hücreleri **B:** A549; 100µg/ml PQE **C:** PC3 kontrol hücreleri **D:** PC3; 100µg/ml PQE **E:** H1299 kontrol hücreleri **F:** H1299; 100µg/ml PQE



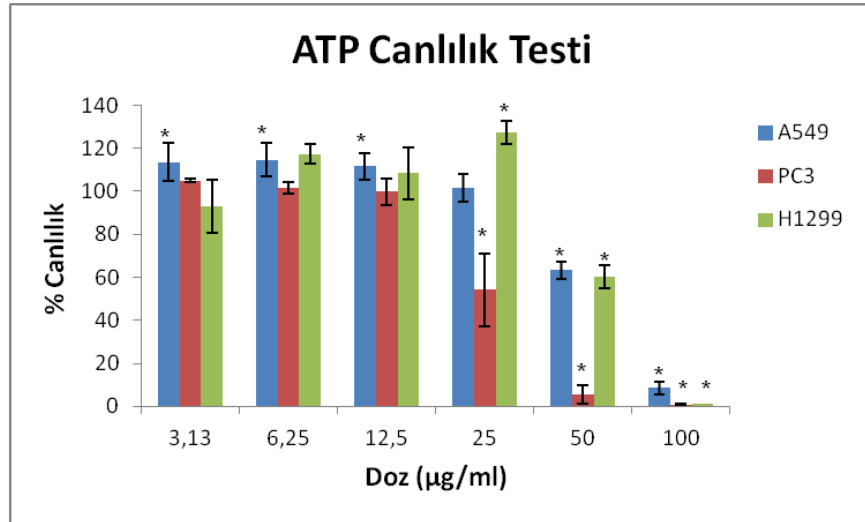
Şekil 3.3. MTT testi uygulamasından sonra A549, PC3 ve H1299 hücrelerinin morfolojik görüntüleri.

A: A549 kontrol hücreleri **B:** A549; 100µg/ml PQE **C:** PC3 kontrol hücreleri **D:** PC3; 100µg/ml PQE **E:** H1299 kontrol hücreleri **F:** H1299; 100µg/ml PQE

Sonuç olarak; PQE'nin 100µg/ml konsantrasyonunda büyümeyi baskılayıcı etkisinden dolayı MTT tetrazolium tuzunun formazana indirgenmesini azalttığı görüldü. Ayrıca kontrol hücrelerinde, mitokondriyel süksinat dehidrogenaz enzimleri tarafından suda çözünmeyen koyu mavi-mor renkli formazan kristallerinin oluşumu gözlenirken, ölü hücrelerde ise formazan kristal oluşumu gözlenmedi.

3.2.ATP Canlılık Testi Bulguları

PQE'nin farklı konsantrasyonlarının (3,13-100µg/ml) A549, PC3 ve H1299 hücre soylarında intrasellüler ATP miktarına olan etkisini belirleyebilmek için ATP canlılık testi yapıldı. Hücre soylarına 48 saat süre ile PQE uygulamasını takiben elde edilen sonuçlar şekil 3.4'te gösterildi. PQE'nin, konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak uygulandığı hücre soylarında intrasellüler ATP miktarında azalmalara neden olduğu belirlendi. PQE uygulanan A549, PC3 ve H1299 hücre soylarının canlılık yüzde değerleri çizelge 3.3'te, IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri ise çizelge 3.4'te verilmiştir. Sonuç olarak, PQE'nin 100µg/ml konsantrasyonunun bütün hücre soyları üzerinde sitotoksik etki gösterdiği gözlemlendi. Ayrıca PC3 hücre soyunda 50µg/ml konsantrasyonunda da sitotoksik aktivite belirlendi. PQE'nin 50µg/ml ve 100µg/ml dozlarının hücre soyları üzerine olan etkileri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu (p<0.05).



Şekil 3.4. PQE uygulanan A549, PC3 ve H1299 hücre soylarının canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 2 bağımsız deneyin ortalamasını temsil etmektedir.

* Aynı doz içinde hücre soyları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (p<0.05) ifade etmektedir.

Dozlar (µg/ml)	A549 % Canlılık	PC3 % Canlılık	H1299 % Canlılık
3,13	113,59	105,02	93,03
6,25	114,70	101,60	117,41
12,5	111,71	99,76	108,37
25	101,54	54,25	127,45
50	63,27	5,58	60,06
100	8,57	0,68	1,07

Çizelge 3.3. PQE uygulanan hücre soylarının 48 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri.

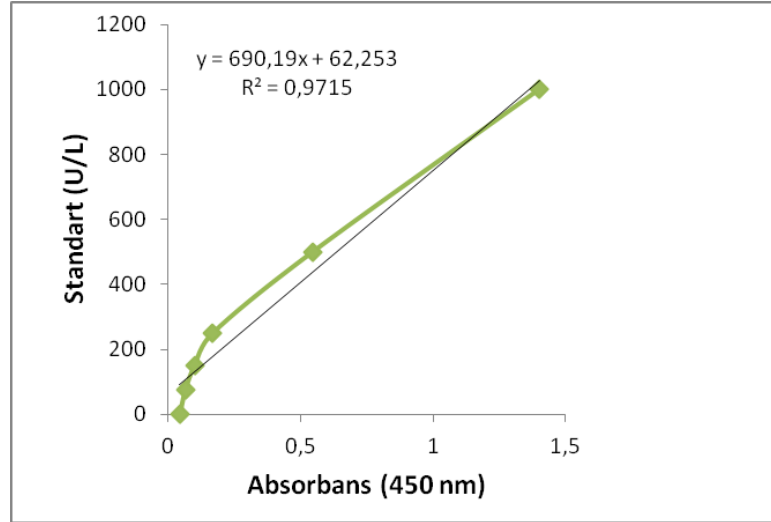
Doz (µg/ml)	A549	PC3	H1299
IC ₅₀	62,13	27,18	58,53
IC ₉₀	98,70	47,73	92,43

Çizelge 3.4. PQE uygulanan hücre soylarında ATP canlılık testi sonuçlarına göre IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri.

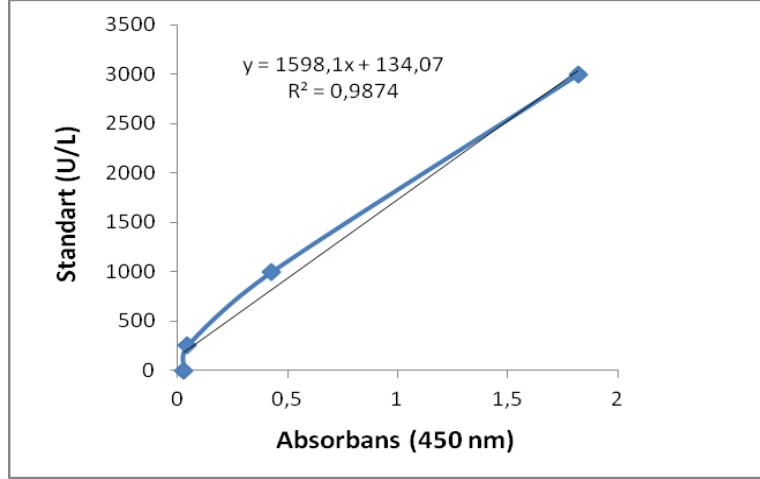
3.3.M30 Antijen (Kaspazla Kırılmış Sitokeratin 18) ve M65 Antijen Bulguları

PQE'nin 100µg/ml konsantrasyonunun hücreler üzerinde sitotoksik aktivite gösterdiği belirlendikten sonra hücre ölüm modunu araştırmak amacıyla apoptozise özgü bir belirteç olan kaspazla-kırılmış CK18 düzeylerine bakıldı. Ayrıca hem apoptotik hem de nekrotik hücreleri belirleyebilen M65 Elisa yöntemini de kullanılarak hücrelerin ölüm modu belirlenmeye çalışıldı.

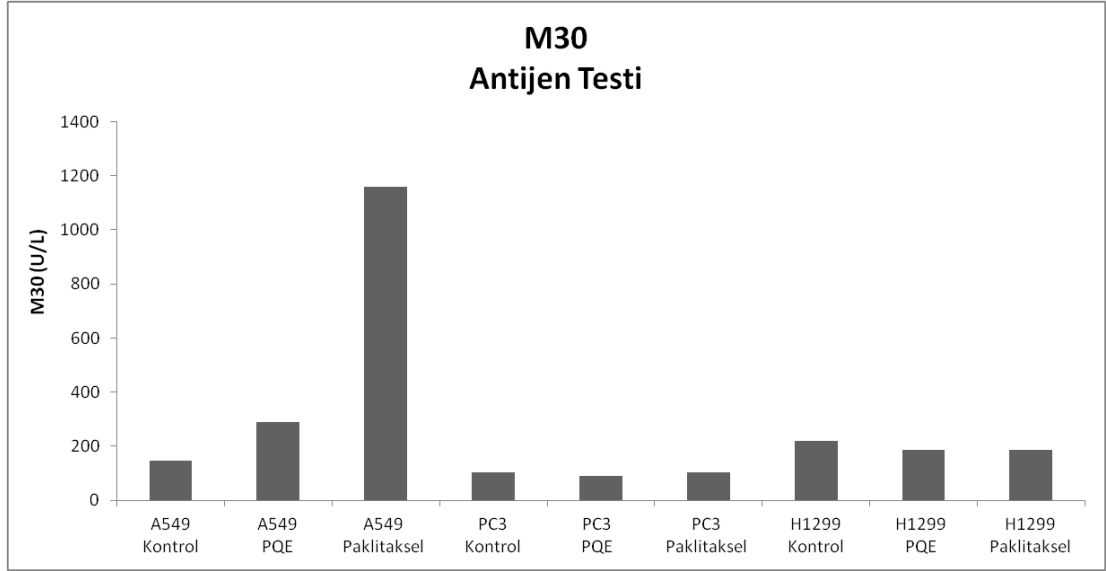
M30-Antijen ölçümlerinin değerlendirilmesi için standart eğri grafiği hazırlandı. A549 ve PC3 hücre soyları ile yapılan çalışmanın standart eğri grafiği şekil 3.5'te, H1299 hücre soyu ile yapılan çalışmanın standart eğri grafiği ise şekil 3.6'da gösterilmiştir. Ölçülen absorbanlar standart eğri grafiği yardımıyla belirlenen formüller üzerinden değerlendirilerek M30 miktarları U/L cinsinden hesaplandı (Şekil 3.7).



Şekil 3.5. A549 ve PC3 hücre soyları ile yapılan çalışmanın M30-Antijen standart eğri grafiği.



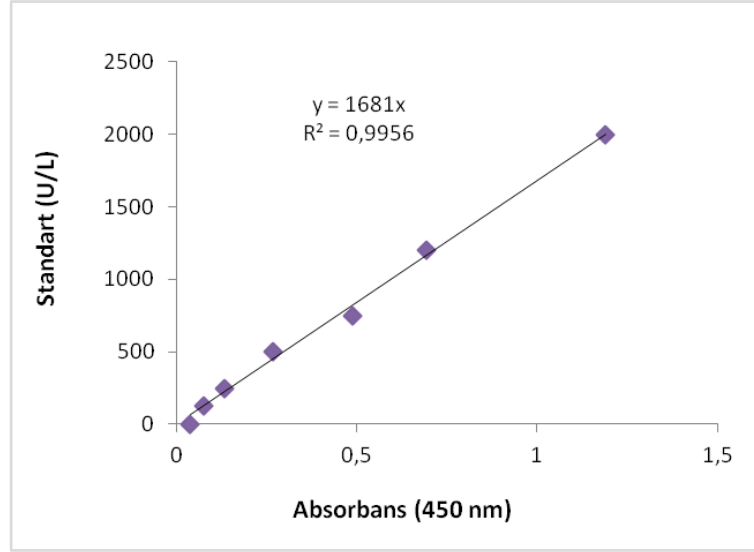
Şekil 3.6. H1299 hücre soyu ile yapılan çalışmanın M30-Antijen standart eğri grafiği.



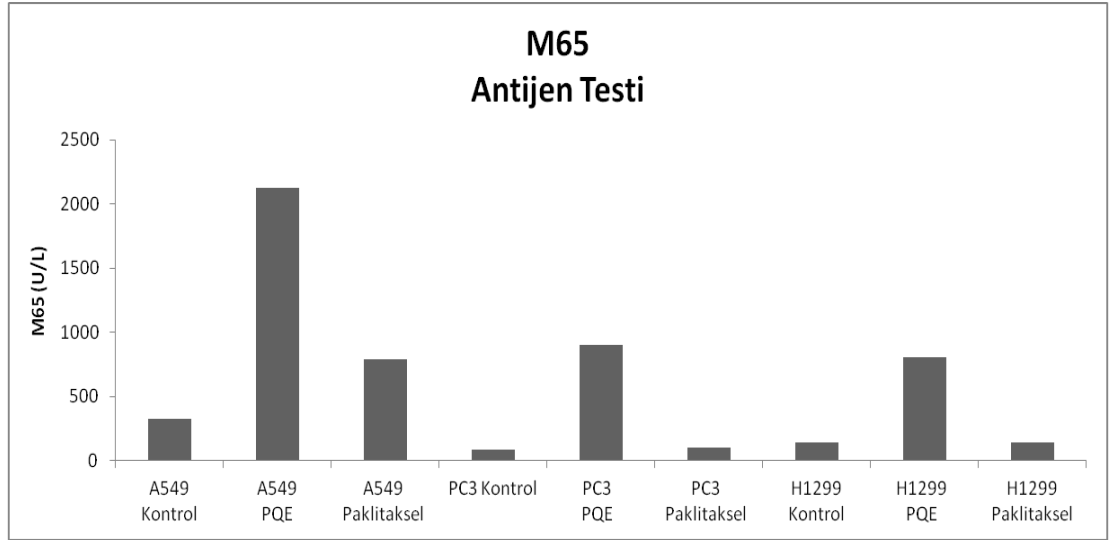
Şekil 3.7. 100µg/ml PQE ve 3,18µM Paklitaksel muamelelerinin 48 saatte A549, PC3 ve H1299 hücre soylarında M30-Antijen üzerine etkisi.

Şekil 3.7'de, 100µg/ml PQE ve 3,18µM Paklitaksel muamelelerinin 48 saatte A549, PC3 ve H1299 hücre soylarında, bir apoptozis belirteci olan kaspazla-kırılmış sitokeratin 18 (M30-Antijen) üzerine olan etkisi gösterilmektedir. Yalnızca A549 hücrelerinde Paklitaksel'in yaklaşık 8-katlık bir artışa neden olduğu buna karşılık diğer hücrelerde Paklitaksel ve 100µg/ml PQE muamelesinde herhangi bir değişimin olmadığı belirlendi.

M65-Antijen ölçümlerinin değerlendirilmesi için de standart eğri grafiği hazırlandı (Şekil 3.8). Ölçülen absorbanslar standart eğri grafiği yardımıyla belirlenen formüller üzerinden değerlendirilerek M65 miktarları U/L cinsinden hesaplandı (Şekil 3.9).



Şekil 3.8. M65-Antijen standart eğri grafiği.



Şekil 3.9. 100µg/ml PQE ve 3,18µM Paklitaksel muamelelerinin 48 saatte A549, PC3 ve H1299 hücre soylarında M65-Antijen üzerine etkisi.

Şekil 3.9'da, 100µg/ml PQE ve 3,18µM Paklitaksel muamelelerinin 48 saatte A549, PC3 ve H1299 hücre soylarında, total sitokeratin 18 (M65-Antijen) üzerine olan etkisi gösterilmektedir. 100µg/ml PQE'nin A549 hücrelerinde kontrole göre 48. saat M65-Antijen seviyesinde yaklaşık 7-katlık bir artışa, PC3 hücrelerinde yaklaşık 11-katlık bir artışa ve H1299 hücrelerinde yaklaşık 6-katlık bir artışa neden olduğu belirlendi.

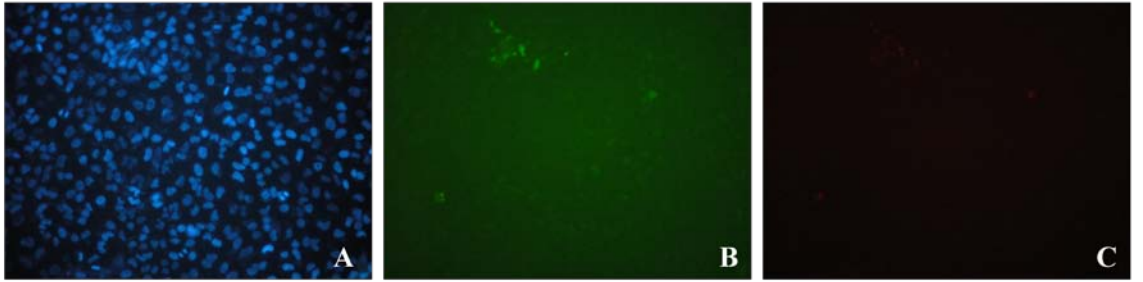
3.4.Floresan Mikroskopu İle Yapılan Değerlendirmeler

3.4.1.Annexin-V Boyama Yöntemi Bulguları

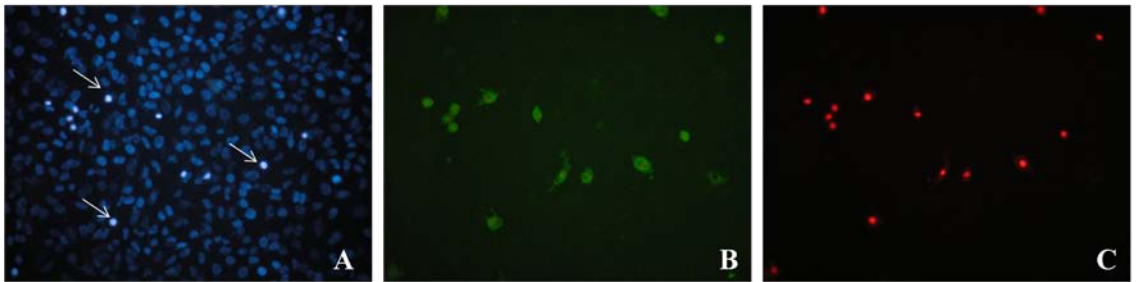
Annexin-V, apoptozisin erken dönemlerinde hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir proteindir ve floresan bir madde ile işaretlendiğinde apoptotik hücreler görünür hale getirilerek floresan mikroskopu ile incelenir. Ayrıca nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Annexin-V bağlanması görülebildiği için yöntem çalışılırken ikinci boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir. Hücreler Annexin-V Fluorescein (yeşil floresan) ve non-vital boya olan propidyum iyodür (kırmızı floresan) ile eş zamanlı olarak boyandığında; canlı hücreler Annexin-V negatif/ PI negatif, erken apoptotik hücreler Annexin-V pozitif/ PI negatif ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler Annexin-V pozitif/ PI pozitif sonuç verir.

PQE'nın 100µg/ml konsantrasyonunun A549, PC3 ve H1299 hücreleri üzerine 24. saatteki etkisi Annexin-V yöntemi kullanılarak floresan mikroskopu altında değerlendirildi. A549 hücrelerinde gözlenen etki şekil 3.10, PC3 hücrelerinde gözlenen etki şekil 3.11 ve H1299 hücrelerinde gözlenen etki şekil 3.12'de gösterilmiştir.

A549 Kontrol



A549 PQE 100µg/ml



Şekil 3.10. A549 hücrelerinin 24 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri.

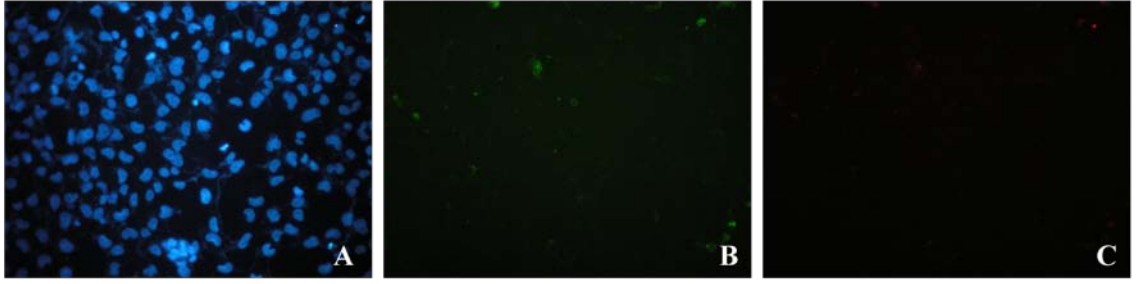
A: Hoechst 33342 ile boyama,

B: Annexin-V ile boyama,

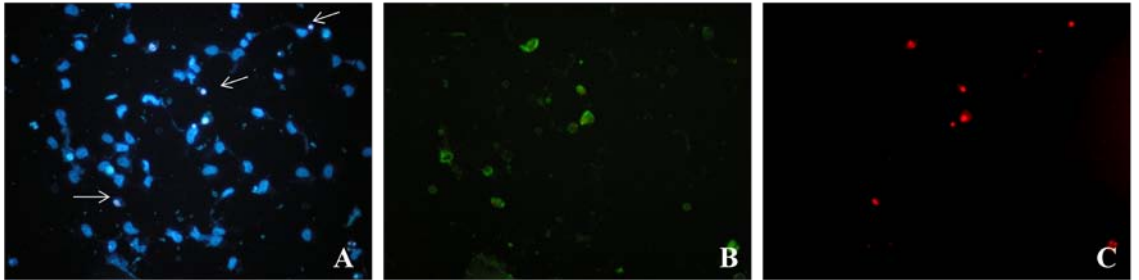
C: Propidyum iyodür ile boyama.

→ Hücre ölüm şekli olarak apoptozisi temsil eden piknotik nükleus varlığını göstermektedir.

PC3 Kontrol



PC3 PQE 100µg/ml



Şekil 3.11. PC3 hücrelerinin 24 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri.

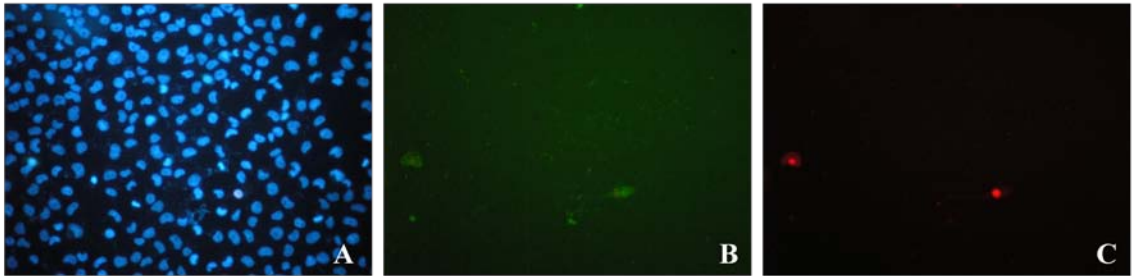
A: Hoechst 33342 ile boyama,

B: Annexin-V ile boyama,

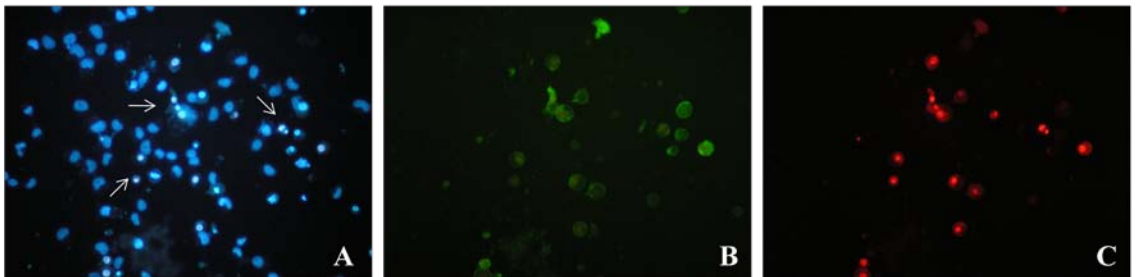
C: Propidyum iyodür ile boyama.

→ Hücre ölüm şekli olarak apoptozisi temsil eden piknotik nükleus varlığını göstermektedir.

H1299 Kontrol



H1299 PQE 100µg/ml



Şekil 3.12. H1299 hücrelerinin 24 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri

A: Hoechst 33342 ile boyama,

B: Annexin-V ile boyama,

C: Propidyum iyodür ile boyama

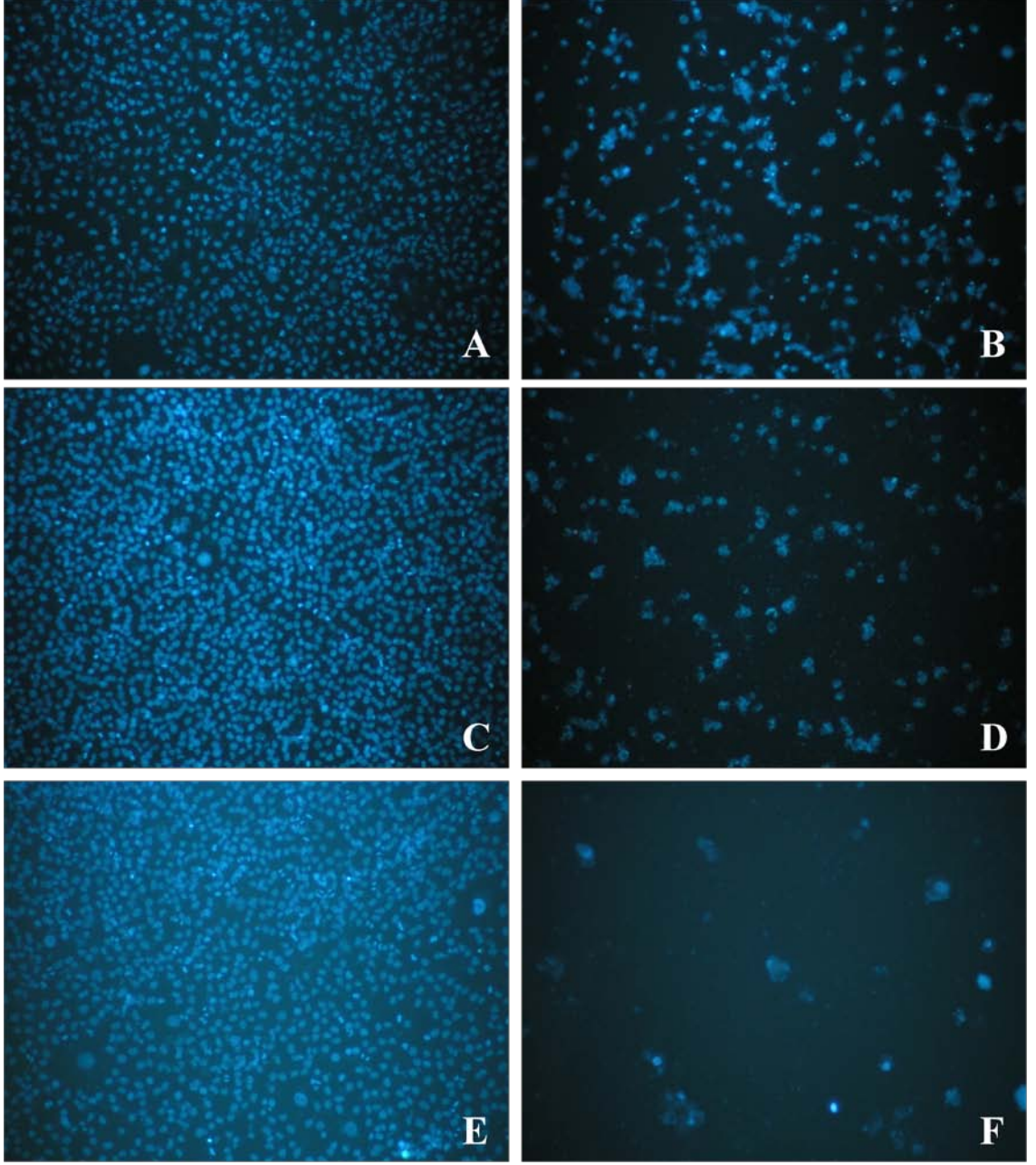
→ Hücre ölüm şekli olarak apoptozisi temsil eden piknotik nükleus varlığını göstermekte

100µg/ml PQE ile muamele edilen A549, PC3 ve H1299 hücrelerinde nükleusun kontrole kıyasla küçüldüğü (piknozis) gözlemlendi. Özellikle PC3 ve H1299 hücrelerinde 24 saat sonra hücre yoğunluğunun kontrole kıyasla azaldığı gösterildi. Anneksin-V pozitif boyanan bölgelerde aynı zamanda PI de pozitif sonuç verdiği için hücrelerde geç apoptozis/sekonder nekrozis geliştiği belirlendi.

3.4.2.Hoechst 33342 Boyama Yöntemi Bulguları

PQE'nin 100µg/ml konsantrasyonunun 48. saatte A549, PC3 ve H1299 hücrelerinin nükleus morfolojisi üzerine olan etkisi Hoechst boyama yöntemi uygulanarak floresan mikroskopta değerlendirildi. Apoptotik hücrelerde; nükleusun normal hücrelere göre daha küçük olma özelliği aranırken, nekrotik hücrelerde nükleusun normal hücrelerden biraz daha büyük olması ve daha az boya alması özelliği arandı.

PQE ile muamele sonucunda, Hoechst boyası ile boyanan hücrelerde kontrole kıyasla hücre yoğunluğunun belirgin şekilde azaldığı gösterildi. Hücrelerin nükleus morfolojilerinin de değiştiği, kontrole kıyaslandığında piknotik nükleusların varlığı tespit edildi (Şekil 3.13).

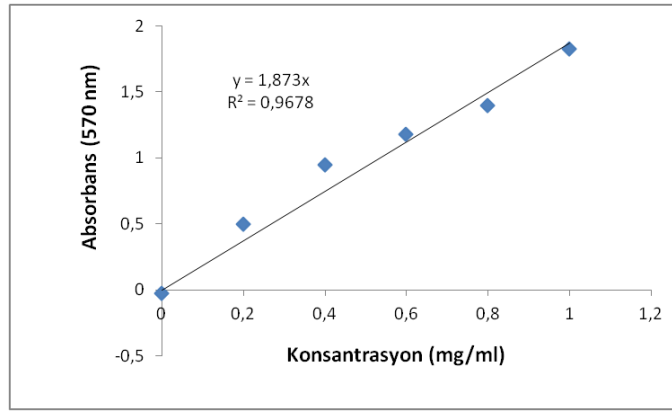


Şekil 3.13. 100µg/ml PQE uygulanan hücrelerin 48 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri.

A: A549 kontrol hücreleri **B:** A549; 100µg/ml PQE **C:** PC3 kontrol hücreleri **D:** PC3; 100µg/ml PQE **E:** H1299 kontrol hücreleri **F:** H1299; 100µg/ml PQE

3.5. Western Blot Bulguları

A549, PC3 ve H1299 hücreleri %70-80 doluluk oranına ulaştıklarında 100µg/ml PQE ile muamele uygulandı ve 24 saat sonunda protein izolasyonu aşamasına geçildi. Elde edilen lizatların protein konsantrasyonlarını belirlemek üzere BSA kullanılarak bir standart eğri grafiği hazırlandı (Şekil 3.14). Örneklerin protein konsantrasyonları bu grafikten elde edilen formül yardımıyla hesaplandı (Çizelge 3.5). Western blot analizi, 20µg protein lizatı ve kontrol olarak da anti aktin antikorları kullanılarak gerçekleştirildi. A549 ve PC3 hücreleri için Sisplatin (20µM), H1299 hücreleri için Etoposit (5µM) PARP kırılmasını görebilmek amacıyla pozitif kontrol olarak kullanıldı.

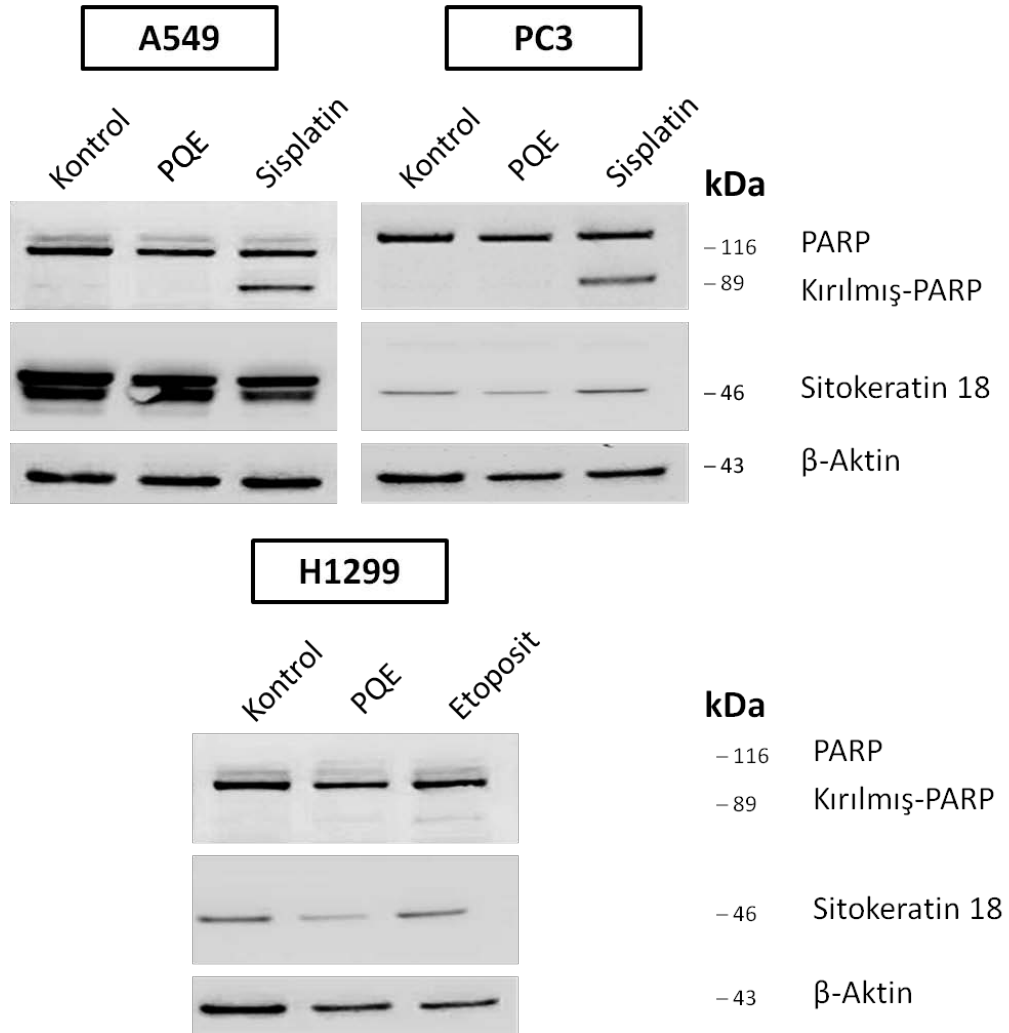


Şekil 3.14. BSA standart eğri grafiği.

Örnekler	Konsantrasyon (mg/ml)
A549 Kontrol	2,14
A549 PQE (100µg/ml)	3,31
A549 Sisplatin (20µM)	3,55
PC3 Kontrol	1,27
PC3 PQE (100µg/ml)	2,17
PC3 Sisplatin (20µM)	1,63
H1299 Kontrol	2,16
H1299 PQE (100µg/ml)	2,51
H1299 Etoposit (5µM)	3,82

Çizelge 3.5. Örneklerin protein konsantrasyonları (mg/ml).

Yapılan deney sonucunda; 100µg/ml PQE ile muamelelerde hiçbir hücre hattında PARP kırılması gözlenmedi. Ayrıca PC3 ve H1299 hücrelerinde M30-Antijen artışı gözlenmediği için bu hücrelerin total keratin 18 düzeylerindeki değişimlere bakıldı. A549 hücrelerinde PQE ve Sisplatin muamelesi sonrasında sitokeratin 18 sinyalinde kontrole kıyasla değişiklik gözlenmezken, PC3 ve H1299 hücrelerinde PQE muamelesi sonrasında kontrole kıyasla sitokeratin 18 sinyali azalmıştır. Sisplatin ve Etoposit muamelelerinde ise sitokeratin 18 ekspresyonunun değişmediği gözlendi. Ayrıca kontrol gruplarına bakıldığında sitokeratin 18 ekspresyonunun PC3 ve H1299 hücrelerinde A549 hücrelerine kıyasla belirgin olarak daha düşük olduğu gözlendi (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Anti-aktin, anti-PARP ve anti-keratin 18 antikorumla yapılan Western blot sonucu bant profilleri.

4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, A549, PC3 ve H1299 hücre soylarında *Pelargonium quercetorum* ekstraktının sitotoksik aktivitesi çalışılmıştır. Çalışmalar neticesinde, ekstraktla muamelenin sitotoksik aktivite ile sonuçlandığı gösterilmiştir ve literatürde bu ekstraktın kullanılması ile ilişkili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan bakılacak olursa, bu çalışma, söz konusu ekstraktın sitotoksik aktiviteye yol açtığını gösteren ilk çalışmadır. Çalışmanın bir diğer özelliği ise söz konusu bitkinin biyolojik aktivitesine yönelik yapılan ilk çalışma olmasıdır.

Kanser günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biridir ve her yıl milyonlarca insan kanserden ölmektedir. Kanser hücreleri ilaç tedavilerine direnç geliştirebilmekte ve bağışıklık sisteminden kaçabilmektedir. Ayrıca birçok faktör salgılayarak beslenmelerini ve kontrolsüz çoğalabilmelerini sağlayarak tedavilerin nihai hedefine ulaşmasını engellemektedirler. Kanser tedavisinde birçok kemoterapi ilacı veya moleküler hedeflere yönelik geliştirilmiş ilaçlar kullanılmakla beraber bu ilaçlar henüz beklenen oranda tedaviye cevap vermemektedir. Bu nedenle geleneksel tedavilerde kullanılan bitkisel veya diğer doğal kaynaklı ürünlerin bilimsel tedavilerin yanında kullanılışı giderek önem kazanmaktadır (Sezgin, 2010).

Dünya nüfusunun yaklaşık %65-80'i, yoksulluk ve modern ilaçlara erişim eksikliği nedeniyle sağlık hizmetleri için geleneksel bitkisel ilaçlar kullanır (Calixto 2005). Güney Afrikalıların yaklaşık %60'ı modern tıp hizmetlerine ek olarak bitkisel tedavileri de kullanmaktadırlar (Lalli ve Jacqueline 2006). Ancak geleneksel ilaç keşfi sürecinde bitkilerin önemi azalmıştır ve kapsamlı bilimsel araştırmaların eksikliği nedeniyle çok az bitki klinik olarak önerilmektedir (Raskin ve ark. 2002). Dünyada bulunan çeyrek milyon bitki türünün yalnızca küçük bir yüzdesi çalışılmış olup yaklaşık 119 bitki kaynaklı bileşiklerin yapısı bilinmekte ve ticari ilaç olarak kullanılmaktadır (Lalli ve Jacqueline 2006).

Bu bilgilerden esinlenerek çalışmamızda, henüz hakkında çalışma bulunmayan *Pelargonium quercetorum*'un kanser hücreleri üzerine olası etkilerini belirleyebilmek amacıyla ham metanol ekstraktı hazırlanarak kullanıldı. PQE'nın, A549, PC3 ve H1299 hücreleri üzerindeki büyümeyi baskılayıcı/sitostatik/sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. MTT canlılık testi sonuçlarına göre, söz konusu hücre soylarında konsantrasyon artışına bağlı olarak canlılık yüzdesinde anlamlı azalmalar bulunmuştur. Farklı *Pelargonium* türlerinin ham aseton ekstraktlarının Graham (insan embriyonik

böbrek) hücreleri üzerine sitotoksik aktiviteleri MTT yöntemiyle çalışılmış olup belirlenen IC₅₀ değerleri; *P. sublignosum* için 11,9µg/ml, *P. citronellum* için 59,9µg/ml, *P. graveolens* için 80,5µg/ml, *P. betulinum* için 88,5µg/ml, *P. capitatum* için 101,5µg/ml, *P. cucullatum* için 118,9µg/ml, *P. vitifolium* için 178,5µg/ml ve *P. tomentosum* için 195,1µg/ml'dir (Lalli ve Jacqueline 2006, Lalli ve ark. 2008). *P. quercetorum* içinse MTT yöntemi dikkate alınarak hesaplanan IC₅₀ değerleri; A549 hücrelerinde 52,7µg/ml, PC3 hücrelerinde 100'den büyük ve H1299 hücrelerinde 43,9µg/ml olarak belirlenmiştir. Yukarıda verilen farklı *Pelargonium* türlerine ait IC₅₀ değerlerine bakıldığında A549 ve H1299 hücrelerinde de PQE ile muamele sonrasında düşük değerler saptanmıştır. IC₅₀ değerleri arasındaki değişkenlik ekstraksiyon işlemlerinde kullanılan çözücülerin farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir. Çünkü türler sahip oldukları farklı uçucu yağ bileşenlerine bağlı olarak farklı biyolojik aktiviteler sergileyebilir. Bu nedenle metanol ekstraktı ile aseton ekstraktının aktiviteleri arasında değişkenlik gözlenebilir.

ATP yöntemi kullanılarak MTT canlılık testinden alınan sonuçlar doğrulanmış ve PQE'nin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak uygulandığı hücre soylarında intraselüler ATP miktarında azalmalara neden olduğu belirlenmiştir. Bu yöntem esas alınarak hesaplanan IC₅₀ değerleri ise; A549 hücrelerinde 62,1µg/ml, PC3 hücrelerinde 27,2µg/ml ve H1299 hücrelerinde 58,5µg/ml olarak belirlendi. MTT canlılık testinde hücre canlılığı üzerine olan etki, dehidrogenaz enzim aktivitesi miktarına göre belirlenirken, ATP testinde ise intraselüler ATP düzeylerine göre belirlenmektedir. Her iki canlılık testi de hücrelerdeki metabolik aktiviteyi göstermesine rağmen, elde edilen sonuçlar birbirinden farklı olabilmektedir. Özellikle için ATP testiyle belirlenen IC₅₀ değerleri MTT testiyle belirlenen değerlere kıyasla belirgin şekilde düşüktür. ATP seviyesindeki azalmaya bağlı olarak gözlenen hücre canlılığındaki düşüşün MTT testi sonuçlarında gözlenenden daha fazla olması, hücrelerin ölüyor olmasına rağmen halen dehidrogenaz içeriğini devam ettirdiğini göstermektedir. Bu farklılık kullanılan ilacın etki mekanizmasına bağlı olarak (örneğin; enerji kaynakları, sinyal molekülleri, DNA) değişmektedir (Ulukaya ve ark. 2008). PQE'nin 100µg/ml konsantrasyonunun hücrelerde sitotoksik etkiye neden olduğu belirlendi ve çalışmalara bu konsantrasyonla devam edildi.

Çalışmanın bir sonraki kısmında, hücrelerin ölüm modunu belirlemek amacıyla apoptozis belirteci olan kaspazla-kırılmış sitokeratin 18 (M30-Antijen) ve hem apoptozis hem nekrozis belirteci olan total sitokeratin 18 (M65-Antijen) düzeylerine bakılmıştır. PQE'nin 100µg/ml konsantrasyonunun hücrelerin kaspazla-kırılmış sitokeratin 18 düzeylerinde herhangi bir artışa neden olmadığı gözlemlendi. Yalnızca A549 hücrelerinde Paklitaksel yaklaşık 8-katlık bir artışa neden olurken, PC3 ve H1299 hücrelerinde pozitif kontroller de dahil olmak üzere herhangi bir artış olmaması bu hücrelerde sitokeratin 18 ekspresyonunun az ya da hiç olmadığını göstermektedir. Bu durum hücre apoptozisle ölmediği için veya hücrelerin genomik durumundan kaynaklanıyor olabilir. Genomik durumla ilişkili yapılan bir çalışmada vimentin ekspresyonu düşük olan meme kanseri hücre hatlarında sitokeratin düzeylerinin de düşük olabileceği gösterilmiştir (Sommers ve ark. 1989). Bu nedenle hücrelerin total keratin 18 düzeylerindeki değişimleri belirlemek için Western blot yöntemi kullanıldı. A549 hücrelerinde PQE ve Sisplatin muamelesi sonrasında sitokeratin 18 sinyalinde kontrole kıyasla değişiklik gözlenmedi. PC3 ve H1299 hücrelerinde PQE muamelesi sonrasında kontrole kıyasla sitokeratin 18 sinyali azaldı. Kontrol gruplarına bakıldığında ise sitokeratin 18 ekspresyonunun PC3 ve H1299 hücrelerinde A549 hücrelerine kıyasla belirgin olarak daha düşük olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlardan yola çıkıldığında PC3 ve H1299 hücrelerinde sitokeratin 18 ekspresyonunun az olduğu sonucuna varılmıştır. Daha önce bu hücrelerle yapılmış böyle bir çalışma olmaması alınan sonuçların literatüre yeni ve değerli bilgiler getireceğini göstermektedir.

100µg/ml PQE'nin A549 hücrelerinde kontrole göre 48. saat M65-Antijen seviyesinde ise yaklaşık 7-katlık bir artışa, PC3 hücrelerinde yaklaşık 11-katlık bir artışa ve H1299 hücrelerinde yaklaşık 6-katlık bir artışa neden olduğu belirlendi. A549 hücrelerinde belirlenen M65-Antijen değerleri (U/L), PC3 ve H1299 hücreleri için belirlenen değerlerden belirgin şekilde yüksek çıkmıştır ve bu sonuç Western blot bulgularını da doğrular niteliktedir. Elde edilen sonuçlar ise hücrelerin primer nekrozis veya hücrelerin membran bütünlüğünü kaybettiği sekonder nekrozis/geç apoptozis ile öldüğünü göstermektedir.

PQE'nin hücreler üzerindeki apoptotik etkisi Anneksin-V-FITC boyaması ile floresan mikroskopunda değerlendirildi. Anneksin-V boyama yöntemi ile erken dönem apoptotik hücreler belirlenebilir çünkü Anneksin-V bağlanması membran hasarlanmadan önce

nüklear kondensasyon safhasına denk gelir (Koopman ve ark. 1994, Boersma ve ark. 1996, Zhang ve ark. 1997). Ancak hücreler membran bütünlüğünü kaybetmeye başladığında (geç apoptosis/sekonder nekrozis veya primer nekrozis) Anneksin-V intraselüler fosfotidilserine bağlanarak pozitif sonuç verir. Bu nedenle membranı hasarlı hücreleri belirleyebilmek için propidyum iyodür ile birlikte kullanılır (Hammill ve ark. 1999). A549, PC3 ve H1299 hücrelerinin 100µg/ml PQE ile 24 saat muamelesi sonrasında, Anneksin-V pozitif boyanan bölgelerde PI'de pozitif sonuç vermiştir. Bu durum hücrelerde membran hasarına bağlı olarak primer nekrozis ya da sekonder nekrozis geliştiğini gösterir. Bu ayrımı daha net yapabilmek açısından yöntem çalışılırken ortama Hoechst boyası eklenerek nükleus morfolojisine de bakıldı. Kontrole kıyasla hücrelerin nükleuslarının küçüldüğü (piknotik) gözlendi. Primer nekrozis hücre hacminin artması fakat fragmente ya da piknotik nükleusların gözlenmemesi ile karakterize iken, sekonder nekrozis piknotik ya da fragmente nükleus ile karakterize olup, apoptozisin geç safhasıdır (Ulukaya 2011). Dolayısıyla söz konusu hücrelerin M65-Antijen düzeylerindeki artışlarda dikkate alındığında membran bütünlüğünün bozulduğu ve sekonder nekrozisle öldüğü yani apoptozisin geç safhasında oldukları sonucuna varılmıştır. Ayrıca hücrelerin 100µg/ml PQE ile 48 saat muamele edilmesinden sonra Hoechst boyaması yapıldı. Bütün hücre gruplarında kontrole kıyasla 48 saatte hücre yoğunluğunun azaldığı ve piknotik nükleus varlığı gözlendi.

PQE'nın PARP kırılması üzerine etkisi Western blot yöntemiyle çalışıldı. PARP fonksiyonu ile hücre ölümü arasındaki ilişki PARP'ın apoptozis sürecinde kaspaz 3 tarafından hızlıca ve spesifik olarak kırılmasıdır (Lazebnik ve ark. 1994, Nicholson ve ark. 1995, Tewari ve ark. 1995). Çalışma sonucunda söz konusu hücrelerde kontrole kıyasla PARP kırılması gözlenmemiştir. M65-Antijen, Anneksin-V ve Hoechst boyama sonuçları dikkate alındığında hücreler apoptozisle ölmektedir. Buna rağmen PARP kırılması gözlenmemesinin nedeni apoptozisin kaspaz bağımsız yoldan indüklenmiş olması olabilir.

Pelargonium türlerinin ham aseton ekstraktının potansiyel olarak anti-mikrobiyal, serbest radikal temizleyici, anti-malaryal ve ayrıca esansiyel yağlarının umut verici anti-inflamatuvar etkileri olmak üzere önemli biyolojik özellikleri gösterilmiştir (Lalli ve Jacqueline 2006). Bu *in vitro* çalışma sonucunda; *Pelargonium quercetorum*'un akciğer kanseri hücreleri üzerine olan sitotoksik/apoptotik etkileri belirlenerek, bu konuda çok

az olan literatür bilgisine katkıda bulunulmuştur. Bütün bu sonuçlar dikkate alındığında *Pelargonium*'lar oldukça değerli terapötik ajanlar olabilirler ve kanser tedavisinde tamamlayıcı bir yaklaşım olarak ileri analizlerle değerlendirilebilirler.

Bu çalışmanın sonuçlarından yola çıkarak, kullanılan ekstraktın kanser tedavisindeki büyüme baskılayıcı etkisinin bir sonraki inceleme basamağının esansiyel yağlarının izolasyonu ve etken maddenin araştırılması olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abcam, 2010.** Protocol Books. <http://docs.abcam.com/pdf/misc/abcam-protocols-book-2010.pdf> (Erişim tarihi: 04.07.13).
- Abo, K.A., Adeyemi, A.A. Adeite, D.A. 2000.** Ethnobotanical survey of plants used in the treatment of infertility and sexually transmitted diseases in southwest Nigeria. *Afr J Med Med Sci*, 29: 325-327.
- Ahlander, J., Bosco, G. 2009.** The RB/E2F pathway and regulation of RNA processing. *Biochemical and biophysical research communications*, 384(3): 280-283.
- Ahmad, I., Mehmood, Z., Mohammad, F. 1998.** Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. *J Ethnopharmacol*, 62: 183-193.
- Akkoçlu, A. 2006.** Akciğer kanserleri. Türk Toraks Derneği. <http://www.toraks.org.tr/SunuMerkezi/?s=3A2E22585A3B5858573D563F365E56> (Erişim tarihi: 24.03.2013).
- Akşit, H., Bildik, A. 2008.** Apoptozis. *YYÜ Vet. Fak. Dergisi*, 19(1): 55-63.
- Alberg, A.J., Samet, J.M. 2003.** Epidemiology of lung cancer. *Chest*, 123: 21-49.
- Alberg, A.J., Brock, M.V., Samet, J.M. 2005.** Epidemiology of Lung Cancer: Looking to the Future. *Journal of Clinical Oncology*, 23(14): 3175-3185.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2002.** Molecular biology of the cell. Fourth edition, New York, 1314.
- Altunkaynak, B.Z., Özbek, E. 2008.** Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6 (2): 93 -104.
- Andreotti, P.E., Cree, I.A., Kurbacher, C.M., Hartmann, D.M., Linder, D., Harel, G. 1995.** Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Res.*, 55(22): 5276-5282.
- Anonim, 2010.** *Pelargonium endlicherianum*. <http://www.biologie.uni-ulm.de/cgi-bin/perl/bild.pl?objid=5294&sid=T&mode=orig> (Erişim tarihi: 01.07.2013).
- Anonim, 2011.** La-muerte-celular-necrosis-y-adoptosis. Biogerontología, <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/biogerontologia/materiales-de-clase-1/capitulo-5.-bases-celulares-del-envejecimiento/5.4-la-muerte-celular-necrosis-y-adoptosis> (Erişim tarihi: 12 Haziran 2013).
- Anonim, 2011a.** *Pelargonium quercetorum*. <http://www.cgf.net> (Erişim tarihi: 01.07.2013).

Anonim, 2011b. Pierce Cypridina Luciferase Glow Assay Kit. <http://www.piercenet.com> (Erişim tarihi: 01.07.2013).

Anonim, 2013. Türkiye Kanser İnsidansları. <http://kanser.thsk.gov.tr/index.php/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri.html> (Erişim tarihi: 24.03.2013).

Attanoos, R L. 2010. Asbestos-Related Lung Disease. *Surgical Pathology Clinics*, 3(1): 109-127.

Attardi, D.L., DePinho, R.A. 2004. Conquering the complexity of p53. *Nature Genetics*, 36: 7-8.

Aydın, S. 2004. Anadolu Diyagonalı: Ekolojik Kesinti Tarihsel-Kültürel bir Farklılığa İşaret edebilir mi?, *Kebikeç İnsan Bilimleri için Kaynak Arastırmaları Dergisi*, 17:117-137.

Bakker, F.T., Culham, A., Hettiarachi, P., Touloumenidou, T., Gibby, M. 2004. Phylogeny of *Pelargonium* (Geraniaceae) based on DNA sequences from three genomes. *Taxon*, 53(1): 17-28.

Boersma, A. W. M., Nooter, K., Oostrum, R. G., Stoter, G. 1996. Quantification of apoptotic cells with fluorescein isothiocyanate-labeled Annexin V in Chinese hamster ovary cell cultures treated with cisplatin. *Cytometry*, 24: 123–130.

Bouchardy, C., Benhamou, S., Jourenkova, N., Dayer, P., Hirvonen, A. 2001. Metabolic genetic polymorphisms and susceptibility to lung cancer. *Lung Cancer*, 32: 109-112.

Bozan, B., Özek, T., Kurkcuoglu, M., Kirimer, N., Başer, K.H.C. 1999. The analysis of essential oil and headspace volatiles of the flowers of *Pelargonium endlicherianum* used as an anthelmintic in folk medicine. *Planta Medica*, 65: 781-782.

Budd, C.R. 2001. Activation-induced cell death. *Current Opinion in Immunology*, 13(3): 356-362.

Cachot, J., Galgani, F., Vincet, F. 1998. cDNA cloning and expression analysis of flounder p53 tumour suppressor gene. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 121: 235-242.

Calixto, J.B. 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America – A personal view. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 131-134.

Canel, C., Moraes, R.M., Dayan, F.E., Ferreira, D. 2000. Podophyllotoxin. *Phytochemistry*, 54(2): 115-120.

Carnesecch, S., Klangley, F., Exinger, F., Gosse, F., Raul, F. 2002. Geraniol ,a component of plant essential oils sensitize human colonic cancer to 5-fluorouracil treatment. *J. Pharm. Exp. Therap.*, 301: 625-630.

Cassady, J.M., Douros, J.D. 1980. Anticancer Agents Based on Natural Product Models. Academic Press, New York.

Chiu, C. C., Lin, C. H., Fang, K. 2005. Etoposide (VP-16) sensitizes p53-deficient human non-small cell lung cancer cells to caspase-7-mediated apoptosis. *Apoptosis*, 10(3): 643-650.

Clark, W.H. 1991. Tumour progression and the nature of cancer. *Br. J. Cancer*, 64: 631-644.

Cooper, G.M., Hausman, R.E. 2006. Hücre Moleküler Yaklaşım. İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, 714.

Coşkun-Arı, F.F. 2003. Western Blotlama Yöntemi ile Protein Tespiti: Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri Kurs Kitabı, Isparta Türkiye, 189-198.

Cragg, G.M. 1999. Paclitaxel (Taxol®): A success story with valuable lessons for natural product drug discovery and development. *Medicinal Research Reviews*, 18(5): 315–331.

Cragg, G.M., Newman, D.J. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 72–79.

Craighead, J.E., Mossman, B.T. 1982. The pathogenesis of asbestos-associated diseases. *New England Journal of Medicine*, 306(24): 1446-1455.

Croce, C.M. 2008. Oncogenes and Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 358: 502-511.

Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G. 2000. Natural products (secondary metabolites): Biochemistry and molecular biology of plants, Ed: Buchanan, B., Grissem, W., Jones, R., Rockville, M.D., American Society of Plant Physiologists, 1250-1318.

Dang, C.V. 1999. c-Myc Target Genes Involved in Cell Growth, Apoptosis, and Metabolism. *Mol. Cell. Biol.*,19(1):1.

Dasgupta, P., Kinkade, R., Joshi, B., DeCook, C., Haura, E., Chellappan, S. 2006. Nicotine inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic drugs by up-regulating XIAP and survivin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(16): 6332-6337.

Dash, P. 2007. Apoptosis. <http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/> (Erişim tarihi: 12 Mayıs 2013).

Datta, B.K., Rahman, I. Das, T.K. 1998. Antifungal activity of Indian plant extracts. *Mycoses*, 41: 535-536.

Davis, P. H. 1988. *Flora of Turkey: and the East Aegean Islands.(Supplement)* Ed: Cullen, J., Coode, M. J. Edinburgh University Press.

de Moura, M. D., de Se Silva, J., de Oliveira, R. A. G., de FF. M. Diniz, M., Barbosa-Filho, J. M. 2002. Natural products reported as potential inhibitors of uterine cervical neoplasia. *Acta Farmácutica Bonaerense*, 21(1): 67-74.

Deans, S.G. 2002. Antimicrobial properties of *Pelargonium* extracts contrasted with that of Geranium: Geranium and Pelargonium, Ed: Lis-Balchin, M., Taylor and Francis, London.

Deans, S.G., Ritchie, G.1987. Antibacterial properties of plant essential oils. *Intern. J. Food Microbiol.*, 5: 165-180.

Dexter, S.J., Camara, M., Davies, M., Shakesheff, K.M. (2003). Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomaterials.*, 24: 27–34.

Diamandis, P.E. 1997. Clinical applications of tumor suppressor genes and oncogenes in cancer. *Clinica Chimica Acta*, 257(2): 157–180.

Dickens, L.S., Boyd, R.S., Jukes-Jones, R., Hughes, M.A., Robinson, G.L., Fairall, L., Schwabe, J.W., Cain, K., Macfarlane, M. 2012. A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediatingapoptotic cell death. *Mol Cell*. 47(2):291-305.

Dilsiz, N. 2004. Moleküler Biyoloji. Palme Yayıncılık, Ankara, 220.

Dixon, R.A., Ferreira, D. 2002. Genistein. *Phytochemistry*, 60(3): 205-211.

Dixon, R.A., Sumner, L.W. 2003. Legume natural products: understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiology*, 131(3): 878-885.

Doll, R., Peto, R. 1981. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *Journal of the National Cancer Institute* 66(6): 1192-1308.

Dorman, H.J.D., Deans, S.G. 2004. Chemical composition, antimicrobial and *in vitro* antioxidant properties of *Monarda citriodora* var. *citriodora*, *Myristica fragrans*, *Origanum vulgare* ssp. *hirtum*, *Pelargonium* sp. and *Thymus zygis* oils. *Journal of Essential Oil Research*,16: 145-150.

Dunagan, D., Chin, R., McCain, T.2001. Staging by positron emission tomography predicts survival in patients with non-small-cell lung cancer. *Chest*, 119:333-339.

Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T.V., Vandenabeele, P. 2009. Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection*. 11, 1050-1062.

Economou, P., Lechner, J. F., Samet, J.M. 1994. Familial and genetic factors in the pathogenesis of lung cancer. *Lung biology in health and disease*, 74: 353-396.

Elmore, S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.*, 35(4): 495-516.

Ertürk, B. 2006. Akciğer Kanseri Hastalarında Malondialdehit (MDA) ve Total Antioksidan Kapasite (TAOK) Düzeyi Ölçümü ile Oksidan-Antioksidan Dengenin Araştırılması. *Uzmanlık Tezi*, T.C.Sağlık Bakanlığı Süreyyapaşa Göğüs ve Kalp-Damar Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.

Evan, G.I., Vousden, K.H. 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411: 342-348.

Fadeel, B., Gleiss, B., Hogstrand, K., Chandra, J., Wiedmer, T., Sims, P.J., Henter, J.I., Orrenius, S., Samali, A. 1999. Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma membrane phospholipid scramblase expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 266(2): 504-11.

Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S., Liang, J. 2005. Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(11): 719-727.

Farnsworth, N.R., Akerev, O., Bingel, A.S. 1985. The Bulletin of WHO., 63: 9865-9871.

Faydaoğlu, E., Sürücüoğlu, M.S. 2011. Geçmisten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik Önemi. *Kastamonu Üni., Orman Fakültesi Dergisi*, 11(1): 52-67.

Fayed, S.A. 2009. Antioxidant and Anticancer Activities of *Citrusreticulata* (Petitgrain Mandarin) and *Pelargonium graveolens* (Geranium) Essential Oils. *Res. J. of Agric. Biol. Sci.*, 5: 740-747.

Fong, K.M., Minna, J.D. 2002. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clin Chest Med*, 23(1):83-101.

Fuentes-Prior, P., Salvesen, G.S. 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J.*, 384: 201-232.

Galluzzi, L., Kroemer, G. 2008. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*, 135: 1161-1163.

Gewis, A. 2003. Introduction to Apoptosis. *ApoReview*, 1-26.

Ghobrial, I.M., Witzig, T.E., Adjei, A.A. 2005. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *Cancer J Clin.* 55:178 -194.

- Ginsberg, R.J., Rubinstein, L.V. 1995.** Randomized trial of lobectomy versus limited resection for T1 N0 non-small cell lung cancer. *The Annals of Thoracic Surgery*, 60: 613-622.
- Ginsberg, M.S. 2005.** Epidemiology of lung cancer. *Seminars in roentgenology*, 40: 83-89.
- Goldblatt, P., Manning, J. 2000.** Cape Plants – a conspectus of the Cape flora of South Africa. *Strelitiza*, 9: 9.
- Golstein, P., Kroemer, G. 2007.** Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.*, 32: 37–43.
- Gorlova, O.Y., Weng, S.F., Zhang, Y., Amos, C.I., Spitz, M.R. 2007.** Aggregation of cancer among relatives of never-smoking lung cancer patients. *Int J Cancer*, 121(1):111-8.
- Gueritte, F., Fahy, J. 2005.** The vinca alkaloids: Anticancer Agents from Natural Products, Ed: Cragg, G.M., Kingston, D.G.I., Newman, D.J., Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 123–136 (Chapter 7).
- Guicciardi, M.E., Gores, G.J. 2009.** Life and death by death receptors. *FASEB J.* 23:1625-1637.
- Gurib-Fakim, A. 2006.** Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 1–93.
- Güleş Ö., Eren Ü. 2008.** Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2: 73-78.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Baser, K.H.C. 2000.** Flora of Turkey, Volume 11, Edinburgh University Press. Edinburgh.
- Gürün, M.S., Süzer, Ö. 2005.** Bitkisel İlaçlar: Süzer Farmakoloji. Ed: Süzer, Ö., Klinisyen Tıp Kitapevleri, İstanbul, 533-40.
- Halberstein, R.A. 2005.** Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. *Ann Epidemiol*, 15: 686–699.
- Hammill, A. K., Uhr, J. W., & Scheuermann, R. H. 1999.** Annexin V staining due to loss of membrane asymmetry can be reversible and precede commitment to apoptotic death. *Experimental cell research*, 251(1): 16-21.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2011.** Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144: 646-674.
- Hecht, S. S. 1999.** Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(14): 1194-1210.

- Hirose, Y., Shibata, M. 1978.** Chemical studies on the components of *Pelargonium radula* Ait. I. *Japanese Journal of Pharmacognosy*, 32(3): 191-193.
- Hussain, S.P., Harris, C.C. 2000.** Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogenous carcinogens. *Mutation Research*, 462: 311-322.
- Jacobson, D. 1999.** Lung tumors: fundamental biology and clinical management: Ras mutations in lung cancer. Editors: Brambilla, C., Brambilla, E., 1st edition, New York, Marcel Dekker, 139–156.
- Jemal, A., Thomas, A., Murray, T., Thun, M. 2002.** Cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 52: 23-47.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay J., Ward, E., Forman, D. 2011.** Global Cancer Statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61: 69–90.
- Johnson, M.A., Özhatay, N. 1988.** The distribution and cytology of Turkish *Pelargonium* (Geraniaceae). *Kew bulletin*, 139-148.
- Kabir, Z., Bennett, K., Clancy, L. 2007.** Lung cancer and urban air-pollution in Dublin: a temporal association? *Ir Med J.*, 100(2):367-9.
- Kandaş, Ö. 2004.** Apoptozis, programlı hücre ölümü. *Ankara Üniversitesi dikimevi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi*,5:1.
- Keane, R.W., Kraydieh, S., Lotocki, G., Bethea, J.R., Krajewski, S., Reed, J.C., Dietrich, W. D. 2001.** Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60: 422-429.
- Kendler, B.S. 1987.** Garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*): A review of their relationship to cardiovascular disease. *Prev Med.*, 16: 670–685.
- Kepp, O., Galluzzi, L., Lipinski, M., Yuan, J., Kroemer, G. 2011.** Cell death assays for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(3): 221-237.
- Kiran, G.D.B., Kaul, V.K. 2005.** Variation in essential oil composition of *Rose-scented geranium* (*Pelargonium sp.*) distilled by different distillation techniques. *Flavour Fragr. J.*, 20: 222-231.
- Köktürk, N., Kırıçoğlu, C.E., Öztürk, C. 2003.** Akciğer kanseri moleküler biyolojisi. *Solunum*, 3(3): 127-138.
- Köktürk, N., Yeğin, D., Ulukavak Çiftçi, T., Bilgin Mullaoglu, S., Öztürk, C. 2004.** Akciğer Kanselerinde Epidemiyolojik Özellikler Yıllar İçinde Değişim Gösteriyor mu? *Türk toraks dergisi*, 5 (3): 137-142.

Kolodziej, H. 2002. *Pelargonium reniforme* and *Pelargonium sidoides*: their botany, chemistry and medicinal use: Geranium and Pelargonium, Ed: Lis-Balchin, M., Taylor and Francis, London.

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

Kopnin, B.P. 2000. Targets of Oncogenes and Tumor Suppressors: Key for Understanding Basic Mechanisms of Carcinogenesis. *Biochemistry (Moscow)*, 65: 2-27.

Kris-Etherton, P.M., Hecker, V.K., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F. 2002. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.*, 113: 71-88.

Lalli, J.Y.Y., Van Zyl, R.L., Van Vuuren, S.F., Viljoen, A.M. 2008. In vitro biological activities of South African Pelargonium (Geraniaceae) species. *South African Journal of Botany*, 74: 153–157.

Lalli, Y., Jacqueline, Y. 2006. In vitro pharmacological properties and composition of leaf essential oils and extracts of selected indigenous Pelargonium (Geraniaceae) species. *Doktora tezi*, University of the Witwatersrand, Johannesburg, Faculty of Health Sciences, Johannesburg.

Lamkanfi, M. 2011. Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nature Reviews Immunology* 11: 213-220.

Lampronti, I., Saab, A.M., Gambari, R. 2006. Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. *International Journal of Oncology*, 29: 989-995.

Lawrence, E., Notten, A. 2001. “*Pelargonium betulinum* (L.) L’Hérit.” S.A. National Biodiversity Institute. Kirstenbosch National Botanical Garden. <http://www.plantzafrica.com/plantnop/pelargbetul.htm> (Erişim tarihi:02.07.13).

Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., Earnshaw, W.C. 1994. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, 371: 346–347.

Leers, M.P., Kölgen, W., Björklund, V., Bergman, T., Tribbick, G., Persson, B., Björklund, P., Ramaekers, F.C., Björklund, B., Nap, M., Jörnvall, H., Schutte, B. 1999. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol.*, 187: 567-72.

Li, J., Yuan, J. 2008. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 27:6194-6206.

Lis-Balchin, M. 1996. Geranium oil. *The International Journal of Aromatherapy*, 7(3): 10-11.

- Lis-Balchin, M. Deans, S.G. 1996.** Antimicrobial effects of hydrophilic extracts of *Pelargonium* species (Geraniaceae). *Letters in Applied Microbiology*, 23(4): 205-207.
- Lis-Balchin, M., Roth, G. 2000.** Composition of the essential oils of *Pelargonium odoratissimum*, *P. exstipulatum*, and *P. x fragrans* (Geraniaceae) and their bioactivity. *Flavour and Fragrance Journal*, 15(6): 391-394.
- Liu, H., Dibling, B., Spike, B., Dirlam, A., Macleod, K. 2004.** New roles for the RB tumor suppressor protein. *Current opinion in genetics & development*, 14(1): 55-64.
- Loeb, L.A., Ernster, V.L., Warner, K.E., Abbotts, J., Laszlo J. 1984.** Smoking and lung cancer: an overview, *Cancer Res*, 44: 5940-5958.
- Lovkova, M. Y., Buzuk, G. N., Sokolova, S. M., Kliment'eva, N. I. 2001.** Chemical features of medicinal plants (Review). *Applied biochemistry and microbiology*, 37(3): 229-237.
- Lowitz, B.B., Casciato, D.A. 2000.** Medical oncology & principles of cancer biology, Cancer Biology and Oncogenes. *Lippincott Williams & Wilkins*, Philadelphia, USA.
- Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., Haber, D.A. 2004.** Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *New England Journal of Medicine*, 350(21): 2129-2139.
- Mabry, M. 1998.** Biology of Lung Cancer: Activating oncogenes in lung cancer. Editors: Kane, M., Bunn, P. , New York, Marcel Dekker, vol: 122, page 391–412.
- Maehara, Y., Anai, H., Tamada, R., Sugimachi, K. 1987.** The ATP assay is more sensitive than the succinate-dehydrogenase inhibition test for predicting cell Viability. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 23: 273–276.
- Mahmood, T., Yang, P. 2012.** Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci.*, 4(9): 429–434.
- Martinez, J.D., Parker, M.T., Fultz, K.E., Ignatenko, N.A., Gerner, E.W. 2003.** Cancer-Related Genes. *Molecular Biology of Cancer*. (Ed: Abraham, D.J.), John Wiley&Sons, Inc, 21-26.
- May, L. 2000.** “*Pelargonium cucullatum* (L) L’Hér.” S.A. National Biodiversity Institute. Kirstenbosch National Botanical Garden <http://www.plantzafrica.com/plantnop/pelargoniumcucull.htm> (Erişim tarihi:02.07.13).
- Meier, P., Finch, A., Evan, G. 2000.** Apoptosis in development. *Nature*, 407(6805): 796-801.
- Meresse, P., Dechaux, E., Monneret, C., Bertounesque, E. 2004.** Etoposide: discovery and medicinal chemistry. *Current medicinal chemistry*, 11(18): 2443-2466.

Miller, D.M. 2002. The taxonomy of *Pelargonium* species and cultivars, their origins and growth in the wild.:Geranium and Pelargonium, Ed: Lis-Balchin, M., Taylor and Francis, London.

Mossman, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2): 55-63.

Mountain, C.F. 1997. Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest*, 11:1710.

Mueller, H., Kassack, M.U., Wiese, M. 2004. Comparison of the usefulness of the MTT, ATP and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *J. Biomol.Scre*, 9: 506–515.

Myrdal, G., Gustafsson, G., Lambe, M., Horte, L.G., Stahle, E. 2001. Outcome after lung cancer surgery. Factors predicting early mortality and major morbidity. *European Journal of Cardiothoracic Surgery*, 20: 694-699.

Nakamura, K., Bossy-Wetzel, E., Burns, K., Fadel, M. P., Lozyk, M., Goping, S., Opas, M., Bleacly, R.C., Green, D.R., Michalak, M. 2000. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *The Journal of cell biology*, 150(4): 731-740.

Naranjo, P. 1995. The urgent need for the study of medicinal plants. *Ethnobotany: Evolution of a Discipline*, 362–368.

National Cancer Institute, 2012. What you need to know about lung cancer. <http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/lung> (Erişim tarihi: 24.03.2013).

Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *Journal of Natural Products*, 66: 1022–1037.

Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A., Munday, N.A., Raju, S.M., Smulson, M.E., Yamin ,T.-T., Yu, V.L., Miller, D.K. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 376: 37–43.

Noble, R.L. 1990. The discovery of the vinca alkaloids—chemotherapeutic agents against cancer. *Biochemistry and Cell Biology*, 68(12): 1344-1351.

O'Hara, M., Kiefer, D., Farrell, K., Kemper, K. 1998. A review of 12 commonly used medicinal herbs. *Arch Family Med*.7: 523–536.

Oliver, L., Vallette, F.M. 2005. The role of caspases in cell death and differentiation. *Drug Resistance Updates*, 8: 163-170.

Olofsson, M. H., Ueno, T., Pan, Y., Xu, R., Cai, F., van der Kuip, H., Muerdter, T.E., Sonnenberg, M., Aulitzky, W.E., Schwarz, S., Andersson, E., Shoshan, M.C. Havelka, A.M., Toi, M., Linder, S. 2007. Cytokeratin-18 is a useful serum biomarker for early determination of response of breast carcinomas to chemotherapy. *Clinical cancer research*, 13(11): 3198-3206.

O'Reilly, K.M., Mclaughlin, A.M., Beckett, W.S., Sime, P.J. 2007. Asbestos-related lung disease. *Am Fam Physician.*, 75(5): 683-8.

Osborne, C., Wilson, P., Tripathy, D. 2004. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: Potential diagnostic and therapeutic applications. *The Oncologist*, 9: 361-377.

Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F.T., Zhou, T.T., Liu, B. Bao, J.K. 2012. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation*, 45(6): 487-498.

Ozaki, T., Nakagawara, A. 2011. p53: The Attractive Tumor Suppressor in the Cancer Research Field. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-13.

Öktem, S., Özhan, M.H., Özol, D. 2001. Apoptozisin Önemi. *Toraks Dergisi*, 2(1): 91-95.

Özlü, T., Bülbül, Y. 2005. Sigara ve akciğer kanseri. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, 53(2):200-209.

Palmarini, M., Fan, H. 2001. Retrovirus-induced ovine pulmonary adenocarcinoma, an animal model for lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 93(21):1603-14.

Palmer, A.M., Greengrass, P.M., Cavalla, D. 2000. The role of mitochondria in apoptosis. *Drug news & Perspectives*, 13(6): 378-384.

Pauk, N., Kubik, A., Zatloukal, P., Krepela, E. 2005. Lung cancer in women. *Lung Cancer*, 48: 1-9.

Park, S.J., Wu, C.H., Gordon, J.D., Zhong, X., Emami, A., Safa, A.R. 2004. Taxol induces caspase-10-dependent apoptosis. *J Biol Chem*. 279: 51057-51067.

Rajalingam, K., Schreck, R., Rapp, U. R., Albert, Š. 2007. Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(8): 1177-1195.

Ramawat, K.G., Dass, S., Mathur M. 2009. The Chemical Diversity of Bioactive Molecules and Therapeutic Potential of Medicinal Plants. *Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine*, 7-30.

Rao, R. V., Hermel, E., Castro-Obregon, S., del Rio, G., Ellerby, L. M., Ellerby, H. M., Bredesen, D. E. 2001. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program mechanism of caspase activation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36): 33869-33874.

Raskin, I., Ribnicky, D.M., Komarnytsky, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., Brinker, A., Moreno, D.A., Ripoll, C., Yakoby, N., O'Neal, J.M., Cornwell, T., Pastor, I., Fridlender, B. 2002. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in Biotechnology* 20(12): 522- 531.

Riedl, S.J., Salvesen, G.S. 2007. The apoptosome: Signalling platform of cell death. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 8:405-413.

Robertson, J.D. ve Orrenius, S. 2000. Molecular Mechanisms of Apoptosis Induced by Cytotoxic Chemicals. *Critical Reviews in Toxicology*, 30(5): 609–627.

Rowinsky, E.K. 1997. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annual review of medicine*, 48(1): 353-374.

Ruano-Ravina, A., Figueiras, A., Barros-Dios, J.M. 2003. Lung cancer and related risk factors: an update of the literature. *Public Health*, 117: 149-156.

Salminen, A., Lehtonen, M., Suuronen, T., Kaarniranta, K., Huuskonen, J. 2008. Terpenoids: natural inhibitors of NF- B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65: 2979 – 2999.

Sandal, T. 2002. Molecular Aspects of the Mammalian Cell Cycle and Cancer. *The Oncologist*, 7: 73-81.

Saraste, A., Pulkki, K. 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* 45(3): 528-37.

Saraswathi, J., Venkatesh, K., Baburao, N., Hilal, M.H., Rani, A.R. 2011. Phytopharmacological importance of *Pelargonium* Species. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(13): 2587-2598.

Sarışen, Ö., Çalışkan, D. 2005. Fitoterapi: Bitkilerle Tedaviye Dikkat(!). *Sted*, 14(8):182-187.

Schutte, B., Henfling, M., Kölgen, W., Bouman, M., Meex, S., Leers, M.P., Nap, M., Björklund, V., Björklund, P., Björklund, B., Lane, E.B., Omary, M.B., Jörnvall, H., Ramaekers, F.C.2004. Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. *Exp Cell Res.*, 297: 11–26.

Seidel, V., Taylor, P.W. 2004. *In vitro* activity of extracts and constituents of *Pelargonium* against rapidly growing mycobacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23: 613-619.

Sellers, T. A., Bailey-Wilson, J. E., Elston, R. C., Wilson, A. F., Elston, G. Z., Ooi, W. L., Rothschild, H. 1990. Evidence for Mendelian inheritance in the pathogenesis of lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(15): 1272-1279.

Sezgin, C. 2010. Kanserde bitkilerle tedavide örnek uygulamalar. Bitkilerle Tedavi Sempozyumu, 5-6 Haziran 2010, Zeytinburnu, İstanbul.

Shields, T.W. 2000. Carcinoma of the lung: General Thoracic Surgery. Ed: Shields, T.W., Locicero, J., Ponn, R.B., Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, 1215-1442.

Solakoğlu, Z. 2009. Apoptoz varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni. *Klinik Gelişim*, 22(3): 20-25.

Sommers, C.L., Walker-Jones, D., Heckford, S. E., Worland, P., Valverius, E., Clark, R., McCormick, F., Stampfer, M., Abularach, S., Gelmann, E.P. 1989. Vimentin Rather Than Keratin Expression in Some Hormone-independent Breast Cancer Cell Lines and in Oncogenetransformed Mammary Epithelial Cells. *Cancer Research*, 49: 4258-4263.

Straszewski-Chavez, S.L., Abrahams, V.M., Mor, G. 2005. The Role of Apoptosis in the Regulation of Trophoblast Survival and Differentiation during Pregnancy. *Endocrine Reviews*, 26(7): 877–897.

Suh, Y. 2002. Cell signaling in aging and apoptosis. *Mechanisms of Ageing and Development*, 123: 881-890.

Sundaram, M.V. 2006. RTK/Ras/MAPK signaling. WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology [Internet], Pasadena (CA).

Telkoparan, P., Tazebay, U. H. 2011. Ras Protein Ailesi: Hücresel İşlevi, Moleküler Kontrolü, Onkogenezdaki Rolü. *Turk J Biochem.* 36 (4) ; 367–373.

Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Yumrutas, O., Sokmnen, A. 2006. Screening of antioxidative properties of the methanolic extracts of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl., *Verbascum wiedemannianum* Fisch. & Mey., *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Borm., *Centaurea mucronifera* DC. and *Hieracium cappadocicum* Freyn from Turkish flora. *Food Chemistry*, 98(1): 9-13.

Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S., Dixit, V.M. 1995. Yama/CPP32 b, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell*, 81: 801–809.

Thun, M.J., Hannan, L.M., Adams-Campbell, L.L., Boffetta, P., Buring, J.E., Feskanich, D., Flanders, W.D., Jee, S.H., Katanoda, K., Kolonel, L.N., Lee, I.M., Marugame, T., Palmer, J.R., Riboli, E., Sobue, T., Avila-Tang, E., Wilkens, L.R., Samet, J.M. 2008. Lung Cancer Occurrence in Never-Smokers: An Analysis of 13 Cohorts and 22 Cancer Registry Studies. *PLoS Med.*, 5(9):185.

Timmer, J.C., Salvesen G.S. 2007. Caspase substrates. *Cell Death and Differentiation*, 14: 66–72.

Travis, W.D., Lubin, J., Ries, I., Devesa, S. 1996. United States lung carcinoma incidence trends: Declining for most histologic types among males, increasing among females. *Cancer*, 77:2464-70.

Ueno, T., Toi, M., Bivén, K., Bando, H., Ogawa, T., Linder, S. 2003. Measurement of an apoptotic product in the sera of breast cancer patients. *Eur J Cancer*, 39: 769-74.

Ulukaya, E. 2001. Akciğer Kanseri, Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar: Hücre Siklusu ve Apoptozis. Ed: Engin, K., Özyardımcı, N., Avrupa Tıp Kitapçılık, İstanbul, Bölüm III.

Ulukaya, E. 2003. Apoptozis ders notları.
http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf-(Erişim tarihi:12 Mayıs 2013).

Ulukaya, E., Acilan, C., Yilmaz, Y. 2011. Apoptosis: Why and how does it occur in biology? *Cell Biochem Func.*, 29: 468-480.

Ulukaya, E., Ozdikicioglu, F., Yilmaztepe-Oral, A., Demirci, M. 2008. The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicology in Vitro*, 22: 232–239.

van der Walt, J.J.A. 1985. A taxonomic revision of the type section of *Pelargonium* L'Hérit. (Geraniaceae). *Bothalia*, 15(3 & 4): 345-385.

van der Walt, J.J.A., Vorster, P.J. 1983. Phytogeography of *Pelargonium*. *Bothalia*, 14 (3 & 4): 517-523.

Van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B., & Reutelingsperger, C. P. 1998. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31(1): 1-9.

Vernin, G., Metzger, J., Fraisse, D., Scarf, C. 1983. Etude des huiles essentielles par GC-SM-banque specma: essences de geranium. *Parf. Cosm. Aromather.*, 52: 51–61.

Wadhawan, T., McEvoy, J., Priß, B.M., Khan, E. 2010. Assessing tetrazolium and ATP assays for rapid in situ viability quantification of bacterial cells entrapped in hydrogel beads. *Enzyme and Microbial Technology*, 47: 166–173.

Webb, W.J. 1984. The *Pelargonium* Family: The species of *Pelargonium*, *Monsonia* and *Sarcocaulon*. Croom Helm, London and Sydney.

WHO 1981. Histological Typing of lung cancers 2nd ed. *Ann Pathol*, 1(3):177-91.

WHO 2004. The World Health Report.

http://www.who.int/whr/2004/annex/topic/en/annex_2_en.pdf (Erişim tarihi: 24.03.2013).

WHO 2008. Cancer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (Erişim tarihi: 24.03.2013).

Williams, C.A., Newman, M., Gibby, M. 2000. The application of leaf phenolic evidence for systematic studies within the genus *Pelargonium* (Geraniaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 28: 119-132.

Williams, C.A., Harborne, J.B. 2002. Phytochemistry of the genus *Pelargonium*: Geranium and Pelargonium, Ed:Lis-Balchin, M., Taylor and Francis, London.

Yanishlieva, N.V., Marinova, E.M., Gordon, H.M., Raneva, V.G.1999. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chem.*, 64: 59-66.

Yılmaz, E., Altunok, V. 2011. Kanser ve p53 geni. *Avkae*, 1:19-23.

Yokota, J. 2000. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, 21(3): 497-503.

Yokota, J., Kohno, T. 2004. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Sci.*, 95(3): 197-204.

Youngkin, E.Q., Israel, D.S. 1996. A review and critique of common herbal alternative therapies. *Nurse Practitioner*, 21: 39-62.

Zeren, E. 2000. Akciğer Kanseri: Akciğer Kanserine Patolojik Yaklaşım, Editörler: Hastürk, S., Yüksel, M., Özlem Grafik Matbaacılık, İstanbul, 29-45.

Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S. R., Yan, G. 1997. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of Annexin V. *Biotechniques*, 23: 525-531.

Zhang, J.H., Zhang, Y., Herman, B. 2003. Caspases, apoptosis and aging. *Ageing Research Reviews*, 2: 357-366.

Zhang, X., Ling, M. T., Wong, Y. C., Wang, X. 2007. Evidence of a novel antiapoptotic factor: Role of inhibitor of differentiation or DNA binding (Id-1) in anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer science*, 98(3): 308-314.

Zhuan, S.R., Chen, S.L., Tsai, J.H., Huang, C.C., Wu, T.C., Liu, W.S., Tseng, H.C., Lee, H.S., Huang, M.C., Shane, G.T., Yang, C.H., Shen, Y.C., Yan, Y.Y., Wang, C.K. 2009. Effect of citronellol and the Chinese medical herb complex on cellular immunity of cancer patients receiving chemotherapy/radiotherapy. *Phytother. Res.*, 23: 785-790.

Zimmermann, K.C., Bonzon, C., Green, D.R. 2001b. The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & Therapeutics*, 92(1): 57–70.

Zimmermann, K.C., Green, D.R. 2001a. How cells die: Apoptosis pathways. *Jallergy Clin Immunol*, 108(4): 99-103.

Zwenger, S., Basu, C. 2008. Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnol Mol Biol Rev*, 3(1): 1-7.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Nazlıhan AZTOPAL

Doğum Yeri ve Tarihi: Samsun, 15 Ocak 1988

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Çarşamba Anadolu Lisesi (2002-2006)

Lisans: Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2006-2010)

Yüksek Lisans: Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü,
Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı (2010-2013)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: -

İletişim (e-posta): nazlihanaztopal@gmail.com

Yayımları: -