

**PROSTAT VE AKCİĞER KANSERİ HÜCRE  
HATLARINDA *ROSMARINUS OFFICINALIS* L.  
(BİBERİYE) EKSTRESİNİN SİTOTOKSİK  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Buse VATANSEVER**



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROSTAT VE AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATLARINDA  
*ROSMARINUS OFFICINALIS* L. (BİBERİYE) EKSTRESİNİN  
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Buse VATANSEVER**

Prof. Dr. Hulusi MALYER

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2014  
**Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ ONAYI

Buse VATANSEVER tarafından hazırlanan “Prostat ve akciğer kanseri hücre hatlarında *Rosmarinus officinalis* L. (biberiye) ekstresinin sitotoksik etkilerinin araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman :** Prof. Dr. Hulusi MALYER

**Başkan :** Prof. Dr. Hulusi MALYER  
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Üye :** Prof. Dr. Hale ŞAMLI  
Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Genetik Anabilim Dalı

**Üye :** Doç. Dr. Sevcan ÇELENK  
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Ali Osman DEMİR**  
**Enstitü Müdürü**

.././....

**U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;**

-tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,

-görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,

-başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,

-atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,

-kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,

-ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

**13/08/2014**

**Buse VATANSEVER**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### PROSTAT VE AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATLARINDA *ROSMARINUS OFFICINALIS* L. (BİBERİYE) EKSTRESİNİN SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

**Buse VATANSEVER**

Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Danışman:** Prof. Dr. Hulusi MALYER

Bu çalışmada, Türkiye'de doğal olarak yetişen *Rosmarinus officinalis* L. (biberiye) bitkisinin farklı çözücüler (etanol ve su) ile hazırlanmış ekstrelerinin prostat ve akciğer kanseri hücre hatları (VCaP ve Calu-1) üzerindeki sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır. Bu amaçla, ilk basamak olan *in vitro* sitotoksositeyi belirlemede kullanılan WST-1 ve SRB canlılık testlerinden faydalanılmıştır. Ayrıca hücrelerdeki sitotoksik aktivite, gerçek zamanlı sitotoksosite analiz sistemi (xCELLigence RTCA) ile doğrulanmıştır. *Rosmarinus officinalis* L. bitkisinden elde edilen etanol ekstresinin VCaP ve Calu-1 hücreleri üzerinde infüzyon ekstresine kıyasla daha güçlü bir sitotoksik etkiye neden olduğu bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçlarından yola çıkarak bir sonraki inceleme basamağının, kullanılan ekstrelerin kanser tedavisindeki büyüme baskılayıcı etkisinden sorumlu olan etken maddelerin araştırılması olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Prostat kanseri, akciğer kanseri, *Rosmarinus officinalis*, biberiye, sitotoksosite

**2014, xii + 144 sayfa.**

## **ABSTRACT**

MSc Thesis

**THE INVESTIGATION OF CYTOTOXIC EFFECTS OF  
*ROSMARINUS OFFICINALIS* L. (ROSEMARY) EXTRACT  
ON THE PROSTATE AND LUNG CANCER CELL LINES**

**Buse VATANSEVER**

Uludag University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

**Supervisor:** Prof. Dr. Hulusi MALYER

In this study, cytotoxic activity of extracts (ethanol and water) of *Rosmarinus officinalis* L., (rosemary) naturally a plant grown in Turkey, is tested against prostate and lung cancer cell lines (VCaP and Calu-1). For this purpose, WST-1 and SRB cell viability tests are utilized to determine *in vitro* cytotoxicity. Furthermore, cytotoxic activity is confirmed with real time cytotoxicity analysis system (xCELLigence RTCA). It has been found that ethanol extracts of *Rosmarinus officinalis* L. more powerful cytotoxic activity compared to water extracts on VCaP and Calu-1 cells. Based on results of this study, it has been concluded that a subsequent step of examination is investigation of active agents, being responsible for growth inhibitory effect of the extracts in the treatment of cancer.

**Keywords:** Prostate cancer, lung cancer, *Rosmarinus officinalis*, rosemary, cytotoxicity

**2014, xii + 144 pages.**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin düzenli işleyişi için büyük bir özveri gösteren, her konuda ilgi ve desteğini benden esirgemeyen, öneri ve eleştirileriyle beni daima yönlendiren tez danışmanım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hulusi MALYER'e,

Tez konumun bulunması, planlanması ve çalışmamın yürütülmesi süresince her aşamada bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, çalışma alanımla ilgili deneyim kazanmamı sağlayan, her zaman ilgi, anlayış ve desteğini gördüğüm, yanında çalışmaktan onur duyduğum değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hale ŞAMLI'ya,

Tez çalışmam süresince Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalına ait Hücre Kültürü Laboratuvarını kullanabilme olanağı sağlayan ve her zaman değerli fikir ve önerilerinden faydalandığım hocam Sayın Prof. Dr. Faruk BALCI'ya,

Laboratuvar çalışmalarında ve deneysel sonuçları yorumlamamda değerli görüş ve deneyimlerinden yararlandığım ve yakın ilgilerini hiç esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. Ferda ARI'ya,

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi birikimlerini tüm içtenliği ile paylaşan, destek ve yardımları ile her konuda yanımda olan ve bana yol gösteren Sayın Dr. Zeynep Özlem ŞİĞVA'ya,

Çalışmamda yer alan bitkinin ekstraksiyon aşamasındaki yardımlarından dolayı, Sayın Prof. Dr. Güleendam TÜMEN'e, Sayın Doç. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI'na ve Sayın Arş. Gör. Mehmet SARIMAHMUT'a, tez çalışmamda hücre hatlarından faydalandığım Sayın Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca tecrübelerinden ve yardımlarından faydalandığım, ilgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen hocalarım Sayın Prof. Dr. Adem BIÇAKCI'ya, Sayın Doç. Dr. Sevcan ÇELENK'e, Sayın Araş. Gör. Dr. Aycan TOSUNOĞLU'na ve Sayın Öğr. Gör. Gülşah SAATÇIOĞLU'na,

Tez çalışmam boyunca bana her konuda yardımcı olan, benden moral ve desteklerini esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan çok büyük keyif aldığım arkadaşlarım Nazlıhan AZTOPAL'a ve Burak ÖZDEMİR'e,

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, hayatım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayıp her zaman yanımda olan ve aldığım her kararda beni destekleyen, bugünlere gelmemde en büyük emeğin sahibi ve başarılarımın esin kaynağı sevgili "AİLEM"e, sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışması Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı (HDP(V)-2014/5) numaralı proje tarafından desteklenmiştir.

Buse VATANSEVER

13/08/2014

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.1.1. Karsinogenez süreci.....	5
2.1.2. Kanser hücrelerinin özellikleri.....	10
2.1.3. Hücre döngüsü ve kanser.....	12
2.2. Prostat Kanseri.....	19
2.2.1. Prostat kanserinin görülme sıklığı.....	20
2.2.2. Prostat kanseri risk faktörleri.....	22
2.3. Akciğer Kanseri.....	24
2.3.1. Akciğer kanserinin görülme sıklığı.....	27
2.3.2. Akciğer kanseri risk faktörleri.....	29
2.4. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Biberiye).....	32
2.4.1. Lamiaceae (Labiatae, Ballıbabagiller) familyası hakkında genel bilgiler.....	34
2.4.2. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.'in sistematikteki yeri.....	35
2.4.3. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.'in genel özellikleri ve yayılış alanları.....	36
2.4.4. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.'in kimyasal kompozisyonu ve biyolojik aktiviteleri.....	39
2.5. Prostat ve Akciğer Kanseri Model Hücre Hatları.....	47
2.5.1. VCaP prostat (androjen bağımlı) kanseri hücre hattı.....	47
2.5.2. Calu-1 akciğer kanseri hücre hattı.....	48
2.6. Sitotoksikite Testleri.....	49
2.6.1. WST-1 (water soluble tetrazolium) testi.....	51
2.6.2. SRB (sulforhodamine B) testi.....	53
2.6.3. xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi (xCELLigence real time cell analyzer).....	55
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	57
3.1. Materyal.....	57
3.1.1. Kimyasal maddeler ve reaktifler.....	57
3.1.2. Cihazlar ve sarf malzemeler.....	58
3.1.3. Deneysel çalışmalarda kullanılan <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Biberiye) ekstraktları.....	59
3.1.4. Deneysel çalışmalarda kullanılan hücre hatları.....	59
3.2. Yöntem.....	59



3.2.1. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.'in ekstraksiyon işlemleri .....	59
3.2.1.1. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.'in etanol ortamındaki ekstraksiyonu .....	59
3.2.1.2. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.'in su ortamındaki ekstraksiyonu .....	60
3.2.2. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstrelerinin hazırlanması.....	60
3.2.2.1. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. etanol ekstresinin hazırlanması.....	60
3.2.2.2. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. su (infüzyon) ekstresinin hazırlanması .....	60
3.2.3. Hücre hatlarının kültüre edilmesi.....	61
3.2.3.1. Dondurulmuş hücre hatlarının çözülmesi .....	62
3.2.3.2. Hücre hatlarının pasajlanması .....	62
3.2.3.3. Hücre hatlarının dondurulması.....	64
3.2.4. Deneysel çalışmalarda kullanılacak hücre sayılarının optimizasyonu.....	64
3.2.5. Hücre hatlarının canlılığının belirlenmesi.....	65
3.2.6. Hücrelerin deney planına göre ekimi ve ekstrelerin uygulanması .....	66
3.2.7. Sitotoksikite testleri .....	68
3.2.7.1. WST-1 (water soluble tetrazolium ) testi .....	68
3.2.7.2. SRB (sulforhodamine B) testi .....	69
3.2.7.3. xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi (xCELLigence Real Time Cell Analyzer).....	71
3.2.8. İstatistiksel Analiz .....	73
4. BULGULAR .....	74
4.1. WST-1 Canlılık Testi Bulguları .....	74
4.1.1. 24 saatlik tedavi sonuçları .....	74
4.1.2. 48 saatlik tedavi sonuçları .....	80
4.1.3. 72 saatlik tedavi sonuçları .....	87
4.2. SRB Canlılık Testi Bulguları .....	95
4.2.1. 24 saatlik tedavi sonuçları .....	95
4.2.2. 48 saatlik tedavi sonuçları .....	98
4.2.3. 72 saatlik tedavi sonuçları .....	101
4.3. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Bulguları.....	104
5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	1155
KAYNAKLAR DİZİNİ .....	1265
ÖZGEÇMİŞ .....	143

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
~	Yaklaşık
$\mu\text{g/ml}$	Mikrogram/mililitre
$\mu\text{m}$	Mikrometre
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
$\text{Ca}^{+2}$	Kalsiyum iyonu
Cl	Klor
cm	Santimetre
$\text{cm}^2$	Santimetrekare
$\text{CO}_2$	Karbondioksit
EtOH	Etanol
g	Gram
K	Potasyum
kg	Kilogram
$\text{mg/ml}$	Miligram/milimetre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
$\text{mm}^2$	Milimetrekare
mM	Milimolar
mV	Milivolt
Na	Sodyum
nm	Nanometre
pH	Potansiyel hidrojen
rpm	Revolutions per minute
Se	Selenyum
U/ml	Ünite/mililitre
w/v	weight/volume
v/v	volume/volume

## Kısaltmalar

## Açıklama

AChE	Asetilkolinesteraz
ADK	Adenokarsinom
BHA	Butilat Hidroksianisol
BHK	Büyük Hücreli Karsinom
BHT	Butilat Hidroksitoluen
BPH	Benign Prostatic Hyperplasia
BRCA-1	Breast Cancer-1
BRCA-2	Breast Cancer-2
BrDU	5-bromo-2'-deoxyuridine
Calu-1	Caucasian Lung Carsinoma
DDT	Dikloro Difenil Trikloroethan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EU	European Union
FBS	Fetal Sığır Serumumu (Fetal Bovine Serum)
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC <sub>50</sub>	Inhibitory Concentration of % 50
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
L	Linnaeus
MMP	Matriks Metalloproteinaz
MPF	Maturation Promoting Factor
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2)-2,5-difenil tetrazolyum bromid
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer
PBS	Fosfat Tuz Tamponu (Phosphate Buffered Saline)
PG	Propil Gallat
PSA	Prostat Spesifik Antijen
RNA	Ribo Nükleik Asit
SCLC	Small Cell Lung Cancer
SHK	Squamöz Hücreli Kanser
SRB	Sulforhodamine B
TBHQ	Tersiyer Hidroksi quinon
TCA	Trikloroasetik Asit
TSG	Tumor Supressor Gene
UV	Ultraviyole (Ultraviolet)
VCaP	Vertebral Cancer of the Prostate
WHO	World Health Organization
WST-1	Water Soluble Tetrazolium Salt 1
XTT	2,3-bis (2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil]-2H-tetrozolum-5-kaboksanilit tuzu
5-FU	5-Fluorourasil

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1. Çok aşamalı malign tümör gelişimi.....	4
Şekil 2.2. Kanserin oluşum aşamaları .....	7
Şekil 2.3. Tümörün basamaklar halinde kan damarları yoluyla yayılması .....	9
Şekil 2.4. Kanserin yayılması (Angle 2011' den değiştirilerek alınmıştır) .....	10
Şekil 2.5. Kanser hücrelerinin özellikleri.....	12
Şekil 2.6. Hücre döngüsü fazları .....	15
Şekil 2.7. Hücre döngüsündeki kontrol noktaları .....	17
Şekil 2.8. Onkogen aktivasyonu ve tümör baskılayıcı gen inaktivasyonu ile karsinogenezin oluşumu.....	18
Şekil 2.9. Prostat bezi ve lokalizasyonu .....	19
Şekil 2.10. Erkeklerde en sık görülen ilk 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızlarının dağılımları.....	21
Şekil 2.11. Akciğerlerin yapısı ve solunum sisteminde görevli diğer organlar .....	25
Şekil 2.12. Kadınlarda en sık görülen ilk 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızlarının dağılımları.....	28
Şekil 2.13. Akciğer kanseri evrelerinin yüzde dağılımları.....	29
Şekil 2.14a. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. genel görünüm .....	36
Şekil 2.14b. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. çiçekli ve yapraklı dal.....	36
Şekil 2.15a. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. çiçek yapısı .....	37
Şekil 2.15b. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. androkeum (erkek organ) .....	37
Şekil 2.16. Türkiye'de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. populasyonlarının coğrafik yayılış alanları.....	38
Şekil 2.17. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. bitkisinin antioksidan etkili bileşenleri.....	42
Şekil 2.18a. VCaP hücre hattının morfolojisi (düşük yoğunluk).....	48
Şekil 2.18b. VCaP hücre hattının morfolojisi (yüksek yoğunluk).....	48
Şekil 2.19. Calu-1 hücre hattının morfolojisi.....	48
Şekil 2.20. Neubauer Hemositometresi.....	50
Şekil 2.21. IC <sub>50</sub> değeri .....	51
Şekil 2.22. WST-1'in reaksiyon şeması .....	52
Şekil 2.23. WST-1 yöntemi ile diğer kolorimetrik testlerin kıyaslanması.....	53
Şekil 2.24. SRB'nin moleküler yapısı .....	54
Şekil 2.25. Empedans ölçüm şeması.....	56
Şekil 3.1. Neubauer hemositometresi ile hücrelerin sayımı.....	66

Şekil 3.2. Sitotoksisite deneylerinde kullanılan 96 kuyucuklu mikrolaka düzeni ve uygulanan ekstrelerin konsantrasyonları.....	67
Şekil 3.3. xCELLigence RTCA'da hücre hareketlerinin empedans temelli analizi .....	72
Şekil 4.1. 24 saat boyunca <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının canlılık yüzdelerinin grafiği (WST-1 Testi) .....	75
Şekil 4.2. 24 saat boyunca <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücre hattının canlılık yüzdelerinin grafiği (WST-1 Testi) .....	75
Şekil 4.3. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. alkol ekstresi ile 24 saatlik tedavinin ardından VCaP hücrelerinin morfolojik görüntüleri .....	77
Şekil 4.4. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. infüzyon ekstresi ile 24 saatlik tedavinin ardından VCaP hücrelerinin morfolojik görüntüleri .....	78
Şekil 4.5. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. alkol ekstresi ile 24 saatlik tedavinin ardından Calu-1 hücrelerinin morfolojik görüntüleri.....	79
Şekil 4.6. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. infüzyon ekstresi ile 24 saatlik tedavinin ardından Calu-1 hücrelerinin morfolojik görüntüleri.....	80
Şekil 4.7. 48 saat boyunca <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının canlılık yüzdelerinin grafiği (WST-1 Testi) .....	81
Şekil 4.7. 48 saat boyunca <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücre hattının canlılık yüzdelerinin grafiği (WST-1 Testi) .....	81
Şekil 4.8. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. alkol ekstresi ile 48 saatlik tedavinin ardından VCaP hücrelerinin morfolojik görüntüleri .....	84
Şekil 4.9. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. infüzyon ekstresi ile 48 saatlik tedavinin ardından VCaP hücrelerinin morfolojik görüntüleri .....	85
Şekil 4.10. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. alkol ekstresi ile 48 saatlik tedavinin ardından Calu-1 hücrelerinin morfolojik görüntüleri.....	86
Şekil 4.11. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. infüzyon ekstresi ile 48 saatlik tedavinin ardından Calu-1 hücrelerinin morfolojik görüntüleri.....	87
Şekil 4.12. 72 saat boyunca <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının canlılık yüzdelerinin grafiği (WST-1 Testi) .....	88
Şekil 4.12. 72 saat boyunca <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının canlılık yüzdelerinin grafiği (WST-1 Testi) .....	88
Şekil 4.13. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. alkol ekstresi ile 72 saatlik tedavinin ardından VCaP hücrelerinin morfolojik görüntüleri .....	91
Şekil 4.14. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. infüzyon ekstresi ile 72 saatlik tedavinin ardından VCaP hücrelerinin morfolojik görüntüleri .....	92
Şekil 4.15. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. alkol ekstresi ile 72 saatlik tedavinin ardından Calu-1 hücrelerinin morfolojik görüntüleri.....	93
Şekil 4.16. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. infüzyon ekstresi ile 72 saatlik tedavinin ardından Calu-1 hücrelerinin morfolojik görüntüleri.....	94
Şekil 4.17. 24 saat boyunca <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının canlılık yüzdelerinin grafiği (SRB Testi) .....	96

Şekil 4.18. 24 saat boyunca <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücre hattının canlılık yüzdelerinin grafiği (SRB Testi) .....	96
Şekil 4.19. 48 saat boyunca <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının canlılık yüzdelerinin grafiği (SRB Testi) .....	99
Şekil 4.20. 48 saat boyunca <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücre hattının canlılık yüzdelerinin grafiği (SRB Testi) .....	99
Şekil 4.21. 72 saat boyunca <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının canlılık yüzdelerinin grafiği (SRB Testi) .....	102
Şekil 4.22. 72 saat boyunca <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücre hattının canlılık yüzdelerinin grafiği (SRB Testi) .....	102
Şekil 4.23. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. alkol ekstresinin 6,25 - 400 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarının VCaP hücrelerindeki 72 saat süreyle hücre indeks değerleri .....	105
Şekil 4.24. Gerçek zamanlı xCELLigence sisteminde kullanılan <i>Rosmarinus officinalis</i> L. alkol ekstresinin konsantrasyonların farklı renklerde ve µg/ml birimi kullanılarak gösterilmesi .....	105
Şekil 4.25. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. alkol ekstresinin 6,25 - 400 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarının uygulandığı VCaP hücrelerinin 72. saatteki doz-yanıt eğrisi .....	106
Şekil 4.26. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. infüzyon ekstresinin 6,25 - 400 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarının VCaP hücrelerindeki 72 saat süreyle hücre indeks değerleri .....	107
Şekil 4.27. Gerçek zamanlı xCELLigence sisteminde kullanılan <i>Rosmarinus officinalis</i> L. infüzyon ekstresinin konsantrasyonların farklı renklerde ve µg/ml birimi kullanılarak gösterilmesi .....	107
Şekil 4.28. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. infüzyon ekstresinin 6,25 - 400 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarının uygulandığı VCaP hücrelerinin 72. saatteki doz-yanıt eğrisi .....	108
Şekil 4.29. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. alkol ekstresinin 6,25 - 400 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarının Calu-1 hücrelerindeki 72 saat süreyle hücre indeks değerleri .....	109
Şekil 4.30. Gerçek zamanlı xCELLigence sisteminde kullanılan <i>Rosmarinus officinalis</i> L. alkol ekstresinin konsantrasyonların farklı renklerde ve µg/ml birimi kullanılarak gösterilmesi .....	109
Şekil 4.31. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. alkol ekstresinin 6,25 - 400 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarının uygulandığı Calu-1 hücrelerinin 72. saatteki doz-yanıt eğrisi .....	110
Şekil 4.32. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. infüzyon ekstresinin 6,25 - 400 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarının Calu-1 hücrelerindeki 72 saat süreyle hücre indeks değerleri .....	111
Şekil 4.33. Gerçek zamanlı xCELLigence sisteminde kullanılan <i>Rosmarinus officinalis</i> L. infüzyon ekstresinin konsantrasyonların farklı renklerde ve µg/ml birimi kullanılarak gösterilmesi .....	111
Şekil 4.34. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. infüzyon ekstresinin 6,25 - 400 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarının uygulandığı Calu-1 hücrelerinin 72. saatteki doz-yanıt eğrisi .....	112

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Deneyleerde kullanılan kimyasal maddeler ve reaktifler .....	57
Çizelge 3.2. Deneyleerde kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler .....	58
Çizelge 4.1. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının 24 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri (WST-1 testi) ....	76
Çizelge 4.2. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücre hattının 24 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri (WST-1 testi) ....	76
Çizelge 4.3. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücrelerinin 24 saatlik tedavi sonrasındaki IC <sub>50</sub> ve IC <sub>90</sub> değerleri (WST-1 testi) .....	76
Çizelge 4.4. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücrelerinin 24 saatlik tedavi sonrasındaki IC <sub>50</sub> ve IC <sub>90</sub> değerleri (WST-1 testi) .....	77
Çizelge 4.5. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının 48 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri (WST-1 testi) ....	82
Çizelge 4.6. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücre hattının 48 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri (WST-1 testi) ....	82
Çizelge 4.7. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücrelerinin 48 saatlik tedavi sonrasındaki IC <sub>50</sub> ve IC <sub>90</sub> değerleri (WST-1 testi) .....	83
Çizelge 4.8. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücrelerinin 48 saatlik tedavi sonrasındaki IC <sub>50</sub> ve IC <sub>90</sub> değerleri (WST-1 testi) .....	83
Çizelge 4.9. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının 72 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri (WST-1 testi) ....	89
Çizelge 4.10. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücre hattının 72 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri (WST-1 testi) ....	89
Çizelge 4.11. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücrelerinin 72 saatlik tedavi sonrasındaki IC <sub>50</sub> ve IC <sub>90</sub> değerleri (WST-1 testi) .....	90
Çizelge 4.12. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücrelerinin 72 saatlik tedavi sonrasındaki IC <sub>50</sub> ve IC <sub>90</sub> değerleri (WST-1 testi) .....	90
Çizelge 4.13. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının 24 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri (SRB testi).....	97
Çizelge 4.14. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücre hattının 24 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri (SRB testi).....	97
Çizelge 4.15. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücrelerinin 24 saatlik tedavi sonrasındaki IC <sub>50</sub> ve IC <sub>90</sub> değerleri (SRB testi) .....	98

Çizelge 4.16. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücrelerinin 24 saatlik tedavi sonrasındaki IC <sub>50</sub> ve IC <sub>90</sub> değerleri (SRB testi) .....	98
Çizelge 4.17. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının 48 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri (SRB testi).....	100
Çizelge 4.18. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücre hattının 48 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri (SRB testi).....	100
Çizelge 4.19. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücrelerinin 48 saatlik tedavi sonrasındaki IC <sub>50</sub> ve IC <sub>90</sub> değerleri (SRB testi) .....	101
Çizelge 4.20. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücrelerinin 48 saatlik tedavi sonrasındaki IC <sub>50</sub> ve IC <sub>90</sub> değerleri (SRB testi) .....	101
Çizelge 4.21. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının 72 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri (SRB testi).....	102
Çizelge 4.22. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücre hattının 72 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri (SRB testi).....	103
Çizelge 4.23. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücrelerinin 72 saatlik tedavi sonrasındaki IC <sub>50</sub> ve IC <sub>90</sub> değerleri (SRB testi) .....	104
Çizelge 4.24. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücrelerinin 72 saatlik tedavi sonrasındaki IC <sub>50</sub> ve IC <sub>90</sub> değerleri (SRB testi) .....	104
Çizelge 4.25. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücrelerinin xCELLigence sonuçlarına göre elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri .....	112
Çizelge 4.26. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücrelerinin xCELLigence sonuçlarına göre elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri .....	113
Çizelge 4.27. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücrelerinden elde edilen IC <sub>50</sub> sonuçlarına göre yöntemlerin kıyaslanması .....	113
Çizelge 4.28. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücrelerinden elde edilen IC <sub>50</sub> sonuçlarına göre yöntemlerin kıyaslanması .....	1134



## 1. GİRİŞ

Kanser, günümüzdeki en önemli sağlık sorunudur ve her yıl bir milyondan fazla kişi kanser nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Sık görülmesi ve mortalitesinin yüksek olması nedeniyle de büyümeye devam eden bir halk sağlığı sorunudur. Dünya Sağlık Örgütü'nün Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından 2014 yılında yayımlanan 2012 yılına ait Globocan verilerine göre; 2012 yılında dünya genelinde 14,1 milyon kişiye kanser teşhisi konulurken, 8,2 milyon kişi kansere bağlı olarak hayatını kaybetmiştir (WHO 2014). T.C Sağlık Bakanlığı Kanser Daire Başkanlığı'nın Ocak 2014'de yayınladığı 2009 yılına ait kanser istatistiklerine göre; ülkemizde her yıl yaklaşık 98 000 erkek ve 63 000 kadın kansere yakalanmaktadır. 2012 yılında, tüm dünyada erkeklerde en sık görülen kanser, akciğer kanseri iken bunu prostat kanseri izlemektedir. Kadınlarda ise; en sık görülen kanser meme kanseridir ve akciğer kanseri görülme sıklığı bakımından 4. sırada yer almaktadır. Ülkemizde görülen ilk 5 kanser türü, dünyadaki ve diğer gelişmiş ülkelerdeki örüntü ile benzerlikler göstermektedir. Ülkemizde de erkeklerde en sık görülen kanser türü akciğer kanseridir, prostat kanseri ise 2. sırada yer almaktadır. Kadınlarda ise akciğer kanseri, en sık görülen 5. kanser türüdür (Gültekin ve Boztaş 2014).

Cerrahi müdahale, radyoterapi, kemoterapi, hormon tedavisi ve immünoterapi kanserin tedavi edilmesinde kullanılan başlıca yöntemlerdir. Prostat ve akciğer kanserleri dahil pek çok kanserin tedavisinde kullanılan bu uygulamalar, ciddi yan etkilere sahiptir. Günümüzde ilk başvuru olan tedavi seçeneği, kanser hücrelerini öldürmek için bir çok sentetik anti-kanser ilaç kombinasyonundan oluşan kemoterapi tedavisidir (Chabner ve Roberts 2005, Ma ve Wang 2009). Fakat; anti-kanser etkili pek çok ilaç, vücutta patolojik biçimde çoğalmakta olan kanser hücrelerinin yanı sıra normal hücreleri de öldürebilmekte ve ileri evrelerde organ kayıplarına neden olabilmektedir. Bu nedenle, bu ilaçların hücrel sitotoksositeye ve bir çok yan etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Cragg ve ark. 2009). Günümüzde prostat ve akciğer kanserlerinin tedavisi için kullanılan ilaç ve yöntemlerin yüksek maliyetli olması da önemli sorunlardan birini oluşturmaktadır. Ayrıca, kullanıma giren birçok kanser ilacına rağmen halen kanser tedavisinde tam bir başarı elde edilememiştir. Bundan dolayı, kemoterapiyi destekleyici yeni tedavi yaklaşımları büyük önem taşımaktadır.

Bitkilerden elde edilen çeşitli doğal bileşiklerin, farklı kanser türlerinin tedavisinde kullanılması amacıyla yürütülen çalışmalar, son zamanlarda bilim dünyasında büyük umut yaratmıştır. Bu bağlamda son çalışmalar, bitkilerden elde edilen doğal bileşiklerin kemopreventif ajanlar olarak kullanılması üzerine yoğunlaşmaktadır. Doğal kemopreventif ajanlarının hiçbir yan etkilerinin bulunmaması ya da düşük yan etkilere sahip olmaları ve önemli sitotoksik etkiler göstermeleri nedeniyle, bu alandaki araştırma ve çalışmalara olan ilgi giderek artış göstermektedir (Johnson 2011). Avrupa ülkeleri başta olmak üzere dünyanın birçok ülkesinde bu konu ile ilgili çalışmalar yoğun bir şekilde yürütülmektedir.

Lamiaceae (Labiatae) familyasına ait biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) bitkisi, geçmişten günümüze dek geleneksel tedavilerde kullanılan önemli bir tıbbi ve aromatik bitki türüdür. Yapılan bilimsel çalışmalarla, biberiye bitkisinin anti-bakteriyel, antioksidan, anti-viral ve bağışıklık sistemi iyileştirici gibi biyolojik etkileri ortaya konmuştur (Gachkar ve ark. 2007). Biberiye bitkisi; karnosol, karnosik ve rosmarinik asit gibi fenolik bileşikler, uçucu yağlar gibi flavonoidler içermektedir (Okamura ve ark. 1994, Angelini ve ark. 2003). Özellikle karnosol ve karnosik asit, biberiyenin farmakolojik özelliklerinde önemli bir rol oynamaktadır (Huang ve ark. 1994). Ayrıca; biberiye bitkisinin, 1,8-cineole,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, camphor ve verbenone gibi uçucu yağ bileşenlerinin anti-mikrobiyal ve anti-kanser etkilerinin yüksek olduğunu bildiren çalışmalarla da karşılaşmak mümkündür. (Pandit ve Shelef 1994, Baratta ve ark. 1998b, Moghtader ve Afzali 2009). Bu nedenle, son yıllarda pek çok çalışma, *R. officinalis* L. bitkisinden elde edilen ekstraların, uçucu yağların ve diğer temel bileşenlerinin biyolojik ve anti-kanser özellikleri üzerine yoğunlaşmıştır (Faleiro ve ark. 1999, Daferera ve ark. 2000, Koschier ve Sedy 2003, Ohno ve ark. 2003).

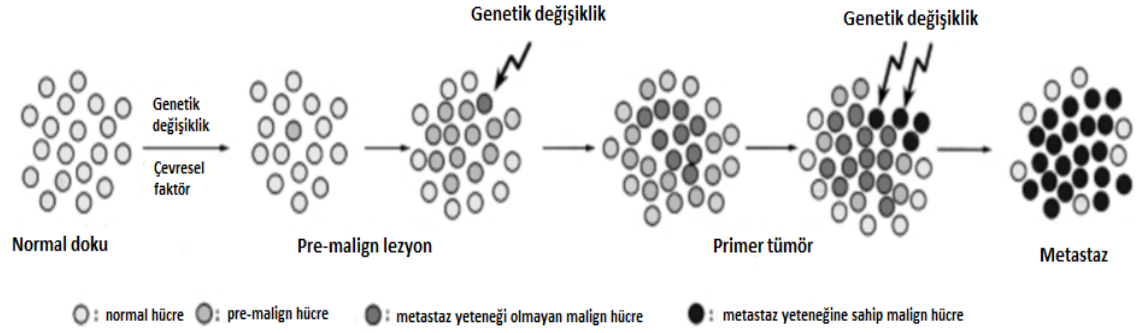
Bu çalışma; daha önce üzerinde biberiye bitkisinin çalışılmadığı prostat ve akciğer kanseri hücre hatları (VCaP ve Calu-1) üzerinde, *Rosmarinus officinalis* L. (biberiye) bitkisinden elde edilen infüzyon ve alkol ekstralarının, sitotoksik etkisinin araştırılması amacıyla yapılmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Kanser

Sağlıklı vücut hücreleri, ölen hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların onarılması için devamlı olarak bölünmektedir. Ancak, hücrelerin bu yetenekleri sınırlıdır. Normal bir vücut hücresi; büyür, daha fazla hücre üretmek için bölünür ve yaşam süresi dolduğunda ya da hasar gördüğünde ise programlı bir şekilde ölür (Anonim 2014a). Bu denge genlerin kontrolü altındadır. Ancak, bu süreç her zaman doğru işlememektedir. Bazen hücreler, bir seri genetik hasarın birikimi ile ya da çevresel faktörlerin çok basamaklı bir süreç içinde, hücre DNA'sında ve genlerde oluşturduğu değişiklikler neticesinde, aşırı ve kontrolsüz olarak bölünmeye başlarlar ve "tümör" olarak adlandırılan bir doku kitlesi meydana getirirler. Bu oluşum, sağlıklı komşu dokuları istila edebilir (invazyon) ve/veya dolaşıma geçerek uzak organlara yayılabilir (metastaz). Bu anormal hücrelerin kontrolsüz büyüme ve yayılma özelliğine sahip olması ile gelişen büyük bir grup hastalığa "kanser" adı verilmektedir (Aliustaoğlu 2009).

Kanser; hücrelerin aşırı ve zamansız çoğalmalarına, immün sistemin gözetiminden kaçmalarına ve sonuç olarak uzaktaki dokuları istila ederek metastazlar oluşturmalarına yol açan, metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirdikleri çok basamaklı bir süreçtir. Bu değişiklikler hücre çoğalmasını ve ömrünü, komşu hücrelerle ilişkilerini ve immün sistemden kaçma kapasitelerini kontrol eden genetik programlardaki modifikasyonların birikmesiyle ortaya çıkmaktadır. Kansere yol açan modifikasyonlar arasında DNA dizilimini modifiye eden genetik değişiklikler de bulunmaktadır (Merlo ve ark. 2006). Clark'a (1991) göre; kanser, normal hücreler üzerinde sınırsız büyüme (populasyonda devamlı artan hücre sayısı) gösteren anormal hücre topluluğudur. Bu tür anormal hücreler, ilk oluştukları doku dışında da büyümeye yeteneğine sahiptir. Aşırı ve kontrolsüz büyüme gösteren hücreler, çevre dokuları istila ederek en az bir bazal membran bölgesine yerleşebilmekte ve birincil alandaki (işgal ettikleri) dokuda büyüme gösterebilmektedir. Bu tür hücreler, kan/lenf yoluyla uzakta bulunan organlara metastaz yapabilmektedir. Bu özelliklerin tamamı, bir lezyonun kanser olarak adlandırılabilceğini göstermektedir (Clark 1991). Normal bir dokudan malign tümör gelişim süreci Şekil 2.1'de gösterilmektedir.



**Şekil 2.1.** Çok aşamalı malign tümör gelişimi (Yokota 2000'den değiştirilerek alınmıştır)

"Habis tümör" ve "neoplazm", kanser ile aynı anlama gelen diğer terimlerdir (WHO; World Health Organization 2014). Ünal'a (2012) göre; neoplazi, herhangi bir sınırlama veya sonlanma göstermeyen, konak canlıının kontrol mekanizmaları dışında hareket eden, kontrolsüz hücre çoğalmasıyla ortaya çıkan anormal bir doku kitlesidir. Neoplazinin tıp dilinde olağan kullanımı tümördür. Ayrıca, tüm tümörler kanser değildir. Bir tümör; meydana geldiği hücre, doku ve organ özelliklerine göre benign (iyi huylu) veya malign (kötü huylu) tümör özellikleri gösterebilir. Bu ayırım, neoplazmin potansiyel klinik davranışı ve mikroskopik görünümü baz alınarak yapılır. Benign tümörler (iyi huylu-selim), kendi özgün bölgesinde lokalize kalırlar ve vücudun diğer bölgelerine yayılmazlar ki bundan dolayı ölümcül değildirler. Bu tümörler, lokal cerrahi ile tedavi edilebilmektedir ve hastalar yaşamını sağlıklı bir şekilde sürdürebilmektedir. Ancak, bazı benign tümörler lezyonun ve lokalizasyonun özelliğine göre ciddi problemlere de neden olabilmektedir. Malign (kötü huylu-habis) tümörlerin tümü kanser olarak adlandırılmaktadır. Malign olarak belirtilen bir neoplazm, çevre dokulara invazyon yapabilmekte ve uzak bölgelere kan ve lenf yollarıyla yayılarak (metastaz) ölüme neden olabilmektedir. Tüm kanserlerin, bu derece öldürücü bir seyir izlemedikleri bilinmektedir. Bazıları erken tanı ve erken tedaviyle kontrol altına alınabilmektedir (Ünal 2012).

Hem malign hem de benign tümörler köken aldıkları doku ve hücre türüne göre sınıflandırılmaktadır:

- **Karsinoma**; epitelyal hücre kökenli malign neoplazmdır. İnsan kanserlerinin % 90'ını karsinomalar oluşturmaktadır. Karsinomalar da birkaç grup altında sınıflandırılabilir. Deri-mukoza gibi, örtücü epitel kökenli malign tümörlere, *skuamoz hücreli karsinoma* (*yassı hücreli karsinoma, spinosellüler karsinoma, epidermoid karsinoma*) denir. Buradaki tümör hücreleri çok katlı yassı epitel hücrelerine benzemektedir. Glandular (salgı bezi) epitelyal hücrelerden gelişen malign tümörlere ise *adenokarsinoma* denir.
- **Sarkoma**; mezansimal dokudan veya onun türevlerinden doğan ve insanlarda nadir olarak görülen malign neoplazmdır. Sarkomalar; kas, kemik, kıkırdak, yağ ve fibröz doku gibi bağ dokularından, kan damarlarından veya diğer destekleyici dokulardan gelişen solid tümörleridir. Sarkomalar da köken aldıkları hücre tipine göre adlandırılabilir:  
Fibröz doku kökenli sarkomaya *fibrosarkoma*, kondrositlerden (kıkırdak dokudan) oluşan malign neoplazma *kondrosarkoma*, yağ dokusundan gelişen sarkomaya *liposarkoma*, kemik dokusundan gelişen sarkomaya ise *osteosarkoma* denir.
- **Lösemi (Lökemiya)**; hematopoetik sistemin malignitesidir ve kan üreten dokulardan (örneğin; kemik iliği) gelişmektedir ve aşırı lökosit üretimi söz konusudur.
- **Lenfoma ve myeloma**; immün sistem hücrelerinin malignitesidir. Lenf düğümlerinde ve dalakta kontrolsüz lenfosit büyümesi ile gelişmektedir.
- **Merkezi sinir sistemi kanserleri (nöroektodermal tümörler)**; beyin ve omurilik dokularından gelişen tümörlerdir (Ünal 2012).

### 2.1.1. Karsinogenez süreci

Karsinogenezin temelinde; hücrenin yaşaması, büyümenin kontrolü ve diferansiasyon gibi biyolojik olayları etkileyen mutasyonların aşamalı olarak bir araya gelmesi yer almaktadır. Kanser gelişimi sürecinde tümör hücreleri birçok fenotipik özellikler kazanır. Bu değişimler, tümör hücrelerinin hızlı ve sınırsız çoğalmalarına ve çevre dokuya yayılmalarına neden olur. Ayrıca, bu hücreler özgün mikroçevreden bağımsız olarak yaşamını devam ettirme ve metastaz yapma özelliğine sahiptir. Protoonkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin seri mutasyonları, farklı mekanizmalar aracılığıyla malign fenotipin oluşumuna katkıda bulunmaktadır (McCormick 1999).

Başka bir tanıma göre; karsinogenez (onkogenez, tümörigenez), normal hücrelerin selüler, genetik ve epigenetik seviyede değişiklikler geçirdiği ve kademeli olarak malign hücrelere dönüştüğü çok adımlı bir süreçtir (Hanahan ve Weinberg 2000). Kavramsal olarak, bu süreç 3 farklı aşamada incelenebilir. Bunlar; başlama (initiation), gelişme (promotion) ve ilerleme (progression) evreleridir (Martinez ve ark. 2003).

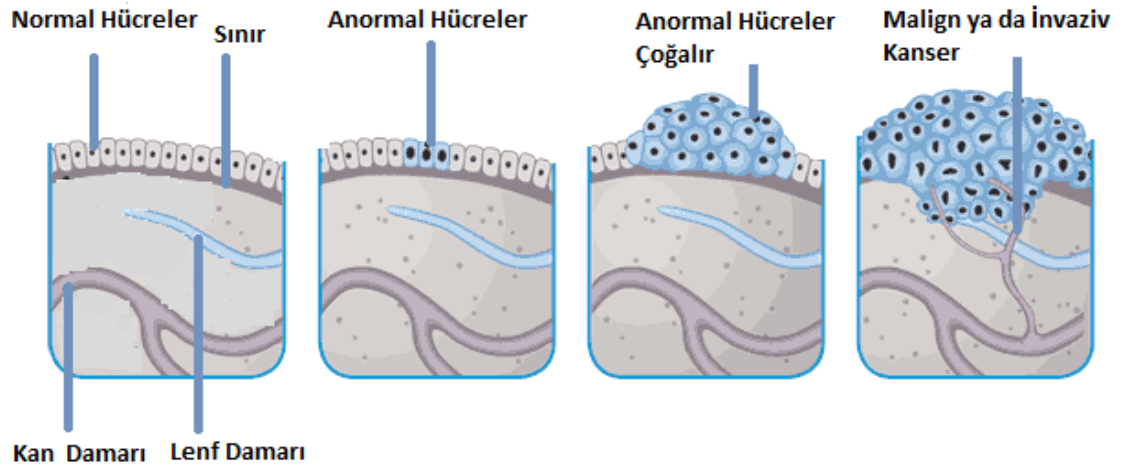
*-Başlama evresi:* Yeni çalışmalar, her tümörün tek bir hasarlı hücreden gelişmeye başladığını ortaya koymaktadır. Başka bir deyişle; tümör, kalıtsal değişikliklerin görüldüğü tek bir hücreden türeyen bir klondur. Genetik hasar, mutasyonlardan (nokta mutasyonları, delesyonlar ve insersiyonlar), kromozomal translokasyonlar ya da kromozomal kayıplardan oluşmaktadır. Bu tür değişiklikler, hücre büyümesi ya da proliferasyonu ile ilgili moleküllerin fonksiyonunda azalma ya da değişiklikler ile neticelenmektedir.

Karsinogenezin başlangıç evresi boyunca, bir hücrenin genomunda genellikle de tek bir gen de meydana gelen kalıcı bir genetik değişim, bu hücreye komşu hücreler üzerinde bir büyüme avantajı sunmaktadır. Pek çok başlangıç mutasyonu, protoonkogenleri ya da tümör supressor genleri etkilemektedir.

*-Gelişme evresi:* Kanserin gelişme evresi, başlangıç evresinin aksine yavaş ve adım adım ilerleyen bir süreçtir. Bu evrede, DNA yapısını değiştirmeyen ve tümör geliştiricileri olarak adlandırılan kimyasalların etkisiyle normal hücrenin belirgin bir şekilde tümör hücresine dönüşümü gerçekleşmektedir. Bu tümör geliştiricileri; hormonlar, büyüme faktörleri, forbol esterleri gibi ajanlardır (McKee ve McKee 2011).

Tümör geliştirici ajanlar, iki temel yöntem ile karsinogeneze katkı sağlamaktadır. Bazı moleküller (forbol esterleri gibi), intraselüler sinyal yolu elementlerini aktive ederek tümör hücresinin, çevre hücreler üzerinde büyüme avantajı kazanmasını sağlamaktadır. Diğer tümör geliştirici ajanların çoğunun etkileri bilinmemektedir. Fakat, bazı ajanların selüler  $Ca^{+2}$  seviyesini arttırma ya da pro-karsinojenleri karsinojenlere dönüştüren enzimlerin sentezini arttırma gibi geçici etkileri bulunduğu bilinmektedir. Başlangıç ajanlarından farklı olarak, tümör geliştirici ajanlarından etkileri kısmen tersinirdir. Bir hücrenin başlangıç mutasyonu geçirmesinin ardından, bu ajanlar sadece uzun süreli maruz bırakma ile kalıcı hasar meydana getirmektedir (McKee ve McKee 2011).

*-İlerleme evresi:* Başlama ve gelişme evrelerinin ardından hücreler, progresyon olarak adlandırılan ilerleme sürecine girerler. Bu aşamada, çok sayıda genetik mutasyon bir araya gelerek hücreler malign ya da invaziv fenotip kazanmaktadır (Martinez ve ark. 2003). Normal hücreler üzerinde önemli büyüme avantajlarına sahip olan ve genetik açıdan duyarlı pre-kanseröz hücreler, bu aşamada da hasar görmeye devam etmektedir (McKee ve McKee 2011). Sonuç olarak, kanserojenlerin hücreler üzerindeki uzun süreli mutajenik etkileri kaçınılmaz olmaktadır. Pre-malign lezyonlar, hücrelerin monoklonal büyümesine neden olan genetik değişiklikler veya hücrelerin poliklonal büyümesine sebep olan viral enfeksiyon gibi çevresel faktörler sonucunda oluşmaktadır. Pre-malign hücrelerin bir veya birkaçında ek mutasyonlar ile genetik değişiklik birikimi meydana gelmektedir. Oluşan bu mutasyonlardan bazıları hücrelere daha hızlı büyüebilmeleri için seçici bir avantaj sağlamaktadır ve sonrasında, hücreler klonal bir şekilde popülasyonunu arttırmakta ve primer (benign, iyi huylu) tümör oluşmaktadır. Bu büyümenin sonucunda ise mutasyon taşıyan hücreler tümör popülasyonu içerisinde baskın hale gelmektedir ve bu süreç klonal seleksiyon olarak adlandırılmaktadır. Klonal seleksiyon tümör gelişimi boyunca devam etmektedir dolayısıyla tümör sürekli daha hızlı büyümekte ve giderek malign hale gelmektedir (Cooper, 2000). Şekil 2.2, bu süreci özetlemektedir.



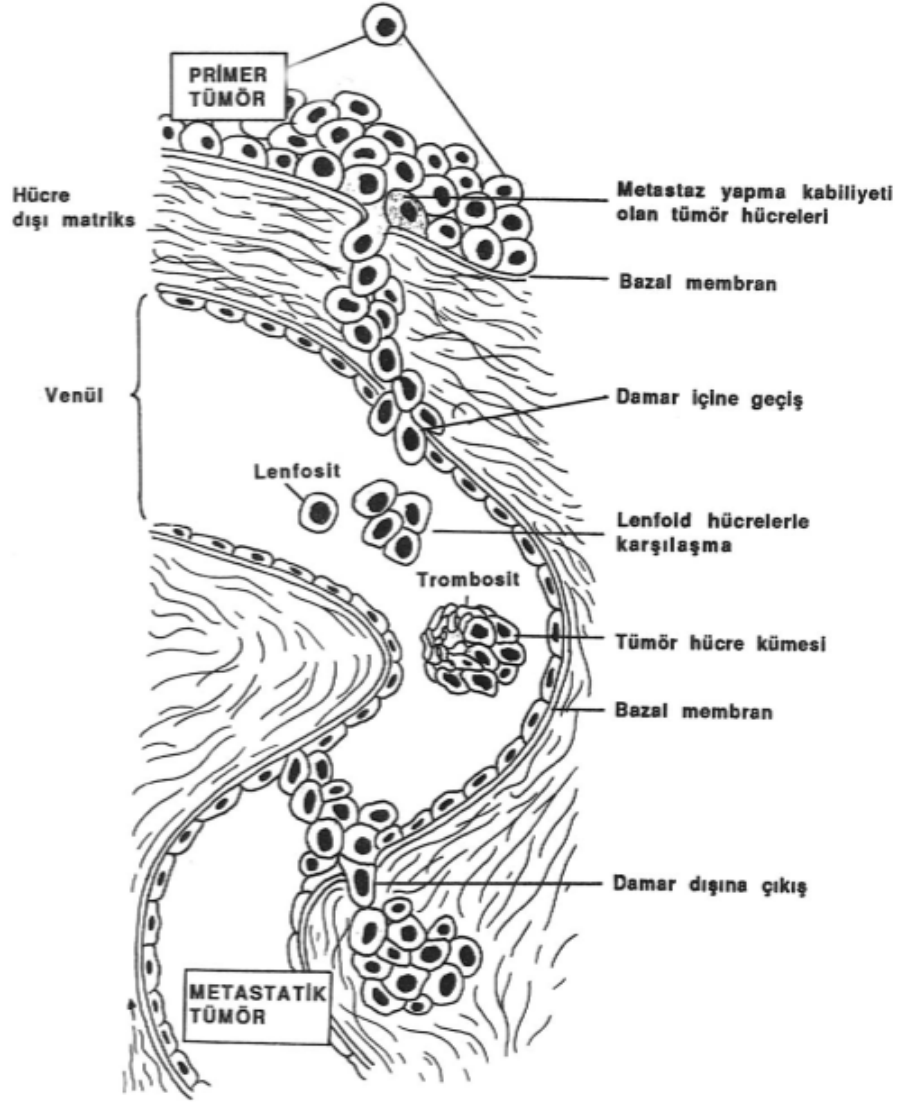
**Şekil 2.2.** Kanserin oluşum aşamaları (Angle 2011'den değiştirilerek alınmıştır)

Primer tümör oluşumunun erken evrelerinde, hücreler invaziv ve metastatik değildir. Kötü huylu tümörler, invazyon ve metastaz yapma yeteneğine sahiptir; ancak primer tümörü oluşturan hücrelerin sadece bir bölümünün yüksek oranda metastatik olduğu düşünülmektedir. Yani; primer bir tümörü oluşturan hücreler, fenotipik ve biyolojik açıdan heterojendir ve böyle bir heterojenite, her kanser hücresinde değişikliğe uğramış genlerden kaynaklanmaktadır. Bundan dolayı; metastaz yeteneğine sahip olan hücreler, daha fazla geninde değişikliğe sahip olmaktadır. Bu tür hücreler, uzak bir organda metastatik bir tümör oluşturmaktadır ki bu nedenle metastatik bir tümördeki hücrelerin, malign fenotiplerini (invazyon ve metastaz yeteneği) korumaları için gerekli olan genetik değişimlerin tümünü taşıdığı düşünülmektedir (Yokota 2000).

Aşırı ve kontrolsüz çoğalma tek başına kanser hastalığının ortaya çıkabilmesi için yeterli değildir. Ayrıca hücrenin invazyon (diğer sağlıklı dokuları istila etme) ve metastaz (dolaşıma geçerek sağlıklı başka dokulara yayılma) gibi diğer malign özelliklerini de içermesi gerekmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2000).

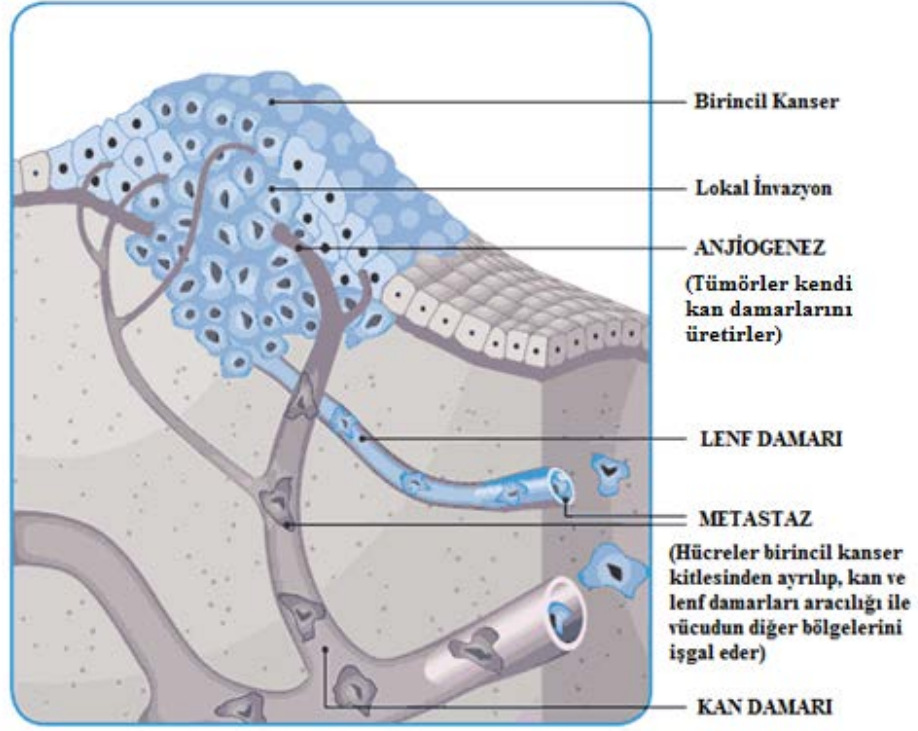
Çoğalan tümör hücrelerinin oluşturduğu primer doku belli bir boyuta ulaştığında, kanser hücrelerinden bazıları bu dokudan ayrılmakta ve doku içinde ilerlemeye başlamaktadır (invazyon). Tümör hücreleri, buldukları dokunun ekstrasellüler matriksinde ilerlemek için, matriks metalloproteinazlar (MMP), protein kinazlar ve lizozomal enzim salgırlarlar. Kanser hücreleri, bir damara rastladığında bu damarın duvarını eriterek damar içine girer ve daha sonra damar içindeki kanla birlikte vücutta dolaşmaya başlar. Damar içindeki tümör hücreleri, belirli organların damar yüzeyine tutunarak tutunduğu bölgedeki damar duvarını tekrar eritmeye başlarlar ve hedef dokuya yerleşerek çoğalmaya devam ederler. Kanser hücreleri damar içine girdikten sonra tüm vücudu dolaştığı halde bazı kanser türleri genellikle belli organlara metastaz yapmaktadır. Örneğin; mide kanseri daha çok karaciğere, meme kanseri kemiğe ve akciğere, kemik tümörleri ise akciğere metastaz yapmaktadır. Organ seçiciliği olarak adlandırılan bu işlevini belirleyen başlıca faktörler; kanser hücrelerinin yüzey özellikleri, organın damar yapısı ve organların damar duvarındaki hücrelerin yüzey özellikleridir. Primer tümör kitlesinden ayrılan kanser hücresinin damar içine girerek uzak organlara yerleşmesine "metastaz" adı verilmektedir. Metastatik tümörün kan damarları aracılığıyla yayılması Şekil 2.3'de gösterilmektedir.





**Şekil 2.3.** Tümörün basamaklar halinde kan damarları yoluyla yayılması (Robbins ve ark. 1989'dan değiştirilerek alınmıştır)

Tümör metastazında özellikle anjiogenez (tümörün kendi kan damarlarını üretmesi) ile yeni oluşan tümör damarları rol oynamaktadır (Aliustaoğlu, 2009). Bunun yanı sıra; anjiogenez, yeni damarların endotel hücrelerinden tümör hücrelerinin büyümesini sağlayan polipeptitler salgılayarak tümör büyümesini de sağlamaktadır (Arıcı 2001). Kanserin yayılma sürecinde rol oynayan anjiogenez oluşumu, Şekil 2.4'de gösterilmektedir.



Şekil 2.4. Kanser yayılması (Angle 2011'den değiştirilerek alınmıştır)

### 2.1.2. Kanser hücrelerinin özellikleri

Kanser karakteristik özellikleri, insan tümörlerinin çok aşamalı gelişimi boyunca kazanılan 6 biyolojik yeteneği kapsamaktadır.

1) *Dışarıdan gelen çoğalma sinyaline bağımlı olmadan bölünme özelliği kazanmaları:* Kanser hücreleri, büyüme sinyallerinde otonomi gösterirler. Kanser hücreleri çoğalma sinyallerine ihtiyaç duymaksızın kendi kendine yeterli olan büyüme sinyalleri üreterek bölünme potansiyeli kazanırlar. Hücrede oluşan mutasyonlar, hücrenin çoğalmayı aktive edici yollarında görev alan moleküllerin fonksiyonunu etkileyerek kontrolsüz çoğalmaya sebep olur.

2) *Büyüme baskılayıcı sinyallere duyarsız olmaları:* Çoğalma sinyallerinin inhibisyonunu sağlayan yollardaki moleküllerde oluşan mutasyonlar, çoğalma sinyallerinin kesintisiz devam etmesine dolayısıyla sürekli bölünmeye neden olur.

3) *Apoptozise direnç göstermeleri*: Kanser hücreleri, apoptotik sinyallere duyarsızdırlar. DNA hasarını takiben birçok normal hücre apoptozise giderken, birçok kanser hücresi için ise bu durum engellenmiştir. Apoptozis mekanizmasını düzenleyen yollardaki moleküllerde oluşan mutasyonlar, kanser hücrelerini apoptotik sinyallere karşı duyarsız hale getirir ve bunun sonucunda, kanser hücreleri hücre ölümüne direnç kazanırlar.

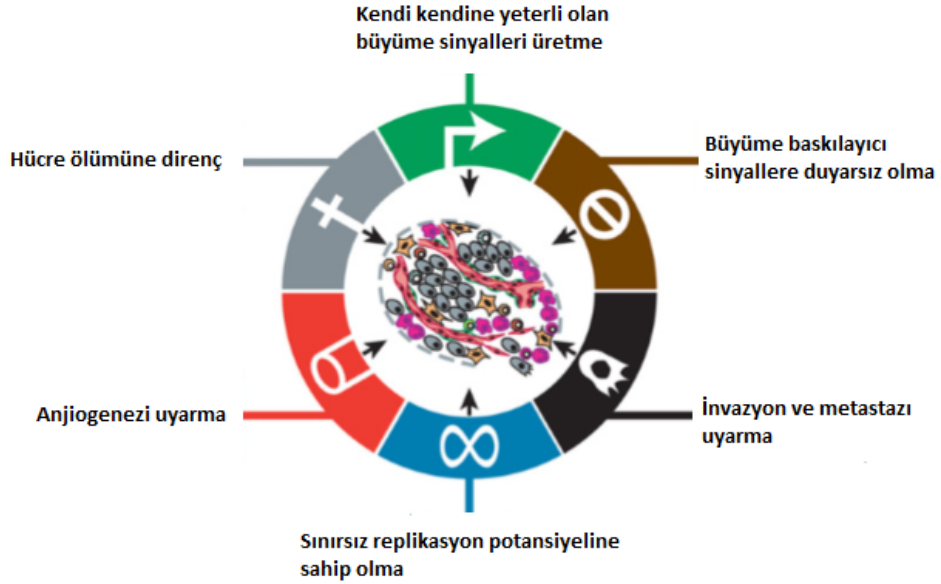
4) *Sınırsız replikasyon potansiyeline sahip olmaları*: Normal bir hücrenin bölünme sayısı sınırlıdır. Kanser hücreleri ise sınırsız sayıda bölünürler. İmmortalitenin mekanizmalarından biri kromozom uçları olan telomerlerdir. Hücre diferansiye olurken normal hücrelerde telomerler gittikçe kısalır, hücre istirahat durumuna geçer ve çoğalma kapasitesini kaybettiğinden ölür. Kanser hücrelerinde ise telomerler telomeraz enziminin etkisi ile yenilenir, telomer uzunluğu sabit kalır ve kanser hücrelerinin bölünme özellikleri devam eder. Telomerlerin uzunluğunun düzenlenmesini kontrol eden mekanizmaları bozan değişimler, kanser hücrelerine limitsiz bölünme potansiyeli kazandırır.

5) *Anjiogenezi uyarmaları*: Kanser hücreleri, yeni kan damarlarının oluşumunu teşvik eden büyüme faktörleri bulundurmaktadır. Bu sayede, kendi kan damarlarını oluşturarak (anjiogenez) artan besin ve oksijen ihtiyaçlarını sağlarlar. Ayrıca, tümör sağ kalımı ve yayılması için yeni kan damarlarının büyümesi gerekmektedir.

6) *İnvazyon ve metastazi uyarmaları*: İnvazyonda rol alan enzimlerde oluşan mutasyonlar ve hücre yüzey adezyon moleküllerinin ekspresyonlarındaki azalmalar sonucu kanser hücreleri, normal hücrelere göre hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinde daha zayıf bağlanma özelliğine sahip olurlar. Bu durum, kanser hücrelerinin invazyonunu ve göçünü kolaylaştırır. Kanser hücreleri genellikle ekstraselüler matriks bileşenlerini sindirecek proteazları yapısında bulundurmaktadır ve bu sayede normal dokuları işgal etmeleri kolaylaşmaktadır. Kanser hücrelerinin vücudun diğer bölgelerine göçü (metastaz yapmaları), vücudun genel homeostazisini bozarak ölüme yol açar (Hanahan ve Weinberg 2000).

Son yıllarda, kavramsal ilerlemeyle birlikte, kanser hücrelerin iki diğer özelliği de bu listeye eklenmiştir. Bu önemli özellikler, enerji metabolizmasını yeniden programlama ve bağışıklık tahribinden kaçınma yetenekleridir (Hanahan ve Weinberg 2011).

Tümör gelişimi boyunca, bu değişikliklerin her birini tüm kanser hücreleri olmasa bile çoğunluğu göstermektedir (Şekil 2.5).



**Şekil 2.5.** Kanser hücrelerinin özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2011'den değiştirilerek alınmıştır)

### 2.1.3. Hücre döngüsü ve kanser

Karsinogenez, fiziksel ya da kimyasal ajanlar ile uyarılmış genetik mutasyonların etkili olduğu bir süreçtir. Kanser, çoğunlukla somatik hücrelerdeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Ancak, kanser tek bir mutasyondan çok, zamanla biriken ve giderek artan genetik bozukluklardan kaynaklanmaktadır. Bundan dolayı, insanlarda görülen tümör oluşumu çok aşamalı ve yaşa bağlı bir süreçtir (Sandal 2002). Bu mutajenik etkilerin önemli bir kısmı, hücrenin mutasyonlara karşı hassas olduğu hücre döngüsü esnasında gerçekleşmektedir (Aliustaoğlu 2009).

Yüksek oranda organize olan hücre siklusu, hücre dublikasyonundan sorumludur. Sıkı regülasyon ve zamanlama, S (sentez) fazı boyunca DNA'nın bir kez replike olmasını (hata olmadıkça) ve M (mitoz) fazı boyunca kardeş kromatitlerin yeni oluşan yavru hücrelere eşit bir şekilde paylaşılmasını sağlar (Sandal 2002). Bu iki temel süreç

arasında ise geçici duraklama evreleri olan  $G_1$  ve  $G_2$  fazları vardır. Vücuttaki hücrelerin büyük çoğunluğu  $G_0$  olarak adlandırılan istirahat evresindedir. Bu hücrelerin hücre döngüsüne girebilmesi için, dışarıdan büyüme sinyallerini alması ve aldıkları bu sinyalleri hücre çekirdeğine ileterek döngüyü başlatması gerekmektedir (Aliustaoğlu 2009).

Tipik bir ökaryotik hücre döngüsü yaklaşık olarak 24 saat sürmektedir. Ancak, hücre siklusunun süresi hücreden hücreye değişiklik gösterebilmektedir. Mikroskop altında incelendiğinde, hücre döngüsü 2 temel bölüme ayrılmaktadır; bu süreçler interfaz ve mitozdur. Hücre döngüsünün yaklaşık %95'ini, mitozlar arasındaki interfaz periyodu oluşturmaktadır. İnterfaz boyunca, kromozomlar dekonpanse olur (yoğunluğu azalır) ve nükleus içinde dağılmış vaziyettedir. Bu yüzden, nükleus morfolojik açıdan üniform olarak görünmektedir. Fakat; moleküler seviyede interfaz periyodu, hücre bölünmesi öncesinde hücre büyümesinin ve DNA replikasyonunun düzenli olarak meydana geldiği bir periyottur. İnterfaz, kendi içerisinde  $G_1$ , S ve  $G_2$  olmak üzere çeşitli alt fazlardan oluşmaktadır.

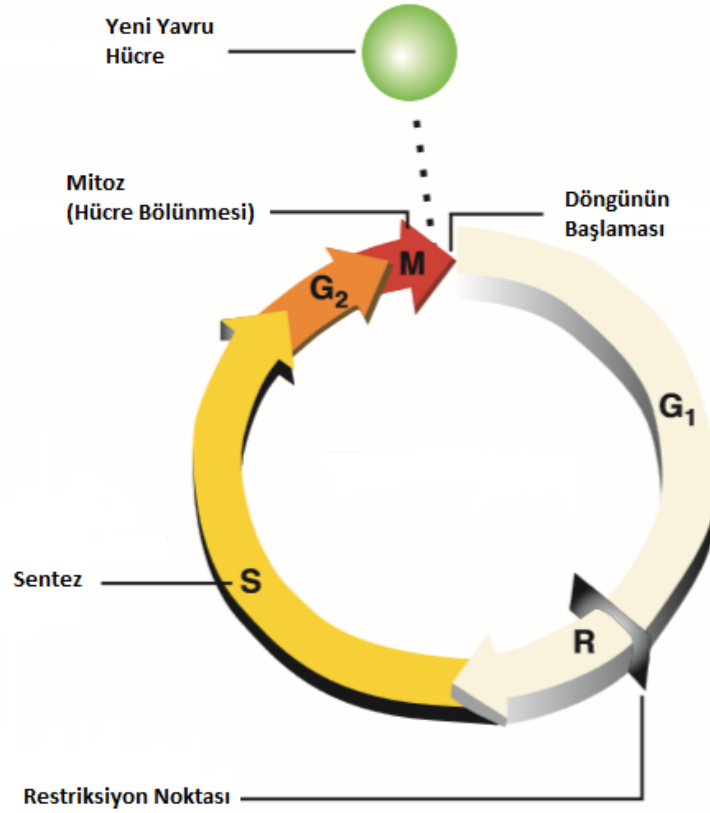
$G_0$  fazında (istirahat fazı); hücreler metabolik açıdan aktiftirler, ancak uygun hücre dışı sinyaller gelmedikçe proliferasyon olmazlar.  $G_0$  fazında, hücreler genellikle spesifik bir işlevi görmek üzere programlanırlar. Bu faz hücrelerin ya bölünmek, ya farklılaşmak ya da ölmek için karar verdikleri fazdır. Hücre, bu faza uygun olmayan koşullar ve büyümeyi engelleyici sinyal varlığında girer. Bu evre birkaç saat, birkaç gün veya ömür boyu sürebilmektedir. Büyüme faktörleri, sitokinler ve tümör virüsleri gibi mitojenik iletiler,  $G_0$  evresindeki hücrenin  $G_1$  evresine girmesine yol açar.

$G_1$  fazı; interfazın ilk evresidir ve mitoz ile DNA replikasyonunun başlangıcı arasındaki geçiş periyodudur.  $G_1$  fazı, büyüme fazı olarak da adlandırılmaktadır. Hücreler kendi çevrelerini kontrol eder, sinyalleri alır, büyümeye devam eder, metabolik olarak aktiftirler fakat kendi DNA'larını replike etmezler. Bu faz boyunca, hücrenin biyosentetik aktivitesi yüksektir. S fazı için gerekli proteinler ve RNA sentezlenir, enzimler üretilir. Sentezlenen enzimlerin büyük bir çoğunluğu, DNA replikasyonu için üretilir.  $G_1$  fazının süresi oldukça değişkendir; aynı türlerin farklı hücreleri arasında bir değişiklik gösterebilir.

S fazında (DNA sentezi fazı); hücre içindeki DNA'nın miktarı iki katına çıkar. Replikasyon tamamlandığında, her kromozom iki (kardeş) kromatide sahiptir. S fazında aynı zamanda kromozom organizasyonunda görev alacak olan histon ve non-histon proteinleri sentezlenir. Hücrenin hacmi iki kat artar ve hücre bölünmesi için sinyal oluşturur. Bu faz boyunca, sentez mümkün olduğunca hızlı tamamlanmaktadır. Çünkü, bu evrede bazı çiftleri mutajenler gibi zararlı dış faktörlere duyarlıdır.

G<sub>2</sub> fazında; hücre büyümesi, protein ve RNA sentezi devam eder; DNA sentezi durur. Histon proteinleri ile DNA kompleks yapmaya başlar. G<sub>2</sub> fazında; hücrede sentezlenen tüm DNA'daki olası hataları saptamak için DNA replikasyonu analiz edilir ve olan hatalar düzeltilir. G<sub>2</sub> evresinde mitozu başlatan, kromozomların kondensasyonunu, çekirdek zarının kopmasını sağlayan ve mitozla ilgili diğer olayları indükleyen MPF (maturation promoting factor) protein kompleksi birikimi vardır.

M fazında (mitoz); replike olan kromozomlar kompleks olaylar (profaz, metafaz, anafaz, telofaz ve sitokinez) ile oluşan iki yavru hücrenin nükleuslarına eşit olarak dağıtılır. Ana hücrenin bölünmesi ile birbiriyle özdeş iki yavru hücre oluşur. Mitozdan sonra oluşan yeni hücreler ya G<sub>1</sub> ya da G<sub>0</sub> fazına girerler. Mitotik faz, hücre döngüsünün yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. Mitozdaki hatalar, ya hasarlı bir hücrenin apoptoz mekanizmasının inaktive olmasından ya da kansere neden olabilen mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (Cooper 2000). Hücre döngüsü fazları Şekil 2.6'da şematik olarak gösterilmektedir.



**Şekil 2.6.** Hücre döngüsü fazları (Sandal 2002'den değiştirilerek alınmıştır)

Hücre çevrimi, özenle düzenlenmiş bir süreçtir ve belli bir doku ya da hücre tipinin spesifik ihtiyaçlarını karşılamaktadır. Normalde, yetişkin bir dokuda hücre ölümü (programlı hücre ölümü ya da apoptozis) ve proliferasyon (hücre bölünmesi) arasında kararlı bir hal oluşturan hassas bir denge bulunmaktadır. Hücre siklusunda bir faz tamamlanmadan sonraki faza geçilirse genetik materyal tam ve doğru kopyalanmadığı için hücrede hasar meydana gelebilir. Hücre döngüsü kontrolünün kaybedilmesi, bu dengenin bozulmasına ve akabinde tümör gelişimine yol açabilmektedir. Bundan dolayı, hücreler hücre döngüsünü durdurabilecek birkaç sisteme sahiptirler. Bunlar, hücre siklusunun "kalite kontrol noktaları" dır. Bu kontrol noktalarında, hücrenin siklusa devam edip etmeyeceği kararı verilmektedir. Kontrol noktalarında, hücrelerin S fazına (G<sub>1</sub> kontrol noktası) ya da M fazına (G<sub>2</sub> kontrol noktası) başlamasından önce hasarlı DNA'yı algılamayı sağlayan önemli mekanizmalar bulunmaktadır.

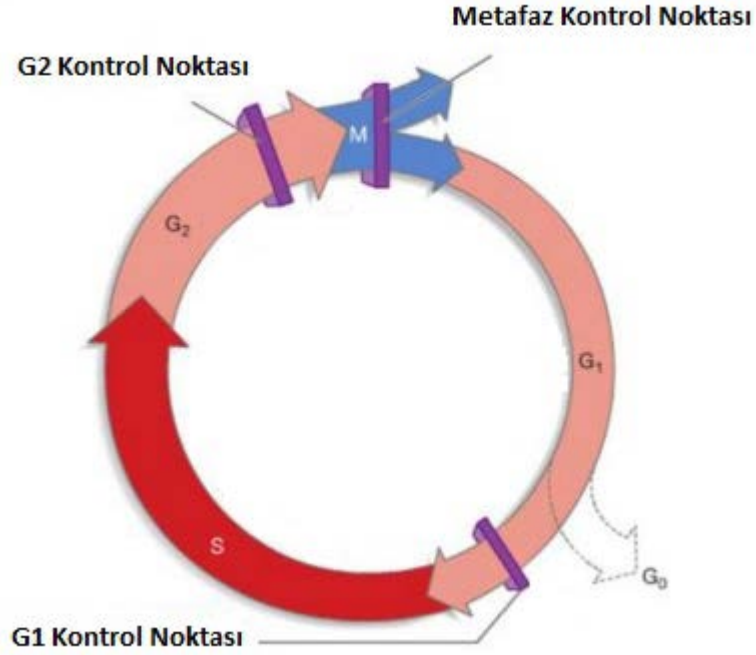
Kontrol noktalarının en önemli özelliği, hücre döngüsünde bir önceki evrenin bittiği ve bir sonraki evrenin başlayacağı geçişlerde bulunmalarıdır (Sandal 2002). Böylece, hücre siklusunun ilerlemesi durdurulabildiği gibi gerekli olan durumlarda apoptozis (programlı hücre ölümü) de aktive edilebilir ve DNA'sını doğru ve tam olarak replike etmiş hücrelerin sadece mitozla girmesi sağlanabilir (Aliustaoğlu 2009). Hücre siklusunda DNA sentezinden hemen önce  $G_1$ -S geçişinde, mitozdan hemen önce  $G_2$ -M geçişinde ve metafaz-anafaz geçişinde olmak üzere üç kontrol noktası bulunmaktadır. Bu kontrol noktaları, Şekil 2.7'de şematik olarak gösterilmektedir.

- *İlk kontrol noktası ( $G_1$ /S geçiş noktası)*, geç  $G_1$  fazında, S fazına girmeden hemen önce bulunur. DNA sentezi için uygun ekstrasellüler sinyaller ve tüm mekanizma çalışır durumda olsa bile, hücrenin  $G_1$  fazından ayrılmasından önce DNA'nın hasarsız bir durumda olması gerekmektedir. Eğer herhangi bir hasar saptanırsa, hücreler ya hasarı onarırlar ya da apoptozise giderek ölürlere ya da  $G_0$  fazına dönerler. Ayrıca bu kontrol noktası p53 proteinin etki yerlerinden biridir. Bu kontrol noktasında, besinlerin, hormonların, büyüme faktörlerinin ve hücre boyutunun yeterli olup olmadığı kontrol edilir ve DNA replikasyonu için karar verilir. Replikasyonun başlaması için karar verilen geç  $G_1$  evresindeki özel kontrol bölgesine restriksiyon noktası denmektedir. Restriksiyon noktası, hücrenin S fazına girmek ve büyüme faktörlerinin yokluğunda dahi, hücre döngüsünü tamamlamak için kararlı hale geldiği, geri dönüşümü olmayan bir noktadır (Silva ve Weinberg 1997, Reed 1997).

- *İkinci kontrol noktası ( $G_2$ /M geçiş noktası)*, hücrelerin M (mitoz) fazına girmesinden önce bulunur. DNA replikasyonu tamamıyla ve doğru şekilde tamamlanmamış ise hücre bu kontrol noktasında durur, replikasyon hataları onarılarak DNA'nın devamlı olarak bütünlüğü sağlanır ve ardından hücreler M fazına başlar.

- *Üçüncü kontrol noktası (iğ iplikçığı kontrol noktası)*, metafaz safhasından anafaz safhasına geçişi düzenler. Bu kontrol noktası, kromozomların mitotik iplikçiklere düzgün tutunamamasına duyarlıdır. İğ iplikçığı kontrol noktası; olgunlaşmamış kardeş kromatidlerin ayrılmasını engeller, bütün kinetokorlara uygun mikrotübül bağlanmasını kontrol eder ve kromozomların tam olarak kardeş hücrelere ayrılmasını sağlar (Cooper 2000, Lowitz ve Casciato 2000, Sandal 2002, Cabadak 2008).





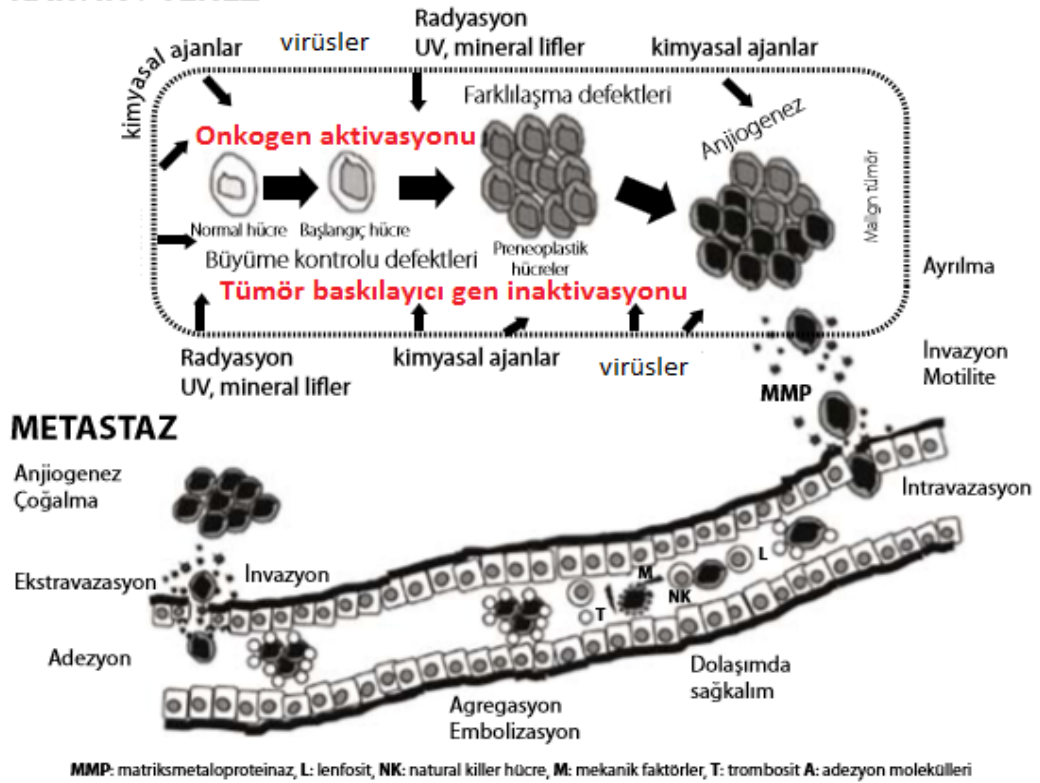
**Şekil 2.7.** Hücre döngüsündeki kontrol noktaları (Pearson 2011'den değiştirilerek alınmıştır)

Tümör supressör genler (anti-onkogenler, TSG), hücre döngüsünü etkileyen en önemli genlerdir. TSG'ler, hücrenin farklı yerlerinde; hücre yüzeyinde, sitoplazmada, nükleusta bulunurlar. TSG'in fizyolojik fonksiyonları, tümör oluşumunu engellemek değil hücre büyümesini kontrol etmektir. TSG'ler, aktive olduklarında hücre proliferasyonunu engellerler (Bitiren 2014). Hasarlı hücrelerin bölünmesine engel olarak kanser gelişimini baskırlar. Tümör baskılayıcı genler eğer işlevlerini kaybederlerse hücre büyümesinin kontrolü ortadan kalkar dolayısıyla DNA onarımı olmadan hücre siklusu kontrolsüz devam eder (Cabadak 2008).

Kanser oluşumuna neden olan diğer gen grubu da normal hücre büyümesini uyaran genler olan proto-onkogenler (normal hücre genleri) dir. Proto-onkogenler de TSG'ler gibi hücrenin değişik bölümlerinde bulunmaktadır. Proto-onkogenler, hücre büyüme kontrol yoluyla ilişkili genlerdir. Bu genlerin salınımı, normal büyüme ve rejenerasyon boyunca sıkı kontrol altındadır. Proto-onkogenler, hücre büyümesini ve/veya bölünmesini destekleyen çeşitli büyüme faktörlerini, büyüme faktörü reseptörlerini, enzimleri ya da transkripsiyon faktörleri için kodlanmaktadır (Pearson 2011).

Proto-onkogenlerdeki mutasyonlar, hücrelerin kontrolden çıkmasına, aşırı bölünmesine ve farklı kanser türlerinin oluşumuna neden olabilir. İnsanlarda proto-onkogenler, somatik mutasyon ile aktive olarak onkogenlere dönüşmektedirler (Kopnin 2000, Cabadak 2008). Pek çok başlangıç mutasyonu, proto-onkogenleri ve tümör baskılayıcı genleri etkilemektedir. Hücre büyümesi, farklılaşması ve çoğalmasında rolü olan proto-onkogenlerde meydana gelen mutasyonlar tümör gelişimine, tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar ise hücre siklusunun inhibisyonunu engelleyerek anormal hücre büyümesine neden olur. Onkogenlerin aktivasyonu ve tümör supresör gen inaktivasyonları; hücrenin kontrolsüz çoğalmasına, kontak inhibisyonun kaybolmasına, invazyon ve metastaz yeteneği kazanılmasına yol açmaktadır (Aliustaoğlu 2009). TSG'lerin ve onkogenlerin, karsinogenez oluşumundaki rolü Şekil 2.8'de gösterilmektedir.

## KARSİNOGENEZ

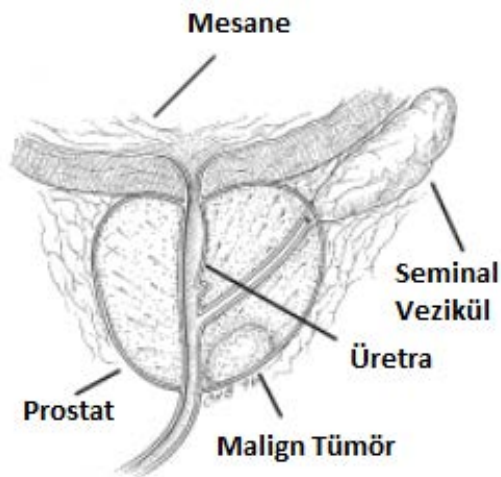


**Şekil 2.8.** Onkogen aktivasyonu ve tümör baskılayıcı gen inaktivasyonu ile karsinogenezin oluşumu (Aliustaoğlu 2009).

## 2.2. Prostat Kanseri

Son yıllarda tüm dünyada hormon bağımlı kanserlerin (meme, testis ve prostat kanserleri gibi) insidansı giderek artmaktadır. Hormon bağımlı kanser türlerinden biri de prostat kanseridir. Prostat kanseri, erkek üreme sisteminin önemli bir üyesi olan prostatta meydana gelen malign değişikliklerdir ve kansere bağlı mortalitede üçüncü sırada yer almaktadır (Sanderson ve ark. 2013). Prostat kanseri, geniş bir gizlilik süresine (20-30 yıl) sahiptir ve teşhis edildiği ortalama yaş 68'dir (Karna ve ark. 2011).

Prostat, sadece erkeklerde bulunan ve seminal sıvının bir kısmını üretmek ile görevli tübulo-alveolar bir bezdir. Rektumun (kalın bağırsağın son kısmı) önünde ve mesanenin altında yerleşmiştir. İdrar akımını sağlayan üretra (idrar yolu) ile çevrilmiştir (Şekil 2.9). Prostat bezi, mesane fonksiyonunu kontrol etmek için; sinirlerin, kan damarlarının ve kasların yakınında lokalize olmuştur. Prostatın büyüklüğü, yaş ile değişiklik göstermektedir. Daha genç erkeklerde sağlıklı bir prostat bezi, ceviz büyüklüğündedir. Prostat, yetişkinlerde genellikle aynı büyüklükte kalır ve hormonlara bağlı olarak yavaş bir büyüme gösterir. Yaşlı erkeklerde, prostat boyutu daha büyük olabilmektedir (Cancer Council 2013). Androjen olarak adlandırılan erkek hormonu prostatın büyümesine katkı sağlamaktadır. Prostat aşırı büyüdüğü zaman üretraya baskı yaparak idrarın mesaneden akımını yavaşlatır ya da durdurur (Anonim 2013a).



Şekil 2.9. Prostat bezi ve lokalizasyonu (Anonim 2013a)

Prostat bezinin iç bölümü (üretranın etrafı) (bkz. Şekil 2.9), yaş ile birlikte büyümeye başlar ve bu durum, iyi huylu prostat hiperplazisi (benign prostatic hyperplasia, BPH) olarak adlandırılan yaygın bir duruma yol açabilir. BPH kanser değildir, kanser gelişimine de neden olmamaktadır. BPH'da, prostat dokusu üretraya baskı yapmaktadır, bu durum da üriner sistemde problemlere neden olabilmektedir.

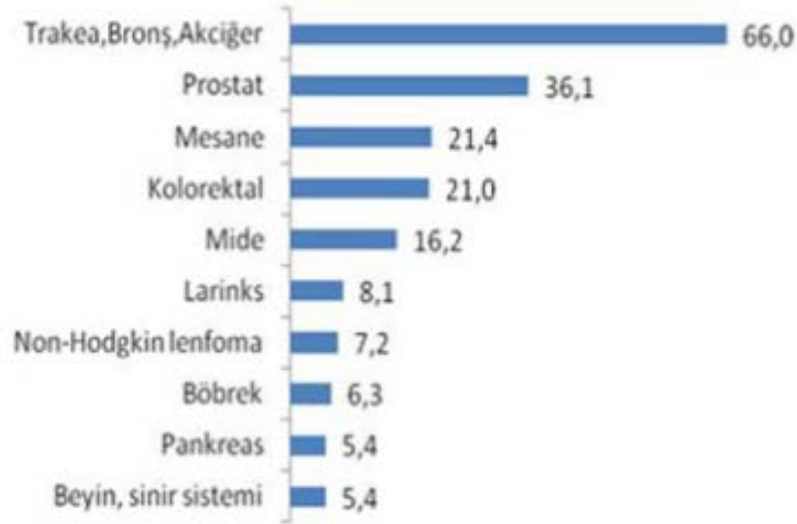
Prostat kanseri, diğer kanser tipleri genetik ve epigenetik değişimler sonucu gelişen karsinomdur. Prostatta, bir çok hücre tipi bulunmaktadır fakat neredeyse tüm prostat kanserleri, normal glandular epitelyum hücrelerinden (asinar hücreleri) gelişmektedir. Prostat tümörleri, androjenlere duyarlı olduğu için, prostat kanserinin başlaması ve ilerlemesi, androjenlerden etkilenmektedir. Çoğu prostat kanseri, diğer kanser türlerine göre daha yavaş gelişmektedir. Erken prostat kanserinde, kanser hücreleri büyür, invazyon ve metastaz yetenekleri yoktur. İleri dereceli prostat kanserleri ise, mesane, kemikler ve lenf düğümleri gibi vücudun diğer bölümlerine yayılabilmektedir (Anonim 2013b).

### **2.2.1. Prostat kanserinin görülme sıklığı**

Ürolojik kanserler erkeklerde teşhis edilen bütün kanserlerin yaklaşık üçte birini teşkil etmektedir ve prostat kanseri ürolojik kanserler içinde en yaygın bulunanıdır. Prostat kanseri, 50 yaş üzerindeki erkeklerde en sık görülen kanser olup yavaş ilerleyen bir malignite olmasına rağmen her yıl çok sayıda erkek bu nedenle ölmektedir. Prostat kanseri, erkeklerde kansere bağlı ölümlerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırayı almaktadır ve kanser ölümlerinin %10'undan sorumludur (Anonim 2013c).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2008 yılında yayınlanan raporuna göre; dünya çapındaki prostat kanseri sayısı, 1975 yılında 200 000 yeni vakadan 2002 yılında 700 000 yeni vakaya çıkmıştır. 2006 yılında Avrupa'da prostat kanserinin, 345 900 yeni vaka ve 87 400 ölümlerle, erkeklerde teşhis edilen kanserler içinde dördüncü sırada olduğu tespit edilmiştir. Prostat kanserinin insidans oranı hızla artmaktayken birçok ülkede 1994 yılından itibaren prostat kanserine bağlı mortalite hızları kademeli olarak düşmeye başlamıştır. Mortalitedeki bu azalmaya, prostat spesifik antijeninin (PSA) katkısının bulunduğu tespit edilmiştir fakat bu olgu etkinin tamamını açıklayamamaktadır (WHO 2008).

Dünya Sağlık Örgütü'nün Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yayımlanan Globocan verilerine göre; 2008 yılında dünya çapında kaydedilen toplam yeni kanser olguları % 14 (903 500), yeni kanser ölümleri ise % 6 (258 400) oranındadır (WHO 2008). ABD'de 2008 yılında, 186 300 kişiye prostat kanseri teşhisi koyulurken, 28 700 kişi ise prostat kanserinden yaşamını yitirmiştir (Antonarakis ve ark. 2010). Türkiye'de kanser sıklığı Dünya ve Dünyanın gelişmekte olan ülkeleriyle benzerlikler göstermektedir. Ülkemizde de prostat kanserine sık rastlanılmaktadır. Sağlık Bakanlığı verilerine göre; 2008 yılında prostat kanseri insidansı, dünya çapında 28/100 000, Avrupa'da 60/100 000 iken; ülkemizde bu oran 36,1/100 000'dir ve erkeklerde görülme sıklığı bakımından akciğer kanserinden sonra gelmektedir (Gültekin ve Boztaş 2014). Ülkemizde erkeklerde en sık görülen kanser insidansları Şekil 2.10'da gösterilmektedir.



**Şekil 2.10.** Erkeklerde en sık görülen ilk 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızlarının dağılımları (100 000 kişide) (Gültekin ve Boztaş 2014).

Prostat kanseri insidansı, ülkeler ve etnik gruplar arasında büyük farklılık göstermektedir. En yüksek oranlar Amerika Birleşik Devletleri'nde özellikle siyah popülasyon grupları arasında, Kanada, İsviçre, Avusturya ve İskandinav ülkelerinde görülmektedir. En düşük oranların ise, İtalya ve İspanya'daki çeşitli popülasyonlarda, Kore, Çin ve Hindistan'da ve Asya'nın diğer bölgelerinde bulunduğu bildirilmiştir. İnsidanstaki bu büyük farklılıktan; coğrafyanın, yaşam tarzının, diyet alışkanlığının çevresel faktörlerin ve kalıtımın sorumlu olduğu düşünülmektedir (WHO 2008).

Prostat kanserinin dünya çapındaki oranları ile ilgili yapılan yeni bir çalışmada, insidans oranlarının gelir seviyesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Kuzey Amerika, Okyanusya, Batı ve Kuzey Avrupa ülkelerini kapsayan dünyanın en yüksek gelir bölgelerinde insidans oranlarının daha yüksek olduğu, Güney Amerika, Karayipler ve Sahra altı Afrika bölgelerini içeren düşük ve orta seviyeli gelir yerlerinde ise ölüm oranlarının daha fazla olduğu bulunmuştur (Anonim 2012a).

Son yıllarda, yıllık kansere yakalanma vakaları ve kanser nedeniyle ölüm oranlarında önemli bir artış eğilimi göze batmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) raporuna göre, dünya genelinde kansere yakalanma sayısının gelecek 20 yılda yaklaşık iki kat artarak yıllık 22 milyona, kanser nedeniyle ölüm sayısının da yıllık 13 milyona ulaşması öngörülmektedir (WHO 2014). Prostat kanseri hastalık yükünün 2030 yılına dek 1,7 milyon yeni kanser vakasına ve 499 000 ölüme ulaşacağı tahmin edilmektedir (Anonim 2012a). 2014 yılı boyunca ABD'de, 233 000 yeni olguya prostat kanseri tanısı konulacağı ve 29 480 kişinin prostat kanserinden hayatını kaybedeceği öngörülmektedir (Siegel ve ark. 2014).

### **2.2.2. Prostat kanseri risk faktörleri**

Prostat kanserinin etiyolojisi halen tam olarak anlaşılammıştır. Yapılan çalışmalarda, tütün ve alkol kullanımı ile prostat kanseri riski arasında hiçbir ilişki bulunamamıştır. Bazı beslenme alışkanlıklarıyla prostat kanseri riski arasında bir ilişki olduğunu gösteren zayıf kanıtlar bulunmaktadır ancak insidansın tamamı beslenme alışkanlıklarına dayandırılmaz (WHO 2008). Prostat kanseri için birkaç risk faktörü belirlenmiştir:

*Yaş:* Prostat kanserinde bugün kabul edilen en önemli risk faktörü yaşlanmadır. Yaş arttıkça prostat kanseri gelişme riski de artmaktadır. Prostat kanseri, 45 yaş altındaki erkeklerde nadir görülmektedir ve kanser gelişme riski çoğunlukla 50 yaşından sonra artmaya başlamaktadır. Tüm prostat kanseri durumlarının yaklaşık %60'ı, 65 yaş ve üzeri erkeklerde saptanmaktadır. 50 yaş ve üzeri erkeklerde prostat kanseri görülme oranı %97'dir (Anonim 2014b).

*Genetik yatkınlık:* Genetik çalışmalar, güçlü ailesel yatkınlığın prostat kanserlerinin %5 ila %10'undan sorumlu olabildiğini göstermiştir. Aile öyküsü, bazı erkeklerde prostat kanseri riskini arttırabilmektedir. Ailesinde (baba ya da erkek kardeş), özellikle birinci derece akrabalarında prostat, meme ya da ovaryum kanseri olan veya prostat kanserli genç (50 yaşın altında) yakınlarla sahip kişilerin, prostat kanseri riskini arttıran kalıtsal bir gene sahip olabileceği söylenmektedir. Fakat, gerçek anlamda kalıtsal prostat kanseri çok nadirdir ve genellikle 55 yaşın altındaki erkeklerde görülmektedir (Anonim 2013d). Erkek kardeşlerde prostat kanseri öyküsü olan ve birden fazla kuşakta prostat kanseri görülen çok sayıda aile olmasına karşın, prostat kanseri için birkaç yıl önce meme kanseri için keşfedilen genlerin (BRCA1 ve BRCA2) önemine benzer önemde bir gen henüz bulunamamıştır (WHO 2008).

*Irk:* Henüz bilinmeyen nedenlerden ötürü Afrika kökenli erkeklerde prostat kanseri insidans oranları daha yüksektir. Asya kökenliler bu açıdan daha düşük risk taşımaktadırlar (Tuna 2005). Yapılan araştırmalar sonucu, dünya çapındaki en yüksek prostat kanseri insidans oranı, Afrika kökenli Amerikalılarda ve Afrika'nın Karayipler bölgesindeki erkeklerde tespit edilmiştir (Anonim 2014b).

*Beslenme:* Makro besinlerin alımıyla prostat kanseri riski arasında az da olsa bir ilişki olduğu bulunmuştur. Çalışmalar, işlenmiş et ya da süt ürünlerinin prostat kanseri için bir risk faktörü olabileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca bazı çalışmalarda hayvansal yağ bakımından zengin ve et içeren gıdalarla beslenmenin prostat kanseri riskini arttırdığı gösterilmektedir. Obezite de prostat kanseri riskini arttıran önemli bir sağlık sorunudur. Son yıllarda yapılan bir çalışmaya göre; selenyum (Se) mineralini içeren besinler, prostat kanseri insidansını düşürebilmektedir. Toprakları Se minerali açısından fakir yörelerde, bu mineralden zengin yörelere oranla bazı kanser çeşitlerinin sık görülmesi de bu etkiyi kanıtlar niteliktedir (Clark ve ark. 1997).

*Sigara ve alkol:* Yapılan çalışmalara sonucu, tütün ve alkol kullanımı ile prostat kanseri riski arasında hiçbir ilişki bulunamamıştır. Sadece bir raporda, günde 35 ve daha fazla sayıda sigara içmenin prostat kanseri ölüm riskini arttırdığı gösterilmiştir (Akiba ve Hirayama 1990).

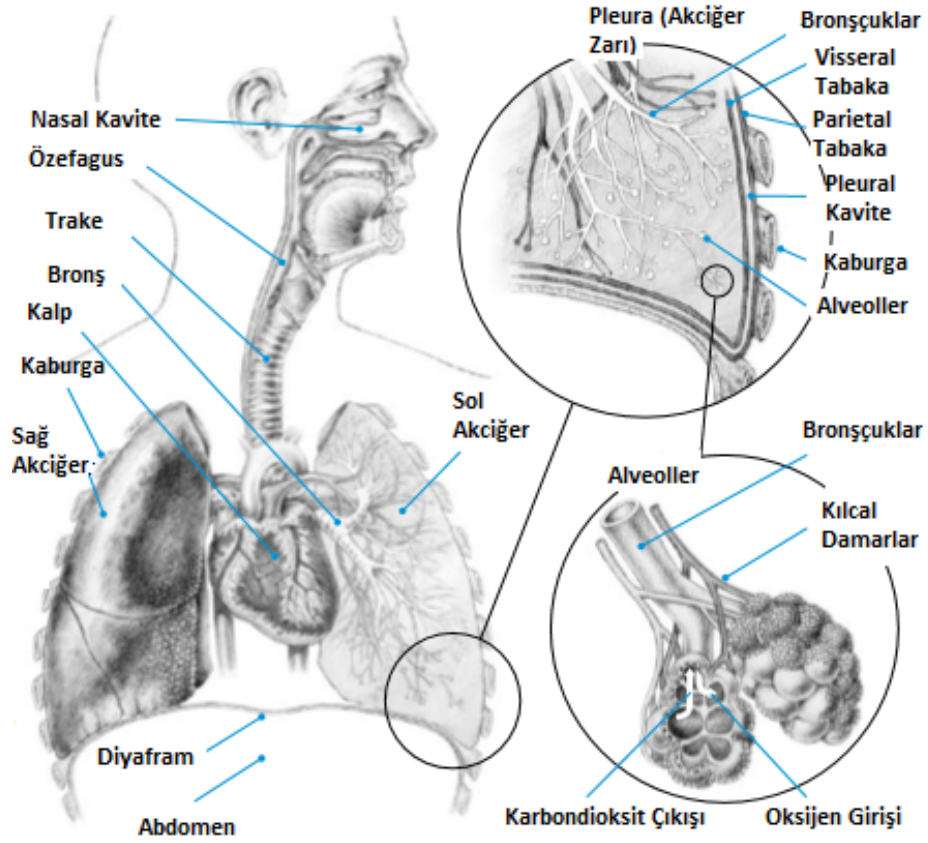
Günümüze dek yapılan araştırmalarda, alkol kullanımının prostat kanseri riskini arttırdığı ile ilgili hiçbir veriye ulaşılamamıştır ve alkol tüketimi ile prostat kanseri arasındaki ilişkilerin araştırıldığı önceki epidemiyolojik çalışmaların sonuçları tutarsızlık göstermektedir. Alkol kullanan prostat kanserli kişilerde, ileri dereceli ya da ölümcül prostat kanseri riskinin daha fazla olduğu bildirilmiştir (Gong ve ark. 2009). Fakat başka bir çalışmada; alkol ve ileri dereceli kanserler arasında hiçbir önemli ilişki saptanamamıştır, ileri dereceli olmayan kanser durumlarında alkol kullanımının kanser riskini arttırdığı yönünde hiçbir veriye ulaşılamamıştır (Watters ve ark. 2010).

### **2.3. Akciğer Kanser**

Akciğer kanseri 20. yüzyılın başlarında nadir görülen bir hastalık iken, sigara içme alışkanlığındaki artışa paralel olarak sıklığı giderek artmıştır ve bugün dünyada hem erkeklerde hem de kadınlarda yaygın olarak görülen kanser türü haline gelmiştir (Spira ve Porter 2002). Dünyada her yıl akciğer kanseri sebebiyle 1,3 milyon kişi ölmekte ve 1,4 milyon kişiye akciğer kanseri tanısı konmaktadır (WHO 2010). Akciğer kanserli olguların ancak % 15'inin tanı konulduktan sonra hayatta kalma süreleri 5 yıldan fazladır (Jemal ve ark. 2002). Erken teşhislerde karşılaşılan zorluklar ve etkili tedavi yöntemlerinin eksikliği de küçümsenmeyecek ölçüde akciğer kanseri mortalitesini (ölüm oranını) arttırmaktadır (Wong ve ark. 2009).

Akciğerler, göğüs boşluğumuzda bulunan, nefes alıp verirken oksijenin dokulara alınmasını ve karbondioksitin dışarı atılmasını sağlayan solunum sisteminde görevli temel organlardır. Akciğerler süngerimsi yapıda ve koni şeklinde bir çift organdır ve her akciğer "lob" olarak adlandırılan bölümlerden oluşmaktadır. Sol akciğer 2, sağ akciğer ise 3 lobdan oluşmaktadır. Akciğerler, solunum işlevini yapısında bulunan bronş ve bronşcuk olarak adlandırılan hava kesecikleri sayesinde gerçekleştirmektedir. Akciğer kanseri, akciğer dokularındaki hücrelerin kontrolsüz çoğaldığı bir hastalıktır ve bu kontrolsüz çoğalma, hücrelerin çevredeki dokuları istila etmeleri veya akciğer dışındaki organlara yayılmaları (metastaz) ile sonuçlanabilir (Anonim 2014c) (şekil 2.11).





**Şekil 2.11.** Akciğerlerin yapısı ve solunum sisteminde görevli diğer organlar (Cancer Council 2012'den değiştirilerek alınmıştır)

Akciğer kanserlerinin büyük çoğunluğu, epitel hücrelerinden köken alan karsinomlardır. Bu kanser türlerinde histopatolojik sınıflandırma klinik yaklaşım ve hastalığın prognozu açısından oldukça önemli olup kanserli hücrelerin mikroskop altındaki görüntüsüne göre 2 gruba ayrılmaktadırlar (Rom ve ark. 2000):

1) *Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK, Small cell lung cancer - SCLC):* KHAK, yoğun nükleuslu, dar sitoplazmalı, oldukça şiddetli bir tabiata sahip olan ve birçok büyüme faktörü içeren düzenli küçük hücrelerden oluşmaktadır. Tümör oluşumu, çoğunlukla bronşlarda başlar. Hızlı seyirli olduğundan dolayı, tanı konulduğu zaman bu tümörler çoğunlukla vücudun diğer bölümlerine (beyin, karaciğer ve kemik iliği) yayılmış olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu kanser türü, genellikle sigara içenlerde

görülmekte ve akciğer kanserlerinin %20-25'ini oluşturmaktadır (Zeren 2000, Otto 2001).

2) *Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK, Non-small cell lung cancer-NSCLC)*: KHDAK, küçük hücreli akciğer kanseri dışındaki diğer epitelyal akciğer kanseri türüdür. KHDAK, KHAK'den daha yavaş gelişim ve yayılım göstermektedir ve daha yaygındır. Tüm akciğer kanserlerinin %75-80'ini oluşturmaktadır. KHDAK, Adenokarsinom, Yassı (Squamöz, epidermoid) Hücreli Karsinom ve Büyük Hücreli Karsinom gibi alt grupları bulunmaktadır. Bu kanser türleri, benzer klinik ve biyolojik karakter gösterdiği için küçük hücreli dışı akciğer kanseri olarak aynı grupta toplanmaktadırlar.

- Yassı (squamöz, epidermoid) hücreli karsinom (SHK), KHDAK'lerinin %30 - 40'ını oluşturmaktadır. SHK'da hücreler büyük, basık ve tabakalı, çekirdek (nükleus) oranı yüksek ve tek sitoplazmalıdır (WHO 1981). Sıklıkla proksimal bronştan köken almaktadırlar ve orta veya zayıf farklılaşmış hücrelere sahip olması ile karakterize edilmektedirler. Bu kanserler, erkeklerde daha yaygındır. Yavaş büyümeye eğilimli olduğu için in situ karsinomdan belirgin tümör haline dönüşmesi 3 - 4 yıl sürmektedir. Nadir görülen metastaz yavaştır ve kanser en sonunda karaciğeri, adrenal bezleri ve lenf düğümlerini etkilemektedir. Çoğunlukla sigara içenlerde görülmektedir (Ginsberg ve Schmocker 1990).

- Adenokarsinomlar (ADK), KHDAK'lerinin yaklaşık %20 - 30'unu oluşturmakta ve çoğunluğu periferik olmak üzere yüzey epitelindeki bronşiyal mukoza bezlerinden köken almaktadırlar (Ginsberg ve Schmocker 1990). ADK'da hücreler belirgin nükleoluslu (çekirdekcik), veziküler nükleuslu ve geniş sitoplazmalı olup metastaz yeteneğine sahiptir. Sigara içimi ile daha az bağlantılı olan tümör tipidir ve kadınlarda daha yaygındır (Ertürk 2006).

- Büyük hücreli karsinomlar (BHK) ise nadir görülen tipi olup, KHDAK'lerinin yaklaşık %9'unu oluşturmaktadırlar ve farklılaşma göstermemektedirler (Ginsberg ve Schmocker 1990). BHK'da hücreler büyük nükleuslu ve belirgin nükleolusludur (Zeren 2000).

### 2.3.1. Akciğer kanserinin görülme sıklığı

Akciğer kanseri, dünyada tüm kanser türleri arasında en sık saptanan ve en ölümcül kanser türü olup 2008 yılında, 1,6 milyon olguya akciğer kanseri tanısı konulmuştur (Akkoçlu 2013). Akciğer kanseri, 20. yüzyılın başlarında nadir görülen bir hastalık iken, bugün hem erkeklerde hem kadınlarda kanserden ölümlerinin başında yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) raporuna göre; akciğer kanseri, tüm dünyada erkeklerde en sık ölüme neden olan birinci, kadınlarda ise ikinci kanser türüdür (WHO 2008).

Mortalitesi (ölüm oranı) oldukça yüksek olan bu kanser türü, hem erkeklerde hem de kadınlarda tüm kanser olgularının %13-15'inden, kanser ölümlerinin ise yaklaşık %20-30'undan sorumludur. Erkeklerde kadınlara göre iki kat daha sık rastlanmaktadır. Ama, zaman içinde meydana gelen sosyolojik değişiklikler kadınların da sigara kullanma alışkanlıklarının arttırmıştır ve bunun sonucunda kadınlarda da bu kanser türünün görülme sıklığı artmıştır. Akciğer kanserinin küresel insidans artış hızı, yılda %0,5 iken, özellikle kadınlarda her yıl %4,1 artış söz konusudur. Erkeklerde en yüksek insidans oranları, Doğu ve Batı Avrupa, Kuzey Amerika, Mikronezya, Polinezya ve Doğu Asya ülkelerinde görülürken, kadınlarda Kuzey Amerika, Kuzey Avrupa ve Avustralya/Yeni Zelanda ülkelerinde görülmektedir. Akciğer kanserinin en düşük sıklıkta rastlandığı ülke ise, Afrika'dır (Akkoçlu 2006, 2013, Jemal ve ark. 2011). Akciğer kanseri insidansı, Orta ve Doğu Avrupa'da 57/100 000; Kuzey Amerika'da 36/100 000 olarak saptanmıştır. Akciğer kanserli olgularda tanı sonrası 5 yıllık sağ kalım, 1974-1976 yılları arasında %12 iken, 1992-1997 yılları arasında çok az yükselmiş ve %15 oranına ulaşmıştır. Günümüzde kemoterapi etkinliğindeki ilerlemeye rağmen, akciğer kanserli erkeklerde 5 yıllık sağ kalım %14, kadınlarda ise %18 gibi düşük oranlarda kalmıştır (Jemal ve ark. 2002, Ece ve Mandel 2013). Bununla birlikte, erken evrelerde beş yıllık sağ kalım %60-70'dir ancak ileri evre olgularda bu oran %5'in altına düşmektedir (Travis ve ark. 1996, Mountain 1997, Ginsberg 2005).

Gelişmiş ülkelerde önceleri kanserden ölümlerin %34'ünden akciğer kanseri sorumlu iken, günümüzde %28'inden sorumludur. Bu azalmaların nedeni, gelişmiş ülkelerde sigara kullanımında belirgin azalma ve sigara içeriğinde yapılan değişikliklerdir.

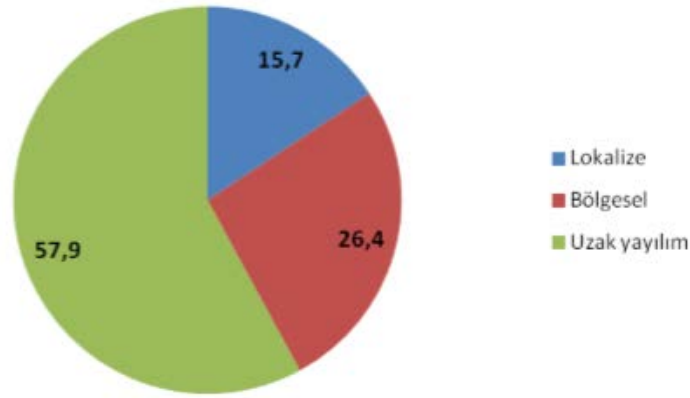
1980 yılı başlarında, hem ABD'de hem de Avrupa ülkelerinde başlatılan sigara karşıtı kampanyalar sonucu, erkeklerde sigara tüketiminin azalmasına bağlı, akciğer kanseri sıklığı ve mortalitesi de azalmaya başlamıştır. Ancak gelişmekte olan ülkelerde sigara kullanımında azalma olmaması bilakis artması sonucunda hem erkeklerde hem de kadınlarda tüm kanser ölümleri içinde önemli yerini korumakta ve belirgin artış gözlenmektedir (Akkoçlu 2013).

Akciğer kanserlerinin sıklığı tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de artmaktadır. Sağlık Bakanlığı verilerine göre; 1983-1989 yılları arasında Türkiye'de kanser insidansı 32/100 000 olarak hesaplanmıştır ve bu insidansın %26'lık bölümünü en sık görülen kanser türü olan akciğer kanseri vakaları oluşturmuştur. 1991-1992 verilerine göre solunum sistemi kanserlerinin oranı, tüm kanserler içinde %43 olarak bulunmuştur (Ertürk 2006). 2001 yılında İzmir ölçeğinde ilk defa topluma dayalı gerçek kanser insidans verileri yayınlanmıştır. İzmir Kanser İzlem Denetim Merkezi'nin 1993-1994 yılları verilerine göre; akciğer kanseri tüm kanserler içinde erkeklerde %38,6'lık oranla en büyük bölümü oluşturmaktadır. Kadınlarda ise %5,2'lik oranla 7. sıradadır (Fidaner ve ark. 2001). Sağlık Bakanlığı'nın Ocak 2014'de yayınladığı 2009 yılı verilerine göre; akciğer kanseri insidansı kadınlarda 8,1/100 000'dir ve tüm yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen 5. kanser türüdür (Gültekin ve Boztaş 2014). Ülkemizde kadınlarda en sık görülen kanser türleri ve insidansları Şekil 2.12'de gösterilmektedir.



**Şekil 2.12.** Kadınlarda en sık görülen ilk 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızlarının dağılımları (100 000 kişide) (Gültekin ve Boztaş 2014)

Aynı raporda, erkeklerde akciğer kanseri insidansının 66/100 000 olduğu ve en sık görülen kanserler arasında ilk sırada yer aldığı bildirilmiştir (bkz. Şekil 2.10). Akciğer kanserinin evreleri incelendiğinde; %57,9'unun uzak metastaz yaptığı tespit edilmiştir (Şekil 2.13). Akciğer kanserinin teşhisi genellikle geç olmaktadır ve hastaların yarısı ileri evrelerde teşhis edilmektedir. Bu nedenle de sağ kalım süreleri diğer kanserlere göre oldukça düşüktür (Gültekin ve Boztaş 2014). Bunun yanı sıra; her bir akciğer kanserli olgunun ortalama tedavi maliyetinin yaklaşık 20 000 TL olduğu göz önüne alındığında, hastalık yükünün önemli boyutlara ulaşmış olduğu görülmektedir (Ece ve Mandel 2013).



**Şekil 2.13.** Akciğer kanseri evrelerinin yüzde dağılımları (Gültekin ve Boztaş 2014)

### 2.3.2. Akciğer kanseri risk faktörleri

**Sigara:** Sigara kullanımı, akciğer kanserinin en sık görülen risk faktörüdür ve akciğer kanseri tanısı konulan olguların %94'ünden sorumludur (Akkoçlu 2013). Polisiklik hidrokarbonlar, aldehitler, peroksitler, nitrozaminler, benzopiren, vinil klorür, karbon monoksit, asit sinhidrik, aseton, naftalin, amonyak, toluidin, üretan, toluen, fenol, bütan, arsenik, radon, bizmut, kurşun, nikel, kadmiyum, berilyum, kadyum, polonyum 210 (radyoaktif madde) ve DDT (böcek öldürücü) sigara dumanında tanımlanmış olan karsinojenlerden birkaçı olup sigara dumanındaki 4000 çeşit zehirli kimyasal madde solunum yoluyla alınmaktadır (Alberg ve Samet 2003, Özlü ve Bülbül 2005, Jeong ve ark 2011). Bunların bir kısmı radyoaktif özelliktedir. Polisiklik hidrokarbonlar ve N-nitrozamin özellikle pro-karsinojenik olarak tanımlanmıştır (Akkoçlu 2013).

Bunun yanı sıra; pipo, puro ve diğer sigaralara benzer şekilde light sigara kullanımı da akciğer kanseri riskini arttırmaktadır (Molina ve ark. 2008).

Sigaranın akciğer kanseri nedeni olduğu yönünde ilk bulgular 1962 yılında yayınlanmıştır (Spiro ve Porter 2002). Sosyoekonomik düzeyi gelişmiş ülkelerde sigara tüketiminin başarılı olarak önlenmesiyle, bu ülkelerde akciğer kanseri sıklığı oldukça azalmıştır. Ancak; akciğer kanseri ölüm oranları, tütün tüketiminin arttığı gelişmekte olan ülkelerde hala belirgin bir şekilde artmaktadır. Günümüzde ortalama 1,2 milyar kişi sigara içmekteyken; 2030'lu yıllarda 2 milyar kişinin sigara bağımlısı olacağı tahmin edilmektedir (Anonim 2014d).

Akciğer kanseri riski; sigara içenlerde, içmeyenlere göre 24-36 kat daha fazladır. Pasif içicilik şeklinde, tütün dumanına maruz kalma da akciğer kanseri oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Pasif sigara içiminde risk, %3,5'tur. Sigara içme süresi, günde içilen sigara sayısı, içilen sigara tipi, sigaraya başlama yaşı, derin inhalasyon da kanser gelişimini etkilemektedir. Ayrıca sigaranın filtresiz olması ve yoğun katran içermesi de ek faktörlerdir (Akkoçlu 2013). Bununla beraber akciğer kanseri, sigara içmeyenlerde de görülebilmektedir. Akciğer kanserli erkeklerin %10 ve kadınların ise %20-25'inde gelişen akciğer kanserlerinin, sigara ile ilişkili olmadığı bildirilmiştir (Palmarini ve Fan 2001, Thun ve ark. 2008). Sigara içmeyen kişilerde görülen akciğer kanseri, çoğunlukla genetik faktörlerin, radon gazının ve hava kirliliğinin kombinasyonuna dayandırılmaktadır (Catelinois ve ark. 2006, Gorlova ve ark. 2007, Kabir ve ark. 2007). Gelişmiş ülkelerde sigara içimi prevalansı kadınlarda %20-40, erkeklerde %30-40 iken gelişmekte olan ülkelerde bu oranlar sırasıyla %2-10 ve %40-60'dır (İtil 2000). Dünya genelinde ise; erkeklerde %47-52, kadınlarda %10-12 sıklıkta sigara kullanımı olduğu tahmin edilmektedir (Spiro ve Porter 2002). Türkiye'de sigara içme oranlarının kadınlarda %24, erkeklerde %63 olduğu tahmin edilmektedir. Toplumumuzun büyük kısmını kapsayan yüksek sigara tüketimi göz önüne alındığında, günümüzde ve gerekli önlemler alınmazsa yakın gelecekte bir akciğer kanseri epidemisi ile karşı karşıya olduğumuzu söylemek yanlış olmaz. O halde akciğer kanseri mortalitesini önlemede en ucuz ve etkili yol, sigara tüketiminin azaltılmasıdır (İtil 2000, Akkoçlu 2013).

*Hava kirliliği:* Aromatik hidrokarbonlar gibi çeşitli bileşiklerin neden olduğu hava kirliliğine uzun süre maruz kalma, akciğer kanserine neden olan önemli çevresel faktörlerden birisidir. Nitekim kentlerde kırsal kesimde oturanlara göre akciğer kanseri gelişimi 1- 3 kat daha fazladır (Molina ve ark. 2008, Akkoçlu 2013). Hava kirliliğinin tüm akciğer kanser olgularının %1-2'sinden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (Doll ve Peto 1981, Kabir ve ark. 2007, Gorlova ve ark. 2007).

*Meslek:* Meslekleri nedeniyle asbest, radon, alüminyum, nikel, kadmiyum, krom, kömür, demir gibi kimyasal maddelere ve radyasyona uzun süre maruz kalan kişilerde akciğer kanseri görülme oranı yükselmektedir (Boffetta 2004). Özellikle gemi yapımı, yapı malzemeleri çıkarımı, çanak-çömlek imalatı, matbaa işleri, madencilik vb. mesleklerde çalışanlarda akciğer kanseri daha sık görülmektedir. Mesleki faktörlere bağlı olarak gelişen akciğer kanserli olguların yarısından fazlası asbest maruziyeti ile ilişkilidir. Asbest; gemi, uçak, otomobil, inşaat ve tekstil sektöründe kullanılmakta olan, doğada bulunan, ısıya ve kimyasal maddelere dayanıklı bir grup fibröz silikatın genel adıdır. Akciğer kanseri, asbest liflerinin inhalasyonuna bağlı olarak gelişebilmekte ve bu risk kümülatif asbest maruziyetiyle orantılı olarak artmaktadır. Sigara ile beraber asbest maruziyeti akciğer kanseri riskini sinerjistik olarak arttırmaktadır. Asbest maruziyetinde bu risk 5 iken, sigara ile birlikte olduğunda risk 50-100 kat artar. Mesleksel radon maruziyetinde risk 20 kat artmaktadır. (Craighead ve Mossman 1982, O'Reilly ve ark. 2007, Attanoos 2010).

*Beslenme:* Birçok epidemiyolojik çalışmada beslenmenin, akciğer ve diğer kanser risklerini orta derecede düşürdüğü gösterilmiştir. Bunları takip eden araştırmalarda, retinol veya vitamin A içeren retinoidlerin öncülü olan  $\beta$ -karotenin akciğer kanseri riski düşüklüğü ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Akkoçlu 2013). Vitamin E, C ve selenyum da benzer şekilde antioksidan etkiyle akciğer kanseri riskini azaltmaktadır. Son yıllarda kolesterolün akciğer kanseri riskini artırdığı da ileri sürülmektedir. Akciğer kanserinde diyetin, %5 oranında etkili olduğu ileri sürülmektedir (İtil 2000). Antioksidant vitaminler ve  $\beta$ -karoten gibi diğer mikrobisimler bakımından zengin diyetin akciğer ve diğer kanserlerin riskini azalttığı bildirilmekle birlikte bazı çalışmalarda bu besinlerin yüksek dozda alınmasının zarar verici olabileceği de işaret edilmektedir (Krinsky ve Johnson 2005, Ruano-Ravina ve ark. 2006).

*Genetik yatkınlık:* Son 60 yıldır akciğer kanserinin agregasyonu ve ailesel geçiş konusunda yapılan araştırmalar sonucunda, hastalığın gelişiminde kalıtsal faktörlerin de rol oynadığı ileri sürölmektedir ve akciğer kanseri gelişiminde; genetik aktarım, sigaradan sonra en önemli risk faktörüdür. Örneğin; P53 mutasyonu taşıyan ve sigara içen kişilerde, akciğer kanseri riskinin 3 kat arttığı bildirilmektedir (Hwang ve ark. 2003). Epidermal büyüme faktörü T790M mutasyonu taşıyan bir ailede ise çok sayıda KHDAK'li olgunun olduğu rapor edilmektedir (Li ve Hemminki 2004). P-450 enzim sisteminde yer alan aril-hidrokarbon hidroksilaz enzimi aktif olduğunda, sigara dumanında yoğun olarak bulunan polisiklik hidrokarbonları aktif karsinojenlere çevirmektedir ve akciğer kanseri riskini 8 kat artırmaktadır (Bilgel 2001). Kanserli hastaların birinci derece yakınlarında akciğer kanseri riski 2,4 kat artmaktadır (İtil 2000).

Epidemiyolojik açıdan bakıldığında akciğer kanseri, önlenebilir bir hastalıktır. Bilinen risk faktörleri elimine edildiğinde, %85-100 oranında gelişiminin azalabileceği tahmin edilmektedir. Bunun için öncelikle sigara kullanımını en aza indirecek ve tümüyle ortadan kaldıracabilecek önlemlerin alınması gereklidir (Akkoçlu 2013).

#### **2.4. *Rosmarinus officinalis* L. (Biberiye)**

Lamiaceae (Labiatae) familyasına ait olan *Rosmarinus officinalis* L. (biberiye) bitkisi, yurdumuzda doğal olarak yetişen önemli bir tıbbi ve aromatik bitki türüdür. Ülkemizde, kuşdili, hasalban, pürem, akpüren ve urum çiçeği gibi farklı isimlerle de anılmaktadır (Baytop 1984). *Rosmarinus*, Latince kelimesi, "denizin çiği" ya da "deniz nemi" anlamına gelmektedir. Genellikle deniz kenarlarında çok yaygın bulunmasından ve deniz iklimini çok sevmesinden dolayı bitki bu ismi almıştır (Sasikumar 2004).

Eski Yunan ve Romalılar döneminde biberiye, hem mutfakta yemeklerin lezzetlendirilmesinde hem de tıbbi, tedavi amaçlı kullanılmıştır. Antik çağlardan beri hafızayı artırıcı etkisi olduğuna inanılan biberiye, Eski Yunanlılar tarafından hafızayı güçlendirmek ve konsantrasyonu arttırmak için kullanılmıştır. Hafif uyarıcı özellikleri nedeniyle de çeşitli halk ilaçlarının bileşimine katıldığı bilinmektedir. Biberiyenin, İkinci Dünya Savaşı sırasında mikrobik hastalıkların bulaşmasını engellemek ve hastalıkları tedavi etmek için, hasta odalarında yakılmak suretiyle havanın



temizlenmesinde kullanıldığı bilinmektedir. 15. yüzyılda insanların veba salgınından korunmak için biberiye bitkisini kullandığı da söylenmektedir. Bunun yanı sıra, biberiye "bağlılık" sembolü olarak kabul edilerek düğün törenlerinde, "unutulmayacak olmanın" simgesi olarak da cenaze törenlerinde kullanılmıştır (Türker ve ark. 2011). Günümüzde ise biberiye; kozmetik, parfümeri, aromaterapi, eczacılık ve gıda gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Bitkinin yaprakları baharat ve tat verici olarak yemeklerde, uçucu yağı antioksidan olarak gıda sanayinde, parfümeride ve kozmetikte (sabun, krem, deodorant, kolonyalar, saç tonikleri, şampuanlar vb.) kullanılmaktadır. Ayrıca; biberiye ve biberiyeden elde edilen ekstralar, anti-bakteriyel ve antioksidan etkiye sahip olup et ve yağların kalitesinin bozulmadan saklanması da kullanılmaktadır (Gülbaba ve ark. 2002).

*Rosmarinus officinalis* L. (biberiye) bitkisi, Akdeniz ülkelerinde doğal olarak yetişen ve birçok ülkede kolayca kültürü yapılan aromatik bir bitkidir. Ülkemizin Akdeniz iklimi özelliklerine sahip batı ve güney kıyılarında doğal olarak yayılış göstermekle birlikte Marmara, Ege ve Akdeniz Bölgelerinin kıyı kesimlerinde süs bitkisi amacıyla yetiştirilmektedir. Türkiye'de biberiye bitkisinin doğal olarak en yoğun bulunduğu ve buna bağlı olarak da en fazla biberiye üretiminin yapıldığı Mersin ve Adana yöresinde biberiye bitkisinden yararlanma, tamamen doğal yayılış alanlarından bilinçsizce toplanma şeklinde olmaktadır. Biberiye bitkisinin doğal ortamlarından bilinçsizce toplanması bir çok riski de beraberinde getirmektedir. Bu durum, gen kaynaklarının erozyona uğramasına, elde edilen ürünün temiz, homojen ve standart olmamasına neden olmaktadır. Biberiyenin doğada bilinçsizce hasat edilmesinden ve doğal yetiştirme alanlarının yeni sanayi bölgelerine ve yerleşim alanlarına dönüştürülerek tahrip edilmesinden dolayı doğal yayılış alanları gün geçtikçe daralmaktadır. Dolayısıyla; biberiye, kontrolsüz ve aşırı toplama, hızlı sanayileşme ve arazi açmacılığı gibi nedenlerle yok olma tehlikesi ile karşı karşıya bulunmaktadır (Türker ve ark. 2011). Biberiye popülasyonunun doğal yetiştirme alanları daralmasına rağmen, son yıllarda talepteki artışa paralel olarak doğal alanlardan yapılan hasatta da artış olmaktadır (Gülbaba ve ark. 2002). 2012 yılında, ülkemizde biberiye ihracatının toplam 1 205 632 kg ve sağlanan yıllık gelirin de 2 613 616 \$ olduğu bildirilmektedir (Başer 2014).

*Rosmarinus officinalis* L. bitkisi haricinde *Rosmarinus* genusu, 4 bitki türü daha içermektedir. *Rosmarinus eriocalyx*, Kuzeybatı Afrika ve Güney İspanya'da doğal olarak yayılış göstermektedir. Bu bitki türü, diğer biberiye türlerinden yapraklarının küçük olması, yoğun tüylü çiçek saplarına sahip olması ve düşük büyüme göstermesi (25 cm-1 m) ile ayırt edilmektedir. *Rosmarinus tomentosus*, *Rosmarinus laxiflorus* ve *Rosmarinus lavandulaceus*, Akdeniz ülkelerinde yayılışı olan diğer türlerdir. *Rosmarinus palaui*, ilk kez 2002 yılında tanımlanmıştır ancak bu türün doğruluğu hala tartışma konusudur (Martin ve Bermejo 2000, Angioni ve ark. 2004, Anonim 2014e).

#### **2.4.1. Lamiaceae (Labiatae, Ballıbabagiller) familyası hakkında genel bilgiler**

##### **Lamiaceae Martinov, Tekno-Bot. Slovar: 355 (1820)**

Taksonomik sınıflandırmada tüm bitkiler akrabalık derecelerine göre gruplandırılarak familyalara ayrılmaktadır. Bu çalışmada kullanılan *Rosmarinus officinalis* L. bitkisi, Lamiaceae (Labiatae, Ballıbabagiller) familyasına ve *Rosmarinus* cinsine ait bitki türüdür. Bu familya bitkileri, bir veya çok yıllık otsu, nadiren çalı, bazen de sarılıcı formdadır. Gövdeleri dik ve dört köşelidir. Yapraklar; basit, stipulasız, bazen pinnat damarlı, bazen parçalı ve karşılıklı dekussat (karşılıklı çapraz) veya dairesel dizilişlidir. Bitkilerin gövde ve yapraklarında uçucu yağ taşıyan Labiatae tipi (sapı tek, başı 8 hücreli ve pul şeklinde) salgı tüyleri vardır. Çiçekler her nodda vertisillastrum durumunda, zigomorf ve bilabiattır. Çiçekler hermafrodit veya steril (dişi fonksiyonel)'dir. Brakteler yapraklara benzer veya belirgin şekilde farklılaşmıştır. Brakteoller mevcut veya eksiktir. Kaliks genelde 5 loblu üst lob 3 dişli, alt lob 2 dişlidir. Korolla gamopetal, zigomorfik ve bilabiattır, genellikle üst dudak indirgenmiş, alt dudak belirsiz 2 veya 3 loblu, dik ya da falkat, az çok konkavdır. Androkeum, 2 veya 4 stamenlidir, stamenler korolla yüzeyine yapışık ve stamen çoğu zaman didinamdır. Ginekeum, 2 karpelli ve 2 tohum taslaklı olup her biri çeperle 2 bölmeye ayrılmıştır. Ovaryum üst durumludur, stilüs ginobaziktir. Meyve, 4 nukstan (merikarp) meydana gelen bir şizokarptır. Familyanın polen morfolojisinin ayrıntılı incelenmesi sonucu karakteristik 3 veya 6 kolpuslu iki temel polen tipi bulundurduğu tespit edilmiştir. Lamiaceae familyası, birleşik petalli familyalar içerisinde ileri derecede gelişmiş olarak kabul edilmektedir. Bu durum, çiçek yapısının indirgenmiş ve böceklerle tozlaşmaya adapte olmasından dolayıdır. (Chadefaud ve Emberger 1960, Datta 1970, Seçmen ve ark. 2000, Akman ve Güney 2006).

Kozmopolit olan Lamiaceae (Labiatae) familyası, çok zengin bir familya olup 250 cins ve 7000 tür ile temsil edilmektedir (Kahraman ve ark. 2009). Bu familya üyeleri, Akdeniz ülkeleri başta olmak üzere Avustralya, Güney Batı Asya ve Güney Amerika'da yoğun yayılım göstermektedir (Temel 2000). Türkiye, Lamiaceae familyasının önemli gen merkezlerinden biridir. Türkiye'de Lamiaceae familyasının endemik türlerinin yoğunlaştığı alanlar Anadolu çaprazı, Toroslar ve Amanoslardır (Hedge 1986).

Lamiaceae familyası, ülkemizde 45 cinste yaklaşık 574 tür ile temsil edilmektedir. Ülkemizde, Lamiaceae familyasının 257 türü endemiktir. Endemizm oranı yaklaşık %44,7 olan bu familya, içerdiği takson sayısı bakımından Türkiye'nin en zengin üçüncü familyası konumundadır (Davis ve ark. 1982, 1988, Güner ve ark. 2000, Kahraman ve ark. 2009, Güner ve ark. 2012).

#### **2.4.2. *Rosmarinus officinalis* L.'in sistematikteki yeri**

Taksonomik Botanik, evrim kuralları içinde tüm bitki türlerini, birbirleriyle olan yakınlıklarına ve akrabalıklarına göre belirli gruplar içinde sınıflandırmaktadır (Davis ve ark. 1982, Akman ve Güney 2006, Güner 2012).

<b>Regnum</b>	: Plantae
<b>Divisio</b>	: Spermatophyta (Phanerogamae)
<b>Subdivisio</b>	: Angiospermae
<b>Classis</b>	: Dicotyledoneae
<b>Subclassis</b>	: Gamopetalae
<b>Ordo</b>	: Lamiales
<b>Familia</b>	: Lamiaceae (Labiatae)
<b>Species</b>	: <i>Rosmarinus officinalis</i> L., sp. PI.23 (1753)-Biberiye

### 2.4.3. *Rosmarinus officinalis* L.'in genel özellikleri ve yayılış alanları

#### *Rosmarinus oficinalis* L., sp. PI.23 (1753)

*Rosmarinus oficinalis* L. (biberiye) bitkisi; 50-100 cm yükseklikte, çalı görünümünde, kışın yaprağını dökmeyen ve 2 m'ye kadar boylanabilen çok yıllık bir bitkidir. Bitkinin gövdesi lifsi yapıda, ince, çok dallı ve diktilir. Gövde ve genç dallar dört köşelidir; gövde, bitkinin ikinci yılında odunsu hale dönüşmektedir. Yaz - kış yeşil kalan yapraklar, 2-4 cm uzunluğunda, 2-4 mm genişliğinde olup sık dallara yapışıktır ve karşılıklı dizilmişlerdir. Yapraklar; dar, linear (şeritsi), derimsi, mızraksı ve serttir; yaprak ucu ise küttür. Yaprakların kenarları düz olup alt tarafa doğru kıvrıktır (revolut) ve taban kısmı çok kısa sap şeklinde daralmıştır. Yaprakların kenarları, alt yüzündeki tüylü olukların içinde bulunan ve bitkinin solunumunu sağlayan gözenekleri koruyabilmek için içe doğru kıvrılmıştır. Bazı yörelerde, biberiyeye "kuşdili" denmesinin nedeni yaprakların bu görünümünden kaynaklanmaktadır. Yaprakların üst yüzeyi tüysüz ve parlak koyu yeşil renklidir; alt yüzeyi ise çok sayıda tüylerle kaplıdır ve soluk gri-yeşil renklidir (Şekil 2.14).



**Şekil 2.14.** *Rosmarinus officinalis* L. **A.** Genel görünüm **B.** Çiçekli ve yapraklı dal (Anonim 2004, Anonim 2014e)

Bitkinin çiçekleri soluk mavi, mavimsi beyaz, mor ve eflatun renkli olup yaprak diplerinden çıkarlar. Çoğunlukla dalların ucunda ve yaprak koltuklarında küçük topluluklar halinde bulunurlar. Kaliks tüp şeklinde, iki dudaklı ve çok tüylüdür.

Korolla da t p  eklinindedir ve iki dudaktan oluşmaktadır. Üst dudak dardır ve iki loptan oluşmaktadır, alt dudakta da     dar lop bulunmaktadır. Alt dudağın orta lobu diğerlerinden daha büyük ve çukurdur. Androkeum, 2 stamenlidir; filament ise korolla tüpünden daha uzun, kıvrık, mor renklidir ve tabanında k   k bir diŐ yapısında çıkıntısı vardır (Şekil 2.15). Ginekeum, iki karpelden oluşmaktadır, stil s uzun ve kıvrık, stigma ise iki parçalıdır.  i eklerinde nektaryum bulunur. Biberiye, kış sonu ve ilkbahar baŐlangıcında  i eklenmektedir. Vejetasyon mevsimi dışında, kış aylarında ise yoğun olarak açan çiçekleri ile arılar için iyi bir nektar kaynağı oluŐurmaktadır. Tohumları, sarımsı kahverengi olup yağlı ve k   kt r. Meyvesi ise; esmer, k   k fındıksı yapıdadır (Baytop 1984, IŞık 2010, Türker ve ark. 2011, Arı ve ark. 2013).



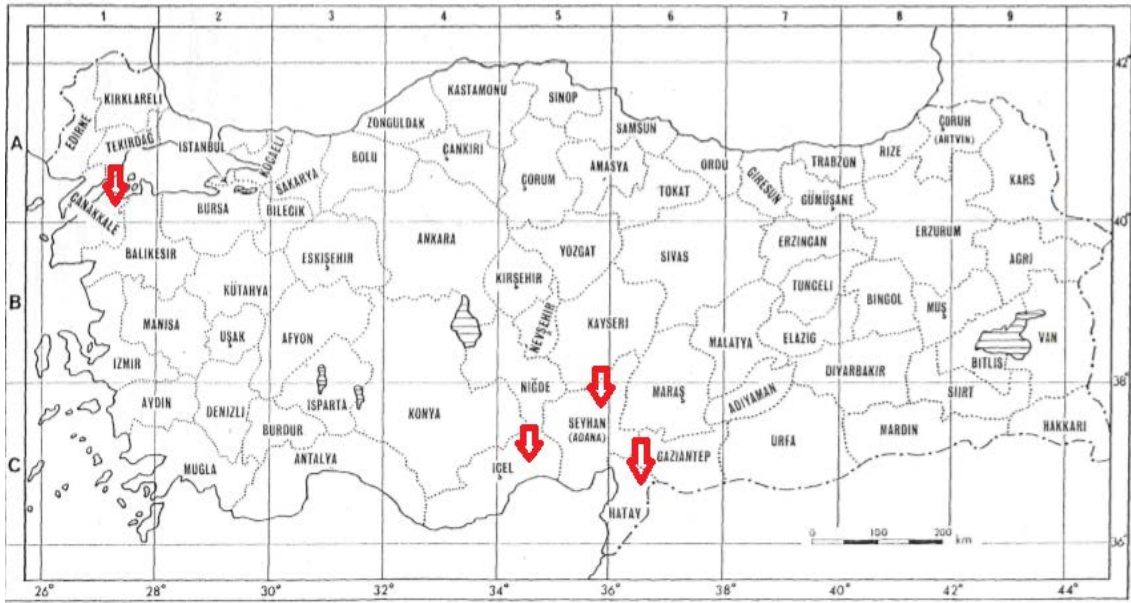
**Şekil 2.15.** *Rosmarinus officinalis* L. **A.**  i ek yapısı **B.** Androkeum (erkek organ) ( apacı 2009, Gaither 2014)

Biberiye bitkisinin ana yurdu Akdeniz havzası olup bir Akdeniz elementidir. Dünya'da, Fransa'nın güney bölgesinden baŐlayarak, ülkemizin de dahil olduğu bir kuŐak üzerinde ve Afrika'nın kuzeyinde yer alan ülkelerden Tunus ve Cezayir kıyılarında, genellikle de Akdeniz makileri içerisinde doğal olarak yayılış göstermektedir. Akdeniz  lkeleri ile Amerika Birleşik Devletleri ve İngiltere'de s s bitkisi olarak ve aromatik yağı için

yetiştirilmektedir. Esas kökeni Akdeniz Bölgesi olan bu bitkinin kültürünün en çok yapıldığı ülkeler Fransa, İspanya, Portekiz, İngiltere, İtalya, Yunanistan, Balkan Ülkeleri, Tunus, ABD ve Meksika'dır (Anonim 1987, Aysel 2008).

### **Rosmarinus officinalis L. bitkisinin Türkiye'deki yayılış alanları:**

Ülkemizde Akdeniz iklimine sahip Kuzeybatı ve Güney Anadolu kıyı şeridinde, en yoğun olarak da Doğu Akdeniz Bölgesinde doğal olarak yayılış gösterir. Davis (1982), *Rosmarinus officinalis* L. bitkisinin Türkiye'deki yayılış alanlarını şu şekilde tanımlamıştır: A1 (A) Çanakkale: Erenköy, Sint. 1883:76, C5 İçel: Tarsus ile Ulaş, 250 m, D. 26356, Adana: Adana'dan Kozan'a 29 km, 150 m, D. 26232, C6 Hatay: İskenderun, Rogers 0600, Is: Khios, Kerfas (Sakız Adası), 30-100 m, Greuter 10710, Samos (Sisam), 100 m, Rech. 3777. Biberiyenin ülkemizdeki yayılış alanları Şekil 2.16'da gösterilmektedir.



**Şekil 2.16.** Türkiye'de *Rosmarinus officinalis* L. populasyonlarının coğrafik yayılış alanları (Davis ve ark. 1982)

### **Rosmarinus officinalis L. bitkisinin ekolojisi:**

*Rosmarinus officinalis* L., ılıman iklim bitkisidir; sıcak ve güneşli ortamları sever. Toprak isteği yönünden fazla seçici bir bitki değildir; kalkerli, kumlu, killi, balçıklı

topraklarda yetişebilmektedir. Bitki, 9-28°C sıcaklık değerlerine, 4,5-8,7 toprak pH'sına ve kayalıktan kumlu topraklara kadar geniş bir toleransa sahiptir. Bitki, yeterli drenaja sahip ve minimum toprak derinliğinin 0,2 cm olduğu topraklarda yetişebilmektedir. Fazla dallanan odunlaşmış kökleri sayesinde kuraklık stresine karşı dayanıklıdır ancak sert kış koşullarına karşı dayanıklı değildir. Bitki su stresine karşı anatomik ve hücrenel bazda güçlü bir adaptasyon göstermektedir. Bitkinin, ciddi hastalık ve zararlısı bulunmamaktadır. (Simon ve ark. 1984, Olmos ve ark. 2007).

#### **2.4.4. *Rosmarinus officinalis* L.'in kimyasal kompozisyonu ve biyolojik aktiviteleri**

Biberiye bitkisinin kimyasal kompozisyonunun ortaya konduğu bilimsel çalışmalarda, biberiye yaprağında genel olarak %1-2,5 oranında uçucu yağ bulunduğu bildirilmiştir. Uçucu yağ, doğrudan yaş veya kurutulmuş biberiyeden ya da biberiyenin su buharı-su distilasyonu ile elde edilebilmektedir (Basmacıoğlu-Malayoğlu 2010, Haksel 2013). Biberiye uçucu yağı; %15-50 1,8-cineole, %15-25  $\alpha$ -pinene, %10-25 camphor (kafur), %7 champhene, %6  $\beta$ -pinene, %5 borneol, %5 myrcene, %3 bornyl acetate ve %2  $\alpha$ -terpineol içermektedir. Uçucu yağın diğer bileşenleri ise;  $\beta$ -caryophyllene, linalool, limonene, verbenone, sabinene ve 2-etil-4,5-dimetilfenol'dür (Bayrak ve Akgül 1989, Panizzi ve ark. 1993, Baratta ve ark. 1998a, Pintore ve ark. 2002, Kabouche ve ark. 2005, Bayrak 2006, Çeliktaş ve ark. 2007a, Gachkar ve ark. 2007, Fu ve ark. 2007). Uçucu yağ ve bu yağın temel bileşenlerinin oranları; bitkinin yetiştiği bölgeye, iklim türüne, hasat zamanına, bitkinin gelişim evresine, genetik yapıya ve ekstraksiyon metotlarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Ruberto ve Barata 2000, Lopez ve ark. 2005, Ramirez ve ark. 2006, Çeliktaş ve ark. 2007, Okoh ve ark. 2010).

*Rosmarinus officinalis* L. uçucu yağ veriminin, bitkinin coğrafik kökenine bağlı olarak gösterdiği değişiklikler ile ilgili bilimsel literatürde farklı çalışmalar bulunmaktadır. Farklı doğal alanlardan toplanan Sardinya'ya özgü *R. officinalis* L. bitkisinin uçucu yağ verimindeki farklılıkların araştırıldığı bir çalışmada; kuzeye ve doğuya ait örneklerden elde edilen verimin, güneye ve merkeze ait örneklerden elde edilen verimin ortalama olarak 2 katı olduğu rapor edilmiştir (Angioni ve ark. 2004). Başka bir çalışmada; Tunus için endemik olan ve farklı biyo-iklimlerde büyüyen *R. officinalis* var. *typicus* ve

var. *trogodytorum* bitkilerinin uçucu yağ verimi tanımlanmış ve üst yarı kurak zonlardaki bitkilerden elde edilen uçucu yağ veriminin, alttaki nemli zonlardaki bitkilerden elde edilen uçucu yağ veriminin 2 katı olduğu saptanmıştır (Zaouali ve ark. 2010). *Rosmarinus officinalis* L. bitkisinin uçucu yağ bileşimi ve anti-bakteriyel aktivitesi üzerinde biyoklimatik alanın etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada, çalışılan biyoklimatik zonlar arasında hiçbir edafik farklılığın bulunmaması, uçucu yağ üretim seviyelerinde iklimin de önemli bir rol oynadığını ileri sürmüştür. Çalışmada; aynı varyeteler arasında biberiye uçucu yağ veriminin, daha düşük sıcaklık indekslerine sahip biyoklimatik alanda artış gösterdiği tespit edilmiştir (Jordan ve ark. 2013).

Başka bir çalışmada, *Rosmarinus officinalis* L.'in farklı lokasyonlarda ve zaman aralıklarındaki uçucu yağ kompozisyonu ve anti-mikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Çalışmada; *R. officinalis* L. bitkisinin uçucu yağlarındaki 1,8-cineole içeriğinin, Mersin'den toplanan bitkilerde en yüksek değere, Çanakkale'den toplanan bitkilerde en düşük değere sahip olduğu ancak Çanakkale'den elde edilen biberiye uçucu yağının, diğer illerden elde edilen biberiye uçucu yağlarına kıyasla, champhor ve verbenone bakımından daha zengin olduğu ortaya konmuştur. Aynı çalışmada, *R. officinalis* L. bitkisinin uçucu yağlarının lokasyona ve zamana bağlı anti-mikrobiyal aktivitesi de test edilmiştir. Mersin, Çanakkale ve İzmir uçucu yağlarının ortalama anti-mikrobiyal aktiviteleri göz önüne alındığında; en yüksek aktiviteleri mart ayında toplanan örneklerin gösterdiği tespit edilmiştir. Lokasyona bağlı anti-mikrobiyal aktiviteler incelendiğinde; Çanakkale ve İzmir uçucu yağlarının anti-mikrobiyal aktivitelerinin, Mersin uçucu yağlarının anti-mikrobiyal aktivitelerinden daha yüksek olduğu saptanmıştır. (Yeşil-Çeliktaş ve ark. 2007).

Bu sonuçlardan açık olarak görülmektedir ki biberiye uçucu yağı bitkilerin yetiştiği alanlardan etkilenmektedir. Fakat bu parametreleri değiştiren temel edafoklimatik faktörler açık değildir.

Uçucu yağ dışında, ekstraksiyon yöntemleri (solvent, süperkritik CO<sub>2</sub> vb.) ile elde edilen *Rosmarinus officinalis* L. ekstraktları da önemli etken maddeler içermektedir. Literatürde biberiye için rapor edilen en sık kullanılan ekstraksiyon solventi; su, etanol, metanol ve asetonur. Bu solventler; karnosik asit, rosmarinik asit, rosmanol, karnosol ve luteolin-7-O-glukozit gibi temel bileşenlere sahip biberiye ekstresinin elde edilmesini



sağlamaktadır (Cuvelier ve ark. 1996, Herrero ve ark. 2010, Zimmermann ve ark. 2011, Kontogianni ve ark. 2013).

*R. officinalis* L. ekstresinin temel bileşenleri şu şekilde gruplandırılabilir:

**-Fenolik diterpenler:** Karnosik asit, karnosol (pikrosalvin), rosmanol, rosmadial, epirosmanol, isorosmanol, apirosmanol, rosmaridifenol, rosmariquinon, rosmakinon A, rosmakinon B, metil karnosat, dimetilisorosmanol, sekohinokiol, royleanonik asit, 12-metoksi-trans-karnosik asit, 12-metoksi-cis-karnosik asit.

**-Fenolik asitler (Kafeoil türevleri):** Rosmarinik asit.

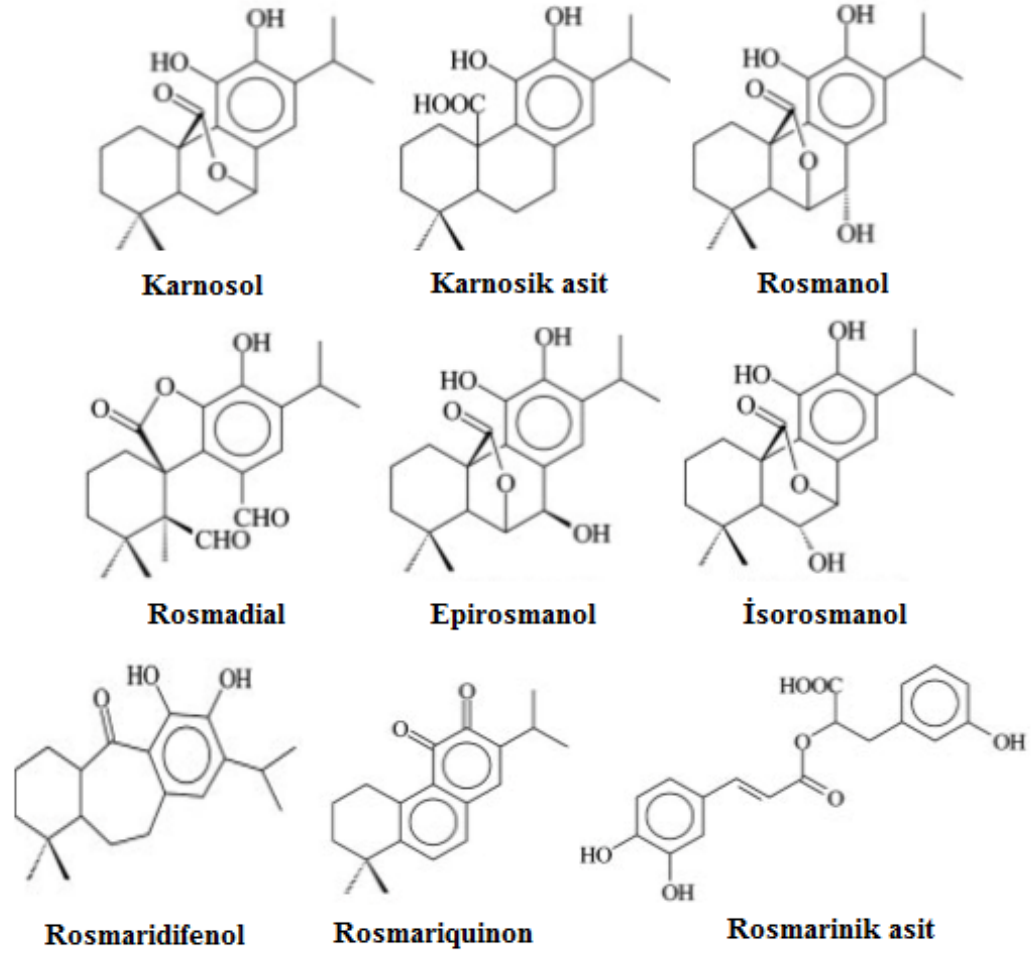
**-Triterpenler:** Betulin, betulinik asit, 23-hidroksibetulinik asit, mikromerik asit, oleanolik asit, ursolik asit, roffiseron.

**-Flavonoidler:** Diosmin, diosmetin, eriositrin, genkvanin, hesperidin, luteolin, nepetin, nepitrin, sirsimaritin.

**-Karotenoitler ve  $\alpha$ -tokoferol**

(Bracco ve ark. 1981, Nakatani ve Inatani 1981, 1983, 1984, Houlihan ve ark. 1984, 1985, Fraga ve ark. 1985, Tomas-Barberan ve ark. 1986, Munne-Bosch ve ark. 1992, Ganeva ve ark. 1993, Huang ve ark. 1994, Okamura ve ark. 1994, Cuvelier ve ark. 1996, Torre ve ark. 2001, Abe ve ark. 2002, del Bano ve ark. 2003, 2004, Oluwatuyi ve ark. 2004, Cantrell ve ark. 2005, Mahmoud ve ark. 2005, Perez-Fons ve ark. 2006, Yanishlieva ve ark. 2006, Altinier ve ark. 2007).

*Rosmarinus officinalis* L. ekstresinde bulunan söz konusu 9 fenolik bileşik, antioksidan etkiye sahip olup kimyasal yapıları Şekil 2.17'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.17.** *Rosmarinus officinalis* L. bitkisinin antioksidan etkili bileşenleri (Yanishlieva ve ark. 2006)

*Rosmarinus officinalis* L. (biberiye) bitkisinden elde edilen uçucu yağ ve ekstreler; anti-tümör (anti-kanser), antioksidan, anti-mikrobiyal, anti-HIV, anti-inflamatuar ve anti-ülserojenik gibi ilgi çekici bir dizi biyolojik aktiviteye sahiptir (Inatani ve ark. 1983, Houlihan ve ark. 1985, Aruoma ve ark. 1992, 1996, Paris ve ark. 1993, Haraguchi ve ark. 1995, Offord ve ark. 1995, Cuvelier ve ark. 1996, Frankel ve ark. 1996, Richheimer ve ark. 1996, Takenaka ve ark. 1997, Dias ve ark. 2000, Sotelo-Felix ve ark. 2002, Dorman ve ark. 2003).

Pek çok çalışma; *Rosmarinus officinalis* L. ekstrelerinin meme, prostat, lökemiya, akciğer, karaciğer ve ovaryum hücre hatlarını içeren bir dizi insan kanser hücre hattı karşısında önemli anti-proliferatif aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir (Cheung ve Tai 2007, Yeşil-Çelikaş ve ark. 2010). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada serbest radikallerin yol açtığı DNA tahribatından hücreyi koruduğu görülmüştür (Sasikumar 2004). Başka bir çalışmada, biberiye ekstresinin 35,6 µg/ml'lik IC<sub>50</sub> değeri ile RINm5F (fare insülinoma m5F hücresi) hücrelerinin canlılığını azalttığı gösterilmiştir (Kontogianni ve ark. 2013). Tai ve ark. (2012) tarafından yürütülen araştırmada, etanollü biberiye ekstresinin A2780 insan ovaryum kanser hücre hatları üzerinde doza bağlı anti-proliferatif etki gösterdiği ortaya konmuştur. 5-Fluorourasil (5-FU), kolorektal kanserinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik bir ajandır. Ancak bu ilaca karşı direnç, diğer ilaçlara nazaran daha sık görülmektedir ve bu direncin üstesinden gelebilmek için acilen yeni stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, süperkritik akışkan biberiye ekstresinin doza bağlı olarak anti-tümör aktiviteler sergilediği, 5-FU ile kombinasyonun kolon kanseri hücre hatları üzerinde sinerjistik bir etki uyguladığı ve 5-FU dirençli hücrelerini duyarlı hale getirdiği saptanmıştır (Gonzalez-Vallinas ve ark. 2013). Başka bir çalışmada, formüle edilmiş biberiye tozunu içeren bir filtrenin, sigara dumanındaki oksijen-kaynaklı radikallerden kaynaklanan BPDE-dG (benzo (a) piren (BP)-7,8-diol-9,10-epoxide-N<sup>2</sup>-deoxyguanosin) seviyesini önemli ölçüde düşürebildiği tespit edilmiştir (Alexandrov ve ark. 2006).

*Rosmarinus officinalis* L. bitkisinden elde edilen ekstreler, serbest radikal süpürücü özellikleri ile güçlü antioksidan aktiviteler göstermektedir. Her ne kadar bazı araştırmacılar (Baratta ve ark. 1998a, Gachkar ve ark. 2007) tarafından biberiye uçucu yağının antioksidan etkisi saptanmış olsa da 1,8-cineole, α-pinene, camphor ve verbenone gibi uçucu yağ bileşenlerinin anti-mikrobiyal etkisinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Pandit ve Shelef 1994, Baratta ve ark. 1998b, Moghtader ve Afzali 2009). Karnosik asit, karnosol, isorosmanol, rosmaridiphenol, rosmariquinone, rosmarinik asit, hidroksisinnamik asit esteri, biberiyede bulunan temel antioksidan bileşenlerdir (Troncoso ve ark. 2005).

Gıdaların hazırlanması ve tüketilmesi sırasında ortaya çıkan en önemli değişikliklerden biri oksidasyondur. Antioksidanlar, gıdanın temel maddesi olan lipidlerin oksidasyonunu önleyerek ürün kalitesini korumaya yardımcı olurlar. Bu amaçla, uzun yıllar gıda sektöründe BHA (butilat hidroksianisol), BHT (butilat hidroksitoluen), propil gallat (PG), tersiyer hidroksiquinon (TBHQ) gibi sentetik antioksidanlar ile  $\alpha$ - tokoferol asetat,  $\beta$ -karoten ve Vitamin C gibi doğal antioksidanlar yaygın olarak kullanılmıştır. Sentetik antioksidanlarının insan sağlığı üzerinde toksik etkilerinin olabileceğinin bildirilmesi ve bu nedenle kullanımlarına sınırlama veya yasaklama getirilmesi; sağlık otoritelerinin bitkisel antioksidanları güvenilir ürünler olarak açıklamaları ve bilinçli tüketicilerin doğal ürünleri tercih etmeleri bitkisel ürünlerin kullanımını gündeme getirmiştir. Yapısında flavonoidler, fenolik bileşikler ve onların türevleri olan bitkisel ürünlerin oto-oksidasyonu önlemede etkili oldukları ortaya konmuş ve etki mekanizmaları serbest radikalleri temizleme, metal iyonlarla bileşik oluşturma, oksijen oluşumunu engelleme veya azaltma şeklinde açıklanmıştır. Ayrıca bu bileşikler aromatik halkalarının hidroksil gruplarındaki hidrojeni vererek besin maddelerinin serbest radikallerce okside olmalarını engellemektedir (Basmacıoğlu-Malayoğlu 2010).

Özellikle son yıllarda fenolik bileşiklerce zengin adaçayı, kekik, biberiye ve karanfil gibi tıbbi ve aromatik bitkilerin gıdalarda koruyucu madde olarak kullanımlarına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Bunlar arasında *R. officinalis* L. üzerinde yoğun olarak çalışılmıştır (Basmacıoğlu-Malayoğlu 2010). Avrupa Birliği (EU) son günlerde, gıda koruması için biberiye ekstrelerinin kullanılmasına onay vermiş ve (EU) Gıda Katkı Mevzuatı içine eklenmiştir (Aguilar ve ark. 2008). Ayrıca, günümüzde söz konusu bitki, Avrupa'da ve ABD'de antioksidan olarak kullanıma sunulan tek ticari ürün durumundadır (Bozin ve ark., 2007). Biberiye, son günlerde et ve et ürünlerinin, yağ içeren gıdaların bozulmadan uzun süreli muhafazasında doğal koruyucu ve antioksidan madde olarak kullanılmaktadır.

Alzheimer hastalığı, günlük fonksiyonları engelleyebilecek kadar şiddetli entellektüel ve sosyal beceri kayıplarının görüldüğü ciddi bir unutkanlık hastalığıdır (Cummings 2004, Mattson 2004). Son birkaç yıl içinde bazı sentetik bileşikler (takrin, rivastigmin, donepezil ve galantamin), klinik amaçlı kullanılmaktadır fakat bu bileşiklerin hiçbirisi hastalıkları durdurma özelliğine sahip değildir. Asetilkolinin inaktive edilmesinde

anahtar enzim olan asetilkolinesterazın (AChE) inhibisyonu, Alzheimer hastalığı, yaşlılık bunaması, kas koordinasyon bozukluğu ve otoimmün kas hastalığı (myasthenia gravis) gibi birkaç nörolojik bozukluğun karşısında tedavi stratejilerinden biri olarak düşünülmektedir (Mukherjee ve ark. 2007, Orhan ve ark. 2006). Bu amaçla; Orhan ve ark. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada, Türk biberiyesi (*Rosmarinus officinalis* L.)'nin asetilkolinesteraz ve bütrilkolinesteraz enzimleri üzerindeki inhibitör etkisi araştırılmıştır. Çalışmada; *R. officinalis* L.'in petrol eterli, kloroformlu, etil asetatlı ve metanollü ekstralarının asetilkolinesteraz ve bütrilkolinesteraz enzimlerini inhibe etme yeteneklerinin bulunmadığı fakat uçucu yağın bu enzimler karşısında oldukça aktif olduğu rapor edilmiştir (Orhan ve ark. 2008).

*R. officinalis* L. bitkisinin sulu ekstresinin, farelerdeki üriner sistem üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; ekstrenin elektrolitlerin ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ve  $\text{Cl}^-$ ) atılımını arttırdığı ve dikkate değer bir diüretik aktiviteye sahip olduğu ortaya konulmuştur (Haloui ve ark. 2000).

Yapılan çalışmalarda, *R. officinalis* L. bitkisinin insektisit, antimikrobiyal ve fungusit gibi etkilerinin de bulunduğu belirtilmiştir. İnsektisit olarak *Sitophilus granarius*'a ve *Acanthoscelides obtectus*'e karşı etkilidir. *Listeria monocytogenes*'i ve *Aspergillus niger*'i yok edici özelliğe sahiptir. Ayrıca, gram-negatif bakterilerinden olan *Staphylococcus aureus*'un ve *S. epidermidis*'in bitkinin uçucu yağına karşı hassas olduğu bildirilmiştir. Bitki patojeni olan *Streptomyces scabies*'i yok edici olduğu da laboratuvar çalışmalarında görülmüştür (Sasikumar 2004). *R. officinalis* L., bu özellikleri ile bitkisel, doğal pestisit olarak kullanılmaktadır.

*Rosmarinus officinalis* L.'in anti-kanser, antioksidan ve anti-HIV aktiviteleri, içerdiği karnosol, karnosik asit, betulinik ve ursolik asit gibi temel bileşenlere dayandırılmaktadır (Kontogianni ve ark. 2013). Karnosik asit ve karnosol, bitkinin yapraklarındaki majör fenolik bileşiklerdir ve biberiyenin antioksidan, anti-inflamatuar ve sitotoksik özelliklerinin temel sorumluları olduğuna inanılmaktadır (Cheung ve Tai 2007, Bai ve ark. 2010, Mulinacci ve ark. 2011). Doğal bir diterpen olan karnosik asit, kurutulmuş biberiye yapraklarında %1,5-2,5 oranında bulunmaktadır.

Biberiyenin en potansiyel antioksidan ajanı olarak bilinen karnosik asit aynı zamanda etkili anti-kanser aktiviteler de sergilemektedir. Yeşil-Çelikleş ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, 6,25 µg/ml (18,8 µM) konsantrasyondaki karnosik asidin prostat kanseri hücre hatlarının (DU-145 ve PC3) hücre canlılığını sırasıyla %13 ve %20 oranında azalttığı saptanmış olup bu çalışmayla, karnosik asidin prostat kanseri hücre hatlarında önemli sitotoksik ve büyüme engelleyici özelliklere sahip olduğu bulunmuştur. Karnosik asit, prostat kanserinin yanı sıra, insan lökemiya, meme, akciğer ve karaciğer kötü huylu dokularından elde edilen çeşitli hücre hatları karşısında da sitotoksik etkiler göstermektedir (Yeşil-Çelikleş ve ark. 2010). Karnosol, karnosik asidin oksidatif bozulma ürünüdür. Karnosolün; anti-inflamatuar, antioksidan, anti-mikrobiyal, anti-kanser ve nöroprotektif (sinir koruyucu) gibi sayısız farmakolojik özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. Bir çok çalışmada, karnosolün prostat, meme, cilt, kolon ve lökemiya gibi birçok kanser hücre hattında anti-karsinojenik etkiler gösterdiği saptanmıştır. Karnosol, lökotriyenleri azaltma yeteneği sayesinde anti-inflamatuar özellikler sergilemektedir (Gajhede ve ark. 1990, Poekkel ve ark. 2008, Johnson 2011).

*R. officinalis* L. bitkisinin temel bileşenleri olan karnosolün ve karnosik asidin *in vivo* ve *in vitro* anjiyogenezin potansiyel inhibitörleri olup olmadığının araştırıldığı bir çalışmada; her iki bileşiğinde endotelial proliferasyon, göç, farklılaşma ve proteolitik kapasite olarak adlandırılan anjiyogenez sürecinin farklı adımlarını etkileyerek *in vivo* ve *in vitro* anjiyogenezini önleyebildiği rapor edilmiştir (Lopez-Jimenez ve ark. 2013).

Bu etkilerin yanı sıra, *R. officinalis* L. ekstresini oluşturan karnosol ve karsonik asit, HIV virüsünün bulaşmasını engelleme konusunda da önemli bir aktiviteye sahiptir. Ayrıca, hücrelere karşı herhangi bir toksik etkisi bulunmamaktadır (Sasikumar 2004).

*Rosmarinus officinalis* (biberiye) L. ile ilgili yapılan klinik denemeler eksik olmasına rağmen; geleneksel olarak oluşmuş tecrübeye dayalı bir bilgi ve güven birikimi vardır. Geleneksel tıpta; Folia Rosmarini (biberiye yaprakları), dahilen dispeptik rahatsızlıklarda kullanılmaktadır. İnce bağırsakta ve safra kesesi kanalı üzerinde antispazmodik, safranın serbestçe akışını sağlayan koleretik etkisi bulunmaktadır. Ayrıca, karminatif (gaz söktürücü), stomaşik (iştah açıcı ve hazım sistemi uyarıcısı), kalp ve karaciğer güçlendirici, safra artırıcı ve idrar söktürücü olarak kullanılmaktadır. Solunum sistemi bozukluklarında özellikle astımda, solunum borusu ve gırtlak

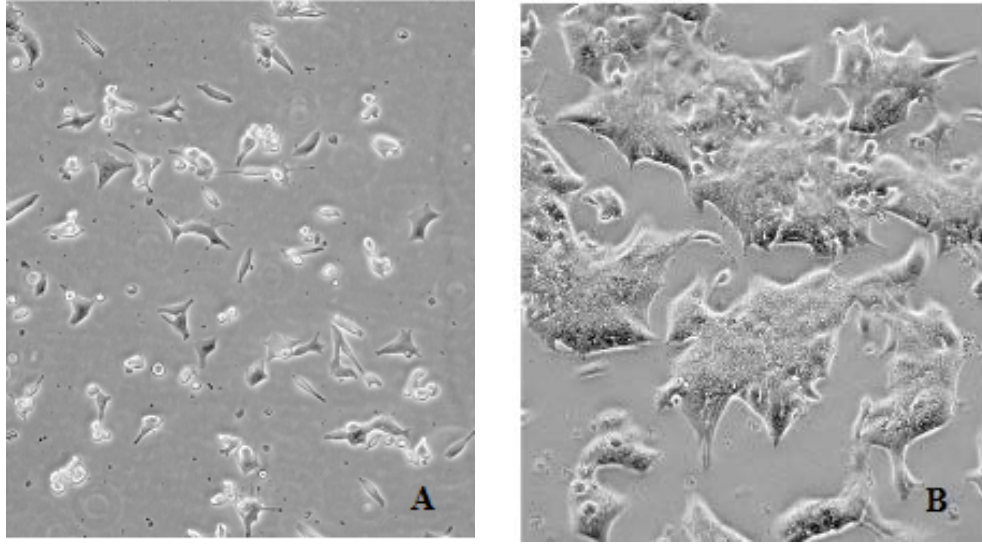
iltihaplarında, ağız içi mukozası iltihabında kullanılmasının yanında stimulan (uyarıcı) ve emanagog etkisi de bulunmaktadır. Harici olarak; genelde lapa şeklinde uygulanarak iltihaplı yaraların ve egzamanın tedavisinde kullanılmaktadır. Biberiye yaprakları; çorbalarda, balık, et ve sebze yemeklerinde, salatalarda lezzet verici olarak tüketilmektedir. Oleum Rosmarini (biberiye esansı veya uçucu yağı) ise; romatizma, kas ve baş ağrılarında, düşük basınçtan kaynaklanan kronik dolaşım bozukluklarında, hipertansiyonda, sinir sistemi bozukluklarında, kan akımını hızlandırmada, burkulma ve ezilmelerde kullanılmaktadır. Bu kullanımların yanı sıra; uçucu yağ, gıda maddelerinde, parfümeride ve kozmetikte (sabun, krem, deodorant, saç tonikleri, şampuanlar vs.) de kullanılmaktadır (Karamanoğlu 1977, Al Sereiti ve ark. 1999, Anonim 2002b, Newall ve ark. 2002, Albu ve ark. 2004, Anonim 2013e, Haksel 2013) .

## **2.5. Prostat ve Akciğer Kanseri Model Hücre Hatları**

Hücre hatları, laboratuvar çalışmalarında ve *in vitro* kanser araştırmalarında model olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Hücre hattı kullanımının bir takım avantajları bulunmaktadır: Muamele edilmeleri kolaydır ve sınırlı koşullarda bile limitsiz üreyebilme yeteneğindedirler. Ayrıca, yüksek derecede homojenite gösterirler ve donmuş stoklardan kolaylıkla kullanılabilir hale getirilebilirler. Ancak, bir takım dezavantajları da bulunmaktadır: Hücre hatları sürekli kültürde genotipik ve fenotipik sapmalara eğilimlidirler. Ayrıca, alt kültürler oluşabilir ve zaman içerisinde popülasyonda bulunan daha hızlı büyüyen ve spesifik klonların seçimiyle fenotipik değişikliklere neden olabilirler (Numanoğlu 2008).

### **2.5.1. VCaP prostat (androjen bağımlı) kanseri hücre hattı**

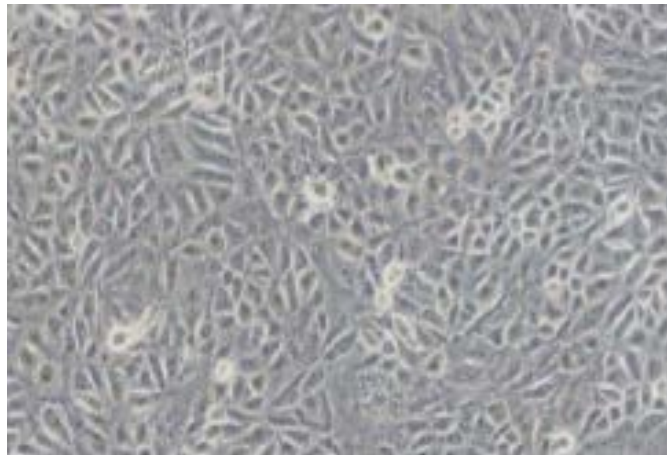
VCaP (Vertebral Cancer of the Prostate) hücre hattı, organizma olarak 59 yaşında Kafkas kökenli *Homo sapiens* (insan) erkekten elde edilmiş epitelyal prostat karsinom hücreleridir. Köken aldığı bölge, prostat kanserli hastanın lomber vertebraya metastaz yapmış prostat kanseri dokusudur. Yapışan (monolayer) hücre tipidir. İnkubasyon süresi, yaklaşık 53 saattir. Bu hücreler geniş serilerde PSA (prostat spesifik antijen) ekspresyon etmektedir (ATCC 2014) (Şekil 2.18).



**Şekil 2.18.** VCaP hücre hattının morfolojisi **A.** Düşük yoğunluk **B.** Yüksek yoğunluk (ATCC 2014)

### **2.5.2. Calu-1 akciğer kanseri hücre hattı**

Calu-1 hücre hattı, organizma olarak 47 yaşında Kafkas kökenli *Homo sapiens* (insan) erkekten elde edilmiş grade III-epidermoid karsinoma hücre serisidir. Bu hücre serisi, küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) grubuna dahildir. Köken aldığı metastatik bölge, pleura'dır. Yapışan (monolayer) hücre tipidir ve morfolojisi epitelyaldır (ATCC 2014) (Şekil 2.19).



**Şekil 2.19.** Calu-1 hücre hattının morfolojisi (ATCC 2014).

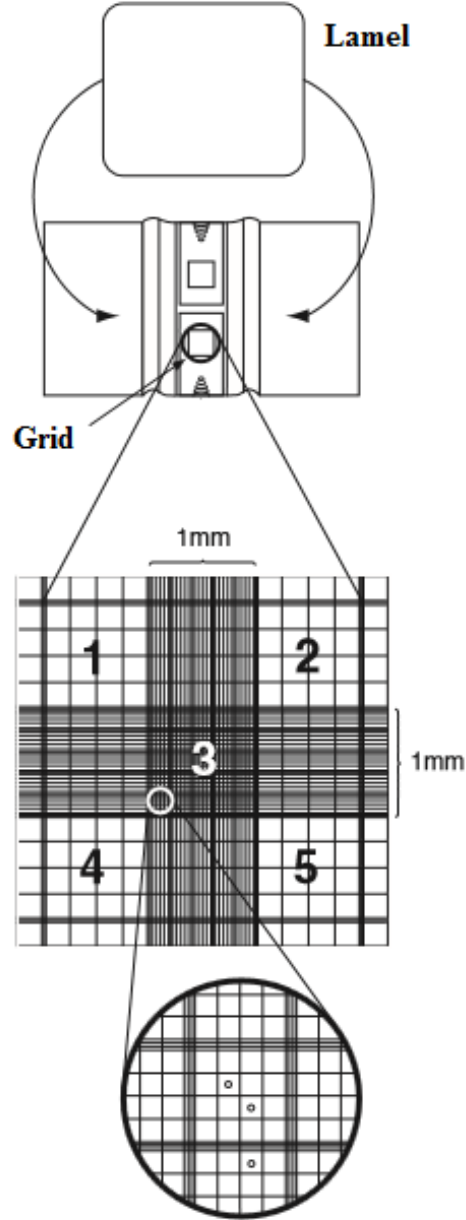


## 2.6. Sitotoksisite Testleri

Canlı hücre sayısının ve hücre proliferasyonunun doğru ve hızlı tespiti, hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmaların deneysel aşamalarında büyük bir öneme sahiptir. Hücre canlılığı, bir örnekteki canlı hücrelerin sayısı olarak tanımlanabilmektedir. Canlı hücre sayısını belirlemede en çok tercih edilen yöntem hemositometre olup Şekil 2.20, Neubauer hemositometresinin yapısını göstermektedir. Hücre proliferasyonu ise; bir kültürde bölünen hücrelerin sayısının ölçülmesi olarak tanımlanmaktadır. Hücre proliferasyon yöntemleri, genellikle hücre biyolojisinde büyüme faktörlerini ve ortam bileşenlerini çalışmak, sitotoksik ajanları ve hücre aktivasyonunu görüntülemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Sitotoksisite testleri, çeşitli hücre kültürlerinde kullanılan kimyasal bileşiklerin toksisitesini belirlemek için kullanılan *in vitro* metotlardır. *In vitro* sitotoksisite testleri; hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, membran seçici geçirgenliği, DNA sentezi ya da hücre metabolizma gibi toksisiteyi belirleyen gösterge parametrelerinin ölçülmesini temel almaktadır. *In vitro* sitotoksisite testlerinin tahmin edilen değeri, "bazal" sitotoksisite fikrine dayanmaktadır. Toksik kimyasallar hücrelerin temel fonksiyonlarını etkilerler ve bu toksisite hücre hasarını değerlendirilmesiyle ölçülebilir. *In vitro* sitotoksisite testlerinin gelişimi, çok sayıda bileşiğin potansiyel toksisitesini hızlı bir şekilde ölçme gerekliliğinden ortaya çıkmıştır. Canlı hücrelerde DNA'yı işaretlemek için radyoaktif timidin ve BrDU kullanılmasını temel alan metotların çok sayıda dezavantajı bulunmaktadır. Bundan dolayı, son yıllarda sitotoksisite ölçmek için kullanılan metotlar, plazma membranı permeabilitesindeki değişimler üzerine kurulmuştur. Bu yöntemlerde, hücreler irreversibl olarak hasara uğratılır. Fakat plazma membranı hasar görmeden kalır. Bundan dolayı bu metotlar, hücre hasarının tespitinde önemli bir yer oluşturmaktadır (Anonim 2008).

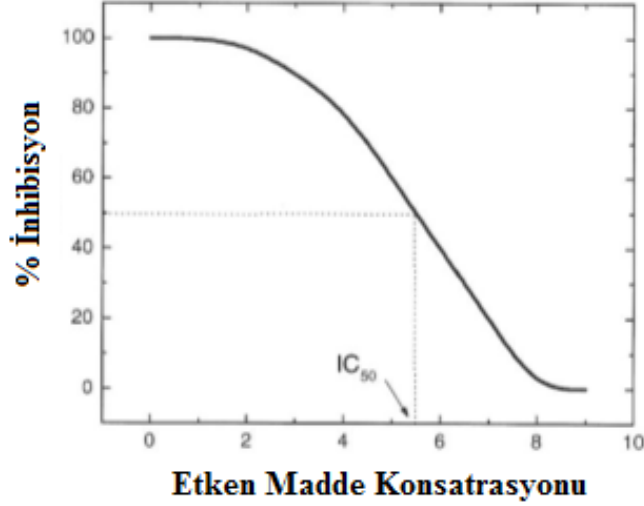
Ölü hücreler, çeşitli tetrazolyum tuzlarını metabolize etme yeteneğine sahip değildir. Hücrelerin metabolik aktiviteleri azaldığında, hücre hasar ve ölümün çok geç basamaklarında, MTT, XTT ve WST-1 gibi çeşitli kolorimetrik metotlar kullanılmaktadır. Kolorimetrik metotların, hücre kültürlerinde herhangi bir faktöre bağlı indüklenmiş sitotoksisite kantitasyonunda 24-96 saatlik döngüde çok etkili oldukları bilinmektedir.

Hücre aracılı sitotoksiteyi ölçmede efektör hücreler, hedef hücelere bağlanarak aktive olmaktadır. Bu aktivasyon, efektör hücre tarafından oluşturulan, formazan üretiminde artış ile sonuçlanmaktadır. Bu durum da, hedef hücre ölümünden kaynaklanan azalmış formazanı maskeleyemeyi hedeflemektedir (Anonim 2008).



**Şekil 2.20.** Neubauer Hemositometresi (Phelan 1998'den değiştirilerek alınmıştır)

IC<sub>50</sub> (half maximal inhibitory concentration); koloni formasyonunda, hücrelerin %50'sini öldüren inhibitör konsantrasyonudur. Sensitivitedeki farklılıklar, eğri üzerinden tespit edilebilmektedir. Düşük IC<sub>50</sub> değeri, yüksek sitotoksik etkiyi göstermektedir (Şekil 2.21).

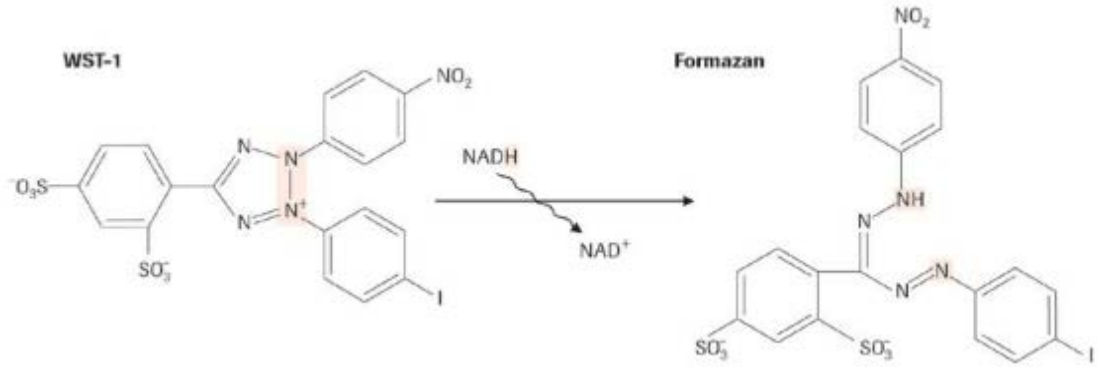


Şekil 2.21. IC<sub>50</sub> değeri (Freshney 2000)

### 2.6.1. WST-1 (water soluble tetrazolium) testi

Tetrazolyum tuzları prensibine dayanan kolorimetrik bir metot olan WST-1 yönteminin kullanımı, proliferasyon ölçümü prosedürünü geniş ölçüde kolaylaştırmıştır. Bununla birlikte, hücrelerin kantifikasyonunda ve radyoaktif izotoplar kullanmadan canlılıklarının tespitinde kusursuz bir çözümdür. Bu yöntem, hücre proliferasyonunun çeşitli büyüme faktörleri ve besin bileşenleri ile ilişkili olarak ölçümü prensibine dayanmaktadır.

WST-1, bir tetrazolyum tuzudur ve canlı hücrelerin mitokondrilerindeki süksinat dehidrogenaz enzimleri ile suda çözünebilen turuncu renkli formazan tuzuna indirgenmektedir (Şekil 2.22). Canlı hücrelerin sayıca çoğalması, örnekteki mitokondriyal dehidrogenazların aktivitesini arttırmaktadır. Enzim aktivitesindeki bu artışa paralel olarak, oluşan formazan boyasının miktarında da bir artış meydana gelmektedir. Bundan dolayı, oluşan formazan boyası miktarı ile kültürdeki metabolik açıdan aktif olan hücre sayısı arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır (Anonim 2006).



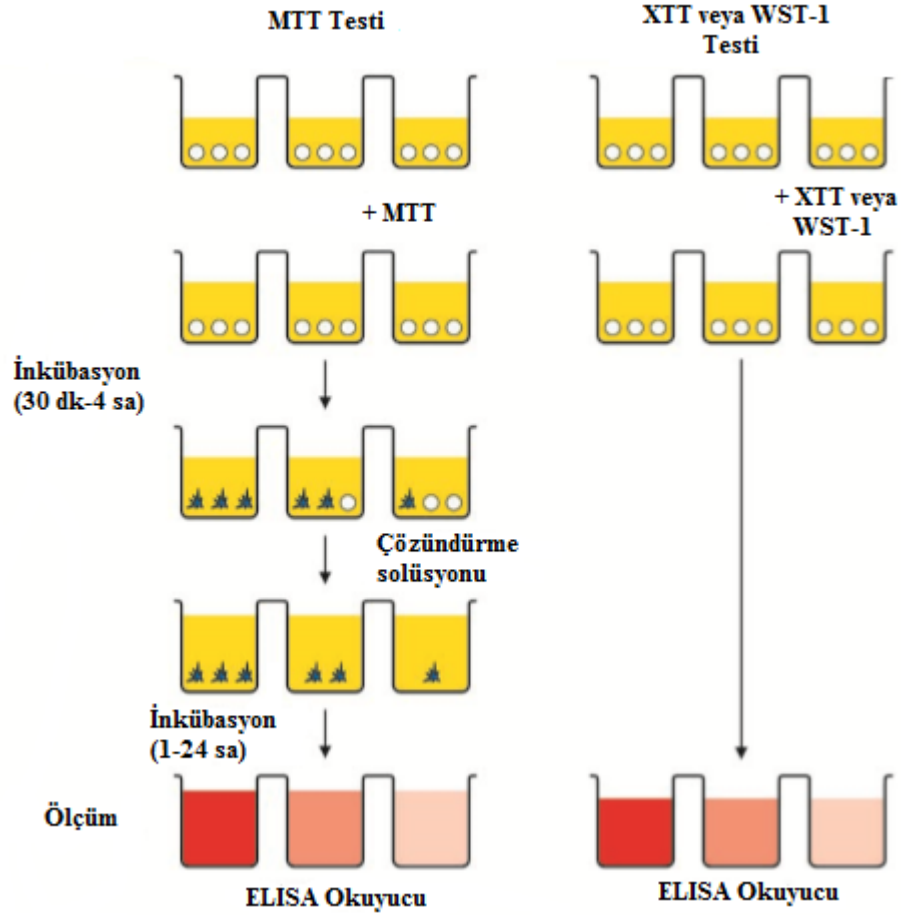
**Şekil 2.22.** WST-1'in reaksiyon şeması (Anonim 2008)

Oluşan formazan kristalleri çözüldükten sonra, çabuk ve kolayca klasik mikropilaka okuyucusunda 450 nm absorbans değerinde miktarı belirlenebilmektedir. WST-1 yönteminde spektrofotometrik olarak ölçülen absorbans değeri, yaşayan hücre sayısı ile ilişkilidir. Proliferasyon arttıkça, formazan tuzu oluşumuna bağlı olarak absorbans değeri de artış gösterir. Çoğalan hücreler proliferasyon göstermeyen hücrelerden metabolik olarak daha çok aktivite gösterdiği için, bu yöntemle sadece hücre canlılığı ve sitotoksite değil hücre aktivasyonu ve proliferasyonu da belirlenmektedir (Carmichael ve ark. 1987, Lian ve ark. 2003). WST-1 testinin diğer kolorimetrik testlere göre üstünlükleri Şekil 2.23'de gösterilmektedir.

Yöntemin avantajları şöyle sıralanabilir:

- 1) Kolay uygulanabilir olması: Ek ajanlara veya hücre yıkama süreçlerine ihtiyaç yoktur.
- 2) Hız: Çok kuyucuklu plakalar ve okuma için bir mikropilaka okuyucuya ihtiyaç vardır.
- 3) Duyarlılık: Düşük hücre konsantrasyonlarında bile ölçüm yapılabilir.
- 4) Doğruluk: Her kuyucuktaki boya absorbansı, hücre sayısı ile orantılıdır.
- 5) Güvenilirlik: Radyoaktif izotoplara ihtiyaç duyulmamaktadır.

6) Normal olarak aktive edilmiş hücrelerin ve çeşitli sitokinlere bağımlı hücre hatlarının hücre canlılığı veya proliferasyonunu değerlendirmede kullanılan yeni bir kromojenik bir yöntem olması açısından da ayrı bir önem taşımaktadır (Numanoğlu 2008).

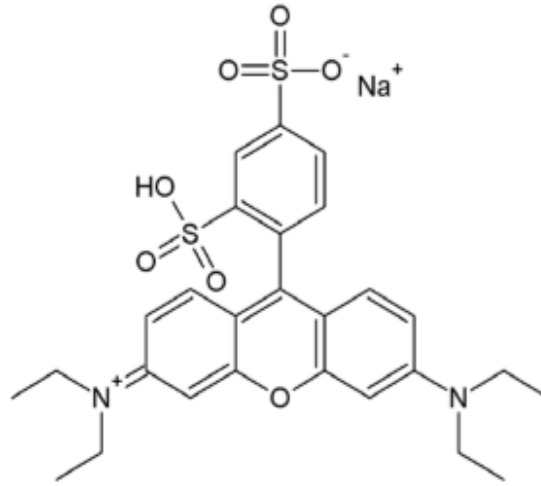


Şekil 2.23. WST-1 yöntemi ile diğer kolorimetrik testlerin kıyaslanması (Anonim 2008'den değiştirilerek alınmıştır)

### 2.6.2. SRB (sulforhodamine B) testi

Bir bileşiğin neden olduğu toplam hücresel proteindeki azalış da hücre canlılığının bir parametresi olarak kullanılabilir (Sumantran 2011). Sulforhodamine B (SRB) testi, yapışan ve süspansiyon kültürlerindeki hücrelerin toplam protein sentezi oranının *in vitro* olarak ölçülmesine dayanan kolorimetrik bir testtir. SRB yöntemi, Ulusal Kanser Enstitüsü (National Cancer Institute) tarafından *in vitro* anti-tümör taramalarında ve

geniş ölçekli anti-kanser ilaç geliştirme programlarında da rutin olarak kullanılmaktadır. Sulforhodamine B (SRB), proteinlere elektrostatik olarak bağlanan, iki sülfonik gruba sahip açık pembe renkli, katı ve suda çözünebilir anyonik aminoksanten boyasıdır (Papazisis ve ark. 1997). SRB molekülünün açık yapısı Şekil 2.24'de gösterilmektedir.



**Şekil 2.24.** SRB'nin moleküler yapısı (Anonim 2012b)

Testin prensibi; floresan protein boyası SRB'nin, trikloroasetik asit (TCA) ile fikse edilmiş hücrelerin selüler proteinlerinin bazik amino asit çökeltilerine bağlanma afinitesine dayanmaktadır. Boya, asidik şartlar altında hücrelere bağlanırken; bazik şartlar altında hücrelerden ayrılabilir (Mathen ve Hardikar 2010). Renk oluşumu, hızlı ve stabildir. Fikse olan boya çözündürme aşamasından sonra, 560-580 nm arasındaki absorbanlarda spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir. Yapılan kolorimetrik değerlendirme, toplam protein sentezi oranı ile dolayısıyla hücre proliferasyonu ile ilgili bilgiler vermektedir (Papazisis ve ark. 1997).

SRB yöntemi; daha duyarlı, basit, güvenilir ve düşük maliyetli olması, hücre sayısı ile daha iyi bir doğrusallık göstermesi ve zamana duyarlı ölçüm gerektirmeyen stabil bir son noktaya sahip olması gibi üstünlüklere sahip olması nedeniyle son yıllarda tetrazolyum tabanlı sitotoksikite testlerin yerini almaktadır (Rubinstein ve ark. 1990, Keepers ve ark. 1991, Monks ve ark. 1991, Perez ve ark. 1993).

Testin avantajları şöyle sıralanabilir:

- 1) Hücre sayısı ile daha iyi doğrusalığa ve daha yüksek duyarlılığa sahiptir.
- 2) Doğru, basit, güvenilir ve tekrarlanabiliridir.
- 3) Düşük maliyetlidir ve hızlıdır.
- 4) Zaman duyarlılık ölçümü gerektirmeyen stabil bir son noktaya sahiptir.
- 5) İlaç kaynaklı sitotoksisteyi ölçmek için uygundur.
- 6) Klonojenitenin miktarını belirlemek için de yararlıdır.

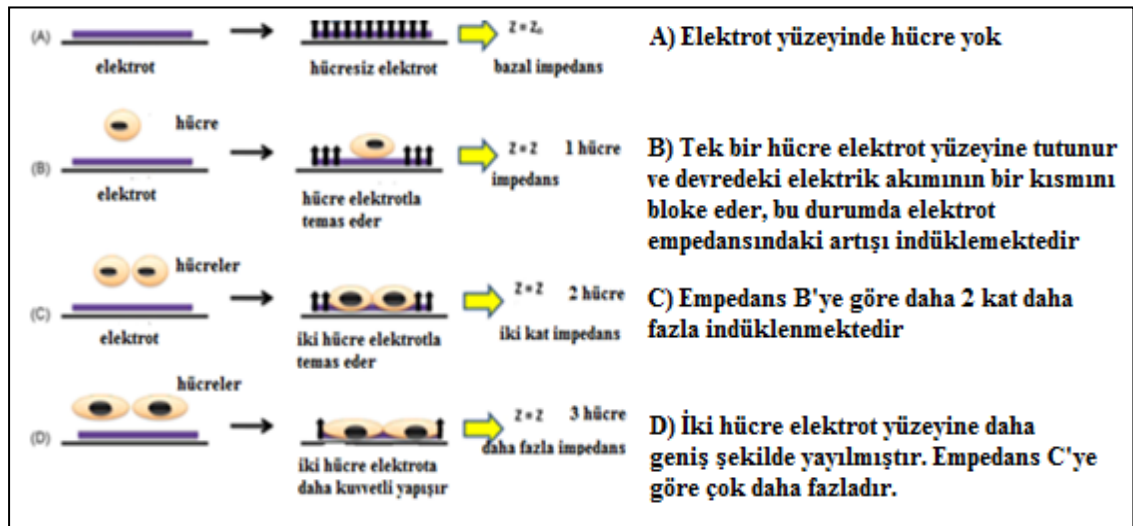
SRB testi, bu üstünlüklerin yanında birkaç dezavantaja da sahiptir. Özellikle, hücre fiksasyonu için TCA (trikloroasetik asit)' in ilave edildiği aşama oldukça kritiktir. TCA hücrelerin üzerine nazik bir şekilde eklenmediğinde hücreler fikse edilmeden zarar görebilmekte ve bu durum sonuçları etkileyebilecek olası hatalara yol açabilmektedir.

### **2.6.3. xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi (xCELLigence real time cell analyzer)**

Hücre proliferasyonunun, canlılığının ve sitotoksistenin analizi için tasarlanan geleneksel yöntemler, sadece bir hücresel parametreye (plazma membranı değişiklikleri, metabolik aktivite, genomik DNA fragmentasyonu gibi) dayalı olarak ölçüm yapmaktadır. Mevcut geleneksel testler sadece spesifik değişiklikleri ortaya çıkardığı için, bu geleneksel testleri kullanarak analitik seviyede farklı hücresel cevapları ölçmek oldukça zordur. Bu nedenle, herhangi bir test ajanının hücre fonksiyonu üzerindeki geniş ölçekli etkilerini detaylı bir biçimde değerlendirmek için, aynı testteki birkaç parametreyi incelemek gereklidir. Yeni bir teknoloji olan "xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi" ile; hücre tutunması, hücre proliferasyonu, hücre ölümü, hücre membranı değişiklikleri ve hücre yayılım hakkında sürekli ve kantitatif veriler elde edilmektedir. Bu sayede, çok daha kısa sürelerde daha doğru hücresel bilgiler elde edilebilmekte özellikle de toksisite çalışmalarında etkin madde dozu daha doğru tespit edilebilmektedir (Slanina ve ark. 2011).

Hüresel olaylar xCELLigence sistemi ile hiçbir işaretleme yapılmadan gerçek zamanlı olarak analiz edilebilmektedir. Sistem, gerçek zamanlı hüresel durumu belirlemek için hücre kültürü e-plate'lerin zeminine yerleştirilmiş mikro-elektrotlar ile, elektriksel empedans ölçmektedir. Bu ölçüm sırasında elektrotlara uygulanan gerilim yaklaşık 20 mV civarındadır. Düşük voltajlı alternatif akım sinyallerinin uygulanması ile elektrotlar arasında bir elektrik alanı oluşmasına sebep olur. Sensör elektrotlarının elektronik empedansı; elektrotlar üzerindeki hücrelerin fiziksel değişikliklerinin izlenmesine ve belirlenmesine izin vermek için ölçülmektedir (Urcan ve ark. 2010, Anonim 2012c).

Elektrotlar arasında ölçülen empedans, elektrot geometrisine, iyon konsantrasyonuna ve hücrelerin elektrotlara bağlı olup olmamasına bağlıdır. Hücrelerin yokluğunda elektrot empedansı, elektrot çözeltisi ara yüzeyinde ve bütün çözeltideki iyon ortamı ile belirlenmektedir. Hücrelerin varlığında, elektrot sensörü yüzeyine hareket eden hücreler yalıtkanlar olarak davranmaktadır. Empedans okuması; hücre sayısı, hücre canlılığı, hücre ölümü, hücre morfolojisi ve adezyonundaki değişiklikleri belirler ve hücrelerin bu biyolojik durumları hakkında kantitatif bilgi vermektedir (Urcan ve ark. 2010, Anonim 2012c). Şekil 2.25, xCELLigence RTCA cihazının çalışma prensibini göstermektedir.



Şekil 2.25. Empedans ölçüm şeması (Urcan ve ark. 2010)



### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kimyasal maddeler ve reaktifler

Çizelge 3.1. Deneylede kullanılan kimyasal maddeler ve reaktifler

Kimyasal Maddeler ve Reaktifler	Ticari Marka
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Ham's FXII Medyum	Biological Industries, İsrail
McCoy's 5a Medium Modified Medyum	Biological Industries, İsrail
Fetal Sığır Serum (FBS, sıcaklık ile inaktive edilmiş)	Biological Industries, İsrail
Penisilin/Streptomisin (10 000 U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin)	Biological Industries, İsrail
L-Glutamin	Biological Industries, İsrail
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Biological Industries, İsrail
% 0,25 Trypsin-EDTA	Biological Industries, İsrail
% 0,5 Tripan Mavisi	Biological Industries, İsrail
Dimetil sülfoksit (DMSO, ultrasaf, steril)	Amresco, USA
Sulforodamine B (SRB)	Sigma-Aldrich, Almanya
WST-1 Cell Proliferation Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Almanya
Trikloroasetik Asit (TCA)	Merck Millipore, Almanya
Tris Base (Tris Bazı)	Amresco, USA
Asetik Asit (Glasiyal, % 100 saflıkta)	Sigma-Aldrich, Almanya
Deiyonize su	

### 3.1.2. Cihazlar ve sarf malzemeler

**Çizelge 3.2.** Deneyleerde kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler

<b>Cihazlar ve Sarf Malzemeler</b>	<b>Ticari Marka</b>
CO <sub>2</sub> (Karbondioksit) 'li İnkübatör	Thermo Scientific BB15, USA
Laminar Air Flow Hood (Steril Kabin)	Labculture ESCO Class II BSC, USA
Inverted Mikroskop	Olympus CKX41, Japonya
Işık Mikroskobu	ZEISS Primostar, Almanya
Mikroplaka Okuyucu (ELISA Reader)	BioRad iMark, USA
xCELLigence Real-Time Cell Analyzer	Roche, Almanya
Santrifüj, açılır rotor	Nüve NF 815
Otoklav	Nüve OT4060V, Türkiye
Buz Üretme Makinesi	Scotsman AF80-AS, USA
Hassas Terazi	Shimadzu AUX 320, Japonya
+4°C ve -20°C 'lik Buzdolapları	Arçelik, Türkiye
-80°C'lik Tıbbi Soğutma Cihazı	Sanyo, Japonya
Şarjlı Pipet Pompası	Axygen motopet, USA
Çok Kanallı Pipet, 300 µl	Eppendorf, Almanya
Otomatik Pipetler (2, 10, 100, 200, 1000 µl 'lik)	Rainin, USA
Filtreli Steril Pipet Uçları (10, 200 ve 1000 µl ' lik)	ATS ve Corning, USA
25 ve 75 cm <sup>2</sup> 'lik Steril Kültür Kapları	Corning, USA
96 Kuyucuklu Mikroplaka	Corning, USA
E-plate	Roche Diagnostics GmbH, Almanya
Falcon Tüpler (15 ve 50 ml'lik)	Corning, USA
Kriyovial Tüpler	Corning, USA
Serolojik Pipetler (5-10 ml'lik)	LP Italiana Spa, İtalya
Pasteur Pipetleri	Isolab, Almanya
Steril Tek Kullanımlık Filtre (0,2 µm)	Sartorius Stedim Biotech, Almanya
Enjektörler (5 ve 10 ml hacimlerinde)	Hayat, Türkiye
Neubauer Lamı (0.1000 mm 0.0025 mm <sup>2</sup> )	Isoterm

### **3.1.3. Deneysel çalışmalarda kullanılan *Rosmarinus officinalis* L. (Biberiye) ekstreleri**

Çalışmada kullanılan kuru toz haldeki *Rosmarinus officinalis* L. etanol ekstresi, hazır olarak temin edildi. *Rosmarinus officinalis* L. su (infüzyon) ekstresinin hazırlanmasında kullanılacak taze *Rosmarinus officinalis* L. bitkileri ise, 19 Mart 2014 tarihinde Uludağ Üniversitesi Görükle Kampüsü'ndeki kültivar örneklerinden toplandı. Toplanan bitkilerin çevresinde herhangi bir atık madde ya da başka bir nedenden kaynaklanan çevresel kirlenme olmamasına özen gösterildi.

### **3.1.4. Deneysel çalışmalarda kullanılan hücre hatları**

Deneysel çalışmalarda kullanılan Calu-1 akciğer kanseri hücre hattı ve VCaP prostat (androjen bağımlı) kanseri hücre hattı, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında görev yapan Prof. Dr. Cumhur Gündüz'den temin edildi. Calu-1 ve VCaP kanser hücre hatları kriyovial tüpler içerisinde -80°C' lik tıbbi soğutma cihazında saklandı.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. *Rosmarinus officinalis* L. 'in ekstraksiyon işlemleri**

Çalışmada, kültüre alınan *Rosmarinus officinalis* L. (biberiye) bitkisi kullanıldı. Deneysel çalışmalarda çalışılmak üzere, bitkinin infüzyon (su) ve etanol (EtOH) ekstreleri hazırlandı.

#### **3.2.1.1. *Rosmarinus officinalis* L. 'in etanol ortamındaki ekstraksiyonu**

Toplanıp gölgede kurutulmuş 1 kg'lık *Rosmarinus officinalis* L. yaprakları öğütülerek toz haline getirildi. Toz halindeki *Rosmarinus officinalis* L. bitkisi, içinde 70 derecelik etanol (EtOH) bulunan tanklarda ara sıra çalkalanarak 3 gün bekletildi ve süzüldü. Süzülen çözelti Spray dryer cihazına gönderildi. Spray dryer cihazında yapılan işlem, alçak basınçta ve düşük ısıda çözeltinin uçurulması işlemidir. Bu işlemin düşük ısıda yapılmasının nedeni, 55 °C'nin üzerindeki ısının fenolik bileşiklerin parçalanmasına

sebepler olmalıdır. Elde edilen kuru toz haldeki ekstreye, çalışma stokları hazırlanırken karanlık ve nem almayan bir ortamda muhafaza edildi ve stabilizasyonu sağlandı.

### **3.2.1.2. *Rosmarinus officinalis* L. 'in su ortamındaki ekstraksiyonu**

Toplanan taze *Rosmarinus officinalis* L. bitkileri, uygun şartlarda laboratuvar ortamına getirilerek yabancı maddelerden temizlendi. *Rosmarinus officinalis* L. 'in toprak üstü kısımları (gövde + yaprak + çiçek), daha küçük parçalara bölündü ve ardından distile su ile yıkandı. Bitki materyali üzerine, katı / sıvı oranı 1:1 olacak şekilde saf su ilave edildi ve 48 saat boyunca ışık almayan bir ortamda çalkalanarak masere edildi. Süre sonunda örnekler filtreden geçirilerek katı bitki materyalinden ayrıldı. Elde edilen ekstrenin çözücüsü (su), evaporatör cihazında 50°C'deki su banyosunda ve vakum altında ekstrakte maddelerden tamamen uzaklaştırıldı (25-30 dakika). Ekstreler, -80°C'de muhafaza edildi. Donmuş haldeki ekstratlar kuru toz haline getirilmek üzere vakum altında, uygun koşullarda ve sıcaklıkta liyofilize edildi. Elde edilen kuru haldeki ekstreye, tarama dozları hazırlanana dek -20°C'de muhafaza edildi ve stabilizasyonu sağlandı.

### **3.2.2. *Rosmarinus officinalis* L. ekstratlarının hazırlanması**

Ekstraksiyon işlemleri sonucunda elde edilen kuru toz haldeki ekstratların, deneylerde test edilmek üzere stok solüsyonları ve çalışma dozları hazırlandı.

#### **3.2.2.1. *Rosmarinus officinalis* L. etanol ekstresinin hazırlanması**

*Rosmarinus officinalis* L.'in etanol (EtOH) ekstresi, 100 mg/ml'lik (0,1 gr bitki ekstresi + 1 ml dimetil sülfoksit-DMSO) stok konsantrasyonda hazırlandı. Bu çözünmüş stoktan 20'şer µl olacak şekilde alikot yapılarak -80°C'de saklandı. Çalışmalar için gerekli seyreltmeler ise besiyeri ile yapıldı.

#### **3.2.2.2. *Rosmarinus officinalis* L. su (infüzyon) ekstresinin hazırlanması**

*Rosmarinus officinalis* L.'in su (infüzyon) ekstresi, 100 mg/ml'lik (0,1 gr bitki ekstresi + 1 ml DMSO) stok konsantrasyonda hazırlandı. Bu çözünmüş stoktan 20'şer µl olacak şekilde alikot yapılarak -80°C'de saklandı. Çalışmalar için gerekli seyreltmeler ise besiyeri ile yapıldı.

### 3.2.3. Hücre hatlarının kültüre edilmesi

Hücre kültürü terimi, orjinal dokulardan, primer bir kültürden veya bir hücre hattından enzimatik, mekanik ya da kimyasal yöntemler ile alınan ve süspanse hücrelerden türetilen bir kültürü ifade etmek için kullanılmaktadır (Anonim 2010). Bu çalışmada, VCaP ve Calu-1 hücrelerinin *in vitro* koşullarda çoğaltılması için hücre kültürü teknikleri kullanıldı. Deney, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

#### Kullanılan besiyerlerinin hazırlanması

Besiyeri, kültürdeki hücrelerin büyümesini etkileyen önemli bir faktördür. Besiyeri, büyüyen hücrelere besin sağlamanın yanı sıra, kontaminasyonu önlemek için antibiyotikler, fungusidler ya da her ikisi ile de desteklenmektedir (Phelan 1998). Besiyeri içerisine, hücrelerin gelişmeleri ve çoğalmaları için %5-10, hücrelerin en düşük seviyede aktivitelerini sürdürüp canlılıklarının devamı için ise %2 oranında inaktif hayvan serumu ilave etmek yeterli olmaktadır (Finegold ve Baron 1986, Isenberg 1992, Murray ve ark. 1995).

Çalışmada, VCaP hücre hattı için %10 fetal sığır serum (FBS, sıcaklıkla inaktive edilmiş), %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin solüsyonu (10 000 U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin) içeren DMEM Ham's FXII besiyeri, Calu-1 hücre hattı için ise %10 fetal sığır serum (FBS), %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin solüsyonu (10 000 U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin) içeren McCoy's 5A Medium (Modified) besiyeri kullanıldı.

Hücre kültürü işlemleri, ultraviyole ile sterilize edilen laminar hava akımlı çalışma kabininde gerçekleştirildi. Tüm besiyerleri ve solüsyonlar, kullanılmadan önce 37°C'ye ısıtıldı. -80°C'de saklanan VCaP ve Calu-1 hücreleri, stoktan çıkarılarak hızlı bir şekilde çözüldü, DMSO'nun uzaklaştırılması için besiyeri ile yıkandıktan sonra 75 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültür flasklarına aktarıldı. Kültür flasklarına ilgili besiyerlerinden 8-10 ml eklendi. Hücreler, 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren inkübatörde çoğaltıldı. Kültür flasklarının tabanına tutunarak çoğalan hücreler, inverted mikroskop yardımıyla canlılık, çoğalma ve kontaminasyon yönünden günlük olarak izlendi. Konfluent olana kadar hücrelerin kullandıkları besiyeri, pH indikatörünün (fenol red) rengi değiştiği

zaman steril şartlarda değiştirildi. Eski besiyeri aspire edildi, ardından flasklara 8-10 ml taze besiyeri ilave edildi. Hücrelerin canlılığını korumak ve devamlılığını sağlamak amacıyla çoğalma sürelerine uygun olarak pasajlama yapıldı. Bir kısım hücre, çalışmayı güvence altına almak için dondurularak -80°C'de stoklandı. Tüm yıkama adımlarında ise, PBS (Fosfat Tuz Tamponu) kullanıldı.

### **3.2.3.1. Dondurulmuş hücre hatlarının çözülmesi**

1) Kriyovial tüpler içerisinde %10 DMSO (dimetil sülfoksit) ile dondurulmuş olan VCaP ve Calu-1 hücre hatları, -80°C'lik tıbbi soğutma cihazından alınarak 37°C'de çözüldü. 4°C'nin üzerindeki DMSO hücrelere toksik olduğundan, 37°C'de hücreleri çözdürürken seri bir şekilde çalışıldı.

2) DMSO'nun hücre canlılığı üzerinde negatif etkisi bulunmaktadır. DMSO'dan zarar görme sürecini azaltmak amacıyla kriyovial tüplerin içerisine hızlı bir şekilde besiyeri ilave edildi. Hücreler, pastör pipeti yardımıyla karıştırılarak 15 ml'lik falkon tüplerin içerisine alındı.

3) Falkon tüplerin içerisine yaklaşık 10 ml daha taze besiyeri ilave edilerek 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

4) Santrifüj sonrası falkon tüplerin içerisinde bulunan süpernatant kısım aspire edildi ve hücre pelletleri üzerine tekrar (~10 ml) besiyeri eklendi.

5) 1200 rpm'de 5 dakika boyunca ikinci kez santrifüj yapıldı.

6) Santrifüj sonrası süpernatant aspire edilerek uzaklaştırıldı, çöken VCaP ve Calu-1 hücrelerinin üzerine sırasıyla, DMEM Ham's FXII ve Mc Coy's 5A Medium (Modified) besiyerlerinden 1 ml eklenerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlandı.

7) Ardından hücrelerin üzerine 9 ml besiyeri daha ilave edildi ve 10 ml'lik hücre süspansiyonu 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklara alındı.

8) Flasklar, 37°C'de, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüve alınarak inkübasyona bırakıldı.

### 3.2.3.2. Hücre hatlarının pasajlanması

Hücreler, flask yüzeyini %80-90 oranında kapladıklarında ve büyümelerini baskılayan bir popülasyon yoğunluğuna ulaştıklarında, steril şartlar altında tripsinizasyon işlemi ile pasajlandı.

1) VCaP ve Calu-1 hücreleri, monolayer hücreler oldukları için pasajlama yaparken ilk olarak hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılmaları gerekir. Bu amaçla, öncelikle flasklarda bulunan ortamlar aspire edilerek uzaklaştırıldı.

2) Flask içerisinde serum (FBS) kalıntılarının bulunması, tripsinin aktivitesini engelleyebilmektedir. Hücreleri serumdaki arındırmak için, flaskların içine 2 ml steril 1X PBS (Fosfat Tuz Tamponu, pH: 7,4) ilave edildi ve hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlandı.

3) PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra, flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için, hücrelerin üzerine 2 ml %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu ilave edildi. Tripsin sıcaklık arttıkça daha etkili çalıştığı için, flasklar 5 dakika boyunca 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde bekletildi.

4) Süre sonunda inkübatörden alınan flasklar inverted mikroskopla incelendi ve tüm hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadığı kontrol edildi.

5) Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelerin üzerine, tripsin-EDTA'nın inhibe edilmesi için 10 ml serumlu besiyeri ilave edildi. Böylece, tripsin-EDTA'nın hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına zarar vermesi engellenmiş oldu.

6) Flaskların içerisinde bulunan hücre süspansiyonları, 15 ml'lik falkon tüplere alındı ve 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek hücrelerin dibe çökmesi sağlandı.

7) Santrifüj sonrası, süpernatant kısımlar aspire edildi, hücre pelletleri üzerine 10 ml besiyeri eklenerek süspansiyonların homojen sağlandı.

8) Elde edilen hücre süspansiyonları, 75 cm<sup>2</sup>'lik iki ayrı flaska aktarıldı. Hücrelerin yüzeye yapışarak üremeye devam etmeleri için flasklar, 37°C'deki %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren etüve kaldırılarak inkübasyona bırakıldı ve çoğalmaları sağlandı.

### **3.2.3.3. Hücre hatlarının dondurulması**

- 1) Hücreler flask yüzeyini %70-80 oranında kapladıklarında, dondurularak -80°C'de stoklandı. İlk olarak, flaskların içerisindeki besiyerleri aspire edilerek uzaklaştırıldı.
- 2) Sonraki aşamada, flaskların içine 2 ml steril 1X PBS (Fosfat Tuz Tamponu, pH: 7,4) ilave edildi ve hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlandı.
- 3) PBS'in ortamdan uzaklaştırılmasından sonra, hücreleri yapışmış oldukları flask yüzeyinden kaldırmak için, hücrelerin üzerine 2 ml %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu ilave edildi ve flasklar 5 dakika boyunca 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde bekletildi.
- 4) Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelerin üzerine 10 ml serumlu besiyeri ilave edilerek tripsin-EDTA'nın toksik etkisi nötralize edildi.
- 5) Flaskların içerisindeki hücre süspansiyonları, 15 ml'lik falkon tüplere alınarak 2000 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edildi.
- 6) Santrifüj sırasında, her bir falkon tüpe ait 2 ml'lik kriyovial tüpler ile 9:1 oranında (%90:%10) serum:DMSO karışımından oluşan dondurma mediumu hazırlandı. Hazırlanan dondurma mediumu ve kriyovial tüpler, buz içerisine alındı.
- 7) Santrifüj sonrası, falkon tüplerde bulunan süpernatant kısım uzaklaştırılarak falkon tüpler de buz üzerine alındı. Çöken hücrelerin üzerine serum:DMSO karışımından 750 µl eklenerek resüspanse edildi.
- 8) Bu karışım, buz içerisinde bulunan kriyovial tüpler içerisine aktarıldı ve uzun dönemli saklama için hızlıca -80°C'ye kaldırıldı.

### **3.2.4. Deneysel çalışmalarda kullanılacak hücre sayılarının optimizasyonu**

Deney aşamasında mikrolakada kuyucuk başına kullanılması gereken standart hücre sayısının belirlenebilmesi amacıyla optimizasyon çalışması yapıldı. Ayrıca bu çalışma ile uygulanacak testler de (WST-1, SRB ve xCELLigence Analizi) standardize edildi. Uygulama için 96 kuyucuklu mikrolakalar kullanıldı. Olması istenen hücre sayısını içeren 100 µl hücre süspansiyonu, mikrolakanın her bir kuyucuğuna 3 tekrarlı olarak ekildi ve mikrolaka 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi.



Deney sonucunda, VCaP ve Calu-1 hücrelerinin çoğalmalarına bağlı olarak uygun olan hücre miktarı, her iki hücre soyu için 5 000 hücre/kuyucuk olarak saptandı.

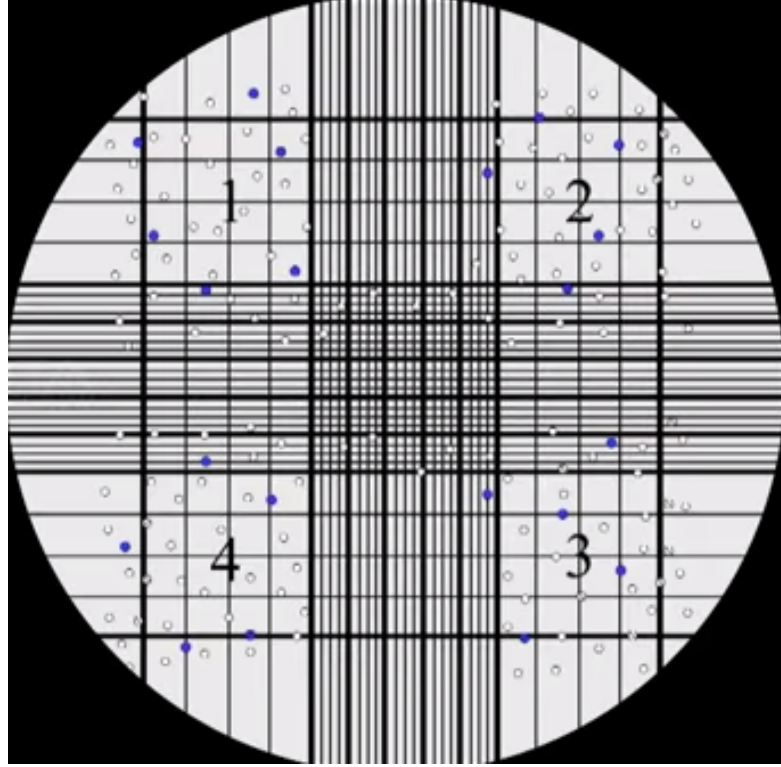
### 3.2.5. Hücre hatlarının canlılığının belirlenmesi

Kültürdeki hücrelerin sayılarının belirlenmesi, kültür şartlarının standardizasyonunda ve doğru kantitatif deneylerin uygulanmasında önemlidir (Phelan 1998). Hücrelerin canlılıklarının ve sayılarının belirlenmesinde, membran bütünlüğünü ölçmeye dayalı bir test olan tripan mavisi boyası testi kullanıldı. Hasar görmüş plazma membranı permeabilitesi olan (ölü) hücreler tripan mavisi ile boyanırken, hasar görmemiş (canlı) hücreler, boyayı plazma membranından geçiremedikleri için bu boya ile boyanmadı. Sayım için iki eş değer bölmeye sahip Neubauer hemositometresi kullanıldı. Testin uygulama aşamaları şu şekildedir:

- 1) VCaP ve Calu-1 hücreleri, monolayer hücreler oldukları için ilk olarak tripsinizasyon işlemi yapıldı ve 1 ml besiyeri ile sulandırılmış hücre süspansiyonu elde edildi.
- 2) Elde edilen hücre süspansiyonundan 50 µl alınarak eppendorf tüpe aktarıldı ve üzerine 50 µl %0,5 tripan mavisi boyası konarak iyice karışması sağlandı.
- 3) Tripan mavisi ile boyanan hücre süspansiyonundan 10 µl örnek alındı, distile su ile temizlenen Neubauer hemositometresinin lamındaki sayım odacığına konuldu.
- 4) Işık mikroskopunda 10X oküler kullanılarak 4 karede hücre sayımı gerçekleştirildi. Tripan mavisi boyasını içine alıp mavi renkte görünen hücreler ölü, boyayı metabolize edip parlak görünen hücreler ise canlı olarak değerlendirildi (Şekil 3.1). Hücreler sayıldıktan sonra 1 ml besiyerindeki toplam canlı hücre sayısı,

$$\text{hücre/ml} = \text{canlı hücrelerin aritmetik ortalaması} \times \text{dilüsyon katsayısı} \times 10^4$$

formülüne göre hesaplandı.

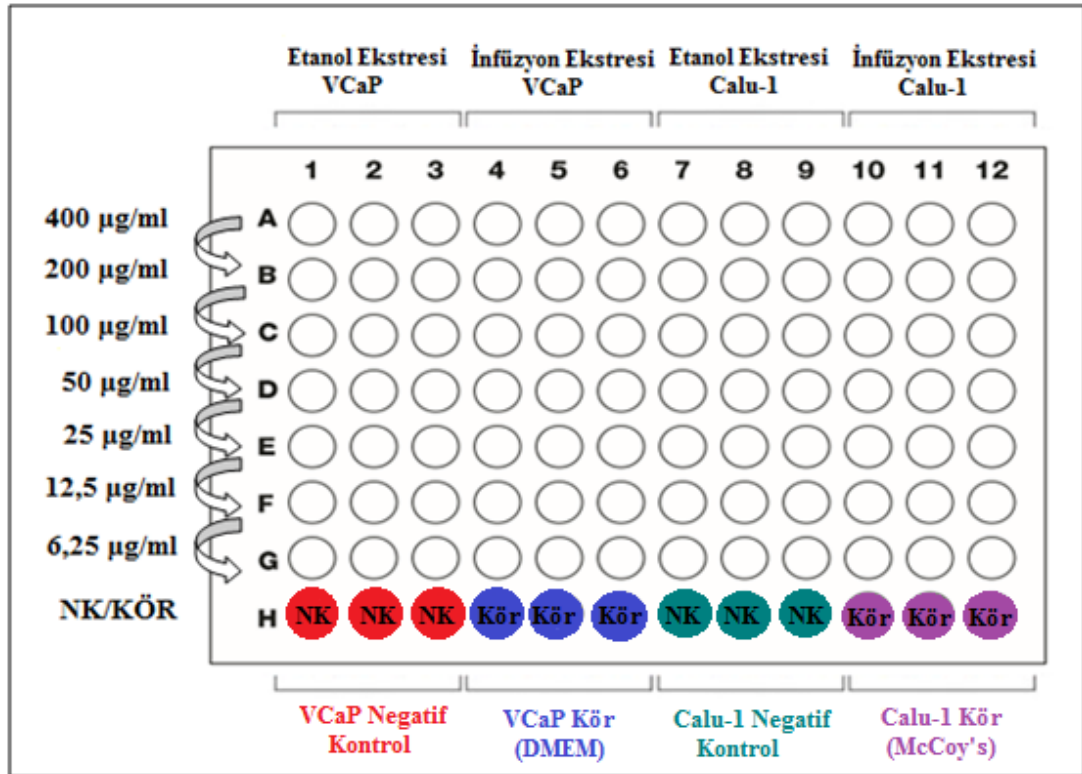


**Şekil 3.1.** Neubauer hemositometresi ile hücrelerin sayımı (Anonim 2011)

### **3.2.6. Hücrelerin deney planına göre ekimi ve ekstrelerin uygulanması**

Canlı hücre sayımı yapıldıktan sonra, *Rosmarinus officinalis* L. (biberiye) ekstrelerinin VCaP ve Calu-1 hücre hatları üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla 3 gün sürecek bir deney düzeneği oluşturuldu. İlk olarak, sitotoksikite testleri (WST-1 ve SRB) için her güne (24., 48. ve 72. saatler) ait ayrı bir 96 kuyucuklu mikrolaka hazırlandı. Canlı hücre sayısı belirlenen hücre süspansiyonundan, ekilecek hücre sayısına göre gerekli dilüsyonlar yapıldı. Ardından, her kuyucukta  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde 100'er  $\mu$ l hücre süspansiyonu, 96 kuyucuklu mikrolakalara dağıtıldı ve hücrelerin ekimi yapıldı. Hücrelerde, ölümün negatif kontrolü (maksimum canlılık, MO) olarak sadece besiyeri ortamı içerisinde ekilen hücreler kullanıldı. Kör için ayrılan kuyular içerisinde ise 100  $\mu$ l besiyeri ilave edildi. Deneyde, her bir etken madde konsantrasyonu üçlü kontrolle (triplicate) çalışıldı. Ekilen hücrelerin kuyucuklara tutunmaları için, mikrolakalar 24 saat boyunca 37°C'de, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübasyona bırakıldı.

Deneyde, sitotoksik etkisi çalışılacak *Rosmarinus officinalis* L. (biberiye) bitkisinin infüzyon (su) ve etanol (EtOH) ekstralarının logaritmik dozları, 400 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml olarak planlandı. Ekstrelerin 100 mg/ml konsantrasyondaki ana stoklarından besiyeri içinde gerekli seyreltmeleri yapılarak çalışma dozları hazırlandı. 24 saatlik inkübasyondan sonra, ekstraların logaritmik dozları hücre kültür kaplarınının her bir kuyucuğuna 100 µl volümde ve mikrolpaka düzenine uygun olarak eklendi (Şekil 3.2). Her konsantrasyon için 3 kuyucuk kullanıldı. Negatif kontrol (sadece hücre içeren) ve kör (sadece besiyeri içeren) için ayrılan kuyucuklara etken madde uygulanmadı, son hacmin 200 µl olması için bu kuyucuklara 100 µl besiyeri eklendi. Ekstre uygulamasını takiben hücreler 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Sitotoksisite testleri öncesinde ekstre uygulanmış hücreler, her 24 saatte bir mikroskopik olarak incelenerek meydana gelen sitopatolojik değişiklikler tespit edildi ve kontrol grupları ile karşılaştırıldı.



**Şekil 3.2.** Sitotoksisite deneylerinde kullanılan 96 kuyucuklu mikrolpaka düzeni ve uygulanan ekstraların konsantrasyonları

### 3.2.7. Sitotoksosite testleri

*Rosmarinus officinalis L.* (biberiye) bitkisinden elde edilen sulu ve etanollü ekstrelerin logaritmik dozlarının, hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla, WST-1 ve SRB canlılık testleri uygulandı. Ayrıca hücrelerdeki sitotoksik aktivite, gerçek zamanlı sitotoksosite analiz sistemi (xCELLigence RTCA) ile de doğrulandı.

#### 3.2.7.1. WST-1 (water soluble tetrazolium) testi

Kolorimetrik bir yöntem olan WST-1 testi ile, *Rosmarinus officinalis L.* ekstrelerinin hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik / sitostatik etkileri ve inhibitör konsantrasyonları (IC<sub>50</sub>) belirlendi.

*Rosmarinus officinalis L.* ekstrelerinin uygulanmasının ardından 24, 48 ve 72 saat boyunca CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edilen hücrelere WST-1 testi uygulandı. 24. saat sonunda, bitki ekstrelerinin logaritmik dozlarını içeren kuyucuklara karanlık ortamda 20 µl WST-1 solüsyonu eklendi. Ardından, hücreler 1 saat boyunca 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li ve %95 nemli etüvde inkübe edildi. Mikroplakanın her bir kuyucuğunun absorbans değeri (OD), 1 saatlik inkübasyon süresi boyunca 15 dakikalık periyotlar ile mikropilaka okuyucuda (ELISA Reader) 450 nm absorbans ve 600 nm referans aralığında okundu. Aynı işlem, ekstrelerin uygulanmasından 48 saat sonra 2. güne ait mikropilaka için ve 72 saat sonra 3. güne ait mikropilaka için tekrarlandı.

Böylece, hücrelerde oluşan renk şiddeti sayısal olarak değerlendirildi ve okunan absorbanslar kullanılarak hücrelerin % canlılık oranları belirlendi.

#### % Hücre canlılığının hesaplanması

Ekstre uygulanmamış kontrol hücre (MO) canlılığı %100 olarak kabul edilerek, ekstre uygulanan hücrelerin canlılık oranları,

$$\text{Canlılık (\%)} = \frac{[(\text{Bileşik ile tedavi edilen hücre absorbansı} - \text{kör ortalama}) / (\text{Kontrol hücre absorbansı} - \text{kör ortalama})] \times 100}{}$$

formülü kullanılarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre, doz - cevap eğrileri çizildi ve bu eğrilerden hücrelerin %50'sini inhibe eden dozlar (IC<sub>50</sub> değerleri) hesaplandı.

### 3.2.7.2. SRB (sulforhodamine B) testi

SRB yöntemi, daha duyarlı, basit ve güvenilir olması, hücre sayısı ile daha iyi bir doğrusallık göstermesi ve zamana duyarlı ölçüm gerektirmemesi gibi üstünlüklere sahip olması nedeniyle son yıllarda tetrazolyum tabanlı sitotoksisite testlerin yerini almaktadır (Rubinstein ve ark. 1990, Keepers ve ark. 1991, Monks ve ark. 1991, Perez ve ark. 1993). Bu bağlamda, *Rosmarinus officinalis* L. ekstralarının hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik / sitostatik etkilerinin 2. bir yöntem ile teyit edilmesi amacıyla kolorimetrik SRB testi uygulandı.

*Rosmarinus officinalis* L. ekstralarının uygulanmasının ardından 24, 48 ve 72 saat boyunca CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edilen hücrelere SRB (Sulforhodamine B) testi uygulandı.

#### SRB testinde kullanılan solüsyonların hazırlanması

-*Trikloroasetik asit (TCA) solüsyonu:* %50'lik (w/v) TCA solüsyonu hazırlamak için, hassas terazide 50 gr TCA tartıldı ve 100 ml steril dH<sub>2</sub>O içinde çözündürüldü. Elde edilen %50'lik TCA solüsyonu, kısa süreli saklama için +4°C'ye kaldırıldı.

-*SRB (Sulforhodamine B) solüsyonu:* %0,4'lük (w/v) SRB solüsyonu hazırlamak için, hassas terazide 400 mg SRB tartıldı ve 100 ml %1'lik glasiyal asetik asit içinde çözündürüldü. Elde edilen %0,4'lük (w/v) SRB solüsyonu, +4°C'de ve karanlık ortamda saklandı.

-*Tris bazı:* pH:10,0 olan 10 mM tamponlanmamış tris bazı hazırlamak için, hassas terazide 121 mg tris bazı tartıldı ve 100 ml steril dH<sub>2</sub>O içinde çözündürüldü ve oda sıcaklığında saklandı.

-*Glasiyal asetik asit çözeltisi:* 100 ml %1'lik (v/v) asetik asit çözeltisi hazırlamak için, 1 ml asetik asit alınarak üzerine 99 ml steril dH<sub>2</sub>O eklendi.

SRB sitotoksisite testinde uygulanan basamaklar şu şekilde sıralanabilir:

- 1) Uygun test ajanları ile 24 saatlik tedavi sonrasında, hücresel proteinleri fikse etmek için, mikrolakanın her kuyucuğuna 50 µl %50'lik (w/v) TCA (trikloroasetik asit) nazikçe eklendi ve TCA'in final konsantrasyonunun her kuyucukta %10 oranında olması sağlandı.
- 2) Fiksasyon reaktifinin (TCA) eklenmesi esnasında ve sonrasında, mikrolakanın sarsılmamasına özen gösterildi. Çünkü beklenmedik bir sarsılma, hücrelerin yüzeyden ayrılmasına ve protein miktarında sapmalara neden olabilirdi. TCA eklendikten sonra plate, +4°C'de en az 1 saat fikse edildi.
- 3) Fiksasyon süresi sonunda, mikroplate'deki TCA aspire edildi. Fazla TCA'i ve serum proteinlerini uzaklaştırmak için, kuyucuklar 5 kez deiyonize su ile yıkandı. Her yıkama sonunda mikroplate ters çevrildi ve kuyucuklardaki su döküldü. Yıkamalar arasında mikroplakaya kuvvetlice vurularak kalan su uzaklaştırıldı ve havada kurutuldu.
- 4) Fikse edilmiş hücrelerin boyanması için, her kuyucuğa %0,4'lük (w/v) SRB solüsyonundan 50 µl eklendi, 30 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi.
- 5) İnkübasyon süresi sonunda, SRB mikrolakadan döküldü. Bağlanmayan boyanın uzaklaştırılması için kuyucuklar 5 kez %1'lik (v/v) asetik asit ile yıkandı. Her yıkama sonunda mikroplate ters çevrilerek kuyucuklardaki asetik asit uzaklaştırıldı.
- 6) Mikrolaka, kuyucukların içinde asetik asit kalmayacak şekilde havada kurutuldu.
- 7) Proteinlere bağlanan boyanın çözünmesi için, her kuyucuğa 150 µl 10 mM tamponlanmamış Tris bazı eklendi.
- 8) Boya solüsyonunu homojenize etmek için, mikroplate en az 10 dakika boyunca shaker' da inkübe edildi.
- 9) Her bir kuyucuğun absorbansı (optik dansitesi), mikrolaka okuyucu kullanılarak 564 nm dalga boyunda ölçüldü.

Aynı işlem, ekstrelerin uygulanmasından 48 saat sonra 2. güne ait mikroplaka için ve 72 saat sonra 3. güne ait mikroplaka için tekrarlandı. Böylece, hücrelerde oluşan renk şiddeti sayısal olarak değerlendirildi ve okunan absorbanlar kullanılarak hücrelerin % canlılık oranları belirlendi.

#### % Hücre canlılığının hesaplanması

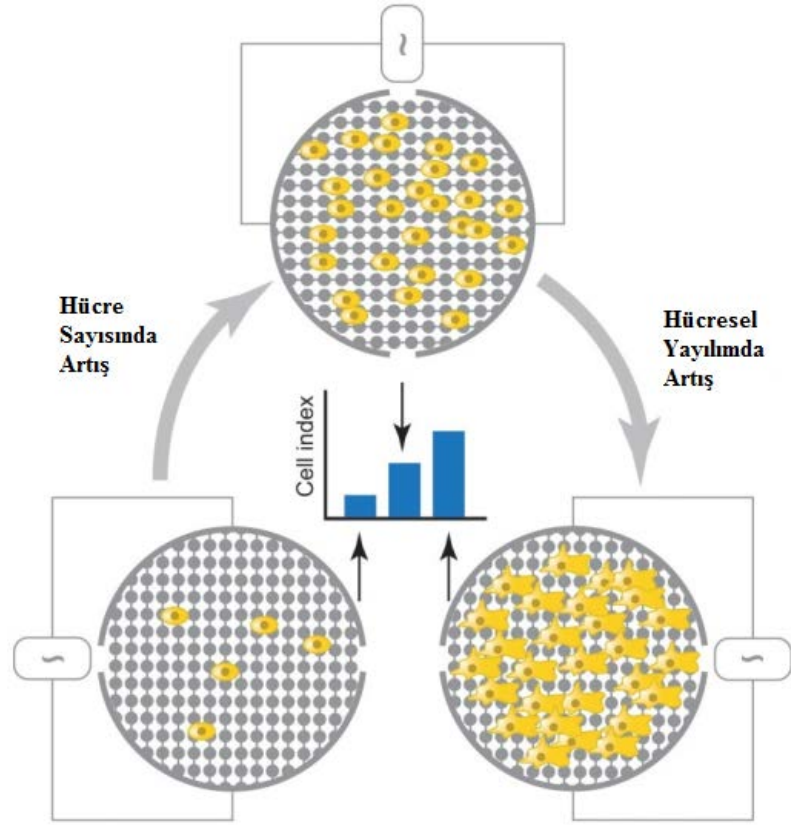
Ekstre uygulanmamış kontrol hücre (MO) canlılığı %100 olarak kabul edilerek, ekstre uygulanan hücrelerin canlılık oranları,

$$\text{Canlılık (\%)} = [(Bileşik ile tedavi edilen hücre absorbanı - kör ortalama) / (Kontrol hücre absorbanı - kör ortalama)] \times 100$$

formülü kullanılarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre, doz - cevap eğrileri çizildi ve bu eğrilerden hücrelerin %50'sini inhibe eden dozlar (IC<sub>50</sub> değerleri) hesaplandı.

#### **3.2.7.3. xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi (xCELLigence Real Time Cell Analyzer)**

Gerçek zamanlı xCELLigence sisteminde; hücreler altın mikroelektrotlarla entegre e-plate'lere ekilir. Bu elektrotlar; kuyucuklar içerisindeki medyumun iyonik çevresi ile etkileşim halinde olduğundan elektrotları saran hücrelerin sayısı, morfolojisi ve yapışma gücüyle sürekli olarak değişebilir. xCELLigence sistemi, gerçek zamanlı olarak *Rosmarinus officinalis* L. ekstrelerinin VCaP ve Calu-1 hücre hatlarındaki sitotoksik etkilerini, hücre proliferasyonunu, canlılığını ve morfolojik değişikliklerini görüntülemek için kullanıldı. Bu hücresel olayların, xCELLigence sistemindeki empedans temelli analizi Şekil 3.3'de şematik olarak gösterilmektedir.



**Şekil 3.3.** xCELLigence RTCA'da hücre hareketlerinin empedans temelli analizi (Limame 2012'den değiştirilerek alınmıştır)

*xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi Protokolü*

- 1) 75 cm<sup>2</sup>'lik flaslara ekilen ve flask yüzeyini kaplayan VCaP ve Calu-1 hücreleri, ilk olarak PBS ile yıkandı, ardından %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu ile muamele edilerek flask yüzeyinden kaldırıldı.
- 2) Santrifügasyon işleminden sonra tripan mavisi boyası kullanılarak hemositometrede hücre sayımı yapıldı ve gerekli hücre miktarına dilüsyon yapıldı.
- 3) 96 kuyucuklu altın mikroelektrotlarla entegre e-plate içerisindeki her kuyuya 100 µl besiyeri koyuldu ve 37°C'de, % 5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyonu takiben bazal ölçüm yapılmak üzere e-plate xCELLigence cihazına yerleştirildi.



- 4) Ölçüm tamamlandıktan sonra e-plate cihazdan çıkartıldı, VCaP ve Calu-1 hücreleri 100 µl besiyeri içerisinde  $1 \times 10^4$  hücre/kuyucuk (3 tekrarlı) olacak şekilde 96 kuyucuklu e-plate'e ekildi.
- 5) 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren etüvde 96 saatlik inkübasyon için, e-plate cihaza yerleştirildi ve 30 dakika sonra empedans okuması başlatıldı.
- 6) 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 24 saatlik inkübasyonu takiben e-plate cihazdan alındı ve tüm kuyucuklardaki yapışmış olan hücrelerin üzerinden (hücrelere zarar vermeden) 100 µl besiyeri uzaklaştırıldı.
- 7) *Rosmarinus officinalis* L.'in infüzyon ve alkollü ekstraktları, kuyucuklardaki son konsantrasyonları 200 µl içerisinde 400 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml ve 6,25 µg/ml olacak şekilde (100 µl/kuyucuk) hücreler üzerine uygulandı.
- 8) Etken madde uygulamasının ardından e-plate tekrar cihaza yerleştirildi ve hücreler 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 72 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.
- 9) Zamana bağlı hücre indeksi grafiği "RTCA software" programı kullanılarak görüntüledi. IC<sub>50</sub> değerleri ise, sigmoidal doz-yanıt eğrisi ile  $[Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{Log IC}_{50} - X) \times \text{HillSlope}))}]$  hesaplandı.

### 3.2.8. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler SPSS 22 bilgisayar paket programı kullanılarak yapıldı. Yüzde canlılık değerleri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak hesaplandı. 3 tekrarlı yapılan tüm analizlerin sonuçları ortalama ve standart sapma ile verildi. İstatistiksel olarak anlamlı veriler  $p < 0.05$  değerine göre belirlendi.

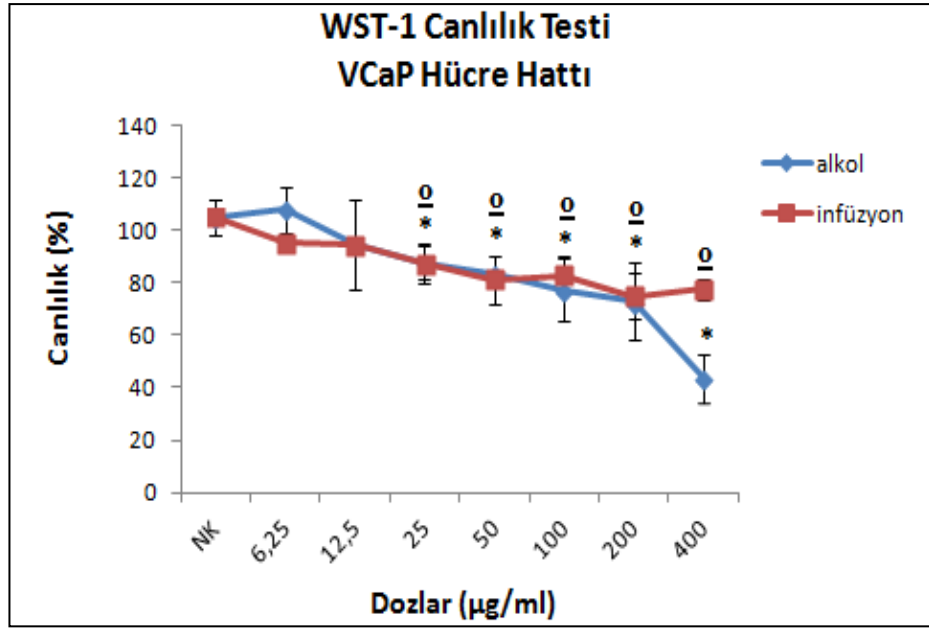
## 4. BULGULAR

### 4.1. WST-1 Canlılık Testi Bulguları

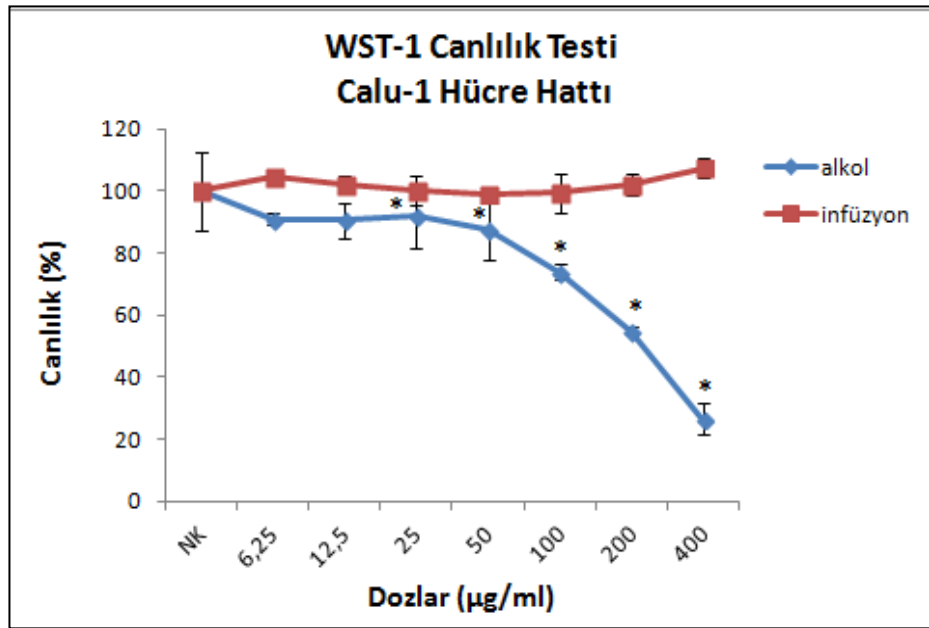
*Rosmarinus officinalis* L.'in infüzyon (su) ve alkol (etanol) ekstrelerinin logaritmik dozlarının (400 µg/ml - 200 µg/ml - 100 µg/ml - 50 µg/ml - 25 µg/ml - 12,5 µg/ml - 6,25 µg/ml) VCaP ve Calu-1 hücre hatlarının canlılığı üzerine olan etkisini belirleyebilmek için WST-1 canlılık testi yapıldı. Hücre hatları; 24, 48 ve 72 saat boyunca söz konusu ekstreler ile inkübasyona bırakıldı. WST-1 testinin uygulanmasının ardından 1 saatlik inkübasyon süresi boyunca 15 dakikalık periyotlar ile okuma yapıldı. En uyumlu sonuçlar; 24 ve 48 saatlik tedaviler için 30. dk'da, 72 saatlik tedavi için 45. dk'da elde edildi.

#### 4.1.1. 24 saatlik tedavi sonuçları

Hücre hatlarına 24 saat boyunca *R. officinalis* L. bitkisinin infüzyon (su) ve alkol (etanol) ekstrelerinin uygulanmasının ardından elde edilen sonuçlar sırasıyla Şekil 4.1 ve 4.2'de gösterildi. *R. officinalis*'in etanol ekstresinin uygulandığı VCaP ve Calu-1 hücre hatlarında konsantrasyon arttıkça hücrelerin canlılık yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi ( $p < 0.05$ ). Ancak, *R. officinalis*'in infüzyon ekstresinin hem VCaP hem de Calu-1 hücre hattında sitotoksik etkisi saptanmadı. İnfüzyon ve etanol ekstreleri uygulanan VCaP ve Calu-1 hücre hatlarının 24 saatlik tedavi sonrasında hesaplanan canlılık yüzde değerleri sırasıyla Çizelge 4.1 ve 4.2 de verildi. Her iki ekstrenin de sitotoksik aktivitesinin gösterilmesinde önemli olan  $IC_{50}$  (kontrol hücrelerine kıyasla ekstreler ile muamele sonrası hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon) ve  $IC_{90}$  (kontrol hücrelerine kıyasla ekstreler ile muamele sonrası hücrelerin %90'ını öldüren konsantrasyon) değerleri, her iki hücre hattı için de WST-1 testinin 24 saatlik tedavi sonuçlarına göre belirlendi. *R. officinalis* L.'in etanol ekstresinin; VCaP hücre hattındaki  $IC_{50}$  dozu 355,12 µg/ml, Calu-1 hücre hattındaki  $IC_{50}$  dozu ise 235,47 µg/ml olarak bulundu. *R. officinalis* L.'in infüzyon ekstresinin; VCaP ve Calu-1 hücre hatlarındaki  $IC_{50}$  dozu ise; >400 olarak belirlendi. Hem etanol hem de infüzyon ekstresinin VCaP ve Calu-1 hücrelerindeki  $IC_{90}$  değeri ise >400 olarak tespit edildi (Çizelge 4.3 ve 4.4).



**Şekil 4.1.** 24 saat boyunca *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının canlılık yüzdelerinin grafiği (Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir)



**Şekil 4.2.** 24 saat boyunca *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücre hattının canlılık yüzdelerinin grafiği (Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir)

\* ve  $\sigma$  Aynı doz içinde hücre soyları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ( $p < 0.05$ ) ifade etmektedir.

**Çizelge 4.1.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının 24 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri (WST-1 testi)

Dozlar ( $\mu\text{g/ml}$ )	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
6,25	107,93	95,09
12,5	94,43	94,86
25	87,60	87,65
50	83,31	81,37
100	77,45	83,05
200	72,79	74,96
400	43,41	77,55

**Çizelge 4.2.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücre hattının 24 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri (WST-1 testi)

Dozlar ( $\mu\text{g/ml}$ )	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
6,25	91,05	104,40
12,5	90,61	102,21
25	91,93	100,02
50	87,71	99,04
100	73,79	99,42
200	55,05	102,32
400	26,55	107,41

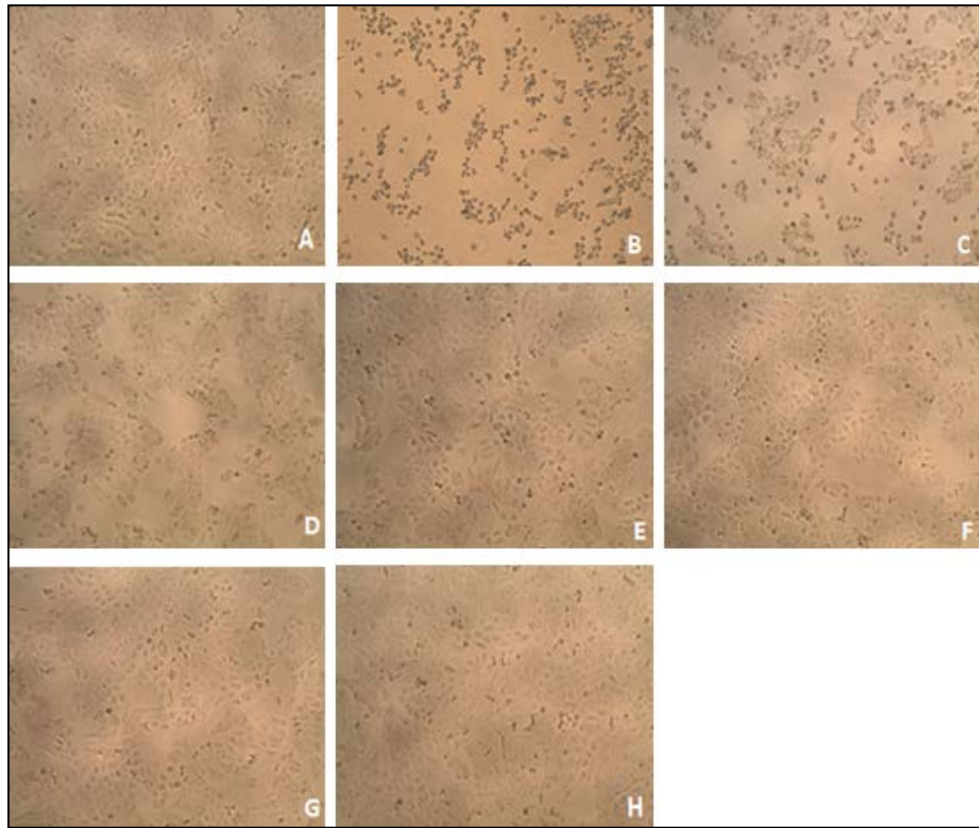
**Çizelge 4.3.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücrelerinin 24 saatlik tedavi sonrasındaki  $\text{IC}_{50}$  ve  $\text{IC}_{90}$  değerleri (WST-1 testi)

Doz ( $\mu\text{g/ml}$ )	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
$\text{IC}_{50}$	355,12	>400
$\text{IC}_{90}$	>400	>400

**Çizelge 4.4.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücrelerinin 24 saatlik tedavi sonrasında  $IC_{50}$  ve  $IC_{90}$  değerleri (WST-1 testi)

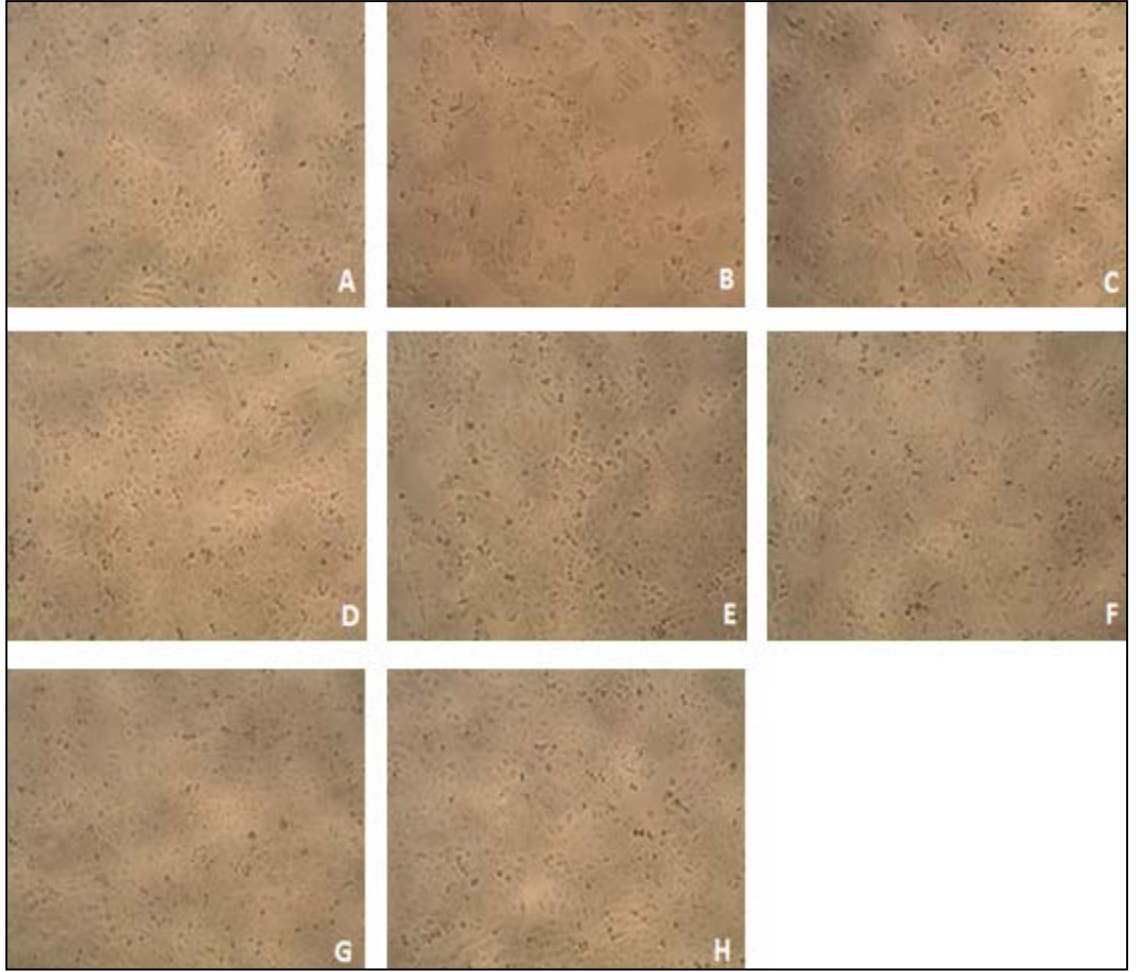
Doz ( $\mu\text{g/ml}$ )	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
$IC_{50}$	235,47	>400
$IC_{90}$	>400	>400

WST-1 canlılık testi uygulaması aşamasında; *Rosmarinus officinalis* L. bitkisinin infüzyon ve alkollü ekstrelerinin logaritmik dozlarının (6,25-400  $\mu\text{g/ml}$ ) 24 saatlik tedavi sonrasında hücreler üzerindeki etkileri, WST-1 solüsyonunun uygulanmasından önce morfolojik olarak faz-kontrast mikroskobunda görüntülendi (Şekil 4.3, 4.4, 4.5, 4.6).



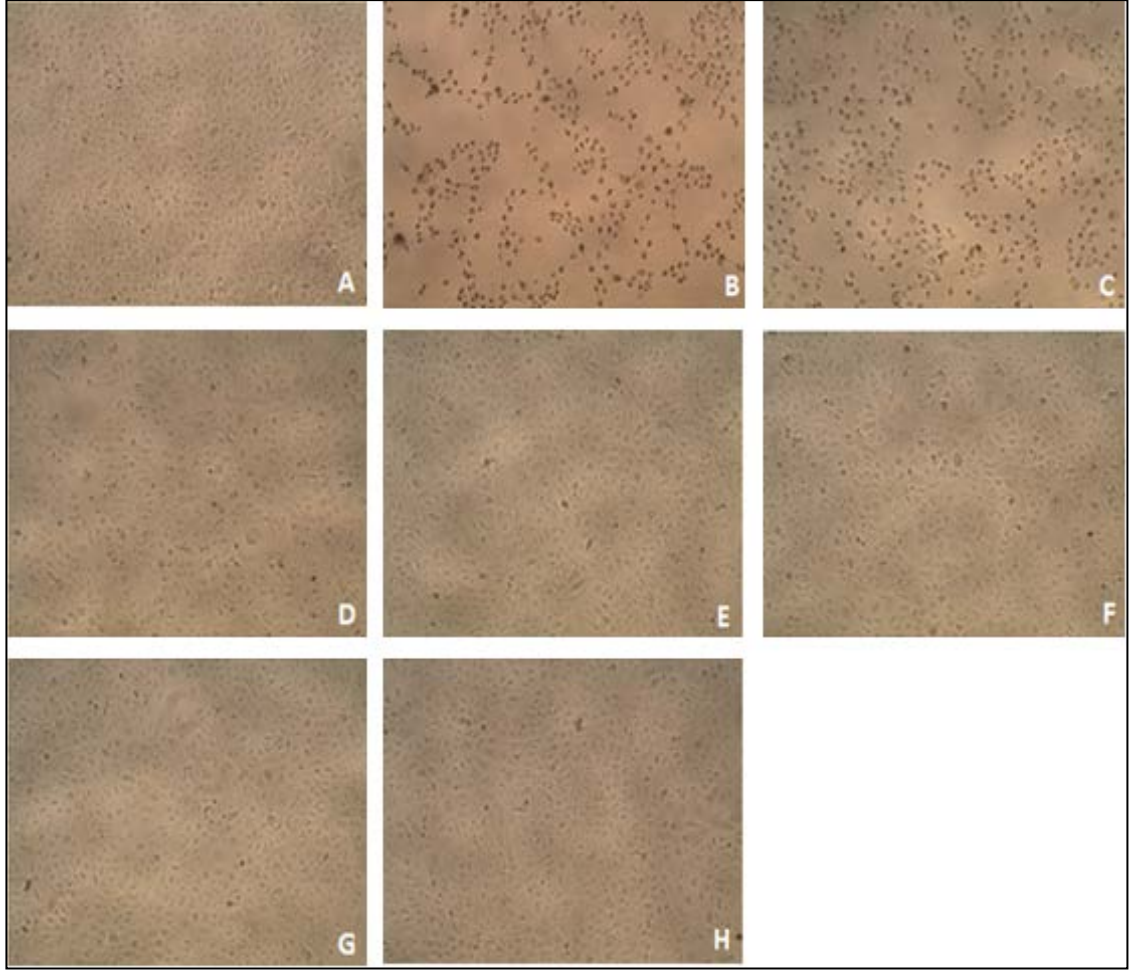
**Şekil 4.3.** *Rosmarinus officinalis* L. alkol ekstresi ile 24 saatlik tedavinin ardından VCaP hücrelerinin morfolojik görüntüleri

**A:** VCaP kontrol hücreleri **B:** 400  $\mu\text{g/ml}$  alkol ekstresi **C:** 200  $\mu\text{g/ml}$  alkol ekstresi **D:** 100  $\mu\text{g/ml}$  alkol ekstresi **E:** 50  $\mu\text{g/ml}$  alkol ekstresi **F:** 25  $\mu\text{g/ml}$  alkol ekstresi **G:** 12,5  $\mu\text{g/ml}$  alkol ekstresi **H:** 6,25  $\mu\text{g/ml}$  alkol ekstresi



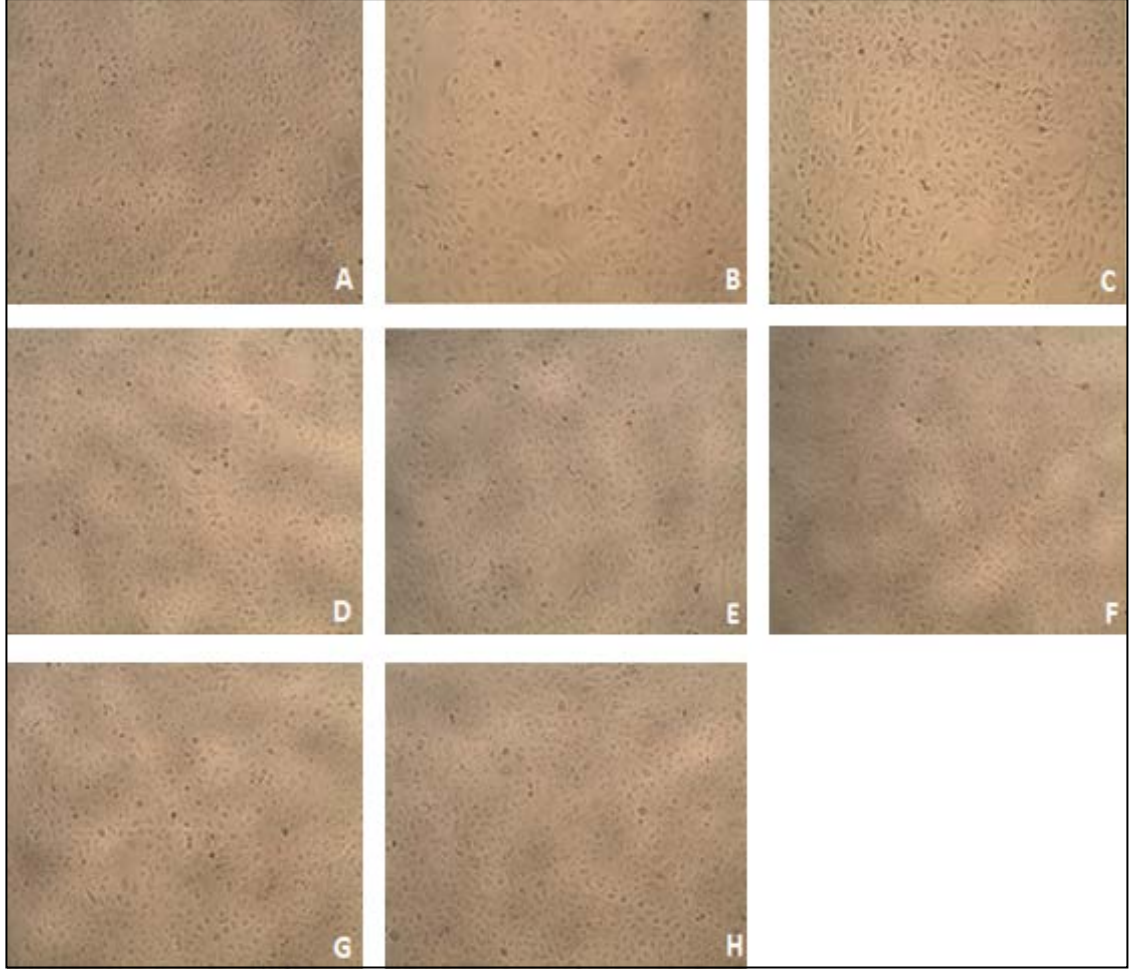
**Şekil 4.4.** *Rosmarinus officinalis* L. infüzyon ekstresi ile 24 saatlik tedavinin ardından VCaP hücrelerinin morfolojik görüntüleri

**A:** VCaP kontrol hücreleri **B:** 400 µg/ml infüzyon ekstresi **C:** 200 µg/ml infüzyon ekstresi **D:** 100 µg/ml infüzyon ekstresi **E:** 50 µg/ml infüzyon ekstresi **F:** 25 µg/ml infüzyon ekstresi **G:** 12,5 µg/ml infüzyon ekstresi **H:** 6,25 µg/ml infüzyon ekstresi



**Şekil 4.5.** *Rosmarinus officinalis* L. alkol ekstresi ile 24 saatlik tedavinin ardından Calu-1 hücrelerinin morfolojik görüntüleri

**A:** Calu-1 kontrol hücreleri **B:** 400 µg/ml alkol ekstresi **C:** 200 µg/ml alkol ekstresi **D:** 100 µg/ml alkol ekstresi **E:** 50 µg/ml alkol ekstresi **F:** 25 µg/ml alkol ekstresi **G:** 12,5 µg/ml alkol ekstresi **H:** 6,25 µg/ml alkol ekstresi



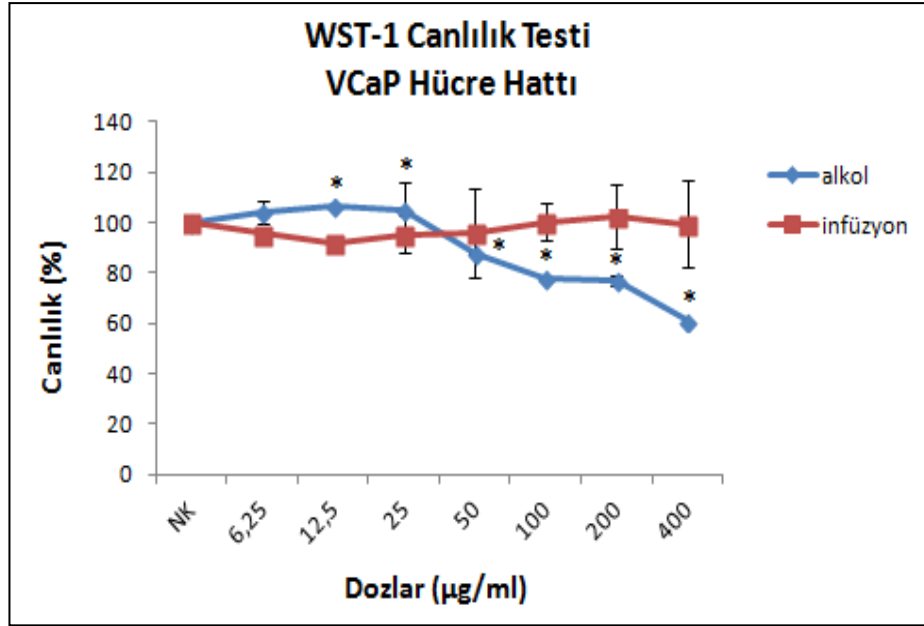
**Şekil 4.6.** *Rosmarinus officinalis* L. infüzyon ekstresi ile 24 saatlik tedavinin ardından Calu-1 hücrelerinin morfolojik görüntüleri

**A:** Calu-1 kontrol hücreleri **B:** 400 µg/ml infüzyon ekstresi **C:** 200 µg/ml infüzyon ekstresi **D:** 100 µg/ml infüzyon ekstresi **E:** 50 µg/ml infüzyon ekstresi **F:** 25 µg/ml infüzyon ekstresi **G:** 12,5 µg/ml infüzyon ekstresi **H:** 6,25 µg/ml infüzyon ekstresi

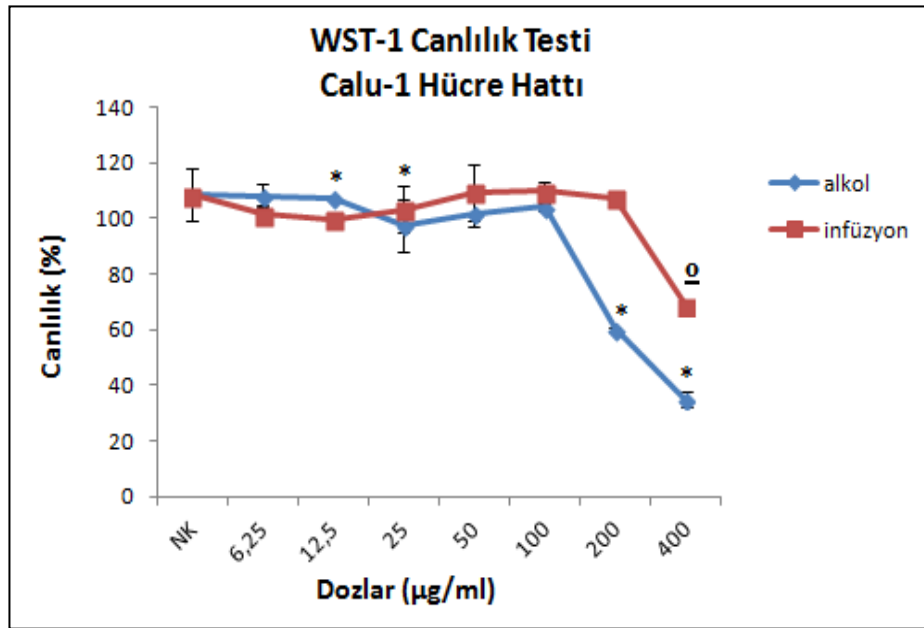
#### **4.1.2. 48 saatlik tedavi sonuçları**

Hücre hatlarına 48 saat boyunca *Rosmarinus officinalis* L. bitkisinin infüzyon ve etanol ekstralarının uygulanmasının ardından WST-1 testi ile elde edilen sonuçlar sırasıyla Şekil 4.7 ve 4.8'de gösterildi.





**Şekil 4.7.** 48 saat boyunca *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının canlılık yüzdelерinin grafiği (Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir)



**Şekil 4.7.** 48 saat boyunca *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücre hattının canlılık yüzdelерinin grafiği (Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir)

\* ve o Aynı doz içinde hücre soyları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ( $p < 0.05$ ) ifade etmektedir.

*Rosmarinus officinalis* L.'in alkol ve infüzyon ekstreleri ile 48 saatlik tedaviden sonra elde edilen sonuçlara göre; etanol ekstresinin yüksek konsantrasyonlarının, VCaP ve Calu-1 hücrelerinin canlılık yüzdelerinde azalışlara neden olduğu gözlemlendi. Etanol ekstresinin, VCaP hücrelerine kıyasla Calu-1 hücrelerinde daha sitotoksik olduğu tespit edildi. *R. officinalis* L.'in infüzyon (su) ekstresinin VCaP hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi saptanmadı ve IC<sub>50</sub> değeri belirlenemedi. Fakat, infüzyon ekstresinin, Calu-1 hücrelerinin canlılık yüzdelerinde az da olsa bir azalmaya sebep olduğu görüldü. İnfüzyon ve etanol ekstreleri uygulanan VCaP ve Calu-1 hücre hatlarının 48 saatlik tedavi sonrasında hesaplanan canlılık yüzde değerleri sırasıyla Çizelge 4.5 ve 4.6'de verildi.

**Çizelge 4.5.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının 48 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri (WST-1 testi)

Dozlar (µg/ml)	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
6,25	104,07	95,52
12,5	106,21	92,01
25	104,84	95,26
50	87,78	95,82
100	78,11	100,10
200	76,88	102,29
400	61,00	99,39

**Çizelge 4.6.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücre hattının 48 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri (WST-1 testi)

Dozlar (µg/ml)	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
6,25	108,00	101,48
12,5	107,49	99,60
25	97,37	103,21
50	101,87	109,51
100	104,11	110,01
200	60,16	107,28
400	34,87	68,80

*R. officinalis* L.'in her iki ekstresinin de sitotoksik aktivitesinin gösterilmesinde önemli olan IC<sub>50</sub> ve IC<sub>90</sub> değerleri, her iki hücre hattı için de WST-1 testinin 48 saatlik tedavi sonuçlarına göre belirlendi. *R. officinalis* L.'in etanol ekstresinin; VCaP hücre hattındaki IC<sub>50</sub> dozu >400 µg/ml, Calu-1 hücre hattındaki IC<sub>50</sub> dozu ise 280,34 µg/ml olarak bulundu. *R. officinalis* L.'in infüzyon ekstresinin, VCaP ve Calu-1 hücre hatlarında IC<sub>50</sub> dozu saptanamadı (IC<sub>50</sub> dozu, her iki hücrede de >400 µg/ml olarak tespit edildi.) (Çizelge 4.7 ve 4.8). *R. officinalis* L. etanol ekstresinin 400 µg/ml ve 200 µg/ml dozlarının VCaP ve Calu-1 hücre soyları üzerine olan etkileri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu (p<0.05).

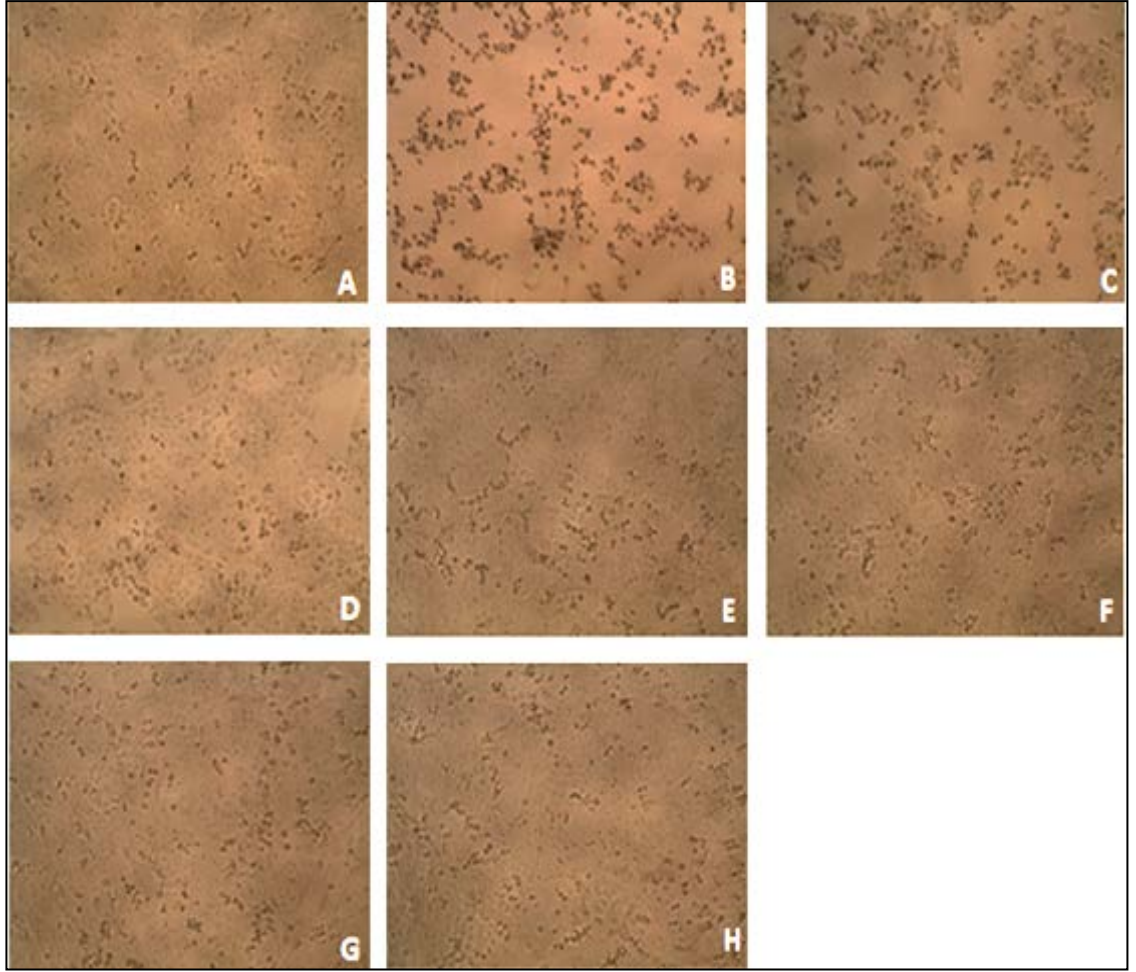
**Çizelge 4.7.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücrelerinin 48 saatlik tedavi sonrasındaki IC<sub>50</sub> ve IC<sub>90</sub> değerleri (WST-1 testi)

Doz (µg/ml)	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
IC <sub>50</sub>	>400	>400
IC <sub>90</sub>	>400	>400

**Çizelge 4.8.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücrelerinin 48 saatlik tedavi sonrasındaki IC<sub>50</sub> ve IC<sub>90</sub> değerleri (WST-1 testi)

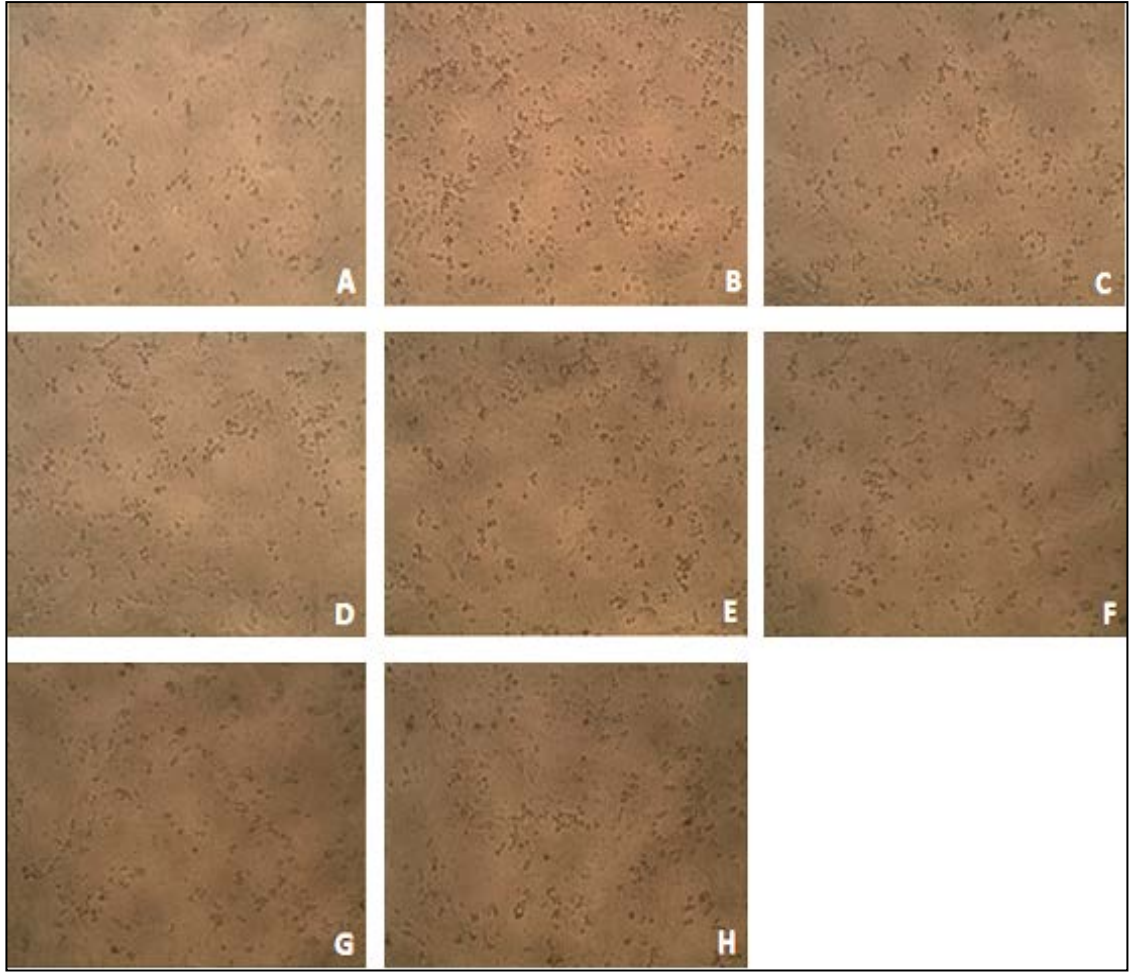
Doz (µg/ml)	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
IC <sub>50</sub>	280,34	>400
IC <sub>90</sub>	>400	>400

WST-1 canlılık testi uygulaması aşamasında; *Rosmarinus officinalis* L. bitkisinin infüzyon ve alkollü ekstrelerinin logaritmik dozlarının (6,25-400 µg/ml) 48 saatlik tedavi sonucunda hücreler üzerindeki etkileri, WST-1 solüsyonunun uygulanmasından önce morfolojik olarak faz-kontrast mikroskopunda görüntülendi (Şekil 4.8, 4.9, 4.10, 4.11).



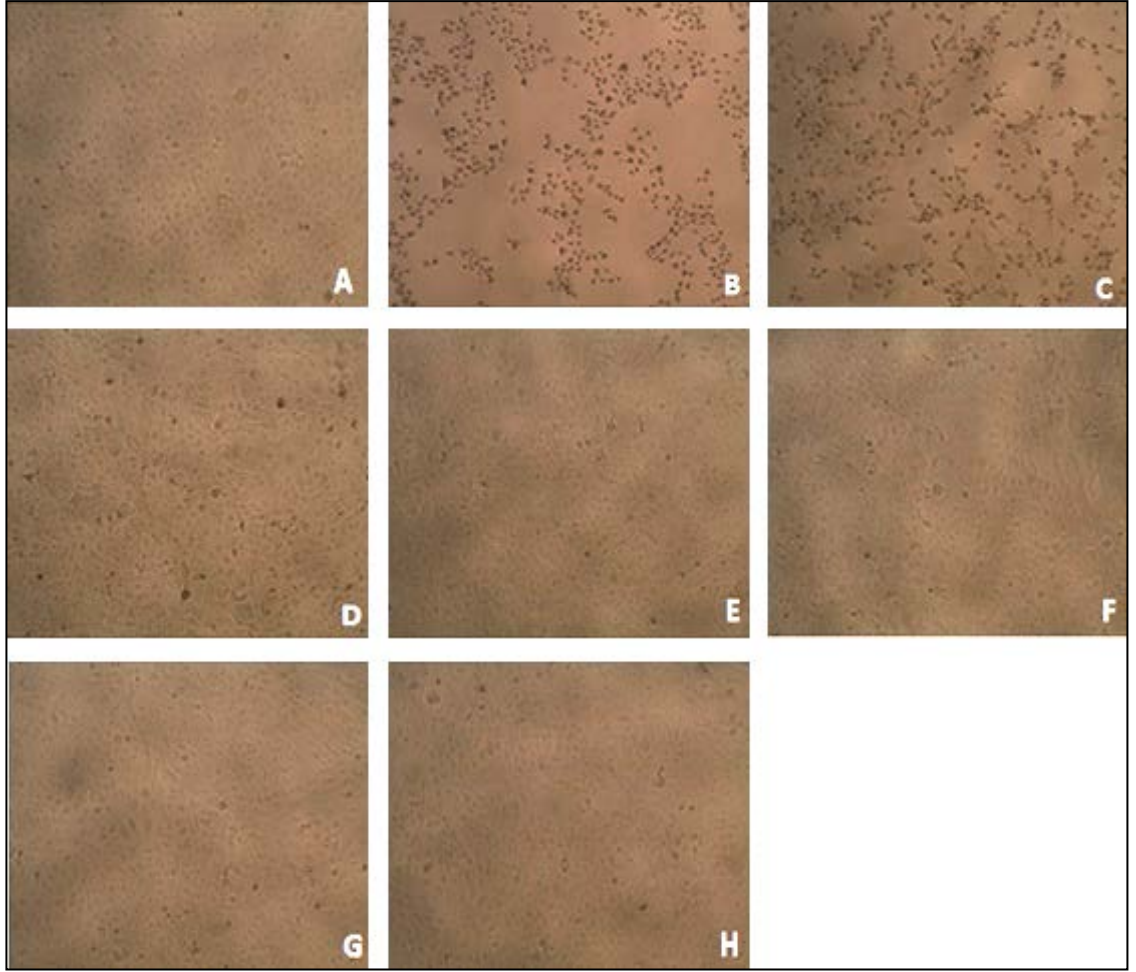
**Şekil 4.8.** *Rosmarinus officinalis* L. alkol ekstresi ile 48 saatlik tedavinin ardından VCaP hücrelerinin morfolojik görüntüleri

**A:** VCaP kontrol hücreleri **B:** 400 µg/ml alkol ekstresi **C:** 200 µg/ml alkol ekstresi **D:** 100 µg/ml alkol ekstresi **E:** 50 µg/ml alkol ekstresi **F:** 25 µg/ml alkol ekstresi **G:** 12,5 µg/ml alkol ekstresi **H:** 6,25 µg/ml alkol ekstresi



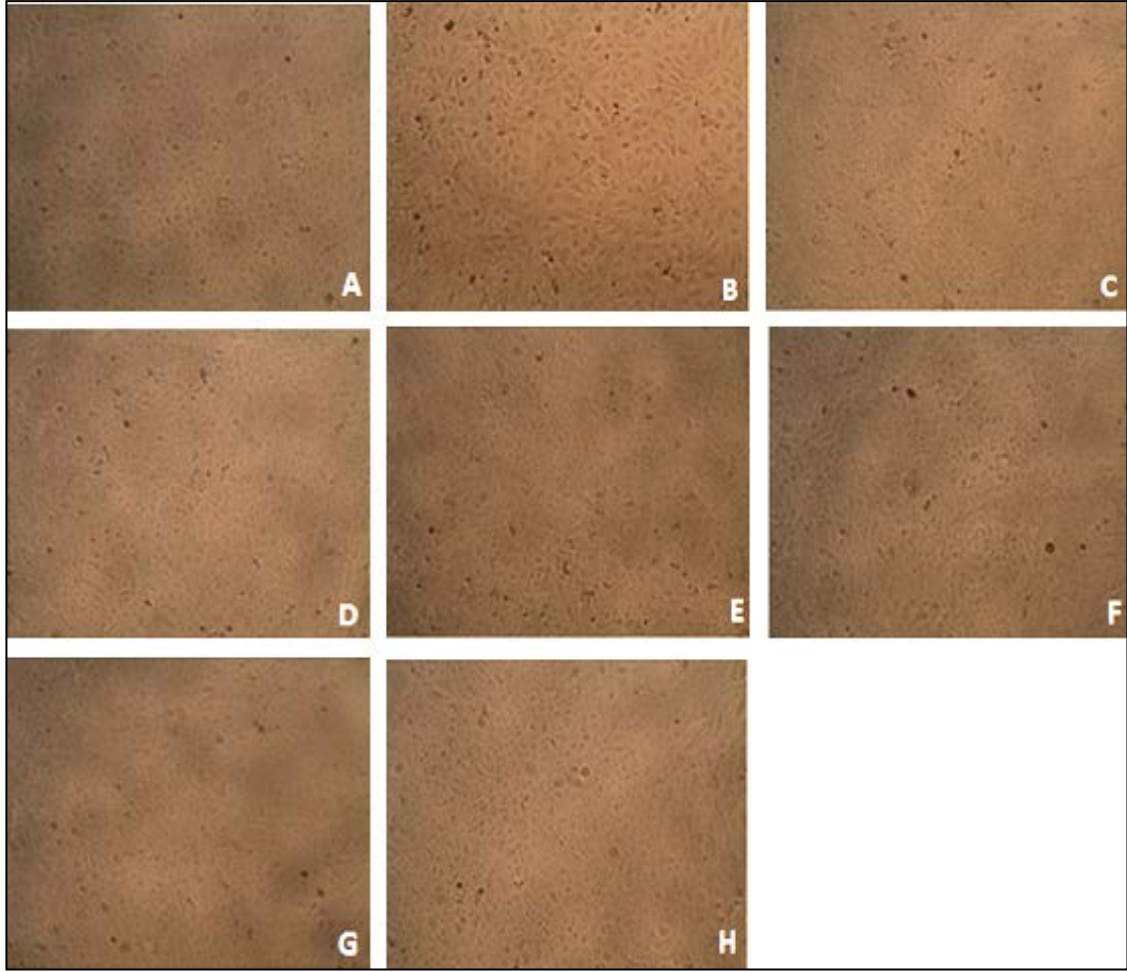
**Şekil 4.9.** *Rosmarinus officinalis* L. infüzyon ekstresi ile 48 saatlik tedavinin ardından VCaP hücrelerinin morfolojik görüntüleri

**A:** VCaP kontrol hücreleri **B:** 400 µg/ml infüzyon ekstresi **C:** 200 µg/ml infüzyon ekstresi **D:** 100 µg/ml infüzyon ekstresi **E:** 50 µg/ml infüzyon ekstresi **F:** 25 µg/ml infüzyon ekstresi **G:** 12,5 µg/ml infüzyon ekstresi **H:** 6,25 µg/ml infüzyon ekstresi



**Şekil 4.10.** *Rosmarinus officinalis* L. alkol ekstresi ile 48 saatlik tedavinin ardından Calu-1 hücrelerinin morfolojik görüntüleri

**A:** Calu-1 kontrol hücreleri **B:** 400 µg/ml alkol ekstresi **C:** 200 µg/ml alkol ekstresi **D:** 100 µg/ml alkol ekstresi **E:** 50 µg/ml alkol ekstresi **F:** 25 µg/ml alkol ekstresi **G:** 12,5 µg/ml alkol ekstresi **H:** 6,25 µg/ml alkol ekstresi

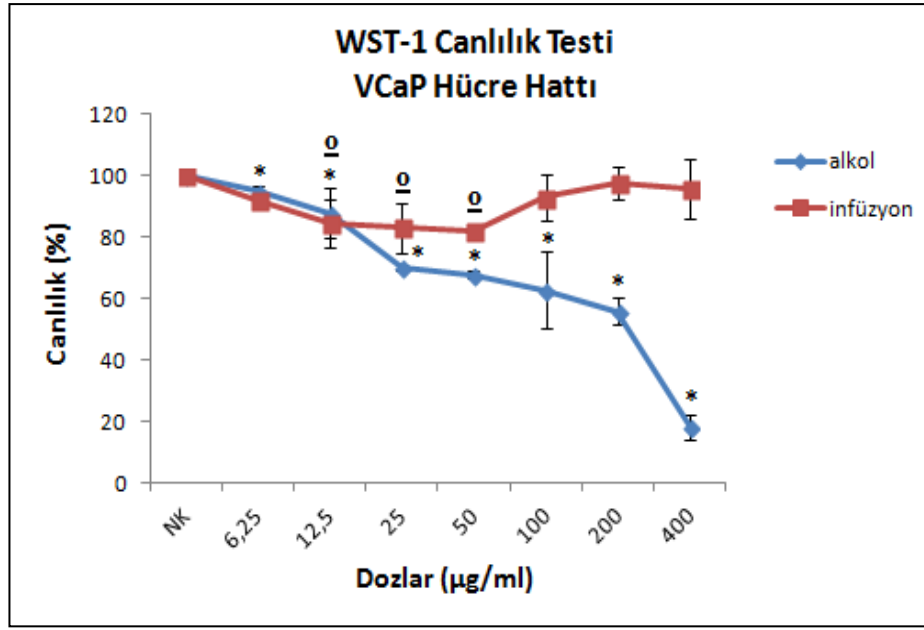


**Şekil 4.11.** *Rosmarinus officinalis* L. infüzyon ekstresi ile 48 saatlik tedavinin ardından Calu-1 hücrelerinin morfolojik görüntüleri

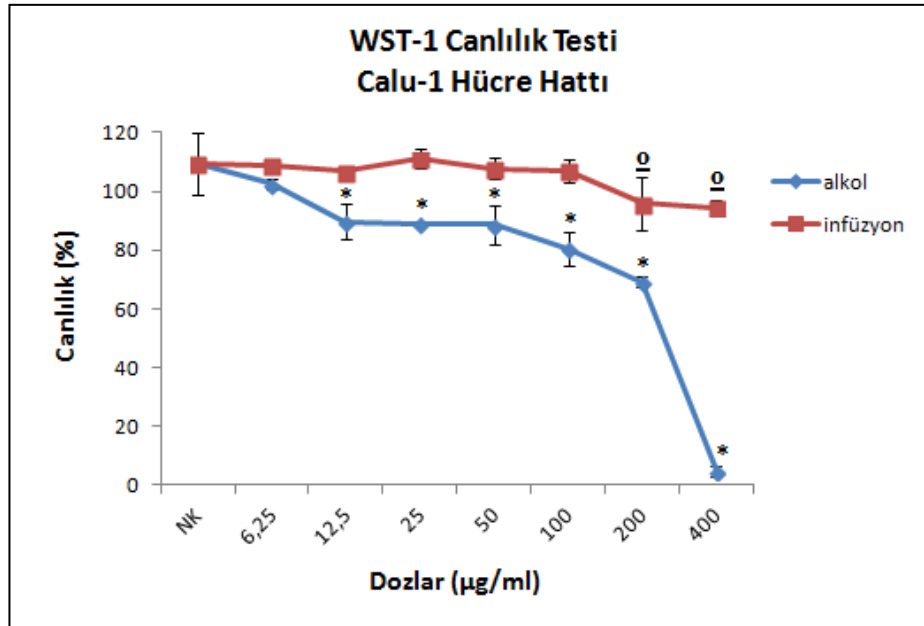
**A:** Calu-1 kontrol hücreleri **B:** 400 µg/ml infüzyon ekstresi **C:** 200 µg/ml infüzyon ekstresi **D:** 100 µg/ml infüzyon ekstresi **E:** 50 µg/ml infüzyon ekstresi **F:** 25 µg/ml infüzyon ekstresi **G:** 12,5 µg/ml infüzyon ekstresi **H:** 6,25 µg/ml infüzyon ekstresi

#### **4.1.3. 72 saatlik tedavi sonuçları**

Hücre hatlarına 72 saat boyunca *Rosmarinus officinalis* L. bitkisinin infüzyon ve etanol ekstralarının uygulanmasının ardından WST-1 testi ile elde edilen sonuçlar sırasıyla Şekil 4.12 ve 4.13'de gösterildi.



**Şekil 4.12.** 72 saat boyunca *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının canlılık yüzdelerinin grafiği (Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir)



**Şekil 4.12.** 72 saat boyunca *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının canlılık yüzdelerinin grafiği (Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir)

\* ve o Aynı doz içinde hücre soyları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ( $p < 0.05$ ) ifade etmektedir.



*Rosmarinus officinalis* L.'in etanol ekstresinin uygulandığı VCaP ve Calu-1 hücre hatlarında konsantrasyon arttıkça hücrelerin canlılık yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi ( $p < 0.05$ ). Özellikle etanol ekstresinin yüksek dozlarının VCaP ve Calu-1 hücrelerinde anti-proliferatif etkiye neden olduğu bulundu. *Rosmarinus officinalis* L.'in infüzyon (su) ekstresinin, VCaP ve Calu-1 hücre hatları üzerinde sitotoksik etkisi saptanamadı ve her iki ekstre için de  $IC_{50}$  değerleri belirlenemedi. VCaP ve Calu-1 hücre hatlarının 72 saatlik tedavi sonrasında hesaplanan canlılık yüzde değerleri sırasıyla Çizelge 4.9 ve 4.10'da verildi.

**Çizelge 4.9.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının 72 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri (WST-1 testi)

Dozlar ( $\mu\text{g/ml}$ )	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
6,25	94,94	92,18
12,5	87,84	84,40
25	70,16	83,14
50	67,93	81,94
100	62,92	93,06
200	55,79	97,70
400	18,03	95,81

**Çizelge 4.10.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücre hattının 72 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri (WST-1 testi)

Dozlar ( $\mu\text{g/ml}$ )	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
6,25	102,51	108,75
12,5	89,77	106,67
25	89,08	110,98
50	88,61	107,83
100	80,48	106,97
200	69,07	95,89
400	4,80	94,56

*R. officinalis* L.'in her iki ekstresinin de sitotoksik/anti-proliferatif etkisinin gösterilmesinde önemli olan IC<sub>50</sub> ve IC<sub>90</sub> değerleri, her iki hücre hattı için de WST-1 testinin 72 saatlik tedavi sonuçlarına göre belirlendi. *R. officinalis* L.'in etanol ekstresinin; VCaP hücre hattı için IC<sub>50</sub> dozu 230,66 µg/ml, IC<sub>90</sub> dozu >400 µg/ml; Calu-1 hücre hattı için IC<sub>50</sub> dozu 259,34 µg/ml, IC<sub>90</sub> dozu 383,81 µg/ml olarak bulundu. *R. officinalis* L.' in infüzyon ekstresinin, VCaP ve Calu-1 hücre hatları için IC<sub>50</sub> ve IC<sub>90</sub> dozları saptanamadı (IC<sub>50</sub> ve IC<sub>90</sub> dozları, her iki hücrede de >400 µg/ml olarak tespit edildi.) (Çizelge 4.11 ve 4.12).

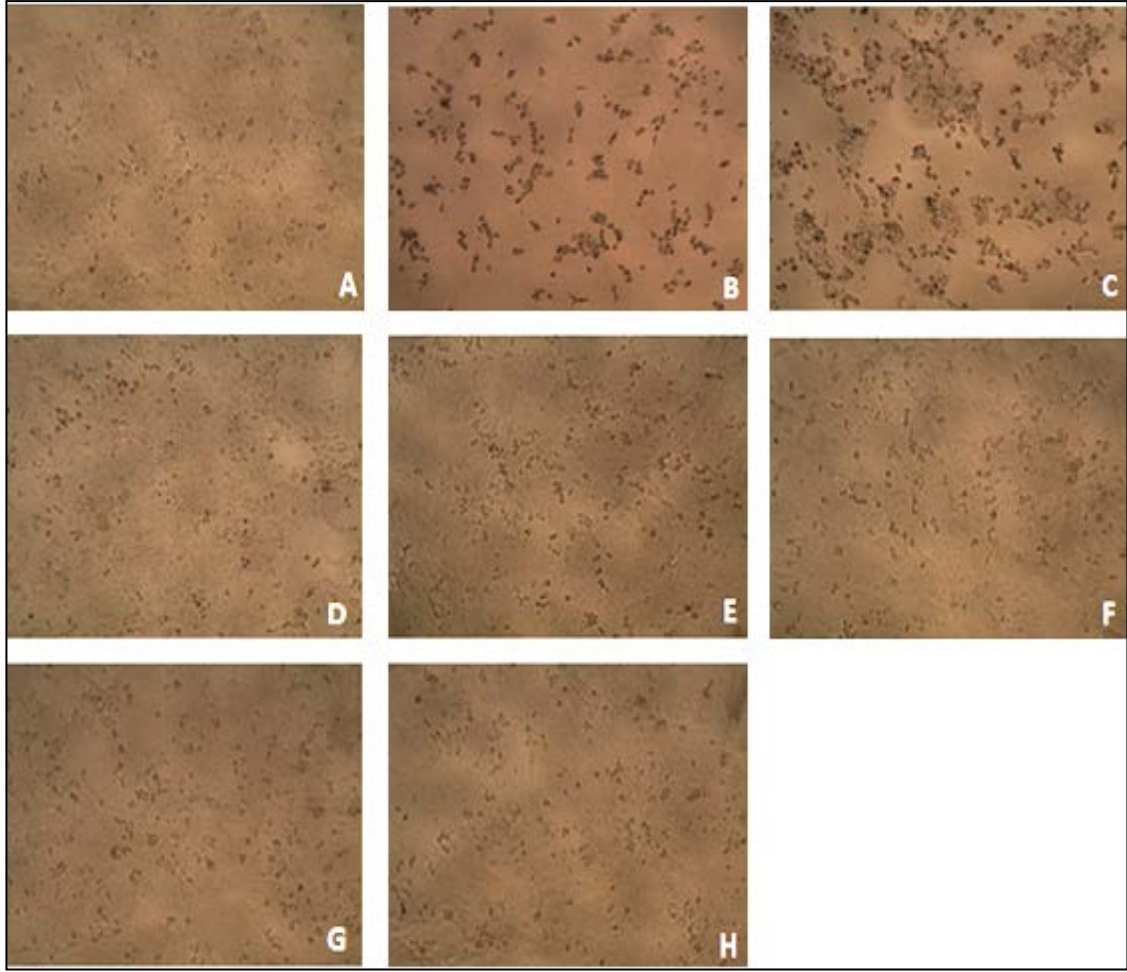
**Çizelge 4.11.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücrelerinin 72 saatlik tedavi sonrasındaki IC<sub>50</sub> ve IC<sub>90</sub> değerleri (WST-1 testi)

Doz (µg/ml)	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
IC <sub>50</sub>	230,66	>400
IC <sub>90</sub>	>400	>400

**Çizelge 4.12.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücrelerinin 72 saatlik tedavi sonrasındaki IC<sub>50</sub> ve IC<sub>90</sub> değerleri (WST-1 testi)

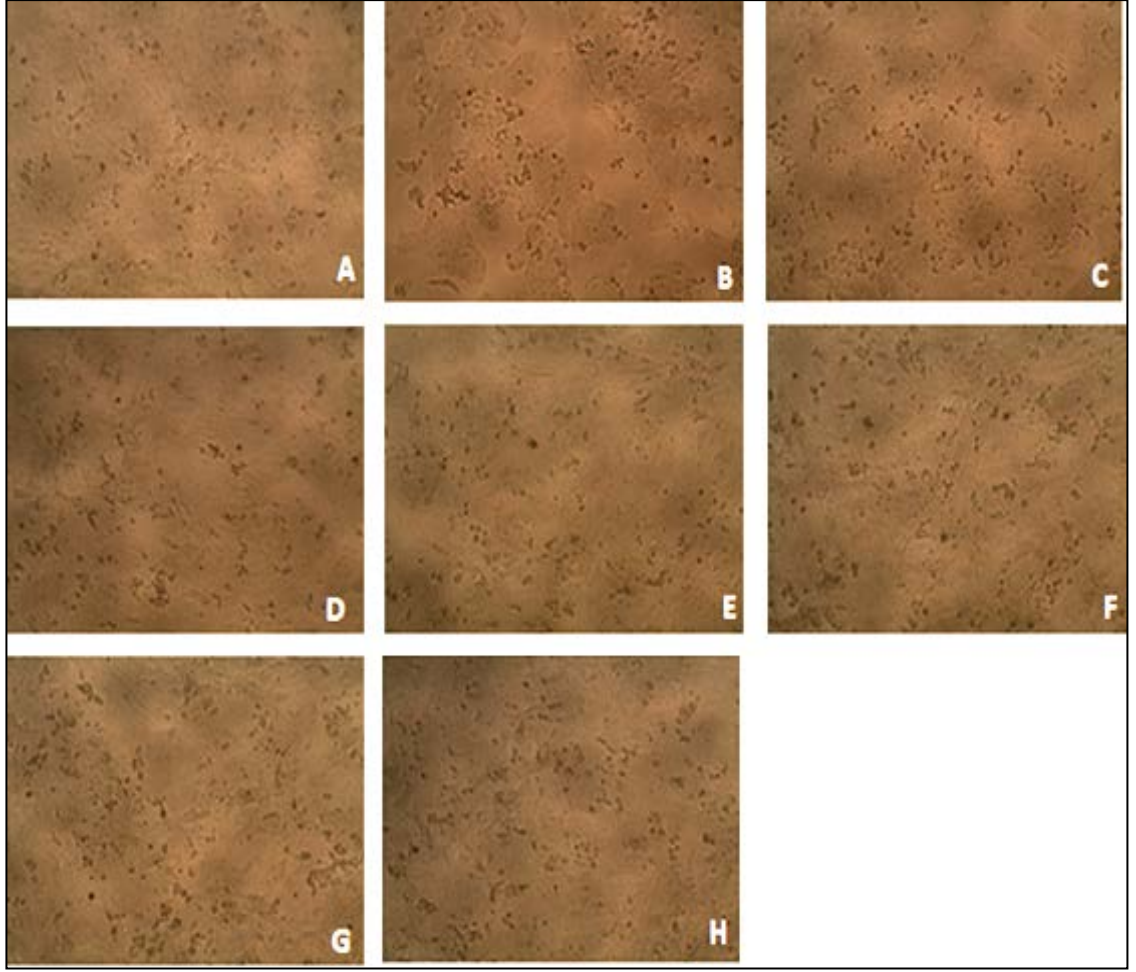
Doz (µg/ml)	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
IC <sub>50</sub>	259,34	>400
IC <sub>90</sub>	383,81	>400

WST-1 canlılık testi uygulaması aşamasında; *Rosmarinus officinalis* L. bitkisinin infüzyon ve alkollü ekstrelerinin logaritmik dozlarının (6,25-400 µg/ml) 72 saatlik tedavi sonucunda hücreler üzerindeki etkileri, WST-1 solüsyonunun uygulanmasından önce morfolojik olarak faz-kontrast mikroskopunda görüntülendi (Şekil 4.13, 4.14, 4.15, 4.16).



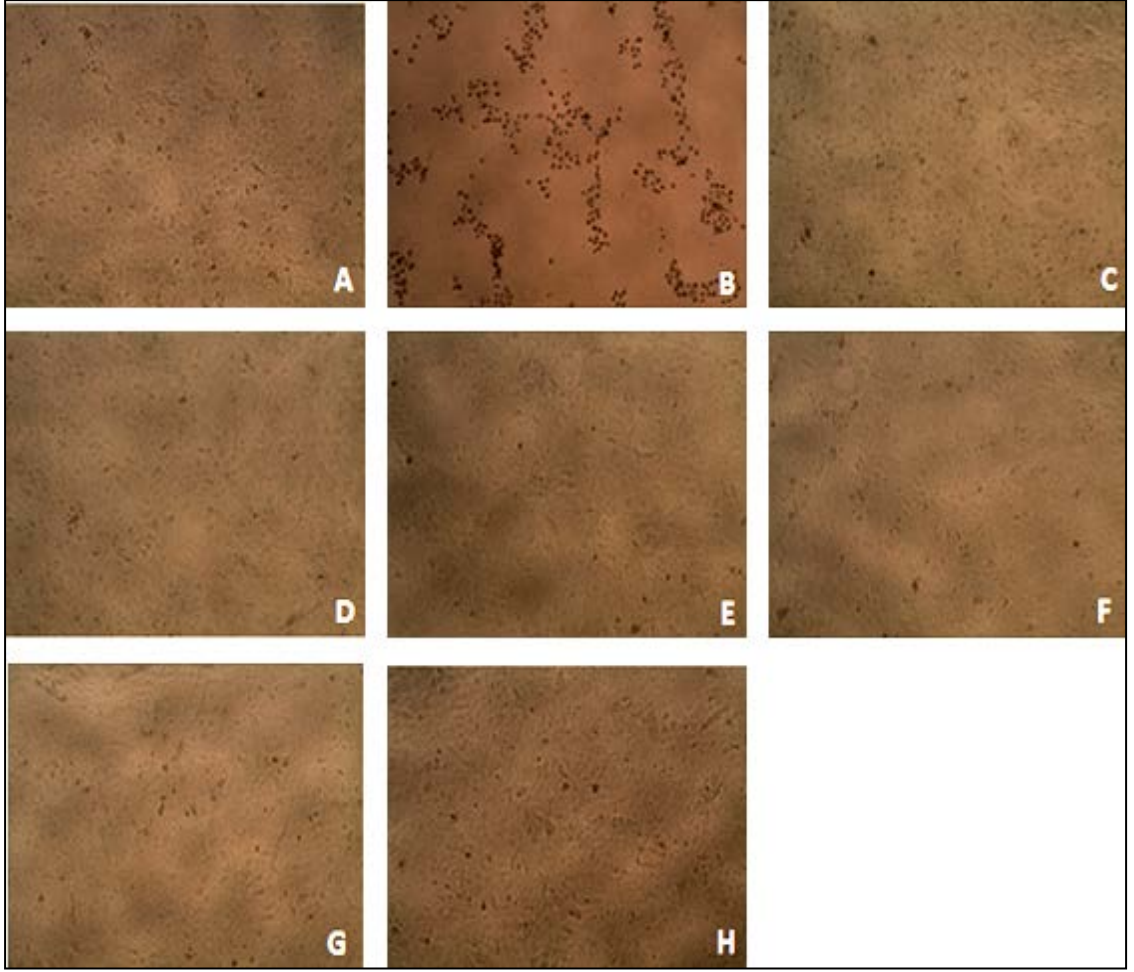
**Şekil 4.13.** *Rosmarinus officinalis* L. alkol ekstresi ile 72 saatlik tedavinin ardından VCaP hücrelerinin morfolojik görüntüleri

**A:** VCaP kontrol hücreleri **B:** 400 µg/ml alkol ekstresi **C:** 200 µg/ml alkol ekstresi **D:** 100 µg/ml alkol ekstresi **E:** 50 µg/ml alkol ekstresi **F:** 25 µg/ml alkol ekstresi **G:** 12,5 µg/ml alkol ekstresi **H:** 6,25 µg/ml alkol ekstresi



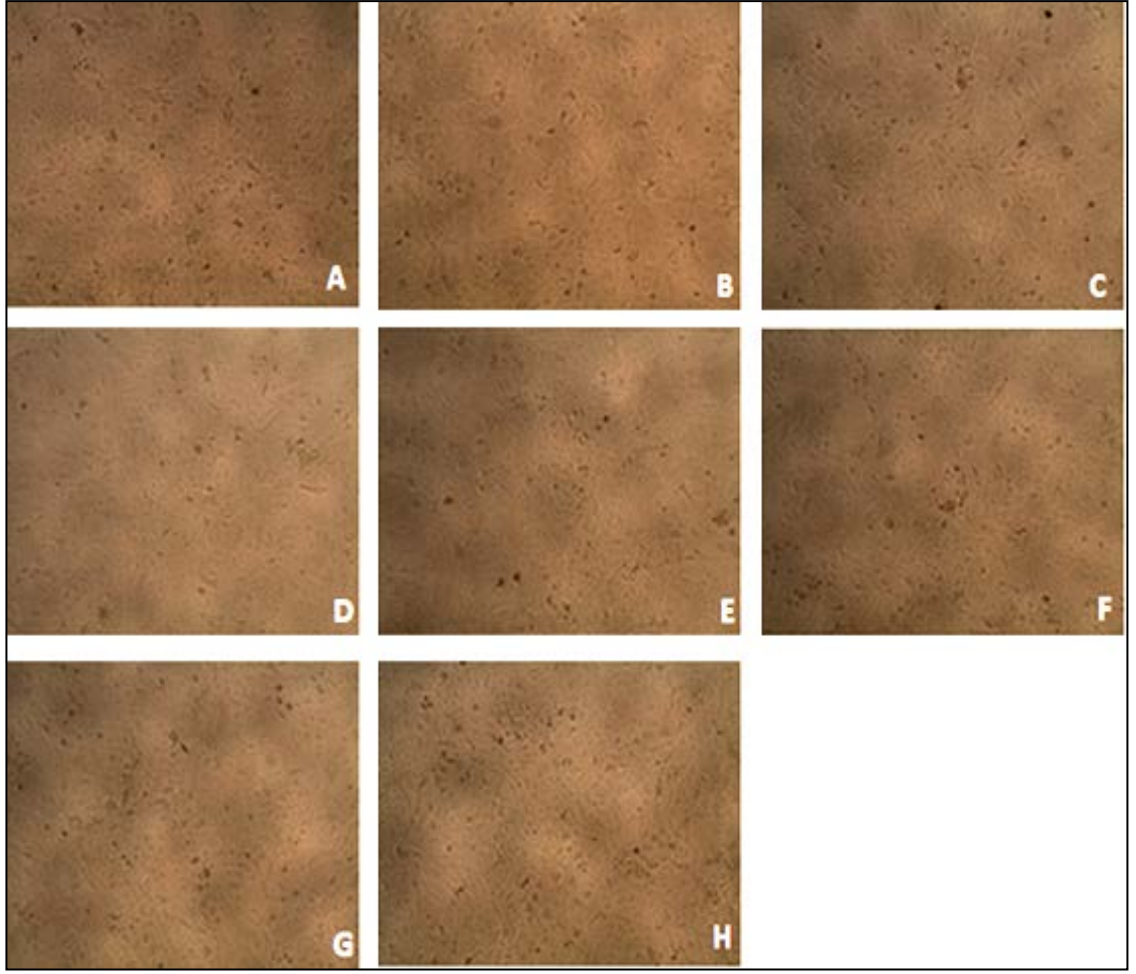
**Şekil 4.14.** *Rosmarinus officinalis* L. infüzyon ekstresi ile 72 saatlik tedavinin ardından VCaP hücrelerinin morfolojik görüntüleri

**A:** VCaP kontrol hücreleri **B:** 400 µg/ml infüzyon ekstresi **C:** 200 µg/ml infüzyon ekstresi **D:** 100 µg/ml infüzyon ekstresi **E:** 50 µg/ml infüzyon ekstresi **F:** 25 µg/ml infüzyon ekstresi **G:** 12,5 µg/ml infüzyon ekstresi **H:** 6,25 µg/ml infüzyon ekstresi



**Şekil 4.15.** *Rosmarinus officinalis* L. alkol ekstresi ile 72 saatlik tedavinin ardından Calu-1 hücrelerinin morfolojik görüntüleri

**A:** Calu-1 kontrol hücreleri **B:** 400 µg/ml alkol ekstresi **C:** 200 µg/ml alkol ekstresi **D:** 100 µg/ml alkol ekstresi **E:** 50 µg/ml alkol ekstresi **F:** 25 µg/ml alkol ekstresi **G:** 12,5 µg/ml alkol ekstresi **H:** 6,25 µg/ml alkol ekstresi



**Şekil 4.16.** *Rosmarinus officinalis* L. infüzyon ekstresi ile 72 saatlik tedavinin ardından Calu-1 hücrelerinin morfolojik görüntüleri

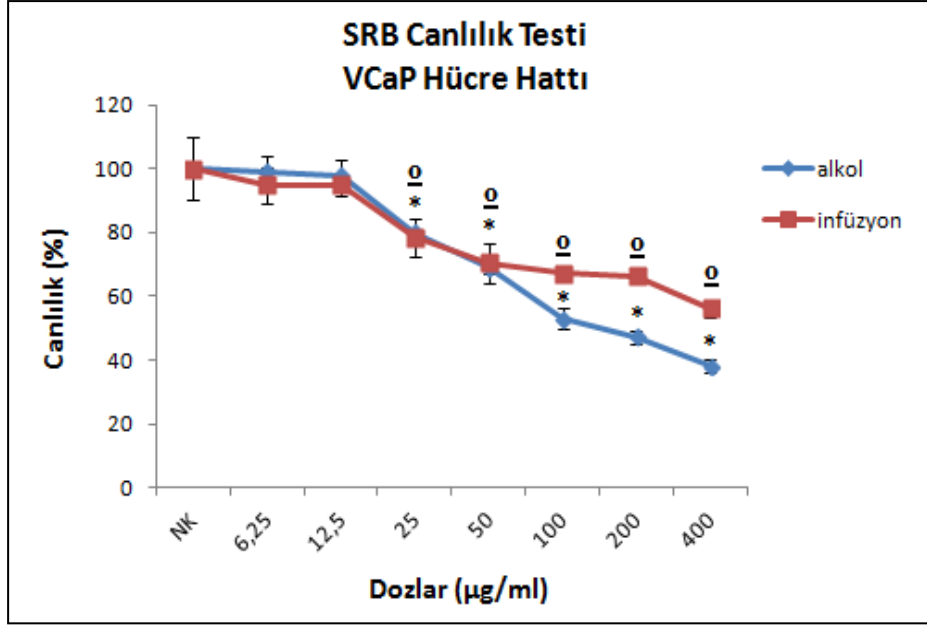
**A:** Calu-1 kontrol hücreleri **B:** 400 µg/ml infüzyon ekstresi **C:** 200 µg/ml infüzyon ekstresi **D:** 100 µg/ml infüzyon ekstresi **E:** 50 µg/ml infüzyon ekstresi **F:** 25 µg/ml infüzyon ekstresi **G:** 12,5 µg/ml infüzyon ekstresi **H:** 6,25 µg/ml infüzyon ekstresi

## 4.2. SRB Canlılık Testi Bulguları

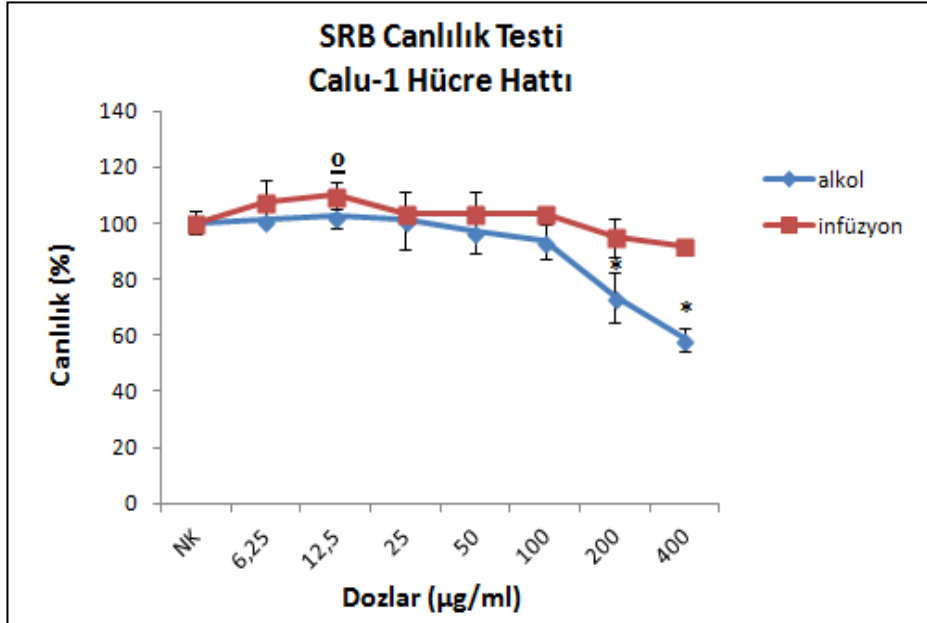
*Rosmarinus officinalis* L.'in infüzyon (su) ve alkol (etanol) ekstralarının logaritmik dozlarının 24, 48 ve 72 saat boyunca VCaP ve Calu-1 hücre hatlarının canlılığı üzerine olan sitotoksik etkisini belirleyebilmek için SRB testi yapıldı. Kolorimetrik SRB testi ile hücrelerde canlılığın bir göstergesi olan toplam protein sentezi oranı belirlendi.

### 4.2.1. 24 saatlik tedavi sonuçları

6,25-400 µg/ml doz aralığında hazırlanan *R. officinalis* L. infüzyon ve alkol ekstralarının 24 saat boyunca VCaP ve Calu-1 hücrelerindeki sellüler protein miktarına olan etkisi Şekil 4.17 ve 4.18'de gösterildi. *R. officinalis* L.'in etanol ekstresinin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak uygulandığı VCaP ve Calu-1 hücrelerinde sellüler protein miktarında azalmalara neden olduğu belirlendi. Protein miktarındaki bu azalışlar, VCaP ve Calu-1 hücrelerinin canlılık yüzdelerinde meydana gelen azalışlar olarak yorumlandı. Etanol ekstresinin 400 µg/ml konsantrasyonunun, VCaP hücre soyu üzerinde sitotoksik etki gösterdiği gözlenirken; Calu-1 hücre soyları üzerinde sitotoksik aktivite belirlenemedi. *R. officinalis* L.'in infüzyon ekstresinin 24 saat sonundaki sitotoksik aktivitesine bakıldığında; VCaP hücreleri üzerinde doza bağlı bir düşüş tespit edilirken, Calu-1 hücreleri üzerinde sitotoksik etki saptanmadı. *R. officinalis* L. ekstralarının hücre soyları üzerine olan etkileri kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, etanol ekstresinin 400-6,25 µg/ml dozlarının hücre soyları üzerine olan etkilerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ( $p < 0.05$ ) fakat infüzyon ekstresinin söz konusu dozlarının etkilerinin her iki hücre soyunda da istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu ( $p > 0.05$ ).



Şekil 4.17. 24 saat boyunca *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının canlılık yüzdelerinin grafiği (Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir)



Şekil 4.18. 24 saat boyunca *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının canlılık yüzdelerinin grafiği (Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir)

\* ve o Aynı doz içinde hücre soyları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ( $p < 0.05$ ) ifade etmektedir.



VCaP ve Calu-1 hücre hatlarının 24 saatlik tedavi sonrasında hesaplanan canlılık yüzde değerleri sırasıyla Çizelge 4.13 ve 4.14'de verildi. Ayrıca, *R. officinalis* L.'in her iki ekstresinin de sitotoksik/anti-proliferatif etkisinin gösterilmesinde önemli olan IC<sub>50</sub> ve IC<sub>90</sub> değerleri, her iki hücre hattı için de SRB testinin 24 saatlik tedavi sonuçlarına göre belirlendi. *R. officinalis* L.'in etanol ekstresinin; VCaP hücre hattı için IC<sub>50</sub> dozu 141,13 µg/ml, Calu-1 hücre hattı için >400 µg/ml olarak belirlendi. *R. officinalis* L.'in infüzyon ekstresi uygulanan VCaP hücrelerinde doz artışına paralel olarak ölüm oranında da artış görülmesine rağmen IC<sub>50</sub> değeri >400 µg/ml olarak tespit edildi. *R. officinalis* L.'in infüzyon ekstresinin Calu-1 hücre hattı üzerindeki sitotoksik/sitostatik aktivitesi saptanamadı (Çizelge 4.15 ve 4.16).

**Çizelge 4.13.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının 24 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri (SRB testi)

Dozlar (µg/ml)	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
6,25	99,23	95,00
12,5	97,93	94,80
25	79,96	78,40
50	68,89	70,46
100	52,88	67,33
200	47,28	66,42
400	38,03	56,26

**Çizelge 4.14.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücre hattının 24 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri (SRB testi)

Dozlar (µg/ml)	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
6,25	101,18	107,65
12,5	102,65	109,95
25	100,98	103,24
50	96,86	103,53
100	93,53	103,24
200	73,73	94,90
400	58,53	91,96

**Çizelge 4.15.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücrelerinin 24 saatlik tedavi sonrasındaki IC<sub>50</sub> ve IC<sub>90</sub> değerleri (SRB testi)

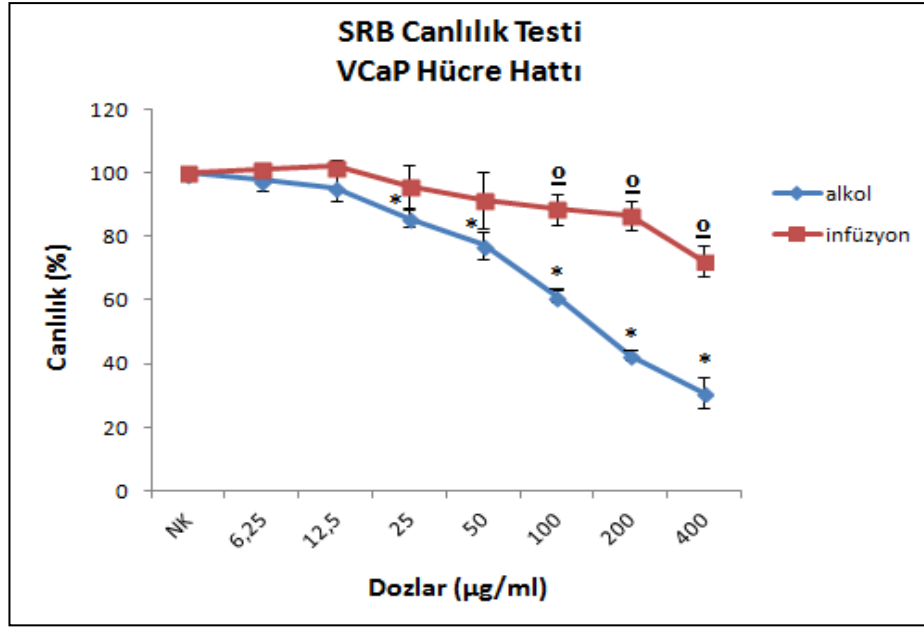
Doz (µg/ml)	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
IC <sub>50</sub>	141,13	>400
IC <sub>90</sub>	>400	>400

**Çizelge 4.16.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücrelerinin 24 saatlik tedavi sonrasındaki IC<sub>50</sub> ve IC<sub>90</sub> değerleri (SRB testi)

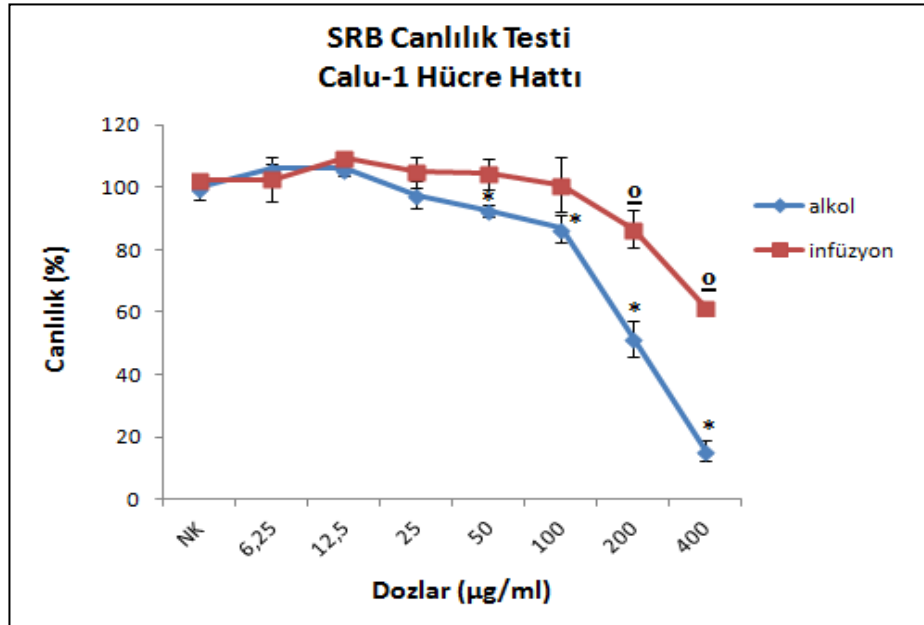
Doz (µg/ml)	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
IC <sub>50</sub>	>400	>400
IC <sub>90</sub>	>400	>400

#### 4.2.2. 48 saatlik tedavi sonuçları

Hücre hatlarına 48 saat boyunca *Rosmarinus officinalis* L. bitkisinin infüzyon ve etanol ekstrelerinin uygulanmasının ardından SRB canlılık testi ile elde edilen sonuçlar sırasıyla Şekil 4.19 ve 4.20'de gösterildi. *R. officinalis* L.'in etanol ve su ekstresinin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak uygulandığı VCaP ve Calu-1 hücrelerinin canlılık yüzdelerinde azalmalar olduğu gözlemlendi. Bu çalışma sonucuna göre; *R. officinalis* L.'in etanol ekstresinin 400 µg/ ml' lik konsantrasyonunun, Calu-1 hücreleri üzerinde VCaP hücrelerine kıyasla daha sitotoksik olduğu saptandı. *R. officinalis* L.'in su ekstresinin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak uygulandığı VCaP ve Calu-1 hücrelerinin canlılıklarında azalmalar olsa da önemli bir sitotoksik aktivite saptanamadı. *R. officinalis* L. etanol ekstresinin uygulandığı hücre soylarında konsantrasyon arttıkça hücrelerin canlılık yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi (p<0.05). *R. officinalis* L. infüzyon ekstresinin uygulandığı hücre soylarında ise, sadece yüksek dozlarda hücrelerin canlılık yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi (p<0.05).



**Şekil 4.19.** 48 saat boyunca *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının canlılık yüzdelerinin grafiği (Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir)



**Şekil 4.20.** 48 saat boyunca *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücre hattının canlılık yüzdelerinin grafiği (Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir)

\* ve <sup>o</sup> Aynı doz içinde hücre soyları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (p<0.05) ifade etmektedir.

VCaP ve Calu-1 hücre hatlarının 48 saatlik tedavi sonrasında hesaplanan canlılık yüzde değerleri sırasıyla Çizelge 4.17 ve 4.18' de verildi. Ayrıca, *R. officinalis* L.'in her iki ekstresinin de sitotoksik/anti-proliferatif etkisinin gösterilmesinde önemli olan IC<sub>50</sub> ve IC<sub>90</sub> değerleri, her iki hücre hattı için de SRB testinin 48 saatlik tedavi sonuçlarına göre belirlendi. *R. officinalis* L.'in etanol ekstresinin; VCaP hücre hattı için IC<sub>50</sub> dozu 160,70 µg/ml, Calu-1 hücre hattı için 200 µg/ml olarak belirlendi. *R. officinalis* L.'in infüzyon ekstresi uygulanan VCaP ve Calu-1 hücrelerinde, doz artışına paralel olarak canlılık oranları düşüş göstermesine rağmen önemli bir sitotoksik aktivite saptanamadı ve IC<sub>50</sub> değerleri >400 µg/ml olarak tespit edildi (Çizelge 4.19 ve 4.20).

**Çizelge 4.17.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının 48 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri (SRB testi)

Dozlar (µg/ml)	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
6,25	97,71	101,28
12,5	95,41	101,97
25	85,60	95,78
50	77,34	91,47
100	61,19	88,62
200	42,75	86,70
400	30,92	72,20

**Çizelge 4.18.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücre hattının 48 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri (SRB testi)

Dozlar (µg/ml)	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
6,25	105,95	102,59
12,5	106,16	109,62
25	97,62	104,87
50	92,54	104,32
100	86,81	100,86
200	51,56	86,54
400	15,56	61,40

**Çizelge 4.19.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücrelerinin 48 saatlik tedavi sonrasındaki IC<sub>50</sub> ve IC<sub>90</sub> değerleri (SRB testi)

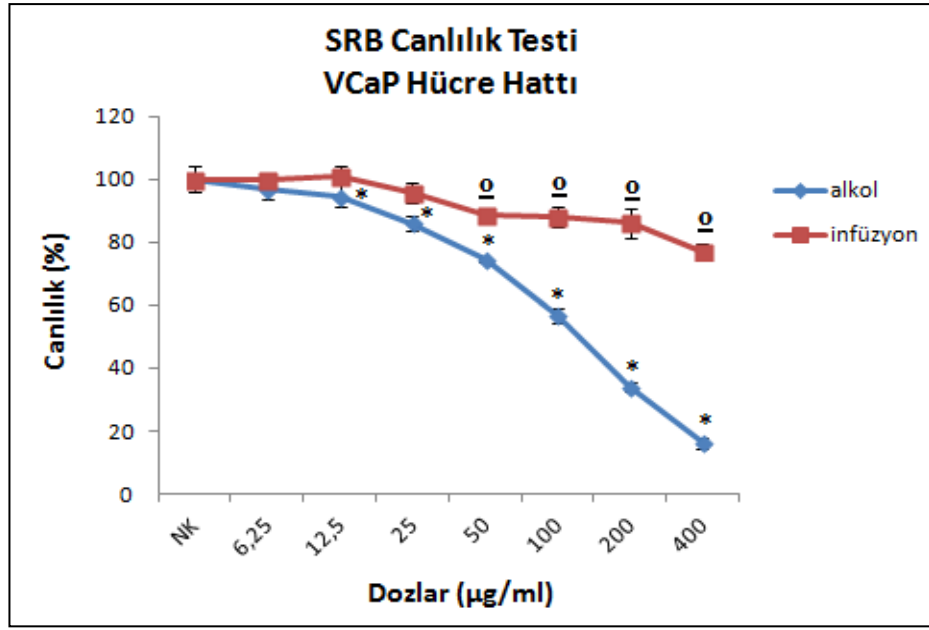
Doz (µg/ml)	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
IC <sub>50</sub>	160,70	>400
IC <sub>90</sub>	>400	>400

**Çizelge 4.20.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücrelerinin 48 saatlik tedavi sonrasındaki IC<sub>50</sub> ve IC<sub>90</sub> değerleri (SRB testi)

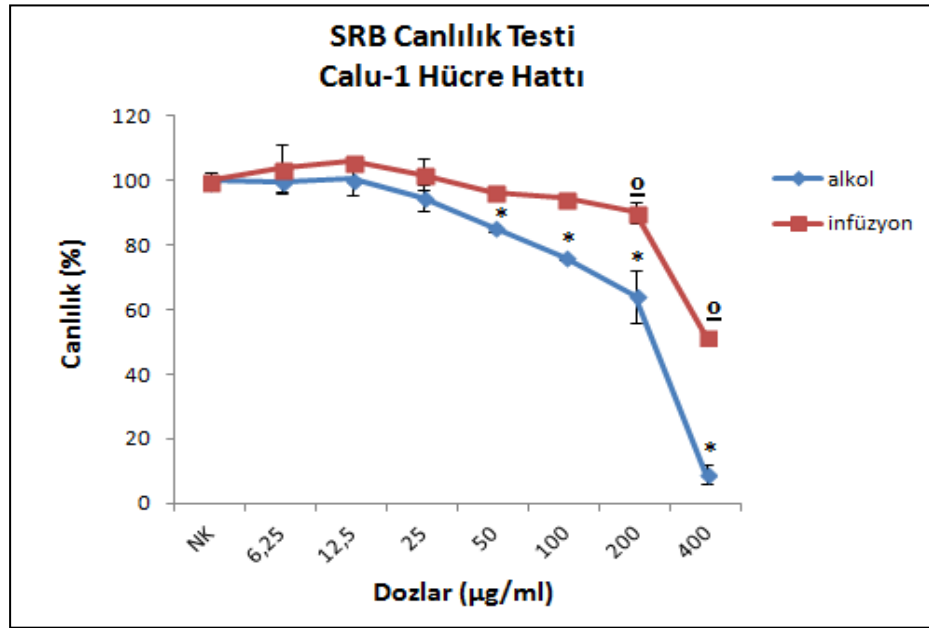
Doz (µg/ml)	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
IC <sub>50</sub>	200	>400
IC <sub>90</sub>	>400	>400

#### 4.2.3. 72 saatlik tedavi sonuçları

Hücre hatlarına 72 saat boyunca *Rosmarinus officinalis* L. bitkisinin infüzyon ve etanol ekstrelerinin uygulanmasını takiben SRB canlılık testi ile elde edilen sonuçlar sırasıyla Şekil 4.21 ve 4.22'de gösterildi. *R. officinalis* L.'in etanol ekstresinin uygulandığı VCaP ve Calu-1 hücre hatlarında konsantrasyon arttıkça hücrelerin canlılık yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlendi ( $p < 0.05$ ). *R. officinalis* L.'in infüzyon ekstresinin uygulandığı VCaP ve Calu-1 hücre hatlarında doza bağlı olarak hücre ölümleri görülmesine rağmen önemli bir sitotoksik aktivite tespit edilmedi. *R. officinalis* L.'in alkol ve infüzyon ekstreleri uygulanan VCaP ve Calu-1 hücre soylarının canlılık yüzde değerleri sırasıyla Çizelge 4.21 ve 4.22'de, IC<sub>50</sub> ve IC<sub>90</sub> değerleri ise sırasıyla Çizelge 4.23 ve 4.24'de gösterildi. Sonuç olarak, *R. officinalis* L.'in etanol ekstresinin 400 µg/ml konsantrasyonunun VCaP ve Calu-1 hücre soyları üzerinde sitotoksik etki gösterdiği gözlemlendi. Ayrıca, VCaP hücre soyunda 200 µg/ml konsantrasyonda da sitotoksik aktivite belirlendi. *R. officinalis* L.'in etanol ekstresinin 400 µg/ml ve 200 µg/ml dozlarının hücre soyları üzerine olan etkileri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 4.21.** 72 saat boyunca *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının canlılık yüzdelerinin grafiği (Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir)



**Şekil 4.22.** 72 saat boyunca *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücre hattının canlılık yüzdelerinin grafiği (Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir)

\* ve 0 Aynı doz içinde hücre soyları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ( $p < 0.05$ ) ifade etmektedir.

**Çizelge 4.21.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstrelere (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücre hattının 72 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri (SRB testi)

Dozlar (µg/ml)	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
6,25	96,97	99,93
12,5	94,70	101,24
25	85,95	95,73
50	74,31	88,53
100	56,82	88,02
200	33,88	86,09
400	16,18	77,07

**Çizelge 4.22.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstrelere (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücre hattının 72 saatlik tedavi sonrasındaki canlılık yüzde değerleri (SRB testi)

Dozlar (µg/ml)	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
6,25	99,48	103,76
12,5	100,51	105,94
25	94,75	101,99
50	85,43	96,52
100	76,12	94,52
200	64,26	90,16
400	9,05	51,62

*R. officinalis* L.'in etanol ekstresinin; VCaP hücre hattı için IC<sub>50</sub> dozu 129,73 µg/ml, IC<sub>90</sub> dozu >400 µg/ml; Calu-1 hücre hattı için IC<sub>50</sub> değeri 251,65 µg/ml, IC<sub>90</sub> dozu 396,55 µg/ml olarak belirlendi. *R. officinalis* L.'in infüzyon ekstresi uygulanan VCaP ve Calu-1 hücrelerinde önemli bir sitotoksik aktivite saptanamadı ve IC<sub>50</sub> ve IC<sub>90</sub> değerleri >400 µg/ml olarak tespit edildi (Çizelge 4.23 ve 4.24).

**Çizelge 4.23.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücrelerinin 72 saatlik tedavi sonrasındaki IC<sub>50</sub> ve IC<sub>90</sub> değerleri (SRB testi)

Doz (µg/ml)	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
IC <sub>50</sub>	129,73	>400
IC <sub>90</sub>	>400	>400

**Çizelge 4.24.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücrelerinin 72 saatlik tedavi sonrasındaki IC<sub>50</sub> ve IC<sub>90</sub> değerleri (SRB testi)

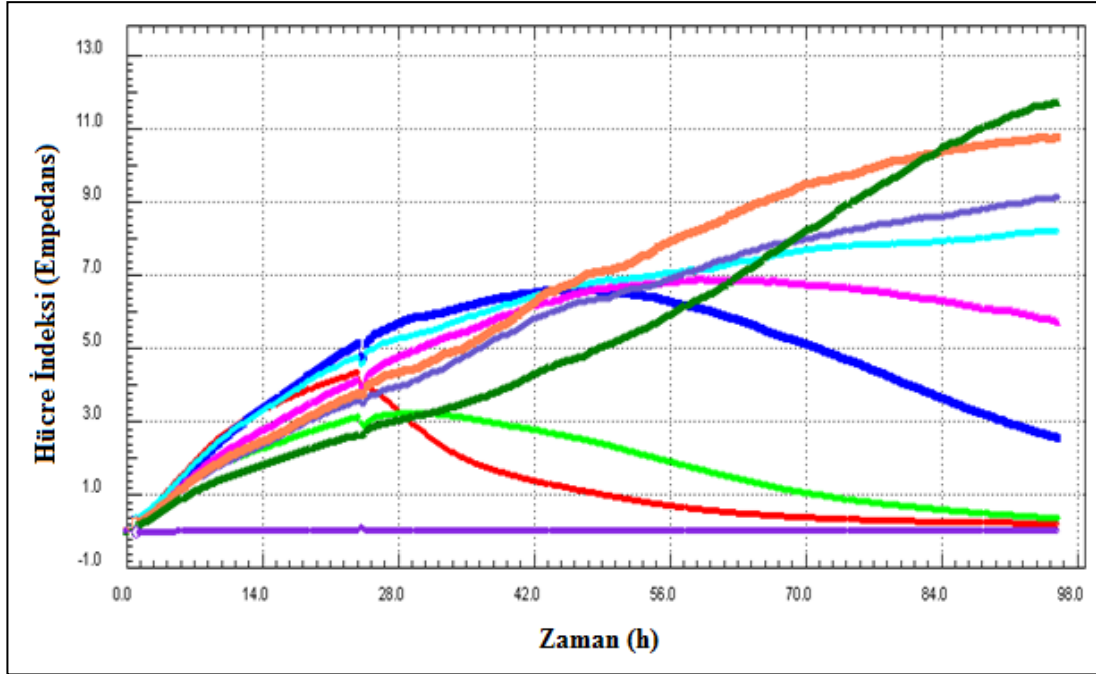
Doz (µg/ml)	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
IC <sub>50</sub>	251,65	>400
IC <sub>90</sub>	396,55	>400

### 4.3. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Bulguları

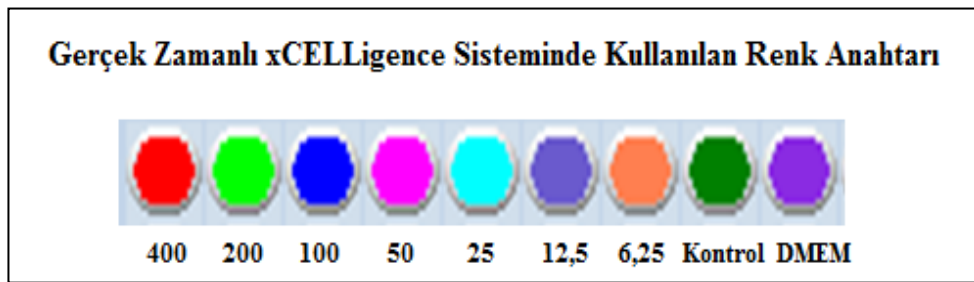
*Rosmarinus officinalis* L. bitkisinden elde edilen alkol ve infüzyon ekstrelerinin VCaP ve Calu-1 hücrelerindeki etkisi, gerçek zamanlı sitotoksosite analiz sistemi kullanılarak 72 saat süre ile izlendi. VCaP hücrelerinde; ilaç uygulanmadan önce hücre indeks değeri 5,0 iken, *R. officinalis* etanol ekstresinin uygulanmasından sonra 2 ila 10 saat içinde en yüksek konsantrasyon olan 2 konsantrasyonda (400 µg/ml ve 200 µg/ml) hücre canlılığının düşmeye başladığı ve etki süresine bağlı olarak ilerleyen saatlerde hücre indeksinin 0' a düştüğü, tüm hücrelerin öldüğü gözlemlendi. *R. officinalis* etanol ekstresinin uygulanmasından 15 saat sonra, 100 µg/ml'lik dozda hücrelerin ölümüyle birlikte hücre indeks değerinin 2'ye düştüğü ve tedavi süresi boyunca tüm hücrelerin ölmediği gözlemlendi. Bu bulgular ışığında ilk 2 dozun (400 µg/ml ve 200 µg/ml) sitotoksik etkiye neden olduğu belirlendi. *R. officinalis* L.'in etanol ekstresinin en düşük konsantrasyonlarında (50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml ve 6,25 µg/ml) ilaç uygulanan hücrelerin yaşamları xCELLigence sistemi ile yine 72 saat boyunca izlendiğinde, hücre indeks değerlerinin kontrol hücrelerine benzer şekilde seyrettiği, hücrelerin üremeye devam ettiği ve bir süre sonra proliferasyonun durduğu gözlemlendi. Bu bulgular, VCaP hücrelerinde bu dozların sitostatik olduğunu düşündürse de zamanla kültür ortamındaki



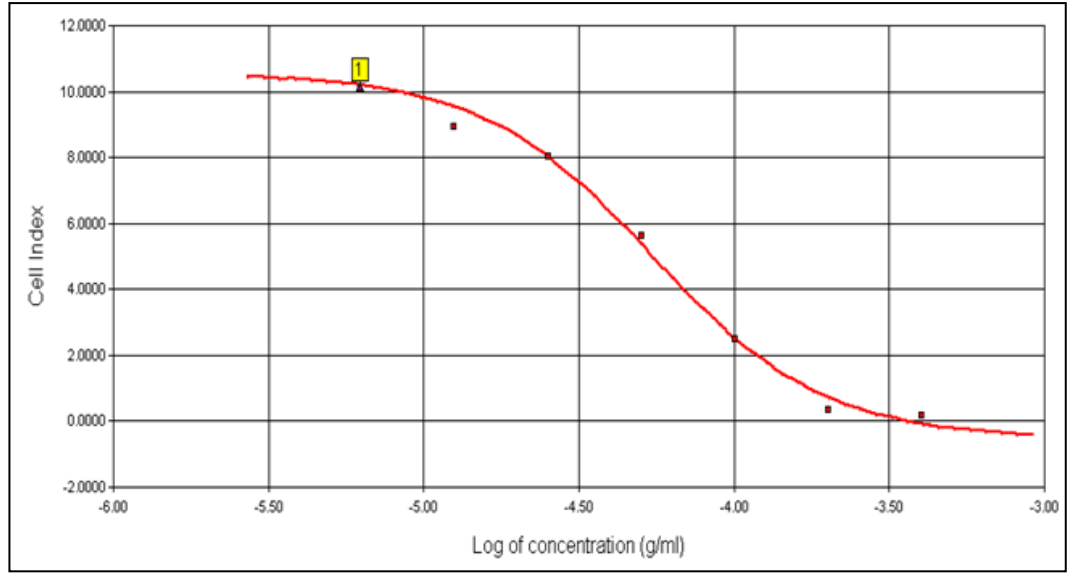
besinlerin tüketilmesine bağlı olarak hem kontrolde hem de bu konsantrasyonlarda (50  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 12,5  $\mu\text{g/ml}$  ve 6,25  $\mu\text{g/ml}$ ) hücrelerin ölümü nedeniyle çoğalmanın baskılandığı gözlemlendi (Şekil 4.23, Şekil 4.24 ve Şekil 4.25).



Şekil 4.23. *Rosmarinus officinalis* L. alkol ekstresinin 6,25 - 400  $\mu\text{g/ml}$  arasındaki konsantrasyonlarının VCaP hücrelerindeki 72 saat süreyle hücre indeks değerleri

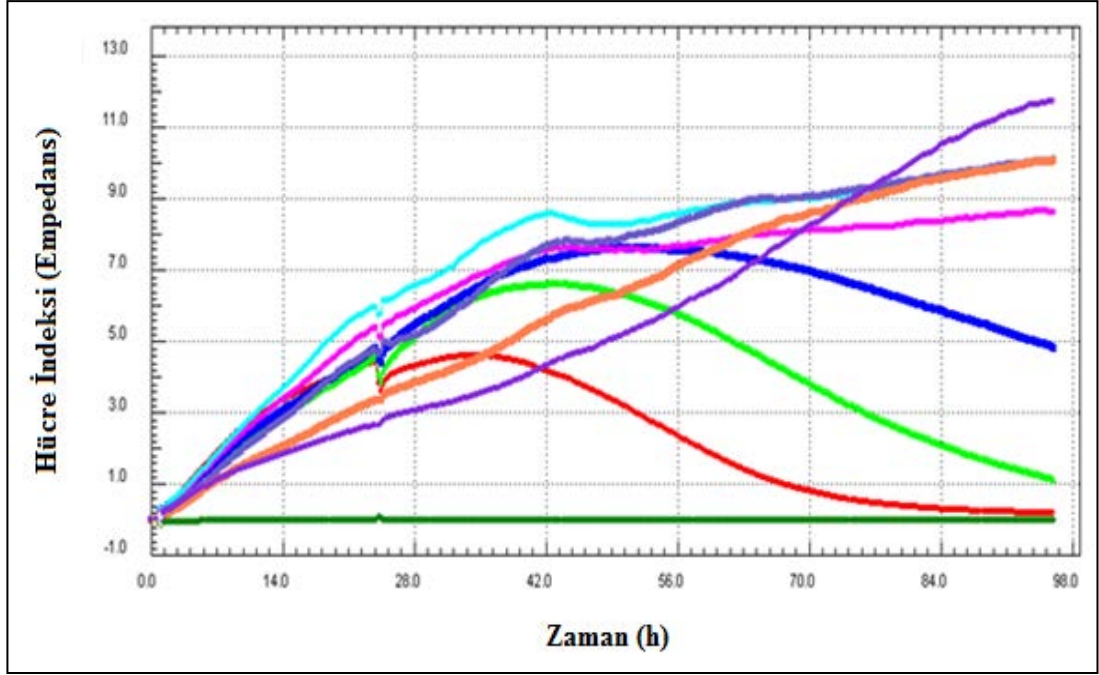


Şekil 4.24. Gerçek zamanlı xCELLigence sisteminde kullanılan *Rosmarinus officinalis* L. alkol ekstresinin konsantrasyonların farklı renklerde ve  $\mu\text{g/ml}$  birimi kullanılarak gösterilmesi

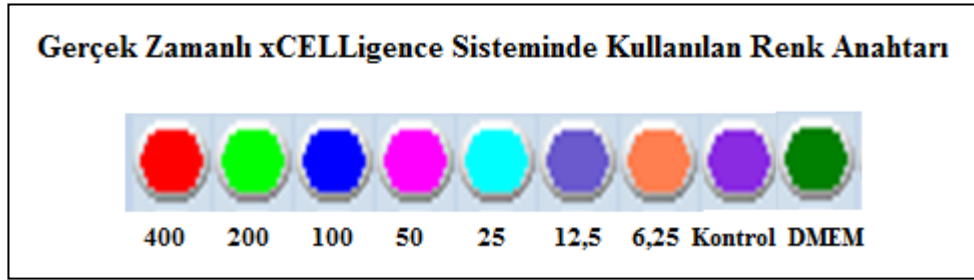


**Şekil 4.25.** *Rosmarinus officinalis* L. alkol ekstresinin 6,25 - 400 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarının uygulandığı VCaP hücrelerinin 72. saatteki doz-yanıt eğrisi

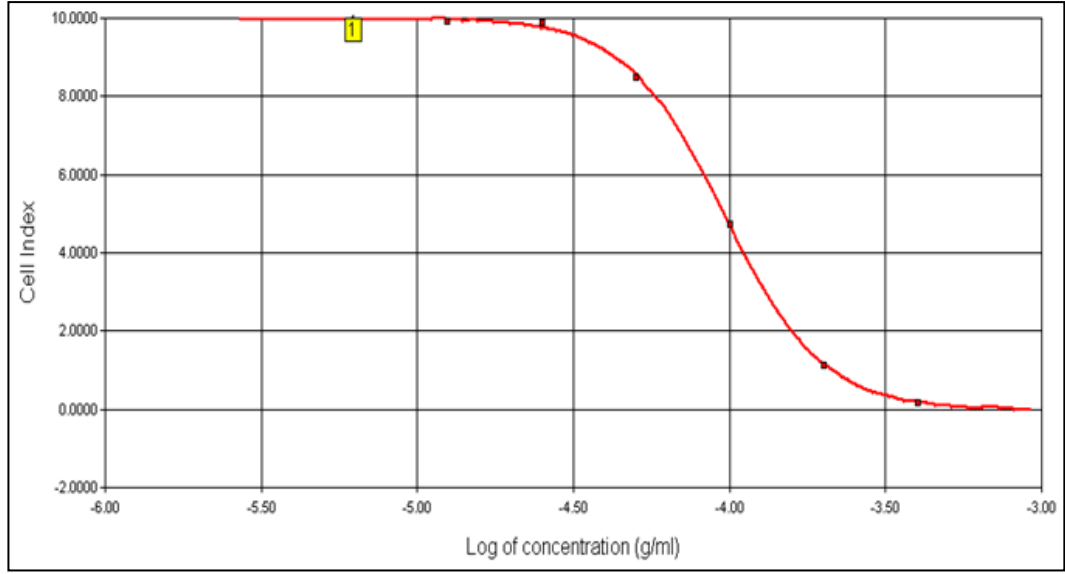
VCaP hücrelerinde; *R. officinalis* infüzyon ekstresinin uygulanmasını takiben, ilk saatlerde en yüksek 3 konsantrasyonda (400 µg/ml, 200 µg/ml ve 100 µg/ml) hücre indeks değerlerinin yükseldiği ancak belli bir süre (10 - 40 saat) sonra hücrelerin platoya ulaştıkları ve canlılıklarının azalmaya başladığı gözlemlendi. 400 µg/ml'lik dozda hücrelerin ~12. saatte platoya ulaştıkları ve 60. saatte hücre indeks değerinin 0'a düştüğü gözlemlendi. İlaç uygulanmadan önce hücre indeks değeri 5,0 iken, 72 saatlik tedavi sonrası 200 µg/ml'lik konsantrasyonda hücre indeks değerinin 1,0'a düştüğü görüldü. Aynı etki 100 µg/ml konsantrasyonunda ise ~42 saat içerisinde gözlemlendi. Bu bulgular ile 400, 200 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarının hücrelerde sitotoksik etkiye neden olduğu belirlendi. 50 µg/ml ve daha düşük konsantrasyonlarda (25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml) ilaç uygulanan hücrelerin yaşamları xCELLigence sistemi ile 72 saat boyunca izlendiğinde, hücre indeks değerleri grafiğinin benzer ve kontrol hücrelerine paralel şekilde seyrettiği gözlemlendi. Dolayısıyla, 50 µg/ml ve daha düşük ilaç dozlarının herhangi bir etkisinin olmadığı sonucuna varıldı (Şekil 4.26, Şekil 4.27 ve Şekil 4.28).



Şekil 4.26. *Rosmarinus officinalis* L. infüzyon ekstresinin 6,25 - 400 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarının VCaP hücrelerindeki 72 saat süreyle hücre indeks değerleri

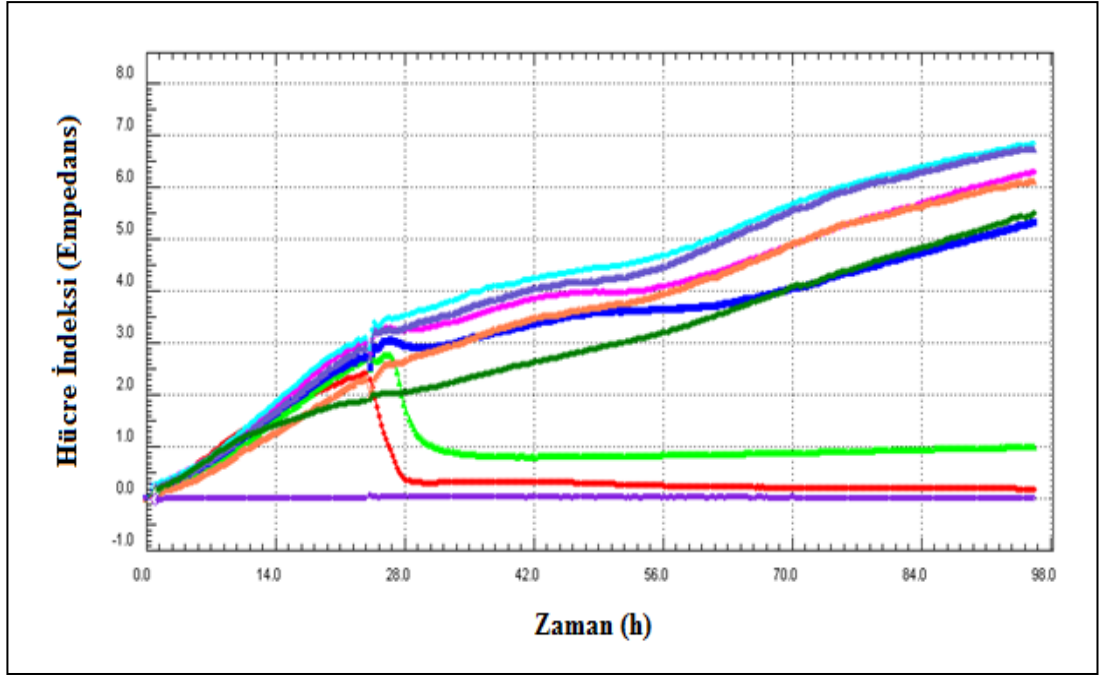


Şekil 4.27. Gerçek zamanlı xCELLigence sisteminde kullanılan *Rosmarinus officinalis* L. infüzyon ekstresinin konsantrasyonların farklı renklerde ve µg/ml birimi kullanılarak gösterilmesi

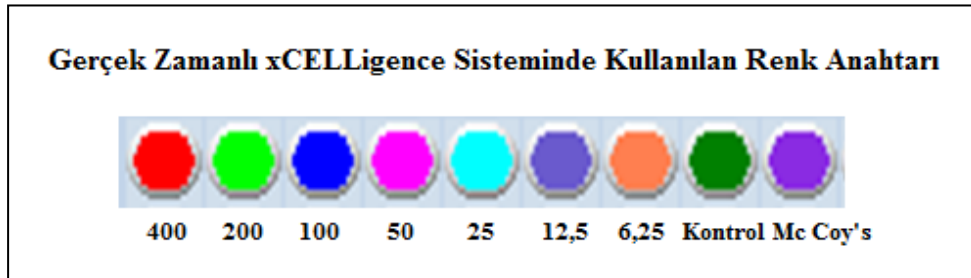


**Şekil 4.28.** *Rosmarinus officinalis* L. infüzyon ekstresinin 6,25 - 400 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarının uygulandığı VCaP hücrelerinin 72. saatteki doz-yanıt eğrisi

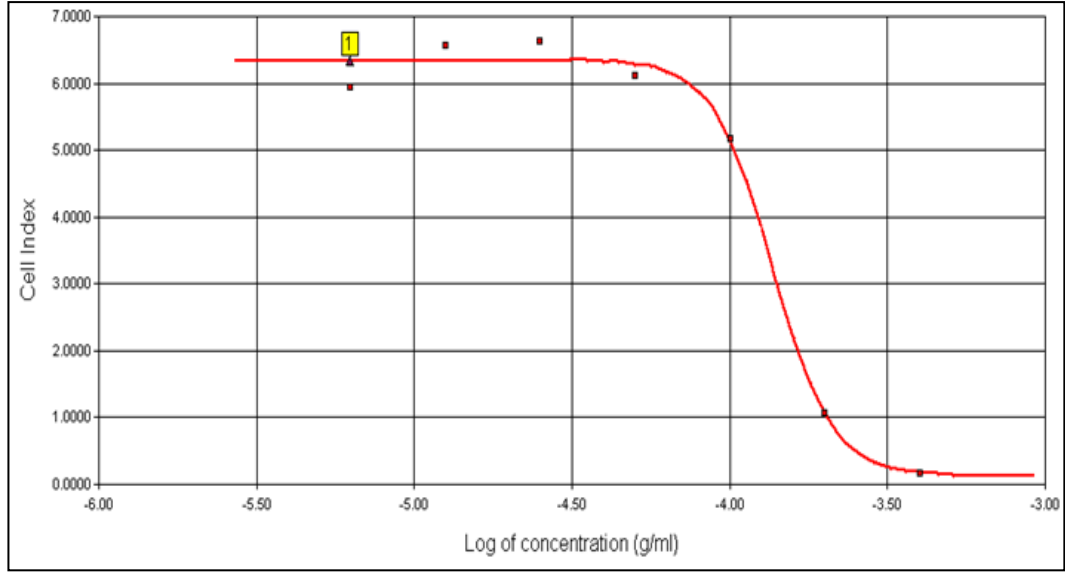
Calu-1 hücrelerinde; ilaç uygulanmadan önce hücre indeks değeri 3,0 iken, uygulamayı takiben 2 saat içinde en yüksek konsantrasyon olan 2 konsantrasyonda (400 µg/ml ve 200 µg/ml) hücre canlılığının düşmeye başladığı ve etki süresine bağlı olarak ilerleyen saatlerde hücre indeksinin; 400 µg/ml'lik dozda 0'a (tüm hücrelerin öldüğü değer), 200 µg/ml'lik dozda ise 1,0 düştüğü gözlemlendi. *R. officinalis* L. alkol ekstresinin uygulanmasının ardından meydana gelen söz konusu sitotoksik etkiler, 400 µg/ml'lik konsantrasyonda 4. saat içerisinde gözlenirken, aynı etki 200 µg/ml'lik konsantrasyonda 6. saat içerisinde gerçekleşti. Bu bulgular ışığında ilk 2 dozun (400 ve 200 µg/ml) sitotoksik etkiye neden olduğu belirlendi. 100 µg/ml ve daha düşük konsantrasyonlarda (50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml ve 6,25 µg/ml) ilaç uygulanan hücrelerin yaşamları xCELLigence sistemi ile 72 saat boyunca analiz edildiğinde; hücre indeks eğrilerinin benzer ve kontrol hücrelerine paralel şekilde seyrettiği ve bu ilaç dozlarının sitotoksik ya da sitostatik etkilerinin olmadığı sonucuna varıldı (Şekil 4.29, Şekil 4.30 ve Şekil 4.31).



Şekil 4.29. *Rosmarinus officinalis* L. alkol ekstresinin 6,25 - 400 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarının Calu-1 hücrelerindeki 72 saat süreyle hücre indeks değerleri

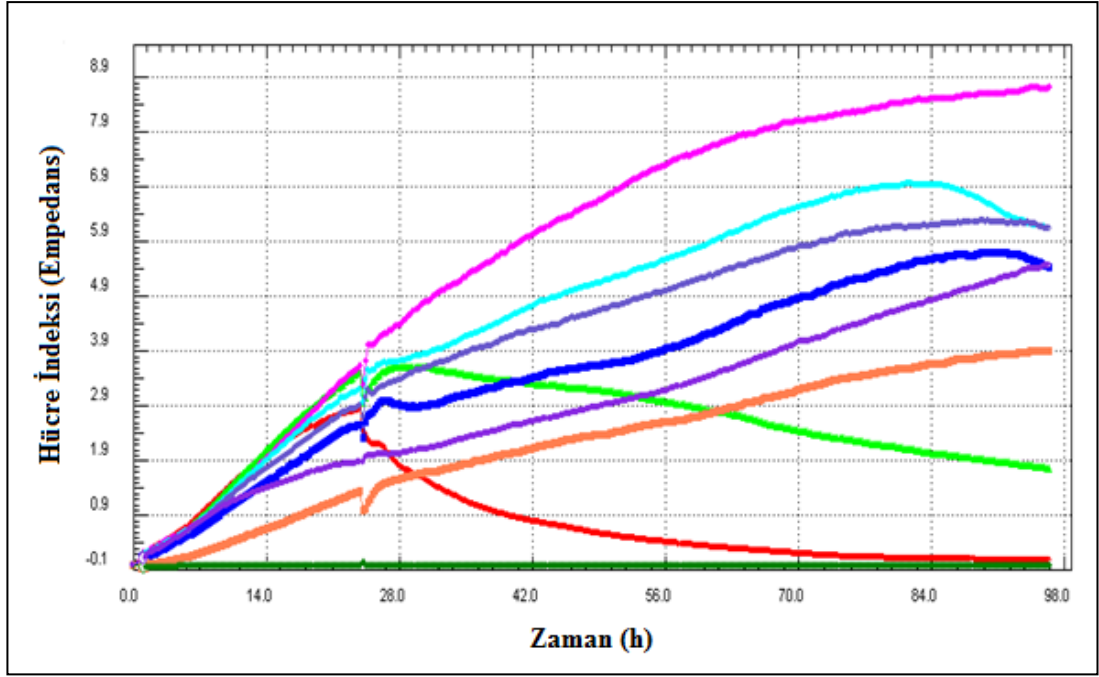


Şekil 4.30. Gerçek zamanlı xCELLigence sisteminde kullanılan *Rosmarinus officinalis* L. alkol ekstresinin konsantrasyonların farklı renklerde ve µg/ml birimi kullanılarak gösterilmesi

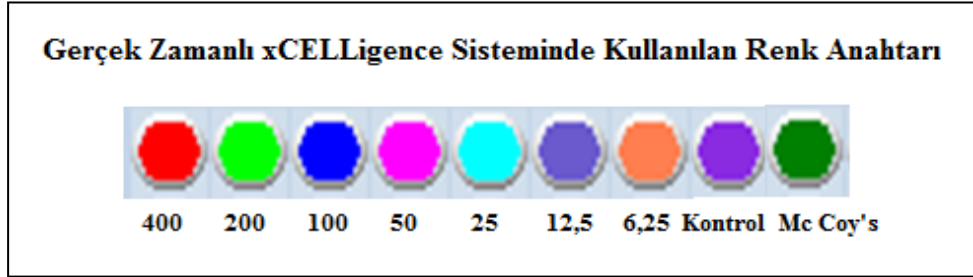


**Şekil 4.31.** *Rosmarinus officinalis* L. alkol ekstresinin 6,25 - 400 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarının uygulandığı Calu-1 hücrelerinin 72. saatteki doz-yanıt eğrisi

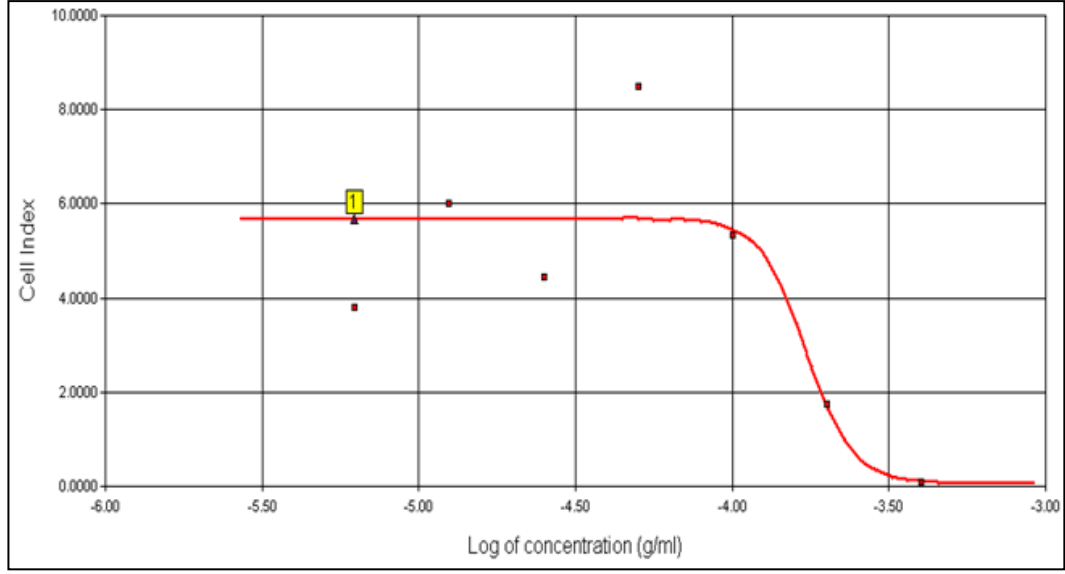
Calu-1 hücrelerinde; *R. officinalis* L. infüzyon ekstresinin uygulanmadan önce hücre indeks değeri 3,0 iken, uygulama sonrasında en yüksek konsantrasyon olan 400 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığının azaldığı ve 24. saatte hücre indeksinin 0'a düştüğü, tüm hücrelerin öldüğü gözlemlendi. *R. officinalis* L. infüzyon ekstresinin 200 µg/ml konsantrasyonunda ilaç uygulanmasını takiben, ilk birkaç saatte hücre indeks değerlerinin ~ 4,0 değerine kadar yükseldiği fakat kısa bir süre (4 saat) sonra hücre canlılığının azaldığı ve hücre indeks değerinin 1,6'ya düştüğü gözlemlendi. Bu sonuçlara dayanarak, 400 µg/ml ve 200 µg/ml dozlarının sitotoksik etkiye neden olduğu belirlendi. 100 µg/ml ve daha düşük konsantrasyonlarda (50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml) ilaç uygulanan hücrelerin yaşamları xCELLigence sistemi ile 72 saat boyunca izlendiğinde; hücre indeks değerleri grafiğinin benzer şekilde seyrettiği, hücrelerin üremeye devam ettiği ve bir süre sonra proliferasyonun durduğu gözlemlendi. Hem kontrol hücrelerinde hem de bu konsantrasyonlarda (100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml), kültür ortamındaki besinlerin tüketilmesinden kaynaklanan baskılanma saptandı (Şekil 4.32, Şekil 4.33 ve Şekil 4.34).



Şekil 4.32. *Rosmarinus officinalis* L. infüzyon ekstresinin 6,25 - 400 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarının Calu-1 hücrelerindeki 72 saat süreyle hücre indeks değerleri



Şekil 4.33. Gerçek zamanlı xCELLigence sisteminde kullanılan *Rosmarinus officinalis* L. infüzyon ekstresinin konsantrasyonların farklı renklerde ve µg/ml birimi kullanılarak gösterilmesi



**Şekil 4.34.** *Rosmarinus officinalis* L. infüzyon ekstresinin 6,25 - 400 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarının uygulandığı Calu-1 hücrelerinin 72. saatteki doz-yanıt eğrisi

*Rosmarinus officinalis* L. alkol ve infüzyon ekstrelerinin VCaP ve Calu-1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin gösterilmesinde önemli olan IC<sub>50</sub> (%50 inhibitör konsantrasyonu) değerleri; 24, 48 ve 72 saatlik tedaviler için sigmoidal doz-yanıt eğrisi ile  $[Y = Bottom + (Top - Bottom) / (1 + 10^{((Log IC_{50} - X) \times HillSlope))}]$  hesaplandı (Çizelge 4.25 ve Çizelge 4.26).

**Çizelge 4.25.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücrelerinin xCELLigence sonuçlarına göre elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri

Tedavi Süresi (h)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
24	172	211
48	101	187
72	54,8	96,4



**Çizelge 4.26.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücrelerinin xCELLigence sonuçlarına göre elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri

Tedavi Süresi (h)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	
	Alkol Ekstresi	İnfüzyon Ekstresi
24	145	278
48	133	183
72	137	161

Bu çalışmada, *Rosmarinus officinalis* L. (biberiye) bitkisinden elde edilen alkol ve infüzyon ekstrelerinin farklı konsantrasyonlarının, hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla, WST-1 ve SRB sitotoksikite testleri uygulandı. Ayrıca hücrelerdeki sitotoksik aktivite, gerçek zamanlı sitotoksikite analiz sistemi (xCELLigence RTCA) ile de doğrulandı. Bu bağlamda, çalışma sonuçlarından elde edilen IC<sub>50</sub> değerlerine göre uygulanan testler arasında karşılaştırma yapmak mümkün olmaktadır. *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP ve Calu-1 hücreleri için, WST-1, SRB ve xCELLigence testlerinden elde edilen IC<sub>50</sub> sonuçları sırasıyla Çizelge 4.27 ve 4.28'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.27.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstreleri (alkol ve infüzyon) uygulanan VCaP hücrelerinden elde edilen IC<sub>50</sub> sonuçlarına göre yöntemlerin kıyaslanması

VCaP Hücre Hattı	IC <sub>50</sub> (µg/ml)			IC <sub>50</sub> (µg/ml)		
	Alkol Ekstresi			İnfüzyon Ekstresi		
Yöntem / Tedavi Süresi	24	48	72	24	48	72
WST-1 Yöntemi	355,12	>400	230,66	>400	>400	>400
SRB Yöntemi	141,13	160,70	129,73	>400	>400	>400
xCELLigence	172	101	54,8	211	187	96,4

**Çizelge 4.28.** *Rosmarinus officinalis* L. ekstrelere (alkol ve infüzyon) uygulanan Calu-1 hücrelerinden elde edilen IC<sub>50</sub> sonuçlarına göre yöntemlerin kıyaslanması

Calu-1 Hücre Hattı	IC <sub>50</sub> (µg/ml) Alkol Ekstresi			IC <sub>50</sub> (µg/ml) İnfüzyon Ekstresi		
	24	48	72	24	48	72
Yöntem / Tedavi Süresi	24	48	72	24	48	72
WST-1 Yöntemi	235,47	280,34	259,34	>400	>400	>400
SRB Yöntemi	>400	200	251,65	>400	>400	>400
xCELLigence	145	133	137	278	183	161

Bu çalışmanın amacı, *Rosmarinus officinalis* L. ekstrelere anti-proliferatif etkilerini, prostat (VCaP) ve akciğer (Calu-1) kanseri hücre kültürlerinde, hem eş zamanlı ve sürekli veri sunan xCELLigence sistemi ile hem de kesikli olarak üç farklı zaman diliminde veri sunan WST-1 ve SRB yöntemleri ile ölçümlemek ve bulguları karşılaştırmaktır. Bu bağlamda yapılan çalışmada, *R. officinalis* L. ekstrelere uygulandığı VCaP ve Calu-1 hücrelerinde, 24, 48 ve 72 saatlik tedaviler sonucunda elde edilen IC<sub>50</sub> değerlerinin 3 yöntemde de birbirinden farklı olduğu bulunmuştur. Bu durum, yöntemlerin kendi içinde hassasiyet, değişkenlik yüzdesi, kullanım kolaylığı, veri tutarlılığı ve güvenilirliği bakımından farklılaşması olarak açıklanabilir.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, prostat ve akciğer kanseri hücre hatları (sırasıyla VCaP ve Calu-1) üzerinde *Rosmarinus officinalis* L. (biberiye) bitkisinin alkollü (etanollü) ve infüzyon (su) ekstralarının büyüme baskılayıcı/sitostatik/sitotoksik etkileri çalışılmıştır. Çalışmalar neticesinde, etanol ekstresiyle muamelenin sitotoksik aktivite ile sonuçlandığı ancak infüzyon (su) ekstresinin sadece en yüksek dozda çok zayıf sitotoksikite gösterdiği bulunmuştur. Literatürde, *Rosmarinus officinalis* L. (biberiye) ekstralarının bu hücreler üzerinde kullanılması ile ilişkili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan bakılacak olursa; bu çalışma, söz konusu ekstraların daha önce üzerinde çalışılmadığı VCaP ve Calu-1 hücrelerinde sitotoksik aktiviteye yol açtığını gösteren ilk çalışmadır. Bundan dolayı, bu çalışmanın yeni bilgiler ile literatüre katkı sağlayacağı öngörülmektedir.

Kanser günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biridir ve her yıl milyonlarca insan kanserden ölmektedir. İlaç tedavilerine direnç geliştirebilen ve bağışıklık sisteminden kaçabilen kanser hücreleri, ayrıca birçok faktör salgılayarak beslenmelerini ve kontrolsüz çoğalabilmelerini sağlarlar. Bu da, tedavilerin nihai hedefine ulaşmasını engellemektedir. Kanser tedavisinde birçok kemoterapi ilacı veya moleküler hedeflere yönelik geliştirilmiş ilaçlar kullanılmakla beraber bu ilaçlar henüz beklenen oranda tedaviye cevap vermemektedir. Bu nedenle, günümüzde bilimsel tedavi yöntemlerinin yanı sıra, özellikle bitkisel veya diğer doğal kaynaklı ürünlerin kullanıldığı tamamlayıcı tedavi yöntemleri de giderek önem kazanmaktadır (Epstein 2004 ve Sezgin 2010).

Son yıllarda, tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen bitkisel ilaç hammaddeleri üzerinde yapılan çalışmalara ilgi giderek artmaktadır. Bunun başlıca nedenleri; bitkilerin, yan etkilerinin bulunmaması ya da sentetik ilaçlara göre yan etkilerinin az olması ve uzun zamandır kullanıldıklarından bu yan etkilerinin iyi bilinmesi, sentetik ilaçların pahalı olması ve yoksulluk nedeniyle modern ilaçlara erişim eksikliği vb. şeklinde sıralanabilir (Kaya 2010). Geleneksel tıp bilhassa Uzak Doğu ülkelerinde yaygındır. Dünya Sağlık Örgütüne göre, dünya nüfusunun %65-80'i gelişmekte olan ülkelere yaşamakta ve tedavilerinde geleneksel tıptan yararlanmaktadır (Şener 2010). Ancak geleneksel ilaç keşfi sürecinde bitkilerin önemi azalmıştır ve kapsamlı bilimsel araştırmaların eksikliği nedeniyle çok az bitki klinik olarak önerilmektedir (Raskin ve ark. 2002). Dünya Sağlık

Örgütü'nün raporuna göre, dünya üzerinde tıbbi amaçlarla kullanılan yaklaşık 70 000 bitkinin 21 000 kadarı ilaç sanayinde kullanılmaktadır (Kaya 2010).

Bu bilgilerden esinlenerek çalışmamızda; *Rosmarinus officinalis* L.'in, daha önce olası etkilerinin çalışılmadığı VCaP ve Calu-1 hücreleri üzerindeki anti-proliferatif ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Bu bağlamda, *Rosmarinus officinalis* L.'in ham etanol ekstresi ve saf su ekstresi hazırlandı ve bu ekstrelerin, VCaP ve Calu-1 model hücre hatları üzerindeki büyümeyi baskılayıcı/sitostatik/sitotoksik etkileri değerlendirildi. WST-1 canlılık testi sonuçlarına göre; etanol ekstresinin, konsantrasyon artışına bağlı olarak her iki hücre hattının da canlılık yüzdelerinde anlamlı azalmalara neden olduğu bulunmuştur. WST-1 testi verileri ile elde edilen doza bağlı canlılık grafiğine göre, etanol ekstresinin en yüksek iki dozunun (400 - 200 µg/ml) hücrelerde sitotoksik etkiye neden olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, etanol ekstresinin her iki hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivitesinin, 72 saatlik inkübasyon periyodunda daha güçlü olduğu saptanmıştır. Uygulanan WST-1 ve SRB canlılık testleri sonucunda, infüzyon (su) ekstresinin, her iki hücre üzerinde de kayda değer bir sitotoksik etkisinin olmadığı bulunmuştur. Ancak, xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile elde edilen sonuçlara göre; infüzyon ekstresinin en yüksek dozunun (400 µg/ml), hem VCaP hem de Calu-1 hücrelerinde sitotoksik etkiye neden olduğu, 200 µg/ml' lik 2. dozun ise her iki hücrenin de büyümesini önemli ölçüde baskıladığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu bulgular, yapılan mikroskopik incelemelerle de uyum göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, *Rosmarinus officinalis* L. ekstrelerinin çeşitli kanser hücre hatları (akciğer, karaciğer, prostat, meme, lösemi, ovaryum, kolon vb.) üzerinde yüksek oranda sitotoksik aktivite sergilediği bulunmuştur (Cheung ve Tai 2007, Bai ve ark. 2010, Yeşil-Çeliksağ ve ark. 2010, Tai ve ark. 2012, Kontogianni ve ark. 2013).

Literatürde, *Rosmarinus officinalis* L. ekstrelerinin IC<sub>50</sub> değerleri arasındaki farklılık, ekstrelerin fitokimyasal profili ve biyolojik aktivitesi arasındaki ilişkiye dayanarak açıklanabilmektedir. Cheung ve Tai (2007) tarafından yapılan bir çalışmada; *Rosmarinus officinalis* L. bitkisinden elde edilen ham etanol ekstresinin (13,4 mg/ml stok konsantrasyondaki), insan lösemi hücre hatları (HL-60 ve K-562) ve insan meme kanseri hücre hatları (MCF-7 ve MDA-MB-468) üzerindeki sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır. *Rosmarinus officinalis* L.' in etanol ekstresinin, HL-60, K-562, MCF-7 ve

MDA-MB-468 hücre hatları için IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla; 1/700 (19,1 µg/ml), 1/400 (33,5 µg/ml), 1/150 (89,3 µg/ml) ve 1/500 (26,8 µg/ml) dilüsyonlarda tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada, *Rosmarinus officinalis* L. etanol ekstresinin (100 mg/ml stok konsantrasyondaki), A2780 (insan ovaryum kanseri) hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi araştırılmış olup IC<sub>50</sub> değeri, 1/1000 (100 µg/ml) dilüsyon olarak belirlenmiştir (Tai ve ark. 2012). *Rosmarinus officinalis* L. bitkisinden hekzan ve etil asetat çözücülerini ile elde edilen ekstraktların, RINm5F (fare insülinoma m5F) hücreleri üzerine olan sitotoksik aktiviteleri MTT yöntemiyle çalışılmıştır ve IC<sub>50</sub> değeri 35,6 µg/ml olarak belirlenmiştir (Kontogianni ve ark. 2013). Yeşil-Çelikleş ve ark. (2010), *Rosmarinus officinalis* L. yapraklarından elde edilen ham metanol ekstraktlarının; NCI-H82 (insan küçük hücreli akciğer karsinom hücreleri), DU-145 (insan prostat kanseri karsinom hücreleri), PC-3 (insan prostat adenokarsinom hücreleri), Hep-3B (insan karaciğer hepatoselüler karsinom hücreleri), K-562 (insan kronik myeloid lökemiya hücreleri), MCF-7 (insan meme adenokarsinom hücreleri) ve MDA-MB-231 (insan meme adenokarsinom hücreleri)'i kapsayan bir dizi kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik aktivitelerini MTT yöntemiyle çalışmıştır. Metanolik ekstre, farklı hücre hatları karşısında farklı etkiler göstermesine rağmen 12,5 ve 47,55 µg/ml arasında değişen nispeten düşük IC<sub>50</sub> değerleri saptanmıştır.

WST-1 yöntemi ile elde ettiğimiz bulgular ışığında; *Rosmarinus officinalis* L. etanol ekstresinin, her iki hücre hattında da sitotoksik etkisinin daha yüksek olduğu 72 saatlik tedavi periyodunda hesaplanan IC<sub>50</sub> değerleri; VCaP hücreleri için 230,66 µg/ml, Calu-1 hücreleri için ise 259,34 µg/ml olarak belirlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda belirlenen *Rosmarinus officinalis* L. ekstraktlarına ait IC<sub>50</sub> değerleri ile kıyaslandığında, çalışmamızda kullandığımız VCaP ve Calu-1 hücrelerinde etanol ekstresi ile muamele sonrasında daha yüksek IC<sub>50</sub> değerleri saptanmıştır. IC<sub>50</sub> değerleri arasındaki değişkenlik, ekstraksiyon işlemlerinde kullanılan çözücülerin farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir. Çünkü, bitki türleri sahip oldukları farklı aktif bileşenlerine bağlı olarak farklı biyolojik aktiviteler sergileyebilir. Bu nedenle; metanol, etanol, aseton, etil asetat, hekzan, kloroform, su gibi çözücüler ile hazırlanan ekstraktların aktiviteleri arasında değişkenlik gözlemlenebilir.

Çalışmamızda uygulanan WST-1 testinde, *Rosmarinus officinalis* L. infüzyon ekstresinin VCaP ve Calu-1 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi belirlenememiştir ve IC<sub>50</sub> değerleri, her iki hücre için de 400 µg/ml' den büyük bulunmuştur. Valdes ve ark.'nın (2013) çalışması, infüzyon ekstresi için elde ettiğimiz bu sonuç ile uyum göstermektedir. Bu araştırmacılar, *Rosmarinus officinalis* L. bitkisinden farklı çözücüler (su ve etanol) ile hazırlanan ekstrelerin, kolon kanseri hücre hatları (HT29 ve SW480) üzerindeki anti-proliferatif etkilerini MTT testiyle değerlendirmiş olup 48 saatlik tedavi sonrasında etanol ekstresinin her iki hücrenin de proliferasyonunu azalttığı ancak su ekstresinin bu hücreler üzerinde sitotoksik bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Valdes ve ark. 2013). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, bizim çalışmamızı büyük ölçüde desteklemektedir.

Çalışmalar arasında gözlemlenen IC<sub>50</sub> farklılıkları, bitkilerin yetiştikleri lokasyondaki ve sahip oldukları fitokimyasal profildeki farklılıklardan da kaynaklanabilir. Yeşil-Çelikleş ve ark. (2010), Türkiye'nin 3 farklı bölgesinden (Çanakkale, Mersin, İzmir) topladıkları *Rosmarinus officinalis* L. yapraklarını iki farklı ekstraksiyon yöntemi (Soxhlet cihazı kullanılarak metanol ekstraksiyonu ve süperkritik CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu) ile ekstre ederek bu ekstrelerin insan kanseri hücre hatları üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Çalışma sonucunda, süperkritik CO<sub>2</sub> ekstrelerinin Soxhlet ekstrelerine kıyasla daha güçlü anti-proliferatif etkiler gösterdiği ve Mersin' den toplanan *R. officinalis* L. bitkisinden elde edilen ekstrelerinin en yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada, Mersin ilinden toplanan bitkinin ekstrelerinin karnosol ve karnosik asit gibi fenolik bileşikler bakımından daha zengin olduğu saptanmıştır. *R. officinalis* L. ekstrelerinin fitokimyasal kompozisyonlarındaki farklılıkların HT29 and SW480 hücrelerinin sitotoksik aktivitesi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada, karnosol ve karnosik asit bakımından zengin ekstrelerin, rosmarinik asit bakımından zengin ekstrelerle göre daha sitotoksik olduğu tespit edilmiştir (Valdes ve ark. 2013).

WST-1 canlılık testinden alınan sonuçları teyit etmek amacıyla başka bir canlılık testi olan SRB yöntemi çalışılmıştır. 24, 48 ve 72 saatlik muameleler sonucunda; *R. officinalis* L. ekstresinin, dozdaki artışa bağımlı olarak VCaP ve Calu-1 hücrelerinin sellüler protein miktarında azalmalara neden olduğu ve hücre ölümünün tedavi süresi

ile doğrusal bir artış gösterdiği belirlenmiştir (En güçlü sitotoksik aktivite, 72 saatlik inkübasyon periyodunda gözlenmiştir). Bu yöntem esas alınarak etanol ekstresi için, her iki hücre hattında da sitotoksik etkinin en yüksek olduğu 72 saatlik tedavi periyodunda hesaplanan IC<sub>50</sub> değerleri; VCaP hücrelerinde 129,73 µg/ml, Calu-1 hücrelerinde ise 251,65 µg/ml' dir. WST-1 canlılık testinde hücre canlılığı üzerine olan etki, mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi miktarına göre belirlenirken, SRB testinde toplam sellüler protein miktarına göre belirlenmektedir. Her iki canlılık testi de hücrelerdeki metabolik aktiviteyi göstermesine rağmen, elde edilen sonuçlar birbirinden farklı olabilmektedir. Özellikle, SRB testiyle belirlenen IC<sub>50</sub> değerleri WST-1 testiyle belirlenen değerlere kıyasla belirgin şekilde düşüktür. Toplam protein miktarındaki azalmaya bağlı olarak gözlenen hücre canlılığındaki düşüşün WST-1 testi sonuçlarında gözlenenden daha fazla olması, hücrelerin ölüyor olmasına rağmen halen mitokondriyal dehidrogenaz içeriğini devam ettirdiğini göstermektedir. Bu farklılık kullanılan ilacın etki mekanizmasına bağlı olarak (örneğin; enerji kaynakları, sinyal molekülleri, DNA) değişmektedir (Ulukaya ve ark. 2008). WST-1 öncesi ve sonrası çekilen faz-kontrast mikroskop görüntüleri ile de hücre canlılığındaki doza artışına bağlı azalma desteklenmiştir.

Çalışmanın bir sonraki kısmında, *Rosmarinus officinalis* L.'in etanol ve infüzyon ekstrelerinin etkisini daha detaylı inceleyebilmek için gerçek zamanlı sitotoksik analiz sistemi kullanılmıştır. XCELLigence sistemi hücre canlılığının ve sitotoksikitenin hızlı bir şekilde belirlenmesinde kullanılan yeni ve güncel bir yöntemdir (Urcan ve ark. 2010). Her iki hücre hattında da ilaç uygulanmasını takiben hücrelerin yaşamları xCELLigence sistemi ile 72 saat boyunca izlendiğinde, en yüksek konsantrasyonlarda hücre indeks değerinin giderek artan saatlerde 0'a düştüğünün gözlenmesi (tüm hücrelerin öldüğü değer), bu konsantrasyonların sitotoksik etkiye neden olduğunu göstermiştir. *R. officinalis* L. etanol ekstresinin uygulandığı VCaP hücrelerinde 400 ve 200 µg/ml'lik ilaç dozları, Calu-1 hücrelerinde ise 400 µg/ml'lik ilaç dozu, hücre indeks değerinin 0'a düşmesine yani tüm hücrelerin ölmesine neden olmuştur. Bu durumdan yola çıkarak; *R. officinalis* L. etanol ekstresinin bu dozlarının, söz konusu hücreler üzerinde %100 sitotoksik olduğu söylenebilmektedir. Zamana bağlı hücre indeks grafiği detaylı olarak incelendiğinde; *R. officinalis* L. etanol ekstresinin 100 ve 50 µg/ml'lik dozlarında ve tedavi süresinin sırasıyla ~28. ve ~46. saatlerinde (100 ve 50 µg/ml

dozları için), VCaP hücrelerinin çoğalmalarının durduğu ve proliferasyonun giderek azaldığı fakat tedavi süresi boyunca hücre indeks değerinin 0'a ulaşmadığı gözlenmiştir. Bu sonuca dayanarak; *R. officinalis* L. etanol ekstresinin 100 ve 50 µg/ml'lik dozlarının, VCaP hücreleri üzerinde zayıf sitotoksik etki gösterdiği söylenebilmektedir. *R. officinalis* L. etanol ekstresinin uygulandığı Calu-1 hücrelerinde 200 µg/ml'lik ilaç konsantrasyonu, ~6 saat içerisinde hücre indeks değerinin hızlı bir şekilde azalmasına neden olmuştur. Fakat, tedavi süresinin sonuna dek hücre indeks değerinin 0'a ulaşmadığı gözlenmiştir. Bu durum; 200 µg/ml'lik etanol ekstresinin, Calu-1 hücreleri üzerinde %100 sitotoksik etki göstermediği anlamına gelmektedir. *R. officinalis* L. etanol ekstresinin daha düşük konsantrasyonlarında (VCaP: 25 µg/ml, 12,5 µg/ml ve 6,25 µg/ml; Calu-1: 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml ve 6,25 µg/ml) ise, hücre indeks değerleri grafiğinin benzer ve kontrol hücrelerine paralel şekilde seyrettiği gözlenmiştir. Bu durum, düşük konsantrasyonların, her iki hücre hattı üzerinde de sitotoksik aktivitesinin olmadığını göstermiştir. Ancak, zamanın ilerlemesi ile kültür ortamındaki besin öğelerinin yetersizliğine bağlı olarak hem düşük konsantrasyonlu ilaç uygulanan hücrelerin hem de kontrol hücrelerinin çoğalmalarının durduğu gözlenmiştir.

*R. officinalis* L. infüzyon ekstresinin uygulandığı VCaP ve Calu-1 hücrelerinin zamana bağlı hücre indeks değerlerini gösteren grafikler incelendiğinde; infüzyon ekstresinin en yüksek konsantrasyonunda (400 µg/ml), hem VCaP hem de Calu-1 hücreleri için hücre indeks değerlerinin ilerleyen saatlerde 0'a düştüğü gözlenmiştir. Bu sonuç, infüzyon ekstresinin 400 µg/ml'lik konsantrasyonunda hem VCaP hem de Calu-1 hücrelerin tümünün öldüğünü ve bu konsantrasyonun her iki hücre üzerinde de %100 sitotoksik etkiye neden olduğunu göstermiştir. VCaP hücrelerinde; *R. officinalis* L. infüzyon ekstresinin uygulanmasını takiben, ilk saatlerde 200 µg/ml ve 100 µg/ml'lik konsantrasyonlarda hücre indeks değerlerinin yükseldiği ve ekstre dozlarının uygulanmasından belli bir süre (sırasıyla 20 ve 25 saat) sonra VCaP hücre canlılığının azalmaya başladığı gözlemlendi. Bu dozlarla tedavi süresi boyunca, VCaP hücre hattının hücre indeks değerleri 0'a ulaşmamasına rağmen infüzyon ekstresinin 200 µg/ml ve 100 µg/ml'lik dozlarının, VCaP hücrelerinin çoğalmalarını baskıladığı ve bu hücreler üzerinde zayıf bir sitotoksik etki gösterdiği söylenebilmektedir. Benzer bir sitotoksik aktivite, *R. officinalis* L. infüzyon ekstresinin 200 µg/ml'lik dozda uygulandığı Calu-1 hücrelerinde de görülmüştür. *R. officinalis* L. infüzyon ekstresinin uygulanmasının ardından ilk



birkaç saat içinde Calu-1 hücre proliferasyonunun devam ettiği ve ilerleyen saatlerde hücre indeks değerinin giderek azaldığı tespit edilmiştir. Bu bağlamda; 200 µg/ml'lik infüzyon ekstresinin, Calu-1 hücrelerinin çoğalmasını büyük ölçüde engellediği sonucuna ulaşılabilmektedir. *R. officinalis* L. infüzyon ekstresinin daha düşük konsantrasyonlarında (VCaP: 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml ve 6,25 µg/ml; Calu-1: 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml ve 6,25 µg/ml) ise, hücre indeks değerleri grafiğinin benzer ve kontrol hücrelerine paralel şekilde seyrettiği gözlenmiştir. Bu durum, infüzyon ekstresinin düşük konsantrasyonlarının, her iki hücre hattı üzerinde de sitotoksik aktivitesinin olmadığını göstermektedir. Alınan sonuçlar, *Rosmarinus officinalis* L. bitkisinden elde edilen ekstrelerin sadece yüksek dozlarda, VCaP ve Calu-1 hücreleri üzerinde sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu bu yöntemle desteklemiştir. Daha önce bu hücrelerle yapılan bir çalışma olmaması çalışmamızın literatüre yeni ve değerli bilgiler getireceğini göstermektedir.

Bu çalışmanın amacı, ülkemizde doğal olarak yetişen bir bitki olan *Rosmarinus officinalis* L. bitkisinden elde edilen alkol ve infüzyon ekstrlerinin, prostat ve akciğer kanseri hücre soyları (VCaP, Calu-1) üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırmaktır. Çalışmada; ekstrelerin VCaP ve Calu-1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini analiz etmek için 3 farklı yöntem (WST-1, SRB ve xCELLigence) kullanılmıştır. Bu yöntemlerden elde edilen sonuçlara dayanarak, uygulanan testleri duyarlılıkları açısından karşılaştırmak mümkündür. WST-1 testi hücrelerin metabolik aktivitesine, SRB testi ise hücrelerdeki toplam protein miktarına dayalı kolorimetrik yöntemlerdir. Bu geleneksel yöntemler proliferasyon ölçümü prosedürünü geniş ölçüde kolaylaştırmıştır. Ancak; mevcut geleneksel testler, etken madde ile tedavi sonrasında oluşan belirli spesifik değişiklikleri sadece ortaya çıkarmaktadır. Bundan dolayı, geleneksel hücre proliferasyon ve sitotoksikite testlerini kullanarak farklı hücresel cevapların ölçümü oldukça zordur. Bu nedenle, *R. officinalis* L. ekstrlerinin VCaP ve Calu-1 hücreleri üzerindeki etkilerini geniş kapsamlı olarak değerlendirebilmek amacıyla WST-1 ve SRB testlerine ek olarak, gerçek zamanlı hücre analiz sistemi olan xCELLigence cihazı da kullanılmıştır. XCELLigence sistemi, canlı hücrelerin yapışma kuvvetini ölçen mikroelektronik bir biyo-sensördür (Moodley ve ark. 2011).

*R. officinalis* L. ekstrelinin VCaP ve Calu-1 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu çalışmada, uygulanan 3 yöntemle de elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri farklılık göstermiştir. Özellikle, xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile belirlenen IC<sub>50</sub> değerleri, diğer iki kolorimetrik test (WST-1 ve SRB) ile belirlenen IC<sub>50</sub> değerlerine kıyasla belirgin olarak düşüktür (rakamsal açıdan değerlendirildiğinde). Ayrıca, *R. officinalis* L. infüzyon ekstresinin her iki hücre soyu üzerindeki sitotoksik etkisi, WST-1 ve SRB testleriyle belirlenememiştir (IC<sub>50</sub>: >400). Bu ekstrenin her iki hücre üzerindeki sitotoksik etkisi, 72 saat boyunca xCELLigence sistemi ile gerçek zamanlı olarak izlendiğinde ise; infüzyon ekstresinin yüksek dozlarında hücre ölümüne olduğu gözlemlenmiştir (VCaP IC<sub>50</sub>: 96,4; Calu-1 IC<sub>50</sub>: 161). Çalışmadan elde edilen bu sonuca dayanarak; sitotoksik ajanların hücre kültürlerindeki etkilerini eş zamanlı ve dinamik olarak izlemede, xCELLigence sisteminin tercih edilebilir ve hassas bir yöntem olduğu söylenebilmektedir.

XCELLigence sistemi, hücre canlılığı, hücre proliferasyonu ve sitotoksisite gibi hücresel süreçlerin gerçek zamanlı olarak izlenmesi için uygun bir test formatıdır (Moodley ve ark. 2011). Klasik sitotoksisite testleri ile kıyaslandığında, xCELLigence sisteminin pek çok üstünlüğü bulunmaktadır. XCELLigence sisteminde tüm deney boyunca hücresel durumun kontrol edilmesi, hücre çoğalması, morfolojik değişiklikler ve hücre ölümleri hakkında sürekli bilgi sağlamaktadır. Bunun yanı sıra; gerçek zamanlı hücre analiz sistemi, zamana bağlı olarak IC<sub>50</sub> değerlerinin hesaplanmasını sağlamaktadır. Bu özellik, klasik sitotoksisite testlerinin tek bir IC<sub>50</sub> değerinden daha tatmin edici bilgiler sunmaktadır. Geleneksel hücre tabanlı testlerin aksine, hücre yapışması, yayılması, proliferasyonu ve ölümü gibi hücresel cevapların bu sistem ile gerçek zamanlı olarak takip edilmesi, *in vitro* testlerde hücre konsantrasyonunun optimize edilmesine yardımcı olmaktadır. Ayrıca, xCELLigence sistemi deney öncesi elde edilen hücre ve test şartlarının tüm deney boyunca stabil kalmasını da sağlamaktadır. XCELLigence sisteminin diğer testlerden en önemli üstünlüğü, canlı hücrelerin bir bileşiğe karşı verdikleri tepkilerin gerçek zamanlı (real-time) olarak gözlemlenebilmesidir. Böyle bir durum, WST-1 ve SRB gibi canlılık testlerinde imkansızdır (Öztürk ve ark. 2011).

Çalışmada, *R. officinalis* L. alkol ekstresinin uygulandığı Calu-1 hücrelerinden xCELLigence sistemiyle elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri incelendiğinde; 72. saatteki IC<sub>50</sub> değerinin, 48. saatteki IC<sub>50</sub> değerinden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu durum, alkol ekstresinin hücreler üzerindeki toksik etkisine bağlı olarak hücre hacimlerinin artmasından ve empedans ölçümü sonucunda daha yüksek hücre indeks değerlerinin elde edilmesinden kaynaklanmaktadır. Xing ve ark. (2005) tarafından bildirildiğine göre, toksisite hücrelerin yayılmasına ya da kümelenmesine neden olabilmektedir. Bu durum, hücre ve elektrotların daha geniş alanda temas kurmasına neden olur ve nihai olarak hücre indeks değerinde bir artışa yol açar. Çalışmamızda, canlılık testlerinden elde edilen sonuçları teyit etmek için faz-kontrast mikroskopunda yapılan incelemeler de bu sonucu doğrulamaktadır.

Bu çalışmada ulaşılan sonuçlara dayanarak, tek bir *in vitro* testin, ilaç uygulamasına cevap olarak oluşan hücresel değişimlerin yalnızca bir yönünü yansıttığı ve bu nedenle bir bileşiğin canlı hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin teyit edilmesi için ikinci bir canlılık testinin uygulanması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca; hücrelerde meydana gelen ilaç kaynaklı sitopatolojik değişiklikleri, mikroskop gibi farklı bir teknoloji ile teyit etmek sonuçların güvenilirliği açısından önemlidir.

Bu tez çalışmasında kullanılan *Rosmarinus officinalis* L. (biberiye) bitkisi, halk tıbbında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitki, dahilen; çay veya çay karışımları halinde diüretik (idrar söktürücü) ve safra arttırıcı olarak, ayrıca sindirim sistemi rahatsızlıklarında kullanılmaktadır. Dolaşım sistemi rahatsızlıklarında ve romatizmal hastalıklarda ise haricen, banyo şeklinde tatbik edilerek kullanımı yaygındır (Haksel 2013). *R. officinalis* L. (biberiye) bitkisinin geçmişten günümüze dek geleneksel tedavilerde yaygın olarak kullanılması, son zamanlarda bilim dünyasının dikkatini çekmiştir ve bitkiden elde edilecek doğal bileşiklerin anti-kanser ilaçlar olarak kullanılması üzerine birçok çalışma yapılmıştır.

*R. officinalis* L. bitkisinden izole edilen ekstraktların farklı kanser hücre soyları üzerindeki sitotoksik etkisinin araştırıldığı literatür çalışmalarından elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri, bu çalışmadan elde edilen IC<sub>50</sub> değerlerine kıyasla belirgin olarak düşüktür. IC<sub>50</sub> değerleri arasındaki farklılıklar; ekstraksiyonda kullanılan çözücülerin türüne, kanser hücre soylarının gösterdiği direnç, bitkinin yetiştiği habitatın özelliğine bağlı

olabilmektedir. Biberiye bitkisinde gözlemlenen bu sitotoksik etki farklılıkları, ekstrelerinin fitokimyasal profilindeki farklılıklardan da kaynaklanabilmektedir. Literatürde, biberiye ekstresinde bulunan temel bileşiklerin (karnosol, karnosik asit, rosmarinik asit, ursolik asit ve betulinik asit gibi) tek başına farklı kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin araştırıldığı pek çok çalışma yer almaktadır. Karnosik asit ve karnosol, biberiye bitkisinin taze veya kurutulmuş yapılarında bulunan birincil fenolik bileşenlerdir ve pek çok raporda bu bileşiklerin, biberiyenin sitotoksik, anti-proliferatif, antioksidan ve anti-enflamatuar aktivitelerinden sorumlu olduğu belirlenmiştir. Biberiye bitkisinde bulunan diğer temel bileşik ise rosmarinik asittir. Rosmarinik asidin; antioksidan, astrenjan (kanama durdurucu), anti-enflamatuar, anti-mikrobiyal, anti-anjiyogenik, anti-viral, anti-romatizmal, anti-alerjik, anti-depresan, anti-diyabetik ve anti-tümör gibi bir dizi aktivitesinin bulunduğu pek çok araştırma ile ortaya konulmasına rağmen rosmarinik asidin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri tatmin edici değildir.

Yeşil-Çelikaş ve ark. (2010) tarafından, *R. officinalis* L.'in aktif bileşikleri olan karnosik ve rosmarinik asidin, çeşitli kanser hücreleri karşısındaki anti-proliferatif etkilerinin araştırıldığı çalışmada, karnosik asidin 6,25 µg/ml'lik konsantrasyonda güçlü sitotoksik etki gösterdiği fakat rosmarinik asidin uygulanan dozlarda (100-6,25 µg/ml) hiçbir anti-proliferatif etki göstermediği bulunmuştur. Benzer bir çalışmada; karnosolün, karnosik asidin ve rosmarinik asidin insan ovaryum kanseri hücre hattı (A2780) üzerindeki anti-proliferatif etkileri araştırılmıştır. Çalışmada, karnosik asidin ve karnosolün sırasıyla 7,5 µg/ml ve 10 µg/ml IC<sub>50</sub> değerleri ile hücrelerin çoğalmasını büyük ölçüde baskıladığı, rosmarinik asidin ise önemli bir sitotoksik aktivitesinin bulunmadığı belirlenmiştir (Cheung ve ark. 2012). *R. officinalis* L. bitkisinden elde edilen ekstrenin fitokimyasal kompozisyonunun ve bitkinin anti-proliferatif etkisi ile olan ilişkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada, biberiye ekstresinde gözlenen güçlü sitotoksik etki, karnosik asidin yüksek konsantrasyonlarda bulunmasına dayandırılmıştır (Kontogianni ve ark. 2013). Daha önce yapılan çalışmaların ışığında değerlendirildiğinde; bu çalışmada kullanılan *R. officinalis* L. ekstrelerinin sitotoksik aktivitesinde gözlenen farklılıklar, büyük olasılıkla bitkinin temel bileşenlerindeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Bu bağlamda, *Rosmarinus officinalis* L. ekstrelerinin fitokimyasal içeriklerinin analiz edilmesi ve ekstrelerdeki birincil sitotoksik bileşenlerin

(karnosol ve karnosik asit gibi) kanser hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkilerinin ekstreden bağımsız olarak değerlendirilmesi için ileri bir çalışmanın yapılması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

Bu *in vitro* çalışma sonucunda; ülkemizde doğal olarak yetişen *Rosmarinus officinalis* L. (biberiye) bitkisinden elde edilen ekstrelerin insan kanser hücre hatları (VCaP ve Calu-1) üzerindeki sitotoksik etkileri belirlenmiştir. *Rosmarinus officinalis* L. ekstrelerinin ilk defa bu hücre hatları üzerinde çalışılmasıyla literatür bilgisine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bu çalışmanın sonuçlarından yola çıkarak, kullanılan ekstrelerin kanser tedavisindeki büyüme baskılayıcı etkisinin inceleneceği bir sonraki basamağın, esansiyel yağların izolasyonu ve etken maddelerin araştırılması olduğu sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abe, F., Yamauchi, T., Nagao, T., Kinjo, J., Okabe H., Higo H., Akahane H. 2002.** Ursolic acid as a trypanocidal constituent in Rosemary. *Biol. Pharm. Bull.*, 25: 1485-1487.
- Aguilar, F., Autrup, H., Barlow, S., Castle, L., Crebelli, R., Dekrant, W. ve ark. 2008.** Use of rosemary extracts as a food additive – scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food. *EFSA J.*, 721: 1-29.
- Akiba, S., Hirayama, T. 1990.** Cigarette smoking and cancer mortality risk in Japanese men and women results from reanalysis of the six-prefecture cohort study data. *Environ Health Perspect*, 87: 19-26.
- Akkoçlu, A. 2006.** Akciğer kanserleri. Türk Toraks Derneği. <http://www.toraks.org.tr/SunuMerkezi/?s=3A2E22585A3B5858573D563F365E56> (Erişim tarihi: 31.05.2014).
- Akkoçlu, A. 2013.** Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi. Ulusal Akciğer Kanseri Kongresi, 13-17 Mart 2013, Kapadokya, Nevşehir.
- Akman, Y., Güney, K. 2006.** Bitki Biyolojisi Botanik. Palme Yayıncılık, Ankara, 775s.
- Alberg, A.J., Samet, J.M. 2003.** Epidemiology of lung cancer. *Chest*, 123: 21-49.
- Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P., Mason, T.J. 2004.** Potential for the use of Ultrasound in the Extraction of Antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the Food and Pharmaceutical Industry. *Ultrasonic Sonochemistry*, 11: 261.
- Alexandrov, K., Rojas, M., Rolando, C. 2006.** DNA Damage by Benzo(a)pyrene in Human Cells Is Increased by Cigarette Smoke and Decreased by a Filter Containing Rosemary Extract, Which Lowers Free Radicals. *Cancer Res.*, 66 (24): 11938-11945.
- Aliustaoğlu, M., 2009.** Temel Kanser Fizyopatolojisi. [http://www.klinikgelisim.org.tr/eskisayi/kg22\\_3/8.pdf](http://www.klinikgelisim.org.tr/eskisayi/kg22_3/8.pdf) (Erişim tarihi: 19.05.2014).
- Al-Sereiti, M.R., Abu-Amer, K.M., Sen, P. 1999.** Pharmacology of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linné) and its Therapeutic Potentials. *Indian J. Exp. Biol.*, 37 (2): 124.
- Altinier, G., Sosa, S., Aquino, R.P., Mencherini, T., Loggia, R.D., Tubaro, A. 2007.** Characterization of topical anti-inflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. *J. Agricult. Food Chem.*, 55 (5): 1718-1723.

**Angelini, L.G., Carpanese, G., Cioni, P.L., Morelli, T., Macchia, M., Flamini, G. 2003.** Essential oils from Mediterranean lamiaceae as weed germination inhibitors. *J Agric Food Chem.*, 51: 6158-6164.

**Angioni, A., Barra, A., Cereti, E., Barile, D., Coisson, J.D., Arlorio, M., Dessi, S., Coroneo, V., Cabras, P. 2004.** Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L.. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52 (11): 3530-3535.

**Angle, A. 2011.** What is cancer?. [http://www.cancervic.org.au/about-cancer/what\\_is\\_cancer](http://www.cancervic.org.au/about-cancer/what_is_cancer) (Erişim tarihi: 19.05.2014).

**Anonim, 1987.** Ülkemizdeki Bazı Orman Tali Ürünlerinin Teşhis ve Tanıtım Kılavuzu. Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı, Ankara.

**Anonim, 2002-b.** Rosemary. <http://newcrop.hot.purdue.edu/newcrop/med-aro/factsheets/ROSEMARY.html> (Erişim tarihi: 01.06.2014).

**Anonim, 2004.** *Rosmarinus officinalis*. Dave' s Garden, <http://davesgarden.com/guides/pf/showimage/60079/> (Erişim tarihi: 07.06.2014).

**Anonim, 2008.** Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation. Roche Diagnostics GmbH, Germany.

**Anonim, 2009.** Türkiye'de Kanser Kayıtcılığı. <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-kayitciligi/108-t%C3%BCrkiyede-kanser-kayitciği.html> (Erişim tarihi: 29.05.2014).

**Anonim, 2010.** Cell Culture Basics Companion Handbook. <http://www.lifetechnologies.com/tr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics.html> (Erişim tarihi: 28.09.2013).

**Anonim, 2011.** Hemocytometer (Counting of cells). <http://amrita.vlab.co.in/index.php?sub=3&brch=188&sim=336&cnt=1> (Erişim tarihi: 03.05.2014).

**Anonim, 2012a.** Study Finds Prostate Cancer Increasing in Most Countries. [www.iarc.fr/en/media-centre/pr/.../pr209\\_E.pdf](http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/.../pr209_E.pdf) (Erişim tarihi: 27.05.2014)

**Anonim, 2012b.** CytoScan™ SRB Cell Cytotoxicity Assay. G-Biosciences, USA.

**Anonim, 2012c.** xCELLigence System. <http://www.roche-applied-science.com/sis/xcelligence/ezhome.html> (Erişim tarihi: 10.06.2014).

**Anonim, 2013a.** Prostate cancer. <http://www.cancer.org/cancer/prostatecancer/detailedguide/prostate-cancer-what-is-prostate-cancer> (Erişim tarihi: 27.05.2013).

**Anonim, 2013b.** Prostat Kanseri. <http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-turleri/52-prostat-kanseri.html> (Erişim tarihi: 27.05.2014).

**Anonim, 2013c.** Study Finds Prostate Cancer Increasing in Most Countries. [www.iarc.fr/en/media-centre/pr/.../pr209\\_E.pd](http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/.../pr209_E.pd) (Erişim tarihi: 27.05.2014).

**Anonim, 2013d.** Dünyada prostat kanseri. <http://www.prostatkanseridernegi.org/prostat-kanseri/dunyada-prostat-kanseri> (Erişim tarihi: 28.05.2014).

**Anonim, 2013e.** *Biberiye (Rosmarinus officinalis)*. [web.ogm.gov.tr/birimler/merkez/odundisiurun/.../BİBERİYE\\_X.pdf](http://web.ogm.gov.tr/birimler/merkez/odundisiurun/.../BİBERİYE_X.pdf) (Erişim tarihi: 20.09.2013).

**Anonim, 2014a.** What Is Cancer?. <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer> (Erişim tarihi: 17.04.2014).

**Anonim, 2014b** Cancer Basics. <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics> (Erişim tarihi: 19.02.2014).

**Anonim, 2014c.** Akciğer kanseri. [http://tr.wikipedia.org/wiki/Akci%C4%9Fer\\_kanseri](http://tr.wikipedia.org/wiki/Akci%C4%9Fer_kanseri) (Erişim tarihi: 30.05.2014).

**Anonim, 2014d.** Cancer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en> (Erişim tarihi: 18.02.2014).

**Anonim, 2014e.** *Rosmarinus*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Rosmarinus> (Erişim tarihi: 06.06.2014).

**Antonarakis, E.S., Carducci, M.A., Eisenberger, M.A., 2010.** Novel targeted therapeutics for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer Letters*, 291: 1-13.

**Arı, E., Uysal, F., Çınar, N., Kaya, N., Çınar, A., Bayır, A., 2013.** Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.). Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, [http://www.batem.gov.tr/urunler/sus\\_ve\\_tibbi/tibbi/tibbi\\_bitkiler.htm](http://www.batem.gov.tr/urunler/sus_ve_tibbi/tibbi/tibbi_bitkiler.htm) (Erişim tarihi: 17.04.2014).

**Arıcı, D. S., 2001.** Karsinogenezis. [tipedu.cumhuriyet.edu.tr/Donem3/.../Patoloji/karsinogenezis.doc](http://tipedu.cumhuriyet.edu.tr/Donem3/.../Patoloji/karsinogenezis.doc) (Erişim tarihi: 14.02.2014).

**Aruoma, O.I., Halliwell, B., Aeschbach, R., Loligers, J. 1992.** Antioxidant and pro-oxidant properties of active Rosemary constituents: carnosol, and carnosic acid. *Xenobiotica*, 22: 257-268.

**Attanoos, R L. 2010.** Asbestos-Related Lung Disease. *Surgical Pathology Clinics*, 3 (1): 109-127.

**ATCC, 2014.** Calu-1. <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-54.aspx> (Erişim tarihi: 09.06.2014).

**ATCC, 2014.** VCaP. <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2876.aspx> (Erişim tarihi: 09.06.2014).



**Aysel, M.B., 2008.** Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) ve mercanköşk (*Origanum onites* L.) bitkilerindeki antioksidan aktivite potansiyellerinin araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara.

**Bai, N., He, K., Roller, M., Lai, C.S., Shao, X., Pan, M.H., Ho, C.T. 2010.** Flavonoids and phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis*. *J Agric. Food Chem.*, 58: 5363-5367.

**Baratta, M.T., Dorman, H.J.D., Deans, S.G., Biondi, D.M., Ruberto, G. 1998a.** Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 10: 618-627.

**Baratta, M.T., Dorman, H.J.D., Deans, S.G., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Ruberto, G. 1998b.** Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 13: 235-244.

**Basmacıoğlu-Malayoğlu, H. 2010.** Biberiyenin (*Rosmarinus officinalis* L.) Antioksidan Etkisi. *Hayvansal Üretim*, 51 (2): 59-67.

**Başer, K.H.C. 2014.** Türkiye' nin Önemli Tıbbi ve Aromatik Odun Dışı Orman Ürünleri. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Eczacılık ve Ormancılıktaki Önemi Çalıştayı, 20-21 Mart 2014, İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi ve Elazığ Orman Bölge Müdürlüğü, Malatya.

**Bayrak, A., Akgül, A. 1989.** Biberiye bitkisinin uçucu yağ kompozisyonu üzerinde araştırma. *Gıda Sanayi Dergisi*, 5: 20-22.

**Bayrak, A. 2006.** Gıda aromaları. Gıda Teknolojisi Derneği. Ankara.

**Baytop, T. 1984.** Türkiye'de bitkilerle tedavi. İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, İstanbul.

**Berridge, M.V. 1996.** The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica*, 4: 15-19.

**Bilgel, N. 2001.** Akciğer kanserlerinin epidemiyolojisi: Uludağ Onkoloji Sempozyumu Kitabı ve Konsensus Raporu, Editörler: Engin, K., Özyardımcı, N., Uludağ Üniversitesi Yayınları, Bursa, s. 35- 8.

**Bitiren, M., 2014.** Karsinogenezis : (Onkogenezis) Kanserin Moleküler Temeli. Harran Üniversitesi, Tıp Fak. Patoloji ABD, [tip.harran.edu.tr/ogrenci/ders\\_notlari/patoloji/karsinogenezis.pdf](http://tip.harran.edu.tr/ogrenci/ders_notlari/patoloji/karsinogenezis.pdf) (Erişim tarihi: 17.02.2014).

**Boffetta, P. 2004.** Epidemiology of environmental and occupational cancer. *Oncogene*, 23: 6392-6403.

**Boyle, P., Levin, B., 2008.** World Cancer Report 2008. Lyon, <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/index.php> (Erişim tarihi: 28.05.2014).

**Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Jovin, E. 2007.** Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 7879-7885.

**Bracco, U., Löliger, J., Viret, J.L. 1981.** Production and use of natural antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58: 686-690.

**Cabadak, H. 2008.** Hücre siklusu ve kanser. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 9 (3): 51- 61.

**Cancer Council, 2012.** Lung cancer. [http://www.cancervic.org.au/about-cancer/cancer\\_types/lung\\_cancer](http://www.cancervic.org.au/about-cancer/cancer_types/lung_cancer) (Erişim tarihi: 31.05.2014).

**Cancer Council, 2013.** Prostate cancer. [http://www.cancervic.org.au/about-cancer/cancer\\_types/prostate\\_cancer](http://www.cancervic.org.au/about-cancer/cancer_types/prostate_cancer) (Erişim tarihi: 27.05.2014).

**Cantrell, C.L., Richeimer, S.L., Nicholas, G. M., Schmidt, B.K., Baile, D.T. 2005.** seco-Hinokiol, a New Abietane Diterpenoid from *Rosmarinus officinalis*. *J. Nat. Prod.*, 68: 98-100.

**Carmicheal, J., DeGrafit W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Mitchell, J.B. 1987.** Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research*, 47: 936-942.

**Catelinois, O., Rogel, A., Laurier, D., Billon, S., Hemon, D., Verger, P., Tirmarche, M. 2006.** Lung cancer attributable to indoor radon exposure in France: impact of the risk models and uncertainty analysis. *Environmental Health Perspectives*, 114: 1361-1366.

**Chabner, B.A., Roberts, T.G. 2005.** Jr. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 5: 65-72.

**Chadefaud, M., Emberger, L. 1960.** Tome II: Traite De Botanique (Systematique), PP: 832-833.

**Cheung, S., Tai, J. 2007.** Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncol. Rep.*, 17: 1525-1531.

**Clark, W.H. 1991.** Tumour progression and the nature of cancer. *Br. J. Cancer*, 64: 631-644.

**Clark, L.C., Combs, G.F., Turnbull, B.W., Slate, E.H., Chalker, D.K., Chow, J., Davis, L.S., Glover, R.A., Graham, G.F., Gross, E.G., Krongrad, A., Leshner, J.L., Park, H.K., Sanders, B.B., Smith, C.L., Taylor, J.R. 1996.** Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A

randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA*, 276 (24):1957-63.

**Cooper, G.M. 2000.** The Cell Cycle: The Cell A Molecular Approach Second Edition, Sunderland.

**Coşkun, M. 2012.** Yeni sentez edilen palladyum (II) bileşiğinin transforme fibroblastlar üzerindeki etkilerinin incelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, AÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.

**Cotran, S.R., Kumar, V., Robbins, S.L. 1989.** Chapter 6: Robbins Pathologic Basis of Disease, Philadelphia, 239-306.

**Cragg, G.M., Grothaus, P.G., Newman, D.J. 2009.** Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem. Rev.*, 109: 3012–3043.

**Craighead, J.E., Mossman, B.T. 1982.** The pathogenesis of asbestos-associated diseases. *New England Journal of Medicine*, 306 (24): 1446-1455.

**Cummings, J.L. 2004.** Alzheimer' s disease. *New English Journal of Medicine*, 351: 56-67.

**Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C. 1996.** Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73: 645-652.

**Çapacı, K. 2009.** Lamiaceae-Labiatae-Balıbabagiller. [http://www.kazimcapaci.com/cicek\\_lamiaceae.htm](http://www.kazimcapaci.com/cicek_lamiaceae.htm) (Erişim tarihi: 07.04.2014).

**Çelikaş, O.Y., Hames-Kocabaş, E.E., Bedir, E., Vardar-Sukan, F., Ozek, T., Baser K.H.C. 2007.** Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 100: 553-559.

**Daferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G. 2000.** GC-MS Analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Agricultural Food Chemistry*, 48: 2576-2581.

**Datta, C.S. 1970.** A Handbook of Systematic Botany. Asia Publishing House, 562 s.

**Davis, P.H., Mill, R.R., Tan, K. 1982.** Flora of Turkey and The East Aegen Islands Vol: 7. Edinburgh University Press, Edinburgh.

**Davis, P.H., Mill, R.R., Tan, K. 1988.** Flora of Turkey and The East Aegen Island Vol: 10. Edinburgh University Press, Edinburgh.

**del Bano, M.J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-Garcia, O., del Rio, J.A., Ortuno, A. Quirin, K.W., Gerard, D. 2003.** Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*, Antioxidant activity. *J. Agricult. Food Chem.*, 51: 4247-4253.

- del Bano, M.J., Lorente, J., Castillo J.N, Benavente-Garcia, O., Marin, M.P., del Rio, J.A., Ortuno, A., Ibarra, I. 2004.** Flavonoid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*, Postulation of a biosynthetic pathway. *J. Agricult. Food Chem.*, 52: 4987-4992.
- Dias, P.C., Foglio, M.A., Possenti, A., De Carvalho, J.E. 2000.** Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L.. *J. Ethnopharmacol.*, 69: 57-62.
- Doğan, A. L., Güç, D. 2004.** Sinyal iletimi mekanizmalar ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35: 34-42.
- Doll, R., Peto, R. 1981.** The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *Journal of the National Cancer Institute*, 66 (6): 1192-1308.
- Dorman, H.J.D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkanen, M.J. 2003.** Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food. Chem.*, 83: 255-262.
- Ece, T., Mandel, N.M. 2013.** Akciğer Kanseri Önsöz. Ulusal Akciğer Kanseri Kongresi, 13-17 Mart 2013, Kapadokya, Nevşehir.
- Epstein, J.I. 2004.** Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology: The prostate and seminal vesicles. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, 2083-2132.
- Ertürk, B. 2006.** Akciğer Kanserli Hastalarda Malondialdehit (MDA) ve Total Antioksidan Kapasite (TAOK) Düzeyi Ölçümü ile Oksidan-Antioksidan Dengenin Araştırılması. *Uzmanlık Tezi*, T.C.Sağlık Bakanlığı Süreyyapaşa Göğüs ve Kalp-Damar Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.
- Faleiro, L., Miguel, G.M., Guerrero, C.A.C., Brito, J.M.C. 1999.** Antimicrobial activity of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus mastichina* (L) L. ssp. *mastichina* and *Thymus albicans*. Part 2: Pharmacognosy, pharmacology, pytochemistry, toxicology. Proceedings of the II WOCMAP congress on medicinal and aromatic plants, Mendoza, Argentina.
- Fidaner, C., Eser, S.Y., Parkin, D.M. 2001.** Incidence in Izmir in 1993-1994: first results from Izmir Cancer Registry. *Eur J Cancer*, 37: 83- 92.
- Finegold, S.M., Baron E.J. 1986.** Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. The C.V. Mosby Company, St. Louis, USA, 643-646.
- Fraga, B.M., Gonzales, A.G., Herrera, J.R., Luis, J.G., Perales, A., Ravelo, A.G. 1985.** A revised structure for the diterpene rosmanol. *Phytochemistry*, 24: 1853-1854.
- Frankel, E.N., Huang, S., Prior, E., Aeschbach, R. 1996.** Evaluation of antioxidant activity of Rosemary extracts, carnosol and carnosic acid in bulk vegetable oils and fish oil and their emulsions. *J. Sci. Food Agric.*, 72: 201-208.

- Freshney, R.I. 2000.** Culture of animal cells, a manual of basic technique, fourth edition. Wiley-Liss Publication, Canada, 577 pp.
- Fu, Y., Zu, Y., Chen, L., Shi, X., Wang, Z., Sun, S., Efferth, T. 2007.** Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research*, 21: 989-994.
- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A., Rasooli, I. 2007.** Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils. *Food Chemistry*, 102: 898-904.
- Gaither, J. 2014.** *Rosmarinus officinalis*. NC State University, <http://plants.ces.ncsu.edu/plants/all/rosmarinus-officinalis/> (Erişim tarihi: 07.06.2014).
- Gajhede, M., Anthoni, U., Nielsen, H., P., Pedersen, E., J., and Christophersen, C. 1990.** Carnosol. Crystal structure, absolute configuration, and spectroscopic properties of a diterpene. *J. Chem. Crystallogr.*, 20: 165–171.
- Ganeva, Y., Tsankova, E., Simova, S., Apostolova, B., Zaharieva, E. 1993.** Rocerone: a new triterpenoid from *Rosmarinus officinalis*. *Planta Med.*, 59: 276-277.
- Ginsberg, R.J., Schmocker, B. 1990.** Diagnostic and staging procedures in non-small cell lung cancer. *Current opinion in oncology*, 2: 328-330.
- Ginsberg, M.S. 2005.** Epidemiology of lung cancer. *Seminars in roentgenology*, 40: 83-89.
- Gong, Z., Kristal, A.R., Schenk, J.M., Tangen, C.M., Goodman, P.J., Thompson, I.M. 2009.** Alcohol consumption, finasteride, and prostate cancer risk: results from the Prostate Cancer Prevention Trial. *Cancer*, 115: 3661-9.
- Gonzalez-Vallinas, M., Molina, S., Vicente, G., de la Cueva, A., Vargas, T., Santoyo, S., Garcia-Risco, M.R., Fornari, T., Reglero, G., de Molina, A.R. 2013.** Antitumor effect of 5-fluorouracil is enhanced by rosemary extract in both drug sensitive and resistant colon cancer cells. *Pharmacological Research*, 72: 61-68.
- Gorlova, O.Y., Weng, S.F., Zhang, Y., Amos, C.I., Spitz, M.R. 2007.** Aggregation of cancer among relatives of never-smoking lung cancer patients. *International Journal of Cancer*, 121: 111-118.
- Gülbaba, A.G., Özkurt, N., Kürkçüoğlu, M., Başer, K.H.C. 2002.** Mersin Ve Adana Yöresindeki Doğal Biberiye (*Rosmarinus Officinalis* L.) Populasyonlarının Tespiti Ve Uçucu Yağ Verim Ve Bileşimlerinin Belirlenmesi. T.C. Orman Bakanlığı, Doğu Akdeniz Ormancılık Araştırma Enstitüsü Teknik Bülten No: 16, Tarsus, Mersin.
- Gültekin, M., Boztaş, G. 2014.** Türkiye Kanser İstatistikleri. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Başer, K.H.C. 2000.** Flora of Turkey and the East Aegean Islands (supplement 2), vol. 11. Edinburgh University Press, Edinburgh.

**Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M.T. 2012.** Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). ANG Vakfı, İstanbul, 547 s.

**Haksel, M. 2013.** Biberiye (*Rosmarinus officinalis*). Türk Eczacıları Birliği E-Kütüphane, [www.e-kutuphane.teb.org.tr/pdf/eczaciodasiyayinlari/ila\\_habr.../7.pdf](http://www.e-kutuphane.teb.org.tr/pdf/eczaciodasiyayinlari/ila_habr.../7.pdf) (Erişim tarihi: 01.06.2014).

**Haloui, M., Louedec, L., Michel, J.B., Lyoussi, B. 2000.** Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaurium erythraea*. *Journal of Ethnopharmacology*, 71: 465–472.

**Hanahan, D., Weinberg, R. A. 2000.** The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100: 57–70.

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

**Haraguchi, H., Saito, T., Okamura, N., Yagi, A. 1995.** Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from *Rosmarinus officinalis*. *Planta Med.*, 61: 333-336.

**Hedge, I.C. 1986.** Lamiaceae of South-West Asia: diversity, distribution and endemism. *Proceeding of the Royal Society*, 23-25.

**Herrero, M., Plaza, M., Cifuentes, A., Ibanez, E. 2010.** Green processes for the extraction of bioactives from rosemary: chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. *Journal of Chromatography A*, 1217: 2512-2520.

**Houlihan, C.M., Ho, C.T., Chang, S.S. 1984.** Elucidation of the chemical structure of a novel antioxidant, rosmaridiphenol, isolated from rosemary. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 61: 1036-1039.

**Houlihan, C.M., Ho, C.-T., Chang, S.S. 1985.** The structure of rosmariquinone: A new antioxidant isolated from *Rosmarinus officinalis* L.. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 62: 96-98.

**Huang, M.T., Ho, C.T., Wang, Z.Y., Ferraro, T., Lou, Y.R., Stauber, K., Ma, W., Georgiadis, C., Laskin, J.D., Conney, A.H. 1994.** Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. *Cancer Res.*, 54: 701-708.

**Hwang, S.J., Cheng, L.S., Lozano, G., Amos, C.I., Gu, X., Strong, L.C. 2003.** Lung cancer risk in germline p53 mutation carriers: association between an inherited cancer predisposition, cigarette smoking, and cancer risk. *Human genetics*, 113: 238-243.

**Inatani, R., Nakatani, N., Fuwa, H. 1983.** Antioxidant effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and their derivatives. *Agric. Biol. Chem.*, 47: 521-528.

**Işık, S. 2010.** Biyoteknolojik Yönden Önemli Tıbbi Bitkiler ve Bitkisel Ürünlerde Kaliteni Belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, AÜ, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara.

- İtil, O. 2000.** Akciğer kanserleri: Tanı ve tedavi: Akciğer kanserlerinin epidemiyolojisi ve etyolojisi, Editör: Haydaroğlu, A., Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, s. 15-34.
- Jemal, A., Thomas, A., Murray, T., Thun, M. 2002.** Cancer statistics, 2002. *CA: a cancer journal for clinicians* 52: 23-47.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay J., Ward, E., Forman, D. 2011.** Global Cancer Statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61: 69–90.
- Jeong, S.J., Koh, W., Kim, B., Kim, S.H. 2011.** Are there new therapeutic options for treating lung cancer based on herbal medicines and their metabolites?. *Journal of Ethnopharmacology*, 138: 652– 661.
- Johnson, J.J. 2011.** Carnosol: a promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. *Cancer Lett.*, 305: 1–7.
- Jordan, M.J., Lax, V., Rota, M.C., Loran, S., Sotomayor, J. A. 2013.** Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L.. *Food Control*, 30: 463-468.
- Kabir, Z., Bennett, K., Clancy, L. 2007.** Lung cancer and urban air-pollution in Dublin: a temporal association?. *Irish Medical Journal*, 100: 367-369.
- Kabouche, Z., Boutaghane, N., Laggoune, S., Kabouche, A., Ait-Kaki, Z., Benlabed, K. 2005.** Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *Int. J. Aromatherapy*, 15: 129–133.
- Kahraman, A., Celep, F., Doğan, M. 2009.** Morphology, Anatomy and Palynology of *Salvia indica* L. (Labiatae). *World Applied Sciences Journal* 6 (2): 289-296.
- Karamanoğlu, K. 1977.** Farmasötik Botanik Ders Kitabı. Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, 483 s.
- Karna, P., Gundala, S.R., Gupta, M.V., Shamsi, S.A., Pace, R.D., Yates, C., Narayan, S., Aneja, R. 2011.** Polyphenol-rich sweet potato greens extract inhibits proliferation and induces apoptosis in prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Carcinogenesis*, 32 (12): 1872–1880.
- Kaya, A. 2010.** Tıbbi Bitkiler ve Etnobotanik Çalışmalar. Bitkilerle Tedavi Sempozyumu, 5-6 Haziran 2010, Zeytinburnu, İstanbul.
- Keepers, Y.P., Pizao, P.E., Peters, G.J., van Ark-Otte, J., Wino-grad, B., Pinedo, H.M. 1991.** Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium MTT assays for in vitro chemosensitivity testing. *Eur. J. Cancer*, 27 (12) : 897.
- Kırpık, M. 2005.** Çukurova bölgesi kıraç ve taban arazi koşullarında yetiştirilen biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) çeşitlerinin verim ve kalitesi üzerine araştırmalar. *Doktora Tezi*, ÇÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Adana.
- Kısım, A. 2010.** (-)-Gossypol (AT-101) ve rekombinant İnsan APO2L/TRAIL' in tekli ve kombine dozlarının meme kanseri hücre hatlarında (MCF-7 VE MDA-MB-231)

sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Manisa.

**Kontogianni, V.G., Tomic, G., Nikolic, I., Nerantzaki, A.A., Sayyad, N., Stosic-Grujicic, S., Stojanovic, I., Gerothanassis, I.P., Tzakos, A.G. 2013.** Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chemistry*, 136: 120-129.

**Koschier, E.H., Sedy, K.A. 2003.** Labiatae essential oils affecting host selection and acceptance of Thrips *Tabaci lindeman*. *Crop protection*, 22: 929-934.

**Kopnin, B.P. 2000.** Targets of Oncogenes and Tumor Suppressors: Key for Understanding Basic Mechanisms of Carcinogenesis. *Biochemistry (Moscow)*, 65: 2-27.

**Krinsky, N.I., Johnson, E.J. 2005.** Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular aspects of medicine*, 26: 459-516.

**Li, X., Hemminki, K. 2004.** Inherited predisposition to early onset lung cancer according to histological type. *International journal of cancer*, 112: 451-457.

**Lian, Z., Niwa, K., Gao, J., Tagami, K., Mori, H., Tamaya, T. 2003.** Association of cellular apoptosis with anti-tumor effects of the Chinese herbal complex in endocrine-resistant cancer cell line. *Cancer Detection and Prevention*, 27: 147-154.

**Limame, R., Wouters, A., Pauwels, B., Franssen, E., Peeters, M., Lardon, F., Wever, O., Pauwels, P. 2012.** Comparative Analysis of Dynamic Cell Viability, Migration and Invasion Assessments by Novel Real-Time Technology and Classic Endpoint Assays. *PLoS ONE*, 7 (10): 1-12.

**Lopez-Jimenez, A., Garcia-Caballero, M., Medina, M.A., Quesada, A.R. 2013.** Anti-angiogenic properties of carnosol and carnosic acid, two major dietary compounds from rosemary. *Eur. J. Nutr.*, 52: 85-95.

**Lopez, P., Sanchez, C., Battle, R., Nerin, C. 2005.** Solid and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (17): 6939-6946.

**Lowitz, B.B., Casciato, D.A. 2000.** Manual of Clinical Oncology, 4th edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 768 pp.

**Ma, X., Wang, Z. 2009.** Anticancer drug discovery in the future: An evolutionary perspective. *Drug Discov. Today*, 14: 1136-1142.

**Mahmoud, A.A., AL-Shihry, S.S., Son, B.W. 2005.** Diterpenoid quinones from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Phytochemistry*, 66: 1685-1690.

**Martin, J.P., Bermejo, H.J.E. 2000.** Genetic variation in the endemic and endangered *Rosmarinus tomentosus* Huber-Morath and Maire (Labiatae) using RAPD markers. *Heredity*, 85: 434-443.



- Martinez, J.D., Parker, M.T., Fultz, K.E., Ignatenko, N.A., Gerner, E.W. 2003.** Cancer-Related Genes: Molecular Biology of Cancer, Editörler: Abraham, D.J., John Wiley&Sons, Inc, Tuscon, Arizona, 21-26.
- Mathen, C., Hardikar, B.P. 2010.** A Method for Photomicrography of Cytotoxicity in 96-Well Plates. *Asian Journal of Biotechnology*, 2 (4): 232-238.
- Mattson, M.P. 2004.** Pathways towards and away from Alzheimer' s disease. *Nature*, 430: 631-639.
- Mayo, J., Boyd, M. 1991.** Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.*, 83 (11): 757-766.
- Moghtader, M., Afzali, D. 2009.** Study of the antimicrobial properties of the essential oil of rosemary. *American-Euroasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 5 (3): 393-397.
- Molina, J.R., Yang, P., Cassivi, S.D., Schild, S.E., Adjei, A.A. 2008.** Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clinic proceedings*, 83: 584-594.
- Moodley, K., Angel, C.E., Glass, M., Graham, E.S. 2011.** Real-time profiling of NK cell killing of human astrocytes using xCELLigence technology. *Journal of Neuroscience Methods*, 200: 173-180.
- Mountain, C.F. 1997.** Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest*, 11:1710.
- McCormick, F. 1999.** Signalling networks that cause cancer. *Trends Cell Biol*, 12: 53-56.
- McKee, T., McKee, J. R. 2011.** Biochemistry in Perspective, Carcinogenesis: Biochemistry: The Molecular Basis of Life, Fifth Edition, Ed.: Noe, J., USA.
- Merlo, L.M.F., Pepper, J.W., Reid, B.J., Maley, C.C. 2006.** Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature*, 6: 924-935.
- Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Cambell, H., Munne-Bosch, S., Schwarz, K., Alegre, L. 1992.** Response of abietane diterpenes to stress in *Rosmarinus officinalis* L. new insights into the function of diterpenes in plants. *Free Rad. Res.*, 31: 107-112.
- Mukherjee, P.K., Kumar, V., Mal, M., Houghton, P.J. 2007.** Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 14: 289-300.
- Mulinacci, N., Innocenti, M., Bellumori, M., Giaccherini, C., Martini, V., Michelozzi, M. 2011.** Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: an HPLC/DAD/MS study. *Talanta*, 85: 167-176.

- Nakatani, N., Inatani, R. 1981.** Structure of rosmanol, a new antioxidant from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agric. Biol. Chem.*, 45: 2385-2386.
- Nakatani, N., Inatani, R. 1983.** A new diterpene lactone, rosmadial, from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agric. Biol. Chem.*, 47: 353-358.
- Nakatani, N., Inatani, R. 1984.** Two antioxidative diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and a revised structure for rosmanol. *Agric. Biol. Chem.*, 48: 2081–2085.
- Newall, C.A., Anderson, L.A., Philipson, J.D. 2002.** Plantas Mediciniais – Guia para Profissionais de Saúde. Premier, São Paulo.
- Numanoğlu, S. 2008.** Östrojen bağımlı meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) genistein ve hiperteminin kombine etkisinin araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir.
- Offord, E.A., Mace, K., Ruffieux, C., Malnoe, A., Pfeifer, A.M.A. 1995.** Rosmary components inhibit benzo[a]pyrene-induced genotoxicity in human bronchial cells. *Carcinogenesis*, 16: 2057-2062.
- Ohno, T., Kita, M., Yamaoka, Y., Imamura, S., Yamamoto, T., Mitsufuji, S. et al. 2003.** Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 8: 207-215.
- Okamura, N., Haraguchi, H., Hashimoto, K., Yagi, A. 1994.** Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochemistry*, 37: 1463-1466.
- Okoh, O.O., Sadimenko, A.P., Afolayan, A.J. 2010.** Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chemistry*, 120: 308-312.
- Olmos, E., Sanchez-Blanco, M. J., Ferrandez, T., Alarcon, J.J. 2007.** Subcellular Effects of Drought Stress in *Rosmarinus officinalis*. *Plant Biology*, 9 (1): 77-84.
- Oluwatuyi, M., Kaatz, G.W., Gibbons, S. 2004.** Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochemistry*, 65: 3249–3254.
- O'Reilly, K.M., Mclaughlin, A.M., Beckett, W.S., Sime, P.J. 2007.** Asbestos-related lung disease. *Am Fam Physician.*, 75 (5): 683-8.
- Orhan, G., Orhan, I., Şener, B. 2006.** Recent developments in natural and synthetic drug research for Alzheimer' s disease. *Letters in Drug Design and Discovery*, 3: 268-274.
- Orhan, İ., Aslan, S., Kartal, M., Şener, B., Beşer, K. H. C. 2008.** Inhibitory effect of Turkish *Rosmarinus officinalis* L. on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. *Food Chemistry*, 108: 663-668.
- Otto, S. 2001.** Oncology Nursing (4<sup>th</sup> ed.). Mosby Inc., St. Louis, Missouri, 284 pp.

**Özlü, T., Bülbül, Y. 2005.** Sigara ve akciğer kanseri. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, 53(2): 200-209.

**Öztürk, F., Malkoç, S., Ersöz, M., Hakkı, S.S., Bozkurt, B.S. 2011.** Real-time cell analysis of the cytotoxicity of the components of orthodontic acrylic materials on gingival fibroblasts. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 140 (5): 243-249.

**Palmarini, M., Fan, H. 2001.** Retrovirus-induced ovine pulmonary adenocarcinoma, an animal model for lung cancer. *J Natl Cancer Inst.*, 93 (21): 1603-14.

**Pandit, V.A., Shelef, L.A. 1994.** Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Microbiol.*, 11: 57-63.

**Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P.L., Morelli, I. 1993.** Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *J. Ethnopharmacol.*, 39: 167-170.

**Papazisis, K.T., Geromichalos, G.D., Dimitriadis, K.A., Kortsaris, A.H. 1997.** Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *Journal of Immunological Methods*, 208 (1997): 151-158.

**Paris, A., Strukelji, B., Renko, M., Turk, V., Puki, M., Umek, A., Korant, B.D. 1993.** Inhibitory effect of carnosolic acid on HIV-1 protease in cell-free assays. *J. Nat. Prod.*, 56: 1426-1430.

**Pearson 2011.** Cancer. <http://www.pearsonmylabandmastering.com/northamerica/mastering-biology/> (Erişim tarihi: 23.05.2014).

**Perez, R.P., Godwin, A.K., Handel, L.M., Hamilton, T.C. 1993.** A comparison of clonogenic, microtetrazolium and sulforhodamine B assays for determination of cisplatin cytotoxicity in human ovarian carcinoma cell lines. *Eur. J. Cancer*, 29A: 395-399.

**Perez-Fons, L., Aranda, F.J., Guillen, J., Villalain, J., Micol, V. 2006.** Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes affect lipid polymorphism and fluidity in phospholipid membranes. *Arch. Biochem. Biophysics.*, 453: 224-236.

**Phelan, M.C. 1998.** Basic Techniques for Mammalian Cell Tissue Culture: Current Protocols in Cell Biology, *John Wiley & Sons, Inc.*, 1-10.

**Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., F'elix, T., Chessa, M., Cerri, R., Casanova J. 2002.** Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour Fragr. J.*, 17: 15-19.

**Planas-Silva, M.D., Weinberg, R.A. 1997.** The restriction point and control of cell proliferation. *Curr Opin Cell Biol*, 9: 768-772.

**Poeckel, D., Greiner, C., Verhoff, M., Rau, O., Tausch, L., Hornig, C. ve ark. 2008.** Carnosic acid and carnosol potently inhibit human 5-lipoxygenase and suppress

pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. Pharmacol.*, 76: 91–97.

**Ramirez, P., Garcia-Risco, M.R., Santoyo, S., Senorans, F.J., Ibanez, E., Reglero, G. 2006.** Isolation of functional ingredients from rosemary by preparative-supercritical fluid chromatography (Prep-SFC). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1606-1613.

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

**Reed, S.I. 1997.** Control of the G1/S transition. *Cancer Surv*, 29: 7-23.

**Richheimer, S.L., Bernart, M.W., King, G.A., Kent, M.C., Bailey, D.T. 1996.** Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from Rosemary. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 73: 507-514.

**Robbins, S., Contran, R., Kumar, V. 1989.** Robbins Pathological Basis of Disease. W.B. Saunders Col, Philadelphia, 256 pp.

**Rom, W.N., Hay, J.G., Lee, T.C., Jiang, Y., Tchou-Wong, K.M. 2000.** Molecular and genetic aspects of lung cancer. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 161: 1355-1367.

**Ruano-Ravina, A., Figueiras, A., Freire-Garabal, M., Barros-Dios, J.M. 2006.** Antioxidant vitamins and risk of lung cancer. *Current pharmaceutical design*, 12: 599-613.

**Ruberto, G., Barata, M.T. 2000.** Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model system. *Food Chemistry*, 69: 167-174.

**Rubinstein, L.V., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Simon, R.M., Tosini, S., Skehan, P., Scudiero, D.A., Monks, A., Boyd, M.R. 1990.** Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82 (13 ): 1113-1117.

**Sandal, T. 2002.** Molecular Aspects of the Mammalian Cell Cycle and Cancer. *The Oncologist*, 7: 73-81.

**Sanderson, J.T, Clabault, H., Patton, C., Claux, G., François, J.J., Pare, A.F., Hebert, M.J.G., Surette, M.E, Touaibia, M. 2013.** Antiproliferative, antiandrogenic and cytotoxic effects of novel caffeic acid derivatives in LNCaP human androgen-dependent prostate cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21: 7182-7193.

**Sasikumar, B., 2004.** Rosemary: Hand Book of Herbs and Spices Volume: 2, Editörler: Peter, K.V., Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, pp: 243–255.

- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L., Leblebici, E. 2000.** Tohumlu Bitkiler Sistematiği. Ege Üniversitesi Basımevi, 389 s.
- Sezgin, C. 2010.** Kanserde bitkilerle tedavide örnek uygulamalar. Bitkilerle Tedavi Sempozyumu, 5-6 Haziran 2010, Zeytinburnu, İstanbul.
- Sherr, C.J. 1996.** Cancer cell cycles. *Science*, 274: 1672-1677.
- Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., Jemal, A. 2014.** Cancer Statistics, 2014. *Ca Cancer J Clin*, 64: 9-29.
- Silva, M.D., Weinberg, R.A. 1997.** The restriction point and control of cell proliferation. *Curr. Opin. Cell Bio.*, 9(6):768-72.
- Simon, J.E., Chadwick, A.F, Craker, L.E. 1984.** Herbs: An Indexed Bibliography. 1971-1980. The Scientific Literature on Selected Herbs, and Aromatic and Medicinal Plants of the Temperate Zone. Archon Books, 770 pp.
- Slanina, H., König, A., Claus, H., Frosch, M., Schubert-Unkmeir, A. 2011.** Real-time impedance analysis of host cell response to meningococcal infection. *Journal of Microbiological Methods*, 84 (2011): 101-108.
- Sotelo-Felix, J.I., Martinez-Fong, D., Muriel, P., Santillan, R.L., Castillo, D., Yahuaca, P. 2002.** Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. *J. Ethnopharmacol.*, 81: 145-154.
- Spiro, S.G., Porter, J.C. 2002.** Lung cancer - Where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. *Am J Respir Crit Care Med*, 166: 1166-96.
- Sumantran, V.N. 2011.** Cellular Chemosensitivity Assays: An Overview: Cancer Cell Culture: Methods and Protocols, Second Edition, Methods in Molecular Biology, Editörler: Cree, I.A., Humana Press, Portsmouth, UK, 219-236.
- Şener, B. 2010.** Bitkisel İlaçlar ve Bitkisel İlaç Mevzuatı. Bitkilerle Tedavi Sempozyumu, 5-6 Haziran 2010, Zeytinburnu, İstanbul.
- Tai, J., Cheung, S., Wu, M., Hasman, D. 2012.** Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cell in vitro. *Phytomedicine*, 19: 436-443.
- Takenaka, M., Watanabe, T. Sugahara, K., Harada, Y., Yoshida, S., Sugawara, F. 1997.** New antimicrobial substances against *Streptomyces scabies* from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61: 1440-1444.
- Temel, M. 2000.** Batı Anadolu Bölgesinde Yayılış Gösteren *Origanum* L. Türleri Üzerinde Biyosistemik Çalışmalar. *Doktora Tezi*, OGÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Thun, M.J., Hannan, L.M., Adams-Campbell, L.L., Boffetta, P., Buring, J.E., Feskanich, D., Flanders, W.D., Jee, S.H., Katanoda, K., Kolonel, L.N., Lee, I.M., Marugame, T., Palmer, J.R., Riboli, E., Sobue, T., Avila-Tang, E., Wilkens, L.R.,**

**Samet, J.M. 2008.** Lung Cancer Occurrence in Never-Smokers: An Analysis of 13 Cohorts and 22 Cancer Registry Studies. *PLoS Med.*, 5 (9): e185.

**Tomas-Barberan, F.A., Lopez-Gomez, C., Vilar, A., Tomas-Lorente, F. 1986.** Inhibition of lens aldose reductase by Labiatae flavonoids. *Planta Med.*, 52: 239-240.

**Torre, J., Lorenzo, M.P., Martinez-Alcazar, M.P, Barbas, C. 2001.** Simple high-performance liquid chromatography method for  $\alpha$ -tocopherol measurement in *Rosmarinus officinalis* leaves New data on  $\alpha$ -tocopherol content. *J. Chromatogr. A*, 919: 305-311.

**Travis, W.D., Lubin, J., Ries, I., Devesa, S. 1996.** United States lung carcinoma incidence trends: Declining for most histologic types among males, increasing among females. *Cancer*, 77: 2464-70.

**Troncoso, N., Sierra, H., Carvajal, L., Delpiano, P., Günther, G. 2005.** Fast high performance liquid chromatography and ultraviolet-visible quantification of principle phenolic antioxidants in fresh rosemary. *J. Chromatogr. A.*, 1100: 20-5.

**Tuna, B. 2005.** Prostat nedir?. [www.turkpath.org.tr/upload/documents/prostat.pdf](http://www.turkpath.org.tr/upload/documents/prostat.pdf) (Erişim tarihi: 19.02.2014).

**Türker, A.H., Gülbaba, A.G., Taşdelen, A., Polat, S. 2011.** Doğu Akdeniz Bölgesi Biberiyelerinin (*Rosmarinus officinalis* L.) Gen Kaynaklarının Korunması ve Klon Seçimi. T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü Doğu Akdeniz Ormancılık Araştırma Enstitüsü Teknik Bülten No: 40, Tarsus, Mersin.

**Ulukaya, E., Ozdikicioglu, F., Yilmaztepe-Oral, A., Demirci, M. 2008.** The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicology in Vitro*, 22: 232–239.

**Urcan, E., Haertel, U., Styllou, M., Hickel, R., Scherthan, H. ve Reichl, F.X. 2010.** Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dental materials*, 26: 51–58.

**Ünal, T. 2012.** Neoplazi. [http://dent.ege.edu.tr/dosyalar/kaynak/301\\_patoloji/12.pdf](http://dent.ege.edu.tr/dosyalar/kaynak/301_patoloji/12.pdf) (Erişim tarihi: 19.05.2014).

**Valdes, A., Garcia-Canas, V., Rocamora-Reverte, L., Gomez-Martinez, A., Ferragut, J.A., Cifuentes, A. 2013.** Effect of rosemary polyphenols on human colon cancer cells: transcriptomic profiling and functional enrichment analysis. *Genes Nutr.*, 8: 43–60.

**Watters, J.L., Park, Y., Hollenbeck, A., Schatzkin, A., Albanes, D. 2010.** Alcoholic beverages and prostate cancer in a prospective US cohort study. *Am J Epidemiol*, 172: 773-80.

**WHO (World Health Organization) 2008.** Cancer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (Erişim tarihi: 28.05.2014).

**WHO (World Health Organization) 2010.** WHO Cancer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html> (Erişim tarihi: 30.05.2014).

**WHO (World Health Organization) 2014.** Global battle against cancer won't be won with treatment alone Effective prevention measures urgently needed to prevent cancer crisis. [www.iarc.fr/en/media-centre/pr/.../pr224\\_E.pdf](http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/.../pr224_E.pdf) (Erişim tarihi: 18.05.2014).

**Wong, B.S., Hsiao, Y.C., Lin, T.W., Chen, K.S., Kuo, W.H., Chu, S.C., Hsieh, Y.S. 2009.** The in vitro and in vivo apoptotic effects of *Mahonia oiwakensis* on human lung cancer cells. *Chemico-Biological Interactions* 180: 165–174.

**Xing, J.Z., Zhu, L., Jackson, J.A., Gabos, S., Sun, X.J., Wang, X.B., Xu, X. 2005.** Dynamic monitoring of cytotoxicity on microelectronic sensors. *Chemical Research in Toxicology*, 18: 154-161.

**Yanishlieva, N.V., Marinovaa, E., Pokorny, J. 2006.** Natural antioxidants from herbs and spices (Review article). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 108: 776-793.

**Yeşil-Çeliktaş, Ö., Bedir, E., Sükan, F. 2007a.** In vitro antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. *Food Chem.*, 101: 1457–1464.

**Yeşil-Çeliktaş, Ö., Sevimli, C., Bedir, E., Vardar-Sükan, F. 2010.** Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 65: 158-163.

**Yokota, J. 2000.** Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, 21 (3): 497-503.

**Zaouali, Y., Bouzaine, T., Boussaid, M. 2010.** Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry Toxicology*, 48: 3144-3152.

**Zeren, E. 2000.** Akciğer Kanseri: Akciğer Kanserine Patolojik Yaklaşım, Editörler: Hastürk, S., Yüksel, M., Özlem Grafik Matbaacılık, İstanbul, 29-45.

**Zimmermann, B.F., Walch, S.G., Tinzoh, L.N., Stühlinger, W., Lachenmeier, D.W. 2011.** Rapid UHPLC determination of polyphenols in aqueous infusions of *Salvia officinalis* L. (sage tea). *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879: 2459-2464.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Buse VATANSEVER

**Doğum Yeri ve Tarihi:** Bursa, 07 Nisan 1990

**Yabancı Dili:** İngilizce

### **Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)**

**Lise:** Bursa Atatürk Lisesi (2004-2007)

**Lisans:** Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2007-2011)

**Yüksek Lisans:** Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Botanik Ana Bilim Dalı (2012-2014)

**Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: -**

**İletişim (e-posta):** busevtnsvr90@gmail.com

**Yayımları: -**