

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI



**İNSAN AKCİĞER (A-549), MEME (MCF-7) VE MELANOMA
(A-2058) KANSER HÜCRELERİNDE ALFA-PİNEN, GAMA-
TERPİNEN VE P-CYMEN'İN APOPTOZİS YOLUYLA *IN VITRO* VE
IN VIVO ANTİTÜMORAL ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Funda ÇİMEN AÇIKGÜL

Danışman

Prof. Dr. Nizami DURAN

HATAY-2021

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**İNSAN AKCİĞER (A-549), MEME (MCF-7) VE MELANOMA
(A-2058) KANSER HÜCRELERİNDE ALFA-PİNEN, GAMA-
TERPİNEN VE P-CYMEN’NİN APOPTOZİS YOLUYLA *IN VITRO*
VE *IN VIVO* ANTİTÜMORAL ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Funda ÇİMEN AÇIKGÜL

Danışman

Prof. Dr. Nizami DURAN

Bu tez, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
19.D.006 nolu proje ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu **219S302** nolu
proje olarak desteklenmiştir.

HATAY – 2021

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**İNSAN AKCİĞER (A-549), MEME (MCF-7) VE MELANOMA
(A-2058) KANSER HÜCRELERİNDE ALFA-PİNEN, GAMA-
TERPİNEN VE P-CYMEN’NİN APOPTOZİS YOLUYLA *IN VITRO*
VE *IN VIVO* ANTİTÜMORAL ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi
Funda ÇİMEN AÇIKGÜL

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 19/04/2021 günü sözlü olarak
yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri başkanı : Prof. Dr. Nizami DURAN
Üye : Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
Üye : Prof. Dr. Tekin KARSLIGİL
Üye : Prof. Dr. Özkan ASLANTAŞ
Üye : Prof. Dr. Ayşe YILDIRIM

Bu tez, Enstitümüz (Tıp) Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda hazırlanmıştır.

19/04/2021
Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin her aşamasında ilgisini, anlayışını, desteğini ve tecrübelerini esirgemeyen ve benim üzerimde çok büyük emekleri olan değerli danışman hocam Prof.Dr. Nizami DURAN'a,

Eğitimim süresince ve tez çalışmalarımda bilgi ve deneyimleri ile her zaman desteklerini gördüğüm değerli hocalarım Prof. Dr. Özkan ASLANTAŞ, Prof. Dr. Burçin ÖZER, Prof. Dr. Ayşe YILDIRIM, Prof. Dr. Akın YAKAN, Doç. Dr. Enver Ahmet Demir, Doç. Dr. Cemil KÜREKÇİ, Dr. Öğr. Üyesi Tuncer KUTLU ve Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin ÖZKAN'a,

Tanıştığımız günden bu yana bana kattığı bilgi, deneyim, dostluk ve her konuda elinden gelenin fazlasını yapan kıymetli arkadaşım Uzm. Emrah AY'a,

Yardımları, dostlukları ve bilgi paylaşımlarından dolayı değerli Öğr. Gör. Dr. Suphi BAYRAKTAR ve Uzm. Mücella Bayırlı'ya,

Her zaman yanımda olan bir an olsun beni yalnız bırakmayan değerlilerim annem, babam, kardeşlerim ve hayat arkadaşım Riyat AÇILGÜL'e

Teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XIV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XV
ÖZET	XVI
ABSTRACT.....	XVIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Fitokimyasallar	6
2.1.1. P-Cymen	9
2.1.2. Alfa-Pinen	10
2.1.3. Gama-Terpinen	10
2.2.Kanser	11
2.2.1. Akciğer Kanseri	12
2.2.2. Meme Kanseri.....	13
2.2.3. Melanoma	14
2.3. . Apoptosis	15
2.3.1. Kaspaz Ailesi ve <i>Kaspaz-3</i>	17
2.3.2. <i>Bcl-2</i>	17
2.3.3. <i>Bcl-xL</i>	19
2.3.4. <i>Bax</i>	19
2.3.5. <i>p53</i>	20
2.3.6. <i>NF-κB</i>	21
2.4. Kanser Tedavisi	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. Fitokimyasallar	24
3.2. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	24

3.2.1. Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi	25
3.2.2. DMSO'nun Non-Toksik Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	25
3.2.3.MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Yöntemi.....	26
3.3. Aktivite Çalışmaları	27
3.3.1. Hücre Kültürlerinin Hazırlanması	27
3.3.2. Proliferasyon Deneyleri	27
3.3.3. Kombinasyon Analizi	28
3.4. Hücrelerde Morfolojik Değişimlerin Tespiti	29
3.4.1. Hematoksilen Eosin Boyama.....	30
3.5. Akım Sitometri ile Hücre Siklusu Analizi ve DNA Analizi	30
3.6. Kaspaz-3 Aktivitesi Miktar Tayini	31
3.7. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	32
3.7.1. RNA Ekstraksiyonu	32
3.7.2. Komplementer DNA (cDNA) Hazırlanması	33
3.7.3. RT-qPCR Uygulaması	33
3.8. Western Blotlama Yöntemi	35
3.8.1. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini	36
3.8.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE)	37
3.8.3. Protein Ekspresyonunun Western Blot yöntemiyle gösterilmesi	37
3.8.4. Yürütme (Running).....	38
3.8.5. İmmun Blotting (Blotlama)	39
3.8.6. Normalizasyon	41
3.9. Deney Hayvanları Çalışmaları.....	42
3.9.1. B16-F10 Hücre Hattının Hazırlanması	42
3.9.2. Deri Altı Tümör Modeli Oluşturulması	43
3.9.3. Fare İnjesiyonu	43
3.9.4. Çalışma Grupları	44
3.9.5. Tedavi	45
3.9.6. Disseksiyon ve Histolojik-Patolojik Değerlendirmeler	46
3.9.7. Patolojik Değerlendirmeler İçin Doku Örneklerinin Hazırlanması	47
3.9.8. İstatistiksel Analiz	47

4. BULGULAR.....	48
4.1. DMSO'nun Non-Toksik Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	48
4.2. MTT Sonuçları.....	54
4.3. Fitokimyasalların Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi	55
4.3.1. Akridin Oranj Boyama Yöntemi.....	55
4.3.2. Morfolojik Analiz	60
4.4. Flow Sitometrik Analiz.....	60
4.5. <i>Kaspaz-3</i> Aktivitesi.....	61
4.6. Real-Time PCR Sonuçları	63
4.7. Sinerjistik Aktivite Çalışma Sonuçları	76
4.7.1. Fitokimyasalların ve Standart ilaçların Farklı Kombinasyonlarının Kanser Hücrelerine Karşı Sinerjistik Etkilerinin Değerlendirilmesi	76
4.8. Western Blotlama Sonuçları	81
4.9. Hayvan Deneyleri ve Histopatolojik Sonuçlar	82
5. TARTIŞMA	97
6. SONUÇ	115
7. KAYNAKLAR	123
ÖZGEÇMİŞ	132

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3. 1. Akridin Oranj- Etidyum Bromid Boyama yöntemiyle hücrelerin boyanması.	30
Şekil 3. 2. Bradford yöntemi ile protein tayini.	36
Şekil 3. 3. Bradford yöntemiyle protein konsantrasyonunun belirlenmesi.....	36
Şekil 3. 4. Western Blotlama yönteminde jele örneklerin yüklenmesi ve yürütülmesi. ...	39
Şekil 3. 5. Western -blotlama yönteminde jelin membrana transfer işlemleri.	40
Şekil 3. 6. Bloklama işlemi.....	40
Şekil 3. 7. A: Blotlama işleminden sonra jelin, B: Boyama işleminden sonra membranın görüntülenmesi.	41
Şekil 3. 8. Normalizasyon işlemlerinin gerçekleştirilmesi.	41
Şekil 3. 9. Fare İnjesiyonu. A: B16-F10 melanoma hücre injesiyonu, B: Tedavinin IP olarak uygulanması.....	44
Şekil 3.10. Deri altı tümör dokusunun kumpasla çapının ölçülmesi ve eksize edilmeden önce değerlendirilmesi.....	46
Şekil 4.1. Vero hücreleri üzerinde DMSO'nun non-toksik konsantrasyonunun belirlenmesi	48
Şekil 4. 2. Vero Hücreleri. A. 96 saat inkübasyondan sonra içerisinde DMSO bulunmayan hücre kültürünün mikroskopik görüntüsü. B: içerisinde $\leq$ %2 DMSO bulunan hücre kültürünün morfolojik görünümü	49
Şekil 4. 3. A-549 Hücreleri. A. 96 saat inkübasyondan sonra içerisinde DMSO bulunmayan hücre kültürünün mikroskopik görüntüsü. B: içerisinde $\leq$ %2 DMSO bulunan hücre kültürünün morfolojik görünümü.....	49
Şekil 4. 4. A-2058 Hücreleri. A. 96 saat inkübasyondan sonra içerisinde DMSO bulunmayan hücre kültürünün mikroskopik görüntüsü. B: içerisinde $\leq$ %2 DMSO bulunan hücre kültürünün morfolojik görünümü.....	50

Şekil 4. 5. MCF-7 Hücreleri. A. 96 saat inkübasyondan sonra içerisinde DMSO bulunmayan hücre kültürünün mikroskopik görüntüsü. B: içerisinde $\leq$ %2 DMSO bulunan hücre kültürünün morfolojik görünümü.....	50
Şekil 4. 6. A-549 hücre hattında Alfa-Pinen'in farklı konsantrasyonlarda hücre morfolojileri üzerinde meydana getirdiği sitopatolojik değişiklikler.....	51
Şekil 4. 7. A-2058 hücre hattında Gama-Terpinen'in farklı konsantrasyonlarda hücre morfolojileri üzerinde meydana getirdiği sitopatolojik değişiklikler.....	52
Şekil 4. 8. MCF-7 hücre hattında P-Cymen'in farklı konsantrasyonlarda hücre morfolojileri üzerinde meydana getirdiği sitopatolojik değişiklikler.....	53
Şekil 4. 9. Fitokimyasalların sağlıklı (Vero hücre hattı) ve kanser hücre dizilerinde (A-549, MCF-7 ve A-2058 hücre hattı) IC ₅₀ değerleri.....	54
Şekil 4.10. Alfa-Pinen'in A-549 hücre hattında apoptotik hücre indeksi.....	55
Şekil 4.11. Gama-Terpinen'in A-549 hücre hattında apoptotik hücre indeksi.....	56
Şekil 4.12. P-Cymen'in A-549 hücre hattında apoptotik hücre indeksi.....	56
Şekil 4.13. Alfa-Pinen'in MCF-7 hücre hattında apoptotik hücre indeksi.....	57
Şekil 4.14. Gama-Terpinen'in MCF-7 hücre hattında apoptotik hücre indeksi.....	57
Şekil 4.15. P-Cymen'in MCF-7 hücre hattında apoptotik hücre indeksi.....	58
Şekil 4.16. Alfa-Pinen'in A-2058 hücre hattında apoptotik hücre indeksi.....	58
Şekil 4.17. Gama-Terpinen'in A-2058 hücre hattında apoptotik hücre indeksi.....	59
Şekil 4.18. P-Cymen'in A-2058 hücre hattında apoptotik hücre indeksi.....	59
Şekil 4.19. Fitokimyasalların kanser hücre hatlarında hücre siklusu üzerindeki etkileri. .	61
Şekil 4.20. <i>Kaspaz-3</i> standart eğri grafiği.....	61
Şekil 4. 21 Alfa-Pinen (0.019 µg/ml), Gama-Terpinen (0.039 µg/ml) ve P-Cymen (0.019 µg/ml)'in A-549 hücre hattı üzerinde <i>kaspaz-3</i> aktivitesinin kontrol ve Paklitaksel (10 µM) ile kıyaslanması.	62

Şekil 4.22. Alfa-Pinen, Gama-Terpinen (0.039 µg/ml) ve P-Cymen (0.019 µg/ml)'in A-2058 hücre hattı üzerinde <i>kaspaz-3</i> aktivitesinin kontrol ve Dakarbazin (10 µM) ile kıyaslanması.	63
Şekil 4.23. A-549, MCF-7 ve A-2058 kanser hücre hatlarında fitokimyasallarla muamele edilen hücrelerden izole edilen RNA'ların elektroforezde görüntüleri.	64
Şekil 4.24. GAPDH'in Real-Time PCR amplifikasyon ve "melting curve" grafiği.	64
Şekil 4.25. <i>Bcl-2</i> geni Real-Time PCR amplifikasyon "melting curve" grafiği.	64
Şekil 4.26. <i>Bax</i> geni Real-Time PCR amplifikasyon "melting curve" grafiği.	65
Şekil 4.27. <i>Bcl-xL</i> geni Real-Time PCR amplifikasyon "melting curve" grafiği.	65
Şekil 4.28. <i>Kaspaz-3</i> geni Real-Time PCR amplifikasyon "melting curve" grafiği.	65
Şekil 4.29. <i>NF-κB</i> geni Real-Time PCR amplifikasyon "melting curve" grafiği.	65
Şekil 4.30. <i>p53</i> geni Real-Time PCR amplifikasyon "melting curve" grafiği.	66
Şekil 4.31. A-549 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in <i>Bcl-xL</i> gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Paklitaksel ve kontrol grubuyla kıyaslanması	66
Şekil 4.32. A-549 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in <i>NF-κB</i> gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Paklitaksel ve kontrol grubuyla kıyaslanması	67
Şekil 4.33. A-549 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in <i>Bcl-2</i> gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Paklitaksel ve kontrol grubuyla kıyaslanması	68
Şekil 4.34. A-549 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in <i>Kaspaz-3</i> gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Paklitaksel ve kontrol grubuyla kıyaslanması	68
Şekil 4.35. A-549 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in <i>p53</i> gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Paklitaksel ve kontrol grubuyla kıyaslanması	68

Şekil 4.36. A-549 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in <i>Bax</i> gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Paklitaksel ve kontrol grubuyla kıyaslanması	69
Şekil 4.37. MCF-7 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in <i>Bcl-xL</i> gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Paklitaksel ve kontrol grubuyla kıyaslanması.	70
Şekil 4.38. MCF-7 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in <i>NF-κB</i> gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Paklitaksel ve kontrol grubuyla kıyaslanması	70
Şekil 4.39. MCF-7 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in <i>Bax</i> gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Paklitaksel ve kontrol grubuyla kıyaslanması	71
Şekil 4.40. MCF-7 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in <i>Bcl-2</i> gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Paklitaksel ve kontrol grubuyla kıyaslanması	71
Şekil 4.41. MCF-7 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in <i>p53</i> gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Paklitakse ve kontrol grubuyla kıyaslanması	72
Şekil 4.42. A-2058 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in <i>Bcl-xL</i> gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Dakarbazin ve kontrol grubuyla kıyaslanması	73
Şekil 4.43. A-2058 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in <i>NF-κB</i> gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Dakarbazin ve kontrol grubuyla kıyaslanması	73
Şekil 4.44. A-2058 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in <i>Bax</i> gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin standart ilaçlar ve kontrol grubuyla kıyaslanması	74
Şekil 4.45. A-2058 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in <i>Bcl-2</i> gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin standart ilaçlar ve kontrol grubuyla kıyaslanması	74

Şekil 4.46. A-2058 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in <i>Kaspaz-3</i> gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin standart ilaçlar ve kontrol grubuyla kıyaslanması	75
Şekil 4.47. A-2058 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in <i>p53</i> gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin standart ilaçlar ve kontrol grubuyla kıyaslanması	75
Şekil 4.48. A-549 hücreleri üzerinde fitokimyasalların kombine kullanılmalarının <i>Bcl-2</i> ve <i>Bcl-xL</i> gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerinin kıyaslanması	76
Şekil 4.49. A-549 hücreleri üzerinde fitokimyasalların kombine kullanılmalarının <i>Bax</i> , <i>Kaspaz-3</i> ve <i>p53</i> gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerinin kıyaslanması	77
Şekil 4.50. MCF-7 hücreleri üzerinde fitokimyasalların kombine kullanılmalarının <i>Bcl-2</i> ve <i>Bcl-xL</i> gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerinin kıyaslanması	78
Şekil 4.51. MCF-7 hücreleri üzerinde fitokimyasalların kombine kullanılmalarının <i>Bax</i> , <i>kaspaz-3</i> ve <i>p53</i> gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerinin kıyaslanması	79
Şekil 4.52. A-2058 hücreleri üzerinde fitokimyasalların kombine kullanılmalarının <i>Bcl-2</i> ve <i>Bcl-xL</i> gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerinin kıyaslanması	79
Şekil 4.53. A-2058 hücreleri üzerinde fitokimyasalların kombine kullanılmalarının <i>Bax</i> , <i>kaspaz-3</i> ve <i>p53</i> gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerinin kıyaslanması	80
Şekil 4.54. Farklı kanser hücre hatlarından ekstrakte edilen 15 µg protein örneklerinin jel elektroforez görüntüleri.	82
Şekil 4.55. Hücre kontrol ile solvent (DMSO/PBS) kontrol grubunda tümör gelişiminin kıyaslanması.	82
Şekil 4.56. Dakarbazin ile tedavi sonrası hücre kontrol ve solvent (DMSO/PBS) kontrol grubunda tümör gelişiminin kıyaslanması.....	83

Şekil 4.57. Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in deri altı tümör modelinde melanoma hücreleri üzerindeki etkinliğinin Dakarbazinin etkinliğiyel kıyaslanması	84
Şekil 4.58. Deri altı tümör moelinde Alfa-Pinen artı Gama-Terpinen ve Alfa-Pinen artı Dakarbazin ve Gama-Terpinen artı Dakarbazin'in kombine etkinliği.....	85
Şekil 4.59. Deri altı tümör modelinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in Dakarbazin ile kombine etkinliği.	85
Şekil 4.60. Gama-Terpinen'in Dakarbazin ile kombinasyonunun melanoma hücreleri üzerindeki sinerjistik etkinliği.	86
Şekil 4.61. Alfa-Pinen'in Dakarbazin ile kombinasyonunun melanoma hücreleri üzerindeki sinerjistik etkinliği	86
Şekil 4.62. P-Cymen'in Dakarbazin ile kombinasyonunun melanoma hücreleri üzerindeki sinerjistik etkinliği.	87
Şekil 4.63. Tümör oluşturulan hayvanlarda tedavi sonrası histopatolojik incelemelerde metastaz varlığı.....	88
Şekil 4.64. Tedavi gruplarından örnek görüntüler. A: Tedavi verilmeyen hücre kontrol grubu. B: Dakarbazin tedavi grubu, C: Gama-Terpinen tedavi grubu. D: Gama-Terpinen artı Dakarbazin tedavi grubu.	89
Şekil 4.65. Sağlıklı kontrol grubundan normal histolojik yapıda deri dokusu.	90
Şekil 4.66. B16-F10 injeksiyonu yapılan hücre kontrol grubundan deri altında bağ dokusu (oklar) ile sınırlandırılmış atipik melanotik melanositler (yıldız).	90
Şekil 4.67. Tedavi verilmeden önce B16-F10 injeksiyonu yapılan farelerden deri altında atipik melanotik melanositler (okbaşları) ve mitotik figürler (oklar).....	91
Şekil 4.68. Sağlıklı kontrol grubundan normal histolojik yapıda akciğer dokusu.....	91
Şekil 4.69. Gama-Terpinen artı Dakarbazin tedavi grubundan tedavi sonrası akciğerde peribronsiyal mononükleer hücre infiltrasyonu (oklar).....	92
Şekil 4.70. Gama-Terpinen grubu tedavi sonrası karaciğerde perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu (oklar).	92

Şekil 4.71. B16-F10 injeksiyonu yapılan tedavi verilmeyen farelerde karaciğerde metastazla gelen melanotik melanositler (oklar).	93
Şekil 4.72. Gama-Terpinen artı Dakarbazin tedavi grubunda normal histolojik yapıda kalp dokusu.....	93
Şekil 4.73. Alfa-Pinen artı Gama-Terpinen tedavi grubunda normal histolojik yapıda kalp dokusu.....	94
Şekil 4.74. Alfa-Pinen artı Gama-Terpinen tedavi grubunda bağırsakta Lamina propria'da fokal mononükleer hücre infiltrasyonu (oklar),.....	94
Şekil 4.75. B16-F10 injeksiyonu yapılan farelerde dalakta metastazla gelen melanotik melanositler (okbaşları), dev hücreleri (oklar)	95
Şekil 4.76. Gama-Terpinen tedavi grubunda böbrekte fokal odaklar halinde mononükleer hücre infiltrasyonu (oklar).....	95
Şekil 4.77. Gama-Terpinen artı Dakarbazin tedavi grubunda normal histolojik yapıda beyin dokusu.....	96

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan oligonükleotidler.....	34
Çizelge 3. 2. Bradford yönteminde kullanılan solüsyonların oranları.....	37



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Derece santigrad
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
Bcl- 2	: B hücreli lenfoma 2
DMSO	: Dimethylsulfoxide
FBS	: Fetal Dana Serum
kDa	: Kilo Dalton
MTT	: 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
<i>NF-κB</i>	: Nükleer faktör κB
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TBS	: Tris Tamponlu Salin

ÖZET

İnsan Akciğer (A-549), Meme (MCF-7) ve Melanoma (A-2058) Kanseri Hücrelerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'nin Apoptozis Yoluyla *In vitro* ve *In vivo* Antitümoral Etkinliğinin Araştırılması

Kanser her yıl dünya çapında milyonlarca insanın ölümüne yol açan ciddi bir halk sağlığı problemidir. Biz bu çalışmada üç farklı insan kanseri [meme (MCF-7), akciğer (A-549), melanoma (A-2058)] hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in antikanserojen aktivitelerini, bu fitokimyasallar ile Paklitaksel ve Dakarbazin'in ikili, üçlü ve dördü kombinasyonlarının sinerjistik etkinliklerini araştırdık.

Antikanserojen etkinlik veya sinerjistik aktivite çalışmaları fitokimyasalların toksik olmayan konsantrasyonları dahilinde gerçekleştirildi. Deneylerde *p53*, *Bax*, *NF-κB*, *Bcl-2*, *Bcl-xL* ve *kaspaz-3* (MCF-7 hücreleri hariç) gen ekspresyonları Real-Time PCR yöntemiyle, protein ekspresyonları da Western blotlama yöntemiyle incelendi. Fitokimyasalların ve kombinasyonlarının konak üzerinde antitümoral aktiviteleri ise deneysel olarak oluşturulmuş deri altı fare tümör modelinde araştırıldı.

Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in non-sitotoksik konsantrasyonları sırasıyla 0.078, 0.625 ve 1.25 µg/ml olarak tespit edildi. Kanser hücrelerini en yüksek düzeyde apoptoza uğratan Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen konsantrasyonlarının, sırasıyla 0.019, 0.078 ve 0.625 µg/ml olduğu tespit edildi. Deneylerde fitokimyasalların hücre tipine göre etkinliklerinin de değiştiği tespit edildi. Çalışmada A-549 hücreleri üzerinde Gama-Terpinen ve P-Cymen'in, A-2058 hücreleri üzerinde ise özellikle Gama-Terpinen'in *kaspaz-3* aktivitesini anlamlı düzeyde arttırdığı tespit edildi. Sözgelimi A-549 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen'in *Bcl-2* gen ekspresyonunu, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in *Bcl-xL* gen ekspresyonunu anlamlı düzeyde inhibe ettiği tespit edilirken, Alfa-Pinen ve Gama-Terpinen'in *NF-κB* gen ekspresyonunu anlamlı derecede inhibe ettiği tespit edildi. Kombinasyon deneylerinde de tekli kullanımlarda olduğu gibi fitokimyasalların etkinliklerinin hücre tiplerine göre anti-apoptotik ve pro-apoptotik gen ekspresyonlarının farklı düzeyde etkilendikleri tespit edildi. Fitokimyasalların kombine kullanımları durumunda hücre tipine göre farklılık görülsede bazı gen ekspresyonları üzerinde güçlü sinerjistik etkinlikler tespit edildi. Sözgelimi MCF-7 hücreleri üzerinde yapılan kombine etkinlik deneylerinde, Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen, Gama-Terpinen artı Paklitaksel ve Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen artı P-Cymen artı Paklitaksel kombinasyonlarının anti-apoptotik genlerden *Bcl-2* gen ekspresyonunu anlamlı derecede azalttığı tespit edildi. *In vivo* deneylerde, Alfa-Pinen tedavi grubunda akciğer ve karaciğer dokularında melanosit metastazının sırasıyla %30 ve %20 oranında azaldığı, Gama-Terpinen tedavi grubunda hem akciğer ve hem de karaciğer metastazının %50 oranında azaldığı tespit edilirken, Alfa-Pinen artı Dakarbazin kombine tedavi grubunda akciğer ve karaciğer metastazının sırasıyla %70 ve %80 oranında azaldığı tespit edildi. Alfa-Pinen artı Gama-Terpinen artı P-Cymen artı

Dakarbazin tedavi grubunda ise farelerin yalnızca %10'unda deri ve %10'unda ise akciğer dokusunda melanosit varlığı tespit edildi.

Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in kombinasyonları ve kanser ilaçlarıyla farklı kombinasyonlarının özellikle *Bcl-2* ve *p53* gibi bazı genlerin ekspresyonlarını arttırıcı ya da inhibe edici yönde güçlü sinerjiler oluşturmuştur. Fitokimyasallarla kemoterapötik ajanların kombine kullanımı, antikanserojen olarak kullanılan ilaçların etkinliğini artırmış ve hücreler üzerindeki sitotoksiteyi de azaltmıştır. Böylece, kanser tedavisinin kemoterapotiklerle tedavi başarı oranları da artacaktır. Bu fitokimyasalların Paklitaksel ve Dakarbazin ile ikili, üçlü ve dördü kombinasyonlarının yapılması, bu üç kanser türü üzerinde tarafımızdan ilk kez araştırılmış olup, bu kombinasyonların güçlü etkinlikler sergilediği tespit edilmiştir. İnsan meme, akciğer ve melanoma kanserlerine karşı bu fitokimyasalların çeşitli kombinasyonlarının oldukça güçlü etkinlik göstermeleri, bu kanser türlerinin tedavilerinde oldukça umut vaad edici olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Alfa-Pinen, Gama-Terpinen, P-Cymen, sinerjistik etki, deri altı tümör modeli.

ABSTRACT

Investigation of *In vitro* and *In vivo* Antitumoral Activity of Alfa-Pinene, Gamma-Terpinene and P-Cymen by Apoptosis in Human Lung (A-549), Breast (MCF-7) and Melanoma (A-2058) Cancer Cells

Cancer is a serious public health problem that kills millions of people around the world each year. In this study, we investigated the anticarcinogenic activities of Alpha-Pinene, Gamma-Terpinene and P-Cymen on three different human cancer cells, as well as the synergistic effects of these phytochemicals and combinations of Paclitaxel and Dacarbazine double, triple and quadruple.

Anticancer activity or synergistic activity studies were performed in non-toxic concentrations of phytochemicals. Gene expressions of *p53*, *Bax*, *NF-κB*, *Bcl-2* and *Bcl-xL* and *caspase-3* (excluding MCF-7 cells) were analyzed by Real-Time PCR method and protein expressions were analyzed by Western blotting method. Antitumoral activities of phytochemicals and their combinations on the host were investigated in an experimental subcutaneous mouse tumor model.

Non-cytotoxic concentrations of Alpha-Pinene, Gamma-Terpinene and P-Cymen were determined as 0.078, 0.625 and 1.25 µg/ml, respectively. The concentrations of Alpha-Pinene, Gamma-Terpinene, and P-Cymen that induce the highest level of apoptosis in cancer cells were 0.019, 0.078 and 0.625 µg/ml, respectively. In the experiments, differences were found in the activities of phytochemicals according to the cell type. It was determined that Gamma-Terpinene and P-Cymen on A-549 cells and especially Gamma-Terpinene on A-2058 cells significantly increased caspase-3 activity. For example, on A-549 cells Alpha-Pinene significantly inhibited the expression of *Bcl-2*, while Gamma-Terpinene and P-Cymen significantly inhibited the expression of *Bcl-xL*. Alpha-Pinene and Gamma-Terpinene significantly inhibited *NF-κB* gene expression on the same cells. In combination experiments, it was determined that the activities of phytochemicals affect different levels of antiapoptotic and proapoptotic gene expressions according to cell types, as in the single use of phytochemicals. Although the activities of the combinations of phytochemicals differ according to cell type, strong synergistic activities were detected on some gene expressions. For example, in combined efficacy experiments on MCF-7 cells, combinations of Gamma-Terpinene plus Alpha-Pinene, Gamma-Terpinene plus Paclitaxel and Gamma-Terpinene plus Alpha-Pinene plus P-Cymen plus Paclitaxel significantly increased *Bcl-2* gene expression from anti-apoptotic genes. It was found to decrease. In in-vivo experiments, it was found that melanocyte metastasis in the lung and liver tissues decreased by 30% and 20%, respectively, in the Alpha-Pinene treatment group, and both lung and liver metastases were reduced by 50% in the Gamma-Terpinene treatment group. However, it was found that lung and liver metastasis decreased by 70% and 80%, respectively, in the combined therapy group of Alpha-Pinene plus dacarbazine. In the Alpha-Pinene plus Gamma-Terpinene plus P-Cymen

plus Dakarbazin treatment group, melanocyte presence was detected in only 10% of the mice and the lung tissue in 10% of the mice.

Combinations of Alpha-Pinene, Gamma-Terpinene and P-Cymen and their different combinations with cancer drugs have created strong synergies to increase or inhibit the expression of some genes, especially *Bcl-2* and *p53*. Combined use of phytochemicals and chemotherapeutic agents increased the efficacy of drugs used as anticarcinogen and decreased cytotoxicity on cells. Thus, the success rates of cancer treatment with chemotherapeutics will increase. Double, triple and quadruple combinations of these phytochemicals with Paclitaxel and Dakarbazin have been investigated by us for the first time on these three types of cancer and it has been determined that these combinations exhibit strong activities. The strong efficacy of various combinations of these phytochemicals against human breast, lung and melanoma cancers has been evaluated as highly promising in the treatment of these cancer types.

Keywords: Alpha-Pinene, Gamma-Terpinen, P-Cymen, synergistic effect, subcutaneous tumor model.

1. GİRİŞ

Kanser her yıl dünya çapında milyonlarca ölüme yol açan ciddi bir halk sağlığı problemidir. Günümüzde tıpta oldukça önemli ilerlemelere rağmen, kanser tedavisini iyileştirmek için hala ele alınması gereken çok sayıda problem bulunmaktadır. Bugün tedavide kullanılan birçok kemoterapötik ilaç mevcut olsa da bu ilaçların etkinliklerinin düşük olması ve kullanımlarındaki en büyük tehdit konak üzerinde görülen yan etkileridir. Kanser ilaçlarında konakta görülen yan etkiler çoğu zaman etkili bir terapötik ilacın kullanımını dahi kısıtlayacak ölçüde ciddi zararlar verebilmektedir (Bisen 2013, Aslam ve ark. 2014).

Günümüzde kanser tedavisinde; cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi temel uygulamaların yanında monoklonal antikorlar, sitokinler, kanser aşılı ve hücre temelli tedaviler gibi çok çeşitli seçenekler tedavide uygulanan yöntemler arasında sayılabilir. Kanser kemoterapisinde sonuçları iyileştirmek için immünoterapi ajanları, doğal ürünler gibi kombinasyon tedavileri gerekli olabilir (Bisen 2013).

İlaç araştırmalarında en önemli stratejilerden biri haline gelmiş olan doğal ürünler halk arasında da binlerce yıldır çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılagelmiştir. Bitkisel doğal ürünlerin son zamanlarda yapılan çeşitli çalışmalarda artan bir cazibesinin olduğu görülmektedir. Halk arasında yüzyıllardır çeşitli fitokimyasalları ihtiva eden tıbbi bitkiler tedavi amacıyla halk tıbbında kullanılmaktadır (Duran ve ark. 2017). Fitokimyasallar bitkilerde yaygın olarak bulunan bileşikler olup, tamamı insan sağlığı açısından son derece faydalı olan ve anti-enflamatuar, antimikrobiyal, antiviral, antikanserojen ve immünomodülatör özelliklere sahip komponentlerdir (Ay ve Duran 2018). Direkt etkileşime girerek ya da gen ekspresyonunun modülasyonu yoluyla karsinogenezisle ilgili birçok hedefin aktivitesini modüle edebilme yeteneklerinden dolayı, kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe edebilmektedir. Bununla birlikte, antikanser ajanlar olarak fitokimyasallarda karşılaşılan en önemli sorun, tek bir bileşiğin *in vivo* etkilerini engelleyebilecek zayıf biyoyararlanımlarıdır. Fitokimyasalların vücutta zayıf olarak emilim ve biyo dağılım gösterdiği ve hızlı bir metabolizma ve atılımının olduğu bildirilmektedir.

Bir fitokimyasalın zayıf biyoyararlanımı, kanser hücreleri üzerinde verilen dozu da etkilemektedir. Bu dezavantajı ortadan kaldırmanın bir yolunun ise farklı fitokimyasallarla ya da fitokimyasallarla mevcut anti-kanser ilaçların kombinasyon yönteminin olduğu düşünülmektedir. Ayrıca fitokimyasalların birinin kullanımından ziyade birden fazlasının kombinasyonunun daha etkili sonuçlar yaratabildiği de bildirilmiştir (Mohan 2013, Zulkipli ve ark. 2015).

Birçok bitkisel esansiyel yağ kimyasal bileşimlerinde yüksek oranda monoterpen içermekte, bu maddelerin de özellikle antitümöral aktivite gibi önemli farmakolojik aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir. Monoterpenler, meyveler, sebzeler ve birçok bitkinin uçucu yağ içeriğinde bulunmaktadır. Monoterpenlerin hem karsinogenezin başlangıcında hem de progresyon aşamalarında karsinogenez sürecini önlediği *in vitro* ve *in vivo* olarak çok sayıda çeşitli hücresel ve moleküler etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Sobral ve ark. 2014). Monoterpenlerin erken ve ileri evre kanserlerin tedavisinde etkili olabileceği de bildirilmiştir. Bugün antikanserojen etkili ilaçların %70'den fazlasının doğal ürünlerden türetildiği bilinmektedir (Tan ve ark. 2006).

Çalışmalarda fitokimyasalların veya bazı doğal bileşiklerin çeşitli kanser hatlarında antikanserojen etkilerinden bahsedilmektedir (Duran ve ark. 2017, Sobral ve ark. 2014, Yeruva ve ark. 2007, Halabi ve ark. 2014). Bu bileşenlerin mevcut tedavilerle sinerjik olarak aktivite gösterebileceği ve bu alanda kanser tedavisi için yeni protokollerin araştırılmasının önemli olduğu bildirilmiştir. Çeşitli çalışmalarda fitokimyasalların konvansiyonel kemoterapi ve radyoterapi ile sinerjik bir şekilde hareket ettiği ve hatta insanlarda olumlu sonuçları görülen sınırlı bazı klinik çalışmalar olduğundan bahsedilmektedir (Lesgards ve ark. 2014). Sinerji, bazı maddelerin ayrı etkilerinin toplamından daha büyük bir birleşik etkiye ulaşmak için işbirliği yaptığı bir süreçtir. Daha güçlü etkinlik elde etmek için geliştirilen bir strateji olarak düşünülebilir. Bu bağlamda, bitkisel ürünler ile geleneksel ilaçlar veya biyokimyasal bileşikler arasındaki etkileşimde sinerjik etkiler gözlemlenebilir. Bu tür süreçlerin getirdiği herhangi bir iyileştirme, hastalıkları tedavi etmek için avantajlı bir şekilde kullanılabileceğinden bu etkileşimlerin belirlenmesi ve kullanılması önemlidir. Kanser gibi komplike bir hastalıkta dahi hastalara daha fazla fayda sağlamak veya olumsuz yan etkilerden kaçınmak dahil olmak üzere en iyi sonuçları elde etmek için pozitif sinerjik

bitki-ilaç etkileşimleri araştırılmalıdır (Butterweck ve ark. 2000, Hemaiswarya ve ark. 2008).

Kombine tedavileri kanser hücreleri veya patojenlerin doğrudan bloke edilmesi veya yok edilmesinin yanı sıra insan vücudu savunmalarının veya onarım mekanizmalarının aktivasyonuna odaklanan yararlı bir stratejidir. Daha önceleri benimsenen tekli ilaç tedavisi dogması günümüzde çok tercih edilmemektedir. Özellikle kemoterapötiklerin doğal bir ürünle kombine edilerek hem kemoterapötik maddenin etkinliğin artırılması hem de konakta immunmodülasyonu sağlaması veya yan etkilerin azaltılması amaçlanmaktadır. Özellikle son yıllarda tüm dünyada fitoterapötik ajanların etkinlikleri üzerinde yoğun çalışmalar sürdürülmektedir (Hemaiswarya ve ark. 2008, Zhang ve ark. 2011).

Birçok hastalığın çok yönlü bir etiyolojiye sahip olduğu ve tek bir uygulamaya göre bir ilaç kombinasyon stratejisi ile daha başarılı bir şekilde tedavi edilebileceği ortaya çıkmıştır. Dünyada kanser gibi çok faktörlü ve oldukça karmaşık hastalık tedavisi için çoklu ilaç tedavisi seçenekleri yaygın olarak benimsenmektedir (Butterweck ve ark. 2000, Hemaiswarya ve ark. 2008, Nagaprashantha ve ark. 2011).

Sinerji iki veya daha fazla maddenin kombine etkilerinin her bir maddenin etkisi toplamından daha güçlü etki yaratabilmek amacıyla etkileşim veya işbirliği olarak tanımlanır. Bir başka deyişle "bir sistemin iki veya daha fazla bileşeni arasındaki işbirliğine dayalı etkileşim, bu birleşik etki her bir parçanın toplamından daha büyüktür. Sinerjik etkiye anatomide, kas gruplarının tek tek kasların oluşturabileceğinden daha büyük bir kuvvetle sonuçlanan birleşik hareketi örnek verilebilir. Farmakolojide sinerjizm terapötik ajanların kullanımının farklı yolları etkileyebildiği ve tedaviyi daha verimli hale getirdiği bildirilmektedir. Bunun yanı sıra sinerjik etki veya farmakolojik sinerji, tek tek bileşenlerden yeni ve farklı etkiler üretmek için etkileşime giren birleşik bileşenlerin etkisi olarak tanımlanmaktadır.

Kombine Kullanımlarda Beklenen Faydalar:

- Sinerjik Çok Hedefli Etkiler;

Bir bileşik veya bir karışım beklendiği gibi tek bir hedef üzerinde hareket etmekle kalmaz, aynı zamanda farklı hedefleri (metabolitler, reseptörler, enzimler, iyon kanalları,

taşıyıcılar, nükleik asitler, ribozomlar ve proteinler gibi tüm işlevsel veya yapısal hücre bileşenleri) de etkileyebilmektedir.

- Farmakokinetik veya Fizikokimyasal Etki Modülasyonu;

Sinerjik etkiler, bir bileşiğin veya karışımın çözünürlüğü dahil olmak üzere fizikokimyasal özelliklerini etkileyerek sözde biyoyararlanımda bir iyileşme de sağlayabilmektedir.

- Direnç Mekanizmalarına Müdahale;

İlaça dirençli mikroorganizmalar (bakteriler, mantarlar) veya kanser hücreleri üzerinde, ilaç direncinin gelişimini antagonize edebilen doğal türevlerin varlığı sayesinde (antibiyotikler veya kanser ilaçları ile birlikte sağlanır) sinerjik etkiler gözlemlenebilmektedir.

- Eliminasyon veya Nötralizasyon Potansiyeli;

Bir bileşik veya karışım, bir ilacın toksik etkisini ortadan kaldırma veya nötralize etme, hatta olumsuz etkilerini azaltma veya etkisizleştirme ve tedavide iyileşme ile sonuçlanma kabiliyetine sahip olabilir (Butterweck ve ark. 2000, Hemaiswarya ve ark. 2008).

Kanser tedavinde tüm kanser tipleri için en önemli ve vazgeçilmez seçenek kemoterapötik uygulamalarıdır. Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan çok sayıda ve farklı grup kemoterapötikler olsa da mevcut ilaçların etkinliğinin düşük olması yan etki sorunu ve etkinliği olan ilaçlara direnç gelişimi kanser kemoterapisinin önünde en büyük engeldir.

Biz çalışmamızda Alfa-Pinen, Gama-Terpinen, P-Cymen'in farklı kombinasyonları ile akciğer, meme ve melanoma kanserleri tedavisinde yaygın olarak kullanılan antikanserojen ilaçlar arasında yer alan Paklitaksel ve Dakarbazin ile bu fitokimyasalların ikili, üçlü ve dörtlü kombinasyonlarının etkinliklerini değerlendirmeyi amaçladık.

Amaç

Günümüzde konvansiyonel kanser tedavisinde kullanılan ilaçların yan etkileri ve tedaviye karşı oluşan direnç sebebiyle kanser hücrelerinin proliferasyonunu durdurucu yeni ilaç araştırma çalışmaları son derece önemlidir. Birçok medisinal bitkinin antikanserojen aktivitesi konusunda dünyanın farklı yerlerinde *in vivo* ve *in vitro* çok çeşitli çalışmaya

rastlanılabilse de Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen gibi fitokimyasalların anti-neoplastik etkilerinin çeşitli hücre hatlarında ve deneysel olarak oluşturulmuş tümör modelinde araştırıldığı kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır.

Bizim bu çalışmadaki amaçlarımız:

- Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in farklı insan kanser hücre hatları [meme (MCF-7), akciğer (A-549), melanoma (A-2058)] üzerinde antiproliferatif etkilerinin varlığını araştırmak,
- Aktif komponentlerin moleküler mekanizmasının aydınlatılabilmesi ve anlaşılabilmesi için bu komponentlerin bazı apoptotik ve anti-apoptotik genlerin (*Bcl-2*, *Bcl-xL*, *NF-κB* ve *p53*, *kaspaz-3* ve *Bax*) transkripsiyonlarını Real-time PCR yöntemiyle araştırmak ve bu genlerin sorumlu olduğu protein seviyelerini ise Western blotlama yöntemiyle göstermek,
- Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in birbirleriyle, Paklitaksel ve Dakarbazin ile birlikte sinerjistik etkilerinin varlığını araştırmak,
- Bunun yanında, *in vitro* etkinliği tespit edilen fitokimyasalların ya da kombinasyonlarının deneysel olarak oluşturulmuş deri altı fare tümör modelinde antikanserojenik etkinliğinin araştırılmasıdır.

Hedefler

Bu çalışma ile;

- Fitokimyasalların (Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen) kombine kullanımının bireysel etkileriyle kıyaslanması,
- Fitokimyasallar ile konvansiyonel ilaç kombinasyonların kanser ilaçlarının etkinliği (aktivitesinin artması, yan etkilerinin azalması gibi) üzerindeki etkilerinin gösterilmesi,
- Fitokimyasallar ile fitokimyasal-ilac kombinasyonlarının insan kanser hücreleri üzerinde etkisinin moleküler mekanizmasının aydınlatılması,
- Kanser hücrelerine karşı etkinliği yüksek yeni aktif kombinasyonları tanımlamak,
- Böylece etkinliği düşük, yan etkileri yüksek olan klasik ilaçların etkinliğini arttırmada, yan etkilerini azaltmada doğal ürünleri kullanımının gösterilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Fitokimyasallar

İnsanlığın başlangıcından beri insanlar bitkileri beslenme amacıyla ve tıbbi özelliklerinden dolayı çeşitli hastalıkların tedavilerinde de kullanagelmişlerdir. Günümüzde ise dünyanın farklı coğrafyalarında yer alan birçok endemik tıbbi bitkinin çok çeşitli farmakolojik özelliklerinden dolayı tedavide ve ilaç geliştirme sanayinde kullanıldığı bilinmektedir (Silva ve ark. 2016).

Bitkiler, yüksek terapötik potansiyele sahip tıbbi bileşiklerin sentezinde rol oynar. (Ukwuani ve ark. 2013) Bitkisel ilaçların düşük maliyetli olması onları gelişmekte olan ülkelerde daha ilgi çekici yapmaktadır. Bitkilerin tıbbi tedavide kullanımı çok eski çağlara kadar uzanmaktadır ve doğa, binlerce yıldır insanlara tıbbi tedavi kaynağı olmuştur. Literatürde milattan sonra yirmili yıllarda hekim Dioscorides'in 600 civarında tıbbi bitkinin tanımını yaptığı Rönesan dönemine kadar bu bilgilerin farmakoloji alanında faydalanılan temel kaynaklardan biri olduğu bildirilmektedir. Tarih boyunca birçok bilim insanının tıbbi öneme haiz olan bitkilerden şifa aradığı ya da bulduğu tarih kitaplarında yer almaktadır. Sözelimi Hipokrat'ın ateşi düşürmek için söğüt ağacı yapraklarını kullandığı bildirilmektedir (Huie 2002). Doğal ürünlerin koku, tat ve renklerinden dolayı hastalıkların tedavisinde insanoğlunun ilgisini çektiği düşünülmüştür. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünya nüfusunun % 80'inin temel sağlık hizmetlerinin şifalı bitkilere bağlı olduğunu bildirmiştir (Prakash ve Sandhu 2012). Bitkilerde elde edilen tıbbi önemi yüksek olan doğal ürünler arasında; monoterpenler, terpenoidler, poliketidler, amino asitler, proteinler, karbonhidratlar, lipidler sayılabilir (Jyoti ve ark. 2019).

Biyolojik sistemler tarafından üretilen bileşikler genellikle iki gruba ayrılır. İlki, primer, diğeri ise sekonder metabolitlerdir. Primer metabolitler hücre çoğalması ve gelişimi için gerekli olan karbonhidratlar, amino asitler, proteinler ve lipidler gibi kimyasal maddelerdir. İkincil metabolitler ise; çevreleriyle etkileşime girerek hayatta kalma ve koruma gibi görevleri olan düşük moleküler ağırlıklı maddeleri kapsamaktadır. Terpenler, alkaloidler veya fenolik asitler sekonder metabolitler sınıfındandır (Azmir ve ark. 2013).

Sekonder metabolitler, bitki, kök, gövde, ağaç kabuğu, yaprak, çiçek, meyve ve tohum özlerinden elde edilmektedir (Bernhoft 2010).

Uçucu yağlar, bitkilerin farklı kısımlarından elde edilen aromatik, uçucu ve kompleks sıvılardır. Bunlar, bitkilerde savunma mekanizmalarında yer alan ve genellikle terpenler (mono, seskiterpenler ve diterpenler), alkol, esterler, ketonlar, asitler, apoksitler, aldehit, sülfid, amin ve benzeri sekonder metabolitlerdir (Bhagat ve ark. 2020). Bunlar, hem uçucu hem de uçucu olmayan maddeleri içerir. Uçucu olmayan bileşikler arasında en yaygın olanlar ise fenolik asitler, flavonoidler ve tanenlerdir (Marchese ve ark. 2017). Kozmetikte çeşitli kullanımları dışında, farmasötikler, parfümler, yiyecekler ve alkollü içeceklerde kullanılırlar. Ayrıca, antimikrobiyal, analjezik, antioksidan, antiviral, antispazmodik, gaz giderici, analjezik, anti-inflamasyon gibi çeşitli biyolojik özelliklerinin olduğu bildirilmiştir (Arpag ve ark. 2020, Bhagat ve ark. 2020).

Fitokimyasallar, sekonder bitkisel metabolitler olarak bilinmektedirler. Doğal ürünlerdeki biyoaktivite, genellikle patojenlere karşı korunma, bitkiler arasındaki rekabette hayatta kalma ve abiyotik streslere karşı savunmada bitkinin sahip olduğu fitokimyasalların önemli rol oynadıkları bildirilmiştir (Ruba ve ark. 2013). Fitokimyasallar; genel olarak, bitki hücrelerini kirlilik, stres, kuraklık, UV'ye maruz kalma ve patojen saldırılarına karşı çevresel tehlikelerden koruyan bitki kimyasallar metabolitlerdir. Günümüzde 4.000'den fazla fitokimyasal sınıflandırılmış ve 150 fitokimyasal ayrıntılı olarak incelenmiştir (Saxena ve ark. 2013). Fitokimyasallar meyvelerde, sebzelerde, baklagillerde, kepekli tahıllarda, kuruyemişlerde, tohumlarda, mantarlarda, şifalı otlarda ve baharatlarda bolca bulunur. Fitokimyasallar bitkilerin kök, gövde, yaprak, çiçek, meyve veya tohum gibi farklı kısımlarında birikmektedir (Saxena ve ark. 2013).

Fitokimyasallar (phyto=bitki) bitkilerde bulunan biyolojik olarak aktif, doğal olarak meydana gelen kimyasal bileşikler olarak da tanımlanabilir. İnsan sağlığı üzerinde son derece önemli faydalarının olduğu bildirilmiştir. (Sarany ve Divyabharathi 2019).

Fitokimyasalların, antibakteriyel, antiviral, antioksidan özellikleri yanında detoksifikasyon enzimlerinin modülasyonu, bağışıklık sisteminin uyarılması, trombosit agregasyonunun azalması, hormon metabolizmasının modülasyonu ve antikanser etki gibi çeşitli biyolojik özelliklerinin olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. Bunun yanında,

fitokimyasalların DNA replikasyonunda da rol oynadığı bildirilmiştir. Fiziksel olarak hücre duvarlarına bağlanarak patojenlerin insan hücre duvarına adezyonunu inhibe ettikleri bildirilmiştir (Ngoci ve ark. 2011). Fitokimyasallar temel besinler değildir ancak yaşamın sürdürülmesi, bazı hastalıkların önlenmesi veya bunlarla savaşılmaları için olan moleküllerdir (Saxena ve ark. 2013).

Bazı fitokimyasalların terapötik ve profilaktik özelliklere sahip olduğu, normal hücre sağlığı ve onarımı için besin sağladığı, kanserojenleri inhibe ettiği ve antioksidan görevi gördüğü bilinmektedir (Ngoci ve ark. 2011). Fitokimyasalların farmakolojik etkinliklerinin farklı moleküllerle arttırılabileceği sinerjik etkileşimin olabileceği bildirilmektedir. Fitokimyasallar patojen mikroorganizmaların direncini kırabilmekte ve adaptif reaksiyonlarını da azaltabilmektedir (Olila ve ark. 2001). Terpenoidler, alkaloidler, tanenler, flavonoidler, saponinler, fitosteroidler, glikozitler fitokimyasallara örnek olarak verilebilir.

Terpenoidler, bir veya daha fazla karbon iskeletine sahip izopren molekül türevleridir (Njeru ve ark. 2013). Terpenoidlerin çoğu fonksiyonel grupları ve temel karbon iskeletleri ile birbirinden farklılıklar göstermekte olup çok halkalı yapıya sahiptir. Bu tür doğal lipitler, her canlı sınıfında bulunabilir. Bu nedenle en büyük doğal ürün grubu olarak kabul edilir (Elbein ve Molyneux 1999). Terpenoidler gıda katkı maddeleri olarak kullanılmakta olup kozmetik sanayinde, tat ve koku olarak kullanımları bakımından önemlidirler (Harborne ve Tomas-Barberan 1991). Terpenler, bitkilerde uçucu yağların bileşenleri olarak doğada yaygın olarak bulunurlar. Yapı taşları hidrokarbon izoprendir. Antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiprotozoal, antiallerjik, immunomodülatör ve antineoplastik özellikleri gibi zengin farmakolojik etkinliklerinin olduğu bildirilmektedir (Duran ve Kaya 2018, Bayraktar ve Duran 2018). Bu moleküllerin hücre zarı yapısını bozarak etki ettiği düşünülmektedir. (Ngoci ve ark. 2011).

Monoterpenlerin oksidasyonu veya yeniden düzenlenmesi gibi biyokimyasal modifikasyonlar sonucu monoterpenoidleri üretilmektedir. Monoterpenoidlerin iki izopren birimi mevcuttur. Siklik (Eucalyptol, Limonene, Citral, Camphor, Pinen, Geranil pirofosfat gibi) veya asiklik yapıda bulunabilirler (Saxena ve ark. 2013).

Bitki türleri önemli gıda takviyesi ve tıbbi sağlık ürünleri kaynaklarıdır. Biyoaktif bileşikler, metabolizma ürünleri olup insanlarda ve hayvanlarda benzer şekilde hareket ederler (Gurib-Fakim 2006). Nutrasötik ürünlerin hastalıkları önlemedeki etkinliği, aktif bileşenlerin stabilitesinin, biyoaktivitesinin ve biyoyararlanımının korunmasına bağlı olarak değişmektedir (Fang ve Bhandari 2010). Bu oldukça önemli bir sorundur çünkü oral uygulamadan sonra genellikle midede kalma süresinin yetersiz olması, düşük geçirgenlik, bağırsakta çözünürlüğün düşük olması ve gastrointestinal sistemde düşük emilim gibi nedenlere bağlı olarak moleküllerin sadece küçük bir kısmı kullanılabilir durumda kalabilmektedir (Leonard 2000). Fitokimyasallar biyolojik olarak parçalanabilir bir polimer içinde kapsüllenebilmektedir. Hücrelerin kullanımı bir süspansiyona göre daha kolaydır ve mikropartiküllerdeki dozajları kontrol edilebilmektedir. Ayrıca kombine kullanımları durumunda etkinlikleri ve emilimi artmaktadır (Anal ve Singh 2007).

2.1.1. P-Cymen

P-Cymen [1-metil-4- (1-metiletil) -benzen], benzen halkası bir metil ve bir izopropil gruba sahip olan ve doğada bulunan aromatik bir hidrokarbondur. Kekik ve kekik gibi aromatik bitkilerde bol bulunmaktadır. P-Cymen, *Thymus* (kekik), *Ocimum* (Lamiaceae-fesleğen), *Eucalyptus* (Ökalyptus), *Origanum*, *Protium* (Burseraceae) ve *Artemisia* (Asteraceae) cinsine ait 100'den fazla bitki türünde bulunur (Marchese ve ark. 2017). Doğal olarak 200'den fazla gıdada (portakal suyu, greyfurt, mandalina, tereyağı, havuç, kekik ve baharatların çoğu) ve çeşitli bitki türlerinde yaygın olarak bulunan bir monoterpindir. P-Cymen'in, antiinflamatuvar, antinosiseptif, analjezik ve antioksidan ve immünomodülatör etkinliklerin olduğu bildirilmiştir (Santos ve ark. 2019).

Deneyisel hayvan modeli üzerinde gerçekleştirilen *in vivo* çalışmalarda, P-Cymen'nin oksidatif stresi azaltarak antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (Marchese ve ark. 2017). Ayrıca, *in vitro* ve *in vivo* nükleer faktör- κB (*NF- κB*) ve proinflamatuvar sitokinlerin sentezinde yer alan yolları aktive ettiği, protein kinazı inhibe ederek sitokin üretimini (tümör nekroz faktörü- α , interlökin-1 β , interlökin 6) modüle ettiği ve böylece anti-inflamatuvar aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Marchese ve ark. 2017).

2.1.2. Alfa-Pinen

Pinen (C₁₀H₁₆) bisiklik, çift bağı, terpenoid bir hidrokarbondur (Winnacker 2018). Alfa ve β-Pinen, iki izomerdir ve doğada en yaygın bulunan monoterpenoidlerdir. Alfa-Pinen, renksiz, suda çözünmeyen ancak yağda ve etanolde çözünen organik bir sıvıdır. Kaynama noktası 155 °C'dir (Vespermann ve ark. 2017). Alfa-Pinen *Pinus* sp. (çam), birçok *Salvia* sp. (adaçayı), *Rosmarinus officinalis* (biberiye), *Helichrysium* sp, *Pistacia vera* (fıstık), siyah erik, *Cannabis sativa* gibi iğne yapraklı birçok bitki türü başta olmak üzere en az 40 farklı esansiyel yağda bulunur (Borges ve ark. 2019, Nuutinen 2018).

Alfa-Pinen'in fungisidal, antiviral ve antimikrobiyal etkinlikler gibi çeşitli farmakolojik etkinliklerinin olduğu bildirilmiştir. Alfa-Pinen hücre siklusu üzerinde modülatör etki, antioksidan etki, antiinflamatuvar etki ve apoptozun uyarılması gibi çeşitli moleküler mekanizmalarla antikanserojen etkinliğe sahiptir (Hou ve ark. 2019). Küçük hücreli olmayan akciğer karsinomuna karşı Alfa ve beta pinen'in antikanserojen etkinliğinden bahsedilmiş, ayrıca, meme kanseri ve lösemi hücreleri üzerinde de hücresel çoğalma üzerinde inhibitör etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Winnacker 2018).

2.1.3. Gama-Terpinen

Gamma-Terpinen (p-Mentha-1,4-diene) C₁₀H₁₆ olarak formüle edilen 136.23 g/mol molekül ağırlığındadır. Gama-Terpinen, iki çift bağı konumunda farklılık gösteren üç izomerik monoterpenden biridir. Diğerleri de Alfa- ve beta-Terpinendir. Alfa-Terpinen'de çift bağlar, p-mentan iskeletinin 1 ve 4 konumlarındadır (National Center for Biotechnology Information). Bir monoterpen olan Gama-Terpinen önemli derecede anti-enflamatuar etkiye sahip olup Eucalyptus cinsi de dahil olmak üzere çok çeşitli bitkilerin uçucu yağlarında bulunan doğal bir bileşiktir. Pre-aromatik olan Gama-Terpinen, ökaliptus, turuncgiller, kekik, ardıç, keklik otu ve geyik otu gibi birçok tıbbi ve aromatik bitkinin uçucu yağlarında yaygın olarak bulunur. Gama-Terpinen'in antiinflamatuvar etkinliği yanında güçlü antioksidan aktiviteye de sahip olduğu bildirilmiştir (Guo ve ark. 2021).

2.2. Kanser

Kanser, bir organ veya dokudaki hücrelerin kontrolsüz olarak bölünüp çoğalmasıyla beliren habis hücreler olarak nitelendirilmektedir (Xia ve ark. 2018). Ortalama olarak her dört kişiden birinin hayatında bir kere kansere yakalanacağı tahmin edilmektedir. Kalıtsal kanserler tümörlerin yalnızca küçük bir bölümünü oluştursa da çoğu kanser, kalıtsal ve çevresel faktörlerin etkisiyle ortaya çıkmaktadır (Ghavami ve ark. 2009, Hausman 2019). Akciğer, meme, melanoma, kolon ve prostat kanser türleri tüm dünyada morbidite ve mortalite bakımından en önemli kanser türleri arasında yer almaktadır. Dünya çapında en sık görülen kanser tipleri arasında akciğer ve meme kanserleri ilk sıralarda yer almaktadır. Melanoma ise metastatik karakteri ve kötü prognozu sebebiyle akciğer ve memekanserleri yanında morbidite ve mortalitesi bakımından ciddi seyirli kanser türleri arasında yer almaktadır. Bu kanser türlerinin her yıl on milyonlarca yeni insanda görülmesi oldukça korkutucu boyutlarda olduğunun bir göstergesi olarak değerlendirilmelidir. Kanser, iskemik kalp hastalığından sonra yaklaşık on milyon ölüm oranı ile dünyadaki ikinci en yüksek mortalite sebebidir. Kanser hastalığının 2060'lı yıllarda yaklaşık yıllık ölümlerin yirmi milyon dolaylarına kadar tırmanabileceği böylece tüm dünyada en yüksek mortalite sebebi olabileceği hesap edilmektedir (Mattiuzzi ve Lippi 2019). İnsanların yaşamları boyunca kansere yakalanma riskinin %20 dolaylarında olduğu bildirilmiştir. Erkek cinsiyette olanların kansere yakalanma olasılığının ise kadınlardan daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Erkeklerde en yüksek malignite riskinin akciğer kanseri iken kadınlarda ise meme kanserlerinin ilk sırada yer aldığı bildirilmiştir (International Agency for Research on Cancer 2019).

Kanser, dünya çapında en önemli morbidite ve mortalite sebeplerinden biri olup (Potočnjak ve ark. 2018) kanser tedavisinde önemli zorluklar yaşanmaktadır. Çünkü tümör hücreleri, proto-onkogenlerin aktivasyonunu ve tümör supressor genlerin inaktivasyonunu oluşturan DNA molekülünün tüm genetik savunma mekanizmasını ve onarımını değiştirebilmektedir (Magalhães ve ark. 2017)

2.2.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri tüm dünyada en sık görülen kanserdir ve kansere bağlı ölümlerin en önde gelen nedenidir (Bray ve ark. 2018). Genel olarak, yüksek riskli grupların tanımlanmasında yaş ve sigara kullanımı temel kriterdir. Ancak araştırmalar akciğer kanserinin sigara dışında; hava kirliliği, çevresel ve genetik faktörlerden de etkilendiğini göstermektedir (Akhtar ve ark. 2017). Akciğer kanserlerinin çoğu sigaradan kaynaklansa da dünya çapında birçok akciğer kanseri vakası da sigara içmeyenlerde bildirilmektedir (Akhtar ve ark. 2017). Hiç sigara içmeyenlerde akciğer kanseri ayrı bir kategori olarak ele alınsaydı, dünya çapında kanser ölümlerinin yedinci nedeni olacağı bildirilmiştir (Parkin ve ark. 2002). Yaşam alışkanlıkları, kimyasal ajanlara maruziyet ve diyet gibi çeşitli unsurlar kanser gelişimi ile yakından ilişkilidir. Ayrıca, farmakolojik müdahale ve beslenme alışkanlığı kanserin ilerlemesini geciktirerek hastaların yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyebilmektedir (Elbe ve ark. 2020). Ayrıca, son yıllarda genç nüfusta akciğer kanser insidansı artış eğilimi göstermektedir (Kang ve ark. 2019). Akciğer kanseri olan genç hastaların sayısı göz ardı edilemeyecek kadar artmaktadır. Akciğer kanserinde hayatta kalma oranının tanı sırasındaki klinik ve patolojik evreler ile negatif korelasyon içinde olduğu bildirilmektedir (Woodard ve ark. 2016). Ne yazık ki, semptomlar ortaya çıktığında, hastalık genellikle ilerlemiş olmakta ve hastalığın tedavisi de zorlaşmaktadır. Ancak, bilgisayarlı tomografinin bazı tümörleri erken evrelerde saptayabilmesi erken tanı ile birlikte yaşam süresine artı olarak yansıyabilmektedir (Team ve ark. 2011).

Akciğer kanseri, dünya çapında kansere bağlı morbidite ve mortalitenin önde gelen nedeni olup ve ciddi bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde, kirli hava nedeniyle hastalığın insidansının daha da yüksek olduğu bildirilmektedir (Yue ve ark. 2017). Son on yılda akciğer kanseri en sık teşhis edilen kanserler türlerinin başında yer almakta olup dünya çapında en yüksek ölüm oranına sahiptir (Siegel ve ark. 2017). Erkeklerde ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerin ikinci nedenidir (Wattanathamsan ve ark. 2018). Akciğer kanseri küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) ve küçük hücreli akciğer kanseri olmak üzere ikiye ayrılır. NSCLC, tüm akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %85'inden sorumludur (Elbe ve ark. 2020). En yaygın tip olan NSCLC hastalarının yaklaşık %15'inde ortalama yaşam süresinin yaklaşık beş yıl kadar olduğu bildirilmektedir. Metastaz bu durumu daha da kötüleştirmektedir. Bu nedenle akciğer

kanserinin moleküler mekanizmalarının daha fazla araştırılması, bu hastalık için daha etkili terapötik yöntemleri belirlemek için kritik öneme sahip olacaktır (Fangjun ve Zhijia 2018).

Akciğer kanserinin tedavisinde kemoterapi dahil olmak üzere birçok terapötik yaklaşım vardır. Radyoterapi ve kemoterapi hala standart tedavi metodu olarak akciğer kanserlerinde uygulansa da radyoterapi ve kemoterapi uygulamasından sonra hayatta kalma oranlarının hala oldukça düşük olması etkili bir kemoterapötik ajana olan ihtiyacın ne denli yüksek olduğunun en önemli göstergesidir. (Chen ve ark. 2017).

2.2.2. Meme Kanseri

Meme kanserleri dünyada en yaygın olan kötü huylu tümörlerden biridir. Farklı ülkeler arasında bölgesel değişiklikler görülse de 20-50 yaş arasındaki kadınlarda ölümün önde gelen sebebidir (Siegel ve ark. 2019). Meme kanserinde mortalite oranının 46.3/100.000 olduğu bildirilmiştir ki, bu oran en yüksek mortaliteye sahip kanser türüdür (International Agency for Research on Cancer 2019).

Çin ve Japonya gibi Asya ülkeleri ile Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa ülkeleri karşılaştırıldığında Asya ülkelerinde meme kanseri daha düşük mortalite göstermektedir (DeSantis ve ark. 2019). Düşük mortalite görülen bölgelerdeki insanlar, daha yüksek oranlara sahip ülkelere göç ettiklerinde meme kanseri insidansı ve mortalitesinde bir artış meydana gelmektedir (Mousavi ve Hemminki 2015). Bu da çevresel faktörlerin ve yaşam tarzının patogeneizde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Meme kanseri, dünya çapında kadınlar arasında yüksek morbidite ve mortalite oranları ile önemli bir sağlık sorunudur. Meme kanseri, heterojen bir hastalık kompleksi olup biyolojik özelliklerine veya gen ekspresyon modellerine göre farklı alt tiplere ayrılmaktadır. Meme kanseri hastalarında metastaz, ölümün ana nedenlerinden biri olarak kabul edilir. Metastaz hücre dışı matriksin degradasyonu ile başlamakta, ardından hücre invazyonu ve transendotelyal hücre göçü ile devam etmekte ve yeni bölgede kolonizasyonla sonuçlanmaktadır (Abdullah ve ark. 2018).

Meme kanseri dünya çapında en çok tanı koyulan kanser tipidir. Kadınlarda kanser ölümlerinin ikinci önemli sebebidir. Bazı meme kanseri türlerinde tedavide cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi gibi kapsamlı ve etkili tedaviler olsa da hastaların yaklaşık %30-40'ında ya metastaz ya da lokal olarak ilerlemiş meme kanseri görüldüğü bildirilmektedir (Assmann ve ark. 2018).

2.2.3. Melanoma

Cilt, en büyük organımızdır ve çevresel saldırılara karşı birinci basamak koruyucu bariyer olarak görevi görmektedir. İnsan cildi sürekli çeşitli zararlı maddelere, güneş ışınlarına ve mikroorganizmalara maruz kalmaktadır. Ciltte farklı streslerin birikmesi kanserin başlaması, proliferasyonu ve progresyonu içeren çok aşamalı bir süreç olan deri karsinogenezine yol açabilir. Başlama aşaması, hücresel DNA hasarına neden olan ultraviyole (UV) radyasyonu gibi bir kanserojene maruz kaldıktan sonra gerçekleşir. UV radyasyonu hem doğrudan fotonlar tarafından DNA hasarı yoluyla hem de dolaylı olarak reaktif oksidatif stresle DNA, membran ve proteinleri etkileyerek karsinogenezi indüklemektedir. Hücrede DNA hasarı onarılmadan kalırsa geri dönüşü olmayan kalıcı genetik mutasyonlar gerçekleşmekte ve hücreye otonom çoğalma yeteneği kazandırmaktadır. Proliferasyon aşaması, klonal hücre proliferasyonunu teşvik eden bileşiklere tekrar tekrar maruz bırakıldığında meydana gelmektedir. Tekrarlayan yaralanma veya UV radyasyonu, kronik inflamasyon ve oksidatif stres rejeneratif proliferasyonu gibi etkenler cilt tümörünün yayılmasına katkıda bulunmaktadır. Progresyon evresinde, iyi huylu tümör başka genetik mutasyonlara uğrar ve progresif olarak invazif hale gelir. Metastaz yapma yeteneği ile malign hücrelerine dönüşür. Anjiyogenez, vasküler yapılardan yeni kan damarlarının ortaya çıktığı bir süreçtir. Progresyon evresindeki üssel tümör çoğalması anjiyogenez yoluyla besin ve oksijen ihtiyacını karşılamaktadır (Ng ve ark. 2018).

Melanoma, deride, gözlerde, iç kulakta ve leptomeninglerde bulunabilen pigment üreten hücreler olan melanositlerde genetik mutasyonların ortaya çıkmasından kaynaklanır (Davids ve ark. 2013). Melanom, tüm cilt malign tümörlerinin yaklaşık %1'ini oluşturur. Ancak, kutanöz malign melanom, cilt kanserinin en agresif ve en ölümcül olanıdır (American Cancer Society Cancer Facts & Figures 2017). Melanoma, en kötü huylu cilt

kanseri türü olup 2019 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde 100.000'den fazla yeni vaka tanı almıştır. Melanomanın yılda progresyonu bakımından en ciddi kanser türlerden biri olduğu bildirilmektedir (Siegel ve ark. 2020). Hastalık metastatik hale geldiğinde prognoz kötüdür. Tedavinin başarılı olabilmesi için erken teşhisi çok önemlidir. Son yıllarda kanser tedavisinde umut verici gelişmelere rağmen, metastatik melanomda yaşam süresi yaklaşık 8-9 aydır (Soleimani ve ark. 2020). Tümörün konum, evre ve genetik özelliklerine bağlı olarak, tedavi seçenekleri cerrahi rezeksiyon, kemoterapi, radyoterapi, fotodinamik tedavi ve immünoterapi olabilmektedir. (Domingues ve ark. 2018).

Kanser tedavisinde en önemli mekanizmalardan biri apoptoz mekanizmasıdır. Hücrenin apoptoza sürüklenmesi intrinsik ve ekstrinsik yolda rol alan bazı genlerin kontrolü altında gerçekleşmektedir.

2.3. Apoptoz (Apoptozis)

Programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz, hücre gelişimi, farklılaşması ve çoğalması dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynar. Hasarlı, istenmeyen veya infekte hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlar. Kromatinin yoğunlaşması, DNA parçalanması, apoptotik cisimlerin gelişimi, kaspazların uyarılması ve aşırı ROS üretimi ile karakterizedir. Bazı kanser ilaçları, apoptoz yoluyla hücre ölümünü uyararak tümör hücrelerine etki eder. Apoptoz kusurlarının olması konakta kansere ve kemoterapiye karşı direnç gelişimiyle de sonuçlanabilmektedir (Hou ve ark. 2019).

Çok hücreli organizmalarda hücrelerin ortadan kaldırılmasında iki ana mekanizma kullanılmaktadır: Nekroz ve apoptoz (Jin ve ark. 2007). Nekroz plazma membranın parçalanmasıyla tetiklenebilir ve buna bir enflamatuar sürecin oluşumu eşlik edebilmektedir (Brown 2008). Apoptoz ise kromatinin yoğunlaştığı temiz bir ölüm tipini içerir; DNA parçalanarak, "apoptotik cisimler" olarak adlandırılan veziküller oluşmaktadır. Bunlar makrofajlar tarafından hızlı bir şekilde fagosite edilir ve herhangi bir inflammatuar yanıt olmadan sonlanmaktadır (Lauber ve ark. 2004).

Konakta apoptoz kusurlarının oluşması kanser ve otoimmün hastalıkları indüklerken; aşırı hücre ölümü ise iskemik vakaları artırabilmekte ve nörodejenerasyonu

tetikleyebilmektedir (Czabotar ve ark. 2014) Apoptozun tümör oluşumunun düzenlenmesinde çok önemli rol oynadığı ve aynı zamanda tedavi yanıtını kritik bir şekilde belirlediği bilinmektedir. Apoptoz indüksiyonu birkaç yolla gerçekleşebilir. Sözgelimi sadece tümör hücrelerinde anti-apoptotik faktörlerin ekspresyonunu azaltırken pro-apoptotik faktörlerin ekspresyonunu tetiklemektedir. Bir diğer yol ise özellikle transforme hücreler içinde hareket eden viral partiküllerin infeksiyonuyla meydana gelebilmektedir (Ozben 2007).

Memelilerde apoptoz üç farklı yolla başlatılabilir: Ölüm reseptörlerinin ligasyonu ve kaspaz-8 aktivasyonu ile tetiklenebilen hücre dışı yolak ile. Hücresel stres ile başlatılan ve *kaspaz-9*'un aktivasyonu ile devam eden hücre içi yolak ile. Sitotoksik hücre proteaz granzim B'nin hedef hücrelere verildiği granzim B yolu ile. (Ghavami ve ark. 2009). Bu yolların her biri *kaspaz-3* ve/veya *kaspaz -7*'nin proteolitik aktivasyonunu gerektiren ortak bir apoptoz fazı gerektirmektedir (Salvesen ve Dixit 1997). Biyokimyasal olarak, apoptozun ana özellikleri kaspaz aktivasyonu ve DNA fragmentasyonudur (Adams 2003). Mitokondri çeşitli uyarıların neden olduğu apoptozda anahtar bir rol oynamaktadır. Mitokondri pro-apoptotik proteinler (sitokrom c, Smac, Omi, AIF ve EndoG) sağlar. Bu pro-apoptotik proteinlerin sitozole salınımı B hücreli lenfoma 2 (*Bcl-2*) ailesi tarafından düzenlenir.

Mitokondriyal yol olarak da adlandırılan intrinsik yol, onkojenik stres kemoterapötik ajanlar ve metabolik stres dahil olmak üzere çeşitli sitotoksik uyarıların tarafından tetiklenmektedir. Bu uyarıların ilgili *Bcl-2* ailesi proteinlerini aktive ederek mitokondriyal dış zar geçirgenliğine yol açmaktadır (Tait ve Green 2010). Dış mitokondriyal zarın bozulmasıyla, sitokrom c ve Smac/DIABLO gibi bir dizi apoptotik protein salınır (Smac/DIABLO, kaspazın ikinci mitokondri kaynaklı aktivatörüdür) (Deng ve ark. 2002). Sitosolik sitokrom c, “apoptozom” oluşturmak için apoptoz proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf-1) ve inaktif olan procaspase 9'u kullanır. *Kaspaz 9*'u aktive ederek kaspazın işlenmesini sağlar (Beere ve ark. 2000). Mitokondriyal sinyal normal hücre homeostaz ve kanser, diabetes mellitus, obezite ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif bozukluklar dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynar (Liu ve ark. 2016).

Ölüm reseptör yolu olarak da bilinen ekstrinsik yol ise ölüm reseptörleri ile tümör nekroz faktörü (TNF) ailesinin aynı kökenli ligandları arasındaki etkileşimlerle aktive edilir. Ölüm ligand uyarımı reseptörlerin oligomerizasyonunu ve FADD (FADD, Fas ile ilişkili

ölüm alanı proteinidir) ile *kaspaz 8*'in rol almasını sağlamaktadır. Bunun sonucunda ölüm indükleyici sinyalleşme kompleksi oluşmaktadır. *Kaspaz 8*'in aktivasyonu, *kaspaz 3, 6 ve 7* gibi diğer efektör kaspazları aktive eder (Ashkenazi ve ark. 1998). Bu iki yol önce efektör kaspazlar üzerinde daha sonra proteazlar ve nükleazlar üzerinde birleşerek hücre ölümüne neden olmaktadır.

2.3.1. Kaspaz Ailesi ve *Kaspaz-3*

Kaspazlar, değişken uzunlukta bir N-terminal prodomain, büyük bir subünit (~20 kDa), küçük bir sunit (~10 kDa) ve bu alt birimleri bağlayan alan olmak üzere dört bölgeden oluşmaktadır (Salvesen ve Riedl 2008). Pro-apoptotik işlevlerine göre başlatıcılar ve efektör kaspazlar olmak üzere iki gruba ayrılır. Başlatıcı kaspazlar (*kaspazlar 2, 8, 9, 10*) efektör kaspaz grubunu (*kaspaz 3, 6 ve 7*) etkinleştirir. Efektör kaspazlar, hücre çekirdeği, sitoplazma ve hücre iskeletindeki yapısal ve düzenleyici proteinler dahil olmak üzere birçok substratı doğrudan indirgeyebilir (Wang ve ark. 2005). Kaspazlar apoptozun yürütücü proteinleridir.

Kaspaz-3 bir efektör kaspazdır. Ektrinsik ve intrinsik hücre ölüm yolları ile aktive edilir. Hücre apoptozunda önemli bir rol oynar (Juo ve ark. 1998). Bir çalışmada meme karsinomu, hepatosellüler karsinom, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, mide karsinomu, kolon karsinomu, multipl miyelom gibi çeşitli kanserlerde *kaspaz-3* somatik mutasyonu araştırılmıştır. *Kaspaz-3* somatik mutasyonları için aynı hastalardan alınan sağlıklı ve malign dokuları karşılaştırdıkları çalışmalarında normal örneklerde herhangi bir mutasyon gözlenmezken mutasyonların somatik olarak arttığı sonucuna varılmıştır (Soung ve ark. 2004).

2.3.2. *Bcl-2*

İnsan *Bcl-2* (B cell Lymphoma/leukemia-2) apoptoz düzenleyici protein ailesinin, 6 anti-apoptotik (*Bcl-2, Bcl-xL* gibi), 3 pro-apoptotik (*Bax, Bak* gibi) üyesi bulunmaktadır. *Bcl-2* ailesi proteinleri, apoptoz, nekroz ve otofaji dahil olmak üzere temel hücre ölümü

mekanizmalarını düzenler (Levine ve Kroemer 2008). Böylece onkolojik yollarda kilit noktaları olarak çalışır. Tümör biyolojisi için önemli bir kilometre taşı olan *Bcl-2* keşfedilen ilk ölüm karşıtı gendir. *Bcl-2* ailesi proteinleri, dört tane *Bcl-2* homolog (BH1- 4) alan içerir. İnsan *Bcl-2* ailesinde *Bcl-2*, *Bcl-xL*, *Mcl -1*, *Bcl-w* anti-apoptotik üyeleri BH1, BH2, BH3 ve BH4 içerir. *Bax*, *Bak* gibi pro-apoptotik proteinler BH4 içermezler. (Reed 2006). Kanserin yeni tedavi yaklaşımlarında BH3 üzerinde çalışmalar yapılmaktadır.

Bcl-2 ailesinde bulunan anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler, mitokondrinin dış zarında c-terminal transmembran alanlarında bulunur. *Bax* ve *Bak* gibi pro-apoptotik proteinleri mitokondriyal membran geçirgenliğini indükleyerek kaspaz aktive edici proteinlerin ve diğer hücre ölüm araçlarının salınmasına neden olur. Fakat *Bcl-2* gibi anti-apoptotik proteinler, *Bax* ve *Bak*'a karşı dış zar bütünlüğünü korur. Mitokondriyal membran geçirgenliği indüksiyonu, *Bcl-2* ve *Bcl-xL* gibi anti-apoptotik proteinlerin aksine dış mitokondriyal membrandaki *Bax* ve/veya *Bak* ile ilişkilidir (Eskes ve ark. 2000, Chipuk ve Green 2008). İnsan kanserlerinin yarısında *Bcl-2* gen yapısı veya kopya sayısında değişikliklerin meydana geldiği tahmin edilmektedir. Bu duruma, *Bcl-2* gen ekspresyonunu baskılayan endojen mikroRNA'ların (miR'ler) kaybı (Cimmino ve ark. 2005) ve gen hipometilasyonunun neden olduğu bildirilmektedir (Hanada ve ark. 1993). Anti-apoptotik *Bcl-2* veya *Bcl-xL*'nin aşırı ekspresyonu çok sayıda insan kanserinde mevcuttur (Amundson ve ark. 2000).

Pro-apoptotik proteinlerin inaktive edici mutasyonları tümörlerin kontrolsüz büyümesine yol açmakta ve bu durum birçok kanserde meydana gelmektedir (Rampino ve ark. 1997). Ayrıca anti-apoptotik *Bcl-2*'nin aşırı ekspresyonu ilaç direncinin önemli bir etkenidir (Adams ve Cory 2007). *Bcl-2* ailesi proteinleri apoptotik hücre ölümünün kritik kontrol noktalarıdır (Danial 2007). Çalışmalarda çeşitli *Bcl-2* aile üyelerini hedeflemek, kanser, otoimmün hastalıklar ve nörodejeneratif bozukluklar dahil, apoptozla ilişkili disfonksiyonel hastalıklar için en umut verici terapötik stratejilerden biridir.

2.3.3. *Bcl-xL*

Bcl-2 protein ailesi, hücre içi apoptotik yolun doğru düzenlenmesi çok hücreli organizmaların normal gelişimi ve fizyolojisi için gereklidir. Pro-apoptotik *Bax*, *Bak* efektör proteinler sadece BH3 proteinleri (*Bim*, *Puma*, *Bid*, *Noxa*, *Bad*, *Bmf*, *Hrk*, *Bik*) ile doğrudan etkileşime girerek apoptozu inhibe eden *Bcl-2* anti-apoptotik proteinleri (*Bcl-xL*, *Bcl-2*, *Bcl-w*, *Bfl-1*, *Mcl-1*) yer alır (Golstein 1998). *Bcl-x* geni BH1 ve BH2 alanları bulunmayan ancak hem BH3 alanı hem de hidrofobik kuyruğa sahip olan proteinlerdir. Pro-apoptotik BH3-sadece proteinleri, sadece bir BH3 alanına sahiptir (Lee ve ark. 2008). *Bcl-xL* ve *Bcl-2* çoklu BH alanı proteinleridir. *Bcl-xL* ve *Bcl-2*'nin BH4 ve BH3 alanı diğer aile üyelerine kıyasla daha uzun bir diziye sahiptir. *Bcl-xL*, *Bcl-w* (%51) ve *Bcl-2* (%45) ile en yüksek sekans özdeşliği gösterirken, diğer tüm çoklu-BH alan proteinleri ile sadece %18-25 oranında benzerlik göstermektedir (Czabotar ve ark. 2014).

Bcl-xL ve *Bcl-2* apoptozu düzenlemek için ikili mekanizmalar kullanır. İlk olarak, *Bcl-xL* ve *Bcl-2*'deki hidrofobik bir oluk, apoptozu inhibe ederek pro-apoptotik düzenleyicilerin α -helikal BH3 alanına bağlanır. İkinci olarak, *Bcl-xL*'deki hidrofobik oluğun distalindeki bir bölge sitosolik *p53*'ü bağlar. *Bax*'ın *p53*'e bağlı aktivasyonunu ve apoptozu inhibe eder. Sadece-BH3 proteini PUMA, ikili mekanizma yoluyla apoptozu tetikler. Bunu *Bcl-xL*'nin hidrofobik oluğuna bağlanarak ve pro-apoptotik sadece-BH3 proteinlerini değiştirerek *p53*'ü serbest bırakmak için uzak bağlanma bölgesini allosterik olarak yeniden modelleyerek gerçekleştirir (Follis ve ark. 2018).

2.3.4. *Bax*

Pro-apoptotik protein olan *Bax*, mitokondriyal dış zar geçirgenliğinden sorumlu temel proteinlerdir. Hücre ölümünün yanı sıra mitokondriyal disfonksiyon için gereklidirler (Wei ve ark. 2001). *Bax* hücre içi apoptotik sinyalleşme için mükemmel bir giriş noktasıdır. İntrinsik yol tetiklendiğinde, BH3 proteinleri, doğrudan veya dolaylı yollarla *Bax*'ı aktive eder. Oligomerize *Bax*, mitokondriyal membran geçirgenliğini kolaylaştırır. Gözeneklerin oluşumunu destekler. Böylece, sitokrom c ve Smac/DIABLO'nun zarlar arası boşluktan sitozole salınmasını sağlar (Jurgensmeier ve ark. 1998). Apoptotik proteaz aktive edici

faktör 1 (Apaf-1), dATP ve prokaspaz-9, sitokrom c ile birlikte karmaşık bir "apoptozom" oluşturur. Apoptozom *kaspaz 9*'u aktive eder. Sonuçta hücre ölümü meydana gelir (Li ve ark. 1997). *Bcl-2* anti-apoptotik aile üyeleri BH3 proteinlerini ayırır. *Bax* proteinlerini nötralize eder. Böylece *Bax*'ın allosterik aktivasyonunu ve mitokondriyal apoptozunu önler (Cheng ve ark. 2001).

2.3.5. *p53*

p53 proteini hem hücre döngüsü kontrolüne hem de programlanmış hücre ölümüne katkıda bulunarak hücrel tepkilerin düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar. Tümörjenez sırasında *p53* fonksiyonunun kaybı istenmeyen hücrelerin çoğalmasına, hücrelerin hayatta kalmasına ve genetik kararsızlığa yol açabilir. *p53* gen mutasyonları tüm malignitelerin yaklaşık yarısında meydana gelmektedir. Bazı tümör türlerinde *p53* mutasyonları kötü prognoz ve tedavi başarısızlığı ile ilişkilidir (Kirsch ve ark. 1998). *p53* geni *Bcl-2* ailesiyle etkileşime girerek *Bcl-2* geninin ekspresyonunu azaltarak ve *Bax* geninin ekspresyonunu artırarak apoptozu düzenlemede rol oynar (Wang ve ark. 2013).

Tümör baskılayıcı *p53* geni normal hücrelerin çekirdeğinde nadiren saptanabilen bir fosfoproteindir (Benchimol ve ark. 1982). Hücrel stres durumunda, özellikle DNA hasarı ile indüklenen *p53*, hücre döngüsünün ilerlemesini durdurabilir, böylece DNA'nın onarılmasına izin verebilir veya apoptozu yol açabilir (Kastan ve ark. 1991). Mutant *p53* proteini taşıyan kanser hücrelerinde hücre proliferasyonu kontrol edilemez. DNA onarımı gerçekleşmez ve genetik olarak değişken hücrelerin ortaya çıkmasına neden olur. İnsan kanserlerinde, *p53* genini kodlayan dizilerde nokta mutasyonlar yaygın olarak görülür (Soussi ve ark.1994). Bu tür mutasyonlar meme, akciğer, beyin, kolon, mide ve larinks kanserleri dahil olmak üzere tüm önemli gruplarda bulunur (Greenblatt ve ark. 1994). *p53* mutasyonlarının insan kanserlerinde en sık görülen genetik olay olduğu ve vakaların %50'den fazlasını oluşturduğu tahmin edilmektedir. Bildirilen nokta mutasyonlarının %90'ından fazlası, ekson 4 ve 10 arasında görülmektedir. Ayrıca, *p53* proteininin DNA bağlanma alanında lokalizedir (Soussi 2000).

2.3.6. *NF-κB*

Nükleer faktör κB (*NF-κB*) çok çeşitli biyolojik yanıtların düzenlenmesinde rol oynayan bir transkripsiyon faktör ailesidir. *NF-κB* bağışıklık yanıtların ve inflamasyonun düzenlenmesinde görev alır. Ayrıca, yapılan çalışmalar onkogeneizde önemli bir rolü olduğunu desteklemektedir (Dolcet et al 2005). *NF-κB* proliferasyon, göç ve apoptoz gibi kanserin gelişimi ve ilerlemesinde anahtar rol oynayan birçok süreçte yer alan genlerin ekspresyonunu düzenler. *NF-κB* hem mitokondriyal (intrinsik) hem de ölüm reseptörü (ektrinsik) yollarla hücre ölümünün baskılanmasında rol oynayan birkaç genin transkripsiyonunu aktive edebilir. *NF-κB* ölüm reseptörü apoptotik yoluna etkili proteinlerin ekspresyonunu artırabilir (Kreuz et al. 2001). *NF-κB* ayrıca apoptoz inhibitörlerinin (Deveraux et al. 1998) ve anti-apoptotik *Bcl-2* ailesinin bazı üyelerinin ekspresyonunu indükler (Chen et al. 2002). *NF-κB* anti-apoptotik genleri yukarı düzenleyerek *p53* seviyelerini düşürür ve *p53* ile indüklenen apoptozu inhibe eder. Böylece, *p53*'ün transkripsiyonel aktivitesine müdahale edebilir. *NF-κB* aktivasyonu, çok adımlı bir sinyal yolunun sonucudur. Bu yüzden, *NF-κB* sinyalleşme sürecinin farklı noktalarını etkileyebilmektedir.

2.4. Kanser Tedavisi

Kanser ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde ikinci, gelişmekte olan ülkeler de ise üçüncü ölüm nedenidir (Hassan et al. 2020). Günümüzde kanser tam ve etkin tedavisi olmayan ciddi bir halk sağlığı problemidir. Kanser tedavi seçenekleri cerrahi rezeksiyon, kemoterapi, radyoterapi, fotodinamik tedavi ve immünoterapi olabilmektedir (Domingues et al. 2018).

Kanser immünoterapisi, kanserle savaşmak için bireyin doğal bağışıklık sistemini kullanan kanser tedavisidir. Kanser immünoterapi tedavisi alan birçok kanser hastası iyi bir prognoz göstermektedir. Kimerik antijen reseptörü (CAR) ile tasarlanmış T hücreleri (CAR-T) kanser immünoterapisinde etkili bir tedavidir. T hücreleri hastanın lökositlerinden ayrılır, spesifik CAR eklenerek belirli kanser hücresi antijenleri hedeflenir. Böylece tümör seçiciliği ve eliminasyonu sağlanır (Jo et al. 2021).

Antikanser ilaçların etkin kullanımı ve koruma özellikleriyle hayatta kalma oranları artmış olsa da birçok kanser türünün hala etkili bir tedavisi yoktur. Kanser tedavisinde metalo-ilaçlar önemli bileşikler haline gelmiştir ve dünya çapında birçok tümöre karşı kullanılmaktadır. Bu tür kompleksler ciddi yan etkilerin ortaya çıkma olasılığını azaltmanın yanı sıra ilaç direncini engelleyebilir. Geniş bir kanser yelpazesinin klinik tedavisinde sisplatin, karboplatin ve oksaliplatin yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, önemli toksisiteleri ve hem doğal hem de edinilmiş ilaç direnci nedeniyle bu platin bazlı ilaçların kullanımı sınırlıdır (Hassan ve ark. 2020).

Antikanser ilaçları arasında Doksorubisin, Vinkristin, Daunorubisin ve Paklitaksel gibi yaygın olarak kullanılan doğal ilaçlar bulunur (Yuan ve ark. 2017). Günümüzde akciğer kanseri için klinik seçenekler arasında cerrahi işlem, radyoterapi, kemoterapi ve hedefe yönelik ilaçlar bulunmaktadır (Huang ve ark. 2017). Gefitinib ve Gemcitabine akciğer kanseri tedavisinde kullanılan standart kontrol ilaçlarıdır (Gökalp 2020).

Meme kanseri tedavisinde cerrahi rezeksiyon ve radyoterapi klasik tedavi yöntemleridir. Abemaciclib, Palbociclib, Ribociclib, Olaparib, Talazoparib, Trastuzumab-Emtansine meme kanseri tedavisinde kullanılan ilaçlardır (Waks ve Winer 2019). Melanoma kemoterapi tedavisinde, Cobimetinib, Dabrafenib, Ipilimumab, Nivolumab, Trametinib, Vemurafenib kullanılır (Naves ve ark. 2017). Kemoterapide Dakarbazin, Temozolomid, Cisplatin ve Paklitaksel yaygın olarak kullanılan antikanser ilaçlarıdır (Mouawad ve ark. 2010). Bunlar lökopeni, hepatik ve böbrek fonksiyon bozuklukları, bulantı ve kusma gibi çeşitli yan etkilere neden olur (Zhang ve ark. 2015). Bu tür yan etkilerin bitkisel esansiyel yağlar, fitokimyasallar veya düşük moleküler ağırlıklı terpenoidler gibi toksik olmayan ajanlarla kombine kullanımlarıyla en aza indirilebileceği bildirilmektedir (Zhang ve ark. 2015, Eid ve ark. 2012).

Bitkisel kaynaklı ürünler sentetik ilaçlara göre daha az yan etkiye sahiptir. Birçok antikanser ilaç bitkilerden elde edilmekte veya kökenleri bitkilere dayanmaktadır. Bitkisel kökenli olan esansiyel yağlar, tıpta ve tamamlayıcı tedavide kullanılan değerli bitkisel doğal ürünlerdendir (Elbe ve ark. 2020).

Günümüzde son yirmi yılda cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi yaklaşımlarında büyük ilerlemeler kaydedilmiş olmasına rağmen, kanser hala insanlığın önündeki en ciddi tehditlerden biridir (Fangjun ve Zhijia 2018).

Monoterpenlerin hem karsinogenezin başlangıcında hem de progresyon aşamalarında karsinojenez sürecini önlediği, çok sayıda çeşitli hücrel ve moleküler etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Sobral ve ark. 2014). Monoterpenlerin erken ve ileri evre kanserlerin tedavisinde etkili olabileceği bildirilmektedir. Günümüzde antikanserojen ilaçların %70'den fazlasının doğal ürünlerden türetildiği bilinmektedir (Tan ve ark. 2006). Bugün antikanser özelliklere sahip olduğu bilinen en az 250.000 bitki türü vardır. Doğadan elde edilen birçok molekül tedavide olumlu sonuçlar verirken, hala araştırmacılar tarafından ayrıntılı olarak çalışılmayı bekleyen çok sayıda molekül vardır. En önemli ajanlardan olan bitkisel fitokimyasalların çeşitli kanser türlerine karşı tedavide etkili olabileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır (Mukherjee ve ark. 2001).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda 25.12.2018-15.01.2021 tarihleri arasında yapıldı. Çalışmada kullanılan fitokimyasallar [Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen (Sigma-Aldrich, ABD)] ticari olarak temin edildi. Deneylerde üç farklı kanser hücre hattı [MCF-7 (meme kanseri), A-549 (akciğer kanseri) ve A-2058 (melanoma)] ile Vero (Afrika yeşil maymun böbrek hücre hattı) hücre hattı üzerinde gerçekleştirildi.

3.1. Fitokimyasallar

Çalışmada ticari olarak temin edilen fitokimyasallar [(Alfa-Pinen (SHBK3116, Sigma-Aldrich, ABD), Gama-Terpinen (BCB24753, Sigma-Aldrich, ABD) ve P-Cymen (MKCG5957, Sigma-Aldrich, ABD)] kullanıldı. Fitokimyasalların besiyeri içinde çözülmesi için solvent olarak dimetil sülfoksit (DMSO, Merck, KGaA, Almanya) kullanıldı. Deneylerde standart ilaç olarak Pakliteksel (Bristol-Myers) ve Dakarbazin (Koçak, Farma) seçildi.

3.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmada sağlıklı hücre hattı olarak Vero (Afrika yeşil maymun hücre hattı) hücre hattı ve A-549 (akciğer karsinomu hücreleri), MCF-7 (insan meme kanseri) ve A-2058 (insan melanoma hücreleri) olmak üzere üç farklı kanser hücre hattı kullanıldı. Fitokimyasalların sağlıklı hücre hatlarında toksik olmayan konsantrasyonlarının belirlenmesi Vero hücre hattında gerçekleştirildi.

Kültür çalışmalarında hücre kültürü üretme besiyeri olarak içerisinde %10 oranında fetal dana serumu (FBS), 10 mM HEPES, 4mM glutaminli 100 IU/ml penisilin/streptomisin ihtiva eden RPMI-1640 hücre üretme besiyeri kullanıldı. Hücre hatlarının kültivasyonunda inkübasyon 37 °C ve %5 CO₂ bulunduran inkübatörde gerçekleştirildi. Hücre çoğaltma ve

üretim deneylerinde hücre yoğunluğu 1×10^6 hücre/ml, aktivite çalışmaları için ise hücre konsantrasyonu 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde ayarlanarak gerçekleştirildi.

İdame çalışmalarında hücrelerin inkübasyonu kültür kabı yüzeyini kaplayıncaya kadar sürdürüldü. Hücrelerin çoğaltılması sırasında besiyerlerinin pH'ında asidite tespit edildiğinde kültür besiyeri değişimi yapıldı. Kültür kabı yüzeyini kaplayan hücreler kültür kabı yüzeyinden %0.25'lik Versen-Tripsin solüsyonu ile kaldırılarak 50 ml'lik santrifüj tüplerine alındı. Tüpler soğutmalı santrifüjde 1500 rpm'de 15 dk. santrifüj edilerek toplandı. Hücre canlılığı ve sayısı hemositometre ile tripan mavisi boyasıyla boyanarak gerçekleştirildi.

3.2.1. Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Hücre canlılığı, tripan mavisi boyası ile tespit edildi. Bu yöntemde temel prensip Tripan mavisi boyasının ölü hücrelerin membran bütünlüklerinin bozulması nedeniyle boyanın ölü hücrelerin içine girmeleri sonucu boyanmaları ile tespit edilmeleri sistemine dayanmaktadır. Kültürlerin pasajları sırasında tripan mavisi ile muamele edilen hücrelerin mikroskopik incelemesinde boya alan (mavi boyanan) hücreler ölü olarak, boya almayan (maviye boyanmamış olan) hücreler ise canlı olarak tespit edildi. %1'lik tripan mavisi boyası PBS çözeltisi içinde hazırlandı. %0.25'lik Versen-Tripsin solüsyonu ile kültür kaplarından toplanan hücreler 1:1 oranında tripan mavisi ve hücre süspansiyonu olacak şekilde boyandı. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilen karışım mikroskopta incelenerek canlılık tespiti yapıldı. Hemositometre (Thoma lamı) ile hücre sayımı gerçekleştirildi.

3.2.2. DMSO'nun Non-Toksik Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Çalışmada kimyasal fitokimyasal bileşiklerin besiyerinde çözülmesi amacıyla dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma, MI, USA) kullanılmıştır. DMSO'nun hücreler üzerindeki non-toksik konsantrasyonunu belirlemek için 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde mikropklara farklı konsantrasyonlarda Vero hücreleri inoküle edildi. Herbir dilüsyon 4 kuyucukta ayrı ayrı çalışıldı. Mikropkların kuyucuklarına DMSO'nun değişik

konsantrasyonları (8%, 4%, 2%, 1%, 0.5%) eklenerek 96 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonunda kontrol grubu (içerisinde DMSO bulunmayan) hücreleri ile içinde DMSO'nun farklı konsantrasyonunu bulunduran kültürlerdeki hücreler morfolojik değerlendirmelerin yanında kültür kabı yüzeyinden toplandı, tripan mavisi boyasıyla boyandıktan sonra hücre sayımları yapılarak DMSO'nun hücre canlılığı üzerindeki etkileri değerlendirildi.

3.2.3. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Yöntemi

MTT yöntemi ile kültive edilen canlı hücreler kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam mitokondrianın MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır (McGahon ve ark. 1995). İlk olarak Mosmann tarafından tanımlanan ve daha sonra Alley ve arkadaşları (1988) tarafından geliştirilen 3-(4,5-dimetil tiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) yöntemi hücre canlılığının belirlenmesi için sıkça kullanılan pratik bir yöntemdir. MTT, hücrelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondriye bağlı bir reaksiyon ile renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenen bir maddedir (Mosmann ve ark. 1983). Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınır ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile korelasyon göstermektedir.

Çalışmada Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in farklı konsantrasyonlarıyla (2,5; 1,25; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0312; 0,0156; 0,0078; 0,0039 µl /ml) muamele edilen MCF-7, A-549 ve A-2058 hücre kültürlerinde hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri MTT hücre proliferasyon yöntemiyle araştırıldı.

Ayrıca yukarıda hücre kültürünün hazırlanması alt başlığında açıklandığı gibi negatif ve pozitif kontroller de MTT yönteminde birlikte çalışılarak kıyaslandı. Kültürlere ilaç ve fitokimyasallar eklendikten sonra 96 saate kadar 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Sonra her kuyucuğa 10 µl MTT eklendi ve pleytler 4 saat için aynı şartlar altında inkübe edilerek absorbans ölçümleri spektrofotometre 570 nm de yapıldı. Proliferasyon fitokimyasallarla muamele edilen kuyucuklardaki hücrelerin kontrol grubu

hücrelerine oranı olarak ifade edildi. IC₅₀ (Infectious Concentrations) değerleri SPSS programı (SPSS.Inc, Chicago) kullanılarak hesaplandı.

3.3. Aktivite Çalışmaları

3.3.1. Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

Hücre kültüründe proliferasyon deneyleri 12, 24, 48 ve 96 kuyucuklu düz tabanlı mikropiplaklarda gerçekleştirildi. Deneyler kuyucuklara içerisinde %10 oranında fetal dana serumu bulunan RPMI-1640 besiyeri ile ml'sinde 1×10^5 hücre olacak şekilde hücre inoküle edilerek gerçekleştirildi.

Deneylerde öncelikle fitokimyasalların sağlıklı hücreler üzerinde non-toksik konsantrasyonlarının belirlenmesi için Vero hücre hattı kullanıldı. Fitokimyasal maddelerin 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.6; 0.8; 1; 1.5; 2; 2.5; 5 ve 10 µg/ml düzeyindeki konsantrasyonları DMSO ile çözülerek hazırlandı. Daha sonra her bir dilüsyon 4 hücre kuyucukta olacak şekilde Vero hücreleri ile kültive edildi. Fitokimyasalların hücre üremesi üzerindeki etkileri gerek invert mikroskopla günlük olarak morfolojik açıdan ve gerekse de inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığı açısından değerlendirmelere tabii tutularak gerçekleştirildi. Inkübasyon süresi sonunda monolayer hücreler %0.25'lik Versen-tripsin solüsyonu toplanarak santrifüj tüplerine alındı. Hücreler soğutmalı santrifüjde (+4 °C'de) 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek toplandı. Çalışmada her bir etken madde 4 kültür kabında 3 kez tekrar edilerek çalışıldı.

3.3.2. Proliferasyon Deneyleri

Antineoplastik aktivite çalışmaları belirlenen bu non-toksik konsantrasyonlar dahilinde gerçekleştirildi. Fitokimyasal bileşiklerin kanser hücre hatları (MCF-7, A-549 ve A-2058 hücre hatları) üzerinde antiproliferatif etkinliklerinin varlığını araştırmak için hücre konsantrasyonu 1×10^5 /ml olacak şekilde ayarlanarak hazırlandı. Hazırlanan bu hücre kültürlerinde hücrelerin adezyonu için kültür kabına inokülasyonunu takiben 6 saat 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Hücrelerin kültür kabı yüzeyine adezyonu için 6

saatlik inkübasyondan sonra fitokimyasalların farklı konsantrasyonlarını (2,5; 1,25; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0312; 0,0156; 0,0078; 0,0039 µl/ml) içeren miktarları kültür plaklarının her kuyucuğuna (her bir dilüsyondan dört farklı kuyucuğa olmak üzere) eklenerek aktivite testleri gerçekleştirildi.

Kontrol grubu olarak, içerisinde sadece solvent olarak kullanılan miktarda DMSO ihtiva eden kültürler deney grubuyla aynı anda kültive edildi. Ayrıca, negatif kontrol olarak içerisinde kimyasal madde bulunmayan kültürler ve pozitif kontrol olarak da Dakarbazin ve Paklitaksel'in (Koçak Farma, Türkiye) farklı konsantrasyonlarını (0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 ve 100 µM) içeren hücre kültürleri kullanıldı. Tüm deneyler üç tekrarlı olarak 4 kez tekrarlanarak gerçekleştirildi.

İnkübasyondan sonra adzeyonunu kaybeden hücreler santrifüj tüplerine alındı. İnkübasyon sonunda adezyonunu sürdüren hücreler ise kültür kabı yüzeyinden %1'lik Versen-tripsin solüsyonu ile muamele edilerek santrifüj tüplerine alındı. Hücreler soğutmalı santrifüjde (+4 °C'de) 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek toplandı ve hücre canlılığı tespiti yapıldı. Ayrıca toplanan hücrelerde *p53*, *Bax*, *Bcl-2*, *Bcl-xL* ve *kaspaz-3* mRNA ekspresyon düzeyleri real-time PCR yöntemiyle gerçekleştirildi.

3.3.3. Kombinasyon Analizi

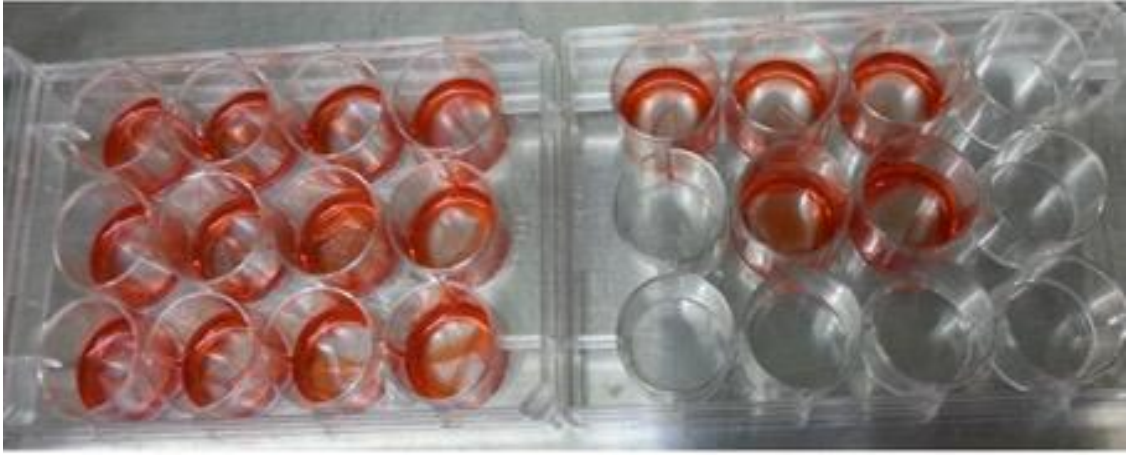
İlaç etkileşimlerini değerlendirmek için Chou-Talalay yöntemi kullanıldı (Chou ve Talalay 1984). Kombinasyon analizi için her bir fitokimyasal maddeden bir ilaç dozu belirlendi. Alfa-Pinen (0.019 µg), Gama-Terpinen (0.039 µg) ve P-Cymen (0.312 µg). Sonra ardından, bir kombinasyon doz etkisi (Fitokimyasal Alfa-Pinen, fitokimyasal Gama-Terpinen) sabit kombinasyon oranında [(IC₅₀) 1/(IC₅₀) 2] belirlendi. Kombinasyon indeksi (CI) değerleri IC₅₀ konsantrasyonunda [(fraksiyon etkisi (Fe) = 0.5)] belirlendi. Kombinasyon indeksi değerleri (CI) CalcuSyn yazılımı (Biosoft, UK) kullanılarak hesaplandı. CI=1: Additif etki, CI<1 sinerjistik etki (sinerjizm) ve CI>1 antagonistik etki (antagonizm) olarak değerlendirildi.

3.4. Hücrelerde Morfolojik Değişimlerin Tespiti

Fitokimyasalların kanser hücreleri üzerinde etkinliklerinin morfolojik değerlendirilmesi için uygulanan yöntemlerden biri Akridin oranj boyama yöntemi idi. Morfolojik değişimlerin gösterilmesi için 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde hazırlanmış hücre süspansiyonları içerisine steril lamellerin yerleştirildiği cam petri kaplarına konarak ve belirlenen konsantrasyonlardaki fitokimyasal bileşikler hücre besiyerlerine eklenerek 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler 3 kez 2 dakika süreyle PBS solüsyonu ile yıkanarak son yıkama işleminden sonra cam petrilere 1 ml %70 etanol eklendi ve 5 dakika oda ısısında tutuldu. Bir seri yıkama işleminden sonra 2 dakika PBS’de bekletilen hücreler PBS içerisinde seyreltilen 200 µl akridin oranj (100 µg/ml) ve etidyum bromür (100 µg/ml) karışımı ile oda ısısında 5 dakika inkübe edildi. Preparat haline getirilen hücreler immüno-floresan mikroskop altında incelenerek değerlendirildi. Örnek başına üç yüz hücre sayılarak canlı, apoptotik veya nekrotik olarak değerlendirmeler rapor edildi (Geng ve ark. 2003).

Daha sonra preparattan, canlı hücreler (yeşil boyanmış kromatin), apoptotik hücreler (kondans ve fragmante yeşil boyanmış kromatin), normal çekirdekli ölü hücreler (nekrotik hücreler homojen turuncu boyanmış kromatin), apoptotik çekirdekli ölü hücrelerin (kondanse ve fragmante turuncu boyanmış kromatin), sayımı gerçekleştirilerek aşağıdaki formüle göre apoptotik indeks hesaplandı (Akalın ve ark. 2005).

Apoptotik indeks = $\frac{\text{Apoptotik Hücre Sayısı} + \text{Apoptotik Çekirdekli Ölü Hücre Sayısı}}{\text{Canlı Hücre Sayısı} + \text{Apoptotik Hücre Sayısı} + \text{Normal Çekirdekli Ölü Hücre Sayısı} + \text{Apoptotik Çekirdekli Ölü Hücre Sayısı}} \times 100$



Şekil 3. 1. Akridin Oranj- Etidyum Bromid Boyama yöntemiyle hücrelerin boyanması.

3.4.1. Hematoksilen Eosin Boyama

Morfolojik hücre analizi için uygulanan yöntemlerden biri de Hematoksilen-Eosin boyama yöntemi idi. Bu yöntemde de 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde hazırlanmış hücre süspansiyonları içerisine steril lamellerin yerleştirildiği cam petri kaplarına konarak ve belirlenen konsantrasyonlardaki fitokimyasal bileşikler hücre besiyerlerine eklenerek 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. Hücreler fitokimyasalların farklı konsantrasyonlarının varlığında ve yokluğunda değerlendirildi. İnkübasyon sonunda hematoksilen boyasında 1 dakika bekletildikten sonra preparatlar distile su ile yıkandı. Daha sonra eosin boyada 20 saniye süreyle muamele edildi ve yıkama işlemi tekrar edildi. Sırasıyla %95 alkol ve %100 alkolde 10 saniye tutulduktan sonra 20 saniye ksilol ile muamele edildi. Boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile incelendi (Topham ve Taylor 2013).

3.5. Akım Sitometri ile Hücre Siklusu Analizi ve DNA Analizi

Fitokimyasallarla muamele edilen hücrelerin yüzeyinde porlar açılmasını sağlayan DNA-prep solüsyonu hücreler üzerine eklenerek vorteklendi. Hücrelerde DNA içeriği Duran ve ark’larının tarif ettiğini gibi gerçekleştirildi (Duran ve ark. 2001). Analiz sonucu hücrelerin G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki hücre yüzdeleri belirlendi. Kontrol grubu hücreleri ile ilaçların (fitokimyasallar ve standart ilaçlar) IC₅₀ konsantrasyonlarıyla muamele edilmiş hücrelerin döngü analizleri için ilaç ve fitokimyasallarla muamele edilen hücre kültürlerinin inkübasyonları sonunda tripsin yardımı ile süspansiyon halinde toplanan

hücreler 2 kez PBS ile 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Sonra hücre konsantrasyonu 3×10^6 hücre/ml olacak şekilde Annexin-V bağlanma çözeltisi içinde süspanse edilerek hazırlanan hücre süspansiyonundan 100 µl alınarak tüplere aktarıldı ve her bir tüpe, 5 µl Annexin-V FITC + 10 µl propidyum iyodür karışımı eklendi. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildikten sonra her bir tüpe 400 µl Annexin-V bağlanma çözeltisi ilave edilerek hücrelerin akım sitometrisi ile hücre siklusu analizleri gerçekleştirildi (Vaz ve ark. 2012, Nunez 2001).

3.6. *Kaspaz-3* Aktivitesi Miktar Tayini

Kaspaz 3 aktivitesi testi hücre lizatından salınan renkli p-NA molekülünün Ac-DEVD-p-NA substratına bağlanması esasına dayanan bir yöntemdir. *Kaspaz-3* aktivitesi, *kaspaz-3* kolorimetrik test kiti (Human Caspase 3 ELISA Kit (Bioassay Technology Laboratory, China) kullanılarak hesaplandı. Çalışmada A-549 ve A-2058 hücreleri üzerinde fitokimyasalların (Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen) çeşitli konsantrasyonları ile bilinen bir apoptotik ajan olan Paklitaksel (10 µM) ve (10 µM) Dakarbazin ile kıyaslamalı olarak araştırıldı. Kanser hücre dizileri ve kontrol grubu hücreleri fitokimyasallar ile muamele edildikten sonra toplanarak hücreler PBS ile yıkandıktan sonra 15 dakika lizis tamponuyla (50 mM HEPES pH7.4, 5 mM CHAPS, 5 mM DTT) resüspanse edildi. Lizis tamponunun konsantrasyonu her 100 µl'de 1×10^7 hücre olacak şekilde ayarlandı. Lize edilen hücreler +4°C'de $16.000 \times g$ 'de 15 dakika santrifüj edildi. Lizat protein konsantrasyonu Bradford yöntemi kullanılarak tespit edildi. Her örnekten eşit miktarda protein (yaklaşık 20 µg) test bufferı (20 mM HEPES, pH7.4, 0.1% CHAPS, 5 mM DTT, 2 mM EDTA) içeren kuyucuklara ilave edilerek üzerine 10 µl Ac-DEVD-p-NA (20 mM) eklendi. Toplam hacim her kuyucukta 100 µl'ye tamamlandı. *Kaspaz-3* aktivitesi ölçümleri spektrofotometrede 405 nm'de dalga boyunda okunarak hesaplandı. Yöntemde açığa çıkan Ac-DEVD-pNA miktarı ile aynı anda *kaspaz-3* aktivitesi üzerinde bir *kaspaz-3* inhibitörü olan Ac-DEVD-CHO'nun etkisi araştırıldı. Sonra 10 µl inhibitör Ac-DEVD-CHO (2 mM) test buffer içeren kuyucuğa eklenerek takiben hücre lizatı üzerine 10 µl Ac-DEVD-pNA (20 mM) substratı eklendi.

3.7. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

3.7.1. RNA Ekstraksiyonu

Hücre kültürü çalışmaları 50 ml'lik kültür kaplarında gerçekleştirildi. Hücre üretme besiyeri olarak içerisinde %1 oranında FBS bulunan RPMI-1640 besiyeri kullanıldı. Sağlıklı hücre hattı Vero ve kanser hücre hatları (MCF-7, A-549 ve A-2058)'nda hücre yoğunluğu 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde ayarlandı. Alfa-Pinen (0.019 μ l/ml), Gama-Terpinen (0.078 μ l/ml) ve P-Cymen (0.312 μ l/ml) ile Paklitaksel (10 μ M) ve Dakarbazin (10 μ M) için önceden belirlenen proliferasyon konsantrasyonları üç tekrar halinde çalışıldı.

Aktivite çalışmalarından önce ve sonra tüm hücre kültürlerinden (insan meme (MCF-7), akciğer (A-549), melanoma (A-2058) tripsinizasyon solüsyonu ile her hücre dizisinden yaklaşık olarak 1×10^6 hücre, +4 °C'de 50 g'de santrifüj edilerek toplandı. Sonra High Pure RNA Tissue Kitleri kullanılarak total RNA ekstraksiyonları gerçekleştirildi. DNA kontaminasyonunu önlemek amacıyla ticari firma protokolüne uygun olarak deoksiribonükleaz I enzimi kullanılmıştır. Degrade olmuş RNA'yı ekarte edebilmek için ekstraksiyonu yapılan RNA agaroz jel elektroforezde yürütülerek kontrol edildi.

Aktivite çalışmalarından önce ve sonra tüm hücre kültürlerinden (insan meme (MCF-7), akciğer (A-549), melanoma (A-2058) tripsinizasyon solüsyonu ile her hücre dizisinden yaklaşık olarak 1×10^6 hücre, +4 °C'de 50 g'de santrifüj edilerek toplandı. Tüm hücre hatlarında aktivite çalışmaları sonucunda toplanan hücreler PCR çalışması yapılncaya dek derin dondurucuda (-86 °C'de) muhafaza edildi. RNA izolasyonu için örnekler -86 °C'den çıkarılarak 20 dakika oda sıcaklığında tutuldu. Total RNA izolasyonu TRIzol Reagent kit protokolüne göre yapıldı (Rio ve ark. 2010). Örnekler 15 dakika oda sıcaklığında tutulduktan sonra 250 μ l kloroform eklenerek 20 kez ters-düz edildi. Sonra 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra örnekler +4 °C'de 12.000 xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası steril, RNase-DNase içermeyen, 1.5 ml'lik ependorflara aqua fazdan 400 μ l alınarak aktarıldı. 500 μ l izopropil alkol ilavesinden sonra örnekler homonejize edilerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben örnekler +4 °C'de 12.000 xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dökülerek örneklere 500 μ l %70'lik etil alkol ilave edildi. Sonra örnekler +4 °C'de 7.500 xg'de 5 dakika santrifüj edildi (bu işlem iki kere tekrar edildi). Son olarak süpernatant dökülerek her bir örneğe 500 μ l %99'luk etil

alkol eklendi ve +4 °C’de 7.500 xg’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar dökülerek pelletler oda sıcaklığında kurumaları için 10-15 dakika tutuldu. Sonra örnekler pellet hacimlerine göre 30-100 µl nükleaz içermeyen distile su ile sulandırıldı. RNA’ların saflık ve konsantrasyonları nükleik asit ölçer (Merinton, SMA-1000 UV Spectrophotometer, China)’de kontrol edildi. Bu adıma ek olarak, rRNA alt üniteleri (28S ve 18S) kontrol etmek için %1’lik agaroz jel hazırlanarak 100 V’da 30 dakika süreyle yürütülerek kontrol edildi.

3.7.2. Komplementer DNA (cDNA) Hazırlanması

Olası genomik DNA kontaminasyonunu önlemek için DNA dijesyon işlemi kit (DNase I, RNase free, Thermo Scientific, USA) protokolüne göre gerçekleştirildi. Bu işlem sonrasında RNA örnekleri kit (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Thermo Fisher Scientific, USA) protokolüne göre cDNA’ya dönüştürüldü. Bu işlemde reaksiyon protokolü; 25 °C’de 10 dakikada, 37 °C’de 120 dakika ve 85 °C’de 5 dakika olarak ayarlandı. Reaksiyon sonrasında örnek hacimleri nükleaz içermeyen su ile 200 µl’ye tamamlandı.

3.7.3. RT-qPCR Uygulaması

Çalışmada cDNA sentezi işleminin ardından, *Bax*, *Bcl-xL*, *Bcl-2*, *Caps-3*, *NF-κB* ve *p53* genlerinin ekspresyon seviyeleri belirlendi. Hedef genin amplifikasyonu her örnekten 10 µl cDNA örneği kullanılarak gerçekleştirildi. RT-qPCR analizlerinde SYBR Green boyası içeren kit (Power SYBR® Green PCR Master, ThermoFisher Scientific, USA) kullanıldı. Reaksiyon protokolü: 95 °C’de 10 dakika, 95 °C’de 15 saniye, 60 °C’de 60 saniye olarak 40 döngü şeklinde ayarlanmıştır (Rotor Gene Q 5plex HRM, Qiagen, Germany). Her örnek dublike çalışıldı ve GAPDH geni referans gen olarak kullanıldı. Kullanılan primerlerin forward ve reverse sekansları Tablo 1’de verimştir.

Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan oligonükleotidler (Yang ve ark. 2013; Wang ve ark. 2018) .

Genler	Primer Sekansları (5'→3')	Ürün Büyükülüğü	Kaynak
<i>Bax</i>	TGGCAGCTGACATGTTTTCTGAC TCACCCAACCACCCTGGTCTT	195	Karaliotas ve ark. (2015)
<i>Bcl-xL</i>	TCCTTGTCTACGCTTTCCACG GGTCGCATT GTGGCCTTT	62	Olie ve ark. (2002)
<i>Bcl-2</i>	CATGTGTGTGGAGAGCGTCAA GCCGGTTCAGGTACTCAGTCA	83	Yang ve ark. (2013)
<i>Kaspaz-3</i>	ACAAATGGACCTGTTGACCTGA ACACCACTGTCTGTCTCAATGC	146	Wang ve ark. (2018)
<i>NF-κB</i>	AAAGACACATCCGGACCTCG TGTAAGAGTTCCCCTCCGGT	118	Designed by authors
<i>p53</i>	CCCATCCTCACCATCATCACAC GCACAAACACGCACCTCAAAG	80	Hoseinzadeh ve ark. 2019
<i>GAPDH</i>	TGCACCACCAACTGCTTAGC GGCATGGACTGTGGTCATGAG	87	Hruz ve ark. 2011

Bcl-2 gen bölgesi için; program ve döngü sayısı; 94 °C’de 5 dk. denatürasyondan sonra 35 siklus olmak üzere: 94 °C’de 5 dk. 95 °C’de 30 sn, 55 °C’de 30 sn, 72 °C’de 30 sn olacak şekilde ayarlandı. Son uzama ise 72 °C’de 10 dk. olarak uygulandı.

Bcl-X L gen bölgesi için; program ve döngü sayısı; 94 °C’de 5 dk. denatürasyondan sonra 35siklus olmak üzere: 94 °C’de 5 dk. 95 °C’de 45 sn, 56 °C’de 45 sn, 72 °C’de 30 sn olacak şekilde ayarlandı. Son uzama ise 72 °C’de 10 dk. olarak uygulandı.

NF-κB gen bölgesi için; program ve döngü sayısı; 94 °C’de 5 dk. denatürasyondan sonra 35 siklus olmak üzere PCR için ısı döngüsü: 94 °C’de 7 dk. 95 °C’de 40 sn, 60 °C’de 30 sn, 72 °C’de 30 sn olacak şekilde ayarlandı. Son uzama ise 72 °C’de 10 dk. olarak uygulandı.

p53 gen bölgesi için; program ve döngü sayısı; 94 °C’de 5 dk. denatürasyondan sonra 35 siklus olmak üzere PCR için ısı döngüsü: 94 °C’de 5 dk. 95 °C’de 30 sn, 55 °C’de 30 sn, 56 °C’de 30 sn olacak şekilde ayarlandı. Son uzama ise 72 °C’de 10 dk. olarak uygulandı.

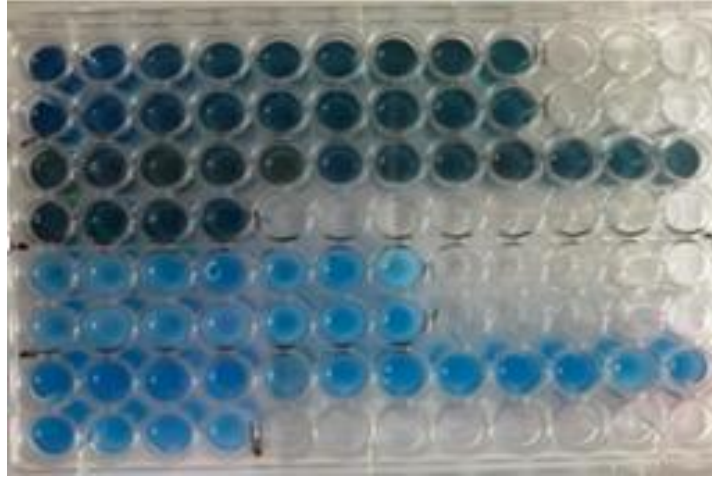
Kaspaz 3 gen bölgesi için; program ve döngü sayısı; 94 °C’de 5 dk. denatürasyondan sonra 35 siklus olmak üzere PCR için ısı döngüsü: 95 °C’de 5 dk. 95 °C’de 40 sn, 60 °C’de 40 sn, 72 °C’de 30 sn olacak şekilde ayarlandı. Son uzama ise 72 °C’de 10 dk. olarak uygulandı.

Bax gen bölgesi için; program ve döngü sayısı; 94 °C’de 5 dk. denatürasyondan sonra 35 siklus olmak üzere PCR için ısı döngüsü: 95 °C’de 5 dk. 95 °C’de 30 sn, 52 °C’de 40 sn, 72 °C’de 30 sn olacak şekilde ayarlandı. Son uzama ise 72 °C’de 10 dk. olarak uygulandı.

3.8. Western Blotlama Yöntemi

3.8.1. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini

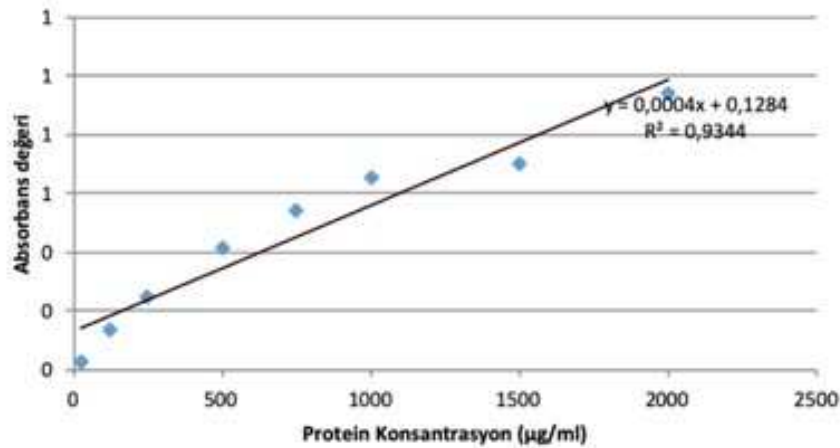
Çalışmada fitokimyasallar ve standart ilaçlara önceden belirlenen konsantrasyonlarda maruz bırakılan hücre hatlarından toplanan hücrelerde Bradford yöntemine göre protein tayini gerçekleştirildi. Çalışmada standart protein olarak BSA (Bovine Serum Albumin; Thermo scientific, ABD) kullanıldı. Distile su ile dilue edilen BSA’dan 500, 1000, 1500, 2000, 2500 µg/ml’lik standartlar hazırlandı. Bu amaçla 96 kuyucuklu düz tabanlı mikroyetkinin her bir kuyucuğuna 10 µl örnek ya da standart konuldu. Daha sonra üzerlerine 250 µl Bradford (Coomassie) (Thermo scientific, ABD) ayıracı eklendi. Blank (kör) olarak seçilen kuyucuğa ise sadece 250 µl Bradford (Coomassie) ayıracı eklendi. Standartlar ve örnekler 3 tekrarlı olarak çalışıldı.



Şekil 3. 2. Bradford Yöntemi ile protein tayini.

Hazırlanan mikroplyetler 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Absorbans ölçümleri ELISA okuyucuda (Multiskan GO, Thermo scientific, ABD) 595 nm dalga boyunda spektrofotometre gerçekleştirildi.

Her bir kültür örneğinden toplanan hücrelerden izole edilen protein konsantrasyonu elde edilen standart eğrisi ile hesaplandı (Şekil 3). Laemmli solüsyonuna 1:10 oranında beta merkapt etanol (900 µl Laemmli buffer + 100 µl beta merkapt etanol) eklendi. Her örnekte 30 µg protein olacak şekilde miktar hesaplandı.



Şekil 3. 3. Bradford yöntemiyle protein konsantrasyonunun belirlenmesi.

Tüplere izole edilen protein ve 4xLaemmli buffer (proteinin 1:3 oranında) eklendi ve toplam hacim TBS (Tris Tamponlu Salin) ile 32 µl'ye tamamlandı.

Çizelge 3. 2 : Bradford yönteminde kullanılan solüsyonların oranları.

Örnek	4x Laemmli Buffer	TBS
17.3 µl	5.8 µl	8.9 µl
12.7 µl	4.2 µl	15.1 µl
16.4 µl	5,5 µl	10.1 µl
24 µl	8 µl	0 µl
12 µl	4 µl	16 µl
17.5 µl	5.8 µl	8.7 µl

Hazırlanan örnekler 95 °C'de 5 dakika denatüre edildi.

3.8.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Poliakrilamid jeller %10'luk konsantrasyonda kullanıldı (her %10'luk “resolving” jel (10 ml'lik) 3.3 ml %30 acrylamide, 2.5 mL 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), 100 µl %10'luk SDS ve 4.1 ml olacak şekilde). Jeller elektofrez tanklarına yerleştirilerek, “running buffer” (%10 10XSDS, %90 distile su) içinde numunelerin yüklenmesinden önce elektrik akımına (200 V) 10 dakika boyunca maruz bırakıldı (ön yürütme: pre-run). Ön yürütme işleminden sonra, tankın içine “running buffer” ilavesi yapıldı, önce 10-20 µl hacminde Rainbow marker ilk kuyucuğa sonra örnekler dikkatlice jelin kuyucuklarına pipetlendi. Jeldeki proteinler 100 V'luk akımın altında yaklaşık bir saat kadar (bromophenol-blue boyasının jelde görünmez olana kadar) yürütüldü.

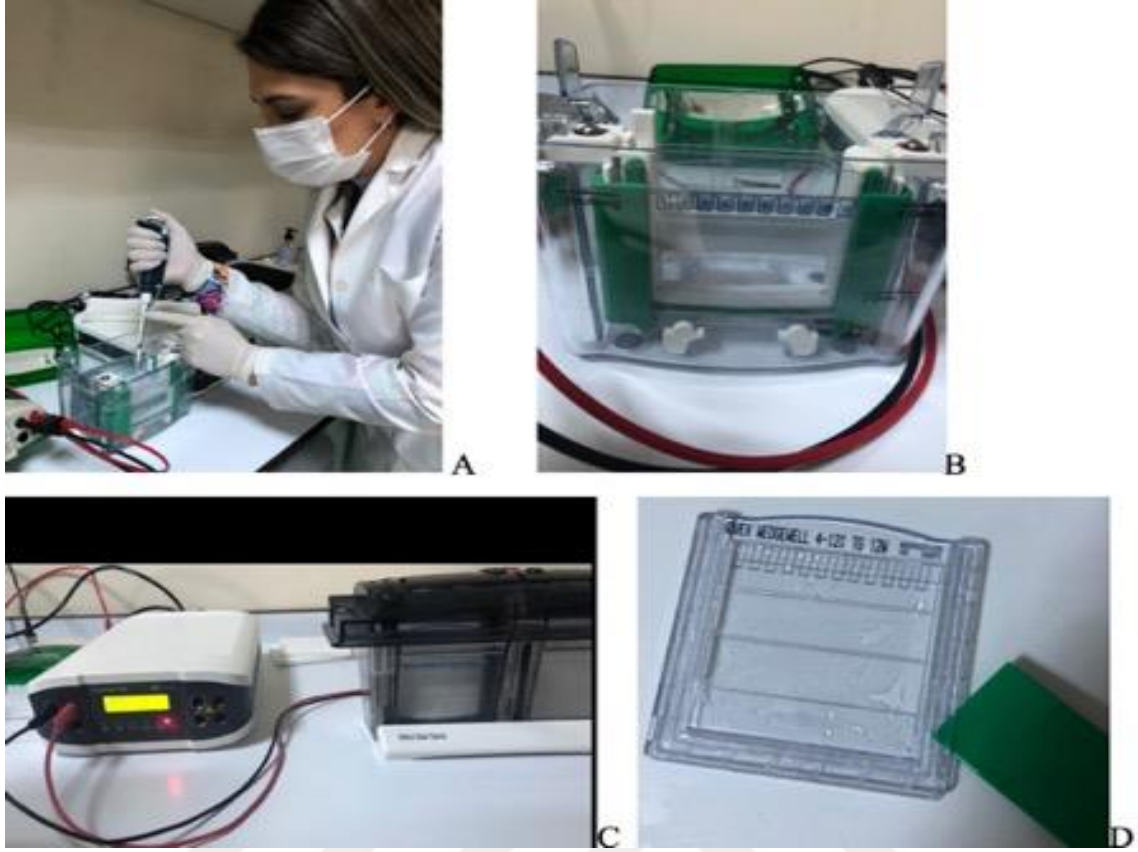
3.8.3. Protein Ekspresyonunun Western Blot yöntemiyle gösterilmesi

Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in kanser hücreleri üzerindeki pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein düzeylerini modüle edip etmediği değerlendirildi. Bu amaçla Vero, MCF-7, A-549 ve A-2058 hücreleri farklı konsantrasyonlarda

fitokimyasallarla 72 saat muamele edildi. İşlem sonunda tüm hücre protein lizatı RIPA buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 7.4, 1.5 M NaCl, 2.5% deoxycholic acid, 10% NP-40, 10 mM EDTA) kullanarak standart protokole göre hazırlandı. Her bir örnekten 30 µg protein, %10'luk poliakrilamid jel elektroforezine yüklenerek ve 2 saat süresince yürütüldü. Daha sonra jel üzerindeki proteinler PVDF membrana (Bio-Rad, Munich, Germany) transfer edildi. Membranlar +4 °C'de bir gece blocking buffer içinde [10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, 0.5% NP-40, 0.5% BSA, 2.5% dry milk powder] bloke edildi. Daha sonra bir mouse anti-human *Bcl-2* antibody (Chemicon International, Temecula, CA) ile +4 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Membran iyice yıkandıktan sonra uygun bir peroxidase-conjugated sekonder antikor ile (Goat anti-rabbit HRP secondary antibody, R-05072-500, Advansta, ABD) ile +4 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnternal kontrol olarak β-actin proteini kullanıldı. Oluşan protein bantları ImageJ Software (NIH, Bethesda, MA, USA) ile denstometrik olarak ölçülerek bant yoğunlukları ilgili aktin bant yoğunlukları normalize edilerek değerlendirildi. Bu işlemler *Bcl-2*, *NF-κB*, *p53*, *Bax* genlerinin sorumlu olduğu protein seviyelerinin belirlenmesi için ilgili anti-human antikorlar kullanarak bu genlerin sorumlu olduğu protein düzeyleri Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen ile muamele öncesi ve sonrası western blot yöntemi kullanılarak belirlendi.

3.8.4. Yürütme (Running)

Protein ekstraksiyonunu takiben jel dikey elektroforez tankına yerleştirildi. Tanka 1×Tris-glycine SDS (sodyum Dodesil Sülfat) “running buffer” (%10 10X SDS, %90 dH₂O) konuldu. Jelin tarağı çıkarıldıktan sonra kuyucuklara 30 µl örnek ve 10 µl protein ladder yüklendi. Jel 150 V'da 60 dakika yürütüldü. Süre sonunda kaset söküldü ve camlar ayrılarak jel çıkarıldı.



Şekil 3. 4. Western Blotlama yönteminde jele örneklerin yüklenmesi ve yürütülmesi. A: Jele örneklerin yüklenmesi, B ve C: Örneklerin yürütülmesi, D: Yürütme işlemi sonrası jelin sistemden çıkarılması.

3.8.5. İmmun Blotting (Blotlama)

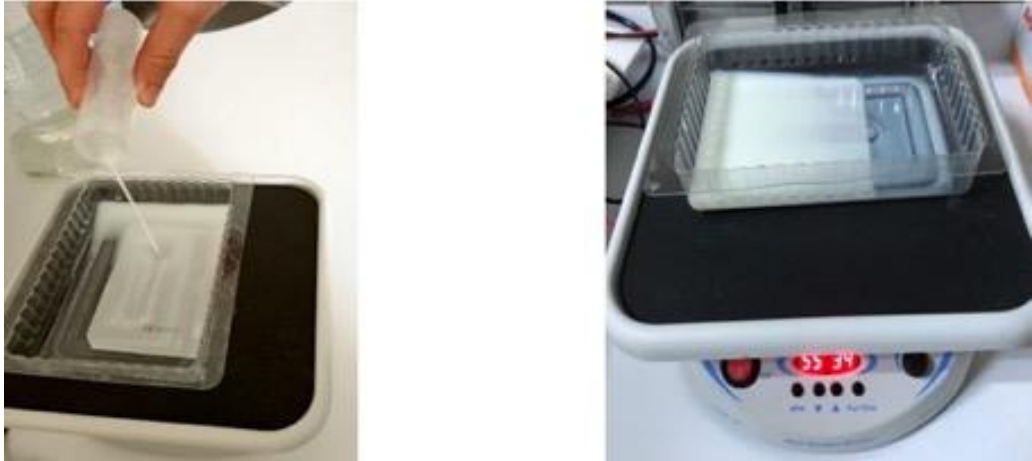
Örneklerin yürütülme işlemi tamamlandıktan sonra jel çıkarılarak immuno-blotlama aşamasına geçildi. Blotlama aşamasında 0.2 µm PVDF membranlar kullanıldı. Öncelikle membranlar 2-3 dakika (şeffaflaşana kadar) metanol içerisinde tutuldu. Membran, transfer buffer (%10 10xTransfer Buffer %90 dH₂O) ile yıkandıktan sonra proteinlerin jelden PVDF membrana aktarılması semi-dry transfer yöntemiyle gerçekleştirildi. Beş 3 MM Whatman kağıdı, jel, PVDF membran, 5 adet 3MM Whatman kağıdı olacak şekilde blotlama cihazına yerleştirildi. Whatman kağıtları ve membranlar transfer başlamadan önce transfer buffer içinde tutularak ısıtıldı (bu aşamada yerleştirilirken hava kabarcığının olmamasına dikkat edildi). Transfer işlemi 1.3 A akım altında 10 dakika süre ile gerçekleştirildi. Transferden sonra jel Poncue S (Bio-Rad, Dubai) ile boyanarak işlemin başarısı gözlemlendi. Transfer işleminin başarılı olduğunun görülmesiyle sonra membranlar

TBS-T (%10 10XTBS, %90 dH₂O ve %0.1'lik Tween-20) solüsyonu içerisinde alınarak oda sıcaklığında 5 dakika çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Daha sonra membran 3 kez yıkama işlemine tabii tutuldu.

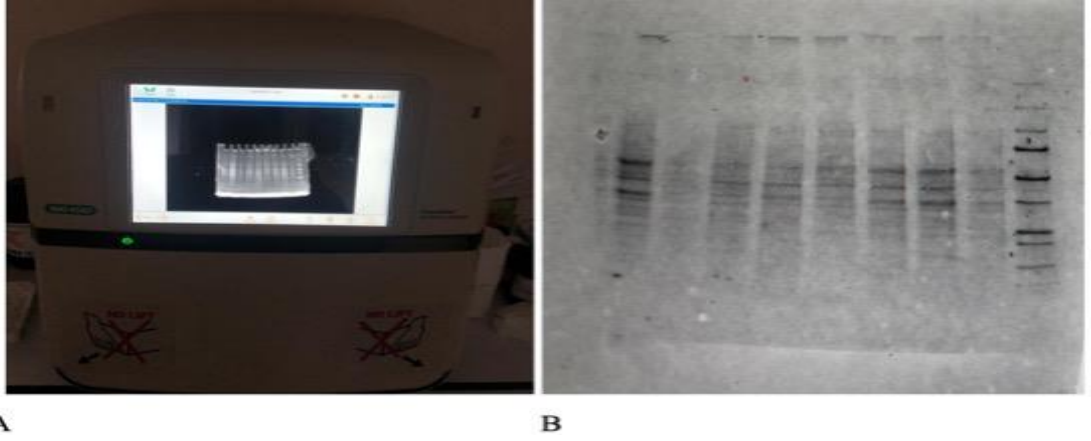


Şekil 3. 5. Western -blotlama yönteminde jelin membrana transfer işlemleri.

Membranların bloklama işlemi için %7 yağsız süt tozu içeren 50 ml TBS-T hazırlandı. Membranın üzerine eklendi ve çalkalayıcıda oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Daha sonra TBS-T ile 3x5 dakika muamele edildi.



Şekil 3. 6. Bloklama işlemi.

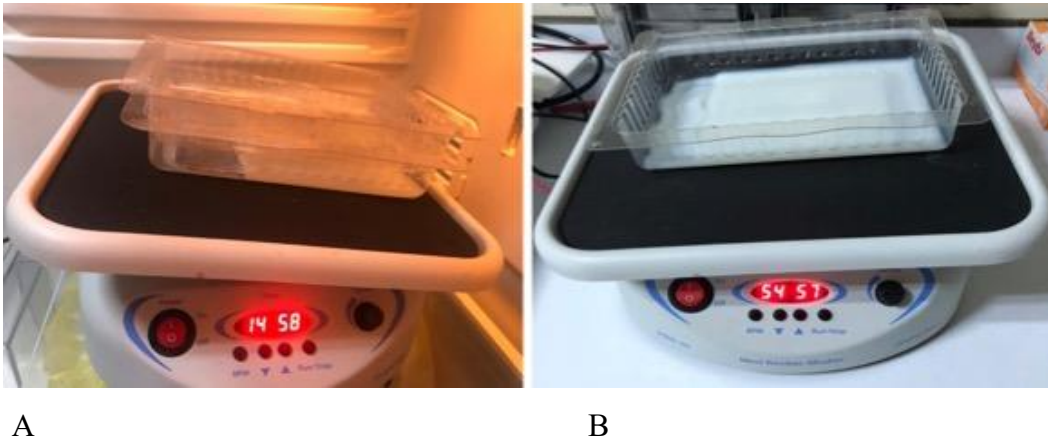


Şekil 3. 7. A: Blotlama işleminden sonra jelin, B: Boyama işleminden sonra membranın görüntülenmesi.

Membran substrat ile boyandı. İçerisinde 1ml peroxide solüsyonu ve 1 ml Luminol Enhancer Solüsyonu ile karıştırıldı (5 dakika süreyle mikropipet yardımıyla membranın her tarafına uygulandı). Görüntüleme ünitesinde bantların fotoğrafları alınarak yoğunluk değerlendirmeleri yapıldı.

3.8.6. Normalizasyon

Bu işlem için 20 ml TBS-T, %5 yağsız süt tozu ile karıştırıldı ve 10 µl Beta-aktin poliklonal antikor eklendi. Çalkalayıcıda +4 °C’de bir gece (12-16 saat) inkübasyona bırakıldı.



Şekil 3. 8. Normalizasyon işlemlerinin gerçekleştirilmesi.

İnkübasyon sonunda karışım döküldü ve membran TBS-T ile 5 dakika yıkandı. Sekonder antikor olarak goat anti-rabbit IgG HRP (R-05072-500, Advansta, ABD) kullanıldı. Sonra 18 ml TBS-T, %6 yağsız süt tozu ve 6 µl anti-rabbit sekonder antikor ile karıştırıldı. Çalkalayıcıda oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi ve TBS-T ile 5 dakika yıkandı.

Membran substrat ile boyandı. Sonra 1 ml Peroxide solution (Thermo Fisher Scientific, USA) ve 1 ml Luminol Enhancer Solution (Thermo Fisher Scientific, USA) karıştırıldı ve 5 dk. boyunca mikropipet yardımıyla membranın her tarafına uygulandı. Görüntüleme ünitesinde bantların fotoğrafları alınarak yoğunluk değerlendirmeleri yapıldı.

Membran TBS-T ile 5 dakika yıkandı. Primer ve sekonder antikoru membrandan uzaklaştırmak amacıyla stripping buffer eklendi ve 37 °C’de 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra TBS-T ile 5 dakika inkübe edildi. Aynı membrana ilk adım olan immun blotlama yapıldı. *Bcl-2*, *NF-κB*, *Bax* ve *p53* genlerinin sorumlu olduğu protein seviyelerinin belirlenmesi için aynı adımlar takip edilerek çalışıldı.

3.9. Deney Hayvanları Çalışmaları

Bu çalışma için Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 27/12/2018 tarih ve 2018/11-9 numaralı etik kurul onayı alınmıştır. Hayvan deneyleri Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinde gerçekleştirildi. Deneylerde Balb-c türü dişi fareler kullanıldı. Fareler randomize olarak gruplara ayrıldı. Çalışmada tüm fareler deneyler süresince standart diyet ve su ile *ad libitum* olarak beslendi.

3.9.1. B16-F10 Hücre Hattının Hazırlanması

Farelerde deri altı tümör oluşturulması için B16-F10 (mouse melanoma cell line) hücre hattı kullanıldı. Hücre kültürleri içerisinde %10 oranında fetal dana serumu, 10 mM HEPES, 4 mM glutaminli 100 IU/ml penisilin/streptomisin ihtiva eden RPMI-1640 sıvı besiyerinde 37 °C ve %5 CO₂ ve bulunduran inkübatörde inkübe edilerek kültive edildi.

Hücrelerin kültürasyonu her bir ml’de $\times 10^5$ hücre olacak şekilde ayarlanmış 100, 200 ve 500 ml’lik kültür kaplarında, kültür kabının yüzde 10’u nispetinde besiyeri bulunan kaplarda inkübe edildi. Hücre kültürlerinin inkübasyonu kültür kabı yüzeyinde monolayer tarzda üremeler gerçekleşinceye kadar beklenerek yapıldı (3-7 gün süreyle). Bu süre içinde besiyeri pH’ında değişme gözlemlenirse besiyeri değişimi yapıldı.

3.9.2. Deri Altı Tümör Modeli Oluşturulması

Çalışmada Balb/c türü fareler kullanıldı. Fareler 11 farklı gruba ayrıldı. Farelerin 10’u sağlıklı kontrol grubu olarak belirlendi. Ayrıca 10 fareden oluşan standart ilaç tedavi grubu oluşturuldu. Diğer gruplar fitokimyasallar ve fitokimyasal+standart ilaç (Dakarbazin (20 mM)) tedavi grupları olacak şekilde düzenlendi.

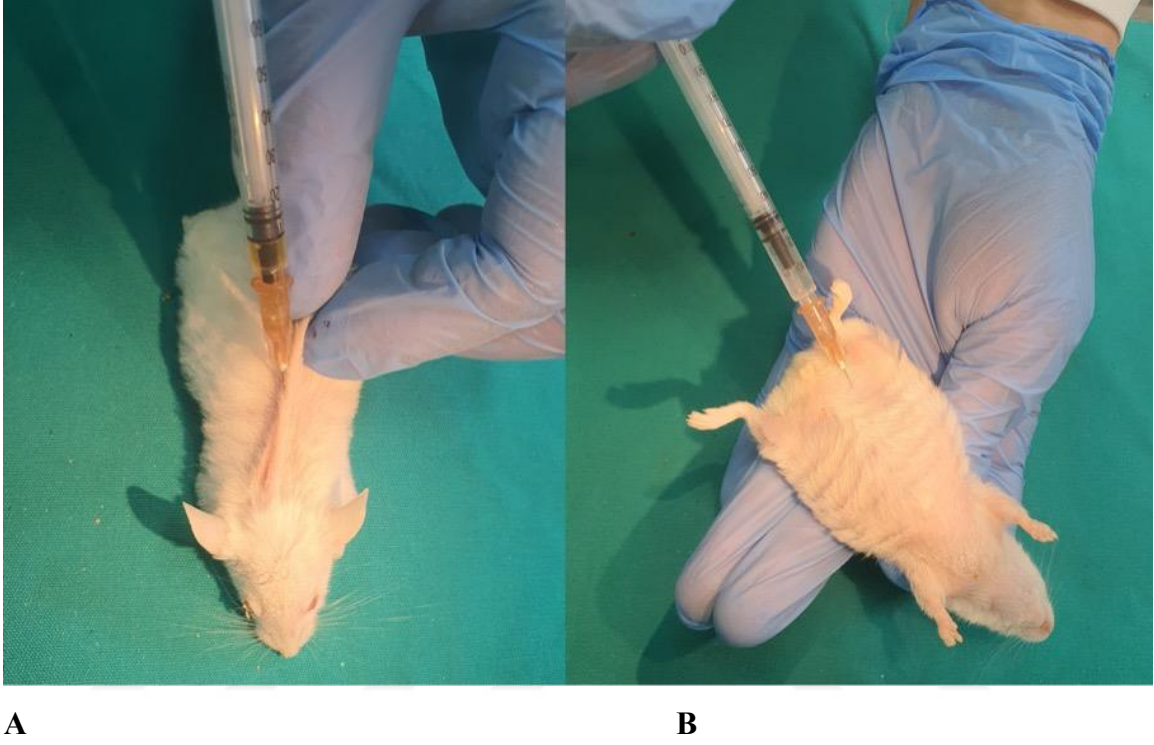
Tümör oluşturmak için fare malign melanoma hücre hattı olan B16-F10 hücre hattı kullanıldı. Fareler randomize olarak tedavi gruplarına alındı. Tedaviye B16-F10 hücre inokülasyonun 7. gününden sonra başlandı. Son injeksiyondan itibaren, hücre kültürlerinde antiproliferatif etkinliği tespit edilen Alfa-Pinen (20 mM), Gama-Terpinen (60 mM), P-Cymen (60 mM) ve bu üç fitokimyasalın Dakarbazin ile (P-Cymene artı Dakarbazin; Gama-Terpinen artı Dakarbazin; Alfa-Pinen artı Dakarbazin; Alfa-Pinen artı Gama-Terpinen artı Dakarbazin) kombinasyonlarının tedavide hayvan modeli üzerinde etkinliği araştırıldı. Hayvanlara tedavi intra peritoneal (IP) olarak uygulandı.

Yukarıda açıklanan hayvan deneyleri *in vitro* etkinliği saptanan her bir fitokimyasal ve fitokimyasal kombinasyonunun *in vivo* etkinliği deri altı fare tümör modelinde ayrı ayrı çalışıldı.

3.9.3. Fare İnjesiyonu

1. Hücre sayımını takiben PBS (pH=7.4) içinde ml’de 1×10^6 canlı hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı.
2. Hücre süspansiyonu insülin enjektörü (25 G) yardımıyla her hayvanın deri altına (sırt bölgesine) 100 μ l (1×10^5 hücre/fare) olacak şekilde injekte edildi.

3. İnjesiyonu takiben fareler özel kafeslerine alındı ve normal besinlerle (su+yem) beslenerek takip edildi.
4. Hücre injesiyonu yapılan fareler çalışmanın ilk gününde ve sonra her haftada iki kez olmak üzere tartılarak tümör gelişimi açısından kontrol edildi.



Şekil 3. 9. Fare İnjesiyonu. A: B16-F10 melanoma hücre injesiyonu, B: Tedavinin IP olarak uygulanması.

3.9.4. Çalışma Grupları

Deney grupları aşağıda verilmiştir. Bu deneylerde kontrol gruplarıyla birlikte toplam 7 grup yer aldı. Birinci, ikinci ve üçüncü gruplar kontrol grupları olarak belirlendi. Sonuçların istatistiksel açıdan değerlendirilmesi her grup verileri açısından kıyaslamalı olarak yapıldı.

Farelerin sol arka sırt bölgesinde B16-F10 melanoma hücreleri ile deri altı tümörü oluşturuldu. İnokülasyonun 7.gününden sonra tedavi protokolleri uygulanmaya başlandı.

1. **Kontrol Grubu:** Birinci grup, sağlıklı kontrol grubu olarak seçildi (hücre inokülasyonu yapılmadı, hiçbir injesiyon işlemi gerçekleştirilmedi).

2. **Hücre kontrol grubu:** Bu grupta seçilen hayvanlara 1×10^6 hücre/ml B16-F10 hücre inokülasyonu yapıldı, hiçbir tedavi uygulanmadı.
3. **Solvent (DMSO/PBS) kontrol grubu:** Bu grupta yer alan farelere fitokimyasalları çözmek için kullandığımız konsantrasyonda DMSO/PBS solüsyonu verildi.
4. **Standart ilaç kontrol grubu:** Bu grupta yer alan farelerin tedavileri Dakarbazin (20 mM) ile 0.5 mg/gün hesabı ile 10 gün tedavi edildi.
5. **P-Cymen tedavi Grubu:** Bu grupta yer alan farelere P-Cymen (60 mM) ile 10 gün tedavi uygulandı.
6. **Gama-Terpinen Tedavi Grubu:** Bu grupta yer alan farelere Gama-Terpinen (60 mM) ile 10 gün tedavi uygulandı.
7. **Alfa-Pinen Tedavi Grubu 3:** Bu grupta yer alan farelere Alfa-Pinen (20 mM) ile 10 gün tedavi uygulandı.
8. **Alfa-Pinen artı Dakarbazin Tedavi Grubu:** Bu grupta yer alan farelere Alfa-Pinen (20 mM) artı Dakarbazin (10 mM) hesabı ile 10 gün tedavi uygulandı.
9. **Gama-Terpinen artı Dakarbazin Tedavi grubu:** Farelere Gama-Terpinen (60 mM) artı Dakarbazin (10 mM) uygulandı.
10. **Alfa-Pinen artı Gama-Terpinen artı P-Cymen artı Dakarbazin Tedavi Grubu:** Farelere Alfa-Pinen (20 mM) artı Gama-Terpinen (60 mM) artı P-Cymen (60 mM) artı Dakarbazin (10 mM) uygulandı.
11. **Dakarbazin Tedavi Grubu:** Bu gruptaki fareler 10 mM Dakarbazin ile tedavi edildi.

3.9.5. Tedavi

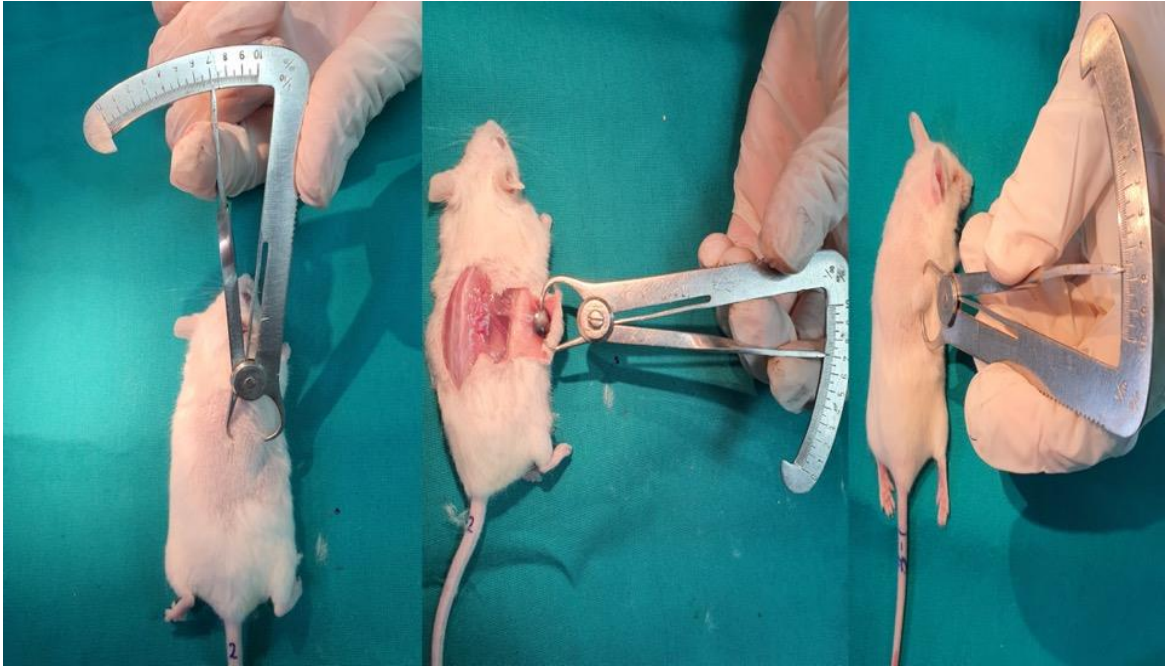
Farelere B16-F10 hücre inokülasyonunu takiben günlük olarak kitle oluşumu tespit edilen hayvanlara inokülasyonun 7'inci gününden itibaren tedavi vermeye başlandı. Fitokimyasallar *in vitro* deneylerde etkili bulunan konsantrasyonlarda standart ilaç olarak

seçilen Dakarbazin tedavi gruplarına uygulandı. Hücre kontrol grubuna hücre injeksiyonunu takiben hiçbir tedavi uygulanmadı. Hayvanlarda kontrol grupları grubu da dahil olmak üzere tüm tedavi verilen gruplarda tümör gelişimi kumpasla ölçülerek not edildi.

3.9.6. Disseksiyon ve Histolojik-Patolojik Değerlendirmeler

Tedavi protokolleri sonunda fareler ketamin/ksilazin anestezisi (150/9 mg/kg, i.p.) yapıldıktan sonra doku disseksiyonları gerçekleştirildi. Projede histolojik-patolojik değerlendirmeler HMK Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Bu aşamada tümör kitlelerinin histopatolojisi ve metastatik özellikleri değerlendirildi.

Hayvanların dikkatli bir şekilde disseksiyonu yapılarak deri altı kitlesi başta olmak üzere beyin, böbrek, dalak, kalp, akciğer, karaciğer, kalın barsakları çıkartıldı. Ayrıca, farelerde karın boşluğunda asit birikimi kontrol edilerek ve periton PBS solüsyonu ile yıkandı. Yıkama solüsyonları tüplere alınarak Giemsa ve Hematoksilen-Eosin boyları ile boyanmak için preperatlar hazırlandı. Tümör kitleleri ile alınan organlar %10'luk formaldehid çözeltisi içine kondu.



şekil 3. 10. Deri altı tümör dokusunun kumpasla çapının ölçülmesi ve eksize edilmeden önce değerlendirilmesi.

Alınan organ ve dokulardan preperat hazırlamak için kasetlere yerleştirme, fiksasyon, parafin blokları oluşturma, kesit alma ve Hematoksilen-Eosin ile boyama gibi gereken tüm prosedürler ve mikroskopik inceleme işlemleri HMKÜ Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.9.7. Patolojik Değerlendirmeler İçin Doku Örneklerinin Hazırlanması

Farelerden alınan örnekler laboratuvarında tespit (fiksasyon), takip (doku İşleme), bloklama, kesme ve boyama işlemlerinden geçirildi. Dokular 10 ile 20 kat fazlası olacak şekilde hazırlanmış % 10'luk tamponlu formalinde (pH 7,2-7,4) tespit edildi. Tespit sonrasında 4 mm kalınlığında küçültülerek bir gece akan çeşme suyunda yıkandı. Rutin yöntemlere göre dereceli alkol (%50, %80, %96, %100), ksilol ve parafin serilerinden geçirildikten sonra parafinde bloklandı. Bu şekilde hazırlanan doku bloklarından mikrotomla 4 mikron kalınlığında alınan kesitler önce 37°C'lik su banyosuna atılıp açılmaları sağlandı ve sonra da lamlara alınarak 30 dakika 54°C'lik etüvde kurutuldu. Bu kesitler ksilollerde deparafinize edilip; 100, 96, 80 ve 70'lik alkol serilerinden de geçirildikten sonra Hematoksilen Eozin (H×E) ile boyandı. Tekrar dereceli alkol (%80, %96, %100) ve ksilolden geçirilip yapıştırıcı (Entellan) yardımıyla lamel ile kapatıldı. Işık mikroskop altında (Olympus C×31) incelendikten sonra mikrofotografı (Olympus DP12) alındı.

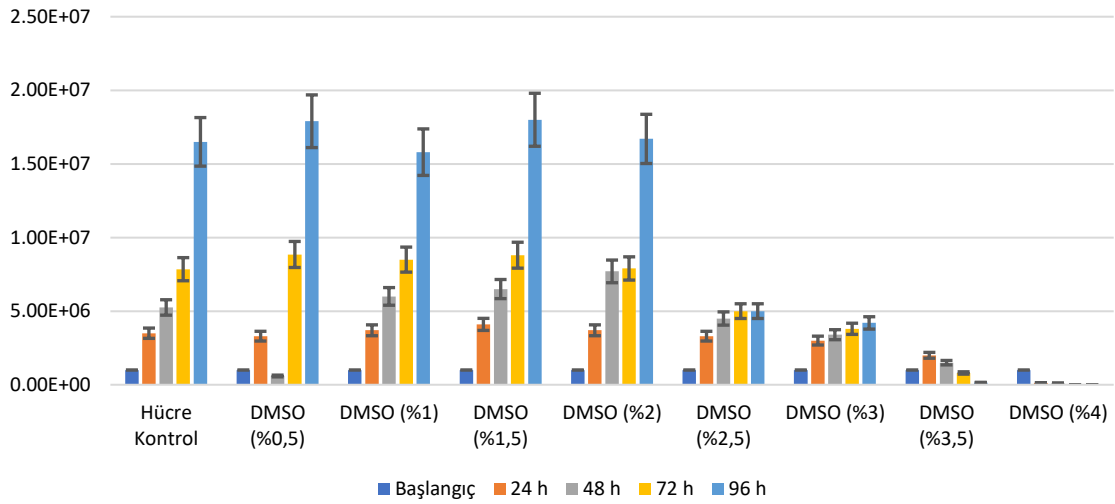
3.9.8. İstatistik Analiz

Tüm istatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for Social Sciences, Windows v. 23, Chicago, IL) programı kullanılarak yapıldı. Grup ortalamaları arası farkların önem dereceleri test edilirken tüm analizlerde farklar $p < 0.05$ ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. DMSO'nun Non-Toksik Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Çalışmada fitokimyasalların besiyerinde çözülmesi için kullanılan DMSO'nun hücreler üzerindeki non-toksik konsantrasyonu belirlendi. DMSO'nun besiyeri içerisindeki farklı konsantrasyonları içerisinde 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde Vero hücreleri muamele edildi. Deneylerde DMSO ≤ 2 (w/v) olan konsantrasyonlarında hücre üremesine, canlılığına herhangi bir toksisitesinin olmadığı tespit edildi (Şekil 4. 1). Deneylerde fitokimyasalların besiyerinde çözülmesi amacıyla solvent olarak kullanılan DMSO'nun %1'lik konsantrasyonları kullanılmıştır.

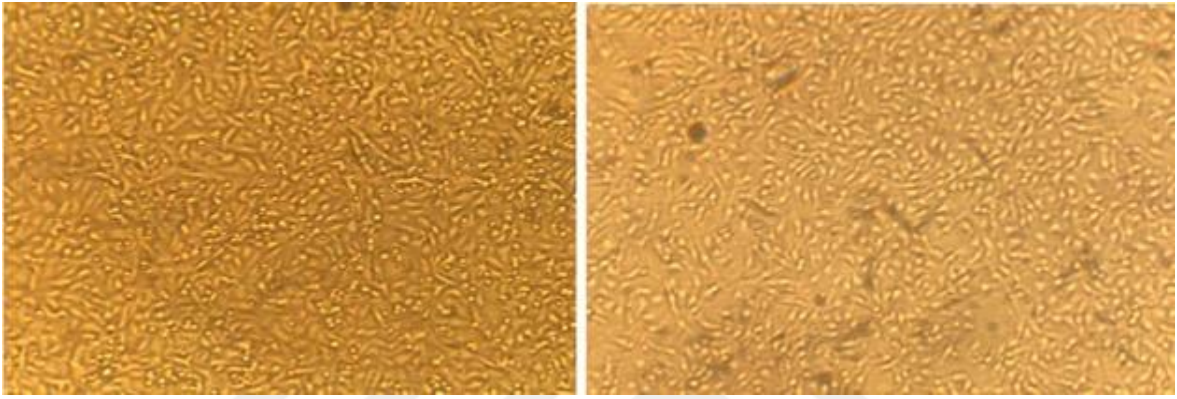


Şekil 4. 1. Vero hücreleri üzerinde DMSO'nun non-toksik konsantrasyonunun belirlenmesi

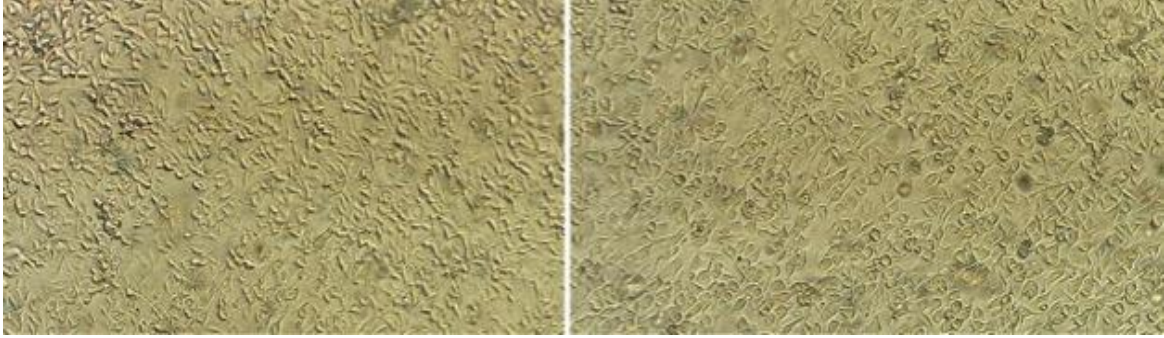
Vero hücreleri üzerinde solvent olarak kullanılan DMSO'nun %2.5'lik konsantrasyonunun inkübasyonun 48.saatinden sonra hücre sayıları açısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmaya başladığı, hücreler üzerinde toksisite oluşturduğu tespit edilmiştir.

Deneylerde Vero hücre kültürlerinde %2 ve daha düşük konsantrasyonlarda DMSO'nun hücre üremesini inhibe etmediği tespit edildi. İçerisinde DMSO bulunan ve içerisinde DMSO bulunmayan Vero hücreleri 96 saat süreyle hem morfolojik olarak

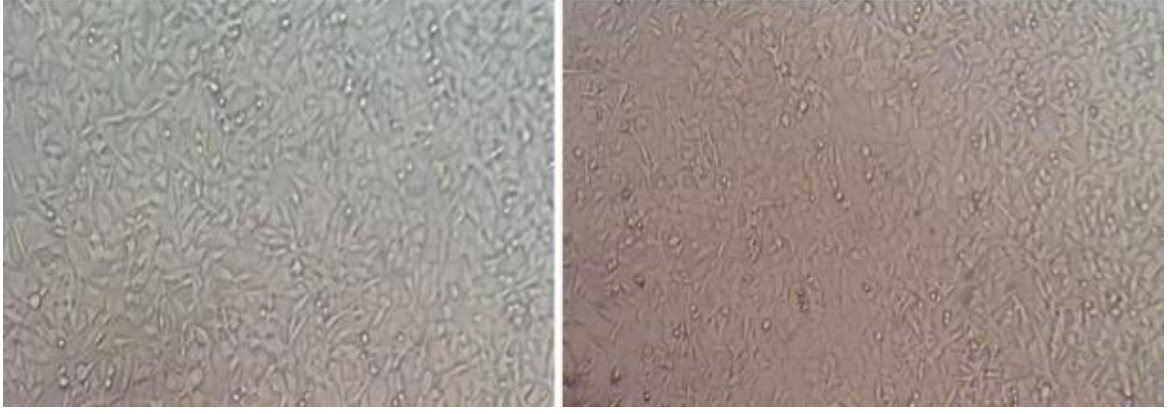
hücrelerde meydana gelebilecek sitopatolojik değişimler (hücre yuvarlaklaşması, hücrelerde piknozis görülmesi, sitoplazmanın daralması, nükleer büyüme gibi) hem de inkübasyon süresi sonunda canlı hücre sayısı bakımından %2 ve daha düşük konsantrasyonda DMSO ihtiva eden hücre kültürlerinde herhangi bir sitopatolojik değişimin meydana gelmediği ve canlı hücre sayısı bakımından kontrol grubu hücre kültürlerinden farksız olduğu tespit edildi ($p>0.05$). Ayrıca, morfolojik açıdan kontrol grubuyla DMSO grubu arasında herhangi bir fark tespit edilmedi (Şekil 4. 2 – 4. 5).



Şekil 4. 2. Vero Hücreleri. A. 96 saat inkübasyondan sonra içerisinde DMSO bulunmayan hücre kültürünün mikroskopik görüntüsü. B: içerisinde $\leq$ %2 DMSO bulunan hücre kültürünün morfolojik görünümü (10 $\times$).



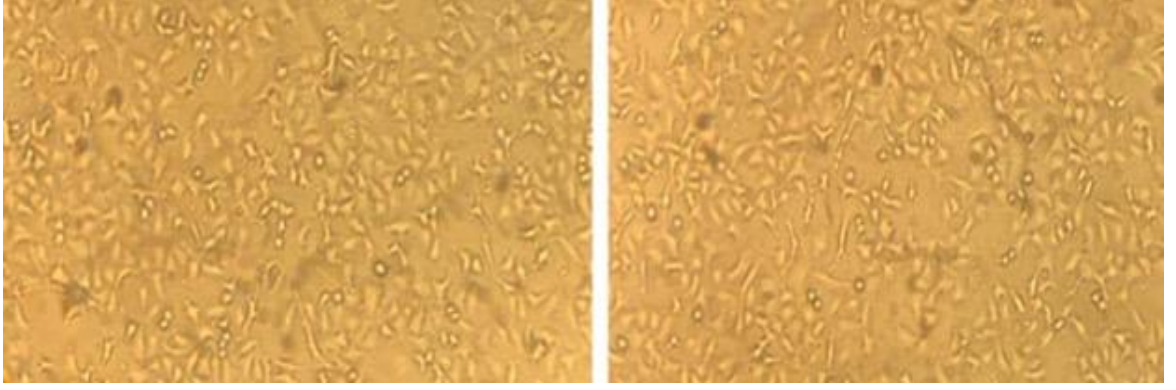
Şekil 4. 3. A-549 Hücreleri. A. 96 saat inkübasyondan sonra içerisinde DMSO bulunmayan hücre kültürünün mikroskopik görüntüsü. B: içerisinde $\leq$ %2 DMSO bulunan hücre kültürünün morfolojik görünümü (10 $\times$).



A

B

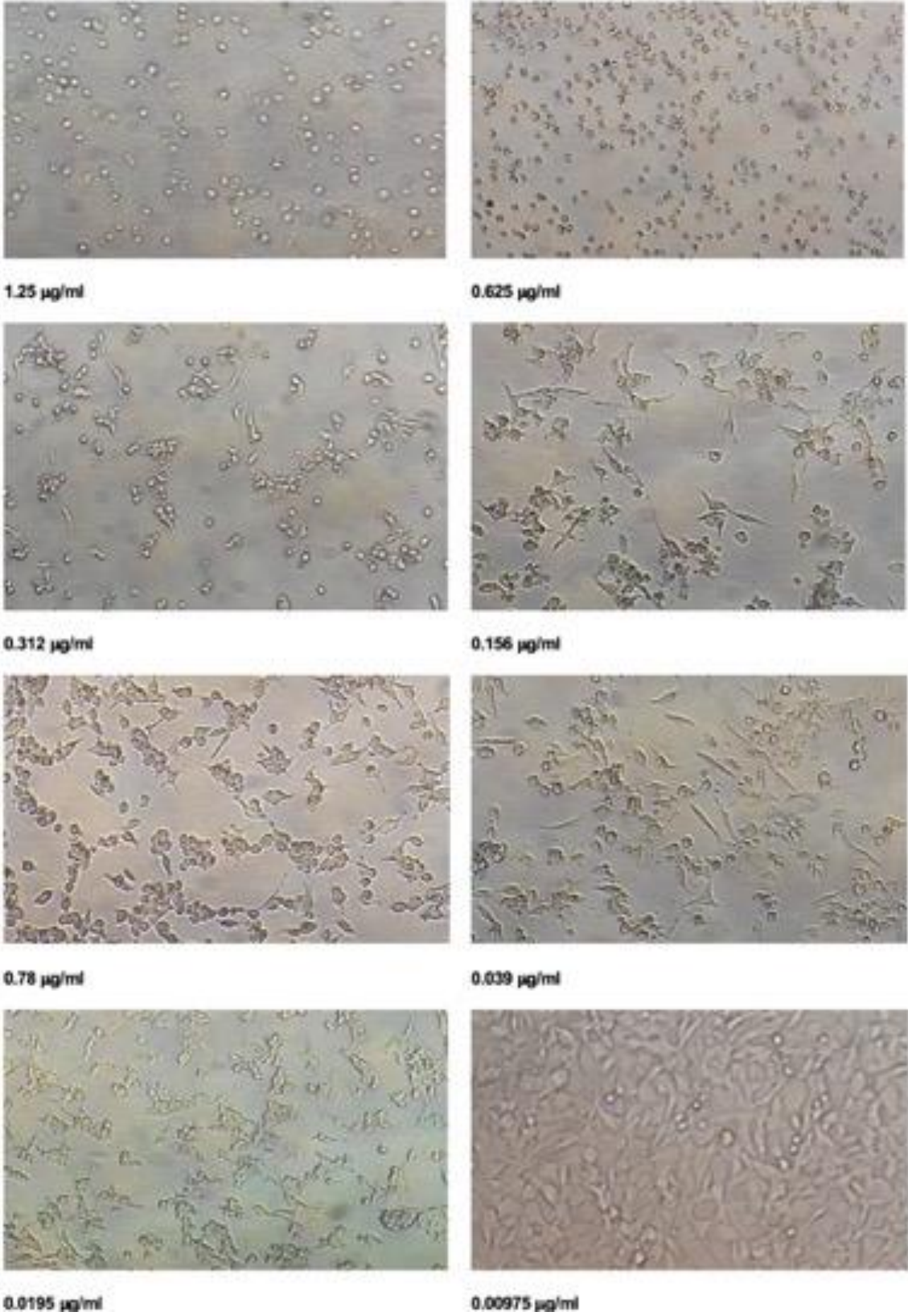
Şekil 4. 4. A-2058 Hücreleri. A. 96 saat inkübasyondan sonra içerisinde DMSO bulunmayan hücre kültürünün mikroskopik görüntüsü. B: içerisinde $\leq$ %2 DMSO bulunan hücre kültürünün morfolojik görünümü (10 $\times$).



A

B

Şekil 4. 5. MCF-7 Hücreleri. A. 96 saat inkübasyondan sonra içerisinde DMSO bulunmayan hücre kültürünün mikroskopik görüntüsü. B: içerisinde $\leq$ %2 DMSO bulunan hücre kültürünün morfolojik görünümü (10 $\times$).



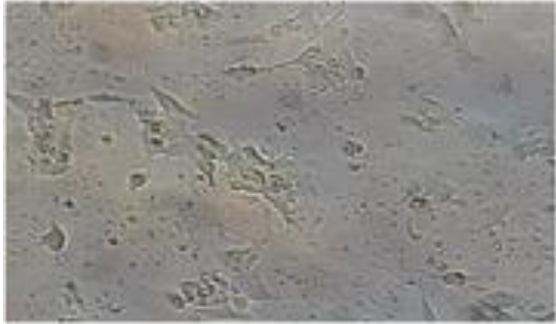
Şekil 4. 6. A-549 hücre hattında Alfa-Pinen'in farklı konsantrasyonlarda hücre morfolojileri üzerinde meydana getirdiği sitopatolojik değişiklikler.



20 µg/ml



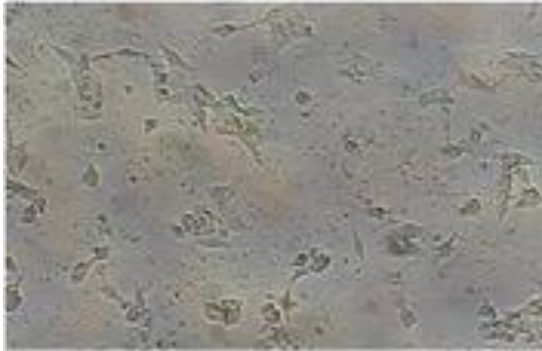
10 µg/ml



5 µg/ml



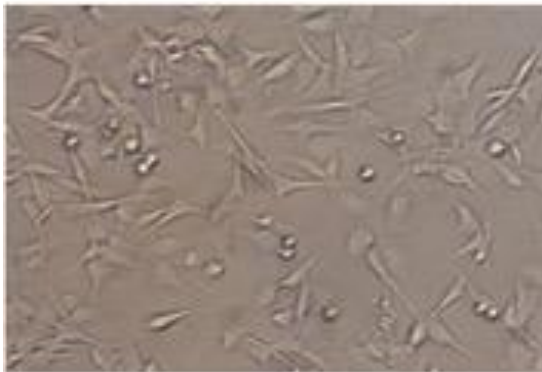
2.5 µg/ml



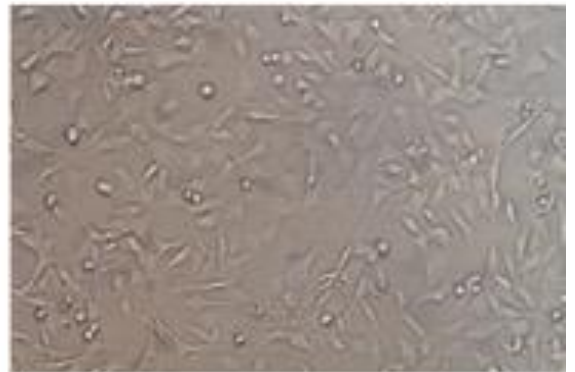
1.25 µg/ml



0.625 µg/ml

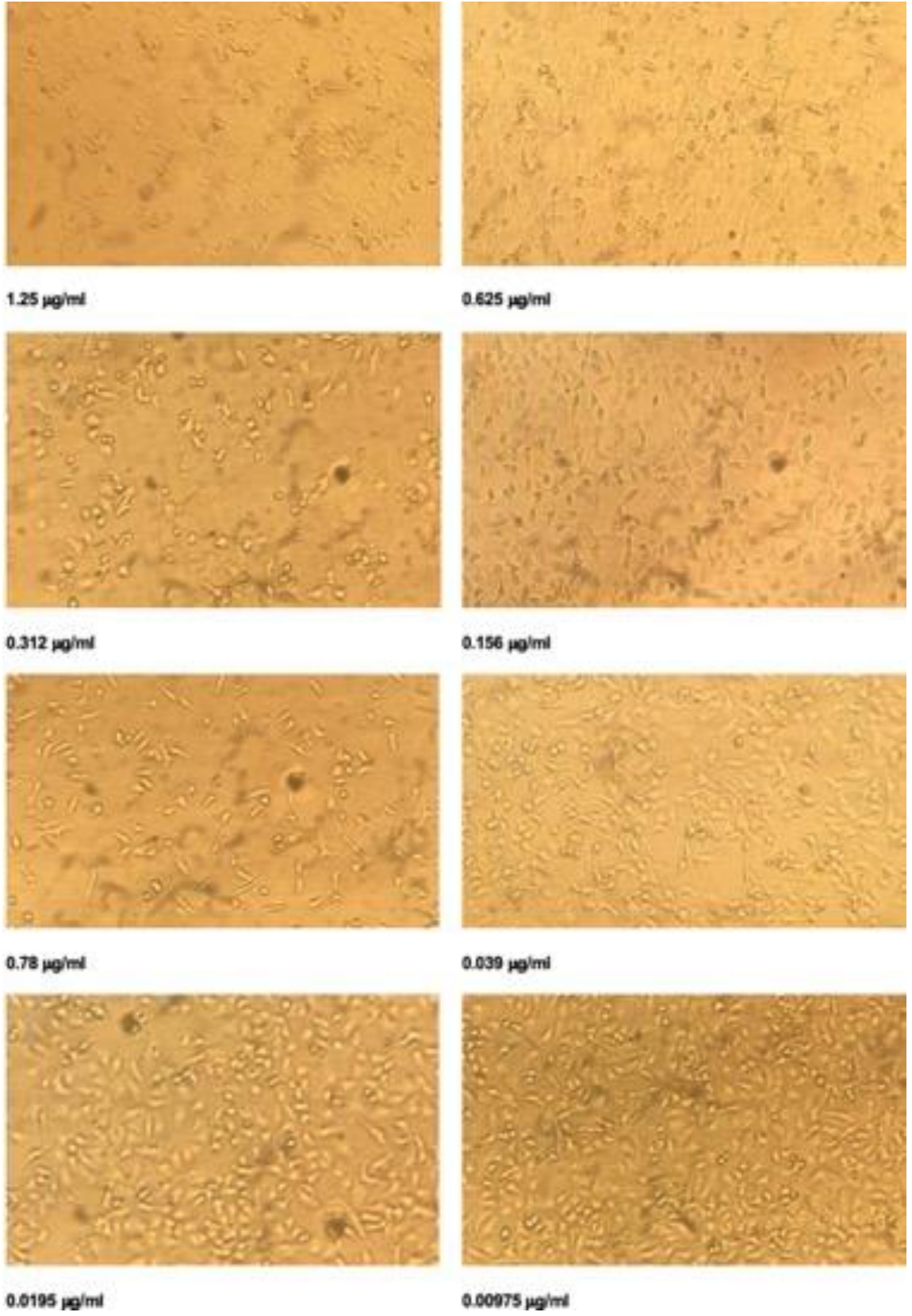


0.312 µg/ml



0.156 µg/ml

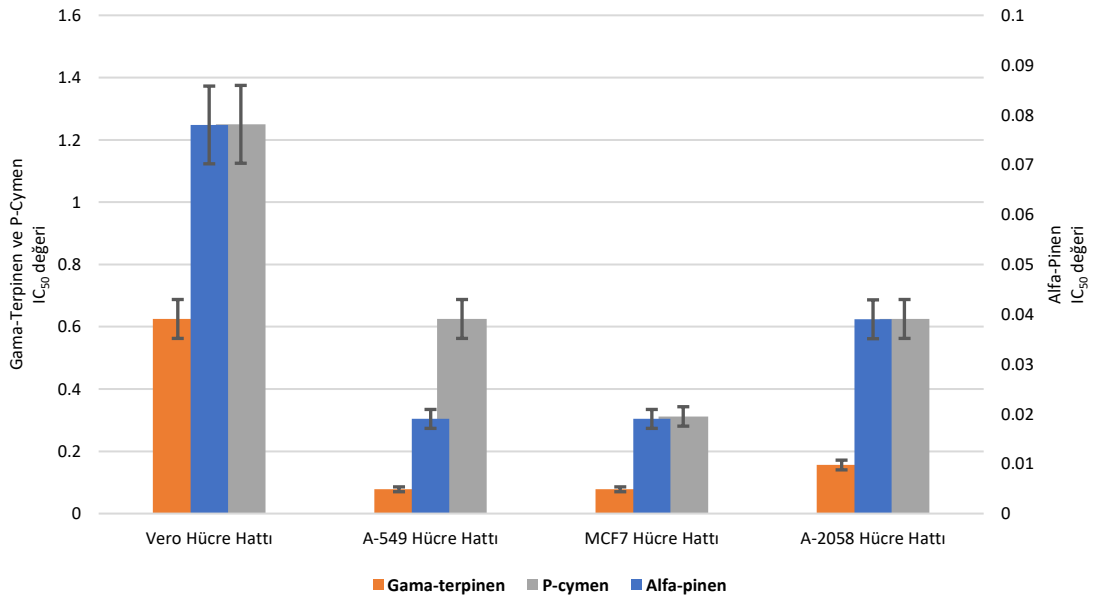
Şekil 4. 7. A-2058 hücre hattında Gama-Terpinen'in farklı konsantrasyonlarda hücre morfolojileri üzerinde meydana getirdiği sitopatolojik değişiklikler.



Şekil 4. 8. MCF-7 hücre hattında P-Cymen'in farklı konsantrasyonlarda hücre morfolojileri üzerinde meydana getirdiği sitopatolojik değişiklikler.

4.2. MTT Sonuçları

Spektrofotometrik ölçüm metotuna dayanan bir yöntem olan bu yöntemle Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in hem sağlıklı (Vero hücre hattı) hücreler üzerinde hem de kanser hücre hatları (A-549, MCF-7 ve A-2058 hücreleri) üzerinde etkileri MTT kiti kullanarak tespit edildi. Deneyler 96 kuyucuklu düz tabanlı mikroplyetler kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler inoküle edildikten sonra 37 °C'de 8 saat inkübasyon sonucunda hücrelerin metabolik fonksiyonlarını düzenlemeleri sağlandı. Metabolik fonksiyonlarını düzenleyen hücrelerin kültür medyumuna içerisinde kültür medyumuna ile dilüe edilen çeşitli konsantrasyonlarda fitokimyasallar ilave edilerek 96 saate kadar inkübasyonları yapıldı. İnkübasyon sonunda MTT yöntemiyle hücre viabilitesi veya kimyasal bileşiklerin (sentezlerin) hücreler üzerindeki etkisi mikroplyet okuyucu ile okutularak IC₅₀ (hücre üremesinin en azından %50'sini inhibe eden konsantrasyon) değerleri belirlendi (Şekil 4. 9).



Şekil 4. 9. Fitokimyasalların sağlıklı (Vero hücre hattı) ve kanser hücre dizilerinde (A-549, MCF-7 ve A-2058 hücre hattı) IC₅₀ değerleri.

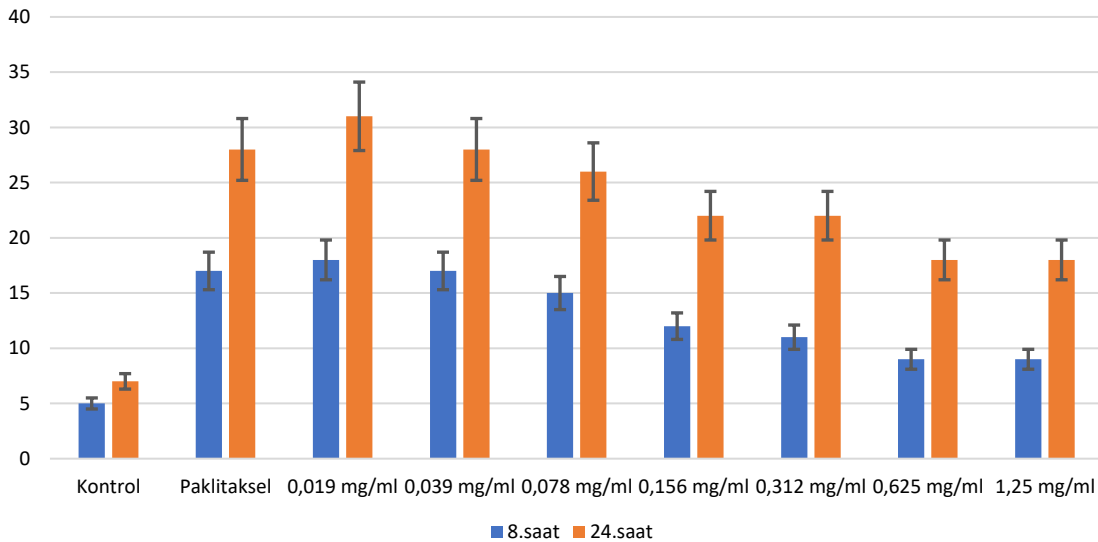
Şekil 4. 9'da Alfa-Terpinen'in üç kanser hattı üzerinde de Gama-Terpinen ve P-Cymen'den çok daha yüksek düzeyde etkili olduğu görülmektedir. Alfa-Pinen'in A-549 ve MCF-7 hücreleri üzerinde IC₅₀ değerinin 0.019 µg/ml olduğu tespit edilirken A-2058 hücreleri üzerinde 0.039 µg/ml olduğu tespit edilmiştir. Deneylerde Gama-Terpinen'in IC₅₀ değerlerinin Alfa-Pinen değerlerine oldukça yakın olduğu (A-549, MCF-7 ve A-2058 için

sırasıyla; 0.078, 0.078 ve 0.156 µg/ml), P-Cymen'in ise IC₅₀ değerleri üç hücre hattından en yüksek olduğu (A-549, MCF-7 ve A-2058 için sırasıyla; 0.625, 0.312 ve 0.625 µg/ml) tespit edilmiştir (Şekil 4. 9).

4.3. Fitokimyasalların Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi

4.3.1. Akridin Oranj Boyama Yöntemi

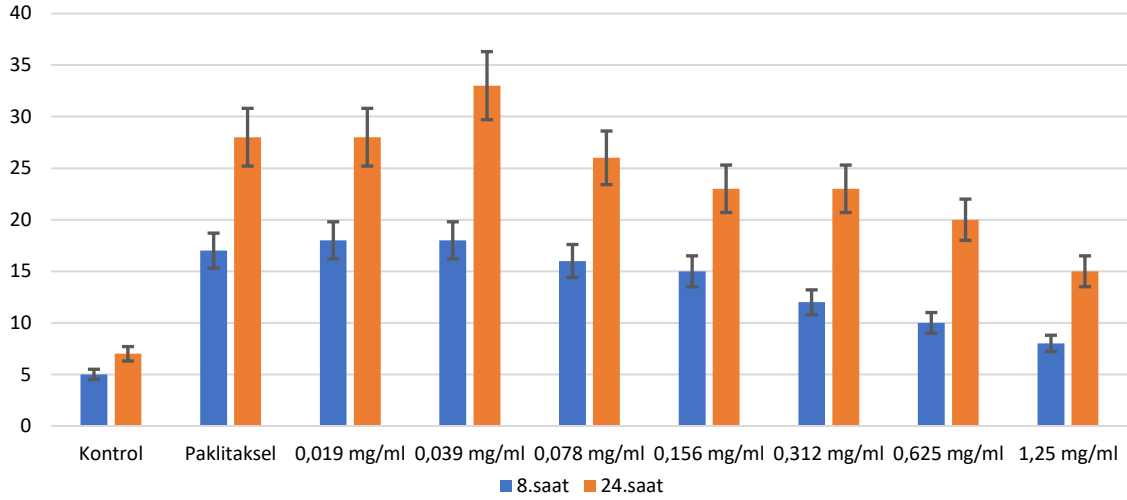
Bu grup deneylerde akridin oranj boyama metodu ile hücrelerde morfolojik değişiklikler kaydedildi. Deneylerde fitokimyasallara maruziyet süresi arttıkça doğru orantılı olarak apoptoza giren hücre sayısının da arttığı tespit edildi. Kanser hücrelerinin fitokimyasallara maruziyetinden sonraki ilk 8 saatlik inkübasyon sonunda apoptotik yapıların hücre zarı etrafında toplandığı, hücrelerde morfolojik değişimlerin oluşmaya başladığı, hücrelerin tipik formdan atipik forma dönüştükleri tespit edildi. Deneylerde kontrol grubuyla kıyaslandığında bileşiklerin apoptotik indeksleri hücre tipine göre şekil 4. 10 - 4. 18'de görülmektedir. Deneylerde Gama-Terpinen, Alfa-Pinen ve P-Cymen'in hücre apoptotik indekslerin 3-34 arasında değiştiği tespit edildi.



Şekil 4. 10. Alfa-Pinen'in A-549 hücre hattında apoptotik hücre indeksi

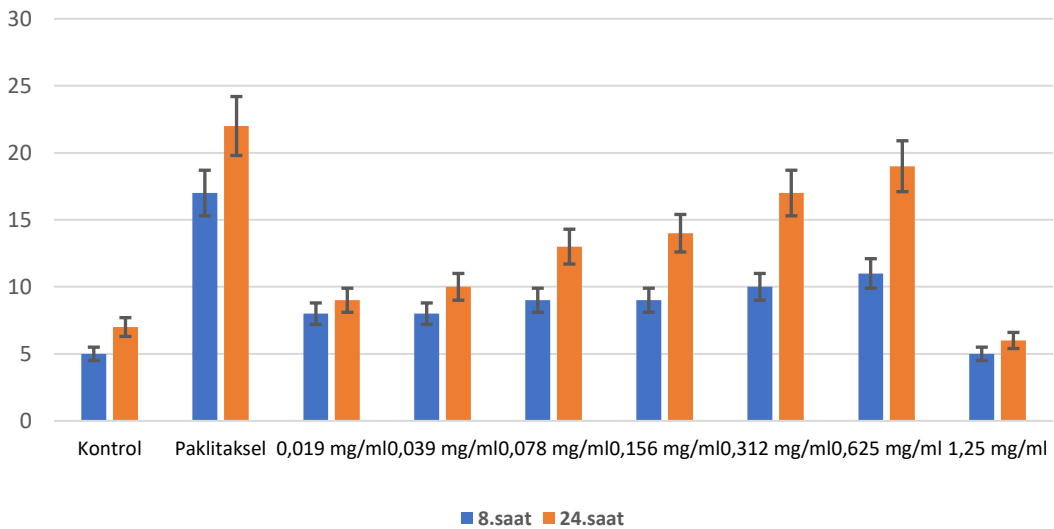
Alfa-Pinen çalışmada etkisi araştırılan üç fitokimyasal arasında etkinliği en yüksek olan fitokimyasal olarak tespit edildi. Alfa-Pinen'in insan akciğer hücreleri üzerinde oldukça

düşük konsantrasyonlarda hücrelerde apoptozu tetiklediği tespit edildi. Alfa-Pinen'in 0.019, 0.039 ve 0.078 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarının standart ilaçla (Paklitaksel) kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farkların olmadığı tespit edildi ($p>0.05$; Şekil 4. 10).



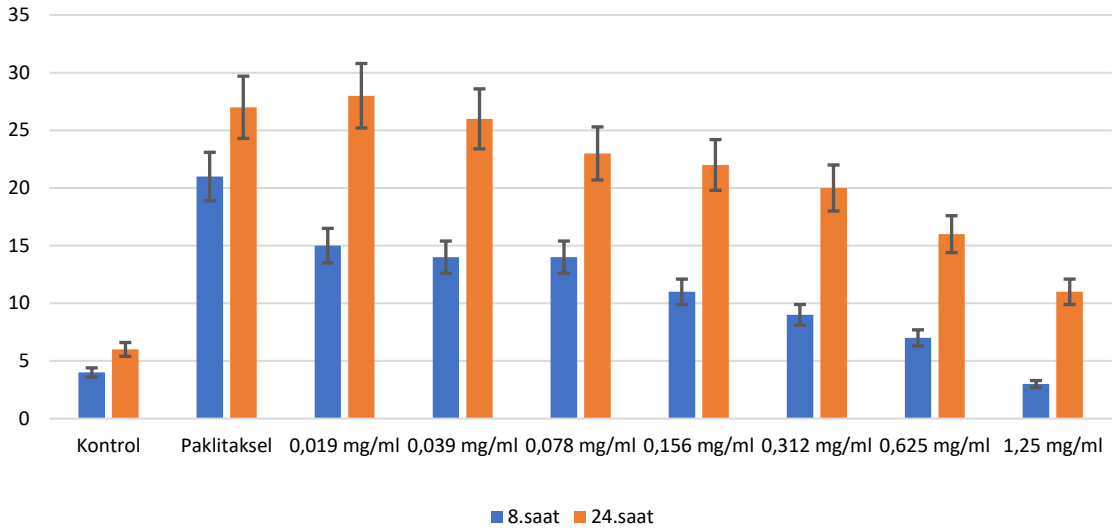
Şekil 4. 11. Gama-Terpinen'in A-549 hücre hattında apoptotik hücre indeksi.

Gama-Terpinen'in insan akciğer adenokarsinoma hücre hattında hücreleri apoptoza sürüklediği dozun oldukça düşük olduğu ve standart ilaç Paklitaksel ile kıyaslandığında oldukça etkili olduğu tespit edildi. Gama-Terpinen'in A-549 hücreleri üzerinde 0.019 ile 0.312 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlar arasında oldukça önemli etkinlik gösterdiği tespit edildi (Şekil 4. 11).



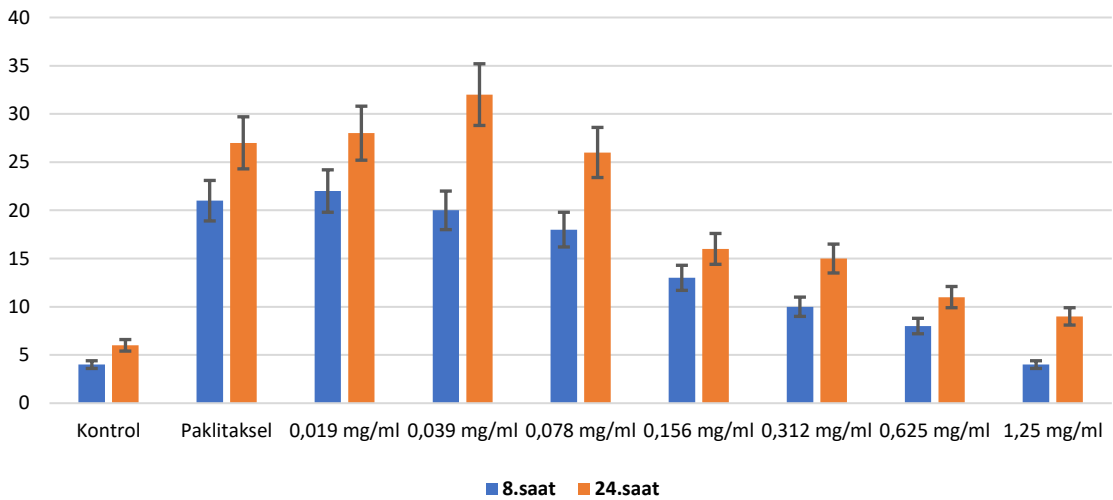
Şekil 4. 12. P-Cymen'in A-549 hücre hattında apoptotik hücre indeksi.

A-549 hücre hattı üzerinde etkinliği araştırılan üçüncü fitokimyasal olan P-Cymen'in etkinliği Alfa-Pinen ve Gama-Terpinen ile kıyaslandığında daha düşük olarak bulundu. P-Cymen'in A-549 hücrelerine karşı apoptozisi indüklediği en yüksek konsantrasyonun 0.625 µg/ml olduğu tespit edildi. Bu dozda etkinliğin paklitaksel ile kıyaslandığında etkinliği düşük bulunsada istatistiksel olarak anlamlı derecede fark olmadığı tespit edildi ($p>0.05$; Şekil 4. 12).



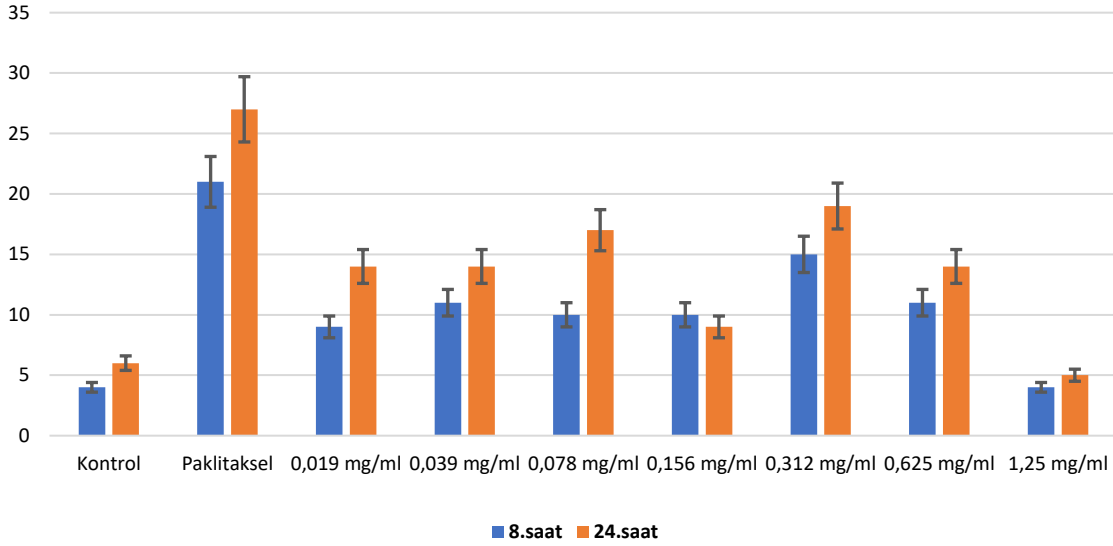
Şekil 4. 13. Alfa-Pinen'in MCF-7 hücre hattında apoptotik hücre indeksi.

Şekil 4. 13'te Alfa-Pinen'in insan meme kanseri hücreleri üzerinde apoptotik indeksi verilmiştir. Burada Alfa-Pinen'in 0.019 ve 0.039 µg/ml'lik konsantrasyonlarda hücreleri önemli ölçüde apoptozise sürüklediği tespit edildi (Şekil 4. 13).



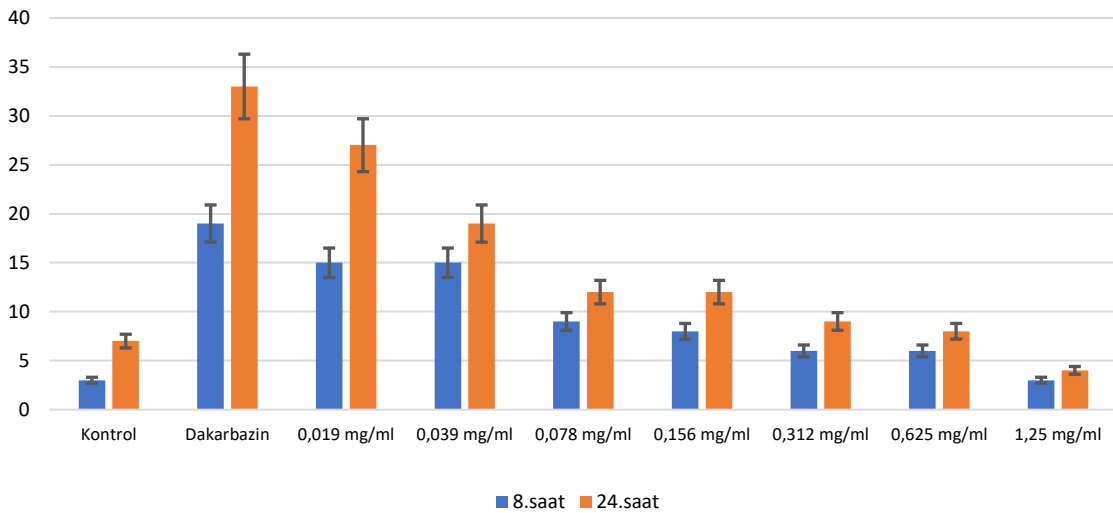
Şekil 4. 14. Gama-Terpinen'in MCF-7 hücre hattında apoptotik hücre indeksi.

A-549 hücreleri üzerinde olduğu gibi Gama-Terpinen MCF-7 hücreleri üzerinde de oldukça önemli apoptotik etkinlik gösterdi. Özellikle 0.019; 0.039 ve 0.078 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda standart ilaç etkinliğiyle kıyaslandığında oldukça önemli etkinlik sergilediği bulundu (Şekil 4. 14).



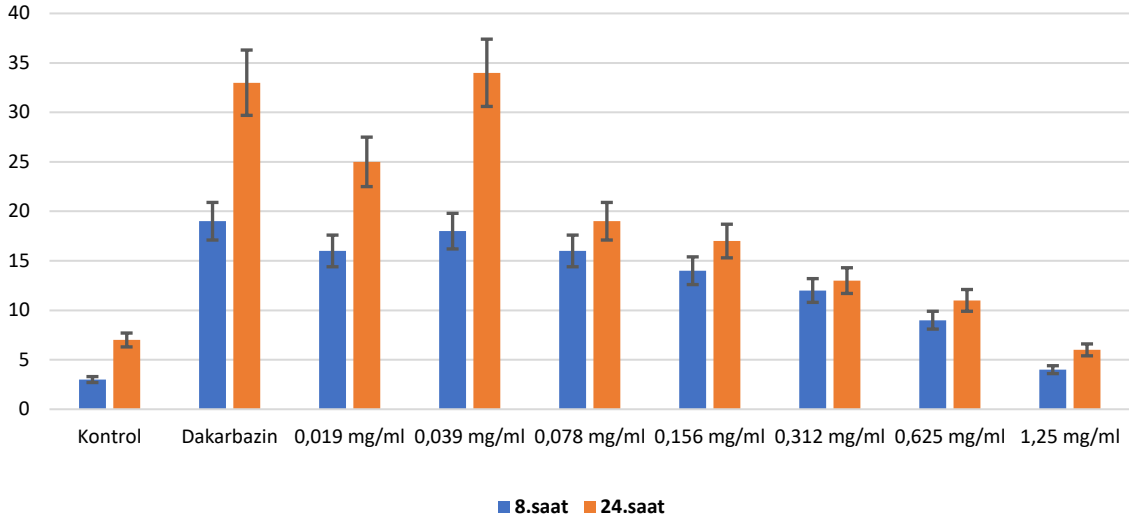
Şekil 4. 15. P-Cymen'in MCF-7 hücre hattında apoptotik hücre indeksi

P-Cymen'in etkinliği MCF-7 hücreleri üzerinde de benzer olarak en düşük etkinlik olarak tespit edildi. P-Cymen'in 0.312 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonda standart ilaçla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük etkinlik saptansa da bu konsantrasyondaki etkinliği önemli bulundu ($p < 0.05$; Şekil 4. 15).



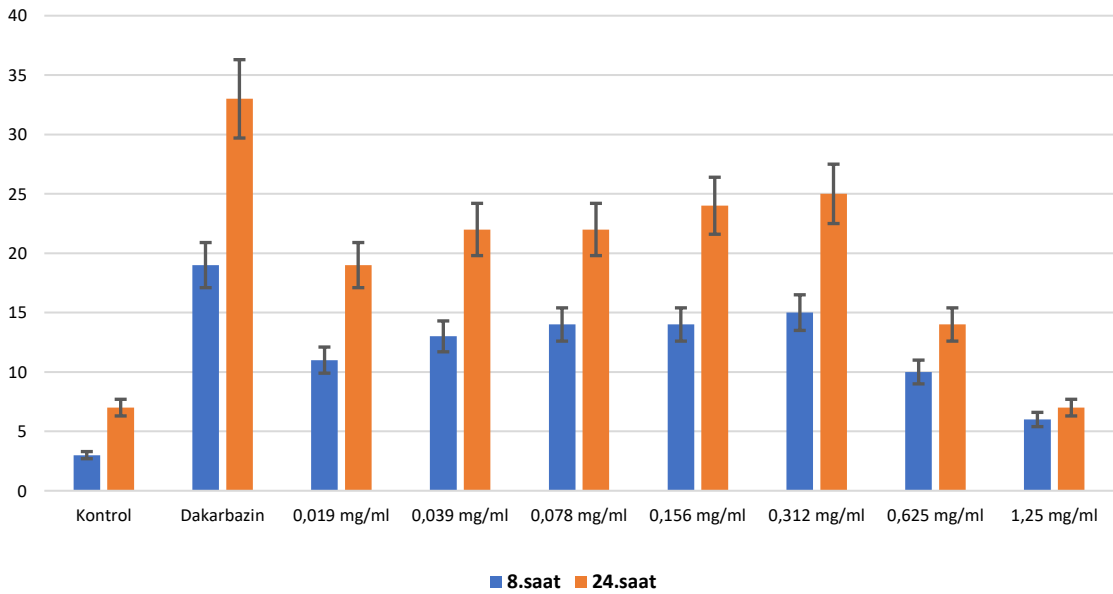
Şekil 4. 16. Alfa-Pinen'in A-2058 hücre hattında apoptotik hücre indeksi.

İnsan melanoma hücre hattında yapılan deneylerde ise Alfa-Pinen'in etkinliğinin Dakarbazin ile kıyaslandığında daha düşük olduğu tespit edilse de 0.019 ve 0.039 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda önemli bulunmuştur (Şekil 4. 16).



Şekil 4. 17. Gama-Terpinen'in A-2058 hücre hattında apoptotik hücre indeksi.

Deneylerde Gama-Terpinen'in melanamo hücreleri üzerinde etkinliği oldukça yüksek olarak tespit edildi. Özellikle Gama-Terpinen'in 0.039 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonda etkinliğinin standart ilaçla kıyaslandığında aralarında istatistiksel açıdan anlamlı farkın olmadığı tespit edildi ($p < 0.05$; Şekil 4. 17).



Şekil 4. 18. P-Cymen'in A-2058 hücre hattında apoptotik hücre indeksi.

P-Cymen'in etkinliği insan meme ve akciğer kanser hücrelerinde olduğu gibi melanoma hücrelerinde de standart ilaçla (Dakarbazin) kıyaslandığında diğer fitokimyasallardan daha düşük olarak tespit edildi. P-Cymen'in 0.312  g/ml'lik konsantrasyonda melanoma hücrelerini dikkate değer ölçüde apoptoza sürüklediği tespit edildi ($p<0.05$; Şekil 4. 18).

4.3.2. Morfolojik Analiz

Çalışmada Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in kanser hücre hatları (A-549, MCF-7 ve A-2058)  zerindeki etkileri standart ilaçlarla (Paklitaksel ve Dakarbazin) eř zamanlı yapılan kültür çalışmalarıyla araştırıldı. Fitokimyasalların standart ilaçlarla etkilerinin değerlendirilmesi hücreler toplanmadan önce morfolojik açıdan yapılan mikroskobik incelemelerle de değerlendirildi.

 cerisinde hiçbir fitokimyasal veya standart ilaç bulundurmayan kontrol grubu hücreleri de bu çalışmalarda değerlendirildi. Hücre kontrol deneylerinde inkübasyonun 96. saatinde hücrelerde herhangi bir sitopatolojik değerliğliğin meydana gelmediği, hücrelerin tipik morfolojide ve kültür kabı yüzeyinde çoğalmasını s rd rd ğu tespit edildi. Hücrelerin kültür kabı yüzeyinde monolayer tarzda ürediği, sinsitya, granülasyon, füzyon, nükleer yapının büyümesi ve hücre yuvarlaklaşması gibi herhangi bir sitopatolojinin gözlenmediği tespit edildi.

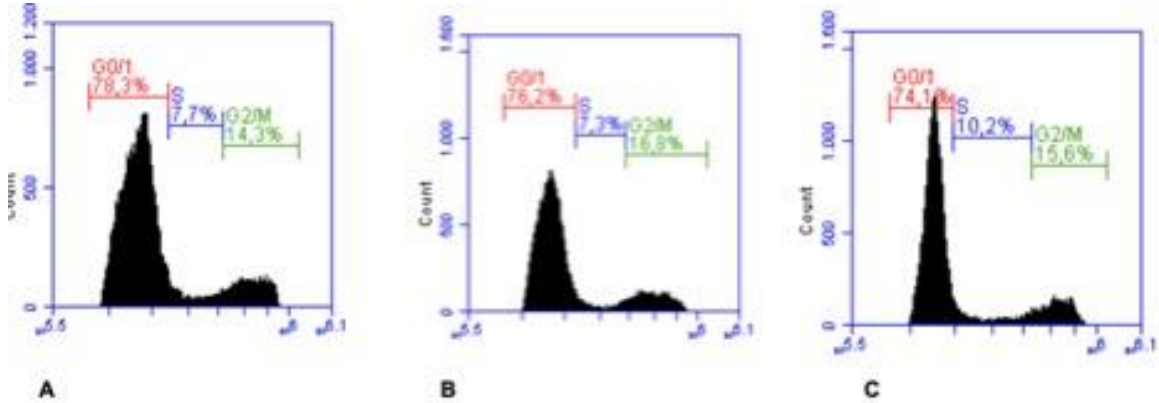
Standart ilaç ihtiya eden kanser hücre dizilerinde ise hücrelerde morfolojik olarak değerliğliklerin oluştuğu, adezyonun bozulduğu, geniş ölçüde atipi ve patolojik değerliğimlerin (hücre yuvarlaklaşması, sitoplazma daralması, nükleer genişleme gibi) olduğu tespit edildi.

4.4. Flow Sitometrik Analiz

Çalışmada hücre kontrol grubu ( cerisinde sadece hücre üretme besiyeri bulunan, herhangi bir kimyasal veya ilaç bulunmayan kültürler) ile fitokimyasallar ve standart ilaçların bulunduğu hücre kültürleri, hücre siklusu ve proliferasyon indeksleri bakımından değerlendirildi. Çalışmada  cerisinde hiçbir madde bulunmayan (fitokimyasal ve ilaç)

kontrol grubu hücre kültürlerinden alınan hücrelerin hücre proliferasyonlarının devam ettiği, incelemelerde hücrelerin büyük oranda G2 siklusunda oldukları tespit edildi.

İçerisinde Paklitaksel bulunan hücrelerin hücre sikluslarının ise büyük oranda S fazında, Dakarbazin bulunan hücre kültürlerindeki hücrelerin ise G0/1 fazında hücre sikluslarının inhibe edildikleri saptanırken, fitokimyasal bulunan hücrelerin ise G0/1 fazında hücre üremesini inhibe ettikleri tespit edildi.



A: Gama-Terpinen'in A-549 hücre hattında hücre siklusu üzerindeki etkileri.

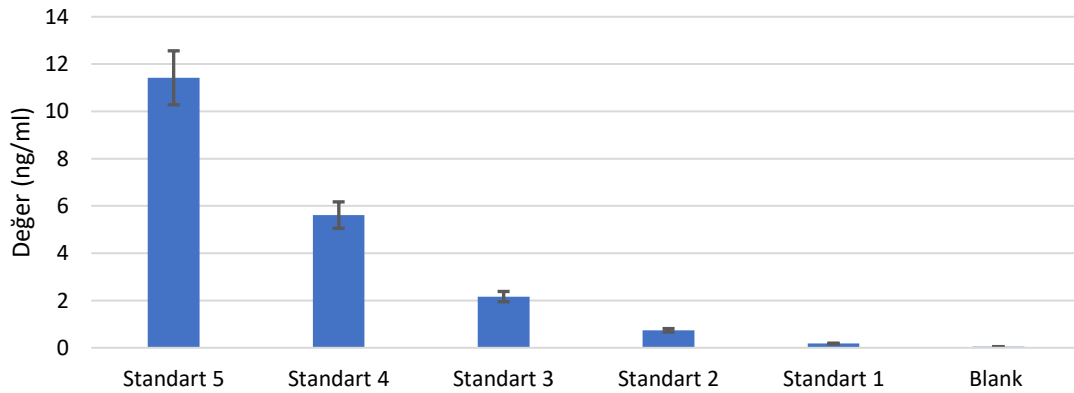
B: Alfa-Pinen'in MCF-7 hücre hattında hücre siklusu üzerindeki etkileri.

C: Gama-Terpinen'in A-2058 hücre hattında hücre siklusu üzerindeki etkileri.

Şekil 4. 19. Fitokimyasalların kanser hücre hatlarında hücre siklusu üzerindeki etkileri.

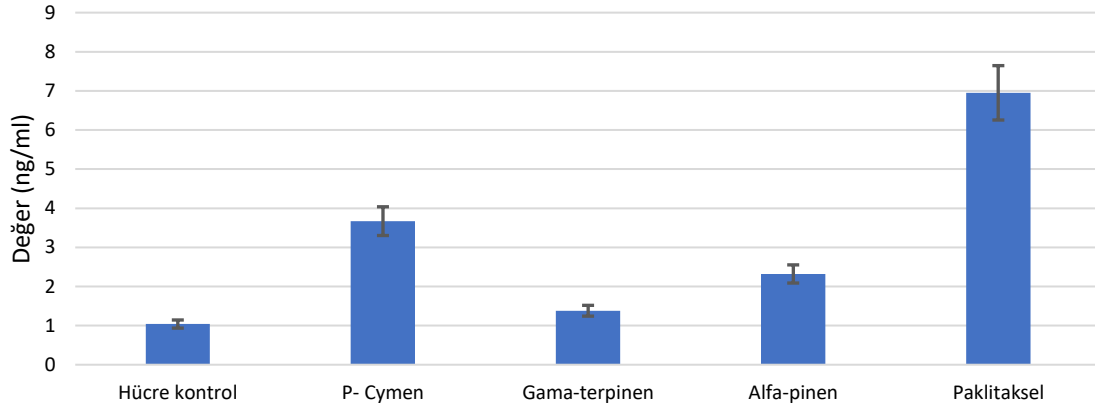
4.5. Kaspaz-3 Aktivitesi

Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in A-549 ve MCF-7 hücreleri üzerinde *kaspaz-3* aktivitesi Paklitaksel, Dakarbazin ve kontrol grubu hücreleriyle kıyaslı olarak değerlendirildi. Çalışmada ticari olarak temin edilen *kaspaz-3* kiti kullanıldı.



Şekil 4. 20. Kaspaz-3 standart eğri grafiği.

A-549 ve A-2058 hücre hattında fitokimyasalların ve standart ilaçların *kaspaz-3* aktivitesi standartlar doğrultusunda değerlendirildi (Şekil 4. 20).

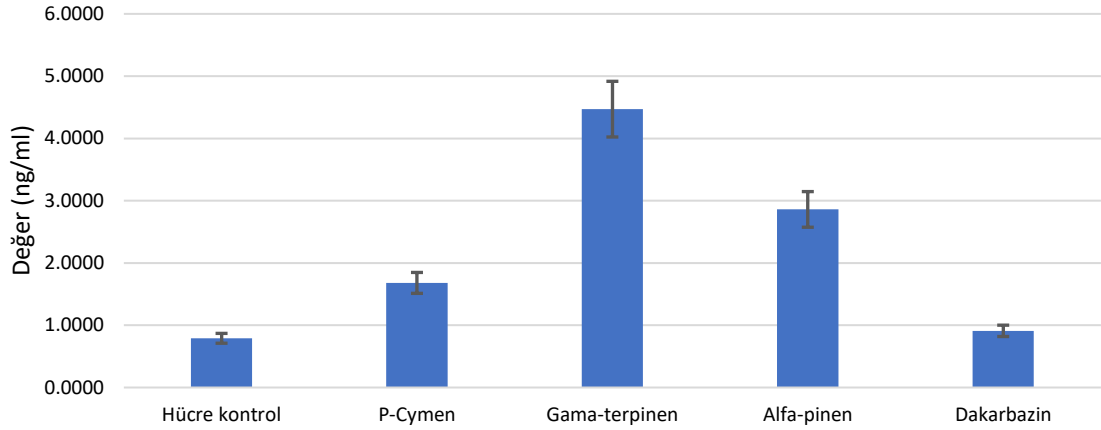


Şekil 4. 21. Alfa-Pinen (0.019 µg/ml), Gama-Terpinen (0.039 µg/ml) ve P-Cymen (0.019 µg/ml)'in A-549 hücre hattı üzerinde *kaspaz-3* aktivitesinin kontrol ve Paklitaksel (10 µM) ile kıyaslanması.

P değerleri

Kontrol&Paklitaksel: p<0.01	Paklitaksel&Alfa-Pinen: p<0.05	Alfa-Pinen&P-Cymen: p<0.05
Kontrol&Alfa-Pinen: p<0.05	Paklitaksel&Gama-Terpinen: p<0.01	Gama-Terpinen&P-Cymen: p<0.05
Kontrol Gama-Terpinen: p>0.05	Paklitaksel&P-Cymen: p<0.05	
Kontrol&P-Cymen: p<0.05	Alfa-Pinen&Gama-Terpinen: p<0.05	

Çalışmada A-549 hücreleri ve sağlıklı hücreler üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in *kaspaz 3* aktiviteleri Paklitaksel ve kontrol grubu hücrelerinin *kaspaz-3* aktivitesiyle kıyaslamalı olarak değerlendirildi. Fitokimyasalların sağlıklı hücreler üzerinde non-toksik konsantrasyonları ile Paklitakselin non-toksik konsantrasyonları karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Çalışmada Paklitakselin *kaspaz-3* aktivitesi fitokimyasalların etkisinden daha yüksek bulunsada her üç fitokimyasalın da kontrol grubu hücreleriyle kıyaslandığında hücrelerdeki *kaspaz-3* aktivitesini tetiklediği tespit edildi. Gama-Terpinen ve P-Cymen'in hücrelerde *kaspaz-3* aktivitesini kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırdığı tespit edildi (Şekil 4. 21).



Şekil 4. 22. Alfa-Pinen, Gama-Terpinen (0.039 µg/ml) ve P-Cymen (0.019 µg/ml)'in A-2058 hücre hattı üzerinde *kaspaz-3* aktivitesinin kontrol ve Dakarbazin (10 µM) ile kıyaslanması.

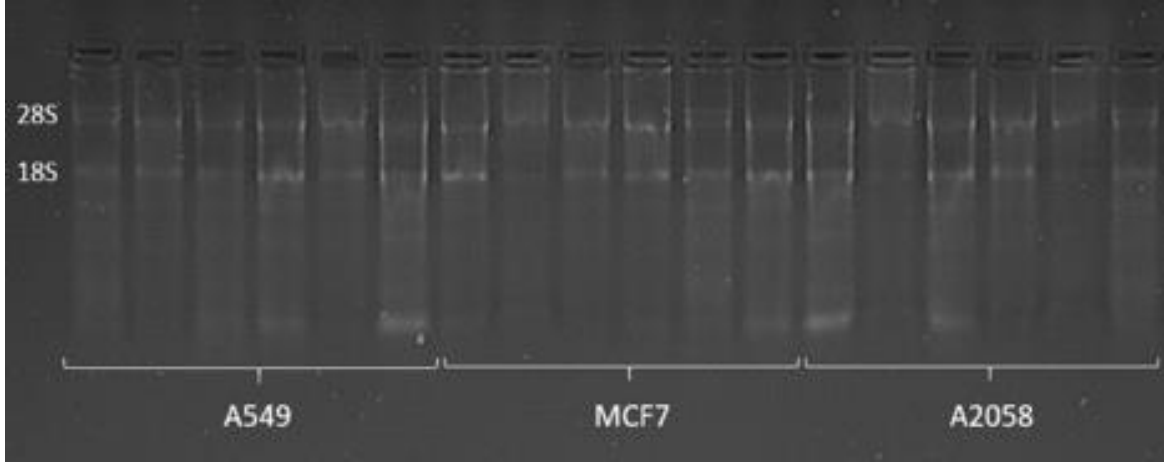
P değerleri

Kontrol&Dakarbazin: p>0.05	Dakarbazin&Alfa-Pinen: p<0.05	Alfa-Pinen&P-Cymen: p<0.05
Kontrol&Alfa-Pinen: p<0.05	Dakarbazin&Gama-Terpinen: p<0.01	Gama-Terpinen&P-Cymen: p<0.05
Kontrol Gama-Terpinen: p<0.01	Dakarbazin&P-Cymen: p<0.05	
Kontrol&P-Cymen: p<0.05	Alfa-Pinen&Gama-Terpinen: p<0.05	

A-2058 melanoma hücreleri üzerinde ise fitokimyasalların *kaspaz-3* aktivitesi üzerinde hem kontrol grubuyla hem de standart ilaçla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı artışların olduğu saptandı. Özellikle Gama-Terpinen'in melanoma hücreleri üzerinde oldukça güçlü *kaspaz-3* aktivitesini tetiklediği tespit edildi (Şekil 4. 22).

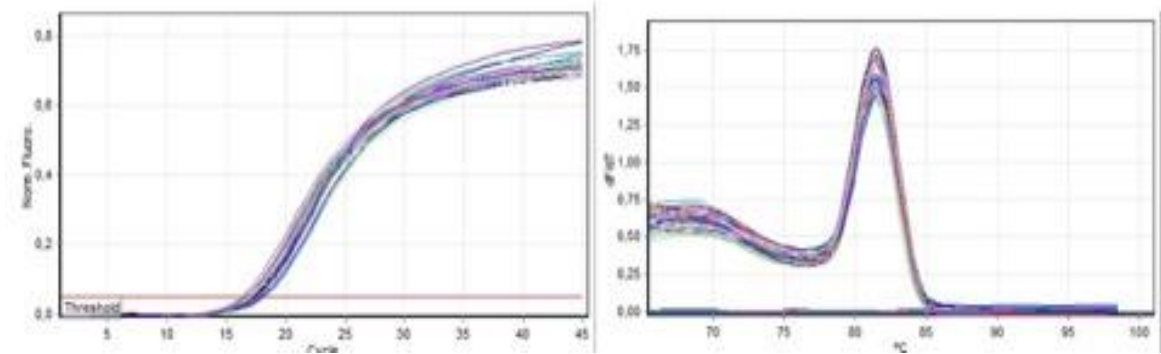
4.6. Real-Time PCR Sonuçları

Fitokimyasallar (Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen) ve standart ilaçlarla (Paklitaksel ve Dakarbazin) muamele edilen kanser hücrelerinde inkübasyon sonunda *Bax*, *Bcl-xL*, *Bcl-2*, *Caps-3*, *NF-κB* ve *p53* genlerinin ekspresyon seviyelerinin belirlenebilmesi için RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA aşamasına geçmeden önce her grup hücreden izole edilen RNA konsantrasyonu optimize edildi ve jel elektroforezinde yürütülerek kontrolleri gerçekleştirildi (Şekil 4. 23). Yeterli konsantrasyonlarda RNA izolasyonu yapılan hücrelerde daha sonra cDNA sentezleri gerçekleştirildi.

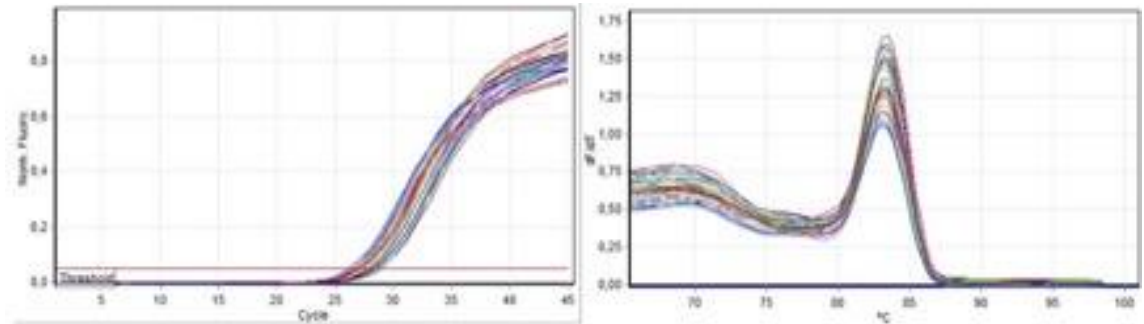


Şekil 4. 23. A-549, MCF-7 ve A-2058 kanser hücre hatlarında fitokimyasallarla muamele edilen hücrelerden izole edilen RNA'ların elektroforezde görüntüleri.

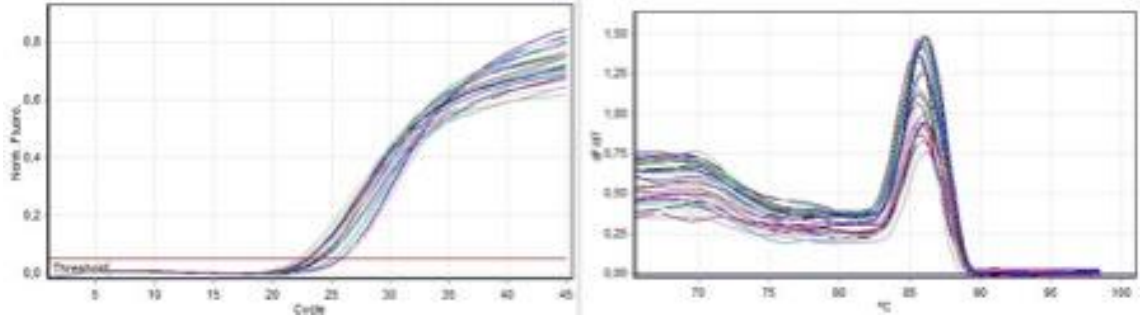
RNA izolasyonu sonrası örneklerin saflık ($A_{260}/A_{280}=1.87\pm0.01$), konsantrasyon (388.10 ± 12.80 ng/ μ l) ve kalite bakımından cDNA dönüşümü için uygun olduğu tespit edildi. RT-qPCR reaksiyonu ile elde edilen Ct ve “melting curve” (erime eğrisi) grafikleri Şekil 4. 24 – 4. 30’da verilmiştir.



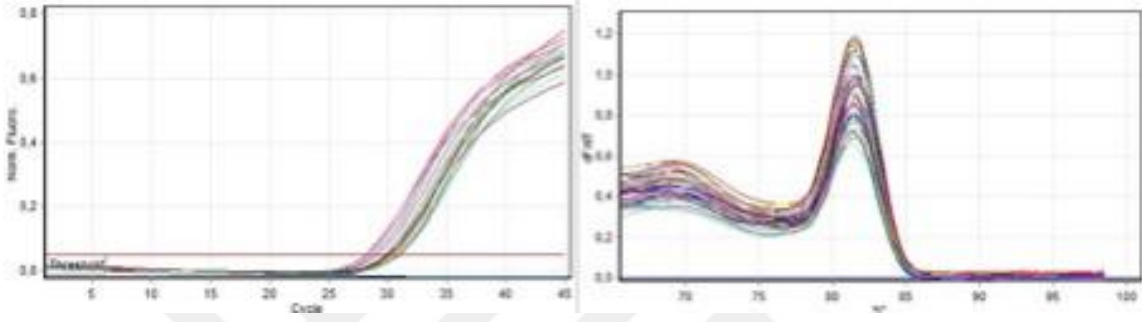
Şekil 4. 24. GAPDH geni Real-Time PCR amplifikasyon ve “melting curve” grafiği.



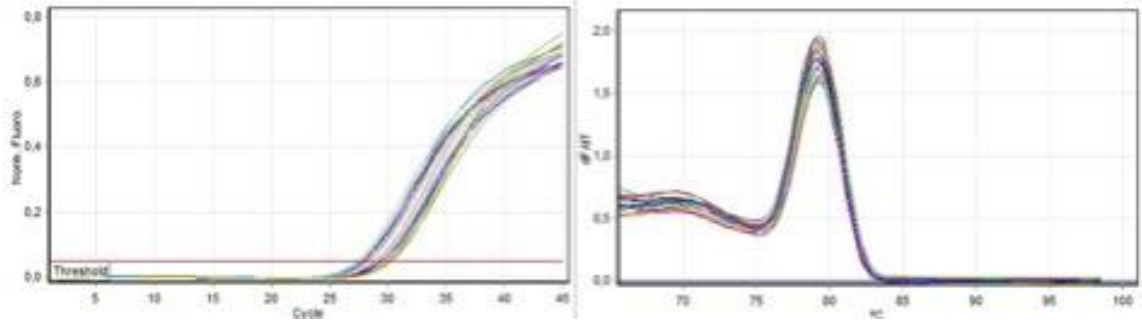
Şekil 4. 25. *Bcl-2* geni Real-Time PCR amplifikasyon ve “melting curve” grafiği.



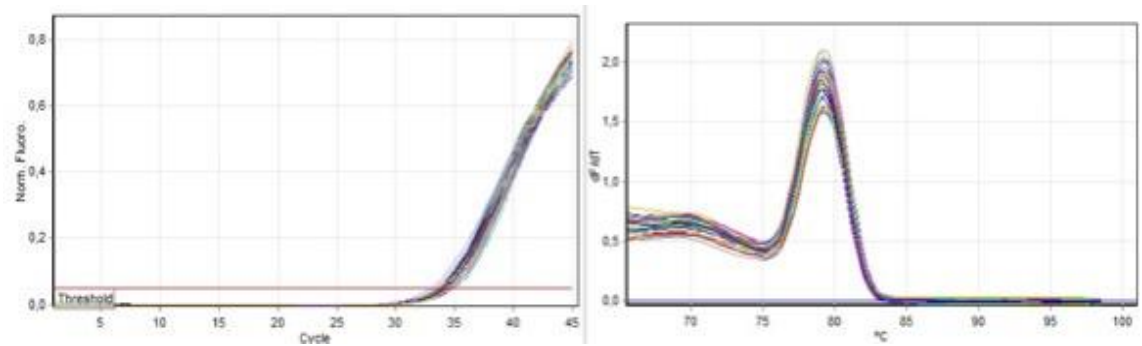
Şekil 4. 26. *Bax* geni Real-Time PCR amplifikasyon “melting curve” grafiği.



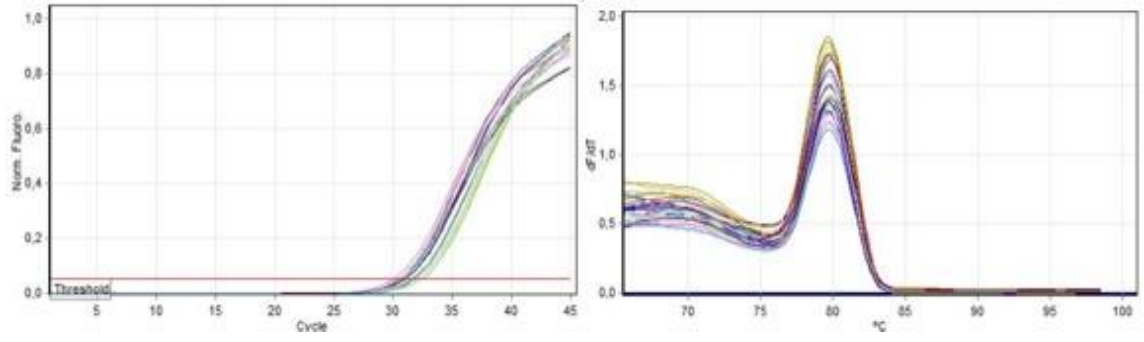
Şekil 4. 27. *Bcl-xL* geni Real-Time PCR amplifikasyon “melting curve” grafiği.



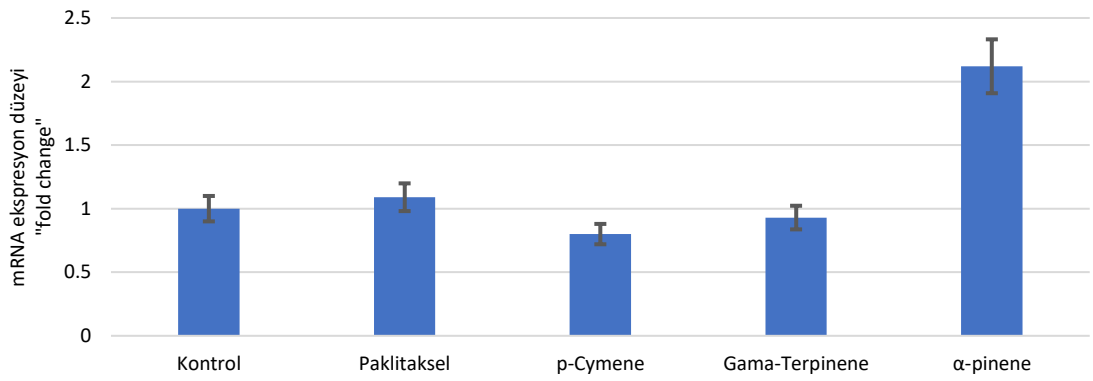
Şekil 4. 28. *Kaspaz-3* geni Real-Time PCR amplifikasyon “melting curve” grafiği.



Şekil 4. 29. *NF-κB* geni Real-Time PCR amplifikasyon “melting curve” grafiği.



Şekil 4. 30. P53 geni Real-Time PCR amplifikasyon “melting curve” grafiği.



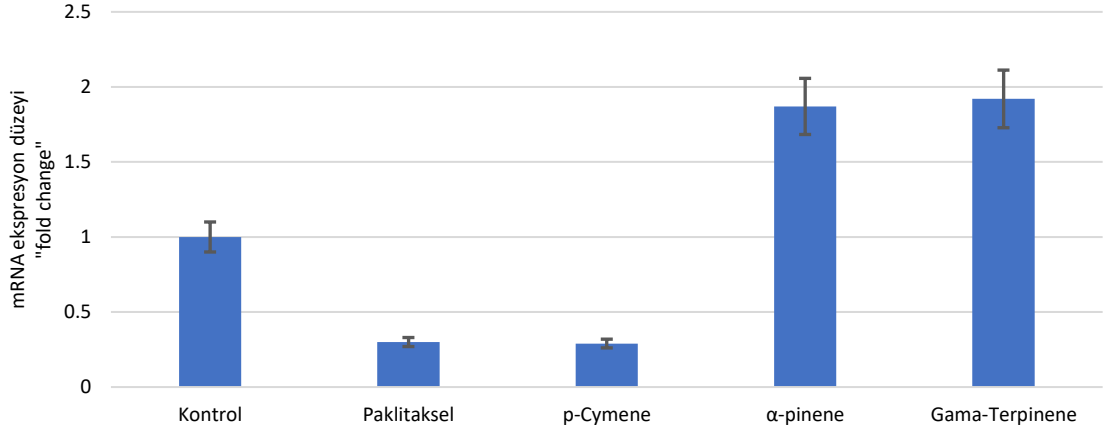
Kont.: Kontrol; PAK: Paklitaksel; PC: P-Cymen; GT: Gama-Terpinen; AP: Alfa-Pinen

Şekil 4. 31. A-549 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in *Bcl-xL* gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Paklitaksel ve kontrol grubuyla kıyaslanması

P Değerleri

Kont.&PAK: P>0.05	Kont.&AP: P<0.05	PAK>: P>0.05
Kont.&PC: P>0.05	PAK&PC: P>0.05	PAK&AP: P<0.05
Kont.>: P>0.05		

Deneylerde A-549 hücreleri üzerinde Gama-Terpinen ve P-Cymen'in *Bcl-xL* gen ekspresyonunu azaltan etkisinin varlığı tespit edilirken, Alfa-Pinen'in anti-apoptotik bir gen olan *Bcl-xL* gen ekspresyonunu inhibe etmediği hatta arttırdığı tespit edildi (Şekil 4. 31).



Şekil 4. 32. A-549 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in *NF-κB* gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Paklitaksel ve kontrol grubuyla kıyaslanması

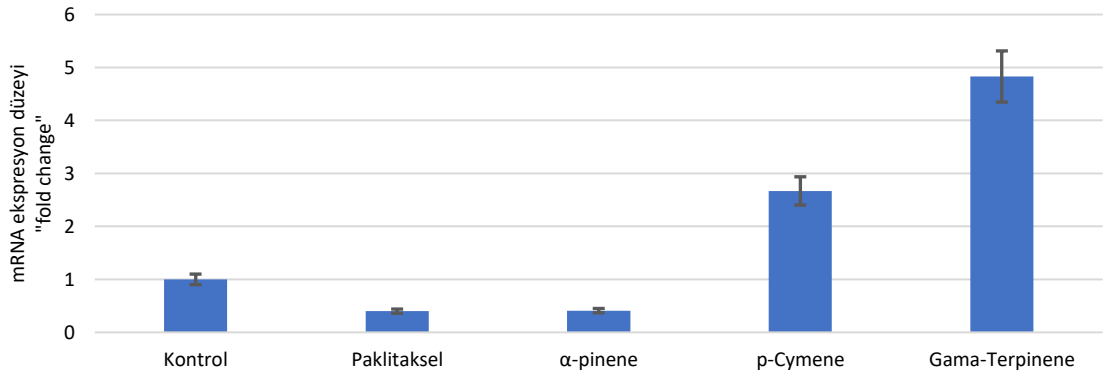
P Değerleri

Kont.&PAK: P<0.05
Kont.&PC: P<0.05
Kont.&AP: P<0.05

Kont.>: P<0.05
PAK&PC: P>0.05

PAK>: P<0.05
PAK&AP: P<0.05

A-549 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen ile Gama-Terpinen'in *NF-κB* gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırdığı tespit edilirken, P-Cymen'in bu gen ekspresyonunu kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı derecede inhibe ettiği tespit edildi (Şekil 4. 32).



Şekil 4. 33. A-549 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in *Bcl-2* gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Paklitaksel ve kontrol grubuyla kıyaslanması

P Değerleri

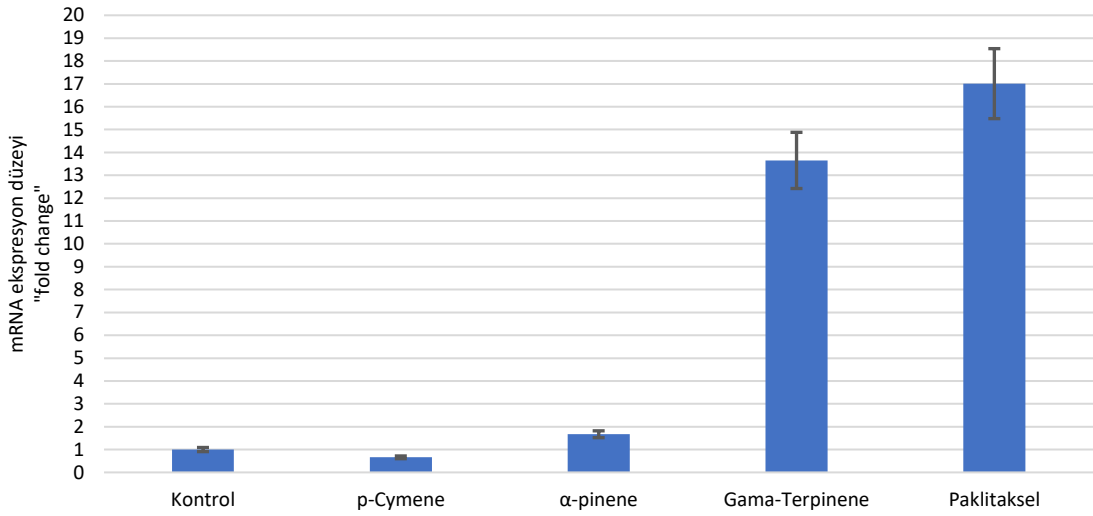
Kont.&PAK: P>0.05
Kont.&PC: P>0.05
Kont.&AP: P<0.05

Kont.>: P<0.01
PAK&PC: P>0.05

PAK>: P<0.05
PAK&AP: P<0.05

Benzer şekilde A-549 hücreleri üzerinde yapılan deneylerde bir anti-apoptotik gen olan *Bcl-2* gen ekspresyonunu Alfa-Pinen'in istatistiksel olarak anlamlı düzeyde inhibe ettiği tespit edilirken P-Cymen ve Gama-Terpinen'in bu genin ekspresyonunu inhibe etmediği aksine tetiklediği tespit edildi. Paklitaksel ile Alfa-Pinen'in etkisi kıyaslandığında *Bcl-2* gen

ekspresyonu üzerindeki inhibisyon etkileri arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi (Şekil 4. 33).

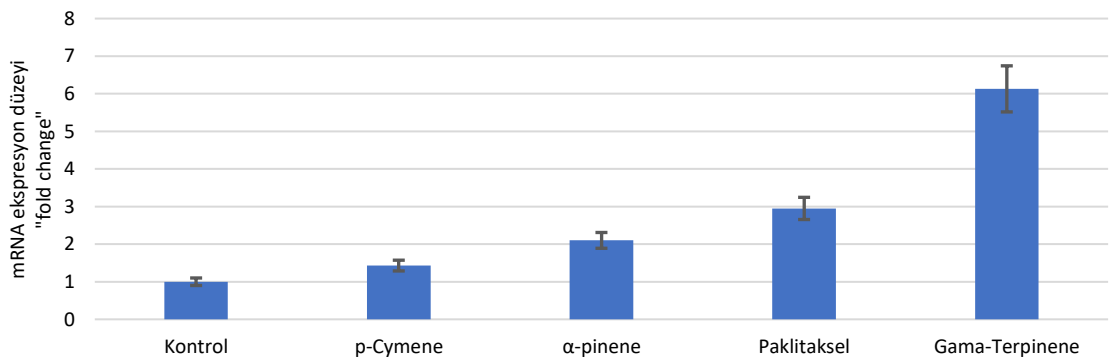


Şekil 4. 34. A-549 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in *kaspaz-3* gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Paklitaksel ve kontrol grubuyla kıyaslanması

P Değerleri

Kont.&PAK: P<0.01	Kont.>: P<0.01	PAK>: P>0.05
Kont.&PC: P>0.05	PAK&PC: P<0.01	PAK&AP: P<0.01
Kont.&AP: P>0.05		

A-549 hücreleri üzerinde *kaspaz-3* geni ekspresyon oranları değerlendirildiğinde Gama-Terpinen'in *kaspaz-3* gen ekspresyonunu anlamlı derecede arttırırken, P-Cymen ve Alfa-Pinen'in bu genin çalışması üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı tespit edildi (Şekil 4. 34).

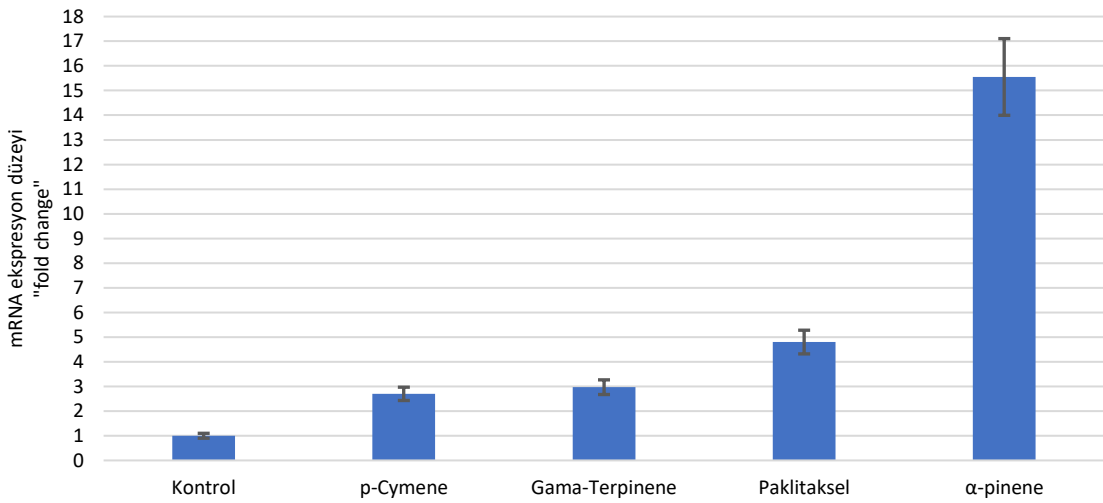


Şekil 4. 35. A-549 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in *p53* gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Paklitaksel ve kontrol grubuyla kıyaslanması

P Değerleri

Kont.&PAK: P<0.05	Kont.>: P<0.01	PAK>: P<0.05
Kont.&PC: P>0.05	PAK&PC: P<0.05	PAK&AP: P>0.05
Kont.&AP: P<0.05		

Fitokimyasalların pro-apoptotik genlerden birisi olan *p53* geni üzerindeki etkisinin insan akciğer karsinomu üzerinde etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda her üç fitokimyasalın da kontrol grubuyla kıyaslandığında *p53* geni ekspresyonunu arttırdığı tespit edilirken, P-Cymen'in etkinliğinin istatistiksel açıdan anlamsız olduğu, Alfa-Pinen'in etkinliğinin istatistiksel olarak kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek olsa da, Paklitaksel'in etkinliğinden anlamlı derecede düşük kaldığı görülmektedir. Gama-Terpinen'in ise *p53* gen ekspresyonunu Paklitaksel ile kıyaslandığında anlamlı derecede yüksek oranda tetiklediği tespit edildi (Şekil 4. 35).

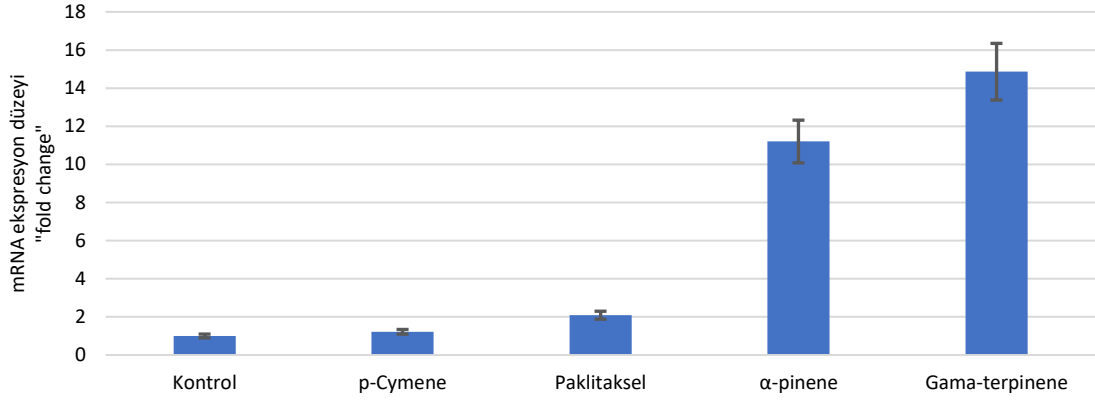


Şekil 4. 36. A-549 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in *Bax* gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Paklitaksel ve kontrol grubuyla kıyaslanması

P Değerleri

Kont.&PAK: P<0.05	Kont.>: P<0.05	PAK>: P<0.05
Kont.&PC: P<0.05	PAK&PC: P<0.05	PAK&AP: P<0.01
Kont.&AP: P<0.001		

A-549 hücreleri üzerinde *Bax* pro-apoptotik geni ile ekspresyon çalışmalarında ise her üç fitokimyasalın da kontrol grubuyla kıyaslandığında *Bax* gen ekspresyonunun anlamlı derecede arttırırsa da hem P-Cymen hem de Gama-Terpinen'in etkinliğinin Paklitakselin etkinliğinden anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi. Paklitakselin etkisiyle kıyaslandığında *Bax* gen ekspresyonunu bu üç fitokimyasal arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede arttıran fitokimyasalın Alfa-Pinen olduğu saptandı ($p<0.01$; Şekil 4. 36).

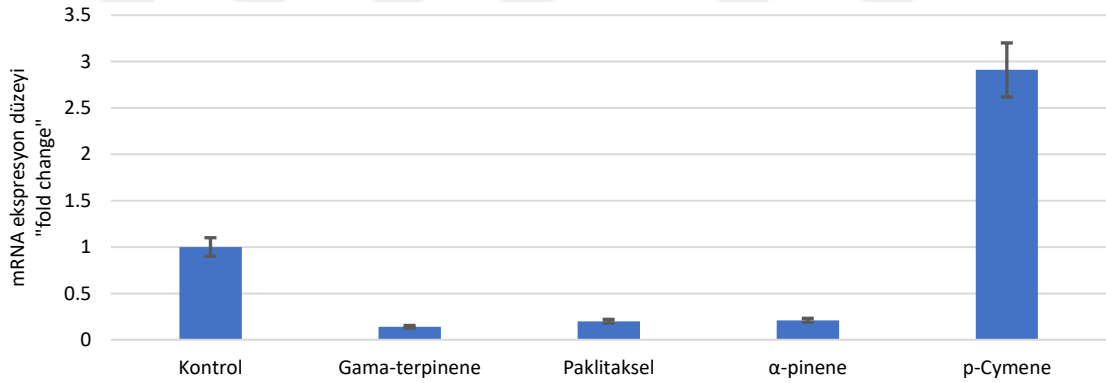


Şekil 4. 37. MCF-7 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in *Bcl-xL* gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Paklitaksel ve kontrol grubuyla kıyaslanması

P Değerleri

Kont.&PAK: P<0.05	Kont.>: P<0.01	PAK>: P<0.01
Kont.&PC: P>0.05	PAK&PC: P>0.05	PAK&AP: P<0.01
Kont.&AP: P<0.01		

MCF-7 hücreleriyle yapılan gen ekspresyonu deneylerinde anti-apoptotik genlerden biri olan *Bcl-xL* gen ekspresyonunu Alfa-Pinen ve Gama-Terpinen'in inhibe etmedikleri aksine arttırdıkları fakat P-Cymen'in bu gen ekspresyonunu Paklitaksel'in etkinliğiyle kıyaslandığında azalttığı tespit edildi (Şekil 4. 37).

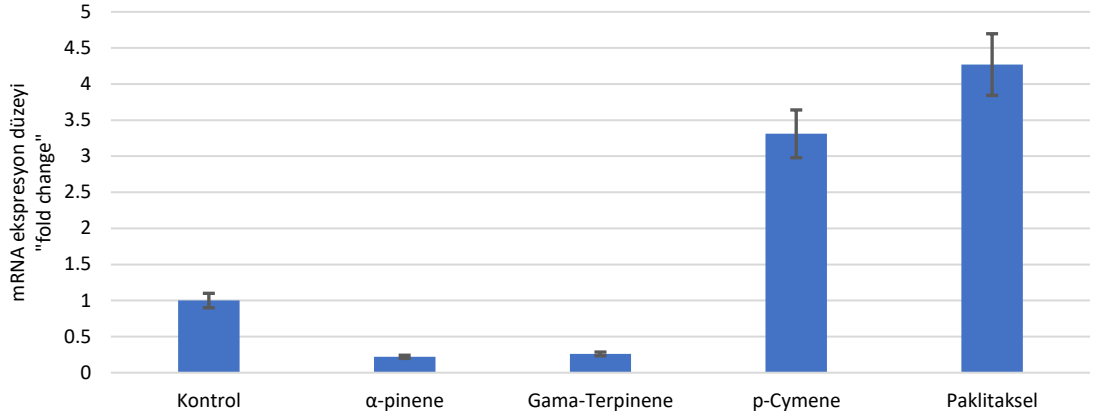


Şekil 4. 38. MCF-7 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in *NF-κB* gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Paklitaksel ve kontrol grubuyla kıyaslanması

P Değerleri

Kont.&PAK: P<0.05	Kont.>: P<0.05	PAK>: P>0.05
Kont.&PC: P<0.01	PAK&PC: P<0.01	PAK&AP: P>0.05
Kont.&AP: P<0.05		

MCF-7 hücreleri üzerinde Gama-Terpinen ve Alfa-Pinen'in Paklitaksele benzer bir mekanizma ile *NF-κB* gen ekspresyonunu inhibe ettiği tespit edilirken, P-Cymen'in bu gen ekspresyonunu anlamlı derecede arttırdığı saptandı (Şekil 4. 38).

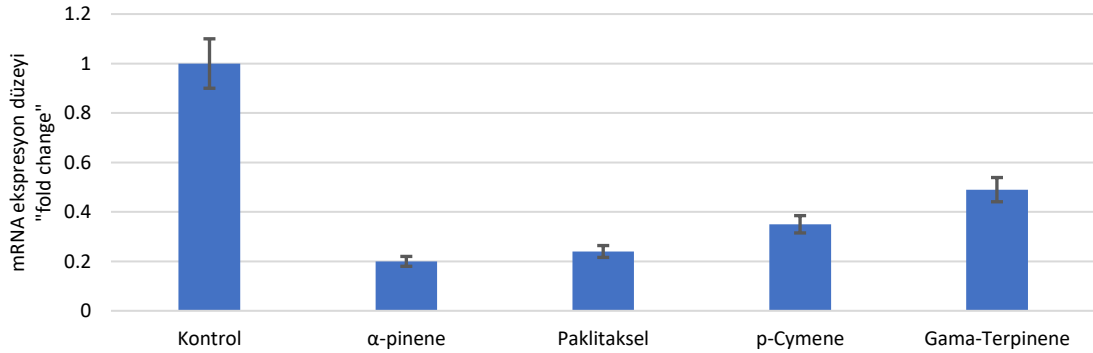


Şekil 4. 39. MCF-7 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in *Bax* gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Paklitaksel ve kontrol grubuyla kıyaslanması

P Değerleri

Kont.&PAK: P<0.01	Kont.>: P<0.05	PAK>: P<0.01
Kont.&PC: P<0.01	PAK&PC: P>0.05	PAK&AP: P<0.01
Kont.&AP: P<0.05		

İnsan meme kanserinden derive edilen MCF-7 hücreleri üzerinde yapılan deneylerde bir pro-apoptotik gen olan *Bax* geni ekspresyonunu P-Cymen'in anlamlı derecede arttırdığı tespit edilirken, Alfa-Pinen ve Gama-Terpinen'in kontrol grubuyla kıyaslandığında hücrelerde istatistiksel açıdan anlamlı derecede düşük düzeyde eksprese edildiği tespit edildi (Şekil 4. 39).



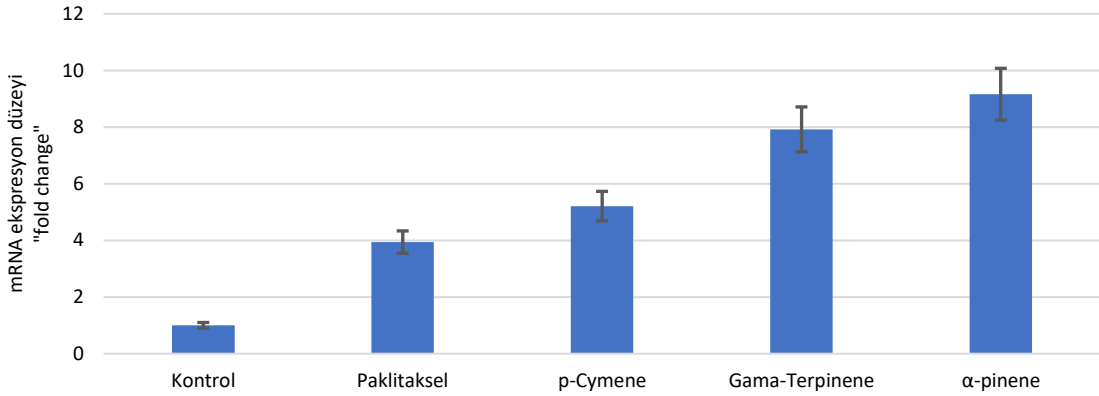
Şekil 4. 40. MCF-7 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in *Bcl-2* gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Paklitaksel ve kontrol grubuyla kıyaslanması

P Değerleri

Kont.&PAK: P<0.05	Kont.>: P<0.05	PAK>: P>0.05
Kont.&PC: P<0.05	PAK&PC: P>0.05	PAK&AP: P>0.05
Kont.&AP: P<0.05		

MCF-7 hücreleri üzerinde her üç fitokimyasalın da kontrol grubuyla kıyaslandığında bir anti-apoptotik gen olan *Bcl-2* gen ekspresyonunu kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı tespit edildi. Fitokimyasalların

Paklitaksel ile kıyaslandığında ise Alfa-Pinen, Gama-terpien ve P-Cymen'in etkinliği ile anlamlı bir fark tespit edilmedi. Çalışmada bu hücreler üzerinde en etkili fitokimyasalın Alfa-Pinen olduğu saptandı (Şekil 4. 40).

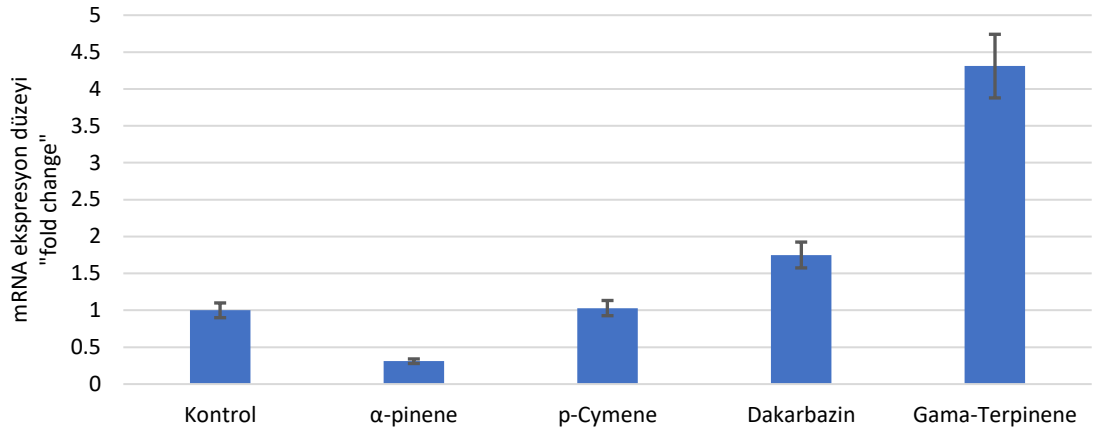


Şekil 4. 41. MCF-7 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in *p53* gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Paklitakse ve kontrol grubuyla kıyaslanması

P Değerleri

Kont.&PAK: P<0.05	Kont.>: P<0.05	PAK>: P<0.05
Kont.&PC: P<0.05	PAK&PC: P>0.05	PAK&AP: P<0.05
Kont.&AP: P<0.05		

Deneylerde MCF-7 hücreleri üzerinde *p53* gen ekspresyonunu her üç fitokimyasalın da tetiklediği tespit edilirken, P-Cymen'in etkinliğinin Paklitaksel'den farksız olduğu istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığı, Gama-Terpinen ve Alfa-Pinen'in ise Paklitaksel'in etkinliğinden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 4. 41).



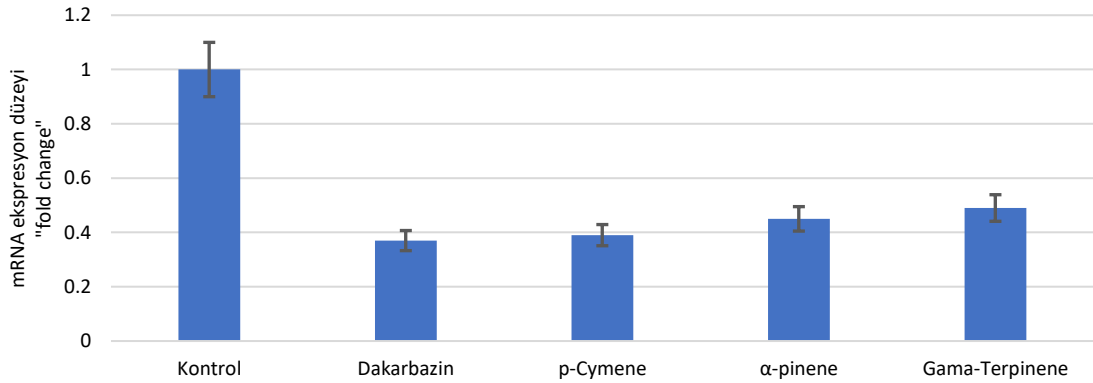
DAK: Dakarbazin

Şekil 4. 42. A-2058 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in *Bcl-xL* gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Dakarbazin ve kontrol grubuyla kıyaslanması

P Değerleri

Kont.&DAK: P<0.05	Kont.>: P<0.01	DAK>: P<0.05
Kont.&PC: P<0.05	DAK&PC: P<0.05	DAK&AP: P<0.05
Kont.&AP: P>0.05		

İnsan melanoma hücreleri üzerinde (A-2058) yapılan çalışmalarda Alfa-Pinen ve P-Cymen'in *Bcl-xL* gen ekspresyonunu Dakarbazin ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde azalttığı tespit edilirken, Gama-Terpinen'in ise anlamlı derecede arttırdığı saptandı (Şekil 4. 42).



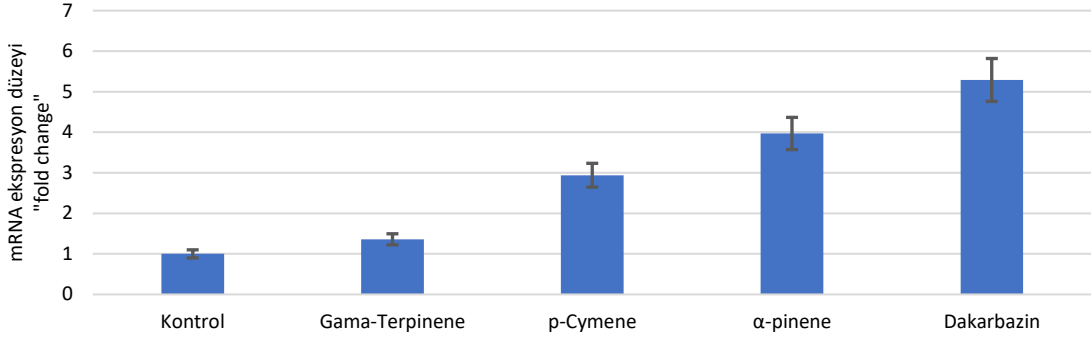
Şekil 4. 43. A-2058 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve *NF-κB* gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin Dakarbazin ve kontrol grubuyla kıyaslanması

P Değerleri

Kont.&DAK: P<0.05	Kont.>: P<0.05	DAK>: P>0.05
Kont.&PC: P<0.05	DAK&PC: P>0.05	DAK&AP: P>0.05
Kont.&AP: P<0.05		

A-2058 hücrelerinde *NF-κB* gen ekspresyonu üzerinde yapılan deneylerde her üç fitokimyasalında etkinliğinin Dakarbazinin etkinliği ile oldukça yakın olduğu tespit edildi.

Dakarbazin ve fitokimyasalların bu gen ekspresyonu üzerinden kontrol grubuyla kıyaslandığında inhibitör etki gösterdikleri tespit edildi (Şekil 4. 43).

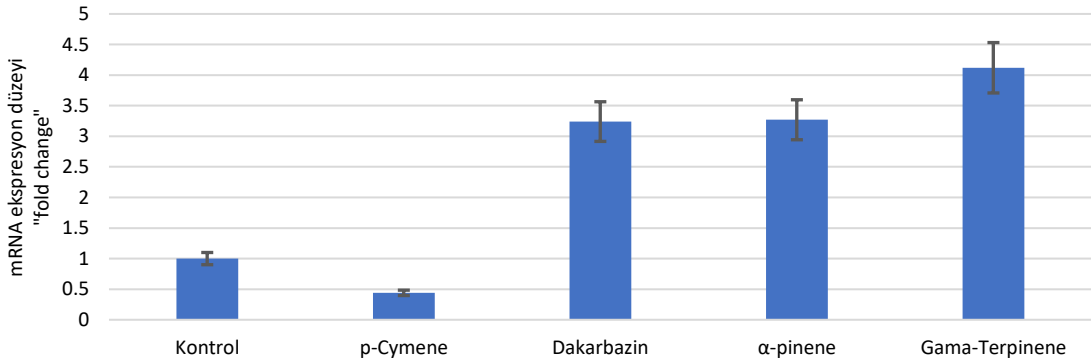


Şekil 4. 44. A-2058 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in *Bax* gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin standart ilaçlar ve kontrol grubuyla kıyaslanması

P Değerleri

Kont.&DAK: P<0.05	Kont.>: P>0.05	DAK>: P<0.05
Kont.&PC: P<0.05	DAK&PC: P<0.05	DAK&AP: P>0.05
Kont.&AP: P<0.05		

Melanoma hücreleri üzerinde *Bax* geni ekspresyonu açısından değerlendirildiğinde fitokimyasallardan Gama-Terpinen etkinliğinin anlamlı derecede yüksek olmadığı tespit edilirken, hem P-Cymen hem de Alfa-Pinen *Bax* geni ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdı (Şekil 4. 44).



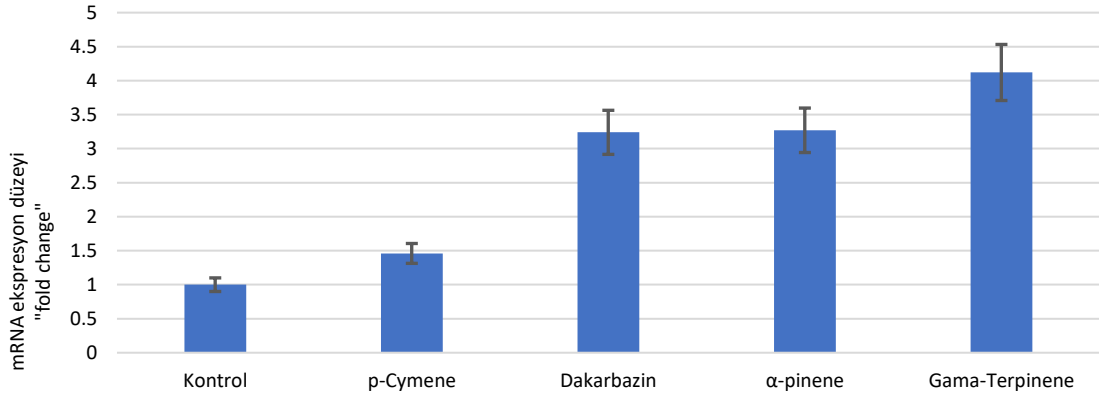
Şekil 4. 45. A-2058 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in *Bcl-2* gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin standart ilaçlar ve kontrol grubuyla kıyaslanması

P Değerleri

Kont.&DAK: P<0.05	Kont.>: P>0.05	DAK>: P>0.05
Kont.&PC: P>0.05	DAK&PC: P<0.05	DAK&AP: P>0.05
Kont.&AP: P<0.05		

A-2058 hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda *Bcl-2* gen ekspresyonunu P-Cymen'in anlamlı derecede inhibe ettiği tespit edilirken hem standart ilaç Dakarbazin

hem de Alfa-Pinen ve Gama-Terpinen bu genin ekspresyonunu inhibe edici bir etki gösterdi (Şekil 4. 45).

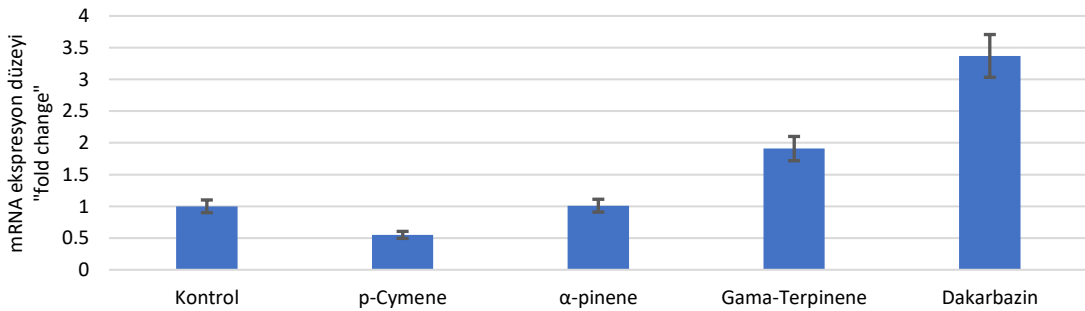


Şekil 4. 46. A-2058 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in *Kaspaz-3* gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin standart ilaçlar ve kontrol grubuyla kıyaslanması

P Değerleri

Kont.&DAK: P<0.05	Kont.>: P<0.05	DAK>: P>0.05
Kont.&PC: P>0.05	DAK&PC: P<0.05	DAK&AP: P>0.05
Kont.&AP: P<0.05		

Melanoma hücreleri üzerinde yapılan deneylerde Alfa-Pinen ve Gama-Terpinen'in hücrelerde *kaspaz-3* geni ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı tespit edilirken, P-Cymen'in *kaspaz-3* geni ekspresyonunu kontrol grubuyla kıyaslandığında arttırdığı tespit edilse de anlamlı bir artışa yol açmadığı görüldü (Şekil 4. 46).



Şekil 4. 47. A-2058 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in *p53* gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin standart ilaçlar ve kontrol grubuyla kıyaslanması

P Değerleri

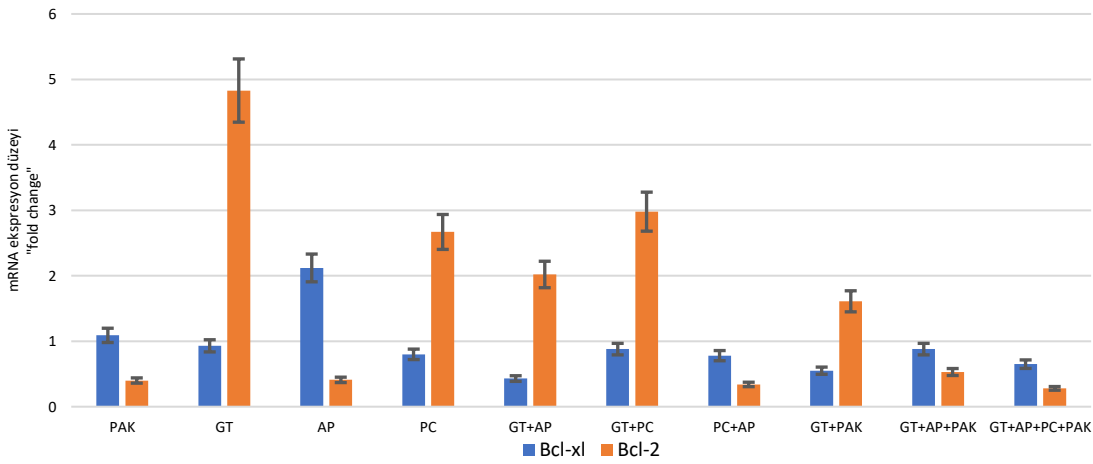
Kont.&DAK: P<0.01	Kont.>: P<0.05	DAK>: P>0.05
Kont.&PC: P>0.05	DAK&PC: P<0.05	DAK&AP: P<0.05
Kont.&AP: P<0.05		

Melanoma hücreleri üzerinde yapılan araştırmalarda P-Cymen ve Alfa-Pinen'in *p53* gen ekspresyonu üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde bir etkisinin olmadığı

ancak, Gama-Terpinen'in bu gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı tespit edildi. Gama-Terpinen'in etkisinin Dakarbazinle kıyaslandığında ise daha düşük olduğu tespit edildi (Şekil 4. 47).

4.7. Sinerjistik Aktivite Çalışma Sonuçları

4.7.1. Fitokimyasalların ve Standart ilaçların Farklı Kombinasyonlarının Kansere Hücrelerine Karşı Sinerjistik Etkilerinin Değerlendirilmesi



Şekil 4. 48. A-549 hücreleri üzerinde fitokimyasalların kombine kullanılmalarının *Bcl-2* ve *Bcl-xL* gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerinin kıyaslanması

P Dğerleri

Bcl-xL

PAK>: P>0.05
PAK&AP: P<0.05
PAK&PC: P>0.05
PAK>+AP: P>0.05
PAK>+PC: P>0.05

PAK&PC+AP: P>0.05
PAK>+PAK: P>0.05
PAK>+AP+PAK: P>0.05
PAK>+AP+PC+PAK: P>0.05

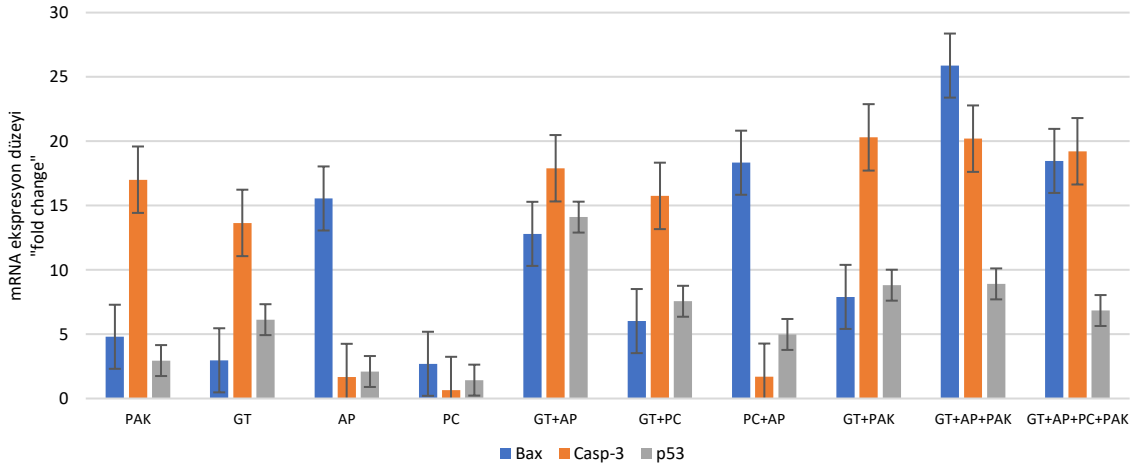
Bcl-2

PAK>: P<0.01
PAK&AP: P>0.05
PAK&PC: P<0.05
PAK>+AP: P<0.05
PAK>+PC: P<0.05
PAK&PC+AP: P>0.05
PAK>+PAK: P<0.05
PAK>+AP+PAK: P>0.05
PAK>+AP+PC+PAK: P>0.05

Fitokimyasalların gerek kendi aralarında ve gerekse de standart ilaçlarla kombine etkinliklerinin araştırıldığı bu grup çalışmalarda standart ilaç etkinlikleriyle karşılaştırmalı olarak pro-apoptotik ve anti-apoptotik gen ekspresyonları araştırıldı.

A-549 hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda anti-apoptotik genlerden *Bcl-xL* ve *Bcl-2* gen ekspresyonları üzerinde farklı kombinasyonlar denendi, Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen'in, P-Cymen artı Paklitaksel'in ve Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen artı P-Cymen artı

Paklitaksel kombinasyonlarının bu iki anti-apoptotik gen ekspresyonları üzerinde oldukça önemli inhibitör etki gösterdikleri tespit edildi (Şekil 4. 48).

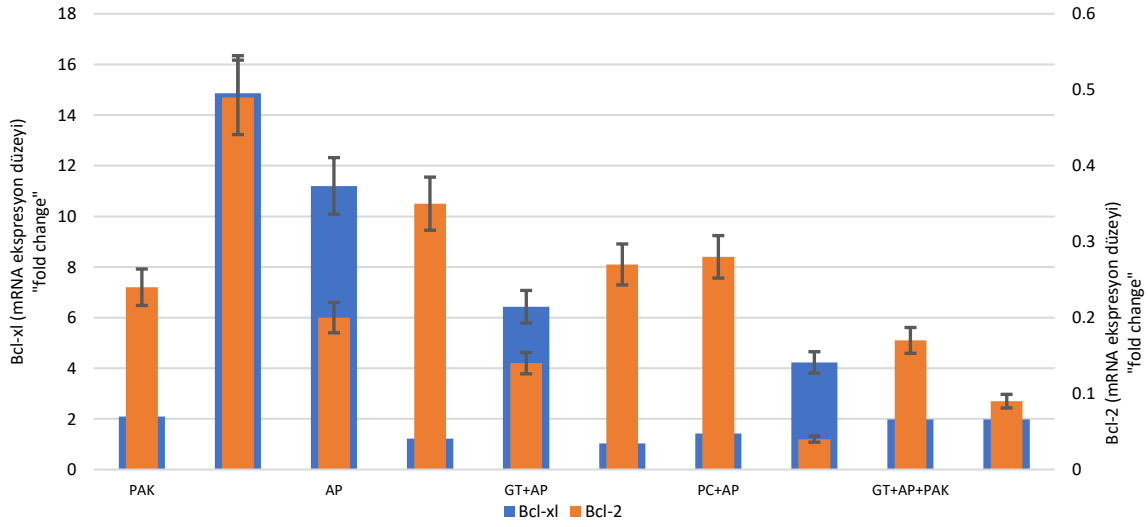


Şekil 4. 49. A-549 hücreleri üzerinde fitokimyasalların kombine kullanılmalarının *Bax*, *kaspaz-3* ve *p53* gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerinin kıyaslanması

P Dğerleri

<i>Bax</i>	<i>Kasp-3</i>	<i>P53</i>
PAK>: P>0.05	PAK>: P>0.05	PAK>: P<0.05
PAK&AP: P<0.05	PAK&AP: P>0.05	PAK&AP: P>0.05
PAK&PC: P>0.05	PAK&PC: P<0.01	PAK&PC: P>0.05
PAK>+AP: P<0.05	PAK>+AP: P>0.05	PAK>+AP: P<0.05
PAK>+PC: P>0.05	PAK>+PC: P<0.05	PAK>+PC: P<0.05
PAK&PC+AP: P<0.05	PAK&PC+AP: P<0.01	PAK&PC+AP: P>0.05
PAK>+PAK: P>0.05	PAK>+PAK: P>0.05	PAK>+PAK: P<0.05
PAK>+AP+PAK: P<0.05	PAK>+AP+PAK: P>0.05	PAK>+AP+PAK: P<0.05
PAK>+AP+PC+PAK: P<0.05	PAK>+AP+PC+PAK: P>0.05	PAK>+AP+PC+PAK: P<0.05

A-549 hücreleri üzerinde pro-apoptotik genlerden *Bax*, *kaspaz-3* ve *p53* genleri üzerinde Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen ve Gama-Terpinen'in diğer kombinasyonlarının *Bax* ve *p53*, Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen ve Paklitaksel kombinasyonlarının *Bax*, *kaspaz-3* ve *p53* gen ekspresyonları üzerinde anlamlı ölçüde artışa yol açtığı tespit edildi (Şekil 4. 49).

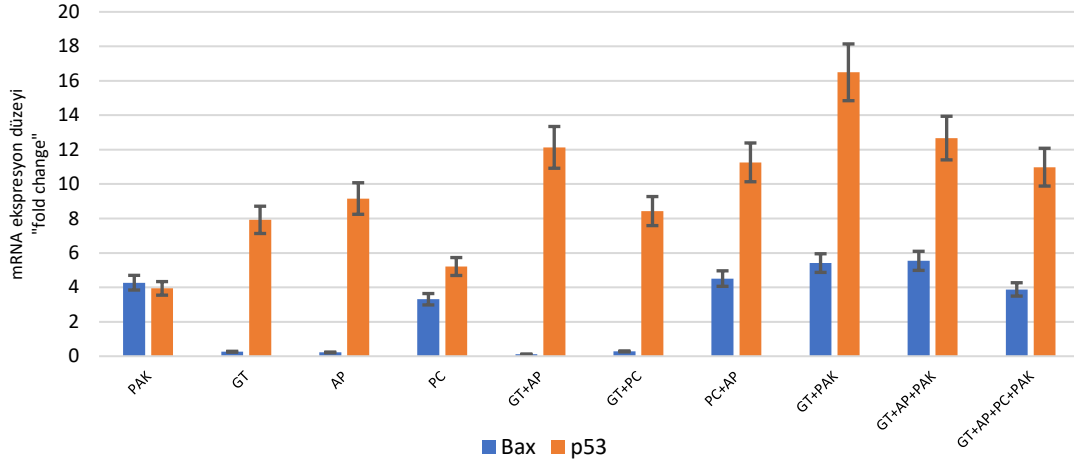


Şekil 4. 50. MCF-7 hücreleri üzerinde fitokimyasalların kombine kullanılmalarının Bcl-2 ve *Bcl-xL* gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerinin kıyaslanması

P Dğerleri

<i>Bcl-xL</i>		<i>Bcl-2</i>	
PAK>: P<0.01	PAK&PC+AP: P>0.05	PAK>: P>0.01	PAK&PC+AP: P>0.05
PAK&AP: P<0.01	PAK>+PAK: P<0.05	PAK&AP: P>0.05	PAK>+PAK: P<0.01
PAK&PC: P>0.05	PAK>+AP+PAK: P>0.05	PAK&PC: P>0.05	PAK>+AP+PAK: P<0.05
PAK>+AP: P<0.05	PAK>+AP+PC+PAK: P>0.05	PAK>+AP: P<0.05	PAK>+AP+PC+PAK: P<0.01
PAK>+PC: P>0.05		PAK>+PC: P>0.05	

MCF-7 hücreleri üzerinde yapılan kombine etkinlik deneylerinde Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen kombinasyonunun, Gama-Terpinen artı Paklitaksel kombinasyonunu ve Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen artı P-Cymen artı Paklitaksel kombinasyonlarının anti-apoptotik genlerden *Bcl-2* gen ekspresyonunu anlamlı derecede azalttığı tespit edildi. Bunun yanında Gama-Terpinen artı P-Cymen kombinasyonunun da *Bcl-xL* gen ekspresyon düzeyinde anlamlı düzeyde azalmaya yol açtığı saptandı (Şekil 4. 50).



Şekil 4. 51. MCF-7 hücreleri üzerinde fitokimyasalların kombine kullanılmalarının *Bax*, *kaspaz-3* ve *p53* gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerinin kıyaslanması

P değerleri

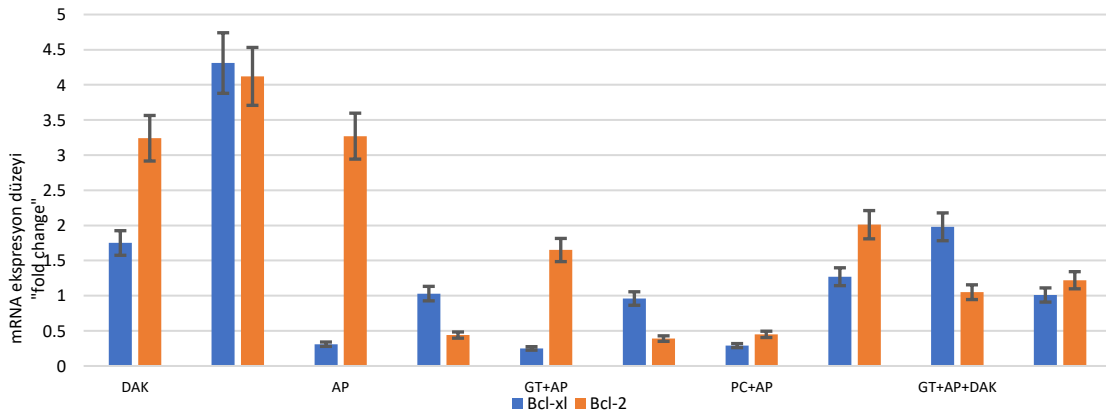
Bax

PAK>: P<0.05
 PAK&AP: P<0.05
 PAK&PC: P>0.05
 PAK>+AP: P<0.01
 PAK>+PC: P<0.01
 PAK&PC+AP: P>0.05
 PAK>+PAK: P>0.05
 PAK>+AP+PAK: P>0.05
 PAK>+AP+PC+PAK: P>0.05

P53

PAK>: P<0.05
 PAK&AP: P<0.05
 PAK&PC: P>0.05
 PAK>+AP: P<0.05
 PAK>+PC: P<0.05
 PAK&PC+AP: P<0.05
 PAK>+PAK: P<0.01
 PAK>+AP+PAK: P<0.01
 PAK>+AP+PC+PAK: P<0.05

A-549 hücreleri üzerinde Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen kombinasyonu, P-Cymen artı Alfa-Pinen kombinasyonu, Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen artı Paklitaksel kombinasyonu, Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen artı P-Cymen artı Paklitaksel kombinasyonlarının *p53* gen ekspresyonu üzerinde anlamlı derecede daha yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 4. 51).



Şekil 4. 52. A-2058 hücreleri üzerinde fitokimyasalların kombine kullanılmalarının *Bcl-2* ve *Bcl-xL* gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerinin kıyaslanması

P Dğerleri

Bcl-xL

DAK>: P<0.05
DAK&AP: P<0.05
DAK&PC: P<0.05
DAK>+AP: P<0.05
DAK>+PC: P<0.05

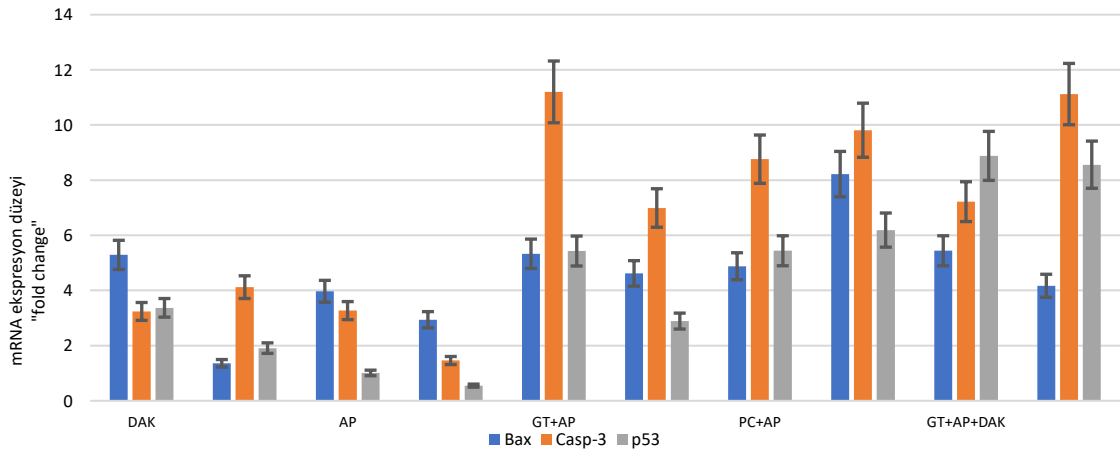
DAK&PC+AP: P>0.05
DAK>+DAK: P>0.05
DAK>+AP+DAK: P>0.05
DAK>+AP+PC+D
AK: P>0.05

Bcl-2

DAK>: P>0.01
DAK&AP: P>0.05
DAK&PC: P<0.05
DAK>+AP: P>0.05
DAK>+PC: P<0.05

DAK&PC+AP: P<0.05
DAK>+DAK: P>0.05
DAK>+AP+DAK: P<0.05
DAK>+AP+PC+D
AK: P<0.05

İnsan melanoma hücreleri üzerinde anti-apoptotik genlerden *Bcl-xL* ve *Bcl-2* ekspresyon oranlarının fitokimyasal ve Dakarbazin kombinasyonları Şekil 4. 52’de verilmiştir. Deneylerde Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen kombinasyonunun her iki gen ekspresyonunda da Dakarbazin ile kıyaslandığında anlamlı bir inhibisyonun oluşturduğu tespit edildi. Gama-Terpinen artı P-Cymen kombinasyonu ve P-Cymen artı Alfa-Pinen kombinasyonlarının da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bu iki anti-apoptotik gen ekspresyonunu inhibe ettiği tespit edildi (Şekil 4. 52).



Şekil 4. 53. A-2058 hücreleri üzerinde fitokimyasalların kombine kullanılmalarının *Bax*, *kaspaz-3* ve *p53* gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerinin kıyaslanması

P Dğerleri

Bax

DAK>: P<0.05
DAK&AP: P>0.05
DAK&PC: P>0.05
DAK>+AP: P>0.05
DAK>+PC: P>0.05
DAK&PC+AP: P>0.05
DAK>+DAK: P<0.05
DAK>+AP+DAK: P>0.05
DAK>+AP+PC+DAK: P>0.05

Kasp-3

DAK>: P>0.05
DAK&AP: P>0.05
DAK&PC: P>0.01
DAK>+AP: P<0.01
DAK>+PC: P<0.05
DAK&PC+AP: P<0.05
DAK>+DAK: P<0.05
DAK>+AP+DAK: P<0.05
DAK>+AP+PC+DAK: P<0.01

p-53

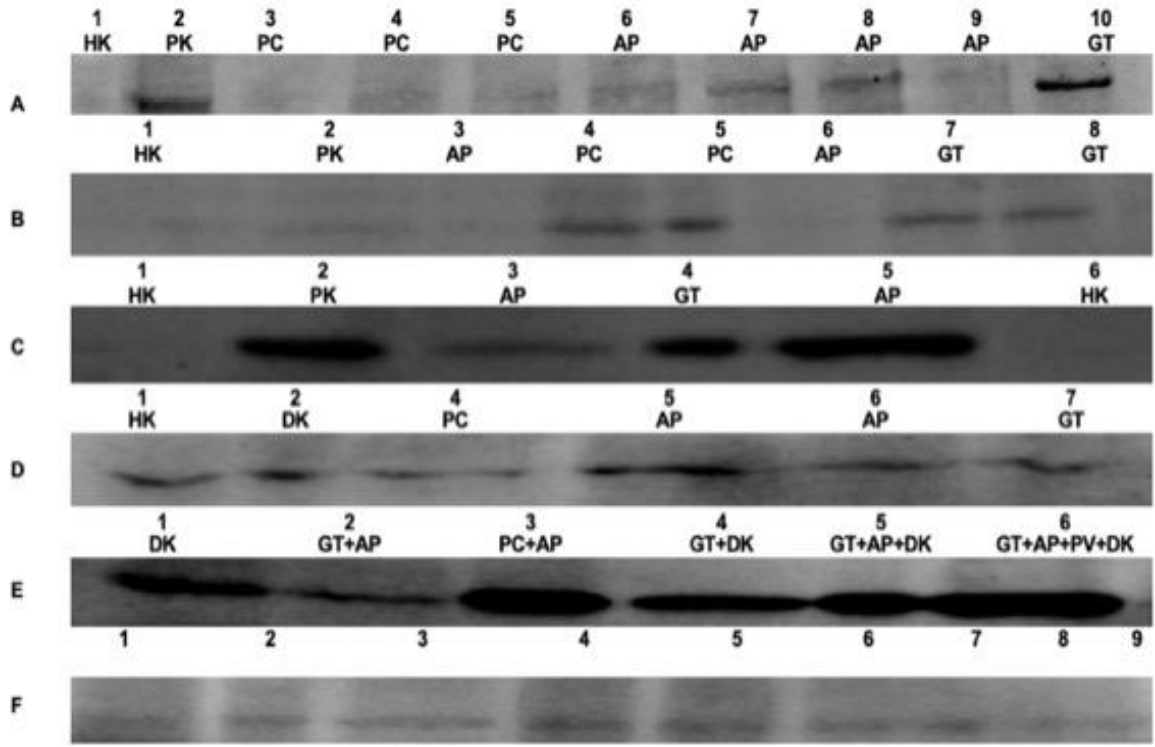
DAK>: P>0.05
DAK&AP: P>0.05
DAK&PC: P<0.05
DAK>+AP: P<0.05
DAK>+PC: P>0.05
DAK&PC+AP: P<0.05
DAK>+DAK: P<0.05
DAK>+AP+DAK: P<0.01
DAK>+AP+PC+DAK: P<0.01

Melanoma hücre hattında yapılan kombinasyon çalışmalarında Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen kombinasyonun *kaspaz-3* ve *p53* gen ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı derecede artışlar tespit edildi. Gama-Terpinen artı P-Cymen kombinasyonunda *kaspaz-3* gen ekspresyonu anlamlı derecede artarken *p53* gen ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik saptanmadı. Bunun yanında Gama-Terpinen'in Dakarbazinle kombine kullanımının ve üç fitokimyasal artı Dakarbazin kombinasyonlarının *kaspaz-3* ve *p53* gen ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı derecede artışlar tespit edildi (Şekil 4. 53).

4.8. Western Blotlama Sonuçları

Bilindiği gibi moleküler biyolojik yöntemlerden biri olan Western Blotlama yöntemi aranılan spesifik proteinlerin varlığının antikorlar kullanılarak gösterilmesi esasına dayanır. Çalışmada, meme (MCF-7 hücre hattı), akciğer (A-549 hücre hattı) ve melanoma (A-2058 hücre hattı) kanser hücre hatlarından total protein izolasyonu RIPA Lysis Buffer sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Western Blotlama analizi ile hücre hatlarından izole edilen total protein ekstraktlarında anti-*p53*, anti-*Bcl-2*, anti-*Bax*, anti-NF- κ B ve anti-*Bcl-xL* primer antikorları kullanılarak protein ekspresyonları spesifik olarak gösterildi. Housekeeping olarak β -aktin seçildi.

Alfa-Pinen (0.019 μ g/ml), Gama-Terpinen (0.039 μ g/ml) ve P-Cymen (0.625 μ g/ml) 'in A-549, MCF-7 ve A-2058 hücre hatlarında Paklitaksel ve Dakarbazin etkileriyle kıyaslamalı olarak *p53*, *Bcl-2*, *Bax*, NF- κ B ve *Bcl-xL* genlerinin ekspresyonları sonucu sentezlenen proteinleri akrilamid jel elektroforezi ve blotlama sonuçları aşağıda verilmiştir. Deneylerde şekil 4. 54'de örnek olarak verilen A-549, A-2058 ve MCF-7 hücrelerinde *p53* ve *Bcl-2* geni protein blotlama sonuçları görülmektedir. Çalışmada anti-apoptotik ve pro-apoptotik gen ekspresyonları sonuçlarının eksprese edilen protein sentezleri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Yüksek düzeyde ekspresyonu RT-PCR yöntemiyle tespit edilen genlerin blotlama sonuçlarından da anlaşılacağı gibi translasyon oranlarının da yüksek olduğu tespit edildi.



HK: Hücre kontrol
PK: Paklitaksel

DK: Dakarbazin
AP: Alfa-Pinen

GT: Gama-Terpinen
PC: P-Cymen

Protein örnekleri SDS-PAGE ile fraksiyonlara ayrıldı, nitroselüloz membrana aktarıldı ve ilgili protein (*p53*) antikorları (A, C ve E), *Bcl-2* (B ve D) ve Beta-aktin (F) ile inkübe edildi.

A: A-549 hücrelerinde *p53* geni proteini sentezi (1: Hücre kontrol, 2: Paklitaksel, 3,4 ve 5: P-cymne, 6-9: Alfa-Pinen, 10: Gama-Terpinen).

B: A-549 hücrelerinde *Bcl-2* geni proteini sentezi (1: Hücre kontrol, 2: Paklitaksel, 3 ve 6: Alfa-Pinen, 4 ve 5: P-Cymen, 7 ve 8: Gama-Terpinen).

C: MCF-7 hücrelerinde *p53* geni proteini sentezi (1 ve 6: Hücre kontrol, 2: paklitaksel, 3 ve 5: Alfa-Pinen, 4: Gama-Terpinen).

D: A-2058 hücrelerinde *Bcl-2* geni proteini sentezi (1: Hücre kontrol, 2: Dakarbazin, 3: P-Cymen, 4 ve 5: Alfa-Pinen, 7: Gama-Terpinen).

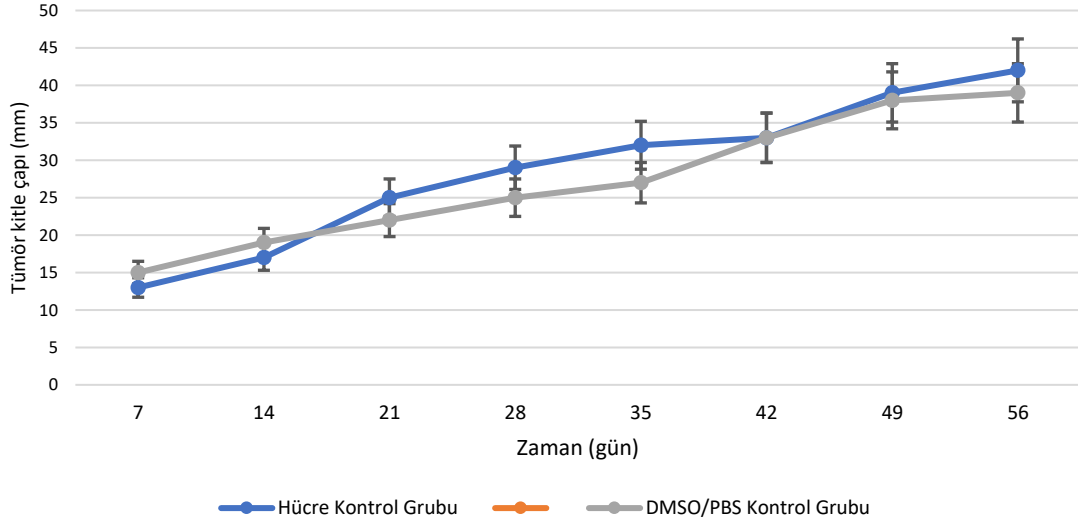
E: A-2058 hücrelerinde *p53* geni proteini sentezi (1: Dakarbazin, 2: Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen, 3: P-Cymen artı Alfa-Pinen, 4: Gama-Terpinen artı Dakarbazin, 5: Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen artı Dakarbazin, 6: Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen artı P-Cymen artı Dakarbazin).

F: Beta-aktin geni.

Şekil 4. 54. Farklı kanser hücre hatlarından ekstrakte edilen 15 µg protein örneklerinin jel elektroforez görüntüleri.

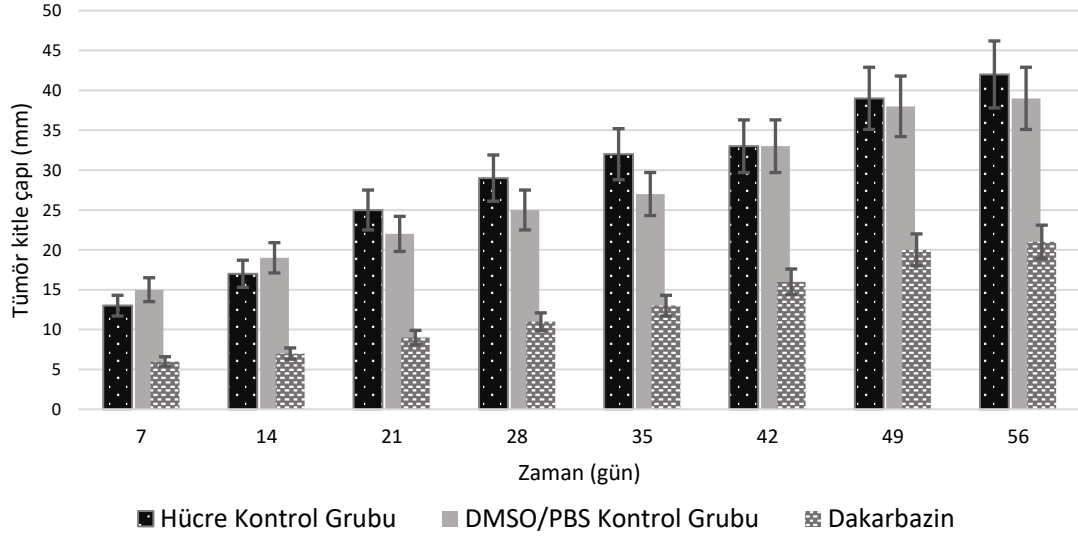
4.9. Hayvan Deneyleri ve Histopatolojik Sonuçlar

Farelerde tedavi verilmeyen kontrol grubunda hayvanların tümör dokularının büyümesinin sakrifikasyon işlemine kadar devam ettiği tespit edildi. Deneylerde tedavi verilmeyen kontrol ve DMSO/PBS kontrol gruplarında 35. günden itibaren tümör büyümesine bağlı olarak ölümler görülmüştür.



Şekil 4. 55. Hücre kontrol ile solvent (DMSO/PBS) kontrol grubunda tümör gelişiminin kıyaslanması

Çalışmada tedavi verilmeyen hücre kontrol grubu ile DMSO/PBS kontrol grubunda tümör gelişiminin enjeksiyonun tamamlanmasından itibaren hafta bazında gelişimi şekil 4. 55’de verilmiştir. Şekil 4. 55’de görüldüğü gibi her iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p < 0.05$) (Şekil 4. 55).



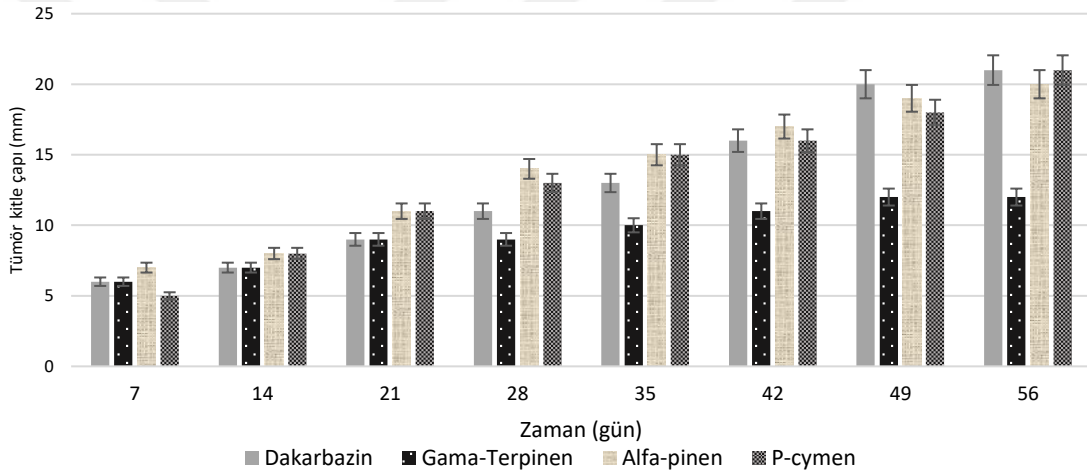
Hücre Kontrol:HK

Şekil 4. 56. Dakarbazin ile tedavi sonrası hücre kontrol ve solvent (DMSO/PBS) kontrol grubunda tümör gelişiminin kıyaslanması.

P değeri

HK&DMSO (7.gün): P>0.05	HK&DAK (7.gün): P<0.05
HK&DMSO (14.gün): P>0.05	HK&DAK (14.gün): P<0.05
HK&DMSO (21.gün): P>0.05	HK&DAK (21.gün): P<0.05
HK&DMSO (28.gün): P>0.05	HK&DAK (28.gün): P<0.05
HK&DMSO (35.gün): P>0.05	HK&DAK (35.gün): P<0.05
HK&DMSO (42.gün): P>0.05	HK&DAK (42.gün): P<0.05
HK&DMSO (49.gün): P>0.05	HK&DAK (49.gün): P<0.05
HK&DMSO (56.gün): P>0.05	HK&DAK (56.gün): P<0.05

Şekil 4. 56'da kontrol grubu ilaç olarak seçilen Dakarbazin'in etkinliğinin kontrol grubu ve DMSO/PBS kontrol grubuyla kıyaslaması görülmektedir. Tümör gelişimi tedavi verilmeyen gruplarda zaman ilişkili olarak büyümesine devam ederken, Dakarbazin'in tümöral gelişim üzerinde anlamlı derecede azalmaya yol açtığı ancak büyümenin sürdüğü tespit edildi.

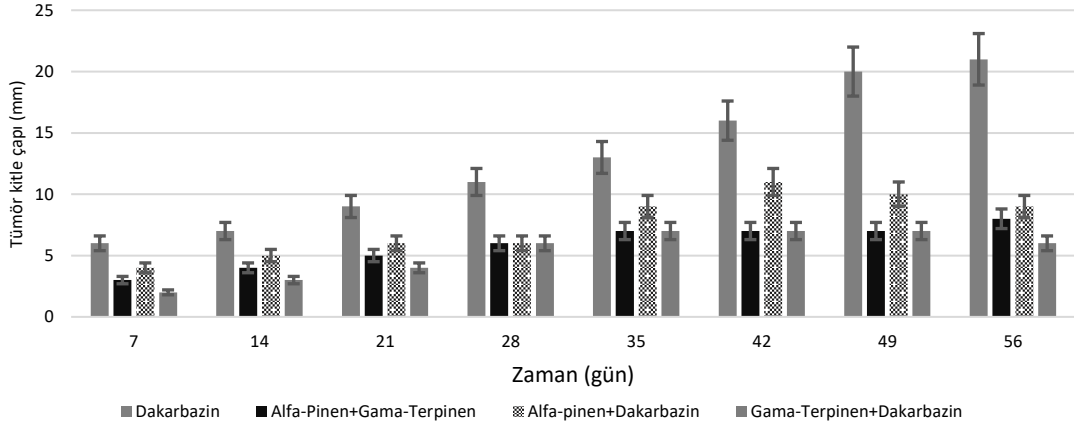


Şekil 4. 57. Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in deri altı tümör modelinde melanoma hücreleri üzerindeki etkinliğinin Dakarbazinin etkinliğiyel kıyaslanması.

P değeri

GT&DAK (28.gün): P<0.05	GT&DAK (49.gün): P<0.01
GT&AP (28.gün): P<0.05	GT&AP (49.gün): P<0.01
GT&PC (28.gün): P<0.05	GT&PC (49.gün): P<0.01
GT&DAK (35.gün): P<0.05	GT&DAK (56.gün): P<0.01
GT&AP (35.gün): P<0.05	GT&AP (56.gün): P<0.01
GT&PC (35.gün): P<0.05	GT&PC (56.gün): P<0.01

Şekil 4. 57'de Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in melanoma hücreleri üzerinde antitömoral etkinliği Dakarbazin ile kıyaslamalı olarak verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi fitokimyasalların melanositler üzerinde antiproliferatif etkinliğinin Dakarbazin ile kıyaslandığında etkinlikleri dikkate değer olarak bulundu. Ancak, Gama-Terpinen'in etkinliği bu üç fitokimyasal içerisinde diğerlerinden ve Dakarbazin'in etkinliğinden anlamlı ölçüde yüksek olarak tespit edildi ($p<0.05$).



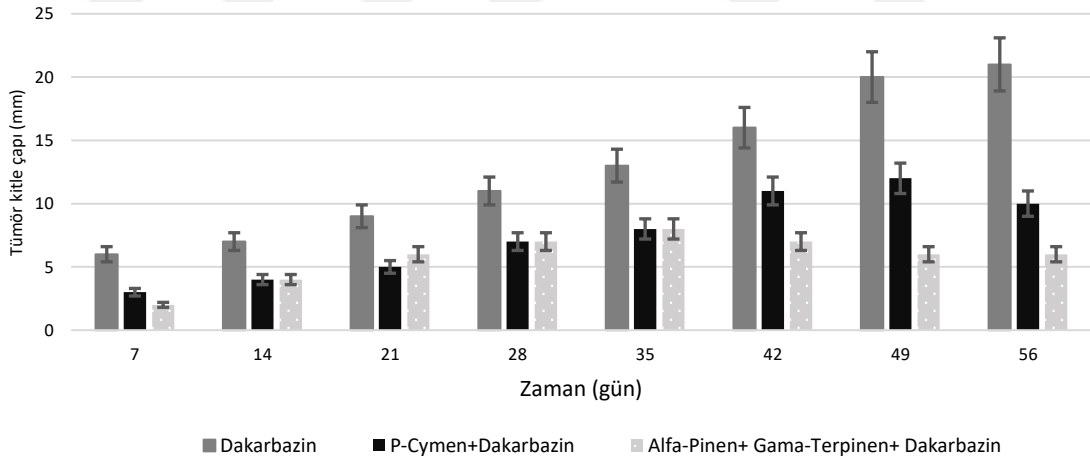
Şekil 4. 58. Deri altı tümör modelinde Alfa-Pinen artı Gama-Terpinen ve Alfa-Pinen artı Dakarbazin ve Gama-Terpinen artı Dakarbazin'in kombine etkinliği.

P değeri

AP+GT&DAK (49.gün): P<0.01
 AP+DAK&DAK (49.gün): P<0.01
 GT+DAK&DAK (49.gün): P<0.01

AP+GT&DAK (56.gün): P<0.01
 AP+DAK&DAK (56.gün): P<0.01
 GT+DAK&DAK (56.gün): P<0.01

Şekil 4. 58'de de görüldüğü gibi Alfa-Pinen ve Gama-Terpinen'in özellikle Dakarbazin ile kombine edilerek kullanıldığından *in vivo* olarak antitümöral etkinliğin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4. 58).



Şekil 4. 59. Deri altı tümör modelinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in Dakarbazin ile kombine etkinliği.

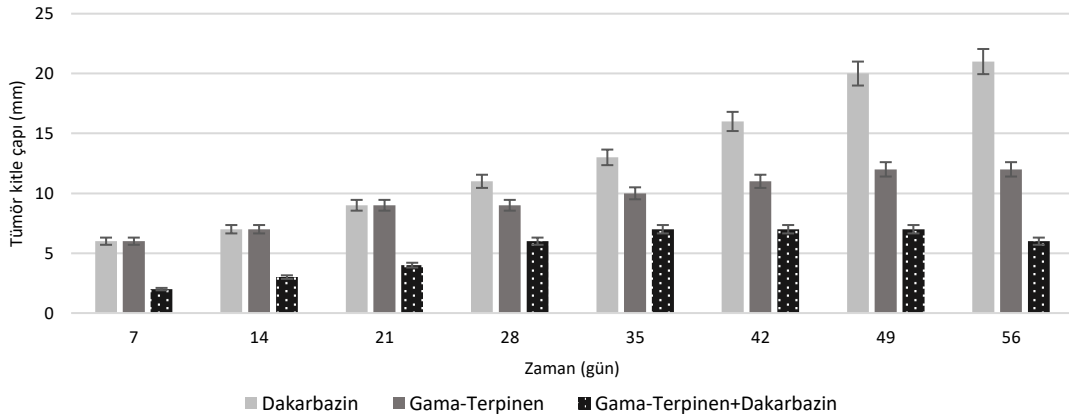
P değeri

PC+DAK&DAK (49.gün): P<0.05
 AP+GT+DAK &DAK (49.gün): P<0.01

PC+DAK&DAK (49.gün): P<0.01
 AP+GT+DAK &DAK (49.gün): P<0.01

Şekil 4. 59'da Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in tümör gelişimini tekli Dakarbazinin etkinliğinden daha yüksek inhibe ettiği, Gama-terpinen artı Alfa-Pinen ile

Dakarbazin kombinasyonun çok daha güçlü antitümöral aktiviteye sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4. 59).



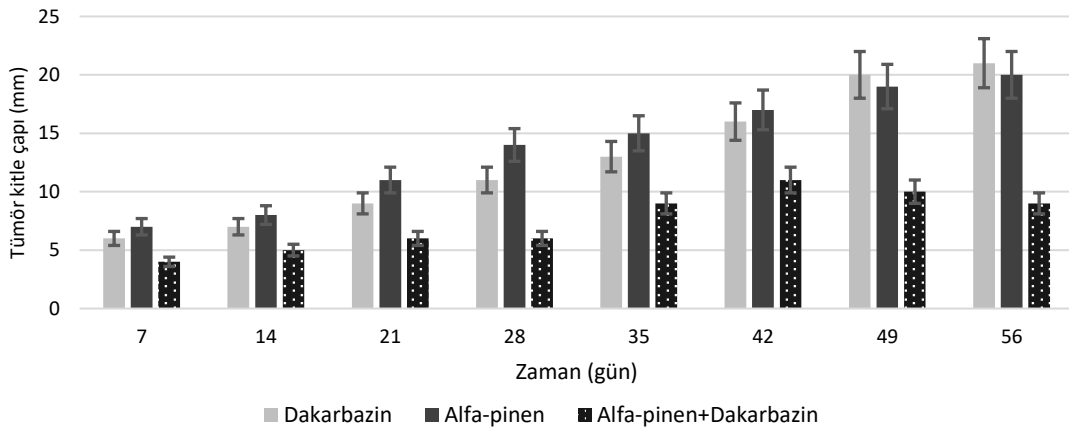
Şekil 4. 60. Gama-Terpinen'in Dakarbazine ile kombinasyonunun melanoma hücreleri üzerindeki sinerjistik etkinliği

P değeri

GT & DAK (42.gün): $P < 0.05$
 GT & DAK (49.gün): $P < 0.05$
 GT & DAK (56.gün): $P < 0.01$

GT+DAK&DAK (42.gün): $P < 0.01$
 GT+DAK&DAK (49.gün): $P < 0.01$
 GT+DAK&DAK (56.gün): $P < 0.01$

Şekil 4. 60'da Gama-Terpinen'in Dakarbazine'in etkinliği ile kıyaslandığında tedavinin ilk haftasından 7. haftasına kadar istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmezken sonraki haftalarda etkinliğinin anlamlı derecede arttığı tespit edildi. Gama-Terpinen artı Dakarbazine kombinasyonunun ise tümör dokusu üzerinde ilk haftadan itibaren anlamlı derecede daha yüksek etkinlik sergilediği tespit edildi (Şekil 4. 60).

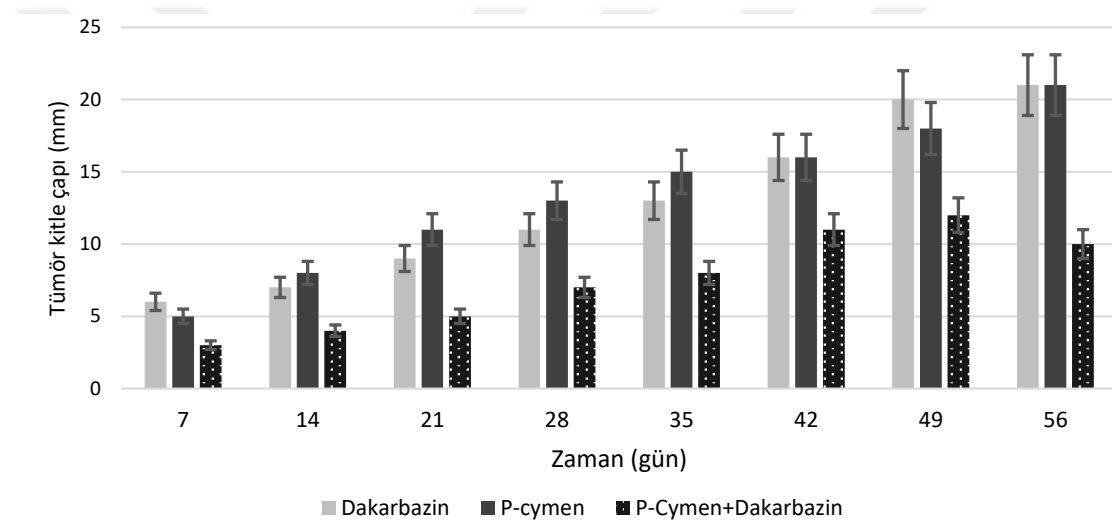


Şekil 4. 61. Alfa-Pinen'in Dakarbazine ile kombinasyonunun melanoma hücreleri üzerindeki sinerjistik etkinliği

P değeri

AP & DAK (7.gün): P>0.05	AP+DAK & DAK (7.gün): P<0.05
AP & DAK (14.gün): P>0.05	AP+DAK & DAK (14.gün): P<0.05
GT & DAK (21.gün): P>0.01	GT+DAK & DAK (21.gün): P<0.01
AP & DAK (28.gün): P>0.05	AP+DAK & DAK (28.gün): P<0.05
AP & DAK (35.gün): P>0.05	AP+DAK & DAK (35.gün): P<0.05
AP & DAK (42.gün): P>0.05	AP+DAK & DAK (42.gün): P<0.05
AP & DAK (49.gün): P>0.05	AP+DAK & DAK (49.gün): P<0.01
AP & DAK (56.gün): P>0.05	AP+DAK & DAK (56.gün): P<0.01

Gama-Terpinen’de olduğu gibi Alfa-Pinen ve Dakarbazin kombinasyonunun melanositler üzerinde oldukça güçlü aktiviteye sahip olduğu tespit edildi. Alfa-Pinen artı Dakarbazin etkinliğinin tekli Dakarbazin etkinliğinden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.05$, Şekil 4. 61).

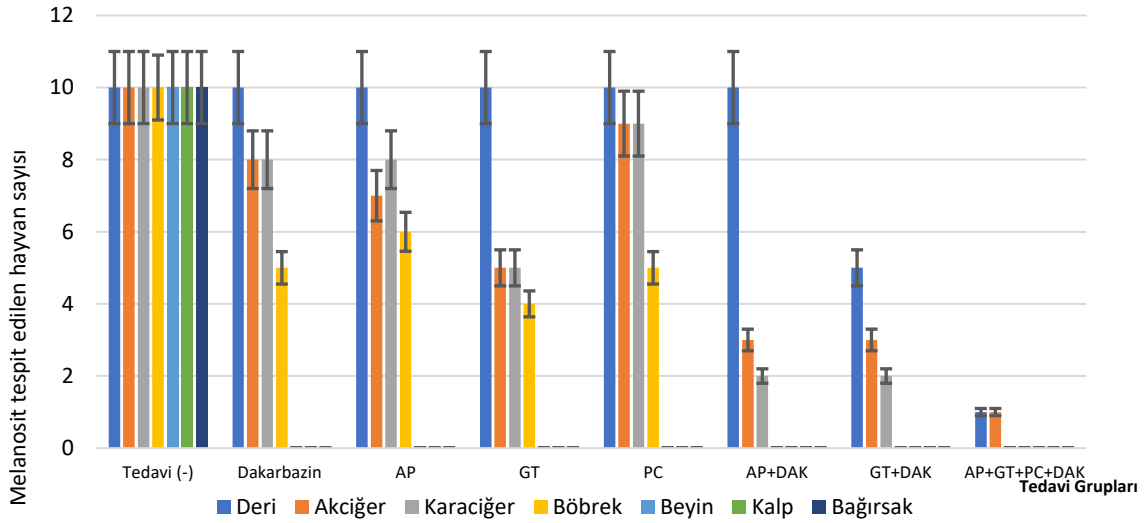


Şekil 4. 62: P-Cymen'in Dakarbazin ile kombinasyonunun melanoma hücreleri üzerindeki sinerjistik etkinliği

P değeri

PC & DAK (7.gün): P>0.05	PC+DAK & DAK (7.gün): P<0.05
PC & DAK (14.gün): P>0.05	PC+DAK & DAK (14.gün): P<0.05
PC & DAK (21.gün): P>0.01	PC+DAK & DAK (21.gün): P<0.01
PC & DAK (28.gün): P>0.05	PC+DAK & DAK (28.gün): P<0.05
PC & DAK (35.gün): P>0.05	PC+DAK & DAK (35.gün): P<0.05
PC & DAK (42.gün): P>0.05	PC+DAK & DAK (42.gün): P<0.05
PC & DAK (49.gün): P>0.05	PC+DAK & DAK (49.gün): P<0.01
PC & DAK (56.gün): P>0.05	PC+DAK & DAK (56.gün): P<0.01

P-Cymen etkinliği Alfa-Pinen ve Gama-Terpinen etkinliğinden düşük olsa da özellikle P-Cymen ve Dakarbazin etkinliğinin Dakarbazinin etkinliğinden daha yüksek olduğu bulundu ($p<0.05$, Şekil 4. 62).



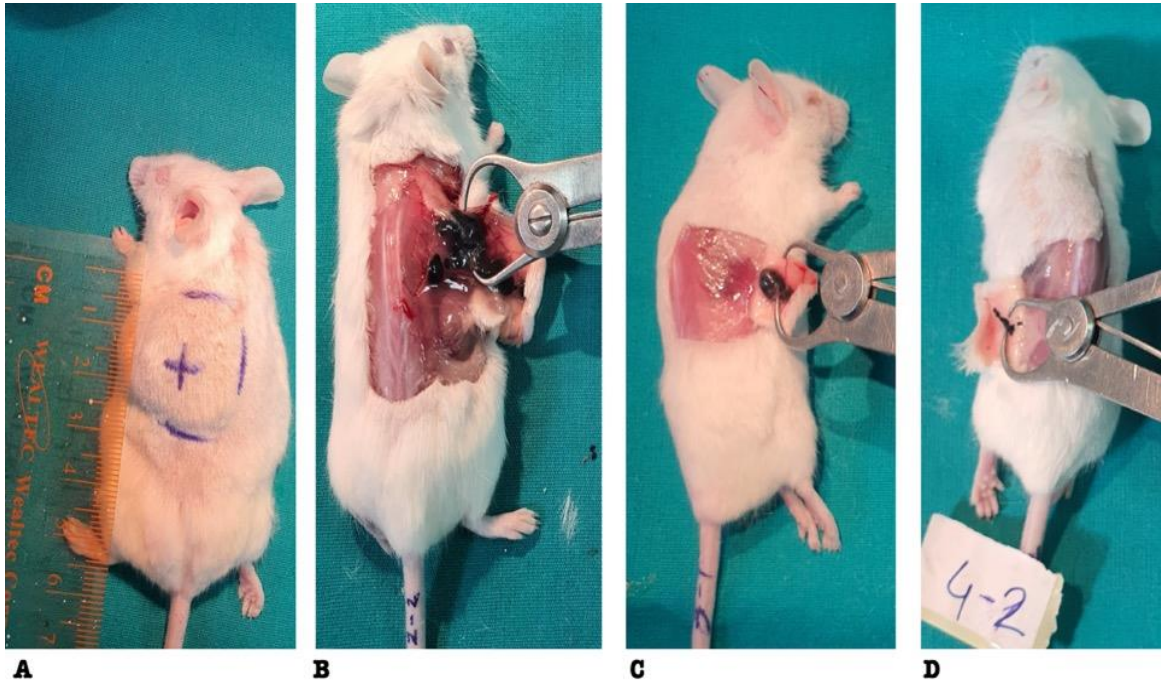
Şekil 4. 63. Tümör oluşturulan hayvanlarda tedavi sonrası histopatolojik incelemelerde metastaz varlığı.

Çalışmada *in vitro* deneylerde en yüksek düzeyde etkinlik gösteren fitokimyasal veya kombinasyonların deri altı fare tümör modelinde antitümöral etkinlikleri karşılaştırılmıştır. B16-F10 hücre enjeksiyonunu takiben tedavi verilmeyen hayvanlardan alınan doku örneklerinin tamamında melanosit varlığı dolayısıyla metastaz tespit edildi (Şekil 4. 63). Dakarbazin tedavi grubunda ise tüm hayvanlarda tümör dokusunda küçülmenin varlığıyla birlikte deri örneklerinin tamamında melanosit varlığı tespit edildi. Ayrıca Dakarbazin'in tedavi verilmeyen kontrol grubuyla kıyaslandığında akciğer, karaciğer ve böbrek metastazlarında bir azalma (sırasıyla %20, %20 ve %50 azalma) tespit edilse de melanositlerin yayılımını önlemede yetersiz kaldığı tespit edildi. Dakarbazin tedavi grubunda beyin, kalp ve bağırsak dokularında ise metastaz tespit edilmedi.

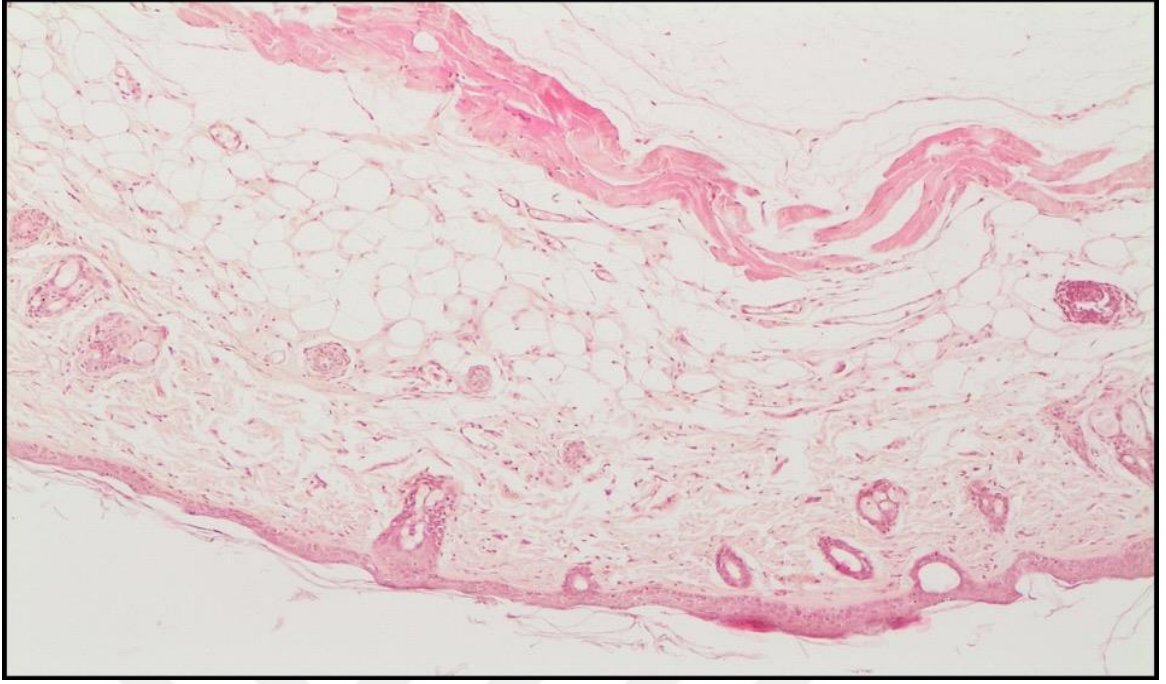
Alfa-Pinen tedavi grubunda ise tüm hayvanların deri örneklerinde melanosit varlığı tespit edilmiş olup, akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında ise metastaz varlığı sırasıyla %30, %20 ve %40 oranında azalmıştır. Dakarbazin tedavi grubunda olduğu gibi diğer organlarda melanosit varlığı tespit edilmedi.

Gama-Terpinen tedavi grubunda ise antitümöral etkinliğin daha güçlü olduğu deri örneklerinin tamamında melanosit varlığı tespit edilirken, tedavi verilmeyen kontrol grubuyla kıyaslandığında akciğer ve karaciğer metastazı farelerin %50'sinde tespit edilirken, böbrek metastazı ise hayvanların %40'ında tespit edildi. P-Cymen'in ise Alfa-Pinen ve Gama-Terpinen tedavi grubuyla kıyaslandığında antitümöral etkinliğin daha düşük olduğu tespit edildi.

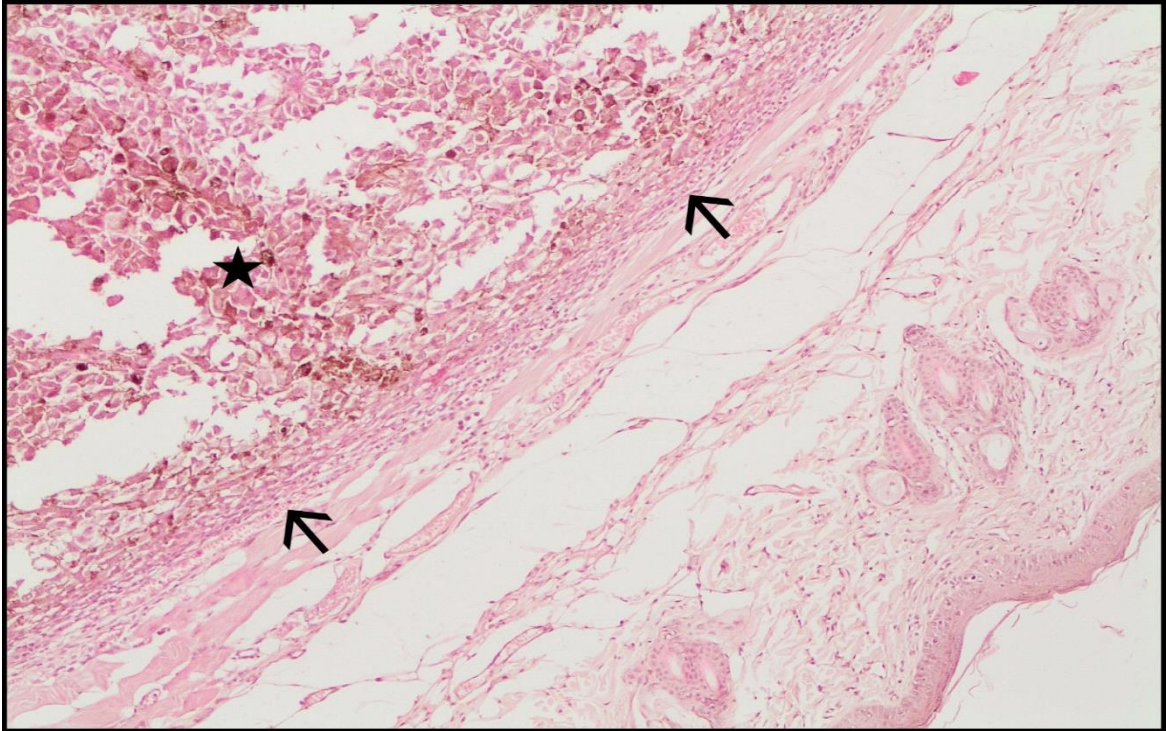
Deneylerde, fitokimyasalların Dakarbazin ile kombine kullanımlarında etkinliklerinin daha çarpıcı olduğu tespit edildi. Alfa-Pinen artı Dakarbazin kombine tedavi grubunda farelerde deri örneklerinin tamamında melanosit varlığı tespit edilirken, farelerin %70'inde akciğer, %80'in de ise karaciğer metatazı tespit edilmedi. Gama-Terpinen artı Dakarbazin tedavi grubunda ise farelerin %50'sinde deri örneklerinde melanosit varlığı, %70'inde akciğer ve %80'inde ise karaciğer metastazının görölmediğı tespit edildi. Alfa-Pinen artı Gama-Terpinen artı P-Cymen artı Dakarbazin tedavi grubunda ise hayvanların sadece %10'unda deri ve %10'unda ise akciğer dokusunda melanosit varlığı tespit edildi.



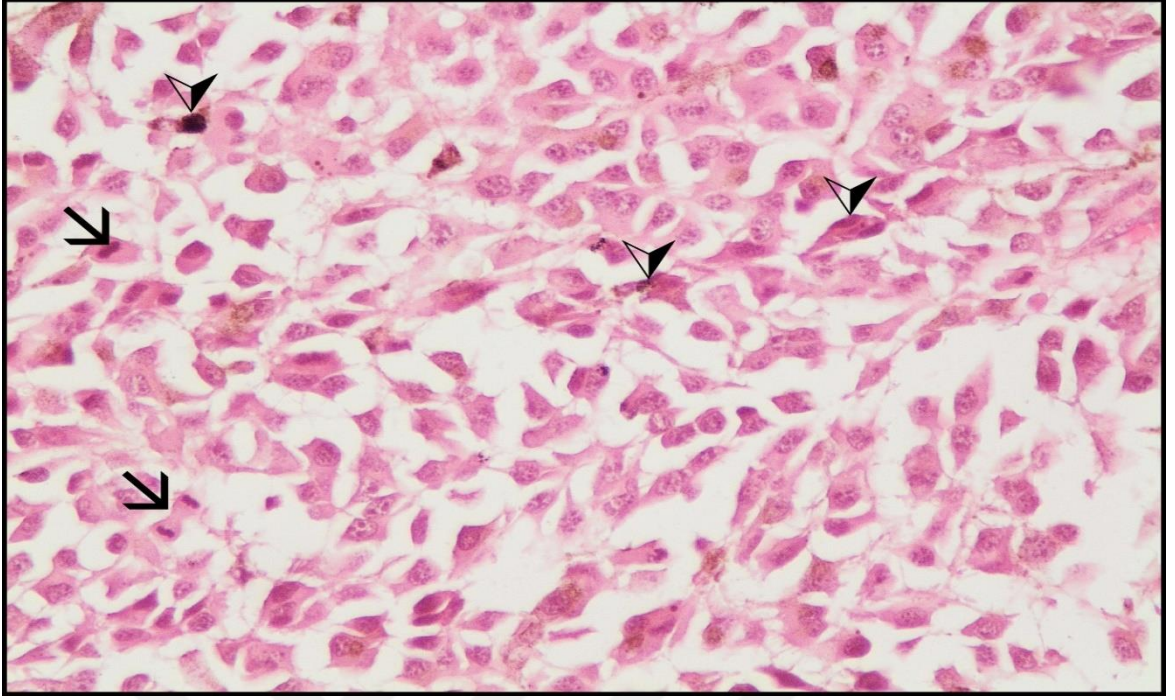
Şekil 4. 64. Tedavi gruplarından örnek görüntüler. A: Tedavi verilmeyen hücre kontrol grubu. B: Dakarbazin tedavi grubu, C: Gama-Terpinen tedavi grubu. D: Gama-Terpinen artı Dakarbazin tedavi grubu.



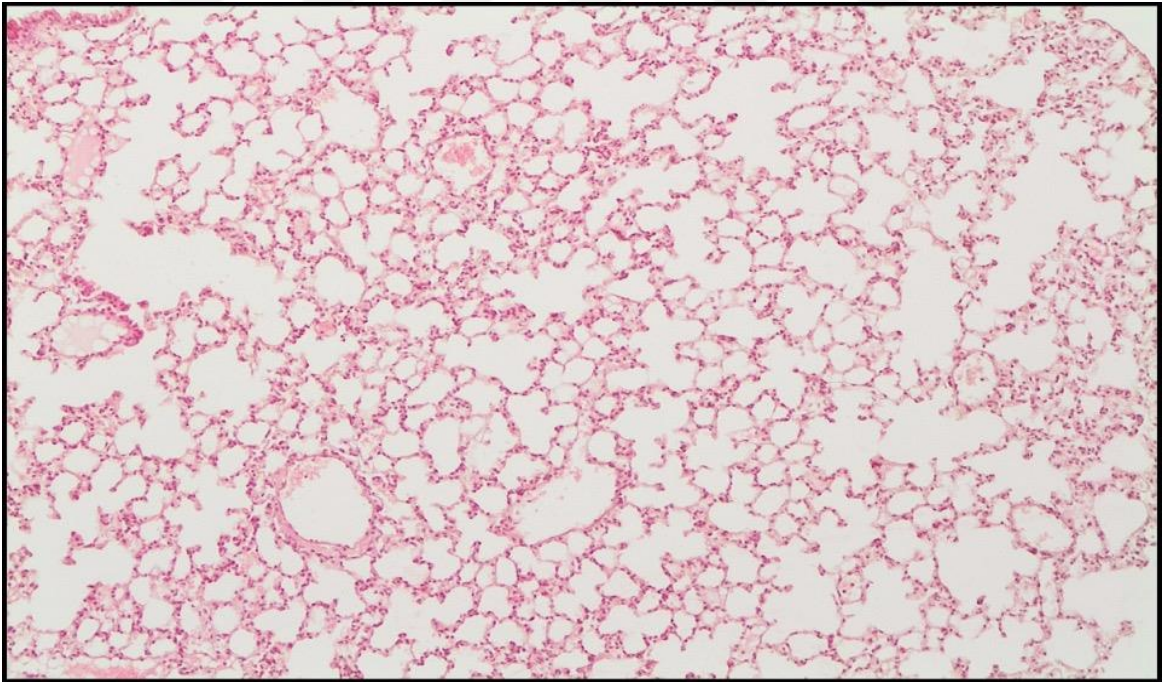
Şekil 4. 65. Sağlıklı kontrol grubundan normal histolojik yapıda deri dokusu, 40×, H×E.



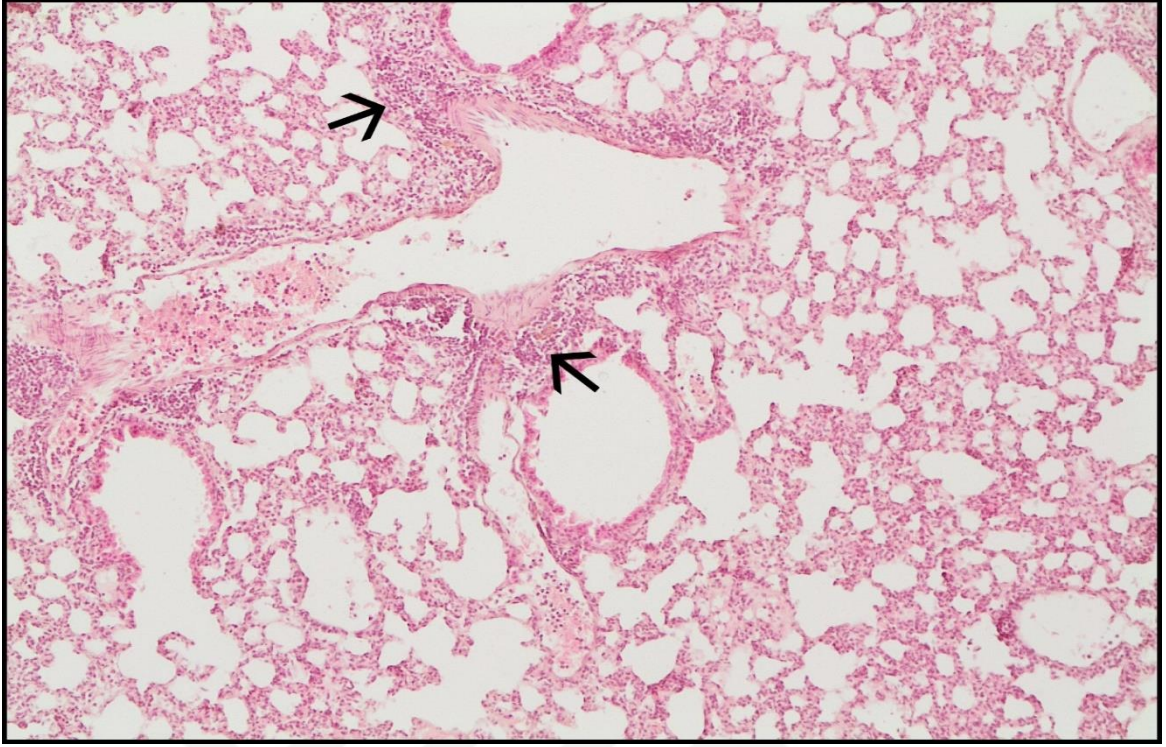
Şekil 4. 66. B16-F10 injeksiyonu yapılan hücre kontrol grubundan deri altında bağ dokusu (oklar) ile sınırlandırılmış atipik melanotik melanositler (yıldız), 100×, H×E.



Şekil 4. 67. Tedavi verilmeden önce B16-F10 enjeksiyonu yapılan farelerden deri altında atipik melanotik melanositler (okbaşları) ve mitotik figürler (oklar), 100×, H×E.



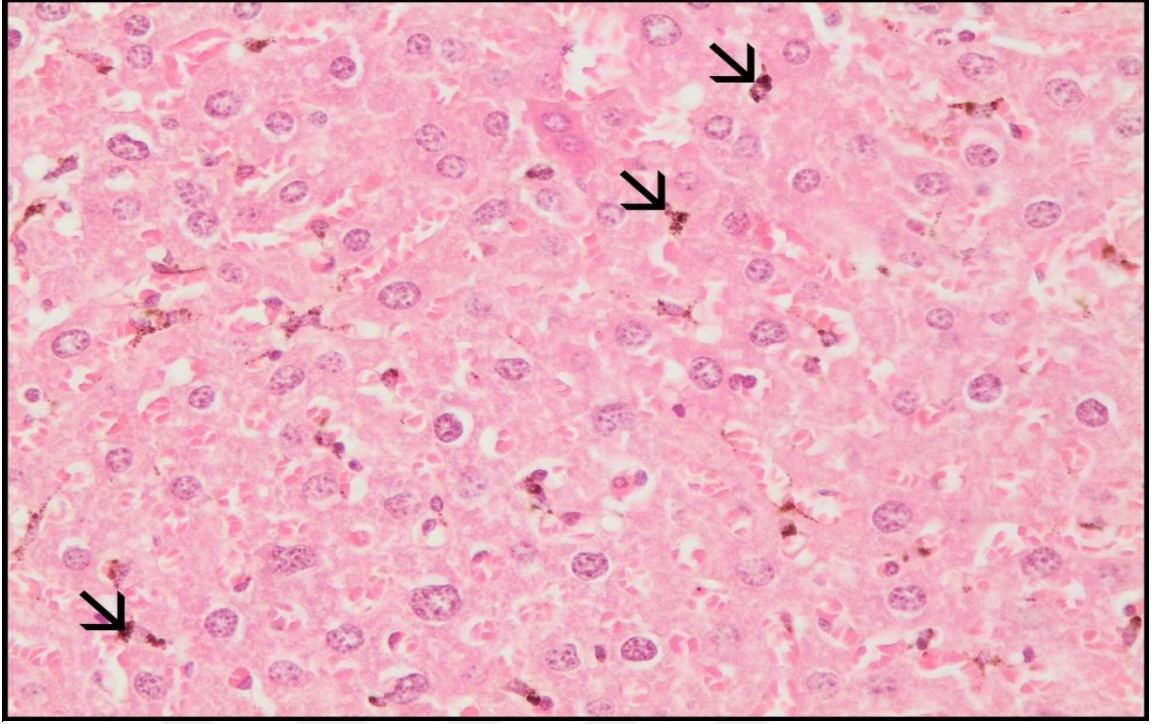
Şekil 4. 68. Sağlıklı kontrol grubundan normal histolojik yapıda akciğer dokusu, 40×, H×E.



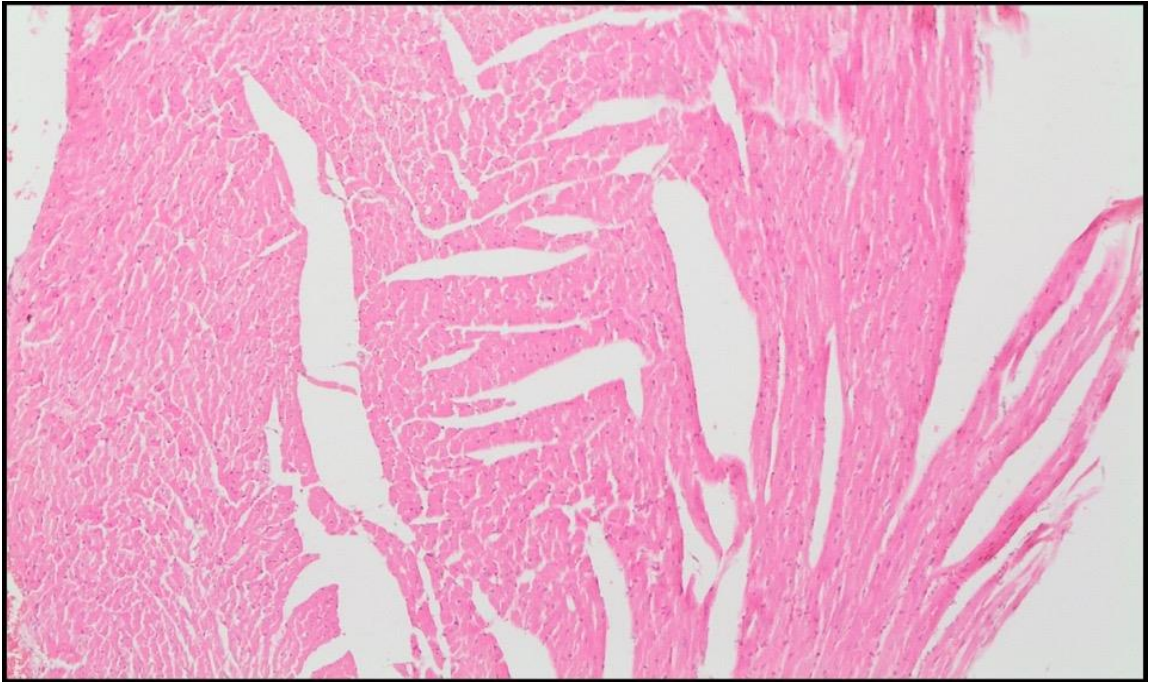
Şekil 4. 69. Gama-Terpinen artı Dakarbazin tedavi grubundan tedavi sonrası akciğerde peribronsiyal mononükleer hücre infiltrasyonu (oklar), 100×, H×E.



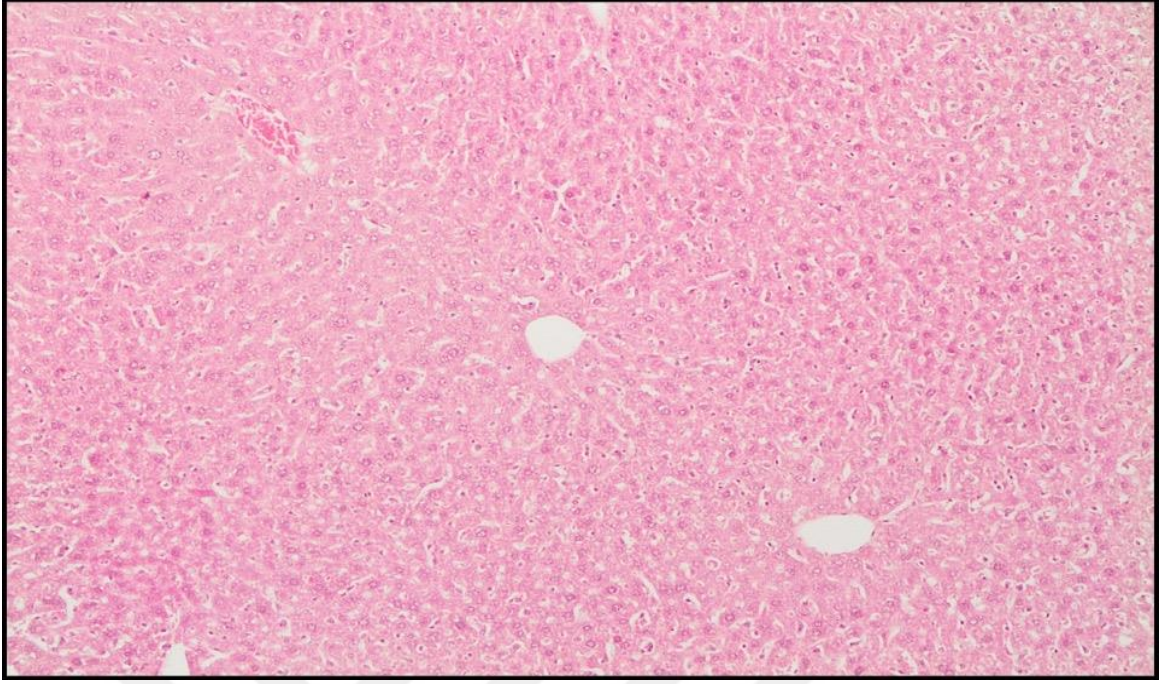
Şekil 4. 70. Gama-Terpinen grubu tedavi sonrası karaciğerde perivasküler mononükleer hücre infiltrasyonu (oklar), 100×, H×E.



Şekil 4. 71. B16-F10 injeksiyonu yapılan tedavi verilmeyen farelerde karaciğerde metastazla gelen melanotik melanositler (oklar), 400×, H×E.



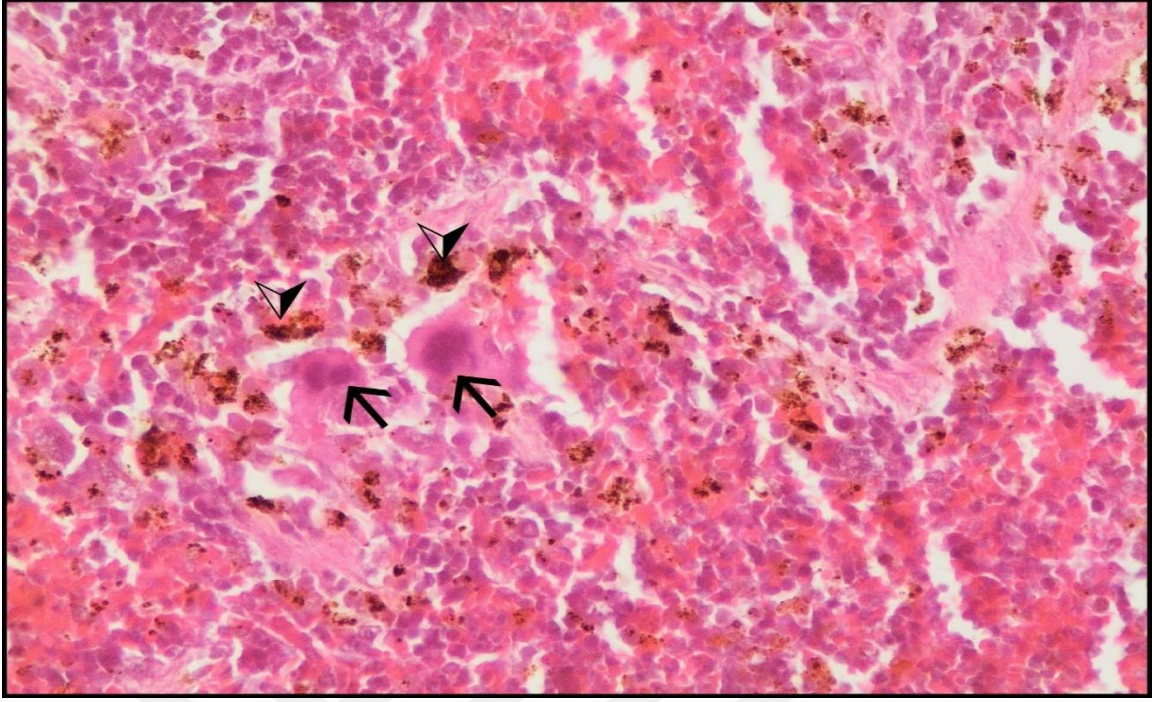
Şekil 4. 72. Gama-Terpinen artı Dakarbazin tedavi grubunda normal histolojik yapıda kalp dokusu, 40×, H×E.



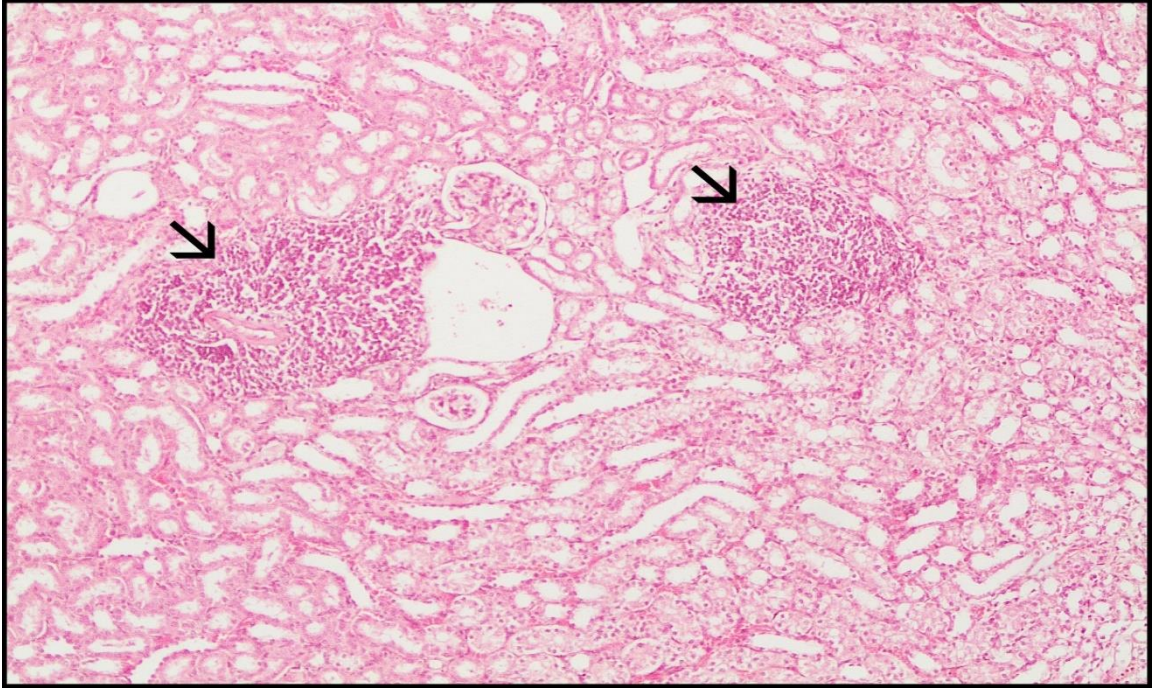
Şekil 4. 73. Alfa-Pinen artı Gama-Terpinen tedavi grubunda normal histolojik yapıda kalp dokusu, 40×, H×E.



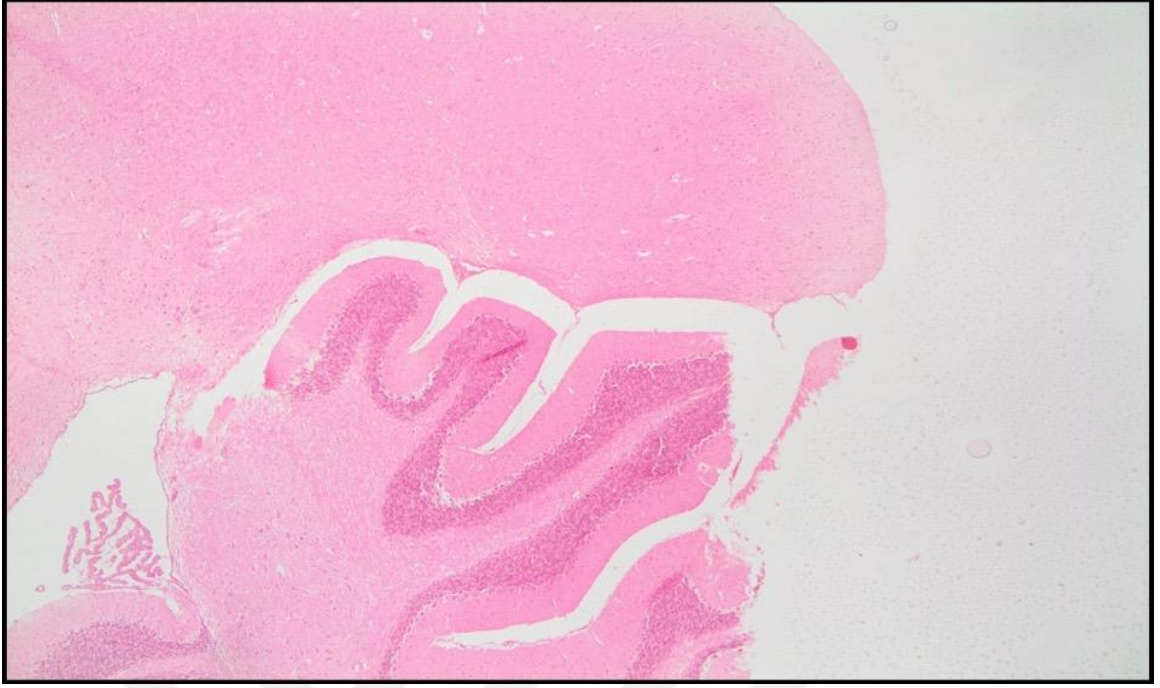
Şekil 4. 74. Alfa-Pinen artı Gama-Terpinen tedavi grubunda bağırsakta Lamina propria'da fokal mononükleer hücre infiltrasyonu (oklar), 40×, H×E.



Şekil 4. 75. B16-F10 injeksiyonu yapılan farelerde dalakta metastazla gelen melanotik melanositler (okbaşılar), dev hücreleri (oklar) 400×, H×E.



Şekil 4. 76. Gama-Terpinen tedavi grubunda böbrekte fokal odaklar halinde mononükleer hücre infiltrasyonu (oklar), 100×, H×E.



Şekil 4. 77. Gama-Terpinen artı Dakarbazin tedavi grubunda normal histolojik yapıda beyin dokusu, 40×, H×E.

5. TARTIŞMA

Hücrelerin kontrolsüz ve anormal şekilde çoğalmaları ile karakterize edilen bir hastalık olan kanser günümüzün en önemli halk sağlığı problemlerinden biridir. Kanser günümüzde henüz kesin tedavisi olmayan önemli bir sağlık problemi olarak kabul edilmektedir. Kanser tedavisinde amaç, vücutta tüm kanser hücrelerinin yok edilmesidir. Bu amaçla günümüzde uygulanan tedavi yöntemleri; cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi olmak üzere başlıca üç önemli kategoriye ayrılmaktadır. Günümüzde kemoterapi yöntemi ile kanserli olguların bir kısmında başarılı olunabilse de kanser hastaların çoğunda kemoterapötik ilaçlara karşı direnç gelişebildiği veya bu ilaçların ölümcül toksisite oluşturabildikleri bilinmektedir. Bu nedenle günümüzde kanser tedavisinde uygulanan temel yöntemlerin ve kullanılan ilaçların yetersiz olduğu kabul edilmektedir. Bundan dolayı son yıllarda kanser tedavisinde yeni antikanserojen ilaçların özellikle bitkisel kökenli ilaçların araştırılmasına daha fazla önem verilmektedir (Bisen 2013, Hong ve ark. 2010, <https://www.intechopen.com>)

Ne yazık ki, günümüzde kanser tedavisinde kullanılan antikanserojen ilaçların sağlıklı hücreler üzerinde meydana getirdiği toksik etkiler bu ilaçların tedavide kullanımını kısıtlayacak boyutlara ulaşabilmektedir. Hatta kanser tedavisinde kullanılan ilaçların yan etkileri sebebiyle mortaliteye dahi sebep olabildiği bildirilmektedir (Karmakar ve ark. 2014, Bader ve ark. 2015).

Bunun yanında, günümüzde kanser kemoterapisinde en önemli sorunlardan birinin de kemoterapik ilaçlara karşı görülen direnç olduğu bildirilmektedir. Kanser tedavisinde kemoterapötik ilaçlara karşı direnç ve ölümcül sitotoksisite en önemli sorunlar arasında yer almaktadır. Bu sebeple günümüzde kanser tedavisinde uygulanan temel yöntemler ve kullanılan ilaçlar yetersiz kalmaktadır (Mansoori ve ark. 2017).

Tedavide karşılaşılan bu problemler sebebiyle yeni ve daha potent ilaç araştırma çalışmaları hızla devam etmektedir. Araştırmalarda temel amaç en az sitotoksisite ve daha güçlü aktivitedir. Kanser araştırmalarında bitkisel orjinli aktif maddelerin daha az toksisite ve daha güçlü aktiviteye sahip olabilecekleri çeşitli araştırmalarda bildirilmektedir. Bundan

dolayı özellikle son yıllarda bitkisel kaynaklı doğal ilaç araştırmaları hızla devam etmektedir (Karmakar ve ark. 2014). Bu nedenle, direnci ve ciddi yan etkileri olmayan yeni ve etkili antikanser ajanların araştırılması ve geliştirilmesi bu konuda en önemli ve can alıcı konular arasındadır. Son on yılda, doğal ürünler önemli bir kemoterapötik kaynağı olmuştur. Günümüzde kullanılan kanser ilaçlarının yarısından fazlasının (yaklaşık %60'ı) doğal ürün kökenli olduğu bilinmektedir. Bugün tıbbi bitkiler dünyada birçok ölkede kanser tedavisine önemli bir alternatif yol olarak görölmektedir (Zulkipli ve ark. 2015, Yin ve ark. 2013, Nobili ve ark. 2009).

Neoplastik hücrelerde proliferasyonu durdurabilen ve apoptozu indükleyebilen birçok fitokimyasal bileşik keşfedilmiştir. Bu bileşiklerin konvansiyonel ilaçlardan daha az toksik olduğu ve antikanserojen etkili olduklarını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Mund ve ark. 2016).

Birçok bitkiye ait esansiyel yağların, bitkisel ekstrelerin veya komponentlerin zengin farmakolojik etkilerinin olduğu bilinmektedir. Bu farmakolojik etkinlikler arasında antikanserojen veya antitümöral etkinlik çalışmaları da literatürde çok çeşitli bitkiler üzerinde çalışılan önemli konular arasında yer almaktadır (Gonzalez-Tejero 2008). Ancak, bu bitkilerin veya aktif komponentlerinin anti-kanser özellikleri ve etki mekanizmaları hakkında bilinenler sınırlıdır (Lewis ve Ausubel 2006, Srivastava ve Srivastava 2015). Gerek mevcut ilaçların etkinliklerinin arttırılmasında veya ilaç direncinin önlenmesinde gerekse de yeni ilaç araştırmalarında bitkisel komponentlerin veya fitokimyasalların moleküler mekanizmalarının bilinmesi büyük önem taşımaktadır. Bu sebeple biz çalışmamızda çok çeşitli tıbbi ve aromatik bitkide bulunan önemli ve zengin farmakolojik etkinliğe sahip olan Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in insan akciğer (A-549), meme (MCF-7) ve melanoma (A-2058) kanser hücreleri üzerinde hem antiproliferatif ve antikanserojen etkinliklerinin varlığını hem de etkinliklerinin moleküler mekanizmasının aydınlatılmasını amaçladık. Literatürde fitokimyasallarla *in vitro* olarak yapılmış çeşitli aktivite çalışmaları veya moleküler mekanizmalara ilişkin çalışmalara rastlanabilmektedir. Çalışmamızda literatürden farklı olarak *in vitro* etkili bulunan moleküllerin veya kombinasyonların hayvan tümör modeli üzerinde etkinliklerinin araştırılması çalışmamızın en güçlü yanlarından biridir.

Doğal kaynaklardan ilaç keşfi, kanser ve komplikasyonları dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik hedeflere karşı yeni ilaçların geliştirilmesine yönelik yeni kimyasal bileşikler elde etmek için etnobotanik, fitokimyasal ve biyolojik teknikleri birleştiren çok disiplinli bir yaklaşımı içermektedir. Sitotoksik tarama modelleri, potansiyel antineoplastik özelliklere sahip bitki ekstraktlarını belirlemede önemli ön veriler sağlamaktadır. Başlangıç çalışmalarını kapsayan ilk taramalar, bitki ekstraktlarının veya izole edilmiş bileşiklerin toksik etkilerinin ölçülebildiği hücre hatları kullanılarak yapılan hücre bazlı analizlerdir (Mondal ve ark. 2012).

Kemoterapi metastatik kanser türlerinin çoğu için temel tedavidir. Bununla birlikte günümüzde kullanılan konvansiyonel kemoterapötik ajanlar kanser hücreleri tarafından malignensi gelişmesi ve çoklu ilaç direnci nedeniyle yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle etkili kemoterapötik ajanların geliştirilmesi kanserin metastatik evrelerini kontrol etmek için son derece önemli ve gereklidir (Alam ve ark. 2018).

Yeni terapötik arayışında bitkiler biyolojik olarak aktif maddelerin ana kaynaklarından biri olarak kabul edilmektedir. Geleneksel tıpta kullanılan bitkiler potansiyel bir aktif bileşik kaynağı olarak büyük ilgi görmektedir. Ayrıca, bitkisel ürünler genellikle daha az toksik olup sentetik ilaçlara göre daha az yan etkiye sahiptirler. Dünyada çok sayıda bitki, çeşitli farmakolojik özellikleri için sürekli taranmaktadır (Ijaz ve ark. 2018, Magalhaes ve ark. 2018).

Fitokimyasallar çeşitli farmakolojik etkinliklerinden dolayı birçok bilimsel çalışmanın yapıldığı moleküller arasında yer almaktadır. Fitokimyasallar, bitkilerde yaygın olarak eksprese edilen bileşikler olup anti-enflamatuvar, antimikrobiyal, antiviral, antikanser ve immünomodülatör aktivitelerin de dahil olduğu insan sağlığı üzerinde yararlı birçok etkiye sahip komponentlerdir (Marzocchella ve ark. 2011, Benvenuto ve ark. 2013, Izzi ve ark. 2012). Çalışmalarda çeşitli fitokimyasalların hücre proliferasyonunu inhibe ederek kontrolsüz çoğalmanın önüne geçebildiği bildirilmektedir. Sözgelimi birçok tıbbi bitkide yaygın olarak bulunan karvakrolün MCF-7 hücreleri üzerinde etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada apoptozun dramatik olarak indüklendiği ve hücre siklusunun G1/G0 safhasında inhibe edildiği bildirilmiştir. (Li ve ark. 2021) Bizim çalışmamızda Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in benzer olarak hem MCF-7 hücrelerini, hem de A-549 akciğer karsinomu ve A-2058 melanoma hücrelerinin proliferasyonunu G1/G0 safhasında inhibe

ettikleri tespit edilmiştir. Deneylerde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in her üç kanser hücre türünde de hücre proliferasyonunu G1/G0 safhasında inhibe ettiği tespit edilmiştir. Paklitaksel'in akciğer ve meme kanseri hücrelerini, Dakarbazin'in ise melanoma hücrelerini S fazında inhibe ettiği görülürken, fitokimyasalların hücre siklusunu mitotik bölünmenin erken safhası olan G1/G0 fazında inhibe etmesi fitokimyasalların etkinliğinin spesifik ve potent olduğu şeklinde yorumlanabilir.

Son zamanlarda, taranan bitkisel ürünlerde sitotoksik ve antiproliferatif etkilerin saptanması yeni antikanser ajanlarının araştırılmasında temel strateji haline gelmiştir (Öztürk ve Duran 2018). Literatürde birçok bitkisel ürün ve komponentlerin umut verici anti-tümör etkili terapötik ajanlar olduğu gösterilmiş, bu tür doğal ürünler üzerinde klinik öncesi ve klinik araştırmalar oldukça yoğun olarak sürdürülmektedir. Bu anti-tümör ajanların genellikle tümör hücrelerindeki apoptozis yolaklarını aktive ettikleri bildirilmektedir (Halabi ve ark. 2014, Bonofiglio ve ark. 2016, Engel ve ark. 2011).

Apoptozis bir hücre içi program tarafından organize edilmiş hücre ölümü düzenlenmesi olarak tanımlanmaktadır. Apoptozis, programlanmış hücre ölümünün tek biçimi olarak düşünülmektedir. Bununla birlikte son yıllarda programlanmış hücre ölümü, otofaji ve nekroptoz (programlanmış nekroz) olaylarını da içerecek şekilde genişlemiştir. Programlanmış hücre ölümünün bu modları, özellikle apoptoz ve nekroptoz, habis hücrelerin hayatta kalmasına ve yayılmasına engel olan doğal bariyer işlevi görmektedir. Apoptozis çok hücreli organizmaların gelişimi ve homeostazı sırasında istenmeyen hücrelerin yok edilmesi için gerekli bir mekanizmadır. Bu son derece iyi düzenlenmiş süreç, DNA parçalanması, zar kabarcıklanması, hücre büzülmesi ve zarla kapalı veziküllere ayrıştırmayı içerir. Düzensiz hücre ölümü giderek artan klinik bozukluklarla ilişkilendirilir. Aşırı apoptozis iskemik hasar ve nörodejeneratif hastalıklara neden olabilirken, kanser ve otoimmün hastalıklar gibi koşullar yetersiz apoptozdan kaynaklanabilir. Yüksek düzeyde düzenlenmiş apoptotik süreç, karmaşık bir olay kaskadı gerektirir (Goldar ve ark. 2015).

Çalışmamızda Alfa-Pinen'in A-549 ve MCF-7 hücrelerinde 0.019, 0.039 ve 0.078 µg/ml'lik konsantrasyonlarının apoptotik indekslerinin Paklitaksel ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Gama-Terpinen'in aynı hücre hattında 0.019-0.312 µg/ml'lik konsantrasyonlar arasında apoptotik indekslerinin en

yüksek olduğu tespit edilirken, P-Cymen'in apoptozisi en yüksek oranda indükleyen konsantrasyonun ise 0.625 µg/ml olduğu tespit edilmiştir. Fitokimyasalların A-2058 melanoma hücrelerinde de hücrel apoptozu tetikleyen en yüksek konsantrasyonlarının; Alfa-Pinen için 0.19 µg/ml, Gama-Terpinen için 0.039 µg/ml olarak bulunurken, P-Cymen'in melanoma hücrelerinde etkinliğinin akciğer ve meme kanseri hücreleriyle kıyaslandığında daha düşük konsantrasyonlarda (0.312 µg/ml) etkinliğinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda en çarpıcı bulgulardan biri ise; fitokimyasalların konsantrasyonlarının artırılmasının hücreleri yüksek düzeyde apoptoza sürüklediğidir. Hücrel sitotoksitenin fitokimyasalların konsantrasyonuna bağlı olarak artış göstermesine rağmen, hücrel apoptozun her bir fitokimyasal için doz-ilişkili olmayıp fitokimyasalların optimal konsantrasyonlarda hücrel apoptozu daha yüksek oranda tetiklediğidir.

Apoptozda çok çeşitli genler bu süreci kontrol etmektedir. Apoptoz sürecinde kaspazlar önemli rol oynamaktadırlar. Kaspazlar yüksek derecede korunmuş aspartata özgü sistein proteazlarından oluşan bir aileye aittir. Kaspazların bulunduğu iki ana apoptotik yol tarif edilmiştir. Bunlar ekstrinsik ve intrinsik yolaklardır. Biri hücre yüzeyi uyarısına dayanır ve ekstrinsik yol olarak bilinir. Ölüm sinyali, tümör nekroz faktörü (TNF) gibi bir hücre dışı ölüm ligandının, aynı kökenli reseptör olan TNF reseptörüne bağlanması yoluyla iletilir. Ölüm reseptörleri, ekstrinsik yolağın apikal proteazları, *kaspaz-8* ve *kaspaz-10*'un alındığı hücrelere sinyal gönderir. *Kaspaz-8*, ölüm reseptörü yolunda önemli başlatıcı kaspazdır. Ligand bağlama üzerine, ölüm reseptörleri, örneğin CD95 (Apo-1/Fas) agreg ve membrana bağlı sinyal kompleksleri oluştururlar. Bu kompleksler daha sonra, adaptör proteinleri vasıtasıyla, *prokaspaz-8* zimojenin yüksek bir lokal konsantrasyonuyla sonuçlanır. İntrinsik yol, hücrel stresin bir sonucu olarak ortaya çıkar ve mitokondriyondaki sitokrom c'nin aracılık ettiği yolaktır. Bu durumda, *kaspaz-9* aktive edilir. Mitokondriye bağımlı (veya intrinsik) apoptoz yolu, büyüme faktörü eksikliği, DNA hasarı, ısı şoku, UV- veya γ-radyasyonu ve kemoterapötik ilaçlar dahil çeşitli uyarılarla aktive edilir. Uyarılar *Bax* ve *Bak* gibi pro-apoptotik genlerin aktivasyonuna neden olur. İntrinsik yolakta *Bax* ve *Bak* proteinlerinin artışı mitokondri dış zarı geçirgenliğini değiştirerek sitokrom c'nin sitozole salınımına neden olur. Sitozole salınan sitokrom c, APAF-1'e bağlanır. Bu kompleks *prokaspaz 9*'a bağlanarak apoptozomu oluşturur. Apoptozom oluşumu ile aktif forma geçen *kaspaz-9*, *kaspaz-3*'ü aktive eder ve bu şekilde apoptoz gerçekleşir (McIlwain ve ark. 2013, MacKenzie ve Clark 2008).

Esansiyel yağlarının temel bileşenleri arasında yer alan Gama-Terpinen, P-Cymen'in bulunduğu *Oliveria decumbens* bitkisinin fare meme karsonuma hücreleri üzerinde antiproliferatif etkinliklerinin araştırıldığı bir çalışmada oldukça önemli etkinliğe sahip olduğu bildirilmiştir. Çalışmada esansiyel yağların *kaspaz-3* aktivasyonu yoluyla hücresel apoptozu tetiklediği bildirilmiştir. Bu çalışma bulgularıyla uyumlu olarak çalışmamızda A-549 ve A-2058 hücrelerinde Gama-Terpinen ve P-Cymen'in *kaspaz-3* aktivasyonu sağlayarak kanser hücrelerini apoptoza sürüklediği böylece antitümöral etkinlik sergiledikleri tespit edilmiştir (Jamali ve ark. 2020).

Türkiye'de endemik olarak yetişen *Myrtus communis* L.'in önemli esansiyel yağ komponentlerinden biri Alfa-Pinen'dir. *Myrtus communis*'in esansiyel yağlarının akciğer karsinoma hücrelerinde (A-549) *kaspaz 3*, *kaspaz 8*, *kaspaz 9*, *Bcl-2* ve *p21* genlerinin ekspresyon seviyeleri qRT-PCR yöntemi ile araştırılmış, çalışmada esansiyel yağların *kaspaz-3*, *kaspaz-9* ve *p21* gen ekspresyon seviyelerinin anlamlı düzeyde arttırdığı böylelikle hücreleri apoptoza sürükledikleri bildirilmiştir. Çalışmamız bu çalışmadan farklı olarak birçok tıbbi bitki esansiyel yağ içeriğinde yer alan komponentler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda Alfa-Pinen'in akciğer (A-549) meme (MCF-7) ve melanoma (A-2058) kanser hücreleri üzerinde önemli antiproliferatif etkinlik sergilediği tespit edilmiş olup, *Myrtus communis* esansiyel yağ içeriği de dikkate alındığında temel bileşenlerin benzer şekilde hücresel yolda rol oynayan gen ekspresyonlarını tetikleyerek kontrollü hücre ölümüne yol açtığı saptanmıştır (Bilgin ve Duran 2020).

Cinnamomum zeylanicum esansiyel yağlarının etkinliklerinin araştırıldığı bir başka çalışmada esansiyel yağların uygulandığı tedavi grubunda kontrollere kıyasla esansiyel yağın tümör hacmini önemli ölçüde küçülttüğü bildirilmiştir. Ayrıca, tedavi edilen tümör hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla mitotik indeksin %29-45 arasında doz-ilişkili olarak azaldığı bildirilmiştir. Tedavi edilen sıçan tümör örneklerinin histopatolojik analizlerde ise kontrol grubuyla kıyaslandığında karsinoma hücre oranında ciddi azalmanın olduğu bildirilmiştir. Esansiyel yağlarla tedavi verilen sıçan karsinomlarında *kaspaz-3* ve *Bax* ekspresyonları artarken, *Bcl-2* geni ekspresyon seviyesinde ise anlamlı derecede azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada esansiyel yağlarının *in vitro* ve *in vivo* değerlendirmeler sonucu hayvan meme karsinom modellerinde önemli düzeyde kemopreventif ve terapötik aktiviteler sergilediği bildirilmiştir (Kubatka ve ark. 2020) Bu çalışmada olduğu gibi bizim

çalışmamızda da fitokimyasalların pro-apoptotik gen ekspresyonlarını (*Bax*, *p53*, *kaspaz-3*) indüklerken, anti-apoptotik gen ekspresyonlarını (*Bcl-2*, *Bcl-xL*) inhibe ederek aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir. Yine benzer şekilde *in vitro* olarak elde edilen test sonuçlarının fare tümör modelinde de etkili olması *in vitro* test sonuçlarının *in vivo* testlerle doğrulandığının göstergesidir. Bu çalışma bizim çalışmamızdan farklı olarak total esansiyel yağlarla yapılsa da esansiyel yağ komponentlerinin temel bileşenleri arasında Alfa-Pinen yer alması çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Antitümöral etkinliğin esansiyel yağ komponentlerinden hangisinden kaynaklandığının bilinmesi ileriki çalışmalar açısından son derece önemlidir. Bu amaçla çalışmamızda tıbbi bitkilerde yaygın bulunan önemli üç komponentin tekli ve kombine etkinlikleri *in vitro* ve sonrasında ise *in vivo* olarak deneysel fare tümör modelinde değerlendirilmiştir. Çalışmamızda bu çalışmayla uyumlu olarak fitokimyasalların doz ilişkili olarak antiproliferatif etkinliklerinin arttığı tespit edilmiştir. *In vitro* testlerde fitokimyasalların hücre siklusunun önemli ölçüde G1/G0 safhasında durdurulduğu tespit edilmiş olup, histopatolojik analizlerde de fitokimyasalların hücreleri apoptoza sürüklendiği tespit edilmiştir. Fitokimyasallarla tedavi grubunda pro-apoptotik gen (*Bax*, *p53*, *kaspaz-3*) ekspresyonlarının indüklenirken, anti-apoptotik gen (*Bcl-2*, *Bcl-xL*) ekspresyonlarının ise inhibe edildiği tespit edilmiştir. Daha da önemlisi, *in vitro* sonuçların deneysel olarak oluşturulmuş deri altı fare tümör modelinde fitokimyasallarla (tekli ve kombine tedavi gruplarında) tümör kitle çaplarından azalma hatta tespit edilemeyecek düzeyde kitlelerin küçüldükleri saptanmıştır. Standart ilaç, fitokimyasallar ve fitokimyasallarla farklı kombinasyonların uygulandığı tedavi grupları ile tedavi verilmeyen kontrol gruplarında yer alan farelerden alınan deri, akciğer, karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve bağırsak doku örneklerinde uzak organlara hücre metastazlarının varlığı değerlendirilmiş olup deneylerde Alfa-Pinen artı Dakarbazin, Gama-Terpinen artı Dakarbazin ve Alfa-Pinen artı Gama-Terpinen artı P-Cymen tedavi gruplarında hücre metastazlarının önemli ölçüde inhibe edildiği tespit edilmiştir. Metastaz yapmasıyla karakterize oldukça önemli bir kanser türü olan melanoma hücrelerinin Gama-Terpinen artı Dakarbazin kombinasyonunun verildiği tedavi grubunda hayvanlarda diğer organlara hücre metastazının %90 nispetinde inhibe edildiği tespit edilmiştir.

Alfa-Pinen türevi olan GY-1 (6,6-dimetilbisiklo [3.1.1] hept-2-en-2-yl) metil-4-metilbenzensülfonat)'in hepatoma karsinomu hücrelerinde antitümöral etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada hücre proliferasyonunun S fazında inhibe edildiği ve *p53* geni

ekspresyonunda artışa yol açarak hücresel apoptozun tetiklendiği bildirilmiştir. Çalışmamızda ise bu çalışmayla uyumlu olarak Alfa-Pinen *p53* geni ekspresyonunu artırarak hücresel apoptozu tetiklerken, bu çalışmadan farklı olarak akciğer, meme ve melanoma kanser hücrelerinde hücre siklusunu G1/0 fazında durdurmuştur (Ye ve ark. 2020)

İnsan over kanser hücre hattında Alfa-Pinen'in hücre siklusunu G2 safhasında inhibe ederek antiproliferatif etki gösterdikleri ve pro-apoptotik genlerden *kaspaz-3* geni ekspresyonunu tetikleyerek hücreleri apoptoza sürüklediği bildirilmiştir. (Hou ve ark. 2019)

Bir başka çalışmada ise Alfa-Pinen'in farelerde CT-26 kolon kanseri hücrelerinde antitümöral etkisinden bahsedilmiştir. (Jo ve ark. 2021) Benzer olarak HepG2 karaciğer karsinoma hücrelerinde hücre siklusunu G2/M safhasında inhibe ettiği, ayrıca *p53* geni ekspresyonunu tetikleyerek hücrelerin apoptoza sürüklenmesini hızlandırdıkları bildirilmiştir. (Xu ve ark. 2018)

Apoptoz *Bcl-2* gen ailesi ile düzenlenmektedir. Bu gen ailesinin bazı üyeleri apoptozu indüklerken (pro-apoptotik), bazıları apoptozu inhibe etmektedir (anti-apoptotik). *Bcl-2*, *Bcl-xL* ve *Bcl-w* bu gen ailesinin yaşamı temsil eden anti-apoptotik genlerini oluştururken, *Bax*, *Bik*, *Bak*, *Bid*, *Bad*, ve *Bcl-xs* genleri apoptozun ölümü temsil eden pro-apoptotik genlerini oluşturmaktadır (Hata ve ark. 2015). *Bax* geni apoptozun mitokondriyal yolunun kilit düzenleyicilerindendir. Hücre stresinde *Bax* ve *Bak*, mitokondriyal yüzey üzerinde farklı odaklarda birikerek burada konformasyonel değişikliğe uğramakta, oligomerize olarak sitokrom c salınımına aracılık ederek hücre ölümüne neden olmaktadır (Hata ve ark. 2015).

Fitokimyasalların antikanserojen etkinliklerinin moleküler mekanizmasının araştırıldığı MCF-7 hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada *Bcl-2* gen ekspresyonunun azaldığı, *Bax* geni ekspresyonunun ise indüklenerek hücresel apoptozun tetiklendiği bildirilmiştir. (Mari ve ark. 2020)

Fitokimyasallarla yapılan bir başka çalışmada ise thymol, Gama-Terpinen ve P-Cymen MCF-7 hücreleri üzerinde antiproliferatif ve antioksidan etkinlikleri *in vitro* olarak araştırılmış, thymol'ün güçlü antiproliferatif ve antioksidan etkisinden bahsedilirken, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in antioksidan ve antiproliferatif etkilerinin zayıf olduğu bildirilmiştir

(Fitsiou ve ark. 2016). Bizim çalışmamızda ise bu çalışmadan farklı olarak Gama-Terpinen ve P-Cymen'in özellikle akciğer kanser hücrelerinde ve melanoma hücrelerinde olmak üzere dikkate değer nitelikte pro-apoptotik gen ekspresyonlarını indükledikleri, anti-apoptotik gen ekspresyonlarını ise inhibe ederek kontrollü hücre ölümüne yol açtıklarını tespit ettik. Ayrıca çalışmamızda literatürden farklı olarak bu fitokimyasalların kendi aralarındaki kombinasyonları ile Paklitaksel ve Dakarbazin kombinasyonlarının da hem *in vitro* olarak hem de deneysel tümör modelinde etkinliklerinin oldukça çarpıcı olduğu tespit edilmiştir.

Son yıllarda P-Cymen ile metallo derivelerinin kanser tedavisinde kullanılan önemli bileşikler haline geldiği bildirilmektedir. Bu türevlerin antikanserojen aktivite gösterdikleri ve kanser kemoterapi kombinasyonunda etkili olabilecekleri bildirilmiştir (Hassan ve ark. 2020). Bu çalışma bulgularını destekler nitelikte bizim çalışmamızda da P-Cymen'in tekli kullanımında kanser hücreleri üzerinden *in vitro* ve *in vivo* etkinliğe sahip olduğu tespit edilse de P-Cymen'in diğer fitokimyasallarla ve standart ilaçlarla kombine kullanımlarının daha güçlü olduğu tespit edilmiştir.

Esansiyel yağ içerisinde temel bileşenler arasında bulunan Gama-Terpinen ve Alfa-Terpinen'in insan meme (MCF-7) ve fare meme kanseri (4T1) hücreleri üzerinde yapılan deneylerde MCF-7 hücrelerinde *Bax* /*Bcl-2* gen ekspresyonu oranının arttığı bildirilmiştir ki böylece hücresel apoptoz tetiklenmiştir. Benzer etkinlik fare meme kanseri hücre hattında da gözlenmiştir. Bu etkinin doz-ilişkili olarak değiştiği bildirilmiştir. Benzer olarak bizim çalışmamızda da hem Alfa-Pinen hem de Gama-Terpinen *Bax* geni ekspresyonunu arttırmış, *Bcl-2* geni ekspresyonunu azaltmıştır. Böylece bu fitokimyasalların verildiği tedavi gruplarında antikanserojen etkinlik varlığı tespit edilmiştir (Assmann ve ark. 2018). Benzer olarak Gama-Terpinen'in HT-29 kolon kanseri hücrelerinde DNA hasarı oluşturarak hücre proliferasyonunun durdurulduğu programlı hücre ölümünün tetiklendiği bildirilmiştir. (Bhagat ve ark. 2020)

In vitro antianserojen etkinlik çalışması olan P-Cymen ve Gama-Terpinen'in temel komponentleri olduğu bildirilen *Sideritis raeseri* bitkisinin esansiyel yağlarının insan melanoma (A-375), insan kolon adenokarsinomu (Caco2) ve insan prostat karsinomU (PC3) hücreleri üzerinde önemli antiproliferatif etkinlik sergiledikleri bildirilmiştir. Bu iki fitokimyasalın en güçlü etkinliği melanoma hücreleri üzerinde gösterdikleri bildirilmiştir (Mitropoulou ve ark. 2020).

Çalışmada P-Cymen ve Gama-Terpinen'in proinflamatuvar sitokin (IL-1 beta ve IL-8) salınımını tetiklediği ve anti-inflamatuvar etkinlik sergilediği tespit edilmiştir. Bu çalışmadan farklı olarak hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmaları kapsayan çalışmamızda Gama-Terpinen'in insan akciğer, meme ve melanoma hücrelerinde yüksek etkinlik gösterdikleri hücresel apoptozun en önemli tetikleyicisi olduğu saptanmıştır (Oliviero ve ark. 2016).

Literatürde fitokimyasalların antiproliferatif ve antitümöral etkinliklerinin kanser hücre tiplerine göre değişebileceği bildirilmektedir. Bir çalışmada Gama-Terpinen ve P-Cymen'in farklı kanser hücrelerinde IC₅₀ değerlerinin tipleri üzerinde farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir. Bu sebeple çalışmamızda da Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in insan akciğer, meme ve melanoma hücrelerinde antiproliferatif ve antitümöral etkinliklerinin ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Literatürle uyumlu olarak bu fitokimyasalların etkinliklerinin farklı kanser türlerinde farklı düzeyde aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. (Özkan ve Erdoğan 2017).

Akciğer karsinomu ve keratinosit hücreleri üzerinde Gama-Terpinen'in önemli kaynaklarından *Rosmarinus officinalis*'in antioksidan, antifungal ve kanser hücrelerine karşı sitotoksitelerinin değerlendirildiği bir çalışmada, Gama-Terpinen'in kanser hücrelerine karşı önemli düzeyde sitotoksitite sergiledikleri ve güçlü antioksidan etkinliğe sahip oldukları tespit edilmiştir. (Spagnoletti ve ark. 2016). Bu çalışmayla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da MCF-7 hücrelerinde Gama-Terpinen'in oldukça güçlü etkinlik gösterdiklerini tespit ettik.

Çalışmamızın en önemli hedeflerinden biri de fitokimyasallarla konvansiyonel tedavide kullanılan kanser ilaçlarının kombine kullanımlarıyla mevcut ilaçların etkinliklerinin artırılması ve yan etkilerinin azaltılmasıdır. Bir çalışmada Gama-Terpinen ve P-Cymen'in farklı tip kanser hücreleriyle muamele edildikten sonra kemoterapötik ilaçlara duyarlılığının arttığı bildirilmiştir. Bu çalışma sonuçlarını destekleyecek şekilde bizim çalışmamızda da seçilen her üç fitokimyasalın insan akciğer meme ve melanoma kanser hücrelerinde hücresel apoptozun tetiklendiği, Paklitaksel ve Dakarbazin ile bu fitokimyasalların kombine kullanımları durumunda etkinliklerinin arttığı tespit edilmiştir (Özkan ve Erdoğan 2017).

Mitokondriyal apoptotik yol, *Bcl-2* protein ailesi tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmekte ve mitokondri dış membran permeabilizasyonunu içermektedir. Mitokondri dış membran permeabilizasyonunu takiben, hücre ölümüne yol açan kaspaz kaskadını aktive etmek için sitozole sitokrom c ve SMAC/DIABLO gibi apoptotik faktörler salınır. Araştırmalar *Bcl-2* ailesinin en az 18 farklı üyesinin tanımlanmasını ve karakterize edilmesini sağlamış ve apoptozdaki işlevlerine ve içerdikleri *Bcl-2* homoloji (BH) alanlarının sayısına göre bunlar üç alt gruba ayrılmıştır. *Bcl-2* ailesinin multi BH (BH 1-3) domaini içeren pro-apoptotik üyeleri *Bax* ve *Bak*, mitokondri dış membran permeabilizasyonunun doğrudan yürütücüleri olarak kabul edilir ve apoptozu başlatırlar. BH3 domaini içeren *Bid*, *Bim* ve *PUMA* da apoptoz indükleyicidir. *Bcl-2* ve *Bcl-xL* ise dört BH alanının tümünü içeren ve pro-apoptotik proteinlerin etkisini inhibe eden anti-apoptotik proteinlerdir. *Bax* ve *Bak* bu nedenle apoptozu oluşturan yolun özünde yer almaktadır. Hem sitozol hem de mitokondri dış membran arasında mekik olmasına rağmen, *Bax* öncelikle sağlıklı hücrelerdeki sitoplazmaya yerleşirken, *Bak* esasen mitokondri dış membranında bulunur. Aktive edildiğinde, bu proteinler oligomerize olur ve mitokondri dış membran permeabilizasyonuna aracılık eder ki, apoptotik faktörlerin sitozole salınmasına izin vererek hücre ölümüne yol açar (Cosentino ve García-Saez 2017, Peña-Blanco ve García-Saez 2018).

Apoptozisi düzenleyen bir diğer gen, tümör baskılayıcı *p53* genidir. Normal işlev gören wild type (yabani tip) *p53* geni, hücrede apoptozu kolaylaştırır. Hipoksi ve serbest radikal oluşumu *p53* aracılı DNA onarımı ve apoptozu başlatır. DNA hasarı olduğu zaman S fazına geçişi bloke eder. DNA tamiri için zaman kazanılır, eğer tamir mümkün değilse hasarlanmış hücreler apoptozla yok edilir. Wild tip *p53* antikanserojen ilaçlar tarafından oluşturulan DNA hasarını takiben apoptoz indüksiyonunda önemli bir regülatör proteindir. Bu tümör supressör protein canlı hücrelerin üremesini G1 fazında durdurmakta onarım gerçekleşmezse apoptozu yol açmaktadır (Sun 2015).

Çalışmamızda A-549 hücreleri üzerinde özellikle P-Cymen başta olmak üzere Gama-Terpinen'in de hücrelerde *kaspaz-3* aktivitesini kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı düzeyde arttırdığı tespit edilirken, Gama-Terpinen ve Alfa-Pinen'in etkinliğinin dikkate değer olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan da anlaşılacağı gibi her bir

fitokimyasal hücrel apoptozda farklı genlerin ekspresyonlarını indükleyerek ya da inhibe ederek aktivite gösterebilmektedir.

Deneylerde fitokimyasallar arasında A-549 hücreleri üzerinde anti-apoptotik genlerden *Bcl-xL* ekspresyonu inhibe etmesiyle öne çıkan fitokimyasal P-Cymen olurken, *Bcl-2* gen ekspresyonunu anlamlı derecede azaltan fitokimyasalın ise Alfa-Pinen olduğu tespit edilmiştir. P-Cymen ve Gama-Terpinen'in ise *Bcl-2* gen ekspresyonu üzerinde herhangi bir inhibitör etkinlik sergilemediği tespit edilmiştir. Aynı hücreler üzerinde pro-apoptotik genlerden olan *p53* ve *kaspaz-3* ekspresyonunun Gama-Terpinen varlığında anlamlı derecede arttığı, *Bax* geni ekspresyonunun ise Alfa-Pinen tarafından benzer şekilde istatistiksel olarak anlamlı derecede indüklendiği tespit edilmiştir. Buradan da anlaşılabacağı gibi fitokimyasalların moleküler mekanizmasının bilinmesi ilaç araştırmalarının temelinde büyük öneme sahiptir.

MCF-7 hücrelerinde *Bcl-xL* ekspresyonu üzerinde üç fitokimyasaldan hiçbirinin kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir azalmaya sebep olmadığı görülürken, üç fitokimyasalın da yine bir anti-apoptotik gen olan *Bcl-2* gen ekspresyonunu anlamlı derecede inhibe ettiği tespit edilmiştir. *NF-κB* gen ekspresyonunun Gama-Terpinen ve Alfa-Pinen tarafından anlamlı derecede inhibe edildiği saptanmıştır. Aynı hücreler üzerinde *p53* gen ekspresyonunun anlamlı derecede indüklendiği tespit edilirken, *Bax* geni ekspresyonu sadece P-Cymen tarafından istatistiksel olarak anlamlı derecede indüklenmiştir.

A-2058 hücrelerinde anti-apoptotik gen ekspresyonunu inhibe eden fitokimyasalların Alfa-Pinen ve P-Cymen, pro-apoptotik gen ekspresyonunu indükleyen fitokimyasalların ise *p53* ve *kaspaz-3* genleri için en yüksek düzeyde Gama-Terpinen, *Bax* geni için ise Alfa-Pinen olduğu tespit edilmiştir.

In vitro ve *in vivo* çalışmalar fitokimyasal kombinasyonlarının, tekli kullanılan bileşiklerden daha etkili bir şekilde tümör büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir. Ayrıca, çalışmalar fitokimyasalların geleneksel tedavilerin etkilerini güçlendirdiğini ve kemoterapi ilaçlarının etkili dozlarını azaltmaya, ilaç direncini yenmeye ve toksisiteyi indirgemeye yardımcı olabileceğini göstermiştir. Kanser tedavisinde önemli bir strateji; farklı fitokimyasalları birbirleriyle birleştirmek ya da antikanser ilaçlarıyla birlikte bu

komponentleri kullanmak olabilir (Chan ve Fong 2009, Halabi ve ark. 2014, Mund ve ark. 2016).

Bununla birlikte, kanser tedavisi için konvansiyonel tedavilerle kombinasyon halinde fitokimyasalların kullanımıyla ilgili sınırlı sayıda klinik çalışma bulunmaktadır. Bunun en olası sebebi; metabolizma, stabilite, diğer ilaçlarla etkileşim, yan etkiler ve bu bitki türevlerinin etki mekanizmalarının insanlarda tam olarak açıklanamamış olması olabilir. Bu fitokimyasalların yanlış uygulanması, insanlarda zararlı etkilere yol açan geleneksel tedavilerin aktivitesine müdahale edebilmektedir (Mohan ve ark. 2013, Ulbricht ve Chao 2010).

Çalışmamızda fitokimyasalların kombine kullanımları tekli kullanımlarıyla kıyaslandığında hem pro-apoptotik gen ekspresyonlarını anlamlı derecede indükledikleri hem de anti-apoptotik gen ekspresyonlarını anlamlı düzeyde inhibe ettikleri tespit edilmiştir. Sözgelimi A-549 hücreleri üzerinde anti-apoptotik genlerden *Bcl-xL* ve *Bcl-2* gen ekspresyonlarının Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen, P-Cymen artı Paklitaksel ve Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen artı P-Cymen artı Paklitaksel kombinasyonlarının tekli etkinliklerinden anlamlı düzeyde daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Aynı hücre hattı üzerinde Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen artı P-Cymen kombinasyonlarının *Bax* ve *p53*, Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen artı Paklitaksel kombinasyonlarının *Bax*, *kaspaz-3* ve *p53* gen ekspresyonlarının anlamlı ölçüde daha yüksek olduğu güçlü sinerjistik aktivite sergiledikleri tespit edilmiştir.

Fitokimyasalların kendi arasında ve Paklitaksel ve Dakarbazin ile kombine kullanımları durumunda benzer sinejistik etkinliklerin hem MCF-7 hem de A-2058 hücrelerinde görüldüğü tespit edilmiştir.

Çalışmamızda Real-Time PCR yöntemiyle gen ekspresyonlarının indüksiyonu ve inhibisyonu tespit edilen gruplarda protein ekspresyon seviyeleri ise Western blotlama yöntemiyle gösterilerek sonuçların konfirmasyonu yapılmıştır.

Çalışmada *in vitro* etkinlikleri gösterilen fitokimyasalların ve kombinasyonlarının *in vivo* etkinlik çalışmalarının değerlendirildiği deri altı tümör modelinde hayvanlara tedavi verilmesini takiben 2 ay süresince tümör büyümesi takip edilmiş, tümör kitle çapı ölçümleri

yapılmıştır. Tedavi sonunda hayvanların sakrifiye edilmelerini takiben melanosit varlığı başta melanositlerin enjekte edildiği deri bölgesinde olmak üzere akciğer, karaciğer, böbrek, dalak, beyin, kalp ve bağırsaklardan hazırlanan preperatlarda incelenerek metastaz varlığı açısından da değerlendirilmiştir.

Gama-Terpinen tedavi grubunda özellikle tedavinin 21. gününden itibaren tümör kitle çapında anlamlı derecede azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Özellikle kombine tedavi başarısının Dakarbazin'le kıyaslandığında birinci haftadan itibaren tümör kitle çapında anlamlı derecede azalmanın tespit edilmesi *in vivo* güçlü sinerjizm olarak değerlendirilmiştir. Deneylerde özellikle Alfa-Pinen artı Gama-Terpinen, Alfa-Pinen artı Dakarbazin ve Gama-Terpinen artı Dakarbazin tedavi gruplarında tümör kitle çaplarının tedavinin 15. gününden itibaren palpasyonla tespit edilemeyecek düzeyde kaybolmasıyla sonuçlanmıştır ki, sonuçlar Dakarbazinin tekli etkinliğinden anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur. Hayvan deneylerinde en potent kombinasyonun Gama-Terpinen artı Dakarbazin olduğu tespit edilmiştir. Bu etkinin tedavinin ilk hastasından itibaren tespit edilmesi ise oldukça önemli olarak nitelendirilmiştir.

Hayvan deneyleri çalışması tedavi bitiminde hayvanların sakrifiye edilerek histopatolojik değerlendirmelerle doğrulanmıştır. Çalışmada *in vitro* deneylerde en yüksek düzeyde etkinlik gösteren fitokimyasal veya kombinasyonların deri altı fare tümör modelinde antitümöral etkinlikleri karşılaştırılmıştır. B16-F10 hücre enjeksiyonunu takiben tedavi verilmeyen hayvanlardan alınan doku örneklerinin tamamında melanosit varlığı dolayısıyla metastaz tespit edilmiştir. Dakarbazin tedavi grubunda ise tüm hayvanlarda tümör dokusunda küçülmenin varlığıyla birlikte deri örneklerinin tamamında melanosit varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca Dakarbazin'in tedavi verilmeyen kontrol grubuyla kıyaslandığında akciğer, karaciğer ve böbrek metastazlarında bir azalma (sırasıyla %20, %20 ve %50 azalma) tespit edilse de melanositlerin yayılımını önlemede yetersiz kaldığı tespit edilmiştir. Dakarbazin tedavi grubunda beyin, kalp ve bağırsak dokularında ise metastaz tespit edilmemiştir.

Alfa-Pinen tedavi grubunda ise tüm hayvanların deri örneklerinde melanosit varlığı tespit edilmiş olup, akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında ise metastaz varlığı sırasıyla hayvanların %70, %80 ve %60'inde oranında tespit edilmiştir. Dakarbazin tedavi grubunda olduğu gibi diğer organlarda melanosit varlığı tespit edilmemiştir.

Gama-Terpinen tedavi grubunda ise antitümöral etkinliğin daha güçlü olduğu deri örneklerinin tamamında melanosit varlığı tespit edilirken, tedavi verilmeyen kontrol grubuyla kıyaslandığında akciğer ve karaciğer metastazı farelerin %50'sinde tespit edilirken, böbrek metastazı ise hayvanların %40'ında tespit edilmiştir. P-Cymen'in ise Alfa-Pinen ve Gama-Terpinen tedavi grubuyla kıyaslandığında antitümöral etkinliğin daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmada Alfa-Pinen artı Dakarbazin kombine tedavi grubunda farelerde deri örneklerinin tamamında melanosit varlığı tespit edilirken, farelerin %70'inde akciğer, %80'in de ise karaciğer metastazı tespit edilmemiştir. Gama-Terpinen artı Dakarbazin tedavi grubunda ise farelerin %50'inde deri örneklerinde melanosit varlığı, %70'inde akciğer ve %80'inde ise karaciğer metastazının görülmediği tespit edilmiştir. Deneylerde üç fitokimyasalın Dakarbazin ile kombine kullanımları durumunda antitümöral etkinliklerinin daha da çarpıcı olarak arttığı tespit edilmiştir. Alfa-Pinen artı Gama-Terpinen artı P-Cymen artı Dakarbazin tedavi grubunda ise hayvanların sadece %10'unda deri ve %10'unda ise akciğer dokusunda melanosit varlığı saptanmıştır.

Karsinogenezde rol oynayan çoklu hedeflerin aktivitesini modüle etme yeteneklerinden dolayı, fitokimyasallar kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe edebilir. Bununla birlikte, *in vitro* çalışmaların ümit verici sonuçlarına rağmen, klinik uygulamada, tek antikanser ajan olarak fitokimyasalların kullanımı sınırlıdır. Bu gerçek, temel olarak insan vücudundaki zayıf biyoyararlanımlarından kaynaklanmaktadır. Aslında, polifenollerin zayıf emilimi ve biyolojik dağılımı vardır, ancak insan vücudunda, tekli bileşiklerin *in vivo* etkilerini engelleyen ve kanser hücrelerine verilen dozu etkileyen yüksek metabolizma ve atılım gibi özellikleri bulunmaktadır. Her ne kadar fitokimyasalların biyoyararlanımını artırma yöntemleri son 20 yılda ilerlemiş olsa da, fitokimyasalların antikanser ilaçlar olarak etkinliğini artırmak için yeni stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır (Chan ve Fong 2009, Halabi ve ark. 2014, Mund ve ark. 2016).

Kemoterapi ve radyoterapi gibi konvansiyonel tedaviler kanser tedavisinde altın standarttır. Ne yazık ki, tümör hücreleri ya kemoterapötik ajanları hücre dışına atarak ya da kanserogenezde rol alan genlerin ve proteinlerin ekspresyonunu değiştirerek ilaç hedeflerini değiştirmekte veya *Bcl-2* ve *Bcl-xL* gibi anti-apoptotik proteinlerin üretimini artırarak bu tedavilere dirençli hale gelebilmektedir (Chan ve Fong 2009). Fitokimyasalların geleneksel

tedavilerde kullanılan ilaçların antikanserojenik etkilerini arttırdığı, karsinogenezde rol oynayan farklı sinyal iletim yollarını modüle edebilme yeteneklerinin olması ve fitokimyasal kombinasyonlarının tümör büyümesini önemli ölçüde engellediğine dair artan kanıtların bulunması kanser tedavisinde oldukça önemlidir. Ayrıca, fitokimyasalların konvansiyonel tedavilerle kombine kullanımının ilaç direncinin üstesinden gelmeye ve standart antikanser tedavilerinin yan etkilerini azaltmaya yardımcı olabileceği de düşünülmektedir (Chan ve Fong 2009, Halabi ve ark. 2014, Mund ve ark. 2016).

Literatürde *in vitro* ve *in vivo* olarak yapılan çalışmalarda, kombinasyon halinde fitokimyasallarla yapılan tedavinin, kanser hücrelerinin üremesini inhibe etmede tek bir fitokimyasal ile yapılan tedaviden daha etkili olduğu bildirilmiştir (Ferrer ve ark. 2005, Wang ve ark. 2014, Wang ve ark. 2012).

Karsinogenezis normal bir hücrenin kanser hücresine aşamalı dönüşümüne neden olan çok aşamalı bir süreçtir. Malign transformasyon hücre proliferasyonunu arttıran genlerin aşırı ekspresyonu veya hiperaktivasyonu ya da hücre çoğalmasını kontrol eden genlerin (tümör baskılayıcı genler) ekspresyonunun azalması veya kaybolması ya da fonksiyonlarının inaktivasyonu sonucu gerçekleşmektedir. Sonuç olarak, normal hücreler çoğalmalarını ve sağ kalımlarını kontrol eden ekzojen uyarıcılardan etkilenirken, kanser hücreleri ekzojen sinyallerin yokluğunda hızla çoğalabilmekte ve sağkalımın negatif düzenleyicilerine karşı duyarsız hale gelmesiyle gerçekleştiği bildirilmektedir. Bunun yanında, büyüme faktörlerinin ve/veya reseptörlerinin aşırı ekspresyonu kanser hücrelerinin sürekli çoğalmalarını da tetiklemektedir (Bei ve ark. 2012). Kanserojenizde yer alan sinyal iletim yollarını düzenleyebildiklerinden, bitkisel komponentlerin tümör hücrelerinin çoğalmasını önleyebileceği konusunda umut verici bir potansiyele sahip olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Benvenuto ve ark. 2013, Kunnumakkara ve ark. 2008, Mohan ve ark. 2013).

Antikanser ajan olarak fitokimyasalların kullanılmasındaki en önemli sakıncanın insan vücudundaki zayıf biyoyararlanımları olduğu bildirilmiştir. Bu durum özellikle fitokimyasalların tek başlarına kullanıldığında *in vivo* etkilerini engelleyebileceği ya da azaltılabileceği bildirilmiştir. Bu etkinin ortadan kaldırılabilmesi konusunda en önemli yaklaşımın ise birkaç fitokimyasalın veya fitokimyasallar ve antikanser ilaçlarla

kombinasyon tedavisinin olabileceği düşünülmektedir (Crozier ve Jaganath 2009, Williamson ve Manach 2005).

Kanser günümüzde insidansı her geçen gün artarak devam eden en mortal hastalıklardan biridir. Kanser tedavisinde cerrahi yöntemler, kemoterapi, radyoterapi, hormon destekleri ve tamamlayıcı/alternatif tıbbi uygulamalar seçilen yöntem veya yöntemler arasında yer almaktadır. Konvansiyonel tedavi yöntemleri yanında alternatif tedavi alan kanser hastalarında ilaç etkileşimleri ciddi riskler de meydana getirebilmektedir (Alam ve ark. 2018, Bisen 2013). Bitkisel bileşiklerin birlikte kullanıldıkları zaman kemoterapötiklerin etkisini arttırdığı (additif veya sinerjistik) ya da etkisini azalttığı bildirilmektedir. Bu sebeple fitokimyasalların birlikte kullanıldığında etkilerinin belirlenmesi önem arz etmektedir (Chan ve Fong 2009). Bu tür çalışmalarda fitokimyasalların kombine kullanımları ile tespit edilebilecek yüksek etkinlikli formülasyonlar tedavi edilmesi düşünülen kanser türü için umut olabilmektedir.

Amacımız ölüm oranının yüksek olduğu bilinen kanser türlerinde etkin bir tedavi yönteminin oluşturulmasına katkı sağlamaktır. Son zamanlarda, kanser tedavisinde ilaç kombinasyon çalışmaları üzerinde önemle durulan ve yaygın olarak kullanılmaya başlanılan yöntemlerdendir. Literatürde insan meme kanseri (MCF-7 hücre hattı), akciğer kanseri (A-549 hücre hattı) ve melanoma (A-2058 hücre hattı) hücreleri üzerinde, Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'nin kombinasyonu ile ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Sinerjistik etkili bileşikler kullanarak en etkin kombinasyonların belirlenmesi kanser gibi hastalıkların tedavisi açısından son derece önemlidir. Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'nin kombine kullanımının biyoyararlanımlarının artırılmasında faydalı olacağı düşünülmüş ve bu fitokimyasalların sinerjistik etkilerinin bu üç önemli kanser hücre tipi üzerinde araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca bu fitokimyasalların birbirleri ile hazırlanan kombinasyonlarının MCF-7, A-549 ve A-2058 hücreleri üzerinde apoptotik mekanizması da aydınlatılmaya çalışılmıştır.

6. SONUÇ

Çalışmada Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in Vero hücreleri (Afrika Yeşil Maymun Böbrek Hücre hattı) üzerinde non-sitotoksik konsantrasyonları tespit edildi. Sağlıklı hücreler üzerinde tespit edilen non-sitotoksik konsantrasyonlar dahilinde bu fitokimyasalların;

- Akciğer (A-549; insan akciğer adenokarsinoma hücre hattı),
- Meme (MCF-7; insan meme adenokarsinoma hücre hattı)
- Melanoma (A-2058; insan malign melanoma hücre hattı),

hücre hatları üzerinde antiproliferatif, antikanserojen etkinliklerinin varlığı araştırıldı.

1. Deneylerde non-toksik konsantrasyonlarının belirlenmesi bu tip çalışmalar için en çok tercih edilen yöntemlerden biri olan MTT (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) yöntemi ile gerçekleştirildi.

2. Çalışmada üç kanser hücre hattında (A-549, MCF-7 ve A-2058) bu fitokimyasalların tekli ve kombine etkinlikleri;

- Akridin oranj boyama yöntemiyle,
- Flow sitometrik hücre siklusu analiziyle,
- Real-Time PCR yöntemiyle pro-apoptotik ve anti-apoptotik gen ekspresyonları üzerindeki etkileri tespit edilerek;

a) *Bcl-2*

b) *Bcl-xL*

c) *p53*

d) *Bax*

e) *NF-κB*,

- Western-Blotlama yöntemiyle protein ekspresyonları analiz edilerek araştırıldı.

Alfa-Pinen'in A-549 hücreleri üzerinde Paklitakselin etkisiyle kıyaslandığında 0.019, 0.039 ve 0.078 µg/ml, 'lik konsantrasyonlarının hücreleri en yüksek düzeyde apoptoza sürükledikleri tespit edilmiştir. İlk 8 ve 24. saatler içinde 0.019 µg/ml, 'lik konsantrasyonda

Alfa-Pinen'in istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa da Paklitaksel'in etkinliğinden daha güçlü bir aktivite sergilediği tespit edilmiştir (Şekil 4. 10).

Gama-Terpinen ise benzer olarak 0.019, 0.039, 0.078, 0.156 ve 0.312 µg/ml'lik konsantrasyonlarda standart ilaç (Paklitaksel) etkinliğinden farklı olmayan aktivite göstermiştir. Gama-Terpinen hücreleri 0.039 µg/ml'lik konsantrasyonda en yüksek etkinlik göstermiştir. Bu konsantrasyonda Paklitaksel'in etkinliğinden daha güçlü bir etkinlik sergilemiştir (Şekil 4. 11).

P-Cymen'in A-549 hücreleri üzerinde hücrelerin apoptotik indeks üzerinde etkinliği değerlendirildiğinde 0.312 ve 0.625 µg/ml'lik konsantrasyonlarda etkinliğinin Paklitakselin etkinliğine benzer olduğu saptanmıştır. P-Cymen akciğer karsinomu üzerinde en yüksek aktiviteyi 0.612 µg/ml'de göstermiştir (Şekil 4. 12).

Meme kanseri hücreleri (MCF-7 Hücre Hattı) üzerinde Alfa-Pinen'in 0.019 µg/ml ile 0.312 µg/ml'lik konsantrasyonlar arasında hücreleri apoptoza sürüklediği bu etkinin Paklitakselin etkisinden anlamlı derecede farksız olduğu tespit edilmiştir. Akciğer kanseri hücrelerinde olduğu gibi 0.019 µg/ml düzeyinde en yüksek derecede hücreleri apoptoza sürüklemiştir (Şekil 4. 13).

Gama-Terpinen'in 0.019 ve 0.039 µg/ml'lik konsantrasyonlarının Paklitaksel'in etkisinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa da daha güçlü aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Gama-Terpinen 0.019, 0.039 ve 0.078 µg/ml'lik konsantrasyonlarda standart ilacın etkinliğine benzer şekilde etkinlik göstermiştir. Gama-Terpinen'in daha yüksek konsantrasyonlarda ise apoptozise sürüklediği hücre sayısında azalma olduğu etkinliğin azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4. 14).

P-Cymen'in meme kanseri hücreleri üzerinde etkinliğinin Paklitaksel'le kıyaslandığında tüm konsantrasyonlarda anlamlı derecede daha düşük olduğu tespit edildi. P-Cymen'in en güçlü aktivite gösterdiği konsantrasyon ise 0.312 µg/ml olarak tespit edilmiştir (Şekil 4. 15).

Melanoma hücreleri üzerinde yapılan deneylerde Alfa-Pinen'in etkinliğinin standart ilaç Dakarbazin'den daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Alfa-Pinen'in 0.019

$\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonunun en yüksek düzeyde hücreleri apoptoza sürükleyen doz olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4. 16).

Gama-Terpinen'in melanoma hücreleri üzerinde Alfa-Pinen'in etkinliğinden daha güçlü olduğu bulundu. Özellikle $0.039 \mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonda istatistiksel açıdan anlamlı olmasa da Dakarabazin'in etkinliğinden daha yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 4. 17).

Bu üç fitokimyasal arasında P-Cymen bu üç kanser tipi içinden en yüksek etkinliği insan melanoma hücreleri üzerinde sergilediği tespit edilmiştir. Dakarbazinin etkinliğinden düşük olsa da 0.039 , 0.078 ve $0.312 \mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlardaki etkinliği dikkate değer bulunmuştur (Şekil 4. 18).

Çalışmada üç fitokimyasalın etkili oldukları konsantrasyonlar hücre tipine göre değişiklikler göstermektedir. Çalışmada fitokimyasalların hücreleri apoptoza sürükledikleri konsantrasyonlarının araştırıldığı deneylerde fitokimyasalların yüksek konsantrasyonlarda kullanımlarının hücreleri daha yüksek düzeyde apoptoza sürüklediği, her fitokimyasalın optimal konsantrasyonda kullanımının en yüksek etkiyi gösterdiği tespit edilmiştir.

Flow sitometrik analizlerde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in her üç kanser hücreleri üzerinde de benzer şekilde hücre siklusunu G0/G1 fazında inhibe ederek antiproliferatif etkinliklerini gösterdikleri tespit edilmiştir (Şekil 4. 19).

Çalışmada fitokimyasalların pro-apoptotik ve anti-apoptotik genlerin üzerindeki etkinliklerinin hücre tipine göre değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Her bir fitokimyasal kanser hücre tipine göre bazı gen ekspresyonlarını tetikleyerek bazılarının ekspresyonlarını da inhibe ederek antikanserojen etkinlikler göstermişlerdir.

Çalışmada hem A-549 hem de A-2058 hücre hatları üzerinde Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ya da anlamlı olmayan derecede *kaspaz-3* aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir. Deneylerde A-549 hücreleri üzerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında Gama-Terpinen'in etkinlikleri arasında anlamlı olmayan bir ilişki saptanırken, Alfa-Pinen ve P-Cymen'in *kaspaz-3* etkinliğini tetiklese de Paklitakselin etkinliğinden anlamlı derecede olmasa da kontrol grubundan anlamlı düzeyde daha yüksek oranda tetiklediği tespit edilmiştir (Şekil 4. 20).

A-2058 insan melanoma hücreleri üzerinde yapılan deneylerde fitokimyasalların *kaspaz-3* aktivasyonu üzerinde daha belirgin düzeyde etkinlik sergilediği tespit edilmiştir. Dakarbazinle kıyaslandığında Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in etkinliğinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4. 21).

A-549 hücreleri üzerinde yapılan gen ekspresyonu deneylerinde bir anti-apoptotik gen olan *Bcl-xL* geni ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı derecede olmasa da P-Cymen ve Gama-Terpinen'in inhibitör etkinlik sergilediği tespit edilirken, Alfa-Pinen bu gen ekspresyonunu anlamlı olarak arttırmıştır. *NF-κB* ekspresyonu üzerinde ise P-Cymen Paklitaksel etkinliğine benzer etkinlik gösterirken, Alfa-Pinen ve Gama-Terpinen etkinlikleri *NF-κB* ekspresyonunu tetikleyici yönde olmuştur. *Bcl-2* geni ekspresyonu A-549 hücreleri üzerinde Alfa-Pinen varlığında kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. Fakat P-Cymen ve Gama-Terpinen *Bcl-2* ekspresyonunu artırıcı bir davranış sergilemiştir. Gama-Terpinen'in ise *kaspaz-3* geni ekspresyonunu anlamlı derecede arttırırken, P-Cymen ve Alfa-Pinen *kaspaz* geni ekspresyonunda etkili olmamıştır. *p53* geni ekspresyonunda ise, Paklitakselin etkinliğiyle kıyaslandığında anlamlı ölçüde daha yüksek etkinlik göstermiştir. A-549 hücreleri üzerinde bir apoptotik gen olan *Bax* geni üzerinde ise Alfa-Pinen etkinliği oldukça çarpıcı bulunmuştur (Şekil 4. 31 - 4. 36).

MCF-7 hücreleri üzerinde yapılan deneylerde; anti-apoptotik genlerden *Bcl-xL* gen ekspresyonunu inhibe edici etkinlik gösteren fitokimyasal P-Cymen olurken, her üç fitokimyasal da *Bcl-2* gen ekspresyonunu kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azaltmıştır. *NF-κB* üzerinde Gama-Terpinen ve Alfa-Pinen etkinliği Paklitaksel etkinliğine benzer olarak tespit edilirken, P-Cymen MCF-7 hücrelerinde bu gen ekspresyonunu çok ciddi oranlarda arttırmıştır. Pro-apoptotik genlerden biri olan *Bax* geni ekspresyonu ise P-Cymen varlığında oldukça önemli oranda artarken, Alfa-Pinen ve Gama-Terpinen etkinliği *Bax* geni ekspresyonunda tespit edilmemiştir. Meme kanseri hücrelerinde her üç fitokimyasal da *p53* pro-apoptotik gen ekspresyonunu anlamlı derecede yükseltirken, en yüksek etkinlik Alfa-Pinen ile tespit edilmiştir (Şekil 4. 37 – 4. 41).

İnsan melanoma hücreleri üzerinde yapılan deneylerde ise standart ilaç Dakarbazin'in etkinliği ile kıyaslandığında anti-apoptotik genlerden *Bcl-xL* geni ekspresyonunu inhibe edici özellikle Alfa-Pinen ve P-Cymen ile tespit edilirken, Gama-Terpinen geni ekspresyonu ise artmıştır. *Bcl-2* geni üzerinde ise inhibitör etkinlik gösteren

tek fitokimyasal P-Cymen olarak tespit edilmiştir. Alfa-Pinen'in etkinliği Dakarbazin'le benzer, Gama-Terpinen'in etkinliği ise *Bcl-2* gen ekspresyonunu tetikleyici yönde tespit edilmiştir. Melanoma hücreleri üzerinde Dakarbazin'de olduğu gibi her üç fitokimyasal da kontrol grubu hücreleriyle kıyaslandığında anlamlı derecede *NF-κB* gen ekspresyonunu inhibe etmiştir. *Bax* geni ekspresyonu üzerinde her üç fitokimyasalın ekspresyonu artırıcı etkinliği tespit edilirken, fitokimyasalların etkinliklerinin Dakarbazin'in etkinliğinden daha düşük olduğu bulunmuştur. *Kaspaz-3* geni üzerinde Alfa-Pinen ve Gama-Terpinen'in oldukça önemli etkinliğinin olduğu tespit edilmiştir. *p53* geni üzerinde ise sadece Gama-Terpinen'in gen ekspresyonunu arttırdığı fakat bu etkinin Dakarbazin'in etkinliğinden daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4. 42 – 4. 47).

Bir molekülün etkinlik gösterdiği bir yol veya yolak, bu molekülün farklı moleküllerle kombine kullanıldığında farklı yol ve yollar üzerinden etkinlik gösterebilmektedir. Ayrıca, kombine kullanımları bileşiklerin tekli kullanımlarından daha güçlü veya daha düşük etki gösterebilmektedir. Çalışmamızda gerek fitokimyasalların birbirleriyle kombine etkinlikleri ve gerekse de standart ilaçlarla kombine etkinliklerinin varlığını araştırdığımız deneylerde oldukça çarpıcı sonuçlar alınmıştır.

A-549 hücre hattı üzerinde yapılan sinerjistik etki varlığının araştırıldığı çalışmalarda, Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen, P-Cymen artı Gama-Terpinen ve Gama-Terpinen artı Paklitaksel'in kombine kullanımlarının *Bcl-xL* gen ekspresyonunu anlamlı derecede inhibe ettikleri tespit edilmiştir. Aynı hücre hattında *Bax*, *Kaspaz-3* ve *p53* pro-apoptotik genleri üzerinde ise, Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen'in *Bax* ve *p53*, P-Cymen artı Alfa-Pinen'in *Bax*, Gama-Terpinen artı Paklitaksel'in *Bax* ve *p53*, Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen artı Paklitaksel kombinasyonunun *Bax*, *Kaspaz-3* ve *p53*, Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen artı P-Cymen artı Paklitaksel kombinasyonunun ise *Bax* ve *Kaspaz-3* genleri üzerinde ekspresyonları anlamlı derecede arttırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4. 48 ve 4. 49).

MCF-7 hücre hattı üzerinde yapılan kombinasyon deneylerinde *Bcl-2* ve *Bcl-xL* anti-apoptotik gen ekspresyonlarını inhibe edici olarak tespit edilen kombinasyonlar; Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen ve Gama-Terpinen artı Paklitaksel kombinasyonudur. Bunun yanında, her üç fitokimyasalın Paklitaksel ile kombinasyonunun *Bcl-2* gen ekspresyonunu anlamlı derecede azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 4. 50).

MCF-7 hücreleri üzerinde fitokimyasallar ve Paklitaksel kombinasyonlarının *Bax* ve *p53* gen ekspresyonları üzerindeki çalışmalarda, P-Cymen'in etkinliğinin tekli kullanıldığında istatistiksel açıdan anlamlı olmayan düzeyde *p53* gen ekspresyonunu arttırdığı tespit edilirken, Gama-Terpinen artı P-Cymen kombinasyonunun bu gen ekspresyonunu anlamlı düzeyde arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca, P-Cymen artı Alfa-Pinen, Gama-Terpinen artı Paklitaksel, Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen artı Paklitaksel ve Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen artı P-Cymen artı Paklitaksel kombinasyonlarının *p53* gen ekspresyonu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artışlar meydana getirdiği tespit edilmiştir (Şekil 4. 51).

İnsan melanoma hücreleri (A-2058) üzerinde yapılan deneylerde fitokimyasalların birbirleri ve Dakarbazin ile kombine kullanımlarının anti-apoptotik genler *Bcl-xL* ve *Bcl-2* gen ekspresyonlarını anlamlı derecede inhibe ederek aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir. Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen kombinasyonunun her iki gen ekspresyonlarını, Gama-Terpinen artı P-Cymen'n *Bcl-xL* ekspresyonunu anlamlı derecede azalttığı tespit edilmiştir. Bunun yanında, Gama-Terpinen artı Dakarbazin kombinasyonunun *Bcl-2* ve *Bcl-xL* gen ekspresyonlarını, Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen artı Dakarbazin kombinasyonu ve Dakarbazinin her üç fitokimyasalla kombine kullanımlarının *Bcl-2* ekspresyonunu anlamlı düzeyde azalttıkları tespit edilmiştir (Şekil 4. 52).

A-2058 hücrelerinde fitokimyasalların kendi içlerinde ve Dakarbazin'le kombinasyonlarının pro-apoptotik genler olan *Bax*, *kaspaz-3* ve *p53* genleri üzerinde başta *kaspaz-3* geni olmak üzere *p53* ve *Bax* gen ekspresyonları üzerinde de oldukça güçlü etkinlik tespit edilmiştir. Gama-Terpinen artı Alfa-Pinen kombinasyonu *kaspaz-3* ve *p53* geni üzerinde, Gama-Terpinen artı Dakarbazin kombinasyonu ise her üç genin ekspresyonlarını da anlamlı derecede arttırmıştır (Şekil 4. 53).

Çalışmada *in vitro* deneylerde en yüksek düzeyde etkinlik gösteren fitokimyasalların ve fitokimyasal-ilaç kombinasyonlarının fare tümör modelinde *in vivo* etkinlikleri değerlendirilmiştir. Deneylerde Alfa-Pinen tedavi grubunda hayvanlarda akciğer, karaciğer ve böbrek dokularında metastaz varlığı anlamlı düzeyde azalmıştır. Gama-Terpinen tedavi grubunda ise antitümöral etkinliğin Alfa-Pinen'in etkinliğinden daha güçlü olduğu tespit edilmiştir. Antitümöral etkinlik sergileyen en düşük fitokimyasal ise P-Cymen olarak bulunmuştur. Bu sonuçlardan daha da çarpıcı olanı fitokimyasal kombinasyonları ve

fitokimyasallarla standart ilaç kombinasyonlarındaki etkinliğin anlamlı ölçüde daha yüksek olarak tespit edimesidir. Alfa-Pinen artı Dakarbazin kombine tedavi grubunda hayvanlarda akciğer ve karaciğer metaztazi farelerde sırasıyla %70 ve %80 oranında inhibe edilirken, en güçlü ekinlik gösteren kombinasyonun ise üç fitokimyasal (Alfa-Pinen artı Gama-Terpinen artı P-Cymen) artı Dakarbazin tedavi grubunda tespit edilmiştir. Bu grupta tedavi edilen hayvanların sadece %10'unda deri ve %10'unda ise akciğer dokusunda melanosit varlığı tespit edilmiştir.

In vitro etkinlik çalışma bulgularının *in vivo* fare modellerinde test edilerek gösterilmesi oldukça önemli olarak değerlendirilmiştir.

Bu projede Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in A-549, MCF-7 ve A-2058 hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalarda bu fitokimyasalların hücre proliferasyonunu inhibe edici, pro-apoptotik gen ekspresyonlarını artırıcı, anti-apoptotik gen ekspresyonunu azaltıcı etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Bu fitokimyasalların bireysel kullanımları yanında kombine kullanımları farklı yollar üzerinden daha yüksek etkinlik göstermiştir ki, bu sonuçların önemli klinik uygulamalarda yansımalarının olacağı kanaatindeyiz.

Ayrıca meme, akciğer ve melanoma kanserlerinde günümüzde kanser tedavisinde en yaygın olarak kullanılan ilaçlar arasında yer alan Paklitaksel ve Dakarbazin'in etkinliğini artırmak, yan etkilerini azaltmak amacıyla fitokimyasallarla farklı kombinasyonlarının bu kanser hücreleri üzerinde etkinliklerinin değerlendirildiği çalışmalarda Gama-Terpinen, Alfa-Pinen ve P-Cymen'in Paklitaksel ve Dakarbazin ile oldukça güçlü sinerjistik aktiviteler sergilemesi hem bu kanser türlerinin tedavisinde ilaçların klinik faydalarını arttıracaklarını hem de ilaç direnci sorununa karşı etkili çözüm olabileceğini düşünmekteyiz.

Bunun yanında bu çalışma sonuçları fitokimyasallarla diğer kemoterapötiklerin etkinliklerini arttırmada, ilaç direnci tespit edilen vakaların direnç gelişimini önlemede ve yan etkilerin azaltılması veya ortadan kaldırılması amacıyla yeni birçok çalışma için rehber olacaktır.

Çalışmamızda Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in akciğer, meme ve melanoma kanser hücrelerinde kanser kemoterapisinde yaygın olarak kullanılan Paklitaksel ve Dakarbazin'in hem etkinlikleri arttırması hem de sağlıklı hücreler üzerinde sitotoksik

değerlerini azaltması (yan etkilerini azaltması), kanser kemoterapisinde kullanılan diğer kemoterapötiklerle fitokimyasalların başarıyla kullanımının yolunu açabilecektir.

Fitokimyasallar veya doğal ürünlerle kemoterapötiklerin kombine kullanımları;

- Kemoterapötiklerin etkinliklerini arttırabilmekte,
- Konak üzerinde yan etkileri ortadan kaldırmak veya azaltmak için en güvenli yollardan biri olabilir,
- Ayrıca günümüzde kemoterapötiklerin etkinliğini sınırlayan veya ortadan kaldıran en önemli sorunlar arasında tanımlanan ilaca karşı direnç gelişimi fitokimyasallarla kombinasyon seçenekleriyle aşılabılır,
- Fitokimyasalların veya doğal ürünlerin bireysel etkinlikleri çoklu kombinasyon uygulamalarıyla daha güçlü sinerjistik etkiler oluşturabilir,
- Yeni ilaç araştırmalarında sinerjistik etki çalışmaları etkinliği arttırmada mutlaka üzerinde durulması gereken bir seçenek olarak her zaman akılda tutulmalıdır.

Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'in akciğer (A-549 hücre hattı), meme (MCF-7 hücre hattı) ve melanoma (A-2058 hücre hattı) kanser hücreleri üzerinde, oldukça önemli antikanserojen etkinliğe sahip fitokimyasal olduğu tespit edilmiştir. Bu fitokimyasalların *p53* ve *Bax* ve *kaspaz* gen ekspresyonlarını arttırırken, *Bcl-2* ve *Bcl-xL* gibi anti apoptotik gen ekspresyonlarını inhibe ettikleri, hücreleri oldukça güçlü şekilde apoptoza sürükledikleri tespit edilmiştir.

Fitokimyasalların birbirleriyle ve kanser ilaçlarıyla farklı kombinasyonlarının, özellikle bazı genlerin ekspresyonlarını ve inhibisyonlarında güçlü sinerjiler oluşturduğu tespit edilmiştir.

Hücre kültürleri kullanılarak yapılan çalışmalar, kansere karşı yeni antikanser ilaçların keşfedilmesi veya geliştirilmesi için doğal ya da sentetik ürünlerin taranmasında önemli modeller olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda seçilen fitokimyasallar ile (Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen) literatürde çeşitli çalışmaların yapıldığı bildirilmiş olsa da bu çalışmamızda Alfa-Pinen, Gama-Terpinen ve P-Cymen'nin insan meme kanseri (MCF-7 hücre hattı), akciğer kanseri (A-549 hücre hattı) ve melanoma (A-2058 hücre hattı) hücreleri üzerinde antiproliferatif ve apoptotik etkileri araştırılarak antikanserojen etki

mekanizmalarının aydınlatılması ve hayvan modellerinde etkili olduğu tespit edilen formülasyonların etkinliklerinin araştırılması çalışmamızın en güçlü yanlarından biri olmuştur.

Ayrıca fitokimyasalların tekli etkinlikleri yanında kombine kullanımlarının ve konvansiyonel kanser kemoterapisinde kullanılan kemoterapötiklerin etkinliklerinin artırılmasının ve yan etkilerinin de azaltılması da en önemli bulgulardan olmuştur.

Çalışmada, Alfa-Pinen ve Gama-Terpinen'in her üç kanser hücre hattında da hücre proliferasyonunu inhibe edici özellikte olduğu, hücreleri apoptoza sürükledikleri tespit edilmiş, ayrıca fare tümör modelinde tümör kitle çaplarında kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede küçülmeye yol açtığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda fitokimyasalların, kanser türlerine karşı etkinliklerinin de değişebildiği farklı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, fitokimyasalların özellikle Gama-Terpinen ve Alfa-Pinen'in Paklitaksel ile kombine kullanımlarında meme ve akciğer kanseri hücrelerinde antiproliferatif etkinliklerinin ve hücreyi apoptoza sürükleyen gen ekspresyonlarının tek başına Paklitaksel'in etkinliği ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir. Bunun yanında, Paklitaksel'in Alfa-Pinen, Gama-Terpinen daha düşük olarak da P-Cymen ile kombinasyonlarının sağlıklı hücreler üzerindeki toksisitelerinin de Paklitaksel'in toksik konsantrasyonu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olması da çalışmanın bir diğer önemli bulgusudur. Bu fitokimyasallarla Paklitaksel'in kombine verilmesi hem akciğer hem de meme kanseri kemoterapisinde konakta oluşan yan etkilerin daha düşük olacağı anlamına gelmektedir. Bu sonuçlar ilaç toksisitesi nedeniyle tedavide kullanımı sınırlı olan antikanser ilaçların yaygın kullanımının önünü açabilecek etkinliklerini de arttırabilecektir.

Fitokimyasalların Paklitaksel ve Dakarbazin ile ikili, üçlü ve dörtlü kombinasyonlarının yapılması, bu üç kanser tipleri için, tarafımızdan ilk kez araştırılmış ve bu kombinasyonların güçlü etkinlikler sergilediği tespit edilmiştir.

Bu fitokimyasalların kombine kullanıldıklarında tek kullanımlarından daha yüksek sinerjistik etkinlik göstermiş olmaları, bu kanser türleri için, tedavide oldukça umut vaat edici değerlendirilmiştir.

7. KAYNAKLAR

1. **Abdullah M. L, Hafez M. M, Al-Hoshani A, & Al-Shabanah O.** Anti-metastatic and anti-proliferative activity of eugenol against triple negative and HER2 positive breast cancer cells. *BMC complementary and alternative medicine*, **2018**, 18(1), 1-11.
2. **Adams JM, Cory S.** The *Bcl-2* apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, **2007**, 26(9):1324–1337.
3. **Adams JM.** Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev*, **2003**, 17:2481–95.
4. **Akalın G, İncesu Z.** Apoptosis of H-RAS Fibroblast Cells is Stimulated by Some 1,3-bis-(Heteroaryl Substituted) Benzene Derivatives. *Turk J Biochem*, **2005**, 31 (1); 27-35.
5. **Akhtar N, Bansal JG.** Risk factors of lung Cancer in nonsmoker. *Curr Probl Cancer*, **2017**, 41:328–39. <https://doi.org/10.1016/j.crrprcancer.2017.07.002>.
6. **Alam A, Farooq U, Singh R, Dubey VP, Kumar S, et al.** “Chemotherapy Treatment and Strategy Schemes: A Review”, *Acc J of Toxicol*. **2018**, 2(5): OAJT.MS.ID.555600.
7. **Alley M. C, Scudiero D. A, Monks A, Hursey M. L, Czerwinski M. J, et al.** Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer research*, **1988**, 48(3), 589-601.
8. American Cancer Society Cancer Facts & Figures 2017. **2017**. [Accessed November 2017]. Available from: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@editorial/documents/document/acspc-048738.pdf>.
9. **Amundson SA, Myers TG, Scudiero D, Kitada S, Reed JC, et al.** An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer Res* **2000**, 60(21):6101–6110.
10. **Anal AK, Singh H.** Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, **2007**, 18, 240e251
11. **Arpag OF, Duran N, Açıkgül FC, Türkmen M.** Comparison of Minimum Inhibitory Concentrations of *Hypericum Perforatum* L. Essential Oils, 0.2% Chlorhexidine and 10% Povidone-iodine Over *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **2020**, 23(6), 1192-1205.
12. **Ashkenazi A, Dixit VM.** Death receptors: Signaling and modulation. *Science* **1998**, 281(5381):1305–1308.
13. **Aslam MS, Naveed S, Ahmed A, Abbas Z, Gull I, et al.** “Side Effects of Chemotherapy in Cancer Patients and Evaluation of Patients Opinion about Starvation Based Differential Chemotherapy. *Journal of Cancer Therapy*”, **2014**, 5: 817-822.
14. **Assmann CE, Cadoná FC, Bonadiman BD, Dornelles SR, Trevisan EB. et al.** Tea tree oil presents *in vitro* antitumor activity on breast cancer cells without cytotoxic effects on fibroblasts and on peripheral blood mononuclear cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **2018**, 103, 1253-1261.
15. **Ay E, Duran N.** Investigation of the antiviral activity of *Ficus carica* L. latex against HSV-2. In International Conference on Advanced Materials and Systems (ICAMS) **2018**, 33-37). The National Research & Development Institute for Textiles and Leather-INCDDTP.
16. **Azmir J, Zaidul I, Rahman SM, Sharif MM, Mohamed KM, et al.** Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, **2013**, 117, 426e436.
17. **Bader A, Abdelhady MI, Shaheen U, El-Malah Y, Abourehab M, et al.** “Azadirachta Indica as a Source for Antioxidant and Cytotoxic Polyphenolic Compounds. *Biosci Biotechnol Res Asia*”, **2015**, 12: 1209-1222.
18. **Bayraktar S, & Duran N.** ANTIMICROBIAL EFFICACY OF *Origanum syriacum* L. AND *Origanum onites* L. ESSENTIAL OILS AGAINST *Pseudomonas aeruginosa* AND THEIR EFFECTS ON BIOFILM FORMATION. In International Conference on Advanced Materials and Systems (ICAMS) **2018**, (pp. 445-450). The National Research & Development Institute for Textiles and Leather-INCDDTP.
19. **Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, et al.** Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* **2000**, 2(8):469–475.
20. **Bei R, Palumbo C, Masuelli L, Turriziani M, Frajese GV et al.** “Impaired expression and function of cancer-related enzymes by anthocyanins: An update”, *Curr. Enzym. Inhib.* **2012**, 8: 2-21.
21. **Benchimol S, Pim D, and Crawford L.** Radioimmunoassay of the cellular protein *p53* in mouse and human cell lines. *EMBO J*, **1982**, 1: 1055–1062.

22. Benvenuto M, Fantini M, Masuelli L, de Smaele E, Zazzeroni F, et al. "Inhibition of ErbB receptors, Hedgehog and NF-kappaB signaling by polyphenols in cancer", *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* **2013**, 18: 1290-1310.
23. Bernhoft A. A brief review on bioactive compounds in plants. The Norwegian Academy of Science and Letters. Oslo: Norway. **2010**.
24. Bhagat M, Sangral M, Kumar A, Rather RA, & Arya, K. Chemical, biological and in silico assessment of *Ocimum viride* essential oil. *Heliyon*, **2020**, 6(6), e04209.
25. Bilgic N, Duran GG. Chemical Composition of *Myrtus communis* L. and Proapoptotic Effects on the A-549 Cell Line. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **2020**, 23(6), 1283-1295.
26. Bisen PS. "Cancer Therapy: An Overview", *J Cancer Sci Ther*, **2013**, 6:1.
27. Bonofiglio D, Giordano C, De Amicis F, Lanzino M, Andò S. "Natural Products as Promising Antitumoral Agents in Breast Cancer: Mechanisms of Action and Molecular Targets", *Mini Rev Med Chem*. **2016**, 16(8): 596-604.
28. Borges RS, Ortiz BLS, Pereira ACM, Keita H, Carvalho JCT. *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *J. Ethnopharmacol.* **2019**, 229, 29–45.
29. Bradford MM. "Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding", *Analytical Biochemistry*, **1976**, 72: 248-254.
30. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, et al. Global cancer statistics: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* **2018**, 68:394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
31. Brown GD. Sensing necrosis with Mincle. *Nat Immunol* **2008**; 9:1099-100.
32. Butterweck V, Jurgenliemk G, Nahrstedt A, Winterhoff H. Flavonoids from *hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med.* **2000**, 66, 3-6.
33. Chan MM, Fong D. "Overcoming drug resistance by phytochemicals. In *Drug Resistance in Cancer Cells*" Metha, K, Bates, S.E, Siddik, Z.H, Eds, Springer Science+Business Media, LLC: New York, NY, USA, **2009**, pp. 315-342.
34. Chen CC, Kao CP, Chiu MM, Wang SH. The anti-cancer effects and mechanisms of *Scutellaria barbata* D. Don on CL1-5 lung cancer cells, *Oncotarget* **2017**, 8 (65);109340–109357
35. Chen QM, Tu VC. Apoptosis and heart failure: mechanisms and therapeutic implications. *Am J Cardiovasc Drugs* **2002**, 2:43–57
36. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, et al. *BCL-2*, *BCLX(L)* sequester BH3 domain-only molecules preventing *BAX*- and *BAK*-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* **2001**, 8(3):705–711.
37. Chinese journal of integrative medicine (2020), <https://doi.org/10.1007/s11655-020-3193-5>.
38. Chipuk JE, Green DR. How do *BCL-2* proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* **2008**, 18: 157–164.
39. Chou TC, Talalay P. "Quantitative analysis of dose-effect relationships - the combined effects of multiple-drugs or enzyme-inhibitors. *Adv Enzyme Regul* **1984**, 22: 27-55.
40. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting *BCL2*. *Proc Nat Acad Sci USA* **2005**, 102: 13944–13949.
41. Cosentino K, García-Sáez AJ. "Bax and Bak Pores: Are We Closing the Circle?", *Trends Cell Biol.* **2017**, 27(4): 266-275.
42. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. "Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health", *Nat. Prod. Rep.* **2009**, 26: 1001-1043.
43. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the *BCL-2* protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews Molecular cell biology*, **2014**, 15(1), 49-63.
44. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the *BCL-2* protein family: Implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**, 15(1):49–63.
45. Danial NN. *BCL-2* family proteins: Critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin Cancer Res* **2007**, 13(24):7254–7263.
46. Davids L, Kleemann B. The menace of melanoma: a photodynamic approach to adjunctive cancer therapy. In: Huynh Thien Duc G, editor. *Melanoma – From Early Detection to Treatment*. Croatia: INTECH Open Access Publisher; **2013**.
47. De Santis CE, Ma J, Gaudet MM, Newman LA, Miller KD, et al. Breast cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians*, **2019**, 69(6), 438-451.
48. Deng Y, Lin Y, Wu X. TRAIL-induced apoptosis requires *Bax*-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev* **2002**, 16(1):33–45.

49. Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsedale T, Zhou Q, et al. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J*, **1998**, 17: 2215–2223.
50. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. *NF- κ B* in development and progression of human cancer. *Virchows archiv*, **2005**, 446(5), 475-482.
51. Domingues B, Lopes JM, Soares P, Pópulo H. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets and therapy*, **2018**, 7, 35.
52. Duran N, & Kaya DA. ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *Origanum syriacum* L. ESSENTIAL OILS AGAINST *Candida* spp. In International Conference on Advanced Materials and Systems (ICAMS) **2018**, (pp. 81-85). The National Research & Development Institute for Textiles and Leather-INCETP.
53. Duran N, Allahverdiyev A, Cetiner S. Flow Cytometric Analysis of the Effects of Methotrexate and Vepesid on the HEP-2 Cell Cycle. *Turk J Med Sci* **2001**, 31 187-192.
54. Duran N, Duran GG, Kaya DA, Ay E, Demir EA et al. The Effects of Essential Oils of *Nigella sativa* L. on p53 Gene Expression and Cell Apoptosis in HT-29 Colon Carcinoma Cells. In *ACTA PHYSIOLOGICA* **2017**, (Vol. 221, pp. 54-54). 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY.
55. Duran N, Duran GG, Kaya DA, Ay E, Tumer C et al. Anti-proliferative Effects of *Trigonella foeniculum* and *Eucalyptus camaldulensis* on Human Melanoma Cells. In *ACTA PHYSIOLOGICA* **2017**, (Vol. 221, pp. 55-55). 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY.
56. Eid SY, El-Readi MZ, Wink M. Carotenoids reverse multidrug resistance in cancer cells by interfering with ABC-transporters. *Phytomedicine* **2012**, 19, 977–987, doi:10.1016/j.phymed.2012.05.010
57. Elbe H, Yigitturk G, Cavusoglu T, Uyanikgil Y, & Ozturk F. Apoptotic effects of thymol, a novel monoterpene phenol, on different types of cancer. *Bratislavske lekarske listy*, **2020**, 121(2), 122-128.
58. Elbein AD, Molyneux RJ. *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 3, Barton D and Nakanishi K, ed. Amsterdam, **1999**; 129.
59. Engel N, Oppermann C, Falodun A, Kragl U. “Proliferative effects of five traditional Nigerian medicinal plant extracts on human breast and bone cancer cell lines”, *J Ethnopharmacol.* **2011**, 137(2): 1003-1010.
60. Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. Bid induces the oligomerization and insertion of *Bax* into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol*, **2000**, 20: 929–935.
61. Fang Z, Bhandari B. Encapsulation of polyphenols e a review. *Trends in Food Science & Technology*, **2010**, 21, 510e523.
62. Fangjun L, Zhijia Y. Tumor suppressive roles of eugenol in human lung cancer cells. *Thoracic cancer*, **2018**, 9(1), 25-29.
63. Ferrer P, Asensi M, Segarra R, Ortega A, Benlloch M, et al. “Association between pterostilbene and quercetin inhibits metastatic activity of B16 melanoma”, *Neoplasia* **2005**, 7: 37-47.
64. Fitsiou E, Anastopoulos I, Chlichlia K, Galanis A, Kourkoutas I, et al. Antioxidant and Antiproliferative Properties of the Essential Oils of *Satureja thymbra* and *Satureja parnassica* and their Major Constituents. *Anticancer Res.* **2016**, Nov;36(11):5757-5763. doi: 10.21873/anticancer.11159. PMID: 27793897.
65. Follis AV, Llambi F, Kalkavan H, Yao Y, Phillips AH, et al. Regulation of apoptosis by an intrinsically disordered region of *Bcl-xL*. *Nature chemical biology*, **2018**, 14(5), 458-465.
66. Geng CX, Zeng ZC, Wang JY. “Docetaxel inhibits SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells growth and induces apoptosis”, *World J. Gastroenterol.* **2003**, 9; 696-700.
67. Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *Journal of medical genetics*, **2009**, 46(8), 497-510.
68. Gökalp F. The investigation of the healing effect of active ingredients in traditional medicinal plants on lung cancer. *Medical Oncology*, **2020**, 37(11), 1-4.
69. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. “Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment”, *Asian Pac J Cancer Prev.* **2015**, 16(6): 2129-2144.
70. Golstein P. Cell death in us and others. *Science* **1998**, 281, 1283.
71. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, and Harris, CC. Mutations in the *p53* tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, **1994**, 54: 4855–4878.
72. Guo Y, Baschieri A, Amorati R, & Valgimigli L. Synergic antioxidant activity of γ -Terpinen with phenols and polyphenols enabled by hydroperoxyl radicals. *Food Chemistry*, **2021**, 345, 128468.
73. Gurib-Fakim, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of Medicine*, **2006**, 27(1), 1-93.

74. Halabi MF, Sheikh BY. "Anti-proliferative effect and phytochemical analysis of *Cymbopogon citratus* extract", *Biomed Res Int.* 906239. **2014**.
75. Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed J. *Bcl-2* gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **1993**, 82: 1820–1828.
76. Harborne JB, Tomas-Barberan FA. *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*, Clarendon, Oxford, **1991**.
77. Hassan SMH, Ray P, Hossain R, Islam MT, Salehi B, et al. P-Cymene metallo-derivatives: An overview on anticancer activity. *Cellular and Molecular Biology*, **2020**, 66(4), 28-32.
78. Hata AN, Engelman JA, Faber AC. "The BCL2 Family: Key Mediators of the Apoptotic Response to Targeted Anticancer Therapeutics", *Cancer Discov.* **2015**, 5(5): 475-487.
79. Hausman DM. What Is Cancer?. *Perspectives in biology and medicine*, **2019**, 62(4), 778-784.
80. Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine* **2008**, 15, 639-652.
81. Hong WK, Bast Jr RC, Hait WN, Kufe DW, Pollock RE, et al. *Cancer Medicine* 8. American Association for Cancer Research **2010**.
82. Hoseinzadeh S, Raeisi E, Lemoigne Y, Heidarian E. Effects of combined 5-Fluorouracil and ZnO NPs on human breast cancer MCF-7 Cells: *P53* gene expression, *Bcl-2* signaling pathway, and invasion activity. *Nanomedicine Journal*, **2019**, 6(3): 232-240.
83. Hou J, Zhang Y, Zhu Y, Zhou B, Ren C, et al. α -Pinen induces apoptotic cell death via caspase activation in human ovarian cancer cells. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, **2019**, 25, 6631.
84. Hruz T, Wyss M, Docquier M, Pfaffl M.W, Masanetz S, et al. RefGenes: identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization. *BMC genomics*, **2011**, 12(1): 156.
85. <https://www.intechopen.com/books/cancer-treatment-conventional-and-innovative-approaches/conventional-cancer-treatment>.
86. Huang CY, Ju DT, Chang CF, Reddy PM, & Velmurugan BK. A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non-small cell lung cancer. *Biomedicine*, **2017**, 7(4).
87. Huie CW. Review: Modern sample preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2002**, 373, 23-30.
88. Ijaz S, Akhtar N, Khan MS, Hameed A, Irfan M, et al. "Plant derived anticancer agents: A green approach towards skin cancers", *Biomed Pharmacother.* **2018**, 103: 1643-1651.
89. Izzi V, Masuelli L, Tresoldi I, Sacchetti P, Modesti A, et al. "The effects of dietary flavonoids on the regulation of redox inflammatory networks", *Front. Biosci.* **2012**, 17: 2396-2418.
90. Jamali T, Kavooosi G, Ardestani S. K. In-vitro and in-vivo anti-breast cancer activity of OEO (*Oliveria decumbens* vent essential oil) through promoting the apoptosis and immunomodulatory effects. *Journal of ethnopharmacology*, **2020**, 248, 112313.
91. Jin S, DiPaola RS, Mathew R, White E. Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. *J Cell Sci* **2007**, 120:379–83
92. Jo H, Cha B, Kim H, Brito S, Kwak BM, et al. α -Pinen Enhances the Anticancer Activity of Natural Killer Cells via ERK/AKT Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, **2021**, 22(2), 656.
93. Joo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol* **1998**;8:1001–8.
94. Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, et al. *Bax* directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* **1998**;95(9):4997–5002.
95. Jyoti DD, Singh D, Kumar G, Karnatak M, Chandra S, et al. (2019). Thymol chemistry: a medicinal toolbox. *Current Bioactive Compounds*, 14, 1-19.
96. Kang HR, Cho JY, Lee SH, Lee YJ, Park JS, et al. Role of low-dose computerized tomography in lung Cancer screening among never-smokers. *J Thorac Oncol.* **2019**;14:436–44. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.11.002>.
97. Karaliotas GI, Mavridis K, Scorilas A, Babis GC. "Quantitative analysis of the mRNA expression levels of BCL2 and BAX genes in human osteoarthritis and normal articular cartilage: An investigation into their differential expression." *Mol Med Rep.* **2015**, 2(3): 4514-4521.
98. Karmakar P, Kyal C, Mondal I. "A review on herbs used in cancer", *Ind Res J Pharm Sci.* **2014**, 1: 24-32.
99. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, and Craig R. W. Participation of *p53* protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*, **1991**, 51: 6304–6311.
100. Kirsch DG, Kastan MB. Tumor-suppressor *p53*: implications for tumor development and prognosis. *Journal of clinical oncology*, **1998**, 16(9), 3158-3168.

101. Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P, Wajant H. NFkappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol* **2001**, 21:3964– 3973.
102. Kubatka P, Kello M, Kajo K, Samec M, Jasek K, et al. Chemopreventive and therapeutic efficacy of *Cinnamomum zeylanicum* L. bark in experimental breast carcinoma: mechanistic *in vivo* and *in vitro* analyses. *Molecules*, **2020**, 25(6), 1399.
103. Kunnumakkara AB, Anand P, Aggarwal BB. “Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins”, *Cancer Lett.* **2008**, 269: 199-225.
104. Lall RK, Syed DN, Adhami VM, Khan MI, Mukhtar H. “Dietary polyphenols in prevention and treatment of prostate cancer”, *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, 16: 3350-3376.
105. Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, Wesselborg S. Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell* **2004**;14:277–87.
106. Lee EF. et al. A novel BH3 ligand that selectively targets Mcl-1 reveals that apoptosis can proceed without Mcl-1 degradation. *J. Cell Biol.* **2008**, 180, 341–355.
107. Leonard NB. Stability testing of nutraceuticals and functional foods. *Hand book of nutraceuticals and functional foods*. CRC Press, Boca Raton. **2000**.
108. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **2008**, 132: 27–42.
109. Lewis K, Ausubel FM. “Prospects for plant-derived antibacterials,” *Nature Biotechnology*, **2006**, 24(12):1504-1507.
110. Li L, He L, Wu Y, Zhang Y. Carvacrol affects breast cancer cells through TRPM7 mediated cell cycle regulation. *Life sciences* **2021**, 266, 118894.
111. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **1997**;91(4):479–489.
112. Liu Z, Ding Y, Ye N, Wild C, Chen H, et al. Direct activation of *Bax* protein for cancer therapy. *Medicinal research reviews*, **2016**, 36(2), 313-341.
113. MacKenzie SH, Clark AC. “Targeting cell death in tumors by activating caspases”, *Curr Cancer Drug Targets*. **2008**, 8(2): 98-109.
114. Magalhães LF, Mello-Andrade F, Pires WC, Silva HD, da Silva PFF, et al. cis-[RuCl (BzCN)(bipy)(dppe)] PF6 induces anti-angiogenesis and apoptosis by a mechanism of caspase-dependent involving DNA damage, PARP activation, and *Tp53* induction in Ehrlich tumor cells. *Chemico-biological interactions*, **2017**, 278, 101-113.
115. Magalhaes LG, Ferreira LLG, Andricopulo AD. “Recent Advances and Perspectives in Cancer Drug Design”, *An Acad Bras Cienc.* **2018**, 90(1 Suppl 2): 1233-1250.
116. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. “Polyphenols: Food sources and bioavailability”, *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, 79: 727-747.
117. Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. “The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review”, *Adv Pharm Bull*, **2017**, 7(3), 339-348.
118. Marchese A, Arciola CR, Barbieri R, Silva AS, Nabavi SF, et al. Update on monoterpenes as antimicrobial agents: A particular focus on P-Cymene. *Materials*, **2017**, 10(8), 947.
119. Mari A, Mani G, Nagabhishek SN, Balaraman G, Subramanian N, et al. Carvacrol promotes cell cycle arrest and apoptosis through PI3K/AKT signaling pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Chinese journal of integrative medicine*, **2020**, 1-8.
120. Marzocchella L, Fantini M, Benvenuto M, Masuelli L, Tresoldi I et al. “Dietary flavonoids: Molecular mechanisms of action as anti- inflammatory agents”, *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* **2011**, 5: 200-220.
121. Mattiuzzi C, Lippi G. Current cancer epidemiology. *Journal of epidemiology and global health*, **2019**, 9(4), 217-222.
122. McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, Mahboubi A, Shi Y, et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis *in vitro*. *Methods Cell Biol.* **1995** ;46:153-185.
123. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. “Caspase Functions in Cell Death and Disease”, *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2013**; 5: a008656.
124. Mitropoulou G, Sidira M, Skitsa M, Tsochantaridis I, Pappa A, et al. Assessment of the Antimicrobial, Antioxidant, and Antiproliferative Potential of *Sideritis raeseri* subsp. *raeseri* Essential Oil. *Foods*. **2020** Jul 1;9(7):860. doi: 10.3390/foods9070860. PMID: 32630203; PMCID: PMC7404406.
125. Mohan A, Narayanan S, Sethuraman S, Krishnan U.M. “Combinations of plant polyphenols & anti-cancer molecules: A novel treatment strategy for cancer chemotherapy”, *Anticancer Agents Med. Chem.* **2013**, 13: 281-295.

126. Mondal S, Bandyopadhyay S, Ghosh MK, Mukhopadhyay S, Roy S, et al. "Natural products: promising resources for cancer drug discovery", *Anticancer Agents Med Chem*. **2012**, 12(1): 49-75.
127. Mosmann T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays", *J. Immunol. Methods*, **1983**, 65: 55-63.
128. Mouawad R, Sebert M, Michels J, Bloch J, Spano J. P, et al. Treatment for metastatic malignant melanoma: old drugs and new strategies. *Critical reviews in oncology/hematology*, **2010**, 74(1), 27-39.
129. Mousavi S. M, Hemminki K. Cancer incidence, trends, and survival among immigrants to Sweden: a population-based study. *European Journal of Cancer Prevention*, **2015**, 24, S1-S63.
130. Mukherjee A. K, Basu S, Sarkar N, Ghosh A. C. Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Current medicinal chemistry*, **2001**, 8(12), 1467-1486.
131. Mund MD, Alam S, Khan UH, Tahir U, Zubair MS, et al. "Phytochemicals as Complementary and Alternative Therapeutic Formulations with Potential proApoptotic Effects on Various Cancerous Cell Lines: A Literature Survey", *Focus Sci*. **2016**, 2(2): 111-121.
132. Nagaprashantha L.D, Vatsyayan R, Singhal J, Fast S, Roby R, et al. Anti-cancer effects of novel flavonoid vicenin-2 as a single agent and in synergistic combination with docetaxel in prostate cancer. *Biochem. Pharmacol*. **2011**, 82, 1100-1109.
133. National Center for Biotechnology Information <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/gamma-Terpinen>
134. Naves LB, Dhand C, Venugopal JR, Rajamani L, Ramakrishna S, et al. Nanotechnology for the treatment of melanoma skin cancer. *Progress in biomaterials*, **2017**, 6(1-2), 13-26.
135. Ng CY, Yen H, Hsiao HY, Su S. C. Phytochemicals in skin cancer prevention and treatment: an updated review. *International journal of molecular sciences*, **2018**, 19(4), 941.
136. Ngoci SN, Mwendia CM, Mwaniki CG. Phytochemical and cytotoxicity testing of Indigofera lupatana Baker F. *Journal of Animal & Plant Sciences*, **2011**, 11(1), 1364-1373. Available from <http://www.biosciences.elewa.org/JAPS>
137. Njeru SN, Matasyoh J, Mwaniki CG, Mwendia CM, Kobia KG. A Review of some phytochemicals commonly found in medicinal plants. *Int J Med Plant*, **2013**, 105, 135-40.
138. Nobili S; Lippi D; Witort E; Donnini M; Bausi L; et al. "Natural compounds for cancer treatment and prevention", *Pharmacol Res*. **2009**, 59: 365-78.
139. Nunez R. 2001. "DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry". *Curr. Issues Mol. Biol*, 3, 67-70.
140. Nuutinen T. Medicinal properties of terpenes found in Cannabis sativa and Humulus lupulus. *Eur. J. Med. Chem*. **2018**, 157, 198–228.
141. Olie RA, Hafner C, Küttel R, Sigrist B, Willers J, et al. "Bcl-2 and Bcl-xL antisense oligonucleotides induce apoptosis in melanoma cells of different clinical stages". *J Invest Dermatol*. **2002**, 118(3):505-12.
142. Olila D, Olwa-Odyek, Opuda-Asibo. Antibacterial and antifungal activities of extracts of Zanthoxylum chalybeum and Warburgia ugandensis, Ugandan medicinal plants. *Journal of African Health Sciences*, **2001**, 1, 66-72.
143. Oliviero M, Romilde I, Beatrice MM, Matteo V, Giovanna N, et al. Evaluations of thyme extract effects in human normal bronchial and tracheal epithelial cell lines and in human lung cancer cell line. *Chemico-biological interactions*, **2016**, 256, 125-133.
144. Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J Pharm Sci* **2007**;96:2181–96.
145. Özkan A, Erdoğan A. Evaluation of cytotoxic, membrane, and DNA damaging effects of Thymus revolutus Celak essential oil on different cancer cells. *Turkish journal of medical sciences*, **2017**, 47(2), 702-714.
146. Öztürk Ş, & Duran N. Antiproliferative effects of Origanum syriacum L. and Myrtus communis L. on human colon cancer cell line. In *International Conference on Advanced Materials and Systems (ICAMS) 2018*, (pp. 255-260). The National Research & Development Institute for Textiles and Leather-INCOTEP.
147. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, *CA Cancer J Clin*. **2005**;55:74–108. <https://doi.org/10.3322/canjclin.55.2.74>.
148. Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. "Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis", *FEBS J*. **2018**, 285(3): 416-431.
149. Potočnjak I, Gobin I, Domitrović R. Carvacrol induces cytotoxicity in human cervical cancer cells but causes cisplatin resistance: Involvement of MEK–ERK activation. *Phytotherapy Research*, **2018**, 32(6), 1090-1097.
150. Prakash V, Sandhu P. *In vitro* antimycobiotic and antibacterial action of seed extract of Celastrus paniculatus Willd. (Jyotismati). *Journal of Antimicrobials*. Photon **2012**, 127 (2012) 123-132.

151. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, et al. Somatic frameshift mutations in the *BAX* gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* **1997**;275(5302):967–969.
152. Reed JC. *Bcl-2*-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood* **2008**, 111: 3322–3330.
153. Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc* **2010**, (6): 5439.
154. Ruba AA, Nishanthini A, Mohan VR. *In vitro* Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Leaf of *Arthocnemum fruticosum* Moq (Chenopodiaceae). *The Journal of Free Radicals and Antioxidants. Photon* **2013**, 139, 166-174.
155. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* **1997**;91:443–6. 10. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* **1998**;281:1312–6.
156. Salvesen GS, Riedl SJ. Caspase mechanisms. *Adv Exp Med Biol* **2008**;615:13–23.
157. Santos WB, Melo MA, Alves RS, de Brito RG, Rabelo TK, et al. P-Cymene attenuates cancer pain via inhibitory pathways and modulation of calcium currents. *Phytotherapy*, **2019**, 61, 152836.
158. Saranya K, Divyabharathi U. Phytochemical and histochemical screening of *Dodonaea viscosa* leaves. *Pramana Res. J*, **2019**, 9, 53-59.
159. Saxena M, Saxena J, Nema R, Singh D, Gupta A. Phytochemistry of medicinal plants. *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*, **2013**, 1(6).
160. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. “Dietary polyphenols and the prevention of diseases”, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005**, 45: 287-306.
161. Siegel RL, Miller K.D, Jemal A. Cancer statistic, **2019** *CA Cancer J. Clin*, 69 (1) (2019), pp. 7-34, 10.3322/caac.21551
162. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RG, et al. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA: a cancer journal for clinicians*, **2017**, 67(3), 177-193.
163. Siegel RL, Miller KD, Jemal A, **2020**. Cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2020**, 70, 7-30.
164. Silva BV, Barreira JC, Oliveira MBP. Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. *Trends in Food Science & Technology*, **2016**, 50, 144-158.
165. Sobral MV, Xavier AL, Lima TC, de Sousa DP. “Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils”, *Sci. World J.* **2014**: doi:10.1155/2014/953451.
166. Soleimani A, Farshchi HK, Mirzavi F, Zamani P, Ghaderi A, et al. The therapeutic potential of targeting CD73 and CD73-derived adenosine in melanoma. *Biochimie*, **2020**, 176, 21-30.
167. Soung YH, Lee JW, Kim SY, Park WS, Nam SW, et al. Somatic mutations of *CASP3* gene in human cancers. *Hum Genet* **2004**;115:112–5.
168. Soussi T, Legros Y, Lubin R, Ory K, and Schlichtholz B. Multifactorial analysis of *p53* alteration in human cancer—a review. *Int. J. Cancer*, 57: 1–9, **1994**.
169. Soussi T. *p53* Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer research*, **2000**, 60(7), 1777-1788.
170. Spagnoletti A, Guerrini A, Tacchini M, Vinciguerra V, Leone C, et al. Chemical composition and bio-efficacy of essential oils from Italian aromatic plants: *Mentha suaveolens*, *Coridothymus capitatus*, *Origanum hirtum* and *Rosmarinus officinalis*. *Natural product communications*, **2016**, 11(10), 1934578X1601101023.
171. Srivastava P, Srivastava A. “*In vitro* anti-cancer activity of ethanolic extract of curcumin longa (turmeric) in HEP-2 cell lines”, *Int J Eng Res General Sci.* **2015**, 3: 495-508.
172. Sun Z. “The General Information of the Tumor Suppressor Gene *p53* and the Protein *p53*”, *J Cancer Prev Curr Res.* **2015**, 3(1): 00068.
173. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2010**;11(9):621–632.
174. Tan G, Gyllenhaal C, Soejarto DD. “Biodiversity as a source of anticancer drugs”, *Curr. Drug.* **2006**, 7: 265-277.
175. Team NLSTR, Aberle DR, Adams AM, Berg CD, Black WC, et al. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med.* **2011**;365:395–409.
176. Topham CH, Taylor SS. “Mitosis and apoptosis: How is the balance set?”, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2013**, 25: 1-6.
177. Ukwuani AN, Abubakar MG, Hassan SW, Agaie BM. Antinociceptive Activity of Hydromethanolic Extract of Some Medicinal Plants in Mice. *International Journal of Pharmacy. Photon* **2013**, 104, 120-125.

178. Ulbricht CE, Chao W. "Phytochemicals in the oncology setting", *Curr. Treat. Opt. Oncol.* **2010**, 11: 95-106.
179. Vallianou NG, Evangelopoulos A, Schizas N, Kazazis C. "Potential anticancer properties and mechanisms of action of curcumin", *Anticancer Res.* **2015**, 35: 645-651.
180. Vaz JA, Almeida GM, Ferreira IC, Martins A, Vasconcelos M.H. "Clitocybe alexandri extract induces cell cycle arrest and apoptosis in a lung cancer cell line: Identification of phenolic acids with cytotoxic potential". *Food Chem.* **2012**, 132, 482-486.
181. Vespermann KA, Paulino BN, Barcelos MC, Pessoa MG, Pastore GM, et al. Biotransformation of alpha- and beta-Pinen into flavor compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, 101, 1805-1817, doi:10.1007/s00253-016-8066-7.
182. Waks AG, Winer EP. Breast cancer treatment: a review. *Jama*, **2019**, 321(3), 288-300.
183. Wang P, Heber D, Henning SM. "Quercetin increased the antiproliferative activity of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate in prostate cancer cells", *Nutr. Cancer* **2012**, 64: 580-587.
184. Wang P, VadGama JV, Said JW, Magyar CE, Doan N, et al. "Enhanced inhibition of prostate cancer xenograft tumor growth by combining quercetin and green tea", *J. Nutr. Biochem.* **2014**, 25: 73-80.
185. Wang Y, Yan L, Zhang L, Xu H, Chen T, et al. NT21MP negatively regulates paclitaxel-resistant cells by targeting miR-155-3p and miR-155-5p via the CXCR4 pathway in breast cancer. *Int J Oncol.* **2018** Sep;53(3):1043-1054
186. Wang YJ, Niu XP, Yang L, Han Z, Ma YJ. Effects of celecoxib on cycle kinetics of gastric cancer cells and protein expression of cytochrome C and caspase-9. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **2013**, 14(4), 2343-2347.
187. Wang ZB, Liu YQ, Cui YF. Pathways to caspase activation. *Cell Biol Int* **2005**;29:489-96
188. Wattanathamsan O, Treesuwan S, Sritularak B, Pongrakhananon V. Cypripedin, a phenanthrenequinone from *Dendrobium densiflorum*, sensitizes non-small cell lung cancer H460 cells to cisplatin-mediated apoptosis. *Journal of natural medicines*, **2018**, 72(2), 503-513.
189. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, et al. Proapoptotic BAX and BAK: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **2001**;292(5517):727-730.
190. Williamson G, Manach C. "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies", *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, 81: 243S-255S.
191. Winnacker M. Pinens: Abundant and Renewable Building Blocks for a Variety of Sustainable Polymers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 14362-14371, doi:10.1002/anie.201804009.
192. Woodard GA, Jones KD, Jablons DM. Lung Cancer staging and prognosis. *Cancer Treat Res.* **2016**;170:47-75. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40389-2_3.
193. World Health Organization. International agency for research on cancer. **2019**.
194. Xia L, Tan S, Zhou Y, Lin J, Wang H, et al. Role of the NFκB-signaling pathway in cancer. *OncoTargets and therapy*, **2018**, 11, 2063.
195. Xu Q, Li M, Yang M, Yang J, Xie J, et al. α-Pinene regulates miR-221 and induces G2/M phase cell cycle arrest in human hepatocellular carcinoma cells. *Bioscience reports*, **2018**, 38(6).
196. Yang Q, Li M, Wang T, Xu H, Zang W, et al. Effect of STAT5 silenced by siRNA on proliferation apoptosis and invasion of esophageal carcinoma cell line Eca-109. *Diagn Pathol.* **2013** Aug 5;8:132.
197. Ye L, Zhang X, Xu Q, Cai Y, Gao W, et al. Anti-tumor activities and mechanism study of α-Pinene derivative *in vivo* and *in vitro*. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, **2020**, 85(2), 367-377.
198. Yeruva L, Pierre KJ, Elegbede A, Wang RC, Carper SW. "Perillyl alcohol and perillic acid induced cell cycle arrest and apoptosis in non-small cell lung cancer cells", *Cancer Lett.* **2007**, 257: 216-226.
199. Yin SY, Wei WC, Jian FY, Yang NS. "Therapeutic applications of herbal medicines for cancer patients", *Evid Based Complement Alternat Med.* **2013**, 30: 24-26.
200. Yuan R, Hou Y, Sun W, Yu J, Liu X, et al. Natural products to prevent drug resistance in cancer chemotherapy: a review. *Annals of the new York Academy of Sciences*, **2017**, 1401(1), 19-27.
201. Yue S, Wang Y, Wang J, Chen J. Relationships between lung cancer incidences and air pollutants. *Technol Health Care* **2017**; 25 (Suppl 1): 411-22.
202. Zhang A, Sun H, Yuan Y, Sun W, Jiao G, et al. An *in vivo* analysis of the therapeutic and synergistic properties of chinese medicinal formula yin-chen-hao-tang based on its active constituents. *Fitoterapia* **2011**, 82, 1160-1168.
203. Zhang L, Jiang N, Shi Y, Li S, Wang P, et al. Induction chemotherapy with concurrent chemoradiotherapy versus concurrent chemoradiotherapy for locally advanced squamous cell carcinoma of head and neck: a meta-analysis. *Sci Rep.* **2015** Jun 4;5:10798. doi: 10.1038/srep10798. PMID: 26041604; PMCID: PMC4455182.

- 204.Zhang Z, Guo S, Liu X, Gao X.** Synergistic antitumor effect of alpha-Pinen and beta-Pinen with paclitaxel against non-small-cell lung carcinoma (NSCLC). *Drug Res.* **2015**, 65, 214–218, doi:10.1055/s-0034-1377025.
- 205.Zulkipli IN, David SR, Rajabalaya R, Idris A.** “Medicinal Plants: A Potential Source of Compounds for Targeting Cell Division”, *Drug Target Insights.* **2015**, 9: 9-19.



ÖZGEÇMİŞ

2008 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2012 yılında mezun oldu. Aynı yıl Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. Yüksek lisans eğitimini tamamladıktan sonra 2017 yılında aynı bölümde doktora eğitimine başladı. 2021 yılında mezun oldu.

