T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ

RHODODENDRON BİTKİ ÖZÜTLERİNİN İNSAN KANSER VE NORMAL HÜCRELERİ ÜZERİNDE Kİ POTANSİYEL ANTİ-PROLİFERATİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Proje No:2015.53001.106.01.04
PI:289

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Saliha Ekşi
Temel Tıp Bilimleri/ Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Araştırmacılar

Prof. Dr. Osman Birol Özgümüş (Temel Tıp Bilimleri/Mikrobiyoloji Ab..Dalı)

Prof.Dr. Vagif Atamov (Biyoloji Bölümü/Genel Biyoloji Ab. Dalı

Dr. Öğr. Üye. Barış Uzunok (Temel Tıp Bilimleri/Fizyoloji Ab. Dalı)

Öğr.Üye. Nebahat Ejder (Temel Tıp Bilimleri/Mikrobiyoloji Ab. Dalı)

Temmuz 2018

RİZE

ÖNSÖZ

2015.53001.106.01.04 nolu ve " ***Rhododendron*** **Bitki Özütlerinin İnsan Kanser ve Normal Hücreleri Üzerinde ki Potansiyel Anti-Proliferatif Etkilerinin Araştırılması** " adlı genel proje(GE) Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi BAP birimi tarafından desteklenmiştir. 01.07.2015 te başlayan proje de başta yürütücü olmak üzere toplam 5 araştırmacı görev yapmıştır. Projede 1yıl olmak üzere uzatma alınarak Temmuz 2018'de tamamlanmıştır: Proje kapsamında satın alınan sarf malzemeler ile projede öngörülen çalışmalar tamamlanmış olup artan malzemeler ile konuyla ilgili farklı çalışmalar devam etmektedir. Buna ek olarak, çalışma kapsamında bir yüksek lisans öğrencisi desteklenerek, Ocak 2018'de, 10185536 tez nosu ile mezün edilmiştir. Çalışmaların bir kısmı çeşitli kongrelerde (''I.International Congres On Medicinal and Aromatic Plants'' 9-12 May 2017/Konya ve '' 6.İlaç Kimyası Kongresi''/22-25 Mart 2018/Antalya) sunulmuş olup yayına dönüştürme süreci proje tamamlandıktan sonrada devam edecektir.

Yapmış oldukları büyük destekten dolayı BAP 'a ve Proje ekibine ve proje ekibini sahaya götüren aile fertlerime ve arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Dr. Öğretim Üyesi Saliha Ekşi
Proje yürütücüsü

İÇİNDEKİLER

TABLOLAR DİZİNİ……..IV
ŞEKİLLER DİZİNİ…….....V
KISALTMALAR DİZİNİ……..VI
ÖZET…….....VII
ABSTRACT……IX
1.GİRİŞ……1
2.GENEL BİLGİLER……2
2.1. Tibbi Bitkilerin Tarihçesi ve Tıpta Kullanımı……2
2.2. *Rhododendron*'ların Özellikleri ve Tıbbi Önemi……..4
2.3 Amaç……...6
3.GEREÇ VE YÖNTEM……6
3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemelar…….6
3.2. Bitkilerin Toplanması ve Muhafaza Edilmesi……...6
3.3. Bitkilerin Ekstraksiyonu……6
3.4. Hücre Hatlarının Kültürü……...9
3.5.Anti-Tümör aktivite Tayini (Sitotoksisite testi)……..9
3.5.1 MTT Yöntemi……10
3.5.2. MTT ile sitotoksisite tayini……...10
3.5.3 Hücrelerde morfolojik değişikliklerin belirlenmesi……...11
3.6. Hücrelerde Apoptozis Analizi……11
3.6.1. Floresans mikrokobu……11
3.6.2. Agaroz jel elektroforezi yöntemi……..11
3.7. İstatistiksel Analiz……12
4.BULGULAR……13
4.1. Anti-Proliferatif Bulgular……13
4.1.1.MTT bulguları……13
4.1.1.1.R*hododendron s*epal metanol özütü nün hücre hatları üzerindeki %büyüme inhibisyonu……13
4.1.1.2.R*hododendron s*epallerinin etil asetat özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme inhibisyonu……15
4.1.1.3.R*hododendron sepallerinin* hekzan özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme

inhibisyonu……..17
4.1.1.4. R*hododendron s*epallerinin sulu özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme inhibisyonu……..18
4.1.1.5. R*hododendron sepallerinin* sulu/DMSO özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme inhibisyonu……..20
4.1.1.6.R*rhododendron çiçeği/ petal etil asetat* özütünün hücre hatları üzerindeki % büyüme inhibisyonu…….21
4.1.1.7. R*hododendron ç*içeği/petal hekzan özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme inhibisyonu……..23
4.1.1.8. R*hododendron* tomurcuk metanol özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme inhibisyonu……..25
4.1.1.9.R*rhododendron* tomurcuk etil asetat özütünün hücre hatları üzerindeki % büyüme inhibisyonu……..26
4.1.1.10. R*hododendron* tomurcuk hekzan özütünün hücre hatları üzerindeki % büyüme inhibisyonu……..28
4.2. Morfolojik Değişimlere Ait Bulgular……..29
4.3. Apoptotik Değişimlere Ait Bulgular……31
4.3.1. Floresans mikroskobu……...31
4.3.2. Agaroz jel elektroforezi……32
5.TARTIŞMAVE SONUÇLAR……34
6.SONUÇve ÖNERİLER……..39
7.KAYNAKLAR……..39

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo1: Elde Edilen Özütler (Ekstraktlar)…….....7
Tablo 2. Kullanılan Cihazlar…….7
Tablo 2. Kullanılan Sarf Malzemeler Cihazlar…….8
Tablo 4. Kullanılan Hücre Hatları……..8
Tablo 5. *Rhododendron* sepal metanol özütünün hücre hatları üzerindek % büyüme ınhibisyonu sonuçları.....14
Tablo 6. *Rhododendron spallerinin* etil asetat özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme ınhibisyonu sonuçları……...15
Tablo 7. *Rhododendron spallerinin* hekzan özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme ınhibisyonu sonuçları……...17
Tablo 8. *Rhododendron* çiçekğ*i s*epallerinin sulu özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme ınhibisyonu sonuçları……..19
Tablo 9. *Rhododendron* çiçekğ*i s*epallerinin sulu/dmso özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme ınhibisyonu sonuçları:…….....20
Tablo 10. *Rhododendron* petal etil asetat özütünün hücre hatları üzerindeki % büyüme inhibisyonu sonuçları……...21
Tablo 11. *Rhododendron* petal hekzan özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme inhibisyonu sonuçları……...23
Tablo 12. *Rhododendron tomurcuk* metanol özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme inhibisyonu sonuçları……...25
Tablo 13. *Rhododendron* tomurcuk etil asetat *özütünün* hücre hatları üzerindeki % büyüme inhibisyonu sonuçları……...26
Tablo14. *Rhododendron* tomurcuk hekzan özütünün hücre hatları üzerindeki % büyüme inhibisyonu sonuçları.……..28

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.*Rhododendron* sepal metanol özütünün hücre hatları üzerindeki % büyüme inhibisyonu grafiği……...14

Şekil 2.*Rhododendron* sepallerinin etil asetat özütünün hücre hatları üzerindeki % büyüme inhibisyonunu grafiği……...16

Şekil 3.*Rhododendron* sepallerinin hekzan özütünün hücre hatları üzerindeki % büyüme inhibisyonunu grafiği……...18

Şekil 4.*Rododendron s*epallerinin sulu/suda özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme inhibisyonunu grafiği……...19

Şekil 5.*Rhododendron s*epallerinin sulu özütünün(dmso) hücre hatları üzerindeki %büyüme inhibisyonunu grafiği……20

Şekil.6.R*ododendron p*etal etil asetat özütünün hücre hatları üzerinde ki %büyüme inhibisyonunu grafiği……..22

Şekil.7.*Rododendron* petal hekzan özütünün hücre hatları üzerinde ki %büyüme inhibisyonunu grafiği……..24

Şekil.8.*Rododendron* tomurcuk metanol özütünün hücre hatları üzerinde ki %büyüme inhibisyonunu grafiği……..25

Şekil.9.*Rododendron* tomurcuk etil asetat özütünün hücre hatları üzerinde ki %büyüme inhibisyonunu grafiği……...27

Şekil.10.*Rododendron* tomurcuk hekzan özütünün hücre hatları üzerinde ki %büyüme inhibisyonunu grafiği……...28

Şekil.11.ARPE,A549,HeLA ve HT29 hücreleri üzerindeki morfolojik değişimleri götermektedi……30

Şekil.12. Kontrol ve *Rhododendron luteum* özütlerinin (sepal, petal, tomurcuk) hücre DNA'ları üzerindeki fragmentasyon etkilerinin floresan mikrokobide Hoechst 33342 boyası ile gösterilmesi…….32

Şekil 13. Agaroz jel elektroforezi sonuçlarını göstermektedir…….33

KISALTMALAR DİZİNİ

ARPE-19	İnsan retina pigment epitel hücreleri(2n)
CRL2923	Endometrium adeno karsinom hücre hattı
HeLa	Serviks epitelyum adeno karsinom hücre hattı
A495	Akciğer adeno karsinom hücre Hattı
HT-29	Kolon adeno karsinom hücre Hattı
CO_2	Karbondioksit
°C	Santigrat derece
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
DMEM	Dulbecco's modified eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
WHO	World Health Organization
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit (Ethylenediaminetetraacetic acid)
FBS	Fetal sığır serum (Fetal bovine serum)
gr	Gram
HeLa	İnsan serviks adenokarsinoma hücre hattı
ml	Mililitre
mg	Miligram
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromür (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
IC_{50}	Hücrelerin %50'nı öldüren doz
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
NCI	National Cancer Institute
nM	Nanomolar
O.D	Optical density (Absorbans değeri)
EtOAc	Etil asetat
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (Phosphate Buffered Saline)
RPMI	Roswell Park Memorial Institude
rpm	Revolutions per minute
U	Unit
EtOAc	Etil Asetat

ÖZET

RHODODENDRON BİTKİ ÖZÜTLERİNİN İNSAN KANSER VE NORMAL HÜCRELERİ ÜZERİNDE Kİ POTANSİYEL ANTİ-PROLİFERATİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Kanser büyüyen bir sağlık sorunu olup, dünyada insan ölümlerinin başındaki önemli nedenlerden biridir. Araştırmacılar, kanserin geleneksel olarak kullanılan ilaçlara karşı direnç geliştirebilme yeteneğini belgeleri ile ortaya koymuş bulunmaktadır. Bu nedenle, yaşamı tehtid eden bu hastalığa karşı, önleyecek yeni ajanların keşfi gerekmektedir. Bitki özütleri herbal ilaç olarak insanlık tarihi boyunca kullanılmış olup, hala gelişmekte olan ülkelerde kullanılmaktadır. Bitkisel ve herbal kökenli ilaçlar arasında Karadeniz Bölgesi'nde bol miktarda yetişen *Rhododendron*'lar son yıllarda anti-kanserojen potansiyel açısından önem kazanmıştır.

Çalışmanın amacı, *Rhododendron luteum* çiçek ve tomurcuklarının çeşitli kısımlarından elde edilen farklı solvent özütlerinin antiproliferatif özelliklerini araştırmaktı. Anti-kanser aktivite tayini için, normal (ARPE-19) ve kanser hücre hatları (HeLa, A549, CRL-2923, HT-29) *Rhododendron luteum*'un çiçeğinin farklı kısımlarından (sepal, petal, tomurcuklar) elde edilen çeşitli organik özütlerle (sulu, etil asetat, hekzan ve metanol) ve DMSO ile (negatif kontrol) in vitro olarak, 48 saat süre ile muamele edildi. Sitotoksik aktivite ölçümü MTT (3-[4,5-Dimetiltiyazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolyum bromür) metodu kullanılarak belirlendi. Hücre morfolojisindeki değişimler inverted mikroskobu altında incelendi. Çeşitli özütlerin insan hücre hatları üzerindeki etkileri Student unpaired t-testi kullanılarak karşılaştırıldı.

Çalışma sonuçları, *Rhododendron luteum'*un sepallerinden elde edilen hekzan ve sulu özütlerin normal ve kanser hücrelerine karşı doza bağlı sitotoksik etkili olduğunu göstermiştir. *Rhododendron luteum'*un sepallerinden elde edilen etil asetat (EtOAc) özütünün doz çalışmaları ise, ARPE-19, HeLa, A549, HT29 ve CRL2923 hücre hatlarının IC_{50} değerlerinin sırasıyla 266.6µg/ml, 263.4µg/ml, 213.2µg/ml 133.2µg/ml ve 360,3µg/ml olduğunu göstermiştir. Çalışmada, normal ARPE-19 hücre hattı ile HT29 hücre hattı arasındaki farklar $p<0.05$'de istatistiksel olarak anlamlı bulunarak, HT29 kolon kanser hattının özüte en hassas kanser hücresi olduğu tespit edilmiştir.

Rhododendron luteum'un tomurcukları ve petallerinden elde edilen özütlerin sitotoksik aktivite sonuçları, hekzan özütülerinin en fazla büyüme inhibisyonunu HeLa serviks kanser hücrelerinde oluşturduğunu gösterdi. Doza bağımlı çalışmalar, petal ve tomurcuktan elde edilen EtOAc. özütülerinin HT29 hücre hattında sırasıyla, 459,3µg/ml ve 159,94µg/ml IC_{50} inhibisyon değerlerinin oluşmasına sebebiyet verdiğini göstermiştir. Buna ek olarak, tomurcuk EtOAc. özütün en yüksek selektivite indeksi 2.29'la HT29 hücreleri için hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, HT29 kolon kanser hücrelerinin özüte en hassas hücreler olduğunu göstermektedir. Çalışmada*, Rododendron luteum* tomurcuklarından elde edilen metanolik özütün ise kanser hücreleri (HT29, HeLa, A549) üzerinde doza bağlı ölüme neden olduğu fakat normal hücre hattı (ARPE) üzerindeki sitotoksik etkisinin daha az belirgin olduğu görülmüştür.

Çalışma sonucunda elde edilen veriler toplu halde değerlendirildiğinde; *Rhododendron luteum'un* çiçek kısımlarından farklı organik solventler kullanılarak elde edilen özütlerin, farklı dokulardan köken alan kanser hücreleri üzerinde seçici etkilerinin olabileceğini göstermektedir. Bunun ortaya çıkarılabilmesi için, farklı tipte kanser hücreleri üzerinde seçici etkilere aracılık edebilecek bileşik/bileşiklerin belirlenip, bunların daha detaylı araştırılmasının gerekliliği kanısındayız.

Anahtar Kelimeler: ARPE, HeLa, HT29,A549, MTT. *Rhododendron sp*

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTI-PROLIFERATIVE POTANTIALS OF *RHODODENDRON* EXTRACS ON HUMAN MALINGNANT AND NORMAL CELL LINES

Cancer is a growing health problem and represent the one of the major reasons for human death globally. Researchers well documented that cancer has ability to develop resistance against the traditionally used drugs. Therefore, it is necessary to discover new agents to prevent this life-threatening disease. The plant extracts have been used in the form of herbal medicines throughout human history and are still used in developing countries. Among the herbal and plant medicines, *Rhododendrons* have gained prominence in recent years for their anti-carcinogenic potential, which are in plentiful supply in the Black Sea Region of Turkey.The aim of this study was to investigate antiproliferative properties of the different solvent extracts obtained from various parts of *Rhododendron luteum* flowers and buds. In order to investigate the anti-cancer activity, non-transformed (ARPE-19) and transformed cell lines (HeLa, A549, CRL-2923, HT-29) were treated various organic extracts (aqueous, ethyl acetate, hexan and methanol) obtained from different flower parts of (sepal, petal and buds) *Rhododendron luteum* or DMSO (vehicle control) for 48h in vitro. Cytotoxic activity measurement was determined by MTT (3- [4,5-Dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide) method. Alterations in cell morphology were examined under inverted microscope. Student unpaired t-test was used to compare effects of the various extracts on the human cell lines.

In the current study, our results showed that hexanic and aqueous extracts from *Rhododendron luteum* sepals caused a dose-dependent cytotoxic activity toward both non-transformed and transformed cell lines. Dose depended studies of ethyl acetate (EtOAc) extract from *Rhododendron luteum* sepals revealed IC_{50} of 266.6µg/ml,233.4µg/ml, 213.2µg/ml 133.2µg/ml and 360,3µg/ml on ARPE-19, HeLa,A549,HT29 and CRL2923, respectively.

Therefore, these data suggest that ethyl acetate extract from *Rhododendron luteum* sepals has the highest inhibitory effect against the HT29 colon cancer cell lines compared to other cancer cell lines used. Additionally, difference between nontransformed ARPE-19 and transformed HT29 cell lines was statistically significant ($p< 0.05$).

Further, we studied cytotoxicity of extracts obtained from *Rhododendron luteum* buds and petals. Dose depended studies from those extract revealed that hexanic extract induced the most growth inhibition on the HeLa cells while EtOAc. Extract from petals and buds showed the most cytotoxic activity for HT29 colon cancer cell line with IC_{50} values 459,3µg/ml and 159,94µg/ml, respectively. The selectivity index of the ethyl acetate extract from buds was calculated to be 2.29 for the HT29 cells and was determined as the most sensitive cells in the extract. We also found that methanolic extract from *Rhododendron luteum* buds showed dose dependent death on transformed cell lines (HT29, HeLa, A549). Meanwhile, cytotoxic effect on nontransformed (ARPE-19) cell line was less pronounced.

The results from the present study suggest that different organic extract from *Rhododendron luteum* flower parts may have a selective effect on different cancer cells. For the determination of this, further studies are needed to asses the activity of the compound/compounds that may mediate selective effect on different type of cancer cells.

Keywords: ARPE-19, HeLa, HT29,A549, MTT. *Rhododendron s.p*

1.GİRİŞ

Dünyada her yıl 1 milyon yeni kanser vakası tespit edilmektedir. Kanser, geçmişte olduğu gibi günümüzde varlığını sürdürerek, insan sağlığını tehdit etmeye devem etmektedir. Yüzyılın başlarında öldüren hastalıklar sıralamasında 7. ve 8. sıraları alırken bugün dünyada en çok öldüren hastalıklar arasında ikinci sırayı almaktadır (Haydaroğlu, 2007) . Kanser, vücudun bir organ veya dokusunda beliren bazı anormal hücrelerin kontrolsüz ve düzensiz bir şekilde çoğalması sonucu ortaya çıkan hastalıklar topluluğuna verilen bir isimdir. Kontrolsüz çoğalan bu hücrelerde normal hücrelere göre yapısal ve işlevsel değişiklikler ortaya çıkmakta ve oluşturdukları mekanik etkilerle çevredeki sağlıklı hücreleri öldürebilmektedirler. Kanser hücreleri farklı şekilde metabolize olmakta ve bunu bir sonucu olarak farklı tedavilere cevap vermektedir (Kayaalp, 2009). Günümüzde ölümü azaltmak için çeşitli tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlar arasında en sık kullanılan cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, gen tedavisi ve anjiyogenez inhibitörleri sayılabilir. Fakat günümüzde bu gelişmiş yöntemlere rağmen morbidite ve mortalite oranlarının hala çok yüksek seyretmesi (Anestopoulos vd., 2012; Housman vd., 2014), kullanılan standart ilaçlara direnç gelişmesi ve bazı ilaçların ciddi yan etkilerinin bulunması bilim insanlarını alternatif kanser stratejileri geliştirmeye yönlendirmiştir (Li Fu-Rong vd., 2012)**.** Herbal ürünler, ucuz olmaları, düşük toksisite göstermeleri nedeniyle, son yıllarda anti-kanser ajanlar olarak kullanımlarının arttığı gözlenmektedir. Bu bağlamda doğa, hala ilaç adayı/adayları için en iyi kaynak olarak görülmektedir. Dünyada en az 250,000 bitki türünün bu amaç için kullanıldığı ve bunlardan 1000'den fazlasının anti-kanser etkisinin olduğu bildirilmiştir (Ashis vd.,2014). 1960-1981 yılları arasında NCI (National Cancer Institute) 35,000 bitkiden elde edilen 114,000 bitki özütünü önce in vitro sonra in vivo olarak denemiştir (Cragg vd.,1994; Wall vd., 1996). Bütün bu çalışmalar sonunda bugünde özellikle over, metastatik meme kanseri ve akciğer kanserlerinde kullanılan taxol (paclitaxel) keşfedilmiştir. Yine akciğer ve testis kanserlerinde kullanılan podophyllotoxin (Etoposide) bu çalışmalar sonucunda bulunmuştur (Nobili vd.,2009; Srivastava vd., 2005). Camptothecin, kolon, akciğer, over ve uterin kanserlerinde kullanılan bitki ve mantar kökenli anti-kanser ajanlarıdır (Arnold vd.,2011). Dünya Sağlık Örgütünün son yıllardaki raporuna göre dünya nüfusunun %80'nine yaklaşık bir bölümü hala hastalıkların tedavisinde bazı bitkisel ürünlere güvenmektedir. 1983 ve 1994 arasında üretilen yeni ilaçların %41'nin etken maddesini doğal ürünler oluşturmuştur (Farnsworth vd.,1985). Bu oran kanser hastalarının tedavisinde %60'a ulaşmaktadır (Newman vd.,1997).

Çalışmamız kapsamında araştırdığımız *Rhododendron* bitkisinin dünyada yaklaşık 1000 türü olup (Lin vd., 2014), ülkemizde özellikle Karadeniz Bölgesi'nde yaygın olan 5 türü vardır. Bunlardan *Rhododendron smirnowii* Karadeniz bölgesinde endemik olarak büyümekte

olan bir bitki türüdür (Taşdemir vd.,2003). *Rhododendron*'ların içerdikleri kimyasal zenginlikler ve biyolojik farklılıklar, bilim insanlarının son yıllarda ilgisini çekmektedir. Bu çalışmada, *Rhododendron luteum*'un tıbbi açıdan bir öneminin olup olmadığının açığa çıkarılması ve bunun neticesinde ileride yapılabilecek In vivo çalışmalar için zemin hazırlanması hedeflenmiştir. Bunun için *Rhododendron luteum* bitkisinin tomurcuk ve çiçeklerinin farklı bölümlerinden elde ettiğimiz etil asetat, sulu, hekzan ve metanol özütlerinin insan kanser ve normal hücre hatları üzerinde ki sitotoksik/antikanser etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar; farklı solventlerle elde edilen özütlerin hücreler üzerinde seçici etkilerinin olabileceğini göstermiştir. Buna ek olarak anti-proliferatif çalışmalar, *Rhododendron luteum* etil asetat özütlerinin kolon kanser hücre hattı n HT29 üzerinde daha etkili olduğunu göstermiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Tıbbi Bitkilerin Tarihçesi ve Tıpta Kullanımı

Antik çağlardan günümüze kadar gelen insan kalıntılarında yapılan çalışmalar, kanserin antik çağdaki insanlarda da vuku bulmuş olabileceğini göstermektedir (Nobili vd.,2009). Günümüzde insan sağlığını tehdit eden hastalıkların başında gelen kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra dünyada en fazla ölümlere neden olan hastalık olarak önemini sürdürmektedir. Veriler dünyada yılda 6 milyon yeni kanser vakasının ortaya çıktığını göstermektedir (Srivastava vd ., 2005). Sağlık bakanlığınca yapılan çalışmalarda Türkiye'de yıllık kanser insidansının yaklaşık olarak 150/100.000 olduğu ve her yıl 90.000-100.000 civarında yeni kanser vakasının görülebileceğini bildirmiştir (Sağlık Bakanlığı,1993). Dünya Sağlık Örgütünün (DSÖ) 2008'de yayınladığı kanser raporunda ki veriler 2030 yılına gelindiğinde kanser vakalarında %75'lik bir artış gözlenebileceği, bu da senede yaklaşık 26,4 milyon yeni kanser vakasının ortaya çıkabileceğini ve yaklaşık 17,5 milyon kanser kökenli ölümlerin oluşabileceğini göstermektedir (WHO,2008). Verilerin büyüklüğü, bilim insanlarının bu hastalığa karşı yeni kontrol stratejilerini hızlı bir şekilde, zaman kaybetmeden geliştirmeleri gerekliliğini ortaya koymaktadır. Yoksa insanlık ne yazık ki bu savaşı kaybetmeye mahkum olacaktır. Varoluştan bugüne, insanoğlu doğal ürünleri tamamlayıcı bir tedavi olarak çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanmıştır. Özellikle 21. yüzyılın ortalarından sonra, temel tedaviye destekleyici olarak toplumların alternatif tedavi kullanımlarına olan

ilgisinin arttığı gözlenmiştir (Muslu vd.,2008). Bitki ürünlerinin hastalıkların tedavisinde kullanıldığı ile ilgili ilk bilgiler M.Ö. 2600 Mezopotomya kaynaklarına kadar dayanmaktadır. Bu kaynaklara göre, yaklaşık 1000 çeşit bitkiden elde edilen maddeler hastalık tedavisinde kullanılmış olup, bunlardan *Cedrus* türleri, C*upressus semniferum*, *Cupressus sempervirens, Glycyrrhiza glabra*, *Commiphora* türleri ve *Papaver somniferum gibi* bitkilerin genelde yağlarının kullanılmasıyla öksürük, soğuk algınlığı, bazı parazit hastalıkları ve inflamasyonu tedavi edebilmişlerdir. Bunlardan bazıları bugün halklar arasında aynı amaç için hala kullanılmaktadır (Newman vd.,2000). Doğal kaynakların tedavi amaçlı kullanılması ile ilgili elimizdeki önemli bilgiler Mısırlıların ‘’The Eber Papyrus’’ adlı kaynağından günümüze kadar gelmiştir (M.Ö: 1500). Bu yazılı kaynağa göre, 700'ün üzerinde çoğu bitki kaynaklı olmak üzere ilaç üretilmiş ve tedavide kullanılmıştır. Yine ‘’The Chinese Materia Medica’’ adlı yazılı kaynak (M.Ö:1100) bitki kökenli ürünlerin hastalık tedavisinde kullanıldığını ve içeriğinde 52 ilaç reçetesini bizlere aktarmaktadır. Daha sonra Yunanlı ve Romalı bilim insanları, Dioscorides (M.S:100) ve Galen (M.S:130–200 M.S) bitkilerden elde ettikleri ürünlerden çeşitli formüller oluşturarak bunları tedavide kullanmışlardır. Galen’in konu ile ilgili 30’dan fazla kitabının bulunduğu kayıtlara geçmiş bulunmaktadır. Avrupa’nın karanlık döneme girmesi ile birlikte, İslam Alemi, özellikle tıpçı, yazar, filozof ve bilim insanı olan İbni-Sina’nın yazmış olduğu ‘’El-Kanun fi't-Tıb (Tıbbın Kanunu)’’ adlı eserinde bitkilerin tedavide kullanımı yönünde büyük ufuklar açmıştır (Cragg vd., 2005). Bitkilerden elde edilen doğal ürünlerin hastalıkların tedavisinde kullanıldığına dair yazılı bilgiler Mezopotamya kaynaklarına kadar inse de(M.Ö: 2600), bitkilerden ilk aktif ürün 1800’lerin ilk yarısında elde edilmiştir. Bunlar arasında bugünde kullanılmaya devam edilen morfin, atropin ve kolşisin gibi maddeler bulunmaktadır (Newman vd.,2000). 1985’e kadar toplanan etnomedikal bilgilerin değerlendirilmesi sonucunda, bitkilerin ilaçların kaynağı olarak kullanılması konusundaki çalışmalar daha da hızlanmıştır (Farnsworth vd.,1985).

Bugün ki gelişmiş olan modern ilaç teknolojisi ve tekniklerine rağmen, doğa hala anti-kanser ajanlarının saklı olduğu en önemli kaynak olarak keşfedilmeyi beklemektedir. Bunu bilen bilim insanları, ülkemizde dâhil olmak üzere dünyanın birçok ülkesinde bitki özütlerinin kanser hücreleri üzerindeki etkilerini bilimsel olarak çeşitli laboratuarlarda araştırmaktadır. Dünyadaki bitkilerin sadece %6’sı biyolojik aktiviteleri bakımından taranmış ve bunların da sadece %15’i farmasötik yönden incelenmiştir (Fabricant vd., 2001). 2011’de yayınlanan bir makaleye göre, elimizde 1 milyona yakın doğal ürün bulunmakta ve bunların 500.000-

600.000 bitki kökenlidir. Elde olan doğal ürünlerin 200.000-250.000'nın doğal aktivitesinin olduğu ve bunlardan 2500 tanesinin moleküler yapısı ortaya konmuş bulunmaktadır (Arnold vd., 2011). Bu alanda yapılan birçok çalışmada, bitkilerde bolca bulunan flavonoidlerin lösemi, hepatom, meme, mesane, pankreas, melanoma, over, beyin, böbrek, kolon, akciğer ve mide kanser hücreleri üzerinde inhibitör etkilerinin olduğu rapor edilmiştir (Nobili vd.,2009). 2007'de yapılan bir çalışma çileğin akciğer kanser riskini azalttığı, çay ve zeytinin çeşitli kanser hücrelerinde inhibitör etkisinin olduğunu göstermiştir (Anestopoulos vd., 2012). Toplumumuzda çağlardır şifalı bir bitki olarak bilinen sarımsağın çeşitli kanser türleri üzerinde ki anti-kanser etkileri bilimsel çalışmalarla gösterilmiştir (Butt vd.,2009). Dünyada en çok kullanılan içeceklerden birisi olan çayın güçlü antioksidan etkisi, oral kanser hücreleri üzerindeki inhibisyon etkisi ve yine yeşil çayın birçok farklı organda kanser riskini azalttığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Rahman vd.,2010). Son yıllarda in vivo olarak herbal maddeler hastalar üzerinde denenmeye başlanmış olup, olumlu sonuçların alındığı bildirilmiştir. Yine Amerika'da denenen yaklaşık 73 bitki kökenli maddenin faz II ve Faz III çalışmalarında çeşitli kanser türlerinde başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Feng vd.,2011). Bütün bu çalışmalar gösteriyor ki, bitkilerden elde edilebilecek ajan veya ajanlar kanserin önlenmesinde veya tedavisinde başarılı olabilecektir. Sağlık Bakanlığı verileri ülkemizde kanser vakalarının geleceğe yönelik katlanarak artacağını işaret etmektedir. Ülkemiz endemisi yönünden incelendiğinde, yaklaşık 3.000 endemik türle tüm Avrupa'dan daha fazla endemik bitki türüne sahiplık etmektedir(Davis, 1965-1985). Bu sebeble, elimizdeki bu doğal kaynağı bir an önce değerlendirerek, bu bitkilerin anti-kanser potansiyelleri yönünden taranmaları, biyolojik aktivitelerinin belirlenerek ülke ekonomisine kazandırılmaları gerekmektedir.

2.2.*Rhododendron*'ların özellikleri ve Tıpta Önemleri

Yukarıda bahsedilen nedenler doğrultusunda; planlanan çalışmada ülkemizde Karadeniz bölgesinde yükseklerde yetişen bir tür olan *Rhodendrom luteum* seçilmiştir. Bir görüşe göre, yükseklerde yetişen bitkilerde biriken sekonder metabolitler antikanser potansiyel göterme özelliğine sahiptir (Davis, 1965-1985).

Çalışmamızda anti-kanser aktivitesi araştırılan *Rhododendron luteum, Rhododendron* cinsine ait çiçekli bitkilerdendir. Afrika ve Güney Amerika hariç dünyada yaygın olarak bulunmaktadırlar. *Rhododendron* cinsi dünya yüzeyinde yaklaşık 1000 türü içermektedir (Lin

vd., 2014)**.** Ülkemizde özellikle Karadeniz Bölgesi'nde yaygın olarak bulunan 5 tür vardır. Bunlardan *Rhododendron smirnovii* özellikle Türkiye'de Karadeniz bölgesinde endemik olarak yetişmektedir (Taşdemir vd., 2003). *Rhododendron* 'lar hak arasında ''ağu, komar, orman gülü veya laasi'' gibi isimlerle bilinirler (Gunduz vd.,2007). *Rhododendron* cinsinde bulunan bazı türler, özellikle *R.ponticum ve R.luteum* zehirleyici özellikleri ile bilinmektedir (Taşdemir vd., 2003). *Rhododendron'* ların neden olduğu zehirlenme vakaları ilk olarak M.Ö 401'de bir Yunan savaş yazarı ve asker olan Xenophon tarafından kayıtlara alınmıştır (Gunduz vd.,2007). Günümüzde deli bal zehirlenmesi (Mad Honey Poisoning) olarak bilinen bu hastalık özellikle Türkiye'de Karadeniz bölgesinde taze bal yiyen kişilerde baş dönmesi, hipotansiyon, ritim bozukluğu, bilinç kaybı, kusma gibi klinik belirtilerle ortaya çıkabilmekte ve nadir de olsa ölümlere neden olabilmektedir.

Araştırmalar sonucunda, *Rhododendron*'ların özellikle yaprak ve çiçeklerinde bol miktarda bulunan Grayanotoxinlerin (rhodotoxin) 25 izoformu olduğu tespit edilmiş olup (Suze vd.,2012), bunların nektarla balda biriktirilmesi sonucunda kişilerde deli bal hastalığına neden olduğu birçok araştırıcı tarafından vakalarla tespit edilmiştir. Toksik etkilerine rağmen, *Rhododendron* cinsindeki pek çok türün bazı fenolik maddeler içerdiği ve antioksidan aktivite gösterebildikleri bazı yayınlarda bildirilmiştir. Birçok tür geleneksel ilaç olarak özellikle öksürük, migren, ağrı, astım, artrit, bronşit, diyabet, baş ağrısı, hipertansiyon, ishal, kusma, inflamasyon, gastro-intestinal bozukluklar, soğuk algınlığı, akciğer ve deri hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Lin vd.,2014; Popescuvd.,2013). Ülkemizde yetişen türlerdenolan *Rhododendron luteum ve Rhododendron ponticum* Türk halk tıbbında inflamasyon tedavisinde, romatoik ağrıların tedavisinde ve anti-fungal tedavide kullanılmıştır (Erdemoglua vd.,2008).

Ülkemizde *Rhodendron ponticum luteum'* un özellikle yaprak ve stemleri ile yapılan bazı çalışmalar, anti-inflamatuar ve anti-protozoal etkilerinin de olabileceğini göstermiştir (Taşdemir vd.,2005). 2012 ve 2014 'te yapılan iki farlı çalışmada, *Rhodendron* bitkisinin yapraklarından elde edilen özütlerin insan endometrial kanser hücrelerinde apoptosisi tetikliyerek sitotoksik etki gösterdiği saptanmiştir.(Li Fu-Rong vd., 2012). İkinci çalışmada, 10 farklı *Rhodendron* türünün yapraklarından elde ettikleri özütlerin antioksidan aktivitelerinin yüksek olduğunu göstermişlerdir (Lin vd., 2014). Bütün bu çalışmalar, *Rhodendron'*ların biyolojik ve anti-proliferetif bazı özelliklerinin olabileceğini

göstermektedir. Bu çalışma ile ülkemizde bolca yetişmekte olan *Rhododendron luteum*'un tıbbi önemi açığa çıkarılmaya çalışılmıştır.

2.3. Amaç

Projenin amacı Karadeniz Bölgesi'nde yaygın olarak yetişen fakat üzerinde çok az çalışma yapılmış olan *Rhododendron luteum'*u antitümoral aktivite yönünden araştırarak, antitümöral potansiyelinin olup olmadığını belirlemek ve insan sağlığı yönünden olası önemni ortaya çıkarmaktı. Ayrıca çalışma bir alt yapı tarama projesi olup elde edilmiş olan sonuçların, bundan sonraki bilimsel çalışmalara işik tutacağı, *Rhododendron*'ların tıpta kullanım alanlarının daha kapsamlı araştırılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

…….Çalışmada kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler Tablo2, Tablo3 ve Tablo4'te sunulmuştur bulunmaktadır.

3.2. Bitkilerin Toplanması ve Muhafaza edilmesi

Projede kullanılmak üzere seçilen *Rhododendron luteum* bitkisinin çiçekleri 2016-2017 yılları arasında, Rize, Ayder yöresinden toplanmıştır. Bitkinin tür tespiti Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr.Vagıf Atamov tarafından yapılmıştır. Toplanan örnekler yabancı maddelerden temizlendikten sonra sepal, petel ve tomurcuk olarak kısımlarına ayrılmıştır. Bu farklı kısımlar, kilitli saklama poşetlerinde etiketlenerek, özüt yapılıncaya kadar -20^{0}Cde muhafaza edilmiştir.

3.3. Bitkilerin Ekstraksiyonu

Çalışmada kullanılan *Rhododendron luteum* bitkisinin tomurcuk ve çiçek kısımları Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Organik Kimya Anabilim Dalı veya Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim dalı Mikrobiyoloji Laboratuarında ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Kısaca;-20Cde saklanmış olan bitki örneklerinden 20 veya 50g tartılarak havanda ezilmiştir. Bunu takiben, örnekler balon şişelere alınmış ve üzerlerine

kimyasallar (metanol, etil asetat, hekzan, su) eklenmiştir. Daha sonra 2 saat ultrasonik banyoda ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Elde edilen ekstraktlar (özütler) filtre kâğıdından süzülmüş ve evaporatörde 40°C' de çözücüsü uçurulmuştur. Ekstraksiyonlarda kullanılan çözücüler polarite özellikleri göz önümde bulun**d**urularak seçilmiştir. Elde edilen özütlerin stok solüsyonları 50 veya 100mg/ml olacak şekilde DMSO'da hazırlanarak, -20C'de saklanmıştır.

Tablo 1: Elde edilen Özütler (ekstraktlar)				
	Kullanılan Solventler			
Bitki Kısımları	Metanol	Etil asetat	su	Hekzan
Sepal	+	+	+	+
Tomurcuk	+	+		+
Petal		+		+

20g veya 50g bitki tartılarak özütler hazırlandı

Tablo :2 Kullanılan Cihazlar	
1-Biyogüvenlik kabini sınıf II	ScanLab
2-Işık mikroskobu	Leica
3-İnverted mikroskobu	Olympus-CKX41)
4-Flouresans mikroskobu	LeicaLM4000B
5-Kameralar-I	OlympusSC30
5-Kameralar-II	Leica DFC 425
6-Santrifüj	Rotina 38012
7-Otomotik pipetler	Thermo
8-Pipet aid	Thermo
9-CO2 inkübatörü	Thermo Scientific
10-Mikroplate okuyucu	Biotec
11-Mikroplate çalkalayıcı	AllSHENG/orbital shaker
12-Etüv	Ecocell
13-Aspiratör	Novela
14- Evapörator	Labech
15- Hemocytometer	İsoLab
16-(-80) Derin dondurucu	New Brunswick Scientefic
17-(-20) Derin dondurucu	Arçelik
18- Buz dolabı	Bosh
19-Hassas terazi	Acc Ulab
Tablo 3: Kullanılan Sarflar	
1- RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institude_1640)	Hyclone, Gibco, Biowest, Thermo
2-DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco, Biowest
3-Fetal bovine serumu (FBS),	Gibco, Biowest
4-100ug/ml streptomycin-100U/ml penicilin,	Sigma, Multicell
5-0.25% trypsin- EDTA	Gibco, Biowest

6-DMSO/(Dimetilsülfoksit	Sigma, Merk
7-Taxol	Sigma, Serva
8-MTT(3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)	Sigma
9-Trypan blue	Sigma
10-D-PBS	Gibco, Biowest
11-Generuler 1kb DNA ladder 5x50ug	Thermo Scientific
12-Genomic DNA Purification Kiti	Promega
13- Cam Pasteur pipet	İsoLab
14- Steril serolojik pipet	Cap, ClearLine
15- Steril falcon tubes	Falcon, İIsoLab
16- Cell culture flasks	Thermo, TPP
17- Kapaklı steril pleytes	Falcon, TPP
18- Cell culture Filtrers	Falcon, Nalgen
19- Steril/filtreli tips	Nalgen, Thermo,
20- Non-Steril/filtreli tips	İsoLab,Cap,
21-Etil alkol, Metanol	Merk
22- Eppendorf tüp	Greiner, İsoLab
23- Syringe filters	Ministar, Nalgen
24- Pudrasız eldiven	Bayby
Cryovial	Simport, İsoLab

Tablo 4: Kullanılan Hücre Hatları		**Özellikleri**
ARPE-19 Sağlıklı hücre hattı (2n)	(ATCC-CRL-2302)	Retina pigment epitel hücreleri. On dokuz yaşındaki bir erkekten izole edilmiş normal (2n) hücre hattı. Hücreler yüzeye adere olarak büyür.
CRL2923 Kanser hücre hattı	ECCI (ATCC-CRL-2923)	Endometrium adeno karsinomundan türetilen insan epitelyum kanser hücre hattıdır.
HeLa Kanser hücre hattı	(ATCC- CRM-CCL2)	İzole edilen ilk insan kaynaklı epitel kanser hücresidir. Serviks epitelyum adeno karsinom hücreleridir
A495 Kanser hücre hattı	(ATCC- CCL-185)	Adeno karsinomik insan alveolar bazal epitelyum hücresi
HT-29 kanser hücre hattı	(ATCCHTB38)	Human colon adenocarcinoma (projeden

Çalışmada kullanılan hücre hatlarından; A549 ve HeLa Prof. Dr. Fikrettin Şahin tarafından hibe edilmiştir(Yeditepe Üniversitesi, İstanbul). CRL-2923 hücre hattı Prof. Dr. Bediha Ağaçhan Çakmakoğlu tarafından bize hediye edilmiştir (İstanbul Üniversitesi, İstanbul). Diploit hücre hattı olan ARPE-19 Dr. Muradiye Acar'ın bize hediyesidir (Turgut Özal Üniversitesi, Ankara). HT-29 hücre hattı, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Kimya

Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Sevgi Kolaylı ile yapılan 114Z370 nolu ortak TÜBİTAK projesi kapsamında alınmıştır.

3.4.Hücre Hatlarının Kültürü

Çalışmanın hücre kültürü kısmı tamamen in vitro laboratuar koşulları altında Recep Tayyip Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Doku Kültürü Araştırma Laboratuarlarında yapıldı. Çalışmada kullanılan CRL-2923 (Endometrium-adenokarsinoma), Hela (servikal-adenokarsinoma), A-549 (akciğer), HT29 (kolon adenokarsinoma) ve ARPE-19 hücre hatlarının kültürü tamamen steril koşullarda, sınıf II güvenlik kabineti içinde gerçekleştirildi. Yine bütün sıvılar kullanılmadan önce, 0,22 µm filtrelerle veya otoklavla steril edildi. Kısaca, -80^{0}C'de stoklanan hücre hatları çözündürülerek RPMI/ DMEM, %10 Fetal bovine serumu (FBS), 100ug/ml streptomycin -100U/ml penicilin içeren besiyerine (büyüme vastı) aktarıldı. Hücreler, %5 CO_2 destekli 37°C deki inkübatörlerde, 25cm^2 steril flasklarda, 6,12,24 veya 96 kuyucuklu steril pleytlerde üretildi. Flask tabanını adere olmuş ve konfluent (%70-80 hücre yoğunluğu) hale gelmiş hücreler, %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu ile kaldırılarak seri pasajları ve kültür devamlılığı sağlandı. Aynı zamanda, bu hücrelerin bir kısmı tripsinizasyon sonrası D-PBS veya RPMI'da çözülerek 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. Oda ısısında 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, hücre pelletlerine % 10 DMSO içeren vasat (medium) eklenerek dondurma tüplerine (cryovial) aktarıldı ve bir daha ki kullanıma kadar –80ºC'de saklandı.

3.5. Anti-tümör Aktivite Tayini (Sitotoksisite Testi)

Rhododendron luteum bitkisinin tomurcuk, sepal vepetallerden elde edilen özütler Mikrobiyoloji hücre kültürü laboratuarında önce ilgili sıvılarda, (su veya DMSO/(Dimetilsülfoksit), 50 veya 100mg/ml olacak şekilde stok solüsyonları halinde hazırlandı. Daha sonra, gerektikçe filtrelerden geçirilerek steril hale getirilip uygun ısılarda (-20 veya +4^{0}C) deney zamanına kadar saklandı. Araştırmada kullanılan test maddeleri kültürde 6,12 veya 96 kuyucuklu pleytlerde üretilen hücre hatlarına azalan dozlarda uygulanarak, hücrelerin proliferasyonu, (canlılığı) MTT ve trypan blue yöntemleri ile test edildi.

3.5.1 MTT Yöntemi

Sitotoksik aktivite tespiti 1983'te Mosmann tarafından yayınlanan protokol modife edilerek test edilmiştir (Mossmann T.,1983). MTT testi kısaca, kolorimetrik bir yöntem olup, hücrelerin canlığını ve proliferasyonu ölçmede kullanılmaktadır. Yöntem, canlı hücrelerdeki mitokondri dehidrogenaz enzimlerinin MTT(3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır (Mossman, 1983). Tetrazolium halkasının dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu oluşan mor renkli çözünmez formazan krıstalleri izopropanol veya DMSO gibi çözücüler yardımı ile çözündürülerek, oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak okunur. Örnekler ve kontroller arasındaki O.D farklılıkları mukayese edilerek deney verileri belirlenir.

3.5.2 MTT ile sitotoksisite

Kanser hücre hatları (A549,CRl-2923,HeLa, HT-29) $1x10^3$/100 µl ve diploid hücre hattı ARPE-19 $2x10^3$/100µl hücre olacak şekilde 96 kuyuluklu mikropleytlere ekimleri yapıldı ve 24 saat sonra inverted mikroskopbu ile gözlenerek adere olup olmadıkları gözlemlendi. Adere olmuş sağlıklı kültürlere test maddelerinin istenilen başlangıç konsantrasyonları veya kontrol maddeleri (DMSO, Taxol), mikropleytlerin ilk kuyucuklarına eklenerek 2x diluyonları yapıldı. Bunu takiben mikropleytlerdeki hücreler, %5 CO_2 destekli inkübatörde, 37°C'de üremeye bırakıldı. Test maddelerinin eklenmesinden 48 saat sonra her bir kuyucuğa daha önce suda çözündürülmüş ve -20'de saklanan MTT stok solüsyonundan(5mg/ml) 10 µl eklenerek hücreler tekrardan %5 karbondioksitli, 37°C'deki inkübatörde 4 saat daha inkübe edildi. Bunu takiben, mikropleytler 500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra kuyucuklardaki vasat çekilerek her bir kuyucuğa insoluble formazan kristellerinin çözünmesini sağlayacak 100µl DMSO ilave edildi ve 37°C'deki inkübatörde 10 dakika daha bekletildi. Bunu takiben, mikropleytler 150rpm'de pleyt çakalayıcısında 1-2dak. çalkalandı ve insoluble formazan kristallerinin çözünmesi sonrası oluşan renk reaksiyonları ELISA cihazında, 570 nm dalga boyunda absorbans değerleri (O.D) olarak okundu. Kullanılan maddelerin hücreler üzerindeki % çoğalma inhibisyonu (kontrol OD-Örnek OD/ kontrol ODX100) formülü ile hesaplandı **(**Zhou,vd.,2004**).** % sitotoksisite= [Kontrol OD - Örnek OD / kontrol ODX100] Hücrelerin

sitotoksik konsantrasyonu olarak ifade edilen IC_{50} değeri, Excell de oluşturulan doz-yanıt eğrisinden (μg/ml) cinsinden hesaplandı. Deneyler an az 3 kez tekrarlandı.

3.5.3. Hücrelerdeki morfolojik değişikliklerin belirlenmesi

A549, CRL-2923, HeLa, HT29 ve ARPE hücre hatları trypan blue ile boyandıktan sonra, hemocytometereyle sayıldı ve 12 kuyucuklu pletlerin her bir kuyucuğuna $1x10^4$/ml hücre olacak şekilde ekilendı. Bunu takiben, hücreler 37^0C'de %5 CO_2 'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Bu periyod sonunda, ortamdaki vasat (medium) yeni besi-yeri ile değiştirilerek *Rhododendron luteum* bitkisinden elde edilen özütler veya kontrol maddeleri (DMSO,Taxol, vasat) belirlenen konsantrasyonlarda hücreler üzerine eklendi. 24 saat sonra hücrelerde oluşan morfolojik değişiklikler inverted mikroskobu (Olympus inverted mikrokbu CKX41, 10X) ile incelenerek, sonuçlar Olympus SC30 kameresi ile 20X'de fotoğraflandı. Özüt eklenen hücrelerle kontrol maddelerinin eklenmiş olduğu hücreler gözlemlenerek, özütlerin nontrasformed ve transformed hücreler üzerinde oluşturdukları morfolojik değişiklikler değerlendirildi.

3.6. Hücrelerde Apoptozis Analizi

3.6.1.Floresans mikroskobu

A549, CRL-2923, HeLa ve ARPE-19 hücreleri *Rhododendron luteum* bitkisi özütleri ve kontrol maddeleri (DMSO, taxol, vasat) ile 24 saat inkübe edildikten sonra, hücreler % 0.25'lik tripsin ile adere oldukları yüzeyden kaldırıldı. 1XPBS'le (fizyolojik tuzlu su) 1000 rpm hızda 3 dakika boyunca santrifüj edilerek yıkanan hücreler buz üzerine kondu. Hoechst 33342 (50ng/ml) boyası ile 25^0C 'de 5 dak. bekletilen hücreler 1XPBS'le tekrardan yıkanarak LeicaLM4000B fluorescence mikroskobunda incelendi ve yine LeicaDFC425 kamerası kullanılarak hücre DNA'ları fotoğraflandı (magnification20X veya 40x). Bu yöntemle, kontrol (DMSO, Taksol,vasat) ve test maddeleri uygulanan hücreler kıyaslanarak, apoptotik hücrelerde ki nükleer fragmantasyonlar belirlendi.

3.6.2 Agaroz Jel Elektroforezi Yöntemi

A549, CRL-2923, HeLa ve ARPE hücreleri *Rhododendron luteum* bitkisi özütleri ve kontrol maddeleri (DMSO, taxol, vasat) ile 24 saat veya 48saat inkübe edillen hücreler, süre sonunda % 0.25'lik tripsin ile adere oldukları yüzeyden kaldırıldı. Bunu takiben, hücreler steril tüplere alınarak santrifüj edilerek 1XPBS'le yıkandı ve ortamdaki vasat uzaklaştırıldı. Promega WIZAR genomik DNA Purificasyon Kiti kullanılarak hücrelerden DNA izolasyonu yapıldı. DNA örnekleri %1'lik (w/v) agaroz jelde, DNA bantlarının boyutlarının belirlenebilmesi için 1,5 kb'lık DNA belirteci (0,1 kb – 1,5 kb) DNA ile birlikte, 90 V'a elektroforez edildi. Bu yöntemle, apoptotik hücrelerde ki nükleer fragmantasyon UV transillüminatörde (Bio-Imaging systems / MiniNumi) jel üzerinde görüntülenerek, kontroller ve özütler arasındaki farklılıklar belirlendi.

3.7. İstatistiksel Analiz

Büyüme inhibisyonları % değer olarak (kontrol OD-Örnek OD/ kontrol ODX100**)** formülü ile hesaplanmıştır. Sonuçlar unpaired t-testi kullanılarak test edilmiştir. p değeri 0.05'ten küçük olan sonuçlar anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4-BULGULAR

4.1. Anti-Proliferatif Etki Bulguları

4.1.1 MTT bulguları

Çalışmada, 4 kanser 1 diploit olmak üzere 5 farklı hücre hattı kullanıldı. Dört farklı solvent kullanılarak *Rhododendron luteum* bitkisinin çiçek kısımları ve tomurcuklarından elde edilen 9 farklı özütün tablo 4'te belirtilen hücreler üzerindeki sitotoksik ve anti-proliferasyon etkileri MTT ve morfolojik testlerle araştırıldı. Metanol, su, etil asetat ve hekzan gibi solventler kullanılarak elde edilen *Rhododendron luteum* özütlerinin stok solüsyonlarını oluşturmak üzere, özütler 50µg/ml veya 100µg/ml olacak şekilde DMSO'da çözündürüldü. Bu özütler çalışmada kullanım zamanına kadar -20^{0}C de saklandı.

Deney öncesi hücreler standart kültür ortamında 25cm$^{2'}$lik flasklarda üretildi. Sağlıklı görülen hücreler tripsinize edilerek 10 ml D-PBS içeren falkon tüplerine aktarıldı ve 1500rpm 5dk. santrifüj edilerek tripsin uzaklaştırıldı. Bunu takiben 1/2 oranında trypan blue ile dilue edilen hücreler hemocytometre yardımı ile inverted mikroskopta sayılarak her bir kuyucuğa

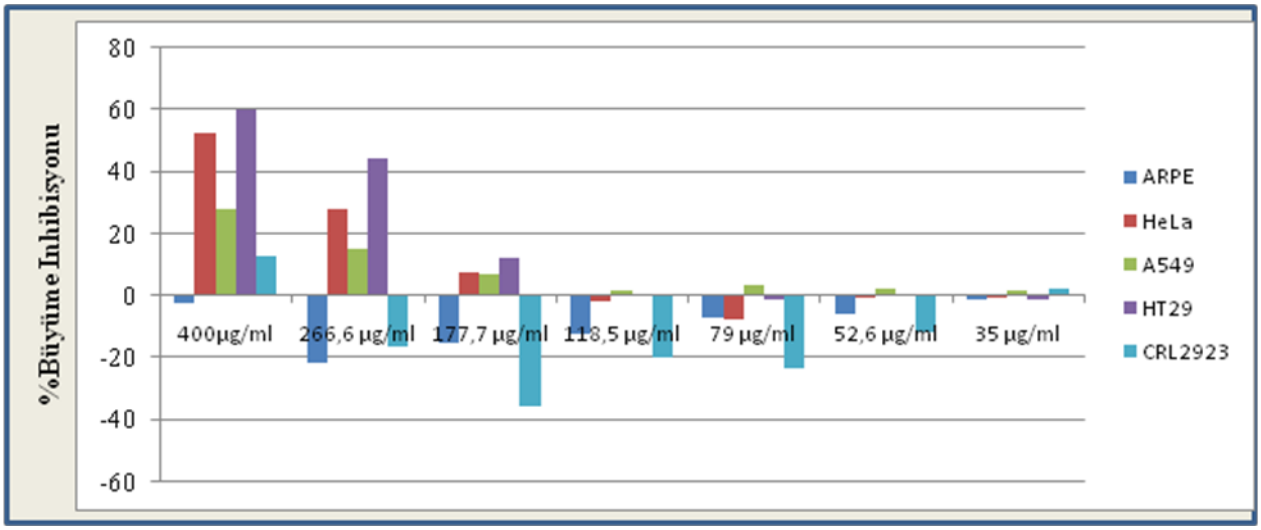
$1x10^3$ (kanser hücreleri) veya $2x10^3$ (diploit hücreler) hücre gelecek şekilde 96 kuyucuklu mikropleytlere ekimleri yapıldı. Hücreler 24 saat süre ile 37^0C'de, %5CO_2 içeren inkübatörde bekletilerek hücrelerin yüzeye adere olmaları sağlandı. Bu süre sonunda daha önce stokları hazırlanmış olan özütlerin ve DMSO'nun deneylerde istenilen başlangıç konsantrasyonları mediumda (vasat) hazırlandı. Bunu takiben, özüt ve kontroller 96 kuyucuklu mikropleytlerin ilk kuyucuklarına 2 tekrarlı olacak şekilde 100µl eklendi ve seri dilusyonları yapıldı. Pozitif kontrol olarak Taxol (5nM) mikropleytlerin bir kuyucuğuna eklenerek hücreler inkübatörde 48 saat süre ile bekletildi. Bu süre sonunda özütlerin ve kontrollerin nontransformed ve transformed hücrelerde oluşturduğu anti-proliferatif etkileri MTT yöntemi ile tespit edildi.

4.1.1.1. *Rhododendron luteum* sepal metanol özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme inhibisyonu

Tablo-1'de belirtildiği gibi *Rhododendron luteum* sepallerinden 4 farklı özüt hazırlanmıştır (metanol, su, etil asetat, hekzan). Bunların her birinin hücreler üzerindeki etkileri MTT yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. *Rhododendron sp.* sepallerinden elde edilen metanol özütünün hücre hatları üzerindeki büyüme inhibisyonu (anti-proliferetif) sonuçları Tablo 5 ve şekil 1'de sunulmuştur.

	HÜCRELER				
Konsantrasyon(µg/ml)	**ARPE**	**HeLa**	**A549**	**HT29**	**CRL2923**
400 µg/ml	-1,33	52,23	28,03	60,26	12,8
266,6 µg/ml	-21,77	27,97	14,8	44,26	-16,91
177,7 µg/ml	-15,54	7,54	7,03	12,19	-36,24
118,5 µg/ml	-12,5	-1,95	1,28	0,41	-20,27
79 µg/ml	-7,07	-7,85	3,55	-1,66	-23,81
52,6 µg/ml	-5,95	-0,5	1,91	0,18	-12,16
35 µg/ml	-1,58	-0,42	1,7	-1,54	2,18
IC_{50} µg/ml	HE	377	HE	300	HE

TABLO 5. *Rhododendron sp.* sepal metanol özütünün hücre hatları üzerindeki % büyüme inhibisyonu sonuçları:**HE:** hesap edilemedi; **Not:** Eksi (-) olarak verilen değerler hücre çoğalmasının devam ettiğini, özütün etkili olmadığını göstermektedir. **IC_{50} µg/ml**: Hücrelerin %50'ni öldüren µg/ml'deki özüt miktarı.



Şekil 1. *Rhododendron sp.* sepal metanol özütünün hücre hatları üzerindeki % büyüme inhibisyonu grafiği

Tablo 5 ve şekil 1**:** *Rhododendron sp.* sepallerinden elde edilen metanol özütünün non-transformed ve transformed hücre hatları üzerindeki anti-proliferatif etkilerini göstermektedir. Çalışmada, DMSO'da çözündürülen metanol özütü hücreler üzerine farklı konsantrasyonlarda (400µg/ml, 266,6µg/ml, 177,7µg/ml, 118,5µg/ml, 79µg/ml 52,6µg/ml 35µg/ml) ilave edilerek, 48 saat süre ile 37^0C'de, %5CO_2 içeren inkübatörde bekletildi. Çalışmada negatif kontrol olarak kullanılan DMSO'nun deneylerde ki konsantrasyonu %1'in altında tutuldu. Çünkü literatür çalışmaları, bunun üzerinde ki DMSO konsantrasyonlarının hücreler üzerinde toksik etkiye neden olabileceğini göstermektedir. Çalışmada, test edilen özüt ile solvent (DMSO) kontrol grubunun absorbans değerleri aşağıda verilen formülü ile % cinsinden ölen hücre sayısı hesaplanmıştır. %büyüme inhibisyonu = [Kontrol OD - Özüt OD / kontrol ODX100] formülü ile hesaplanmıştır. Deneyler en az üç kez farklı zamanlarda tekrarlanmıştır. Sepal metanol özütünün sonuçları değerlendirildiğinde, metanol özütünün 400µg/ml'lik konsantrasyonun diploit hücre hattı (ARPE-19) üzerinde etkisiz olduğu, aynı konsantrasyonun A549 ve CRL-2923 kanser hücre hatları üzerinde hafif etkili olarak, sırasıyla %28,03, %12,8 hücre ölümüne neden olduğu, buna karşın HeLa ve HT29 kanser hücre hatlarında sırasıyla %52.23 ve % 60,26 hücre inhibisyonuna sebebiyet verdiği bulunmuştur (Tab.5, Şek.1). Özellikle diploit ARPE-19 hücre hattı ile HT29 ve HeLa hücre hatları arasındaki bu farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Konsantrasyon 266,6µg/ml düşürüldüğünde, HT29 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinin devem ederek, hücrelerin %44,26'nın büyümesini inhibe ettiği görülmüştür. Özütün konsantrasyonunun azalmasına paralel olarak (177,7µg/ml,118,5 µg/ml,79µg/m l52,6 µg/ml35 µg/ml) hücrelerde ki sitotoksik etkinin ortadan kalktığı gözlenmiştir (Tab.5, Şek.1). HeLa ve HT29 hücreleri için IC_{50}

değerleri sırasıyla 377µg/ml ve 300µg/ml olarak hesaplanırken ARPE-19 ve diğer hücreleri için bu değer, elimizdeki verilerden hesaplanamamıştır (Tab.5).

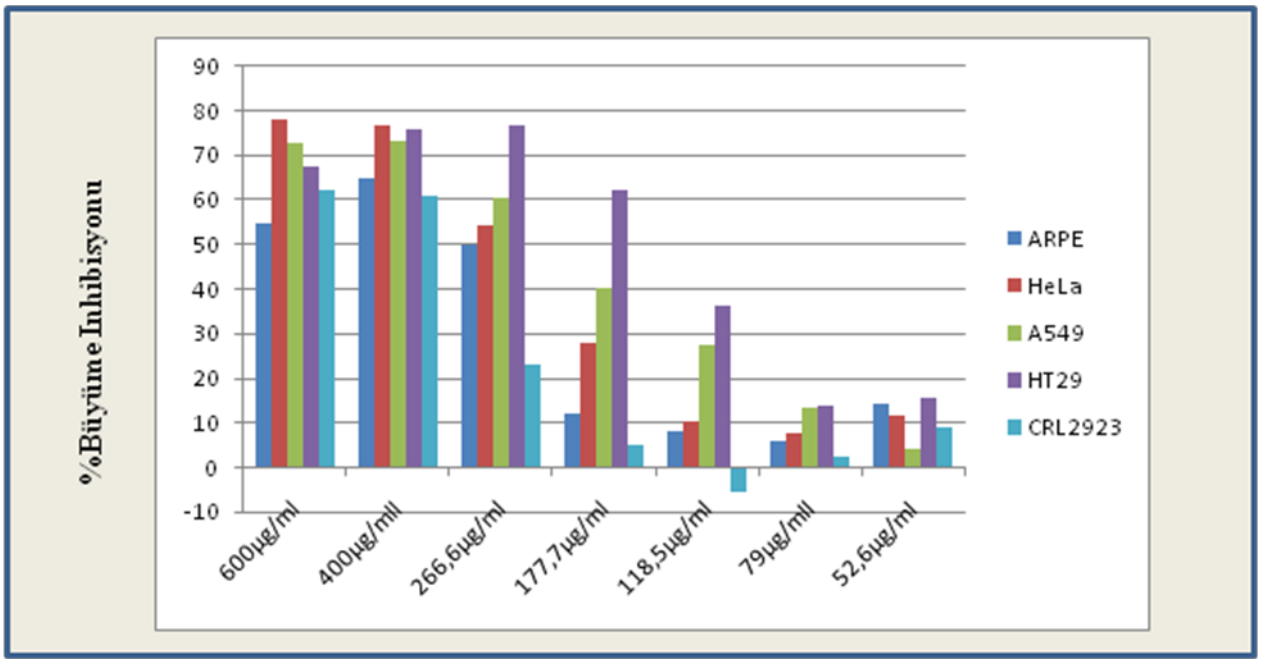
Çalışma sonucunda elde edilen bu veriler, total metanol özüt içeriğinin kanser hücreleri için seçici bir etkisinin olabileceği ve bunun daha detaylı araştırılmasının gerektiği kanısındayız. Özellikle yüksek konsantrasyonda (400µg/ml) dahi ARPE-19 hücreleri üzerinde etkisiz bulunması önemli görülüp bunun daha detaylı çalışmalarla doğrulanmasının gerekliliği kanısındayız.

4.1.1.2.*Rhododendron luteum* sepallerinin etil asetat özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme inhibisyonu

Tablo 6. *Rhododendron sp.* sepallerinden elde edilen etil asetat özütünün non-transformed ve transformed hücre hatları üzerindeki anti-proliferetif etkilerini göstermektedir.

	HÜCRELER				
Konsantrasyonlar(µg/ml)	**ARPE**	**HeLa**	**A549**	**HT29**	**CRL2923**
600 µg/ml	54,74	78	72,87	67,56	62,03
400 µg/ml	64,96	76,8	73,3	75,91	60,96
266,6 µg/ml	49,99	54,3	60,42	76,77	23,04
177,7 µg/ml	12,13	28	40,01	62,34	5,05
118,5 µg/ml	8,06	10,1	27,34	36,31	-5,75
79 µg/ml	6,04	7,6	13,19	13,75	2,55
52,6 µg/ml	14,42	11,6	4,3	15,7	8,83
IC_{50} µg/ml	266,6	233	213	133	360

IC_{50} µg/ml: Hücrelerin %50'ni öldüren µg/ml'deki özüt miktarı.



Şekil 2. *Rhododendron* sp. sepallerinin etil asetat özütünün hücre hatları üzerindeki % büyüme inhibisyonunu grafiği

Tablo 6 ve şekil 2: Çalışmada, *Rhododendron sp.* sepallerinden elde edilen etil asetat özütünün 5 farklı hücre hattı üzerinde ki anti-proliferatif etkileri araştırılmıştır. DMSO'da çözündürülen etil asetat özütü (600µg/ml 400 µg/ml, 266,6µg/ml,177,7µg/ml,118,5µg/ml,79 µg/ml 52,6µg/ml) ve kontrol DMSO farklı konsantrasyonlarda hücreler üzerine ilave edilerek, 48 saat süre ile 37^{o}C'de, %5CO_2 içeren inkübatörde bekletildi. Bunu takiben MTT yöntemi kullanılarak sonuçlar değerlendirildi. Kısaca, çalışmada test edilen özüt ile kontrol grubunun (çözücü/DMSO) absorbans verileri kullanılarak % hücre inhibisyon değerleri hesaplandı. Sonuçlar değerlendirildiğinde, etil asetat özütünün 600-266,6µg/ml aralığında ki konsantrasyonlarının kullanılan bütün hücrelere doza bağlı sitotoksik etkili olduğu gözlendi. Alt konsantrasyonlarda doza bağlı olarak hücreler üzerinde ki sitotoksik etki azalsa da, etil asetat özütünün 177,7µg/ml konsantrasyonunun A549 ve HT29 kanser hücreleri üzerinde etkisini devam ettirdiği ve sırasıyla bu hücrelerin büyümesini %40 ve %62,34 seviyesinde inhibe ettiği tespit edildi. Bu konsantrasyonda yapılan istatistiksel analizler ARPE-19 hücre hattı ile kanser hücre hatları olan A549 ve HT29 arasında ki farklılıkların anlamlı olduğunu göstermiştir ($p<0.05$).

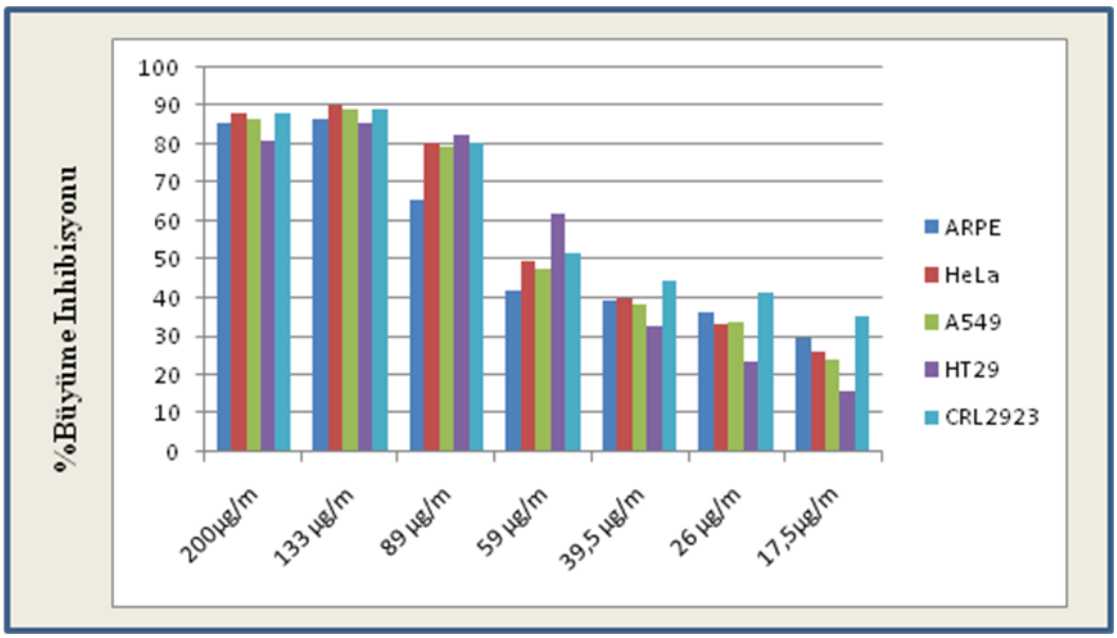
Bunlara ilaveten, etil asetat özütünün 118,5µg/ml konsantrasyonu HT29 hücrelerinin %36,3'nü inhibe ederken, APRE-19 diploit hücrelerinin sadece %8'ni etkilemiş olup, iki hücre arasında ki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Çalışmada hesaplanan IC_{50} değerleri, ARPE-19, HeLa A549, HT29 ve CRL2923 hücreleri için sırasıyla 266,6µg/ml, 233µg/ml, 213µg/ml, 133µg/ml, 360µg/ml olarak bulunmuş olup, en düşük değer kolon kanseri hücre hattı HT29 için tespit edilmiştir (Tab.6). Bu sonuç, HT29 hücrelerinin etil asetat özütüne daha hassas olduğunu ve özütün kanser hücreleri arasında seçici bir potansiyelinin olabileceğini düşündürmektedir.

4.1.1.3. *Rhododendron luteum* sepallerinin hekzan özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme inhibisyonu

Tablo 7 ve şekil 3'de *Rhododendron sp.* sepallerinden elde edilen hekzan özütünün DMSO'da ki farklı konsantrasyonlarının beş farklı hücre hattı üzerindeki antitümoral aktivite değerleri verilmektedir.

	HÜCRELER				
Konsantrasyonlar (µg/ml)	**ARPE**	**HeLa**	**A549**	**HT29**	**CRL2923**
200 µg/ml	85,76	88,36	86,55	81,26	87,95
133 µg/ml	86,81	90,13	89,42	85,58	89,08
89 µg/ml	65,45	80,64	79,49	82,7	80,3
59 µg/ml	41,82	49,74	47,94	62,02	52,01
39,5 µg/ml	39,58	39,99	38,42	32,91	44,76
26 µg/ml	36,45	33,32	33,85	23,5	41,49
17,5 µg/ml	29,51	26,09	23,98	16,11	35,61
IC_{50} µg/ml	68,7	57,7	59,9	50	56,6

TABLO 7. *Rhododendron sp.* sepallerinin hekzan özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme inhibisyonu sonuçları: **IC_{50} µg/ml**: Hücrelerin %50'ni öldüren µg/ml'deki özüt miktarı.



Şekil 3. *Rhododendron sp.* sepallerinin hekzan özütünün hücre hatları üzerindeki % büyüme inhibisyonunu grafiği

Sepal Hekzan özütünün 200 µg/ml ile 89 µg/ml konsantrasyon aralığında bütün hücre hatları üzerinde sitotoksik etkili olduğu ve hücre hatlarında %>65'den fazla hücre inhibisyonuna neden olduğu tespit edilmiştir. Doza bağlı olarak hücreler üzerindeki sitotoksik

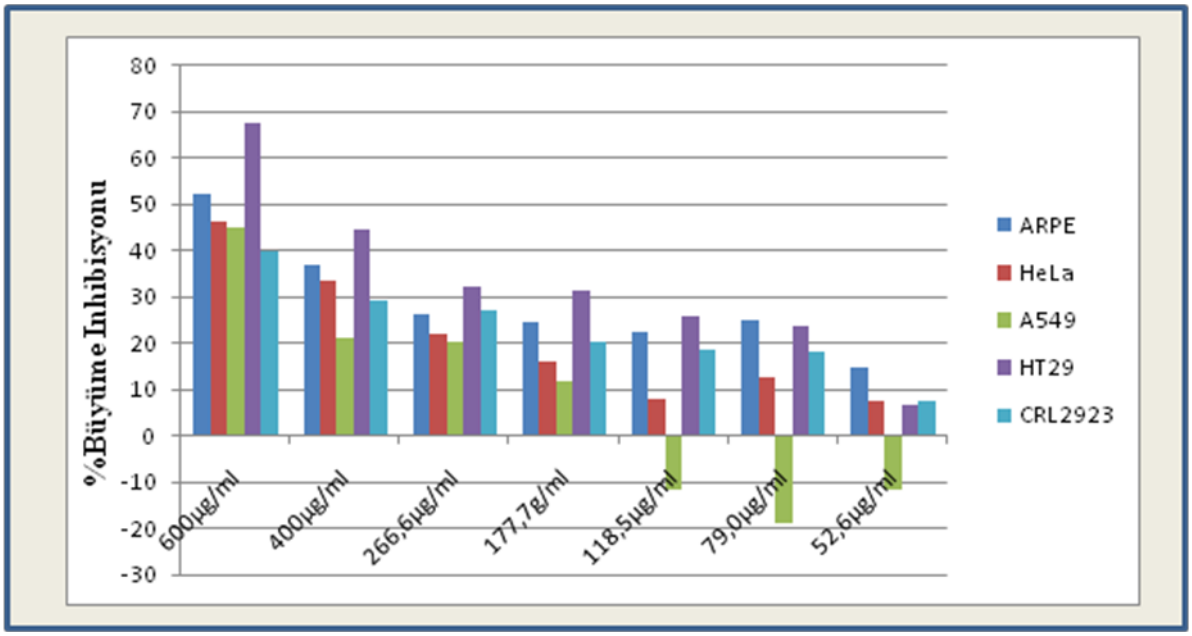
etki azalsa da, en düşük konsantrasyon olan 17,5µg/ml de bile hücrelerde %16'nın üzerinde büyüme inhibisyonuna neden olmuştur(Tab.7, şek.3). IC_{50} değerleri ARPE-19, HeLa, A549, HT-29 ve CRL-2923 hücre hatları için sırasıyla 68,7 µg/ml, 57,7µg/ml, 59,9µg/ml, 50,0µg/ml ve 56,6µg/ml hesaplanmış olup, uygulanan hiçbir konsantrasyonda sitotoksik açıdan hücreler arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır.

4.1.1.4. *Rododendron luteum* sepallerinin sulu/suda özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme inhibisyonu

Çalışmada *Rhododendron sp.* sepallerinden elde edilen sulu özüt, suda çözündürülerek normal ve kanser hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkileri farklı konsantrasyonlarda (600µg/ml 400µg/ml 266,6µg/ml, 177,7g/ml 118,5µg/ml 79,0µg/ml ile 52,6µg/ml) MTT testi ile analiz edildi ve sonuçlar Tablo 8 ve Şekil 4 'te sunuldu.

	HÜCRELER				
Konsantrasyonlar(µg/ml)	**ARPE**	**HeLa**	**A549**	**HT29**	**CRL2923**
600µg/ml	52,28	46,45	45,15	67,68	39,74
400µg/ml	37,11	33,42	21,15	44,79	29,1
266,6µg/ml	26,34	21,99	20,48	32,43	26,93
177,7g/ml	24,65	16,22	11,95	31,54	20,24
118,5µg/ml	22,63	7,9	-11,63	26,06	18,66
79,0µg/ml	25,19	12,74	-18,89	23,61	18,32
52,6µg/ml	14,85	7,66	-11,64	6,77	7,67
IC_{50} µg/ml	578,8	HE	HE	444,44	HE

TABLO 8. *Rhododendron sp.* sepallerinin sulu özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme inhibisyonu sonuçları: **HE:** hesap edilmedi; **Not:** - olarak verilen değerler hücre çoğalmasının devam ettiğini, ekstrenin etkili olmadığını göstermektedir. **IC_{50} µg/ml:** Hücrelerin %50'ni öldüren µg/ml'deki özüt miktarı.



Şekil 4. *Rododendron sp. s*epallerinin sulu/suda özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme inhibisyonunu grafiği

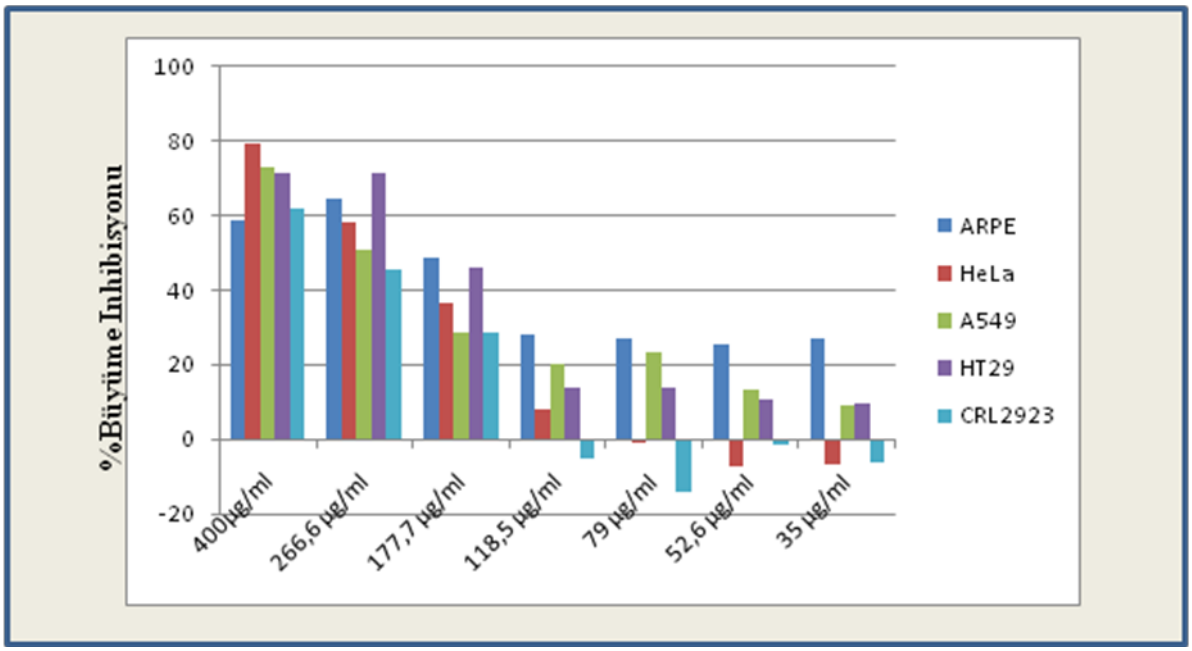
Sepal sulu özütü bütün hücreler (ARPE-19, HeLa, A549, HT-29 ve CRL-2923,) üzerinde doza bağlı olarak hücre büyüme inhibisyonuna neden olurken, 118,5g/ml ve üzeri konsantrasyonlarda en fazla etkinin HT29 hücre hattında olduğu gözlenmiştir (Tab.8,Şek.4). Uygulanan 118,5µg/ml ve alt dozlarda, özütün akciğer kanser hücreleri (A549) üzerindeki etkisini tamamen kaybederek, hücrelerin bölünmesini stimule ettiği gösterilmiştir. Sonuçlar sitotoksisite açısından değerlendirildiğinde diploit (ARPE-19) ve kanser hücreleri arasında istatistiksel açıdan bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. IC_{50} değerleri HeLa, A549, ve CRL-2923 için hesaplanamazken, ARPE ve HT-29 hücreleri için bu değerler sırasıyla 578,8 µg/ml ve 444,44 µg/ml olarak hesaplanmıştır (Tab. 8).

4.1.1.5. *Rododendron luteum* sepallerinin sulu/DMSO özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme inhibisyonu

Bu çalışmada *Rododendron sp.* sepallerinin sulu özütü DMSO' da çözündürülerek anti-tümoral aktivite tayini yapılarak, sonuçlar Tablo 9 ve Şekil 5'te sunulmuştur.

	HÜCRELER				
Konsantrasyonlar(µg/ml)	**ARPE**	**HeLa**	**A549**	**HT29**	**CRL2923**
400µg/ml	58,72	79,30	73,30	71,43	61,71
266,6µg/ml	64,82	58,47	50,79	71,41	45,55
177,7g/ml	48,91	36,30	28,73	45,95	28,72
118,5µg/ml	28,29	8,22	19,97	13,78	-5,26
79,0µg/ml	27,12	-0,90	23,39	13,64	-14,28
52,6µg/ml	25,25	-7,37	13,43	10,72	-1,53
35µg/ml	27,21	-6,71	8,98	9,67	-6,49
IC_{50} µg/ml	216	240	268	184	300

TABLO 9. *Rhododendron sp.* sepallerinin sulu/dmso özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme inhibisyonu sonuçları**:IC_{50} µg/ml:** Hücrelerin %50'ni öldüren µg/ml'deki özüt miktarı



Şekil 5. *Rhododendron sp.* sepallerinin sulu özütünün(DMSO) hücre hatları üzerindeki %büyüme inhibisyonunu grafiği

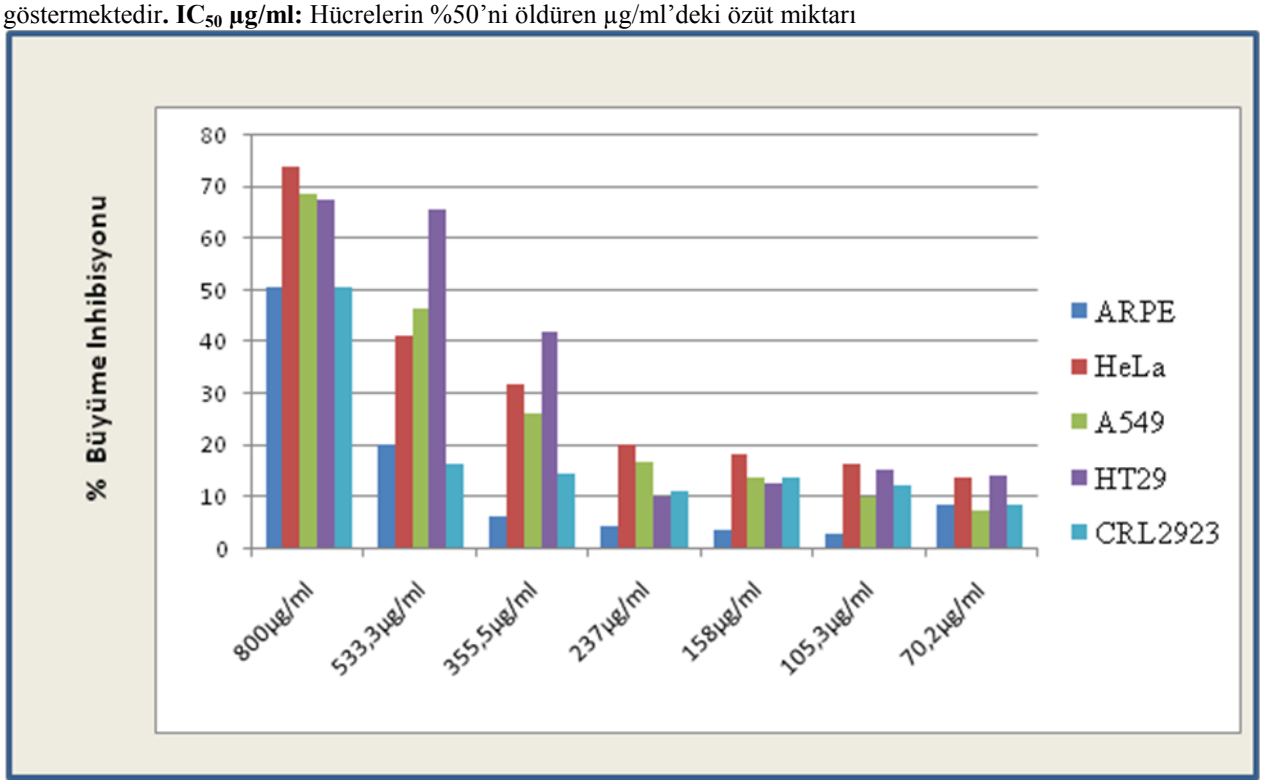
Sonuçlar değerlendirildiğinde, 177,7g/ml ve üzeri konsantrasyonlarda bütün hücrelerde sitotoksik etkili bulunan özütün, seri dilüsyonlarla konsantrasyonu düşürüldüğünde HeLa ve CRL2923 kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini tamamen kaybettiği fakat diploit ARPE-19 hücre hattı ve kanser hücre hatları (HT29, A549) üzerindeki etkisini az da olsa devam ettirdiği gözlenmiştir (Tab.9, Şekil 5). ARPE-19, HeLa, A549, HT-29 ve CRL-2923 hücre hatları için IC_{50} değerleri hesaplanmış olup, sırasıyla 216, 240, 268, 184, 300µg/ml olarak bulunmuştur. Transformed ve nontransformed hücrelerin IC_{50} değerlerinin birbirine çok yakın bulunması, bu özütün anti-tümoral değil, sitotoksik bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir.

4.1.1.6. *Rhododendron luteum* petal etil asetat özütünün hücre hatları üzerindeki % büyüme inhibisyonu

Rhododendron sp. petal etil asetat özütü, farklı konsantrasyonlarda (800µg/ml, 533,3µg/ml 355,5µg/ml, 237µg/ml, 158µg/ml, 105,3µg/ml,70,2µg/ml) hücre hatları üzerinde In Vitro koşullarda, 48 saat uygulanarak antitümoral aktiviteleri araştırılmış ve sonuçlar Tablo 10 ve Şekil 6' da sunulmuştur.

	HÜCRELER				
Konsantrasyonlar(µg/ml)	**ARPE**	**HeLa**	**A549**	**HT29**	**CRL2923**
800 µg/ml	50,6	73,83	68,79	67,59	50,71
533,3µg/ml	20,21	41,42	46,6	65,67	16,67
355,5µg/ml	6,29	31,78	26,21	41,99	14,73
237µg/ml	4,5	20,26	16,93	10,15	11,18
158µg/ml	3,81	18,49	14,08	12,87	13,85
105,3µg/ml	2,86	16,41	19,17	15,53	18,49
70,2µg/ml	8,6	13,75	21,59	14,13	18,67
IC_{50} µg/ml	800	644,4	622,1	459,3	800

Tablo 10. *Rhododendron sp.* petal etil asetat özütünün hücre hatları üzerindeki % büyüme inhibisyonu sonuçları; **HE**: hesap edilmedi; **Not**: - olarak verilen değerler hücre çoğalmasının devam ettiğini, özütün etkili olmadığını göstermektedir**. IC_{50} µg/ml:** Hücrelerin %50'ni öldüren µg/ml'deki özüt miktarı



Şekil 6. *Rododendron sp.* petal etil asetat özütünün hücre hatları üzerinde ki %büyüme inhibisyonunu göstermektedir

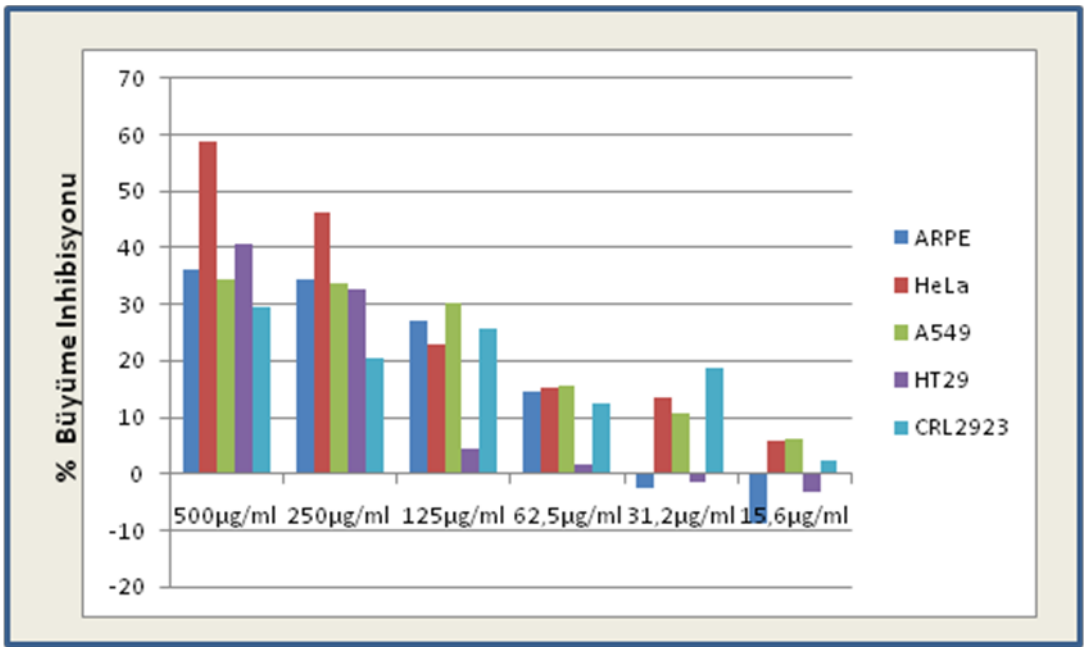
Petal etil asetat özütünün yüksek konsantrasyonda (800µg/ml) uygulandığı bütün hücrelerde %50,6-%73,83 seviyelerinde sitotoksik etkili olduğu gösterilmiştir (Tab.10, Şek.6). Tablo 10'da görüldüğü gibi, petal etil asetat özütünün 800 µg/ml'de diploit ARPE-19 hücre hattı üzerinde %50,6 oranında inhibisyona neden olduğu, doz 533,3µg/ml- 70,2 µg/ml aralığına düşürüldüğünde sitotoksik etkinin tamamen ortadan kalktığı görülmektedir. Özüt 533,3µg/ml ve 355,5µg/ml doz aralığında uygulandığında, en hassas hücre hattı olarak bulunan HT29 kolon kanser hücrelerini, sırasıyla %65,67 ve %41,99 inhibisyona uğrattığı tespit edilmiştir. 533,3µg/ml'de petal özüt dozunun akciğer kanser hücre hattının (A549) %46,6'nı, serviks kanser hücrelerinin (HeLa) ise %41,42'ni inhibe ettiği görülmüştür. Petal özütün endometrium kanser hücre hattı (CRL2923) üzerindeki antiproliferatif etkisi en yüksek doz olan 800µg/ml'de % 50,70 olarak saptanmıştır. Daha alt konsantrasyonlarda özütün bu hücrelerde anlamlı bir hücre inhibisyona neden olmadığı tespit edilmiştir. 533,3µg/ml ve 355,5µg/ml konsantrasyonlarda elde edilen verilere uygulanan Student Unpaired *t* testi sonuçları bu dozlarda diploit ARPE-19 hücre hattı ile HT29 hücre hattı arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p<0.05$), diğer kanser hücre hatları olan HeLa, A549, CRL-292 ile diploit ARPE-19 hücreleri arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır. ARPE-19, HeLa, A549, HT29 ve CRL-2923 hücre hatları için hesaplanan IC_{50} değerleri sırasıyla 800µg/ml, 644,4µg/ml, 622,1µg/ml,459,3µg/ml ve 800µg/ml olarak bulunmuştur (Tab.10). Bu veriler toplu olarak değerlendirildiğinde, *Rhododendron sp.* petal etil asetat özütünün HT29 hücre hattı üzerinde seçici antitümoral bir etkisinin olabileceğini düşündürmektedir.

4.1.1.7. *Rhododendron luteum* petal hekzan özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme inhibisyonu

Rododendron sp. petal hekzan özütünün antitümoral etkisi MTT testi kullanılarak, 500µg/ml, 250µg/ml, 125µg/ml, 62,5µg/ml, 31,2µg/ml 15,6µg/ml konsantrasyonlarda İn Vitro olarak çalışılmıştır. Elde edilen bulgular aşağıda Tablo 11 ve Şekil 7'de verilmiştir.

	HÜCRELER				
Konsantrasyonlar (µg/ml)	**ARPE**	**HeLa**	**A549**	**HT29**	**CRL2923**
500 µg/ml	36	58,7	34,5	40,6	29,4
250µg/ml	34,3	46,4	33,7	32,6	20,3
125µg/ml	27,1	22,8	30,1	4,3	25,7
62,5µg/ml	14,6	15.4	15,6	1,8	12,3
31,2µg/ml	-2,4	13,6	12,8	-1,4	8,6
15,6µg/ml	-8,7	5,7	6,3	-3,3	2,2
IC_{50} µg/ml	HE	406,7	HE	HE	HE

TABLO 11. *Rhododendron sp.* petal hekzan özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme inhibisyonu sonuçları; **HE**: hesap edilmedi; **Not:** - olarak verilen değerler hücre çoğalmasının devam ettiğini, özütün etkili olmadığını göstermektedir. **IC_{50} µg/ml:** Hücrelerin %50'ni öldüren µg/ml'deki özüt miktarı



Şekil 7. *Rododendron sp.* petal hekzan özütünün hücre hatları üzerinde ki %büyüme inhibisyonunu grafiği

Bulgular, özütün 500µg/ml konsantrasyonda hücre hatlarında %29,4 ile %58,7 aralığında büyüme inhibisyonuna neden olduğunu göstermiştir (Tab.11, Şek.7). Ayrıca 500µg/ml ve 250µg/ml dozlarda serviks kanser hücre hattı olan HeLa en hassas hücre olarak tespit edilmiş olup hücrelerde, sırasıyla %58,7 ve %46,4 büyüme inhibisyonu saptanmıştır (Tab.11 ve Şek.7). Seri dilüsyonlarla özüt seyreltildiğinde yüksek konsantrasyonda ki inhibisyon etkinsinin kaybolduğu gözlenmiştir. İstatistiksel değerlendirmede diploit ARPE-19 ve kanser hücre hatları arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır. Bu çalışmada dikkate değer bir sonuç; kullandığımız bütün *Rododendron sp.* özütlerine en hassas hücre hattı olarak saptanan HT29 hücrelerinin bu özütten en az etkilenen hücre olmasıdır.

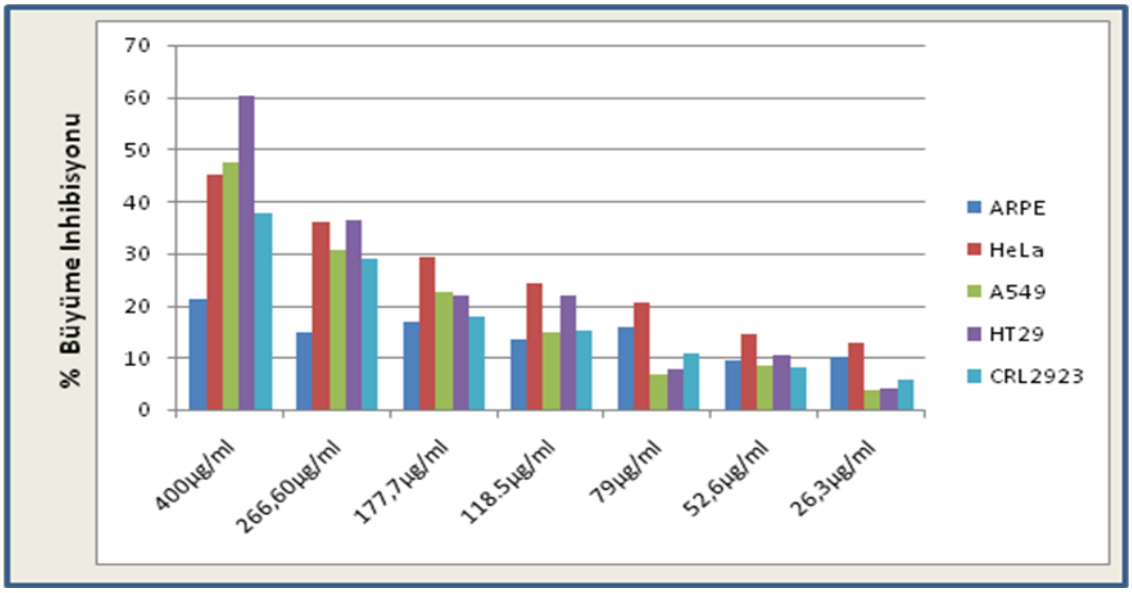
Bunun olası bir nedeni, farklı solventler kullanılarak elde edilen özüt içeriklerinin farklı komponentler içermiş olabileceği, bunların farklı hücreler üzerinde seçici etkilerinin değişebileceğidir. Bunun tam olarak açığa çıkarılabilmesi için özütlerin komponentlerin belirlenerek, bunların çeşitli kökenden gelen hücreler üzerindeki anti-proliferatif etkilerinin araştırılmasının gerekliliği kanısındayız.

4.1.1.8. *Rhododendron luteum* tomurcuk metanol özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme inhibisyonu

Rhododendron sp. bitkisinin tomurcuklarından elde edilen metanol özütüne ait farklı konsantrasyonlar (400, 266.60, 177.7, 118.5, 79, 52.6 26.3µg/ml) hücre hatlarına 48 saat uygulanarak belirlenen anti-tümoral aktivite verileri Tablo 12 ve Şekil 8'de sunulmuştur.

	HÜCRELER				
Konsantrasyonlar(µg/ml)	**ARPE**	**HeLa**	**A549**	**HT29**	**CRL2923**
400µg/ml	21,3	45,2	47,3	60,2	37,68
266,60µg/ml	14,8	35,9	30,6	36,3	29,11
177,7µg/ml	16,9	29,4	22,6	21,9	17,74
118.5µg/ml	13,6	24,3	14,7	21,8	15,22
79µg/ml	15,7	20,6	6,6	7,9	10,8
52,6µg/ml	9,4	14,5	8,5	10,6	8,11
26,3µg/ml	10	12,8	3,7	4,1	5,74
IC_{50} µg/ml	HE	HE	HE	375.5	HE

TABLO 12. *Rhododendron sp.* tomurcuk metanol özütünün hücre hatları üzerindeki %büyüme inhibisyonu sonuçları; **HE**: hesap edilmedi; **Not**: - olarak verilen değerler hücre çoğalmasının devam ettiğini, özütün etkili olmadığını göstermektedir**. IC_{50} µg/ml:** Hücrelerin %50'ni öldüren µg/ml'deki özüt miktarı



Şekil 8. *Rododendron sp.* tomurcuk metanol özütünün hücre hatları üzerinde ki %büyüme inhibisyonunu grafiği

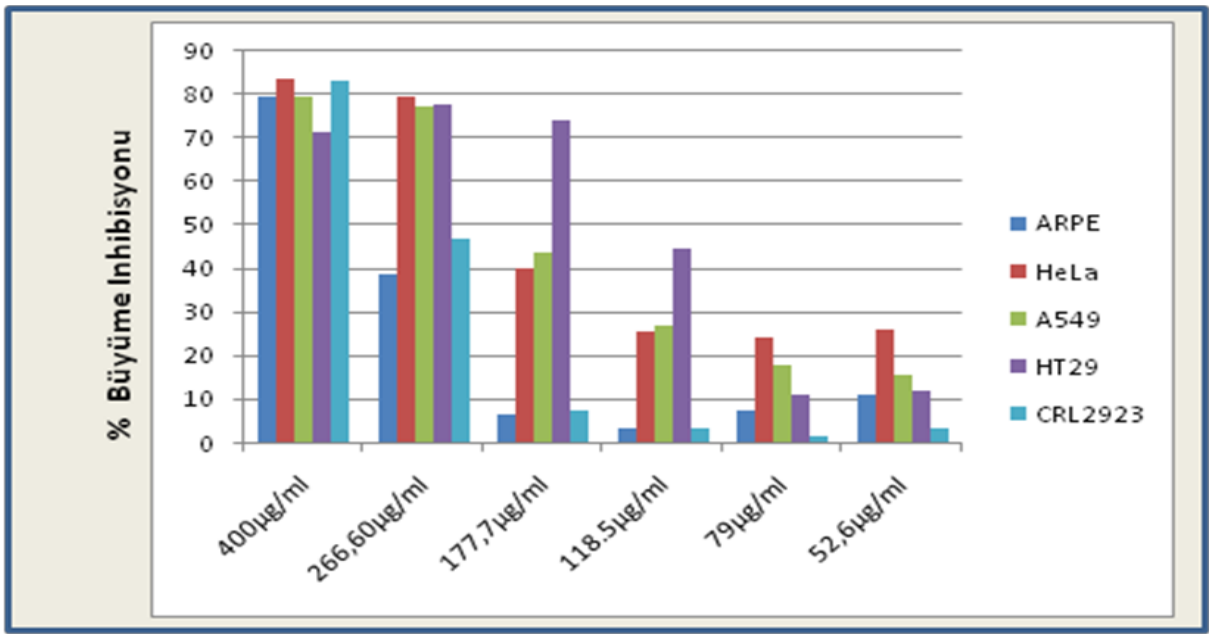
Çalışma sonunda yapılan değerlendirmede; özütün 400µg/ml konsantrasyonun bütün hücre hatlarında %21,3 ile %60,2 seviyelerinde büyüme inhibisyonuna neden olduğu görülmüştür (Tab.12, Şek.8). En az etkilenen hücre hattı olarak bulunan ARPE-19 ile kanser hücre hatları (HT-29, A549 ve HeLa) arasındaki farklılıklar $p<0.05$ seviyesinde anlamlı bulunmuştur. Seri dilüsyonlarla özüt konsantrasyonu düşürüldüğünde bütün hücreler üzerinde ki sitotoksik etkinin giderek azaldığı ve sitotoksisite açısından farklılık olmadığı tespit edilmiştir. (Tab.12,Şek.8). Hücre büyümesinde %50 oranında azalmaya neden olan özüt dozları, HT29 için 375,5µg/ml olarak hesaplanırken bu değerler ARPE, HeLa, CRL2923 için hesaplanamamıştır (Tab.12).

4.1.1.9. *Rhododendron luteum* tomurcuk etil asetat *özütünün* hücre hatları üzerindeki % büyüme inhibisyonu

.*Rhododendron sp.* bitkisinin tomurcuklarına ait farklı etil asetat özüt konsantrasyonları (400, 266.60, 177.7, 118.5, 79, 52.6µg/ml) hücre hatlarına 48 saat uygulanarak belirlenen anti-tümoral aktivite verileri Tablo 13 ve Şekil 9'da sunulmuştur.

	HÜCRELER				
Konsantrasyonlar (µg/ml)	**ARPE**	**HeLa**	**A549**	**HT29**	**CRL2923**
400µg/ml	79,6	83,63	79,45	71,32	83,15
266,60µg/ml	38,71	79,72	77,19	77,82	46,65
177,7µg/ml	6,45	40,21	43,42	74,28	7,14
118.5µg/ml	3,3	25,53	26,93	44,6	3,1
79µg/ml	7,43	23,94	17,68	10,99	1,5
52,6µg/ml	11,0	26,05	15,35	11,77	3,13
IC_{50} µg/ml	366,65	231,0	222,15	159,94	333,5

TABLO 13. *Rhododendron sp.* tomurcuk etil asetat özütünün hücre hatları üzerindeki % büyüme inhibisyonu sonuçları:**IC_{50} µg/ml**: Hücrelerin %50'ni öldüren µg/ml'deki özüt miktarı



Şekil 9. *Rododendron sp.* tomurcuk etil asetat özütünün hücre hatları üzerinde ki %büyüme inhibisyonunu grafiği

Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde; özütün yüksek konsantrasyonda (400µg/ml), diploit ARPE-19 ve kanser hücrelerinin hepsinde >%71'in üzerinde bir büyüme inhibisyonuna neden olduğu bulunmuştur. Bir alt konsantrasyon olan 266.60µg/ml'de APRE-19 ve CRL2923 hücre hatları üzerinde ki etki azalırken, HeLa, A549, HT29 hücreleri üzerindeki anti-tümoral etki sırası ile %79,72, %77,19 ve %77,82 olarak seyretmiştir. (Tab.13, Şek 9). Seri dilüsyonlarla konsantrasyonlar azaltıldığında (177.7µg/ml-52.6µg/ml) diploit ARPE-19 ve endometrium kanser hücre hattı CRL2923 üzerindeki sitotoksik aktivitenin çok düşük seviyelere indiği görülmüştür. Buna karşın HeLa, A549 ve HT29 kanser hücre hatları

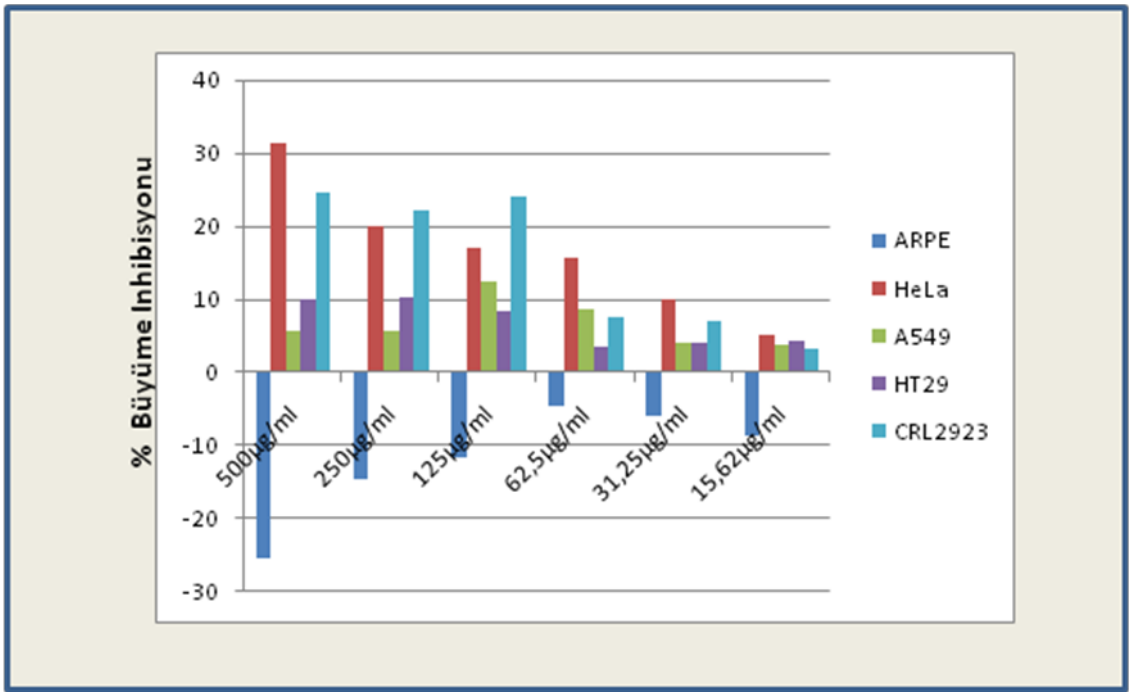
üzerindeki anti-tümoral aktivite devam ederek, 118,5µg/ml dozda bu hücrelerde sırasıyla %25,53, %26,93 ve %44,6 büyüme inhibisyonuna neden olmuştur. Bu konsantrasyonda yapılan istatistiksel analiz sonuçları, kontrol ARPE-19 ile HeLa, A549 ve HT29 kanser hücre hatları arasındaki farklılıkların $p<0.05$ seviyesinde anlamlı olduğunu göstermiştir. Çalışmada saptanan IC_{50} değerleri Tab.13'te sunulmuş olup, bu değer kontrol ARPE hücreleri için 366,65µg/ml olarak hesaplanırken en hassas hücre olarak saptanan HT29 kolon kanser hücresi için 159,94µg/ml olarak bulunmuştur. Bu değerler kullanılarak hesaplanan SI (selektivite indeksi) HT29 kanser hücreleri için 2.29 olarak bulunmuştur. Literatur taramaları, SI 3 ve üzeri bir değer olarak saptanır ise bunun anti-tümöral açıdan önemli olabileceğini ve üzerinde durulması gerekliliğini vurgulamaktadır (Bézivin vd.,2003).

4.1.1.10. *Rhododendron luteum* tomurcuk hekzan özütünün hücre hatları üzerindeki % büyüme inhibisyonu

Rhododendron sp. bitkisinin tomurcuklarından elde edilen hekzan özütünün antitumoral aktivite sonuçları Tablo 10 ve Şekil 10'da sunulmuştur.

	HÜCRELER				
Konsantrasyonlar(µg/ml)	**ARPE**	**HeLa**	**A549**	**HT29**	**CRL2923**
500µg/ml	-25,5	31,46	5,8	10,07	24,58
250µg/ml	-14,5	19,96	5,67	10,19	22,22
125µg/ml	-11,62	16,94	12,35	8,5	24,05
62,5µg/ml	-4,5	15,59	8,55	3,4	7,7
31,25µg/ml	-6,05	10,03	4,11	3,92	7,1
15,62µg/ml	-8,58	5,25	3,82	4,28	3,27
IC_{50} µg/ml	HE	HE	HE	HE	HE

TABLO 14. *Rhododendron sp.* tomurcuk hekzan özütünün hücre hatları üzerindeki % büyüme inhibisyonu sonuçları; **HE**: hesap edilmedi; **Not**: - olarak verilen değerler hücre çoğalmasının devam ettiğini, özütün etkili olmadığını göstermektedir. **IC_{50} µg/ml:** Hücrelerin %50'ni öldüren µg/ml'deki özüt miktarı.



Şekil 10. *Rododendron sp.* tomurcuk hekzan özütünün hücre hatları üzerinde ki %büyüme inhibisyonunu grafiği

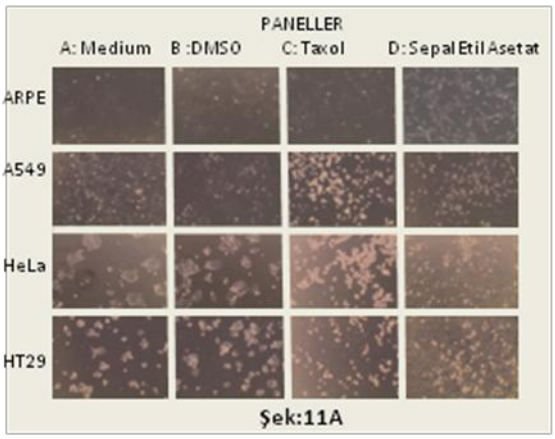
Çalışmada, hekzan özütünün uygulanan konsantrasyonlarının (500, 250, 125, 62,5, 31,25 15,62µg/ml) transformed (HeLa,HT29;CRl2329,A549) hücrelerinin aksine, nontransformed(ARPE-19) hücrelerin proliferasyonunu arttırmış olduğu saptanmıştır (Tab.14,Şek.10). 500µg/ml konsantrasyonda en yüksek etki, %31,46'lık hücre inhibisyonu ile HeLa ve %24,58'lik hücre inhibisyonu ile CRL2923 hücre hatlarında görülmüştür. Hücrelerden, HeLa serviks, CRL2923 ise endometrium kanserlerine neden olmaktadır. Bu sonuç, tomurcuk hekzan özütündeki bir veya birden fazla maddenin rahim kökenli kanser türlerinde seçici bir etkisinin olup olmadığı sorusunu akla getirmektedir. Diğer bir bulgu ise, bu proje kapsamında çalışılan *Rhododendron sp.* bitki özütlerine hassas bir hücre hattı olarak tespit edilen HT29'a olan inhibisyon etkisinin sadece %10 seviyelerinde kalmış olmasıdır.

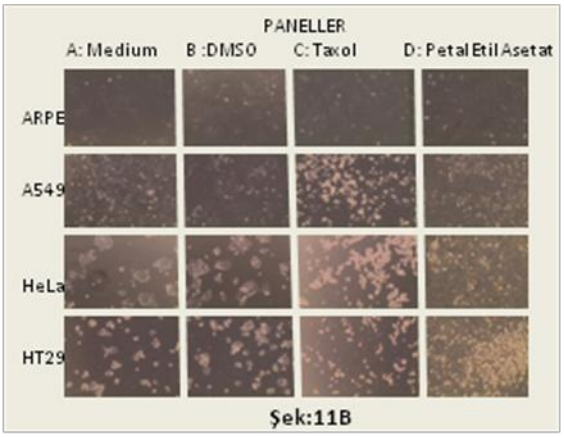
4.2. Morfolojik Değişimlere Ait Bulgular

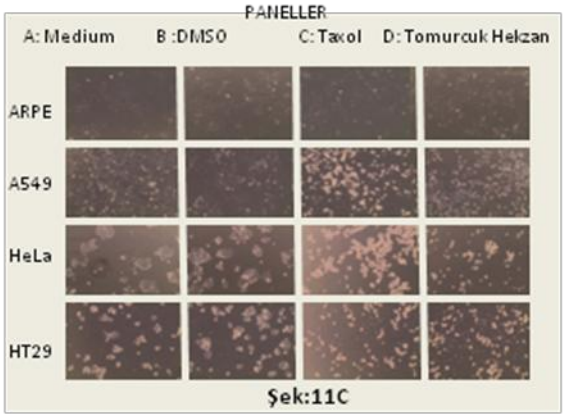
Transformed (A549,HeLa,HT29) ve nontransformed (ARPE-19) hücreler üzerindeki morfolojik değişikliklerin belirlenebilmesi için, kontrol maddeleri (DMSO, Taxol, medium/vasat) ve 5 farklı *Rhododendron sp.* özütü (sepal, petal ve tomurcuk etil asetat, sepal metanol, tomurcuk hekzan) hücre hatları üzerine istenilen konsantrasyonlarda eklenerek 24

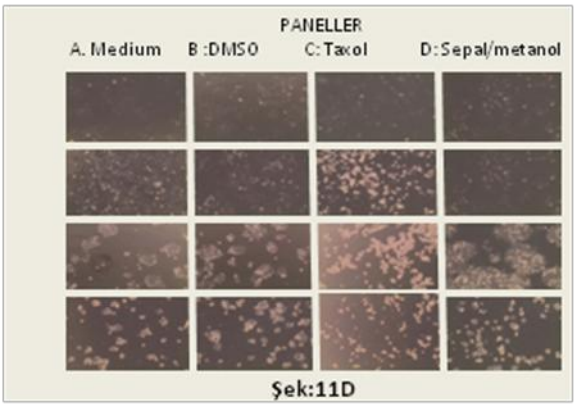
saat, 37^{o}C'de inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda inverted mikroskobu kullanılarak hücrelerdeki morfolojik değişiklikler değerlendirilmiş ve sonuçlar şekil 11'de sunulmuştur.

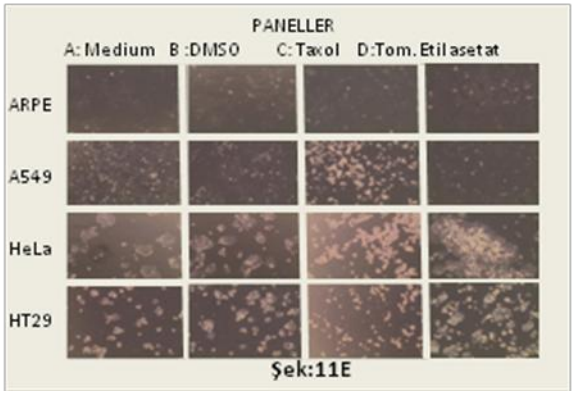
Çok iyi bir çözücü olarak bilinen DMSO'nun %0,8 altındaki seyreltik çözeltilerinin hücre hatlarında herhangi bir etkisi olmadığı bilindiğinden, çalışmamızda özütler için çözücü ve testler için negatif kontrol olarak DMSO kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan Taxol, kemoterapide kullanılan bir kanser ilacı olup *Taxus brevifolia* bitksinin kabuklarından doğal yolla elde edilmiş yarı sentetik bir ilaçtır (Erdemoğlu vd.,1999)











Şekil 11. ARPE,A549,HeLA ve HT29 Hücreleri Üzerindeki Morfolojik Değişimleri göstermektedir: DMSO(≤ %0.8), medium, Taxol(5 nM) **Şek.11A; panel D**: sepal etil asetat özütü (300µg/ml). **Şek.11B;panel D:** petal etil asetat özütü (400µg/ml). **Şek.11C;panel D** tomurcuk hekzan özütü (80µg/ml). **Şek.11D;panel D:** sepal metanol özütü (250µg/ml). **Şek.11E;Panel D:** sepal metanol özütü (150µg/ml). **Şek.11. Panel A:**Medium(negatif kontrol). **Şek11.PanelB DMSO** (negatif kontrol): **Şek11.Panel C taxol** (pozitif kontrol).(Olympus,10x objektif)

Şekil 11'de sunulan morfolojik sonuçlar değerlendirildiğinde negatif kontrollerin (DMSO, medium) hücreler üzerinde morfolojik değişikliklere neden olmadığı saptanmıştır (Şek.11 paneller A,B). Pozitif kontrol olarak Taxol'un 5nM konsantrasyonda kanser (A549,HeLa,HT29) hücrelerinde değişime sebebiyet vererek hücrelerin deadere olmalarına

yol açtığı görülürken, bu etkinin ARPE-19 normal hücrelerinde görülmediği tespit edilmiştir (Şek. 11(A,B,C,D,E.) panel C.

Çalışmada test edilen 5 farklı *Rhododendron luteum* özütünün (sepal etil asetat, petal etil asetat, tomurcuk hekzan, sepal metanol ve tomurcuk etil asetat) HT-29 kolon kanseri hücreleri üzerine morfolojik değişikliklere neden olarak, hücrelerin yüzeyden kopmalarına yol açmıştır (Şek.11. (A,B,C,D,E.) panel D. Bu özütlerden sadece sepal etil asetat özütünün 300µg/ml konsantrasyonda ARPE-19 normal hücreler üzerinde hafif bir etkisinin olduğu saptanırken, diğer özetlerin ARPE-19 hücereleri üzerinde morfolojik bir değişime neden olmadığı görülmüştür (Şekil11(A,B,C,D,E/ Panel D). Bunlara ilaveten kullanılan konsantrasyonlarda sepal etil asetat ve tomurcuk hekzan özütlerinin HeLa hücre hattı üzerinde morfolojik değişimlere neden olarak, hücrelerin deadere olmalarına neden olduğu gözlenmiştir (Şek 11(A,C/ Panel D).

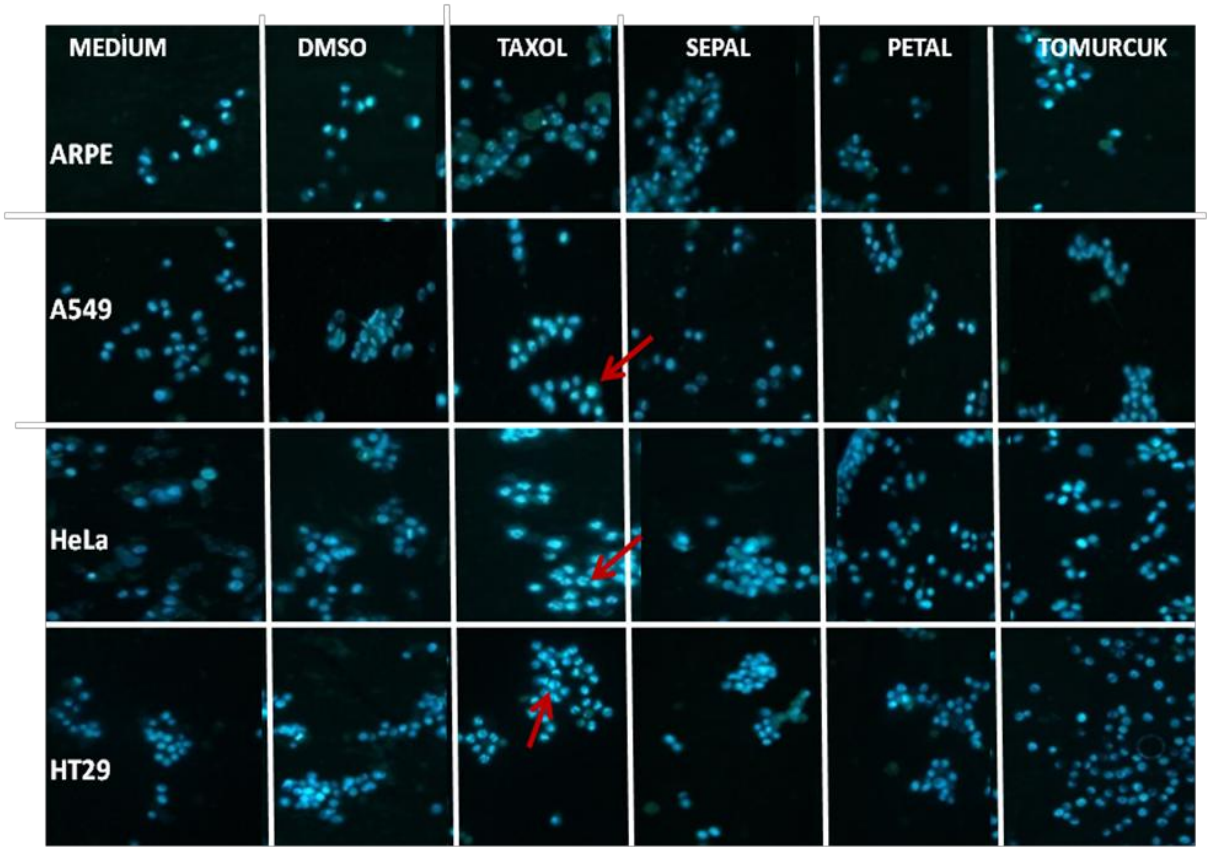
4.3. Apoptotik Değişimlere Ait Bulgular

Apoptoz çok hücreli canlılarda çeşitli dokularda ömür boyu devam eden fizyolojik bir olaydır. Bu olay sayesinde çok hücreli canlılarda homeostaziz dengeli bir şekilde sürdürülmüş olur. Yapılan birçok çalışma kanser hücrelerinin ölüme giderken apoptozis yolağını kullandıklarını göstermiştir (Wong vd., 2011). DNA fragmantasyonu apoptozun karakteristik özelliklerinden biri olup (Allen vd.,1997), çeşitli yöntemlerle analiz edilebilmektedir. Bu çalışmada, kullanılan maddelerin hücreler üzerindek apoptik etkilerini değerlendirebilmek için Floresans mikroskobu ve Agaroz Jel Elektroforezi yöntemleri kullanılmış, sonuçlar şekil 12 ve 13'te sunulmuştur.

4.3.1 Floresan mikroskobu

Özütlerin A549, HT29, HeLa ve ARPE hücre hatlarında neden olabileceği DNA fragmantasyonlarını belirleyebilmek için, transformed ve nontransformed hücreler *Rhododendron luteum* sepal (150ug/ml), petal(150ug/ml) ve tomurcuklarından (350ug/ml) elde edilen etil asetat özütleri ve kontrol maddeleri (DMSO, taxol, medium) ile 24 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda tripsinize edilen hücreler Hoechst 33342 (50ng/ml) boyası ile 25^0C 'de 5 dk. bekletilmiştir. Sonuçlar Leica floresan mikroskobunda incelenerek,

(LeicaLM4000B) ve yine LeicaDFC425 20X objektifle fotoğraflanmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde DMSO, medium ve *Rhododendron luteum* etil asetat özütlerinin kullanılan hücrelerin DNA'ları üzerinde fragmantasyonlara neden olmadığı belirlenmiştir. Fakat pozitif kontrol olarak kullanılan Taxol'un beklendiği gibi kanser hücrelerinde DNA fragmantasyonu neden olduğu tespit edilmiştir (Şek.12).

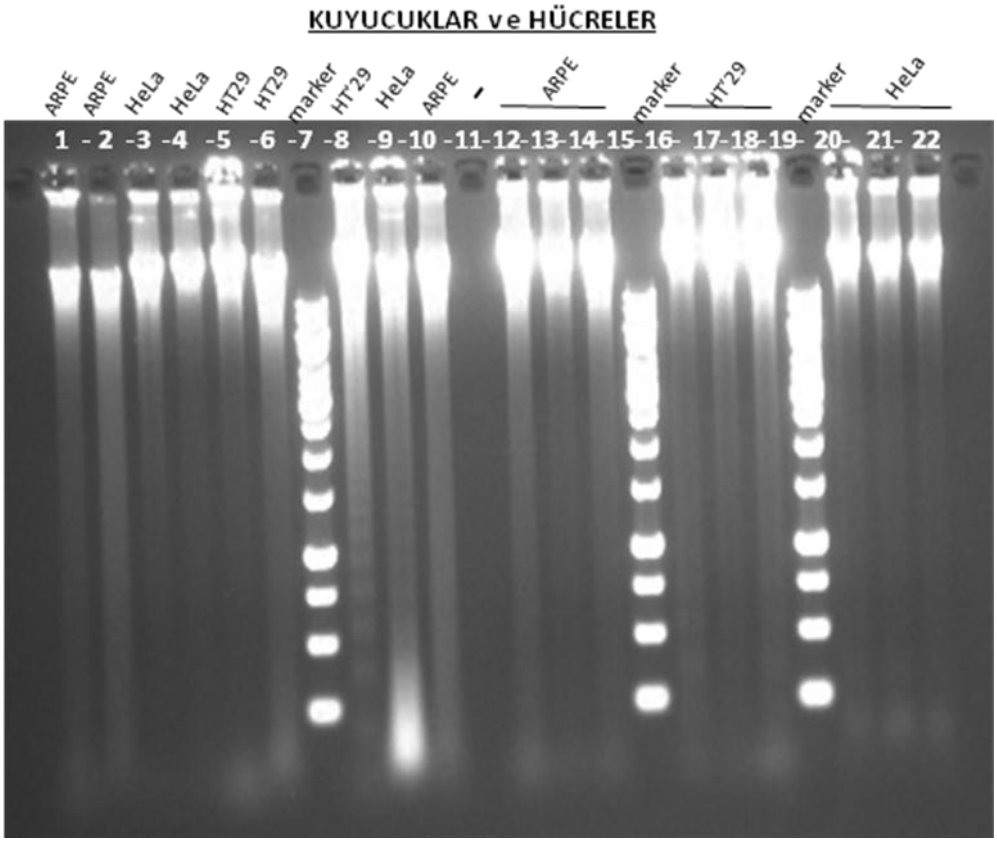


Şekil 12. Kontrol ve *Rhododendron luteum* özütlerinin (sepal, petal, tomurcuk) hücre dna'ları üzerindeki fragmantasyon etkileri hoechst 33342 boyası kullanılarak floresan mikroskobunda gösterilmesi

4.3.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Ayrıca *Rhododendron sp.* etil asetat özütlerinin HT29, HeLa ve ARPE-19 hücre hatlarında neden olabileceği DNA fragmantasyonları Agaroz Jel Elektroforezi yöntemi kullanılarak analiz edilmiş ve sonuçlar Şekil 13'te sunulmuştur. Kısaca; kontroller (DMSO, Taxol, medium) ve *Rhododendron luteum* etil asetat özütleri ile 48 saat inkübe edilen hücrelerden, WİZAR genomik DNA kiti kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Bunu takiben DNA örnekleri ve 1Kb DNA marker %1 jelde**,** 90 V'a elektroforez edilerek, oluşan DNA bantları değerlendirilmiştir. Şekil 13'te görüldüğü gibi negatif kontroller (DMSO, Medium) kendi başlarına kullanıldıklarında hücrelerin DNA'larında her hangi bir

fragmantasyona neden olmamıştır. Beklendiği gibi, pozitif kontrol olarak kullanılan Taxol (5nM), HeLa ve HT29 kanser hücre hattı DNA'larında fragmantasyona neden olmuştur. Yine beklendiği üzere, normal ARPE-19 hücre hattı DNA'sında fragmantasyon görülmemiştir (Şekil 13, kuyucuklar 8,9,10). Çalışmada, umulanın aksine, *Rhododendron luteum'*un sepal, petal ve tomurcuklardan elde edilen etil asetat özütleri (400µg/ml) kanser hücre DNA'larında fragmantasyona neden olmamıştır (şekil.13)



Şekil 13. garoz Jel Elektroforezi Sonuçlarını Göstermektedir
Kuyucuklarara eklenen maddeler: Medium (1-3-5), DMSO (2-4-6), Marker (7-15-19),Taxol (8-9-10), Petal etil asetat özütleri (12-16-17),Sepal etil asetat özütleri(13-17-21), Tomurcuk etil asetat özütleri(14-21,23).

Apoptozis deney sonuçları toplu halde değerlendirildiğinde; kullanılan *Rhododendron sp.* etil asetat özütlerinin kanser hücrelerini ölüme götürürken apoptozis yolağını indüklemediği düşünülmektedir. Bu durum, özütlerin kanser hücrelerinde ölüme neden olurken farklı ölüm yolaklarının indüklenmesine sebep olup olmadığı sorusunu akla getirmektedir.

Son yıllardaki bazı çalışmalar, bazı kimyasallar karşısında kanser hücrelerinin diğer bir hücre ölüm mekanizması olan otofaji (Autopphagy) yolağını kullanabildiklerini rapor etmişlerdir (Chen vd.,2011; Thorburn vd.,2014; Marinković vd., 2018). Buda bize

Rhododendron sp. özütleri ile muamele edilen hücrelerin ölüme giderken apoptozis yerine otofaji yolağını seçmiş olabileceğini düşündürmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Günümüzün en önemli sağlık problemlerinden biri olan kanser her yıl milyonlarca insanın ölümüne neden olmaktadır. 2008 WHO'nun Raporu'na göre; 2030 yılına gelindiğinde Dünya'da yaklaşık 26 milyon yeni kanser vakasının oluşacağı, bunlardan da 7.6 milyonun hayatını kaybedeceği öngörülmektedir (World Cancer Reporth. 2008). Kanser sistemik bir hastalık olup bütün vücudu yayıldığından en etkili tedavi yönteminin kimyasal tedavi olduğu düşünülmektedir. Fakat kemoterapide kullanılan ilaçların normal hücrelere de etkili olması ve daha da önemlisi kanserli hücrelerin zamanla bu ilaçlara direnç geliştirebilmesi (Housman vd.,2014; Liang vd.,2010; Sak K., 2012) bilim insanlarını hem daha az zararlı, hem de sadece kanser hücrelerini hedef alacak, özellikle bitkisel kökenli yeni ilaç ajanlarının araştırılmasına yönlendirmiştir.

Bitkilerin halk tıbbında kullanımı insanlık tarihi kadar eski olup, insanlar deneme yanılma yolu ile bitkilerin tedavi edici özelliklerini öğrenmiştir. Günümüzde bitkilerin kullanımı fitoterapi (bitkiler ile tedavi) adı altında kontrollü ve bilimsel veriler ışığında yapılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre yaklaşık 20.000 bitki tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır (Karık vd.,2016).Türkiye bitki çeşitliği bakımından zengin bir floraya sahip olmasına rağmen bunların kimyasal içerikleri ve tıbbi etkileri hakkında araştırmalar yok denecek kadar azdır. Ülkemizde ki tıbbi ve aromatik bitkilerin ağırlıklı bulunduğu bölgelerden birisi de Doğu Karadeniz Bölgesidir (Başer vd.,1998).

Proje kapsamında çalışılan *Rhododendron luteum* zehirli bir bitki olarak bilinir ve özellikle Karadeniz Bölgesi'nde deli bal hastalığına neden olur (Baytop vd.,1999; Onat vd., 1991;Sütlüpınar vd.,1993). Bu nedenle insan ve hayvanlar tarafından besin kaynağı olarak tercih edilmemektedir. Fakat her zehirli bitkinin bir ilaç olma potansiyelinin olabileceği düşünülmelidir. *Rhododendron*'un ülkemizde özellikle Karadeniz Bölgesi'nde yaygın olarak 5 türü yetişmektedir (Taşdemir vd.,2003). Bulardan *Rhododendron luteum ve Rhododendron ponticum* türlerinin halkımız tarafından inflamasyon, romatoik ağrılar ve anti-fungal tedavide kullanıldığı bildirilmiştir (Erdemoglua vd.,2008).

Rhododendron cinsi bitkiler genetik çeşitliliğe sahip olup, çok fazla sayıda sekonder metabolitler sentez edebilmektedirler (Jaiswal vd.,2012; Grimbs,vd.2017). 1990-2009 yılları arasında yapılan çalışmalarda *Rhododendron*'larda çoğunluğu flavonoidler ve diterpenoidler yapısında olan 208 sekonder metabolit tespit edilmiştir (Qianga vd.,2011). 2003, 2010 ve 2013 yıllarında yayınlanan üç makalede, *Rhododendron*'ların uçucu yağlar (Tasdemir vd.,2003; Innocenti vd 2010) ve flavonovidlerce zengin olduğu rapor edilmiştir (Dampc vd.,2013). Literatürde bitkilerden elde edilen uçucu yağların ve flavonovidlerin kanser dahil pek çok kronik hastalığın önlenmesinde etkili olabileceği yönünde pek çok yayına rastlanmaktadır (Seelinger vd.,2008; Middleton vd.,2000; Galati vd.,2004; Sak K.,2014). Pek çok araştırmacı farklı dokulardan elde edilen over, gastrik, servikal, kolon, akciğer, meme ve prostat kanser hücrelerinin farklı flavonoidlere hassasiyetlerinin farklılık gösterdiğini, bu maddelerin normal hücrelere etkisiz veya çok az etkisinin olduğunu saptamışlardır (Sak, K.,2014). Bunların yanı sıra, 2010 yılında yapılan bir çalışma *Rhododendron anthopogon*'dan elde edilen uçucu yağların anti-mikrobiyal, anti-fungal ve anti-kanser etkilerinin olduğunu rapor etmiştir (Innocenti vd 2010).

Rhododendron cinsi bitkisinin kimyasal zenginliği son yıllarda bilim insanlarının olduğu gibi bizimde ilgimizi çekmiş bulunmaktadır. Bu kapsamda çalışmada, Ayder ve çevresinden toplanan *Rhododendron luteum* çiçeklerinin farklı kısımlarından elde edilen özütlerin normal ve kanser hücre hatları üzerindeki anti-proliferatif etkileri in vitro olarak incelenmiştir. Literatür tarandığında, *Rhododendron* cinsi bitkilerinin antimikrobiyal ve antiproliferatif etkilerinin pek araştırılmamış olduğu görülmüştür. Yine yapılan çalışmalarda genelde bitkinin yaprak kısımlarının kullanıldığı saptanmıştır. Fakat yapılan çalışmalar, farklı türlerden elde edilen molekülerin farklılığı yanında, aynı türün farklı kısımlarından elde edilen komponentlerin de faklı olabileceğini göstermiştir (Taşdemir vd., 2003; Grimbs vd.,2017).

Çalışmada, *Rhododendron luteum* tıbbi açıdan bir öneminin olup olmadığının açığa çıkarılması hedeflenmiş olup ilk olarak *Rhododendron luteum* sepallerinden elde edilen özütlerinin transformed (HeLa, A549, HT29 ve CRL2923) ve non-trasformed(ARPE-19) insan hücre hatları üzerindeki anti-proliferatif etkileri kolorimetrik bir yöntem olan MTT metodu ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar, sepal hekzan ve sepal sulu özütlerinin bütün hücreler üzerinde doza bağlı antiproliferatif etkili olduğunu, sitotoksisite açısından nontransformed ve transformed hücreler arasında istatistiksel olarak bir farklılık olmadığı gösterilmiştir (Şek.3,4,5).

Sepallerden elde edilen metanol özütü ise yüksek konsantrasyonda (400ug/ml) HeLa ve HT29 hücrelerinde sitotoksik etkili bulunurken non-tranformed ARPE-19 hücrelerinde hiçbir antiproliferatif etki göstermemiştir (Şek.1). Özütün normal hücrelerde etkisiz, kanser hücrelerinde (HeLa, HT29) etkili bulunması önemli olup, etkinin antitümoral olup olmadığının tespiti için detaylı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulduğu kanısındayız. Buna ilaveten, özütün A549 ve CRL-2923 kanser hücreleri üzerinde inhibisyon etkisinin olmaması, etkinin kanser hücreleri için seçici bir gösterge olabileceğini düşündürmektedir (Şek.1).

Rhodendrom spallerından elde edilen etil asetat özütü doza bağlı olarak, yüksek konsantrasyonlarda nontrasformed ve transformed hücrelerde büyüme inhibisyonuna neden olmuştur. Konsantrasyonlar 177,7-118,5µg aralığına düşürüldüğünde antiproliferatif etkinin sadece HT-29 ve A549 hücreleri üzerinde devam ettiği, bu konsantrasyonlarda HT29 hücrelerinin sırasıyla %78,77ve %62,34'nı, A549 hücrelerinin ise, sırasıyla %60,42 ve 40,01'nı inhibe ettiği bulunmuştur (Şek.2). Bu konsantrasyonlarda transformed HT-29 ve A549 hücreleri ile nontransformed ARPE-19 arasında ki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Ayrıca hesaplanan IC_{50} değerlerinde en düşük veri 133µg/ml ile HT-29 hücrelerinde tespit edilmiştir (Tab.6). Bu sonuçlar, özütün HT-29 hücreleri üzerinde seçici sitotoksik bir aktivitesinin olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde, *Rhododendron* cinsi bitkilerin farklı kısımlarından elde edilen fraksiyonların farklı kanser hücre hatları üzerinde seçici etkilerinin olabileceği rapor edilmiştir (Popescu vd.,2013). 2012 'de yapılan bir çalışmada, *Rhododendron'*un yapraklarından elde edilen ve bir flavonol olan Hyperin'in insan endometrium kanser hücre (RL952) hattında Ca^{+2} salınmasını tetikleyerek mitokondriyal apoptos yolağını aktive ettiği gösterilmiştir **(**Li, Fu-Rong vd.,2012).

İkinci grup özüt olarak; *Rhododendron luteum*'un petallerinden elde edilen hekzan ve etil asetat özütlerinin hücreler üzerindeki antiproliferatif etkileri araştırılmıştır. Hekzan özütünün yüksek konsantrasyonlarda (500-250 µg/ml) bütün hücrelerde sitotoksik aktiviteye sahip olduğu, fakat en fazla büyüme inhibisyonunu HeLa hücrelerinde yaptığı görülmüştür (Şek.7). 800µg/ml' de bütün hücrelerde sitotoksik etkili olan etil asetat özütü ise, 533,5 ve 355,5 µg/ml dozlarda en fazla etkiyi HT-29 hücrelerinde üzerinde göstererek sırasıyla %65,67 ve %41,99 hücre bölünme inhibisyonuna neden olmuştur (Şek.6). Yapılan istatistiksel analiz sonucunda sadece HT-29 ve ARPE-19 hücreleri arasında gözlenen farklılıkların $p<0.05$ seviyesinde anlamlı olduğu bulunmuştur. Bu sonuç, HT-29 hücrelerinin bu özüte daha hassas

olduğunu göstermektedir ve bunun sipesifik ant-tümoral bir etki olup olmadığının tespiti için detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulduğu kanısındayız. 2011'de yapılan bir çalışmada *R. ferrugineum* cinsinin yapraklarında elde etikleri 3 farklı yeni komponentin (Ferruginenes A-B-C) transformed (HT-60, HeLa-S3,MCF-7) ve non-trasformed (HEK-293) hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerine araştırmışlar ve HL-60 hücrelerinin bu maddelere daha hassas olduğunu bulmuşlardır (Seephonkai,vd., 2011). Yine Gabbriella ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada, *Rhododendron anthopogon*'nun yaprak ve çiçeklerinden elde ettikleri uçucu yağ özütlerinin etkilerini insan adenocarcinoma hücre hatları olan ; Ovarian-2008, LoLo-kolon ve cervix A-143 üzerinde test ettiklerinde, Cervix adenocarcinoma hücre hattının bu özütlere daha hassas olduğunu göstermişlerdir (Innocenti,vd.,2010). Çalışma sonuçları literatürde ki bulgularla paralellik göstermiş olup, bitkilerden elde edilen total özütlerin veya elde edilen komponetlerin farklı kökenden gelen kanser hücreleri üzerinde sitotoksik açıdan farklı etkilerinin olabileceğini ortaya koymuş bulunmaktadır.

Çalışmada üçüncü grup özüt olarak *Rhododendron luteum*'un tomurcuk kısmınlarından elde edilen hekzan metanol ve etil asetat özütleri kullanılmıştır. Tomurcuk hekzan özütünün ARPE-19, HT29 ve A549 hücreleri üzerinde sitotoksik bir etkisi saptanmadı fakat HeLa ve CRL2923 kanser hücrelerinde çok hafif antiproliferatif etkili olduğu tespit edildi (Şek.10). Bu çalışmada ilginç olan bir bulgu, hekzan özütünün özellikle nontransformed ARPE-19 hücrelerinin proliferasyonunu situmule etmesidir. Bu sonuç önemli olup yeni ve kapsamlı çalışmalarla doğrulanmaya ihtiyaç duymaktadır. Proliferasyona neden olabilecek komponent/komponetler belirlenebilirse bilimsel anlamda çok önemli bir verinin elde edilmiş olacağı düşünülmektedir. İnsan vücudunda bulunan kas ve sinir hücreleri gibi bazı hücreler ya hiç bölünmemekte ya da çok yavaş bölünebilmektedir. Hücrelerde bu tip defektleri giderebilecek mitojen aktivitesi olan bir komponentin bulunup, hücreler üzerinde olumlu sonuç vermesi durumunda tıp alanında önemli bir açığın tamamlanacağı kanısındayız. Ayrıca, böyle bir maddenin keşfi ve uygulamaya konması durumunda, bunun ülke ekonomisine katkısının büyük olacağı düşünülmektedir.

Tomurcuk metanol özütü bütün kanser hücreleri üzerinde doza bağlı sitotoksik bir etki göstermiş olup (Şek.8), 400µg/ml' de yapılan istatistiksel analizde ARPE-19 ile transformed (A549, HT-29, HeLa) hücreleri arasındaki farklılıklar anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Doza bağlı hücre inhibisyonu gösteren tomurcuk etil asetat özütünün(Şek.9) 118,5µg/ml de yapılan istatistiksel değerlendirme sonuçları, nontransformed ARPE-19 hücreleri ile transformed HeLa, A549, HT-29 hücreleri arasında ki farklılıkların ($p<0.05$) seviyesinde anlamlı olduğunu göstermiştir. Çalışmada saptanan IC_{50} değerleri kontrol ARPE-19 hücreleri için 366,65µg/ml olarak hesaplanırken en hassas hücre hattı olarak tespit edilen HT29 kolon kanser hücreleri için bu değer 159,94µg/ml olarak hesaplanmıştır (Tab.13). Ayrıca bu veriler kullanılarak hesaplanan SI(selektif indeks) değeri en yüksek HT29 hücreleri için 2.29 olarak tespit edildilmiştir. Literatür, SI (selektif indeks) 3 ve üzeri bir değer olarak saptanırsa bunun antikanser potansiyel açıdan önemli olabileceği vurgulamaktadır (Bézivin vd.2003). Çalışmada elde ettiğimiz 2.29 SI değerini önemsiyoruz çünkü çalışmada *Rhododendron'*un total özütü kullanılmış olup kimyasal içerik analizi yapılmamıştır. Kabul edileceği gibi total özütte binlerce farklı komponent bulunabilmekte ve bunların birbirleriyle sinerjik veya antogonist etkileşimleri olabilmektedir. Ayrıca Özütteki komponentleri bilemediğimizden, hangi etken maddenin antitümoral etkiye neden olduğu konusunda bir değerlendirme yapılamamaktadır.

Çalışmanın genel bir değerlendirilmesi yapıldığında, özellikle *Rhododendron luteum*'un etil asetat özütlerinin HT29 kolon kanseri hücreleri üzerinde seçici bir etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Buna karşın, hekzan özütlerinin Hela hücrelerinde daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Metanol özütü ise daha geniş bir spektrumda kanser hücreleri üzerinde etkili olabilmiştir. Çalışma sonuçları literatürde yapılan çalışmalarla paralellik göstermekte olup, Tzongve arkadaşları *Rhododendrom formosanum* yapraklarından elde ettikleri etil asetat, n-butanol ve su fraksiyonlarını non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) hücre hatları üzerinde denediklerinde, özellikle etil asetat fraksiyonlarının NSCLC hücrelerinde antineoplastik etki göstererek apoptozisi tetiklediğini göstermişlerdir (Tzong–der vd., 2014). Aynı araştırmacı grubu 2015'te yayınladığı diğer bir makalede, *Rhododendrom formosanum* yapraklarından isole ettikleri cinnamtannin D1 (CNT D1) adlı bir maddenin NSCLC hücrelerini G1 fazında bloke ederek, hücreleri diğer bir hücre ölüm yolağı olan autophagye götürdüğünü tespit etmişlerdir (Tzong–der vd.,2015). 2016 yılında Selim ve ark. *Rhododendron luteum'*un çiçeklerinden elde ettikleri özütün MCF-7, HepG2,WiDr ve Fibrolblast hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkilerini araştırdıklarında, özütün HepG2 (Karaciğer kanser hücreleri) ve WiDr(kolon kanseri) üzerinde secici etkisinin olduğunu göstermişlerdir (Demir vd.,2016).

Çalışmamızdaki apoptozisi test etmek için kullanılan floresan ve elektroforez deney sonuçları *Rhododendron luteum'*um etil asetat özütlerinin DNA fragmentasyonunu neden olmadığını göstermiştir (Şek12,13). Son yıllardaki bazı çalışmalar bazı kimyasallar karşısında kanser hücrelerinin diğer bir hücre ölüm mekanizması olan otofajiyi (Autopphagy) kullanabildiklerini göstermişlerdir (Chen vd.,2011; Thorburn vd.,2014; Marinković vd., 2018). Buda *Rhododendron* özütleri ile muamele edilen hücrelerin ölüme giderken apoptozis yerine otofaji yolağını mı seçtiği sorusunu akla getirmektedir. Bunu anlaşılabilmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulduğu kanısındayız. Otofajinın apoptozisten bir farkı hücre ölüme giderken DNA fragmentasyona sebebiyet vermemesidir (Coşkun vd.,2011). Sonyıllarda ki çalışmaların üzerinde önemle durdukları konulardan birisi, gelecekte otofaji yolağının kanser tedavisinde kullanılabilecek önemli mekanizmalardan birisi olabileceği yönündedir (Mathew vd.,2007;Turcotte vd.,2010).

SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmada; nontrasformed(ARPE-19) ve transfrormed(HeLA,A549,CRL29,HT29) hücre hatlarında *Rhododendron luteum*'un etil asetat, metanol, hekzan veya sulu özütlerinin antiproliferatif etkileri araştırılmıştır. Etil asetat özütünün HT29 kolon kanseri üzerinde seçici bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca hekzan özütünün HeLa (servikal kanser hücre hattı) hücrelerinde hücre çoğalmasını diğer kanser hücreleriyle kıyaslandığında daha fazla inhibe ettiği bulunmuştur. Metanol özütü ise genelde kullanılan kanser hücrelerinde aynı seviyede etki göstermiştir. Bu sonuçlar, farklı solventlerle elde edilmiş özüt komponentlerinin farklı olabileceğini ve bunların farklı kanser kökeninden gelen hücre hatlarında etkilerinin farklı olabileceğini göstermektedir. Bunun tam olarak açığa çıkarılabilmesi için özütlerin içeriğindeki komponentlerin belirlenip, yukarıda belirtilen hücreler arasında ki farklılıklarda rol alabilecek etken madde/maddelerin tespit edilerek, farklı kökenden gelen kanser hücreleri üzerindeki biyolojik etkilerinin araştırılması önerilmektedir. Bunlara ek olarak çalışmada; *Rhododendron* tomurcuk hekzan özütünün normal ARPE-19 hücrelerinde hücre proliferasyonunu önemli derece artırmış olduğu gözlenirken, bu etki diğer hiçbir kanser hücresinde tespit edilememiştir. Biz bu sonucun önemli olabileceğini düşünüyoruz ve bu özütle ilgili çalışmaların sürdürülerek, özüt içeriğinde mitojenik aktiviteye sahip bir maddenin olup olmadığını belirlenmesi, varsa bunun biyolojik etkilerinin araştırılmasını tavsiye etmekteyiz.

KAYNAKLAR

Allen, R.T., William,J.H. and Devendra, I.L.,1997. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. Medical Microbiology and Immunology, 37(4):215-228.

Anestopoulos, D.Z.I.,Hanafi, R.,Voulgaridou, G.P. and Mihalis, A.P.,2012.I. Panayiotidis Pleiotrophic effects of natural products in ROS-induced carcinogenesis I: The role of plant-derived natural products in oral cancer chemoprevention. Cancer Letters, 327,16–25.

Arnold, L. D. and Preeti,V.,2011.Natural products for cancer chemotherapy. Microbial Biotechnology,4(6):687-699.

Ashis, K., Basu,M. S., Sakar,N. and Ghosh,A. C.,2001. Advances in cancer therapy with plant based natural- products.Current Medicinal Chemistry, 8(12):1467-86.

Başer, H.C.,1998. Tıbbi ve aromatik bitkilerin endüstriyel kullanımı TAB Bülteni 13(14):19-43.

Baytop T. (1999). Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, Nobel Tıp Basımevi, Istanbul, Turkiye 275.

Bézivin,C. S., Tomasi, F., Lohézic-Le Dévéhat, and Boustie,J.2003. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. Phytomedicine, 10, 499–503

Butt, M.S., Sultan, M.T.and Iqba J., 2009. Garlic: nature's protection against physiological threats,Crit. Rev. Food. Sci. Nutr, 49, 538–551.

Chen, N. and Karantza1,V., 2011. Bioscience autophagy as a therapeutic target in cancer.Cancer Biology & Therapy, 11(2): 157-168.

Coşkun, G ve Özgür, H.,2011. Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması.
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Adana Arşiv 20: 145.

Cragg, G.M, Boyd, M.R., Cardellina, J.H., Newman, D.J., Snader, K.M. and McCloud, T.G.,1994. Ethnobotany and drug discovery: the experience of the US National Cancer Institute. Ciba Found Symp,185,178–190.

Cragg, G. M. and Newman, D. J., 2005. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. Pure Appl. Chem,77(1): 7–24.

Dampc, A., Luczkiewicz., M. 2013. *Rhododendron tomentosum* (Ledum palustre). A review oftraditional use based on current research Fitoterapia, 85, 130–143.

Davis, PH., (ed).,1965-1985. Flora of Turkey and the East Aegean Islands.vol.1-9 Edinburgh: University Press.

Demir, S., Turan, I., Aliyazicioglu, Y.2016.. Selective cytotoxic effect of *Rhododendron luteum* extract on human colon and liver cancer cells JBUON, 21(4): 883-888.

Erdemoğlu, N.ve Şener, B.,1999. Taksol ve türevlerinin biyosentezi.
(the bıosynthesıs of taxol and derıvatıves). Ankara ecz. fak. Derg,28(2):99-116.

Erdemoglua,N., Kupeli,E.A., Yesilad.E., Calıs.I., 2008. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory and antinociceptive principles from a folk remedy, *Rhododendron ponticum* L. leaves. Journal of Ethnopharmacology, 119, 172–178.

Fabricant, D. S. and Farnsworth, N. R.,2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. Environmental Health Perspectives, 109, 69-75.

Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bıngel A.S., Soejarto D.D.and Zhengang G. Z.,1985. Medicinal plants in therapy. Bulletin of the World Health Organization, 63(6):965-981.

Feng, Y., Wang, N., Meifen, Z, Feng,Y, Li, H. and Tsao, S., 2011. Recent progress on anticancer candidates in patents of herbal medicinal products. Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture,3, 30-40.

Galatı, G. and O'brıenpotentıa,P. J. 2004. Toxıcıty of flavonoıds and other dıetaryphenolıcs: sıgnıfıcance for theır chemopreventıve and antıcancer propertıes. Free Radical Biology & Medicine, 37(3): 287 – 303, Doi:10.1016/J.Freeradbiomed..04.034/0.

Grimbs, A., Shrestha.A., Rezk. A.S. D., Grimbs.S., Said.I.H., Schepker.H., Hütt.M., Albach.D.C., Brix.K., Kuhnert.N and Ullrich.M.S., 2017. Bioactivity in *Rhododendron*: A systemic analysis of antimicrobialand cytotoxic activities and theirphylogenetic and hytochemical origins. Original Research,8,1-16.doi: 10.3389/fpls..00551.

Gunduz, A., Bostan. H.and Turedi, S., 2007. Wild flowers and mad honey. Wilderness and Environmental Medicine,18,69–71.

Haydaroglu, A.,2007. Ege Üniversitesi'nde kanser kayıt analizleri: 34134 Olgunun değerlendirmesi. Türk Onkoloji Dergisi, 22 (1):22-28.

Housman, G., Byler, S., Heerboth, Sarah., Lapinska, K., Longacre, M., Snyde,N. and Sarkar, S., 2014. Drug resistance in cancer: An Overview Cancers, *6*, 1769-1792.

Innocenti, G., Acqua, S. D., Scialino,G., Banfi, E., Sosa, S., and Carrara, M 2010.Chemical composition and biological properties of*Rhododendron anthopogon* essential oil. Molecules,15,2326-2338; doi:10.3390/molecules15042326.

Jaiswal, R., Jayasinghe, L.and Kuhnert N. 2012. Identification and characterization of proanthocyanidins of 16 members of the Rhododendron genus (Ericaceae) by tandem LC-MS. J Mass Spectrom, 47(4):502-15. doi: 10.1002/jms.2954.

Karık, Ü., Oğur, E.ve Çiçek, F. 2016.Türkiye tıbbi ve aromatik bitkiler genetik kaynakları. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Menemen - İzmir / Turkey. Anadolu, J. of AARI 26 (1): 62 – 71.

Kayaalp, S.O.,2009. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji Ankara, 315.

Li, Fu-Rong., Yu, Feng-X., Yao, S.T., Si, Y.H. and Gao, W.Z. L., 2012. hyperin extracted from manchurian rhododendron leaf ınduces apoptosis in human endometrial cancer cells through a mitochondrial pathway**.** Pacific Journal of Cancer Prevention, 13, 3653-3656.

Liang, Xing-Jie., Chen, C., Zhao, Y. and Wang, P C. 2010. Circumventing tumor resistance to chemotherapy by nanotechnology. Methods Mol Biol. 596, 467–488. doi:10.1007/978-1-60761-416-6_21.

Lin,Chi-Yang,, Lin, Lei-Chen,, Ho, Shang-Tse., Tung, Yu-Tang., Tseng, Yen-Hsueh. and Wu, Jyh-Horng.,2014. Antioxidant activities and phytochemicals of leaf extracts from 10 native *rhododendron* species in taiwan. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 1- 9.

Marinković,, Šprun, M., Buljubašić,M. and Novak, I. 2018.Autophagy modulation in cancer.CurrentKnowledgeonActionand Therapy. pageshttps://doi.org/10.1155/2018/8023821.

Mathew, R,, Karantza-Wadsworth V., White, E., 2007.Role of autophagy in cancer. Nat Rev Cancer,7,961–967.

Middleton, E. Jr., Kandaswamı, C.and Theoharıdes, T. C.,2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells:ımplications for ınflammation, heart disease,and cancer Pharmacologıcal Revıews.American Society For Pharmacology and Experimental Therapeutics. (Pharmacol Rev), 52,673–751.

Mossmann, T., 1983.Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of İmmunological Methods, 65,55-63.

Muslu, G.K. ve Öztürk C., 2008.Tamamlayıcı ve alternatif tedaviler ve çocuklarda kullanımı. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 51, 62-67.

Newman, G.M., Snader,, D.J., K.M., 1997. Natural products in drugdiscovery and development. J Nat Prod, 60,52–60 .

Newman,D.J.,Cragga, G. M. and Snader, K. M., 2000.The influence of natural products upon drug discovery. This journal is The Royal Society of Chemistry Nat. Prod. Rep, 17, 215–234.

Nobili, S., Lippi, D., Witortc, E., Donninic, M., Bausi, L., Minia, E. and Capacciolic,S., 2009. Natural compounds for cancer treatment and prevention. Pharmacological Research, 59, 365–378.

Onat F. Y., Yegen B. C., Lawrence R., Oktay A., and miste ve Bugün (Therapy with Medicinal Plants in Oktay S. (1991). Mad honey poisoning in man and rat. Nobel Tıp Bası Evi No:9- Turkiye

Popescu, R. and Kopp B., 2013.The genus Rhododendron: An Ethnopharmacological and toxicological review. Journal of Ethnopharmacology, 147,42–62.

Qianga, Y., Zhoub, B., and Gao, K. 2011. Chemical constituents of plants from the genus Rhododendron. Chemıstry & Biodiversity, 8, 792-815.

Rahman,M.A.,Amin, Ruhul,A.R.M.and Shin, D. M. 2010. Chemopreventive potential of natural compounds in head and neck. Cancer Nutrition and Cancer, 62(7): 973–987.

Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Dairesi Başkanlığının 6-10-1993 tarih 681 sayılı yazısı.

Sak,K.2012. Chemotherapy and Dietary Phytochemical Agents. Hindawi Publishing Corporation Chemotherapy Research and Practice, 1-11 doi:10.1155/2012/282570.

Sak, K.,2014. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. Pharmacogn Rev. 8,(16): 122–146.

Seelinger,G., Merfort, I., Wölfle, U. and Schempp,C. M., 2008, Anti-carcinogenic effects ofthe flavonoid luteolin. Molecules, 13, 2628-2651; DOI: 10.3390/molecules13102628ICER0

Seephonkai, P.,Popescu,R.,Zehl,M.,Krupitza,G.,Urban,E., and Kopp,B., 2011. Ferruginenes A-Cfrom Rhododendron ferrugineum and theircytotoxicevalua- tion. Journalof Natural Products, 74,712–717.

Srivastava,V., Singh, A., Kumar,N. J. K. M., Gupta, M. and Suman P. S., 2005. Khanuja Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads Bioorganic & Medicinal Chemistry, 13, 5892-5980.

Sütlüpınar N., Mat A., and Satganoglu Y. 1993. Poisoning by toxic honey in Turkey. Arch. Toxicol, 67(2):148-50.

Suze ,A., Zonne, J. I. K., Hofman, Ie., Kappen, F. P. M., Marcel., A. Stary-Weinzinger. A. G., van der, H.,2012. Grayanotoxin Poisoning: 'Mad Honey Disease' and Beyond. Cardiovasc. Toxicol, 12,208–215.

Taşdemir, D., Demirci,B., Demirci, F.,Dönmez ,A. A., Baser, C. K. H. and Rüedia, Peter.,2003.Analysis of the volatile components of five turkish *rhododendron* species by headspace solid-phase microextraction and GC-MS (HS-SPME-GC- MS). Z. Naturforsch, 58, 797-803.

Taşdemir, D., Brun,R., Perozzo, R. and Dönmez, A. A., 2005. Short Communıcatıon Evaluation of antiprotozoal and plasmodial enoyl-acp reductase ınhibition potential of turkish medicinal plants. Phytotherapy Research,19, 162–166.

Thorburn, A., Douglas H., Thamm. and Daniel L. Gustafson., 2014.Autophagy and Cancer Therapy.Molecular Pharmacology, 85,830–838.

Turcotte .S. and Giaccia, A. 2010. Targeting cancer cells through autophagy for anticancer therapy.Curr Opin Cell Biol. 22(2): 246–251.

Tzong-Der, Way. Tsai, Shang-Jie., Wang, Chao-Min., Ho, Chi-Tang. and Chou, Chang-Hung. 2014. Chemical constituents of rhododendron formosanum show pronounced growth ınhibitory effect on non-small-cell lung carcinoma cells. Journal of Agrıcultural and Food Chemıstry, 62, 875-884.

Tzong-Der, Way., Tsai Shang-Jie., Wang Chao-Min., Jhan, Yun-Lian., Ho,Chi-Tang.and Chou.Chang-Hung.2015.Cinnamtannin D1 from Rhododendron formosanum ınducesautophagy via the ınhibition of Akt/mTOR and activation of ERK1/2in Non-Small-cell lung carcinoma cells. journalof Agrıcultural and Food Chemıstry,63,10407-10417

Wall, M.E. and Wani, M.C.,1996. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. J Ethnopharmacol 51,239–254.

Wong,.R.S.Y. 2011., Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment Wong Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 30(87):1-14.

World Health Organization. (World Cancer Reporth. 2008.

Zhou,Y., Jie, X. J., Xing,C., Zhang, D., 2004. Anticancer activity and mechanism of Scutellaria barbata extract on human lung cancer cell line A549. Life Sciences.75(18):2233-2244.