T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DRACAENA CİNNABARİ REÇİNESİNİN İNSAN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTINDA (A549) PROLİFERASYON VE APOPTOZ DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Eissa AL-MAGHREBI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Hüsamettin VATANSEV

KONYA-2020

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DRACAENA CİNNABARİ REÇİNESİNİN İNSAN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTINDA (A549) PROLİFERASYON VE APOPTOZ DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Eissa AL-MAGHREBI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Hüsamettin VATANSEV

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 19202076 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2020

ÖNSÖZ

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Hüsamettin VATANSEV yürütücülüğünde hazırlanmış olup, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne yüksek lisans tezi olarak sunulmuştur.

Yüksek lisans eğitimim süresince emeği ve bilgisi ile desteğini hiç esirgemeyen, üzerimde büyük emekleri olan, iki yıl boyunca bilgilerini bizlerle paylaşan, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemi asla unutmayacağım saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Hüsamettin VATANSEV'e teşekkür ederim.

Ders dönemim ve tez çalmam boyunca sorularımı yanıtsız bırakmayan, her aşamada bana yardımcı olan sayın hocam Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK'e, eğitimim için emek veren ve yanlarına çekinmeden gidebildiğim Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ali ÜNLÜ'ye ve değerli Ana Bilim Dalı Öğretim Üyeleri, Prof. Dr. Abdullah SİVRİKAYA, Doç. Dr. Sedat ABUŞOĞLU ve Doç. Dr. Esma MENEVŞE'ye teşekkürlerimi sunuyorum.

Deneyimlerinden yararlandığım ve yardımlarını esirgemeyen hocalarım; Hakan VATANSEV, Hatice Feyza AKBULUT ve arkadaşlarım; İhsan OBALI, İlkay SAK, Fatma AKAT, Fadime OVALI, Mustafa BAYRAKTAR ve Firdevs Sak'a ve isimlerini burada sayamadığım diğer arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu tezi, bana her türlü desteği veren ve yüksek lisansı bitirmemi sabırsızlıkla bekleyen sevgili ve değerli aileme ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI ..... İİİ

ÖNSÖZ ..... İV

İÇİNDEKİLER V

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... Vİİ

TABLOLAR DİZİNİ ..... Vİİ

ŞEKİLLER VE GRAFİKLER DİZİNİ ..... İİ

ÖZET ..... İİİ

SUMMARY. ..... İV

1.GİRİŞ 1

1.1.Akciğer Kanseri 2

1.1.1. Akciğer Kanserinde Risk Faktörleri 3

1.1.2. Akciğer Kanserinin Sınıflandırılması 6

1.1.3. Akciğer Kanserinde Tanı ve Tedavi 8

1.2.A549 Hücre Hattı 9

1.3.HEK-293 Hücre Hattı 10

1.4.Apoptoz… 10

1.5. Nekroz… 11

1.6. Ejderhanın Kanı 11

1.7. Dracaena Cinnabari (DC) 13

1.7.1. Dracaena Cinnabari Reçinesinin Hazırlanma Şekilleri 16

1.7.2. DC Ekstraksiyonunda Kullanılan Bazı Çözücüler 16

1.7.3. Sürekli Sıcak Ekstraksiyon 17

2.GEREÇ VE YÖNTEM 18

2.1. Gereçler 18

2.1.1. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar 18

2.1.2. Cihaz ve Laboratuvar Gereçleri 18

2.2.Yöntem 19

2.2.1. DC Reçinesinin Ekstraksiyonu 19

2.2.2. Besiyeri Hazırlama 20

2.2.3. Sıvı Azot Tankından Hücre Çıkarma 20
2.2.4. Hücre Kültürü İnkübasyon Şartları 20
2.2.5. Hücrelerin Pasajlanması, Sayımı ve Dondurulması 20
2.2.6. DC Reçinesi Ekstraktı Dozlarının Ayarlanması 21
2.2.7. A549 Hücrelerine DC Reçinesi Ekstraktı Dozlarının Uygulanması 21
2.2.8. MTT Yöntemi İle IC_{50} Değerinin Tespiti 22
2.2.9. Annexin V Yöntemi İle Apoptoz Analizi 22
3.BULGULAR 25
3.1. DC Reçinesi Ekstraktı Uygulanmış A549 ve HEK-293 Hücrelerinin MTT Yöntemi İle Belirlenmiş IC50 Değerleri 25
3.2. Muse/Flow Sitometri Cihazında Annexin V Yöntemi İle Apoptoz Analizi Sonuçları 28
4.TARTIŞMA 31
5.SONUÇ VE ÖNERİLER 34
6.KAYNAKLAR 36
7.EKLER 46
8.ÖZGEÇMİŞ 47

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C: Santigrat Derece

ACD: Adenokarsinom

BAC: Bronsioloalveolar Karsinom

BT: Bilgisayarlı Tomografi

DC: Dracaena Cinnabari

DMEM: Minimal Essential Medium

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

ECV-304: İnsan Mesane Karsinomu Hücre

EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

FBS: Fetal Sığır Serumu

KHAK: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

KHDAK: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomu

LCC: Büyük Hücreli Karsinom

MTT: (3-(4, 5-Dimetiltiazolil-2)-2, 5-Difeniltetrazolyum bromit)

KHDAK: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Karsinomu

OSCC: Oral skuamöz hücreli karsinom

PBS: Fosfat Tamponu Salin

SBRT: Stereotaktik Vücut Radyoterapisi

SCC: Skuamöz Hücre Karsinomu

KHAK: Küçük Hücreli Karsinom

UNESCO: Birleşmiş Milletler Eğitim, Bilim ve Kültür Örgütü

ATCC: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyo

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. WHO 2015 akciğer kanseri sınıflandırılması

Tablo 1.2. DC reçinesinde tanımlanmış bazı kimyasal bileşikler.

Tablo 3.1. DC reçinesi ekstraktı uygulanmış A549 hücrelerinin ve kontrol hücrelerinin 24. saatteki % canlılık ve apoptoz tablosu.

Tablo 3.2. DC reçinesi ekstraktı uygulanmış HEK-293 hücrelerinin ve kontrol hücrelerinin 24. saatteki % canlılık ve apoptoz tablosu.

ŞEKİLLER VE GRAFİKLER DİZİNİ

Şekil 1.1. A549 hücrelerinin mikroskop görüntüleri (ATCC).

Şekil 1.2. HEK-293 hücrelerinin mikroskop görüntüleri (ATCC).

Şekil 1.3. Dünyanın farklı bölgelerinde ejderhanın kanı.

Şekil 1.4. Dracaena cinnabari.

Grafik 3.1. Farklı konsantrasyonlarda DC reçinesi ekstraktı uygulanmış A549 hücrelerinin 24 ve 48. saattaki % canlılıkları.

Grafik 3.2. Farklı konsantrasyonlarda DC reçinesi ekstraktı uygulanmış HEK-293 hücrelerinin 24 ve 48. saatteki % canlılıkları.

Grafik 3.3. Farklı konsantrasyonlarda DC reçinesi ekstraktı uygulanmış A549 hücrelerinin 24. saatteki % canlılıkları, eğilim çizgisi ve doğru denklemi (IC_{50}: 90,96 μg/ml).

Grafik 3.3. Farklı konsantrasyonlarda DC reçinesi ekstraktı uygulanmış A549 hücrelerinin 24. saatteki % canlılıkları, eğilim çizgisi ve doğru denklemi (IC_{50}: 90,96 μg/ml).

Grafik 3.4. Farklı konsantrasyonlarda DC reçinesi ekstraktı uygulanmış HEK-293 hücrelerinin 24. saatteki % canlılıkları, eğilim çizgisi ve doğru denklemi (IC_{50}: 72,10 μg/ml).

Grafik 3.5. A549 kontrol hücrelerinin apoptoz grafikleri.

Grafik 3.6. IC_{50} dozunda DC reçinesi ekstraktı uygulanmış A549 hücrelerinin 24. saatteki apoptoz grafikleri.

Grafik 3.7. HEK-293 kontrol hücrelerinin apoptoz grafikleri.

Grafik 3.8. IC_{50} dozunda DC reçinesi ekstraktı uygulanmış HEK-293 hücrelerinin 24. saatteki apoptoz grafikleri.

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Dracaena Cinnabari Reçinesinin İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattında (A549) Proliferasyon Ve Apoptoz Düzeyleri Üzerine Etkisi

Eissa AL-MAGHREBI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Hüsamettin VATANSEV

KONYA-2020

Akciğer kanseri dünya çapında önemli ve yaygın hastalıklardan biridir. Akciğer kanserinde hastalığın tipi ve evresine göre cerrahi müdahale ya da kemoterapik ilaçlar ile tedavi uygulanabilmektedir. Dracaena cinnabari (DC) reçinesi uzun yıllardır genel yara iyileşmesi, pıhtılaşma, ishal, ishali azaltma, dizanteri hastalıkları, ağız yaraları, boğaz ağrısı gibi hastalıklar için bir çeşit tedavi aracı olarak kullanılmıştır. Yaptığımız bu tez çalışmasında, DC reçinesi ekstraktının, insan akciğer kanseri hücre hattı olan A549 hücrelerinde, apoptoz ve hücre proliferasyonu üzerine etkisini araştırmayı amaçladık. Hücre proliferasyon testi MTT yöntemi ile, apoptoz analizi ise Annexin V yöntemi ile Muse flow sitometre cihazında çalışılmıştır. DC reçinesinin metanol ekstraktı elde edilip A549 ve HEK-293 hücrelerine uygulanmıştır. A549 ve HEK-293 hücrelerine 50,75,100,125,150 µg/ml konsantrasyonlarda DC reçinesi ekstraktı uygulanmış ve MTT yöntemi ile proliferasyon analizi yapılmıştır. A549 hücreleri için IC_{50} değeri 24. saatte 90,96 µg/ml, HEK-293 hücrelerinde ise IC_{50} değeri 24. saatte 72,10 µg/ml olarak bulunmuştur. Muse/Flow sitometri cihazında Annexin V yöntemi ile A549 hücrelerinin ve HEK-293 hücrelerinin apoptoz analizleri yapılmıştır. Elde edilen IC_{50} konsantrasyonunda DC reçinesi ekstraktı uygulanmış A549 hücreleri yaklaşık %65 oranında özellikle geç apoptoza gitmiştir. A549 hücrelerine benzer şekilde HEK-293 hücreleri de daha çok geç apoptoza gitmiştir. DC reçinesi ile yapılan diğer çalışmalarda çoğunlukla DC reçinesi ekstraktı hücre proliferasyonunu inhibe etmiş ve hücreleri apoptoza götürmüştür. Fakat yapılan çalışmaların hiçbirinde DC reçinesi ekstraktının sağlıklı hücrelere etkisi araştırılmamıştır. Elde ettiğimiz bu sonuçlara göre DC reçinesinin doğrudan takviye tedavi olarak kullanılamayacağı ve ileri moleküler araştırmalarla etki mekanizmasının aydınlatılmasının yapılacak olan diğer çalışmalara yol gösterici nitelikte olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri; Apoptoz ; Dracaena cinnabari; Proliferasyon.

SUMMARY

T. C.

SELCUK UNIVERSITY

INSTITUTE of HEALTH SCIENCES

The Effect of *Dracaena Cinnabari* Resin on Proliferation and Apoptosis In Human Lung Cancer Cell Line (A549)

Eissa AL-MAGHREBI

MASTER THESIS

DEPARTMENT OF MEDICAL BIOCHEMISTRY

Prof. Dr. Hüsamettin VATANSEV

KONYA-2020

Lung cancer is one of the most important and common diseases worldwide. Surgical intervention or treatment with chemotherapeutic drugs can be applied in lung cancer, depending on the type and stage of the disease. Dracaena cinnabari (DC) resin has been used for many years as a treatment tool for general wound healing, coagulation, diarrhea, reducing diarrhea, dysentery diseases, mouth sores, sore throat. In this thesis study, we aimed to investigate the effect of DC resin extract on apoptosis and cell proliferation in A549 cells, which is a human lung cancer cell line. Cell proliferation test was studied by MTT method, and apoptosis analysis was studied with Annexin V method in Muse flow cytometer device. Methanol extract of DC resin was obtained and applied to A549 and HEK-293 cells. DC resin extract was applied to A549 and HEK-293 cells at concentrations of 50,75,100,125,150 µg / ml and proliferation analysis was performed by MTT method. The IC_{50} value for A549 cells was 90.96 µg / ml at the 24th hour, and the IC_{50} value for HEK-293 cells at the 24th hour was 72.10 µg / ml. Apoptosis analyzes of A549 cells and HEK-293 cells were performed with Annexin V method in Muse / Flow cytometry device. A549 cells treated with DC resin extract at the IC_{50} concentration obtained attained approximately 65%, especially late apoptosis. Similar to A549 cells, HEK-293 cells also underwent more late apoptosis. In other studies with DC resin, mostly DC resin extract inhibited cell proliferation and led cells to apoptosis. However, none of the studies investigated the effect of DC resin extract on healthy cells. According to these results, we think that DC resin cannot be used directly as a supplementary treatment and that elucidation of its mechanism of action with advanced molecular research will guide other studies.

Keywords: Apoptosis ; Dracaena cinnabari; Lung cancer; Proliferation.

1. GİRİŞ

Kanser, anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılması ile karakterize olan bir hastalıktır. Kanserin etiyolojisi hem genetik hem de çevresel etkileri içermekte olup çok faktörlüdür. Kanser hücreleri anormal hücresel çoğalma ile ilişkili olup onları normal hücrelerden ayıran yaygın özellikler sergilemektedir (Stathopoulou ve ark 2012).

Hastalığın gelişme nedenlerinin, çocukluk dönemi kanserleri için bilinmemesine rağmen, tütün kullanımı, obezite, kalıtım, mutasyonlar, hormonlar ve bağışıklık koşulları olduğu bilinmektedir. (Amerikan kanser topluluğu, 2018). Amerikan Kanser Derneği ve Uluslararası Kanserle Mücadele Birliği tarafından yapılan güncel değerlendirmeler, 2008 yılında dünya çapında 7 milyon ölüm ve 12 milyon kanser vakasının teşhis edildiğini göstermektedir. Bu sayıların 2030 yılına kadar iki katına çıkacağı tahmin edilmektedir (17 milyon ölümle 27 milyon vaka) (Bhanot ve ark 2011). Bu yüzyılda gelişmiş ülkelerde birkaç kanser türünün riski önemli ölçüde azalmış olsa da, hastalığın en önemli formlarının görülme sıklığı artmıştır. Akciğer, meme, prostat, kolon ve rektum kanserlerine, sigara içme, sağlıksız beslenme alışkanlıkları, işyerinde veya çevrede tehlikeli kimyasallara maruz kalma gibi risk faktörlerinin yaygın olduğu ülkelerde daha sık rastlanmaktadır (Srinivasan ve ark 2008).

Kanser, özellikle iki farklı kanserojenin etkisinden kaynaklanmaktadır. Bunlardan biri, hücre proliferasyonunu ve göçünü kontrol eden genlere zarar veren ajanlar içermektedir. Kanser oluşumunda tek bir hücre, genellikle uzun yıllar boyunca bu mutasyonların birçoğunu biriktirdiğinde ve nihayet çoğalma üzerindeki çoğu kısıtlamadan kaçtığında ortaya çıkmaktadır. Kanser çoğunlukla bu anormal hücrelerden oluşmaktadır. Diğeri ise, genlere zarar vermeyen, bunun yerine tümör hücrelerinin veya öncüllerinin büyümesini seçici bir şekilde arttıran ajanları içermektedir. Malignitelerin birincil tehlikesi, bazı hücrelerinin, vücudun diğer bölgelerine metastaz yapabilmeleridir. Böylece hastalık vücudun hayati organlarından birine ulaşıp o organa zarar verebilir (Trichopoulos ve ark 1996). 2018'de elde edilen verilere göre dünyadaki yeni tanı konulan kanserli vaka sayısı ve buna bağlı ölümlerde daha önceki yıllara göre artmaktadır. GLOBOCAN 2018 verilerine göre dünyadaki

yeni kanser vaka sayısı 18 milyona kansere bağlı ölüm 9 milyona ulaşmıştır. Dünyada en çok teşhis edilen kanserlerin başında akciğer (%11,6), meme (%11,6) ve kolon (%10,2) kanseri gelirken, kanser kaynaklı ölümlerin başında da akciğer (%18,4), kolon (%9,2), mide (%8,2) ve meme (%6,6) kanserleri gelmektedir (GLOBOCAN, 2018).

1.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, dünyadaki en yaygın kanser olup kanser ölümlerinin bir numaralı nedeni olmaya devam etmektedir. Akciğer kanseri, erkeklerde kansere bağlı ölümlerde ilk sıradayken kadınlarda ikinci sıradadır (Siegel ve ark 2012).

1953 yılında akciğer kanseri erkeklerde kanser ölümlerinin en yaygın nedeni haline gelmiştir. 1985'te kadınlarda kanser ölümlerinin önde gelen nedenlerinden olmuş ve günümüzde meme kanserinin yaklaşık iki katına kadarı akciğer kanseri kaynaklıdır. Genel olarak akciğer kanseri, meme, prostat, kolorektal ve beyin kanserlerinin toplamından daha fazla ölüme neden olabilmektedir (Siegel ve ark 2020). 2018 yılında dünya çapında yaklaşık olarak 2.1 milyon hastada akciğer kanseri tespit edilmiştir ve yaklaşık 1.7 milyon hastada ölümle sonuçlanmıştır (Goncalo ve ark 2018). Yüksek mortalite, özellikle küçük hücreli dışı akciğer karsinomunda (KHDAK) erken metastaza bağlanmaktadır (Gupta ve Massagué 2006, Wang ve ark 2010). Damar üzerine tümör metastazı oluşumu, hücre bağlanması, proliferasyon, istila gibi bir dizi adımla meydana gelir ve çok karmaşık mekanizmalar tarafından düzenlenmektedir (Fidler 2002).

Akciğer kanserleri herhangi bir akciğer kısmında ortaya çıkıp gelişebilir. Tüm akciğer kanserlerinin % 90-95'inin epitelyal hücrelerden ve hava yollarını kaplayan hücrelerde (bronşlar ve bronşiyoller) oluştuğuna inanılmaktadır. Bu nedenle akciğer kanserlerine bazen bronkojenik karsinomlar da denir. Kanserler ayrıca mezotelyoma adı verilen plevradan veya nadiren akciğerlerdeki kan damarlarında bulunan destekleyici dokularda ortaya çıkmaktadır.

Hücrelerin mikroskop altında görünmesine bağlı olarak, akciğer kanserleri geniş ölçüde farklı büyüyen ve yayılan iki tipte sınıflandırılır; küçük hücreli akciğer kanserleri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri (Group). KHDAK, tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %80'ini oluşturan en yaygın akciğer kanseri türüdür.

KHDAK'ın ana alt kategorileri, Skuamöz Hücreli Karsinom (SCC), Adenokarsinom (ACD) ve Büyük Hücreli Karsinomdur (Akciğer Kanseri Hasta Versiyonu, 2016).

Akciğer kanseri evrelemesinde, KHDAK olan hastalarda, ciddiyet sırasına göre 1'den 5'e kadar bir aşama olarak tanımlanır: Evre 1'de kanser akciğerle sınırlıdır. Evre 2'de kanser göğüs, diyafram veya plevra ile sınırlıdır ve tümör, lenf düğümlerine yayılmaktadır. Evre 3'de tümörler çok büyük ve daha invaziv hale gelmiş olabilir. Evre 4'de kanserden etkilenen akciğerin diğer kısımlarına, öteki akciğere veya göğüsten vücudun diğer bölgelerine yayılmıştır (Amerikan kanser topluluğu, 2018).

1.1.1. Akciğer Kanserinde Risk Faktörleri

Toplumumuzda tüm kanserojen maddelerin insan vücudu üzerindeki etkisinin uzun süredir bilinmesine rağmen, yine de kendimizi kasıtlı olarak birçok risk faktörüne maruz bırakmaya devam etmekteyiz.

21. yüzyılın başlarında, insanlara sadece dış ekzojen faktörlerin değil aynı zamanda bireysel maruz kaldığımız birçok faktörün de zarar verebileceği görülmüştür. En önemli faktörlerin başında kötü beslenme, gıda yoluyla bulaşan hastalık ve güvenli gıdaya güvenli erişim eksikliği olduğu varsayılmaktadır. Ayrıca, aşırı kilo ve obezite, hareketsiz ve hareketsiz yaşam tarzı, depresyon ve stres de önemli etkenler arasındadır. (Kulzhanbekov 2011).

Tütün ve sigara kullanımı

Sigara içmenin kitlesel dağılımı uluslararası bir konu haline gelmiştir. Sigara içmek yirminci yüzyılın vebası olarak adlandırılmıştır (Warner ve Mendez 2010).

Tütün içimi her yıl dünya çapında 5 milyondan fazla insanı öldürmeye devam etmektedir (Organization ve Control 2008). Sigara şeklinde tütün kullanımı, ortalama yetişkin sigarasının 1900'lerde yılda 100 sigaradan daha az olmasıyla, 1960'larda kişi başına yılda yaklaşık 4400 sigaraya kadar önemli ölçüde artmıştır (Warner ve Mendez 2010).

Sigara ürünlerinin olumsuz etkisi, tüm akciğer kanseri ölümlerinin % 80-90'ınına, ağız boşluğu, larinks, özofagus ve mide kanseri gibi ölümle sonuçlanan

kanserlerde de dahil olmak üzere gelişmekte olan ülkelerde tüm kanser ölümlerinin yaklaşık %30'una neden olmaktadır (Organization 2002).

Sigara içme prevalansı çoğu ülkede kadınlarda erkeklerden daha düşük olmakla birlikte, dünyada bir milyar sigara içicisinin yaklaşık 200 milyonunun kadın olduğu bilinmektedir (Organization 2010).

Bugüne kadar tütün kullanımının, akciğer kanseri için en önemli değişken risk faktörü olduğu ve akciğer kanserlerinin yaklaşık %90'nın tütün kullanımına bağlı ortaya çıktığı bilinmektedir (Health ve Services 2014).

Kirlilik ve hava kalitesi

Kentsel-kırsal karşılaştırmaları içeren ilk çalışmalar, akciğer kanseri ölümlerinde %10-40 artışla ilişkili bir "kentsel faktör" olduğunu göstermiştir (Pershagen 1990). İki büyük kömür ocağı çalışması, ince partiküllere uzun süreli maruziyette akciğer kanseri için yaklaşık %19 daha fazla risk olduğunu göstermektedir (Dockery ve ark 1993).

Hava, dizel egzoz, benzen, formaldehit gibi gaz bileşenleri içerir ve 1,3-bütadienin de bilinen kanserojen etkileri vardır. Dizel egzozuna, özellikle kamyon endüstrisinde çalışan bireylerdeki mesleki maruziyetin, akciğer kanseri görülme riskini %30-50 oranında arttırdığı bildirilmiştir (Cohen ve ark 2017).

Uranyum, radyum ve radon

Radon ve kısa ömürlü çürüme ürünleri için, akciğer kanserinin ortaya çıkmasına sebep olduğu bilinmektedir. Uranyumun doğal çürümesi, alfa parçacıkları yayıldığında radon gazından çürüyen radyumu üretir. Uranyum ve radyum değişken konsantrasyonlarda toprak, kaya ve madenlerde bulunmaktadır. Muhtemelen bu maruziyetler nedeniyle, madencilik akciğer kanseri ile ilişkili en eski meslektir. Artan akciğer kanseri riskine neden olan etiyolojik faktörler başlangıçta toza bağlı pnömokonyoz, arsenik veya kobalt olarak speküle edilmiş olsa da, gerçek karsinojenler başta radon ve çürüme ürünleri olmak üzere radyoaktif maddeler olarak tanımlanmıştır (Lubin ve ark 1995).

Sigara içmeyen popülasyonda radonun kanserojen olarak potansiyel önemi, sigara içen madencilerle tüm madenciler karşılaştırıldığında akciğer kanseri için göreceli olarak daha yüksek risk taşıdığı vurgulanmıştır (Saccomanno ve ark 1988).

Mesleki maruziyet-asbest

Asbest, meslek koşullarından kaynaklanan kanser kaynaklı ölümlerin yaklaşık yarısını oluşturan en önemli meslek karsinojenlerinden biridir (WHO, 2010). Birçok çalışma, sigara ve asbest kombinasyonunun maruziyetinin özellikle tehlikeli olduğunu göstermiştir. Hem sigara kullanan hem de asbeste maruz kalan bireylerin diğerlerine göre daha fazla akciğer kanseri riski vardır. (Vainio ve ark 1993).

Akciğer karsinojenleri olarak önerilen veya kanıtlanmış mesleki maruziyetler arasında arsenik, asbest, berilyum, kadmiyum, klorometil eterler, krom, nikel, radon, silika ve vinil klorür bulunmaktadır. Erkekler arasında akciğer kanseri ölümlerinin %10'unun ve kadınlar arasında %5'inin asbest, arsenik berilyum, kadmiyum, krom, nikel, silika ve dizel dumanlarına maruz kalmaya bağlı olduğu tahmin edilmektedir (Fingerhut ve ark 2006).

Genetik yatkınlık

Çoğu akciğer kanseri vakası sigara içimi ile ilişkili olsa da, genetik yatkınlık hala çok sayıda çalışma ile desteklenen büyük bir hastalık gelişimi faktörüdür (Kulzhanbekov 2011). Bazı akciğer hastalıklarının, özellikle kronik obstrüktif akciğer hastalığının varlığı, akciğer kanseri riskinin artmasıyla ilişkilidir. Bireysel risk faktörlerinin kanseri etkileyebileceğini anlamak çok önemlidir. Genler yaşamımızda önemli bir rol oynar ve insan vücudunda meydana gelen süreçlerin çoğunu kontrol ederler. Normal yaşamda, genler hücre bölünmesini ve büyümesini destekleyebilir. Genlerde mutasyonlarla hasar meydana geldiğinde kanser gelişebilir. Özellikle genç yaşta kanserden hastalık veya ölüm vakaları yaşayan aileler yüksek risk grubuna girmektedir. Kanser insidansının arttığı belirtilen ailelerde, daha genç yaşta düzenli taramaya başlanmalı ve daha tedbirli olunmalıdır (Mohandas 2001).

1.1.2. Akciğer Kanserinin Sınıflandırılması

Akciğer kanserleri geleneksel olarak küçük hücreli olmayan karsinoma (KHDAK) ve küçük hücreli karsinoma (KHAK) olarak ikiye ayrılır ve birincisi vakaların % 80'ini ve ikincisi kalan % 20'sini oluşturmaktadır.

KHAK'lar agresif davranır ve çoğu durumda cerrahi olmayan bir şekilde tedavi edilirken, KHDAK'lar cerrahi ve adjuvan tedavinin bir kombinasyonu ile yönetilir. KHDAK tipleri arasında adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom (LCC) bulunmaktadır. Böylece, KHDAK'ın alt tipi belirtilirken, "KHDAK" tanımı sadece belirli küçük biyopsilerde ve sitoloji örneklerinde korunur. KHAK, nöroendokrin farklılaşma gösteren diğer tümörler ile gruplandırılmıştır.

Tablo 1.1. WHO 2015 akciğer kanseri sınıflandırılması

<table>
<tr>
<td rowspan="2">1-Adenokarsinom
- Lepidik
- Papiller
-Mikro Papiller
-Katı
-İnvaziv
-Kolloid
-Fetal
-Enterik
-Minimal invaziv</td>
<td rowspan="2">5-Nöroendokrin Tümörler
-Karsinoid tümörler
+Tipik karsinoid
+Atipik karsinoid
-Küçük hücreli karsinom
-Büyük hücreli nöroendokrin karsinom</td>
<td rowspan="2">9-Tükürük Bezi Tipi Karsinomlar
-Mukoepidermoid karsinom
-Adenoid kistik karsinom
-Epitelyal miyoepitelyal karsinom</td>
<td>13-Metastatik Tümörler</td>
</tr>
<tr>
<td>14-Pulmoner Blastoma</td>
</tr>
<tr>
<td>2-Skuamöz Hücre Karsinoması</td>
<td>6-Büyük Hücreli Karsinom</td>
<td>10-Mil Hücreli Karsinom</td>
<td rowspan="3">15-Karsinosarkom</td>
</tr>
<tr>
<td>3-Adenoskuamöz Karsinom</td>
<td>7-Pleomorfik Karsinom</td>
<td>11-Dev Hücreli Karsinom</td>
<td rowspan="2">16- Diğer Karsinomlar
-Lenfoepitelyoma benzeri karsinom
-NUT karsinomu</td>
</tr>
<tr>
<td>4-Mezenkimal Tümörler</td>
<td>8-Lenfohistiyositik Tümörler</td>
<td>12-Ektopik Menşeli Tümörler</td>
</tr>
</table>

Adenokarsinoma

Akciğer adenokarsinomu tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır. 2004 DSÖ sınıflandırmasına göre adenokarsinom, beş ana alt tipe ayrılır; asiner, papiller, müsin üretimi ile solid, BAC (Bronchioloalveolar Karsinom) ve karışık adenokarsinomlar (Travis ve ark 2004). Çoğu adenokarsinom iki veya daha fazla histolojik alt tipten oluşmuş yapıda olup heterojendir. Bu nedenle çoğu

adenokarsinom %80 karışık alt tipe girmektedir. Akciğer adenokarsinomları tekli veya çoklu olabilir ve boyut olarak geniş bir aralıkta olabilir (Nakanishi ve ark 2003).

Akciğer adenokarsinomları esas olarak lenfatik ve hematojen yollarla yayılırken, aerojen yayılma sıklıkla bronşiyalalveolar karsinomda (BAC) meydana gelir ve tümör hücrelerinin hava yollarından yayılmasıyla karakterize edilerek ana kitleden ayrı lezyonlar oluşturmaktadır (Travis ve ark 2004).

Squamöz hücreli karsinoma

Skuamöz hücreli karsinom (SCC), tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır (Lewis ve ark 2014). Hücreler arası köprüler, skuamöz ince oluşumu ve bireysel hücre keratinizasyonu, bu tümör tipinde skuamöz farklılaşmayı karakterize etmektedir. Tüm bu özellikler iyi diferansiye skuamöz hücreli karsinomlarda çok belirgin olmakla birlikte, kötü diferansiye tümörlerde bulunması zordur (Travis 2004).

SCC genellikle akciğerin orta kısmında, büyük hava yolları boyunca meydana gelir ve büyük bir boyuta ulaştıklarında boşluklar oluşturabilirler. Tümör hücreleri genellikle göze çarpmayan nükleollerle görülebilen hiperkromatik çekirdeklere ve belirgin hücreler arası köprülere sahip ve orta veya bol sitoplazmalı yapıdadır (Travis 2004).

Solid tümör yuvalarına merkezi olarak yerleştirilmiş keratin incileri oluşturan bireysel tümör hücresi keratinizasyonu veya keratinize skuamöz hücre grupları olabilir. SCC'ler ayrıca keratinize, nonkeratinize olmayan ve bazaloid alt tiplere ayrılır. Adenokarsinom alt tiplerinin aksine, bu tür alt sınıflandırma, bildirildiğine göre sitotoksik kemoterapiye içsel direnç sağlayan farklı moleküler profil sergileyen bazaloid SCC'ler dışında hiçbir görünür prognostik fayda göstermez (Brambilla ve ark 2014). Diğer akciğer kanseri türlerine benzer şekilde, skuamöz hücreli karsinomlar öncelikle lenfatik ve hematojen yollarla yayılmaktadır. Ayrıca, skuamöz hücreli karsinomlar, peribronşiyal dokulardan genişleyerek mediastinal lenf düğümlerini ve diğer mediastinal yapıları doğrudan istila eder (Travis 2004).

Büyük hücreli karsinoma

Büyük hücreli karsinom, skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom veya KHAK özelliklerine sahip olmayan farklılaşmamış bir karsinomdur (Takei ve ark 2002).

LCC'ler akciğer kanserlerinin % 3'ünden azını temsil etmektedir (Travis ve ark 2013, Travis ve ark 2015). Büyük hücreli karsinom, skuamöz hücre veya glandüler farklılaşmanın varlığının ışık mikroskobu ile dışlanması gereken bir dışlama tanısıdır. Ayrıca bunlar, büyük hücreli nöroendokrin karsinomlar (LCNEC), bazaloid karsinomlar, lenfoepitelyoma benzeri karsinomlar, şeffaf hücreli karsinomlar ve rabdoid bileşenli büyük hücreli karsinomlar gibi bazı spesifik varyantları içermektedir (Brambilla ve ark 2004). Tümör genellikle visseral plevrayı, göğüs duvarını veya bitişik yapıları işgal etmektedir.

Büyük hücreli karsinomun bazaloid varyantları genellikle ekzofitik bronşiyal büyüme paternine sahip merkezi tümörlerdir. Büyük hücreli karsinomların yayılma paterni genellikle diğer KHDAK'lara benzemektedir.

1.1.3. Akciğer Kanserinde Tanı ve Tedavi

Akciğer kanseri tanısında göğüs radyografisi, bir kişinin akciğer kanseri semptomlarını bildirmesi durumunda ilk araştırma adımlarından biridir. Bu bariz bir kitle, mediastenin genişlemesi (oradaki lenf nodlarına yayılmasını düşündürür), atelektazi (çökme), konsolidasyon (akciğer iltihaplanması) veya plevral efüzyonu ortaya çıkarmaktır (Tsao 2007).

Bilgisayarlı tomografi görüntüleme tipik olarak hastalığın türü ve kapsamı hakkında daha fazla bilgi sağlamak için kullanılmaktadır. Histopatoloji için tümörü örneklemek için sıklıkla bilgisayarlı tomografi kılavuzluğunda biyopsi kullanılmaktadır. Akciğer kanseri genellikle bir göğüs radyografisinde ayrı bir akciğer nodülü olarak görülmektedir (Mustafa ve ark 2016).

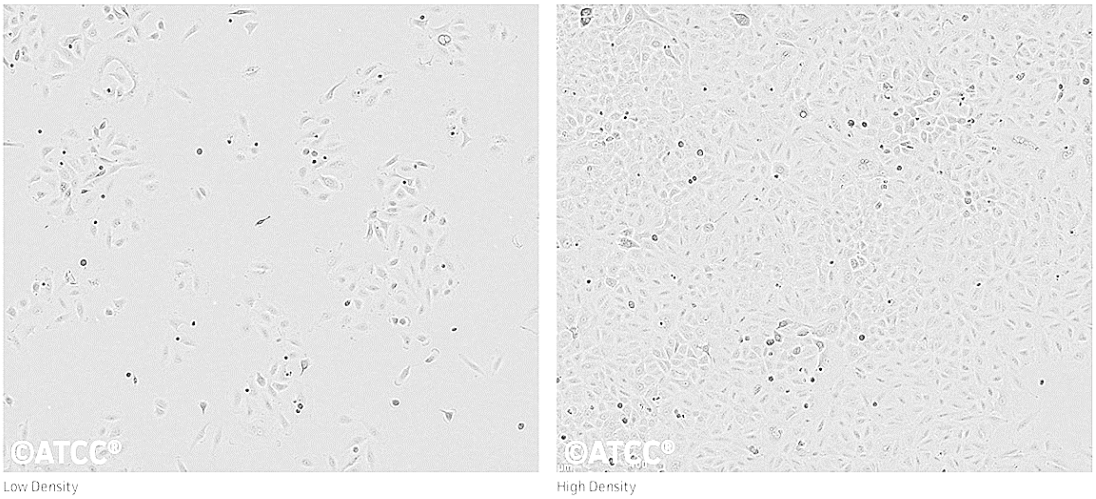
Akciğer kanseri aynı zamanda bir akciğer radyografisinde yalnız yaşayan akciğer nodülleri veya alakasız bir nedenden dolayı yapılan bilgisayarlı tomografi taramasında rastlantısal bir bulgu da olabilir (Frank ve Quint 2012). Akciğer

kanserinin kesin tanısı, şüpheli dokuların klinik ve radyolojik özellikleri bağlamında histolojik incelemesine dayanmaktadır (Holland ve Pollock 2010, HomL ve Johnson 2015). Klinik uygulama kılavuzları akciğer nodüllerinin kontrolü için sıklık önermektedir (Travis ve ark 2013). Bilgisayarlı tomografi görüntülemede uzun süren gözetim, insanları artan radyasyona maruz bıraktığı için belirtilenden daha az kullanılmalıdır (Travis ve ark 2013).

Akciğer kanseri tedavisi kanserin spesifik tipine, ne kadar yayıldığına ve kişinin performans durumuna bağlıdır. Yaygın tedaviler palyatif bakım, cerrahi, kemoterapi ve radyasyon tedavisidir (Ferrell ve ark 2011, Kasper ve ark 2015). Bu tedavi yöntemlerinin yan etkilerinin olması ve hastanın yaşam kalitesini olumsuz etkilemesi, bitkisel tedavi yöntemlerine yöneltmiştir.

1.2. A549 Hücre Hattı

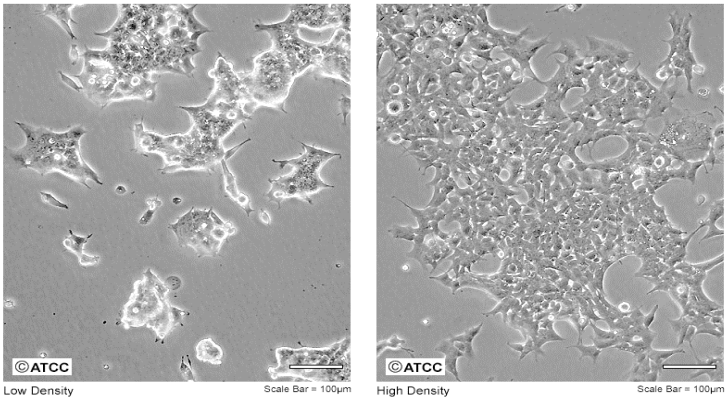
A549 hücre hattı köken olarak ilk defa 1972'de 58 yaşında beyaz bir erkeğin eksplante tümöründe kanserli akciğer dokusunun çıkarılması ve kültürlenmesi ile gerçekleştirilmiştir. A549 hücreleri adenokarsinomik insan alveoler bazal epitel hücreleridir ve kültür şişesine in vitro bağlanan bir tek tabaka olarak yapışmaktadır. (Giard ve ark 1973). Mikroskop görüntüsü Şekil 1.1'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. A549 hücrelerinin mikroskop görüntüleri (ATCC).

1.3. HEK-293 Hücre Hattı

Morfolojisi epitel olan HEK-293 hücre hattı 1973 yılında normal insan embriyonik böbrek hücrelerinin Adenovirüs-5 ile transforme edilmesiyle üretilmiştir. Hücrelerin ışık mikroskobundaki morfolojisi birbirlerine ağımsı bağlantılar ile bağlanmış yassı adherent tipindedir (Şekil 1.2) (Kalkan ve ark 2018).



Şekil 1.2. HEK-293 hücrelerinin mikroskop görüntüleri (ATCC).

1.4. Apoptoz

Programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz, hücre intihar yolu, artık ihtiyaç duyulmayan veya hasar gören hücrelerin ortadan kaldırılması için gereklidir (Sayers 2011, Hongmei 2012).

Apoptoz, normal hücre gelişimi, döngüsü sırasında ve ayrıca çeşitli patolojik durumlarda ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte, apoptozun uygun olmayan şekilde düzenlenmesi, viral enfeksiyon, otoimmün hastalıklar, AIDS, nörodejeneratif bozukluklar, inme, anemi ve kanser gibi bazı bozukluklara katkıda bulumaktadır (Pucci ve ark 2000). Apoptoz, kromatin yoğunlaşması, hücre büzülmesi, fosfatidilserin translokasyonu, apoptotik cisimlerin oluşumu ve hücre lizizinden önce plazma membranının emilmesi dahil olmak üzere spesifik morfolojik değişiklikler ile karakterize edilmektedir (Hsu ve ark 2004). Moleküler düzeyde, apoptoz iki farklı yoldan meydana gelmektedir. İntrinsik veya mitokondriyal yol, hücre içi olaylar tarafından aktive edilir ve proapoptotik faktörlerin mitokondriden salınmasına bağlıdır. Ekstrinsik apoptoz yolu ise, hücre dışı protein ölüm ligandlarının proapoptotik ölüm reseptörlerine bağlanması yoluyla sinyaller almasıdır (Sayers 2011).

1.5. Nekroz

Apoptotik hücre ölümüne alternatif yol nekrozdur. Isı, radyasyon, hipoksi veya düşük dozlarda sitotoksik antikanser ilaçlara maruz kalma gibi bazı yaralanma / uyaran türleri apoptoza neden olabilir, ancak yaralanma / uyaran türleri daha şiddetli hale geldiğinde nekroz ile sonuçlanır (Elmore 2007).

Nekroz, hücreler fizyolojik koşullarla hücre zarına zarar veren bileşiklere bağlı olmayan koşullara maruz kaldığında ortaya çıkmaktadır. Nekroz, hücre homeostazı sürdüremediğinde başlatılır ve bu da su ve hücre dışı iyonların akmasına neden olur. Hücre içi organeller, en önemlisi mitokondri ve tüm hücre şişmeye başlar ve yırtılır (hücre lizisi). Plazma zarının bozulması nedeniyle, lizozomal enzimleri içeren sitoplazmik içerikler hücre dışı sıvıya salınır. Bu nedenle, in vivo nekrotik hücre ölümü sıklıkla yoğun bir enflamatuar yanıta neden olan geniş doku hasarı ile ilişkilidir (Miret ve ark 2006, Yanina ve ark 2011).

Nekrotik hücrelerdeki morfolojik değişiklikler hücre şişmesi, sitoplazmik vakuollerin ve sitoplazmik bleblerin oluşumu, şişmiş endoplazmik retikulum, şişmiş veya kopmuş mitokondri,lizozomlar ve parçalanmış organel veya hücre zarları ile birlikte görülmektedir (Trump ve ark 1997).

1.6. Ejderhanın Kanı

Ejderhanın kanı, dünyanın farklı kültürlerinde kullanılan ünlü geleneksel ilaçlardan biridir. Ejderhanın kanı kırmızımsı reçineli ürünlere atıfta bulunan bir terimdir ve bu koyu kırmızı reçine, birçok kültür tarafından eski zamanlardan beri geleneksel bir ilaç olarak kullanılmaktadır.

Ejderhanın kanı ağacı, dört nesil (Şekil.1.3.) Dracaena Spp'ye ait dünyanın çeşitli bölgelerinde endemik olan farklı bitki türlerinden koyu kırmızı reçineli eksüdasyonlar için kesin olmayan bir isimdir (Chao ve Henry 2010).



Dracaena cinnabari, Yemen



Croton draco, Venezuela



Pterocarpus, Batı Hint Adaları ve Güney Amerika



Daemonorops draco, Güneydoğu Asya

Şekil 1.3. Dünyanın farklı bölgelerinde ejderhanın kanı.

Ejderhanın kanının tıbbi kullanımı eski Yunanlılara, Romalılara, Araplara ve Çinlilere dayanmaktadır (Masaud ve ark 1995, Mothana ve ark 2006, Chao ve Henry 2010, Yehia ve ark 2013).

Ejderhanın kanı, antik çağlardan beri birçok kültür tarafından geleneksel tıpta kullanılan koyu kırmızı bir reçinedir (Gupta ve ark., 2008).

Soqotra adasındaki Moomy şehrinin yerlileri, genel yara iyileşmesi, pıhtılaşma, ishal, ishali azaltma, dizanteri hastalıkları, ağız yaraları, boğaz ağrısı gibi hastalıklar için ejder kanını bir çeşit tedavi aracı olarak kullanmışlardır. Bağırsak, mide, solunum ve mide virüsleri için bir antiviral ve egzama gibi cilt rahatsızlıkları için kullanılmaktadır (Milburn 1984).

Yunan tıbbında Ejderhanın kanı reçinesi yaygın olarak “Dammul-akhwain” olarak bilinmektedir. Aynı zamanda bir anti-enflamatuar, antioksidan ve antitümör maddesi yaygın olarak kullanılmaktadır (Milburn 1984). Croton drco gövdesinden elde edilen bir Ejderhanın kanı reçinesi değerlendirilmiş ve Staphylococcus aureus ve Salmonella typhimurium'a karşı antibakteriyel aktivite sergilediği bildirilmiştir (Peres

ve ark 1997). Jones (2003), Gonzales ve Valerio (2006) tarafından yapılan çalışmalarda diğer ejderhanın kanı reçinesinin (*Croton spp*.) bir antidiyareik, antikanser, antienflamatuar ve antiromatizmal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Jones 2003, Gonzales ve Valerio 2006). Ayrıca *Daemonorops spp.* Çin tıbbında, kan dolaşımını uyarmak, doku rejenerasyonunu teşvik etmek ve aynı zamanda kırıkların, burkulmaların, ülserlerin iyileşmesi, kanama ve ağrı hissinin kontrolü için kullanılan ünlü bir bitkidir (Bensky ve ark 2004). Ejderhanın kanının kökeninin Yemen'in güney kıyısında bulunan Soqotra Adası'ndan geldiğine inanılmaktadır (Alexander ve Miller 1996, Edwards ve ark 1997, Gupta ve ark 2008).

1.7. Dracaena Cinnabari (DC)

Dracaena cinnabari (DC) endemik bir türdür ve Yemen Cumhuriyetine bağlı Soqotra Adası'nın en ünlü bitkisidir (Şekil 1.4.) Dracaenaceae, Dracaena cinsi ve cinnabari türleri altında sınıflandırılmaktadır (Gupta ve ark 2008, Hubalkova ve ark 2017). Coğrafi olarak, Yemen cumhuriyetinin bulunduğu Arap Yarımadası'na 240 mil uzaklıktadır. Dracaena cinnabari, kuzeybatı Hint Okyanusu'ndaki dört ada olan Soqotra takımadalarına özgü sıra dışı ağaçların en ünlüsüdür. Bu ada, sahip olduğu olağanüstü niteliklerin uluslararası olarak tanınması sonucu 2003 yılında UNESCO tarafından korunmaya alınmıştır (Hubálková 2011). Soqatra adasında bulunan 825'den fazla bitki türü bulunup 12 cins ve 307 türün (%37) endemik olduğu düşünülmektedir (Hubálková 2011).

Adadaki çevresel koşullar ve kalite genellikle Yemen ana karasındakinden çok daha iyidir. Ada, jeolojik olarak, merkezinde bulunan granitik Hagghier Dağları'nın plütonik çekirdeği ve adanın doğu ve batı uçlarında, tortul kayalarla kaplı yerlerde benzer iki kristal masif ile karakterize edilmektedir. Granitlerin ayrışması, zengin kırmızı toprakların oluşmasına yol açmıştır. Düz, gri kabuklu, 10 m yüksekliğe kadar büyüyebilen, tek gövdeli bir ağaçtır. Şemsiye şeklindeki dalları bir taç oluşturmaktadır (Hubálková ve ark, 2015).

Dracaena cinsi 60 ila 100 tür içerir ve üç aile olarak sınıflandırılmıştır. Bunlar Dracaenaceae, Agavaceae, Liliaceae'dir. Dracaenaceae, diğer ikisini kapsar ve bu aile Soqotra takımadasının uzun coğrafi izolasyonu, şiddetli sıcağı ve kuraklığı ile birleşerek benzersiz ve harikulade endemik bitki örtüsünü yaratmıştır. Kırmızı özsuyu,

eskilerin ejderhanın kanı olarak adlandırdığı, ilaç ve boya olarak kullanılan bir reçinedir (Adolt ve Pavlis, 2004).



Şekil 1.4. Dracaena cinnabari (Yehia ve ark 2013)

Bitkisel ilaçlar, özellikle kırsal alanlarda, Yemen'deki geleneksel tıbbın en önemli alanlarından birini temsil eder. Bu nedenle, fitoterapi birkaç fiziksel, fizyolojik, zihinsel ve sosyal rahatsızlığın tedavisi için Yemen popülasyonunun büyük bir kısmı tarafından uygulanır. Tüm yerel bilgi kaynakları %100 Soqotra'daki Dracaena Cinnabari reçinesinin tıbbi kullanımlarını bildirmiştir. Araştırmalara göre, reçinenin farklı rahatsızlıklara karşı geniş kullanımı gösterilmiştir. 20'den fazla hastalığın Dracaena Cinnabari kullanılarak tedavi edildiği bildirilmiştir. Dermal hastalıklar ve diş rahatsızlıkları en sık reçine (her biri için % 100 yanıt) ile tedavi edilir, bunu göz hastalıkları (%98), iç ve dış kanama (%95) ve gastrointestinal hastalıklar (%94) takip eder (Miller ve Morris 2004).

Dracaena Cinnabari reçinesinin etanol ekstraktının analjezik ve anti-enflamatuar etkileri araştırılmış ve asetik asite bağlı uyarma cevap testi kullanılarak test edildiğinde önemli bir periferik analjezik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Dracaena Cinnabari'nin metanol ekstraktında flavonoidlerin varlığı, akut inflamasyonun geç fazında yer alan hedef prostaglandinleri tanıdığı için antienflamatuar aktivitelere katkıda bulunabildiği düşünülmektedir (Gupta ve ark 2014).

DC reçinesinin ayrıca sıçandan izole edilen ince bağırsak, rahim ve idrar kesesi üzerinde gevşetici bir etki gösterdiği ve bu etkinin yine DC reçinesinde bulunan flavonoidlerin varlığı ile gerçekleştiği gösterilmiştir(Al-Awthan ve ark 2010) .

DC'deki flavonoidlerin başka bir özelliği de kalp kasılmasını arttırmasıdır (Al-Awthan ve ark 2010). Ayrıca, anestezi uygulanan sıçanlarda, sulu DC ekstraktının hem sistolik hem de diyastolik kan basıncını düşürdüğü bildirilmiştir ve bunun nedeni, rahatlamış düz kasların kan damarlarının vazodilatasyonundan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Vazodilatasyon veya artan glomerüler filtrasyon hızı ile ilgili hipotansif etki nedeniyle, bu aynı zamanda sıçanlarda artan idrar atılımına neden olmuştur (Al-Awthan ve ark 2010).

Mothana ve ark.(2005) tarafından yapılan bir çalışma, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Micrococcus flavus ve Escherichia coli'ye karşı DC reçinesinin (kloroform ve metanol ekstraktı) antimikrobiyal aktivitesini bildirmiştir. DC'nin metanol ekstraktının ayrıca herpes simpleks ve insan influenza virüslerine karşı bir antiviral aktivite uyguladığı bildirilmiştir (Mothana ve ark 2006).

Ansari ve ark. (2016) yayınladığı bir çalışmada DC'nin etanol ekstraktının Gram-pozitif, Gram-negatif patojenler ve mantarlara karşı antimikrobiyal aktivitesini bildirmiş ve DC'nin insandaki mikrobiyal enfeksiyonların kontrolünde önemli bir rol oynayabileceği sonucuna varmışlardır (Ansari ve ark 2016).

DC reçinesinin antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri nedeniyle çeşitli gıda kaynaklı patojenler üzerinde potansiyel bir gıda koruyucu madde olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (Gupta ve Gupta, 2011). Yüksek sitotoksisitesinden ötürü, DC'nin metanolik ekstraktı ayrıca parazitlerin spesifik olmayan bir inhibisyonunu sergilemiştir (Mothana ve ark 2012). Glikoz alımını indükleme aktivitesi (% 98.86) kullanılarak test edilen DC etil asetat ekstraktının anti-diyabetik aktivitesi ile bu ekstraktın antidiyabetik bir ilaç olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğunu gösterilmiştir (Mohammed ve Khanum 2016). Yemen'den toplanan DC reçinesinin sitotoksik aktivitesi, insan ECV-304 hücrelerine karşı araştırılmış ve belirgin toksisite göstermiştir (Al-Fatimi ve ark 2005)

Çeşitlili çalışmalarda DC reçinesinin kimyasal içeriği hakkında bilgiler verilmiştir. Önemli kimyasal bileşenler Tablo 1.2'de gösterilmiştir.

Tablo 1.2. DC reçinesinde tanımlanmış bazı kimyasal bileşikler.

NO	Bileşiğin kimyasal adı	Kaynak
1	3- (4-hidroksibenzil) -7 kroman, 3- (4-Hidroksibenzil) -7,8 -metilendioksikrom	(Suchý ve ark 1991)
2	kampesterol, stigmastanol, Stigmasterol, sitosterol, sikloartanol,	(Masaoud ve ark 1995)
3	24-metilensikloartanol, lupeol ve betulin, 7-hidroksi-3- (4-hidroksibenzil) -8 metoksikroman, 3- (4 hidroksibenzil) -7,8metilendioksikroman, 7-hidroksi-3- (4-hidroksibenzil) kroman, 4-dihidroksi-3-metoksiflavan, 4-4-dihidroksi-2-metoksidihidrochalcone, 4-4-dihidroksi-2-metoksikloroil.	(Masaoud ve ark 1995)

1.7.1. Dracaena Cinnabari Reçinesinin Hazırlanma Şekilleri

Geleneksel hazırlamalar kurutulmuş (hazırlık modlarının % 50'si) veya taze reçineden (% 50) yapılır:

1. Kurutulmuş reçine toz (hazırlama şekilleri % 40'ı) veya süspansiyon (% 33) olarak kullanılabilir.

2. Kurutulan reçine toz haline getirilir veya az su içinde süspanse edilir. Taze reçine bir macun (% 20) hazırlamak için az su ile ezilir. Dahili kullanım için taze reçine çiğnenir veya tozu alınır.

Toz haline getirilmiş reçine, dahili kullanım için sütte süspanse edilirken harici kullanım için curcuma veya antimon ile karıştırılabilir. Normal hazırlama şekli toz haline getirilmiş olan kurutulmuş reçinedir.

1.7.2. DC Ekstraksiyonunda Kullanılan Bazı Çözücüler

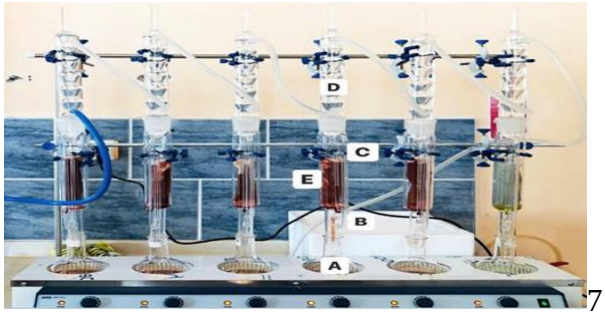
Alkol: Bitki ekstraksiyonunda çözücü olarak kullanılan en yaygın alkol türlerinden ikisi etanol ve metanoldür (Wang ve ark 2010, Bimakr ve ark 2011). Çeşitli bitki türlerinden ve bitki bazlı gıdalardan (meyve, sebze vb.) antioksidan bileşikleri çıkarmak için yaygın olarak kullanılmıştır (Peschel ve ark 2006). Alkol ile su kıyaslandığında alkol, daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip bitki özleri üretebilmektedir (Lapornik ve ark 2005). Su ve organik çözücünün birlikte

kullanılması, suda veya organik çözücüde çözünen kimyasalların ekstraksiyonunu kolaylaştırabilir. Bu sulu metanol, etanol ve aseton ekstreleri gibi çözücüler kullanılarak bitki ekstrelerinin veriminin yüksek olmasının nedenini açıklamaktadır (Do ve ark 2014). Flavonoid bileşikleri, farklı tipte çözücüler kullanılarak nane yapraklarından ekstrakte edildiğinde, metanol kullanımında, en yüksek bitki ekstrakt verimi elde edilmiştir (Bimakr ve ark 2011).

Genel olarak metanol, etanolden daha fazla polariteye sahiptir ve bu ekstrakt işleminin daha verimli olmasına ve daha fazla bitki bileşeninin özütlenmesine olanak tanımaktadır (Wang ve ark 2010, Bimakr ve ark 2011).

1.7.3. Sürekli Sıcak Ekstraksiyon

Bu yöntemde, ince öğütülmüş ham bitkiler gözenekli bir yere yerleştirilir (Şekil 1.5.). Soxhlet aparatının E bölmesine yerleştirilen güçlü filtre kağıdından yapılmış yüksük, Şekil 1.5.A'da gösterilen borudaki ekstre edici çözücü ısıtılır ve buharları Şekil 1.5.D'deki kondansatörde yoğunlaşır. Yoğunlaştırılmış ekstrakt, ham ilacı içeren yüksük içine damlatılır ve temas yoluyla ekstrakte edilir. Şekil 1.5.B'de görülen odadaki çözücü seviyesi Şekil 1.5.C'deki sifon borusunun üstüne yükseldiğinde, Şekil 1.5.B'deki odanın sıvı içeriği Şekil 1.5.A'ya sifonlanır. Bu işlem süreklidir ve sifon tüpünden bir damla çözücü buharlaştığında artık bırakmayana kadar devam edilir. Bu yöntemin avantajı diğer ekstraksiyon yöntemlerle karşılaştırıldığında, çok miktarda bitkinin çok daha az miktarda çözücü ile özütlenebilmesidir. Bu zaman, enerji ve dolayısıyla finansal girdiler açısından muazzam ekonomiyi etkilemektedir. Küçük ölçekte sadece bir toplu işlem olarak kullanılır ancak orta veya büyük ölçekte sürekli ekstraksiyon prosedürüne dönüştürüldüğünde çok daha ekonomik ve uygulanabilir hale gelir (Singh 2008).



7

Şekil 1.5. Sürekli Sıcak Ekstraksiyon

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar

- MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT), GoldBio Catalog # T-030 [CAS 298-93-1, mw = 414.32 g/mol])Apoptoz kiti
- DMEM besiyeri
- FBS: Fetal Bovin Serum European Grade Heat Inactivated (BIO-IND, BI04-127-1B) (100ml)
- Penisilin-Streptomisin: Penicillin-Strptomycin Solüsyon 10,000 units/ml Penicil (BIO-IND, BI03-031-1C) (20mL)
- Glutamin-L-glutamin Solüsyonu, 29.2 mg/ml in Saline) (200 mmol) (BIO. IND,BI03-020-1B) (100mL)
- Tripsin-EDTA: Trypsin EDTA, Solution C (0.05%) EDTA (0.02%), with Phenol Biological Industries Kibutz Haemek: (BIO. IND, BI03-053-1B) (100mL)
- DMSO: Dimetil Sülfoksit Sigma-Aldrich D2650-100ml
- Trypan Blue
- Etil alkol

2.1.2. Cihaz ve Laboratuvar Gereçleri

- Çalışmalarda steril ortamı sağlamak için hücre kültürü laminar akım kabini, Steril VBH Compact
- Hücrelerin büyümesi için gerekli sıcaklık ve CO_2'li inkübatör, SANYO O2/CO2 INCUBATOR MCO-175M
- Hücrelerin büyümesini ve morfolojisindeki değişiklikleri gözlemlemek için kullanılan inverted mikroskop, Leica Dmil Led
- Spektrofotometre
- Çalışmada kullanılan çözelti ve ekstrakt solüsyonlarının saklandığı buzdolabı, (+4 ˚C ve -20˚C): ALTUS AL 302
- Doku preparatlarının ve fraksiyonlarının saklandığı derin dondurucular (-20).

- Soğutmalı yüksek hız santrifüj (20000 Rpm), Sigma 3K30
- Saf su sistemi
- Sterilizasyon için otoklav
- pH-Metre
- Otomatik pipetler
- Ultrasonikatör
- Vorteks, Heidolph, Almanya
- Su banyosu, Wise Bath fuzzy systems
- Hücrelerin uzun süre saklanabilmesi için sıvı azot tankı, LS 750 Las Systems Taylor-Wharton
- Steril filtre
- 96 kuyucuklu steril plaka: Corning® Costar® 96-well plate
- ELISA Reader: CLARIOstar
- Falcon tüp 15mL/ 50mL
- Kriyo tüp
- Petri Kabı: Corning® 100x20mm Lot: 430167
- Serolojik pipet: (5 ve 10mL)
- Steril filtre: 0,22 μm
- Thoma lamı: IsoLab, Tiefe depth profendeur 0,200mm
- Otomatik Eliza okuyucusu ve yıkayıcısı (Rayto Microplate Washer RT-2600, Rayto Microplate Reader RT-2100C marka, Çin)
- Flow sitometre

2.2. Yöntem

2.2.1. DC Reçinesinin Ekstraksiyonu

Çalışmamızda kullandığımız Dracena cinnabari reçinesi Soqotra adasından (Yemen) temin edilmiş ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulan reçine öğütücü yardımıyla toz haline getirilmiştir. Toz halindeki reçinenin metanol ile ekstraksiyonu yapılmıştır. 25'er gram tartılan Dracena cinnabari reçineleri 5 balona tartılarak konulmuş üzerine 280'er ml metanol ilave edilmiştir ve soxhlet cihazında 7 saat ekstrakte edilmiştir. Elde edilen üründeki metanol SCILOGEX marka RE100-Pro

model rotary evaporatörde uzaklaştırılarak elde ettiğimiz ekstrakt +4°C'de saklanmıştır.

2.2.2. Besiyeri Hazırlama

500 mL DMEM içine steril filtreden geçirilerek, %10'u kadar FBS, %1'i kadar penisilin-streptomisin eklendi ve çalkalandı.

2.2.3. Sıvı Azot Tankından Hücre Çıkarma

-80 ^{o}C'de vialler içinde saklanan donuk halde olan hücreler çıkarılıp 10-12 saniye 37 ^{o}C benmaride tutuldu. Vialde bulunan hücrenin üzerine 1mL DMEM eklendi ve yavaşça pipetaj yapıldı. Boş falkona 5-6 mL besiyeri koyuldu. Falkondaki besiyerinin içine vialdeki hücre besiyeri karışımı eklendi. Dondurma işlemi sırasında kullanılan DMSO'nun uzaklaştırılması için 1300 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Üstteki supernatant kısım atıldı. Altta kalan hücre pelletinin üzerine 1mL besiyeri eklendi. Petri kabına 6-7 mL besiyeri koyulup falkondaki hücre petriye ekildi. 37 ^{o}C ve %5 CO_2 koşullarında inkübe edildi. 24 saatte bir hücrelerin besiyerleri değiştirilerek çoğalmaları ve yüzeye tutunmaları sağlanmıştır.

2.2.4. Hücre Kültürü İnkübasyon Şartları

Akciğer kanseri hücre hattı (A549) Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında -80°C'de hazır bulunmaktadır. A549 akciğer kanseri hücre hattı, nemlendirilmiş 37°C'lik %5 CO_2 olan ortamda ve %10 FBS ve % 1 PSG bulunan DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium) besiyeri içerisinde kültüre edilmiştir.

2.2.5. Hücrelerin Pasajlanması, Sayımı ve Dondurulması

Hücrelerin pasajlanması iki - üç günde bir yapıldı. Pasajlamada ilk adım olarak hücrelerin PBS ile yıkanıp, tripsin-EDTA ile kaldırılması işlemi gerçekleştirildi. 1300 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüje edilen hücrelerin süpernatant kısmı atılarak, dipte kalan pellet kısmı 1-2 ml besiyeri ile yavaşça pipetaj yapılarak 100 cm^2'lik petri kaplarına besi yeri içine alınmıştır. Stoklanması gereken hücreler ise tripsin ile kaldırıldıktan sonra, santrifüj edilip besiyeri uzaklaştırıldı. %90 FBS ve %10

DMSO içeren dondurma solüsyonu eklendi ve 1,5 ml'lik kriyo tüplere alınarak -20°C'de 1-2 gece bekletildikten sonra -80°C'ye alınarak saklandı. Bu şekilde depolanan hücreler gerektiğinde hızlıca çözülüp kullanıma hazır şekilde stoklandı.

Çalışmamızda -80°C'de bulunan A549 akciğer hücre serisi donuk haldeyken 1 ml besiyeri ilave edilerek çözdürüldü. Boş falkona 5 ml besiyeri alındı ve üzerine çözülmüş hücreler eklenip pipetaj ile karıştırıldı. 1300 rpm'de 3dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı ve hücre pelletine 1 ml besiyeri eklendi. Petri kabında 5ml taze besiyeriyle pasaj edildi. Hücre sayımı için, 2 ml PBS ile yıkanan hücreler 2 ml tripsin ile kaldırdı. 6 dk inkibisyona bırakıldı. Falkon tüpe 4-5 ml besiyeri üzerine hücreler eklendi. 1300 rpm'de 3 dk santrifüj edildikten sonra, kalan hücre pelleti 1-2 ml besiyerine alınarak pipetajlandı. Ependorfa 50 µl alındı ve 50 µl tripan blue ile yavaşça karıştırıldı. Karışımdan 10'ar µl Thoma lamının alt ve üst kısımlarına eklenildi. Thoma lamının alt ve üst bölümlerinde bulunan 16 küçük karede mikroskop altında hücre sayımları yapılarak, ortamaları alınarak hesaplamagerçekleştirildi.

2.2.6. DC Reçinesi Ekstraktı Dozlarının Ayarlanması

4 gr DC ekstraktı, 20 ml DMSO'da çözdük. 0,45 µm çaplı steril filtreden geçirilip -20˚C'de stokladık. %1'lik DMSO oranını geçmeyecek şekilde 50 µg/mL, 75 µg/mL, 100 µg/mL, 125 µg/mL ve 150 µg/mL konsantrasyonlarda dozlar hazırladık.

2.2.7. A549 Hücrelerine DC Reçinesi Ekstraktı Dozlarının Uygulanması

- Hücreler inkübatörden çıkarılıp mikroskopta incelendi.
- Hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı.
- Hücreler 1,5 µl PBS ile yıkandı ve PBS uzaklaştırıldı.
- 1,5 µl Tripsin eklendi ve 37 ºC'de 5 dk inkübe edildi.
- Hücreler falkona aktarılarak 1300 rpm'de 3 dk santrifüj edildi.
- Supernatant kısmı atılıp altta kalan hücre pelletine 3mL besiyeri eklenip pipetaj yapıldı.
- 20 µl hücreye 20 µl Trypan Blue eklenip pipetaj yapıldı.
- Thoma lamında sayım yapıldı.
- Herbir kuyucukta $7x10^3$ hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu platelere ekilip 24 saat inkübe edildi.

- Herbir dozdan 6 tekrarlı olacak şekilde hücrelere verildi.
- 24 saatin sonunda hücreler inkübasyondan çıkarılıp besiyerleri atıldı.
- Hücrelerin bulunduğu herbir kuyucuğa hazırlanan dozlardan 100 µl eklendi.
- Kontrol kuyucuklarında bulunan hücrelerin üzerine 100 µl besiyeri eklendi.
- Blank kuyucuklarında hücre bulunmaz sadece besiyeri koyuldu.
- Plateler 24 ve 48 saat ayrı ayrı inkübe edildi.
- Aynı işlemler HEK-293 hücrelerine de uygulandı.

2.2.8. MTT Yöntemi İle IC_{50} Değerinin Tespiti

- 1000 µl MTT kiti hazırlamak için, 5 mg MTT tozu tartıldı ve üzerine 1000 µL PBS eklendi.
- 24 ve 48 saat inkübe edilen hücreler 2 ayrı günde MTT testine tabi tutuldu.
- Herbir kuyucuğa hazırlanan MTT solüsyonundan 20 µl eklendi.
- 3 saat 37ºC'de inkübe edildi.
- İnkübatörden çıkarılan plate'deki besiyerleri uzaklaştırıldı.
- Herbir kuyucuğa MTT solüsyonu ile oluşan formazon kristallerini çözmesi için 150 µl DMSO eklendi.
- Alüminyum folyoya sarılarak 20 dk karıştırıcıda bekletildi.
- Spektrofotometrik yöntemle absorbans ölçümü yapıldı.

2.2.9. Annexin V Yöntemi İle Apoptoz Analizi

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. AnneksinV, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir. FITC-Anneksin-V komplesinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri ile

ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir. Annexin V-FITC (green fluorescence) ve non-vital boya olan propidium iodide (red fluorescence) ile aynı zamanda boyanan hücreler, canlı hücreler (FITCPI-), erken apoptotik hücreler (FITC+PI-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücrelerin (FITC+PI+) birbirinden ayırt edilmesine izin verir (Güleş Ö 2008).

7-Aminoaktinomisin D (7AAD), DNA'ya güçlü bir afinitesi olan bir floresan kimyasal bileşiktir. Floresan mikroskopisinde ve akış sitometrisinde DNA için bir floresan marker olarak kullanılır. Annexin V ve 7AAD sağlam bir hücre zarından geçemez.

- A549 hücreleri sıvı azot tankından çıkarılıp ekildi. 2 gün ara ile besiyerleri değiştirildi ve inkübe edildi.
- Hücreler inkübatörden çıkarılıp besiyerleri uzaklaştırıldı.
- PBS ile yıkanan hücelere Tripsin eklendi ve 37 ^{o}C'de 5 dk inkübe edildi.
- Tripsin ile kaldırılan hücreler falkona aktarıldı. Tripsinin 2 katı kadar besiyeri eklendi.
- 1300 rpm'de 3 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant kısım atıldı.
- Altta kalan pellet kısma besiyeri ve Trypan Blue eklendi.
- Thoma Lamında hücre sayımı yapıldı.
- 6 kuyucuklu petri kabına, her kuyucukta $7x10^4$ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 3 tekrarlı çalışıldı.
- CO_2'li 37^{o}C inkübatörde 24 saat inkübe edildi.
- MTT yöntemi ile belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda, DC reçinesi ekstraktı hücrelere uygulandı. Kontrol hücrelerine aynı miktarda besiyeri eklendi.
- 24. saatte hücrelerden besiyeri uaklaştırıldı.
- Hücreler PBS ile yıkanıp Tripsin ile kaldırıldı. Üzerine besiyeri eklendi.
- Eppendorfa kaldırıldı.
- 350 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- Supernatant kısmı atıldı.

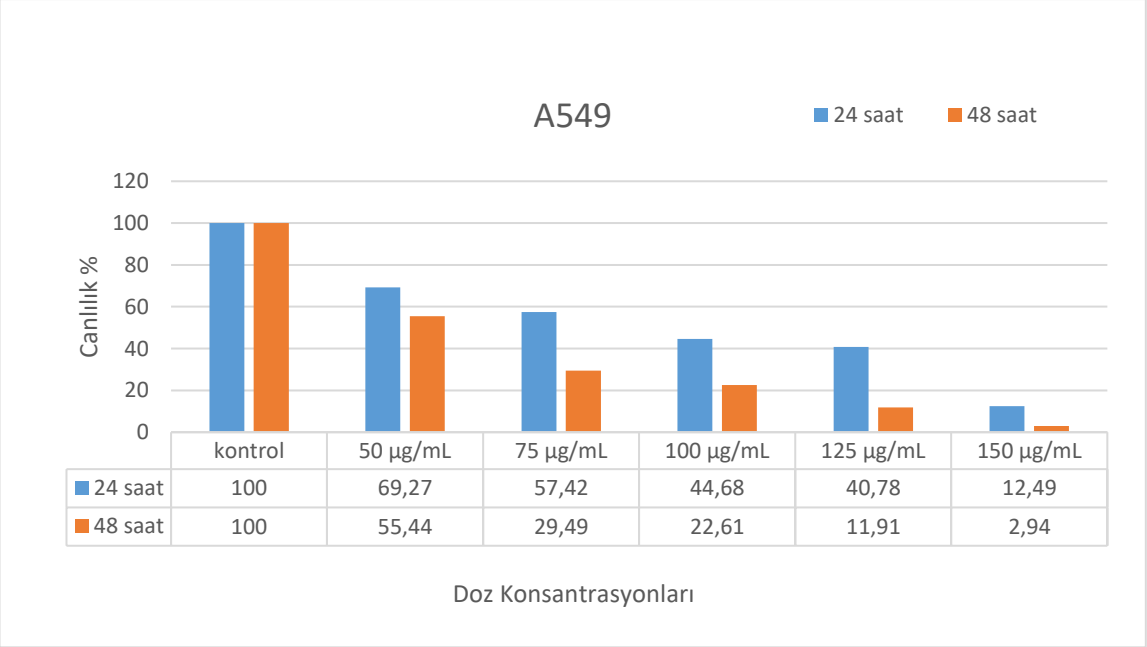
- 100 µL PBS ile pipetaj yapıldı. PBS uzaklaştırıldı.
- 100 µL besiyeri ile hücre çöküntüsü çözdürülürdü.
- Aynı ependorfa 100 µL Annexin V & Dead Cell Reagent eklendi.
- 20 dk oda sıcaklığında, karanlıkta bekletildi.
- MUSE Cell Analyzer'da Annexin V ölçümü yapıldı.
- Sonuçlar değerlendirildi.

Aynı işlemler HEK-293 hücrelerine de uygulandı ve sonuçlar değerlendirildi.

3. BULGULAR

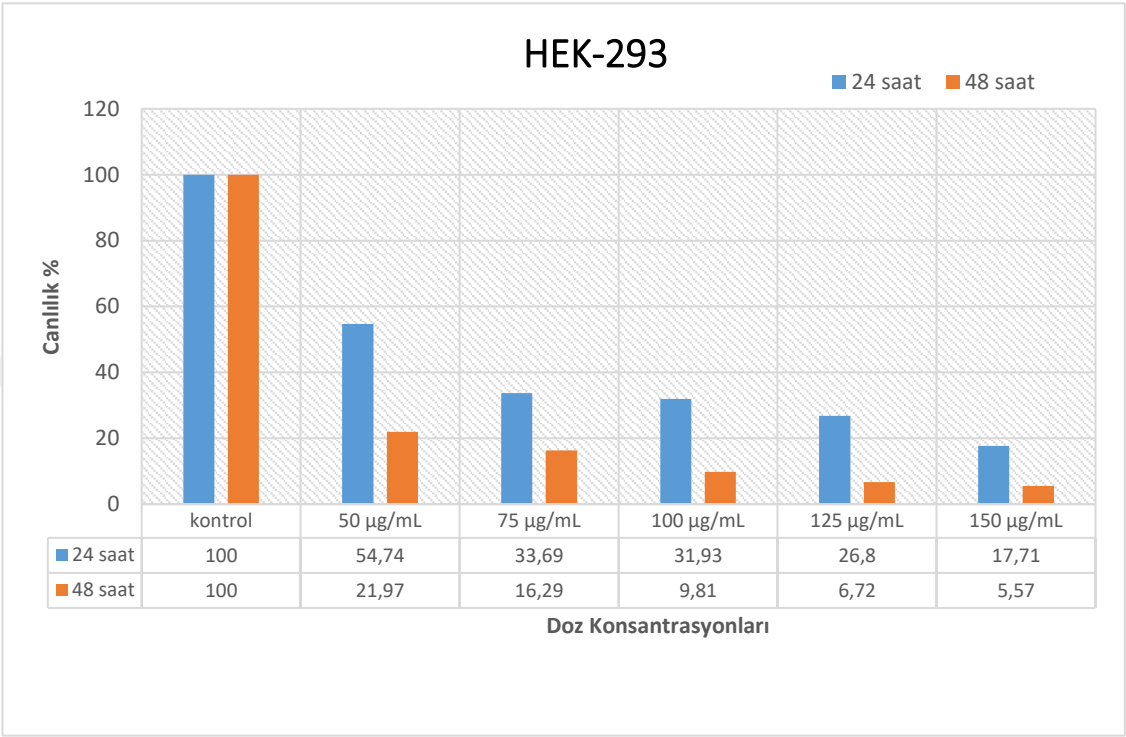
3.1. DC Reçinesi Ekstraktı Uygulanmış A549 ve HEK-293 Hücrelerinin MTT Yöntemi İle Belirlenmiş IC_{50} Değerleri

DC reçinesi doz konsantrasyon aralığını belirlemek için literatür taraması yaptık ve 10-600 µg/mL konsantrasyon aralığında DC reçinesi ekstraktı dozları hazırladık. Bu konsantrasyonlar ile 96 kuyucuklu platete her (6 tekrarlı çalışıldı) kuyucukta $5x10^3$ sayıda bulunan A549 hücrelerine yaptığımız MTT testi sonucunda hücrelerin canlılık oranlarının sıfıra yakın olduğunu gözlemledik. DC reçinesi ekstraktının doz konsantrasyonlarının yüksek olduğunu varsayarak konsantrasyon aralığını 50-150 µg/mL aralığına düşürdük ve kuyucuk başına hücre sayısını $7x10^3$ olarak ayarladık. Yine 6 tekrarlı çalışma yapıldı. A549 hücrelerine DC reçinesi. ekstraktından 50 µg/mL, 75 µg/mL, 100 µg/mL, 125 µg/mL ve 150 µg/mL dozlarda uyguladık. MTT yöntemi ile proliferasyon analizi sonuçlarının doza ve zamana bağlı değişimi Grafik 3.1.de verilmiştir. Aynı proliferasyon analizi aynı doz aralığında böbrek epiteli hücre hattı olan HEK-293 hücrelerine de uygulandı.



Grafik 3.1. Farklı konsantrasyonlarda DC reçinesi ekstraktı uygulanmış A549 hücrelerinin 24 ve 48. saattaki % canlılıkları.

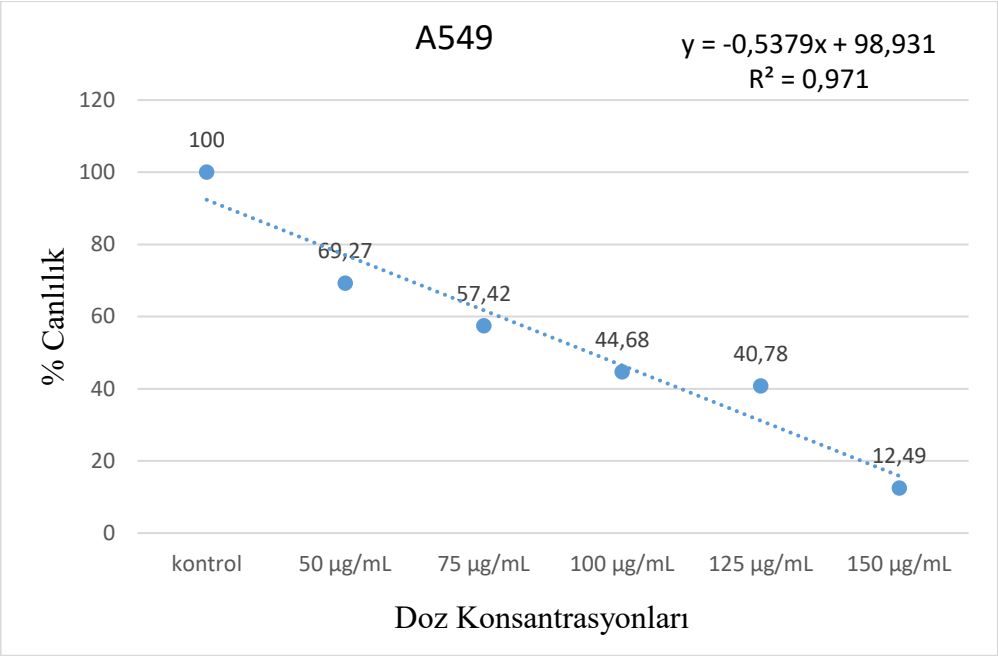
DC reçinesi ekstraktının sağlıklı hücrelere etkisini araştırmak amacıyla A549 hücrelerine uyguladığımız DC reçinesi ekstraktı dozlarını HEK-293 hücrelerine de uyguladık. MTT yöntemi ile yapılan proliferasyon analizi sonuçları Grafik 3.2.'de gösterilmiştir.



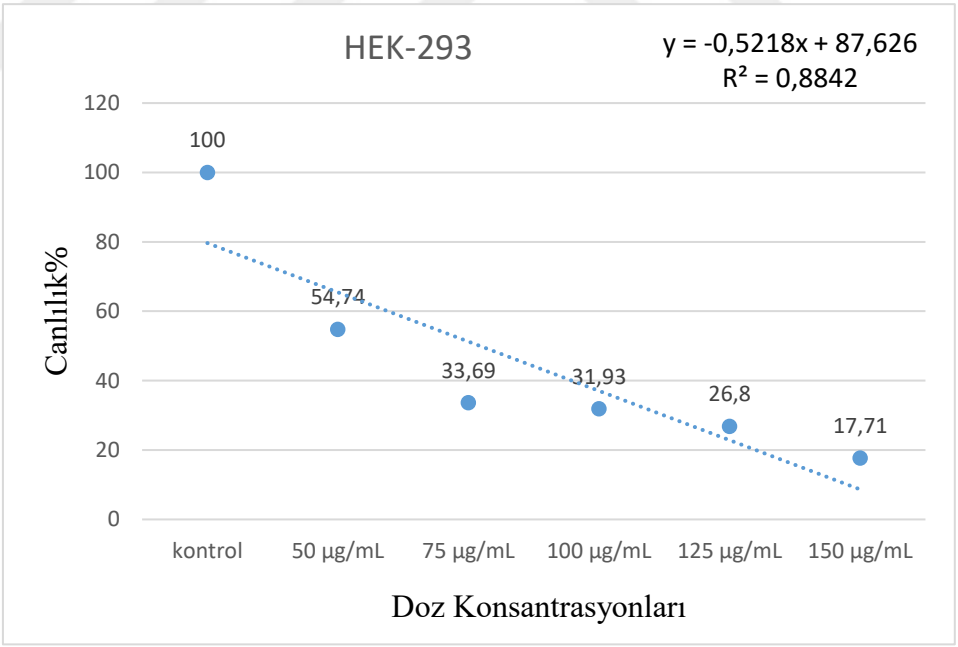
Grafik 3.2. Farklı konsantrasyonlarda DC reçinesi ekstraktı uygulanmış HEK-293 hücrelerinin 24 ve 48. saatteki % canlılıkları.

A549 hücrelerinde IC_{50} değerine en yakın değeri 24. saatte 100 µg/mL konsantrasyonda elde ettik ve IC_{50} değerini Grafik 3.3.'te bulunan denklemden yararlanarak hesapladık.

Sağlıklı hücre hattı olarak kullandığımız HEK-293 hücrelerinde IC_{50} değerine yakın bir değer 24. saatte 50 µg/mL konsantrasyonda elde ettik. Grafik 3.4.'te bulunan denklemden yola çıkarak IC_{50} değerini hesapladık.



Grafik 3.3. Farklı konsantrasyonlarda DC reçinesi ekstraktı uygulanmış A549 hücrelerinin 24. saatteki % canlılıkları, eğilim çizgisi ve doğru denklemi (IC_{50}: 90,96 µg/ml).

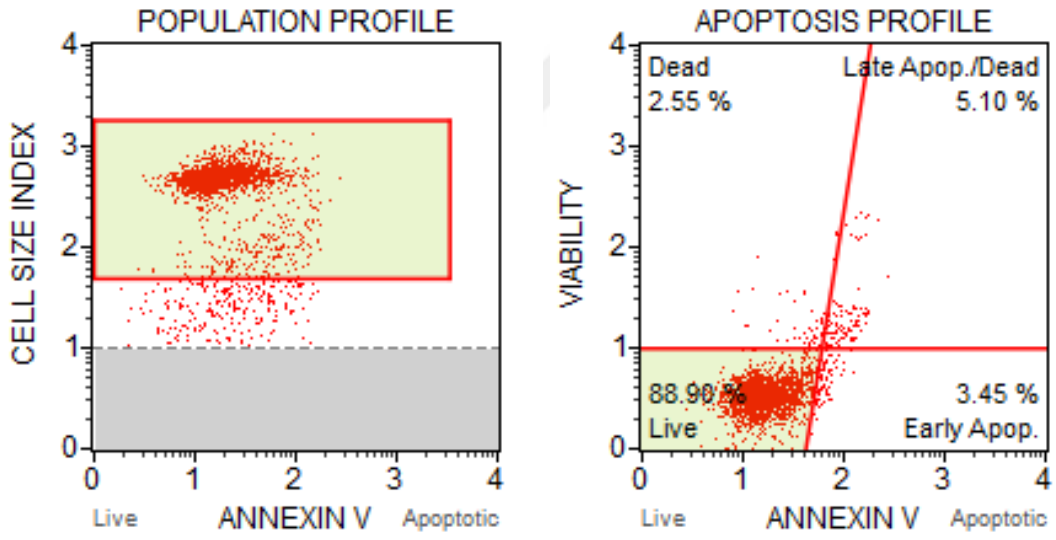


Grafik 3.4. Farklı konsantrasyonlarda DC reçinesi ekstraktı uygulanmış HEK-293 hücrelerinin 24. saatteki % canlılıkları, eğilim çizgisi ve doğru denklemi (IC_{50}: 72,10 µg/ml).

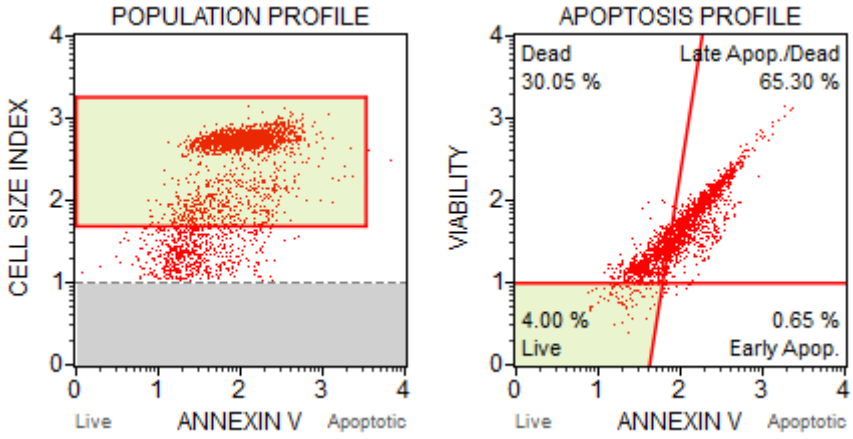
3.2. Muse/Flow Sitometri Cihazında Annexin V Yöntemi İle Apoptoz Analizi Sonuçları

A549 ve HEK-293 hücreleri 6 kuyucuklu platelere her kuyucukta $7x10^4$ olacak şekilde ekildi. Muse/Flow sitometri cihazında Annexin V yöntemi ile apoptoz analizi yapıldı. Hücrenin apoptoza uğramasıyla hücre iç yüzeyinde bulunan fosfotidil serin membranın dış yüzeyine transloke olur. Dış yüzeye transloke olan fosfotidiserine Annexin V'ın bağlanması ve 7AAD'nin hücre çekirdeğinde bulunan DNA'ya bağlanması durumuna göre sonuçlar elde edildi. Muse/Flow sitometri cihazından elde edilen sonuçlara göre (Grafik 3.5, Grafik 3.6 ve Tablo 3.3) A549 hücrelerinin özellikle geç apoptoza gittiği görülmüştür.

Aynı şekilde HEK-293 hücrelerinin Annexin V yöntemi ile apoptoz analizi sonuçlarında Grafik 3.7,Grafik 3.8 ve Tablo 3.4'de görüldüğü gibi daha çok geç apoptoza ve düşük oranda da erken apoptoza gittiği görülmüştür.



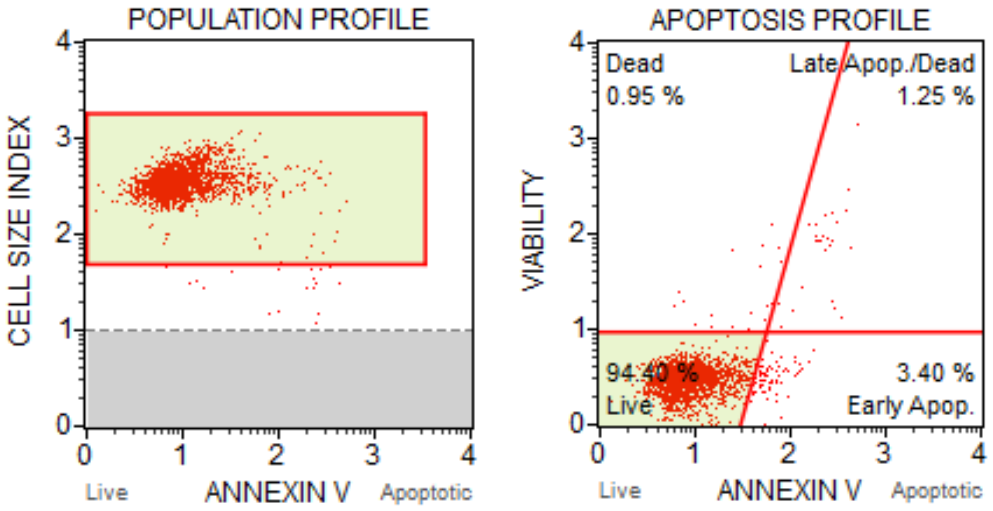
Grafik 3.5. A549 kontrol hücrelerinin apoptoz grafikleri.



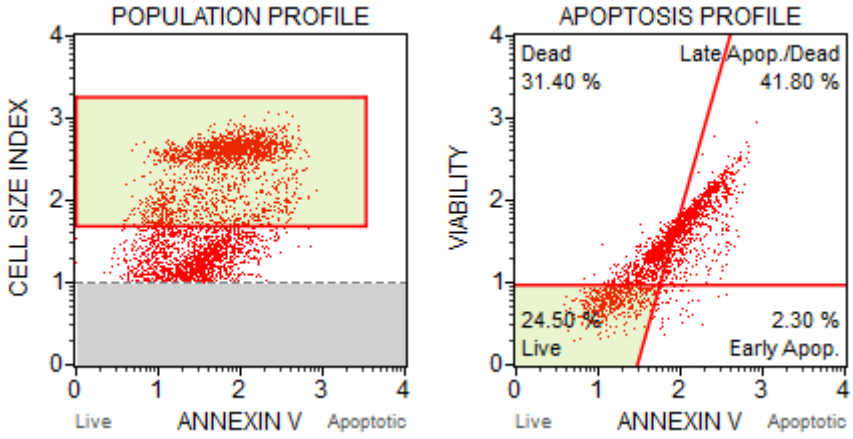
Grafik 3.6. IC_{50} dozunda DC reçinesi ekstraktı uygulanmış A549 hücrelerinin 24. saatteki apoptoz grafikleri.

Tablo 3.1. DC reçinesi ekstraktı uygulanmış A549 hücrelerinin ve kontrol hücrelerinin 24. saatteki % canlılık ve apoptoz tablosu.

A549	%Canlılık	Erken Apoptoz	Geç Apoptoz	Ölü Hücre	Total Apoptoz
Kontrol	% 88,90	% 3,45	% 5,10	% 2,55	% 8,55
DC Reçinesi	% 4	% 0,65	% 65,30	% 30,05	% 65,95



Grafik 3.7. HEK-293 kontrol hücrelerinin apoptoz grafikleri.



Grafik 3.8. IC_{50} dozunda DC reçinesi ekstraktı uygulanmış HEK-293 hücrelerinin 24. saatteki apoptoz grafikleri.

Tablo 3.2. DC reçinesi ekstraktı uygulanmış HEK-293 hücrelerinin ve kontrol hücrelerinin 24. saatteki % canlılık ve apoptoz tablosu.

HEK-293	%Canlılık	Erken Apoptoz	Geç Apoptoz	Ölü Hücre	Total Apoptoz
Kontrol	% 94,40	% 3,40	% 1,25	% 0,95	% 4,65
DC Reçinesi	% 24,5	% 2,30	% 41,80	% 31,40	% 44,10

24 saatlik apoptoz analiz sonuçlarına göre; A549 kontrol hücrelerinin canlılığı %88.90 erken apoptoz miktarı %3.45 ve geç apoptoz miktarı %5.10 olarak bulunmuştur. DC reçinesi ekstraktı uygulanmış A549 hücrelerinde ise hücre canlılığı %4, erken apoptoz %0.65 ve geç apoptoz da % 65.30 olarak bulunmuştur.

DC reçinesi ekstraktının sağlıklı hücrelere etkisini gözlemlemek amacıyla kullandığımız HEK-293 hücrelerinin 24 saatlik apoptoz sonuçlarına göre; HEK-293 kontrol hücrelerinin canlılığı %94.40, erken apoptoz oranı %3.40 ve geç apoptoz oranı da %1.25 olarak bulunmuştur. DC reçinesi ekstraktı uygulanmış HEK-293 hücrelerinin canlılığı ise % 24.5, erken apoptoz oranı %2.30 ve geç apoptoz oranı da %41.80 olarak bulunmuştur. Bu sonuçların ışığında DC reçinesi hem A549 hücrelerini hem de HEK-293 hücrelerini özellikle geç apoptoza götürmüştür.

4. TARTIŞMA

Akciğer kanseri yıllardır kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir, insidans ve mortalite istatistikleri dünya çapında büyük farklılıklar göstermektedir. Akciğer kanseri, en sık teşhis edilen kanserlerden biridir ve dünya çapında kanserle ilişkili ölümlerin önde gelen nedenidir. Akciğer kanseri, dünya çapında her yıl 1.8 milyondan fazla yeni teşhis edilen kanser vakasını (toplam teşhis edilen kanser vakalarının %13'ü) ve 1.6 milyon kansere bağlı ölümü (toplamın %19.4'ü) oluşturmaktadır. Şu anda kemoterapi ve radyoterapi akciğer kanserinin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu tedavilerde kullanılan anti-tümör ilaçların ciddi yan etkileri vardır. Bu nedenle akciğer kanserinin tedavisi için bitki kaynaklı yeni ilaçların geliştirilmesine yoğun ilgi gösterilmektedir.

Ejderhanın kanı, tıp literatüründe tanımlanan birçok kırmızı reçineye uygulanan bir isimdir. Ejderhanın kanı olarak da bilinen Dracaena cinnabari, dünya çapında farklı kültürlerde geleneksel bir ilaç olarak kullanılan koyu kırmızı bir reçinedir. Genel olarak Soqotra Adası'ndaki Moomy şehrinin yerlileri, DC'yi genel yara iyileşmesi, pıhtılaşma problemleri, ishal, dizanteri hastalıkları, ateş, romatizma bağırsaklar, mide iç ülserlerini tedavisi, ağız yaraları, boğaz ağrısı gibi hastalıklar için tedavi amaçlı kullanmaktadırlar. Soqotra adasında bulunan DC'nin reçinesinin, analjezik, antimikrobiyal, antioksidatif, antitrombotik, antitümör, antiviral, sitotoksik ve hemostatik aktiviteler için gerekli bileşimlere sahip olduğu gösterilmektedir.

Alabsi ve ark. DC'nin metanol ekstresinin, Oral Skuamöz Hücreli Karsinom (OSCC) olan H400 hücre hattında sitotoksisite ve apoptoz üzerine etkisini araştırmışlardır. MTT analizinde 10.000 hücreye DC reçinesi ekstraktı uygulanmış ve IC_{50} değeri 5.9 µg/ml olarak bulunmuştur. Annexin V yöntemi ile yaptıkları apoptoz analizinde ise DC reçinesi ekstraktının H400 hücrelerini, S fazını durdurarak kaspaz 9,7 ve 3'ün aktivasyonu ile gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre DC reçinesi ekstraktının antikanser ajan olarak geliştirilebilme potansiyelinin olduğunu (Alabsi ve ark 2016).

Mothana, R. A. A ve ark. Yemen geleneksel tıbbında kullanılan 24 bitkinin metanol ekstraktılarının antikanser aktivitesini değerlendirmişlerdir. Araştırılan ekstraktların in vitro sitotoksik potansiyelini değerlendirmek için iki akciğer kanseri

(A-427 ve LCLC-103H), iki idrar kesesi karsinomu (5637 ve RT-112) ve bir meme kanseri (MCF-7) hücre hattı kullanmışlardır. Sitotoksisite testlerinde LCLC-103H hücre hattında kuyucuk başına 250 hücre ile diğer hücre hatlarında ise kuyucuk başına 1000 hücre ile çalışmışlardır. Dracena cinnabari metanol ekstraktılarının, 0.29-5.54 µg/ml arasında değişen IC_{50} değerleri ile tüm tümör hücre hatlarında en yüksek toksisiteyi sergilediğini göstermişlerdir.

Al-Fatimi ve ark. Yemen'de geleneksel tıpta kullanılan 14 bitkinin insan mesane karsinomu hücre hattı olan ECV-304 üzerinde sitotoksisitesi araştırılmıştır. Test edilen 14 bitki ekstraktından 7'si ECV-304 hücrelerine karşı belirgin toksisite (IC_{50} değeri < 30 µg/ml) göstermiştir (Al-Fatimi ve ark 2005).

Yaptığımız bu tez çalışmasında DC reçinesinin metanol ekstraktının insan akciğer kanseri hücre hattı olan A549'da, proliferasyon apoptoz düzeylerine etkisini araştırdık. DC reçinesini DMSO'da çözdük. Yaptığımız MTT yöntemi ile hücre canlılığı testinde, her kuyucuk başına 7000 hücre kullandık. Elde ettiğimiz sonuçlara göre DC reçinesi ekstraktı 24. saatte A549 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etti ve IC_{50} değerini 90,96 µg/ml olarak bulduk. DC reçinesi ekstraktının sağlıklı hücrelere etkisini gözlemlemek amacıyla kullandığımız böbrek epiteli hücre hattı olan HEK-293 hücrelerinde de hücre canlılığı testi MTT yöntemi ile yapıldı. HEK-293 hücrelerinde de 24. Saatte IC_{50} değeri 72,10 µg/ml olarak bulundu.

Apoptoz analizi için Annexin V yöntemi kullandık ve Muse/flowsitometri cihazında ölçüm yaptık. Apoptoz analizi için kuyucuk başına 70.000 hücre ektik ve DC reçinesi ekstraktını IC50 dozunda uyguladık. Bu işlemleri hem A549 hücreleri için hem de HEK-293 hücreleri için aynı koşullarda yaptık. Elde ettiğimiz verilere göre DC reçinesi ekstraktı A549 hücrelerini yaklaşık %65 oranında geç apoptoza götürdü. Buna ek olarak DC reçinesi ekstraktı HEK-293 hücrelerini de özellikle geç apoptoza götürdü. DC reçinesi ekstraktının hem A549 hücrelerini hem de HEK-293 hücrelerini apoptoza götürmesi ve proliferasyonlarını inhibe etmesi, DC reçinesinin hem akciğer kanseri hücresine hem de sağlıklı hücreye sitotoksisitesinin olduğu anlamına gelmektedir. Bundan yola çıkarak DC reçinesinin akciğer kanserinde takviye tedavi olarak kullanılamayacağı görülmüştür.

Literatürdeki diğer çalışmalarla bizim çalışmamız kıyaslandığında IC50 değerlerinin birbirinden çok farklı olduğu görülmektedir. Bunun sebebi olarak da kullanılan hücre sayısı, bitki ekstraksiyon yöntemi, kullanılan çözücü, hücre hattı ve hatta bitkinin toplanma mevsimi, kurutulma yöntemi bile sebep olarak gösterilebilir. Ayrıca yapılan diğer çalışmalarda DC reçinesi ekstraktının sadece kanser hücrelerinde toksisite ve apoptoz analizi yapılmıştır. Hiçbir çalışmada sağlıklı hücre hattı kullanılmamıştır. Çalışmamızda hem akciğer kanseri hücre hattı olan A549 hücrelerini hem de sağlıklı hücre olarak kullandığımız böbrek epiteli hücre hattı olan HEK-293 hücrelerini kullanmamız hem çalışmamızın özgünlüğünü arttırmaktadır hem de diğer çalışmalardan farkını ortaya koymaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Akciğer kanseri, dünya çapında en yaygın kanserlerden biridir ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. Akciğer kanseri tedavisi güç olmakla birlikte, aynı zamanda yüksek oranda nüks insidansına sahiptir. Bu nedenle, yeni yaklaşımların ve etkili antikanser stratejilerinin geliştirilmesi, akciğer kanserinin uzun süreli hayatta kalım ve erken dönemde takip edilmesi için kritik bir öneme sahiptir. Günümüzde akciğer kanserinin tedavisi esas olarak cerrahi, radyoterapi ve kemoterapiden oluşmaktadır. Ancak, mevcut tedavi yeterli değildir ve çok sayıda yan etkisi vardır. Akciğer kanserinin ölüm oranı artmaya devam etmekte ve 5 yıllık genel sağ kalım %15'in altındadır. Son yıllarda, kanserin önlenmesi ve tedavisi için bitki materyallerinin kullanımı, çeşitli sağlık yararları ve minimum toksisite ile olası terapötik nitelikleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür.

Çalışmamızda kullandığımız Dracena cinnabari reçinesi Soqotra adasından (Yemen) temin edilmiş ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulan reçine öğütücü yardımıyla toz haline getirilmiştir. Öğütülen reçinenin tozu ekstrakte edildikten sonra A549 hücre hattında proliferasyon ve apoptoz üzerine etkileri araştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar ile DC reçinesi ekstraktının A549 hücrelerinde proliferasyonu 50, 75, 100, 125, 150 µl/ml dozlarında inhibe ettiği ve hücreleri özellikle geç apoptoza götürdüğü gözlemlenmiştir. DC reçinesi ekstraktı, kontrol olarak kullandığımız sağlıklı hücre olan HEK-293 hücrelerinin proliferasyonunu da 50, 75, 100, 125, 150 µl/ml dozlarında inhibe etmiş ve HEK-293 hücrelerini de apoptoza götürmüştür. Literatüre baktığımızda şimdiye kadar araştırılan DC reçinesi ekstraktının akciğer kanseri A549 hücre hattı üzerindeki proliferasyon ve apoptoz üzerine etkilerinin daha önce çalışılmamış olduğu görülmektedir. Çalışmamız sonucunda DC reçinesinin A549 hücreleri üzerinde proliferasyonu inhibe etme potansiyeli olduğunu bununla birlikte, geleneksel tıpta kullanım için güvenli olmadığı görülmüştür. Çalışmamız bulguları sonucunda DC reçinesinin, hem akciğer kanseri hücre hattında hem de böbrek epiteli hücre hattında proliferasyon ve apoptozu neredeyse aynı derecede etkilediği için akciğer kanserini önleyici bir ajan olarak veya tedavi edici takviye olarak kullanılamayacağı görülmüştür. Konu ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmanın bulunmaması sebebiyle çalışmamızın konusunun özgün olup bilimsel dergilerde ilk makale olarak katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Çalışmamıza ek olarak yapılması

öngörülen biyokimyasal yolak çalışmaları, protein analizleri gibi çalışmalar DC reçinesinin etki mekanizmasını daha net olarak anlamamıza yardımcı olacaktır.

6. KAYNAKLAR

Adolt R, Pavlis J, 2004. Age structure and growth of Dracaena cinnabari populations on Soqotra. Trees, 18, 1, 43-53.

Akopyan G, Bonavida B, 2006. Understanding tobacco smoke carcinogen NNK and lung tumorigenesis. International journal of oncology, 29, 4, 745-52.

Al-Afifi N, Alabsi A, Kaid F, Bakri M, Ramanathan A, 2019. Prevention of oral carcinogenesis in rats by Dracaena cinnabari resin extracts. Clinical oral investigations, 23, 5, 2287-301.

Al-Afifi NA, Alabsi AM, Bakri MM, Ramanathan A, 2018. Acute and sub-acute oral toxicity of Dracaena cinnabari resin methanol extract in rats. BMC complementary and alternative medicine, 18, 1, 50.

Al-Awthan YS, Zarga MA, Abdalla S, 2010. Flavonoids content of Dracaena cinnabari resin and effects of the aqueous extract on isolated smooth muscle preparations, Perfused heart, blood pressure and Diuresis in the rat. Jordan J Pharm Sci, 3, 1, 8-16.

Al-Fatimi M, 1999. From the Nature to the Pharmacy. Obadi Center for Researches, Sanaa.

Al-Fatimi M, 2018. Ethnobotanical survey of Dracaena cinnabari and investigation of the pharmacognostical properties, antifungal and antioxidant activity of its resin. Plants, 7, 4, 91.

Al-Fatimi M, Friedrich U, Jenett-Siems K, 2005. Cytotoxicity of plants used in traditional medicine in Yemen. Fitoterapia, 76, 3-4, 355-8.

Alabsi AM, Lim KL, Paterson IC, Ali-Saeed R, Muharram BA, 2016. Cell cycle arrest and apoptosis induction via modulation of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase dependence in Dracaena cinnabari-treated H400 human oral squamous cell carcinoma. BioMed research international, 2016.

Alavanja MC, 2002. Biologic damage resulting from exposure to tobacco smoke and from radon: implication for preventive interventions. Oncogene, 21, 48, 7365-75.

Alexander D, Miller A, 1996. Saving the spectacular flora of Soqotra. Plant Talk (United Kingdom).

Ansari MJ, Al-Ghamdi A, Al-Waili N, Adgaba N, Khan KA, Amro A, 2016. Antimicrobial Activity of Dracaena cinnabari resin from Soqotra Island on multi drug resistant human pathogens. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 13, 1, 123-7.

Baumer U, Dietemann P, 2010. Identification and differentiation of dragon's blood in works of art using gas chromatography/mass spectrometry. Analytical and bioanalytical chemistry, 397, 3, 1363-76.

Bensky D, Clavey S, Stöger E, Gamble A, 2004. Chinese herbal medicine. Materia medica, 3, 437-40.

Bhanot A, Sharma R, Noolvi MN, 2011. Natural sources as potential anti-cancer agents: A review. International journal of phytomedicine, 3, 1, 09.

Biesalski HK, De Mesquita BB, Chesson A, Chytil F, Grimble R, Hermus R, Köhrle J, Lotan R, Norpoth K, Pastorino U, 1998. European consensus statement on lung cancer: risk factors and prevention. lung cancer panel. CA: a cancer journal for clinicians, 48, 3, 167-76.

Bimakr M, Rahman RA, Taip FS, Ganjloo A, Salleh LM, Selamat J, Hamid A, Zaidul I, 2011. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (Mentha spicata L.) leaves. Food and bioproducts processing, 89, 1, 67-72.

Brambilla C, Laffaire J, Lantuejoul S, Moro-Sibilot D, Mignotte H, Arbib F, Toffart A-C, Petel F, Hainaut P, Rousseaux S, 2014. Lung squamous cell carcinomas with basaloid histology represent a specific molecular entity. Clinical Cancer Research, 20, 22, 5777-86.

Brambilla E, Pugatch B, Geisinger K, Gal A, Sheppard M, Guinee D, 2004. Large cell carcinoma. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart, 48.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A, 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians, 68, 6, 394-424.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A, 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin, 68, 6, 394-424.

Brown G, Mies B, 2012. Vegetation ecology of Soqotra, Springer Science & Business Media, p.

Chabner BA, Roberts TG, 2005. Chemotherapy and the war on cancer. Nature Reviews Cancer, 5, 1, 65-72.

Chao EC, Henry RR, 2010. SGLT2 inhibition—a novel strategy for diabetes treatment. Nature reviews drug discovery, 9, 7, 551-9.

Charloux A, Quoix E, Wolkove N, Small D, Pauli G, Kreisman H, 1997. The increasing incidence of lung adenocarcinoma: reality or artefact? A review of the epidemiology of lung adenocarcinoma. International journal of epidemiology, 26, 1, 14-23.

Chatha SAS, Anwar F, Manzoor M, 2006. Evaluation of the antioxidant activity of rice bran extracts using different antioxidant assays. Grasas y aceites, 57, 3, 328-35.

Cohen AJ, Brauer M, Burnett R, Anderson HR, Frostad J, Estep K, Balakrishnan K, Brunekreef B, Dandona L, Dandona R, 2017. Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: an analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015. The Lancet, 389, 10082, 1907-18.

D'Antonio C, Passaro A, Gori B, Del Signore E, Migliorino MR, Ricciardi S, Fulvi A, De Marinis F, 2014. Bone and brain metastasis in lung cancer: recent advances in therapeutic strategies. Therapeutic advances in medical oncology, 6, 3, 101-14.

Das K, Tiwari R, Shrivastava D, 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends. Journal of medicinal plants research, 4, 2, 104-11.

DiPiazza FD, 2007. Yemen in pictures, Twenty-First Century Books, p.

Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, Ju Y-H, 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of Limnophila aromatica. Journal of food and drug analysis, 22, 3, 296-302.

Dockery DW, Pope CA, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris Jr BG, Speizer FE, 1993. An association between air pollution and mortality in six US cities. New England journal of medicine, 329, 24, 1753-9.

Edwards H, Farwell D, Quye A, 1997. 'Dragon's blood'I—characterization of an ancient resin using Fourier transform Raman spectroscopy. Journal of Raman spectroscopy, 28, 4, 243-9.

Elmore S, 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicologic pathology, 35, 4, 495-516.

Erridge SC, Møller H, Price A, Brewster D, 2007. International comparisons of survival from lung cancer: pitfalls and warnings. Nature clinical practice Oncology, 4, 10, 570-7.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F, 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. International journal of cancer, 136, 5, E359-E86.

Ferrell B, Koczywas M, Grannis F, Harrington A, 2011. Palliative care in lung cancer. Surgical Clinics, 91, 2, 403-17.

Fidler IJ, 2002. The organ microenvironment and cancer metastasis. Differentiation, 70, 9-10, 498-505.

Fingerhut M, Nelson DI, Driscoll T, Concha-Barrientos M, Steenland K, Punnett L, Prüss-Ustün A, Leigh J, Corvalan C, Eijkemans G, 2006. The contribution of occupational risks to the global burden of disease: summary and next steps. La Medicina del lavoro, 97, 2, 313-21.

Frank L, Quint LE, 2012. Chest CT incidentalomas: thyroid lesions, enlarged mediastinal lymph nodes, and lung nodules. Cancer Imaging, 12, 1, 41.

Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A, 2010. Cellular stress responses: cell survival and cell death. International journal of cell biology, 2010.

Garassino M, Marabese M, Rusconi P, Rulli E, Martelli O, Farina G, Scanni A, Broggini M, 2011. Different types of K-Ras mutations could affect drug sensitivity and tumour behaviour in non-small-cell lung cancer. Annals of oncology, 22, 1, 235-7.

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP, 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. Journal of the National Cancer Institute, 51, 5, 1417-23.

Goncalo M, Pinho A, Agner T, Andersen KE, Bruze M, Diepgen T, Foti C, Gimenez-Arnau A, Goossens A, Johanssen JD, Paulsen E, Svedman C, Wilkinson M, Aalto-Korte K, 2018. Allergic contact dermatitis caused by nail acrylates in Europe. An EECDRG study. Contact Dermatitis, 78, 4, 254-60.

Gonzales GF, Valerio LG, 2006. Medicinal plants from Peru: a review of plants as potential agents against cancer. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents), 6, 5, 429-44.

Gorlova OY, Weng SF, Zhang Y, Amos CI, Spitz MR, 2007. Aggregation of cancer among relatives of never-smoking lung cancer patients. International journal of cancer, 121, 1, 111-8.

Group NM-AC, 2008. Chemotherapy in addition to supportive care improves survival in advanced non–small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 16 randomized controlled trials. Journal of Clinical Oncology, 26, 28, 4617.

Gupta D, Bleakley B, Gupta RK, 2008. Dragon's blood: botany, chemistry and therapeutic uses. Journal of ethnopharmacology, 115, 3, 361-80.

Gupta D, Bleakley B, Gupta RK, 2009. Bioassay guided isolation of antibacterial homoisoflavan from Dragonís blood resin (Dammul-akhwain).

Gupta D, Verma N, Das HR, Gupta RK, 2014. Evaluation of anti-inflammatory activity of Dracaena cinnabari Balf. f. resin.

Gupta GP, Massagué J, 2006. Cancer metastasis: building a framework. Cell, 127, 4, 679-95.

Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ, 1997. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. Bmj, 315, 7114, 980-8.

Hann CL, Rudin CM, 2008. Management of small-cell lung cancer: incremental changes but hope for the future. Oncology (Williston Park, NY), 22, 13, 1486.

Health UDo, Services H, (2014). 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 ….

Health W, 2018. LUNG CANCER.

Himmelreich U, Masaoud M, Adam G, Ripperger H, 1995. Damalachawin, a triflavonoid of a new structural type from dragon's blood of Dracaena cinnabari. Phytochemistry, 39, 4, 949-51.

Hoffmann DH, Ilse, 1997. The changing cigarette, 1950-1995. Journal of Toxicology and Environmental Health Part A, 50, 4, 307-64.

Holland JF, Pollock RE, 2010. Holland-Frei cancer medicine 8, PMPH-USA, p.

HomL L, Johnson D, 2015. Chapter 107. Neoplasm of Lung. Kasper DL; Hauser, SL, JamesonJL, Fauci AS, Longo DL, LoscalzoJ. Harrison’s Principles ofInternal Medicine (19th ed.) McGraw-Hill.

Hongmei Z, 2012. Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway review. In: Apoptosis and medicine. Eds: InTechOpen, p.

Hsu S, Singh B, Schuster G, 2004. Induction of apoptosis in oral cancer cells: agents and mechanisms for potential therapy and prevention. Oral Oncology, 40, 5, 461-73.

Huang Y-T, Lin X, Liu Y, Chirieac LR, McGovern R, Wain J, Heist R, Skaug V, Zienolddiny S, Haugen A, 2011. Cigarette smoking increases copy number alterations in nonsmall-cell lung cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108, 39, 16345-50.

Hubálková I, 2011. Prediction of Dragon's blood tree (Dracaena cinnabari Balf.) stand sample density on Soqotra Island. Journal of Landscape Ecology, 4, 2, 5-17.

Hubalkova I, Houška J, Kubíček J, Mazal P, Pavliš J, Pohořalý J, Vačkářová G, Duchoslav M, 2017. Preliminary anatomical study on secondary thickening parts of endemic Dracaena cinnabari Bal. fil. from the Soqotra island. Wood Res, 62, 67-77.

Hubalkova I, Maděra P, Volařík D, 2017. Growth dynamics of Dracaena cinnabari under controlled conditions as the most effective way to protect endangered species. Saudi Journal of Biological Sciences, 24, 7, 1445-52.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ, 2008. Cancer statistics, 2008. CA: a cancer journal for clinicians, 58, 2, 71-96.

Jones K, 2003. Review of sangre de drago (Croton lechleri)-a South American tree sap in the treatment of diarrhea, inflammation, insect bites, viral infections, and wounds: traditional uses to clinical research. The Journal of Alternative & Complementary Medicine, 9, 6, 877-96.

Kadara H, Kabbout M, Wistuba II, 2012. Pulmonary adenocarcinoma: a renewed entity in 2011. Respirology, 17, 1, 50-65.

Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J, 2015. Harrison's principles of internal medicine, 19e. 2, Mcgraw-hill, p.

Khanzada K, Medical Condition: Lung Cancer. Drugs, 866, 280-4722.

Kulzhanbekov M, 2011. Development of lung cancer mortality in European Union from 1980 to 2006.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC, 2014. Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition e-book, Elsevier health sciences, p.

Lapornik B, Prošek M, Wondra AG, 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. Journal of food engineering, 71, 2, 214-22.

Lee YS, Dutta A, 2007. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. Genes & development, 21, 9, 1025-30.

Lewis DR, Check DP, Caporaso NE, Travis WD, Devesa SS, 2014. US lung cancer trends by histologic type. Cancer, 120, 18, 2883-92.

Li Q, Wei YQ, Wen YJ, Zhao X, Tian L, Yang L, Mao YQ, Kan B, Wu Y, Ding ZY, 2004. Induction of apoptosis and tumor regression by vesicular stomatitis virus in the presence of gemcitabine in lung cancer. International journal of cancer, 112, 1, 143-9.

Li Y, Bäckesjö C-M, Haldosén L-A, Lindgren U, 2009. Resveratrol inhibits proliferation and promotes apoptosis of osteosarcoma cells. European journal of pharmacology, 609, 1-3, 13-8.

Lockshin RA, Zakeri Z, 2001. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. Nature reviews Molecular cell biology, 2, 7, 545-50.

Lubin JH, Boice Jr JD, Edling C, Hornung RW, Howe GR, Kunz E, Kusiak RA, Morrison HI, Radford EP, Samet JM, 1995. Lung cancer in radon-exposed miners and estimation of risk from indoor exposure. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 87, 11, 817-27.

Machala M, Kubínová R, Hořavová P, Suchý V, 2001. Chemoprotective potentials of homoisoflavonoids and chalcones of Dracaena cinnabari: modulations of drug-metabolizing enzymes and antioxidant activity. Phytotherapy Research, 15, 2, 114-8.

Martini N, Bains MS, Burt ME, Zakowski MF, McCormack P, Rusch VW, Ginsberg RJ, 1995. Incidence of local recurrence and second primary tumors in resected stage I lung cancer. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 109, 1, 120-9.

Masaoud M, Ripperger H, Himmelreich U, Adam G, 1995. Cinnabarone, a biflavonoid from dragon's blood of Dracaena cinnabari. Phytochemistry, 38, 3, 751-3.

Masaoud M, Ripperger H, Porzel A, Adam G, 1995. Flavonoids of dragon's blood from Dracaena cinnabari. Phytochemistry, 38, 3, 745-9.

Masaoud M, Schmidt J, Adam G, 1995. Sterols and triterpenoids from Dracaena cinnabari. Phytochemistry, 38, 3, 795-6.

Masaud M, Ripperger H, Himmelerich U, Adam G, 1995. Cinnabaron, ABiflavonoid from Dragon’s Blood of Dracaena Cinnabari, Institute of plant. Phytochemistry, 38, 3.

Meksuriyen D, Cordell GA, 1988. TRADITIONAL MEDICINAL PLANTS OF THAILAND XIII. FLAVONOID DERIVATIVES FROM DRACAENA LOUREIRI (AGAVACEAE). Journal of the Science Society of Thailand, 14, 3-24.

Milburn M, 1984. Dragon's blood in East and West Africa, Arabia and the Canary Islands. Africa: Rivista trimestrale di studi e documentazione dell’Istituto italiano per l’Africa e l’Oriente, 39, 3, 486-93.

Miller AG, Morris M, 2004. Ethnoflora of the Soqotra Archipelago, Royal Botanic Garden Edinburgh, p.

Miller G, Morris M, 2004. Ethnoflora of the Soqotra Archipelago Charlesworth Group. Huddersfield, UK.

Miret S, De Groene EM, Klaffke W, 2006. Comparison of in vitro assays of cellular toxicity in the human hepatic cell line HepG2. Journal of biomolecular screening, 11, 2, 184-93.

Mohammed YHE, Khanum SA, 2016. Anti-Diabetic Activity of Dracaen cinnabari Balf. f Extracts from Resin in Soqotra Island-Yemen. Journal of Plant Biochemistry & Physiology.

Mohandas K, 2001. Genetic predisposition to cancer. Current Science, 482-9.

Molina JR, Adjei AA, Jett JR, 2006. Advances in chemotherapy of non-small cell lung cancer. Chest, 130, 4, 1211-9.

Mothana R, Gruenert R, Lindequist U, Bednarski P, 2007. Study of the anticancer potential of Yemeni plants used in folk medicine. Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 62, 4, 305-7.

Mothana RA, Al-Musayeib NM, Matheeussen A, Cos P, Maes L, 2012. Assessment of the in vitro antiprotozoal and cytotoxic potential of 20 selected medicinal plants from the island of Soqotra. Molecules, 17, 12, 14349-60.

Mothana RA, Mentel R, Reiss C, Lindequist U, 2006. Phytochemical screening and antiviral activity of some medicinal plants from the island Soqotra. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 20, 4, 298-302.

Murray N, Turrisi III AT, 2006. A review of first-line treatment for small-cell lung cancer. Journal of Thoracic Oncology, 1, 3, 270-8.

Mustafa M, JamalulAzizi A, IIIzam E, Nazirah A, Sharifa A, Abbas S, 2016. Lung cancer: risk factors, management, and prognosis. IOSR Journal of Dental and Medical Sciences, 15, 10, 94-101.

Nakanishi K, Kawai T, Kumaki F, Hiroi S, Mukai M, Ikeda E, 2003. Survivin expression in atypical adenomatous hyperplasia of the lung. American journal of clinical pathology, 120, 5, 712-9.

O'Reilly KM, Mclaughlin AM, Beckett WS, Sime PJ, 2007. Asbestos-related lung disease. American family physician, 75, 5, 683-8.

Organization WH, (2002). European strategy for tobacco control, Copenhagen: WHO Regional Office for Europe.

Organization WH, 2004. Gender in lung cancer and smoking research.

Organization WH, 2009. WHO report on the global tobacco epidemic, 2009: implementing smoke-free environments, Geneva: World Health Organization, p.

Organization WH, 2010. Asbestos: elimination of asbestos-related diseases. Fact sheet, 343.

Organization WH, Control RfIT, 2008. WHO report on the global tobacco epidemic, 2008: the MPOWER package, World Health Organization, p.

Organization. WH, 2018. CANCER.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P, 2005. Global cancer statistics, 2002. CA: a cancer journal for clinicians, 55, 2, 74-108.

Peres MT, Delle Monache F, Cruz AB, Pizzolatti MG, Yunes RA, 1997. Chemical composition and antimicrobial activity of Croton urucurana Baillon (Euphorbiaceae). Journal of ethnopharmacology, 56, 3, 223-6.

Pershagen G, 1990. Air pollution and cancer. IARC scientific publications, 104, 240-51.

Peschel W, Sánchez-Rabaneda F, Diekmann W, Plescher A, Gartzía I, Jiménez D, Lamuela-Raventos R, Buxaderas S, Codina C, 2006. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. Food Chemistry, 97, 1, 137-50.

Pucci B, Kasten M, Giordano A, 2000. Cell cycle and apoptosis. Neoplasia, 2, 4, 291-9.

Reyes-Zurita FJ, Rufino-Palomares EE, Lupiáñez JA, Cascante M, 2009. Maslinic acid, a natural triterpene from Olea europaea L., induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway. Cancer letters, 273, 1, 44-54.

Saccomanno G, Huth GC, Auerbach O, Kuschner M, 1988. Relationship of radioactive radon daughters and cigarette smoking in the genesis of lung cancer in uranium miners. Cancer, 62, 7, 1402-8.

Satcher D, Thompson TG, Koplan JP, 2002. Women and smoking: a report of the Surgeon General. Nicotine Tob Res, 4, 1, 7-20.

Sayers TJ, 2011. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. Cancer Immunology, Immunotherapy, 60, 8, 1173-80.

Scherer WF, Syverton JT, Gey GO, 1953. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses: IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. The Journal of experimental medicine, 97, 5, 695-710.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A, 2012. Cancer statistics, 2012. CA: a cancer journal for clinicians, 62, 1, 10-29.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A, 2020. Cancer statistics, 2020. CA Cancer J Clin, 70, 1, 7-30.

Singh J, 2008. Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants, 67, 32-5.

Smith C, Perfetti T, Mullens M, Rodgman A, Doolittle D, 2000. "IARC Group 2B Carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. Food and chemical toxicology, 38, 9, 825-48.

Srinivasan P, Suchalatha S, Babu PVA, Devi RS, Narayan S, Sabitha KE, Devi CSS, 2008. Chemopreventive and therapeutic modulation of green tea polyphenols on drug metabolizing enzymes in 4-Nitroquinoline 1-oxide induced oral cancer. Chemico-Biological Interactions, 172, 3, 224-34.

Srivastav AK, Das P, 2014. Phytochemical extraction and characterization of roots of Withania Somnifera for its Anti-Bacterial, Anti-Oxidant, Anti-Inflammation and Analgesic activity. Int J Innov Res Devlop, 3, 22-33.

Stathopoulou A, Roukos V, Petropoulou C, Kotsantis P, Karantzelis N, Nishitani H, Lygerou Z, Taraviras S, 2012. Cdt1 is differentially targeted for degradation by anticancer chemotherapeutic drugs. PloS one, 7, 3, e34621.

Suchý V, Bobovnický B, Trojánek J, Buděsínský M, Ubik K, 1991. Homoisoflavans and other constituents of Dragon's blood from Dracaena cinnabari. Progress on Terrestrial and Marine Natural Products of Medicinal and Biological Interest. American Botanical Council, Austin, 110-8.

Takei H, Asamura H, Maeshima A, Suzuki K, Kondo H, Niki T, Yamada T, Tsuchiya R, Matsuno Y, 2002. Large cell neuroendocrine carcinoma of the lung: a clinicopathologic study of eighty-seven cases. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 124, 2, 285-92.

Thun MJ, Hannan LM, Adams-Campbell LL, Boffetta P, Buring JE, Feskanich D, Flanders WD, Jee SH, Katanoda K, Kolonel LN, 2008. Lung cancer occurrence in never-smokers: an analysis of 13 cohorts and 22 cancer registry studies. PLoS Med, 5, 9, e185.

Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H, 2011. Phytochemical screening and extraction: a review. Internationale pharmaceutica sciencia, 1, 1, 98-106.

Travis W, Brambilla E, Muller-Hermelink H, Harris C, 2004. Pathology and genetics. Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart, 2004.

Travis WD, 2004. Pathology & genetics tumours of the lung, pleura, thymus and heart. World Health Organization classification of tumours.

Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG, 2015. Introduction to the 2015 World Health Organization classification of tumors of the lung, pleura, thymus, and heart. Journal of Thoracic Oncology, 10, 9, 1240-2.

Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, Harris CC, 2004. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart, 10, 179-84.

Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, Ishikawa Y, Wistuba I, Flieder DB, Franklin W, 2013. Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. Archives of Pathology and Laboratory Medicine, 137, 5, 668-84.

Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King Jr TE, Lynch DA, Nicholson AG, Ryerson CJ, Ryu JH, Selman M, Wells AU, 2013. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. American journal of respiratory and critical care medicine, 188, 6, 733-48.

Trichopoulos D, Li FP, Hunter DJ, 1996. What causes cancer? Scientific American, 275, 3, 80-7.

Trump BE, Berezesky IK, Chang SH, Phelps PC, 1997. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. Toxicologic pathology, 25, 1, 82-8.

Tsao A, (2007). Lung Carcinoma: Tumors of the Lungs. Merck Manual Professional Edition. Online edition.

Vachalkova A, Novotny L, Nejedlikova M, Suchy V, 1995. Potential carcinogenicity of homoisoflavanoids and flavanoids from resina sanguinis draconis (Dracaena Cinnabari Balf.). Neoplasma, 42, 6, 313.

Vainio H, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Karjalainen A, Hackman P, Partanen T, 1993. Interaction between smoking and asbestos in human lung adenocarcinoma: role of K-ras mutations. Environmental health perspectives, 101, suppl 3, 189-92.

Veselá D, Marek R, Ubik K, Lunerová K, Sklenář Vr, Suchý V, 2002. Dracophane, a metacyclophane derivative from the resin of Dracaena cinnabari Balf. Phytochemistry, 61, 8, 967-70.

Vilmar A, Sorensen J, 2011. Customising chemotherapy in advanced nonsmall cell lung cancer: daily practice and perspectives. European Respiratory Review, 20, 119, 045-52.

Wang C-Z, Calway T, Yuan C-S, 2012. Herbal medicines as adjuvants for cancer therapeutics. The American journal of Chinese medicine, 40, 04, 657-69.

Wang G-X, Zhou Z, Jiang D-X, Han J, Wang J-F, Zhao L-W, Li J, 2010. In vivo anthelmintic activity of five alkaloids from Macleaya microcarpa (Maxim) Fedde against Dactylogyrus intermedius in Carassius auratus. Veterinary Parasitology, 171, 3-4, 305-13.

Wang T, Nelson RA, Bogardus A, Grannis Jr FW, 2010. Five-year lung cancer survival: which advanced stage nonsmall cell lung cancer patients attain long-term survival? Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society, 116, 6, 1518-25.

Warner KE, Mendez D, 2010. Tobacco control policy in developed countries: yesterday, today, and tomorrow. Nicotine & Tobacco Research, 12, 9, 876-87.

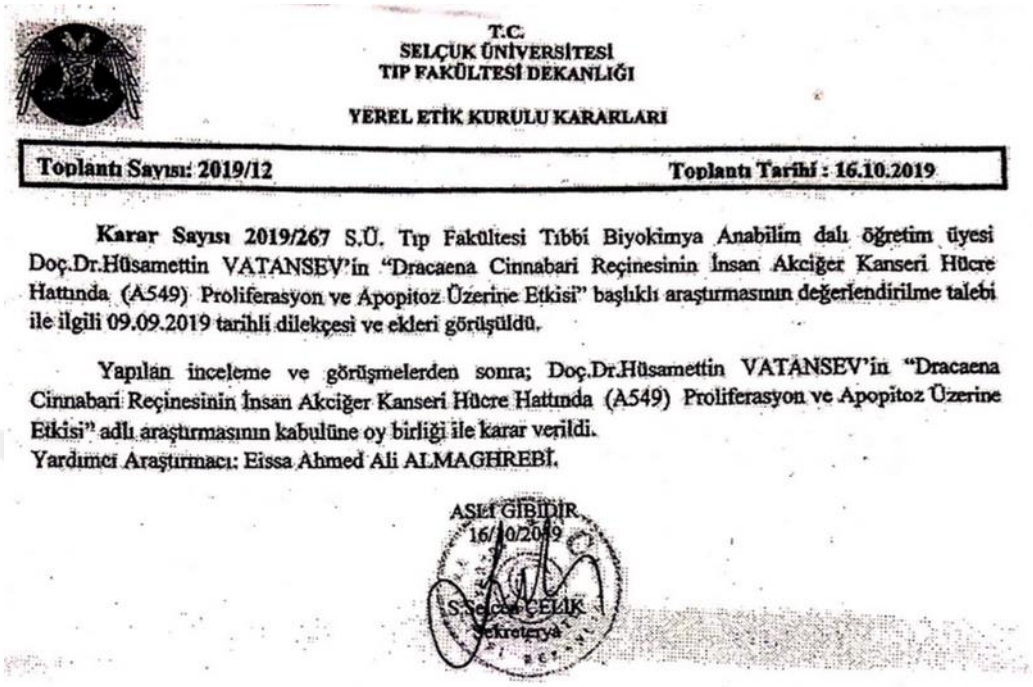
Yanina IY, Orlova TG, Tuchin VV, Altshuler GB. The morphology of apoptosis and necrosis of fat cells after photodynamic treatment at a constant temperature in vitro. Mechanisms for Low-Light Therapy VI, 78870X.

Yehia A-TA, Alzowahi FAM, Kadam TA, Shaikh RU, 2013. In vitro evaluation of antimicrobial and antioxidant activity of Dragon's blood tree (Dracaena cinnabari Balf. f.) of Soqotra Island (Yemen). J Coastal Life Med, 1, 2, 123-9.

Zhang J, OU JX, BAI CX, 2011. Tobacco smoking in China: prevalence, disease burden, challenges and future strategies. Respirology, 16, 8, 1165-72.

7. EKLER

EKA: Etik Kurul Kararı



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Toplantı Sayısı: 2019/12	Toplantı Tarihi : 16.10.2019

Karar Sayısı 2019/267 S.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Hüsamettin VATANSEV'in "Dracaena Cinnabari Reçinesinin İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattında (A549) Proliferasyon ve Apopitoz Üzerine Etkisi" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 09.09.2019 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Doç.Dr.Hüsamettin VATANSEV'in "Dracaena Cinnabari Reçinesinin İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattında (A549) Proliferasyon ve Apopitoz Üzerine Etkisi" adlı araştırmasının kabulüne oy birliği ile karar verildi.
Yardımcı Araştırmacı: Eissa Ahmed Ali ALMAGHREBİ.

ASLI GİBİDİR
16/10/2019
Selçuk ÇELİK
Sekreterya

8. ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Yemen'da doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimini ibb'de tamamladı. Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi kimya bölümünden 2018 yılında mezun oldu. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü/ Tıbbi biyokimya ABD'ında yüksek lisansı devam etmektedir.