

***ANEMONE BLANDA*'NIN SAĞLIKLI (BEAS-2B) VE  
KANSER (A549) AKCİĞER EPİTEL HÜCRE HATLARI  
ÜZERİNDEKİ İN VİTRO ANTİPROLİFERATİF VE  
ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**SİNEM FINDIK İRKÖREN**



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANEMONE BLANDA'NIN SAĞLIKLI (BEAS-2B) VE KANSER (A549)  
AKCİĞER EPİTEL HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ İN VİTRO  
ANTİPROLİFERATİF VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI.**

Sinem FINDIK İRKÖREN  
0000-0002-5187-9874

Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ  
0000-0002-3595-6286  
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2022  
Her Hakkı Saklıdır

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### **ANEMONE BLANDA’NIN SAĞLIKLI (BEAS-2B) VE KANSER (A549) AKCİĞER EPİTEL HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ İN VİTRO ANTİPROLİFERATİF VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI** **Sinem FINDIK İRKÖREN**

Bursa Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Danışman:** Prof. Dr. Nilüfer Çinkılıç

Kanser, tüm dünyada morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. Kanser, bulaşıcı olmayan hastalıklar dışında, kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci önde gelen ölüm nedenidir. Son yıllarda, çeşitli bitkisel ürünlerin farklı kanserlere karşı umut verici anti-kanser etkinliği gösterilmiştir. Bu bağlamda tez çalışmasında, *Anemone blanda* bitkisinden elde edilen metanolik ekstraktlarının anti-kanser potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak, insan sağlıklı bronşiyal epitel hücre hattı olan Beas-2B ve insan akciğer karsinoma hücre hattı olan A549 hücreleri kullanılmıştır. Sitotoksitenin belirlenebilmesi için XTT testi ve Klononjenik testi, DNA hasarlarının belirlenebilmesi için Komet yöntemi ve hücre içi reaktif oksijen seviyesine etkilerini belirlemek için ROS testi kullanılmıştır.

XTT testi sonucunda Beas-2B ve A549 hücre hatlarındaki IC50 değeri sırasıyla 21,90 µg/mL ve 21,25 µg/mL olarak, klonojenik testte ise bu değerler Beas-2B ve A549 hücre hatları için sırasıyla 24,57 µg/mL ve 27,62 µg/mL olarak belirlenmiştir. Komet testinde ise XTT ve Klonojenik testinde kullanılarak dozlara ek olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'li kombine dozlarda eklenmiştir. Beas-2B ve A549 hücre hatlarındaki kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA ve olive kuyruk momentleri hesaplanmış ve elde edilen sonuçlarda DNA iplik kırıklarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artışlar olduğu belirlenirken H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'li dozlarda istatistiksel olarak azaldığı belirlenmiştir. ROS testinde komet testindeki aynı dozlar kullanılırken sonuçlarında ise Beas-2B için hücre içi ROS seviyesinde istatistikî olarak anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Kombine dozlarda ise *Anemone* ekstraktının ortalama hücre içi ROS seviyesini 40 µg/mL dozdan itibaren istatistikî olarak anlamlı şekilde azalttığı görülmüştür. A549 için ROS seviyesini istatistikî olarak anlamlı şekilde düşürürken H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kombine dozlarda hücre içi ROS seviyesini istatistiksel anlamlı olarak düşürdü fakat 100µg/ml+1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'lik kombine dozda ekstrakt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in etkisini arttırarak hücre içi ROS seviyesini istatistikî olarak anlamlı şekilde arttırdığı görüldü.

**Anahtar Kelimeler:** *Anemone blanda*, Akciğer kanseri, anti-kanser, A549, Beas-2B, Klononjenik testi, Komet testi, ROS testi, XTT testi

**2022, x + 81 sayfa.**

## ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF ANTI PROLIFERATIVE AND ANTI-OXIDANT  
POTENTIAL OF *ANEMONE BLANDA* PLANT EXTRACT IN BEAS-2B AND A549  
CELL LINES IN VITRO

**Sinem FINDIK İRKÖREN**

Bursa Uludağ University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

**Supervisor:** Prof. Dr. Nilüfer Çinkılıç

Cancer continues to be one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide. Cancer is the second leading cause of death after cardiovascular diseases, excluding non-communicable diseases. Today, research on various herbal products is increasingly continuing to develop new drugs against diseases such as cancer. In recent years, promising anti-cancer efficacy of various herbal products against different cancers has been demonstrated. In this context, in the thesis study, it was aimed to investigate the anti-cancer potentials of methanolic extracts obtained from *Anemone blanda* plant. For this purpose, the human healthy bronchial epithelial cell line Beas-2B and the human carcinoma cell line A549 cells were used. XTT test and Clonogenic test were used to determine cytotoxicity, Komet method to determine DNA damages and ROS test to determine their effects on intracellular reactive oxygen level.

As a result of the XTT test, the IC<sub>50</sub> values in Beas-2B and A549 cell lines were determined as 21.90 µg/mL and 21.25 µg/mL, respectively. In the clonogenic test, these values were determined as 24.57 µg/mL and 27.62 µg/mL for Beas-2B and A549 cell lines, respectively. In the Comet test, it was used in XTT and Clonogenic tests, in addition to the doses, it was added in combined doses with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tail length, tail % DNA and olive tail moment in Beas-2B and A549 cell lines were calculated, and it was determined that there were statistically significant increases in DNA strand breaks compared to the control group, while it was statistically decreased at doses with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. While the same doses as in the comet test were used in the ROS test, there was no statistically significant change in the intra-ROS level for Beas-2B in the results. In combined doses, it was observed that the mean intracellular ROS level of Anemone extract was statistically significantly reduced from 40 µg/mL dose, while it statistically decreased the ROS level for A549, while it decreased the intracellular ROS level statistically at combined doses, but 100µg/ml+1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. It was observed that the extract at a combined dose of 1,0 increased the effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and increased the intracellular ROS level statistically significantly.

**Keywords:** *Anemone blanda*, Lung cancer, anti-cancer, A549, Beas-2B, Clonogenic test, Comet test, ROS test, XTT test

**2022, x + 81 pages.**

## TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve yrtlmesinde desteęini esirgemeyen tm zverisiyle yanmda olan ok sevgili danřmanm sayn Prof. Dr. Nilüfer NKILI'a,

Deęerli hocalarm Prof. Dr. Tolga ÇAVAŐ ve Doç. Dr. Özgür VATAN'a,

Tez çalıŐmam sırasında desteklerini ve hoŐgörülerini esirgemeyen doktora ęrencileri Melika BEKTAŐ HORTOęLU ve Huzeyfe HURYET'e,

Tüm destekleriyle yanımda olan çok sevgili arkadaŐlarım Gülseven DNE, Onur ETG ve Dr. Ender Deniz ASMAZ'a,

Her durumda sonsuz sevgi ve hoŐgörü gösteren, maddi manevi desteklerini asla esirgemeyen sevgili eŐim ve anneme sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

**Sinem FINDIK İRKÖREN**  
31/08/2022

## İÇİNDEKİLER

|  | Sayfa |
|--|-------|
| ÖZET .....   | i     |
| ABSTRACT .....   | ii    |
| TEŞEKKÜR .....   | iii   |
| İÇİNDEKİLER.....   | iv    |
| SİMGELER VE KISALTMALAR .....  | vi    |
| ŞEKİL DİZİNİ.....  | viii  |
| ÇİZELGE DİZİNİ.....  | viii  |
| 1. GİRİŞ .....   | 1     |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ .....   | 3     |
| 2.1. Kanser.....   | 3     |
| 2.1.2. Kanser hücrelerinin özellikleri.....  | 7     |
| 2.1.3. Kanser gelişim aşamaları.....   | 8     |
| 2.1.4. Akciğer kanseri .....   | 10    |
| 2.1.5. Akciğer kanserinin histopatolojisi .....  | 12    |
| 2.1.6. Akciğer kanserinin moleküler biyolojisi .....                                     | 13    |
| 2.2. Tıbbi Bitkiler .....  | 13    |
| 2.3. <i>Anemone</i> Cinsi.....   | 16    |
| 2.3.1. <i>Anemone</i> cinsinin dağılımı .....  | 16    |
| 2.3.2. <i>Anemone</i> cinsinin etnofarmakolojisi .....                                   | 17    |
| 2.3.3. Fitokimyasal bileşenleri.....   | 26    |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM.....   | 28    |
| 3.1 Kullanılan Ekipmanlar ve Sarf Malzemeler .....                                       | 29    |
| 3.2. Kullanılan Hücre Hatları .....  | 31    |
| 3.3. Deney Grupları .....  | 32    |
| 3.4. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması .....                               | 32    |
| 3.4.1. Besiyeri hazırlanması .....   | 32    |
| 3.4.2. Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) solüsyonunun hazırlanması..... | 32    |
| 3.4.3. <i>Anemone blanda</i> ekstraksiyonunun hazırlanışı.....                           | 32    |
| 3.5. Sitotoksikite Testleri.....   | 33    |
| 3.5.1. XTT testi.....  | 33    |
| 3.5.2. Klonojenik test.....  | 35    |
| 3.6. Genotoksikite Testleri.....   | 36    |
| 3.6.1. Tek hücre jel elektroforez (Komet) testi .....                                    | 36    |

|   |    |
|---|----|
| 3.7. Enzimatik testler .....  | 41 |
| 3.7.1. ROS (reaktif oksijen türleri) testi.....   | 41 |
| 3.8. İstatiksel analizler .....   | 42 |
| 4. BULGULAR .....   | 43 |
| 4.1. XTT test bulguları.....  | 43 |
| 4.1.1. Beas-2B hücre hattında <i>Anemone blanda</i> 'nın ekstasyonu için elde edilen XTT bulguları.....               | 43 |
| 4.1.2 A549 hücre hattında <i>Anemone blanda</i> 'nın ekstrasyonu için elde edilen XTT bulguları.....                  | 45 |
| 4.2. Klonojenik test bulguları .....  | 46 |
| 4.2.1. Beas-2B hücre hattında <i>Anemone blanda</i> 'nın ekstrasyonu için elde edilen klonojenik test bulguları ..... | 46 |
| 4.2.2. A549 hücre hattında <i>Anemone blanda</i> 'nın ekstrasyonu için elde edilen klonojenik test bulguları .....    | 48 |
| 4.3. Komet Testi Bulguları.....   | 50 |
| 4.3.1. Beas-2B hücre hattı kuyruk uzunluğu bulguları .....  | 51 |
| 4.3.2. Beas-2B hücre hattı kuyruk % DNA bulguları.....  | 52 |
| 4.3.3. Beas-2B hücre hattı kuyruk olive kuyruk momenti bulguları .....  | 54 |
| 4.3.4. A549 hücre hattı kuyruk uzunluğu bulguları.....  | 56 |
| 4.3.5. A549 hücre hattı kuyruk % DNA bulguları.....   | 58 |
| 4.3.6. A549 hücre hattı kuyruk olive kuyruk momenti bulguları .....   | 60 |
| 4.4. ROS testi bulguları.....   | 65 |
| 4.4.1 Beas-2B hücre hattında <i>Anemone blanda</i> bitki ekstraktı için elde edilen ROS bulguları.....                | 66 |
| 4.4.2. A549 hücre hattında <i>Anemone blanda</i> bitki ekstraktı için elde edilen hücre içi ROS bulguları.....        | 68 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....  | 70 |
| KAYNAKLAR.....  | 75 |
| ÖZGEÇMİŞ.....   | 81 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

<sup>0</sup>C

dk

dH<sub>2</sub>O

P

g

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

CO<sub>2</sub>

kg

L

µg

µL

mA

mg

mL

nM

NaOH

NaCl

V

### Açıklama

Celcius

Dakika

Distile su

Fosfat

Gram

Hidrojen peroksit

Karbondioksit

Kilogram

Litre

Mikrogram

Mikrolitre

Miliamper

Miligram

Mililitre

Nanomolar

Sodyum hidroksit

Sodyum klorür

Volt

### Kısaltmalar

A549

ADK

AIDS

Beas-2B

BHK

BK

DCFDA

DCFH

DCF

DNA

DMSO

EtBr

FBS

HeLa

HepG2

HL-60

IC

KHAK

KHDAK

LMA

Na<sub>2</sub>EDTA

n-BuOH

### Açıklama

İnsan akciğer karsinom hücre hattı

Adenokarsinom hücre hattı

Kazanılmış bağışıklık yetersizliği sendromu

İnsan sağlıklı akciğer fibroblast hücre hattı

Büyük hücreli karsinom

Büyüme kontrol

2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate

Dichlorodihydrofluorescein

2',7'-Dichlorofluorescein

Deoksiribonukleik Asit

Dimetil Sülfoksit

Etidyum bromür

Fetal bovine serum

İnsan servikal karsinom hücre hattı

İnsan hepatoselüler kanser hücre hattı

İnsan promyelositik lösemi

İnhibisyon konsantrasyon

Küçük hücreli akciğer kanseri

Küçük hücreli dışı akciğer hücresi

Low Melting Agoroz (Düşük sıcaklıkta eriyen agaroz)

Sodyum Etilendiamin Tetra Asetik Asit

N-Bütanol

|            |  |
|------------|--|
| MDA-MB-231 | İnsan meme kanseri hücre hattı           |
| MTT        | Metill tiazol difenil tetrazolyum bromür |
| M.Ö        | Milattan önce                            |
| PBS        | Fosfat Buffer Serum                      |
| PK         | Pozitif kontrol                          |
| ROS        | Serbest Reaktif Oksijen                  |
| RR         | Rölatif etki                             |
| RFU        | Relative fluorescence units              |
| SHK        | Skuamöz hücreli karsinom hücre hattı     |
| TCM        | Geleneksel Çin tıbbı                     |
| TIM        | Geleneksel Hint tıbbı                    |
| U87MG      | Glioblastoma hücre hattı                 |
| XTT        | 2h-tetrazolyum-5-karboksanilid           |



## ŞEKİL DİZİNİ

|             | <b>Sayfa</b>   |
|-------------|--|
| Şekil 2.1.  | Kanser gelişim aşamalarında genetik modeller..... 4  |
| Şekil 2.2.  | Kanser hücrelerini özellikleri..... 7  |
| Şekil 2.3.  | Akciğer kanserinin histolojik olarak sınıflandırılması..... 12   |
| Şekil 2.4.  | <i>Anemone</i> türlerinden oleanan tipi triterpenoidlerin temel iskeletleri..... 26  |
| Şekil 2.5.  | <i>Anemone</i> türlerinden diğer tip triterpenoidlerin temel iskeletleri 27  |
| Şekil 3.1.  | <i>Anemone blanda</i> bitkisi..... 33  |
| Şekil 4.1.  | <i>Anemone blanda</i> ekstraktına maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında XTT testi ile belirlenen canlılık oranları..... 44  |
| Şekil 4.2.  | <i>Anemone blanda</i> ekstraktına maruz bırakılan A549 akciğer karsinom hücre hattında XTT test ile belirlenen canlılık oranları 45  |
| Şekil 4.3.  | <i>Anemone blanda</i> 'nın ekstraksiyonuna maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık oranları..... 47                                     |
| Şekil 4.4.  | <i>Anemone blanda</i> 'nın ekstraksiyonuna maruz bırakılan A549 hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık oranları..... 48  |
| Şekil 4.5.  | <i>Anemone blanda</i> 'nın çeşitli konsantrasyonlarda ekstraktına maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında büyüme kontrole göre değerlendirilen kuyruk uzunluğu oranları..... 51 |
| Şekil 4.6.  | <i>Anemone blanda</i> 'nın ekstraktına maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında pozitif kontrole göre değerlendirilen kuyruk uzunluğu oranları..... 52                           |
| Şekil 4.7.  | <i>Anemone blanda</i> 'nın ekstraktına maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında büyüme kontrole göre değerlendirilen kuyruk % DNA oranları..... 53                               |
| Şekil 4.8.  | <i>Anemone blanda</i> 'nın ekstraktına maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında pozitif kontrole göre değerlendirilen kuyruk % DNA oranları..... 54                              |
| Şekil 4.9.  | <i>Anemone blanda</i> 'nın ekstraktına maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında büyüme kontrole göre değerlendirilen olive kuyruk moment oranları..... 55                        |
| Şekil 4.10. | <i>Anemone blanda</i> ekstraktına maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında pozitif kontrole göre değerlendirilen olive kuyrukmoment oranları..... 56                             |
| Şekil 4.11. | <i>Anemone blanda</i> 'nın ekstraktına maruz bırakılan A549 hücre hattında büyüme kontrole göre değerlendirilen kuyruk uzunluğu oranları..... 57                               |
| Şekil 4.12. | <i>Anemone blanda</i> ekstraktına maruz bırakılan A549 hücre hattında pozitif kontrole göre değerlendirilen kuyruk uzunluğu oranları..... 58                                   |
| Şekil 4.13. | <i>Anemone blanda</i> ekstraktına maruz bırakılan A549 hücre hattında büyüme kontrole göre değerlendirilen % DNA oranları 59   |
| Şekil 4.14. | <i>Anemone blanda</i> ekstraktına maruz bırakılan A549 hücre hattında komet testi ile belirlenen pozitif kontrole göre değerlendirilen % DNA oranları..... 60                  |

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Şekil 4.15. | <i>Anemone blanda</i> ekstraktına maruz bırakılan A549 hücre hattında büyüme kontrole göre değerlendirilen olive kuyruk moment oranları.....   | 61 |
| Şekil 4.16. | <i>Anemone blanda</i> bitki ekstraktının çeşitli dozlarına maruz bırakılan A549 hücre hattında pozitif kontrole göre değerlendirilen olive kuyruk moment oranları.....   | 62 |
| Şekil 4.17. | Beas-2B sağlıklı akciğer epitel hücre hattında çeşitli konsantrasyonlarda floresan mikroskop altında komet görüntüleri.....  | 63 |
| Şekil 4.18. | A549 akciğer karsinoma hücre hattında çeşitli konsantrasyonlarda floresan mikroskop altında komet görüntüleri.....   | 64 |
| Şekil 4.19. | <i>Anemone blanda</i> ekstraktına maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında büyüme kontrole göre hücre içi reaktif oksijen seviyeleri.....  | 66 |
| Şekil 4.20. | <i>Anemone blanda</i> ekstraktının farklı dozları ile 1000 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ 'e birlikte maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında pozitif kontrole göre değerlendirilen hücre içi reaktif oksijen seviyeleri..... | 67 |
| Şekil 4.21. | <i>Anemone blanda</i> 'nın ekstraksiyonuna maruz bırakılan A549 hücre hattında ROS testi ile belirlenen büyüme kontrole göre değerlendirilen hücre içi reaktif oksijen seviyeleri.....   | 68 |
| Şekil 4.22. | <i>Anemone blanda</i> ekstraktına maruz bırakılan A549 hücre hattında ROS testi ile belirlenen pozitif kontrole göre değerlendirilen hücre içi reaktif oksijen seviyeleri.....   | 69 |

## ÇİZELGE DİZİNİ

|  | <b>Sayfa</b> |
|--|--------------|
| Çizelge 2.1. <i>Anemone türleri</i> , yayılışları, kullanım alanları.....  | 18           |
| Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan ekipmanlar.....   | 29           |
| Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan saf malzemeler.....  | 30           |
| Çizelge 3.3. DCF standartlarının tüp dilüsyon yöntemiyle hazırlanması.....   | 42           |
| Çizelge 4.1. <i>Anemone blanda</i> 'nın ekstraksiyonuna maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında XTT testi ile belirlenen canlılık yüzdeleri.....                      | 44           |
| Çizelge 4.2. <i>Anemone blanda</i> 'nın ekstraksiyonuna maruz bırakılan A549 akciğer karsinom hücre hattında XTT testi ile belirlenen canlılık yüzdeleri.....        | 46           |
| Çizelge 4.3. <i>Anemone blanda</i> 'nın ekstraksiyonuna maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında Klonojenik testi ile belirlenen canlılık yüzdeleri...                 | 47           |
| Çizelge 4.4. <i>Anemone blanda</i> 'nın ekstraksiyonuna maruz bırakılan A549 akciğer karsinom hücre hattında Klonojenik testi ile belirlenen canlılık yüzdeleri..... | 49           |
| Çizelge 4.5. Beas-2B sağlıklı akciğer epitel hücre hattının komet testi sonuçları.....   | 50           |
| Çizelge 4.6. A549 akciğer karsinoma hücre hattının komet testi sonuçları.....  | 50           |
| Çizelge 4.7. ROS testi sonuçları.....  | 65           |

## 1.GİRİŞ

Tüm dünyaya bakıldığında kanser, mortalite ve morbiditeyi önemli ölçüde etkileyen sebeplerden biri olarak görülmeye devam etmektedir. Kanser, bulaşıcı olmayan hastalıklar dışında, kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci önde gelen ölüm nedenidir (Hoyert ve ark. 2006). Kanser: AIDS, tüberküloz ve sıtmanın toplamından daha fazla ölüm oranına sahiptir ve dünya çapında sekiz ölümden birinden sorumludur. Genel kanser insidansı ve mortalitesi, dünyanın geri kalanına kıyasla Kuzey Amerika, Yeni Zelanda, Avustralya ve Batı Avrupa ülkelerinde daha yüksektir. Amerika Birleşik Devletleri'nde her dört ölümden biri kansere bağlı gerçekleşmektedir. Kanser sebebiyle gerçekleşen ölümleri küresel olarak değerlendirildiğinde 2002'de 7,1 milyon olarak rapor edilirken 2030'da 11,5 milyona çıkacağı ön görülmektedir (Avni ve ark. 2008).

Kanser çoğunlukla normal olmayan hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılmasını içeren bir hastalık olarak tanımlanır (Ferlay ve ark. 2013). Bu hücreler, kontrolsüz bir şekilde çoğalarak tümör oluşturabilir ve metastaz ile göç ederek vücudun herhangi bir bölgesinde tümör oluşturabilir. Kanser genellikle radyoterapi, kemoterapi, anti-kanser ilaçları veya cerrahi yöntemle tedavisi mümkünken tedavi sırasında veya sonrasında bazı yan etkileri görülebilir (Bray ve ark. 2013).

Kemoterapi, kanser tedavisinde rutin olarak kullanılmaktadır. Kanser hücreleri, normal hücrelerde bulunan düzenleyici fonksiyonların çoğunu kaybeder fakat bölünmeye devam ederler. Bu özellikleri, kanser hücrelerini kemoterapötik ilaçlara duyarlı hale getirir. Kemoterapötik tedavilerin bir sonucu olarak çeşitli toksisiteler ortaya çıkabilir. Örneğin, yaygın bir kemoterapötik ajan olan 5-florourasil'in miyelotoksisiteye, kardiyotoksisiteye neden olduğu bilinmesiyle beraber nadir olarak bazı vakalarda vazospastik bir ajan olarak etki ettiği gösterilmiştir. Yaygın olarak kullanılan diğer bir kemodrug, doksorubisin kardiyak toksisiteye, renal toksisiteye ve miyelotoksisiteye neden olur (Avni ve ark. 2008).

Kemoterapötik ilaçların toksisitesi bazen kanserin tedavisinde önemli bir sorun yaratır. Bitkisel kaynaklı ürünler uygulanan kanser tedavisi için çeşitli terapiler önerilmiştir. Bugün piyasada bitki kaynaklı antikanser ajanlarının dört sınıfı vardır, vinka alkaloidleri (vinblastin, vinkristin ve vindesin), epipodofilotoksinler (etoposid ve teniposide), taksanlar (paklitaksel ve docetaxel) ve kamptotesin (kamptotesin ve irinotekan) türevleridir. Bitkiler yeni ilaçlar sağlamak için muazzam bir potansiyele sahiptir ve bu nedenle kansere karşı kemoprotektif potansiyel sağlayabilen doğal kimyasalların bir rezervuarıdır (Avni ve ark. 2008).

▼ *Ranunculaceae* cinsine ait olan *Anemone*, 150'den fazla tür içerir ve bu türlerin birçoğu şifalı bitkiler olarak bilinirken geleneksel tıpta uzun süredir kullanılmaktadır. *Anemone* bitkilerinde, özellikle bazıları anti-kanser aktiviteleri gösteren triterpenoid saponinler olmak üzere çeşitli tıbbi bileşikler bulunmuştur. Bazı *Anemone* bileşikleri ve özleri, immünomodülatör, anti-inflamatuar, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteler gösterir. 50'den fazla türün, modern ilaç keşfi için ipuçları sağlayan etnofarmakolojik kullanımları vardır. *Anemone* bileşikleri, antikanser ve diğer biyoaktiviteleri birçok yolla gösterir (Hao ve ark. 2017).

Bu çalışmada *Anemone blanda* bitki özütlerinin in vitro sitotoksik ve in vitro genotoksik etkilerinin sağlıklı akciğer fibroblast (Beas-2B) ve akciğer kanser (A549) hücre hatları üzerindeki etkilerini karşılaştırmalı olarak araştırılması amaçlanmıştır. Sitotoksik ve antiproliferatif etkilerin belirlenmesi amacıyla, klonojenik test ve XTT testleri kullanılmıştır. Genotoksik etkilerinin ve DNA kırıklarının araştırılması amacıyla komet test yöntemi kullanılmış, ayrıca hücre içi oksidatif hasar oluşum mekanizmasını belirlemek için reaktif oksijen türleri (ROS) düzeyi DFCDA kullanılarak ölçülmüştür.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Kanser

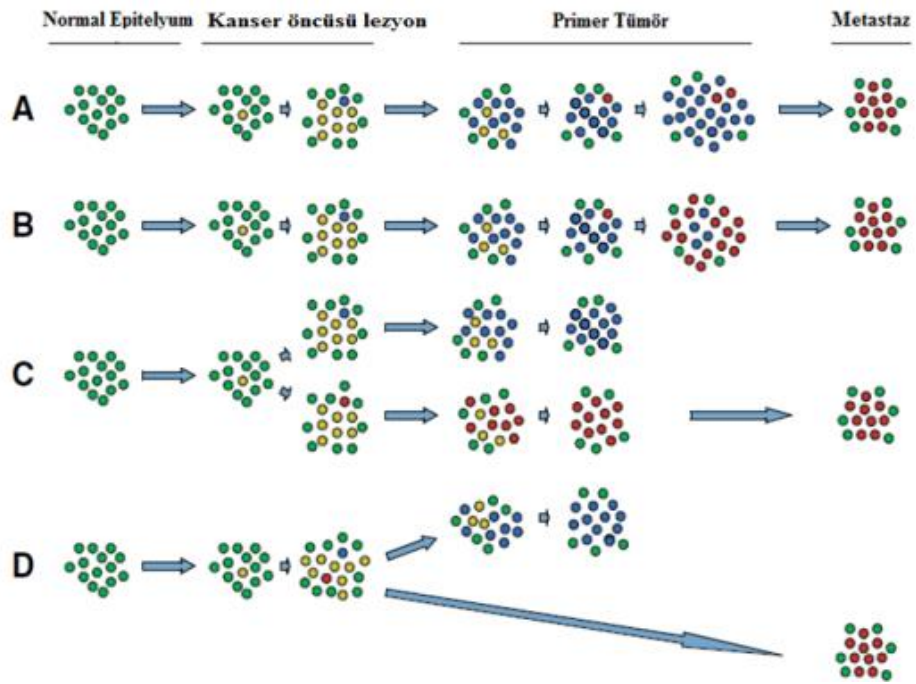
“Cancer” veya “carcinoma” kelimeleri Latince’den türeyen yengeç anlamına gelen kelimeler olup kansere ait en eski bilgiler M.Ö. 3000’lerde belirlenmiştir. Kanser kelimesini ilk olarak, M.Ö. 460-377 yıllarında Hipokrat organizmada tedaviye cevap vermeyen oluşumları tanımlamak için kullanmıştır. Vücudun yüzeyinde gelişen, diğer yapılara göre farklı karakterde olan, yavaş büyüyen ve kırmızı renkli olan şişlikleri Hipokrat “Carcinos” ya da “Carcinoma” olarak adlandırmıştır. Hipokrat “cancer” terimini ilk defa M.Ö. 3. Yüzyılda kitle (tümör) çevresinde oluşan şişkin damarları bir yengecin bacaklarına benzettiği için kullanırken Galen ise “oncos” terimini şişme anlamına geldiği için kullanmıştır (Harris ve ark. 1993, Ünal 2006).

Kanser, son yıllarda hızla artış göstermektedir. Tedavisinde değişik metotlar denenmesine rağmen kanseri tamamen tedavi edecek bir yöntem günümüzde henüz keşfedilememiştir. Günümüzde kanser, kardiyovasküler vakalardan sonra ikinci sırada bulunmaktadır. Kolorektal, akciğer ve prostat erkek bireylerde sıkça görülürken kolorektal, akciğer ve meme kadın bireylerde en sık karşılaşılan kanser türleri olduğu gözlemlenmiştir (Aktaş 2010). Tedavide kullanılan farklı yöntemler mevcuttur; Cerrahi metodlar, kemoterapi, radyoterapi, immunoterapi, hormon tedavisi, sinyal ileti sistemi inhibitörü, gen tedavi protokolü, anjiyojenez ve geleneksel tıbbi yöntemleri gibi (Aktaş 2010). 2000’li yıllara bakıldığında akciğer kanseri en sık görülen kanser türü olduğu belirtilirken, vakaların tümüne bakıldığında ise akciğer kanseri %12,8’ini oluşturmasıyla beraber her yıl %3 artış gösterdiği rapor edilmiştir. Tüm bireylerde, akciğer kanserinin diğer kanser türlerine nazaran daha fazla ölüm oranına sahip olduğu belirtilmiştir. Oran olarak ise bakıldığında tüm kanser vakalarına bağlı ölümlerin %17,8’ini akciğer kanserinin oluşturduğu bilinmektedir (Bakar 2017).

Kanser, vücutta bulunan herhangi bir farklı hücre türünün olağandışı çoğalmasıyla gerçekleşebilir. Farklı hücre türlerindeki bu değişim tedaviye verilen cevabı ve davranışlarını değiştirmesinden dolayı yüzden fazla kanser türevi olduğu gözlemlenmiştir.

Kanser patolojisinde en önemli konu iyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) tümör ayrımıdır. Bir tümör, iyi huylu veya kötü huylu olabilen hücrelerin anormal çoğalmasdır. Yaygın bir cilt siğili gibi iyi huylu bir tümör, ne çevreleyen normal dokuyu işgal eder ne de uzak vücut bölgelerine yayılır, orijinal konumuyla sınırlı kalır (Bakar 2017). Tüm bunların yanı sıra kötü huylu bir tümör metastaz yoluyla tüm vücuda yayılabilirken bulunduğu çevredeki diğer normal dokulara da etki edebilir (Şekil 2.1.) (Bakar 2017).

Kötü huylu olan tümörler kanser olarak betimlenirken onları bu kadar tehlikeli yapan metastaz ve istila etme özellikleridir. İyi huylu tümörler genellikle cerrahi yöntemlerle önüne geçilebilirken, kötü huylu tümörlerin metastaz özelliklerinden dolayı lokal olarak yapılan tedavilere direnç kazanırlar (Su ve ark. 2015, Bakar 2017).



**Şekil 2.1.** Kanser gelişim aşamalarında genetik modeller. Yeşil, sağlıklı epitel hücresi. Mavi, metastaz yapma yeteneğine sahip olmayan kanserli hücreler. Kırmızı, metastaz yapma yeteneğine sahip olan kanserli hücreler. A ve D modellemelerinde metastaz yapma yetisi olan kanserli hücreler gösterilirken, B ve C modellemelerinde metastaz yapma yetisine ek olarak baskın büyüme yeteneği olan kanserli hücreler resmedilmiştir (Yokota ve Kohna 2004)

Tümörler iyi huylu veya kötü huylu fark etmeksizin oluştukları hücre tipine göre üç ana grupta yer alırlar;

I-Karsinomlar,

II-Sarkomlar

III-Lösemiler veya lenfomalar;

*Karsinomlar*; en sık görülen kanser türüdür. Tüm vücudu kaplayan epitel hücrelerden köken alırlar. İnsanlarda görülen kanserlere bakıldığında yaklaşık olarak %90'ını içeren karsinomlar, epitel hücrelerinin maligniteleridir (Su ve ark. 2015).

*Adenokarsinom*; mukus, sıvı gibi maddeler üreten epitel hücrelerden oluşan türlerdir. Meme, kolon ve prostat kanserlerinin çoğu adenokarsinomdur (Su ve ark. 2015).

*Bazal hücreli karsinom*; insanlarda en çok karşılaşılan kanser türlerinden biridir. Sıklıkla güneşe maruz kalan kısımlarda baş gösterir. Epidermin alt veya bazal kısımlarında görülen bir türken aynı zamanda gelişimi yavaş ve nadiren metastaz yapar. Bazal hücreli karsinom gelişme riski, düşük bağışıklık, güneşe maruz kalma, genetik yatkınlık, gibi değişken faktörlere bağlıdır (Adışen ve Gürer 2007).

*Skuamöz hücreli karsinom*; bu kanser tipi vücut yüzeyinin altında bulunan skuamöz hücrelerde oluşan bir türdür. Bu hücre tipi aynı zamanda mide, bağırsaklar, akciğerler, mesane ve böbrekler dahil olmak üzere diğer birçok organı da kaplamaktadır. Mikroskopik olarak incelendiklerinde balık pulları gibi düz bir görünüme sahiptir. Skuamöz hücreli karsinoma bazen epidermoid karsinomlar da denir (Su ve ark. 2015).

*Geçiş hücreli karsinom*; aynı zamanda ürotelyum adı verilen epitel dokusunda oluşan bir kanser türüdür. Esneyebilen epitel hücre katmanlarında oluşan bu doku, mesane, üreterler, böbrek pelvisi ve diğer birkaç organın astarında bulunur. Mesane, üreter ve böbreklerin bazı kanserleri geçiş hücreli karsinomlardır (Su ve ark. 2015).

*Sarkomlar*, nadir olarak görülen bu kanser türü tüm kanser vakalarına bakıldığında %1'lik bir dilimi oluşturur. Karmaşık ve heterojen bir kanser türü olmalarının sebebi mezenşimal farklılık göstermelerinden kaynaklanmaktadır.

Nadir olarak gözlemlenen sarkomlar, kas, yağ, kan damarları, lenf damarları ve fibröz doku (tendonlar ve bağlar gibi) dahil olmak üzere kemik ve yumuşak dokularda oluşan kanserlerdir. Osteosarkomlar bu türde en sık gözlemlenen kanser türüdür. Histopatolojik özellikleri, anatomik bölgeleri ve biyolojik davranışlarındaki farklılıkları nedeniyle anlaşılması, tanımlanması ve tedavisinde güçlükler oluşturmaktadır. (Yazılıtaş ve ark. 2014).

*Lösemi ve Lenfoma;* kan oluşumunda görevli olan kemik iliği dokusunda baş gösteren kanser türleri lösemi olarak adlandırılır. Bu türler kitle oluşturmazlar bunun yerine, kanda ve kemik iliğinde çok fazla miktarda anormal olan beyaz kan hücresi birikir ve normal kan hücrelerini dışarıda bırakır. Normal kan hücrelerinin düşük seviyede kalması pıhtılaşmanın kontrolü, dokulara oksijen taşınması, enfeksiyonlara karşı savunmasız kalma gibi birçok duruma sebebiyet verir. İnsan malignitelerinin yaklaşık %8'ini oluşturan lösemiler kan oluşturan hücre grublarından oluşurken, lenfomalar ise bağışıklık sistemi hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Tümörler ayrıca köken aldığı dokuya ve ilgili hücre tipine göre sınıflandırılır. Örneğin, fibrosarkomlar fibroblastlardan ve eritroid lösemiler, eritrositlerin öncülerinden kaynaklanır. Hastalığın ne kadar hızlı kötüleştiğine (akut veya kronik) ve kanserin başladığı kan hücresi tipine (lenfoblastik veya miyeloid) göre gruplanan dört yaygın lösemi türü vardır. Akut lösemi formları hızla büyür ve kronik formlar daha yavaş büyür (Su ve ark. 2015).

*Lenfoma;* bağışıklık sistemi elemanları olan B hücreleri ve T hücrelerinde gözlemlenen türlerdir. Bu tip kanser türleri lenf sisteminde bulunan düğümler ve damarlarda görülürken bunların dışında diğer organlarda da anormal lenfosit oluşumuna sebep olabilirler

Lenfoma türlerini iki ana başlık altında toplar;

*Hodgkin lenfoma* – çoğunlukla B hücrelerinde görülen bu kanser türünde Reed-Sternberg hücreleri adı verilen anormal lenfositler bulunur.

*Hodgkin olmayan lenfoma* – B veya T hücrelerinde gözlemlenen ve hızlı veya yavaş yayılım gösteren bu kanser türü geniş bir kanser grubudur (Su ve ark. 2015).

### 2.1.2. Kanser hücrelerinin özellikleri

Normal hücreler sınırlı bölünme sayısına sahipken kanserli hücrelerde böyle bir durum söz konusu değildir. Kanserli olan hücrelerin bölünme yeteneği sınırsızdır ve bu durum immortalite olarak adlandırılır. Bu yeteneğin sınırsız olmasının sebebi, normal hücreler bölündüğünde telomeraz enzimi sistemli bir şekilde azalırken telomerlerde kısılır. Böylece tamamen farklılaşmış bir hücre siklusun G0 fazında durur ve sonunda çoğalma kapasitesini kaybeder. Fakat kanserli hücrelerde bu enzim etkinliğini sürdürmeye devam eder ve telomerin uzunluğu sabit kalır bu yüzden kanserli hücreler sınırsız bölünme yeteneği kazanırlar (Shay ve ark. 2001).

Yapılan son çalışmalarda yeniden programlanma, enerji metabolizması ve bağışıklık sisteminden kaçınma gibi özelliklere de sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 2.2).



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

### 2.1.3. Kanser gelişim aşamaları

Malign transformasyon, kanserli hücrelerin sağlıklı hücrelerden geliştiği karmaşık süreçtir. Birkaç adımdan oluşur:

-Başlatma

-Gelişim

-İlerleme

Başlatma, iki aşamalı kanser gelişimi modelinde ilk adımdır. Başlatıcılar, halihazırda DNA ile reaktif değillerse, vücuttaki ilaç metabolize edici enzimler aracılığıyla değişir (sıklıkla elektrofilik hale getirilirler) ve daha sonra DNA'da değişikliklere (mutasyonlar) neden olurlar (Troll ve Wiesner 1985). Birçok başlatıcının aktif hale gelmeden önce metabolize edilmesi gerektiğinden, başlatıcılar genellikle belirli doku tiplerine veya türlerine özgüdür (Pitot ve ark. 2004).

Başlatıcıların etkileri geri döndürülemez. Belirli bir hücre bir başlatıcı tarafından etkilendiğinde, ölümüne kadar ilerlemeye açıktır. Başlatma kalıcı genetik değişimin sonucu olduğundan, mutasyona uğramış hücrenin bölünmesinden üretilen herhangi bir yavru hücre de mutasyonu taşıyacaktır (Yamagiwa ve ark. 1918). Fare derisi karsinogenezi çalışmalarında, başlatıcı dozu ile üretilen tümör miktarı arasında doğrusal bir ilişki gözlemlenmiştir, bu nedenle başlatıcıya herhangi bir maruz kalma durumu, riski artırır ve bu risk, daha yüksek maruziyet seviyeleri ile süresiz olarak artar (Pitot ve ark. 2004).

Gelişim, bir hücre bir başlatıcı tarafından mutasyona uğratıldığında, promotörlerin etkilerine karşı hassastır. Bu bileşikler, başlatıcı tarafından yaratılan mutasyonu içeren çok sayıda yavru hücreye yol açarak hücrenin çoğalmasını teşvik eder. Daha önce bir başlatıcıya maruz kalmayan promotörlerin, söz konusu organizma üzerinde hiçbir etkisi olmaz (Pitot ve ark. 2004).

Başlatıcıların aksine, promotörler hücre içindeki DNA veya makromoleküllere kovalent olarak bağlanmazlar. Birçoğu, artan hücre proliferasyonuna yol açan hücre içi yolları etkilemek için hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanır (Troll ve Wiesner 1985).

İki genel promotör kategorisi vardır; tanımlanmış dokuların hedef hücreleri üzerindeki veya içindeki reseptörlerle etkileşime giren spesifik promotörler ve bilinen bir reseptör olmaksızın gen ekspresyonunu değiştiren spesifik olmayan promotörler. Promotörler, farklı doku tiplerinde farklı miktarlarda bulunan reseptörlerle etkileşimleri nedeniyle genellikle belirli bir doku veya türe özgüdür.

Promotör uygulaması ile tümör büyüme riski doza bağlı olmakla birlikte, promotörlerin hem bir eşik etkisi hem de maksimum etkisi vardır. Çok düşük dozlarda promotörler tümör gelişimine yol açmaz ve aşırı yüksek dozlar, orta düzeyde maruziyetten daha fazla risk oluşturmaz (Pitot ve ark. 2004).

Bununla birlikte bazı kanserojenler, promotörlere ihtiyaç duymadan kansere neden olabilecek kadar güçlüdür. Örneğin iyonlaştırıcı radyasyon (X-ışınlarında kullanılan ve nükleer santrallerde ve atom bombası patlamalarında üretilen) başta sarkomlar, lösemi, tiroid kanseri ve meme kanseri olmak üzere çeşitli kanserlere neden olabilir.

İlerleme, Leslie Foulds tarafından ortaya atılan progresyon (ilerleme) terimi, iyi huylu bir tümörün bir neoplazmaya ve maligniteye adım adım dönüşümünü ifade eder. İlerleyen hemen hemen tüm tümörler anöploid olduğundan (yanlış sayıda kromozoma sahip olduklarından) progresyon karyotipik bir değişiklik ile ilişkilidir. Bu karyotipik değişiklik, artan bir büyüme hızı, istila, metastaz ve biyokimya ya da morfolojide bir değişiklik ile birleştirilir (Pitot ve ark. 2004).

Kanser doğrudan onu çevreleyen dokuyu istila edebilir veya yakındaki/uzaktaki dokulara veya organlara yayılabilir. Kanser lenfatik sistem yoluyla da yayılabilir. Bu tür yayılma, karsinomlar için tipiktir. Örneğin, meme kanseri genellikle önce koltuk altındaki yakındaki lenf düğümlerine yayılır ve ancak daha sonrada uzak bölgelere yayılır. Kanser ayrıca kan dolaşımı yoluyla da yayılabilir. Bu yayılma türü sarkomların tipik bir örneğidir.

#### 2.1.4. Akciğer kanseri

Akciğer kanseri; dünya sağlık örgütünün 2014 yılı verilerine göre en çok karşılaşılan kanser türü olduğu ifade edilmiştir. Kansere bağlı ölüm sebeplerinde akciğer kanseri ilk sırada yer almaktadır. Cinsiyet dağılımına bakıldığında akciğer kanseri erkeklerde ilk sırada yer alırken kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci sırayı oluşturur (Ferlay ve ark. 2014). Türkiye'deki durumda ise ölüm oranına bakıldığında ilk sırada yer alan akciğer kanseri, kadın bireylerde 2014 verilerine göre meme kanserinden sonra gelirken erkek bireylerde ise ilk sırada yer almaktadır (Ferlay ve ark. 2014). "Türkiye'nin akciğer kanseri haritası" projesini yöneten Türk Toraks Derneği'nin sonuçlarında her yıl Türkiye'de 29.314 yeni akciğer kanseri vakasının eklendiği belirtilirken bu vakaların %80,7'si küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), %16,4'ü küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve %2,9'u ise diğer alt tiplerden oluştuğu belirtilmiştir.

Akciğer kanseri görülen hastaların yaş ortalaması Türkiye'de 60'ken, %90,4'ü erkektir (Ferlay ve ark. 2014). Skuamöz olmayan hücreli akciğer kanserleri en çok görülen tür iken 45 yaş altı topluluklarda ve kadın bireylerde en çok karşılaşılan tür adenokarsinom olarak belirlenmiştir. Bu kanser türüne tanı konulduğunda %47 gibi büyük bir dilim metastatik evrede iken %16'sı operasyona uygun olan evrede belirlenmektedir (Şencan ve Keskinliç 2015).

Coğrafik varyasyon gösteren akciğer kanser insidansı yaygın olarak gelişmiş olan ülkelerde görülürken, gelişmekte olan ülkelerde insidans daha düşük olduğu görülmüştür (Gilliland ve Samet 1994). En önemli etiyolojik faktörlerden olan sigara kullanımı akciğer kanser riskini kullanmayanlara göre 30 kat artırırken pasif içici olanlarda bu risk 3,5 kat artmaktadır. Diğer etiyolojik faktörler ise yaş, ırk, kronik hastalıklar, genetik faktörler, cinsiyet, geçirilmiş akciğer hastalıkları, mesleki ve çevresel kanserojenler, sosyoekonomik durum gibi sınıflandırılabilir (Nam ve ark 2016).

Kanser ölümlerinin önde gelen nedenlerinden olan akciğer kanseri (tüm vakaların %11,6'sını oluşturur) tüm dünyada en sık teşhisi konulan ve toplam vakanın %11,6'sını oluşturan kanser türüdür. Akciğer kanseri tüm kanser vakalarında yaşanan ölümlerin %18,4'ünü oluştururken, her yıl 1,8 milyondan fazla ölümden sorumludur (Bray ve ark. 2018).

Akciğer kanserinde ölüm oranının fazla olması geç evrelerde teşhis edilmesi sonucuyla bağdaştırılabilir. Geç evrelerde tedavilerin etkileri daha azken sağkalım oranları da düşüktür. Erken evrede sağkalım %57,4 oranındayken geç teşhis edilen veya metastaza uğrayan durumlarda %5,2 oranındadır (Alencar ve ark. 2020).

Erkek bireylerde yapılan araştırmalardan elde edilen son istatistik sonuçlarına dayanarak belirlenen insidans oranına göre Doğu Asya, Mikronezya/Polinezya, Avrupa'nın çoğunda ve özellikle Doğu Avrupa'da yüksek olduğunu belirtilmiştir. Afrika kıtasında ise Fas (31.9/100.000) ve Güney Afrika'da (28.2/100.000) oranlar yüksek olmasına rağmen kıta olarak değerlendirildiğinde oran düşük kalmaktadır. Kadınlar arasında insidans oranları en yüksek Kuzey Amerika, Kuzey ve Batı Avrupa ve Avustralya/Yeni Zelanda'dadır (Alencar ve ark. 2020).

Sigara, pasif içicilik, hava kirliliği, akciğer hastalıkları, kanserojen kimyasallara mesleki maruziyet, iyonlaştırıcı radyasyon, asbest ve alkol tüketimi gibi çeşitli çevresel faktörler kanser oluşumu ve gelişiminde etkilidir (Kanval ve ark. 2017, Brennan 2011). Batı toplumlarındaki tüm akciğer kanseri vakalarının %80'inden fazlasından sorumlu olan tütün içimi, sigara içenlerde akciğer kanseri rölatif riskini (RR) hiç sigara içmeyenlere kıyasla 10-20 kat artırır (Bray ve ark. 2018). Sigara içmek en güçlü şekilde küçük hücreli akciğer kanseri (KHDAK) ve skuamöz hücreli karsinom ile bağlantılıyken, adenokarsinom hiç sigara içmemiş hastalarda en sık görülen akciğer kanseri türüdür (Herbst ve ark. 2008).

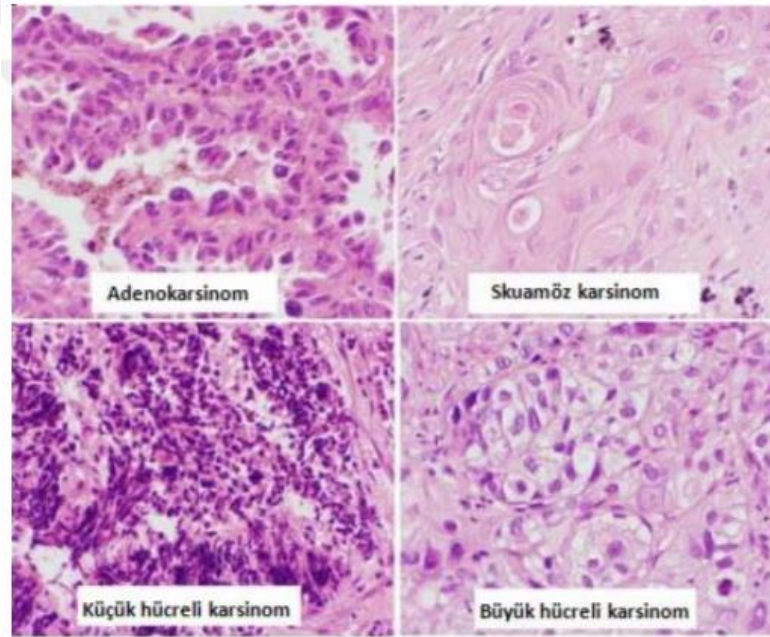
Küresel istatistiklere bakıldığında ise toplam sigara içenlerin %10-15'inde akciğer kanser oluşumu gözlemlenirken, tüm akciğer kanser hastalarına bakıldığında %10-25'i sigarayla bağlantısı belirlenmemiştir (Alencar ve ark. 2020).

Tütün içimi akciğer epitel hücrelerinde DNA hasarına neden olduğu ve lokal bağışıklık sistemini değiştirdiğinden dolayı, sigara içenlerde ve hiç sigara içmeyenlerde tümör mikroçevreleri incelendiğinde farklı olduğu belirlenmiştir (Smolle ve ark 2019). 2018 yılında Li ve meslektaşlarının gerçekleştirdikleri bir çalışmada, 200 adet akciğer adenokarsinomlardan alınan doku örneklerinde yapılan araştırmalarda, sigara içenlerde ve hiç sigara içmeyenlerde karsinogenezinin oluşum yollarının farklı olduğu belirtilmiştir (Xufan ve ark. 2018).

### 2.1.5. Akciğer kanserinin histopatolojisi

Akciğer kanseri, mikroskop görüntüsünde hücrelerin yoğunluğuna bakıldığında Adenokarsinom (ADK), Büyük Hücreli Karsinom (BHK), Küçük Hücreli Karsinomdan (KHAK) ve yassı (Skuamöz, epidermoid) Hücreli Karsinom (SHK) oluşmaktadır (Zeren 2000). Bu sınıflandırmalardan ADK, SHK ve BHK'nın biyolojik ve klinik verileri benzer olduğu için Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri olarak (KHDAK) tanımlanmaktadır. KHDAK grubuna dahil olan kanserli hücreler çoğunlukla kemik, karaciğer, beyin ve adrenal bezler ve mediastinal ve retroperitoneal lenf bezlerine metastaz yaptıkları belirtilmiştir (Bakar 2017) (Şekil 2.3.).

Adenokarsinom, akciğerdeki hava keselerinde bulunan bronşiyolepitel hücrelerden köken alırken, Skuamöz hücreli karsinom, nefes borusundan akciğerlere uzanan skuamöz hücrelerden, büyük hücreli karsinom ise akciğer epitel hücrelerinden köken almaktadır (Özercan ve Şimşek 2017). Akciğer kanserinin %85'lik dilimini KHDAK oluştururken %15'lik kısmını KHAK oluşturmaktadır (Travis 2011).



**Şekil 2.3.** Akciğer kanserinin histolojik olarak sınıflandırılması (Motadi ve ark. 2007)

### **2.1.6. Akciğer kanserinin moleküler biyolojisi**

Genetik materyalde oluşan bir hatadan dolayı tümör oluşumu (Karsinogenez) gerçekleşebilmektedir. Bir genetik hasar oluştuğunda ilk olarak hedef alınan genler; büyümeyi uyaran protoonkogenler, büyümeyi inhibe ederek kanseri baskılayan gen ve hasara uğramış DNA'nın onarımında görev alan genlerdir.

Akciğer karsinogenezinde etkin olan moleküler mekanizmalar bu şekilde sıralanabilir;

- Onkogenlerin aktivasyonu,
- Tümörü baskılayan genlerdeki aktivasyon kaybı,
- Hücre siklusunu düzenleyen genlerin aralarındaki farklılıklar,
- DNA tamirindeki sorumlu genlerde oluşan hatalar,
- Büyüme faktörleri ve büyüme reseptörlerinde oluşan farklılıklar (Fong ve Minna 2002).

### **2.2. Tıbbi Bitkiler**

Bitkiler, eski kültürlerde önemli bir yer edinmişlerdir. Gıda ve baharat olarak kullanımının yanı sıra 5000 yılı aşkın bir süredir ilaç olarak da kullanılmaktadır. Geleneksel Çin tıbbı (TCM) ve Geleneksel Hint tıbbı (TIM) olan Ayurveda, bitkilerin tedavi edici özelliklerini günümüze kadar aktarmışlardır (Goldman, 2001 ; Patwardhan ve diğerleri, 2005 ).TCM ve TIM tedavi edici özellikteki bitkileri, çaylar, tentürler, tozlar ve diğer formülasyon türleri olarak hazırlayarak kullanmışlardır ( Balick ve Cox, 1996 ; Samuelsson, 2004). Hangi bitkiden ne tür bir ilaç hazırlanacağını ve bu ilacın hangi doğru teknikle hazırlanması gerektiğini, elde edilen ilaçların kullanım alanlarını, bir nesilden diğerine sözlü olarak aktarılmıştır ( Kinghorn, 2001 ; Samuelsson, 2004 ). Hastalıkları tedavi etmede bitkilerin kullanılması fitoterapi terimiyle tanımlanmaktadır ve ilk kez Fransız asıllı hekim olan Henri Lenclerc (1870-1953) tarafından kullanılmıştır.

Bitkilerin tedavi edici yönlerinin tarihin her döneminde kullanıldığı bilinmektedir. Bu durumla ilgili ilk yazılı kayıt M.Ö. 3000 yıllarına ait olan Ninova tabletleridir. Bu tabletler ile Mezopotomya'da kurulmuş olan Akat medeniyeti, Sümer medeniyeti ve Asur medeniyetinde hayvansal ve bitkisel ilaçlarla tedavilerin mevcut olduğu ispatlanmaktadır (Sarışen ve Çalışkan 2005). Halk dilinde şifalı olarak tanımlanan tıbbi bitkiler Çin ve Hint geleneksel tıbbında önemli bir yer edinmişlerdir. Yunan tıbbında Hipokrat kitaplarında şifalı bitkilerden söz ederken, İbn-i Sina ve Al Gafini'ninde şifalı bitkileri ele aldıkları eserleri bulunmaktadır (Sarışen ve Çalışkan 2005).

Günümüze baktığımızda ise biyokimya ve kimya alanlarındaki ilerlemeler sonucu bitkilerin farmakolojik, klinik ve toksikolojik araştırmalara yapılmış ve elde edilen bilgilere dayanarak bitkilerin etki düzeyleri, sağlıklı dokulardaki etkileri, kalite gibi bazı parametreleri araştırarak tıbbın ihtiyacına yanıt veren birçok ilaç türevi oluşturulmuştur (Sarışen ve Çalışkan 2005). Gelişmekte olan ülkelerdeki nüfusun %70-95'inin geleneksel ilaçları kullandığı düşünülmektedir ( Robinson ve Zhang, 2011 ). Günümüzde, insan ve hayvanlarda çeşitli rahatsızlıkların iyileştirilmesinde ve önlenmesinde tedavi edici olarak kullanılan bitkiler şifalı otlar olarak tanımlanmaktadır. Bitki özleri, kuru tozlar ve bitki parçaları, mantarlar ve algler gibi bitkisel ürünler, geleneksel ilaçların yanında tamamlayıcı tedaviler olarak kullanılmıştır ( Li, 2002 ; Robinson ve Zhang, 2011 ). Tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin sayısını Dünya Sağlık Örgütü yaklaşık 20,000 olduğunu ve ortalama 4 milyar bireyin ilk etapta sağlık sorunları için bitkisel tedavilere başvurduğunu belirtmiştir (Naranjo 1995, Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2011).

Ondokuzuncu yüzyılın başlarında bitkilerden aktif birleşenlerinin izolasyonunu içeren yeni bir yöntemin benimsenmesiyle *Papaver somniferum* L.'den analjezik ilaçlar olan morfin ve kodeinin keşfedilmiştir. Bunların yanı sıra *Erythroxylum koka*'dan bitkisinden kardiyak glikozit, *Digitalis purpurea*'dan izole edilen digitoksin kardiyak ve kanser önleyici ilaç olarak kullanılırken *Digitalis lanata*, *Cinchona calisaya*, *Wedd* ve *Cinchona succirubra*'den elde edilen bileşiklerle ateş düşürücü, sıtma önleyici, analjezik ve iltihap önleyici özelliklere sahip olan ilaçlar üretilmiştir ve bazıları halen kullanımdadır (Newman ve diğerleri, 2000; Kinghorn, 2001; Butler, 2004; Samuelson, 2004; Balunas ve Kinghorn, 2005; Elbaz ve diğerleri, 2012; Menger ve diğerleri, 2013 ).

Bu tür bitkilerden elde edilen doğal bileşikler, terapötik tedavilerin geliştirilmesinde önemli bir rol oynarlar ( Butler, 2004; Balunas ve Kinghorn, 2005; Gordaliza, 2007 ).

Bitkiden izole edilen maddelerle üretilen ilaçların varlığı, bu tür bileşikleri tanımlamak için son 200 yılda gelişmiştir. İlk etapta, bitki, bir botanikçi veya etnobotanist, etnofarmakolog veya bitki ekolojisti tarafından tanımlanır. Daha sonra, potansiyel terapötik aktiviteyi belirlemek için bir fitokimyacı tarafından biyolojik tarama deneyleri, bitkinin içeriği devamında ise aktif bileşiğin izolasyonu yapılır. Son olarak, etki yolağını ve ilgili molekülleri ortaya çıkarmak için moleküler biyoloji çalışmaları gereklidir. Bu alanların kombinasyonu, farmakognozi olarak adlandırılan disiplinler arası bir yaklaşımı belirler ( Kinghorn, 2001; Balunas ve Kinghorn, 2005 ). Bitkisel kökenli ilaçların örnekleri, *Artemisia annua*'dan izole edilen seskiterpen laktondan üretilen artemether (artemotil®) sıtma tedavisinde kullanılırken, *Galanthus woronowii* izole edilen asetilkolinesteraz inhibitöründen üretilen galantamin (Reminyl®) alzheimer tedavisi için, *Papaver somniferum* L.'de üretilen bir dopamin reseptör olan apomorfine hidroklorit (Apokyn®) parkinson hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak Paclitaxel (Taxol®) ve Camptothecin gibi kanser önleyici aktiviteye sahip diğer bitki kaynaklı maddeler de izole edilmiş ve kullanımları onaylanmıştır (Fridlender ve ark. 2011).

En yaygın olarak kullanılan ve bilinen bitki kökenli ilaçları şu şekilde sıralayabiliriz;

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

### 2.3. *Anemone* Cinsi

*Ranunculaceae* ailesine ait olan *Anemone*'nin ortalama 250 türü bulunmaktadır. Kuzey, Güney, ılıman bölgelerde yayılış göstermesiyle beraber *Pulsatilla*, *Clematis* ve *Hepatica* cinsleriyle morfolojik ve fitokimyasal olarak yakından ilişkilidir. *Anemone* türünün 50 örneğinden fazlası ilaç keşifleri için entofarmakolojik kullanımları mevcuttur. Geleneksel Hint ve Çin tıbbında sıklıkla kullanılan *Anemone* türlerinin klinik öncesi ve klinik çalışmaları yapılarak bilimsel olarak kullanımları doğrulanmıştır (Hao ve ark. 2017).

#### 2.3.1. *Anemone* cinsinin dağılımı

Dünya çapında yayılış gösteren *Anemone L.* Önemli tür çeşitliliğine sahiptir. *Anemone blanda*'nın ise doğal yayılımı Güneydoğu Avrupa'dan Türkiye ve Lübnan'a kadar yayılış gösterirken batı Suriye'de de varlığı rapor edilmiştir.

Bu monofiletik grup, çoğunlukla  $2n=16$  ile diploid olan jeofitik çok yıllık bitkilerden oluşur (Ehrendorfer ve ark. 2009).

*Anemone* kavramı, 200 yıldan fazla bir sürede kademeli olarak gelişmiştir. Linnaeus (1753), *Anemone* cinsinde yumru rizomlu tamamı Güney Avrupa'da dağılım gösteren dört tür belirtmiştir: *A. coronaria L.*, *A. hortensis L.*, *A. palmata L.* ve *A. apennina L.* 1764 yılında ise güney Amerika'da dağılım gösteren *Anemone decapetala* eklemiştir. De Candolle (1817, 1824), *Anemone* içindeki alt grupları belirten ilk kişi olarak bilinmektedir. De Candolle *Anemone*'nin alt bölümlerini, kısa stiller, 1-2 çiçekli gövdeler, petiolat veya sapsız involukral yaprakları olan oval, tüylü veya lanat achenes ile karakterize etmiştir (Ehrendorfer ve ark. 2009).

### 2.3.2. *Anemone* cinsinin etnofarmakolojisi

Bu monofiletik grup, çoğunlukla  $2n=16$  ile diploid olan jeofitik çok yıllık bitkilerden oluşur (Ehrendorfer ve ark. 2009).

*Anemone* kavramı, 200 yıldan fazla bir sürede kademeli olarak gelişmiştir. Linnaeus (1753), *Anemone* cinsinde yumru rizomlu tamamı güney avrupada dağılım gösteren dört tür belirtmiştir: *A. coronaria* L., *A. hortensis* L., *A. palmata* L. ve *A. apennina* L. 1764 yılında ise güney Amerikada dağılım gösteren *Anemone decapetala* eklemiştir. De Candolle (1817, 1824), *Anemone* içindeki alt grupları belirten ilk kişi olarak bilinmektedir. De Candolle *Anemone*'nin alt bölümlerini, kısa stiller, 1-2 çiçekli gövdeler, petiolat veya sapsız involukral yaprakları olan oval, tüylü veya lanat ile karakterize etmiştir (Ehrendorfer ve ark. 2009).

Geleneksel tıbbi yöntemlerde 50'den fazla *Anemone* türü kullanıldığı bilinmektedir. Geleneksel Çin tıbbında (TCM) *Anemone*, detoksifikasyon, dizanteri, sıtma, tinea, ülser, yara, artrit, travmatik yaralanma, farengolarenjit, paraziter hastalık ve hepatitte kullanılmıştır (Xiao ve ark.1986). Buna uygun olarak, antitümör, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antikonvülzan antihistamin sedatif ve analjezik aktiviteler dahil olmak üzere geniş bir farmakolojik aktivite yelpazesine sahip olduğu gözlenmiştir (Çizelge 2.1.) (Sun ve ark. 2011).

**Çizelge 2.1.** *Anemone* türleri, yayılışları, kullanım alanları (Hao ve ark. 2016)

| <b>Türler</b>         | <b>Tıbbi kısım</b>    | <b>Terapötik etkinlik</b>   | <b>Dağıtım</b>   | <b>Not</b> |
|-----------------------|-----------------------|---|--|------------|
| <i>A. altay</i>       | Kök, sap              | Sakinleştirici, rutubeti giderici, detoksifiye edici, ağrı kesici, yüksek ateş, deliryum, epilepsi, qi durgunluğu ile sağrlık, uyku hali, unutkanlık, göğüste sıkışma, karında şişkinlik, anoreksi, romatizma ağrısı, ülser, uyuz | Avrupa, Kuzey Asya, Çin (Hubei, Henan, Shanxi, Shaanxi, Chongqing)                           |            |
| <i>A. amurensis</i>   | Bütün bitki, kök, sap | Terleme, karaciğer/böbrek tonlama (bütün bitki); Kore tıbbı (felç, menoxenia, karın ağrısı, boğmaca (rizom))  | Rusya, Uzak Doğu; Kuzey Kore, Çin (Liaoning, Jilin, Heilongjiang)                            |            |
| <i>A. anhuiensis</i>  | Kök, Sap              | Travmatik yaralanma, romatizmal artrit  | Çin (Anhui)  |            |
| <i>A. baicalensis</i> | Yaprak                | Detoksifiye edici, vermifüj   | Sibirya, Kore, Çin (Sichuan, Gansu, Shaanxi, Qinling Dağları, Liaoning, Jilin, Heilongjiang) |            |
| <i>A. begonifolia</i> | Bütün bitki           | Rutubet giderici, detoksifikasyon, ağrı giderici; romatizma, ürtiker, karbonkül yarası  | Çin (Yunnan, Guangxi, Guizhou, Sichuan, Chongqing)   |            |

**Çizelge 2.2.** *Anemone* türleri, yayılışları, kullanım alanları (Hao ve ark. 2016) (devam)

|  |                                    |  |   |                |
|--|------------------------------------|--|---|----------------|
| <i>A. biflora</i>  | Ampul                              | Stiptik, antiflojistik, yanıklar, kesikler ve yaralar  | Keşmir<br>Himalaya  |                |
| <i>A. canadensis</i>   | Kök,<br>yaprak                     | Antelmintik, antiafonik, antiseptik, oftalmik, stiptik; bel bölgesinde ağrı, şaşı gözler, seğirmeler ve göz zehirlenmeleri, yaralar, burun kanaması, ağrı, baş ağrısı ve baş dönmesi, boğazı temizleme   | Doğu ve Orta<br>Kuzey<br>Amerika  |                |
| <i>A. cathayensis</i>  | Kök,<br>Sap                        | Kanser, inflamasyon, analjezik, konvülsiyon  | Kore, Çin<br>(Shanxi,<br>Hebei)   |                |
| <i>A. selecticola</i><br><i>var. Schantun</i><br><i>gensis</i> | Kök                                | Styptic, nem giderici, ısı temizleme, detoksifikasyon  | Çin<br>(Shandong)   |                |
| <i>A. silindirik</i>   | Kök,<br>gövde,<br>meyve,<br>yaprak | Antiseptik, ağrılı gözler (kök, meyve); baş ağrısı, baş dönmesi, yaralar (kök); yanıklar (yaprak)  | Batı Kuzey<br>Amerika   |                |
| <i>A. davidii</i>  | Kök,<br>Sap                        | Kanı aktive eden, ağrıyı gideren, şişliği azaltan, zehirden arındıran; travmatik yaralanma, artrit ağrısı, lomber kas gerginliği; Tujia tıbbi (artrit ağrısı, interkostal nevralsi, travmatik yaralanma, hematemez, hemafecia)                             | Çin<br>(Chongqing,<br>Tibet, Yunnan,<br>Sichuan,<br>Guizhou,<br>Hunan, Hubei) |                |
| <i>A. delavayi</i>   | Kök,<br>Sap                        | Kansızlık  | Çin (Yunnan,<br>Siçuan)   |                |
| <i>A. demissa</i>  | Kök,<br>meyve,<br>bütün bitki      | Bütün bitki: romatizma, dizanteri, sindirime yardımcı olma, hazımsızlık, bel soğukluğu, rüzgar-soğuk-nem artraljisi, eklem sarısı su; meyve: nemli temizleme, kitlesel saçılma, toksinlerden arındırma, her türlü soğuk algınlığı, kaynatma, yılan ısırığı | Himalayalar,<br>Çin (QTP<br>Doğu marjı)                                       | Tibet<br>tıbbı |

**Çizelge 2.3.** *Anemone* türleri, yayılışları, kullanım alanları (Hao ve ark. 2016) (devam)

|   |                               |   |   |             |
|---|-------------------------------|---|---|-------------|
| <i>A. demissa</i><br><i>var. Ana</i>          | Kök,<br>meyve,<br>bütün bitki | Bütün bitki: romatizma, dizanteri, sindirime yardımcı olma, hazımsızlık, bel soğukluğu, artralji, eklem iltihap meyve: toksinlerden arındırma, her türlü soğuk algınlığı, kaynatma, yılan ısırığı   | Çin (QTP Doğu marjı)  | Tibet tıbbı |
| <i>A. demissa</i><br><i>var. Villosissima</i> | Kök,<br>meyve,<br>bütün bitki | Bütün bitki: romatizma, dizanteri, sindirime yardımcı olma, hazımsızlık, bel soğukluğu, rüzgar-soğuk-nem artraljisi, eklem iltihabı, meyve: nemli temizleme, kitlesel saçılma, toksinlerden arındırma, her türlü soğuk algınlığı, kaynatma, yılan ısırığı | Himalayalar, Çin (QTP Doğu marjı)   | Tibet tıbbı |
| <i>A. ikilem</i>                              | Kök,<br>Sap                   | Kas gevşetici, kan aktive edici, ısı temizleme, detoksifikasyon, travmatik yaralanma, dizanteri, romatoid eklem ağrısı; cilt ülseri, boğaz ağrısı, bol balgamlı öksürük, lenfnodit  | Kuzey Asya, Avrupa, Çin (Jilin, Heilongjiang)   |             |
| <i>A. drummondii</i>                          | Kök,<br>tohum                 | Aşınma, diş ağrısı, romatizma, antibakteriyel, seksle ilgili zorluklar, melankoli (kök), baş ağrısı (tohum)   | Batı Kuzey Amerika  |             |
| <i>A. flaccida</i>                            | Kök,<br>Sap                   | Rüzgar uzaklaştırıcı, rutubet giderici, kas gevşetici, kan aktive edici, travmatik yaralanma, artrit ağrısı, lomber kas gerginliği  | Japonya, Rusya, Uzak Doğu, Çin (Yunnan, Sichuan, Guizhou, Hubei, Hunan, Jiangxi, Gansu, Zhejiang, Jiangsu,) |             |

**Çizelge 2.4.** *Anemone* türleri, yayılışları, kullanım alanları (Hao ve ark. 2016) (devam)

|   |  |  |  |                |
|---|--|--|--|----------------|
| <i>A. flaccida</i><br><i>var.</i><br><i>höfengensis</i> | Kök,<br>Sap                                      | Rüzgar uzaklaştırıcı, rutubet giderici, kas gevşetici, kan aktive edici; travmatik yaralanma, artrit ağrısı, lomber kas gerginliği   | Çin<br>(Çongçing)  |                |
| <i>A. fulingensis</i>                                   | Kök,<br>Sap                                      | Rüzgar uzaklaştırıcı, rutubet giderici, kas gevşetici, kan aktive edici; travmatik yaralanma, artrit ağrısı, lomber kas gerginliği   | Çin<br>(Çongçing)  |                |
| <i>A. griffithii</i>                                    | rizom,<br>tohum                                  | Kanı aktive eden, ağrıyı gideren, şişliği azaltan, zehirden arındıran, travmatik yaralanma, artrit ağrısı, lomber kas gerginliği, Tibet tıbbi (mide kurdu, keskin ağrı, yılan ısırığı, soğuk tümör, bel soğukluğu, eklem iltihabı (tohum)) | Sikkim,<br>Butan, Nepal,<br>Çin (Tibet,<br>Sichuan,<br>Chongqing)  | Tibet<br>tıbbi |
| <i>A. hupehensis</i>                                    | Kök,<br>sap,<br>gövde,<br>yaprak,<br>bütün bitki | Yanık, diürez, detoksifikasyon, vermifüj, detümesans; dizanteri, çocuklarda yetersiz beslenme ve hazımsızlık, sıtma, akut sarılık hepatit, askariasis, fraktür karbunkül, skrofula, travmatik yaralanma                                    | Çin<br>(Chongqing,<br>Güney<br>Shaanxi,<br>Gansu,<br>Zhejiang,<br>Jiangxi, Batı<br>Hubei, Kuzey<br>Guangdong,<br>Kuzey<br>Guangxi,<br>Sichuan,<br>Guizhou,<br>Doğu Yunnan) |                |
| <i>A. hupehensis</i><br><i>f. Alba</i>                  | Kök,<br>Sap                                      | Yanık, diürez, detoksifikasyon, vermifüj, staz-saçılım, detümesans; dizanteri, çocuklarda yetersiz beslenme ve hazımsızlık, sıtma, akut sarılık hepatit, askariasis, fraktür karbunkül, skrofula, travmatik yaralanma                      | Çin<br>(Çongçing)  |                |

**Çizelge 2.5.** *Anemone* türleri, yayılışları, kullanım alanları (Hao ve ark. 2016) (devam)

|  |  |   |                                    |                |
|--|--|---|------------------------------------|----------------|
| <i>A. hupehensis</i><br><i>var. japonika</i> | Kök,<br>Sap  | Yanık, diürez, detoksifikasyon, vermifüj, staz-saçılım, detümesans, dizanteri, çocuklarda yetersiz beslenme ve hazımsızlık, sıtma, akut sarılık hepatit, askariasis, fraktür karbunkül, skrofula, travmatik yaralanma   | Çin<br>(Çongçing)                  |                |
| <i>A. imbricata</i>                          | Kök,<br>meyve,<br>bütün bitki,<br>çiçek,<br>gövde,<br>yaprak,<br>tohum | Bütün bitki: rüzgar-nemli, dizanteri, sindirime yardımcı, bel soğukluğu, rüzgar-soğuk-nemli eklem ağrısı, meyve: rutubet giderici, kitle yok edici, detoksifiye edici, her türlü soğuk alınlığı, yumru kaynatma, yılan sokması; mide solucanları, keskin ağrı, yılan ısırığı, tümör, bel soğukluğu, tohum; bel soğukluğu, eklem sarısı su, hipotermi, kusturucu yaprak; iltihap önleyici, yanık | Çin (QTP<br>Doğu marjı)            | Tibet<br>tıbbı |
| <i>A. multifida</i>                          | Kök,<br>tohum  | Aşınma, diş ağrısı, romatizma, antibakteriyel, seksle ilgili zorluklar, melankoli (kök), baş ağrısı (tohum)   | Orta ve Batı<br>Kuzey<br>Amerika   |                |
| <i>A. nergis</i><br><i>florası</i>           | Kök,<br>tohum,<br>Yaprak   | Aşınma, diş ağrısı, romatizma, antibakteriyel, seksle ilgili zorluklar, melankoli (kök), baş ağrısı (tohum)   | Avrupa, Asya,<br>Kuzey<br>Amerika  |                |
| <i>A. nemorosa</i>                           | Tüm bitki  | Baş ağrısı, tertian agues ve romatizmal gut (çeşitli kısımlar), cüzzam (yaprak), sulu ve balgamlı mizahları (kök), uyuşukluk, göz iltihabı, kötü huylu ve aşındırıcı ülserleri (kök) uzaklaştırır   | İngiltere,<br>Avrupa, Batı<br>Asya |                |
| <i>A. nikoensis</i>                          | Yaprak   | Yenilebilir kullanım  | Japonya                            |                |

**Çizelge 2.6.** *Anemone* türleri, yayılışları, kullanım alanları (Hao ve ark. 2016) (devam)

|  |   |  |   |                              |
|--|---|--|---|------------------------------|
| <i>A. obtusiloba</i>                           | Tohum,<br>yer üstü<br>kısım, kök,<br>meyve          | Diürez detümesans, yara iyileşmesi, irin drenajı, antiromatizmal, (tohum); oftalmik, rubefacient, kontüzyon (kök); hipotermi, boğaz ağrısı, kronik bronşit, bademcik iltihabı, hepatit, mide hastalığı, dizanteri, bel soğukluğu, artrit ağrısı  | Himalayalar,<br>Çin (QTP<br>Doğu marjı)   | Tibet<br>tıbbı               |
| <i>A. obtusiloba</i><br><i>ssp. ovalifolia</i> | Bütün<br>bitki, yer<br>üstü kısmı,<br>kök,<br>meyve | Diürez detümesans, kanı zenginleştirme, vücudu ısıtma, yara iyileşmesi, irin drenajı; stiptik (bütün bitki), hastalık, hipotermi, boğaz ağrısı, kronik bronşit, bademcik iltihabı, hepatit, mide hastalığı, dizanteri, bel soğukluğu, artrit ağrısı, periferik sinir felci, yılan ısırığı, inatçı dermatit, impetigo, eklem iltihabı | Çin (Taibai<br>dağı, QTP<br>Doğu sınırı)  | Tibet<br>tıbbı               |
| <i>A. parviflora</i>                           | Kök,<br>tohum                                       | Aşınma, diş ağrısı, romatizma, antibakteriyel, seksle ilgili zorluklar, melankoli (kök); baş ağrısı (tohum)  | Kuzey<br>Amerika  |                              |
| <i>A. parviflora</i> ( <i>A. pulsatilla</i> )  | Bütün bitki   | Terletici, idrar söktürücü, sinirsel, rubefacient, göz rahatsızlıkları, kulak ağrısı, stres, anksiyete, gerginlik, deri döküntüleri, romatizma, lökorrhea, adet kanamasının tıkanması, bronşit, öksürük, astım   | İngiltere,<br>Avrupa  |                              |
| <i>A. quinquefolia</i>                         | Kök   | Rubefacient, romatizma, gut, ateş, vesikant  | Doğu Kuzey<br>Amerika   |                              |
| <i>A. raddeana</i>                             | Kök,<br>Sap   | Moğol tıbbı: romatizma, bel ve bacak ağrısı, flebit, inflamasyonu azaltmak, artralji, soğuk algınlığı, bol balgamlı öksürük, eklem ağrısı  | Çin<br>(Kuzeydoğu<br>Shandong,<br>Liaoning,<br>Jilin,<br>Heilongjiang),<br>Kore, Rusya<br>Uzak Doğu | Çin tıbbı,<br>Moğol<br>tıbbı |

**Çizelge 2.7. *Anemone* türleri, yayılışları, kullanım alanları (Hao ve ark. 2016) (devam)**

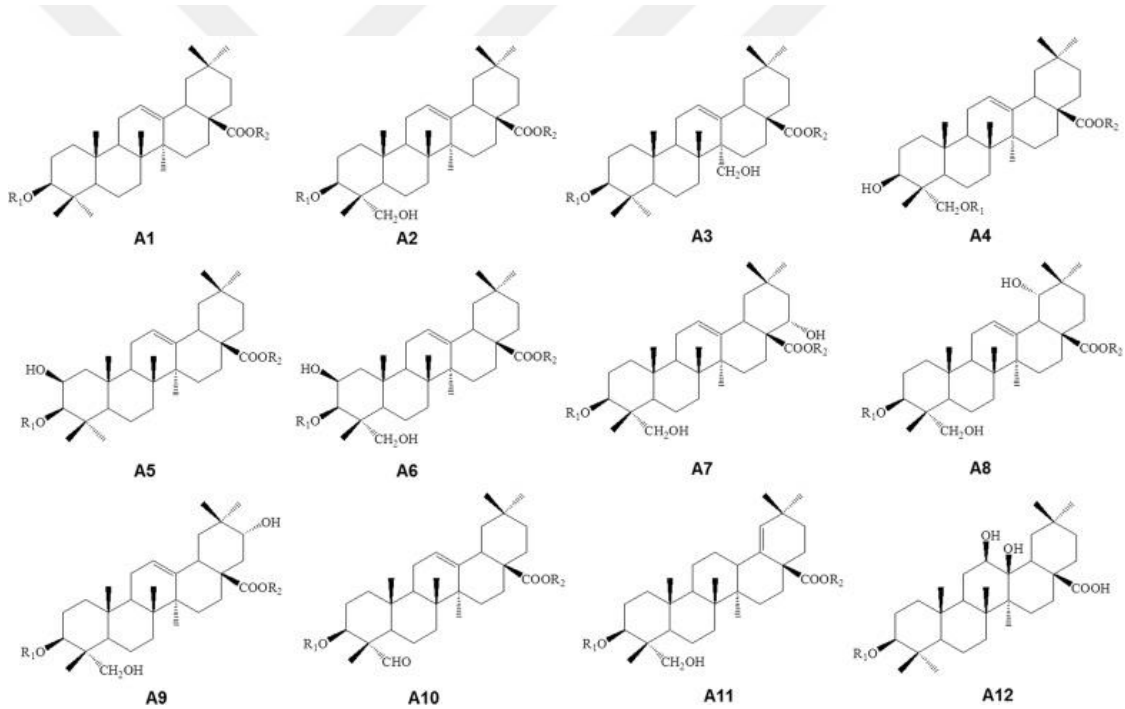
|  |   |   |  |                |
|--|---|---|--|----------------|
| <i>A. reflex</i>   | Kök,<br>Sap   | Ağızları aromalı, rutubeti gideren, iştahı açan; yüksek ateş, deliryum, epilepsi, qi durgunluğu ile sağırlık, uyku hali, unutkanlık, göğüste sıkışma, karında şişkinlik, anoreksi, romatizma ağrısı, ülser, uyuz  | Kuzey<br>Kore; Sibirya,<br>Doğu<br>Avrupa; Çin<br>(Shaanxi,<br>Doğu Jilin,<br>Taibai Dağı) |                |
| <i>A. rivularis</i>  | Kök,<br>sap,<br>tohum üstü<br>kısmı, kök,<br>meyve,<br>yaprak | Yanık, detoksifikasyon, kan aktive edici, kas gevşetici, şişkinlik dağıtıcı, ağrı kesici, diürez şişmesi, kanı zenginleştirme, vücudu ısıtma, yara iyileşmesi, irin drenajı, kabakulak, skrofula, karbonkül, sıtma, öksürük, sarılık, artrit ağrısı, travmatik yaralanma, karın ağrısı, diş ağrısı; hastalık, hipotermi, boğaz ağrısı, kronik bronşit, bademcik iltihabı, hepatit, mide hastalığı, dizanteri, bel soğukluğu, artrit ağrısı, periferik sinir felci, yılan ısırığı, inatçı dermatit, impetigo, eklem iltihabı | Çin, Tibet,<br>Himalayalar,<br>Sri Lanka   | Tibet<br>tıbbı |
| <i>A. rivularis</i><br><i>var. flore-</i><br><i>minore</i> | Kök,<br>Sap   | Detoksifikasyon, kan aktive edici, kas gevşetici, şişkinlik dağıtıcı, ağrı kesici; boğaz ağrısı, kabakulak, skrofula, karbonkül, sıtma, öksürük, sarılık, artrit ağrısı, travmatik yaralanma, karın ağrısı, diş ağrısı  | Çin<br>(Çongçing)  |                |
| <i>A. rockii</i><br><i>var. pilokarpa</i>                  | Kök, sap  | Rutubet giderici, kas gevşetici, kan aktive edici, artrit ağrısı, travmatik yaralanma   | Çin<br>(Çongçing)  |                |
| <i>A. rupikol</i>  | Tohum   | Mide solucanları, keskin ağrı, yılan ısırığı, soğuk tümör, bel soğukluğu, eklem iltihabı  | Çin<br>(Güneydoğu<br>ve Güney<br>Tibet), Butan,<br>Nepal; Kuzey<br>Hindistan               | Tibet<br>tıbbı |

**Çizelge 2.8.** *Anemone* türleri, yayılışları, kullanım alanları (Hao ve ark. 2016) (devam)

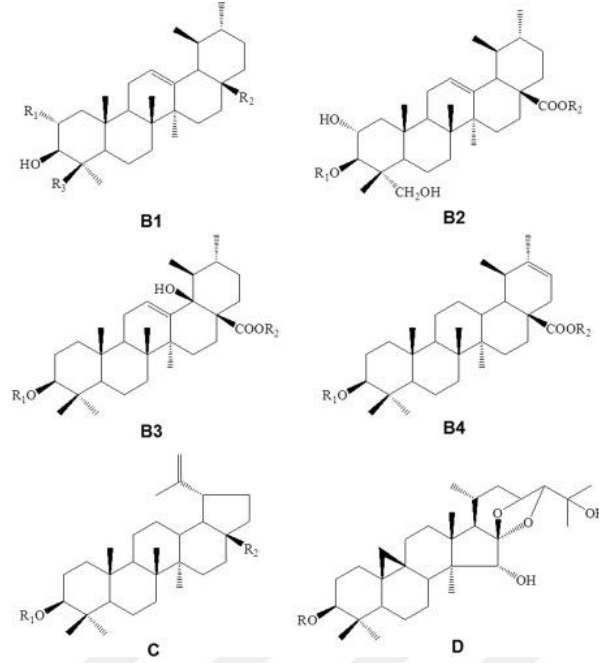
|                       |                  |   |  |                |
|-----------------------|------------------|---|--|----------------|
| <i>A. silvestris</i>  | Kök,<br>Sap      | Baskı ve kitlelerin giderilmesi, irin drenajı, çürük giderici, insektisit   | Avrupa, Asya,<br>Çin                                       | Moğol<br>tıbbı |
| <i>A. stolonifera</i> | Gövde,<br>yaprak | Yenilebilir kullanım  | Çin, Japonya   |                |
| <i>A. taipaiensis</i> | Kök, sap         | Kanser  | Çin (Taibai<br>dağı)                                       |                |
| <i>A. tetrasepala</i> | Tohum            | Mide solucanları, keskin ağrı, yılan ısırığı, tümör, bel soğukluğu, eklem iltihabı  | Çin (Güney<br>Tibet),<br>Keşmir, Afga<br>nistan            | Tibet<br>tıbbı |
| <i>A. tibetika</i>    | Tohum            | Mide solucanları, keskin ağrı, yılan ısırığı, tümör, bel soğukluğu, eklem iltihabı  | Çin (Tibet)  | Tibet<br>tıbbı |
| <i>A. tomentoza</i>   | Kök, sap         | Dağıtıcı balgam stazı, dispepsi giderici, detoksifikasyon, vermifüj; eparsalji öksürük, travmatik yaralanma, çocuklarda yetersiz beslenme ve hazımsızlık, sıtma, dizanteri, ağrılı fraktür karbunkül, inatçı dermatit | Çin<br>(Chongqing,<br>Sichuan,<br>Gansu, Henan,<br>Shanxi) |                |
| <i>A. trullifolia</i> | Kök, çiçek       | Kas gevşetici, kan aktive edici, öksürük kesici; kronik bronşit, periferik sinir felci, nevralsi, tendon kompleksi ağrısı   | Çin (QTP<br>Doğu sınırı,<br>Güney Tibet),<br>Butan         | Tibet<br>tıbbı |
| <i>A. trullifolia</i> | Kök, çiçek       | Kas gevşetici, kan aktive edici, öksürük kesici; kronik bronşit, periferik sinir felci, nevralsi, tendon kompleksi ağrısı   | Çin (QTP<br>Doğu marjı)                                    | Tibet<br>tıbbı |
| <i>A. tüberoz</i>     |                  | Anksiyolitik  | Güneybatı<br>Amerika                                       |                |
| <i>A. virginiana</i>  | Kök,<br>tohum    | Kusturucu; balgam söktürücü, TB, boğmaca, ishal   | Orta ve Doğu<br>Kuzey<br>Amerika                           |                |

### 2.3.3. Fitokimyasal bileşenleri

Yapılan araştırmalardan *Anemone* bileşikleri arasında triterpenoidler, saponinler, steroidler, laktonlar, katı ve sıvı yağlar, sakkaritler ve alkaloidler belirlenmiştir. Oleanolik asit, triterpen ve saponin, *Anemone* türlerinde bol miktarda bulunmaktadır. *Anemone*, ranunculin, anemonin içerir ve *Pulsatilla*'nın karakteristik bileşenleri olan protoanemonin bu iki cins arasındaki yakın ilişkiyi gösterir. *Anemone* ayrıca kumarinler ve flavonoidler içerir (Hao ve ark 2016). Saponinler, *Ranunculaceae* ailesinde *Clematis*, *Pulsatilla*, *Anemone* ve *Cimicifugeae*' de bol miktarda bulunur. Bunlar genellikle hücre döngüsü durdurma ve apoptoz induksiyonu yoluyla antikanser aktivitesi gösterir (Hao ve ark. 2013).



**Şekil 2.4.** *Anemone* türlerinden oleanan tipi triterpenoidlerin (A tipi) temel iskeletleri (Hao ve ark. 2013)



**Şekil 2.5.** *Anemone* türlerinden diğer tip triterpenoidlerin (B ve C tipleri) temel iskeletleri (Hao ve ark. 2016)

*Anemone* de A tipi saponin (oleanolik tip) baskındır. Esansiyel yağlar olarak ise büyük oranda asetofenon, 3-etil-2-metil-hexsan, 5,6-dimetil-dekan ve 4,5-dietil-oktan içermektedir. Diğer baskın bileşikler ise yağ asidi türevleri, sesquiterpenoidler, ve ayrıca fenolik bileşikler olarak sıralanmıştır (Zou ve ark. 2004).

Bu tez çalışmasında dağ lalesi olarak bilinen ve Bursa Orhaneli ilçesi Sadağ Kanyonu'nda yayılış gösteren *Anemone blanda* bitkisinin çiçek, yaprak, sap, kök kısımlarından elde edilen ekstraktın in vitro sitotoksik ve genotoksik etkilerinin Beas-2B insan sağlıklı bronş epitel hücre hattı ile A549 insan akciğer kanseri hücre hatları üzerinde karşılaştırmalı olarak araştırılması amaçlanmıştır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışması Bursa Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde bulunan Hücre Kültürü ve Genetik Toksikoloji laboratuvarında yapılmıştır. Bu çalışmada *Anemone blanda* bitkisinin kök gövde çiçek kısımları kullanılarak hazırlanmış olan ekstraksiyonun, A549 insan akciğer kanseri hücre hattı ve Beas-2B insan sağlıklı bronş epitel hücre hatları kullanılarak sitotoksik etkileri XTT testi ve klonojenik testi ile genotoksik etkileri ise komet testi ile değerlendirilmiştir. Hücre içi reaktif oksijen seviyesine etkileri ROS testi ile ölçülmüştür.



### 3.1 Kullanılan Ekipmanlar ve Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 3.1’de, sarf malzemelerine ilişkin bilgiler ise Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Çalışmalarda kullanılan ekipmanlar

| <b>Ekipman</b>            | <b>Marka/Model</b>       |
|---------------------------|--------------------------|
| CO <sub>2</sub> İnkübatör | PANASONIC                |
| Soğutmalı santrifüj       | SIGMA-2-16PK             |
| Laminar akım kabini       | BERNER                   |
| Hassas terazi             | SHIMADZU-AUW220D         |
| Kaba terazi               | RADWAG-WTB2000           |
| Pastör fırını             | ELEKTRO.MAG-M3025P       |
| İnvert mikroskop          | SOIF                     |
| Floresan mikroskop        | NIKON-ECLIPSE 80i        |
| Işık mikroskobu           | NIKON-ECLIPSE E100       |
| Komet yazılımı            | KAMERAM 21               |
| Elektroforez güç kaynağı  | PEQLAB-REQPOWER 300      |
| Elektroforez tankı        | CLEAVER SCIENTIFIC       |
| Mikroplaka okuyucu        | BIO TEK, ELX800 U.S.A    |
| Azot tankı                | INT. CRYOGENICS – IC 20R |
| Ph metre                  | HANNA – HI 221           |
| +4 Buzdolabı              | REGAL                    |
| Manyetik Karıştırıcı      | ISOTEX                   |
| -20 Derin dondurucu       | ALASKA – ADF 06 V        |
| -80 Derin dondurucu       | ELCOLD                   |
| Karıştırıcı-ısıtıcı       | M TOPS MS300HS           |
| Hücre sayım cihazı        | CEDEX XS                 |
| Distile su cihazı         | MP MINI PURE – DEST UP   |
| Su banyosu                | NÜVEBATH NBS             |

**Çizelge 9.2.** Çalışmada kullanılan saf malzemeler

| <b>Sarf Malzeme</b>            | <b>Firma/ Katalog No</b>                |
|--------------------------------|---|
| Serolojik pipet                | COSTAR                                  |
| Serolojik pipet tabancası      | BIOHIT-MIDI PLUS / DRAGON MED LEVO PLUS |
| Steril 15 mL'lik tüpler        | ISOLAB                                  |
| Steril flasklar (T-25 ve T-75) | NEST BIOTECHNOLOGY                      |
| RPMI-1640 (500 mL)             | PAN BIOTECH/ P04-22100                  |
| Penisilin-Streptomisin         | SIGMA/ P0781                            |
| L-Glutamin (100 mL)            | SIGMA/ RNBB4386                         |
| Fetal bovine serum             | PANBIOTECH/ P30-1985                    |
| Sodyum pirüvat (100 mL)        | PANBIOTECH/ P04-43100                   |
| EDTA disodium salt             | CARLO ERBA/ 303201                      |
| DPBS                           | PANBIOTECH/ P04-36500                   |
| Etanol                         | MERCK                                   |
| Metanol                        | MERCK                                   |
| NaCl                           | MERCK/ 7647-14-5                        |
| NaOH                           | SIGMA/ S8045-1 KG                       |
| Triton X-100                   | GERBU/ 34021300                         |
| Lowmelting Agaroz              | SIGMA/ A9414-25G                        |
| Normal Agaroz                  | SIGMA/ A9539-100G                       |
| DMSO                           | MERCK/ K39661843                        |
| Tripsin-EDTA                   | GIBCO/ 1304898                          |
| DCFH-DA (ROS Kit)              | CELL BIOLABS'OXISELECT™ / 59342021      |
| Hücre proliferasyon kiti       | BIOLOGICAL INDUSTRIES/1548576           |
| Cosmasie Brilliant blue G-250  | 7815 SIGMA BRILLIANT BLUE G 250         |

### 3.2. Kullanılan hücre hatları

Tez çalışmasında A549 insan akciğer kanseri hücre hattı ve Beas-2B insan sağlıklı bronşiyal epitel hücre hatları kullanılmıştır. Hücreler havalandırılmalı T75 flasklar içerisinde 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> ortama sahip inkübatör içerisinde yaşatılmıştır. Flasklara konulacak olan besiyeri; RPMI-1640, 60 mL fetal bovine serum (FBS), 6 mL penisilin–streptomisin, 6 mL sodyum piruvat, 3 mL glutamin oluşmuştur. Hücreler haftada 2 kez pasajlanmıştır.

Hücrelerin pasajlanması aşağıdaki sıralamaya göre yapılmıştır;

- 1) T-75 flaskındaki hücreler doluluğa ulaştığında besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılmıştır.
- 2) Flask 5 mL PBS ile yıkama işlemi yapılmış daha sonra PBS aspire edilerek uzaklaştırılmıştır.
- 3) 3 mL tripsin eknene flasklar 1-2 dk inkübatörde bekletilmiştir.
- 4) Hücrelerin zeminden ayrılıp ayrılmadığını İnvert mikroskop yardımıyla kontrol edilmiştir.
- 5) Tripsin reaksiyonunu sonlandırmak için tripsin miktarıyla aynı oranda besiyeri flasklara ekelenmiştir.
- 6) Önceden etiketlenmiş olan 15 mL'lik falcon tüplere, flastaki hücre süspansiyonu steril serolojik pipet ile toplanarak aktarılmıştır.
- 7) 15 mL'lik falconlardaki hücreler +4°C'de, 1000 rpm'de, 5 dk santrifüj edilmiştir.
- 8) Santrifüj sonunda oluşan ayırıda süpernatant kısmı yaklaşık 100 µL kalacak şekilde aspire edilip kalan pellet ise 5 L besiyeri içinde yeniden süspansiyon edilmiştir.

9) Süspansiyon içerisindeki toplam hücre miktarını hücre sayım cihazı ile belirlendikten sonra yeni flasklara ekilecek hücre miktarını elde etmek için gerekli olan süspansiyon miktarı belirlenmiş ve taze besiyeri içeren flasklara belirlenen miktarda hücre süspansiyonu aktarılmıştır.

10) Yeni ekim yapılan flasklardaki hücreler 37° C'lik etüve inkübe edilmişlerdir.

### **3.3. Deney Grupları**

Negatif – Büyüme Kontrol (BK): Herhangi bir ajana maruz kalmayan kontrol grubu.

Pozitif Kontrol (PK): Karşılaştırmaların yapılması ve test sistemlerinin doğru çalışıp çalışmadığını kontrol amacıyla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılmıştır

### **3.4. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması**

#### **3.4.1. Besiyeri hazırlanması**

500 mL'lik şişedeki RPMI-1640 medyum içerisine; 60 mL fetal bovine serum (FBS), 6 mL penisilin–streptomisin, 6 mL sodyum piruvat, 3 mL L-glutamin eklenerek hazırlanmıştır.

#### **3.4.2. Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) solüsyonunun hazırlanması**

%35'lik stok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den 6,318 µL çekilerek 4993,682 µL steril distile su içeren falkon tüpüne eklenmiş ve 5 mL'lik yeni bir stok oluşturulmuştur.

#### **3.4.3. *Anemone blanda* ekstraksiyonunun hazırlanışı**

Bursa Sadağ Kanyonu'nundan toplanan *Anemone blanda* bitkisinin çiçek, yaprak, sap, kök kısımları kullanılarak soxhalet cihazında ekstrasikyonu elde edildi. Daha sonra oluşan bu metonalik karışımdan metanolu uzaklaştırmak için evoparatöre konuldu ve sonrasında 9 gün boyunca desikatörde bekletildi. Metanol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra hazırlanmış olduğumuz bu ekstrasyondan 0,1615 g tartıldı ve besiyeri (RPMI) karışımında çözüldü.



**Şekil 3.1.** *Anemone blanda* bitkisi

### **3.5. Sitotoksisite testleri**

#### **3.5.1. XTT Testi**

XTT canlılık testi proliferasyonu ve hücre canlılığını ölçen bir sitotoksik test çeşididir. Bu yöntemin amacı hücre içerisinde bulunan mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerin kapasitesi ile hücre canlılığı ve hücre artışını belirlemektir (Kocaoğlu 2014). Bu yöntem ilk olarak 1988 yılında Scudiero ve arkadaşları tarafından litaretüre kazandırılmıştır (Kocaoğlu 2014). Sarımtırak veya renksiz bir görünüme sahip olan XTT, ayracında bulunan tetrazolium halkası canlı hücrelerde mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından parçalanarak turuncu-kırmızı renkli formazan kristalleri oluşturur. Hücre öldükten bir süre sonra inaktive olan dehidrogenaz enziminden dolayı canlı hücrelerde turuncu-kırmızı renkli formazon boyası oluşur. Bunun sonucunda deneydeki canlı hücre sayısı ve oluşan formazan boya miktarı doğru orantılıdır (Kumbıçak 2013).

### *XTT Testi Protokolü;*

- 1) 1 hafta boyunca 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklara ekilen hücrelerin doluluğa ulaşması beklenmiştir.
- 2) Flasklarda %80 doluluğa ulaştığında pasajlanarak hücreler 96 kuyucuklu platelere ekilmiştir.
- 3) A549 ve Beas-2B hücre hatları için her bir kuyucuğa 5×10<sup>3</sup> hücre eklenmiştir.
- 4) %5 oranında CO<sub>2</sub> ve 37 °C sıcaklığa sahip olan inkübatörde 24 saat inkübe edilen hücrelerin besiyerlerini değiştirdikten sonra *Anemone blanda* ekstraksiyonuyla 2 ile 64 µg/ mL arasında değişen farklı konsantrasyonlar eklenmiştir.
- 5) 24 saat boyunca ekstraksiyona maruz bırakılan hücrelerden besiyeri uzaklaştırılarak PBS ile yıkanmış ve 100 µL yeni besiyeri eklenmiştir.
- 6) Aktif hale getirilen XTT solüsyonu her kuyucuğa eklenerek 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinden sonra mikropilaka okuyucu ile 450nm'de absorbans ölçülmüştür.
- 7) Blankler çıkarıldıktan sonra (1- A muamele grubu / A kontrol) x100 formülü kullanılarak hesaplanmıştır ve poliferasyon eğrisi çizilmiştir.
- 8) Proliferasyon eğrisinden *Anemone blanda* için ayrı ayrı A549 ve Beas-2B IC50 dozları aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

### *XTT Solüsyonlarının Hazırlanması;*

XTT kimyasal solüsyonları deneyden önce 37 °C'de ısıtılarak eritilmiştir. XTT ölçüm solüsyonunu hazırlamak için XTT solüsyon A'ya 1:50 hacim oranında elektron bağlama solüsyonu eklenmiştir. Örneğin 96 kuyucuklu platete 5000 µL XTT solüsyonu için 100 µL aktive edici ajana ihtiyaç duyulmaktadır.

### 3.5.2. Klonojenik Test

Bir hücrenin üreme yeteneğini koruyup çoğalarak koloni veya klon oluşturması esasına dayanmaktadır. Üremesini bu şekilde gerçekleştiren hücrelere klonojenik hücre olarak isimlendirilir. Hayatta kalma oranları deneyde kullanılan dozlarla doğrudan bağlantı gösterir. Klonojenik test yöntemi radyasyon etkilerini belirlemek amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Zaman içerisinde kullanımı çeşitlenen bu yöntem günümüzde ajanların etkilerini belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Bu test yönteminde yeteri kadar bölünme geçirmeyen, koloni oluşturamayan hücreler ölü hücreler olarak kabul edilir. Bu bilgiye dayanarak koloni sayımı yapılırken 50 hücreden daha az olan koloniler sayıma alınmamaktadır (Franken ve ark. 2006).

*Klonojenik test protokolü;*

- 1) T75 flaskta bulunan ve %80 konfluent olan flasklarda bulunan hücrelerin pasaji gerçekleştirilmiştir. Flasklardan toplanan hücreler +4 °C'de 2500 rpm'da santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra hücrelerin supernatant kısmı atılmış ve hücreler süspansiyon edilmiştir. Toplam hücre sayısı hücre sayım cihazında hesaplanmıştır. Deney gruplarımızın sayısı kadar T25 flaska istediğimiz sayıda hücre eklenmiştir.
- 2) Ekimden birkaç gün sonra hücreler T25 flasklarında %80 doluluğa ulaştıklarında flasklar kontrol grubu, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 80 µg/mL ve 100 µg/mL olacak şekilde dozlama yapılmıştır.
- 3) Dozlamadan 24 saat sonra flasklardaki hücreler pasajlanmış ve 15 mL'lik tüplere alınmıştır. Santrifüj işleminden sonra supernatant kısmı atılıp, kalan hücreler süspansiyon edilerek canlı hücre sayımı yapılmıştır.
- 4) Sayım sonuçlarına göre 60 mm'lik petriye 500 canlı hücre aktarılacak şekilde hesaplama yapılmış ve her doz için 4 ayrı petriye 500 canlı hücre aktarılmıştır. Daha sonra petriler 37 °C ve %5 CO<sub>2</sub> ortama sahip inkübatörde inkübe edilmiştir.

- 5) Petrilerdeki hücrelerin koloni oluşturması beklenmiş ve her gün petriler invert mikroskopta kontrol edilmiş petrilerdeki koloniler belli büyüklüğe eriştiklerinde petrilerden besiyeri uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkanmıştır.
- 6) 0,5 gr toz halindeki kristal viyole boyası 20 mL metanol içerisinde çözülmüş sonra 100 mL' ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlanarak hazırlana boya ile boyanmıştır.
- 7) Her bir petrideki koloniler sayılarak elde edilen sonuçlar tablo haline getirilmiştir.
- 8) Yüzde yaşayabilirlik oranı (sitotoksosite) aşağıda belirtilen formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Yaşayabilirlik} = \frac{\text{Petri başına düşen ortalama koloni sayısı}}{\text{Kontrol petrisindeki ortalama koloni sayısı}} \times 100$$

### **3.6. Genotoksisite Testleri**

#### **3.6.1. Tek hücre jel elektroforez (Komet) Testi**

Tek hücre jel elektroforezi yani komet testi güvenilir sonuç vermesi ve kısa sürede uygulanabilir olmasından dolayı tercih edilen bir yöntemdir. Fiziksel etkiler ve kimyasal etkiler gibi birçok durumun sebebiyet verebileceği DNA hasarını belirlemek için kullanılan komet yöntemi, DNA'daki sarmal kırıkları belirlemek amacıyla ilk olarak Rydberg ve Johanson tarafından 1978 yılında kullanılmıştır. Daha sonra Ostling ve Johanson tarafından 1984 yılında geliştirilerek, nötral pH lizis durumu içerisinde DNA çift sarmal kırıklarını belirleyebilmek amacı ile kullanılmıştır. Komet testinde, alkali pH'ından farklı molekül ağırlığına ve elektrik yüküne sahip olan DNA moleküllerinin elektriksel alandan faydalınarak farklı uzaklığa göç etmesi temeline dayanır. Sonuçta karşılaşılan görüntü kuyruklu yıldız benzetildiği için de "komet" (comet; kuyruklu yıldız) olarak betimlenmiştir (Kumbıçak 2013, Akça 2015).

Tek DNA zincir kırıkları veya çift DNA zincir kırıkları oluşmuş ve oluşan bu hasarları DNA tamir mekanizmalarının düzeltemediği hücrelerin DNA molekülleri, farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip olmalarından dolayı elektroforetik ortamda farklı hızlarda göç etmektedirler. Bu göç sonrasında DNA moleküllerine özgü ethidium bromid gibi boyalarla boyanan lamalar floresan mikroskopta incelendiğinde hasarın derecesine göre kuyruklu yıldız şeklini alır. Komet yöntemi kısaca betimlemek gerekirse DNA parçalarının elektrik akımı doğrultusunda ilerlemesiyle kuyruk oluşturması esasına dayanmaktadır (Dikilitaş ve Koçyiğit 2010).

Diğer genotoksisite testlerine nazaran daha az maliyetli, hızlı ve basit olan komet yöntemi, fiziksel etmenler veya kimyasal etmenlere bağlı olarak oluşan DNA hasarlarının belirlenmesinde, özellikle kanser hastalarında DNA'daki hasarın derecesinin belirlenmesinde, bazı kalıtsal hastalıkların belirlenmesinde kullanılan düşük hasar seviyelerinide belirleyebilen ve az miktarda hücre sayısı ile sonuç elde edilebilen bir genotoksisite test yöntemidir (Kumbıçak 2013, Akça 2015).

#### *Komet Testi Protokolü;*

- 1) T75 cm<sup>2</sup> 'lik flaskta bulunan ve %80 konfluent olan flasklardaki hücreler pasajlanmış, T25 cm<sup>2</sup> 'lik flasklara bölünmüş ve çoğalması için inkübatörde bekletilmiştir.
- 2) Çoğalan hücreler kontrol grubu, pozitif kontrol grubu, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 80 µg/mL, 100 µg/mL ve 10+1 µg/mL, 20+1 µg/mL, 40+1 µg/mL, 80+1 µg/mL, 100+1 µg/mL (+1= 1000 µg/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) olacak şekilde dozlama yapılmıştır.
- 3) Dozlanan hücreler 24 saat sonra tripsinlenerek kaldırılmış tüplere alınarak santrifüj edilmiştir.
- 4) Bu aşamadan sonra prosedür karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant kısmı atıldıktan sonra kalan hücreler 1 mL PBS ile seyreltilmiş ve iyice karıştırılmıştır.

- 5) Komet testinde kullanılacak lamaların bir gün önceden agarla kaplanması gerekir. 0,75 gr normal melting agaroz 100 mL dH<sub>2</sub>O'da çözülmüş ve lamaların rodajlı kısımlarına kadar agarla kaplanmıştır. Lamaların rodajlı kısımları deney gruplarına göre etiketlenmiştir.
- 6) Hücreleri jel içine gömmek için, düşük erime noktalı agaroz (LMA) kullanılmıştır. 0,065 gr LMA tartılmış ve 10 mL PBS içinde ısıtılarak jel haline getirilmiştir.
- 7) Eppendorf tüplere 250'şer µL LMA bölünmüş ve bu eppendorf tüpler 37 °C'de bekleyen sıcak su banyosuna yerleştirilmiştir.
- 8) Hücre pelletlerinden 100 µl çekilmiş, su banyosunda bekleyen ve içinde 250µl LMA jeli bulunan eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Buradaki hücre süspansiyonundan alınacak miktar hücre yoğunluğuna göre ayarlanabilir. Eppendorf tüpünde pipetaj yapılarak karışımın homojen olması sağlanır.
- 9) Bu karışımdan 80 µl çekilmiş ve lam üzerine yayılmıştır. Her deney grubu önceden etiketlenmiş olan lamaların üzerine ayrı ayrı yayılmıştır.
- 10) Üzerine karışım koyulan lamalar hemen lamelle kapatılmış ve yayma işlemi bittikten sonra lamalar 15 dakika +4 °C de bekletilmiştir.
- 11) 15 dakika sonra lamaların üzerindeki lameller çıkarılmıştır.
- 12) Lamelleri çıkmış olan lamalar şalelere dizilmiş ve şaleler lizis solüsyonu ile doldurulmuştur. Lamalar şaleler içinde 1 gece boyunca karanlıkta ve +4 °C de bekletilmiştir.
- 13) Bir gece bekletilen lamalar lizis solüsyonundan çıkarılmış ve elektroforez tankına dizilmiştir. Tanklar yürütme tamponu ile doldurulmuş ve 30 dk yürütme tamponu içinde akım verilmeden bekletilmiştir.
- 14) Yürütme işlemi 500 mA, 25V'da, yarım saatte gerçekleştirilmiştir.

15) Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra lamalar tanktan çıkarılıp nötralizasyon tamponuna konulmuş ve 5 dakika lamalar tampon içerisinde karanlıkta bekletilmiştir.

16) Nötralizasyon işlemi sonrasında lamalar tampondan çıkarılıp soğuk distile suya daldırılıp yıkanmış ve kuruması beklenmiştir.

17) Kuruduktan sonra lamalar %99 etanol içinde 5 dakika fikse edilmiştir.

*Lamların agar ile kaplanması;*

0,75 gr olarak tartılan normal melting agaroz 100 mL distile edilmiş suya eklenerek oluşan karışım ısıtılmıştır. Buzla muamele edilen lamalar yarısına kadar agarozla batırılmış lamaların alt kısımları silinerek o bölgedeki agaroz uzaklaştırılmış ve lamalar kurumaya bırakılmışlardır.

*Low melting agaroz (LMA) için PBS hazırlanması;*

0,48gr PBS tartılarak 50 mL distile edilmiş suda çözülmüştür.

*Low Melting Agaroz (LMA) hazırlanması;*

0.065 gr LMA tartılarak 10 mL PBS içerisinde çözülmüştür.

*Lizis Buffer hazırlanması*

2,5 M NaCl'den 29,22 gr; 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA' dan 7,4448 gr; 10 mM Tris'den 0,2422 gr tartılarak 178 mL distile edilmiş suyun içerisinde çözülmüştür. pH=10 değerini ayarlamak için NaOH veya HCl kullanılmıştır. Lizis buffer işleminden önce çözeltiye toplam hacmin %1'i kadar Triton X 100 ve %10'u kadar DMSO eklenmiştir.

*Running Buffer hazırlanması;*

0,56g Na<sub>2</sub>EDTA ve 8g NaOH 1,5 lt distile suda (pH 13) çözülerek hazırlanmıştır. +4°C 'de saklanmıştır.

*Nötralizasyon Buffer hazırlanması;*

Ph=7,5 olan tris 4,8456 g tartılarak 100 mL distile edilen suda çözülmüş ve +4°C'de sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

*Etidyum bromür boyasının hazırlanması;*

20 µg/ mL konsantrasyonda sahip olan etidyum bromür, distile edilen su içerisinde çözülmüştür.

*Boyama İşlemi;*

20 µg/mL konsantrasyona sahip olan EtBr boya solüsyonu içerisinden enjektör yardımıyla 0,2 mL çekilip lamların üzerine damlatılır. Bu işlem sonrasında lamların üzeri lameller ile kapatılarak mikroskopik olarak incelenmeye hazır hale getirilir.

*Lamların mikroskopta incelenmesi;*

Boyayla muamele edilen lamlar Floresan mikroskop yardımıyla sayım ve değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Her doza özgü lamlardan 100 tane hücre sayılmıştır. Değerlendirme Kameram 21® komet sayım programı ile yapılmıştır. Komet kuyruk uzunluğu, kuyruktaki % DNA ve olive kuyruk momenti verileri değerlendirilmiştir. Olive kuyruk momenti ilk olarak Olive ve ark. (1990) tarafından hesaplanmıştır. Bu kriter kuyruktaki DNA dağılımındaki değişimleri hesaplayarak hücre topluluğundaki heterojen dağılımı belirlediği için oldukça kullanışlı olarak kabul edilmektedir. Deneyle iki bağımsız tekrar halinde yapılmıştır.

### 3.7. Enzimatik testler

#### 3.7.1. ROS (reaktif oksijen türleri) testi

Bu test yöntemi ile *Anemone blanda* ekstraksiyonun hücre içi ROS oluşumuna etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) hücre içerisine girerek hücresel esterazların etkisi ile 2',7'- dichlorodihydrofluorescein (DCFH) oluşturur. Floresan özellikleri bulunmayan bu maddeler DCFH reaktif oksijenleri ile bir araya geldiğinde hızlıca okside olarak 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF)'yi oluşturur. Bu tepkimeler sonucu oluşan DCF'nin yüksek seviyede floresan özelliği bilinmektedir.

#### *ROS Testi Protokolü;*

- 1) Hücrelerin 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda 1 hafta boyunca büyümesi beklenmiştir.
- 2) Flasklarda %80 doluluğa ulaştığında pasajlanarak hücreler 96 kuyucuklu platalere ekilmiştir.
- 3) A549 ve Beas-2B hücre hatları için her bir kuyucuğa 8×10<sup>3</sup> hücre eklenmiştir.
- 4) Hücre doluluğuna ulaşan flasklar besi yeri değiştirildikten sonra hücreler 2 kez PBS ile yıkanmıştır.
- 5) Hücrelere 1xDCFH-DA/besiyeri çözeltilisinden 200'er µL eklenmiş ve 37 °C'de 120 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- 6) İnkübasyon sonunda hücreler 2 kez PBS ile tekrar yıkanmıştır.
- 7) DCFH-DA yüklenmiş hücreler 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 80 µg/mL, 100 µg/mL ve 10+1 µg/mL, 20+1 µg/mL, 40+1 µg/mL, 80+1 µg/mL, 100+1 µg/mL dozları ile muamele edilmiştir. Ayrıca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin IC<sub>50</sub> dozu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.
- 8) Konsantrasyonu 0 µM – 10 µM arasında değişen DCF standartlarınının 1:10 seyreltme serisi 1mM DCF stok solüsyonunun besi yeri ile seyreltilmesi ile standartlar tüp dilüsyon yöntemi ile hazırlanmıştır (Çizelge3.3).

**Çizelge 3.3.** DCF standartlarının tüp dilüsyon yöntemiyle hazırlanması

| No | DCF standard    | Besiyeri (RPMI) | DCF (nM) |
|----|-----------------|-----------------|----------|
| 1  | 10              | 990 µL          | 10000 nM |
| 2  | 1.tüpten 100 µL | 900 µL          | 1000 nM  |
| 3  | 2.tüpten 100 µL | 900 µL          | 100 nM   |
| 4  | 3.tüpten 100 µL | 900 µL          | 10 nM    |
| 5  | 4.tüpten 100 µL | 900 µL          | 1 nM     |
| 6  | 5.tüpten 100 µL | 900 µL          | 0,1 nM   |
| 7  | 6.tüpten 100 µL | 900 µL          | 0,01 nM  |
| 8  | 0 µL            | 1000 µL         | 0 nM     |

Absorbansı 480 nm/530 nm'de florometrik plaka okuyucuda plateler 24 saat belirli aralıklarla kinetik olarak okunmuştur. ROS değerleri standartlardan çizilen standart dağılım grafiğinin eğim formülünden yararlanılarak hesaplanmıştır. Deneyler her bir hücre hattı için iki tekrarlı şekilde gerçekleştirilmiştir.

### 3.8. İstatiksel analizler

İstatistiksel analizler GraphPad Prism 7 programıyla gerçekleştirilmiştir. Analizlerde One-way ANOVA testi kullanılmıştır. Değerlendirme  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$ ,  $p \leq 0,001$  alınarak yapılmıştır.

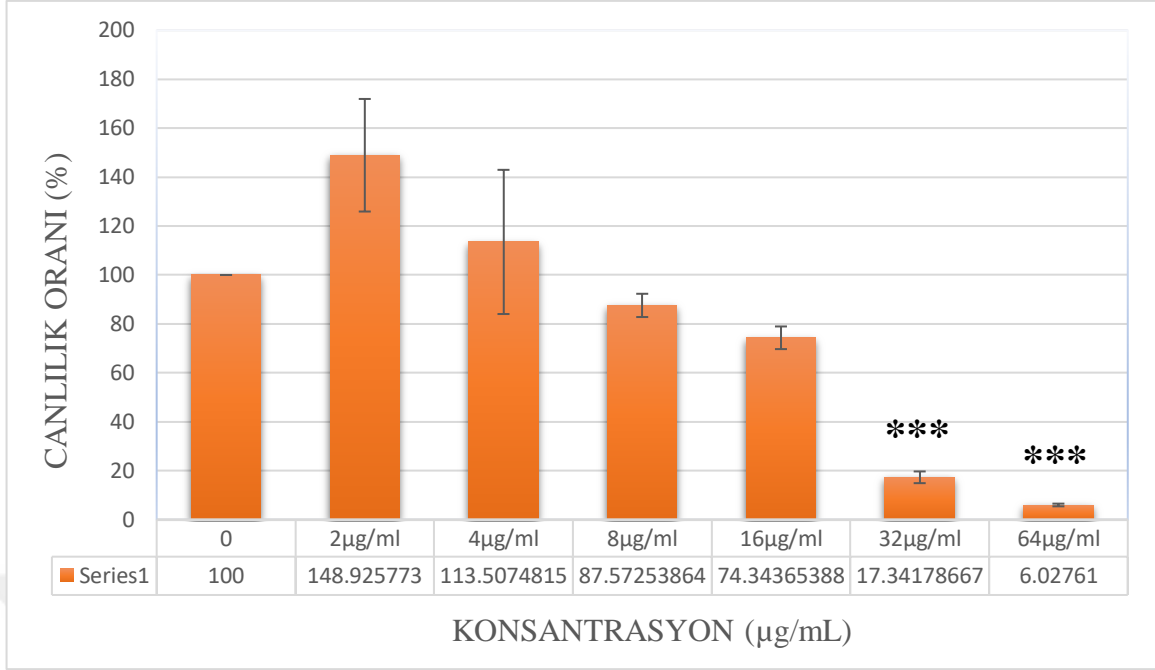
## 4.BULGULAR

### 4.1. XTT test bulguları

XTT testinden elde edilen bulgular Şekil 4.1.'de ve Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. *Anemone blanda* ekstraktının 2 µg/mL ve 64 µg/mL arasında değişen konsantrasyonları Beas-2B ve A549 hücre hatlarına 24 saat süreyle muamele edilmiştir.

#### 4.1.1 Beas-2B hücre hattında *Anemone blanda* ekstraktı için elde edilen XTT bulguları

*Anemone blanda* ekstraksiyonu Beas-2B hücre hattında farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır ve canlılık oranları ile standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.1.). XTT uygulaması sonuçları Şekil 4.1'te verilmiştir. XTT deney sonuçlarında konsantrasyonun artmasına paralel olarak anlamlı azalma olduğu One-Way Anova testi ile belirlenmiştir ( $p \leq 0,01$ ). 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL ve 64 µg/mL'lik konsantrasyonlarda büyüme kontrol grubuna göre canlılık oranlarının istatistiki olarak anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuş IC50 değeri 21,90 µg/mL olarak belirlenmiştir ( $p \leq 0,01$ ).



**Şekil 4.1.** *Anemone blanda* ekstraktına maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında XTT testi ile belirlenen canlılık oranları; \*\*\*  $p \leq 0,001$

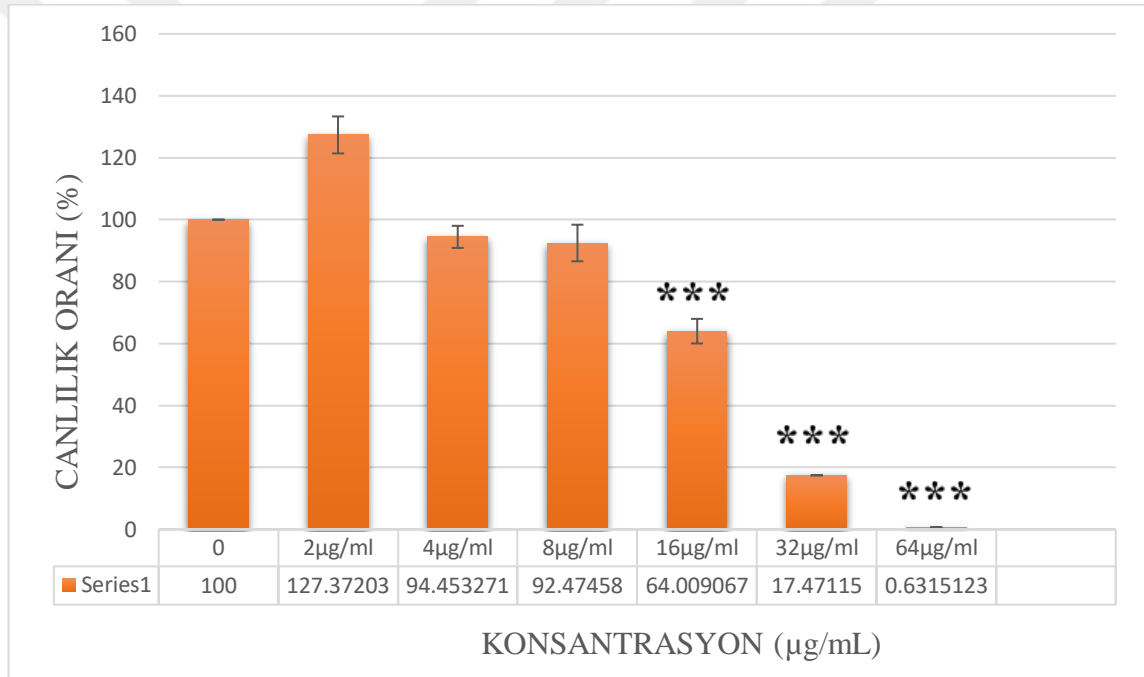
**Çizelge 4.1.** *Anemone blanda*'nın ekstraksiyonuna maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında XTT test ile belirlenen canlılık yüzdeleri;  $\pm$  standart sapmayı ifade etmektedir; \*\*\*  $p \leq 0,01$

| Dozlar     | Büyüme Kontrol       | 2 µg/ml                  | 4 µg/ml                  | 8 µg/ml                | 16 µg/ml               | 32 µg/ml                      | 64 µg/ml                     |
|------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| % Canlılık | 100<br>$\pm$<br>0,00 | 148,93<br>$\pm$<br>23,00 | 113,51<br>$\pm$<br>29,46 | 87,57<br>$\pm$<br>4,75 | 74,34<br>$\pm$<br>4,63 | 17,34<br>$\pm$<br>2,39<br>*** | 6,03<br>$\pm$<br>0,55<br>*** |

*Anemone blanda* ekstraktının Beas-2B sağlıklı akciğer epitel hücre hattı üzerine etkisi değerlendirildiğinde, 24 saatlik muamelede 32 µg/mL ve 64 µg/mL dozlarında, istatistiksel olarak hücre canlılığında kontrole oranla anlamlı bir azalmaya neden olduğu gözlemlendi (\*\*\*  $p \leq 0,01$ ).

#### 4.1.2 A549 hücre hattında *Anemone blanda*'nın ekstraktı ile muamele sonunda elde edilen XTT bulguları

*Anemone blanda* ekstraktı A549 hücre hattında farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır ve canlılık oranları ile standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.2.). XTT uygulaması sonuçları Şekil 4.2.'te verilmiştir. XTT deney sonuçlarında konsantrasyonun artmasına paralel olarak anlamlı azalma olduğu One-Way Anova testi ile belirlenmiştir ( $p \leq 0,01$ ). 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik konsantrasyonlarda büyüme kontrol grubuna göre canlılık oranlarının istatistiki olarak anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuş IC50 eğeri 21,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  olarak belirlenmiştir ( $p \leq 0,01$ ).



Şekil 4.2. *Anemone blanda* ekstraktına maruz bırakılan A549 akciğer karsinom hücre hattında XTT test ile belirlenen canlılık oranları; \*\*\*  $p \leq 0,01$

**Çizelge 4.2.** *Anemone blanda* ekstraktına maruz bırakılan A549 akciğer karsinom hücre hattında XTT test ile belirlenen canlılık yüzdeleri;  $\pm$  standart sapmayı ifade etmektedir; \*\*\*  $p \leq 0,01$

| Dozlar     | Büyüme Kontrol    | 2 $\mu\text{g/ml}$      | 4 $\mu\text{g/ml}$     | 8 $\mu\text{g/ml}$     | 16 $\mu\text{g/ml}$           | 32 $\mu\text{g/ml}$           | 64 $\mu\text{g/ml}$          |
|------------|-------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| % Canlılık | 100<br>$\pm$<br>0 | 127,37<br>$\pm$<br>5,97 | 94,45<br>$\pm$<br>3,57 | 92,47<br>$\pm$<br>5,91 | 64,01<br>$\pm$<br>3,97<br>*** | 17,47<br>$\pm$<br>0,07<br>*** | 0,63<br>$\pm$<br>0,09<br>*** |

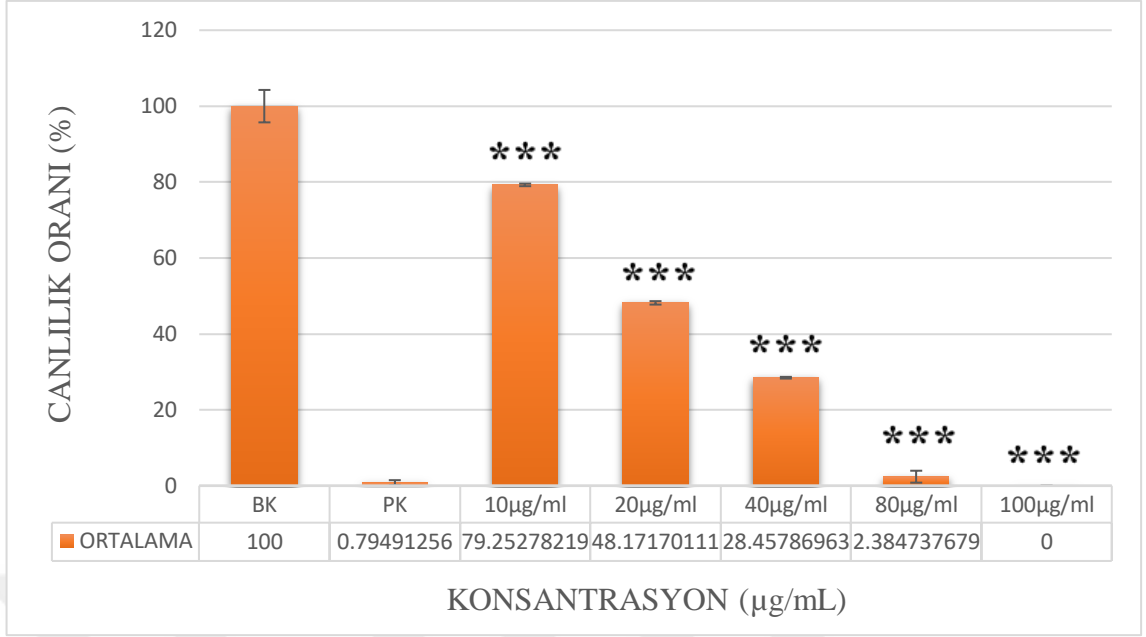
*Anemone blanda* bitkisi ekstraktının A549 hücre hattı üzerine etkisi değerlendirildiğinde, 24 saatlik muamelede 16  $\mu\text{g/mL}$ , 32  $\mu\text{g/mL}$  ve 64  $\mu\text{g/mL}$  dozlarında, istatistiksel olarak hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir azalmaya neden olduğu gözlemlendi (\*\*\*  $p \leq 0,01$ ).

#### 4.2. Klonojenik test bulguları

Klonojenik testinden elde edilen bulgular Şekil 4.3.'de ve Şekil 4.4.'de gösterilmiştir. *Anemone blanda*'nın ekstraksiyonuyla 10  $\mu\text{g/mL}$  ve 100  $\mu\text{g/mL}$  arasında değişen konsantrasyonları Beas-2B sağlıklı akciğer epitel ve A549 akciğer karsinom hücre hatlarına 24 saat muamele edilmiştir.

##### 4.2.1. Beas-2B hücre hattında *Anemone blanda*'nın ekstraksiyonu için elde edilen klonojenik test bulguları

*Anemone blanda* ekstraktı Beas-2B hücre hattında farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır ve canlılık oranları ile standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.3.). Klonojenik test uygulaması sonuçları Şekil 4.3'te verilmiştir. Klonojenik deney sonuçlarında konsantrasyonun artmasına paralel olarak anlamlı azalma olduğu One-Way Anova testi ile belirlenmiştir ( $p \leq 0,01$ ). 10  $\mu\text{g/mL}$  20  $\mu\text{g/mL}$ , 40  $\mu\text{g/mL}$ , 80  $\mu\text{g/mL}$  ve 100  $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarda büyüme kontrol grubuna göre canlılık oranlarının istatistiki olarak anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuş IC50 değeri 24,57  $\mu\text{g/mL}$  olarak belirlenmiştir ( $p \leq 0,01$ ).



**Şekil 4.3.** *Anemone blanda*'nın ekstraksiyonuna maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık oranları; \*\*\*  $p \leq 0,01$

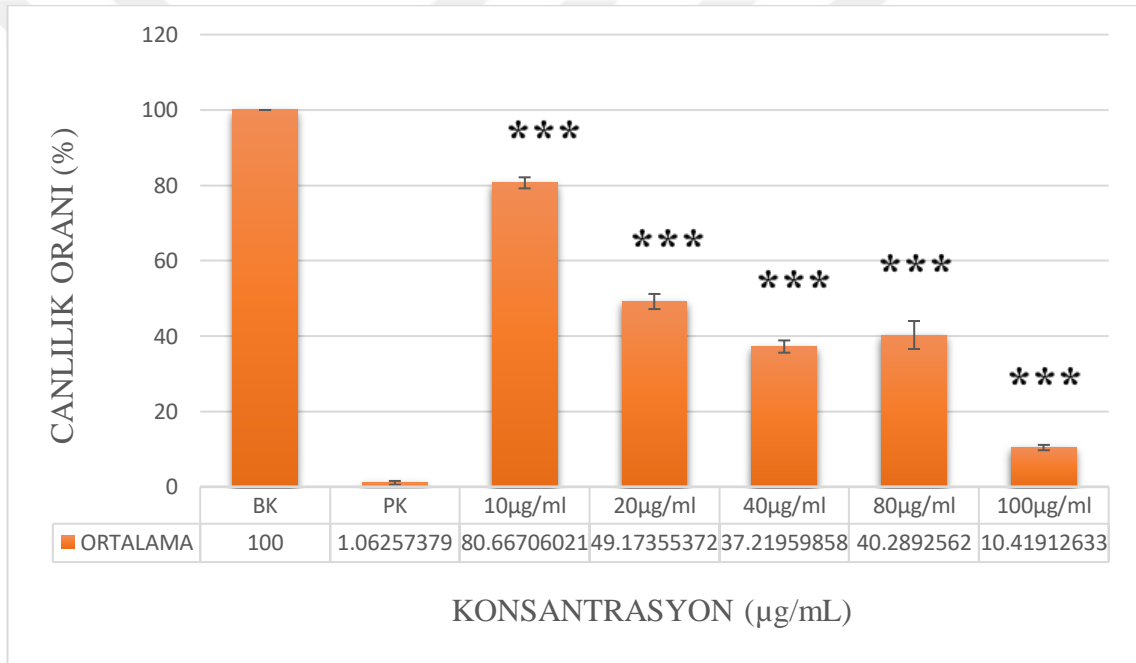
**Çizelge 4.3.** *Anemone blanda*'nın ekstraksiyonuna maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık yüzdeleri;  $\pm$  standart sapmayı ifade etmektedir; \*\*\*  $p \leq 0,01$

| Dozlar     | Büyüme Kontrol       | Pozitif Kontrol       | 10 µg/ml                      | 20 µg/ml                      | 40 µg/ml                      | 80 µg/ml                     | 100 µg/ml              |
|------------|----------------------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------|
| % Canlılık | 100<br>$\pm$<br>4,27 | 0,79<br>$\pm$<br>0,67 | 79,25<br>$\pm$<br>0,34<br>*** | 48,17<br>$\pm$<br>0,45<br>*** | 28,46<br>$\pm$<br>0,22<br>*** | 2,38<br>$\pm$<br>1,57<br>*** | 0<br>$\pm$<br>0<br>*** |

*Anemone blanda* ekstraktının Beas-2B hücre hattı üzerine etkisi değerlendirildiğinde, 24 saatlik muamelede 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 80 µg/mL ve 100 µg/mL dozlarında, istatistiksel olarak hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir azalmaya neden olduğu gözlemlendi (\*\*\*  $p \leq 0,01$ ).

#### 4.2.2. A549 hücre hattında *Anemone blanda*'nın ekstraksiyonu için elde edilen klonojenik test bulguları

*Anemone blanda* ekstraksiyonu A549 hücre hattında farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır ve canlılık oranları ile standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.4.). Klonojenik test uygulaması sonuçları Şekil 4.4'te verilmiştir. Klonojenik deney sonuçlarında konsantrasyonun artmasına paralel olarak anlamlı azalma olduğu One-Way Anova testi ile belirlenmiştir ( $p \leq 0,01$ ). 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik konsantrasyonlarda büyüme kontrol grubuna göre canlılık oranlarının istatistiki olarak anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuş IC50 değeri 27,62  $\mu\text{g}/\text{mL}$  olarak belirlenmiştir ( $p \leq 0,01$ ).



Şekil 4.4. *Anemone blanda*'nın ekstraksiyonuna maruz bırakılan A549 hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık oranları; \*\*\*  $p \leq 0,01$

**Çizelge 4.4.** *Anemone blanda*'nın ekstraksiyonuna maruz bırakılan A549 hücre hattında Klonojenik test ile belirlenen canlılık yüzdeleri;  $\pm$  standart sapmayı ifade etmektedir; \*\*\*  $p \leq 0,01$

| Dozlar     | Büyüme Kontrol    | Pozitif kontrol       | 10 $\mu\text{g/ml}$           | 20 $\mu\text{g/ml}$           | 40 $\mu\text{g/ml}$           | 80 $\mu\text{g/ml}$           | 100 $\mu\text{g/ml}$          |
|------------|-------------------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| % Canlılık | 100<br>$\pm$<br>0 | 1,06<br>$\pm$<br>0,50 | 80,67<br>$\pm$<br>1,46<br>*** | 49,17<br>$\pm$<br>2,00<br>*** | 37,22<br>$\pm$<br>1,63<br>*** | 40,29<br>$\pm$<br>3,71<br>*** | 10,41<br>$\pm$<br>0,71<br>*** |

*Anemone blanda* ekstraktı A549 hücre hattı üzerine etkisi değerlendirildiğinde, 24 saatlik muamelede 10  $\mu\text{g/mL}$ , 20  $\mu\text{g/mL}$ , 40  $\mu\text{g/mL}$ , 80  $\mu\text{g/mL}$  ve 100  $\mu\text{g/mL}$  dozlarında, istatistiksel olarak hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir azalmaya neden olduğu gözlemlendi (\*\*\*  $p \leq 0,01$ ).

### 4.3. Komet Testi Bulguları

Tüm komet test bulguları her iki hücre hattı için Çizelge 4.5. ve 4.6. da sunulmuştur.

**Çizelge 4.5.** Beas-2B sağlıklı akciğer epitel hücre hattının komet testi sonuçları

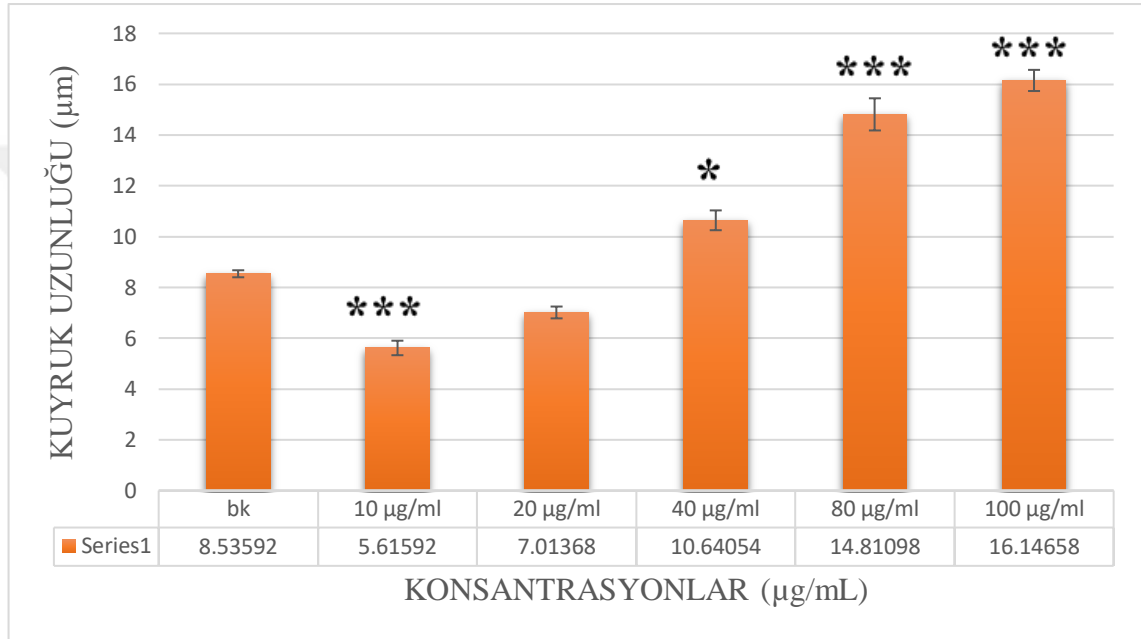
| Dozlar   | Kuyruk uzunluğu | % DNA        | Olive kuyruk momentleri |
|--|-----------------|--------------|-------------------------|
| Büyüme kontrol   | 8,54 ± 0,14     | 25,22 ± 0,78 | 3,15 ± 0,04             |
| 10 µg/mL   | 5,62 ± 0,29     | 19,66 ± 0,32 | 2,85 ± 0,15             |
| 20 µg/mL   | 7,01 ± 0,23     | 23,32 ± 0,45 | 4,65 ± 0,17             |
| 40 µg/mL   | 10,64 ± 0,39    | 27,08 ± 0,46 | 6,10 ± 0,37             |
| 80 µg/mL   | 14,81 ± 0,63    | 32,08 ± 0,58 | 9,29 ± 0,42             |
| 100 µg/mL  | 16,15 ± 0,42    | 35,66 ± 0,58 | 10,69 ± 0,44            |
| Pozitif kontrol (1000 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | 43,47 ± 0,64    | 59,51 ± 0,94 | 17,22 ± 0,61            |
| 10 µg/mL + 1000 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>         | 41,56 ± 0,44    | 56,60 ± 0,53 | 15,94 ± 0,51            |
| 20 µg/mL + 1000 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>         | 36,71 ± 0,47    | 50,26 ± 0,49 | 12,46 ± 0,47            |
| 40 µg/mL + 1000 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>         | 31,52 ± 0,46    | 45,45 ± 0,37 | 9,91 ± 0,43             |
| 80 µg/mL + 1000 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>         | 28,80 ± 0,43    | 43,12 ± 0,44 | 7,93 ± 0,40             |
| 100 µg/mL + 1000 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | 26,98 ± 0,39    | 40,64 ± 0,45 | 5,97 ± 0,41             |

**Çizelge 4.6.** A549 akciğer karsinoma hücre hattının komet testi sonuçları

| Dozlar   | Kuyruk uzunluğu | % DNA         | Olive kuyruk momentleri |
|--|-----------------|---------------|-------------------------|
| Büyüme kontrol   | 8,70 ± 0,20     | 26,67 ± 1,07  | 3,15 ± 0,04             |
| 10 µg/mL   | 9,30 ± 0,35     | 28,34 ± 0,76  | 2,85 ± 0,15             |
| 20 µg/mL   | 10,04 ± 0,35    | 29,11 ± 0,78  | 4,65 ± 0,17             |
| 40 µg/mL   | 15,87 ± 0,22    | 33,70 ± 0,56  | 6,10 ± 0,37             |
| 80 µg/mL   | 17,22 ± 0,47    | 38,17 ± 0,71  | 9,29 ± 0,42             |
| 100 µg/mL  | 18,46 ± 0,80    | 40,75 ± 1,38  | 10,69 ± 0,44            |
| Pozitif kontrol (1000 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | 45,76 ± 0,86    | 59,19 ± 1,38  | 17,22 ± 0,61            |
| 10 µg/mL + 1000 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>         | 43,53 ± 0,69    | 57,62 ± 0,61  | 15,94 ± 0,51            |
| 20 µg/mL + 1000 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>         | 41,25 ± 0,58    | 55,50 ± 0,90  | 12,46 ± 0,47            |
| 40 µg/mL + 1000 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>         | 38,50 ± 0,73    | 51,38 ± 0,72  | 9,91 ± 0,43             |
| 80 µg/mL + 1000 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>         | 34,13 ± 0,66    | 48,37 ± 0,672 | 7,93 ± 0,40             |
| 100 µg/mL + 1000 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | 32,77 ± 0,62    | 46,66 ± 0,52  | 5,97 ± 0,41             |

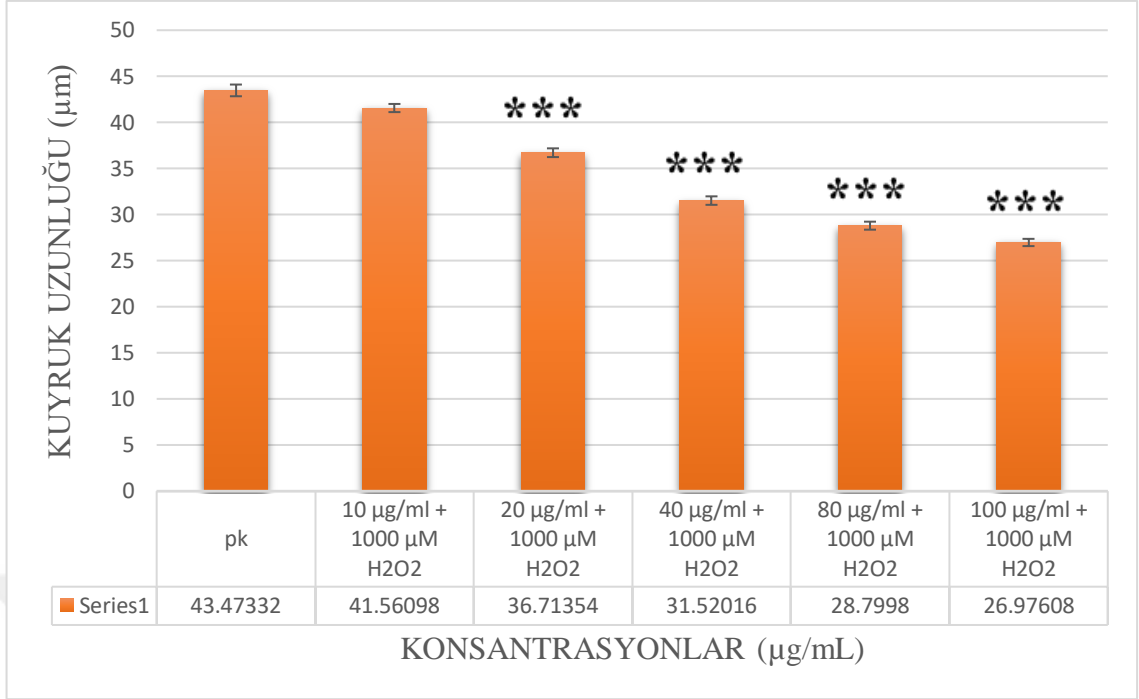
#### 4.3.1. Beas-2B hücre hattı kuyruk uzunluğu bulguları

Komet testi kuyruk uzunluğu sonuçları Şekil 4.5 ve Şekil 4.6.'da verilmiştir. Kuyruk uzunluğu sonuçlarına göre *Anemone blanda* ekstraktının 10 µg/mL'lik dozda anlamlı azalma gösterdiği ( $p \leq 0,01$ ), 20 µg/mL dozda istatistiksel anlamsız bir azalma olduğu, sırasıyla 40 µg/mL, 80 µg/mL ve 100 µg/mL'lik dozlarda ise kuyruk uzunluklarının büyüme kontrole göre anlamlı artış gösterdiği One-Way Anova testi ile belirlenmiştir ( $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$ ; Şekil 4.5).



**Şekil 4.5.** *Anemone blanda*'nın çeşitli konsantrasyonlarda ekstraktına maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında büyüme kontrole göre değerlendirilen kuyruk uzunluğu oranları; \*  $p \leq 0,05$  \*\*\*  $p \leq 0,01$

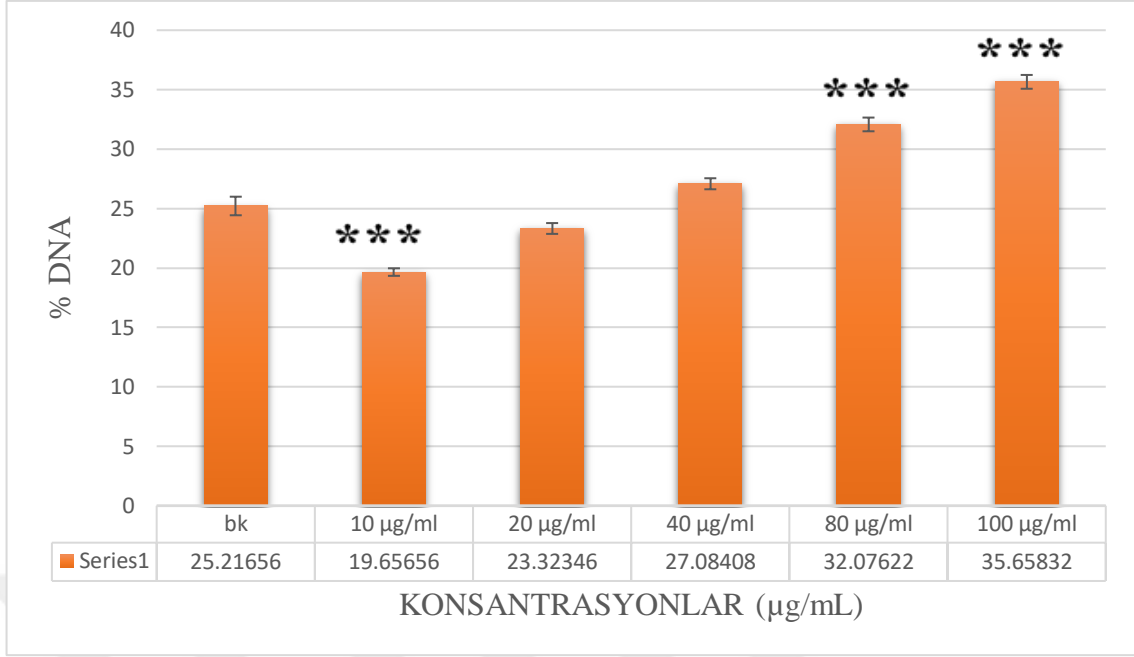
*Anemone* ekstraktının tüm dozları kombine bir şekilde 1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile birlikte Beas-2B hücrelerine uygulandığında pozitif kontrol 1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile karşılaştırılmış ve *Anemone* ekstraktı 20 µg/mL'den itibaren tüm dozlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin kuyruk uzunluğu oranlarını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır ( $p \leq 0,01$ ; Şekil 4.6).



**Şekil 4.6.** *Anemone blanda*'nın ekstraktına maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında pozitif kontrole göre değerlendirilen kuyruk uzunluğu oranları; \*\*\*  $p \leq 0,01$

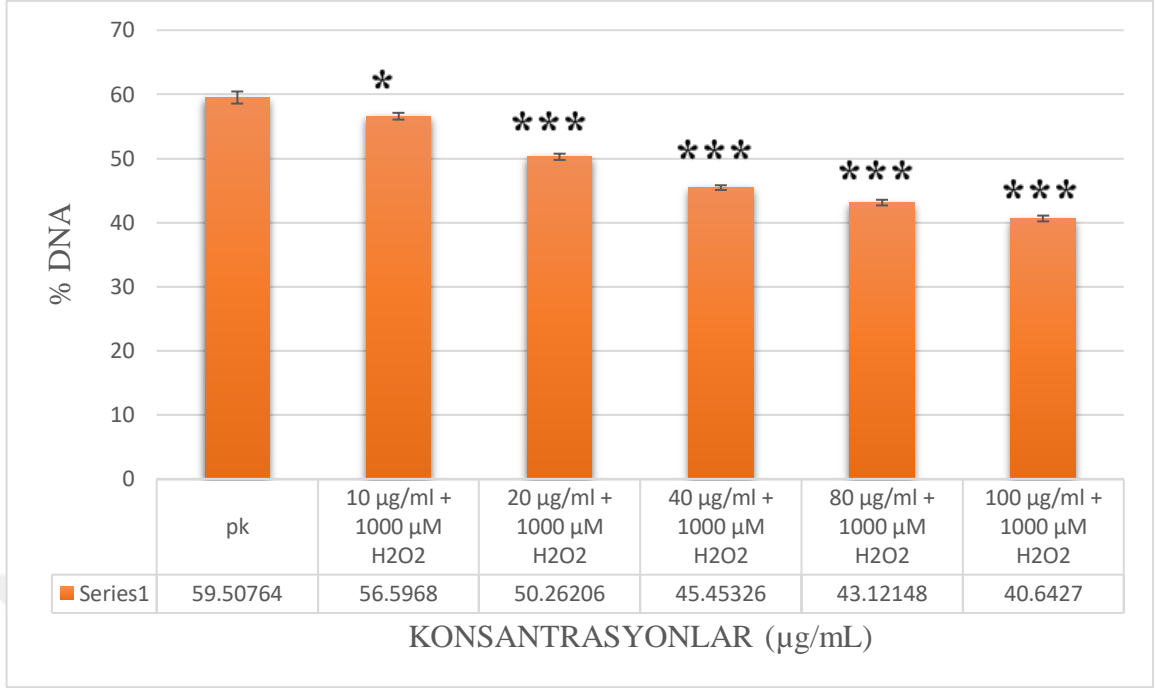
#### 4.3.2. Beas-2B hücre hattı kuyruk % DNA bulguları

Komet testi kuyruk % DNA sonuçları Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'te verilmiştir. *Anemone* ekstresinin 10 µg/mL dozunda anlamlı bir azalma görülürken 20 µg/mL ve 40 µg/mL dozlarda büyüme kontrole göre istatistiki anlamlılık gözlenmemiştir ( $p > 0,05$ ). 80 µg/mL ve 100 µg/mL'lik konsantrasyonlarda ise büyüme kontrol grubuna göre kuyruk % DNA'nın istatistiki olarak anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir ( $p \leq 0,01$ ; Şekil 4.7).



**Şekil 4.7.** *Anemone blanda*'nın ekstraktına maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında büyüme kontrole göre değerlendirilen kuyruk % DNA oranları; \*\*\*  $p \leq 0,01$

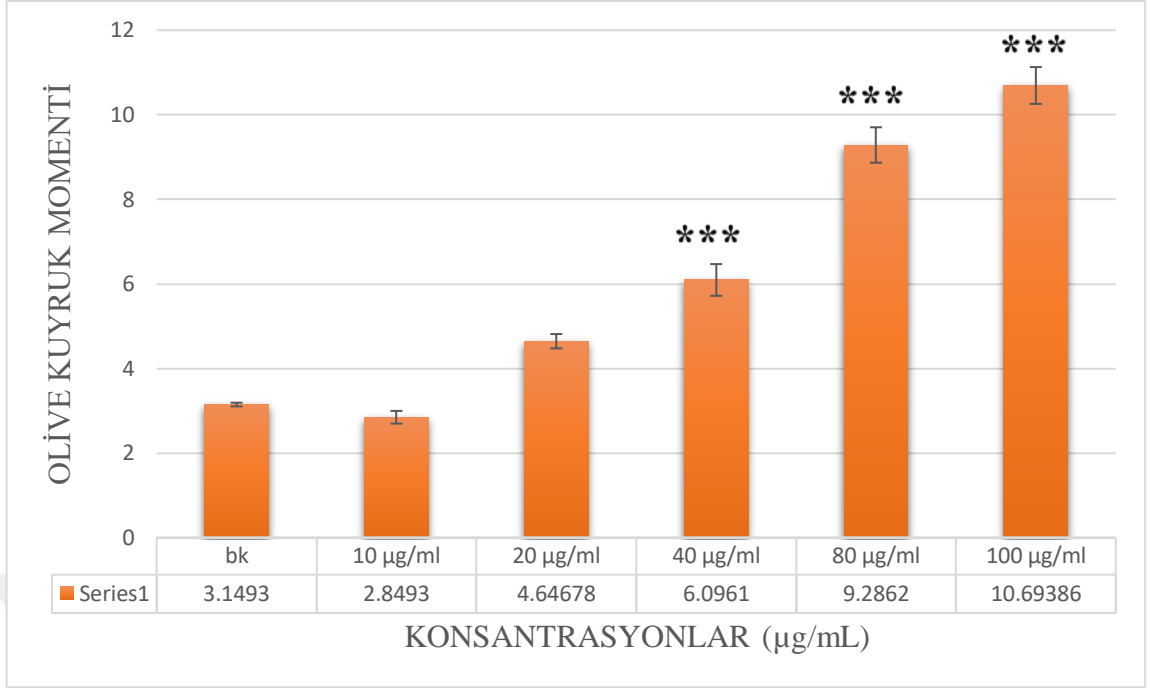
*Anemone* ekstraktının tüm dozları kombine bir şekilde 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ile birlikte Beas-2B hücrelerine uygulandığında pozitif kontrol 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ile karşılaştırılmış ve *Anemone* ekstraktı 10  $\mu\text{g/mL}$ 'den itibaren tüm dozlarda  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin arttırdığı kuyruk % DNA oranlarını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\* $p \leq 0,01$ ; Şekil 4.8).



**Şekil 4.8.** *Anemone blanda*'nın ekstraktına maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında pozitif kontrole göre değerlendirilen kuyruk % DNA oranları; \*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,01$

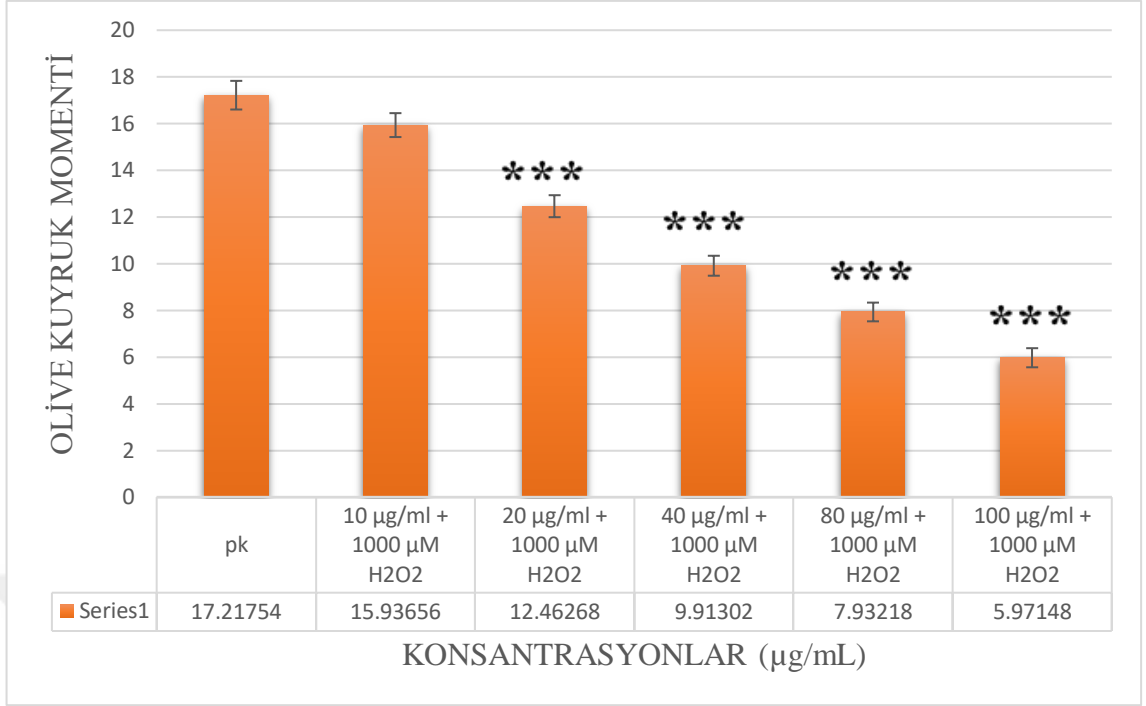
#### 4.3.3. Beas-2B hücre hattı kuyruk olive kuyruk momenti bulguları

*Anemone blanda* ekstraktı ile Beas-2B hücrelerinde gerçekleştirilen komet testi olive kuyruk momenti sonuçları Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmiştir. ( $p \leq 0,01$ ). 10 µg/mL ve 20 µg/mL'lik dozlarda olive kuyruk momenti oranlarının değişmediği ve istatistiki bir anlamlılık oluşturmadığı, 40 µg/mL, 80 µg/mL ve 100 µg/mL'lik konsantrasyonlarda ise büyüme kontrol grubuna göre olive kuyruk momenti oranının istatistiki olarak anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur ( $p \leq 0,01$ ; Şekil 4.9).



**Şekil 4.9.** *Anemone blanda*'nın ekstraktına maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında büyüme kontrole göre değerlendirilen olive kuyruk moment oranları; \*\*\*  $p \leq 0,01$

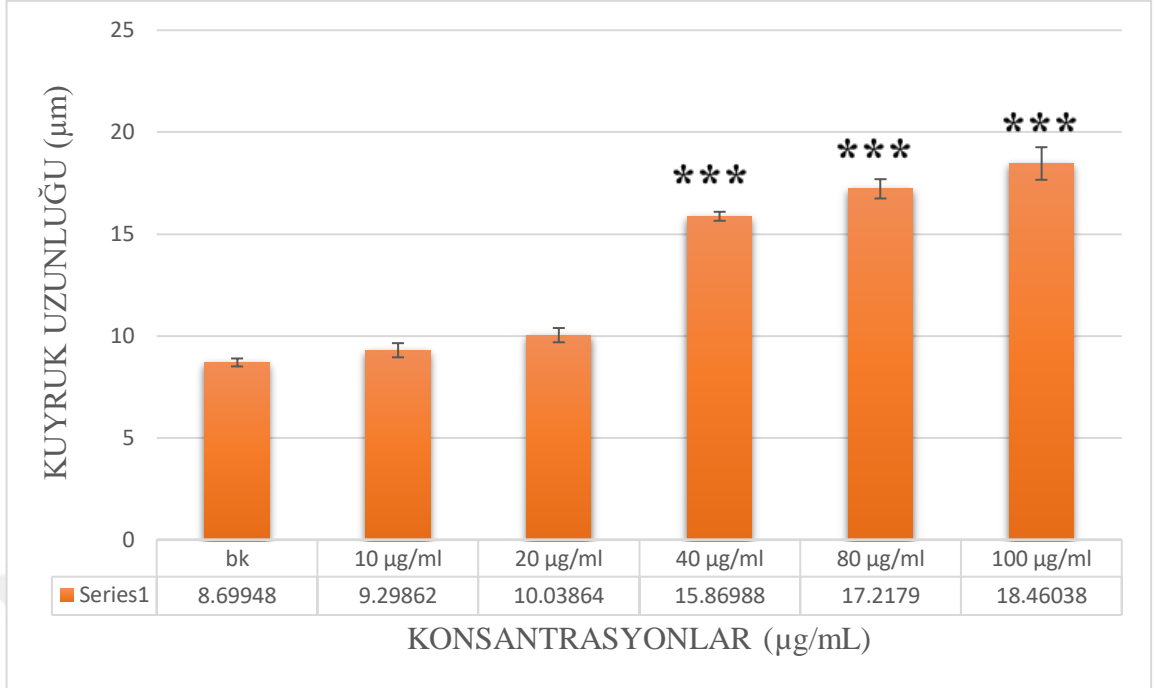
*Anemone* ekstraktının tüm dozları kombine bir şekilde 1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile birlikte Beas-2B hücrelerine uygulandığında pozitif kontrol 1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile karşılaştırılmış ve *Anemone* ekstraktı 20 µg/mL'den itibaren tüm dozlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin olive kuyruk moment oranlarını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır ( $p \leq 0,01$ ; Şekil 4.10).



**Şekil 4.10.** *Anemone blanda* ekstraktına maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında pozitif kontrole göre değerlendirilen olive kuyruk moment oranları; \*\*\*  $p \leq 0,001$

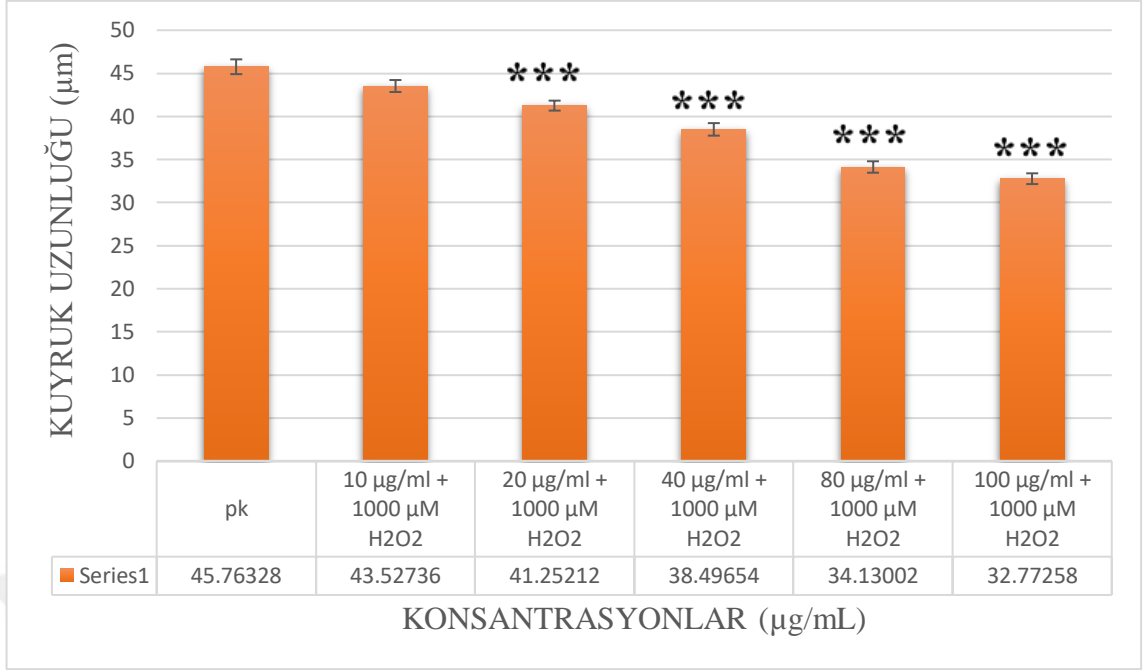
#### 4.3.4. A549 hücre hattı kuyruk uzunluğu bulguları

Komet testi kuyruk uzunluğu sonuçları Şekil 4.11 ve Şekil 4.12.'te verilmiştir. Komet testi kuyruk uzunluğu sonuçlarında *Anemone* ekstraktının 10 µg/mL ve 20 µg/mL dozlarında etkin olmadığı yani DNA'da hasar oluşturmadığı, 40 µg/mL, 80 µg/mL ve 100 µg/mL'lik dozlarında ise büyüme kontrol grubuna göre kuyruk uzunluklarını istatistiki olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı bulunmuştur ( $p \leq 0,001$ ; Şekil 4.11).



**Şekil 4.11.** *Anemone blanda*'nın ekstraktına maruz bırakılan A549 hücre hattında büyüme kontrole göre değerlendirilen kuyruk uzunluğu oranları; \*\*\*  $p \leq 0,01$ .

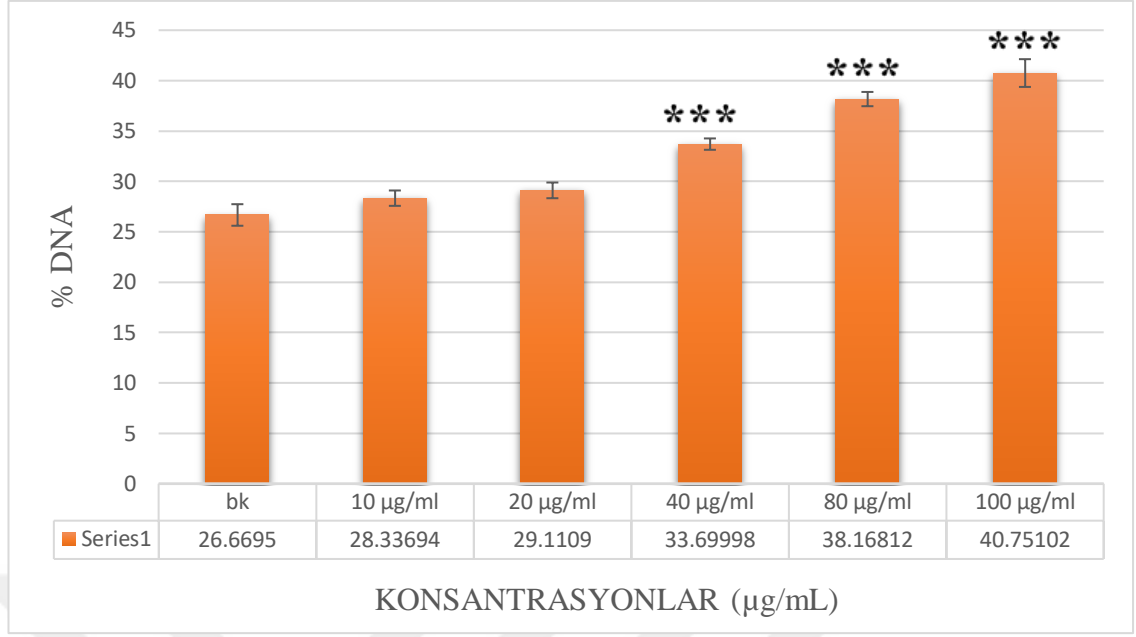
*Anemone* ekstraktının tüm dozları kombine bir şekilde A549 hücrelerine 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ile birlikte uygulandığında pozitif kontrol 1000  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ile karşılaştırılmış ve *Anemone* ekstraktı 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'den itibaren tüm dozlarda  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin kuyruk uzunluğu oranlarını yani DNA hasarı oluşturma etkisini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltmıştır ( $p \leq 0,001$ ; Şekil 4.12).



**Şekil 4.12.** *Anemone blanda* ekstraktına maruz bırakılan A549 hücre hattında pozitif kontrole göre değerlendirilen kuyruk uzunluğu oranları; \*\*\*  $p \leq 0,001$

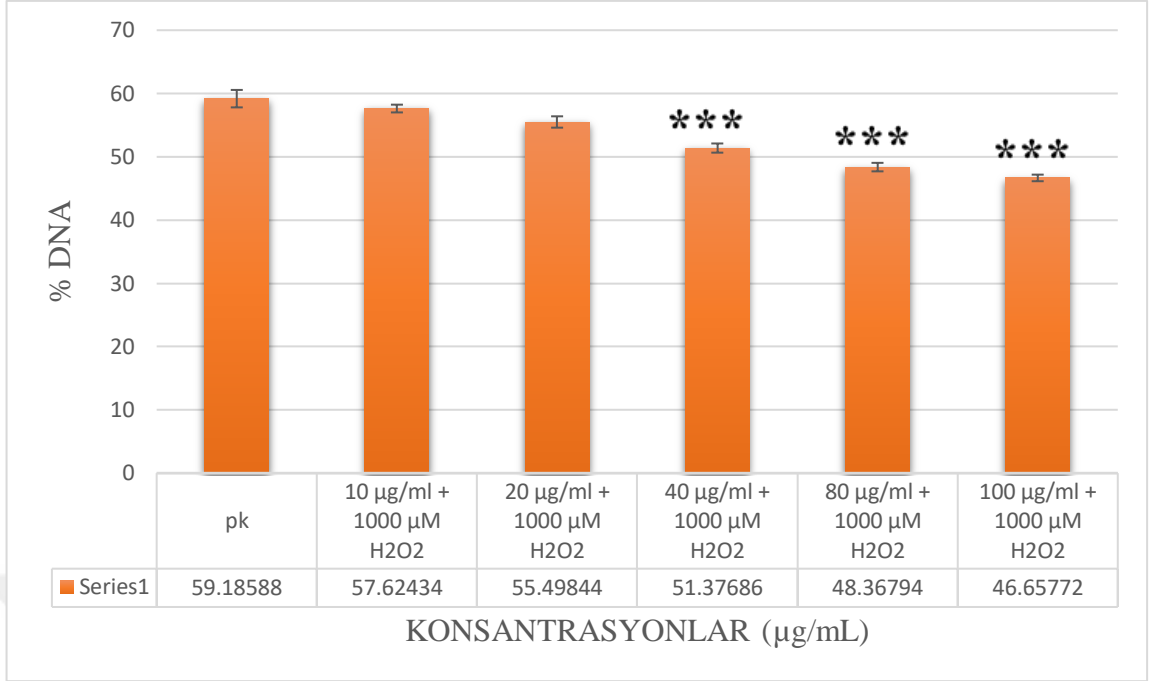
#### 4.3.2. A549 hücre hattı kuyruk % DNA bulguları

*Anemone blanda* ekstraktı A549 hücre hattında farklı konsantrasyonlarda uygulanmış ve kuyruk % DNA sonuçları Şekil 4.13. ve Şekil 4.14.'te verilmiştir (Çizelge 4.6). Kuyruk % DNA oranları 10 µg/mL ve 20 µg/mL konsantrasyonlarda değişmeden kalırken 40 µg/mL, 80 µg/mL ve 100 µg/mL'lik konsantrasyonlarda büyüme kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ( $p \leq 0,001$ ; Şekil 4.13).



**Şekil 4.13.** *Anemone blanda* ekstraktına maruz bırakılan A549 hücre hattında büyüme kontrole göre değerlendirilen % DNA oranları; \*\*\*  $p \leq 0,001$

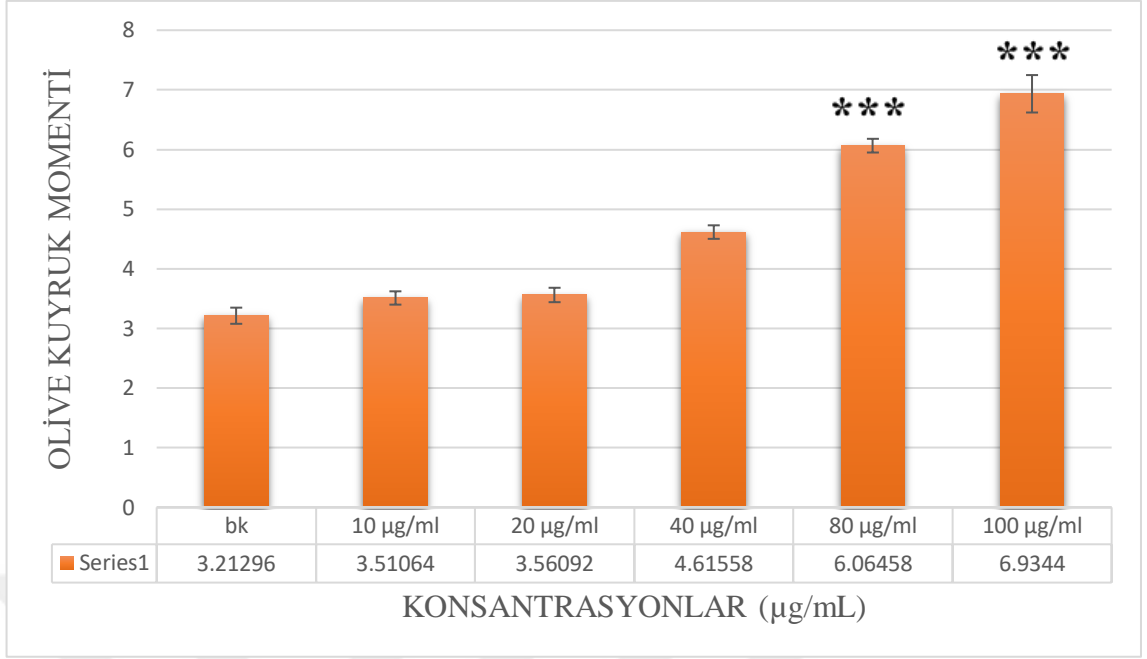
*Anemone* ekstraktının tüm dozları kombine bir şekilde A549 hücrelerine 1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile birlikte uygulanıp pozitif kontrol 1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile karşılaştırılmış ve ekstraktın 40 µg/mL'den itibaren tüm dozlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin kuyruk % DNA oranlarını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı gözlenmiştir ( $p \leq 0,001$ ; Şekil 4.14).



**Şekil 4.14.** *Anemone blanda* ekstraktına maruz bırakılan A549 hücre hattında komet testi ile belirlenen pozitif kontrole göre değerlendirilen % DNA oranları; \*\*\*  $p \leq 0,001$

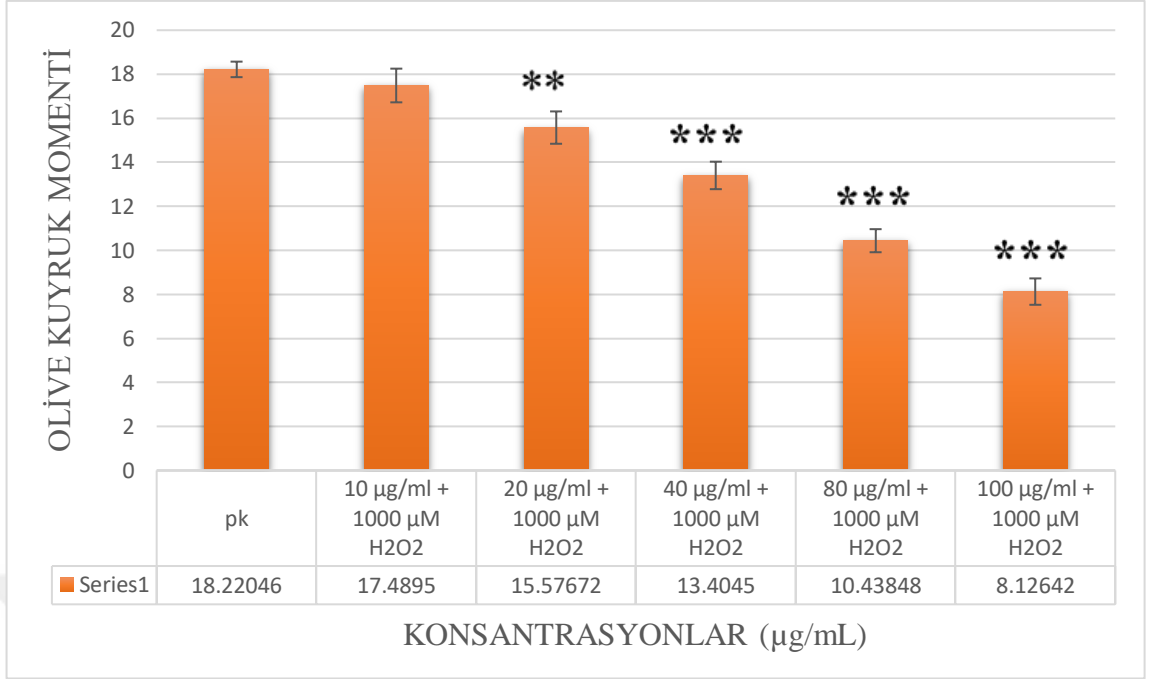
#### 4.3.6. A549 hücre hattı kuyruk olive kuyruk momenti bulguları

A549 hücrelerinde *Anemone* bitkisi ekstraktı ile muamele sonucu elde edilen olive kuyruk momenti bulguları Şekil 4.15. ve Şekil 4.16.'da verilmiştir. Olive kuyruk momenti oranları 10 µg/mL, 20 µg/mL ve 40 µg/mL konsantrasyonlarda değişmezken, 80 µg/mL ve 100 µg/mL'lik konsantrasyonlarda büyüme kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ( $p \leq 0,001$ ; Şekil 4.15).

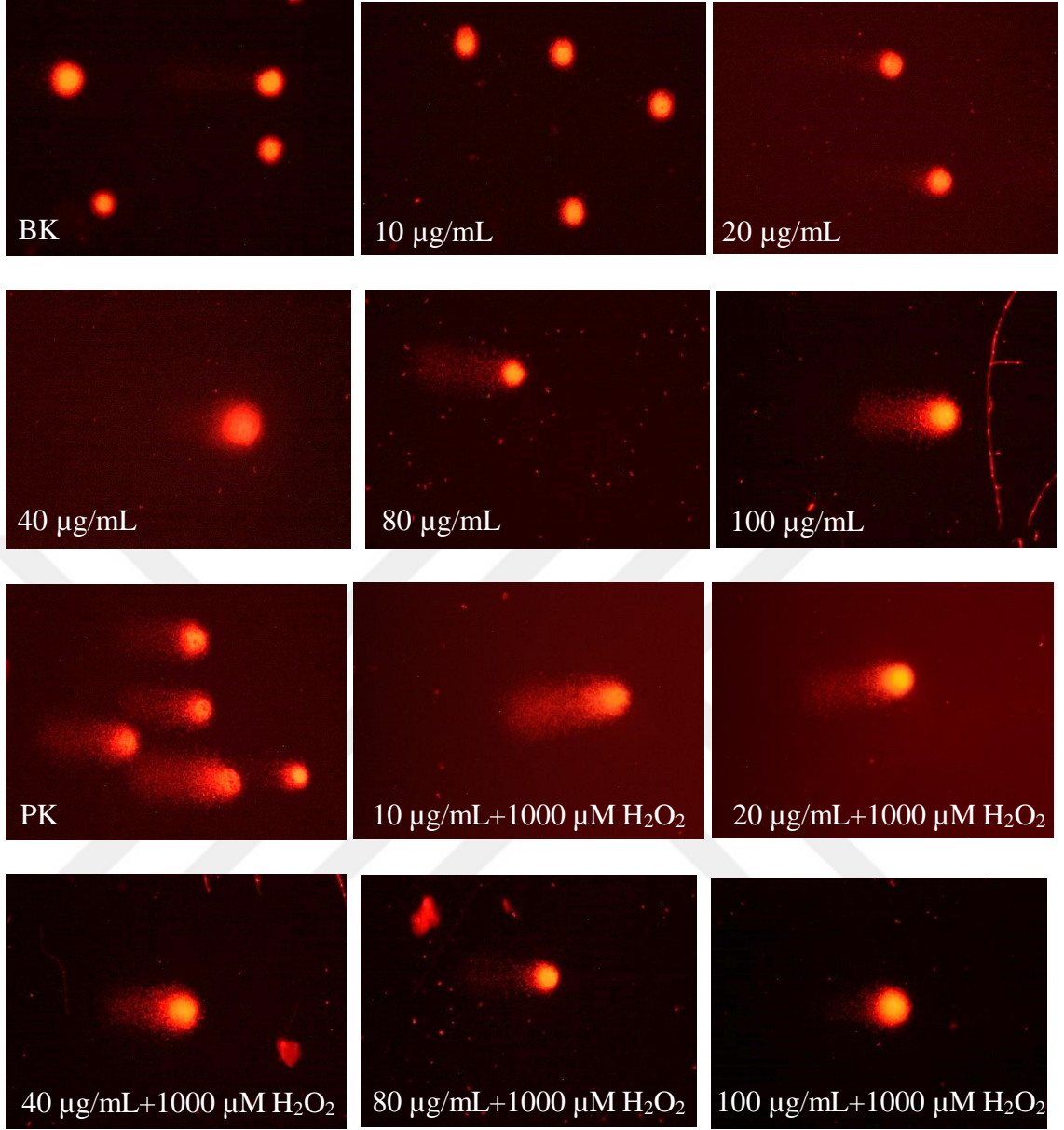


**Şekil 4.15.** *Anemone blanda* ekstraktının çeşitli dozlarına maruz bırakılan A549 hücre hattında büyüme kontrole göre değerlendirilen olive kuyruk moment oranları; \*\*\*  $p \leq 0,001$

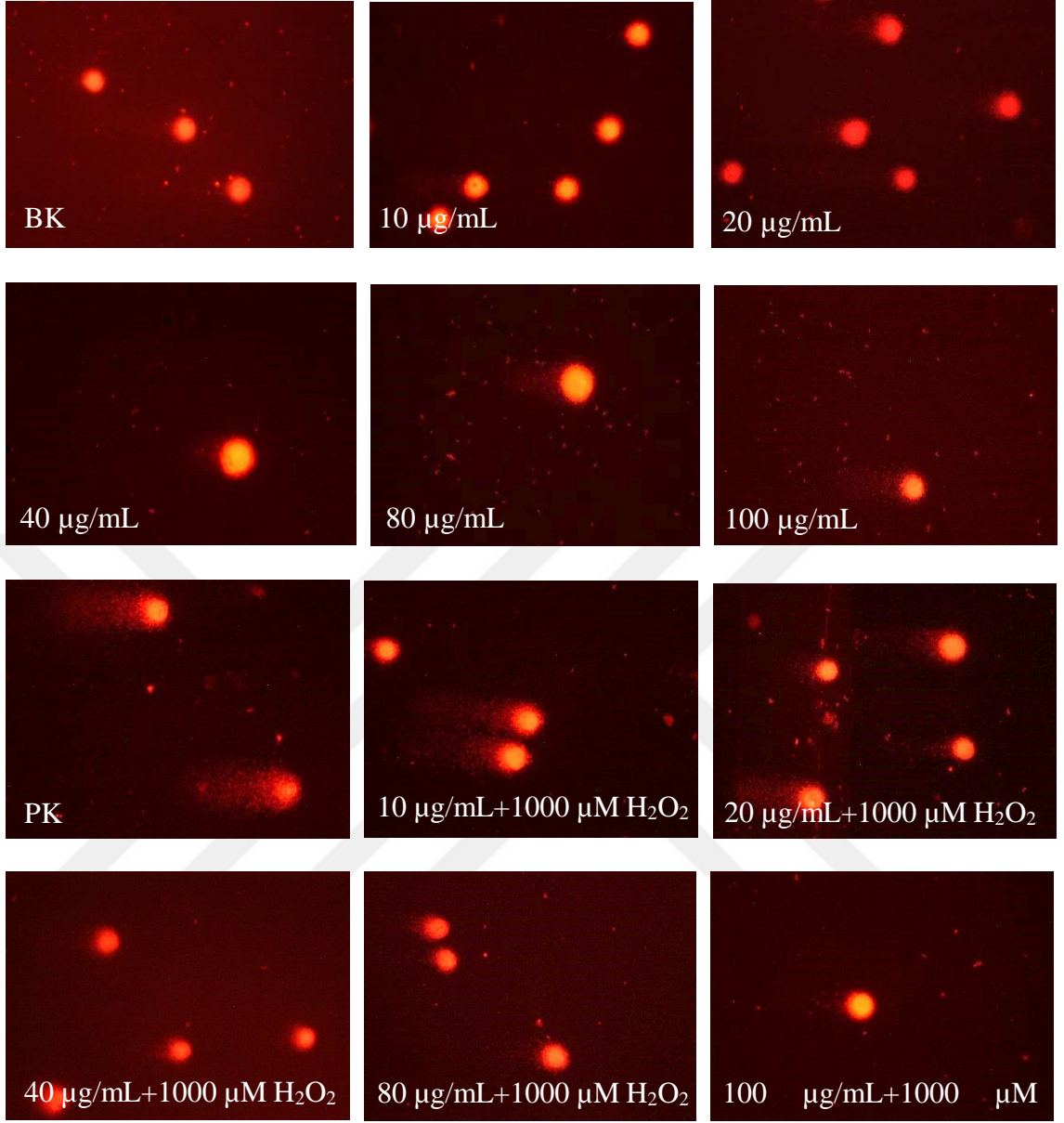
*Anemone* ekstraktının tüm dozları kombine bir şekilde A549 hücrelerine  $1000 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  ile birlikte uygulanıp pozitif kontrol  $1000 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  ile karşılaştırıldığında ekstraktın  $20 \mu\text{g/mL}$ 'den itibaren tüm dozlarda  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile indüklenen olive kuyruk momenti oranlarını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı gözlenmiştir ( $p \leq 0,01$ ;  $p \leq 0,001$  Şekil 4.16).



**Şekil 4.16.** *Anemone blanda* bitki ekstraktının çeşitli dozlarına maruz bırakılan A549 hücre hattında pozitif kontrole göre değerlendirilen olive kuyruk moment oranları; \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$



**Şekil 4.17.** Beas-2B sağlıklı akciğer epitel hücre hattında görsellerdeki konsantrasyonlarda floresan mikroskop altında komet görüntüleri



**Şekil 4.18.** A549 akciğer karsinoma hücre hattında görsellerdeki konsantrasyonlardaki floresan mikroskop altında komet görüntüleri

#### 4.4. ROS testi bulguları

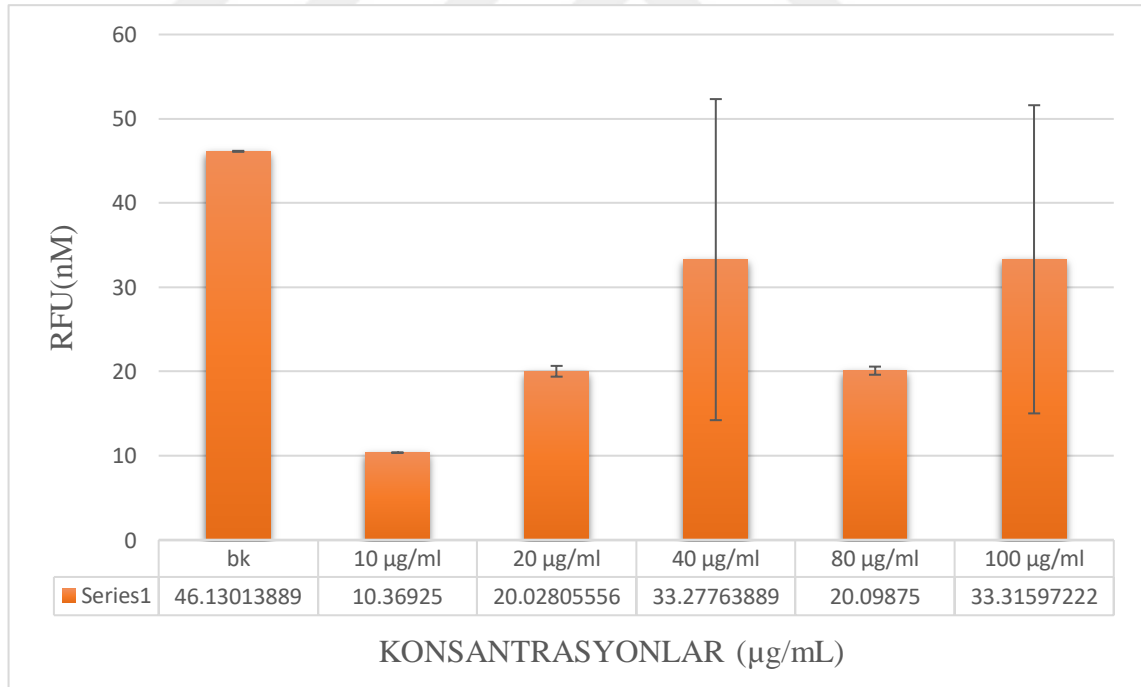
Çizelge 4.7. ROS testi sonuçları

| DOZLAR   | BEAS-2B HÜCRE<br>ROS DÜZEYLERİ<br>(RFU birimi) | A549 HÜCRE ROS<br>DÜZEYLERİ (RFU<br>birimi) |
|--|--|---|
| Büyüme kontrol   | 46,13 ± 0,06                                   | 19,17 ± 0,02                                |
| 10 µg/mL   | 10,37 ± 0,02                                   | 7,11 ± 0,01                                 |
| 20 µg/mL   | 20,03 ± 0,64                                   | 14,32 ± 0,03                                |
| 40 µg/mL   | 33,28 ± 19,05                                  | 16,06 ± 0,02                                |
| 80 µg/mL   | 20,10 ± 0,48                                   | 13,05 ± 0,02                                |
| 100 µg/mL  | 33,32 ± 18,29                                  | 13,35 ± 0,02                                |
| Pozitif kontrol (1000 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | 156,16 ± 0,08                                  | 86,99 ± 0,002                               |
| 10 µg/mL + 1000 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>         | 45,66 ± 0,01                                   | 44,09 ± 0,01                                |
| 20 µg/mL + 1000 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>         | 92,29 ± 0,05                                   | 50,95 ± 0,01                                |
| 40 µg/mL + 1000 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>         | 115,77 ± 0,05                                  | 74,56 ± 0,02                                |
| 80 µg/mL + 1000 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>         | 156,41 ± 0,08                                  | 83,36 ± 0,05                                |
| 100 µg/mL + 1000 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>        | 168,47 ± 0,17                                  | 100,39 ± 0,005                              |

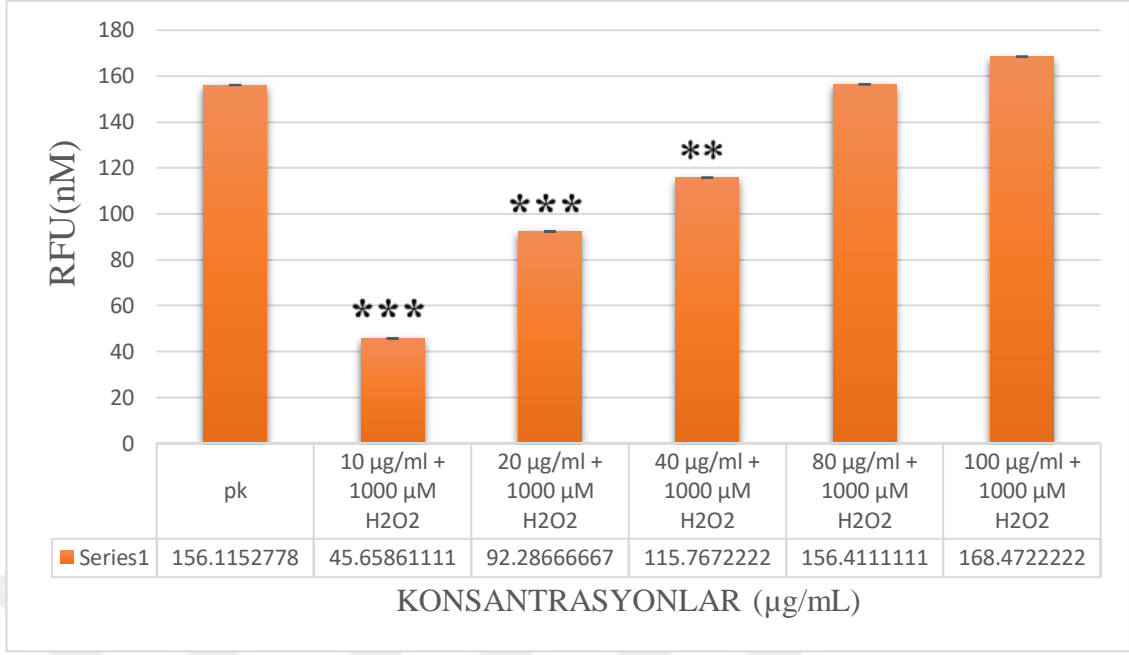
#### 4.4.1 Beas-2B hücre hattında *Anemone blanda* bitki ekstraktı için elde edilen ROS bulguları

*Anemone blanda* ekstraktı Beas-2B hücre hattında farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır, RFU cinsinden hücre içi ROS seviyeleri ve standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.7).

24 saatlik ROS test uygulaması sonuçları Şekil 4.19. ve Şekil 4.20.'de verilmiştir. 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 80 µg/mL ve 100 µg/mL'lik konsantrasyon grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında konsantrasyon artışına göre ortalama hücre içi ROS seviyesinde istatistikî olarak anlamlı bir değişiklik görülmemiştir (Şekil 4.19). 10 µg/mL+1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 20 µg/mL+1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 40 µg/mL+1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 80 µg/mL+1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 100µg/mL+1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'lik konsantrasyon grupları pozitif kontrol (1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile karşılaştırıldığında *Anemone* ekstraktının ortalama hücre içi ROS seviyesini 40 µg/mL dozdan itibaren istatistikî olarak anlamlı şekilde azalttığı görülmüştür (p≤0,01; p≤0,001; Şekil 4.20).



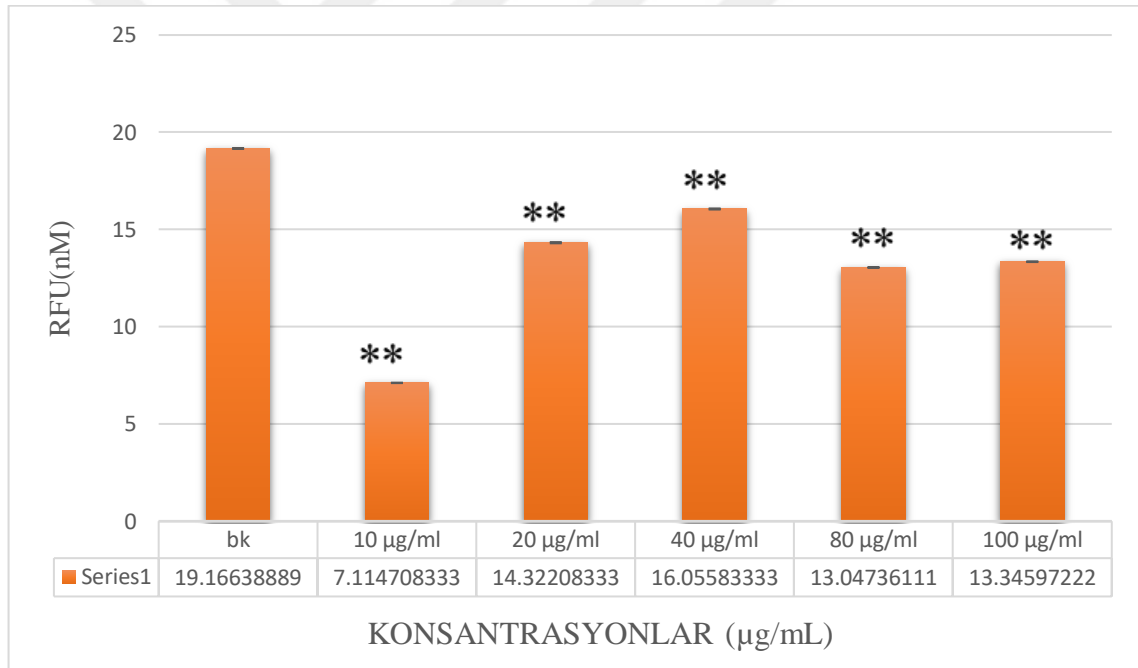
**Şekil 4.19.** *Anemone blanda* ekstraktına maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında büyüme kontrole göre değerlendirilen hücre içi reaktif oksijen seviyeleri



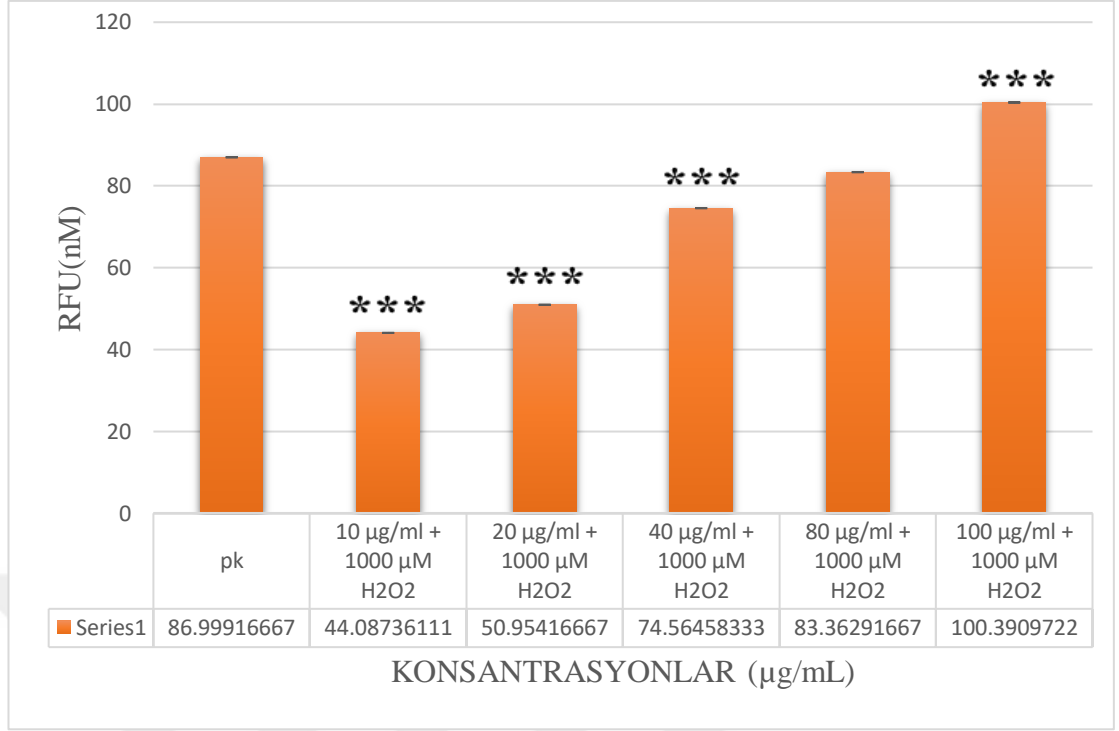
**Şekil 4.20.** *Anemone blanda* ekstraktının farklı dozları ile 1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e birlikte maruz bırakılan Beas-2B hücre hattında pozitif kontrole göre değerlendirilen hücre içi reaktif oksijen seviyeleri; \*\*p≤0,01, \*\*\* p≤0,001

#### 4.4.2. A549 hücre hattında *Anemone blanda* bitki ekstraktı için elde edilen hücre içi ROS bulguları

*Anemone blanda* ekstraktı A549 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır ve RFU cinsinden hücre içi ROS seviyeleri ile standart sapmaları hesaplanmıştır (Çizelge 4.7). ROS testi sonuçları Şekil 4.21. ve Şekil 4. 22.'de verilmiştir. Büyüme kontrol ile karşılaştırıldığında tüm konsantrasyon grupları ortalama hücre içi ROS seviyesini istatistikî olarak anlamlı şekilde düşürmüştür ( $p \leq 0,01$ ;  $p \leq 0,001$  Şekil 4.21). 10  $\mu\text{g/ml} + 1000 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ , 20  $\mu\text{g/ml} + 1000 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  ve 40  $\mu\text{g/ml} + 1000 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  kombine dozları pozitif kontrol grubu ( $1000 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ )'na göre hücre içi ROS seviyesini istatistiksel anlamlı olarak düşürürken 100 $\mu\text{g/ml} + 1000 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ 'lik kombine dozda ekstraktın  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in etkisini arttırarak hücre içi ROS seviyesini istatistikî olarak anlamlı şekilde arttırdığı görülmüştür ( $p \leq 0,001$ ; Şekil 4.22).



**Şekil 4.21.** *Anemone blanda*'nın ekstraksiyonuna maruz bırakılan A549 hücre hattında, ROS testi ile belirlenen büyüme kontrole göre değerlendirilen hücre içi reaktif oksijen seviyeleri; \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$



**Şekil 4.22.** *Anemone blanda* ekstraktına maruz bırakılan A549 hücre hattında, ROS testi ile belirlenen pozitif kontrole göre değerlendirilen hücre içi reaktif oksijen seviyeleri; \*\*\*  $p \leq 0,001$

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanser, hücrelerde olması gerektiği gibi gerçekleşen düzenleme, çoğalma, farklılaşma gibi olayların olağan durumun dışına çıkması, yoldan sapması sonucu oluşur. Büyüme sinyallerinde öz etkinlik, büyümeyi önleyici sinyallere karşı duyarsızlık, programlanmış hücre ölümünden kaçınma ve sınırsız metastaz potansiyeline sahip olma hücre ölümsüzlüğüne ve kansere yol açmaktadır (Salari ve ark. 2022). Kanser, dünya çapında her sekiz ölümden birinden sorumludur ve farklı epidemiyoloji ve risk faktörlerine sahip 100'den fazla farklı hastalığı kapsar. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde her yıl dokuz milyon yeni kanser vakası tespit edilmektedir (Salari ve ark. 2022).

Akciğer kanseri, hem erkekleri hem de kadınları etkileyen dünyadaki en yaygın ölümcül kanserlerden biridir. Dünya çapında, her yıl yaklaşık 1,8 milyon yeni vaka ve 1,6 milyon ölüm vardır Akciğer kanserinde, ortalama 5 yıllık sağ kalım oranı yaklaşık olarak %19 olarak rapor edilmiştir. Cerrahi rezeksiyon ile tedavi edilebilir olduğundan bu kanser türünün ölüm oranı geç evrelere kıyasla erken evrelerde çok daha düşüktür. (Ramaswamy 2022). Akciğer kanseriyle tütün içimi güçlü bir şekilde bağlantılıdır. Yapılan araştırmalarda akciğer kanserindeki artış 1800'lerin sonlarında ve 1900'lerde tütün içimindeki artışa paralel seyretmektedir (Ramaswamy 2022).

Mevcut kanser tedavileri düşük etkinlik ve güvenliğe sahip olduğundan, daha etkili ve farmakotoksikolojik olarak tanımlanmış ilaçların keşfedilmesi önemli bir hal almıştır. Ek olarak, antikanser ajanlara karşı hızlı direnç gelişimi ve bunların istenmeyen yan etkileri, tedavi edilemeyen kanserlere karşı aktif hale gelebilecek yeni anti-tümör ilaçlara olan talebi arttırmaktadır (Miri ve ark. 2022). Doğal ürünler, özellikle şifalı bitkiler, kanser dahil birçok hastalığın tedavisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır. Araştırmalar kanseri tedavi etmek için kullanılan 3000'den fazla bitki türü olduğunu göstermektedir (Salari ve ark. 2022). Antioksidanlar açısından zengin besinlerin kanser türleri üzerinde engelleyici etkileri olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Deledda ve ark. 2021). Birkaç çalışma, diyetteki fitokimyasallar ile kanseri önleme arasında bir ilişki olduğunu öne sürmektedir (Salari ve ark. 2022). Deneysel kanıtlara göre, birçok fitokimyasalın düşük toksisite ile antikanser aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Salari ve ark. 2022). Tüm bunlar dikkate alındığında, doğal bileşikler daha çok önem kazanmıştır (Miri ve ark. 2022).

Doğal ürünler, kanser tedavisinde ya alternatif olarak ya da diğer anti-tümör tedavilerine tamamlayıcı bileşikler olarak kullanılabilir.

Aromatik ve tıbbi bitkiler, sayısız sağlık ve iyileştirici özellikleri nedeniyle çeşitli uygarlıklarda kullanılmıştır. Aromatik ve tıbbi bitkiler 2000 yıldan daha uzun süredir özellikle Çin tıbbında kullanıldığına dair veriler mevcuttur. Kullanılabilirlikleri, satın alma bilirlikleri ve güvenilir olmalarıyla aromatik ve tıbbi bitkiler bugün hala birçok farklı alanda ve ülkede kullanılmaktadır (Ibourki ve ark 2022). Tıpta, bronşit ve ülserlere karşı antiskorbutik, antispazmodik, tonik, gaz giderici, idrar söktürücü, sindirim uyarıcı, anti-inflamatuar, antimikrobiyal, antioksidan ve antikanserojenik ajanlar olarak kullanılmaktadırlar (Mueller ve ark. 2010). Benzer şekilde, aromatik ve tıbbi bitkiler, yeni ilaçlar geliştirmek için büyük bir potansiyele sahip olan biyolojik olarak aktif bileşiklerin iyi bir kaynağıdır ve bitki türevi ilaçlar halihazırda kullanılmaktadır (Ibourki ve ark 2022).

Tez çalışmamızda Bursa Orhaneli Sadağ Kanyonu'nda yayılış gösteren *Anemone blanda* bitkisinin çeşitli kısımlarından elde edilen ekstraktının Beas-2B insan sağlıklı bronşiyal epitel hücre hattı ile A549 insan akciğer kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri XTT ve klonojenik test ile değerlendirilmiştir. Her iki test sonucunda *Anemone* bitki ekstraktı A549 insan akciğer epitel karsinom hücrelerinde doza bağlı olarak sitotoksik etki göstermiş, ancak sağlıklı akciğer fibroblast hücrelerinde de kanser hücrelerine yakın bir sitotoksik etki yaptığı belirlenmiştir. Bu durumda *Anemone* bitki ekstresinin sağlıklı ve kanserli hücre arasında seçici bir etkisi olmadığını düşünmekteyiz.

Farklı türlerde *Anemone* türü bitkileri ile yapılan çeşitli sitotoksisite çalışmaları incelendiğinde Wang ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada *Anemone katayensis* bitkisinden izole ettikleri fraksiyon ve bileşiklerin antikanser, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini değerlendirmesini gerçekleştirmişlerdir. Ekstraktlardan 14 bileşik izole edilmiş ve bunların anti kanser aktiviteleri MTT testi ile belirlenmiştir. Yapılan deneyde insan meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231) kullanılmıştır. Gerçekleştirilen test sonucuna göre insan meme kanseri üzerinde fraksiyonların inhibisyon aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen fraksiyonlar arasında en etkin şekilde etki eden fraksiyon 6 inhibisyon yüzdesi %50,32 olarak ortaya konmuştur (Wang ve ark. 2012).

Yine Wang ve ark (2013) gerçekleştirdikleri bir çalışmada, *Anemone taipaiensis*'in rizomları ile n-BuOH ekstraksiyonu oluşturulmuş ve fitokimyasal olarak değerlendirildiğinde dört saponin (4-7) ile üç yeni oleanane tipi triterpenoid saponin (1-3) belirlenmiştir. Bu elde edilen bileşikler 4 farklı hücre hattında değerlendirilmiştir; A549 (insan akciğer karsinomu), HeLa (insan servikal karsinom), Hep-G2 (insan hepatoselüler karsinom), HL-60 (insan promyelositik lösemi) ve U87MG (glioblastoma). Monodesmosidik saponin 4, 6,42 ile 18,16  $\mu\text{M}$  arasında değişen IC50 değerlerinde sitotoksik aktivite sergilediği belirtilmiştir. Bu değerler çalışmamızdaki IC50 değerleri ile uyumlu görünmektedir.

Lv ve ark. (2016) yaptığı bir başka çalışmada ise, *Anemone amurensis*, bitkisinin rizom kısmı %70'lik etanol ile ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu bileşik HPLC'de saflaştırılarak birleşik 1 ve 2 elde edilmiş ve bu bileşiklerin sitotoksikite etkinlikleri araştırılmıştır. Sitotoksikite etkinliğini belirlemek için MTT test yöntemi ve insan kanser akciğer hücre hattı (A549) ile insan hepatokarsinom hücre hattı (Hep-G2) kullanılmıştır. Yapılan test sonucunda bileşik 2, sırasıyla A549'da 38.53 ve Hep-G2'de 66.17  $\mu\text{M}$  IC50 değerleri ile güçlü sitotoksikite gösterirken, bileşik 1'in, IC50>100  $\mu\text{M}$  olduğu belirtilmiştir.

Genelde literatürde ekstraktın total olarak kullanımından ziyade içerdiği önemli saponinler izole edilerek sitotoksik aktiviteleri belirlenmeye çalışılmıştır. Tez çalışmamızda ekstraktın içerik analizini yaptırılmamız mümkün olmamıştır. Ancak elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde sonraki aşamada uygun bir proje kapsamında içerik analizi de gerçekleştirilip etken maddelerin ayrı ayrı etkilerinin değerlendirilmesi düşünülmektedir.

*Anemone* bitkisinin ekstraktı ile gerçekleştirilen ve tek ve çift iplik DNA hasarı oluşturma potansiyelini anlamamızı sağlayan komet testi sonuçlarını incelediğimizde Beas-2B sağlıklı akciğer epitel hücreleri üzerine bu bitkinin düşük dozlarda (10 ve 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) DNA hasarı oluşturmadığı ancak 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve üzeri dozlarda genotoksik etki gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu bitki ekstraktının komet testinde pozitif kontrol olarak da kullanılan ama aynı zamanda güçlü bir oksidatif hasar oluşturucu ajan olan  $\text{H}_2\text{O}_2$  tarafından oluşturulan DNA hasarını önleyici etkisi de değerlendirilmiş ve Beas-2B hücrelerinde en düşük dozdan itibaren DNA hasar oranını azalttığı ortaya konmuştur.

Bu durum *Anemone* bitki ekstraktındaki önemli saponin ve diğer fenolik bileşenlerin güçlü anti-genotoksik etkisi olduğu şeklinde yorumlanabilir.

Çalışmada elde ettiğimiz ekstraktın A549 akciğer karsinom hücreleri üzerindeki DNA hasarı oluşturma etkisi komet testi ile incelendiğinde benzer şekilde 10 ve 20 µg/mL gibi düşük konsantrasyonlarda DNA hasarına sebep olmadığı ancak 40 µg/mL ve üzeri yüksek konsantrasyonlarda genotoksik etki gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu durumda *Anemone* bitkisi ekstresinin yüksek konsantrasyonlarının A-549 akciğer karsinom hücrelerinde genotoksik etkisi sebebiyle hem anti-kanser etki oluşturduğu hem de hücreleri apoptoza yönlendirebileceği düşünülebilir. Ancak bu ekstrakt Beas-2B sağlıklı akciğer epitel hücreleri üzerinde de aynı etkiyi gösterdiği için sadece bu hücreler üzerinde selektif bir etkisi olmadığı anlaşılmaktadır (aynı dozlarda sağlıklı hücreyi korurken kanserli hücreleri öldürebilme etkisi). *Anemone* bitkisi ekstraktının A-549 akciğer karsinom hücrelerinde komet testi kapsamında etkisi değerlendirildiğinde bu kez 20 ve/veya 40 µg/mL' lik konsantrasyondan başlayarak güçlü oksidatif ajan olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından oluşturulan DNA hasarını önleyici etki gösterdiği belirlenmiştir. Buna göre karsinom hücreleri söz konusu olduğunda ekstrakt ve içindeki etken maddelerin ancak yüksek konsantrasyonlarda anti-oksidan etki ortaya koyabildiği düşünülmektedir.

Hücre ölümüne yol açan mekanizmalardan biri hücre içerisinde serbest oksijen radikallerinin artmasıdır. Tez çalışmamızda *Anemone blanda* ekstraktı muamelesi ile Beas-2B ve A549 hücrelerinde artan serbest radikal seviyeleri DFCH-DA maddesi kullanılarak yapılan ROS testi ile belirlenmeye çalışılmıştır. 24 saatlik uygulama sonunda hücre içi reaktif oksijen miktarları ölçülmüştür. *Anemone* bitki ekstresi Beas-2B sağlıklı akciğer hücrelerinde büyüme kontrole göre hücre içi ROS değerlerinde bir değişim oluşturmamış ancak oksidan etkili H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen yüksek hücre içi ROS değerlerini 10 µg/mL kontrol düzeyine düşürmüştür. Ancak sonraki yüksek konsantrasyonlarda (40-100 µg/mL) ekstrakt ve içerdiği etken maddelerin olası oksidan potansiyelleri sebebiyle hücre içi ROS değerleri tek başına H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in oluşturduğu seviyenin üzerine yükselmiştir. Çalışmada elde ettiğimiz bu sonuçlar *Anemone* bitki ekstresinin düşük dozlarda anti-oksidatif yüksek dozlarda ise pro-oksidan ya da oksidan etki gösterdiğini düşündürmektedir.

Pirvu ve ark. (2022), yaptıkları çalışmada, *Anemone nemorosa* bitkisinin toprak üstü kısımları kullanarak iki ayrı ekstraksiyon (su ve etanol) yapılmıştır. İnsan kolon adenokarsinom hücre hattı olan Caco-2 üzerinde polifenol profilini, antioksidan aktiviteyi, sitotoksik ve antiproliferatif aktiviteyi ortaya çıkarmak için gerçekleştirilen bu çalışmada bitki ekstraktının yüksek antioksidan etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Pirvu ve ark. 2022).

*Anemone raddeana* rizomundan elde edilen total saponinin düşük dozlarda MCF-7 meme kanser hücreleri üzerindeki hücre içi ROS düzeylerini anlamlı oranda düşürdüğü ortaya konmuştur (Zhang ve ark. 2020). Çalışmamızdaki *Anemone* ekstraktının da benzer şekilde düşük dozda hücre içi ROS seviyesini düşürdüğünü belirlemiş bulunmaktayız.

Sonuç olarak *Anemone blanda* ekstraktının antikanser potansiyellerini araştırmak amacıyla Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü Hücre Kültürü ve Genetik Toksikoloji Laboratuvarında yürütülen bu ön çalışmada, sitotoksik ve yüksek dozlarda genotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, sağlıklı ve kanser hücre hatlarındaki etki açısından anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenirken çalışmamızda kullanılan *Anemone blanda* ekstraksiyonu total olarak elde edildiği şekilde kullanılmıştır. Bu ekstraktın biyokimyasal içeriklerinin detaylı şekilde belirlenmesi ve ilave test yöntemleri ile hücre hatlarının kullanılacağı yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir. Böylece *Anemone blanda*'dan izole edilebilecek çeşitli etken maddelerin kanser ve sağlıklı hücreler üzerindeki olası seçici sitotoksik ve genotoksik etkilerinin ve bu etkilere ait mekanizmalarının daha detaylı bir biçimde ortaya konulması mümkün olabilecektir.

## KAYNAKLAR

- Adışen, E., Gürer, M.A. (2007). Bazal Hücreli Karsinom. *Türkiye Klinikleri*, J Int Med Sci;3(22):10-9.
- Akça, Ç. (2015). Eşek sütünün sitotoksik ve genotoksik etkilerinin kanserli ve sağlıklı insan akciğer hücre hatları üzerine karşılaştırmalı olarak araştırılması. Yüksek lisans tezi, BUÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Biyoloji Bölümü.
- Aktaş, S.H. (2010). Kemoterapinin Kolon Kanseri, Meme Kanseri ve Mide Kanserinde Vegf Düzeylerine Etkisinin İn Vivo ve İn Vitro İncelemesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Avni, G., Desai, Ghulam, N., Qazi, Ramesh, K., Ganju, Mahmoud, El-Tamer, Jaswant Singh, Ajit, K., Saxena, Yashbir, S., Bedi, Subhash, C., Taneja, and Hari, K. Bhat. (2008). *Medicinal Plants and Cancer Chemoprevention*. September. 9(7): 581–591.
- Bakar, C. (2017). Dünyada ve Türkiye'de Kanser Epidemiyolojisi. *Türkiye Klinikleri*, 2(2):49-59.
- Balick, M. J., and Cox, P. A. (1996). *Plants, People, and Culture: the Science of Ethnobotany*. New York: Scientific American Library
- Balunas, M. J., and Kinghorn, A. D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci*. 78, 431–441. doi: 10.1016/j.lfs.2005.09.012
- Bray, F., Ferlay, J., and Soerjomataram, I. 2018. Global cancer statistics (2018). Globocan estimates of incidence and mortality world wide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer Clin.* 68 394–424 <https://doi.org/10.3322/caac.21492> PMID: 30207593
- Bray, F., Ren, J.S., Masuyer, E., Ferlay, J. (2013). Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in. *Int. J. Cancer* 132(5), 1133–1145.
- Brennan, P., Hainaut, P., and Boffetta, P. (2011). Genetics of lung-cancer susceptibility. *Lancet Oncol.* 12 399–408 [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70126-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70126-1).
- Butler, M. S. (2004). The role of natural product chemistry in drug discovery. *J. Nat. Prod.* 67, 2141–2153. doi: 10.1021/np040106y
- Da-Cheng, Hao, N., XiaojieGua, PeigenXiaob, N. (2016). *Anemone* medicinalplants: ethnopharmacology, phytochemistryandbiology. *Acta Pharmaceutica Sinica B*;7(2):146–158
- Deledda, A., Annunziata, G., Tenore, G.C., Palmas, V., Manzin, A., Velluzzi, F. (2021). Diet-derivedantioxidantsandtheir role in infammation, obesityand gut microbiota modulation. *Antioxidants* 10(5):70.

Dikilitaş, M., Koçyiğit, A. (2010). Canlılarda “Tek Hücre Jel Elektroferez” Yöntemi ile DNA Hasar Analizi (Teknik Not): Comet Analiz Yöntemi. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 14(2):77-89.

Ehrendorfer, F., Svetlana, N.Z., Christiane, K., Carl, S., Keener, Bryan E. Dutton, Olga, N. Tsarenko, Elena, V., Bulakh, Monica Boşcau, Frederic, M., Arndt, K. (2009). Taxonomic revision, phylogenetics and transcontinental distribution of *Anemone* section *Anemone* (*Ranunculaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, Volume 160, Issue 3, Pages 312–354.

Elbaz, H. A., Stueckle, T. A., Tse, W., Rojanasakul, Y., and Dinu, C. Z. (2012). Digitoxin and its analogs as novel cancer. *Exp. Hematol. Oncol.* 1, 4. doi: 10.1186/2162-3619-1-4

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

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Filho J.C.C., Sarria, A.L.F., Becceneri, A.B., Fuzer, A.M., BatalhãoJR, da Silva, C.M.P. (2014). Copper (II) and 2,2'-Bipyridine Complexation Improves Chemopreventive Effects of Naringenin against Breast Tumor Cells. *PLoS ONE* 9(9): e107058.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M. et al. Globocan. (2013). v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11. *International Agency for Research on Cancer*, Lyon, France.

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

Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., Van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 339p.

Fridlender M, Kapulnik Y and Koltai H (2015) Plant derived substances with anti-cancer activity: from folklore to practice. *Front. Plant Sci.* 6:799. doi: 10.3389/fpls.2015.00799

Gilliland, F.D., Samet, J.M. (1994). Lung cancer. *Chest Journal.* 20: 175–195.

Goldman, P. (2001). Herbal medicines today and the roots of modern pharmacology. *Ann. Intern. Med.* 135, 594–600. doi: 10.7326/0003-4819-135-8\_Part\_1-200110160-00010

Gordaliza, M. (2007). Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin. Transl. Oncol.* 9, 767–776. doi: 10.1007/s12094-007-0138-9

Halberstein, R.A. 2005. Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. *Ann Epidemiol.* 15: 686–699.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144: 646-674.

- Hao, D.C., Gu, X., Xiao, P. (2017). Ethnopharmacology, phytochemistry and biology Anemone. *Medicinal plants*. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.12.001>
- Hao, D.C., Gu, X.J., Xiao, P.G., Peng, Y. (2013). Chemical and biological research of Clematis medicinal resources. *ChinSciBull*; 58:1120–9.
- Harris, J.R., Morrow, M., Banadonna, G. (1993). Cancer of the breast. *Principles and Practice of Oncology*. 4: 1264-1332.
- Herbst, R., Heymach, J., and Lippman, S.M. (2008). Molecularorigins of cancer (lung cancer) *N Engl J Med*.359 1367 1380 <https://doi.org/10.1056/NEJMra0802714> PMID: 18815398.
- Hoyert, D.L., Heron, M.P., Murphy, S.L., Kung, H.C. (2006). *Natl. Vital Stat. Rep*; 54(13):1–120. [PubMed: 16689256].
- Ibourki, M.M., Bouzid, H.A., Bijla, L., Sakar, E.H., Asdadi, A., Laknifi, A., Hammadi, A.E., Gharby, S. (2022). Mineral Profiling of Twenty Wild and Cultivated Aromatic and Medicinal Plants Growing in Biological Trace Element Research, <https://doi.org/10.1007/s12011-021-03062-w>.
- Kanwal, M., Ding, X., and Cao, Y. (2017). Familial risk forlung cancer *Oncol Lett* 13 535542 <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5518> PMID: 28356926 PMCID: 5351216.
- Kendler, B.S. 1987. Garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*): A review of their relationship to cardiovascular disease. *Prev Med.*,16: 670–685.
- Kinghorn, A. D. (2001). Pharmacognosy in the 21st century. *J. Pharm. Pharmacol.* 53, 135–148. doi: 10.1211/0022357011775334
- Kocaoğlu, E. (2014). Kinik asidin sitotoksik / genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin sağlıklı akciğer epitel hücre hatlarında belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, BUÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Biyoloji Bölümü.
- Kumbıçak, Ü. (2013). Bakır çinko alaşım nanopartiküllerinin in vitrositotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, BUÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Biyoloji Bölümü.
- Li, W. (2002). Botanical Drugs: The Next New New Thing? Available at: <http://nrs.harvard.edu/urn-3:HUL.InstRepos:8965577> (accessed September 26, 2015)
- Lv, C.N., Li, Y.J., Wang, J., Qin, R.L., Lei, T.L., Lu, J.C. (2016). Chemical constituents from rhizome of *Anemone amurensis*. *Journal of asian batural products research*.10.1080/10286020.2016.1142974.

Menger, L., Vacchelli, E., Kepp, O., Eggermont, A., Tartour, E., Zitvogel, L., et al. (2013). Trial watch: cardiac glycosides and cancer therapy. *Oncoimmunology* 2, e23082. doi: 10.4161/onci.23082

Miri, M.R., Zare, A., Saberzadeh, J., Baghban, N., Nabipour, I., Tamadon, A. (2022). Anti-lung Cancer Marine Compounds: A Review Therapeutic. *Innovation & Regulatory Science*, 56:191–205 <https://doi.org/10.1007/s43441-022-00375-3>.

Motadi, L.R., Misso, N.L., Dlamini, Z., Bhoola, K.D. (2007). Molecular genetic and mechanisms of apoptosis in carcinomas of the lung and pleura: Therapeutic targets. *International Immunopharmacology*, 14: 1934–1947.

Mueller, M., Hobiger, S., Jungbauer, A. (2010). Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *FoodChem* 122:987–996.

Nam, J.S., Sharma, A.R., Nguyen, L.T., Chakraborty, C., Sharma, G., Lee, S.S. (2016). Application of bioactive quercetin in oncotherapy: from nutrition to nanomedicine. *Molecules*; 21: E108.

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

Newman, D. J., Cragg, G. M., and Snader, K. M. (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.* 17, 215–234. doi: 10.1039/a902202c

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

Olive PL, Banath JP, Durand RE. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “Comet” assay. *Radiat Res* 1990; 122:86–94.

Özercan, İ. H., Şimşek, S. (2017). “Akciğer Kanserinin Histopatolojik Özellikleri. *Turkiye Klinikleri*, 8(1):14-8.

Patwardhan, B., Warude, D., Pushpangadan, P., and Bhatt, N. (2005). Ayurveda and traditional Chinese medicine: a comparative overview. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2, 465–473. doi: 10.1093/ecam/neh140

Pitot, H.C., Goldsworthy, T., Moran, S. (2004). The natural history of carcinogenesis: Implications of experimental carcinogenesis in the genesis of human cancer. *Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry*; Volume 17, Issue 2, Pages 133–146. Published Online.

Ramaswamy, A. (2022). Lung Cancer Screening: Review and 2021 Update Current Pulmonology Reports, 11:15–28 <https://doi.org/10.1007/s13665-021-00283-1>.

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

Robinson, M. M., and Zhang, X. (2011). The World Medicines Situation 2011. Traditional Medicines: Global Situation, Issues and Challenges. Geneva: World Health Organization.

Salari, N., Faraji, F., Jafarpour, S., Faraji, F., Rasoulpoor, S., Dokaneheifard, S., Mohammadi, M. 2022. Anti-cancer Activity of Chrysin in Cancer Therapy. *Indian Journal of Surgical Oncology. a Systematic Review*. <https://doi.org/10.1007/s13193-022-01550-6>.

Samuelsson, G. (ed.). (2004). Drugs of Natural Origin: A Textbook of Pharmacognosy, 5th Edn. Stockholm: Swedish Pharmaceutical Press.

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

Shay, J. W., Zou, Y., Hiyama, E., & Wright, W. E. (2001). Telomerase and cancer. *Human Molecular Genetics*, 10(7): 677-685.

Smolle, E., and Pichler, M. (2019). Non-smoking-associated lung cancer: a distinct entity in terms of tumor biology, patient characteristics and impact of hereditary cancer predisposition. *Cancers (Basel)* 11(204) 1–13 <https://doi.org/10.3390/cancers11020204>.

Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., Yu, Q. (2015). Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular Cancer*. 10.1186/s12943-015-0321-5.

Sun, Y.X., Liu, J.C., Liu, D.Y. (2011). Phytochemicals and bioactivities of *Anemone raddeana* Regel: a review. *Pharmazie*; 66:813–21.

Şencan, İ., Keskinçilic, B. 2015. Türkiye Kanser İstatistikleri. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara.

Travis, W.D. (2011). Pathology of Lung Cancer. *Clinics in Chest Medicine*, 32: 669 692.

Troll, W., Wiesner, R. (1985). The role of oxygen radicals as a possible mechanism of tumor promotion. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 25:509-28.

Ünal, H., (2006). “Meme Kanserinin Tanı ve Tedavisinin Tarihsel Gelişimi”, İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Meme Kanseri Sempozyumu Dizisi No:54; 9-13.

V.T. L., Alencar, M.N., Formiga, ve V.C C. Lima. (2020). Inherited lung cancer: a review 14: 1008. Published online 2020 Jan 29. doi: 10.3332/ecancer.2020.1008JournalList. *E cancer medical science*, v.14; 2020, PMC703969.

Pirvu, L., Neagu, A., Pintilie, G., Pintilie, L. (2022). Studies on *Anemone nemorosa* L. extracts; polyphenols profile, antioxidant activity, and effects on Caco-2 cells by in vitro and in silico studies. *Open chemistry* 10.1515/chem-2022-0137.

Xiao, P.G., Wang, L.W., Lv, S.J., Qiu, G.S. (1986). Statistical analysis of the ethnopharmacologic data based on Chinese medicinal plants by electronic computer I. Magnoliidae. *Chin J Integr Trad West Med*; 6:253–6.

Xufan L, Wu J, and Zhou L, (2018). Smoker and non-smoker lung adenocarcinoma is characterized by distinct tumor immune micro environments. *Oncoimmunology* 7(10) 1–11 <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1494677>.

Yamagiwa, K., Ichikawa, K. (1918). Experimental Study of the Pathogenesis of Carcinoma. *J Cancer Res* 3:1-29.

Wang, J.L., Gong, W.Z., Wang, W., Qian Xu, D.T., Liu, M.F., Bi, K.L., Song, Y.F. (2012). Anticancer, antioxidant, and antimicrobial activities of *anemone* (*Anemone cathayensis*). *Food science and biotechnology*, 10.1007/s10068-012-0070-9.

Wang, X.Y., Zhang, W., Gao, K., Lu, Y.Y., Tang, H.F., Sun, X.L. (2013). Oleanane-type saponins from *Anemone taipaiensis* and their cytotoxic activities. *Fitoterapia*. 1016/j.fitote.2013.06.008

Yazılıtaş, D., Yazıcı, O., Demirci N.S. (2014). Nadir Görülen Sarkom Türleri Türkiye Klinikleri, *J Med Oncol-Special Topics*; 7(1):61-6.

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

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

Zhang D., Zhang Q., Zheng Y. (2020). Anti-breast cancer and toxicity studies of total secondary saponin from *Anemone raddeana* Rhizome on MCF-7 cells via ROS generation and PI3K/AKT/mTOR inactivation. *Journal of Ethnopharmacology*. doi: 10.1016/j.jep.2020.112984

Zou ZJ, Liu HX, Yang JS. (2004) Phytochemical components and pharmacological activities of the genus *Anemone*. *Chin Pharm J* 2004; 39:493–5.