

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ORGANİK TARIM İŞLETMECİLİĞİ ANABİLİM DALI

AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE *Achillea alimeana*'NİN  
ANTİKANSER ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YAĞMUR CEYLAN EKİZ

DENİZLİ, KASIM - 2024

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ORGANİK TARIM İŞLETMECİLİĞİ ANABİLİM DALI



AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE *Achillea alimeana*'NIN  
ANTİKANSER ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YAĞMUR CEYLAN EKİZ

DENİZLİ, KASIM - 2024

**Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi tarafından 2023FEBE009  
numaralı proje ile desteklenmiştir.**

**Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.**

**YAĞMUR CEYLAN EKİZ**

## ÖZET

**AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE *Achillea alimeana*'NİN  
ANTİKANSER ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
YAĞMUR CEYLAN EKİZ  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ORGANİK TARIM İŞLETMECİLİĞİ ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖGR. ÜYESİ GURBET ÇELİK TURGUT)**

**DENİZLİ, KASIM - 2024**

Akciğer kanseri, dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenlerinden biridir ve önemli bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir. Son yıllarda tanı ve tedavi alanında önemli ilerlemeler kaydedilmiş olmasına rağmen, akciğer kanseri hastalarının prognozu genellikle tatmin edici değildir. Günümüzde kanser hastaları, konvansiyonel tedavilerin yanı sıra alternatif ve tamamlayıcı tedavileri de sıklıkla tercih etmektedir. Bitkisel preparatlar ve fitokimyasallar, bu tedavi yöntemlerinin önemli bir parçasını oluşturmaktadır. *Achillea* cinsine ait bitkiler geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılmakta ve antienflamatuvar, antioksidan ve antikanser özellikleri gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri ile dikkat çekmektedir. *Achillea alimeana*, 2022 yılında Denizli ilinin Çameli ilçesinde (Türkiye) keşfedilen yeni bir bitki türüdür. Bu bitkinin biyolojik aktiviteleri hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır. Bu çalışma, *A. alimeana*'nın iki farklı insan akciğer kanseri hücre hattı (A549 ve H1975) üzerindeki potansiyel biyolojik etkilerini aydınlatmayı hedeflemiştir. Bu kapsamda bu hücre hatları kullanılarak, *A. alimeana*'nın sitotoksik etkileri *in vitro* olarak incelenmiş, Annexin V boyama, lüsiferaz aktivite analizi ve RT-PZR yöntemi ile apoptotik etkileri belirlenmiş ve migrasyon ve invazyon kapasitesi değerlendirilmiştir. Sonuçlar *A. alimeana*'nın her iki akciğer kanseri hücresinin farklı derecede antiproliferatif etkiye sahip olabileceğini ve farklı sinyal yollarını kullanarak apoptotik ve nekrotik ölümü tetiklediğini göstermiştir. Ayrıca hücrelerin migrasyon ve invazyon yeteneklerini engelleyerek anti-migratif ve anti-invaziv özellikler sergilemiştir. Bu tez çalışması literatüre yeni antikanserojenik etkiye sahip bir bitkinin tanımlanmasını sağlamıştır. İleride yapılacak çalışmalarda bu bitkinin içerisindeki etken maddelerin izole edilmesi, tek başına yeni ilaç etken maddelerinin tanımlanmasına ve yüksek ekonomik çıktılarının üretilmesine olanak sağlayabilir.

**ANAHTAR KELİMELELER:** *Achillea alimeana*, akciğer kanseri, sitotoksik, apoptoz, hücre göçü, invazyon.

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF ANTICANCER PROPERTIES OF *Achillea alimeana* IN LUNG CANCER CELLS

MSC THESIS

YAĞMUR CEYLAN EKİZ

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

DEPARTMENT OF ORGANIC AGRICULTURE MANAGEMENT  
(SUPERVISOR: ASSIST. PROF. GURBET ÇELİK TURGUT)

DENİZLİ, NOVEMBER 2024

Lung cancer is one of the leading causes of cancer-related deaths worldwide and is considered a major public health problem. Although significant progress has been made in diagnosis and treatment in recent years, the prognosis of lung cancer patients is often unsatisfactory. Today, cancer patients often prefer alternative and complementary treatments in addition to conventional treatments. Herbal preparations and phytochemicals constitute an important part of these treatment methods. Plants belonging to the genus *Achillea* are widely used in traditional medicine and attract attention with their various biological activities such as anti-inflammatory, antioxidant and anticancer properties. *Achillea alimeana* is a new plant species discovered in Çameli district of Denizli province (Türkiye) in 2022. There is limited information about the biological activities of this plant. This study aimed to elucidate the potential biological effects of *A. alimeana* on two different human lung cancer cell lines (A549 and H1975). In this context, using these cell lines, the cytotoxic effects of *A. alimeana* were examined *in vitro*, its apoptotic effects were determined by Annexin V staining, luciferase activity analysis, and RT-PCR method as well as evaluating its migration and invasion capacity. The results showed that *A. alimeana* may have different degree of antiproliferative effect on both cell lines, triggering apoptotic and necrotic death using different signaling pathways. It also exhibited anti-migratory and anti-invasive properties by inhibiting the migration and invasion abilities of the cells. This thesis study has provided the identification of a plant with new anticarcinogenic effects in the literature. In future studies, isolating the active ingredients in this plant may allow for the identification of new drug active ingredients and the production of high economic outputs.

**KEYWORDS:** *Achillea alimeana*, lung cancer, cytotoxic, apoptosis, cell migration, invasion.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>v</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>SEMBOL LİSTESİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>ix</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1    Kanser.....	7
1.1.1    Akciğer Kanseri .....	8
1.1.1.1    Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi .....	8
1.1.1.2    Akciğer Kanseri Etiyolojisi.....	8
1.1.1.3    Akciğer Kanseri Histopatolojisi.....	12
1.1.1.4    Akciğer Kanserinin Moleküler Mekanizması .....	15
1.2    Asteraceae Familyası.....	17
1.2.1 <i>Achillea</i> cinsi.....	18
1.3    Tez Çalışmasının Amacı.....	20
<b>2. MATERYAL VE METOT</b> .....	<b>22</b>
2.1    MATERYAL .....	22
2.1.1    Çalışmada Kullanılan Cihazlar .....	22
2.1.2    Çalışmada Kullanılan Kimyasallar .....	22
2.2    METOT .....	23
2.2.1    Çalışmada Kullanılacak Bitki Materyalinin Toplanması.....	23
2.2.2 <i>Achillea alimeana</i> 'nın Biyoetkinliğinin Belirlenmesi .....	23
2.2.2.1 <i>Achillea alimeana</i> 'nın Su Ekstresinin Hazırlanması.....	23
2.2.2.2    Hücre Kültürü Çalışmaları .....	24
2.2.2.2.1    Besiyeri Hazırlanması.....	24
2.2.2.2.2    Hücrelerin Büyütülmesi .....	24
2.2.2.2.3    Hücrelerin Pasajlanması .....	25
2.2.2.2.4    Sitotoksikite Çalışmaları .....	25
2.2.2.2.5    Apoptotik Hücrelerin Belirlenmesi.....	26
2.2.2.2.6    Total RNA İzolasyonu .....	27
2.2.2.2.7    RNA 'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi ...	27
2.2.2.2.8    cDNA Sentezi .....	28
2.2.2.2.9    Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)29	
2.2.2.2.10    Lüsiferaz Aktivitesinin Belirlenmesi .....	30
2.2.2.2.11    İnvazyon Etkisinin Belirlenmesi.....	31
2.2.2.2.12    Migrasyon Etkisinin Belirlenmesi .....	31
2.2.2.2.13    İstatistiksel Analiz.....	31
<b>3. BULGULAR</b> .....	<b>33</b>
3.1    Sitotoksikte Sonuçları.....	33
3.2    Apoptoz Sonuçları .....	37
3.2.1    Annexin-V/PI Boyama Sonuçları .....	37
3.2.2    RT-PZR Sonuçları .....	39
3.2.3    Lüsiferaz Aktivitesi Sonuçları .....	42

3.3	İnvazyon Etkisinin Belirlenmesi .....	43
3.4	Migrasyon Etkisinin Belirlenmesi .....	44
<b>4.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>47</b>
<b>5.</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>51</b>
<b>6.</b>	<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>73</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Şekil 2.1:</b> A549 ve H1975 hücrelerinden izole edilen RNA'ların %1'lik agaroz jel elektroforezi.....	28
<b>Şekil 3.1:</b> Farklı konsantrasyonlardaki <i>A. alimeana</i> su ekstresinin A549 hücre canlılığına etkisi.....	33
<b>Şekil 3.2:</b> Farklı konsantrasyonlardaki <i>A. alimeana</i> su ekstresinin H1975 hücre canlılığına etkisi .....	34
<b>Şekil 3.3:</b> Farklı konsantrasyonlardaki <i>A. alimeana</i> su ekstresinin HEK-293 hücre canlılığına etkisi .....	35
<b>Şekil 3.4:</b> <i>A. alimeana</i> 'nın A549 hücrelerinde apoptoza etkisi. Aynı harfi taşımayan değerler birbirinden anlamlı şekilde farklıdır ( $p < 0,05$ ).....	38
<b>Şekil 3.5:</b> <i>A. alimeana</i> 'nın H1975 hücrelerinde apoptoza etkisi. Aynı harfi taşımayan değerler birbirinden anlamlı şekilde farklıdır ( $p < 0,05$ ).....	38
<b>Şekil 3.6:</b> <i>A. alimeana</i> 'nın A549 hücrelerinde APAF1, BAX, BCL2, CASP3, CASP8, CASP9, FAS ve P53 mRNA seviyesine etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edilerek değerlendirilmiştir. *: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0,05$ ).....	40
<b>Şekil 3.7:</b> <i>A. alimeana</i> 'nın H1975 hücrelerinde APAF1, BAX, BCL2, CASP3, CASP8, CASP9, FAS ve P53 mRNA seviyesine etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edilerek değerlendirilmiştir. *: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0,05$ ).....	40
<b>Şekil 3.8:</b> pGL4.38 plazmidi transfekte edilmiş hücrelere, doksorubisin ve <i>A. alimeana</i> muamele edildikten sonra lüsiferaz aktivitesi ölçümü. Aynı harfi taşımayan değerler birbirinden istatistiki olarak anlamlı şekilde farklıdır ( $p < 0,05$ ) .....	43
<b>Şekil 3.9:</b> A) Kontrol ve doz grubu invaze olan A549 ve H1975 hücrelerin mikroskop görüntüsü. Görüntüler temsili alanlardan seçilmiştir B) yüzde sütun grafiği .....	44
<b>Şekil 3.10:</b> A) <i>A. alimeana</i> 'nın A549 hücre hattında migrasyon yeteneği üzerine etkisi B) yüzde sütun grafiği. Aynı harfi taşımayan değerler birbirinden anlamlı şekilde farklıdır ( $p < 0,05$ ).....	45
<b>Şekil 3.11:</b> A) <i>A. alimeana</i> 'nın H1975 hücre hattında migrasyon yeteneği üzerine etkisi B) yüzde sütun grafiği. Aynı harfi taşımayan değerler birbirinden anlamlı şekilde farklıdır ( $p < 0,05$ ).....	46

## TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 1.1:</b> DSÖ'ye göre akciğer kanserlerinin patolojik sınıflandırılması .....	12
<b>Tablo 2.1:</b> cDNA sentez karışımı .....	29
<b>Tablo 2.2:</b> Primerlerin nükleotit dizilimleri .....	29
<b>Tablo 2.3:</b> RT-PZR koşulları.....	30
<b>Tablo 2.4:</b> RT-PZR protokolü .....	30



## SEMBOL LİSTESİ

°C	:	Santigrat derece
µg	:	Mikrogram
µL	:	Mikrolitre
µM	:	Mikromolar
A	:	Adenin
A549	:	İnsan akciğer karsinom hücre hattı
ACTB	:	β-Aktin
APAF1	:	Apoptotik peptidaz aktive edici faktör 1
ATCC	:	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
BAX	:	BCL2 ile ilişkili X proteini
BCL2	:	B hücreli lenfoma 2
C	:	Sitozin
c-MYC	:	Miyelositomatozis
C/EBP	:	CCAAT güçlendirici bağlayıcı protein
CASP3	:	Kaspaz 3
CASP8	:	Kaspaz 8
CASP9	:	Kaspaz 9
cDNA	:	Komplementer deoksiribonükleik asit
Chop	:	C/EBP homolog transkripsiyon faktörü
CO <sub>2</sub>	:	Karbondioksit
CTD	:	Kantaridin
DHE	:	Dehidrokostuslakton
dk	:	Dakika
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle's Besiyeri
DMSO	:	Dimetilsülfoksit
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
DR1	:	Ölüm reseptörü 1
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
ECM	:	Ekstraselüler matriks
EDTA	:	Etilendiamintetraasetik asit
EGF	:	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	:	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ER	:	Endoplazmik retikulum
EtBr	:	Etidyum bromür
F	:	İleri
FAS	:	Fas hücre yüzey ölüm reseptörü
FBS	:	Fetal sığır serumu
g	:	Gram
G	:	Guanin
GWAS	:	Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları
H1975	:	İnsan akciğer adenokarsinomu hücre hattı
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	:	Hidrojen peroksit
HDAC	:	Histon deasetilaz
HEK293	:	İnsan embriyo böbrek hücre hattı
IC <sub>10</sub>	:	%10 inhibitör konsantrasyonu
IC <sub>50</sub>	:	Yarı maksimal inhibitör konsantrasyon
IGF	:	İnsülin benzeri büyüme faktörü

<b>kg</b>	:	Kilogram
<b>KHAK</b>	:	Küçük hücreli akciğer kanseri
<b>KHDAK</b>	:	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
<b>KOAH</b>	:	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
<b>KRAS</b>	:	Kirsten sıçan sarkom virüsü
<b>m</b>	:	metre
<b>mA</b>	:	Miliamper
<b>mg</b>	:	Miligram
<b>mL</b>	:	Mililitre
<b>MMP9</b>	:	Matriks metalloproteinaz 9
<b>MS</b>	:	Multiple skleroz
<b>MTT</b>	:	3-(4,5- di metil tiyazol -2-il)-2,5-di fenil tetrazolyum bromür
<b>nm</b>	:	Nanometre
<b>P53</b>	:	Tümör protein 53
<b>P53RE</b>	:	P53 yanıt elementi
<b>PBS</b>	:	Fosfat tuz tamponu
<b>PDI</b>	:	Protein disülfür izomeraz
<b>pg</b>	:	pikogram
<b>R</b>	:	Geri
<b>RAS</b>	:	Sıçan sarkom virüsü
<b>RB</b>	:	Retinoblastom
<b>RNA</b>	:	Ribonükleikasit
<b>ROS</b>	:	Reaktif oksijen türü
<b>rpm</b>	:	Dakikadaki devir sayısı
<b>RPMI</b>	:	Roswell Park Memorial Institute Besiyeri
<b>RT</b>	:	Ters transkriptaz
<b>RT-PZR</b>	:	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
<b>sn</b>	:	Saniye
<b>SNP</b>	:	Tek nükleotit polimorfizmi
<b>T</b>	:	Timin
<b>TAE</b>	:	Tris-Asetik asit-EDTA
<b>TK</b>	:	Tirozin kinaz
<b>TKI</b>	:	Tirozin kinaz inhibitörü
<b>TM</b>	:	Yapışma sıcaklığı
<b>TTK</b>	:	Transmembran tirozin kinaz
<b>UK</b>	:	Ülseratif kolit
<b>UV</b>	:	Ultraviyole
<b>V</b>	:	Volt
<b>VEGF</b>	:	Vasküler endotel büyüme faktörü
<b>ω-HUA</b>	:	ω-Hydroxyundec-9-enoik asit

## ÖNSÖZ

‘Akciğer Kanseri Hücrelerinde *Achillea alimeana*’nın Antikanser Özelliklerinin İncelenmesi’ adlı Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Organik Tarım İşletmeciliği Yüksek Lisans Tez’inin tüm deneysel çalışmaları Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Biyokimya ve Moleküler Toksikoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışma konusunun belirlenmesinde, bilgisini, deneyimini, zamanını hiçbir zaman benden esirgemeyen, karşılaştığım tüm sorunları çözmemde bana destek olan, lisans ve yüksek lisans sürecimde yetişmemde çok büyük emeği olan, tez çalışmamın başından sonuna kadar maddi manevi her zaman yanımda olan, kendisiyle çalışmayı her zaman şanslı hissettiğim ve örnek aldığım çok değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Gurbet ÇELİK TURGUT’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvarının tüm imkânlarını sonuna kadar açan, tecrübe ve eşsiz bilgilerinden yararlandığım çok değerli hocam Prof. Dr. Alaattin ŞEN’e teşekkür ederim.

Tezimde kullandığım bitki türünün tedarik ve teşhisinde yardımcı olan Prof. Dr. Gürkan SEMİZ’e ve deneylerin birçok aşamasında laboratuvar imkanlarını açan Prof. Dr. Şevki ARSLAN’a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman bilgisi ve tecrübesiyle yardımcı olan Doç. Dr. Fikret SARI ve Dr. Öğr. Üyesi Ege Rıza KARAGÜR’e, deney çalışmalarımı yaparken yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Doğukan MUTLU, Hajarat Abilo ALFA ve Amine Hafis ABDELSALAM’a teşekkür ederim.

Maddi desteği sağladığı için Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne (2023FEBE009) teşekkür ederim.

Son olarak desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, maddi manevi her daim yanımda olan eşim Kadir EKİZ’e, beni bugünlere özveriyle getiren annem Mukaddes Özlem CEYLAN ve babam Ahmet CEYLAN’a sonsuz teşekkürler ederim.

# 1. GİRİŞ

Akciğer kanseri, invaziv doğası ve hızlı metastaz yeteneği ile hem erkeklerde hem de kadınlarda en yüksek ölüm oranına sahip kanser türüdür (Dela Cruz ve diğ. 2011). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın 2020 yılına ait verileri, dünya genelinde yaklaşık 1,8 milyon insanın akciğer kanseri nedeniyle hayatını kaybettiğini göstermektedir. Bu sayı, tüm kanser türlerinden kaynaklanan ölümlerin yaklaşık %18'ini oluşturmaktadır (Sung ve diğ. 2021). Ölüm ve sağ kalım şansları, ülkelere ve bölgelere göre değişiklik gösterse de genellikle yüksek insidans ve ölüm oranlarına sahip olduğu gözlemlenmektedir (Youlden ve diğ. 2008). İnsidans ve ölüm oranları, akciğer kanseri vakalarının çoğunu oluşturan başlıca risk faktörünün, uzun süre sigara kullanımı ile tutarlı bir ilişki içinde olduğunu ortaya koymaktadır (Lee ve diğ. 2014). Akciğer kanseri etiyolojisinde sigara içmenin dışında tanımlanmış birçok farklı risk faktörü bulunmaktadır (Molina ve diğ. 2008; Dela Cruz ve diğ. 2011).

Akciğer kanseri, esas olarak iki türde sınıflandırılır: Tüm vakaların %85'ini oluşturan küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve geriye kalan %15'lik bir oranı temsil eden küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) (Basumallik ve Agarwal 2023). KHDAK, genellikle daha yavaş ilerleyen ve daha yaygın olan form iken KHAK ise daha agresif seyreden ve tedaviye daha hızlı yanıt veren bir türdür. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), KHDAK'ı üç temel kategoriye ayırmıştır: Adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom. Adenokarsinom, akciğer kanserlerinin en yaygın formudur ve genellikle akciğerlerin dış bölümlerinde başlar. Skuamöz hücreli karsinom genellikle bronşların orta bölümlerinde oluşur. Büyük hücreli karsinom ise isminden de anlaşılacağı gibi büyük anormal hücrelerin karakteristik olduğu nadir bir türdür. Akciğerin hormonal hücrelerinden kaynaklanan KHAK, en farklılaşmış kanser türlerinden biridir ve genellikle merkezi mediastinal tümörler şeklinde görülür (Travis ve diğ. 2015; Zappa ve Mousa 2016). KHAK, hızlı hücre bölünme oranı ve hızlı büyüme ilerlemesi ile karakterizedir ve bu aynı zamanda erken yayılıma ve yüksek nüks oranlarına da yol açar (Gergen ve diğ. 2020).

Akciğer kanseri, bronşların çeşitli bölgelerinde gelişebilen ve çok çeşitli özellikler gösterebilen bir hastalıktır. Bu karmaşık hastalık, farklı türlerdeki hücrelerden kaynaklanabilir ve her hasta için farklı bir seyir izleyebilir. Anatomik yerleşimine göre farklılık gösteren çeşitli semptom ve bulgulara neden olabilir. Akciğer kanserinin teşhisi ve tedavisinde, bu değişken belirtiler göz önünde bulundurularak çeşitli tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Erken evre akciğer kanseri hastaları için, Evre I ve II'de, kontrendikasyon yoksa tam cerrahi rezeksiyon önerilmektedir (Luna ve diğ. 2021). İleri evre hastalıklarda tedavi seçenekleri, hastanın genel durumu, tümörün özellikleri ve yerleşimi gibi birçok faktöre bağlı olarak belirlenir. Radyoterapi ve kemoterapi gibi sistemik tedaviler, tümörün vücuttaki yayılımını kontrol altına almayı amaçlar. İmmünoterapi, hastanın kendi bağışıklık sistemini tümöre karşı aktive ederek çalışır. Perkütan termal ablasyon yöntemleri olan kriyoablasyon, mikrodalga ve radyofrekans ablasyon, tümör dokusunu yüksek veya düşük sıcaklıklar kullanarak yok etmeyi hedefler. Cerrahi rezeksiyon ise mümkün olduğunda tümörün tamamının çıkarılmasını içerir. Her bir tedavi yöntemi, hastanın ihtiyaçlarına ve tümörün özelliklerine göre özelleştirilir ve birçok durumda, en etkili sonuçları elde etmek için bir kombinasyon halinde uygulanır (McTaggart ve Dupuy 2007). Kanser tedavisinde klasik yöntemlerin yanı sıra, hedefe yönelik terapiler giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Bu terapiler arasında epidermal büyüme faktörü reseptör (EGFR) inhibitörleri, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) inhibitörleri, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) inhibitörleri, histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri ve proapoptotik ajanlar bulunmaktadır. EGFR inhibitörleri, özellikle KHDAK tedavisinde kullanılan hedefe yönelik tedaviler arasında yer alır ve bu tedavi, EGFR mutasyonu taşıyan hastalarda etkili olabilmektedir. VEGF inhibitörleri, anjiyogenezin inhibisyonu yoluyla tümör büyümesini engelleyerek kanser tedavisinde kullanılır. IGF inhibitörleri, hücre büyümesi ve farklılaşmasını düzenleyen sinyal yollarını hedef alır. HDAC inhibitörleri, gen ifadesini düzenleyerek kanser hücrelerinin büyümesini baskılayabilir. Proapoptotik ajanlar ise, kanser hücrelerinin programlı hücre ölümünü (apoptoz) indükleyerek tedaviye katkıda bulunur (Bonnesen ve diğ. 2009; Horn ve Sandler 2009; Soria ve diğ. 2010; Fidler ve diğ. 2012; Mamdani ve Jalal 2020). Conatumumab ve YM155, KHDAK tedavisinde umut verici yeni proapoptotik ajanlardır. Conatumumab, ölüm reseptörü 1'i (DR1) hedef alırken, YM155 survivin proteinini hedef alarak kanser hücrelerinin apoptozunu indüklemeyi amaçlar. Klinik

çalışmalar, bu ajanların kemoterapi ile birlikte kullanıldığında sinerjik etkiler gösterdiğini ve hastalığın ilerlemesini yavaşlattığını ortaya koymuştur (Kelly ve diğ. 2013; Paz-Ares ve diğ. 2013). Ancak, bu ajanların tam potansiyelini anlamak ve en iyi tedavi kombinasyonlarını belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Geleneksel ve tamamlayıcı tıp çeşitli kültürlerde yüzyıllar boyunca kullanılan doğal ürünlerin ve uygulamaların bir araya gelmesiyle oluşur. Bu tıp dalı genellikle bitkiler, mineraller ve diğer doğal kaynaklardan elde edilen ilaçları içerir. Modern tıbbın yanı sıra, geleneksel yöntemler de sağlık ve iyileşme süreçlerinde önemli bir rol oynar. Türkiye’de ve dünya genelinde pek çok insan, konvansiyonel tedavilere ek olarak veya alternatif olarak bu yöntemlere başvurmaktadır (Cragg ve Newman 2013). Doğal kaynaklardan elde edilen bileşiklerin sağlık üzerindeki olumlu etkileri, modern tıbbın önemli bir parçasıdır. Özellikle, antikanser, antioksidan, immünomodülatör, antimikrobiyal ve antienflamatuvar gibi özellikler gösteren bileşikler, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Tilaoui ve diğ. 2015; Oliveira ve diğ. 2017; Gonelimali ve diğ. 2018; Chaves ve diğ. 2020; Zebeaman ve diğ. 2023). Doğal ürünlerin akciğer kanseri hücrelerine karşı antikanser aktivitesi olduğunu gösteren çeşitli araştırmalar bulunmaktadır (Hung ve diğ. 2010; Wu ve diğ. 2010; Yang ve diğ. 2014; Poofery ve diğ. 2020). *Bridelia ovata*, *Croton oblongifolius* ve *Erythrophleum succirubrum* bitkilerinden elde edilen etil asetat ve etanol ekstralarının, A549 akciğer kanseri hücre dizisi üzerindeki antikanser etkileri üzerine yapılan araştırma, bu bitki ekstralarının kanser hücrelerine karşı toksik etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Özellikle, etil asetat ekstresi formunda *B. ovata*, *C. oblongifolius* ve *E. succirubrum* ve etanol ekstresi formunda *E. succirubrum* olmak üzere dört etkili ekstre, A549 hücrelerine karşı toksik etkiler sergilemiştir. Bu etkili ekstralar, kemoterapötik ilaçlarla birlikte test edilmiş ve özellikle *B. ovata*’nın etil asetat ekstresi ile metotreksat, *E. succirubrum*’nin etanol ekstresi ile metotreksat ve *E. succirubrum*’nin etanol ekstresi ile etoposid kombinasyonlarından etkili bir sinerjizm gözlemlenmiştir. Apoptotik hücre ölümü, bu etkili ekstralar tarafından A549 hücrelerinde mitokondri yoluyla indüklenmiştir. Ayrıca, akciğer kanseri hastalarının akciğer dokusundan elde edilen primer akciğer kanseri ve normal epitelyal hücreler üzerinde yapılan sitotoksikite sonuçları, *E. succirubrum*’nin etanol ekstresinin akciğer kanseri tedavisinde önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir (Poofery ve diğ. 2020). Dehidrokostuslakton (DHE), tıbbi bitki türevi bir

seskiterpen lakton olup, KHDAK hücre dizileri üzerindeki antikanser etkileri araştırılan ilgi çekici bileşiklerden biridir. Yapılan çalışmada, DHE'nin A549, NCI-H460 ve NCI-H520 hücre dizilerinin çoğalmasını engelleyebildiğini ve özellikle A549 ve NCI-H460 hücrelerinde endoplazmik retikulum (ER) stresi yoluyla hücre ölümünü tetikleyebildiğini göstermiştir. Bu bulgular, hayvan modeli üzerinde yapılan deneylerle de desteklenmiş, 28 günlük bir tedavi sürecinin ardından tümör boyutlarında %50'ye varan bir azalma sağladığı rapor edilmiştir (Hung ve diğ. 2010). Bu sonuçlar, DHE'nin KHDAK tedavisinde potansiyel bir antikanser ajanı olarak kullanılabilmesine dair umut verici bir perspektif sunmaktadır. *Oryza officinalis*, içerdiği  $\omega$ -Hydroxyundec-9-enoik asit ( $\omega$ -HUA) ile dikkat çekmektedir. Bu hidroksil doymamış yağ asidi türevi, KHDAK hücre hattında apoptozu indükleyerek antikanser aktivitesi göstermiştir. Araştırma,  $\omega$ -HUA'nın reaktif oksijen türleri (ROS) aracılı ER stresini tetikleyerek bu etkiyi gerçekleştirdiğini ortaya koymuştur. Bu bulgu,  $\omega$ -HUA'nın KHDAK tedavisinde umut verici bir aday olabileceğini göstermektedir (Yang ve diğ. 2014). *Paris polyphylla* bitkisinde bulunan Polyphyllin D, güçlü bir sitotoksik saponin olarak bilinir ve son çalışmada, Polyphyllin D'nin KHDAK hücre hattı NCI-H460 üzerindeki etkilerini detaylı bir şekilde incelenmiştir. Bu çalışma, Polyphyllin D'nin ER stresi yoluyla ve ardından mitokondriyal apoptotik yolu tetikleyerek akciğer kanseri hücrelerinde sitotoksik etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur (Siu ve diğ. 2008). Özellikle, Polyphyllin D'nin hücre içi stres yanıtını düzenleyen proteinler olan glukoz düzenlenmiş protein 78 (Bip/GRP78), protein disülfür izomeraz (PDI) ve C/EBP homolog transkripsiyon faktörünü (chop) artırarak hücre ölümünü indüklediği belirlenmiştir (Siu ve diğ. 2008). Kantaridin (CTD), *Mylabris phalerata*'nın doğal bir bileşeni olarak, NCI-H460 insan akciğer kanseri hücrelerinde önemli etkiler göstermiştir. Araştırmalar, CTD'nin hücre ölümünü indükleyerek kanser hücrelerinin göçünü ve invazyonunu inhibe ettiğini ortaya koymuştur. Özellikle, CTD'nin hücre canlılığını doza bağlı olarak azalttığı ve hücre göçü ile invazyonunu doza bağlı olarak inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca, CTD'nin matriks metalloproteinazların (MMP-2/-9) enzimatik aktivitelerini inhibe ettiği ve NCI-H460 hücrelerinin protein ekspresyonunu azalttığı gözlemlenmiştir (Hsia ve diğ. 2014). Bu bulgular, CTD'nin akciğer kanseri metastazını inhibe eden yeni bir antikanser ajanı olarak potansiyelini göstermektedir. Ayrıca, CTD'nin ER stresi ile ilişkili proteinlerin ekspresyonunu artırarak ve apoptoz yollarıyla ilişkili bazı proteinleri inhibe ederek hücre ölümüne yol açtığı belirtilmiştir. (Hsia ve diğ. 2014).

Kurkumin, geleneksel tıpta uzun yıllardır kullanılan ve son yıllarda kanser araştırmalarında dikkat çeken bir bileşendir. NCI-H460 akciğer kanseri hücre hattı üzerinde yapılan çalışmada, kurkuminin antikanser etkilerini apoptoz ve hücre döngüsünün durdurulması yoluyla gösterdiğini ortaya koymuştur (Wu ve diğ. 2010). Xu ve arkadaşlarının yaptığı çalışma, *Curcumae rhizoma*'dan izole edilen Furanodien adlı doğal bir terpenoidin, A549, NIH-H1299 ve 95-D akciğer kanseri hücre hatlarında hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ortaya koymuştur (Xu ve diğ. 2012). Bu çalışma, Furanodien'in potansiyel bir antikanser ajanı olarak kullanımını destekleyen önemli bir çalışmadır (Xu ve diğ. 2012). *Achillea millefolium*, yaygın olarak bilinen adıyla civanperçemi, seskiterpen laktonlar gibi biyoaktif bileşikler iğermesiyle tanınır. Bu bileşiklerden izo-seko-tanapartholid, arteludooicinolide A ve milifolid A, insan akciğer kanseri hücreleri üzerindeki inhibitör etkileri açısından incelenmiştir. Yapılan araştırma, özellikle milifolid A'nın, hücre apoptozunu tetikleyerek kanser hücrelerinin çoğalmasını önemli ölçüde inhibe ettiğini ortaya koymuştur. MTT (3-(4,5- di metil tiyazol -2-il)-2,5-di fenil tetrazolyum bromür) ve raportör gen tahlilleri gibi yöntemlerle yapılan bu çalışmalar, civanperçeminin potansiyel kanser tedavisindeki rolünü daha iyi anlamamıza yardımcı olmaktadır (Yu ve diğ. 2022). *A. millefolium* çiçeğinden elde edilen yeni bir guaianolid olan Achillinin A'nın, A549 hücre hattı üzerinde gösterdiğini potansiyel antiproliferatif aktivite, bilimsel araştırmalarda dikkat çekici bulgular arasında yer almaktadır. Bu bileşik, 2 $\beta$ ,3 $\beta$ -epoksi-1 $\alpha$ ,4 $\beta$ ,10 $\alpha$ -trihidroksiguai-11(13)-en-12,6 $\alpha$ -olide olarak tanımlanmış ve özellikle A549 akciğer kanser hücreleri üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Yapılan çalışmalar, Achillinin A'nın yarı maksimal inhibitör konsantrasyonu (IC<sub>50</sub>) değerlerinin A549, RERF-LC-KJ ve QG-90 hücre hatları için sırasıyla 5,8  $\mu$ M, 10  $\mu$ M ve 0,31  $\mu$ M olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, *A. millefolium*'un geleneksel tıpta uzun zamandır kullanılmasının yanı sıra, modern tıbbi uygulamalarda da potansiyel bir değere sahip olabileceğini göstermektedir. Ayrıca bu tür bileşiklerin kanser tedavisinde yeni terapötik ajanlar olarak geliştirilme potansiyeli taşıdığına dair umut verici işaretler sunmaktadır (Li ve diğ. 2011). Yapılan başka bir çalışmada, BALB/c fareler üzerinde Ehrlich solid tümörü oluşturulmuş ve *A. millefolium* ekstresinin etkileri incelenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre yüksek dozda (400 mg/kg) civanperçemi ekstresi alan grup histolojik olarak olumlu sonuçlar göstermiş ancak tümör büyüklüğü, hacmi ve ağırlığı üzerinde anlamlı bir etki gözlemlenmemiştir (Bağcı Uzun ve diğ. 2022). Bu

bulgular, akciğer kanseri tedavisinde civanperçeminin potansiyel kullanımı hakkında umut verici olmakla birlikte, insanlar üzerindeki etkinliğini ve güvenliğini belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

100'den fazla türü bulunan *Achillea* cinsine ait bitkiler, uzun bir süredir çeşitli geleneksel tıp uygulamalarında kullanılmaktadır (Khazneh ve diğ. 2010). Bu bitkilerin içerdiği 141 farklı fitokimyasal bileşen, hepatoprotektif, antispazmodik, antiviral, antikanser, antienflamatuvar, yara iyileştirici, antioksidan, antidiyabetik, esterojenik, antispermatojenik, antiülser, antimikrobiyal gibi çeşitli etkilere sahiptir (Candan ve diğ. 2003; Yaeesh ve diğ. 2006; Saeidnia ve diğ. 2011; Moradi ve diğ. 2013; Tadić ve diğ. 2017; Hosseini ve diğ. 2019; Papakosta ve diğ. 2020; Salehi ve diğ. 2020; Tilwani ve diğ. 2022). Klinik çalışmalar, *Achillea*'nın multiple skleroz (MS), ülseratif kolit (UK), epizyotomi yarası, primer dismenore, oral mukozit gibi çeşitli rahatsızlıklara karşı potansiyelini göstermiştir (Jenabi ve Fereidoony 2015; Miranzadeh ve diğ. 2015; Hajhashemi ve diğ. 2018; Ayoobi ve diğ. 2019; Salehi ve diğ. 2020; Mohamed ve diğ. 2021). *Achillea* türleri özellikle kanser tedavisinde potansiyel bir fitokimyasal kaynak olarak değerlendirilen, Türkiye'de geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılan bir bitkidir (Bali ve diğ. 2015; Tian ve Zang 2015; Ashtiani ve diğ. 2017; Mouhid ve diğ. 2019; Rezai ve diğ. 2019; Abdalla ve diğ. 2020; Papakosta ve diğ. 2020; Gaweł-Bęben ve diğ. 2020; Sargazi ve diğ. 2020; Alshuail ve diğ. 2022; Ayan ve diğ. 2022; Break ve diğ. 2021; Alasmari 2024). Akciğer kanseri, dünya genelinde en ölümcül kanser türlerinden biri olarak kabul edilmekte ve bu nedenle kanser tedavisinde yeni ve etkili terapötik seçeneklerin geliştirilmesine katkıda bulunabilecek bileşiklerin tanımlandığı çalışmalar büyük önem arz etmektedir. Bu çalışmalar akciğer kanseri tedavisinde bitkisel terapilerin potansiyelini ortaya koymakta ve bu alanda gelecekte yapılacak araştırmalar için bir temel oluşturmaktadır. *Achillea alimeana*, bu cinsin yeni tanımlanmış bir türü olup (Semiz ve diğ. 2022) biyolojik aktiviteleri hakkında henüz yeterli bilimsel veri bulunmamaktadır.

Bu çalışmada *A. alimeana*'nın insan akciğer kanseri hücre hatlarında olası antikanser etkisinin moleküler mekanizmalarının araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmanın, *A. alimeana*'nın biyolojik aktivitelerini ve potansiyel tıbbi kullanımlarını gözler önüne seren ilk çalışma olduğu gözler önünde bulundurulduğunda türün

korunması ve sürdürülebilir kullanımı için oldukça önemli bir mihenk taşı olacağı açıktır.

## 1.1 Kanser

Kanser, genetik düzeyde meydana gelen değişikliklerin bir sonucu olarak ortaya çıkan ve ilerleyen bir hastalıktır (Wang 2016). Bu değişiklikler, onkogenlerin aktive olması, tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybetmesi, apoptoz mekanizmalarını düzenleyen genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler ve DNA hasarını onaran mekanizmalardaki bozulmalar şeklinde olabilir (Pedraza-Fariña 2006; Chow 2010; Lee ve Muller 2010).

Genetik mutasyonlar, bazı durumlarda kalıtsal olarak mevcut olup kansere yatkınlık yaratabilirken, diğer durumlarda ise hücresel düzeyde dış etkenlerle tetiklenerek hücrenin bölünme kapasitesinde değişikliklere yol açar ve neoplastik dönüşümü tetikleyebilir. Bu süreç, hücrenin kontrolsüz şekilde bölünmesine ve tümör oluşumuna neden olur (Shlyakhtina ve diğ. 2021).

Kanserin gelişimi, genetik ve çevresel faktörlerin karmaşık etkileşimi sonucunda meydana gelir ve bu süreçte birçok genetik ve moleküler mekanizma rol oynar (Virolainen ve diğ. 2023). Hücrelerde görülen genetik değişiklikler, kanser gelişiminde önemli bir rol oynar ve bu değişiklikler hücrelerin davranışını altı temel mekanizma ile etkiler. İlk olarak, hücreler büyüme faktörü sinyallerine ihtiyaç duymadan kendi kendine çoğalabilir. İkinci olarak, normalde büyümeyi engelleyen sinyallere direnç gösterebilirler. Üçüncüsü, programlanmış hücre ölümü olan apoptoz mekanizmasını devre dışı bırakabilirler. Dördüncü olarak, hücreler normal sınırlarını aşarak sürekli bölünebilir hale gelebilir. Beşinci mekanizma, tümörün beslenmesini sağlayan yeni kan damarlarının oluşumunu içeren anjiyogenezdır. Altıncı ve son olarak, kanser hücreleri çevre dokulara yayılabilir ve vücudun diğer bölgelerine metastaz yapabilir. Bu altı mekanizma, kanser araştırmalarında temel oluşturur ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde kritik öneme sahiptir (Hanahan ve Weinberg 2011).

Bu değişimler, hücre metabolizması ve proliferasyonunda rol oynayan sinyal iletim yollarındaki değişikliklerle gerçekleşir. Normal koşullarda, hücre döngüsü,

DNA hasarı oluştuğunda tamir mekanizmaları tarafından onarılanaya kadar durdurulur. Eğer hasar onarılamıyorsa, hücre apoptoza yönlendirilir ve böylece hasarlı hücrenin ortadan kaldırılması sağlanır (Gorgoulis ve diğ. 2018). Ancak bir hücre kanserli hücreye dönüşürken, DNA hasarı sonrasında hücre döngüsü kontrolü ve/veya DNA hasarı tamir mekanizmaları etkin bir şekilde çalışmadığında, hasar onarılamayabilir ve hücre hasarlı bir şekilde proliferasyona devam edebilir. Bu süreç, hücre sayısının genetik düzenlenmesi ve homeostazın bozulmasıyla ilişkilidir ve kanserin temelinde yatan genetik nedenler, hücre çoğalmasını ve ölümünü kontrol eden mekanizmaların mutasyonlarıdır. Kanser, kontrolsüz büyüyen ve yayılan kötü huylu tümörlerdir ve bu süreçte tümör baskılayıcı genler, DNA onarımı ve apoptoz gibi kritik mekanizmalar önemli rol oynar (Alhmoud ve diğ. 2020).

### **1.1.1 Akciğer Kanseri**

#### **1.1.1.1 Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi**

Akciğer kanseri, dünya çapında en yaygın kanser türlerinden biri olarak kabul edilir ve her yıl tanı konulan vaka sayısında artış yaşanmaktadır. Erkeklerde en yaygın ölüm nedeni olan kanser türü, kadınlarda ise meme kanserinden sonra ikinci en yüksek ölüm oranına sahip kanser türüdür. 2018 yılı küresel verileri, akciğer kanserinin 2.093.900 yeni vaka ile en sık teşhis edilen kanser olduğunu ve aynı şekilde küresel olarak 1.761.000 ölümle en yaygın kanser ölüm nedeni olduğunu göstermektedir (Oliver 2022). 2022 yılında kaydedilen verilere göre, 2.480.301 kişi akciğer kanseri tanısı almış ve ölüm sayısı 1.817.172'ye yükselmiştir (Bray ve diğ. 2024). Bu, küresel sağlık alanında önemli bir veri noktasıdır ve kanser araştırmaları için kritik bir öneme sahiptir.

#### **1.1.1.2 Akciğer Kanseri Etiyolojisi**

Akciğer kanseri, çeşitli etkenlerin bir araya gelmesiyle gelişebilen karmaşık bir hastalıktır. En yaygın bilinen risk faktörü sigara kullanımınıdır ve kanser vakalarının büyük bir kısmından sorumludur (Bade ve Dela Cruz 2020). Yaş,

cinsiyet ve etnik köken gibi demografik özellikler hastalığın görülme sıklığını etkileyebilir (Cranford ve diğ. 2023; Çen ve diğ. 2023). Mesleki maruziyetler ve çevresel kanserojenler, özellikle asbest, radon ve bazı ağır metaller riski artırabilir (Shankar ve diğ. 2019; Buttice ve diğ. 2023). Beslenme alışkanlıkları ve diyet de kanser gelişiminde rol oynayabilirken, sosyoekonomik durum ve yaşam tarzı faktörleri üzerinden etkili olabilir (Andersen ve diğ. 2023). Daha önce geçirilmiş akciğer hastalıkları olan bireylerde de akciğer kanseri riskinde artış gözlemlenmiştir (Cho ve diğ. 2023). Son olarak, genetik yatkınlık, ailede akciğer kanseri öyküsü olan kişilerde hastalığa yakalanma olasılığını yükseltebilir (Cao ve diğ. 2016).

Sigara kullanımı, akciğer kanseri gelişimindeki en kritik risk faktörlerinden biridir. Yirminci yüzyılın başlarında, akciğer kanseri oldukça nadir bir hastalıkken, sigara tüketimi ile bu kanser türünün ilişkisi kurulmuş ve zamanla bu ilişki daha da netleşmiştir (Thun 2010). Amerika Birleşik Devletleri'nde, sigara tüketiminin artmasıyla birlikte akciğer kanseri vakalarının ve ölüm oranlarının yükseldiği gözlemlenmiştir. Erkekler, özellikle 20. yüzyılın başlarında ve II. Dünya Savaşı sırasında sigaraya başlamış, savaş sonrası dönemde ise kadınlar arasında sigara kullanımı yaygınlaşmıştır (Lund ve diğ. 2009). 1964 yılında yayımlanan ve sigara içmenin akciğer kanseri üzerindeki etkilerini belgeleyen rapor sonrasında, tütün tüketimi önemli ölçüde azalmıştır. Bu rapor, sigara içmenin akciğer kanserine yol açtığına dair kesin kanıtlar sunmuş ve toplum sağlığı üzerinde büyük etkiler yaratmıştır. Tütün kullanımının azaltılması, akciğer kanseri vakalarının önlenmesinde kritik bir adım olarak görülmektedir (Ruegg 2015). Sigara içmenin, hiç içmeyen bir bireye kıyasla akciğer kanseri riskini yaklaşık 20 kat artırdığı bilinmektedir. Bu risk, sigara tüketim sıklığı ile doğru orantılıdır (Peto 2012; Alberg ve diğ. 2013). Sigara içme alışkanlıklarını ve demografik bilgileri temel alan birçok internet tabanlı akciğer kanseri risk değerlendirme modeli bulunmaktadır. Bu modeller, bireylerin geçmiş sigara kullanımı ve içme yoğunluğuna dayanarak kişisel risk değerlendirmesi yapmalarına olanak tanır (Amos ve Bostock 2007; Brenner ve diğ. 2011; Church ve diğ. 2014; Chen ve diğ. 2015; Hveem ve diğ. 2018).

Pasif içicilik, akciğer kanserine neden olabilen, dolaylı bir kanserojen maruziyet biçimidir. Tütün dumanı, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, nitrozaminler ve aromatik aminler gibi çeşitli kanserojen maddeler içerir (Hang ve diğ. 2019). Bu

maddeler, sigara içmeyen bireylerin bile maruz kaldığı zaman sağlıkları üzerinde olumsuz etkilere sahip olabilir. Araştırmalar, pasif içiciliğin, nikotin ve onun metaboliti olan kotininin yanı sıra, tütün dumanındaki kanserojen maddelerin DNA'ya bağlanarak oluşturduğu eklentilerin, sigara içmeyen kişilerin idrarında dahi tespit edilebildiğini göstermektedir (Hecht ve diğ. 2013). Bu durum, pasif içiciliğin potansiyel sağlık risklerini ve tütün dumanının zararlarını ortaya koymaktadır. 2018 yılında yayımlanan ve 12 ayrı çalışmayı değerlendiren bir meta-analiz, pasif içicilik yoluyla sigara dumanına maruz kalan kişilerin, hiç sigara içmemiş bireylere göre akciğer kanseri riskinin %25 oranında arttığını ortaya koymuştur (Kim ve diğ. 2018).

Akciğer kanserinde demografik özellikler hastalığın görülme sıklığı ve seyri üzerinde etkili olabilmektedir. Erkeklerde akciğer kanseri görülme oranı, kadınlara kıyasla daha yüksektir (Gee ve Yendamuri 2024). Akciğer kanseri, daha çok orta ve ileri yaş gruplarında görülse de son zamanlarda genç bireyler arasında da artan bir oranda tespit edilmektedir. Araştırmalar, genç hastalarda akciğer kanserinin, sigara içme öyküsü gibi belirli risk faktörleriyle ilişkili olduğunu ve bu hastalarda genel sağkalım süresinin sigara içmeyenlere göre daha kısa olabileceğini göstermektedir (Bailey ve diğ. 2001). Ayrıca etnik grupların, genetik yatkınlıklar ve maruz kalınan çevresel faktörler nedeniyle akciğer kanserine daha yüksek oranda yakalanabileceğini göstermektedir (Cranford ve diğ. 2023).

Mesleki maruziyetler, akciğer kanserlerinin yaklaşık %5 ile %10'unun nedeni olarak kabul edilir (Albin ve diğ. 1999; Concha-Barrientos ve diğ. 2005; Dela Cruz ve diğ. 2011; Alberg ve diğ. 2013). Bu maruziyetler arasında, asbest en yaygın bilinenidir ve birçok meslek grubunu etkilemiştir. Asbeste maruziyet, akciğer kanserinin etiyolojisinde önemli bir faktördür ve hem doğrudan hem de dolaylı yollarla karmaşık mekanizmaları etkiler. Bu etkiler, oksidatif stresin artması, kronik enflamasyon, genetik ve epigenetik düzeyde değişiklikler, hücre zehirlenmesi ve fibrozis gibi çeşitli biyolojik süreçleri içerir (Liu ve diğ. 2013; Zolondick ve diğ. 2021). Ayrıca, asbest maruziyeti ve tütün kullanımının akciğer kanseri riski ve ölüm oranları üzerinde sinerjik etkileri olduğu gözlemlenmiştir (Hammond ve diğ. 1979; Ambrosini ve diğ. 2006; Case 2006). Bu etkileşimler, akciğer kanseri gelişiminde önemli faktörler olarak kabul edilmektedir. Asbest dışında Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansının "insanlar için kanserojen" olarak sınıflandırdığı Grup 1

kanserojenleri arasında arsenik, berilyum, kadmiyum, krom ve dizel egzoz partikülleri bulunmaktadır (Field ve Withers 2012). Bu maddelere maruziyet, özellikle alüminyum üretimi, kömür gazlaştırma, kok üretimi, yeraltı hematit madenciliği, demir ve çelik dökümü, boyama ve kauçuk üretimi gibi belirli meslek gruplarında daha yaygındır. Bu tür maruziyetler, akciğer kanseri riskini artırabilir (Croft ve diğ. 2018).

Radon, toryum ve uranyumun radyoaktif bozunması sonucu doğal olarak oluşan, görünmez, kokusuz ve tatsız bir gazdır. Toprakta bulunan bu gaz, evlerin içine sızarak insan sağlığı için risk oluşturabilir. Dünya genelinde, akciğer kanserlerinin %3 ile %14'ü radon maruziyetine bağlanmaktadır (Riudavets ve diğ. 2022). Yayımlanan meta-analizler, iç mekanlardaki radon maruziyetinin, hiç sigara içmemiş bireylerde bile akciğer kanseri riskini önemli ölçüde artırabileceğini göstermektedir (Lubin ve Boice 1997; Zhang ve diğ. 2012; Garzillo ve diğ. 2017; Riudavets ve diğ. 2022).

Epidemiyolojik çalışmalar, beslenme alışkanlıklarının kanser riski üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Marino ve diğ. 2024). Özellikle, bitkisel gıdalarda bulunan fitokimyasalların akciğer kanseri riskini azaltabileceği belirtilmiştir (Rudzińska ve diğ. 2023). Ayrıca vitamin A eksikliğinin solunum sistemi epitelinde skuamöz metaplaziye yol açtığı ve bu durumun akciğer kanseri riskini artırabileceği belirtilmiştir (Schaefer-Prokop ve Elicker 2019). Bulaşıcı olmayan solunum hastalıklarının, akciğer kanseri riskini artırabileceği bilinmektedir. Yapılan meta-analiz çalışmaları, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), amfizem veya kronik bronşit gibi hastalıkların, akciğer kanseri riskini 2 ile 3 kat arasında artırabileceğini göstermiştir (Brenner ve diğ. 2011; Brenner ve diğ. 2012; Wang ve diğ. 2012). Uluslararası Akciğer Kanseri Konsorsiyumu tarafından yapılan bir analiz ise, amfizem öyküsü olan bireylerde akciğer kanseri riskinin 2,44 kat daha fazla olduğunu ortaya koymuştur (Brenner ve diğ. 2012). 2012 yılında Uluslararası Akciğer Kanseri Konsorsiyumu tarafından yapılan 16 çalışmanın birleşik analizi, astım ile akciğer kanseri riski arasındaki ilişkinin mutlaka nedensel olmayabileceğini ortaya koymuştur. Bu sonuca varılmasının nedeni, astım vakalarındaki artışın, özellikle teşhisten sonraki ilk iki yıl içinde küçük hücreli ve skuamöz hücreli akciğer kanserlerinde gözlemlenmesi ve bu ilişkinin sigara içmeyenlerde daha zayıf

olmasıdır (Rosenberger ve diğ. 2012). Ancak, 2017’de 16 milyonu aşkın kişiyi kapsayan 18 çalışmanın değerlendirildiği bir meta-analiz, astımın akciğer kanseri riskini %44 oranında artırdığını ve sigara içmeyenlerde bu riskin %28 olduğunu belirlemiştir (Qu ve diğ. 2017). Bu bulgular, solunum yolu hastalıklarının ve özellikle sigara kullanımının, akciğer kanseri gelişimi üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılması açısından önemlidir.

Genetik faktörlerde, akciğer kanseri riskini etkileyebilmektedir. 2004 yılında, Akciğer Kanseri Genetik Epidemiyolojisi Konsorsiyumu, 6q23–25 kromozom bölgesinde akciğer kanseri riskini artıran önemli bir genetik duyarlılık lokusu keşfetmiştir (Bailey-Wilson ve diğ. 2004). Bu keşif, genom çapında ilişkilendirme çalışmalarının (GWAS) başlamasından yaklaşık 17 yıl sonra gelmiştir ve bu çalışmalar, insan hastalıkları ile kalıtsal tek nükleotit polimorfizmleri (SNP) arasındaki bağlantıların anlaşılmasını sağlamıştır. GWAS çalışmaları, farklı kanıt güçleriyle akciğer kanseri duyarlılığına etki eden genetik faktörleri başarıyla tanımlamıştır. Bu faktörler cinsiyet, etnik köken, sigara içme durumu ve histolojik alt tipler gibi belirli alt gruplara göre detaylandırılmıştır (Long ve diğ. 2023).

### 1.1.1.3 Akciğer Kanseri Histopatolojisi

DSÖ, 1967 yılında akciğer kanserinin sınıflandırılması için temel bir sistem yayınlamıştır. Bu sınıflandırma, sonraki yıllarda (1982, 1999, 2004 ve 2015’te) güncellenmiştir. Ancak, morfolojinin kullanılması, immünohistokimya ile desteklenmesi ve moleküler tekniklerin kullanılmasındaki değişiklikler nedeniyle, DSÖ 2021 yılında bu sınıflandırmayı yeniden gözden geçirmiştir. Nicholson ve arkadaşları tarafından 2022 yılında yapılan bu sınıflandırma Tablo 1.1’de verilmiştir (Nicholson ve diğ. 2022).

**Tablo 1.1:** DSÖ’ye göre akciğer kanserlerinin patolojik sınıflandırılması

<b>1. Epitel Tümörler</b>
<b>A. Papillomlar</b>
Skvamöz hücreli papillom
Skvamöz hücreli ters papillom
Glandüler papillom
Karışık skuamöz hücreli ve glandüler papillom

<b>B. Adenomlar</b>
Sklerozan pnömositoma
Alveolar adenom
Papiller adenom
Bronşiyoler adenom / mukonodüler papiller tümör
Mukoza kistadenom
Mukoza bezi adenomu
<b>C. Öncü glandüler lezyonlar</b>
Atipik adenomatöz hiperplazi
1. Adenokarsinom <i>in situ</i>
Adenokarsinom <i>in situ</i> , müsinöz olmayan
Adenokarsinom <i>in situ</i> , müsinöz
<b>D. Adenokarsinomlar</b>
1. Minimal invaziv adenokarsinom
Minimal invaziv adenokarsinom, müsinöz olmayan
Minimal invaziv adenokarsinom, müsinöz
2. İnvaziv müsinöz olmayan adenokarsinom
Lepidik adenokarsinom
Asiner adenokarsinom
Papiller adenokarsinom
Mikropapiller adenokarsinom
Katı adenokarsinom
<b>E. İnvazif müsinöz adenokarsinom</b>
Karışık invaziv müsinöz ve müsinöz olmayan adenokarsinom
Kolloid adenokarsinom
Fetal adenokarsinom
Adenokarsinom, enterik tip
Adenokarsinom
<b>F. Skuamöz öncü lezyonlar</b>
<i>In situ</i> skuamöz hücreli karsinom
Hafif skuamöz displazi
Orta derecede skuamöz displazi
Şiddetli skuamöz displazi
<b>G. Skuamöz hücreli karsinomlar</b>
Skuamöz hücreli karsinom
Skuamöz hücre karsinoması, keratinize
Skuamöz hücre karsinoması, keratinize olmayan
Bazaloid skuamöz hücreli karsinom
Lenfoepitelyal karsinom
<b>H. Büyük hücreli karsinomlar</b>
Büyük hücreli karsinom
<b>I. Adenoskuamöz karsinomlar</b>
Adenoskuamöz karsinom
<b>İ. Sarkomatoid karsinomlar</b>
Pleomorfik karsinom

Dev hücreli karsinom
İğ hücreli karsinom
Pulmoner blastoma
Karsinosarkom
<b>J. Diğer epitelyal tümörler</b>
NUT karsinomu
Torasik SMARCA4 eksikliği farklılaşmamış tümör
<b>K. Tükürük bezi tipi tümörler</b>
Pleomorfik adenom
Adenoid kistik karsinom
Epitelyal-miyoepitelyal karsinom
Mukoepidermoid karsinom
Hyalinize edici berrak hücreli karsinom
Miyoepitelyoma
Miyoepitelyal karsinom
<b>2. Akciğer nöroendokrin neoplazmaları</b>
<b>A. Öncü lezyon</b>
Yaygın idiyopatik nöroendokrin hücre hiperplazi
<b>B. Nöroendokrin tümörler</b>
Karsinoid tümör, nöroendokrin tümör
Tipik karsinoid/nöroendokrin tümör, derece 1
Atipik karsinoid/nöroendokrin tümör, derece 2
<b>C. Nöroendokrin karsinomlar</b>
Küçük hücreli karsinom
Kombine küçük hücreli karsinom
Büyük hücreli nöroendokrin karsinom
Birleşik büyük hücre nöroendokrin karsinom
<b>3. Ektopik doku tümörleri</b>
Melanom
Menenjiyom
<b>4. Spesifik mezenkimal akciğer tümörleri</b>
Pulmoner hamartom
Kondrom
Diffüz lenfanjiomatoz
Plöröpulmoner blastoma
İntimal sarkom
Konjenital peribronşiyal miyofibroblastik tümör
Pulmoner miksoid sarkom EWSR1-CREB1 füzyonu ile
<b>A. PEKomatöz tümörler</b>
Lenfanjiyoleiyomiyomatozis
PEKom, iyi huylu
PEKoma, kötü huylu
<b>5. Hematolenfoid tümörler</b>
MALT lenfoma
Diffüz büyük B hücreli lenfoma, NOS

Lenfomatoid granülomatoz
Lenfomatoid granülomatoz, 1. derece
Lenfomatoid granülomatoz, 2. sınıf
Lenfomatoid granülomatoz, 3. sınıf
İntravasküler büyük B hücreli lenfoma
Langerhans hücreli histiyositoz
Erdheim-Chester hastalığı

Akciğer kanserlerinin çok çeşitli türleri olmasına karşılık, bunların yaklaşık %15'i KHAK olarak bilinir. KHDAK ise tüm vakaların yaklaşık %85'ini oluşturur (Basumallik ve Agarwal 2023). Adenokarsinomlar %32-40 arasında bir orana sahiptir. Skuamöz karsinomlar %25-30'lük bir yüzdeyle temsil edilmektedir. Büyük hücreli tümörler ise %8-16'luk bir kısmı teşkil eder (Sudhakar ve diğ. 2019).

#### 1.1.1.4 Akciğer Kanserinin Moleküler Mekanizması

Solunum yolu mukozası, kanserojen maddelerle uzun süreli temas sonucu çeşitli değişikliklere uğrar. Bu kanserojenler, hücrelerde bulunan proteinler, lipidler ve DNA ile etkileşime girerek genetik materyalde hasar oluşturabilir. Kronik maruziyet, hücre bölünmesini düzenleyen onkogenlerin (örneğin c-Myc ve RAS genlerinin) aktivasyonuna ve hücre büyümesini engelleyen tümör baskılayıcı genlerin, RB ve P53 gibi, inaktivasyonuna yol açabilir. Kanserler, akciğer kanseri de dahil, sıklıkla onkogenlerin aktive olması veya tümör supresör genlerin devre dışı bırakılmasıyla tanımlanır. Bu genetik olaylar, kanserin ilerlemesinde hayati öneme sahiptir. Onkogenlerin aşırı aktive olması hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına yol açarken, tümör supresör genlerin işlev kaybı hücre büyümesini durdurma yeteneğini kaybettirir, bu da kanser gelişimini tetikler (Fong ve diğ. 2003; Larsen ve Minna 2011).

Kromozom 17p13 üzerinde yer alan P53 geni, hasar görmüş DNA bölgelerini tanıyan ve bu bölgelere bağlanarak onarımını veya apoptozu tetikleyen bir nükleer fosfoprotein olan P53'ü kodlar (Mogi ve Kuwano 2011). Bu protein aynı zamanda birçok farklı genin ifadesini düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. DNA hasarı veya kanserojen stres durumunda, P53 aktivasyonu hücre döngüsünün durmasına ve hasarın onarılmasına ya da hücrenin ölümüne yol açar. Akciğer kanserinde, P53

geninin inaktivasyonu, özellikle KHAK'ın %90'ında ve KHDAK'ın yaklaşık %65'inde görülen önemli bir genetik anormalliktir (Mogi ve Kuwano 2011; Wang ve diğ. 2023). P53'teki inaktive edici mutasyonlar, KHAK'ın büyük bir çoğunluğunda rapor edilmiştir (D'Amico ve diğ. 1992). Diğer yandan, KHDAK vakalarının yaklaşık yarısında P53 mutasyonları veya protein birikimi gözlemlenmiş, bu durum genellikle adenokarsinomlardan ziyade skuamöz hücreli karsinomlarda ve yüksek tümör evresi, derecesi ve erkek cinsiyeti ile ilişkilendirilmiştir. Sigara içme alışkanlığı ve çevresel tütün dumanına maruz kalma, P53 mutasyonları ile güçlü bir ilişki gösterir ve sigara içenlerdeki mutasyon spektrumu, içmeyenlere göre farklılık gösterir. Sigara ile ilişkili kanserlerde, polisiklik aromatik hidrokarbonların etkisiyle Guanin'den (G) Timin'e (T) dönüşümler daha sık görülürken, sigara içmeyenlerde CG dinükleotitlerinde G'den Adenin'e (A) dönüşümler daha yaygındır (Pfeifer ve diğ. 2002; Rivlin ve diğ. 2011). 74 çalışmanın meta-analizi, protein ekspresyonu ya da mutasyon analizi yoluyla saptanan anormal P53 proteininin, KHDAK için kötü bir prognostik gösterge olduğunu ortaya koymuştur (Steels ve diğ. 2001). Ayrıca, P53 genindeki değişikliklerin, kanser tedavisine direnç gelişimi ile bağlantılı olduğu belirlenmiştir (Mogi ve Kuwano 2011).

KRAS, insanlarda bulunan RAS proto-onkogen ailesinin önemli bir üyesidir ve hücre büyümesi, farklılaşması ve hayatta kalması için gerekli olan sinyal yollarını düzenleyen bir G-proteini ifade eder (Jancík ve diğ. 2010). KRAS mutasyonları, EGFR mutasyonları ile birlikte görülmez (Jang ve diğ. 2009), bu da onların kanserde önemli mutasyonlar olarak özel bir rol oynadığını gösterir ancak bazı nadir durumlarda birlikte bulunabilirler (Schmid ve diğ. 2009). Yapılan bir meta-analiz, KRAS mutasyonu taşıyan tümörlerin, EGFR tirozin kinaz inhibitörlerine (TKI) direnç gösterdiğini ortaya koymuştur (Linardou ve diğ. 2008) çünkü bu mutasyonlar EGFR sinyal yolunun altında yer alan yolların sürekli aktive olmasına neden olur. Akciğer kanserinde KRAS mutasyonlarının yüksek oranda bulunması, bu geni potansiyel bir terapötik hedef yapar fakat şimdiye kadar yapılan klinik çalışmalar genellikle başarısız olmuştur. KRAS genindeki aktivasyon mutasyonları, özellikle akciğer adenokarsinomlarında en sık rastlanan onkogenik değişiklikler arasındadır (Reita ve diğ. 2022).

EGFR, KHDAK gibi birçok tümörün gelişiminde önemli bir rol oynar. Bu transmembran tirozin kinaz (TTK), bir hücre dışı ligand bağlama alanına ve bir hücre

içi tirozin kinaz (TK) bölgeye sahiptir (Prenzel ve diğ. 2001). Ligandın, yani EGF'in bağlanması, EGFR'nin diğer aile üyeleriyle reseptör dimerizasyonunu tetikler ve bu da TK alanının aktivasyonuna yol açar (Scagliotti ve diğ. 2004). Aktive olan EGFR, PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MAPK ve JAK/STAT gibi çeşitli sinyal yollarını kullanarak hücre içi sinyal iletimini başlatır. Bu sinyal yolları, hücre büyümesi, proliferasyon ve hayatta kalma gibi süreçleri düzenleyerek tümör gelişimine katkıda bulunur (Wee ve diğ. 2017).

Akciğer kanseri, EGFR mutasyonları açısından incelendiğinde, bu mutasyonların büyük çoğunluğu adenokarsinomlarda bulunur (Kosaka ve diğ. 2004; Shigematsu ve diğ. 2005; Tam ve diğ. 2006; Li ve diğ. 2008; Wu ve diğ. 2008). EGFR mutasyonları, kadınlar, gençler ve sigara içmeyen bireyler arasında daha yaygın olarak tespit edilmektedir (Kosaka ve diğ. 2004; Shigematsu ve diğ. 2005; Tokumo ve diğ. 2005; Tam ve diğ. 2006; Wu ve diğ. 2008). Skuamöz hücreli karsinomlarda EGFR mutasyonlarına çok nadiren rastlanır ancak bazı çalışmalar bu tür kanserlerde de EGFR mutasyonlarının varlığını göstermiştir (Ohtsuka ve diğ. 2007; Jin ve diğ. 2021). Örneğin, 188 skuamöz hücreli karsinom örneğinin geniş çaplı genomik analizinde, iki vakada L861G mutasyonu tespit edilmiştir (Cooper ve diğ. 2013).

## 1.2 Asteraceae Familyası

3.000 yıldan fazla bir süredir hem beslenme hem de tıbbi kullanım için yetiştirilen bitki türlerini içeren Asteraceae familyası, genellikle ayçiçeği familyası olarak bilinir ve dünya çapında 1.600'den fazla cins ve 25.000'den fazla tür barındırır. (Rolnik ve Olas 2021). Papatya (*Chamaemelum nobile*), hindiba (*Cichorium intybus*), marul (*Lactuca sativa*), yıldız çiçeği (*Dahlia pinnata*) ve karahindiba (*Taraxacum officinale*) en çok bilinen taksonlarıdır. Bu türler dünya genelinde yaygın bir şekilde bulunur fakat en yoğun olarak subtropikal ve düşük ılıman enlemlerin kurak ve yarı kurak iklimlerde rastlanır (Achika ve diğ. 2014).

Bu familyadaki bitkilerin çoğu, tüylü ve aromatik yapraklara ve gövdenin üst kısmında küçük, renkli çiçeklerden oluşan düz kümelere sahip olma eğilimindedir; bu da onların bahçe bitkisi olarak kullanılmasına neden olur (Achika ve diğ. 2014).

Çoğu türün dekoratif kullanımının yanı sıra tedavi edici uygulamaları da vardır. Bu familyanın üyeleri, antioksidan, antienflamatuvar ve antimikrobiyal aktiviteler gibi çeşitli terapötik özelliklere sahiptir ve geleneksel tıpta binlerce yıldır kullanılmaktadır (Chagas-Paula ve diğ. 2015; Anvari ve Jamei 2018; Piątkowska ve diğ. 2022; Gou ve diğ. 2023; Yousseu Nana ve diğ. 2023). Örneğin hem karahindiba hem de papatya güçlü antienflamatuvar ve idrar söktürücü aktivitelere sahiptir (Rolnik ve Olas ve diğ. 2022). *Achillea kellalensis*'in su bazlı özütü, sıçanlarda yara iyileşmesini hızlandıran önemli bir etkinlik sergilemiştir. Bu tedavi süreci, flavonoid bileşiklerinin etkisi sayesinde, kontrol gruplarına göre sıçanların daha çabuk iyileşmesini sağlamıştır. Bu sonuçlar, *A. kellalensis*'in potansiyel terapötik kullanımlarını ve flavonoidlerin yara iyileşmesindeki rolünü vurgulamaktadır (Rolnik ve Olas 2022).

Bu familyadaki pek çok bitki, karakteristik aromalarından sorumlu olan uçucu yağlar içerir. Bu yağlar genellikle parfümlerde, kozmetik ürünlerde ve diğer kokularda kullanılır. Seskiterpen laktonlar birçok Asteraceae familyası üyesinde bulunan ve bunların farmakolojik etkilerinden sorumlu olan başka bir bileşik sınıfıdır. Bu bileşiklerin de antienflamatuvar, antimikrobiyal ve antikanser özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Ivanescu ve diğ. 2015; Salazar-Gómez ve diğ. 2020).

Asteraceae familyası, farmakolojik olarak aktif birçok madde sınıfını içeren türler bakımından oldukça zengindir. Bu familyanın üyeleri bitkisel tedavilerin geliştirilmesinde önemli bir rol oynayabilir ve yeni ilaç keşifleri için umut verici bir kaynak olabilir.

### 1.2.1 *Achillea* cinsi

*Achillea* cinsi, Asteraceae familyasına dahil olup, ılıman bölgelerdeki kuru ve yarı kuru alanlarda yetişen yaklaşık 130 türü barındırır (Saeidnia ve diğ. 2011). Geleneksel kullanımlarda, *Achillea*'nın toprak üstü kısımları spazmodik gastrointestinal ve hepatobiliyer bozukluklar, kanamalar, zatürre, romatizmal ağrılar ve yara iyileşmesi gibi durumlar için infüzyon ve kaynatma şeklinde kullanılmıştır (Nemeth ve Bernath 2008; Barda ve diğ. 2021). *Achillea* türleri, antimikrobiyal, antioksidatif, antiproliferatif ve antikanser etkiler göstererek bilim dünyasının

dikkatini çekmiştir (Nemeth ve Bernath 2008; Barda ve diğ. 2021; Villalva ve diğ. 2022). Klinik araştırmalarda da MS, UK ve oral mukozit gibi durumlar için potansiyel tedavi yöntemleri arasında yer almaktadır (Ayoobi ve diğ. 2019; Salehi ve diğ. 2020). *Achillea* cinsine ait bazı bitkilerden elde edilen ekstreler ve izole edilmiş bileşiklerin antiproliferatif ve sitotoksik etkileri literatürde belgelenmiştir (Csupor-Löffler ve diğ. 2009; Hosseini ve diğ. 2019; Papakosta ve diğ. 2020). *A. millefolium*'un yaprak ve çiçeklerinden elde edilen etanolik ekstreler, insan meme kanseri hücre hatları SK-BR-3 ve MDA-MB-435 ile lösemi hücre hatları U937 ve K562 üzerinde incelenmiştir (Amirghofran ve Karimi 2001). Ayrıca, *A. millefolium*'un metanol ve kloroform ekstrelerinin MCF-7, THP-1, PC-3 ve OVCAR-5 kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri de araştırılmıştır (Bhat ve diğ. 2014). Bu çalışmalar, *A. millefolium* ekstrelerinin söz konusu tüm kanser hücre hatlarına karşı belirgin bir sitotoksik aktivite gösterdiğini göstermiştir. *A. millefolium* çiçeklerinden elde edilen vitexikarpin ve centaureidin bileşikleri meme kanseri ve prostat kanseri hücre hatlarında Achillinin A ise akciğer kanseri hücre hatlarında önemli antiproliferatif aktivite göstermiştir (Li ve diğ. 2011; Huo ve diğ. 2013). *A. millefolium*'dan elde edilen flavonoid bileşik olan kastisin, hücre büyümesini G2/M fazında durdurma etkisine sahiptir. Tübülin bağlayıcı bir ajan olarak işlev gören kastisin, P21 proteininin indüksiyonunu sağlar ve bu durum Cdk1 enziminin inhibisyonu ile birlikte siklin A seviyesinin düşürülmesine yol açar (Haïdara ve diğ. 2006). *A. clavennae*'den izole edilen izosekogaianolid bileşiği, insan U251 ve sıçan C6 glioma hücre hatlarında apoptotik hücre ölümünün indüklenmektedir (Trifunović ve diğ. 2014). *A. wilhelmsii*'nin hidroalkolik ekstresinin prostat kanseri hücrelerinde hTERT onkogeninin ifade düzeyinin inhibisyonu sağlayarak güçlü antiproliferatif ve apoptotik etkiler göstermiştir (Ashtiani ve diğ. 2017). *A. teretifolia* metanol ekstresi prostat kanseri hücrelerinde BAX ve CASP3 gen ekspresyonunun artırarak, BCL2 ekspresyonunun azaltarak önemli bir sitotoksik aktivite sergiledi. Aksine HGF hücrelerinde sitotoksik aktivite gözlenmedi (Bali ve diğ. 2015).

Yapılan araştırmalar, *Achillea* türlerinin bitkisel tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde kritik bir öneme sahip olabileceğini ve yeni ilaçların keşfedilmesi için umut vadeden bir kaynak teşkil edebileceğini göstermektedir. Bu türler,

farmakolojik özellikleri nedeniyle, özellikle doğal bileşenlerin tıbbi potansiyelini ortaya çıkarmada ve hastalıkların tedavisinde yenilikçi yaklaşımlar sunabilir.

### 1.3 Tez Çalışmasının Amacı

Kanser, erken teşhis ve tedavi yöntemlerindeki ilerlemelere rağmen, dünya genelinde önde gelen ölüm nedenleri arasında yer almaya devam etmektedir. Bu durum, bilim insanlarını, kanserin önlenmesi ve tedavisinde yeni yollar aramaya itmiştir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, bitkisel kaynaklı maddelerin kansere karşı koruyucu özellikler taşıdığını göstermiştir. Özellikle, bu maddelerin antioksidatif, antikanserojenik ve antimutajenik etkileri üzerine yoğunlaşmıştır (Desai ve diğ. 2008; Dehelean ve diğ. 2021; Michalak 2022).

Günümüzde, bitkisel kaynaklardan elde edilen pek çok aktif bileşen, dünya genelinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır ve özellikle bazı kanser türlerinin tedavisinde umut verici sonuçlar sunmaktadır. Bu aktif bileşenler, doğal tedavi yöntemleri arasında önemli bir yere sahip olup, modern tıbbın yanı sıra alternatif tıp uygulamalarında da tercih edilmektedir. Bitkisel kökenli bu kimyasallar, kanser hücrelerinin büyümesini engelleme ve onları yok etme potansiyeline sahip olmasıyla bilinir ve bu özellikleri sayesinde, kanser araştırmalarında yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır.

Asteraceae familyasının *Achillea* türleri, potansiyel kanser tedavisi için fitokimyasallar içermesi olasılığı yüksek olduğundan insan sağlığı için önemlidir. *A. alimeana*, bu türler arasında yeni keşfedilmiş bir türdür ve kansere karşı koruyucu etkilerinin mekanizması henüz bilinmemektedir. Bu çalışmada, *A. alimeana*'nın A549 (KRAS mutasyonu) ve H1975 (P53 ve EGFR mutasyonu) KHDAK hücre hatları üzerindeki antikanserojenik etkilerinin ve bu etkilerin mekanizmalarının incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla *A. alimeana* su ekstresinin A549 ve H1975 hücre hatları üzerindeki potansiyel sitotoksik etkileri ve apoptotik etki mekanizmaları, belirli genlerin ekspresyon düzeylerinin incelenmesi yoluyla araştırılmıştır. Bu genler arasında apoptoz yolaklarını düzenleyen BCL2, BAX, CASP8, CASP9, APAF1 ve P53 genlerinin ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir. Bu çalışma, hücre ölümü mekanizmaları olan apoptotik ve nekrotik hücre oranlarının

yanı sıra, P53 yanıt elementinin (P53RE) aktivitesini ve hücrelerin invazyon ve migrasyon kapasitelerini de kapsayacak şekilde tasarlanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, *A. alimeana*'nın alternatif tedavi yöntemleri arasında yer alabilmesi için gerekli antikanserojenik ve apoptotik etki mekanizmalarının aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.



## **2. MATERYAL VE METOT**

### **2.1 MATERYAL**

#### **2.1.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar**

Tez çalışmasında laboratuvarında yer alan laminar flow kabin (Nuair Biological Safety Cabinet Class II model), santrifüj (Sigma, 1-14), CO<sub>2</sub> inkübatörü (NuAire AutoFlow, NU-8500), vorteks (HV-VM-20), otoklav (Hirayama Hiclave, HVE-50), mikroskop (Olympus, CX31), RT-PZR cihazı (Bioneer ExiCycler 96, EXI-05C-1101019), agaroz jel elektroforez aparatı (Thermo, EC-320), UV jel görüntüleme sistemi (Herolab UVT-14M), kuru blok ısıtıcı (Biosan Kuru Blok Termostat, TDB-100), mikropilaka okuyucu (Thermo Scientific Multiskan GO Mikropilaka spektrofotometre, 1510), analitik terazi (Precisa, XB 220A), mikrodalga fırın (SHOV, M7017-P), güç kaynağı (Thermo, EC-250-90), -80°C ultra düşük sıcaklıklı dondurucu (NuAire, NU-99338J), saf su sistemi (Human Power Scholar), ekstraksiyon cihazı (Gerhardt, SOX-416), liyofilizatör (Labconco Freeze Dryer, 7750020), yüksek hızlı soğutmalı santrifüj (Sigma, 3K30), nanodrop (Maestrogen, MN-913), orbital çalkalayıcı (IKA-Werke, RS 10B), buz makinesi (Hoshizaki, FM-120 EE), etüv (Binder BD 115), luminometre (Synergy HTX, BioTek) kullanılmıştır.

#### **2.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar**

Çalışmada kullanılan kimyasallar; tripsin-EDTA (Wisent, 325-043 EL), Dulbecco's Modified Eagle's besiyeri (DMEM) (Gibco, 41966029), Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 besiyeri (Gibco, 21875034), fetal sığır serumu (FBS) (Gibco, 10270106), penisilin-streptomisin (Gibco, 15140122), etanol (Riedel, 32221), dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich, 67-68-5), kristal viyole (Fluka, 61135), qPZR Kit (NucleoGene-qPCR Sybr Green Master Mix (2X)), cDNA sentez kiti (NucleoGene-RNA to cDNA Mix), 1 kb DNA ladder (Genesta, GA-100),

Annexin V-FITC/Apoptoz kit (Elabscience, E-CK-A211-100A), total RNA izolasyon kiti (Hibrogen, MG-RNA-01-50), etidyum bromür (Bioshop, ETB444.50), tripan mavisi boya (Fluka, 93595), sodyum sitrat (Sigma, S1804), lüsiferaz kit (Promega, E1500), transfeksiyon reaktifi (Abmgood, G2500).

## 2.2 METOT

### 2.2.1 Çalışmada Kullanılacak Bitki Materyalinin Toplanması

Örnekler Denizli'nin Çameli ilçesine bağlı Kargın Yaylası'nda (Akdağ), 1700-1900 m yükseklikten 2022 yılı haziran ayı içerisinde toplanmıştır. Bu örnekler, Prof. Dr. Gürkan SEMİZ tarafından güncel literatür (Boissier 1875; Huber-Morath ve Davis 1975; Duman 2000; Arabacı 2006, Arabacı ve diğ. 2012) referans alınarak incelenmiş ve tür teşhisi yapılmıştır. Söz konusu örneklerden biri, Pamukkale Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryum'unda (GSE2146 envanter numarası ile) muhafaza edilmektedir.

### 2.2.2 *Achillea alimeana*'nın Biyoetkinliğinin Belirlenmesi

*A. alimeana*'nın biyoetkinlik çalışmaları Pamukkale Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyokimya ve Moleküler Toksikoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

#### 2.2.2.1 *Achillea alimeana*'nın Su Ekstresinin Hazırlanması

*A. alimeana*'nın biyoetkinlik çalışmaları için toplanan örnekler gölge ve havadar bir yerde kurutulmuştur. Kurutulmuş örnekler laboratuvar ortamında değirmende toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilmiş örnekten 10 g ekstraksiyon kartuşuna alındıktan sonra örneğe 100 mL distile su ilave edilmiş, Gerhardt ekstraksiyon cihazında 130°C'de ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Elde edilen sulu

ekstre Labconco Freeze Dryer cihazı ile liyofilize edilmiştir. Bu ekstre, sonraki deneylerde kullanılmak üzere +4°C’de buzdolabında saklanmıştır.

### **2.2.2.2 Hücre Kültürü Çalışmaları**

#### **2.2.2.2.1 Besiyeri Hazırlanması**

Tez çalışmasında KHDAK hücre hatlarından A549 ve H1975 ve ayrıca insan embriyo böbrek hücre hattı HEK-293 kullanılmıştır. A549 ve HEK-293 hücre hattı için, %1 penisilin/streptomisin ve %10 FBS içeren DMEM kullanılırken; H1975 hücre hattı için ise %1 penisilin/streptomisin ve %20 FBS içeren RPMI besiyeri kullanılmıştır.

#### **2.2.2.2.2 Hücrelerin Büyütülmesi**

İnsan akciğer karsinomu hücresi A549 (CCL-185), insan akciğer adenokarsinomu hücresi H1975 (CRL-5908) ve insan embriyo böbrek hücresi HEK-293 (CRL-1573) hücre hatları Amerikan Tipi Kültür Koleksiyon (ATCC) firmasından satın alınmıştır. Kriyojenik tüp içerisinde olan hücreler 2000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası, süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmış ve peletin yoğunluğuna uygun olarak besiyeri eklenmiştir. Hücreler pipetleme yapılarak besiyeri içerisinde çözdürülmüş, daha sonra petri kaplarına (100 mm x 20 mm) aktarılmıştır. Petri kaplarına alınan hücrelere 6 mL besiyeri eklenmiş, 37°C sıcaklıkta, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nispi nem içeren bir CO<sub>2</sub> inkübatöründe 24 saat inkübe edilerek hücrelerin yüzeye adezyonu sağlanmıştır. Hücrelerin 24 saatte bir kontrolü sağlanarak, hücre canlılıkları ve büyümeleri takip edilmiştir. Standart koşulları sağlayan hücrelere besiyeri değişikliği veya pasajlama işlemleri yapılmıştır.

### 2.2.2.2.3 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler yapıştıkları petri kaplarının yüzeyini tamamen kapladıklarında pasajlama işlemi yapılmıştır. Pasajlama işleminde ilk olarak petri içerisinde bulunan besiyeri tamamen çekilmiştir. Hücreleri serumdan ve ölü hücrelerden uzaklaştırmak için hücreler steril fosfat tuz tamponu (PBS) ile yıkanmıştır. PBS uzaklaştırıldıktan sonra hücrelere %0,25'lik 2 mL tripsin ilave edilmiş ve inkübatöre kaldırılmıştır. Adherent hücreler yüzeyden tamamen kalktıktan sonra hücreye uygun besiyeri ilave edilmiştir. Hücreler 15 mL'lik falkon tüpe aktarılmıştır. 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant atılmış, pelet hücre yoğunluğuna göre hücreye uygun besiyeri ile çözdürülmüştür ve yeni petrilere ekim gerçekleştirilmiştir.

### 2.2.2.2.4 Sitotoksosite Çalışmaları

A549, H1975 ve HEK-293 hücrelerinin büyümeleri ve yeterli stok durumuna ulaştıktan sonra sitotoksosite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. *A. alimeana* sitotoksosite deneyi için steril saf su içerisinde çözdürülerek sitotoksosite deneylerinde kullanılacak olan ana stok hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stoktan 7 farklı dozda (10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL ve 500 µg/mL) uygulama yapılmıştır. Kontrol grubu hücrelerine sadece uygun besiyeri (100 µL) eklenmiştir. Sitotoksosite çalışmaları için büyütülen hücrelerin içerisinde ilk olarak eski besiyeri çekilmiştir. Daha sonra yapışan hücreleri kaldırmak üzere tripsin uygulanmıştır. Kaldırılan hücreler üzerine tripsinin 2 katı kadar uygun besiyeri eklenerek, 15 mL'lik steril tüp içerisine aktarılmıştır ve 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp, dibe çöken pelet 1 mL besiyeri içinde süspanse edilmiştir. Tripin mavisi kullanılarak hücre canlılığı değerlendirilmiştir ve hücre sayımı manuel olarak thoma lamı üzerinde gerçekleştirilmiştir. Sayım sonrasında, 96 kuyulu plakada her bir kuyucuğa  $1 \times 10^3$  hücre ekilmiştir ve hücrelerin adezyonu için CO<sub>2</sub> inkübatöründe bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından *A. alimeana* ekstresinin 7 farklı konsantrasyonu hücrelere uygulanmıştır ve hücreler tekrar %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyonun

tamamlanmasının ardından, 96 kuyulu plakadaki besi ortamı uzaklaştırılmış ve her bir kuyu 100 µL kristal viyole ile boyanmıştır. 10 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Kristal viyole, plakaların eğik bir şekilde tutularak su altında yıkanmasıyla uzaklaştırılmıştır. Son olarak, her kuyucuğa 100 µL, 0,1 M sodyum-sitrat içeren %50 etanol çözeltisi eklenmiş ve 15 dk boyunca 100 rpm hızında çalkalama işlemi gerçekleştirilmiştir. Mikrolaka okuyucuda 630 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak elde edilen renk değerleri analiz edilmiştir (Çelik ve diğ. 2013). Kontrol grubuna kıyasla farklı dozlarda *A. alimeana* su ekstrelerinin hücre hatlarının canlılık oranına etkileri incelenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, *A. alimeana*'nın hücreler üzerinde yarı maksimal etkili olduğu konsantrasyon olan IC<sub>50</sub> dozu tespit edilmiştir ve bu doz sonraki çalışmalarda kullanılmıştır.

#### **2.2.2.2.5 Apoptotik Hücrelerin Belirlenmesi**

*A. alimeana*'nın apoptotik hücre sayısını belirlemek için, 6 kuyulu mikrolakalara 30x10<sup>3</sup> hücre/kuyu oranında hücre ekimi yapılmıştır. Bu hücreler %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, *A. alimeana*'nın önceden belirlenen IC<sub>50</sub> değerlerine göre doz uygulaması gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılmıştır. 24 saat inkübasyonu takiben, hücreler PBS ile yıkanmış ve Tripsin-EDTA ile kaldırılmıştır. Daha sonra 15 mL'lik falkon tüplere transfer edilmiştir ve 2000 rpm'de 5 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atılmış ve hücre peleti PBS ile yıkanmıştır. Temizlenmiş pelet, kit içeriğinde bulunan bağlanma tamponu ile çözülmüştür. Hücre süspansiyonuna 5 µL Annexin V ve 2 µL PI boya eklenmiş ve karışım homojenize edilmiştir. Numuneler, 20 dk boyunca karanlık bir ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, slaytlara yüklenen örnekler floresan imaj sitometri cihazında analiz edilerek canlı, apoptotik ve nekrotik hücre yüzdeleri saptanmıştır (Sulak ve diğ. 2022; Çelik Turgut 2023).

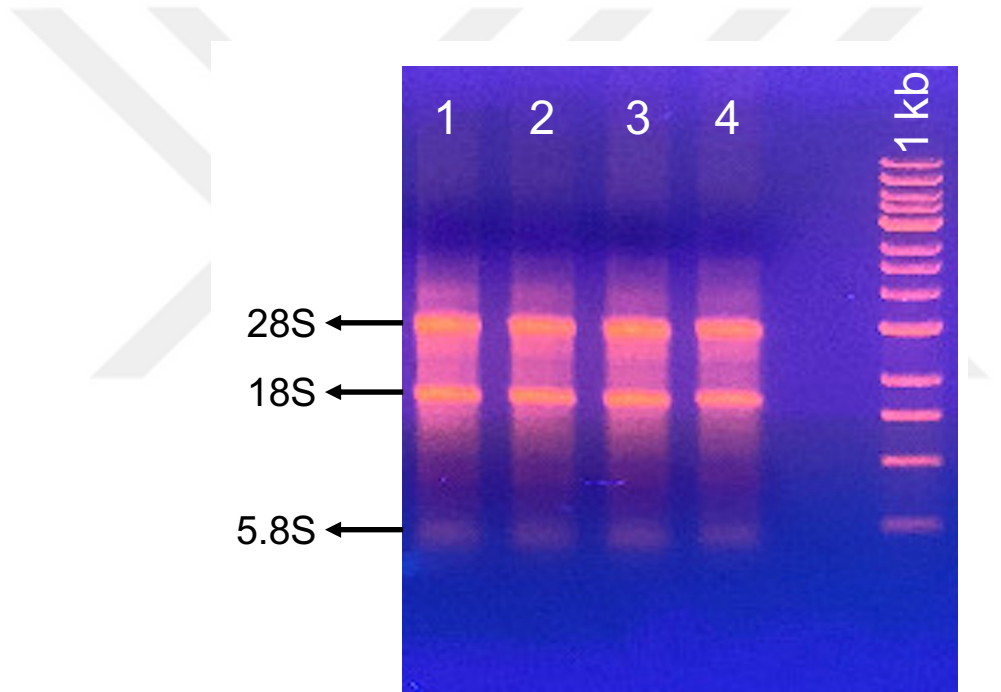
#### 2.2.2.2.6 Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonunu gerçekleştirmek için ilk olarak petri kaplarına  $10^6$  hücre ekilip, bir gün boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra, *A. alimeana* bitkisinin IC<sub>50</sub> dozları, steril koşullar altında hücrelere uygulanmıştır. 24 saat inkübasyon sonrasında, ‘Hibrigen RNA İzolasyon’ kiti kullanılarak total RNA, hücrelerden izole edilmiştir. Kitte belirtilen prosedüre uygun olarak, ilk olarak petri kaplarındaki besiyeri uzaklaştırılmıştır ve hücreler PBS ile üç defa yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra, HT1 tamponu kullanılarak bir hücre kazıyıcı aracılığıyla hücreler toplanmış ve 5 dk buz üzerinde bekletilmiştir. Ardından 200 µL kloroform eklenerek, 4-5 defa pipetleme yapılmıştır. 10 dk buz üzerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 4°C’de 11.000 xg’de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan üst faz başka bir ependorfa toplanarak izolasyona devam edilmiştir. Üst fazdan kaç µL alındıysa eşit hacimde üzerine %100 etanol eklenmiştir ve çek-bırak yapılarak RNeasy mini spin kolona aktarılmıştır. 4°C’de 11.000’xg de 30 sn santrifüj edilmiştir. Kolonun altına geçen sıvı atılmıştır. Kolonun tam ortasından 500 µL RY1 yıkama tamponu eklenmiştir ve 4°C’de 11.000’xg de 30 sn santrifüj edilmiştir ve alta geçen sıvı tekrar atılmıştır. Kolonun tam ortasından 500 µL RY2 yıkama tamponu eklenmiştir ve 4°C’de 11.000 xg’de 30 sn santrifüj edilmiştir ve alta geçen sıvı atılmıştır. Bu basamak 2 kez tekrarlanmıştır. 4°C’de 11.000 xg’de 2 dk tekrar santrifüj edilmiştir. Kolon, yeni bir tüpe transfer edilmiş, ardından 40 µL su eklenmiş ve oda sıcaklığında 2 dk süreyle inkübe edilmek üzere bekletilmiştir. Son olarak 4°C’de 11.000 xg’de 2 dk santrifüj edilmiştir.

#### 2.2.2.2.7 RNA’nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi

İzole edilen RNA’lar, %1 agaroz jel kullanılarak Thermo yatay agaroz jel elektroforezi ile elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. %1’lik agaroz jel, 10X Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tampon çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. Agaroz, 10X TAE tamponu içinde mikrodalga fırında ısıtılarak çözülmüştür. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra, agaroz solüsyonu soğutulmuş ve 0,75 µL EtBr eklenerek homojen bir karışım elde edilmiştir. Daha sonra bu karışım, elektroforez tankına dökülerek jel katılaşana kadar bekletilmiştir. Agaroz jel elektroforez tankına

yerleştirildikten sonra, RNA'nın negatif (-) kutuptan pozitif (+) kutba doğru hareket edebilmesi için elektroforezin negatif kutbuna doğru konumlandırılmıştır. Elektroforez işlemi için tank, 1X TAE tampon çözeltisi ile doldurulmuştur. Ardından, 6 µL RNA örneği, 2 µL yükleme boyası ve 1 µL DNAaz/RNAaz içermeyen su ile hazırlanan karışım, mikropipet yardımıyla jeldeki kuyulara yüklenmiştir. Elektroforez cihazı güç kaynağına bağlanarak, 90 V ve maksimum 500 mA şartlarında 45 dk süreyle çalıştırılmıştır. İşlem tamamlandığında, jel UV transilluminatör kullanılarak görüntülenmiş ve RNA örneklerinde herhangi bir kırılma veya DNA kontaminasyonu olup olmadığı değerlendirilmiştir (Şekil 2.1). RNA konsantrasyonları, MaestroNano cihazı ile ölçüm yapılarak belirlenmiştir. Elde edilen RNA örnekleri, cDNA sentezi işlemine kadar -80°C'de saklanmıştır.



**Şekil 2.1:** A549 ve H1975 hücrelerinden izole edilen RNA'ların %1'lik agaroz jel elektroforezi. Hat 1: A549 kontrol hücreleri, Hat 2: *A. alimeana* uygulamasından sonra elden edilen A549 hücreleri Hat 3: H1975 kontrol hücreleri, Hat 4: *A. alimeana* uygulamasından sonra elden edilen H1975 hücreleri, Hat 5: Boş, Hat 6: 1 kb Markör

#### 2.2.2.2.8 cDNA Sentezi

cDNA sentezi, 'NucleoGene-RNA to cDNA mix' kiti kullanılarak oligo d(T) primer ve ters transkriptaz (RT) enzimi ile gerçekleştirilmiştir. Üretici firmanın talimatlarına uygun olarak, cDNA sentez karışımı Tablo 2.1'deki prosedüre göre

hazırlanmıştır. Karışım hazırlandıktan sonra, cDNA sentezi için 50 dk boyunca 50°C’de inkübe edilmiştir. Süre tamamlandığında, enzim aktivitesini durdurmak için karışım 5 dk süreyle 85°C’de bekletilmiştir. Sentezlenen cDNA’lar, RT-PZR işlemi gerçekleşene kadar -80°C’de saklanmıştır.

**Tablo 2.1:** cDNA sentez karışımı

	Hacim	Son konsantrasyon
<b>Enzim karışımı (20X)</b>	1 µL	1X
<b>NucleoGene RNA – cDNA mix (5X)</b>	4 µL	1X
<b>RNAaz içermeyen su</b>	Değişken	-
<b>Son hacim</b>	20 µL	-
<b>Total RNA</b>	Değişken	1 µg – 10 pg total RNA

#### 2.2.2.2.9 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

Literatür ve veri bankalarının taranması sonucunda, apoptoz ile ilişkili olduğu bilinen genler tespit edilmiştir. GenBank/EMBL veri bankaları taranarak, bu genler için uygun primer dizileri belirlenmiştir. Söz konusu primerlerin nükleotit dizilimleri Tablo 2.2’de listelenmiştir. Her bir gen için öncelikle ön deneme yapılarak uygun koşullar (primer konsantrasyonu, yapışma sıcaklığı vb.) belirlenmiştir.

**Tablo 2.2:** Primerlerin nükleotit dizilimleri

Primer	F ve R	Nükleotit Dizisi	TM (°C)
APAF	F (5’→3’)	GTCTGCTGATGGTGCAAGGA	61
	R (3’→5’)	GATGGCCCGTGTGGATTTC	
BAX	F (5’→3’)	AGAGGATGATTGCCGCGT	58
	R (3’→5’)	CAACCACCCTGGTCTTGGATC	
BCL2	F (5’→3’)	ATGTGTGTGGAGAGCGTCAACC	61
	R (3’→5’)	TGAGCAGAGTCTTCAGAGACAGCC	
CAS8	F (5’→3’)	TCTGGAGCATCTGCTGTCTG	59
	R (3’→5’)	CCTGCCTGGTGTCTGAAGTT	
CAS9	F (5’→3’)	GGCTGTCTACGGCACAGATGGA	61
	R (3’→5’)	CTGGCTCGGGGTTACTGCCAG	
P53	F (5’→3’)	ATCTACAAGCAGTCACAGCACAT	61
	R (3’→5’)	GTGGTACAGTCAGAGCCAACC	
ACTB	F (5’→3’)	TCCTCCTGAGCGCAAGTACTC	59
	R (3’→5’)	CTGCTTGCTGATCCACATCTG	

*A. alimeana*’nın gen ifade düzeyleri üzerindeki etkilerini tespit etmek amacıyla RT-PZR analizi yapılmıştır. Bu analiz için kullanılan RT-PZR koşulları

Tablo 2.3'te, RT-PZR protokolü ise Tablo 2.4'te detaylandırılmıştır (Turgut ve diğ. 2017).

**Tablo 2.3:** RT-PZR koşulları

Bileşenler	Reaksiyon Karışımı
SYBR Green	12,5 µL
F primer (10 pm)	0,6 µL
R primer (10 pm)	0,6 µL
cDNA	5 µL
Distile su	6,3 µL
<b>Toplam Hacim</b>	<b>25 µL</b>

**Tablo 2.4:** RT-PZR protokolü

Program İsmi	Segment	Sıcaklık (°C)	İnkübasyon Süresi (sn)
<b>Ön İnkübasyon</b>	-	95	900
	Denatürasyon	95	10
<b>Kantitatif Analiz</b>	Yapışma	Değişken	5
	Uzama	72	25
	Denatürasyon	95	0
<b>Erime Eğri Analizi</b>	Yapışma	65	15
	Uzama	95 (Eğim 0.1°C/S)	0

#### 2.2.2.2.10 Lüsiferaz Aktivitesinin Belirlenmesi

P53 yanıt elementinin (P53RE) aktivitesini ölçmek için  $2 \times 10^4$  hücre 96 kuyulu plaklara ekilmiştir. 24 saat inkübasyonun ardından P53RE ve lüsiferaz normalizasyonu amacıyla Renilla geni barındıran pGL4.38 [luc2P/P53RE/Hygro] plazmidini, 'Fugene HD' reaktifi ile HEK-293 hücrelerine transfekte edilmiştir. Transfeksiyondan 24 saat sonra, hücrelere *A. alimeana* ekstresinin belirlenen dozu uygulanmıştır. Ardından 24 saatlik bir stimülasyon sürecinden sonra, lüsiferaz deney kitini kullanarak 'Synergy HTX' luminometre ile lüsiferaz aktivitesi ölçülmüştür (Sulak ve diğ. 2022).

#### 2.2.2.2.11 İnvazyon Etkisinin Belirlenmesi

*A. alimeana*'nın hücre invazyon kapasitesi üzerindeki etkisi, Trans-well matrigel invazyon kapları kullanılarak 24 kuyulu mikropalakalarda incelenmiştir. Deneyde, serum içeren kültür ortamı invazyon kuyucuğunun altına yerleştirilmiş, matrigel membranın (8 µm gözenek genişliği) üst kısmına ise serumsuz ortamda bekletilen *A. alimeana* ile işlem görmüş hücreler eklenmiştir. 24 saat inkübasyon sonrası, membranın üst yüzeyinde kalan invaze olmayan hücreler bir kulak pamuğu yardımıyla temizlenmiş, alt yüzeye göç eden hücreler ise kristal viyole ile boyanarak ışık mikroskobu ile sayılmış ve analiz edilmiştir (Karagur ve diğ. 2018).

#### 2.2.2.2.12 Migrasyon Etkisinin Belirlenmesi

Altı kuyulu mikropalakalara  $30 \times 10^3$  hücre ekilmiştir. Ekim yapılan hücreler %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde, %95 nemli ortamda inkübe edilmiştir. Hücre yoğunluğu %90'a ulaştığında, steril 200 µL pipet ucu kullanılarak petri kabı düz tutulup kuyunun tam ortasından lineer olarak çizilmiş ve besiyeri kuyudan alınmıştır. Ardından, hücreler PBS ile üç kez yıkanmıştır. Kontrol grubu, serum içeren besiyeriyle kültüre alınırken, *A. alimeana* ekstresi uygulanan grup, belirlenen dozlarda ekstre içeren besiyeriyle kültüre alınmıştır. Deneyin başlangıcında, sıfırıncı saatte hücreler fotoğraflanmıştır. Ardından kontrol ile ekstre uygulanan hücreler, 24 ve 48 saat sonunda tekrar fotoğraflanmıştır. Deneyin sonunda, kontrol ve ekstre uygulanan grupların hücre göç kapasiteleri görsel olarak karşılaştırılmış ve Image J programı kullanılarak migrasyon alanları ölçülmüştür (Mutlu ve diğ. 2022).

#### 2.2.2.2.13 İstatistiksel Analiz

Tüm veriler, Ortalama ± Standart Sapma şeklinde ifade edilmiştir. Gen ifadesindeki varyasyonları değerlendirmek için varsayılan parametrelerle Qiagen GeneGlobe qPCR Veri Analiz Portalı kullanılmıştır. Verilerin istatistiksel analizleri Minitab 21 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İnvazyon verileri Student's t-test ile analiz edilirken, apoptoz, migrasyon ve lüsiferaz deneylerinden elde edilen veriler tek yönlü ANOVA ve akabinde Tukey testi ile analiz edilmiştir. 0,05'ten

küçük p değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir. Her deney iki paralelli olarak en az üç defa tekrar edilmiştir.

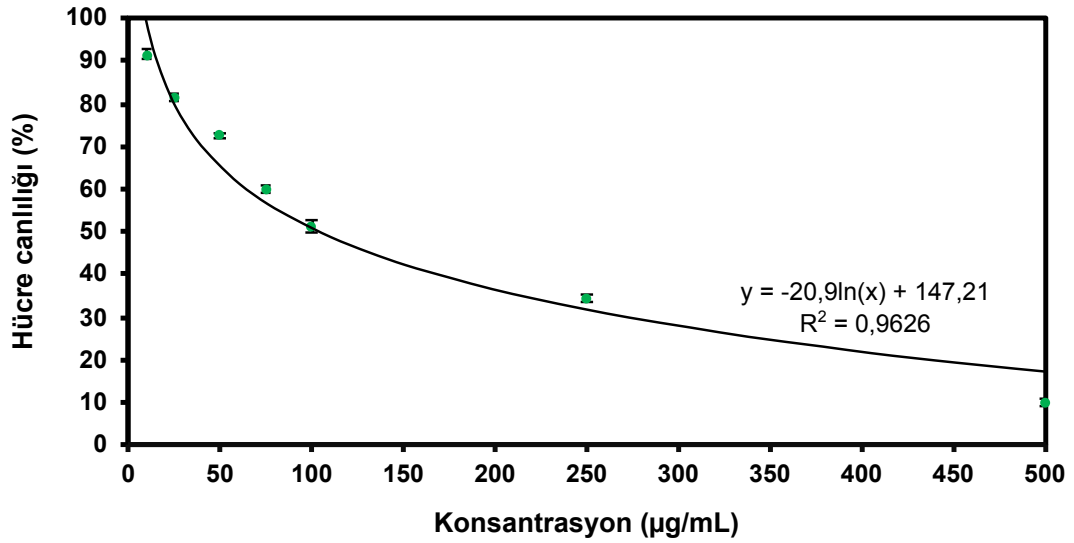


### 3. BULGULAR

#### 3.1 Sitotoksikte Sonuçları

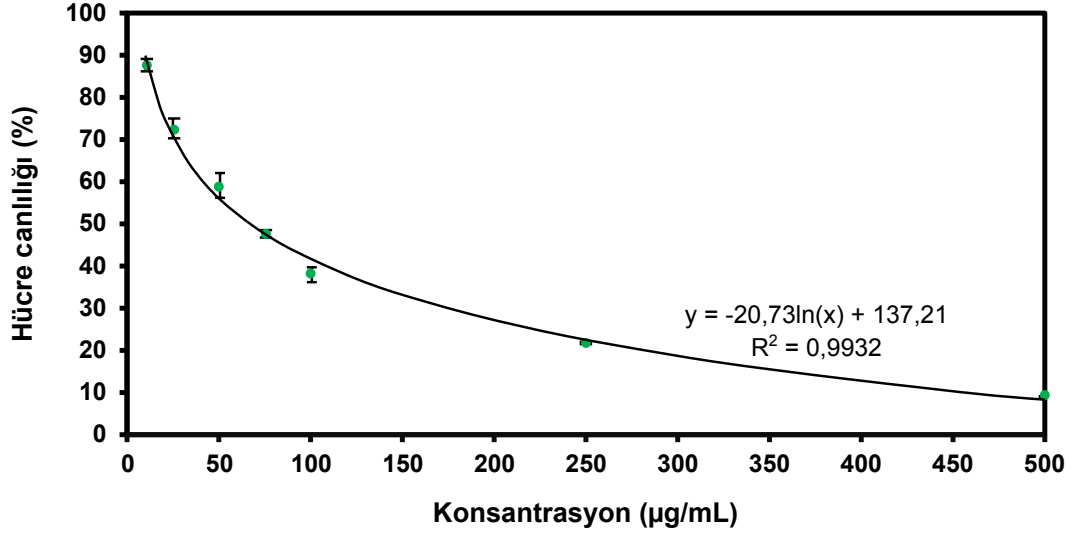
*A. alimeana* su ekstresinin A549, H1975 ve HEK-293 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerini incelemek için kristal viyole boyama metodu kullanılmıştır. 96 kuyulu plakaya ekilen A549, H1975 ve HEK-293 hücreleri üzerine 7 farklı konsantrasyonda (10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL ve 500 µg/mL) *A. alimeana* su ekstresi uygulanmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından farklı konsantrasyonlarda uygulanan *A. alimeana* su ekstresinin hücrelerin yaşam oranlarına etkileri belirlenmiştir.

*A. alimeana* su ekstresinin farklı konsantrasyonlarının A549 hücrelerinin canlılık oranı üzerindeki etkisi Şekil 3.1’de sunulmuştur. Kontrol grubu verileri %100 canlılık olarak kabul edilerek, diğer doz gruplarının sonuçları bu referans değerine göre değerlendirilmiştir. Regresyon analizi kullanılarak  $y=ax+b$  denklemi ile  $IC_{50}$  değeri hesaplanmış ve sonraki deneyler için *A. alimeana*’nın  $IC_{50}$  değeri olarak hesaplanan  $104,68 \pm 12,48$  µg/mL dozu kullanılmıştır.



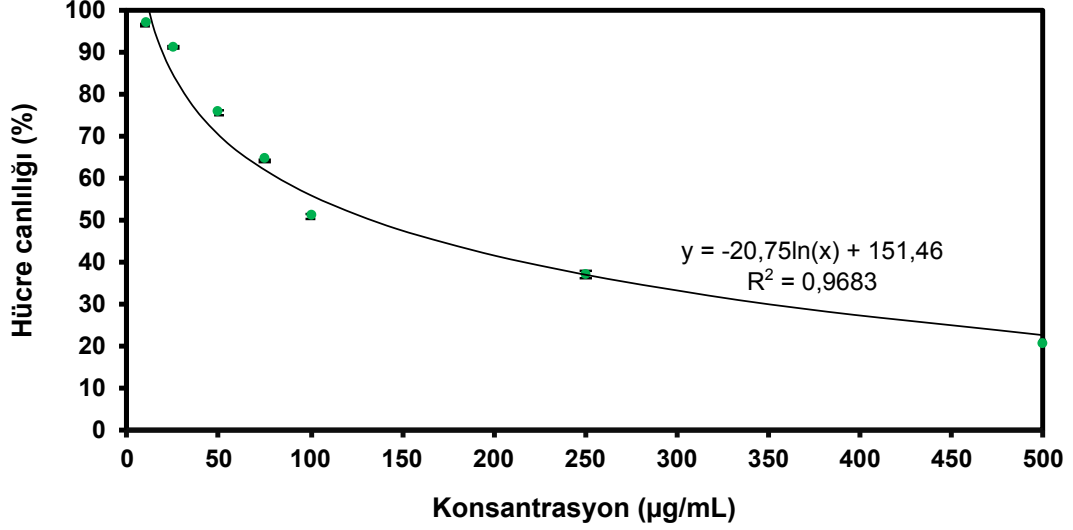
Şekil 3.1: Farklı konsantrasyonlardaki *A. alimeana* su ekstresinin A549 hücre canlılığına etkisi

*A. alimeana* su ekstresinin farklı konsantrasyonlarının H1975 hücrelerinin canlılık oranı üzerindeki etkisi Şekil 3.2’de sunulmuştur. Kontrol grubu verileri %100 canlılık olarak kabul edilerek, diğer doz gruplarının sonuçları bu referans değerine göre değerlendirilmiştir. Regresyon analizi kullanılarak  $y=ax+b$  denklemi ile  $IC_{50}$  değeri hesaplanmış ve sonraki deneyler için *A. alimeana*’nın  $IC_{50}$  değeri olarak hesaplanan  $66,68 \pm 9,43 \mu\text{g/mL}$  dozu kullanılmıştır.



Şekil 3.2: Farklı konsantrasyonlardaki *A. alimeana* su ekstresinin H1975 hücre canlılığına etkisi

*A. alimeana* su ekstresinin farklı konsantrasyonlarının HEK-293 hücrelerinin canlılık oranı üzerindeki etkisi Şekil 3.3’te sunulmuştur. Kontrol grubu verileri %100 canlılık olarak kabul edilerek, diğer doz gruplarının sonuçları bu referans değerine göre değerlendirilmiştir. Regresyon analizi kullanılarak  $y=ax+b$  denklemi ile  $IC_{50}$  değeri hesaplanmış ve sonraki deneyler için *A. alimeana*’nın  $IC_{50}$  değeri olarak hesaplanan  $131,63 \pm 2,98 \mu\text{g/mL}$  dozu kullanılmıştır.



Şekil 3.3: Farklı konsantrasyonlardaki *A. alimeana* su ekstresinin HEK-293 hücre canlılığına etkisi

*A. alimeana*'nın farklı akciğer kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri farklılık göstermektedir. Özellikle, *A. alimeana* su ekstresi uygulamasının, H1975 hücre hattında A549 hücre hattına kıyasla daha duyarlı olduğu yani daha düşük konsantrasyonlarda bile yüksek öldürücülük gösterdiği belirlenmiştir. Bu bulgular *A. alimeana*'nın sitotoksik etkilerinin farklı akciğer kanseri hücrelerinde farklılık gösterebileceği ve potansiyel bir kanser tedavisi ajanı olarak kullanımının hücre hattının özelliklerine göre özelleştirilmesi gerektiğini göstermiştir. Ayrıca *A. alimeana*'nın akciğer kanseri hücreleri (A549 ve H1975) için normal hücrelere (HEK-293) göre daha toksik olduğu görülmüştür.

Literatür incelendiğinde *Achillea* türlerinin çeşitli kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Ghavami ve diğ. 2010; Albayrak ve Silahtarlıoğlu 2017; Köngül ve diğ. 2017; Baker 2020; Ullah ve diğ. 2022). Ullah ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *A. fragrantissima*'nın hidrometanolik özütü meme kanseri (MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR-3), pankreas kanseri (BxPC-3, MIAPaCa-2), prostat kanseri (LNCaP, C4-2B, PC-3) ve akciğer kanseri (A549) hücreleri üzerindeki antikanser mekanizması araştırılmıştır. Özütün 96 saat uygulaması sonucunda MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR-3, LNCaP, C4-2B, PC-3, MIAPaCa-2, BxPC-3 ve A549 hücreleri üzerindeki IC<sub>50</sub> değeri sırasıyla 236,6 µg/mL, 150,2 µg/mL, 44,2 µg/mL, 45 µg/mL, 51,8 µg/mL, 80 µg/mL, 280,1 µg/mL, 60,2 µg/mL ve 318 µg/mL bulunmuştur (Ullah ve diğ. 2022).

*A. coarctata* özütünün MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi araştırılmıştır. *A. coarctata*'nın 24 ve 48 saatlik uygulamasından sonra MCF-7 hücre

hattı üzerindeki IC<sub>50</sub> değerinin sırasıyla 37,39 µg/mL ve 33,98 µg/mL olduğu bildirilmiştir (Albayrak ve Silahtarlıoğlu 2017).

*A. millefolium* etanol özütünün, çeşitli kanser hücre hatları üzerindeki antikanser potansiyeli incelenmiştir. Yapılan bir çalışmada, normal fibroblast hücre hattı (HFFF) ve insan mide adenokarsinomu (AGS), insan meme kanseri (MCF-7), insan kolorektal adenokarsinomu (SW742), insan akciğer karsinomu (SKLC6), insan melanom kanseri (A375) ve insan karaciğer hepatomu (PLC/PRF/5) olmak üzere 6 farklı kanser hücre hattı kullanılmıştır. *A. millefolium*'un AGS, SKLC6, HFFF, SW742, A375, MCF-7 ve PLC/PRF/5 hücre hatlarındaki IC<sub>50</sub> değeri sırasıyla 22 µg/mL, 24,1 µg/mL, 34,4 µg/mL, 40,2 µg/mL, 49,4 µg/mL, 64 µg/mL ve 66 µg/mL bulunmuştur. Elde edilen sonuçlardan, *A. millefolium* etanol özütünün kanser hücre hatlarına karşı seçici sitotoksik etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Ghavami ve diğ. 2010). Ayrıca yapılan başka bir çalışmada *A. millefolium*'un dört farklı çözücü ile ekstralarının K562, HeLa, MCF-7, A431 ve A549 hücre hatları üzerindeki sitotoksik aktiviteleri incelenmiştir. HeLa hücrelerinde etil asetat ekstresi en yüksek sitotoksik etkiyi göstermiştir (Baker 2020). *A. millefolium*'un farklı özütlerinin meme kanseri üzerine etkileri incelendiğinde MCF-7 hücre hattında 30,6 µg/mL IC<sub>50</sub> değeri ile su özütünün en sitotoksik özüt olduğu bulunmuştur (Köngül ve diğ. 2017). Yapılan çalışmalar *A. millefolium*'un çeşitli kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin olduğunu ve farklı ekstraksiyon yöntemlerinin, kanser hücrelerinin canlılık oranları üzerinde farklı etkilere neden olabileceğini ortaya koymaktadır.

Bitki ekstralarının antiproliferatif etkileri üzerine yapılan sayısız çalışma mevcuttur (Uğur ve diğ. 2017; Sergazy ve diğ. 2021; Khan ve diğ. 2022) ve *Achillea* cinsi, çeşitli kanser hücre tiplerine karşı gösterdiği belirgin sitotoksik etkilerle dikkat çekmektedir (Papakosta ve diğ. 2020; Sowa ve diğ. 2020). Yeni tanımlanan *A. alimeana* türü ile ilgili şu ana kadar herhangi bir antikanser aktivite çalışması bulunmamaktadır. *A. alimeana*'nın akciğer kanseri hücre hatları üzerindeki etkisi bu çalışma ile literatüre kazandırılmıştır.

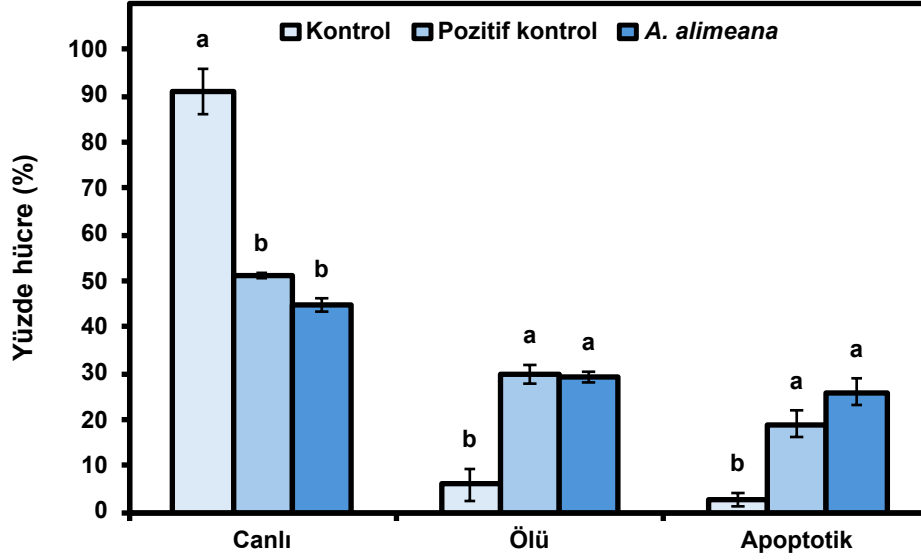
## 3.2 Apoptoz Sonuçları

### 3.2.1 Annexin-V/PI Boyama Sonuçları

*A. alimeana* su ekstresinin belirlenen IC<sub>50</sub> dozlarının A549 ve H1975 hücrelerine 24 saat uygulanması sonrasında Annexin-V/PI boyama yöntemi ile apoptoz oranı belirlenmiştir. Kontrol grubuna sadece besiyeri uygulanırken, pozitif kontrol grubuna H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanmıştır. Canlı, ölü ve apoptotik hücre oranları floresans imaj sitometri cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

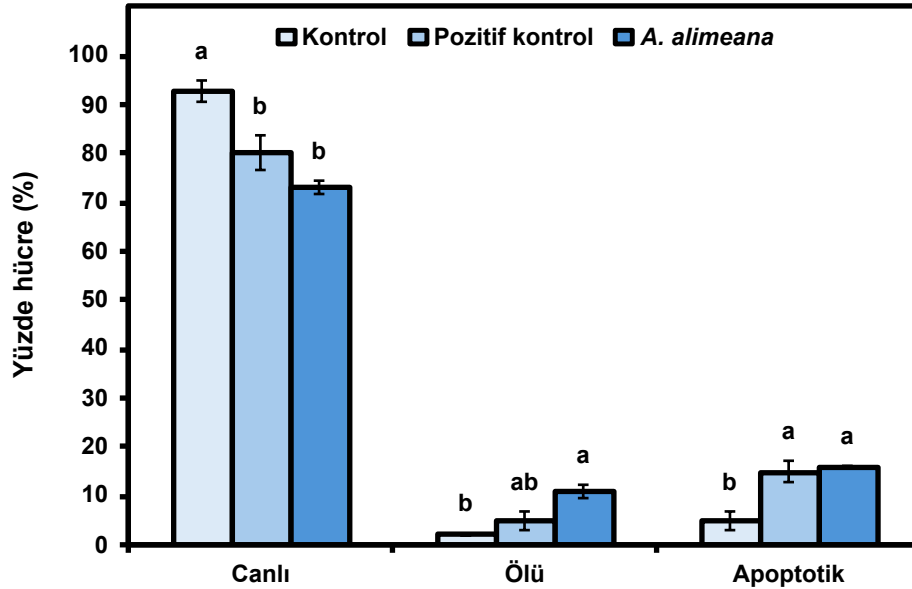
*A. alimeana*'nın A549 hücrelerine uygulanması sonrasında kontrol grubunda canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri sırasıyla  $91 \pm 4,94$ ,  $6 \pm 3,00$  ve  $3 \pm 1,41$  iken pozitif kontrol grubunda sırasıyla  $51 \pm 0,70$ ,  $30 \pm 2,12$  ve  $19 \pm 2,82$  olarak belirlenmiştir. *A. alimeana* grubunda ise  $\%45 \pm 1,41$  canlı,  $\%29 \pm 1,41$  ölü ve  $\%26 \pm 2,82$  apoptotik hücre bulunmuştur (Şekil 3.4).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin apoptozu indüklediği bilindiği için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Vilema-Enríquez ve diğ. 2016). Apoptozu indüklemesinin yanı sıra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin A549 hücrelerinde nekrozu da indüklediği gösterilmiştir (Chiou ve diğ. 2013). Yapılan çalışma sonucunda literatür ile uyumlu olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, A549 hücrelerinde hem apoptotik hem de nekrotik hücre sayısını anlamlı olarak artırmıştır. Ayrıca *A. alimeana* uygulaması sonrasında apoptotik hücre sayısının yanı sıra ölü/nekrotik hücre sayısı da indüklenmiştir.



Şekil 3.4: *A. alimeana*'nın A549 hücrelerinde apoptoza etkisi. Aynı harfi taşımayan değerler birbirinden anlamlı şekilde farklıdır ( $p < 0,05$ )

*A. alimeana*'nın H1975 hücrelerine uygulanması sonrasında kontrol grubunda canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri sırasıyla  $93 \pm 2,12$ ,  $2 \pm 0$  ve  $5 \pm 2,12$  iken pozitif kontrol grubunda sırasıyla  $80 \pm 3,53$ ,  $5 \pm 2,12$  ve  $15 \pm 2,12$  olarak belirlenmiştir. *A. alimeana* grubunda ise  $73 \pm 1,41$  canlı,  $11 \pm 1,41$  ölü ve  $16 \pm 0$  apoptotik hücre bulunmuştur (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: *A. alimeana*'nın H1975 hücrelerinde apoptoza etkisi. Aynı harfi taşımayan değerler birbirinden anlamlı şekilde farklıdır ( $p < 0,05$ )

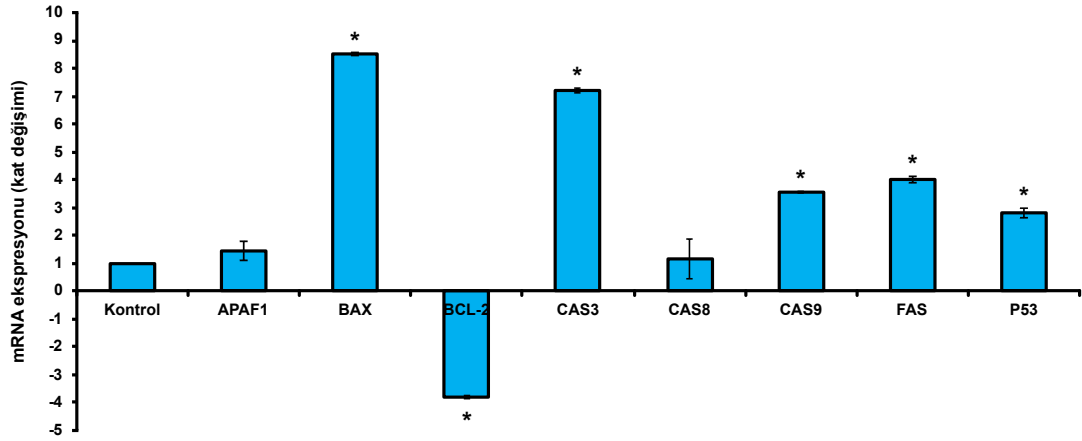
H1975 hücrelerinde en yüksek ölü/nekrotik hücre sayısı *A. alimeana* grubunda ( $11,00 \pm 1,41$ ) en düşük ölü/nekrotik hücre sayısı kontrol grubunda ( $2,00 \pm 0,00$ ) tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler, *A. alimeana* grubundaki ölü/nekrotik hücre sayısının kontrol grubundakinden anlamlı derecede farklı olduğunu ( $p < 0,05$ ), ancak pozitif kontrol grubundaki ölü/nekrotik hücre sayısının kontrol grubundakinden ve *A. alimeana* grubundakinden istatistiksel olarak farklı olmadığını ( $p > 0,05$ ) göstermiştir. Ayrıca apoptotik hücre sayısı pozitif kontrol ve *A. alimeana* grubunda anlamlı bir şekilde artmıştır ( $p < 0,05$ ).

*A. alimeana* su ekstresi A549 hücrelerinde H1975 hücrelerine göre apoptozu daha fazla indüklemiştir. Ayrıca her iki hücre hattında anlamlı bir şekilde ölü/nekrotik hücre sayısı artmıştır. *A. alimeana* su ekstresi hem apoptotik hem de ölü/nekrotik hücre ölümünü artırmaktadır.

### 3.2.2 RT-PZR Sonuçları

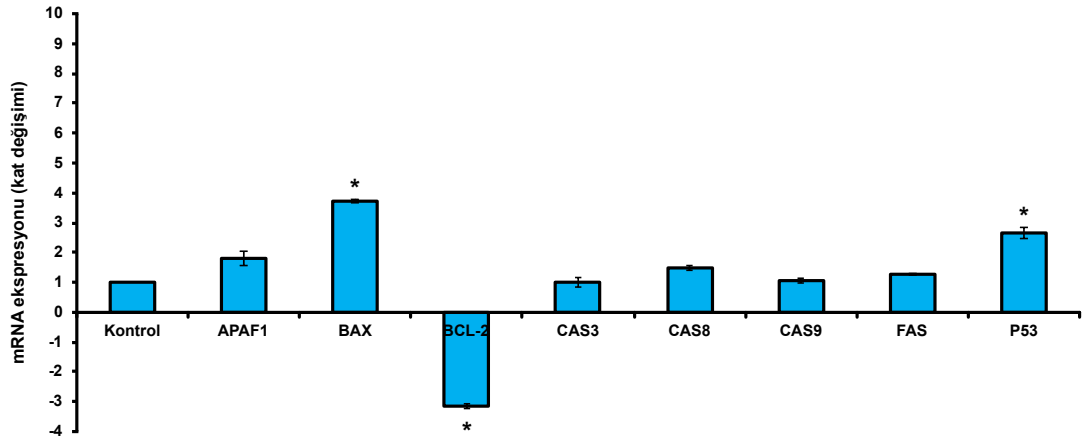
Sitotoksosite çalışmaları ile belirlenen *A. alimeana* su ekstresinin A549 ve H1975 hücreleri üzerinde etkili dozları hücrelere uygulanmış ve RT-PZR yöntemiyle apoptotik yolları düzenleyen APAF1, BAX, BCL2, FAS, CASP3, CASP8, CASP9 ve P53 genlerinin mRNA seviyelerindeki değişiklikler belirlenmiştir.

*A. alimeana* su ekstresinin  $IC_{50}$  dozunun A549 hücrelerine 24 saat muamele edilmesinden sonra BAX, CASP3, CASP9, FAS ve P53 gen ekspresyon seviyesi sırasıyla  $8,54 \pm 0,04$  kat,  $7,21 \pm 0,06$  kat,  $3,56 \pm 0,01$  kat,  $3,99 \pm 0,11$  kat ve  $2,81 \pm 0,17$  kat artarken, BCL2 gen ekspresyon seviyesi  $3,83 \pm 0,08$  kat azalmıştır ( $p < 0,05$ ). APAF1 ve CASP8 gen ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir (Şekil 3.6).



**Şekil 3.6:** *A. alimeana*'nın A549 hücrelerinde APAF1, BAX, BCL2, CASP3, CASP8, CASP9, FAS ve P53 mRNA seviyesine etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edilerek değerlendirilmiştir. \*: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0,05$ )

*A. alimeana* su ekstrelerinin  $IC_{50}$  dozunun H1975 hücrelerine 24 saat muamele edilmesinden sonra BAX ve P53 gen ekspresyon seviyesi sırasıyla  $3,74 \pm 0,03$  kat ve  $2,64 \pm 0,19$  kat artarken, BCL2 gen ekspresyon seviyesi  $3,13 \pm 0,08$  kat azalmıştır ( $p < 0,05$ ). APAF1, CASP3, CASP8, CASP9 ve FAS gen ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişim gerçekleşmemiştir (Şekil 3.7).



**Şekil 3.7:** *A. alimeana*'nın H1975 hücrelerinde APAF1, BAX, BCL2, CASP3, CASP8, CASP9, FAS ve P53 mRNA seviyesine etkisi. Sonuçlar ACTB ile normalize edilerek değerlendirilmiştir. \*: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0,05$ )

Apoptoz, hücre ölümünün programlanmış bir formudur. Kanser hücrelerini öldürmede kritik bir rol oynar, içsel ve dışsal olarak düzenlenir. İçsel yolak, mitokondriyal hasar ve sitokrom c salınımı gibi hücre içi sinyaller tarafından tetiklenirken, dışsal yolak, ölüm reseptörlerinin ligandları ile etkileşimi sonucu başlatılır. Bu süreçler, hücrenin programlı ölümünü sağlayarak kanser hücrelerinin

çoğalmasını engelleyebilir (Jan ve Chaudhry 2019). Bu nedenle, kanser hücrelerinin apoptoza uğramasını ve ölümünü indükleyebilen doğal ajanların keşfi kanser araştırmalarında önemli bir hedef haline gelmiştir.

*A. fragrantissima*'nın MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışma, bu bitkinin etanolik ekstresinin 20 µg/mL konsantrasyonda 24 saat süreyle hücreler üzerinde sitotoksik etki gösterdiğini ve hücre canlılığını azaltarak apoptoz oluşumuna yol açtığını ortaya koymuştur. Bu çalışma, *A. fragrantissima*'nın CASP3, CASP8, CASP9, sitokrom c, BID, BAX ve PTEN gibi apoptoz ile ilişkili genleri önemli ölçüde yukarı düzenlediğini, Pi3K/Akt sinyal yolunu ise aşağı düzenleyerek apoptozu tetiklediğini doğrulamıştır (Alasmari 2024).

Ayrıca başka bir çalışmada *A. fragrantissima* yapraklarının metanol ekstresinin HepG2, A549, HCT116 ve MCF-7 kanser hücreleri üzerinde sitotoksik ve apoptotik özellikleri belirlenmiştir. Sitotoksik aktivite en yüksek A549 hücrelerinde gözlemlenmiştir. CASP3, P53 ve BAX'ın aktivasyonunu, BCL2'nin de baskılanmasını sağlayarak apoptozu indüklediği belirtilmiştir (Break ve diğ. 2021). Ayrıca *A. vermicularis* metanol özütünün de MCF-7 hücrelerinde CASP3'ü aktive ettiği bildirilmiştir (Hamzeloo-Moghadam ve diğ. 2015).

Rezai ve arkadaşları (2019) *A. wilhelmsii* hidroalkolik özütünün HeLa servikal kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptoz indükleyici etkisini araştırmışlar ve P53'ün mRNA seviyesinin *A. wilhelmsii* uygulamasının 12, 24 ve 48 saatinden sonra arttığını göstermişlerdir. Başka bir çalışmada ise *A. wilhelmsii*'nin hidroalkolik özütünün MCF-7 ve MDA-MB-468 hücre hatlarında antiproliferatif ve apoptoz indükleyici potansiyeli gösterilmiştir. *A. wilhelmsii*'nin hidroalkolik özütünün MCF-7'de geç apoptozu ve MDA-MB-468'de erken apoptozu indüklediği ve MDA-MB-468'de CASP3'ün arttığını gösterilmiştir (Galavi ve diğ. 2016). Bu çalışmalar, *A. wilhelmsii* hidroalkolik özütünün çeşitli kanser hücre hatlarında apoptozu indüklediğini göstermiştir.

Yapılan bir araştırmada, *A. millefolium*'un hidroetanolik özütünün, NCI-H460 ve HCT-15 hücre hatları üzerindeki etkileri incelemiştir. Bu çalışmada, özütün 75 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarının, hücre döngüsünde değişikliklere yol açtığını ve apoptoz seviyelerini artırdığını göstermiştir. Ayrıca, NCI-H460 hücrelerinde P53 ve P21 proteinlerinin ekspresyonunu artırırken, HCT-15 hücrelerinde XIAP protein seviyelerini düşürdüğü belirlenmiştir (Pereira ve diğ. 2018).

*A. teretifolia* ekstrelerinin insan prostat kanseri hücre hatları DU145 ve PC-3 hücre hatlarında BAX ve CASP3 mRNA ekspresyonunu artırdığı, BCL2 mRNA ekspresyonunu önemli düzeyde baskıladığı bununla birlikte insan gingival fibroblast HGF hücre hattında herhangi bir sitotoksik ve apoptotik etki göstermediği bildirilmiştir (Bali ve diğ. 2015).

*A. ketenoglui* metanol özütünün kolorektal kanser hücre hatları HCT-116 ve HT-29 üzerinde antikanser aktivitesi belirlenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda P53, P21, CASP3 ve CASP9 mRNA ekspresyonunu artmıştır. Protein ekspresyon analizinde ise CASP3 ve P53 ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Ayrıca, HT-29 hücrelerinde CASP9 ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (Ayan ve diğ. 2022).

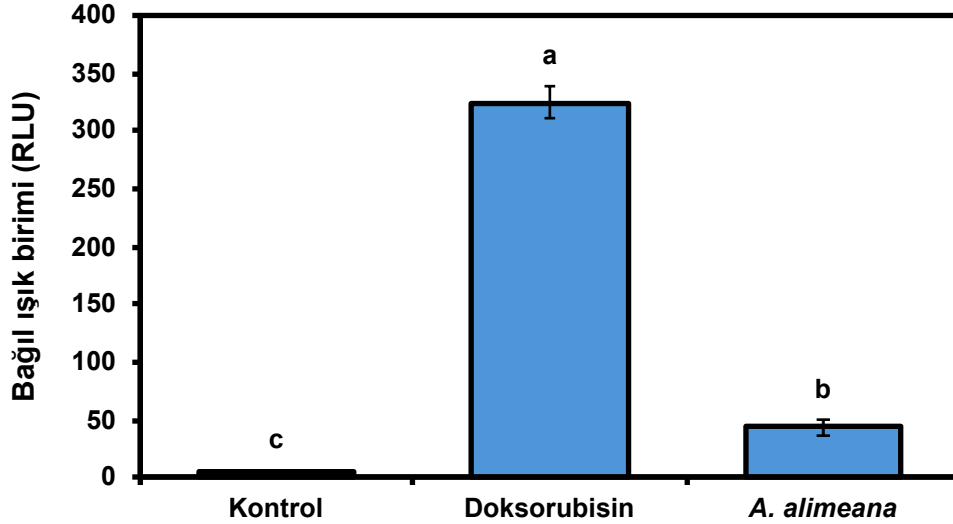
*A. filipendulina*'nın metanol özütünün, MCF-7 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik etkileri incelenmiştir. Annexin V testi ile gerçekleştirilen apoptoz deneyi sonuçları erken ve geç apoptotik hücrelerin varlığını tespit etmiştir. *A. filipendulina*'nın apoptozu indüklemeye yeteneğine sahip bir bitki olduğu bildirilmiştir (Hamzeloo ve diğ. 2019).

Literatür çalışmaları *Achillea* türlerinin çeşitli apoptotik yolları indükleyerek kanser hücrelerini apoptoza teşvik ettiğini göstermiştir. Literatür çalışmalarına benzer olarak A549 ve H1975 hücreleri üzerinde gerçekleştirdiğimiz *in vitro* apoptoz deneyleri, yeni keşfedilmiş bir tür olan *A. alimeana*'nın su ekstresinin antikanser özelliklerini apoptoz indüksiyonu yoluyla gerçekleştirdiğini göstermiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında A549 hücrelerinde hücre ölümü mekanizmasının, kaspaz bağımlı apoptozun içsel yolu aracılığıyla gerçekleştiği, H1975 hücrelerinde ise BCL2 ailesi proteinleri tarafından kontrol edilen kaspaz bağımsız yolun aktive olduğu düşünülmektedir.

### 3.2.3 Lüsiferaz Aktivitesi Sonuçları

*A. alimeana* su ekstresi akciğer kanseri hücrelerinde apoptozu indüklemektedir. Hücrelerin apoptozuna P53 transkripsiyonel faktörünün aracılık edip etmediğini doğrulamak için, P53RE ve lüsiferaz normalizasyonu amacıyla Renilla geni barındıran pGL4.38 [luc2P/P53RE/Hygro] plazmidini, transfeksiyon reaktifi kullanılarak HEK-293 hücrelerine transfekte edilmiştir. Transfeksiyon sonrasında luminometre ile lüsiferaz aktivitesi ölçülmüştür. Pozitif kontrol olarak

doksorubisin kullanılmıştır Kontrol grubu  $4,33 \pm 0,91$  RLU aktivite değerine sahip iken, Doksorubisin ( $324,20 \pm 16,81$ ) ve *A. alimeana* su ekstresi ( $43,86 \pm 7,68$ ) P53 promotör aktivitesini anlamlı bir şekilde arttırmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8: pGL4.38 plazmidi transfekte edilmiş hücelere, doksorubisin ve *A. alimeana* muamele edildikten sonra lüsiferaz aktivitesi ölçümü. Aynı harfi taşımayan değerler birbirinden istatistiki olarak anlamlı şekilde farklıdır ( $p < 0,05$ )

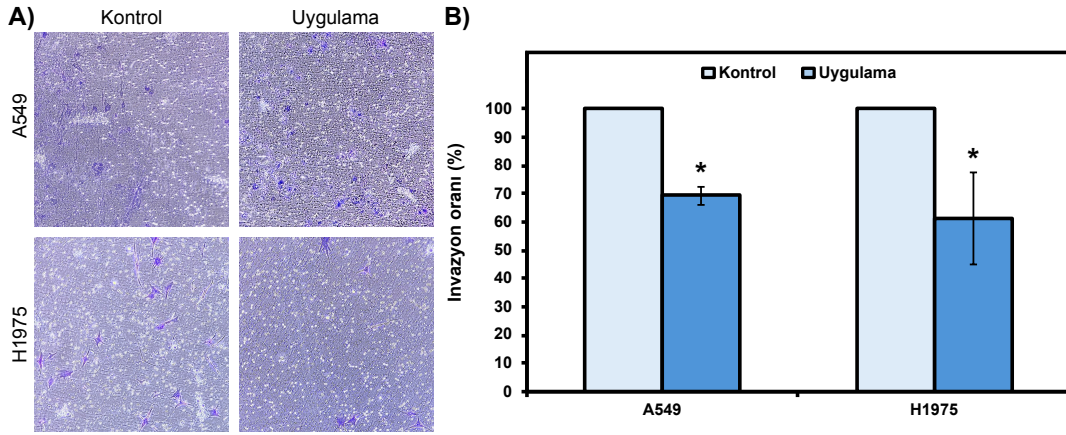
Bu sonuç, *A. alimeana*'nın akciğer kanseri hücrelerinde P53 aracılığıyla transkripsiyonel olarak düzenleme yaparak çeşitli sinyal yollarını etkilediğini düşündürmektedir.

### 3.3 İnvazyon Etkisinin Belirlenmesi

Kanser hücreleri çevresindeki dokuları istila etme yeteneği kazandığında, hücre dışı matriksten (ECM) hücreler göç etmeye başlar. İnvazyon, kanser hücrelerinin metastazı ile ilişkili bir süreci ifade eder (Martin ve diğ. 2013). Kanser hücrelerinin metastazını araştırmakta invazyon testleri kullanılmaktadır. Bu çalışmada *A. alimeana*'nın akciğer kanseri hücrelerinde anti-metastatik etkisinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla Matrigel invazyon testi kullanılmıştır. Göç eden hücreler kristal viyole ile boyanarak ışık mikroskobu ile sayılmış ve ImageJ programı ile analiz edilmiştir.

*A. alimeana* su ekstresinin 24 saat uygulaması sonrasında A549 hücrelerinde invazyonu  $\%30,5 \pm 3,32$  azalttığı, H1975 hücrelerinde ise kontrol

grubuna göre  $38,8 \pm 12,26$  baskıladığı belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ). Kontrol grubu 100 olarak alınmıştır (Şekil 3.9).



**Şekil 3.9:** A) Kontrol ve doz grubu invaze olan A549 ve H1975 hücrelerin mikroskop görüntüsü. Görüntüler temsili alanlardan seçilmiştir B) yüzde sütun grafiği

Literatür taramaları sonucunda fitokimyasalların anti-metastatik aktiviteler araştıran çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Weng ve Yen 2012; Kapinova ve diğ. 2019). *A. fragrantissima* hidrometanolik özütünün meme kanseri (MDA-MB-231, MCF-7, SKBR3), pankreas kanseri (BxPC-3, MiaPaCa-2), prostat kanseri (LNCaP, C4-2B, PC-3) ve akciğer kanseri (A549) hücreleri ile muamelesinden sonra hücre göçünde ve invazivlikte kademeli bir azalma gözlemlenmiş, invazivliği geciktirerek anti-metastatik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Ullah ve diğ. 2022). Yapılan başka bir çalışmada da *A. fragrantissima*'nın etanolik özütünün MCF-7 hücre hattında hücre göçünü durdurduğu, koloni oluşturma yeteneğinin kaybettiği ve invazyonu baskıladığı gösterilmiştir (Alasmari 2024).

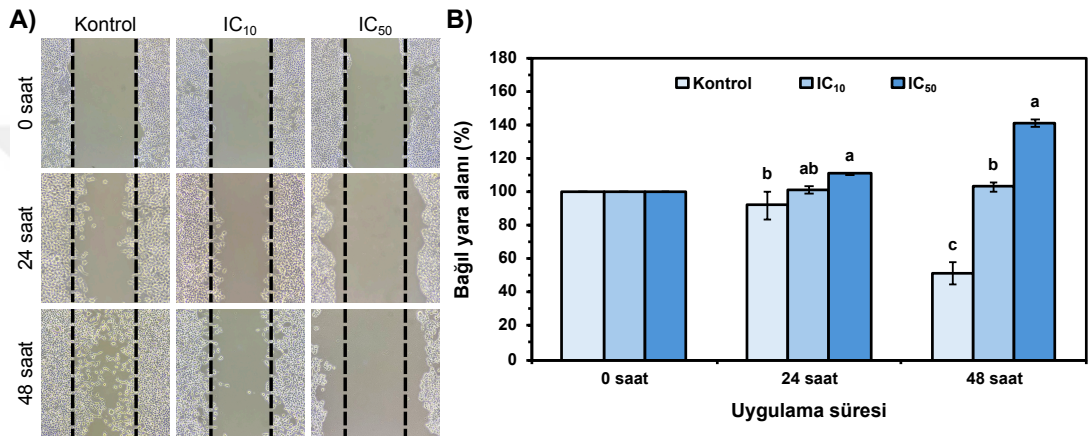
Deney sonuçları akciğer kanseri hücrelerinde invazivliğin *A. alimeana* ile muamele edilen hücrelerde anlamlı derecede azaldığı, dolayısıyla *A. alimeana*'nın iki hücre hattında da invazyonu baskılama potansiyelinin olduğu görülmüştür.

### 3.4 Migrasyon Etkisinin Belirlenmesi

Migrasyon yöntemi *A. alimeana* su ekstresinin A549 ve H1975 hücrelerin göç etme yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. 6 kuyulu plakalara ekilen hücreler %90 yoğunluğa ulaştıktan sonra yara açılımı gerçekleşmiş ve sıfırıncı saat olarak fotoğraf çekilmiştir. Sıfırıncı saat olarak ifade edilen yara

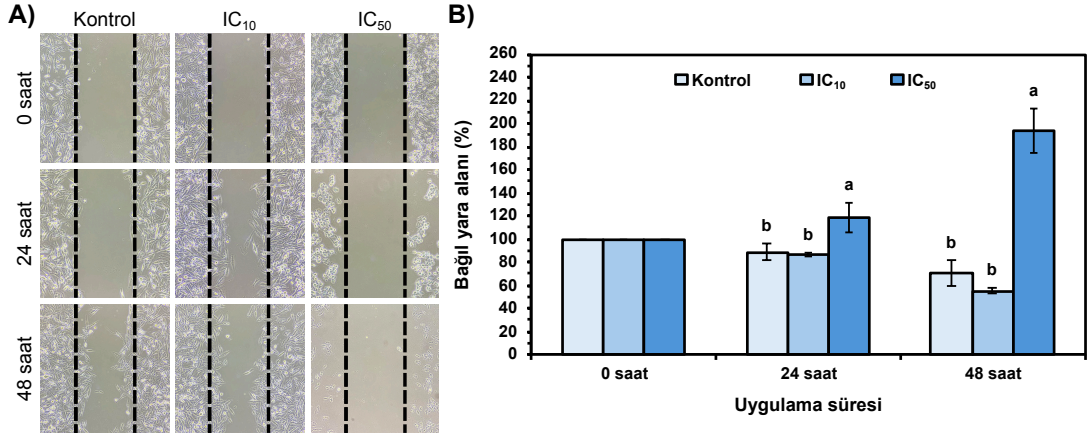
açılımı %100 olarak kabul edilmiş ve sonuçlar buna göre değerlendirilmiştir. Yara alanı kapanana kadar hücreler fotoğraflanmış ve ImageJ programı ile analiz edilmiştir. Kontrol grubu yalnızca besiyeri içermektedir.

Elde edilen sonuçlara göre negatif kontrolde 48. saatte  $49 \pm 6,27$  migrasyon kaydedilmiştir. *A. alimeana*'nın  $IC_{10}$  dozunda 48 saat uygulamasından sonra  $103 \pm 2,35$  migrasyonu engellerken,  $IC_{50}$  dozunun 48. saat uygulamasında  $141 \pm 2,28$  hücre çoğalmasını engellediği ayrıca hücre morfolojisini bozduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10: A) *A. alimeana*'nın A549 hücre hattında migrasyon yeteneği üzerine etkisi B) yüzde sütun grafiği. Aynı harfi taşımayan değerler birbirinden anlamlı şekilde farklıdır ( $p < 0,05$ ).

Elde edilen sonuçlara göre negatif kontrolde 48. saatte  $30 \pm 10,71$  migrasyon kaydedilirken, *A. alimeana*'nın  $IC_{10}$  dozunun 48 saat uygulamasından sonra  $44 \pm 2,32$  migrasyon kaydedilmiştir. *A. alimeana*'nın  $IC_{50}$  dozunun 48. saat uygulamasında  $194 \pm 18,95$  hücre çoğalmasını engellediği ayrıca hücre morfolojisinin bozulduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.11).



**Şekil 3.11:** A) *A. alimeana*'nın H1975 hücre hattında migrasyon yeteneği üzerine etkisi B) yüzde sütun grafiği. Aynı harfi taşımayan değerler birbirinden anlamlı şekilde farklıdır ( $p < 0,05$ ).

*A. fragrantissima*'nın hücreyel göç üzerindeki etkisini araştırmak için MCF-7 hücrelerinde *in vitro* yara iyileştirme testi gerçekleştirilmiştir. Test grubunda migrasyon azalmış, kontrol grubunda ise aktif olarak göç etmiş ve yara alanını kapatmıştır. Artan aralık sırasında, tedavi edilen grupta hücreyel bütünlüğünde kaybolduğu gösterilmiştir (Alasmari 2024). Ayrıca Qurtam ve Nasr yaptığı çalışmada *A. millefolium* diklorometan özütünün MDA-MB-231 insan meme kanseri hücreleri üzerinde apoptotik ve anti-göç etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Qurtam and Nasr 2024). Yaptığımız çalışma sonucu literatür çalışmalarına benzer olarak *A. alimeana*'nın A549 hücrelerine uygulanması sonucu IC<sub>10</sub> ve IC<sub>50</sub> dozunda hücre göçünü geciktirdiği görülmüştür. H1975 hücrelerinde ise *A. alimeana* uygulanmasından 48 saat sonra IC<sub>10</sub> dozunda yara kapanması desteklenirken, IC<sub>50</sub> dozunda yara kapanmasını engellemiştir. Bu etkinin doza bağlı olduğu düşünülmektedir. *A. alimeana*'nın her hücre hattı için spesifik doz çalışmaları yapılmasının önem taşıdığı anlaşılmaktadır. Migrasyon deneyi sonuçları *A. alimeana*'nın hücre türüne, sahip olduğu mutasyonlara ve doza bağlı olarak hücre migrasyonunu artırıp azaltabileceğine işaret etmektedir.

#### 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Akciğer kanseri, dünya genelinde en sık görülen kanser türlerinden biri olup, kansere bağlı ölümlerde de ilk sıralarda yer almaktadır (Bray ve diğ. 2024; Thandra ve diğ. 2021). DSÖ'nün 2020 tahminlerine göre, erkekler arasında en yaygın kanser türü olarak bilinirken, kadınlarda ikinci sırada yer almaktadır (Bray ve diğ. 2024). Bu kadar yaygın olmasının sebebi hastalığın erken evrelerinde herhangi bir belirti göstermemesidir. Bu nedenle birçok hastaya ileri evre akciğer kanseri tanısı konmaktadır (Ning ve diğ. 2021). Hastalığın tedavisi, kanserin türüne ve evresine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Cerrahi rezeksiyon uzun süreli sağkalım için tercih edilebilir. Ancak her hastanın durumu farklı olduğundan, tedavi seçenekleri kişiselleştirilmelidir (Montagne ve diğ. 2021). İmmünoterapi gibi yeni tedavi yöntemleri özellikle ileri evre kanserlerde umut vaat eden sonuçlar göstermektedir (Mamdani ve diğ. 2022). Cerrahi müdahalenin uygun olmadığı hastalarda, kanserli hücreleri yok etmek için radyoterapi ve/veya kemoterapi önerilebilmektedir (Albain ve diğ. 2009). Kemoterapi, hastalıkların tedavisinde sıklıkla başvurulan yöntemler arasındadır. Ancak kemoterapinin neden olabileceği toksisite, sınırlı etkinlik ve bazı durumlarda gelişebilen çoklu ilaç direnci gibi yan etkiler, tedavinin uygulanabilirliğini kısıtlayan faktörlerdendir (Alfarouk ve diğ. 2015; Bukowski ve diğ. 2020). Bu bağlamda, klinik sonuçları iyileştirecek yeni terapötik ajanların geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Bitkisel ilaçlar, kemoterapi tedavisinin yol açabileceği yan etkileri hafifletmek, toksisiteyi düşürmek, hastaların yaşam süresini artırmak, bağışıklık sistemini güçlendirmek, kanser semptomlarını azaltmak ve hatta bazı durumlarda antikanser etkiler göstermek için tercih edilmektedir (Wang ve diğ. 2012; Yin ve diğ. 2013; Jaradat ve diğ. 2016; Li ve diğ. 2020; Jenča ve diğ. 2024). Bu doğal ilaçlar modern tıbbi tedavilerle birlikte kullanıldığında, hastaların genel sağlık durumlarını iyileştirebilir ve yaşam kalitelerini yükseltebilir (Olaku ve White 2011). Doğal kaynaklardan izole elde edilerek elde edilen bileşikler kansere karşı koruyucu, oksidatif hasarı önleyici, bağışıklık sistemini düzenleyici, mikroplara karşı öldürücü ve iltihap önleyici gibi birçok terapötik fayda sağlamaktadır (Arulselvan ve diğ. 2016; Xu ve diğ. 2017; Asma ve diğ. 2022; Zebeaman ve diğ. 2023; Eshboev ve diğ. 2024). Bitkisel kaynaklardan elde edilen preparatların, potansiyel antikanser

ajanları olarak tanımlanması büyük önem taşımaktadır. Bu tür doğal ürünler, kanserle mücadelede yeni yollar sunarak geleneksel tedavilere alternatif çözümler sağlayabilir. Bu nedenle, bu tür preparatların sistematik bir şekilde tanımlanması ve karakterize edilmesi, kanser tedavisindeki potansiyellerini anlamak için kritik bir adımdır.

*Achillea* türleri, geleneksel tıpta uzun zamandır kullanılan ve çeşitli sağlık yararlarıyla bilinen bitkilerdir. Bu bitkiler, yaraların iyileştirilmesi, kanamaların durdurulması, baş ağrılarının hafifletilmesi, iltihapların azaltılması, ağrılarının giderilmesi, spazmodik rahatsızlıkların tedavisi ve hazımsızlık problemlerinin üstesinden gelmede yardımcı olabilir (Saeidnia ve diğ. 2011; Strzpek-Gomółka ve diğ. 2021; Bagheri ve diğ. 2024). *A. alimeana* yeni tanımlanmış bir türüdür ve insan akciğer kanseri hücre hatları üzerindeki potansiyel antikanser etkilerinin araştırılması, kanser tedavisi alanında önemli bir gelişme olabilir. Bu türün, kanser hücrelerinin büyümesini engelleme veya yavaşlatma yeteneği, modern tıbbın yanı sıra geleneksel tedavi yöntemlerine de katkıda bulunabilir. *A. alimeana*'nın etkinliğinin bilimsel olarak kanıtlanması, bu bitkinin kanserle mücadelede kullanımını destekleyecek ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine imkân tanıyacaktır. Bu nedenle, bu bitkinin antikanser özelliklerinin belirlenmesi hem bilimsel hem de tıbbi açıdan büyük önem taşımaktadır.

Yeni antikanser ilaçlarının geliştirilmesindeki temel yaklaşımlardan biri, bitkilerin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin tespit edilmesidir. Bu nedenle öncelikle, ilaçların etkinliğini ölçmek için iki farklı mutasyona sahip akciğer kanser hücre hattı üzerinde IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır. IC<sub>50</sub> değeri, bir ilacın belirli bir hücre hattını inhibe etmek için gereken konsantrasyonunu ifade eder ve bu değer, potansiyel bir tedavinin gücünü belirlemede kritik öneme sahiptir. Bu yüzden öncelikle *A. alimeana*'nın A549 ve H1975 kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi araştırılmış ve IC<sub>50</sub> değerleri belirlenmiştir. *A. alimeana*'nın antiproliferatif etkileri, farklı akciğer kanser hücre hatlarında çeşitlilik göstermiştir. H1975 hücre hattının A549'a kıyasla *A. alimeana*'ya daha duyarlı olduğu, *A. alimeana*'nın sitotoksik etkilerinin akciğer kanseri hücreleri arasında değişebileceğini ve potansiyel bir kanser tedavi ajanı olarak kullanımının, hücre hattı özelliklerine göre optimize edilmesi gerektiğini göstermiştir. Ayrıca, *A. alimeana*'nın akciğer kanseri

hücreleri (A549 ve H1975) üzerindeki toksisitesinin, normal hücelere (HEK-293) göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Kemoterapötik ajanlar ve bitkisel kaynaklı antikanser ilaçları, sitotoksik aktivitelerini genellikle tümör hücrelerinde apoptozu tetikleyerek gösterirler (Banerjee ve diğ. 2023). Apoptotik sinyallerin uyarımı çoğunlukla P53 sinyallerini aktivasyonu ile gerçekleşir. Ancak P53 geni kanser hücrelerinde en fazla mutasyona uğrayan gen dir (Hernández Borrero ve El-Deiry 2021). Bu durumda farklı apoptotik sinyal uyarıcıları veya apoptotik uyarıcılara dirençli kanser hücrelerinde, farklı apoptotik olmayan mekanizmalarla da ölüme yönlendirilebilir (Mohammad ve diğ. 2015). *A. alimeana* uygulaması sonucunda A549 ve H1975 hücrelerinde hem apoptotik hem de ölü/nekrotik hücre ölümü gerçekleşmiştir. *A. alimeana*'nın akciğer kanseri hücrelerinde apoptotik etkisini, P53 promotör aktivitesindeki artış nedeniyle transkripsiyonel düzeyde apoptozu tetikleyerek ve çeşitli sinyal yollarını aktive ederek gerçekleştirdiği düşünülmektedir. P53; apoptoz, hücre döngüsü durması, DNA onarımı ve hücre yaşlanma gibi birçok hücre olayda görev alan bir transkripsiyon faktörüdür (Chen ve diğ. 2016). P53 transkripsiyonel aktivitesini, bağlandığı hedef genlerdeki düzenleyici bölge olan P53 yanıt elamanlarına bağlanarak başlatır (Sullivan ve diğ. 2018). P53 pro-apoptotik genlerin transkripsiyon düzeyini değiştirerek apoptozu artırmaktadır. BAX geninin transkripsiyonunu artırıp BCL2'nin transkripsiyonunu azaltarak apoptozu indüklemektedir (Yamaguchi ve diğ. 2009). *In vitro* apoptoz deney sonuçları, KRAS mutasyonlu A549 hücrelerinde hücre ölümü mekanizmasının kaspaz bağımlı apoptozun içsel yolu aracılığıyla gerçekleştiğini, EGFR mutasyonlu H1975 hücrelerinde ise BCL2 ailesi proteinleri tarafından kontrol edilen kaspaz bağımsız yolun aktive olduğunu düşündürmektedir. Bu farklılık her iki hücre hattındaki farklı mutasyonlardan kaynaklanıyor olabilir. *A. alimeana*'nın antiproliferatif etkisi EGFR mutasyonlu hücrelerde daha fazla iken, apoptotik etkisi KRAS mutasyonlu hücrelerde daha belirgindir. Bununla birlikte *A. alimeana* uygulaması sonucunda ölü/nekrotik hücre ölümü de anlamlı bir şekilde artmıştır. Hücre ölümü/nekroz sinyal yolağının ileri araştırmalarda belirlenmesi apoptoza dirençli kanser hücrelerinde alternatif hücre ölümü yollarını indükleyen antikanser ilaçlarının da keşfedilmesi açısından önem arz etmektedir.

Kanser hücrelerin anormal bir şekilde çoğalması ve oluştuğu dokudan farklı dokulara yayılması ile karakterizedir (Brown ve diğ. 2023). Sitotoksik ilaçlar kanser tedavisinde her ne kadar etkili olsa da lokal invazyon veya metastaz gerçekleştiğinde tedavi etkisi sınırlanmaktadır (Gandalovičová ve diğ. 2017). Bu nedenle kanser hücrelerinde antikanser ilaçlarının ECM'yi istila etme ve metastaz özellikleri de araştırılmalıdır (Prakash ve diğ. 2024). *A. alimeana*, her iki hücre hattında da hücrelerin göç ve invazyon yeteneklerini azaltarak anti-migratif ve anti-invaziv etki göstermiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında literatüre yeni kazandırılmış olan *A. alimeana* bitkisinin akciğer kanseri hücrelerinde antiproliferatif etki gösterdiği, apoptoz ve nekrozu indüklediği, anti-migratif ve anti-invaziv özelliklerinin bulunduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar *A. alimeana*'nın antikanser aktivitesine sahip olduğunu gözler önüne sermiştir. İleriki çalışmalar ile moleküler mekanizmasının *in vitro* ve *in vivo* uygulamalar ile daha detaylı araştırılması ve yan etkilerinin belirlenmesi gerekmektedir.

## 5. KAYNAKLAR

Abdalla, A. N., Shaheen, U., Abdallah, Q. M. A., Flamini, G., Bkhaitan, M. M, Abdelhady, M. I. S., Ascrizzi, R., Bader, A., “Proapoptotic activity of *Achillea membranacea* essential oil and its major constituent 1,8-cineole against A2780 ovarian cancer cells”, *Molecules*, 30, 25 (7), 1582, (2020).

Achika, J. I., Arthur, D. E., Gerald, I., Adedayo, A. Y., “A Review on the phytoconstituents and related medicinal properties of plants in the Asteraceae family”, *IOSR Journal of Applied Chemistry*, 7, 1-8, (2014).

Alasmari, A., “*Achillea fragrantissima* (Forssk.) Sch. Bip instigates the ROS/FADD/c-PARP expression that triggers apoptosis in breast cancer cell (MCF-7)”, *PLoS One*, 31, 19(5), (2024).

Albain, K. S., Swann, R. S., Rusch, V. W., Turrisi, A. T., Shepherd, F. A., Smith, C., Chen, Y., Livingston, R. B., Feins, R. H., Gandara, D. R., Fry, W. A., Darling, G., Johnson, D. H., Green, M. R., Miller, R. C., Ley, J., Sause, W. T., “Radiotherapy plus chemotherapy with or without surgical resection for stage III non-small-cell lung cancer: a phase III randomised controlled trial”, *Lancet*, 1, 374 (9687), 379-386, (2009).

Albayrak, S., Silahtarlıoğlu, N., “Cytotoxic activity of *Achillea coarctata* Poir. Extract”, *Proceedings*, 1 (10), 1039, (2017).

Alberg, A. J., Brock, M. V., Ford, J. G., Samet, J. M., Spivack, S. D., “Epidemiology of lung cancer: diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines”, *Chest*, 143, (2013).

Albin, M., Magnani, C., Krstev, S., Rapiti, E., Shefer, I., “Asbestos and cancer: an overview of current trends in Europe”, *Environ Health Perspect*, 107, 289–298, (1999).

Alfarouk, K. O., Stock, C. M., Taylor, S., Walsh, M., Muddathir, A. K., Verduzco, D., Bashir, A. H., Mohammed, O. Y., Elhassan, G. O., Harguindey, S., Reshkin, S. J., Ibrahim, M. E., Rauch, C. “Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp”, *Cancer cell international*, 15, 71 (2015).

Alhmoud, J. F., Woolley, J. F., Al Moustafa, A. E., Malki, M. I., “DNA Damage/Repair Management in Cancers”, *Cancers*, 12, 1050, (2020).

Alshuail, N., Alehaideb, Z., Alghamdi, S., Suliman, R., Al-Eidi, H., Ali, R., Barhoumi, T., Almutairi, M., Alwhibi, M., Alghanem, B., Alamro, A., Alghamdi, A.,

Matou-Nasri, S., “*Achillea fragrantissima* (Forssk.) Sch. Bip flower dichloromethane extract exerts anti-proliferative and pro-apoptotic properties in human triple-negative breast cancer (MDA-MB-231) cells: *in vitro* and *in silico* studies”, *Pharmaceuticals*, 26, 15 (9), 1060, (2022).

Ambrosini, G. L., Berry, G., de Klerk, N. H., Musk, A. W., Reid, A., “The risk of lung cancer with increasing time since ceasing exposure to asbestos and quitting smoking”, *Occup Environ Med*, 63, 509-512, (2006).

Amirghofran, Z., Karimi, M., “Cytotoxic activity of *Thymus vulgaris*, *Achillea millefolium* and *Thuja orientalis* on different growing cell lines”, *Medical Journal of The Islamic Republic of Iran*, 15 (3), 149-154, (2001).

Amos, A., Bostock, Y., “Young people, smoking and gender a qualitative exploration”, *Health education research*, 22(6), 770–781. (2007).

Andersen, H., Jekunen, A., Johansson, M., Sanström, N., “Socioeconomic status and lifestyle patterns in the most common cancer types-community-based research”, *BMC Public Health*, 23 (1), 1722, (2023).

Anvari, D., Jamei, R., “Evaluation of antioxidant capacity and phenolic content in ethanolic extracts of leaves and flowers of some Asteraceae species”, *Recent Pat Food Nutr Agric*, 9 (1), 42-49, (2018).

Arabacı, T., “The revision of *Achillea* L. (Asteraceae) genus grown in Turkey”, Doktora tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya, Turkey, (2006).

Arabacı, T., Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M. T., Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler), İstanbul, Turkey: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, 108–112, (2012).

Arulselvan, P., Fard, M. T., Tan, W. S., Gothai, S., Fakurazi, S., Norhaizan, M. E., Kumar, S. S., “Role of antioxidants and natural products in inflammation”, *Oxid Med Cell Longev*, 5276130, (2016).

Ashtiani, M., Nabatchian, F., Galavi, H. R., Saravani, R., Farajian-Mashhadi, F., Salimi, S., “Effect of *Achillea wilhelmsii* extract on expression of the human telomerase reverse transcriptase mRNA in the PC3 prostate cancer cell line”, *Biomed Rep*, 7 (3), 251-256, (2017).

Asma, S. T., Acaroz, U., Imre, K., Morar, A., Shah, S. R. A., Hussain, S. Z., Arslan-Acaroz, D., Demirbas, H., Hajrulai-Musliu, Z., Istanbullugil, F. R., Soleimanzadeh, A., Morozov, D., Zhu, K., Herman, V., Ayad, A., Athanassiou, C., Ince, S., “Natural products/bioactive compounds as a source of anticancer drugs”, *Cancers*, 15, 14 (24), 6203, (2022).

Ayan, İ. Ç., Çetinkaya, S., Dursun, H. G., Güneş, C. E., Şirin, S., “Anticancer effect and phytochemical profile of the extract from *Achillea ketenoglui* against human colorectal cancer cell lines”, *Anticancer Agents Med Chem*, 22 (9), 1769-1779, (2022).

Ayoobi, F., Moghadam-Ahmadi, A., Amiri, H., Vakilian, A., Heidari, M., Farahmand, H., Fathollahi, M. S., Fatemi, I., Shafiei, S. A., Alahtavakoli, M., Shamsizadeh, A. “*Achillea millefolium* is beneficial as an add-on therapy in patients with multiple sclerosis: A randomized placebo-controlled clinical trial”, *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 52, 89–97 (2019).

Bade, B. C., Dela Cruz, C. S., “Lung cancer 2020: epidemiology, etiology, and prevention”, *Clin Chest Med.*, 41 (1), 1-24, (2020).

Bağcı Uzun, G., Nisari, M., Hanım Yay, A., Şeker Karatoprak, G., Al, Ö., Uçar, S., Arslan, A., “Investigating the anti-tumoral effect of yarrow (*Achillea millefolium*) on the mice in which Ehrlich solid tumor is created”, *Med Oncol*, 6, 40 (1), 42, (2022).

Bagheri, A., Amin, G., Tavangar, S. M., Heidari, M., Bagheri, J., “Safety and hemostatic effect of *Achillea millefolium* L. in localized bleeding”, *Hepatol Forum*, 16, 5 (1), 25-27, (2024).

Bailey-Wilson, J. E., Amos, C. I., Pinney, S. M., Petersen, G. M., de Andrade, M., Wiest, J. S., Fain, P., Schwartz, A. G., You, M., Franklin, W., Klein, C., Gazdar, A., Rothschild, H., Mandal, D., Coons, T., Slusser, J., Lee, J., Gaba, C., Kupert, E., Perez, A., Anderson, M. W., “A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25”, *Am J Hum Genet*, 75 (3), 460-74, (2004).

Bailey, A., Herbst, R. S., Leong, T. L., Skarin, T. A. and Sugarbaker, D., “Lung cancer in patients under age 40”, *Lung Cancer*, 32 (3), 255-264, (2001).

Baker, D. H. A., “*Achillea millefolium* L. ethyl acetate fraction induces apoptosis and cell cycle arrest in human cervical cancer (HeLa) cells”, *Annals of Agricultural Sciences*, 65 (1), 42-48, (2020).

Bali, E. B., Açıık, L., Elçi, P., Sarper, M., Avcu, F., Vural, M., “*In vitro* anti-oxidant, cytotoxic and pro-apoptotic effects of *Achillea teretifolia* Willd extracts on human prostate cancer cell lines”, *Pharmacogn Mag*, 11, 308-15, (2015).

Banerjee, S., Nau, S., Hochwald, S.N., Xie, H., Zhang, J., “Anticancer properties and mechanisms of botanical derivatives”, *Phytomedicine Plus*, 3 (1), 100396, (2023).

Barda, C., Grafakou, M. E., Tomou, E.M., Skaltsa, H., “Phytochemistry and evidence-based traditional uses of the genus *Achillea* L.: an update (2011–2021)”, *Scientia Pharmaceutica*, 89(4), 50, (2021).

Basumallik, N., and Agarwal, M., Small Cell Lung Cancer, In: StatPearls, StatPearls Publishing, (2023).

Bhat, H. M., Bhat, K. A., Prabha, S., Hamid, A., “Antioxidant and cytotoxic activities of *Achillea millefolium* from Kashmir”, *J Acad Ind*, 2(8), 487-491, (2014).

Boissier, E., “Flora Orientalis”, *Genevae et Basileae*, 3, 253–277, (1875).

Bonnesen, B., Pappot, H., Holmstav, J., Skov, B. G., “Vascular endothelial growth factor A and vascular endothelial growth factor receptor 2 expression in non-small cell lung cancer patients: relation to prognosis”, *Lung Cancer*, 66(3), 314-318, (2009).

Bray F, Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Soerjomataram, I., Jemal, A., “Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries”, *CA Cancer J Clin*, 74, 229-63, (2024).

Break, M. K. B., Younes, K. M., Elkahoui, S., Unissa, R., Alfahidat, S. A., Alshawi, K. S., Abouzied, A. S., “*Achillea fragrantissima* (Forssk.) Sch.Bip. methanolic extract exerts potent antimicrobial activity and causes cancer cell death *via* induction of caspase-dependent apoptosis and S-phase arrest”, *Natural Product Research*, 36(18), 4639–4644, (2021).

Brenner, D. R., Boffetta, P., Duell, E. J., Bickeböller, H., Rosenberger, A., McCormack, V., Muscat, J. E., Yang, P., Wichmann, H. E., Brueske-Hohlfeld, I., Schwartz, A. G., Cote, M. L., Tjønneland, A., Friis, S., Le Marchand, L., Zhang, Z. F., Morgenstern, H., Szeszenia-Dabrowska, N., Lissowska, J., Zaridze, D., Hung, R. J., “Previous lung diseases and lung cancer risk: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium”, *Am J Epidemiol*, 1, 176 (7), 573-85, (2012).

Brenner, D. R., McLaughlin, J. R., Hung, R. J., “Previous lung diseases and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis”, *PLoS One*, 31, 6 (3), (2011).

Brown, J. S., Amend, S. R., Austin, R. H., Gatenby, R. A., Hammarlund, E. U., Pienta, K. J., “Updating the definition of cancer”, *Mol Cancer Res.*, 1, 21(11), 1142-1147, (2023).

Bukowski, K., Kciuk, M., Kontek, R., “Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy”, *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (9), 3233, (2020).

Buttice, S., Buttigliero, C., Cani, M., Capelletto, E., Novello, S., Turco, F. and Vogl, M. U., “How does environmental and occupational exposure contribute to carcinogenesis in genitourinary and lung cancers?”, *Cancers*, 15(10), 2836, (2023).

Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., Akpulat, H. A. “Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae)”, *J Ethnopharmacol*, 87(2-3), 215-220, (2003).

Cao, Y., Ding, X. J. and Kanwal, M., “Familial risk for lung cancer”, *Oncol Lett*, 13(2), 535-542, (2016).

Case, B. W., “Asbestos, smoking, and lung cancer: interaction and attribution”, *Occup Environ Med*, 63, 507–8, (2006).

Çelik Turgut, G., “A Comparative study of the antiproliferative and apoptotic effects of some chemotherapeutic drugs on neuroblastoma cells”, *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 12, 3, 634–641, (2023).

Celik, G., Akca, H., Sen, A., “Investigation of aromatase inhibition by several dietary vegetables in human non–small cell lung cancer cell lines”, *Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem*, 38 (2), 207–217, (2013).

Çen, Y., Fu, Y., Liu, J., Liu, Z., Xia, H. and Xu, H., “Gender disparities in lung cancer incidence in the United States during 2001–2019”, *Scientific Reports*, 12581, (2023).

Chagas-Paula, D. A., Oliveira, T. B., Faleiro, D. P., Oliveira, R. B., Costa, F. B., “Outstanding anti-inflammatory potential of selected Asteraceae species through the potent dual inhibition of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase”, *Planta Med*, 81 (14), 1296-307, (2015).

Chaves, N., Santiago, A., Alías, J. C., “Quantification of the antioxidant activity of plant extracts: analysis of sensitivity and hierarchization based on the method used”, *Antioxidants*, 15, 9 (1), 76, (2020).

Chen, J., “The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression”, *Cold Spring Harb Perspect Med*, 16 (3), (2016).

Chen, Y., Duffy, S. W., Field, J. K., Marcus, M. W., Raji, O. Y., “LLPi: Liverpool lung project risk prediction model for lung cancer incidence”, *Cancer Prev Res*, 8, 570–575, (2015).

Chiou, S. Y., Lee, Y. S., Jeng, M. J., Tsao, P. C., Soong, W. J., “Moderate hypothermia attenuates oxidative stress injuries in alveolar epithelial A549 cells”, *Exp Lung Res*, 39 (6), 217-28, (2013).

Cho, H., Hwangbo, B., Kwon, H., Lee, S. and Oh, C. M., “Prevalence of pre-existing lung diseases and their association with income level among patients with lung cancer: a nationwide population-based case-control study in South Korea”, *BMJ Open Respir Res*, 10 (1), (2023).

Chow, A. Y., “Cell cycle control by oncogenes and tumor suppressors: driving the transformation of normal cells into cancerous cells”, *Nature Education*, 3 (9), 1-7, (2010).

Church, T. R., Hocking, W. G., Kvale, P. A., Riley, T. L., Silvestri, G. A., Tammemagi, M. C., “Evaluation of the lung cancer risks at which to screen ever- and never-smokers: screening rules applied to the PLCO and NLST cohorts”, *PLoS Med*, 11, (2014).

Concha-Barrientos, M., Driscoll, T., Fingerhut, M., Leigh, J., Nelson, D.I., Steenland, K., “The global burden of disease due to occupational carcinogens”, *Am J Ind Med*, 48, 419–31, (2005).

Cooper, W. A., Lam, D. C., O’Toole, S. A., Minna, J. D., “Molecular biology of lung cancer”, *J Thorac Dis.*, 479-490, (2013).

Cragg, G. M., Newman, D. J., “Natural products: A continuing source of novel drug leads”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA): General Subjects*, 1830 (6), 3670-3695, (2013).

Cranford, H. M., Koru-Sengul, T., Lopes, G. and Pinheiro, P. S., “Lung cancer incidence by detailed race-ethnicity”, *Cancers*, 15 (7), 2164, (2023).

Croft, J. B., Liu, Y., Lu, H., Matthews, K. A., Wheaton, A. G., Xu, F., “Urban-rural County and state differences in chronic obstructive pulmonary disease - United States, 2015”, *MMWR Morb Mortal Wkly*, 67, 205–211, (2018).

Csupor-Löffler, B., Hajdú, Z., Zupkó, I., Réthy, B., Falkay, G., Forgo, P., Hohmann, J., “Antiproliferative effect of flavonoids and sesquiterpenoids from *Achillea millefolium* s.l. on cultured human tumour cell lines”, *Phytother Res*, 23 (5), 672-676, (2009).

D'Amico, D., Carbone, D., Mitsudomi, T., Nau, M., Fedorko, J., Russell, E., Johnson, B., Buchhagen, D., Bodner, S., Phelps, R. “High frequency of somatically acquired p53 mutations in small-cell lung cancer cell lines and tumors”, *Oncogene*, 7 (2), 339-346, (1992).

Dehelean, C. A., Marcovici, I., Soica, C., Mioc, M., Coricovac, D., Iurciuc, S., Cretu, O. M., Pinzaru, I., “Plant-derived anticancer compounds as new perspectives in drug discovery and alternative therapy”, *Molecules*, 19, 26 (4), 1109, (2021).

Dela Cruz, C. S., Matthay, R. A., Tanoue, L. T “Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention”, *Clin Chest Med*, 32, 605–44, (2011).

Desai, A. G., Qazi, G. N., Ganju, R. K., El-Tamer, M., Singh, J., Saxena, A. K., Bedi, Y. S., Taneja, S. C., Bhat, H. K., “Medicinal plants and cancer chemoprevention”, *Curr Drug Metab*, 9 (7) 581-91, (2008).

Duman, H., *Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Suppl. 2)*, 11, Edinburgh, UK: Edinburgh University Press, 158–159, (2000).

Eshboev, F., Mamadalieva, N., Nazarov, P.A., Hussain, H., Katanaev, V., Egamberdieva, D., Azimova, S., “Antimicrobial action mechanisms of natural compounds isolated from endophytic microorganisms”, *Antibiotics*, 13 (3), 271, (2024).

Fidler, M. J., Shersher, D. D., Borgia, J. A., Bonomi, P., “Targeting the insulin-like growth factor receptor pathway in lung cancer: problems and pitfalls”, *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 4 (2), 51-60, (2012).

Field, R. W., Withers, B.L., “Occupational and environmental causes of lung cancer”, *Clin Chest Med*, 33, 681–703, (2012).

Fong, K. M., Sekido, Y., Gazdar, A. F., Minna, J. D., “Lung cancer. 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications”, *Thorax*, 58 (10), 892-900, (2003).

Galavi, H. R., Saravani, R., Shahraki, A., Ashtiani, M., “Anti-proliferative and apoptosis inducing potential of hydroalcoholic *Achillea wilhelmsii* C. Koch extract on human breast adenocarcinoma cell lines MCF-7 and MDA-Mb-468”, *Pak J Pharm*, 29, 2397-2403, (2016).

Gandalovičová, A., Rosel, D., Fernandes, M., Veselý, P., Heneberg, P., Čermák, V., Petruželka, L., Kumar, S., Sanz-Moreno, V., Brábek, J., “Migrastatics-anti-metastatic and anti-invasion drugs promises and challenges”, *Trends Cancer*, 3 (6), 391-406, (2017).

Garzillo, C., Loffredo, F., Pugliese, M., Quarto, M., “Indoor radon exposure and lung cancer risk: a meta-analysis of case-control studies”, *Transl Cancer*, 6, 934–943, (2017).

Gaweł-Bęben, K., Strzypek-Gomółka, M., Czop, M., Sakipova, Z., Głowniak, K., Kukula-Koch, W., “*Achillea millefolium* L. and *Achillea biebersteinii* Afan.

hydroglycolic extracts-bioactive ingredients for cosmetic use”, *Molecules*, 24, 25 (15), 3368, (2020).

Gee, K. and Yendamuri, S., “Lung cancer in females—sex-based differences from males in epidemiology, biology, and outcomes: a narrative review”, *Transl Lung Cancer Res*, 13 (1), 163-178, (2024).

Gergen, A. K., Scott, C. D., Mitchell, J.D., “Surgery for limited stage small cell lung cancer”, *J Thorac Dis*, 12 (10), 6291-6297, (2020).

Ghavami, G., Sardari, S., Shokrgozar, M. A., “Anticancerous potentials of *Achillea* species against selected cell lines”, *J Medi Plan Res*, 4, 2411–2417, (2010).

Gonelimali, F. D., Lin, J., Miao, W., Xuan, J., Charles, F., Chen, M., Hatab, S. R., “Antimicrobial properties and mechanism of action of some plant extracts against food pathogens and spoilage microorganisms”, *Front Microbiol*, 24, 9, 1639, (2018).

Gorgoulis, V. G., Pefani, D. E., Pateras, I. S., Trougakos, I. P., “Integrating the DNA damage and protein stress responses during cancer development and treatment”, *J. Pathol*, 246 (1), 12-40, (2018).

Gou, J., Lu, Y., Xie, M., Tang, X., Chen, L., Zhao, J., Li, G., Wang, H., “Antimicrobial activity in Asterceae: The selected genera characterization and against multidrug resistance bacteria”, *Heliyon*, 31, 9 (4), (2023).

Haïdara, K., Zamir, L., Shi, Q.W., Batist, G., “The flavonoid Casticin has multiple mechanisms of tumor cytotoxicity action”, *Cancer Lett*, 28, 242 (2), 180-190, (2006).

Hajhashemi, M., Ghanbari, Z., Movahedi, M., Rafieian, M., Keivani, A., Haghollahi, F., “The effect of *Achillea millefolium* and *Hypericum perforatum* ointments on episiotomy wound healing in primiparous women”, *J Matern Fetal Neonatal Med*, 31 (1), 63-69, (2018).

Hammond, E. C., Seidman, H., Selikoff, I. J., “Asbestos exposure, cigarette smoking and death rates”, *Ann N Y Acad*, 330, 473-490, (1979).

Hamzeloo-Moghadam, M., Khalaj, A., Malekmohammadi, M., Mosaddegh, M., “*Achillea vermicularis* a medicinal plant from Iranian traditional medicine induces apoptosis in MCF-7 cells”, *Research Journal of Pharmacognosy (RJP)*, 2(1), 1-5, (2015).

Hamzeloo, M. M., Mahmoud, M., Mahboobeh, I., “Programmed cell death in breast adenocarcinoma induced by *Achillea filipendulina*”, *Medicinal Plants - International Journal of Phytomedicines and Related Industries*, 11(4), 435-439, (2019).

Hanahan, D., Weinberg, R. A., “Hallmarks of cancer: the next generation”, *Cell*, 4, 144 (5), 646-674, (2011).

Hang, B., Wang, P., Zhao, Y., Chang, H., Mao, J. H., Snijders, A. M., “Thirdhand smoke: Genotoxicity and carcinogenic potential”, *Chronic Dis Transl Med*, 26, 6 (1), 27-34, (2019).

Hecht, S. S., Murphy, S. E., Stepanov, I., Nelson, H. H., Yuan, J. M., “Tobacco smoke biomarkers and cancer risk among male smokers in the Shanghai cohort study”, *Cancer Lett*, 28, 334 (1), 34-38, (2013).

Hernández Borrero, L. J., El-Deiry, W. S., “Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting”, *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1876 (1), 88556, (2021).

Horn, L., Sandler, A., “Epidermal growth factor receptor inhibitors and antiangiogenic agents for the treatment of non-small cell lung cancer”, *Clin Cancer Res*, 15 (16), 5040-5048, (2009).

Hosseini, M.S., Hosseini, F., Ahmadi, A., Mozafari, M., Amjadi, I., “Antiproliferative activity of *Hypericum perforatum*, *Achillea millefolium*, and *Aloe vera* in interaction with the prostatic activity of CD82”, *Reports of biochemistry & molecular biology*, 8(3), 260–268, (2019).

Hsia, T. C., Yu, C. C., Hsu, S. C., Tang, N. Y., Lu, H. F., Huang, Y. P., Wu, S. H., Lin, J. G., Chung, J. G., “Cantharidin induces apoptosis of H460 human lung cancer cells through mitochondria-dependent pathways”, *Int. J. Oncol*, 45, 245–254, (2014).

Huber-Morath, A., Davis, P. H. (editor), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, 5, Edinburgh, UK: Edinburgh University Press, 224–252, (1975).

Hung, J. Y., Hsu, Y. L., Ni, W. C., Tsai, Y. M., Yang, C. J., Kuo, P. L., Huang, M. S., “Oxidative and endoplasmic reticulum stress signaling are involved in dehydrocostus lactone-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells”, *Lung Cancer*, 68, 355–365, (2010).

Huo, C-H., Li, Y., Zhang, M-L. Wang, Y-F. Zhang, Q., Qin, F., Shi, Q-W., Kiyota, H., “Cytotoxic flavonoids from the flowers of *Achillea millefolium*”, *Chemistry of natural compounds*, 48(6), 958-962, (2013).

Hveem, K., Markaki, M., Lagani, V., Langhammer, A, Roe, O. D. Tsamardinos, I., “A validated clinical risk prediction model for lung cancer in smokers of all ages and exposure types: a HUNT study”, *EBioMedicine*, 31, 36–46, (2018).

Ivanescu, B., Miron, A., Corciova, A., “Sesquiterpene Lactones from Artemisia Genus: Biological Activities and Methods of Analysis”, *J Anal Methods Chem*, 247685, (2015).

Jan, R., Chaudhry, G. E., “Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics”, *Adv Pharm Bull*, 9 (2), 205-218, (2019).

Jancík, S., Drábek, J., Radzioch, D., Hajdúch, M., “Clinical relevance of KRAS in human cancers”, *J Biomed Biotechnol*, 150960, (2010).

Jang, T. W., Oak, C.H., Chang, H. K., Suo, S. J., Jung, M. H., “EGFR and KRAS mutations in patients with adenocarcinoma of the lung”, *Korean J Intern Med*, 24 (1), 48-54, (2009).

Jaradat, N. A., Shawahna, R., Eid, A. M., Al-Ramahi, R., Asma, M. K., Zaid, A. N., “Herbal remedies use by breast cancer patients in the West Bank of Palestine”, *J Ethnopharmacol*, 3, 178, 1-8, (2016).

Jenabi, E., Fereidoony, B., “Effect of *Achillea millefolium* on relief of primary dysmenorrhea: a double-blind randomized clinical trial”, *J Pediatr Adolesc Gynecol*, 28(5), 402-404, (2015).

Jenča, A., Mills, D. K., Ghasemi, H., Saberian, E., Jenča, A., Karimi Forood, A. M., Petrášová, A., Jenčová, J., Jabbari Velisdeh, Z., Zare-Zardini, H., Ebrahimifar, M., “Herbal therapies for cancer treatment: A Review of phytotherapeutic efficacy”, *Biologics*, 18, 229-255, (2024).

Jin, R., Peng, L., Shou, J., Wang, J., Jin, Y., Liang, F., Zhao, J., Wu, M., Li, Q., Zhang, B., Wu, X., Lan, F., Xia, L., Yan, J., Shao, Y., Stebbing, J., Shen, H., Li, W., Xia, Y., “EGFR-mutated squamous cell lung cancer and its association with outcomes”, *Front Oncol*, 14, 11, 680804, (2021).

Kapinova, A., Kubatka, P., Liskova, A., Baranenko, D., Kruzliak, P., Matta, M., Büsselberg, D., Malicherova, B., Zulli, A., Kwon, T.K., Jezkova, E., Blahutova, D., Zubor, P., Danko, J., “Controlling metastatic cancer: the role of phytochemicals in cell signaling”, *J Cancer Res Clin Oncol*, 145 (5), 1087-1109, (2019).

Karagur, E.R., Ozay, C., Mammadov, R., Akca, H., “Anti-invasive effect of *Cyclamen pseudibericum* extract on A549 non-small cell lung carcinoma cells via inhibition of ZEB1 mediated by miR-200c”, *J Nat Med*, 72 (3), 686-693, (2018).

Kelly, R. J., Thomas, A., Rajan, A., Chun, G., Lopez-Chavez, A., Szabo, E., Spencer, S., Carter, C. A., Guha, U., Khozin, S., Poondru, S., Van Sant, C., Keating, A., Steinberg, S. M., Figg, W., Giaccone, G., “A phase I/II study of sepantronium

bromide (YM155, survivin suppressor) with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer”, *Ann Oncol*, 24 (10), 2601-2606, (2013).

Khan, M., Khan, M., Adil, S. F., Alkathlan, H. Z., “Screening of potential cytotoxic activities of some medicinal plants of Saudi Arabia”, *Saudi J Biol*, 29 (3), 1801-1807, (2022).

Khazneh, E., Saltan, G., Tekin, M., Bahadır Acıkara, Ö., Yeşiloğlu, T., Özbilgin, S., “The importance of *Achillea* species and phenolic compounds in *Achillea schischkini* Sosn”, *J. Fac. Pharm*, 39 (1), 43-50, (2010).

Kim, A. S., Ko, H. J., Kwon, J. H., Lee, J. M., “Exposure to secondhand smoke and risk of cancer in never smokers: a meta-analysis of epidemiologic studies”, *Int J Environ Res Public Health*, 15, E1981, (2018).

Köngül, E., Taş, Ö., Paşayeva, L., Karatoprak, G. Ş., “Analysis of the cytotoxic effects of *Achillea millefolium* L. extracts on MCF7 cell line”, *Proceedings*, 1 (10), 1077, (2017).

Kosaka, T., Yatabe, Y., Endoh, H., Kuwano, H., Takahashi, T., Mitsudomi, T., “Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications”, *Cancer Res*, 15, 64 (24), 8919-23, (2004).

Larsen, J. E., Minna, J. D., “Molecular biology of lung cancer: clinical implications”, *Clin Chest Med*, 32 (4), 703-740, (2011).

Lee, E. Y., Muller, W. J., “Oncogenes and tumor suppressor genes”, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2 (10), a003236, (2010).

Lee, S. J., Lee, J., Park, Y. S., Lee, C. H., Lee, S. M., Yim, J. J., Yoo, C. G., Han, S. K., Kim, Y. W., “Impact of smoking on mortality of patients with non-small cell lung cancer”, *Thorac Cancer*, 5 (1), 43-49, (2014).

Li, A. R., Chitale, D., Riely, G. J., Pao, W., Miller, V. A., Zakowski, M. F., Rusch, V., Kris, M. G., Ladanyi, M., “EGFR mutations in lung adenocarcinomas: clinical testing experience and relationship to EGFR gene copy number and immunohistochemical expression”, *J Mol Diagn*, 10 (3), 242-248, (2008).

Li, S., So, T. H., Tang, G., Tan, H. Y., Wang, N., Ng, B. F. L., Chan, C. K. W., Yu, E. C., Feng, Y., “Chinese herbal medicine for reducing chemotherapy-associated side-effects in breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis”, *Front Oncol*, 10, 599073, (2020).

Li, Y., Zhang, M. L., Cong, B., Wang, S. M., Dong, M., Sauriol, F., Huo, C. H., Shi, Q. W., Gu, Y. C., Kiyota, H., “Achillinin A, a cytotoxic guaianolide from the flower

of Yarrow, *Achillea millefolium*”, *Biosci Biotechnol Biochem*, 75(8), 1554-1556, (2011).

Linardou, H., Dahabreh, I. J., Kanaloupiti, D., Siannis, F., Bafaloukos, D., Kosmidis, P., Papadimitriou, C. A., Murray, S., “Assessment of somatic KRAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer”, *Lancet Oncol*, 9 (10), 962-972, (2008).

Liu, G., Cheresch, P., Kamp, D. W., “Molecular basis of asbestos-induced lung disease”, *Annu Rev Pathol*, 24, 8, 161-187, (2013).

Long, E., Yin, J., Shin, J. H., Li, Y., Kane, A., Patel, H., Luong, T., Xia, J., Han, Y., Byun, J., Zhang, T., Zhao, W., Landi, M. T., Rothman, N., Lan, Q., Chang, Y. S., Yu, F., Amos, C., Shi, J., Lee, J. G., Choi, J., “Context-aware single-cell multiome approach identified cell-type specific lung cancer susceptibility genes”, *BioRxiv*, 26, (2023).

Lubin, J. H, Boice, J. D. Jr., “Lung cancer risk from residential radon: meta-analysis of eight epidemiologic studies”, *J Natl Cancer Inst*, 1, 89 (1), 49-57, (1997).

Luna, J., Sotoca, A., Fernández, P., Miralles, C., Rodríguez, A., “Recent advances in early-stage lung cancer”, *J Clin Transl Res*, 7(2), 163-174, (2021).

Lund, K. E., Lund, M., Bryhn, A., “Tobacco consumption among men and women 1927 – 2007”, *Tidsskr nor Legerforen*, 129, 1871-1874, (2009).

Mamdani, H., Jalal, S.I., “Histone deacetylase inhibition in non-small cell lung cancer: hype or hope?”, *Front Cell Dev Biol*, 8, 582370, (2020).

Mamdani, H., Matosevic, S., Khalid, A.B, Durm, G., Jalal, S.I., “Immunotherapy in lung cancer: current landscape and future directions”, *Front Immunol*, 9, 13, 823618, (2022).

Marino, P., Mininni, M., Deiana, G., Marino, G., Divella, R., Bochicchio, I., Giuliano, A., Lapadula, S., Lettini, A.R., Sanseverino, F., Besinler, 16, 800, (2024).

Martin, T. A., Ye, L., Sanders, A. J., Madame Curie Bioscience Database, Austin (TX): Landes Bioscience, 2000-2013.

McTaggart, R. A., Dupuy, D. E., “Thermal ablation of lung tumors”, *Tech Vasc Interv Radiol*, 10 (2), 102-113, (2007).

Michalak, M., “Plant-derived antioxidants: significance in skin health and the ageing process”, *Int J Mol*, 623 (2), 585, (2022).

Miranzadeh, S., Adib-Hajbaghery, M., Soleymanpoor, L., Ehsani, M., “Effect of adding the herb *Achillea millefolium* on mouthwash on chemotherapy induced oral mucositis in cancer patients: A double-blind randomized controlled trial”, *Eur J Oncol Nurs*, 19 (3), 207-213, (2015).

Mogi, A., Kuwano, H., “TP53 mutations in non-small cell lung cancer”, *J Biomed Biotechnol*, 583929, (2011).

Mohamed, M. E., Elsayed, S. A., Madkor, H. R., Eldien, H. M. S., Mohafez, O. M., “Yarrow oil ameliorates ulcerative colitis in mice model via regulating the NF- $\kappa$ B and PPAR- $\gamma$  pathways”, *Intest Res*, 19 (2), 194-205, (2021).

Mohammad, R. M., Muqbil, I., Lowe, L., Yedjou, C., Hsu, H. Y., Lin, L. T., Siegelin, M. D., Fimognari, C., Kumar, N. B., Dou, Q. P., Yang, H., Samadi, A. K., Russo, G. L., Spagnuolo, C., Ray, S. K., Chakrabarti, M., Morre, J. D., Coley, H. M., Honoki, K., Fujii, H., Azmi, A. S., “Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer”, *Semin Cancer Biol*, 35, 78-103, (2015).

Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E., Adjei, A. A., “Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship”, *Mayo Clin Proc*, 83 (5), 584-594, (2008).

Montagne, F., Guisier, F., Venissac, N., Baste, J. M., “The role of surgery in lung cancer treatment: present indications and future perspectives-state of the art”, *Cancers*, 23, 13 (15), 3711, (2021).

Moradi, M. T., Rafieian-Koupaei, M., Imani-Rastabi, R., Nasiri, J., Shahrani, M., Rabiei, Z., Alibabaei, Z., “Antispasmodic effects of yarrow (*Achillea millefolium* L.) extract in the isolated ileum of rat”, *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines: AJTCAM*, 10 (6), 499–503, (2013).

Mouhid, L., Gómez de, Cedrón, M., García-Carrascosa, E., Reglero, G., Fornari, T., Ramírez de, Molina, A., “Yarrow supercritical extract exerts antitumoral properties by targeting lipid metabolism in pancreatic cancer”, *PLoS One*, 26, 14 (3), (2019).

Mutlu, D., Cakir, C., Ozturk, M., Arslan, S., “Anticancer and apoptotic effects of a polysaccharide extract isolated from *Lactarius chrysorrheus* Fr. in HepG2 and PANC-1 cell lines”, *Arch Biol Sci*, 74 (4), 315-324, (2022).

Nemeth, E., Bernath, J., “Biological activities of yarrow species (*Achillea* spp.)”, *Curr Pharm Des*, 14 (29), 3151-3167, (2008).

Nicholson, A. G., Tsao, M. S., Beasley, M. B., Borczuk, A. C., Brambilla, E., Cooper, W. A., Dacic, S., Jain, D., Kerr, K. M., Lantuejoul, S., Noguchi, M., Papotti, M., Rekhtman, N., Scagliotti, G., van Schil, P., Sholl, L., Yatabe, Y., Yoshida, A.,

Travis, W. D., “The 2021 WHO classification of lung tumors: impact of advances since 2015” *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* , 17, 3, 362-387, (2022).

Ning, J., Ge, T., Jiang, M., Jia, K., Wang, L., Li, W., Chen, B., Liu, Y., Wang, H., Zhao, S., He, Y., “Early diagnosis of lung cancer: which is the optimal choice?”, *Ageing (Albany NY)*, 11, 13 (4), 6214-6227, (2021).

Ohtsuka, K., Ohnishi, H., Fujiwara, M., Kishino, T., Matsushima, S., Furuyashiki, G., Takei, H., Koshiishi, Y., Goya, T., Watanabe, T., “Abnormalities of epidermal growth factor receptor in lung squamous-cell carcinomas, adenosquamous carcinomas, and large-cell carcinomas: tyrosine kinase domain mutations are not rare in tumors with an adenocarcinoma component”, *Cancer*, 15, 109 (4), 741-750, (2007).

Olaku, O., White, J. D., “Herbal therapy use by cancer patients: a literature review on case reports”, *Eur J Cancer*, 47 (4), 508-514, (2011).

Oliveira, A. H., de Oliveira, G. G., Carnevale, Neto, F., Portuondo, D. F., Batista-Duarte, A., Carlos, I. Z., “Anti-inflammatory activity of *Vismia guianensis* (Aubl.) Pers. extracts and antifungal activity against *Sporothrix schenckii*”, *Journal of Ethnopharmacology*, 195, 266-274, (2017).

Oliver, A., “Lung cancer: epidemiology and screening”, *Surg Clin North Am*, 102 (3), 335-344, (2022).

Papakosta, K., Grafakou, M. E., Barda, C., Kostopoulos, I. V., Tsitsilonis, O., Skaltsa, H., “Cytotoxicity and anti-cancer activity of the genus *Achillea* L”, *Curr Med Chem*, 27 (41), 6910-6925, (2020).

Paz-Ares, L., Bálint, B., de Boer, R. H., van Meerbeeck, J. P., Wierzbicki, R., De Souza, P., Galimi, F., Haddad, V., Sabin, T., Hei, Y. J., Pan, Y., Cottrell, S., Hsu, C. P., RamLau, R., “A randomized phase 2 study of paclitaxel and carboplatin with or without conatumumab for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer”, *J Thorac Oncol*, 8 (3), 329-337, (2013).

Pedraza-Fariña, L. G., “Mechanisms of oncogenic cooperation in cancer initiation and metastasis”, *Yale J. Biol. Med*, 79 (3-4), 95-103, (2006).

Pereira, J. M., Peixoto, V., Teixeira, A., Sousa, D., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R., Vasconcelos, M. H., “*Achillea millefolium* L. hydroethanolic extract inhibits growth of human tumor cell lines by interfering with cell cycle and inducing apoptosis”, *Food Chem Toxicol*, 118, 635-644, (2018).

Peto, J., “That the effects of smoking should be measured in pack-years: misconceptions 4”, *Br J Cancer*, 107, 406–407, (2012).

Pfeifer, G. P., Denissenko, M. F., Olivier, M., Tretyakova, N., Hecht, S. S., Hainaut, P., “Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers”, *Oncogene*, 21 (48), 7435-7451, (2002).

Piątkowska, E., Biel, W., Witkowicz, R., Kępińska-Pacelik, J., “Chemical composition and antioxidant activity of *Asteraceae* family plants”, *Applied Sciences*, 12 (23), 12293, (2022).

Poofery, J., Khaw-On, P., Subhawa, S., Sripanidkulchai, B., Tantraworasin, A., Saeteng, S., Siwachat, S., Lertprasertsuke, N., Banjerdpongchai, R., “Potential of thai herbal extracts on lung cancer treatment by inducing apoptosis and synergizing chemotherapy”, *Molecules*, 25 (1), 231, (2020).

Prakash, J., Shaked, Y., “The interplay between extracellular matrix remodeling and cancer therapeutics”, *Cancer Discov*, 2, 14 (8), 1375-1388, (2024).

Prenzel, N., Fischer, O. M., Streit, S., Hart, S., Ullrich, A., “The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification”, *Endocr Relat Cancer*, 8 (1), 11-31, (2001).

Qu, Y. L., Liu, J., Zhang, L. X., Wu, C. M., Chu, A. J., Wen, B. L., Ma, C., Yan, X. Y., Zhang, X., Wang, D. M., Lv, X., Hou, S. J., “Asthma and the risk of lung cancer: a meta-analysis”, *Oncotarget*, 14, 8 (7), 11614-11620, (2017).

Qurtam, A. A., Nasr, F. A., “Apoptotic and anti-migratory effects of *Achillea millefolium* dichloromethane extract on MDA-MB-231 human breast cancer cells”, *Journal of Animal and Feed Sciences*, (2024).  
<https://doi.org/10.22358/jafs/187176/2024>

Reita, D., Pabst, L., Pencreach, E., Guérin, E., Dano, L., Rimelen, V., Voegeli, A.C., Vallat, L., Mascaux, C., Beau-Faller, M., “Direct targeting KRAS mutation in non-small cell lung cancer: focus on resistance”, *Cancers*, 4, 14 (5), 1321, (2022).

Rezai, M., Saravani, R., Sargazi, S., Moudi, M., Jafari, Shahroudi, M., Saravani, R., “*Achillea wilhelmsii* C. Koch hydroalcoholic extract induces apoptosis and alters *lin28b* and *p53* gene expression in HELA cervical cancer cells”, *Rep Biochem Mol Biol*, 8 (3), 318-325, (2019).

Riudavets, M., Garcia de Herreros, M., Besse, B., Mezquita, L., “Radon and lung cancer: current trends and future perspectives”, *Cancers*, 27, 14 (13), 3142, (2022).

Rivlin, N., Brosh, R., Oren, M., Rotter, V., “Mutations in the p53 tumor suppressor gene: important milestones at the various steps of tumorigenesis”, *Genes Cancer*, 2 (4), 466-74, (2011).

Rolnik, A., Olas, B., “A Review of the effect of preparations from vegetables of the *Asteraceae* family and *Cucurbitaceae* family on the cardiovascular system and its diseases”, *Nutrients*, 31, 14 (17), 3601, (2022).

Rolnik, A., Olas, B., “The plants of the *Asteraceae* family as agents in the protection of human health”, *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (6), 3009, (2021).

Rosenberger, A., Bickeböller, H., McCormack, V., Brenner, D. R., Duell, E. J., Tjønneland, A., Friis, S., Muscat, J. E., Yang, P., Wichmann, H. E., Heinrich, J., Szeszenia-Dabrowska, N., Lissowska, J., Zaridze, D., Rudnai, P., Fabianova, E., Janout, V., Bencko, V., Brennan, P., Mates, D., Hung, R. J., “Asthma and lung cancer risk: a systematic investigation by the International Lung Cancer Consortium”, *Carcinogenesis*, 33 (3), 587-597, (2012).

Rudzińska, A., Juchaniuk, P., Oberda, J., Wiśniewska, J., Wojdan, W., Szklener, K., Mańdziuk, S., “Phytochemicals in cancer treatment and cancer prevention-review on epidemiological data and clinical trials”, *Nutrients*, 14, 15 (8), 1896, (2023).

Ruegg, T. A., “Historical perspectives of the causation of lung cancer: nursing as a bystander”, *Glob Qual Nurs Res*, 14, 2, (2015).

Saeidnia, S., Gohari, A., Mokhber-Dezfuli, N., Kiuchi, F., “A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus *Achillea*”, *Daru: journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 19 (3), 173–186, (2011).

Salazar-Gómez, A., Ontiveros-Rodríguez, J. C., Pablo-Pérez, S. S., Vargas-Díaz, M. E., Garduño-Siciliano, L., “The potential role of sesquiterpene lactones isolated from medicinal plants in the treatment of the metabolic syndrome - A review”, *S Afr J Bot*, 135, 240-251, (2020).

Salehi, B., Selamoglu, Z., Sevindik, M., Fahmy, N. M., Al-Sayed, E., El-Shazly, M., Csupor-Löffler, B., “*Achillea* spp.: A comprehensive review on its ethnobotany, phytochemistry, phytopharmacology and industrial applications”, *Cellular and Molecular Biology*, 66, 4, 78-103, (2020).

Sargazi, S., Moudi, M., Kooshkaki, O., Mirinejad, S., Saravani, R., “Hydro-alcoholic extract of *Achillea Wilhelmsii* C. Koch reduces the expression of cell death-associated genes while inducing DNA Damage in HeLa cervical cancer cells”, *Iran J Med*, 45 (5), 359-367, (2020).

Scagliotti, G. V., Selvaggi, G., Novello, S., Hirsch, F. R., “The biology of epidermal growth factor receptor in lung cancer”, *Clin Cancer Res*, 15, 10, 4227-4232, (2004).

Schaefer-Prokop, C., Elicker, B. M., Hodler, J., “Diseases of the chest, breast, heart and vessels 2019-2022: diagnostic and interventional imaging”, 127–138, Springer, (2019).

Schmid, K., Oehl, N., Wrba, F., Pirker, R., Pirker, C., Filipits, M., “EGFR/KRAS/BRAF mutations in primary lung adenocarcinomas and corresponding locoregional lymph node metastases”, *Clin Cancer Res*, 15, 15 (14), 4554-4560, (2009).

Semiz, G., Uysal, T., Bozkurt, M., and Günal, B., “A new *Achillea* (Asteraceae) species from southwestern Turkey”, *Turkish Journal of Botany*, 46, 4, (2022).

Sergazy, S., Vetrova, A., Orhan, I. E., Senol Deniz, F. S., Kahraman, A., Zhang, J. Y., Aljofan, M., “Antiproliferative and cytotoxic activity of geraniaceae plant extracts against five tumor cell lines”, *Future Science OA*, 8 (2), (2021).

Shankar, A., Dubey, A., Saini, D., Singh, M., Prasad, C. P., Roy, S., Bharati, S. J., Rinki, M., Singh, N., Seth, T., Khanna, M., Sethi, N., Kumar, S., Sirohi, B., Mohan, A., Guleria, R., Rath, G. K. “Environmental and occupational determinants of lung cancer”, *Transl Lung Cancer*, 8, 31-49, (2019).

Shigematsu, H., Lin, L., Takahashi, T., Nomura, M., Suzuki, M., Wistuba, II., Fong, K. M., Lee, H., Toyooka, S., Shimizu, N., Fujisawa, T., Feng, Z., Roth, J.A., Herz, J., Minna, J. D., Gazdar, A. F., “Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers”, *J Natl Cancer Inst*, 2, 97 (5), 339-346, (2005).

Shlyakhtina, Y., Moran, K. L., Portal, M. M., “Genetic and non-genetic mechanisms underlying cancer evolution”, *Cancers*, 13, 1380, (2021).

Siu, F. M., Ma, D. L., Cheung, Y. W., Lok, C. N., Yan, K., Yang, Z., Yang, M., Xu, S., Ko, B. C., He, Q. Y., Che, C. M., “Proteomic and transcriptomic study on the action of a cytotoxic saponin (polyphyllin D): Induction of endoplasmic reticulum stress and mitochondria-mediated apoptotic pathways”, *Proteomics*, 8, 3105–3117, (2008).

Soria, J. C., Smit, E., Khayat, D., Besse, B., Yang, X., Hsu, C. P., Reese, D., Wiezorek, J., Blackhall, F., “Phase 1b study of dulanermin (recombinant human Apo2L/TRAIL) in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer”, *J Clin Oncol*, 28 (9), 1527-1533, (2010).

Sowa, P., Marcinčáková, D., Mišek, M., Sidor, E., Legáth, J., Džugan, M., “Analysis of cytotoxicity of selected Asteraceae plant extracts in real time, their antioxidant properties and polyphenolic profile”, *Molecules*, 25, 25 (23), 5517, (2020).

Steels, E., Paesmans, M., Berghmans, T., Branle, F., Lemaitre, F., Mascaux, C., Meert, A. P., Vallot, F., Lafitte, J. J., Sculier, J. P., “Role of p53 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis”, *Eur Respir J*, 18 (4), 705-719, (2001).

Strzępek-Gomółka, M., Gaweł-Bęben, K., Kukula-Koch, W., “*Achillea* species as sources of active phytochemicals for dermatological and cosmetic applications”, *Oxid Med Cell Longev*, 25, 6643827, (2021).

Sudhakar, K., Mishra, V., Riyaz, B., Jain, A., Charyulu, R.N., Jain, S., “Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Lung Cancer, Chapter 12-Hydrogel-Based Drug Delivery for Lung Cancer”, 293-310, (2019).

Sulak, M., Turgut, G. C., Sen, A., “Cerium oxide nanoparticles biosynthesized using fresh green walnut shell in microwave environment and their anticancer effect on breast cancer cells”, *Chem Biodivers*, 19 (8), (2022).

Sullivan, K. D., Galbraith, M.D., Andrysik, Z., Espinosa, J. M., “Mechanisms of transcriptional regulation by p53”, *Cell Death Differ*, 25 (1), 133-143, (2018).

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F., “Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries”, *CA Cancer J Clin*, 71 (3), 209-249, (2021).

Tadić, V., Arsić, I., Zvezdanović, J., Zugić, A., Cvetković, D., Pavkov, S., “The estimation of the traditionally used yarrow (*Achillea millefolium* L. Asteraceae) oil extracts with anti-inflammatory potential in topical application”, *J Ethnopharmacol*, 199, 138-148, (2017).

Tam, I. Y., Chung, L. P., Suen, W. S., Wang, E., Wong, M. C., Ho, K. K., Lam, W. K., Chiu, S. W., Girard, L., Minna, J. D., Gazdar, A. F., Wong, M. P., “Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features”, *Clin Cancer Res*, 1, 12 (5), 1647-1653, (2006).

Thandra, K. C., Barsouk, A., Saginala, K., Aluru, J. S., Barsouk, A., “Epidemiology of lung cancer”, *Contemp Oncol (Pozn)*, 25 (1), 45-52, (2021).

Thun, M. J., “Early landmark studies of smoking and lung cancer”, *Lancet Oncol*, 11, 1200, (2010).

Tian, Q., Zang, Y. H., “Antiproliferative and apoptotic effects of the ethanolic herbal extract of *Achillea falcata* in human cervical cancer cells are mediated via cell cycle arrest and mitochondrial membrane potential loss”, *J Buon*, 20 (6), 1487-1496, (2015).

Tilaoui, M., Mouse, H. A., Jaafari, A., Ziad, A., “Comparative phytochemical analysis of essential oils from different biological parts of *Artemisia herba alba* and their cytotoxic effect on cancer cells”, *PLoS One*, 10 (7), (2015).

Tilwani, K., Patel, A., Parikh, H., Thakker, D. J., Dave, G., “Investigation on anti-corona viral potential of Yarrow tea”, *J Biomol Struct Dyn*, 1-13, (2022).

Tokumo, M., Toyooka, S., Kiura, K., Shigematsu, H., Tomii, K., Aoe, M., Ichimura, K., Tsuda, T., Yano, M., Tsukuda, K., Tabata, M., Ueoka, H., Tanimoto, M., Date, H., Gazdar, A. F., Shimizu, N., “The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers”, *Clin Cancer Res*, 1, 11 (3), 1167-1173, (2005).

Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., Beasley, M. B., Chirieac, L. R., Dacic, S., Duhig, E., Flieder, D. B., Geisinger, K., Hirsch, F. R., Ishikawa, Y., Kerr, K. M., Noguchi, M., Pelosi, G., Powell, C. A., Tsao, M. S., Wistuba, I., WHO Panel, “The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification”, *J Thorac Oncol*, 10 (9), 1243-1260, (2015).

Trifunović, S., Isaković, A. M., Isaković, A., Vučković, I., Mandić, B., Novaković, M., Vajs, V., Milosavljević, S., Trajković, V., “Isolation, characterization, and in vitro cytotoxicity of new sesquiterpenoids from *Achillea clavennae*”, *Planta Med*, 80(4), 297-305, (2014).

Turgut, G. Ç., Doyduk, D., Yıldırım, Y., Yavuz, S., Akdemir, A., Dişli, A., Şen, A. “Computer design, synthesis, and bioactivity analyses of drugs like fingolimod used in the treatment of multiple sclerosis”, *Bioorg Med Chem*, 15, 25 (2), 483-495, (2017).

Uğur, D., Güneş, H., Güneş, F., Mammadov, R., “Cytotoxic activities of certain medicinal plants on different cancer cell lines”, *Turk J Pharm*, 14 (3), 222-230, (2017).

Ullah, M. F., Ahmad, A., Bhat, S. H., Abuduhier, F. M., Mustafa, S. K., Al-Qirim, T., “Functional profiling of *Achillea fragrantissima* (a perennial edible herb) against human cancer cells and potential nutraceutical impact in neutralizing cell proliferation by interfering with VEGF and NF-κB signaling pathways”, *Italian Journal of Food Science*, 34 (3), 35–47, (2022).

Vilema-Enríquez, G., Arroyo, A., Grijalva, M., Amador-Zafra, R.I., Camacho, J., “Molecular and cellular effects of hydrogen peroxide on human lung cancer cells: potential therapeutic implications”, *Oxid Med Cell Longev*, (2016).

Villalva, M., Silvan, J. M., Alarcón-Cavero, T., Villanueva-Bermejo, D., Jaime, L., Santoyo, S., Martínez-Rodríguez, A. J., “Antioxidant, anti-inflammatory, and antibacterial properties of an *Achillea millefolium* L. extract and its fractions obtained by supercritical anti-solvent fractionation against *Helicobacter pylori*”, *Antioxidants*, 20, 11(10), 1849, (2022).

Virolainen, S. J., VonHandorf, A., Viel, K. C. M. F., Weirauch, M. T., Kottyan, L. C., “Gene–environment interactions and their impact on human health”, *Genes Immun. 24*, 1–11, (2023).

Wang, C. Z., Calway, T., Yuan, C. S., “Herbal medicines as adjuvants for cancer therapeutics”, *Am J Chin Med*, 40 (4), 657-669, (2012).

Wang, H., Yang, L., Zou, L., Huang, D., Guo, Y., Pan, M., Tan, Y., Zhong, H., Ji, W., Ran, P., Zhong, N., Lu, J., “Association between chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: a case control study in Southern Chinese and a meta-analysis”, *PLoS One*, 7, (2012).

Wang, Q., “Cancer predisposition genes: molecular mechanisms and clinical impact on personalized cancer care: examples of Lynch and HBOC syndromes”, *Acta Pharmacol*, 37 (2), 143-149, (2016).

Wang, Q., Gümüş, Z. H., Colarossi, C., Memeo, L., Wang, X., Kong, C. Y., Boffetta, P., “SCLC: epidemiology, risk factors, genetic susceptibility, molecular pathology, screening, and early detection”, *J Thorac Oncol*, 18 (1), 31-46, (2023).

Wee, P., Wang, Z., “Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways”, *Cancers*, 17, 9 (5), 52, (2017).

Weng, C.J., Yen, G.C., “Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives”, *Cancer Treat Rev*, 38 (1), 76-87, (2012).

Wu, J. Y., Wu, S. G., Yang, C. H., Gow, C. H., Chang, Y. L., Yu, C. J., Shih, J. Y., Yang, P. C., “Lung cancer with epidermal growth factor receptor exon 20 mutations is associated with poor gefitinib treatment response”, *Clin Cancer Res*, 1, 14 (15), 4877-4882, (2008).

Wu, S. H., Hang, L. W., Yang, J. S., Chen, H. Y., Lin, H. Y., Chiang, J. H., Lu, C. C., Yang, J. L., Lai, T. Y., Ko, Y. C., “Curcumin induces apoptosis in human non-

small cell lung cancer NCI-H460 cells through er stress and caspase cascade-and mitochondria-dependent pathways”, *Anticancer Res*, 30, 2125–2133, (2010).

Xu, D. P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J. J., Li, H. B., “Natural antioxidants in foods and medicinal plants: extraction, assessment and resources”, *Int J Mol*, 5, 18 (1), 96, (2017).

Xu, W. S., Dang, Y. Y., Guo, J. J., Wu, G. S., Lu, J. J., Chen, X. P., Wang, Y. T., “Furanodiene induces endoplasmic reticulum stress and presents antiproliferative activities in lung cancer cells”, *Evid. Based Complement. Altern. Med. ECAM*, 426521, (2012).

Yaesh, S., Jamal, Q., Khan, A. U., Gilani, A. H., “Studies on hepatoprotective, antispasmodic and calcium antagonist activities of the aqueous-methanol extract of *Achillea millefolium*”, *Phytother Res*, 20 (7), 546-551, (2006).

Yamaguchi, H., Woods, N. T., Piluso, L. G., Lee, H. H., Chen, J., Bhalla, K. N., Monteiro, A., Liu, X., Hung, M. C., Wang, H. G., “p53 acetylation is crucial for its transcription-independent proapoptotic functions”, *J Biol Chem*, 24, 284 (17), 11171-83, (2009).

Yang, K. M., Kim, B. M., Park, J. B., “Omega-hydroxyundec-9-enoic acid induces apoptosis through ROS-mediated endoplasmic reticulum stress in non-small cell lung cancer cells”, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 448, 267–273, (2014).

Yin, S. Y., Wei, W. C., Jian, F. Y., Yang, N. S., “Therapeutic applications of herbal medicines for cancer patients”, *Evid Based Complement Alternat Med*, 302426, (2013).

Youlden, D. R., Cramb, S. M., Baade, P. D., “The international epidemiology of lung cancer: geographical distribution and secular trends”, *J Thorac Oncol*, 3 (8), 819-831, (2008).

Yousseu Nana, W., Billong Mimb, J. R., Atsamo, A. D., Tsafack, E. G., Djuichou Nguemnang, S. F., Fagni Njoya, Z. L., Matah Marthe, V. M., Madjo Kouam, Y. K., Mbiancha, M., Ateufack, G., “*In Vitro* and *in Vivo* anti-inflammatory properties of the hydroethanolic extract of the roots of *Vernonia guineensis* (Asteraceae)”, *Int J Inflam*, 1, 7915367, (2023).

Yu, P. P., Yu, F., Li, W. Z., Wang, S. M., Wang, C., Dong, M., Ni, Z. Y., Li, Y., Kiyota, H. “Millifolide A, a dimeric ether of degraded sesquiterpene lactones, inhibited the proliferation of human lung cancer cell line A549”, *Nat Prod Res*, 36 (11), 2875-2877, (2022).

Zappa, C., Mousa, S. A., “Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances”, *Transl Lung Cancer Res*, 5 (3), 288-300, (2016).

Zebeaman, M., Tadesse, M. G., Bachheti, R. K., Bachheti, A., Gebeyhu, R., Chaubey, K. K., “Plants and plant-derived molecules as natural immunomodulators”, *Biomed Res*, 5, 7711297, (2023).

Zhang, Z. L., Sun, J., Dong, J. Y., Tian, H. L., Xue, L., Qin, L. Q., Tong, J., “Residential radon and lung cancer risk: an updated meta- analysis of case-control studies”, *Asian Pac J Cancer*, 13, 2459–2465, (2012).

Zolondick, A. A., Gaudino, G., Xue, J., Pass, H. I., Carbone, M., Yang, H., “Asbestos-induced chronic inflammation in malignant pleural mesothelioma and related therapeutic approaches-a narrative review”, *Precis Cancer Med*, 4, 27, (2021).