

T.C.
ERZİNCAN BİNALI YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MELİSSA OFFİCİNALİS BİTKİ EKSTRESİ VE OSİMERTİNİBİN KÜÇÜK
HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTI ÜZERİNDE SİNERJİK
ANTİKANSER ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Esra Tuba SEZGİN

Danışman: Prof. Dr. Murat ÇANKAYA

TEZ JÜRİ ÜYELERİ

Prof. Dr. Murat ÇANKAYA

Prof. Dr. Deniz EKİNCİ

Prof. Dr. Esra DİLEK

Doç. Dr. Mehmet KUZUCU

Doç. Dr. Aykut ÖZGÜR

DOKTOR TEZİ

ERZİNCAN, 2025

© 2025 [Esra Tuba SEZGİN]. Tüm hakları saklıdır.

Kabul ve Onay Sayfası

Prof. Dr. Murat ÇANKAYA danışmanlığında, Esra Tuba SEZGİN tarafından hazırlanan bu çalışma 11/06/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Bilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak kabul oybirliği ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Murat ÇANKAYA İmza:

Üye : Prof. Dr. Deniz EKİNCİ İmza:

Üye : Prof. Dr. Esra DİLEK İmza:

Üye : Doç. Dr. Mehmet KUZUCU İmza:

Üye : Doç. Dr. Aykut ÖZGÜR İmza:

Yukarıdaki Doktora Tezi Enstitü Yönetim Kurulunun / / 2025 tarih ve/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. Kemal Volkan ÖZDOKUR
Enstitü Müdür V.

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, şekil ve tabloların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

Bilimsel Etiğe Uygunluk Sayfası

“*Melissa officinalis* Bitki Ekstresi ve Osimertinibin Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hattı Üzerinde Sinerjik Antikanser Etkilerinin İncelenmesi” isimli “Doktora” tezim tarafımca intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir biçimde elde edildiğini; aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiğı gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim. 11/06/2025

(İmza)

Esra Tuba SEZGİN

ÖZET

MELİSSA OFFİCİNALİS BİTKİ EKSTRESİ VE OSİMERTİNİBİN KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTI ÜZERİNDE SİNERJİK ANTİKANSER ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Esra Tuba SEZGİN

Doktora Tezi, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Murat ÇANKAYA

2025, 67 sayfa

Kanser dünya çapında farklı türleri ile pek çok insanı etkileyen ve prognozunun genelleştirilmesi çok zor olan en önemli hastalıkların başında gelmektedir. Tedavide yeni nesil ilaçların geliştirilmesi ve cerrahi alandaki yenilikler hastaların yaşam sürelerini önemli ölçüde uzatmaktadır. İlaçlara karşı oluşan içsel ve dışsal direnç tedavinin önündeki en büyük engeli teşkil etmektedir. Akciğer kanserinde görülen kemorezistans da hastalığın nüks etmesine neden olup sağkalım oranlarını düşürmektedir. Kemorezistansa karşı yapılan çalışmalar bazı fitokimyasalların kanser hücrelerinin ilaç direncini aşabileceğine dair birçok kanıt sunmaktadır. Daha az yan etkiye sahip olmaları nedeniyle bitkisel ürünler, kanser tedavisinde giderek daha fazla ilgi görmektedir. Osimertinib oral olarak kullanılan, üçüncü nesil, geri dönüşsüz bir epidermal büyüme reseptörü tirozin kinaz inhibitörüdür. Epidermal Büyüme Reseptörü aktive edici mutasyonlardan olan T790M direnç mutasyonlarını seçici olarak inhibe etmektedir. *Melissa officinalis* (*M. officinalis*) bitkisi düşük toksisitesi sayesinde çeşitli kanser türlerinin ve birçok kronik hastalığın uzun vadeli tedavisinde yardımcı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bitkinin esansiyel yağının ve ekstraktlarının antikanser ve antiproliferatif özellikleri pek çok insan kanser hücre hattında çalışılıp, anlamlı sonuçlar alınmıştır. Tez kapsamında *in vitro* şartlarda Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri hücreleri üzerinde *M. Officinalis*'in su ve metanol ekstresi ile osimertinibin sinerjik etkisi araştırılmıştır. Denemesi yapılan tüm dozlarda antagonizm belirlenmiş olup Compusyn Programı aracılığıyla en yüksek CI değeri 3031,44 olarak, *M. Officinalis*'in Metanol ekstraktı-osimertinib kombinasyonunun, sırasıyla 50 µg/ml- 50 nM dozlarında 48 saat inkübasyon sonrasında belirlenmiştir. En yüksek antagonistik bir etki belirlenen bu kombinasyonda bazı apoptotik ve pro-apoptotik genlerin

ifade seviyeleri incelenerek kombinasyonel etkinin hangi metabolik etkileri olduğu kısmen ortaya koyulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, kemorezistans, *M. officinalis*, osimertinib

ABSTRACT

INVESTIGATION OF SYNERGISTIC ANTICANCER EFFECTS OF MELISSA OFFICINALIS PLANT EXTRACT AND OSIMERTINIB ON NON-SMALL CELL LUNG CANCER CELL LINE

Esra Tuba SEZGİN

Master's Thesis, Erzincan Binali Yıldırım University, Institute of Science and
Technology,
Department of Biology

Advisor: Prof. Dr. Murat ÇANKAYA

2025, 67 pages

Cancer ranks among the most significant diseases worldwide, affecting millions of people through its various forms and presenting a prognosis that is difficult to generalize. Innovations in surgical approaches and the development of next-generation therapeutics have markedly extended patient survival times. However, intrinsic and acquired resistance to drugs remains one of the major obstacles in cancer treatment. In lung cancer, chemoresistance contributes to disease recurrence and reduced survival rates. Studies addressing chemoresistance have provided substantial evidence suggesting that certain phytochemicals can overcome drug resistance in cancer cells. Due to their relatively low side-effect profiles, plant-derived compounds are receiving growing interest as adjuncts in cancer therapy. Osimertinib is an orally administered, third-generation, irreversible epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor (TKI) that selectively targets the T790M resistance mutation, one of the common activating mutations of EGFR. *Melissa officinalis* (*M. officinalis*), owing to its low toxicity, has been widely employed as an adjunct in the long-term treatment of various cancer types and chronic diseases. Numerous studies have demonstrated the anticancer and antiproliferative properties of its essential oil and extracts on various human cancer cell lines, yielding significant findings. This thesis investigated the synergistic effect of aqueous and methanolic extracts of *M. officinalis* in combination with osimertinib on non-small cell lung cancer (NSCLC) cells under in vitro conditions. Across all tested doses, antagonism was observed. The highest Combination Index (CI) value was calculated as 3031.44 using the Compusyn software, determined at a 48-hour incubation with 50 µg/ml of methanolic extract

of *M. officinalis* and 50 nM of osimertinib. In this most antagonistic combination, the expression levels of certain apoptotic and pro-apoptotic genes were examined, partially elucidating the metabolic mechanisms underlying the observed combinatorial effects.

Keywords: Lung cancer, chemoresistant, *M. officinalis*, osimertinib

TEŞEKKÜR

Doktora sürecim boyunca manevi desteğini, bilgi ve tecrübelerini hiçbir zaman eksik etmeyen, her koşulda yanımda olan çok kıymetli danışman hocam sayın Prof. Dr. Murat ÇANKAYA'ya teşekkürlerimi sunarım. Doktora çalışmalarım boyunca hem ders hem tez aşamamda çok şey öğrendiğim; bilgi ve deneyimlerini benden hiç esirgemeyen, samimiyeti ve içtenliğiyle manevi olarak da hep yanımda olan değerli hocam Doç. Dr. Mehmet KUZUCU'ya teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında beni destekleyen ve hücre kültürü çalışmalarını başta olmak üzere bana çok şey katan sayın Dr. Ahmet ÇETİN'e teşekkürlerimi sunarım. Hayat boyu yanımda olan ve bugünlerimin gerçek mimarı olan canım aileme ve başından beri bu süreçte beni ayakta tutan sevgili eşime sonsuz minnetlerimi sunarım.

Esra Tuba SEZGİN

Haziran, 2025

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Araştırmanın Amacı	1
1.2. Araştırmanın Önemi	2
1.3. Varsayımlar	3
1.4. Sınırlılıklar	3
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	4
2.1. Kanser.....	4
2.1.1. Kanser genetiği.....	4
2.1.2. Kanser istatistikleri.....	8
2.2. Akciğer Kanseri.....	9
2.2.1. Akciğer kanseri epidemiyolojisi.....	9
2.2.2. Akciğer kanseri etiyolojisi.....	9
2.2.3. Akciğer kanseri sınıflandırılması	11
2.2.4. Akciğer kanseri genetiği.....	11
2.2.5. Akciğer kanseri evreleri.....	13
2.2.6. Akciğer kanseri teşhisi.....	13
2.2.7. Akciğer kanseri tedavisi	14
2.3. İlaç Direnci ve Tedavi	16
2.3.1. EGFR direnci ve mutasyonları	17
2.3.2. EML4-ALK füzyon mutasyonu	19
2.4. Tirozin Kinaz İnhibitörleri.....	19
2.4.1. Birinci nesil TKİ' ler	19
2.4.2. İkinci nesil TKİ' ler	20
2.4.3. Üçüncü nesil TKİ' ler.....	20
2.5. Osimertinib	21

2.6. İlaç Direncini Önleme	23
2.7. Bitkilerin Kanser Tedavisindeki Yeri.....	24
2.7.1. <i>Melissa officinalis</i> L. bitkisi	25
2.7.1.1. <i>Melissa officinalis</i> bitkisinin antikanser etkileri.....	27
3. YÖNTEM.....	30
3.1.1. Materyal.....	30
3.1.2. Kullanılan ekipman ve cihazlar	30
3.1.3. Hücre hattı	31
3.1.4. Kullanılan kimyasallar.....	31
3.2. Yöntem	32
3.2.1. Hücre kültürü çalışmaları	32
3.2.1.1. Besiyeri hazırlanması	32
3.2.1.2. Hücre hattının pasajlanması.....	32
3.2.1.3. Hücre hattı stoklarının hazırlanması.....	33
3.2.1.4. Hücrelerin çözündürülmesi.....	33
3.2.1.5. Hücre sayım işlemi	34
3.2.2. Sitotoksosite çalışmaları.....	34
3.2.2.1. Uygulanan kimyasal maddelerin hazırlanması.....	34
3.2.2.2. Hücre canlılık testi.....	35
3.2.3. Kombinasyon indeksi hesaplaması.....	36
3.2.4. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi	37
3.2.5. RNA ve cDNA konsantrasyon ve saflık tespiti.....	38
3.2.6. Gen ifade seviyelerinin RT-qPCR ile tespiti	39
3.2.7. Protein ekstraksiyonu	40
3.2.8. İstatistiksel bulgular.....	41
4. BULGULAR	42
4.1. Sitotoksosite çalışmaları.....	42
4.1.1. Hücre canlılık testi.....	42
4.1.2. Kombinasyon indeksi	44
4.1.3. Gen ifade ve protein seviyelerinin belirlenmesi	48
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	51
KAYNAKÇA	58
ÖZGEÇMİŞ.....	67

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Genel TNM evreleme tanımlayıcıları.....	13
Tablo 2.2. FDA tarafından onaylı bitkisel ilaç örnekleri.....	25
Tablo 2.3. Kanser hücrelerinde çalışılan <i>M. officinalis</i> ekstraktlarına örnekler.....	29
Tablo 3.4. Hücrelere uygulanan kimyasallar ve konsantrasyonları.....	36
Tablo 3.5. CI sonuçlarına göre uygulanan kimyasalların hücre hattı üzerindeki etkisi.....	37
Tablo 3.6. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi için petrilere uygulanan kimyasallar.....	37
Tablo 3.7. Analizi yapılan genlerin primer sekansları.....	40
Tablo 3.8. Sıcaklık siklusu.....	40
Tablo 4.9. 24 saat inkübasyon süresinde OSİ ve <i>M. officinalis</i> su ekstraktı kombinasyonlarının CI değerleri.....	45
Tablo 4.10. 48 saat inkübasyon süresinde OSİ ve <i>M. officinalis</i> su ekstraktı kombinasyonlarının CI değerleri.....	45
Tablo 4.11. 24 saat inkübasyon süresinde OSİ ve <i>M. officinalis</i> metanol ekstraktı kombinasyonlarının CI değerleri.....	45
Tablo 4.12. 48 saat inkübasyon süresinde OSİ ve <i>M. officinalis</i> metanol ekstraktı kombinasyonlarının CI değerleri.....	46
Tablo 4.13. PC-9 hücre hattında 48 saatlik BCL-2, BAX ve CASP3 protein seviyeleri.....	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Türkiye’ de her iki cinsiyette en çok görülen ilk altı kanser türü.....	10
Şekil 2.2. Adenokarsinoma, skuamöz hücreli karsinoma ve büyük hücreli karsinomanın histolojik profili.....	11
Şekil 2.3. Kazanılmış dirence yönelik moleküler mekanizmalar.....	17
Şekil 2.4. Osimertinib kimyasal yapı modeli.....	21
Şekil 2.5. Osimertinib ve EGFR790M ve EGFR797S ile bağlanma etkileşimlerinin şematik temsili.....	22
Şekil 2.6. Osimertinib direncinin mekanizması.....	22
Şekil 3.7. PC-9 hücre hattı.....	29
Şekil 3.8. Hücre kültürü çalışmalarının yapıldığı steril laminar kabin.....	30
Şekil 3.9. M. officinalis metanol ekstraktına uygulanan evaporasyon işlemi.....	35
Şekil 3.10. Elisa cihazında RNA ve cDNA konsantrasyon ve saflık tespiti.....	37
Şekil 4.11. 24 saat inkübasyon süresince PC-9 hücre hattı üzerine OSİ, MO-Su ve OSİ+(MO-Su)’nun antiproliferatif aktivitesi.....	40
Şekil 4.12. 24 saat inkübasyon süresinde PC-9 hücre hattı üzerine OSİ, MO-MetOH ve OSİ+(MO-MetOH)’ın antiproliferatif aktivitesi.....	43
Şekil 4.13. 48 saat inkübasyon süresinde PC-9 hücre hattı üzerine OSİ, MO-Su ve OSİ+(MO-Su)’nun antiproliferatif aktivitesi.....	43
Şekil 4.14. 48 saat inkübasyon süresinde PC-9 hücre hattı üzerine OSİ, MO-MetOH ve OSİ+(MO-MetOH)’ın antiproliferatif aktivitesi.....	44
Şekil 4.15. OSİ, MO-MetOH ve kombinasyonlarının 48 saatlik inkübasyon süresinde doz-etki eğrisi.....	46
Şekil 4.16. OSİ ve MO-MetOH 48 saat inkübasyon süresinde DRI grafiği.....	47
Şekil 4.17. OSİ, MO-MetOH ve kombinasyonlarının 48 saat inkübasyon süresinde median-etki eğrisi.....	47
Şekil 4.18. BCL-2 gen ekspresyonu ve protein seviyeleri.....	48
Şekil 4.19. BAX gen ekspresyonu ve protein seviyeleri.....	49
Şekil 4.20. BAX/BCL-2 oranı.....	49
Şekil 4.21. CASP3 gen ekspresyonu ve protein seviyeleri.....	50

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
mL	Mililitre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
dk	Dakika
°C	Celcius
ng	Nanogram
nM	Nanomolar
g	Yer çekimi ivmesi
ABC	Adenozin Trifosfat-Sentaz Bağlayıcı Kaset Taşıyıcıları
ACS	Amerikan Kimya Derneği
AJCC	Amerikan Ortak Kanser Komitesi
ALK	Anaplastik Lösemik Kinaz
ATP	Adenozin Trifosfat
BAX	BCL-2 ilişkili x protein
BCL-2	B-hücreli lenfoma 2
BCRP	Meme Kanseri Direnç Protein
bFGF	Temel fibroblast büyüme faktörü
BHK	Büyük Hücreli Karsinom
BRAF	v-Raf murin sarkoma viral onkogen homolog B1
BRCA1/2	Meme kanseri duyarlılık geni 1-2
BT	Bilgisayarlı Tomografi
CASP3	Kaspaz 3
CNS	Merkezi Sinir Sistemi
CXR	Göğüs radyografisi
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiriboz Nükleik Asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EGFR-TKİ	EGFR-Tirozin Kinaz İnhibitörleri
EML4	Echinoderm Mikrotübül İlişkili Protein-Benzeri 4
EMT	Epitel-mezenkimal Geçiş

FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GLOBOCAN	Küresel Kanser Gözlem Verisi
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
HIF	Hipoksi ile indüklenen faktör
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Onkogen
mAb	Monoklonal antikor
MDR	Çoklu İlaç Direnci
MET	Mezenkimal-epitelyal Geçiş
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MRP	Çoklu İlaç Direnci ile İlişkili Protein
OSİ	Osimertinib
P-gp	P-glikoprotein
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
PIK3CA	Fosfatidil İnositol 3-Kinaz Katalitik Alfa
PTEN	Fosfataz ve Tensin Analogu
RB1	Retinoblastoma protein
TBA	Tübülin Bağlayıcı Ajan
TGF	Transformasyon büyüme faktörü
TNF	Tümör nekroz faktörü
TNM	Tümör Nod Metastaz
VATS	Video Yardımlı Torakoskopik Cerrahi
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

1. GİRİŞ

1.1. Araştırmanın Amacı

GLOBOCAN (Global Cancer Incidence, Mortality and Prevalence)' in 2022 yılı verilerince akciğer kanseri kansere bağlı ölümler arasında en yaygın neden olup, Türkiye'de de kansere bağlı ölümler içinde en yüksek orana sahiptir. (GLOBOCAN, 2022). Akciğer kanserinin %80,7' si küçük hücreli dışı akciğer kanserinden (KHDAK) oluşurken, %16,4' ü küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve %2,9' u ise diğer alt tiplerden oluşmaktadır. KHDAK akciğer kanserinin en sık görülen türü olup genellikle büyük hücreli karsinom, skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom veya belirtilmemiş tür olarak sınıflandırılabilir (Travis vd., 2015).

Sigara içmek akciğer kanserinin en önemli risk faktörüken, hava kirliliği, asbest ve/veya radon gazı maruziyeti, genetik faktörler ve pasif içicilik de akciğer kanseri oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Wangari-Talbot ve Hopper-Borge, 2013).

KHDAK' nin yönetimi, multidisipliner bir yaklaşım gerektirmektedir. Hastalar genellikle evresine, rezeke edilebilirliğine ve genel durumlarına bağlı olarak cerrahi, radyoterapi ve/veya kemoterapi kombinasyonlarına gerek duyabilmektedir (Chang, 2011). Cerrahi operasyonlar, KHDAK tedavisinde en iyi seçenektir. Fakat hastalık fark edildiğinde ileri evrelere gelinmiş olduğundan cerrahi müdahale hastaların yalnızca % 25' inden daha azına uygulanabilmektedir. Bu durumda kemoterapi altın standart olmasına rağmen kemorezistans gelişmesi nedeniyle tedavi başarısız olabilmektedir (Xiao ve He, 2010).

Kemorezistans, doğuştan olabileceği gibi sonradan da kazanılabilir ve genellikle aynı ya da benzer antineoplastik etki mekanizmalarına sahip ilaçlara karşı gelişir. Genel olarak kanser hücrelerinin kemoterapi ilaçlarına karşı direnç geliştirmesi olarak açıklanabilir. Bu direnç ile kanser hücrelerinin ilaca yanıt verme yeteneği veya ilacın etkisi azalır (Chang, 2011).

Akciğer kanseri oluşum mekanizmalarından biri olan sürücü mutasyonlar da tedavide hali hazırda kullanılmakta olan ilaçların etkilerini azaltmaktadır. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), Kirsten Ras Sarcoma viral onkogen (KRAS), anaplastik lösemik kinaz (ALK), ROS-1, v-Raf murin sarkoma viral onkogen homolog B1 (BRAF) ve insan epidermal

büyüme faktörü reseptörü (HER-2) en sık görülen sürücü mutasyonlardandır (Bilgin ve Yücel, 2019).

Tümörleri EGFR geninde somatik aktive edici mutasyonlar barındıran hastalar, EGFR-tirozin kinaz inhibitörleri (EGFR-TKİ) ile tedaviden büyük ölçüde fayda sağlamaktadır. EGFR' yi hedef alan antikanser ilaçların yakın zamanda geliştirilmesi, hastaların hayatta kalma oranlarını önemli ölçüde iyileştirmektedir (Wu vd., 2014).

Fakat EGFR mutasyonlarına sahip KHDAK' lı hastalarda EGFR-TKİ' lere 10-16 ay içinde kazanılmış direnç gelişir. Ekzon 20' deki 790. kalıntıda treonin-metionin değişimi (T790M) ilk tanımlanan kazanılmış direnç mutasyonudur (Dirican vd., 2016).

Osimertinib (OSİ, AZD9291) oral olarak kullanılan, üçüncü nesil, geri dönüşsüz bir EGFR-TKİ' dir (Soria vd., 2018). EGFR aktive edici mutasyonlardan olan EGFR T790M direnç mutasyonlarını seçici olarak inhibe eder (Leonetti vd., 2019). Ama zamanla hastaların yaklaşık %40' ında T790M' li C797S mutasyonunu da görülmektedir. Sonuç olarak da ilacın hücre çoğalmasını inhibe edici etkisi azalmaktadır (J. Li ve Kwok, 2020; Y. Li vd., 2023).

Yapılan çalışmalar bazı fitokimyasalların kanser hücrelerinin ilaç direncini aşabileceğine dair birçok kanıt sunmaktadır. Böylelikle daha az yan etki profilleri ile bitkiler kanser tedavisinde umut vadetmektedir (Isaoglu vd., 2020; Pu Wang vd., 2015).

Üzerinde araştırmalar yapılan bitkilerden biri olan *M. officinalis*, çeşitli kanser türlerinin tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Javadi ve Emami, 2015). Bitkinin esansiyal yağının ve ekstraktlarının antikanser ve antiproliferatif özellikleri pek çok insan kanser hücre hattında çalışılıp, anlamlı sonuçlar bulunmuştur (Faraji et al., 2021).

1.2. Araştırmanın Önemi

Akciğer kanseri kansere bağlı ölümler arasında en yaygın nedenlerden biri olup, hastalığın geç teşhis edilmesi ve kemoterapötik ilaçlara karşı zamanla gelişen direnç mekanizmaları tedavi başarısını azaltmaktadır. EGFR mutasyonlu KHDAK hastalarında OSİ ile tedavi başlangıçta etkin olsa da zamanla gelişen direnç mutasyonları tedaviyi gölgelemektedir. Daha az yan etki profiline sahip olmaları ve çeşitli antikanser özellikleri nedeniyle fitoterapötiklerin kanser

tedavisine eklenmelerinden yola çıkılarak *M. officinalis* kanserde kemorezistansı önlemesi ve destekleyici tedavi stratejileri sunması açısından umut vadetmektedir.

1.3. Varsayımlar

Çalışmamızda; *M. Officinalis* ekstraktlarının KHDAK hücrelerinde antikanserojen ve antiproliferatif özelliklere sahip olup olmadığı, OSİ ile kombinasyonlarında ilaca karşı gelişecek direnci azaltarak ilacın etkinliğini artırıp artıramayacağı, kemoterapi ilaçlarının neden olduğu yan tesirleri hafifletme potansiyeline sahip olup olmadığı gibi varsayımlar üzerinde durulmuştur.

1.4. Sınırlılıklar

OSİ ve daha pek çok antikanser ilacına karşı gelişen direnç mekanizması tedavi başarısını kısıtlayan sınırlayıcı bir faktördür. EGFR mutasyonu ve diğer sürücü mutasyonların çeşitliliği tedaviye olan yanıtları karmaşık hale getirmektedir. İn vitro ortamda elde edilen bulguların in vivo koşullarda aynı etkiyi gösteremeyip, bu koşullara tam anlamıyla entegre edilememesi riski bulunmaktadır. Yine *M. Officinalis* ekstraktının potansiyel yan tesirleri ve daha uzun vadeli etkileri henüz tam olarak aydınlatılmadığından, in vivo uygulamalarda karşılaşılabilecek bazı belirsizlikler mevcuttur. *M. Officinalis* bitki ekstraktlarının aktif bileşenlerinin etki mekanizmaları ve farmakokinetiği üzerinde durulup, araştırmalar *in silico* ve *in vivo* olarak uygun hayvan modelleri üzerinde gerçekleştirilmelidir.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

2.1. Kanser

Kanserle ilgili en eski kayıtlar M.Ö. 3000 yılına kadar dayanmaktadır (Fitzmaurice vd., 2015). Kanser, normal hücre fonksiyonları bozulan anormal hücrelerin kontrolsüz hücre bölünmesi ve yayılması olarak ifade edilir. Ayrıca kanser dünya çapında önemli bir sağlık sorunudur ve kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci ölüm nedeni olarak görülmektedir (Kamel ve Megally Abdo, 2014).

Tüm kanserler deoksiriboz nükleik asit (DNA) dizisindeki anormalliklerden kaynaklanır. İnsan yaşamı boyunca DNA çeşitli mutajenlere maruz kalır, bu da her hücredeki DNA dizisinde ilerleyici değişikliklere neden olmaktadır. Hücre bölünmesi ve kontrolü genler tarafından düzenlendiği için kanser temelde genetik bir hastalıktır. Gende hasar oluştuğunda DNA tamir sistemleri bu hasarı onarmaya çalışsa da her zaman başarılı olamayabilir. Bunun sonucunda görülen proteinlerin eksik veya hatalı üretilmesi hücre işlevlerinin bozulmasına yol açabilir (Futreal vd., 2001).

Onkogenlerin aktivasyonu ve tümör süpresör genlerinin inaktivasyonu sonucu oluşan kanser gelişim sürecinde mutasyonlar rol almaktadır. Kanseri gelişimi temel olarak genetik ve epigenetik değişimlere bağlıdır. Kromatin yeniden düzenlenmesi, histon metilasyonu, histon asetilasyonu, histon fosforilasyonu ve DNA metilasyonu bu değişimlerden biridir (Cansino Alcaide ve Martínez-Piñero, 2006).

Kanser tedavisi radyoterapi ve cerrahi ile veya kemoterapötik ilaçlardan yararlanılarak yapılmaktadır. Bu üç yolda da önemli sorunlarla karşılaşmaktadır. Pek çok kanser türü için tercih edilen yöntem geleneksel antineoplastik kemoterapi olmakla beraber tedaviyi daha seçici hale getirecek yeni stratejiler geliştirilmektedir. Hedef normal hücreler üzerindeki yan etkileri önleyerek daha az yan etkiye neden olacak yeni ilaçlar geliştirmektir (Andrews Wright ve Goss, 2019).

2.1.1. Kanseri genetiği

Tüm hücrelerin belirli bir yaşam süresi bulunmaktadır. Bu süre içinde bölünüp kalıtsal materyallerini aktarırlar ve belirli bir süre sonra da ölürlür. Bazıları çeşitli nedenlerle (genetik

faktörler, enfeksiyonlar, tütün-alkol kullanımı, obezite, sağlıksız beslenme, radyasyon ve çevresel toksinler) sınırsız bir şekilde bölünmeye devam ederler. Bu şekilde dokudaki tümör oluşumu ve kontrolsüz büyümeler kanserin temelini oluşturur. Tümör baskılayıcı genler hücre bölünmesi üzerinde baskı yaratabilen bir grup genlerdir ve hücre içi kontrolü sağlarlar. Hasara uğradıkları zaman hücrenin kontrolsüz çoğalmasına neden olan hücrelerin normal çoğalmasının kontrolü için gereken otozomal resesif genlerdir. Hücresel DNA hasarlarını onarırlar. Apoptozu (programlanmış hücre ölümü) başlatıp metastazı önlerler. İntrinsik (mitokondriyal) yol ve ekstrinsik (ölüm reseptörü yolağı) yol olmak üzere iki şekilde meydana gelirler. Apoptozun düzenlenmesinde temel olarak; B-hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) ailesi, p53, kaspazlar kalsiyum ve seramid gibi moleküller rol oynamaktadır. Süreç boyunca sürekli hücreye girişi olan kalsiyum iyonları hücre iskeletinin organizasyonunda ve gen regülasyonunda rol almaktadır.

Kaspazlar: Bütün programlanmış hücre ölümlerinin ortak noktası proteinleri parçalayan sistein proteazlar olan kaspazların aktivasyonudur. Kaspaz aktivasyonu ile sonuçlanan intrinsik yolak ile ekstrinsik yol birbirleriyle bağlantılıdır ve bir yolaktaki molekülün diğer yolu etkileyebildiği gösterilmiştir. Kaspazlar efektör (3, 6 ve 7) ve başlatıcı (2, 8, 9, 10) kaspazlar diye iki gruba ayrılırlar.

Mitokondri: Kontrollü hücre ölümü aktivasyonunda çok önemli bir yer almaktadır. İntermembran proteinlerine karşı geçirgen hale gelir. Apoptotik öneme sahip sitokrom-c de bu proteinlerden olup, salınması mitokondriyal dış membran permeabilizasyonu (MOMP) olarak bilinen ve yüzeyinde bulunan Bcl-2 aile üyeleri (Bax ve Bak) aktivasyonunu içeren bir süreçten meydana gelmektedir. Salınan sitokrom c, pro-kaspaz 9' a bağlanıp apoptozom denilen kompleksi oluşturmaktadır. Ve aktif formu olan kaspaz 9' a dönüşmektedir (Guvenc ve Guvenc, 2017).

Bcl-2 ailesi: Proapoptotik (Puma, Bad, Bax, Bim, Noxa, Bak) ve antiapoptotik (Bcl-xL, Bcl-2) üyeler olmak üzere birbirine zıt çalışan iki gruptan oluşmaktadır. Hücredeki kalsiyum oranını kontrol ederek kaspazların öncü formlarıyla sitokrom-c salınımını bloke edip apoptozu inhibe ederler.

Sağlıklı hücrelerde antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri Bax mekanizmasını baskırlar. Hücrenin akibetinin yaşama mı yoksa ölümle mi devam edeceğini Bcl-2' nin Bax' a oranı belirlemektedir.

Retinoblastoma protein (RB1): Retinoblastoma adlı göz kanseri türü ile ilişkilidir ancak diğer birçok kanser türünde de rol oynar.

Fosfatase ve tensin homologu (PTEN) geni: Hücrelerin büyüme ve çoğalmasını baskılayıp tümör oluşumunu engeller. Prostat, meme ve endometriyum kanserlerinde yaygın olarak mutasyonlarına rastlanmaktadır. Tümör baskılayıcı PTEN, PI3K/PTEN/Akt sinyal yolunun negatif bir düzenleyicisi olup; hücre büyümesi, çoğalması, göçü ve farklılaşması gibi hücre işlevleri düzenlemektedir. PI3K/PTEN/Akt sinyal yolunun GLUT-4' ün yer değiştirmesi yoluyla glikoz alımı üzerinde de etkisi olduğu düşünülmektedir. Yani PTEN genini hedeflemek hem kanser hem de bazı metabolik hastalıklarda (obezite, tip 2 diyabet v.b.) önemli bir tedavi yoludur.

BRCA1/BRCA2 genleri: DNA onarımını doğru bir şekilde gerçekleştirmeye yardımcı olurlar. Mutasyonları meme ve over kanser riskini artırmaktadır.

TP53 geni: p53 adlı protein hücre döngüsünü durdurur, DNA hasarını onarır ve apoptozu başlatır. Bu gende oluşan mutasyonlar kanser vakalarının yarısını oluşturur. p53 hücrelerdeki DNA' nın bütünlüğünü koruduğundan "genomun koruyucusu" olarak da bilinir. (Çetiner, 2021; Gökhan vd., 2020; Lee ve Muller, 2010; A. Li vd., 2017).

Protoonkogenler hücrelerin büyümesi, proliferasyonu ve hücre ölümünü yerine getiren yani hücre homeostazı sağlayan genlerdir. Mutasyon gibi nedenlerle yeni bir işlev ve aktivite kazanıp otozomal dominant etki gösteren ve kanser oluşumunu kolaylaştıran genlere onkogen (Gli, Gsp, Ras K, Ras N, C-myc, L-myc, N-myc, Akt, Abl, erbB-2) denmektedir. Özellikle MYC insan kanserlerinin %70' inde görülmekte ve düzensiz ekspresyonu sonucunda tümör gelişimi olmaktadır.

Mutasyon hücre büyümesi, farklılaşması ve çoğalmasında rol alan onkogenlerde meydana gelirse hücrenin invazyon ve metastaz yeteneği gibi malign özellikler kazanmasına neden olur. Mutasyon tümör baskılayıcı genlerde meydana gelirse hücre döngüsü inhibisyonu ve anormal hücre büyümesi gerçekleşir. Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve onkogenlerin aktivasyonu birçok kanser türünün gelişimine neden olmaktadır (Debeleç-Bütüner ve Kantarci, 2006; Farrell ve Sears, 2014; Shortt ve Johnstone, 2012; Şeydel ve Aksoy, 2009).

Kanser genetiğinin temelinde yatan mutasyonlar kalıtsal (DNA onarımında görevli BRCA1 ve BRCA2 genlerinde mutasyon) ve edinilmiş mutasyonlardır. Edinilmiş mutasyonlara interkalasyon ajanları gibi mutajenler ve UV ışınları, gama ışınları gibi radyasyon etmenleri örnek olarak verilebilir. DNA onarım bozuklukları büyüme anomalilerine, cilt, meme ve kolon kanseri gibi pek çok kanser türüne neden olmaktadır. Kanser tedavisinde DNA onarımını artırmak ise düşünülenin aksine tedavi de direnç oluşumuna neden olmaktadır. Bu yüzden DNA onarımında görev alan proteinlerin inaktivasyonu ya da ekspresyonlarının azaltılması amaçlanmaktadır (Debeleç-Bütüner ve Kantarci, 2006).

Anjiyogenez vücuttaki kan damarlarından yeni kan damarlarının oluşumudur. Hem normal fizyolojik olaylar hem de patolojik durumlar için kritik bir rol oynamaktadır. Anjiyogenez vasküler gelişim, embriyonik gelişim ve yara iyileşmesi gibi normal süreçlerde gerekli olmasına rağmen romatoid artrit, diyabetik retinopati, sedef hastalığı, hemanjiyomlar ve kanser gibi bazı patolojik durumlarda da ortaya çıkmaktadır (Hamutoğlu ve Önder, 2017).

Vasküler ağdaki yeni büyümeler kanser açısından önem arz etmektedir çünkü kanser hücrelerinin büyümesi, çoğalması ve metastatik yayılımı için yeterli oksijen ve besin gerekirken atık ürünler de uzaklaştırılmalıdır. Yeni kan ve lenfatik damarlar sırasıyla anjiyogenez ve lenfanjiyogenez adı verilen süreçler aracılığıyla oluşmaktadır.

Anjiyojenik aktivatörler arasında; transformasyon büyüme faktörü-alfa (TGF- α), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), interlökin-8, anjiogenin, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α), TGF- β , trombosit kaynaklı endotelial büyüme faktörü, granülosit koloni uyarıcı faktörü, hepatosit büyüme faktörü, plasental büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi çeşitli proteinler mevcuttur. VEGF ailesi ve reseptörleri (VEGFR) karsinogenez sürecindeki vaskülarizasyonda git gide daha fazla dikkat çekmektedir.

Kanser hücreleri yayıldıkça hipoksi meydana gelmektedir. Anjiyogenezin esas düzenleyicisi olan hipoksi ile indüklenen faktör (HIF)-1, VEGF' den oluşan hipoksik genlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Hamutoğlu ve Önder, 2017; Nishida vd., 2006).

Anjiyojenik sürece katkısı olan pek çok yolak olmasına rağmen, ana düzenleyici olarak VEGF/VEGFR yolakları kabul edilmektedir. Bu da bu yolağın kanser tedavisi için kullanılması

yönünde önemli bir ilgi ve çaba oluşturmaktadır. VEGF' nin aşırı eksprese edilmesi ya da yüksek VEGF serum seviyeleri KHDAK ve KHAK' de de doğrulanmıştır. Bu nedenle kanser tedavisinde umut vadeden ve şu anda prelinik ve klinik çalışmaları süren çoğu anti-anjiyogenik ajan, VEGF yolaklarının inhibisyonuna odaklanmaktadır. Anti-VEGF stratejilerinden bazıları; VEGFR' lerin tirozin kinaz inhibitörleri, VEGF veya VEGFR' lere karşı nötralize edici antikolar ve çözünebilir VEGFR/VEGFR hibritleridir (Alevizakos vd., 2013; Ferrara vd., 2005; Malik vd., 2014; Rapisarda ve Melillo, 2012). Onkolojide VEGF inhibisyonunun potansiyel klinik rolü solid tümörlerle sınırlı değildir. Çeşitli lösemiler ve diğer hematolojik malignitelere de VEGF ve VEGF reseptörlerinin ifade edildiğine dair birçok kanıt mevcuttur. Bu yüzden VEGF veya VEGFR sinyal inhibisyonu üzerine pek çok klinik çalışma yürütülmektedir (Ferrara vd., 2005; Lauro vd., 2014; Sandler, 2007).

2.1.2. Kanser istatistikleri

2022 verilerine göre Türkiye' de 240.013 yeni kanser vakası bildirilmiş olup, 129.672 kişi ise kanserden hayatını kaybetmiştir (GLOBOCAN 2022). En sık görülen kanser türleri erkeklerde akciğer, prostat ve kolorektal kanserdir. Kadınlarda ise meme, tiroid ve kolorektal kanser şeklinde sıralanmaktadır. Tüm nüfusa bakıldığında ise meme, akciğer ve kolorektal kanser şeklinde sıralanmaktadır (Şekil 1). Kanser ölümlerinin %50' den fazlasını erkek cinsiyet oluşturmaktadır. Erkeklerde ölüme neden olan kanserler akciğer, mide ve kolorektal kanser şeklinde sıralanırken; kadınlarda meme, akciğer ve kolorektal kanserdir. Tüm nüfusa bakıldığında ise akciğer, kolorektal ve mide kanseri ilk üç sırayı almaktadır.

Türkiye' de kanser görülme sıklığı hem erkeklerde hem de kadınlarda Avrupa, Kanada, Amerika, Avustralya gibi ülkelere göre daha düşüktür. Dünyada ilk sıralarda görülen kanser örüntüsü benzerlik gösterip 160 ülkede kadınlarda meme kanseri ilk sırada yer almaktadır. Afrika bölgesinin belirli bir alanında ise serviks kanseri ilk sıraya yerleşmiştir. Erkeklerde ise Kuzey Amerika, Güney Amerika, Avrupa'nın Batısı, Avustralya ve Afrika bölgelerinde prostat kanseri ilk sırada yer almakta iken; Türkiye'nin de içinde yer aldığı Asya ve Doğu Avrupa bölgelerinde akciğer kanseri ilk sırada yer almaktadır (İlter ve Keskinçelik, 2018).

Türkiye'de kanser görülme sıklığı Avrupa, Amerika, Kanada ve Avustralya gibi ülkelere kıyasla hem erkeklerde hem de kadınlarda daha düşüktür. Dünya genelinde yaygın olan kanser türleri benzerlik gösterirken, 160 ülkede kadınlar arasında en sık görülen kanser türü meme

kanseridir. Afrika'nın belirli bölgelerinde ise serviks kanseri en yaygın kanser türü olarak öne çıkmaktadır. Erkeklerde ise Kuzey ve Güney Amerika, Batı Avrupa, Avustralya ve bazı Afrika bölgelerinde prostat kanseri en sık görülen tür iken, Türkiye'nin de dahil olduğu Asya ve Doğu Avrupa bölgelerinde akciğer kanseri ilk sırada yer almaktadır.

2.2. Akciğer Kanseri

2.2.1. Akciğer kanseri epidemiyolojisi

Dünya çapında en yaygın ve ölümcül kanser türlerinden biri akciğer kanseridir. Erkeklerde kansere bağlı ölümlerin başlıca nedeni iken kadınlarda meme kanserinden sonra gelmektedir (WHO, 2020).

Amerikan Kimya Derneği (ACS) 2023 yılında 238.340 yeni akciğer kanseri vakası olacağını ve 127.070 kişinin akciğer kanserinden öleceğini tahmin ediyordu ki, bu tüm kanser ölümlerinin yaklaşık %20'sini oluşturmaktaydı. Akciğer kanserinin temel nedeni olarak vakaların yaklaşık %80'inde olan sigara kullanımını görülmektedir (Wolf vd., 2024).

Ülkemizde kanserden meydana gelen ölümlerin %29,7'sini akciğer kanseri oluşturmaktadır. Erkeklerde kansere bağlı ölümlerin ilk nedeni iken kadınlarda meme kanserinden sonra gelmektedir (GLOBOCAN, 2022).

Dünya genelinde akciğer kanseri kansere bağlı ölümler arasında en yaygın neden olup, her yıl yaklaşık 1,8 milyon insanın hayatını kaybetmesine yol açan yüksek mortalite oranına sahip bir kanser türüdür (Sharma, 2022; Yıldız Gülhan vd., 2019).

Akciğer kanserinin ölüm oranı kolon, meme ve pankreas kanserlerinin ölüm oranı toplamından daha fazladır. Akciğer kanseri tanısı konulan hastaların yarısından fazlası tanı konulmasının ardından yaklaşık bir yıl içinde ölmekte olup, 5 yıllık sağkalım oranı %17,8 kadardır (Zappa ve Mousa, 2016).

2.2.2. Akciğer kanseri etiyolojisi

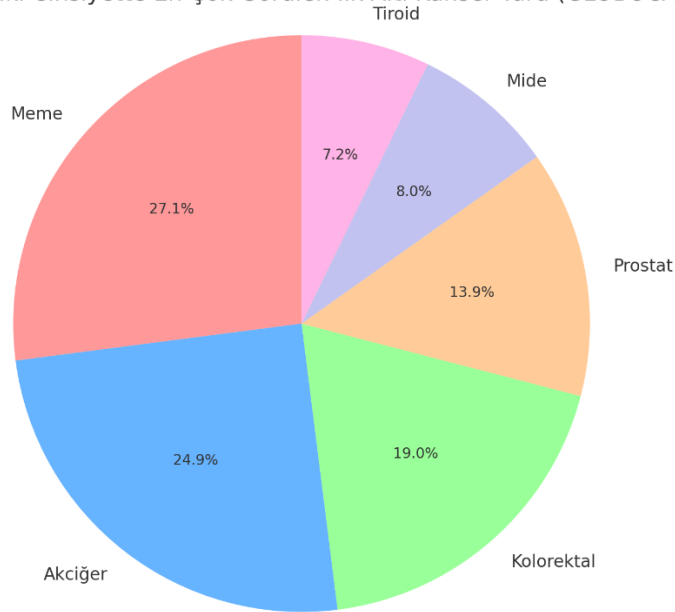
Tütün kullanmak akciğer kanserinde en tipik risk faktörüken; sigara-pipo içmek, pasif içicilik, çevre ve hava kirliliği, enfeksiyonlar, asbest, radon gazı, silika, arsenik gibi kimyasallara

maruziyet, yaş, etnik köken, beslenme şekli, obezite, diğer tıkaçıcı akciğer rahatsızlıkları gibi çeşitli faktörler de akciğer kanserine neden olabilmektedir. Akciğer kanserinde genetik faktörler de etkilidir. Aile öyküsünde karsinoma olan birinin kansere yakalanma olasılığı, olmayanlara oranla yaklaşık dört kat daha fazladır (Dela Cruz vd., 2011; Wangari-Talbot ve Hopper-Borge, 2013).

Tütün kullananlarda görülen akciğer kanseri özellikleri bakımından kullanmayanlardan oldukça farklıdır. Bu spesifik popülasyonda görülen KHDAK' de tütün etkili olmadığından hastalığın patogenezinde belirleyici olan birçok başka risk faktörü bulunmaktadır. Radon maruziyeti, bakteriyel (*Mycobacterium tuberculosis*) ve viral (İnsan Papilloma Virüsü) enfeksiyonlar, astım ve sarkoidoz gibi inflamatuvar hastalıklar bu türe neden olan faktörlerdendir (Corrales vd., 2020).

Akciğer kanseri için göreceli risk tek başına asbest maruziyeti ile 6 kat, tek başına tütün kullanımı ile 11 kat yüksek olabilirken; ikisine maruz kalma ile artış 59 kat yüksek olabilmektedir (Bade ve Dela Cruz, 2020).

Türkiye'de Her İki Cinsiyette En Çok Görülen İlk Altı Kanser Türü (GLOBOCAN, 2022)

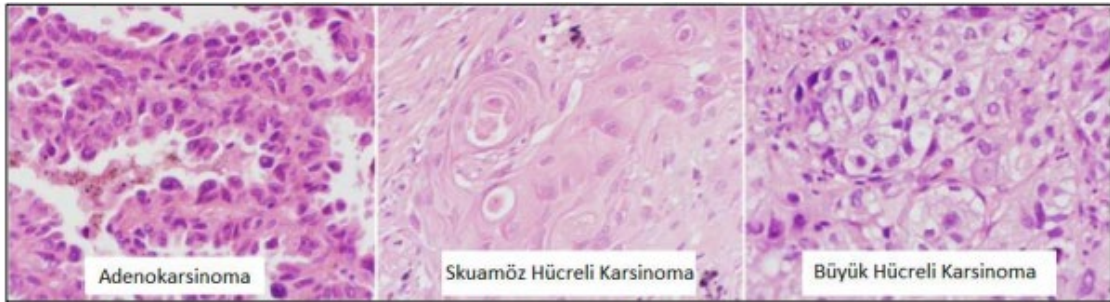


Şekil 2.1. Türkiye' de her iki cinsiyette en çok görülen ilk altı kanser türü (GLOBOCAN, 2022)

2.2.3. Akciğer kanseri sınıflandırılması

Akciğer kanseri üç alt gruptan oluşmaktadır. Bunun %80,7' sini KHDAK, %16,4' ünü KHAK ve %2,9' unu ise diğer alt tipler oluşturmaktadır (Abughanimeh vd., 2022).

KHDAK akciğer kanserinin en yaygın türü olup, genellikle skuamöz hücreli karsinom, büyük hücreli karsinom (BHK), adenokarsinom veya belirtilmemiş olarak sınıflandırılabilir (Şekil 2). Skuamöz hücreli karsinom, tüm akciğer kanserlerinin %25' ini oluşturup, genellikle akciğerin merkezinde bronşiyal tüplerdeki hava yolunun epitelyal hücrelerinden kaynaklanır ve tütün kullanımıyla ilişkilidir. Öte yandan BHK, akciğerin herhangi bir yerinde meydana gelebilen hızlı büyüyen bir tümördür ve KHDAK vakalarının yaklaşık %10' unu temsil etmektedir. Adenokarsinom en yaygın akciğer kanseri türü olup, tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %40' ını oluşturmaktadır. Bu tür daha yavaş büyüdüğünden, akciğerlerin dışına yayılmadan önce bulunma şansı daha yüksektir (Chaddad vd., 2017; Zappa ve Mousa, 2016).



Şekil 2.2. Adenokarsinoma, skuamöz hücreli karsinoma ve büyük hücreli karsinomanın histolojik profili (Motadi vd., 2007)

2.2.4. Akciğer kanser genetiği

Bazı genler mutasyonlara diğerlerine göre daha eğilimlidirler. Apoptotik genler, büyümeyi teşvik eden protoonkogenler ve büyümeyi inhibe eden tümör baskılayıcı genler hasarlanmanın başlıca hedefleri arasındadır. Ayrıca DNA onarımını sağlayan genler de kanser gelişiminde hedef alınan unsurlar arasında yer almaktadır (Yokuş ve Çakır, 2012).

Akciğer adenokarsinomlarında KRAS onkogeni vakaların %30' unda mutasyona uğramıştır. EGFR, MYC ve siklin D1 ise KHDAK' de sırasıyla %6, %2,5-10 ve %5 oranlarında aşırı ifade edilmektedir. Vakaların %25' inde Bcl-2 ya da C-erbB2 (Her-2/neu) ' in aşırı ifadesi

görülmektedir. EGFR genindeki mutasyonlar küçük molekülü kinaz inhibitörlerine (gefitinib veya erlotinib gibi) karşı oluşan yanıtla ilişkilendirilmiştir. Echinoderm mikrotübül ilişkili protein-benzeri 4-ALK (EML4-ALK) füzyon geni de KHDAK' de eksprese edilmektedir (Pazarbaşı ve Kasap, 2003; Risch ve Plass, 2008).

Skvamöz hücreli karsinomlardaki genetik değişiklikler için hedefe yönelik tedaviler bulunmamaktadır. Bu tümörlerin yaklaşık %80 'inde EGFR aşırı eksprese edilip, yaklaşık %30' u HER2 genini aşırı ifade etmektedir (Forsythe vd., 2020).

KRAS onkogeninde ve hücre bölünmesini baskılayan p53 geninde mutasyonlar meydana geldiğinde akciğer hücreleri sürekli bölüneceğinden tümör oluşumu meydana gelmektedir (Yokuş ve Çakır, 2012).

p53 proteini hücre döngüsünün önemli bir düzenleyicisidir. İnsan kanserlerinde en sık mutasyona uğradığı bilinen genidir. Spesifik DNA yapılarına bağlanarak transkripsiyonel düzenleyici olarak rol oynar. Mutasyonla inaktive olursa hücre döngüsü bozularak tümör gelişebildiğinden genetik değişikliklerin en yaygın hedefi olduğu artık bilinmektedir. Mutasyona uğramamış yabancıl tip p53 proteini (wtp53) hücrelerde latent halde bulunur ve hücrel sinyallere yanıt olarak aktif hale gelir (Oren ve Rotter, 1999).

Programlı hücre ölümü, antiapoptotik ve proapoptotik proteinler arasındaki denge ile düzenlenmektedir. Bcl-2 gen ailesi proteinleri (bcl-2, bcl-xL, bax) mitokondriyal apoptotik yolun ana düzenleyicilerinden biridir. Bcl-2 kaspazların aktivasyonu ve bölünmesi için gerekli olan adaptörleri inhibe ederek hücrenin canlılığını sağlayan bir apoptoz inhibitörüdür ancak hücre çoğalmasını teşvik etmez hücre ölümünü engeller yani hücreleri yaşatır. Bcl-2-ilişkili x protein (Bax) protein aynı gen ailesinden olmasına karşın proapoptotik aktivite göstermektedir. Yüksek Bcl-2 düzeyi kanser hücrelerinin çoğalmasına ve tümör gelişimine katkı sunmaktadır. Bax overekspresyonu, bcl-2 proteini inaktive eder ve apoptozu teşvik eder. Bax/Bcl-2 oranı, kanser hücrelerinin apoptoz eğilimini gösteren önemli bir belirteçdir. Bax/Bcl-2 oranı yüksek olan hücreler tedaviyle daha kolay apoptoza gideceğinden kemoterapiye daha duyarlı olabilirler. Kanser tedavisinde bu oran, hücrelerin tedaviye nasıl yanıt vereceğini anlamada ve tedavi stratejilerini belirlemede önemli bir belirteçdir.

Bcl-2' nin çeşitli hematolojik ve solid kötü huylu tümörlerde yüksek düzeyde ifade edildiği çeşitli çalışmalarla belirtilse de KHDAK, bazal hücreli karsinom ve meme kanserinde bağımsız pozitif bir belirteç olduğu öne sürülmektedir (Mendez-Flores vd., 2022; Tilli vd., 2002).

2.2.5. Akciğer kanseri evreleri

Akciğer kanseri hastalarının tedavi stratejisi hastalığın evresine bağlı olarak değişmektedir. Tümörün boyutu ve doku penetrasyon derecesi bu evreleri belirlemektedir. Akciğer kanserinin evrelemesi için Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC) Tümör Nod Metastaz (TNM) sistemi kullanılmaktadır (Tablo 1). Bu sistem tümörün özellikleri (T), lenf nodlarına yayılması (N) ve metastaz durumu (M) incelenmektedir. Evreleme; T, N ve M harflerinden sonra sayılar ve harfler kullanılarak devam ettirilir (Rami-Porta vd., 2018).

Tablo 2.1. Genel TNM evreleme tanımlayıcıları (Yılmaz vd., 2012)

Semboller	TNM kriterlerinin açıklaması
Tx	Primer tümör değerlendirilemiyor
Tis	İnsitü karsinom
T0	Primer tümör yok
T1	Çapı 3 cm' den küçük olan tümör
T2	Çapı 3-5 arasında olan tümör
Nx	Değerlendirilemeyen lenf nodu
N0	Metastaz olmayan lenf nodu
N1	İpsilateral pulmoner veya hiler nodlarda metastaz
N2	İpsilateral mediastinal veya subkarinal lenf bezlerine metastaz
N3	Kontralateral mediastinal, hiler veya supraklaviküler nodlarda metastaz
M0	Uzak metastaz yok
M1	Değerlendirilemeyen lenf nodu

2.2.6. Akciğer kanseri teşhisi

Öksürük, göğüs ağrısı, kan tükürme, kilo kaybı ve nefes darlığı gibi klinik bulgular, akciğer kanseri olan hastaların %75' inde görülmektedir (Spiro vd., 2007). Manyetik rezonans

görüntüleme (MRG), pozitron emisyon tomografisi (PET), göğüs radyografileri (CXR) ve bilgisayarlı tomografi (BT) taramaları akciğer kanserinin tanısında yer alan görüntüleme teknikleridir (Thakur vd., 2020). Diğer yöntemleri ise bronkoskopi, balgam sitolojisi, mediastinoskopi, transtorasik ince iğne aspirasyon biyopsisi ve mediastinal görüntüleme oluşturmaktadır (Gridelli vd., 2015).

KHDAK için güncel moleküler testlere bakıldığında önce EGFR, ROS1 ve ALK genlerine yönelik moleküler testler eş zamanlı olarak yapılmalıdır. Bu genlerde mutasyon saptanamadığı durumda ikinci basamakta mezenkimal-epitelyal geçiş (MET), BRAF, RET, Erb-B2 Reseptör Tirozin Kinaz 2 (ERBB2) / HER2, KRAS genlerine yönelik moleküler testler yapılır. Ancak, Avrupa Tıbbi Onkoloji Derneği (ESMO), KHDAK tanılı hastalarda BRAF mutasyon analizinin de ilk basamak moleküler testler arasında yapılmasını önermektedir (Felip vd., 2011).

2.2.7. Akciğer kanseri tedavisi

Akciğer kanserinde erken teşhis başarılı bir sonuç için çok önemlidir. Cerrahi müdahale ile evre 1 KHDAK tanısı konmuş hastaların 5 yıllık sağkalım oranı yaklaşık olarak %70 iken, bu rakam ileri metastaz gelişmiş hastalarda %5'e kadar düşmektedir (Wang vd., 2020).

KHDAK' nin yönetimi multidisipliner bir yaklaşım gerektirmektedir. Hastalar genellikle evresine, rezeke edilebilirliğine ve genel durumlarına bağlı olarak cerrahi, radyoterapi ve/veya kemoterapi kombinasyonlarına gerek duyabilmektedir (Chang, 2011). Cerrahi operasyonlar KHDAK tedavisinde en iyi seçenektir. Fakat hastalık fark edildiğinde ileri evrelere gelinmiş olduğundan cerrahi müdahale hastaların ancak %25' inden daha azına uygulanabilmektedir. Bu durumda kemoterapi altın standartken tümör hücrelerinin kemoterapi ajanlarına direnç (kemorezistans) geliştirmesi nedeniyle tedavi başarısız olabilmektedir (Xiao ve He, 2010).

KHDAK' nin metastatik durumlarında sistemik kemoterapi, TKİ ile tedavi, immünoterapi veya radyoterapi; lokal ileri evrelerinde kemoradyoterapi veya cerrahi; erken evrelerinde (evre I-II) cerrahi tedavi prensibini oluşturmaktadır (Varım vd., 2020).

KHDAK' ların %40-80' i dahil olmak üzere çok sayıda kanser türünde EGFR gereğinden fazla eksprese edilmektedir. Tümörleri EGFR geninde somatik aktive edici mutasyonlar barındıran hastalar EGFR-TKİ ile tedaviden büyük ölçüde fayda sağlamaktadır. EGFR' yi hedef alan

antikanser ilaçların yakın zamanda geliştirilmesi hayatta kalma oranlarını iyileştirmektedir (Wu vd., 2014).

KHAK evreleri olan I-III genellikle cerrahi ve kombinasyon immünoterapi ve kemoterapi ile tedavi edilmektedir. Cerrahlar tümörü içeren bir lobu veya akciğer bölümünü çıkarmaktadır. Günümüzde birçok cerrah, küçük bir kesinin yapıldığı ve bir torakoskopun yerleştirildiği video yardımcı torakoskopik cerrahi (VATS) yöntemini kullanmaktadır (Howington vd., 2013).

Bu çalışmaların çoğu EGFR ve ALK mutasyonları olan hastaları dışlamaktadır. Neoadjuvan tedavi ile EGFR-TKİ monoterapisi, kemoterapi ile kombinasyon tedavisi ve immünoterapi ile kombinasyon tedavisi ile ilgili araştırılan birçok tamamlanmış ve devam eden çalışma bulunmaktadır (Grant ve Nagasaka, 2024).

KHDAK' de hastaların %77' sine hastalık birincil bölgeden yayılmadan tanı koyulamayıp yaklaşık %55' inde tanı metastatik (evre IV) dönemde koyulmaktadır. Bu hastaların sağkalımları ve yaşam kalitelerini belirlemede kemoterapi tedavisi çok önemli bir yer tutmaktadır. KHDAK için kemoterapinin temelini platin bazlı tedaviler oluşturmaktadır ve genellikle tübülün bağlayıcı bir ajanla (TBA; taksenler [paklitaksel, doksetaksel] ve vinca alkaloidleri [vinorelbin, vinkristin] içeren), bir kamptotesin analogu (irinotekan, topotekan), gemsitabin veya pemetrekset ile kombinasyon halinde verilmektedir (Chang, 2011).

Anti-anjiyojenik tedavi de kanser kemoterapisinin nispeten yeni bir alanı olup, hedefe yönelik tedaviler arasındadır. Bevasizumab, aflibersept, ranibizumab, sorafenib, sunitinib ve pazopanib onay almış ve tedavide kullanılmakta olan etken maddelerdendir.

VEGF inhibisyonuna yönelik en iyi incelenmiş ve en ileri yaklaşıma sahip kanser tedavisi için onaylanmış anti-anjiogenik ajan olan monoklonal antikor bevasizumabdır. KHDAK de dahil, pek çok kanser türünün tedavisinde klinik fayda göstermektedir. Erlotinib ile kombinasyonu üzerinde etkin çalışmalar mevcuttur. Aflibersept plasental büyüme faktörü, VEGF ve VEGF-B' ye bağlanmak için tasarlanmış bir tuzak reseptör füzyon proteindir. Sorafenib VEGFR-2 ve VEGFR-3, c-kit, B-Raf ve C-Raf' ı inhibe eden bir TKİ' dir. Sunitinib VEGFR' ler, c-kit, flt3, RET ve CSF-1R' ye karşı etkili bir TKİ' dir (Alevizakos vd., 2013; Sandler, 2007).

2.3. İlaç Direnci ve Tedavi

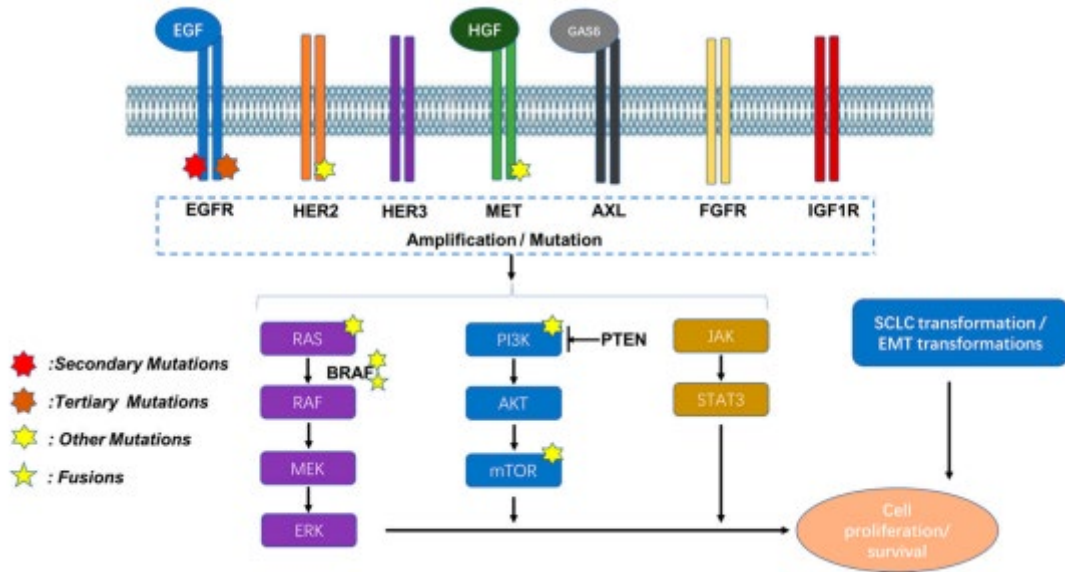
Kemoterapi ajanlarının başarılarına rağmen oluşan kemorezistans insan neoplazmalarının yönetiminde önemli bir zorluk olarak karşımıza çıkmaktadır (Chang, 2011).

Kemorezistans doğuştan olabilir veya sonradan kazanılabilir ve aynı veya benzer antineoplastik mekanizmalara sahip bir ilaç veya ilaç sınıfını tanımlayabilir. Genel olarak kanser hücrelerinin kemoterapi ilaçlarına karşı direnç geliştirmesi olarak tanımlanmaktadır. Bu direnç ile kanser hücrelerinin ilaca yanıt verme yeteneği azalır veya ilacın etkisi azalır. Kemorezistansa aracılık eden birkaç mekanizma bilinmektedir. Platinlerin hücre içi konsantrasyonu ve ilacın hücre içine alınmasının engellenmesi ve ilacın dışı atılımı ve detoksifikasyonunun artırılması yoluyla azaltılması, platin aracılı hücre döngüsü durmasının ve apoptozun bozulması, epitel-mezenkimal geçiş (EMT) ve kanser kök hücreleri, kemoterapi için değişmiş hücresel hedefler, azalmış hücresel ilaç konsantrasyonları, mikroRNA' ların düzensiz ekspresyonu, epigenetik modülasyon ve tümör mikroçevreleri ile etkileşimdir (Chang, 2011; Min ve Lee, 2021).

Çoklu ilaç direnci (MDR) ise antineoplastik ilaçların tümör hücrelerinden dışarı atılma sürecidir. Bu şekilde ilaçlar hedef bölgelerdeki konsantrasyonları azaldığı için düşük farmakolojik aktivite gösterirler. Dirençli hücreler kötü prognozdan ve tümörlerin tekrarlanmasından sorumludurlar. MDR hastalardaki içsel faktörlerden kaynaklanabilir (intrinsik MDR) veya kemoterapi sırasında kanser hücrelerinin ilaca karşı duyarsız hale gelmesi (edinilmiş MDR) ile oluşabilir. Kanser hücrelerindeki bazı ilaç direnç mekanizmaları; adenosin trifosfat (ATP)-sentaz bağlayıcı kaset taşıyıcıları (ABC) ile ilaç atılım mekanizmaları, apoptoz mekanizmalarının inaktivasyonu, DNA onarım yollarının aktivasyonu, büyüme faktörleri, ilaç metabolizmasındaki değişiklikler ve genetik mutasyonlardır (Isaoglu vd., 2020; P. Wang vd., 2015). P-glikoprotein (P-gp), ilaç direncinde rol oynadığı bilinen ABC ailesinin en önemli üyesidir. Diğer direnç proteinleri ise, çoklu ilaç direnci ile ilişkili proteinler (MRP) ve meme kanseri direnç proteinidir (BCRP) (Sodani vd., 2012).

Akciğer kanserinin nedenlerinden olan ve sürücü mutasyonlar olarak bilinen mutasyonlar genelde hücrenin proliferasyonunda kritik öneme sahip olan sinyal ileti proteinlerinin genlerinde görülmektedir. Yaklaşık %60 adenokarsinom vakasında süreci bir sürücü mutasyon başlatmaktadır. KRAS (%25), EGFR (%23), ALK (%6), Fosfatidil İnositol 3- Kinaz Katalitik Alfa (PIK3CA, %3), BRAF (%3) ve HER2 (%1) genlerinde en sık görülen mutasyonlar

bulunmaktadır (Şekil 3). Klasik kemoterapi ilaçlarına nazaran bu mutasyonlara yani hedefe yönelik ajanların geliştirilmesi hem etkinlik hem de yan etkiler açısından çok daha avantajlı görülmektedir (Bilgin ve Yücel, 2019; Forsythe vd., 2020)



2.3.1. EGFR direnci ve mutasyonları

EGFR plazma membran reseptörü tirozin kinazların erbB hücre reseptör ailesindedir. erbB protein ailesi EGFR (ErbB1, HER1), ErbB2 (Her2/ neu), ErbB3 (HER3) ve erbB4 (HER4) diye dört transmembran reseptörden oluşmaktadır (Cowen, 2007; Wu vd., 2014).

EGFR ligand bağlanma alanını hücre içi tirozin kinaz sinyal iletim alanına bağlayan bir transmembran reseptördür. Bu da tirozin fosforilasyonunu teşvik eder ve sonuç olarak bronşiyal proliferasyonu artırır (Krause ve Van Etten, 2005).

EGFR membran içi ve ATP' nin bağlandığı tirozin kinaz aktivitesi gösteren intrasellüler domaininden oluşmaktadır. Bu domain hücrenin büyümesi ve çoğalması için gerekli olan proteinleri sentezleyen intrasellüler sinyal yollarının aktivasyonu sağlamaktadır. EGFR genindeki bazı mutasyonlar tirozin kinaz domaininde yapısal değişikliğe neden olarak sürekli devam eden bir intrasellüler ileti oluşturmaktadır. Bu da anormal kontrolsüz çoğalma ve kanserleşmeye neden olmaktadır. Ekson 19 delesyon ve L858R mutasyon gibi EGFR mutasyon sıklığı batı toplumlarında %15 oranında saptanırken, Kafkasyalı hastaların yaklaşık %10' unda

ve Asyalı hastaların yaklaşık yarısında görülmektedir (Abughanimeh vd., 2022; Mazza ve Cappuzzo, 2017).

EGFR mutasyonlarının %90 gibi büyük bir kısmı exon 19 delesyonu ve exon 21' deki L858R nokta mutasyonundan oluşmaktadır. Bunlar intrinsik direnç mekanizmalarıdır. Daha az yaygın olan duyarlılaştırıcı mutasyonlar arasında ekzon 18' deki G719A/C/S ve S720F mutasyonları, ekzon 21' deki L861Q/R mutasyonu ve ekzon 21' deki V765A, T783A ve S768I mutasyonları yer almaktadır. EGFR ekson 19 delesyonları ve/veya ekson 21' de EGFR L858R mutasyonu KHDAK hastalarının %10-40' ında görülmektedir. KHDAK üzerine yapılan çalışmalar Gefitinib, Afatinib ve Erlotinib gibi TKİ' lerin EGFR sürücü mutasyonlarının varlığında kullanılmasının, standart kemoterapiye göre daha yararlı olduğunu göstermiştir (Dirican vd., 2016; Lu vd., 2018; Schoenfeld ve Yu, 2020; Tang ve Lu, 2018).

EGFR mutasyonlarına sahip KHDAK' lı hastalarda EGFR-TKİ' lere 10-16 ay içinde kazanılmış direnç gelişir. EGFR-TKİ' lere karşı gelişen sekonder direncin yaklaşık %60' ından Ekzon 20' deki 790. kalıntıda treonin-metionin değişimi (T790M) sorumludur. T790M mutasyonu esnasında tirozin kinazda yapısal değişiklik olmakta ve EGFR-TKİ' ler bağlanamamaktadır. Ayrıca D761Y, L747S ve T854A gibi birkaç nadir ikincil EGFR mutasyonu da rapor edilmiştir (Dirican vd., 2016; Lu vd., 2018)

Kovalent mutant-selektif EGFR-TKİ' ler klinikte çok iyi terapötik etki göstermiş olsalar da yine de üçüncül mutasyon ile kazanılmış direnç meydana gelmektedir. Tress ve arkadaşları çalışmalarında EGFR T790M+ mutasyonu olanların %40' ında plazma C797S tespit etmişlerdir. Bu mutasyonda nükleofilik sistein daha az reaktif bir serinle değişmiştir. Çalışmaları ayrıca geri dönüşümsüz EGFR-TKİ' lere karşı baskın direnç mekanizmasının EGFR T790M/C797S mutasyonu olabileceğini göstermiştir. OSİ hariç mevcut üçüncü nesil geri dönüşümsüz EGFR inhibitörlerinin tümü, C797S mutasyonu karşı direnç oluşturmuştur (Lu vd., 2018).

Ayrıca PTEN kaybı EGFR mutasyonları olan hastalarda tümörün EGFR sinyalleşmesine bağımlılığını azaltarak direnç yapabilmektedir. PTEN, PI3K-Akt yolunu negatif olarak düzenleyen bir enzimdir. Edinilmiş içsel direnç PTEN kaybı ve artan PI3K/AKT sinyal iletimi ile ilgilidir. PI3K' nın alt birimlerdeki mutasyonlar da primer direnç oluşturabilmektedir (Wangari-Talbot ve Hopper-Borge, 2013).

2.3.2. EML4- ALK füzyon mutasyonu

ALK bir tirozin kinaz reseptörüdür. Akciğer adenokarsinomlarının %5' EML4 geni ile birleşebilir. Bir çalışma EML4-ALK birleşmesi olan hastaların EGFR TKİ' lerden fayda sağlayamadığını ortaya koymuştur. Krizotinib bu hastalarda en umut verici ilaç olarak görülse de zamanla direnç gelişebilmekte ve tedaviye seritinib, alektinib veya brigatinib ile devam edilmektedir (Koivunen vd., 2008; Wangari-Talbot ve Hopper-Borge, 2013).

2.4. Tirozin Kinaz İnhibitörleri

TKİ' ler, tirozin fosforilasyonunu inhibe etmek amacıyla oluşturulmuştur. İlk dönüm noktası olan EGFR-TKİ Iressa Pan-Asya çalışması, gefitinibin kemoterapi ile karşılaştırıldığı ilk randomize Faz 3 klinik çalışmasıdır (Fukuoka vd., 2011).

Daha sonra geliştirilen ilaçlar ise icotinib ve erlotinibdir. Başarılı ilaçlar olmalarına rağmen T790M mutasyonu barındıran tümörlerde EGFR-TKİ tedavisi sırasında veya sonrasında, 9 ila 14 ay içinde edinilmiş direnç gelişmektedir. Afatinib ve dacomitinib ise ikinci nesil EGFR-TKİ' lerden ikisidir (Grant vd., 2023).

Bu gelişmelere rağmen advers olayların insidansı ve süre giden direnç göz önüne alındığında üçüncü nesil TKİ' ler geliştirilmiştir.

Bazı hedefe yönelik TKİ' ler “Merkezi sinir sistemi (MSS) koruyucu” olarak tanımlanmış olup yeni beyin metastazı gelişme oranını azaltmaktadırlar. Bu ya ilacın MSS' ye daha iyi nüfuz etmesi ile ya da sadece küçük bir miktarının kan-beyin engelini geçerek etkili olmasıyla gerçekleşmektedir. Bu durum beyin metastazı olan bazı hastaların beyin radyasyonlarının ertelenmesine hatta yapılmamasına olanak sağlamaktadır (Forsythe vd., 2020).

2.4.1. Birinci nesil TKİ' ler

EGFR mutasyona uğramış (ekzonlar 18-21) ilerlemiş KHDAK genellikle bir EGFR-TKİ ile tedaviye oldukça hassastır (Malapelle vd., 2018).

Birinci nesil EFGR-TKİ' ler erlotinib, gefitinib ve icotinibdir. Bu TKİ' ler, ATP' nin bağlanması için Met793' te bir hidrojen bağı oluşturarak ATP ile rekabet etmektedir. Randomize kontrollü

çalışmalardan, OPTIMAL, EURTAC, WJTOG3405 ve NEJ002; platin bazlı kemoterapiye kıyasla birinci nesil EGFR-TKİ' lerin progresyonsuz sağkalım oranını önemli ölçüde artırdığını göstermiştir. Bu ilaçlarla tedaviden sonra hastaların %50-60' ında görülen edinilmiş direncin nedeni ikincil EGFR T790M mutasyonudur. Bu mutasyon, ekzon 20' deki 790 konumunda meydana gelip, treonin ile metionin yer değiştirmektedir (Kus, 2019; J. Li ve Kwok, 2020).

2.4.2. İkinci nesil TKİ' ler

Afatinib ve dacomitinib, ikinci nesil EGFR-TKİ' lerdir. Birinci nesil TKİ' lere farkı yan zincirleri sistein 797 kalıntısına bağlanarak EGFR tirozin kinazını geri dönüşsüz olarak inhibe etmeleridir. LUX-Lung7 klinik çalışmasında, afatinib ve gefitinib, EGFR mutasyonu taşıyan KHDAK hastalarında birinci basamak tedavi olarak kullanılmıştır. Sonuç olarak afatinibin progresyonsuz sağkalım oranı gefitinibden daha uzun süreli bulunmuş olup, tedavi başarısızlığını da %27 oranında azaltmıştır. Bununla birlikte her ikisi de seçici olmayan inhibitörler olduğundan EGFR' ye bağlanmanın yanı sıra HER ailesi üyelerini eşzamanlı olarak hedefleyen pan-HER' i de inhibe ederler. Bu da hastalarda düşük maksimum tolere edilen dozda sıkıntılara neden olmaktadır. Birinci nesilde olduğu gibi afatinibin klinik uygulamasının ana engeli de edinsel direncin ortaya çıkması olup, T790M mutasyonu afatinibe karşı edinsel direncin ana mekanizmasını oluşturmaktadır (J. Li ve Kwok, 2020).

2.4.3. Üçüncü nesil TKİ' ler

OSİ, rociletinib, lazertinib, abivertinib, nazartinib ve olmutinib üçüncü nesil TKİ' lerdir. Geri dönüşsüz mutasyon-seçici özellikleri ile T790M vakalarında iyi aktivite göstermektedirler. Çalışmalarda pemetrekset ve platin bazlı ilaçlarla yapılan kemoterapiye oranla progresyonsuz sağkalım oranı çok daha uzun bulunmuştur. Üçüncü nesil TKİ' ler geçici başarı elde etse de C797S adlı üçüncül bir mutasyon tedaviyi fazlaca engellemektedir. Bu mutasyon ekson 20' de meydana gelip, EGFR' nin bağlanma yeri olan 797 konumundaki sisteini serin ile değiştirdiği bir yerdedir. Üçüncü nesil TKİ' ler de bu bölgeyi hedef aldığı ve sistein 797 kalıntısına geri dönüşsüz olarak bağlandığı için, bu mutasyon tüm üçüncü nesil ilaçlara karşı direnç kazandırmaktadır (J. Li ve Kwok, 2020; Y. Li vd., 2023).

2.5. Osimertinib

OSİ (Müstahzar: Tagrisso; Astra Zeneca) oral olarak kullanılan, üçüncü nesil, geri dönüşsüz bir EGFR-TKİ' dir (Soria vd., 2018). $C_{28}H_{33}N_7O_2$ kimyasal formülüne sahiptir (Şekil 4). EGFR aktive edici mutasyonlardan olan EGFR T790M direnç mutasyonlarını seçici olarak inhibe eder (Leonetti vd., 2019). T790M mutasyonu, EGFR inhibitörü tedavisi alıp tedaviye direnç geliştiren hastaların yaklaşık %50' sinde görülmektedir (KİRİŞOĞLU vd., 2003). OSİ' nin etkili olduğu diğer EGFR mutasyonları, T790M/L858R, L858R, T790M/ekzon 19 delesyonu ve ekzon 19 delesyonudur (Khozin vd., 2017). Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) 13 Kasım 2015' te EGFR mutant akciğer kanserinin ve metastatik EGFR T790M mutant KHDAK' nin birinci basamak tedavisinde kullanılmak üzere bu ilaca hızlı onay vermiştir (Khozin vd., 2017; Skupin-Mrugalska ve Minko, 2020)



Şekil 2.4. Osimertinib kimyasal yapı modeli

Ancak bu ilacın kullanım şartı, ilk TKİ tedavisi sonrası progresyon geliştiğinde alınacak yeni biyopsi materyalinde bu mutasyonun yeniden görülmesidir (Dirican vd., 2016)

OSİ rezeke edilmiş, evre IB' den IIIA KHDAK' ye yönelik bir adjuvan tedavi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Tsuboi vd., 2023)

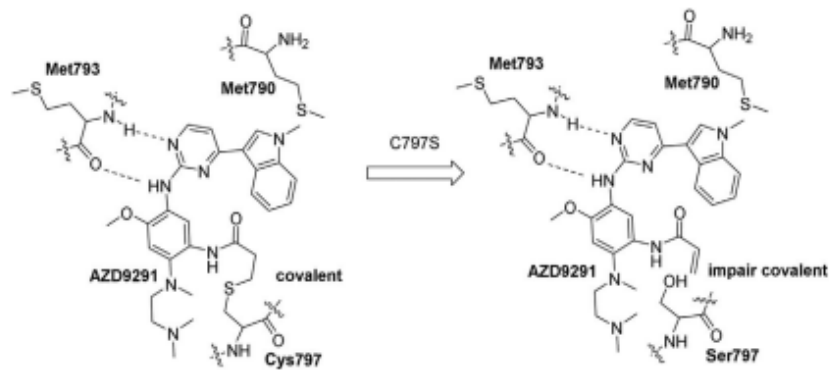
Önerilen günlük dozu 80 mg' dır. Aç ya da tok alınabilip, yutma zorluğu olan hastalarda 50 mL suda çözülerek içilir veya nazogastrik tüp aracılığıyla uygulanabilir (Greig, 2016).

Sıçan ve köpeklerde yapılan testlerde toksisite için ana hedef organlar gastrointestinal sistem, cilt ve gözler olarak bulunmuştur (Khozin vd., 2017).

Farmakokinetik profilini yaş, cinsiyet, kilo, etnik köken, hafif veya orta dereceli böbrek yetmezliği ya da hafif karaciğer yetmezliği gibi faktörler anlamlı bir şekilde etkilememektedir. Üreme çağındaki kadın ve erkek hastalar tedavisi sırasında ve sonrasında etkili bir doğum kontrol yöntemi kullanmaları hususunda bilgilendirilmelidir. Hamilelik sırasında uygulandığında fetüse zarar verebilir. Laktasyonda tedavi süresince ve son dozdan sonra 2 hafta boyunca emzirme bırakılmalıdır (Greig, 2016).

Tedavide görülen en yaygın yan etkiler diyare, döküntü, cilt kuruluğu ve tırnak toksisitesidir. Kardiyomiyopati ve pnömoni ise nadir olarak görülmektedir (Jänne vd., 2015).

OSİ geçici başarılar elde etse de C797S adlı üçüncül bir mutasyon tedaviyi fazlaca engellemektedir. Bu mutasyon ekson 20' de meydana gelip, EGFR' nin bağlanma yeri olan 797 konumundaki sisteini serin ile değiştirdiği bir yerdedir. Moleküler modellemeler OSİ' nin akrilamid grubu aracılığıyla EGFR T790M' in Cys797' si ile kovalent bir bağ oluşturduğunu göstermektedir (Şekil 5). OSİ tedavisinden sonra T790M' li hastaların yaklaşık %40' ında C797S mutasyonunu da görülmektedir. Sonuçta ilacın hücre çoğalmasını inhibe etme ve EGFR fosforilasyonunu etkileme oranı 100 ila 1000 kat kadar azalmaktadır (J. Li ve Kwok, 2020; Y. Li vd., 2023; Lu vd., 2018).

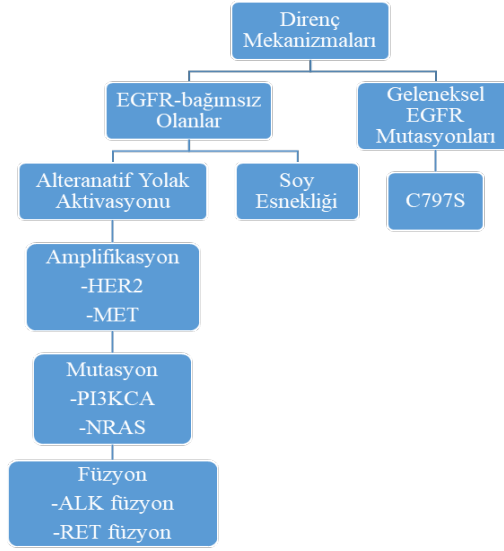


Şekil 2.5. Osimertinib ve EGFR T790M ve EGFR C797S ile bağlanma etkileşimlerinin şematik temsili (Lu vd., 2018)

Thress ve arkadaşları 15 hastada yaptıkları çalışmalarında, tedavi öncesinde hepsinin T790M mutasyonunun pozitif olduğunu ancak OSİ direnci geliştirdiklerinde üç moleküler alt tipe ayrıldıklarını göstermişlerdir. Altı hasta C797S mutasyonuna sahip olup, beş vakada T790M mutasyonu korundu fakat C797S mutasyonu edinilmedi ve dört vakada ise EGFR aktive edici mutasyonun varlığına rağmen T790M mutasyonu kayboldu. Bu ve diğer bazı çalışmalar EGFR

C797S mutasyonu tarafından aracılık edilen direnci aşabilen yeni tedavilere olan ihtiyacı ortaya koyarak dördüncü nesil TKİ' lerin keşfini hızlandırmıştır (Lu vd., 2018; Thress vd., 2015)

OSİ dirençlerini; ikincil EGFR mutasyonlarından C797S mutasyonu, tirozin kinaz yolağı aktivasyonu olan MET ve HER2 amplifikasyonu, PI3K/AKT/mTOR ve RAS-MAPK yolağı aktivasyonu, EMT ve ABC transporterları şeklinde özetleyebiliriz (Şekil 6).



Şekil 2.6. Osimertinib direncinin mekanizması (Schmid vd., 2020)

2.6. İlaç Direncini Önleme

MDR kanser tedavisinin karşı karşıya olduğu en yaygın klinik problemlerden biridir. Tümör hücrelerinde ilaç direnciyle mücadele etmek için kullanılan geleneksel stratejilerden kemoterapötik dozunu artırma kanserin tamamen tedavi edilmesinde başarılı olamamaktadır. Bu alanda geliştirilen ve şu anda ilaç direncini azaltmanın en umut verici yöntemlerinden biri nanotaşıyıcılarıdır. Nanopartiküllerin kullanıldığı nanomedisin, ilaç direncinde rol oynayan P-gp gibi proteinleri baskılayıp apoptozu indükleyerek etki göstermektedir (Majidinia vd., 2020). İlaç direncinin etkisini en aza indigeme girişimlerinden biri de farklı mekanizmalara ve farklı direnç türlerine sahip olan iki veya daha fazla ajanın bir arada kullanılmasıdır. Tümörün çoğalması için gerekli olan hücresel kaçış yollarının gelişimini engellemeyi hedeflemektedirler. Kanser tedavisinde bu amaçla yapılan kombinasyon tedavileri son yıllarda ivme kazanmaktadır ve yapılan birkaç çalışmada ilaç kombinasyonlarının monoterapiye kıyasla daha iyi sonuçlar verdiği ortaya koymuştur. FDA da monoterapiye göre daha üstün etkinlik gösteren ve başarılı

güvenlik profiline sahip kombinasyon tedavilerini onaylamaktadır (W. Huang vd., 2021; Yardley, 2013)

2.7. Bitkilerin Kansere Tedavisindeki Yeri

Kemoterapi kanserin ana tedavi yöntemlerinden biri olsa da kemoterapi almalarına rağmen hastalarda ölüm oranları hala yüksek seviyelerdedir. MDR ile ilişkili doz sınırlayıcı toksisite kanser tedavisindeki başarısızlık nedenlerinden olup MDR' nin başarılı yönetimi kemoterapi için çok önemlidir. Bugüne kadar MDR' yi tamamen aşacak etkili bir antikanser ilacı henüz bulunamamıştır. Çin literatüründe doğal ürünlerin kanser hücrelerinin ilaç direncini aşabileceğine dair birçok rapor bulunmaktadır. Fitokimyasallar tek başına veya diğer kemoterapötiklerle kombinasyon halinde kanser hastalarında daha az yan etkiyle konvansiyonel antikanser ilaçlara karşı kanser hücrelerini duyarlı hale getirme potansiyeline sahiptir. Bunu ilaç taşıyıcılarını inhibe ederek, hücre detoksifikasyon kapasitesini azaltarak veya hücre apoptoz hassasiyetini artırarak gerçekleştirmektedirler (Isaoglu vd., 2020; Pu Wang vd., 2015) Yine kemoterapinin yorgunluk, saç dökülmesi, anemi ve kanama ile beraber oluşan sağlıklı hücrelerdeki toksisite riski de bitkisel tedavi seçeneklerini popüler hale getirmektedir (Majolo vd., 2019)

Tıbbi bitkilerin bazılarının bağışıklık düzenleyici ve antioksidan özellikler içeren aktif bileşikler açısından zengin olması da onları potansiyel kanser ilacı adayları haline getirmektedir (Tablo 2) (Bhanupriya, 2015; Darji vd., 2024)

Avrupa' daki kanser hastalarının %15 ile %73' ünün kanser tedavisinin yan etkilerinden dolayı bitkisel ilaçlar kullandığı tahmin edilmektedir. Hastaların %70' i bitkileri doğal, güvenilir ve yan etkisiz bulduğundan doktor ve eczacılarına danışmadan direk kullanmaya başlamaktadırlar. Kansere tedavisi son derece karmaşık olup çok çeşitli etken madde içerdiğinden ilaç etkileşimleri açısından büyük bir potansiyel taşımaktadır. Bitkilerin ilaçlar ile eş zamanlı kullanımı aynı metabolik yolların kullanılmasına bağlı olarak istenmeyen reaksiyonlar ve etkileşimler ile sonuçlanabilmektedir. Bu etkiler alerjik reaksiyonlardan gastrointestinal sorunlara hatta hepatotoksisite, nörotoksisite veya nefrotoksisite gibi ciddi problemlere kadar uzanmaktadır (Vasques vd., 2024)

Tablo 2.2. FDA tarafından onaylı bitkisel ilaç örnekleri (Cragg vd., 1997)

İlaç	Bitki Kaynağı	Kullanım
Taxol	Taxus brevifolia	Ovary and breast cancer
Vinblastine Vincristine	Catharanthus roseus	Leukemia, bladder and testicular cancer
Irinotecan	Camptotheca acuminata	Metastatic colorectal cancer
Etoposide Teniposide	Podophyllum peltatum	Small-cell lung, testicle cancer and lymphoma

M. officinalis bitkisi de esansiyel yağında bulunan aktif sekonder metabolitlerin kolay erişilebilirlikleri, hoş aromaları ve düşük toksisiteleri sayesinde birçok kronik hastalığın uzun vadeli tedavisinde kullanılır ve bu nedenle çeşitli doğal ürünlerin araştırılması günümüzde kanser tedavisi için umut vadetmektedir (Rasgele vd., 2024).

2.7.1. *Melissa officinalis* L. bitkisi

M. officinalis L., Lamiaceae familyasına ait aromatik bir tıbbi bitki türüdür. Arı melisa, bal melisa ve limona benzer kokusundan dolayı limon melisa gibi birçok isimle bilinen çok yıllık bir bitkidir. Melisa çayı Avrupa' da sakinleştirici olarak kullanılmaktadır. Çok uzun bir süredir geleneksel tıpta ilaç olarak kullanılmakta ve terapötik özelliklerini belirlemek için birçok araştırma yapılmaktadır. *M. officinalis* ekstraktları antiviral, antibakteriyel, antifungal ve antiparaziter özelliklere sahiptir. Antioksidan, hipoglisemik, hipolipidemik, hepatoprotektif, antikanser, antidepresan, anksiyolitik, antiinflamatuvar, spazmolitik ve sedatif-hipnotik gibi tıbbi özellikleri de dahil olmak üzere gıda sektöründe, aromaterapide ve geleneksel tıpta geniş bir kullanım alanı mevcuttur (Miraj vd., 2017; Moacă vd., 2018; Shakeri vd., 2016; Stefanovic ve Čomić, 2012).

Fitokimyasal analizlerde *M. officinalis*' in ana aktif bileşenleri olarak flavonoidler, uçucu yağlar, triterpenler ve fenolik asitler öne çıkmaktadır (Mencherini vd., 2007). Geranial, geraniol, sitronellal, neral, karvakrol bu uçucu bileşiklerin bazılarındandır (Meftahizade vd.,

2009). Fenolik asitler temel olarak rosmarinik asit, kafeik asit, salvianolik acid A-B-C ve F, gallik asit ve melitrik asitten oluşmaktadır (Barros vd., 2013). Apigenin, luteolin, hesperidin, rutin, kateşin ve naringin ise flavonoidlerin başlıcalarıdır (Dastmalchi vd., 2008; Patora ve Klimek, 2002; Pereira vd., 2014).

M. officinalis' in geleneksel olarak sakinleştirici etki için kullanımına dair birçok kayıt bulunup *M. officinalis'* in anksiyolitik etkilerini destekleyen birkaç çalışma da yapılmıştır. Fare beyinleri üzerinde yapılan bir in vitro çalışmada, *M. officinalis'* in metanol ekstraktı ve ana bileşeni olan rosmarinik asitin GABA-T inhibisyon aktivitesi gösterdiği bulunmuştur (Awad vd., 2009).

Başka bir in vivo çalışmada, bitkinin hidroalkolik ve etanolik ekstraktlarının oral olarak verilmesinin beyin GABA seviyelerinin artmasına yol açan GABA-T inhibisyonuna neden olup, anksiyolitik etkiler doğurduğu öngörülmüştür (Ibarra vd., 2010).

Eski tıp kitaplarında *M. officinalis'* den canlandırıcı ilaç olarak bahsedilmesine istinaden yapılan bir in vitro çalışmada, *M. officinalis'* in su ve metanol ekstraktlarının az da olsa monoamin oksidaz A (MAO-A)' yı inhibe edebildiği ve metanol ekstraktının bu inhibisyonda daha etkili olduğu gösterilmiştir.

M. officinalis' in merkezi sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde kullanılması da çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalarla desteklenmektedir. *M. officinalis'* in metanol ekstraktının nöroendokrin bir hücre hattı olan PC-12 hücrelerine uygulanması sonucu yapılan MTT ve LDH testleri, bu hücrelerin H₂O₂ toksisitesine karşı korunduğunu göstermiştir. Ayrıca hem su hem de metanol ekstraktları hücre içi ROS oluşumunda önemli bir azalma ile nöroprotektif etkinlik sağlamıştır (López vd., 2009).

M. officinalis' in antioksidan, hipolipidemik ve anksiyolitik özellikleri bitkinin kalp hastalıklarının tedavisinde geleneksel olarak kullanımını kısmen de olsa açıklasa da bu etkilerin doza bağımlılığını değerlendirmek için daha fazla çalışma gerekmektedir (Shakeri vd., 2016).

Kardiyovasküler özelliklerini belirlemek için ise farmakolojik çalışmalar çoğunlukla *M. officinalis'* ekstraktlarının anti-aritmik etkilerine odaklanmıştır. Sıçanlarda yapılan in vivo bir çalışmada, bitkinin metanol ekstraktı CaCl₂ ile indüklenen aritmiler sonrası ventriküler

fibrilasyon (VF) ve ventriküler taşikardi (VT) görülme sıklığını azaltmıştır. Bunun da bitkinin β -adrenerjik antagonistik aktivitesine bağlı olduğu düşünülmektedir (Akhondali vd., 2015).

2.7.1.1. *Melissa officinalis* bitkisinin antikanser etkileri

M. officinalis çeşitli kanser türlerinin tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Javadi ve Emami, 2015). Bitkinin esansiyal yağının ve ekstraktlarının antikanser ve antiproliferatif özellikleri pek çok insan kanser hücre hattında çalışılıp anlamlı sonuçlar alınmıştır (Tablo 3) (Faraji et al., 2021).

Darzi ve Amirghofran' ın yaptıkları çalışmada *M. officinalis* bitkisinin diklorometan ve n-hekzan fraksiyonları K562 miyelojenöz lösemi hücre hattında ve Jurkat insan T lenfosit hücrelerinde doza bağımlı olarak güçlü inhibitör etki göstermiştir. Diklorometan fraksiyonu lösemi hücre hatlarında Bax mRNA ekspresyonunu ve Bax/Bcl-2 oranını artırarak apoptozu anlamlı bir şekilde indüklemiştir. Bunun yanında bitkinin n-hekzan fraksiyonu apoptozla ilgili genlerin ekspresyonunu anlamlı bir şekilde değiştirmedikinden hücrenin büyümesinin inhibisyonu bitkinin bir fraksiyonu olarak bulunmamıştır (Ebrahimnezhad Darzi ve Amirghofran, 2013).

Yapılan bir çalışmada *M. officinalis*' in hidroalkolik ekstraktının MCF-7 meme kanseri ve A549 insan akciğer kanseri hücre hatlarına uygulanması sonucu görülen antiproliferatif etkinin ekstrenin Bcl-2, Her2, VEGF ve hTERT onkogenlerinin ekspresyonunu inhibe etmesi sonucu olduğu bulunmuştur (R. Jahanban-Esfahlan vd., 2017).

Sghaier ve arkadaşları *M. officinalis*' in aktif flavonoidlerinden biri olan rutin A549 insan akciğer kanseri hücre hattı, HT29 ve Caco-2 insan kolon kanseri hücre hatlarındaki antiproliferatif etkisini araştırmıştır. Yapılan MTT testleri ve kemilüminesans ile ölçülen değerler sonucu rutin hücre adhezyon ve göçünü azaltmak, proliferasyonu inhibe etmek ve ROS üretimini azaltmak için kullanılabileceği gösterilmiştir (Ben Sghaier vd., 2016).

Sattu ve arkadaşları *M. officinalis*' in etkin flavonoidlerinden olan hesperidinin etkisini A549 insan akciğer kanseri hücre hattında apoptozu indükleyen tümör baskılayıcı proteinlerden p53 ve p21' i geri kazandırıp, c-myc, β -katenin ve PCNA protein ekspresyonunu azaltarak sağladığını göstermiştir (Sattu vd., 2019).

Yapılan bir çalışma *M. officinalis*' in etkin flavonoidlerinden olan apigeninin A549 hücre hattında tümör büyümesini, hücre göçü ve invazyonunu PI3K/AKT sinyal yolağını hedef alarak gerçekleştirdiğini göstermiştir (Zhou vd., 2017).

Moacă ve arkadaşları çalışmalarında *M. officinalis*' in hem kök hem yaprak etanol ekstraktlarının MDA-MB-231 meme kanseri ve HaCat anöplid ölümsüz keratinosit hücre hatlarında uygulanması sonucu yaprak ekstraktının HaCat hücrelerine karşı daha seçici bir şekilde sitotoksik olduğunu, gövde ekstraktının MDA-MB-231 hücrelerine karşı daha yüksek sitotoksikite gösterip bu ekstraktların antitümör aktivitesinin anlamlı olduğunu göstermiştir (Moacă vd., 2018).

de Sousa ve arkadaşları *M. officinalis* esansiyel yağının MTT ile yapılan in vitro sitotoksikite testinde yağın K562, A549, Caco-2, MCF-7 ve HL-60 insan kanser hücre hatları ve B16F10 fare hücre hattı üzerinde son derece etkili olduğunu ve antioksidan özelliklerinin antitümoral aktivitesine katkıda bulunabileceğini göstermiştir (de Sousa vd., 2004).

Yapılan bir çalışmada *M. officinalis* esansiyel yağı ve ana bileşeni olan sitral aktif MRP1 ekspresyon eden A172 ve U87 insan glioblastoma multiforme hücre hatlarında ROS üretimini arttırmış ve MRP1 ekspresyonunu inhibe etmiştir (Queiroz vd., 2014).

Bitgen ve arkadaşları *M. officinalis*' in MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde hem programlı hücre ölümü hem de otofaji gibi hücrel geri dönüşüm yolları üzerinden sitotoksik bir etkiye sahip olduğunu Beclin-1 ve LC3 immünofloresans boyama yöntemi ile göstermiştir (Bitgen vd., 2022).

Weidner ve arkadaşları *M. officinalis* hidroalkolik ekstraktının HT-29 ve T84 kolon karsinoma hücrelerinde antiproliferatif etkiler gösterdiğini ve intrasellüler ROS üretiminin indüklenmesi yoluyla apoptozu artırdığını bulmuştur (Weidner vd., 2015).

Jahanban-Esfahlan ve arkadaşları *M. officinalis* hidroalkolik ekstresinin A549, PC-3, MCF-7, SKOV3 hücre hatlarının proliferasyonunu dozdan bağımsız bir şekilde inhibe ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca *M. officinalis*' in antiproliferatif etkilerinin tümör tipi spesifik olduğu ve hormon bağımlı kanser hücrelerinin bu ekstraktların antitümöral etkilerine yüksek yanıt verdiği bulunmuştur (A. Jahanban-Esfahlan vd., 2015).

Tablo 2.3. Kansere hücrelerinde çalışılan *M. officinalis* ekstraktlarına örnekler (Faraji et al., 2021)

Mekanizma	Ekstrat tipi/İçerik	Kanser hücresi
Antiangiyojenik	Su	A549/ MCF-7/ PC3
Antiproliferasyon	Etanol/Su	HCT-116
Antiapoptotik	Metanol	K562
Antiangiyojenesis	Etanol	MCF-7/MDA-MB-231
Antiproliferasyon	Hidroalkolik	MCF-7/PC-3/A549
Antiapoptotik	Su	MCF-7/MDA-MB-468
Antioksidan	Esansiyel yağ	HL-60/A549/B16F10

3. YÖNTEM

Tez çalışmasında PC-9 KHDAK hücre hattı üzerinde OSİ' nin, *M. officinalis* su ve metanol ekstraktlarının tek tek ve bir arada etkileri incelenmiş olup, deneysel çalışmalar Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı ve Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi' nde gerçekleştirilmiştir.

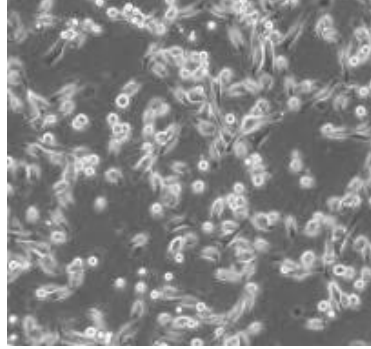
3.1.1. Materyal

3.1.2. Kullanılan ekipman ve cihazlar

RT-qPCR cihazı	: Qiagen Rotor Gene Q
ELISA	: Biotek Epoch
PCR	: Bio-Rad Touch C1000
Mikroskop	: Inverted Nikon Eclipse Ti2-U
Biyogüvenlik Kabini	: Bil-ser Class II B2
Santrifüj cihazı	: Hanil, Smart R17
Karbondioksit inkübatörü	: Nüve EC 160
Otomatik pipet	: Eppendorf Research Plus
Otomatik pipet (Şarjlı)	: Isolab
Tüp karıştırıcı	: Heidolph Reax top
Soğutucu	: Bosch Buzdolabı
Ultra derin dondurucu (-80°C)	: Haier Biomedical
Hazneli buz makinesi	: Scotsman AF 206
Distile su aleti	: Nüve ND 12
Su banyosu	: Memmert WNB 14
Analitik tartı aleti	: Shimadzu ATX224

3.1.3. Hücre hattı

PC-9 KHDAK hücre hattı (Şekil 7) ticari olarak ATCC' den satın alınmıştır.



Şekil 3.7. PC-9 hücre hattı

3.1.4. Kullanılan kimyasallar

Osimertinib	: SelleckChem, Cat no: S7297
<i>M. officinalis</i> bitkisi	: Aktar
Dulbeco's Modified Eagle Medium	: Biological Industries, REF 01-055-1A
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	: Biowest, Cat no: L0615
Fetal Bovine Serum (500 ml)	: Panbiotech, Cat no: P30-3033
L-Glutamin Solüsyon	: Sigma-Aldrich G2150
Penisilin Streptomisin 100 mL	: Sigma-Aldrich P4333
Tripsin-EDTA solüsyon (%0,25)	: Sigma-Aldrich T3924
Tripan mavisi solüsyonu	: Lonza Cat no: 17-942E
Aquaguard-1 (100 mL)	: Vivacell C3480-0100
Cell Proliferation Kit (MTT)	: Elabscience E-CK-A341
İnsan BCL-2 ELISA Kit	: Thermofisher BMS2443
İnsan BAX ELISA Kit	: Thermofisher EEL030
İnsan CASP3 ELISA Kit	: Thermofisher KH0109
RT-qPCR Kiti	: SYBR Green PCR Master Mix
RNA izolasyon Kiti	:Axyprep Multisource Total RNA Miniprep Kit, Axygen Scientific, Inc.
cDNA sentez Kiti	:Thermofisher, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre kültürü çalışmaları

3.2.1.1. Besiyeri hazırlanması

PC-9 hücre hattında besiyeri olarak 500 mL DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kullanılmıştır. İçerisine 7,5 ml L-glutamin, 50 ml Fetal bovine serum (FBS) ve 5 ml penisilin-streptomisin eklenerek besiyerinin son hali hazırlanmıştır. Çalışmalarda laminar kabin kullanılmıştır (Şekil 8). Her çalışmadan önce ve sonra kabin ultraviyole ışını ile sterilize edilip, kabinin iç yüzeyleri %70' lik etanol ile silinmiştir.



Şekil 3.8. Hücre kültürü çalışmalarının yapıldığı steril laminar kabin

3.2.1.2. Hücre hattının pasajlanması

Çalışmada PC-9 hücre hattı DMEM besiyerinde, CO₂ inkübatöründe ve 75 cm²' lik flask içerisinde inkübe edilmiştir. İnkübatörün koşulları %5 CO₂, 37°C ve %95 nem şeklindedir. İnkübatörün steril kalabilmesi adına otoklavlanarak steril hale getirilmiş saf su içine %1 oranında Aquaguard-1 ilave edilerek inkübatör haznesine koyulmuştur. Flasklerdeki besiyerleri

önce birer gün daha sonra ikişer ya da üçer gün arayla değiştirilmiştir. Bu işlem flastaki besiyerinin çekilmesi, hücrelerin yaklaşık 5 ml DMEM ile yıkanması ve son olarak 8 ml taze DMEM eklenmesi şeklinde yapılmıştır. Süreç hücreler flask yüzeyinin yaklaşık %90' ını kaplayana dek devam etmiştir. PC-9 hücre hattının yaklaşık beş günde flask yüzeyinin %90' lık kısmını kapladığı görülmüş ve pasajlama işlemine başlanmıştır. Bu işlem için hücre hattı besiyeri uzaklaştırılıp hücreler 5 ml besiyeri ile yıkanmıştır. Hücrelerin yüzeyden ayrılması için yıkama işleminden sonra flaska 6 ml Tripsin-EDTA solüsyonu ilave edilerek yaklaşık 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Işık mikroskopu altında hücrelerin sökülüp sökülmediği kontrol edilmiştir. Flask yüzeyinden ayrılan hücrelerin tripsinden zarar görmemesi ve tripsinin uzaklaştırılması için örnekler 12 ml besiyeri içeren 50 ml' lik falkon tüpe alınıp 18 ml' ye seyreltilmiştir. Ardından 800 xg de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi bitiminde süpernatant atılıp içerisine 12 ml DMEM eklenerek pipetajlanmıştır. Daha sonra bu homojenat 75 cm² 'lik dört tane flaska paylaştırılmış ve DMEM eklenerek her birinin hacmi 8 ml' ye tamamlanarak inkübatöre kaldırılmıştır.

3.2.1.3. Hücre hattı stoklarının hazırlanması

İlerleyen zamanlarda aynı hücre hattının başka bir bilimsel çalışmada kullanılması, çalışmaya ara verilmesi veya çalışmanın tekrarlanması amacıyla PC-9 hücre hattı dondurulup stokları oluşturulmuş ve sıvı azot tankına kaldırılmıştır. %80' e yakın kısmı dolan flaskların besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Ardından 5 ml besiyeri ile yıkayıp içerisine 6 ml Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek CO₂ inkübatöründe 5 dk bekletilmiştir. Hücrelerin ayrılması işleminin ardından 12 ml DMEM içeren 50 mL falkon tüpe alınıp 18 ml' ye seyreltilmiştir. Bu şekilde solüsyonun zararlı etkileri en aza indirilmiştir. Hücrelerin çökmesi için 800 xg' de 5 dk santrifüj edilip süpernatant atılmıştır. Hücrelerin yüzeyden ayrılması için falkon tüplere nazikçe vurulup içerisine buzda bekletilmiş 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO %5-10) ve 900 µl FBS eklenmiştir. Oluşan sıvı hızlı bir şekilde 2 ml kriyotüpe konularak sıvı azot tankında muhafaza edilmiştir.

3.2.1.4. Hücrelerin çözündürülmesi

Sıvı azotta bulunan stoklardan alınarak hücre çözdürme işlemi yapılmıştır. Su banyosunda DMEM 37°C' ye gelene dek bekletilmiştir. Stoktan alınan PC-9 hücre hattı su banyosunda hızlıca çözdürülüp içerisinde 20 ml DMEM olan tüplere alınmıştır. Falkon tüp 5 dk 800 xg' de santrifüj edilip süpernatant atılarak hücreler DMSO' nun zararlı etkilerinden arındırılmıştır.

Hücrelerin yüzeyden ayrılması için tüplere nazıkçe vurulmuştur. İçerisine 8 ml DMEM eklenerek pipetajlanıp flaska aktarılmıştır. %5 CO₂ ve 37°C şartlarına sahip inkübatöre konularak bir gün bekletilmiştir. Mikroskopta yapılan kontrol sonucunda hücrelerin flaskın tabanına yapışmaması canlı olmadığını, yapışması canlı olduğunu göstermektedir. Hücrelerin yapıştığı görüldüğünde yıkanıp taze besiyeri eklenerek tekrar inkübatöre kaldırılmıştır.

3.2.1.5. Hücre sayım işlemi

Hücre sayma protein analizi, gen ifade analizi ve sitotoksisite çalışmalarında yapılmaktadır. İnkübatörden alınan flask içerisindeki besiyeri atılıp yıkama işlemi yapılmıştır. Hücreleri yüzeyden ayırmak için 6 ml Tripsin-EDTA solüsyonu eklenip 5 dk inkübe edilmiştir. Sökülen hücreler 12 ml besiyeri içeren falkon tüplere alınarak seyreltilmiştir. Ardından 5 dk, 800 xg' de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra içerisine 5 ml besiyeri eklenerek pipetajlanmıştır. Hücre homojenatından 10 µl Thoma lamına alınıp hücreler sayılmıştır. Hücre sayısını bulmak için Hücre sayısı = sayılan hücre sayısı x seyreltme faktörü x 10⁴ formülü esas alınmıştır.

3.2.2. Sitotoksisite çalışmaları

3.2.2.1. Uygulanacak kimyasal maddelerin hazırlanması

OSİ' den 0,124 g toz tartılarak 800 µl DMSO (%0,1) içerisinde çözündürülmüştür. 5 dk, 1000 xg' de santrifüj edilip süpernatant alınarak 0,05 molar derişimde stok hazırlanmıştır. Çalışmada seyreltme esnasında kolaylık sağlaması açısından ana stoktan 1 µl alıp üzerine 624 µl DMEM eklenerek 8.10⁴ nM ara stok elde edilmiştir.

M. officinalis bitkisinin yapraklarını içeren drog aktardan temin edilmiştir. 25 g drog tartılarak erlene alınıp 500 ml' ye metanol ile tamamlanmıştır. Bir diğer erlene yine 25 g drog eklenip distile su ile 500 ml' ye tamamlanmıştır. Erlenler 24 saat inkübatörde bekletilip 24 saat sonunda karışımlar filtre edilmiştir.

Metanol ekstraktı için süzöntü bir balon jøjeye alınarak evaporasyon işlemi uygulanmıştır (Şekil 9). Ekstraktın 0,08 g tartılıp, 1 mL DMSO içinde çözündürülmesiyle 80.000 µg/mL stok hazırlanmıştır.

Su ekstraktı için ise falkonlara 25 ml civarı süzüntü alınıp -80°C' de 1,5 saat dondurulmuştur. Ardından 48 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Liyofilize üründen 0,08 gram tartılıp 1 mL DMSO ardından 4 mL DMEM' de çözündürülmüştür. Böylece 16.000 µg/mL stok hazırlanmıştır.



Şekil 3.9. *M. officinalis* metanol ekstraktına uygulanan evaporasyon işlemi

3.2.2.2. Hücre canlılık testi

TC-treated pleytler 96 kuyucukludur. Her bir kuyucuğunda 200 µl hacminde %1,5 penisilin-streptomisin, %1 L-glutamin, %10 FBS içeren DMEM içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde inoküle edilerek 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Konsantrasyona ve süreye bağlı sitotoksik etkilerini belirlemek için OSİ, *M. officinalis* su ve metanol ekstraktı ve bunların kombinasyonları ayrı ayrı çalışılmıştır.

24 saatlik sürenin sonunda pleytlerdeki DMEM uzaklaştırılmıştır. Kimyasallar azalan konsantrasyonlarda tatbik edilmiştir. Her bir grup için 24 ve 48 saatlik ilaç konsantrasyonları hazırlanmıştır. Her deneme 4 tekrarlı olup kontrol grubu 12 tekrarlı çalışılmıştır (Tablo 4). 24 ve 48 saat sonunda MTT uygulaması protokolü yapılarak, absorbanslar 570 nm' de ölçülüp hücre canlılık yüzdeleri hesaplanmıştır. Negatif kontrol grubu olarak DMEM kullanılmıştır.

Tablo 3.4. Hücelere uygulanan kimyasallar ve konsantrasyonları

Konsantrasyon Setleri	OSİ (nM)	Met. ekst. (µg/mL)	Su ekst. (µg/mL)	OSİ (nM)+Met. (µg/mL)	OSİ (nM)+Su (µg/mL)
1	800	800	800	800+800	800+800
2	400	400	400	400+400	400+400
3	200	200	200	200+200	200+200
4	100	100	100	100+100	100+100
5	50	50	50	50+50	50+50
6	25	25	25	25+25	25+25
7	12,5	12,5	12,5	12,5+12,5	12,5+12,5

3.2.3. Kombinasyon indeksinin hesaplanması

Maddelerin aditif, sinerjik ya da antagonistik etkilerden hangine sahip olduğunu ve etkinin derecesini gösteren değer olan CI değerleri Compusyn programı kullanılarak hesaplanmıştır. İki veya daha fazla ajanın birlikte kullanıldığında sinerjik, aditif veya antagonistik etkiler gösterip göstermediğini belirlemek için kullanılan Chou–Talalay yöntemi uygulanmıştır. Bu kapsamda değerlendirilen parametreler; her bir bileşiğin bireysel etkisi (IC_{50} değerleri), kombinasyon halinde uygulandıklarında gözlemlenen etkiler, sabit oranlarda dozların uygulanması ve etki düzeylerine göre CI hesaplaması şeklindedir.

İstatistiksel analiz, tek yönlü ANOVA yöntemi ile yapılarak; CI sonuçlarına göre uygulanan kimyasalların hücre hattı üzerindeki etkisi tablosuna göre de seçilecek etkiye karar verilmiştir (Tablo 5).

Elde edilen CI değerleri neticesinde, CI değerinin en yüksek olduğu antagonistik etkinin en fazla olduğu OSİ ve *M. officinalis* ekstrelerinin konsantrasyonlarında gen ifade düzeyi ve protein seviyesi incelenmiştir.

Tablo 3.5. CI sonuçlarına göre uygulanan kimyasalların hücre hattı üzerindeki etkisi

Kombinasyon İndeksi (CI)	Hücreye Etkisi
CI = 1,1-1,2	Hafif Antagonistik
CI = 1,2-1,45	Orta Antagonistik
CI = 1,45-3,3	Antagonistik
CI = 3,3-10	Güçlü Antagonistik
CI > 10	Çok güçlü Antagonistik
CI = 0,9-1,1	Aditif
CI = 0,85-0,9	Hafif sinerjik
CI = 0,7-0,85	Orta sinerjik
CI = 0,3-0,7	Sinerjik
CI = 0,1-0,3	Güçlü sinerjik
CI < 0,1	Çok güçlü sinerjik

3.2.4. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

En iyi antagonistik etkinin olduğu 48 saat inkübasyon, 50 µg/ml metanol ekstraktı, 50 nM OSİ kombinasyonu kullanılarak PC-9 hücre hatlarından RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmıştır. Dört adet steril petri içine her birinde $1,8 \times 10^6$ tane hücre olacak şekilde ekim yapıp hücrelerin yapışması için bir gece inkübatöre kaldırılmıştır. Hücreler PBS ile yıkayıp, kimyasallar uygulanmıştır.

Tablo 3.6. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi için petrilere uygulanan kimyasallar

Petri no	Osi	Metanol ekstrakt
Kontrol (1)	-	-
2	50 nM	-
3	-	50 µg/ml
4	50 nM	50 µg/ml

Uygulamanın ardından petri 48 saat bekletilmiştir. 48 saatlik inkübasyon bitiminde hücreler petrilere alınarak 5 dk 800 xg' de ve +4°C' de santrifüjlenip hemen buz içerisine alınmıştır. RNA birleşiminin stabilitesi kalması için ivedilikle her birine Thermo Fisher-RNA later

Reagent solüsyonu eklenmiştir. Axyprep Multisource Total RNA Miniprep Kit (Axygen ®) protokolüne göre saflaştırma işlemi yapılmıştır.

Membran parçalama ve RNA saflaştırma aşamaları aşağıda belirtildiği şekilde olmuştur:

- Hücrelere 200 µL R1 buffer ilave edilmiştir.
- 10 defa steril 21 Gauge' luk şırınga ile çek-bırak yapılmıştır.
- Üzerine 75 µL R2 buffer ilave edilip 20 sn vortekslenip 24°C'de, 5 dk, 12000 xg' de santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant RNaz-DNaz' dan arındırılmış 1,5 mL' lik steril tüplere aktarıldıktan sonra 125 µL kadar izopropanol eklenip 5 sn vortekslenmiştir.
- Spin kolonu 2 ml' lik bir mikrotüpe yerleştirildikten sonra örnek kolona transfer edilmiştir.
- 1 dk boyunca +4°C' de 6000 xg' de santrifüj edilmiştir.
- Altta kalan filtrat atıldıktan sonra spin kolonu yeniden mikrotüpe yerleştirilmiştir.
- Spin kolona 500 µL Buffer W1A eklenip 1 dk boyunca 12000 xg' de santrifüj edilmiştir.
- Filtrat atılıp, mikrotüpe tekrar yerleştirildikten sonra 700 µL Buffer W2 eklenip 1dk boyunca +4°C 12000 xg' de santrifüjlenmiştir. Bu işlem 2 kez tekrar edilmiştir.
- Filtrat atılıp tekrar tüpe yerleştirildikten sonra, boş halde +4°C 12000 xg'de 1 dk boyunca yıkama solüsyonunu uzaklaştırmak için santrifüj edilmiştir. Kolon RNaz-DNaz' dan arındırılmış, steril 1,5 ml' lik bir tüpe aktarılmıştır.

Kolona Buffer TE' den 100 µL eklenerek 1 dk 24°C' de inkübasyona bırakılmıştır. 1 dk boyunca 12000 xg' de santrifüj edilip alt kısımda biriken saflaştırılmış RNA'nın saflık ve konsantrasyon tayini yapıldıktan sonra cDNA sentez kiti protokolüne uygun olarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiş ve RT-qPCR analizinde kullanılmak üzere -80°C' de saklanmıştır.

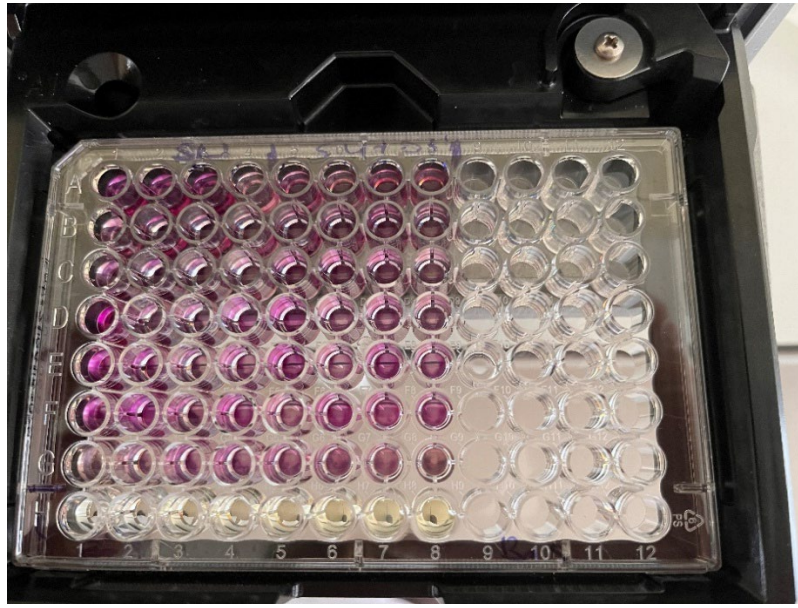
3.2.5. RNA ve cDNA konsantrasyon ve saflık tespiti

ELISA cihazı (BIOTEK) ile RNA ve DNA için konsantrasyon ve saflık belirlenmiştir (Şekil 10). Ölçülmüştür absorbanları 260 nm, 280 nm, 320 nm dalga boylarında kör örneğe karşı

ölçülmüştür. RNA miktarı (ng/μl), (OD260) x seyreltme faktörü x 40; DNA miktarı (ng/μl) ise, (OD260) x seyreltme faktörü x 50 formülü ile hesaplanmıştır.

Konsantrasyon ve saflık değerlendirilmesine RNA için 260 nm dalga boyundaki absorbans, proteinler için 280 nm dalga boyundaki absorbans ve partikül varlığı için 320 nm dalga boyundaki absorbans değeri ile ulaşılmıştır.

RNA ve DNA' nın saflıkları RNA için $OD260/OD280 \geq 2.0$, DNA için $OD260/OD280 = 1.8$ değeriyle hesaplanmıştır.



Şekil 3.10. Elisa cihazında RNA ve cDNA konsantrasyon ve saflık tespiti

3.2.6. Gen ifade seviyelerinin RT-qPCR ile tespiti

Çalışmada PC-9 hücre hattının GAPDH (referans geni olmak üzere), BCL-2, BAX ve CASP3 gen ifade düzeyleri belirlenmiştir. CI değerlerine bakıldığında en iyi antagonistik etkinin 48 saat inkübasyon süresi ve 50 μg/ml metanol ekstraktı ve 50 nM OSİ kombinasyonu olduğu belirlenmiştir. PC-9 hücre hattı bu parametreler ile kültive edilip RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir (Tablo 6).

Tablo 7' de belirtilen sekanslara göre Metabion tarafından sentezlenen primerler, NCBI Primer-BLAST programı ile tasarlanmıştır.

Tablo 3.7. Analizi yapılan genlerin primer sekansları

Gen	Primer Dizisi
BCL-2	F: 5-TATCTGGGCCACAAGTGAAG R: 5-ATTCGACGTTTTGCCTGAAG
BAX	F: 5-AGCAGATCATGAAGACAGGG R: 5-GAAGTTGCCGTCAGAAAACA
CASP3	F: 5-GCGCTCTGGTTTTTCGTTAAT R: 5-ACCCATCTCAGGATAATCCATTT
GAPDH	F: 5- CTTTTGCGTCGCCAGCC R: 5- AATTTGCCATGGGTGGAATCA

RT-qPCR işlemi Thermofisher SYBR Green Master Mix kiti ile Tablo 8' deki sıcaklık döngüsü protokolüne göre yapılmıştır.

Tablo 3.8. Sıcaklık siklusu

Döngü Adı	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95°C	10 dk.	1
Denatürasyon	95°C	30 sn.	
Bağlanma	57°C	30 sn.	45
Uzama	72°C	45 sn.	
Bekleme	4°C	∞	1

3.2.7. Protein ekstraksiyonu

CI değerinin en yüksek olduğu OSI (50 nM), MO-MetOH (50 µg/ml) ve OSI+MO-MetOH (50 nM+50 µg/ml) konsantrasyonları ve 48 saatlik inkübasyon sonucuna göre BAX, CASP-3 ve BCL-2 protein ekspresyon seviyeleri ELISA ile tesbit edilmiştir. Proteinlerin ekspresyon seviyeleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Dört ayrı steril petrinin her birisinin içerisine $1,8 \times 10^6$ tane hücre ekilip ilaç uygulaması yapıp 48 saatlik inkübasyon süresi bitiminde ilaç ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bu işlemin ardında PBS hücreler üzerine üç kez eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında petrilere 4 mL Lizis Buffer (150mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH: 7,4, 1 mM PMSF, %0,5 sodium deoksikolat,

%5 gliserol, 1 mM EDTA, %1 Triton X-100) ilave edilip buzda 10 dk bekletilmiştir. Çalışma hücrelerin petri yüzeyinden kazındıktan sonra falkon tüpe aktarılması ile devam etmiştir. Bu hücrelere buz üzerinde 10 defa steril 21 Gauge' luk şırınga ile çek-bırak yapılmıştır. Ve lizis işlemi tamamlanmıştır. Daha sonra hücreler +4°C' de 10 dk 2000 xg' de santrifüj edilmiştir. Falkon tüp üzerinde kalan süpernatant -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.8. İstatistik bulgular

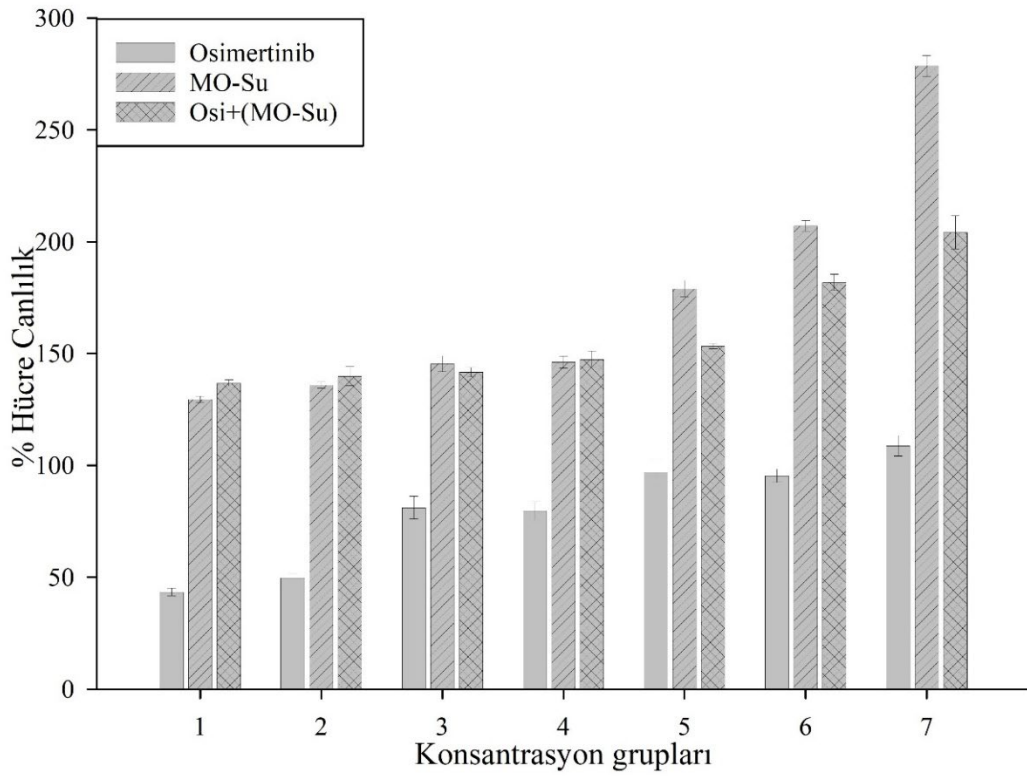
Hücre canlılık oranları ve gen/protein ekspresyon seviyeleri gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Gruplar arası karşılaştırmalar Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) testi ile yapılmıştır. SPSS 24.0 yazılımı ile istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tüm veriler ortalama \pm standart hata (Mean \pm SE) olarak rapor edilmiştir.

4. BULGULAR

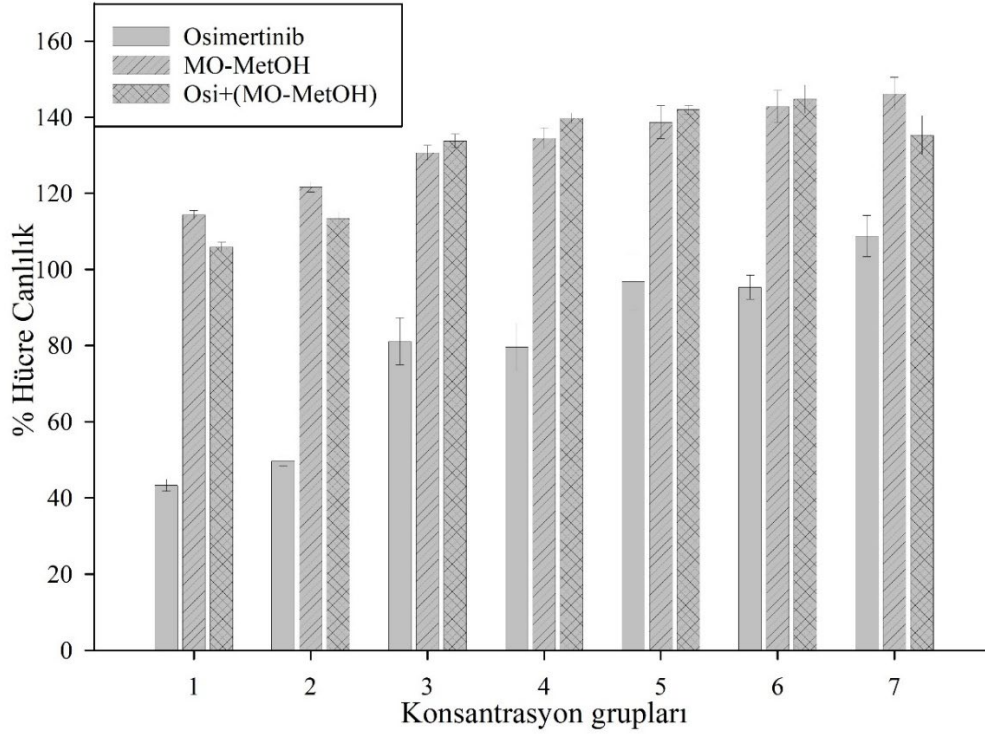
4.1. Sitotoksisite Çalışmaları

4.1.1. Hücre canlılık testi

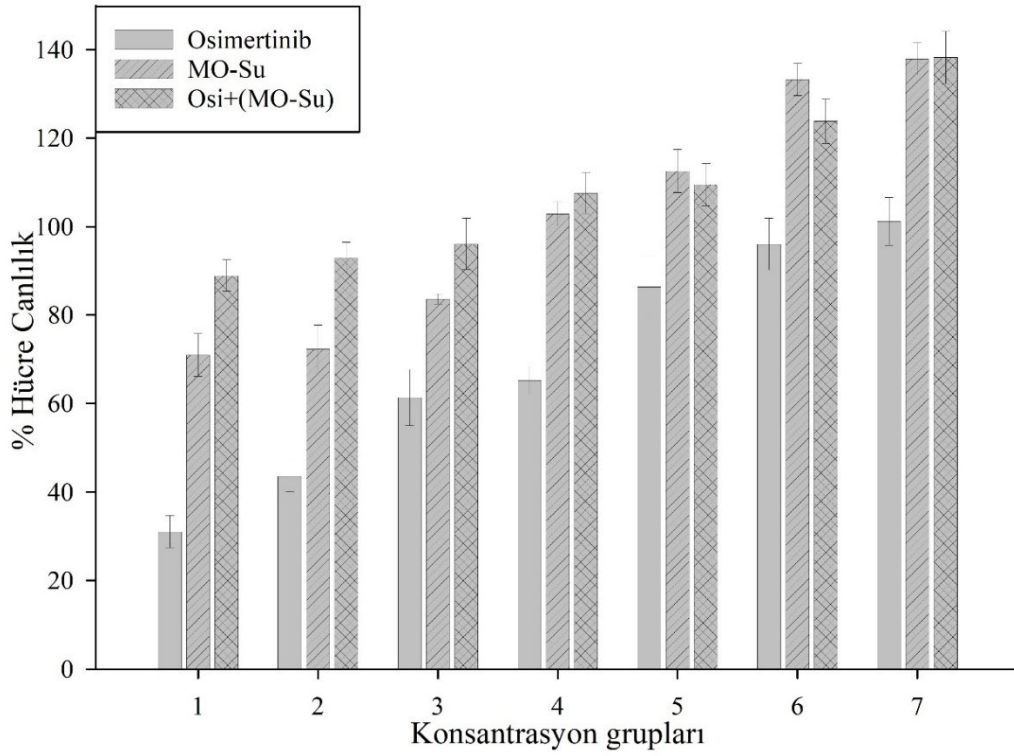
OSİ ile *M. officinalis* metanol ve su ekstraları, tek tek ve kombinasyon halinde belirlenen konsantrasyonlarda PC-9 hücre hattı üzerine uygulanmıştır. 24 ve 48 saatlik kültivasyon sonunda MTT çalışması yapılmıştır. Hücre canlılık yüzdeleri 570 nm’ de ölçülen absorbans değerlerine göre hesaplanmış ve sonuçlar neticesinde Şekil 11-12-13 ve 14’ teki grafikler çizilmiştir.



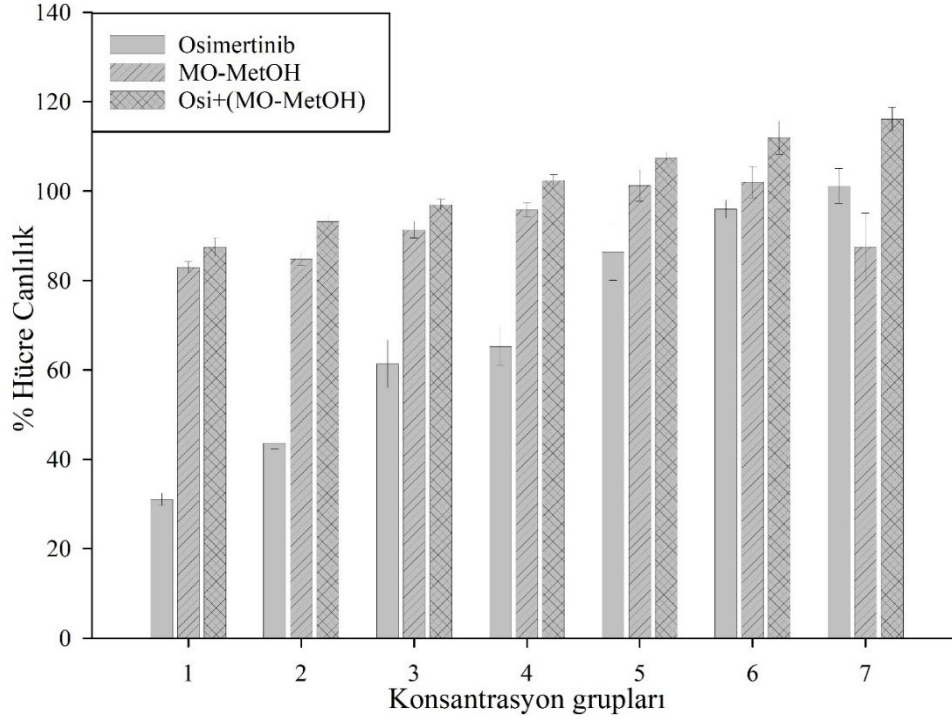
Şekil 4.11. 24 saat inkübasyon süresince PC-9 hücre hattı üzerine osimertinib (OSİ), *M. officinalis* su ekstraktı (MO-Su) ve OSİ+ (MO-Su)’ nun antiproliferatif aktivitesi



Şekil 4.12. 24 saat inkübasyon süresinde PC-9 hücre hattı üzerine osimertinib (OSİ), *M. officinalis* metanol ekstraktı (MO-MetOH) ve OSİ+ (MO-MetOH) 'ın antiproliferatif aktivitesi



Şekil 4.13. 48 saat inkübasyon süresinde PC-9 hücre hattı üzerine osimertinib (OSİ), *M. officinalis* su ekstraktı (MO-Su) ve OSİ+ (MO-Su)' nun antiproliferatif aktivitesi



Şekil 4.14. 48 saat inkübasyon süresinde PC-9 hücre hattı üzerine osimertinib (OSİ), *M. officinalis* metanol ekstraktı (MO-MetOH) ve OSİ+ (MO-MetOH)' ın antiproliferatif aktivitesi

4.1.2. Kombinasyon indeksi (CI)

PC-9 hücre hattı üzerine uygulanan OSİ, *M. officinalis* metanol ekstraktı, *M. officinalis* su ekstraktı ve ilaçla ekstraların kombinasyonlarının 24. ve 48. saatlerde alınan absorbans verileri baz alınarak CompuSyn programı ile CI değerleri Tablo 9-10-11 ve 12' ye göre hesaplanıp, en iyi antagonistik etkinin olduğu 48. saat ve 50 nM OSİ ve 50 µg/ml *M. officinalis* metanol ekstraktı kombinasyonuna göre Şekil 15-16 ve 17' deki grafikler çizilmiştir.

Tablo 4.9. 24 saat inkübasyon süresinde OSİ ve *M. officinalis* su ekstraktı kombinasyonlarının CI değerleri

OSİ+MO-Su Konsantrasyonu (nM+ µg/ml)	CI Değeri	Kombinasyonun Etkisi
800+800	9,6873	Güçlü antagonistik etki
400+400	8,7659	Güçlü antagonistik etki
200+200	11,0965	Çok güçlü antagonistik etki
100+100	15,842	Çok güçlü antagonistik etki
50+50	28,378	Çok güçlü antagonistik etki
25+25	46,785	Çok güçlü antagonistik etki
12,5+12,5	28,487	Çok güçlü antagonistik etki

Tablo 4.100. 48 saat inkübasyon süresinde OSİ ve *M. officinalis* su ekstraktı kombinasyonlarının CI değerleri

OSİ+MO-Su Konsantrasyonu (nM+ µg/ml)	CI Değeri	Kombinasyonun Etkisi
800+800	6,37023	Güçlü antagonistik etki
400+400	3,74539	Güçlü antagonistik etki
200+200	2,11624	Antagonistik etki
100+100	1,74190	Antagonistik etki
50+50	0,95259	Aditif etki
25+25	0,95260	Aditif etki
12,5+12,5	1,06306	Aditif etki

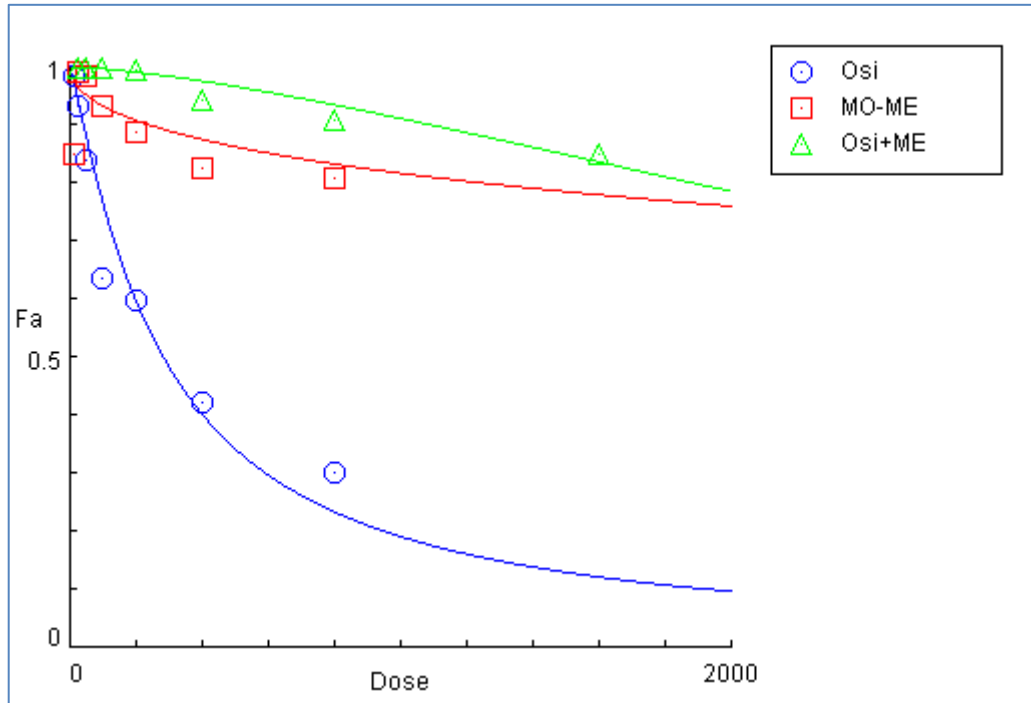
Tablo 4.111. 24 saat inkübasyon süresinde OSİ ve *M. officinalis* metanol ekstraktı kombinasyonlarının CI değerleri

OSİ+MO-MetOH Konsantrasyonu (nM+ µg/ml)	CI Değeri	Kombinasyonun Etkisi
800+800	28,1842	Çok güçlü antagonistik etki
400+400	24,4509	Çok güçlü antagonistik etki
200+200	102,095	Çok güçlü antagonistik etki
100+100	152,973	Çok güçlü antagonistik etki
50+50	135,907	Çok güçlü antagonistik etki

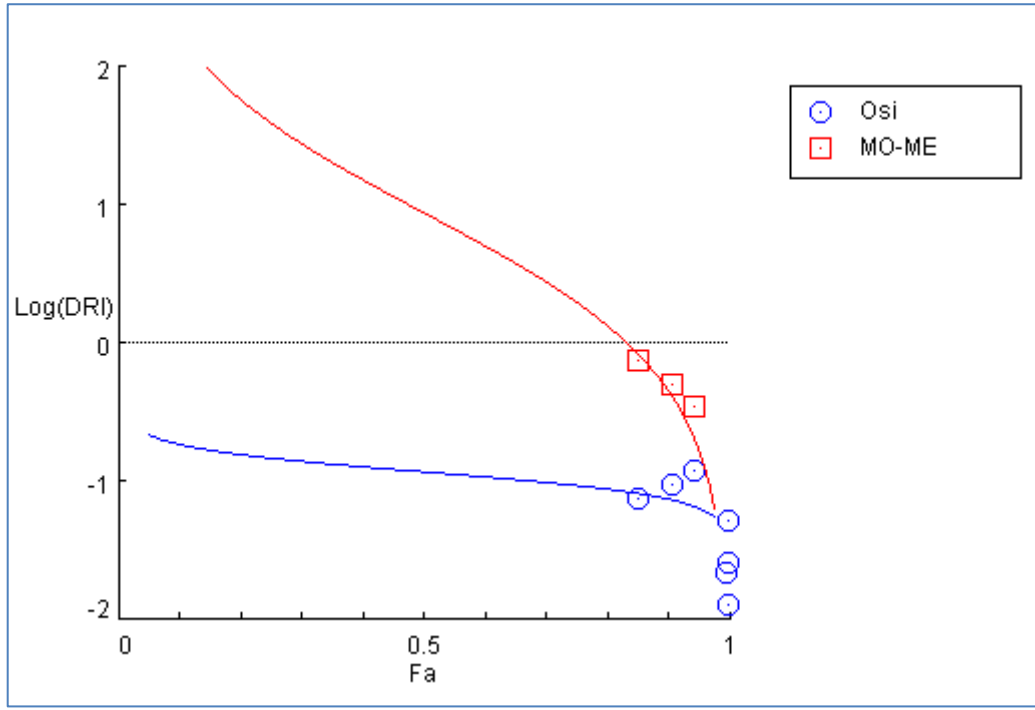
25+25	174,066	Çok güçlü antagonistik etki
12,5+12,5	6,83199	Güçlü antagonistik etki

Tablo 4.12. 48 saat inkübasyon süresinde OSİ ve *M. officinalis* metanol ekstraktı kombinasyonlarının CI değerleri

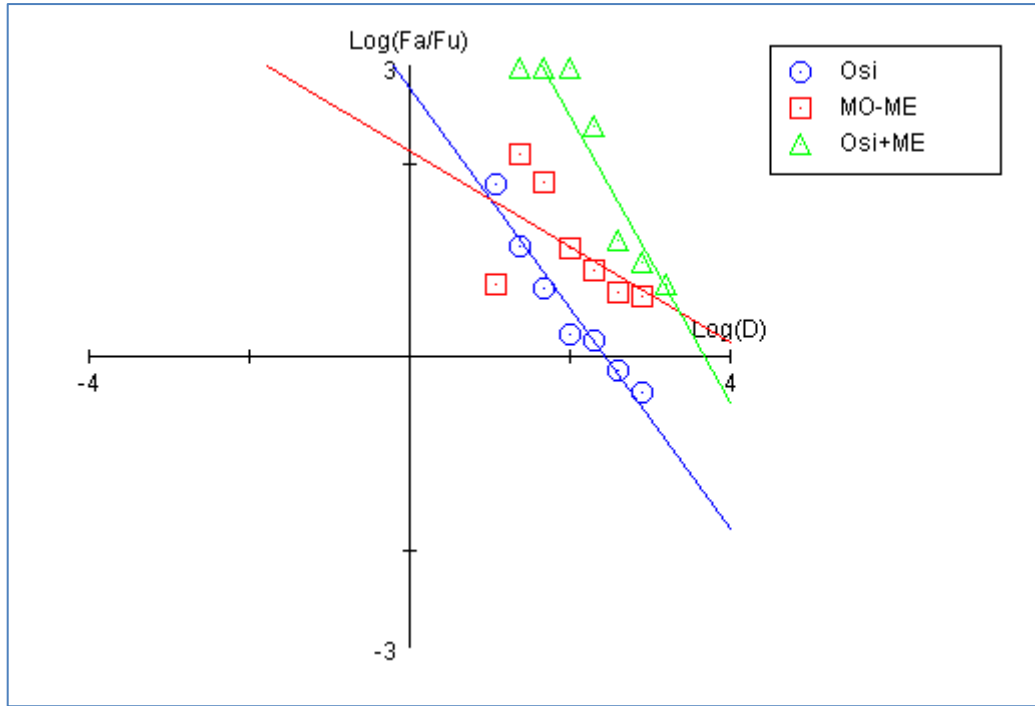
OSİ+MO-MetOH Konsantrasyonu (nM+ µg/ml)	CI Değeri	Kombinasyonun Etkisi
800+800	14,4838	Çok güçlü antagonistik etki
400+400	12,4944	Çok güçlü antagonistik etki
200+200	11,2465	Çok güçlü antagonistik etki
100+100	397,128	Çok güçlü antagonistik etki
50+50	3031,44	Çok güçlü antagonistik etki
25+25	1515,72	Çok güçlü antagonistik etki
12,5+12,5	757,859	Çok güçlü antagonistik etki



Şekil 4.15. OSİ, MO-MetOH ve kombinasyonlarının 48 saatlik inkübasyon süresinde Doz-Etki eğrisi



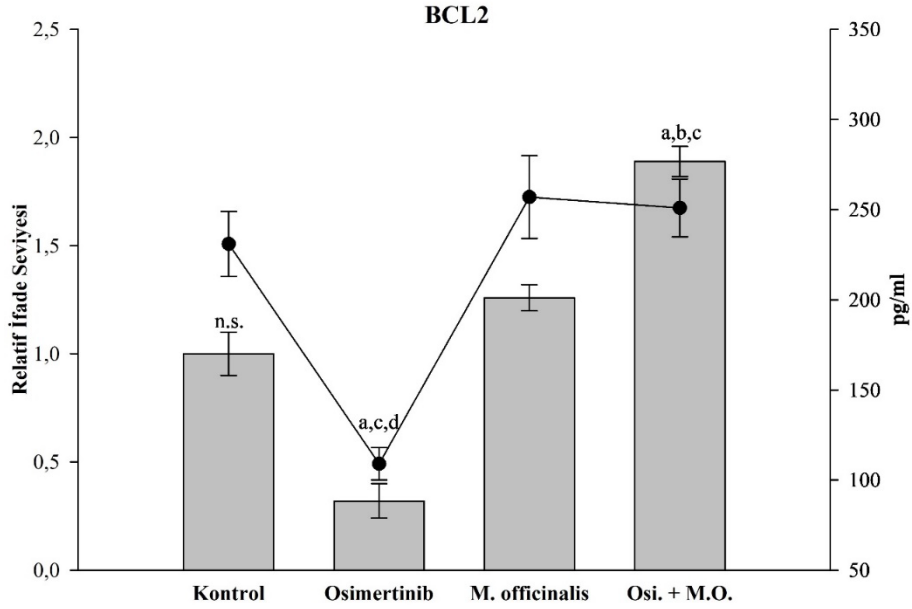
Şekil 4.16. OSİ ve MO-MetOH 48 saat inkübasyon süresinde doz azalım indeksi (DRI) grafiği



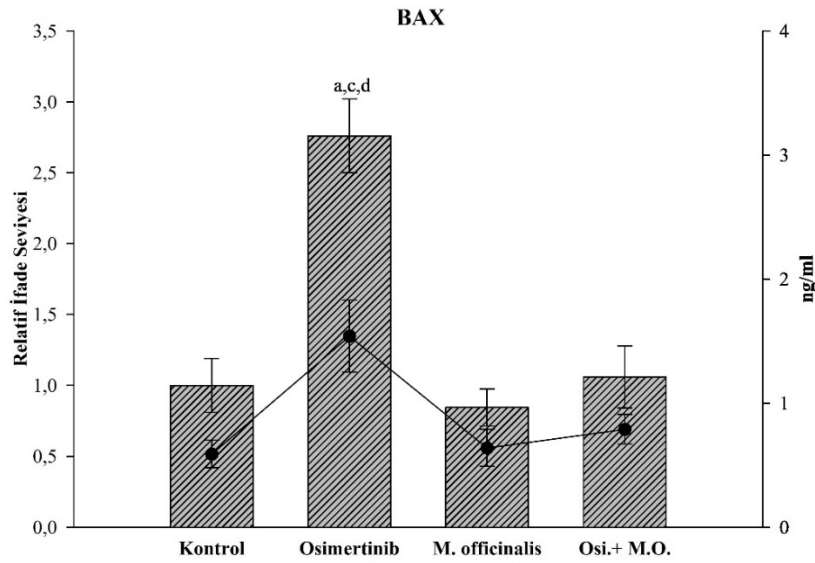
Şekil 4.17. OSİ, MO-MetOH ve kombinasyonlarının 48 saat inkübasyon süresinde Median-Etki eğrisi

4.1.3. Gen ifade ve protein seviyelerinin belirlenmesi

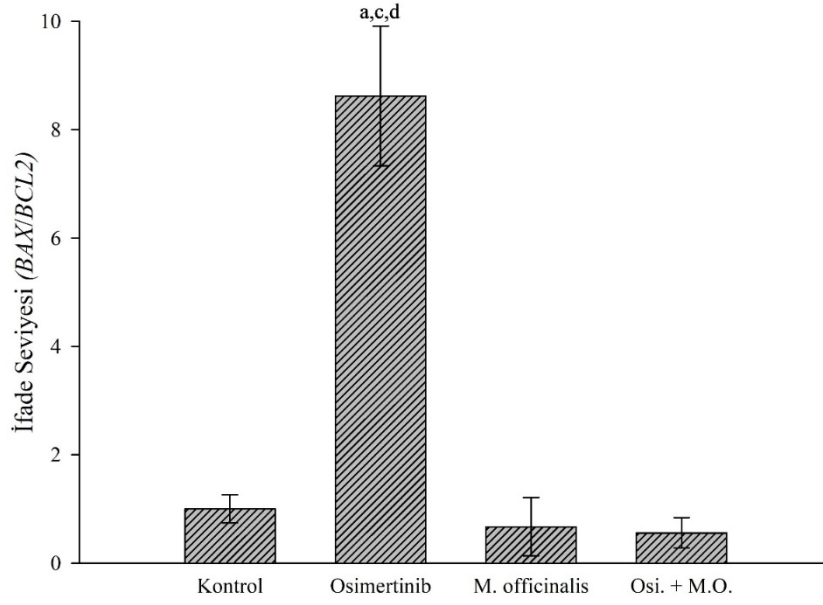
Çalışmamızda en yüksek CI değerinde 50 nM OSİ ve 50 µg/ml MO-MetOH için PC-9 hücre hattında BCL-2, BAX ve CASP3 genlerinin ifade seviyeleri belirlenmiştir. Referans geni olarak GAPDH alınmıştır. Tablo 13' deki veriler ışığında Şekil 18-19-20-21 çizilmiştir.



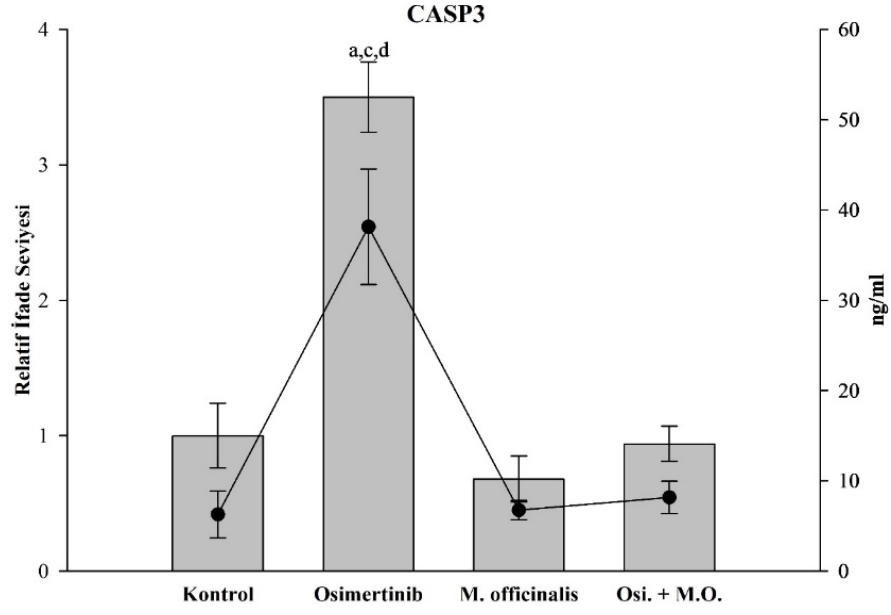
Şekil 4.18. BCL-2 gen ekspresyonu ve protein seviyeleri (OSİ, *M. officinalis* alkol ekstraktı ve bunların kombinasyonlarının etkisi). Değerler, ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak temsil edilmiştir. ^{a,b,c} p < 0,05



Şekil 4.19. BAX gen ekspresyonu ve protein seviyeleri (OSİ, *M. officinalis* alkol ekstraktı ve bunların kombinasyonlarının etkisi). Değerler, ortalama \pm ortalamanın standart hatası olarak temsil edilmiştir. ^{a,b} $p < 0,05$



Şekil 4.20. BAX/BCL-2 oranı (OSİ, *M. officinalis* alkol ekstraktı ve bunların kombinasyonlarının etkisi). Değerler, ortalama \pm ortalamanın standart hatası olarak temsil edilmiştir. ^{a,b} $p < 0,05$



Şekil 4.21. CASP3 gen ekspresyonu ve protein seviyeleri (OSİ, *M. officinalis* alkol ekstraktı ve bunların kombinasyonlarının etkisi). Değerler, ortalama \pm ortalamanın standart hatası olarak temsil edilmiştir. ^{a,b} $p < 0,05$

Tablo 4.13. PC-9 hücre hattında 48 saatlik BCL-2, BAX ve CASP3 protein seviyeleri

	BCL-2 (pg/mL)	BAX (ng/mL)	BAX/BCL-2 Oranı	CASP3 (ng/mL)
Kontrol	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a
OSİ	0,32 b	2,76 b	8,63 b	3,50 b
M.O-MetOH	1,26 a	0,85 a	0,67 a	0,68 a
OSİ + M.O-MetOH	1,89 c	1,06 a	0,56 a	0,94 a

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Akciğer kanseri tütün kullanımının artması ve değişen ortam şartları ile yaygın görülen bir hastalık olmaktan çıkıp, dünyada en sık görülen bir kanser türü haline. Akciğer kanseri, kanserden ölümler arasında birinci sırada yer almaktadır (Ihlamur vd., 2024).

Akciğer kanserlerinin yaklaşık %85' i KHDAK' dir. Hastaların çoğu teşhis konulduğunda zaten ileri evrede olduğundan hastalığın prognozu genellikle kötüdür. Ancak monoklonal antikorlar (mAbs), TKİ' ler ve immünoterapi (immün kontrol noktası inhibitörleri) gibi ilaç hedefleme tedavileri, KHDAK tedavisini kısmen daha başarılı hale getirmiştir (Y. Li vd., 2023).

Kansere neden olan mutasyonlardan EGFR, ALK ve ROS gibi sürücü mutasyonların keşfinden sonra tedavide moleküler hedefli ilaçlar terapötik olarak kullanılmaya başlanmıştır. EGFR mutasyonu KHDAK' de de %15 ile %50 arasında görülmektedir (Sedef vd., 2018).

OSİ, EGFR' nin çeşitli mutant formlarına (T790M, L858R) vahşi tip EGFR' ye göre çok daha düşük konsantrasyonlarda geri dönüşsüz olarak bağlanan bir üçüncü nesil TKİ' dir (Khozin vd., 2017).

Üçüncü nesil TKİ' ler KHDAK' de geçici başarı elde etse de C797S adlı üçüncül bir mutasyon tedaviyi fazlaca engellemektedir. Bu mutasyon ekson 20' de meydana gelip, EGFR' nin bağlanma yeri olan 797 konumundaki sisteini serin ile değiştirdiği bir yerdedir. Üçüncü nesil TKİ' ler de bu bölgeyi hedef aldığı ve sistein 797 kalıntısına geri dönüşsüz olarak bağlandığı için, bu mutasyon tüm üçüncü nesil ilaçlara karşı direnç kazandırmaktadır (J. Li ve Kwok, 2020; Y. Li vd., 2023).

Günümüzde tıbbi bitkiler antikanser tedaviye güçlü bir şekilde katılmaktadır. Antikanser tedavide bitkilerin çalışılma nedenlerinin başında ilaç direncine karşı koymak gelmektedir. Yine sentetik kimyasallara göre daha etkili ve daha az ya da hiç yan etkiye sahip olmamaları sayesinde kanser tedavisinde bitkisel ajanlar ile kanser ajanları kombine kullanılmaktadır. Vincristine, deserpidine, reserpine ve vinblastine dahil olmak üzere yüz yeni bitki bazlı ilaç bunlardan bazılarıdır. Yine bazı çalışmalar kanser ajanlarının bitkiler ile kombine kullanılmasının sinerjik etkiyle kemoterapötik etkinliği artırdığını ayrıca toksik etkilerini de azalttığını göstermiştir. (Faraji et al., 2021; Ihlamur vd., 2024; Talib vd., 2021).

Chen ve arkadaşları HCC827/AR hücre hattı üzerinde yaptıkları çalışmada, MET amplifikasyonlu EGFR mutasyonlu KHDAK hücrelerini üzerinde doğal bir MET inhibitörü olarak görev yapan berberinin OSİ ile sinerjik etki yaparak; apoptozu artırdığını ve OSİ' ye karşı gelişen direncin üstesinden gelmek adına daha çok çalışılması gerektiğini göstermiştir (Chen vd., 2022).

Yine OSİ' ye dirençli bazı hücre hatlarında yapılan çalışmalar, C797S mutasyonu gibi mekanizmalara bağlı olarak oluşan OSİ' ye karşı kazanılmış direncin üstesinden gelmek için doğal bir ürün olan honokiol ve türevlerinin potansiyel adaylar olduğunu belirlemiştir (Vallega ve Sun, 2020; Zang vd., 2020).

Huang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, H1975/OR hücre hattında doğal bir ürün olan luteolinin OSİ ile sinerjik etkileşimde bulunarak MET amplifikasyonlu OSİ' ye karşı kazanılmış dirençli hücrelerin proliferasyonunu, göçünü ve invazyonunu inhibe ederken apoptozu teşvik ettiğini göstermiştir (Huang vd., 2023).

Ni ve arkadaşları çalışmalarında, doğal bir ürün olan manoalidin KRAS mutasyonlu ve OSİ' ye dirençli akciğer kanseri hücrelerinde ferroptozisi indüklediğini ve yeni bir EGFR-TKİ duyarlılık artırıcı olduğunu göstermiştir (Ni vd., 2023).

M. officinalis (Oğulotu) bitkisi de FDA tarafından güvenli bir bitki olarak tanınmış ve çay olarak kullanılan, kanser dahil pek çok hastalığı tedavi etmek için yararlanılan tıbbi bitkilerden biridir. Mevcut çalışmalar özellikle akciğer, meme, prostat, kolon ve servikal kanserler üzerinde bitkinin antitümör etkinliğini kanıtlamıştır. *M. officinalis* ekstralarının aktif bileşenlerinin bu etkinliği antiapoptotik, antiproliferasyon, antiangiogenik, antioksidan, hücre döngüsü durdurma gibi çeşitli biyolojik mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşmektedir (Faraji et al., 2021).

Darzi ve Amirghofran yaptıkları çalışmada, *M. officinalis* bitkisinin diklorometan ve n-hekzan fraksiyonları, K562 miyelojenöz lösemi hücre hattında ve Jurkat insan T lenfosit hücrelerinde doza bağımlı olarak güçlü inhibitör etki göstermiştir. Diklorometan fraksiyonu, lösemi hücre hatlarında BAX mRNA ekspresyonunu ve BAX/BCL-2 oranını arttırarak apoptozu anlamlı bir şekilde indüklemiştir. Bunun yanında bitkinin n-hekzan fraksiyonu, apoptozla ilgili genlerin

ekspresyonunu anlamlı bir şekilde değiştirmediğinden hücrenin büyümesinin inhibisyonu bitkinin bir fraksiyonu olarak bulunmamıştır (Ebrahimnezhad Darzi ve Amirghofran, 2013).

Yapılan bir çalışmada *M. officinalis*' in hidroalkolik ekstraktının MCF-7 meme kanseri ve A549 akciğer kanseri hücre hatlarına uygulanması sonucu görülen antiproliferatif etkinin ekstrenin Bcl-2, Her2, VEGF ve hTERT onkogenlerinin ekspresyonunu inhibe etmesi sonucu olduğu bulunmuştur (R. Jahanban-Esfahlan vd., 2017).

Sghaier ve arkadaşları, *M. officinalis*' in aktif flavonoidlerinden biri olan rutin A549 akciğer kanseri hücre hattı, HT29 ve Caco-2 kolon kanseri hücre hatlarındaki antiproliferatif etkisini araştırmıştır. Yapılan MTT testleri sonucu ve kemilüminesans ile ölçülen değerler sonucu, rutin hücre adhezyon ve göçünü azaltmak, proliferasyonu inhibe etmek ve ROS üretimini azaltmak için kullanılabileceği gösterilmiştir (Ben Sghaier vd., 2016).

Sattu ve arkadaşları *M. officinalis*' in etkin flavonoidlerinden olan hesperidinin A549 hücre hattında hücrelerin anormal çoğalmasını; apoptozu indükleyen tümör baskılayıcı proteinlerden p53 ve p21' i geri kazandırıp; c-myc, β -katenin ve PCNA protein ekspresyonunu azaltarak sağladığının göstermiştir (Sattu vd., 2019).

Yapılan bir çalışma *M. officinalis*' in etkin flavonoidlerinden olan apigeninin A549 hücre hattında, hücre anormal çoğalmasını, göçünü ve invazyonunu PI3K/AKT sinyal yolağını hedef olarak gerçekleştirdiğini göstermiştir (Zhou vd., 2017).

Moacă ve arkadaşları çalışmalarında, *M. officinalis*' in hem kök hem yaprak etanol ekstraktlarının MDA-MB-231 meme kanseri ve HaCat anöplid ölümsüz keratinosit hücre hatlarında uygulanması sonucu yaprak ekstraktının HaCat hücrelerine karşı daha seçici bir şekilde sitotoksik olduğunu, gövde ekstraktının MDA-MB-231 hücrelerine karşı daha yüksek sitotoksosite gösterip; bu ekstraktların antitümör aktivitesinin anlamlı olduğunu göstermiştir (Moacă vd., 2018).

de Sousa ve arkadaşları, *M. officinalis* esansiyel yağının MTT ile yapılan in vitro sitotoksosite testinde yağın MCF-7, A549, HL-60, Caco-2, K562 gibi insan kanser hücre hatları ve B16F10 fare hücre hattı üzerinde son derece etkili olduğu ve antioksidan özelliklerinin antitümoral aktivitesine katkıda bulunabileceği göstermiştir (de Sousa vd., 2004).

Yapılan bir çalışmada *M. officinalis* esansiyal yağı ve ana bileşeni olan sitral, aktif MRP1 eksprese eden A172 ve U87 insan glioblastoma multiforme hücre hatlarında sitral ROS üretimini arttırmış ve MRP1 ekspresyonunu inhibe etmiştir (Queiroz vd., 2014).

Bitgen ve arkadaşları, *M. officinalis*' in, MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde otofaji ve apoptoz hücre ölüm yolları üzerinden sitotoksik bir etkiye sahip olduğunu Beclin-1 ve LC3 *immünofloresans* boyama yöntemi ile göstermiştir (Bitgen vd., 2022).

Weidner ve arkadaşları, *M. officinalis* hidroalkolik ekstraktının HT-29 ve T84 kolon karsinoma hücrelerinde antiproliferatif etkiler gösterdiğini ve intrasellüler ROS üretiminin indüklenmesi yoluyla apoptozu artırdığını bulmuştur (Weidner vd., 2015).

Jahanban-Esfahlan ve arkadaşları *M. officinalis* hidroalkolik ekstresinin A549, PC-3, MCF-7, SKOV3 hücre hatlarının proliferasyonunu doz bağımsız bir şekilde inhibe ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca *M. officinalis*' in antiproliferatif etkilerinin tümör tipi spesifik olduğu ve hormon bağımlı kanser hücrelerinin bu ekstraktların antitümöral etkilerine yüksek yanıt verdiği bulunmuştur (A. Jahanban-Esfahlan vd., 2015).

Çalışmamızda 24 saatlik MTT sonuçlarına göre, hücre canlılık oranları açısından 5., 6. ve 7. konsantrasyonlarda OSİ, *M. officinalis* ve kombinasyon grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir ($p > 0,05$). Ancak 4. ve üzeri konsantrasyonlarda, OSİ uygulanan hücrelerin canlılık oranı hem kombinasyon grubu hem de *M. officinalis* ile karşılaştırılması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Sonuçlar, *M. officinalis* uygulamasının hücre canlılığını kısmen koruyabildiğini ve OSİ' nin yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığını belirgin şekilde azalttığını göstermektedir.

48 saatlik MTT sonuçlarımıza göre, 6. ve 7. konsantrasyonlarda, OSİ, *M. officinalis* ve kombinasyon grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p > 0,05$). Fakat 5. ve üzeri konsantrasyonlarda, OSİ uygulanan hücrelerin canlılık oranlarının hem *M. officinalis* hem de kombinasyon grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$). Bu bulgular, OSİ' nin hücre canlılığını doza bağımlı olarak azalttığını ve *M. officinalis* uygulamasının hücre canlılık oranlarını belirli doz aralıklarında koruyabileceğini göstermektedir.

M.officinalis metanol ve su ekstraktları içeren 24 saatlik MTT sonuçları, OSİ' nin tek başına uygulanmasının hücre canlılık oranlarını belirgin şekilde düşürdüğünü, *M. officinalis* ve OSİ+*M. officinalis* kombinasyonu uygulamalarının ise hücre canlılığını önemli ölçüde artırdığını göstermiştir (p <0,001). Bu sonuç, *M. officinalis* uygulamasının hücre canlılığını artırıcı etkisini gösterirken, OSİ ile kombinasyonunun OSİ 'nin tek başına uygulandığı gruba kıyasla daha yüksek hücre canlılık oranları sağladığını ortaya koymaktadır. Ancak, *M. officinalis* ile kombinasyonun, tek başına *M. officinalis* uygulamasına kıyasla ek bir avantaj sağlamadığı gözlemlenmiştir.

48 saatlik MTT sonuçlarımıza göre metanol ve su ekstraktları içeren deneylerde, OSİ' nin tek başına uygulanmasının hücre canlılık oranlarını belirgin şekilde düşürdüğü, *M. officinalis* ve OSİ+*M. officinalis* kombinasyonu uygulamalarının ise hücre canlılığını önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir (p <0,05). Bu bulgular, *M. officinalis* uygulamasının hücre canlılığını artırıcı etkisini gösterirken, OSİ ile kombinasyonunun, OSİ' nin tek başına uygulandığı gruba kıyasla daha yüksek hücre canlılık oranları sağladığını ortaya koymaktadır. Ancak, *M. officinalis* ile kombinasyonun, tek başına *M. officinalis* uygulamasına kıyasla ek bir avantaj sağlamadığı gözlemlenmiştir.

24 saatlik hücre canlılık oranlarını incelediğimizde OSİ, *M. officinalis* ve OSİ+*M. officinalis* kombinasyonu içeren metanol ve su ekstraktı grupları arasında anlamlı farklılıklar olduğu belirlenmiştir (p <0,001).

Karşılaştırmalar neticesinde hücre canlılık oranlarının en düşük olduğu grubun OSİ uygulanan metanol ve su ekstraktı grupları (%79,26) olduğu, en yüksek hücre canlılık oranının ise su ekstraktı içeren *M. officinalis* grubuna (%174,51) ait olduğu belirlenmiştir.

48 saatlik hücre canlılık oranlarını incelediğimizde ise OSİ, *M. officinalis* ve OSİ+*M. officinalis* kombinasyonu içeren metanol ve su ekstraktı grupları arasında anlamlı farklılıklar olduğu belirlenmiştir (p <0,01). Karşılaştırmalar sonucunda hücre canlılık oranlarının en düşük olduğu grubun OSİ uygulanan metanol ve su ekstraktı grupları (%69,26) olduğu, en yüksek hücre canlılık oranının ise su ekstraktı içeren OSİ+*M. officinalis* kombinasyon grubuna (%108,15) ait olduğu belirlenmiştir.

Hücre canlılık oranları 24 saat sonunda su ekstralarında en yüksek değerde olsa da günümüzde kullanımda olan *M.officinalis* preparatlarının ekstraları metanolle hazırlandığı için, hücre canlılık oranının en yüksek bulunduğu; 48 saat süreli OSİ+MO-MetOH kombinasyonunun antagonistik etkisi baz alınmıştır.

48 saat inkübasyon süresi, OSİ (50 nM), MO-MetOH (50 µg/ml) ve OSİ+MO-MetOH (50 nM+50 µg/ml) kombinasyonunda, en yüksek CI değeri (3031,44) tespit edilmiştir (Tablo 5). RT-qPCR ve ELISA yöntemlerinden faydalanılarak, antagonistik etkinin daha net bir şekilde anlaşılması için BCL-2, BAX, CASP3 genlerinin ifade düzeyleri ve proteinlerin bulunma oranları analizi yapılmıştır.

Tablo 13'de belirtilen gen ve protein analizi sonuçlarına göre, OSİ grubunun BCL-2 gen protein seviyesinin kontrol ve *M. officinalis* gruplarına kıyasla anlamlı şekilde azaldığı tespit edilip, OSİ+*M. officinalis* kombinasyonunda BCL-2 gen protein düzeyinin tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur.

BAX gen protein seviyesinin OSİ uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde arttığı görülmüştür. Fakat *M. officinalis* ve OSİ+*M. officinalis* kombinasyon gruplarında BAX gen protein seviyesi kontrol grubu ile benzer bulunmuş ve OSİ ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir.

Analiz sonucunda OSİ grubunda BAX/BCL-2 oranının kontrol, *M. officinalis* ve OSİ+*M. officinalis* kombinasyon gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu görülmüştür. Diğer yandan, *M. officinalis* ve kombinasyon gruplarında BAX/BCL-2 oranı kontrol grubuna benzer bulunurken, OSİ grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir.

OSİ uygulanan PC-9 hücre hattında CASP3 gen ve protein seviyesinin; kontrol, *M. officinalis* ve kombinasyon gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan, *M. officinalis* ve kombinasyon gruplarında CASP3 seviyelerinin kontrol grubu ile benzer olduğu, ancak OSİ grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük kaldığı gözlemlenmiştir.

Özetle, OSİ uygulaması BCL-2 seviyesini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltırken, BAX ve CASP3 seviyelerini artırmıştır. Bu sonuç bize OSİ uygulanan hücrelerde apoptoz mekanizmasının tetiklendiğini göstermiştir. BAX/BCL-2 oranının OSİ grubunda belirgin şekilde yükselmiş olması, hücrede ölüm mekanizmasının aktive olduğunu düşündürmektedir. *M. officinalis* uygulaması ise BCL-2 seviyesini artırırken, BAX ve CASP3 seviyelerini OSİ grubuna kıyasla daha düşük tutmuştur. Bu sonuç ise, apoptoz sürecinin baskılandığını düşündürmektedir. OSİ+*M. officinalis* kombinasyonu grubunda ise BCL-2 seviyesinin en yüksek düzeyde olduğu, BAX/BCL-2 oranının düşük kaldığı ve CASP3 seviyesinin OSİ grubuna göre daha az arttığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda ele aldığımız ve halk arasında antikanser ve antiproliferatif etkilerinden dolayı sıkça kullanılmakta olan *M. officinalis* bitkisinin de diğer fitoterapötikler gibi ilaç direncinin tedavisinde kullanımı hala sınırlıdır. Yapılan çalışmalar ve alınan sonuçlar etkin bileşenler ile moleküler ve hücresel etki mekanizmalarını açıklamada yeterli değildir. Kombinasyon tedavilerindeki yerlerini keşfetmek için ise daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Nitekim çalışmamızda OSİ' nin kemoterapötik etkisini potansiyelize etmek adına kullanılan *M. officinalis* bitki ekstraktlarının apoptotik sinyali azalttığı görülmüştür.

İleri çalışmalarda, *M. officinalis* bitki ekstraktlarının aktif bileşenlerinin etki mekanizmaları ve farmakokinetiği üzerinde durulmalıdır. Araştırmalar, *in silico* ve *in vivo* olarak uygun hayvan modelleri üzerinde ve farklı dozajlarda gerçekleştirilmelidir.

KAYNAKÇA

- International Agency for Research on Cancer. (2020). Global Cancer Observatory: Cancer today. <https://gco.iarc.fr/today>
- World Health Organization. (2020). Global health estimates 2020: Deaths by cause, age, sex, by country and by region, 2000–2019. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/gho-leading-causes-of-death>
- Abughanimeh, O., Kaur, A., El Osta, B., & Ganti, A. K. (2022). Novel targeted therapies for advanced non-small lung cancer. *Semin Oncol*. doi:10.1053/j.seminoncol.2022.03.003
- Akhondali, Z., Dianat, M., & Radan, M. (2015). Negative Chronotropic and Antidysrhythmic Effects of Hydroalcoholic Extract of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) on CaCl₂-Induced Arrhythmias in Rats. *Electron Physician*, 7(1), 971-976. doi:10.14661/2015.971-976
- Alevizakos, M., Kaltsas, S., & Syrigos, K. N. (2013). The VEGF pathway in lung cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 72(6), 1169-1181. doi:10.1007/s00280-013-2298-3
- Andrews Wright, N. M., & Goss, G. D. (2019). Third-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors for the treatment of non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*, S247-S264.
- Awad, R., Muhammad, A., Durst, T., Trudeau, V. L., & Arnason, J. T. (2009). Bioassay-guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) using an in vitro measure of GABA transaminase activity. *Phytother Res*, 23(8), 1075-1081. doi:10.1002/ptr.2712
- Bade, B. C., & Dela Cruz, C. S. (2020). Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med*, 41(1), 1-24. doi:10.1016/j.ccm.2019.10.001
- Barros, L., Dueñas, M., Dias, M. I., Sousa, M. J., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. (2013). Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions. *Food Chem*, 136(1), 1-8. doi:10.1016/j.foodchem.2012.07.107
- Ben Sghaier, M., Pagano, A., Mousslim, M., Ammari, Y., Kovacic, H., & Luis, J. (2016). Rutin inhibits proliferation, attenuates superoxide production and decreases adhesion and migration of human cancerous cells. *Biomed Pharmacother*, 84, 1972-1978. doi:10.1016/j.biopha.2016.11.001
- Bhanupriya, K. (2015). Herbal and Medicinal Plants Molecules Towards Treatment of Cancer: A Mini Review. *American Journal of Ethnomedicine*, 2.
- Bilgin, B., & Yücel, Ş. (2019). Clinical Feature and Survival Outcomes of Lung Cancer with ALK Mutation Positive and Treated with Crizotinib, Single Centre Experience. *Acta Oncologica Turcica*, 52(2), 208-212. doi:10.5505/aot.2019.52523
- Bitgen, N., Baran, M., Önder, G. Ö., Alişan Suna, P., Gürbüz, P., & Yay, A. (2022). Effect of *Melissa officinalis* L. on human breast cancer cell line via apoptosis and autophagy. [Melissa officinalis L. bitkisinin apoptoz ve otofaji yoluyla insan meme kanser hücre hattı üzerine etkisi]. *Cukurova Medical Journal*, 47(2), 765-775. doi:10.17826/cumj.1090930
- Cansino Alcaide, J. R., & Martínez-Piñeiro, L. (2006). Molecular biology in prostate cancer. *Clin Transl Oncol*, 8(3), 148-152. doi:10.1007/s12094-006-0004-1

- Chaddad, A., Desrosiers, C., Toews, M., & Abdulkarim, B. (2017). Predicting survival time of lung cancer patients using radiomic analysis. *Oncotarget*, 8(61), 104393-104407. doi:10.18632/oncotarget.22251
- Chang, A. (2011). Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC. *Lung Cancer*, 71(1), 3-10. doi:10.1016/j.lungcan.2010.08.022
- Chen, Z., Vallega, K. A., Chen, H., Zhou, J., Ramalingam, S. S., & Sun, S.-Y. (2022). The natural product berberine synergizes with osimertinib preferentially against MET-amplified osimertinib-resistant lung cancer via direct MET inhibition. *Pharmacological Research*, 175, 105998. doi:https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105998
- Corrales, L., Rosell, R., Cardona, A. F., Martín, C., Zatarain-Barrón, Z. L., & Arrieta, O. (2020). Lung cancer in never smokers: The role of different risk factors other than tobacco smoking. *Crit Rev Oncol Hematol*, 148, 102895. doi:https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.102895
- Cowen, E. W. (2007). Epidermal growth factor receptor inhibitors: a new era of drug reactions in a new era of cancer therapy. *J Am Acad Dermatol*, 56(3), 514-517. doi:10.1016/j.jaad.2006.11.004
- Cragg, G. M., Newman, D. J., & Snader, K. M. (1997). Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod*, 60(1), 52-60. doi:10.1021/np9604893
- Çetiner, U. (2021). Kanser Hücrelerinin Genetik Yapısı ve Mekanizmaları Genel Tanımlarıyla Kanseri ve İşleyişi.
- Darji, P., Patel, J., Patel, B., Chudasama, A., Ivan, P., Fnu, J., & Nalla, S. (2024). A COMPREHENSIVE REVIEW ON ANTICANCER NATURAL DRUGS. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 13, 717-734. doi:10.20959/wjpps20244-27049
- Dastmalchi, K., Dorman, D., Oinonen, P., Darwis, Y., Laakso, I., & Hiltunen, R. (2008). Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 391-400. doi:10.1016/j.lwt.2007.03.007
- de Sousa, A. C., Alviano, D. S., Blank, A. F., Alves, P. B., Alviano, C. S., & Gattass, C. R. (2004). *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J Pharm Pharmacol*, 56(5), 677-681. doi:10.1211/0022357023321
- Debeleş-Bütüner, B., & Kantarci, G. (2006). Mutation, DNA damage, repair mechanisms and the relation of cancer. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 35, 149-170.
- Dela Cruz, C. S., Tanoue, L. T., & Matthay, R. A. (2011). Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med*, 32(4), 605-644. doi:10.1016/j.ccm.2011.09.001
- Dirican, A., Dirican, N., & Ölmezoğlu, A. (2016). İleri Evre Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hedef Driver Mutasyonların Tespitinde Likit Biyopsi Doku Biyopsisinin Yerini Alabilir mi?. *Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3(2), 165-168.
- Ebrahimnezhad Darzi, S., & Amirghofran, Z. (2013). Dichloromethane fraction of *Melissa officinalis* induces apoptosis by activation of intrinsic and extrinsic pathways in human leukemia cell lines. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 35(3), 313-320. doi:10.3109/08923973.2013.768268

- Faraji, P., Araj-Khodaei, M., Ghaffari, M., & Dolatabadi, J. E. N. (2021). Anticancer effects of *Melissa officinalis*: a traditional medicine. *Pharmaceutical Sciences*, 28(3), 355-364.
- Farrell, A. S., & Sears, R. C. (2014). MYC degradation. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4(3). doi:10.1101/cshperspect.a014365
- Felip, E., Gridelli, C., Baas, P., Rosell, R., & Stahel, R. (2011). Metastatic non-small-cell lung cancer: consensus on pathology and molecular tests, first-line, second-line, and third-line therapy: 1st ESMO Consensus Conference in Lung Cancer; Lugano 2010. *Ann Oncol*, 22(7), 1507-1519. doi:10.1093/annonc/mdr150
- Ferrara, N., Hillan, K. J., & Novotny, W. (2005). Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333(2), 328-335.
- Fitzmaurice, C., Dicker, D., Pain, A., Hamavid, H., Moradi-Lakeh, M., MacIntyre, M. F., . . . Naghavi, M. (2015). The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol*, 1(4), 505-527. doi:10.1001/jamaoncol.2015.0735
- Forsythe, M. L., Alwithenani, A., Bethune, D., Castonguay, M., Drucker, A., Flowerdew, G., . . . Xu, Z. (2020). Molecular profiling of non-small cell lung cancer. *PLoS One*, 15(8), e0236580. doi:10.1371/journal.pone.0236580
- Futreal, P. A., Kasprzyk, A., Birney, E., Mullikin, J. C., Wooster, R., & Stratton, M. R. (2001). Cancer and genomics. *Nature*, 409(6822), 850-852. doi:10.1038/35057046
- Gökhan, A., Kılıç, K., Gülle, K., Uyanıkgil, Y., & çavuşoğlu, T. (2020). Apoptotik Yolaklar ve Hedefe Yönelik Tedaviler. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 27, 565-573. doi:10.17343/sdutfd.619417
- Grant, C., Hagopian, G., & Nagasaka, M. (2023). Neoadjuvant therapy in non-small cell lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 190, 104080. doi:10.1016/j.critrevonc.2023.104080
- Grant, C., & Nagasaka, M. (2024). Neoadjuvant EGFR-TKI therapy in Non-Small cell lung cancer. *Cancer Treat Rev*, 126, 102724. doi:10.1016/j.ctrv.2024.102724
- Greig, S. L. (2016). Osimertinib: First Global Approval. *Drugs*, 76(2), 263-273. doi:10.1007/s40265-015-0533-4
- Gridelli, C., Rossi, A., Carbone, D. P., Guarize, J., Karachaliou, N., Mok, T., . . . Rosell, R. (2015). Non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 1, 15009. doi:10.1038/nrdp.2015.9
- Guvenc, D., & Guvenc, T. (2017). Apoptotik Hücre Ölümü ve Toksikolojik Yanıtta Önemi Apoptotic Cell Death and Its Importance in Toxicological Response. 499-504.
- Hamutoğlu, R., & Önder, O. (2017). [Fizyolojik ve patolojik koşullarda anjiyogenezin rolü]. *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Transplantasyon Dergisi*, 2(2), 56-62.
- Howington, J. A., Blum, M. G., Chang, A. C., Balekian, A. A., & Murthy, S. C. (2013). Treatment of stage I and II non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 143(5 Suppl), e278S-e313S. doi:10.1378/chest.12-2359
- Huang, G., Liu, X., Jiang, T., Cao, Y., Sang, M., Song, X., . . . Zheng, X. (2023). Luteolin overcomes acquired resistance to osimertinib in non-small cell lung cancer cells by targeting the HGF-MET-Akt pathway. *Am J Cancer Res*, 13(9), 4145-4162.

- Huang, W., Chen, J.-J., Xing, R., & Zeng, Y.-C. (2021). Combination therapy: Future directions of immunotherapy in small cell lung cancer. *Translational Oncology*, 14(1), 100889. doi:https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100889
- Ibarra, A., Feuillere, N., Roller, M., Lesburgere, E., & Beracochea, D. (2010). Effects of chronic administration of *Melissa officinalis* L. extract on anxiety-like reactivity and on circadian and exploratory activities in mice. *Phytomedicine*, 17(6), 397-403. doi:10.1016/j.phymed.2010.01.012
- Ihlamur, M., Kelleci, K., Gölebatmaz, E., & Abamor, E. Ş. (2024). *Foeniculum Vulgare* Ekstraktının Altuzan İlacı Kombinasyonu ile A549 Akciğer Kanseri Hücrelerine Karşı Antikanser Etkileri. [Anticancer Effects of *Foeniculum Vulgare* Extract with Altuzan Drug Combination Against A549 Lung Cancer Cells]. *Çukurova Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, 39(1), 189-195. doi:10.21605/cukurovaumfd.1460427
- İlter, H., & Keskinçilic, B. (2018). *TÜRKİYE KANSER İSTATİSTİKLERİ*.
- Isaoglu, M., Güllüce, M., & Karadayı, M. (2020). Plant-Derived Natural Products as Multidrug Resistance Modulators in Cancer Therapy.
- Jahanban-Esfahlan, A., Modaeinama, S., Abasi, M., Abbasi, M. M., & Jahanban-Esfahlan, R. (2015). Anti Proliferative Properties of *Melissa officinalis* in Different Human Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16(14), 5703-5707. doi:10.7314/apjcp.2015.16.14.5703
- Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, K., Monfaredan, A., Shafie-Irannejad, V., Abbasi, M. M., Karimian, A., & Yousefi, B. (2017). The herbal medicine *Melissa officinalis* extract effects on gene expression of p53, Bcl-2, Her2, VEGF-A and hTERT in human lung, breast and prostate cancer cell lines. *Gene*, 613, 14-19. doi:10.1016/j.gene.2017.02.034
- Jänne, P. A., Yang, J. C., Kim, D. W., Planchard, D., Ohe, Y., Ramalingam, S. S., . . . Ranson, M. (2015). AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 372(18), 1689-1699. doi:10.1056/NEJMoa1411817
- Javadi, B., & Emami, S. A. (2015). Avicenna's contribution to mechanisms of cardiovascular drugs. *Iran J Basic Med Sci*, 18(8), 721-722.
- Kamel, M. M., & Megally Abdo, N. Y. (2014). Synthesis of novel 1,2,4-triazoles, triazolothiadiazines and triazolothiadiazoles as potential anticancer agents. *Eur J Med Chem*, 86, 75-80. doi:10.1016/j.ejmech.2014.08.047
- Khozin, S., Weinstock, C., Blumenthal, G. M., Cheng, J., He, K., Zhuang, L., . . . Pazdur, R. (2017). Osimertinib for the Treatment of Metastatic EGFR T790M Mutation-Positive Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, 23(9), 2131-2135. doi:10.1158/1078-0432.ccr-16-1773
- Kirişoğlu, C. E., Öztürk, C., & Köktürk, N. (2003). The role of epidermal growth factor receptor and egfr inhibitors in non-small cell lung cancer. *Eurasian Journal of Pulmonology*, 5(3), 146-152.
- Koivunen, J. P., Mermel, C., Zejnullahu, K., Murphy, C., Lifshits, E., Holmes, A. J., . . . Jänne, P. A. (2008). EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res*, 14(13), 4275-4283. doi:10.1158/1078-0432.ccr-08-0168
- Krause, D. S., & Van Etten, R. A. (2005). Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med*, 353(2), 172-187. doi:10.1056/NEJMra044389

- Kus, T. (2019). AKCİĞER KANSERİ'NDE KULLANILAN TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNE KARŞI GELİŞEN DİRENÇ MEKANİZMALARI VE TEDAVİ YAKLAŞIMLARI.
- Lauro, S., Onesti, C. E., Righini, R., & Marchetti, P. (2014). The Use of Bevacizumab in Non-Small Cell Lung Cancer: An Update. *Anticancer Research*, *34*(4), 1537.
- Lee, E. Y., & Muller, W. J. (2010). Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *2*(10), a003236. doi:10.1101/cshperspect.a003236
- Leonetti, A., Sharma, S., Minari, R., Perego, P., Giovannetti, E., & Tiseo, M. (2019). Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*, *121*(9), 725-737. doi:10.1038/s41416-019-0573-8
- Li, A., Qiu, M., Zhou, H., Wang, T., & Guo, W. (2017). PTEN, Insulin Resistance and Cancer. *Curr Pharm Des*, *23*(25), 3667-3676. doi:10.2174/1381612823666170704124611
- Li, J., & Kwok, H. F. (2020). Current Strategies for Treating NSCLC: From Biological Mechanisms to Clinical Treatment. *Cancers (Basel)*, *12*(6). doi:10.3390/cancers12061587
- Li, Y., Mao, T., Wang, J., Zheng, H., Hu, Z., Pingping, C., . . . Lin, F. (2023). Toward the next generation EGFR inhibitors: an overview of osimertinib resistance mediated by EGFR mutations in non-small cell lung cancer. *Cell Communication and Signaling*, *21*. doi:10.1186/s12964-023-01082-8
- López, V., Martín, S., Gómez-Serranillos, M. P., Carretero, M. E., Jäger, A. K., & Calvo, M. I. (2009). Neuroprotective and Neurological Properties of *Melissa officinalis*. *Neurochem Res*, *34*(11), 1955-1961. doi:10.1007/s11064-009-9981-0
- Lu, X., Yu, L., Zhang, Z., Ren, X., Smaill, J. B., & Ding, K. (2018). Targeting EGFR(L858R/T790M) and EGFR(L858R/T790M/C797S) resistance mutations in NSCLC: Current developments in medicinal chemistry. *Med Res Rev*, *38*(5), 1550-1581. doi:10.1002/med.21488
- Majolo, F., de Oliveira Becker Delwing, L. K., Marmitt, D. J., Bustamante-Filho, I. C., & Goettert, M. I. (2019). Medicinal plants and bioactive natural compounds for cancer treatment: Important advances for drug discovery. *Phytochemistry Letters*, *31*, 196-207. doi:https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.04.003
- Malapelle, U., Ricciuti, B., Baglivo, S., Pepe, F., Pisapia, P., Anastasi, P., . . . Metro, G. (2018). Osimertinib. *Recent Results Cancer Res*, *211*, 257-276. doi:10.1007/978-3-319-91442-8_18
- Malik, D., Tarek, M., del Carpio, J. C., Ramirez, C., Boyer, D., Kenney, M. C., & Kuppermann, B. D. (2014). Safety profiles of anti-VEGF drugs: bevacizumab, ranibizumab, aflibercept and ziv-aflibercept on human retinal pigment epithelium cells in culture. *British Journal of Ophthalmology*, *98*(Suppl 1), i11-i16.
- Mazza, V., & Cappuzzo, F. (2017). Treating EGFR mutation resistance in non-small cell lung cancer - role of osimertinib. *Appl Clin Genet*, *10*, 49-56. doi:10.2147/tacg.s103471
- Meftahizade, H., Sargsyan, E., & Moradkhani, H. (2009). Investigation of antioxidant capacity of *Melissa officinalis* L. essential oils. *J Med Plant Res*, *4*.
- Mencherini, T., Picerno, P., Scesa, C., & Aquino, R. (2007). Triterpene, antioxidant, and antimicrobial compounds from *Melissa officinalis*. *J Nat Prod*, *70*(12), 1889-1894. doi:10.1021/np070351s

- Mendez-Flores, R. G., Martínez-Fernández, D. E., Vega-De la Torre, D. E., Zambrano-Román, M., Muñoz-Valle, J. F., Toledo-Lelevier, M. G., . . . Valdés-Alvarado, E. (2022). Role of Bcl-2, p53, and Ki-67 expression in basal cell carcinoma and their association with aggressive and non-aggressive histological phenotypes. *Postepy Dermatol Alergol*, *39*(3), 517-523. doi:10.5114/ada.2022.117598
- Min, H. Y., & Lee, H. Y. (2021). Mechanisms of resistance to chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Arch Pharm Res*, *44*(2), 146-164. doi:10.1007/s12272-021-01312-y
- Miraj, S., Rafieian, K., & Kiani, S. (2017). Melissa officinalis L: A Review Study With an Antioxidant Prospective. *J Evid Based Complementary Altern Med*, *22*(3), 385-394. doi:10.1177/2156587216663433
- Moacă, E. A., Farcaș, C., Ghițu, A., Coricovac, D., Popovici, R., Cărăba-Meiță, N. L., . . . Avram, Ș. (2018). A Comparative Study of Melissa officinalis Leaves and Stems Ethanolic Extracts in terms of Antioxidant, Cytotoxic, and Antiproliferative Potential. *Evid Based Complement Alternat Med*, *2018*, 7860456. doi:10.1155/2018/7860456
- Motadi, L. R., Misso, N. L., Dlamini, Z., & Bhoola, K. D. (2007). Molecular genetics and mechanisms of apoptosis in carcinomas of the lung and pleura: therapeutic targets. *Int Immunopharmacol*, *7*(14), 1934-1947. doi:10.1016/j.intimp.2007.07.013
- Ni, Y., Liu, J., Zeng, L., Yang, Y., Liu, L., Yao, M., . . . Li, W. (2023). Natural product manoalide promotes EGFR-TKI sensitivity of lung cancer cells by KRAS-ERK pathway and mitochondrial Ca²⁺ overload-induced ferroptosis. *Frontiers in Pharmacology*, *13*. doi:10.3389/fphar.2022.1109822
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., & Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in Cancer. *Vascular Health and Risk Management*, *2*(3), 213-219. doi:10.2147/vhrm.s23213
- Oren, M., & Rotter, V. (1999). Introduction: p53--the first twenty years. *Cell Mol Life Sci*, *55*(1), 9-11. doi:10.1007/s000180050265
- Patora, J., & Klimek, B. (2002). Flavonoids from lemon balm (Melissa officinalis L., Lamiaceae). *Acta Pol Pharm*, *59*(2), 139-143.
- Pazarbaşı, A., & Kasap, M. (2003). Kanser Genetiği. [Genetics of Cancer]. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, *12*(4).
- Pereira, R., Boligon, A., Appel, A., Fachineto, R., Ceron, C., Tanus-Santos, J., . . . Rocha, J. B. (2014). Chemical composition, antioxidant and anticholinesterase activity of Melissa officinalis. *Industrial Crops and Products*, *53*, 34-45. doi:10.1016/j.indcrop.2013.12.007
- Queiroz, R. M. d., Takiya, C. M., Guimarães, L. P. T. P., Rocha, G. d. G., Alviano, D. S., Blank, A. F., . . . Gattass, C. R. (2014). Apoptosis-Inducing Effects of Melissa officinalis L. Essential Oil in Glioblastoma Multiforme Cells. *Cancer Investigation*, *32*(6), 226-235. doi:10.3109/07357907.2014.905587
- Rami-Porta, R., Call, S., Dooms, C., Obiols, C., Sánchez, M., Travis, W. D., & Vollmer, I. (2018). Lung cancer staging: a concise update. *Eur Respir J*, *51*(5). doi:10.1183/13993003.00190-2018
- Rapisarda, A., & Melillo, G. (2012). Role of the VEGF/VEGFR Axis in Cancer Biology and Therapy. In I. O. Daar (Ed.), *Advances in Cancer Research* (Vol. 114, pp. 237-267): Academic Press.
- Rasgele, P. G., Yoldas, P. A., Sipahi, N., & Ucan, H. (2024). Investigation and Characterization of Novel Biologically Active Secondary Metabolites from Melissa officinalis L.

- Risch, A., & Plass, C. (2008). Lung cancer epigenetics and genetics. *International Journal of Cancer*, 123(1), 1-7. doi:https://doi.org/10.1002/ijc.23605
- Sandler, A. (2007). Bevacizumab in non small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 13(15 Pt 2), s4613-4616. doi:10.1158/1078-0432.ccr-07-0647
- Sattu, K., Anandakumar, P., Sundaram, J., Gopalakrishnan, R., Periasamy, P., Asokkumar, S., . . . Devaki, T. (2019). Hesperidin inhibits cell proliferation and induces mitochondrial-mediated apoptosis in human lung cancer cells through down regulation of β -catenin/c-myc. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 101065. doi:10.1016/j.bcab.2019.101065
- Schmid, S., Li, J. J. N., & Leighl, N. B. (2020). Mechanisms of osimertinib resistance and emerging treatment options. *Lung Cancer*, 147, 123-129. doi:https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2020.07.014
- Schoenfeld, A. J., & Yu, H. A. (2020). The Evolving Landscape of Resistance to Osimertinib. *J Thorac Oncol*, 15(1), 18-21. doi:10.1016/j.jtho.2019.11.005
- Sedef, A. M., Çalığışu, Z., Bakkal Temi, Y., Gökçay, S., Mertsoylu, H., Beşen, A. A., & Köse, F. (2018). [Non-small-cell lung cancer (NSCLC) harboring driver mutation (EGFR mutation or ALK translocations) with clinical characteristics and management in a real-life setting: a retrospective observational multicenter case series study]. *Ortadoğu Tıp Dergisi*, 10(3), 361-367. doi:10.21601/ortadogutipdergisi.343275
- Shakeri, A., Sahebkar, A., & Javadi, B. (2016). Melissa officinalis L. - A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol*, 188, 204-228. doi:10.1016/j.jep.2016.05.010
- Sharma, R. (2022). Mapping of global, regional and national incidence, mortality and mortality-to-incidence ratio of lung cancer in 2020 and 2050. *Int J Clin Oncol*, 27(4), 665-675. doi:10.1007/s10147-021-02108-2
- Shortt, J., & Johnstone, R. W. (2012). Oncogenes in cell survival and cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(12). doi:10.1101/cshperspect.a009829
- Skupin-Mrugalska, P., & Minko, T. (2020). Development of Liposomal Vesicles for Osimertinib Delivery to EGFR Mutation-Positive Lung Cancer Cells. *Pharmaceutics*, 12(10). doi:10.3390/pharmaceutics12100939
- Sodani, K., Patel, A., Kathawala, R. J., & Chen, Z. S. (2012). Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chin J Cancer*, 31(2), 58-72. doi:10.5732/cjc.011.10329
- Soria, J. C., Ohe, Y., Vansteenkiste, J., Reungwetwattana, T., Chewaskulyong, B., Lee, K. H., . . . Ramalingam, S. S. (2018). Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 378(2), 113-125. doi:10.1056/NEJMoa1713137
- Spiro, S. G., Gould, M. K., & Colice, G. L. (2007). Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*, 132(3 Suppl), 149s-160s. doi:10.1378/chest.07-1358
- Stefanovic, O., & Čomić, L. (2012). Synergistic antibacterial interaction between Melissa officinalis extracts and antibiotics. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2, 1-5.

- Şeydel, G. Ş., & Aksoy, K. (2009). Onkogen ve Tümör Supressör Gen Olan miRNA'ların Özellikleri ve Kullanım Alanları. [Features and Usage Areas of MicroRNAs as Oncogenes and Tumor Suppressors]. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 18(1), 1-12.
- Talib, W. H., Alsayed, A. R., Barakat, M., Abu-Taha, M. I., & Mahmud, A. I. (2021). Targeting Drug Chemo-Resistance in Cancer Using Natural Products. *Biomedicines*, 9(10). Retrieved from doi:10.3390/biomedicines9101353
- Tang, Z. H., & Lu, J. J. (2018). Osimertinib resistance in non-small cell lung cancer: Mechanisms and therapeutic strategies. *Cancer Lett*, 420, 242-246. doi:10.1016/j.canlet.2018.02.004
- Thakur, S. K., Singh, D. P., & Choudhary, J. (2020). *Lung cancer identification: a review on detection and classification*. (39). Available from NLM (3)
- Thress, K. S., Paweletz, C. P., Felip, E., Cho, B. C., Stetson, D., Dougherty, B., . . . Oxnard, G. R. (2015). Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med*, 21(6), 560-562. doi:10.1038/nm.3854
- Tilli, C. M., Stavast-Koey, A. J., Ramaekers, F. C., & Neumann, H. A. (2002). Bax expression and growth behavior of basal cell carcinomas. *J Cutan Pathol*, 29(2), 79-87. doi:10.1034/j.1600-0560.2002.290203.x
- Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., Beasley, M. B., . . . Wistuba, I. (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol*, 10(9), 1243-1260. doi:10.1097/jto.0000000000000630
- Tsuboi, M., Herbst, R. S., John, T., Kato, T., Majem, M., Grohé, C., . . . Wu, Y. L. (2023). Overall Survival with Osimertinib in Resected EGFR-Mutated NSCLC. *N Engl J Med*, 389(2), 137-147. doi:10.1056/NEJMoa2304594
- Vallega, K. A., & Sun, S. Y. (2020). Does the natural product, honokiol, have value in the battle against osimertinib resistance? *Oncoscience*, 7(9-10), 73-75. doi:10.18632/oncoscience.517
- Varım, C., Cengiz, H., Demirci, A., Mandel, N. M., & Turna, Z. (2020). Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde Neoadjuvan ve Adjuvan Tedavi Sonuçları. *Sakarya Tıp Dergisi*, 10(3), 450-458. doi:10.31832/smj.738807
- Vasques, A. C., Sr., Cavaco, P., Duarte, T., Duarte Branco, V., Miranda Baleiras, M., Pinto, M., . . . Martins, A. (2024). The Use of Herbal Medicines Among Cancer Patients. *Cureus*, 16(2), e53455. doi:10.7759/cureus.53455
- Wang, P., Yang, H. L., Yang, Y. J., Wang, L., & Lee, S. C. (2015). Overcome Cancer Cell Drug Resistance Using Natural Products. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 767136. doi:10.1155/2015/767136
- Wang, P., Yang, H. L., Yang, Y. J., Wang, L., & Lee, S. C. (2015). Overcome Cancer Cell Drug Resistance Using Natural Products. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 767136. doi:10.1155/2015/767136
- Wang, W., Sun, Y., Li, H., Bao, M., Liu, X., Jiang, G., . . . Hu, Y. (2020). Surgical modality for stage IA non-small cell lung cancer among the elderly: analysis of the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *J Thorac Dis*, 12(11), 6731-6742. doi:10.21037/jtd-20-2221

- Wangari-Talbot, J., & Hopper-Borge, E. (2013). Drug Resistance Mechanisms in Non-Small Cell Lung Carcinoma. *J Can Res Updates*, 2(4), 265-282. doi:10.6000/1929-2279.2013.02.04.5
- Weidner, C., Rousseau, M., Plauth, A., Wowro, S. J., Fischer, C., Abdel-Aziz, H., & Sauer, S. (2015). Melissa officinalis extract induces apoptosis and inhibits proliferation in colon cancer cells through formation of reactive oxygen species. *Phytomedicine*, 22(2), 262-270. doi:https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.12.008
- Wolf, A. M. D., Oeffinger, K. C., Shih, T. Y., Walter, L. C., Church, T. R., Fontham, E. T. H., . . . Smith, R. A. (2024). Screening for lung cancer: 2023 guideline update from the American Cancer Society. *CA Cancer J Clin*, 74(1), 50-81. doi:10.3322/caac.21811
- Wu, M., Yuan, Y., Pan, Y. Y., & Zhang, Y. (2014). Combined gefitinib and pemetrexed overcome the acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Mol Med Rep*, 10(2), 931-938. doi:10.3892/mmr.2014.2243
- Xiao, D., & He, J. (2010). Epithelial mesenchymal transition and lung cancer. *J Thorac Dis*, 2(3), 154-159. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2010.02.03.7
- Yardley, D. A. (2013). Drug Resistance and the Role of Combination Chemotherapy in Improving Patient Outcomes. *International Journal of Breast Cancer*, 2013(1), 137414. doi:https://doi.org/10.1155/2013/137414
- Yıldız Gülhan, P., Ataoglu, Ö., Güleç Balbay, E., & Annakkaya, A. N. (2019). Akciğer Kanseri Tanısıyla Serviste Yatırılarak İzlenen Hastalarımızın Genel Özellikleri. [General Features of Patients Followed Up in Hospital with Diagnosis of Lung Cancer]. *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(3), 150-154. doi:10.33631/duzcesbed.605184
- Yilmaz, H. Ö., KÖKsal, H., Sarıman, N., Maraşlı, D., DÜZgÜN, Y., ÖRkİ, A., & Saygi, A. (2012). Akciğer kanseri güncel klinik TNM evrelemesinde T evresi ile nodal metastaz arasındaki ilişki. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi*, 20(1), 101-106.
- Yokuş, B., & Çakır, D. Ü. (2012). [Kanser Biyokimyası]. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*(1), 7-18.
- Zang, H., Qian, G., Arbiser, J., Owonikoko, T. K., Ramalingam, S. S., Fan, S., & Sun, S.-Y. (2020). Overcoming acquired resistance of EGFR-mutant NSCLC cells to the third generation EGFR inhibitor, osimertinib, with the natural product honokiol. *Molecular Oncology*, 14(4), 882-895. doi:https://doi.org/10.1002/1878-0261.12645
- Zappa, C., & Mousa, S. A. (2016). Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res*, 5(3), 288-300. doi:10.21037/tlcr.2016.06.07
- Zhou, Z., Tang, M., Liu, Y., Zhang, Z., Lu, R., & Lu, J. (2017). Apigenin inhibits cell proliferation, migration, and invasion by targeting Akt in the A549 human lung cancer cell line. *Anticancer Drugs*, 28(4), 446-456. doi:10.1097/cad.0000000000000479

Doğum Tarihi:	01.01.1985	
Doğum Yeri:	Erzincan	
Yüksek Lisans	Tıbbi Mikrobiyoloji, Erzincan Binali Yıldırım Üni.	2015- 2018
Üniversite	Eczacılık Fakültesi, Ege Üniversitesi	2003 - 2007
Lise	Erzincan Anadolu Lisesi	1995- 2002

İŞ DENEYİMİ

Erzincan Binali Yıldırım Üni Sağlık Hizmetleri M.Y.O Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü Anestezi Programı Öğretim Görevlisi	2019-Devam
Kamu Hastaneleri Kurumu Kamu Eczacısı	2011- 2019
Demir Eczanesi/ Erzincan Mesul Müdür	2009- 2011
Atatürk Üniversitesi / Erzurum Eczacılık Fakültesi Farmöstik Teknoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi	2007- 2009