T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TÜTÜN (*Nicotiana tabacum*) TOHUMU BİTKİSİNİN ANTİ KANSER AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ceren ARAR

DANIŞMAN
Doç. Dr. Feridun AKKAFA

ŞANLIURFA
2022

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TÜTÜN (*Nicotiana tabacum*) TOHUMU BİTKİSİNİN ANTİ KANSER AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ceren ARAR

DANIŞMAN
Doç. Dr. Feridun AKKAFA

Bu çalışma Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Kurulu (HÜBAK) tarafından 21255 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA
2022

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardım ve rehberliğini esirgemeyen, bilimsel bilgi ve tecrübesiyle bana ve tezime katkı sağlayan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Feridun AKKAFA'ya,

Ders aldığım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Fuat DİLMEÇ ve Sayın Prof. Dr. Halit AKBAŞ hocalarıma,

Çalışmalarım süresince laboratuvar ortamında bana destek olan Uzm. Biyolog Özgür YÜKSEKDAĞ'a,

Hakkını asla ödeyemeyeceğim ve beni her durumda destekleyen, yanımda olan ve bana güç veren, sevgili annem Remziye Ayten ARAR'a, kardeşlerim İrem ve Eren ARAR'a ve özellikle tez boyunca beni bir an olsun yalnız ve güçsüz hissettirmeyen, umutsuzluğa kapıldığımda ayağa kaldıran kahramanım sevgili babam Mahmut ARAR'a,

İhtiyaç duyduğumda yardımıma koşan canım arkadaşlarım Elif Gamze HAS, Onur TONK, Dilan ULUKAYA ve Deniz Evrim KAVAK'a, her zor anımda yanımda olan, pozitif kalmamı sağlayan, sevgisi ve sabrıyla bana yol arkadaşlığı yapan sevgili Mehmet Furkan GÜNDÜZ'e teşekkürlerimi sunarım.

CEREN ARAR

2022

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR ..... **i**
İÇİNDEKİLER ..... **ii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **iv**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **v**
SİMGE ve KISALTMALAR ..... **vi**
ÖZET ..... **vii**
ABSTRACT ..... **viii**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **1**
2.1. Kanserin Tanımı 1
2.2. Kanser Epidemiyolojisi ve Kanserin Ayırt Edici Özellikleri 4
2.3. Kanser Türleri 5
2.4. Hücre Döngüsü ve Kanser 6
2.5. Kansere Sebep Olan Genler 8
2.6. Kanser ve Epigenetik 10
2.6.1. Epigenetik 10
2.6.2. Epigenetik Mekanizmalar 12
2.6.3. Epigenetik ve Kanser 13
2.7. Akciğer Kanseri 14
2.8. Kanser ve Apoptozis 16
2.9. Kanser Tedavileri 20
2.9.1. Kemoterapi 20
2.9.2. Radyoterapi 20
2.9.3. İmmünoterapi 21
2.9.4. Fitoterapi 22
2.10. Nicotiana Tabacum 24
2.10.1. Tütün Taksonomik Sınıflandırması 25
2.10.4. Tütün Bitkisinin Toksik Etkisi 26
3. GEREÇ ve YÖNTEM **30**
3.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması 30
3.2. Antikanser Özellik İle İlgili Yöntemler 30
3.3. Bitki Ekstrelerinin Uygulanması 31

3.4. MTT Hücre Proliferasyon Kiti ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi 31
3.5. Hücre Kültürü Etken Dozunun Hesaplanması 32
3.6. Apoptotik Etkinin Tespit Edilmesi 32
3.7. Akım (Flow) Sitometride Apoptozis Seviyelerine Bakılması 33
4. BULGULAR **34**
4.1. Sitotoksik Etkinliğin İncelenmesi 34
4.2. Hekzan Ekstraktının A549 Hücre Hattında Hücre Morfolojisi Üzerindeki Etkileri 35
4.3. Hekzan Ekstraktının A549 Hücre Hattında Hücre DNA'sı Üzerindeki Etkilerinin Floresan Boyama Yöntemiyle İncelenmesi 36
4.4. Hekzan Ekstraktının A549 Hücre Hattının Hücre Apotozisi Üzerindeki Etkilerinin Flow Sitometrik Annexin-V Apoptoz/Nekroz Analizi İle İncelenmesi 37
5. TARTIŞMA **39**
6. SONUÇ ve ÖNERİLER **42**
7. KAYNAKLAR **43**
8. EKLER 52
8.1. Orijinallik ve Beyan Raporu 52
8.2. İntihal Raporu 53
8.3. Tez veri Giriş Formu 54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Kanser 2020 İnsidansı (4).....3
Şekil 2.2. Kanser Mortalite Oranı (4).....3
Şekil 2.3. Kanserin Ayırt Edici Özellikleri (5)……..5
Şekil 2.4. Epigenetik Mekanizmalar (3). 11
Şekil 2.5. DNA Metilasyonu (25). 13
Şekil 2.6. Akciğerin Temel Anatomisi ve Dört Temel Akciğer Kanseri İçin Genel Yerleşimler (31). 15
Şekil 2.7. Akciğer Kanser Tipleri (32).....15
Şekil 2.8. Tütün Tohumu Kapsülleri (68). 26
Şekil 2.9. Sigara Dumanındaki Kanserojenler ile Kanser Arasındaki Bağlantı (78). 29
Şekil 4.1. A-549 ve BEAS-2B Hücrelerinin IC50 Değerlerinin Karşılaştırılması……..35
Şekil 4.2. Hekzan Ekstraktının A549 Hücre Hattı Üzerindeki Morfolojik Görüntüsü.....36
Şekil 4.3. Hekzan Ekstraktının A549 Hücre Hattı Üzerindeki Akridin Oranj-Etidyum Bromür Boyaması Sonucu Elde Edilen Görüntüleri.....37
Şekil 4.4. Hekzan Ekstraktının A549 Hücre Hattı Üzerindeki Apoptoz/Nekroz Etkisi....37
Şekil 4.5. A549 Hücrelerinin Sitometrik Annexin-V-PI Boyaması Sonucu IC_{50} Değerleri……..38

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 2.1. Apoptozis ve Genler (38). 18
Tablo 2.2. Sigara Dumanındaki Bazı Maddeler (69). 27
Tablo 4.1. A5 Hücre Hattındaki IC_{50} Değerleri..... 34
Tablo 4.2. BEAS-2B Hücre Hattındaki IC_{50} Değerleri..... 35

SİMGE ve KISALTMALAR

A549: Akciğer Kanseri Hücre Hattı

BEAS-2B: Normal Akciğer Hücre Hattı (Human Bronchial Epithelium cell line)

DNMT: DNA metiltransferaz

DH2O: Distile Su

CH_2CL_2: Dikloro Metan

IC_{50}: Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyonu

MTT: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazoliumbromür

PBS: Fosfat Tamponlu Salin

PI: Propidyum İyodür

MPF: Maturating Promoting Factor

CDKI: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü

Rb: Retinoblastoma

KHAK: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

PS: Fosfatidilserinin

ICAD: İnhibitör of caspase-activated deoxyribose

CAD: Caspase-activated deoxyribose

ÖZET

TÜTÜN (NICOTIANA TABACUM) TOHUMU BİTKİSİNİN ANTİ KANSER AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

Ceren ARAR

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Kanser, organizmadaki hücrelerin kontrolsüz biçimde çoğalması, bölünmesi, birikmesi ve yayılması ile ortaya çıkan her geçen yıl daha da yaygınlaşan bir hastalıktır. Günümüzde tedavide kullanılan yöntemler, tedavi süresinde vücudun bağışıklık sisteminde birçok sorunlara yol açmaktadır.Nicotiana tabacum'un biyolojik aktivitelerini araştıran az sayıda çalışma vardır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda daha çok yapraklarına odaklanılmıştır. Bu belki de tütün kullanımının akciğer kanseri için önemli bir risk faktörü olmasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle ilk kez Nicotiana tabacum tohumundan elde edilen ekstraktların antikanser aktivitelerini araştırmayı amaçladık. Tütün tohumunun A549 ve BEAS-2B hücre hatları üzerindeki antikanser aktivitesi hücre kültürü yöntemiyle incelendi. Hekzan çözeltisiyle hazırlanmış tütün tohumu ekstraktlarının, bu hücre hatları üzerindeki sitotoksik ölçümü MTT yöntemiyle, apoptotik etkisi ise Annexin-V tayin yöntemiyle belirlendi. A549 akciğer kanseri hücre hattı üzerinde tütün tohumu hekzan esktraktları uygulanması sonucu IC_{50} değeri 58,53 µg/ml olarak ölçüldü. A549 hücre hattı üzerinde morfolojik etkilerinin incelenmesi sonucu 50 µg/ml hekzan ekstraktının hücreleri apoptosize sürüklediği gözlemlendi. Morfolojik görüntülerde doza bağlı olarak hücre sayısının azaldığı ve membran yapılarının değiştiği ve tipik apoptotik hücre görüntüsü verdiği tespit edildi. Hekzan esktraktının A549 hücreleri üzerinde 50 µg/ml dozunun %81 oranında hücre ölümüne neden olduğu gözlemlendi. Bu ölümlerin %20,6'sı geç apoptozis ve %59'u ise nekroz kaynaklı olduğu gözlemlendi.

Elde ettiğimiz bulgulara göre tütün tohumunun A549 hücrelerini apoptozis yolağına sürüklemesi nedeniyle daha kapsamlı çalışmalara yön verme potansiyeline sahip olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: *Nicotiana tabacum,* antikanser, akciğer kanseri, apoptozis

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTICANCER EFFECT OF NICOTIANA TABACUM SEED

Ceren ARAR

Medical Biology Department, Master Thesis

Cancer is a disease that is becoming more common every year, which is caused by the uncontrolled proliferation, division, accumulation and spread of cells in the organism. The methods used in treatment today cause many problems in the immune system of the body during the treatment period. There are few studies investigating the biological activities of Nicotiana tabacum. Studies so far have focused more on leaves. This is perhaps due to the fact that tobacco use is an important risk factor for lung cancer. For this reason, we aimed to investigate the anticancer activities of extracts obtained from Nicotiana tabacum seed for the first time.Anticancer activity of tobacco seed on A549 and BEAS-2B cell lines was investigated by cell culture method. The cytotoxic measurement of tobacco seed extracts prepared with hexane solution on these cell lines was determined by the MTT method, and the apoptotic effect was determined by the Annexin-V assay method.As a result of the application of tobacco seed hexane extracts on the A549 lung cancer cell line, the IC50 value was measured as 58.53 µg/ml. As a result of examining the morphological effects on the A549 cell line, it was observed that 50 µg/ml hexane extract caused the cells to apoptosis. In the morphological images, it was determined that the number of cells decreased and the membrane structures changed depending on the dose, giving a typical apoptotic cell appearance. It was observed that 50 µg/ml dose of hexane extract caused 81% cell death on A549 cells. It was observed that 20.6% of these deaths were caused by late apoptosis and 59% by necrosis.

According to the findings we obtained, it was concluded that tobacco seed has the potential to direct more comprehensive studies because it drives A549 cells to the apoptosis pathway.

Key words: Nicotiana tabacum, anticancer, lung cancer, apoptosis

1. GİRİŞ

Kanser kardiyovasküler hastalıklardan sonra en sık görülen hastalıktır. Kanserin bu denli yaygınlaşması hastalığın tanı ve tedavisi için yapılan çalışmaları arttırmıştır. Fakat kanser hücrelerinin normal hücrelere nazaran proliferasyon hızının oldukça yüksek olması, yoğunluğa bağlı inhibisyonun olmaması, telomeraz aktivitesinin yüksek olması ve metastaz özelliği ile vücudun diğer bölgelerine yayılması gibi özelliklerinden dolayı kanserli hücrelerle mücadele oldukça güçtür. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ve radyoterapi gibi çeşitli tedavi yöntemleri hastalığı tamamen tedavi etmemekle birlikte aynı zamanda normal vücut hücrelerine de zarar vermektedir. Bu yöntemlerdeki dezavantajlar göz önünde bulundurulduğunda daha etkili tedavi yöntemleri arayışına gidilmiştir. Doğada bulunan bitkisel tedavi yöntemleri normal hücrelerde herhangi bir hasara sebep olmadan kanserli hücreleri öldürmeyi amaçlar. Bu yönteme fitoterapi adı verilir. Bu yöntemle birlikte bitkilerin özelliklerine göre spesifik kanserler üzerinde etki gösterebilme özelliğine yoğunlaşılmıştır. Bu çalışmada da kanser tedavilerine alternatif bir çözüm olarak düşünülen fitoterapi yöntemi temel alınarak tütün bitkisi tohumunun kanser hücrelerini apoptozise hangi oranda sürüklediğinin araştırılması hedeflendi. Tütün tohumunun antikanser özelliği ile ilgili çalışmaların oldukça sınırlı olması nedeniyle bu çalışmanın önemli olduğu düşünüldü.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanserin Tanımı

Kanser, organizmadaki hücrelerin kontrolsüz biçimde çoğalması, bölünmesi, birikmesi ve yayılması olarak adlandırılır. Kanserli hücreler yalnızca tek bir organı etkileyebildiği gibi uzaklarda bulunan organlara da ulaşarak etki edebilir. (1).

Kanser, büyüme fonksiyonları hasar görmüş hücrelerdeki klonal yayılım olarak da açıklanabilir. Somatik genetik hastalıklardan en sık görülen ve en komplike olanıdır. Birçok toplumda kanserin görülmesine ek olarak kanserden ölüm oranı da beşte bir olarak saptanmıştır.

Görülen bütün kanser türleri DNA dizisindeki çeşitli anormaliler sonucu oluşmaktadır. Kanserlerin %10 ila 15'i kalıtımsal olarak anne ve babadan aktarılırken geri kalan %85-90'lık kısımda bir insanın DNA'sının yaşam boyu çeşitli mutajenlere maruz kalması sonucu oluşur (2). Kanser hücrelerinin metabolik aktivasyonları normal hücrelere kıyasla çok daha farklı seyreder. Kanser hücreleri yüksek glikoliz hızı, pürivat oksidasyonu ve laktik asit oluşumundaki artışlarla normal hücrelerden farklı bir metabolik aktiviteye sahiptir (3).

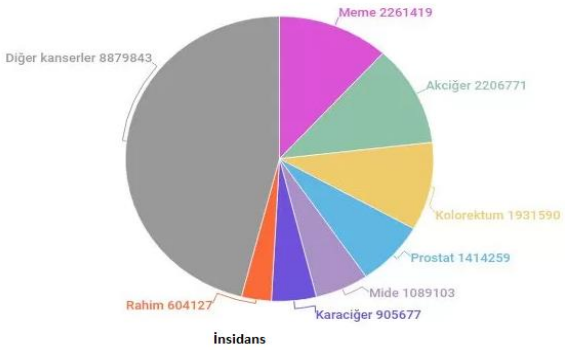
Kanser multifaktöriyel bir hastalık olup birçok etmen tarafından gerçekleşebilir. Bakteriler, virüsler, radyasyon, kalıtım, çevresel faktörler, beslenme alışkanlıkları ve diyet, kimyasallar gibi birçok etmen kanserleşmeye sebep olmaktadır. Kalıtsal olarak meydana gelen kanserler çevresel faktörlerden dolayı oluşan kanserlerden çok daha az oranda görülür. Tümör gelişimini engelleyen tümör baskılayıcı genlerdeki bozuklukların kalıtımsal bir şekilde aktarılması ve hücrelere radyasyon gibi bir karsinojenin ilave katkısı insanları kansere daha yatkın hale getirebilir. Kanser oluşumuna etki eden bir diğer etmen de virüsler ve bakterilerdir. *Helicobacter pylori,* T hücreli lösemi virüsü, insan papilloma virüsü gibi çeşitli virüs ve bakteriler, hücreleri biyolojik olarak anormal özelliklere sahip olacak şekilde değiştirerek kansere neden olabilmektedir. Fiziksel ve kimyasal etmenlerde hücrelerde değişikliklere neden olarak kanser oluşumunu tetikleyebilir. Kansere neden olan fiziksel etmenler; radyasyon, ısı, güneş ışığı, mekanik etki, iyonlaştırıcı radyasyon (gama, x, nükleer emisyon, UV) olarak sıralanabilir (2).

Kanser mortalite oranı en yüksek olan hastalıklardan biridir (2). Dünyada her beş kişiden biri kansere yakalanmaktadır. Her sekiz erkekten biri kanserden ölmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) bir yan kuruluşu olan Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC), küresel kanser yüküne ilişkin son verilerini 15 Aralık 2020'de yayımladı. Buna göre küresel olarak kanser yükünün 2020 yılında 19,3 milyon yeni vakaya ulaştığı ve 10 milyon can kaybının olduğu ileri sürülmüştür (4).

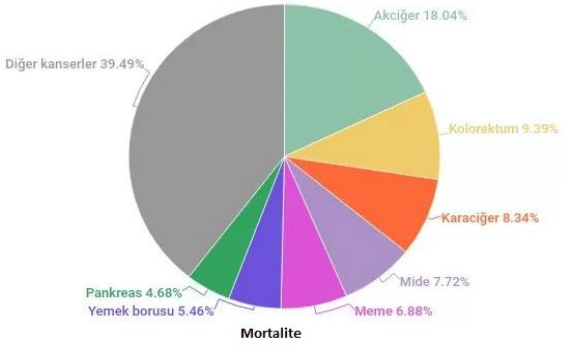
2020 de en yaygın olarak görülen ve yeni tanı konulan kanser vakalarının %60'ından ve aynı zamanda kansere bağlı ölümlerin %70'inden fazlasında 10 spesifik kanser türünün sorumlu olduğu saptanmıştır. Dünya çapında görülen en yaygın kanser türü, aynı zamanda yeni vakaların da %11,7'sini kapsayan kadın meme kanseridir. Bu

durumu sırasıyla %11,4 ile akciğer kanseri, %10,0 ile kolorektal kanseri, %7,3 ile prostat kanseri ve %5,6 ile mide kanseri takip etmektedir (4).

Kanser sebepli ölümlerin başında %18 ölüm oranıyla akciğer kanseri bulunmaktadır. Daha sonra sırasıyla; %9,4 oranında kolorektal kanser, %8,3 oranında karaciğer kanseri, %7,7 ile meme kanseri ve %6,9 oranıyla kadın meme kanseri takip etmektedir (4).



Şekil 2.1. Kanser 2020 İnsidansı (4).



Şekil 1.2. Kanser Mortalite Oranı (4).

Cinsiyet farklılığına göre kanser vakalarının görülme sıklığı verilerle belirtilmiştir. Erkeklerde en sık tanı konulan ve bu hastalık nedeniyle ölümlerin başlıca sebebi akciğer kanseridir. İnsidans sıralamasında (yani her 100 bin kişide ortaya çıkan

kanser vaka sayısı) akciğer kanserinden sonra sırasıyla prostat kanseri, kolorektal kanser gelir. Kadınlarda en sık tanı konulan ve ölüm oranı en yüksek olan kanser türü meme kanseridir. İnsidans sıralamasında meme kanserinden sonra kolorektal kanser ve akciğer kanseri gelir (4).

2.2. Kanser Epidemiyolojisi ve Kanserin Ayırt Edici Özellikleri

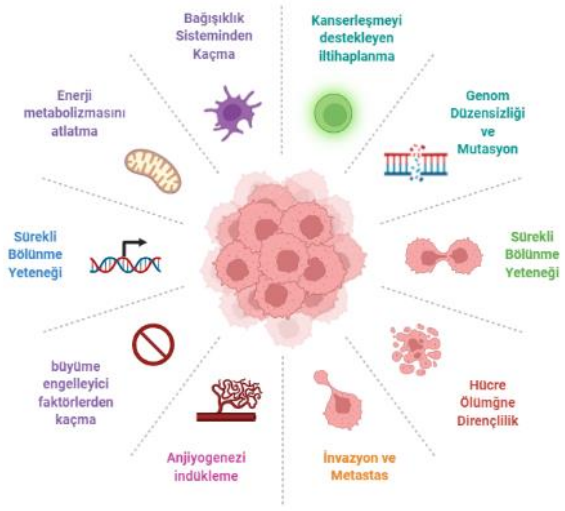
Kanser epidemiyolojisine ilişkin detaylı ve doğru bilgi, bu hastalıkların olası nedenleri ve demografik eğilimleri hakkında temel bilgiler sağlayarak, hastalığın önlenmesi, kontrolü ve teşhisi için etkili politikalar geliştirmek için özel sağlık müdahalelerinin ve zamanında oluşturulmasına olanak tanır. Kanserde risk faktörleri %85-90 çevre ve %10-15 genlerin etkisiyle oluşur. Çevresel faktörler;

- Meyve sebze tüketiminin azlığı,
- Fiziksel aktivitenin yetersizliği,
- Obezite,
- Alkol,
- Çeşitli enfeksiyonlar,
- UV ve benzeri radyasyonlar,
- Hava kirliliği olarak sıralanabilir.

Kanser epidemiyolojisinde kullanılan ölçüt olan insidans, sağlıklı kişilerin belirli zaman biriminde belirli bir hastalığa yakalanma olasılığıdır. Kanserde insidans ise risk altında bulunan toplumda bir yıl içinde değişen kanser vakalarının sayısıdır. İnsidans hızı ise belirli bir zamandaki yeni olan kanser olgu sayısı / belirli bir süre izlenen risk altındaki nüfüs * (100.000). Aynı şekilde kanser epidemiyolojisinde kullanılan ölçütlerden biri olan mortalite topluluk için kullanılan ölüm oranı terimidir (5).

Kanserin ayırt edici özellikleri insan tümörlerinde birçok aşamalı gelişim sırasında çeşitli biyolojik değişimleri içerir. Bu ayırt edici özellikler, kanser karmaşıklığını rasyonalize etmek için bir yönetim ilkesi oluşturur. Bunlar arasında proliferatif sinyalleşmeyi sürdürmek, büyüme inhibitörlerinden kaçınmak, hücre ölümüne direnmek, klon ölümsüzlüğünü sağlamak, anjiyogenezi indüklemek, istila ve metastazı aktive etmek yer alır. Bu özelliklerin temelinde genetik çeşitliliğe yol açan ayrıca bu özelliklerin kazanılmasını ve birçok özelliği oluşturan iltihaplanmayı teşvik eden genomik kararsızlıklar yatmaktadır. Son on yıldaki kavramsal ilerlemeler, bu

listeye, enerji metabolizmasını yeniden programlaması ve bağışıklık hasarını önlemesi gibi iki olası ortak özelliği de ekledi. Kanser hücrelerine ek olarak, tümörler başka bir karmaşık özellik sergilerler: "mikroplar" üreterek farklı özelliklerine katkıda bulunan, görünüşte normal ancak anormal hücrelerden oluşan bir dizi içerirler. Bu durum insan kanserinin tedavisi için yeni araçların geliştirilmesini giderek daha fazla etkilemektedir(5).



Şekil 2.3. Kanserin Ayırt Edici Özellikleri (5).

2.3. Kanser Türleri

Kanser, farklı hücre türlerinde anormal bir proliferasyondan kaynaklanır. Kanserli hücrelerin davranışının ve tedaviye verebildikleri yanıtlarının çoğunlukla değiştiği 100'den fazla kanser türü bulunmaktadır. Onkolojide en önemli konu" benign" ve "malignant" tümörlerdir. Çoğunlukla normal hayatta gördüğümüz cilt siğili iyi huylu (benign) bir tümördür. Bu tümörler ne çevresindeki normal dokuyu işgal eder ne de uzakta olan vücut bölgelerine yayılım gösterir. Buna karşın kötü huylu (malignant) tümörler ise hem çevresindeki normal dokuyu istila eder hem de dolaşım ve çeşitli lenfatik sistemler aracılığıyla tüm vücuda yayılabilir.

Sadece kötü huylu tümörler kanser olarak adlandırılır. Bir kanser türünü kötü yapan özellik, onun istila etme ve dolaşım gibi çeşitli yollarla yayılım (metastaz) yapma yetenekleridir. Kanserli hücreler çoğalmaya başladıkları zaman normal hücrelerden farklı hareket ederler. Ne zaman çoğalmayı durduracaklarını veya ne zaman öleceklerini bilmezler ve çoğu zamanda birbirine yapışmazlar. Yapışmamaları durumunda birbirinden ayrılarak kan damarlarıyla ya da lenf sistemiyle yayılım gösterirler. Bu sürece metazstaz adı verilir (6). İyi huylu tümörler çoğunlukla cerrahi bir işlemle alınabilmekte ancak kötü huylu tümörler fazlaca yayılım gösterdiklerinden lokal tedavi yöntemleri bu kanser türü için yeterli olmamaktadır (7).

Hem iyi huylu hem de kötü huylu tümörler ortaya çıktıkları hücrelerin tiplerine göre sınıflandırılırlar. Birçok kanser türü üç ana grup içerir: karsinomlar, lenfomalar, sarkomalar. İnsan kanser türlerinin %90'ını içeren karsinomlar epitel hücrelerin malignantlarıdır. Daha nadir olarak görülen sarkomlar ise fibröz, kas, kıkırdak ve kemik gibi bağ dokulardaki katı tümörlerdir. Buna karşın insan malignitelerinin %8'ini oluşturan lösemiler, lenfomalar kan oluşturan hücrelerden ve bağışıklık sistemi hücrelerinden kaynaklanır (7).

2.4. Hücre Döngüsü ve Kanser

Bir organizmanın, organın veya dokunun gelişimi; hücre büyümesi ve üremesinin yanı sıra hücre ölümünün bir bölümünü kapsarir. Hücre büyümesinde, farklılaşmasında ve çoğalmasında rol oynayan proto-onkogenlerdeki mutasyonlar tümörlerin büyümesine neden olur. Ayrıca tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar hücre döngüsü inhibisyonunu engeller ve anormal hücre büyümesine neden olur(8).

Hücre döngüsü devam eden evre geçişleri gösteren bir döngüdür. Hücrelerin fiziksel durumlarına göre substratları düzenleyerek kinazların inaktif ve aktif hale getirilmesi ile hücre döngüsündeki geçişler gerçekleştirilir. Kontrol noktaları ise hücre içi ve dışındaki şartlar sağlanana kadar geçişleri geciktirmekle görevlidir. Hücre döngüsündeki kontrol noktaları G1 ve G2 evrelerinin sonundadır. Hücre G1 evresindeyken uyarı alınca replikasyon döngüsüne girer. Oluşan iki hücre bölünmesi arasındaki zaman dilimi somatik hücre döngüsü olarak adlandırılır. Bir mitozun bitip bir diğerinin başlamasına kadar olan süreye ise interfaz aşaması denir. Görünür mitoz olarak

bilinen bölünme evresine de M fazı denir. G1 RNA ve proteinlerin sentezinin yapıldığı evredir. DNA replikasyonun başlamasıyla G1 fazı bitip S fazına geçilir ve S fazı sonunda DNA miktarı 2n olur. G1 ve G2 fazları DNA replikasyonun olmadığı gap evreleridir. Buna karşın RNA ve protein sentezleri interfazdaki üç evrede de devam eder.

MPF (maturating promoting factor) olarak da bilinen M-faz kinazlar farklı fonksiyonlar içeren 2 alt üniteden oluşur. Hedef olan proteinlerdeki serin-threonin rezidülerini fosforile eden katalitik alt ünite olan p34 ve kinazın gerekli substratla aktivasyonu için gereken regülatör alt ünite p45dir. Birçok tipte çeşitlilik gösteren regülatör kinazların ortak özellikleri katalitik alt ünite içermeleridir. Bu regülatör alt üniteler siklinler olarak adlandırılır. Siklin olarak adlandırılan regülatör alt birimler katalitik alt birimlerle kompleks oluşturarak siklin bağlı kinazları oluşturur.

Siklin D sentezlenmesi, hücrede büyüme faktörleri ile uyarılarak aktive edilir. Genellikle Siklin D'ler cdk2, cdk4 ve cdk5 ile kompleks bir yapı oluşturarak hücrenin G0'dan çıkıp siklusa girerek hücrenin G1/S restriksiyon noktalarını aşmasını sağlar. Siklin D diğer siklinlere göre daha farklı olup ömürleri kısadır ve büyüme faktörü yokluğunda seviyeleri hızlıca düşer. Diğer yandan cdk2-siklin E kompleksi de hücrenin S fazına girmesi için gereklidir. Cdk2-siklin A kompleksine ise G1/S fazı ve G2/M geçişinde gerek duyulur (9).

Hücre döngüsünde bir aşamadan diğerine geçiş çeşitli kontrol noktaları ile kontrol altına alınır. Bu kontrol noktaları hücre döngüsünde herhangi bir anormalite veya bir kusur tespit edilirse sorun çözülene kadar hücre döngüsünün durmasına sebep olacak efektörler taşır. Efektör proteinler hücre döngüsü ilerlemesini tersi yöne çevirecek veya durdurabilecek inhibitörler taşır. Bunlar CDKI olarak bilinir. Örneğin döngü G1'de tutulduğunda CDKI'lerin Ink4 ailesinde bulunan çeşitli proteinler, CDK4 ve CDK6'yı inhibe eder.

Hücre döngüsünün deregülasyonu malign fenotipli kontrolsüz hücre çoğalmalarının temelini oluşturmaktadır. Mitojenler, E2F transkripsiyon faktörü ailesiyle etkileşime giren "pRB" proteinin fosforilasyonunu tetikleyerek oluşan bozunumun, G1-S CDK aktivitelerini uyararak, hücre döngüsü ilerlemesini serbest bırakır. Bu yüzden kanser hücrelerinde "pRB" büyük olasılıkla kusurludur. Normal olmayan sinyalizasyonda Rb fosforilasyona uğrayarak Cdk-Siklin komplekslerinin aktivasyonunu

sağlar. Bu bağlamda Rb fosforilasyonun onkojenik sinyal yolaklarıyla yakından ilişkisi; Rb geninin çeşitli mutasyonlar ve metilasyonlarla oluşan inaktivasyonunun kanserde yaygın olarak görülmesi bu ilişkiyi doğrular niteliktedir. CDKI'leri kodlayan çeşitli tümör baskılayıcı genler örneğin p15, p16 ve p27 gibi genlerin inaktivasyonu da birçok tümör tiplerinde yaygın olarak bulunmaktadır (10) .

2.5. Kansere Sebep Olan Genler

Kansere sebep olan etmen ne olursa olsun, kanser genetik materyalin bozulması sonucu oluşur. Bir gende meydana gelen mutasyondan ziyade çok sayıda gende oluşan mutasyonlar kanser oluşumunda rol oynar (2).

Kanserin temel olarak birçok gendeki bozukluklarla alakalı olduğu bilinmektedir. Bu genlerde meydana gelen hatalar DNA tamir mekanizmalarıyla onarılmaya çalışılır. Buna rağmen oluşan hatalar yanlış ve eksik gen ürünü olan proteinlerin hatalı sentezlenmesini sağlayarak, hücresel düzeyde bir bozukluk meydana getirir. Genin işlevini değiştiren bir diğer etmen de çeşitli epigenetik değişimlerdir. Bunlar; asetilleme, metilleme, fosforilleme ribozilleme, vs gibi sıralanabilir. Bu değişimler; kromozomlar üzerinde sadece özel bölgelere etki edilebileceği gibi kromozomun tamamını veya büyük bir kısmını etkileyen bölgesel delesyon, insersiyon veya inversiyonlar olarak da görülebilir.

Kanserin oluşumunda 3 önemli gen grubu bulunmaktadır. Bunlar; onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleridir (1).

2.5.1. Onkogenler

Protoonkogenler hücrelerdeki sinyal iletim mekanizmasında işlev gören birçok proteinin sentezinden sorumlu genlerdir. Hücre ileti yollarındaki protoonkogenlerde gerçekleşen mutasyonlar hücre bölünmelerindeki kontrolsüzlük, transkripsiyon faktörlerinin artması, büyüme faktörlerinin çok fazla üretilmesi gibi sonuçlar ortaya çıkarmaktadır. Büyümenin düzenlenmesini kontrol eden proteinler olan protoonkogenlerin onkogenlere dönüşümü, hücre büyümesinin kontrol mekanizmasının bozulmasına ve kanser hücrelerinin kontrolsüz bölünmesine sebep olmaktadır(3).

Dönüşen onkogenler eğer viral onkogenler ise v (viral) harfi ile (v-fos, v-myc), hücresel benzerleri ise c (cellular) harfi başa getirilerek (c-fos, c-myc) ifade edilir (9).

2.5.2. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler, büyümeyi inhibe eden yolun çeşitli bileşenlerini kodlar. Normalde hücre bölünmesini bloke eden proteinleri kodlayan bir veya daha fazla tümör baskılayıcı gendeki mutasyonlar tümörlere neden olur (2). Şimdiye kadar 10 civarında tümör baskılayıcı gen tanımlanmıştır. Tek bir alleldeki değişikliğin normal işlevi bozduğu hücre kanserlerinden farklı olarak, bir tümör baskılayıcı genin her iki allelinin de bir tümör büyümeden önce işlevini kaybetmesi gerekir (9). Keşfedilen ilk kanser baskılayıcı gen, retinoblastomadır (Rb). Rb bölgesine göre heterozigot olan hücreler normaldir ve normal Rb geni için heterozigotluk kaybı kanser gelişimine yol açar. (2).

2.5.3. DNA Tamir Genleri

Diğer önemli gen grubu olarak bilinen DNA tamir genleri; hasarlı olan DNA'yı tamir edebilmek için bu mekanizmada görevli olan genleri hasarlı bölgeye çekerek gen işlevinin yeniden kazanımını sağlar. Çok önemli işlevi olan bu gen grubunda meydana gelen çeşitli hatalar, hücrenin kanserleşmesinde çok sık rastlanan bir durumdur (1). Hasarlı hücrelerde p53, büyüme regülasyonunda önemli bir rol oynar. Hücre içi DNA hasarı, p53 ifadesinin artmasına ve hücre döngüsünün G1'de durmasına yol açar. DNA onarımı başarılı olursa hücre döngüsü devam eder. Onarım başarısız olursa hücre ölür (apoptoz). Mutant p53 proteini ile hasar gören hücreler G1'de durmaz ve sonraki S evresinde hasarlı DNA iki katına çıkar (9).

2.5.4 Tümör Virüsleri

Bilimsel olarak önemli bir adım olarak görülen bazı gözlemler, Danimarka'da, öncelikle 1908'lerde kuşlarda löseminin ve sonrasında 1911'lerde civcivlerde sarkomanın "taşınabilir" olduğunu göstermiştir. Bu yapılan gözlemler viral onkolojinin temelini oluşturmuştur. 1930'larda R. Shope'nin tavşanlar üzerinde yaptığı çalışmalarda, yaban tavşanlarının ayak tabanlarında yerleşim gösteren fibramatöz tümörler elde

edilmiştir. Bu elde edilen hücreden arındırılmış ekstrelerin, diğer kuşlar da tümör gelişimine yol açtığı görülmüştür. Elde edilen bu ekstreler Shope'un fibroma virüsü olarak isimlendirilmiştir. İlk durumda iyi huylu olarak görülen papillomların zaman içinde ve spontane şekilde skuamöz hücreli karsinomlara dönüştüğü saptanmıştır.

1960 ve 1970'li yıllarda yapılan detaylı çalışmalarda "reverse transkriptase", rekombinant DNA teknolojisi, onkogenler ve tümör baskılayıcı genler gibi önemli kavramlar ortaya çıkmıştır.

Virüs ile insan malignitelerinin gelişimi arasında yakın bir ilişki vardır. Bugün, insan populasyonunda, üyeleri dünya çapında enfeksiyöz kanser ajanları olan bir grup onkojenik DNA virüsü bulunmaktadır. Bu grup Epstein-Barr virüsü, Kaposi sarkomu ile ilişkili herpes virüsü, insan papilloma virüsü ve insan polioma virüsünü içerir. Küresel olarak, kanser vakalarının tahminen %5'i enfeksiyöz ajanlarla ilişkilidir. DNA virüsü çalışmaları ile, hücre dönüşümündeki başlıca moleküler faktörler hakkındaki mevcut bilgilere katkıda bulunulmuştur. Çalışmalar aynı zamanda bu virüsler tarafından kullanılan tümörijenezin moleküler mekanizmalarını da aydınlatmış ve bazı durumlarda virüsün karsinojenisitesi için gerekli olan kofaktörlerinde olabileceğine dair göstergeler sunmuştur (11).

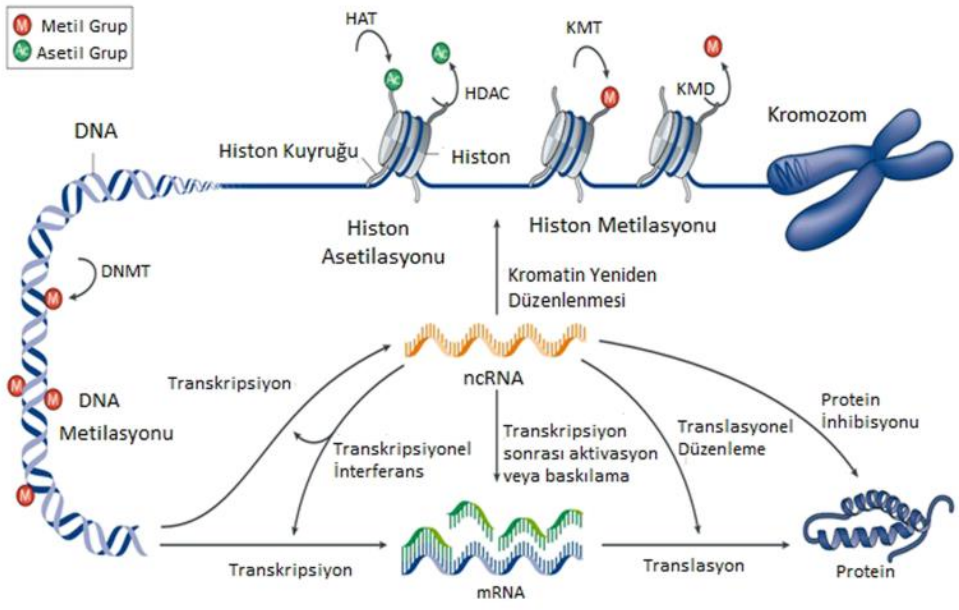
2.6. Kanser ve Epigenetik

2.6.1. Epigenetik

Kalıtım materiyali olan DNA, histon ve histon olmayan proteinlere sarılıp paketlenmiş bir şekilde hücre çekirdeğinde kromatin olarak bulunur. Nükleozomlar kromozomların en küçük fonksiyonel parçası olarak tanımlanır. Bunlar 147 baz çiftinin H2A, H2B, H3 ve H4 proteinlerinin etrafına sarılması ile oluşur. Kromatin iki kısma ayrılır ve bunlar heterokromatin ve ökromatin olarak adlandırılır. Heterokromatin daha yoğun yapıdaki kısım olmakla beraber aktif halde bulunmayan genler bu kısımda bulunur. Ökromatin ise daha gevşek yapıda olup aktif genleri barındırır (12). Son yıllarda yapılan araştırmalar ile histon proteinlerindeki değişikliklerin varsayılandan daha çok olduğu anlaşıldığından, bu değişimlerin özellikleri araştırılmaya başlanmıştır (13). Bu değişimler

1940'lı yıllarda "Epigenetik" kavramı olarak benimsenmiş ve bu durum fenotipin ortaya çıkması için gerekli olan genler ve bu genlerin ürünleri ile ilişkili bir durum olarak görülmüştür (14). Günümüzde "Epigenetik" kavramı, kalıtım materyali olan DNA üzerinde kalıcı olmayan ve gen ifadesini etkileyen kalıtımsal değişiklikler olarak tanımlanır. Bu mekanizma X kromozom inaktivasyonu, embriyonik gelişim genlerinde aktivasyonlar gibi embriyonik dönemden başlayarak süregelen değişimlerden sorumludur. Epigenetik mekanizmalar doku ve organlarda farklı fonksiyon gösterebilir. Bu durum dokulardaki oluşumdan sorumlu genlerin farklılığından ve buna bağlı olarak transkripsiyonun sonucu olan ifadenin de farklılaşacağından kaynaklanabilir. Embriyodan yaşamın sonuna kadar olan zamanda gen ifadesinde birçok değişiklik meydana gelmektedir. Epigenetik değişimlerin, bir gendeki aktivasyonun susturulmasına sebep olduğu görülmektedir. Gen ifadesinin nasıl düzenlendiğini belirlemek, hücrelerin farklılaşması veya kanserleşmenin anlaşılmasında önemli bir faktördür.

.



Şekil 2.4. Epigenetik Mekanizmalar (3).

2.6.2. Epigenetik Mekanizmalar

Kromatinler dört çekirdekli histon ve histon olmayan proteinlerden oluşur. Oktamerin etrafını çevreleyen 147 DNA baz çiftinden oluşan ve tekrarlanan nükleozomlardan oluşur (15). Kromatindeki değişimleri sağlayan epigenetik mekanizmalar; histon modifikasyonları, kromozom yeniden şekillendirilmesi ve mikro RNA'ların düzenlenmesi olarak sıralanabilir (3).

Bu değişimler, kromatinin lokal yapısal dinamiklerini değiştirerek genomun işleyişini düzenlemek için birlikte çalışır. Bu değişimler arasındaki etkileşimler, memeli genomunun farklı hücre tiplerinde, gelişim evrelerinde ve kanser dahil olmak üzere hastalık durumunun nasıl ifade edildiğini düzenleyen bir "epigenetik manzara" oluşturur. Çeşitli hücresel olaylarda bulunan bu çeşitliliklerin farklı modelleri hücresel kimliği koruma amacına hizmet eder (16).

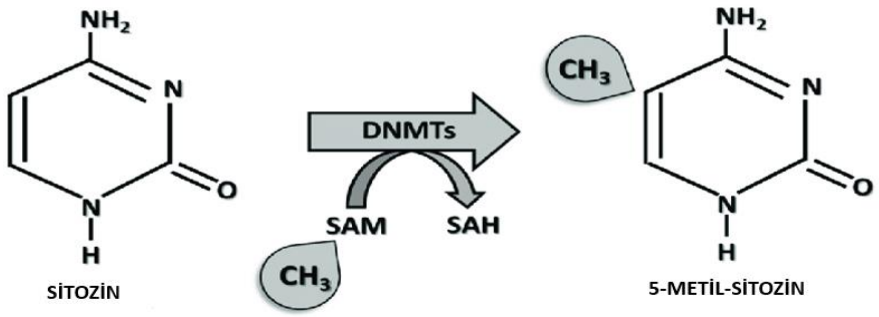
DNA metilasyonun iki görevi vardır. Bunlardan biri gen ifadesinin baskılanması diğeri ise genomda yapısal bütünlüğün sağlanmasıdır (17).

Epigenetik çalışmalar kapsamında ilk ve en çok çalışılan DNA metilasyonudur (18,19). Sitozin nükleotidinde gerçekleşen metillenmenin gen ifadesiyle bağlantılı olması, çoğu ökaryotik canlının gelişmesinde, normal veya hastalık durumlarında önemli bir role sahiptir (20).

S-adenozikmetiyonundaki (SAM) bir metil (-CH3) grubundaki hücre genomuna sitozin nükleotidi kovalent bağ ile eklenir ve metilsitozini oluşturur. Bu olay DNA metillenmesi olarak adlandırılır ve bu süreç DNA eşlenmesinin ardından enzimatik olarak gerçekleşir (21). Memeli hücrelerde gerçekleşen DNA metilasyonu çoğunlukla CpG dinükleotidindeki sitozinin pirimidin halkasının 5. karbonunda olur. CpG adacıkları genelde genlerdeki promotör bölgelerde bulunur ve 0,5 ila 3 kb uzunluğunda CpG bakımından zengin bölgelerdir. Housekeeping genleri başta olmak üzere insan DNA'sının yüzde 60 ila 70'inde CpG adacıkları bulunur. Promotör bölgeleri dışında CpG adacıkları 3'- bölgelerde ve genin yapısında (ekzonik CpG) da bulunur (22).

5-Metilsitozin genellikle CpG adacıklarında olmasına rağmen CpA ve CpT'de de bulunabilir. Ancak bunlar somatik hücrelerde bulunmaz buna karşın emriyonik kök hücrelerde bulunur (23).

DNA’daki metilasyonu, DNA metiltransferaz (DNMT) enzimi tarafından ve metil bağlanma proteinleri yardımıyla katalizlenir (24).



Şekil 2.2. DNA metilasyonu, DNA metiltransferazlar (DNMT'ler) tarafından gerçekleştirilir. CpG dinükleotidlerinde sitozin rezidülerinde 5’- DNMT'ler, metil gruplarını SAM'den (S-adenosilmetiyonin) SAH'a (S adenosilhomosistein) aktarır; böylece 5’-metilsitozin oluşur (25).

2.6.3. Epigenetik ve Kanser

Kanser hücresinde oluşan onkogenlerin fazla ifade edilmesi ve tümör baskılayıcı genlerin ise susmasında genetik değişikliklerin yanı sıra epigenetik mekanizmaların da etkisinin görülmesi üzerine epigenetik çalışılmıştır. Üstelik epigenetik mekanizmaların karsinogenezin ilk aşamalarında aşırı meydana geldiği göz önünde bulundurulunca kanser tedavi yöntemlerinde epigenetik temelli bir yaklaşım yeni bir hedef olarak görülmüştür. Yapılan araştırmalar epigenetik mekanizmaların; prostat, tiroid, mide, beyin, akciğer, mesane, kolon, over, korolektal, ağız, deri ve meme kanserlerinde rol aldığı görülmüştür. Bunlara ek olarak normal olan kök hücrelerin kanser kök hücrelere dönüşmesinde de etkili olduğu saptanmıştır (26).

Kanserli hücrelerin genomlarının normal hücre genomlarına göre hipometile olduğu saptanmıştır. DNA’daki hipometilasyon onkogenleri aktive ederek, transpozonlarının hareketliliğini çoğaltarak, genomik kararsızlığa sebep olarak kanserleşme sürecini oluşturur (27).

Kanserde çoğunlukla görülen metilasyon değişiklikleri tüm genom hipometilasyonu ve bölgesel hipermetilasyon olarak iki gruba ayrılır. Tüm genom hipometilasyonu tüm genomda 5'-metil-sitozinin azalmasıyla oluşur. Bu metilasyon türü neredeyse tüm kanser türlerinde görülür ve genomik kararsızlığa yol açar ve kanserleşmenin ilerlemesini sağlar (28).

DNA'daki hipermetilasyon kanserleşmenin erken evrelerinde ortaya çıktığı için kanserde erken tanı olarak kullanılabilir. Birçok doku ve vücut sıvılarında metilasyon saptanabilir (29).

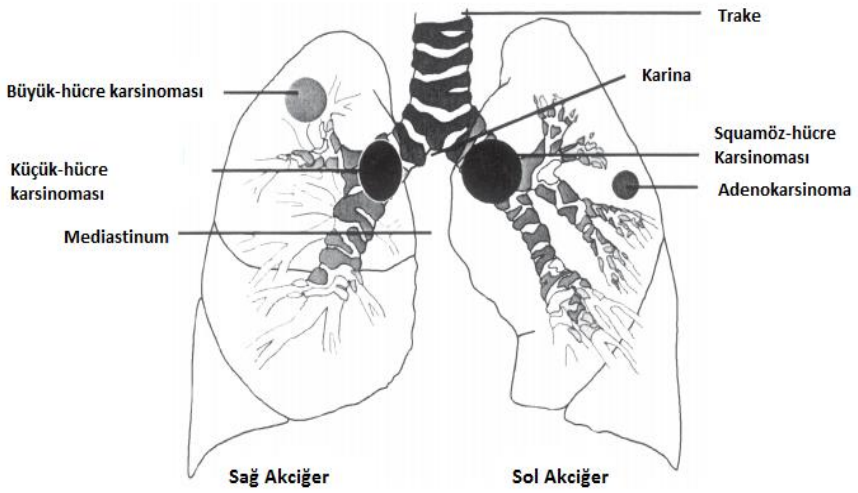
2.7. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri dünya çapında en sık görülen ikinci kanserdir. Erkeklerde ve kadınlarda en sık görülen ikinci kanserdir. 2020'de 2,2 milyondan fazla yeni akciğer kanseri vakası olduğu belirtilmiştir (30).

2020'deki küresel kanser insidansı karşılaştırıldığında Türkiye'deki kadınlar akciğer kanseri sıralamasında beşinci sırada iken erkekler ise ilk sırada yer almaktadır (30).

Sağ akciğer üç lobdan sol akciğer ise iki lobdan oluşmaktadır. Trakea, havayı akciğerlere taşıyan ana hava yoludur. Distal ucundan akciğere giden iki ana bronşa ayrılır. Trakeanın çatallanma alanı karina olarak adlandırılır. Bu alan çok önemli anatomik dönüm noktası olarak kabul edilir. Bunun sebebi kanserin karinaya 2 cm yayılması halinde cerrahi rezeksiyonu imkansız kılmasından kaynaklanmaktadır.

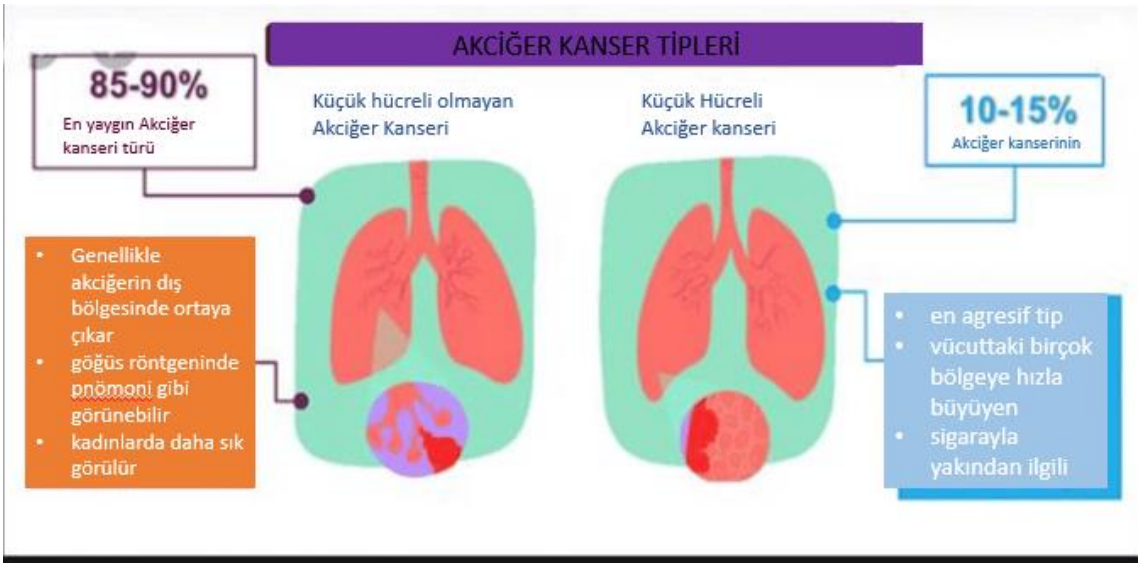
Bölgesel lenf düğümleri mediastinal ve intrapulmoner olarak ikiye ayrılır. Mediastinal düğümler arasında peritrakeal, pretrakeal ve retrotrakeal, aortik, subkarinal, periözofageal ve pulmoner bağ düğümleri bulunur. İntrapulmoner düğümler hiler, peribronşiyal, intralobar, lober ve segmental düğümlerden oluşur. Lenfatik yayılımda yaygın olarak bulunan yerler hiler, mediastinal ve para aortik düğümlerdir. Bölgesel düğümler hastalığın tanı, evreleme ve cerrahi rezeksiyonu için prognozun belirlenmesinde önemli bir rol üstlenir (31).



Şekil 2.3. Akciğerin Temel Anatomisi ve Dört Temel Akciğer Kanseri İçin Genel Yerleşimler (31).

2.7.1. Akciğer Kanseri Patolojisi

Akciğer kanserleri genellikle küçük hücreli karsinomlar ve küçük hücreli olmayan karsinomlar olarak ikiye ayrılır. Küçük hücreli olmayan karsinomlar ise adenokarsinomlar ve büyük hücreli karsinomlar olarak ayrılır.



Şekil 2.4. Akciğer Kanser Tipleri (32).

2.7.2. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri

Akciğer kanserlerinin büyük çoğunluğunu oluşturan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tümör dokusundaki EGFR, ALK, ROS1 ve HER2 gibi çeşitli tirozin kinaz reseptörleri genlerinde, RAS, RAF, MEK1 gibi Map Kinaz sinyal yolaklarındaki genlerinde mutasyonlar gözlenmektedir. Bu mutasyonlar kanserleşmelerle ilişkilendirilmiştir (33, 34).

Akciğer kanseri vakalarında yüzde 30 oranında skuamöz hücreli karsinomlar görülür. Bu karsinomlar sıklıkla sigara içimiyle ilişkilendirilmiştir. Bu tür tümör hücreleri akciğerin orta alanında yer alır ve bu kanser türünün ilerlemesinin, diğer kanser türlerine göre daha yavaş olduğu görülmüştür. Skuamöz hücreli karsinomlar genellikle göğüste kalma eğilimindedirler. Bu tip kanserlerin bulguları genellikle tümör dokuları yeterli derecede büyüdüğünde tespit edilir (35, 36).

2.7.3. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

Küçük hücreli akciğer kanseri, tüm akciğer kanseri vakalarının yüzde 20-25'ini oluşturur. Vücutta 29 günde bölünen en hızlı çoğalan akciğer kanseri alt tipidir. Akciğerin merkezi bölgelerinden kaynaklanır ve çok yüksek metastaz potansiyeline sahiptir (37).

2.8. Kanser ve Apoptozis

Hücreler doğduktan itibaren çoğalıp (proliferasyon), farklılaşır (diferansiasyon) ve sonrasında ölür. Gerçekleşen bu süreçler doğal bir denge ile oluşur. Dokuların homeostazisi, apoptozis ve proliferansyonun dengesini doğru bir şekilde sürdürmesine bağlıdır. Yapılan son çalışmalarda gerçekleşen bu dengedeki aksaklıkların karsinogenesizde önemli bir etken olduğu görülmüştür (38).

Apoptoz canlılardaki otonom mekanizma ile düzenlenerek; yaşlanmış, ihtiyaç duyulmayan veya zararlı hücrelerin öldürülmesidir. Çok hücrelilerde hücre bölünmesiyle hücre sayısı artmaktadır. Bunun aksine artan hücre sayıları ölümlerle dengelenmektedir.

Organizma eğer bir hücreye gereksinim duymuyorsa hücre içi ölüm mekanizmalarını devreye sokarak hücrenin kendi kendini öldürme aşamasına geçmesini sağlar (16).

Apoptozis aynı zamanda yaşamlarını sürdürebilmek için birbirlerine ihtiyaç duyan hücrelerin düzenlediği yanıt olarak da tanımlanabilir. Bu doğrultuda birçok önemli kavramı da beraberinde getirmiştir;

- Hücre; diğer hücrelerden gelen sinyallerle canlı tutulmadığı süreçte apoptoz ile ölebilir. Bu apoptozdaki kitlesel kontrole bağlı doku homeostaziyi korumak için gereken önemli bir etmendir.
- Hücreler için yakınlarındaki hücrelere bağlı olmaları metastatik ilerlemeyi önlemek için çok önemli bir uyarandır.
- Büyüme faktörlerindeki terapötik uygulamalar hastalık işlevlerinde apoptozisi bloke edebilir.
- Bazı durumlarda hücrelerin büyümesi için apoptozisin inhibe edilmesi gerekli olabilir (39).

2.8.1. Apoptozisin Morfolojisi

Apoptoz, karakteristik olarak dağınık tek hücreleri etkiler ve histolojik olarak, bazıları piknotik çekirdek kalıntıları içeren küçük, kabaca küresel veya oval sitoplazmik fragmanların oluşumu ile kendini gösterir (40). Apoptotik hücreler, karakteristik bir sitoplazmik hücre büzülmesi, plazma zarının tomurcuklanması, hücre dış tarafta fosfatidilserinin (PS) zara maruz kalması, kromatin yoğunlaşması ve DNA parçalanması gösterir. Plazma zarı bu işlemler sürecinde sağlam kalır. Sonraki aşamada zarın kabarması, sitoplazmik organellerde ultrastrüktürel modifikasyonlar ve zar bütünlüğünün gerçekleştiği görülür (41). Apoptozis sürecinde gerçekleşen ana morfolojik değişiklik nükleusta yaşanan yoğunlaşma ve sonrasında gerçekleşen parçalara ayrılma durumudur. İmmun elektroforez yapıldığı zaman merdiven şeklinde bir görüntü ortaya çıktığı görülmüştür. Bu görüntü ladder pattern olarak adlandırılır (42).

Apoptozisin erken evrelerinde birleşme noktalarından ayrılan hücreler özelleşmiş olan hücre yüzey organellerini kaybeder ve belirgin bir biçimde büzülür. Dakikalar sonra hacimlerinden üçte birini kaybederler. Bu yaşanan değişikliklerin plazma membrandaki

iyon kanalları ve pompaların aktivasyon kayıplarına bağlı olduğu bilinmektedir (43). Ardından plazma membranında tomurcuklanmalar görülmeye başlar ve hücreler apoptotik cisimciklere parçalanır. Bu apoptotik hücreler komşu hücrelerin makrofajları tarafından tanınır ve fagosite edilir (44).

2.8.2. Apoptozis Mekanizması

Apoptozis belirli şekillerde başlar ya da gelişir. Önce hazırlanmış olan primer hücrelerde başlatılabilir ya da bir uyaran sonucunda sekonder olarak gelişebilir. Hücre dışı uyaranlar olarak sayılabilecekler; tümör nekroz faktör (TNF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) gibi maddelerin ortamda azalmasının yanı sıra ilaçlar, radyasyon veya çeşitli antijenler önemli bir yere sahiptir (38). Organizmadaki apoptozisi uyaran çok sayıda gen bulunmaktadır (Tablo 1).

Belirli bir genetik kontrol altında gerçekleşen programlı hücre ölümü olan apoptozis için birkaç mekanizmadan söz edilebilir. Kaspaz aracılığıyla hücre ölümü: Hücre ölümlerinin düzenlemesi ile ilgili çalışmalar C. elegans üzerinden elde edilmiştir. Programlı hücre ölümüne sebep olan bazı mutasyonlar, C.elegans'ın gelişmesi ile ilgili yürütülen çalışmalar ile saptanmıştır (39).

C. elangans ile yapılan bir çalışmada, CED-3 ve CED-4 genlerinde fonksiyon kaybı mutasyonu taşıyan kurtçukların hücrelerinde apoptozun gerçekleşmediği ve hücrelerin canlılığını koruduğu belirtilmiştir.

Tablo 2.1. Apoptozis ve Genler (38).

Apoptozisi baskılayan genler	Apoptozisi indükleyen genler
• Bcl-2 grubundan;	• Bcl-2 grubundan;
BHRL–1, bcl-xl, bcl-w, bfl-1, brag-1,	Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, bid, bik,
Mcl-1, A1	Hrk1
• c-abl geni	• c-myc
• ras onkogeni	• p53, p21
• çözünebilir fas	• fas (CD95/APO1)
• p35	FADD/MORT, RIP, FAST
• A20	• İnterlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (İCE)
	• LOH (MTS1/CDK41)

Proteaz aktivitesine sahip olan CED-4 proteini, CED-3 öncü proteinini keserek aktif CED-3 proteinin oluşmasını sağlar. Aktif hale gelen CED-3 ise hücre ölümünü başlatır. CED-9 mutantlar hücrelerin embriyonik gelişim sürecinde öldüğü için ergin gelişimi sağlanamamaktadır. Bu gelişmeler iki proteininde hücre ölümünde rol oynadığını göstermiştir (45).

İnsanlarda görülen foliküler lenfoma tarafından klonlanan apoptotik gen Bcl-2 olarak bilinen gendir. Bu genin bir mutantını taşıyan bireylerde, kromozom yeniden düzenlemeler ile lenfoma gelişimi görülmektedir. Onkogen olarak görev yapan bu genin *C. elegans*'larda bulunan CED-9 proteini ile homolog olduğu ve ikisinin de apoptozu inhibe ettiği görülmüştür. (46)

Bcl-2 proteinin hücre ölümünü baskıladığına ek olarak Bcl-2 proteini ile ilgili bazı proteinlerin de apoptotik hücre ölümünü desteklediği bilinmektedir. Apoptotik proteinler iki grupta incelenebilir.

- Anti-apoptotik düzenleyiciler olarak bilinen proteinler; Bcl-2, BclxL, Bcl-w, CED-9, Mcl-1, Rb, gibi proteinlerdir.
- Pro-apoptotik düzenleyiciler olarak bilinen genler; Bax, Bad, p53, c-Fos, Bcl-xS.

Tek geçişli transmembran proteini olan bu proteinler Bcl-2 ailesi olarak kabul edilir. Bunlar apoptozu engelleyen ve apoptoza katkıda bulunanlar olarak iki gruba ayrılır (39).

Kaspaz olarak bilinen proteinler omurgalıların apoptotik yolaklarında etkilidir. Kaspaz yani "caspase" adını katalitik bölgede görev alan sistein rezidüsü taşıyan, elektif olarak hedef proteinlerde **C-** uçundaki **asp**artat'ı kesilen ve enzim (.**ase**) olarak görev aldıkları için bu adı almıştır (47).

Kaspazlar öncelikle prokaspaz olarak sentezlenir, sonrasında spesifik bölgelerinin kesilmesi ile aktif kaspaz durumuna geçer. Bu yolakta protein ile stimüle edilen kaspas-9, kaspaz-3'de belli bölgeleri keserek onu aktif hale getirir. Kaspaz-3 aktifleşince ICAD (inhibitör of caspase-activated deoxyribose)'ı inaktifleştirerek bağlı olduğu CAD (caspase-activated deoxyribose)'dan ayırarak, CAD'ın sitozolde serbest halde kalmasını sağlar. Serbest halde bulunan CAD nükleusa giriş yapar ve kromatinde yoğunlaşmalara ve bir takım DNA kırıklarına sebebiyet vererek hücrenin apoptoza girmesini sağlar (47).

2.9. Kanser Tedavileri

Kanserin çeşitli yöntemlerle tedavi edilmesi; bu yöntemlerin tek başına ya da kombine halde kullanılması tümör oluşumunu önemli derecede etkilemektedir. Bu tedaviler kemoterapi, radyoterapi, cerrahi, immünoterapi vs. olarak sıralanabilir.

2.9.1. Kemoterapi

Kemoterapinin ana işlevi kanserli hücreleri çeşitli kemoterapötik ajanlar kullanarak yok etmektir. Cerrahi işlemden önce tümör boyutlarını küçültmek amacıyla kullanılır. Buna ek olarak lösemi ve lenfoma gibi kanser türlerinde önemli ölçüde etkili bir tedavi yöntemi olduğu bilinmektedir (48).

Kemoterapide kullanılan ilaçlar;

- Alkilleyici ajanlar, DNA transkripsiyonunu baskılayarak protein üretimini bloke eden bir ajandır. Alkil grupları hücreye girdiğinde DNA üzerindeki hidrojen atomları ile yer değiştirir, aynı zamanda kanserojen bir etkiye sahiptir.
- Anti metabolitler, vücutta sinyal iletimi, enzim inhibisyonu veya uyarımı gibi olaylardan sorumlu olan metabolitlerin baskılanmasından sorumludur (49).
- Anti tümör antibiyotikler, DNA/ RNA sentezini inhibe ederek sentezi durdurmaya yarayan kimyasallardır (50).

2.9.2. Radyoterapi

Kanserli hücreleri iyonize ışınlar ile yok etmeye yarayan bir tedavi yöntemidir. Radyoterapi vücudun belirli bölgelerini hedef alabildiği gibi tüm vücuda da uygulanabilir. Rahatsızlığın türü ya da hastanın özelliklerine göre çeşitli radyoterapik tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlar;

- 3 Boyutlu Konformal Radyoterapi,
- Konformal Proton Işın Radyasyon Terapi,
- Yoğunluk Aracılı Radyoterapi,
- Görüntü Rehberliğinde Radyoterapi olarak sıralanabilir (51).

2.9.3. İmmünoterapi

İmmünoterapi kişinin bağışıklık sistemini kullanarak, kanseri de içine alan hastalıkları tedavi etme yöntemidir.

Cerrahi yöntemler ve radyoterapinin kanser üzerinde etkisi büyük ölçüde başarılı olsa da kanserli hücre kalıntıları ya da metastaz sonucu hastalığın nüksetmesi önemli bir sorundur. Bu sebeple kombine tedavi olarak kemoterapinin kullanılması da kanserli hücrelerin yanında, sağlıklı hücrelere de oldukça fazla zarar vermektedir. Tüm bu dezavantajlar göz önünde bulundurulduğunda tümöre özgü tedavilere ilgi oldukça artmıştır (52).

Vücuda dışarıdan verilen maddelerle bağışıklık sisteminin uyarılmasının yanında, vücudun bunu kendi hücreleriyle yapması ve yanıt oluşturabilmesi immünoterapik yöntemin temelini oluşturur. Bu duruma örnek olarak makrofajlar, NK hücreleri, T ve B lenfositleri, dentritik hücreler örnek olarak verilebilir (53).

Vücutta bağışıklık sisteminin kanseri engelleyici özellik göstermesine karşın aynı zamanda kanser oluşumuna da katkı sağladığı bilinmektedir (53).

İmmünoterapide kullanılan yöntemler;

- Monoklonal antikorlar; bu tedavi yöntemi klinik uygulamada en çok kullanılan yöntemdir. Bağışıklık sistemi antikor üretimi ile yabancı maddelere saldırarak vücudu savunur. Antikorlar antijen olarak adlandırılan spesifik proteinlere bağlanır. Spesifik bir antijeni hedef alan antikorlara monoklonal antikor denir (54).
- İmmün sistemi kontrol inhibitörleri; kanserli hücrelere saldırıyı frenleyen kontrol mekanizmasını inhibe ederek kanserli hücrelere saldırıyı hedefler (55) .
- Kanser aşıları; virüslere karşı kullanılan aşılardan farklı olarak kanser hücrelerinden, hücredeki bazı kısımları ya da sadece antijenleri vücuda gönderme yöntemidir. Genellikle bağışıklık sistemini güçlendirmek için kullanılır (56).

2.9.4. Fitoterapi

Kanser dünyada ikinci ölüm nedeni olmakla beraber aynı zamanda kanserden kurtulanlarda da tedavinin yan etkileri haricinde fiziksel, bilişsel ve psikososyal tahribatlar da dahil olmak üzere zorluklar yaşanabilir (57).

Normalde genetik olarak kökeni olduğu düşünülen kanser, son yıllarda yapılan çalışmalarla birçok epigenetik ve çevresel etmenlerin hastalığın gelişimi ve ilerlemesinde büyük bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Bilinen tek bir nedeni olmamakla birlikte kanser, sigara, alkol, obezite ve bir dizi faktörden bağımsız olarak yaygın olarak bir yaşam tarzı hastalığı olarak kabul edilmektedir. Tedavi seçeneklerindeki büyük ilerlemelere karşın insidans ve mortalite oranları artış göstermeye devam etmektedir. Farklı kültürlerde farklı tıbbi sistemler son birkaç yüzyıldır hastalıkların ilerlemesini durdurmak ya da tedavi etmek amacıyla özellikle bitkilerden elde edilen yenilenebilir maddelerin kullanımını kabul etmiştir. Bu kapsamda fitokimyasallar olarak bilinen doğal ajanların potansiyellerini ortaya çıkarmıştır (57).

Bitkiler yeni ilaçların keşfinde ve geliştirilmesinde önemli kaynak olarak kullanılmaktadır. Kanser tedavisinde bitkilerin kullanımı uzun bir geçmişe dayanmakla birlikte, tedavideki geleneksel ilaçların üretilmesi için birincil kaynak olarak gösterilmektedir. Tümör gelişimi üzerindeki önemli düzenleyici etkileri olan yeni proteinler saptandıktan sonra çalışılacak molekülleri bitkilerden veya diğer doğal organizmalardan izole etmeye dayanan araştırmalar, bitkilerin antikanser ilaçların üretim ve geliştirme potansiyeline sahip sentez inhibitörleri için önemli birer kaynak olarak belirlenmiştir (11).

Antikanser olarak kullanılan ilaçlarda görülen direnç, kanser tedavisinin erken dönemlerinde ortaya çıkmıştır. Bu durum hala hastaların tedavisindeki başarıyı engellemektedir. Hücreler ister malign olsun ister olmasın kullanılan birçok antikanser ilac proliferatif hücreleri öldürür. Bu durumda orta düzeyli tümör özgüllüğüne neden olur ve tümör olmayan proliferatif dokular da etkilenir. Bu yüzden kanserli hastalarda daha az duyarlı tümör alt popülasyonların da içinde bulunduğu bütün tümör hücrelerini yok edecek kadar yüksek dozda antikanser ilacı kullanmak çok ciddi bir yan etkiye sebep olacaktır. İlaçların dozları optimal olmadığında ise dirençli olan bazı tümör hücrelerinin

etkilenmemesi söz konusu olabilir. Bu durum tümörlerin sonradan tekrardan oluşmasına yol açar. Bu dirençli tümörler artık sitostatik tedaviye cevap vermeyerek hastaya ölümcül sonuçlar doğurur (58).

Halihazırda kemoterapi protokolleri, aynı klinik standart tedavi klavuzlarıyla ya da rastgele çift kör faz 3 çalışmalarına dayanır. Ayrıca her tümör farklı şekilde davranabilmektedir. Büyük hasta gruplarındaki tedavi yanıtı istatistiksel olarak tahmin edilmesine karşın, bireysel hastalarda tedavi başarısı güvenli veya net bir şekilde tahmin edilemeyebilir. Aynı histoloji ve kökene sahip olan tümör hücrelerinin bile hastadan hastaya farklılık gösterebilmesi bunun en önemli sebebidir (59).

Buna ek olarak araştırmacılar, eski çağlardan bu yana kanser tedavisinde kullanılan birçok bitki türünü bildirmişlerdir. Bu durum göze alındığında günümüzde de bitkilerin tedavi edici özellikleri sebebiyle potansiyel bir antikanser ilacı olarak kullanılmasına ve değerlendirilmesine yönelik yönelmeler görülmektedir. Buna bağlı olarak günümüzde de kullanılan birçok antikanser ilacın çeşitli bitkilerden, mikroorganizmalardan veya deniz canlıları gibi doğal kaynaklardan elde edildiği görülmüştür (60).

Belirtilen bu ilaçların hücrelere etki ettiği mekanizmalar genellikle belirsizdir. Bu duruma ek olarak oksidatif stresin kanserin uyarılmasında, kanserin önlenmesinde ve tedavisinde antioksidanların rolü oldukça belirgindir. Bitkilerin birçoğu da önemli antioksidan kaynağı olarak bilinir. Yapılan çalışmaların büyük bir bölümü kanserin diyetle ilişkisini ortaya koymuştur. Buna ek olarak kanser türlerinin riskleri diyetlerle azaltılabilmektedir (60). Diyetteki bitkilerden doğal olarak oluşan ajanlar kanserin önlenmesinde ve aynı zamanda tedavisinde ilgi kaynağı olmuştur. Doğal olarak oluşan bu ajanlar önemli yan etkilere sahip pahalı kemoterapik ajanların aksine daha güvenli ve daha maliyetsizdir (60). Bitkiler, yeni ilaçların izolasyonu ve keşifleri için önemli bir kaynaktır (61).

Kanserin görülme sıklığı ve ölüm oranları göz önünde bulundurulursa, bu oranları düşürmek için en önemli etmenin erken teşhis ve uygun tedavi olduğu kabul edilir. Birçok kanser türlerini tedavi etme amacıyla kemoterapötik ajanlar bulunmuş olsalar bile, kullanılan bu ilaçlarla bağlantılı olarak birçok yan etki ortaya çıkmakta ve bu ilaçların kullanılması aynı zamanda kanserin eradikasyonunda bazı sınırlamaları da beraberinde

getirmektedir. Örneğin çok yaygın olarak kullanılan bir antikanser ilacın nefrotoksisite ile ilişkisi saptanmış ve bu oldukça önemli bir yan etki olarak kabul edilmiştir. Bu kapsamda hastalarda geçici veya kalıcı böbrek hasarına yol açmıştır. Kanser hastalarının hayatlarını da tehlikeye atacağından durumlarını fazlasıyla kötüleştirmektedir (62).

2.10. Nicotiana Tabacum

Bilimsel adı *Nicotiana tabacum* olan Solanaceae familyasına ait bu bitki dünyanın birçok ülkesinde yetiştirilmektedir. Türkiye'de çoğunlukla Doğu ve Güneydoğu Anadolu'da, Adıyaman-Çelikhan bölgesinde yetiştirilir. *Nicotiana tabacum* bitkisinin tohumu hariç, her bölgesi nikotin içermektedir.

Tütün bitkisi patlıcangiller (Solanacea) familyasında bulunan ve Nicotiana cinsi bir senelik bitkidir. Tütün bitkisinin anayurdu Orta Amerika ve Antiller Bölgesi olarak bilinmektedir. Tütün bitkisinin 50 türü Amerika kökenli olmakla birlikte, 5-6 türü Avusturya ve Yeni Zelanda, bilinen birkaç türü de Asya'da olmakla beraber 60'ın üzerinde türü olduğu bilinmektedir (63).

Tütündeki kaliteyi kurutma işlemi büyük ölçüde etkilemektedir. 4 farklı yöntem ile tütün kurutulması yapılır;

- Flue- Cured tütünler (ısı ile kurutma)
- Air-Cured tütünler (hava ile kurutma)
- Sun-Cured tütünler (güneşte kurutma)
- Fire-Cured tütünler (ateşle kurutma)

Türkiye'de üretilen tütünlerin genel olarak güneşte kurutulduğu bilinmektedir. Üretimden tüketime kadar her aşamada büyük çapta bir istihdam sağlayan bu bitki yüzyılları aşkın süredir birçok bölgede aile tarımı olarak yapılmaktadır. Milli gelir bakımından Türk ekonomisinde önemli bir yer edinmiştir (63).

Dünya toplam tütün üretiminin yaklaşık yüzde 75'inin Çin, Türkiye, ABD, Hindistan, Endonezya ve Brezilya tarafından karşılandğı bilinmektedir (64). Farklı coğrafi bölgelerde hızlıca adapte olup ve bu uyum sürecini kısa sürede atlatan en iyi tarımsal ürün olarak bilinir. Dünya tarım tarihine bakılınca tütün en hızlı yayılış gösteren bitki olarak bilinir. Günümüzde tütün ve tütün ürünlerinin tüketilmediği bir ülke olduğundan söz etmek oldukça zordur. 60'dan fazla tütün türünün içinde en çok

yetiştirilen türü *Nicotiana tabacum L*. dir. Ülkemizde de yetiştirilen türlere göre yüzde 95 oranında bu tür üretilir (65).

Adıyaman, Malatya, Akçadağ, Bahçe ve Mardin kaynaklı tütünler, mızrak biçiminde ve aynı şekilde sığır dili olarak da bilinen formda olan tütün çeşididir. Bu tür tütünler sarı- açık kırmızı, kırmızı renginde bulunan iki kıt'alı kalın ve içimi sert olan tütünlerdir (66)

2.10.1. Tütün Taksonomik Sınıflandırması

- Bilimsel isim: *Nicotiana tabacum L.*
- Alem: Plantae, Eudicots, Asteridler
- Sınıf: Solanales
- Cins: Nicotiana
- Tür: Nicotiana Tabacum
- Küme: Magnoliophyta
- Sınıf: Magnoliopsida
- Aile: Solanaceae
- Latince ismi: Nicotiana Tabacum
- Genel isimleri: Fumo, Petume, Petina, Pitura, Etum, Tabaco, Tütün, Tabaci Folia
- Yetiştirilen yeri: Amerika, Çin, Türkiye, Yunanistan, Hollanda, Fransa, Almanya ve çoğu alt tropikal ülkeler (67).

2.10.2. Tütün Tohumu İçeriği

Tütün bitkisi yalnızca tek bir ana sapa sahip olup ve bu sap kısmında dağınık halde ya da bütün halde salkımlar biçiminde çiçekler bulundurur. Döllenme evresinden sonra oluşan bu çiçek kapsüllerinin sayısının, ortalama olarak bir bitkide 35 ila 100 arasında olduğu gözlemlenmiştir. Bu kapsüllerin içerdiği tohum renkleri kahverengi ve siyah arasında değişmektedir. Bu tohumların ağırlığı 0,007 ila 0,09 gram olup, kapsüllerin içerisinde yaklaşık 1000 tane tohum bulunur (68).



Şekil 2.5. Tütün Tohumu Kapsülleri (68).

Yaprak tütün üretiminin yan ürünü olarak görülen tohumda, yüzde 38-42 oranında yağ olmasının yanı sıra protein, inorganik madde, karbonhidrat ve ham lif bulunur (68).

2.10.3. Tütünün Kimyasal Bileşenleri

Tütün yaprağı az miktarda piridin alkaloid içermesinin yanı sıra çoğunlukla içerdiği alkoloid nikotindir. Tütün yaprağında bulunan diğer alkoloidler; nikotimin, anabazin, anatalin içerir. Bununla beraber yüksek miktarda da organik asit içerir. Yapraklar glukozit, tahasinin, tahasilin, izokersitrin, kafeik ve oksalik asit içerir. Bunların dışında terpenik ve kanserojen madde içerir (67).

2.10.4. Tütün Bitkisinin Toksik Etkisi

Tütün bitkisinin yaprak, çiçek, tohum ve kök kısımları olarak bilinen tüm kısımları tıbbi ve geleneksel olarak kullanılmaktadır. Tüm dünyada kötü olarak kullanılması söz konusudur. Enfiye olarak kullanıldığında fazlasıyla mukus salgılatır ve şiddetli hapşırıklara neden olur. Tütünün çiğnenmesi durumunda ağızdaki mukoza zarını tahriş ederek tükürük miktarında artış gösterir (67).

Yüksek dozlarda kullanılması halinde ise kusma, terleme ve kas güçsüzlüğüne sebep olur. Alkoloid nikotin sindirim sistemini ve dolaşım sistemlerinde büyük sıkıntılar yaratacak zehirler içerir. Kalp rahatsızlığı, kalp çarpıntısı damar kasılmaları ve arteriyel bozukluklara neden olduğu görülmektedir (67).

Cilt nikotini kolayca emer ve cilt düzeyinde ölümcül etkilere dayanan büyük hasarlar bırakır. Duman direkt olarak beyne etki eder ve kusmaya, bedende uyuşukluklara sebep olur (70, 71).

Tablo 2.2. Sigara Dumanındaki Bazı Maddeler (69).

Partikül fazı	Başlıca etki	Gaz fazı	Başlıca etki
Tar (katran)	Mutajenik/ karsinojenik	Karbon monoksit	Oksijenin hemoglobine bağlanmasını bozar
Nikotin	Doza-bağımlı uyarıcı veya parasempatik N-kolinerjik reseptörler üzerine depresör	Nitrojen oksidler	Irritan, proinflamatuar, siliotoksik
Aromatik hidrokarbonlar	Mutajenik/ karsinojenik	Aldehidler	Irritan, proinflamatuar, Siliotoksik
Fenol	İrritan, Mutajenik/ karsinojenik	Hidrosyanik asid	Irritan, proinflamatuar, Siliotoksik
Kresol	İrritan, Mutajenik/ karsinojenik	Akrolein	Irritan, proinflamatuar, Siliotoksik
b-Naftilamin	Mutajenik/ karsinojenik	Amonyak	Irritan, proinflamatuar, Siliotoksik
Benzo(a)piren	Mutajenik/ karsinojenik	Nitrosaminler	Mutajenik/ Karsinojenik
Katekol	Mutajenik/ karsinojenik	Hidrazin	Mutajenik/ Karsinojenik
İndol	Tümör hızlanması	Vinil klorid	Mutajenik/ Karsinojenik
Karbazol	Tümör hızlanması		

Kullanıldığı anda saniyeler içinde beyne ulaşan nikotin içeren tütün; beyin üzerinde yüksek bir etkiye sahiptir. Sigara kullanan bireyler nikotinle beraber 4.000'e yakın kanserojen maddenin de vücuda alınmasını sağlar. Beyindeki zevk ve motivasyonla alakalı nörotransmitterlerin salınması nikotinin beyne ulaşması durumunda gerçekleşir. Bireyler sadece bir defa bile sigara kullanması durumunda bağımlı olabilir. Çünkü beyin rahatlık hissini sürdürebilmek için gereken nikotin tolerans seviyesine ulaşmak ister. Bu rahatlık düzeyi sağlanması halinde beyinde yaşanan nikotin yoksunluğu rahatsız edici boyutlarda yoksunluk semptomlarına yol açar ve bu yoksunluk semptomları bireyi sinirli bir hale sokar (67).

2.10.5. Tütünün Akciğer Kanseri Gelişimine Etkisi

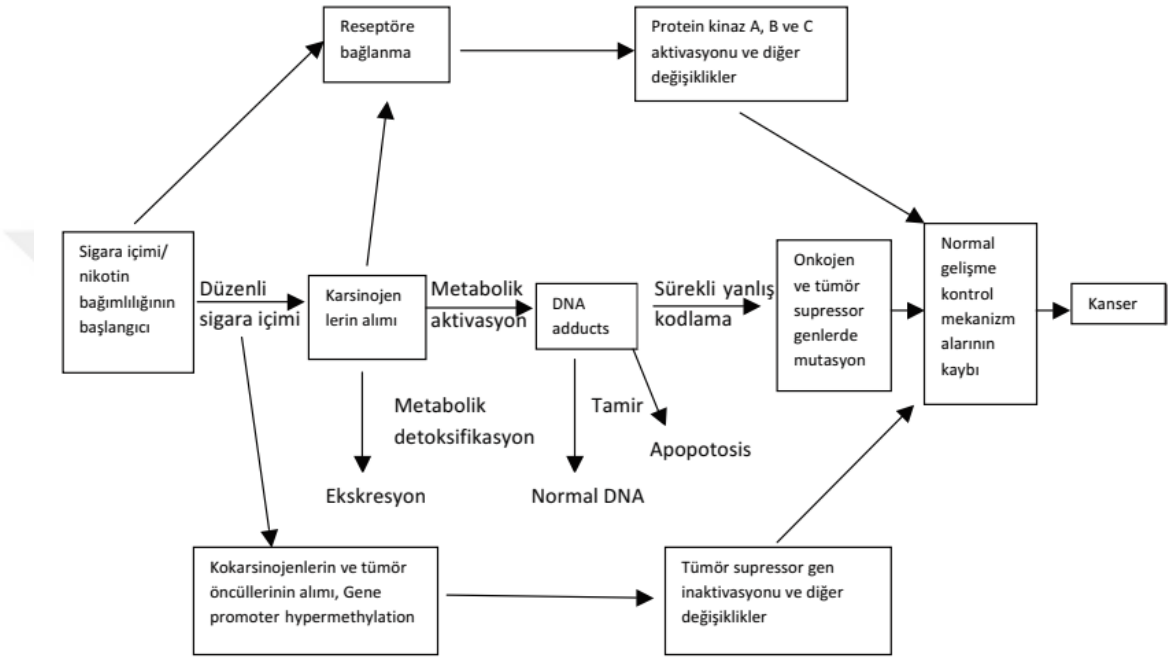
Sigara genel sağlık problemi olarak, alt solunum yollarının hemen her alanında patofizyolojik değişikliklere neden olur. Bunlar peribronşiyal inflamasyon ve fibrozis, epitel yapı ve işlevindeki değişiklikler, intimal vasküler kalınlaşma ve alveolar yıkımdır. Disfonksiyon, bozulmuş inhale klirensi, artan patojen bağlanmasını ve anormal vasküler ve epitelyal geçirgenliği içerir (72, 73).

Sigara içenlerde solunum sorunları önemli ölçüde artar. Kronik öksürük, balgam üretimi, hırıltı ve nefes darlığı arasında bir doz-yanıt ilişkisi vardır. Hava yolu epitelindeki kirpiklerin kaybı, mukus bezlerinin büyümesi, artan goblet hücre sayısı ve artan geçirgenlik bu semptomlara neden olan değişikliklerdir (74).

İlk resmi olarak akciğer kanseri ile sigara içiminin nedensel ilişkisinin ortaya çıkarıldığı; 1964 yılında "Surgeon General" raporu yayınlanmış ve sonuçlar sigaranın akciğer kanseri üzerindeki etkisinin inkar edilemeyecek şekilde olduğunu ortaya koymuştur (75).

Akciğer kanserlerinin %85'inden fazlası tütün sebebiyle ortaya çıkmıştır. Her solumada dumandaki kimyasallar akciğere ulaşır ve ardından kan yoluyla bütün organlara yayılır. 1950'lerde sigaraların yapısında yapılan değişiklikler, tütündeki nitrözaminlerdeki artış ve filtrelerin kullanılmaya başlanması ile mevcut kanser tiplerinde değişiklikler meydana gelmiştir. Squamöz tip kanser azalmasına karşın cinsiyet farketmeksizin adeno kanser tipi artmıştır (76).

Yapılan bir meta analizde, sigara içenlerin içmeyenlere oranla 11 kat daha fazla akciğer kanserine yakalandığı ortaya konmuştur. Buna ek olarak kullanılan sigara sayısına bağlı olarak riskin arttığı ortaya konmuştur. (77).



Şekil 2.6. Sigara Dumanındaki Kanserojenler ile Kanser Arasındaki Bağlantı (78).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak olan tütün bitkisinin tohum kısımları 40 ^{0}C etüvde kurutuldu. Kuruyan bitki örnekleri toz haline getirildikten sonra, 500 gr. alınarak (1:1) oranda hazırlanan hekzan içerisinde 40 ^{0}C'de bir gece boyunca inkübe edildi. Daha sonra küçük porsiyonlar haline getirilip 15 dk ultrasonikatör ile iyice homojenize edildikten sonra, whatman filtre ile süzülüp hekzan ile yıkanarak lipofilik kısımlar, uçucu yağlar ve klorofilli kısımlar ekstreden uzaklaştırıldı. Birleştirilen hekzan porsiyonları da aynı şekilde rotary evaporatör ve liyofilizatör yardımıyla kurutulup hekzan ekstresi elde edildi.

3.2. Antikanser Özellik İle İlgili Yöntemler

3.2.1. Sıvı Azot Tankından Alınan Hücrelerin Kültürünün Yapılması ve Tripsinizasyonu

Sıvı azot tankından çıkarılan donmuş haldeki hücreler 37 ^{0}C'de çözülerek steril ortamda Laminar kabın içerisinde 15 ml' lik falkon tüpe 5 ml%10 FBS içeren DMEM-F12/RPMI medyuma tanktan çıkarılarak çözülen hücreler aktarıldı. Falkon 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılarak pellet el yardımı ile hafifçe vurularak süspanse edildi. Süspansiyondan alınan hücreler thoma lamında sayılarak 25 cm^2' lik flaska 5 ml %10 FBS içeren DMEM-F12 medyum koyduktan sonra üzerine 1x10^5 hücre eklenerek flask 37 °C' de %5 CO_2 'li inkübatörde kapağı hafif açık olacak şekilde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında flask inkübatörden alınıp steril ortamda Laminar kabinde, flask içerisindeki medyum dökülerek flaskın yüzeyine yapışmış halde bulunan hücreler 1ml PBS ile yıkandı. PBS döküldükten sonra 0,5 ml tripsin-EDTA ilave edilerek flask 5-10 dakika inkübatörde bekletilip mikroskobik olarak hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edildi. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskobik olarak gözlendikten sonra, flaska medyum eklenerek hücreler falkon tüpe aktarılarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek supernatant uzaklaştırıldı ve tüpün dibinde kalan hücre pelleti süspanse edildi.

3.2.2. Hücre Sayımı

Hücreler sitotoksisite, çalışmalarında kullanılmadan önce hücre sayımı thoma lamı adı verilen özel sayım lamlarında yapıldı. Steril santrifüj tüpüne alınan hücre çözeltisi santrifüj işleminden sonra süpernatantı atılarak dibe çöken hücre pelleti besiyeri ile seyreltildi. Vortekslenip homojenize edilen hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak ve 90 µl Tripan mavisi ile karıştırıldı. Bu karışımdan alınan örnek, hemositometre lamına aktarıldı ve ışık mikroskobu ile 10X büyütmede incelendi. Lamdaki boyanmamış (canlı) hücreler sayılarak hücre süspansiyonunun ml'sindeki canlı hücre sayısı hesaplandı.

Toplam canlı hücre sayısı = A x B x C x 10^4

A = Hücre solüsyonunun hacmi (ml)

B = Dilüsyon faktörü (Tripan mavisi ile)

C = Boyanmamış hücrelerin ortalama sayısı formülü ile hesaplandı.

3.2.3. Hücre Ekimi

Hücreler stoktan açılarak 75 cm^3 flasklara ekildi. Hücreler % 80-90 oranında çoğaldığı zaman, tripsinizasyon yardımıyla kaldırıldı. 1x10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plaklara ekim işlemi yapıldı.

3.3. Bitki Ekstrelerinin Uygulanması

Ekilen hücrelerin 24 saatlik inkübasyon süreci sonucunda besi yerleri uzaklaştırıldı. Uzaklaştırılan besi yerleri yerine 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonunda ekstre bulunduran 200 µl besi yeri hücrelere eklenerek 24 saat inkübasyonu gerçekleştirildi.

3.4. MTT Hücre Proliferasyon Kiti ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

MTT hücre proliferasyon kiti kullanılarak bitki ekstrelerinin sitotoksik etkileri incelendi. MTT testi canlı hücrelerdeki metabolik aktiviteyi, hücrelerin mitokondriyal

dehidrogenaz enzimi aracılığı ile MTT parçalayarak, çözülebilir formazan tuzları oluşturması prensibine dayanarak yapılmaktadır. Hücreler stoktan açılarak 25 cm^3 flasklara ekilip, %80-90 oranında dolunca tripsinizasyon ile kaldırılıp $1x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plaklara ekildi. 24 saatlik süre ardından besi yerleri uzaklaştırılıp ve her bir ekstre için 0,2.5,5,10,25,50,100 ve 200µg/ml olacak şekilde uygulandı ve sitotoksik doz bulunmaya çalışıldı. Bitki ekstreleri her bir kuyucuğa 200 µl olacak şekilde eklendi ve ardından 24 saatlik inkübasyon süresince %5 CO_2'li atmosferde 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin ardından kuyucuklardaki besi yerleri çekilip 20 µl serumsuz besi yeri üzerine 90 µl MTT solüsyonu eklendi ve ortalama 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda plaklardaki besiyeri uzaklaştırıldı, formazon kristalleri 100 µl DMSO ile çözdürüldükten sonra absorbans değerleri spektrofotometrede 470 nm dalga boyunda ölçülerek kaydedildi.

3.5. Hücre Kültürü Etken Dozunun Hesaplanması

Mikroplağın her bir kuyucuğunda bulunan ekstrakt ile muamele edilmiş hücrelerin morfolojileri mikroskobik olarak değerlendirildi ve her bir kuyucuktaki hücreler üzerine MTT ilave edilerek ve formazan kristallerinin oluşumu gözlemlendi. Oluşan kristaller DMSO ile çözdürülerek mikroplak spektrofotometrede okutuldu. Sonuçlara göre, hücreli ve hücresiz her bir konsantrasyon için kuyucuklardan okunan değerlerin ortalaması alındı ve hücreli kuyucukların ortalama değeri ile hücresiz kuyucukların ortalama değerlerinin farkı alınıp ve formüle uygulanarak % canlılık hesaplandı. Okunan değerlere göre elde edilen grafiğin eğrisinden kültürün %50'sini enfekte eden doz hesaplandı.

3.6. Apoptotik Etkinin Tespit Edilmesi

3.6.1. Acridine Orange /Ethidium Bromide Staining Metodu İle Apoptozisin Morfolojik Olarak Tespit Edilmesi

Bitki ekstreleri ile muamele edilmiş lameller alınıp, 2 kez 2 dakika PBS ile yıkandı daha sonra 5 dakika %70 etanol ile fikse edilip, hücreler 5 defa distile su ile yıkandı ve bunlar 2 kez PBS'de bekletilip oda ısısında 15 dakika akridin orange/Ethidium bromide

çalışma solüsyonu ile boyandı. Lamellerin kurutma kâğıdı üzerinde dik tutulması suretiyle boya uzaklaştırılıp ve 4 kez PBS ile yıkandı. Lamellere bir damla PBS damlatılıp lamların üzeri kapatılarak floresans mikroskopta incelendi.

3.7. Akım (Flow) Sitometride Apoptozis Seviyelerine Bakılması

Hücre apoptozu Annexin V ve PI içeren kit kullanılarak üretici firmanın (BD) tavsiyeleri doğrultusunda çalışıldı. Apoptotik hücrelerle nekrotik hücreleri ayırmak için, hücreler Annexin V (yeşil floresan) ve PI (kırmızı floresan) ile aynı anda boyatıldı.

1. 6 kuyucuklu playtlere total hücre 10.000 olacak şekilde ekildi.
2. 24 saat sonrasında hekzan ekstraktının etkin dozunda madde uygulaması yapıldı ve inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrası hücreler kaldırılarak 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, pellete dokunulmadan süpernatant uzaklaştırıldı.
4. Hücre süspansiyonlarının üzerine 1ml PBS eklenip, 5 saniye vorteksle pellet çözülerek, 1500 rpm de 5 dakika sanrifüj edilip, üst faz döküldü. Bu işlem 2 kez tekrarlandıktan sonra, hücre süspansiyonlarının üzerine binding buffer eklendi. 1ml binding buffer + 9 ml distile su ile seyreltildi) 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırıldı.
5. Hücre süspansiyonların üzerine 500 µl binding buffer eklendi. Kısaca vortekslendi ve yeni tüplere 100 µl olacak şekilde transfer edildi.
6. 100 µl hücre süspansiyonun üzerine 5 µl Annexin, 5 µl PI boyası eklenip, hafif karıştırılarak 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildi.
7. Hücreler 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırıldı.
8. Hücre süspansiyonlarının üzerine 500 µl binding buffer (1ml binding buffer + 9 ml distile su ile seyreltildi) eklendi.
9. Hücre süspansiyonları daha sonra BD Facs VİA tipi akım (flow) sitometre ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Sitotoksik Etkinliğin İncelenmesi

A549 ve BEAS-2B hücre hatları üzerinde yapılan sitotoksik inceleme sonucunda çeşitli değerler elde edildi.

Akciğer kanser hücresi (A549) ve normal akciğer (BEAS-2B) hücresi 96-well plaklara kuyucuk başı $1x10^4$ hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin yapışması ve duplikasyonu için 24 saat beklendikten sonra besiyerleri değiştirildi. *Nicotiana tabacum* bitkisi ile hazırlanan hekzan, su, diklorometan ve metanol ekstreleri; 0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µg/ml dozlarında uygulandı. 24 saatin sonunda hücrelere uygulanan ekstrelerin sitotoksik etkisi incelendi. Ekstrakt ilavesi olmayan (0 µM) kontrol grubu olarak kabul edildi ve canlılığı zaman dilimi açısından %100 kabul edildi.

A549 ve BEAS-2B hücreleri üzerine sitotoksik etkisi MTT Assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyl tetrazoliumbromide, sigma) yöntemi kullanılarak tespit edildi.

Tablo 4.1. A549 Hücre Hattındaki IC50 Değerleri

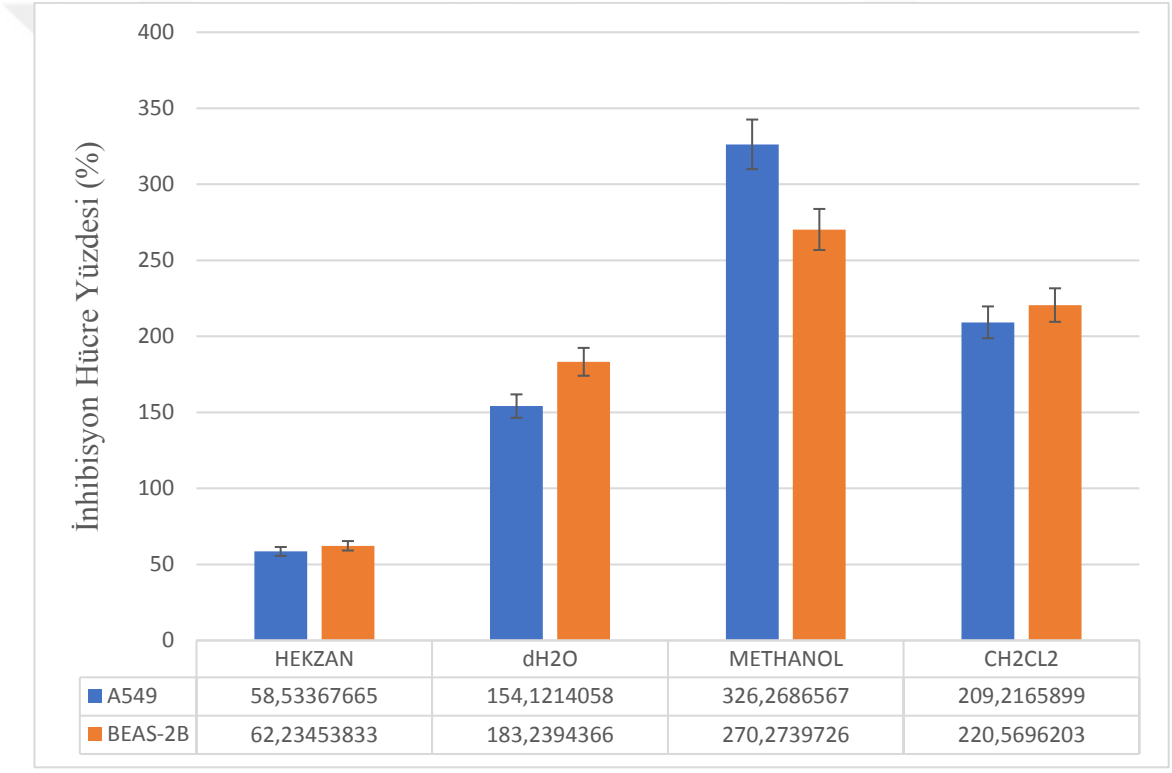
EKSTRAKTLAR	KANSER HÜCRE HATTI
	A549
HEKZAN	58,53367665
DH_2O	154,1214058
METHANOL	326,2686567
CH_2CL_2	209,2165899

24 saat sonunda hekzanın akciğer kanseri üzerindeki sitotoksik etkisi (IC_{50}) 58.53 µg/ml olarak hesaplanırken distile su, metanol ve dikloro metan ekstraktlarının IC_{50} değerleri sırasıyla; 154, 326, 209 µg/ml olarak belirlendi (Tablo 4.1.).

Tüm ekstraktların A549 hücresi üzerinde farklı dozlarda sitotoksik etki gösterdiği tespit edildi. Hekzan ekstraktı 24 saatte A549 hücresi üzerinde IC_{50} değerinin 100 µg altında sitotoksik etki gösterdiği tespit edildi. Aynı şekilde tüm ekstraktların farklı dozlarının normal akciğer hücreleri (BEAS-2B) üzerindeki sitotoksik etkisi 24 saat sonunda elde edildi (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. BEAS-2B Hücre Hattındaki IC50 Değerleri

EKSTRAKTLAR	NORMAL HÜCRE HATTI
	BEAS-2B
HEKZAN	62,23453833
DH_2O	183,2394366
METHANOL	270,2739726
CH_2CL_2	220,5696203

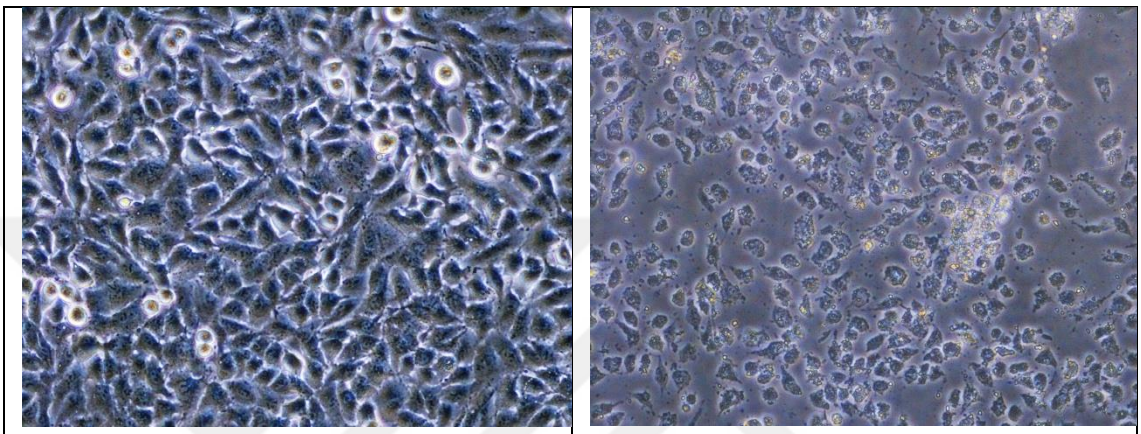


Şekil 4.1. A-549 ve BEAS-2B Hücrelerinin IC50 Değerlerinin Karşılaştırılması

4.2. Hekzan Ekstraktının A549 Hücre Hattında Hücre Morfolojisi Üzerindeki Etkileri

Hücre canlılığı ve proliferasyon deneyleri ile tespit edilen IC_{50} değerlerine göre 50 µg/ml hekzan olacak şekilde A549 hücrelerinin 24 saat sonundaki morfolojisi Şekil 4.2.'de verilmiştir.

Görüntüler incelendiğinde 50 µg/ml hekzan ekstraktının hücreleri apoptozise yönlendirdiği gözlemlenmiştir. Morfolojik görüntülerde doza bağlı olarak hücre sayısının azaldığı, hücrelerin membran yapılarının değiştiği tipik apoptotik hücre görüntüsü verdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.2.).

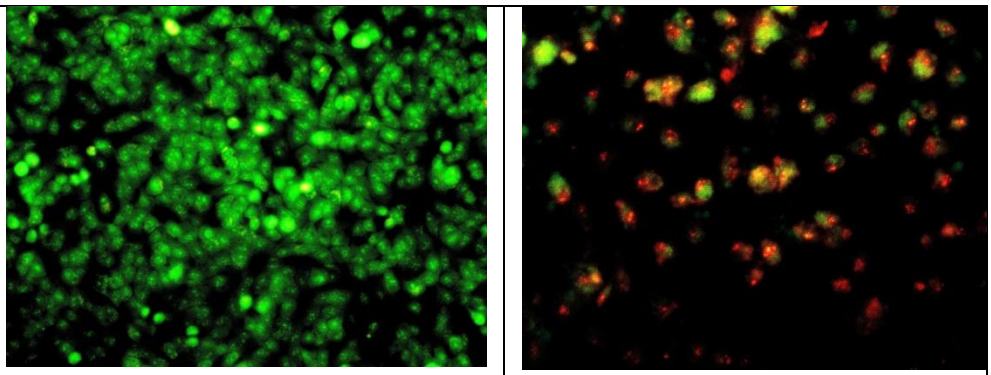


KONTROL A549	50 µg/ml Hekzan Ekstresi Uygulanmış A549

Şekil 4.2. Hekzan Ekstraktının A549 Hücre Hattı Üzerindeki Morfolojik Görüntüsü

4.3. Hekzan Ekstraktının A549 Hücre Hattında Hücre DNA'sı Üzerindeki Etkilerinin Floresan Boyama Yöntemiyle İncelenmesi

Çalışmada hücreler etidyum bromür akridin oranj boyaları ile boyandıktan sonra floresan mikroskop kullanılarak morfolojik olarak değerlendirilmiştir. Hekzan ekstraktının A549 hücreleri üzerindeki apoptotik ve nekrotik etkilerinin gözlenmesi amacıyla bu boyama metodu kullanıldı. Canlı hücreler homojen yeşil boyanmış kromatin, nekrotik hücreler homojen turuncu boyanmış kromatin, erken apoptotik hücreler kondanse ve fragmante yeşil boyanmış kromatin ve geç apoptotik hücreler kondanse ve fragmante turuncu boyanmış kromatin şeklinde gözlemlenmiştir (Şekil 4.2.).

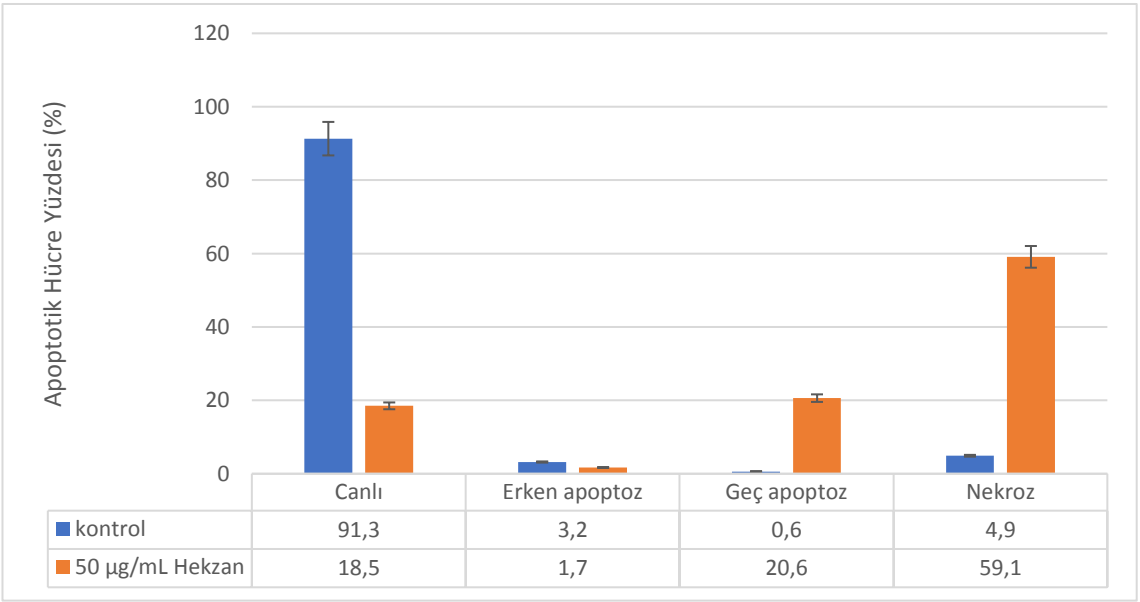


KONTROL A549 | A549 Hekzan Ekstresi 50 µg/ml

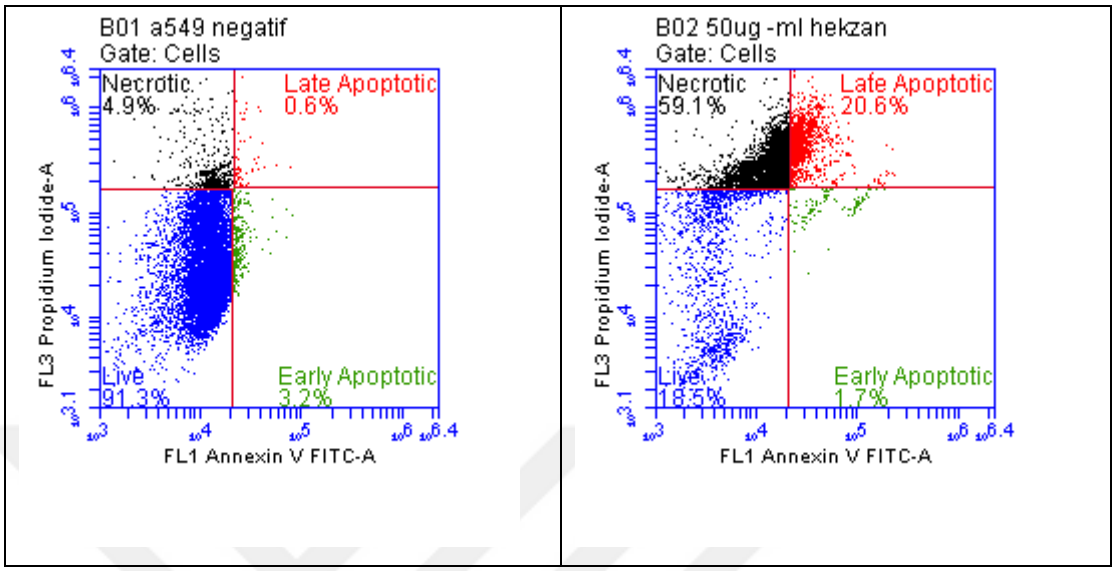
Şekil 4.3. Hekzan Ekstraktının A549 Hücre Hattı Üzerindeki Akridin Oranj-Etidyum Bromür Boyaması Sonucu Elde Edilen Görüntüleri

4.4. Hekzan Ekstraktının A549 Hücre Hattının Hücre Apotozisi Üzerindeki Etkilerinin Flow Sitometrik Annexin-V Apoptoz/Nekroz Analizi İle İncelenmesi

Hekzan ekstresinin A549 hücreleri üzerinde 50 µg/ml dozunun %81 oranında hücre ölümüne neden olduğu gözlemlendi. Bu ölümlerin %20,6 sinin geç apoptozis, %59,1'nin ise nekroz kaynaklı olduğu gözlenmiştir (Şekil 12).



Şekil 4.4. Hekzan Ekstraktının A549 Hücre Hattı Üzerindeki Apoptoz/Nekroz Etkisi



Şekil 4.5. A549 Hücrelerinin Sitometrik Annexin-V-PI Boyaması Sonucu IC_{50} Değerleri

5. TARTIŞMA

Kanser, dünya çapında bir halk sağlığı sorunudur. Mevcut tedavilerin yanında yeni terapötiklere acilen ihtiyaç duyulmakta ve aktif olarak aranmaktadır. Tütün bitkisinin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ile ilgili çalışmalar çok sınırlı sayıdadır. Bu çalışmada tütün tohumu ekstraktının akciğer kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini araştırdık.

Kasumawardani ve ark.'ları tarafından, Endonezya'da Kasturi tütünü olarak bilinen ekili tütünün (*Nicotiana tabacum*) flavonoid içeriğinin sitotoksik etkisi, insan meme kanseri (MCF-7) hücreleri ve normal hücre olarak da Afrika maymun böbrek epitel hücreleri (Vero) üzerindeki sitotoksik etkisi test edilmiştir. Araştırmacılar flavonoidi nikotinden arındırılmış tütün yapraklarının metanolik özlerinden elde etmişlerdir. Hücreler, 20,40,80,160,320,640 µg/mL konsantrasyonlarında flavonoidle 24 saat boyunca muamele edilmiştir. Hücre canlılığı MTT yöntemiyle belirlenmiştir. Vero hücrelerinde 320 µg/mL konsantrasyonda sitotoksisite gösterdiğini gözlemlemişler. Bu konsantrasyonda Vero hücrelerinin IC_{50} değerini 225.35 µg/mL olarak elde etmişler. Buna karşın MCF-7 hücrelerinde; 160, 320 ve 640 µg/mL konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösterdiğini gözlemlemişler. Ancak 160 µg/mL konsantrasyona sahip Kasturi tütün yapraklarının flavonoidin, MCF-7 hücre canlılığını 50'den fazla azalttığını ve 50 (IC_{50}) inhibitör konsantrasyonu değerinin ise 148.41 µg/mL olduğunu tespit etmişler. Yapılan çalışma ile flavonoidin MCF-7 hücrelerinde daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği ortaya konulmuştur. Sitotoksik etkiyi gösteren bileşenin bir tür flavonoid olan quersetin olduğunu göstermişler. Quersetinin sitotoksik etkisini, DNA hasarını indükleyerek ve apoptozis içsel yolağını aktive ederek gösterdiğini ortaya koymuşmuşlar. Sonuç olarak Kasturi tütün yapraklarının flavonoidinin, MCF-7 hücreleri üzerinde sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu ve insan meme kanseri tedavisi için potansiyel bir alternatif ajan olabileceğini ileri sürmüşlerdir. (79).

Yuan ve ark.'ları, *Nicotiana tabacum* bitkisinden elde edilen Cembranoid tipi diterpenlerin anti-tümör aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada karaciğer karsinom hücrelerini kullanmışlar. Tütünden izole edilen CBD'leri, HepG2, SMMC-7721 ve HL-7702 hücrelerine uygulamışlar. Hücreleri 24, 48, 72 saat boyunca, a-CBD'nin değişik

konsantrasyonlarıyla muamele etmişler ve MTT yöntemiyle hücre canlılığını belirlemişler. a-CBD'nin üç hücre tipinde de zamana ve konsantrasyona bağlı olarak önemli ölçüde hücreleri inhibe edici etkiye sahip olduğunu göstermişler. a-CBD'nin hücre klonlarının oluşumunu azalttığını ve hepatoselüler karsinom hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır. a-CBD'nin apoptozu indüklemeden önce hücre morfolojisini ve membran geçirgenliğini değiştirdiğini morfolojik gözlemler ile göstermişlerdir (80).

Elias ve arkadaşları, ham tütün özütünün (TCE) oral skuamoz hücreli karsinom hücre hattında (OSCC-3) sitotoksik etkisini araştırmışlar. TCE iki farklı fraksiyonunun (A1 ve A4) hücre canlılığı üzerindeki etkisini test etmişler. Hücreleri, azalan konsantrasyonlarda (500, 250, 100, 50, 10, 0 Ig/mL) TCE ile muamele edip, hücre sağkalımını spektrofotometreyle ölçmüşler. Bu çalışma ile 100 Ig/mL'nin altındaki konsantrasyonların sitotoksisiteyi indüklemediği, fakat yüksek konsantrasyonlardaki TCE'nin hücre sağkalımını azalttığı ortaya konulmuştur. Araştırmacılar 24 saatin sonunda TCE ve fraksiyon A4'ün hücre sağkalımını önemli ölçüde azalttığını ancak, A1'in zararsız olduğunu ortaya koymuşlardır. Bunun yanında TCE A4 fraksiyonun 48 saat sonunda, hücre ölümünü %50'nin üzerinde indükleyerek sitotoksik etki sağladığı ortaya konulmuştur (81).

Zhou ve ark.'ları, *Nicotiana tabacum* yapraklarından yeni bifenil türevleri elde etmişler ve sitotoksik aktivitelerini incelemişler. Çeşitli bileşiklerin 2.8 ila 9.4 mM arasında değişen IC_{50} değerleriyle orta seviyede inhibisyon aktivitesi gösterdiğini ortaya koymuşlardır (82).

Al-Lahham ve ark.'ları, *Nicotiana tabacum* bitkisininin köklerinden 4 farklı ekstrakt elde etmişler. Bunların antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik etkisini incelemişler. Anti-proliferatif ve apoptotik aktiviteler, kolorimetrik yöntemler kullanılarak değerlendirilmiş. Hekzan ekstraktının 2 µg/ml IC_{50} değeri ile en güçlü ve önemli anti-proliferatif etkilere sahip organik ekstrakt olduğunu göstermişler. Bunu 6 µg/ml IC_{50} ile aseton ve ardından 21 µg/ml IC_{50} değeri ile metanol takip etmiştir. Bunun nedeni olarak büyümenin durması veya hücre ölümü olabileceğini düşünmüşler. Bunu açıklığa kavuşturmak için, aseton ekstraktının kaspaz-3 aktivitesi üzerindeki etkisini

araştırmışlar ve kemoterapötik bir ilaç olan doksorubisinden 2 kat daha güçlü apoptotik etkiye sahip olduğunu görmüşler (83).

Sharma ve ark.'ları, tarımsal atık bir malzeme olan *Nicotiana tabacum* sapının antioksidan ve antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu ortaya çıkarmışlar. Wistar sıçan modelinde yara iyileştirici özelliğini incelemişler. Yağı alınan gövde ile etanolik ekstrakt oluşturmuşlar. Sapta bulunan çeşitli fitokimyasallar, spektrofotometre ve kromotografik ölçümlerle tespit edilmiştir. Aynı zamanda ekstraktların sitotoksik etkileri fare fibroblast L929 hücre hattında MTT yöntemiyle gözlemlenmiştir. Civciv korioallantoik membran (CAM) modelinde kan damarı oluşumu ve dallanmaları gözlemlenerek *in vivo* anjiyojenik aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmada spektrofotometrik ve kromotografik analizler sonucu etanolik ekstraktta polifenoller, tanenler ve alkoloidlerin varlığını saptamışlar. Ekstraktın sitotoksik etkisi ise L929 hücre hattı üzerinde gösterilmemiş. Antioksidan tahlili ile maksimum antioksidan aktiviteyi ortaya çıkarmışlar. CAM modelinde, 480 µg/ml konsantrasyonlarda ekstrenin, kan damarlarında büyümeyi gerçekleştirdiğini gözlemlemişler. Ekstraktların kesi yaralarına topikal olarak uygulanması durumunda ise 14. günde yara iyileştirme aktivitesini gözlemlemişler. Histopatolojik çalışmalar ile cilt yaralarında yeniden epitelizasyonu doğrulamışlar. N. tabacum sapının topikal bir uygulama olarak yara iyileşme sürecinde bitkisel ilaç olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir (84).

Dalberto ve ark.'ları, fırınlarda kurutulan *Nicotiana tabacum* yapraklarının sulu ekstraktlarının genotoksik etkisini, Çin hamsteri akciğer fibroblast hücreleri (V79) üzerinde test etmişler. Fırınlanmış tütün ekstrelerinin sitotoksisitesini MTT yöntemiyle belirlemişler. Ekstreler 0.625-5 mg/ml konsantrasyonlar için hücre canlılığını %85 gösterirken comet testi ile elde edilen tüm konsantrasyonlarda DNA hasarında önemli bir artış gösterdiğini ortaya çıkarmışlar (85).

Ashiro ve ark.'ları, tütünün olası alternatif kullanımını belirlemek için, öğütülmüş Nicotiana tabacum tohumlarından elde edilen Kazakistan tütün çeşitlerini temsil eden tohumlar, soğuk pres kullanılarak elde ettikleri tütün yağındaki yağ asidi bileşimlerini gaz kromotografi metoduyla saptamışlar. Yapılan bu çalışmada doymuş yağ oranına kıyasla yüksek doymamış yağ asidi içeriği saptamışlar. Tütün tohumlarında en çok linoleik asit (%71,73) ve oleik asit (%13,77) içeren yağ bakımından zengin bir içerik ortaya

çıkarmışlar. Ayrıca tütün tohumu yağının anti kanser aktivitesi ve aroma tutma kapasitesini, belirli doymamış yağ asidi bileşimine dayandırmışlar (86).

Çalışmamızda tütün tohumundan elde ettiğimiz ekstraktların akciğer kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi incelendi. Akciğer kanseri hücreleri için A549 hücre hattı ve normal hücre olarak BEAS-2B hücre hattı kullanıldı. Önce sırasıyla hekzan, su, metanol ve dikloro metanla çözdürülen tütün tohumları ekstraktları elde edildi. Elde edilen ekstraktlar akciğer kanser hücrelerine (A549) ve akciğer normal hücrelerine (BEAS-2B) belirli konsantrasyonlarda uygulanarak MTT yöntemiyle sitotoksik etkisi test edildi. Bu uygulamalar sonucunda hekzan ekstraktının A549 hücreleri üzerinde IC_{50} değerinin 58,53 µg/ml olduğu, BEAS-2B hücreleri üzerinde IC_{50} değerinin 62,23 µg/ml olduğu bulundu. Elde edilen IC_{50} değerine göre 50 µg/ml hekzan ekstraktının kanser hücrelerini apoptozise yönlendirdiği gözlemlendi. Morfolojik görüntülerde doza bağlı olarak hücre sayısının azaldığı, hücrelerin membran yapılarının değiştiği tipik apoptotik hücre görüntüsü verdiği tespit edildi.

Hekzan ekstraktının hücrelerdeki olası sitotoksik etkisinin apoptotik mi yoksa nekrotik mi olduğunun tespiti, flow sitometrik Annexin- V-PI analizi ile yapıldı. Hekzan ekstraktının A549 hücrelerini %81 oranında ölüme sürüklediği saptandı. Ancak bu ölümlerin %20,6'sının geç apoptoz ile, %59,1'inin ise nekroz kaynaklı olduğu gözlemlendi.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, elde ettiğimiz bulgulara göre tütün tohumunun A549 hücrelerini apoptozis yolağına sürüklemesi nedeniyle daha kapsamlı çalışmalara yön verme potansiyeline sahip olduğu sonucuna varıldı. Bütçenin sınırlı olması çalışmanın önemli kısıtlarından biriydi. Tütün tohumunun kimyasal içeriğinin ayrıştırılması sonucu elde edilen bileşenlerin, A549 başta olmak üzere çeşitli kanser hücre hatlarındaki anti kanser aktivitelerinin yeni yapılacak projelerle ortaya konulması gerektiği kanaatine varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Baykara O. Current Modalities in Treatment of Cancer. BSBD. 2016;5(3):154-65.

2. Yokuş B, Çakır DÜ. Kanser biyokimyası. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2012(1):7-18.

3. Karataş M, Tunçdemir M. Mitokondriyal Epigenetik ve Kanser. Cerrahpaşa Medical Journal. 2021;45(2):64-79.

4. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians. 2021;71(3):209-49.

5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. 2011;144(5):646-74.

6. Niche CM, Vdr PP, Tunç FZ, Balık DD. Republic of Turkey Yıldız Technical University Faculity Of Chemical and Metallurgical Engineering.

7. Cooper GM, Ganem D. The Cell: A Molecular Approach. Nature Medicine. 1997;3(9):1042-.

8. Cabadak H. Hücre Siklusu ve Kanser. 2008.

9. Pazarbaşı A, Kasap M. Kanser Genetiği. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi.12(4).

10. Williams GH, Stoeber K. The cell Cycle and Cancer. The Journal of Pathology. 2012;226(2):352-64.

11. Damania B. DNA Tumor Viruses and Human Cancer. Trends in Microbiology. 2007;15(1):38-44.

12. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. Cell. 2012;150(1):12-27.

13. Rando OJ. Combinatorial Complexity in Chromatin Structure and Function: Revisiting the Histone Code. Current Opinion in Genetics & Development. 2012;22(2):148-55.

14. Waddington C. The epigenotype. Int J Epidemiol. 2012;41:10-3.

15. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal Structure of The Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution. Nature. 1997;389(6648):251-60.

16. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in Cancer. Carcinogenesis. 2010;31(1):27-36.

17. Şahin Ö, Ayaz U, Özdemir SM. Epigenetik VE Kanser.

18. Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, et al. Human DNA Methylomes at Base Resolution Show Widespread Epigenomic Differences. Nature. 2009;462(7271):315-22.

19. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a Landscape Takes Shape. Cell. 2007;128(4):635-8.

20. Umer M, Herceg Z. Deciphering the Epigenetic Code: an Overview of DNA Methylation Analysis Methods. Antioxidants & Redox Signaling. 2013;18(15):1972-86.

21. Zuo T, Tycko B, Liu T-M, Lin H-JL, Huang TH. Methods in DNA Methylation Profiling. Epigenomics. 2009;1(2):331-45.

22. Nguyen C, Liang G, Nguyen TT, Tsao-Wei D, Groshen S, Lübbert M, et al. Susceptibility of Nonpromoter CpG Islands to *de novo* Methylation in Normal and Neoplastic Cells. Journal of the National Cancer Institute. 2001;93(19):1465-72.

23. Kulis M, Esteller M. DNA Methylation and Cancer. Advances in Genetics. 2010;70:27-56.

24. Miller CA, Sweatt JD. Covalent modification of DNA regulates memory formation. Neuron. 2007;53(6):857-69.

25. Ciechomska M, Roszkowski L, Maslinski W. DNA Methilation as a Future Therapeutic and Diagnostic Target in Rheumatoid Arthritis. Cells. 2019;8(9):953

26. Hatipoğlu Öf, Ertuğrul K, Yaykaşlı E, Yaykaşlı Ko. Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser. Duzce Medical Journal. 2012;14(3):58-68.

27. Robertson KD. DNA Methylation and Chromatin–unraveling the Tangled Web. Oncogene. 2002;21(35):5361-79.

28. Matsusaka K, Funata S, Fukayama M, Kaneda A. DNA Methylation in Gastric Cancer, Related to *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus. World Journal of Gastroenterology: WJG. 2014;20(14):3916.

29. Mikeska T, Craig JM. DNA Methylation Biomarkers: cancer and beyond. Genes. 2014;5(3):821-64.

30. World Cancer Research Fund International - Lung Cancer Statics URL: https://www.wcrf.org/cancer-trends/lung-cancer-statistics/ Erişim Tarihi: 28.07.2022

31. Cersosimo RJ. Lung cancer: a review. American journal of health-system pharmacy. 2002;59(7):611-42.

32. Mosa M, Alkazazz F, editors. Characterization of some biochemical parameters in respiratory system diseases. Journal of Physics: Conference Series; 2021: IOP Publishing.

33. Barlesi F, Mazieres J, Merlio J-P, Debieuvre D, Mosser J, Lena H, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). The Lancet. 2016;387(10026):1415-26.

34. Costa DB, Halmos B, Kumar A, Schumer ST, Huberman MS, Boggon TJ, et al. BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations. PLoS medicine. 2007;4(10):e315.

35. Travis WD. Pathology of lung cancer. Clinics in chest medicine. 2011;32(4):669-92.

36. Geddes D. The natural history of lung cancer: a review based on rates of tumour growth. British journal of diseases of the chest. 1979;73:1-17.

37. Suh JH, editor Current readings: pathology, prognosis, and lung cancer. Seminars in thoracic and cardiovascular surgery; 2013: Elsevier.

38. Akşit H, Bildik A. Apoptozis. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2008;19(1):55-63.

39. Canan K, Çalışkan Y, Yönden Z. Apoptozis. Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi. 2012;3(11):26-37.

40. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. British journal of cancer. 1972;26(4):239-57.

41. Pistritto G, Trisciuoglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. Aging (Albany NY). 2016;8(4):603.

42. Walker PR, Leblanc J, Smith B, Pandey S, Sikorska M. Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis. Methods. 1999;17(4):329-38.

43. Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, Van de Velde C, Cornelisse CJ, Van Dierendonck JH. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 1993;41(1):7-12.

44. Bar-Dayan Y, Kaveri S, Kazatchkine M, Shoenfeld Y. Is cancer an autoimmune process dependent on anti-apoptotic autoantibodies? Medical hypotheses. 2000;55(2):103-8.

45. Spector MS, Desnoyers S, Hoeppner DJ, Hengartner MO. Interaction between the C. elegans cell-death regulators CED-9 and CED-4. Nature. 1997;385(6617):653-6.

46. Pınarbaşı E. Apoptozis (programlı hücre ölümü), Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B (Editörler). Moleküler Biyoloji. 2010;2.

47. Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, et al. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1999;96(10):5752-7.

48. Mian M, Tinelli M, De March E, Turri G, Meneghini V, Pescosta N, et al. Bortezomib, thalidomide and lenalidomide: Have they really changed the outcome of multiple myeloma? Anticancer research. 2016;36(3):1059-65.

49. Lee C-H, Hyun MK, Jang EJ, Lee NR, Kim K, Yim J-J. Inhaled corticosteroid use and risks of lung cancer and laryngeal cancer. Respiratory medicine. 2013;107(8):1222-33.

50.Patil Y, Amitay Y, Ohana P, Shmeeda H, Gabizon A. Targeting of pegylated liposomal mitomycin-C prodrug to the folate receptor of cancer cells: Intracellular activation and enhanced cytotoxicity. Journal of controlled release. 2016;225:87-95.

51. Baykara O. Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşimlar. Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi. 2016;5(3):154-65.

52. Wayteck L, Breckpot K, Demeester J, De Smedt SC, Raemdonck K. A personalized view on cancer immunotherapy. Cancer letters. 2014;352(1):113-25.

53. Aslan G. Tümör immünolojisi. Turk J Immunol. 2010;15(1):7-13.

54. Yang Y. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. The Journal of clinical investigation. 2015;125(9):3335-7.

55. Hideki S, Hideaki Y, Yusuke M, Yasunori B. Safety profile of nivolumab, a programmed death 1 checkpoint inhibitor, in solid tumors: a meta-analysis of randomized clinical trials. (38):1-14.

56. Özlük AA, Oytun MG, Günenç D. Kanser immünoterapisi. İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Transplantasyon Dergisi. 2017;2(1):21-3.

57. Sharma P, McClees SF, Afaq F. Pomegranate for prevention and treatment of cancer: An update. Molecules. 2017;22(1):177.

58. Efferth T, Saeed ME, Mirghani E, Alim A, Yassin Z, Saeed E, et al. Integration of phytochemicals and phytotherapy into cancer precision medicine. Oncotarget. 2017;8(30):50284.

59. Bahmani M, Shirzad H, Shahinfard N, Sheivandi L, Rafieian-Kopaei M. Cancer phytotherapy: Recent views on the role of antioxidant and angiogenesis activities. Journal of evidence-based complementary & alternative medicine. 2017;22(2):299-309.

60. Sharma P, McClees SF, Afaq F. Pomegranate for Prevention and Treatment of Cancer: An Update. Molecules. 2017;22(1).

61. Capdesuñer Y, García-Brizuela J, Mock HP, Hernández KV, de la Torre MH, Santiesteban-Toca CE. Accessing to the Nicotiana tabacum leaf antimicrobial activity: In-silico and in-vitro investigations. Plant Physiology and Biochemistry. 2019;139:591-9.

62. Heidari-Soreshjani S, Asadi-Samani M, Yang Q, Saeedi-Boroujeni A. Phytotherapy of nephrotoxicity-induced by cancer drugs: an updated review. Journal of nephropathology. 2017;6(3):254.

63. Gümüş M, Erkan S, Serpil T. Bazı kabakgil türlerinin tohumlarındaki viral etmenlerin saptanması üzerinde araştırmalar. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 2004;41(1).

64. Sivük U, Ataseven Y, Gül U, ARISOY H, Sivük H, Ataseven Y. Alternatif ürün projesi kapsamında tütün ve bazı ürünler arasında kârlılık karşılaştırmaları. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi. 2009;6(3):215-26.

65. Günay A. Adıyaman ili tütün üretim alanlarındaki bazı tütün virüslerinin multipleks RT-PCR yöntemi ile araştırılması ve bazı virüs izolatlarının moleküler karekterizasyonu: Fen Bilimleri Enstitüsü; 2019.

66. Peksüsülü A, Yılmaz İ, Kartal AİH, Kartal H. Türkiye Tütün Genotipleri. ANADOLU Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi. 2012;22(2):82-90.

67. Kishore K. Monograph of tobacco (Nicotiana tabacum). Indian Journal of Drugs. 2014;2(1):5-23.

68. Çalışkan Ö, Odabaş MS, Çamaş N. Tütün (Nicotiana tabacum L.) tohumunun biyoyakıt olarak değerlendirilmesi. Ziraat Fakültesi Dergisi. 2009;4(2):46-55.

69. Behr J, Nowak D. Tobacco smoke and respiratory disease. World. 2002;58(44):1-20.

70. Charlton A. Medicinal uses of tobacco in history. Journal of the royal society of medicine. 2004;97(6):292-6.

71. Grieve M. A modern herbal: Courier Corporation; 2013.

72. Foster WM, Langenback EG, Bergofsky EH. Disassociation in the mucociliary function of central and peripheral airways of asymptomatic smokers. American Review of Respiratory Disease. 1985;132(3):633-9.

73. Murin S, Bilello KS, Matthay R. Other smoking-affected pulmonary diseases. Clinics in chest medicine. 2000;21(1):121-37.

74. Hasan S. ATS statement--cigarette smoking and health. American journal of respiratory and critical care medicine. 1996;154(5):1579-80.

75. Cohen V, Khuri FR. Progress in lung cancer chemoprevention. Cancer control. 2003;10(4):315-24.

76. Centers for Disease Control and Prevention (US), National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US), & Office on Smoking and Health (US). (2010). How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General. Centers for Disease Control and Prevention (US).

77. Lee Y-CA, Cohet C, Yang Y-C, Stayner L, Hashibe M, Straif K. Meta-analysis of epidemiologic studies on cigarette smoking and liver cancer. International journal of epidemiology. 2009;38(6):1497-511.

78. Health UDo, Services H. The health consequences of smoking—50 years of progress: a report of the Surgeon General. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease.; 2014.

79. Kusumawardani B, Febi QN, Rosidah M, Azis DA, Puspitasari E, Nugraha AS. Cytotoxic Potential of Flavonoid from Nicotiana tabacum Leaves on MCF-7 Human Breast Cancer Cells. Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention. 2020;11(2):97-102.

80. Yuan X-L, Mao X-X, Du Y-M, Yan P-Z, Hou X-D, Zhang Z-F. Anti-tumor activity of cembranoid-type diterpenes isolated from Nicotiana tabacum L. Biomolecules. 2019;9(2):45.

81. Elias ST, Diniz J, Almeida RS, Alvarenga N, Simeoni LA, Silveira D, et al. Cytotoxic effect of tobacco extracts on human oral squamous cell carcinoma cell-line. Oral oncology. 2010;46(12):869-73.

82. Zhou M, Zhou K, Lou J, Wang Y-D, Dong W, Li G-P, et al. New biphenyl derivatives from the leaves of Nicotiana tabacum and their cytotoxic activity. Phytochemistry Letters. 2015;14:226-9.

83. Al-Lahham S, Sbieh R, Jaradat N, Almasri M, Mosa A, Hamayel A, et al. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of four different extracts derived from the roots of Nicotiana tabacum L. European Journal of Integrative Medicine. 2020;33:101039.

84. Sharma Y, Kaur A, Bhardwaj R, Srivastava N, Lal M, Madan S, et al. Preclinical assessment of stem of Nicotiana tabacum on excision wound model. Bioorganic Chemistry. 2021;109:104731.

85. Dalberto D, Nicolau CC, Rosa De Sousa M, Garcia ALH, Boaretto F, Picada JN, et al. Genotoxic effect induced by dried nicotiana tabacum leaves from tobacco barns (kiln-houses) in chinese hamster lung fibroblast cells (V79). Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A. 2021;84(17):689-701.

86. Ashirov MZ, Datkhayev UM, Myrzakozha DA, Sato H, Zhakipbekov KS, Rakhymbayev NA, et al. Study of Cold-Pressed Tobacco Seed Oil Properties by Gas Chromatography Method. The Scientific World Journal. 2020;2020.

8. EKLER

8.1. Orijinallik ve Beyan Raporu

8.2. İntihal Raporu

8.3. Tez veri Giriş Formu