

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANA BİLİM DALI



**HATAY İLİNDE YETİŞEN *Myrtus communis L.*'NİN A549
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nilüfer BİLGİÇ

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Gülay GÜLBOL DURAN

HATAY - 2018

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANA BİLİM DALI

**HATAY İLİNDE YETİŞEN *Myrtus communis L.*'NİN A549
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nilüfer BİLGİÇ

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Gülay GÜLBOL DURAN

HATAY - 2018

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA.VE GENETİK (TIP) ANA BİLİM DALI

**HATAY İLİNDE YETİŞEN *Myrtus communis L.*'NİN A549
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİSİ**

Yüksek Lisans Tezi

Nilüfer BİLGİÇ

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 29.06.2018 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri başkanı: Prof. Dr. Ramazan GÜNEŞAÇAR

Üye : Doç. Dr. Meral URHAN KÜÇÜK

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Gülay GÜLBOL DURAN

Bu tez, Enstitümüz Moleküler Biyokimya ve Genetik (Tıp) Ana Bilim Dalında hazırlanmıştır.

29.06.2018

Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sürecince akademik bilgi ve tecrübeleriyle gelişimime katkıda bulunan, deneylerin gerçekleştirilmesi ve yazım aşamasında yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Gülay GÜLBOL DURAN'a

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesindeki katkılarından dolayı Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Meral URHAN KÜÇÜK'e

Tez çalışmamda kullanılan *Myrtus communis* L. esansiyel yağının temininde ve yağ bileşeni ile ilgili verilerin elde edilmesinde katkıları bulunan Sayın Doç. Dr. Durmuş Alpaslan KAYA'ya

Tez çalışmamdaki katkılarından dolayı Arş. Gör. Hasret ECEVİT'e, laboratuvar aşamasındaki yardımlarından dolayı Moleküler Biyokimya ve Genetik Ana Bilim Dalı yüksek lisans öğrencileri Zehra KENANOĞLU ve Kübra ERKOÇ'a

Her konuda koşulsuz sevgi ve sabırla yanımda olan desteklerini esirgemeyen çok değerli babam, annem, abilerim ve canım ikizim Yasemin' e

Teşekkürlerimi Sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Kabul ve Onay.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	IX
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	X
ÖZET.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Myrtuscommunis L.....	2
2.1.1. Myrtuscommunis L. Bileşenleri.....	3
2.1.2. Myrtuscommunis L. ve Kanser.....	5
2.2. Apoptoz.....	6
2.2.1. Apoptozda Rol Alan Proteinler/Genler.....	7
2.2.1.1. Kaspaz Ailesi.....	7
2.2.1.2. Bcl-2 Ailesi.....	9
2.2.1.2.1. Anti-apoptotik Bcl-2 Proteinleri.....	9
2.2.1.2.2. Pro-apoptotik Bcl-2 Proteinleri.....	10
2.2.1.2.3. BH3-only Proteinler.....	10
2.2.1.3. p53.....	11
2.2.1.4. p21.....	12
2.2.2. Apoptoz Mekanizmaları.....	13

2.2.2.1. İntrensik Yolak.....	14
2.2.2.2. Ekstrinsik Yolak.....	16
2.2.3. Kanser ve Apoptoz.....	17
2.2.3.1. Akciğer Kanseri ve Apoptoz	18
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	20
3.1. Hücre Kültürü.....	21
3.2. Myrtuscommunis L. Esansiyel Yağ Dozlarının Hazırlanması.....	21
3.3. Myrtuscommunis L. Esansiyel Yağ Eldesi ve Kimyasal Kompozisyonları.....	22
3.4. MTT Testi.....	25
3.5. RNA İzolasyonu.....	26
3.6. cDNA Sentezi.....	27
3.7. Real Time PCR Analizi.....	28
3.8. İstatistiksel Analizler.....	29
4. BULGULAR.....	30
4.1. Myrtuscommunis L. Esansiyel Yağının (2500 µg/ml-78.125 µg/ml) Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	30
4.2. Myrtuscommunis L. Esansiyel Yağının (1000 µg/ml-31.25 µg/ml) Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	32
4.3. Myrtuscommunis L. Esansiyel Yağının Apoptoz Mekanizmasında Rol Alan Genlerin Ekspresyonu Üzerine Etkileri.....	35
4.3.1. Myrtuscommunis L. Esansiyel Yağının (312.5 µg/ml) Kaspaz 3 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	35
4.3.2. Myrtuscommunis L. Esansiyel Yağının (312.5 µg/ml) Kaspaz 8 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	36
4.3.3. Myrtuscommunis L. Esansiyel Yağının (312.5 µg/ml) Kaspaz 9 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	36

4.3.4. Myrtuscommunis L. Esansiyel Yağının (312.5 µg/ml) Bcl-2 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	37
4.3.5. Myrtuscommunis L. Esansiyel Yağının (312.5 µg/ml) p21 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	38
4.3.6. Myrtuscommunis L. Esansiyel Yağı (312.5 µg/ml) Uygulanmış A549 Hücrelerinde Apoptoz Genleri Ekspresyonunun Karşılaştırılması.....	39
4.3.7. Myrtuscommunis L. Esansiyel Yağının (156.25 µg/ml) Kaspaz 3 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	41
4.3.8. Myrtuscommunis L. Esansiyel Yağının (156.25 µg/ml) Kaspaz 8 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	42
4.3.9. Myrtuscommunis L. Esansiyel Yağının (156.25 µg/ml) Kaspaz 9 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	42
4.3.10. Myrtuscommunis L. Esansiyel Yağının (156.25 µg/ml) Bcl-2 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	43
4.3.11. Myrtuscommunis L. Esansiyel Yağının (156.25 µg/ml) p21 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	44
4.3.12. Myrtuscommunis L. Esansiyel Yağı (156.25 µg/ml) Uygulanmış A549 Hücrelerinde Apoptoz Genleri Ekspresyonunun Karşılaştırılması.....	45
5. TARTIŞMA.....	48
6. SONUÇ.....	53
7. KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ.....	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Myrtus communis L. bitkisi.....	2
Şekil 2.2. Apoptotik hücre ölümünün genel aşamaları.....	7
Şekil 2.3. Kaspazların sınıflandırılması.....	8
Şekil 2.4. Apoptoz mekanizmasında p21'in rolü.....	13
Şekil 2.5. Apoptoz mekanizması.....	14
Şekil 2.6. Nükleik asitlerin degradasyon süreci.....	15
Şekil 2.7. Genel popülasyonda akciğer kanseri insidans ve mortalite oranları.....	19
Şekil 2.8. Erkeklerde akciğer kanseri insidans ve mortalite oranları.....	19
Şekil 2.9. Kadınlarda akciğer kanseri insidans ve mortalite oranları.....	19
Şekil 3.1. Deney akışı.....	20
Şekil 3.2. A549 hücrelerinin görünümü.....	21
Şekil 3.3. Clevenger cihazı ile uçucu yağ eldesi.....	23
Şekil 3.4. MC esansiyel yağının GC-MS kromatogramı.....	23
Şekil 4.1. MC esansiyel yağının 2500 µg/ml-78.125 µg/ml konsantrasyon aralıklarında A549 hücre canlılığı üzerine etkisi.....	31
Şekil 4.2. A549 hücrelerinde MC esansiyel yağının 2500 µg/ml-78.125 µg/ml konsantrasyon aralıklarında % inhibisyon grafiği.....	32
Şekil 4.3. MC esansiyel yağının 1000 µg/ml-31.25 µg/ml konsantrasyon aralıklarında A549 hücre canlılığı üzerine etkisi.....	33
Şekil 4.4. A549 hücrelerinde MC esansiyel yağının 1000 µg/ml-31.25 µg/ml konsantrasyon aralıklarında % inhibisyon grafiği.....	34
Şekil 4.5. MC esansiyel yağının (312.5 µg/ml) Kaspaz 3 geninin ekspresyonu üzerine etkisi.....	35
Şekil 4.6. MC esansiyel yağının (312.5 µg/ml) Kaspaz 8 geninin ekspresyonu üzerine etkisi.....	36

Şekil 4.7. MC esansiyel yağının (312.5 µg/ml) Kaspaz 9 geninin ekspresyonu üzerine etkisi.....	37
Şekil 4.8. MC esansiyel yağının (312.5 µg/ml) Bcl-2 geninin ekspresyonu üzerine etkisi.....	38
Şekil 4.9. MC esansiyel yağının (312.5 µg/ml) p21 geninin ekspresyonu üzerine etkisi.....	39
Şekil 4.10. MC esansiyel yağının (312.5 µg/ml) apoptoz mekanizmasında rol alan genlerin ekspresyonu üzerine etkisinin karşılaştırılması.....	40
Şekil 4.11. Apoptoz mekanizmasında rol alan genlerde kontrol grubu ve 312.5 µg/ml MC esansiyel yağ dozunun ortalama Ct değerlerinin karşılaştırılması.....	40
Şekil 4.12. MC esansiyel yağının (156.25 µg/ml) Kaspaz 3 geninin ekspresyonu üzerine etkisi.....	41
Şekil 4.13. MC esansiyel yağının (156.25 µg/ml) Kaspaz 8 geninin ekspresyonu üzerine etkisi.....	42
Şekil 4.14. MC esansiyel yağının (156.25 µg/ml) Kaspaz 9 geninin ekspresyonu üzerine etkisi.....	43
Şekil 4.15. MC esansiyel yağının (156.25 µg/ml) Bcl-2 geninin ekspresyonu üzerine etkisi.....	44
Şekil 4.16. MC esansiyel yağının (156.25 µg/ml) p21 geninin ekspresyonu üzerine etkisi.....	45
Şekil 4.17. MC esansiyel yağının (156.25 µg/ml) apoptoz mekanizmasında rol alan genlerin ekspresyonu üzerine etkisinin karşılaştırılması.....	46
Şekil 4.18. Apoptoz mekanizmasında rol alan genlerde kontrol grubu ve 156.25 µg/ml MC esansiyel yağ dozunun ortalama Ct değerlerinin karşılaştırılması.....	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 3.1. MC esansiyel yağının kimyasal kompozisyonları.....	24
Çizelge 3.2. cDNA sentezinde kullanılan karışım ve oranları.....	27
Çizelge 3.3. cDNA reaksiyon koşulları.....	28
Çizelge 3.4. qRT-PCR'da kullanılan karışım ve oranları.....	28
Çizelge 3.5. qRT-PCR reaksiyon koşulları.....	29
Çizelge 4.1. 2500 µg/ml-78.125 µg/ml konsantrasyon aralıklarında 'optik dansite' nin ortalama ± standart sapma değerleri.....	30
Çizelge 4.2. 2500 µg/ml-78.125 µg/ml konsantrasyon aralıklarında % inhibisyon oranları.....	31
Çizelge 4.3. 1000 µg/ml-31.25 µg/ml konsantrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama ± standart sapma değerleri.....	33
Çizelge 4.4. 1000 µg/ml-31.25 µg/ml konsantrasyon aralıklarında % inhibisyon oranları.....	34
Çizelge 4.5. Kontrol grubu ve 312.5 µg/ml MC esansiyel yağ dozunun ortalama Ct ± standart sapma değerleri.....	41
Çizelge 4.6. Kontrol grubu ve 156.25 µg/ml MC esansiyel yağ dozunun ortalama Ct ± standart sapma değerleri.....	47

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Apaf1	:Apoptotic protease activating factor 1; apoptotik proteaz aktive edici faktör
APRIL	:A proliferation inducing ligand; proliferasyon uyarıcı ligand
ASK1	:Apoptosis signal-regulating kinase-1; apoptoz sinyal düzenleyici kinaz-1
A1/BFL-1	:BCL2A1; Bcl-2 related protein A1; Bcl-2 ile ilişkili A1 proteini
Bad	:Bcl-2 associated death promoter; Bcl-2 ilişkili ölüm promoteri
Bak	:Bcl-2 antagonist killer; Bcl-2 antagonist öldürücü
Bax	:Bcl-2-associated X protein; Bcl-2 ilişkili X proteini
Bcl-2	:B-Cell CLL/Lymphoma 2
Bcl-W	:BCL2L2; Bcl-2-like protein 2; Bcl-2 benzeri protein 2
Bcl-xL	:B-Cell lymphoma extra large
Bid	:BH3 interacting domain death agonist; BH3 ile etkileşen domain ölüm agonisti
Bik	:Bcl-2 interacting killer; Bcl-2 ile etkileşen öldürücü
Bim	:Bcl-2 interacting mediator; Bcl-2 ile etkileşen aracı
Bmf	:Bcl-2 modifying factor; Bcl-2 değiştirici faktör
Bok	:Bcl-2 related ovarian killer; Bcl-2 ile ilişkili yumurtalık katili
CAD	:Caspase activated deoxyribonuclease; kaspazla aktive olan deoksiribonükleaz
dATP	:Deoksiadenozin trifosfat
DISC	:Death-inducing signaling complex; ölüm uyarıcı sinyal kompleksi
dk	:Dakika
DMSO	:Dimethyl Sulfoxide; dimetil sülfoksit
FBS	:Fetal bovine serum; fetal sığır serumu
g	:g-force; g kuvveti

GC-MS	:Gas chromatography-mass spectrometry; gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
IAP	:Inhibitors of apoptosis proteins; apoptoz proteinlerinin inhibitörleri
ICAD	:Inhibitor of caspase activated deoxyribonuclease; kaspazla aktive olan deoksiribonükleaz inhibitörü
MC	: <i>Myrtus communis</i> L.
MCL-1	:Myeloid cell leukemia 1
ml	:Mililitre
MOM	:Mitochondrial outer membrane; mitokondriyal dış zar
MS	:Mass spectrometry; kütle spektrometresi
Ort	:Ortalama
PUMA	:p53 upregulated modulator of apoptosis; p53 up-regüle modülatör apoptoz
p21	:CDKN1A; cyclin dependent kinase inhibitor 1A; siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1A
p53	:TP53; Tumor Protein p53
RANKL	:Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; nükleer faktör kappa-B ligandının reseptör aktivatörü
RCF	:Relative centrifugal force; nispi merkezkaç kuvveti
Rpm	:Revolutions per minute; dakikadaki devir sayısı
Smac	:Second mitochondria-derived activator of caspase; mitokondriyen türevli kaspaz aktivatörü
sn	:Saniye
tBid	:Truncated Bid; kesilmiş Bid
TNF	:Tumor necrosis factor; tümör nekroz faktörü
TNFR	:Tumor necrosis factor receptors; tümör nekrozis faktör reseptörü
TNFR1	:Tumor necrosis factor receptor 1; tümör nekrozis faktör reseptörü 1
TNFR2	:Tumor necrosis factor receptor 2; tümör nekrozis faktör reseptörü 2
TNF α	:Tumor necrosis factor alpha; tümör nekroz faktör alfa

TRAIL	:Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; tümör nekrozis faktör ile ilişkili apoptoz uyarıcı ligand
TRAILR1	:Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing Receptor-1; tümör nekrozis faktör ile ilişkili apoptoz uyarıcı ligand reseptör 1
TRAILR2	:Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing Receptor-2; tümör nekrozis faktör ile ilişkili apoptoz uyarıcı ligand reseptör 2
TRAILR3	:Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing Receptor-3; tümör nekrozis faktör ile ilişkili apoptoz uyarıcı ligand reseptör 3
TRAILR4	:Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing Receptor-4; tümör nekrozis faktör ile ilişkili apoptoz uyarıcı ligand reseptör 4
TWEAK	:TNF-related weak inducer of apoptosis; apoptozun TNF ile ilişkili zayıf uyarıcısı
μg	:Mikrogram
μl	:Mikrolitre
$^{\circ}\text{C}$:Santigrat derece

ÖZET

Hatay İlinde Yetişen *Myrtus communis* L.'nin A549 Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisi

Myrtus communis L. (MC) anti-proliferatif, apoptotik, analjezik ve anti-inflamatuar etkilere sahip olan önemli tıbbi ve aromatik bir bitkidir. Ancak bitkinin biyolojik aktiviteleri ve potansiyel moleküler hedefleri ile ilgili bilgiler henüz tam olarak netlik kazanmamıştır. Kanser araştırmalarında apoptotik hücre ölümünün moleküler mekanizmasının anlaşılması büyük önem arz etmektedir. Çalışmamızın amacı, MC esansiyel yağının A549 hücrelerinde apoptozu uyarıp uyarmadığı, uyarıyor ise hangi yolak üzerinden hücreleri apoptoza yönlendirdiğini araştırmaktır.

Çalışmamızda, A549 hücreleri 24 ve 48 saat süreyle MC esansiyel yağının 31.25 ile 2500 µg/ml doz aralığındaki çeşitli konsantrasyonları ile muamele edildi. MTT analizi ile sitotoksikite ölçüldü ve IC₅₀'nin altındaki sitotoksik olmayan konsantrasyonlar belirlendi. Daha sonra hücreler 312.5 ve 156.25 µg/ml konsantrasyonlarında MC esansiyel yağı ile 24 saat süreyle inkübe edildi ve qRT-PCR yöntemiyle Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9, Bcl-2 ve p21 genlerinin ekspresyon seviyeleri belirlendi.

Sonuçlarımız 24. saatte 625 µg/ml ve üstündeki konsantrasyonların, kontrol grubu ile kıyaslandığında hücre canlılığını önemli ölçüde baskıladığını gösterdi. 312.5 µg/ml dozda, intrinsik yolakta görev alan genlerden Kaspaz 3 ve Kaspaz 9'un ekspresyon seviyelerinin anlamlı ölçüde arttığı saptandı (sırasıyla p:0.0129 ve p:0.0180). p21, anti-apoptotik Bcl-2 ve ekstrinsik yolakta görev alan Kaspaz 8 geninin ekspresyon seviyelerinde ise anlamlı bir fark görülmedi. 156.25 µg/ml dozda ise bakılan genlerden sadece p21 geninin ekspresyon seviyesi anlamlı bir artış gösterdi (p:0.0002).

Sonuç olarak, bu çalışma kapsamında MC esansiyel yağının intrinsik yolak aracılığıyla apoptozu uyardığı gösterilmiş olup MC'nin kanser tedavisinde doğal yeni bir terapötik ajan olarak potansiyel teşkil ettiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, A549 hücreleri, *Myrtus communis* L. esansiyel yağ

ABSTRACT

Growing in Hatay Province *Myrtus communis* L. of Apoptotic Effect on A549 Cells

Myrtus communis L. (MC) is an important aromatic and medicinal plant with anti-proliferative, apoptotic, analgesic and anti-inflammatory effects. However, information about the plant's biological activities and potential molecular targets has not yet been fully clarified. Understanding of the molecular mechanism of apoptotic cell death in cancer studies has great importance. In our study, we aimed to investigate whether the essential oils of MC induce apoptosis on A549 cells, and if it is induced, which pathway leads the cells to apoptosis.

In our study, A549 cells were exposed to various concentrations from 31.25 to 2500 µg/ml of the essential oils for 24 and 48 hours. The cytotoxicity was measured by MTT assay and non-cytotoxic concentrations lower than IC₅₀ were determined. Then, the MC essential oil was administered at the concentrations of 312.5 and 156.25 µg/ml for 24 hours. The expression levels of Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9, Bcl-2 and p21 genes were evaluated by qRT-PCR method.

Our results showed that 625 µg/ml and higher concentrations of the MC essential oil was significantly suppressed cell viability at 24 hour time period in treatment group when compared to control. Expression levels of Caspase 3 and Caspase 9 genes which are mediators of intrinsic pathway were significantly increased at concentration of 312.5 µg/ml of essential oils (p:0.0129 and p:0.0180 respectively). However, the expression levels of the Caspase 8 gene, an important mediator of extrinsic apoptosis pathway, no difference was found. It was found that the p21 and the anti-apoptotic Bcl-2 genes were not different. At the dose of 156.25 µg/ml, only the expression level of the p21 gene showed a significant increase (p:0.0002).

As a result, the essential oils of MC induce apoptosis through the intrinsic pathway. In this regard, we think that MC has potential as a new natural therapeutic agent in the treatment of cancer.

Keywords: Apoptosis, A549 cells, *Myrtus communis* L. essential oil

1.GİRİŞ

Myrtus communis L. (MC), 100 cins ve yaklaşık 3000 tür içeren myrtaceae familyasından önemli aromatik ve tıbbi bir bitkidir. Murt ve mersin bitkisi olarak anılmasının yanı sıra Hatay ilinde "hambeles" ismi ile bilinen MC özellikle Türkiye, Yunanistan, İtalya, Cezayir, Tunus ve Fas gibi Akdeniz ülkelerinde yaygın olarak görülmektedir (Benchikh 2016). Bitkinin çeşitli kısımları yüzyıllar boyunca ishal, dizanteri, peptik ülser, hemoroit, inflamasyon, akciğer ve deri hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır (Alipour ve ark. 2014). Daha önce yapılan çalışmalarda, bitkinin anti-bakteriyel, anti-inflamatuvar, analjezik, anti-proliferatif ve apoptotik etkileri gösterilmiştir ancak biyolojik aktiviteleri ve potansiyel moleküler hedefleri ile ilgili bilgiler henüz tam olarak anlaşılammıştır. Ayrıca MC'nin apoptoz yolağı üzerine etkilerini araştıran sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (Cottiglia ve ark. 2012, Iskender ve ark. 2015).

Apoptoz çok hücreli organizmalarda istenmeyen, hasar görmüş, enfekte olmuş hücrelerin yok edilmesinde ve gelişme, hücre farklılaşması, çoğalmayı içeren çeşitli biyolojik süreçlerin ortadan kaldırılmasında önemli rol oynamaktadır. Apoptotik sinyaller genomik bütünlüğün korunmasına katkıda bulunurken kusurlu apoptoz kanser, otoimmün ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığa neden olabilmektedir. Bu yüzden apoptotik hücre ölümünü kontrol eden ve yürüten moleküler mekanizmalar ile ilgili araştırmalar büyük önem arz etmektedir (Hassan ve ark. 2014, Lowe ve ark. 2000).

Tümör gelişimi, düzensiz proliferasyon ve apoptozun baskılanması sonucu ortaya çıkmaktadır. Tümör gelişimi sırasındaki bu birincil kusurlara yapılacak müdahale kanser tedavisi için büyük bir fırsat sunmaktadır (Kasibhatla ve Tseng 2003). Nitekim bizim çalışmamızda da apoptoza dirençli olduğu bilinen kanser hücrelerinde anti-proliferatif ve apoptotik özelliklere sahip olan MC'nin önemli etkiler sunacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada *in vitro* ortamda A549 hücre dizileri MC esansiyel yağının farklı konsantrasyonları ile muamele edilerek, MC esansiyel yağının apoptotik yolak üzerindeki etkilerinin; hangi doz ve muamele sürelerinde gerçekleştiği ve hangi apoptotik yolak üzerinden düzenlendiği belirlenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Myrtus communis* L.

Myrtus communis L., 100 cins ve yaklaşık 3000 tür içeren myrtaceae familyasından, boyu 5 metreye kadar ulaşabilen her daim yeşil, aromatik ve tıbbi bir bitkidir. Yaprakları 7-13 cm uzunluğunda olup güzel kokuludur (Şekil 2.1). MC özellikle Güney Avrupa, Kuzey Afrika, Batı Asya, Güney Amerika, Kuzey Batı, Himalaya ve Avustralya'da yetişmektedir. En yaygın görüldüğü ülkeler ise Türkiye, Yunanistan, İtalya, Cezayir, Tunus ve Fas gibi Akdeniz ülkeleridir (Alipour ve ark. 2014).

İçeriğinde çok sayıda aktif bileşen bulunduğundan dolayı geniş terapötik etkilere sahip olan bitkinin meyvesi, dalları ve yaprakları diyare, peptik ülser, hemoroit, inflamasyon, kanama, baş ağrısı, çarpıntı, aşırı terleme, akciğer ve deri hastalıklarının tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır (Alipour ve ark. 2014, Gauthier ve ark. 1989). Ayrıca, etnofarmakolojik araştırmalar tarafından da bitkinin anti-mikrobiyal, anti-diyareik, anti-diyabetik, anti-spazmodik, vazodilatatör, anti-ülser, anti-oksidan, anti-kanser, anksiyolitik, sedatif-hipnotik ve anti-inflamatuar etkinlikler gibi kapsamlı farmakolojik aktivitelere sahip olduğu belirtilmektedir (Sisay ve Gashaw 2017).



Şekil 2.1. *Myrtus communis* L. bitkisi (Özkan ve Güray 2009)

2.1.1. *Myrtus communis* L. Bileşenleri

Myrtus communis L. bitkisi fenolik asitler, flavonoidler, tanenler ve terpenler gibi bileşenleri bünyesinde barındırmaktadır. Ayrıca bitkinin yağı, biyoaktif monoterpen (Örneğin: ökaliptol, α -pinen, linalol) çeşitliliği ve seskiterpen (sesquiterpenes) türevleri açısından zengin bir içeriğe sahiptir (Sisay ve Gashaw 2017).

Fenolik Asitler: Fenolik bileşenlerin önemli bir kategorisi olan ve doğal olarak oluşan fenolik asitler önemli anti-oksidan özelliğe sahiptirler. Kimyasal yapılarına göre; yapılarında hidroksi benzoik asit bulunduranlar ve yapılarında hidroksi benzoik asit bulundurmayanlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Liu ve ark. 2017).

Flavonoidler: Bitkisel kökenli gıdalarda bulunan polifenolik bileşiklerdir. Yapılan çalışmalarda anti-inflamatuar, anti-oksidan özellikleri ve tümör gelişiminin çeşitli aşamalarındaki inhibitör rolleri nedeniyle faydalı sağlık etkilerine sahip olabildikleri belirtilmiştir (Hollman ve Katan 1999, Koca ve Karadeniz 2005). Flavonoidlerin tümör oluşumuyla yakından ilgili olan prostaglandin sentaz, lipoksigenaz ve siklooksigenaz enzimlerini inhibe edebildikleri ve ayrıca serbest radikallerin tetiklediği kanser, kalp damar hastalıkları ve mide mukozası rahatsızlıkları gibi hastalıkları önleyebildikleri belirtilmiştir (Koca ve Karadeniz 2005). Bunun aksine, belirli koşullara bağlı olarak zararlı etkilerinin bulunduğu da bildirilmiştir (Ross ve Kasum 2002).

Tanenler: Bitkilerde doğal olarak bulunan polifenollerdir. Genelde hidrolize ve non-hidrolize (veya yoğunlaştırılmış) olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Fresco ve ark. 2006). Tanenlerin anti-kanserojen, anti-oksidan, anti-mutajenik ve anti-mikrobiyal oldukları bildirilmiştir. Tanenlerin anti-karsinojenik ve anti-mutajenik potansiyel etkilerinin hücrel oksidatif hasarı korumada önemli olan anti-oksidatif özellikleri ile ilişkili olabildiği düşünülmektedir. Bunun dışında tanenlerin, doz ve tanen türüne bağlı olarak kan pıhtılaşmasını hızlandırmak, kan basıncını düşürmek, serum lipit düzeyini düşürmek, karaciğer nekrozu üretmek gibi fizyolojik etkilerinin olduğu da bildirilmiştir (Chung ve ark. 1998).

Terpenler: Monoterpen, seskiterpen, diterpen, triterpen, tetraterpen ve politerpen olarak sınıflandırılmaktadırlar (Katerova ve ark. 2012). Uçucu yağların önemli bileşenlerinden olan terpenler mutajenlere karşı koruyucu etki göstermektedirler (Bakkal ve ark. 2008).

Monoterpenler: Esansiyel yağların temel bileşenlerindedir. Hayvan modellerinde ve farklı hücre hatlarında yapılan çalışmalarda monoterpenlerin anti-tümör ve anti-oksidan etkinliğe sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca kanserin hem başlangıç aşamasında hem de ileri safhalarında karsinogenezi inhibe ederek erken ve ileri kanser tedavisinde önemli bir bileşen olduğu savunulmaktadır (Crowell 1999, Grassmann 2005).

Ökalyptol: 1, 8-cineole olarak da bilinen ökalyptol mentol benzeri kokuya sahip doğal monoterpen bileşendir. MC esansiyel yağında yüksek oranda bulunan bu bileşenin kanserojenik etkileri ile ilgili yapılan bir çalışmada insan kolorektal kanseri hücre hattında (HCT 116) apoptozu uyararak proliferasyonu baskıladığı gösterilmiştir (Murata ve ark. 2013). Ayrıca ökalyptolün anti-inflamatuar sitokin inhibisyonu ile hava yolu mukus hipersekresyonunu ve astımı kontrol ettiğine dair kanıtlar mevcuttur (Juergens 2014). Bu etkilerin yanı sıra, analjezik bir ajan olarak terapide potansiyel yararlı kullanıma sahip olduğu da belirtilmiştir (Santos ve Rao 2000).

α -Pinen: Terpen sınıfına ait organik bir bileşendir. MC esansiyel yağının ana bileşenlerinden biri olan α -pinen'in anti-kanserojen özelliklere sahip olduğuna dair önemli kanıtlar mevcuttur. Nitekim prostat kanseri hücre hattında (PC-3) yapılan çalışmada α -pinenin hücre döngüsünü durdurup apoptozu uyararak kanser hücre büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Zhao ve ark. 2018). Benzer şekilde karaciğer kanseri hücrelerinde yapılan çalışmada da kanser hücrelerinin büyümesini in-vitro da %79.3, in-vivo da %69.1 oranında belirgin bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (Chen ve ark. 2015). Ayrıca bu bileşen anti-inflamatuar etkiye sahiptir. İnsan monosit hücre hattında (THP-1) yapılan bir çalışmada α -pinenin lipopolisakkarit tarafından uyarılan NF- κ B'nin nükleer translokasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Zhou ve ark. 2004).

Linalol: MC esansiyel yağında bulunan biyolojik aktif bileşenlerden biridir. Analjezik, anti-inflamatuar, anti-viral, anti-bakteriyel ve anti-kanserojenik etkilere sahip olduğu düşünülmektedir (Ravizza ve ark. 2008, Sun ve ark. 2015). Kemoterapötik ajan olarak potansiyel etkileri HL-60 (akut promyelositik lösemi hücre hattı) hücre büyümesini inhibe ettiği ve apoptozu uyardığı yönündedir (Maeda ve ark. 2012). Benzer şekilde Hep G2 (karaciğer karsinom hücre hattı) (Usta ve ark. 2009) ve DU 145 (prostat karsinom hücre hattı) hücrelerinde de büyümeyi inhibe ettiği bildirilmiştir (Sun ve ark. 2015). Epitelial over kanseri hücrelerinde ise ROS ve Kaspaz 3 seviyesinin artışı ile apoptozun arttığı bildirilmiştir (Han ve ark. 2016). Bunlara ilaveten U937 (insan akut miyeloid lösemi hücre

hattı) ve HeLa (insan papillom virüsü hücre hattı) hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada da sitotoksik etki gösterdiği ve hücre döngüsünü durduğu gösterilmiştir (Chang ve ark. 2015).

Seskiterpenler: Esansiyel yağların temel bileşenlerindedir. Seskiterpenler kanser gelişimini azaltmada terapötik potansiyel etki göstermesinin yanı sıra anti-oksidan etkinliğe sahip bir moleküldür. Bu molekül bitkilerde ve deniz canlılarında bulunmaktadır (Grassmann 2005, Modzelewska ve ark. 2005).

2.1.2. *Myrtus communis* L. ve Kanser

KontROLSÜZ büyüme ve anormal ölümsüz hücrelerin yayılması ile karakterize olan kanser, multifaktöriyel bir hastalık olup her geçen gün artan sıklığı ve tatmin edici bir tıbbi tedavi yönteminin bulunmaması nedeniyle günümüzün en önemli sağlık problemlerinden birini oluşturmaktadır (Ogur 2014). Günümüzde çoğu kanser türü için uygulanan terapötik ve cerrahi yaklaşımlar hastalığın insidansını kontrol edemediği için, mekanizmaya dayalı stratejiler geliştirmek hastalığın tedavisinde oldukça önemlidir. Dolayısıyla bilim adamları, mevcut kanser biyolojisinde özellikle hücrelerin proliferasyonunu, sağ kalımını ve transformasyonunu düzenleyen hücresel sinyal yolları ile ilgili çalışmalar üzerine yoğunlaşmaktadır (Fresco ve ark. 2006).

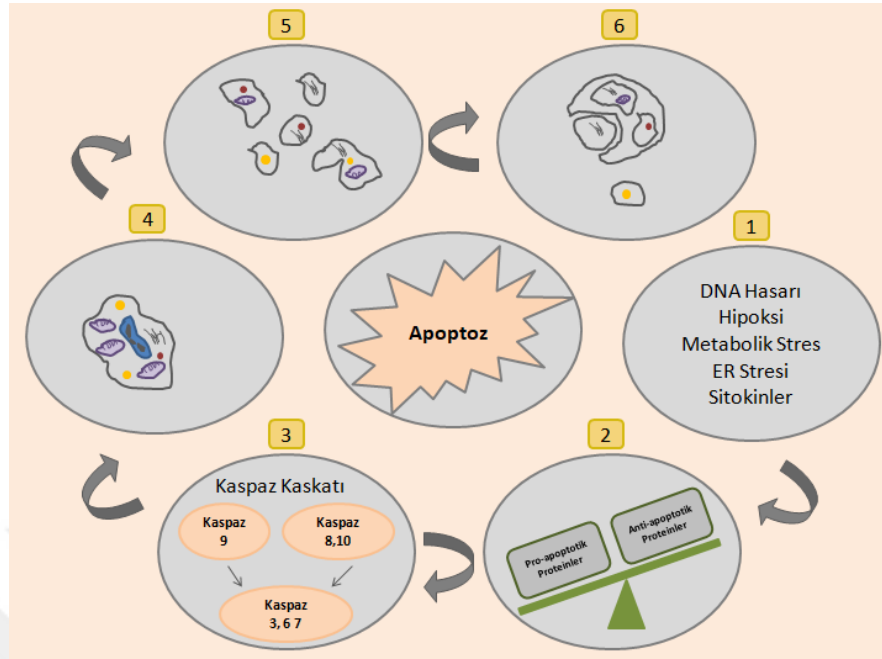
Doğal veya doğal türevli ürünler modern tıpta en önemli ilaç kaynağı olduğu için kanserde de bu doğal ürünlerin kullanımı büyük önem arz etmektedir (Ogur 2014). MC yüzyıllar boyunca çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan doğal bir üründür. MC'nin tıbbi özellikleri ile ilgili farklı çalışmalar bulunmasına rağmen çeşitli ekstraktları ve esansiyel yağı kullanılarak yapılan anti-kanser çalışmaları kısıtlı sayıdadır (Ogur 2014). Dolayısıyla bu alanda yapılacak çalışmalar doğal ve sitotoksik olmayan ilaç araştırmalarına ışık tutacaktır.

2.2. Apoptoz

Apoptoz terimi "ağaçtan düşen yaprak" anlamına gelen eski bir yunanca kelimedir (Wong 2011). İlk kez 1972'de Kerr ve arkadaşları hücre ölümünün farklı bir morfolojisini tanımlamak için "apoptoz" terimini kullanmıştır (Kerr ve ark. 1972). Apoptozun moleküler biyolojik çalışmaları 1980'lerin sonlarında başlamış olup apoptoz mekanizmasını açığa çıkarmada oldukça hızlı bir ilerleme kaydedilmiştir (Tsujimoto 1998). 1990'lı yıllara doğru ise önemli gelişmeler sağlayacak iki bulgu tespit edilmiştir. İlk olarak, nematod *Caenorhabditis elegans*'in tek hücre düzeyinde tam gelişim dizisi bildirilmiş ve böylece öngörülebilir sayıda hücrenin ölüm sürecine girdiği ve bu süreçte pozitif ve negatif düzenleyici spesifik genlerin rol aldığı açıklanmıştır. İkinci olarak ise Bcl-2 (B-Cell CLL/Lymphoma 2) adı verilen yeni bir gen keşfedilmiş ve bu genin, insan tümör hücrelerinde hücre bölünmesini harekete geçiren klasik bir onkogenin aksine apoptozu önleyerek işlev gördüğü bildirilmiştir (Shamas-Din ve ark. 2013).

Apoptotik hücre ölümünün genel aşamaları 6 adımı takip etmektedir; 1) apoptozun uyarılması veya tetiklenmesi, 2) pro-apoptotik proteinlerin aktivasyonu, 3) kaspaz kaskatını takiben hedef proteinlerin ayrılması, 4) hücre içi organellerin bozunumu/yeniden organizasyonu, 5) hücrelerin apoptotik cisimlere bölünmesi, 6) makrofajlar veya komşu hücreler tarafından fagositoz için hücre fragmanlarının hazırlanması (Savitskaya ve Onishchenko 2015) (Şekil 2.2).

Apoptozun uyarılmasında; hücre zarı, mitokondri, endoplazmik retikulum, golgi, lizozomlar ve çekirdek gibi çeşitli organeller rol alır. Pro-apoptotik proteinlerin farklı sinyal yollarını uyarması ile kaspaz ailesi tarafından yönlendirilen ortak bir mekanizma aktive olur. Daha sonra süreç DNA ve protein parçalanmasını takiben membran değişiklikleri ve fagositik hücreler tarafından tanınma ile son bulur (Savitskaya ve Onishchenko 2015). Bu mekanizmada Bcl-2 ailesi negatif düzenleyici olarak görev alır (Tsujimoto 1998).



Şekil 2.2. Apoptotik hücre ölümünün genel aşamaları

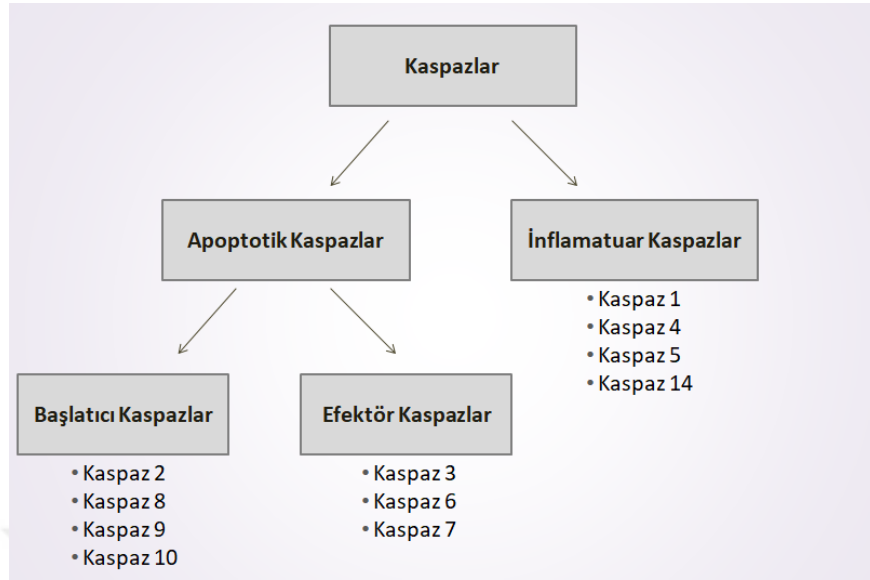
2.2.1. Apoptozda Rol Alan Proteinler/Genler

2.2.1.1. Kaspaz Ailesi

Kaspazlar (Caspases; cysteine-dependent aspartate-specific peptidases), apoptotik hücre ölüm mekanizmasının gerçekleşmesini sağlayan sistein proteazlardır (Wong 2011). Kaspazlar hücrede zimojen veya pro-kaspaz durumunda olup apoptotik uyarılar ile aktifleşirler (Kim ve ark. 2011). Günümüzde insanlarda 11 kaspaz tarif edilmiştir. Genel olarak, apoptotik (Kaspaz 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10) ve inflamatuvar kaspazlar (Kaspaz 1, 4, 5 ve 14) olarak ikiye bölünebilirler (Galluzzi ve ark. 2016).

Apoptotik kaspazlar da iki alt aileye ayrılmıştır;

- 1) Başlatıcı kaspazlar: Kaspaz 2, 8, 9, 10.
- 2) Efektör kaspazlar: Kaspaz 3, 6, 7 (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Kaspazların sınıflandırılması

Başlatıcı kaspazlar kesilip aktive olduktan sonra efektör kaspazların inaktif formlarını aktive ederler ve böylece hızlı hücre ölümüyle apoptotik yolları tetiklemiş olurlar. Efektör kaspazlar ise apoptotik işlemi başlatmak için hücredeki diğer protein substratlarını parçalarlar (Balasescu ve ark. 2015).

Fonksiyonel yönden kaspazlar, yakınındaki amino asitlerin tanınmasına ve aspartik asit kalıntılarında proteinin kesilmesine izin veren proteolitik aktiviteye sahiptir. Bu aktivasyon süreci ölüm sinyalleri tarafından tetiklenir, IAP (Inhibitors of apoptosis proteins; apoptoz proteinlerinin inhibitörleri) ve Bcl-2 protein ailesinin bazı üyeleri tarafından ise kontrol edilir (Balasescu ve ark. 2015).

Kaspazların aktivasyonu ile hücre sistematik olarak sökülüp, çevresindeki hücelere ve dokuya zarar vermeden etkin bir şekilde çıkarılır. Dolayısıyla apoptoz mekanizmasında, bir dizi olayın ilerlemesinde önemli rol oynayan kaspazlara yapılan müdahaleler tümör tedavisi için olası bir yaklaşımı temsil edebilir (Kasibhatla ve Tseng 2003).

Kaspaz 3: Hem intrinsik hem de ekstrinsik yolakta en iyi tanımlanmış efektör kaspazlardan biridir (Mirzayans ve ark. 2016). Kaspaz 9 sonrası Kaspaz 3 aktivasyonu genellikle geri dönüşümsüz hücre ölümünün gerçekleşmesi olarak düşünülür (Li ve ark. 2017). Bunun yanı sıra Kaspaz 3'ün; nöro gelişim ve farklılaşma gibi fizyolojik süreçlerde

ve alzheimer, parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarda rol oynayan apoptozdan bağımsız fonksiyonlarının da olduğu bildirilmiştir (Mirzayans ve ark. 2016).

Kaspaz 8: Ekstrinsik yolak için başlatıcı bir kaspazdır. Kaspaz 3 ve 7'yi doğrudan aktive ederek apoptozun gerçekleşmesini sağlar (Julien ve Wells 2017).

Kaspaz 9: İntrinsik yolak için başlatıcı bir kaspazdır. Kaspaz 9'un aktive edilmemesi dejeneratif ve gelişimsel bozukluklara hatta kansere yol açabilen önemli fizyolojik ve patofizyolojik sonuçlara neden olabilmektedir (Li ve ark. 2017).

2.2.1.2. Bcl-2 Ailesi

Bcl-2 protein ailesi, intrinsik apoptoz yolunda anahtar regülatörler olarak görev yapan önemli bir protein grubudur (Anilkumar ve Prehn 2014). Bugüne kadar, apoptozu teşvik eden pro-apoptotik proteinler ve apoptozu önleyen anti-apoptotik proteinler de dahil olmak üzere memeli hücrelerinde en az 15 Bcl-2 aile üyesi protein tespit edilmiştir (Lowe ve Lin 2000).

Bcl-2 ailesi, yapısal ve işlevsel özelliklerine bağlı olarak; anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri, pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri ve BH3-only proteinler (Bcl-2 homology 3; Bcl-2 homolojisi 3) olmak üzere üç farklı sınıfa ayrılmaktadır (Anilkumar ve Prehn 2014).

2.2.1.2.1. Anti-apoptotik Bcl-2 Proteinleri

İlk bulunan apoptoz inhibitörü olan Bcl-2 (Adams ve Cory 2018), Bcl-xL (B-cell lymphoma extra large), MCL-1 (Myeloid cell leukemia 1) A1/BFL-1 (BCL2A1; Bcl-2 related protein A1; Bcl-2 ile ilişkili A1 proteini) ve Bcl-W (BCL2L2; Bcl-2-like protein 2; Bcl-2 benzeri protein 2) bu grupta yer alan proteinlerdir. Bunlar dört BH (1-4) domaini içerirler (Anilkumar ve Prehn 2014) ve apoptozun inhibe edilmesi ile hücre sağ kalımını artırırlar (Adams ve Cory 2018). Bcl-2, hücrede integral bir zar proteindir. Bcl-W ve Bcl-xL ise sadece sitotoksik bir sinyalden sonra zar ile sıkı bir şekilde birleşen proteinlerdir (Aggarwal ve ark. 2004).

Bcl-2; Bcl-2 ilk başta B hücre orijinli insan foliküler lenfoma da rol oynayan bir onkogen olarak tanımlanmıştır (Tsujimoto 1998). 1988 yılında Vaux ve arkadaşları tarafından bu proteinin anti-apoptotik aktivitesi keşfedilmiştir (Vaux ve ark. 1988). Bundan kısa bir süre sonra ise Bcl-2'nin serum yoksunluğu, ısı şoku ve kemoterapötik reaktifler gibi çeşitli uyaranlar tarafından tetiklenen apoptozu önlediği gösterilmiştir (Tsujimoto 1998). Bcl-2 aşırı düzeyde eksprese olduğu zaman MOM (Mitochondrial outer membrane; mitokondriyal dış zar) permeabilizasyonunu düzenleyen ilgili proteinlere bağlanır ve çeşitli uyaranlara yanıt olarak hücrelerin apoptozu yönelmesini önler (Shamas-Din ve ark. 2013).

2.2.1.2.2. Pro-apoptotik Bcl-2 Proteinleri

Bax (Bcl-2-associated X protein; Bcl-2 ilişkili X proteini), Bak (Bcl-2 antagonist killer; Bcl-2 antagonist öldürücü) ve Bok (Bcl-2 related ovarian killer; Bcl-2 ile ilişkili yumurtalık katili) bu grupta yer alan proteinlerdir. Bunlar korunmuş üç BH domaini içerirler ve bazı anti-apoptotik proteinlerle güçlü bir şekilde etkileşime girerler (Anilkumar ve Prehn 2014). Aktive olan pro-apoptotik proteinler, Bcl-2 veya Bcl-xL ile bağlanmadıkça hücre ölümünü teşvik ederler. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik iki molekül (örneğin; pro-apoptotik bax ve anti-apoptotik Bcl-2) etkilerini harekete geçirmek için eş zamanlı aktive olabildikleri gibi birbirilerinden bağımsız olarak da hareket edebilirler. Yani proteinlerin aktivasyonu aynı zamanda gerçekleşmeyebilir (Kim ve ark. 2011). Bax ve homologu Bak apoptozun mitokondriyal yolunun anahtar düzenleyicileridir. Aktive olan Bax ve Bak, mitokondriyal yüzey üzerinde konformasyonel bir değişime uğrar, oligomerize olur ve hücre ölümüne yol açan sitokrom c salınımına aracılık eder (Cosentino ve Garcia-Saez 2017).

2.2.1.2.3. BH3-only Proteinler

Bim (Bcl-2 interacting mediator; Bcl-2 ile etkileşen aracı), PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis; p53 up-regüle modülatör apoptoz), Bid (BH3 interacting domain death agonist; BH3 ile etkileşen domain ölüm agonisti), Bik (Bcl-2 interacting killer; Bcl-2 ile etkileşen öldürücü), Bad (Bcl-2 associated death promoter; Bcl-2 ilişkili ölüm promotörü),

Bmf (Bcl-2 modifying factor; Bcl-2 değiştirici faktör), Hrk (Hara-kiri) ve Noxa (latince "zarar") bu grupta yer alan proteinlerdir. Bu proteinler sadece bir alanda Bcl-2 ailesi proteinlerinin homolojisine sahip olan BH3 domaini içerirler. Anti-apoptotik ve pro-apoptotik Bcl-2 familyası proteinleri hücrelerde yapısal olarak eksprese edilirken, BH3-only proteinleri apoptotik stres sinyaline yanıt oluşturma sırasında, tipik transkripsiyonla veya translasyon sonrası aktive olur (Anilkumar ve Prehn 2014). Anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerin aksine, BH3-only proteinler hücrede meydana gelen çeşitli stres durumunda (Örn: DNA hasarı, sitokinler ve besin yetersizliği) up-regüle olur ve Bcl-2 benzeri proteinleri engelleyerek Bax ve Bak'ın kısıtlanmasını önler. Böylece hücre ölümünü teşvik etmiş olur. Bunun yanı sıra Bim, Bid ve muhtemelen PUMA' nın da dahil olduğu BH3 proteinlerinin doğrudan Bax ve Bak'ı aktive ederek homo-oligomerleşmeyi ve MOM permeabilizasyonunu hızlandırabileceği bildirilmektedir (Adams ve Cory 2018).

2.2.1.3. p53

p53 (TP53; Tumor Protein p53) apoptoz ile bağlantılı ilk tümör baskılayıcı genidir (Lowe ve Lin 2000). Yaygın olarak "genomun koruyucusu" olarak adlandırılan p53, DNA'daki spesifik tepki öğelerine bağlanır ve genomik stabiliteyi arttırarak tümör oluşumunu inhibe eder (Lakin ve Jackson 1999).

Normal koşullarda, p53 yapısında bulunan poli peptit yarı ömrünün çok kısa olması sebebiyle p53 proteini düşük seviyede eksprese edilmektedir. Ancak DNA hasarı, hipoksi ve nükleotit yoksunluğu dahil olmak üzere bir dizi hücresel stres yanıtında p53 aktivasyonu gerçekleşir ve p53 proteini stres sinyallerine cevap olarak çeşitli mekanizmalarla genomik stabilitenin korunmasına yardımcı olur. S fazına girmeden önce DNA hasarı olduğunda p53, p21'i transkripsiyonel olarak uyararak G1 fazındaki hücre döngüsünü durdurur. DNA onarım sistemleri aktif hale getirilerek hasar giderilir ve hücre döngüsüne devam eder. Hasarın onarılamadığı durumlarda ise apoptoz uyarılır (Kang ve Rosenwaks 2018, Lakin ve Jackson 1999). Bunun yanı sıra aktif p53'ün p21 yokluğunda da hücre döngüsünü durdurduğu veya apoptozu destekleyebildiği belirtilmektedir (Piccolo ve Crispi 2012).

p53 kaybı kanser gelişiminin uyarılmasında esas rol oynar. Çünkü genomu koruyan bu genin yokluğunda hücre artık mutasyonlardan ve genomik sapmalardan yeterince korunamaz (Williams ve Schumacher 2016).

Tümör süpresör protein p53; DNA onarım proteinlerinin aktivasyonu, DNA hasarının tanınmasından sonra G1/S kontrol noktasında durarak hücre büyümesinin engellenmesi, DNA hasarı telafi edilmez ise apoptozun başlatılması gibi çoklu etkileri ile Bcl-2 proteininin düzenlenmesinde de önemli bir rol oynamaktadır (Balasescu ve ark. 2015).

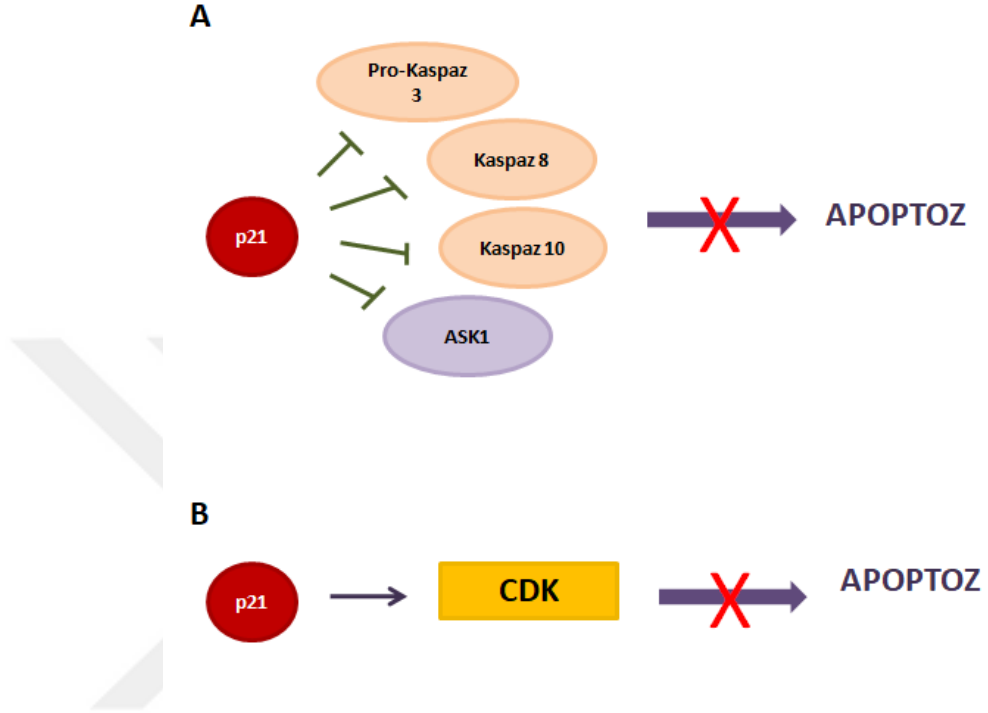
2.2.1.4. p21

p21 (CDKN1A; cyclin dependent kinase inhibitor 1A; siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1A), p53 tarafından transkripsiyonel olarak aktive edilen bir siklin bağımlı kinaz (Cdk) inhibitörüdür. p21; CDK2, CDK1 ve CDK4/6 komplekslerinin aktivitesini fiziksel etkileşimler ile inhibe eder böylece G1 ve S evrelerinde hücre döngüsü sürecinin regülatörü olarak işlev görür (Georgakilas ve ark. 2017).

İlk olarak 1996 yılında p21'in DNA hasarına yanıt olarak anti-apoptotik aktivite gösterebileceği bildirilmiştir (Waldman ve ark. 1996). Daha sonra yapılan çalışmalarda p21 ekspresyonunun, p53'ten bağımsız olarak iki ana mekanizma yoluyla apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir. Pro-Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 10 veya ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase-1; apoptoz sinyal düzenleyici kinaz-1) gibi pro-apoptotik düzenleyici proteinler ile etkileşerek inhibisyon (Şekil 2.4-A) ve CDK'ların kaspaz bağımlı aktivasyonunu hedefleyerek kromatin yoğunlaşması, adezyon kaybı ve hücre büzüşmesi gibi apoptotik olayların inhibisyonu (Dutto ve ark. 2015) (Şekil 2.4-B).

20 yılı aşkın bir süre önce keşfedilmesinin ardından, p21 hakkındaki görüşlere son zamanlarda yapılan çalışmalarla yenileri eklenmiştir. Basitçe bir hücre döngüsü inhibitörü, yaşlanma tetikleyicisi ve tümör süpresör görevlerinin yanı sıra apoptoz, DNA onarımı, aktin sitoskeleton yeniden şekillendirme ve hücre göçü gibi birçok karmaşık hücrel programın düzenleyicisi olduğu düşünülmektedir (Romanov ve Rudolph 2016). Bunun yanı sıra önemli hücrel mekanizmalarda rol oynayan p21, son zamanlarda tümör süpresör işlevlerini kullanabilen ve/veya onkojenik özelliklerini inhibe edebilen yeni bileşiklerin tanımlanması

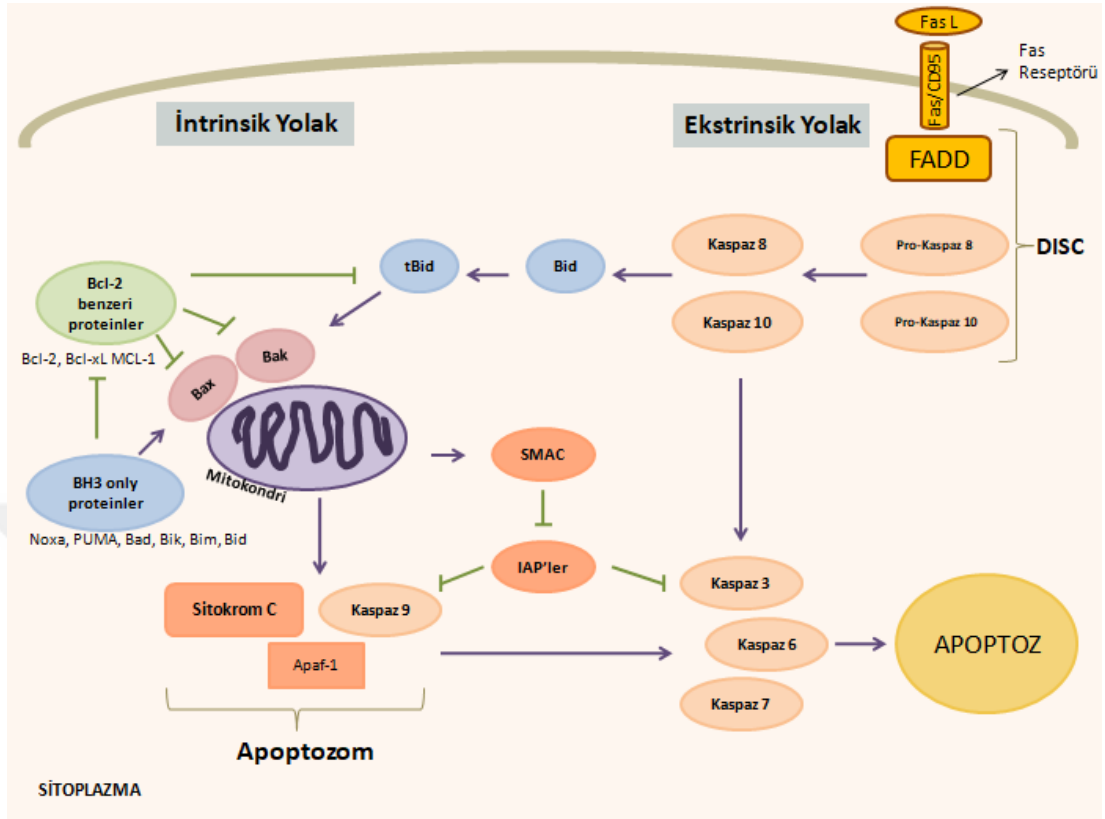
için anti-kanser araştırmalarında umut verici bir hedef olarak görölmektedir (Dutto ve ark. 2015).



Şekil 2.4. Apoptoz mekanizmasında p21'in rolü

2.2.2. Apoptoz Mekanizmaları

Apoptozun genel olarak açıklanan iki başlatma yolu; intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik (ölüm reseptörü aracılığıyla) yolaklardır (Ola ve ark. 2011) (Şekil 2.5).

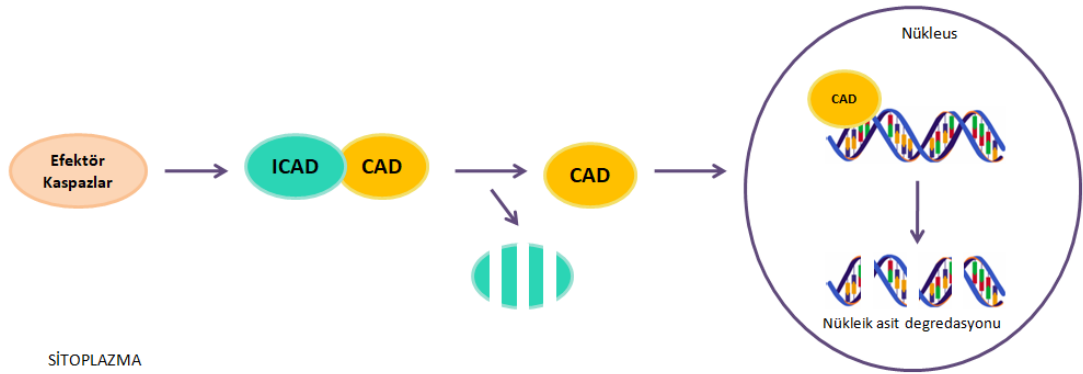


Şekil 2.5. Apoptoz mekanizması

2.2.2.1. İntrinsik Yolak

Mitokondriyal yolak olarak da adlandırılan intrinsik yol, mitokondrinin anahtar rol oynadığı hücre içi sinyaller tarafından tetiklenmektedir (Radha ve Raghavan 2017). Hücre içi sinyaller doğrultusunda pro-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin mitokondriyal apoptoz yolağını aktive etmesi ile apoptoz dahil olmak üzere farklı hücre ölüm yolları aktive olabilmektedir (Anilkumar ve Prehn 2014). Apoptoz da önemli rol oynayan pro-apoptotik Bax ve Bak'ın aktivasyonu için iki model önerilmiştir. 1) Doğrudan aktivasyon modeli; Bax ve Bak aktivasyonunun doğrudan BH3-only proteinlerin neden olduğu konformasyonel değişiklikler yoluyla gerçekleştiği model. 2) Dolaylı aktivasyon modeli; BH3-only proteinlerin anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerine bağlanarak pro-apoptotik Bax ve Bak proteinlerinin serbest bırakılmasını ve aktivasyonunu sağladığı model (Anilkumar ve Prehn, 2014). Bu aktivasyon modelleri sayesinde aktif hale gelen Bax ve Bak, homo-oligomerize

olarak MOM permeabilizasyon sürecini başlatır ve böylece apoptotik kaskattaki downstream olaylarının tetiklenmesinde önemli rol oynayan Smac [(Diablo olarak da bilinir) Second mitochondria-derived activator of caspase; mitokondriyen türevli kaspaz aktivatörü], sitokrom c ve pro-apoptotik moleküller mitokondri gözeneklerinden sitozole salınır (Brunelle ve Letai 2009). Sitokrom c'nin salınımı, önemli hücre proteinleri parçalayan proteazlar olan kaspazların aktivasyonuna yol açar (Brunelle ve Letai 2009). Bu durum hücre büzülmesi, zar kabarcıklaşması, kromatin yoğunlaşması ve nükleer parçalanma gibi birçok morfolojik özelliğin oluşumunu tetikler (Radha ve Raghavan 2017). Sitokrom c, Apaf1 (Apoptotic protease activating factor 1; apoptotik proteaz aktive edici faktör) ve dATP (Deoksiadenozin trifosfat) ile etkileşerek aktive olur ve "apoptozomu" oluşturur. Apoptozom, intrinsik yolağın başlatıcı kaspaz moleküllerini bir araya getiren bir platform oluşturur (Ola ve ark. 2011). Kaspaz 9 aktive olur. Bu durum, hücre proteinleri parçalayan, hücre yıkımını sağlayan efektör Kaspaz 3, Kaspaz 6 ve Kaspaz 7'yi aktive eder (Adams ve Cory 2018) (Şekil 2.5). Aktif durumdaki efektör kaspazlar, CAD (Caspase activated deoxyribonuclease; kaspazla aktive olan deoksiribonükleaz) inhibitörü ICAD (Inhibitor of caspase activated deoxyribonuclease; kaspazla aktive olan deoksiribonükleaz inhibitörü)'ı inaktif hale getirir. Serbest kalan CAD'nin nükleus içine girmesiyle nükleik asitler degrade olur (Şekil 2.6) ve apoptoz gerçekleşir (Güneş 2012).



Şekil 2.6. Nükleik asitlerin degradasyon süreci

2.2.2.2. Ekstrinsik Yolak

Ekstrinsik yolağın aktivasyonu, apoptozu tetikleyen bir ligand, hücre yüzey ölüm reseptörüne bağlandığında gerçekleşir. Apoptozu tetikleyen ligandlar, TNFR (Tumor necrosis factor receptors; tümör nekrozis faktör reseptörü) süper ailesinin ölüm reseptörleri ile etkileşime giren TNF (Tumor necrosis factor; tümör nekroz faktörü)'nin sitokinlerine aittir. TNF süper ailesi sitokinleri membrana bağlanmış veya salgılanmış protein durumundadırlar (Savitskaya ve Onishchenko 2015). TNF α (Tumor necrosis factor alpha; tümör nekroz faktör alfa), FasL, TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; tümör nekrozis faktör ile ilişkili apoptoz uyarıcı ligand), TWEAK (TNF-related weak inducer of apoptosis; apoptozun TNF ile ilişkili zayıf uyarıcısı), RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; nükleer faktör kappa-B ligandının reseptör aktivatörü), APRIL (A proliferation inducing ligand; proliferasyon uyarıcı ligand) ve lenfotoksin- α (LT α) ligandları TNF süper ailesine aittir. FasL selektif olarak Fas'a bağlanır. TRAIL; TRAILR1 (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing Receptor-1; tümör nekrozis faktör ile ilişkili apoptoz uyarıcı ligand reseptör 1), TRAILR2 (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing Receptor-2; tümör nekrozis faktör ile ilişkili apoptoz uyarıcı ligand reseptör 2), TRAILR3 (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing Receptor-3; tümör nekrozis faktör ile ilişkili apoptoz uyarıcı ligand reseptör 3) ve TRAILR4 (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing Receptor-4; tümör nekrozis faktör ile ilişkili apoptoz uyarıcı ligand reseptör 4) olmak üzere dört farklı reseptöre bağlanabilir. TNF α ise iki reseptör ile etkileşir: TNFR1 (Tumor necrosis factor receptor 1; tümör nekrozis faktör reseptörü 1) ve TNFR2 (Tumor necrosis factor receptor 2; tümör nekrozis faktör reseptörü 2) (Savitskaya ve Onishchenko 2015).

FasL tarafından aktive edilen Fas/CD95 reseptörü, FADD/MORT1 (Fas ilişkili ölüm bölgesi) adaptör proteinleri ile etkileşime girer ve bu da hemen başlatıcı Pro-Kaspaz 8 veya Pro-Kaspaz 10 etkileşimini başlatır ve DISC (Death-inducing signaling complex; ölüm uyarıcı sinyal kompleksi) olarak adlandırılan bir kompleks oluşur. Bu kompleksin oluşması Kaspaz 8 ve Kaspaz 10'u aktive eder. Aktive olan Kaspaz 8 ve Kaspaz 10 efektör kaspazları

(Kaspaz 3, 6, 7) etkinleştirir (şekil 2.5) ve nükleik asit degradasyonunu takiben apoptoz gerçekleşir (Wong 2011) (şekil 2.6).

Bunun yanı sıra ekstrinsik yolakta önemli rol oynayan Kaspaz 8 ve Kaspaz 10, Bid proteinini parçalayarak aktif tBid (Truncated Bid; kesilmiş Bid) retir ve böylece tBid, dış mitokondriyal membrana dahil olan ve mitokondriyal yolla apoptozu uyarın Bax'ı aktive eder. Aktive olan Bax apoptotik kaskat downstream olaylarını tetikleyerek apoptozun gerçekleşmesini sağlar (Ott ve ark. 2009) (şekil 2.5).

2.2.3. Kanser ve Apoptoz

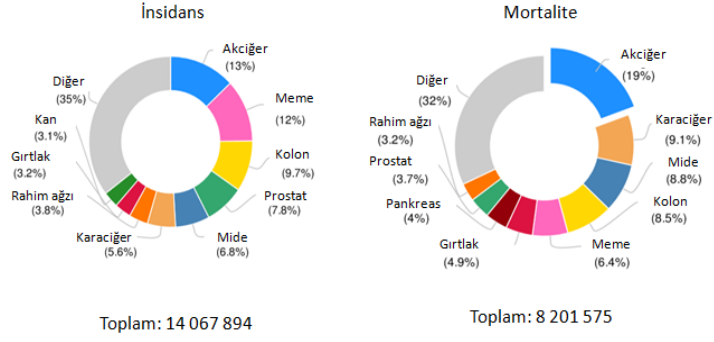
Normal bir hücrede proliferasyon (hücre çoğalması), apoptoz (hücre ölümü) ile dengelenmiştir. Homeostazisi sağlayan bu dengenin değişmesi çok önemli sağlık sorunlarına neden olabilmektedir. Nitekim kanserde de apoptotik sinyalleşmenin bastırılması ile değişen proliferasyon-apoptoz dengesinin karsinogenezise ve tümör ilerlemesine neden olduğu bildirilmektedir (Hata ve ark. 2015). Dolayısıyla kanserde apoptoz mekanizması ile ilgili çalışmalar büyük önem arz etmektedir (Mohamed ve ark. 2017).

Kanser gelişimi, başlatıcı mutasyonlar ile başlar ve aşamalı olarak ortaya çıkan birçok adım ile devam eder. Bu aşamalı adımlar sırasında kanser hücreleri, hücrelere hayatta kalma ve çoğalma avantajı kazandıran bir dizi genetik değişiklik meydana getirir (Fernald ve Kurokawa, 2013). Ayrıca kanser hücreleri, gelişme süreci boyunca anormal veya hasar görmüş hücreleri ortadan kaldırmak için apoptoz ile karşılaşırlar. Apoptoz ile karşılaşın kanserli hücreler, Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonu ile veya Bax, Bak gibi pro-apoptotik proteinlerin down-regülasyonu veya mutasyonu ile apoptosise direnç kazanabilmek için çeşitli stratejiler uygularlar (Hassan ve ark. 2014). Kanser hücreleri bu stratejileri uygularken apoptotik yolları transkripsiyonel, translasyonel ve posttranslasyonel (translasyon sonrası modifikasyon örneğin; fosforilasyon) olarak modüle edebilirler. Ayrıca alternatif olarak, anti-apoptotik veya pro-apoptotik proteinleri stabilize ederek veya destabilize ederek de apoptozu inhibe edebilirler (Fernald ve Kurokawa 2013). Böylece aşını proliferasyon gösterirler ve zorlu koşullar altında (hipoksi ve stres gibi) bile hayatta kalarak terapötik ajanlara karşı direnç sağlarlar (Matsuura ve ark. 2016).

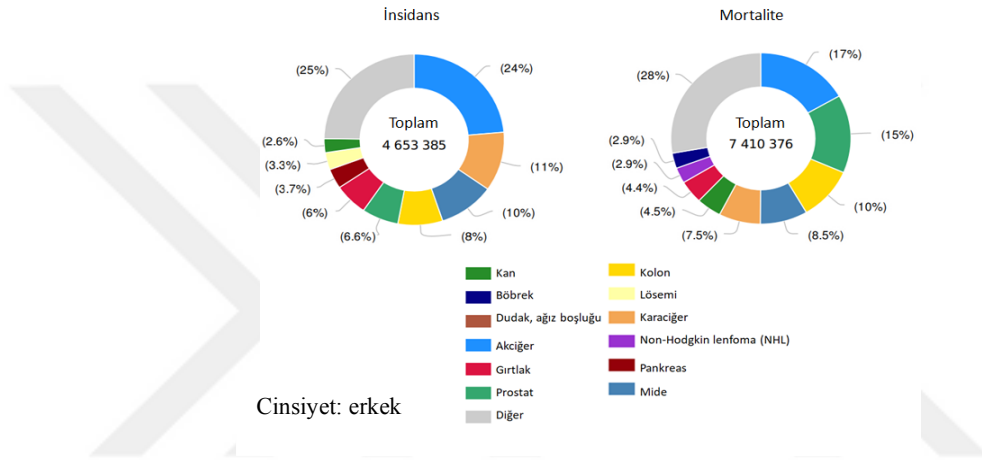
2.2.3.1. Akciğer Kanseri ve Apoptoz

Akciğer kanseri, akciğer dokusunda kontrolsüz hücre büyümesi ile karakterize malign tümörler ile oluşan kanser türüdür. Birden fazla alt tip vardır, ancak 2 ana alt tipe ayrılabilir; küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC: non-small-cell lung cancer) ve küçük hücreli (SCLC: small-cell lung cancer) akciğer kanseri. Çalışmalar, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %80-85'lik oranla daha yaygın akciğer kanseri türü olduğunu göstermektedir (Cho 2017). Uluslararası kanser araştırma ajansı 2012 verilerine göre akciğer kanseri genel popülasyonda en yüksek insidans (%13) ve mortalite (%19) oranları ile dünya çapında en önemli ölüm nedenlerinden biridir (Şekil 2.7). Erkeklerde tüm kanser türleri arasında en yüksek insidans ve mortalite oranı ile ilk sıradadır (Şekil 2.8). Kadınlar da ise üçüncü en yüksek insidans ve ikinci en yüksek mortalite oranına sahiptir (Şekil 2.9) (International Agency for Research on Cancer 2018).

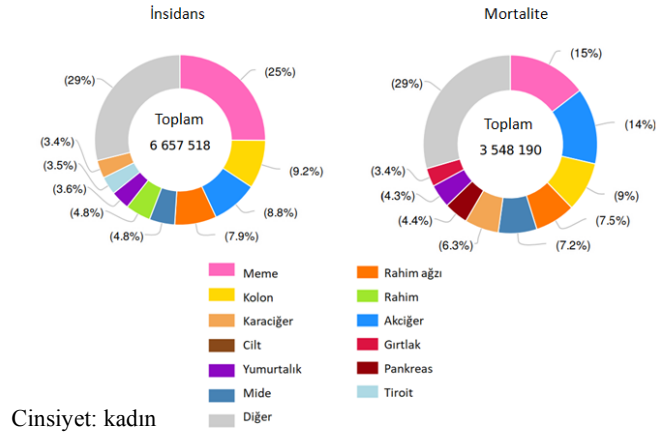
Apoptoz normal koşullar altında tümör oluşumunu önlemeye yönelik bir koruma mekanizmasını temsil etmektedir. Apoptozdan kaçınma kanserlerin karakteristik özelliklerinden biridir. Baskılanmış hücre ölümü sadece kanser oluşumuna katkıda bulunmakla kalmaz aynı zamanda kanserin ilerlemesine ve tedavi direncine de neden olur. Düzenli apoptoz çoğu anti-kanser terapisinin terapötik etkinliği için kritik önem taşımaktadır. Dolayısıyla kanser oluşumunda rol oynayan mekanizmaların daha iyi anlaşılması ve bu mekanizmalardaki düzensizliğin giderilmesine yönelik yapılan çalışmalar kanser tedavisi için umut vaat edici gözükmektedir (Fulda 2015).



Şekil 2.7. Genel popülasyonda akciğer kanseri insidans ve mortalite oranları (International Agency for Research on Cancer 2018).



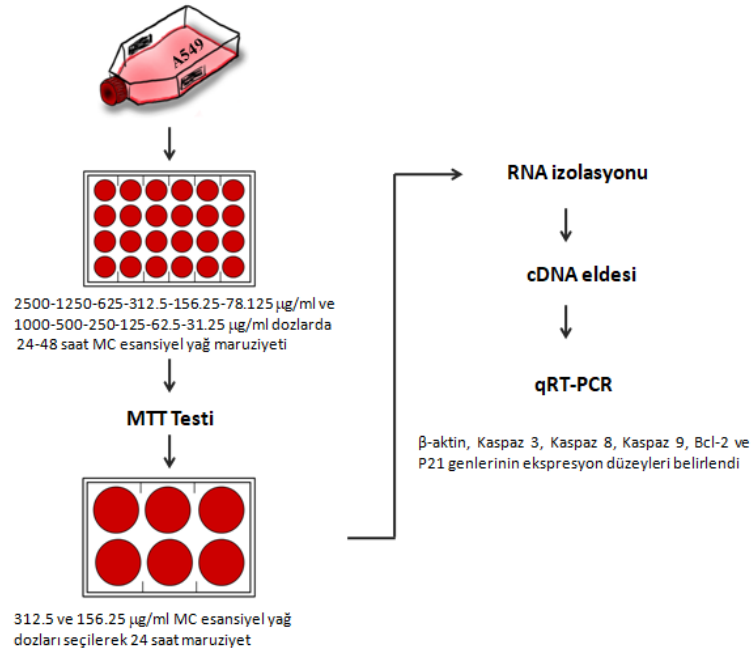
Şekil 2.8. Erkeklerde akciğer kanseri insidans ve mortalite oranları (International Agency for Research on Cancer 2018).



Şekil 2.9. Kadınlarda akciğer kanseri insidans ve mortalite oranları (International Agency for Research on Cancer 2018).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

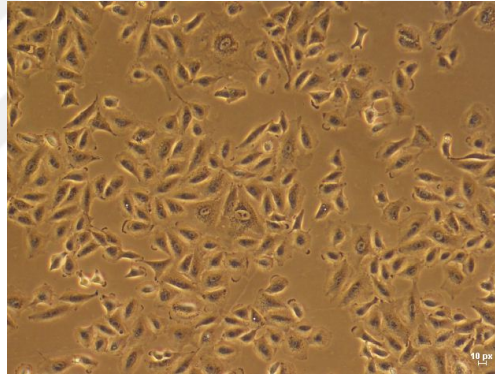
Deney akış prosedürü: adenokarsinomik insan alveol epitel hücre dizileri olan A549 hücreleri uygun koşullarda çoğaltılarak kültüre edildi. Ardından deneylerde kullanılmak üzere 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde 24 kuyucuklu 'plate'lere ekim yapıldı. Hücreler kültür kaplarının yüzeyini %70-80 oranında kapladıktan sonra, hücrelerin üzerine %10 FBS (Fetal bovine serum; fetal sığır serumu) içeren vasatın yerine serumsuz vasat eklenerek 24 saat süreyle bu koşullarda inkübe edildi. Hücreler 24 saatin sonunda 2500-1250-625-312.5-156.25-78.125 $\mu\text{g/ml}$ ve 1000-500-250-125-62.5-31.25 $\mu\text{g/ml}$ dozlarda MC esansiyel yağı ile 24 ve 48 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süreleri sonunda MTT testi yapıldı ve % inhibisyon oranları belirlendi. IC_{50} (hücrelerin yarısını öldüren konsantrasyon) değerinin altındaki sitotoksik olmayan konsantrasyonlar saptandı. Hücreler belirlenen uygun dozlar ve sürede MC esansiyel yağ ile muamele edilerek RNA izolasyonu ve cDNA eldesi gerçekleştirildi. Daha sonra real-time PCR (qRT-PCR) yardımıyla apoptoz yolağında rol alan genlerden Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9, Bcl-2 ve p21'in ekspresyon düzeyleri belirlendi (Şekil 3.1). Tüm deneyler 3 set olarak çalışıldı.



Şekil 3.1. Deney akışı

3.1. Hücre Kültürü

Mustafa Kemal Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı hücre kültürü laboratuvar stoğundan temin edilen A549 hücre dizileri, *in vitro* çalışmalarda yaygın olarak kullanılan adenokarsinomik insan alveol epitel hücre dizileridir. Deneylerde kullanılacak olan A549 hücre dizileri 175 cm²'lik kültür kaplarında (flask) %10 FBS (Gibco, USA) ve %1 penisilin/streptomisin (Gibco, USA) içeren Dulbecco Modifiye Edilmiş Vasatta (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, Gibco, UK) %95 nem, %5 CO₂ ve 37°C sağlayan inkübatörde kültüre edildi. Kültür vasatı haftada iki kez değiştirildi ve hücreler yeterli sayıya ulaştıklarında deneylerde kullanıldı.



Şekil 3.2. A549 hücrelerinin görünümü

3.2. *Myrtus communis* L. Esansiyel Yağ Dozlarının Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak MC esansiyel yağı Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden temin edildi. MC esansiyel yağı 2500-1250-625-312.5-156.25-78.125 µg/ml ve 1000-500-250-125-62.5-31.25 µg/ml dozlarda az miktarda DMSO (Dimethyl Sulfoxide, SİGMA) içeren serumsuz DMEM vasat içinde hazırlanıp deneylerde kullanıldı.

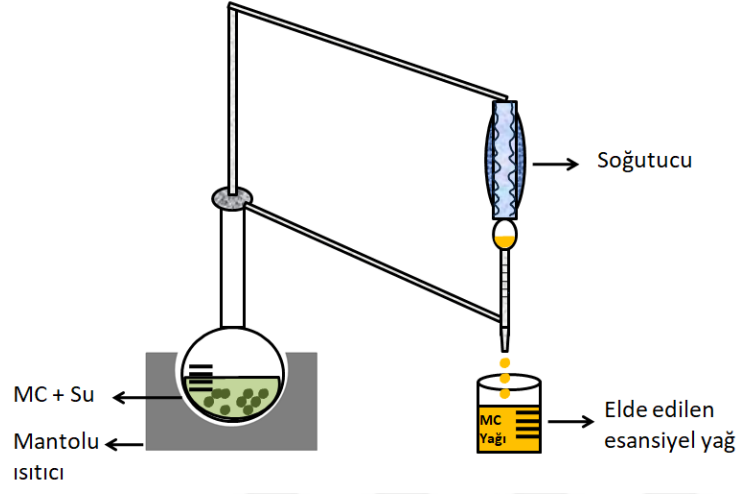
Dimetil sülfoksitin %0.25 üzerindeki konsantrasyonunun sitotoksik olduğu belirtilmektedir (Borel 1976). Çalışmada kullanılan en yüksek konsantrasyonda (2500 µg/ml) DMSO dozu %0.25 oranında olup diğer dozlarda seri dilüsyon ile her seferinde

yarıya düşmektedir. Dolayısıyla kullanılan doz sitotoksik olmadığı için gruplar arasına ayrıca DMSO muamelesi yapılan bir kontrol grubu (vehicle kontrol grubu) eklenmemiştir.

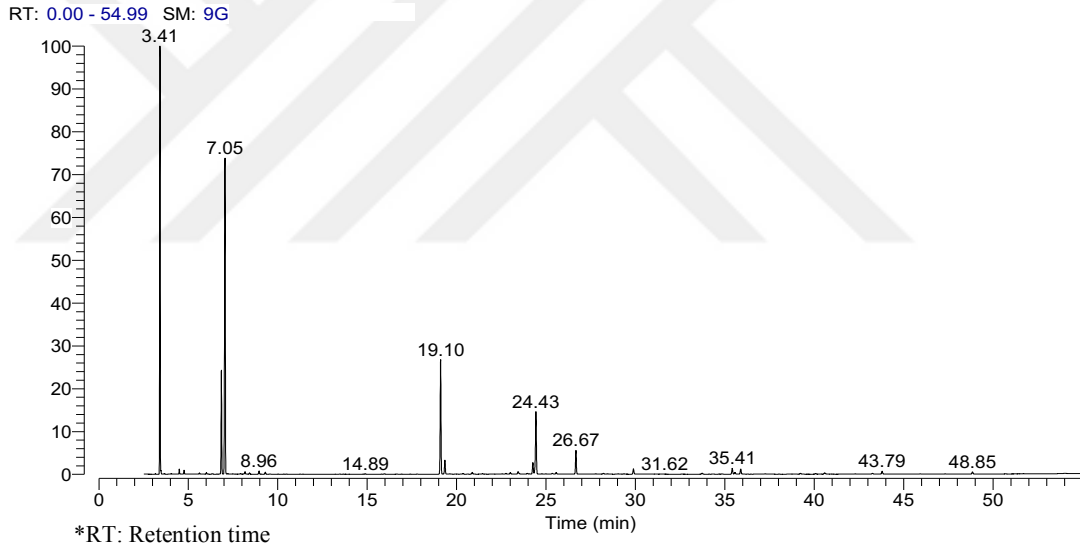
3.3. *Myrtus communis* L. Esansiyel Yağ Eldesi ve Kimyasal Kompozisyonları

Myrtus communis L. etken madde miktarlarının en yoğun olduğu dönem olan tam çiçeklenme döneminde Hatay ilinde hasat edilmiş ve kurutma fırınlarında 35°C sabit sıcaklıkta kurutulduktan sonra Neo-clevenger aparat ile hidrodistilasyon yöntemiyle esansiyel yağ oranları belirlenmiştir. Bunun için 100 g kuru bitki örneği clevenger cihazının balonuna konulduktan sonra balona bitki miktarının 10 katı kadar (1000 ml) saf su ilave edilerek mantolu ısıtıcı üzerinde balon içeriği kaynatılmıştır. Kaynama sırasında, esansiyel yağlar su buharı ile birlikte buharlaşarak balonun üstüne monte edilmiş olan ve soğuk su sirkülasyonu ile soğutulan soğutucuya sürüklenmiştir. Soğutucuya çarpan buhar yoğunlaşarak damla damla toplama ünitesinde birikmiştir. Hidrodistilasyona, bitkisel materyal kaynamaya başladıktan sonra 3 saat süreyle devam edilmiş ve sürenin sonunda toplama ünitesinde biriken uçucu yağ koyu renkli küçük şişelere alınmıştır (Şekil 3.3).

Elde edilen uçucu yağların kimyasal kompozisyonları GC-MS (Gas chromatography-mass spectrometry; gaz kromatografisi-kütle spektrometresi) ile analiz edilerek belirlenmiştir. Bu analizlerde kapiler kolon (TG-Wax 30m x 25 µm) ve mass dedektör kullanılmıştır. İyonizasyon için kullanılan enerji 70 eV olup, helyum gazı taşıyıcı gaz (1 ml/dk) olarak kullanılmıştır. Enjektör ve MS (Mass spectrometry; kütle spektrometresi) geçiş hattı sıcaklık değerleri sırasıyla 250 ve 220 °C'dir. Kolon sıcaklığı ise başlangıçta 50°C'de 3°C/dk ısı artış oranı ile 220°C'ye kadar yükselmiştir. Uçucu yağ örnekleri cihaza otomatik enjeksiyonla 1 µl verilmiştir.



Şekil 3.3. Clevenger cihazı ile uçucu yağ eldesi



Şekil 3.4. MC esansiyel yağının GC-MS kromatogramı

Çizelge 3.1. MC esansiyel yağının kimyasal kompozisyonları

RT	Bileşen Adı	SI	RSI	Cas #	% Alan
3,41	α -Pinene	985	986	80-56-8	29,56
4,49	Isobutylisobutyrate	991	992	97-85-8	0,34
4,76	β -Pinene	983	993	127-91-3	0,28
6,01	Myrcene	973	981	123-35-3	0,11
6,85	Limonene	980	995	138-86-3	8,16
7,05	Eucalyptol	989	989	470-82-6	31,20
8,17	γ -Terpinene	960	977	99-85-4	0,26
8,42	Ocimene	973	983	3779-61-1	0,10
8,96	p-Cymene	964	964	99-87-6	0,30
9,3	Terpinolene	933	934	586-62-9	0,18
19,1	Linalool	982	982	78-70-6	11,76
19,34	Linalylacetate	982	984	115-95-7	1,46
20,87	Terpinen-4-ol	979	981	562-74-3	0,20
23	α -Humulene	966	972	6753-98-6	0,18
23,44	Estragole	978	988	140-67-0	0,33
23,95	trans-Sabinol	885	890	471-16-9	0,10
24,27	α -Terpinylacetate	968	985	80-26-2	1,17
24,43	α -Terpineol	991	993	98-55-5	7,19
25,35	2-Hydroxycineol	839	874	18679-48-6	0,12
25,57	Nerylacetate	955	959	141-12-8	0,19
26,67	Geranylacetate	991	991	105-87-3	2,44
28,21	Nerol	969	976	106-25-2	0,10
29,89	Geraniol	971	972	106-24-1	0,61
33,72	Caryophylleneoxide	956	978	1139-30-6	0,12
35,41	Anisylacetone	953	960	104-20-1	0,68
35,56	Humuladienone	838	859	NA	0,21
35,89	Cinerolone	787	892	17190-74-8	0,60
39,23	1,2,4-Cyclopentanetrione, 3-(2-pentenyl)-	767	864	54644-27-8	0,11
40,58	Docosane, 11-decyl-	643	644	55401-55-3	0,19
43,26	Caryophylleneoxide	873	897	1139-30-6	0,11
43,79	Methyl 4-[(2E)-3',7'-dimethyl-5'-oxo-3',6'-octadienyl]oxy]-3-hydroxybenzoate	609	933	NA	0,35
48,85	Pyrrolidine, 1-(1,6-dioxooctadecyl)-	660	733	56630-89-8	0,26

*RT: Retention time

3.4. MTT Testi

MTT testi için hücreler, 24 kuyucuklu 'plate'lere %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM vasatta 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde ekildi ve %95 nem, %5 CO₂ ve 37°C sağlayan inkübatör koşullarında inkübe edildi. Hücreler kültür kaplarının yüzeyini %70-80 oranında kapladıktan sonra, hücrelerin üzerine %10 FBS içeren vasatın yerine serumsuz vasat eklenerek 24 saat süreyle bu koşullarda inkübe edildi. Hücreler 24 saatin sonunda 2500-1250-625-312.5-156.25-78.125 µg/ml ve 1000-500-250-125-62.5-31.25 µg/ml MC esansiyel yağ ile 24 ve 48 saat süreyle muamele edildi. 24 ve 48 saatlik süreler sonunda aşağıdaki adımlar takip edildi.

1. 1 mg/ml MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Sigma-Aldrich, USA) solüsyonu hazırlandı.
2. 24 kuyucuklu 'plate'deki mevcut solüsyon vakumlandı ve her bir kuyuya 500 µl MTT solüsyonu eklendi.
3. 4 saat 37 °C'de inkübe edildi.
4. İnkübasyon süresi sonunda plate içindeki MTT solüsyonu döküldü ve bir peçete üzerinde 2-3 dk bekletildi.
5. Her bir kuyuya 500 µl DMSO eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
6. Renkteki değişim kolorimetrik bir okuyucu olan spektrofotometrede 590 nm'de 670 nm referans dalga boyuna karşı okutuldu.
7. Aşağıdaki formül kullanılarak % inhibisyon oranları belirlendi.

Hücre canlılığının % inhibisyonu= $100 - (M_{god} \times 100 / K_{god})$

M_{god}: MC-uygulama grubu optik dansite

K_{god}: Kontrol grubu optik dansite

8. IC₅₀ değerinin altında kalan sitotoksik olmayan dozlar (312.5 ve 156.25ug/ml) ve uygun muamele zamanı (24 saat) seçilerek çalışmalar devam ettirildi.

3.5. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için hücreler 6 kuyucuklu 'plate'lere %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM vasatta 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde ekildi ve %95 nem, %5 CO₂ ve 37°C sağlayan inkübatör koşullarında inkübe edildi. Hücreler kültür kaplarının yüzeyini %70-80 oranında kapladıktan sonra, hücrelerin üzerine %10 FBS içeren vasatın yerine serumsuz vasat eklenerek 24 saat süreyle bu koşullarda inkübe edildi. 24 saat sonra hücreler 312.5-156.25 µg/ml dozlarda MC esansiyel yağ ile muamele edildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra hücreler tripsin yardımıyla kaldırıldı ve 3000 rpm (Revolutions per minute; dakikadaki devir sayısı)'de 5 dk santrifüj edildi. Üst faz uzaklaştırılarak hücre pelletinin üzerine 700 µl QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN, USA) eklenerek homojenize edildi daha sonra RNeasy Mini Kit (Katalog no: 217004, QIAGEN, Germany) ile üretici firmanın protokolüne uygun olarak RNA izolasyonu yapıldı.

RNA izolasyonu aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir;

1. Homojenize edilmiş hücreler 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
2. Süre sonunda hücrelerin üzerine 140 µl kloroform eklendi ve kuvvetlice çalkalandı.
3. 2-3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
4. 4°C, 12.000 x g (g-force; g kuvveti veya RCF: Relative centrifugal force; nispi merkezkaç kuvveti)'de 15 dk santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası tüpte 3 faz (üst faz RNA, orta faz DNA, alt faz protein ve lipit) oluştu. Üst faz (RNA tabakası) dikkatli bir şekilde yeni bir tüpe alındı. Üzerine 1.5 hacim % 100 etanol eklendi ve pipetle iyice karıştırıldı.
6. Tüp içindeki RNeasy Mini column içine hiç bir çökelti içermeyen 700 µl örnek eklendi ve oda sıcaklığında 15 sn (saniye), 8000 x g'de santrifüj edildi. Alt faz atıldı.
7. RNeasy Mini columna 700 µl RWT buffer eklendi. Oda sıcaklığında 15 sn, 8000 x g'de santrifüj edildi. Alt faz atıldı.
8. RNeasy Mini columna 500 µl RPE Buffer eklendi. Oda sıcaklığında 15 sn, 8000 x g'de santrifüj edildi. Alt faz atıldı.

9. RNeasy Mini columnna 500 µl RPE Buffer eklendi. Oda sıcaklığında 2 dk, 8000 x g'de santrifüj edildi.

10. Yeni 2 ml toplama tüp içine RNeasy Mini column yerleştirildi. Membranın kuruması için oda sıcaklığında 1 dk, 10.000 x g'de santrifüj edildi.

11. RNeasy mini column yeni bir tüpe aktarıldı ve membran üzerine doğrudan 50 µl RNase-free su eklendi. Oda sıcaklığında 1 dk, 8000 x g santrifüj edildi.

12. Bir önceki adım RNase-free su 20 µl olacak şekilde tekrarlandı.

Elde edilen RNA'ların kalite ve miktar tayini MultiskanGo (Thermo Scientific) cihazı kullanılarak yapıldı. RNA'lar 0.1 µg/µl olacak şekilde dilüe edilerek cDNA sentezi için kullanıldı. Kalan stok RNA'lar -80°C' de saklandı.

3.6. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'lardan cDNA sentez kiti (High Capacity cDNA, Reverse Transcription Kit, applied biosystems by Thermo Fisher Scientific, Lithuania) kullanılarak cDNA eldesi gerçekleştirildi. cDNA sentezinde kullanılan karışım aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 3.2. cDNA sentezinde kullanılan karışım ve oranları

10X RT Buffer	2 µl
25X dNTP	0.8 µl
10X RT Random Primer	2 µl
Reverse Transcriptase	1 µl
Nuclease-Free Water	4.2 µl

Toplam 20 µl olacak şekilde çizelge 3.2'de belirtilen cDNA karışımı (10 µl), 10 µl dilüe RNA ile birleştirildi. Ardından reverse transkripsiyon işlemi Thermal Cycler (T100, BİO-RAD) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon koşulları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 3.3. cDNA reaksiyon koşulları

Sıcaklık (°C)	Zaman (Dk)
25	10
37	120
85	5
4	~

Elde edilen cDNA örnekleri üzerine 80 µl Nuclease-free su eklenerek dilüe edildi ve toplam 100 µl olan cDNA'lar -20°C'de saklandı.

3.7. Real Time PCR Analizi

Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9, Bcl-2, p21 genleri ve 'ev' (housekeeping) geni β -aktin (RT² qPCR Primer Assay QIAGEN, USA) genlerinin gen transkripsiyon düzeyleri 'real time' PCR (qRT-PCR) yöntemiyle (QIAGEN Rotor-Gene Q, Germany) belirlendi. qRT-PCR'da kullanılan karışım aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 3.4. qRT-PCR'da kullanılan karışım ve oranları

qPCR Mastermix (Luminaris Color HiGreen Low ROX qPCR Master Mix, Thermo Scientific)	7.5 µl
Primer (10 µM stok) (QIAGEN, USA)	1 µl
Nuclease Free Water	5 µl

Reaksiyon toplam 15 µl olacak şekilde; 13.5 µl qRT-PCR karışımı + 1.5 µl cDNA ile birleştirilerek QIAGEN Rotor-Gene Q cihazında gerçekleştirildi. Reaksiyon koşulları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 3.5. qRT-PCR reaksiyon koşulları

Aşama	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
UDG pre-treatment	50	2 dk	1
Initial denaturation	95	10 dk	1
Denaturation	95	15 sn	40
Anneling and extention	60	1 dk	40

* UDG: Uracil-DNA glycosylase

3.8. İstatistiksel Analizler

Çalışmanın MTT analiz sonuçları GraphPad Prism Version 5.01 (GraphPad Software Inc., USA) programı kullanılarak yapıldı. Gruplar içindeki verilerin normal dağılıma uyup uymadığı Shapiro-Wilk testi ile belirlendi. Gruplar arasında farklılığın olup olmadığı Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. Gruplar arasındaki anlamlılığın hangileri arasında olduğunun belirlenmesinde Dunn's Multiple Comparison Test kullanıldı. Her test grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldı ve $p < 0,05$ 'den küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama (ort)±standart sapma olarak ifade edildi.

QIAGEN Rotor-Gene Q cihazında yapılan ekspresyon verilerinin analizi RT² profiler PCR Array Data Analysis version 3.5 ile yapıldı ve tüm grafiker GraphPad Prism 5.01 ile oluşturuldu. β -aktin "housekeeping gen" olarak normalizasyonda kullanıldı. Gen ekspresyon analizleri Fold change (kat değişimi) olarak ifade edildi.

4. BULGULAR

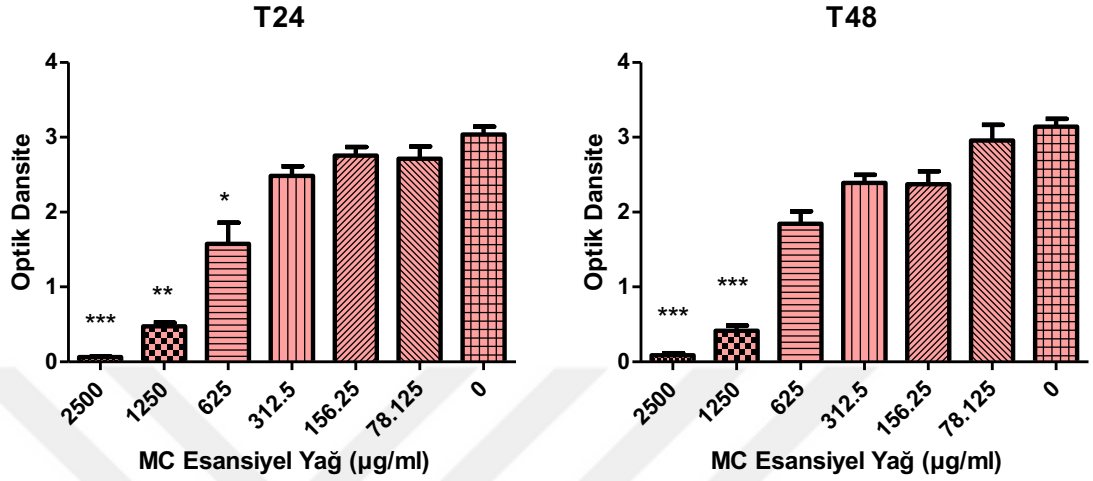
4.1. *Myrtus communis* L. Esansiyel Yağının (2500 µg/ml-78.125 µg/ml) Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Myrtus communis L. esansiyel yağının 2500 µg/ml ve 78.125 µg/ml konsantrasyon aralıklarında A549 hücre canlılığı üzerine etkilerine bakıldığında; 24 saatlik süre sonunda, 2500-1250-625 µg/ml dozlarda hücre canlılığını anlamlı bir şekilde baskıladığı görüldü. 48 saatlik süre sonunda ise, 2500 ve 1250 µg/ml dozlarda hücre canlılığını anlamlı bir şekilde baskıladığı görüldü (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1).

Çizelge 4.1. 2500 µg/ml-78.125 µg/ml konsantrasyon aralıklarında 'optik dansite' nin ortalama±standart sapma değerleri

MC Esansiyel Yağ Konsantrasyonu	Ortalama±Standart Sapma	
	T24	T48
2500 µg/ml	0.06493±0.01557***	0.08696±0.08167***
1250 µg/ml	0.4753±0.1320**	0.4156±0.1960***
625 µg/ml	1.574±0.8023*	1.845±0.4764
312.5 µg/ml	2.485±0.3562	2.390±0.3081
156.25 µg/ml	2.755±0.3314	2.371±0.4982
78.125 µg/ml	2.716±0.4576	2.959±0.5802
Kontrol (0)	3.038±0.2894	3.140±0.2980

İstatistiksel önem *<0.05, **<0.01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir.



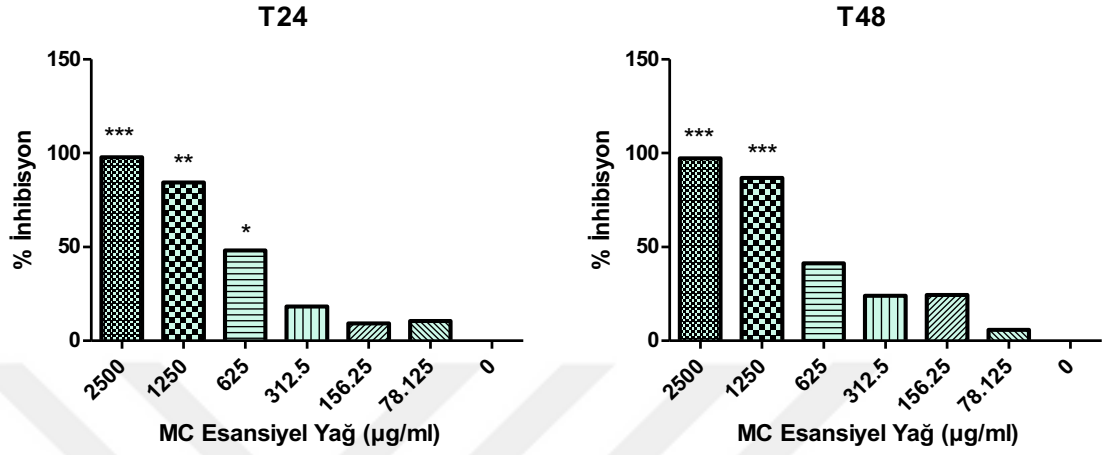
Şekil 4.1. MC esansiyel yağının 2500 µg/ml-78.125 µg/ml konsantrasyon aralıklarında A549 hücre canlılığı üzerine etkisi

Myrtus communis L. esansiyel yağının 2500 µg/ml ve 78.125 µg/ml konsantrasyon aralıklarında A549 hücrelerinde % inhibisyona etkilerine bakıldığında; 24 saatlik süre sonunda, 2500-1250 ve 625 µg/ml dozlarda % inhibisyon sırasıyla 97.8-84.3 ve 48.1 değerleri ile anlamlı gözlemlendi. 48 saatlik süre sonunda ise, 2500 ve 1250 µg/ml dozlarda % inhibisyon sırasıyla 97.2 ve 86.7 değerleri ile anlamlı gözlemlendi (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2).

Çizelge 4.2. 2500 µg/ml-78.125 µg/ml konsantrasyon aralıklarında % inhibisyon oranları

MC Esansiyel Yağ Konsantrasyonu	% İnhibisyon Oranı	
	T24	T48
2500 µg/ml	97.8***	97.2***
1250 µg/ml	84.3**	86.7***
625 µg/ml	48.1*	41.2
312.5 µg/ml	18.2	23.8
156.25 µg/ml	9.3	24.4
78.125 µg/ml	10.5	5.7
Kontrol (0)	0	0

İstatistiksel önem *<0.05, **<0.01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir.



Şekil 4.2. A549 hücrelerinde MC esansiyel yağının 2500 µg/ml-78.125 µg/ml konsantrasyon aralıklarında % inhibisyon grafiği

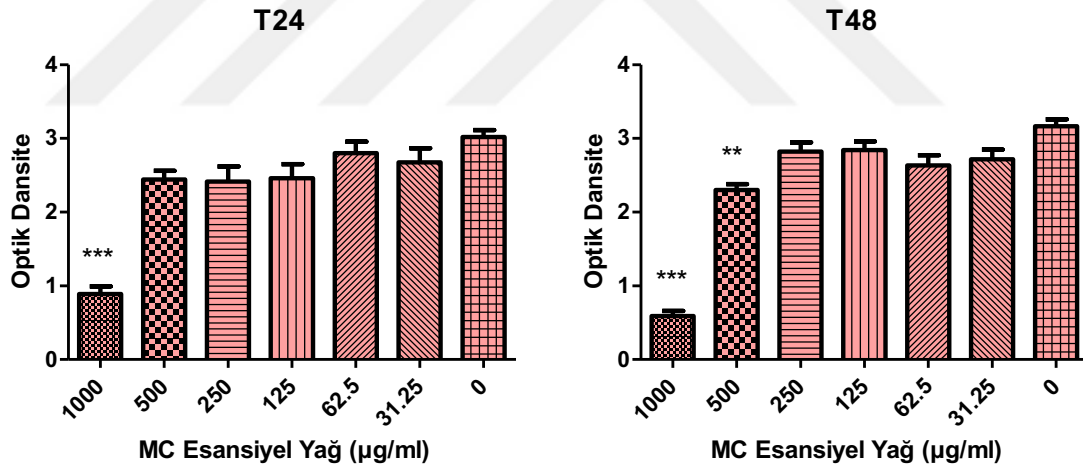
4.2. *Myrtus communis* L. Esansiyel Yağının (1000 µg/ml-31.25 µg/ml) Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Myrtus communis L. esansiyel yağının 1000 µg/ml ve 31.25 µg/ml konsantrasyon aralıklarında A549 hücre canlılığı üzerine etkilerine bakıldığında; 24 saatlik süre sonunda 1000 µg/ml dozda hücre canlılığını anlamlı bir şekilde baskıladığı görüldü. 48 saatlik süre sonunda ise, 1000 ve 500 µg/ml dozlarda hücre canlılığını anlamlı bir şekilde baskıladığı görüldü (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3).

Çizelge 4.3. 1000 µg/ml-31.25 µg/ml konsantrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değerleri

MC Esansiyel Yağ Konsantrasyonu	Ortalama±Standart Sapma	
	T24	T48
1000 µg/ml	0.8884±0.3030***	0.5923±0.1952***
500 µg/ml	2.446±0.3305	2.301±0.2312**
250 µg/ml	2.414±0.5849	2.821±0.3586
125 µg/ml	2.462±0.5362	2.844±0.3305
62.5 µg/ml	2.800±0.4474	2.636±0.3934
31.25 µg/ml	2.674±0.5471	2.718±0.3802
Kontrol (0)	3.022±0.2645	3.163±0.2818

İstatistiksel önem *<0.05, **<0.01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir.



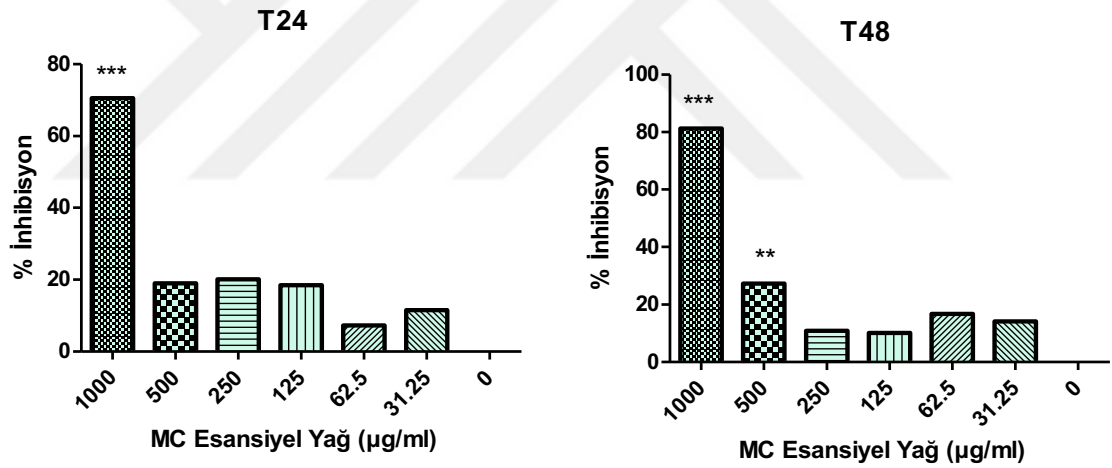
Şekil 4.3. MC esansiyel yağının 1000 µg/ml-31.25 µg/ml konsantrasyon aralıklarında A549 hücre canlılığı üzerine etkisi

Myrtus communis L. esansiyel yağının 1000 µg/ml ve 31.25 µg/ml konsantrasyon aralıklarında A549 hücrelerinde % inhibisyona etkilerine bakıldığında; 24 saatlik süre sonunda, 1000 µg/ml dozda % inhibisyon 70.5 değeri ile anlamlı gözlemlendi. 48 saatlik süre sonunda ise 1000 ve 500 µg/ml dozlarda % inhibisyon sırasıyla 81.2 ve 27.2 değerleri ile anlamlı gözlemlendi (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4).

Çizelge 4.4. 1000 µg/ml-31.25 µg/ml konsantrasyon aralıklarında % inhibisyon oranları

MC Esansiyel Yağ Konsantrasyonu	% İnhibisyon Oranı	
	T24	T48
1000 µg/ml	70.5***	81.2***
500 µg/ml	19.0	27.2**
250 µg/ml	20.1	10.8
125 µg/ml	18.5	10.0
62.5 µg/ml	7.3	16.6
31.25 µg/ml	11.5	14.0
Kontrol (0)	0	0

İstatistiksel önem * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 şeklinde gösterilmiştir.

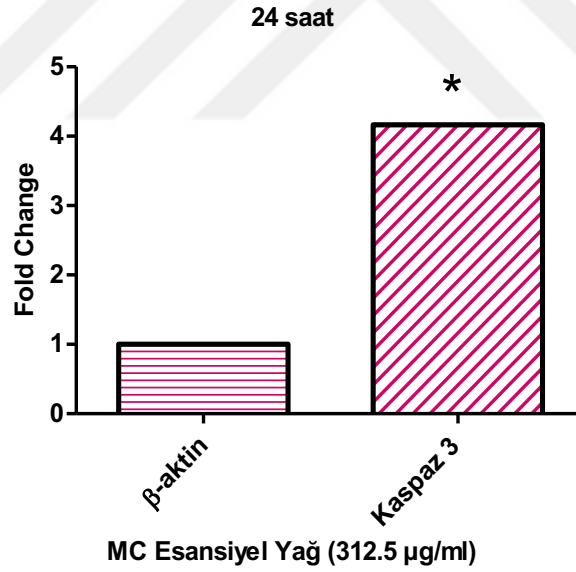


Şekil 4.4. A549 hücrelerinde MC esansiyel yağının 1000 µg/ml-31.25 µg/ml konsantrasyon aralıklarında % inhibisyon grafiği

4.3. *Myrtus communis* L. Esansiyel Yağının Apoptoz Mekanizmasında Rol Alan Genlerin Ekspresyonu Üzerine Etkileri

4.3.1. *Myrtus communis* L. Esansiyel Yağının (312.5 µg/ml) Kaspaz 3 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi

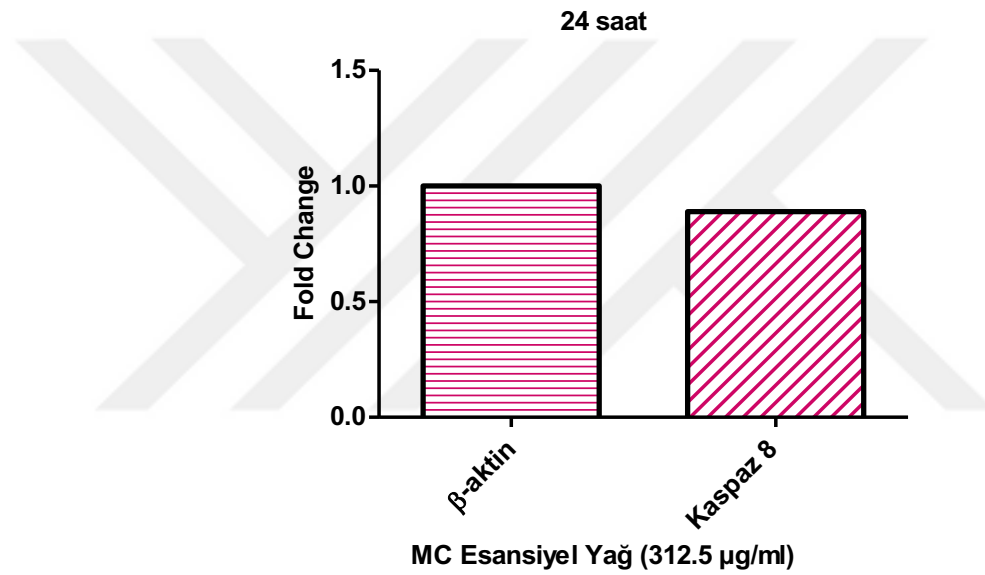
A549 hücrelerinde 24. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MC esansiyel yağının 312.5 µg/ml dozunda Kaspaz 3 geninin ekspresyon seviyesinin anlamlı bir şekilde arttığı görüldü (p:0.0129) (Şekil 4.5). İstatistiksel önem $* < 0.05$, $** < 0.01$, $*** < 0.001$ şeklinde gösterilmiştir.



Şekil 4.5. MC esansiyel yağının (312.5 µg/ml) Kaspaz 3 geninin ekspresyonu üzerine etkisi

4.3.2. *Myrtus communis* L. Esansiyel Yağının (312.5 µg/ml) Kaspaz 8 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi

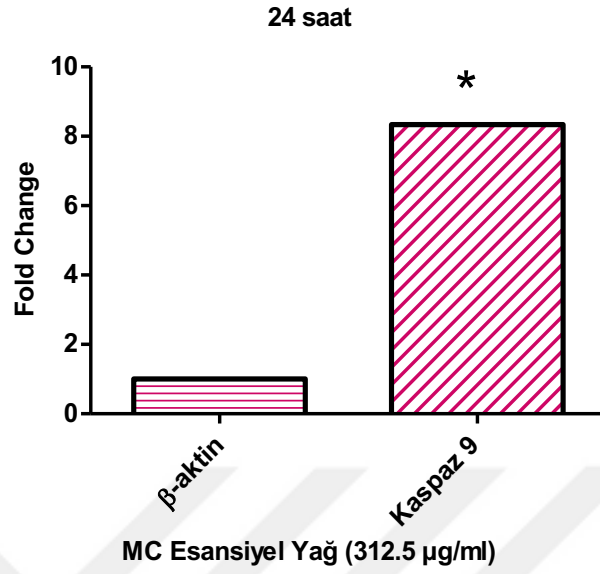
A549 hücrelerinde 24. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MC esansiyel yağının 312.5 µg/ml dozunda Kaspaz 8 geninin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişim görülmedi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. MC esansiyel yağının (312.5 µg/ml) Kaspaz 8 geninin ekspresyonu üzerine etkisi

4.3.3. *Myrtus communis* L. Esansiyel Yağının (312.5 µg/ml) Kaspaz 9 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi

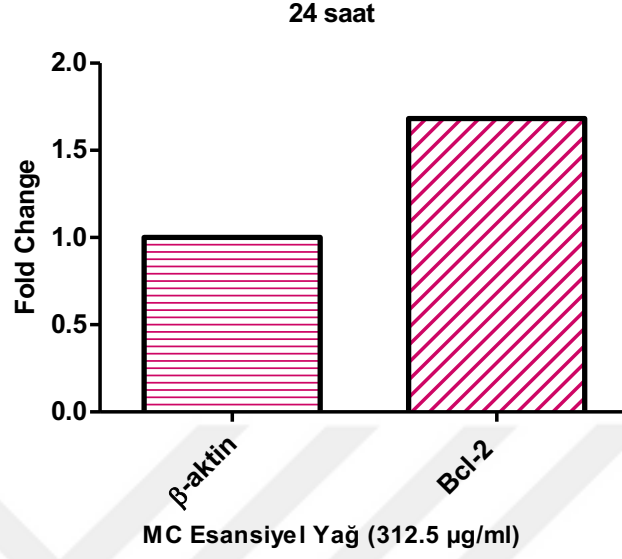
A549 hücrelerinde 24. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MC esansiyel yağının 312.5 µg/ml dozunda Kaspaz 9 geninin ekspresyon seviyesinin anlamlı bir şekilde arttığı görüldü (p:0.0180) (Şekil 4.7). İstatistiksel önem *<0.05, **<0.01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir.



Şekil 4.7. MC esansiyel yağının (312.5 µg/ml) Kaspaz 9 geninin ekspresyonu üzerine etkisi

4.3.4. *Myrtus communis* L. Esansiyel Yağının (312.5 µg/ml) Bcl-2 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi

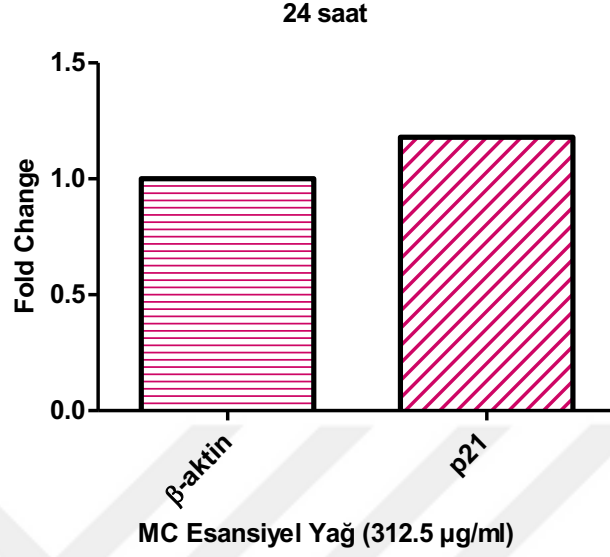
A549 hücrelerinde 24. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MC esansiyel yağının 312.5 µg/ml dozunda Bcl-2 geninin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişim görülmedi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. MC esansiyel yağının (312.5 µg/ml) Bcl-2 geninin ekspresyonu üzerine etkisi

4.3.5. *Myrtus communis* L. Esansiyel Yağının (312.5 µg/ml) p21 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi

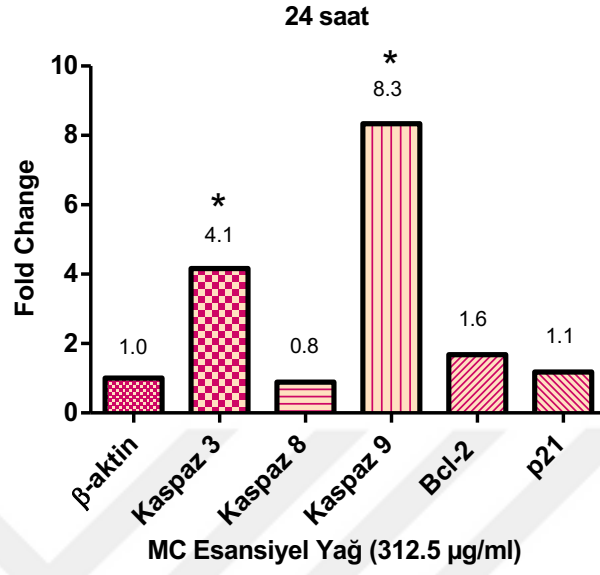
A549 hücrelerinde 24. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MC esansiyel yağının 312.5 µg/ml dozunda p21 geninin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişim görülmedi (Şekil 4.9).



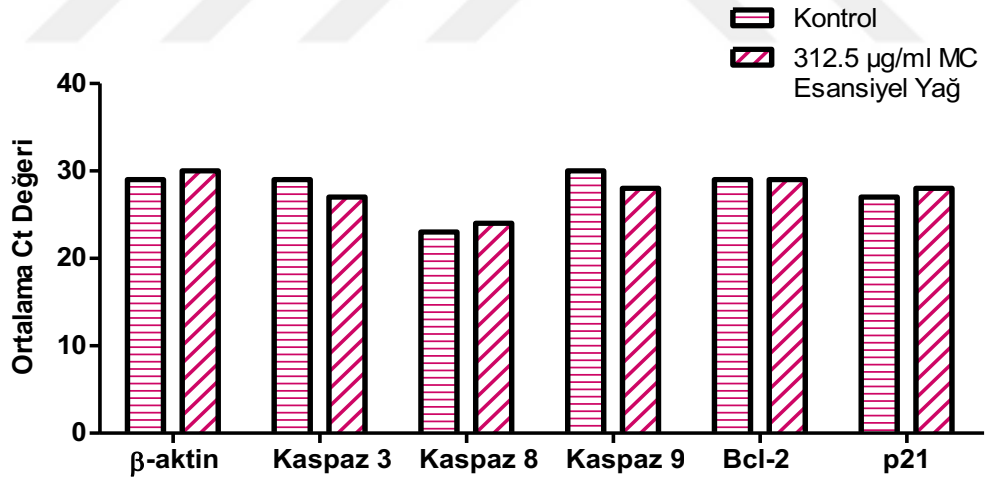
Şekil 4.9. MC esansiyel yağının (312.5 µg/ml) p21 geninin ekspresyonu üzerine etkisi

4.3.6. *Myrtus communis* L. Esansiyel Yağı (312.5 µg/ml) Uygulanmış A549 Hücrelerinde Apoptoz Genleri Ekspresyonunun Karşılaştırılması

A549 hücrelerinde 24. saatte MC yağının 312.5 µg/ml dozunda Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 genlerinin ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde arttığı görüldü (sırasıyla p:0.0129 ve p:0.0180) (Şekil 4.10). İstatistiksel önem $* < 0.05$, $** < 0.01$, $*** < 0.001$ şeklinde gösterilmiştir.



Şekil 4.10. MC esansiyel yağının (312.5 µg/ml) apoptoz mekanizmasında rol alan genlerin ekspresyonu üzerine etkisinin karşılaştırılması



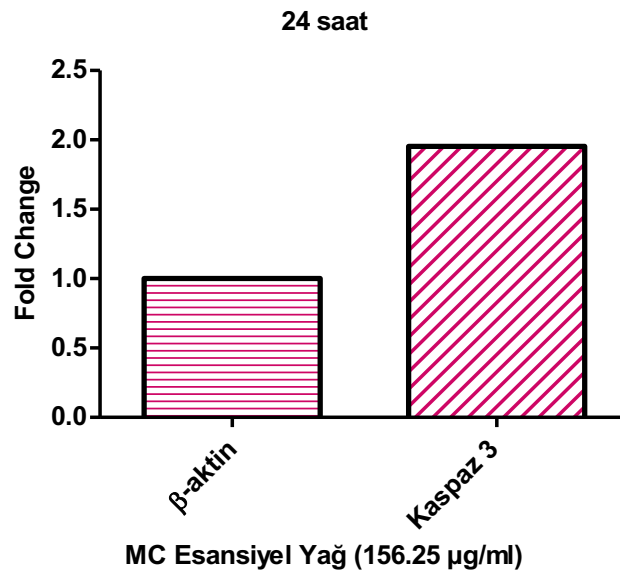
Şekil 4.11. Apoptoz mekanizmasında rol alan genlerde kontrol grubu ve 312.5 µg/ml MC esansiyel yağ dozunun ortalama Ct değerlerinin karşılaştırılması

Çizelge 4.5. Kontrol grubu ve 312.5 µg/ml MC esansiyel yağ dozunun ortalama Ct±standart sapma değerleri

Genler	Kontrol Grubu Ort Ct±Standart Sapma	312.5 µg/ml MC Esansiyel Yağ Konsantrasyonu Ort Ct±Standart Sapma
β-aktin	29.69±0.297923	30.42±0.56888
Kaspaz 3	29.29±0.957827	27.95±0.729446
Kaspaz 8	23.73±0.286051	24.62±0.168795
Kaspaz 9	30.45±1.025943	28.11±1.063246
Bcl-2	29.94±0.188569	29.92±1.03767
p21	27.53±0.415772	28.02±0.538354

4.3.7. *Myrtus communis* L. Esansiyel Yağının (156.25 µg/ml) Kaspaz 3 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi

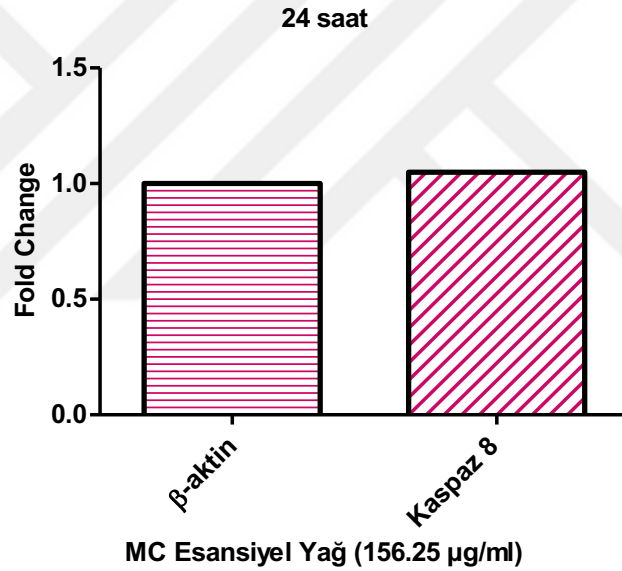
A549 hücrelerinde 24. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MC esansiyel yağının 156.25 µg/ml dozunda Kaspaz 3 geninin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişim görülmedi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. MC esansiyel yağının (156.25 µg/ml) Kaspaz 3 geninin ekspresyonu üzerine etkisi

4.3.8. *Myrtus communis* L. Esansiyel Yağının (156.25 µg/ml) Kaspaz 8 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi

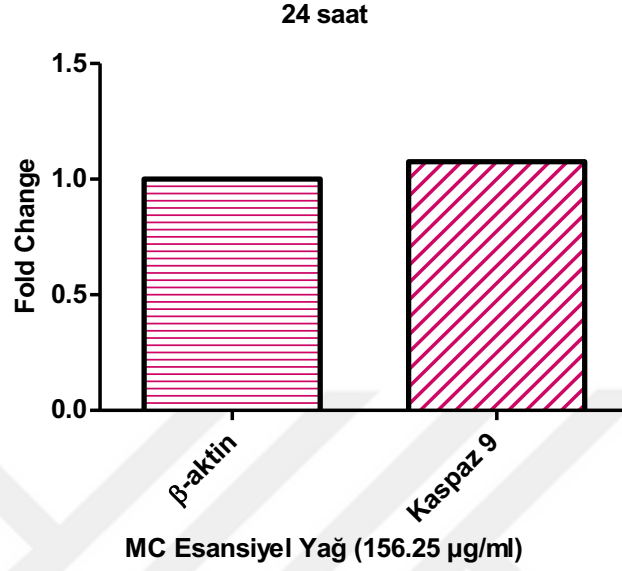
A549 hücrelerinde 24. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MC esansiyel yağının 156.25 µg/ml dozunda Kaspaz 8 geninin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişim görülmedi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. MC esansiyel yağının (156.25 µg/ml) Kaspaz 8 geninin ekspresyonu üzerine etkisi

4.3.9. *Myrtus communis* L. Esansiyel Yağının (156.25 µg/ml) Kaspaz 9 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi

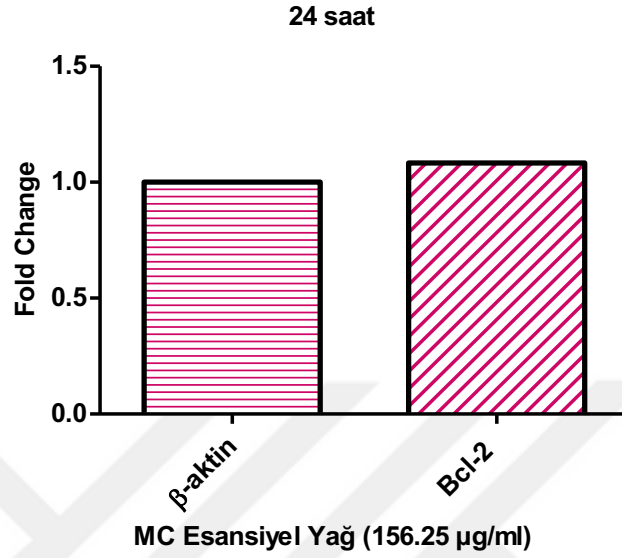
A549 hücrelerinde 24. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MC esansiyel yağının 156.25 µg/ml dozunda Kaspaz 9 geninin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişim görülmedi (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. MC esansiyel yağının (156.25 µg/ml) Kaspaz 9 geninin ekspresyonu üzerine etkisi

4.3.10. *Myrtus communis* L. Esansiyel Yağının (156.25 µg/ml) Bcl-2 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi

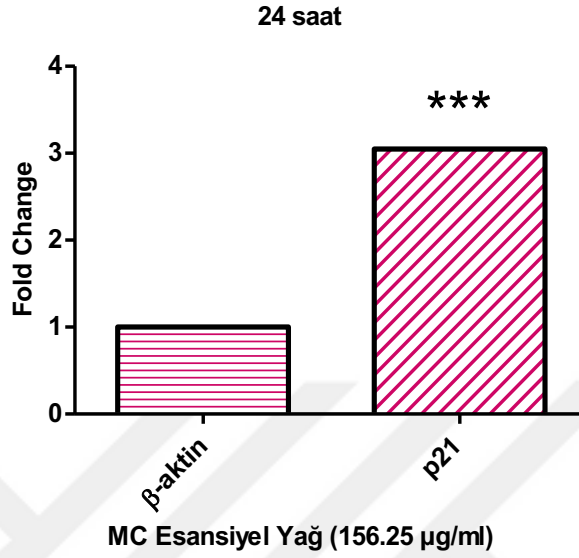
A549 hücrelerinde 24. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MC esansiyel yağının 156.25 µg/ml dozunda Bcl-2 geninin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişim görülmedi (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. MC esansiyel yağının (156.25 µg/ml) Bcl-2 geninin ekspresyonu üzerine etkisi

4.3.11. *Myrtus communis* L. Esansiyel Yağının (156.25 µg/ml) p21 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi

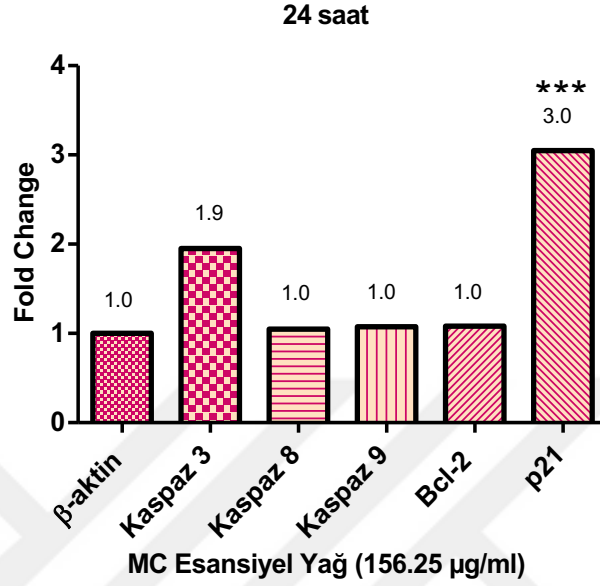
A549 hücrelerinde 24. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MC esansiyel yağının 312.5 µg/ml dozunda p21 geninin ekspresyon seviyesinin anlamlı bir şekilde arttığı görüldü (p:0.0002) (Şekil 4.16). İstatistiksel önem $* < 0.05$, $** < 0.01$, $*** < 0.001$ şeklinde gösterilmiştir.



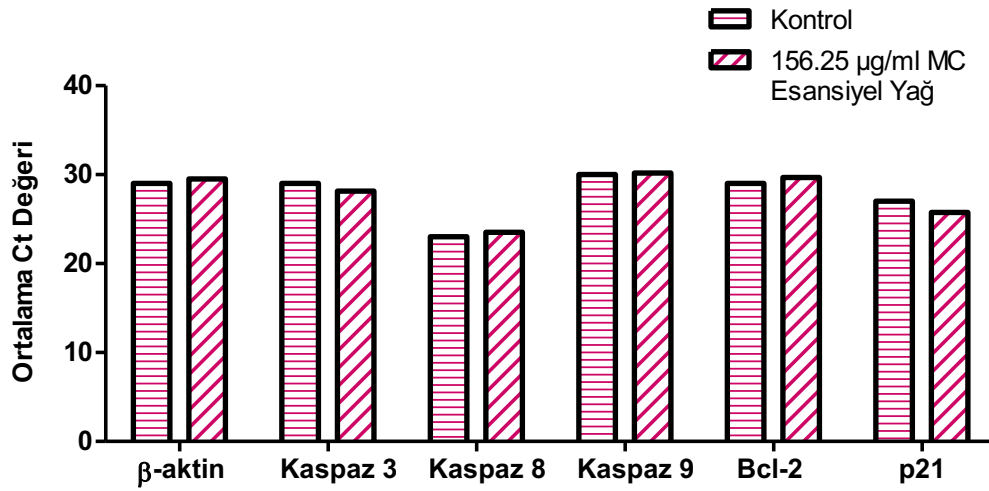
Şekil 4.16. MC esansiyel yağının (156.25 µg/ml) p21 geninin ekspresyonu üzerine etkisi

4.3.12. *Myrtus communis* L. Esansiyel Yağı (156.25 µg/ml) Uygulanmış A549 Hücrelerinde Apoptoz Genleri Ekspresyonunun Karşılaştırılması

A549 hücrelerinde 24. saatte MC yağının 156.25 µg/ml dozunda p21 geninin ekspresyon seviyesinin anlamlı bir şekilde arttığı görüldü (p:0.0002) (Şekil 4.17). İstatistiksel önem $* < 0.05$, $** < 0.01$, $*** < 0.001$ şeklinde gösterilmiştir.



Şekil 4.17. MC esansiyel yağının (156.25 µg/ml) apoptoz mekanizmasında rol alan genlerin ekspresyonu üzerine etkisinin karşılaştırılması



Şekil 4.18. Apoptoz mekanizmasında rol alan genlerde kontrol grubu ve 156.25 µg/ml MC esansiyel yağ dozunun ortalama Ct değerlerinin karşılaştırılması

Çizelge 4.6. Kontrol grubu ve 156.25 µg/ml MC esansiyel yağ dozunun ortalama Ct±standart sapma değerleri

Genler	Kontrol Grubu Ort Ct±Standart Sapma	156.25 µg/ml MC Esansiyel Yağ Konsantrasyonu Ort Ct±Standart Sapma
β-aktin	29.69±0.297923	29.53±0.19242
Kaspaz 3	29.29±0.957827	28.16±0.17378
Kaspaz 8	23.73±0.286051	23.5±0.16338
Kaspaz 9	30.45±1.025943	30.18±0.77526
Bcl-2	29.94±0.188569	29.67±0.34365
p21	27.53±0.415772	25.76±0.10532

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada insan akciğer adenokarsinom hücresi olan A549 hücreleri, MC esansiyel yağı ile muamele edildi ve bu yağın apoptotik yolak üzerindeki etkileri araştırıldı. Öncelikle sitotoksik olmayan MC esansiyel yağ dozunun belirlenmesi amacıyla MTT testi yapıldı. Daha sonra apoptotik yolda rol alan Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9, Bcl-2 ve p21 genlerinin ekspresyon düzeyleri belirlendi.

Kanser dünya genelinde yüksek ölüm oranları nedeniyle önemli sağlık sorunlarından biridir (Huang ve ark. 2017). Uluslararası kanser araştırma ajansı 2012 verilerine göre, tüm kanser türleri arasında akciğer kanseri genel popülasyonda en yüksek insidans ve mortalite oranları ile ilk sırada yer almaktadır (International Agency for Research on Cancer 2018). Günümüzde kanser tedavilerinde kemoterapi ve radyasyon terapisi gibi çeşitli tedavi yöntemleri kullanılıyor olsa da bu yöntemler sağlıklı hücrelerin de kaybına yol açması ve çok sayıda yan etkilere sahip olması nedeniyle hastaların yaşam kalitesini kötü etkilemektedir (Cho 2017). Son yıllarda bilim adamları bu olumsuz etkilerle başa çıkabilecek doğal ve sitotoksik olmayan ya da yüksek etkinlik ve düşük yan etkilere sahip yeni ilaç araştırmaları üzerine yoğunlaşmaktadır (Kooti ve ark. 2017).

Normal şartlar altında hücreler apoptoz ile homeostazisi sağlayarak tümör oluşumunu engellemesine rağmen kanserli hücreler apoptoza karşı direnç kazandıkları için devamlı çoğalarak tümör oluşumuna neden olurlar. Dolayısıyla bu hücrelerin kontrol altına alınabilmesinde apoptozun uyarılmasını hedefleyen terapötik bir strateji geliştirmek oldukça önemli bir yaklaşımdır (Fernald ve Kurokawa 2013).

Myrtus communis L. geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılan biyoaktif bileşenlerce zengin bir bitki türüdür. Apoptotik, anti-proliferatif, anti-inflamatuar, anti-oksidan ve analjezik gibi çeşitli etkilere sahiptir (Amira ve ark. 2012, Ogur 2014). Bitkinin bu doğal etkileri, içerisinde bulunan biyoaktif bileşenlerce (alkaloidler, terpenoidler, flavonoidler, pigmentler, tanenler vb.) sağlanmaktadır (Kooti ve ark. 2017). MC'nin farklı formları kullanılarak in-vivo ve in-vitro çalışmalar yapılmıştır ancak MC esansiyel yağı ile yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Çalışmamızda, anti-proliferatif ve apoptotik etkilere sahip olan MC esansiyel yağının A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

MTT testi ile belirlenen sitotoksikite sonuçlarımıza göre; 24 saatlik süre sonunda A549 hücrelerinde 2500-1250-1000 ve 625 µg/ml MC esansiyel yağ dozunun hücre canlılığını sırasıyla %97.8-84.3-70.5 ve 48.1 inhibisyon ile anlamlı bir şekilde baskıladığı gözlemlendi. 500-312.5-250-156.25-125-78.125-62.5 ve 31.25 µg/ml MC esansiyel yağ dozlarının ise hücre canlılığında anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı gözlemlendi. 48 saatlik MC esansiyel yağ muamelesi sonunda ise A549 hücrelerinde 2500-1250-1000 ve 500 µg/ml MC esansiyel yağ dozunun hücre canlılığını sırasıyla %97.2-86.7-81.2 ve 27.2 inhibisyon ile anlamlı bir şekilde baskıladığı gözlemlendi. 625-312.5-250-156.25-125-78.125-62.5 ve 31.25 µg/ml MC esansiyel yağ dozlarının ise hücre canlılığında anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı gözlemlendi. İlginç bir şekilde 625 µg/ml dozda 24 saatlik sürede sitotoksik etki görülmesine rağmen 48 saatlik süre sonunda sitotoksik etki istatistiksel olarak anlamlı görülmedi. Fakat 24 ve 48 saatlik % inhibisyon oranları sırasıyla %48.1 ve 41.2 ile benzerlik gösterdi. Ayrıca 500 µg/ml dozda 24 saatlik muamele süresinde sitotoksikite görülmemesine rağmen 48 saatlik muamele süresinde sitotoksikite gözlemlendi. MC'nin aktif bileşenlerinden olan Myrtucommulone-A ile yapılan bir çalışmada uzun süreli kültürde sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir (Iskender ve ark. 2015). Bizim çalışmamızda da 500 µg/ml MC esansiyel yağ dozunun 24 saatte sitotoksik etki göstermemesine rağmen 48 saatte göstermesinin Myrtucommulone-A çalışmasında belirtilmiş olduğu gibi uzun süreli muamelenin sitotoksik etki oluşturmamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Daha önce MC esansiyel yağ ile ilgili yapılan in-vitro çalışmalarda; Cezayir'de farklı bölgelerden toplanarak elde edilen iki farklı MC esansiyel yağının 1.25 mg/ml'ye kadar olan konsantrasyonlarda A549 canlılığını etkilemediği gözlemlenmiştir (Bouzabata ve ark. 2015). 200 µg/ml konsantrasyonda MC esansiyel yağının prostat kanseri hücrelerinde %67, göğüs kanseri hücrelerinde ise %95.2 inhibisyon ile hücre canlılığını azalttığı bildirilmiştir. 3T3 fibroblast hücreleri ile yapılan bir çalışmada ise 100 µg/ml MC esansiyel yağı %3.7, 200 µg/ml MC esansiyel yağı ise %6.5 inhibisyon sağlayarak hücre canlılığını azaltmıştır (Stevens 2018). HT29 (insan kolon adenokarsinom hücreleri) hücre hattında MC esansiyel yağının IC₅₀ değeri 110±4 µg/ml olarak belirtilmiştir (Anwar ve ark. 2017). MC yaprağından elde edilen Myrtucommulone bileşiğinin ise HL-60 (akut promyelositik lösemi), MM6 (akut monositik

lösemi), DLD-1 (kolorektal adenokarsinom), H9 (kutanöz T hücreli lenfoma) ve KFR (rabdomyosarkom) gibi farklı kanser hücre hatlarında yaklaşık 3.1–8.8 μM aralığındaki IC_{50} değerleri ile hücre ölümünü güçlü bir şekilde tetiklediği belirtilmiştir. Bunun yanı sıra sağlıklı hücre hattı olan PBMC (insan periferik kan mononükleer hücreleri)'de Myrtucommulone'in 60 μM IC_{50} değeri ile daha az sitotoksik olduğu saptanmıştır (Tretiakova ve ark. 2008). MCF 7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatlarında MC'nin farklı ekstraksiyon formları (metanol, etil asetat, n-Bütanol ve su) kullanılarak sitotoksik etkiler araştırılmış ve IC_{50} değerleri MCF 7 hücrelerinde yaklaşık 22-51 $\mu\text{g/ml}$, MDA-MB-231 hücrelerinde ise yaklaşık 24-138 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır (Hrubik ve ark. 2012). Daha önce bildirilen bu sonuçlar bizim elde ettiğimiz sonuçlar ile uyumludur fakat konsantrasyon düzeyleri farklılık göstermektedir. Bu durumun MC'nin kullanılan formundan, MC içeriğindeki aktif bileşenlerden ve hücre hattından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Elde edilen bu veriler doğrultusunda çalışmamızın ikinci bölümü olan apoptozun belirlenmesinde, uygun dozlar ve muamele süresi seçilerek çalışmalar devam ettirilmiştir. 625 $\mu\text{g/ml}$ doz ve üstündeki dozlar ilk muamele süresinde (24 saat) sitotoksosite gösterdiği için bu dozlar çalışmaya dahil edilmemiştir. 500 $\mu\text{g/ml}$ 'lik doz 24. saatte sitotoksosite göstermemiştir. Ancak 48. saatte doza ve süreye bağlı gösterdiği sitotoksosite nedeniyle, IC_{50} değerinin altındaki sitotoksosite göstermeyen en yüksek iki doz (312.5 $\mu\text{g/ml}$ ve 156.25 $\mu\text{g/ml}$) ve ilk etkinin görüldüğü süre olan 24. saat seçilerek gen ekspresyonu yoluyla apoptoz değerlendirilmiştir.

Gen ekspresyonu ile belirlenen apoptoz sonuçlarımıza göre; 24 saatlik süre sonunda A549 hücrelerinde 312.5 $\mu\text{g/ml}$ MC esansiyel yağ dozunun Kaspaz 3 geninin ekspresyonunu 4.1 kat, Kaspaz 9 geninin ekspresyonunu ise 8.3 kat arttırdığı gözlemlenmiştir. Kaspaz 8, Bcl-2 ve p21 genlerinin ekspresyon düzeylerinde ise anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Bu sonuçlar, intrinsik yolakta rol alan Kaspaz 3 ve Kaspaz 9'un artışını, ekstrinsik yolakta rol alan Kaspaz 8'in ise değişmediğini gösterdiği için MC'nin intrinsik yolak aracılığıyla apoptoza neden olduğunu düşündürmektedir.

156.25 $\mu\text{g/ml}$ MC esansiyel yağ dozunun ise sadece p21 geninin ekspresyonunu 3 kat arttırdığı, Kaspaz 3, 8, 9 ve Bcl-2 genlerinin ekspresyonlarında ise anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı gözlemlenmiştir. Elde edilen bu veriler 156.25 $\mu\text{g/ml}$ MC esansiyel yağ dozunun apoptozda etkin bir doz olmadığını göstermektedir. p21 geni ile ilgili yapılan

çalışmalarda, hücre tipine ve hücresel koşullara bağlı olarak, hem tümör oluşumunda hem de tümör baskılanmasında anti-apoptotik veya pro-apoptotik fonksiyonlara sahip olabileceği bildirilmektedir (Gartel ve Tyner 2002, Piccolo ve Crispi 2012, Xia ve ark. 2011). Nitekim bizim çalışmamızda da A549 hücrelerine uygulanan 156.25 µg/ml MC esansiyel yağ dozunda p21 ekspresyonunun artmış olması, p21'in apoptozu inhibe ettiğini dolayısıyla apoptozun gerçekleşmesinde önemli rol oynayan kaspaz genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir değişiklik olmadığını düşündürmektedir. Başka bir açıdan bakıldığında ise elde edilen bu veriler doğrultusunda 156.25 µg/ml MC esansiyel yağ dozunun apoptozda henüz etkin bir doz olmadığı da söylenebilir. p21'in uyarılması ile ilgili olarak, P21'in hücre döngüsünü durdurması ile olası DNA hasarının giderildiği ve hücre döngüsüne devam edildiği ya da hasarın onarılamadığı durumlarda apoptozun uyarıldığı belirtilmektedir (Kang ve Rosenwaks 2018, Lakin ve Jackson 1999). Dolayısıyla 156.25 µg/ml MC esansiyel yağ dozunda ekspresyonu artmış olan p21'in uyarılmış olduğu fakat bir sonraki aşama ihtimali olan apoptozun henüz görülmediği yorumu da yapılabilir.

Tretiakova ve ark. (2008) farklı kanser hücre hatlarında [Jurkat cell (akut T-cell lösemi), PC-3 (androjenden bağımsız prostat kansinomu), LNCaP (androjene bağlı prostat kansinomu), H9 (kutanöz T-hücreli lenfoma), DLD-1 (kolorektal adenokarsinom), HL-60 (akut promiyelositik lösemi)] Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9'un aktivasyonunu inceleyerek Myrtucommulone'nin apoptozu ekstrinsik yoldan ziyade intrinsik ölüm yolağı aracılığıyla uyardığı bildirilmiştir. Bunun aksine fare meme kanseri hücre dizisinde (4T1) yapılan başka bir çalışmada ise Myrtucommulone-A'nın ekstrinsik apoptotik yolağı tetiklediği bildirilmiştir (Izgi ve ark. 2015). Bizim bulgularımız Tretiakova ve ark. (2008)'nin yaptığı Myrtucommulone çalışması ile benzer sonuçlar göstermiş ve Kaspaz 3 ve Kaspaz 9'un uyarılması ile intrinsik apoptotik yolağın aktive olduğu düşünülmüştür.

Kanserle başa çıkabilmek için kanserli hücrelerde apoptozun uyarılması ve apoptotik moleküler yolağın aydınlatılması büyük önem arz etmektedir. Bu konuda literatürde çok fazla in-vivo çalışma bulunmamasına rağmen bir derlemede bildirilen bazı bulgular şu şekildedir; CD1 farelerine enjekte edilmiş Ehrlich tümörü üzerine MC yağının anti-kanser etkileri araştırılmış ve MC yağı için maksimum tolerans dozu 2 ml/kg, LD₅₀ değeri ise 2.5 ml/kg olarak belirlenmiştir. Ayrıca araştırmacılar MC yağının deney hayvanlarının hayatta kalma süresini anlamlı bir şekilde arttırdığını belirtmişlerdir. Benzer bir çalışmada Ehrlich asit tümörü enjekte edilen farelerle MC su ekstraktının hayvanlarda yaşam süresini uzattığı

tespit edilmiştir (Ogur 2014). MC'nin kanserde önemli etkilere neden olduğunu gösteren bu in-vivo sonuçlar ve bizim in-vitro çalışmalardan elde ettiğimiz bulgular MC esansiyel yağının apoptozu uyarak kanserde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Taranan literatür verileri ve çalışmamızdan elde edilen bulgular doğrultusunda; apoptotik ve anti-kanserojenik etkilere sahip olan MC'nin çağımızın en önemli hastalıklarından olan kanser tedavisinde umut vaat edeceği olduğu söylenebilir.



6. SONUÇ

Myrtus communis L. esansiyel yağının, A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerini araştırdığımız bu çalışmada; 2500-1250-1000-625-500-312.5-250-156.25-125-78.125-62.5-31.25 µg/ml MC esansiyel yağ dozları kullanıldı. Sitotoksisite ölçüldü ve Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9, Bcl-2 ve p21 genlerinin ekspresyon düzeyleri incelendi.

1. MC esansiyel yağının 0-312.5 µg/ml doz aralığında sitotoksik olmadığı tespit edildi.
2. MC esansiyel yağının apoptozu uyardığı en etkili doz 312.5 µg/ml, en etkili süre ise 24 saat olarak saptandı.
3. A549 hücrelerinde 312.5 µg/ml MC esansiyel yağ muamelesi ile Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 ekspresyonlarının arttığı saptandı.
4. A549 hücrelerinde 312.5 µg/ml MC esansiyel yağ muamelesi ile Kaspaz 8 ekspresyonunun değişmediği saptandı.
5. A549 hücrelerinde 312.5 µg/ml MC esansiyel yağ muamelesi ile p21 ve anti-apoptotik Bcl-2 ekspresyonunun değişmediği saptandı.
6. A549 hücrelerinde 156.25 µg/ml MC esansiyel yağ muamelesi ile sadece p21 ekspresyonunun arttığı saptandı.
7. A549 hücrelerinde MC esansiyel yağının apoptozu intrinsik yolak aracılığıyla uyardığı belirlendi.
8. Bulguların; in-vitro ortamda sağlıklı bir hücre hattı eklenerek, apoptotik ürün oluşumu gösterilerek ve *in vivo* deneysel ortamlarda test edilerek genişletilmesi MC esansiyel yağının apoptotik etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için yararlı olacaktır.

Sonuç olarak; bu çalışma kapsamında MC esansiyel yağının ortaya konulan apoptotik etkilerinin, kanser tedavisinde doğal yeni bir terapötik ajan olarak potansiyel teşkil ettiği düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **Adams JM, Cory S.** The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. *Cell Death Differ*, **2018**, 25(1): s.27-36.
2. **Aggarwal BB, Bhardwaj U, Takada Y.** Regulation of TRAIL-induced apoptosis by ectopic expression of antiapoptotic factors. *Vitamins & Hormones*, **2004**, 67: s. 453-483.
3. **Alipour G, Dashti S, Hosseinzadeh H.** Review of pharmacological effects of *Myrtus communis* L. and its active constituents. *Phytother Res*, **2014**, 28(8): s.1125-36.
4. **Amira S, Dade M, Schinella G, Rios JL.** Anti-inflammatory, anti-oxidant, and apoptotic activities of four plant species used in folk medicine in the Mediterranean basin. *Pak J Pharm Sci*, **2012**, 25(1): s.65-72.
5. **Anilkumar U, Prehn JH.** Anti-apoptotic BCL-2 family proteins in acute neural injury. *Front Cell Neurosci*, **2014**, 8: s.281.
6. **Anwar S, Crouch RA, Awadh Ali NA, Al-Fatimi MA, Setzer WN ve ark.** Hierarchical cluster analysis and chemical characterisation of *Myrtus communis* L. essential oil from Yemen region and its antimicrobial, antioxidant and anti-colorectal adenocarcinoma properties. *Nat Prod Res*, **2017**, 31(18): s.2158-2163.
7. **Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M.** Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol*, **2008**, 46(2): s.446-75.
8. **Balasescu E, Ion DA, Cioplea M, Zurac S.** Caspases, Cell Death and Diabetic Nephropathy. *Rom J Intern Med*, **2015**, 53(4): s.296-303.
9. **Benchikh F, Benabdallah H, Dahamna S, Khenouf S, Flamini G ve ark.** Antimotility and antidiarrhoeal activity of *Myrtus communis* L. Leaves essential oil in mice. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, **2016**, 8(7): s.1238-1244.
10. **Borel JF.** Comparative study of in vitro and in vivo drug effects on cell-mediated cytotoxicity. *Immunology*, **1976**, 31(4): s.631-41.
11. **Brunelle JK, Letai A.** Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci*, **2009**, 122(Pt 4): s.437-41.
12. **Bouzabata A, Cabral C, Gonçalves MJ, Cruz MT, Bighelli A ve ark.** *Myrtus communis* L. as source of a bioactive and safe essential oil. *Food and Chemical Toxicology*, **2016**, 75: s.166-172.
13. **Chang MY, Shieh DE, Chen CC, Yeh CS, Dong HP.** Linalool Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Leukemia Cells and Cervical Cancer Cells through CDKs. *Int J Mol Sci*, **2015**, 16(12): s.28169-79.
14. **Chen W, Liu Y, Li M, Mao J, Zhang L ve ark.** Anti-tumor effect of alpha-pinene on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest. *J Pharmacol Sci*, **2015**, 127(3): s.332-8.
15. **Cho JH.** Immunotherapy for Non-small-cell Lung Cancer: Current Status and Future Obstacles. *Immune Netw*, **2017**, 17(6): s.378-391.
16. **Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y.** Tannins and human health: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **1998**, 38(6): s.421-64.
17. **Cosentino K, Garcia-Saez AJ.** Bax and Bak Pores: Are We Closing the Circle? *Trends Cell Biol*, **2017**, 27(4): s.266-275.
18. **Cottiglia F, Casu L, Leonti M, Caboni P, Floris C ve ark.** Cytotoxic phloroglucinols from the leaves of *Myrtus communis*. *J Nat Prod*, **2012**, 75(2): s.225-9.
19. **Crowell PL.** Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *J Nutr*, **1999**, 129(3): s.775S-778S.
20. **Dutto I, Tillhon M, Cazzalini O, Stivala LA, Prospero E.** Biology of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A): molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology. *Arch Toxicol*, **2015**, 89(2): s.155-78.
21. **Fernald K, Kurokawa M.** Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol*, **2013**, 23(12): s.620-33.
22. **Fresco P, Borges F, Diniz C, Marques MP.** New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med Res Rev*, **2006**, 26(6): s.747-66.
23. **Fulda S.** Targeting apoptosis for anticancer therapy. *Semin Cancer Biol*, **2015**, 31: s.84-8.
24. **Galluzzi L, Lopez-Soto A, Kumar S, Kroemer G.** Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis. *Immunity*, **2016**, 44(2): s.221-31.

25. **Gartel AL, Tyner AL.** The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis 1 supported in part by NIH grant R01 DK56283 (to ALT) for the p21 research and Campus Research Board and Illinois Department of Public Health Penny Severns Breast and Cervical Cancer grants (to ALG). 1. *Molecular cancer therapeutics*, **2002**, 1(8): s.639-649.
26. **Gauthier R, Agoumi A, Gourai M.** Activity of Myrtus communis extracts against head lice. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, **1989**, 23: s.95-108.
27. **Georgakilas AG, Martin OA, Bonner WM.** p21: A Two-Faced Genome Guardian. *Trends Mol Med*, **2017**, 23(4): s.310-319.
28. **Grassmann J.** Terpenoids as plant antioxidants. *Vitam Horm*, **2005**, 72: s.505-35.
29. **Güneş HV.** *Moleküler Hücre Biyolojisi*. 3. Baskı, İstanbul Tıp Kitabevi, İstanbul, **2012**. s. 313.
30. **Han HD, Cho YJ, Cho SK, Byeon Y, Jeon HN ve ark.** Linalool-Incorporated Nanoparticles as a Novel Anticancer Agent for Epithelial Ovarian Carcinoma. *Mol Cancer Ther*, **2016**, 15(4): s.618-27.
31. **Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N.** Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int*, **2014**, 2014: s.150845.
32. **Hata AN, Engelman JA, Faber AC.** The BCL2 Family: Key Mediators of the Apoptotic Response to Targeted Anticancer Therapeutics. *Cancer Discov*, **2015**, 5(5): s.475-87.
33. **Hollman PC, Katan MB.** Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol*, **1999**, 37(9-10): s.937-42.
34. **Hrubik JD, Kaišarević SN, Glišić BD, Jovin ED, Mimica-Dukić NM ve ark.** Myrtus comunis and Eucalyptus camaldulensis cytotoxicity on breast cancer cells. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, **2012**, (123): s.65-73.
35. **Huang Z, Yu H, Zhang J, Jing H, Zhu W ve ark.** Correlation of cancer stem cell markers and immune cell markers in resected non-small cell lung cancer. *J Cancer*, **2017**, 8(16): s.3190-3197.
36. **International Agency for Research on Cancer.** Erişim: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx. **2018**. Erişim tarihi: 16.03.2018
37. **Iskender B, Izgi K, Karaca H, Canatan H.** Myrtucommulone-A treatment decreases pluripotency- and multipotency-associated marker expression in bladder cancer cell line HTB-9. *J Nat Med*, **2015**, 69(4): s.543-54.
38. **Izgi K, Iskender B, Jauch J, Sezen S, Cakir M ve ark.** Myrtucommulone-A Induces both Extrinsic and Intrinsic Apoptotic Pathways in Cancer Cells. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, **2015**, 29(9): s.432-439.
39. **Juergens U.** Anti-inflammatory properties of the monoterpene 1.8-cineole: current evidence for co-medication in inflammatory airway diseases. *Drug Research*, **2014**, 64(12): s.638-646.
40. **Julien O, Wells JA.** Caspases and their substrates. *Cell Death Differ*, **2017**, 24(8): s.1380-1389.
41. **Kang HJ, Rosenwaks Z.** p53 and reproduction. *Fertil Steril*, **2018**, 109(1): s.39-43.
42. **Kasibhatla S, Tseng B.** Why target apoptosis in cancer treatment? *Mol Cancer Ther*, **2003**, 2(6): s.573-80.
43. **Katerova Z, Todorova D, Tasheva K, Sergiev I.** Influence of ultraviolet radiation on plant secondary metabolite production. *Genet Plant Physiol*, **2012**, 2(3-4): s.113-144.
44. **Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **1972**, 26(4): s.239-57.
45. **Kim HS, Park MS, Lee JK, Kim HJ, Park JT ve ark.** Time point expression of apoptosis regulatory proteins in a photochemically-induced focal cerebral ischemic rat brain. *Chonnam Med J*, **2011**, 47(3): s.144-9.
46. **Koca N, Karadeniz F.** Gıdalardaki doğal antioksidan bileşikler. *Gıda/The Journal of Food*, **2005**, 30(4).
47. **Kooti W, Servatyari K, Behzadifar M, Asadi-Samani M, Sadeghi F ve ark.** Effective Medicinal Plant in Cancer Treatment, Part 2: Review Study. *J Evid Based Complementary Altern Med*, **2017**, 22(4): s.982-995.
48. **Lakin ND, Jackson SP.** Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene*, **1999**, 18(53): s.7644-55.
49. **Li P, Zhou L, Zhao T, Liu X, Zhang P ve ark.** Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget*, **2017**, 8(14): s.23996-24008.
50. **Liu J, Pu H, Liu S, Kan J, Jin C.** Synthesis, characterization, bioactivity and potential application of phenolic acid grafted chitosan: A review. *Carbohydr Polym*, **2017**, 174: s.999-1017.
51. **Lowe SW, Lin AW.** Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, **2000**, 21(3): s.485-495.

52. **Maeda H, Yamazaki M, Katagata Y.** Kuromoji (*Lindera umbellata*) essential oil-induced apoptosis and differentiation in human leukemia HL-60 cells. *Exp Ther Med*, **2012**, 3(1): s.49-52.
53. **Matsuura K, Canfield K, Feng W, Kurokawa M.** Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer. *Int Rev Cell Mol Biol*, **2016**, 327: s.43-87.
54. **Mirzayans R, Andrais B, Kumar P, Murray D.** The Growing Complexity of Cancer Cell Response to DNA-Damaging Agents: Caspase 3 Mediates Cell Death or Survival? *Int J Mol Sci*, **2016**, 17(5).
55. **Modzelewska A, Sur S, Kumar SK, Khan SR.** Sesquiterpenes: natural products that decrease cancer growth. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, **2005**, 5(5): s.477-99.
56. **Mohamed MS, Bishr MK, Almutairi FM, Ali AG.** Inhibitors of apoptosis: clinical implications in cancer. *Apoptosis*, **2017**, 22(12): s.1487-1509.
57. **Murata S, Shiragami R, Kosugi C, Tezuka T, Yamazaki M ve ark.** Antitumor effect of 1, 8-cineole against colon cancer. *Oncol Rep*, **2013**, 30(6): s.2647-52.
58. **Ogur R.** Studies with *Myrtus communis* L.: Anticancer properties. *J Intercult Ethnopharmacol*, **2014**, 3(4): s.135-7.
59. **Ola MS, Nawaz M, Ahsan H.** Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem*, **2011**, 351(1-2): s.41-58.
60. **Ott M, Norberg E, Zhivotovsky B, Orrenius S.** Mitochondrial targeting of tBid/Bax: a role for the TOM complex? *Cell Death Differ*, **2009**, 16(8): s.1075-82.
61. **Özkan AMG, Güray ÇG.** A Mediterranean: *Myrtus communis* L.(Myrtle). *Plants and Culture: Seeds of the Cultural Heritage of Europe*, Morel JP, Mercuri AM (eds.). *Edipuglia: Bari*, **2009**, s.159-168.
62. **Piccolo MT, Crispi S.** The dual role played by p21 may influence the apoptotic or anti-apoptotic fate in cancer. *Journal of Cancer Research Updates*, **2012**, 1(2): s.189-202.
63. **Radha G, Raghavan SC.** BCL2: A promising cancer therapeutic target. *Biochim Biophys Acta*, **2017**, 1868(1): s.309-314.
64. **Ravizza R, Gariboldi MB, Molteni R, Monti E.** Linalool, a plant-derived monoterpene alcohol, reverses doxorubicin resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncol Rep*, **2008**, 20(3): s.625-30.
65. **Romanov VS, Rudolph KL.** p21 shapes cancer evolution. *Nat Cell Biol*, **2016**, 18(7): s.722-4.
66. **Ross JA, Kasum CM.** Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual review of nutrition*, **2002**, 22(1): s.19-34.
67. **Santos FA, Rao VS.** Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytother Res*, **2000**, 14(4): s.240-4.
68. **Savitskaya MA, Onishchenko GE.** Mechanisms of Apoptosis. *Biochemistry (Mosc)*, **2015**, 80(11): s.1393-405.
69. **Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW.** Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2013**, 5(4): s.a008714.
70. **Sisay M, Gashaw T.** Ethnobotanical, Ethnopharmacological, and Phytochemical Studies of *Myrtus communis* Linn: A Popular Herb in Unani System of Medicine. *J Evid Based Complementary Altern Med*, **2017**: s.2156587217718958.
71. **Stevens, N.** Natural Synergy: Essential Oils in Cancer Research. Erişim: <http://www.young-living.net/Presentations/StevensEssentialOilsInCancer.pdf>. **2018**. Erişim tarihi: 15.05.2018.
72. **Sun X-B, Wang S-M, Li T, Yang Y.** Anticancer activity of linalool terpenoid: Apoptosis induction and cell cycle arrest in prostate cancer cells. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **2015**, 14(4): s.619-625.
73. **Tretiakova I, Blaesius D, Maxia L, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K ve ark.** Myrtucommulone from *Myrtus communis* induces apoptosis in cancer cells via the mitochondrial pathway involving caspase-9. *Apoptosis*, **2008**, 13(1): s.119-31.
74. **Tsujimoto Y.** Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells*, **1998**, 3(11): s.697-707.
75. **Usta J, Kreydiyyeh S, Knio K, Barnabe P, Bou-Moughlabay Y ve ark.** Linalool decreases HepG2 viability by inhibiting mitochondrial complexes I and II, increasing reactive oxygen species and decreasing ATP and GSH levels. *Chem Biol Interact*, **2009**, 180(1): s.39-46.
76. **Vaux DL, Cory S, Adams JM.** Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, **1988**, 335(6189): s.440-2.
77. **Waldman T, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B.** Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature*, **1996**, 381(6584): s.713.

78. **Williams AB, Schumacher B.** p53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **2016**, 6(5).
79. **Wong RS.** Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*, **2011**, 30: s.87.
80. **Xia M, Knezevic D, Vassilev LT.** p21 does not protect cancer cells from apoptosis induced by nongenotoxic p53 activation. *Oncogene*, **2011**, 30(3): s.346-55.
81. **Zhao Y, Chen R, Wang Y, Yang Y.** alpha-Pinene Inhibits Human Prostate Cancer Growth in a Mouse Xenograft Model. *Chemotherapy*, **2018**, 63(1): s.1-7.
82. **Zhou JY, Tang FD, Mao GG, Bian RL.** Effect of alpha-pinene on nuclear translocation of NF-kappa B in THP-1 cells. *Acta Pharmacol Sin*, **2004**, 25(4): s.480-4.



ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Gaziantep'de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Gaziantep'de tamamladı. 2008 yılında Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2012 yılında mezun oldu. 2014 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyokimya ve Genetik (Tıp) Ana Bilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.

