



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Epimedium pubigerum (DC.) C.
**MOREN & DECNE BİTKİSİNİN BİYOLOJİK
ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Gökçe SEYHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Burak BARUT

TRABZON-2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Gökçe SEYHAN

İthaf

Tanıdığım en güçlü kadına, bir tanecik annem Özlem SEYHAN'a



İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI

ONAY

BEYAN

İTHAF

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

vi

TABLolar DİZİNİ

ix

ŞEKİLLER DİZİNİ

x

RESİMLER DİZİNİ

xi

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

xii

ÖZET

xiv

ABSTRACT

xv

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

2. GENEL BİLGİLER

4

2.1. Kanser

4

2.2. Akciğer Kanseri

5

2.2.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi

6

2.2.2. Akciğer Kanseri Etiyolojisi

7

2.2.3. Akciğer Kanseri Tedavisi

10

2.3. Hücre Ölümü ve Mekanizmaları

11

2.4. *Epimedium* Cinsi

15

2.4.1. *Epimedium* Cinsi'ne Ait Botanik Bilgiler

15

2.4.2. *Epimedium* Cinsi'nin Etnofarmakolojik Kullanımı

16

2.4.3. *Epimedium* Cinsi'nin Kimyasal Bileşenleri

17

2.4.4. *Epimedium* Cinsi'ne Ait Biyolojik ve Farmakolojik Çalışmalar

18

2.4.5. *Epimedium pubigerum* (DC.) C. Moren & Decne Türü

20

3. GEREÇ ve YÖNTEM

21

3.1. Gereç

21

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

21

3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Ekipmanlar

22

3.1.3. Antikorlar	23
3.1.4. Çalışmadan Kullanılan Bitki	24
3.1.5. Kullanılan Çözeltiler	24
3.2. Yöntem	27
3.2.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması	27
3.2.2. LC-HR/MS Analizinin Gerçekleştirilmesi	27
3.2.3. Toplam Fenolik ve Flavonoit Madde Miktarı Tayini	28
3.2.3.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini	28
3.2.3.2. Toplam Flavonoit Madde Miktarı Tayini	29
3.2.4. Antioksidan Aktivitenin İncelenmesi	29
3.2.4.1. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi	29
3.2.4.2. Fosfomolibdenyum İndirgeyici Antioksidan Kapasite Ölçümü	29
3.2.5. DNA Etkileşim Çalışmaları	30
3.2.5.1. DNA Hasarı Çalışması	31
3.2.5.2. DNA Hasarından Koruma Etkisi	31
3.2.6. Hücre Kültürü Çalışmaları	32
3.2.6.1. MTT Testi ile Sitotoksosite Analizi	33
3.2.6.2. Hücre Göçü Analizi	33
3.2.7. Western Blotlama Analizi	34
3.2.8. İstatiksel Analiz	36
4. BULGULAR	37
4.1. LC-HR/MS Analiz Sonuçları	37
4.2. Toplam Fenolik ve Flavonoit Madde Miktarı Tayini	38
4.3. Antioksidan Aktivitenin İncelenmesi	39
4.3.1. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi	39
4.3.2. PRAP Aktivitesinin Belirlenmesi	40
4.4. DNA Etkileşim Çalışmaları	40
4.5. MTT Testi ile Sitotoksosite Analizi	43
4.6. Hücre Göçü Analizi	45
4.7. Western Blotlama Analizi	47
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	49
6. KAYNAKLAR	54
EKLER	69

EK 1. Ekstrelelere ait kromatogram görüntüleri

70

ÖZGEÇMİŞ

73



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. <i>Epimedium</i> cinsinin bitki sistematigindeki yeri	16
Tablo 2. Kullanılan cihazlar ve markaları	21
Tablo 3. Kullanılan kimyasallar, marka ve kodları	22
Tablo 4. Kullanılan antikorlar, marka ve kodları	23
Tablo 5. Kullanılan çözeltiler, içerikleri ve hazırlanışları	24
Tablo 6. HPLC ve gradiyent sistem şartları	27
Tablo 7. Kütle spektrometresi ve çevre şartları	28
Tablo 8. SME ve RME'nin fitokimyasallarının kantitatif tayini (mg/kg)	37
Tablo 9. SME ve RME'nin toplam fenolik ve flavonoit madde miktarı	39
Tablo 10. Ekstrelerin DPPH radikal süpürme aktivitelerinin yüzdesi (%)	40
Tablo 11. Ekstrelerin PRAP aktivitesi (absorbans)	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	Her iki cinsiyette dünyadaki tahmini yeni vaka ve ölüm sayıları	4
Şekil 2.	Erkekler için dünyadaki tahmini insidans ve ölüm sayıları	6
Şekil 3.	Kadınlar için dünyadaki tahmini insidans ve ölüm sayıları	7
Şekil 4.	Her iki cinsiyette Türkiye'deki tahmini yeni vaka ve ölüm sayıları	7
Şekil 5.	Hücre ölümü ve mekanizmaları	14
Şekil 6.	Süpersarmal DNA'nın kırılma durumuna göre oluşan formlar	31
Şekil 7.	Gallik asit (a) ve kersetine (b) ait standart grafik	39
Şekil 8.	Ekstrelerin hidrolitik nükleaz aktivitesi	41
Şekil 9.	Ekstrelerin Fenton reaktifi ile DNA üzerinde oluşturulan hasarı koruma etkisi	42
Şekil 10.	Ekstrelerin ışık varlığında metilen mavisi ile DNA üzerinde oluşturulan hasarı koruma etkisi	43
Şekil 11.	A549 hücrelerinde ekstrelerinin sitotoksosite profili	44
Şekil 12.	BEAS-2B hücrelerinde ekstrelerinin sitotoksosite profili	44
Şekil 13.	Ekstrelerin varlığında A549 hücrelerinde migrasyon oranı (72 saat)	45
Şekil 14.	Ekstrelerin varlığında A549 hücrelerinde migrasyon oranı	46
Şekil 15.	RME ve SME varlığında A549 hücrelerinde p53 ve sitokrom c ekspresyonlarının western blot analizi	47
Şekil 16.	RME ve SME varlığında A549 hücrelerinde kaspaz-3 ekspresyonlarının western blot analizi	48

RESİMLER DİZİNİ

Resim No	Sayfa
Resim 1. <i>Epimedium pubigerum</i> (DC.) C. Moren & Decne bitkisine ait görseller	20



KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

A549	Akciğer kanseri hücre hattı
APAF1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
APS	Amonyum persülfat
BEAS-2B	İnsan bronş epitel hücre hattı
Bcl-2	B-hücreli lenfoma 2
CARD	Kaspaz protein toplayıcı bölge
DED	Ölüm etkileyici bölge
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	2,2-difenil-1-pikril hidrazil
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EB	Etidyum bromür
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
GAE	Gallik asit eşdeğeri
kD	Kilodalton
KE	Kersetin eşdeğeri
KHAK	Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
LC-HR/MS	Sıvı kromatografisi-yüksek çözünürlüklü/kütle spektrometresi
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür
PMSF	Fenil metil sülfonil florid
PRAP	Fosfomolibdenyum indirgeyici antioksidan kapasite
PVDF	Polivinilidin florür
RME	Rizom metanol ekstresi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SME	Herba metanol ekstresi
TAE	Tris-asetik asit-EDTA
TEMED	Tetrametiletildiaminden
TNF	Tümör nekroz faktör
TNFR	Tümör nekroz faktör reseptörü

Simgeler

&	Ve
α	Alfa
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
M	Molar
mL	Mililitre
mM	Milimolar
N	Normal
nm	Nanometre
ng	Nanogram

Formüller

AlCl₃	Alüminyum klorür
CO₂	Karbondioksit
FeSO₄	Demir (II) sülfat
H₂O₂	Hidrojen peroksit
NH₄CH₃CO₂	Amonyum asetat
Na₂CO₃	Sodyum karbonat

ÖZET

***Epimedium pubigerum* (DC.) C. Moren & Decne Bitkisinin Biyolojik Etkinliklerinin İncelenmesi**

Bu çalışmada, *Epimedium pubigerum*'dan elde edilen metanol herba (SME) ve rizom (RME) ekstrelerinin akciğer kanseri tedavisindeki kullanım potansiyelini değerlendirmek amacıyla ekstrelerin fitokimyasal karakterizasyonu, biyolojik aktivitesi ve sitotoksik mekanizması incelenmiştir. Bu bağlamda öncelikle ekstrelerin fitokimyasal içeriği LC-HR/MS ile analiz edilmiştir. Ardından ekstrelerin toplam fenolik ve flavonoit madde miktarı tayini ile DPPH radikal süpürme aktiviteleri spektrofotometrik yöntemler kullanılarak araştırılmıştır. Ekstrelerin plazmid DNA üzerinde DNA hasarı ve DNA hasarı koruyucu etkileri araştırılmıştır. Her iki ekstrenin sitotoksik etkileri ve apoptotik belirteçlerin (sitokrom c, p53, kaspaz-3) ekspresyonları üzerindeki etkileri insan akciğer kanseri (A549) hücrelerinde araştırılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda RME'de 21 bileşik, SME'de ise 22 bileşik tanımlanmıştır; fumarik asitin her iki ekstrede de yüksek miktarda bulunan bileşik olduğu bulunmuştur. SME ve RME'nin toplam fenolik içerikleri sırasıyla 104.64±4.06 mg GAE/g kuru ağırlık ve 215.65±8.11 mg GAE/g kuru ağırlık, toplam flavonoit içerikleri ise 50.20±5.28 mg KE/g kuru ağırlık ve 23.52±8.22 mg KE/g kuru ağırlık olarak bulunmuştur. DPPH radikal süpürme aktivitelerinin IC₅₀ değerleri SME ve RME için 146.24 µg/mL ve 64.79 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Her iki ekstre de plazmid DNA'da hasar oluşturmamış ve ekstreler, hidroksil radikali üzerinde koruyucu özellikler göstermiştir. SME ve RME, konsantrasyona bağlı olarak A549 hücreleri üzerinde sitotoksikite göstermiştir. Ayrıca *in vitro* yara iyileştirme testi, SME ve RME'nin 1 mg/mL'de önemli bir anti-göç etkisine yol açtığını göstermiştir. Sitokrom c, p53 ve kaspaz-3 ekspresyonları, RME varlığında kontrole kıyasla önemli ölçüde artmıştır.

Tüm bu sonuçlar RME'nin akciğer kanseri için teorik olarak SME'de görülen etkiye kıyasla daha etkili bir fitoterapötik ajan olarak önerilebileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: A549 hücre hattı, Akciğer kanseri, *Epimedium pubigerum*, plazmid DNA

ABSTRACT

Investigation of Biological Activities of *Epimedium pubigerum* (DC.) C. Moren & Decne

In this study, the phytochemical characterization, biological activity and cytotoxic mechanism of methanol herb (SME) and rhizome (RME) extracts obtained from *Epimedium pubigerum* were examined in order to evaluate their potential for use in the treatment of lung cancer. In this context, firstly, the phytochemical content of the extracts was analyzed by LC-HR/MS. Then, the total phenolic and flavonoid compounds content of the extracts and DPPH radical scavenging activities were investigated using spectrophotometric methods. DNA damage and DNA damage protective effects of the extracts were examined on plasmid DNA. The cytotoxic effects of both extracts and their effects on the expression of apoptotic markers (cytochrome c, p53, and caspase 3) were investigated on human lung cancer (A549) cells. As a result of the experiments, 21 compounds were identified in RME and 22 compounds in SME; fumaric acid was found to be the compound in high amounts in both extracts. Total phenolic contents of SME and RME were 104.64 ± 4.06 mg GAE/g dry weight and 215.65 ± 8.11 mg GAE/g dry weight, respectively, total flavonoid contents were found to be 50.20 ± 5.28 mg QE/g dry weight and 23.52 ± 8.22 mg QE/g dry weight. The IC_{50} values of DPPH radical scavenging activities were calculated as $146.24 \mu\text{g/mL}$ and $64.79 \mu\text{g/mL}$ for SME and RME. Both extracts did not damage to plasmid DNA and the extracts showed strong protective properties on hydroxyl radical. SME and RME showed cytotoxicity on A549 cells concentration-dependently. Also, *in vitro* scratch assay showed that SME and RME led to a significant anti-migratory effect at 1 mg/mL . Cytochrome c, p53, and caspase 3 expression significantly increased in the presence of RME compared to the control.

All these results claimed that RME might be suggested as a theoretically more effective phytotherapeutic agent for lung cancer compared to the effect seen with the SME.

Keywords: A549 cell line, *Epimedium pubigerum*, Lung cancer, plasmid DNA

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, vücuttaki bir organ veya dokudaki hücrelerin, kontrolsüzce büyümesi ve çoğalması sonucu vücudun bazı kısımlarını işgal etmesi veya yayılması sonucu oluşabilen bir hastalıktır (1). Dünya çapında meydana gelen ölümlerin nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün verilerine göre, 2020 yılında yaklaşık 10 milyon ölüme neden olmuştur (2).

En sık görülen türlerinden biri olan akciğer kanseri, köken aldığı hücreye göre iki tipe ayrılmaktadır: küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK). KHDAK; adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom olarak alt gruplara ayrılmaktadır. Akciğer kanserine yatkınlık genetik olarak belirlenirken sigara kullanımı, hava kirliliği, iyonlaştırıcı radyasyon, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve asbest gibi kimyasallar, kronik enfeksiyonlar ve virüsler hastalığın gelişmesine neden olabilmektedir (3).

Akciğer kanseri tedavisinde cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hedefe yönelik tedaviler ve immünoterapi yöntemleri kullanılmaktadır. Tedavi yöntemlerine ve sağlık alanındaki gelişmelere rağmen iki kanser türü de çok düşük sağ kalım oranlarına ve kötü prognoza sahiptirler (4, 5).

Kemoterapi ve immünoterapi ilaçlarının içerdiği antikanser ajanlar, kanser hücrelerini esas olarak programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptoz yoluyla öldürmektedir. Apoptozun ekstrasik (ölüm reseptörü) yolu ve intrinsik (mitokondriyal) yolu bilinen en yaygın hücre ölüm yollarıdır. İntrinsik yolu mitokondri tarafından sitokrom c salınmasına bağlıdır ve hem çekirdek hem de mitokondride oksidatif stres ve deoksiribonükleik asit (DNA) hasarı intrinsik yol boyunca apoptozu tetikleyebilmektedir. Ayrıca B-hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) protein ailesinin proapoptotik ve antiapoptotik proteinleri, başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8, -9 ve -10) ve efektör kaspazlar (kaspaz -3, -6 ve -7) arasındaki bir denge de sitokrom c salınmasında önemlidir (6, 7).

Tümör supresör genlerden biri olan ve p53 proteininin sentezinden sorumlu olan gen TP53'tür. TP53, kanserde sıklıkla mutasyona uğrayan bir gendir (8). Bu gen tarafından üretilen p53 proteini; DNA onarımı, hücre yaşlanma, hücre ölümü, hücre farklılaşması gibi çeşitli hücresel yanıtların düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Çalışmalar kanser hastalarının çoğunda TP53 geninin inaktive edildiğini göstermektedir (9). p53 proteini eksikliği nedeniyle meydana gelen kanserler genellikle kararsız, agresif ve tedaviye

dirençlidir (10). Bu nedenle kanser etiolojisinde bu protein önemli bir yere sahiptir. Tedavi yöntemleri doğrudan hücre ölümüne neden olurken antioksidan savunma sistemini ve DNA onarım mekanizmalarını baskılayabilmektedir. Bu durum DNA kırıklarının artmasına ve mitokondri gibi önemli organellerin hasar görmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle, önemli bir yan etki olmadan terapötik etkinliği artırmak için kanser önleyici özelliklere sahip daha az toksik yeni ajanların keşfedilmesi gerekmektedir (7).

Bitkilerin sağlık alanında kullanımı uzun yıllara dayanmaktadır ve 3000'den fazla bitki türünün kanser hastalığının tedavisinde kullanıldığı bildirilmektedir (11). Bitki kaynaklı antikanser ilaç arayışı 1950'lerde başlamıştır. Mevcut kullanılan antikanser ilaçların yarısından fazlası doğrudan veya dolaylı olarak bitkiler, deniz organizmaları ve mikroorganizmalar gibi doğal kaynaklardan elde edilmiştir (12, 13). *Epimedium* türleri de tedavi çalışmaları için kullanılan doğal kaynaklardan biridir (14). Bitkinin yaprakları ilk olarak milattan önce 200-300 yıllarında tarım ve şifalı bitkiler üzerine yazılmış bir Çin kitabında iktidarsızlık ve romatizma tedavisi, böbrek fonksiyonlarını geliştirme, kemikleri ve tendonları güçlendirme özellikleri ile yer almıştır. Araştırmalar; yaşlanma karşıtı, antitümör, antiosteoporoz gibi çeşitli biyoaktivitelere sahip olduklarını ve bağışıklığı iyileştirebildiklerini, kan hücrelerinin oluşumunu desteklediklerini, kardiyovasküler akışı artırabildiklerini ve kemik metabolizmasını düzenleyebildiklerini göstermiştir (15, 16). Bu farmakolojik etkilerini içerdikleri flavonoidler, polisakkaritler ve fenolik asitler gibi 260'tan fazla bileşeni sayesinde göstermektedirler (17).

Epimedium cinsi Berberidaceae familyasının en büyük otsu cinsidir. Farklı türleri ayırt etmek için kök, yaprak ve çiçeklerin morfolojik karakterleri kullanılmaktadır. Türler, merkezi Çin olmak üzere Akdeniz bölgesi, Batı ve Doğu Asya'daki ormanlık alanlarda veya çalılıklarda ayırık ve çok düzensiz bir şekilde dağılım göstermektedir (18). Türkiye'de doğal olarak yetişebilen 2 türü bulunmaktadır: *Epimedium Pinnatum* Fischer in DC. Subsp. *colchicum* (Boiss.) Busch ve *Epimedium pubigerum* (DC.) C. Moren & Decne.

Bu tez çalışması kapsamında *E. pubigerum* bitkisinden elde edilen metanol herba ve rizom ekstraktlarının akciğer kanseri tedavisinde kullanılmak üzere iyi bir antikanser ajanı olma potansiyelini araştırmak amaçlanmıştır. Bu amaçla ekstraktların fitokimyasal içerik analizi Sıvı Kromatografisi-Yüksek Çözünürlüklü/Kütle Spektrometresi (LC-HR/MS) yöntemi kullanılarak, toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları ise spektrofotometrik yöntemler kullanılarak analiz edilmiştir. Ardından 2,2-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH) ve

fosfomolibdenyum indirgeyici antioksidan kapasite (PRAP) yöntemleri ile ekstrelerin antioksidan aktivite özellikleri incelenmiştir. Ekstrelerin DNA hasarı ya da farklı reaktiflerle oluşturulan hasara karşı DNA'yı koruma özellikleri agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Ekstrelerin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini incelemek amacıyla 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür (MTT) hücre canlılık testi ve hücre göçü analizleri gerçekleştirilmiştir. Hücre ölüm sürecinde ekspresyon seviyelerinde önemli değişiklikler gösteren sitokrom c, p53 ve kaspaz-3 proteinlerinin ekstrelerle muamele edilen A549 hücrelerinde ekspresyon düzeyleri western blot yöntemiyle analiz edilmiştir.

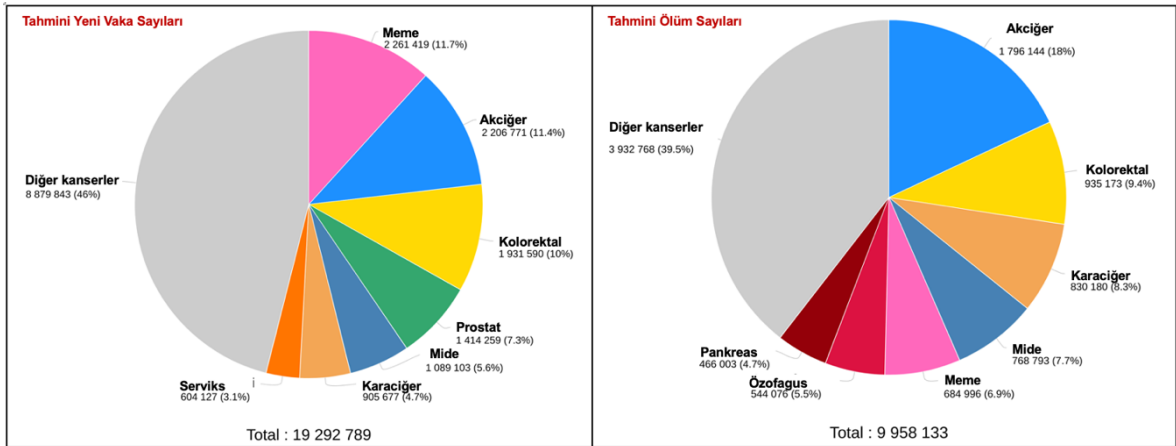


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Hücreler, vücudun ihtiyaç duyduğu yeni hücreleri sağlamak için hücre bölünmesi olarak adlandırılan bir süreç ile büyümekte ve bölünerek çoğalmaktadırlar. Ayrıca hücreler yaşlandıklarında veya hasar aldıklarında ölmekte ve yeni hücreler üretilmektedir. Bazı durumlarda bu süreç bozulur ve ölmesi gereken yaşlı veya hasarlı hücreler büyüyüp çoğalmaya devam ederler (19). Bu durum kanser olarak adlandırılan ve vücudun herhangi bir bölgesinde başlayıp farklı organlara yayılabilen bir hastalığa neden olmaktadır (2).

Anormal hücre büyümesini içeren kompleks genetik bir hastalık olan kanser, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde başta gelen ölüm nedenlerindendir (20). 2020’de dünya çapında 19.3 milyon yeni kanser vakası görülmüş ve yaklaşık 10 milyon kanser kaynaklı ölüm gerçekleşmiştir. DSÖ verilerine göre her iki cinsiyette teşhis edilen kanserlerde kadın meme kanseri ilk sırada yer alırken bunu akciğer, kolorektal, prostat ve mide kanserleri takip etmektedir. Kanser ölümlerinde ise akciğer kanserini kolorektal, karaciğer, mide ve meme kanserleri takip etmektedir (Şekil 1) (21). Kanser ekonomik olarak da toplumları olumsuz yönde etkileyen bir hastalıktır. 2020’den 2050’ye kadar tahmini küresel ekonomik maliyeti 25.2 milyar dolardır (22).



Şekil 1. Her iki cinsiyette dünyadaki tahmini yeni vaka ve ölüm sayıları (DSÖ’den, 2)

Kanser hastalığına neden olabilecek birçok faktör vardır. Genetik faktörler, tütün tüketimi, yetersiz beslenme, obezite, aşırı alkol alımı, yaşlanma gibi faktörlerin yanında iyonlaştırıcı radyasyon, çevresel kirlenmeler ve enfeksiyona maruz kalmak kansere neden

olabilmektedir (23). Kanser hücrelerinin proliferatif sinyalleri sürdürme, büyüme baskılayıcılarından kaçınma, hücre ölümüne direnme, replikatif ölümsüzlüğü sağlama, anjiyogenezi indüklemeye, invazyon ve metastazı aktifleştirmek gibi ayırt edici özellikleri bulunmaktadır. Ayrıca genom kararsızlığı, enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve bağışıklık yanıtından kaçınmak gibi özellikler de geliştirmektedirler. Böylece kanser hücreleri sağ kalımlarını sağlamaktadırlar (24).

Tümörler benign ve malign olmak üzere ikiye ayrılırlar. Benign tümörler yavaş büyür ve farklı dokuları istila etmezler. Kanserli değillerdir ancak büyüyerek yakın dokuları sıkıştırıp ağrıya veya tıbbi komplikasyonlara neden olabilirler. Çıkarıldıktan sonra tekrarlama olasılıkları düşüktür. Malign tümörler, kontrolsüzce büyüyen ve metastaz yapabilen hücrelere sahiptirler. Kanserli dokulardır, kan dolaşımı veya lenfatik sistemle uzak yerleri istila etmektedirler. Hızla yayılabilirler ve tedavi edilmelidirler (25).

Uzun süredir kanser tedavisinde cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi yöntemleri tek veya kombine olarak kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda kanser tedavisindeki ilerlemeyle birlikte hormon tedavisi, kök hücre tedavileri, immünoterapi, fotodinamik terapi ve hipertermi gibi yöntemler de hastalığın tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (19, 26).

2.2. Akciğer Kanseri

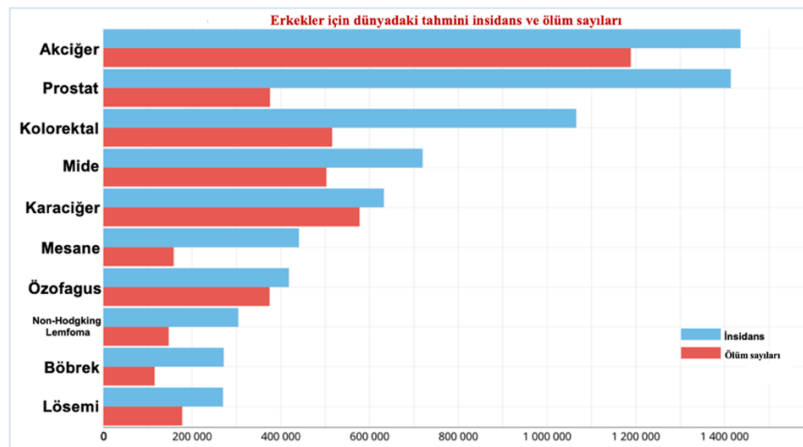
Akciğer kanseri, akciğer dokularındaki hücrelerin kontrolsüz olarak büyümesi ile karakterize bir hastalıktır. Kontrolsüz büyüme tedavi edilmezse tümör metastaz yapabilmektedir. Primer akciğer kanserleri olarak bilinen ve akciğerde başlayan kanserlerin çoğu epitel hücrelerinden köken almaktadır (27). Bronş ağacının farklı bölgelerinde oluşabilen heterojen bir hastalıktır. Kanserin olduğu bölgeye göre hastalarda değişik semptom ve bulgular gözlenmektedir (4). Yaygın semptomlar arasında öksürük, nefes darlığı, kilo kaybı ve göğüs ağrısı yer almaktadır (28). Değiştirilemez veya değiştirilebilir birçok faktör akciğer kanserine neden olmaktadır. Yaş, cinsiyet, ırk ve aile öyküsü değiştirilemez faktörler arasında yer alırken tütün ve esrar kullanımı, asbest, hava kirliliği, arsenik, enfeksiyon, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ise değiştirilebilir faktörlerdir (29).

Akciğer kanseri iki histolojik sınıfa ayrılmaktadır: KHAK ve KHDAK. KHDAK'ler adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom olarak alt gruplara ayrılmaktadır (30). Akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %80-85'i KHDAK'dir (31). En iyi bilinen önlenemez nedeni sigara kullanımıdır. Adenokarsinom en

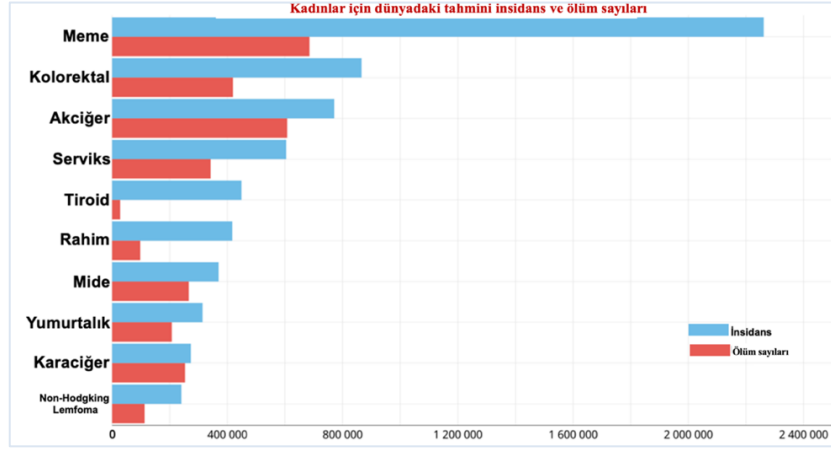
yaygın görülen akciğer kanseri türüdür ve tüm vakaların yarısını oluşturmaktadır (32). Her iki tip akciğer kanseri de düşük sağ kalım oranına sahiptir (33). Hastalığın erken teşhisi önemlidir çünkü tedavi edilen evre I'in 5 yıllık sağ kalım oranı evre II ya da IV'e göre daha iyidir ancak hastaneye başvuran hastaların %70'inin ileri evrede (evre III veya IV) olduğu bulunmuştur (4, 34). KHAK, kemoterapi ve radyoterapiye karşı duyarlıdır ancak hastalık tanı anında yayılır bu nedenle de tedavisi zorlaşmaktadır (35). KHDAK ise antikanser ilaçlara karşı güçlü bir direnç göstermektedir. Tanı anında hastalar, hastalığın durumuna ve kullanılan tedavi yöntemine göre üç gruba ayrılmaktadır. İlk hasta grubunda hastalık erken aşamada teşhis edilebilir ve hastaların tümörleri cerrahi olarak çıkarılabilmektedir. İkinci hasta grubunda lokal olarak ilerlemiş tümörler vardır, hastalar kemoterapi ve radyoterapi kombinasyonu ile tedavi edilebilmektedir. Üçüncü hasta grubu tanı anında metastazı olan hastalardan oluşur ve tek tedavi semptomların hafiflemesi için radyoterapi veya kemoterapidir (36).

2.2.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi

DSÖ verilerine göre 2020 yılında 2.2 milyon yeni akciğer kanseri vakası görülmüş olup 1.8 milyon kişi bu hastalık sebebiyle vefat etmiştir. Akciğer kanseri, 2020'de en çok tanı alan kanserler arasında ikinci sıradayken kanser nedeni ölümlerin başında gelmektedir. Dünyada erkeklerde tahmini kanser vakalarının insidansında ve ölüm sayılarında akciğer kanseri ilk sırada yer almaktadır (Şekil 2). Kadınlarda ise insidans olarak üçüncü sırada yer almaktadır. Ölüm sayıları olarak ise ikinci sırada meme kanserinin altında yer almaktadır (Şekil 3) (21).

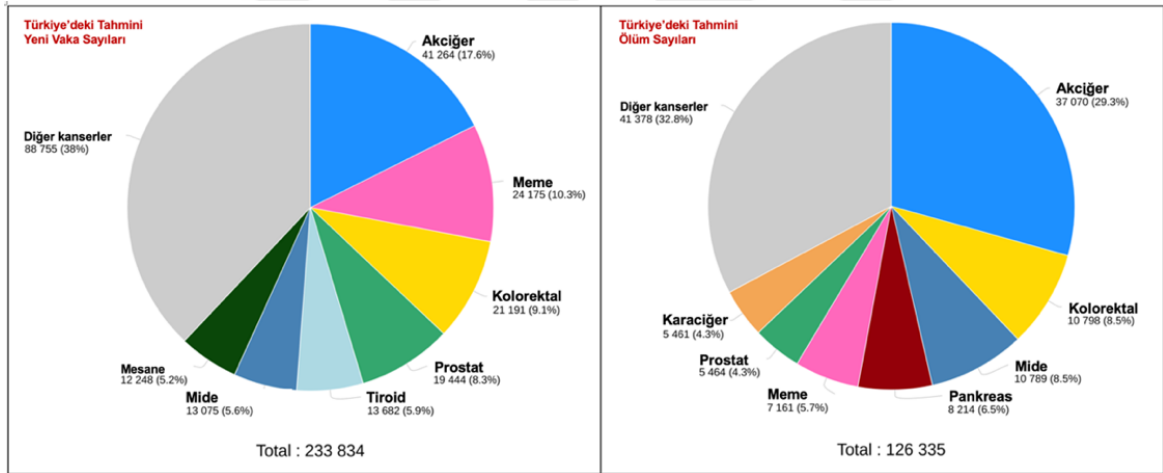


Şekil 2. Erkekler için dünyadaki tahmini insidans ve ölüm sayıları (DSÖ'den, 2)



Şekil 3. Kadınlar için dünyadaki tahmini insidans ve ölüm sayıları (DSÖ'den, 2)

Dünyada olduğu gibi Türkiye’de de akciğer kanseri 2020 yılında tahmini olarak en çok yeni vaka görülen kanser türüdür ve kanser kaynaklı ölümlerin ilk sırasında yer almaktadır (Şekil 4) (2).



Şekil 4. Her iki cinsiyette Türkiye'deki tahmini yeni vaka ve ölüm sayıları (DSÖ’den, 2)

2.2.2. Akciğer Kanseri Etiyolojisi

Hücrelerin çeşitli etkenlere maruz kalması sonucu DNA’larında hasar meydana gelebilmektedir. Meydana gelen hasarlar DNA onarım mekanizmaları tarafından onarılmaktadır. Hücrede meydana gelen ve tek bir mutasyonla başlayan DNA hasarlarının onarılamadığı durumlar kanser oluşumuna kadar ilerleyebilmektedir. Hücrelerin normal büyümesini ve çoğalmasını kontrol eden, DNA’da hasar meydana geldiğinde onarımını, onarılmazsa da apoptozun indüklenmesinden sorumlu olan tümör baskılayıcı genler

bulunmaktadır. Benzer şekilde hücrelerin çoğalmasında ve farklılaşmasından sorumlu olan proto-onkogenler bulunmaktadır. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu tümör baskılayıcı genlerin inaktive olması veya proto-onkogenlerin aktivasyonu kanser oluşumunu başlatmaktadır (37).

Tümör baskılayıcı genlerden birisi olan TP53 geni kanser türlerinde en sık mutasyona uğrayan genlerden birisidir. Kanserlerin yarısı TP53 geni mutasyonu içerirken, birçok kanser türünde de işlevi tehlikededir. TP53 geni bir transkripsiyon faktörü olan p53 proteinini kodlamaktadır. p53 proteini; DNA onarımı, yaşlanma, hücre döngüsü kontrolü, otofajik ve apoptozda rol oynamaktadır (38). DNA hasarı, radyasyon, reaktif oksijen türlerinin yüksek üretimi, birkaç farklı onkogenin aktivasyonu gibi nedenler p53'ün transkripsiyonunu etkilemektedir (39). p53 proteininde meydana gelen bir anormallik sonucu hücre döngüsü kontrolü kaybedilir ve hücre döngüsü sınırsız hale gelerek hasarlı DNA kopyalanır, bu da kontrolsüz hücre çoğalmasına ve tümör oluşumuna neden olmaktadır (40). TP53 genindeki mutasyonlar akciğer kanseri hastaları için de en yaygın genetik değişikliklerden birisidir. KHAK ve KHDAK hastalarının neredeyse %70 ve %50'sinde bu gende mutasyona rastlanmıştır. p53 proteini fonksiyon kaybı akciğer kanserinde erken evrede gerçekleşen bir olaydır ve etiolojisinde rol oynamaktadır. Ayrıca insan kanserinde p53 eksikliği çok yaygın olduğundan, bu protein kanser tedavisinde iyi bir hedeftir. Tedavide kullanılan ajanların çoğu doğrudan DNA'yı hedefler ve bu tür tedavilere yanıt olarak p53, DNA onarım sürecinin ve hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozun koordinatörü olarak işlev görmektedir (40, 41).

Apoptoz, kaspazların merkezi bir rol oynadığı ve aktivasyonu intrinsik ve ekstrinsik olmak üzere iki ana yolak tarafından gerçekleştirilen bir hücre ölüm mekanizmasıdır. İntrinsik yolak, DNA hasarı, kalsiyum aşırı yüklenmesi, reaktif oksijen türleri sayısının artması gibi hücre içi sinyallerle aktive olmaktadır. Bu sinyaller mitokondri zarının geçirgenliğini değiştirerek sitokrom c gibi apoptotik proteinlerin salınmasını ve kaspaz-3'ün aktive edilerek apoptozun gerçekleştiği bir dizi reaksiyona yol açmaktadır (42). Kanser ayırt edici özelliklerinden birisi apoptoz inhibisyonu olmakla birlikte apoptozun indüklenmesi ise tümörler için terapötik bir yaklaşımdır. Azalmış serum sitokrom c seviyeleri inhibisyonu ile ilişkiliyken artmış seviyeleri indüksiyonu ile ilişkilidir (43). Düşük sitokrom c seviyeleri oksidatif strese, mitokondriyal/hücrel hasara ve KHDAK gibi çeşitli kanser türlerine neden olmaktadır (44). KHDAK hastalarının kemoterapi

tedavisi öncesi ve sonrası serum sitokrom c seviyeleri incelenmiştir. Yeni tanı almış hastaların sağlıklı bireylere oranla üç kat daha düşük serum sitokrom c seviyelerine sahip olduğu görülmüştür. Aynı şekilde ileri evre hastaların daha düşük seviyelere sahip olduğu görülmüştür. İlk kemoterapi sonrasında ise hastalardaki sitokrom c seviyesinin 13 kattan fazla arttığı gözlemlenmiştir (45).

Apoptozun başlatılmasında ve yürütülmesinde kaspazlar önemli bir yere sahiptir. Kaspazlar, kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkilidir. Özellikle apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan kaspaz-3, kanser tedavilerinde önde gelen hedeflerden biridir (46, 47). Sitotoksik ilaçlar, radyoterapi, immünoterapi gibi antikanser tedaviler kaspaz-3'ü aktive ederek kanserli hücrelerin ölümüne neden olabilmektedir. Bu nedenle kaspaz-3 aktivasyonu uygulanan tedavinin etkinliğini belirlemede belirteç olarak kullanılabilir (48).

Kadınlarda CYP1A1 geninin aşırı ekspresyonu, karsinogenezin ilk adımı sayılabilecek ve sigara kullanımından bağımsız olarak akciğer kanserinde görülen DNA eklentilerinin oluşmalarında artışa neden olmaktadır. Glutasyon S-transferaz M1 geninin azalan ekspresyonu DNA'ya hasar verdiği bilinen reaktif oksijen türlerinde artışa neden olmaktadır (49). Epidermal büyüme faktörü reseptörü genindeki ya da yolundaki mutasyonlar, KRAS genindeki ve EML4-ALK onkogenindeki mutasyonlar, hepatosit büyüme faktörü reseptörünün (c-MET) aşırı ekspresyonu ya da mutasyonu, fosfo inositol 3-kinaz katalitik alt birim (PI3KCA) geni amplifikasyonu, protein tirozin fosfataz ve tensin homologu (PTEN) geni delesyonları, vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörünün aşırı ekspresyonu, ROS1 translokasyonu, epigenetik değişiklikler ve insülin benzeri büyüme faktöründeki değişiklikler de akciğer kanserinin gelişmesinde rol oynamaktadır (50).

Akciğer kanseri türlerinin gelişimine genetik faktörlerin yanı sıra tütün tüketimi, yaş, aile hikayesi, hava kirliliği ve asbest maruziyeti gibi faktörler de neden olmaktadır. Ailesinde akciğer kanseri öyküsü olan bireylerde sigara içmeyen bireylere kıyasla akciğer kanseri riskinin 2 kat daha fazla olduğu ve malign olmayan akciğer rahatsızlığı olan kişilerde de akciğer kanseri riskinin arttığı görülmüştür (51, 52). Tütün içerisindeki nikotinin yanmasıyla polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve N-nitrozaminler gibi 60'tan fazla kanserojen oluşmaktadır. Oluşan bu bileşikler DNA hasarına ve mutasyonlara neden olarak yıllar sonra kanser riskini artırmaktadır (29). Akciğer kanseri insidansı hem sigara

içenlerde hem de hiç sigara içmeyenlerde yaşla birlikte artmaktadır (52). Yaşlılıktaki yüksek insidansı; sigara içme sıklığı, sigarayı bıraktıktan sonra geçen süre ve elektronik sigara kullanımı gibi faktörlerle ilişkilidir (54). Fosil yakıtların yanmasıyla açığa çıkan kanserojenlerden polisiklik aromatik hidrokarbonlar, sanayi bölgelerinde yaşayan insanlar tarafından bulunduğu için risklidir ancak mesleği nedeniyle uzun süre maruz kalan işçilerdeki akciğer kanseri riski daha yüksektir (55). Asbest inşaatlarda kullanılan bir mineraldir. Akciğerde lif biriktirmektedir ve akciğer kanserinin de içinde olduğu çeşitli akciğer hastalıklarıyla ilişkilendirilmiştir. Akciğer kanseri vakalarının %5-10'unu asbest oluşturmaktadır (29). Hava kirliliği akciğer kanseri için bir risk faktörüdür. Hava kirliliği sigara kullanımından ayrı olarak akciğer kanseri riskinde ve mortalitesinde etkisi olduğu bilinmektedir (56).

2.2.3. Akciğer Kanseri Tedavisi

Akciğer kanseri tedavisinde hastanın durumuna göre cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hedefli terapi ve immünoterapi yöntemleri kullanılmaktadır. Cerrahi, tümörlü dokunun çıkarılmasıdır ve çoğu kanser türlerinin, özellikle katı tümörlerin birincil tedavisidir (57). KHDAK olan hastalarda evre I ve II'de uzun süreli sağ kalım için en iyi seçenektir. Cerrahi rezeksiyon sonrası beş yıllık sağ kalım oranları evre I hastaları için %60-80 iken evre II hastaları için %30-50'dir. Ameliyata uygun olmayan ya da ameliyat olmak istemeyen hastalarda radyoterapi uygulanmaktadır (58). Radyoterapi, bir tümörü küçültmek için yüksek enerjili X ışınlarının uygulanmasıdır. Genellikle cerrahi veya alternatif kemoterapiyle veya bir tümörün boyutunu küçülterek cerrahiye yardımcı olmak için neo-adjuvan tedavi olarak kullanılmaktadır. Sadece tümör bölgesini etkilediği için lokal tedavi olarak kabul edilmektedir (57). Hastalığın tüm evrelerinde ve hasta performans durumunun tüm kategorilerinde kullanılabilen tek tedavi yöntemidir (59). Tedavideki amaç ya iyileştirmektir ya da semptomları hafifletmektir (5). Teknolojik gelişmelerle birlikte radyoterapinin tümörleri daha iyi hedef alması sağlanarak çevredeki normal dokuların rastgele ışınlanması azaltılmıştır. Böylece hem sağ kalım artırılmış hem de toksisite azaltılmıştır (60).

Akciğer kanseri teşhisi konan hastaların çoğunluğu evre IV hastalarıdır. Tedavileri, sağ kalımı ve yaşam kalitesini iyileştirmeyi amaçlamaktadır. Evre IV KHDAK hastaları için ilk tedavi adımı genellikle tümörün durumuna göre uygulanan kemoterapidir (61). Kemoterapi, kimyasallar veya ilaçlar kullanılarak kanser hücrelerinin öldürülmesidir.

Rezeke edilemeyen ve metastatik kanserli hastalar kemoterapiden fayda görebilmektedir (57). Kemoterapi ilaçları genellikle kanser hücresinin büyümesini, bölünmesini ve daha fazla hücre üretmesini engelleyerek kanser hücrelerini yok etmek için kullanılmaktadır. Genellikle tek başlarına ya da farklı ilaçlarla kombine edilerek verilmektedir (62). Gemsitabin, sisplatin (62), pemetrekset, paklitaksel (63), karboplatin ve etoposid (64) akciğer kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçlardır. Bu ilaçlar kanserli hücrelerin DNA'sı için toksiktirler. Ancak çoğalan hücreleri rastgele öldürdüklerinden dolayı hastalarda aşırı yorgunluk, ishal, nöropati gibi yan etkilere neden olmaktadır (65). Farklı aşamalarındaki birçok kanser türünde kemoterapi önemli bir tedavi yöntemidir ancak birçok durumda kanser hücreleri ilaç direnci geliştirerek kemoterapiye yanıt veremez hale gelmektedir. Ayrıca radyoterapi ve kemoterapi yöntemleri saç dökülmesi, lenfödem, kan pıhtısı, kemo-beyin, gastrointestinal problemler ve kilo kaybı gibi yan etkilere neden olabilmektedir. Bu nedenle yeni ve alternatif tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (66).

Hedefe yönelik tedavilerin kullanımına büyük bir ilgi vardır. İlerlemiş KHDAK tedavisinde kullanılan dört hedefe yönelik ilaç bulunmaktadır: gefitinib, erlotinib, setuksimab ve bevasizumab. Bu ilaçlardan gefitinib ve erlotinib, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) olan tirozin kinazın, erlotinib EGFR'nin ve bevasizumab vasküler EGFR'nin inhibitörleridir (65). Bu ilaçların sitotoksik ilaçlarla kullanımı ciddi yan etkilere neden olmamıştır ancak yine de tedavi gören kişilerde akneiform döküntü, kseroz ve egzama gibi dermatolojik yan etkilere neden olmuştur (67). Fotodinamik terapi de akciğer kanseri tedavisinde kullanılan etkili bir yöntemdir. Işığın, fotoduyarlaştırıcı ve moleküler oksijenin fotokimyasal etkileşimi, reaktif oksijen türlerini üreterek kanser hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır (68).

İmmünoterapi, hastalığın metastaz yapmasını önlemeyi ve bireylerin yaşam kalitesini artırmayı amaçlayan bir tedavi yöntemidir. Lenfokinler, aşılardan veya antikörler gibi immünoterapötikler ile bağışıklık sisteminin tamamlanmasına veya uyarılmasına dayanan bir tedavi yöntemidir. Hastanın bağışıklık sisteminin tümör gelişmeden önce anormal hücreleri erkenden yıkması hedeflenmektedir (69).

2.3. Hücre Ölümü ve Mekanizmaları

Hücreler kaza sonucu ya da regüle edilmiş olarak ölebilmektedirler. Regüle hücre ölümü aynı zamanda programlı hücre ölümü, 1842'de Karl Vogt'un kurbağalarda ölen

hücreleri fark etmesiyle araştırılmaya başlanmıştır. 1972’de Kerr, Wyllie ve Currie’nin hücre ölümünün bir formu olarak “apoptoz”u tanımlaması ve bu hücre ölümünün morfolojisini açıklamasıyla araştırmalar hız kazanmıştır (70). 1973 yılında Schweichel ve Merker, hücre ölümü türlerini morfolojik özelliklerine göre Tip I, II ve III olacak şekilde sınıflandırmıştır. Bu sınıflandırmaya göre Tip I apoptozdur ve hücre büzüşmesi, membran tomurcuklanması, DNA fragmentasyonu ve kromatin kondenzasyonu ile karakterizedir. Tip II otofajiktir, vakuollerin oluşumu ve sitozolik materyaller ve organellerin oluşumuyla karakterizedir. Son olarak Tip III nekrozdur, membran bütünlüğü kaybı ve organellerin şişmesi ile karakterizedir (71, 72). Ancak 2018’de Uluslararası Hücre Ölümü Terminoloji Komitesinin yayınladığı kılavuzda hücre ölümü türleri morfolojik özelliklerinin yanı sıra fonksiyonel yönleri, enzim alımını ve immünolojik tepkileri dikkate alarak sınıflandırmıştır (73). Hücre ölümü türleri programlı olmayan hücre ölümü ve programlı hücre ölümü olarak iki kategoride incelenebilmektedir. Programlı olmayan hücre ölümü nekrozu temsil etmektedir (74). Nekroz; hücrenin radyasyon, ısı, kimyasallar gibi etkenlerden şiddetli hasar görmesi sonucu oluşan enerjiden bağımsız bir hücre ölümüdür. Nekroz, plazma zarı bütünlüğünün kaybı, organel ve hücre şişmesi, hücre lizisi ile karakterizedir. Zararlı hücre içi bileşenlerinin sızması komşu hücrelere zarar verebilir ve inflamasyonu tetikleyebilmektedirler (75, 76).

Programlı hücre ölümü tüm çok hücreli organizmalar için önemlidir. Çalışmalar programlı hücre ölümü olan apoptoza yoğunlaşmış olsa da apoptotik olmayan nekroptoz, piroptoz gibi apoptotik olmayan programlı hücre ölümü türleri de bulunmaktadır. Bu türler apoptozdan bağımsız olarak indüklenebilir ya da apoptoz gerçekleştirilemediğinde devreye girmektedirler (77). Apoptoz, programlı hücre ölümünün ilk tanımlanan türüdür ve doku homeostazında önemli bir rol oynamaktadır. Hücre döngüsüne, bağışıklık sisteminin normal çalışmasına ve embriyonik gelişime katkıda bulunmaktadır (78). Her hücre, ölüm veya hayatta kalım sinyali veren içsel bir mekanizmaya sahiptir. Bu sinyalde meydana gelen bir dengesizlik apoptoza neden olabilmektedir (79). Apoptoz sürecinde hücre morfolojisinde hücre büzüşmesi, plazma zarı tomurcuklanması, apoptotik cisimlerin oluşumu, kromatin kondenzasyonu ve DNA parçalanması değişiklikleri meydana gelmektedir (80). Hücre zarından fosfatidilserin gibi hücre yüzeyi belirteçlerinin salınması, makrofajların apoptotik cisimleri fagosite etmesine ve ikincil nekrozu önlenmesini sağlamaktadır (81).

Apoptozda kaspazlar merkezi bir görev üstlenmektedir. Bir hücrenin kaspaz aktivitesinin uygun şekilde düzenlenmemesi karsinojenez, otoimmünite, nörodejenerasyon ve immün yetersizliğe yol açan anormal apoptotik hücre ölümüyle sonuçlanmaktadır (79).

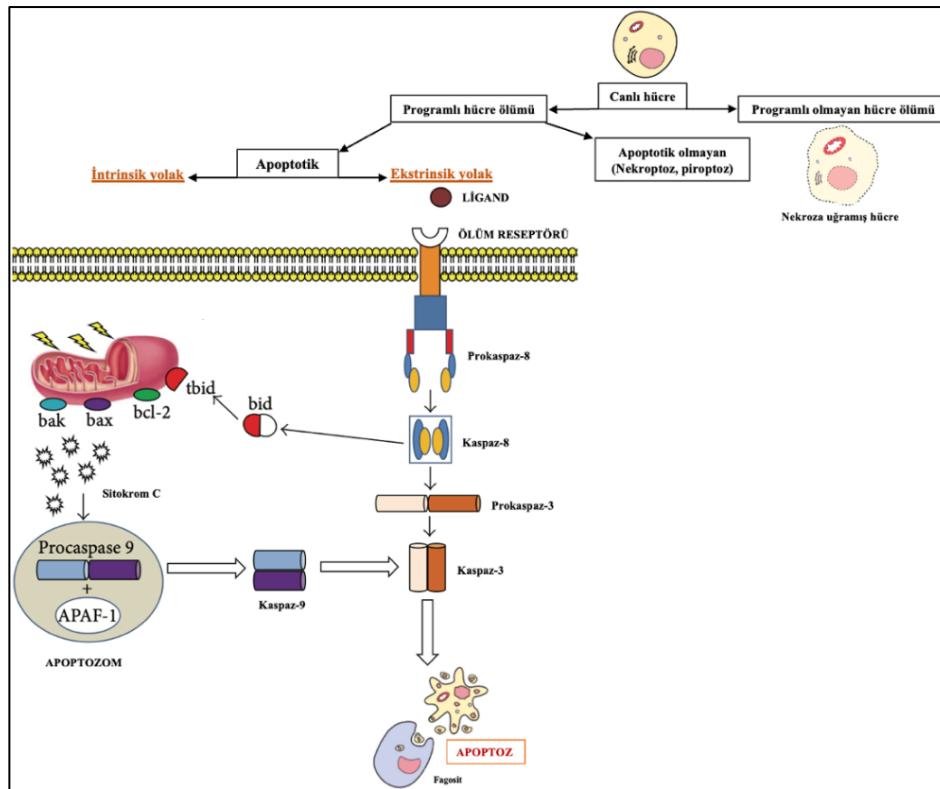
Kaspazlar, sistein-bağımlı-aspartat spesifik proteazlar ailesidir. 20 kD'luk büyük ve 10 kD'luk küçük katalitik alt birimlerinin takip ettiği bir amino-terminal alanından oluşmaktadırlar (79, 82). Hücre içinde inaktif prokaspazlar şeklinde sentezlenmektedirler. Apoptotik sinyal kaskadlarındaki konumlarına göre başlatıcı (kaspaz-2, -8, -9 ve -10) veya efektör/sonlandırıcı (kaspaz-3, -6 ve -7) kaspazlar olarak sınıflandırılmaktadırlar (82). Başlatıcı kaspazların amino terminal uçlarında kaspaz protein toplayıcı bölge (Caspase recruitment domain/CARD) ve ölüm etkileyici bölge (Death effector domain/DED) bulunmaktadır. Efektör kaspazlarda ise bu bölgeler bulunmaz bu nedenle aktive olmak için başlatıcı bir kaspaz tarafından kesilmeleri gerekmektedir (83).

Apoptozun gerçekleşmesi için kaspazların aktivasyonu gerçekleşmelidir, aktivasyonlarını da iki ana hücrel sinyal yolağı kontrol etmektedir. Bunlar ekstrinsik (ölüm reseptörü) ve intrinsik (mitokondriyal) yolaklarıdır (84). Ekstrinsik yolak, ölüm reseptörü ligandlarının bağlanmasıyla ya da bağıllık reseptörlerinin ayrılmasıyla indüklenmektedir. Kaspaz-8 ve -10 ölüm reseptörü aracılı, kaspaz-9 bağıllık reseptörü aracılı apoptozu başlatmaktadırlar (72). Ölüm reseptörleri tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) üst ailesinin bir alt kümesidir ve sitoplazmik kısımlarında ölüm bölgesine (Death domain) sahip olmalarıyla ayırt edilmektedirler (85). TNFR1, Fas, DR3, tümör nekroz faktör (TNF) ilişkili apoptoz indükleyici ligand reseptör 1 (TRAILR1), TRAILR2, ektodisplasin A ve sinir büyüme faktörü reseptörü (NGFR); tanımlanmış olan sekiz adet ölüm reseptörleridirler (86). Ölüm sinyallerinin ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla oluşan trimerik yapıya adaptör moleküller ve prokaspazların eklenmesi sonucu ölüme sebep olan sinyal kompleksi oluşmaktadır. Kompleks oluşumdan sonra prokaspaz-8 aktif formu olan kaspaz-8'e dönüşmektedir. Kaspaz-8, direkt veya dolaylı olarak kaspaz-3'ü aktive etmektedir. Kaspaz-3'ün aktivasyonu çeşitli hücrel bileşenlerin proteolitik parçalanmasını ve proapoptotik faktörlerin aktivasyonu ile hücrel ölümün son aşamalarına yol açmaktadır (87). Sonuç olarak kaspaz aktive eden DNAz aktivasyonu DNA fragmentasyonuna neden olmaktadır (88).

Intrinsik (mitokondriyal) yolak, toksik ajanlar veya DNA hasarı ile hücre içi homeostazı dengesizliği ile tetiklenmektedir. Sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasıyla

sonuçlanan mitokondriyal dış zar geçirgenliğiyle karakterizedir (6). Bcl-2 ailesini oluşturan proapoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin apoptotik mekanizmalarda önemli düzenleyici rolleri bulunmaktadır. p53 proteini, Bcl-2 protein ailesinin düzeylerini regüle ederek intrinsik yolakta rol olmaktadır. Hasarlı hücrelerin apoptoz ile ölmelerini sağlar ve antiapoptotik proteinlerin salınımını azaltmaktadır (89). Proapoptotik/antiapoptotik protein oranı hücreye ne olacağına karar vermektedir. Oran yüksek ise hücre apoptoza daha fazla eğilimliken oran azaldığında hücre apoptoza daha az eğilimli hale gelmektedir (90).

Proapoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonu mitokondrinin dış zarındaki gözenekleri açarak iç zarının iyonlara ve çözünen moleküllere geçirgenliğini artırmaktadır. Artan iç zar geçirgenliği; matrikse doğru akışı, organelin şişmesini ve dış zarın yapısının bozularak sitoplazmada sitokrom c ekspresyonu ile sonuçlanmaktadır (89). Sitokrom c mitokondriden salındıktan sonra apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (APAF1) sitoplazmaya girerek adaptör sitokrom c molekülüne bağlanır. Kaspaz aktivasyonu için gerekli olan bu kompleks apoptozom olarak adlandırılmaktadır. Apoptozom, inaktif olan pro-kaspaz-9'a bağlanır ve aktif kaspaz-9 oluşur. Kaspaz-9'da efektör olan kaspaz-3, -6 ve -7'yi aktive ederek apoptozun sonlandırılmasını sağlamaktadır (43, 91) (Şekil 5).



Şekil 5. Hücre ölümü ve mekanizmaları (Loreto'dan, 92)

Kanser hücrelerinde Bcl-2 ve Bcl-XL gibi bazı antiapoptotik proteinlerin düzeyleri artmıştır. Böylece kanser hücreleri apoptozu inhibe ederek sağ kalabilmektedirler. p53 proteini, hem proapoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerini hem de spesifik ölüm reseptörlerinin ekspresyonunu indüklemektedir. Bu nedenle, p53 aktivitesini teşvik eden terapötik stratejiler, her iki yolla da apoptozun indüklenmesini kolaylaştırabilir. Ayrıca ilaçlarla veya katı tümörlerde gen düzenlemesiyle kaspazları hedef alan yeni antikanser terapötik stratejiler geliştirilme aşamasındadır (6).

2.4. *Epimedium* Cinsi

Epimedium, Berberidaceae familyasına ait en büyük otsu cinstir. Çin, *Epimedium* cinsinin çeşitlilik ve dağıtım merkezidir ayrıca yeni türlerin keşfedilebileceği tek yerdir. Toplam türlerin yaklaşık %80'i Çin'in merkezinde ve güneydoğusunda bulunmaktadır. Türler, Çin dışında Akdeniz bölgesi, Batı ve Doğu Asya'da düzensiz bir şekilde ormanlık ve çalılık alanlarda dağılım göstermektedir. 1753'te Linnaeus cinse ait ilk tür olan *Epimedium alpinum*'u kaydettikten sonra Morren ve Decaisne (1834), Fischer ve Meyer (1846), Franchet (1886), Komarov (1908) ve Stearn (1938-2002) tarafından cinsin monografik ve sistematik çalışmaları gerçekleştirilmiştir (18, 93). *Epimedium* cinsi bitkilerin kimyasal içerikleri incelendiğinde prenillenmiş flavonoidler ana bileşen olmak üzere 260'tan fazla bileşik tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarla birlikte *Epimedium* ve aktif bileşiklerinin geniş çaplı farmakolojik etkilere sahip olduğu görülmüştür (94). Bu cinse ait bitkilerin toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstraktlar afrodizyak ve antiromatizmal etkileri nedeniyle Çin, Japonya ve Kore'de kullanılmaktadır. Ayrıca cinsel işlev bozuklukları, kemik erimesi, kardiyovasküler hastalıkları ve astım gibi hastalıkların tedavisinde yardımcı olarak kullanılmaktadır (95).

2.4.1. *Epimedium* Cinsi'ne Ait Botanik Bilgiler

Cinsin ait olduğu Berberidaceae familyası, kabul edilmiş 13 cins ve 747 türden oluşmaktadır (96) (Tablo 1). Familyanın ikinci en büyük genusu olan *Epimedium* cinsine ait 69 tür bulunmaktadır (97). Türlerin büyük bir kısmı Çin'de endemikken küçük bir kısmı Kore, Japonya, Türkiye, Bulgaristan, Cezayir ve İran'ın yanı sıra Rusya'nın uzak doğu bölgesi, Batı Himalayalar, Kuzey Afrika, Kafkasya bölgesi, Kuzey İtalya ve Akdeniz bölgesinde dağınık olarak yer almaktadırlar (98).

Tablo 1. *Epimedium* cinsinin bitki sistematikteki yeri (14)

Bölüm	Spermatophyta
Alt Bölüm	Angiospermae
Sınıf	Dicotyledones
Alt Sınıf	Dialypetalae
Takım	Ranales
Familiya	Berberidaceae
Cins	<i>Epimedium</i> L.

Epimedium doğal olarak nemli ormanların altındaki kayalıklarda, akarsulara yakın alanlarda ve 200-3700 metre rakımlarda, ıslak arazilerde yetişmektedir. Yetiştirmek istendiğinde nemin yüksek olduğu, güneş ışığından korunan asitli toprağa ekilmelidir. Büyüme koşullarının *Epimedium* türlerindeki bileşenlerin içeriğini etkilediği bilindiğinden bitki büyütülürken uygun koşullar sağlanmalıdır. Mart ayından Mayıs ayı sonunda kadar olan süre üreme dönemidir ve yeterli ışığa ihtiyaç duymaktadır. Kurak ve sıcak günlerde sulanmalıdır (94, 98).

Epimedium türleri; az büyüyen, yaprak döken, dayanıklı, çok yıllık bitkilerdir. Yaprakçıkları ovat, kordat veya akuminat şekillerinde, uzunlukları 2.5-13.5 cm ve genişlikleri 1.5-7.5 cm olabilmektedir. Çiçekleri Piskopos şapkasına benzer ve mor, pembe, sarı, beyaz renklerindedirler. Çiçeğin dörder adet iç ve dış olmak üzere sekiz adet çanak yaprağı vardır. Dıştakiler eşit boyda değildirler ve içtekiler petaloiddir. Çiçeğin 1 ovaryumu ve 4 stamini vardır (14, 94). *Epimedium* türlerinde bitkilerin çiçek boyu, petal tipi ve iç çanak yaprakları gibi özellikler sınıflandırılmasında önemlidir. Türlerin petalleri önemli bir çeşitlilik göstermektedir (93). Yaprakçık sayısı, çiçekli gövde üzerindeki yaprak sayısı ve yaprakçıkların morfolojisi önemlidir. Yapraklar karakteristiktir ve sadece yapraklardan cins tanımlanabilmektedir. Rizom şekli yani uzama ve kalınlık derecesi her tür için nispeten sabittir. Gövdesi düz ve yuvarlaktır, az çeşitlilik göstermesine rağmen bazı türler için özgündür (18).

2.4.2. *Epimedium* Cinsi'nin Etnofarmakolojik Kullanımı

Epimedium türlerinin yapraklarının dışında rizomları başta Guizhou eyaleti olmak üzere Çin'in bazı bölgelerinde kullanılmaktadır. Yapraklar erkeklerde cinsel işlev

bozuklukları, osteoporoz ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılırken rizomlar romatoid artrit ve astım tedavisinde kullanılmaktadır (16).

Beş farklı *Epimedium* türünün kurutulmuş yapraklarından elde edilen Epimedii folium, 2010 yılında Çin Farmakopesi'ne eklenmiştir. Bu karışım Çin'in farklı bölgelerinde karaciğer ve böbreğin rejenerasyonu, böbrek yetmezliği, impotens, romatizma, uyuşukluk spazmını tedavi etmek için kullanılmaktadır. Ayrıca hastalıkları önleyen ve vücudu güçlendiren bir takviye olarak da kullanılmaktadır. Epimedii folium, Çin ve Japonya'da tek başına veya formülasyonlarıyla osteoporoz, cinsel işlev bozukluğu, hipertansiyon ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (11).

Epimedium türlerinin toprak üstü ve toprak altı kısımları Çin halk ilaçlarında anti-romatizmal ilaç olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Kore'de *Epimedium koreanum* geleneksel olarak impotens, spermatore ve unutkanlık için kullanılmaktadır (16, 95).

Epimedium acuminatum Franch. türünün toprak üstü kısımları 2000 yıldan fazla bir süredir Çin, Japonya ve Kore'de tonik, afrodizyak ve anti-romatizmal olarak yaygın kullanıma sahiptir (99). *Epimedium brevicornum* Maxim., binlerce yıldır kardiyovasküler hastalıklar, kısırlık, impotens, amnezi, lumbago, artrit ve uzuvların uyuşma ve zayıflığının tedavisinde Çin'de yaygın olarak kullanılmaktadır (100). *Epimedium* türlerinden izole edilen ikarin bileşeni, erkeklerde cinsel işlevin artırılmasında ve yaşlanmayla ilgili hastalıkların tedavisinde tıbbi bitkisel tonikler olarak Asya ülkelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (101).

2.4.3. *Epimedium* Cinsi'nin Kimyasal Bileşenleri

Epimedium türlerinden flavonoidler, polisakkaritler, uçucu yağlar, fitoseroller, fenolik asitler ve alkaloitler dahil olmak üzere 260'tan fazla bileşen izole edilmiştir (17). 141 flavonoid, 31 lignin, 12 iyonon, 9 fenol glikozit, 6 feniletanoid glikozit, 5 seskiterpen ve çok sayıda ikincil metabolitten oluşan çeşitli kimyasal içerik profiline sahiptir. Bunlardan en iyi bilinenleri flavonoidlerken en belirgin bileşenler prenillenmiş flavonoidlerdir (102). Flavonoidlerden özellikle ikarin, epimedin A, epimedin B ve epimedin C'nin biyolojik olarak aktif olduğu bilinmektedir (103). İkarin ana aktif bileşendir. İkarisit II başka aktif bir flavonoid glikozittir ve ikarinin enzimatik hidrolizinden elde edilen bir *in vivo* farmakolojik metabolitidir (11). Baohuozit I, baohuozit II, epimedin A, epimedin B, epimedin C, kuersitrin, sagittatozit A, sagittatozid B, hiperozit, ikarisit I,

ıkarin ve astragalin izole edilen diğ er bileşiklerdir ve farmakolojik olarak çeşitli özelliklere sahiptirler (17).

2.4.4. *Epimedium* Cinsi'ne Ait Biyolojik ve Farmakolojik Çalışmalar

Epimedium türlerine ait biyolojik ve farmakolojik çalışmalar, türlerin antitümör, anti-osteoporoz ve yaşılanma karşıtı gibi çeşitli aktivitelerinin olduğunu ayrıca kardiyovasküler sistem, bağışıklık sistemi ve kemik metabolizması üzerinde de düzenleyici etkilerinin olduğunu göstermektedir (104).

Farelerde yapılan bir deneyde *Epimedium sagittatum*'un yapraklarının metanol ekstresinin makrofajlar üzerinde uyarıcı bir etki gösterdiği ve retiküloendotelial sistemin fagositik aktivitesini desteklediği görülmüştür. Başıka bir çalışmada *E. sagittatum*'un kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda immün yetmezliği ve cinsel işılev bozukluğunu iyileştirdiği bildirilmişt  r (105). Post-menopozal kadınlarda, 24 aylık randomize, çift k  r ve plasebo kontrollü bir çalışma yapılmıştır. *Epimedium* türevli fitoöstrojen flavonoitlerin endometriyum üzerinde saptanabilir bir hiperplazi etkisine yol a  madan post-menopozal kadınlarda kemik kaybını önlemede yararlı etki gösterebildiği sonucuna ulaşılmıştır (106).

Erektile disfonksiyonu üzerindeki etkilerini araştırmak için yapılan klinik, çift kör bir çalışmada en az 45 gün boyunca bir grup erkeğe sildenafil verilirken diğer gruba da *Epimedium folium* takviyesi verilmişt  r. Bunun sonucunda da takviye kullananların sildenafil kullananlara oranla cinsel doyumunu daha fazla artırdığı görülmüştür (107).

Farklı bir çalışmada *Epimedium* ekstresinin ve ıkarin bileşiminin periferik sinir onarımı üzerindeki etkileri ezilme yarası olan bir sıçan modelinde araştırmıştır.   karin gruplarının kontrole göre *Epimedium* ekstresi gruplarının ise hepsine göre daha iyi iyileşme gösterdiği görülmüştür. Bunun sonucunda da *Epimedium* ekstresinin periferik sinir yenilenmesini etkili bir şekilde desteklediğini ve hasarlı sinirlerin işılevini iyileştirdiğini göstermektedir (108).

Epimedium folium'un farklı konsantrasyonlardaki etanol ekstrelerinin insan meme kanseri (MCF-7) hücrelerindeki antiproliferatif etkisi incelenmişt  r. %95'lik etanol ekstresinin (100–800 µg/mL) hücrelerin çoğalmasını yüksek   l  de engellediği belirlenmişt  r. %70'lik etanol ekstresinin bir miktar çoğalmayı engellediği %20 ve 40'lık etanol ekstrelerinin ise dikkate değer bir engelleme yapmadığı g  zlemlenmişt  r (109).

Epimedii folium'dan izole edilen ikaritinin aktive edilmiş hepatik stellat hücrelerinde intrinsik yolakla apoptozu indüklemekte olduğu ve sıçanlarda karaciğer fibrozunun gelişimini iyileştirdiği görülmüştür (110).

Epimedium türlerinden elde edilen ve ana bileşen olan ikarin, kanser hastalarında lenfokinle aktive olmuş doğal öldürücü hücre ve doğal öldürücü hücre aktivitesini artırmaktadır (105). İkarin; reaktif oksijen türlerine bağlı, c-Jun N-terminal kinaz ve p38 yollarını inhibe ederek H9c2 sıçan kardiyomiyosit hücrelerini anjiyotensin II'nin neden olduğu hipertrofi ve apoptozdan korumaktadır (111).

Hepatosellüler karsinom tedavisinde kullanılan arsenik trioksitin ikarin ile kullanıldığındaki aktivitesi incelenmiştir. İkarinin arsenik trioksitin aktivitesini *in vitro* ve *in vivo* olarak güçlendirdiği bunu da hücre içi reaktif oksijen türler üreterek ve NF-κB aktivitesini inhibe ederek gerçekleştirdiği sonucuna ulaşılmıştır (112).

İkarinin hepatosellüler karsinom (HepG2) hücrelerinin proliferasyonu ve hücre iskeleti üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla bir çalışma yapılmış ve kontrol olarak oksaliplatin kullanılmıştır. İkarinin kontrol grubuna kıyasla Bcl-2 protein ekspresyonunu azaltarak apoptozu desteklediği ve aktin hücre iskeletini bozduğunu göstermiştir (113).

İkarinin A549 hücrelerine karşı antikanser etkileri *in vivo* ve *in vitro* olarak incelenmiş ve bu süreçteki endoplazmik retikulum stres (ERS) sinyalinin rolü araştırılmıştır. Sonuç olarak ikarin tedavisinin dozu ve süresi arttıkça kanser hücrelerinin canlılığının azaldığı ERS ilişkili moleküllerin arttığı görülmüştür. Ayrıca kaspaz-3 aktivitesi ve reaktif oksijen türlerinin sayısı artmıştır. Apoptozla ilişkili bir protein olan PUMA'nın ekspresyonunun arttırdığı ve Bcl-2 protein ekspresyonunu azaltarak hücrelerin büyümesini inhibe ettiği gözlemlenmiştir (114).

E. alpinum L. bitkisinin toprak üstü ve toprak altı kısımlarının metanol ekstratlarının kronik miyeloid lösemi (K562) hücrelerindeki sitotoksikite aktivitelerini belirlemek için bir çalışma yapılmıştır. Ekstrelerin doza bağımlı aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur (115).

E. koreanum Nakai sulu ekstresinin antiviral etkilerinin incelendiği bir çalışmada western blot analizi, ekstrenin influenza viral protein ekspresyonunu doza bağlı bir şekilde azalttığını ortaya koymaktadır. Ekstrenin viral bağlanmayı doğrudan engelleyerek influenza A virüsü enfeksiyonu üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu da ortaya koyulmuştur (116).

Epimedium wushanense bitkisinin flavonoitlerinin önemli antioksidan ve antimikrobiyal aktivite gösterdiği ortaya koyulmuştur (117).

2.4.5. *Epimedium pubigerum* (DC.) C. Moren & Decne Türü

Türkiye’de “keşikülâhı” ve “tekeotu” olarak bilinen cinse ait iki tür doğal olarak yetişmektedir. Bunlardan biri *Epimedium pubigerum* (DC.) C. Moren & Decne türüdür ve İstanbul, Zonguldak, Kastamonu, Samsun, Ordu, Tokat, Giresun ve Trabzon illerinde yetişmektedirler (14, 118). Çok senelik otsu bir bitkidir. Boyu 30-50 cm olabilmektedir, rizomu 1 cm kadar boğumlu ve yataydır. Gövdesi dik ve silindir şekilde, seyrek tüylü ve tek yapraklıdır. Yaprakları biternat, yaprakçıkları kalp şeklindedir. Çiçekler dört petal ve sepalden oluşur, petalleri soluk kırmızı renklidir (Resim 1). Mart-Mayıs aylarında da çiçeklenmektedirler (119). Cinse ait diğer türler gibi yapısında ikarin, epimedin A, epimedin B ve epimedin C gibi biyolojik olarak aktif olan bileşikler bulunmaktadır (103).



Resim 1. *Epimedium pubigerum* (DC.) C. Moren & Decne bitkisine ait görseller

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan cihazlar ve markaları

Cihazın Adı	Marka
Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik
CO ₂ ’li inkübatör	Esco Lifesciences
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik
Derin dondurucu (-80 °C)	Thermo Scientific
Dikey elektroforez ve transfer sistemi	Bio–Rad
Elektroforez güç kaynağı (Yatay)	Bio–Rad
Görüntüleme sistemi	Thermo Scientific
Hassas analitik terazi	Ohaus
Hücre kültürü biyogüvenlik kabini	Thermo Fischer
Ters ışık mikroskobu	Zeiss
Jel görüntüleme sistemi	Bio–Rad
LC–HR/MS	Thermo Q Exactive
Manyetik karıştırıcı	Heidolph MR
Membran görüntüleme sistemi	Bio–Rad ChemiDoc™ MP
UV–Vis Spektrofotometre	Thermo Scientific Multiskan Go
Orbital çalkalayıcı	Bio-Rad UltraRocker™ Rocking platform
Otomatik pipetler	Socorex
pH metre	Ohaus
Rotary evaporatör	Heidolph
Su banyolu çalkalayıcı	Memmert
Soğutmalı santrifüj	Sigma
Vorteks	Wisd
Yatay DNA elektroforezi	Bio-Rad

3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Ekipmanlar

Kullanılan kimyasal maddeler ve ekipmanlar Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan kimyasallar, marka ve kodları

Kimyasal Adı	Marka/ Kodu
Agaroz	Sigma/ A9539
Alüminyum klorür ($AlCl_3$)	Fluka/ 06220
Amonyum asetat ($NH_4CH_3CO_2$)	Isolab/ 903.026.1000
Amonyum persülfat (APS)	Bio-Rad/ 161-0700
Asetik asit	Sigma/ A6283
A549 hücre hattı	ATCC/ CL-185™
Bikinkoninik asit (BCA) protein miktarı tayin kiti	Thermo Scientific/ 23225
BEAS-2B hücre hattı	ATCC/ CRL-9609™
Bromofenol mavisi	Sigma/ B0126
Clarity Western ECL Substrate	Bio-Rad/ 1705061
Demir (II) sülfat ($FeSO_4$)	Carlo Erba/ 344957
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco/ 41966-029
Doksorubisin HCl (DOX)	Sigma-Aldrich/ D2975000
2,2-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH)	Aldrich/ D9132
Ditiyoeritrol	Sigma/ 43815
Etanol	Supelco/ 1009832511
Etidyum bromür (EB)	Sigma/ E7637
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco/ 10500064
Folin-Coicalteu reaktifi	Sigma-Aldrich/ F9252
Fosfomolibdik asit	Sigma-Aldrich/ 221856
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Sigma-Aldrich/ 18312
İzopropanol	Sigma Aldrich/ I9516-1L
96 kuyulu plaka	Nest/ 701001
Gliserol	Sigma/ G5516
pBR322 plazmid DNA	Thermo Scientific/ SD0041
Metanol	Isolab/ 947.046.2500

Tablo 3. (Devam)

Kimyasal Adı	Marka/ Kodu
0.5 mm uçlu kazıyıcı	SPLScar™/ 201924
3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-difenil tetrazolyum bromür (MTT)	Sigma Aldrich/ M2128
Sodyum hidroksit (NaOH)	Tekkim/TK.170510.01000
Penisilin-streptomisin (10.000 U/mL)	Gibco/ 15140122
Fenil metil sülfonil florid (PMSF)	Sigma/ 78830
Ponceau S	Sigma/ P7170
Polivinilidin florür (PVDF) membran	Bio-Rad/ Immun Blot PVDF membran
Sodyum florür (NaF)	Sigma/ S7920
Sodyum karbonat (Na ₂ CO ₃)	Sigma/ S7795
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma/ L4390
Sodyum ortovanadat (NaVan-Na ₃ VO ₄)	Sigma/ S6508
Tetrametiletilediaminden (TEMED)	Sigma/ T9281
TGX Stain-Free FastCast %10 Acrylamide Kit	Bio-Rad/ 161-0183
Triton X 100	Sigma/ T8787
Trisma baz	Sigma/ T1503
Yağsız süt tozu	Monn bio skimmed milk powder

3.1.3. Antikorlar

Kullanılan antikorlar Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan antikorlar, marka ve kodları

Antikor Adı	Marka/ Kodu
Anti-mouse IgG HRP-linked antikor	Bio-Rad/ 170-5047
Anti-rabbit IgG HRP-linked antikor	Bio-Rad/ 170-5045
Anti β -aktin (8H10D10) antikor	Cell Signaling Technology / 3700S
Sitokrom c (D18C7) antikor	Cell Signaling Technology / 11940S
P53 Ab antikor	Cell Signaling Technology / 9282S
Anti-kaspaz-3 antikor	Cell Signaling Technology / 9662S

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Bitki

Bu tez çalışmasında kullanılan *E. pubigerum* bitkisi çiçekli durumda iken yaprak, çiçek ve rizomları 23 Nisan 2022 tarihinde Trabzon Dernekpazarı Zincirlitaş köyünden toplanmıştır. Bitkinin tespiti Doç. Dr. Yeter YEŞİL CANTÜRK ve Dr. Öğr. Üyesi Nurdan YAZICI BEKTAŞ tarafından yapılmıştır ve İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumuna bir numune örneği bırakılmıştır (ISTE 118075).

Ekstraksiyon çalışmaları Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Meslek Bilimleri Bölümü Farmakognozi Anabilim Dalı Laboratuvarlarında Dr. Öğr. Üyesi Nurdan YAZICI BEKTAŞ'ın desteğiyle gerçekleştirilmiştir.

3.1.5. Kullanılan Çözeltiler

Kullanılan çözeltiler, içerikleri ve hazırlanışları Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Kullanılan çözeltiler, içerikleri ve hazırlanışları

Çözelti Adı	İçerik ve Hazırlanış
0.5 N Folin reaktifi çözeltisi	2.5 mL 2 N Folin-Ciocalteu fenol reaktif çözeltisi deiyonize suyla hacmi 10 mL'ye tamamlandı.
5 mg/mL gallik asit çözeltisi	3.9 mg gallik asit, 780 µL metanolde çözüldü.
%10'luk Na ₂ CO ₃ çözeltisi	3 g Na ₂ CO ₃ , 15 mL deiyonize suda çözüldü. Hacmi 30 mL'ye tamamlandı.
5 mg/mL kersetin çözeltisi	5 mg kersetin, 1000 µL metanolde çözüldü.
%2 H ₂ O ₂	1 mL %30'luk H ₂ O ₂ , 14 mL deiyonize suda seyreltili.
1 mM FeSO ₄ çözeltisi	4.170 mg FeSO ₄ , 15 mL deiyonize suda çözüldü.
1 M amonyum asetat çözeltisi	770.8 mg amonyum asetat, 10 mL deiyonize suda çözüldü.
0.2 mM DPPH çözeltisi	3.2 mg 2,2-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH), 40.576 µL metanolde çözüldü.
%10'luk fosfomolibdik asit çözeltisi	207.6 mg fosfomolibdik asit, 20.760 µL etanolde çözüldü.

Tablo 5. (Devam)

Çözeltili Adı	İçerik ve Hazırlanış
50 mM Tris-HCl (pH 7) tamponu	302.75 mg Trizma baz bir miktar saf 35 mL deiyonize suda çözüldü. Seyreltik HCl ile pH değeri 7'ye ayarlanıp son hacmi 50 mL'ye tamamlandı.
Agaroz jel elektroforezi yürütme tamponu (10× TAE) (pH 8)	24.2 gram Trizma bazı, 5.6 mL asetik asit, 10 mL 0.5 M EDTA; 400 mL deiyonize suda çözüldü, hacmi 500 mL'ye tamamlandı.
1X TAE Yürütme tamponu	100 mL 10× TAE'ye 900 mL deiyonize su eklenerek seyreltilir.
Agaroz jel yükleme boyası	1 gram sodyum dodesil sülfat (SDS), 20 mg bromofenol mavisi (%0.2), 20 mg ksilen siyanol (%0.2), 3 mL gliserol (%30); hacmi deiyonize suyla 10 mL'ye tamamlandı.
%0.8'lik agaroz jel	800 mg agaroz, 100 mL 1×TAE'de ısıtıcıda kaynatılarak çözüldü. 7 µL 5 mg/mL etidyum bromür eklenerek agaroz jel tankına döküldü.
5 mg/mL etidyum bromür çözeltisi	50 mg etidyum bromür, 10 mL deiyonize suda çözülmüştür.
Tam hücre kültürü ortamı	DMEM, %10 (h/h) FBS, %1'lik (h/h) Antibiyotikler (10.000 µg/mL streptomisin + 10.000 ünite/mL, penisilin) toplam hacim 50 mL olarak hazırlandı.
MTT çözeltisi	250 mg MTT, 50 mL fosfat tamponunda çözülerek alıktlandı. Deney için tam kültür ortamı ile seyreltilerek 0.5 mg/mL son konsantrasyonda uygulandı.
1 M Tris-HCl (pH 7.4) tamponu	121.1 gram Trizma baz, 800 mL deiyonize suda çözüldü. Derişik HCl ile pH değeri 7.4'e ayarlanıp hacmi 1 L'ye tamamlandı.
5 M NaCl çözeltisi	14.61 gram NaCl, 50 mL deiyonize suda çözüldü.
%20 Triton X-100 çözeltisi	20 mL Triton X-100, 80 mL deiyonize suda çözüldü.

Tablo 5. (Devam)

Çözelti Adı	İçerik ve Hazırlanış
500 mM EDTA çözeltisi (pH 8)	20.81 gr EDTA tetrasodyum tuzu 75 mL deiyonize suda çözüldü. Derişik NaOH ile pH'ı ayarlanıp hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
50 mM NaPPi çözeltisi	1.115 gram NaPPi, 50 mL deiyonize suda çözüldü.
1 M NaF çözeltisi	2.1 gram NaF, 50 mL deiyonize suda çözüldü.
200 mM NaVan (Na ₃ VO ₄) çözeltisi	3.68 gram Na ₃ VO ₄ , 90 mL deiyonize suda çözüldü. pH değeri 10'a 1 N HCl ile ayarlandı. Çözeltinin renksiz olana kadar kaynatıldı ve soğutuldu.
100 mM PMSF çözeltisi	0.174 gram PMSF, 10 mL etanolde çözüldü.
Tris-Glisin-SDS (TGS) yürütme tamponu	80 mL 10× Tris-Glisin tamponu, 5 mL %20 SDS; 715 mL deiyonize suda çözüldü.
10× TBS çözeltisi	29.71 gram Trizma baz, 110 gram NaCl; 800 mL deiyonize suda çözüldü. Derişik HCl ile pH değeri 7.6'ya ayarlanıp hacmi 1 L'ye tamamlandı.
%0.1 Tween 20 içeren TBS çözeltisi	10× TBS çözeltisi deiyonize suyla 1×'e seyreltildi. 100 µL Tween 20 çözeltisi, 1× TBS ile 100 mL'ye tamamlandı.
5X yükleme tamponu	0.25 M Tris-HCl (pH 6.8), %10 SDS, %50 gliserol, %0.01 bromofenol mavisi; 10 mL çözeltide olacak şekilde eklendi. Son konsantrasyon 0.5 M olacak şekilde ditiyoeritrol eklendi.
%5'lik süt tozu çözeltisi	1.2 gram yağsız süt tozu, 24 mL %0.1 Tween 20 içeren TBS'de çözüldü.
TBST çözeltisi	100 mL 10× TBS, 800 mL deiyonize suyla seyreltildi. 2.5 mL %20'lik Tween 20 eklendi. Hacmi 1 L ye tamamlandı.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

E. pubigerum bitkisine ait herba (SME) ve rizom (RME) kısımları havada kurutulmuş ve toz haline getirilmiştir. Her iki kısımdan 20 gram olacak şekilde tartım yapılmıştır ve metanol eklenerek maserasyon yöntemiyle 8 saat boyunca ekstre edilmiştir. Bu işlem 3 defa tekrar edilmiş ve elde edilen ekstreler birleştirilip rotary evaporatörde yoğunlaştırılmıştır (14). Ekstreler, çalışma çözeltisi konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde metanol ile çözülerek çalışmaya hazır hale getirilmiştir. Elde edilen ekstreler ve çalışma çözeltisi çalışmalar boyunca kadar +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. LC-HR/MS Analizinin Gerçekleştirilmesi

E. pubigerum bitkisinden hazırlanan ekstrelerin fenolik ve flavonoit madde profili LC-HR/MS yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Ekstre numuneleri üzerine son konsantrasyonu 3 ppm olacak şekilde 100 mg/L’lik internal standart çözeltisi eklenmiştir. Numune 0.45 µm filtreden geçirilerek analize hazır hale getirilmiştir. Tablo 6’da HPLC ve gradiyent sistem şartları, Tablo 7’de kütle spektrometresi ve çevre şartları verilmiştir (120, 121).

Tablo 6. HPLC ve gradiyent sistem şartları

HPLC Şartları		
Mobil faz A: %1 Formik asit-H ₂ O		
Mobil faz B: %1 Formik asit-Metanol		
Analitik Kolon: Troyasil C18 HS- 150×3mm 5 µm		
Gradiyent sistem şartları		
Zaman	Mobil faz akış hızı	%B
0.00	0.35 mL/dakika	50
1.00	0.35 mL/dakika	50
3.00	0.35 mL/dakika	100
6.00	0.35 mL/dakika	100
7.00	0.35 mL/dakika	50
15.00	0.35 mL/dakika	50

Tablo 7. Kütle spektrometresi ve çevre şartları

Kütle spektrometresi şartları
Sistem: Thermo ORBITRAP Q-Exactive
İyon kaynağı: Elektrosprey iyonizasyon (ESI)
Kütle tarama aralığı: 100–900 m/z
Sheat gaz akış hızı: 45
Aux gaz akış hızı: 10
Sprey voltajı (kV): 3.80
Kapiler sıcaklığı (°C): 320
Auxiliary gas heater sıcaklığı (°C): 320
S-lens RF düzeyi: 50.0
Çevre Şartları
Sıcaklık: (22.0 ± 5.0) °C
Bağıl nem: (50±15) %rh

*Tanımlamalar İLMER Kütüphanesi'ne göre yapılmıştır.

3.2.3. Toplam Fenolik ve Flavonoit Madde Miktarı Tayini

E. pubigerum bitkisinden hazırlanan ekstrelerin toplam fenolik ve flavonoit madde miktarı tayini spektrofotometrik yöntem kullanılarak tespit edilmiştir.

3.2.3.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarı tayini Folin-Coicalteu reaktifi kullanılarak spektrofotometrik olarak incelenmiştir (122). Folin-Coicalteu reaktifi bir maddenin indirgeme kapasitesini ölçmektedir (123). Deney tüplerine farklı konsantrasyonlarda (0.3125–5 mg/mL) olacak şekilde 20 µL ekstrelerden eklenerek gerekli seyreltmeler metanol eklenerek gerçekleştirilmiştir. Ardından her bir tüpe 400 µL 0.5 N Folin-Coicalteu reaktifi, 680 µL deiyonize su ve 400 µL %10'luk Na₂CO₃ eklenmiştir. Elde edilen karışımlar 120 dakika karanlıkta bekletildikten sonra 96 kuyucuklu plakaya aktarılmıştır. Spektrofotometre cihazıyla 760 nm'de metanolden oluşan köre karşı absorbansları ölçülmüştür. Standart bileşik olarak gallik asit kullanılmıştır. Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarı gallik asit

kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/ekstrenin gram kuru ağırlığı olarak verilmiştir (124).

3.2.3.2. Toplam Flavonoit Madde Miktarı Tayini

Ekstrelerin toplam flavonoit madde miktarı tayini alüminyum nitrat kolorimetrik yöntemi kullanılarak incelenmiştir. 10 mg/mL olarak hazırlanan çalışma çözeltilerinden uygun miktarlarda alınarak 5 mg/mL'ye seyreltilmiştir. Deney tüplerine farklı konsantrasyonlarda (0.3125–5 mg/mL) olacak şekilde 250 µL ekstrelerden eklenerek gerekli seyreltmeler metanol eklenerek gerçekleştirilmiştir. Ardından her deney tüpüne 25 µL %10'luk AlCl₃, 25 µL 1 mM NH₄CH₃CO₂ ve 700 µL deiyonize su eklenmiştir. Elde edilen karışımlar 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldıktan sonra 96 kuyucuklu plakaya aktarılmış ve 415 nm'de etanolden oluşan köre karşı absorbansları spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Standart bileşik olarak kersetin kullanılmıştır. Ekstrelerin toplam flavonoit madde miktarı mg kersetin eşdeğeri (KE)/ekstrenin gram kuru ağırlığı olarak verilmiştir (125).

3.2.4. Antioksidan Aktivitenin İncelenmesi

3.2.4.1. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi

Bu yöntem, antioksidanların kararlı bir serbest radikal olan DPPH'ı süpürmesi sonucu rengin giderek açılması temeline dayanan spektrofotometrik bir deneydir. Ekstrelerin DPPH'ı süpürme kapasitesi ölçülmektedir (127). 10 mg/mL olarak hazırlanan çalışma çözeltilerinden uygun miktarlarda alınarak 1 mg/mL'ye seyreltilmiştir. Ardından kuyu içleri farklı konsantrasyonlarda (20–200 µg/mL) olacak şekilde ekstreler 96 kuyucuklu plakaya eklenmiştir. Her kuyucuğa 200 µL 0.2 mM DPPH çözeltisi eklenerek 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. 517 nm'de absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (A₁). Kör olarak da 0.2 mM DPPH'ın metanoldeki çözeltisinin 517 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür (A₀). Bu çalışmada standart bileşik olarak gallik asit kullanılmıştır. DPPH radikallerinin inhibisyonu aşağıda verilen "Eşitlik 1" denklemi kullanılarak farklı konsantrasyonlar için hesaplanmıştır. Deney üç gün üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir ve değerlerin standart sapması hesaplanmıştır.

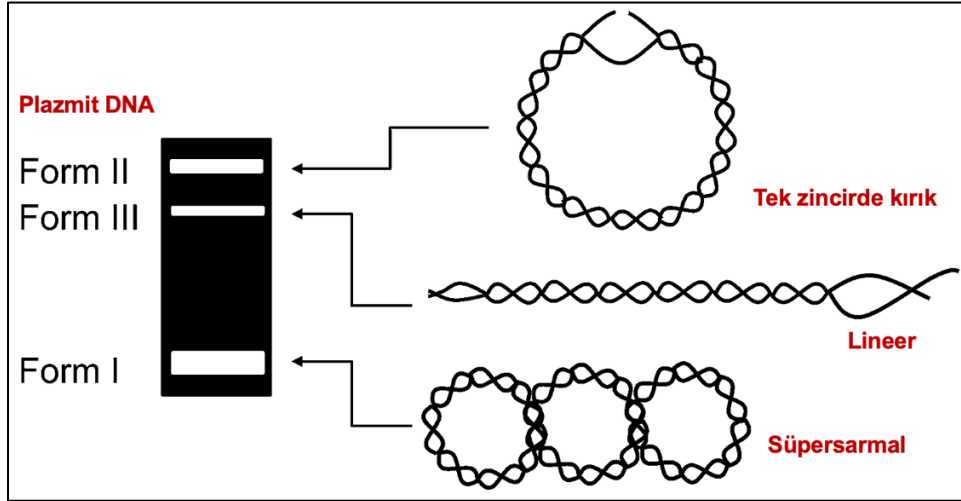
$$\%Inhibisyon = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 1})$$

3.2.4.2. Fosfomolibdenyum İndirgeyici Antioksidan Kapasite Ölçümü

PRAP deneyi, antioksidan varlığında molibden VI'nın molibden V'e indirgenmesi sonucu oluşan yeşil rengin absorbans değerlerinin ölçümüne dayanmaktadır (126). Deney tüplerinin her birine 400 µL %10'luk fosfomolibdik asit çözeltisinden eklenmiştir. Ardından 5 mg/mL olarak hazırlanan çalışma çözeltilerinden uygun miktarlarda alınarak 1 mg/mL'ye seyreltilmiştir. Deney tüplerinin farklı konsantrasyonlarda (40-200 µg/mL) olması sağlanacak şekilde 1 mg/mL konsantrasyonlardaki ekstrelerden 100 µL alınarak deney tüplerine eklenmiştir ve gerekli seyreltme etanol ile yapılmıştır. Kör olarak 400 µL %10'luk fosfomolibdik asitin 100 µL etanoldeki çözeltisi kullanılmıştır. Karışımlar Thermo-shaker cihazında 80 °C'de 30 dakika inkübe edilmiş ve 96 kuyucuklu plakaya aktararak 600 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. Standart bileşik olarak kersetin kullanılmıştır. Sonuç olarak absorbans değerleri verilmiştir.

3.2.5. DNA Etkileşim Çalışmaları

E. pubigerum bitkisinden hazırlanan ekstrelerin DNA etkileşim çalışmaları süpersarmal pBR322 plazmid DNA kullanılarak agaroz jel elektroforez yöntemiyle belirlenmiştir. Agaroz jel elektroforezi, elektriksel bir alan varlığında yüklü moleküllerin jel üzerindeki göçüne dayanmaktadır. Göç hızı moleküllerin büyüklüğüne ve yapısına, agaroz jel konsantrasyonuna, uygulanan elektrik akımının şiddetine ve iyonik kuvvete bağlı olarak değişmektedir (128). Süpersarmal plazmid DNA'nın ekstrelerle etkileşimi sonrasında zincirlerdeki kırılma durumuna göre farklı formlar oluşmaktadır. Kırılma olmadığı durumda süpersarmal konformasyonunda bir değişiklik meydana gelmez ve nispeten yüksek bir elektroforetik hareketliliğe sahip olan Form I oluşmaktadır. Tek zincirde kırılma olduğunda Form II oluşur ve yük yoğunluğu düşük olduğundan düşük bir elektroforetik hareketliliğe sahiptir. Her iki zincirde kırılma olduğunda lineer olan Form III oluşmaktadır. Form III, Form I ve Form II arasında bir hareketliliğe sahiptir (129) (Şekil 6). Deneyde kullanılmak üzere 5 mg/mL çalışma çözeltilerinden gerekli miktarlarda alınıp seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda (0.2-2.5 mg/mL) çalışma çözeltileri elde edilmiştir.



Şekil 6. Süpersarmal DNA'nın kırılma durumuna göre oluşan formlar (Li'den, 130)

3.2.5.1. DNA Hasarı Çalışması

Bu çalışma ekstreler süpersarmal pBR322 plazmid DNA üzerinde oluşabilecek hasarı tespit amacıyla gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel kuyu içerikleri 10 µL olacak şekilde oluşturulmuştur. Kuyu içerisine 1 µL süpersarmal pBR322 plazmid DNA, 7 µL tampon çözelti (50 mM Tris-HCl (pH 7)) ve kuyu içi konsantrasyonları 40–500 µg/mL olacak şekilde 2 µL ekstre eklenmiştir. Negatif kontrol olarak saf su kullanılmıştır. Standart bileşik olarak ise galik asit kullanılmıştır. Oluşturulan karışımlar jel yükleme boyasıyla %0.8'lik agaroz jele (0.25 µg/mL EB içeren) yüklenmiştir. 1× TAE yürütme tamponu ilavesinden sonra 100 V, 400 mA akım uygulanarak 90 dakika boyunca jelde yürütülmüştür. Sonuçlar BioRad Gel Doc XR system cihazı yardımıyla görüntülenip, Image Lab Version 4.0.1 programı ile nükleaz yüzdeleri hesaplanmıştır (131).

3.2.5.2. DNA Hasarından Koruma Etkisi

Bu çalışmada süpersarmal pBR322 plazmid DNA üzerinde farklı reaktifler kullanılarak hasar meydana getirilmiştir. Ekstrelerin DNA'yı bu hasarlara karşı koruyup korumadığını belirlemek amaçlanmıştır. Bu amacı gerçekleştirmek için agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır.

Fenton reaksiyonu: Fe^{3+} 'ün süperoksitle indirgenip Fe^{2+} olması ve Fe^{2+} 'nin H_2O_2 ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturması fenton reaksiyonu olarak bilinmektedir. Bu çalışmada fenton reaksiyonu gerçekleşmesi için 1 mM FeSO_4 ve %2 H_2O_2

kullanılmıştır. Ekstrelerin hidroksil radikalının neden olduğu DNA hasarına karşı koruyucu etkileri, Yeung ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemle göre belirlenmiştir (132).

Agaroz jel kuyu içerikleri 10 µL olacak şekilde oluşturulmuştur. Kuyu içerisinde 1 µL süpersarmal pBR322 plazmid DNA, 5 µL tampon çözelti (50 mM Tris-HCl (pH 7)), kuyu içi konsantrasyonları 40–500 µg/mL olacak şekilde 2 µL ekstre ve 1 µL 1 mM FeSO₄ ve 1 µL %2 H₂O₂ eklenmiştir. Negatif kontrol olarak saf su kullanılmıştır. Standart bileşik olarak ise gallik asit kullanılmıştır. Oluşturulan karışımlar jel yükleme boyasıyla %0.8'lik agaroz jele (0.25 µg/mL EB içeren) yüklenmiştir. 1× TAE yürütme tamponu ilavesinden sonra 100 V, 400 mA akım uygulanarak 90 dakika boyunca jelde yürütülmüştür. Sonuçlar BioRad Gel Doc XR system cihazı yardımıyla görüntülenip, Image Lab Version 4.0.1 programı ile nükleaz yüzdeleri hesaplanmıştır (131).

Işık varlığında metilen mavis: Metilen mavis boyası olarak kullanılan bir kimyasaldır ve aynı zamanda etkili bir fotoduyarlastırıcı bileşiktir. Işık varlığında metilen mavisinin singlet oksijen üreterek DNA üzerinde hasar oluşturduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (133). Bu çalışmada ekstrelerin ışık varlığında metilen mavis kullanılarak oluşturulan DNA hasarına karşı DNA'yı koruma potansiyeli incelenmiştir.

Agaroz jel kuyu içerikleri 10 µL olacak şekilde oluşturulmuştur. Kuyu içerisinde 1 µL süpersarmal pBR322 plazmid DNA, 6 µL tampon çözelti (50 mM Tris-HCl (pH 7)), kuyu içi konsantrasyonları 40–500 µg/mL olacak şekilde 2 µL ekstre ve 1 µL metilen mavis (500 µM) eklenmiştir. Negatif kontrol olarak saf su kullanılmıştır. Standart bileşik olarak ise gallik asit kullanılmıştır. Karışımlar önce 30 dakika beyaz ışığa (17.5 mW/cm²) daha sonra 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Oluşturulan karışımlar jel yükleme boyasıyla %0.8'lik agaroz jele (0.25 µg/mL EB içeren) yüklenmiştir. 1× TAE yürütme tamponu ilavesinden sonra 100 V, 400 mA akım uygulanarak 90 dakika boyunca jelde yürütülmüştür. Sonuçlar BioRad Gel Doc XR system cihazı yardımıyla görüntülenip, Image Lab Version 4.0.1 programı ile nükleaz yüzdeleri hesaplanmıştır (131).

3.2.6. Hücre Kültürü Çalışmaları

E. pubigerum bitkisinden hazırlanan ekstrelerin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinliklerinin tespit edilmesi amacıyla [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür] (MTT) hücre canlılık testi ve hücre göçü analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.1. MTT Testi ile Sitotoksosite

Bu çalışmada, ekstrelerin sitotoksosite profilleri MTT testi ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmada kanserli hücre olarak A549 hücreleri, sağlıklı hücre olarak ise insan bronş epitel (BEAS-2B) hücreleri kullanılmıştır.

Hücreler, DMEM (10% FBS, v/v)'de kültürlenmiştir ve %5 CO₂'lik nemli atmosferde 37 °C'de %1'lik antibiyotiklerle (10.000 µg/mL streptomisin ve 10.000 U/mL penisilin) desteklenmiştir. Her iki hücre kaplandıktan sonra 24 saat 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübe edilerek bir konfluent katman oluşturulmuştur. 24 saat sonra hücreler, %5 (v/v) dimetil sülfoksit (DMSO) içeren hücre kültürü ortamı ile seyreltilmiş çeşitli konsantrasyonlarda (0.125–1 mg/mL) SME ve RME ile muamele edilmiştir. Pozitif kontrol olarak DOX kullanılmıştır. 24 saatlik inkübasyonun ardından besiyeri uzaklaştırılmış ve ardından her kuyuya MTT (0.5 mg/mL) eklenmiştir. 2 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Bu sürenin ardından ortam uzaklaştırılıp formazan kristallerini çözmek için kuyulara 100 µL izopropanol ilave edilmiştir. Optik yoğunluk spektrofotometrik olarak 570 nm'de ölçülmüştür (134). Hücre canlılığı yüzdesi “Eşitlik 2” denklemi kullanılarak tespit edilmiştir.

$$\%Hücre\ canlılığı = \frac{OD_{kontrol} - OD_{tedavi}}{OD_{kontrol}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 2})$$

Her ekstrenin hedef kanserli hücre hattı üzerindeki etkinliklerini tanımlamak için seçicilik indeksi (SI), “Eşitlik 3” denklemi kullanılarak hesaplanmıştır (135).

$$SI = \frac{IC50_{BEAS-2B}}{IC50_{A549}} \quad (\text{Eşitlik 3})$$

3.2.6.2. Hücre Göçü Analizi

Ekstrelerin hücre göçü üzerindeki etkisini belirlemek için *in vitro* yara iyileştirme testi yapılmıştır. Ekstrelerin göç önleme potansiyelleri A549 hücrelerinin 72 saate kadar olan migrasyon hızlarıyla değerlendirilmiştir. A549 hücreleri, 24 kuyucuklu bir plaka içine 7x10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir ve bir konfluent katmanı oluşturmak üzere 24 saat inkübe edilmiştir. Ertesi gün çizik/yara oluşturmak için 0.5 mm uçlu kazıyıcı kullanılmıştır ve çizikler oluşturulduktan sonra her kuyucuk fosfat tamponlu tuz çözeltisi ile yıkanmıştır. Oluşturulan çiziklerin hemen görüntüsü alınmıştır (t₀). Bu aşamadan sonra, farklı konsantrasyonlarda (0.125–1 mg/mL) ekstreler uygulanmış ve 37°C'de %5 CO₂

ortamında inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak ortamla muamele edilen gruplar kullanılmıştır. İlk çizikten sonraki 24, 48 ve 72. saatlerde de çiziklerin görüntüleri alınmıştır ve migrasyon hızı ImageJ Software tarafından “Eşitlik 4”de verilen denklem ile analiz edilmiştir (136).

$$\%Yara iyileşmesi = \frac{(t_0 \text{ anında yara alanı}) - (t_{son} \text{ anında yara alanı})}{t_0 \text{ anında yara alanı}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 4})$$

t_0 : Çizik oluştuğu zaman

t_{son} : Çizik oluşturulduktan 72 saat sonrası

3.2.7. Western Blotlama Analizi

A549 hücrelerinde *E. pubigerum* bitkisinden elde edilen ekstrelerin hücre içi toplam sitokrom c, p53 ve kaspaz-3 ekspresyonu üzerindeki etkileri western blot yöntemi ile analiz edilmiştir. Protein elektroforezine hazırlık aşamasında homojenat elde etmek için içerisinde A549 hücrelerinin bulunduğu tüpler isimlendirilmiştir. Tüplerin içerisine 150 µL lizis tamponu eklenerek pipetaj yapılmış ve 15 dakika bekletilmiştir. Ardından rcf 13000×g, +4°C’de 10 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır. Tüp içerisinden süpernatantlar alınarak farklı eppendorflara aktarılmış çalışma boyunca buzda muhafaza edilmiştir.

Homojenatlardaki total protein tayini için bikinkoninik asit (BCA) protein ölçüm kiti kullanılmıştır. Kitte bulunan ve konsantrasyonu bilinen sığır serum albuminden (2 mg/mL) gerekli dilüsyonlar yapılarak 0–2000 µg/mL’lik standartlar hazırlanmıştır. Solüsyon A ve solüsyon B 50:1 oranında karıştırılarak çalışma hazırlanmıştır. Ekstrelerden ve standart çözeltilerden 25 µL alınarak 96 kuyucuklu plakanın kuyucuklarına eklenmiştir. Ardından her kuyucuğa 200 µL çalışma çözeltilisi eklenerek su banyosunda oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu oluşan renk değişimi 562 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Protein elektroforezi için jel hazırlanmasında TGX Stain-Free FastCast %10 Acrylamide Kit kullanılmıştır. Kit içerisinden çıkan *resolver A ve B* solüsyonlarından 3’er mL alınıp ve karıştırıldıktan sonra %10’luk APS çözeltilisinden 30 µL ve TEMED’ten 3 µL eklenerek ayırma jeli hazırlanmıştır. Ayırma jeli, jel standına yerleştirilen ve kısa camı öne bakan kısa ve uzun camlar arasına hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde dökülmüştür. Ardından kit içerisinden çıkan *stacker A ve B* solüsyonlarından 1’er mL alınıp ve karıştırılarak %10’luk APS’den 10 µL ve TEMED’ten 2 µL eklenerek yükleme jeli

hazırlanmıştır. Hazırlanan yükleme jeli, camlar arasına kısa camın üzerine çıkacak şekilde dökülüp ve tarak yerleştirilmiştir. Jellerin polimerizasyonunu sağlamak için 30 dakika beklenmiştir.

Jellerin polimerizasyonu gerçekleşirken numuneler yüklemeye hazır hale getirilmiştir. Bu işlem için de eppendorflar isimlendirilerek her birinde 30 µg protein olacak şekilde sırasıyla süpernatantlar ve 5× yükleme tamponu eklenmiştir. Deiyonize suyla son hacim 30 µL olacak şekilde karışımlar seyreltilmiştir. Numuneler vortekslenip 2-3 saniye de santrifüjlendikten sonra kaynar su banyosunda 2 dakika kaynatılmıştır. Ardından tekrar vortekslenip santrifüjlenerek hazır hale getirilmiştir.

Hazırlanan jeller, jel standından çıkarılarak deiyonize suyla yıkanıp kurulanmıştır. Taraklar çıkarılmadan önce kuyucuk yerleri asesat kalemiyle işaretlenerek görünür hale getirilmiştir. Jeller, uzun cam öne bakacak şekilde elektroforez tankına yerleştirilip jeller arasına TGS yürütme tamponu eklenerek sızdırma kontrolü yapılmıştır. Sızma olmadığı için tank uygun seviyeye kadar TGS yürütme tamponuyla doldurulup yükleme yapmak için taraklar çıkarılmıştır. Her jelin ilk kuyucuğuna 3 µL molekül ağırlık standardı eklenmiştir. Diğer kuyucuklara numunelerden 30 µL alınarak eklenerek yükleme işlemi tamamlanmıştır. Numuneler 100 V'da ortalama 90 dakika en son 25 kDa'lık molekül ağırlık çizgisi görülene kadar yürütülmüştür.

Transfer işleminde PVDF membran kullanılmıştır. Jellere uygun boyutta PVDF membran kesilerek 10 dakika orbital çalkalayıcıda metanolle ıslatılmıştır. Daha sonra 15 dakika da soğuk transfer tamponuyla çalkalayıcı da ıslatılmıştır. Bu esnada elektroforezde TGS yürütme işlemi tamamlanan jeller tanktan çıkarılarak deiyonize suyla yıkanmıştır. İnce bir spatula ile camlar ayrılarak jel üzerindeki kuyucuk ve protein bulunmayan kısımlar temiz bir jilet yardımıyla kesilmiş ve kalan kısım soğuk transfer tamponunun bulunduğu bir kaba aktarılmıştır. Transfer tamponu eklenmiş ayrı bir kaba, transfer kasedi siyah yüzü altta olacak şekilde yerleştirilmiştir. Üzerine sırayla transfer tamponuyla ıslatılmış sünger ve whatman kâğıdı koyulup üzerine de whatman kâğıdına aktarılmış jel koyulmuştur. Daha sonra tekrar transfer tamponunda ıslatılmış whatman kâğıdı ve sünger koyularak kasetin şeffaf yüzüyle kaset kapatılmıştır. Oluşturulan kasetler transfer tamponu dolu tanka yerleştirilmiş ve tank iç ortam sıcaklığının dengeli olması için tanka temiz bir buz aküsü ile balık koyulmuştur. Buz dolu bir kap içerisine yerleştirilen tank manyetik karıştırıcı üzerine koyularak 80 V'da 2 saat transfer işlemine bırakılmıştır.

Transfer işlemi tamamlandıktan işlemin doğruluğunu ve yeterliliğini teyit etmek için kasetten çıkarılan membran Ponceau S çözeltisiyle boyanmıştır. Daha sonra membran Ponceau S çözeltisinden deiyonize suyla yıkanarak arındırılmış ve saf metanolle de birkaç saniye yıkandıktan sonra oda sıcaklığında 15 dakika kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan membran metanolle ıslatılarak 3 kere 10'ar dakika olacak şekilde TBST çözeltisiyle yıkanmıştır.

Yıkama işleminden sonra membranlar bloklama işlemi için %5'lik süt tozu çözeltisi ile oda sıcaklığında 90 dakika orbital çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Bloklama sonrasında membranlar anti-sitokrom c (1:1000), anti-p53 (1:500) ve anti-kaspaz (1:1000) ve anti- β aktin (1:3000) antikorlarıyla +4°C'de orbital çalkalayıcıda gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün inkübasyon tamamlandıktan sonra membranlar TBST çözeltisiyle orbital çalkalayıcıda 3 kere 10'ar dakika yıkanmıştır. Membranlar sitokrom c, p53 ve kaspaz-3 proteinleri için anti-rabbit, β aktin için anti-mouse IgG HRP antikorlarıyla dilüsyon oranı 1:5000; %5'lik süt tozu çözeltisi olacak şekilde oda sıcaklığında 60 dakika orbital çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.

Sekonder inkübasyon tamamlandıktan sonra membranlar 3 kere 10'ar dakika daha TBST ile yıkanmıştır. Membranlar ECL solüsyonu ile yıkanarak görünür hale getirildikten sonra ChemiDocTM MP (Bio-Rad) görüntüleme cihazıyla uygun protokoller kullanılarak görüntülenmiştir. Kantitatif analizler için yoğunluk analizi Image J yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

3.2.8. İstatiksel Analiz

Tüm istatiksel analizler için GraphPad Prism Software version 6.0 kullanılmıştır. Gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları karşılaştırmak için T-testi kullanılmıştır. P değeri <0.05, sitotoksosite testi ve hücre göçü analizi deneyleri için istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Western blot analizleri Student T-testi ile analiz edilmiştir. $p < 0.05$, $p < 0.01$ ve $p < 0.001$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. LC-HR/MS Analiz Sonuçları

Bu çalışmada, *E. pubigerum*'dan elde edilen SME ve RME'nin fitokimyasal bileşenleri LC-HR/MS yöntemi yardımıyla incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 8'de sunulmuştur. Ayrıca ekstrelelere ait kromatogramlar EK 1'de sunulmuştur. Sonuçlara göre SME içerisinde 22, RME içerisinde ise 21 bileşiğin varlığı ortaya konulmuştur. Fumarik asit her iki ekstre içerisinde de en yüksek miktarda bulunan bileşik olarak kaydedilmiştir. Fumarik asit, RME içerisinde 12745.52 mg/kg, RME içerisinde ise 10460.05 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Bunun dışında RME içerisinde yüksek miktarda bulunan ikinci bileşik ise (-)-epikateşin olarak tespit edilmiştir.

Tablo 8. SME ve RME'nin fitokimyasallarının kantitatif tayini (mg/kg)

Bileşikler	m/z	R _t (SME) (dk)	SME (mg/kg)	R _t (RME) (dk)	RME (mg/kg)
Askorbik asit	175.0239	2.28	85.75	2.30	41.44
Klorojenik asit	353.0860	2.51	4380.15	2.51	358.53
Fumarik asit	115.0031	2.18	12745.52	2.18	10460.05
(-)-Epikateşin	289.0703	2.37	759.53	2.55	2192.92
Orientin	447.0910	3.03	0.80	3.97	0.22
Kafeik asit	179.0340	3.07	45.30	-	<LOD
(+)- <i>trans</i> taksifolin	303.0495	3.64	1.19	-	<LOD
Luteolin 7- rutinozit	593.1482	3.84	44.10	5.23	4.50
Vanilik asit	167.0341	3.88	482.11	3.89	208.92

Tablo 8. (Devam)

Bileşikler	m/z	R_t (SME) (dk)	SME (mg/kg)	R_t (RME) (dk)	RME (mg/kg)
Luteolin-7-glukozit	447.0910	3.94	207.69	3.97	3.06
Rutin	609.1430	4.20	72.84	4.72	237.79
Hiperozit	463.0858	4.31	1627.79	4.31	439.78
Dihidrokaempferol	287.0546	4.69	0.35	4.68	0.50
Oleuropein	539.1743	-	<LOD	4.76	1.37
Kersitrin	447.0910	5.00	158.13	5.01	44.84
Mirisetin	317.0287	5.08	1.64	5.07	0.12
Kersetin	301.0338	5.61	16.47	5.61	1.91
Naringenin	271.0598	5.66	1.74	5.69	1.44
Luteolin	285.0390	5.76	18.08	5.98	2.11
Asasetin	283.0597	7.01	3.01	7.01	1.17
Emodin	269.0442	8.36	0.75	8.37	6.48
Apigenin 7-O-açılglukozit	473.1071	5.70	4.08	5.71	154.19
Apigenin 7-metilat	283.0600	7.01	0.40	7.01	0.17

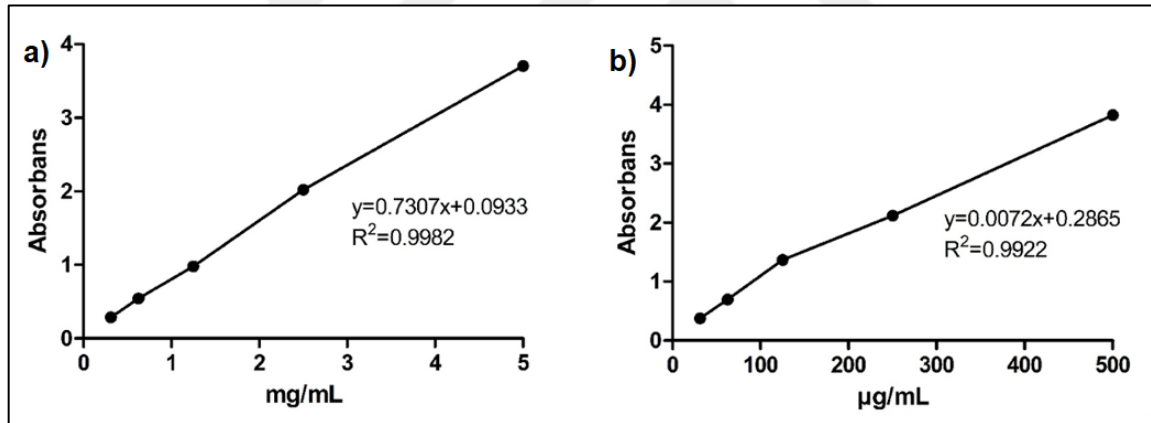
4.2. Toplam Fenolik ve Flavonoit Madde Miktarı Tayini

SME ve RME'nin toplam fenolik ve flavonoit madde miktarı tayini spektrofotometrik yöntemler kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 9'da sunulmuştur. Toplam fenolik madde miktarı tayini için standart bileşik olarak kullanılan gallik asite ait standart grafik ($R^2=0.9982$) (Şekil 7a), toplam flavonoit madde miktarı tayini için ise

kersetine ait standart grafik ($R^2=0.9922$) (Şekil 7b) çizilmiştir. SME ve RME'nin toplam fenolik içerikleri sırasıyla 104.64 ± 4.06 mg GAE/g kuru ağırlık ve 215.65 ± 8.11 mg GAE/g kuru ağırlık, toplam flavonoit içerikleri ise sırasıyla 50.20 ± 5.28 mg KE/g kuru ağırlık ve 23.52 ± 8.22 mg KE/g kuru ağırlık olarak bulunmuştur.

Tablo 9. SME ve RME'nin toplam fenolik ve flavonoit madde miktarı

	Toplam fenolik içerik	Toplam flavonoit içerik
	mg GAE/g kuru ağırlık	mg KE/g kuru ağırlık
SME	104.64 ± 4.06	50.20 ± 5.28
RME	215.65 ± 8.11	23.52 ± 8.22



Şekil 7. Gallik asit (a) ve kersetine (b) ait standart grafik

4.3. Antioksidan Aktivitenin İncelenmesi

4.3.1. DPPH Radikal Süpürme Aktivitesinin Belirlenmesi

Ekstrelerin radikal süpürme etkileri, DPPH yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 10'da verilmiştir. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak gallik asit kullanılmıştır. Sonuçlar, her iki ekstrenin de DPPH radikalini konsantrasyona bağlı bir şekilde süpürdüğünü ortaya koymuştur. RME'nin radikal süpürme yüzdeleri $80 \mu\text{g/mL}$ ve $200 \mu\text{g/mL}$ 'de sırasıyla $\%72.64 \pm 3.59$ ve $\%90.14 \pm 1.33$ olarak tespit edilmiştir. SME ve RME'nin IC_{50} değerleri sırasıyla $146.24 \mu\text{g/mL}$ ve $64.79 \mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır.

Gallik asit 20, 40 ve 80 µg/mL'de RME'den daha yüksek aktivite gösterse de, 200 µg/mL'de benzer aktivite göstermiştir.

Tablo 10. Ekstrelerin DPPH radikal süpürme aktivitelerinin yüzdesi (%)

%	20 µg/mL	40 µg/mL	80 µg/mL	200 µg/mL
SME	6.59±2.89	15.27±2.99	27.62±3.30	68.01±2.70
RME	21.50±4.87	43.32±4.91	72.64±3.59	90.14±1.33
Gallik asit	92.07±0.50	91.96±0.63	92.00±0.65	92.16±0.57

4.3.2. PRAP Aktivitesinin Belirlenmesi

Ekstrelerin PRAP aktiviteleri, spektrofotometrik yöntem kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 11'de verilmiştir. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak kersetin kullanılmıştır. Sonuçlar her iki ekstrenin de konsantrasyona bağlı olarak PRAP aktivitesinde artış olduğunu ortaya koymasına rağmen pozitif kontrol olarak kullanılan kersetine göre düşük absorbans gösterdiği belirlenmiştir.

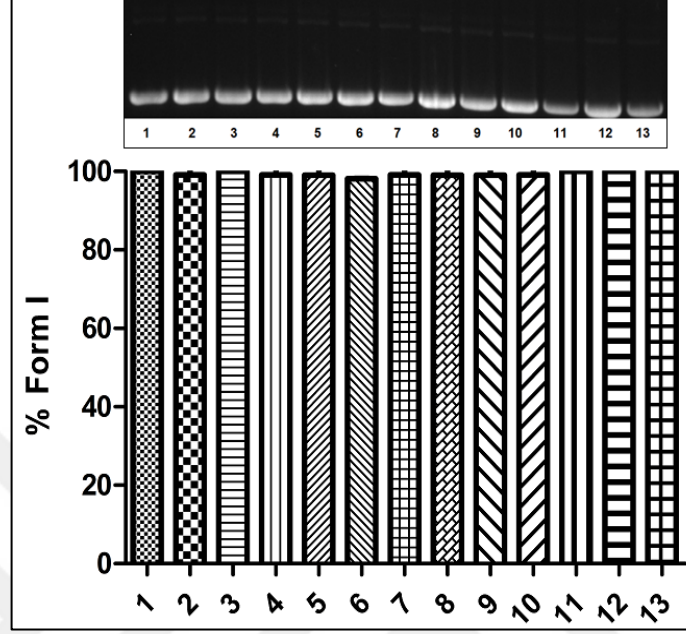
Tablo 11. Ekstrelerin PRAP aktivitesi (absorbans)

%	40 µg/mL	80 µg/mL	200 µg/mL
SME	0.0744±0.017	0.0861±0.004	0.1056±0.005
RME	0.0704±0.022	0.0865±0.004	0.1201±0.009
Kersetin	0.1768±0.014	0.3297±0.029	0.6402±0.024

4.4. DNA Etkileşim Çalışmaları

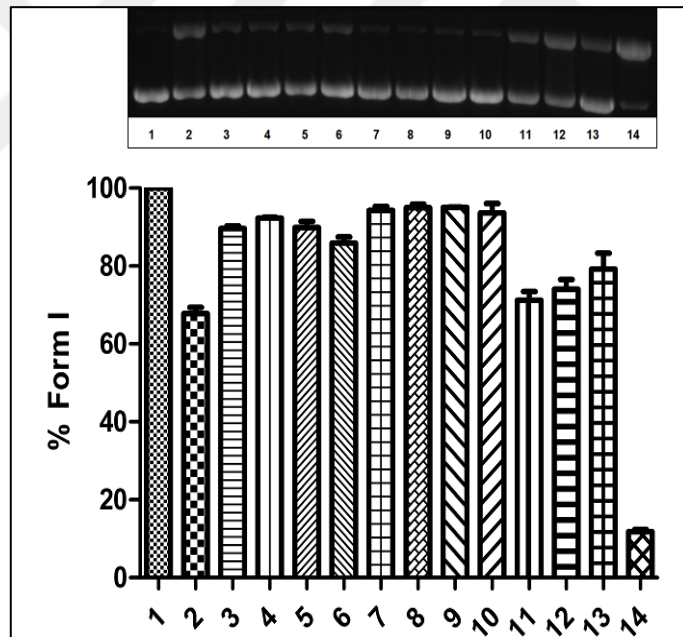
Bu çalışmada, ekstrelerin pBR322 plazmid DNA üzerindeki DNA hasarı ve koruyucu etkileri agaroz jel elektroforezi kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 8, 9 ve 10'da verilmiştir. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak gallik asit kullanılmıştır. Şekil 8'de görüldüğü üzere, SME ve RME çalışılan konsantrasyonlarda (40-500 µg/mL) herhangi bir

plazmid DNA üzerinde herhangi bir hasar oluşturmamıştır. Plazmid DNA'nın Form I yüzdeleri incelendiğinde yaklaşık olarak %100 olduğu görülmüştür (Şekil 8).

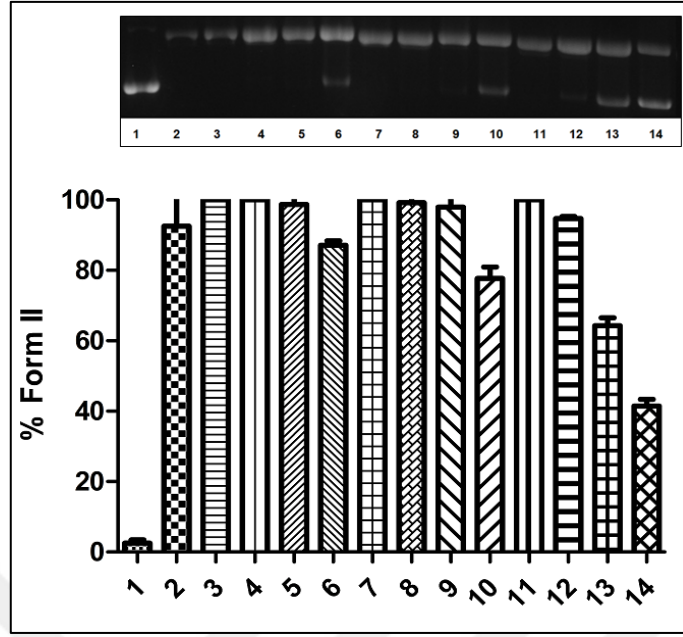


Şekil 8. Ekstrelerin hidrolitik nükleaz aktivitesi. **1:** DNA kontrol; **2:** DNA + 40 µg/mL SME; **3:** DNA + 80 µg/mL SME; **4:** DNA + 200 µg/mL SME; **5:** DNA + 500 µg/mL SME; **6:** DNA + 40 µg/mL RME; **7:** DNA + 80 µg/mL RME; **8:** DNA + 200 µg/mL RME; **9:** DNA + 500 µg/mL RME; **10:** DNA + 40 µg/mL gallik asit; **11:** DNA + 80 µg/mL gallik asit; **12:** DNA + 200 µg/mL gallik asit; **13:** DNA + 500 µg/mL gallik asit.

Ekstrelerin aynı konsantrasyonlarda Fenton reaktifi (Şekil 9) ve singlet oksijen (Şekil 10) tarafından indüklenen DNA hasarı üzerindeki koruyucu etkileri araştırılmıştır. Plazmid DNA, Fenton reaktifine maruz bırakıldığında, oluşan hidroksil radikali DNA'ya zarar vererek Form I'in yüzdesini düşürürken Form II'nin yüzdesini artırmıştır. (Şekil 9, bant 2). Daha sonra ekstrelerin artan konsantrasyonları ilave edildiğinde DNA üzerindeki hasarın önlendiği gözlenmiştir. Ayrıca plazmid DNA ışık varlığında metilen mavisine maruz kaldığında singlet oksijen oluşur ve bu durum güçlü DNA hasarına neden olmaktadır. Şekil 10'da görüldüğü üzere, oluşan singlet oksijenin oluşturduğu hasar sonrasında, plazmid DNA'nın süpersarmal formu tamamen kaybolmuştur. 40, 80 ve 200 µg/mL'de SME ve RME varlığında singlet oksijen hasarı korunamazken, her iki ekstrenin 500 µg/mL varlığında DNA hasarı kısmen önlenmiştir.



Şekil 9. Ekstrelerin Fenton reaktifi ile DNA üzerinde oluşturulan hasarı koruma etkisi. **1:** DNA kontrol; **2:** DNA + 1 mM FeSO₄ + %2 H₂O₂; **3:** DNA + 40 µg/mL SME + 1 mM FeSO₄ + %2 H₂O₂; **4:** DNA + 80 µg/mL SME + 1 mM FeSO₄ + %2 H₂O₂; **5:** DNA + 200 µg/mL SME + 1 mM FeSO₄ + %2 H₂O₂; **6:** DNA + 500 µg/mL SME + 1 mM FeSO₄ + %2 H₂O₂; **7:** DNA + 40 µg/mL RME + 1 mM FeSO₄ + %2 H₂O₂; **8:** DNA + 80 µg/mL RME + 1 mM FeSO₄ + %2 H₂O₂; **9:** DNA + 200 µg/mL RME + 1 mM FeSO₄ + %2 H₂O₂; **10:** DNA + 500 µg/mL RME + 1 mM FeSO₄ + %2 H₂O₂; **11:** DNA + 40 µg/mL gallik asit + 1 mM FeSO₄ + %2 H₂O₂; **12:** DNA + 80 µg/mL gallik asit + 1 mM FeSO₄ + %2 H₂O₂; **13:** DNA + 200 µg/mL gallik asit + 1 mM FeSO₄ + %2 H₂O₂; **14:** DNA + 500 µg/mL gallik asit + 1 mM FeSO₄ + %2 H₂O₂.

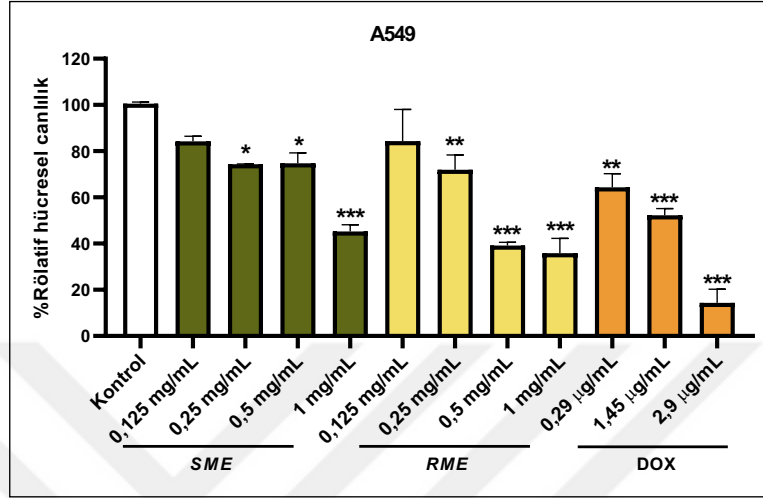


Şekil 10. Ekstrelerin ışık varlığında metilen mavisi ile DNA üzerinde oluşturulan hasarı koruma etkisi. **1:** DNA kontrol + beyaz ışık (30 dakika); **2:** DNA + 25 μ M metilen mavisi + beyaz ışık (30 dakika); **3:** DNA + 40 μ g/mL SME + 25 μ M metilen mavisi + beyaz ışık (30 dakika); **4:** DNA + 80 μ g/mL SME + 25 μ M metilen mavisi + beyaz ışık (30 dakika); **5:** DNA + 200 μ g/mL SME + 25 μ M metilen mavisi + beyaz ışık (30 dakika); **6:** DNA + 500 μ g/mL SME + 25 μ M metilen mavisi + beyaz ışık (30 dakika); **7:** DNA + 40 μ g/mL RME + 25 μ M metilen mavisi + beyaz ışık (30 dakika); **8:** DNA + 80 μ g/mL RME + 25 μ M metilen mavisi + beyaz ışık (30 dakika); **9:** DNA + 200 μ g/mL RME + 25 μ M metilen mavisi + beyaz ışık (30 dakika); **10:** DNA + 500 μ g/mL RME + 25 μ M metilen mavisi + beyaz ışık (30 dakika); **11:** DNA + 40 μ g/mL gallik asit + 25 μ M metilen mavisi + beyaz ışık (30 dakika); **12:** DNA + 80 μ g/mL gallik asit + 25 μ M metilen mavisi + beyaz ışık (30 dakika); **13:** DNA + 200 μ g/mL gallik asit + 25 μ M metilen mavisi + beyaz ışık (30 dakika); **14:** DNA + 500 μ g/mL gallik asit + 25 μ M metilen mavisi + beyaz ışık (30 dakika).

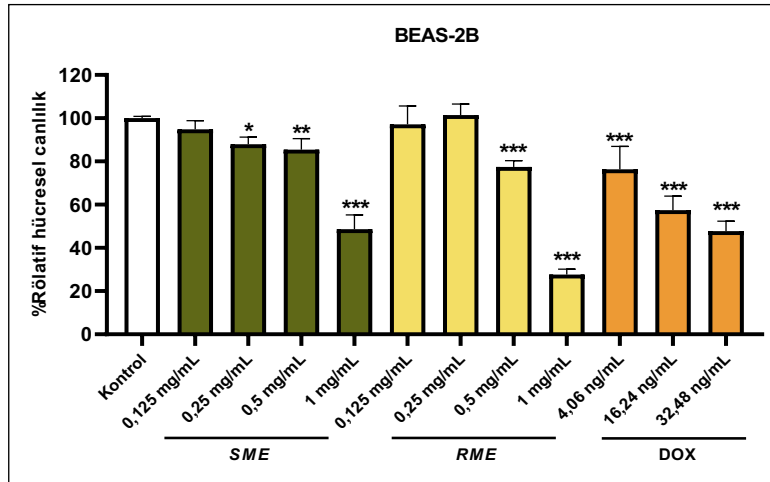
4.5. MTT Testi ile Sitotoksosite Analizi

MTT testinin sonuçlarına göre, SME ve RME'nin A549 hücreleri üzerinde 24 saat maruz bırakılması sonrasında her iki ekstre de konsantrasyona bağlı sitotoksosite göstermiştir. Sonuçlar Şekil 11 ve 12'de verilmiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak DOX kullanılmıştır. Şekil 10'da görüldüğü üzere, RME 0.5 ve 1 mg/mL konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak sitotoksik etki göstermiştir ($p < 0.001$). Ekstrelerin sitotoksosite profili BEAS-2B hücreleri ile benzer sonuçlar göstermiştir. RME, 1 mg/mL'de sağlıklı hücrelerde önemli sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir ($p < 0.001$). SME ve RME'nin selektiflik indeksi (SI = Sağlıklı hücre dizisi BEAS-2B için IC_{50})

/ (kanserli hücre dizisi A549 için IC₅₀) hesaplanmıştır. SME ve RME için SI değerleri sırasıyla 1.05±0.03 ve 1.88±0.10'dur. Ekstrelerin BEAS-2B ve A549 hücreleri üzerindeki SI değerlerine göre RME'nin SI oranının daha yüksek olduğu belirlenmiştir.



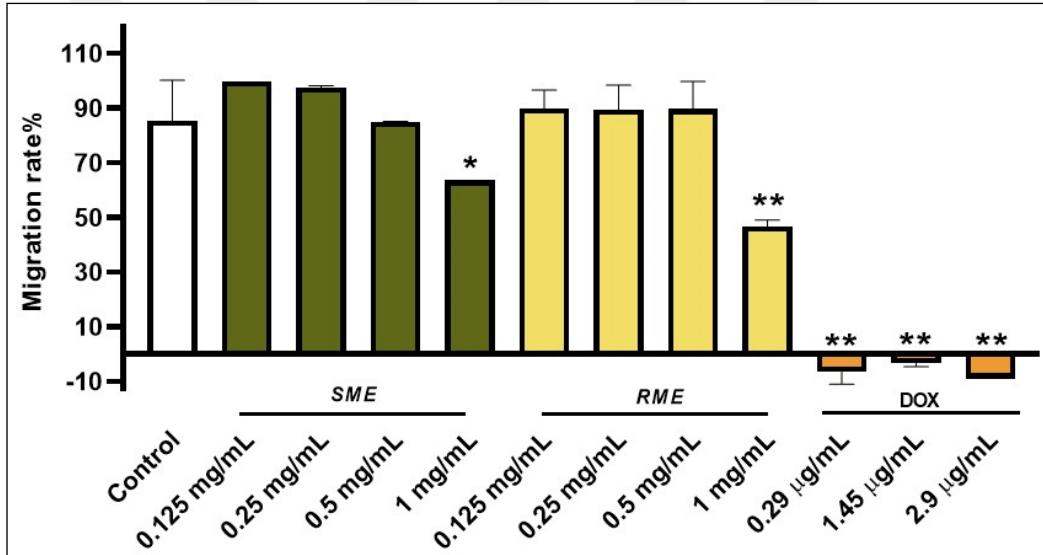
Şekil 11. A549 hücrelerinde ekstrelerinin sitotoksosite profili. Kontrol ve gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Kontrol (DMSO 0.5%, v/v); DOX: (0.29 µg/mL = 1 µM; 1.45 µg/mL = 5 µM; 2.9 µg/mL = 10 µM).



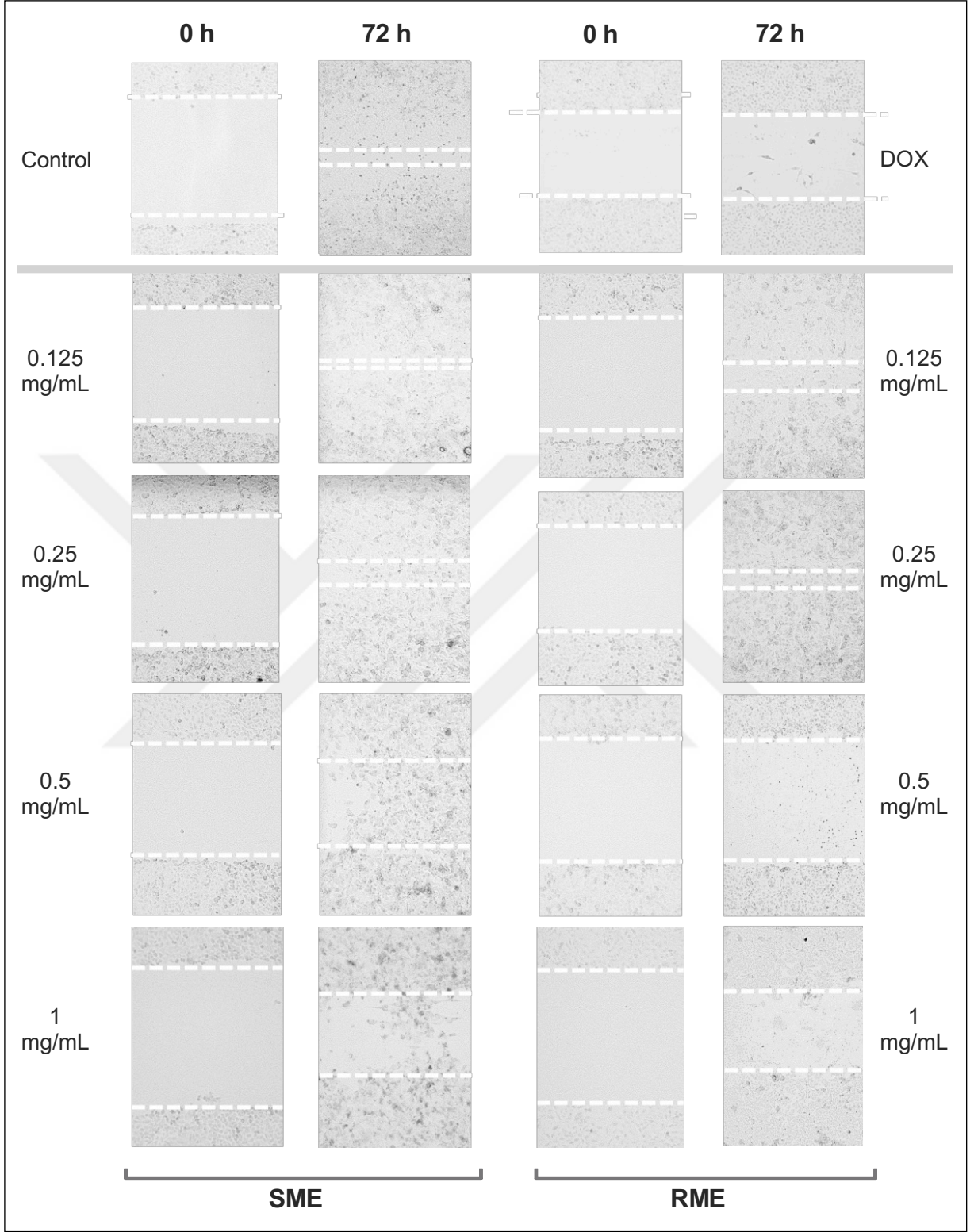
Şekil 12. BEAS-2B hücrelerinde ekstrelerinin sitotoksosite profili. Kontrol ve gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Kontrol (DMSO 0.5%, v/v); DOX: (4.06 ng/mL = 0.007 µM; 16.24 ng/mL = 0.031 µM; 32.48 ng/mL = 0.062 µM).

4.6. Hücre Göçü Analizi

SME ve RME'nin A549 hücrelerinin *in vitro* migrasyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmek için 72 saat boyunca yara iyileştirme testi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 13 ve 14'te verilmiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak DOX kullanılmıştır. Ekstrelerin farklı konsantrasyonlarına (0.125-1 mg/mL) maruz bırakılan A549 hücrelerinin migrasyon hızına göre, 1 mg/mL SME ve RME varlığında önemli bir migrasyon önleyici etkiye yol açtığı tespit edilmiştir (Şekil 13). Şekil 14'te gösterildiği gibi RME varlığında anti-migrasyon etkisinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. 0.5 mg/mL SME, RME'ye kıyasla A549 hücrelerinin migrasyonunda daha yüksek bir azalmaya neden olmasına rağmen bu durumun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Test edilen tüm konsantrasyonlarda en yüksek göç karşıtı aktivite pozitif kontrol ile gözlenmiştir.



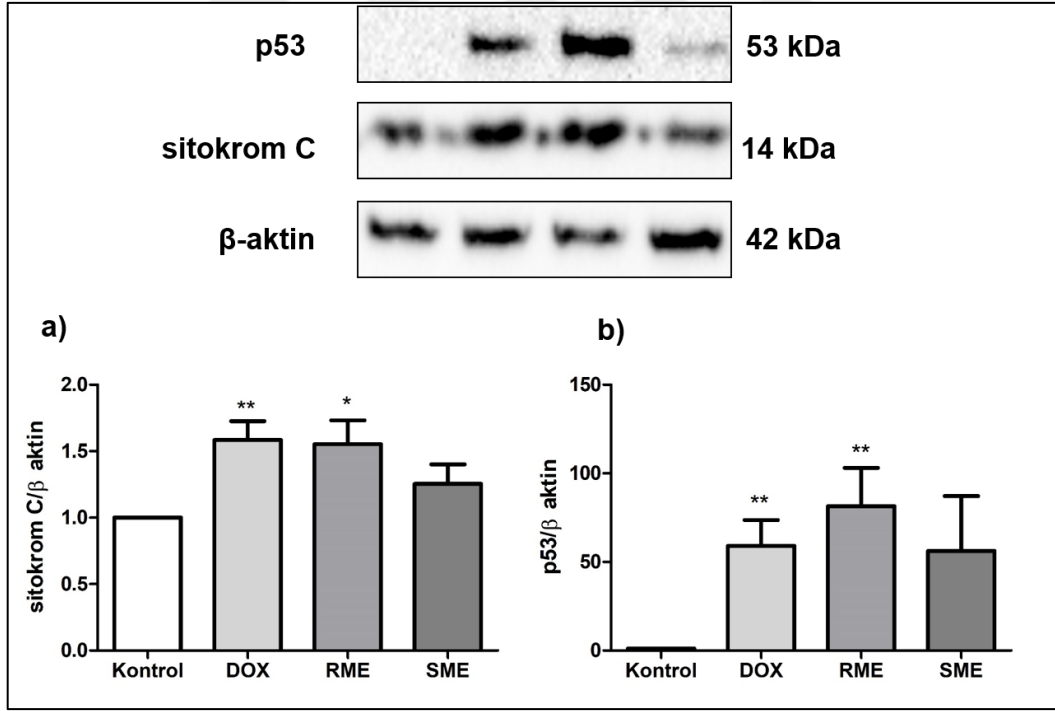
Şekil 13. Ekstrelerin varlığında A549 hücrelerinde migrasyon oranı (72 saat). Kontrol ve gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001. Kontrol (DMSO 0.5%, v/v); DOX: (0.29 µg/mL = 1 µM; 1.45 µg/mL = 5 µM; 2.9 µg/mL = 10 µM).



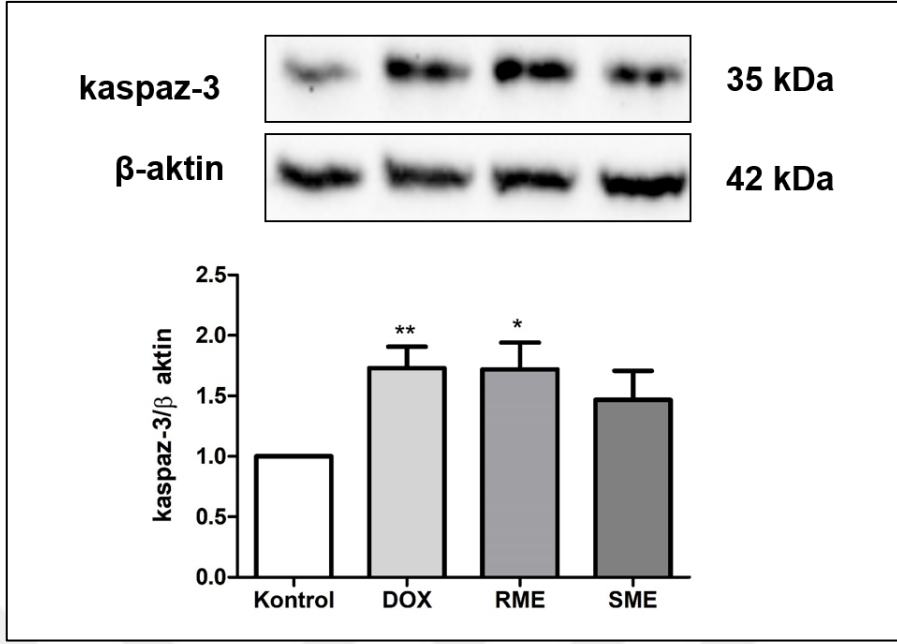
Şekil 14. Ekstrelerin varlığında A549 hücrelerinde migrasyon oranı. Hücre migrasyonu analizi, yara iyileştirme testi ile gerçekleştirilmiş ve görüntüler, 10 × büyütme oranıyla (EVOS M5000, Thermo-Scientific) çekilmiştir. DOX, 0.29 µg/mL=1 µM'de test edilmiştir.

4.7. Western Blotlama Analizi

Bu çalışmada, hücre ölüm mekanizmasını aydınlatmak için ekstrelerin varlığında A549 hücrelerinin hücre içi sitokrom c (Cell Signaling Technology; 11940S), p53 (Cell signaling Technology; 9282S) ve kaspaz-3'ün (Cell signaling Technology; 9662) ekspresyon seviyeleri western blotlama tekniği kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 15 ve 16'da verilmiştir. Sonuçlar, kontrole kıyasla 1 mg/mL'de RME varlığında A549 hücrelerinde sitokrom c ekspresyonunun yaklaşık 1.55 kat arttığını göstermiştir ($p < 0.01$). Bununla birlikte, sitokrom c ekspresyonu SME varlığında da 1.25 kat artmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. (Şekil 15a). Öte yandan, A549 hücrelerinde RME maruziyeti sonrasında p53 ekspresyonunun kontrole göre istatistiksel olarak arttığı tespit edilmiştir ($p < 0.01$) (Şekil 15b). Kaspaz-3 ekspresyon seviyesi 24 saatlik RME maruziyeti sonrasında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış göstermiştir ($p < 0.05$). Bu artış yaklaşık 1.72 kat olarak tespit edilmiştir (Şekil 16).



Şekil 15. RME ve SME varlığında A549 hücrelerinde p53 ve sitokrom c ekspresyonlarının western blot analizi. **(a)** A549 hücrelerinin sitokrom c ekspresyonu görüntüleri ve densitometrik verileri. **(b)** A549 hücrelerinin p53 ekspresyonu görüntüleri ve densitometrik verileri. Veriler ortalama $\pm$ SEM ($n = 4$ grup) olarak sunulmuştur. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, Student t testi ile test edilmiştir.



Şekil 16. RME ve SME varlığında A549 hücrelerinin kaspaz-3 ekspresyonu görüntüleri ve densitometrik verileri. Veriler ortalama $\pm$ SEM (n=4 grup) olarak sunulmuştur. *p < 0.05, **p < 0.01, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, Student t testi ile test edilmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Berberidaceae familyasının bir üyesi olan *Epimedium* cinsi, Avrupa'da geleneksel olarak astım, akciğer kanseri gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (137). *Epimedium* türlerinde, bugüne kadar tanımlanmış olan flavonoidler, fenol glikozitler, feniletanoid glikozitler ve seskiterpenler gibi 260 aktif bileşik bulunmaktadır (95). Ma ve arkadaşlarının (94) hazırladığı derleme çalışmasında içerdiği aktif bileşikler sayesinde *Epimedium* cinsinin afrodizyak etkileri, kemik metabolizması, bağışıklık ve kardiyovasküler sistem üzerindeki etkileri, kıkırdak büyümesi, anti-hipertansif, antitümör, antioksidan etkileri gibi çeşitli özellikleri üzerine *in vitro* ve *in vivo* biyolojik çalışmaların bulunduğu ortaya konulmuştur. Bu bölümde tez çalışması ile *E. pubigerum* bitkisinin fitokimyasal karakterizasyonu, biyolojik aktiviteleri ve sitotoksite profilinin incelenmesi ve akciğer kanseri tedavisindeki kullanım potansiyelinin ortaya çıkarılması ile ilgili elde edilen bulguların literatür ile karşılaştırmalı inceleme sonuçlarını sunmak hedeflenmektedir.

Tez çalışmasında *E. pubigerum* bitkisinin SME ve RME ekstraktları kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiştir. Ekstrelerin fitokimyasal bileşenleri LC-HR/MS yöntemi ile analiz edilmiştir. Tablo 8'de sunulduğu üzere bitkinin SME'si 22, RME'si 21 bileşik içermektedir. SME'de 12745.52 mg/kg, RME'de 10460.05 mg/kg olmak üzere her iki ekstrede de fumarik asit en yüksek miktarda bulunan bileşiktir. Fumarik asit, sitrik asit döngüsünün önemli bir metabolitidir. Gıda katkı maddesi olarak da kullanılan bu bileşik skleroz, sedef ve kanser hastalıklarının tedavisinde kullanılan bileşiklerin öncüsüdür (138). RME'de yüksek miktarda bulunan ikinci bileşik (-)-epikateşindir (2192.92 mg/kg). Epikateşin, genellikle yeşil çay, üzüm ve kakaoda bulunan polifenolik yapısında bir bileşiktir (139). Epikateşinin farklı kanser hücre hatlarındaki etkilerini ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalar epikateşinin servikal kanser (HeLa), gastrik adenokarsinom (MKN45) ve insan mesane kanseri (TCCSUP) hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermektedir (140-142). Ayrıca epikateşinin A549 hücreleri ve sağlıklı insan akciğer fibroblast (Hel 299) hücrelerindeki proliferasyonu ve hücre canlılığı üzerindeki etkisini araştırmak, bir kemoterapötik olan sisplatin ile kullanıldığında etkisini belirlemek için bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak epikateşinin konsantrasyona bağlı olarak A549 hücrelerinin proliferasyonunda inhibitör etki gösterirken Hel 299 hücrelerinin proliferasyonunu engellememiştir. Sisplatin ile

kombine edildiğinde ise etkisinin sinerjistik olduğu görülmüştür. Ayrıca her iki tedavinin de apoptotik hücre ölümünü indüklediği sonucuna ulaşılmıştır (143).

Ekstrelerin fitokimyasal analizi gerçekleştirildikten sonra toplam fenolik ve flavonoit içeriği tayini yapılmıştır. Tablo 9’da sunulduğu üzere RME’nin toplam fenolik ve flavonoit içeriği 215.65 ± 8.11 mg GAE/g kuru ağırlık ve 23.52 ± 8.22 mg KE/g kuru ağırlık olarak bulunmuştur. Sonuçlar RME’nin toplam fenolik içeriğinin SME’den daha yüksek olduğunu gösterirken SME’nin 50.20 ± 5.28 mg KE/g kuru ağırlık ile toplam flavonoit içeriğinin RME’den daha yüksek olduğu göstermiştir. Lee ve arkadaşları (144), *E. koreanum* Nakai bitkisinin kök, gövde ve yapraklarının %70’lik etanol ekstrelerinin toplam fenolik ve flavonoit içeriği analiz etmiştir. Kök kısmının toplam fenolik ve flavonoit içeriği sırasıyla 2.47 ± 0.02 mg klorojenik asit eşdeğeri/g ve 2.07 mg KE/g bulmuştur. Kök kısmı diğer kısımlara kıyasla daha yüksek içeriğe sahip olduğu görülmektedir. Zhang ve arkadaşları (145), *E. koreanum* Nakai’nin kök ve yapraklarının farklı fraksiyonlarının ve ekstrelerinin toplam fenolik ve flavonoit içeriğini analiz etmiştir. Bitkinin yapraklarının ve kök kısmının toplam fenolik içeriği sırasıyla 64.19 ± 2.54 – 182.99 ± 0.60 mg GAE/g kuru ağırlık ve 15.23 ± 3.40 – 75.81 ± 2.19 mg GAE/g kuru ağırlık değerleri arasında değişiklik gösterdiği görülmüştür. Genel olarak yaprakların toplam fenolik içeriği kök kısmına oranla daha yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca benzer şekilde toplam flavonoit içeriğinin yapraklarda kök kısmına kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür. Munir ve arkadaşları (146), Folin-Ciocalteu yöntemiyle *Epimedium ganderiflorum* bitkisinin toplam fenolik ve flavonoit içeriğini analiz etmiştir. İçerikleri sırasıyla 1010.72 ± 12.49 mg GAE/g kuru ağırlık ve 241.8 ± 11.18 µg GAE/g kuru ağırlık olarak hesaplanmıştır.

SME ve RME’nin antioksidan aktivitesini belirlemek amacıyla DPPH yöntemi kullanılmıştır. Tablo 10’da ekstrelerin radikal süpürme aktivitelerinin yüzdelere yer verilmiştir. IC₅₀ değerleri ise SME ve RME için sırasıyla 146.24 µg/mL ve 64.79 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda RME’nin daha yüksek DPPH radikal süpürme aktivitesi gösterdiğini görülmektedir bu durumun toplam fenolik içeriği ile uyumlu bulunmuştur. Benzer bir çalışmada Zhao ve arkadaşları (147) farklı kurutma işlemlerinden sonra *E. koreanum* Nakai’nin radikal süpürücü özelliklerini DPPH yöntemini kullanarak araştırmış ve IC₅₀ değerlerinin 87.44 – 118.12 µg/mL arasında değiştiği sonucuna ulaşmıştır. Lee ve arkadaşları (144), *E. koreanum* Nakai flavonoidlerinin %70’lik etanol ekstrelerinin antioksidan aktivitelerini araştırmak için DPPH ve farklı yöntemler

kullanmıştır. DPPH testi sonucunda yaprakların 20 mg/mL’de %80’lik bir süpürme yüzdesiyle diğer kısımlara oranla en yüksek radikal süpürücü etkiyi gösterdiği görülmüştür. Yang ve arkadaşları (148), *Epimedium pubescens* bitkisinden izole edilen flavonoidlerinin radikal süpürücü etkilerini DPPH yöntemi yardımıyla analiz ettiğinde IC₅₀ değerini 52.10 µg/mL olarak hesaplamıştır. Naseer ve arkadaşları (149), *Epimedium elatum* bitkisinin toprak altı ve toprak üstü kısımlarının metanol ekstraktlarından izole edilen 10 bileşenin antioksidan potansiyellerini araştırmak amacıyla DPPH testi gerçekleştirmiştir. Bileşenlerden flavonoid olduğu bilinen dibenzilidenaseton’un IC₅₀ değeri 4.32 µM olmak üzere diğer bileşikler de IC₅₀ değerleri 4.32–13.98 µM arasında değişmektedir. Genel olarak bu bitkiden elde edilen bileşenlerin antioksidan kapasiteleri yüksek bulunmuştur. Xu ve arkadaşları (150), *E. acuminatum* Franch. bitkisinin toprak üstü kısımlarından saflaştırılmış nötral ve asidik polisakkaritlerinin radikal süpürme özelliklerini DPPH yöntemiyle analiz ettiler ve doza bağımlı olarak radikal yakalama aktivitesi gösterdiklerini, asidik polisakkaritlerin daha yüksek radikal süpürme aktivitesi gösterdiği gözlemlenmiştir. Sonuçlardaki farklılıkların nedeni bitkilerdeki bileşiklerin yetiştikleri iklim, toprak, nem koşullarına göre değişiklik göstermesi olabilmektedir.

Ayrıca bu tez çalışması kapsamında ekstraktların plazmid DNA’ya karşı DNA hasarı ve DNA hasarı koruyucu etkileri araştırılmıştır. Agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılmıştır, bu yöntem çözünmüş biyomoleküllerin elektriksel bir alanda kütle/yük oranına göre yer değiştirmesine dayanmaktadır. Plazmid DNA’nın elektroforez üzerinde bilinen üç formu (Form I, II ve III) vardır (131). Plazmid DNA’da hasar meydana geldiğinde bu formlarda değişiklikler meydana gelmekte böylece hasarın miktarı belirlenmektedir (125). Bu tez çalışmasında kullanılan konsantrasyonlarda ekstraktların Şekil 8’de görüldüğü üzere plazmid DNA’da herhangi bir hasar oluşturmadığı ortaya çıkmıştır. Fenton reaktifi ile oluşturulan DNA hasarında ise Şekil 9’da görüldüğü üzere form I yüzdesinin azaldığı, form II yüzdesinin ise arttığı gözlenmiştir. Ekstrakt eklendiğinde form I yüzdesinin yeniden arttığı gözlenmiştir. Sonuçlar, ekstraktların Fenton reaktifinin neden olduğu DNA hasarına karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Yine bir başka yöntemde metilen mavisi ve ışık varlığında oluşan singlet oksijen Şekil 10’da görüldüğü üzere DNA’da ciddi bir hasara neden olmuştur. Farklı konsantrasyonlarda ekstrakt eklendiğinde ise sadece 500 µg/mL’inde kısmi koruyucu etki gözlenirken, diğer konsantrasyonlarda koruma gözlenmemiştir. Her iki sonuç da RME’nin SME’den daha güçlü bir DNA koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir. Benzer bir çalışmada Yang ve

arkadaşları (151) *Epimedium brevicornu*'dan elde edilen polisakkaritlerin enzimatik su ekstrelerinin DNA koruyucu etkilerini araştırmıştır. Sonuçlar bitkinin DNA hasarı üzerinde oldukça yüksek inhibitör etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Munir ve arkadaşları (152), *Epimedium grandiflorum*'un hidroetanolik ekstresinin Fenton reaktifi ile oluşturulan DNA hasarını önleme yeteneklerini agaroz jel elektroforezi yöntemini kullanarak değerlendirdiler. Ekstrenin hasarı önleme potansiyelinin olduğu görülmüştür.

Yine bu tez çalışması kapsamında ekstrelerin A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına karşı sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Sitotoksikite, canlı hücreler üzerindeki toksik etki oranını ifade etmektedir. Yaygın olarak kullanılan sitotoksikite testlerinden biri MTT testidir. MTT testinde oluşan rengin kolorimetrik olarak ölçüldüğü formazana indirgenmektedir. Üretilen formazan miktarı canlı hücre sayısını vermektedir (153). *In vitro* yara iyileştirme testi ile farklı hücre modellerinin çeşitli uyaranlara karşı verdiği yanıtlar incelenmektedir. %70-80 konfluensiye ulaşmış hücre tabakasında ince bir çizik oluşturularak farklı saat aralıklarında hücrelerin davranışları incelenir. Sonuçta elde edilen görüntüler ışık mikroskopunda incelenerek kaydedilmektedir. Ulaşılmak istenen sonuç araştırılan maddelerle hücrelerin bulunmadığı, göç edemediği bir alan oluşturmaktır (154). Bu tez çalışmasında Şekil 11 ve 12'de görüldüğü üzere SME ve RME'nin A549 hücreleri üzerinde konsantrasyona bağlı bir sitotoksikite gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte 0.5–1 mg/mL'de RME'nin SME'ye kıyasla önemli bir sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca her iki ekstrenin sitotoksik etkileri BEAS-2B hücreleri ile de benzer sonuçlar vermiştir. Ek olarak SME ve RME'nin A549 hücrelerindeki migrasyon üzerindeki etkilerini 72 saat boyunca değerlendirmek için *in vitro* yara iyileştirme testi yapılmıştır. Şekil 13'te görüldüğü üzere 1 mg/mL'de SME ve RME'nin önemli bir migrasyon önleyici etkiye yol açtığı ancak pozitif kontrol olarak kullanılan DOX'un test edilen tüm konsantrasyonlarda en yüksek migrasyon önleyici aktiviteyi gösterdiği görülmüştür. Zulfıkar ve arkadaşları (155), *E. grandiflorum* bitkisinin metanol ekstresinden izole ettikleri 30 bileşenin dört farklı kanser hücrelerindeki (insan melanoma (SK-MEL), HeLa, insan epitelyal meme (BT-549) ve insan over kanseri (SKOV-3) hücreleri) sitotoksik etkileri hücre proliferasyonu deneyi kullanılarak belirlenmiştir. Bu bileşenlerden epimedigrandiozit A, korepimeozit A ve B, epimozit ve ikarisit II'in IC₅₀ değerleri 9–45 µM arasında değişirken kanser hücre hatlarında sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Pang ve arkadaşları (156), *Epimedium brevicornu*'nun yapraklarından elde edilen metanol ekstresinden izole ettikleri bileşiklerin HepG2 hücrelerindeki sitotoksik

etkilerini MTT testini kullanarak incelemiştir. Bu bileşiklerin IC₅₀ değerleri 32.8–87.3 µM arasında değer gösterirken HepG2 hücrelerine karşı sitotoksik aktivite gösterdiklerini ortaya koydular. Zhang ve arkadaşları (157), *E. koreanum* Nakai bitkisinin yaprak ekstresinden izole ettiği sekiz bileşiğin A549 ve insan akciğer mukoepidermoid kanser (NCI-292) hücrelerindeki sitotoksik aktivitelerini MTT testi ile incelenmiştir. İzole edilen bileşiklerden beş tanesinin IC₅₀ değerleri 5.7–23.5 µM arasında değişirken, her iki hücrede de hücre proliferasyonunu inhibe ettikleri gözlemlenmiştir.

Bildiğimiz kadarıyla *E. pubigerum*'un sitotoksik etkileri ve hücre ölüm mekanizması hakkında herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle ekstraların A549 hücrelerinde hücre ölümüne neden olduğu konsantrasyonda sitokrom c, p53 ve kaspaz-3 ekspresyonunu belirlemek ve böylece ölüm mekanizmalarını açıklamak için western blotlama tekniği kullanılmıştır. Apoptoz, hücre içi ve hücre dışı sinyaller tarafından düzenlenen programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmıştır. Apoptoz ile hücre ölümünün beş farklı yoldan gerçekleşebileceği bilinmektedir. Bunlardan en yaygın olanları intrinsik (mitokondriyal) yol ve ekstrinsik (ölüm reseptörü) yoldur. İntrinsik yol, metabolik ve hipoksik stres tarafından indüklenirken, ekstrinsik yol, ölüm ligandları olarak bilinen Fas-L veya tümör nekroz faktörü-α tarafından indüklenmektedir (158, 159). Mitokondriyal membran yapısının bozulması, sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya göç etmesine neden olur ve kaspaz enzimlerinin aktivasyonu sonucunda hücre apoptoza girmeye teşvik edilir ve hücre ölümünün meydana geldiği bir süreci başlatır (160, 161). Tümör baskılayıcı genlerden biri de DNA'ya bağlı olarak çekirdekte bulunan p53 proteininin sentezinden sorumlu olan TP53'tür. TP53, kanserde sıklıkla mutasyona uğrayan bir gen dir (8). TP53 geninden eksprese edilen p53 proteini, DNA hasarı, hipoksi, onkogenlerin aşırı ekspresyonu veya metabolik sınırlamalar dahil olmak üzere bir dizi farklı stresör üzerinde aktive olan bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görmektedir (162). Bu protein, programlanmış hücre ölümünün kontrolünde, DNA onarımında ve DNA hasarı meydana geldiğinde sentezde önemli bir rol oynamaktadır. p53 proteininin etkisizleştirilmesi, adenomun karsinoma dönüşmesine neden olmaktadır (163). p53 proteinini kodlayan genlerdeki mutasyonlar, akciğer epitel hücrelerinde tümör oluşumda da önemli bir rol oynamaktadır. KHDAK hastalarının yaklaşık %50'sinin bu genlerinde mutasyon olduğu ve bu hastaların çok daha kötü prognoza sahip olduğu ve kemoterapi, radyoterapi gibi tedavi yöntemlerine karşı daha dirençli oldukları görülmüştür (164). Sitokrom c, mitokondri iç yüzeyinde yer alan apoptozda görevli bir enzimdir. Mitokondri

aracılı apoptoz için önemli bir belirteçtir ve apoptoz indüklendikten sonraki süreçte mitokondriden hücre dışı boşluğa ve kan dolaşımına salınmaktadır. Bu durum normal fizyolojik koşullarda gerçekleşebilirken kanserli hastalarda da gerçekleşebilen ve apoptoza özgü bir süreçtir. Çeşitli çalışmalar farklı türlerde de olmakla beraber akciğer kanseri için de uygulanan tedavinin bir sonucu olarak serum sitokrom c seviyesinin önemli bir gösterge olduğunu ortaya koymaktadır (165). KHDAK hastalarında sağlıklı bireylere oranla üç kat daha az serum sitokrom c seviyeleri tespit edilmiştir. Kemoterapi alan hastaların tedavi sonrasında serum sitokrom c seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir (43). Apoptotik hücre ölümünde yer alan proteinlerden bir diğeri de kaspaz-3 proteinidir, KHDAK'de tümör oluşumuna dahil olduğunu gösteren veriler bulunmaktadır. Ayrıca kaspaz-3 ekspresyonu bu tümörlerde olumlu bir prognoza işaret edebilmektedir (166). Tüm bu nedenlerle p53, sitokrom c ve kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyonları kanser etiyolojisinde önemlidir. Bu tez çalışması ile ilk defa, Şekil 15'te görüldüğü üzere 1 mg/mL'de RME varlığında kontrole kıyasla sitokrom c, p53 ve kaspaz-3 ekspresyonunun önemli ölçüde arttığını gösterilmiştir. Bu sonuçlar, RME'nin A549 hücrelerinde apoptozu indüklediğini ortaya koymuştur. Elde edilen tüm veriler sonucunda, RME'nin SME'de görülen etkiye kıyasla teorik olarak daha güçlü bir adjuvan terapötik ajan olduğu önerilebilmektedir. Bu hipotezin desteklenmesi amacıyla genotoksik analizler ve *in vivo* çalışmaların planlanması önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Barut B (2020). Yeni BODİPY bileşiklerinin fotodinamik terapi amaçlı *in vitro* etkinliklerinin incelenmesi. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon
2. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) (2023). Cancer [online]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. [Accessed 12 April 2023].
3. Musial C, Zaucha R, Kuban-Jankowska A, Konieczna L, Belka M, Marino Gammazza A, Baczek T, Cappello F, Wozniak M, Gorska-Ponikowska M (2021). Plausible role of estrogens in pathogenesis, progression and therapy of lung cancer. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18(2): 648.
4. Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OU, Yang YW, Buchanan P (2015). Lung cancer: biology and treatment options. *Biochimica et Biophysica Acta* 1856(2): 189–210.
5. Deshpand R, Chandra M, Rauthan A (2022). Evolving trends in lung cancer: epidemiology, diagnosis, and management. *Indian Journal of Cancer* 59(1): 90–105.
6. Bertheloot D, Latz E, Franklin BS (2021). Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cellular & Molecular Immunology* 18(5): 1106–1121.
7. Wu XY, Xu WW, Huan XK, Wu GN, Li G, Zhou YH, Najafi M (2023). Mechanisms of cancer cell killing by metformin: A review on different cell death pathways. *Molecular and Cellular Biochemistry* 478(1): 197–214.
8. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, Xie M, Zhang Q, McMichael JF, Wyczalkowski MA, Leiserson MD, Miller CA, Welch JS, Walter, MJ, Wendl M.C, Ley TJ, Wilson RK, Raphael BJ, Ding L (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 502: 333–339.
9. Duffy MJ, Synnott NC, O’Grady S, Crown J (2022). Targeting p53 for the treatment of cancer. In *Seminars in Cancer Biology* 79: 58–67.
10. Carson DA, Lois A (1995). Cancer progression and p53. *The Lancet* 346(8981): 1009–1011.
11. Chen M, Wu J, Luo Q, Mo S, Lyu Y, Wei Y, Dong J (2016). The anticancer properties of *Herba Epimedii* and its main bioactive components icariin and icarisside II. *Nutrients* 8(9): 563.
12. Cragg GM, Newman DJ (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 72–79.

13. Zhang X, Chen LX, Ouyang L, Cheng Y, Liu B (2012). Plant natural compounds: Targeting pathways of autophagy as anti-cancer therapeutic agents. *Cell Proliferation*, 45: 466–476.
14. Çiçek Polat D (2018). Türkiye’de yetişen *Epimedium* L. (Berberiaceae) türleri üzerinde araştırmalar. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, Ankara
15. Guo BL, Xiao PG (2003). Comment on main species of *Herba Epimedii*. *China Journal of Chinese Materia Medica* 28(4): 303–307.
16. Zhou M, Zheng W, Sun X, Yuan M, Zhang J, Chen X, Yu Guo B, Ma B (2021). Comparative analysis of chemical components in different parts of *Epimedium* Herb. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 198: 113984.
17. Zhang H, Wang H, Wei J, Chen X, Sun M, Ouyang H, Hao J, Chang Y, Dou Z, He J (2018). Comparison of the active compositions between raw and processed *epimedium* from different species. *Molecules*, 23(7): 1656.
18. Zhang Y, Li J, Wang Y, Liang, Q (2022). Taxonomy of *Epimedium* (Berberidaceae) with special reference to Chinese species. *Chinese Herbal Medicines*, 14(1): 20–35.
19. National Cancer Institute (NIH) (2023). What is cancer? [online]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#definition>. [Accessed 24 April 2023].
20. Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2016). Cancer statics, CA: A Cancer Journal for Clinicians 66(1): 7–30.
21. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians 71(3): 209–249.
22. Chen S, Cao Z, Prettnner K, Kuhn M, Yang J, Jiao L, Wang Z, Li W, Geldsetzer P, Bärnighausen T, Bloom DE, Wang C (2023). Estimates and projections of the global economic cost of 29 cancers in 204 countries and territories from 2020 to 2050. *JAMA Oncology* 9(4): 465–472.
23. Saini A, Kumar M, Bhatt S, Saini V, Malik A (2020). Cancer causes and treatments. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 11(7): 3121–3134.

24. Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144(5): 646–674.
25. Patel A (2020). Benign vs malignant tumors. *JAMA oncology* 6(9): 1488–1488.
26. Debela DT, Muzazu SG, Heraro KD, Ndalama MT, Mesele BW, Haile DC, Kitui SK, Manyazewal T (2021). New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Medicine* 9: 1–10.
27. Marchand LL, Sivaraman L, Pierce L, Seifried A, Lum A, Wilkens LR, Lau AF (1998). Associations of CYP1A1, GSTM1, and CYP2E1 polymorphisms with lung cancer suggest cell type specificities to tobacco carcinogens. *Cancer Research* 58(21): 4858–4863.
28. Ettinger DS, Akerley W, Bepler G, Blum MG, Chang A, Cheney RT, Chirieac LR, D'Amico TA, Demmy TL, Ganti AKP, Govindan R, Grannis FW, Jahan T, Jahanzeb M, Johnson DH, Kessinger A, Komaki R, Kong FM, Kris MG, Krug LM, Le QT, Lennes IT, Martins R, O'Malley J, Osarogiagbon RU, Otterson GA, Patel JD, Pisters KM, Reckamp K, Riely GJ, Rohren E, Simon GR, Swanson SJ, Wood DE, Yang SC (2010). Non-small cell lung cancer. *Journal of The National Comprehensive Cancer Network* 8(7): 740–801.
29. Thandra KC, Barsouk A, Saginala K, Aluru JS, Barsouk A (2021). Epidemiology of lung cancer. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia* 25(1): 45–52.
30. Inamura K (2017). Lung cancer: Understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. *Frontiers in Oncology* 7: 193.
31. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Forman D, Parkin DM, Bray F (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 136(5): 359–386.
32. Clark SB, Alsubait S (2020). Non small cell lung cancer. StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL), USA.
33. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: Cancer Journal for Clinicians* 68: 394–424.
34. Cruz CSD, Tanoue LT, Matthay RA (2011). Lung cancer: Epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in Chest Medicine* 32(4): 605–644.

35. Indovina P, Marcelli E, Maranta P, Tarro G (2011). Lung cancer proteomics: Recent advances in biomarker discovery. *International Journal of Proteomics* 2011.
36. Lehtiö J, De Petris L (2010). Lung cancer proteomics, clinical and technological considerations. *Journal of Proteomics* 73(10): 1851–1863.
37. Weir B, Zhao X, Meyerson M (2004). Somatic alterations in the human cancer genome. *Cancer Cell* 6(5): 433–438.
38. Voskarides K, Giannopoulou N (2023). The role of TP53 in adaptation and evolution. *Cells* 12(3): 512.
39. Levine AJ (2019). Targeting therapies for the p53 protein in cancer treatments. *Annual Review of Cancer Biology* 3: 21–34.
40. Marei HE, Althani A, Afifi N, Hasan A, Caceci T, Pozzoli G, Morrione A, Giordano A, Cenciarelli C (2021). p53 signaling in cancer progression and therapy. *Cancer Cell International* 21(1): 1–15.
41. Viktorsson K, De Petris L, Lewensohn R (2005). The role of p53 in treatment responses of lung cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331(3): 868–880.
42. Shoshan-Barmatz V, Arif T, Shteinifer-Kuzmine A (2023). Apoptotic proteins with non-apoptotic activity: expression and function in cancer. *Apoptosis* 28(5-6): 730–753.
43. Pessoa J (2022). Cytochrome c in cancer therapy and prognosis. *Bioscience Reports* 42(12): BSR20222171.
44. Yadav S, Sawarni N, Kumari P, Sharma M (2022). Advancement in analytical techniques fabricated for the quantitation of cytochrome c. *Process Biochemistry* 122(1): 315–330.
45. Javid J, Mir R, Julka PK, Ray PC, Saxena A (2015). Extracellular cytochrome c as a biomarker for monitoring therapeutic efficacy and prognosis of non-small cell lung cancer patients. *Tumor Biology* 36: 4253–4260.
46. Yadav P, Yadav R, Jain S, Vaidya A (2021). Caspase-3: A primary target for natural and synthetic compounds for cancer therapy. *Chemical Biology & Drug Design* 98(1): 144–165.
47. Shen Y, Xin Z, Zhu Y, Wang J (2022). Mesoporous carbon nanospheres featured multifunctional fluorescent nanoprobe: Simultaneous activation and tracing of caspase-3 involved cell apoptosis. *Sensors and Actuators B: Chemical* 358: 131485.

48. Zhou M, Liu X, Li Z, Huang Q, Li F, Li CY (2018). Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells. *International Journal of Cancer* 143(4): 921–930.
49. North CM, Christiani DC (2013). Women and lung cancer: what is new ?. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery* 25(2): 87–94.
50. West L, Vidwans SJ, Campbell NP, Shrager J, Simon GR, Bueno R, Dennis PA, Otterson GA, Salgia R (2012). A novel classification of lung cancer into molecular subtypes. *PLoS One* 7(2): e31906.
51. Matakidou A, Eisen T, Houlston RS (2005). Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *British Journal of Cancer* 93: 825–833.
52. Gao Y, Goldstein AM, Consonni D, Pesatori AC, Wacholder S, Tucker MA, Caporaso NE, Goldin L, Landi MT (2009). Family history of cancer and nonmalignant lung diseases as risk factors for lung cancer. *International Journal of Cancer* 125(1): 146–152.
53. National Cancer Institute (NIH) (2023). Age and cancer risk [online]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/age>. [Accessed 7 June 2023].
54. Chen S, Wu S (2020). Identifying lung cancer risk factors in the elderly using deep neural networks: Quantitative analysis of web-based survey data. *Journal of Medical Internet Research* 22(3): e17695.
55. Bade BC, Dela Cruz CS (2020). Lung cancer 2020: Epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in Chest Medicine* 41(1): 1–24.
56. Li J, Li WX, Bai C, Song Y (2017). Particulate matter-induced epigenetic changes and lung cancer. *The Clinical Respiratory Journal* 11(5): 539–46.
57. Huang CY, Ju DT, Chang CF, Reddy PM, Velmurugan BK (2017). A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non-small cell lung cancer. *Biomedicine* 7(4): 23.
58. Parashar B, Arora S, Wernicke AG (2013). Radiation therapy for early stage lung cancer. In *Seminars in Interventional Radiology* 30(2): 185–190.
59. Delaney GP, Barton MB (2015). Evidence-based estimates of the demand for radiotherapy. *Clinical Oncology* 27(2): 70–76.
60. Vinod SK, Hau E (2020). Radiotherapy treatment for lung cancer: Current status and future directions. *Respirology* 25: 61–71.

61. Earle CC, Tsai JS, Gelber RD, Weinstein MC, Neumann PJ, Weeks JC (2001). Effectiveness of chemotherapy for advanced lung cancer in the elderly: Instrumental variable and propensity analysis. *Journal of Clinical Oncology* 19(4): 1064–1070.
62. Mohamad Saimi NI, Salim N, Ahmad N, Abdulmalek E, Abdul Rahman MB (2021). Aerosolized niosome formulation containing gemcitabine and cisplatin for lung cancer treatment: Optimization, characterization and in vitro evaluation. *Pharmaceutics* 13(1): 59.
63. Ye LY, Sun LX, Zhong XH, Chen XS, Hu S, Xu RR, Zeng SN, Xie WP, Kong H (2021). The structure of blood–tumor barrier and distribution of chemotherapeutic drugs in non-small cell lung cancer brain metastases. *Cancer Cell International* 21: 1–12.
64. Sakin A, Aldemir MN, Alay M (2021). Metastatik küçük hücreli akciğer kanserinde platin seçiminin sağkalımı üzerine etkisi ve sağkalımı etkileyen faktörler: Tek Merkez Deneyimi. *Van Tıp Dergisi* 28(1).
65. McFarland DC (2019). New lung cancer treatments (immunotherapy and targeted therapies) and their associations with depression and other psychological side effects as compared to chemotherapy. *General Hospital Psychiatry* 60: 148–155.
66. Sharma P, Mehta M, Dhanjal DS, Kaur S, Gupta G, Singh H, Thangavelu L, Rajeshkumar S, Tambuwala M, Bakshi HA, Chellappan DK, Dua K, Satija S (2019). Emerging trends in the novel drug delivery approaches for the treatment of lung cancer. *Chemico-Biological Interactions* 309: 108720.
67. Ricciardi S, Tomao S, De Marinis F (2009). Toxicity of targeted therapy in non–small-cell lung cancer management. *Clinical Lung Cancer* 10(1): 28–35.
68. El-Hussein A, Manoto SL, Ombinda-Lemboumba S, Alrowaili ZA, Mthunzi-Kufa P (2021). A review of chemotherapy and photodynamic therapy for lung cancer treatment. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)* 21(2): 149–161.
69. Schuster M, Nechansky A, Kircheis R (2006). Cancer immunotherapy. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology* 1(2): 138–147.
70. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26(4): 239–57.

71. Green DR, Llambi F (2015). Cell death signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7(12): a006080.
72. Tang D, Kang R, Berghe TV, Vandenabeele P, Kroemer G (2019). The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Research* 29(5): 347–364.
73. Carafa V, Altucci L (2020). Deregulation of cell death in cancer: Recent highlights. *Cancers* 12(12): 3517.
74. Wu Z, Deng J, Zhou H, Tan W, Lin L, Yang J (2022). Programmed cell death in sepsis associated acute kidney injury. *Frontiers in Medicine* 9: 883028.
75. Ashkenazi A, Salvesen G (2014). Regulated cell death: signaling and mechanisms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30: 337–356.
76. D’Arcy MS (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International* 43(6): 582–592.
77. Tait SWG, Ichim G, Green DR (2014). Die another way–non-apoptotic mechanisms of cell death. *Journal of Cell Science* 127(10): 2135–2144.
78. Kist M, Vucic D (2021). Cell death pathways: intricate connections and disease implications. *The EMBO Journal* 40(5): e106700.
79. Sankari SL, Masthan KMK, Babu NA, Bhattacharjee T, Elumalai M (2012). Apoptosis in cancer-an update. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 13(10): 4873–4878.
80. Banfalvi G (2017). Methods to detect apoptotic cell death. *Apoptosis* 22: 306–323.
81. Obeng E (2021). Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Brazilian Journal of Biology* 81: 1133–1143.
82. Van Opdenbosch N, Lamkanfi M (2019). Caspases in cell death, inflammation, and disease. *Immunity* 50(6): 1352–1364.
83. Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S (2013). Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(6): a008672.
84. Koren E, Fuchs Y (2021). Modes of regulated cell death in cancer. *Cancer Discovery* 11(2): 245–265.
85. Nair P, Lu M, Petersen S, Ashkenazi A (2014). Apoptosis initiation through the cell-extrinsic pathway. In *Methods in Enzymology* 544: 99–128.
86. Lavrik I, Golks A, Krammer PH (2005). Death receptor signaling. *Journal of Cell Science* 118(2): 265–267.

87. Yin X, Zhou J, Jie C, Xing D, Zhang Y (2004). Anticancer activity and mechanism of *Scutellaria barbata* extract on human lung cancer cell line A549. Life Sciences 75(18): 2233–2244.
88. Akçapınar R (2021). Hücre ölüm yollarının tespiti için kâğıt tabanlı biyosensör tasarımı. Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Ankara
89. Yılmaz MB, Muz D (2022). Apoptosis in cancer. Turkish Journal of Veterinary Research 6(2): 85–95.
90. Coşkun G, Özgür H (2011). Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi 20(3): 145–158.
91. Lopez J, Tait SWG (2015). Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. British Journal of Cancer 112(6): 957–962.
92. Loreto C, La Rocca G, Anzalone R, Caltabiano R, Vespasiani G, Castorina S, Ralph DJ, Celtek S, Musumeci G, Giunta S, Djinojic R, Basic D, Sansalone, S (2014). The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in Peyronie's disease. BioMed Research International 2014.
93. Sun Y, Fung KP, Leung PC, Shaw PC (2005). A phylogenetic analysis of *Epimedium* (Berberidaceae) based on nuclear ribosomal DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 35(1): 287–291.
94. Ma H, He X, Yang Y, Li M, Hao D, Jia Z. (2011). The genus *Epimedium*: an ethnopharmacological and phytochemical review. Journal of Ethnopharmacology 134(3): 519–541.
95. Jiang J, Song J, Jia XB (2015). Phytochemistry and ethnopharmacology of *Epimedium* L. species. Chinese Herbal Medicines 7(3): 204–222.
96. The World Flora Online (WFO) Plant List (2023). Berberidaceae [online]. Available from: <https://wfoplantlist.org/plant-list/taxon/wfo-7000000069-2023-06?page=1>. [Accessed 18 June 2023].
97. The World Flora Online (WFO) Plant List (2023). *Epimedium* L. [online]. Available from: <https://wfoplantlist.org/plant-list/taxon/wfo-4000013613-2023-06?page=1>. [Accessed 18 June 2023].
98. Qian YF, Du W, Chen LY, Quan QM, Li YX (2023). Floral traits and pollination biology of *Epimedium chlorandrum* Stearn (Berberidaceae). Journal of Plant Ecology 16(4): rtad003.

99. Li HF, Guan XY, Yang WZ, Liu KD, Ye M, Sun C, Lu S, Guo DA (2012). Antioxidant flavonoids from *Epimedium wushanense*. *Fitoterapia* 83(1): 44–48.
100. Yang L, Lu D, Guo J, Meng X, Zhang G, Wang F (2013). Icariin from *Epimedium brevicornum* Maxim promotes the biosynthesis of estrogen by aromatase (CYP19). *Journal of Ethnopharmacology* 145(3): 715–721.
101. Sze SCW, Tong Y, Ng TB, Cheng CLY, Cheung HP (2010). Herba Epimedii: anti-oxidative properties and its medical implications. *Molecules* 15(11): 7861–7870.
102. Li C, Li Q, Mei Q, Lu T (2015). Pharmacological effects and pharmacokinetic properties of icariin, the major bioactive component in Herba Epimedii. *Life Sciences* 126: 57–68.
103. Polat DC, Coskun M (2016). Quantitative determination by HPLC-DAD of icariin, epimedin A, epimedin B, and epimedin C in *Epimedium* (Berberidaceae) species growing in Turkey. *Natural Product Communications* 11(11): 1934578X1601101110.
104. Ren L, Guo M, Pang XH (2018). Identification and classification of medicinal plants in *Epimedium*. *Chinese Herbal Medicines* 10(3): 249–254.
105. Lin CC, Ng LT, Hsu FF, Shieh DE, Chiang LC (2004). Cytotoxic effects of *Coptis chinensis* and *Epimedium sagittatum* extracts and their major constituents (berberine, coptisine and icariin) on hepatoma and leukaemia cell growth. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 31(1-2): 65–69.
106. Zhang G, Qin L, Shi Y (2007). *Epimedium*-derived phytoestrogen flavonoids exert beneficial effect on preventing bone loss in late postmenopausal women: a 24-month randomized, double-blind and placebo-controlled trial. *Journal of Bone and Mineral Research* 22(7): 1072–1079.
107. Edwards SE, Da Costa Rocha I, Williamson EM, Heinrich M (2015). *Horny Goat Weed: Phytopharmacy: An Evidence-Based Guide to Herbal Medicinal Products*. 1st ed. United States: John Wiley & Sons Ltd. United States: 210–214.
108. Kou Y, Wang Z, Wu Z, Zhang P, Zhang Y, Yin X, Wong X, Qiu G, Jiang B (2013). *Epimedium* extract promotes peripheral nerve regeneration in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013: 1–6.
109. Cheng Y, Wang XL, Zhang DW, Wang NL, Yao XS (2007). Nonflavanoid compounds from *Epimedium koreanum*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* 38: 1135–1138.

110. Jiang J, Zhao BJ, Song J, Jia XB (2016). Pharmacology and clinical application of plants in *Epimedium* L. Chinese Herbal Medicines 8(1): 12–23.
111. Zhou H, Yuan Y, Liu Y, Deng W, Zong J, Bian ZY, Dai J, Tang QZ (2014). Icariin attenuates angiotensin II-induced hypertrophy and apoptosis in H9c2 cardiomyocytes by inhibiting reactive oxygen species-dependent JNK and p38 pathways. Experimental and Therapeutic Medicine 7(5): 1116–1122.
112. Li W, Wang M, Wang L, Ji S, Zhang J, Zhang C (2014). Icariin synergizes with arsenic trioxide to suppress human hepatocellular carcinoma. Cell Biochemistry and Biophysics 68: 427–436.
113. Wang ZM, Song N, Ren YL (2015). Anti-proliferative and cytoskeleton-disruptive effects of icariin on HepG2 cells. Molecular Medicine Reports 12(5): 6815–6820.
114. Di S, Fan C, Yang Y, Jiang S, Liang M, Wu G, Wang B, Xin Z, Hu W, Zhu Y, Li W, Zhou Y, Li X, Yan X (2015). Activation of endoplasmic reticulum stress is involved in the activity of icariin against human lung adenocarcinoma cells. Apoptosis 20: 1229–1241.
115. Došlov-Kokoruš ZR, Ivanović ID, Simić MR, Vajs VE, Kovačević NN (2006). The HPLC determination of the content of magnoflorine in *Epimedium alpinum* L. Journal of the Serbian Chemical Society 71(3): 251–255.
116. Cho WK, Ma JY (2022). Antiviral activity of *Epimedium koreanum* Nakai water extract against influenza viruses. Biomedicine & Pharmacotherapy 146: 112581.
117. Xie J, Sun W, Duan K, Zhang Y (2007). Chemical constituents of roots of *Epimedium wushanense* and evaluation of their biological activities. Natural Product Research 21(7): 600–605.
118. Coode MJE (1965). *Epimedium* L. Davis PH (Ed.), Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburg University Press, Edinburgh, page: 210–211.
119. Baytop T (1965). *Epimedium pubigerum* Morr. et Dec. bitkisinin kök ve rizomların üzerinde kimyasal araştırmalar. Journal of Faculty of Pharmacy of Istanbul University 1: 9–17.
120. Yazıcı Bektaş N, Ersoy E, Boğa M, Boran T, Cinar E, Özhan G, Özkan EE, (2021). Cytotoxic and apoptotic effects of *Hypericum androsaemum* on prostate adenocarcinoma (PC-3) and hepatocellular carcinoma (Hep G2) cell lines with identification of secondary metabolites by LC-HRMS. Turkish Journal of Chemistry, 45(5): 1621.

121. Bingol Z, Kızıltaş H, Gören AC, Kose LP, Topal M, Durmaz L, Gulcin I (2021). Antidiabetic, anticholinergic and antioxidant activities of aerial parts of shaggy bindweed (*Convolvulus betonicifolia* Miller subsp.) – profiling of phenolic compounds by LC-HRMS. *Heliyon* 7(5): e06986.
122. Spanos GA, Wrolstad RE (1990). Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 1565–1571.
123. Huang D, Ou B, Prior RL (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(6): 1841–1856.
124. Kahkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha J, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(10): 3954–3962.
125. Yazıcı Bektaş N, Barut B, Mataracı Kara E, Yeşil Cantürk Y (2021). Total phenolic, total flavonoid contents, and *in vitro* biological activities of *Cephalaria procera* Fisch. & Ave-Lall. *Istanbul Journal of Pharmacy* 51(3): 365–371.
126. Kedare SB, Singh RP (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology* 48: 412–422.
127. Deniz FSS, Orhan IE, Duman H (2021). Profiling cosmeceutical effects of various herbal extracts through elastase, collagenase, tyrosinase inhibitory and antioxidant assays. *Phytochemistry Letters* 45: 171–183.
128. Atabey Özdemir B (2019). *Hypericum montbretii* Spach. bitkisinden elde edilen rutin, kuersitrin ve mirisitrin flavonoidlerinin DNA ile etkileşimlerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Zonguldak
129. Dinç H (2015). Bis-akridin ligantlarının sentezi, yapısal karakterizasyonu, antimikrobiyal aktiviteleri ve DNA ile etkileşimlerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Diyarbakır
130. Li Z, Grant KB (2016). DNA photo-cleaving agents in the far-red to near-infrared range—a review. *RSC Advances* 6(29): 24617–24634.
131. Barut B, Yalçın CÖ, Sari S, Çoban Ö, Keleş T, Biyiklioglu Z, Abudayyak M, Demirbaş Ü, Özel A (2019). Novel water soluble BODIPY compounds: Synthesis, photochemical, DNA interaction, topoisomerases inhibition and photodynamic activity properties. *European Journal of Medicinal Chemistry* 183: 111685.

132. Renda G, Özel A, Barut B, Yaylı B, Yaylı N (2018). *In vitro* protection by Crataegus microphylla extracts against oxidative damage and enzyme inhibition effects. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences 15(1): 77–84.
133. Luengas SLP, Marin GH, Aviles K, Acuna RC, Roque G, Nieto F (2014). Enhanced singlet oxygen production by photodynamic therapy and a novel method for its intracellular measurement. Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals 29(10): 435–443.
134. Reis R, Orak D, Yilmaz D, Cimen H, Sipahi H (2021). Modulation of cigarette smoke extract-induced human bronchial epithelial damage by eucalyptol and curcumin. Human & Experimental Toxicology 40(9): 1445–1462.
135. Krzywik J, Mozga W, Aminpour M, Janczak J, Maj E, Wietrzyk J, Tuszyński JA, Huczyński A (2020). Synthesis, antiproliferative activity and molecular docking studies of novel doubly modified colchicine amides and sulfonamides as anticancer agents. Molecules 25(8): 1789.
136. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nature Methods 9: 671–675.
137. Pilepić KH, Yang Z, Chen J, Chen X, Wang Y, Zhao J, Mihaljević S, Li S P (2018). Flavonoids in natural and tissue cultured materials of *Epimedium alpinum* identified by using UHPLC-Q-TOF-MS/MS. International Journal of Mass Spectrometry 434: 222–232.
138. Sebastian J, Osorio-Gonzalez C, Rouissi T, Hegde K, Brar SK (2022). Bioderived fumaric acid for sustainable production of key active pharmaceutical ingredients: Dimethyl fumarate and Monomethyl fumarate. Process Biochemistry 120: 35–40.
139. Abdulkhaleq LA, Assi MA, Noor MHM, Abdullah R, Saad MZ, Taufiq-Yap YH (2017). Therapeutic uses of epicatechin in diabetes and cancer. Veterinary World 10(8): 869.
140. Horie N, Hirabayashi N, Takahashi Y, Miyauchi Y, Taguchi H, Takeishi K (2005). Synergistic effect of green tea catechins on cell growth and apoptosis induction in gastric carcinoma cells. Biological and Pharmaceutical Bulletin 28(4): 574–579.
141. Philips BJ, Coyle CH, Morrisroe SN, Chancellor MB, Yoshimura N (2009). Induction of apoptosis in human bladder cancer cells by green tea catechins. Biomedical Research 30(4): 207–215.

142. Shay J, Elbaz HA, Lee I, Zielske SP, Malek MH, Hüttemann M (2015). Molecular mechanisms and therapeutic effects of (-)-epicatechin and other polyphenols in cancer, inflammation, diabetes, and neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015.
143. Varela-Castillo O, Cordero P, Gutiérrez-Iglesias G, Palma I, Rubio-Gayosso I, Meaney E, Sanchez-Ramirez I, Villarreal F, Ceballos G, Nájera N (2018). Characterization of the cytotoxic effects of the combination of cisplatin and flavanol (-)-epicatechin on human lung cancer cell line A549. An isobolographic approach. *Experimental Oncology* 40(1): 19–23.
144. Lee SH, Jang M, Kim GH (2016). Antioxidative effects of extracts from different parts of *Epimedium koreanum* Nakai. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 45(2): 188–193.
145. Zhang W, Chen H, Wang Z, Lan G, Zhang L (2013). Comparative studies on antioxidant activities of extracts and fractions from the leaves and stem of *Epimedium koreanum* Nakai. *Journal of Food Science Technology* 50: 1122–1129.
146. Munir N, Mahmood Z, Yameen M, Mustafa G (2020). Therapeutic response of *Epimedium gandiflorum*'s different doses to restore the antioxidant potential and reproductive hormones in male albino rats. *Dose Response* 18(3): 1559325820959563.
147. Zhao Y, Chen S, Wang Y, Lv C, Wang J, Lu J (2018). Effect of drying processes on prenylflavonoid content and antioxidant activity of *Epimedium koreanum* Nakai. *Journal of Food and Drug Analysis* 26(2): 796–806.
148. Yang XH, Li L, Xue YB, Zhou XX, Tang JH (2020). Flavonoids from *Epimedium pubescens*: Extraction and mechanism, antioxidant capacity and effects on CAT and GSH-Px of *Drosophila melanogaster*. *PeerJ* 8: e8361.
149. Naseer S, Lone SH, Lone JA, Khuroo MA, Bhat KA (2015). LC–MS guided isolation, quantification and antioxidant evaluation of bioactive principles from *Epimedium elatum*. *Journal of Chromatography B* 989: 62–70.
150. Xu Z, Feng S, Shen S, Wang H, Yuan M, Liu J, Huang Y, Ding C (2016). The antioxidant activities effect of neutral and acidic polysaccharides from *Epimedium acuminatum* Franch. on *Caenorhabditis elegans*. *Carbohydrate Polymers* 144: 122–130.

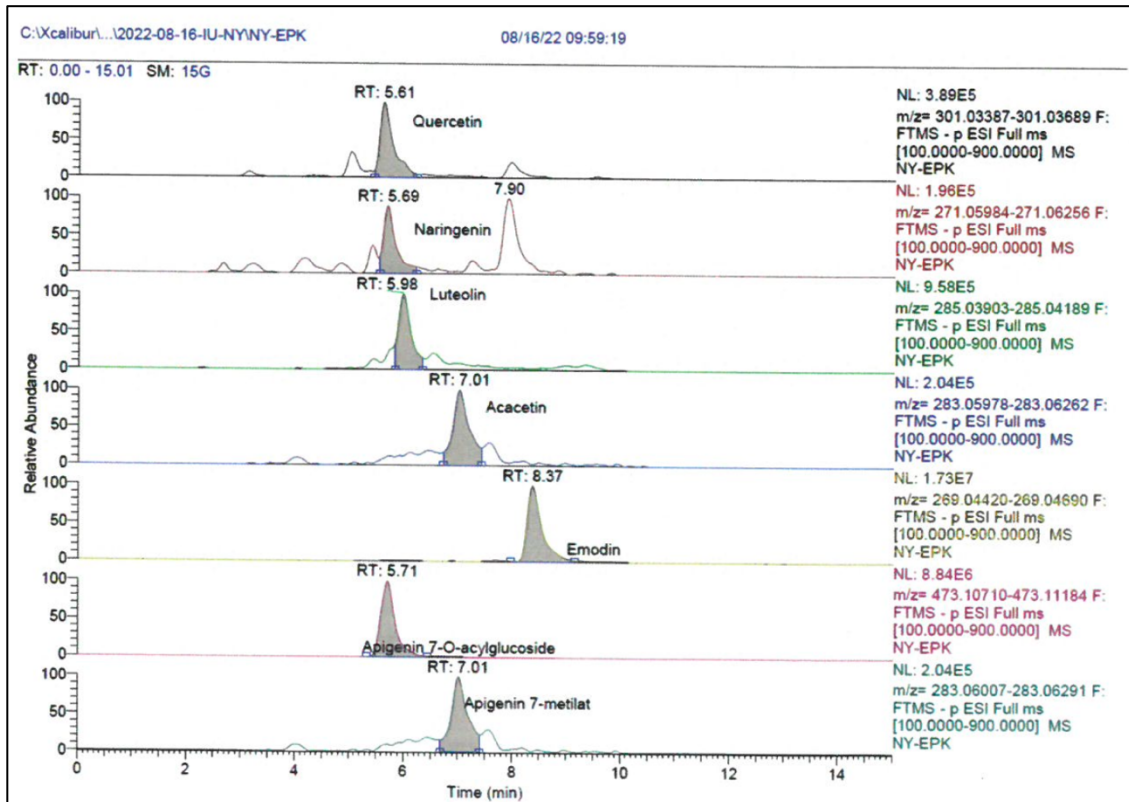
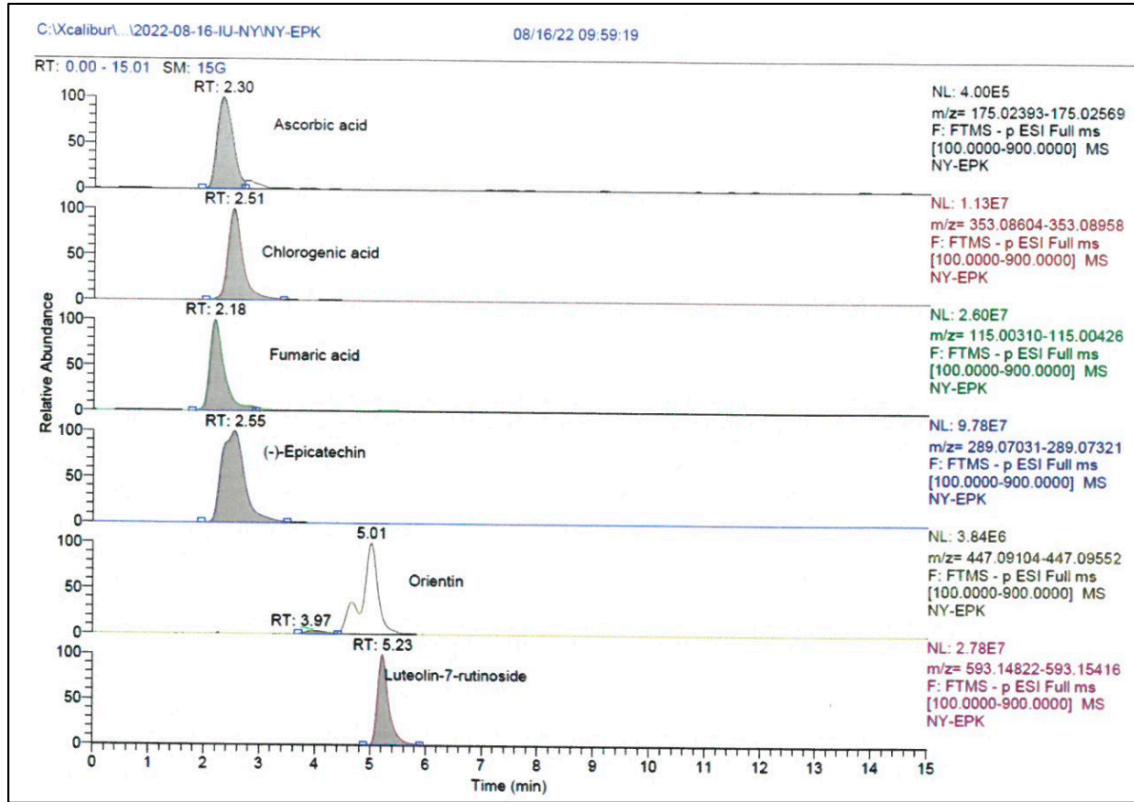
151. Yang J, Zhang HF, Cao XY, Yang XH, Wang FZ, Guo Q, Sun CQ (2017). Enzymatic water extraction of polysaccharides from *Epimedium brevicornu* and their antioxidant activity and protective effect against DNA damage. *Journal of Food Biochemistry* 41(1): e12298.
152. Munir N, Mahmood Z, Riaz M, Tahir IM, Shah SMA, Bacha U, Mehmood R, Hussain S (2022). In vitro evaluation of antimicrobial and cytotoxic potential of *Epimedium grandiflorum* hydroethanolic extract as natural medicine. *International Journal of Natural Medicine and Health Sciences* 2(1): 25–31.
153. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I (2021). The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Science* 22(23): 12827.
154. Çakır A (2023) Nanoenkapsüle fitokimyasalların meme kanseri hücreleri üzerindeki etkisi. Yüksek lisans tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul
155. Zulfiqar F, Khan SI, Ross SA, Ali Z, Khan IA (2017). Prenylated flavonol glycosides from *Epimedium grandiflorum*: Cytotoxicity and evaluation against inflammation and metabolic disorder. *Phytochemistry Letters* 20: 160–167.
156. Pang X, Yin SS, Yu HY, Zhang Y, Wang T, Hu LM, Han LF (2018). Prenylated flavonoids and dihydrophenanthrenes from the leaves of *Epimedium brevicornu* and their cytotoxicity against HepG2 cells. *Natural Product Research* 32(19): 2253–2259.
157. Zhang H, Wu X, Wang J, Wang M, Wang X, Shen T, Wang S, Ren D (2020). Flavonoids from the leaves of *Epimedium Koreanum* Nakai and their potential cytotoxic activities. *Natural Product Research* 34(9): 1256–1263.
158. Elmore S (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicology Pathology* 35(4): 495–516.
159. Grilo AL, Mantalaris A (2019). Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnology Advances* 37(3): 459–475.
160. Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS, Babenko VA, Zorov SD, Balakireva AV, Juhaszova M, Sollott SJ, Zorov DB (2018). Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry* 552: 50–59.
161. Lin C, Huang YC, Wu CR, Wu HT, Fu RH, Tsai CW (2023). Carnosic acid attenuated cytochrome c release through the mitochondrial structural protein Mic60 by PINK1 in SH-SY5Y cells. *Food and Chemistry Toxicology* 173: 113636.

162. Choi H, Cho MC, Lee HG, Yoon DY (2010). Indole-3-carbinol induces apoptosis through p53 and activation of caspase-8 pathway in lung cancer A549 cells. *Food and Chemical Toxicology* 48: 883–890.
163. Nakayama M, Oshima M (2019). Mutant p53 in colon cancer. *Journal of Molecular Cell Biology* 11(4): 267–276.
164. Mogi A, Kuwano H (2011). TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *BioMed Research International* 2011.
165. Liu Z, Zhao X, Zhang L, Pei B (2019). Cytochrome C inhibits tumor growth and predicts favorable prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Oncology Letters* 18(6): 6026–6032.
166. Young Yoo J, Kim CH, Song SH, Shim BY, Jeong YJ, Im Ahn M, Kim S, Cho DG, Jo MS, Cho KD, Cho HJ, Kang SJ, Kim HK (2004). Expression of caspase-3 and c-myc in non-small cell lung cancer. *Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association* 36(5): 303–307.

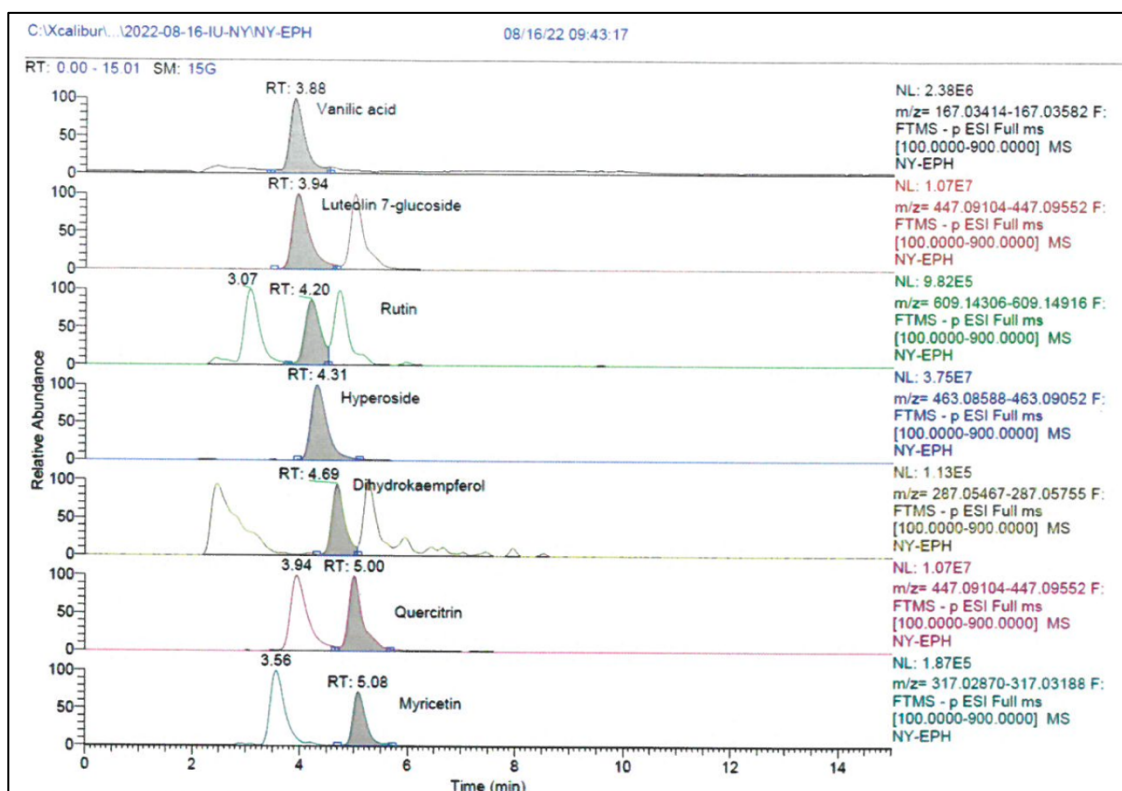
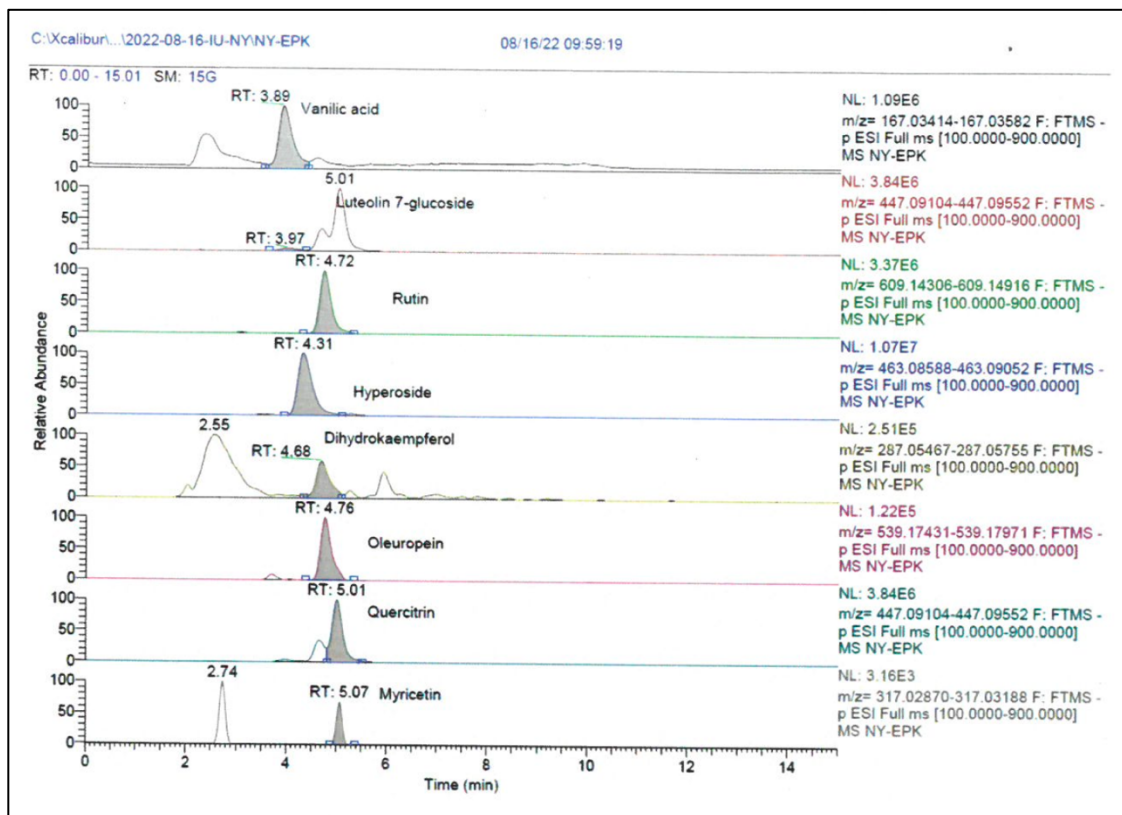


EKLER

EK 1. Ekstrelelere Ait Kromatogram Görüntüleri



EK 1. (Devam)



EK 1. (Devam)

