

T.C.  
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDEMİK ANADOLU SIĞLA AĞACI (*Liquidambar orientalis*  
*Mill.*) EKSTRAKTLARININ VE YAĞININ ANTİKANSER, DNA  
KORUMA VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN  
İNCELENMESİ

Buket USTAOĞLU

Danışman  
Jüri Üyesi  
Jüri Üyesi

Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU  
Prof. Dr. Ekrem GÜREL  
Doç.Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

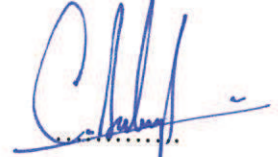
KASTAMONU – 2019

## TEZ ONAYI

**Buket USTAOĞLU** tarafından hazırlanan "**Endemik Anadolu Sığıla Ağacı (*Liquidambar Orientalis Mill.*) Ekstraktlarının ve Yağının Antikanser, DNA Koruma ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde savunulmuş ve oy birliği ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Genetik ve Biyomühendislik Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

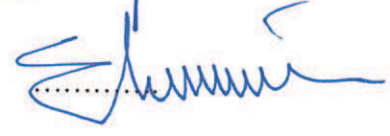
Danışman

Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU  
Kastamonu Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Ekrem GÜREL  
Abant İzzet Baysal Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU  
Kastamonu Üniversitesi



05/08/2019

Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Nur BELKAYALI



## TAAHHÜTNAME

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildirir ve taahhüt ederim.

İmza  
Buket USTAOĞLU



## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### ENDEMİK ANADOLU SIĞLA AĞACI (*Liquidambar orientalis Mill.*) EKSTRAKTLARININ VE YAĞININ ANTİKANSER, DNA KORUMA VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Buket USTAOĞLU  
Kastamonu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU

Kanser hücreleri, sağlıklı hücrelerin aksine sürekli bölünürler ve ölümsüzdürler. Kanser hastalığına karşı birçok farklı tedavi yöntemi ve ilaç geliştirilmiş olmasına karşın doğal olarak bulunan, kanser mekanizmasının direncini kırabilecek yeni ilaç hammaddesi arayışı hala sürmektedir.

Anadolu Sığla Ağacı (*Liquidambar orientalis Mill.*) dünya üzerinde sadece ülkemizin Güneybatısında bulunan ve değişen çevre koşullarına rağmen yüzyıllardır varlığını korumayı başaran endemik bir ağaç türüdür. Günümüzde ağacın gövdesinin yaralanması ile elde edilen sığla yağından birçok alanda faydalanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında Anadolu Sığla ağacından farklı çözücüler ile elde edilen ekstraktların ve ağaç yağının; A549 akciğer kanseri hattı, MDA-MB 231 meme kanseri hattı ve PC3 prostat kanseri hücre hattı kullanılarak MTT hücre canlılığı analizleri yapılmıştır. Analiz sonucunda, sığla ağacı yağının tüm hücre hatları üzerinde ve iki farklı zaman aralığında en fazla sitotoksik etkiyi gösteren ekstrakt olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ekstraktlar ve yağ ile muamele edilmiş hücre hatlarının apoptotik ve otofajik marker gen ifadeleri kantitatif gerçek zamanlı PZR yöntemi ile analiz edilmiştir. Ekstraktların ve yağın DNA koruma analizleri yapılan pUC19 plazmid DNA'sı kullanılarak yapılmış olup, 10, 20 ve 50 mg/ml konsantrasyonlarında DNA koruma aktivitesi görülmemiştir. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi amacıyla 12 farklı bakteri üzerinde mikrodilüsyon yöntemi ile minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyonları (MBK) bulunmuştur. Antimikrobiyal etki gösteren bakteri sayıları göz önüne alındığında en etkili olan ekstraktlar sırasıyla; sığla yağı, metanol, su ve etil asetat ekstraktı olmuştur. Sığla yağının antikanser etkisinin deney hayvanları ve klinik çalışmalara taşınarak yapılmasının uygun olacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Yaprak ekstraktları, sitotoksikite, antimikrobiyal, DNA koruma

**2019, 87 sayfa**  
**Bilim Kodu: 923**

## ABSTRACT

MSc. Thesis

### INVESTIGATION OF ANTI-CANCER, DNA PROTECTION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF EXTRACTS AND OILS OF ENDEMIC ANATOLIA SWEETGUM TREE (*Liquidambar orientalis* Mill.)

Buket USTAOGU  
Kastamonu University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Genetic and Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Cengiz BALOGLU

Unlike healthy cells, cancer cells are constantly dividing and immortal. Although many different treatment methods and drugs have been developed against the disease, the search for new pharmaceutical raw materials, which are naturally found in nature and which may break the resistance of the cancer mechanism, still continues.

Anatolian Sweetgum Tree (*Liquidambar orientalis* Mill.) is an endemic tree species which is found only in the southwest of the our country and managed to maintain its existence for centuries despite the changing environmental conditions. Today, sweetgum oil obtained from the injury of the tree trunk is still used in many areas.

In this thesis, the extracts obtained with different solvents from Anatolian Sweetgum tree and tree oil; MTT cell viability analyzes were performed using A549 lung cancer line, MDA-MB 231 breast cancer line and PC3 prostate cancer cell line. As a result of the analysis, sweetgum oil was found to be the most cytotoxic extract on all cell lines and in two different time intervals. Furthermore, apoptotic and autophagic marker gene expressions of extracts and oil treated cell lines were analyzed by quantitative real-time PCR method. DNA protection analyzes of extracts and oil were performed using pUC19 plasmid DNA, with no DNA protection activity at concentrations of 10, 20 and 50 mg/ml. In order to determine the antimicrobial activity, minimum inhibition concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC) were determined by microdilution method on 12 different bacteria. Considering the number of bacteria showing antimicrobial effect, the most effective extracts were; sweetgum oil, methanol, water and ethyl acetate. It is considered that the anticancer effect of sweetgum oil should be carried to experimental animals and clinical studies.

**Key Words:** Leaf extracts, cytotoxicity, antimicrobial, DNA protection

**2019, 87 pages**

**Science Code: 923**

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamın her aşamasında desteklerini ve emeğini esirgemeyen, deneyimleri ile bana yol gösteren, öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum değerli danışman hocam Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU'na; aynı zamanda fikirleri ve nezaketi ile desteğini eksik etmeyen Doç. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU'na; laboratuvar çalışmalarım süresince bilgisi, önerileri ve yönlendirmeleri ile bana yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Aslı UĞURLU'ya; başta Şerife YERLİKAYA olmak üzere, laboratuvarlarımızda birlikte çalıştığımız bütün ekip arkadaşlarıma; eğitim hayatımın her aşamasında benim yanımda olup, her zaman bana destek olan sevgili aileme en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Buket USTAOĞLU  
Kastamonu, Ağustos, 2019

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ ONAYI.....	ii
TAAHHÜTNAME .....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	v
TEŞEKKÜR .....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
TABLolar DİZİNİ .....	xi
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Anadolu Sığla Ağacı ( <i>Liquidambar orientalis Mill.</i> ) .....	4
1.1.1. Yetiştirme Yeri Özellikleri.....	4
1.1.2. Yayılış Alanları.....	5
1.1.3. Botanik .....	6
1.2. Anadolu Sığla Ağacı Yağı .....	7
1.2.1. Sığla Yağı Üretimi .....	8
1.2.2. Sığla Yağının Kimyasal Bileşenleri .....	9
1.3. Kanser ve Kanser Türleri.....	10
1.3.1. Akciğer Kanseri .....	10
1.3.2. Meme Kanseri.....	12
1.3.3. Prostat Kanseri.....	13
1.4. Programlı Hücre Ölüm Modelleri .....	13
1.4.1. Apoptoz .....	14
1.4.1.1. Apoptozun Aşamaları .....	16
1.4.1.2. Apoptozda Etkili Genler .....	17
1.4.2. Otofaji.....	20
1.4.2.1. Otofajinin Aşamaları .....	21
1.4.2.2. Otofajide Etkili Genler .....	22
1.5. Eş Zamanlı PZR .....	24
2. KURAMSAL TEMELLER.....	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
3.1. Materyal .....	29
3.1.1. Kimyasallar ve Kitler .....	29
3.1.2. Cihazlar ve Aletler .....	30
3.2. Yöntem.....	32
3.2.1. Bitki Ekstraksiyonu .....	32
3.2.2. Sitotoksosite Analizi .....	32
3.2.2.1. Hücre Kültürleri.....	32
3.2.2.2. MTT .....	34
3.2.3. Apoptotik ve Otofajik Marker Gen İfadelerinin Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR yöntemi ile Analizi .....	35
3.2.3.1. IC <sub>50</sub> Değerlerinin Belirlenmesi .....	35
3.2.3.2. IC <sub>50</sub> Değerleri ile Hücre Muamelesi .....	35

3.2.3.3. Hücre Toplama .....	36
3.2.3.4. RNA İzolasyonu.....	36
3.2.3.5. DNaz Muamelesi .....	36
3.2.3.6. Komplementer DNA Sentezi.....	37
3.2.3.7. Primer Tasarımı .....	38
3.2.4. DNA Koruma Analizi .....	39
3.2.4.1. pUC19 Plazmid DNA (pDNA) İzolasyonu ve Fenton Reaksiyonunun Hazırlanması.....	39
3.2.4.2. Ekstraktların Seyreltilmesi.....	39
3.2.4.3. Agaroz Jel Elektroforezi .....	40
3.2.5. Antimikrobiyal Aktivite Analizi .....	41
3.2.5.1. Mikrodilüsyon Yöntemi (MİK ve MBK Testleri) .....	41
4. BULGULAR .....	43
4.1. Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi .....	43
4.1.1. IC <sub>50</sub> Değerleri.....	47
4.2. Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi .....	51
4.2.1. Apoptotik ve Otofajik Marker Gen İfadelerinin Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR yöntemi ile Analizi .....	51
4.3. DNA Koruma Aktivitesinin Belirlenmesi .....	54
4.4. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi .....	55
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	59
6. ÖNERİLER .....	65
KAYNAKLAR.....	66
EKLER.....	78
EK-1 (A549 hücre hattının 24. Saat hücre fotoğrafları) .....	79
EK-2 (A549 hücre hattının 48. Saat hücre fotoğrafları) .....	80
EK-3 (MDA-MB-231 hücre hattının 24. Saat hücre fotoğrafları).....	81
EK-4 (MDA-MB-231 hücre hattının 48. Saat hücre fotoğrafları).....	82
EK-5 (PC3 hücre hattının 24. Saat hücre fotoğrafları) .....	83
EK-6 (PC3 hücre hattının 48. Saat hücre fotoğrafları) .....	84
EK-7 (A549, MDA-MB-231 ve PC3 hücre hatlarında <i>Bax/Bcl2 – Beclin1/LC3-II</i> genlerinin erime eğrisi grafikleri).....	85
ÖZGEÇMİŞ.....	86



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
bç	Baz çifti
IC <sub>50</sub>	Yarım maksimum inhibitör konsantrasyonu
ml	Mililitre

### Kısaltmalar

Akt	Protein kinaz B
Atg	Otofaji ilişkili gen
ATP	Adenozin Trifosfat
Bax	<i>Bcl-2</i> ilişkili X proteini
<i>Bcl-2</i>	B-hücre lenfoma 2
<i>Beclin-1</i>	<i>Bcl-2</i> Etkileşim Proteini
cDNA	Komplementer DNA
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
Ct	Cycle Threshold (Döngü Eşiği)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ER	Östrojen Reseptörü
FBS	Fetal bovin serum
gr	Gram
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
LC3	Hafif zincir 3
mTOR	Rapamisin'in memeli hedefi
MTT	Metiltiazol difeniltetrazolyum bromür
p53	Tümör protein (TP53)
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PBS	Tuzlu fosfat tamponu
ph	Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribo Nükleik Asit
RNAze	RiboNükleaz
ROS	Reaktif oksijen türevleri
Rpm	Rotation Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
RT-PZR	Real Time PZR (Eş Zamanlı PZR)
TAE	Tris-Asetat Tamponu
Tm	Erime Sıcaklığı- Hidrojen Bağlarının Oluştığı Sıcaklık
IUCN	Dünya Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 1.1. Türkiye’de Anadolu sığla ağacının yayılım alanları .....	6
Şekil 1.2. Anadolu sığla ağacı ve kısımları .....	7
Şekil 1.3. Eş zamanlı PZR aşamaları .....	25
Şekil 4.1. A549 hücre hatlarında 24. saat MTT grafikleri .....	44
Şekil 4.2. A549 hücre hatlarında 48. saat MTT grafikleri .....	44
Şekil 4.3. MDA-MB-231 hücre hatlarında 24. saat MTT grafikleri.....	45
Şekil 4.4. MDA-MB-231 hücre hatlarında 48. saat MTT grafikleri.....	45
Şekil 4.5. PC3 hücre hatlarında 24. saat MTT grafikleri .....	46
Şekil 4.6. PC3 hücre hatlarında 48. saat MTT grafikleri .....	47
Şekil 4.7. A549 hücre hatlarında 24. Saat IC <sub>50</sub> değerleri.....	48
Şekil 4.8. A549 hücre hatlarında 48. Saat IC <sub>50</sub> değerleri .....	48
Şekil 4.9. MDA-MB 231 hücre hatlarında 24. Saat IC <sub>50</sub> değerleri.....	49
Şekil 4.10. MDA-MB 231 hücre hatlarında 48. Saat IC <sub>50</sub> değerleri.....	49
Şekil 4.11. PC3 hücre hatlarında 24. saat IC <sub>50</sub> değerleri .....	50
Şekil 4.12. PC3 hücre hatlarında 48. saat IC <sub>50</sub> değerleri .....	50
Şekil 4.13. A549 hücre hattında <i>Bax</i> ve <i>Bcl-2</i> ekspresyon grafikleri .....	51
Şekil 4.14. A549 hücre hattında <i>Beclin1</i> ve <i>LC3-II</i> ekspresyon grafikleri .....	52
Şekil 4.15. MDA-MB-231 hücre hattında <i>Bax</i> ve <i>Bcl-2</i> ekspresyon grafikleri .	52
Şekil 4.16. MDA-MB-231 hücre hattında <i>Beclin1</i> ve <i>LC3-II</i> ekspresyon grafikleri.....	53
Şekil 4.17. PC3 hücre hattında <i>Bax</i> ve <i>Bcl-2</i> ekspresyon grafikleri .....	53
Şekil 4.18. PC3 hücre hattında <i>Beclin1</i> ve <i>LC3-II</i> ekspresyon grafikleri .....	54
Şekil 4.19. Sığla ekstratlarının ve yağının 10, 20 ve 50 mg/mL için DNA koruma analizi yüzdesi ve plazmid DNA koruma testinin jel görünümü .....	54

## TABLolar DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Tablo 1.1. Apoptoz ve Genler .....	16
Tablo 3.1. Reaksiyon Karışımları ve Sıcaklık Döngüleri .....	37
Tablo 3.2. Komplementer DNA Sentezinde Kullanılan Reaksiyon Basamakları .....	37
Tablo 3.3. Gen İfade Analizlerinde Kullanılan Genlere Ait Primer Listesi.....	38
Tablo 3.4. Fenton Reaksiyonu Bileşenleri ve Hazırlanması .....	39
Tablo 3.5. Her Bir Ekstrakt İçin Reaksiyon Karışım İçeriği.....	40
Tablo 3.6. Tris-EDTA Tamponunun Bileşenleri ve Hazırlanması.....	40
Tablo 3.7. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesinde Kullanılan Bakteriler.	42
Tablo 4.1. Sığla Su Ekstraktının MİK ve MBK Sonuçları .....	55
Tablo 4.2. Sığla Methanol Ekstraktının MİK ve MBK Sonuçları.....	56
Tablo 4.3. Sığla Etil Asetat Ekstraktının MİK ve MBK Sonuçları.....	57
Tablo 4.4. Sığla Yağının MİK ve MBK Sonuçları.....	58

## 1. GİRİŞ

Ülkemizde endemik bir tür olarak yetişen Anadolu sığla ağacı (*Liquidambar orientalis* Mill.) Hamamelidaceae ailesinin, Buclanoidae alt ailesinden *Liquidambar* cinsinin *Liquidambar orientalis* türüdür. Anadolu’da yetişmekte olan *Liquidambar orientalis*, yöresinde günlük ağacı olarak bilinmektedir. *Liquidambar orientalis* Mill. türünün iki alt türü bulunmaktadır; *Liquidambar orientalis* Mill var. *orientalis* ve *Liquidambar orientalis* var. *Intergrita*. Türlerden biri sığla reçinesi (balsamı) verirken diğer türler balsam vermemektedir. Anadolu sığla ağacının gövdesinin yaralanması yöntemiyle elde edilen ve ticari bir hammadde olan yağı ise, başta deri hastalıkları ve mide rahatsızlıkları olmak üzere birçok hastalığa faydası olduğu düşünüldüğü için yüzyıllardır geleneksel tıpta kullanılmaktadır. Aynı zamanda bu yağ, kozmetik sanayisinde parfüm çözeltilerinde fiskeatör (koku tutucu) işlevinde kullanılmakta ve bu özelliği sayesinde ithal edilmektedir. Ayrıca ağacın gövdesini kaplayan hoş kokulu kabuğu halk arasında “buhur” olarak adlandırılmakta, kandillerde ve özel günlerde ibadethanelerde, evlerde tütsü olarak yakılmaktadır. Fakat kendine has kokusu ve koyu yeşil rengi ile dikkat çeken ağaç yapraklarının faydaları henüz bilinmemektedir. Günümüzde sadece ülkemizin güneybatısında yetişebilen bu ağaç türünün neslinin tükenme tehdidi altında olduğu rapor edilmektedir [1].

Canlı hücrelerinde DNA'nın hasar görmesi ile ortaya çıkan kanser, hücrelerin kontrolsüz ve normal olmayan yollarla büyüyerek çoğalması ile oluşmaktadır. Kanserlerin %10- 15'inin, ebeveynlerden gelen genlerle aktarıldığı yani kalıtsal olduğu, geriye kalan %85-90'lık kısmının ise yaşamımız boyunca canlı hücrelerdeki DNA'nın, bazı mutajenlere maruz kalması, hücre DNA'sındaki hafif ilerleme ile seyreden değişiklikler ve replikasyonda oluşan hatalar ile şekillendiği düşünülmektedir. Genellikle oluşan mutasyonlardan herhangi biri, içinde bulunduğu hücrenin giderek büyümesine ve bu hücreden türeyen bir kanser klonunun oluşmasına neden olmaktadır. Yaygın olarak kullanılan tedavi yöntemleri ise genellikle cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir [2].

2018'de dünyada 9,5 milyon vakanın erkeklerde, 8,5 milyon kadınlarda olmak üzere toplam 18 milyon kanser vakası olduğu tahmin edilmiştir. Akciğer ve meme kanserleri, dünya çapında en yaygın kanserler olarak tespit edilip, kolorektal kanser türünün 2018'de 1,8 milyon yeni vakayla üçüncü en sık görülen kanser olduğu belirtilmektedir. Cinsiyet ayrımı yapıldığında ise dünya genelinde erkeklerde en fazla görülen ilk üç kanser türü akciğer, prostat ve kolorektal kanserleridir. Bu sıralama kadınlarda meme, kolorektal ve akciğer kanserleri olarak görülmektedir [3].

Ülkemizde bakıldığında ise, kanser tüm ölümlerin yaklaşık yüzde 20'sini oluşturmaktadır. 2015 yılında kanser hastalıkları, 49.946 erkek, 27.022 kadın olmak üzere toplam 76.968 kişinin ölümüne neden olmuştur ve 2030 yılında ise 22 milyon yeni kanser vakası ortaya çıkması ihtimali bulunmaktadır. Türkiye'de dünya genelinde olduğu gibi erkeklerde en fazla akciğer ve prostat kanseri, kadınlarda ise en fazla meme kanseri görülmektedir. Ülkemizde her 4 kadın kanserinden 1'i meme kanseridir. Özellikle kadınlarda 15-49 yaşları arasında meme kanserinin görülme ihtimali artmaktadır [4].

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, bir antimikrobiyal ajanın herhangi bir bakteri türüne karşı *in vitro* etkinliğini belirlemek amacıyla uygulanan testlerdir. İstenilen maddelerin antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek için çeşitli *in vitro* yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerle, maddenin antimikrobiyal aktiviteye sahip olup olmadığı belirlenmektedir. Eğer aktivitesi var ise minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ve mikroorganizma spektrumu belirlenir. *In vitro* antimikrobiyal aktivite testleri için amaca en uygun olan testi seçmek gerekmektedir. Yöntemin seçiminde; kullanacağımız maddelerin yapısı, sayısı, miktarı, çözünürlüğü ayrıca kullanılacak mikroorganizma cinsi, özelliği ve yoğunluğu büyük rol oynar. Sonuçların güvenilir ve tekrarlanabilir olmasına ek, özellikle zaman ve maliyet açısından uygun testler seçilmelidir [5].

Mikrodilüsyon yöntemi, bir seferde çoklu mikroorganizmaların antibiyotiklere, ekstraktlara ve kimyasal maddelere duyarlılığını test etmek için kullanılabilir. En çok bilinen testi olan MİK testi ile elde edilen MİK değeri, mikroorganizma süspansiyonunda (belli sayıda canlı organizma içeren kültür sıvısı) test şartlarında üremeyi, yani mevcut canlı hücre sayısının artışı önleyen, çıplak gözle belirlenebilen en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonlarıdır. Ayrıca kontrol ile kıyaslandığında %80 veya daha fazla bir azalmanın olduğu konsantrasyondur. Yeni ilaç adayları için MİK tayini, antimikrobiyal potansiyelini değerlendiren ilk adımlardan biridir. MBK testi; MİK değeri belirlendikten sonra gözle görülür üremenin olmadığı kuyucuklardan antibiyotiksiz besiyerine çizgi ekimi yapılarak %99,9 üremenin görülmediği en düşük konsantrasyondur (mg/L veya µg/ml) [6].

Hücre ölümünün 3 farklı tipi bulunmaktadır. Bunlardan ilk ikisi apoptotik ölüm tipi ve otofajik ölüm tipi programlı olup, nekrotik ölüm tipi ise hücrelerde hasar yoluyla gerçekleşmektedir. Nekroz; mekanik hasar, oksijen yokluğu veya toksik maddeler etkisi ile meydana gelmektedir. Hücrenin intiharı olarak da bilinen apoptoz ise fizyolojik koşullarda veya bazen patolojik koşullarda gözlenen programlı hücre ölümüdür. Otofaji ise çoğu açlık tarafından tetiklenen, hücre sağ kalımında büyük bir rolü bulunan sistemik bir programlı ölüm mekanizmasıdır. Özellikle hücrelerin, özellikle hücre içindeki besin ve enerji üretimlerine ihtiyacı olduğu anlarda hızlıca aktive edilirler. Hücrenin zor koşullara uyum sağlamasını sağlayan bu özelliği ile yaşamsal organları tüketerek ölüme yol açmakta, kontrolü bozulduğunda ise kanser, bazı kalıtsal hastalıklar, erken bunama, Alzheimer ve bazı enfeksiyonların oluşmasına neden olmaktadır [7].

Yapılan çalışmalar apoptozdan farklı olarak otofajinin, hücresel stres durumunda ya da hücrede besin olmadığında hücre içindeki moleküllerinin geri dönüştürülmesi ile enerji sağlayarak homöostazisinin (iç denge) korunmasında yardımcı olduğu gösterilmiştir [8].

DNA koruma testi, proteinlerin veya kimyasalların koruyucu özelliklerinin *in vitro* karakterizasyonu için basit, hızlı ve sağlam bir araçtır. DNA'nın zarar verici bir oksidatif reaksiyona maruz bırakılmasını ve ilgilenilen bileşiğin çeşitli

konsantrasyonlarının eklenmesi ile deney gerçekleştirilmektedir. DNA'ya zarar verici reaksiyon sonucunda DNA' da hasarın oluşması ile ya da ortama eklenen ilgili ekstraktın/maddenin DNA' yı hasardan koruması ile ortaya çıkan bantlarının azalması veya artması jel elektroforezi kullanılarak görselleştirilir [9].

### **1.1. Anadolu Sığla Ağacı (*Liquidambar orientalis Mill.*)**

Ülkemizde genellikle günlük ağacı adıyla bilinen Anadolu sığla ağacı (*Liquidambar orientalis Mill.*) Hamamelidaceae ailesinden olup, Bucklandioidae alt ailesinden, Liquidambar cinsidir ve Türkiye'nin Güneybatısında yayılışını gösteren bir türüdür [9]. *Liquidambar* türü gövdesinde balsam kanalı bulundurmaktadır. İsim anlamına bakıldığında Latince de sıvı anlamına gelmekte olan "liquidus" ve Arapça da güzel kokulu aromatik maddelere verilen genel isim anlamında "amber" kelimelerinin birleşiminden oluşmaktadır bundan dolayı güzel kokulu sıvı olarak da bilinmektedir. [15]. Sığla ağacının dünya geneline bakıldığında farklı türlerini görmek mümkündür. Amerika'da *L. styraciflua* ve *L. macrophylla*, Kuzey yarım kürede ve Asya da *L. formosana* ve *L. edentata* olmak üzere 4 türü daha bulunmaktadır. Özellikle Amerika'da yetişen *L. styraciflua* türüyle alakalı yapılmış birçok bilimsel araştırma mevcuttur. Bu araştırmaların çoğu ağaçtan elde edilen sakız (sweetgum) için yapılmaktadır [1,10].

#### **1.1.1. Yetiştirme Yeri Özellikleri**

Ülkemizde kapladığı alan bakımından özellikle 1950'li yıllardan itibaren giderek azalmaya başlayan Anadolu sığla ağacı genel olarak ülkemizin batısında yetişmektedir. Yetiştirme yeri özellikleri açısından sığla ağacı, genel olarak en iyi büyümeyi rutubet yönünden zengin, killi, aliviyal ve balçıklı topraklarda ve nehir yataklarının bulunduğu bölgelerde yaptığı belirtilmektedir. Anadolu sığla ağacı, senelik ortalama sıcaklığın 18°C olduğu, kışın şiddetli geçmediği kuru ve soğuk rüzgârlara karşı korunaklı sıcak mıntikalarda, yıllık ortalama 1000-1200 mm yağış alan bölgelerde, rutubetin ve yeraltı suyunun yüksek olduğu alanlarda, vadi, bataklık, akarsu, dere kenarları ve deniz kıyıları gibi daha çok sulak bölgelerde yayılışını göstermekte ve yetişmektedir [1].

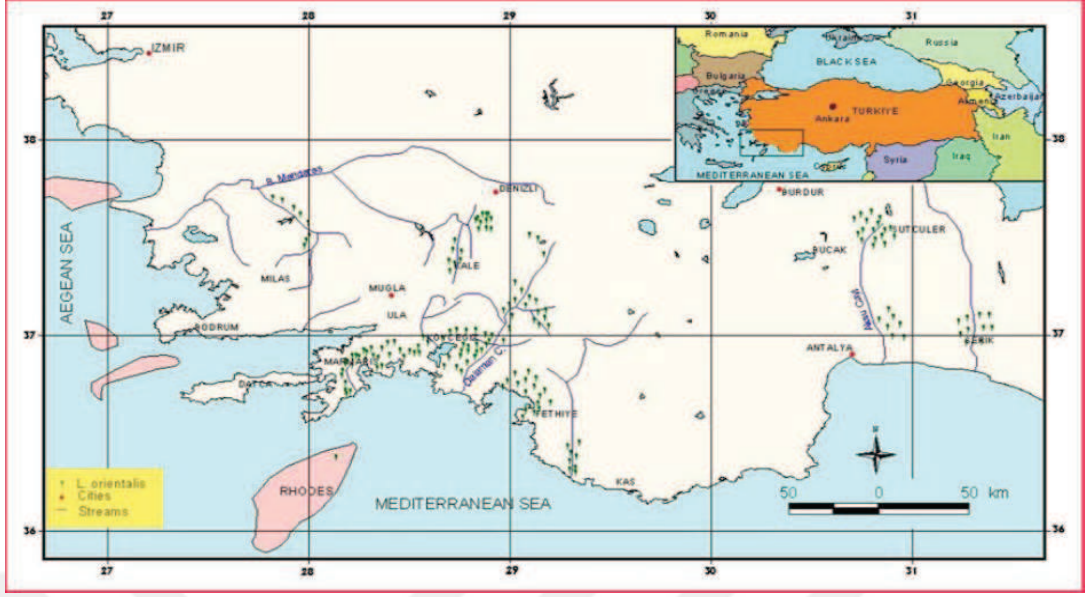
### 1.1.2. Yayılış Alanları

Anadolu sığla ağacının yayılımında bulunduğu bölgedeki arazinin eğimi ise son derece önemlidir. Suyun toprak tabanında ve yüzeyinde daha rahat yayılabildiği geniş, düz arazilik alanlarda yayılabilmektedir. Sığla ağacı arazi eğiminin normalden daha fazla olduğu bölgelerde ise taban suyu arazide şeritler halinde kullanılabilirliğini sürdürebilmekte, böylece sığla ağacının su ihtiyacı karşılanabilmektedir. Sığla ağacı yetiştiği ve yayılış gösterdiği bölgelere göre yöre halkı tarafından isimlendirilmektedir. Örneğin yaklaşık 15-20 metre deniz seviyesinden yükseklikte bulunan arazilerde yer alıyorsa “Taban Günlüğü” denilmekte fakat meşçere denilen ağaç korularında yani 400-450 m yükseklikteki yer alıyor ise “Dağ Günlüğü” şeklinde tanımlanmaktadır [10-11].

Günümüzde sığla ağacının yoğun olarak yetiştiği yöre ve bölgeler ise; Muğla'nın Köyceğiz, Marmaris, Dalaman Fethiye, Ula ve Datça ilçeleridir. Bunların dışında Denizli, Aydın, Antalya ve Burdur'un birkaç bölgesinde çok az miktarlarda yetiştiği bilinmektedir. Literatürde ağacın Türkiye'den farklı olarak 12 Adalar ve Kuzey Suriye'de ve Rodos'da yetiştiğine dair bilgiler bulunmaktadır, fakat Türkiye sınırları içerisindeki yayılım alanından fazla olmadığı düşünülmektedir. Anadolu sığla ağacının (*Liquidambar orientalis Mill.*) Anadolu'da endemik bir tür olduğu bilinmektedir [1,12,13,14]

Dünya Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği (IUCN) kırmızı liste kategorisine göre zarar görebilir (VU) sınıfına dâhil edilen ve endemik bir tür olan Anadolu sığla ağacının sayısı giderek azalmaktadır. Kırmızı liste kategorisine göre bu türler, eğer korunma önlemi alınmazsa yakın zamanda nesli tükenme tehdidi ve yok olma tehlikesi altına girebilirler. Anadolu sığla ağacı anayasal olarak korunmasına rağmen 1950'lerden itibaren geçmişten bu yana dar olan ve giderek daralan yaşam alanının 6500 hektardan 1300 hektara inmiş olduğu görülmektedir. Parçalanmış alanlarda kalan ağaçlar ise yok olmakla karşı karşıya kalmaktadır. Anadolu sığla ağacının Türkiye'de yayılışı Şekil 1.1 de verilmiştir. [15,16].





Şekil 1.1. Türkiye’de Anadolu sığla ağacının yayılım alanları [16].

### 1.1.3 Botanik

Kışın yapraklarını döken Anadolu sığla ağacı (*Liquidambar orientalis* Mill.) 20-25 metreye kadar uzayabilen kalın dallara, kenarları ince ve dişli olan yapraklara sahiptir. Ağaçta çiçeklenme dönemi Mart ayında başlar ve süresi birkaç ay kadar sürmektedir. Ağacın meyveleri Kasım ayında olgunlaşmaya başlar. Meyveler uzun sapların ucunda sarkık dururlar ve 2-6 cm çapında birçok kapsülden oluşmaktadır. İçerisinde fazlaca tohum bulundurulur ve meyveleri olgunlaştığı zaman sertleşip, kapsüllerinin açılması ile birlikte tohumları dökülmektedir. Oldukça geniş tepeli bir ağaç olarak bilinen Anadolu sığla ağacının en az 65 milyon yıldan bu yana yetişmeye ve var olmaya devam ettiği bilinmektedir. Toprak yüzünde hareketli suyunun olduğu ya da taban suyunun yüksek bulunduğu bölgelerde yetişir. İlk bakıldığında ise dış görünüşü olarak çınar ağacını andırmaktadır [13,14,17].

Ağaç kabuğunun rengi ilk zamanlarda açık grimsi, yaşlanmaya başladığında grimsi koyu kahverengiye dönmektedir. Yani ağaç yaşlandıkça, kabuğu koyulaşmakta ve daha derin çatlaklı bir görünüm almaktadır. Ağacın gövdesinde birçok patolojik balzam kanalları bulunmaktadır. Ağaçta meydana gelen herhangi bir yaralanma sonucu, yani dıştan gelen etkiler söz konusu olduğunda oluşmaktadır. Yaralanma ile birlikte ağacın öz kısmından oluşan bir çeşit balzam olan ve özellikle parfüm sanayisinde kullanılmakta olan sığla yağı, önemli bir hammadde olup ayrıca besin

takviyesi olarak da tüketilmektedir. Ağacın önemi, özellikle elde edilen bu balsamdan/yağdan kaynaklanmaktadır [15].

Ağaç kökleri yüzeye çok yakın olmaktadır, köklerin gelişimleri yatay olarak ve maksimum bir metreyi geçmeyen toprak derinliğinde olduğundan bazı durumlarda kökler yüzeyde de görülebilir. Genellikle kumlu, sulak ve asidik topraklarda yetişen Anadolu Sığla Ağacı, oldukça uzun ömürlü bir ağaçtır. Ortalama 200 yıl yaşadığı tahmin edilmektedir [13]. Şekil 1.2’de Anadolu Sığla ağacı ve kısımları verilmiştir [15].



Şekil 1.2. Anadolu Sığla Ağacı ve Kısımları [15].

## 1.2. Anadolu Sığla Ağacı Yağı

Anadolu sığla ağacının (*Liquidambar orientalis Mill.*) diğer ağaçlardan farklı olarak odunu ile değil, odun dışı bir orman ürünü olarak değerlendirmekte olan balsamı daha büyük bir önem kazanmıştır. Storax ve sweetgum olarak da adlandırılan ve kahverengi ve sarımsı bir renkte olan Anadolu sığla yağı yarı akışkan bir kıvamına sahiptir. Yağın yüzeyi oksidasyona uğradığında grimsi bir renk almaktadır. Saydam renksiz bir görünüme sahip ağaç balsam ise daha koyu kıvamlı ve tamamen yapışkan haldedir. Vanilyayı anımsatan hoş kokulu kokuya sahip olduğu ve ısıtılınca tarçın kokusuna benzer bir kokuya benzediği düşünülmektedir. Balsamın özgül ağırlığı ise 1,091-1,113 gr arasındadır [14].

### 1.2.1. Sıgla Yağı Üretimi

Üretimi yüzyıllar öncesine kadar uzanan Anadolu sıgla ağacı yağı için ilk olarak uygun gövdeye sahip ağaç seçimi yapılmaktadır.

1) Sıgla ağacından yağ elde edilmesi için ilk olarak ağaçta uzun hatlı yaralar açılmalıdır. Yara açılacak gövde kısmı üzerindeki kabuklar Mart ayının sonlarına doğru iyice yontulmak suretiyle inceltir.

2) Yaralandırılan ağaçlar bir ay boyunca bu halde bırakılır. Kaşık ismi verilen özel bir alet ile mayıs ayı sonu itibariyle yara açılmaya başlanır. Yaralar diri kabuk, dış kabuk, kambiyum ve diri oduna girecek şekilde açılmakta ve damar adını almaktadır.

3) Yaralar yaklaşık bir hafta sonra aynı alet ile tazelenmektedir. Bahsi geçen işleme surlama/sur ismi verilir. İki hafta sonra, bu işlem ile damarlar içinde birikmiş yağ kısmı alır ve “sur arkası” verilen bu işlem böylece tamamlanmış olur. Daha sonra ki adımda hakiki sıgla yağının elde edilmesi işlemine geçilmektedir.

4) Yağın alınması işlemine Temmuz ayı ortasından başlayarak Ekim ayının sonuna kadar sürmektedir. Bu zaman içerisinde ağaçta birikerek çevre etkileri katılarak rengi değişmiş yağ sızıntıları, kabuk ve odun kısımları olan sıyrıntılar (son ürünler) olarak sıyrılır. Bu işleme ise “karakap” olarak adlandırılmaktadır.

5) İşçiler sıyrılan son ürünleri kıl torbalar içerisine koymaktadırlar. Bu işleme sefer adı verilir. Torbalardan sonra çuval içerisine alınan sıyrıntılarda sıkılır ve sonra yarıdan fazlası (1/3) su ile doldurulmuş kazan tipi kaplarda yarım saat ila bir saat süreyle kaynatılmaktadır.

6) Presleme olarak tanımlanan, sıgla yağın mekanik yollarla kabuk ve odun sıyrıntılardan ayrılması kısmına geçilir.

7) Su ve yağın karışık olarak bulunduğu karışım beton ve derin havuzlarda dinlendirilir.

8) Torbalarda presleme işleminin sonunda kalan kısım yağ ve artık (küspe) kısımları oluşturur. Bu kısımlardan kurutulur ve artıklar buhur olarak adlandırılır. Bazı yörelerde günlük ismi de verilmektedir [1,10].

### 1.2.2. Sığla Yağının Kimyasal Bileşenleri

Sığla yağının yapısının araştırılmaya başlanması, 16. yüzyıla kadar uzanmaktadır. İlk önemli çalışmayı 1827 yılında Bauillon-Lagrange yapmış, yağın destilasyonu ile elde ettiği bileşiğin önce benzoik asit olduğunu ileri sürmüş olsa da daha sonra bu yapının sinamik asit olduğunu belirlenmiştir. Birçok araştırma sonucunda yağın içerisindeki uçucu yağ miktarının %1 olduğu belirtilmektedir [17].

Anadolu sığla yağı, öncelikli olarak yapısında asit, uçucu bileşikler, ester, alkol ve fenolik bileşikler bulundurmaktadır. Yağda bulunan ana bileşenler ise; sinamik asit, styracin, styrol, stoyrone, storesinol, storesin, styrene, sinamil sinamat, 3-fenilpropil sinamat, benzil sinamat, trans-cinnamyl alkol, hydrocinnamyl alkol ve vanillindir. Uçucu yağlar kısmında ise; styrene,  $\alpha$ -pinen, cinnamyl alcohol ve  $\beta$ -pinendir. Amerika sığla (*L. styraciflua*) ve Anadolu (*L. orientalis*) yağlarını uçucu bileşenler oranı olarak ayıran öncelikli bileşenleri ise  $\beta$ -Caryophyllene ve styrene'dir. Anadolu sığla yağında bulunan styrene, Amerika sığla yağında bulunan  $\beta$ -Caryophyllene daha yüksek miktarlarda olduğu belirtilmektedir [14,18,19].

Anadolu sığla ağacının yapraklarında bulunan uçucu bileşenlerde ağacın yetiştiği bölgeye göre farklılık göstermektedir. Örnek olarak Marmaris ve Fethiye'de yetişen sığla ağacı yaprakları terpinolen bileşenini içermezken, Köyceğiz'de bulunan sığla ağaçlarının b-karyofilen ve tujen-a gibi farklı bileşenleri içerdiği bilinmektedir. Anadolu sığla ağacının yaprakları ise terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol, sabinen,  $\alpha$ -pinen, viridiflorene ve germance D gibi uçucu yağları içermektedir. Fenolik bileşik olarak; protocatchuic asit, epicatchin ve gallik asit içerdiği bilinmektedir [20,21].

### 1.3. Kanser ve Türleri

Kanser; normal olmayan hücrelerin kontrolsüz büyüme ve gelişme özelliğine sahip olması nedeniyle gelişebilen hastalıklara verilen genel isimdir [22]. Tüm kanserlere DNA dizisindeki anormallikler neden olur. Yaşam boyunca insan hücrelerinde bulunan DNA, yapısını değiştirerek değişime neden olacak etkilere yani mutajenlere maruz kalır. DNA çoğaltımında her bir hücrede bulunan DNA sekansında değişiklikler meydana gelir. Bu mutasyonlardan her biri kritik bir genin işlevini değiştirir, içinde bulunduğu hücreye büyüme avantajı sağlar ve bu hücreden türetilen genişletilmiş bir klonun ortaya çıkmasına neden olur [23].

Kanser, dünyadaki ikinci önde gelen ölüm nedenidir ve 2018'deki tahmini 9,6 milyon ölümden sorumludur. Küresel olarak, 6 ölümden yaklaşık 1 tanesi kanserden kaynaklanmaktadır. Dünya genelinde en yaygın kanser türleri: Akciğer (2,09 milyon), Meme (2,09 milyon), Kolorektal (1,80 milyon) Prostat (1,28 milyon), Deri kanseri, (1,04 milyon vaka), Mide (1.03 milyon) olmak üzere 6 türde görülmektedir [24,25]

#### 1.3.1. Akciğer Kanseri

Temel solunum organımız olan akciğer, göğüs kafesinin içinde sağda üç lob ve solda iki lob halinde bulunmaktadır. Akciğerlerin vücuttaki temel görevi, vücut hücrelerinde biriken atık maddelerden biri olan karbondioksiti tamamen vücuttan dışarı atmak, insan hayatı için ana bir gereksinimi olan oksijeni vücuda almak, yani solunum işlevini yürütmektir. Birçok organda olduğu gibi akciğerde de kanserle karşılaşmak mümkündür. Akciğer kanseri, genetik yapıları bozulmuş ve değişmiş atipik (normal olmayan) hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüyüp çoğalması anlamına gelmektedir. Metastaz olarak bilinen, kanser hücrelerinin vücudun başka bölgelerine yayılım göstermesi ile ölüme yol açabilen bir hastalıktır [26].

Akciğer kanserinin geçtiğimiz 2018 yılı ile birlikte 2,1 milyon yeni vaka olarak görüleceği aynı zamanda 1,8 milyon ölüm ile beraber gelecek yılların kanser insidansı ve ölümlerinin en önde gelen nedeni olmaya devam edeceği düşünülmektedir. Erkeklerde akciğer kanseri, Doğu Avrupa, Batı Asya, Kuzey

Afrika ve Doğu Asya ve Güney Doğu Asya'daki çoğu ülkede başlıca ölüm nedenidir. Erkeklerde 25 ülkeye bakıldığında kanser ölümlerinin en önde gelen nedeni, akciğer kanseridir. En yüksek yayılma oranları Kuzey ve Batı Avrupa'da (özellikle Danimarka ve Hollanda'da), Kuzey Amerika, Macaristan ve Avustralya/Yeni Zelanda'da listenin en üstünde yer almaktadır [25].

Sigara akciğer kanserinin oluşumunda %94 oranında sorumlu bir etkidir. Kanser riski sigara kullanma süresi, başlama yaşı, toplam kullanılan sigara ve kullanılan sigaranın içeriğindeki maddelerin oranlarına göre değişir. Sigara kullananların akciğer kanserine yakalanma riski sigara kullanmayan kişilere göre ortalama olarak 30 kat artmaktadır. Sigara bırakılır ise akciğer kanserinin gelişme riski, 15 yıl hiç sigara kullanmamış bir bireyin seviyesine yakın seviyede bir risk oranına sahip olmaktadır. Aktif olarak sigara kullanımından sonra akciğer kanserinin bilinen önemli ikinci faktörü ise pasif sigara kullanımı olmakta ve kansere yakalanma riski bu bireylerde normale göre ortalama iki kat artmaktadır [27].

Sigara kullanma dışında etkili diğer faktörler yaş, cinsiyet, ırk, meslek, hava kirliliği, diyet, radyasyona maruz kalma ve önceden geçirilmiş akciğer hastalığından dolayı vücuttaki doku bozukluğu, immünolojik ve genetik faktörlerin tamamının ancak %6 oranında etkili olduğu gözlenmektedir. Ayrıca aile bireylerinde akciğer kanseri hastalığına görülmesinin de akciğer kanserine yakalanma riskini arttırdığı kanıtlanmıştır [28].

Tütün dumanındaki kanserojenlerde olduğu gibi kömür katranı veya asbest gibi diğer inhale partiküller, akciğer hücrelerinin DNA'sı ile doğrudan etkileşime girebilir. Tüm akciğer solunan kanserojenlere maruz kaldığından, çeşitli bölgeler farklı hücrelerde ortaya çıkan çoklu kanserlere yol açan farklı kanser değişikliklerini biriktirebilir. Kronik iltihap ayrıca, akciğer kanserinin gelişiminde, tahriş edici maddelere maruz kalma ve tekrarlanan yaralanmalara tepki olarak ortaya çıkan kanserli değişikliklerle de rol oynayabilmektedir [2].

Dünyada ve diğer gelişmiş ülkelerdeki ilk beş kanser türünün, ülkemizde ilk beş kanser türü ile benzerlikler gösterdiği görülmektedir. Erkeklerde gırtlak, bronş ve

akciğer kanseri (60,4/100000 kişide), kadınlarda ise ilk sırada meme kanseri (46,8/100000 kişide) en sık rastlanılan kanser türleri olduğu bilinmektedir [3].

### 1.3.2. Meme Kanseri

Meme kanseri; meme dokusundaki süt bezlerinde ve süt kanalını oluşturan hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmasıyla ortaya çıkmaktadır. Diğer kanser tipleri gibi genetik ve çevresel 5 faktörler aracılığıyla meydana gelmekte olup hücreleri; anti büyüme sinyallerine karşı direnç, büyüme sinyalleri otonomisi, apoptozdan kaçış, sınırsız replikasyon potansiyeli, doku invazyonu ve metastaz, DNA tamir mekanizmasının bozulması ve metabolik dönüşüm geçirme gibi özelliklere sahiptirler [29,30]

Bu kanser türü, kadınlarda en sık ve en yaygın görülen kanser tipi olarak bilinmektedir. Kadınlardaki kanserlerin tümünün kanserle ilişkili ölümlerin %20'sinden sorumlu olduğu bilinmektedir. Kansere bağlı ölümlere bakıldığında ise akciğer kanserinden sonra ikinci sırada gelmektedir [31].

Dünya genelinde ise 2018'de yeni teşhis edilmiş yaklaşık 2,1 milyon kadında meme kanseri vakası tespit edilmiştir ve kadınlar arasında 4 kanser vakasının 1'ini oluşturmaktadır. Hastalık, ülkelerin büyük çoğunluğunda en sık görülen kanserdir (185 adet ülkenin 154 tanesinde) ve aynı zamanda 100'den fazla ülkede kanser ölümünün önde gelen nedenidir [25].

Kanser, meme dokusuna, hormonal duruma ve diğer çevresel etkilere cevap olarak, yaşamın farklı aşamalarında değişmektedir. Bu nedenle, bazı risk faktörlerinin farklı yaşam evrelerinde farklı etkileri olması olası görülmektedir. Hormonlar meme kanseri ilerlemesinde önemli bir rol oynar, çünkü epitelyal hücrelerin yapısını ve büyümesini modüle ederler. Farklı kanserler hormon duyarlılığına göre değişir. Meme kanserleri, hormon reseptör tiplerine göre sınıflandırılabilir; örneğin, kanser hücrelerinin ne kadarının östrojen ve progesteron hormonları için reseptörleri vardır. Bunlar meme kanseri hücrelerinin büyümesini etkileyebilmektedir. Östrojen reseptörlerine sahip meme kanseri hücrelerine östrojen pozitif (ER +), progesteron reseptörleri içerenlere progesteron pozitif (PR +) kanserler denilmektedir.

Hormon reseptörü pozitif kanserler, meme kanserinin en yaygın alt tipleridir, ancak popülasyona göre değişir (%60-90). Hormon reseptörü negatif kanserlerden daha iyi bir prognoza sahiptirler ve tedavisi daha zor olabilir. Birçok meme kanseri ayrıca büyüme faktörleri gibi hormonlar üretir ve bunlar, tümörün büyümesini hem uyarır hem de engeller [2] [32-35].

### **1.3.3. Prostat Kanseri**

Prostat kanseri, erkeklerde menide sıvının bir kısmını üreten ve idrar kontrolünde rol oynayan bez olan prostat bezindeki normal olmayan hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması ile meydana gelmektedir. Prostat bezi mesanenin altında ve rektumun önünde bulunur. Prostat kanserine neyin yol açtığı henüz tam olarak bilinmemektedir ve çoğu durumda, prostat kanseri hiçbir belirti vermez. Araştırmacılar bu faktörlerin kansere dönüşen prostat hücrelerine katkıda bulunup bulunmadığını belirlemek için olası risk faktörlerini incelemektedirler. Ancak erken evrelerde bulunursa tedavi edilebilir. Son küresel kanser verilerine göre 1,3 milyon vaka ile ve % 7,1 oranla prostat kanseri dünyada dördüncü sıradadır. Aynı zamanda erkeklerde en sık görülen ikinci kanser ve beşinci önde gelen kanser ölüm nedenidir [24]. Özellikle Amerika, Kuzey ve Batı Avrupa, Avustralya/Yeni Zelanda başta olmak üzere, dünya ülkelerinin yarısından fazlasında (185 ülkenin 105 tanesinde) erkeklerde en sık görülen kanserdir [25].

### **1.4. Programlı Hücre Ölüm Modelleri**

Çok hücreli organizmalarda programlı hücre ölümü evrim süresi boyunca korunmuş olup halde birçok temel işlevde rol oynamaktadır. Bu işlevlere morfogenez, patojenlere karşı savunma ve doku homeostasisi (iç dengesi) örnek verilebilmektedir. Programlı hücre ölüm modelleri tarihte ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından tanımlanmıştır. Bu tanıma göre apoptoz, genetik olarak kontrol edilen hücre ölümü, nekroz ise programlı olmayan ve tesadüf eseri hücre ölümü olarak açıklamışlardır. Devamında ki yıllarda apoptoz programlı hücre ölümü olarak kabul edilirken, Clarke 1990 yılında birtakım çalışmalar ile hücre ölümünün 3 tipi daha olduğunu belirtmiştir. Bu sınıflandırmayı yaparken hücre ölümlerinin, embriyonik



gelişim safhasında ve bazı toksinleri kullanarak yaptığı muameleler sonucunda en az 8 çeşit programlı hücre ölüm yolunun olduğuna dikkat çekmiştir. Özellikle moleküler düzeyde ve morfolojik tanımlamalar sayesinde apoptozdan farklı olarak düşünülen ölüm modelinden biride otofajidir. Otofaji daha çok temel anlamı ile hücrenin kendini içten yemesi olarak bilinmektedir. Yapılan çalışmalar hücrenin içindeki yaşanan stres durumları ile başa çıkmak ve en önemlisi besin yokluğunda iç dengesini sağlayabilmek adına otofaji yoluna başvurduğunu göstermektedir [7,8].

#### **1.4.1. Apoptoz**

Apoptosis terimi ilk defa patolog olan İskoçyalı bilim insanları Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında Yunanca'da apo: ayrı, ptosis: düşen anlamlarına gelen ve sonbaharda ağaç yapraklarının dökülmesine benzetilerek tanımlanmıştır. Bu terim bir takım fizyolojik nedenlerden kaynaklanan, programlı hücre ölümünü anlatmaktadır. Nekroz olarak bilinen; patolojik bir hücre ölümü olan ve ATP miktarının normale oranla azalıp, hücre iç dengesinin hızlıca bozularak inflamasyon yanıtının olduğu olaydan farklı olarak, apoptoz; inflamasyon olmadan hücrelerin önce kendilerini yok etmeye başladığı, genlerle düzenlenen, programlı ayrıca RNA, enerjiye ve protein sentezine gereksinimi olan, organizmada asıl dengeyi koruyan bir olaydır [36-38].

Apoptoza uğramış hücre miktarı hücrede iç dengeyi sağlamakla birlikte organizmanın sağlıklı ya da sağlıklı oluşunu belirler. Bu durumda apoptoza gitme oranında azalma ile hücre sayısı da artmaktadır ancak tam tersi bir şekilde apoptoz oranı artar ise azalan hücre sayısı ve istenmeyen doku tahribatları oluşur [33,36]. Yani apoptoz eğer normalden çok hızlı gerçekleşiyor ise, gerekenden fazla hücre ölümü meydana gelir, anormal olarak yavaş gerçekleşiyor ise sağlıklı hücreler vücut dokularında ve bazı bölgelerde birikerek kanserin meydana gelmesine sebebiyet vermektedir.

Bu sistematik hücre ölüm mekanizmasının hücrelerde bulunan genetik bilgilerde yer alan intihar programının sinyalleriyle, oksidatif stres gibi olaylarla tetiklendiği düşünülmekle birlikte mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamaktadır [38].

Apoptoz, hücrenin intiharı olarak da tanımlanabilmekte, hücre tarafından programlanmış bir mekanizma vasıtasıyla, hücre dışı etkenler ve genetik faktörlerle tetiklenen bir sistem olarak bilinmektedir ve fizyolojik bir olaydır.

Apoptozis, doku gelişimi esnasında istenmeyen tüm hücrelerin ortadan kaldırılmasında ve memelilerde sinir sisteminin gelişimde rol oynar. Gerekinden fazla üretilmiş nöronların büyük bir kısmında hücre ölümü programlanmış bir şekilde gerçekleşir. Ayrıca hücrelerde ani hasarların meydana gelmesi durumunda apoptoz görev almaktadır [39].

Hücrede sağlıklı çoğalma işlemi durduğunda, DNA onarımı meydana gelmezse apoptoz ile sonuçlanan olaylar serisi başlamaktadır. Bu esnada hücre tipi, hücredeki hasarın boyutu ve hücrenin tümör oluşturabilme yeteneğine de bağlı olarak apoptotik süreç mekanizması değişebilmektedir. Programlı hücre ölümü ile immün (bağışıklık) sistem mekanizmalarının gerçekleşmesi ve hücrenin dengede kalması sağlanmaktadır [40].

Apoptoz, hücre içi veya hücre dışı yani çevreden gelen farklı sinyallerle başlar. Apoptoza hazır durumdaki hücrelerde birincil (primer) olarak başlayabilir veya herhangi bir uyarıcı sonucunda ikincil (sekonder) olarak gelişebilir. Apoptozun hücresel düzeylerde başlamasında etkili olan temel fizyolojik aktivatörler; Tümör nekrozis faktör (TNF) ve Fas Ligant (FasL) olarak isimlendirilmiş proteinlerdir. Bu proteinler ölüm faktörü olarak bilinirler. İlgili reseptöre bağlanması ile de hücre ölümü gerçekleşir [103]. Apoptozu hücre dışı uyaranlar arasında; koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF), glukokortikoidler, IL-2 gibi maddelerin ortamda azalması, onkogenler, kemoterapötikler, çeşitli antijenler, radyasyon önemli bir yere sahiptir. Otoimmün hastalık gelişiminde etkisi olduğu belirtilen Fas/FasL, sFas proteinleri ve virüslerin de hücreyi apoptoza götürdüğü bilinmektedir.

Organizmada apoptozu uyaran ve engelleyen birçok sayıda gen bulunmaktadır [41-44]. Tablo 1.1'de apoptozu indükleyen ve baskılayan genler verilmiştir [42].

Tablo 1.1. *Apoptoz ve Genler* [42]

Apoptozu indükleyen genler	Apoptozu baskılayan genler
<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Bcl-2</i> grubundan; <i>Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, bid, bik, Hrk1</i></li> <li>- <i>c-myc</i></li> <li>- <i>p53, p21</i></li> <li>- fas(CD95/APO1)</li> <li>FADD/MORT/RIP/FAST</li> <li>- İnterlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (İCE)</li> <li>- LOH(MTS1/CDK41)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Bcl-2</i> grubundan; BHRL-1, <i>Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1, A1</i></li> <li>- <i>p53</i></li> <li>- <i>C-Abl</i> Geni</li> <li>- Ras Onkogeni</li> <li>- Çözünebilir fas</li> <li>- A20</li> </ul>

#### 1.4.1.1. *Apoptozun Aşamaları*

Apoptoz bu süreçte dâhili birçok sinyaller tarafından tetiklenir. Genlerin DNA hasarına karşı cevabı, ölüm bildirilerinin alınması (Fas ligandı) ve proteolitik enzimin direkt olarak hücreye girişi (granzim) olarak üç farklı şekilde ileyebilir. Bu süreçte üç bileşenin önemi vardır. Bu bileşenler; *Apaf-1* (Apoptotik Proteaz Aktivatör Faktör-1) proteini, kaspazlar ve *Bcl-2* ailesi proteinleridir. Sağlıklı bir hücrede, mitokondri dış zarı apoptozu önleyen *Bcl-2* proteini görülür. Hücrenin iç hasara uğraması Bax proteininin mitokondri yüzeyine göç etmesine neden olur. *Bcl-2*'nin etkisinin inhibe edilmesi ile kendisi zardaki dış mitokondriyal zar oluşturucu kısımlara yerleşir. Daha sonra, sitokrom-c sızarak *Apaf-1*'e bağlanır. Apoptozom olarak bilinen bir protein kompleksi oluşturmak için pro-kaspaz-9'a bağlanır. Apoptozomlar, kaspaz-3'ü bağlayan ve aktive eden kaspaz-9'u bağlar ve aktive ederler. Bu kaspazın aktivasyonu, sitoplazma içerisinde yapısal proteinlerinin sindirilmesine, kromozomal DNA'nın degradasyonuna ve hücrelerin fagositozunda parçalanmasına yol açan genişleyen proteolitik bir aktivite kaskadı oluşturur [45].

Apoptoz uyarısı alan hücreler buldukları ortamdan uzaklaşırlar, komşu hücrelerle bağlantısını koparırlar ve büzülürler bu sırada kromatinleri giderek yoğunlaşır dağılımsal bir görünüm alır. Apoptoz, bu şekilde diğer hücrelerden uzaklaşarak bağlantının ortadan kalkması ve hücrelerin büzülmesi ile karakterizedir. Na, K, Cl taşıyıcı sisteminin durmasına bağlı olarak ise sıvı hareketi sağlanamaz ve hücreler büzülürler [38,46].

Hücre zarı yapısında bulunan fosfotidil serin zarının iç yüzünden dış yüzüne doğru transloke olur. Çekirdek küçülür ve parçalara ayrılır. Hücre parçalandıktan sonra nükleer materyal içeren zarla çevrili "apoptotik cisimcikler" adı verilen özel yapılar oluşur. Hücreler zarla sarılı tomurcuklar halinde koparken bu apoptotik cisimciklere ayrılırlar. Apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilirler, ancak inflamasyon görülmez [47]. Ayrıca apoptozun en benzersiz yönü ise hücre DNA'sının nükleozomlar arası bölgelerden yaklaşık olarak 180-200 bp ya da bu sayının katları halinde DNA parçalarının oluşması ile parçalanmasıdır [48].

Apoptotik uyarıya bağlı olarak sürecin başlamasıyla apoptotik cisimciklerin oluşumuna kadar meydana gelen tüm bu olaylar zinciri sadece birkaç dakika sürmektedir. Fakat meydana gelen küçük cisimciklerin fagositozu için ise 12-18 saat kadar uzun bir zaman zarfı gerekebilmektedir. Apoptoz esnasında oluşan DNA çözülmesi ve kromatin yoğunlaşması apoptoz mekanizmasında önemli bir role sahiptir [49-52]

Apoptoz uyarımından sonraki 1 saate kadar sonra DNA'nın tek iplikçiginde geri dönüşü olmayan parçalanmalar meydana gelir. DNA parçalanması, apoptozun gerçekleşmesi için zorunlu değildir. Normal ve sağlıklı hücrelerde de ani gelişen bir uyarı ya da basit bir olay da programlı hücre ölümüne neden olabilmektedir. Yani belirleyici çeşitli moleküller hücrenin apoptoza girip girmeyeceğine karar verir [53].

#### ***1.4.1.2. Apoptozda Etkili Genler***

p53'ün rolü: Ağır DNA hasarlarına yanıt olarak aktive olan p53 geni, reaktif oksijen radikalleri ile (genom, plazma membranı ve mitokondri üzerinde oluşturabileceği bir takım hasarlara bağlı olarak) apoptozu tetikleyebilir.

İnsanda apoptoz, *p53* ile başlayıp kaspazlara kadar devam eden sistemik mekanizmaya sahiptir. *p53* apoptozu indüklemeye özelliği olan özel bir protein olarak bilinmektedir. Birçok tümör önleyici ilaç maddesi, hedef olarak hücre DNA'sını seçer ve *p53* seviyesini artırır. Bu aktivasyon ile hasar tamir edilebilir ya da apoptoz tetiklenebilir [54,55]. Aktivasyon aynı zamanda kromozom-17'nin kısa kolunda bulunan bir gen olan *17p53* üretimi ile alakalıdır. *p53* tümör baskılayıcı bir gen olarak çalışmaktadır bu yüzden bu gende meydana gelen mutasyonlar tümör hücrelerinin yaşama süresinin uzamasına neden olmaktadır [56].

Çoğu zaman toksik etkilerle meydana gelen hücre hasarı, transkripsiyonu düzenleyici etkiye de sahip olan *p53*'ü aktive etmektedir. *p53*, hücrede DNA hasarında hücre siklusunu G1 fazında durdururup böylece hücreye DNA tamiri için gereken zamanı veren bir transkripsiyon faktörü olarak bilinmektedir. Eğer hasar tamir edilemeyecek durumda ise *Bax*, *Apaf-1* ve *Fas* yapımını artırır diğer taraftan *Bcl-2* ve *Bcl-xL*'yi baskılar ve apoptozu indükler [57]. Günümüzde *p53* geni ile aynı fonksiyonlara sahip olan *p63* ve *p73* genleri de tespit edilmiştir [58].

*Bcl-2/Bax*'in rolü: Geniş ve karmaşık yapıya sahip olan *Bcl-2/Bax* gen ailesi, apoptozun düzenlenmesini sağlamaktadır. Bu gen ailesinde 20 kadar üye tanımlanmıştır. Bu aile de *Bcl-2*, *Bcl-w*, *BclxL*, *Boo* ve *Mcl-1* gibi genler apoptozu inhibe ederken (antiapoptotik), *Bax* gibi proapoptotik genler ise apoptozu indüklemektedir. [59-60].

*Bcl-2* ailesi birbirine zıt 2 gruptan oluşmaktadır bunlar proapoptotik üyeler ve antiapoptotik üyelerdir. Hücrede proapoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoza eğilimli diye bilinmekte, antiapoptotik proteinler fazla ise de hücre apoptoza daha az eğilimli olduğu belirtilmektedir. Proapoptotik üyeler sitozolde yer alırlar ve bunlar *Bad*, *Bax*, *Bid*, *BclXs*, *Bak*, *Bim*, *Puma* ve *Noxa*'dır. Antiapoptotik üyelerin ise *Bcl-2*, *Bcl-xL* ve *Mcl-1* olduğu bilinmektedir [61]. *Bcl-2* ve *Bcl-XL*, sitokrom C ve apoptoz uyarıcı faktör (AIF) gibi faktörlerin mitokondriden serbest hale gelmesini engeller ya da kaspazların salınımlarını durdur böylece apoptozu inhibe eder. Diğer yandan *Bax* geninin sentezlenmesi ile apoptoz aktive edilmektedir.

Hücrelerin apoptoza eğiliminin olması ya da olmaması heterodimer veya homodimer formunda bulunan *Bcl-2* ailesi genlerine bağlıdır. Örneğin *Bcl-2* salgılanması ile *Bcl-2* homodimerleri oluşur ve apoptoz inhibe edilmektedir [62].

*Bax* ya da *Bak* gibi proapoptotik genler ise, mitokondri zarının por açıklığını değiştirme yoluyla sitokrom C'nin mitokondriden serbest salınımlı hale gelmesini kolaylaştırarak ve kaspazların serbestleşmesini uyarıp sonra apoptozu aktive ederler [63,64]

Kaspazların rolü: Sistein proteazlardan biri olan kaspazlar, aspartik asitten sonra gelen peptid bağını kırdıkları için c-asp-ases olarak adlandırılmışlardır. Hücrede aktif değildirler, ancak proteolitik olarak birbirlerini aktive edebilirler. Yaklaşık 100 farklı hedef proteinini keserek apoptoza neden olurlar [38].

Biyolojik fonksiyonlarına göre 3 ana grupta incelenen kaspazların ilki, sitokin aktivasyonu yapanlar: Kaspaz1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14'ü içermektedir. İkincisi, sitokin sekresyonu ve inflamasyondan sorumludurlar ve kaspaz-1, 4 ve 5 tetrapeptid olduğu için kendi kendilerine aktive olabilmektedirler. Sonuncusu, apoptozu başlatanlar: Kaspaz 2, 8, 9 ve 10'u içermektedir. Apoptozu yürüten grup olarak bilinen efektör grup ise: Kaspaz 3, 6 ve 7'yi içermektedir [65,66].

Apoptoz mekanizmasında yer alan üç temel grup; ölüm reseptörler, proteolitik enzimler (kaspazlar) ve adaptör proteinlerlerdir. Ölüm reseptörleri TNF (Tümör Nekrozis Faktör) gen ailesinde bulunur. TNF reseptörü, polipeptidlerin sitoplazmik bölümlerini ve ölüm alanı denilen bir aminoasit dizisini içermektedirler, böylece adaptör proteinlerine bağlanırlar. Adaptör proteinleri ise reseptörler ile ulaşılmış sinyalleri alarak kaspazlara bağlanmaktadır ve bu sayede kaspazların aktivasyonunu sağlarlar [37,38]. DNA tamiri ve replikasyonu için gerekli enzimleri inaktive eden kaspazlar, hücre iskeleti proteinlerini keserek hücre zarının tomurcuklanmasına neden olmaktadır [67].

### 1.4.2. Otofaji

Otofaji kendi kendini yeme anlamına gelmektedir ve hücrelerin fizyolojik koşullarda olası açlık durumunda hücrenin hayatta kalmasını sağlamak, metabolizma ve ATP seviyelerini korumak ve besin elde etmek için hücre içindeki yapıların parçalaması anlamında kullanılmaktadır [68]. Hücre içi organeller ve uzun ömürlü proteinler bu otofajik sistem tarafından parçalanmaktadır ve oluşan küçük yapı taşları da hücrenin kullanması için geri kazandırılırlar. Ayrıca, otofaji doğuştan gelen ve adaptif immün yanıtlarda rol oynar [69].

Otofaji; mikrobiyal enfeksiyon, oksijen azlığı, besin eksikliği ya da reaktif oksijen çeşitleri (ROS) gibi hücrenin yaşadığı stres ile tetiklenebilir. Otofaji kontrolü bozulduğunda ise kanser, bazı genetik hastalıklar, erken bunama, Alzheimer ve enfeksiyonların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır [7].

Otofajik hücre ölümü apoptotik hücre ölümünden farklıdır. Ancak, otofaji ve apoptozis arasındaki ilişki aslında daha karmaşıktır. Apoptozis sırasında uyarılmış otofaji, koruyucu bir mekanizma veya hücre ölümüne neden olan bir işlem olabilir. Son çalışmalar, otofajinin, DNA hasarını takiben invazif olmayan meme kanseri hücrelerinde apoptotik ölümü geciktirdiğini göstermiştir [55]. Öte yandan, apoptoz yokluğunda, otofaji bir hücre ölümü biçimini tetikleyebilir [56]. Hücre içerisinde gerçekleşen bazal düzeydeki otofaji mekanizması, protein ve organellerin döngüsü ile homeostazise (iç dengeye) katkıda bulunur ve zamanla artan hücresel stres durumlarında hücrenin hayatta kalmasını sağlar [70].

Hücre içerisine giren etkili toksin maddeler de otofajik hücre ölüm yolağının yapısal niteliklerinden dolayı hücre ölümüne sebep olmaktadır. Ek olarak, otofajilizozomal yolak, hücre içi uzun ömürlü proteinlerin ve organellerin homeostazını düzenlemek için önemli bir mekanizmadır [71]. Bugüne kadar otofajik etkinlik ve hücre ölüm arasındaki rastgele ilişkinin tespiti henüz yapılamamış olması ve sadece gözlem seviyesinde olması da bu çalışmaların otofajik aktivitenin hücre ölüm yolağındaki etkisinin dikkatle araştırılmasına sebep olmuştur [8].

Günümüzde kanser-otofaji ilişkisi hala oldukça tartışmalıdır. Otofaji, kanser gelişimi esnasında tümör baskılayıcı etki gösterirken, aynı zamanda kanserin ilerlemesi esnasında kanser hücrelerinin hayatta kalmasına da katkıda bulunmaktadır [72].

Kanser tedavisi süresi boyunca hem kanser hücrelerinde hem de normal hücrelerde otofajinin arttığı bilinmektedir. Ancak normal hücrelere nazaran kanser hücrelerinin hayatta kalmak için otofajiyi daha fazla kullanmaları sebebiyle bu durumun yeni tedavi fırsatları oluşturabileceği düşünülmektedir.

#### **1.4.2.1. Otofajinin aşamaları**

Hücre içinde oluşan atıklar ve bazı biriken maddeler asit hidrolaz enzimi içeren lizozomlar aracılığı ile parçalanmaktadır. Böylece otofaji ile hasarlanmış organellerle uzun ömürlü sitoplazmik proteinlerin lizozomlar aracılığı ile ortamdan uzaklaştırılması sağlanmaktadır [73].

Otofaji ile ilişkili protein grubu (Autophagy-related proteins) veya kısa adıyla Atg proteinleri olarak bilinen ayrıca otofaji mekanizmalarında önemli bir rol oynamakta olan bu proteinlerin çoğu mayada yapılan bir takım çalışmalar sonucunda bulunmuşlardır. Şuan ise 30'dan fazla *Atg* geni tanımlanmıştır [74]. Bu proteinlerin birazı ve bazı farklı protein kompleksleri otofagozom olarak bilinen ancak izolasyon membranı yada otofajik kesecik ismi de verilen yapıların oluşumunda görev almaktadırlar. Otofaji oluşum merkezi (PAS) olarak bilinen otofagozomlar, hücrede genellikle memelilerde özellikle E.R ile golgi cisimciklerinin aralarına dağılmış olan bölgelerde oluşmaktadır. Otofagozomların kaynağı henüz tam olarak belirli olmasa bile yaygın doğru sayılan düşünce, henüz yeni sentez edilmiş veya plazma membranı, mitokondri dış membrandan ve endoplazmik retikulumdan kaynaklanabiliyor olabileceği tahmin edilmektedir [75]. Ana moleküler mekanizmayı özetlemek gerekirse *Atg1-Atg17-Atg13* kinaz kompleksi; Vps34'ün ve sınıf III phosphoinositol 3 fosfat (PI3F) kinaz aktivitesini düzenleyen *Atg6* protein (memelilerde *Beclin-1*) kompleksi; iki ubikitin benzeri sistem ve *Atg9* döngü sistemi olarak dört adımdan oluşmaktadır [76].



Otofajik aktivitelerin kontrol edilmesinde, Tor protein kompleksinin oynadığı rol önemlidir. Tor kompleksi, ilk olarak mantara karşı kullanılmak üzere mayada geliştirilmiştir ve ortaya rapamisin ilacının hedefi olarak çıkarılmış bu sayede ünlenmiştir. Genel itibari ile hücrede özellikle hücresel büyümeyi ve protein sentezini kontrol eden bir kinaz olarak Tor bilinmektedir. Tor proteinin baskılanması durumunda hem memelilerde hem de mayalarda otofajinin aktif hale getirildiği bilinmektedir [77].

#### **1.4.2.2. Otofajide etkili genler**

*Bcl-2* ve *Bcl-XL*: Anti-apoptotik proteinlerdir, hem apoptozisi hem de otofajiyi inhibe ederler [78,79]. Memeli hücreleri içerisinde aynı zamanda mitokondrinin dış zarında bulunan *Bcl-2* üyeleri ise otofajiye etki etmektedir. *Bcl-2* aşağı regülasyonu, insanın lösemi hücrelerinde kaspazdan bağımsız olarak otofajiyi artırır. *Bcl-2*, *Beclin1* gibi anahtar otofajik proteinlerle direkt bağlantıya girerek otofajinin regülasyonunda rol oynar. *Bcl-2*, otofajinin bir proteini olan *Beclin1* ile doğrudan otofajiyi baskılamaktadır. Fakat mitokondri organelinde *Bcl-2* proteinlerinin otofajiyi düzenleyici işlevleri hala net olarak açıklanamamıştır. *Bcl-2* ile *Bcl-XL* gibi anti ölüm üyelerinin fazla ekspresyonu, otofajik hücre ölümünden hücreleri korur [80,81].

*p53*: Apoptozu uyarıcı etkisi olan *p53*; *Bax*, *PUMA* ve *NOXA* gibi pro-apoptotik genlerin transkripsiyonunu artırırken *Bcl-2* gibi anti-apoptotik protenleri ise azaltmaktadır [82]. *p53*'ün aktivasyonu, mTOR yolağının inhibisyonuyla birlikte otofajinin de aktivasyonuna yol açmaktadır [83]. Aminoasit ve büyüme faktörü eksikliğinde otofajiyi düzenleyen *p53* geni ve mTOR işlevi arasında bir ilişki olduğu da ortaya konmuştur. Antiapoptoz sinyal yolunda etkili olduğu bilinen mTOR etkinliğinin inhibe edilmesi ile *p53* yolağı otofajiyi uyarmaktadır [80]. Çekirdekteki *p53*'ün otofajiyi arttırdığı ancak sitoplazmik *p53*'ün ise azalttığı gösterilmiştir [84]. Ayrıca *p53*, *PTEN* ve *p19ARF* gibi birçok farklı tümör baskılayıcı gen, otofajiyi aktive etmektedir [85].

Akt/PKB ve TOR yolağı: Bu yolak otofajinin regülasyonunda en önemli yolaktır. TOR yolağının aktivasyonu ile hücre büyümesi ve sağ kalımını sağlarken inaktive olması ise otofajiye yol açmaktadır. mTOR yolağının Akt/PKB yolağı ile kontrol edildiği bilinmektedir. Akt/PKB aktivasyonu, *NF-kB* yolağı üzerinden apoptozu da bloke eder. Akt/PKB'nin aktivasyonu aynı zamanda otofajinin inhibisyonuna yol açmaktadır. Ayrıca AKT ve *c-Myc*, *Ras* ve *PI3K* gibi birçok onkoprotein de otofajiyi baskılamaktadır [85-88].

*Atg4D*, *Atg5* ve *Beclin*: Bu proteinlerin proteolize uğraması apoptozu indüklemektedir. Bu sayede bazı otofaji proteinlerinin apoptoz yolakları tarafından da kullanıldığı belirlenmiştir [89,90] .

Reaktif oksijen türleri (ROS) ve *Atg4*: ROS, *Atg4*'ü okside ederek otofaji üzerindeki etkilerini göstermektedir. Okside ile *Atg4* inaktive olur ve böylece otofagozom oluşumu baskılanır. Hücre içinde ROS yüksekliğinin apoptozu uyardığı düşünülürken, düşüklüğünde ise hücre büyümesi ve sağkalımı arttırdığı bilinmektedir [91].

Arasında kompleks ilişkiler bulunan apoptotik hücre ölümü ve otofajik hücre ölümü birbirleri ile ilişkilidir. Örneğin, otofajiyi indükleyen bazı proapoptotik sinyaller bulunmaktadır. Bunlar; serin-treonin kinazlar olarak bilinen kalsiyum-kalmodulinle regüle edilen DAPK1 ve DRP-1, dışsal apoptoz yolağı olarak bilinen yolağın bileşenlerinden olan seramid, TRAIL, TNF ve FADD otofajiyi indüklemektedir. Ayrıca Sınıf I olarak bilinen PI3K/AKT/TOR sinyalizasyonu gibi antiapoptotik sinyaller nedeniyle de otofajiyi baskılamaktadır. Apoptozun mitokondriyal regülasyonunu sağlayan bazı genlerde, otofaji yolağıyla birbirini etkileyebilmektedirler. Hatta bunun mitokondrinin, apoptoz ve otofaji yolaklarının birbirlerini etkilemesine neden olan adeta bağlantı noktası özelliği gösterdiği düşünölmektedir [80,92].

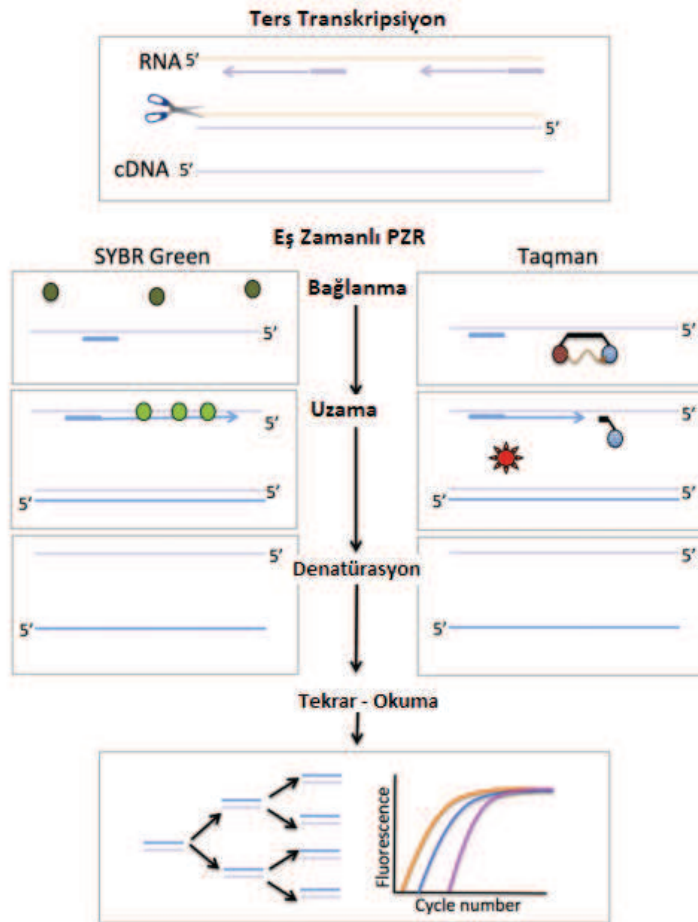
## 1.5. Eş Zamanlı-PZR

Gerçek (eş) zamanlı PZR veya kantitatif PZR (qPZR), moleküler biyolojinin tüm alanlarında nükleik asit (DNA, RNA) ölçümü için tercih edilen bir yöntemdir. Yöntemin adı, DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile amplifikasyonunun (çoğaltmanın) gerçek zamanlı olarak izlenmesinden kaynaklanmaktadır. Geleneksel PZR'nin aksine nicel bir yöntemdir, yani numunelerde amplifiye DNA'nın tam miktarlarının göreceli veya mutlak belirlenmesini sağlamaktadır. DNA'nın yanı sıra, RNA bir şablon olarak da kullanılabilir (örneğin, gen ekspresyon çalışmaları veya RNA virüslerinin tespiti durumunda). Bu durumda, RNA'nın, gerçek zamanlı PZR ile çalışılmadan önce DNA'ya (tamamlayıcı DNA veya cDNA olarak da adlandırılır) ters kopyalanması gerekir. PZR, bir enzimin ilk olarak 1960'larda *Thermus aquaticus* bakterisinden 1960'larda izole edilmesi ile DNA'nın (amplikon) şablonunun kısa bir bölümünü, farklı döngülerde çoğalttığı bir yöntemdir. Her döngüde, DNA'nın kısa spesifik bölümlerinin sayısı iki katına çıkar, bu da çok kopyalı amplifikasyonun gerçekleşmesini sağlamaktadır. Eş zamanlı PZR'da da (qPZR) tam olarak aynı prosedür gerçekleşmektedir. Fakat iki büyük değişiklik vardır: ilk olarak, çoğaltılmış DNA flüoresan (genellikle siyanine dayalı flüoresan boyalarla) olarak etiketlenmektedir. İkinci olarak, çoğaltma sırasında salınan flüoresan miktarı, amplifiye DNA'nın miktarı ile doğrudan orantılı olmaktadır. Floresans, bütün PCR işlemi sırasında izlenlebilmektedir. Örnekteki ilk DNA molekülü sayısı ne kadar yüksek olursa, PZR döngüleri sırasında floresans o kadar hızlı artmaktadır [93].

Gerçek zamanlı bir PCR reaksiyonundaki ilk adım, RNA'nın tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) dönüştürülmesidir. Bu işlem ters transkripsiyon olarak bilinir. Bir sonraki adım, spesifik genleri büyütmek ve tespit etmek için floresan etiketleri ve bir PZR reaksiyonunu kullanır. İki tip floresan etiketi yaygın olarak kullanılmaktadır; bunlar SYBR Green ve Taqman problarıdır. SYBR Green, yalnızca çift sarmallı DNA'ya (yani PCR ürünü) bağlandığında flüoresan bir boyadır. Taqman probları, raportör ve söndürücü moleküllere birleştirilen gene özgü bir nükleik asit sondasından yapılıdır. Prob, ileri ve geri primer arasındaki DNA'ya bağlanır. Etiket ve söndürücü sondaya bağlıken, söndürücü etiket tarafından yayılan floresansı emer.

PCR reaksiyonunun uzama fazı sırasında, prob bozulur, raportör serbest bırakılır ve flüoresansının saptanmasına izin verilir. Taqman yönteminin avantajı, farklı renkli raporlayıcılara sahip olan problemlerin multipleks analizlerde birleştirilebilmesidir [94]

Hem SYBR Green hem de Taqman yöntemlerinde, bir numunedeki floresans miktarı 'gerçek zamanlı' olarak tespit edilir ve döngü numarasına karşı çizilir. Floresans miktarı, PCR ürününün miktarı ile orantılıdır. Floresansın tanımlanmış bir eşığe ulaştığı zaman noktası, gen ekspresyonunun seviyesine bağlıdır. Gen ekspresyonunun okuması, belirli bir floresans seviyesini elde etmek için gereken PCR döngü sayısı ("döngü eşığı" Ct) olarak verilmektedir. Gerçek zamanlı PCR deneylerinin tasarımı, gen dizisinin önceden bilinmesini ve dâhil edilecek kontrol türlerinin dikkatlice değerlendirilmesini gerektirir [94].



Şekil 1.3. Eş zamanlı PZR aşamaları [136]

Eş zamanlı PZR'da çoğaltma ve çoğaltılan son ürünleri saptama işlemi aynı cihazda yapıldığı için yöntem gayet pratiktir.

Aynı zamanda tüpler açılmadan deney tamamlandığı için oluşabilecek kontaminasyon riskleri de azalmaktadır. Gerçek zamanlı PCR'nin diğer önemli avantajları, DNA konsantrasyonlarını geniş bir aralıkta ölçebilme kabiliyeti, hassasiyeti, aynı anda birden fazla numuneyi işleme kabiliyeti ve anında bilgi sağlama kabiliyetidir.

Bir dezavantaj, makinelerin geleneksel PCR makinelerinden daha pahalı olmasıdır. Gerçek zamanlı PCR, benzer türde çok sayıda örneği işleyen büyük ticari laboratuvarlarda özellikle kullanılmaktadır. Eş zamanlı PZR yardımı ile apoptoz kantifikasyonu da apoptozisin şu ana dek proteinden saptanıyor olmasına karşı getirilen önemli bir gelişmedir. *Bcl2*, *Bax*, *Dapk1*, *Myc*, *Bad*, *Wt1*, *Mcl1* gibi genlere ait ekspresyon analizleri ve RNA *Y1 (hY1)* gen kantifikasyonu bu amaçla uygulanan başarılı çalışmalardandır [95].

## 2. KURAMSAL TEMELLER

Anadolu sığla yağının antibakteriyel özelliğine bakıldığında farklı bakterilere karşı; %10 konsantrasyonda, bazı bakterilere karşı ise %0,1, %0,2 ve %0,4 olmak üzere farklı konsantrasyonda antibakteriyel etki gösterdiği belirlenmiştir [96]. Anadolu sığla ağacı yaprağı ekstraktlarının antibakteriyel özelliği dolayısıyla, yeni ilaç hammaddesi ve ilaç araştırmalarında antimikrobiyal etken maddesi olarak kullanılabilmesi önerilmiştir [97]. Anadolu sığla ağacı balsamının antifungal etkisinin bulunduğu saptanmıştır [98]. Benzer şekilde yapılan bir araştırmada Anadolu sığla balsamının uçucu yağı ve bileşenlerinin *Drosophila suzukii* sineğine karşı sprey tipi kontrol maddeleri ve fumigant madde olarak kullanılabilmesi, bununla birlikte yapılacak olan daha fazla çalışma ile pratik ve ticari kullanımının gerçekleştirilmesi gerektiği belirtilmektedir [99].

Anadolu sığla yağının özellikle deri endüstrisinde antibakteriyel madde olarak kullanılabilmesi tespit edilmiştir [100]. Anadolu sığla yağının *Reticulitermes speratus* termitine karşı fumigant toksisite testinde, yağın yapısında bulunan trans-cinnamyl alkol ve hydrocinnamyl alkolün önemli bir rol oynadığı belirtilmiş, Anadolu sığla yağının ticari bir fumigant olabilmesi için ise daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir [101].

Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada Anadolu sığla yağının karbon tetra klorür (CCl<sub>4</sub>) toksisitesine karşı antioksidan kapasitesinin bulunduğu, ayrıca karaciğer koruyucu etkisinin olabileceği vurgulanmıştır [102]. Yapılan bir incelemede, 16. yüzyıl başında tıp metni olarak yazılmış “Ala'im-i Cerrahi” (Cerrahi Belirtiler) isimli eserde ismi geçen bitkiler arasında Anadolu sığlasının da bulunduğu belirtilmektedir [103].

Marmaris'te tıbbi bitkiler hakkında etnobotaniksel (bitki-insan ilişkisi) inceleme yapıldığında, Anadolu sığla balsamının ciddi anlamda tıbbi amaçlı geleneksel bir kullanımı olduğu ifade edilmiştir. Bununla birlikte literatürdeki bilgiler referans verilerek ülser, deri hastalıkları, yanık, ağız hastalıkları, kesik, akciğer hastalıkları, mide ağrısı vb. rahatsızlıklarda tedavi edici etkisi olduğu belirtilmiştir [104].

Yerel halkın geleneksel tedavi olarak özellikle mide hastalıklarında kullandıkları dozda Anadolu sığla yağının farmakolojik deneyler sonucunda, sıçanlara oral yoldan verilen 150 ve 300 mg/kg dozda Anadolu sığla yağının önemli oranda mide koruması gösterdiği tespit edilmiştir. Reçinenin GC-MS analizinde genel olarak, toplam yağın % 99,8'ini temsil eden 31 bileşik tanımlanmıştır bunlar; stiren (% 81,9), sinnamil alkol (% 6,9) ve a-pinen (% 3,5) ve diğer ana bileşenlerdir. Bu çalışma ile, Türkiye'deki *Styrax liquidus*'un lokal etnobotanik kullanımının anti-ülserojenik aktivite Anadolu sığla yapraklarından elde ettikleri etanol ekstrenin antioksidan ve antimutagenik etkileri olduğu ortaya koyulmuş ve etanolik ekstrenin genotoksik olarak güvenli kabul edilebileceği gösterilmiştir [105].

Sığla ağacı yaprakları ile yapılan bir çalışmada ağaç yapraklarının ruminant hayvanlarda metan gazını azaltmak için *E. globules* ve *L. nobilis* yapraklarından daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Ancak, *L. orientalis* yapraklarının etkileri büyük ölçekli uygulamadan önce, hayvansal üretim üzerinde *in vivo* test edilmesi gerektiğini ifade etmişlerdir [106].

Anadolu sığla yapraklarından elde edilen ekstraktın kültür levrek balıklarının raf ömürlerini duyuşal olarak 3 gün daha uzattığı gözlemlenmiştir [107]. Anadolu sığla balsamı ile emprenye (oduna madde emdirme) işlemleri uyguladıkları kayın odununda çürüme direnci seviyesinde iyileşme, elastikiyet modülü, eğilme direnci, liflere paralel basınç direnci gibi bazı mekanik özelliklerde azalma olduğu belirtilmiştir [108]. “Kent Ağaçları Bilgi Modeli” isimli yapılan bir çalışmada, Anadolu sığla ağacının sonbaharda yaprak renklenmesinden dolayı park ve bahçelerde kullanıldığı belirtilmiştir [109].

Birbirinden bağımsız yapılan farklı çalışmaların özellikle sığla yağı üzerine olduğu görülmekte olup, tez çalışmamız kapsamında hem yağ hemde daha önce çalışmamış olan Anadolu Sığla ağacının toprak üstü aksamından (yaprak ve dal karıştırılarak) farklı çözücüler yardımıyla elde edilen ekstraktların biyolojik aktivitelerinin incelemesi literatüre ve yapılacak olan yeni çalışmalara katkı sağlayacaktır.

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Kimyasal ve Kitler**

FBS (Gibco Thermo, ABD)

Penicilin/Streptomycin (PAN Biotech, Germany)

NEAA (Non-essential Aminoacid) (PAN Biotech, Germany)

Insulin human (PAN Biotech, Germany)

1X DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) (Gibco Thermo, ABD)

% 2,5 Trypsin/EDTA 10X (Gibco Thermo, ABD)

PBS pH 7.4 (Gibco Thermo, ABD)

GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, USA)

cDNA Sentez Kiti (BioRad, USA)

SYBR Green Solüsyonu (BioRad, USA)

Genejet Plazmid Miniprep Kiti (Thermo Scientific, ABD)

RedSafe™ Nükleik Asit Renklendirme Solüsyonu (Intron Biotechnology, Güney Kore)

6X DNA Jel Yükleme Boyası (Thermo Fisher Scientific, ABD)

Tris (Applichem, Almanya)

Asetik Asit (Glasiyal Asit, Merck)

Agaroz (Applichem, Almanya)

Etanol (Kimetsan, Türkiye)



Nutrient Agar (Merck, Almanya)

Nutrient Broth (Merck, Almanya)

### **3.1.2. Cihazlar ve Aletler**

96'lı Well Plate (Isolab, Almanya)

Buz makinesi (Hoshizaki, Avrupa Ltd.)

Çok Amaçlı Vorteks (Wisd Laboratory Instruments, Kore)

Çok Uçlu Otomatik Pipet (CAPP, Danimarka)

Derin Dondurucu -20 °C - Buzdolabı +4 (Arçelik 4252N, Türkiye)

Derin Dondurucu -82 °C (Glacier Nuaire Nu-9668E, Meksika)

Distile Su Cihazı (Protek Lab, Türkiye)

Elektroforez (Thermo Scientific EC1000XL2 ve EC300XL2, ABD)

Falcon Tüpleri (TPP, İsviçre)

Hassas Terazi (Presica 350-8519, İsviçre )

Hücre Densitometre Cihazı (Biosan, Letonya)

Hücre Kazıyıcı (TPP, İsviçre)

Hücre Kültürü İnkübatörü (Nüve EC 160, Türkiye)

Jel görüntüleme sistemi Quantum ST5 (Vilber lourmat, Fransa)

Laminar Flow Kabin (Hedlab, Türkiye)

Laptop (HP, ABD)

Manyetik Karıştırıcı (Wisd Laboratory MSH-20A, Kore)

Mikro Santrifüj Cihazı (Hettich, Fransa)

Mikrodalga Fırın (Arçelik, Türkiye)

Mikropipet (Thermo, ABD)

Mikrosantrifüj (N2631-0007 Star Lab, Kore)

Mikrosantrifüj tüpleri (TPP, İsviçre)

Multipurpose Vorteks (Wisd Laboratory Ğnstruments, Kore)

Otoklav Cihazı (Nüve, Türkiye)

Otomatik Mikropipetler (Eppendorf, Almanya)

Petri Kabı (Isolab, Almanya)

Phmetre (Jenco Quality Instruments, Çin)

Pipet Uçu ( CAPP, Danimarka)

Q-PZR (Eş zamanlı PZR) Cihazı (Qiagen, Germany)

Santrifüj (Nüve NF800, Türkiye)

Serolojik Pipet (Biologix, Çin)

Soğutmalı Santrifüj (Hetrich Micro 220/220R, Almanya)

Spektrofotometre Nano Drop (Thermo Sci. Multiskan go, Finlandiya)

Spektrofotometre Nano Drop (Thermo Sci. Multiskan go, Finlandiya)

Ters Mikroskop (Leica DMi1, Almanya)

Thermal Cycler Isı bloęu (Thermo, ABD)

Thermo-Shaker (Biosan Ts-100, Letonya)

Thoma Lamı (Marienfeld, Almanya)

UV Table Manuel (Prizma, Fransa)

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Bitki Ekstraksiyonu

Anadolu sığla ağacının (*Liquidambar orientalis Mill.*) toprak üstü aksamı (yaprak, dal) Muğla/Aksaz-Türkiye'den toplanmıştır. Ağacın yağı ise aynı bölgeden temin edilmiştir. Ağacın dal ve yaprakları karıştırılarak su, etil asetat ve metanol ekstraktlarının elde edilmesi için, hava yoluyla kurutma yapılmış (10 g), 24 saat boyunca oda sıcaklığında ( $25 \text{ }^\circ \pm 1 \text{ }^\circ \text{C}$ ) 200 mL çözücülerle yumuşatılmıştır. Ekstraktlar bir döner buharlaştırıcı kullanılarak  $40 \text{ }^\circ \text{C}$ 'de vakum altında konsantre edilmiştir. Su ekstraktını elde etmek için, toz haline getirilmiş numuneler 30 dakika boyunca 250 mL damıtılmış su ile kaynatılmıştır. Ardından sulu ekstraktlar süzülüp, liyofilize edilmiş ( $-80 \text{ }^\circ \text{C}$ , 48 saat) ve tüm özler, kullanılıncaya kadar karanlıkta  $+4 \text{ }^\circ \text{C}$ 'de saklanmıştır. Anadolu Sığla Ağacının (*Liquidambar orientalis Mill.*) toprak üstü aksamının metanol, etilasetat ve su ekstraktlarının, 10 mg/ml stok solüsyon içerisinde çözünerek hazırlanmıştır. Santrifüj işlemi gerçekleştirildikten sonra süpernatantlar  $0.22 \text{ }\mu\text{m}$  pore çapına sahip steril filtrelerde filtre edilmiştir. Daha sonra bu stok solüsyondan alınarak konsantrasyon miktarlarına göre seyreltmeler yapılmıştır.

### 3.2.2. Sitotoksisite Analizi

#### 3.2.2.1. Hücre Kültürleri

A549 hücre hattı: A549 akciğer kanseri hücre hücre hattı Kastamonu Üniversitesi, Biyoloji bölümünde temin edilmiştir. Hücreler  $37 \text{ }^\circ \text{C}$  sıcaklık ve %5  $\text{CO}_2$  sağlayan inkübatörde %10 FBS, %1 penicilin/streptomycin, %1 NEAA (Non-essential Aminoacid), 0,01 mg/ml human insulin içeren 1X DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) besiyeri içinde çoğaltılmıştır. Stok kültürler 75 cm<sup>2</sup> steril corning flasklarda, deney kültürleri ise 60 mm x 15 mm steril petri kaplarında ve 96-well kuyucuklu platelerde çoğaltıldı. Adherent özellikte olan bu hücreler %80-90 konflüens (hücre kabının kaplanması) hale geldiğinde hücre pasajlama işlemi için öncelikle ortamdaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücreler 2 ml 1x PBS ile yıkandıktan sonra 2 ml 1x %0.25 tripsin petrilere ilave edilerek inkübatörde 5 dakika

bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda hücrelerin zarar görmemesi ve tripsini inaktive etmesi için petri kabına 2 ml taze besiyeri eklenerek tripsinin aktivitesi durdurulmuş, hücre kazıyıcı yardımı ile kapların yüzeyinden ayrılan hücreler, 15 mL'lik falcon tüpler içerisine toplanıp, 5000 rpm de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatant kısım dökülmüştür, pellet kısım (hücreler) ise yeni hücre kültür kaplarına ekilmiştir. Hücre pasajı her 3 günde bir periyodik olarak gerçekleştirilmiştir. Hücre sayımı için Thoma lamı kullanılmıştır. Üzerinde üçlü çizgiler yardımıyla birbirinden ayrılan ve 16 büyük kareden oluşan Thoma lamı özel bir mikroskop lamıdır. Her 16 büyük karenin alanı 1 mm<sup>2</sup> 'dir. Lam üzerine konulan sıvının derinliği ise 0.1 mm olmalıdır. Sonuç olarak her bir büyük kare üzerindeki sıvı hacmi ise 104 µl' dir. Thoma lamının üst ve alt kısmında bulunan büyük iki adet 16 karedeki hücreler sayılıp aritmetik ortalamalar alınmıştır. Daha sonra aşağıdaki formül ile belirlenen dilüsyonlar yapılmıştır.

Dilüsyon Miktarı = (Başlangıçtaki Dilüsyon x Ortalama Sayılan Hücre x 10.000 İçin Katılan Miktar Sayısı (Sabit)) / ml'de İstenilen Hücre Sayısı

MDA-MB-231 hücre hattı: MDA-MB-231 (östrojen reseptörü negatif, ER-) meme kanseri hücre hattı Boğaziçi Üniversitesinden temin edilmiştir. MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> sağlayan inkübatörde %10 FBS, %1 penicilin/streptomycin, %1 NEAA (Non-essential Aminoacid), 0,01 mg/ml human insulin içeren 1X DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) besiyeri içinde çoğaltılmıştır. Stok kültürler 75 cm<sup>2</sup> steril corning flasklarda, deney kültürleri ise 60 mm x 15 mm steril petri kaplarında ve 96-well kuyucuklu platelerde çoğaltıldı. Adherent özellikte olan bu hücreler %80-90 konflüens (hücre kabının kaplanması) hale geldiğinde hücre pasajlama işlemi için öncelikle ortamdan besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücreler 2 ml 1x PBS ile yıkandıktan sonra 2 ml 1x %0.25 tripsin petrilere ilave edilerek inkübatörde 5 dakika bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda hücrelerin zarar görmemesi ve tripsini inaktive etmesi için petri kabına 2 ml taze besiyeri eklenerek tripsinin aktivitesi durdurulmuş, hücre kazıyıcı yardımı ile kapların yüzeyinden ayrılan hücreler, 15 mL'lik falcon tüpler içerisine toplanıp, 5000 rpm de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatant kısım dökülmüştür, pellet kısım (hücreler) ise yeni hücre kültür kaplarına ekilmiştir.

Hücre pasajı her 3 günde bir periyodik olarak gerçekleştirilmiştir. Hücre sayımı, yukarıda bahsedildiği gibi her hücre hattında Thoma Lamı ile yapılmıştır.

PC3 hücre hattı: PC3 prostat kanseri hücre hattı Selçuk Üniversitesi, Biyokimya bölümünden temin edilmiştir. Hücreler 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> sağlayan inkübatörde %10 FBS, %1 penicilin/streptomycin içeren 1X DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) besiyeri içinde çoğaltılmıştır. Stok kültürler 75 cm<sup>2</sup> steril corning flasklarda, deney kültürleri ise 60 mm x 15 mm steril petri kaplarında ve 96-well kuyucuklu platelerde çoğaltıldı. Adherent özellikte olan bu hücreler %80-90 konflüens (hücre kabının kaplanması) hale geldiğinde hücre pasajlama işlemi için öncelikle ortamdaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücreler 2 ml 1x PBS ile yıkandıktan sonra 2 ml 1x %0.25 tripsin petrilere ilave edilerek inkübatörde 5 dakika bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda hücrelerin zarar görmemesi ve tripsini inaktive etmesi için petri kabına 2 ml taze besiyeri eklenerek tripsinin aktivitesi durdurulmuş, hücre kazıyıcı yardımı ile kapların yüzeyinden ayrılan hücreler, 15 mL'lik falcon tüpler içerisine toplanıp, 5000 rpm de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatant kısım dökülmüştür, pellet kısım (hücreler) ise yeni hücre kültür kaplarına ekilmiştir. Hücre pasajı her 3 günde bir periyodik olarak gerçekleştirilmiştir. Hücre sayımını yukarıda bahsedildiği gibi her hücre hattında Thoma Lamı ile yapılmıştır.

### **3.2.2.2. MTT**

Hücre canlılığını belirlemek amacıyla metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) ajanı kullanılmıştır. MTT ajanı içerisinde bulundurduğu tetrazolium halkası, canlı hücrelerin mitokondrilerindeki dehidrogenaz enzimleri sayesinde parçalanmakta ve mor renkli formazan tuzu oluşturmaktadır. Daha sonrasında kolorimetrik yöntem ile hücre canlılığı belirlenir. MDA-MB-231, A549 ve PC3 hücre hatlarının sayımı yapıldıktan sonra hücreler, 96 kuyucuklu hücre kültür kablarna her kuyucuğa 10.000 hücre olmak suretiyle ekilmiştir. İnkübatörde 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'de logaritmik faza ulaşana kadar inkübe edilmiştir. 24 saat 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyonu takiben yapışmış olan hücrelere su, methanol, etil asetat ve yağ ekstraktları ile seri dilüsyon yapılarak muamele edilmiştir ve inkübatöre kaldırılmıştır.

Her bir ekstrakt ile muamele için 62,5 µg, 125 µg, 250 µg, 500 µg ve 1000 µg konsantrasyon aralığı seçilmiştir. Muamelelerin tamamı üç tekrarlı yapılmıştır. Hücreler 24 ve 48 saat olmak üzere inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra besiyeri aspire edilip hücrelerin ters mikroskop altında fotoğrafları çekilmiştir. Sonrasında her kuyucuğa 100 µl, 0,5 µg/µl MTT ve %0,5 FBS içeren besiyeri konulmuştur. Petriler inkübatörde 4 saat daha inkübe edilmiştir. 4 saatin sonunda petrilerdeki MTT'li besiyeri aspire edilmiştir. Her petriye %3 SDS eklenip 5 dakika çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra 40 mM HCl/izopropanol konulup 15 dakika çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Pipetleme yapılarak hücreler homojenize edilmiştir. Homojenizasyondan sonra hücreler %3 SDS + 40 mM HCl/izopropanol içeren seyreltme solüsyonu ile seyreltilmiştir (1/10 seyreltme). Son olarak 96 kuyucuklu hücre kültür kablaları içerisinde bulunan muamele edilmiş hücreler spektrofotometrede 570 nm dalga boyundaki absorbans değeri spektrofotometrede ölçülmüştür.

### **3.2.3. Apoptotik ve Otofajik Marker Gen İfadelerinin Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR yöntemi ile Analizi**

#### **3.2.3.1. IC<sub>50</sub> Değerinin Belirlenmesi**

Yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonları (IC<sub>50</sub>) olarak bilinen IC<sub>50</sub> değerleri, GraphPad Prism 7.0 yazılımı ile hesaplanmıştır.

#### **3.2.3.2. IC<sub>50</sub> Değerleri ile Hücre Muamele**

MDA-MB-231, A549 ve PC3 hücre hatlarının her biri için ayrı olmak üzere taze ilaveli besiyeri hazırlanmış, 60 mm x 15 mm steril petri kaplarına ekilmiştir. Adherent (tabana yapışık büyüyen) özellikte olan bu hücreler %80-90 konflüens (hücre kabının kaplanması) olduğu zaman 5 ml %0,25'lik PBS ile yıkandıktan sonra 2 ml %0,25 tripsin flasklara ilave edilerek kültür kabından ayrılması sağlanmıştır. Kapların yüzeyinden ayrılan bu hücreler, 15 mL'lik falcon tüpler içerisine toplanıp, 5000 rpm de 5 dk. santrüfuj edilmiştir. Santrüfuj sonunda elde edilen süpernatant kısım dökülmüştür, pellet kısım (hücreler) ise yeni hücre kültür kaplarına ekilerek, taze hazırlanan ilaveli besiyeri içerisinde %5'lik CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 37°C'de büyütülmüştür.

Logaritmik büyüme fazındaki hücreler bitki ekstraktlarının IC<sub>50</sub> değerleri ile muamele edilmiştir. Seçilen değerler 48. Saat IC<sub>50</sub> değerleri olduğu için hücreler 48 saat boyunca inkübatörde 37°C, %5 CO<sub>2</sub> 'de inkübe edilmiştir.

### **3.2.3.3. Hücre toplama**

48 saatlik inkübasyonun ardından kültür kaplarından muamele edilen besiyeri aspire edilmiştir. 5 ml %0,25'lik PBS ile nazıkçe ve hızlıca yıkandıktan sonra aspire edilmiştir. Tekrar %0,25'lik PBS' ten 6 ml kültür kaplarına eklenmiş ve hücre kazıyıcı ile petri tabanındaki tüm hücreler toplanmıştır. Petri kapların yüzeyinden ayrılan bu hücreler, 15 mL'lik falcon tüpler içerisine toplanıp, 5000 rpm de 5 dk santrüfuj edilmiştir. Santrüfuj sonunda elde edilen süpernatant kısım dökülmüştür, pellet kısım (hücreler) ise -80°C ye kaldırılmıştır.

### **3.2.3.4. RNA izolasyonu**

MDA-MB-231, A549 ve PC3 hücre hatlarından GeneJET RNA purifikasyon kiti (Thermo Scientific, USA) ile total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonrası RNA örneklerinin spektrofotometrede absorbans değerleri ölçülmüştür.

### **3.2.3.5. DNaz muamelesi**

Yapılan izolasyon sonrasında elde edilen RNA örneklerinden DNA bulaşı var ise uzaklaştırmak amacı ile DNaz muamelesi yapılmıştır. *DNazI* enzimi kullanılarak örneklere bulaşmış olan DNA fragmentleri uzaklaştırılmıştır. Reaksiyon karışımları ve sıcaklık döngüleri ise Tablo 3.1'e göre hazırlanmış ve uygulanmıştır. Sonrasında örneklerin spektrofotometrede absorbans değerleri ölçülmüştür. DNaz ile muamele edilmiş RNA örnekleri, komplementer DNA (cDNA) sentezinde kullanılmıştır.

Tablo 3.1. *Reaksiyon Karışımları ve Sıcaklık Döngüleri*

<b>Bileşenler</b>	<b>Miktar</b>
<b>RNA</b>	Absorbans değerlerine göre RNA miktarları belirlenmiştir.
<b>10x MgCl<sub>2</sub> içeren reaksiyon tamponu</b>	2 µl
<b>Dnaz I</b>	2 µl (1U)
<b>DEPC-muamele edilmiş su</b>	20µl' ye tamamlanır
37°C' de 30 dakika inkübasyon	
50 mM EDTA	2 µl
65°C' de 10 dakika inkübasyon	

### 3.2.3.6. *Komplementer DNA sentezi*

DNaz ile muamele edilmiş RNA'ların komplementer DNA sentezlenmesinde iScript™ cDNA Sentez Kiti kullanılmış ve kalıp DNA'lar gen ifadesi analizi için hazır hale getirilmiştir. Tablo 3.2'ye göre reaksiyon karışımları hazırlanmış ve tablodaki sıcaklık döngüleri uygulanmıştır.

Tablo 3.2. *Komplementer DNA sentezinde reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon basamakları*

<b>Bileşenler</b>	<b>Miktar</b>
5x iScript Reaksiyon Karışımı	4 µl
iScript Ters Transkriptaz	1 µl
RNA	DNaz muamelesi sonrası ölçülen absorbans değerine göre belirlenmiştir.
Nükleaz içermeyen su	20 µl' ye tamamlanır
5 dakika 25° C	
20 dakika 46° C	
1 dakika 95° C	



### 3.2.3.7. Primer Tasarımı

Genlerin ifade analizleri için kullanılmış olan primerler ile internal kontrol genine ait primer çiftleri Tablo 3.3 de gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Gen ifade analizlerinde kullanılan genlere ait primer listesi

Gen adı	İleri Primer	Geri Primer
<i>GAPDH</i>	5'- AACATGTAAACCATGTAGTTGAGGT-3'	5'- GGAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
<i>LC3-II</i>	5'-GAGAAGCAGCTTCCTGTCTGG-3'	5'-GTGTCCGTTACCAACAGGAAG-3'
<i>Beclin-1</i>	5'-GGCTGAGAGACTGGATCAGG-3'	5'-CTGCGTCTGGGCATAACG-3'
<i>Bax</i>	5'-CCCGAGAGGTCTTTTCCGAG-3'	5'-CCAGCCCATGATGGTTCTGAT-3'
<i>Bcl2</i>	5'-GGTGGGGTCATGTGTGTGG-3'	5'-CGGTTTCAGGTACTCAGTCATCC-3'

Amplifikasyonlar ise şu reaksiyon şartlarında gerçekleştirilmiştir; başlangıç denatürasyon için 95°C 'de 5 dakika bekletilmiş, ardından 40 reaksiyon döngüsünde denatürasyon 95°C 10 saniye, bağlanma ve uzama sıcaklığı ise 57°C'de olmak üzere 30 saniye olarak gerçekleştirilmiştir. Gen ifade analizleri relatif olarak karşılaştırmalı CT metodu (  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  ) kullanılarak yapılmıştır.  $\Delta Ct$  ve  $\Delta\Delta Ct$  değerleri,  $\Delta\Delta Ct: [(Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{housekeeping gen}}) - (Ct_{\text{normal gen}} - Ct_{\text{housekeeping gen}})]$  olarak hesaplanmış ve ekspresyon seviyesindeki farklılık  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  olarak belirlenmiştir. Elde ettiğimiz verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi ise Livak ve Schmittgen (2001)'in 2- $\Delta\Delta Ct$  metoduna göre yapılmıştır [152].

### 3.2.4. DNA Koruma Analizi

#### 3.2.4.1. pUC19 plazmid DNA (pDNA) İzolasyonu ve Fenton Reaksiyonu Hazırlanması

İncelenen ekstraktların DNA koruma aktivitesi, pUC19 plazmid DNA (pDNA) kullanılarak analiz edilmiştir.

Plazmid izolasyonu, ticari bir kit olan Thermo Scientific Genejet Plazmid Miniprep Kiti ile yapıldı. İzolasyonu yapılan pUC19 plazmid DNA 'sının konsantrasyonu ölçülmüştür.

Ekstraktların DNA koruma aktivitesini test etmek amacıyla DNA'ya hasar verecek fenton reaksiyon ( $\text{Fe}^{+2} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{+3} + \text{OH}^- + \text{OH}^-$ ) karışımı hazırlanmıştır. Fenton reaksiyonu bileşenleri ve hazırlanması Tablo 3.4 de gösterilmiştir.

Tablo 3.4. Fenton reaksiyonu bileşenleri ve hazırlanması

Bileşenler	Miktar
Hidrojen Peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	30 mM
Askorbik Asit	50 mM
FeCl <sub>3</sub>	80 mM
Tüm bileşenler bu sıraya göre eklenmiş, ardından 10 ml distile su içerisinde çözülmüştür.	

#### 3.2.4.2. Ekstraktların Seyreltilmesi

Su, metanol, etil asetat ekstraktları ve sıgla yağı stoklarından seyreltme yapılmış ve 0.22 µm pore çapına sahip steril filtrelerde filtre edilmiştir. Her bir ekstrakt için 5,10, 20 ve 50 mg / mL olmak üzere 4 farklı konsantrasyon belirlenmiştir. Belirlenen konsantrasyonlar için ekstraktlar tartılmış ve kendi çözücülerinde çözülmüştür. Ekstraktların bu konsantrasyonlar da DNA koruma aktivitesini belirlemek amacıyla 1,5 mL' lik eppendorf tüplerine tablodaki bileşenler sırayla eklenmiştir.

Pozitif kontrol, 12 µL distile su, 5 µL Fenton reaksiyonu ve 300 ng pDNA'dan oluşmaktadır. Negatif kontrol sadece 17 µL distile su ve 3 µL pDNA içermektedir. Örnekler 30 dakika 37°C'de inkübe edildi. Her bir ekstrakt için reaksiyon karışım içeriği Tablo 3.5. de gösterilmiştir.

Tablo 3.5. Her Bir Ekstrakt İçin Reaksiyon Karışım İçeriği

Bileşenler	Miktar
Ekstrakt	5µl
Fenton Karışımı	5µl
pDNA	3 µL pDNA (300 µg / µL).
dH <sub>2</sub> O	7 µL
Reaksiyon karışım hacmi, çift damıtılmış su kullanılarak 20 µL'ye tamamlanmıştır.	

### 3.2.4.3. Agaroz Jel Elektrofrez

DNA karışımlarını yürütmek için içerisinde; 0,4 gr Agaroz (Toz), 10 mL 1X TAE Tampon Çözeltisi, 2,5 µL RedSafe Jel Boyası içeren, % 0,8 agaroz jel karışımı hazırlanmıştır. Karışım elektroferez tankına dökülmüştür. Uygun tank tarağı yerleştirilmiş ve donması için 20 dakika beklenilmiştir. Daha sonra taraklar alınarak jel yüklemeye hazır hale getirilmiştir. 1x TAE tamponu Tablo 3.6'ya göre hazırlanmıştır.

Tablo 3.6. Tris-EDTA tamponunun bileşenleri ve hazırlanması

Bileşenler	Miktar
TRIS	48,5 gr
Glasiyal Asetik Asit	11,4 ml
EDTA	20 ml (0,5 M pH:8)
Toplam karışım 800 ml distile su içerisinde çözülmüştür, ardından son hacim 1000 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır.	

Örneklerin jele yüklenmesinde 4 µl, 6x DNA jel yükleme boyası kullanılmıştır. Böylece toplam hacim olarak 24 µl olmuştur. Örnekler sırasıyla; negatif kontrol, pozitif kontrol, 5 mg/mL ekstrakt içeren su, metanol, etil asetat, yağ örnekleri olmak üzere jele yüklenmiştir. Aynı şekilde 10 mg/ml, 20 mg/ml ve 50 mg/ml ekstrakt içeren örneklerde hazırlanıp, jele yüklenmiştir.

Daha sonra ultraviyole ışık kabini altında görselleştirilmiştir. Testin biyolojik tekrarı üç kez gerçekleştirildi ve bant görüntü yoğunluğu, jel görüntü analiz yazılımı (Quantum, Vision-Capt., Vilber Lourmat SAS, Fransa) ile belirlendi. Tüm konsantrasyonlardaki örnekler aynı protokol takip edilerek biyolojik tekrar amaçlı 3 kez daha yapılmıştır.

### **3.2.5. Antimikrobiyal Aktivite Analizi**

#### **3.2.5.1. Mikrodilüsyon Yöntemi (MİK ve MBK Testi)**

Antimikrobiyal değerlendirmeyi yapmak için kullanılan yöntemlerden biri olan MİK (Minimum İnhibitör Konsantrasyon) deneyi için, 6 gram-pozitif, 6 gram-negatif bakteri suşu olmak üzere toplam 12 bakteri kullanılmıştır. Bu bakteriler Kastamonu Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü (Kastamonu, Türkiye) tarafından temin edildi. Minimum inhibitör konsantrasyonları, belirli büyüme koşulları altında bakteri üremesini önleyen en yüksek konsantrasyonlar olarak tanımlanmaktadır.

İlk olarak stok bakterilerin tazelenmesi için katı besi ortamı (Nutrient Agar) hazırlandı. Petrilere dökülmüş ve soğutuldu. Stok bakterilerden iğne uçlu öze yardımıyla çizgi ekim yapıldı. Bakteriler inkübatör de 37°C 1 gece boyunca inkübe edilmiş. Sıvı besi ortamı hazırlandı (Nutrient Broth). Bakteriler öze ile toplanarak eppendorf tüp içerisindeki sıvı ortama aktırıldı. Bakteriler inkübatörde 37°C de gece boyunca inkübe edildi ve bakterilerin çoğalması sağlanmıştır. Cam tüpler içerisinde 10ml steril su ile otoklav yapıldı. McFarland densitometresi cihazı kullanılarak bakterin konsantrasyonları 0.5 McFarland standardına sabitlenmiştir.

96 Kuyucuklu plâtelere 100 µl Nutrient Broth eklenmiştir. Daha sonra, bitki ekstraktlarından 15,6/1000 µg konsantrasyon aralığında iki kat seri seyreltmeler (dilüsyon) yapılmıştır. Son seyreltmeden 100 µl çözelti atıldı. Plâtelere bir gece 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, bulanıklık 600 nm dalga boyunda spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir. MİK, büyümenin görsel olarak gözlemlenmediği ancak spektrofotometre ile ölçülebilen en düşük konsantrasyondur. MBK testi ise mikroorganizmaları öldüren en düşük antimikrobiyal bileşik konsantrasyonunu tespit etmektedir. MBK' yı belirlemek için, belirlenen MİK değerleri Müller Hilton Agara ekildi ve bir gece 37°C 'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün bakteriyal üreme olup olmadığı kontrol edilmiş, üreme olmayan konsantrasyonlar MBK değeri olarak kabul edilmiştir. Kullanılan bakteriler Tablo 3.7. de gösterilmiştir.

Tablo 3.7. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde kullanılan bakteriler

Gram (+)	Gram (-)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Staphylococcus epidermis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Staphylococcus alpha haemolyticus</i>	<i>Serratia marrescens</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>Salmonella kentucky</i>
<i>Enterococcus durans</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048

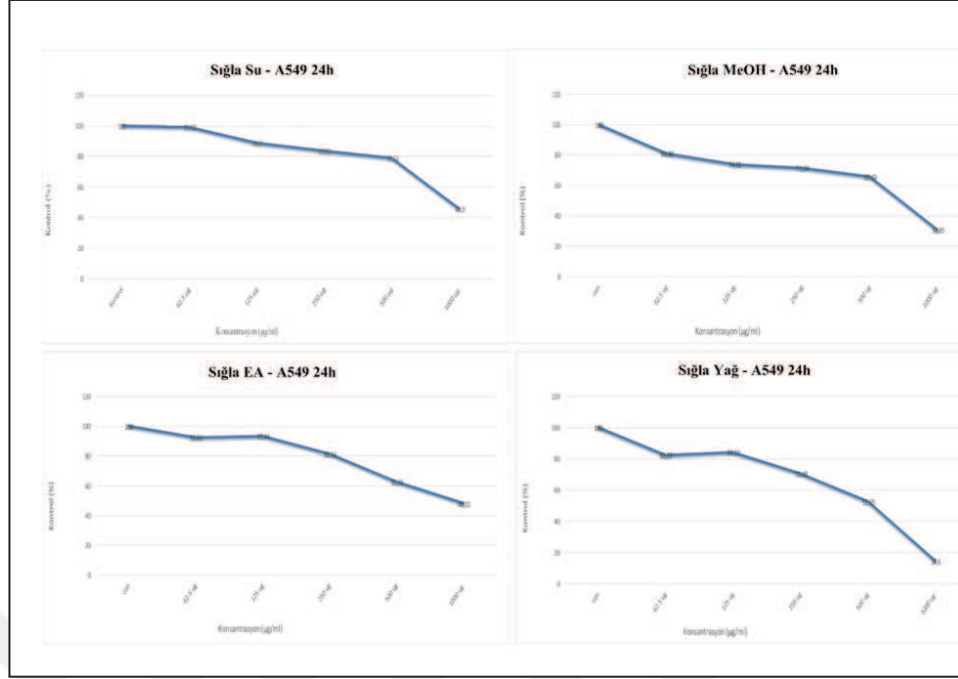
## 4. BULGULAR

Çalışmamızda ülkemizde endemik olarak yetişen Anadolu Sığla Ağacının (*Liquidambar orientalis Mill.*) su, metanol, etil asetatlı ekstraktları ile sığla yağı kullanılarak antikanser (sitotoksik), DNA koruma ve antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmış, aynı zamanda ekstraktların ve yağın apoptotik ve otofajik süreçte görevli olan genler üzerine olan etkisi incelenmiştir.

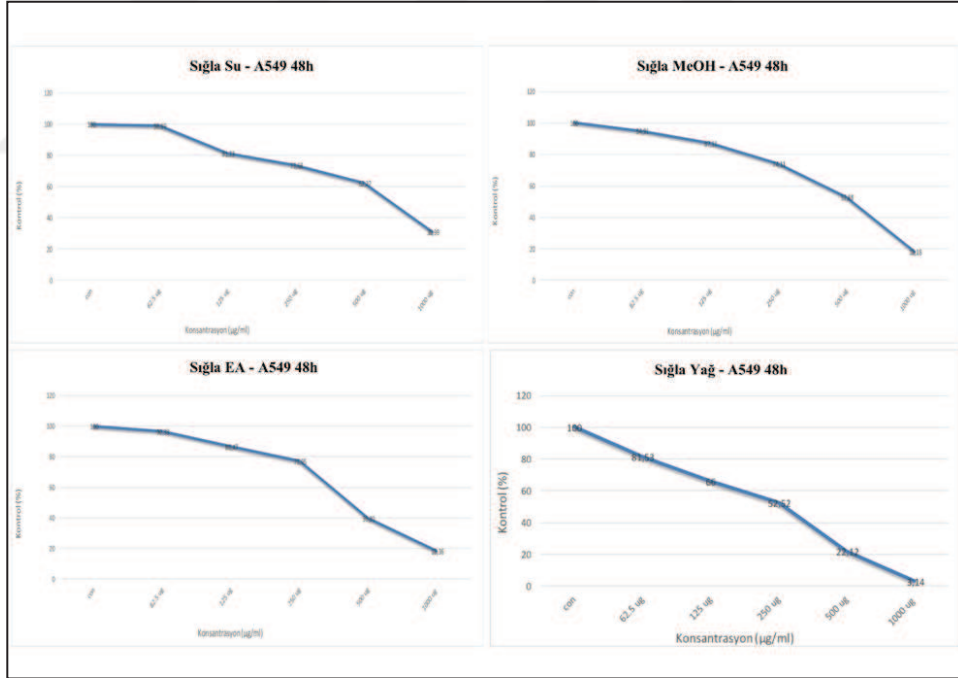
### 4.1. Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi

Ağaç ekstraktlarının ve yağının sitotoksik etkileri, MTT yöntemiyle belirlenmiştir. Toplam 4 ekstrakt için 24 saat ve 48 saat olarak iki farklı zaman aralığı uygulanmıştır. Hücre hatlarının ekstraktlarla muamelesi sonrasında iki farklı saat dilimi sonunda ters mikroskop altında fotoğrafları çekilerek morfolojileri görüntülenmiştir. Çekilen fotoğraflarda tüm hücre hatlarında artan konsantrasyon ve zaman dilimi ile doğru orantılı olarak muameleye uğramamış (kontrol) hücrelere göre hücrelerin morfolojilerinde azalma olduğu görülmüştür. A549, MDA-MB-231 ve PC3 hücre hatlarının fotoğrafları ekler bölümünde; EK 1, EK 2, EK 3, EK 4, EK 5, EK 6, EK 7 ve EK 8 de verilmiştir. A549 akciğer kanseri hattı için bakıldığında; 24 saat ve 48 saat için en iyi etkinin yağ ekstraktının 1000 µg/ml konsantrasyonunda görülmüştür. Diğer ekstraktlardaki etkilere bakıldığında ise 24 saat için sırasıyla metanol, su ve etil asetat ekstraktlarının, 48 saat için ise metanol, etil asetat ve su ekstraktlarının olduğu belirlenmiştir. 24 saat ve 48 saate ait MTT grafikleri Şekil 4.1. ve Şekil 4.2. de verilmiştir.

Genel olarak tüm ekstraktların 48. saatte ölçülen sitotoksik etkilerinin 24. saate göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Yağın 1000 µg/ml konsantrasyonunda tüm hücre hatlarında hem 24 hemde 48 saatte en iyi sitotoksik etkiyi gösterdiği görülmüştür. Ayrıca tüm ekstraktlarda doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkinin arttığı ve kanserli hücre yüzdelerini kontrole göre azalttığı görülmüştür.



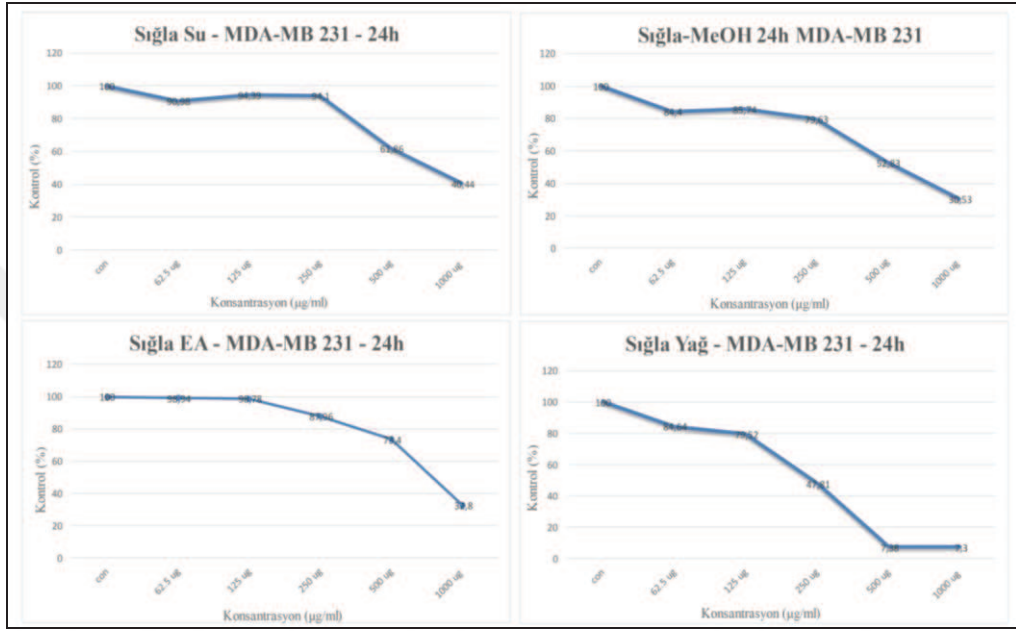
Şekil 4.1. A549 hücre hattının 24. saat MTT grafikleri



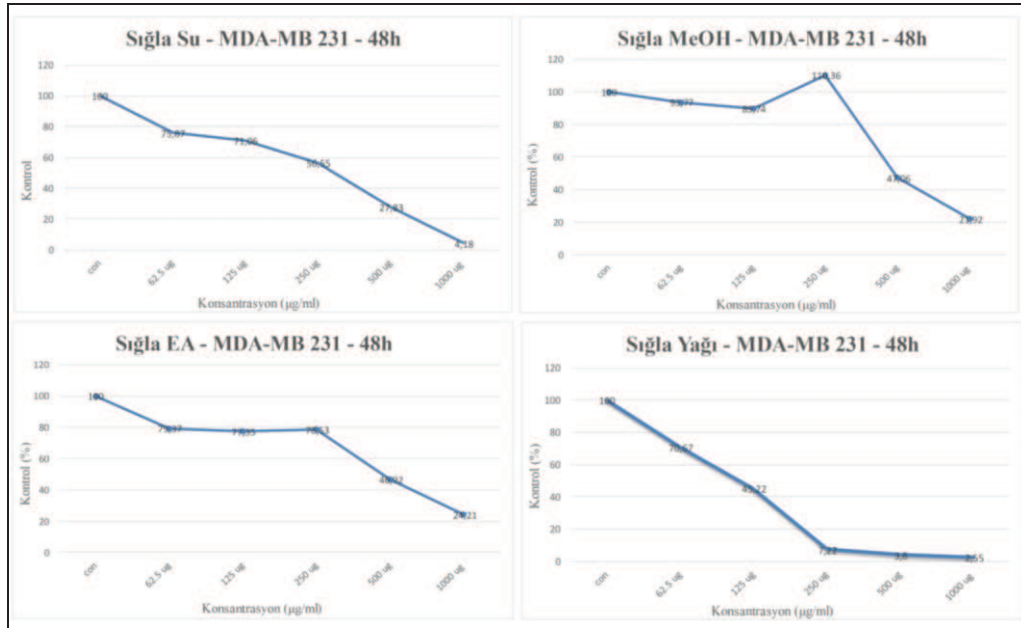
Şekil 4.2. A549 hücre hattının 48. saat MTT grafikleri

MDA-MB 231 meme kanseri hattı için bakıldığında 24 saat ve 48 saat için en iyi etkinin yağın 1000 µg/ml konsantrasyonunda görülmüştür.

Diğer ekstraktlardaki etkilere bakıldığında ise 24 saat için sırasıyla metanol, su ve etil asetat ekstraktlarının, 48 saat için ise su, methanol, ve etil asetat ekstraktlarının olduğu belirlenmiştir. Genel olarak tüm ekstraktların 48. saatte ölçülen sitotoksik etkilerinin 24. saate göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. 24. saat ve 48. saate ait MTT grafikleri Şekil 4.3. ve Şekil 4.4. de verilmiştir.



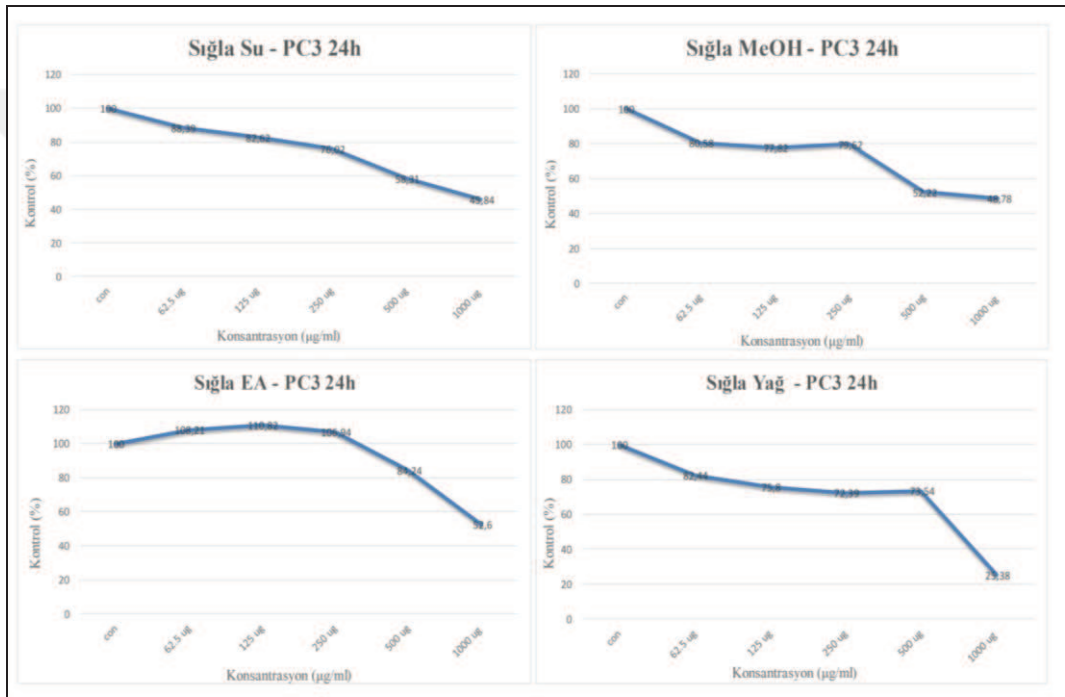
Şekil 4.3. MDA-MB 231 hücre hattının 24. saat MTT grafikleri



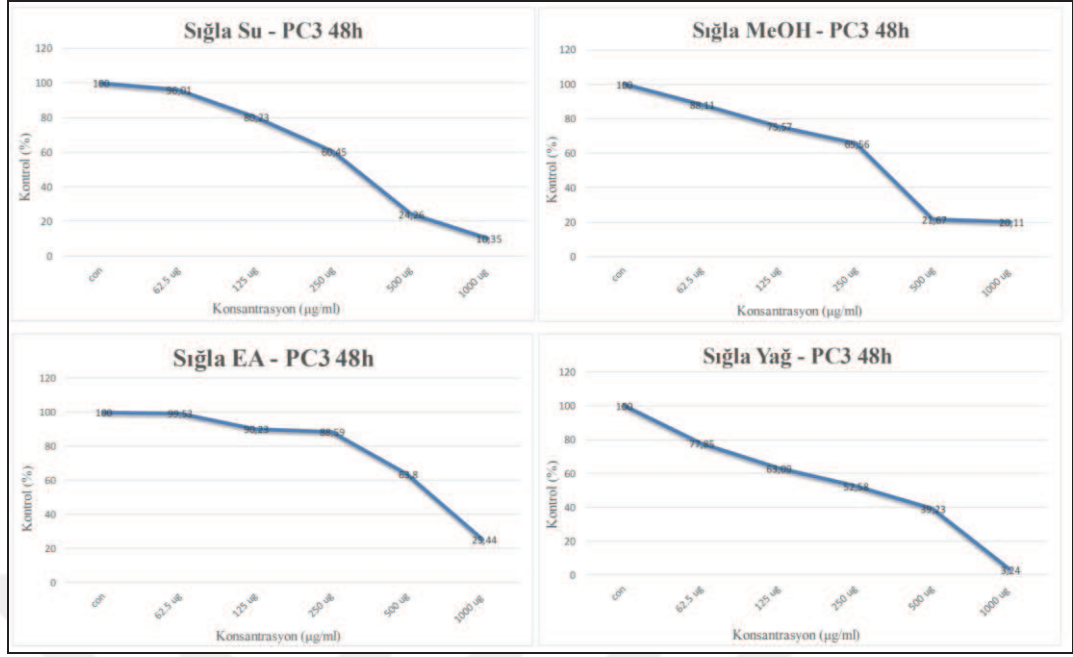
Şekil 4.4. MDA-MB 231 hücre hattının 48. saat MTT grafikleri



PC3 prostat kanseri hattı için bakıldığında 24 saat ve 48 saat için en iyi etkinin yağın 1000 µg/ml konsantrasyonunda görülmüştür. Diğer ekstraktlardaki etkilere bakıldığında ise 24 saat için sırasıyla su, metanol ve etil asetat ekstraktlarının, 48 saat için ise su, metanol ve etil asetat ekstraktlarının olduğu belirlenmiştir. Genel olarak tüm ekstraktların 48. saatte ölçülen sitotoksik etkilerinin 24. saate göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. 24. saat ve 48. saate ait MTT grafikleri Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.de verilmiştir.



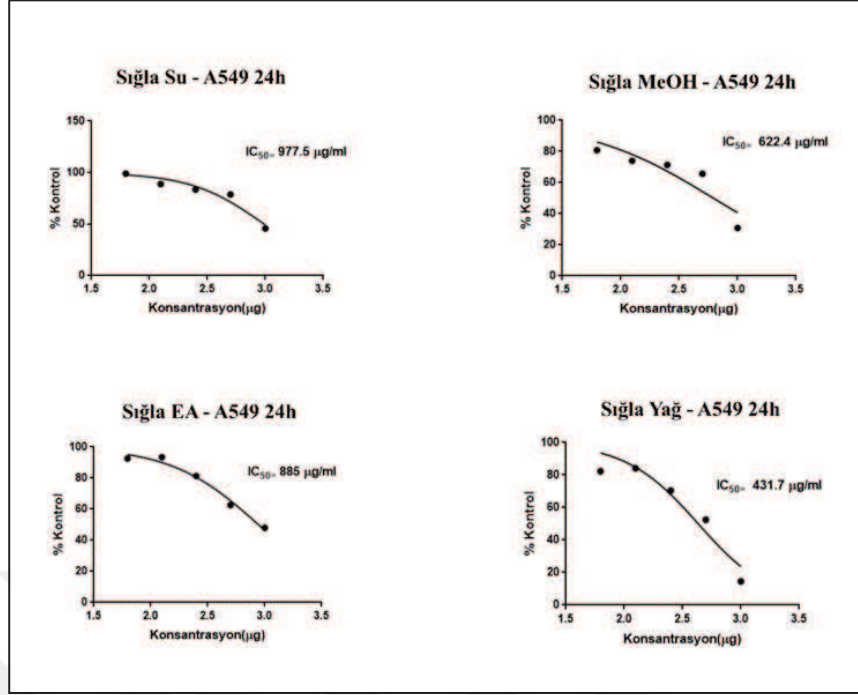
Şekil 4.5. PC3 hücre hattının 24. saat MTT grafikleri



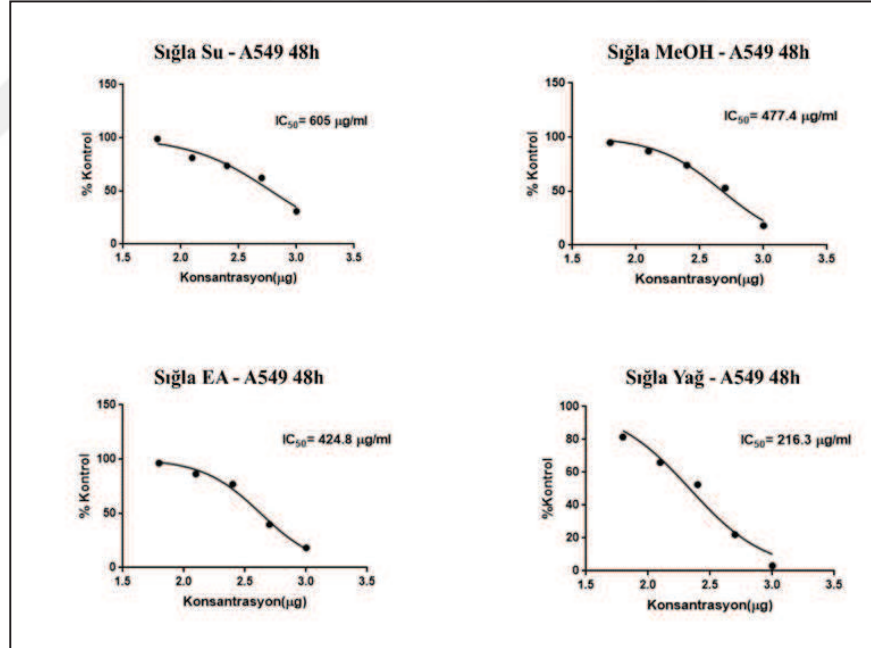
Şekil 4.6. PC3 hücre hattının 48. saat MTT grafikleri

#### 4.1.1. IC<sub>50</sub> Değerlerinin Belirlenmesi

Yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonları (IC<sub>50</sub>) GraphPad Prism 7.0 yazılımı ile hesaplanmıştır. A549 akciğer kanseri hücre hattında en düşük yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonu 24 saat için 413,7 µg/ml ve 48 saat için 216,3 µg/ml ile sıgla yağında hesaplanmıştır. 24. saat ve 48. saate ait IC<sub>50</sub> değerleri grafikleri Şekil 4.7. ve Şekil 4.9. de verilmiştir.

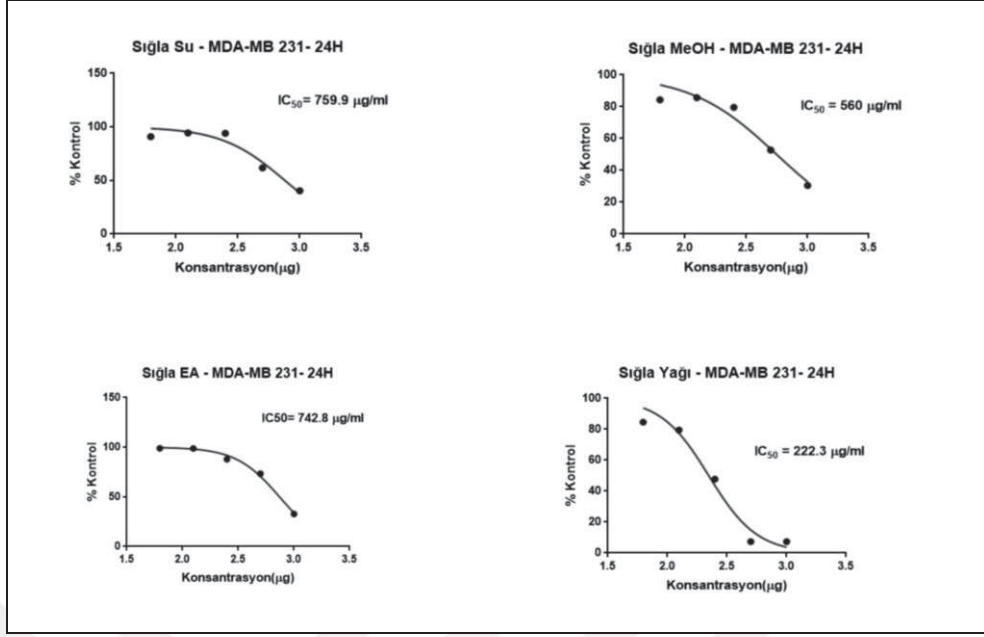


Şekil 4.7. A549 hücre hattının 24. saat IC<sub>50</sub> değerleri

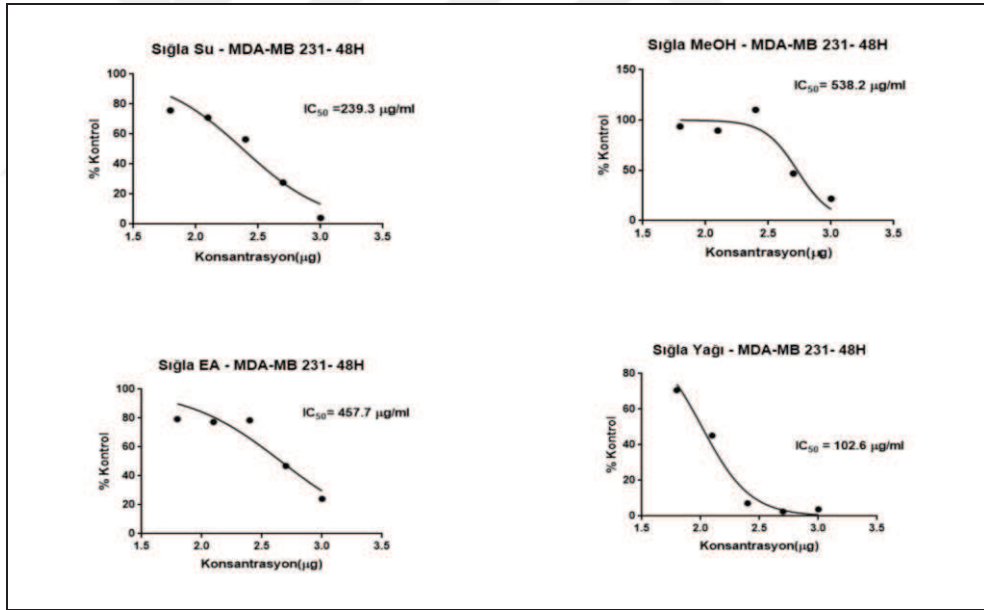


Şekil 4.8. a549 hücre hattının 48. saat IC<sub>50</sub> değerleri

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında en düşük yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonu 24. saat için 223,3 µg/ml ve 48 saat için 102,6 µg/ml ile sıgla yağında hesaplanmıştır. 24 saat ve 48 saate ait IC<sub>50</sub> değerler grafikleri Şekil 4.9. ve Şekil 4.10. de verilmiştir.



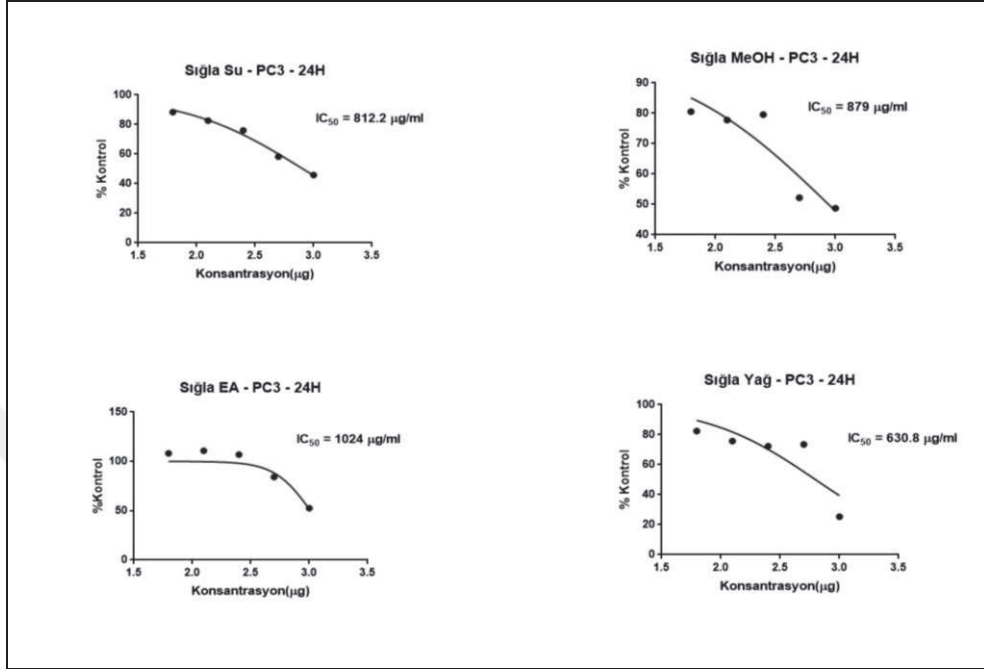
Şekil 4.9. MDA-MB-231 hücre hattının 24. saat  $IC_{50}$  değerleri



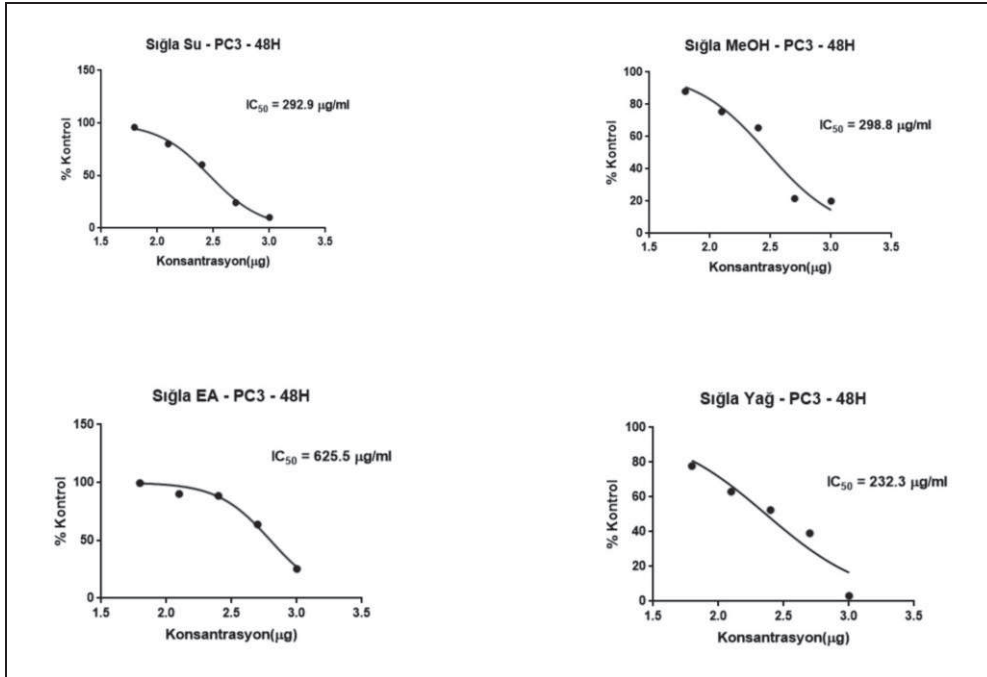
Şekil 4.10. MDA-MB-231 hücre hattının 48. saat  $IC_{50}$  değerleri

PC3 prostat kanseri hücre hattında en düşük yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonu 24 saat için 630,8  $\mu\text{g/ml}$  ve 48 saat için 232,3  $\mu\text{g/ml}$  ile sığla yağında hesaplanmıştır. Etil asetatlı ekstraktın 24 saat için yapılan  $IC_{50}$  değeri hesaplamasında 1024  $\mu\text{g/ml}$  sonucu elde edilmiştir fakat elde edilen değer çalışmamızdaki en yüksek konsantrasyonu aştığı için dikkate alınmamış, ekstraktın bu saat diliminde yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonu olmadığı görülmüştür.

24 saat ve 48 saate ait  $IC_{50}$  değerler grafikleri Şekil 4.11. ve Şekil 4.12. de verilmiştir.



Şekil 4.11. PC3 hücre hattının 24. Saat  $IC_{50}$  değerleri

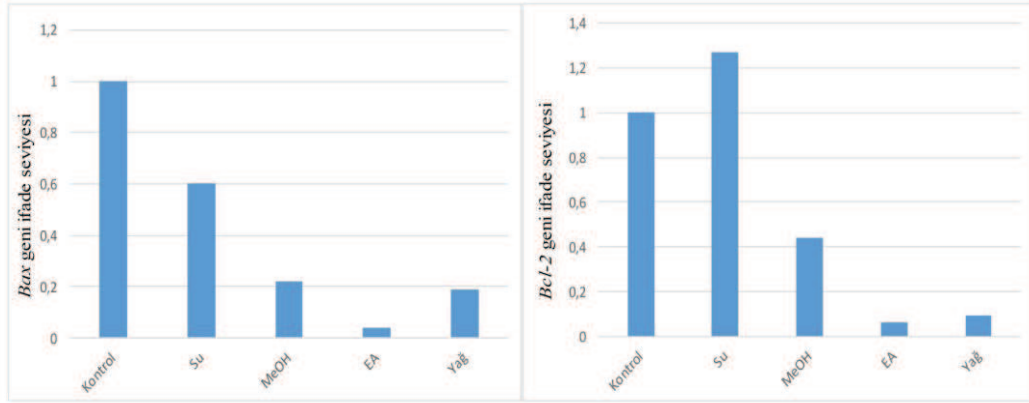


Şekil 4.12. PC3 hücre hattının 48. Saat  $IC_{50}$  değerleri

## 4.2. Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi

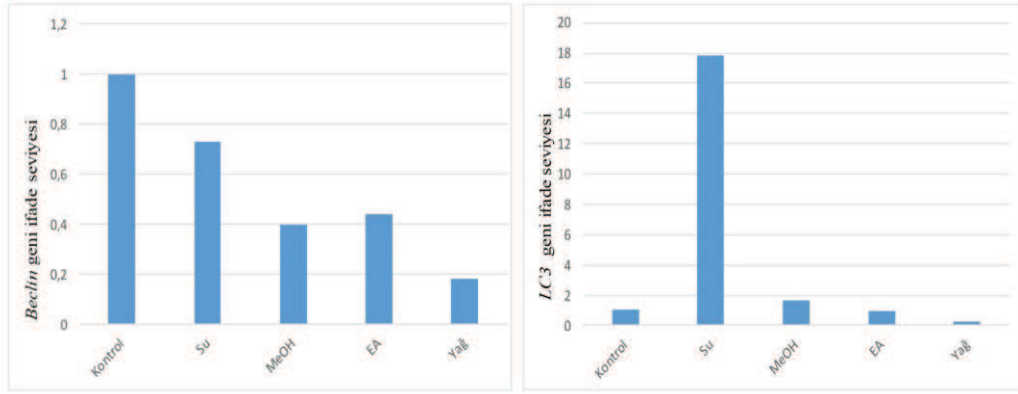
### 4.2.1. Apoptotik ve Otofajik Marker Gen İfadelerinin Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Yöntemi ile Analizi

A549 Akciğer kanser hattı hücreleri ekstraktların ve yağın 48. saat  $IC_{50}$  değerleri ile muamele edilmiş, 48 saat sonra toplanmış ve bunlardan RNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra cDNA izolasyonu yapıp son olarak da eş zamanlı PZR ile *Bax* ve *Bcl-2* apoptotik genlerinin, *Beclin1* ve *LC3-II* otofaji genlerinin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. *Bax*, *Bcl-2*, *Beclin1* ve *LC3-II* genlerinin ekspresyon oranlarını gösteren grafikleri Şekil 4.13. ve Şekil 4.14. de verilmiştir.



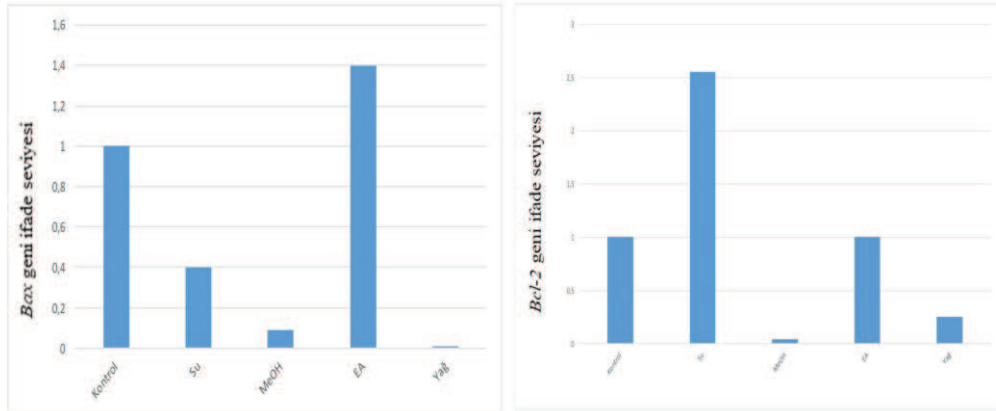
Şekil 4.13. A549 hücre hattın *Bax* ve *Bcl-2* genlerinin ekspresyon grafikleri

Tüm ekstraktlarda *Bax* ve *Beclin1* geninin ekspresyonu düşerken, *Bcl-2* genin ekspresyonunun özellikle su ekstraktıyla muamele edilen hücrelerde arttığı görülmüştür. *LC3-II* geninin ekspresyonu ise su ve metanol ekstraktlarında artmıştır.



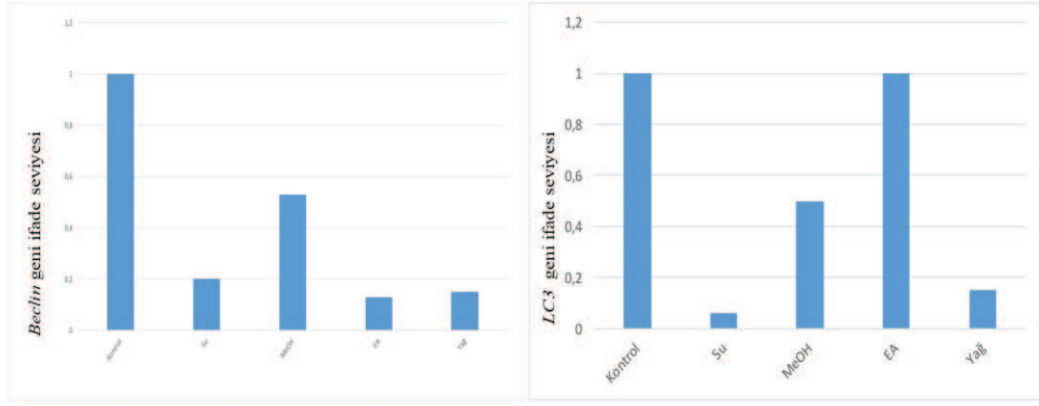
Şekil 4.14. a549 hücre hattın *Beclin1* ve *LC3-II* genlerinin ekspresyon grafikleri

MDA-MB-231 meme kanser hattı hücreleri öztülerin ve yağın 48. saat  $IC_{50}$  değerleri ile muamele edilmiş, 48 saat sonra toplanmış ve bunlardan RNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra cDNA izolasyonu yapıp son olarak da eş zamanlı PZR ile *Bax* ve *Bcl-2* apoptotik genlerinin, *Beclin1* ve *LC3-II* otofajik genlerinin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. *Bax*, *Bcl-2*, *Beclin1* ve *LC3-II* genlerinin ekspresyon oranları grafikleri Şekil 4.15. ve Şekil 4.16. de verilmiştir.



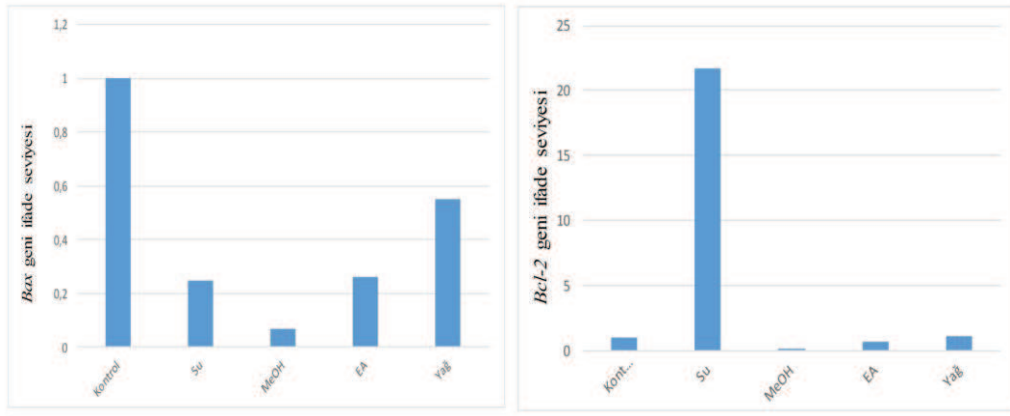
Şekil 4.15. MDA-MB-231 hücre hattın *Bax* ve *Bcl-2* genlerinin ekspresyon grafikleri

*Bax* geninin ekspresyonu etil asetat ekstraktında artmıştır. *Bcl-2* geninin ekspresyonu su ve etil asetat ekstraktlarında artarken metanol ekstraktı ve yağda azalmıştır. *Beclin1* geninin ekspresyonu tüm ekstraktlarda düşerken, etil asetat ve metanol ekstraktlarında *LC3-II* geninin ekspresyonu artmıştır.



Şekil 4.16. MDA-MB-231 hücre hattının *Beclin1* ve *LC3-II* genlerinin ekspresyon grafikleri

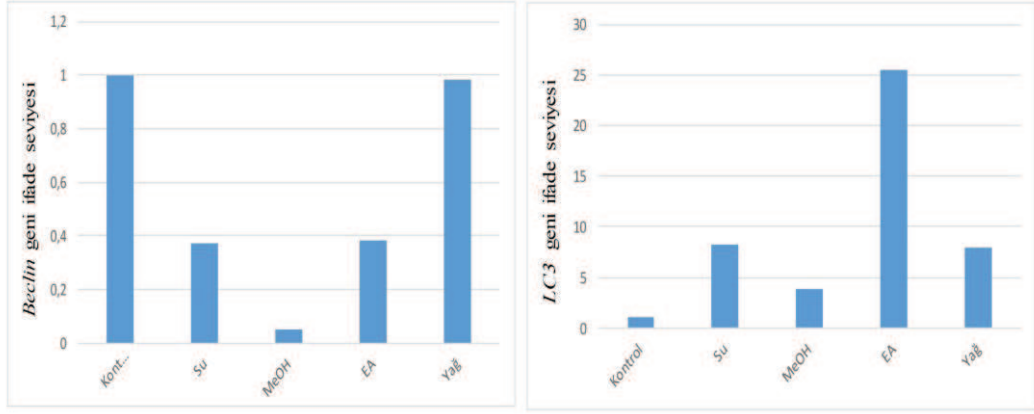
PC3 prostat kanser hattı hücreleri ekstraktların ve yağın 48. saat  $IC_{50}$  değerleri ile muamele edilmiş, 48 saat sonra toplanmış ve bunlardan RNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra cDNA izolasyonu yapıp, son olarak da eş zamanlı PZR ile *Bax* ve *Bcl-2* apoptotik genlerinin, *Beclin1* ve *LC3-II* otofajik genlerinin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. *Bax*, *Bcl-2*, *Beclin1* ve *LC3-II* genlerinin ekspresyon oranları grafikleri Şekil 4.17. ve Şekil 4.18. de verilmiştir.



Şekil 4.17. PC3 hücre hattında *Bax* ve *Bcl-2* genlerinin ekspresyon grafikleri

Tüm ekstraktlarda *Bax* ve *Beclin* geninin ekspresyonu düşerken, *Bcl-2* geninin ekspresyonunun özellikle su ekstraktında ve yağ ile muamele edilen hücrelerde arttığı görülmüştür. *LC3-II* genin ekspresyonu ise genel olarak tüm ekstraktlarda artmıştır. Özellikle etil asetat ekstraktında ekspresyonu artmıştır.



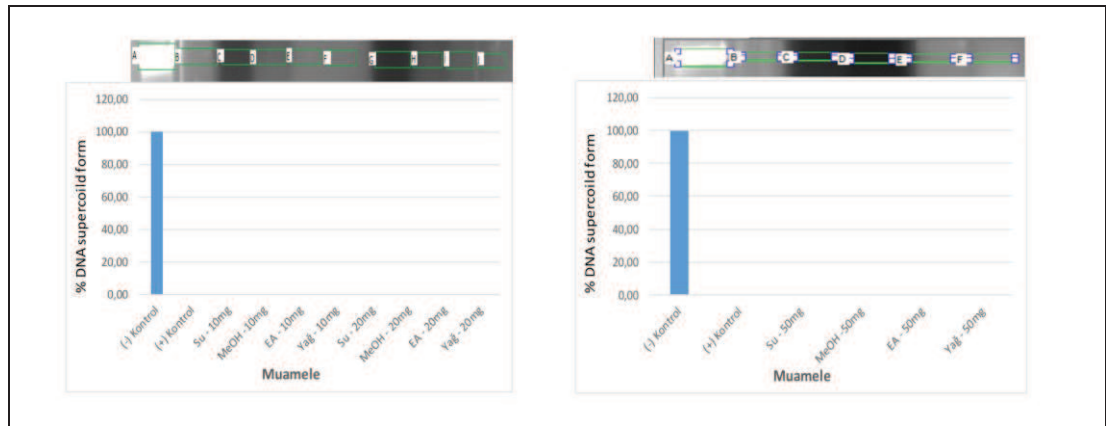


Şekil 4.18. PC3 hücre hattında *Beclin1* ve *LC3-II* genlerinin ekspresyon grafikleri

Ayrıca amplifikasyonun reaksiyona sokulan genlere özgü erime eğrisi analizi yapılmıştır. Erime eğrisine bakılarak karşılaştırma yapılmış ve doğru bölgenin çoğaltılıp çoğaltılmadığına, dimerleşmelerin olup olmadığına bakılarak teyit edilmiştir. Erime eğrisi grafikleri ekler bölümünde EK 7 de verilmiştir.

#### 4.3. DNA Koruma Aktivitesinin Belirlenmesi

Çalışmamızda ekstraktların ve yağın DNA koruma aktivitesi pUC19 plazmid DNA (pDNA)'sı ve Fenton karışımı kullanılarak belirlenmiştir. Su, metanol, etil asetat ve sıgla yağının her biri için çalışılan 10, 20 ve 50 mg/mL olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda da DNA koruma aktivitesi görülmemiştir.



Şekil 4.19. Sıgla ekstraktlarının ve yağının 10, 20 ve 50 mg/mL için DNA koruma analizi yüzdesi ve plazmid DNA koruma testinin jel görünümü

#### 4.4. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek için toplam 12 farklı bakteri suşu kullanarak yaptığımız MİK ve MBK (Minimum İnhibitör/Bakterisidal Konsantrasyon) testi sonuçları su ekstraktı için Tablo 4.1’de verilmiştir. Buna göre su ekstraktının *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus alpha haemolyticus* ve *Salmonella kentucky* üzerinde antimikrobiyal etkisinin olmadığı görülmüştür.

Tablo 4.1. Sığla Su Ekstraktında MİK ve MBK Sonuçları ( $\mu\text{g/ml}$ )

Bakteriler	Gram (-) (+)	MİK	MBK	STANDART İLAÇ (LEVOFLAXİN)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	(+)	250	1000	31,25
<i>Staphylococcus epidermis</i>	(+)	500	-	62,5
<i>Staphylococcus alpha haemolyticus</i>	(+)	500	-	62,5
<i>Enterococcus faecium</i>	(+)	500	-	15,62
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	(+)	500	1000	15,62
<i>Enterococcus durans</i>	(+)	250	1000	15,62
<i>Proteus vulgaris</i>	(-)	500	-	15,62
<i>Escherichia coli</i>	(-)	500	1000	15,62
<i>Serratia marrescens</i>	(-)	500	-	31,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(-)	500	-	15,625
<i>Salmonella kentucky</i>	(-)	1000	-	NT
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	(-)	500	1000	NT

Metanol ekstraktının *Staphylococcus alpha haemolyticus*, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde antimikrobiyal etkisinin olmadığı görülmüştür. MİK ve MBK (Minimum İnhibitör/Bakterisidal Konsantrasyon) testi sonuçları metanol ekstraktı için Tablo 4.2.’de verilmiştir.

Tablo 4.2. Sığla Methanol Ekstraktının MİK ve MBK Sonuçları (µg/ml)

Bakteriler	Gram (-) (+)	MİK	MBK	STANDART İLAÇ (LEVOFLAXİN)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	(+)	500	500	31,25
<i>Staphylococcus epidermis</i>	(+)	500	500	62,5
<i>Staphylococcus alpha haemolyticus</i>	(+)	-	-	62,5
<i>Enterococcus faecium</i>	(+)	500	1000	15,62
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	(+)	-	-	15,62
<i>Enterococcus durans</i>	(+)	500	1000	15,62
<i>Proteus vulgaris</i>	(-)	500	-	15,62
<i>Escherichia coli</i>	(-)	1000	-	15,62
<i>Serratia marrescens</i>	(-)	1000	-	31,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(-)	-	-	15,625
<i>Salmonella kentucky</i>	(-)	500	1000	NT
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	(-)	500	1000	NT

Etil asetat ekstraktının *Staphylococcus alpha haemolyticus*, *Proteus vulgaris* ve *Salmonella kentucky* üzerinde antimikrobiyal etkisinin olmadığı görülmüştür. MİK ve MBK (Minimum İnhibitör/Bakterisidal Konsantrasyon) testi sonuçları etil asetat ekstraktı için Tablo 4.1. de verilmiştir.

Tablo 4.3. Sığıla Etil Asetat Ekstraktının MİK ve MBK Sonuçları (µg/ml)

Bakteriler	Gram (-) (+)	MİK	MBK	STANDART İLAC (LEVOFLAXİN)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	(+)	500	-	31,25
<i>Staphylococcus epidermis</i>	(+)	1000	-	62,5
<i>Staphylococcus alpha haemolyticus</i>	(+)	-	-	62,5
<i>Enterococcus faecium</i>	(+)	1000	-	15,62
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	(+)	1000	-	15,62
<i>Enterococcus durans</i>	(+)	1000	-	15,62
<i>Proteus vulgaris</i>	(-)	-	-	15,62
<i>Escherichia coli</i>	(-)	500	1000	15,62
<i>Serratia marrescens</i>	(-)	1000	-	31,25
<i>Pseudomonas aeroginosa</i>	(-)	1000	-	15,625
<i>Salmonella kentucky</i>	(-)	-	-	NT
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	(-)	1000	1000	NT

Sığıla yağının tüm bakteriler üzerinde minimum inhibitör/bakterisidal konsantrasyona sahip olduğu görülmüştür. MİK ve MBK (Minimum İnhibitör/Bakterisidal Konsantrasyon) testi sonuçları sığıla yağı için Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.4. Sığıla Yağının MİK ve MBK Sonuçları (µg/ml)

Bakteriler	Gram (-) (+)	MİK	MBK	STANDART İLAÇ (LEVOFLAXİN)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	(+)	250	500	31,25
<i>Staphylococcus epidermis</i>	(+)	500	-	62,5
<i>Staphylococcus alpha haemolyticus</i>	(+)	500	1000	62,5
<i>Enterococcus faecium</i>	(+)	500	1000	15,62
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	(+)	500	-	15,62
<i>Enterococcus durans</i>	(+)	250	-	15,62
<i>Proteus vulgaris</i>	(-)	250	1000	15,62
<i>Escherichia coli</i>	(-)	500	1000	15,62
<i>Serratia marrescens</i>	(-)	500	-	31,25
<i>Pseudomonas aeroginosa</i>	(-)	500	1000	15,625
<i>Salmonella kentucky</i>	(-)	500	1000	NT
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	(-)	500	1000	NT

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser hastalığının görülme sıklığı, öldürücülüğü, teşhis ve tedavideki güçlükleri yönünden bakıldığında, özellikle günümüz için en önemli sağlık sorunlarından biridir. Ancak hala hücrenin kanserleşmesinden hatta hastalığın vücudun çeşitli bölgelerine dağılmasına kadar geçen süre ve olaylar tam olarak bilinmediği için yapılan kanser araştırmaları bu nedenle büyük önem taşımaktadır [110, 111]

İnsanoğlu, ilk çağlardan bu yana sağlığı bozulduğunda ve bu rahatsızlığını tedavi edebilmek amacıyla çevresine yani doğaya başvurmuştur. Kullanılan bitkisel kökenli droglar (ilaç hammaddesi) çok eski devirlerden beri hastalıklara karşı kullanılırlar. İçeriklerinde bulunan etkili bileşikler ve etki mekanizmaları hakkındaki bilgiler ise ancak 19. yüzyılın ortalarından itibaren bilinmeye başlanmıştır. Bitkiler, içerdiği birçok fenolik bileşik sayesinde tıpta kullanılmakta ve geleneksel olarak kullanan kişinin farklı amaç ve kullanım biçimleri bulunmaktadır. Özellikle kanser hastalıkları için kullanılan bitkilerin yanlış ve tehlikeli kullanımını önlemek, bilimsel verileri açığa çıkarmak için çalışmalar yapılmaktadır [111].

Bu nedenle biz de çalışmamızda ülkemizde endemik olarak yetişen Anadolu sığıla ağacının farklı çözücüler ile elde edilmiş ekstraktlarının ve ağaçtan elde edilen sığıla yağının 3 farklı kanser hücreleri hattı üzerinde sitotoksik etkilerini MTT hücre canlılık testini kullanarak araştırdık. Daha sonra apoptotik ve otofajik marker genler olan *Bax*, *Bcl-2*, *Beclin1* ve *LC3-II* genlerinin ifadelerinin kantitatif gerçek zamanlı PZR yöntemi ile gen ekspresyon analizini gerçekleştirdik.

MTT hücre canlılık deneyi, yaşayan hücrelerin çözünür bir tetrazolium tuzunu [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür] çözünmeyen bir formazan çökeltiye dönüştürme yeteneği ile yani canlı hücrelerin boyanması ile belirlenmektedir [112]. Yapılan bir çalışmada MTT analizinin sitotoksitesite, proliferasyon ve hücre aktivasyonu çalışmasında kullanımının avantajlı olduğundan bahsedilmiş ve bu analizin mitokondriyal aktivitenin hücre aktivasyonunu ve bir ilacın sitotoksik etkisini araştırmak için kullanılabilmesi ifade edilmiştir [113].

Çalışmamızda akciğer, meme ve prostat kanseri hücre hatları kullanılarak MTT hücre canlılık deneyi 62.5, 125, 250, 500 ve 1000 µg/ml olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda çalışılmıştır. Deney sonucunda tüm hücre hatlarında canlılık oranlarının en az olduğu ve sitotoksik etkinin en fazla görüldüğü saat dozu 48. Saat olarak belirlenmiştir. Ayrıca 24 saat için en yüksek konsantrasyonumuz olan 1000 µg/ml göz önüne alındığında hücrelerin canlılık oranları sığla yağı için A549 akciğer kanseri hücre hattında %14,6, MDA-MB 231 meme kanseri hücre hattında %7,3 ve PC3 prostat kanseri hücre hattında ise %25,38 olarak hesaplanmıştır. İkinci zaman aralığımız olan 48 saatte ise bu oranlar a549 akciğer kanseri hücre hattında %3,14, MDA-MB 231 meme kanseri hücre hattında %2,55 ve PC3 prostat kanseri hücre hattında ise %3,4 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak Anadolu sığla ağacı yağı, 3 farklı kanserli hücre hattında ve iki farklı zaman aralığında en fazla sitotoksik etkiyi gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer ekstraktlarda ise yine iki farklı zaman aralığında da su ve metanol ekstraktı birbirine yaklaşık oranlara sahipken, etil asetat ekstraktının en az sitotoksositeye sahip olduğu belirlenmiştir. Tüm ekstraktların değerleri Şekil 4.1 ve Şekil 4.6. da verilmiştir.

Basitçe hücrelerin yarısını öldüren konsansatrasyon olarak veya yarım maksimum inhibitör konsantrasyonu olarak da tanımlanan IC<sub>50</sub> değeri tüm ekstraktlar için GraphPad Prism 7.0 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Hesaplamalarımıza göre sığla yağı, kullanılan tüm hücre hatlarında en düşük değeri vermiştir. Bu değerler a549 akciğer kanseri hattında 24 saat için 431,7 µg/ml, 48 saat için 216,3 µg/ml, MDA-MB 231 meme kanseri hücre hattında 24 saat için 222,3 µg/ml, 48 saat için 102,6 µg/ml, PC3 prostat kanseri hücre hattında ise 24 saat için 630,8 µg/ml, 48 saat için 216,3 µg/ml olarak tespit edilmiştir.

Sığla yağından sonra tüm hücre hatlarında 24 saat için en düşük IC<sub>50</sub> değerlerinin olduğu ekstraktlar sırasıyla metanol, su ve etil asetat olmuştur. PC3 prostat kanseri hücre hattında 24 saat için etil asetat ekstraktının IC<sub>50</sub> değerleri en yüksek konsantrasyon olan 1000 µg/ml'yi aştığı için hesaplanamamıştır. Sitotoksosite analizlerinde MTT ve IC<sub>50</sub> değerlerini birbirleri ile uyumlu olarak görmekteyiz.

Apoptoz, programlı hücre ölümü olarak bilinmekte ve hücre ölümlerinin fizyolojik formu olarak tanımlanmaktadır. Hücreler, yaşlandıklarında veya hasar aldıklarında programlı ölüm mekanizması ile kendilerini yok etmektedirler. Hücrelerden gelen bir takım sinyallere bağlı olarak bu durum düzenlenir [114]. Özellikle antikanser aktivite için apoptoz, en kabul gören mekanizmalardan birisidir. Ancak apoptoz düzenleyici olan mekanizmalar çok karmaşıktır. Reaktif oksijen türleri (ROS), tümör nekroz edici faktör (TNF), kaspazın aktivasyonu, mitokondriyal yolak ve protein kinaz apoptozun temelini oluşturmaktadırlar [115].

*Bcl-2* ailesi, onkoprotein grubuna dâhil olup antiapoptotik ve proapoptotik üyelerden oluşmaktadır ve apoptozu düzenlemede önemli bir role sahiptir. Bir hücrenin apoptoza eğilimli oluşu *Bcl-2* ailesine bağlı olan genlerinin etkisine bağlıdır. Bu süreçte *Bcl-2* salgılanması sonucu *Bcl-2* homodimerleri şekillenmekte ve apoptoz inhibe edilmektedir. Diğer yandan ise aşırı *Bax* apoptozu aktive etmektedir [116]. *p53* proteini, apoptozu uyarıcı bir proteindir ve bu protein seviyesini, çoğu anti-tümör ilaç olmak üzere hücre DNA'sını hedef olarak seçerek arttırmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu aktivasyonun apoptoza ya da hasarın tamirine yol açtığı bilinmektedir [117].

Apoptozun gerçekleşip gerçekleşmeyeceğini *Bax* ve *Bcl-2* dengesinin doğruluğu belirler. Hücrelerin apoptoza gitmesi için *Bax* düzeyinin *Bcl-2*'den fazla olması gerekir. Yaban tip *p53* varlığında ise *Bcl-2* ekspresyonu az olan hücreler apoptoza giderler [118-125]. Buna istinaden çalışmamızda, etil asetat ekstraktıyla muamele edilen MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında *Bax*'ın *Bcl-2*'den daha fazla ifade olduğu, böylece hücrelerin apoptoza gitmiş olabileceği ihtimalini düşünmekteyiz.

Antiapoptotik *Bcl-2* üyeleri kaspaz aktivasyonunu önler ve antiapoptotik etki gösterirler. Bazı çalışmalarda *Bcl-2* ekspresyonunun çok yüksek bulunmasına rağmen hücre ölümünün arttığı da gösterilmiştir [118]. Su ekstraktı ile muamele edilmiş A549, MDA-MB-231 ve PC3 hücre hatlarında *Bcl-2* ekspresyonunun arttığı görülmüştür.



Son zamanlarda yapılan araştırmalarda ise apoptoz yoluyla hücre ölümünün artması veya azalmasının kanser, otoimmün bozukluklar, nörodejeneratif hastalıklar, viral infeksiyonlar gibi önde gelen birçok hastalığın gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir [126,127].

Otofaji ise temel anlamda hücrenin kendini yemesi anlamına gelir ve bazı açlık durumlarında hücrenin açlıkla karşı karşıya kalması ile besin elde edebilmek için hücre içindeki yapıları nasıl ve hangi şekillerde parçalandığını ifade etmek amacı ile kullanılmaktadır. Otofaji hakkında yapılan ilk çalışmalarda özellikle besin yokluğunda hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak, stres ortamına uyum sağlamaya yardım ettiği belirtilmekte ve böylece hücre iç dengesinde korunmasında önemli bir rol oynadığı görülmektedir [67]. Otofaji ile ilişkili proteinler ise *Beclin1*, *LC3-I* ve *LC3-II* olup otofajik aktiviteyi düzenlerler [113]. *Beclin1*, *Bcl-2* protein ailesinin özelleşmiş olan BH3 domanine sahiptir. *Bcl-2* haricinde diğer bir aile üyesi olan *Bcl-xL* proteini ile de birlikte çalışmaktadır. *Beclin1* proteini, *Bcl-2* proteini veya *Bcl-xL* ile olan ilişkisinin herhangi bir nedenden dolayı bozulması durumunda hücrenin apoptoz ve otofaji gibi ölüm yolları arasında bir seçim yapması gerekmekte ve yaşamını devam ettirmek ya da canlılığına son vermek durumunda kalmaktadır [128].

Çalışmamızda su ekstraktı ile muamele edilmiş a549 akciğer kanseri hücrelerinde *Bcl-2* ve *LC3-II* 'nin ekspresyonunun birbiri ile uyumlu şekilde arttığını görmekteyiz. Metanol ekstraktlarına bakıldığında ise *Bcl-2* ve *Beclin*'nin eşit miktarlarda ekspresyon olduğunu söylemek mümkündür. PC3 prostat kanseri hücre hattına bakıldığında ise tüm ekstraktlarda *LC3-II*'nin ekspresyonunun arttığı, *Beclin*'in ise ekspresyonunun azaldığı görülmüştür.

Yaklaşık 60 milyon yıllık bir ağaç olan Anadolu sığla ağacının günümüzde geriye kalan sadece 4 türünden Türkiye'de bulunan türü *Liquidambar orientalis*'tir [16]. Anadolu sığla ağacının (*Liquidambar orientalis* Mill.) ürünlerinin yaprakları, kabuğu, sığla yağı vb. ürünlerinin doğal koruyucu potansiyeli taşıdığı ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır [129-131].

Antimikrobiyal aktivite testleri, kullanılan maddenin üreyen mikroorganizmayı etkileyerek üremesinin engellenip engellenmediğinin belirlenmesi temeline dayanır. Bu testlerde maddenin antimikrobiyal aktivitesinin olup olmadığı minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ve mikroorganizma spektrum sonuçlarına göre belirlenmektedir [5,132].

Sığla yağı, %45 oranında içeriğinde fenolik bir bileşik olan sinnamik asit bulundurmaktadır [131]. Sinnamik asit içeren bitki ekstraktları ve propolis ile yapılan çalışmalar özellikle bu maddenin antioksidan, antibakteriyal ve antiinflamatuvar özelliğinin bulunduğunu göstermiştir [133]. Benzer çalışmalarda ise sinnamik asidin bazı hücreleri çeşitli oksidatif toksinlere bağlı hasardan ve lipid peroksidasyonundan koruduğunu belirtmiştir. Sinnamik asit türevi olan curcumin ile yapılan bir çalışma da sinnamik asidin antimikrobiyal, antimetastatik, antikarsinojenik, anjiogenezisi düzenleyici birçok özelliği ispatlanmış ve doz aşımında toksik özelliğinin olduğu çalışmada belirtilmemiştir. Sığla yağının insanlar üzerindeki farmakokinetiği yani vücuda alınma ve atılma süreci hakkında çok detaylı bilgiler bulunmamakla beraber; sinnamik asit ile antioksidan, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar etki gösterdiği düşünülmektedir. Yine içermiş olduğu fenil propil alkolünün antibakteriyal etkide rol oynadığı düşünülmektedir [134].

Sığla ağacı balsamının antimikrobiyal etkilerini belirlemek için yapılan bir çalışmada 20 farklı bakteri ile çalışılmış ve en hassas bakterinin *Bacillus cereus* olduğu belirtilmiştir. Buradan hareketle balsamın bazı durumlarda topikal bir antibakteriyal madde olarak bakterilere karşı koruma sağlamak için kullanılabileceği ifade edilmiştir [91].

Türkiye’de bazı tıbbi bitkilerinin antimikrobiyal taramasının yapıldığı bir diğer çalışmada ise *Liquidambar orientalis* etanol ekstraktının, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) bakterisine karşı çok güçlü bir aktivite gösterdiği bulunmuştur [135].

Çalışmamızda antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi amacı ile 6 Gram pozitif, 6 Gram negatif bakteri olmak üzere toplam 12 bakteri ile MİK ve MBK testleri yapılmıştır.

Su ve etil asetat ekstraktlarının her ikisinin de *Salmonella kentucky*, su, etil asetat, metanol ekstraktlarının *Staphylococcus alpha haemolyticus* ve etil asetat ekstraktının da *Proteus vulgaris* bakteri türleri üzerinde antimikrobiyal etki göstermediği belirlenmiştir. Sığıla yağında her iki bakteri için minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) 500 µg/ml, minimum bakterisidal konsantrasyonları ise (MBK) 1000 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Antimikrobiyal etki gösteren bakteri sayıları göz önüne alındığında en etkili olan ekstraktlar sırasıyla; sığıla yağı, metanol, su ve etil asetat ekstraktı olmuştur. Tüm ekstraktların, bakteriler üzerindeki MİK-MBK değerleri Tablo 4.1-Tablo 4.4. de verilmiştir.

Tez çalışmasındaki sonuçlar değerlendirildiğinde, Anadolu sığıla ağacının üç farklı ekstraktının ve yağının uygulanan hatlar da sitotoksik ve antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Apoptotik ve otofajik hedef genlerinin ekspresyon düzeylerine bakılarak değerlendirme yapılmıştır. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında *Bax*'ın *Bcl-2*'den daha fazla ekspresse olduğu böylece hücrelerin apoptoza gitmiş olabileceği ihtimalini düşünmekteyiz.

Çalıştığımız tez konumuzun, yaptığımız literatür araştırmaları neticesinde bugüne kadar çok az ve kısıtlı çalışılmış olması sebebiyle, özgün bir konu olduğu ortaya çıkmaktadır.

## 6. ÖNERİLER

Dünyada doğal kaynakların kullanımının büyük bir ölçüde arttığı bilinmektedir. Ülkemizde değerli bir ağaç olan sığla ağacının etkisinin daha iyi anlaşılması ve özellikle doğal olarak antikanser, antioksidan ve antimikrobiyal olarak kullanılabilmesi için farklı yöntemlerin de denenmesini yeni araştırmacılar için önerilebilir.

Ayrıca Anadolu sığla ağacının sadece ülkemizde yetişen endemik bir tür olduğu unutulmamalı ve gereken değer verilmelidir. Çalışmamızda da çeşitli etkilerini tespit ettiğimiz sığla yağının üretimine yeniliklerle katkıda bulunarak ham yağ değil işlenmiş sığla yağ ürünlerinin üretilmesinin aynı zamanda satılmasının yolu açılarak ülke ekonomisine katkıda bulunulabileğini düşünülmektedir.

Elde edilen bulguların, diğer kanser hücrelerinde ve bakteri türlerinde tam olarak doğrulanmasına, ek olarak yapılacak farklı bilimsel deneylere ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda özellikle antikanser bölümünün daha ileri çalışmalara (deney hayvanları, klinik çalışmalar) taşınarak yapılmasının uygun olacağını düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] Arslan, M. B., & Şahin, H. T. (2016). Unutulan Bir Orman Ürünü Kaynağı: Anadolu Sığıla Ağacı (*Liquidambar orientalis* Miller). *Journal of Bartın Faculty of Forestry*, 18(1), 103-117
- [2] Yokuş, B., & Çakır, D. Ü. (2012). Kanser biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (1), 7-18.
- [3] URL-1 <https://www.wcrf.org> Global cancer statistics for the most common cancers 17/06/2019 tarihinde alınmıştır.
- [4] URL-2 <https://hsgm.saglik.gov.tr> Türkiye Kanser İstatistikleri 2015 17/06/2019 tarihinde alınmıştır.
- [5] ABBASoGLU, U. (1996). Antimikrobiyal Aktivite Araştırma Yöntemleri. *FABAD J. Pharm. Sci*, 22, 111-118.
- [6] Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, 3(2), 163.
- [7] Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., ... & Gottlieb, E. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation*, 19(1), 107.
- [8] Anding, A. L., & Baehrecke, E. H. (2015). Autophagy in cell life and cell death. *In Current topics in developmental biology* (Vol. 114, pp. 67-91). Academic Press.
- [9] Karas, V. O., Westerlaken, I., & Meyer, A. S. (2013). Application of an in vitro DNA protection assay to visualize stress mediation properties of the Dps protein. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (75), e50390.
- [10] Aydıngöz, M., & Bulut, S. (2014). Egenin Gizli Kalmış Şifa İksiri: Sığıla. *Afyon Kocatepe University Journal of Science & Engineering*, 14(1).
- [11] Acar, M. İ., Gemici, Y., Genç, A., & Özel, N. (1993). Anadolu Sığıla (*Liquidambar orientalis* Mill.) Ormanlarının ve Günümüzdeki Durumu. 2. Uluslararası Ekoloji ve Çevre Sorunları Sempozyumu. *Türk-Alman Kültür İşleri Kurulu Yayın Dizisi*, (3).

- [12] Atay, I. (1985). Sığla Ağacının (*Liquidambar Orientalis Mill*) önemi ve Silvikültürel Özellikleri. *GÜ. Orman Fakültesi Dergisi*, 35, 15-21.
- [13] Efe, A. (1987). *Liquidambar Orientalis Mill.*(Sığla Ağacı)'in morfolojik ve palinolojik özellikleri üzerine araştırmalar. *İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 47(2).
- [14] İstek, A., & Hafizoğlu, H. (2004). Sığla ağacı (*Liquidambar orientalis Mill.*) odununun anatomik özelliklerinin belirlenmesi. *Bartın Or. Fak. Dergisi*, (1).
- [15] URL-3 <http://liquidamberorientalis.com/sigla-agaci.html> 10/06/2019 tarihinde alınmıştır.
- [16] Velioglu, E., Kandemir, G., Tayanç, Y., Çengel, B., Alan, M., & Kaya, Z. (2008). Türkiye'deki sığla *Liquidambar orientalis* Miller populasyonlarının genetik yapısının moleküler belirteçlerle belirlenmesi ve koruma stratejileri geliştirilmesi. *Orman Ağaçları ve Tohumları Islah Araştırma Müdürlüğü Teknik Bülten*, (20), 43.
- [17] Huneck, S. (1963). Triterpene—IV: Die triterpensäuren des Balsams von *Liquidambar orientalis* Miller. *Tetrahedron*, 19(3), 479-482.
- [18] Huş, S. (1969). Orman mahsülleri kimyası. *İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Yayınları*.
- [19] Fernandez, X., Lizzani-Cuvelier, L., Loiseau, A. M., Perichet, C., Delbecque, C., & Arnaudo, J. F. (2005). Chemical composition of the essential oils from Turkish and Honduras *Styrax*. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(1), 70-73.
- [20] Duru, M. E., Cakir, A., & Harmandar, M. (2002). Composition of the volatile oils isolated from the leaves of *Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis* and *L. orientalis* var. *integriloba* from Turkey. *Flavour and fragrance journal*, 17(2), 95-98.
- [21] Saraç, N., & Şen, B. (2014). Antioxidant, mutagenic, antimutagenic activities, and phenolic compounds of *Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis*. *Industrial Crops and Products*, 53, 60-64.
- [22] Ringer, D. P., & Schnipper, L. E. (2001). Principles of Cancer Biology. In: Lenhard RE, Osteen RT, Gansler T; eds. *Clinical Oncology Atlanta: American Cancer Society*, 21-35.
- [23] Higginson, J., Muir, C. & Munoz, N. Human Cancer: Epidemiology and Environmental Causes (Cambridge Monographs on Cancer Research, Cambridge, UK, 1992)

- [24] URL-4 <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> adresinden 15.07.2019 tarihinde alınmıştır.
- [25] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424
- [26] Hyde, L., Yee, J., Wilson, R., & Patno, M. E. (1965). Cell type and the natural history of lung cancer. *Jama*, 193(1), 52-54.
- [27] Akin, S., Can, G., Aydinler, A., Ozdilli, K., & Durna, Z. (2010). Quality of life, symptom experience and distress of lung cancer patients undergoing chemotherapy. *European journal of oncology nursing*, 14(5), 400-409.
- [28] Alar, T., & EK, Ş. (2012). Akciğer kanseri: birinci basamakta tanı, tedavi ve korunma. *Smyrna Tıp Dergisi*, 1, 68-74.
- [29] Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.
- [30] Marie, S. K. N., & Shinjo, S. M. O. (2011). Metabolism and brain cancer. *Clinics*, 66, 33-43.
- [31] Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., & Thun, M. J. (2009). Cancer statistics, 2009. *CA: a cancer journal for clinicians*, 59(4), 225-249.
- [32] Holland-Frei Cancer Medicine. 6th ed. Ed. P.R. Kufe DW, Weichselbaum RR, Bast Jr RC, Gansler TS, Holland JF, Frei III E. Hamilton, Ontario: BC Decker. 2003.
- [33] Kong, Y., Yang, L., Tang, H., Lv, N., Xie, X., Li, J., ... & Yang, H. (2013). A nation-wide multicenter retrospective study of the epidemiological, pathological and clinical characteristics of breast cancer in situ in Chinese women in 1999-2008. *PloS one*, 8(11), e81055.
- [34] Lippman, M. E., Dickson, R. B., Gelmann, E. P., Rosen, N., Knabbe, C., Bates, S., ... & Kasid, A. (1987). Growth regulation of human breast carcinoma occurs through regulated growth factor secretion. *Journal of cellular biochemistry*, 35(1), 1-16.
- [35] Murray, P. A., Barrett-Lee, P., Travers, M., Luqmani, Y., Powles, T., & Coombes, R. C. (1993). The prognostic significance of transforming growth factors in human breast cancer. *British journal of cancer*, 67(6), 1408.

- [36] Altunkaynak, B. Z., & Özbek, E. (2008). Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz nedir. *Tip Araştırmaları Dergisi*, 6(2), 93-104.
- [37] Israels, L.G., & Israels, ED. (1999). Apoptosis. *The Oncologist*. 4:332-9
- [38] Tomatır, A. G. (2003). Apoptoz: programlı hücre ölümü. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 23(6), 499-508.
- [39] Behnia, M., Robertson, K. A., & Martin II, W. J. (2000). Lung Infections. *Chest*, 117(6), 1771-1777.
- [40] Evan, G., & Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science*, 281(5381), 1317-1322.
- [41] Erdoğan, B. B., & Uzaslan, E. K. (2003). Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde Fas-FasL bağımlı apoptozis. *Türkiye Klinikleri Archives of Lung*, 4(3), 165-174.
- [42] Öktem, S., Özhan, M. H., & Özol, D. (2001). Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, 2(1), 91-95.
- [43] Gürbilek M, Dağlar C, Aköz M, Topçu C (2004): Diabetes mellituslu hastalarda hastalık süresinin eritrosit membranı Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz enzim aktivitesi, lipid peroksidasyonu ve DHEA(S), glukoz, lipid düzeyleri üzerine etkisi. *Turkish Journal of Biochemistry*, 29 (3): 237-242
- [44] Bender, L. M., Morgan, M. J., Thomas, L. R., Liu, Z. G., & Thorburn, A. (2005). The adaptor protein TRADD activates distinct mechanisms of apoptosis from the nucleus and the cytoplasm. *Cell death and differentiation*, 12(5), 473.
- [45] Noy, N. (2010). Between death and survival: retinoic acid in regulation of apoptosis. *Annual review of nutrition*, 30, 201-217.
- [46] Büyükgebiz, O., & Caferler, J. S. (2001). Apoptoz. *Sendrom*, 13, 102-107.
- [47] Vousden, K. H., & Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer*, 2(8), 594.
- [48] Lewin B. Apoptosis. Genes VI. In: Lewin B (ed). Chapter 36. New York: Oxford Universty Press; 1997. 1122-9.
- [49] Ruaslathi, E., & Reed, J.C. (1994). Anchorage dependence integrins and apoptosis. *Cell*, 77: 477-8.



- [50] Wyllie, A. H., Kerr, J. R., & Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. In *International review of cytology* (Vol. 68, pp. 251-306). Academic Press.
- [51] Walker, N. I., Harmon, B. V., Gobe, G. C., & Kerr, J. F. (1988). Patterns of cell death. *Methods and achievements in experimental pathology*, 13, 18-54.
- [52] Steller, H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 267(5203), 1445-1449.
- [53] Altunkaynak, B. Z., & Özbek, E. (2008). Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz nedir. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6(2), 93-104.
- [54] Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267(5203), 1456-1462.
- [55] Kaelin Jr, W. G. (1999). The emerging p53 gene family. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(7), 594-598. Kaellin, W.G. (1999).
- [56] Béroud, C., & Soussi, T. (1998). p53 gene mutation: software and database. *Nucleic acids research*, 26(1), 200-204.
- [57] Adams, J. M., & Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in biochemical sciences*, 26(1), 61-66.
- [58] Renehan, A. G., Booth, C., & Potten, C. S. (2001). What is apoptosis, and why is it important? Education and debate. *Bmj*, 322(7301), 1536-1538.
- [59] Chao, D. T., & Korsmeyer, S. J. (1998). BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual review of immunology*, 16(1), 395-419.
- [60] Tsujimoto, Y. (1998). Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria?. *Genes to cells*, 3(11), 697-707.
- [61] Spierings, D. C., de Vries, E. G., Vellenga, E., van den Heuvel, F. A., Koornstra, J. J., Wesseling, J., ... & de Jong, S. (2004). Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52(6), 821-831.
- [62] Taneja, N., Tjalkens, R., Philbert, M. A., & Rehemtulla, A. (2001). Irradiation of mitochondria initiates apoptosis in a cell free system. *Oncogene*, 20(2), 167.
- [63] Tsujimoto, Y. (1998). Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria?. *Genes to cells*, 3(11), 697-707.

- [64] Noble, C. G., Dong, J. M., Manser, E., & Song, H. (2008). Bcl-xL and UVRAG cause a monomer-dimer switch in Beclin1. *Journal of Biological Chemistry*, 283(38), 26274-26282.
- [65] Lilja, H. (1985). A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *The Journal of clinical investigation*, 76(5), 1899-1903.
- [66] Velioğlu, E., Kandemir, G., Tayanç, Y., Çengel, B., Alan, M., & Kaya, Z. (2008). Türkiye'deki sığla *Liquidambar orientalis* Miller populasyonlarının genetik yapısının moleküler belirteçlerle belirlenmesi ve koruma stratejileri geliştirilmesi. *Orman Ağaçları ve Tohumları Islah Araştırma Müdürlüğü Teknik Bülten*, (20), 43.
- [67] Ohsumi, Y. (2001). Ubiquitin and proteasomes: Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2(3), 211.
- [68] Yorimitsu, T., & Klionsky, D. J. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death & Differentiation*, 12(2), 1542.
- [69] Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C., & Rubinsztein, D. C. (2010). Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nature cell biology*, 12(8), 747.
- [70] Abedin, M. J., Wang, D., McDonnell, M. A., Lehmann, U., & Kelekar, A. (2007). Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. *Cell death and differentiation*, 14(3), 500.
- [71] Shintani, T., & Klionsky, D. J. (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 306(5698), 990-995.
- [72] Rouschop, K., & Wouters, B. G. (2009). Regulation of autophagy through multiple independent hypoxic signaling pathways. *Current molecular medicine*, 9(4), 417-424.
- [73] Klionsky, D. J., & Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, 290(5497), 1717-1721.
- [74] Kroemer, G., Mariño, G., & Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Molecular cell*, 40(2), 280-293.
- [75] Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I., & Codogno, P. (2010). Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell research*, 20(7), 748.

- [76] Shang, L., & Wang, X. (2011). AMPK and mTOR coordinate the regulation of Ulk1 and mammalian autophagy initiation. *Autophagy*, 7(8), 924-926.
- [77] Christensson, A., Björk, T., Nilsson, O., Dahlén, U., Matikainen, M. T., Cockett, A. T., ... & Lilja, H. (1993). Serum prostate specific antigen complexed to  $\alpha$  1-antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. *The Journal of urology*, 150(1), 100-105.
- [78] Levine, B., Sinha, S. C., & Kroemer, G. (2008). Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*, 4(5), 600-606.
- [79] Gozuacik, D., & Kimchi, A. (2006). DAPk protein family and cancer. *Autophagy*, 2(2), 74-79.
- [80] Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), 1069.
- [81] Fridman, J. S., & Lowe, S. W. (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 22(56), 9030.
- [82] Feng, Z., Zhang, H., Levine, A. J., & Jin, S. (2005). The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(23), 8204-8209.
- [83] Tasdemir, E., Maiuri, M. C., Galluzzi, L., Vitale, I., Djavaheri-Mergny, M., D'amelio, M., ... & Nannmark, U. (2008). Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nature cell biology*, 10(6), 676.
- [84] Liu, S., Li, J., Tao, Y., & Xiao, X. (2007). Small heat shock protein  $\alpha$ B-crystallin binds to p53 to sequester its translocation to mitochondria during hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*, 354(1), 109-114.
- [85] Guertin, D. A., & Sabatini, D. M. (2007). Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer cell*, 12(1), 9-22.
- [86] Corradetti, M. N., & Guan, K. L. (2006). Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR?. *Oncogene*, 25(48), 6347.
- [87] Ballif, B. A., & Blenis, J. (2001). Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell growth and differentiation*, 12(8), 397-408.

- [88] Cho, D. H., Jo, Y. K., Hwang, J. J., Lee, Y. M., Roh, S. A., & Kim, J. C. (2009). Caspase-mediated cleavage of ATG6/Beclin-1 links apoptosis to autophagy in HeLa cells. *Cancer letters*, 274(1), 95-100.
- [89] Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., ... & Simon, H. U. (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nature cell biology*, 8(10), 1124.
- [90] Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., & Elazar, Z. (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO journal*, 26(7), 1749-1760.
- [91] Sağdıç, O., Özkan, G., Özcan, M., & Özçelik, S. (2005). A study on inhibitory effects of sığla tree (*Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis*) storax against several bacteria. *Phytotherapy Research*, 19(6), 549-551.
- [92] Levine, B., & Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict?. *The Journal of clinical investigation*, 115(10), 2679-2688.
- [93] Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., ... & Ståhlberg, A. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, 27(2-3), 95-125
- [94] Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). REVIEW Real-time PCR for mRNA quantitation.
- [95] Aydın Sayitoğlu, M. (2005). Hematoloji'de real time PCR. *Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi Temel Moleküler Hematoloji Kursu*.
- [96] Oskay, M. (2009). Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains. *African Journal of Biotechnology*, 8(13).
- [97] Lee, Y. S., Kim, J., Lee, S. G., Oh, E., Shin, S. C., & Park, I. K. (2009). Effects of plant essential oils and components from Oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*) on growth and morphogenesis of three phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93(3), 138-143.
- [98] Park, I. K., Choi, K. S., Kim, D. H., Choi, I. H., Kim, L. S., Bak, W. C., ... & Shin, S. C. (2006). Fumigant activity of plant essential oils and components from horseradish (*Armoracia rusticana*), anise (*Pimpinella anisum*) and garlic (*Allium sativum*) oils against *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae). *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 62(8), 723-728.

- [99] Bayramoglu, E. E. (2010). Possibility of using Sigla tree (*Liquidambar orientalis* Mill. var *orientalis*) storax as bactericide in the soaking float. *Journal of the American Leather Chemists Association*.
- [100] Park, I. K. (2014). Fumigant toxicity of Oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*) and valerian (*Valeriana wallichii*) essential oils and their components, including their acetylcholinesterase inhibitory activity, against Japanese termites (*Reticulitermes speratus*). *Molecules*, 19(8), 12547-12558.
- [101] Suzek, H., Celik, I., Dogan, A., & Yildirim, S. (2016). Protective effect and antioxidant role of sweetgum (*Liquidambar orientalis*) oil against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Pharmaceutical biology*, 54(3), 451-457.
- [102] Gürlek, M. (2011). ‘ALÂ’İM-İ CERRÂHÎN’DE GEÇEN BİTKİ ADLARI. *Adıyaman Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*, 2011(7), 123-145.
- [103] Özhatay, F. N., Kültür, Ş., & Gürdal, M. B. (2011). Check-list of additional taxa to the supplement Flora of Turkey V. *Turkish Journal of Botany*, 35(5), 589-624.
- [104] Gurbuz, I., Yesilada, E., Demirci, B., Sezik, E., Demirci, F., & Baser, K. H. (2013). Characterization of volatiles and anti-ulcerogenic effect of Turkish sweetgum balsam (*Styrax liquidus*). *Journal of ethnopharmacology*, 148(1), 332-336.
- [105] Eid, H. H., Labib, R. M., Hamid, N. S. A., Hamed, M. A., & Ross, S. A. (2015). Hepatoprotective and antioxidant polyphenols from a standardized methanolic extract of the leaves of *Liquidambar styraciflua* L. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 53(2), 117-127.
- [106] Ulger, I., Kamalak, A., Kaya, E., & Kurt, O. (2017). Comparison of chemical composition and anti-methanogenic potential of *Liquidambar orientalis* leaves with *Laurus nobilis* and *Eucalyptus globulus* leaves using in vitro gas production technique. *Ciencia e Investigación Agraria*, 44(1), 75-82.
- [107] Değirmençtepe, S., Baysal, E., Türkoğlu, T., Toker, H., & Deveci, İ. (2015). Some properties of Turkish sweetgum balsam (*styrax liquidus*) impregnated oriental beech wood. Part II: Decay resistance, mechanical and thermal properties. *Wood Research*, 60(4), 591-604.
- [108] Akten, S., & Gül, A. (2014). Korunan doğal alanlarda ziyaretçilerin olası etki düzeyleri önlem ve standartların belirlenmesi (Gölcük Tabiat Parkı örneği). *Türkiye Ormancılık Dergisi*, 15(2), 130-139.

- [109] Cooper, G. M., Hausman, R. E., & Hausman, R. E. (2000). *The cell: a molecular approach* (Vol. 10). Washington, DC: ASM press.
- [110] Fırat, D. , & Küçüküsu, M. N. : Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu ve Kanser Konusunda Genel Bilgiler, Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları. Ankara, 1980
- [111] Aksoy, C., Yücecan, S., Çiftçi, N., Tayfur, M., Akgün, B., & Taşçı, N. (1988). Kanser hastalığında tedavi amacıyla kullanılan yöresel bitkiler. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 17(1), 111-120.
- [112] Supino, R. (1995). MTT assays. In *In vitro toxicity testing protocols* (pp. 137-149). Humana Press.
- [113] Xie, M., Kong, Y., Tan, W., May, H., Battiprolu, P. K., Pedrozo, Z., ... & Jiang, N. (2014). Histone deacetylase inhibition blunts ischemia/reperfusion injury by inducing cardiomyocyte autophagy. *Circulation*, 129(10), 1139-1151.
- [114] Kosova, F., & Arı, Z. (2011). Prostat kanseri ve apoptozis ilişkisi. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 2(1), 124-131.
- [115] Sanmartin, C., Plano, D., & Palop, J. A. (2008). Selenium compounds and apoptotic modulation: a new perspective in cancer therapy. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 8(10), 1020-1031.
- [116] Taneja, N., Tjalkens, R., Philbert, M. A., & Rehemtulla, A. (2001). Irradiation of mitochondria initiates apoptosis in a cell free system. *Oncogene*, 20(2), 167.
- [117] Thompson C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis of autoimmune disease. *Clin Immunol Immunopathol*. 267: 1456-1462.
- [118] Vermeulen, K., Berneman, Z. N., & Van Bockstaele, D. R. (2003). Cell cycle and apoptosis. *Cell proliferation*, 36(3), 165-175.
- [119] Craig, A., Scott, M., Burch, L., Smith, G., Ball, K., & Hupp, T. (2003). Allosteric effects mediate CHK2 phosphorylation of the p53 transactivation domain. *EMBO reports*, 4(8), 787-792.
- [120] Bellamy, C. O. (1997). p53 and apoptosis. *British medical bulletin*, 53(3), 522-538.
- [121] Zong, W. X., & Thompson, C. B. (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes & development*, 20(1), 1-15.

- [122] Foster, I. (2008). Cancer: A cell cycle defect. *Radiography*, 14(2), 144-149.
- [123] Fearon, E. R. (1997). Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science*, 278(5340), 1043-1050.
- [124] Harms-Ringdahl, M., Nicotera, P., & Radford, I. R. (1996). Radiation induced apoptosis. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 366(2), 171-179.
- [125] Cabadak, H. (2008). Hücre siklusu ve kanser.
- [126] Kiess, W., & Gallaher, B. (1998). Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *European Journal of Endocrinology*, 138(5), 482-491.
- [127] Hetts, S. W. (1998). To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *Jama*, 279(4), 300-307.
- [128] Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T., & Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell death and differentiation*, 18(4), 571.
- [129] Baytop, T. (1984). Türkiyede bitkiler ile tedavi (geçmişte ve bugün) (Vol. 40). İstanbul Üniversitesi.
- [130] HAFIZOĞLU, H. (1986). Kağıt fabrikası atık sularından yararlanma olanakları. KTÜ Orman Fakültesi., C, 9, 1-2.
- [131] Hafizoglu, H., Reunanen, M., & Istek, A. (1996). Chemical constituents of balsam from *Liquidambar orientalis*. *Holzforschung*, 50(2), 116-117.
- [132] Çetin, E.T., & Gürler, N., (1989) "Bakterilerin Antibiyotiklere Duyarlık Deneyinin Yapılması", *Kükem Derg.*, 12(2), 97-105.
- [133] Polat, G., & Koçan, D. (2006). Propolis ve antimikrobiyel etkisi. *Türkiye*, 9, 24-26.
- [134] Uzer, N. (2007). Sıçanlarda Deri Fleplerinin Yaşayabilirliğinde Curcumin Kullanımının Etkilerinin Araştırılması. *Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Kliniği*.
- [135] Oskay, M., & Sarı, D. (2007). Antimicrobial screening of some Turkish medicinal plants. *Pharmaceutical Biology*, 45(3), 176-181.

[136] URL-5 <https://www.ebi.ac.uk/training/online/course/functional-genomics-ii-common-technologies-and-data-analysis-methods/real-time-pcr> adresinden 20.07.2019 tarihinde alınmıştır.





# EKLER

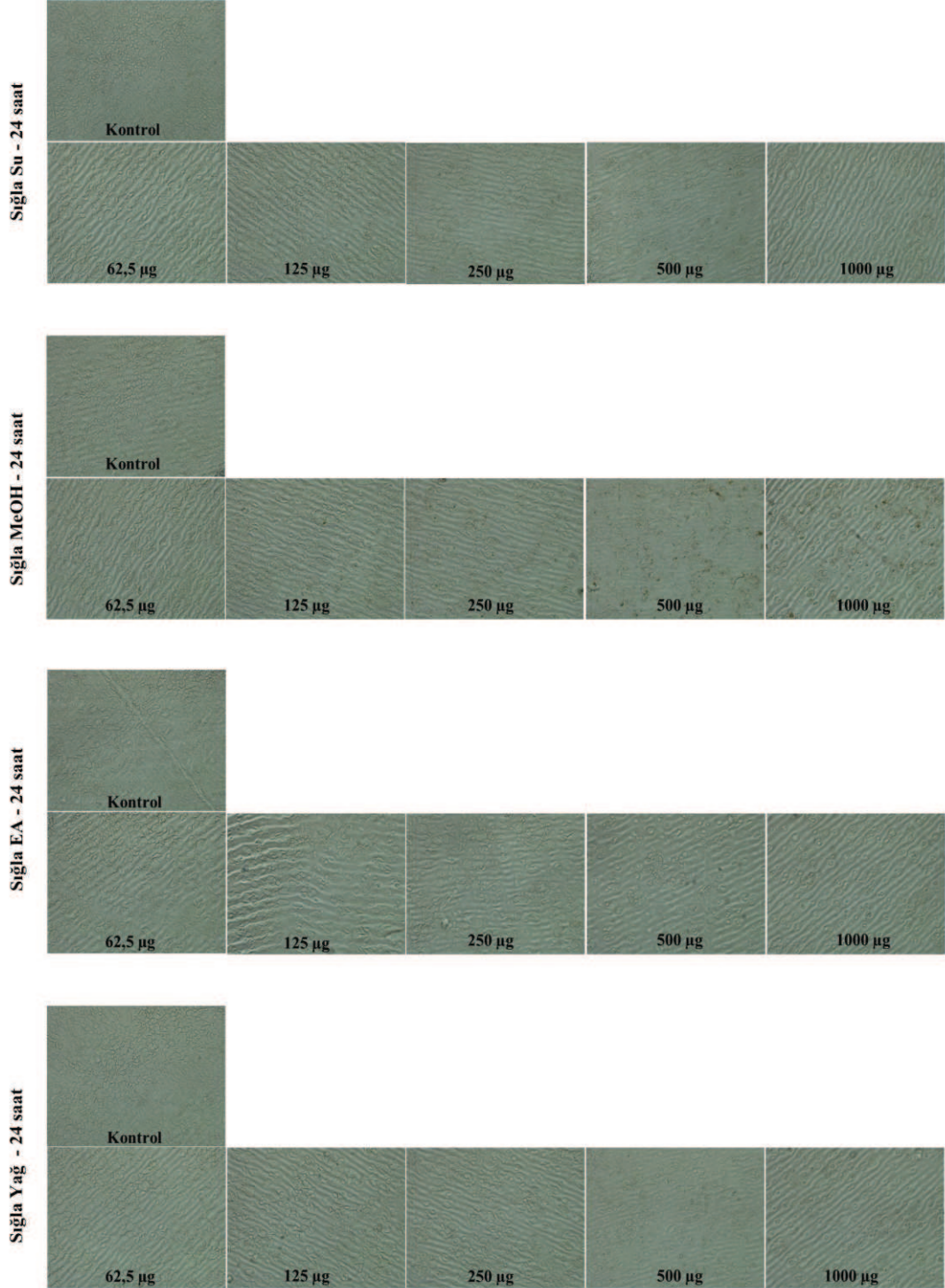
- EK 1** A549 hücre hattının 24. Saat hücre fotoğrafları  
**EK 2** A549 hücre hattının 48. Saat hücre fotoğrafları  
**EK 3** MDA-MB-231 hücre hattının 24. Saat hücre fotoğrafları  
**EK 4** MDA-MB-231 hücre hattının 48. Saat hücre fotoğrafları  
**EK 5** PC3 hücre hattının 24. Saat hücre fotoğrafları  
**EK 6** PC3 hücre hattının 48. Saat hücre fotoğrafları  
**EK 7** A549, MDA-MB-231 ve PC3 hücre hatlarında *Bax/Bcl2-Beclin1/LC3-II* genlerinin erime eğrisi grafikleri



# EKLER

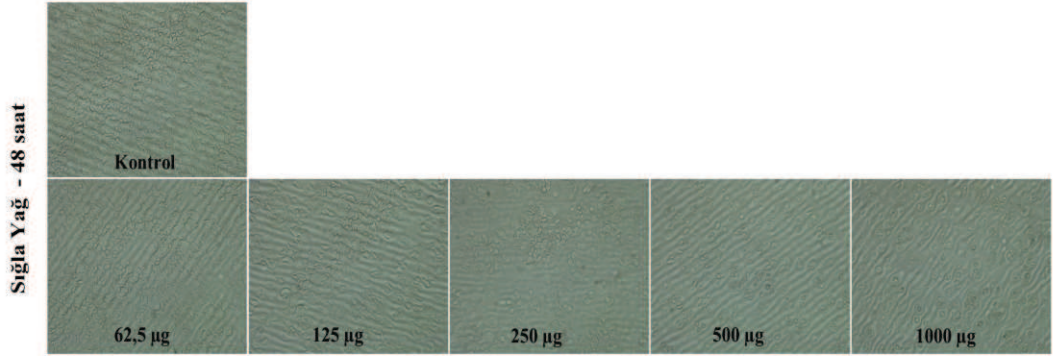
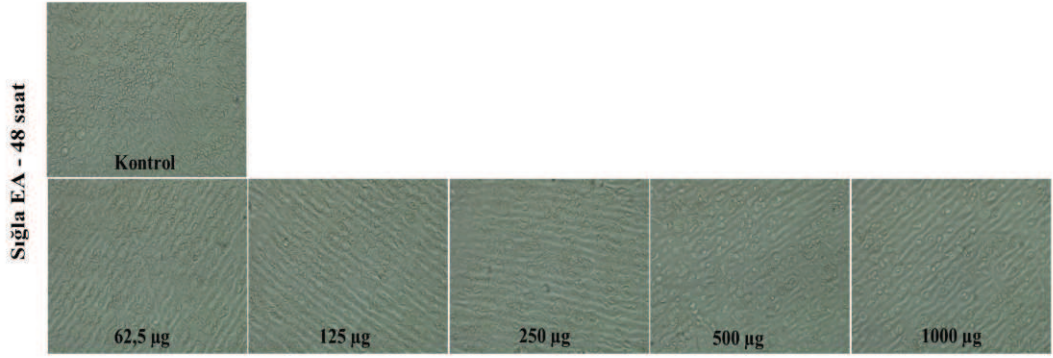
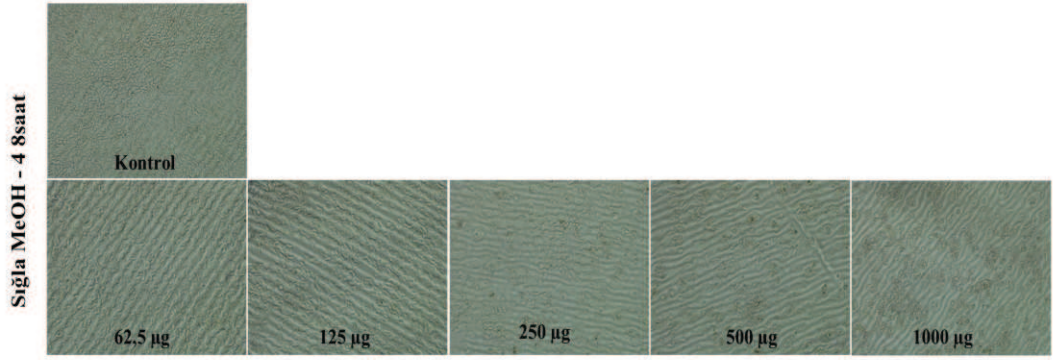
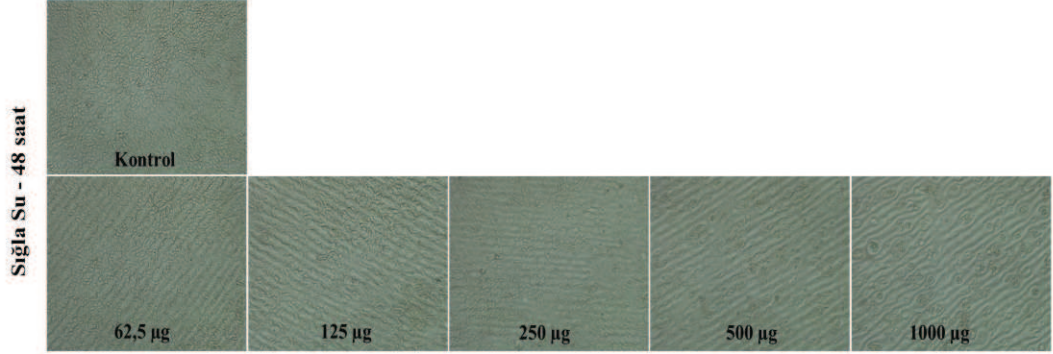
## EK 1 A549 hücre hattının 24. Saat hücre fotoğrafları

### A549 Hücre Hattı - 24 saat



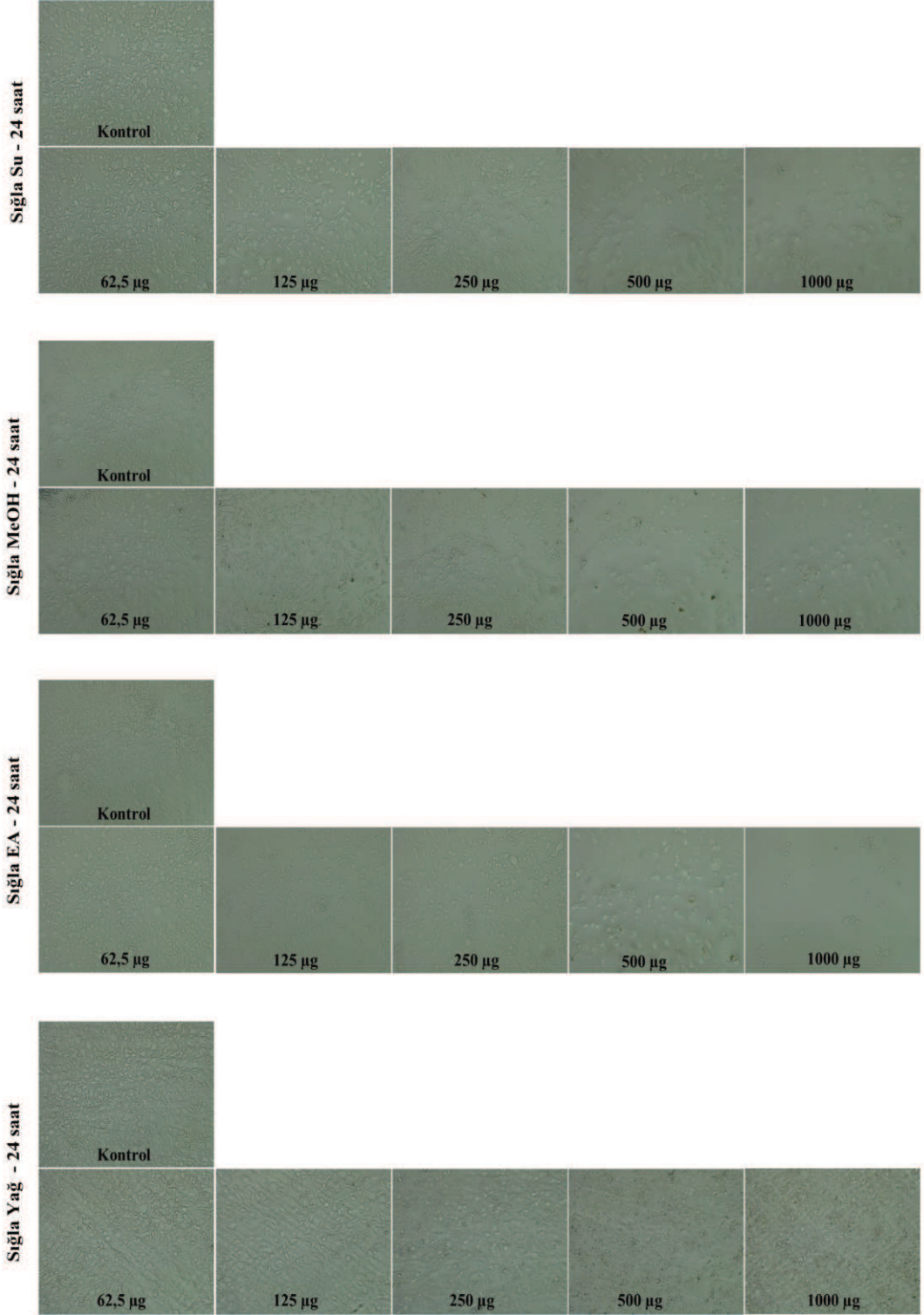
## EK 2 A549 hücre hattının 48. Saat hücre fotoğrafları

### A549 Hücre Hattı - 48 saat



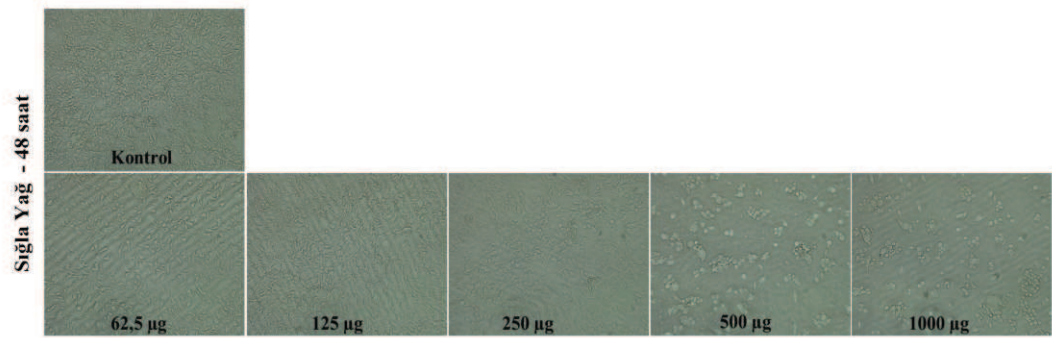
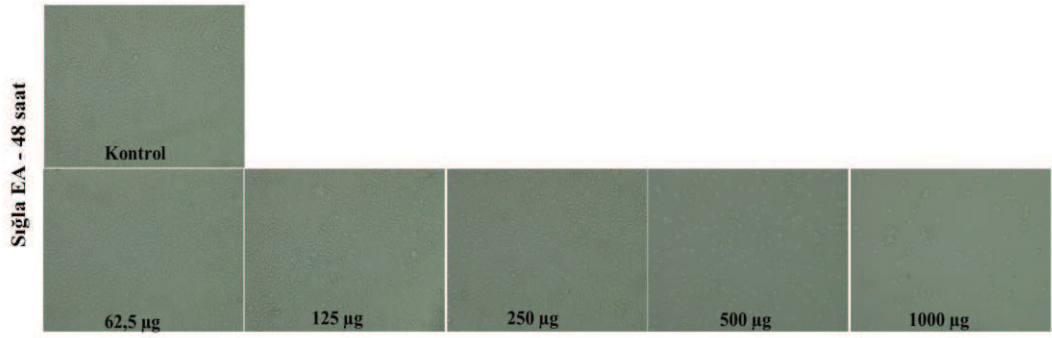
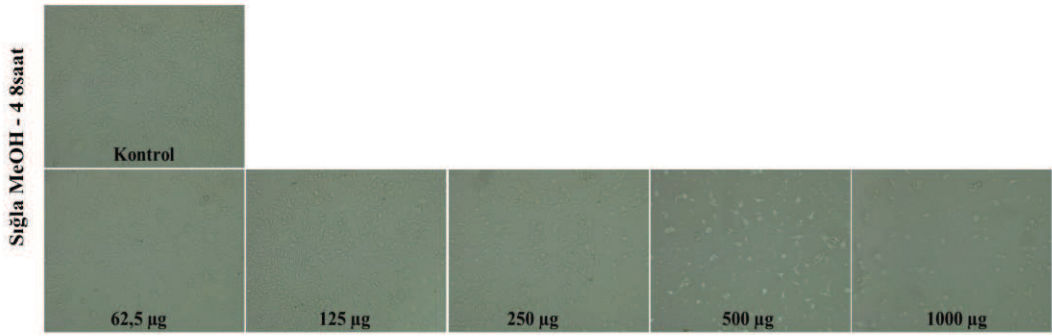
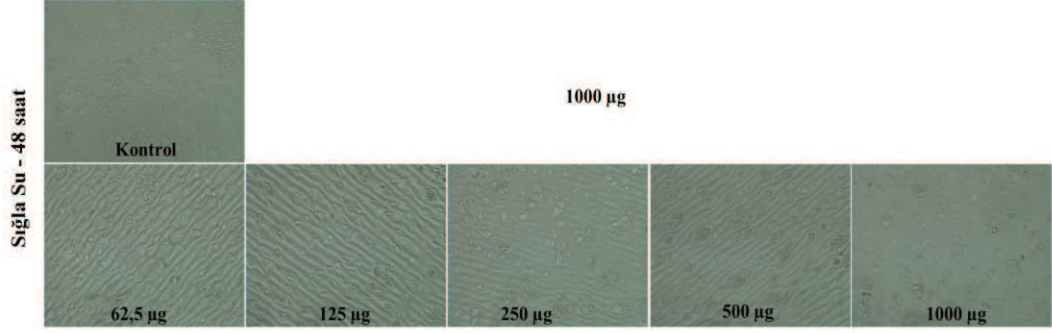
### EK 3 MDA-MB-231 hücre hattının 24. Saat hücre fotoğrafları

#### MDA-MB-231 Hücre Hattı - 24 saat

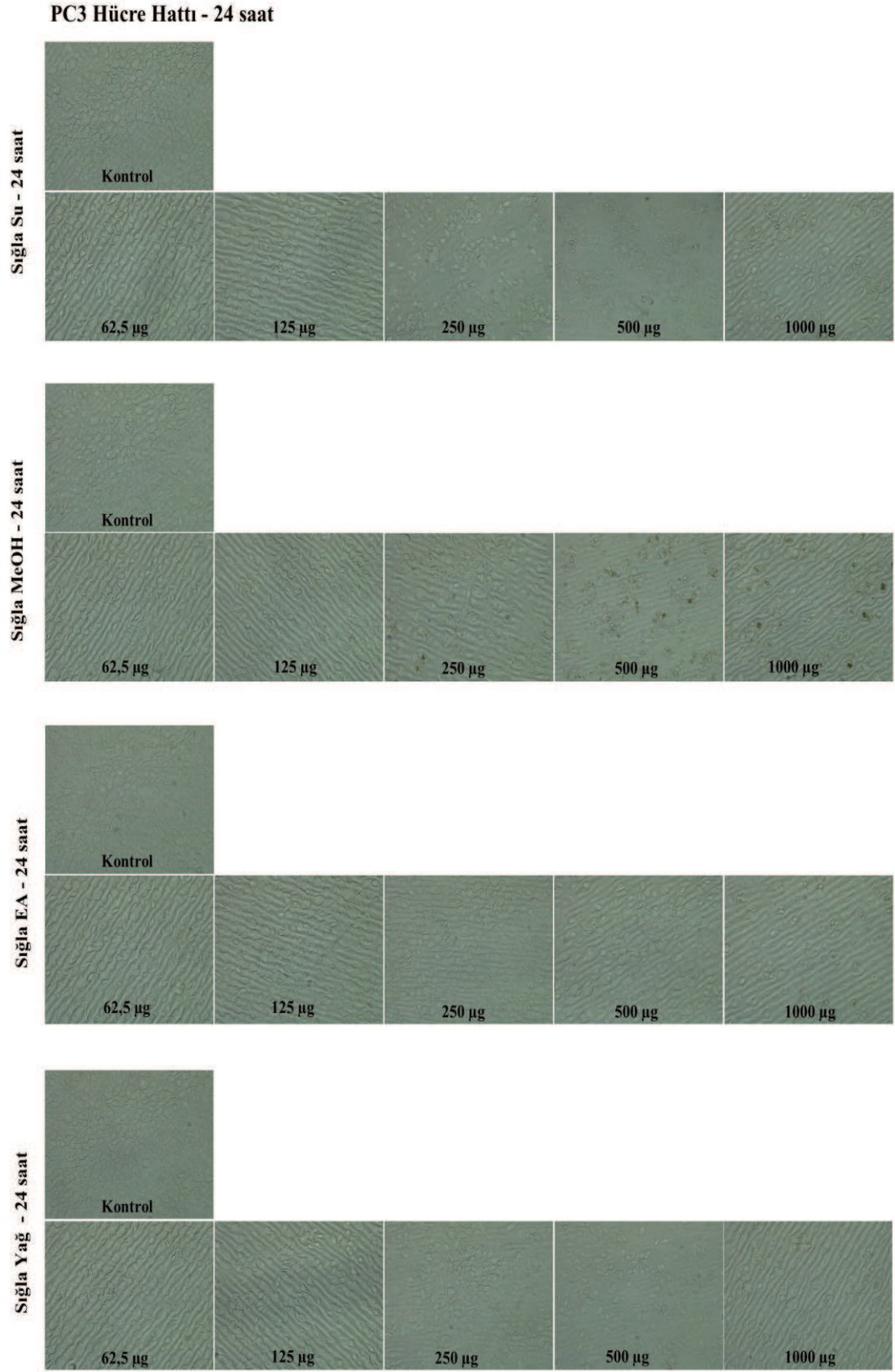


## EK 4 MDA-MB-231 hücre hattının 48. Saat hücre fotoğrafları

### MDA-MB-231 Hücre Hattı - 48 saat

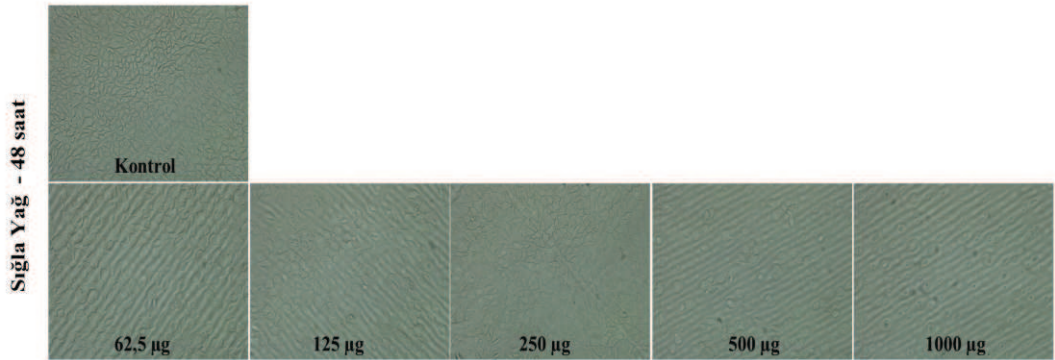
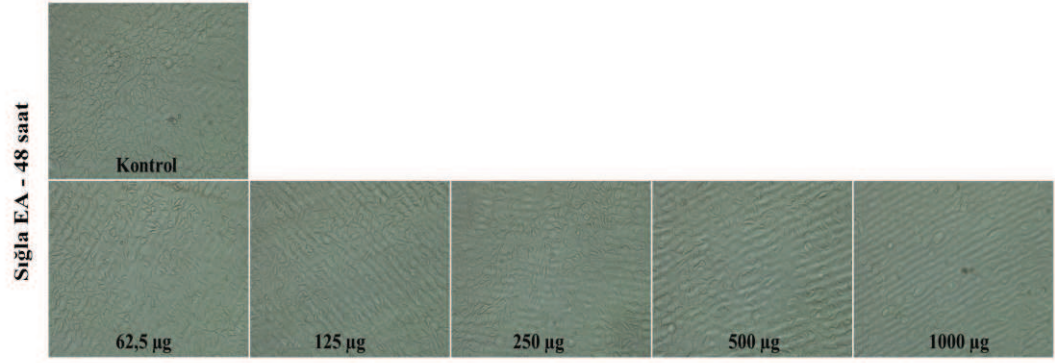
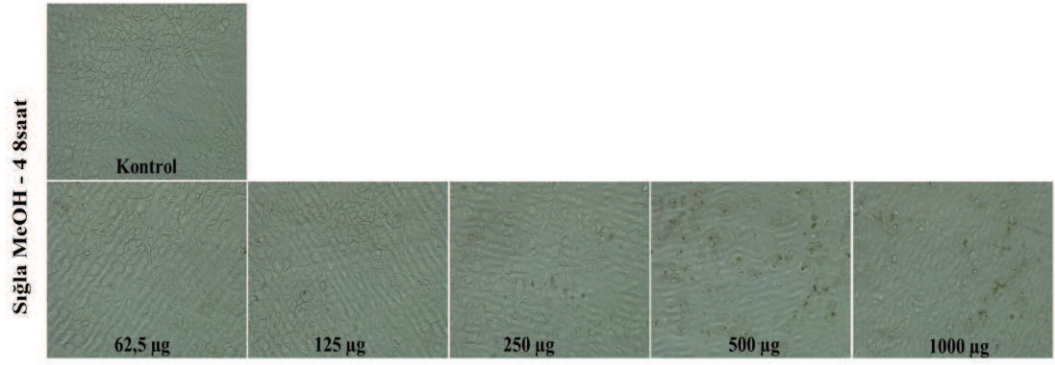
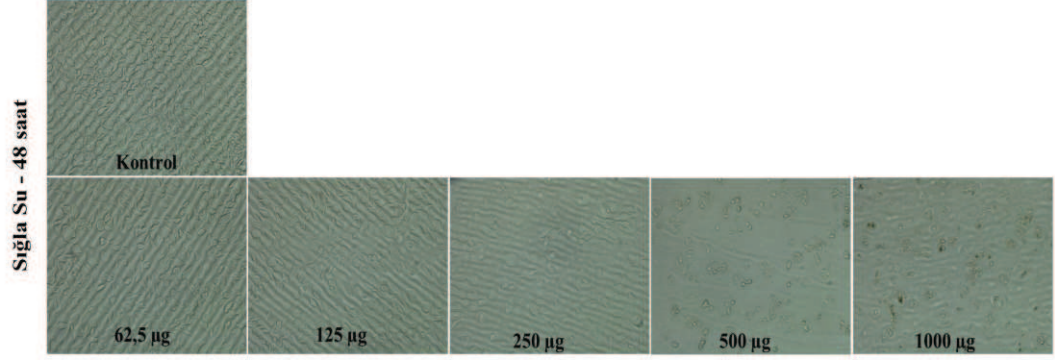


## EK 5 PC3 hücre hattının 24. Saat hücre fotoğrafları



## EK 6 PC3 hücre hattının 48. Saat hücre fotoğrafları

### PC3 Hücre Hattı - 48 saat



**EK 7 A549, MDA-MB-231 ve PC3 hücre hatlarında *Bax/Bcl2* -  
*Beclin1/LC3-II* genlerinin erime eğrisi grafikleri**

