

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

*Cyclamen graecum* ve *Cyclamen pseudibericum* BİTKİ  
TÜRLERİNİN EKSTRAKTLARININ AKTİF  
BİLEŞENLERİNİN KARAKTERİZASYONU VE  
ANTI-TÜMÖR ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EGE RIZA KARAGÜR

DENİZLİ, ARALIK - 2014

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



*Cyclamen graecum* ve *Cyclamen pseudibericum* BİTKİ  
TÜRLERİNİN EKSTRAKTLARININ AKTİF  
BİLEŞENLERİNİN KARAKTERİZASYONU VE  
ANTI-TÜMÖR ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EGE RIZA KARAGÜR

DENİZLİ, ARALIK - 2014

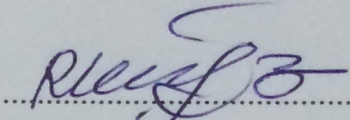
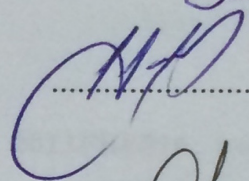
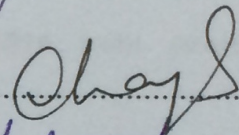
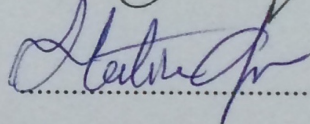
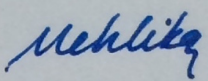
## KABUL VE ONAY SAYFASI

Ege Rıza KARAGÜR tarafından hazırlanan “*Cyclamen graecum* ve *Cyclamen pseudibericum* Bitki Türlerinin Ekstraktlarının Aktif Bileşenlerinin Karakterizasyonu ve Anti-tümör Özelliklerinin Belirlenmesi” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 26.12.2014 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Botanik Bilimi Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

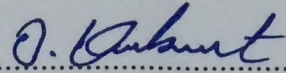
Jüri Üyeleri

İmza

Danışman  
Prof. Dr. Ramazan MAMMADOV  
Pamukkale Üniversitesi  
Eş Danışman  
Prof. Dr. Hakan AKÇA  
Pamukkale Üniversitesi  
Üye  
Prof. Dr. Olcay DÜŞEN  
Pamukkale Üniversitesi  
Üye  
Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ  
Sıtkı Koçman Üniversitesi  
Üye  
Yrd.Doç. Dr. Mehlika ALPER  
Sıtkı Koçman Üniversitesi

  
.....  
  
.....  
  
.....  
  
.....  
  
.....

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
14/01/2015. tarih ve .02/26..... sayılı kararıyla onaylanmıştır..

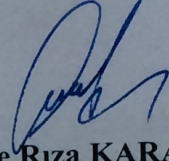
  
.....

Prof. Dr. Orhan KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**Bu tez çalışması BAP tarafından 2013FBE016 nolu proje ile desteklenmiştir.**

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



**Ege Rıza KARAGÜR**

## ÖZET

***Cyclamen graecum* ve *Cyclamen pseudibericum* BİTKİ TÜRLERİNİN  
EKSTRAKTLARININ AKTİF BİLEŞENLERİNİN  
KARAKTERİZASYONU VE ANTI-TÜMÖR ÖZELLİKLERİNİN  
BELİRLENMESİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
EGE RIZA KARAGÜR  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
BOTANİK BİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. RAMAZAN MAMMADOV)  
(EŞ DANIŞMAN: PROF. DR. HAKAN AKÇA)  
DENİZLİ, ARALIK - 2014**

Bu çalışmada *Cyclamen graecum* Link. ve *Cyclamen pseudibericum* Hildebr. (Primulaceae) tuber ve yapraklarından çeşitli çözücü ekstraktlarının (metanol, etanol, aseton ve dH<sub>2</sub>O) antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. *C. graecum* ve *C. pseudibericum*'un çeşitli ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ve FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) deneyleri ile değerlendirilmiştir. *C. graecum* yaprak dH<sub>2</sub>O ekstraktının süpürücülük aktivitesi *C. pseudibericum* yaprak dH<sub>2</sub>O ekstraktının aktivitesine göre daha etkin olduğu bulunmuştur. *C. graecum* tuber etanol ekstraktının demir indirgenme aktivitesi *C. pseudibericum* tuber etanol ekstraktının aktivitesine göre daha etkin olduğu bulunmuştur. Ek olarak *C. graecum* ve *C. pseudibericum* yaprak ve tuber ekstraktlarının toplam fenolik içerikleri gallik asit eş değerine göre belirlenmiştir. Antioksidan aktivite tayin yöntemlerinin birlikte değerlendirilmesiyle, antioksidan aktivite potansiyeli ve ekstraktların toplam fenolik içerikleri arasında güçlü bir korelasyon görülmüştür. *C. graecum* tuber ve yaprak ekstraktlarının çoğunda etkin bir serbest radikal süpürme aktivitesi saptanmıştır. *C. graecum* ve *C. pseudibericum*'un fenolik içerikleri YPSK ile analiz edilmiştir. Ferulik, kafeik ve gallik asit *C. graecum* ve *C. pseudibericum*'da en çok rastlanan fenolik bileşiklerdir. *C. graecum* ve *C. pseudibericum*'un tuberinden farklı çözücülerle elde edilmiş olan ekstraktların PC9, PC14 ve A549 akciğer kanser hücre hatları üzerinde antiproliferasyon aktiviteleri araştırılmıştır. Bu deney konsantrasyon bağımlı olarak 1 µg/ml den başlayıp 1000 µg/ml 'ye kadar devam edecek şekilde gerçekleştirilmiştir. Ekstraktlara göre konsantrasyonların IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır. *C. pseudibericum* dH<sub>2</sub>O ekstraktının PC9 hücre hattı üzerinde en yüksek antiproliferatif aktivitesi görülürken *C. pseudibericum* etanolik ekstraktının PC9 hücre hattı üzerinde en düşük antiproliferatif aktivitesi gösterdiği bulunmuştur. İnvazyon deneyine göre bütün ekstraktlar PC9, PC14 ve A549 hücre hatlarının invazyon yeteneğini inhibe etmiştir. Kat değişim analizi ile mikroRNA ekspresyon seviyeleri ölçüldüğünde,

miR-200c ekspresyonunun *C.pseudibericum* ekstraktı ile muamele edilmiş PC14 ve A549 hücre hatlarında belirgin bir şekilde artışı gözlemlenmiştir. Aynı zamanda miR-146 ekspresyonunun *C. graecum* ekstraktı ile muamele edilmiş PC14 ve A549 hücre hatlarında belirgin bir şekilde artışı gözlemlenmiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:** *Cyclamen*, DPPH, FRAP, YPSK, İnvazyon, miRNA, Sitotoksiste

## ABSTRACT

### CHARACTERIZATION OF ACTIVE COMPONENTS OF THE EXTRACTS OF *Cyclamen graecum* and *Cyclamen pseudibericum* PLANT SPECIES AND DETERMINATION OF THEIR ANTITUMOR PROPERTY

MSC THESIS

EGE RIZA KARAGÜR

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

BOTANY

(SUPERVISOR:PROF. DR. RAMAZAN MAMMADOV)

(CO-SUPERVISOR:PROF. DR. HAKAN AKÇA)

DENİZLİ, DECEMBER 2014

In this study, antioxidant activities of various solvent extracts (methanol, ethanol, acetone and dH<sub>2</sub>O) obtained from tubers and leaves of *Cyclamen graecum* Link and *C. pseudibericum* Hildebr (Primulaceae) were determined. Antioxidant properties of various extracts from *C. graecum* and *C.pseudibericum* were evaluated by using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) assays. The scavenging activity of *C. graecum* leaf-dH<sub>2</sub>O extract (85.13%) was found more effective than *C. pseudibericum* leaf-dH<sub>2</sub>O extract (74.61%). Ferric Reducing Antioxidant Power of *C. graecum* tuber-ethanol extract (2.731) was found more effective than *C. pseudibericum* tuber-ethanol extract (1.829). In addition, total phenolic contents in all the extracts of *C. graecum* and *C. pseudibericum* tubers and leaves were determined as gallic acid equivalents. When we evaluated the results obtained from antioxidant activity test systems together, we saw a strong correlation between the antioxidant activity potential and total phenolic contents of the extracts. Most of the extracts of *C. graecum* tubers and leaves had effective free radical scavenging activity. Phenolics contents of *C. graecum* and *C. pseudibericum* were also analyzed by HPLC. The most abundant phenolic compounds found in *C. graecum* and *C. pseudibericum* are ferulic, caffeic and gallic acids. The extracts obtained from tubers of *C. graecum* and *C. pseudibericum* by different solvent were investigated for its in vitro antiproliferative activities against lung cancer PC9, PC14 and A549 cells. The test were carried out concentration dependent assay starting from 1 µg/ml to 1000 µg/ml. Values for the concentration at which 50% inhibition occurred (IC<sub>50</sub>) were calculated for the extracts. While the highest antiproliferative activity was found in *C. pseudibericum* aqueous extract on PC9 cell lines, the lowest antiproliferative activity was found in *C. pseudibericum* ethanolic extract on PC9 cell lines. As for the invasion assay, all the extracts inhibited the invasion ability of PC9, PC14 and A549 cell lines. When we evaluated the miRNA expressions levels with fold change analysis. We determined that the expression levels of miR-200c significantly increased in PC14 and A549 cell lines when



*C. pseudibericum* extract treated. Also, Expression levels of miR-146 significantly increased in PC14 and A549 cell lines when *C. graecum* extract treated.

**KEYWORDS:** *Cyclamen*, DPPH, FRAP, HPLC, Invasion, miRNA, Cytotoxicity

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	v
ŞEKİL LİSTESİ .....	vii
TABLO LİSTESİ .....	ix
SEMBOL ve KISALTMA LİSTESİ.....	x
ÖNSÖZ.....	xi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Çalışmanın Amacı ve Önemi.....	4
1.2 Çalışma Materyalinin Botanik Özellikleri.....	5
1.2.1 Primulaceae Familyası ve <i>Cyclamen</i> cinsi.....	5
1.2.2 <i>Cyclamen graecum</i> Link.....	7
1.2.3 <i>Cyclamen pseudibericum</i> Hildebr.....	7
1.3 Bitkisel Sekonder Metabolitler.....	8
1.4 Serbest Radikaller.....	11
1.5 Antioksidanlar .....	11
1.5.1 Fenolik Bileşikler.....	14
1.5.1.1 Fenolik Asitler.....	15
1.5.1.2 Flavonoidler .....	16
1.5.2 Antioksidan Savunma Sistemleri.....	17
1.5.2.1 Endojen (doğal) Antioksidanlar .....	17
1.5.2.2 Eksojen Antioksidanlar (ilaçlar) .....	18
1.6 Kullanılmakta Olan Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri .....	18
1.7 <i>Cyclamen</i> Türleri ile Yapılan Bazı Çalışmalar.....	20
1.8 Kanser Tanımı .....	21
1.8.1 Çok Aşamalı Kanser Gelişim Süreci .....	22
1.8.2 Kanser Hücrelerinin Özellikleri.....	23
1.9 Akciğer Kanseri.....	23
1.9.1 Epidemiyolojisi.....	23
1.9.2 Etiyolojisi.....	24
1.9.3 Patolojik Sınıflandırma .....	27
1.9.3.1 Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK).....	27
1.9.3.2 Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK).....	27
1.10 İnvazyon ve Metastaz .....	28
1.11 Mikro RNA (miRNA) ve Biyosentezi.....	29
1.12 Mikro RNA (miRNA) ile Akciğer Kanseri Arasındaki İlişki .....	32
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>35</b>
2.1 Materyal.....	35
2.1.1 Bitkisel Materyal .....	35
2.2 Yöntemler.....	36
2.2.1 Bitkilerin Kurutulması ve Ekstraksiyon İşlemleri .....	36
2.2.2 Antioksidan Aktivite Analiz Yöntemleri.....	36
2.2.2.1 Serbest Radikal Giderim Aktivitenin Belirlenmesi.....	36

2.2.2.2 İndirgeme Gücü Kapasitesinin Belirlenmesi (FRAP Yöntemi) .....	38
2.2.3 Toplam Fenolik Bileşik Miktarının Belirlenmesi (Folin-Ciocalteu Yöntemi).....	38
2.2.4 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC/YPSK) ile Fenolik Bileşiklerin Analizi.....	39
2.2.5 Hücre Kültürleri Üzerindeki Sitotoksik İncelemeler .....	44
2.2.6 Hücre Kültürü .....	44
2.2.7 Proliferasyonun Saptanması .....	44
2.2.8 İnvazyonun Saptanması .....	45
2.2.9 MiRNA İzolasyonu.....	46
2.2.10 Eş Zamanlı PZR.....	48
2.2.11 Verilerin Değerlendirilmesi .....	52
<b>3. BULGULAR .....</b>	<b>53</b>
3.1 Antioksidan Aktivite Sonuçları .....	53
3.1.1 Serbets Radikal Giderim Aktivite Sonuçları .....	53
3.1.1.1 İndirgeme Gücü Kapasitesinin Belirlenmesi .....	57
3.2 Toplam Fenolik Madde Miktarı Sonuçları .....	60
3.3 İçerik Analiz Sonuçları.....	60
3.4 Hücre Kültürü Çalışma Sonuçları .....	66
3.4.1 Bitki Ekstraktlarının Proliferasyona Etkisinin Saptanması .....	66
3.4.1 Bitki Ekstraktlarının İnvazyona Etkisinin Saptanması .....	68
3.4.2 miRNA ekspresyon sonuçları .....	70
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR .....</b>	<b>74</b>
<b>5. KAYNAKLAR.....</b>	<b>92</b>
<b>6. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>106</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1: <i>C. graecum</i> bitkisi (web 1) .....	7
Şekil 1.2: <i>C. pseudibericum</i> bitkisi (web 2).....	8
Şekil 1.3: Sekonder metabolitlerin sentez yolları .....	9
Şekil 1.4: Fenolik asitlerin genel yapısı: a) Benzoik asit türevleri b) Sinamik asit türevleri (Shahidi F 2005) .....	16
Şekil 1.5: Flavonoidlerin genel yapısı (Shahidi F 2005).....	16
Şekil 1.6: miRNA oluşum yolağının şematik gösterimi (Wang 2010) .....	30
Şekil 1.7: Akciğer kanserogenezi'nin miRNA'lar ile ilişkisi .....	34
Şekil 2.8: DPPH antioksidan madde ile reaksiyonu.....	37
Şekil 2.9: Gallik asit kalibrasyon grafiği ( $y = 1,158x - 0,0027 R^2 =$ $0,9959$ ).....	39
Şekil 2.10: Basit bir Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi düzeneği.....	42
Şekil 2.11: Cytotox Glo kitinin canlı hücreler içindeki ATP molekülünü saptaması .....	45
Şekil 2.12: SYBR Green tekniği A. Başlangıç aşaması: Reaksiyonun başlangıcında ortamda SYBR Green, primerler ve tek zincirli DNA bulunduğu için floresans sinyal yoktur. B. Primerin hedef moleküle bağlanması: Primerin bağlanması ile amplifikasyon sonucu SYBR Green oluşan çift zincirli DNA'ya bağlanır ve az miktarda floresan sinyal açığa çıkar. C. Primer uzaması: Amplifikasyon oranına bağlı olarak çift zincirli DNA'nın yapısına daha fazla boya katılarak floresans sinyal artar. ....	49
Şekil 2.13: Erime eğrisi analizi .....	50
Şekil 2.14: PCR amplifikasyon eğrisi ve standart eğri. A. Standart dilüsyon örneklerinin amplifikasyon eğrisi ve Ct değerleri (mavi oklar) gösterilmiştir. Bir adet bilinmeyen örnek ve Ct değeri kırmızıyla gösterilmiştir. B. Standart örneklerin Ct değerleri kullanılarak çizilen standart eğri gösterilmiştir. Bilinmeyen örnek kırmızı ile ifade edilmiştir .....	52
Şekil 3.15: DPPH yöntemi ile <i>C. graecum</i> tuber ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda serbest radikal giderim kapasiteleri ( $p < 0,05$ ).....	54
Şekil 3.16: DPPH yöntemi ile <i>C. graecum</i> yaprak ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda serbest radikal giderim kapasiteleri ( $p < 0,05$ ).....	55
Şekil 3.17: DPPH yöntemi ile <i>C. pseudibericum</i> tuber ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda serbest radikal giderim kapasiteleri ( $p < 0,05$ ).....	56
Şekil 3.18: DPPH yöntemi ile <i>C. pseudibericum</i> yaprak ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda serbest radikal giderim kapasiteleri ( $p < 0,05$ ).....	57

Şekil 3.19: <i>C. graecum</i> ve <i>C. pseudibericum</i> tuber ekstraktlarının indirgeme güçlerinin karşılaştırılması.....	58
Şekil 3.20: <i>C. graecum</i> ve <i>C. pseudibericum</i> yaprak ekstraktlarının indirgeme güçlerinin karşılaştırılması.....	59
Şekil 3.21: YPSK'da <i>C. graecum</i> ve <i>C. pseudibericum</i> ekstraktları için kullanılan standartların kromatogramları.....	61
Şekil 3.22: <i>C. graecum</i> 'un kromatogramı.....	61
Şekil 3.23: <i>C. pseudibericum</i> 'un kromatogramı.....	62
Şekil 3.24: Farklı konsantrasyonlarda uygulanmış <i>C. graecum</i> ve <i>C. pseudibericum</i> ekstraktlarının PC9 hücrelerinin sağ kalımı üzerine etkisi ( $p<0,05$ ).....	66
Şekil 3.25: Farklı konsantrasyonlarda uygulanmış <i>C. graecum</i> ve <i>C. pseudibericum</i> ekstraktlarının PC14 hücrelerinin sağ kalımı üzerine etkisi ( $p<0,05$ ).....	67
Şekil 3.26: Farklı konsantrasyonlarda uygulanmış <i>C. graecum</i> ve <i>C. pseudibericum</i> ekstraktlarının A549 hücrelerinin sağ kalımı üzerine etkisi ( $p<0,05$ ).....	67
Şekil 3.27: <i>C. graecum</i> ve <i>C. pseudibericum</i> ekstraktlarının PC9, PC14 ve A549, hücrelerinin invazyon kapasitelerine etkisi ( $p<0,05$ ).....	69
Şekil 3.28: <i>C. graecum</i> tuber ekstraktı uygulanmış PC9 hücre hattında, miRNA ekspresyonları.....	70
Şekil 3.29: <i>C. pseudibericum</i> tuber ekstraktı uygulanmış PC9 hücre hattında, miRNA ekspresyonları.....	71
Şekil 3.30: <i>C. graecum</i> tuber ekstraktı uygulanmış PC14 hücre hattında, miRNA ekspresyonları.....	71
Şekil 3.31: <i>C. pseudibericum</i> tuber ekstraktı uygulanmış PC14 hücre hattında, miRNA ekspresyonları.....	72
Şekil 3.32: <i>C. graecum</i> tuber ekstraktı uygulanmış A549 hücre hattında, miRNA ekspresyonları.....	72
Şekil 3.33: <i>C. pseudibericum</i> tuber ekstraktı uygulanmış A549 hücre hattında, miRNA ekspresyonları.....	73

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

Tablo 1.1: Türkiyedeki <i>Cyclamen</i> türleri.....	5
Tablo 2.2: Bitkilerin toplandığı lokaliteler.....	35
Tablo 2.3: Kullanılan miRNA'ların erişim kodları ve hedef genleri.....	46
Tablo 3.4: DPPH yöntemi ile <i>C. graecum</i> tuber ekstraktlarının Serbest Radikal Giderim Kapasitelerinin % inhibisyonları.....	53
Tablo 3.5: DPPH yöntemi ile <i>C. graecum</i> yaprak ekstraktlarının Serbest Radikal Giderim Kapasitelerinin % inhibisyonları.....	54
Tablo 3.6: DPPH yöntemi ile <i>C. pseudibericum</i> tuber ekstraktlarının Serbest Radikal Giderim Kapasitelerinin % inhibisyonları.....	55
Tablo 3.7: DPPH yöntemi ile <i>C. pseudibericum</i> yaprak ekstraktlarının Serbest Radikal Giderim Kapasitelerinin % inhibisyonları.....	56
Tablo 3.8: <i>C. graecum</i> ve <i>C. pseudibericum</i> tuber ekstraktlarının ve BHT'nin 700 nm'deki absorbansları.....	58
Tablo 3.9: <i>C. graecum</i> ve <i>C. pseudibericum</i> yaprak ekstraktlarının ve BHT'nin 700 nm'deki absorbansları.....	59
Tablo 3.10: <i>C. graecum</i> ve <i>C. pseudibericum</i> 'a ait etanol, metanol, aseton ve dH <sub>2</sub> O ekstraktlarının gallik aside eş değer (mg/g GAE) toplam fenolik madde miktarları.....	60
Tablo 3.11: PC9, PC14 ve A549 hücre hatlarında <i>C. graecum</i> ve <i>C. pseudibericum</i> 'un IC <sub>50</sub> değerleri.....	68
Tablo 3.12: PC9, PC14 ve a549 hücre hatlarında <i>C. graecum</i> ve <i>C. pseudibericum</i> 'un IC <sub>50</sub> değerleri.....	68
Tablo 3.13: <i>C. graecum</i> ve <i>C. pseudibericum</i> tuber etanol ekstraktlarının PC9, PC14 ve A549 hücreleri üzerinde kontrole oranlı % invazyonu.....	69

## SEMBOL ve KISALTMA LİSTESİ

<b>β</b>	:	Beta
<b>DPPH</b>	:	1,1-difenil-2-pikril hidrazil
<b>BHT</b>	:	Bütillenmiş hidroksi toluen
<b>BHA</b>	:	Bütillenmiş hidroksi anisol
<b>CUPRAC</b>	:	Bakır (II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite
<b>CGT</b>	:	<i>C. graecum</i> tuber
<b>CGY</b>	:	<i>C. graecum</i> yaprak
<b>CGE</b>	:	<i>C. graecum</i> 'un ethanol ekstresi
<b>CPT</b>	:	<i>C. pseudibericum</i> tuber
<b>CPY</b>	:	<i>C. pseudibericum</i> yaprak
<b>DNA</b>	:	Deoksiribonükleik asit
<b>DSÖ</b>	:	Dünya Sağlık Örgütü
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	:	Distile Su
<b>E.R. Karagür:</b>	:	Ege Rıza Karagür
<b>FRAP</b>	:	Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü
<b>FCR</b>	:	Folin-Ciocalteu reaktifi
<b>GC</b>	:	Gaz Kromatografisi
<b>GC/MS</b>	:	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi
<b>GSH-Px</b>	:	Glutasyon Peroksidaz
<b>GAG</b>	:	Glikozaminoglikan
<b>•HO</b>	:	Hidroksil radikali
<b>HAT</b>	:	Hidrojen atomu transferi
<b>İTK</b>	:	İnce tabaka kromatografisinde
<b>KHAK</b>	:	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
<b>KHDAK</b>	:	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
<b>LOO•</b>	:	Lipid peroksil
<b>miRNA</b>	:	Mikro RNA
<b>MTT</b>	:	3 (4,5dimetiltiyazol- 2 il)-2,5- difenil tetrazolyum bromid
<b>NADPH</b>	:	Nikotinamid adenin dinükleotid
<b>O<sub>2</sub>-</b>	:	Oksijen peroksit
<b>ORAC</b>	:	Oksijen radikal absorban kapasitesi
<b>PZR</b>	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>ROP</b>	:	Reaktif Oksijen Partikülleri
<b>RNA</b>	:	Ribonükleik asit
<b>SOD</b>	:	Süperoksit Dismutaz
<b>ET</b>	:	Tek elektron transferi
<b>TBA</b>	:	Tiyobarbitürik asit metodu
<b>TCA</b>	:	Trikloroasetik asit
<b>TRAP</b>	:	Total radikal yakalama antioksidan kapasitesi
<b>vb.</b>	:	Ve benzeri
<b>YPSK</b>	:	Yüksek performanslı sıvı kromatografi

## ÖNSÖZ

“*Cyclamen graecum* ve *Cyclamen pseudibericum* Bitki Türlerinin Ekstratlarının Aktif Bileşenlerinin Karakterizasyonu ve Anti-tümör Özelliklerinin Belirlenmesi” adlı yüksek lisans tezimi hazırlamamda değerli görüş ve önerileri ile katkılarını esirgemeyen danışman hocalarım Prof. Dr. Ramazan MAMMADOV ve Prof. Dr. Hakan AKÇA’ya sonsuz teşekkürler. Bu noktaya gelmemde, emeği olan tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca yaşamım boyunca benden hiçbir zaman maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürler.



## 1. GİRİŞ

Dünya üzerindeki coğrafik konumu nedeniyle Türkiye'nin floristik yapısı, büyük bir zenginlik ve çeşitlilik göstermektedir. Bu çeşitlik sahip olduğu jeolojik yapı, edafik özellikleri, yükseklik farklılıkları ve içinde bulunduğu iklim kuşağından kaynaklanmaktadır.

Ülkemizde, değişen yükseklik farklılıkları (0-5000 m) ile Anadolu diyagonalinin doğusu ve batısı arasında ekolojik farklılıkların bulunması, ayrıca gen merkezi veya genetik farklılaşma alanları ve çok sayıda tür ve türaltı taksonları bulundurması sebebiyle ülkemiz, tüm dünya ülkeleri ve bilim adamları için önemli bir floristik merkez olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca Türkiye, Holarktik flora aleminin sınırları içerisinde yer almakta olup, İran-Turan, Avrupa-Sibirya ve Akdeniz fitocoğrafik bölgelerinin kesişme noktasında bulunmaktadır. Türkiye sahip olduğu farklı floristik özellikler sayesinde, hem bitki çeşitliliği hemde endemik tür bakımından zengin bir floraya sahiptir (Güner 1994). Tür zenginliği açısından Dünya'nın sayılı ülkeleri arasında yer alan Türkiye florası 12000 civarında takson içermekte olup bu sayı gün geçtikte daha da artmaktadır. (Erik ve Tarıkahya 2004).

Ülkemiz sadece flora zenginliği açısından değil, endemik tür zenginliği açısından da çok önemli bir yere sahiptir. Endemik bitkiler sınırlı yayılış alanına sahip bitkilerdir. Türkiye florasındaki endemik tür sayısı 2891'dir. Bu sayıya endemik olan 497 alttürü ve 390 varyeteyi dahil ettiğimizde endemik takson sayısı 3778'e çıkmaktadır (Erik ve Tarıkahya 2004).

Yeryüzündeki yaklaşık 400.000'den fazla tohumlu bitkinin % 6-7'si geofit bitkilerden olup, 19 familyaya ait yaklaşık 21000 tür bulunmaktadır (Sezik 1984). Yurdumuzdaki geofitlerin büyük bir kısmı; Liliaceae (Zambakgiller), Alliaceae (Soğangiller), Amaryllidaceae (Nergisgiller), İridaceae (Süsengiller), Orchidaceae (Salepgiller), Ranunculaceae (Düğünçiçeğigiller), Araceae (Yılanyastığıgiller), Primulaceae (Çuhaçiçeğigiller) ve Crassulaceae (Damkoruğugiller) familyalarına

aittir. Yurdumuzda yetişen geofitlerin çoğu Batı Anadolu, Toroslar ve Kuzey Doğu Anadolu çevresinde toplanmıştır (Koyuncu 1994).

Geofitler toprak altında soğan, tuber ve rizom gibi gıda maddesi depo eden özelleşmiş toprak altı gövdelerine sahip otsu bitkilerdir (Çetik 1973). Türkiye zengin bir floraya sahip olmasından dolayı geofitler de ülkemizde çok çeşitlilik göstermektedir. 500 civarında tür yurdumuzda doğal olarak yetişmektedir (Ekim ve Koyuncu 1992).

Geofitlerin bitkiler aleminde yeri incelendiğinde, bunların Tohumlu bitkiler (Spermatophyta) bölümünde, kapalı tohumlu bitkiler (Magnoliophyta) alt bölümünde yer aldıkları görülmektedir. Bu grup bir çenekli bitkiler (Liliopsida) ve iki çenekli bitkiler (Magnoliapsida) olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Geofitler çoğunluğu “bir çenekli bitkiler” sınıfında olmak üzere, her iki sınıfta da yer almaktadır (Koyuncu 1994).

Geofit bitkiler adı altında yer alan sıklamen gibi bitkilerin gelişimi açısından, yazın sıcak ve kurak, kışın da soğuk ve karlı aylar elverişsiz dönemlerdir. Bitkiler, bu elverişsiz ayları toprak altında uyku halinde geçirirler. İlkbahar ve sonbaharda yağmurların başlaması ve sıcaklığın normale dönmesi ile hızlı bir gelişme göstererek, çiçek ve tohum oluşumunu gerçekleştirirler. Geofitlerin toprak altı kısımları, yedek besin depo ettikleri için bu tür bitkiler, bu organların toprağa dikilmesiyle kolayca üretilirler (Koyuncu 1994).

Doğada varolan bitkilerin birçoğu, tıbbi ve kimyasal açıdan büyük öneme sahiptir. İlaç sanayi, yiyecek endüstrisi, kozmetik ve parfümeri, ev temizlik ürünleri imalatı gibi birçok alanda da yine bitkilerden faydalanılmaktadır. Hastalıklardan korunma ve hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılan bitkiler eski zamanlardan beri birçok hastalığın tedavisinde geleneksel tıpta kullanılmaktadır (Pezzuto 1997).

Geofitlerin soğan, yumru ve rizomlarının içerdikleri etken maddeler, bunların tıbbi açıdan kullanılmasında büyük bir önem taşır. (Demirhan 2001). Birçok *Cyclamen* türü hemoroid, egzema tedavisi ve bağırsak kurdunun uzaklaştırılması için etnobotanik olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca Türkiye de kısırlığa

karşı koca karı ilacı olarak kullanıldığı da rapor edilmiştir. (Çalış ve diğ. 1997). *Cyclamen* ekstraktları spermicidal, antimikrobiyal, anti-inflamatuar ve anti-nociceptif aktivite göstermekle birlikte rinosinüzitte de kullanılırlar (Primorac ve diğ. 1985, Mahasneh ve El-Oqlah 1999, Speroni ve diğ. 2005).

Yakın geçmişimizde ilaç sanayisinin hızlı bir şekilde gelişmesiyle göz ardı edilen bitkilerle tedavi, çoğunlukla sentetik ilaçların neden olduğu olumsuz yan etkileri nedeniyle günümüzde yeniden önem kazanmıştır. Bitkiler üzerinde yapılan çalışmalar çeşitli hastalıklara karşı kullanılan yeni ilaçların keşfine öncülük etmiştir (Orhan ve diğ. 2006). Bitkilerin içerdiği biyoaktif bileşikler olan sekonder metabolitlerin keşfi, bu alanda yapılan çalışmaları tetiklemiştir. Birçok çalışmada farklı sekonder metabolitlerin antioksidan, antimikrobiyal, antiviral, anti-bakteriyal, antikanser, yaşlanmayı geciktirici gibi farklı biyolojik aktiviteler gösterdiği ortaya koyulmuştur. Süperoksit anyonu ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $OH^{\bullet}$ ) gibi reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerin insan vücudunda bulunan lipitler, proteinler ve DNA üzerinde oksidatif modifikasyonlara, yaşa bağlı dejeneratif bozukluklara ve çeşitli hastalıklara neden olduğu bilinmektedir.

Antioksidanlar, serbest radikal zincir reaksiyonlarının ilerleme ya da başlangıç basamağını bloke ederek oksidatif sürecin durdurulmasını sağlarlar (Özen ve diğ. 2011). Bu sayede vücudu, serbest radikallerin sebep olduğu çeşitli oksidatif zararlara karşı korumaya yardımcı olurlar. Bu aktif serbest radikallerin; kanser, diyabet, yaşlanma, artirit gibi pek çok hastalığa neden olduğu bilinmektedir (Shahidi 1997).

Mikro RNA'lar, 20-24 nükleotid büyüklüğündeki küçük RNA molekülleri olarak tanımlanmaktadır (Bedeir ve diğ. 2011, Iorio ve diğ. 2005). Günümüzde 5922 adet miRNA tanımlanmıştır ve hali hazırda tanımlanan miRNA'lar ile beraber bu sayı her geçen gün artış göstermektedir (Jones ve diğ. 2008). miRNA'lar hücrel diferansiyasyon, proliferasyon (Chen ve diğ. 2006), apoptozis (Krichevsky ve diğ. 2006), eritropoez, fibrozis, angiogenez (Felli ve diğ. 2005), immunité (Kloosterman ve diğ. 2007) gibi birçok hücrel ve biyolojik olaylarda görev almaktadır. Bu moleküllerin hücre büyümesi ve hücre ölümünde etkili oldukları belirlenmiş ve bunun üzerine miRNA'ların kanser dokularında araştırılması söz konusu olmuştur.

İnsan genomundaki 23000 civarındaki genin üçte birinin bu düzenleyiciler tarafından kontrol edildiği bilinmektedir. Araştırmacılar bu küçük RNA moleküllerinin hücrede birçok temel işlevin düzenlenmesinde görev aldığını, bununla birlikte, hücrede miRNA ekspresyonunun normal seviyelerinin dışına çıkmasının insanlarda kanser gelişimi ile bağlantılı olduğunu rapor etmişlerdir (Pillai ve diğ. 2007). Kanser gelişim süresi sırasında invazyon ve metastaz aşamalarında da mikro RNA'ların regülatör bir rol oynadıkları literatürde yapılan çalışmalarla saptanmıştır (Camarillo ve diğ. 2012). Kromozomların kırık bölgesi yakınında miRNA genlerinin bulunması ve malign dokularda bu genlerin ekspresyon düzeylerinin değişmesi, kanser ile kurulan bağlantıyı desteklemiştir (Calin ve diğ. 2004).

### 1.1 Çalışmanın Amacı ve Önemi

*Cyclamen* türleri, içermiş oldukları biyolojik aktif bileşenler (özellikle saponinler ve alkaloidler) sayesinde önemli ve çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptirler. Yaptığımız literatür taramasına göre *Cyclamen* cinsine ait bazı bitkilerde çeşitli biyolojik aktivite çalışmalarına (antioksidan, antimikrobiyal, anti-inflamatuar, antiproliferatif antinosiseptik, insektisidal) rastlanmıştır. Endemik bir bitki olan *Cyclamen pseudibericum* hakkında morfolojik ve anatomik bir çalışma dışında herhangi bir biyolojik aktivite çalışmasına rastlanılmamışken *C. graecum*'da bazı biyolojik aktivite çalışmalarına rastlanılmıştır. *Cyclamen* cinsi ile ilgili antitümör çalışmalarına sadece *Cyclamen coum* ve *Cyclamen europaeum* türlerinde rastlanılmıştır.

Bu çalışmada *Cyclamen* cinsine ait *C. graecum* ve *C. pseudibericum* ekstraktlarının antioksidan özellikleri, toplam fenolik madde miktarı, sitotoksik ve anti-tümör etkisinin araştırılması planlanırken, akciğer kanseri, apoptozis, metastaz ve invazyon ile ilişkili miRNA'ların ekspresyonlarının incelenmesi ve YPSK ile aktif bileşenlerinin tespit edilmesi amaçlanmaktadır.

## 1.2 Çalışma Materyalinin Botanik Özellikleri

### 1.2.1 Primulaceae Familyası ve *Cyclamen* cinsi

Dünyada Primulaceae familyası 28 cins, 1000 kadar takson ile temsil edilirken Türkiye’de 9 cins (*Primula*, *Dionysia*, *Androsace*, *Hottonia*, *Cyclamen*, *Lysimachia*, *Glaux*, *Anagallis*, *Samolus*) ve 51 takson ile temsil edilmektedir. Bu familyanın çoğunluğu Kuzey Yarımkürede ve özellikle Alpin bölgelerde yayılış gösterir (Davis 1978).

Ülkemizde genel olarak kıyı bölgelerimizde yayılış gösteren *Cyclamen* cinsinin, doğal halde 12 taksonu yetişir ve bu taksonların 6 tanesi ilkbaharda 6 tanesi sonbaharda çiçek açar. Sahip olduğumuz 5 endemik taksonla Anadolu bir *Cyclamen* cennetidir (Tablo 1.1) (Ekim ve diğ. 1991).

**Tablo 1.1:** Türkiyedeki *Cyclamen* türleri

İlkbaharda çiçek açan türler	Sonbaharda çiçek açan türler	Endemik olan türler
<i>C. persicum</i> Miller.	<i>C. graecum</i> Link.	<i>C. intaminatum</i> (Meikle.) Grey.-Wilson.
<i>C. pseudibericum</i> Hildebr.	<i>C. cilicicum</i> Boiss. &Heldr.	<i>C. parviflorum</i> Pobed.
<i>C. coum</i> Miller.	<i>C. mirabile</i> Hildebr.	<i>C. pseudibericum</i> Hildebr.
<i>C. alpinum</i> Damman. ex Spreng.	<i>C. hederifolium</i> Aiton.	<i>C. mirabile</i> Hildebr.
<i>C. parviflorum</i> Pobed.	<i>C. repandum</i> Sibth. & Sm.	<i>C. cilicicum</i> Boiss. & Heldr.
	<i>C. intaminatum</i> (Meikle.) Grey.-Wilson.	

*Cyclamen* ismi latince “kuklamis”, “kuklamiren” sözcüklerinden türetilmiştir. Latince “kuklos”veya “cyclos” daire anlamına gelmektedir. *Cyclamen* ismi bu bitkilere M.Ö. 370-285 yılları arasında yaşayan Theophrastus tarafından verilmiştir. Bitkiye bu ismin verilmesinin sebebi ise toprak altı yumrularının yuvarlak, yaprakların daire şeklinde olmasından veya meyva saplarının daire şeklinde helezonlar yaparak toprağa doğru uzanmasından dolayıdır (Tanker ve diğ. 1984).

Bu cinste yer alan türler ülkemizin değişik yörelerinde “domuz ekmeği, domuz turpu, domuz ağırşığı, dağ menekşesi, sıklamen, tavşan kulağı, devetabanı, buhur otu, buhur meryem, yer somunu, dana göbeği, kır menekşesi, köstebek, köstüköpen, köstüköpeği, kuskusa, menekşe kökü, tavşan paçası, topalak isimleri ile tanınırken Avrupa dillerinde ise “morron de cochon, savbnot, sowbread, ciclamino, pan de 5 puerco” isimleri ile tanınmaktadır. Bu isimlerden de anlaşılacağı üzere domuzlar bu bitkinin yumrularını fazlaca tüketmektedir. (Baytop 1994, Tanker ve diğ. 1984). *Cyclamen* türleri yaprak ve çiçeklerinin güzelliğinden dolayı sevilen bir süs bitkisi olup, bu amaçla yetiştirilen birçok kültür formu vardır. Ayrıca ülkemizde doğal olarak yetişen türlerin bir kısmı da tabiatın sökülerek süs bitkisi olarak başta Hollanda olmak üzere Avrupa ülkelerine ihraç edilmektedir (Ekim ve diğ. 1991).

Aşırı derecede tarımsal mücadeleler, yol yapımları, tarla açmalar, yol genişletme çalışmaları, hayvanların aşırı otlamaları ve birçok sebepten ötürü, *cyclamen* gibi bitkiler tehlike altındadırlar. Bu durumdaki bitkilerin korunması ve kültüre alınması, hem Türkiye’deki gen kaynaklarının korunması, hem de iyi adapte oldukları ortam şartlarında üretilmesi açısından önemlidir. İhraç ürünü olarak kullanılması nedeniyle halen bilinçsizce yapılan gerek toplama, gerekse yukarıda belirtilen faktörlerden dolayı, *Cyclamen* türleri nesilleri tehlike altında olan doğal bitki ve hayvan türlerinin ticaretini düzenleyen anlaşmanın (CITES) ek listesinde yer almaktadır (Özatay 2000).

### 1.2.2 *Cyclamen graecum* Link.

Yumrular küresel ya da oval, çatlaklı, mantarimsıdır. Kökler merkezden aşağı yüzeylere yayılır kalınlaşır ve geri kıvrılır. Sonbaharın sonlarına doğru çiçeklenir, yapraklar çiçeklerden sonra ortaya çıkar. Kordat çok az köşelidir, 3-14 cm uzunluğunda ve genişliğindedir, marjini çok hafif kalınlaşır ve kabuk bağlar, dentrikulattır. Korolla soluk pembe nadiren beyaz, loblar 2 cm uzunluğunda ve auriculate'tır. Loblar koyu kırmızı renktedir. Korolla 2 ya da 3 damarlıdır. Meyve pediselleri tabandan ya da ortadan düzensiz helezon şekilde çıkar. (Davis 1978 ).

- Yayılış alanları: *Pinus brutia* ormanları, makilik alanlar, kireçli kayalıklardır.
- Yetiştirme yüksekliği: 1-100 m
- Çiçeklenme zamanı: Eylül-Kasım



Şekil 1.1: *C. graecum* bitkisi (web 1)

### 1.2.3 *Cyclamen pseudibericum* Hildebr.

Yumrular basık küresel (2-3 cm), çatlaklı ve mantarimsıdır. Kökler tabandan çıkar. Yapraklar ilkbaharın başlarında çiçeklerden önce çıkar, geniş kordat, 2-5 cm uzunluğunda ve genişliğinde genellikle damarlı ve yüzeyi oldukça parlak, kenarları belirgin dişli. Korolla geniş, beyaz veya soluk bazal göz ile çevrili tabanda belirgin koyu bir lekeye sahip parlak macenta rengindedir. Korolla auriculate, loblar 15-25 mm, genişçe ovat, aküt ya da obtüs. Meyve pediselleri apeksten helezon şeklinde çıkar (Davis 1978 ).

- Yayılış alanları: *Pinus brutia* ormanları, kireçli, metamorfik ya da volkanik kayalıklardır
- Yetiştirme yüksekliği: 550-1500 metre
- Çiçeklenme zamanı: Mart-Mayıs



Şekil 1.2: *C. pseudibericum* bitkisi (web 2)

### 1.3 Bitkisel Sekonder Metabolitler

Sekonder metabolitler, bitkiler tarafından üretilen ve günümüze birçok sektörde ham madde olarak kullanılan, bitkinin temel yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkisi olmayan bileşenlerdir. Sekonder metabolitler keşfedildiklerinde herhangi bir işlevinin olmadığı ve bitkiler tarafından üretilen atık maddeler olduğu düşünülmüştür.

Sekonder metabolitler, primer metabolitler gibi bitkinin yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkili olmamasına rağmen bitkinin savunma, korunma, ortama uyum, hayatta kalma ve neslin devamı için oldukça karmaşık mekanizmaların ürünleri olduğu anlaşılmıştır.

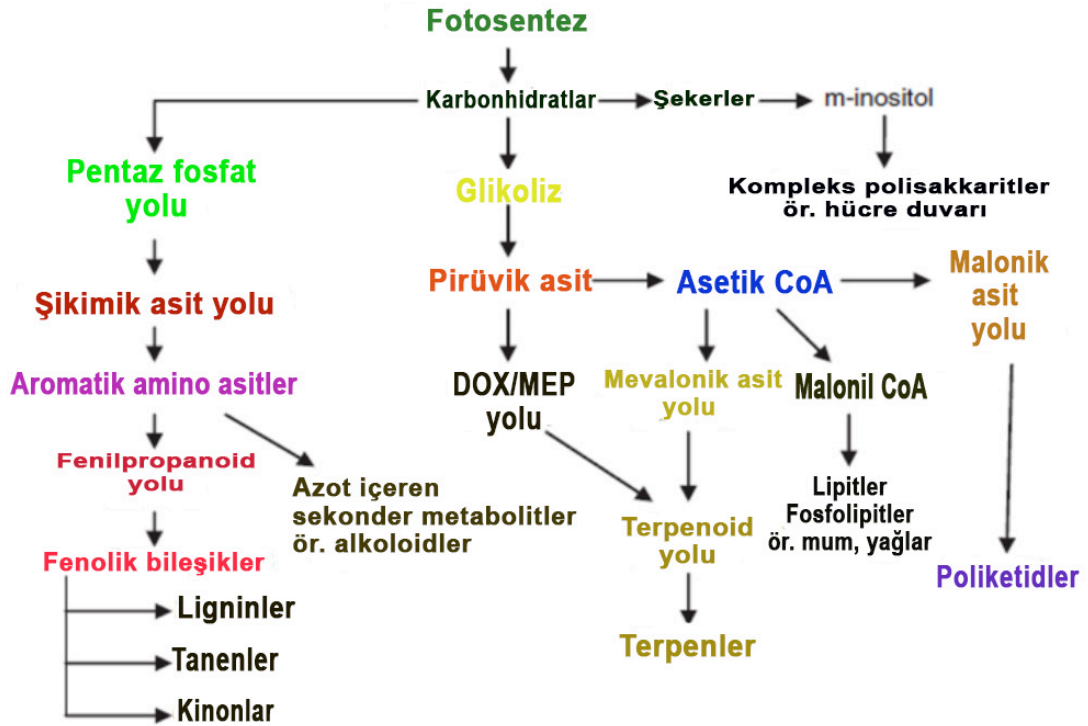
Sekonder metabolitlerin bitkilere kazandırmaları şunlardır (Babaoğlu 2001):

- Çevresel faktörlerin oluşturduğu stres ortamına karşı dayanıklılık (kuraklık, tuzluluk, UV ışınları gibi değişik çevresel faktörler).
- Herbivorlara karşı savunma (böcek, sürüngen vb.).



- Mikroorganizmalara karşı savunma (bakteri, mantar vb.).
- Çeşitli metabolik ve ekolojik işlevleri yerine getirme (örn; tohum dağılımını sağlamak için hayvanları ve diğer taşıyıcıları cezbetme gibi).

Sekonder metabolitler glikoliz, fotosentez ve krebs döngüsü süreci boyunca gerçekleşen metabolik yan basamaklardan üretilmektedir. Primer metabolizmanın ana yolları olan bu süreçlerin ara ürünleri olan asetil CoA, şikimik asit, mevalonik asit ve deoksiksiloz-5-fosfat üzerinden sekonder metabolitler sentezlenmektedir. İlk metabolik yol; fenoller, prostaglandinler ve makrolid antibiyotiklerin sentezlendiği asetil CoA yoludur. Diğer bir yol olan şikimik asit yolu üzerinden alkaloidler, sinamik asit türevleri ve lignanlar sentezlenir. Üçüncü ve dördüncü yol ise mevalonik asit ve deoksiksiloz fosfat yoludur. Terpenoidler ve steroidler bu iki yol üzerinden sentezlenen metabolitlerdir (Dewick 2002).



Şekil 1.3: Sekonder metabolitlerin sentez yolları

Sekonder metabolitler Şu Şekilde gruplandırılabilir (Mammadov 2014):

- Terpenler ve terpenoidler (izoterpenoidler)
  - Hemiterpenler
  - Monoterpenler
  - Seskiterpenler
  - Diterpenler ve diterpenoidler
  
- Fenolik bileşikler
  - Fenolik asitler
  - Fenilpropanoidler
  - Naftokinonlar ve ksantonlar
  - Stilbenler ve antrakinonlar
  - Flavonoidler
  
- Alkaloidler
  - Ornitin turevi alkaloidler
  - Triptofan tipli alkaloidler
  - Lizin tipli alkaloidler
  - Fenilalanin, tirozin ve antranilik asit tipli alkaloidler
  - Histidin tipli alkaloidler
  - İzoprenin yolu ile sentezlenen alkaloidler
  
- Diğer gruplar
  - Glikozitler
  - Saponinler
  - Minör ve sekonder metabolitler

## 1.4 Serbest Radikaller

Serbest radikaller son yörüngelerinde ortaklanmamış elektron çifti içeren ve bundan dolayı kararlı bir yapıya sahip olmayan atom ya da moleküllerdir. Bu moleküller oldukça reaktif olup, genel olarak (R•) simgesi ile gösterilir. En bilindik serbest radikal türleri, süperoksit anyonu (O•), hidroksil radikali (OH•), peroksit radikali (OOH•), azot oksit radikali (NO•)'dir.

Oksidasyon yani yükseltgenme, bir atom ya da molekülün bir alıcıya elektron verme işlemidir. Yükseltgenme potansiyeli karşısındakine göre yüksek olan madde yükseltgenirken diğeri indirgenir. Vücudumuzdaki ve besinlerdeki lipitler, proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler de oksidasyona uğrayabilmekte ve canlı organizma için zararlı olabilecek oksidasyon ürünleri oluşabilmektedir. Sağlıklı bir organizmada daima bir denge olmak zorundadır. Fakat serbest radikalın oluşum hızı savunma mekanizmasını aşarsa, yani biyolojik sistemlerdeki oksidatif denge bozulursa, çok sayıda ölümcül hastalığın (astım, damar tıkanıklığı, kronik akciğer, şeker, beyin damar hasarı, kalp, hipertansiyon, grip, miyokardial enfarktüsü, zatüre, vb. hastalık) oluşumunu tetikleyen bir durum meydana gelir, bu durum "Oksidatif Stres" olarak adlandırılır. Oksidatif stresin baş sorumluları reaktif oksijen ve azot türleridir. Reaktif oksijen ve azot türleri insan vücudunda değişik vesilelerle bulunabilirler. Örneğin; süperoksit ve hidrojen peroksit miktarı, bazı biyomoleküllerin (adrenalin, dopamin, tetrahidrofolat ile mitokondriyal ve sitokrom P450 elektron transport zincirlerinin bazı bileşikleri) oksijen tarafından doğrudan oksidasyonuyla oluşur.

## 1.5 Antioksidanlar

Antioksidanlar serbest radikalleri nötralize ederek vücudun etkilenmemesini veya kendini yenilemesini sağlayan maddelerdir. Antioksidanların, hücrelerin normal solunumu sırasında yan ürün olarak oluşan reaktif oksijen türlerine (ROT) karşı vücut savunma sisteminde önemli bir rolü olduğuna inanılmaktadır.

Canlı organizmalarda oluşan serbest radikaller, çoğu zaman lipit oksidasyonuna ve buna bağlı olarak da hücre ölümlerine neden olmaktadır.

Antioksidanlar bu oksidasyonun çeşitli aşamalarında değişik mekanizmalar yoluyla koruyucu özelliklere sahiptir. Sentetik olarak üretilebildiği gibi doğal kaynaklardan da elde edilebilirler. Bu tür maddeler, oluşan serbest radikalleri (reaktif oksijen türlerini) ya doğrudan temizleyerek ya da bu türlere elektron veya hidrojen aktarımı yaparak etkisiz hale getirirler. Genel anlamda iki tür antioksidan madde tanımlanır. Birincil antioksidan maddeler, zincir kırma tepkimeleri oluşturan veya serbest radikal temizleyen türlerdir. İkincil antioksidan maddeler veya koruyucu antioksidan maddeler ise, metallerin aktivasyonunu azaltıcı lipit hidroperoksitlerin istenmeyen uçucu türlere parçalanmasını engelleyen, tekli oksijen yakalayan ya da birincil antioksidanların yeniden üretimini sağlayan türlerdir.

Antioksidanlar hepimizin bildiği vitamin C, vitamin E ve A vitamininin öncü maddesi olan  $\beta$ -karoten, bitki ve sebzelerin genelde renkli maddelerini oluşturan flavonoidler ve bunlardan elektron alan selenyum, çinko gibi maddelerdir. Serbest radikaller, en dış yörüngelerinden bir elektron kaybetmiş ve dolayısıyla bu elektron açığını kapatabilmek için başka atomların elektronlarını paylaşmaya çalışan atomlardır. Serbest radikal oluşturan kaynaklar radyasyon, virüsler, güneş ışınlarının bir kısmı olan ultraviyole ışınları, hava kirliliğine sebep olan fosil kökenli yakıtların yanma sonundaki ürünleri, sigara dumanı, enfeksiyon, stres, yağ metabolizması sonunda ortaya çıkan ürünler gibi hücre metabolizmasının toksik ürünleri, bazı tahrip edici kimyasallar, haşere kontrol ilaçları ve birçok başka etkenlerdir.

Genelde oksijen, hidrojen ve hidroksi tipinde olan bu serbest radikaller elektron açıklarını elektron verme özelliği yüksek olan antioksidanlardan sağlarlarsa bir başka biyomolekülü indirgememiş olurlar ya da serbest radikaller tarafından etkilenmiş biyomoleküller, antioksidanlardan elektron alarak yenilenebilir.

Teorik olarak mümkün görünse de antioksidanların vücudun tüm bölümlerine mesela beyin, omurilik sıvısına, kemik iliği veya bazı dokulara, kanda bulunduğu konsantrasyonda girmesi mümkün değildir. Bunun yanı sıra, antioksidanlar elektron aldıklarında bu elektronları verebilecekleri başka akseptörlerinde yanlarında bulunması gerekir. Belki bu nedenle doğal olarak alınan birbirine benzer ve bir arada bulunan antioksidanlar ilaç gibi alınan saf ve bir tip antioksidanlardan daha değerlidir. Antioksidanlar açısından zengin olan beslenme alışkanlıklarında bazı

hastalıkların az görünmesi söz konusudur. Fransızlarda kalp hastalığının, Güneydoğu Asya'da yaşayanlarda meme kanserinin az bulunması gibi.

Antioksidanların etki mekanizmaları şunlardır:

1. Reaktif oksijen türlerinin enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla veya doğrudan temizlenmesi.
2. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun baskılama yoluyla engellenmesi.
3. Metal iyonlarının bağlanması ve böylece radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi.
4. Serbest radikallerin bağlandığı organik moleküllerin hasar sonrası tamiri ve temizlemesi.

Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında glutatyon, sistein, ürik asit, seruloplazmin, albumin, haptoglobin, laktofrin, vitamin E, vitamin C ve karotenoidler bulunmaktadır. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ise enzimatik antioksidanlardır. C vitamini, E vitamini,  $\beta$ -karoten ve riboflavin, gıdalarda bulunduğu bilinen doğal antioksidanlardır. Sodyum benzoat ve propil gallat gıdalarda koruyucu antioksidanlar olarak kullanılmaktadır. E vitamini doğal bir antioksidandır. Peroksidleri ve serbest oksijen radikallerini nötralize etmektedir. Hücre zarının fosfolipid tabakasında bulunan uzun zincirli doymamış yağ asitleri (linoleik asit ve arakidonik asit), kendiliğinden veya oksitleyici maddelerin etkisi sonucu kolayca oksitlenebilir ve peroksit türevlerine dönüşebilirler. Işığın ve havanın etkisiyle gerçekleşen bu olay lipid oksidasyonu veya oto-oksidasyon olarak isimlendirilmektedir. Serbest radikaller doymamış bir yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomu ( $H^+$ ) kopardıklarında karbon merkezli bir lipid radikali meydana gelir ( $L\bullet$ ). Oluşan bu moleküle bir oksijen molekülü ilave edilir ve lipid peroksil radikali ( $LOO\bullet$ ) oluşur. Oluşan bu lipid peroksil radikali, zincir üzerinde hemen yanında bulunan doymamış yağ asidinden bir hidrojen atomu koparır. Radikalin kendisi lipid hidroperoksil haline dönüşürken ( $LOOH$ ) hidrojen atomunu aldığı doymamış yağ asidi de yine önceki yağ asidinin geçirdiği reaksiyon basamaklarını geçirir. Böylelikle zincir üzerinde bulunan tüm doymamış yağ asitleri sırasıyla oksitlenerek toksik birer radikal haline dönüşürler. Son aşamada oluşan lipid hidroperoksil ( $LOOH$ ) ise kolay bir şekilde daha tehlikeli ve kararsız olan lipid

alkoksil radikaline dönüşür (LO•). Serbest oksijen radikallerinin oluşmasının eşlik ettiği bu olaylar zincirini hücre zarında önleyen ve oluştuğunda nötralize eden en güçlü antioksidan faktör, E vitamini, hücre ve hücre içi organellerin zarlarında bulunan lipidler üzerindeki bu etkisi nedeniyle bu zarları oksidatif hasara karşı korur.  $\beta$ -karoten ve diğer karotenoidler bitkiler için oldukça önemli antioksidanlardır. Polien yapıları sayesinde ışığı absorbe ederler, klorofil ve güneş ışığı etkileşiminden ortaya çıkan serbest radikalleri temizlerler.

Karotenoidler antioksidan ajanlar olarak bilinmektedirler ve polifenol özellik göstermemektedirler. Polienler olarak sınıflandırılan karotenoidler tekli oksijeni giderme özelliğine sahiptir (Sanjust ve diğ. 2008).

Bitkiler doğal antioksidanlar açısından oldukça zengin kaynaklardır. Özellikle fenolik bileşikler, bu yeteneklerinden dolayı ön plana çıkmaktadır.

### **1.5.1 Fenolik Bileşikler**

Fenolik bileşenler yapısında, aromatik halkanın karbon atomları ile birleşmiş olan bir veya birkaç adet hidroksil grubu bulunduran, doğal bileşenlerdir. Aromatik halkaya bağlı olan hidroksil grubu sayısı bir ise bu madde fenol, iki ve daha çok sayıda ise polifenol olarak adlandırılmıştır. Metabolizmada çok önemli fonksiyonlar üstlenen fenolik bileşenlerin bitki hücresinde toplanması bitki hayatında önemli bir olaydır. Fenolik bileşenlerin büyük bir kısmı sekonder metabolitlerdir. Ubikinon, adrenalin, tiroksin, serotonin vb. gibi fenolik bileşenler canlı dokularda çok önemli fonksiyonlar yerine getirmektedirler. Genelde insan ve hayvan dokularında benzen halkası sentezlenemez ve yalnız hazır gıdalarla alınır. Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Mammadov 2014).

Günümüzde binlerce fenolik bileşiğin yapısı tanımlanmıştır (Kafkas ve diğ. 2006). Bunlara devamlı olarak bulunan yeni tanımlanan fenolikler eklenmektedir (Cemeroğlu 2004). Fenolik bileşikler bitkilerin meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdelerinde bulunabilirler (Bilaloğlu ve diğ. 2004, Çoşkun 2006, Aydın

2007). Flavanoidler, bitkisel çayların, meyve ve sebzelerin doğal yapılarında bulunan polifenolik antioksidanlardır. Fenolik bileşiklerin bir kısmı meyve ve sebzelerin lezzetinin oluşmasında, özellikle ağızda acılık ve burukluk gibi iki önemli tat unsurunun oluşmasında etkilidirler. Bir kısmı ise meyve ve sebzelerin sarı, sarı-esmer, kırmızı-mavi tonlardaki renklerinin oluşmasını sağlamaktadırlar. (Cemeroğlu 2004, Zor 2007, Güngör 2007). Meyveler, özellikle içerdikleri fenolik bileşiklerin antioksidatif ve antimikrobiyal etkilerine bağlı olarak sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı fonksiyonel gıda olarak değerlendirilmektedir (Pehlivan ve diğ. 2004). Fenolik bileşiklere, beslenme fizyolojisi açısından olumlu etkileri nedeniyle "biyoflavonoid" adı da verilmektedir. Bazı kaynaklarda P faktörü (permeabilite faktörü) veya P vitamini olarak da adlandırılmaktadırlar (Saldamlı 2007, Cemeroğlu 2004).

#### **1.5.1.1 Fenolik Asitler**

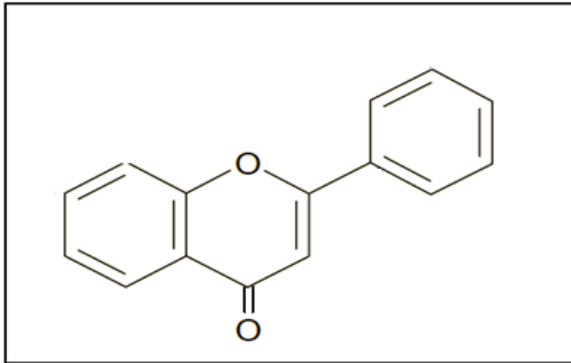
Hidroksi benzoik ve hidroksisinamik asitler olarak iki gruba ayrılırlar. Hidroksibenzoik asitler C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> fenilmetan yapısında olup, bitkisel gıdalarda genelde iz miktarda bulunurlar. Bunlar salisilik asit, *m*-hidroksibenzoik asit, gallik asit, vanilik asitler gibi asitlerdir. Hidroksisinamik asitler ise C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> fenilpropan yapısındadırlar. Fenilpropan halkasına bağlanan OH grubunun konumu ve yapısına göre farklı özellik gösterirler. Çok yaygın bulunanları; kafeik asit, ferulik asit, *p*-kumarik asit ve *o*-kumarik asitlerdir. Bitkilerde büyük bir kısmı organik asitler ve şekerlerle esterleşmiş halde bulunan, fenolik asitlerin (Saldamlı 2007, Balasundram ve diğ. 2006) kimyasal yapıları Şekil 1.4'de görülmektedir.

Asit	R1	R2	R3	Asit	R1	R2	R3
<i>p</i> -Hidroksibenzoik	H	OH	H	<i>p</i> -Kumarik	H	OH	H
Pirokate şük	H	OH	OH	Kafeik	H	OH	OH
Vanilik	CH <sub>3</sub> O	OH	H	Ferulik	CH <sub>3</sub> O	OH	H
Siringik	CH <sub>3</sub> O	OH	CH <sub>3</sub> O	Sinapik	CH <sub>3</sub> O	OH	CH <sub>3</sub> O
Gallik	OH	OH	OH				

**Şekil 1.4:** Fenolik asitlerin genel yapısı: a) Benzoik asit türevleri b) Sinamik asit türevleri (Shahidi F 2005)

### 1.5.1.2 Flavonoidler

Flavonoidlerin karbon iskeleti, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, difenilpropan (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) yapısındadır. Flavonoidlerin yapısındaki OH grupları, reaktif özelliklerinden dolayı kolaylıkla glikozitlenir (Bilaloğlu ve diğ. 1999). Flavan türevleri olan flavonoidlerin genel yapısı Şekil 1.5’de görülmektedir.



**Şekil 1.5:** Flavonoidlerin genel yapısı (Shahidi F 2005)



Flavonoidler gıdalarda en yaygın bulunan polifenollerdir. Yaklaşık 6500 farklı flavonoid bilinmektedir (Saldamlı 2007).

Yapısal olarak beş gruba ayrılırlar;

- 1- Antosiyanidinler
- 2- Flavonlar ve flavonollar
- 3- Flavanonlar
- 4- Kateşinler ve löykoantosiyanidinler
- 5- Proantosiyanidinler

### **1.5.2 Antioksidan Savunma Sistemleri**

Reaktif oksijen veya nitrojen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar antioksidanlar olarak bilinirler.

Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler.

Antioksidanlar hem sıvı hem de membran kısımlarında bulunabilirler. Antioksidan savunma sistemleri endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılabilir (Konukoğlu 2000).

#### **1.5.2.1 Endojen (doğal) Antioksidanlar**

1- Enzimler

- a) Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi
- b) Süperoksid dismutaz
- c) Katalaz
- d) Glutatyon-S-transferaz
- e) Hidroperoksidaz

## 2-Enzim olmayanlar

### a) Lipid fazda bulunanlar

- E vitamini ( $\alpha$ -tokoferol)

-  $\beta$ -karoten

### b) Sıvı fazda (Hücre sitozolünde veya kan plazmasında) bulunanlar.

-C vitamini (Askorbik asit)

-A vitamini (retinol)

-Melatonin

-Ürat

-Sistein

-Seruloplazmin

### 1.5.2.2 Eksojen Antioksidanlar (ilaçlar)

1-Ksantin oksidaz inhibitörleri

2-NADPH oksidaz inhibitörleri

3-Rekombinant süperoksit dismutaz

4-Trolox-C (E vitamini analogu)

5-Endojen antioksidan aktiviteyi artıran maddeler

6-Diğer nonenzimatik serbest radikal toplayıcıları

7-Demir redoks döngüsünün inhibitörleri

8-Nötrofil adezyon inhibitörleri

9-Sitokinler

10-Barbitüratlar

11-Demir şelatörleri

## 1.6 Kullanılmakta Olan Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

Antioksidan kapasite tayin yöntemleri, kullanılan kimyasal reaksiyon açısından temel olarak iki sınıfta toplanabilir:

### a) Hidrojen atomu transferi reaksiyonuna dayananlar (HAT).

b) Tek elektron transferi reaksiyonlarına dayananlar (ET) (MacDonald-Wicks 2006).

HAT esaslı analiz yöntemlerinin çoğunda yarışmalı reaksiyon kinetiği izlenir ve kantitasyon kinetik eğrilerden türetilir. HAT esaslı yöntemler genellikle bir sentetik serbest radikal oluşturucu, bir oksitlenebilen prob ve bir antioksidandan oluşur.

ET esaslı yöntemler reaksiyon sonunun indikatörü olarak bir oksidan (aynı zamanda reaksiyonu takip etmek için prob olarak kullanılır) ile redoks reaksiyonunu içerir. HAT ve ET esaslı yöntemler bir örneğin koruyucu antioksidan kapasitesi yerine radikal (veya oksidan) süpürücü kapasitesini ölçmeye dönüktür. HAT analiz yöntemleri:

- a) İndüklenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein otooksidasyonu.
- b) Oksijen radikal absorban kapasitesi (ORAC) (Ellefson 2006).
- c) Total radikal yakalama antioksidan kapasitesi (TRAP) (Somogyi 2007).
- d) Crocin bleaching deneyleri, olarak sıralanabilir (Lussignali 1999).

ET esaslı analiz yöntemleri, antioksidan maddenin indirgenmesinde renk değiştiren bir oksidan maddeyi indirgeme kapasitesinin ölçümüne dayanır. Renk değişiminin derecesi örnekteki antioksidan derişimi ile bağlantılıdır. ET esaslı analiz yöntemleri:

- a) Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik madde analizi (Magalhães 2008).
- b) Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) ölçümü (Miller 1993).
- c) Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ölçümü (Benzie 1996).
- d) Cu (II) kompleksini oksidan olarak kullanılan “toplam antioksidan potansiyel ölçüm yöntemi.
- e) DPPH kullanarak “toplam antioksidan potansiyel” ölçüm yöntemi (Huang 2005).
- f) CUPRAC (Bakır (II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite) yöntemi, olarak sıralanabilir (Huang 2005).

Çalışmalarda en fazla kullanılan yöntemler ise:

- Ransimat yöntemi ile lipit peroksidasyon etki tayini.
- DPPH ile serbest radikal süpürücü etki tayini.
- Demir-tiyosiyonat metodu.
- Tiyobarbitürik asit metodu (TBA).
- $\beta$ -Karoten-Linoleik Asit Yöntemi (total antioksidan aktivite) (Tunalier ve diğ. 2002).

### 1.7 *Cyclamen* Türleri ile Yapılan Bazı Çalışmalar

*C. pseudibericum* Hildebr., *C. neopolitanum* Tenn. ve endemik bir tür olan *C. cilicicum* Boiss. ve Hildebr. var. *intaminatum* üzerinde yapılan çalışmalarda bu bitkilerin yayılışı, morfolojik ve bazı anatomik karakterleri incelenerek, saponozitleri izole edilmiş ve hidroliz edilerek sapogenolleri ile ozları teşhis edilmiştir. Araştırmalar sonucunda saponozitlerin, siklamiretin izomerlerinin, glukoz, arabinoz ve ksiloz ile oluşturduğu heterozitler olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda ozların bağlanma sıraları da incelenmiştir (Tanker 1965, Tanker ve Türköz 1984). Yapılan başka bir çalışmada *Cyclamen coum* yumrularından NMR triterpenoid saponin-coumoside A Cs~H9202v - 3/3-O- {D-glucopyranosyl-(1-6)-L-arabinopyranosyl-(1-2)]-fi-D-glucopyranosyl-(1-4)-[D-gluc-pyran-sy-(-2)]-c-L-arabin-pyran-sy-}-6c-hydr-xy-3-28-Mact-ne-ean-2-ene) izole edilmiştir (Rosemary 1999). Bu bileşenler bitkiye yüksek antioksidan özellik vermektedir (Yaylı 1998). Başka bir çalışmada ise *Cyclamen persicum* 1H ve 13 C-NMR spektroskopi yöntemleri ile yumru ve yaprak içerikleri öğrenilerek anthocyanin, peonidin 3-O-a-L-rhamnopyranosyl-(1-2)-b-D-glucopyranosid flavon bileşikleri izole edilmiştir. Bu bileşenler aktif bileşenlerdir (Rosemary 1999). *Cyclamen* tuber ve yapraklarının triterpen-glikozid bileşenleri içerdikleri kanıtlanmıştır. Bu açıdan çalışmaların birisinde *Cyclamen repandum*'un yumrularının metanollü çözeltilerinde GC-MS yöntemi ile triterpen-glikozidler belirlenmiş ve bu bileşenlerin insan THP-1 makrofajları üzerinde etkili oldukları öğrenilmiştir (Dall'Acqua 2010). Farklı kimyasalların ve besi ortamının etkisi ile *C. persicum*'un embriyolojik süspansiyon kültürü üzerinde uygulanabilecek değişiklikleri yapılmış ve çalışmalarda sakkaroz besi ortamındaki embriyonik

hücrelerde 2-4 gün içinde hızlı değişimin meydana geldiği bildirilmiştir. *Cyclamen europaeum*'un terapötik ajan olarak sinüzit tedavisinde mukus membran üzerindeki etkileri ortaya konmuştur. Ayrıca, *Cyclamen repandum*'un ağrı ve enflamasyon üzerindeki etkileri araştırılmıştır (Speroni ve diğ. 2007). Son yıllarda yapılan bir çalışmada 14 *Cyclamen* türünün yumrularından elde edilen saponinlerin genelde cyclamin, deglukocyclamin I, degluocyclamin II olduğu bildirilmiş, *C. graecum* bitkisinden ise yeni bir saponin olan isocyclamin izole edilmiştir (Reznicek ve diğ. 1989). *C. persicum*, *C. purpurascens*'in çiçeklerindeki uçucu bileşikleri ve onların hibritleri gaz kromatografi yöntemiyle aydınlatılmıştır (İshizaka ve diğ. 2002). *Cyclamen* içeriğinde yer alan saponinler, nazal mukozada mukus ve nöropeptit salgılanmasını artırır. Bu yüzden bitki ekstraktı, rinosinüzit tedavisinde kullanılan burun spreileri içeriğinde yer almaktadır. *C. mirabile* ve *C. coum*'dan elde edilen saponin sıçanlara enjekte edilerek uterus kontraktıl aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır (Çalış ve diğ. 1997). *Cyclamen* ekstraktı nazal mukozada ozmotik etki göstererek musin salgısını artırır, mukoza ödemi ve konjestiyonunu azaltır (Fabre 2007).

## 1.8 Kanserin Tanımı

Canlı organizmalardaki tüm hücreler belirli bir yaşam süresine sahiptir bu süreçte hücre çoğalması, hücre ölümü gibi hücrenin yaşamsal aktivitelerinin düzenli bir şekilde devam etmesini, hücrelerin ve dokuların devamlılığını, hücrelerin ömürlerini tamamlamalarının ardından ölmelerini kontrol eden mekanizmalar mevcuttur. Ancak canlıda gerçekleşebilecek bir moleküler kargaşa sonucunda bu sistemin bozulabilmektedir. Bu durumun sonucu olarak hücrelerin kontrolsüz ve aşırı çoğalmasını takiben tümör oluşumu ve devam eden süreçte ise ilerleyen tümörün çevre dokulara zarar vermesi sonucu kanserleşme süreci başlamaktadır. Kısacası kanser, hücrelerin aşırı ve zamansız çoğalmalarına, immün sistemden kaçmalarına ve sonuç olarak daha uzak dokulara metastazlar oluşturmalarına yol açan metabolik değişiklikler geçirdikleri çok adımlı bir süreçtir (Merlo ve diğ. 2006).

### 1.8.1 Çok Aşamalı Kanser Gelişim Süreci

Kanserin gelişim süreci “karsinogenez” olarak adlandırılır. Hücrelerin hızlı bölünebilme, canlı kalma sürelerini artırma ve metastaz yapabilme yeteneği kazanmaları gibi normalde varolan özelliklerinden farklı özellikleri kazanmaları için gerekli birden fazla süreci içerdiğinden çok basamaklı bir süreç olup başlangıcında bir genetik hasar yatmaktadır (Lüleyap 2008). Meydana gelen bu genetik hasar kansere yol açan ajanlara ya da karsinojenlere maruz kalınmasıyla ortaya çıkabilir. Kimyasal madde, radyasyon gibi karsinojenlerin veya virüslerin etkisiyle hasara uğrayan tek bir hücre, bir dizi olay zinciri sonrasında tümör gelişimine sebep olur. Kanserin en önemli özelliklerinden birisi de “klonalite”dir ve tümörün anormal olarak proliferasyona uğrayan tek bir hücreden gelişerek gruplar oluşturmasıdır. Bunun yanında, tümörlerin klonal olması, tümör gelişimine neden olan hücrenin başlangıçta, kanser hücresinin bütün özelliklerini taşıyacağı anlamına gelmez. Aksine, kanser gelişimi birbirini izleyen değişiklikler sonucunda giderek malign hale dönüşen bir süreçtir. Kanser gelişiminin ilk basamağı, tek bir hücrede meydana gelen genetik veya epigenetik değişiklik sonucu bu hücrenin anormal bölünme yeteneği kazanmasıdır. Anormal hücre bölünmelerine paralel olarak, hücrelerde ek mutasyonların oluşması, bu tümör hücrelerine daha hızlı çoğalma, daha uzun süre canlı kalma yeteneği gibi avantajlar kazandırır. Sonuçta, bu avantajlı hücreler, tümör popülasyonunda dominant hale gelirler. Tümörü oluşturan hücre popülasyonlarının artan büyüme hızı, sağkalım, invazyon, metastaz gibi özellikler bakımından daha baskın hale gelme sürecine “klonal seleksiyon” adı verilir. Klonal seleksiyon, kanser oluşum süreci boyunca sürekli devam eden ve tümörlerin malign forma dönüşmesini sağlayan önemli bir mekanizmadır (Cooper ve Hausmann 2006, Lüleyap 2008).

Kanser oluşumuna sebep olan genetik değişiklikler, kromozomal düzeyde ya da tek bir nükleotid düzeyinde (tek ya da çoklu nükleotid değişimleri) olabileceği gibi hiçbir baz değişimi gerçekleşmeksizin metilasyon ya da asetilasyon mekanizmaları ile de oluşabilmektedir (Williams ve Cummings 2000, Cooper ve Goeffrey 2006, Kumar ve diğ. 2000).

## 1.8.2 Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalması, normal hücrelerin homeostatik feedback mekanizmaların kontrolünden çıkmasından kaynaklanır. Normal hücrelerin çoğalmasını durduran sinyallere uyması yerine, kanser hücreleri kontrolsüz çoğalma davranışı sergileyerek hücre yoğunluğunun artmasına rağmen çoğalmaya devam ederler ve kontakt inhibisyonundan etkilenmezler. Kanser hücreleri, normal hücrelerimizden farklı olarak daha düşük miktarda büyüme faktörüne ihtiyaç duymaktadırlar. Bunun yanında kanser hücreleri bazı durumlarda çoğalabilmek için gerekli büyüme faktörlerini kendileri de salgılayabilmektedirler. Kanser hücreleri, normal hücrelerden farklı olarak hücre dışı matriks bileşenlerini parçalayan ve komşu dokunun içerisine yayılmasına olanak veren proteazlar ile anjiyogenezi hızlandıran büyüme faktörleri de salgırlar. Kanser hücrelerinin bir başka genel özelliği ise sürekli aktif biçimde çoğalmaları ile uyumlu olarak, farklılaşmanın erken aşamalarında kalmalarıdır. Kanser hücrelerinin uzun süre yaşamalarının nedeni ise kanser hücrelerinin çoğunda apoptoz görülmemesidir. Bazı kanser hücreleri programlı hücre ölümünden kaçmalarına ek olarak, telomeraz enziminin ekspresyonu sayesinde, sınırsız replikasyon yeteneğine de sahiptir. Böylece anormal sağ kalım ve çoğalma yeteneği sayesinde kanser hücrelerinin sınırsız çoğalmaları mümkün olur (Cooper ve Goeffrey 2006).

## 1.9 Akciğer Kanseri

### 1.9.1 Epidemiyolojisi

Akciğer kanseri tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de insidansı yüksek bir kanser türüdür. 2008 yılındaki verilere baktığımızda dünya genelinde 1.600.000 yeni vaka tespit edilmiş ve 1.380.000 ölümlle sonuçlanmıştır (Jemal ve diğ. 2009). Ülkemizde Sağlık Bakanlığı'nın tüm sağlık kuruluşlarında tanı alan kanser olgularının kaydedildiği pasif kanser kayıt bilgilerine göre akciğer kanseri insidansı 11,5/100000'dir (Arslan ve Bölükbaşı 2003). Yine bu verilere göre akciğer kanseri insidansı batı bölgelerimizde daha yüksek iken (Akdeniz 41/100000, Ege ve İç

Anadolu (39,5/100000), Doğu (17,7/100000) ve Güneydoğu Anadolu (11,7/100000) bölgelerimizde bu oranın daha düşük olduğu saptanmıştır (Pisani ve diğ. 1990).

Dünya Sağlık Örgütü 2008 raporuna göre kanser ölümlerinin erkeklerde %29,3'ü, kadınlarda %11'i akciğer kanseri nedenlidir (Travis ve diğ. 2004).

Akciğer kanserinin görülme sıklığı uzun yıllardır artış göstermektedir ancak son yıllarda özellikle gelişmiş batı ülkelerinde sigara içme oranlarındaki azalmaya paralel olarak akciğer kanseri sıklığında da azalma olmaya başlamıştır. Erkekler arasında akciğer kanserine bağlı ölümlerde sigara içiciliğindeki azalmaya bağlı olarak gerileme olmuştur (Crofton ve Douglas 1981).

### 1.9.2 Etiyolojisi

Akciğer kanserinde rol oynadığı düşünülen ve büyük oranda kabul edilen faktörler:

- Sigara
- Yaş, cinsiyet ve ırk
- Mesleki ve çevresel karsinojenler
- Diyet
- Sosyoekonomik durum
- Geçirilmiş akciğer hastalıkları
- Genetik faktörler

Akciğer kanserinde en önemli etiyolojik faktör sigaradır (%96) ve sigara içenlerde akciğer kanseri riski içmeyenlerden 24-36 kat daha fazladır. Sigara kanser ilişkisi ilk kez 1761'de yapılan bir çalışmada buruna çekilen tütün tozunun burunda polip oluşumuna neden olduğunun saptanmasına dayanmaktadır (Crofton ve Douglas 1981). Sigara dumanında dört binden fazla kimyasal madde bulunur ve 60'tan fazlasının kanıtlanmış karsinojen özelliği vardır. Bunlardan radon, kurşun, bizmut ve polonyum radyoaktif özellikte iken polisiklik hidrokarbonlar ve N-nitrozamin prokarsinojenik olarak tanımlanmıştır. Sigara dumanının kimyasal bir bileşeni olan



benzo(a)pirenin p53 tümör baskılayıcı geninin 3 spesifik lokusuna zarar verdiği ve primer akciğer kanseri olan hastaların %60'ında bu gen anormalliğinin tespit edildiği saptanmıştır (Denissenko 1996). Tütün dumanında bulunan diğer polisiklik aromatik hidrokarbonların ise akciğer kanserine yol açabilecek diğer mutasyonel bölgeleri etkileyebilme kapasitesine sahip oldukları saptanmıştır (Smith ve diğ. 2000).

Sigara içimi ile kanser arasında güçlü bir doz-cevap ilişkisi vardır. İçilen sigara sayısı, içme süresi, inhalasyon derecesi, sigaraya başlama yaşı ile artan, sigarayı bırakmayla azalan bir doz-cevap ilişkisi görülmektedir. Çocuklukta dumana maruz kalmak bile artmış kanser riski ile bağlantılıdır (Fraser ve diğ. 1999). Her iki cinste de adenokarsinomlar sigara içmeyenlerde çok daha sık olmakla birlikte sigara ile ilişkili olarak en fazla skuamöz hücreli karsinom ve özellikle kadınlarda küçük hücreli karsinom tespit edilmiştir (Carney 2002). Akciğer kanseri tüm dünyada, sigara alışkanlığı erkeklerde daha fazla olduğu için erkeklerde daha sık görülmektedir, ancak kadınlarda sigara içme oranının artmasıyla insidans erkeklere göre daha hızlı artmaktadır (Spitz ve diğ. 2007).

Pasif sigara içiminde de akciğer kanseri riski 3,5 kat artmıştır. Çünkü etrafa yayılan sigara dumanında tüm karsinojenler aynen bulunur ve sigara filtresinden de geçmediğinden çok daha yoğundur. Sigara içen erkeklerle evli, sigara içmeyen kadınlarda risk 1,3 kat artmıştır. Sigarayı bırakmanın erken evrede tespit edilen akciğer kanserli hastalarda olumlu etkileri olduğu saptanmıştır. Buna karşılık erken evrede tanı konan ancak, sigara içmeye devam eden akciğer kanserli hastalarda yapılan çalışmalarda mortalite oranlarında ve ikinci bir primer tümörün oluşma oranında artış saptanmıştır (Parsons ve diğ. 2010). Yapılan kohort çalışmalarında sigara içiciliği ile oluşan akciğer kanserinin görülme riskinde, etnik ve ırksal farklılıkların rolü olduğu saptanmıştır (Haiman ve diğ. 2006).

Akciğer kanseri riskini artıran çok sayıda mesleki ve çevresel karsinojen vardır. Bunlar arasında en iyi bilinenler asbest, radon, arsenik maruziyeti, diklorometil eter, krom, formaldehit, iyonize radyasyon, nikel, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, ağır metal tozları ve vinil kloriddir (Chen ve diğ. 2004).

Doğada da bulunan radonun son yıllarda akciğer kanserine yol açabileceğine dair çalışmalar vardır. Hava kirliliği akciğer kanserlerinin %1 kadarından sorumlu tutulmaktadır. Aromatik hidrokarbonların yoğun olduğu bölgelerde akciğer kanseri olguları daha fazladır. Kentlerde yaşayanlarda risk 1-2 kat daha fazladır. Vitamin A ve β-karotenden fakir beslenmenin hayvan modellerinde akciğer kanseri riskini artırdığı gösterilmiştir. İnsanlardaki çalışmalarda da diyetinde β-karoten/retinol miktarı yüksek olan olgularda akciğer kanserinin göreceli riski 0,59'a düşmektedir. β-karoten, A vitamininin öncülüdür ve turunçgiller, yeşil sebzeler ile balıkta bulunur. Vitamin E ve selenyum benzer şekilde antioksidan etkiyle riski azaltmaktadır. Yüksek yağlı diyetle beslenen sigara tiryakilerinde akciğer kanseri riskinin arttığı gösterilmiştir Sarı-yeşil sebze ve meyvelerin yeterli alımı riski azaltır. Çayın (özellikle yeşil çay) koruyucu olduğuna dair de bazı bulgular mevcuttur (İtil 2000).

Sosyo-ekonomik durumu kötü olan bireylerde akciğer kanseri riski 2-6 kat fazladır ve bu muhtemelen bu grubun etiyolojideki faktörlere daha fazla maruz kalması ile ilişkilidir (Müşteri Oltulu 2014).

Akciğerde bulunan fibrozis sahalarında kanser gelişim riski artmaktadır. Tüberküloz, bronşektazi, pnömoni, abse, pulmoner emboli, interstisyel akciğer hastalıkları gibi akciğerde skatris bırakan hastalıklarda, skar dokusunun kanser gelişimine zemin oluşturduğu ve akciğer tüberkülozu geçiren olgularda akciğer kanseri gelişme riskinin 8 kat fazla olduğu belirtilmektedir (Tatar ve diğ. 2000). Skar zemininde gelişen akciğer kanserinde özellikle adenokarsinom tipi gelişir. Türkiye'de akciğer kanseri hastalarının %0,3'ünde idiopatik fibrozis, %2,9'unda akciğer tüberkülozuna sekonder gelişen fibrozis zemininde kanser geliştiği saptanmıştır (Turkish Thoraici Society 2002).

Akciğer kanserli hastaların birinci derece akrabalarında, akciğer kanseri riskinde 2,4 kat artış olduğu belirtilmektedir (Matakidou ve diğ. 2005).

### **1.9.3 Patolojik Sınıflandırma**

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) akciğer kanseri sınıflandırması 1981'de yapılmış ancak patolojik tanı yöntemleri ve kriterlerinde belirgin değişiklikler gerçekleşmesi üzerine sınıflama yine DSÖ tarafından 2004 yılında yeniden düzenlenmiştir (Travis ve diğ. 2004). Histopatolojik olarak çok fazla çeşitlilik gösteren akciğer tümörleri klinik, tedavi ve tedaviye verdikleri yanıt açısından majör olarak küçük hücreli ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri olmak üzere 2 ana grupta incelenir.

#### **1.9.3.1 Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK)**

Akciğer kanserlerinin yaklaşık %85-90'nı Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK)'dir. Skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinom olmak üzere 3 ana alt tipi vardır. Farklı hücrelerden köken almalarına rağmen bu alt tiplerin tedavi yanıtları ve prognozlarının büyük benzerlikler göstermesi nedeniyle bütün hepsine ortak bir ad ile pratikte KHDAK denilmektedir (Passlick ve diğ. 2000).

#### **1.9.3.2 Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK)**

Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %10-15'ini oluşturur. Az sitoplazmaya, iyi tanımlanamayan hücre sınırlarına, ince granüler çekirdek kromatinine sahip, nükleusu bulunmayan veya çok küçük olan küçük hücrelerden oluşan bir malign epitelyal tümördür (Moran ve diğ. 2009). KHAK, sigara içimi ile ilişkisi en belirgin akciğer kanseri tipidir ve erkeklerde daha sık görülmektedir. Soluk gri renkte, santral lokalizasyonda, genellikle mukoza altında (submukozal) yerleşim gösterirler. Santral hava yollarından köken alan bu tümörler, ilk olarak submukoza ve periferik parankimal dokuları infiltre ederler. Sonra lümende ekstresek olarak ya da endobronşial yayılımla obstrüksiyona neden olurlar. Erken ve yaygın metastaz gösteren agresif bir tümördür. KHAK kemiğe, karaciğere, sürrenal ve karşı akciğere

sıklıkla metastaz yapar. Ayrıca KHAK %40'ı bulan beyin metastazı yapar. Çeşitli paraneoplastik sendromlara neden olabilirler (Ettinger 2001).

### **1.10 İnvazyon ve Metastaz**

Neoplazm gösteren hücre ya da hücre grubunun proliferasyon veya hücre göçü yoluyla bulunduğu bölgedeki komşu dokuya penetrasyonu sonucu işgali invazyon olarak tanımlanır. Metastaz; uzak dokularda, tümör ile devamlılığı olmayan sekonder implantların gelişmesi olarak tanımlanır. Genel olarak daha anaplastik ve daha büyük primer neoplazm daha çok metastatik yayılım özelliğindedir, ancak istisnalar bulunmaktadır (Kumar ve diğ. 2003).

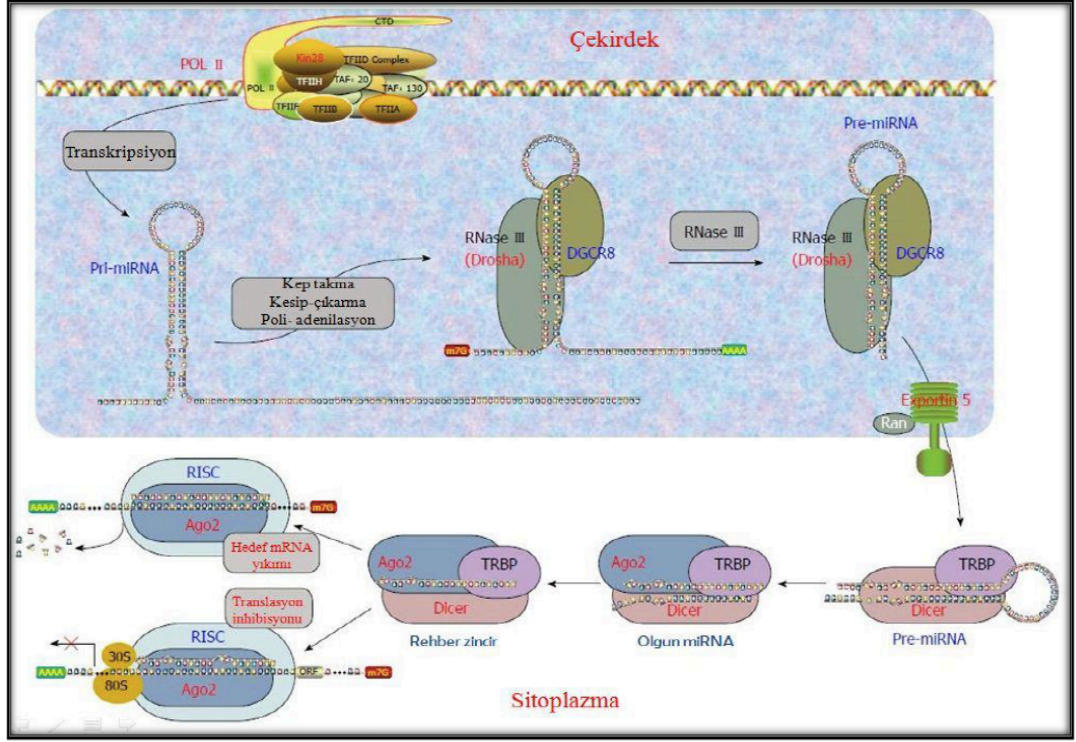
Kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümeleri devam ederken buldukları dokuda diğer dokuları itmeye başlarlar. Bu süreçte mutasyonlar da devam etmektedir. Kanser gelişiminin ilk aşamalarında anormal derecede çoğalan hücrelerin arasındaki bağlantı yapıları da bozulmaktadır. Örneğin, kanser hücrelerinde bir yapılan araştırmada kadherin ailesinden E kadherinin ifadesinin azaldığı ve N-kadherinin ifadesinin arttığı gösterilmiştir (Bogenrieder ve Herlyn 2003). E-kadherin ifadesini kaybetmiş olan kanser hücresi, bazal laminaya  $\alpha 5 \beta 3$  integrin proteini ile fibronektin aracılığıyla tutunmaktadır (Demuth ve Berens 2003). Bu tutunma hareketi sabit olmayıp, E-kadherin ifade kaybı nedeni ile zayıflayan hücre-bazal lamina bağlantısının sonucu olarak hücre hareketliliği kazanmış olan kanser hücresi amoboid hareket yapmaktadır. Bu hareketliliği aktin proteinin yeniden organize olması sonucu oluşan yalancı ayak, fillipoda ve lamellipoda oluşumları ile sağlamaktadır. Sitoplazmada ise miyozin kasılmaları ile hücre hareketini gerçekleştirmektedir (Sahai 2005).

### 1.11 Mikro RNA (miRNA) ve Biyosentezi

miRNA'lar, genom üzerinde protein kodlayan intron veya ekzon bölgeleri ve protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden transkripsiyonu sağlanan; fakat proteine translasyonu gerçekleştirilmeyen, transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel düzeyde negatif gen düzenleyiciler olarak görev alan, yaklaşık olarak ~20-25 nükleotid uzunluğunda, tek zincirli, endojen, kısa RNA dizileridir (Ambros 2004).

Mikro RNA'lar, bir birini takip eden üç basamaktan meydana gelir. İlk basamakta miRNA genlerinden, pri-miRNA'ların transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci basamakta pri-miRNA'lar; nükleus içinde, pre-miRNA'lara dönüştürülür. Son basamakta ise olgun miRNA'ların sitoplazma içinde oluşumu gerçekleşir (Şekil 1.6) (Bui ve diğ. 2010, Saydam ve diğ. 2011).

Pri-miRNA transkriptleri genellikle RNA polimeraz II (küçük bir grubu RNA polimeraz III) tarafından intragenik ya da intergenik kromozomal (genomik) DNA'dan sentezlenir. Pri-miRNA'lar birkaç kilobaz uzunluğunda olup cap'lenmiş ve poli-adenil'lenmiş olarak bulunur. Pri-miRNA'lar çift zincirde bir ya da daha fazla sayıda saç tokası ilmeği ve bir terminal uç içerirler (Slezak-prochazka ve diğ. 2010, Lin ve diğ. 2006, Wang 2010, Bui ve diğ. 2010, Junn ve diğ. 2012).



**Şekil 1.6:** miRNA oluşum yolunun şematik gösterimi (Wang 2010)

Nükleusda başlamış olan miRNA oluşum süreci (Şekil 1.6), Pri-miRNA'lar mikroşlemci kompleks (microprocessor complex) tarafından yaklaşık 70 nükleotid uzunluğundaki, pre-miRNA (precursor miRNA=pre-miRNA) formuna dönüştürülmesiyle devam eder. Mikroşlemci kompleksi, sınıf II RNaz III protein ailesi olan Drosha ve onun kofaktörü olan çift iplikli RNA bağlayıcı protein DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8)'in meydana getirdiği kompleks bir yapıdır (insanlardaki adı DGCR8 olan proteinin adı *Caenorhabditis elegans*'ta PASHA'dır) (Bui ve Mendell. 2010, Macra ve Doudna 2007).

Nükleusda pre-miRNA formuna dönüştürülen yapı, RanGTP bağımlı olarak Exportin-5 (XPO-5) tarafından sitoplazmaya taşınır. Pre-miRNA sitoplazmada, sınıf III RNaz III üyesi olan Dicer endonükleaz enzimi ile ~20-25 nükleotid uzunluğundaki çift zincirli rehber (guide) ve yolcu (passenger) zincirden oluşan miRNA/miRNA\* dubleksine çevrilir. Memeli hücrelerinde Dicer; trans-aktivasyon yanıt elemanı RNA bağlayıcı protein (trans-activation response element RNA binding protein, TRBP = TARBP) ve interferon uyarıcı protein kinaz aktivatör protein (PACT) ile iş birliği içerisinde. Dicer, pre-miRNA'nın saç tokası ilmeğini

keser. Akabinde miRNA/miRNA\* dubleksinden sadece bir tanesi RISC (RNA-induced silencing complex = RNA ile uyarılmış sessizleştirme kompleksi) içerisine girer. Seçilen bu zincir, 5' ucu ile Argonaute (AGO) proteinine bağlanan rehber zincirdir. Rehber zincirin 5' ucu, öteki zincirin ucuna göre daha kararlı bir yapıya sahiptir. Rehber zincir RISC ve AGO'nun birlikte oluşturduğu yapı mi-RISC olarak adlandırılır. Komplekse dahil olmayan zincir, yolcu zincir (miRNA\*) olarak adlandırılır. Komplekse dahil olmayan yolcu zincir nükleazlar tarafından parçalanarak yok edilir. mi-RISC; Dicer, TARBP, PACT, GEMIN 3 (Gem—çekirdek organeli İlişkili Protein 3) ve GEMIN 4 (Gem—çekirdek organeli İlişkili Protein 4) gibi birkaç proteini içerir; fakat bu proteinler doğrudan AGO ile ilişkilidir. AGO proteinlerinin memeli hücrelerde AGO 1, AGO 2, AGO 3 ve AGO 4 olmak üzere 4 farklı formu, her bir proteinin de N-terminal, PAZ, orta ve Piwi olmak üzere de 4 bölgesi bulunmaktadır (Wang 2010, Bui ve Mendell 2010, Junn ve diğ. 2012, Pasquinelli 2012, Juvvuna 2012).

Tek zincirli miRNA'yı içeren aktif RISC kompleksi miRNA'daki 2-8 nükleotidlik çekirdek dizi (seed sequence) ile mRNA (messenger RNA)'ya bağlanır. Bu eşleşme, mRNA'nın 3' UTR (untranslated region) bölgesi ya da ORF (open reading frame) ucu tarafında gerçekleşir. ORF ile kurulan bağ mükemmel bir şekilde gerçekleşirken, 3' UTR tarafındaki eşleşme, mükemmel olmayan eksik bir eşleşme şeklinde gerçekleşir (Bui ve Mendell 2010, Saydam ve diğ. 2011, Junn ve Mouradian 2012). mi-RISC kompleksi, AGO yardımıyla hedef mRNA'nın yıkımını başlatmakta ve/veya protein translasyonunun baskılanmasına neden olmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda miRNA'ların, translasyonu arttırdığı yönünde ifadeler de bulunmaktadır. Buna göre; hücre döngüsü arest durumunda iken, TNF  $\alpha$  (tumor necrosis factor-alpha) aktivasyon sinyali üzerinden miR 368-3 direkt AU-Rich element (ARE) ile ilişkili olarak translasyonu aktive etmektedir (Wang 2010, Bui ve Mendell, Juvvuna ve diğ. 2012, Vasudevan ve diğ. 2007).

## 1.12 Mikro RNA (miRNA) ile Akciğer Kanseri Arasındaki İlişki

Mikro RNA'lar hedef mRNA'nın yıkımını ya da RNA interferans olarak adlandırılan gen susturma mekanizmasında ve fonksiyonel olarak gen ekspresyonunun posttranskripsiyonel düzenlenmesinde görev alırlar (Wijnhoven ve diğ. 2007). Hücre büyümesinde, farklılaşmasında, proliferasyonunda ve hücre ölümünde bir veya daha fazla hedef genin baskılanmasında rol oynar (Selbach ve diğ. 2008, Baek ve diğ. 2008). miRNA'lar dokuya spesifik olup insanlarda bütün hücre tipinde bulunurlar ve farklı hücrelerden farklı miRNA'lar eksprese edilmektedir. Çeşitli miRNA ekspresyon düzey değişiklikleri birçok hücrel proteinin ekspresyon düzeylerini etkilemektedir (Latronico ve diğ. 2007).

MiRNA'ların sentezi genellikle polisistroniktir. Bu güne kadar 2000'den fazla insan miRNA geni tarif edilmiştir (Griffiths-Jones ve diğ. 2008). Bunların yaklaşık 1/3'ü 113 bölgede kümelenmişlerdir. Aynı bölgede bulunan mikro RNA'lar, çeşitli hücre kültürü çalışması verilerine göre bir arada eksprese olmaktadır (Landgraf ve diğ. 2007, Chiang ve diğ. 2010, Witten ve diğ. 2010). Bunlardan bazıları onkogenik (miR-17-92 ve miR-21) ve tümör baskılayıcı genler (Let-7/miR-98 ve miR-141/200) olarak da sınıflandırılabilirler (Esquela-Kerscher ve Slack 2006, Calin ve Croce 2006).

miRNA'lar kardiyovasküler hastalıklar, merkezi sinir sistemi hastalıkları, inflamatuvar ve immün kökenli birçok hastalıkla yakından ilişkilidir (Ha 2011, Soifer ve diğ. 2007, Tsitsiou ve Lindsay 2009). miR-146a ve miR-155'in Alzheimer hastalığının erken tanısında markır olarak kullanılabileceği saptanmıştır (Lukiw ve diğ. 2012, Wang ve diğ. 2012). inflamatuvar ve immün kökenli hastalıklarda, miR-155, miR-146a, miR-125b, mir-204, miR-296, miR-198, miR-342, miR-383 ve Let-7b miRNA'ları rol oynamaktadır (Tili ve diğ. 2008).

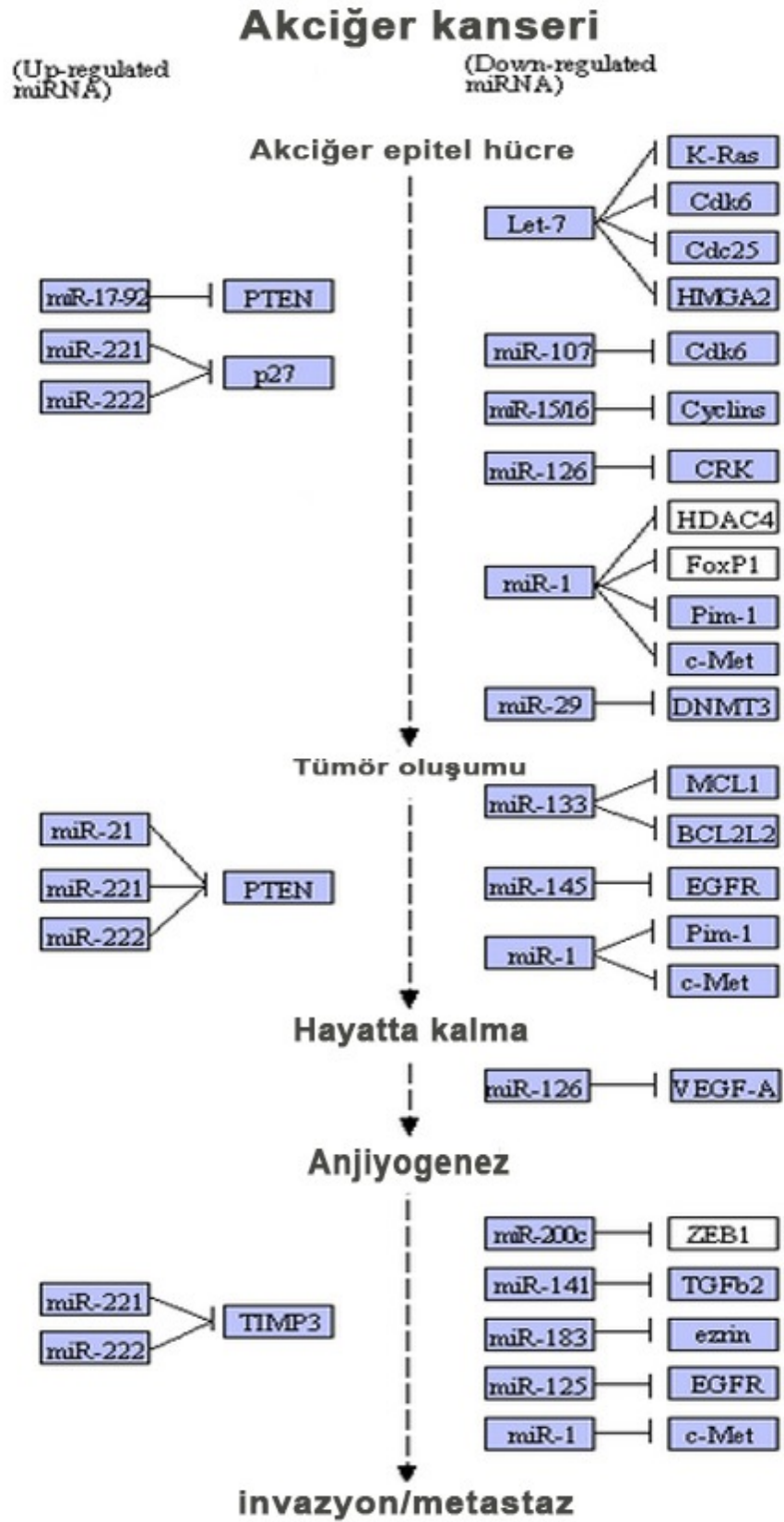
Günümüzde yüzlerce miRNA'nın azalan veya artan ekspresyon özellikleri ile tümör baskılayıcı veya onkogen olarak görev aldığı gösterilmiştir. Ayrıca miRNA genlerinin %50'den fazlası kanser ile ilişkili genomik bölgelerde yerleşmiştir (Bartles 2009). MikroRNA'lar akciğer, mide, meme, kolon, tiroid, pankreas ve prostat kanserlerini de içeren birçok kanserde anormal eksprese edilirler (Bartles



2009, Khosknaw ve diğ. 2009, Mitchell ve diğ. 2008). Nakajima ve arkadaşları (Nakajima ve diğ. 2006) tarafından kolorektal kanserlerde onkogenik miRNA'lerden Let-7g, miR-181b, miR-200c, miR-29 ve miR-92'nin seviyelerinde artış olduğu gösterilmiştir.

Akciğer kanserinde miR-210, miR-21, miR-31 ve miR-182 düzeylerinde artış saptanmıştır (Wang ve diğ. 2009, Nikiforova ve diğ. 2008).

Chen ve arkadaşları akciğer kanseri hastalarında serum miRNA'larını analiz ederek KHDAK hasta serumunda bulunan ancak normal serumda bulunmayan 63 tane miRNA tespit etmişlerdir. Akciğer kanserinde Let-7 ve miR-155 ailesi akciğer adenokarsinomalı hastalarda hayatta kalmayla ilişkilidir. Ras onkogenini Let-7 ailesi negatif regüle edebilir bu nedenle Let-7 ailesi tümör baskılayıcı olarak fonksiyon gösterir (Johnson ve diğ. 2005). Yu ve arkadaşları 2008 yılında yayınladıkları çalışmada beş yeni miRNA tanımlamışlardır; bunlardan miR-221 ve Let-7 koruyucu etki gösterirken miR-137, miR-372 ve miR-182 ise kötü prognoz göstergesi olduğunu ileri sürmüşlerdir (Yu ve diğ. 2008). Garofalo ve arkadaşları miR-221 ve miR-222'nin KHDAK'de TRAIL-direncini artırdığını ve TRAIL sinyalinin p27'ye ulaşmasını engellediklerini ortaya çıkarmışlardır (Garofalo ve diğ. 2008).



Şekil 1.7: Akciğer kanserogenezi'nin miRNA'lar ile ilişkisi

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1 Materyal

#### 2.1.1 Bitkisel Materyal

Arazi çalışmaları kapsamında projede yer alan türlerinin alternatif lokaliteleri ilgili kaynaklar (Davis 1984, Duman ve diğ. 2002, Çelik ve diğ. 2004, Varol 2006) taranarak tespit edilmiştir ve bu türlerin çiçeklenme dönemleri, yayılış gösterdikleri lokaliteler, habitatları ve yükseklikleri doğrultusunda bir arazi çalışması planı hazırlanmıştır. Bu arazi planı sayesinde türler doğru zaman ve lokalitelerden toplanmıştır. Arazi çalışmaları sırasında farklı lokalitelerden toplamak suretiyle her bitki türünden yer altı ve yer üstü kısımlar birlikte olmakla 1,5-2 kg yaş kitle toplanmıştır (Tablo 2.2). Bu işlemler yapıldığı zaman ekolojik dengenin bozulmaması ve endemik türlerin tahrip edilmemesi durumuna özen gösterilmiştir.

**Tablo 2.2:** Bitkilerin toplandığı lokaliteler

TÜR	İSTASYON
<i>C. graecum</i> Link.	C2 Antalya Kemer mevkii, <i>Pinus brutia</i> orman altları, 30 m, 25. VIII. 2012, E.R. Karagür 9001. Medit elementi.
<i>C. pseudibericum</i> Hildebr.	C5 Adana Hasan Dağı etekleri kahveci yaylası, 950 m, 22. IV.2013, E.R. Karagür 9002. Medit elementi.

Türlerin teşhisi Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde Sistemantik Botanik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

## **2.2 Yöntemler**

### **2.2.1 Bitkilerin Kurutulması ve Ekstraksiyon İşlemleri**

Bitkiler araziden toplandıktan sonra morfolojik özelliklerini çok fazla kaybetmeden bitkilerin toprak üstü ve toprak altı kısımları gölgede kurutulduktan sonra toprak üstü kısımları blender ile parçalanarak, yumrular küçük parçalara bölünerek analize hazır hale getirilmiştir.

Küçük parçalara bölünmüş olan bitki örnekleri, su banyosu cihazı kullanılarak 55°C'de yaklaşık 6 saat, minimum 2 tekrarla çeşitli çözücülerin (metanol, etanol, aseton ve dH<sub>2</sub>O) ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Her 10 gr'lık kuru örnek için (yaprak ve tuber) 100 ml. çözücü kullanılmıştır (Feresin ve diğ. 2000).

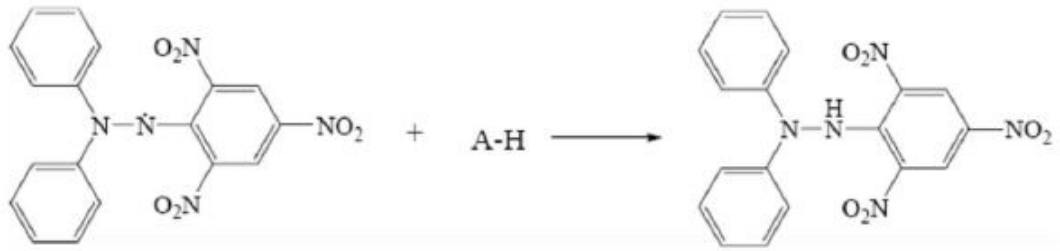
Elde edilen karışım filtre edilerek süzölmüş ve çözeltilinin yapısındaki çözücü madde rotary evaporatörde 48°C'de uçurulmuştur. Her bir ekstrenin yapısındaki su Freeze Dryer makinesinde dondurularak çekilmiştir. Ekstreler deneylerde kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

### **2.2.2 Antioksidan Aktivite Analiz Yöntemleri**

#### **2.2.2.1 Serbest Radikal Giderim Aktivitenin Belirlenmesi**

Bu yöntem ilk kez Blois (1958) tarafından 1,1-difenil-2- pikrilhidrazil (DPPH) radikallerinin (Şekil 2.8) antioksidan moleküllerin tayininde kullanılabileceğinin önerilmesi ile ortaya çıkmıştır. Antioksidan aktivite ölçümlerinin yoğunlaştığı yıllarda Brand-Williams ve arkadaşları (Brand-Williams ve diğ. 1995) yöntemi geliştirmiş ve bu yöntem pek çok araştırmacı tarafından referans olarak kullanılmıştır. Yöntemin esası antioksidanların kararlı bir organik azot radikali olan DPPH radikalini süpürücü etkilerini ölçmeye dayalı bir yöntemdir. Bu radikal

hidrojen donörlerle etkileştiğinde hidrazine indirgenir. Mor renkli DPPH radikali 517 nm’de maksimum absorpsiyon verir. DPPH çözeltisine antioksidanın ilave edilmesiyle absorbansta düşüş meydana gelir ve antioksidanların varlığıyla radikalın rengi mordan sarıya döner. Bu yöntem antioksidanların radikal süpürme kabiliyetlerini değerlendiren kolay ve geçerli bir yöntem olarak bilinmektedir. Antioksidan etkinliği araştırılmak istenen bitkisel ekstrelerin DPPH radikalini temizleyici etkisi ve bu ekstrelerin DPPH ile oluşturdukları rengin 517 nm’de ölçümüne ve standart madde ile karşılaştırılmasına dayanmaktadır (Blois 1958).



**Şekil 2.8:** DPPH antioksidan madde ile reaksiyonu

Ekstraktların serbest radikal giderim aktiviteleri DPPH serbest radikali kullanılarak belirlendi (Wu ve diğ. 2006). DPPH'nin %0,004'lük (w/v) metanolik çözeltisinin 4 ml'si, ekstraktların 1 ml (0,2-1,0 mg)'si ile karıştırıldı ve 30 dakikalık karanlık ortamda oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonra, örneklerin absorbanı 517 nm’de ölçülmüştür. Özütlelerin absorban değerleri kullanılarak % inhibisyon değerleri aşağıda verildiği şekliyle hesaplanmıştır:

$$\text{İnhibisyon (\%)} = 100 - [(A_1 / A_0) \times 100]$$

Burada; A<sub>0</sub> kontrolün absorbanı ve A<sub>1</sub> örneğin absorbanıdır (Duh ve diğ. 1997).

Elde edilen % inhibisyon değerleri, mg/ml olarak belirlenen özütle derişimlerine karşı grafiğe geçirilmiştir. Pozitif kontrol olarak BHT kullanılmıştır. Tüm deneyler üç tekrar halinde yapılmıştır.

### 2.2.2.2 İndirgeme Gücü Kapasitesinin Belirlenmesi (FRAP Yöntemi)

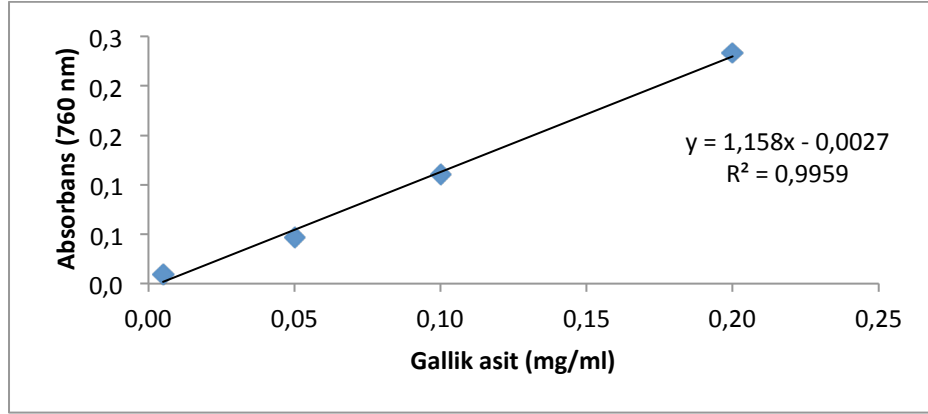
İndirgeme gücü kapasitesi Oyaizu (1986) tarafından belirlenen yöntemle göre tespit edilmiştir. Özütlelerin 2,5 ml'si (0,2–1,0 mg/ml) test tüplerine konularak her bir tüpe 2,5 ml 0,2 M fosfat tamponu (pH:6,6) ve 2,5 ml %1'lik potasyum ferrosiyanyür ilave edilmiştir. Karışım 50°C de 20 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra tepkime karışımına 2,5 ml %10'luk triklorasetik asit ilave edilerek çözülden 2,5 ml alınmıştır. Örnek üzerine 2,5 ml dH<sub>2</sub>O ve %0,1'lik 0,5 ml FeCl<sub>3</sub> ilavesinden sonra 700 nm'de absorban değerleri belirlenmiştir. Kontrol olarak örnek yerine çözücüler kullanılmıştır. Bu test sisteminde BHT pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

### 2.2.3 Toplam Fenolik Bileşik Miktarının Belirlenmesi (Folin-Ciocalteu Yöntemi)

Bu yöntem 1999'da Singleton ve diğ. tarafından önerilmiş ve daha sonra farklı uygulayıcılar tarafından geliştirilmiştir. Folin-Ciocalteu reaktifi (Folin Fenol Reaktifi veya Folin-Denis reaktifi) fosfomolibdat ve fosfotungstat karışımı bir reaktif olup fenolik ve polifenolik antioksidanların kolorimetrik tayininde kullanılır. Yöntem test edilen materyalin reaktifin oksidasyonunu inhibe etmesi için gerekli miktarını ölçer (Vinson ve diğ. 2005). Ancak bu reaktifin sadece total fenolik bileşik miktarını ölçmediği ve örnek içinde mevcut tüm indirgen maddelerle de reaksiyon vereceği bilinmektedir. Bu nedenle reaktifin sadece örnekteki fenolik bileşik düzeyini değil örneğin total indirgeme kapasitesini de ölçtüğü konusunda tartışma vardır (Ikawa ve diğ. 2003). Buna rağmen Folin-Ciocalteu reaktifi ile total fenolik bileşik miktarı tayini hemen hemen tüm antioksidan çalışmalarında örnekteki fenolik içeriğinin tayininde kullanılan standart bir yöntemdir. Ayrıca bu reaktifin ilaç analizinde (Rao ve diğ. 1978), idrar gibi biyolojik örneklerde (Roura ve diğ. 2006), gıda ürünlerinde (Mogalhaes ve diğ. 2006) fenolik bileşik düzeyi veya indirgeme kapasitesi ölçümleri için genişletilmiş veya modifiye edilmiş uygulamaları vardır.

Özütlelerin toplam fenolik bileşik miktarları Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR) kullanılarak gallik asite eşdeğer olarak belirlenmiştir (Chandler ve Dodds 1983, Singleton ve diğ. 1999). İçerisinde 1 ml özüt çözeltisi (2 mg/ml) bulunan test

tüplerine 45 ml dH<sub>2</sub>O, 1 ml FCR ve 3 dakika sonra da %2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisinden 3 ml ilave edilmiştir. Karışım 2 saat süresince oda sıcaklığında inkübasyona bırakılıp periyodik aralıklarla çalkalanmıştır. Örneklerin absorbans değerleri 760 nm'de tespit edilmiştir. Özütlerin toplam fenolik bileşik miktarları standart gallik asit grafiğinden (Şekil 2.9) elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlenmiştir:



**Şekil 2.9:** Gallik asit kalibrasyon grafiği ( $y = 1,158x - 0,0027$   $R^2 = 0,9959$ )

#### 2.2.4 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC/YPSK) ile Fenolik Bileşiklerin Analizi

Kromatografi bir karışımdaki bileşenlerin biri hareketli diğeri sabit iki faz arasındaki dağılım dengelerine dayanan analiz yöntemidir. Bileşenler hareketli faz tarafından sabit faz üzerinde sürüklenir. Hareketli faz ile etkileşimi fazla olan bileşenin sürüklenme hızı da fazladır (Wilard ve diğ. 1981).

Kromatografik yöntemlerde hareketli faz gaz, sıvı ya da süperkritik akışkandır, sabit faz ise sıvı ya da katı olabilir. Kromatografinin sınıflandırılması ise hem hareketli faza (Sıvı kromatografisi-SK/LC) hem de sabit faza (dağılım ve adsorbsiyon kromatografisi) göre yapılabilir. Kromatografik yöntemlerde ayırım, sabit faz sıvı ise dağılım, katı ise adsorbsiyon prensibi üzerinde gerçekleşir. Bunu yanında hareketli faz ile sabit fazın birbirine nasıl temas ettirildikleri esas alınarak başka bir sınıflandırma da (Kolon Kromatografisi ve Düzlemsel Kromatografi) yapılabilir (Skoog ve diğ. 1981). YPSK sabit fazı içeren kolonda analizi yapılacak

madde ya da karışımın yüksek bir basınçta hareketli faz (sıvı) ile sürüklenmesi prensibine dayanan kromatografik analiz yöntemidir. Analiz örneğini içeren sıvı çözelti sisteme enjeksiyon yoluyla uygulanır ve kolona hareketli fazın akışında çözünerek sürüklenir. Kolondan geçen madde ya da maddelerin çıkışı özel kimyasal ve/veya fiziksel etkileşimler neticesinde belli bir gecikme ile gerçekleşir. Bu gecikmeye retansiyon denir. Maddelerin kimyasal ve fiziksel davranış farkları retansiyon farkı oluşturur ve ayırımı sağlar (Meyer 1999, Wilard ve diğ. 1981).

YPSK bütün analitik ayırma yöntemleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Bunun nedenleri ise:

- Duyarlılığı olması
- Doğruluğu yüksek miktar tayinlerine kolayca uyarlanabilmesi
- Uçucu olmayan ve sıcakta kolayca bozulan maddelerin ayrılmasında uygun olması
- Sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir.

YPSK'nin uygulanabileceği maddelere örnek olarak amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, metal organik türevler ve çeşitli inorganik bileşikler gösterebilir (Skoog ve diğ. 1998).

YPSK temel olarak şu kısımlardan oluşur (Şekil 2.10):

*Rezervuar* içinde hareketli fazın olduğu ve hareketli fazın pompa tarafından çekilerek sisteme yönlendirildiği ilk birimdir. Hareketli faz olarak kullanılacak çözücü ve çözücü karışımları sabit fazın ve analizi yapılacak maddelerin polaritesine göre seçilir.

*Pompa*, 0,1 ml/dak. ile 10 ml/dak. arasında sabit bir akış, 350 -500 bar civarında da basınç sağlamalıdır. İzokritik akış (hareketli faz bileşimi sabittir), gradient akış (akış zamana göre değişen çözücü bileşimi kullanılır) olmak üzere iki tip akış gerçekleştirilebilirler.



*Enjeksiyon Birimi* analiz örneğinin sisteme verildiği ve hareketli faz akışıyla birlikte kolona yönlendiği kısımdır. Enjeksiyon manuel ya da otomatik enjektörler ile gerçekleştirilir.

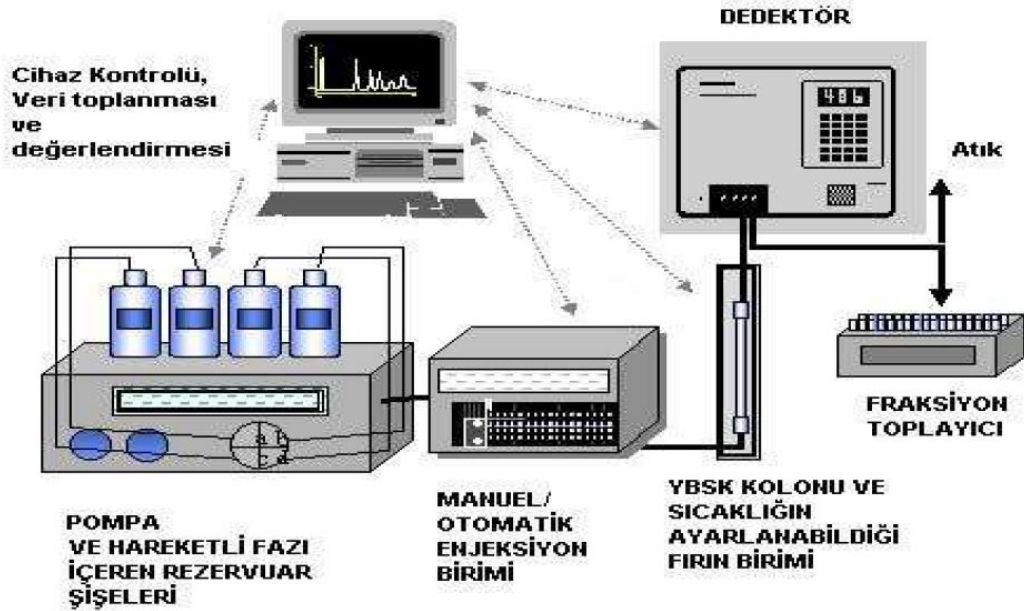
*Kolon* sabit fazın bulunduğu ve ayırımın gerçekleştiği birimdir. Kolon çapı 2-5 mm olanlar genellikle analitik amaçlarla kullanılmaktadır. Kolon uzunluğu artınca retansiyon hacmi de artar bu da elüattaki pik konsantrasyonunu düşürüp tespit limitini zayıflatır. Kolon dolguları normal faz ve ters faz olmak üzere iki temel gruba ayrılmaktadır. Normal faz YPSK esaslı, polarite farkı ile ayırım ve analiz olan iki sistemdir. Sabit fazı silika ya da alümina partiküller üzerine tutturulmuş su ya da trietilenglikol gibi oldukça polar maddeler oluşturmaktadır. Bu yöntem polar sabit faz ve non-polar hareketli fazdan meydana gelmektedir. Ters faz YPSK ise adından da anlaşılacağı gibi; non-polar sabit faz ve polar hareketli fazdan oluşan YPSK sistemidir. Sabit faz olarak en çok kimyasal olarak bağlanmış oktadesilsilan (ODS), 18 karbon atomlu n-alkan (C-18) kullanılır.

*Dedektörün görevi*, örnekteki bileşenlerden biri ayrılıp kolondan çıktığında tespit etmektir. Hareketli faz kompozisyonundaki değişimi fark eder, bunu konsantrasyonla orantılı elektriksel bir sinyale dönüştürür ve bu sinyallerden kromatogramı oluşturur.

Dedektör Türleri:

- UV Dedektörler
  - Sabit dalga boyunda
  - Değişken dalga boylarında
  - Diod-Array Dedektörler (DAD)
- Refraktif İndeks Dedektörler
- Floresans Dedektörler
- Elektrokimyasal Dedektörler
- Buharlaştırıcı Işık Saçılım (evaporative light scattering) Dedektörleri
- Kondüktivite Dedektörü

*Kaydedici*, dedektörden gelen sinyalleri kromotograma dönüştürerek kaydeder. Basit bilgisayar yazıcısından çok az karmaşık olabildikleri gibi gelişmiş yazılımlı bilgisayarlar ve bilgisayar programları da olabilirler (Meyer 1999, Skoog ve diğ. 1998, Willard ve diğ. 1981).



**Şekil 2.10:** Basit bir Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi düzeneği

YPSK çok sayıda analitik teknikle kombine edilerek kullanılabilir ancak bu tekniklerin içinde en önemlileri spektroskopik yöntemlerle birleştirilmiş olarak kullanılan YPSK uygulamalarıdır.

YPSK'nın birlikte kullanabildiği başlıca spektroskopik yöntemler:

- UV spektrofotometresi (YPSK-UV/DAD)
- YPSK- NMR (nükleer manyetik rezonans)
- SK-KS (kütle spektrometresi)

*C. graecum* ve *C. pseudibericum*'un etanolik tuber ekstraktlarının YPSK'da fenolik bileşik tayini Caponio ve diğ.(1999) tarafından kullanılan yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Numune hazırlama işleminde ekstraktlardan 20 mg alınıp 1 ml metanolde çözülmüştür.

Fenolik bileşik tayini için gallik asit, protokateşik asit, kateşin, *p*-hisroksi benzoik asit, klorojenik asit, kafeik asit, epikateşin, sirinjik asit, valinin, *p*-coum asit, ferulik asit, sinapinic asit, benzoik asit, *o*-coum asit, rutin, naringin, hesperidin, rosmarik asit, eriodistiol, sinamin asit, kuercetin, luteolin, kamferol, apigenin standartları kullanılmıştır.

### **Kullanılan Shimadzu Marka YSBK Cihazı ile İlgili Özellikler**

*Dedektör:* Diode Array Dedector (DAD)

*Sistem kontrol:* SCL-10Avp

*Mobil faz :*A %3 asetik asit, B metanol

*Auto sampler:* SIL-10ADvp

*Enjeksiyon hacmi:* 20 mikrolitre

*Pompa:* LC-10ADvp

*Akış hızı:* 0,8 ml/dk

*Degasser:* DGU-14A

*Kolon:* Agilent Eclipse XDB-C18 (250x4,60 mm) 5 mikron

*Kolon fırını ve sıcaklığı:* CTO-10Avp 30°C

### 2.2.5 Hücre Kültürleri Üzerindeki Sitotoksik İncelemeler

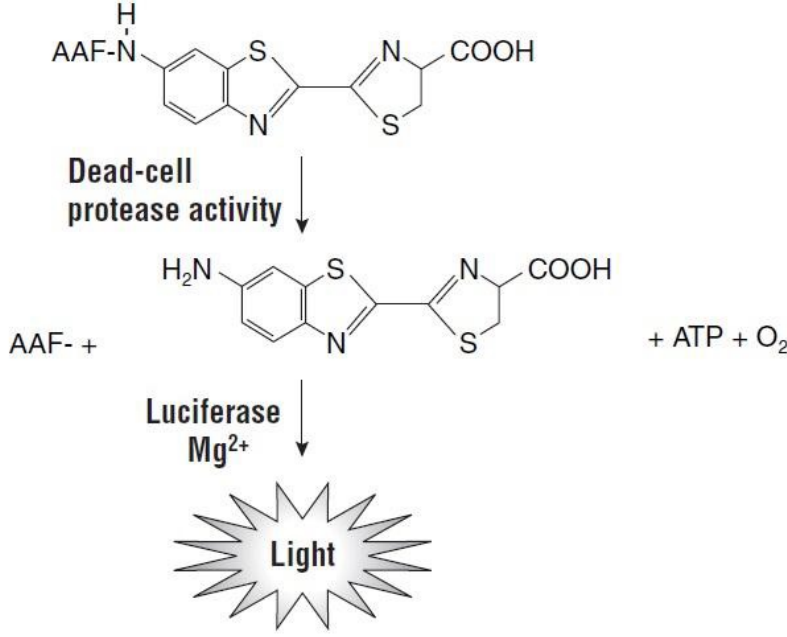
Bu çalışmalar Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

### 2.2.6 Hücre Kültürü

Projede KHDAK hücre dizileri olan PC9, PC14 ve A549 hücreleri kullanılmıştır. PC9 hücre hattında EGFR geninde ekzon 19'da E746-A750 delesyonu ve ekzon 21'de L858R nokta mutasyonu taşıması, PC14 hücre hattı ekzon 19'da E746-A750 delesyonu, A549 KRAS geninde kodon 12'de G12S nokta mutasyonu taşımaları dolayısıyla seçilmiştir. Bu mutasyonla PI3K/ AKT yolağının sürekli aktif olması nedeniyle proliferasyon, invazyon ve metastazda rol aldığı bu hücreler seçilmiştir. PC9 ve PC14 hücre hatları %10 Fetal Calf Serum ve %0.5'lik penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 besi ortamında, A549 hücre hattı %10 Fetal Calf Serum ve %0.5'lik penisilin/streptomisin içeren DMEM besi ortamında 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren ortamda inkübe edilmiştir.

### 2.2.7 Proliferasyonun Saptanması

*C. graecum* ve *C. pseudibericum* etanol ekstraktları, tripsinize edilerek sayılmış ve 96 kuyucuklu plaklara  $1 \times 10^3$  hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. PC9, PC14 ve A549 hücre hatlarına son konsantrasyonları 1000, 500, 250, 100, 50, 10, 1 ng/ $\mu$ l olmak üzere yedi farklı konsantrasyon uygulanmıştır. Bu şekilde hücreler 37°C'de, % 5 CO<sub>2</sub> ve % 95 nemli hava içeren ortamda 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda Cytotox Glo kit (Promega firmasından temin edilmiştir) kullanılarak Glomax Multi Detection System (Promega) cihazı ile 0. ve 72. saatlerdeki hücre proliferasyonu luminometrik olarak (Şekil 2.11) ölçülmüştür. Ölçüm sonucu ölü hücrelerin sayısı elde edilmiştir. Daha sonra etkin dozu belirlenmesi için IC<sub>50</sub> değeri hesaplanmıştır.



**Şekil 2.11:** Cytotox Glo kitinin canlı hücreler içindeki ATP molekülünü saptaması

### 2.2.8 İnvazyonun Saptanması

Planlanan çalışmada bitki ekstratlarının hücre invazyonuna etkisinin saptanması için BioCoat Matrigel Invazyon Chamber-invazyon odaları (BD Biosciences, Clontech) kullanılmıştır. Bu invazyon odacıklarının hücelere sağladıkları özel şartlar sayesinde in vitro koşullar altında hücrelerin invaziv özellikleri saptanabilmektedir. Bu invazyon odacıkları 8 mikron çaplı porlar içeren bir membran ile örtülüdür ve bu porlu membran ayrıca bir matrijel matriks ile kaplıdır. Bu matrijel matriks bize bazal membranı in vitro koşullarda oluşturma imkanı sağlamaktadır. Bu membran sayesinde invasive özelliği olmayan hücrelerin membranın diğer yüzeyine geçmesi engellenmektedir. Bu membrandan diğer yüze ancak invaziv hücreler geçebilmektedir. Dolayısı ile matrijel membran bize invaziv ve invaziv olmayan hücrelerin birbirinden ayırabilme imkanı sunmaktadır.

PC9, PC14 ve A549 hücreleri her invazyon odasında  $1,25 \times 10^5$  olacak şekilde invazyon odalarına ekilerek üzerlerine 0,5 ml Fetal Calf Serum içermeyen RPMI 1640 konulurken invazyon odacığının dışına 0,75 ml %10 Fetal Calf Serum içeren

RPMI 1640 eklenmiştir. PC9, PC14 ve A549 hücre hatlarına *C. graecum* ve *C. pseudibericum* etanol ekstraktları Tablo 3.11’de belirtilen IC<sub>50</sub> değerlerine göre uygulanmıştır. Hücreler 24 saat 37°C’de CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edilmiştir. İnkübasyon saatinin sonunda invaziv özellikte olan hücreler invazyon odacığının porlu olan membranının dış yüzeyine geçeceklerinden invazyon odacığının içindeki besi yeri uzaklaştırıldıktan sonra spatülle iç yüzeyindeki hücreler kazınıp atılmıştır. Dış yüzeydeki hücreler önce 2 ml metanol ile fikse edildikten sonra 2 ml Toluidine (%1) ile boyanmış, daha sonra mikroskop altında invaziv hücreler sayılmıştır. % invazyon değerlerini hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\% \text{ invazyon} = (\text{matrijel matriks bazal membranındaki hücre sayısı} / \text{Kontrol membranındaki hücre sayısı}) \times 100$$

### 2.2.9 MiRNA İzolasyonu

Öncelikle akciğer kanseri, metastaz, apoptozis, invazyon ile ilgili miRNA profilleri literatür taraması yapılarak 19 adet miRNA belirlenmiştir. Belirlenen miRNA’ların erişim kodları ve hedef genleri (hedef puanı 100 olanlar) (Wang ve diğ. 2008) Tablo 2.3’te gösterilmiştir.

**Tablo 2.3:** Kullanılan miRNA’ların erişim kodları ve hedef genleri

miRNA Adı	miRNA Erişim Kodu	Hedef Genler
miR-146-5p	MIRT004459	<i>NFKB, NOVA1, SRSF6</i>
let-7a-5p	MIRT004830	<i>NFKB, C-MYC, DLD-1, RAS, SMAR, CAD1, FAM178A, LIN28B</i>
miR- 218	MIRT006529	<i>NFKB1, CDK9, TP53INP2, FAM63B, SLC38A2</i>
miR-21-5p	MIRT006529	<i>NFKB, PTEN, EGFR, PDCD4, RECK, NFIB, TPM1, SPRY2</i>

miR-31-5p	MIRT000088	<i>RHOA2, RSBN1, IDE, PIK3C2A</i>
miR-155-5p	MIRT001961	<i>RHOA, WEE1, IRF2BP2, UNEP2, MLH1, MSH2, MSH6</i>
miR-200c	MIRT007345	<i>RHOA2, ZEB1, ZEB2, TRIM33,PTPN21,LHFP</i>
miR-375	MIRT019977	<i>RHOA2, ELAV24, CCDC129, HNF1B</i>
miR-10a-5p	MIRT05509	<i>MAPK1/2/3, BDNF,KCNA6, RORA</i>
miR-145-5p	MIRT021513	<i>MAPK1/2/3, IRS-1, C-MYC, YES1, STAT1, OCT4</i>
miR-92b-3P	MIRT040708	<i>MAPK1/2/3, CD69,SLC12A5, EFR3A,USP28</i>
miR-494-3P	MIRT001209	<i>PTEN, MFAP3L, PTPNI2, NOVA1</i>
miR-7	M0000264	<i>NFKB1,RIMKLB, CCNG2, MAPK1IP1L</i>
miR-145	MIRT003325	<i>EGFR UBN, ATRX, CCDC88A</i>
miR-128b	MIRT006585	<i>EGFR,CBFA2T3, GNG13, UNC5A</i>
miR-27a-3p	MIRT007360	<i>EGFR, PTEN, TP53, EYA4, AFF4, GSPT1</i>
miR-200b-3p	MIRT006670	<i>BCL2, TCEB1, PTPN21, LHFP</i>
miR-191-5p	MIRT006721	<i>CDK9, TAF5, NAURL4, MAP3K12</i>
miR-218_3p	MIRT007145	<i>GLCE, PIEZO2, C3ORF70</i>

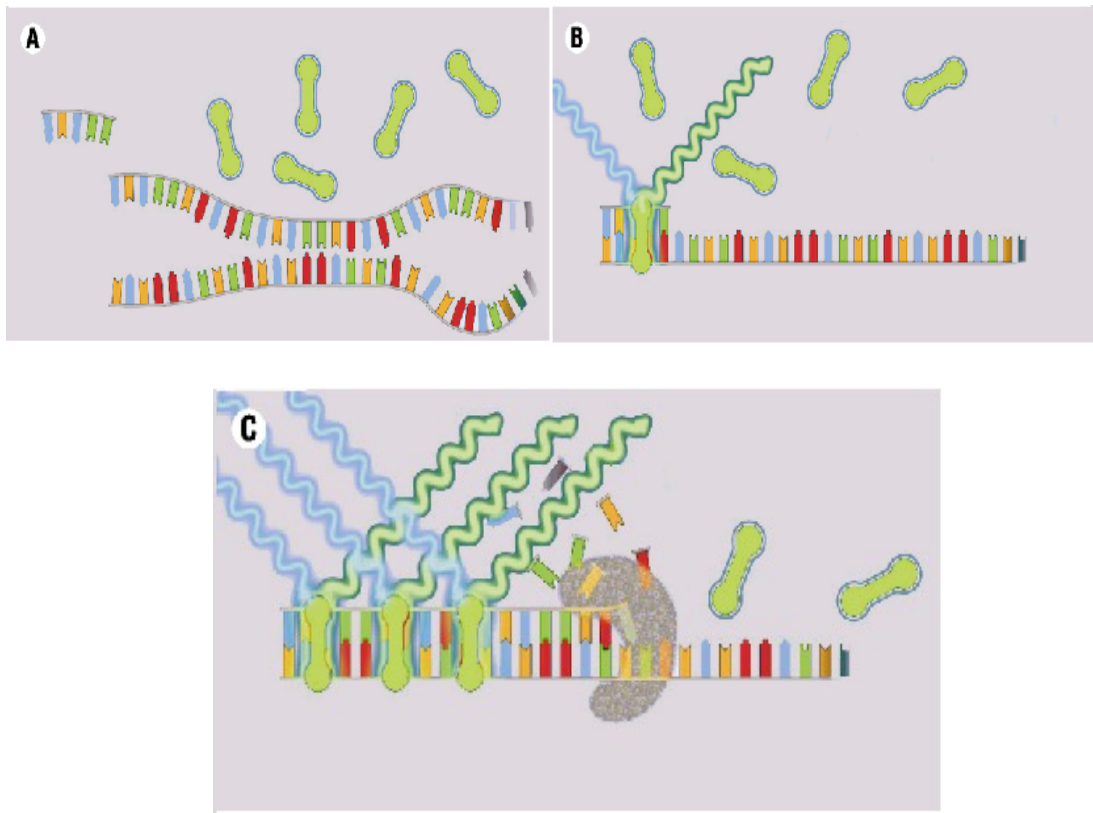
miRNA izolasyonu için *C. graecum* ve *C. pseudibericum* etanol tuber ekstraktları PC9, PC14 ve A549 hücre hatlarına daha önceden belirlenmiş olan IC<sub>50</sub> değerlerinde uygulanmıştır. Petrideki hücreler 700 µl QIAzol lysis Reagent ile kaldırılıp 1,5 ml'lik ependorflara aktarılmıştır. Oda sıcaklığında (15-25 C'de) 5 dk bekletildikten sonra 140 µl kloroform eklenmiştir ve 15 saniye vorteks sonrası oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübasyon edilmiştir. İnkübasyon sonrası 12000 g'de +4°C'de 15 dakika santrifüj edilip supernatant kısmı yeni bir ependorfa aktarılmıştır (aradaki agoroz faza dokunulmadan). Ependorfa aktarılan supernatantın, 1,5 katı kadar %100'lük etil alkolle yavaşça pipetaj yapılmıştır. RNeasy min elute spin kolonlarına 700 µl örnek koyulup, 8000 g'de veya üstü bir hızda oda sıcaklığında 15 saniye santrifüj edilmiştir. Daha sonra kolona 700 µl RWT buffer eklenmiştir ve 8000 g'de 15 saniye santrifüj yapılmıştır. Bu işlemleri takiben 500 µl RPE buffer 8000 g'de 15 saniye santrifüj edilmiştir ve sonrasında 500 µl %80'lik etil alkol 2 dk 8000 g'de santrifüj edildikten sonra Spin kolonlar 1,5 ml'lik toplama tüplerine yerleştirilmiştir ve 20 µl RNase-free water spin kolonun ortasına koyulup 1 dakika yüksek hızda santrifüj yapılarak kolonda bulunan miRNA 1,5 ml'lik ependorfa toplanmıştır.

### 2.2.10 Eş Zamanlı PZR

Eş zamanlı PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), nükleik asit amplifikasyonunun eş zamanlı olarak gözlenmesini sağlayan bir PZR teknolojisidir. DNA (deoksiribonükleik asit) sarmalına bağlanarak floresan ışığa yapan özel boyalarla (SYBR Green, SYTO9 gibi) veya yıkıma bağlı sinyal oluşturan prob dizileri aracılığı ile amplifikasyon miktarının tespit edilmesi sağlanır. Eş zamanlı PZR her PZR döngüsü sonunda tüp içinde oluşan çift zincirli ürün miktarının ölçülebilmesini ve kantitatif analizlerin yapılmasını sağlar (Bustin ve diğ. 2005, Nolan ve diğ. 2006). SYBR Green I, gen ekspresyonu kantitasyonunda sıklıkla kullanılan, çift zincirli DNA'ya bağlanarak floresan özellik kazanan bir boyadır. Bu boyanın çift zincirli PZR ürününe bağlanması ürün miktarı ile orantılı olarak floresans açığa çıkmasını sağlar.

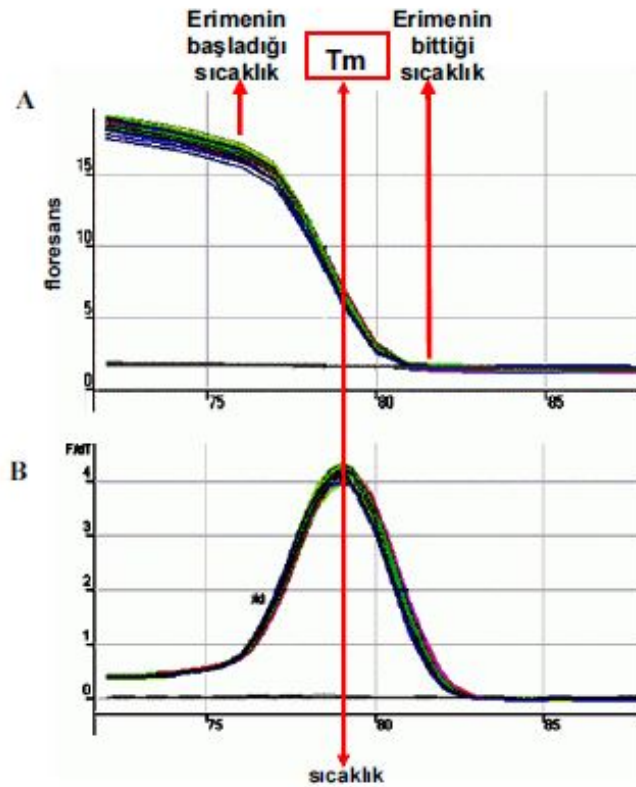


PZR primerlerinin sadece özgül cDNA'ya bağlanması, primer-dimer veya özgül olmayan amplifikasyon ürünü oluşturmaması gereklidir. SYBR Green tekniği ile gen ekspresyonu kantitasyonu için uygun primer seçimi en önemli aşamadır. Bu tekniğin başarıyla uygulanabilmesi için RNA (ribonükleik asit) izolasyonu sırasında sıklıkla gözlenen genomik DNA kontaminasyonu da SYBR Green tekniğinin başarısını tehdit eden bir diğer unsurdur. Özgül amplifikasyon ürünü elde etmek için, cDNA amplifikasyon primerlerinin farklı ekzonlardan seçilmesi, amplicon uzunluklarının kısa tutulması (120-250 baz) ve primerlerin bağlandığı ekzonların uzak seçilmesi dikkat edilmesi gereken noktalardır.



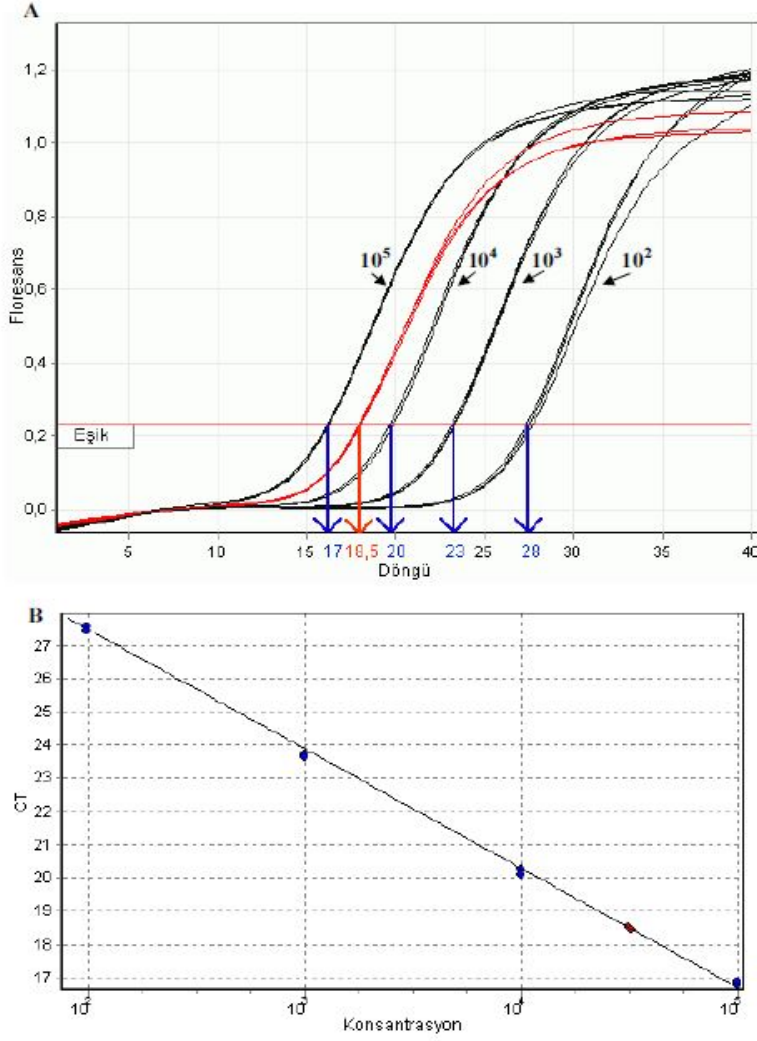
**Şekil 2.12:** SYBR Green tekniği **A.** Başlangıç aşaması: Reaksiyonun başlangıcında ortamda SYBR Green, primerler ve tek zincirli DNA bulunduğu için floresans sinyal yoktur. **B.** Primerin hedef moleküle bağlanması: Primerin bağlanması ile amplifikasyon sonucu SYBR Green oluşan çift zincirli DNA'ya bağlanır ve az miktarda floresans sinyal açığa çıkar. **C.** Primer uzaması: Amplifikasyon oranına bağlı olarak çift zincirli DNA'nın yapısına daha fazla boya katılarak floresans sinyal artar.

SYBR Green I, primer dimerleri ve özgül olmayan PZR ürünleri gibi çift zincirli DNA moleküllerine de bağlanabilir (Bustin ve Mueller 2005). Bu nedenle floresans artışı her zaman özgül amplifikasyonu göstermez. Amplifikasyon ürününün özgül olup olmadığı, agaroz jel elektroforezi ile incelenir. Bununla birlikte eş zamanlı PCR cihazlarında primer dimer oluşumu ve özgül olmayan amplifikasyon ürünlerinin tespiti için “melting curve” (erime eğrisi) analizi yapılabilmektedir (Şekil 2.13). Her çift zincirli DNA kendine özgül bir “melting temperature,  $T_m$ ” (Çift zincirli DNA’nın %50’sinin tek zincirli hale geçmesi için gerekli olan sıcaklık) değerine sahiptir. Amplifikasyondan sonra sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek belirli aralıklar ile floresans miktarı tespit edilir. Çift zincirli DNA denatüre olmaya başlayınca interkale olan boya serbest kaldığı için ölçülen floresans miktarı azalmaya başlar. Bu şekilde elde edilen erime eğrisinden yararlanılarak amplifikasyonun özgüllüğü belirlenebilir.  $T_m$  değerinin tam olarak saptanabilmesi için erime eğrisinin zamana karşı türevi çizilebilir. Bu türev analiz, sıklıkla başvurulan bir yöntemdir (Şekil 2.12-B).



Şekil 2.13: Erime eğrisi analizi

Eşik döngü değeri (threshold cycle = Ct) eş zamanlı PZR uygulamalarında önemli bir parametredir. Ct değeri, amplifikasyon sırasında tespit edilen floresan ışınım eşik değerinin aşıldığı döngü sayısıdır. Başka bir ifade ile üründeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir. Farklı PZR reaksiyonlarında yer alan kalıp örneklerin miktarı Ct değerleri karşılaştırılarak öngörülebilir (Wong Medrano 2005). Florimetrik PZR yöntemi ile yapılan kantitasyon çalışmalarında, kalıp DNA miktarı bilinen standart örneklerle ait Ct değerleri ile incelenen örneğin Ct değeri karşılaştırılarak kantitasyon yapılmaktadır. Bu nedenle, kantitatif PZR analizlerinde standart olarak tanımlanan kontrol örneklerine ihtiyaç vardır. Standart örnek olarak içinde bulunan kalıp DNA miktarı bilinen örneklerle yapılan çalışmalara mutlak kantitasyon adı verilir. Bir örneğin içinde yer alan kalıp miktarının diğer bir örnekle karşılaştırıldığı durumlarda mutlak kantitasyona gerek yoktur. Bu durumda, standart örneğin içinde bulunan kalıp DNA miktarının bilinmesi önemli değildir. İyi ekspresyon sağlayan bir örneğin seri dilüsyonları standart olarak kullanılabilir. Bu çalışmalarda önemli olan standartlar arasındaki kalıp oranının tekrarlanabilir ve ölçülebilir olmasıdır. Bu tip çalışmalara göreceli kantitasyon (relative quantitation) adı verilir (Pfaffl 2001). Bir standart örnekten seri dilüsyonlar hazırlanır. Standart dilüsyonlara varsayılan bir konsantrasyon miktarı atfedilir ve genellikle bu miktar “varsayılan birim” (arbitrary unit) olarak ifade edilir. Bu standartlar kullanılarak, atfedilen konsantrasyon değerlerine karşılık gelen dilüsyonların Ct değerleri belirlenerek kantitasyon için gerekli olan regresyon eğrisi çizilir. Bu eğri standart eğri olarak da ifade edilmektedir. Kantitasyon aşamasında, örneklerin Ct değerlerinin regresyon eğrisi üzerinde hangi atfedilen değeri temsil ettiklerine bakılarak göreceli bir miktar belirlenir. Bu şekilde kantitatif PZR verilerinin analizinde; mutlak ve göreceli kantitasyon kullanılır. Ct değerleri ile amplifikasyon eğrileri ve bu eğriler kullanılarak çizilen standart eğri bir örnek olarak verilmiştir (Şekil 2.14) (Yüzbaşıoğlu 2008).



**Şekil 2.14:** PCR amplifikasyon eğrisi ve standart eğri. A. Standart dilüsyon örneklerinin amplifikasyon eğrisi ve Ct değerleri (mavi oklar) gösterilmiştir. Bir adet bilinmeyen örnek ve Ct değeri kırmızıyla gösterilmiştir. B. Standart örneklerin Ct değerleri kullanılarak çizilen standart eğri gösterilmiştir. Bilinmeyen örnek kırmızı ile ifade edilmiştir

### 2.2.11 Verilerin Değerlendirilmesi

Proliferasyon ve invazyon deneylerinden elde edilen sonuçlar istatistiksel analiz program olan SPSS'in (Statistical Package for the Social Sciences) 17.0 sürümündeki ilişkilendirilmiş örneklemeler için T testi (paired sample T test) kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu testler sayesinde gruplarımızın hem kontrol hem de birbirleri arasındaki farkın istatistiksel olarak  $p < 0,05$  düzeyinde anlam taşıyıp taşımadığı test edilmiştir.

### 3. BULGULAR

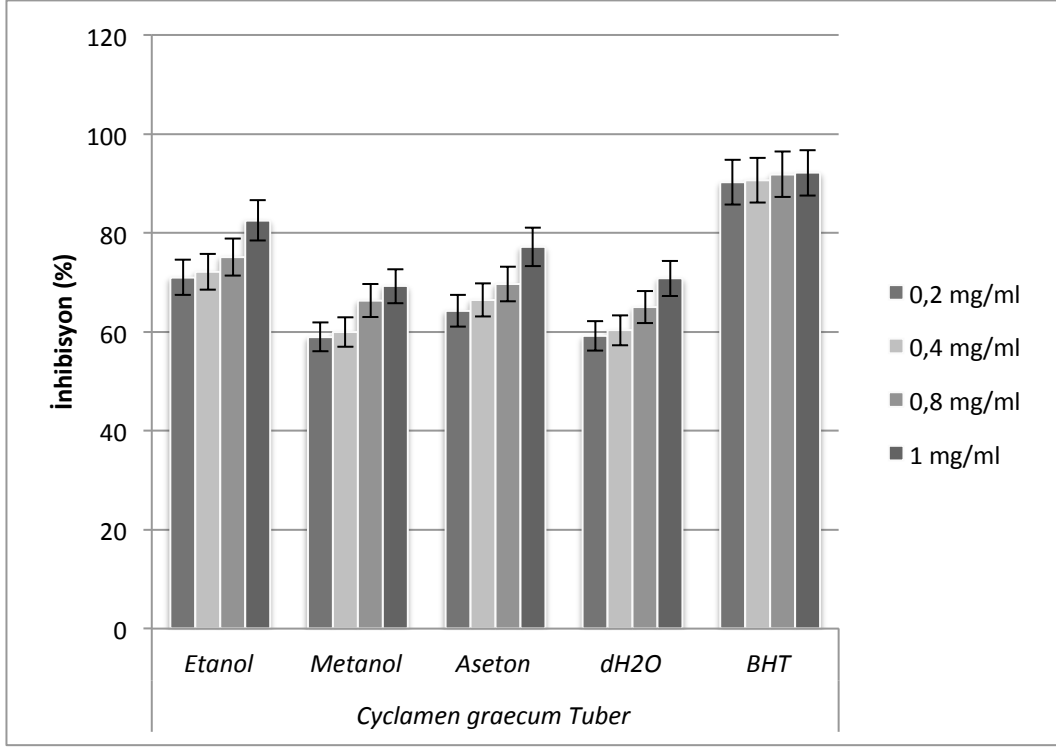
#### 3.1 Antioksidan Aktivite Sonuçları

##### 3.1.1 Serbest Radikal Giderim Aktivite Sonuçları

Cuendet ve diğ. (1997) kullandığı DPPH serbest radikal giderim aktivite belirleme yöntemi kullanılarak, *C. graecum* ve *C. pseudibericum* bitki türlerinin DPPH serbest radikal giderim aktivite değerleri belirlenmiştir (Tablo 3.4-5-6-7). *C. graecum* ve *C. pseudibericum* bitkisinin farklı konsantrasyonlardaki DPPH serbest radikal giderim kapasiteleri Şekil 3. 15-16-17-18'de verilmiştir.

**Tablo 3.4:** DPPH yöntemi ile *C. graecum* tuber ekstraktlarının Serbest Radikal Giderim Kapasitelerinin % inhibisyonları

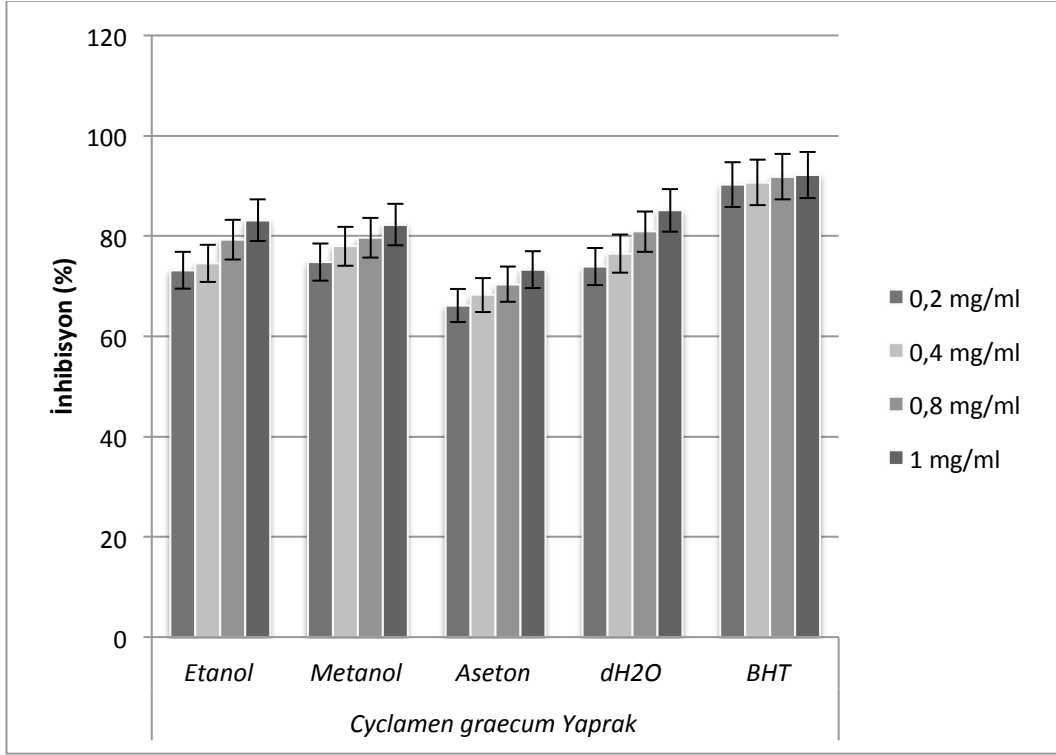
Bitki Ekstraktları		0,2 mg/ml	0,4 mg/ml	0,8 mg/ml	1 mg/ml
<i>C. graecum</i> Tuber	Etanol	71,01	72,13	75,13	82,53
	Metanol	58,99	59,92	66,31	69,24
	Aseton	64,27	66,43	69,64	77,14
	dH <sub>2</sub> O	59,15	60,30	64,96	70,78



**Şekil 3.15:** DPPH yöntemi ile *C. graecum* tuber ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda serbest radikal giderim kapasiteleri (p<0,05)

**Tablo 3.5:** DPPH yöntemi ile *C. graecum* yaprak ekstraktlarının Serbest Radikal Giderim Kapasitelerinin % inhibisyonları

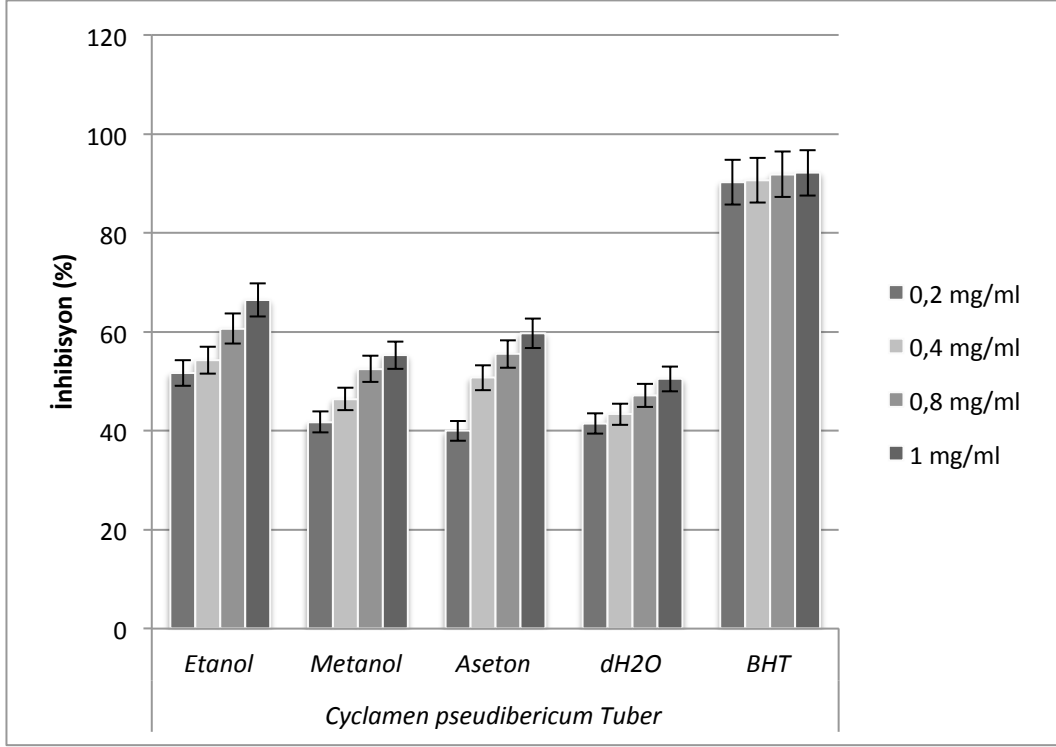
Bitki Ekstraktları		0,2 mg/ml	0,4 mg/ml	0,8 mg/ml	1 mg/ml
<i>C. graecum</i> Yaprak	<b>Etanol</b>	73,16	74,51	79,26	83,15
	<b>Metanol</b>	74,80	77,97	79,65	82,27
	<b>Aseton</b>	66,16	68,24	70,36	73,29
	<b>dH<sub>2</sub>O</b>	73,91	76,52	80,90	85,13



**Şekil 3.16:** DPPH yöntemi ile *C. graecum* yaprak ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda serbest radikal giderim kapasiteleri (p<0,05)

**Tablo 3.6:** DPPH yöntemi ile *C. pseudibericum* tuber ekstraktlarının Serbest Radikal Giderim Kapasitelerinin % inhibisyonları

Bitki Ekstraktları		0,2 mg/ml	0,4 mg/ml	0,8 mg/ml	1 mg/ml
<i>C. pseudibericum</i> Tuber	Etanol	51,65	54,25	60,64	66,42
	Metanol	41,76	46,43	52,50	55,27
	Aseton	39,97	50,74	55,51	59,67
	dH <sub>2</sub> O	41,50	43,36	47,12	50,50

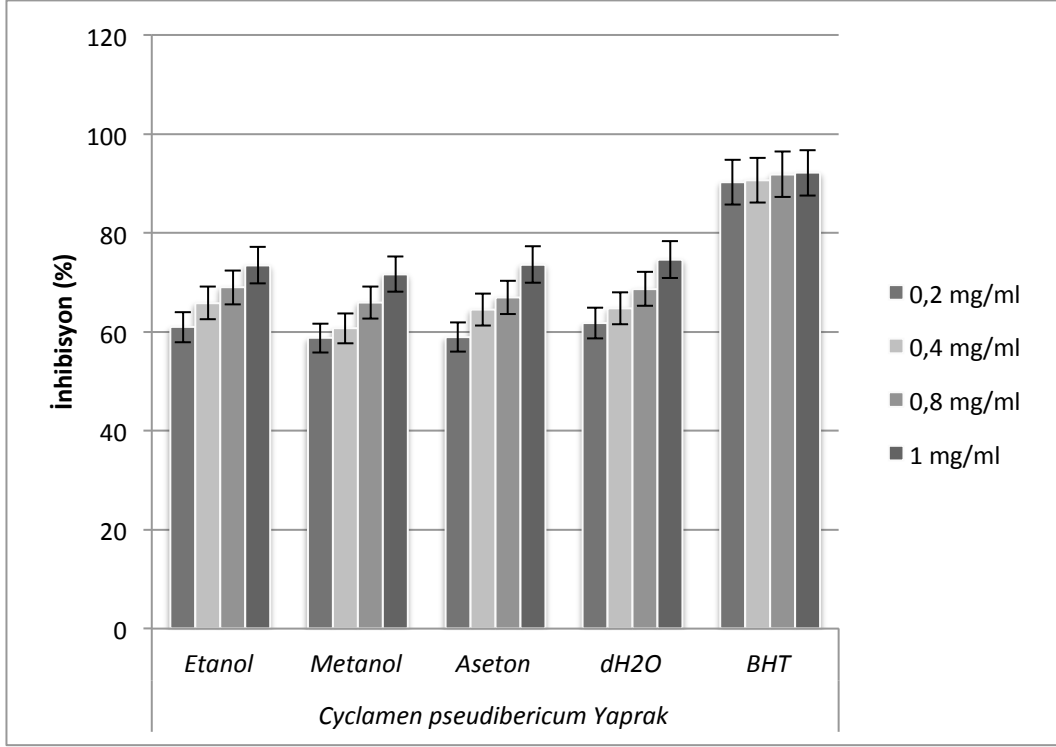


**Şekil 3.17:** DPPH yöntemi ile *C. pseudibericum* tuber ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda serbest radikal giderim kapasiteleri (p<0,05)

**Tablo 3.7:** DPPH yöntemi ile *C. pseudibericum* yaprak ekstraktlarının Serbest Radikal Giderim Kapasitelerinin % inhibisyonları

Bitki Ekstraktları		0,2 mg/ml	0,4 mg/ml	0,8 mg/ml	1 mg/ml
<i>C. pseudibericum</i> Yaprak	<b>Etanol</b>	60,94	65,84	69,00	73,45
	<b>Metanol</b>	58,75	60,71	65,91	71,64
	<b>Aseton</b>	58,95	64,50	66,94	73,60
	<b>dH<sub>2</sub>O</b>	61,76	64,77	68,65	74,61





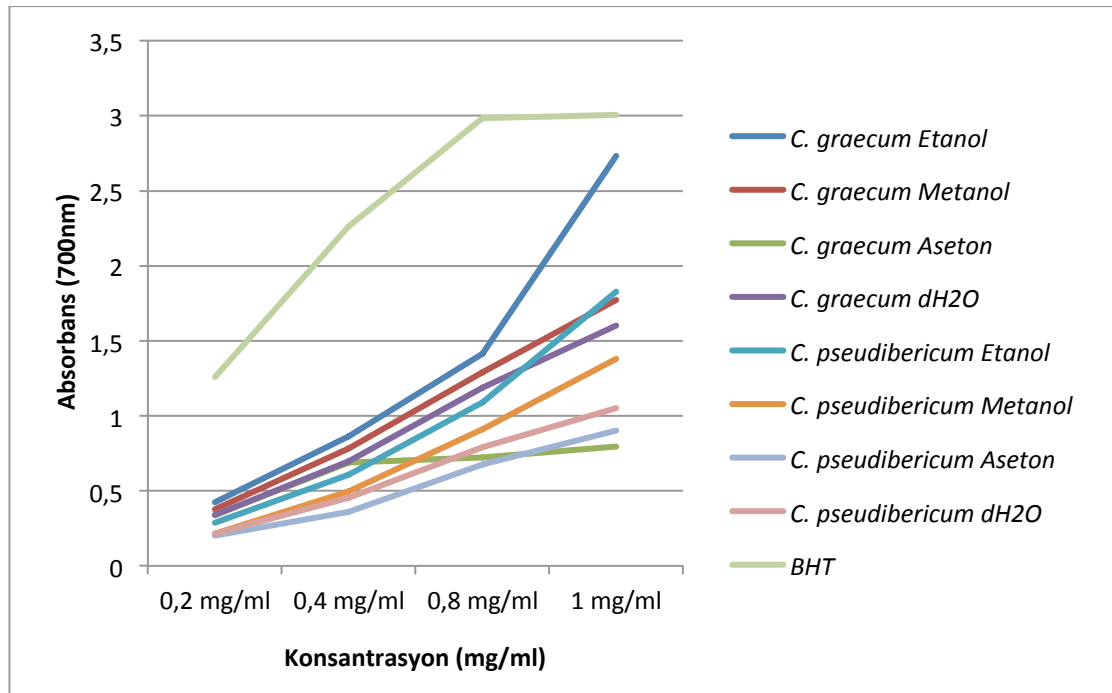
**Şekil 3.18:** DPPH yöntemi ile *C. pseudibericum* yaprak ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda serbest radikal giderim kapasiteleri ( $p < 0,05$ )

### 3.1.1.1 İndirgeme Gücü Kapasitesinin Belirlenmesi

İndirgeme gücü kapasitesi Oyaizu (1986) tarafından belirlenen yöntemle tespit edilmiştir. Fe (III) iyonun indirgeme kapasitesi sıklıkla elektron verme yeteneğinin bir göstergesi olarak kullanılır. Bu durum fenolik antioksidanların önemli bir mekanizması olup diğer antioksidan özellikler ile güçlü bir korelasyon gösterir (Dorman ve diğ. 2003). İndirgeme gücünde absorbansın artması ile antioksidan kapasite doğru orantılıdır. *C. graecum* ve *C. pseudibericum* tuber ve yaprak ekstraktlarının indirme gücü kapasiteleri Şekil 3.19 ve 3.20’de gösterilirken, 700 nm’deki absorbansları ise Tablo 3.8 ve 3.9’da gösterilmiştir.

**Tablo 3.8:** *C. graecum* ve *C. pseudibericum* tuber ekstraktlarının ve BHT'nin 700 nm'deki absorbanları

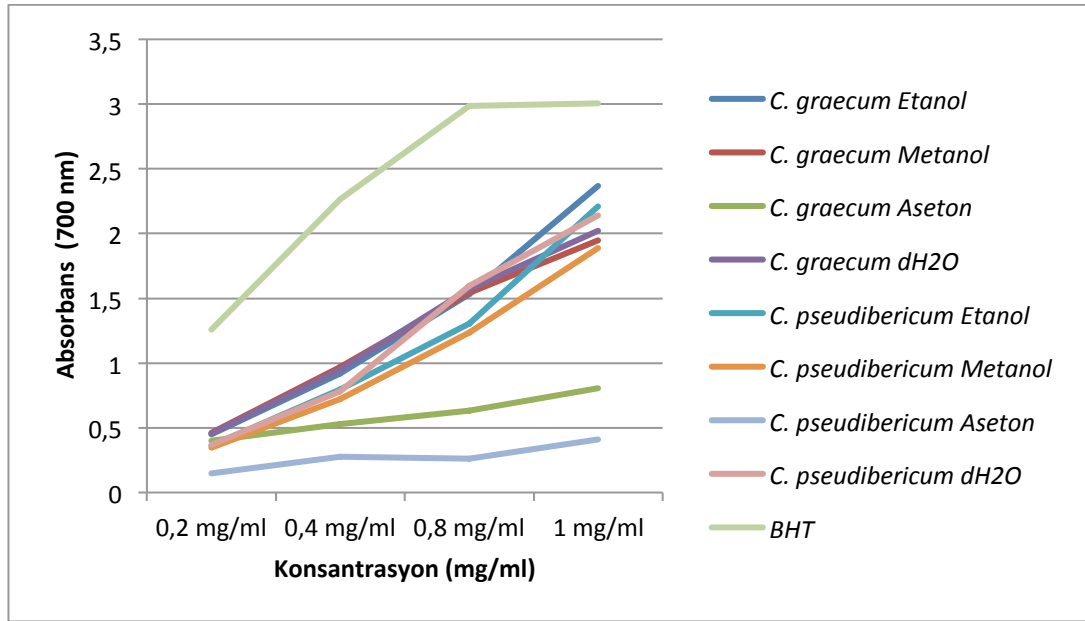
Bitki Ekstraktları		0,2 mg/ml	0,4 mg/ml	0,8 mg/ml	1 mg/ml
<i>C. graecum</i> Tuber	Etanol	0,424	0,865	1,412	2,731
	Metanol	0,376	0,783	1,290	1,772
	Aseton	0,338	0,690	0,724	0,796
	dH <sub>2</sub> O	0,339	0,696	1,186	1,600
<i>C. pseudibericum</i> Tuber	Etanol	0,286	0,609	1,090	1,829
	Metanol	0,215	0,498	0,909	1,381
	Aseton	0,202	0,359	0,676	0,900
	dH <sub>2</sub> O	0,213	0,454	0,790	1,052
<b>BHT</b>		1,258	2,264	2,985	3,004



**Şekil 3.19:** *C. graecum* ve *C. pseudibericum* tuber ekstraktlarının indirgeme güçlerinin karşılaştırılması

**Tablo 3.9:** *C. graecum* ve *C. pseudibericum* yaprak ekstraktlarının ve BHT'nin 700 nm'deki absorbanları

Bitki Ekstraktları		0,2 mg/ml	0,4 mg/ml	0,8 mg/ml	1 mg/ml
<i>C. graecum</i> Yaprak	Etanol	0,449	0,917	1,533	2,370
	Metanol	0,460	0,967	1,542	1,946
	Aseton	0,399	0,528	0,633	0,803
	dH <sub>2</sub> O	0,454	0,946	1,569	2,028
<i>C. pseudibericum</i> Yaprak	Etanol	0,362	0,794	1,305	2,208
	Metanol	0,346	0,720	1,236	1,890
	Aseton	0,147	0,274	0,259	0,411
	dH <sub>2</sub> O	0,367	0,778	1,597	2,139
<b>BHT</b>		1,258	2,264	2,985	3,004



**Şekil 3.20:** *C. graecum* ve *C. pseudibericum* yaprak ekstraktlarının indirgeme güçlerinin karşılaştırılması

### 3.2 Toplam Fenolik Madde Miktarı Sonuçları

*C. graecum* ve *C. pseudibericum*'un toplam fenolik içerikleri literatürlerde en sık kullanılan metot olan Folin yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntemde bitkilerin fenolik madde içeriği standart bir fenolik madde kullanılarak ona eş değer olarak verilmiştir. Bu metotta gallik asit standart fenolik madde olarak kullanılmıştır. Bitki ekstraktlarının absorbansları ve bu absorbanslara karşılık gelen gallik aside eş değer (GAE) fenolik madde içerikleri hesaplanarak gösterilmiştir (Şekil 2.9).

Çalışılmış tüm örneklerin toplam fenolik bileşik miktarı tayinlerinde bu grafik kullanılmıştır. Tüm ekstraktların Folin Ciocalteau yöntemi kullanılarak elde edilen toplam fenolik bileşik miktarı değerleri Tablo 3.10'de gösterilmiştir.

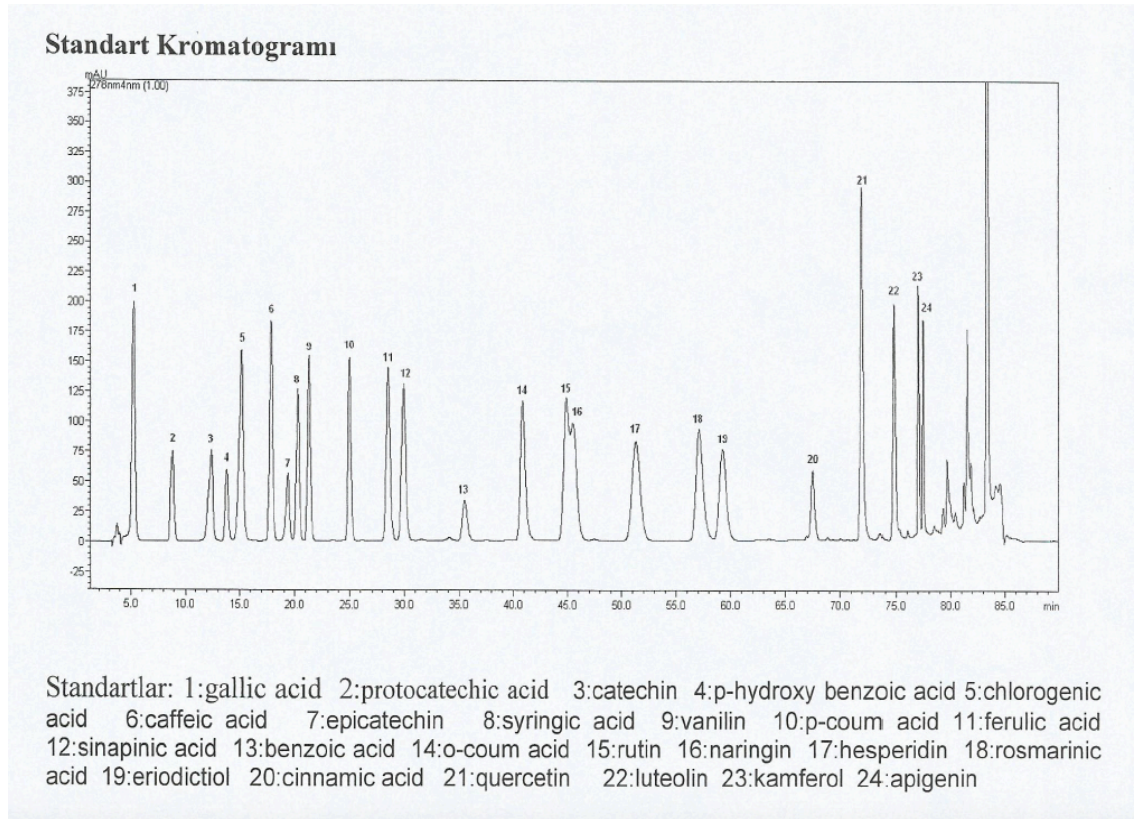
**Tablo 3.10:** *C. graecum* ve *C. pseudibericum*'a ait etanol, metanol, aseton ve dH<sub>2</sub>O ekstraktlarının gallik aside eş değer (mg/g GAE) toplam fenolik madde miktarları

Bitki Ekstraktları		Tuber	Yaprak
<i>C. graecum</i>	Etanol	68,52 ±,0,02	73,18±,0,12
	Metanol	55,53±,0,01	60,17±,0,03
	Aseton	49,71±,0,05	58,44±,0,62
	dH <sub>2</sub> O	68,22±,0,12	58,76±,0,33
<i>C. pseudibericum</i>	Etanol	21,34±,0,22	55,53±,0,47
	Metanol	18,95±,0,03	36,55±,0,76
	Aseton	14,18±,0,17	24,12±,0,19
	dH <sub>2</sub> O	54,65±,0,11	32,83±,0,20

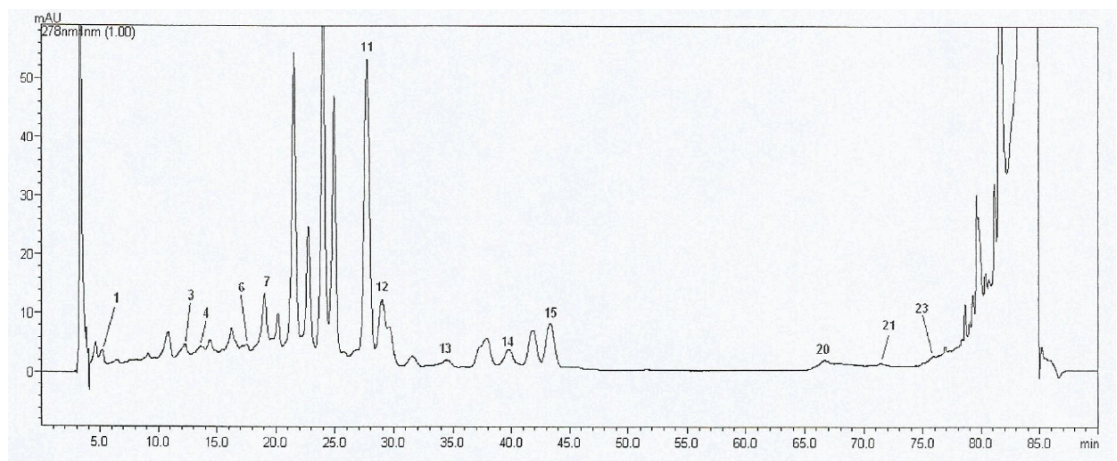
### 3.3 İçerik Analiz Sonuçları

*C. graecum* ve *C. pseudibericum*'un etanol ekstraktlarının YPSK'da fenolik içerik tayini için gallik asit, protokateşik asit, kateşin, *p*-hisroksibenzoik asit, klorojenik asit, kafeik asit, epikateşin, sirinjik asit, valinin, *p*-kumarik asit, ferulik asit, sinapinic asit, benzoik asit, *o*-kumarik asit, rutin, naringin, hesperidin, rosmarik asit, eriodistiol, sinamin asit, kuercetin, luteolin, kamferol, apigenin standartları (Şekil 3.22) ile (Caponio ve diğ. 1999) fenolik bileşik tayin yöntemi kullanılmıştır.

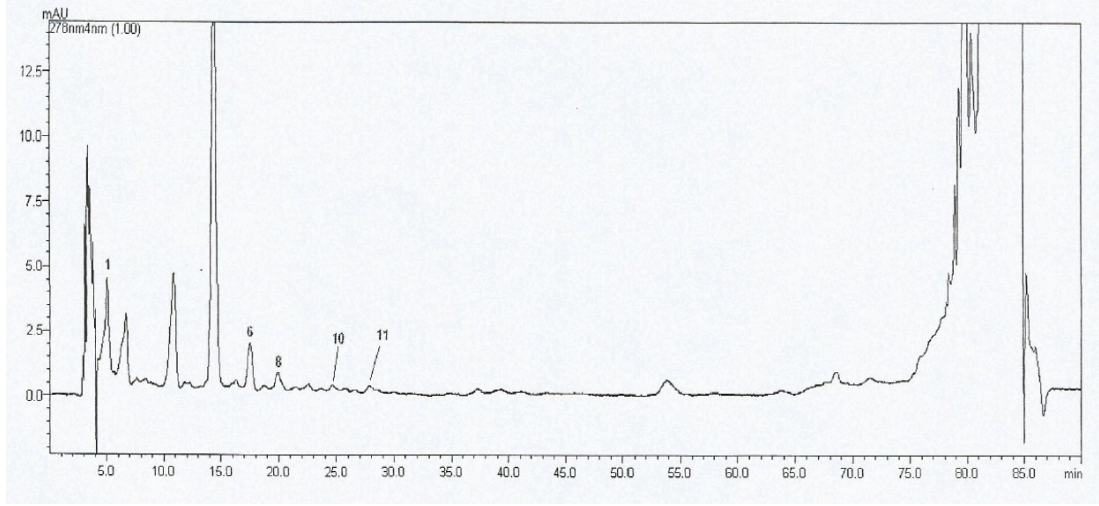
*C.graecum* için yapılan YPSK analizde elde edilen fenolik bileşenlerin kromatogramları şekil 3.23’de ve *C.pseudibericum*’un YPSK analizinden elde edilen fenolik bileşenlerin kromatogramı şekil 3.24’de verilmektedir.



**Şekil 3.21:** YPSK’da *C. graecum* ve *C. pseudibericum* ekstraktları için kullanılan standartların kromatogramları



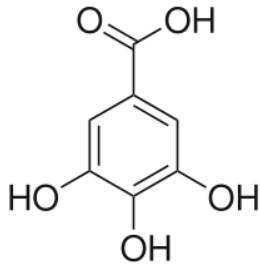
**Şekil 3.22:** *C. graecum*’un kromatogramı



**Şekil 3.23:** *C. pseudibericum*'un kromatogramı

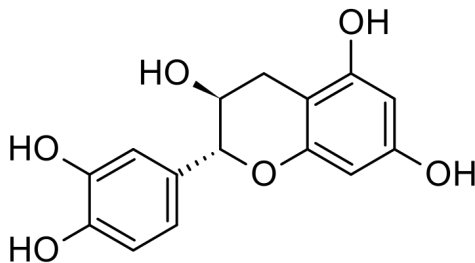
*C. graecum* ve *C. pseudibericum* 'un etanol ekstraktlarının YPSK analizi ile elde edilen fenolik bileşiklerinin kimyasal yapıları aşağıda gösterilmiştir:

#### Gallik asit



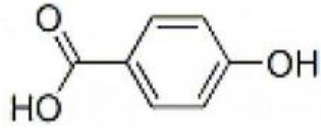
YPSK analizi sonucu hem *C. graecum* hem de *C. pseudibericum* 'un gallik asit içerdiği belirlenmiştir.

#### Kateşin hidrat



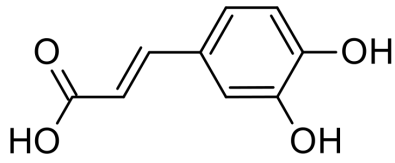
YPSK analizi sonucu hem *C. graecum* 'un kateşin hidrat içerdiği belirlenmiştir.

### ***p*-hidroksibenzoik asit**



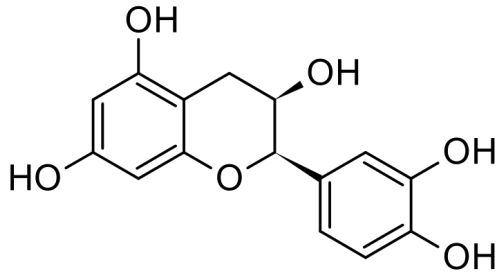
YPSK analizi sonucu *C. graecum* 'un *p*-hidroksibenzoik asit içerdiği belirlenmiştir.

### **Kafeik asit**



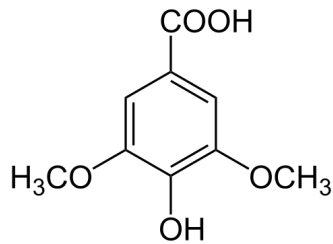
YPSK analizi sonucu hem *C. graecum* hem de *C. pseudibericum* 'un kafeik asit içerdiği belirlenmiştir.

### **Epikateşin**



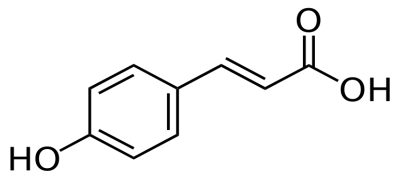
YPSK analizi sonucu *C. graecum* 'un epikateşin içerdiği belirlenmiştir.

### **Sirinjik asit**



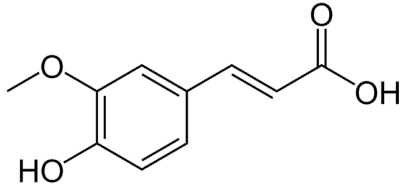
YPSK analizi sonucu *C. pseudibericum* 'un sirinjk asit içerdiği belirlenmiştir.

### ***p*-kumarik asit**



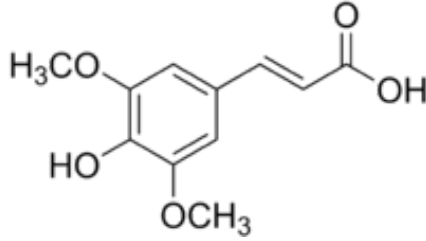
YPSK analizi sonucu *C. pseudibericum* 'un *p*-coum asit içerdiği belirlenmiştir.

### Ferulik asit



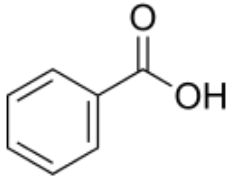
YPSK analizi sonucu hem *C. graecum* hem de *C. pseudibericum* 'un ferulik asit içerdđi belirlenmiştir

### Sinapik asit



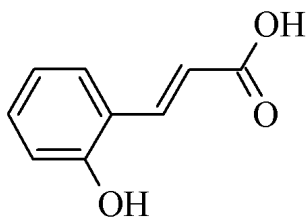
YPSK analizi sonucu *C. graecum* 'un Sinapik asit içerdđi belirlenmiştir

### Benzoik asit



YPSK analizi sonucu *C. graecum* 'un benzoik asit içerdđi belirlenmiştir

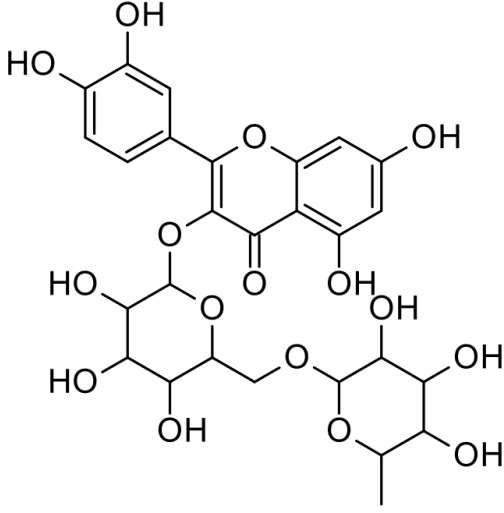
### *o*-kumarik asit



YPSK analizi sonucu *C. graecum* 'un *o*-kumarik içerdđi belirlenmiştir

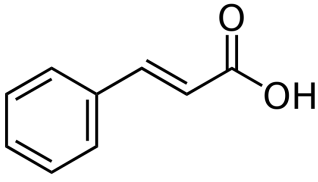


### Rutin



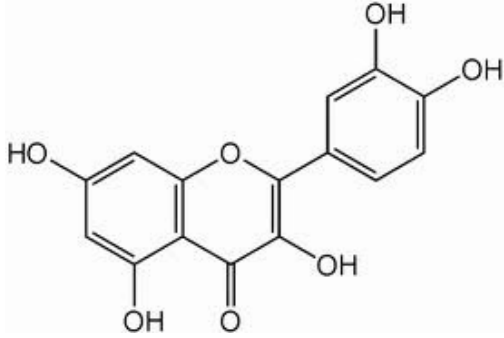
YPSK analizi sonucu *C. graecum* 'un rutin içerdiği belirlenmiştir

### Sinamik asit



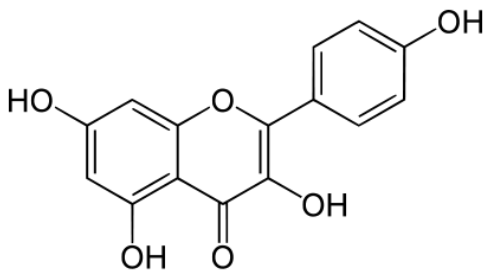
YPSK analizi sonucu *C. graecum* 'un sinamik asit içerdiği belirlenmiştir

### Kuersetin



YPSK analizi sonucu *C. graecum* 'un kuersetin içerdiği belirlenmiştir

### Kamferol

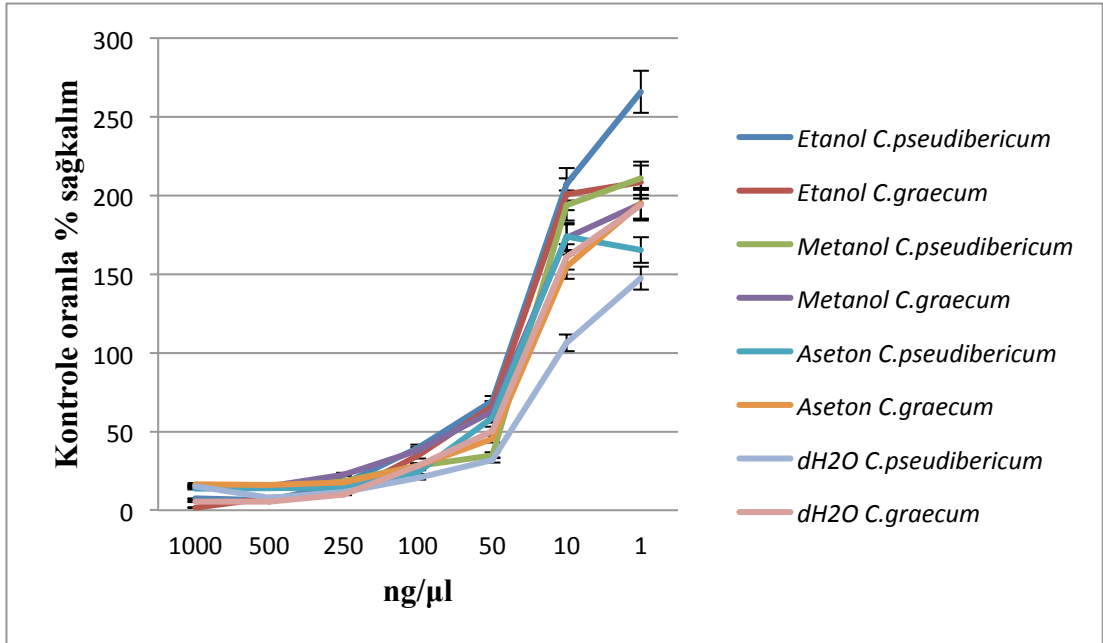


YPSK analizi sonucu *C. graecum* 'un kamferol içerdiği belirlenmiştir

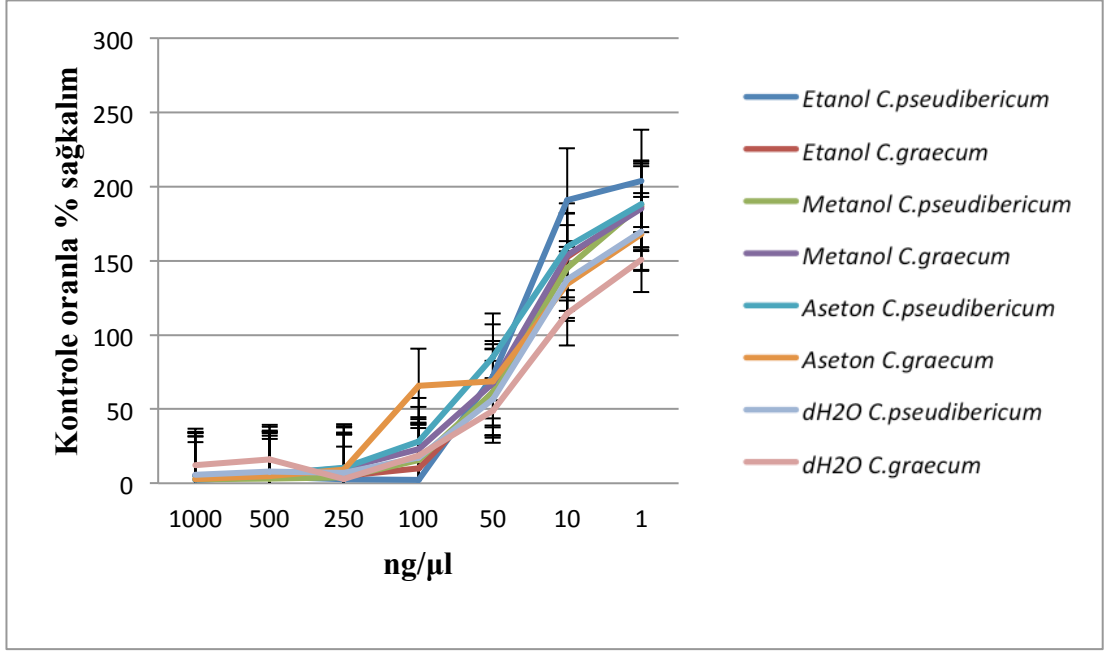
### 3.4 Hücre Kültürü Çalışma Sonuçları

#### 3.4.1 Bitki Ekstraktlarının Proliferasyona Etkisinin Saptanması

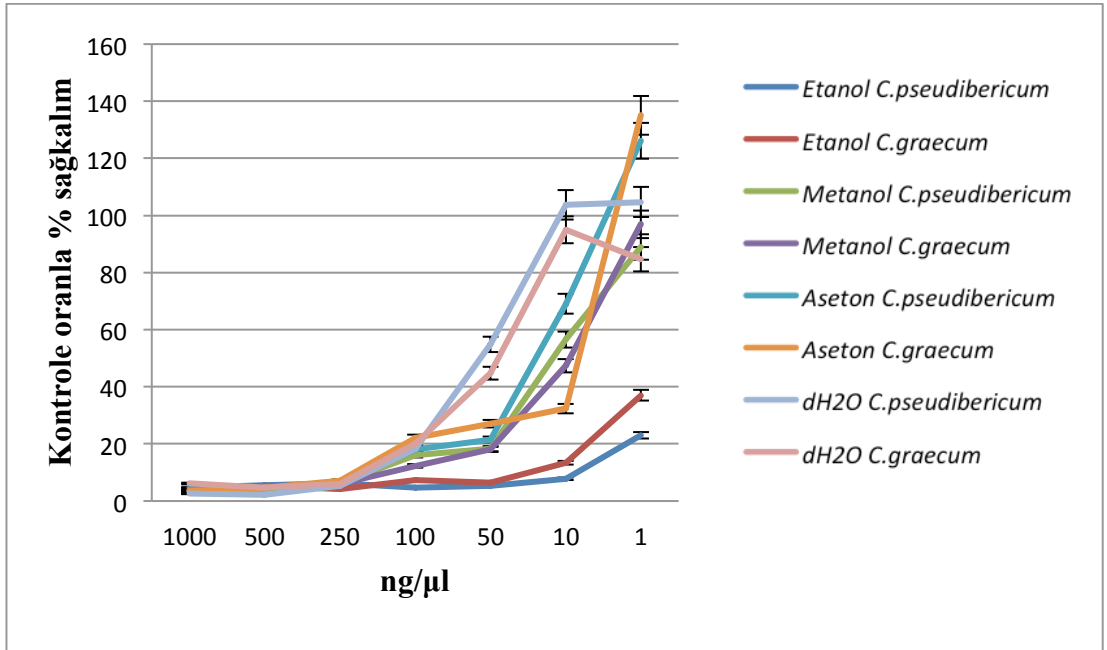
PC9, PC14 ve A549 hücreleri yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra tripsinize edilerek sayılmış ve 96 kuyucuklu plaklara  $1 \times 10^3$  hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiş ardından bu hücelere besi yerinde çözünebildiği için bitkilerin tuber ekstraktlarının son konsantrasyonları 1000, 500, 250, 100, 50, 10, 1 ng/ $\mu$ l olacak şekilde uygulanmıştır. Bu şekilde hücreler 37°C’de, % 5 CO<sub>2</sub> ve % 95 nemli hava içeren ortamda 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda Cytotox Glo kit (Promega firmasından temin edilmiştir) kullanılarak Glomax Multi Detection System (Promega) cihazı ile 0. ve 72. saatlerdeki hücre proliferasyonu ölçülmüştür. PC9, PC14 ve A549 hücre hatlarında kontrole oranla yüzde sağkalım oranları hesaplanarak sırasıyla şekil 3.25, 3.26 ve 3.27’da gösterilmiştir.



**Şekil 3.24:** Farklı konsantrasyonlarda uygulanmış *C. graecum* ve *C. pseudibericum* ekstraktlarının PC9 hücrelerinin sağ kalımı üzerine etkisi ( $p < 0,05$ )



Şekil 3.25: Farklı konsantrasyonlarda uygulanmış *C. graecum* ve *C. pseudibericum* ekstraktlarının PC14 hücrelerinin sağ kalımı üzerine etkisi (p<0,05)



Şekil 3.26: Farklı konsantrasyonlarda uygulanmış *C. graecum* ve *C. pseudibericum* ekstraktlarının A549 hücrelerinin sağ kalımı üzerine etkisi (p<0,05)

**Tablo 3.11:** PC9, PC14 ve A549 hücre hatlarında *C. graecum* ve *C.pseudibericum*'un IC<sub>50</sub> değerleri

	Etanol		Metanol	
	<i>C. graecum</i>	<i>C. pseudibericum</i>	<i>C. graecum</i>	<i>C. pseudibericum</i>
<b>PC9</b>	41,16 ng/μl	43,13 ng/μl	42,28 ng/μl	47,61 ng/μl
<b>PC14</b>	69,74 ng/μl	62,53 ng/μl	95,69 ng/μl	90,93 ng/μl
<b>A549</b>	30,31 ng/μl	46,52 ng/μl	34,16 ng/μl	37,43 ng/μl

**Tablo 3.12:** PC9, PC14 ve a549 hücre hatlarında *C. graecum* ve *C.pseudibericum*'un IC<sub>50</sub> değerleri

	Aseton		dH <sub>2</sub> O	
	<i>C. graecum</i>	<i>C. pseudibericum</i>	<i>C. graecum</i>	<i>C. pseudibericum</i>
<b>PC9</b>	19,52 ng/μl	41,49 ng/μl	13,89 ng/μl	39,42 ng/μl
<b>PC14</b>	89,74 ng/μl	66,08 ng/μl	122,55 ng/μl	48,71 ng/μl
<b>A549</b>	45,52 ng/μl	32,16 ng/μl	47,32 ng/μl	46,98 ng/μl

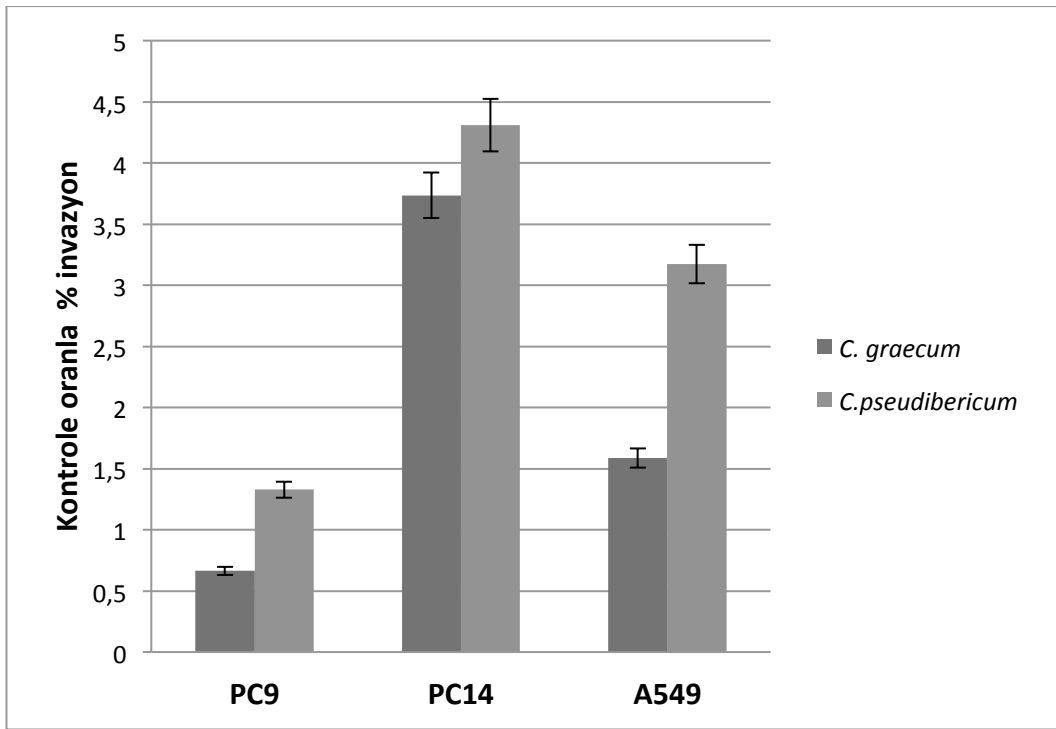
### 3.4.1 Bitki Ekstraktlarının İnvazyona Etkisinin Saptanması

PC9, PC14 ve A549 hücreleri her invazyon odasında  $1,25 \times 10^5$  olacak şekilde invazyon odalarına ekilerek üzerlerine 0,5 ml RPMI1640 (serum içermeyen) konulurken invazyon odacığının dışına 0,75 ml %10 Fetal Calf Serum içeren RPMI1640 eklenmiştir. Hücreler 24 saat 37°C'de CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edilmiştir. İnkübasyon saatinin sonunda invaziv özellikte olan hücreler invazyon odacığının porlu olan membranının dış yüzeyine geçeceklerinden invazyon odacığının içindeki besi yeri uzaklaştırılmış ve ardından spatülle iç yüzeyindeki hücreler kazınıp atılmıştır. Dış yüzeydeki hücreler önce 2 ml metanol ile fikse edildikten sonra 2 ml Toludine (%1) ile boyanıp, mikroskop altında invaziv hücreler sayılmıştır. % invazyon hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır: *C.graecum* ve *C. pseudibericum* tuber etanol ekstraktlarının PC9, PC14 ve A549 hücreleri üzerinde kontrole oranlı % invazyonu Tablo 3.10 da verilirken Şekil 3.28'de karşılaştırmalı grafiği verilmiştir.

**%invazyon** = (matrijel matriks bazal membranındaki hücre sayısı / Kontrol membranındaki hücre sayısı) x 100

**Tablo 3.13:** *C. graecum* ve *C. pseudibericum* tuber etanol ekstraktlarının PC9, PC14 ve A549 hücreleri üzerinde kontrole oranlı % invazyonu

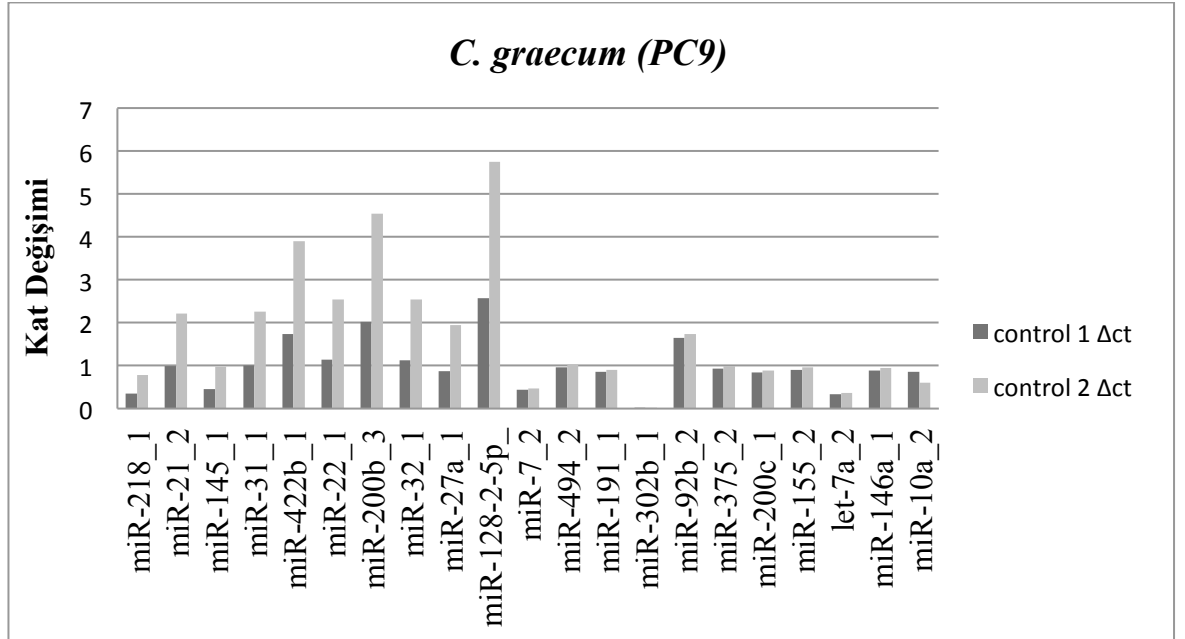
Bitki ekstraktları	PC9	PC14	A549
<i>C. graecum</i> Tuber Etanol	0,664	3,735	1,587
<i>C. pseudibericum</i> Tuber Etanol	1,328	4,310	3,174



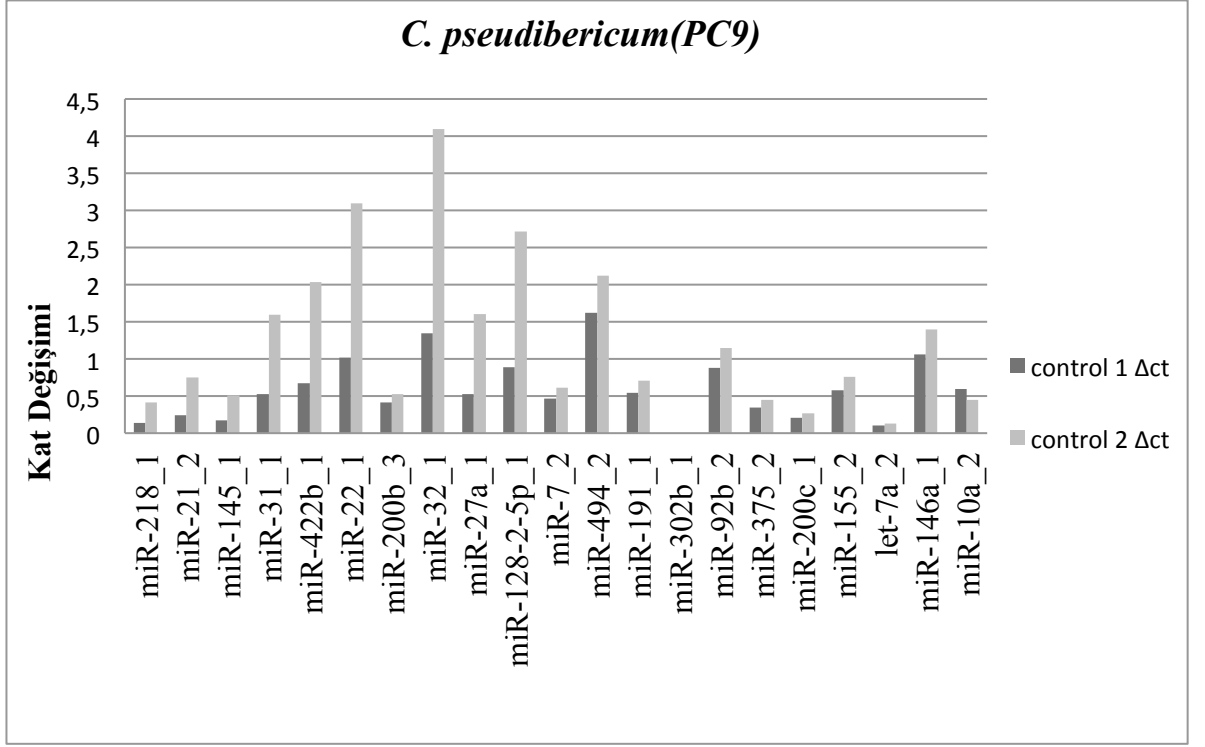
**Şekil 3.27:** *C. graecum* ve *C. pseudibericum* ekstraktlarının PC9, PC14 ve A549, hücrelerinin invazyon kapasitelerine etkisi ( $p < 0,05$ )

### 3.4.2 miRNA ekspresyon sonuçları

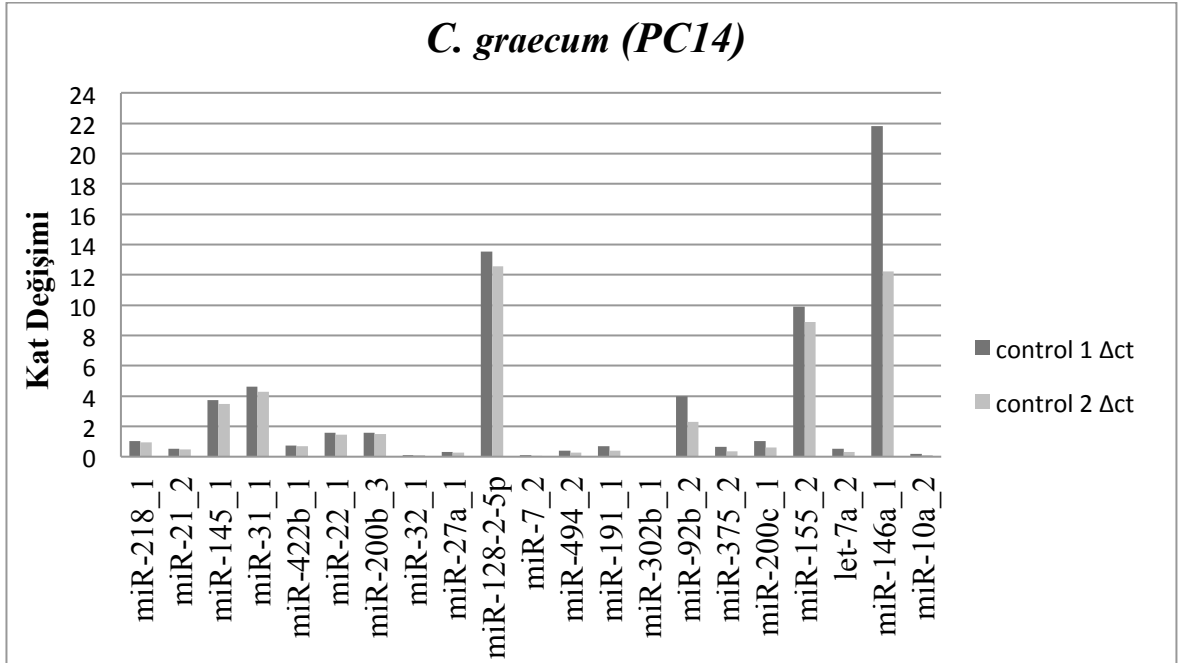
*C. graecum* ve *C. pseudibericum* tuber etanol ekstraktları uygulanmış ve uygulanmamış PC9, PC14 ve A549 hücre hatlarından izole edilen miRNAlar Qiagen miScript II RT kit kullanılarak cDNA'ya çevrilmiştir ve Qiagen Rotor Corbett Gene Real Time cihazı ile SYBR green okuma yaptırılarak ekspresyonları belirlenmiştir. Sonuçlar standart bir eşik değeri (threshold value) belirlendikten sonra elde edilen Ct değerlerinin " $2^{-\Delta\Delta Ct}$ " formülüne göre hesaplanarak kat değişimi (fold change) analizi yapılmıştır. PC9 hücrelerinde *C. graecum* ve *C. pseudibericum* tuber etanol ekstraktlarının miRNA ekspresyonları Şekil 3.29 ve 3.30'da, PC14 hücrelerinde Şekil 3.31 ve 3.32'de ve A549 hücrelerinde ise Şekil 3.33 ve 3.34'de gösterilmiştir.



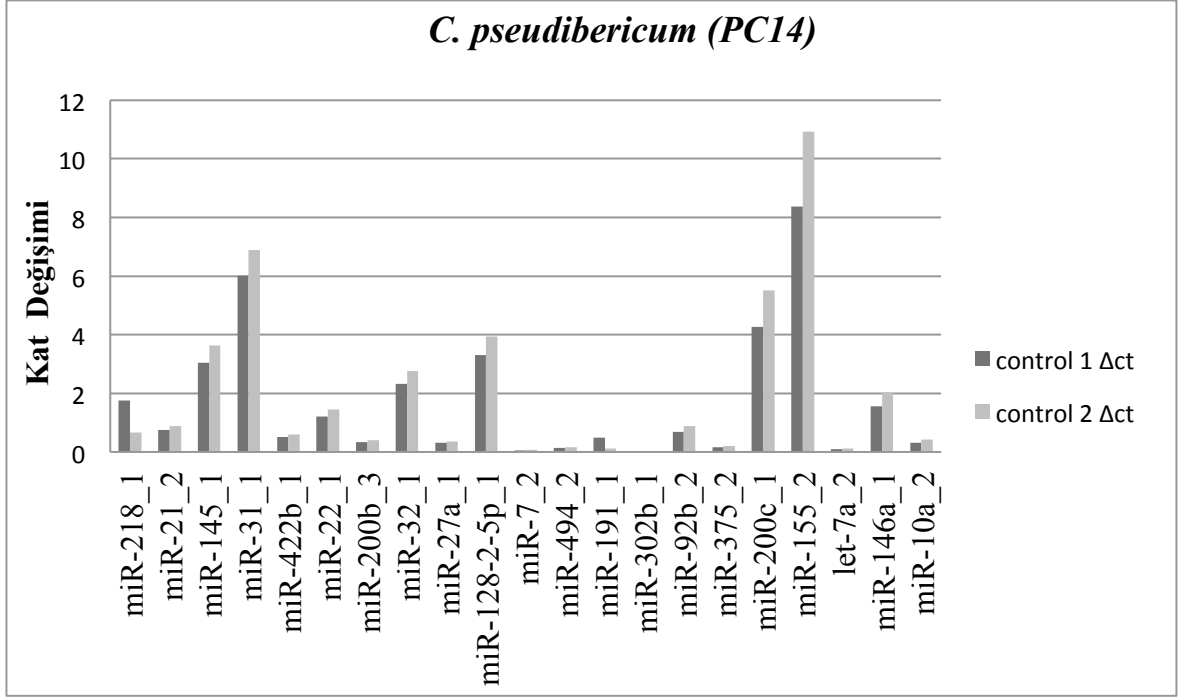
**Şekil 3.28:** *C. graecum* tuber ekstraktı uygulanmış PC9 hücre hattında, miRNA ekspresyonları



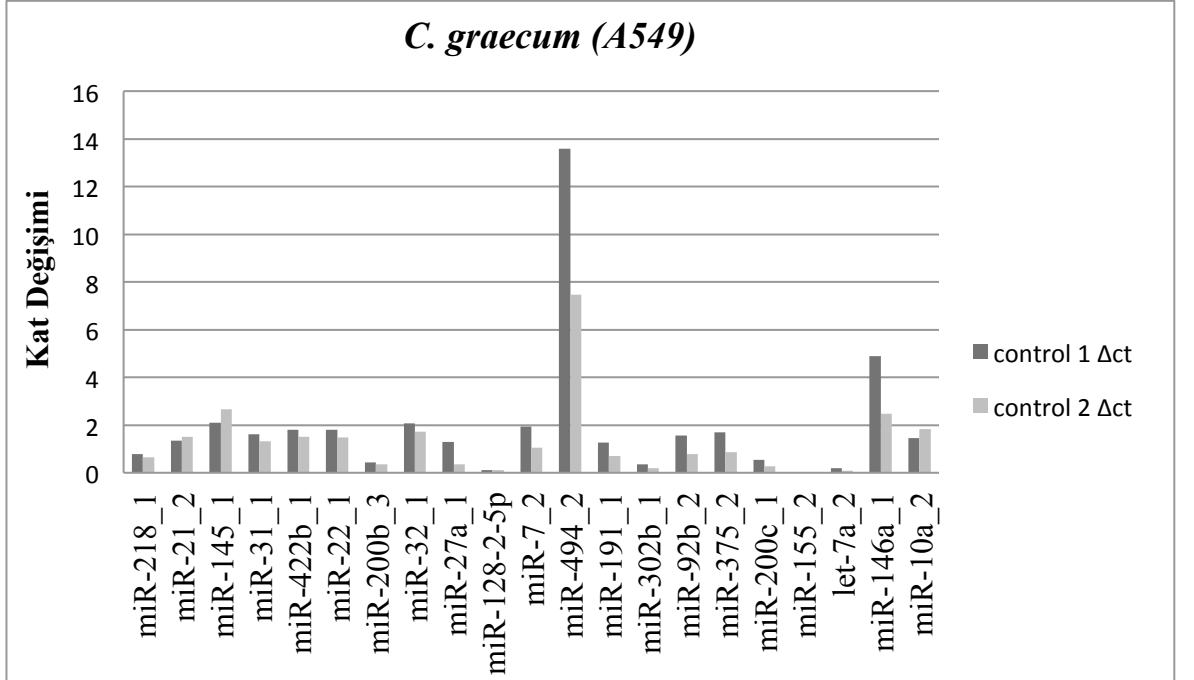
**Şekil 3.29:** *C. pseudibericum* tuber ekstraktı uygulanmış PC9 hücre hattında, miRNA ekspresyonları



**Şekil 3.30:** *C. graecum* tuber ekstraktı uygulanmış PC14 hücre hattında, miRNA ekspresyonları

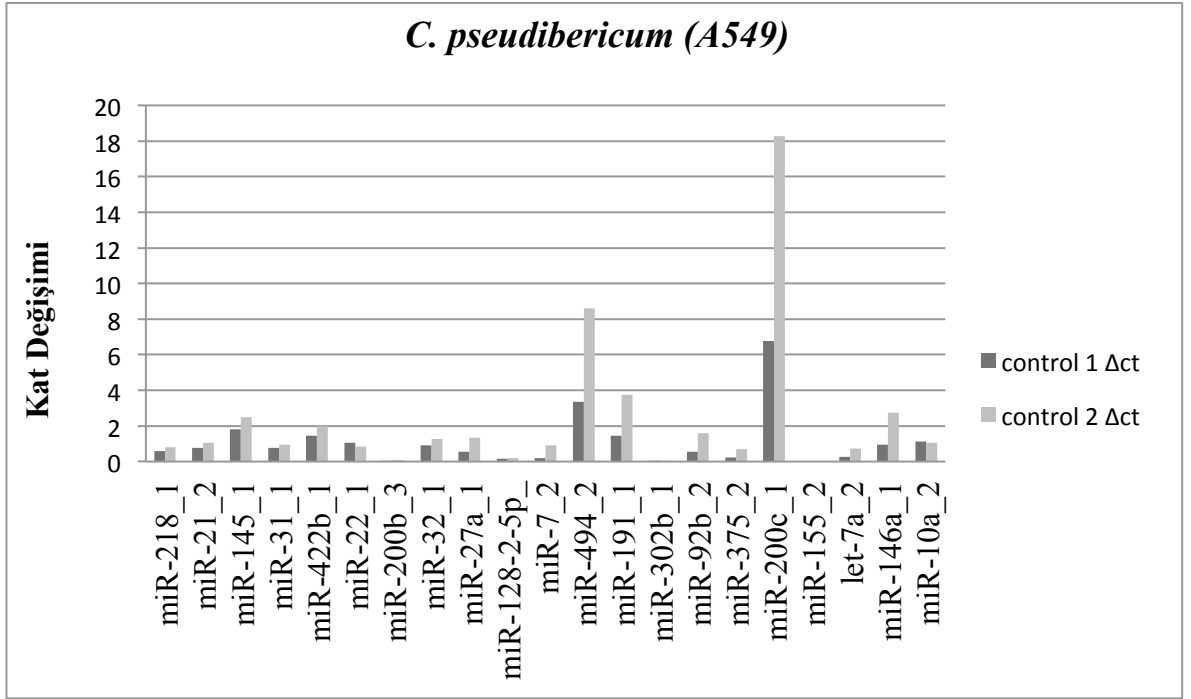


**Şekil 3.31:** *C. pseudibericum* tuber ekstraktı uygulanmış PC14 hücre hattında, miRNA ekspresyonları



**Şekil 3.32:** *C. graecum* tuber ekstraktı uygulanmış A549 hücre hattında, miRNA ekspresyonları





**Şekil 3.33:** *C. pseudibericum* tuber ekstraktı uygulanmış A549 hücre hattında, miRNA ekspresyonları

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu çalışmada ülkemizde yayılış gösteren *Cyclamen* cinsinin iki türü, *Cyclamen graecum* ve *Cyclamen pseudibericum* bitkilerinin tuber ve yaprak kısımları etanol, metanol, aseton ve dH<sub>2</sub>O çözücülerıyla 16 farklı örneğin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Bu amaçla iki farklı metot (DPPH, serbest radikal giderim aktivitesi ve FRAP, demir iyonu indirgeme gücü) kullanılmıştır ve ayrıca bu 16 örneğin toplam fenolik madde içerikleri de belirlenmiştir.

Üzerinde çalıştığımız *C. graecum* ve *C. pseudibericum* da yapılan deneyler sonucu konuya hakim uzmanların fikirleri de alınarak *C. graecum* ve *C. pseudibericum* etanol ekstraktlarının YPSK analizi ile fenolik madde içerikleri incelenmiştir.

Projenin ikinci basamağı olan, *C. graecum* ve *C. pseudibericum*'un anti-tümör özelliklerini belirlemek için yapılan proliferasyon ve invazyon deneyleri sonucu elde edilen sonuçlara göre miRNA çalışmalarında *C. graecum* ve *C. pseudibericum*'un etanol ekstraktlarının kullanılmasına karar verilmiştir.

*C. graecum* ve *C. pseudibericum*'un toplam fenolik içerikleri literatürde en sık kullanılan metot olan Folin yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntemde bitkilerin fenolik madde içeriği standart bir fenolik madde kullanılarak ona eş değer olarak verilmiştir. Çünkü bitkilerde oldukça fazla sayıda fenolik madde bulunduğu için her birini tek tek hesaplamak imkansızdır. Bu nedenle bitkilerin fenolik madde içeriği standart bir fenolik madde olan gallik asit kullanılarak hesaplanmıştır. Gallik asit kalibrasyon eğrisi üzerinden ekstraktların toplam fenolik madde miktarları mg özütte eşdeğer gallik asit miktarı cinsinden hesaplanmıştır.

Hem *C. graecum* hem de *C. pseudibericum*'un toplam fenolik madde miktarı analizlerine bakıldığında en yüksek gallik asit eş değerini etanol ekstraktında en düşük değeri ise aseton ekstraktlarında görmekteyiz (Tablo 3.10). Bu elde etmiş olduğumuz sonuçlar doğrultusunda iki bitki arasında çözücüler ve ekstrakte edilen

kısımlar arasında bir uyum mevcuttur.

*C. graecum* tuber ekstraktlarını kendi arasında ele alırsak en yüksek toplam fenolik madde miktarı etanol ekstraktında (68,52 mg GAE/g) gözlemlenmiştir. Daha sonra sırasıyla dH<sub>2</sub>O ekstraktı (68,22 mg GAE/g), metanol ekstraktı (55,53 mg GAE/g) ve en düşük aseton ekstraktında (49,71 mg GAE/g) gözlemlenmiştir (Tablo 3.10).

*C. graecum* yaprak ekstraktlarını kendi arasında ele alırsak en yüksek toplam fenolik madde miktarı etanol ekstraktında (73,18 mg GAE/g) bulunurken, bunu sırasıyla metanol (60,17mg GAE/g), dH<sub>2</sub>O (58,76 mg GAE/g) ve aseton ekstraktı (58,44 mg GAE/g) takip etmektedir (Tablo 3.10).

*C. pseudibericum*'da en yüksek toplam fenolik madde miktarı yaprak etanol ekstraktında görülmüştür (55,54 mg GAE/g). En düşük toplam fenolik madde miktarı ise tuber aseton ekstraktında görülmüştür. (14,18 mg GAE/g) (Tablo 3.10).

*C. pseudibericum* tuber ekstraktlarını kendi arasında değerlendirecek olursak en yüksek toplam fenolik madde miktarı dH<sub>2</sub>O ekstraktında (44,65 mg GAE/g) gözlemlenmiştir. Daha sonra sırasıyla etanol ekstraktında (21,34 mg GAE/g), metanol ekstraktı (18,95 mg GAE/g) ve en düşük de aseton ekstraktında (14,18 mg GAE/g) görülmüştür (Tablo 3.10).

*C. pseudibericum* yaprak ekstraktlarını kendi arasında değerlendirecek olursak en yüksek toplam fenolik madde miktarı etanol ekstraktında (55,54 mg GAE/g) gözlemlenmiştir. Daha sonra sırasıyla metanol ekstraktı (36,55 mg GAE/g) dH<sub>2</sub>O ekstraktı (32,83 mg GAE/g), ve en düşük aseton ekstraktında (24,12 mg GAE/g) gözlemlenmiştir (Tablo 3.10). Çözücüler arasındaki bu toplam fenolik madde miktarlarındaki değişikliğin, kullanılmış olan çözücülerin sahip olduğu polar ve apolar yapılarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Apolar özelliğe sahip aseton çözücüsünün ekstraksiyon sırasında ortamdan çözüp çıkardığı madde miktarının, polar özellik gösteren diğer çözücülerimizin ortamdan çözüp çıkardığı madde miktarından farklı olması kuvvetle muhtemeldir.

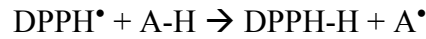
*C. graecum* ile yapılan bir çalışmada toplam fenolik madde miktarı tayininde, metanol, etanol, aseton ve petrol eteri ile elde edilen tuber ve yaprak ekstraktları, standart bir fenolik madde olan pirokatekol eşdeğerliği kullanılarak değerlendirilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı *C. graecum* yaprak etanol ekstraktında 33,73 µg PE/g, aseton ekstraktında 13,02 µg PE/g, metanol ekstraktında 25,55 µg PE/g ve petrol eteri ekstraktında 12,20 µg PE/g olarak tespit edilmiştir. *C. graecum* tuber etanol ekstraktında 21,81 µg PE/g, asetonunda 20,09 µg PE/g, metanolde 11,71 µg PE/g ve petrol eterinde ise 6,18 µg PE/g olarak tespit edilmiştir (Metin ve diğ. 2013). Bu sonuçlar bizim bulduğumuz değerlerle uyum içindedir. *C. graecum* tuber ve yaprak ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarı yaprak kısımlarında tuber kısımlarına göre daha yüksek miktarda tespit edilirken bu sonuçlar bizim bulduğumuz değerler ile uyum içindedir. Bu bulgulardan yola çıkarak toplam fenolik madde miktarı bakımından *C. graecum* ve *C. pseudibericum*'un yaprak kısımlarının tuber kısımlarından daha zengin olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca toplam fenolik madde miktarlarını çözücüler bazında ele alırsak en yüksek değerlerin ortaya çıkmasında etanolün diğer çözücülere göre üstün olduğunu söyleyebiliriz.

*C. alpinum (trochopteranthum)* ile yapılan bir çalışmada etanol tuber ekstraktının toplam fenolik madde miktarı 16,4 mg GAE/g olarak saptanmıştır. (Arslan ve diğ 2011).

*C. mirabile*'nin yaprak ve tuber kısımlarının, metanol, aseton, dH<sub>2</sub>O ve petrol eteri ile hazırlanan ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları, tuber metanol ekstraktında 5,18 µg PE/g, aseton ekstraktında 51,76 µg PE/g, dH<sub>2</sub>O ekstraktında 6,36 µg PE/g, petrol eteri ekstraktında 17,42 µg PE/g olarak tespit edilirken, yaprak metanol, aseton, dH<sub>2</sub>O ve petrol eteri ekstraktlarında ise sırasıyla 17,30 µg PE/g, 21,06 µg PE/g, 30,14 µg PE/g ve 37,36 µg PE/g olarak tespit edilmiştir. (Sarıkurkcu 2011). Tüm çözücüler göz önünde bulundurulduğunda aseton ekstraktı hariç diğer ekstraktlarda çalışmamızda da elde edildiği gibi bitkinin yaprak ekstraktlarının daha yüksek fenolik madde ihtiva ettiği görülmektedir.

*C. graecum* ve *C. pseudibericum*'un antioksidan özelliklerini belirlemede iki farklı metot (DPPH, serbest radikal giderim aktivitesi ve FRAP, demir iyonu indirgeme gücü) kullanılmıştır.

DPPH deneyinde, ekstraktların serbest radikal giderim aktivitesi ekstrakt içerisindeki antioksidan bileşiklerin hidrojenlerini verebilmelerine ve bileşiğin yapısal konformasyonuna bağlıdır (Eryiğit 2006). DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) 517 nm dalga boyunda maksimum absorbansa sahiptir ve bazı doğal bileşiklerin antioksidan aktivitesinin belirlenmesinde serbest radikal olarak kullanılmaktadır. DPPH serbest radikali, aşağıdaki tepkime gereği kararlı bir molekül olabilmek için antioksidan moleküllerden bir elektron ya da hidrojen radikalini kolaylıkla alabilmektedir. DPPH ile bitki ekstrelerine reaksiyonunun gösterdiği absorbansı ne kadar düşük olursa serbest radikal giderme aktivitesi o kadar büyük demektir. Kararlı DPPH en yüksek absorbansı 517 nm de verir. DPPH radikalinin azalması ile absorbansın azalması doğru orantıdır. Absorbansın düşmesinin sebebi; radikal ile antioksidan moleküllerin reaksiyonu sonucu hidrojen bağlanması ile radikalın giderilmesi sonucudur.



DPPH deneyinde iki bitkinin her bir çözücüsü için dört farklı konsantrasyonda (1 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,4 mg/ml ve 0,2 mg/ml) ekstraktlar hazırlandıktan sonra DPPH ile olan reaksiyonlarının verdiği absorbans değerlerinden yüzde inhibisyonları hesaplanmıştır.

Ekstraktların serbest radikal giderim aktivitesi, özütlerin derişiminin artmasıyla birlikte artmaktadır. *C. graecum*'da 1 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan ekstraktları arasında en yüksek serbest radikal giderim aktivitesi yaprak dH<sub>2</sub>O ekstraktında (%85,13) saptanmıştır ve bunu yaprak etanol ekstraktı takip etmektedir (%83,15). En düşük aktivite ise tuber metanol ekstraktında (%69,24) gözlenmiştir (Tablo 3.4).

*C. pseudibericum*'un 1 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan ekstraktları arasında en yüksek serbest radikal giderim aktivitesi yaprak dH<sub>2</sub>O ekstraktında (%74,61) bulunmuştur ve bunu takiben yaprak etanol ekstraktı gelmektedir (%73,45). En düşük aktivite ise tuber metanol ekstraktında (%71,64) bulunmuştur (Tablo 3.7).

Yapmış olduğumuz DPPH deneyinde, 16 örnek ve 4 farklı konsantrasyon ile toplamda 64 farklı DPPH yüzde inhibisyon değeri elde etmiş bulunmaktayız. Bu değerler %39,97 ile %85,13 arasında yer almaktadır. *C.graecum* ve *C. pseudibericum* metanol ekstraktları %58,99-82,27 aralığına sahiptir (Tablo 3.4-5-6-7). Bu değerler Tepe ve arkadaşlarının (2005) yurdumuzda yayılış gösteren 5 *Allium* türünün metanollü ekstraktlarının antioksidan aktivitesini araştırmasında elde ettiğimiz % 60–70 sonuçlarıyla da uyumludur (Tepe ve diğ. 2005).

*C. graecum*'un tuber ekstraktlarının % inhibisyon değerlerine göre çözücü bazında sıralamasını etanol (%82,53) > aseton (%77,14) > dH<sub>2</sub>O (%70,78) > metanol (%69,24) şeklinde yapmak mümkünken, *C. graecum*'un yaprak ekstraktlarının % inhibisyon değerlerine göre ise bu sıralamayı şu şekilde yapabiliriz; dH<sub>2</sub>O (%85,13) > etanol (%83,15) > metanol (%82,27) > aseton (%73,29) (Tablo 3.4-5).

*C. pseudibericum*'un tuber ekstraktlarının % inhibisyon değerlerine göre çözücü bazında sıralamasını etanol (%66,42) > aseton (%59,67) > metanol (%55,27) > dH<sub>2</sub>O (%50,50) şeklinde yapmak mümkünken, *C. pseudibericum*'un yaprak ekstraktlarının % inhibisyon değerlerine göre ise bu sıralamayı şu şekilde yapabiliriz; dH<sub>2</sub>O (%74,61) > aseton (%73,60) > etanol (%73,45) > metanol (%71,64) (Tablo 36-7).

Antioksidan aktiviteyi belirlemek için yapılan bir diğer test yönteminde de özütlerin indirgeme gücü tespit edilmiştir. Bu test, Fe<sup>3+</sup> formundaki Feferrisyanid kompleksinin, antioksidanların varlığında Fe<sup>2+</sup> formuna indirgenmesi temeline dayanmaktadır. Solüsyon prusya mavisi rengini almaktadır ve 700 nm'de absorbans değeri ölçülmektedir (Oyaizu 1986). Fe (III) iyonun indirgeme kapasitesi sıklıkla elektron verme yeteneğinin bir göstergesi olarak kullanılır. Bu durum fenolik antioksidanların önemli bir mekanizması olup diğer antioksidan özellikler ile güçlü bir korelasyon gösterir (Dorman ve diğ. 2003). İndirgeme gücünde absorbansın artması ile antioksidan kapasite doğru orantılıdır.

En yüksek absorbansa sahip olan *C. graecum* etanol ekstraktı, DPPH serbest radikal giderim aktivitesi ile uyumlu olarak en güçlü antioksidan kapasiteye sahiptir. Yine DPPH metodu ile uyumlu olarak *C. graecum*, *C. pseudibericum*'dan daha yüksek antioksidan kapasiteye sahiptir.

FRAP deneyi (İndirgeme gücü kapasitesinin belirlenmesinde), 16 örnek ve 4 farklı konsantrasyon ile toplamda 64 farklı absorbans değeri elde etmiş bulunmaktayız. Hazırlamış olduğumuz 4 farklı konsantrasyondaki (1 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,2 mg/ml) ekstrakt çözeltilerindeki derişim farklılıklarına göre elde ettiğimiz absorbans değerleri arasında bir uyum olduğu gözlemlenmiştir.

*C.graecum* tuber ekstraktlarında (1 mg/ml) en güçlü antioksidan kapasiteye etanol ekstraktının sahip olduğu tespit edilmiştir. Bunu metanol, dH<sub>2</sub>O ve aseton ekstraktları takip etmektedir. *C. pseudibericum* tuber ekstraktlarında da bu sıra geçerlidir. *C.graecum* ve *C. pseudibericum* yaprak etanol ekstraktları en yüksek antioksidan aktivite gösterirken aseton ekstraktları ise en düşük antioksidan aktivite göstermiştir.

FRAP deneyi için *C. graecum* 'un tuber ekstraktlarının çözücülere göre sahip olduğu antioksidan kapasiteleri sırasıyla etanol (2,731) > metanol (1,772) > dH<sub>2</sub>O (1,600) > aseton (0,796) iken *C. graecum* 'un yaprak ekstraktlarının çözücülere göre sahip olduğu antioksidan kapasitelerinin sırası etanol (2,370) > dH<sub>2</sub>O (2,028) > metanol (1,946) > aseton (0,803) şeklindedir (Tablo 3.8-9).

*C. pseudibericum* 'un tuber ekstraktlarının çözücülere göre sahip olduğu antioksidan kapasiteleri sırasıyla etanol (1,829) > metanol (1,381) > dH<sub>2</sub>O (1,052) > aseton (0,900) iken *C. pseudibericum* 'un yaprak ekstraktlarının çözücülere göre sahip olduğu antioksidan kapasitelerinin sırası etanol (2,208) > dH<sub>2</sub>O (2,139) > metanol (1,890) > aseton (0,411) şeklindedir (Tablo 3.8-9).

*C. graecum* ve *C. pseudibericum* 'un etanol ekstraktlarının DPPH ve FRAP deneylerinden elde edilen antioksidan kapasitesinin metanol ekstraktlarından elde edilen sonuçlara göre daha güçlü olduğu olduğu sonucu her iki deneyde de ortak bir sonuç olarak gözlemlenmiştir.

DPPH deneyinde *C. graecum* ve *C. pseudibericum* yaprak ekstraktlarında % inhibisyon değerlerinin dH<sub>2</sub>O'da daha yüksek çıkmış olması, araştırmacılar tarafından yapılmış olan başka bir çalışmayla etkin çözücü bakımından benzerlik göstermektedir. Bu çalışmada hekzan, kloroform, etilasetat, n-bütanol ve su ekstraktlarının DPPH'ın yarısının süpürüldüğü konsantrasyon olan IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 8,163±0,425 µg/ml, 2,706±0,057 µg/ml, 1,660±0,024 µg/ml, 6,882±0,101 µg/ml ve 69,806±1,026 µg/ml olarak belirlenmiştir (Çakmak 2011).

Yapılan bir çalışmada *C. mirabile* bitkisinin tuber etanol ve metanol ekstraktlarının antioksidan kapasitesi DPPH deneyi ile belirlenmiştir. 60 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan ekstraktlarda etanol ekstraktının inhibisyon değeri %87 iken metanol ekstraktının inhibisyon değeri %77 olarak belirlenmiştir (Okmen ve diğ. 2014).

Elde ettiğimiz verilere bakıldığında *C. graecum* ve *C. pseudibericum*'un hem tuber hemde yaprak kısımlarında 4 farklı çözücü için de etanol ekstraktlarının, metanol ekstraktlarından daha yüksek % inhibisyona sahip olduğu görülmektedir.

Araştırmacılar tarafından birçok bitki toplam antioksidan aktivite yönünden incelenmiştir. *Muscari parviflorum* ekstraktlarının antioksidan aktivite değerleri belirlenmiştir. Buna göre en yüksek antioksidan aktivite etanol ekstraktlarında %76,8 ± 1,51 olarak, en düşük antioksidan aktivite ise metanol ekstraktlarında %60 ± 1,32 olarak belirlemişlerdir (Mammadov ve diğ. 2012).

*C. mirabile*'nin yaprak ve tuber kısımlarının, metanol, aseton, dH<sub>2</sub>O petrol eteri ile hazırlanan ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri belirlemiştir. Tüm çözücülerde yaprak kısımları en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Antioksidan kapasitesi petrol eterinde % 85,3-76,8 asetonunda % 53,1-42,1 metanolde % 71.2-63.42 ve su ekstraktında % 58.2-34.6 olarak bulunmuştur (Sarikurkcu 2011).

*Viburnum opulus* ve *V. orientale* bitkilerininin sulu, kloroformlu ve metanollü ekstraktlarının antioksidan aktivitelerini incelemiştir. Metanol ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriği sulu ekstraktlardan daha yüksek olduğunu bulmuştur. Metanol ve su ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin kloroform ekstraktlarından daha yüksek olduğunu tespit edilmiştir (Burnaz 2007).



Yapılan antioksidan aktivite tayin yöntemlerinde elde ettiğimiz sonuçlardan *C. graecum*'un *C. pseudibericum*'dan daha yüksek antioksidan aktivite kapasitesine sahip olduğunu söyleyebiliriz. Toplam fenolik madde miktarı tayininde elde ettiğimiz değerler de antioksidan aktivite ile uyum içindedir. Özütlarin toplam fenolik bileşik içeriği ile antioksidan aktiviteleri arasında açıkça görülebilen bir paralellik bulunmaktadır.

*C. graecum* ve *C. pseudibericum*'un üzerinde yapmış olduğumuz DPPH (serbest radikal giderim aktivite) deneyi ve FRAP (İndirgeme gücü kapasitesi) deneyleriyle bu iki türünde antioksidant kaynağı olduğu, elde etmiş olduğumuz sonuçlarla ortaya koyulmuştur.

Amarowicz ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir araştırmada indirgeme gücünün toplam fenolik madde içeriği ve diğer metotlar ile büyük ölçüde uyum gösterdiği belirtilmiştir (Amarowicz ve diğ. 2004). Aynı bitkilerden farklı çözücülerle elde edilen ekstraktlarının birbirlerinden çok farklı antioksidan aktivite göstermesinin sebebi olarak çözücülerin polariteleri gösterilebilir. Biyolojik aktivite potansiyeli, bitkiden elde edilen fitokimyasalların polaritesine, bitkinin yetiştiği iklimsel şartlara, toplanma zamanına, toprak yapısına ve yüksekliğe bağlı olarak değişkenlikler gösterebilmektedir.

*Cassia siamea* (Fabaceae) türünün araştırıldığı bir çalışmada toplam fenolik madde içeriğinin yüksek olmasının yüksek bir antioksidan aktiviteye neden olduğu indirgeme gücü testiyle gösterilmiştir (Kaur ve diğ. 2006). Benzer bir durum aynı Fabaceae familyasına ait türler olan *Bauhinia kockiana*, *Caesalpinia pulcherrima* ve *Cassia surattensis*'in çiçek ve yapraklarının antioksidan kapasitelerinin değerlendirildiği çalışmada da görülmüştür. Çalışmada incelenen türlerin çiçek ve yapraklarının toplam fenolik içerikleriyle indirgeme güçleri arasında doğru orantı olduğu belirlenmiştir (Chew ve diğ. 2009).

Kromatografi bir karışımdaki bileşenlerin biri hareketli diğeri sabit iki faz arasındaki dağılım dengelerine dayanan analiz yöntemidir. (Wilard ve diğ. 1981). Çalışmamızda *C. graecum* ve *C. pseudibericum* tuber etanol ekstraktaları YPSK

(yüksek performanslı sıvı kromatogramı) ile fenolik madde miktarları açısından analiz edilmiştir.

*C. graecum* ve *C. pseudibericum*'un etanol ekstraktlarının YPSK'da fenolik içerik tayini için 21 tane standart madde (gallik asit, protokateşik asit, kateşin, *p*-hidroksibenzoik asit, klorojenik asit, kafeik asit, epikateşin, sirinjik asit, valinin, *p*-kumarik asit, ferulik asit, sinapinic asit, benzoik asit, *o*-kumarik asit, rutin, naringin, hesperidin, rosmarik asit, eriodistiol, sinamin asit, kuersetin, luteolin, kamferol, apigenin) baz alınarak (Caponio ve diğ. 1999) fenolik bileşikler tespit edilmiştir.

Analiz sonucunda *C. graecum* tuber etanol ekstraktında, gallik asit, kateşin hidrat *p*-hidroksibenzoik asit, kafeik asit, epikateşin, ferulik asit, Sinapik asit, benzoik asit, *o*-kumarik asit, rutin, sinamik asit, kuersetin, kamferol fenolik bileşikleri tayin edilmiştir. Fakat *C. pseudibericum* tuber etanol ekstraktında gallik asit, kafeik asit sirinjik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, fenolik bileşikleri tayin edilebilmiştir (Şekil 3.23-24).

İki bitki arasındaki fenolik madde miktarı ve çeşitliliğine bakıldığında *C. graecum*' da daha fazla fenolik madde (*C. graecum*'da tayin edilip *C. pseudibericum*'da tayin edilemeyen fenolikler: kateşin hidrat *p*-hidroksibenzoik asit, epikateşin, sinapik asit, benzoik asit, *o*-kumarik asit, rutin, sinamik asit, kuersetin, kamferol) tayin edildiğini görülmektedir.

Yapılan olan bir çalışmada *C. graecum*'un tuber ve yapraklarının kimyasal kompozisyonu incelenmiştir. Flavonoidler, şekerler ve lipidler ana bileşenler olarak tespit edilmiştir.

Tuberde saponinler, sapogeninler, triterpenik asitler, nişasta, serbest ve bağlı şekerler (arabinoz, ramnoz, ksiloz, fruktoz, glukoz ve galaktoz) tanenler, lökoantosiyanidinler, kateşinler, fenolik asitler ve lipidler belirlenmiştir. Fakat kinonlar tespit edilememiştir. Yapraklarda olduğu gibi tuberde de amino asitler ve flavonoidler tespit edilmiştir. Tuberlerde bulunan steroller, yağ asitleri ve flavonoidler klasik teknikler (TLC, HPLC, UV, IR, NMR, MS, GLC) kullanılarak teşhis edilmiştir.

Yaprakda ve tuberde kuersetin, kamferol, mrisetin, kateşin gibi flavonoidler teşhis edilmiştir (Stamatiki 1990).

Yapılan bir çalışmada *Labisia pumila* bitkisine farklı konsantrasyonlarda (400, 800 ve 1200 µmol/mol) 15 hafta süreyle CO<sub>2</sub> uygulandığında, CO<sub>2</sub> artışının flavanoid ve fenolik bileşiklerin profillerinde modifikasyonuna neden olduğu YPSK analizi ile açıklanmıştır (Hawa ve diğ. 2012).

Deniz seviyesinden yukarılara doğru çıkıldıkça havadaki oksijen miktarı azalır CO<sub>2</sub> miktarı ise artar. *C. graecum* bitkisi 30-50 metre yükseklikte anayola yakın bir lokaliteden toplanırken *C. pseudibericum* 950 metre yükseklikten (Adana Feka yaylası) toplanmıştır. *C. graecum* *C. pseudibericum*'a nazaran daha yüksek bir CO<sub>2</sub> konsantrasyonuna maruz kaldığı için fenolik madde miktarında artış ve çeşitli fenolik bileşiklerde de modifikasyonların oluşması muhtemeldir. Bu bilgiden yola çıkacak olursak *C. graecum* ve *C. pseudibericum*'un toplam fenolik miktarlarındaki farkıda açıklayabiliriz.

*Labisia pumila*'da yaygın bir şekilde bulunan gallik asit ve kuersetin miktarları 1,200 µmol/mol CO<sub>2</sub>'ye maruz bırakıldığında gallik asitin ciddi bir şekilde artığı gözlenmiştir (Hawa ve diğ. 2012).

*Labisia pumila*'nın bütün varyetelerinde normal CO<sub>2</sub> konsantrasyonunda kamferol belirlenmesine rağmen yüksek CO<sub>2</sub> konsantrasyonu sonucunda kamferol belirlenememiştir. Bunun yerine *pumila* ve *alata* varyetelerinde kafeik asit miktarında artış gözlemlenmiştir (Hawa ve diğ. 2012).

*C. graecum* ve *C. pseudibericum*'da yapmış olduğumuz DPPH ve FRAP antioksidan aktivite deneylerinde *C. graecum*'un daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini belirlenmiştir. Bu bilgi Hawa ve arkadaşlarının (2012) yüksek CO<sub>2</sub> altındaki *L. pumila*'dan elde ettikleri DPPH ve FRAP değerlerindeki artmayla korelasyon içindedir.

Bitki polifenollerini (flavonoid ve fenolik bileşikler) çeşitli yollarla senezlenirler. İki temel yol (şikimik asit ve malonik asit yolu) bu aşamada görev almaktadır. Şikimik asit yolu precursorlerini glikoliz ve pentozfostat yolundan

türevlenen basit karbonhidratı aromatik amino asitlere dönüştürebilir (Ghasemzadeh ve diğ. 2010).

Önceki çalışmalar fenolik ve flavonoid bileşiklerdeki artış ile karbohidrat kaynaklarındaki artış arasında bir denge olduğunu göstermektedir. Daha fazla karbonhidrat kaynağına sahip ve artan miktarda CO<sub>2</sub> uygulanmış bitkilerde fenolik bileşiklerin miktarı ve konsantrasyonunun arttığı gözlemlenmiştir (Herrmann ve Weaver 1999, Penuelas ve Estiarte 1998).

*C. graecum* ve *C. pseudibericum* tuber ekstraktlarının anti-tümör özelliklerini belirlemek için PC9, PC14 ve A549 hücre hatları üzerinde bitki ekstraktlarının 1000, 500, 250, 100, 50, 10, 1 ng/μl son konsantrasyonları uygulanmıştır. Bu şekilde hücreler 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemli hava içeren ortamda 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda Cytotox Glo kit (Promega firmasından temin edilmiştir) kullanılarak Glomax Multi Detection System (Promega) cihazı ile 0. ve 72. saatlerdeki hücre proliferasyonu ölçülmüştür. PC9, PC14 ve A549 hücre hatlarında kontrole oranla yüzde sağkalım oranları ve IC<sub>50</sub> değerleri "<http://www.antimalarial-icestimator.net/runregression1.2.htm>" web sitesinin regression analiz programı kullanılarak hesaplanmıştır Yapmış olduğumuz hücre proliferasyon saptama deneyinde, en yüksek sitotoksik etkiyi PC9 hücre hattı üzerinde *C. graecum* dH<sub>2</sub>O ekstraktında görmekteyiz (13,89 ng/μl) (Şekil 3.12). Buna neden dH<sub>2</sub>O ekstraktlarında saponinlere bağlı olan aglikon (monosakkaratlar) kısmının diğer çözücülere nazaran dH<sub>2</sub>O tarafından kolayca çözülmüş olması düşünülmektedir. Bu aglikon kısmının daha çok açığa çıkması ve DPPH deneylerinde olduğu gibi "H<sup>+</sup>" radikallerini ortamdan süpürebilmesi ve PC9 hücre hattında sitotoksik etkinin daha güçlü olma olasılığını ortaya koymaktadır. Bir bütün halinde IC<sub>50</sub> değerleri incelendiği zaman PC9, PC14 ve A549 hücre hatları üzerinde genel olarak *C. graecum* ekstraktlarının daha yüksek sitotoksik bir etkiye sahip olduğu söz konusudur. Yapmış olduğumuz toplam fenolik madde miktarı tayin yönteminde ve yapılan YPSK fenolik madde analizinde *C. graecum*'un *C. pseudibericum*'dan daha yüksek toplam fenolik madde ye sahip olduğu ve YPSK fenolik madde analiz sonucunda yine *C. graecum*'un *C. pseudibericum* dan daha fazla madde içerdiği tayin edilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda, bitkilerin içermiş olduğu madde miktarı/farklılıklarında, hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi

değişiklik göstermektedir.

PC9 hücre hattında en yüksek yüzde sağ kalım oranı *C. pseudibericum* etanol ekstraktında gözlenirken ikinci sırada *C. graecum* etanol ekstraktı gelmektedir. PC9 hücre hattında *C. pseudibericum* ekstraktlarının yüzde sağkalım değerlerine baktığımızda sıranın şu şekilde olduğu etanol>metanol>aseton>dH<sub>2</sub>O görülmektedir (Şekil 3.25).

PC9 hücre hattında *C. graecum* ekstraktlarının yüzde sağkalım değerlerine baktığımızda etanol>metanol>aseton>dH<sub>2</sub>O sırası görülmektedir (Şekil 3.25). Aynı hücre hattı üzerinde farklı iki bitkinin aynı çözücülerle vermiş olduğu yüzde sağkalım değerleri birbiriyle korelasyon içindedir.

PC14 hücre hattında en yüksek yüzde sağ kalım oranı *C. pseudibericum* etanol ekstraktında saptanırken ikinci sırada *C. graecum* etanol ekstraktı gelmektedir. PC9 hücre hattında *C. pseudibericum* ekstraktlarının yüzde sağkalım değerlerine baktığımızda etanol>aseton>metanol>dH<sub>2</sub>O sırası görülmektedir (Şekil 3.26).

PC14 hücre hattında *C. graecum* ekstraktlarının yüzde sağkalım değerlerine baktığımızda metanol>etanol>aseton>dH<sub>2</sub>O sırası görülmektedir (Şekil 3.26). Aynı hücre hattı üzerinde farklı iki bitkinin aynı çözücülerle vermiş olduğu yüzde sağkalım değerleri birbiriyle korele olmasa bile PC9 ve PC14 hücre hatlarında yüzde sağkalım değerlerine baktığımızda en düşük etkiye sahip ekstrakt olarak dH<sub>2</sub>O gözükmektedir.

A549 hücre hattında en yüksek yüzde sağ kalım oranı *C. graecum* aseton ekstraktında saptanırken ikinci sırada *C. pseudibericum* aseton ekstraktı gelmektedir. A549 hücre hattında *C. pseudibericum* ekstraktlarının yüzde sağkalım değerlerine baktığımızda aseton> dH<sub>2</sub>O >metanol>etanol sırası görülmektedir.

A549 hücre hattında *C. graecum* ekstraktlarının yüzde sağkalım değerlerine baktığımızda aseton>metanol> dH<sub>2</sub>O>etanol sırası görülmektedir. Aynı hücre hattı üzerinde farklı iki bitkinin aynı çözücülerle vermiş olduğu yüzde sağkalım değerleri genel olarak bir uyum göstermektedir.

Yapılan bir çalışmada *Cyclamen europaeum*'un hücre yaşayabilirliği üzerindeki olası sitotoksik etkisi L929 fare fibroblast modelinde araştırılmıştır. Hücre yaşayabilirli MTT yöntemiyle değerlendirildiğinde *Cyclamen europaeum* ekstraktının yüksek konsantrasyonlarda hücre ölümüne sahip olduğu gösterilmiştir (Beriat ve diğ. 2011).

Yapılan bir çalışmada, *Cyclamen coum* ekstraktlarının HeLa ve H1299 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi araştırılmıştır. IC<sub>50</sub> değerlerine bakıldığında *C. coum* ekstraktının HeLa hücre hattı üzerinde 8,61µg/ml HeLa iken 9,52 µg/ml ile H1299'da daha yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğunu gözlemlemişler (Yıldız ve diğ. 2013)

PC9, PC14 ve A549 hücre hatlarına uygulanan *C. graecum* ve *C. pseudibericum* ekstraktların hücre hatları üzerindeki kontrole oranla invazyon etkisi en yüksek PC9 hücre hattında, *C.graecum* ekstraktı çıkmıştır. Ekstraktların en az etki gösterdiği hücre hattı ise PC14'dür. Hücre hatlarının invazyonu üzerine daha etkili olan ekstrakt *C. graecum*'dur. Çalışmadaki kontrole oranla % invazyon sonuçlarına bakıldığında iki bitki ekstraktınında PC9, PC14 ve A549 hücre hatlarında invazyonu baskıladığı görülmektedir.

*C. graecum* ve *C. pseudibericum* etanol tuber ekstraktlarının PC9, PC14 ve A549 akciğer kanseri hücre hatlarınının invazyon kapasitelerini kontrole oranla kuvvetli bir şekilde baskıladığı saptanmıştır (Şekil 3.11). Ekstraktların hücrelerin invazyonunu baskılama yetenekleri küçük farklılıklar göstermektedir, invazyon baskılama oranı en yüksekten en düşüğe sırasıyla PC9, PC14 ve A549 şeklinde saptanmıştır.

*C. graecum* ekstraktlarının PC9 PC14 ve A549 hücre hattı üzerinde göstermiş olduğu invazyonu baskılama ve sitotoksik etki kapasitesi bir biriyle büyük bir uyum içindedir.

Literatürde *Cyclamen* cinsin invazyona olan etkisini gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu yüzden yapmış olduğumuz bu çalışmanın yüksek özgünlük değerine sahip olduğu ve daha sonraki araştırmalar için bir adım olarak düşünülmektedir.

Mikro RNA'lar hedef mRNA'nın yıkımını ya da translasyonunun baskılanmasını gerçekleştirerek posttranskripsiyonal düzeyde gen ekspresyonunu düzenler. Hücre büyümesinde, farklılaşmasında, proliferasyonunda ve hücre ölümünde bir veya daha fazla hedef genin baskılanmasında rol oynar (Selbach ve diğ. 2008, Baek ve diğ. 2008). miRNA'lar dokuya spesifik olup insanlarda bütün hücre tipinde bulunurlar ve farklı hücrelerden farklı miRNA'lar eksprese edilmektedir. Çeşitli miRNA ekspresyon düzey değişiklikleri birçok hücrel proteinin ekspresyon düzeylerini etkilemektedir (Latronico ve diğ. 2007).

miRNA'lar kardiyovasküler hastalıklar, merkezi sinir sistemi hastalıkları, inflamatuvar ve immün kökenli birçok hastalıkla yakından ilişkilidir (Ha 2011, Soifer ve diğ. 2007, Tsitsiou ve Lindsay 2009).

Günümüzde yüzlerce miRNA'nın azalan veya artan ekspresyon özellikleri ile tümör baskılayıcı veya onkomir olarak görev aldığı gösterilmiştir. Ayrıca miRNA genlerinin %50'den fazlası kanser ile ilişkili genomik bölgelerde yerleşmiştir (Bartles 2009). MikroRNA'lar akciğer, mide, meme, kolon, tiroid, pankreas ve prostat kanserlerini de içeren birçok kanserde anormal eksprese edilirler (Bartles 2009, Khosknaw ve diğ. 2009, Mitchell ve diğ. 2008).

*C. graecum* ve *C. pseudibericum* etanol ekstraktları PC9, PC14 ve A549 hücre hatlarına daha önceden belirlenmiş olan IC<sub>50</sub> değerlerinde uygulanmıştır. Bitki ekstraktları ile 24 saat muamele edilen hücre hatları 24 saat sonra Qiagen micro RNAeasy izolasyon kiti kullanılarak mikro RNA'lar elde edilmiştir. Eş zamanlı PZR yapmak için miRNA'lar RT II kiti kullanılarak cDNA'lara dönüştürülmüştür. Öncelikle akciğer kanseri, metastaz, apoptozis, invazyon ile ilgili miRNA profilleri literatür taraması yapılarak 19 adet miRNA belirlenmiştir. Belirlenen miRNA primerleri ve normalizatörleri kullanılarak protokoldeki şartlar doğrultusunda eş zamanlı PZR reaksiyonu kurulmuştur. Çıkan sonuçlar "2<sup>-delta delta Ct</sup>" formülüyle değerlendirilmiştir (1'in altındaki ve 2 ile üzeri kat değişimleri dikkate alınarak

akciğer kanser ilişkili mikro RNA'lar tartışılmıştır). Elde etmiş olduğumuz kat değişimi grafiklerinde görüldüğü üzere (Şekil 3.28 ve 3.29) PC9 hücre hattı için *C. graecum* ve *C. pseudibericum* tuber etanol ekstraktları uygulandığında miR-128, miR-422 ve miR-22 mikroRNA'ların ekspresyonlarının artmış olduğu görülmektedir. Literatür bilgisinde bu ifadesi artmış olan mikro RNA'ların akciğer kanseri invazyonu ile ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bu yüzden akciğer kanser invazyonu ile miRNA arasındaki mekanizma çalışmaları için önemli bir bilgidir.

PC9 hücre hattında *C. pseudibericum* ekstraktının, miR-146 tümör baskılayıcı miRNA'sının ekspresyonunu arttırdığı görülmektedir (Şekil 3.30). MiR-146 tümör baskılayıcı mikro RNA'sı MMP16'yı (matriks metalloproteaz 16) hedefleyerek kanser hücresinin invazyon ve hücre göçü yeteneğini azaltır (Lin ve diğ. 2011). miR-146 ifadesi yapmış olduğumuz deneylerde artış gözlemlenmesi ve invazyonun azalmasına neden olmuştur bu sonuçlar literatür ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

*C. graecum* ve *C. pseudibericum* tuber etanol ekstraktları uygulanmış PC14 hücre hatlarında miR-21, miR-31, miR-128 ve miR-155 mikroRNA'larının ekspresyonlarında artış görülmektedir (Şekil 3.31-3.32). PC14 hücre hattına *C. graecum* ekstraktı uygulandığında miR-146 mikroRNA'sının ekspresyonunu arttırırken *C. pseudibericum* ekstraktının ise miR-191 ve miR-200c'nin ekspresyonunu arttırdığı görülmektedir.

*C. pseudibericum* tuber etanol ekstraktları uygulanmış PC14 hücre hatlarında tümör baskılayıcı miR-200c ve miR-146'nin ifadesindeki artış onkomir olarak görev alan ve aynı şekilde artış gösteren miR155'in hedefini up-regule etmiş olabilir. Çünkü akciğer kanserinde miR155 onkomiri VEGF-A genini hedefler (Johnson ve diğ. 2005). MiR-200c tümör baskılayıcı mikro RNA'sı anjigenez, invazyon ve metastazda görev alır. MiR-200c mikro RNA'sı hücre göçü ve invazyon basamağında *ZEB1*, *PLCG1*, *MSN*, *VEGFRI*, *CDH1*, *HMGB1* genlerini hedefler. İfadesi artmış olan miR-146 tümör baskılayıcı mikro RNA MMP16 proteinini hedefleyerek PC14 hücre hattının invazyon yeteneğini baskılamıştır. miR-200c, miR-146 ve miR-155 ifadeleri literatürle uyum göstermektedir.



Yapılan başka bir araştırmada akciğer kanserinde miR-210, miR-21, miR31 ve miR-182 düzeylerinde artış saptanmıştır (Wang ve diğ. 2009, Nikiforova ve diğ. 2008, Meng ve diğ. 2007).

*C. graecum* ve *C. pseudibericum* tuber etanol ekstraktları A546 hücre hattına uygulandığında miR145 mikroRNA'larının ekspresyonlarında artışa sebep olduğu görölmektedir. MiR-145 hedefleri arasında EGFR proteini yer almaktadır. Buna bağlı olarak hücrelerin invazyon yeteneği düşmektedir. Bu sonucumuz literatür ile uyum göstermektedir.

*C. graecum* tuber etanol ekstraktı A546 hücre hattına uygulandığında miR-146 mikro RNA'sının ekspresyonu artarken *C. pseudibericum* ekstraktında ise miR-200c'nin ekspresyonunda bir artış görölmüştür.

A549 hücre hattına uygulanan *C. graecum* ekstraktının, MiR-146'nın ifadesini arttırmış olduğu görölmektedir (şekil 3.32). İfadesi artımış olan miR-146 tümör baskılayıcı mikro RNA, MMP16 proteinini hedefleyerek PC14 hücre hattının invazyon yeteneğini baskılamış olabilir. Bu düşüncemizi yapmış olduğumuz invazyon deneyini sonucuda (A549 hücre hattında %1,587 oranında invaze olmuş hücre göröldü (Tablo 3.10)) desteklemektedir.

A549 hücre hattına uygulanan *C. pseudibericum* ekstraktının, miR-200c'nin ifadesini arttırmış olduğu görölmektedir (şekil 3.33). İfadesi artımış olan miR-200c tümör baskılayıcı mikro RNA, anjiyogenez, hücre göçü ve invazyon basamağında *ZEB1*, *PLCG1*, *MSN*, *VEGFRI*, *CDH1*, *HMGB1* genlerini hedefler. *ZEB1*'in mekanizmasına bakıldığında, miR-200c *ZEB1*'i hedefler, susturulan *ZEB1* EMT' yı indükleyemez. EMT'nin baskılanması sonucu kanser hücresi invazyon yeteneğini kaybeder.

Elde etmiş olduğumuz bu veriler doğrultusunda *C. graecum* tuber etanol ekstraktı hem PC14 hem de A549 hücre hattında miR146 mikro RNA'sının ekspresyonunun artmasında etkili olmuştur. *C. pseudibericum* ekstraktının ise PC14 ve A549 hücre hatlarında miR200c'nin ekspresyon artışında etkili olduğu görölmektedir.

PC9, PC14 ve A549 akciğer kanser hücre hatlarında uyguladığımız bitki ekstraktlarının invazyonu nasıl baskılamış olabileceğini mikro RNA'ların en bilindik olanları miR-200c ve miR-146 tümör baskılayıcı mikro RNA'ların ifadelerinin arttırarak yapmış olabileceklerini ön görmekteyiz.

Yapmış olduğumuz çalışmada *C. graecum* ve *C. pseudibericum* ekstraktı uygulanmış PC9, PC14 ve A549 hücre hatlarında Let-7 ve miR-7 mikro RNA'larının ifadelerinin kat değişimi analizinde 1'in altında olduğunu görmekteyiz (Şekil 3.28-29-30-31-32-33). Bu bağlamda *C. graecum* ve *C. pseudibericum* ekstraktlarının ve *cMyc* onkogenleri üzerine bir etkiye sahip olmadığı söylenebilir. Nakajima ve diğ. (Nakajima ve diğ. 2006) tarafından kolorektal kanserlerde onkogenik miRNA'lardan Let-7g, miR-181b ve miR-200c, miR-29 ve miR-92'nin seviyesinde artış olduğu gösterilmiştir.

Chen ve arkadaşları akciğer kanseri hastalarında serum miRNA'larını analiz ederek KHDAK hasta serumunda bulunan ancak normal serumda bulunmayan 63 tane miRNA tespit etmişlerdir. Akciğer kanserinde Let-7 ve miR-155 ailesi akciğer adenokarsinomlu hastalarda hayatta kalmayla ilişkilidir. Ras onkogenini Let-7 ailesi negatif regüle edebilir bu nedenle Let-7 ailesi tümör baskılayıcı olarak fonksiyon gösterir (Johnson ve diğ. 2005). Yu ve arkadaşları 2008 yılında yayınladıkları çalışmada beş yeni miRNA tanımlamışlardır; bunlardan miR-221 ve Let-7 koruyucu etki gösterirken miR-137, miR-372 ve miR-182 ise kötü prognoz göstergesi olduğunu ileri sürmüşlerdir (Yu ve diğ. 2008, Garofalo ve diğ. 2008).

Sonuc olarak, bu çalışma kapsamında çalışılan *C. graecum* ve *C. pseudibericum* ekstraktlarına ait bulgular göz önünde bulundurulacak olursa bitkilerin ihtiva ettikleri fenolik madde miktarı/türevleri aynı cinslerde çevresel ve coğrafik farklılıklardan etkilendiği tespit edilmiştir. Bitkilerin sahip oldukları antioksidan aktivite kapasiteleri ile fenolik madde miktarları arasında bir uyum olduğunu saptamış bulunmaktayız. Bu bağlamda yükseklik ve çevresel şartların, sekonder metabolitler üzerindeki etkisini anlamak için farklı yükseklikte ve farklı çevresel şartlarda yayılış gösteren ya da suni ortamlarda yetiştirilen türler üzerinde toplam fenolik/flavonoid madde miktarı ve antioksidan aktivite farklılıklarının araştırılması gerekmektedir.

Ayrıca *C. graecum* ve *C. pseudibericum* ekstraktlarının akciğer kanser hücre invazyonunu baskılama mekanizmasının miR-146, miR-200c ve miR-155 mikro RNA'ların ifadesini arttırarak gerçekleştirdiklerini saptamış bulunmaktayız, ekstraktların miR-146, miR-200c ve miR-155 mikro RNA'larının hangi genlerin ifadelerini baskılayarak invazyonu inhibe ettiklerini gösterilerek etki mekanizmalarının araştırılması gerekmektedir.

## 5. KAYNAKLAR

- Aigner, A., “MicroRNAs (miRNAs) in cancer invasion and metastasis: therapeutic approaches based on metastasis-related miRNAs”, *J. Mol. Med.*, (5), 445-457, (2011).
- Allen, P., “Soft-Tissue Accumulation Of Lead In The Blue Tilapia, *Oreochromis Aureus* (Steindachner), and The Modifying Effects Of Cadmium And Mercury”, *Biological Trace Element Research*, 50, 3, 193-208, (1995).
- Ambros, V., “The functions of animal microRNAs.” *Nature*, 431, 350–355, (2004).
- Arslan, S., Bölükbaş, N., “Kanserli Hastalarda Yaşam Kalitesinin Değerlendirilmesi”, *AÜHYO Dergisi*, 6, 3, 38-48, (2003).
- Arslan, Ş., Özgün, Ö., Celik, G., Semiz, A., Duşen, O., Mammadov, R. ve Şen, A., “Effects of *Cyclamen trochopteranthum* of hepatic drug metabolizing enzymes”, *Archives of Biological Science Belgrade*, 63, (3), 545-555, (2011).
- Aydın, S.A., Stün, F., “Tanenlerin kimyasal Yapıları, Farmakolojik Etkileri, Analiz Yöntemleri”, *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 33, 1, 21-31, (2007).
- Babaoğlu, M., “Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları”, *Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları*, Konya, (2001).
- Baek D., Villén J., Shin C., Camargo F.D., Gygi S.P., Bartel D.P., “The impact of microRNAs on protein output”, *Nature*, 4, 455, 7209, 64-71, (2008).
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman Samir., “Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses”, *Food Chemistry*, 99, 191–203, (2006).
- Bartel, D.P., “MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function”, *Cell*, 116, 281–297, (2004).
- Bartles, C.L., Tsongalis, G.J., “MicroRNAs : novel biomarkers for human cancer”, *Clin. Chem.*, 55, 4, 623-631, (2009).
- Baytop, T., “Türkçe Bitki Adları Sözlüğü”, *Atatürk Kültür, Dil ve Tarih Yüksek Kurumu Türk Dil Kurumu Yayınları*, Ankara, 578-579 (1994).
- Baytop, T., “Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi”, *İstanbul Üniv. Yay. No.3255*, İstanbul, (1984).
- Bedeir, A., Krasinskas, Am., “Molecular Diagnostics of Colorectal Cancer”, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135, 204-215, (2011).

Benzie, İ.F.F., ve Strain, J.J., “The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”, The FRAP Assay”, *Anal. Biochem*, 239, 1, 70-76, (1996).

Beriat, G.K., Akmansı, Ş.H., Gürpınar, Ö.A., Onur, M.A., Alhan, A.,”The Cytotoxic Effect of Nasodren Nasal Spray (*Cyclamen europaeum* Extract) in L929 Fibroblastic Cell Culture”, *Türkiye Klinikleri J. Med. Sci.*, 31, 2, (2011).

Bilaloğlu, G.V., Harmandar, M., “Flavonoidler.” Aktif Yayınevi, İstanbul, 334-354, (1999).

Blois, M.S., “Antioxidant Determination By The Use Of A Stable Free Radical”, *Nature*, 181, 1199-1200, (1958).

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., “Use Of A Free Radical Method To Evaluate Antioxidant Activity”, *Food Science And Technology*, 28, 25-31, (1995).

Bui, T.V., Mendell, J.T., “Myc: Maestro of MicroRNAs”. *Genes Cancer*, 1, 6, 568–575, (2010).

Bustin, S.A., Benes,V., Nolan, T., Pfaffl, M.W., “Quantitative real-time RT-PCR aperspective”, *Journal of Molecular Endocrinology*, 34, 597–601, (2005).

Bustin, S.A., ve Mueller, R., “Real-time reverse transcription PCR (qrt-pcr) and its potential use in clinical diagnosis”, *Clinical Science*, 109, 365-379, (2005).

Calin, G.A., Liu, C.G., Sevignani, C., ve diğ. “MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias”, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 101, 11755–11760, (2004).

Calin, G.A., Croce, C.M., “MicroRNA signatures in human cancers.” *Nat. Rev. Cancer*, 6, 857-866, (2006).

Camarillo-Lopez, C., Marchat, L.A., Arechaga-Ocampo E. ve diğ., “MetastamiRs: non-coding microRNAs driving cancer invasion andmetastasis”, *International Journal ofMolecular Sciences*, 13, 2, 1347–1379, (2012).

Caponio, F., Alloggio, V., Gomes, T., ”Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques”, *Food Chemistry*, 64, 2, 203-209, (1999).

Carney, DN., “Lung cancer :time to move on from chemotherapy”, *N. Engl. J. Med.*, 346, 1127-1236, (2002).

Catalucci, D., Gallo, P., Condorelli, G., “MicroRNAs in Cardiovascular Biology and Heart Disease”, *Circ Cardiovasc Genet*, Review, 2, 4, 402-408, (2009).

Çelik, A., Çiçek, M., Semiz, G., ve Karıncalı, M., “Taxonomical And Ecological Investigations On Some Geophytes Growing Around Denizli Province (Turkey)” *Turkish Journal Of Botany*, 28, 1-2, 205-211, (2004).

Cemeroğlu, B., “Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi “1. Cilt. *Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları* No: 35, Ankara, 77-88, (2004).

Cesar, L.C., Laurence, A., Marchat, Elena Arechaga-Ocampo, Carlos Perez-Plasencia, Oscar del Moral-Hernandez, Elizabeth J., Castaneda-Ortiz, and Sergio Rodriguez-Cuevas “MetastamiRs: Non-Coding MicroRNAs Driving Cancer Invasion and Metastasis Int”, *J. Mol. Sci.*, 13, 1347–1379, (2012).

Cetik, R., “Vejetasyon Bilimi”, *A.Ü.Fen Fak.*, Ülkemiz Matbaası, İzmir, (1973).

Chandler, S.F., ve Dodds, J.H., ”The effect of phosphate. nitrogen and sucrose on the production of phenolics and solasidine in callus cultures of *Solanum lacinitum*”, *Plant Cell Reports*, 2, 105-110, (1983).

Chaudiere, J., Ferrari-iliou, R., “Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms, *Food Chem. Toxicol.*, 37, 9-10, 949-962, (1999).

Chen, C.L., Hsu L.I., Chiou H.Y., ve diğ., “Ingested arsenic, cigarette smoking, and lung cancer risk: A follow-up study in arseniasis-endemic areas in Taiwan”. *JAMA.*, 292, 2984-2998, (2004).

Chen, J.F., Mandel, E.M., Thomson, J.M., Wu, Q., Callis, T.E., Hammond, S.M., Conlon, FL, Wang, D.Z., “The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscleproliferation and differentiation”, *Nat. Genet.*, 38, 228–233, (2006).

Chew, Y.L., Goh, J.K., Lim, Y.Y., “Assessment of in vitro antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia”, *Food Chemistry*, 116, 13-18, (2009).

Chiang, H.R., Schoenfeld, L.W., Ruby, J.G., ve diğ. “Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes”, *Genes Dev.*, 24, 992–1009, (2010).

Crawford, M., Brawner, E., Batte, K., Yu, L., Hunter, M.G., Otterson, GA., Nuovo, G., Marsh C.B., Nana-Sinkam S.P.,”MicroRNA-126 inhibits invasion in non-small cell lung carcinoma cell lines”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 373, 607–612, (2008).

Crofton, J., Douglas. In: Crofton J, Douglas A, eds. “Respiratory diseases”. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science A. *Lung cancer*, 631-669, (1981).

Cooper, M.C., ve Hausmann, R.E., “Hücre Moleküler Yaklaşım”, (Çev. Ed: Sakızlı, M., Atabey, N.), *İzmir Tıp Kitabevi*, İzmir, 631-673, (2006).

Coşkun, F., “Gıdalarda Bulunan Doğal Koruyucular”. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 27-33, (2006).

Dall'Acqua, S., Castagliuolo, L., Brun, P., Ditadi, F., Palù, G., Innocenti, G., "Triterpene glycosides with in vitro anti-inflammatory activity from Cyclamen repandum tubers", *Carbohydrate Research* (2010).

Davis, P.H., "Flora Of Turkey And The East Aegean Islands", *University Press, Edinburgh*, Vol: 6, (1978).

Davis, P.H., "Flora Of Turkey And The East Aegean Islands", *Edinburg Univ. Press, Edinburg* Vol: 8, (1984).

Denissenko, MF., Pao, A., Tang, M., "Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53" *Science*, 274-430, (1996).

Demirhan, E., "Şifalı Bitkiler", Alfa Basım Yayın Dağıtım Ltd. Sti., İstanbul, 540, (2001).

Dewick, PM., "Medicinal Natural Products" *A Biosynthetic Approach*. 2. 6-12. (Wiley & Sons), Chichester, England, (2002).

Duh, P.D., Yen, W.J., Du, P.C., ve Yen, G.C., "Antioxidant Activity Of Mung Bean Hulls", *Journal Of The American Oil Chemists' Society*, 74,1059-1063, (1997).

Duman, H., Koyuncu, M., Ünal, F., "The Genus *Sternbergia* Waldst. & Kit. (Amaryllidaceae) İn Turkey", *The Karaca Arboretum Magazine*, 6, 115-130, (2002).

Ekim, T., "Bitkiler, Türkiye'nin Biyolojik Zenginlikleri Türkiye Çevre Sorunları" *Vakfi Yayını*, Ankara, (1990).

Ekim, T., Koyuncu, M., Güner, A., Erik, S., Yıldız, B., Vural, M., "Türkiye'nin Ekonomik Değer Taşıyan Geofitleri Üzerinde Taksonomik Ve Ekolojik Araştırmalar", T. C. Tarım Orman Ve Köyişleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü, İşletme Ve Pazarlama Daire Başkanlığı, O. E. M. Eğitim Dairesi Başkanlığı Yayın Ve Tanıtma Şube Müdürlüğü Matbaası, Ankara, (1991).

Ekim, T., Koyuncu, M., "Türkiye'den İhraç Edilen Çiçek Soğanları ve Koruma Önlemleri", II. Uluslararası Ekoloji ve Çevre Sorunları Sempozyumu Bildirileri, 42-47, Ankara, (1992).

Ellefson, W., Lilla Z. and Crowley, R., "Quantification and Evaluation of Antioxidants in Food and Botanical Products", *International Conference on Nutraceuticals and Functional Foods*, Reno, Nevada, 5-8, (2006).

Erik, S., Tarıkahya, B., "Türkiye Florası Üzerine", *Kebikeç*, 17, 139-163, (2004).

Eryiğit, F., "Mentha pulegium L. ve Salvia tomentosa Miller Bitkilerinin Metanol Özütlelerinin İn Vitro Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi", *Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı*, (Yüksek Lisans Tezi), Isparta. (2006).

- Esquela-Kerscher, A., Slack, F.J., “Oncomirs - microRNAs with a role in cancer”. *Nat. Rev. Cancer*, Review, 6, 4, 259-269, (2006).
- Ettinger, D.S., “New drugs for chemotherapy-naive patients with extensive-disease small cell lung cancer”. *Semin. Oncol.*, 28, 27-36, (2001).
- Felli, N., Fontana, L., Pelosi, E., Botta, R., Bonci, D., Facchiano, F., Liuzzi, F., Lulli, V., Morsilli, O., Santoro, S., Valtieri, M., Calin, G.A., Liu, C.G., Sorrentino, A., Croce, C.M., Peschle, C., “MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor downmodulation”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 102, 18081–18086, (2005).
- Feresin, G.E., Tapia, A.A., Bustos, D.A., “Antibacterial activity of some medicinal plants from San Juan, Argentina”, *Fitoterapia*, 71, 4, 429–432, (2000).
- Fraser, R.S., Müller, N.L., Colman, N., Pare, P.D., “Diagnosis of Diseases of the Chest Pulmonary Carcinoma”, 4th edition. *Philadelphia*, 1070-1228, (1999).
- Garofalo, M., Quintavalle, C., Di Leva, G., Zanca, C., Romano, G., Taccioli, C., Liu, C.G., Croce, C.M., Condorelli, G., “MicroRNA signatures of TRAIL resistance in human non-small cell lung cancer”. *Oncogene*, 19, 27, 3845-3855, (2008).
- Geoffrey, A., Cordell, “The Alkaloids Chemistry and Biology” *Natural Products Inc.*, Evanston, Illinois, USA, 67, 1-280, (2009).
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z., Rahmat, A.,” Elevated carbon dioxide increases contents of flavonoids and phenolic compounds, and antioxidant activities in Malaysian young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe.) varieties” *Molecules*, 15, 7907–7922, (2010).
- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S., Enright, A.J., “miRBase: tools formicroRNA genomics”, *Nucleic Acids Res.*, 36, 154–158, (2008).
- Güner, A., “Bitkiler Dünyası”, *Bilim Ve Teknik*, Tübitak Yayını, Pro- Mat Basın Yayın A. Ş., Cilt: 27, 321, 431, (1994).
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Baser, K.H.C., “Flora of Turkey (Supplament II)”, *Edinburgh*, 11, 656-678, (2000).
- Güngör, N., “Dut Pekmezinin Bazı Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri İle Antioksidan Aktivitesi Üzerine Depolamanın Etkisi”, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum*, (2007).
- Ha, T.Y., “MicroRNAs in Human Diseases: From Cancer to Cardiovascular Disease”, *Immune Netw.*, 11, 3, 135-154, (2011).
- Haiman, C.A., Stram, D.O., Wilkens, L.R., ve diğ., “Ethnic and racial differences in the smoking-related risk of lung cancer”, *N. Engl. J. Med.*, 333-354, (2006).



Halliwell, B., "How To Characterize An Antioxidant: An Update", *Biochemistry Society Symposium*, 61, 73-101, (1995).

Hammond, S.M., "MicroRNAs as oncogenes", *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 16, 1, 4-9, (2006).

Hawa, Z.E., Jaafar, Mohd Hafiz I., ve Ehsan K., "Phenolics and Flavonoids Compounds, Phenylalanine Ammonia Lyase and Antioxidant Activity Responses to Elevated CO<sub>2</sub> in *Labisia pumila* (Myrsinaceae)" *Molecules*, 17, 6331-6347, (2012).

Herrmann, K.M., Weaver, L.M., "The shikimate pathway", *Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.*, 50, 473-503, (1999).

Ikawa, M., Schaper, T.D., Dollord, C.A. ve Sosner, J.J., "Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7, 1811-1815, (2003).

Ishizaka, H., Yamada, H., Sasaki, K., "Volatile compounds in the flowers of *Cyclamen persicum*, *C. purpurascens* and their hybrids", *Scientia Horticulturae*, 1, 2, 94, 125-135, (2002).

Iorio, Mv., Ferracin, M., Liu, Cg., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., Ménard, S., Palazzo, Jp., Rosenberg, A., Musiani, P., Volinia, S., Nenci, I., Calin, Ga., Querzoli, P., Negrini, M., Croce, Cm., "MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer", *Cancer Research*, 65, 7065-7070, (2005).

Çalış, İ., Ersan, M., Şatana, A., Kelican, P., Demirdamar, R., Alaçam, R., Tanker, N., Rügger H., ve Sticher, O., "Triterpene Saponins from *Cyclamen mirabile* and Their Biological Activities", *J. Nat. Prod.*, 60, 3, 315-318, (1997).

İtil, O., "Akciğer kanserlerinin epidemiyolojisi ve etyolojisi". In: *Haydaroğlu A; ed. Akciğer kanserleri: Tanı ve tedavi. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi*, 15-34, (2000).

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Thun, M.J., "Cancer statistic, 2009", *CA. Cancer J. Clin.*, 59, 4, 225-249, (2009).

Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D., Slack, F.J., "RAS is regulated by the let-7 microRNA family", *Cel.*, 11, 120, 635-647, (2005).

Jones, D., Griffiths, S., Kaur Saini, H., Dongen, S., Enright, Aj., "miRBase: tools for microRNA genomics". *Nucleic Acids Research*, 1, 5 1103-1121, (2007).

Junn, E., Mouradian, M.M., "MicroRNAs in neurodegenerative diseases and their therapeutic potential", *Pharmacol Ther.*, 133,2, 142-150, (2012).

Juvvuna, P.K., Khandelia, P., Lee, L.M., Makeyev, E.V., “Argonaute identity defines the length of mature mammalian microRNAs.” *Nucleic Acids Research*, 40, 14, 6808–6820, (2012).

Kafkas, E., Bozdoğan, A., Burgut, A., Türemiş, N., Paydaş Kargı, S., Cabaroğlu, T., “Bazı üzüksü Meyvelerde Toplam Fenol ve Antosiyanin İçerikleri.” *II. Ulusal Üzüksü Meyveler Sempozyumu*, Tokat, 309-312, (2006).

Kargı, A., Veral, A., “Patolojik Tanı ve sorunları.”In:Akkoçlu A, Öztürk C. *Akciğer kanseri multidisipliner yaklaşım*. Toraks Kitapları Sayı:1 Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 1, 17-21, (1999).

Kaur, G., Alam, M.S., Jabbar, Z., Javed, K., Athar, M., “Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flower”, *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 340-348, (2006).

Khosknaw, S., Green, A., Powe, D., Ellis, I., “MicroRNA involvement in the pathogenesis and management of breast cancer” *J. Clin. Pathol.*, 62, 5, 422-430, (2009).

Kloosterman, W.P., Lagendijk, A.K., Ketting, R.F., Moulton, J.D., Plasterk, R.H., “Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development.” *PLoS. Biol.*, 5, 203-219, (2007).

Koç, H., “Bitkilerle Sağlıklı Yaşama”, *Başbakanlık*, (2002).

Konukoğlu, D., *Biyokimya Nobel tıp kitabevi*, İstanbul, (2000).

Koyuncu, M., “Geofitler”. *Bilim ve Teknik* Tübitak Yayınları Cilt 27, Sayı 321, Pro-Mat Basın Yayını, A.S. Ankara ,(1994).

Krichevsky, A.M., Sonntag, K.C., Isacson, O., Kosik, K.S., “Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis”, *Stem Cells*, 24, 857–864, (2006).

Kumar, V., Cotran, R.S., ve Robbins, S.L., “Temel Patoloji”, (Çev. Ed: Çevikbaş, U.), *Nobel Tıp Kitabevi*, İstanbul, 132-174, (2000).

Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., “A Mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing.” *Cell*, 129, 1401–1414, (2007).

Latronico, MV., Catalucci, D., Condorelli, G., “Emerging role of microRNAs in cardiovascular biology”, *Circ. Res.*, 101, 1225-1236, (2007).

Lin, F., Wang, X., Jie, Z., Hong, X., Li, X., Wang, M., Yu, Y., “Inhibitory effects of miR-146b-5p on cell migration and invasion of pancreatic cancer by targeting MMP16”, *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 4, 509-523, ( 2011).

Lin, S.L., Miller, J.D., Ying, S.Y., “Intronic MicroRNA (miRNA)”. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1–13, (2006).

- Liu, Z.L., Wang, H., Jing, Liu, Z., Wang, X., “MicroRNA-21 (miR-21) expression promotes growth, metastasis, and chemo- or radioresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN”, *Mol. Cel. Biochem.*, 372, 2, 34-45, (2012).
- Lukiw, W.J., Alexandrov, P.N., Zhao, Y., Hill, J.M., “Spreading pf Alzheimer’s disease inflammatory signaling through soluble micro-RNA.” *Neuroreport*, 11, 23, 10, 621-627, (2012).
- Lüleyap, H.Ü., “Moleküler Genetiğin Esasları”, *Nobel Kitabevi*, Adana, 303-318 (2008).
- MacDonald-Wicks, LK., Wood, L.G., ve Garg, M.L., “Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro”, a review, *J. Sci. Food Agric.*, 86, 2046–2056, (2006).
- MacRa, J.I., Doudna, J.A., “Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes”, *Current Opinion in Structural Biology*, 17, 138–145, (2007).
- Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, JLFC., “Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties”, *Anal. Chim. Acta*, 613, 1–19, (2008).
- Mahasneh, A.M., El-Oqlah, A.A., “Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan”, *J. Ethnopharmacol*, 64, 271-276, (1999).
- Mammadov, R., Ili, P., ve Dusen, O.,” Phenolic contents and antioxidant properties of Muscari parviflorum Desf” *Journal of Chemical Society of Pakistan*, 34, 651-655, (2012).
- Matakidou, A., Eisen, T., Houlston, R.S., “Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk”, *Br. J. Cancer*, 93, 825-841, (2005).
- Meng, F., Henson, R.H., Wehbe-Janek, H., “MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer”, *Gastroenterology*, 133, 647, 58-71, (2007).
- Merlo, L.M., Pepper, J.W., Reid, B.J., “Cancer as an evolutionary and ecological process (Evrimsel ve ekolojik bir süreç olarak kanser)”, *Nat. Rev. Cancer*, 6, 924-935, (2006).
- Metin, H., Aydın, C., Ozay, C., ve Mammadov, R., “Antioxidant Activity of the Various Extracts of *Cyclamen graecum* Link Tubers and Leaves from Turkey”, *J. Chem. Soc. Pak.*, 35, 5, 1332-1336, (2013).
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A., “A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates”, *Clin. Sci.*, 84, 407–412, (1993).

Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K.C., Allen, A., Lin, D.W., Urban, N., Drescher, C.W., Knudsen, B.S., Stirewalt, D.L., Gentleman, R., Vessella, R.L., Nelson, P.S., Martin, D.B., Tewari, M., "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 29, 105, 30, 10513-10521, (2008).

Mogalhaes, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, LLFC., ve Rangel, O.S., "Automatic method for the determination of Folin-Ciocalteu reducing capacity in food products", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 15, 5241-5246, (2006).

Moran, C.A., Suster, S., Coppola, D., Wick, M.R., "Neuroendocrine Carcinomas of the Lung: A Critical Analysis", *Am. J. Clin. Pathol.*, 131, 206-221, (2009).

Müşteri Oltulu, Y., "Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hastalarında Serum Bazlı Mir221 ve Mir222'nin Biobelirteç Olarak Kullanımının Araştırılması", *Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Moleküler Tıp Programı*, İstanbul, (2014).

Nakajima, G., Hayashi, K., Xi, Y., Kudo, K., Uchida, K., Takasaki, K., Yamamoto, M., Ju, J., "Non-coding MicroRNAs gsa-let-7g and hsa-miR-181b are Associated with Chemoresponse to S-1 in Colon Cancer", *Cancer Genomics Proteomics*, 3, 5, 317-324, (2006).

Nikiforova, M.N., Tseng, G.C., Steward, D., Diorio, D., Nikiforov, Y.E., "MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 93, 5, 1600-1608, (2008).

Nolan, T., Hands, RE., Bustin, SE., "Quantification of mRNA using real-time RTPCR", *Nature Protocols*, 1, 3, 1559-1582, (2006).

Orhan, I., Kupeli, E., Aslan, M., Kartal, M., Yesilada, E., "Bioassayguided evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of pistachio, *Pistacia vera L*", *Journal of Ethnopharmacology*, 105,1-2, 235-240, (2006).

Özen, T., Demirtaş, İ., Akşit, H., "Determination of antioxidant activities of various extract and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *Skorpili*", *Food Chemistry*, 124, 58-64, (2011).

Parsons, A., Daley, A., Begh, R., "Influence of smoking cessation after diagnosis of early stage lung cancer on prognosis: systematic review of observational studies with meta-analysis", *B.M.J.*, 340, 55-69, (2010).

Pasquinelli, A.E., "MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship". *Nature Reviews Genetics*, 12, 271-282, (2012).

Passlick, B., Sienele, W., Seen-Hibler, R., "Overexpression of matrix metalloproteinase 2 predicts unfavorable outcome in early stage nonsmall cell lung cancer", *Clin. Cancer Research*, 6, 3944-3948, (2000).

- Pehlivan, M., Güleriyüz, M., "Ahududu ve Böğürtlenlerin İnsan Sağlığı Açısından Önemi", *Bahçe*, 33, 1-2, 51–57, (2004).
- Penuelas, J., Estiarte, M., "Can elevated CO<sub>2</sub> affect secondary metabolism and ecosystem function", *Trees*, 13, 20–24, (1998).
- Pezzuto, J.M., "Plant derived anticancer agents". *Biochemical Pharmacology* 2, 121-133, (1997).
- Pfaffl, M.W., "A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR", *Nucleic Acids Research*, 29-45, (2001).
- Pillai, R.S., Bhattacharyya, Sn., Filipowicz, W., "Repression of protein synthesis by miRNAs: How many mechanisms?", *Trends in Cell Biology*, 17, 118-126, (2007).
- Pisani, P., Parkin, DM., Bray, F., Ferlay, J., "Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990". *Int. J. Cancer*, 83, 18-29, (1999).
- Primorac, M., Sekulovic, D., Antonic, S., "In vitro determination of the spermicidal activity of plant saponins", *Pharmazie*, 40, 8, 585-597, (1985).
- Rao, G.R., Konjilal, G., Mohan, K.R., ".Xextended application of Folin- Ciocalteu reagent in the determination of drugs", *The Analyst*, 103, 993- 994, (2003).
- Reznicek, G., Jurenitsch, J., Robiena, W., Kubelka W., "Phytochemistry", 3, 825–828, (1989)
- Rosemary, F.W., Murray, R.B., "Peonidin 3-O-neohesperidoside and other *Cyclamen persicum* petals", *Phytochemistry*, 52, 939-941, (1999).
- Roura, E., Anders-Lacuea, C., Estruch, R., and Lamueala-Rasentos, RM., "Total Polyp henol Intake Estimated by a Modified Folin-Ciocalteu assay of urine", *Clin Chem.*, 52, 4, 749-752, (2006).
- Sanjust, E., Mocci, G., Zucca, P., Rescigno, A., "Mediterranean shrubs as potential antioxidant sources", *Natural Product Research*, 22, 8, 689–708, (2008).
- Sarikurkcü, C., "Antioxidant activities of solvent extracts from endemic *Cyclamen mirabile* Hildebr. tubers and leaves", *African Journal of Biotechnology*, 10, 5, 831-839, (2011).
- Saydam, F., Değirmenci, Ş., Güneş, H.V., "MikroRNA'lar ve kanser", *Dicle Tıp Derg. / Dicle Med. J.*, 38, 1, 113-120, (2011).
- Sebahattin, Nas., Saldamlı, İ., "Gıda Kimyası." Hacettepe Üniversitesi Yayınları. Ankara, 463-492, (2007).

Selbach, M., Schwan, haus ser B., “Their fel der N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N., “Wide spread changes in protein synthesis induced by microRNAs”, *Nature*, 455, 7209, 58-63, (2008).

Shahidi, F., Naczk, M., ”Food Phenolics”. *Technomic Publishing Company Book, Lanchester, USA*, 199-225, (1995).

Shahidi, F., “Natural antioxidants: chemistry, health effects and Applications”, USA: *AOCS Press*, 1-3, (1997).

Siddiqui, S., Verma, A., Rather, A.A., Jabeen, F., Meghvansi, M.K., “Preliminary phytochemicals analysis of some important medicinal and aromatic plant”, *Advances in Biological Research*, 3, 188-195, (2009).

Singleton, V.L., Orthofer, R., ve Lamuela-Raventos, R.M., ” Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent”, *Methods in Enzymology*, 299, 152–178, (1999).

Slezak-Prochazka, I., Durmus, S., Kroesen, B.J., Van Den Berg, A., “MicroRNAs, macrocontrol: Regulation of miRNA processing”. *RNA*, 16, 1087–1095, (2010).

Smith, L.E., Denissenko, M.F., Bennett, W.P., ve diğ. “Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons”, *J. Natl. Cancer, Inst.*, 92, 803-815, (2000).

Soifer, H.S., Rossi, J.J., Saetrom, P., “MicroRNAs in disease and potential therapeutic applications”, *Mol. Ther.*, 15, 12, 2070-2079, (2007).

Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z., Nagy, G., “Antioxidant measurements”, *Physiol. Meas.*, 28, 41–55, (2007).

Speroni, E., Cervellati, R., Innocenti, G., Costa, S., Guerra, M.C., Dall'Acqua, S., Govoni, P., “Anti-inflammatory, anti-nociceptive and antioxidant activities of *Balanites aegyptiaca* (L.) Delile”, *Ethnopharmacol*, 98, 117-125, (2005).

Spitz, M.R., Hong, W.K., Amos, C.I., Wu, X., Schabath, M.B., Dong, Q., Shete, S., Etzel, C.J., “A risk model for prediction of lung cancer”, *J. Natl. Cancer Inst.*, 99, 715-726, (2007).

Stamatiki, G., ”Research Of The Chemical Composition Of The Plant Of *Cyclamen Graecum L*”, *National and Kapodistrian University of Athens*, 183, (1990).

Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T., Takahashi, T., “Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival”, *Cancer Res.*, 1, 64 ,11, 3753-3756, (2004).

Tanker, M., Tanker, N., “Farmakognozi”. Cilt 1. (92-283), *Ankara Üniv. Ecz. Fak. Yayınları* No:66, (1998).

Tanker, N., “*Cyclamen pseudibericum* Hildebr. Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar”, *İstanbul Ecz. Fak. Mec./J. Fac. Pharm. İstanbul*, 1, 61-81, (1965).

Tanker, N., Türköz, S., “*Cyclamen cilicium* Boiss. Et Heldr. var. *intaminatum* Meikle Üzerinde Morfolojik Ve Anatomik Araştırmalar”, *Gazi Ecz. Fak. Der.*, 1, 79-85, (1984).

Tatar, D., Kılınç, O., Yorgancıoğlu, A., “Akciğer tümörü ve akciğer tüberkülozu birlikteliği”, *Solunum*, 2, 56-60, (2000).

Tili, E., Michaille, J.J., Costinean, S., Croce, C.M., “MicroRNAs, the immune system and rheumatic disease”, *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, 4, 10, 534-541, (2008).

Travis, W.D., Brambilla, E., Müller-Hemerlink, H.K., “WHO histological classification of tumours of the lung. World Health Organization Classification of Tumours, pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart”, *IARC., press*, 10, 5, 21-33, (2004).

Tsitsiou, E., Lindsay, M.A., “microRNAs and the immune response”, *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 4, 514–520, (2009).

Tunalier, Z., Öztürk, N., Koşar, M., Başer, K.H., Duman, H., Kırimer, N., “Bazı *Sideritis* Türlerinin Antioksidan Etki ve Fenolik Bileşikler Yönünden İncelenmesi”, *14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler*, Eskişehir, (2002).

Turkish Thoracic Society, “Lung and Pleural Malignancies Study Group. Pattern of lung cancer in Turkey 1994-1998”. *Respiration*, 69, 207-210, (2002).

Valencia-Sanchez, M.A., Liu, J., Hannon, G.J., Parker, R., “Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs”, *Genes Dev.*, 20, 515–524, (2006).

Varol, Ö., Mammadov, R.,” Investigation of Geophyte species of Muğla, Turkey” *J. Botany*, 2, 235-243, (2006).

Vasudevan, S., Tong, Y., Steitz, J.A., “Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation”, *Science*, 318, 5858, 1931-1934, (2007).

Vinson, J., Zubik, L., Bose, P., Sammon, N., Proch, J., “Dried fruits: excellent in vitro and in vivo antioxidants”, *Journal of the American College of Nutrition*, 24, 1, 44-50, (2005).

Wang, L.L., Huang, Y., Wang, G., Chen, S.D., “The potential role of microRNA-146 in Alzheimer’s disease: biomarker or therapeutic target?”, *Med. Hypotheses*, 78, 3, 398-401, (2012).

Wang, QZ., Xu, W., Habib, N., Xu, R., “Potential uses of microRNA in lung cancer diagnosis, prognosis, and therapy”, *Curr Cancer Drug Targets*, 9, 4, 572-594, (2009).

Wang, X., ve Issam, M., El, N., “Prediction of both conserved and nonconserved microRNA targets in animals”, *Bioinformatics*, 24, 3, 325-332, (2008).

Wang, Z., “MicroRNA: A matter of life or death”, *World J. Biol. Chem.*, 1, 4, 41-54, (2010).

Wettasinghe, M., Shahidi, F., “Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds”, *Food Chemistry*, 67, 399-414, (1999).

Wijnhoven, BP., Michael, M.Z., Watson, Di., “MicroRNAs and cancer”, *The British Journal of Surgery*, 94, 23-30, (2007).

William, S.K., Cummings, M.R.,” *Genetik Kavramlar*”, (Çev.: Öner C.), *Palme Yayıncılık*, Ankara, 635-636, (2000).

Witten, D., Tibshirani, R., Gu, S.G., “Ultra-high throughput sequencing-based small RNA discovery and discrete statistical biomarker analysis in a collection of cervical tumours and matched controls”, *B.M.C. Biol.*, 8, 58-71, (2010).

Wong, M.L., ve Medrano, J.F., “Review: Real Time PCR for mRNA quantitation.Biotechniques”, *B.M.C. Biol.*, 39, 1, 75-85, (2005).

Wu, C., Chen, F., Wang, X., Kim, H., He, G., Haley-zitlin, V., Huang, G., “Antioxidant constituents in fewerfew (*Tanacetum parthenium*) extract and their chromatographic quantification”, *Food Chem.*, 96, 220–227, (2006).

Yaman, M., “Akciğer Kanseri”. In:Erk M. *Göğüs Hastalıkları 11. cilt, istanbul; Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayın No:237*, 753-805, (2001).

Yıldız, M., Bozcu, H., Tokgun, O., Karagur, E.R., Akyurt, O., Akca, H., “*Cyclamen* exerts cytotoxicity in solid tumor cell lines: a step toward new anticancer agents?” *Asian Pac. J. Cancer Prev*, 5, 91-104, (2013).

Yu, S.L., Chen, H.Y., Chang, G.C., Chen, C.Y., Chen, H.W., Singh, S., Cheng, C.L., Yu, C.J., Lee, Y.C., Chen, H.S., Su, T.J., Chiang, C.C., Li, H.N., Hong, Q.S., Su, H.Y., Chen, C.C., Chen, W.J., Liu, C.C., Chan, W.K., Chen, W.J., Li, K.C., Chen, J.J., Yang, P.C., “MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer”, *Cancer Cell*, 13,1, 48-57, (2008).

Yüzbaşıoğlu, A., “Dejenerasyon Sürecindeki Kas Dokusunda Housekeeping Genlerin Ekspresyon Düzeyinin İncelenmesi”, *Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, (2008).

Zhang, X., Azhar, G., Helms, S.A., Wei, J.Y., “Regulation of cardiac microRNAs by serum response factor”, *J. Biomed. Sci*, 8, 18,15, (2011).



Zor, M., “Depolamanın Ayva Reçelinin Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri İle Antioksidan Aktivitesi Üzerine Etkisi”. *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, Erzurum, (2007).

Web 1: <http://www.ashwoodnursery.com/shop/cyclamen-graecum.html>

Web 2: <http://www.pacifichorticulture.org/articles/cyclamen-for-winter-and-spring/>

## 6. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ege Rıza KARAGÜR

Doğum Yeri ve Tarihi : UŞAK, 03.06.1987

Lisans Üniversite : PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ

Elektronik posta : erkaragur@gmail.com

İletişim Adresi : Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilimdalı morfoloji binası kat :3.

### Yayınlar

#### Uluslararası hakemli derilerde yayımlanan makaleler

Yildiz M, Bozcu H, Tokgun O, **Karagur ER**, Akyurt O, Akca H. “*Cyclamen* exerts cytotoxicity in solid tumor cell lines: a step toward new anticancer agents?” *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 14, 10, 5911-5914 (2013).

#### Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler.

**E. R. Karagür**, C. Ozay, H. Akça, R. Rammadov. Ethnobotanical Characteristics of *Cyclamen* L. Species Growing in Turkey, XI. International Ethnobotany Symposio, November 02-05, Antalya/TURKEY (Poster sunum). *Emir. J. Food Agri.*, 25 Suppl., 39, (2013).

C. Özay, **E. R. Karagür**, A. Demiray, H. Akça, R. Rammadov Evaluation of Anticancer Properties of an Endemic Geophyte Species from Turkey, *Muscari muscarimi*. *FEBS Journal* 281 (Suppl. 1), 463-463 (Poster sunum). (2014).

## **Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler**

### **Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler**

Demiray A, **Karagür E.R**, Tokgün O,Elmas L, Akça H, Yaren A, Gököz Doğu G, Karagenç N,Bağcı G, Bir F. “Denizli bölgesindeki akciğer küçük hücre dışı akciğer kanserli hastalarda egfr mutasyonu”, *iv. Multidisipliner Kanser Araştırma sempozyumu*, P08 13-16 Aralık (2012).

Tokgün O, Elmas L, Demiray A, **Karagür ER**, Akça H, Yaren A,Gököz Doğu G, Karagenç N Bağcı G, Bir F. “Denizli ilinde kolon kanseri tanısı almış hastalarda *kras* mutasyon sıklığının belirlenmesi”, *IV Multidisipliner Kanser Araştırma sempozyumu* P50 13-16 Aralık (2012).

XIII. ULUSAL TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK KONGRESİ “Denizli bölgesindeki küçük hücre dışı akciğer kanserli hastalarda EGFR mutasyonu analizi”, Kuşadası, 27 - 30 Ekim (2013).

