T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MYRTUS COMMUNİS BİTKİSİNDEN ELDE EDİLEN ESANSİYEL YAĞIN ve BİLEŞENLERİNİN MCF7, MCF10A ve BJ HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Yasenya KAŞIKCI

TIBBİ BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI

ADANA-2020

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MYRTUS COMMUNİS BİTKİSİNDEN ELDE EDİLEN ESANSİYEL YAĞIN ve BİLEŞENLERİNİN MCF7, MCF10A ve BJ HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Yasenya KAŞIKCI

TIBBİ BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TYL-2018-11209 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

ADANA-2020

KABUL VE ONAY

Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan "*Myrtus Communis* Bitkisinden Elden Edilen Esansiyel Yağın ve Bileşenlerinin MCF7, MCF10A ve BJ Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkisinin İncelenmesi" adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih:

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI
Çukurova Üniversitesi
Başkan

Prof. Dr. Davut ALPTEKİN
Çukurova Üniversitesi
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Gülay GÜLBOL DURAN
Çukurova Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun 16/01/2020 tarih ve …….. sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimleriyle bana rehberlik eden, her konuda destek olan ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI'na sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmamın yürütülmesi aşamasında yardım ve desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Davut ALPTEKİN'e, yüksek lisans eğitimime katkıda bulunan anabilim dalımızın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Mehmet Bertan Yılmaz, Prof. Dr. Ümit LÜLEYAP, Prof. Dr. Osman DEMİRHAN, Öğr. Gör. Dr. Sabriye KOCATÜRK SEL'e ve bütün anabilim dalı çalışanlarına tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Fransa IGBMC Enstitüsü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Hinrich Gronemeyer'e ve Ph.D. Filipe Pereira'ya beni her koşulda destekledikleri için ve tezime maddi, manevi katkıda bulunduğu için tüm içtenliğimle teşekkür ederim. Tez çalışmamda kullanılan Myrtus Communis L. esansiyel yağının temininde ve yağ bileşeni ile ilgili verdiği bilgilerle tezime katkıda bulunan Doç. Dr. Durmuş Alparslan Kaya'ya çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın laboratuvar aşamasındaki desteklerinden ötürü Yük. Lis. Öğr. Seray KARAÇAY'a, Arş. Gör. M. Tahir HÜSUNET ve Arş. Gör. Mustafa M. ALPARSLAN'a çok teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında olduğu gibi tez süresi boyunca tüm sabrıyla beni her anlamda destekleyen sevgili annem Ebru Yel'e, sevgili anneannem Cemile Yel'e ve sevgili kardeşim Umut Akın Kaşıkcı'ya çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması TYL-2018-11209 numaralı proje ile Ç.Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY ii
TEŞEKKÜR iii
İÇİNDEKİLER iv
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
ÇİZELGELER DİZİNİ xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xvi
ÖZET xix
ABSTRACT xx
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. *Mrytus communis* L. 3
2.1.1. *Myrtus communis* L. Bileşenleri 4
2.2. Kanser 8
2.2.1. Meme Kanseri 9
2.3. *Myrtus communis* L. ve Kanser 10
2.4. Apoptoz 11
2.4.1. Apoptozon Düzenlenmesi 12
2.4.1.1. Kaspazlar 12
2.4.1.2. Bcl-2 Ailesi 16
2.4.1.3. p53 18
2.4.1.4. Isı Şok Proteinleri 19
2.4.2. Apoptoz Mekanizmaları 19
2.4.2.1. İntrinsik Yolak 19
2.4.2.2. Ekstrinsik Yolak 23
2.5. Apoptoz ve Kanser 25
2.6. Meme Kanseri ve Apoptoz 26
3. GEREÇ VE YÖNTEM 29
3.1. Hücre Kültürü 29
3.1.1. Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması 29
3.1.1.1. MCF7 Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması 29
3.1.1.2. MCF10A Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması 29

3.1.1.3. BJ ATCC Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması 29
3.1.2. Hücre Kültürü İnkübasyon Koşulları 30
3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması 30
3.1.3.1. MCF7 Hücre Hattının Pasajlanması 30
3.1.3.2. MCF10A Hücre Hattının Pasajlanması 31
3.1.3.3. BJ ATCC Hücre Hattının Pasajlanması 32
3.1.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması 33
3.1.5. Thoma Lamı Yardımı ile Hücre Sayılarının Hesaplanması 34
3.2. *M. communis* Esansiyel Yağ Dozlarının Hazırlanması 34
3.2.1. *M. communis* Esansiyel Yağ Eldesi ve Kimyasal Komposizyonları 34
3.3. MTT Testi 37
3.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR) Analizleri 38
3.4.1. RNA İzolasyonu 38
3.4.1.1. RNA İzolasyon Prorokolü 39
3.4.2. cDNA (Komplementer DNA Zincir) Sentezi 40
3.4.3. Real Time PCR 41
3.5. İstatistiksel Analiz 43
4. BULGULAR 44
4.1. *M. communis* Esansiyel Yağının (3000-46,875 µg/ml) MCF7 ve MCF10A Hücre Hatları için Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi 44
4.2. *M. communis* Esansiyel Yağının (1200-18,75 µg/ml) MCF7 ve MCF10A Hücre Hatları için Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi 49
4.3. Linalool Bileşeninin (3000-46,875 µg/ml) MCF7 ve MCF10A Hücre Hatları için Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi 53
4.4. Linalool Bileşeninin (1200-18,75 µg/ml) MCF7 ve MCF10A Hücre Hatları için Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi 59
4.5. α-Pinene Bileşeninin (3000-46,875 µg/ml) MCF7 ve MCF10A Hücre Hatları için Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi 64
4.6. α-Pinene Bileşeninin (1200-18,75 µg/ml) MCF7 ve MCF10A Hücre Hatları için Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi 69
4.7. 1,8- cineole Bileşeninin (3000-46,875 µg/ml) MCF7 ve MCF10A Hücre Hatları için Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi 74
4.8. 1,8-cineole Bileşeninin (1200-18,75 µg/ml) MCF7 ve MCF10A Hücre Hatları için Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi 79
4.9. MCF7 ve MCF10A Hücre Hatları Üzerinde *M. communis* Esansiyel Yağının, 1,8-cineole, Linalool ve α-pinen Bileşenlerinin Etkin Dozunun Belirlenmesi 83
4.10. BELİRLENEN ETKİN DOZUN BJ HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ 88

4.11. MCF7 Hücre Hattı Üzerinde Uygulanan *M. communis* Esansiyel Yağının Apoptoz Mekanizmasında Rol Alan Gen Ekspresyonları Üzerine Etkileri 89

4.11.1. MCF7 Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (750 µg/ml) Bcl-2 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi 90

4.11.2. MCF7 Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (750 µg/ml) Kaspaz 9 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi 90

4.11.3. MCF7 Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (750 µg/ml) Bax Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi 91

4.11.4 MCF7 Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (750 µg/ml) Apaf-1 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi 92

4.11.5. *M. communis* Esansiyel Yağı (750 µg/ml) Uygulanan MCF7 Hücrelerinde Apoptotik Genlerin Ekspresyon Seviyelerinin Kontrol Grupları ile Karşılaştırılması 92

4.11.6. MCF7 Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (600 µg/ml) Bcl-2 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi 94

4.11.7. MCF7 Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (600 µg/ml) Kaspaz 9 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi 95

4.11.8. MCF7 Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (600 µg/ml) Bax Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi 95

4.11.9. MCF7 Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (600 µg/ml) Apaf-1 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi 96

4.11.10. *M. communis* Esansiyel Yağı (600 µg/ml) Uygulanan MCF7 Hücrelerinde Apoptotik Genlerin Ekspresyon Seviyelerinin Kontrol Grupları ile Karşılaştırılması 97

4.12. MCF10A Hücre Hattı Üzerinde Uygulanan *M. communis* Esansiyel Yağının Apoptoz Mekanizmasında Rol Alan Gen Ekspresyonları Üzerine Etkileri 99

4.12.1. MCF10A Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (750 µg/ml) Bcl-2 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi 99

4.12.2. MCF10A Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (750 µg/ml) Kaspaz 9 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi 99

4.12.3. MCF10A Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (750 µg/ml) Apaf-1 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi 100

4.12.4. MCF10A Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (750 µg/ml) Bax Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi 101

4.12.5. *M. communis* Esansiyel Yağı (750 µg/ml) Uygulanan MCF10A Hücrelerinde Apoptotik Genlerin Ekspresyon Seviyelerinin Kontrol Grupları ile Karşılaştırılması 101

4.12.6. MCF10A Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (600 µg/ml) Bcl-2 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi 103

4.12.7. MCF10A Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (600 µg/ml) Kaspaz 9 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi 104

4.12.8. MCF10A Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (600 µg/ml) Apaf-1 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi 104

4.12.9. MCF10A Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (600 µg/ml) Bax Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi 105
4.12.10. *M. communis* Esansiyel Yağı (600 µg/ml) Uygulanan MCF10A Hücrelerinde Apoptotik Genlerin Ekspresyon Seviyelerinin Kontrol Grupları ile Karşılaştırılması 106
5. TARTIŞMA 108
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 116
KAYNAKLAR 118
ÖZGEÇMİŞ 132

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No: **Sayfa No:**

Şekil 1. *Myrtus communis* L. Bitkisi 4
Şekil 2. 1,8-sineol'ün çizgisel formülü 7
Şekil 3. α-pinen'in çizgisel formülü 7
Şekil 4. Linalool'un çizgisel formülü 8
Şekil 5. Apoptoz Mekanizmasının İntrinsik Yolağı 23
Şekil 6. Apoptoz Mekanizmasının Ekstrinsik Yolağı 25
Şekil 7. MCF7 Hücre Hattının Mikroskoptaki Görünümü 31
Şekil 8. MCF10A Hücre Hattının Mikroskoptaki Görünümü 32
Şekil 9. BJ ATCC Hücre Hattının Mikroskoptaki Görünümü 33
Şekil 10. Uçucu yağların etken maddelerinin belirlenmesi (GC/MS) 35
Şekil 11. *Myrtus communis* L. Uçucu Yağına Ait Kromotogram (GC/MS)**Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
Şekil 12. *M. communis* Esansiyel yağinin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi 45
Şekil 13. *M. communis* Esansiyel yağının 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF10A hücre canlılığı üzerine etkisi 46
Şekil 14. MCF7 hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon grafiği 48
Şekil 15. MCF10A hücrelerinde *M. communis* esansiyel yağinin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon grafiği 48
Şekil 16. *M. communis* Esansiyel yağının 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi 50
Şekil 17. *M. communis* Esansiyel yağının 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF10 hücre canlılığı üzerine etkisi 51
Şekil 18. MCF7 hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon grafiği 53
Şekil 19. MCF10A hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon grafiği 53
Şekil 20. Linalool bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi 55
Şekil 21. Linalool bileşeneninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF10A hücre canlılığı üzerine etkisi 56
Şekil 22. MCF7 hücrelerinde Linalool bileşeninin 3000-46,875µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon grafiği 58
Şekil 23. MCF10A hücrelerinde Linalool bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon grafiği 58

Şekil 24. Linalool bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi 60
Şekil 25. Linalool bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF10A hücre canlılığı üzerine etkisi 61
Şekil 26. MCF7 hücrelerinde Linalool bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon grafiği 63
Şekil 27. MCF10A hücrelerinde Linalool bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon grafiği. 63
Şekil 28. α--pinen bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi 65
Şekil 29. α-pinen bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF10A hücre canlılığı üzerine etkisi 66
Şekil 30. MCF7 hücrelerinde α-pinen bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon grafiği 68
Şekil 31. MCF10A hücrelerinde α-pinen bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon grafiği 68
Şekil 32. α-Pinen bileşeneninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi 70
Şekil 33. α-Pinen bileşeneninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF10A hücre canlılığı üzerine etkisi 71
Şekil 34. MCF7 hücrelerinde α-pinen bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon grafiği 73
Şekil 35. MCF10A hücrelerinde α-pinen bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon grafiği 73
Şekil 36. 1,8-sineol bileşeneninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi 75
Şekil 37. 1,8-sineol bileşeneninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF10A hücre canlılığı üzerine etkisi 76
Şekil 38. MCF7 hücrelerinde 1,8-sineol bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon grafiği 78
Şekil 39. MCF10A hücrelerinde 1,8-sineol bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon grafiği 78
Şekil 40. 1,8-sineol bileşeneninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi 80
Şekil 41. 1,8-sineol bileşeneninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında mcf10a hücre canlılığı üzerine etkisi 81
Şekil 42. MCF7 hücrelerinde 1,8-sineol bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon grafiği 83

Şekil 43. MCF10A hücrelerinde 1,8-sineol bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon grafiği 83
Şekil 44. MCF7 ve MCF10A hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının 3000-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında ve 24-48h sürelerinde % hücre canlılığı grafiğine bakılarak IC50 değerlerine göre MCF7 hücre hattında sitotoksik etki gösteren fakat MCF10A hücre hattı üzerinde sitotoksik olmayan ortak konsantrasyonun belirlenmesi 84
Şekil 45. MCF7 ve MCF10A hücrelerinde Linalool bileşeninin 3000-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında ve 24-48h sürelerinde % hücre canlılığı grafiğine bakılarak IC50 değerlerine göre MCF7 hücre hattında sitotoksik etki gösteren fakat MCF10A hücre hattı üzerinde sitotoksik olmayan ortak konsantrasyonun belirlenmesi 85
Şekil 46. MCF7 ve MCF10A hücrelerinde 1,8-sineol bileşeninin 3000-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında ve 24-48h sürelerinde % hücre canlılığı grafiğine bakılarak IC50 değerlerine göre MCF7 hücre hattında sitotoksik etki gösteren fakat MCF10A hücre hattı üzerinde sitotoksik olmayan ortak konsantrasyonun belirlenmesi 86
Şekil 47. MCF7 ve ve MCF10A hücrelerinde Linalool bileşeninin 3000-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında ve 24-48h sürelerinde % hücre canlılığı grafiğine bakılarak IC50 değerlerine göre MCF7 hücre hattında sitotoksik etki gösteren fakat MCF10A hücre hattı üzerinde sitotoksik olmayan ortak konsantrasyonun belirlenmesi 87
Şekil 48. *M. communis* esansiyel yağı uygulanan MCF-7 ve MCF10A Hücre hatları ve kontrol gruplarına AİT invert mikroskop görüntüleri. 88
Şekil 49. BJ hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının 750 ve 600 µg/ml konsantrasyonlarında % inhibasyon grafiği. 89
Şekil 50. MCF7 hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (750 µg/ml) Bcl-2 gen ekspresyonu üzerine etkisi. 90
Şekil 51. MCF7 hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (750 µg/ml) Kaspaz 9 gen ekspresyonu üzerine etkisi. 91
Şekil 52. MCF7 hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (750 µg/ml) Bax gen ekspresyonu üzerine etkisi. 91
Şekil 53. MCF7 hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (750 µg/ml) Apaf-1 gen ekspresyonu üzerine etkisi. 92
Şekil 54. MCF7 hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (750 µg/ml) apoptoz mekanizmasında rol alan genlerin ekspresyonu üzerine etkisinin karşılaştırılması. 93
Şekil 55. Apoptotik genlerin kontrol grubu ve 750 µg/ml *M. communis* esansiyel yağ ile ortalama Ct değerlerinin karşılaştırılması 94
Şekil 56. MCF7 hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (600 µg/ml) Bcl-2 gen ekspresyonu üzerine etkisi. 94
Şekil 57. MCF7 hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (600 µg/ml) Kaspaz 9 gen ekspresyonu üzerine etkisi. 95

Şekil 58. MCF7 hücrelerinde *M. communis*. Esansiyel yağının (600 µg/ml) Bax gen ekspresyonu üzerine etkisi. 96
Şekil 59. MCF7 hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (600 µg/ml) Apaf-1 gen ekspresyonu üzerine etkisi. 96
Şekil 60. MCF7 hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (600 µg/ml) apoptoz mekanizmasında rol alan genlerin ekspresyonu üzerine etkisinin karşılaştırılması. 97
Şekil 61. Apoptotik genlerin kontrol grubu ve 600 µg/ml *M. communis* esansiyel yağ ile ortalama Ct± standart sapma değerleri. 98
Şekil 62. Apoptotik genlerin kontrol grubu ve 600 µg/ml *M. communis* esansiyel yağ ile ortalama Ct değerlerinin karşılaştırılması 98
Şekil 63. MCF10A hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (750 µg/ml) Bcl-2 gen ekspresyonu üzerine etkisi. 99
Şekil 64. MCF10A hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (750 µg/ml) Kaspaz 9 gen ekspresyonu üzerine etkisi. 100
Şekil 65. MCF10A hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (750 µg/ml) Apaf-1 gen ekspresyonu üzerine etkisi. 100
Şekil 66. MCF10A hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (750 µg/ml) Bax gen ekspresyonu üzerine etkisi. 101
Şekil 67. MCF10A hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (750 µg/ml) apoptoz mekanizmasında rol alan genlerin ekspresyonu üzerine etkisinin karşılaştırılması. 102
Şekil 68. Apoptotik genlerin kontrol grubu ve 750 µg/ml *M. communis* esansiyel yağ ile ortalama Ct değerlerinin karşılaştırılması 103
Şekil 69. MCF10A hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (600 µg/ml) Bcl-2 gen ekspresyonu üzerine etkisi. 103
Şekil 70. MCF10A hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (600 µg/ml) Kaspaz 9 gen ekspresyonu üzerine etkisi. 104
Şekil 71. MCF10A hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (600 µg/ml) Apaf-1 gen ekspresyonu üzerine etkisi. 105
Şekil 72. MCF10A hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (600 µg/ml) Bax gen ekspresyonu üzerine etkisi 105
Şekil 73. MCF10A hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (600 µg/ml) apoptoz mekanizmasında rol alan genlerin ekspresyonu üzerine etkisinin karşılaştırılması. 106
Şekil 74. Apoptotik genlerin kontrol grubu ve 600 µg/ml *M. communis* esansiyel yağ ile ortalama Ct değerlerinin karşılaştırılması. 107

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge No: **Sayfa No:**

Çizelge 1. Kaspazların Sınıflandırılması 14

Çizelge 2. Bcl-2 ailesinin sınıflandırılması 18

Çizelge 3. *Myrtus communis* L. uçucu yağ bileşenleri 36

Çizelge 4. 96 kuyucuklu 'plate'lere ekim yapılan hücrelerin ve muamele edilen maddelerin şematize edilmiş şekli 38

Çizelge 5. RNA konsantrasyonlarının (ng/ µl) ve absorbans değerlerinin (260/280 nm) hesaplanarak cDNA izolasyonu için eklenen RNA ve su miktarının belirlenmesi 40

Çizelge 6. cDNA sentez karışım oranları ..... **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

Çizelge 7. cDNA eldesinde ısıl döngüler ve süreleri ..... **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

Çizelge 8. Real time PCR reaksiyon bileşenleri ve miktarları 42

Çizelge 9. RT-qPCR reaksiyonunda ısıl döngüler ve süreleri 42

Çizelge 10. Real time PCR için kullanılan gen dizileri 43

Çizelge 11. MCF7 hücre hattı için *M. communis* esansiyel yağının 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir). 44

Çizelge 12. MCF10A hücre hattı için *M. communis* esansiyel yağının 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir). 45

Çizelge 13 MCF7 hücre hattı için *M. communis* esansiyel yağının 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir). 47

Çizelge 14. MCF10A hücre hattı için *M. communis* esansiyel yağının 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir). 47

Çizelge 15. MCF7 hücre hattı için *M. communis* esansiyel yağının 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir). 49

Çizelge 16. MCF10A hücre hattı için 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir). 50

Çizelge 17. MCF7 hücre hattı için *M. communis* esansiyel yağının 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir). 52

Çizelge 18. MCF10A hücre hattı için *M. communis* esansiyel yağının 120-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir). 52

Çizelge 19. MCF7 hücre hattı için Linalool bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir). 54

Çizelge 20. MCF10A hücre hattı için Linalool bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir). 55

Çizelge 21. MCF7 hücre hattı için Linalool bileşenin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir). 57

Çizelge 22. MCF10A hücre hattı için Linalool bileşenin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir). 57

Çizelge 23. MCF7 hücre hattı için Linalool bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir). 59

Çizelge 24. MCF10A hücre hattı için Linalool bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir). 60

Çizelge 25. MCF7 hücre hattı için Linalool bileşenin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir). 62

Çizelge 26. MCF10A hücre hattı için Linalool bileşenin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir). 62

Çizelge 27. MCF7 hücre hattı için α-Pinene bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir). 64

Çizelge 28. MCF10A hücre hattı için α-Pinene bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir). 65

Çizelge 29. MCF7 hücre hattı için α-pinen bileşenin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir 67

Çizelge 30. MCF10A hücre hattı için α-pinen bileşenin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir). 67

Çizelge 31. MCF7 hücre hattı için α-Pinene bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir)..... 69

Çizelge 32. MCF10A hücre hattı için α-Pinen bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir)..... 70

Çizelge 33. MCF7 hücre hattı için α-pinen bileşenin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir)..... 72

Çizelge 34. MCF10A hücre hattı için α-pinen bileşenin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir)..... 72

Çizelge 35. MCF7 hücre hattı için 1,8-cineole bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir)..... 74

Çizelge 36. MCF10A hücre hattı için 1,8-cineole bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir)..... 75

Çizelge 37. MCF7 hücre hattı için 1,8-sineol bileşenin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir)..... 77

Çizelge 38. MCF10A hücre hattı için 1,8-sineol bileşenin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir)..... 77

Çizelge 39. MCF7 hücre hattı için 1,8-cineole bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir)..... 79

Çizelge 40. MCF10A hücre hattı için 1,8-cineole bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir)..... 80

Çizelge 41. MCF7 hücre hattı için 1,8-sineol bileşenin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir)..... 82

Çizelge 42. MCF10A hücre hattı için 1,8-sineol bileşenin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir)..... 82

Çizelge 43. BJ hücre hattı için *M. communis* esansiyel yağının 750-600 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibasyon oranları (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir)..... 89

Çizelge 44. Apoptotik genlerin kontrol grubu ve 750 µg/ml *M. communis* esansiyel yağ ile ortalama Ct± standart sapma değerleri. 93
Çizelge 45. Apoptotik genlerin kontrol grubu ve 750 µg/ml *M. communis* esansiyel yağ ile ortalama Ct± standart sapma değerleri. 102
Çizelge 46. Apoptotik genlerin kontrol grubu ve 600 µg/ml *M. communis* esansiyel yağ ile ortalama Ct± standart sapma değerleri. 107

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A549 : İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattı

AIF : Apoptoz İndükleyici Faktör

APAF-1 : Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1

BAD : Bcl-2 ile ilişkili hücre ölümü agonisti

BAK : Bcl-2 homolog antagonist öldürücü

BAX : Bcl-2 ile ilişkili X proteini

BCL-w : Bcl-2 benzeri protein 2

BCL-xL : B hücreli lenfoma-ekstra geniş

BCL2 : B hücreli lenfoma 2

BEL-7402 : İnsan hepatom hücre hattı

BID : BH3 etkileşimli-domain ölüm agonisti

BIM : Bcl-2 benzeri protein 11

BJ : İnsan Sağlıklı Fibroblast Hücre Hattı

BNIP3 : Bcl-2 İlişkili Protein 3

c-FLIP : Hücresel FLICE inhibitör proteini

cIAP1 : Apoptosis Proteininin Hücresel İnhibitörü 1

C10H16 : Adamantan

C15H24 : Kariofilen

C5H8 : İzopren

CAD : Kaspazlarla Aktive Edilen DNAz

CARD : Kaspazı Aktive Eden Bölge

CD1 : Başkalaşım kümesi 1

Ced : Caenorhabditis elegans hücre ölüm geni

DD : Ölüm Domaini

DED : Ölüm Oluşturan Bölge

DIABLO : Doğrudan IAP'a bağlanan düşük pl'lı protein

DISC : Ölümü Başlatan Sinyalleşme Yapısı

FAS : Apoptoz Antijeni 1

FBS : Fetal Sığır Serumu

GC-MS : Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi

HCT-116 : İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattı

Hep G2 : İnsan Karaciğer Kanseri Hücre Hattı

HSP : Isı Şok Proteini

IC50 : Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu

ICAD : CAD Baskılayıcısı

LUBAC : Lineer ubiquitin zincir düzeneği kompleksi

M.C : Myrtus Communis

MAPK : Mitojenin Etkinleştirdiği Protein Kinaz

MCF10A : İnsan Sağlıklı Meme Epitel Hücre Hattı

MCF7 : İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı

MMP : Mitokondri Zar Geçirgenliği

MOMP : Mitokondriyal Dış Membran Geçirgenliği

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

MAPK : Mitojenin Etkinleştirdiği Protein Kinaz

Myc : Proto-onkogen

NEAA : Non esansiyel amino asitler

NF-KB : Çekirdek Kappa B Faktörü

NOXA : Phorbol-12-miristat-13-asetat ile indüklenen protein 1

OMI : HtrA serin peptidaz – 2

p53 : Tümör baskılayıcı protein 53

PBS : Phosphate Buffered Saline

PC-3 : İnsan Prostat Kanseri Hücre Hattı

PUMA : p53 ile Regüle Edilen Apoptoz Düzenleyicisi

RANBP2 : RAN bağlayıcı protein 2

RCD : Düzenlenmiş Hücre Ölümü

RIPK : Reseptör ilişkili serin / trenonin protein kinazlar

RT-PCR : Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SW-620 : İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattı

Smac : Sekonder mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörü

TNF : Tümör Nekroz Faktörü

TNFR : Tümör Nekroz Faktör Reseptörü

TRADD : TNFR'e bağlı Ölüm Bölgesi

TRAF : TNF Reseptörü ile ilişkili Faktör

TRAIL : TNF'yle ilişkili Apoptozu Uyaran Bağ

VDAC2 : Gerilime bağlı anyon seçici kanal proteini 2

ÖZET

Myrtus communis L. Bitkisinden Elde Edilen Esansiyel Yağın ve Bileşenlerinin MCF7, MCF10A ve BJ Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkisinin İncelenmesi

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür ve son 20 yılda çok sayıda moleküler, farmasötik ve klinik çalışmalar yapılmıştır. Özellikle son yıllarda yapılan araştırmalarda bitkilerde yer alan bileşenlerin antioksidan ve apoptotik aktivitelerine karşı ilgi giderek artmıştır. Bu çalışmada, geleneksel tıpta ve kanser dahil çeşitli hastalık alanları üzerinde yapılan çalışmalarda kullanılan bir _Myrtus communis_ Linnaeus ekstraktının anti-proliferatif ve apoptotik etkilerini araştırmayı amaçladık.

Çalışmada, insan meme kanseri hücre hattı MCF7, 24 ve 48 saat boyunca artan _M. communis_ uçucu yağ dozlarına maruz bırakıldı ve sitotoksik aktiviteler MTT testleri ile değerlendirildi. Gözlenen toksisitenin tümöre özgü karakteristik özelliklere sahip olup olmadığını değerlendirmek için, (yağın) aynı dozları insan tümörijenik olmayan MCF10A meme hücre hattına paralel olarak maruz bırakıldı. Ayrıca, uçucu yağın bileşenleri olarak bildirilen üç terpenoid (1,8-sineole, a-Pinen, linalool) bileşiğin MCF7 ve MCF10A hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırmak üzere saf formda kullanıldı. Elde edilen sonuçlar, sineol hariç, diğer iki terpenoidin gerçekten meme kanseri hücrelerinde hücre ölümünü indükleme kapasitesine sahip olduğunu ortaya koydu. Ek olarak, _M. communis_ uçucu yağının terapötik ve apoptotik konsantrasyonu (750 ve 600 ug/ml, 24 saat) belirlendikten sonra, yağın hücre tipi seçiciliği epitel olmayan yani insan BJ fibroblastı kullanılarak test edildi. BJ hücreleri üzerinde, meme kanseri hücrelerinin ölümünü indükleyen yağ konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi, bu da yağın hücre tipine özgü bir aktivite sergilediğini gösterir. Son olarak, yağın moleküler etkisini anlamak amacıyla, hücreler _M. communis_ uçucu yağına maruz kaldıktan sonra 4 apoptoz aracısının (Bcl2, Caspase 9, Apaf-1 and Bax) gen ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler gerçek zamanlı PCR ile belirlendi. Gerçekten de, yağın terapötik konsantrasyonları, anti-apoptotik Bcl2 ekspresyonu üzerinde farkedilebilir bir etkiye sahipti. En önemlisi ise bu etki tümör ve normal hücreler arasında farklılık gösterdi. Bcl2 ekspresyon seviyeleri MCF7 kanser hücrelerinde 5.5 kata kadar azalırken, aslında tümör-olmayan MCF10A hücrelerinde 3 kata kadar arttı. Test edilen diğer tüm apoptoz aracıları esansiyel yağdan etkilenmedi veya sadece zayıf bir şekilde etkilendi.

Sonuç olarak, yukarıdaki sonuçlar ve Bcl2 seviyesindeki değişiklikler _M. communis_ yağının intrinsik yolak aracılığıyla apoptoza neden olduğunu desteklemektedir. _M. communis_ esansiyel yağının aktivitesine dayanarak BcL2'nin kansere özgü değişikliğinin gözlemlenmesi ve fibroblastların özüte karşı hassas olmaması meme kanseri terapötik ajanlarının geliştirilmesi için umut vaat edicidir.

<u>Anahtar Sözcükler:</u> Apoptoz, Kanser, MCF7 hücreleri, MCF10A hücreleri, _Myrtus communis_ L.

ABSTRACT

Investigation of Cytotoxic and Apoptotic Effects of Essential Oil and Its Components Obtained from Myrtus Communis L. on MCF7, MCF10A and BJ Cell Lines

Breast cancer is the most common type of cancer in women and a plethora of molecular, pharmaceutical and clinical studies have been performed over the past 20 years. One particular field of molecular pharmacology that attracts increasing interest concerns the antioxidant and apoptotic activities of plant components.In this study, we aimed at investigating the anti-proliferative and apoptotic effects of a *Myrtus communis* Linnaeus extracts, which are used traditional medicine and in studies on diverse disease areas including cancer.

Here, the human breast cancer cell line MCF7 was exposed to increasing doses of *M. communis* essential oil for 24 and 48 hours and cytotoxic activities were evaluated by MTT tests. To assess if the observed toxicity has tumor-specific characteristics, human non-tumorigenic MCF10A cells were exposed in parallel. Furthermore, three terpenoids, reported as components of the Essential oil (1,8-cineole, α-Pinene, linalool), were used as pure compounds to provide evidence for a contribution of these compounds to the observed cytotoxic effects on MCF7 and MCF10A cells. The obtained results revealed that with the exception of the cineole, the two other terpenoids had indeed the capacity to induce cell death in breast cancer cells. In addition, after establishing a therapeutic window (750 and 600 µg/ml, 24 h) of the *M. communis* essential oil, the cell type specificity of the oil was tested by using non-epithelial, human BJ fibroblast. Notably, BJ cells were insensitive to the oil at concentration that induce cell death of the breast cancer cells, thus supporting a cell type specific activity. Finally, with the aim of obtaining mechanistic insight into the molecular action of the oil, the changes in gene expression levels of 4 apoptosis mediators (Bcl2, Caspase 9, Apaf-1 and Bax) upon exposure to *M. communis* essential oil was determined by real-time PCR. Indeed, therapeutic concentrations of the oil had a dramatic effect on expression of anti-apoptogenic Bcl2. Most importantly, this effect diverged between tumor and normal cells. While Bcl2 expression levels decreased up to 5.5-fold in MCF7 cancer cells, they actually increased up to 3-fold in the non-tumorigenic MCF10A cells. All other tested apoptosis mediators were not, or only weakly affected by the oil.

In conclusion, the above results support the concept that *M. communis* essential oil induces cell death, most likely apoptosis triggered via the intrinsic pathway through alterations of Bcl2 levels. The observation of the cancer-specific alteration of BcL2 and insensitivity of fibroblasts has promise for the development of novel breast cancer therapeutic agents based on the activities of *M. communis* essential oil described in the present study.

Keywords: **Apoptosis, Cancer, MCF7 cells, MCF10A cells, *Myrtus communis* L.**

1. GİRİŞ

Bitkiler gibi doğal kaynaklardan türetilen moleküller, çoğu insan hastalığının tedavisi için geleneksel ilaçların keşfedilmesinde önemli bir rol oynar ve bu nedenle modern tıbbın temelini oluşturur [1]. Son otuz yıl içerisinde kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik etkilerin araştırılması açısından çok sayıda bitki özütü ile çalışılmış, bu da bazı önemli ilaçların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Ek olarak, bazı ekstraktların, farklı kanser hücre hatları arasında veya sağlıklı hücre hatları arasında sitotoksik ve seçici oldukları ve farklı mekanizmalarla olsa bile temel olarak hücre çoğalmasını inhibe ederek hareket ettikleri gösterilmiştir [2].

Mersin (*Myrtus communis* L.), Akdeniz bölgesine özgü olan tıbbi bir bitkidir ve antik çağdan bu yana tıbbi özellikleri açısından kullanımı yerli halk tarafından tercih edilmiştir [3]. Mersin bitkisi Akdeniz ülkelerinin büyük çoğunluğunda, Kuzey Amerika'nın sıcak bölgelerinde ve Avusturalya'da geniş bir alana yayılmış; Tunus, Fas, Türkiye, Fransa sahillerinde ise yabani olarak yetişen bir bitki türüdür [4-13]. *Myrtus communis*, murt ve mersin bitkisi olarak bilinmesinin yanı sıra ülkemizin Güney sahillerinde 'hambeles' olarak bilinir ve yüzyıllar boyunca diare, mide ülseri, hemoroid, inflamasyon, regl, başağrısı, çarpıntı, burun kanaması, aşırı terleme, öksürük, akciğer ve deri hastalıkları, diyabet, mide ekşimesi, şişlik gibi farklı rahatsızlıklarda da birçok tıbbi kullanımı olduğu bilinmektedir[14]. Daha önce yapılan çalışmalarda, *Myrtus communis* özütlerinin antimikrobiyal ve antioksidan [15] etkiler gösterdiği doğrulanırken, esansiyel yağının önemli antioksidan ve antimutajenik [16] etkisi olduğu belirlenmiştir. Mersin bitkisinin doğal antioksidanlar, anti-genotoksik, antimutajenik ve kemopreventif ajanların kaynağı olabileceği açıktır[16]. Ancak, *M. communis*'in antikanser aktivitesi ve apoptoz yolağı üzerine etkileri ile ilgili yeterli sayıda araştırma yapılmamıştır.

Apoptoz, çeşitli fizyolojik süreçlerde ve patolojik durumlarda kritik bir rol oynayan programlanmış hücre ölümünün en kapsamlı çalışılan formlarından birini temsil eder [17]. Doku homeostazının bir taraftan hücre ölümü ve diğer taraftan hücre proliferasyonu arasında ince bir denge ile sağladığı duruma karşın, bu parametrelerden birinde herhangi bir değişiklik oluşması insan hastalıklarının temelini oluşturabilir. Normal şartlar altında apoptoz tümör oluşumunu önlemeye yönelik bir korunma

mekanizmasını temsil eder ve insan kanser hücrelerinin en belirgin karakteristik özellikleri bu mekanizmalardan kaçınmalarıdır [18]. Tümör oluşumu, düzensiz proliferasyon ve apoptotik mekanizmaların baskılanması sonucu ortaya çıkmaktadır. Tümor oluşumu ve gelişimi sırasında doku homeostazının hasar gören mekanizmasına uygulanacak müdahele kanser tedavisi için büyük bir fırsat sunmaktadır [19]. Bizim çalışmamızda da programlı hücre ölümüne dirençli olduğu bilinen kanser hücreleri üzerinde *M. communis* bitki özütünün antiproliferatif ve apoptotik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada in vitro ortamda MCF7, MCF10A hücre hatları, *M. communis* esansiyel yağının ve bu yağın içerisinde bulunan 3 temel kimyasal bileşiğin (1,8-cineole, α-Pinene, linalool) farklı konsantrasyonlarıyla muamele edilerek sitotoksik aktivitesine bakılmıştır. MCF7 için MCF10A kıyasla daha sitotoksik olan dozların (*M. communis*, 750 ve 600 µg/ml) belirlenmesiyle, uygulanan maddenin hücrede apoptozu uyarıp uyarmadığını anlamak için bu iki hücre hattında Bcl2, Kaspaz 9, Apaf-1 ve Bax genlerinin ekspresyon düzeyleri RT-qPCR yöntemi uygulanarak incelenmiştir. Ayrıca, tedavi edici özelliğe sahip konsantrasyonun belirlenmesiyle sadece olası hücre tipi seçiciliği üzerine olup olmadığını görmek için epitel olmayan hücrelerde yani insan BJ fibroblastı hücre hattı da belirlenen dozlar ile muamele edilerek sitotoksik aktivitesine bakılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Mrytus communis* L.

Myrtus communis L., geleneksel tıpta dünya çapında kullanılan tanınmış tıbbi bir bitkidir. 100 cins ve 3000 tür içeren Myrtaceae familyasına ait olan bu tür, çok yıllık, çalı formunda, yaz kış yeşil, genellikle kısa boylu ender olarak da 1-3 metre boyları arasındadır[20]. Güney Avrupa, Kuzey Afrika ve Batı Asya'ya özgüdür, ayrıca Güney Amerika, Kuzey Batı Himalaya ve Avustralya'da da yaygınlık göstermektedir [21,22]. *M. communis*'in çam ormanlarında ve nehir kenarlarında, özellikle deniz seviyesinden 500-600 metre yükseklikte Toros Dağları'nda yetiştiği bilinmektedir. Ülkemizde genel olarak 'Mersin' adıyla bilinmesine rağmen, özellikle Güney sahillerinde yöresel olarak 'murt', 'hambeles' ve 'adi mersin' olarak da bilinmektedir [20,23].

Çok yıllık bir bitki olan *M. communis*.'in dalları, yaprakları ve meyveleri gibi farklı kısımları uzun süreden beri halk arasında gıda ve baharat amaçlı kullanılmaktadır. Aynı zamanda geleneksel olarak antiseptik ve dezenfektan ilaç olarak yaygın şekilde kullanılan bir bitkidir. *M. communis* esansiyel yağı antiseptik olma özelliğinden dolayı göğüs hastalıklarını tedavi etmek için de kullanılmaktadır [24]. *M. communis,* diare, peptik ülser, hemoroit, iltihap, kanama, baş ağrısı, çarpıntı, burun kanaması, aşırı terleme, pulmoner ve cilt hastalıklarının tedavisi için de geleneksel olarak kullanılmaktadır, buna karşın kliniksel ve deneysel çalışmalar bu bitkinin daha geniş bir farmakolojik ve terapötik etki yelpazesine sahip olduğunu göstermektedir [25-27]. Ayrıca, bu bitkinin yaprakları ve meyveleri idrar yolları rahatsızlıklarının tedavisinde de çokça kullanılmaktadır [28].



Şekil 1. *Myrtus communis* L. Bitkisi

2.1.1. *Myrtus communis* L. Bileşenleri

M. communis bitkisinin özütü, fenolik asitler, tanenler ve flavonoidler olmak üzere üç ana kimyasal sınıfta gruplandırılmış polifenolik bileşikleri içermektedir. Ayrıca *M. communis* bitkisinin esansiyel yağı, terpenler (monoterpen hidrokarbonlar ve seskiterpen hidrokarbonlar), terpenoidler (oksijenli monoterpenler ve oksijenli seskiterpenler) ve fenilpropanoidler açısından zengin bir içeriğe sahiptir [29-33].

Fenolik asitler: Mersin bitkisi yüksek miktarda fenolik bileşik içermektedir. Fenolik bileşiklerin önemli bir kategorisine sahip olan fenolik asitler, antioksidan ve antiradikal özellikleri son derece yüksek olan maddelerdir. Kimyasal yapılarına göre; yapılarında hidroksi benzoik asit bulunduranlar ve bulundurmayanlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar[34].

Flavonoidler: Bitkisel gıdalarda bol ve yaygın olarak bulunan, değişken fenolik yapıya sahip doğal maddeler içeren bileşiklerdir. Bu doğal ürünler sağlık üzerindeki faydalı etkileriyle bilinmektedirler. Kanser, alzheimer, ateroskleroz gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkili birçok olumlu biyokimyasal ve antioksidan etkileri vardır [35,36]. Flavonoidler, sağlığı destekleyici etkileri açısından geniş bir yelpazeye sahiptir ve çeşitli nutrasötik, farmasötik, tıbbi ve kozmetik uygulamalarda vazgeçilmez bileşenlerdir. Bunun nedeni, temel hücresel enzim fonksiyonlarını modüle etme kapasiteleri ile birlikte antioksidan, antienflamatuar, anti-mutajenik ve anti-kanserojen özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, ksantin oksidaz (XO), siklooksijenaz

(COX), lipoksijenaz ve fosfoinositid 3-kinaz gibi çeşitli enzimler için güçlü birer inhibitör oldukları bilinmektedir[37,38]. Flavonoidler, hücreler arası iletişimi arttırmakla, ornitin dekarboksilazı ve timidinin DNA'nın yapısına katılmasını engellemek suretiyle hücre proliferasyonunu inhibe ederek, ilgili reseptörleri bloke edip antiproliferatif etki göstererek, laktat transportunu ve kalmodulini inhibe edip vaskuler dokunun endotelyumundaki nitrikoksit (NO) sentezinin regülasyonunu düzenleyerek antitümör etki gösterirler[39].

Tanenler: Polifenol yapısında ikincil metabolitler olup yüksek yapılı bitkilerin pek çoğunda bulunan ve suda çözünebilen bileşiklerdir[40]. Ellagitanenler, gallotanenler, kompleks tanenler ve kondense tanenler olmak üzere dört temel gruba ayrılırlar. Ayrıca tanenlerin anti-kanserojen, anti-oksidan ve anti-mutajenik oldukları bildirilmiştir. Tanenlerin antikarsinojenik ve antimutajenik potansiyelleri, lipid peroksidaton da dahil olmak üzere hücresel oksidatif hasarın korunmasında önemli olan antioksidan özelliklerine bağlı olabilir. Superoksit radikallerinin oluşmasının, taninler ve ilgili bileşikler tarafından inhibe edildiği daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir. Ayrıca tanenlerin, kanın pıhtılaşmasını hızlandırmak, kan basıncını düşürmek, serum lipit seviyesini düşürmek ve immün yanıtları modüle etmek gibi başka fizyolojik etkiler de gösterdiği bildirilmiştir. Bu etkiler için dozaj ve tanen türleri çok önemlidir [41].

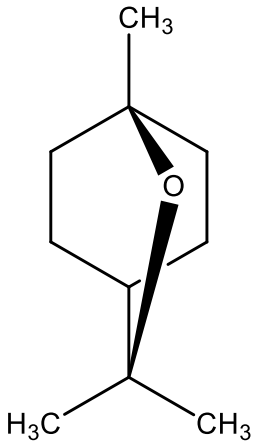
Terpenler: Yapısal ve işlevsel olarak farklı sınıflar oluştururlar. Terpenler, izopren birimleri (C_5H_8) adı verilen birkaç beş karbonlu baz kombinasyonundan üretilen hidrokarbonlardır. Bitki hücrelerinin sitoplazmasında sentezlenirler ve sentez asetil-CoA'dan başlayarak mevalonik asit yolu ile ilerler. Ana terpenler, monoterpen ($C_{10}H_{16}$) ve seskiterpendir ($C_{15}H_{24}$), fakat daha uzun zinciri olanları da mevcuttur. Mersin bitkisinin esansiyel yağlarında bulunan terpen örnekleri arasında pinen, limonen, sabinen ve myrcene bulunur. Yapılan çalışmalarda terpenlerin mutajenlere karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir[42].

Terpenoidler: Oksijen molekülleri ekleyen ve metil gruplarını hareket ettiren veya kaldıran enzimler yoluyla biyokimyasal değişikliklere uğrayan terpenlerdir[43]. Terpenoidler alkoller, esterler, aldehitler, ketonlar, eterler, fenoller ve epoksitler içinde alt gruplara ayrılır. Mersin bitkisinin terpenoidlerinin örnekleri, myrtenol, linalool, linalil asetat ve geraniol'dür.

Seskiterpenler: *M. communis* esansiyel yağının temel bileşenlerindendir. Kanser gelişimini azaltmada terapötik potansiyel etki göstermesinin yanısıra anti-oksidan etkinliğe sahip bir moleküldür. Bu molekül bitkilerde ve deniz canlılarında bulunmaktadır [44,45].

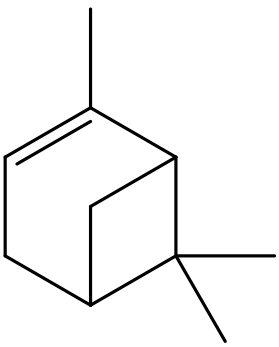
Monoterpenler: Myrtle esansiyel yağlarındaki ana terpenler monoterpenler, seskiterpenler ve terpenoidleridir[16,47-48]. Farklı hücre hatlarında yapılan çalışmalarda monoterpenlerin antioksidan ve antitümör etkinliğe sahip olduğu bildirilmiştir. Monoterpenlerin birkaçının, sadece kanser oluşumunu veya ilerleyişini değil, aynı zamanda mevcut malign tümörleri de gerileten antitümör aktivitesine sahip olduğu da bildirilmiştir[49].

Ökaliptol: 1,8-sineol olarak da bilinen ökaliptol, Okaliptüs, Croton, Mısır, Pectis, Rosamarinus ve Salvia cinslerinin birçok aromatik bitkisinde doğal olarak bulunan bir monoterpendir [50-52] (Şekil 2). Önceki çalışmalar, ökaliptolün antimikrobiyal[53],antialerjik,antienflamatuvar[54], hepatoprotektif[55], antikarsinojenik[56] ve gastroprotektif aktiviteler dahil olmak üzere bir dizi biyolojik ve farmakolojik aktivitesi için incelendiğini göstermiştir. Antikarsinojenik aktivitesi ile ilgili yapılan bir çalışmada, 1,8-sineolün insan kolorektal hücre hattında (HCT 116) apoptozu indükleyerek proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir [57]. Ayrıca ökaliptolün güçlü bir anti-inflamatuar etkiye sahip olduğunu göstermeyi hedefleyen çalışmalar, solunum yolu hastalıkları üzerine odaklanarak 1,8-sineolün, mevcut kortikosteroid kullanımı için yardımcı bir terapi olabileceğini, akciğer ve kolon dokularında immünolojik bir sorunu önemli ölçüde engellemek için yeterli biyoaktiviteyi koruduğunu göstermektedir [58]. Bunun yanı sıra, yapılan diğer çalışmalar ökaliptolün antioksidan ve sitoprotektif mekanizmaların, bileşiğin gastroprotektif (aneljezik) etkisine dahil olduğunu göstermektedir [59].



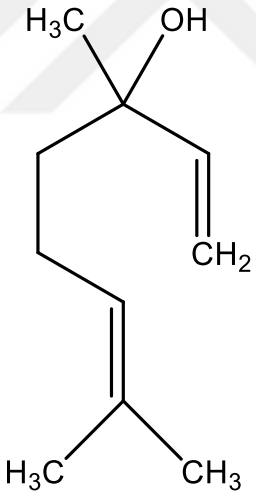
Şekil 2. 1,8-sineol'ün şematik formülü

α-pinen: Terpen sınıfına ait olan organik bir bileşendir (Şekil 3). *M. communis* bitkisinin esansiyel yağının ana bileşenlerinden biri olan α-pinen'in anti-karsinojen özelliğe sahip olduğunu göstermek amacıyla yapılan bir çalışmada, karaciğer kanseri BEL-7402 hücre hattında hücre döngüsünün G2 fazından M fazına geçişinin (G2/M) α-pinen tarafından inhibe edildiği rapor edilmiştir [60]. Benzer şekilde prostat kanseri PC-3 hücre hattında yapılan çalışmada da α-pinen'in hücre büyümesini önemli ölçüde engellediği ve hücre döngüsünü durdurup apoptozu tetiklediği bildirilmiştir [61]. Ayrıca, THP-1 (insan monosit hücre hattı) hücrelerinde yapılan bir çalışmada, α-pinen'in mitojenle aktive olan protein kinazların (MAPK'ler) ve nükleer faktör-kappa B'nin (NF-KB) baskılanması yoluyla anti-inflamatuar aktivite gösterdiği belirlenmiştir[62].



Şekil 3. ***α***-pinen'in şematik formülü

Linalool: *M. communis* esansiyel yağında bulunan ana bileşenlerden biri olan Linalool'ün analjezik, anti-inflamatuar, anti-viral, anti-bakteriyel ve anti-kanserojenik etkilere sahip olduğu düşünülmektedir [63] (Şekil 4). Linalool'ün anti-karsinojenik mekanizması ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada Linalool'ün kansere özgü oksidatif stres yoluyla HCT 116 (insan kolorektal kanser) hücre hattında apoptozu indüklediği bildirilmiştir [64]. Benzer şekilde, SW 620 (insan kolorektal kanser hücre hattı), T-47D (insan meme kanseri hücre hattı), Hep G2 (insan karaciğer karsinom hücre hattı) ve A549 (insan akciğer karsinom hücre hattı) hücre hatları üzerinde yapılan bir çalışmada, linaloolün hücre ölümünü tetiklediği ve hücrelerin apoptoza uğramasına neden olarak sitotoksik etkilere neden olduğu gösterilmiştir [65]. Ek olarak HeLa (İnsan papillom virüsü hücre hattı) ve U937 (İnsan akut miyeloid lösemi hücre hattı) hücreleri üzerinden yapılan bir çalışmada hücre döngüsünü durdurduğu ve sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir [66].



Şekil 4. Linalool'un şematik formülü

2.2. Kanser

Kanser, anormal bir hücre grubunun, normal hücre bölünmesi kurallarını göz ardı ederek kontrolsüz bir şekilde prolifere olduğu bir hastalık olarak tanımlanabilir. Normal hücreler, hücrelerin bölünmesi, başka bir hücreye farklılaşması veya ölmesi gerektiğini belirleyen sinyallere maruz kalır. Kanser hücreleri, bu sinyallerden bir dereceye kadar otonomi geliştirerek kontrolsüz büyümeye ve çoğalmaya başlar. Eğer bu

çoğalmanın devam etmesine ve yayılmasına izin verilirse ölümcül olabilir. Aslında, kansere bağlı ölümlerin neredeyse %90'ı, metastazdan kaynaklanmaktadır. Modern kanser biyolojisinin temeli basit bir ilkeye dayanmaktadır, hemen hemen tüm memeli hücreleri, hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve hücre ölümünü kontrol eden benzer moleküler yolakları paylaşırlar. Kanserin doğuşu ve tedavisine ilişkin araştırmaların temelini oluşturan teori; normal hücrelerin moleküler, biyokimyasal ve hücresel seviyede bu yolaklar üzerindeki anormal değişimlerin bir sonucu olarak kansere dönüşmesidir ve her bir hücre için bu bozulmanın ortaya çıkabileceği sınırlı sayıda yol vardır. Kanser araştırmalarında son 50 yıldaki olağanüstü gelişmeler, kanser hücrelerinin bu otonomiyi nasıl geliştirdiği konusunda bir fikir oluşturmaktadır. Bundan dolayı artık kanser, hücre genomundaki değişiklikler veya mutasyonlar içeren bir hastalık grubu olarak tanımlanabilmektedir (Introduction to Cancer Biology- Momna Hejmadi).

Literatürde bilinen 100'den fazla kanser türü vardır. Kanser türleri genellikle kanserin oluşmaya başladığı doku veya organa göre adlandırılır. Ayrıca kanserler, epitel hücresi veya skuamöz hücresi gibi onları oluşturan hücre tipine göre de adlandırılır.

2.2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen malignitelerden biridir. Evrensel meme kanseri insidansı, son üç yılda yıllık %3,1 oranında artarak 2010 yılında 1,6 milyondan fazla vakaya yükselmiştir [67]. Türkiye kanser istatistiklerine göre ise 2009 yılında tanı konulan her 4 kadın kanserinden 1'i meme kanseridir. Ülkemizde meme kanseri tanısı alan kadınların %44,5'i 50-69 yaş arasında olduğu, %40,4 ünün ise 25-49 yaş aralığında yer aldığı görülmektedir. Meme kanseri evreleri incelendiğinde veri tabanında yer alan invaziv vakaların %11,1'i son evrededir. Meme kanseri vakalarının %5-10'unu kalıtsal nedenli oluşmaktadır. Meme kanserinin farklı alt tipleri, tanı ve tedavide zorluğa neden olan lümen veya bazal öncü hücre popülasyonunda meydana gelen farklı gen mutasyonlarından kaynaklanmaktadır [68]. Erken başlangıçlı meme kanseri için yüksek riskli ailelerin bir kısmında BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar sorumludur [69]. Aile öyküsünde meme kanseri olan kişilerde erken yaşta meme kanseri görülme ihtimali artmaktadır [70]. Yapılan meme kanseri çalışmalarında; menarş yaşının, önceki

biyopsi sayısının iyi anlaşılmış olan risk faktörleri olduğu belirtilmektedir [71]. Belirlenen diğer risk faktörlerinden bazıları yaş, menapoz yaşı, kilo, alkol kullanımı, hormon tedavisi, östrojen-progesteron kombinasyonu ve yüksek kemik mineral yoğunluğu olarak belirlenmiştir [72].

Meme kanseri için geliştirilen çok sayıda tedavi yöntemi vardır. Bu tedavi yöntemleri hastada oluşan meme kanseri türüne, tümörün boyutuna ve yayılma alanına bağlı olarak değişir. Meme kanseri olan hastalara genellikle birden fazla tedavi yöntemi uygulanır. Başlıca tedavi yöntemleri, ameliyatla tümör dokusunun kesilip çıkartılması, radyoterapi, kemoterapi, hormon tedavisi ve hedefe yönelik biyolojik terapi olarak sınıflandırılabilir. Ancak hem genetik hem de histopatolojik olarak heterojen olan meme kanseri gelişiminin altında yatan mekanizmalar belirsizliğini hala sürdürmektedir [69]. Bundan dolayı cerrahi, radyasyon ve konvansiyonel kemoterapi sınırlı düzeyde etki göstermektedir. Öte yandan, spesifik doğal veya sentetik kimyasal bileşikler kanserin malignitesinin baskılanması için yaygın olarak kullanılmaktadır [70].

2.3. *Myrtus communis* L. ve Kanser

Kanser, sıklığı her geçen gün artan ve hala yeterli bir tedavi yöntemi bulunamayan bir sağlık problemidir [73]. Kanser tüm dünyada en çok çalışılan hastalıklardan biri olmasına rağmen, ana umut kaynağının doğal ve özellikle bitki kaynaklı ürünler olduğunu gösteren çalışmalar giderek artmaktadır. Doğal veya doğal türevli ürünler modern tıbbın en önemli ilaç kaynağı olduğundan dolayı, bu doğal ürünlerin kanserdeki baskın rolü, antikanser bileşiklerin yaklaşık %74'ünü oluşturur [74]. Muhtemelen, ağır tarama ve hedefe yönelik detaylı bilimsel araştırma, kanser araştırmalarında potansiyel olarak "druggable" hedeflerin belirlenmesinde ve geliştirilmesinde en belirgin adım olacaktır [74,75].

M. communis'in farklı semptomlarda birçok tıbbi kullanımı vardır [76]. Aynı zamanda geleneksel tıpta antikanser amaçlı kullanımı hakkında da bazı bilgiler mevcuttur [22,76,77]. 2005 yılında Brigham Young Üniversitesi'ndeki UNLV Kanser Araştırma Enstitüsü'nde yapılan bir tarama çalışmasında, çeşitli bitkilerin uçucu yağları farklı kanser hücre hatlarına karşı test edilmiştir. *M. communis* esansiyel yağının belirli konsantrasyonları meme ve prostat kanseri hücre hatları üzerinde uygulanmış ve her iki

hücre hattında inhibisyon değerlerinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın en heyecan ve umut verici sonucu ise *M. communis* esansiyel yağının uygulanan dozlarının fibroblast hücre hattı üzerinde düşük inhibisyon değeri göstermesi olmuştur. Bu sonuçlara dayanarak *M. communis* esansiyel yağının seçici antikanser etkisinden bahsedilebilir. Bu tür tarama çalışmaları hızlı, ucuz ve pratik olmasının yanısıra ileri ki çalışmalar için ipuçları sağlamak açısından çok yararlıdır [78].

Yapılan başka bir çalışmada ise enjekte edilen CD1 farelerinin Ehrlich tümörü üzerindeki antikanser etkileri için *M. communis* esansiyel yağı test edilmiştir. Bu çalışmada, *M. communis* esansiyel yağın kanseri önleyici özelliklere sahip olduğu gösterilmiş ve *M. communis* esansiyel yağı için maksimum tolerans dozu (MTD) belirlenmiştir. Ehrlich tümörünün enjekte edildiği dört hayvan grubundan, bir grup kontrol grubu olarak kullanılmış, diğer üç gruba farklı *M. communis* dozları verilmiştir (Dozlar sırasıyla 2, 3, 4, deney grupları için 0.1, 0.2, 0.4 ml / kg'dır). Deney grubunda sağkalım süresinin anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir [79].

M. communis'in tıbbi özellikleri ile ilgili farklı çalışmalar bulunmasına rağmen çeşitli ekstrakları, esansiyel yağı ve yağın içeriğinde bulunan kimyasal bileşenlerle ilgili yapılan anti-kanser çalışmaları yeterli sayıda değildir. Bundan dolayı bu alanda yapılacak çalışmalar doğal ve sitotoksik etkisi olmayan ilaç araştırmalarına ışık tutacaktır.

2.4.Apoptoz

Vücudumuzdaki her hücre belli bir süre yaşar ve zamanı gelince ölür. Hücre ölümüyle hücre çoğalması arasında kontrollü bir denge vardır. Hücre ölüm tiplerinden biri olan apoptoz yunanca 'ağaçtan düşen yaprak' anlamına gelmektedir. Apoptoz genel olarak hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, programlı; RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan, organizmada homeostazı koruyan bir olaydır. Nekrozun aksine, apoptoz bir hücrenin belirli uyaranları aldıktan sonra aktif olarak ölüm yolunda ilerlemekte olduğu durumu tanımlamak için kullanılmaktadır [80]. Apoptoz terimi,1970'lerde Kerr ve arkadaşları tarafından tanımlandığından beri, biyolojik araştırmalarda en çok araştırılan süreçlerden biri olmaya devam etmektedir [81]. 1990'lı yıllara doğru, apoptozun genetik mekanizması ile ilgili önemli gelişmeler

sağlayacak iki bulgu tespit edilmiştir. İlk olarak, *Caenorhabditis elegans* isimli nematodun tek hücre düzeyinde tam gelişim dizisi bildirilmiş ve *C.elegans*'ın gelişim sürecinde oluşan 1090 somatik hücreden 131 hücrenin öldüğü gözlemlenmiştir. Bu programlı hücre ölümünde rol oynayan genler, araştırmacılar tarafından ced-3 ve ced-4 olarak tanımlanmıştır. İkinci olarak ise Bcl-2 adı verilen yeni bir gen keşfedilmiş ve bu genin insan tümör hücrelerinde, hücre bölünmesini harekete geçiren klasik bir onkogenin aksine apoptozu baskılayarak işlev gördüğü bildirilmiştir [82].

Apoptoz hücrenin kendini yok etmek için bir takım metabolik ve fizyolojik işlemleri devreye soktuğu bir olaydır. Apoptoz uyarısı alan hücre bulunduğu ortamdan uzaklaşır, komşu hücrelerle bağlantısını koparır, büzüşür ve kromatini yoğunlaşır, DNA'sı nukleozomlarından kesilir ve jel elektroforezinde tipik merdiven bant görünümü alır. Ancak hücre organelleri yapısal bütünlüklerini korur. Hücre zarı yapısında bulunan fosfotidil serin (PS) hücre zarının iç yüzünden dış yüzüne transloke olur. Çekirdek küçülür ve parçalara ayrılır. Apoptotik cisimcikler oluşur ve bu cisimcikler makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir, ancak enflamasyon görülmez[83,84]. Bu değişikliklerin bazılarını tespit etmeye dayalı teknikler; DNA kopmalarında etiketli nükleotidlerin dahil edilmiş terminal deoksinükleotidiltransferazı ile birleştirilmesi [85], hücre yüzeyine transloke olan PS'nin anneksin V ile boyanması [86] ve DNA'nın interkalasyon yapan ajanlarla boyanarak belirgin subdiploid DNA içeriğine sahip hücrelerin tespit edilmesi[87] apoptozu kanıtlamak için kullanılan standart araçlardır.

2.4.1. Apoptozon Düzenlenmesi

Apoptozda hayati rol oynadığı belirlenen birçok faktör (çoğunlukla proteinler) vardır. Bunlardan en önemlileri: kaspazlar, Bcl-2 protein ailesi, p53 geni ve ısı şok proteinleridir.

2.4.1.1. Kaspazlar

Kaspazlar, aspartil spesifik sistein proteaz ailesinin bir üyesidir. Bu terim "sisteine bağımlı aspartata özgü proteazlar" ın kısaltmasıdır. Hücre içinde aktif olmayan

pro-formlar (pro-kaspazlar) veya zimojenler olarak bulunurlar. Bir N-terminal "prodomain", büyük bir alt birim ve küçük bir alt birim içerirler ve apoptozun indüklenmesinin ardından aktif enzimlere yol açarlar.

Her aktif kaspaz, iki aynı büyük alt birim ve iki aynı küçük alt birimden oluşan bir tetramerdir. DED (Death Effector Domains) veya CARD (Caspase Recruitment Domains) içerebilirler. Bu domainlerin yardımıyla, aktif kaspazlar hücrenin içinde veya dışında bulunan diğer moleküllere bağlanabilir. Örneğin, ölüm reseptörleri Fas / CD95 (farklılaşma kümesi), TNFR1 (Tümör nekroz faktörü reseptörü), DR3 (Ölüm reseptörü) /TRAMP (TNFR'ye bağlı apoptoz aracılı protein) DR4/TRAIL (Tümör nekroz faktörüne bağlı apoptoz-indükleyen ligand) -R1, DR5/TRAIL-R2) sitoplazma içerisinde bir ölüm domain motifine bağlanan TNF süper ailesinin bir alt grubudur. FADD ve TRADD gibi adaptör moleküller kaspazların komplekse alınmasına yol açan bu ölüm alanı motifine bağlanmaktadır.

Kaspazlar, iki büyük alt kategoriye ayrılabilir (Çizelge 1): (a) mekanizmaya dahil olanlar ve apoptoz sırasında aktive edilenler yani apoptotik kaspazlar (Kaspaz 2, -3, -6, -7, -8, -9 and -10) (b) immün cevap sırasında pro-enflamatuar sitokinlerin işlenmesinde rol oynayanlar (kaspaz-1, -4, -5 ve -12) [89]

Apoptotik kaspazlar da iki alt aileye ayrılmıştır;

i. Başlatıcı kaspazlar; Kaspaz 2, 8, 9, 10

ii. Efektör kaspazlar; Kaspaz 3, 6, 7

Ölüm reseptörü aktivasyonu ile indüklenen apoptoz durumunda, süreç Kaspaz 8 veya Kaspaz 9 aktivasyonu ile başlar. Kaspaz 9 sırasıyla Kaspaz 3 ve Kaspaz 7'yi aktive eder ve diğer kaspazların kaskadı ile aktivasyonu başlar. Özellikle Kaspaz-3, hem Kaspaz-2'yi hem de Kaspaz-6'yı aktive ederken, Kaspaz-6, Kaspaz-8 ve -10'u aktive eder [88], bu şekilde, ölüm reseptörü aktivasyonunda tüm ilgili kaspazların toplanması apoptotik kaskadı indükler.

Yapılan çalışmalarda, Kaspaz -1, -4, -5 ve -12'ye ve immün yanıt sırasında pro-enflamatuar sitokinlerin işlenmesindeki rollerine ilişkin olarak, Kaspaz-1'in baskın bir negatif mutantını ifade eden farelerin ve Kaspaz-1 eksikliği bulunan farelerin iskemi kaynaklı beyin hasarına karşı korunduğu belirtilmiştir. Bu nedenle, en azından bazı

durumlarda Kaspaz-1'in baskılanmasının apoptozun önlenmesine yardımcı olabileceği tahmin edilmektedir. Kaspaz-3 veya Kaspaz-9'dan yoksun fareler, beyinde artan sayıda nörona sahiptir ve lenfositleri, bazı apoptotik uyaranlara kısmen dirençlidir [90-93]. Bundan dolayı kaspazlar sadece apoptozun son aşamasına kadar hücresel substratların bozulmasından sorumlu değil, aynı zamanda hücre ölümü başlangıcının kritik düzenleyicileridir.

Çizelge 1. Kaspazların Sınıflandırılması

Başlatıcı Kaspazlar		**Efektör Kaspazlar**	**İnflamatuar Kaspazlar**
Ekstrinsik Yolak	**İntrinsik Yolak**	Kaspaz 3 Kaspaz 6 Kaspaz 7	Kaspaz 1 Kaspaz 4 Kaspaz 5 Kaspaz 12
Kaspaz 8 Kaspaz10	Kaspaz 2 Kaspaz 9		

Kaspaz-2: Tüm kaspazlar arasında evrimsel olarak en çok korunmuş kaspaz olmasına rağmen, apoptozda yeterli düzeyde tanımlanmamış bir rolü vardır [94]. Her iki grubun özelliklerine sahip olduğu için Kaspaz-2'yi başlatıcı veya efektör kaspaz olarak karakterize etmek oldukça zor olmuştur. Kaspaz-2'nin substrat spesifikliği, başlatıcı kaspazlara göre efektör kaspazlarla daha uygundur. Tüm kaspazlar, bir aspartik asit kalıntısından sonra bölünür (P1 pozisyonu olarak adlandırılır) ancak aspartik asitten (P2-P5) hemen önceki 3-4 amino asitler için farklı tercihlere sahiptirler. Kaspaz-2, Kaspaz-3 ve -7 gibi, substratlarının P4 pozisyonunda bir aspartik asit kalıntısı için güçlü bir tercih gösterirken, diğer kaspazlar bu pozisyonda farklı amino asitleri tolere edebilirler [95,96]. Öte yandan, Kaspaz-2, başlatıcı kaspazlarla dizi benzerlikleri gösterir. Başlatıcı kaspazların hepsinde, bir kaspaz alım alanı (CARD) veya bir ölüm efektör alanı gibi protein-protein etkileşim alanı içeren uzun prodomainler bulunur[97,98]. Adaptör proteinler ile CARD'ları ve ölüm efektör alanlarını içeren kaspazlar arasındaki homotipik etkileşimler, başlatıcı kaspazların kaspaz aktivasyonuyla sonuçlanan

aktivasyon platformlarına alınmasını yönetir. Kaspaz-2, prodomaininde, başlatıcı kaspazlara benzer şekilde aktive edildiğini gösteren bir CARD içerir [98].

Kaspaz-3: Hem Kaspaz-8 hem de Kaspaz-9 başlatıcı kaspazları tarafından parçalanan ve aktive edilen önemli bir efektör kaspazdır. Kaspaz-3, aktif Kaspaz-3 enzimini oluşturmak için p12 ve p17 alt birimlerine bölünür [99]. Aktif Kaspaz-3, birçok hücresel proteini bozar ve apoptoz sırasında oluşan hücrelerdeki morfolojik değişikliklerden ve DNA parçalanmasından sorumludur [100]. Ayrıca Kaspaz-3'ün nöro gelişim ve farklılaşma gibi fizyolojik olaylarda ve alzheimer, parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarda rol oynayan apoptozdan bağımsız fonksiyonlarının da olduğu bildirilmiştir [101].

Kaspaz-6: Apoptotik bir efektör olarak sınıflandırılır ve apoptoz sırasında çekirdek büzülmesine aracılık eder, ancak diğer efektör kaspazlardan farklı olarak aktivasyon ve düzenleme mekanizmalarına sahiptir. Ayrıca Kaspaz-6, Huntington ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda ve akson dejenerasyonunda rol oynadığı bildirilmiştir [102].

Kaspaz-7: Efektör kaspazdır ve apoptoz aşamasında merkezi bir rol oynar. Kaspaz-7, Kaspaz-3 ile son derece ilişkilidir ve bu iki kaspaz, hem ölüm reseptörü hem de mitokondri ile indüklenen apoptoz tarafından aktive edilir [103]. Apoptoz sırasındaki aktivasyonunun yanı sıra, Kaspaz-7'nin proteolitik olgunlaşması, inflamatuar koşullar altında da gözlemlenmiştir [104].

Kaspaz-8: Apoptozda yer alan sistein proteazlarının bir üyesidir. Ekstrinsik yolak için başlatıcı bir kaspazdır ve ektrinsik yolakta efektör Kaspaz -3 ve -7'yi ayırıp ve doğrudan aktive etmesiyle iyi bilinmektedir. Kaspaz-8'in daha az bilinen bir fonksiyonu ise, gelişim sırasında nekroptozu destekleyen RIPK1/RIPK3 fonksiyonunun baskılanmasında hayatta kalma rolüdür [105-106].

Kaspaz-9: İntrinsik apoptoz yolunun başlatıcı kaspazı olan prokaspaz-9 monomer olarak bulunur ve kaspaz aktivasyon domain (CARD) motifini içeren uzun bir prodomain'e sahiptir [107]. Ölüm sinyalini ilk proteolitik olaya dönüştürme ve doğrudan ölümcül efektör proteazın aktivasyonuna aracılık etmesiyle, Kaspaz-9'un kontrolü, hem proliferatif hem de dejeneratif hastalıklar için umut verici bir tedavi yaklaşımıdır. Kaspaz-9'un aktive edilmemesi dejeneratif ve gelişimsel bozuklukların yanı sıra kansere de yol açabilen önemli fizyolojik ve patofizyolojik sonuçlara neden

olabilmektedir [108].

Kaspaz-10: Sistein-aspartik asit proteaz (kaspaz) familyasının bir üyesidir. Kaspaz-10, Kaspaz-3 ve -7'yi ikiye ayırır ve aktive eder ve Kaspaz-8 tarafından işlenir. Bu gendeki mutasyonlar Non-Hodgkin lenfoma, tip IIA otoimmün lenfoproliferatif sendromu ve mide kanseri ile ilişkilidir.

2.4.1.2. Bcl-2 Ailesi

Kaspazlara ek olarak, Bcl-2 protein ailesi de apoptozda önemli bir rol oynar. Bcl-2 ailesi (B hücreli lenfoma / lösemi-2 geni), bazıları proapoptotik iken bazıları anti-apoptotik olan yaklaşık 15 üyeden oluşur. Apoptozun prototipik inhibitörü olan Bcl-2'ye yapısal benzerlik gösteren çok sayıda protein son 24 yılda keşfedilmiştir [109]. Memeli Bcl-xL [110], Bcl-w [111], A1 / Bfl-1 [112,113], Mcl-1 [114] ve Boo / Diva [115,116] , C.elegans Ced-9 [117] ve bir dizi viral homolog da hücre sağkalımını arttırır ve Bcl-2 (Bcl-2 homoloji bölgeleri BH1-BH4) ile benzerlik gösteren kapsamlı amino asit dizilimine sahip üç veya dört bölgeleri vardır. Memeli Bax [118], Bcl-xS (bcl-x geninin bir ek varyantı [110]), Bak [119-120] ve Bok / Mtd [121] dahil olmak üzere, daha uzaktan ilgili aile üyeleri 2 veya 3 BH bölgesi içerir ve stres koşulları altında apoptozu arttırır. Hücre ölümünün en etkili indükleyicileri, sadece bir BH3 bölgesine sahip olan bir grup proteindir. Aksi takdirde, Bcl-2 familyasına veya hali hazırda bilinen başka herhangi bir proteine benzerlik göstermez. Bu pro-apoptotik molekül grubu, memeli Bad [122], Bik/ Nbk [123,124], Bid [125], Hrk/DP5 [126], Bim / Bod [127,128] ve Blk [129] içerir. Bcl-2 protein ailesinin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri fiziksel olarak etkileşime girebilir [130]. Tüm Bcl-2 ailesi üyeleri, Bcl-2 homoloji domainlerinden en az birini içerirken, Bcl-2'ye en çok benzeyenlerin dört BH alanı da vardır. Şimdiye kadar keşfedilen pro-apoptotik proteinlerin tümü bir BH3 bölgesine sahip olmasına rağmen anti-apoptotik proteinlerin hepsi bu bölgeye sahip değildir, bu durum iki alt aile için belirleyici bir özellik olabilir. Örneğin Bik / Nbk, Bid, Bim ve Hrk / DP5 ortak olarak yalnızca BH3 alanına sahiptir, ancak hepsi aşırı eksprese edildiğinde proapoptotiktir ve hepsi antiapoptotik Bcl-2 aile üyelerine bağlanırlar [123-126].

Bcl-2 protein ailesinin pro-apoptotik üyeleri iki alt gruba ayrılır (Çizelge 2): (a) Bax, Bak ve Bok'tan oluşan ve BH1, BH2 ve BH3 domainlerinin kombinasyonlarını

içeren Bax alt ailesi üyeleri ve (b) sadece BH3 motifi içinde homoloji paylaşan ve bu nedenle "BH3-only proteinleri" olarak adlandırılan Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa, Puma, Blk, BNIP3, ve Spike'dır [131].

Bcl-2 ailesi proteinlerinin apoptozda nasıl yer aldığına dair birçok teori vardır; bütün teorilerin, sadece apoptotik sürecin farklı olaylarında Bcl-2 ailesi üyelerinin varlığı ya da yokluğu için değil, aynı zamanda, her Bcl-2 aile üyesinin farklı organizmalarda, farklı organlarda ya da apoptotik sürecin farklı aşamalarında üstlenebileceği farklı rolleri olduğu bilinmelidir. Mevcut görüşlerden biri, Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik üyelerinin mitokondriyal sitokrom c salınımını engellerken, proapoptotik üyelerin salınımı indüklediğidir [132]. Bcl-2 ailesi, apoptozom denilen multiprotein kompleksinin bir araya gelip gelmeyeceğini belirler [133]. Başka bir teori ise, Bcl-2'nin mitokondri gibi hücre organelleriyle etkileşime girmesidir. Bcl-2 ailesi üyeleri apoptozomun oluşması için gerekli olan sitokrom c salınımını önleyerek görünüşte apoptozu engellediğinden, bu teoriye göre, Bcl-2 ve Bcl-xL dış mitokondriyal membranına bağlanıp, sitokrom c'nin hem in vitro hem de in vivo [134,135] salımını bloke ederken, Bax ve Bak gibi proapoptotik proteinler mitokondriyal membrandan sitokrom c'nin salınmasını kolaylaştırır. Bu proteinler BH3 kısımları boyunca mitokondriyal membranla etkileşime girer ve sitokrom c'nin salındığı kanalları oluşturduğu anlaşılmaktadır [136]. Üçüncü bir teori ise, Bcl-2 veya Bcl-xL yüksek konsantrasyonlarının sitozolde sitokrom c ilavesiyle indüklenen kaspaz aktivasyonunu etkili bir şekilde önlediğini öne sürmektedir [137]. Son olarak, Bcl-xL'nin kilit anti-apoptotik protein olduğu kabul edildiği gibi, Bax, sinir sistemi gelişimi sırasında kritik bir apoptotik Bcl-2 aile üyesi olarak kabul edilmiştir. Diğer ana pro-apoptotik protein Bak ile birlikte Bax, sitokrom c, Smac / DIABLO, Omi / HtrA2, AIF ve Endonükleaz G gibi küçük proapoptotik moleküllerin salınmasıyla sonuçlanan mitokondriyal membran geçirgenliği (MMP) yoluyla hücre ölümüne neden olur [138]. Bax'ın bozulması ve inhibisyonu sinir sisteminde apoptozu azaltır, bu da bazı nöronal popülasyonlarda nöronların sayısının artmasına neden olur [139,140].

Anti-apoptotik ve pro-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri hücrelerde yapısal olarak eksprese edilirken, BH3-only proteinleri apoptotik stres sinyaline yanıt oluşturma sırasında, transkripsiyonla ve post-translasyonla aktive olur [141]. Anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerin aksine, BH3-only proteinler hücrede meydana gelen çeşitli stres durumunda

upregüle olur ve Bcl-2 benzeri proteinleri engelleyerek Bax ve Bak'ın kısıtlanmasını önler ve hücre ölümünü teşvik etmiş olur. Ayrıca Bim, Bid ve PUMA'nın da dahil olduğu BH3 proteinlerinin doğrudan Bax ve Bak'ı aktive ederek homo-oligomerleşmeyi ve MOM geçirgenliğini hızlandırabileceği bildirilmektedir.

Çizelge 2. Bcl-2 ailesinin sınıflandırılması

Anti-apoptotic	**Pro-apoptotic**	
	BH3 domain	**Multi domain**
Bcl-2	Bad	Bax
Bcl-xL	Bid	Bak
Bcl-w	Noxa	Bok
Mcl-1	Puma	Bcl-xS
Bcl-B	Bik	
Bfl/A1	Hrk	

2.4.1.3.p53

Tümör baskılayıcı gen p53 apoptozda kilit rol oynayan bir gendir. Kodladığı protein, üç üyeli bir protein ailesine aittir: p53, p63 ve p73. Bu genler, DNA bağlama bölgesinde yaklaşık %60-70 aminoasit benzerliğine sahiptir ve üçü de apoptozu indükleyebilir [142]. DNA hasarı, iyonlaştırıcı radyasyon, UV ışıması, hipoksi, ısı şoku, onkogen aktivasyonu ve sitotoksik ilaçlar gibi çeşitli uyaranlar p53 genini aktive eder [143] ve p53 DNA bağlanma bölgelerini taşıyan spesifik hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonu yoluyla hücre döngüsü durdurma, apoptoz, DNA onarımı ve farklılaşma

içeren cevapları başlatır. p53, Bax ve örneğin Bid, Noxa, PUMA gibi BH3-only proteinleri de dahil olmak üzere bazı Bcl-2 ailesi genlerinin ekspresyonunu uyarır [144]. Ayrıca p53, bir veya daha fazla anti-apoptotik mitokondriyal proteine bağlanabilir, bu nedenle Bax/Bak mitokondriyal por oluşumunu ve sonuç olarak sitokrom c salımını inhibe eder [145,146]. Son olarak, p53, konsensüs bağlanma bölgesi motifleri içermeyen belirli genlerin transkripsiyonel baskısı yoluyla apoptoz aktivitesini indükleyebilir [147,148].

2.4.1.4. Isı Şok Proteinleri

Hsp70, Hsp27 ve Hsp90 gibi ısı şoku proteinlerinin apoptoz inhibisyonunda rol oynadığı düşünülmektedir. Özellikle Hsp70 proteini, Apaf-1 geni ile birleşerek kaspaz aktivasyonunu doğrudan önler [149]. Isı şoku proteinleri, apoptozomun oluşumu için gerekli olan sitokrom c'nin mitokondriden salınmasını engelleyebilir [150]. Hsp27 ile ilgili olarak, iki olası etkileşim yolu olduğu anlaşılmıştır: Ya Hsp27, sitokrom c'nin salınımına müdahale eder ya da mitokondri tarafından salındığında sitokrom c'nin kendisi ile etkileşime girer. Isı şoku proteinlerinin anti-apoptotik rolü üzerindeki etkisi ile ilgili birçok yeni araştırma projesi bulunmaktadır. Isı şoku proteini Hsp70, esas olarak Bax aktivasyonunun inhibisyonu ile apoptozu bloke eder ve bunun sonucu olarak proapoptotik faktörlerin mitokondriden salınmasını önler [151].

2.4.2. Apoptoz Mekanizmaları

Apoptozun genel olarak açıklanan iki başlatma mekanizması; intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik (ölüm reseptörü aracılığıyla) yolaklardır [152].

2.4.2.1. İntrinsik Yolak

İntrinsik apoptoz; DNA hasarı, aşırı reaktif oksijen türleri (ROS) birikimi, endoplazmik retikulum (ER) stresi, replikasyon stresi, mikrotubüler değişiklikler veya mitotik kusurları içeren çeşitli mikro-çevresel bozulmalar tarafından başlatılan bir RCD (düzenlenmiş hücre ölümü) formudur[153,154]. İntrinsik apoptoz için kritik adım, Bcl2'nin

pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri tarafından kontrol edilen geri dönüşümsüz ve yaygın mitokondriyal dış membran permeabilizasyonudur (MOMP) [155,156]. Apoptotik uyarıcılara cevap olarak MOMP; her ikisi de dört BH domaini ve korunmuş bir transmembran domaini içeren Bcl2 ile ilişkili X, apoptoz düzenleyici (Bax) ve/veya Bcl2 antagonisti (Bak1; en iyi Bak olarak bilinir) ile aracılık eder [157-159]. Fizyolojik koşullarda, Bax, durgun bir monomerik veya inaktif bir dimerik konformasyon sergilediğinde, sürekli olarak OMM (dış mitokondriyal membran) ve sitozol arasında geçiş yapar [160,161]. Bunun aksine, Bak, yapısal olarak OMM'de bulunur, burada lipid çift tabakasının içine, gerilim bağımlı anyon kanalı 2 (VDAC2) ile etkileşimi üzerine hidrofobik C-terminal α9 sarmalı aracılığıyla yerleştirilir [162-165]. Bcl2 protein ailesinin bu pro-apoptotik üyeleri, aslında stres sinyalizasyonunun hücresel transdüser uyaranları olarak çalışan homeostaz bozulmaları durumlarında spesifik organeller veya hücresel bölmeler gibi transkripsiyonel veya post-translasyonel olarak aktive edilirler [166-168].

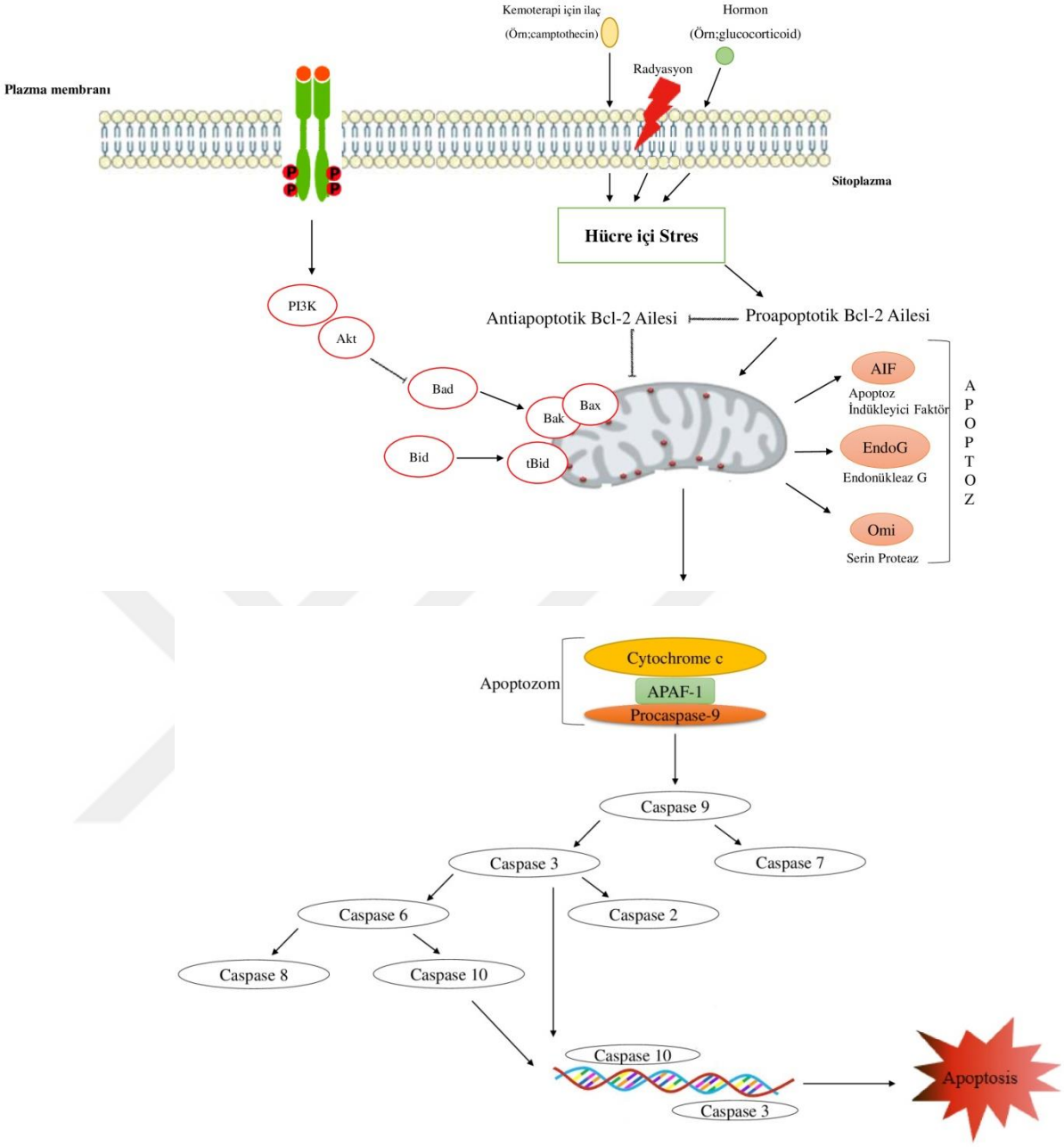
Bcl2 bağlama bileşeni 3 (Bbc3; en iyi p53-upregüle apoptoz modülatörü, Puma olarak bilinir), Bcl2l11 (Bcl2 etkileşimli hücre ölüm aracısı, Bim) ve forbol-12-miristat-13-asetat ile uyarılmış protein 1 (PMAIP1; en iyi Noxa olarak bilinir) gibi bazı BH3-only proteinleri esas olarak transkripsiyonel düzenleme ile aktive edilirken, BH3 etkileşimli domain ölüm agonisti (Bid) gibi diğer proteinler çoğunlukla post-translasyonal aktivasyona uğrar [169-175].

Mevcut görünüm, aktive edilmiş Bax ve Bak'ın BH3-only proteinlerin salınması ve ayrıca dimer-dimer oligomerizasyonu ile sonuçlanan homodimerler oluşturmasıdır [176,177]. Oligomerizasyon, mitokondriyal geçirgenliği değiştiren ve mitokondriyal altyapının derin bir şekilde yeniden düzenlenmesine neden olan toroidal bir lipidik gözeneğin birleştirilmesine yol açar [178,179]. Bu model doğrultusunda, son zamanlarda (1) Bax'ın OMM'yi [179,180] delmek için halkasal veya doğrusal (lineer) şekilli oligomerler oluşturabildiği ve (2) MOMP'nin, alınan Bax dimerlerinin sayısına bağlı, boyut olarak değişebilen gözeneklerin oluşumu üzerine ilerlediği gösterilmiştir [181]. MOMP; Bcl2, Bcl2L1 (en iyi Bcl-xl olarak bilinir), MCL1 (Bcl2 ailesi apoptoz düzenleyici), Bcl2L2 (en iyi Bcl-w olarak bilinir) ve Bcl2A1 (Bcl2 ilişkili protein A1) dahil olmak üzere, Bcl2 ailesinin anti-apoptotik üyeleri tarafından antagonize edilir. Bazı anti-apoptotik Bcl2 ailesi üyelerine, hücresel hayatta kalmayı arttırmak için önerilen maddeler: (1) ER'de Ca^{2+} homeostazını düzenlemek [182,183]; (2) F_1F_0 ATP

sentaz ile etkileşimi sonucu biyoenerjetik metabolizmayı düzenlemek [184,185]; (3) redoks homeostazının düzenlenmesine katkıda bulunmaktır [186,187]. Ancak, bu fonksiyonların önemi, başlıca tüm anti-apoptotik ve pro-apoptotik Bcl2 aile üyelerinden yoksun hücre hatlarının oluşmasıyla ortaya çıkarılmıştır [187]. Bu nedenle, prosurvival Bcl2 ailesi üyelerinin çoğu, oligomerizasyon ve por oluşturma aktivitelerini ya OMM'de fiziksel sekretasyon sonrasında doğrudan olarak ya da BH3-only aktivatörlerinin sekretasyonunu takiben dolaylı olarak önleyerek Bax ve Bak'ı inhibe eder [171,188]. Fizyolojik koşullarda, Bcl-xl gibi bazı anti-apoptotik Bcl2 proteinleri, Bax ve Bak'ın mitokondriden sitoplazmaya retrotranslokasyonunu düzenleyerek koruyucu bir rol oynar. Önemli olarak, Bcl2-ilişkili hücre ölüm agonisti (Bad), Bcl2 değiştirici faktör (Bmf), Bcl2 etkileşimli protein (Hrk) de dahil olmak üzere bazı BH3-only proteinleri, Bax veya Bak ile fiziksel bir etkileşimin olmadığı durumlarda MOMP'yi arttırır [160,178]. Bazen "inaktivatörler" olarak adlandırılan BH3-only proteinleri, anti-apoptotik Bcl2 ailesi üyelerine bağlanır ve bu nedenle Bax, Bak veya BH3-only aktivatörlerini ayırmak için kullanılabilirliklerini sınırlar [178,189]. Farklı BH3-only proteinlerinin spesifik anti-apoptotik Bcl2 ailesi üyelerine tercihen bağlandığı gözlenmiştir (örneğin, Bid, Bim ve Puma tüm anti-apoptotik Bcl2 ailesi üyelerine güçlü bir şekilde bağlanır; Bad tercihen Bcl2, Bcl-xl ve Bcl-W ile etkileşime girer; Noxa tercihen MCL1'i inhibe eder ve Hrk tercihen Bcl-xl'i inhibe eder). Bununla birlikte, BH3-only inaktivatörlerinin aşırı ekspresyonu, Bid, Bim, Puma ve Noxa içermeyen hücrelerde minimal apoptozu indükler.

Onkogenler, doğrudan DNA hasarı, oksidatif stres ve açlık gibi intrinsik stresler, intrinsik apoptotik yolağı aktive edebilir. Sitoplazmada bulunan proapoptotik proteinler Bax ve Bid, stres sinyalini aldıktan sonra mitokondrinin dış zarına bağlanırlar. Mitokondri içinde bulunan bir başka proapoptotik protein olan Bak, Bax ve Bid ile etkileşime girerek sitokrom c ve diğer mitokondriyal proapoptotik faktörlerin sitozole salınmasını sağlar[190]. Sitoktom c'nin salınımı, önemli hücresel proteinleri parçalayan proteazlar olan kaspazların aktivasyonuna sebep olur [191]. Bu durum hücre büzüşmesi, zar kabarcıklanması, kromatin yoğunlaşması ve nükleer parçalanma gibi birçok morfolojik özelliğin oluşumunu tetikler [192]. Sitokrom c, ATP- bağımlı bir konformasyonel değişim ve oligomerizasyona uğrayan apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1)'e bağlanır ve daha sonra apoptozom kompleksini oluşturan prokaspaz-

9'u CARD domain etkileşimi ile bağlar. Başlatıcı Kaspaz-9 daha sonra aktive edilir ve hücresel hedeflerini parçalamak için apoptozomun bir parçası olarak kalır. Aynı zamanda kaspaz 8 substratlarından biri Bid olduğu için extrinsik ve intrinsik yolaklar arasında bir bağlantı vardır. Aktive edilen Kaspaz-9, daha sonra Kaspaz-3, Kaspaz-7 ve Kaspaz-6 gibi downstream efektör kaspazlarını içeren bir kaspaz kaskadı başlatır [193]. Aktif durumdaki efektör kaspazlar, CAD (Caspase activated deoxyribonuclease; kaspazla aktive olan deoksiribonükleaz) inhibitörü, ICAD (Inhibator of caspase activated deoxyribonuclease; kaspazla aktive olan deoksiribonükleaz inhibitörü)'i inaktif hale getirir. Serbest kalan CAD'ın nükleus içine girmesiyle nükleik asitler degrade olur ve apoptoz gerçekleşir (Şekil 5). Tümör baskılayıcı p53 proteini, hücresel stresin bir sensörüdür ve intrinsik yolağın kritik bir aktivatörüdür. p53, proapoptotik Bax ailesi üyelerini transkripsiyonel olarak aktive ederek ve antiapoptotik Bcl2 proteinlerini baskılayarak apoptozu başlatır[194]. İntrinsik yolaktan farklı olarak, ekstrinsik yolakta p53'ün apoptozun uyarılmasında katılımı yoktur.



Şekil 5. Apoptoz Mekanizmasının İntrinsik Yolağı

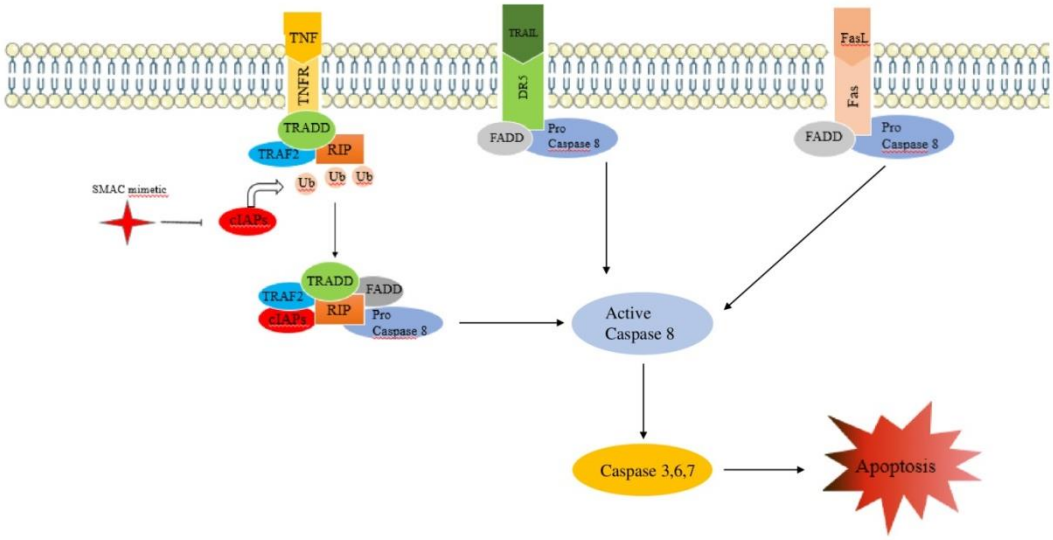
2.4.2.2. Ekstrinsik Yolak

Ekstrinsik apoptoz, ekstraselüler mikro-ortamın bozulması ile başlatılan bir RCD (regulated cell death) yöntemidir [195-198]. Ekstrinsik apoptoz çoğunlukla iki tip plazma membranı reseptöründen herhangi biri ile yönlendirilir: (1) aktivasyonu ligand(lar)ın bağlanmasına bağlı olan ölüm reseptörleri ve (2) aktivasyonları spesifik ligandlarının seviyeleri belirli bir eşiğin altına düştüğünde gerçekleşen bağımlı reseptörleri [199-201].

Ölüm reseptörleri (ancak bunlarla sınırlı değildir): Fas hücre yüzeyi ölüm reseptörü (FAS; CD95 veya APO1 olarak da bilinir) ve TNF reseptörü süper ailesi üyesi 1A (TNFRSF1A; en iyi TNFR1 olarak bilinir), 10a (TNFRSF10A; en iyi TRAILR1 veya DR4 olarak bilinir) ve 10b (TNFRSF10B; en iyi TRAILR2 veya DR5 olarak bilinir) [199-202].Genel bir kural olarak, ölüm reseptörü ligasyonu, Kaspaz 8' in aktivasyonunu ve fonksiyonlarını düzenlemek için moleküler platformlar olarak çalışan "ölüme neden olan sinyal kompleksi" (DISC), "kompleks I" ve "kompleks II" gibi reseptörün intrasellüler ucunda dinamik bir multiprotein kompleksinin birleştirilmesine izin verir [203-205]. FAS ve TRAILR'ler söz konusu olduğunda, eş kökenli ligandlar, yani FAS ligand (FASLG; ayrıca CD95L veya APO-1L olarak da bilinir) ve TNF süper aile üyesi 10 (TNFSF10; en iyi TRAIL olarak bilinir) sırasıyla – Fas'a bağlı ölüm bölgesi (FADD) adaptörünün ölüm domainine (DD) bağımlı birleşmesini sağlayan intrasellüler uçlarında konformasyonel bir değişikliğin tetiklenmesi için önceden oluşturulmuş reseptör homotrimerlerini stabilize ederler [205-210]. Sırasıyla, FADD, Kaspaz 8'in (veya Kaspaz 10) ve çoklu c-FLIP izoformlarının ölüm efektör domaini (DED) bağımlı alımını arttırarak DISC düzeneğini yönlendirir. Aksine, TNFR1 sinyalleşmesi, genellikle TNF reseptörü ile ilişkili faktör 2 (TRAF2), TRAF5, c-IAP1, cIAP2, RIPK1 içeren kompleks I'in montajı için bir adaptör görevi gören TRADD (TNFR'e bağlı ölüm reseptörü) ve SHARPIN (SHANK ile ilişkili RH domain etkileşimi), RANBP2 tipi, C3HC4 tipi çinko parmak içeren 1(RBCK1; en iyi HOIL-1 olarak bilinir) ve halka parmak proteini 31 (RNF31; en iyi HOIP olarak bilinir) içeren supramoleküler bir varlık olan LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex) içerir [211-215].

FasL tarafından aktive edilen Fas/CD95 reseptörü, FADD/MORT1 adaptör proteinleri ile etkileşime girerek başlatıcı pro-kaspaz 8 ve pro-kaspaz 10 etkileşimini başlatır ve DISC kompleksi 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 ve nükleik asit degredasyonundan sonra apoptoz gerçekleşir [216].

Ayrıca, ekstrinsik yolakta önemli rol oynayan Kaspaz 8 ve Kaspaz 10, Bid proteinini parçalar ve aktif tBid, dış mitokondriyal membrana dahil olan ve mitokondriyal yolla apoptozu uyaran Bax'ı aktive eder. Aktive olan Bax apoptotik kaskadı downstream tetikleyerek apoptozun gerçekleşmesini sağlar [217] (Şekil 6).



Şekil 6. Apoptoz Mekanizmasının Ekstrinsik Yolağı

2.5. Apoptoz ve Kanser

Kanser, birçok doku tipinden kaynaklanan ve oldukça geniş genetik çeşitlilik gösteren heterojen bir hastalıktır. Bununla birlikte, yakın zamandaki görüşler, hastalığın altında yatan etiyoloji ve ilerlemenin, aşırı proliferasyona neden olan mutasyonlar ve bu hiperproliferatif hücrelerin kalıcılığını sağlayan sağkalım sinyal yollarının telafi edici bir bozulması olan iki lezyona kadar indirgenebileceğini önermeye teşvik etmiştir [218]. Bu teori, apoptozu aktif olarak tutmak için p53 gibi tümör baskılayıcıların ve Myc dahil onkogenlerin yetenekleri ile örneklenen neoplaziler ve apoptoz arasındaki temel bağı kurar. Myc'in güçlü bir proliferatif sinyal sağlamanın yanı sıra apoptoz oluşturma yeteneği onkojenik kapasitesini dengelemek için güvenli olmayan bir mekanizma olarak yorumlanır [219]. Bu mekanizma çoğu zaman işlev görüyor gibi görünsede, olması gerektiği gibi, myc ile yönlendirilen hücre apoptozunu baskılamak için telafi edici mekanizmalar kazanmak adına Myc'in yüksek seviyelerini ifade eden "sözde" tümör hücresi için seçici bir baskı oluşturur. Benzer şekilde, ölümcül mutasyonların potansiyel kazanımını önlemek için DNA hasarı gibi streslere cevap olarak apoptozu uyarabilen p53, tümör hücrelerinde sıklıkla mutasyona uğrar veya silinir. Her iki senaryoda, proapoptotik sinyallerin fonksiyonel telafisi veya silinmesi, normal hücrelere göre belirgin bir sağkalım avantajına sahip bir tümör hücresi oluşturur. 1970'lerin başlarında, Kerr ve ark. apoptozu potansiyel olarak kötü huylu hücrelerin, hiperplazi ve tümör

ilerlemesinin ortadan kaldırılmasıyla ilişkilendirmişlerdir [81]. Dolayısıyla, azalmış apoptoz veya apoptoz direnci karsinogenezde hayati bir rol oynar. Malign bir hücrenin apoptoz veya apoptoz direncinde azalma sağlayabileceği birçok yol vardır. Genel olarak, apoptozdan kaçınmanın meydana getirdiği mekanizmalar 3 gruba ayrılabilir:

1) Proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerin bozunma dengesi
2) Kaspaz fonksiyonunun azalması
3) Ölüm reseptör sinyalinin bozunması

Böylece, hücreler aşırı proliferasyon gösterirler ve hipoksi, stres gibi zorlu koşullar altında bile hayatta kalarak terapötik ajanlara karşı direnç sağlarlar.

2.6. Meme Kanseri ve Apoptoz

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen malignitelerden (kötü huylu tümör) biridir. Evrensel meme kanseri insidansı, son üç yılda yıllık %3,1 oranında artarak 2010 yılında 1,6 milyondan fazla vakaya yükselmiştir [67]. 1990'dan beri, meme kanserinden kaynaklanan ölüm oranları %25 oranında azalmıştır ve bu durumun kısmen adjuvan tamoksifen ve kemoterapinin kullanımının artmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Mevcut araştırmalar apoptozun rolü de dahil olmak üzere tedaviye verilen yanıt ve direncin daha iyi anlaşılmasına odaklanmıştır. Primer tümörün erişilebilirliği, meme kanserini bu tür çalışmalar için benzersiz şekilde uygun kılar.

Normal meme gelişimi, hücre proliferasyonu ve apoptozis arasındaki denge ile kontrol edilir ve tümör büyümesinin sadece kontrolsüz proliferasyonun değil, aynı zamanda azalmış apoptozun bir sonucu olduğuna dair güçlü kanıtlar vardır. Proliferasyon ve apoptoz arasındaki denge; kemoterapi, radyoterapi ve hormonal tedavilere cevap olarak tümörün genel büyümesini veya gerilemesini belirlemede çok önemlidir [220,221]. Bunların hepsi kısmen apoptozu indükleyerek etki gösterir [222,223]. Böylelikle, apoptozu inceleyerek bireysel tümörlerin biyolojisini moleküler ve biyokimyasal düzeyde tanımlamak, kontrol ve regülasyonunu incelemek ve klinik avantajdan yararlanmak için bunları kullanmak mümkündür. Bu ilişkileri anlamak, tümör gerilemesini ve tedavinin etkinliğini maksimuma çıkarmak için kişiselleştirilmiş tedavi yöntemlerine öncü olabilir. Ayrıca, bazı tümörlerin neden tedaviye cevap

veremediğini bulmaya yardımcı olabilir ve bundan dolayı ilaç geliştirmenin yeni yolları gösterilebilir.

Meme, doğum sonrası gelişimini iki ayrı fizyolojik durumda tamamlayan bir organdır: ergenlik ve hamilelik. Bu aşamalar sırasında meme proliferasyonunda ve farklılaşmasında gözle görülür değişiklikler vardır [224]. Bcl2 ailesinin apoptotik düzenleyici proteinlerindeki değişiklikler, kısmen östrojenlerin ve progesteronun etkisiyle meydana gelir. Gelişmekte olan meme kanallarının sonundaki hücreler, hamileliğin başlangıcına kadar mitotik olarak sessiz kalır. Daha sonra, ek duktal dallanma ve lobuloalveoler büyüme ile hızlı epitel proliferasyon oluşur. Emzirmeden sonra, primer yapıya dönüşme ve kütle kaybına yol açan büyük bir yeniden yapılanma ve apoptoz mevcuttur [224].

Apoptotik değişikliklerin çoğu, menstrüel döngü boyunca periyodik değişiklikler ve menstrüel döngünün sonuna yakın apoptoz tepe noktası ile terminal kanalının lobüler ünitesinde meydana gelir [225]. Meme bezi boyunca hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve ölümü arasındaki dengenin normal gelişim ve homoeostaz için kritik olduğu açıktır. Hücre proliferasyonunu upregüle edebilen veya apoptozu downregüle edebilen durumlar, meme kanseri ile sonuçlanan mutasyonların birikmesine neden olabilir. Hücresel süreçlerde DNA'ya önemli zarar geldiğini tespit eden ve hücrelerin silinmesine yol açan kusurlar, bu kansere bağlı mutasyonların oluşumuna yol açabilir. Epitel dokuda meydana gelen karsinogenez sırasında genetik mutasyonlar birikir ve hücresel fonksiyonlarda kayıp oluşur.

Hücrelerin fenotipi, normalden bir dizi malign lezyon aracılığıyla yüzeysel kanserlere ve son olarak invaziv hastalıklara dönüşmektir. “Premalignant” aşamalarında, apoptoz, proliferasyon ve hücre döngüsünün düzenleyici biyobelirteçlerinde büyük değişiklikler vardır. Duktal karsinom in situ ve invazif meme kanserinde apoptoz artmaktadır [226,227]. Apoptoz, invazif meme kanseri etrafındaki “normal” meme epitelindeki proliferasyona göre azalmış gibi görünmektedir [228]. Mommers ve arkadaşları, invazif karsinom ile karşılaştırıldığında, preinvazif duktal lezyonlarda mitotik: apoptotik endekslerde farklılıklar göstermiştir [229]. Az farklılaşmış duktal karsinom in situ ile karşılaştırıldığında, az farklılaşmış hiperplastik meme lezyonlarında mitotik indeks ve apoptozda artış ve az farklılaşmış invazif meme kanserlerinde mitotik indekste daha fazla artış, apoptozda ise nispi bir azalma

gözlemlemişlerdir. Apoptozdan kaçınma kanserlerin karakteristik özelliklerinden biridir. Düzenli apoptoz anti-kanser tedavisinin terapötik etkinliği için büyük önem taşımaktadır. Bundan dolayı kanser oluşumunda ve kanserin ilerlemesinde rol oynayan mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına yönelik yapılan çalışmalar yeni tedavi yöntemleri için umut vaat edici gözükmektedir [230].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

3.1.1. Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması

3.1.1.1. MCF7 Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması

- DMEM (1g/l glikoz)
- 10 % FBS
- İnsülin 0,6 µg/ml
- Gentamisin 40 µg/ml

Maddeleri eklenerek kullanıma hazır hücre kültür medyumu elde edildi.

3.1.1.2. MCF10A Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması

- DMEM /HAM F12 (1:1)
- 5% AT SERUMU (Horse Serum)
- İnsan Epidermal Büyüme Faktörü (Human Epidermal Growth Factor) 20ng/ml
- Kolera Toksin 100 ng/ml
- İnsülin 0,01 mg/ml
- Hidrokortizon 500 ng/ml
- Gentamisin 40 µg/ml

Maddeleri eklenerek kullanıma hazır hücre kültür medyumu elde edildi.

3.1.1.3. BJ ATCC Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması

- MEM w/Earle's Salts
- 10% FBS
- Sodyum Piruvat 1mM
- Gentamisin 40 µg/ml
- Esansiyel olmayan amino asit (NEAA)

Maddeleri eklenerek kullanıma hazır hücre kültür medyumu elde edildi.

3.1.2. Hücre Kültürü İnkübasyon Koşulları

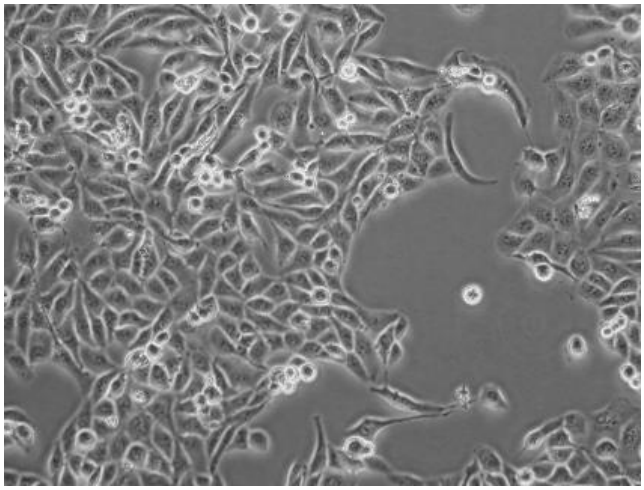
İnsan meme epitel kanser hücre hattı olan MCF7 (2.pasaj), insan sağlıklı meme epitel hücre hattı olan MCF10A (2.pasaj) ve insan sağlıklı fibroblast hücre hattı olan BJ (2.pasaj) hücreleri Fransa, Genetik ve Moleküler ve Hücresel Biyoloji Enstitüsünden (IGBMC) temin edildi. MCF7 hücre hattı DMEM medyumu, MCF10A hücre hattı DMEM/HAM F12 medyumu, BJ hücre hattı MEM w/Earle's Salts medyumu içerisinde, %5 CO_2 ve 37^oC sıcaklıktaki inkübatörde 75 cm^2'lik flasklar içerisinde steril koşullarda, hücrelerin çoğalması için gereken en uygun ortamda inkübe edildi.

3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması

Çoğalmakta olan hücreler bulundukları flaskı %80-90 oranında kaplayınca (confluent) yeniden pasajlandı [231].

3.1.3.1. MCF7 Hücre Hattının Pasajlanması

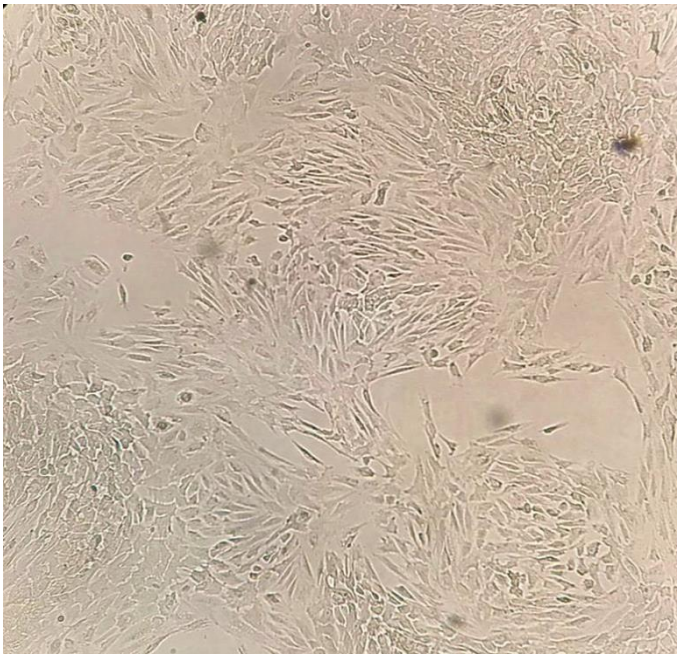
- Flaskın içerisinde bulunan DMEM besiyeri siteril serolojik pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve hücreler steril PBS (fosfat tampon solüsyonu) (75 cm^2 için 5 ml) ile yıkandı.
- Ardından PBS uzaklaştırıldı ve hücrelerin yapışık olduğu flask yüzeyinden ayrılması için 5 ml Tripsin-EDTA solüsyonu ilave edilerek 10 dk inkübatörde bekletildi.
- Yüzeye yapışık olan hücreler Tripsin yardımıyla kaldırıldıktan sonra tripsinin inhibisyonu için tripsin hacminin 2 katı kadar besiyeri eklenerek tripsin+hücre+besiyeri solüsyonu 15 ml'lik falkon tüp içerisine aktarılarak 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve pelletin üzerine DMEM besiyeri eklenerek hücreler her seferinde 1:4 oranında 75 cm^2'lik flasklar içerisine taze hücre besiyeri ile pasajlandı.
- Yeniden pasajlanan hücreler 37^oC'de %5 CO_2 ortamında inkübe edildi (Şekil 7).



Şekil 7. MCF7 Hücre Hattının Mikroskoptaki Görünümü

3.1.3.2. MCF10A Hücre Hattının Pasajlanması

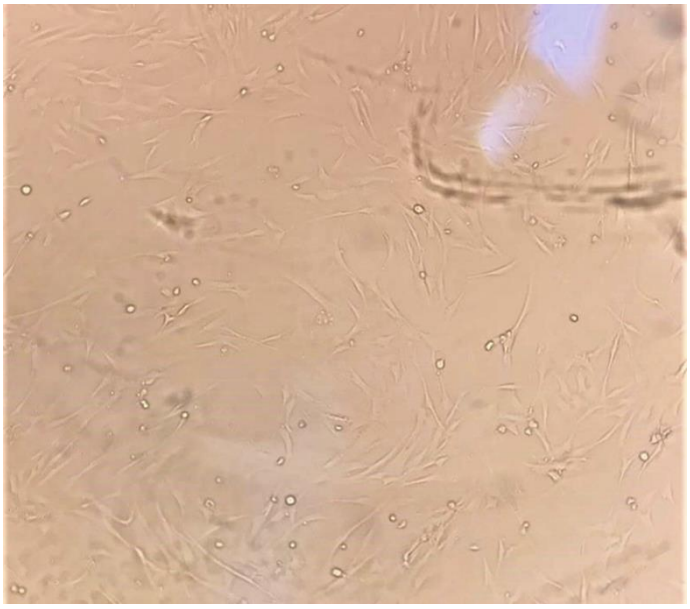
- Flaskın içerisinde bulunan DMEM/HAM F12 besiyeri steril serolojk pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve hücreler steril Hücre Ayrışma Tamponu (Cell Dissociation Buffer) (75 cm^2 için 5 ml) ile yıkandı.
- Ardından PBS uzaklaştırıldı ve hücrelerin yapışık olduğu flask yüzeyinden ayrılması için 1 ml Cell Dissociaton Buffer + 4 ml Tripsin-EDTA solüsyonu ilave edilerek 10 dk inkübatörde bekletildi
- Yüzeye yapışık olan hücreler Tripsin-EDTA + Hücre Ayrışma Tamponu yardımıyla kaldırıldıktan sonra solüsyonun inhibisyonu için solüsyon hacminin 2 katı kadar Soybean Tripsin İnhibitör eklenerek solüsyon 15 ml'lik falcon tüp içerisine aktarıldı ve 850 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve pelletin üzerine besiyeri eklenerek hücreler her seferinde 1:3 veya 1:4 oranında 75 cm^2'lik flasklar içerisine taze hücre medyumu ile pasajlandı.
- Yeniden pasajlanan hücreler 37ºC'de %5 CO_2 ortamında inkübe edildi (Şekil 8).



Şekil 8. MCF10A Hücre Hattının Mikroskoptaki Görünümü

3.1.3.3. BJ ATCC Hücre Hattının Pasajlanması

- Flaskın içerisinde bulunan MEM/e Earle's Salts besiyeri steril serolojik pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve hücreler steril PBS (fosfat tampon solüsyonu) (75 cm^2 için 5 ml) ile yıkandı.
- Ardından PBS uzaklaştırıldı ve hücrelerin yapışık olduğu flask yüzeyinden ayrılması için 5 ml Tripsin-EDTA solüsyonu ilave edilerek 10 dk inkübatörde bekletildi.
- Yüzeye yapışık olan hücreler Tripsin yardımıyla kaldırıldıktan sonra tripsinin inhibisyonu için tripsin hacminin 2 katı kadar besiyeri eklenerek tripsin+hücre+besiyeri solüsyonu 15 ml'lik falkon tüp içerisine aktarılarak 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve pelletin üzerine besiyeri eklenerek hücreler her seferinde 1:3 oranında 75 cm^2'lik flasklar içerisine taze hücre medyumu ile pasajlandı.
- Yeniden pasajlanan hücreler 37^oC'de %5 CO_2 ortamında inkübe edildi (Şekil 9).



Şekil 9. BJ ATCC Hücre Hattının Mikroskoptaki Görünümü

3.1.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

- Dondurmayı istediğimiz hücre flaskındaki besiyeri uzaklaştırıldı.
- Hücreler steril PBS (fosfat tampon solüsyonu) (75 cm^2 için 5 ml) ile yıkandı.
- PBS uzaklaştırıldı ve yüzeye yapışan hücreleri kaldırmak için 5 ml (75 cm^2 flask için) Tripsin-EDTA solüsyonu ilave edildi.
- 10 dk inkübatörde bekletildikten sonra, kullanılan Tripsin miktarının iki katı kadar besiyeri eklenerek (reaksiyonun durması için) tripsin+hücre+besiyeri solüsyonu 15 ml'lik falkon tüp içerisine aktarılarak hücre hattına uygun olan koşullarda santrifüj edildi.
- Süpernatantın hepsi uzaklaştırıldı.
- Pellet üzerine 1 ml hücre medyumu eklenerek hücre dilue edildi ve thoma lamı yardımıyla sayıldı (Hücre süspansiyonunda 2-4 x106 hücre/ml olması, hücre yeniden çözdürüldüğünde canlılığının yüksek olması açısından önemlidir).
- Hücre sayımı yapıldıktan sonra, soğuttuğumuz dondurma medyumundan (%90 FBS ve %10 DMSO) 1 ml eklendi ve mikropipetle hızlıca pipetaj yapıldı.
- Pelletin tamamı çözündükten sonra kriyoviala tüpüne hızlıca aktarıldı.
- Hücrelerin donma işlemi gerçekleşene kadar -20 ºC'de bekletildi ve donma işlemi tamamlandıktan sonra uzun süreli saklama için -80 ºC'ye kaldırıldı.

3.1.5. Thoma Lamı Yardımı ile Hücre Sayılarının Hesaplanması

- Hücrelerin yoğunluğuna bağlı olarak dilüsyon yapıldıktan sonra hücre süspansiyonundan 20 µl alınarak ependorf tüpe aktarıldı.
- Lamel ile kapatılan thoma lamının her iki bölmesine 10'ar µl hücre süspansiyonu yüklendi.
- 1 µl hacimlik alanda bulunan hücreler sayıldıktan sonra 96 kuyucuklu plateler için her bir kuyuya 1x104 hücre düşecek şekilde hesaplama yapıldı.

3.2. *M. communis* Esansiyel Yağ Dozlarının Hazırlanması

Çalışmada Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Bölümüne ait Telkaliş deneme alanlarından temin edilen Mersin (*M. communis*) bitkilerine ait uçucu yağlar materyal olarak kullanıldı. *M. communis* esansiyel yağı 3000-1500-750-375-187,5-93,75-46,875 µg/ml ve 1200-600-300-150-75-37,5-18,75 µg/ml dozlarda DMSO (Dimethyl Sulfoxide, SIGMA) içeren serumsuz besiyeri ile hazırlanıp deneylerde kullanıldı.

DMSO'nun %0.25 üzerindeki konsanstrasyonun sitotoksik olduğu belirtilmektedir (Borel 1976). Kullanılan en yüksek konsantrasyonda (3000 µg/ml) DMSO dozu % 0.1 oranında olup diğer dozlarda seri dilüsyon ile DMSO oranı her seferinde yarıya düşmektedir. Kullanılan hiçbir doz sitotoksik olmadığı için gruplar arasında kontrol grubu olarak ayrıca DMSO muamelesi yapılmasına gerek kalmamıştır.

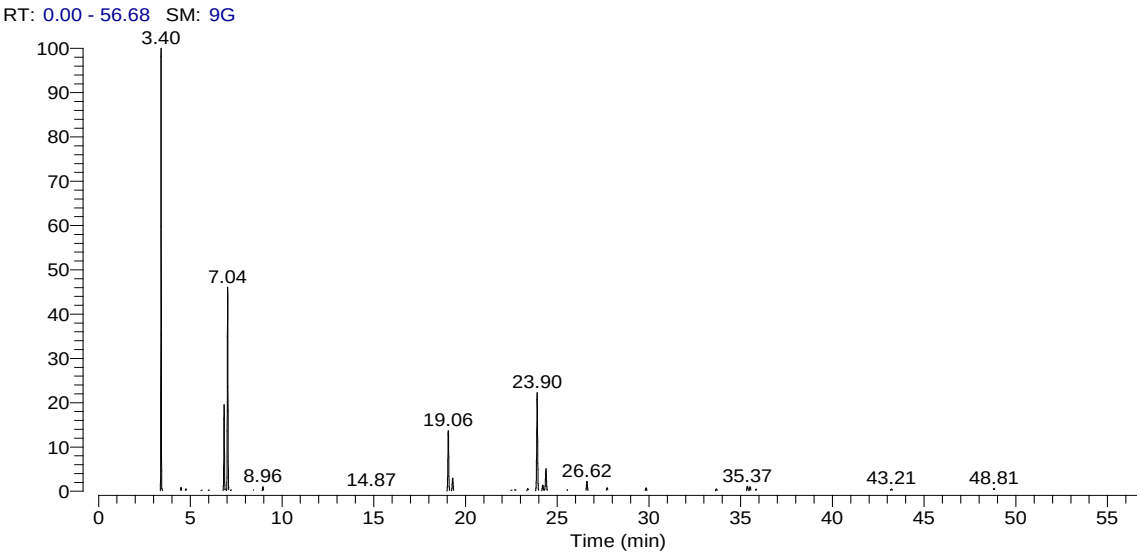
3.2.1. *M. communis* Esansiyel Yağ Eldesi ve Kimyasal Komposizyonları

Bitkilerinin uçucu yağlarının bileşenleri gaz-kromatogafik yöntem ile saptanmıştır. Uçucu yağ bileşenlerinin belirlenmesi Thermo Scientific ISQ Single Quadrupole model gaz kromatogafi cihazı ile aşağıdaki şartlar altında gerçekleştirilmiştir (Şekil 10). TR-FAME MS model, %5 Phenyl Polysilphenylene-siloxane, 0.25 mm iç çap x 60 m uzunlukla, 0.25 µm film kalınlığına sahip kolon kullanılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak 1 mL/dak akış hızında helyum (%99.9) kullanılmıştır. İyonizasyon 22 enerjisi 70 eV, kütle aralığı m/z 1,2-1200 amu olarak ayarlanmıştır. Veri toplamada tarama modu (Scan Mode) kullanılmıştır. MS transfer line sıcaklığı 250 °C,

MS iyonizasyon sıcaklığı 220 °C, Enjeksiyon port sıcaklığı 220 °C, kolon sıcaklığı başlangıçta 50 °C olup 3 °C/dak ısı artış oranı ile 220 °C'ye kadar yükseltilmiştir. Her bileşiğin yapısı Xcalibur progamı ile kütle spektrumları kullanılarak (Wiley 9) tanımlanmıştır (Şekil 11).



Şekil 10. Uçucu yağların etken maddelerinin belirlenmesi (GC/MS)



Şekil 11. Myrtus communis L. uçucu yağına ait kromotogram (GC/MS)

Çizelge 3. *Myrtus communis* L. uçucu yağ bileşenleri

RT	Bileşen Adı	SI	RSI	Cas #	% Alan
3,4	**α-Pinene**	992	993	80-56-8	31.82
4,49	Isobutyl isobutyrate	929	970	97-85-8	0.27
4,75	β-Pinene	857	893	127-91-3	0.39
6,84	Limonene	987	994	138-86-3	8.77
7,04	**Eucalyptol**	991	992	470-82-6	21.33
7,22	8-Hydroxylinalool	790	817	64142-78-5	0.10
8,17	Alloocimene	778	823	673-84-7	0.19
8,43	3-carene	831	848	NA	0.13
8,96	p-Cymene	928	931	99-87-6	0.48
9,3	1,5,5-Trimethyl-6-methylene-cyclohexene	710	743	514-95-4	0.09
15,94	cis-Linalool Oxide	803	874	5989-33-3	0.16
16,63	α-Pinene oxide	770	812	1686-14-2	0.08
19,06	**Linalool**	995	996	78-70-6	8.20
19,3	Linalyl acetate	980	990	115-95-7	1.82
19,57	Citronellic acid	792	846	18951-85-4	0.09
20,31	Icosapent	743	752	10417-94-4	0.06
20,83	Terpinen-4-ol	892	938	562-74-3	0.15
21,4	2,6-dimethylocta-3,7-diene-2,6-diol	779	834	13741-21-4	0.06
22,5	trans-Pinocarvyl acetate	879	917	NA	0.17
22,71	trans-Pinocarveol	911	955	547-61-5	0.27
22,95	α-Humulene	854	882	6753-98-6	0.13
23,39	Anethol	928	952	104-46-1	0.40
23,9	**Myrtenyl acetate**	989	992	1079-01-2	14.01
24,21	α-Terpinyl acetate	950	968	80-26-2	0.83
24,39	α-Terpineol	986	990	98-55-5	3.40
25,3	exo-2-Hydroxycineole acetate	830	889	57709-95-2	0.08
25,52	Neryl acetate	911	948	141-12-8	0.24
26,62	Geranyl acetate	985	986	105-87-3	1.37
27,72	Myrtenol	949	969	515-00-4	0.52
28,16	Nerol	872	904	106-25-2	0.11
29,32	trans-Carveol	871	926	1197-07-5	0.10
29,84	Geraniol	947	960	106-24-1	0.49
33,67	Caryophyllene oxide	928	966	1139-30-6	0.34
34,78	cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid	806	825	1783-84-2	0.09
35,37	Methyleugenol	934	956	93-15-2	0.79
35,51	Humulene epoxide II	912	950	19888-34-7	0.74
43,21	Cholestan-3-ol, 2-methylene-	850	869	22599-96-8	0.38

Mersin bitkisinin uçucu yağ ana bileşenlerinin α-pinene (% 31,82), eucalyptol (% 21,33), myrtenyl acetate (% 14,01), linalool (% 8,20), olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3).

3.3. MTT Testi

Hücreler, 96 kuyucuklu ‘plate’lere her bir kuyucukta 1x104 hücre olacak şekilde ekildi (Çizelge 4). Ekim sırasında her bir hücre hattı için hücrelere özgü besiyeri kullanılarak 100 µl hücre + besiyeri kuyucuklara eklendi. Hücreler %95 nem, %5 CO2 ve 37 ºC sağlayan inkübatör koşullarında 24 saat inkübe edildi. Hücreler 24 saat sonunda 96 kuyucuklu plate yüzeyini %70-80 oranında kapladıktan sonra 3000-1500-750-375-187,5-93,75-46,875 µg/ml ve 1200-600-300-150-75-37,5-18,75 µg/ml dozlarda Myrtus Communis esansiyel yağı, 1,8-sineol (Ökaliptol), Linalool ve α-pinen bileşikleri ile madde muamelesi yapıldı. 24 saat ve 48 saatlik süreler sonunda MTT analizi yapmak için aşağıdaki adımlar takip edildi:

- 0,005g/ml MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Sigma Aldrich) solüsyonu hazırlandı.
- 96 kuyucuklu ‘plate’lere ekim yapılan hücre ve maddelerin üzerine 10 µl MTT solüsyonu eklendi.
- 4 saat süresince 37 ºC inkübe edildi.
- İnkübasyon süresi sonunda plate içerisindeki mevcut olan solüsyonlar vakumlandı.
- Her bir kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi ve yarım saat 37 ºC’de inkübe edildi.
- Renkteki değişimi gözlemlemek için kolorimetrik bir okuyucu olan spektrofotometrede 590 nm’de 670 nm referans dalga boyuna karşın okutuldu.
- Microsoft Excel programı üzerinden % hücre canlılığı inhibisyon oranı aşağıdaki formülle belirlendi.

$$\%\text{Hücre canlılığı inhibisyonu} = \frac{(\text{OD muamale edilen hücre ortalaması } [-\text{blank}])}{(\text{OD kontrol hücre ortalaması } [-\text{blank}])} X100$$

- IC50 değerinin altında kalan MCF7 ve MCF10A için sitotoksik olmayan dozlar, uygun kimyasallar ve uygun muamele zamanı seçilerek çalışmaya devam ettirildi.

Çizelge 4. 96 kuyucuklu 'plate'lere ekim yapılan hücrelerin ve muamele edilen maddelerin şematize edilmiş şekli

3000 µg/ml	750 µg/ml	187,5 µg/ml	46,875 µg/ml	600 µg/ml	150 µg/ml	37,5 µg/ml	Blank	Negatif Kontrol		Pozitif Kontrol	
3000 µg/ml	750 µg/ml	187,5 µg/ml	46,875 µg/ml	600 µg/ml	150 µg/ml	37,5 µg/ml	Blank	Negatif Kontrol		Pozitif Kontrol	
3000 µg/ml	750 µg/ml	187,5 µg/ml	46,875 µg/ml	600 µg/ml	150 µg/ml	37,5 µg/ml	Blank	Negatif Kontrol		Pozitif Kontrol	
3000 µg/ml	750 µg/ml	187,5 µg/ml	46,875 µg/ml	600 µg/ml	150 µg/ml	37,5 µg/ml	Blank	Negatif Kontrol		Pozitif Kontrol	
1500 µg/ml	375 µg/ml	93,75 µg/ml	1200 µg/ml	300 µg/ml	75 µg/ml	18,75 µg/ml					
1500 µg/ml	375 µg/ml	93,75 µg/ml	1200 µg/ml	300 µg/ml	75 µg/ml	18,75 µg/ml					
1500 µg/ml	375 µg/ml	93,75 µg/ml	1200 µg/ml	300 µg/ml	75 µg/ml	18,75 µg/ml					
1500 µg/ml	375 µg/ml	93,75 µg/ml	1200 µg/ml	300 µg/ml	75 µg/ml	18,75 µg/ml					

3.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR) Analizleri

3.4.1. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için MCF7 ve MCF10A hücreleri 6 kuyucuklu plate'lere sırasıyla DMEM ve DMEM/HAM F12 içeren besi ortamında kuyu başına 1x105 hücre/ml olacak şekilde ekildi ve 37ºC'de %5 CO_2 koşullarında 24 saat boyunca inkübe edildi. Hücreler bulundukları kültür kaplarının yüzeyini %70-80 oranında 750 ve 600 µg/ml dozlarda *M. communis* esansiyel yağı ile 24 saatlik süre için muamele edildi. İnkübasyon sürelerinden sonra,

- Kuyucuklarda bulunan besiyeri uzaklaştırıldı.
- 1 ml soğuk PBS ile hücreler yıkandı.
- Hücrelerin yapışık olduğu plate yüzeyinden ayrılması için 1 ml tripsin (6 kuyucuklu plate için) eklendi ve 37ºC'de %5 CO_2 ortamında 5 dk inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra tripsini inhibe etmek için solüsyonun üzerine 1 ml besiyeri

eklendi.

- Tripsin+hücre+besiyeri solüsyonu 2 ml ependorf tüpe aktarılarak 3000 rpm (Revolution per minute; dakikadaki devir sayısı)'de 10 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırılarak hücre pelletinin üzerine 1 ml Trizol eklendi. (Örnekler kısa süreli çalışmalar için -20 ºC, uzun süreli çalışmalar için ise -80 ºC de muhafaza edilir).

3.4.1.1. RNA İzolasyon Prorokolü

1. Trizol ile homojenize edilen hücreler 1.5 ml ependorf tüpe aktarıldı.
2. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
3. 250 µl kloroform eklendi ve tüp yaklaşık 15 saniye boyunca kuvvetlice sallandı.
4. 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
5. 10.000 rpm 4ºC'de 15 dk santrifüj edildi.
6. Bu aşamada, tüpte üç katman oluştu:
    - Üst katman: berrak, sulu (RNA)
    - Orta katman: beyaz çöken DNA
    - Alt katman: pembe organik faz
7. Pipet yardımıyla üst faz dikkatlice çekildi ve 1.5 ml ependorf tüpe aktarıldı.
8. 500 µl izopropanol eklendi ve yavaşça karıştırıldı.
9. 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
10. 14.000 rpm 4ºC'de 15 dk santrifüj edildi.
11. Süpernatant uzaklaştırıldı ve örnekler buzun üzerine yerleştirildi.
12. Her bir örnek 1 ml soğuk %75 EtOH (%75 EtOH + %25 DEPC-muamele edilmiş su) ile yıkandı ve pipet yardımıyla yavaşça karıştırıldı.
13. 10.000 rpm 4ºC'de 10 dk santrifüj edildi.
14. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet kuruması için bekletildi.
15. Kuruduktan sonra RNA pelleti üzerine 20 µl DEPC-muamele edilmiş su eklendi.
16. Son olarak örnekler pipetajlanıp, bir sonraki aşamaya kadar -20 ºC'ye kaldırıldı.

Elde edilen RNA'ların kalite ve miktar tayini Thermofisher varioskan lux multimode microplate reader cihazı kullanılarak yapıldı (Çizelge 5). RNA'lar 1,5 µg/µl olacak şekilde dilue edilerek cDNA sentezi için kullanıldı ve kalan stok RNA'lar -80 ºC'de saklandı.

Çizelge 5. RNA konsantrasyonlarının (ng/ µl) ve absorbans değerlerinin (260/280 nm) hesaplanarak cDNA izolasyonu için eklenen RNA ve su miktarının belirlenmesi

Örnek Kimliği	RNA konsantrasyonu (ng/µl)	Eklenen RNA miktarı (1,5 µg)	Eklenen su miktarı	Absorbans (260/280)
MCF7_24h_Kontrol	566,4 ng/µl	1500÷566,4=2,65 µl	7,35 µl	1,947
MCF7_24h_*M.communis*_750 µg/µl	348,6 ng/µl	1500÷ 348,6=4,30 µl	5,7 µl	1,928
MCF7_24h_*M.communis*_600 µg/µl	485,9 ng/µl	1500÷ 485,9=3,09 µl	6,1 µl	1,822
MCF10A_24h_Kontrol	112,5 ng/µl	1500÷ 112,5=10 µl	-	1,895
MCF10A_24h_ *M.communis* _750 µg/µl	79,84 ng/µl	1500÷ 79,84=10 µl	-	1,828
MCF10A_24h_*M.communis*_600 µg/µl	125,7 ng/µl	1500÷ 125,7=10 µl	-	1,909

3.4.2. cDNA (Komplementer DNA Zincir) Sentezi

RNA izolasyonundan sonra kültüre edilmiş doku hücrelerinden elde edilen total RNA miktarları 260/280 nm absorbans değerinde spektrofotometrik ölçümleri hesaplandı ve sonuçlar ng/µl olarak bulundu. Elde edilen RNA'lardan cDNA sentez kiti (High Capacity cDNA, Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Lithunia) ile cDNA elde edildi. cDNA sentezinin eldesinde kullanılan karışım aşağıdaki tabloda verilmiştir (Çizelge 6,7).

Çizelge 6. cDNA sentez karışım oranları

10X RT Buffer	2 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8 µl
10X RT Random Primers	2 µl
MultiSucribe Reverse Transcriptase	1 µl
Nuclease-Free Water	4.2 µl
RNA	10 µl
Total	20 µl

Çizelge 7. cDNA eldesinde ısı döngüleri ve süreleri

Ayarlar	**Adım 1**	**Adım 2**	**Adım 3**	**Adım 4**
Sıcaklık	25 °C	37 °C	85°C	4 °C
Zaman	10 dakika	120 dakika	5 dakika	∞

Toplam 20µl olacak şekilde Çizelge 6'da belirtildiği gibi hazırlanan karışımdan 10 µl alındı ve 10 µl dilute RNA ile birleştirildi. Her bir örnek için ayrı ayrı hazırlanan dilüe RNA miktarları Çizelge 5'de belirtilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri 80 µl Nuclease-free su eklenerek dilüe edildi ve totalde 100 µl olan cDNA örnekleri bir sonraki aşamaya kadar -20 ºC'de muhafaza edildi.

3.4.3. Real Time PCR

cDNA sentezinden sonra reverse transkripsion işlemi QIAGEN Rotor-Gene Q cihazı kullanılarak gerçekleştirildi (Çizelge 8,9).

Çizelge 8. Real time PCR reaksiyon bileşenleri ve miktarları

2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	7,5 µl
Primer (10µM stok)	2 µl (Forward+Reverse)
cDNA (1500 ng RNA ile hazırlanan)	1,5 µl
Nükleazsız su	4 µl
Total	15 µl

Çizelge 9. RT-qPCR reaksiyonunda ısıl döngüler ve süreleri

Aşama	**Sıcaklık (ºC)**	**Zaman**
UNG pre-treatment	50 ºC	2 dk
Başlangıç Denatürasyonu	95 ºC	15 dk
Denatürasyon	94 ºC	15 sn
Annealing	50-60 ºC	30 sn
Extension	72 ºC	30 sn

Kaspaz 9, Bax, Bcl-2 ve Apaf1 dizileri primer3 programı kullanılarak tasarlandı (Çizelge 10). PCR primer spesifikliğini, dimerleri ve saç tokası yapısını değerlendirmek için MFEPrimer 3 programı kullanıldı. Primer kalitesinin, homo ve hetero dimer oluşumunun değerlendirilmesi için ise Oligo Analyzer programı kullanıldı.

Çizelge 10. Real time PCR için kullanılan gen dizileri

SyBr Green Gen Expression Assay	Diziler
Kaspaz 9 Primer Forward	5'-TCCTACTCTACTTTCCCAGGTTT-3'
Kaspaz 9 Primer Reverse	5'-GAAATTAAAGCAACCAGGCATCT-3'
Bax Primer Forward	5'-TGCAGAGGATGATTGCCG-3'
Bax Primer Reverse	5'-GGAGGAAGTCCAATGTCCAG-3'
Bcl-2 Primer Forward	5'-GATTGTGGCCTTCTTTGAGTTC-3'
Bcl-2 Primer Reverse	5'-TTCCACAAAGGCATCCCAG-3'
Apaf-1 Primer Forward	5'-AACACCCAAGGTCTCTCTTG-3'
Apaf-1 Primer Reverse	5'-TAAGGAACTCTCCACAGGGA-3'

3.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın MTT analiz sonuçları GraphPad Prism Version 8.0 programı ile yapıldı. İstatistiksel analizde SPSS 23 bilgisayar programı kullanıldı. Kolmogorov-Smirnov analizi ile test sonuçlarının normal dağılıma sahip olup olmadığına bakıldı. Normal dağılıma sahip olan değişkenler için one-way ANOVA (tek yönlü varyans analizi), normal dağılım göstermeyen değişkenler için ise Shapiro-Wilk varyans analizi kullanılarak gruplar arası ölçümler karşılaştırıldı. Her test grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldı ve istatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak kabul edildi. Veriler ORT ± SE olarak ifade edildi.

QIAGEN Rotor-Gene Q cihazında yapılan ekspresyon verilerinin analizi RT^2 profiler PCR Array Data Analysis Version 3.5 ile yapıldı ve GAPDH 'housekeeping gen' olarak normalizasyonda kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. *M. communis* Esansiyel Yağının (3000-46,875 µg/ml) MCF7 ve MCF10A Hücre Hatları için Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

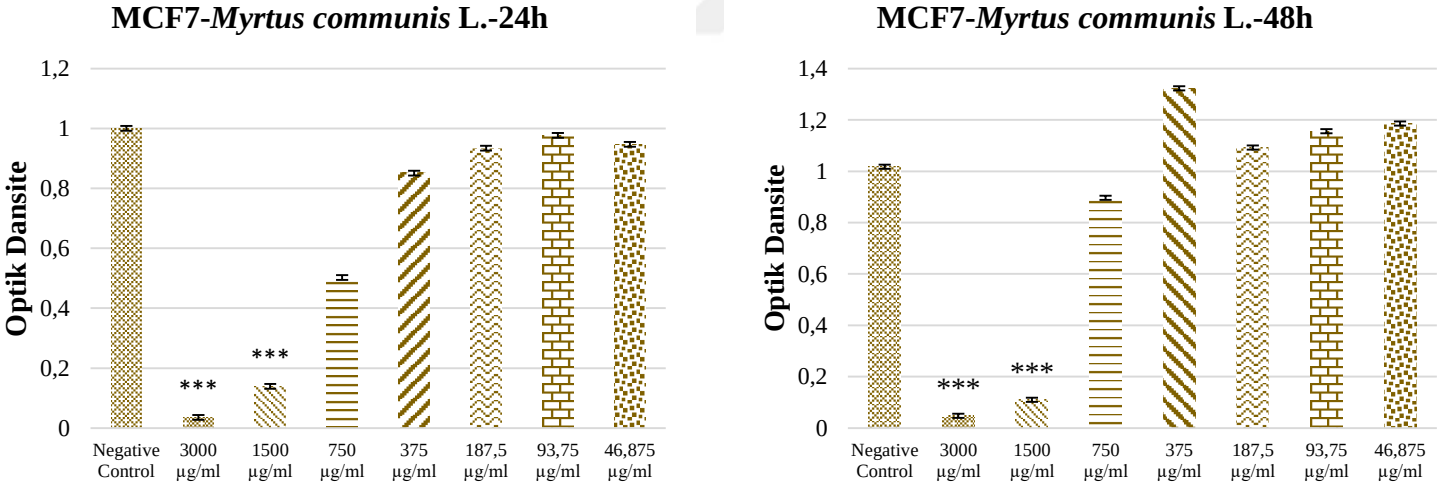
M. communis esansiyel yağının 3000 µg/ml ve 46,875 µg/ml konsantrasyon aralıklarında MCF7 ve MCF10A hücre hatları üzerinde canlılık etkisine bakıldı. MCF7 için 24 ve 48 saatlik muamele sonunda 3000 ve 1500 µg/ml dozlarda hücre canlılığını anlamlı bir şekilde baskıladığı görüldü (Çizelge 11, Şekil 12). MCF10A için 24 ve 48 saatlik süre sonunda, 3000 ve 1500 µg/ml dozlarda hücre canlılığını anlamlı bir şekilde baskıladığı görülürken, 48 saatlik süre sonunda aynı zamanda 750 µg/ml dozunda da hücre canlılığını anlamlı bir şekilde baskıladığı görüldü (Çizelge 12, Şekil 13).

Çizelge 11. MCF7 hücre hattı için *M. communis* esansiyel yağının 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

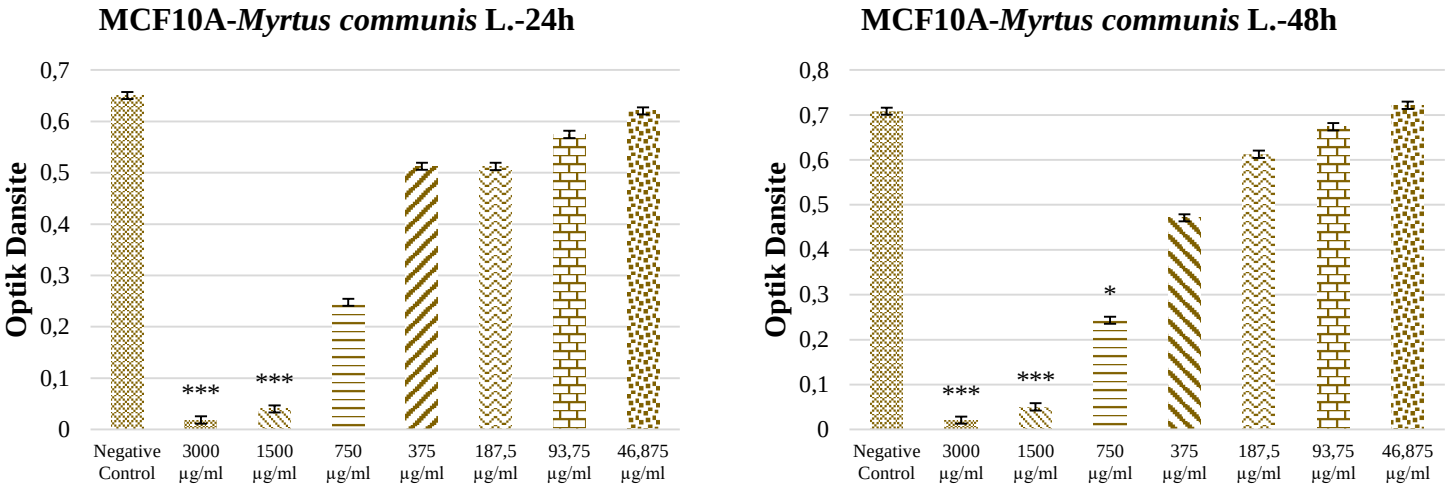
MCF7 için *M. communis* Esansiyel Yağ Konsantrasyonu	Ortalama ± Standart Sapma	
	T24	T48
3000 µg/ml	0,03451± 0,00681***	0,04725±0,010957***
1500 µg/ml	0,8275± 0,03897***	0, 10991±0,05065***
750 µg/ml	0,70387±0,05311	0, 616833±0,15232
375 µg/ml	1,0948± 0,1506	1,32312±0,23155
187,5 µg/ml	1,181125±0,088067	1,39362±0,10845
93,75 µg/ml	1,19975±0,086465	1,4145±0,10765
46,875 µg/ml	1,174125±0,12359	1,429±0,0896

Çizelge 12. MCF10A hücre hattı için *M. communis*. esansiyel yağının 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

MCF10A için *M. communis* Esansiyel Yağ Konsantrasyonu	Ortalama ± Standart Sapma	
	T24	T48
3000 µg/ml	0,01842±0,00549***	0,02075±0,00378***
1500 µg/ml	0,052875±0,02665***	0,0503±0,02072***
750 µg/ml	0,34625±0,07056	0,24317±0,051105*
375 µg/ml	0,51275±0,03484	0,471±0,058964
187,5 µg/ml	0,51225±0,073294	0,61258±0,06223
93,75 µg/ml	0,5745±0,05424	0,67375±0,055937
46,875 µg/ml	0,62042±0,05299	0,7217±0,06693



Şekil 12. *M. communis* esansiyel yağinin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).



Şekil 13. *M. communis* esansiyel yağının 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF10A hücre canlılığı üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

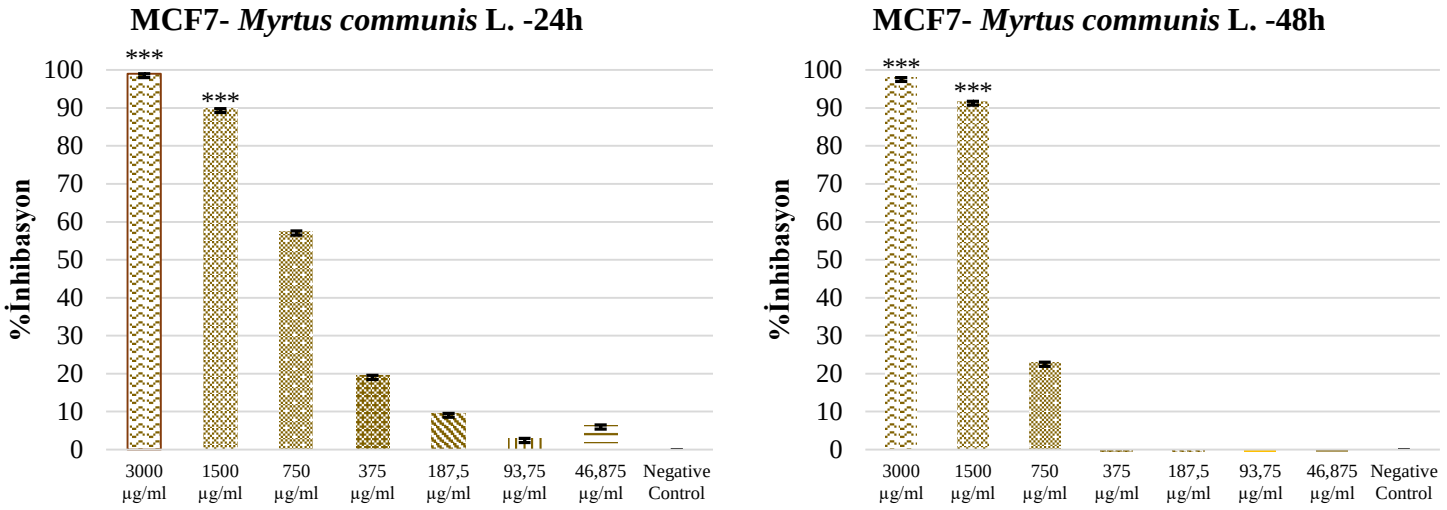
M. communis esansiyel yağının 3000 µg/ml ve 46,875 µg/ml konsantrasyon aralıklarında MCF7 ve MCF10A hücre hatları üzerinde % inhibisyon etkilerine bakıldığında; MCF7 için 24 saatlik süre sonunda, 3000 ve 1500 µg/ml dozlarda % inhibisyon sırasıyla 99 ve 89,7 değerleri ile anlamlı gözlemlenirken, 48 saatlik süre sonunda ise, 3000 ve 1500 µg/ml dozlarda % inhibisyon sırasıyla 98 ve 91,7 değerleri ile anlamlı gözlemlendi (Çizelge 13, Şekil 14). MCF10A için 24 saatlik süre sonunda, 3000 ve 1500 µg/ml dozlarda % inhibisyon sırasıyla 99,4 ve 95,8 değerleri ile anlamlı gözlemlenirken, 48 saatlik süre sonunda ise 3000,1500 ve 750 µg/ml dozlarda % inhibisyon sırasıyla 99-94,7 ve 66,7 değerleri ile anlamlı gözlemlendi (Çizelge 14, Şekil 15).

Çizelge 13. MCF7 hücre hattı için *M. communis*. esansiyel yağının 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

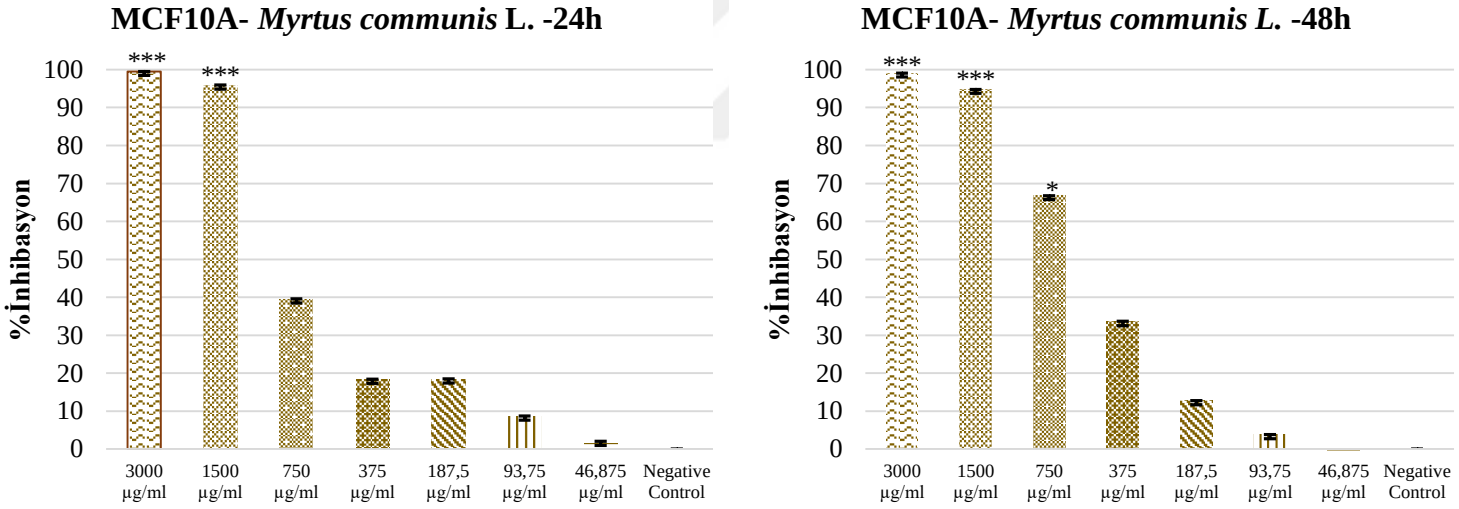
MCF7 için *M. communis* Esansiyel Yağ Konsantrasyonu	% İnhibisyon Oranları	
	T24	T48
3000 µg/ml	99,02***	98***
1500 µg/ml	89,7***	91,7***
750 µg/ml	57,5	22,9
375 µg/ml	19,4	0
187,5 µg/ml	9,4	0
93,75 µg/ml	2,81	0
46,875 µg/ml	6,35	0
Kontrol	0	0

Çizelge 14. MCF10A hücre hattı için *M. communis* esansiyel yağının 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

MCF10A için *M. communis* Esansiyel Yağ Konsantrasyonu	% İnhibisyon Oranları	
	T24	T48
3000 µg/ml	99,4***	99,05***
1500 µg/ml	95,8***	94,7***
750 µg/ml	39,5	66,7*
375 µg/ml	18,28	33,5
187,5 µg/ml	18,39	12,7
93,75 µg/ml	8,6	3,74
46,875 µg/ml	1,9	0
Kontrol	0	0



Şekil 14. MCF7 hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon grafiği (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).



Şekil 15. MCF10A hücrelerinde *M. communis* esansiyel yağinin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon grafiği (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

4.2. *M. communis* Esansiyel Yağının (1200-18,75 µg/ml) MCF7 ve MCF10A Hücre Hatları için Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

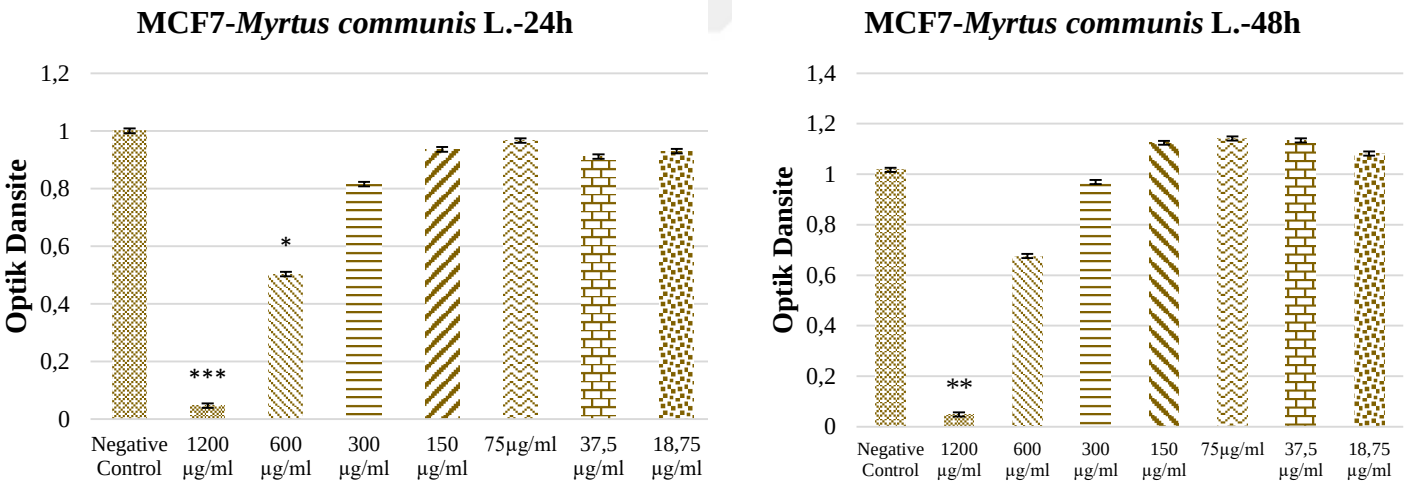
M. communis esansiyel yağının 1200 µg/ml ve 18,75 µg/ml konsantrasyon aralıklarında MCF7 ve MCF10A hücre hatları üzerinde canlılık etkisine bakıldı. MCF7 için 24 saatlik süre sonunda, 1200-600 µg/ml dozlarda hücre canlılığını anlamlı bir şekilde baskıladığı görülürken, 48 saatlik süre sonunda ise 1200 µg/ml dozlarda hücre canlılığını anlamlı bir şekilde baskıladığı görüldü (Çizelge 15, Şekil 16). MCF10A için 24 saatlik süre sonunda anlamlı bir değişim görülmezken, 48 saatlik süre sonunda ise 1200 µg/ml dozlarda hücre canlılığını anlamlı bir şekilde baskıladığı görüldü (Çizelge 16, Şekil 17).

Çizelge 15. MCF7 hücre hattı için *M. communis* esansiyel yağının 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

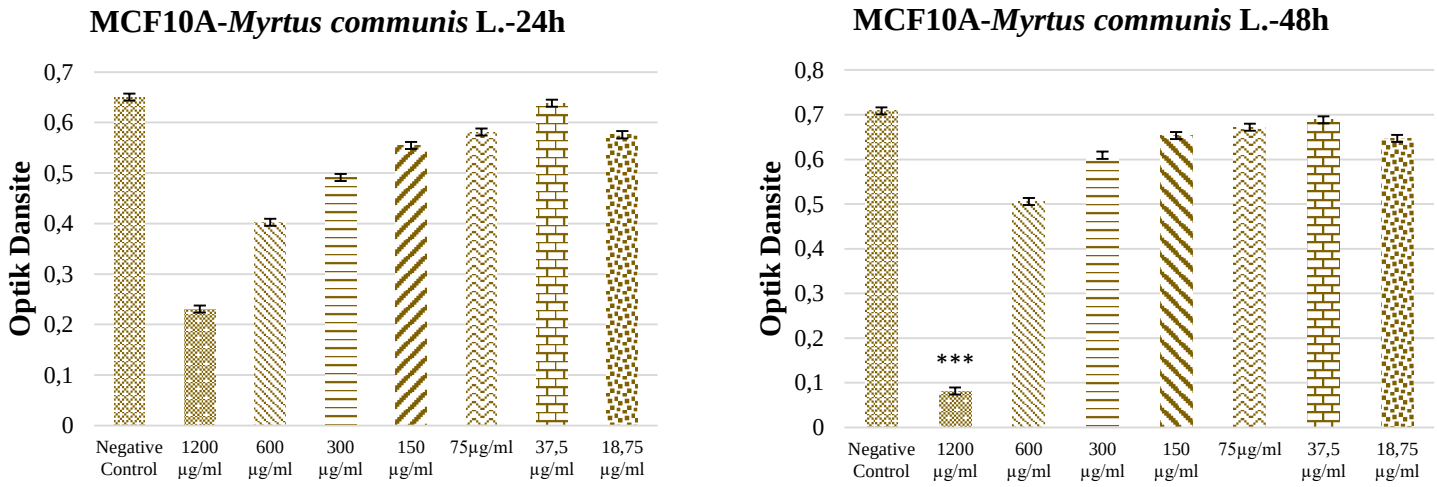
MCF7 için *M. communis* Esansiyel Yağ Konsantrasyonu	Ortalama ± Standart Sapma	
	T24	T48
1200 µg/ml	0,3522± 0,03718***	0,3905±0,037010***
600 µg/ml	0,66475±0,14937*	0,67612±0,18835
300 µg/ml	1,004± 0,08527	1,16612±0,14021
150 µg/ml	1,1285±0,12544	1,35912±0,16482
75 µg/ml	1,1715±0,14326	1,32912±0,1548
37,5 µg/ml	1,091125±0,14207	1,34028±0,12538
18,75 µg/ml	1,113875±0,10166	1,22837±0,137673

Çizelge 16. MCF10A hücre hattı için *M. communis* esansiyel yağının 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

MCF10A için *M. communis* Esansiyel Yağ Konsantrasyonu	Ortalama ± Standart Sapma	
	T24	T48
1200 µg/ml	0,2305±0,050988	0,1065±0,035368**
600 µg/ml	0,40225±0,062726	0,50583±0,11007
300 µg/ml	0,49092±0,12076	0,60925±0,07235
150 µg/ml	0,55442±0,08518	0,65328±0,05926
75 µg/ml	0,581±0,09675	0,672±0,088439
37,5 µg/ml	0,6383±0,07594	0,6885±0,071459
18,75 µg/ml	0,57583±0,06551	0,64683±0,087126



Şekil 16. *M. communis* Esansiyel yağının 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).



Şekil 17. *M. communis* Esansiyel yağının 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF10A hücre canlılığı üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

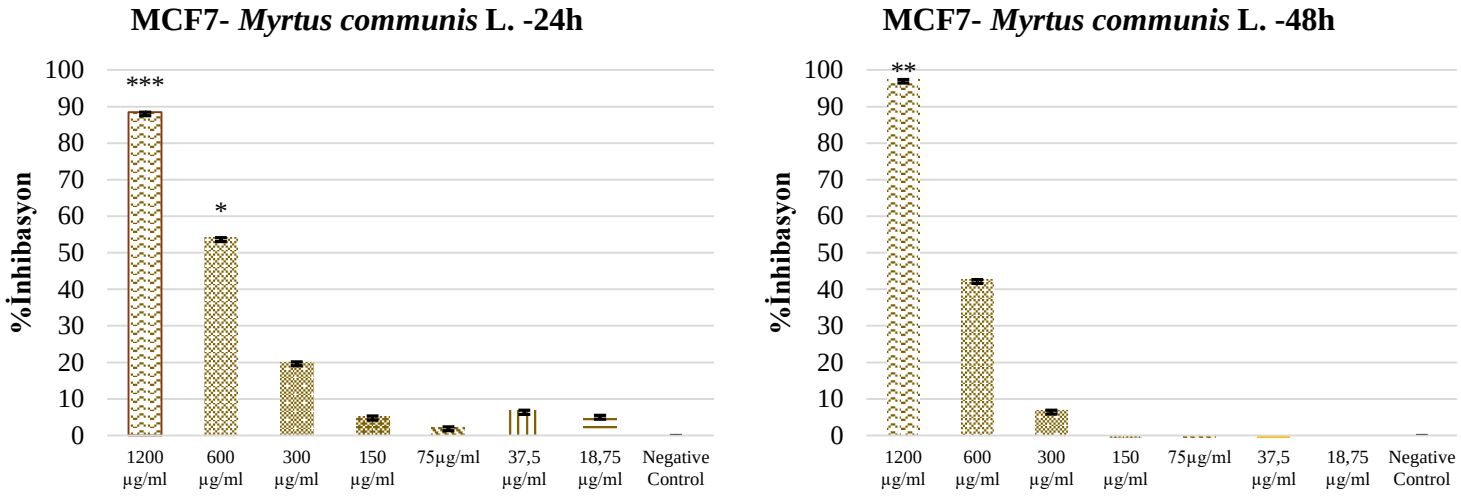
M. communis esansiyel yağının 1200 ve 18,75 µg/ml konsantrasyon aralıklarında MCF7 ve MCF10A hücre hatları üzerinden % inhibisyon etkilerine bakıldığında; MCF7 için 24 saatlik süre sonunda, 1200 ve 600 µg/ml dozlarda % inhibisyon sırasıyla 88,5 ve 54,09 değerleri ile anlamlı olarak gözlemlenirken, 48 saatlik süre sonunda ise, 1200 µg/ml dozunda % inhibisyon sırasıyla 97,4 değeri ile anlamlı gözlemlendi (Çizelge 17, Şekil 18). MCF10A için 24 saatlik süre sonunda hiçbir konsantrasyonda anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, 48 saatlik süre sonunda ise 1200 µg/ml dozunda % inhibisyon 90,06 değeri ile anlamlı gözlemlendi (Çizelge 18, Şekil 19).

Çizelge 17. MCF7 hücre hattı için *M. communis* esansiyel yağının 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

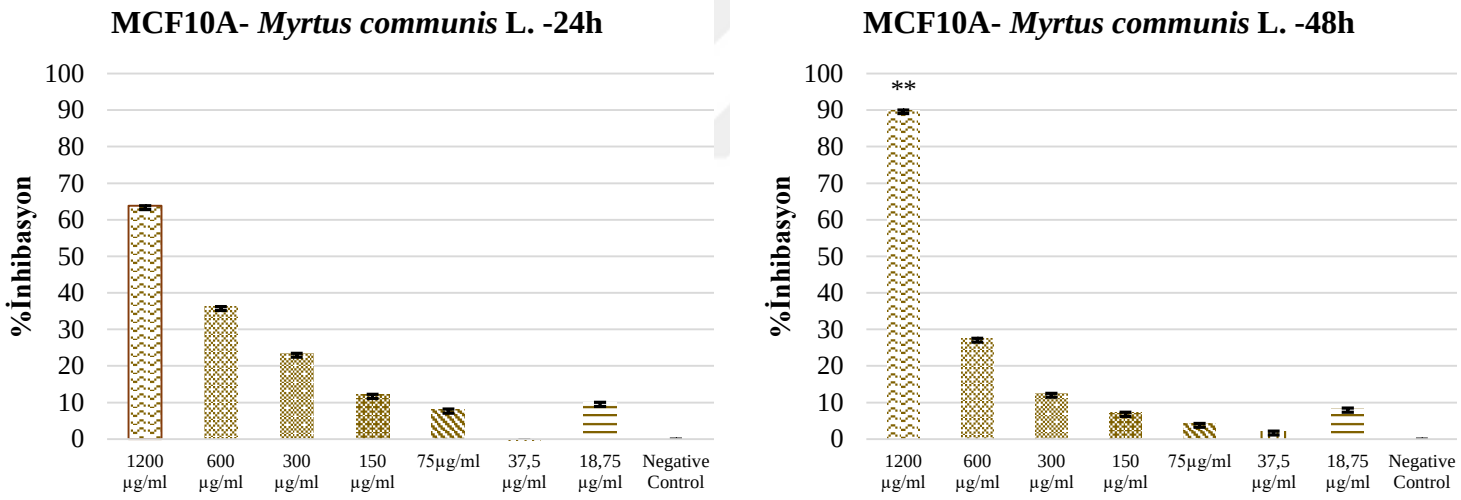
MCF7 için *M. communis* Esansiyel Yağ Konsantrasyonu	% İnhibisyon Oranları	
	T24	T48
1200 µg/ml	88,5***	97,4***
600 µg/ml	54,09*	42,58
300 µg/ml	20,06	6,84
150 µg/ml	5,21	0
75 µg/ml	2,28	0
37,5 µg/ml	6,81	0
18,75 µg/ml	5,43	0
Kontrol	0	0

Çizelge 18. MCF10A hücre hattı için *M. communis* esansiyel yağının 120-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

MCF10A için *M. communis* Esansiyel Yağ Konsantrasyonu	% İnhibisyon Oranları	
	T24	T48
1200 µg/ml	63,82	90,06**
600 µg/ml	36,22	27,52
300 µg/ml	23,4	12,43
150 µg/ml	12,06	7,21
75 µg/ml	8,08	4,2
37,5 µg/ml	0	2,09
18,75 µg/ml	9,93	8,32
Kontrol	0	0



Şekil 18. MCF7 hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon grafiği (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).



Şekil 19. MCF10A hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon grafiği (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

4.3. Linalool Bileşeninin (3000-46,875 µg/ml) MCF7 ve MCF10A Hücre Hatları için Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Linalool bileşeninin 3000 µg/ml ve 46,875 µg/ml konsantrasyon aralıklarında MCF7 ve MCF10A hücre hatları üzerinde canlılık etkisine bakıldı. MCF7 için 24 ve 48 saatlik süre sonunda, 3000 ve 1500 µg/ml dozlarda hücre canlılığını anlamlı bir şekilde

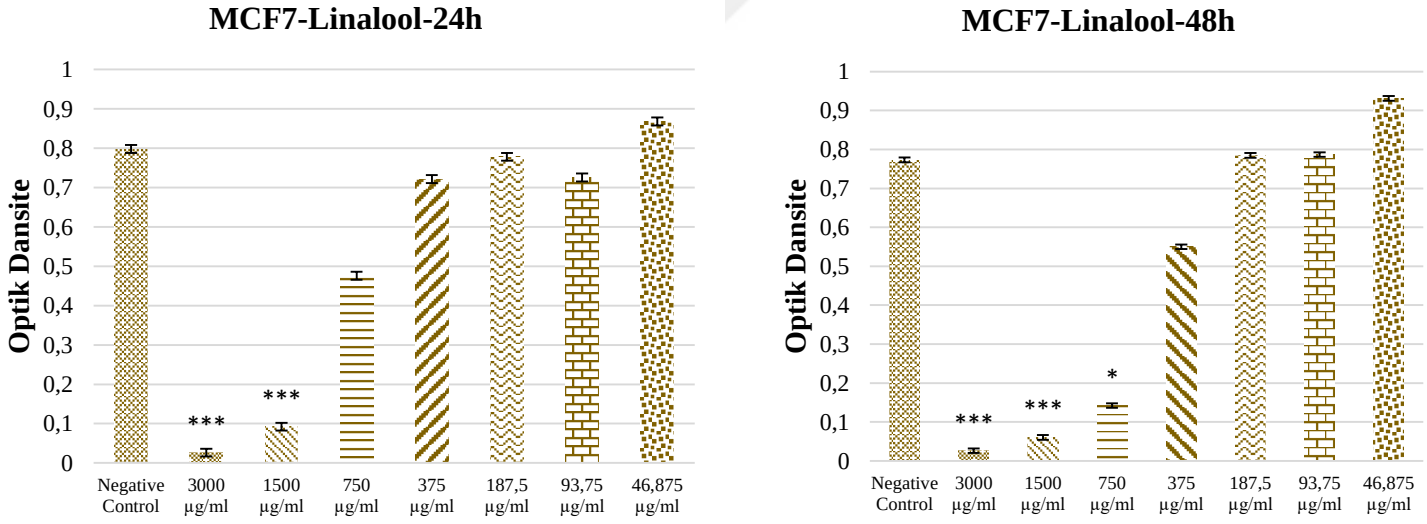
baskıladığı görülürken, aynı zamanda 48 saatlik süre sonunda 750 µg/ml dozunda da hücre canlılığını anlamlı bir şekilde baskıladığı görüldü (Çizelge 19, Şekil 20). MCF10A için 24 saatlik süre sonunda 3000-1500-750-375-187,5 ve 46,875 µg/ml dozlarında, 48 saatlik süre sonunda ise 3000-1500-750-375-187,5-93,75 µg/ml dozlarda hücre canlılığını anlamlı bir şekilde baskıladığı görüldü (Çizelge 20, Şekil 21).

Çizelge 19. MCF7 hücre hattı için Linalool bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

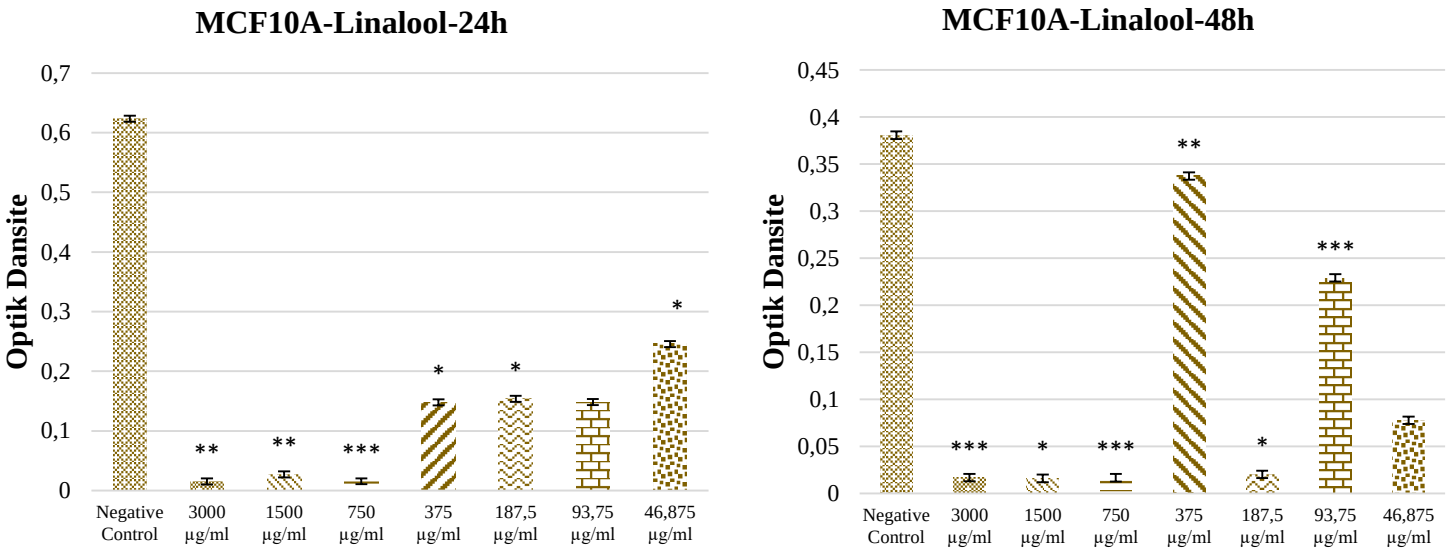
MCF7 için Linalool Konsantrasyonu	Ortalama ± Standart Sapma	
	T24	T48
3000 µg/ml	0,02618±0,00475***	0,02625±0,00215***
1500 µg/ml	0,11166±0,02562***	0,0606±0,04080***
750 µg/ml	0,475916±0,09339	0,43125±0,04652*
375 µg/ml	0,72141±0,1120	0,54992±0,09567
187,5 µg/ml	0,92266±0,07477	0,78458±0,09889
93,75 µg/ml	0,8235±0,157342	0,78658±0,11498
46,875 µg/ml	1,00691±0,15463	0,93092±0,06064

Çizelge 20. MCF10A hücre hattı için Linalool bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

MCF10A için Linalool Konsantrasyonu	Ortalama ± Standart Sapma	
	T24	T48
3000 µg/ml	0,01525±0,0037**	0,0168±0,00395***
1500 µg/ml	0,05275±0,0079**	0,03767±0,00553*
750 µg/ml	0,03025±0,002876***	0,0167±0,00337***
375 µg/ml	0,14775±0,08829*	0,04862±0,03928**
187,5 µg/ml	0,15375±0,036951*	0,02037±0,01525*
93,75 µg/ml	0,14825±0,04982	0,32162±0,07012***
46,875 µg/ml	0,24562±0,030815*	0,03858±0,007959



Şekil 20. Linalool bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).



Şekil 21. Linalool bileşeneninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF10A hücre canlılığı üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

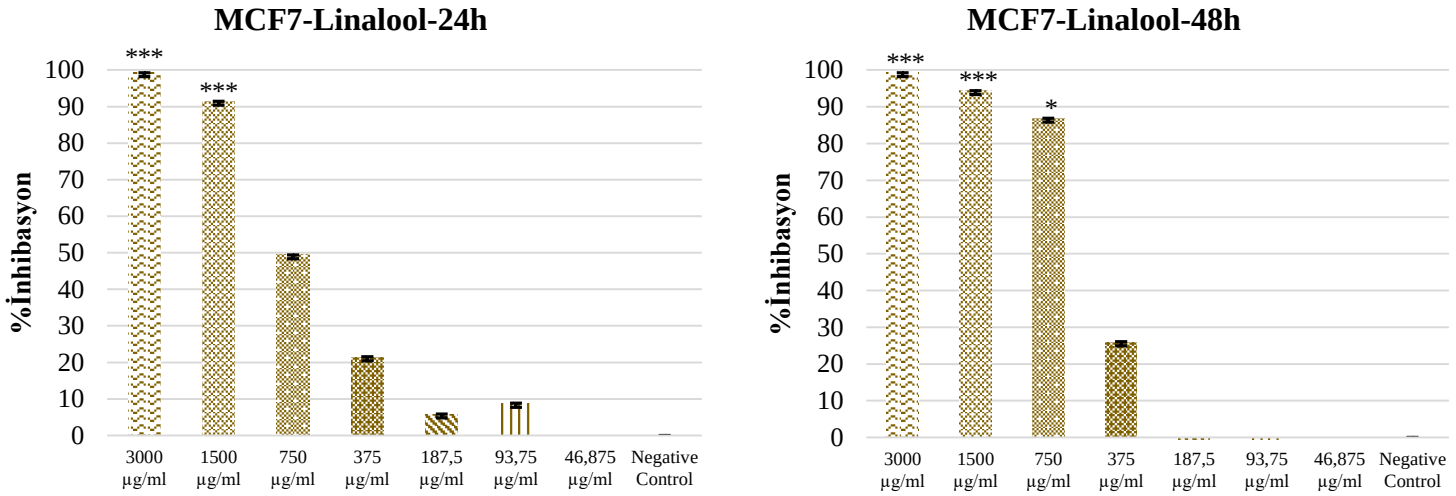
Linalool bileşeninin 3000 µg/ml ve 46,875 µg/ml konsantrasyon aralıklarında MCF7 ve MCF10A hücre hatları üzerinde % inhibisyon etkilerine bakıldığında; MCF7 için 24 saatlik süre sonunda, 3000 ve 1500 µg/ml dozlarda % inhibisyon sırasıyla 99,2 ve 91,38 değerleri ile anlamlı gözlemlenirken, 48 saatlik süre sonunda ise, 3000, 1500 ve 750 µg/ml dozlarda % inhibisyon sırasıyla 99,2-94,3 ve 86,8 değerleri ile anlamlı bir şekilde gözlemlendi (Çizelge 21, Şekil 22). MCF10A için 24 saatlik süre sonunda, 3000– 1500– 750– 375- 187,5 ve 46,875 µg/ml dozlarda % inhibisyon sırasıyla 99,4- 97,2- 99,4- 66,4- 67,92 ve 46,9 değerleri ile anlamlı gözlemlenirken, 48 saatlik süre sonunda ise 3000-1500-750-375-187,5 ve 93,75 µg/ml dozlarda % inhibisyon sırasıyla 96,73- 95,98- 96,38- 96,1- 97,06 ve 80,15 değerleri ile anlamlı bir şekilde gözlemlendi (Çizelge 22, Şekil 23).

Çizelge 21. MCF7 hücre hattı için Linalool bileşenin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

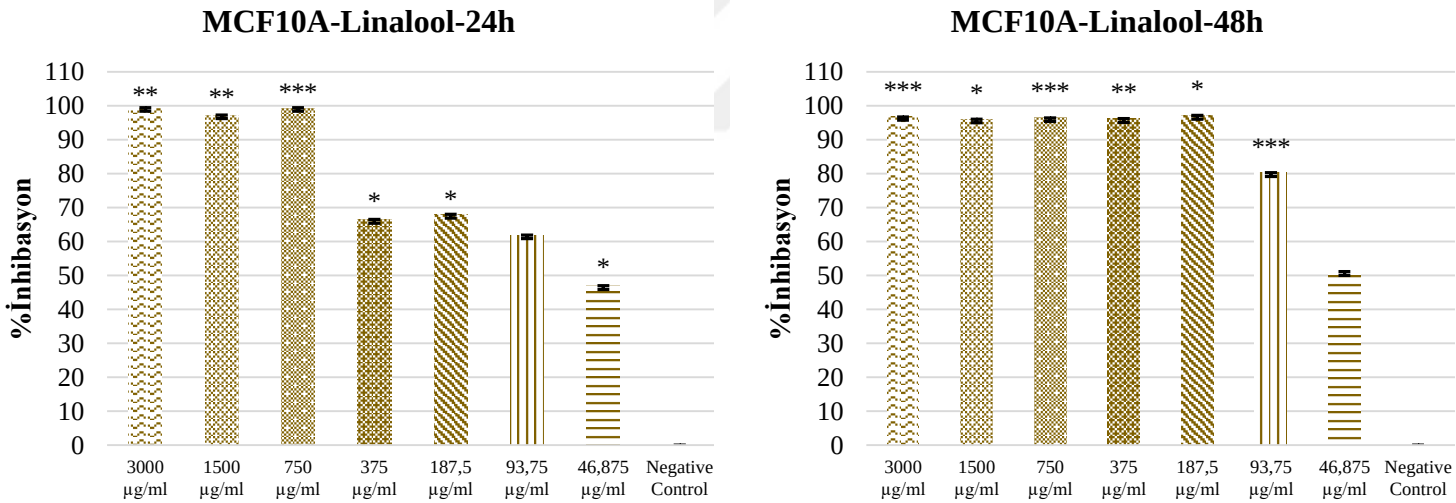
MCF7 için Linalool Konsantrasyonu	% İnhibisyon Oranları	
	T24	T48
3000 µg/ml	99,2***	99,2***
1500 µg/ml	91,38***	94,3***
750 µg/ml	49,36	86,8*
375 µg/ml	21,37	25,9
187,5 µg/ml	5,82	0
93,75 µg/ml	8,73	0
46,875 µg/ml	0	0
Kontrol	0	0

Çizelge 22. MCF10A hücre hattı için Linalool bileşenin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

MCF10A için Linalool Konsantrasyonu	% İnhibisyon Oranları	
	T24	T48
3000 µg/ml	99,4**	96,73***
1500 µg/ml	97,2**	95,98*
750 µg/ml	99,4***	96,38***
375 µg/ml	66,4*	96,1**
187,5 µg/ml	67,92*	97,06*
93,75 µg/ml	61,85	80,15***
46,875 µg/ml	46,9*	50,97
Kontrol	0	0



Şekil 22. MCF7 hücrelerinde Linalool bileşeninin 3000-46,875µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon grafiği (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).



Şekil 23. MCF10A hücrelerinde Linalool bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon grafiği (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

4.4. Linalool Bileşeninin (1200-18,75 µg/ml) MCF7 ve MCF10A Hücre Hatları için Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

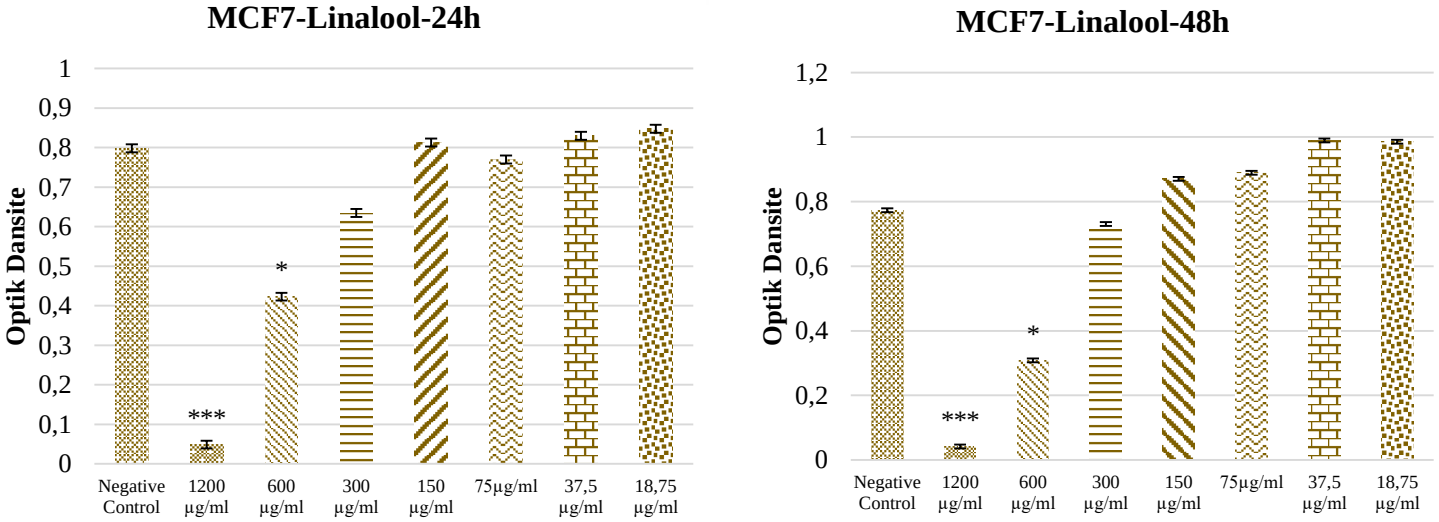
Linalool bileşeninin 1200 µg/ml ve 18,75 µg/ml konsantrasyon aralıklarında MCF7 ve MCF10A hücre hatları üzerinde canlılık etkisine bakıldı. MCF7 için 24 ve 48 saatlik süre sonunda, 1200-600 µg/ml dozlarda hücre canlılığını anlamlı bir şekilde baskıladığı görüldü (Çizelge 23, Şekil 24). MCF10A için 24 saatlik süre sonunda 1200-600-150 µg/ml dozlarında, 48 saatlik süre sonunda ise 1200-600-300-150 µg/ml dozlarda hücre canlılığını anlamlı bir şekilde baskıladığı görüldü (Çizelge 24, Şekil 25).

Çizelge 23. MCF7 hücre hattı için Linalool bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

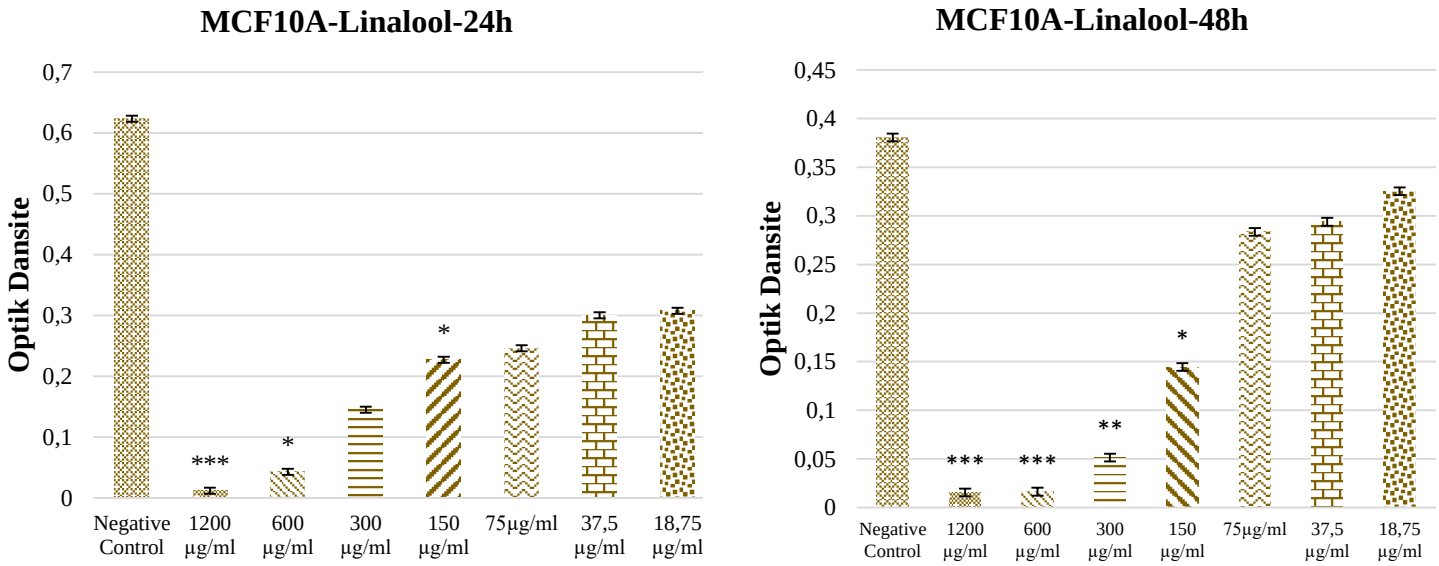
MCF7 için Linalool Konsantrasyonu	Ortalama ± Standart Sapma	
	T24	T48
1200 µg/ml	0,049062±0,02907***	0,04175±0,007693***
600 µg/ml	0,42293±0,0508*	0,30858±0,06381*
300 µg/ml	0,63443±0,09577	0,73042±0,0680
150 µg/ml	0,9089±0,09137	0,87033±0,1188
75 µg/ml	0,8451±0,12849	0,88925±0,07118
37,5 µg/ml	0,91983±0,13208	0,98916±0,17914
18,75 µg/ml	0,92822±0,13209	0,9853±0,08272

Çizelge 24. MCF10A hücre hattı için Linalool bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

MCF10A için Linalool Konsantrasyonu	Ortalama ± Standart Sapma	
	T24	T48
1200 µg/ml	0,02658±0,001825***	0,0155±0,00216***
600 µg/ml	0,0655±0,00867*	0,01625±0,00284***
300 µg/ml	0,145125±0,0127	0,01887±0,02847**
150 µg/ml	0,227±0,019469*	0,1445±0,015513*
75 µg/ml	0,24575±0,01289	0,19525±0,052125
37,5 µg/ml	0,25167±0,06695	0,201±0,011472
18,75 µg/ml	0,2738±0,08147	0,2225±0,043513



Şekil 24. Linalool bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).



Şekil 25. Linalool bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF10A hücre canlılığı üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

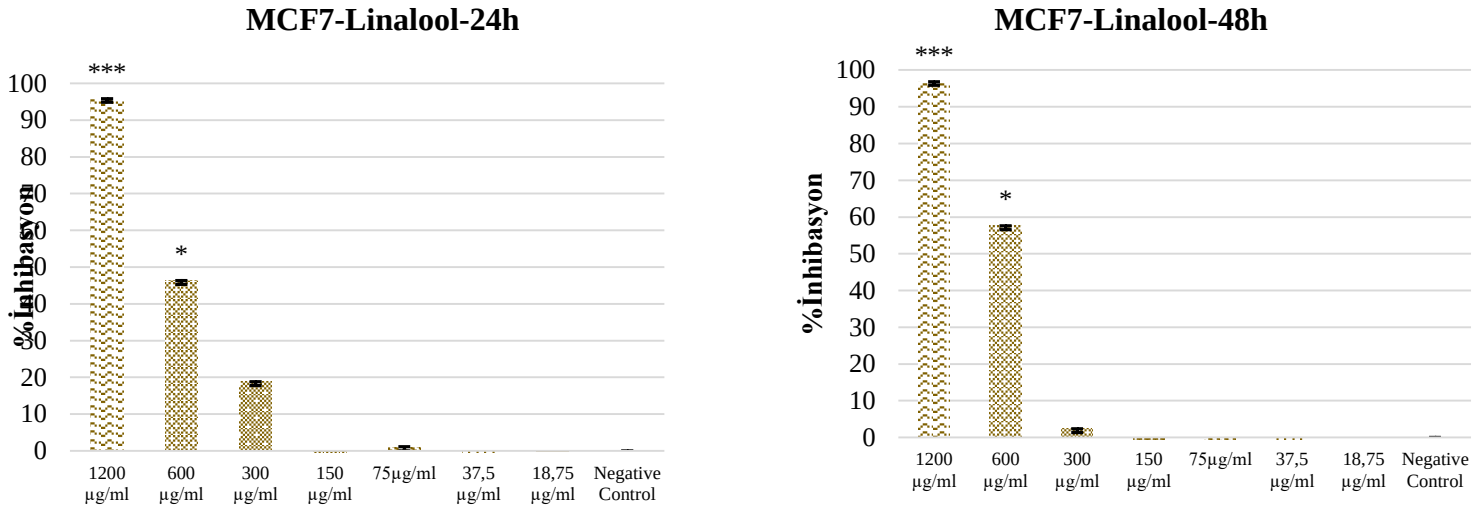
Linalool bileşeninin 1200 ve 18,75 µg/ml konsantrasyon aralıklarında MCF7 ve MCF10A hücre hatları üzerinde % inhibisyon etkilerine bakıldığında; MCF7 için 24 saatlik süre sonunda, 1200 ve 600 µg/ml dozlarında % inhibisyon sırasıyla 95,8 ve 46,3 değerleri ile anlamlı bir şekilde gözlemlenirken, 48 saatlik süre sonunda ise, 1200 ve 600 µg/ml dozlarda % inhibisyon sırasıyla 96,8 ve 57,6 değerleri ile anlamlı bir şekilde gözlemlendi (Çizelge 25, Şekil 26). MCF10A için 24 saatlik süre sonunda, 1200-600 ve 150 µg/ml dozlarda % inhibisyon sırasıyla 99,9-95,3 ve 52,3 değerleri ile anlamlı gözlemlenirken, 48 saatlik süre sonunda ise 1200, 600, 300 ve 150 µg/ml dozlarda % inhibisyon sırasıyla 97,02-96,8-91,6 ve 64,9 değerleri ile anlamlı bir şekilde gözlemlendi (Çizelge 26, Şekil 27).

Çizelge 25. MCF7 hücre hattı için Linalool bileşenin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

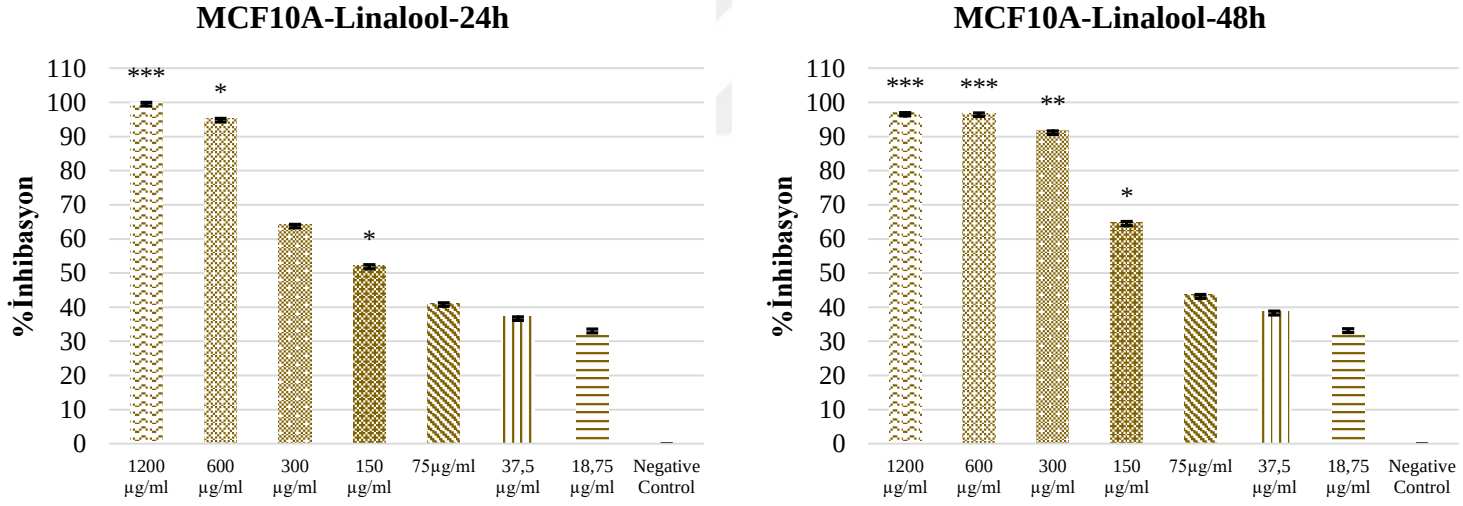
MCF7 için Linalool Konsantrasyonu	% İnhibisyon Oranları	
	T24	T48
1200 µg/ml	95,8***	96,8***
600 µg/ml	46,3*	57,6*
300 µg/ml	18,8	2,33
150 µg/ml	0	0
75 µg/ml	1,02	0
37,5 µg/ml	0	0
18,75 µg/ml	0	0
Kontrol	0	0

Çizelge 26. MCF10A hücre hattı için Linalool bileşenin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

MCF10A için Linalool Konsantrasyonu	% İnhibisyon Oranları	
	T24	T48
1200 µg/ml	99,97***	97,02***
600 µg/ml	95,3*	96,8***
300 µg/ml	64,2	91,6**
150 µg/ml	52,3*	64,9*
75 µg/ml	41,2	43,6
37,5 µg/ml	37,12	38,7
18,75 µg/ml	33,5	33,6
Kontrol	0	0



Şekil 26. MCF7 hücrelerinde Linalool bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon grafiği (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).



Şekil 27. MCF10A hücrelerinde Linalool bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon grafiği (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

4.5. α-pinen Bileşeninin (3000-46,875 µg/ml) MCF7 ve MCF10A Hücre Hatları için Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

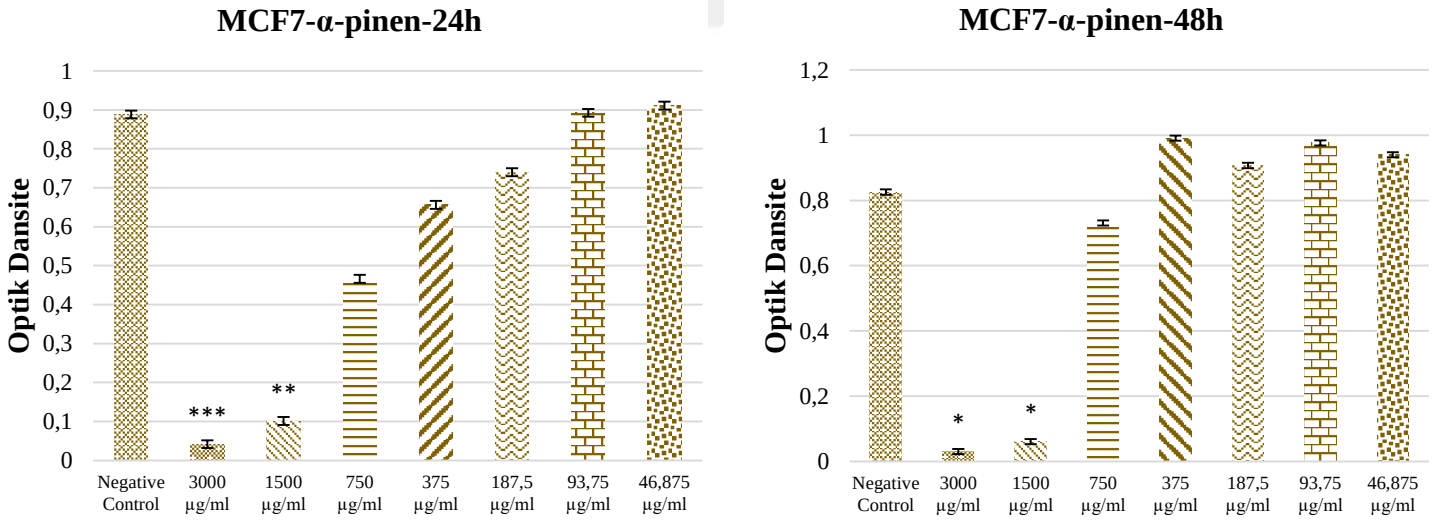
α-pinen bileşeninin 3000 µg/ml ve 46,875 µg/ml konsantrasyon aralıklarında MCF7 ve MCF10A hücre hatları üzerinde canlılık etkisine bakıldı. MCF7 için 24 ve 48 saatlik süre sonunda, 3000-1500 µg/ml dozlarda hücre canlılığını anlamlı bir şekilde baskıladığı görüldü (Çizelge 27, Şekil 28). MCF10A için 24 saatlik süre sonunda 3000-1500 µg/ml dozlarda, 48 saatlik süre sonunda ise 3000-1500-750-375 µg/ml dozlarda hücre canlılığını anlamlı bir şekilde baskıladığı görüldü (Çizelge 28, Şekil 29).

Çizelge 27. MCF7 hücre hattı için α-pinen bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

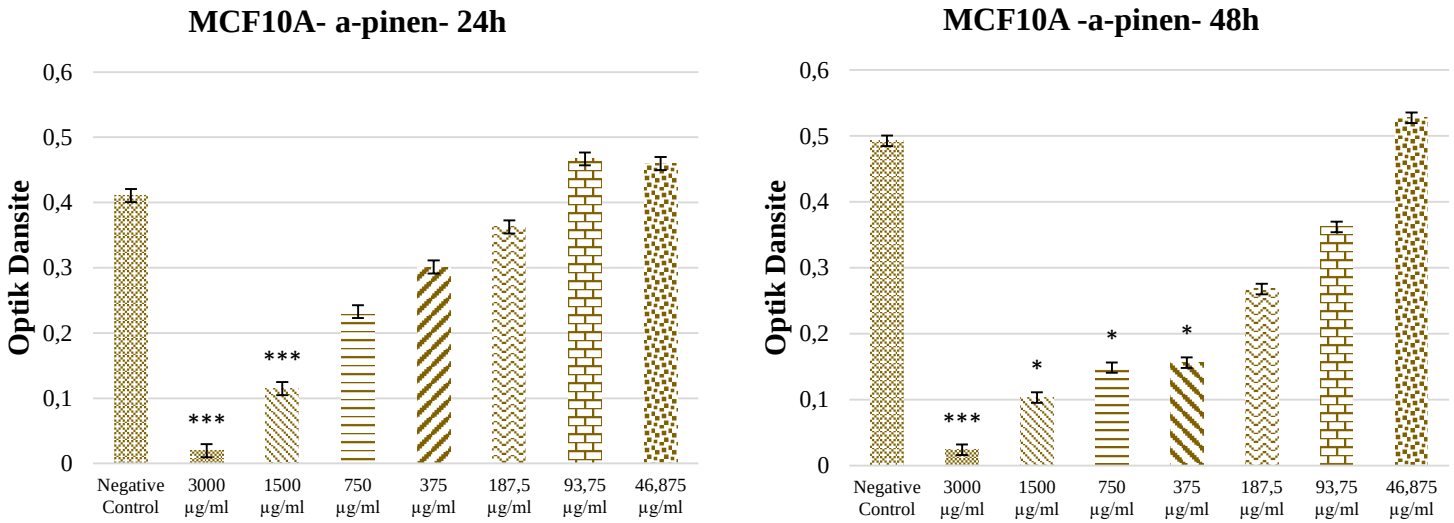
MCF7 için α-pinen Konsantrasyonu	Ortalama ± Standart Sapma	
	T24	T48
3000 µg/ml	0,0415±0,0132***	0,03025±0,00617*
1500 µg/ml	0,04325±0,0151**	0,019±0,0613*
750 µg/ml	0,16575±0,07237	0,73075±0,1206
375 µg/ml	0,42925±0,06237	0,9911±0,14056
187,5 µg/ml	0,5595±0,09919	0,907±0,13777
93,75 µg/ml	1,10612±0,11617	0,97625±0,07129
46,875 µg/ml	1,14237±0,09035	0,93975±0,12546

Çizelge 28. MCF10A hücre hattı için α-pinen bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

MCF10A için α-pinen Konsantrasyonu	Ortalama ± Standart Sapma	
	T24	T48
3000 µg/ml	0,01958±0,004258***	0,023705±0,0048***
1500 µg/ml	0,11475±0,0170**	0,103±0,01054*
750 µg/ml	0,23275±0,0294	0,1485±0,02181*
375 µg/ml	0,30125±0,02054	0,156±0,0148*
187,5 µg/ml	0,36275±0,036	0,2678±0,02693
93,75 µg/ml	0,46687±0,05443	0,36213±0,05044
46,875 µg/ml	0,45988±0,06422	0,52763±0,04870



Şekil 28. α--pinen bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).



Şekil 29. α-pinen bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF10A hücre canlılığı üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

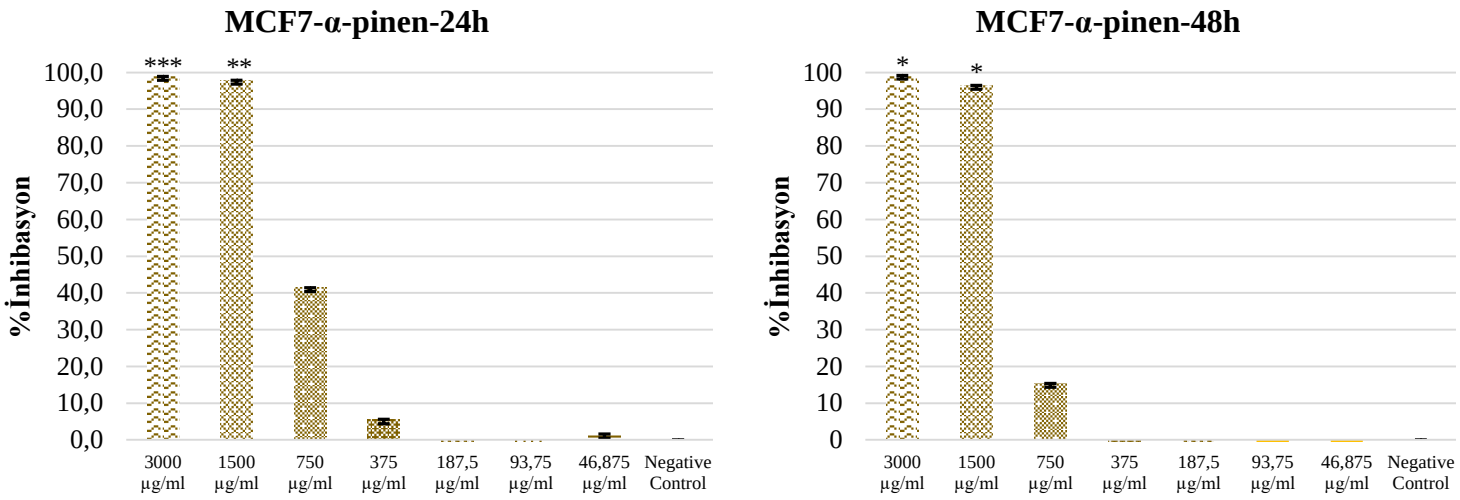
α-pinen bileşeninin 3000 µg/ml ve 46,875 µg/ml konsantrasyon aralıklarında MCF7 ve MCF10A hücre hatları üzerinde % inhibisyon etkilerine bakıldığında; MCF7 için 24 saatlik süre sonunda, 3000 ve 1500 µg/ml dozlarda % inhibisyon sırasıyla 98,9 ve 97,9 değerleri ile anlamlı bir şekilde gözlemlenirken, 48 saatlik süre sonunda ise, 3000 ve 1500 µg/ml dozlarda % inhibisyon sırasıyla 99,2 ve 96,4 değerleri ile anlamlı bir şekilde gözlemlendi (Çizelge 29, Şekil 30). MCF10A için 24 saatlik süre sonunda, 3000 ve 1500 µg/ml dozlarda % inhibisyon sırasıyla 97,3 ve 80,3 değerleri ile anlamlı gözlemlenirken, 48 saatlik süre sonunda ise 3000, 1500, 750 ve 375 µg/ml dozlarında % inhibisyon sırasıyla 98,3-86,05-78,8 ve 77,7 değerleri ile anlamlı bir şekilde gözlemlendi (Çizelge 30, Şekil 31).

Çizelge 29. MCF7 hücre hattı için α-pinen bileşenin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir

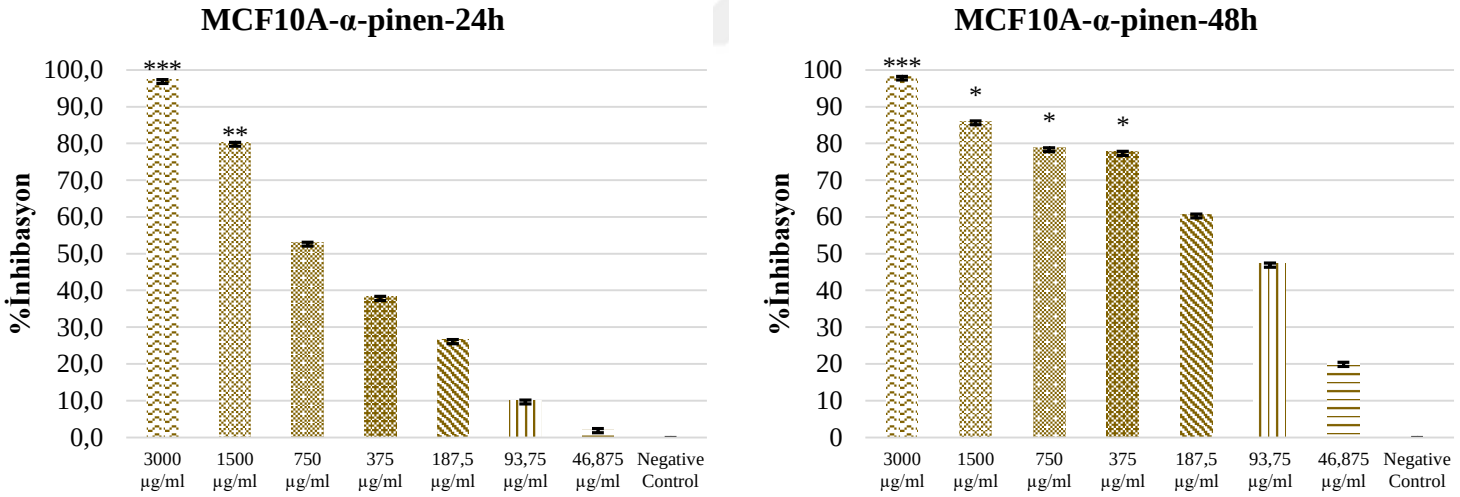
MCF7 için α-pinen Konsantrasyonu	% İnhibisyon Oranları	
	T24	T48
3000 µg/ml	98,9***	99,2*
1500 µg/ml	97,9***	96,4*
750 µg/ml	41,4	15,3
375 µg/ml	5,4	0
187,5 µg/ml	0	0
93,75 µg/ml	0	0
46,875 µg/ml	1,5	0
Kontrol	0	0

Çizelge 30. MCF10A hücre hattı için α-pinen bileşenin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

MCF10A için α-pinen Konsantrasyonu	% İnhibisyon Oranları	
	T24	T48
3000 µg/ml	97,3***	98,3***
1500 µg/ml	80,3**	86,05*
750 µg/ml	53	78,8*
375 µg/ml	38,3	77,7*
187,5 µg/ml	26,5	60,7
93,75 µg/ml	10,1	47,35
46,875 µg/ml	2,3	20,33
Kontrol	0	0



Şekil 30. MCF7 hücrelerinde α-pinen bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon grafiği (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).



Şekil 31. MCF10A hücrelerinde α-pinen bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon grafiği (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

4.6. α-pinen Bileşeninin (1200-18,75 µg/ml) MCF7 ve MCF10A Hücre Hatları için Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

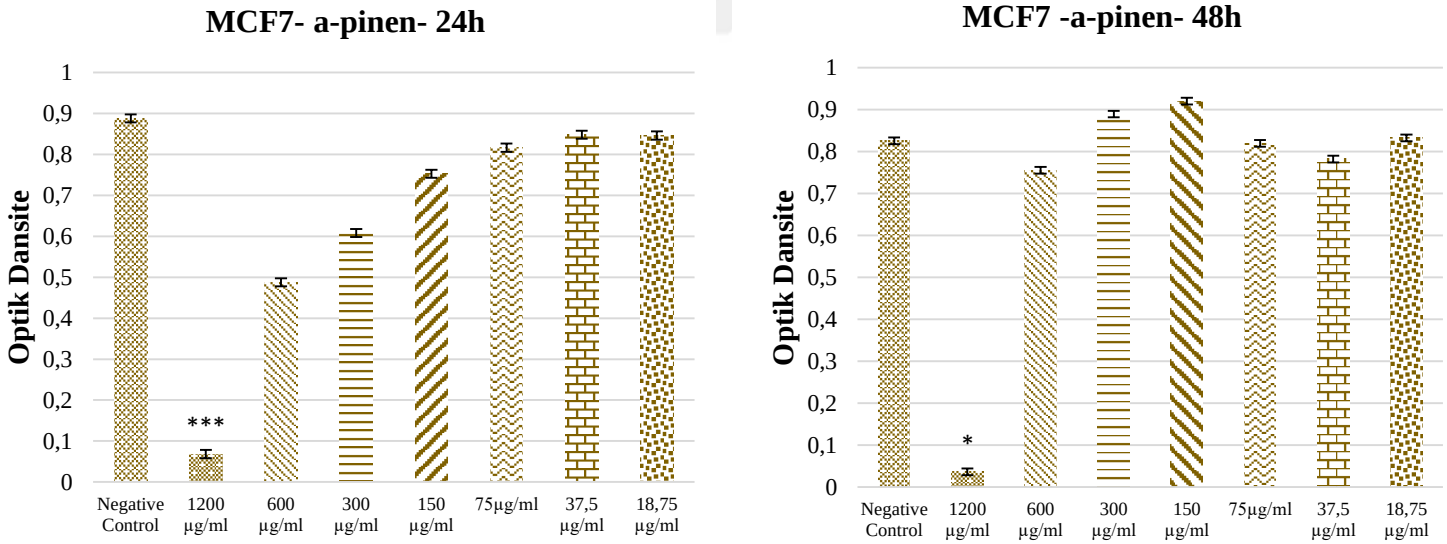
α-pinen bileşeninin 1200 µg/ml ve 18,75 µg/ml konsantrasyon aralıklarında MCF7 ve MCF10A hücre hatları üzerinde canlılık etkisine bakıldı. MCF7 için 24 ve 48 saatlik süre sonunda, 1200 µg/ml dozunda hücre canlılığını anlamlı bir şekilde baskıladığı görülürken (Çizelge 31, Şekil 32), MCF10A için 24 saatlik süre sonunda 1200 µg/ml dozunda, 48 saatlik süre sonunda ise 1200-600-300 µg/ml dozlarda hücre canlılığını anlamlı bir şekilde baskıladığı görüldü (Çizelge 32, Şekil 33).

Çizelge 31. MCF7 hücre hattı için α-pinen bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

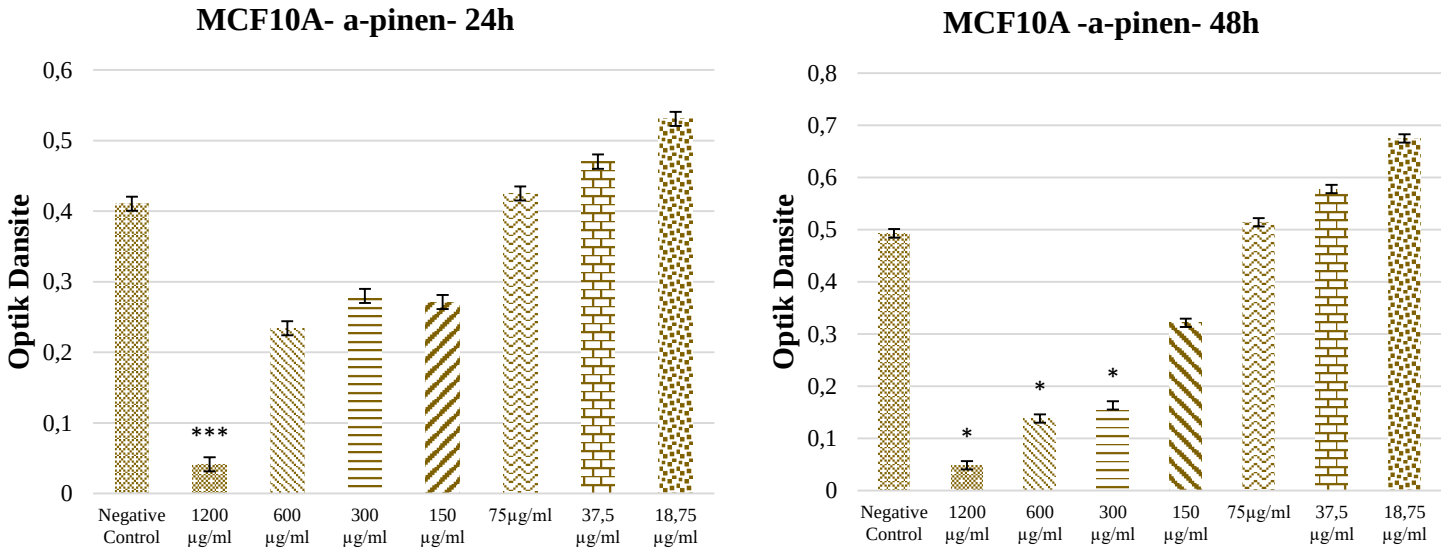
MCF7 için α-pinen Konsantrasyonu	Ortalama ± Standart Sapma	
	T24	T48
1200 µg/ml	0,03212±0,01589***	0,036±0,00665*
600 µg/ml	0,24412±0,03582	0,75525±0,13338
300 µg/ml	0,4115±0,0835	0,889±0,2118
150 µg/ml	0,91837±0,09289	0,91962±0,12709
75 µg/ml	1,0326±0,11438	0,819±0,07694
37,5 µg/ml	1,07925±0,0908	0,782±0,08063
18,75 µg/ml	1,0295±0,12565	0,8325±0,11187

Çizelge 32. MCF10A hücre hattı için α-pinen bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

MCF10A için α-pinen Konsantrasyonu	Ortalama ± Standart Sapma	
	T24	T48
1200 µg/ml	0,0545±0,010535***	0,04842±0,01376*
600 µg/ml	0,234±0,03256	0,13788±0,01396*
300 µg/ml	0,28013±0,03716	0,163±0,02502*
150 µg/ml	0,27137±0,02945	0,32125±0,05959
75 µg/ml	0,425±0,08774	0,514±0,02371
37,5 µg/ml	0,4703±0,04634	0,57763±0,06077
18,75 µg/ml	0,53075±0,058949	0,6745±0,08984



Şekil 32. α-pinen bileşeneninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).



Şekil 33. α-pinen bileşeneninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF10A hücre canlılığı üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

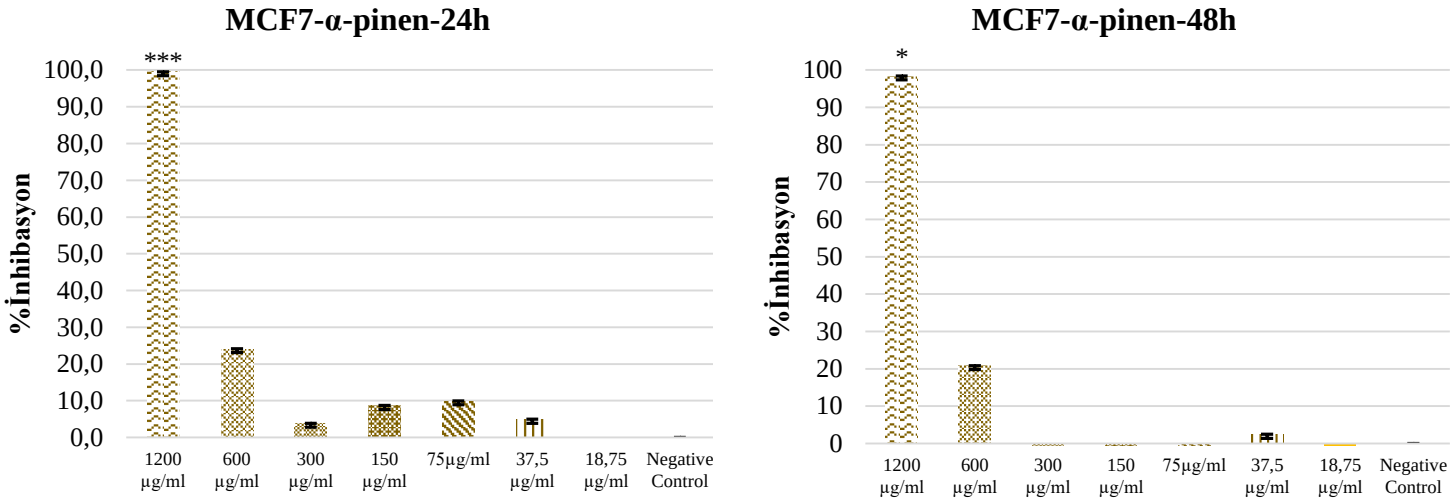
α-pinen bileşeninin 1200 µg/ml ve 18,75 µg/ml konsantrasyon aralıklarında MCF7 ve MCF10A hücre hatları üzerinde % inhibisyon etkilerine bakıldığında; MCF7 için 24 saatlik süre sonunda, 1200 µg/ml dozunda % inhibisyon 99,5 değeri ile anlamlı bir şekilde gözlemlenirken, 48 saatlik süre sonunda ise, 12000 µg/ml dozunda %inhibisyon 98,4 değeri ile anlamlı bir şekilde gözlemlendi (Çizelge 33, Şekil 34). MCF10A için 24 saatlik süre sonunda, 1200 µg/ml dozunda % inhibisyon 92,8 değeri ile anlamlı gözlemlenirken, 48 saatlik süre sonunda ise 1200,600 ve 300 µg/ml dozlarında % inhibisyon sırasıyla 94,34-80,8 ve 76,6 değerleri ile anlamlı bir şekilde gözlemlendi (Çizelge 34, Şekil 35).

Çizelge 33. MCF7 hücre hattı için α-pinen bileşenin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

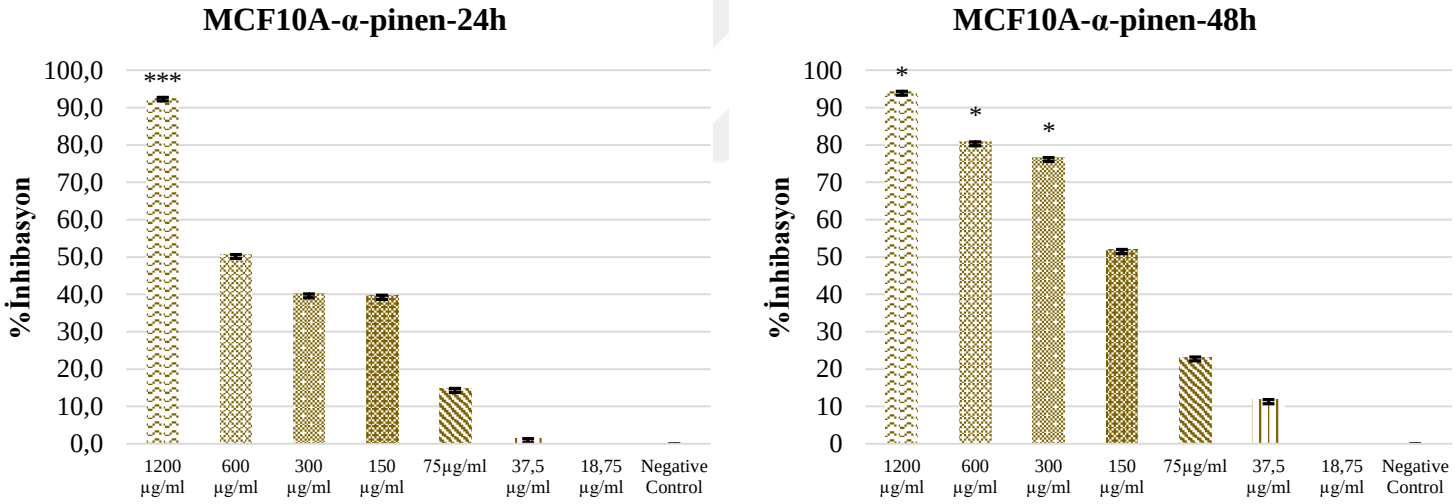
MCF7 için α-pinen Konsantrasyonu	% İnhibisyon Oranları	
	T24	T48
1200 µg/ml	99,5***	98,4*
600 µg/ml	24,1	20,82
300 µg/ml	3,8	0
150 µg/ml	8,6	0
75 µg/ml	9,9	0
37,5 µg/ml	4,9	2,37
18,75 µg/ml	0	0
Kontrol	0	0

Çizelge 34. MCF10A hücre hattı için α-pinen bileşenin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

MCF10A için α-pinen Konsantrasyonu	% İnhibisyon Oranları	
	T24	T48
1200 µg/ml	92,8***	94,34*
600 µg/ml	50,6	80,8*
300 µg/ml	40,1	76,6*
150 µg/ml	39,6	51,9
75 µg/ml	14,7	23,15
37,5 µg/ml	1,2	11,7
18,75 µg/ml	0	0
Kontrol	0	0



Şekil 34. MCF7 hücrelerinde α-pinen bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon grafiği (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).



Şekil 35. MCF10A hücrelerinde α-pinen bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon grafiği (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

4.7. 1,8-cineole Bileşeninin (3000-46,875 µg/ml) MCF7 ve MCF10A Hücre Hatları için Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

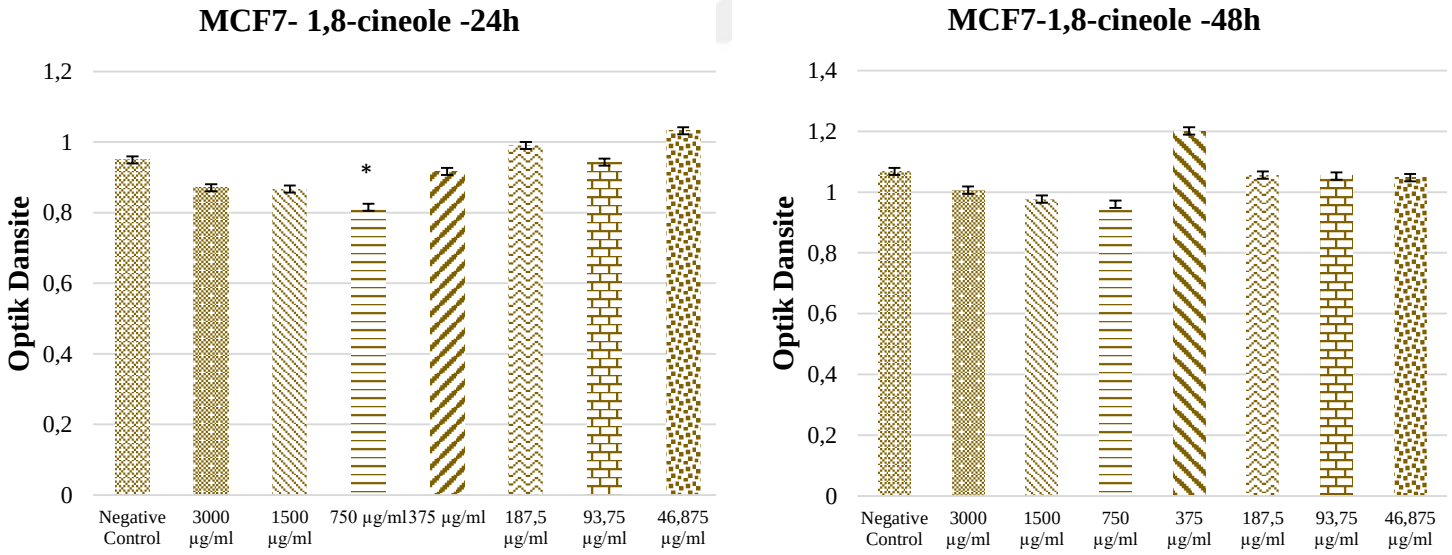
1,8-cineole bileşeninin 3000 µg/ml ve 46,875 µg/ml konsantrasyon aralıklarında MCF7 ve MCF10A hücre hatları üzerinde canlılık etkisine bakıldı. MCF7 için 24 ve 48 saatlik süre sonunda ise herhangi bir dozda hücre canlılığında anlamlı bir değişiklik görülmedi (Çizelge 35, Şekil 36). MCF10A için 24 saatlik süre sonunda 3000 µg/ml dozundan hücre canlılığı anlamlı bir şekilde baskılayıp 1500-375-46,875 µg/ml dozlarda hücre proliferasyonunu anlamlı bir şekilde arttırdığı görülürken, 48 saatlik süre sonunda ise 3000 µg/ml hücre canlılığını anlamlı bir şekilde baskılayıp 187,5 µg/ml hücre proliferasyonunu anlamlı bir şekilde arttırdığı görüldü (Çizelge 36, Şekil 37).

Çizelge 35. MCF7 hücre hattı için 1,8-cineole bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

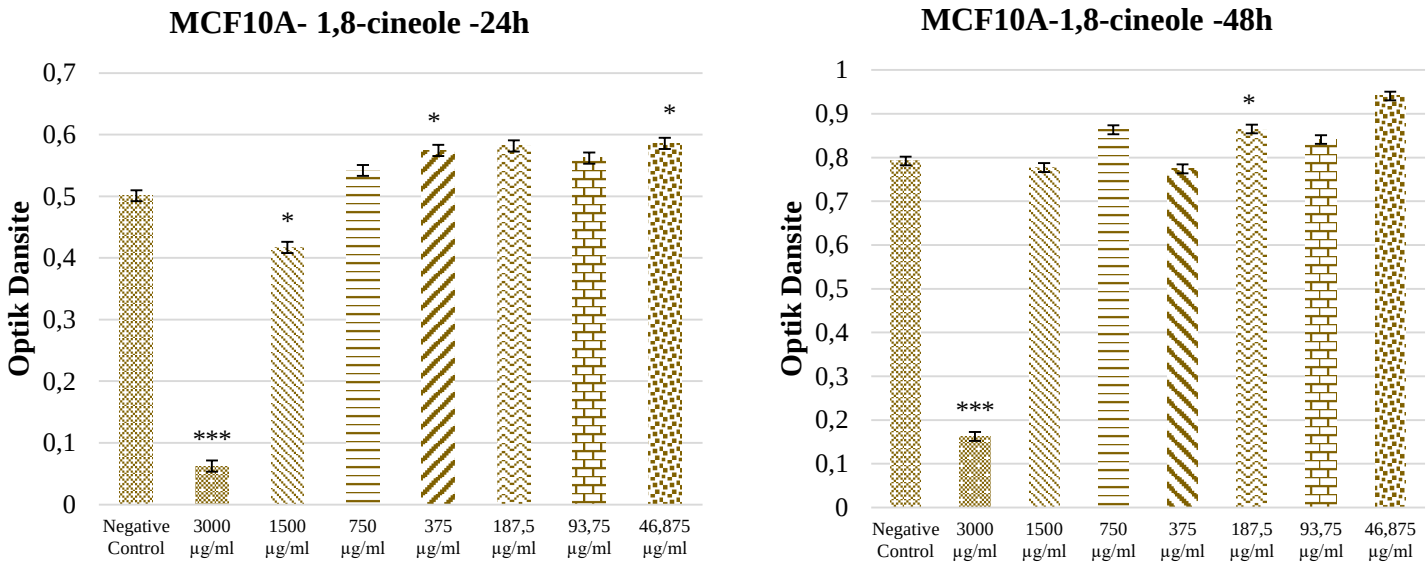
MCF7 için 1,8-cineole Konsantrasyonu	Ortalama ± Standart Sapma	
	T24	T48
3000 µg/ml	0,87025±0,19117	1,00602±0,11942
1500 µg/ml	1,0301±0,19785	0,9765±0,1651
750 µg/ml	0,9165±0,17129	0,96±0,17415
375 µg/ml	1,035±0,07709	1,2011±0,15294
187,5 µg/ml	1,1052±0,12075	1,0556±0,16572
93,75 µg/ml	1,05608±0,1717	1,0527±0,17276
46,875 µg/ml	1,03218±0,17645	1,04731±0,2077

Çizelge 36. MCF10A hücre hattı için 1,8-cineole bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

MCF10A için 1,8-cineole Konsantrasyonu	Ortalama ± Standart Sapma	
	T24	T48
3000 µg/ml	0,06225±0,014009***	0,1625±0,04702***
1500 µg/ml	0,41725±0,03098*	0,777±0,10811
750 µg/ml	0,542±0,07063	0,8635±0,114326
375 µg/ml	0,5745±0,039273*	0,77425±0,091409
187,5 µg/ml	0,5817±0,093831	0,86525±0,038483*
93,75 µg/ml	0,562±0,136448	0,841±0,09296
46,875 µg/ml	0,586±0,024014*	0,94075±0,1447



Şekil 36. 1,8-cineole bileşeneninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).



Şekil 37. 1,8-cineole bileşeneninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF10A hücre canlılığı üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

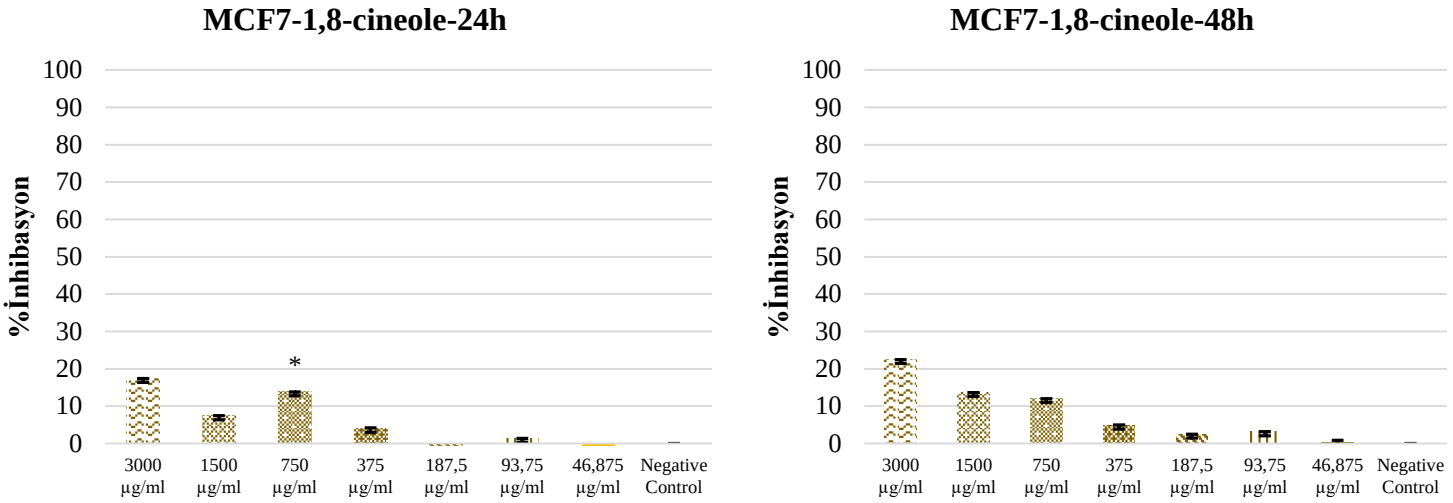
1,8-cineole bileşeninin 3000 ve 46,875 µg/ml konsantrasyon aralıklarında MCF7 ve MCF10A hücre hatları üzerinde % inhibisyon etkilerine bakıldığında; MCF10A için 24 saatlik süre sonunda, 3000 ve 1500 µg/ml dozlarında % inhibisyon sırasıyla 90,9 ve 17,4 değerleri ile anlamlı bir şekilde gözlendi. 48 saatlik süre sonunda ise 3000 µg/ml dozunda % inhibisyon 81,5 değeri ile anlamlı bir şekilde gözlemlendi (Çizelge 38, Şekil 39).

Çizelge 37. MCF7 hücre hattı için 1,8-cineole bileşenin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

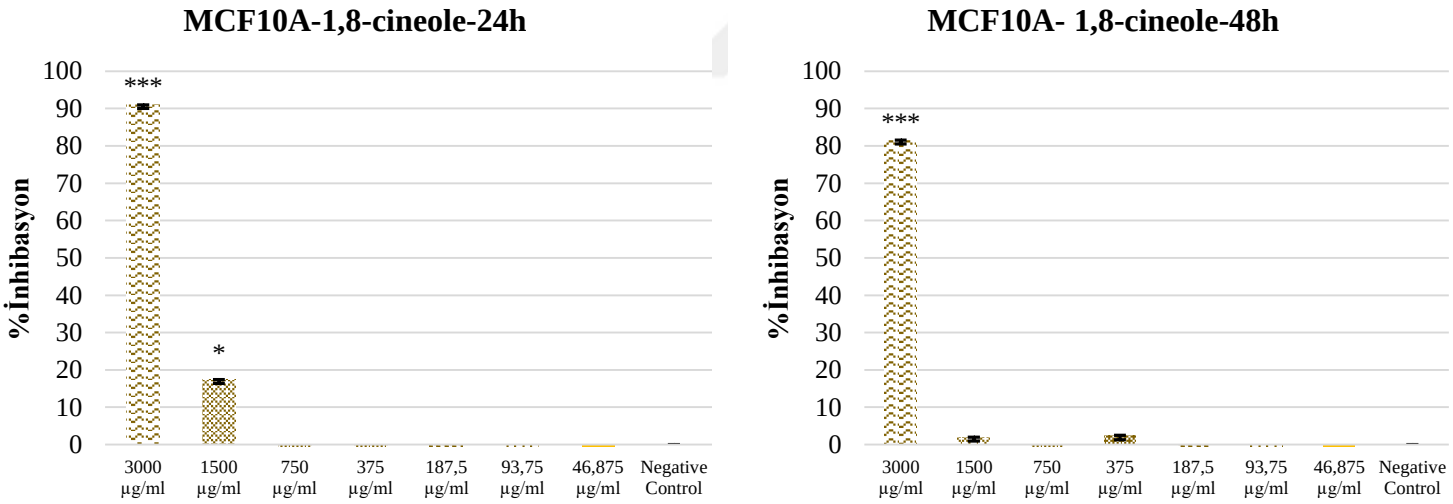
MCF7 için 1,8-cineole Konsantrasyonu	% İnhibisyon Oranları	
	T24	T48
3000 µg/ml	17,4	22,46
1500 µg/ml	7,37	13,6
750 µg/ml	13,78	12
375 µg/ml	4	4,85
187,5 µg/ml	0	2,43
93,75 µg/ml	1,31	3,07
46,875 µg/ml	0	0,76
Kontrol	0	0

Çizelge 38. MCF10A hücre hattı için 1,8-cineole bileşenin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında %inhibisyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

MCF10A için 1,8-cineole Konsantrasyonu	% İnhibisyon Oranları	
	T24	T48
3000 µg/ml	90,9***	81,5***
1500 µg/ml	17,4*	2
750 µg/ml	0	0
375 µg/ml	0	2,32
187,5 µg/ml	0	0*
93,75 µg/ml	0	0
46,875 µg/ml	0*	0
Kontrol	0	0



Şekil 38. MCF7 hücrelerinde 1,8-cineole bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon grafiği (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).



Şekil 39. MCF10A hücrelerinde 1,8-cineole bileşeninin 3000-46,875 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon grafiği (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

4.8. 1,8-cineole Bileşeninin (1200-18,75 µg/ml) MCF7 ve MCF10A Hücre Hatları için Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

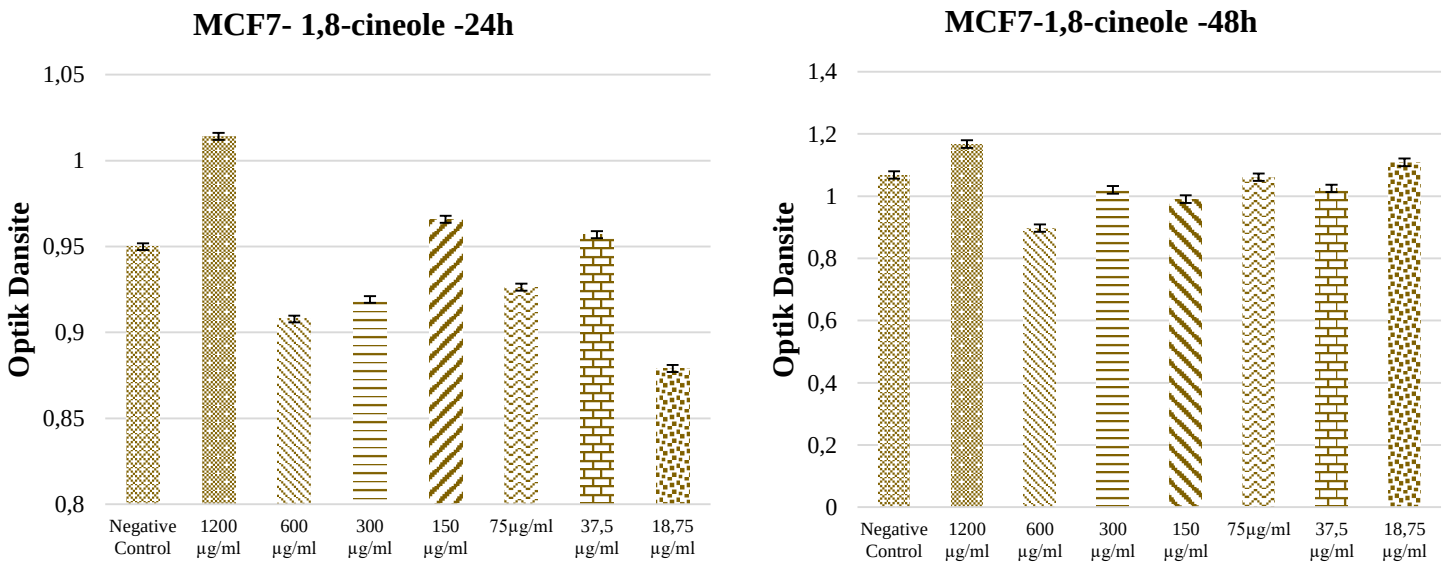
1,8-cineole bileşeninin 1200 µg/ml ve 18,75 µg/ml konsantrasyon aralıklarında MCF7 ve MCF10A hücre hatları üzerinde canlılık etkisine bakıldı. MCF7 için 24 saatlik ve 48 saatlik süre sonunda herhangi bir dozda hücre canlılığında anlamlı bir değişiklik görülmedi (Çizelge 39, Şekil 40). MCF10A için 24 saatlik süre sonunda 1200-600 µg/ml dozlarında, 48 saatlik süre sonunda ise 1200 µg/ml hücre canlılığını anlamlı bir şekilde baskıladığı görüldü (Çizelge 40, Şekil 41).

Çizelge 39. MCF7 hücre hattı için 1,8-cineole bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

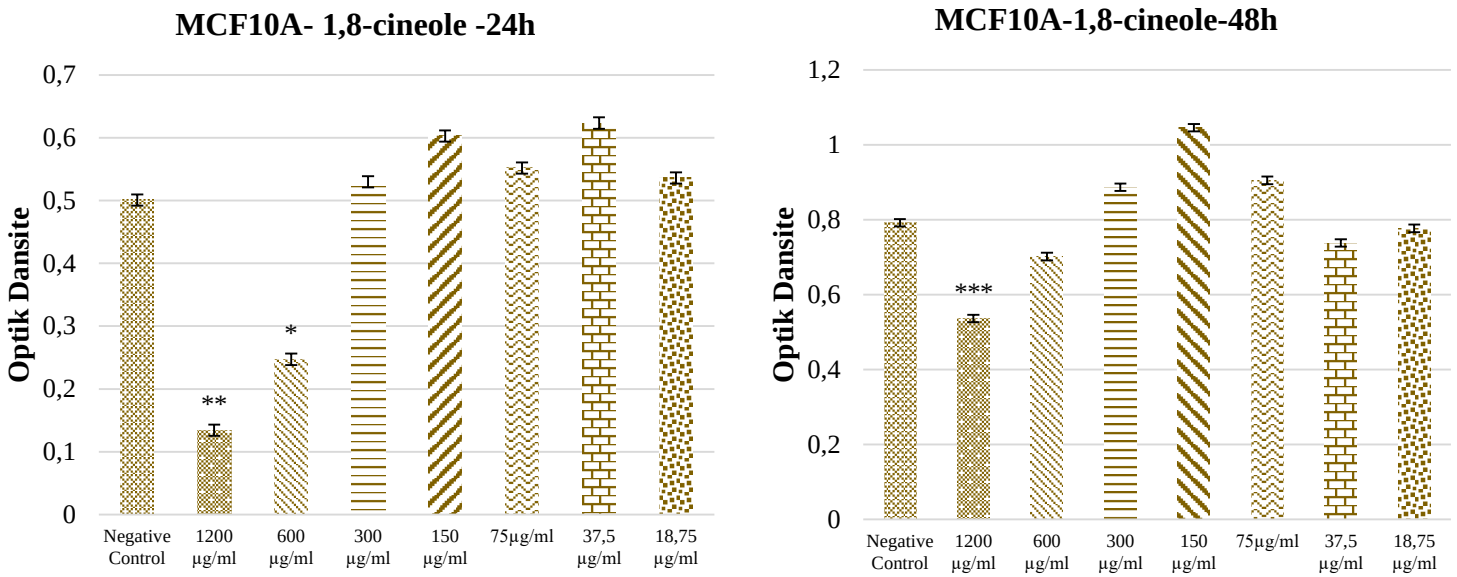
MCF7 için 1,8-cineole Konsantrasyonu	Ortalama ± Standart Sapma	
	T24	T48
1200 µg/ml	1,01408±0,0893	0,93775±0,146976
600 µg/ml	0,90781±0,12183	0,897±0,15772
300 µg/ml	0,9191±0,11754	1,0203±0,16489
150 µg/ml	1,05725±0,1716	0,9903±0,16915
75 µg/ml	0,9263±0,12876	1,06093±0,1745
37,5 µg/ml	1,06108±0,13326	1,0248±0,2218
18,75 µg/ml	0,879±0,10927	1,10892±0,13436

Çizelge 40. MCF10A hücre hattı için 1,8-cineole bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında 'optik dansite'nin ortalama±standart sapma değeri. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

MCF10A için 1,8-cineole Konsantrasyonu	Ortalama ± Standart Sapma	
	T24	T48
1200 µg/ml	0,13425±0,071928**	0,53675±0,039424***
600 µg/ml	0,2472±0,093023*	0,70225±0,16875
300 µg/ml	0,53±0,079628	0,887±0,28974
150 µg/ml	0,603±0,0662	1,04625±0,15624
75 µg/ml	0,552±0,073326	0,9055±0,0986
37,5 µg/ml	0,6235±0,196422	0,73825±0,13455
18,75 µg/ml	0,53625±0,016978	0,77725±0,2248



Şekil 40. 1,8-cineole bileşeneninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF7 hücre canlılığı üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).



Şekil 41. 1,8-cineole bileşeneninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında MCF10A hücre canlılığı üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

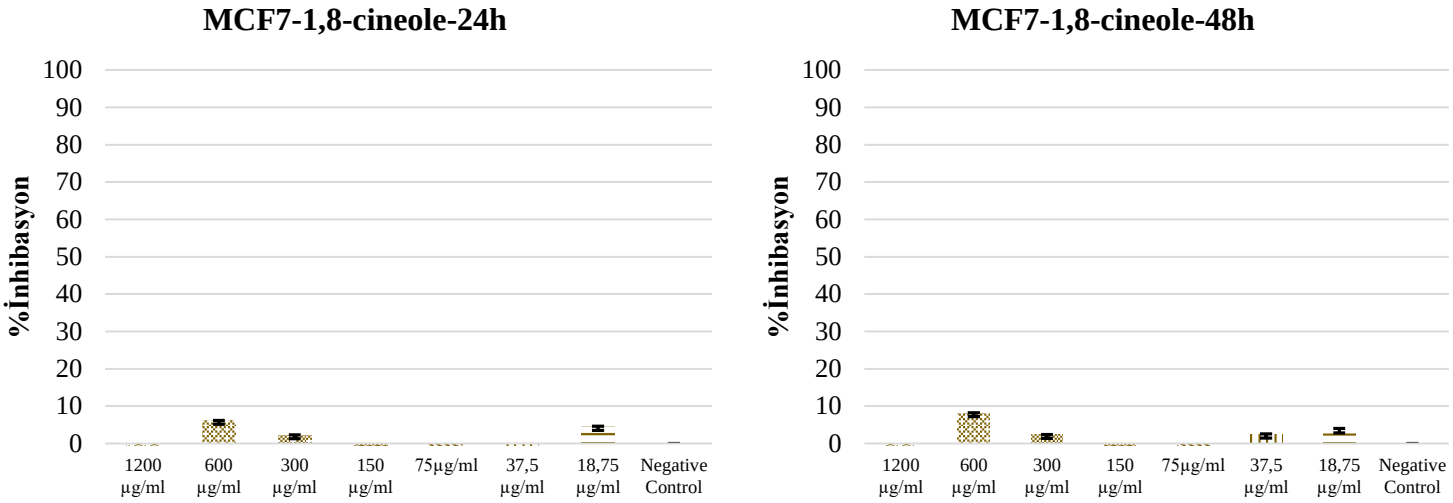
1,8-cineole bileşeninin 1200 ve 18,75 µg/ml konsantrasyon aralıklarında MCF7 ve MCF10A hücre hatları üzerinde % inhibisyon etkilerine bakıldığında, MCF10A için 24 saatlik süre sonunda, 1200 ve 600 µg/ml dozlarında % inhibisyon sırasıyla 76,05 ve 52,6 değerleri ile anlamlı bir şekilde gözlendi. 48 saatlik süre sonunda ise 1200 µg/ml dozunda % inhibisyon 33,06 değeri ile anlamlı bir şekilde gözlemlendi (Çizelge 42, Şekil 43).

Çizelge 41. MCF7 hücre hattı için 1,8-cineole bileşenin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

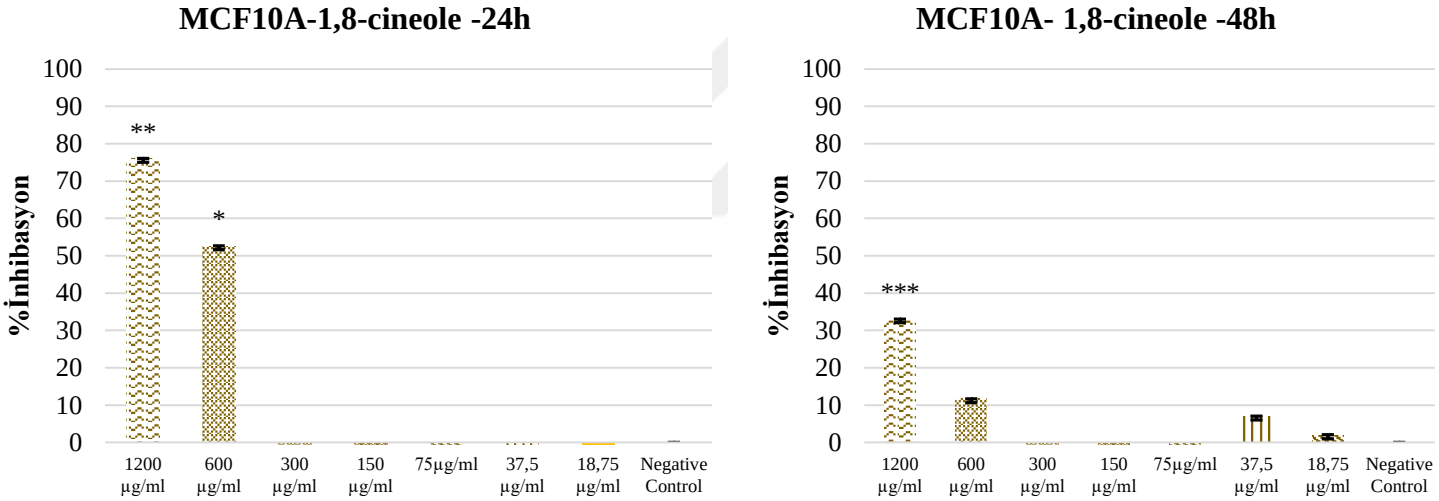
MCF7 için 1,8-cineole Konsantrasyonu	% İnhibisyon Oranları	
	T24	T48
1200 µg/ml	0	0
600 µg/ml	6,10	8,17
300 µg/ml	2,24	2,36
150 µg/ml	0	0
75 µg/ml	0	0
37,5 µg/ml	0	2,44
18,75 µg/ml	4,53	3,86
Kontrol	0	0

Çizelge 42.MCF10A hücre hattı için 1,8-cineole bileşenin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon oranları. (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

MCF10A için 1,8-cineole Konsantrasyonu	% İnhibisyon Oranları	
	T24	T48
1200 µg/ml	76,05**	33,06***
600 µg/ml	52,6*	11,65
300 µg/ml	0	0
150 µg/ml	0	0
75 µg/ml	0	0
37,5 µg/ml	0	6,98
18,75 µg/ml	0	1,94
Kontrol	0	0



Şekil 42. MCF7 hücrelerinde 1,8-cineole bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon grafiği (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

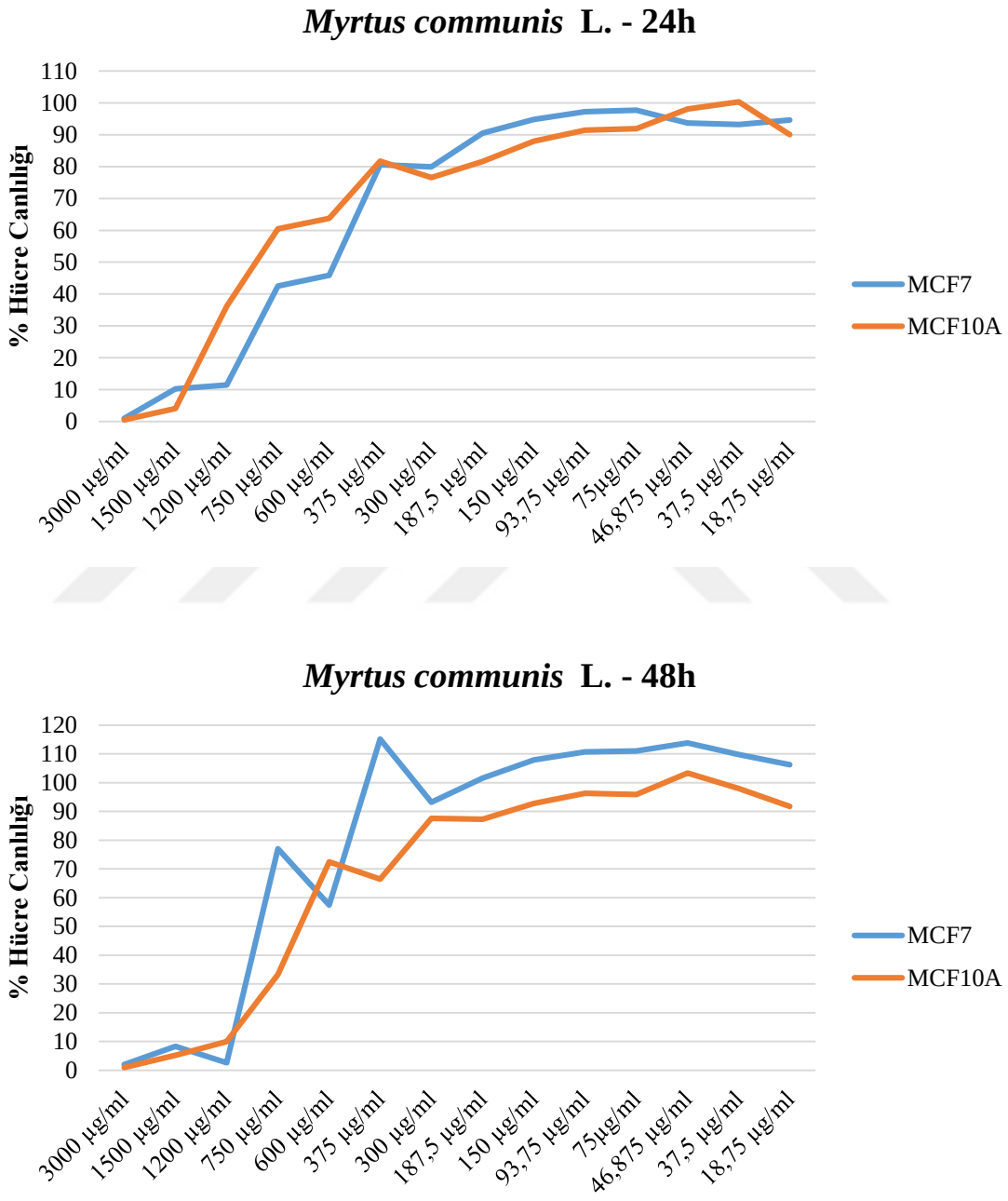


Şekil 43. MCF10A hücrelerinde 1,8-cineole bileşeninin 1200-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon grafiği (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

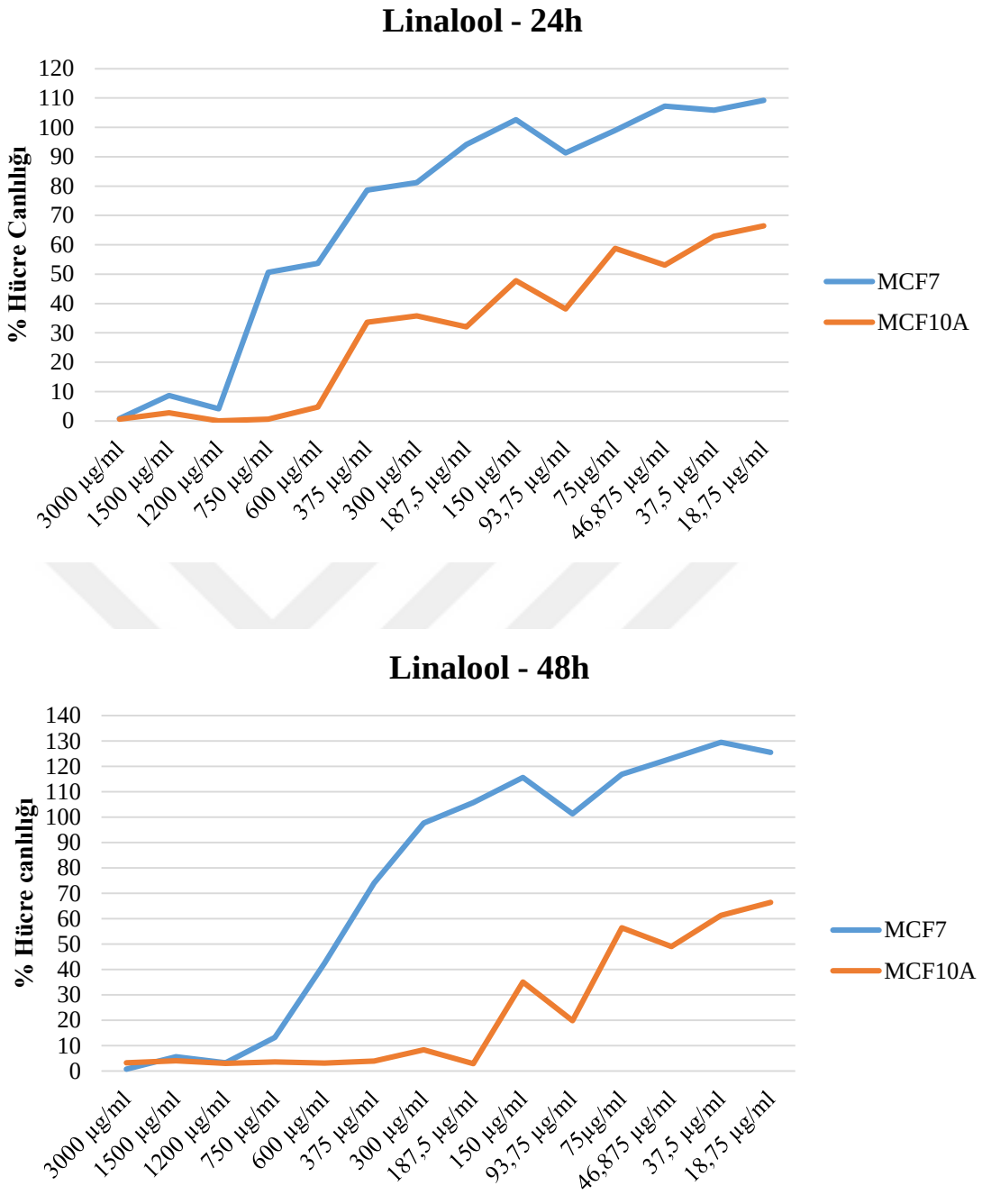
4.9. MCF7 ve MCF10A Hücre Hatları Üzerinde *M. communis* Esansiyel Yağının, 1,8-cineole, Linalool ve α-pinen Bileşenlerinin Etkin Dozunun Belirlenmesi

MCF-7 meme kanseri hücre hattı ve MCF10A normal meme hücre hattı üzerinde en etkin dozu belirleyebilmek amacıyla farklı dozlarda ve sürelerde *M. communis* esansiyel yağı, 1,8-cineole, Linalool ve α-pinen bileşenleri kullanıldı. Ardından MTT yöntemiyle *M. communis* esansiyel yağının ve 3 kimyasal bileşeğin

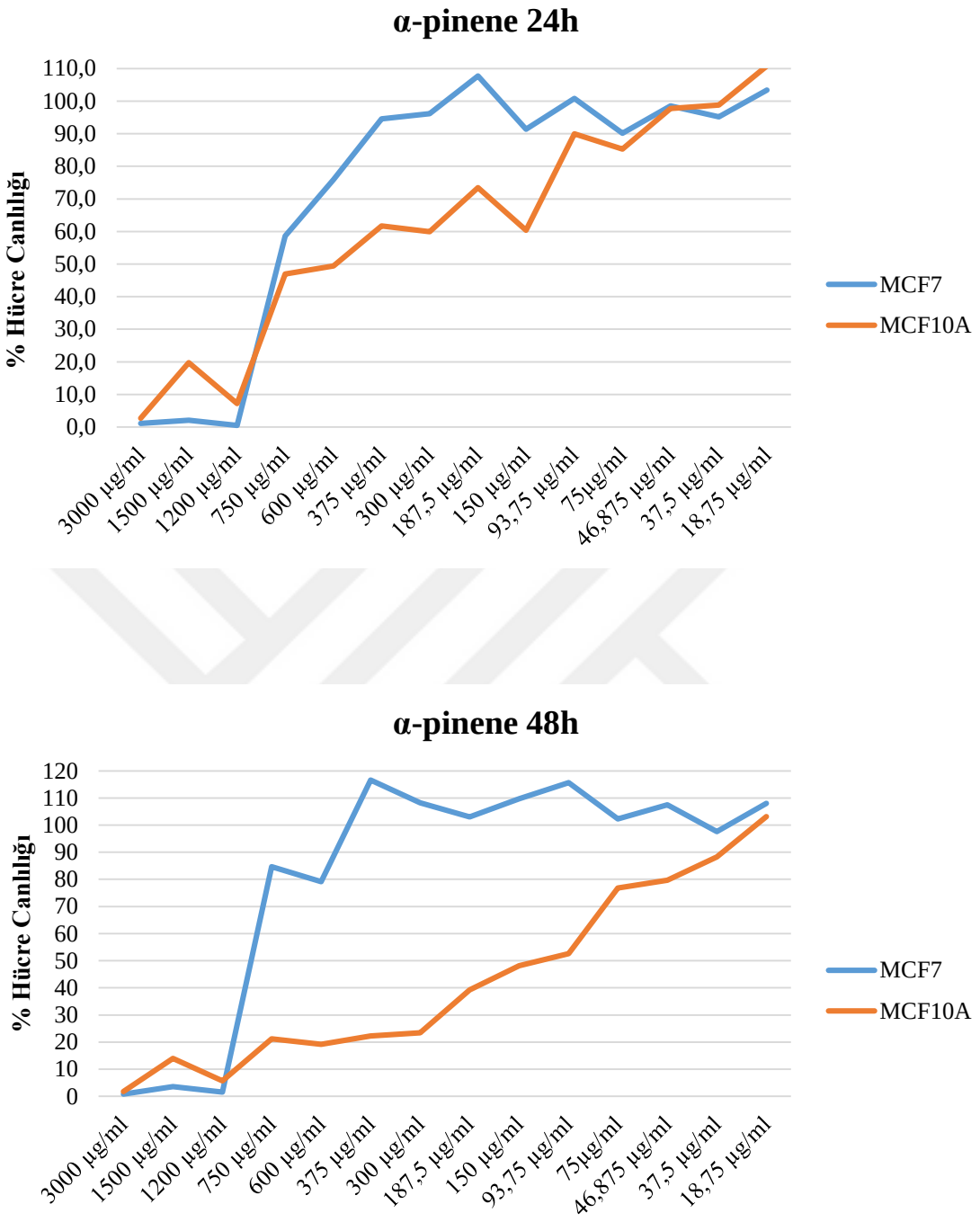
sitotoksisitesi ve baskılayıcı konsantrasyon 50 (IC50) değeri belirlendi. IC50 değeri belirlendikten sonra MCF7 hücre hattında MCF10A hücre hattına kıyasla daha fazla toksisite gösteren ortak konsantrasyon belirlendi (Şekil 44, 45, 46, 47). Ayrıca 6 kuyucuklu 'plate'lere ekilen hücrelerdeki proliferasyonu göstermek amacıyla hücrelerin invert mikroskop ile görüntüleri alındı (Şekil 48).



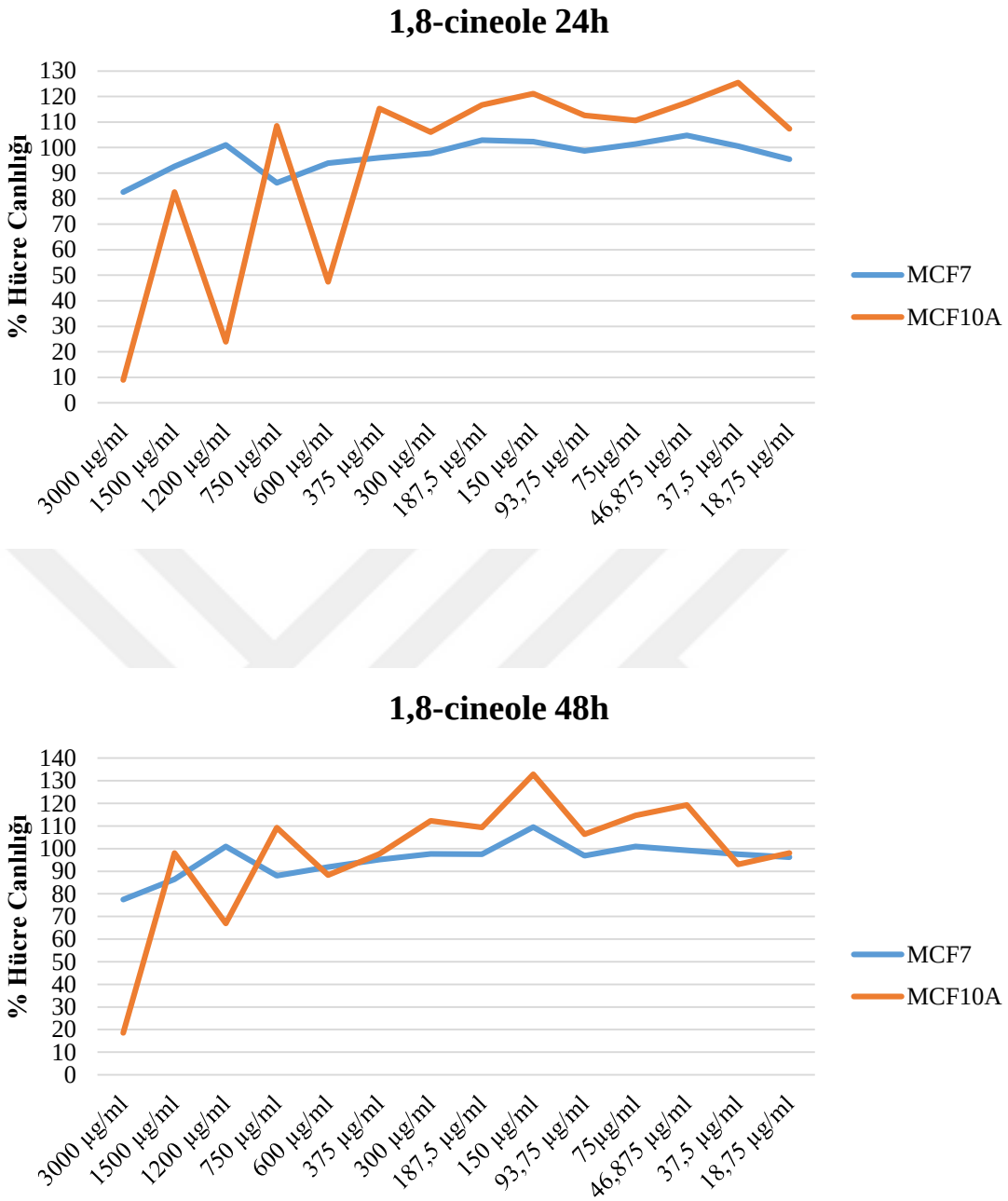
Şekil 44. MCF7 ve MCF10A hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının 3000-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında ve 24-48h sürelerinde % hücre canlılığı grafiğine bakılarak IC50 değerlerine göre MCF7 hücre hattında MCF10A hücre hattına kıyasla daha fazla toksik etki gösteren ortak konsantrasyonun belirlenmesi



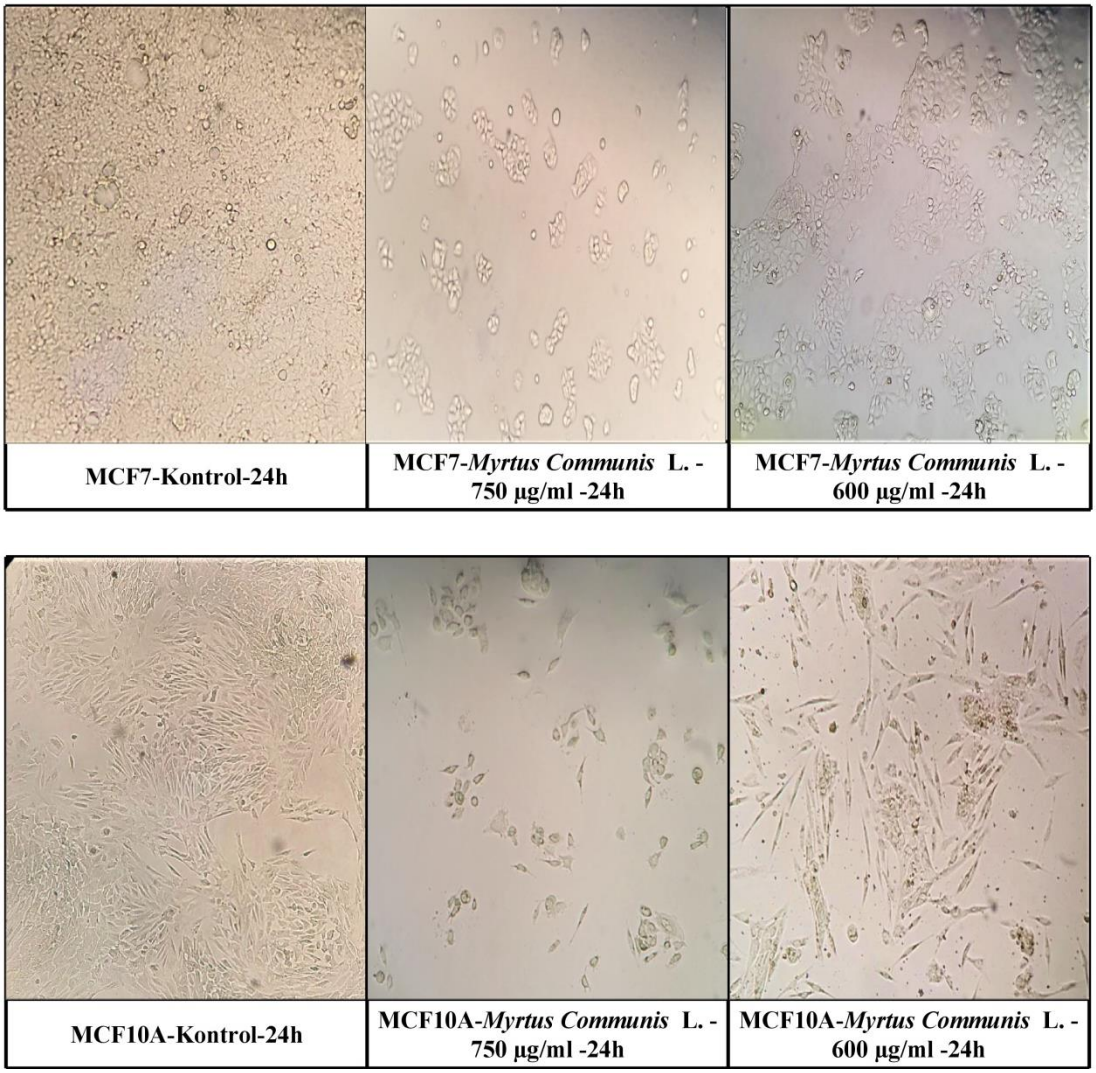
Şekil 45. MCF7 ve MCF10A hücrelerinde Linalool bileşeninin 3000-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında ve 24-48h sürelerinde % hücre canlılığı grafiğine bakılarak IC50 değerlerine göre MCF7 hücre hattında MCF10A hücre hattına kıyasla daha fazla toksik etki gösteren ortak konsantrasyonun belirlenmesi



Şekil 46. MCF7 ve MCF10A hücrelerinde 1,8-sineol bileşeninin 3000-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında ve 24-48h sürelerinde % hücre canlılığı grafiğine bakılarak IC50 değerlerine göre MCF7 hücre hattında MCF10A hücre hattına kıyasla daha fazla toksik etki gösteren ortak konsantrasyonun belirlenmesi



Şekil 47. MCF7 ve ve MCF10A hücrelerinde Linalool bileşeninin 3000-18,75 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında ve 24-48h sürelerinde % hücre canlılığı grafiğine bakılarak IC50 değerlerine göre MCF7 hücre hattında MCF10A hücre hattına kıyasla daha fazla toksik etki gösteren ortak konsantrasyonun belirlenmesi



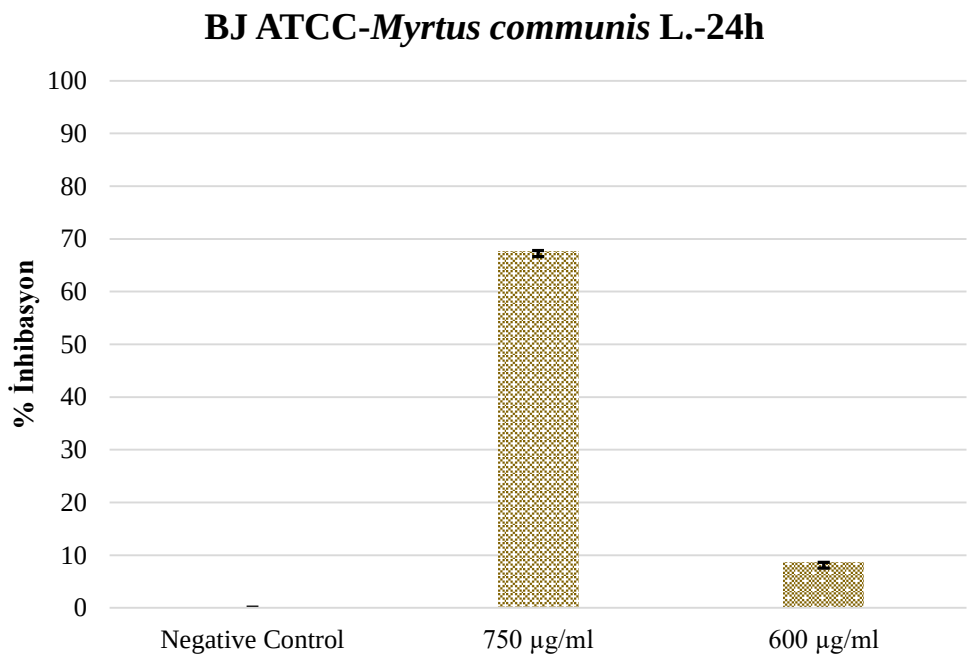
Şekil 48. *M. communis* esansiyel yağı uygulanan MCF-7 ve MCF10A Hücre hatları ve kontrol gruplarına ait invert mikroskop görüntüleri.

4.10. BELİRLENEN ETKİN DOZUN BJ HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Terapötik konsantrasyon belirlendikten sonra, *M. communis* esansiyel yağının 750 ve 600 µg/ml konsantrasyon aralıklarında BJ hücre hattı üzerinde % inhibisyon etkilerine bakıldığında; 24 saatlik süre sonunda, 750 ve 600 µg/ml dozlarda % inhibisyon sırasıyla 67,6 ve 8,5 olarak gözlemlendi (Çizelge 43, Şekil 49).

Çizelge 43. BJ hücre hattı için *M. communis* esansiyel yağının 750-600 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında % inhibisyon oranları (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

BJ için *M. communis* Esansiyel Yağının Konsantrasyonu	% İnhibasyon Oranları
	T24
750 µg/ml	67,6
600 µg/ml	8,5
Kontrol	0

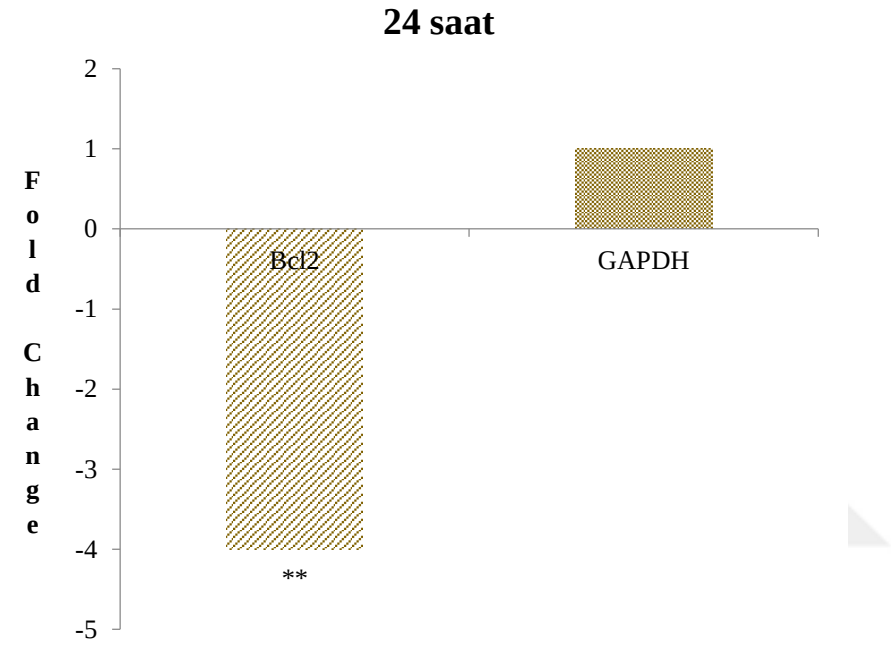


Şekil 49. BJ hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının 750 ve 600 µg/ml konsantrasyonlarında % inhibisyon grafiği (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir). .

4.11. MCF7 Hücre Hattı Üzerinde Uygulanan *M. communis* Esansiyel Yağının Apoptoz Mekanizmasında Rol Alan Gen Ekspresyonları Üzerine Etkileri

4.11.1. MCF7 Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (750 µg/ml) Bcl-2 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

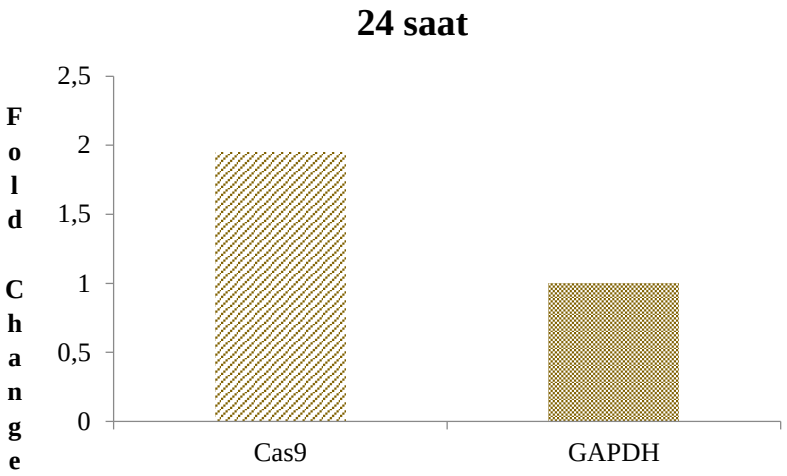
750 µg/ml *M. communis* esansiyel yağı ile muamele edilen MCF7 hücreleri 24. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Bcl-2 gen ekspresyon seviyesinin anlamlı bir şekilde 3.9 kat azaldığı görüldü (Şekil 50).



Şekil 50. MCF7 hücrelerinde *M. communis* esansiyel yağının (750 µg/ml) Bcl-2 gen ekspresyonu üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

4.11.2. MCF7 Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (750 µg/ml) Kaspaz 9 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

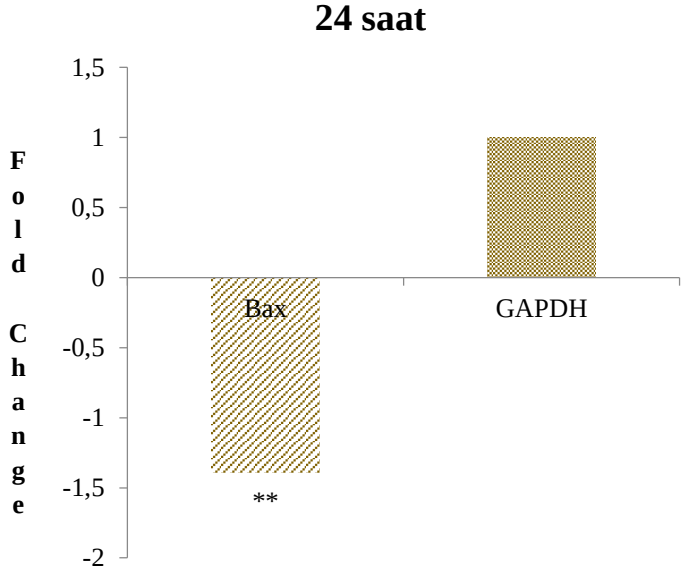
750 µg/ml *M. communis* esansiyel yağı ile muamele edilen MCF7 hücreleri 24. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Kaspaz 9 gen ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişim görülmedi (Şekil 51).



Şekil 51. MCF7 hücrelerinde *M. communis* esansiyel yağının (750 µg/ml) Kaspaz 9 gen ekspresyonu üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

4.11.3. MCF7 Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (750 µg/ml) Bax Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

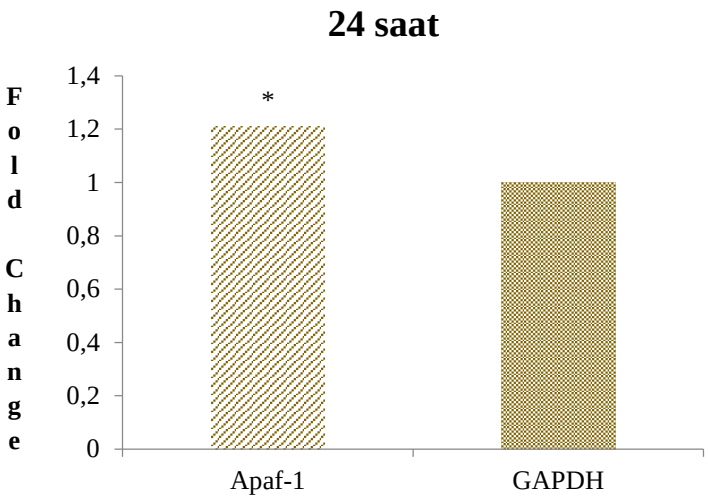
750 µg/ml *M. communis* esansiyel yağı ile muamele edilen MCF7 hücreleri 24. Saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Bax gen ekspresyon seviyesinin anlamlı bir şekilde 1.4 kat azaldığı görüldü (Şekil 52).



Şekil 52. MCF7 hücrelerinde *M. communis* esansiyel yağının (750 µg/ml) Bax gen ekspresyonu üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

4.11.4 MCF7 Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (750 µg/ml) Apaf-1 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

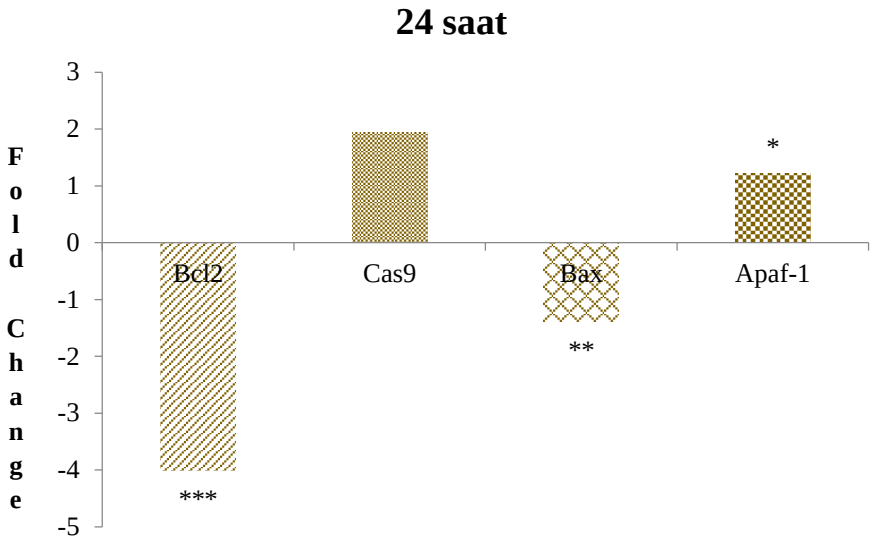
750 µg/ml *M. communis* esansiyel yağı ile muamele edilen MCF7 hücreleri 24. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Apaf-1 gen ekspresyon seviyesinin anlamlı bir şekilde 1.2 kat arttığı görüldü (Şekil 53).



Şekil 53. MCF7 hücrelerinde *M. communis* esansiyel yağının (750 µg/ml) Apaf-1 gen ekspresyonu üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

4.11.5. *M. communis* Esansiyel Yağı (750 µg/ml) Uygulanan MCF7 Hücrelerinde Apoptotik Genlerin Ekspresyon Seviyelerinin Kontrol Grupları ile Karşılaştırılması

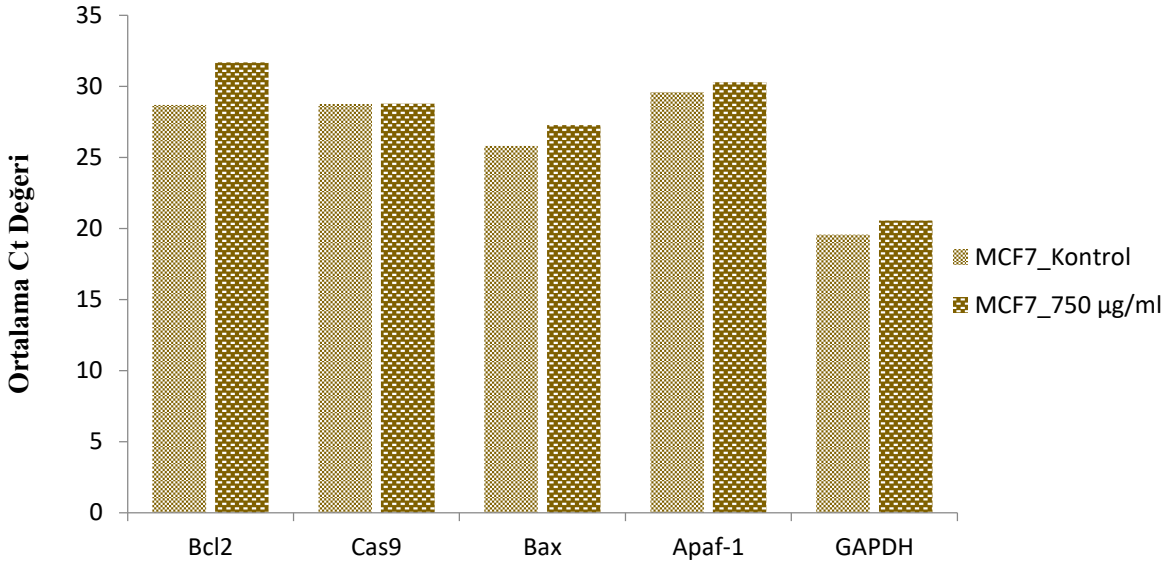
750 µg/ml *M. communis* esansiyel yağı ile muamele edilen MCF7 hücreleri 24. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Apaf-1 gen ekspresyon seviyesinin anlamlı bir şekilde arttığı görülürken, Bax ve Bcl-2 gen ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü. Kaspaz 9 gen ekspresyon seviyesinde ise anlamlı bir değişim görülmedi (Çizelge 44, Şekil 54,55).



Şekil 54. MCF7 hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (750 µg/ml) apoptoz mekanizmasında rol alan genlerin ekspresyonu üzerine etkisinin karşılaştırılması (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

Çizelge 44. Apoptotik genlerin kontrol grubu ve 750 µg/ml *M. communis* esansiyel yağ ile ortalama Ct± standart sapma değerleri.

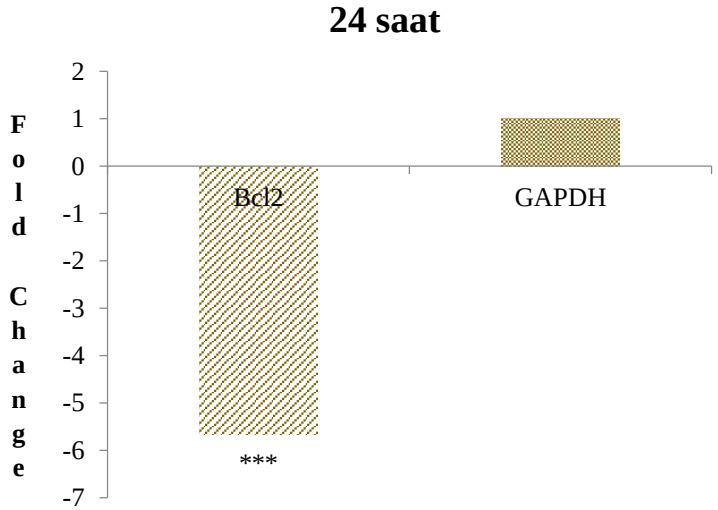
Genler	Kontrol Grubu (MCF7) Ort Ct ± Standart Sapma	750 µg/ml *M. communis* Esansiyel Yağ Konsantrasyonu Ort Ct ± Standart Sapma
GAPDH	19,56±0,0322	20,55±0,0153
Bcl2	28,69±0,299	31,68±0,310
Cas9	28,75±0,3148	28,77±0,1887
Bax	25,796±0,104	27,26±0,25
Apaf-1	29,583±0,0153	30,29±0,2193



Şekil 55. Apoptotik genlerin kontrol grubu ve 750 µg/ml *M. communis* esansiyel yağ ile ortalama Ct değerlerinin karşılaştırılması

4.11.6. MCF7 Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (600 µg/ml) Bcl-2 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

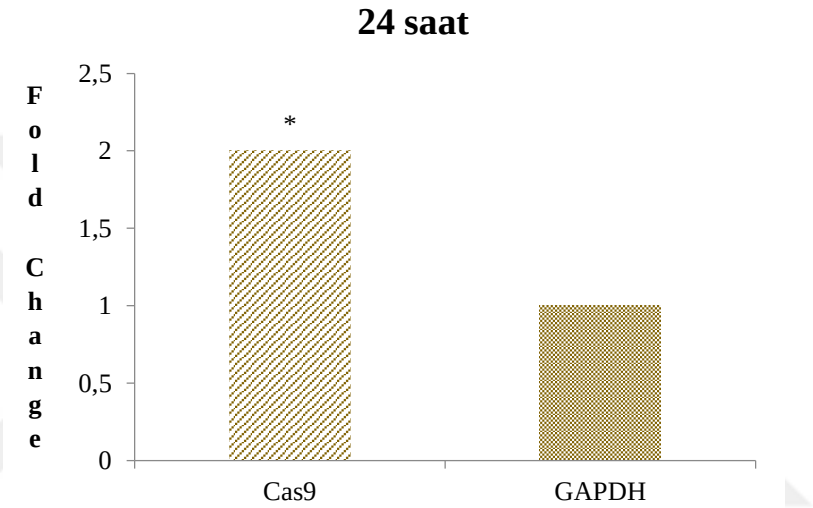
600 µg/ml *M. communis* esansiyel yağı ile muamele edilen MCF7 hücreleri 24. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Bcl-2 gen ekspresyon seviyesinin anlamlı bir şekilde 5.7 kat azaldığı görüldü (Şekil 56).



Şekil 56. MCF7 hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (600 µg/ml) Bcl-2 gen ekspresyonu üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

4.11.7. MCF7 Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (600 µg/ml) Kaspaz 9 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

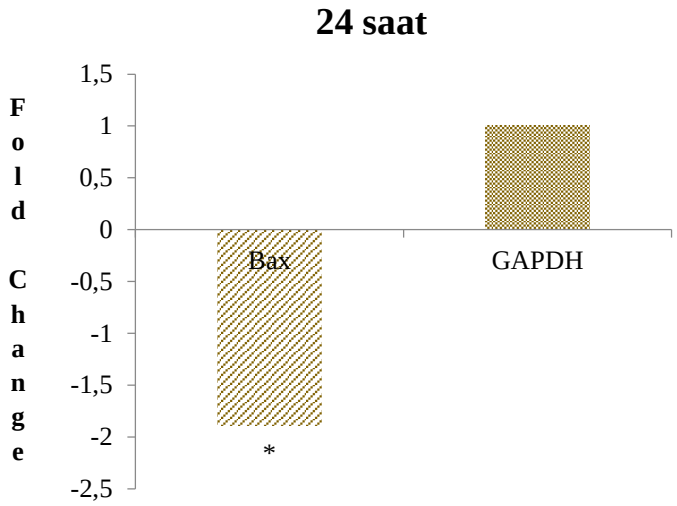
600 µg/ml *M. communis* esansiyel yağı ile muamele edilen MCF7 hücreleri 24. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Kaspaz 9 gen ekspresyon seviyesinin anlamlı bir şekilde 2 kat arttığı görüldü (Şekil 57).



Şekil 57. MCF7 hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (600 µg/ml) Kaspaz 9 gen ekspresyonu üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

4.11.8. MCF7 Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (600 µg/ml) Bax Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

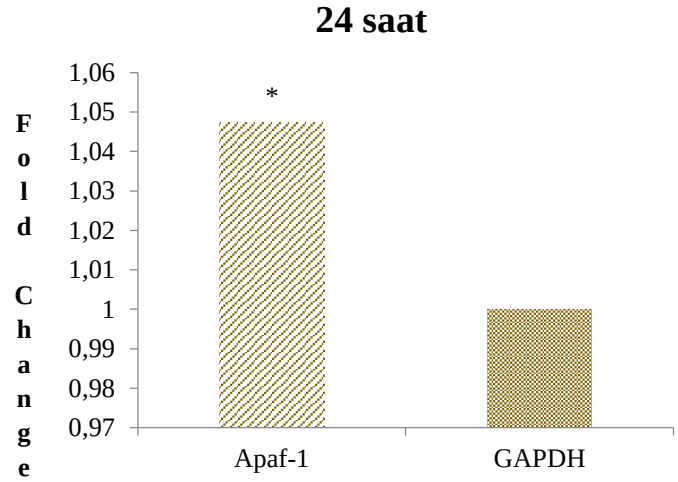
600 µg/ml *M. communis* esansiyel yağı ile muamele edilen MCF7 hücreleri 24. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Bax gen ekspresyon seviyesinin anlamlı bir şekilde 1.9 kat azaldığı görüldü (Şekil 58).



Şekil 58. MCF7 hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (600 µg/ml) Bax gen ekspresyonu üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

4.11.9. MCF7 Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (600 µg/ml) Apaf-1 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

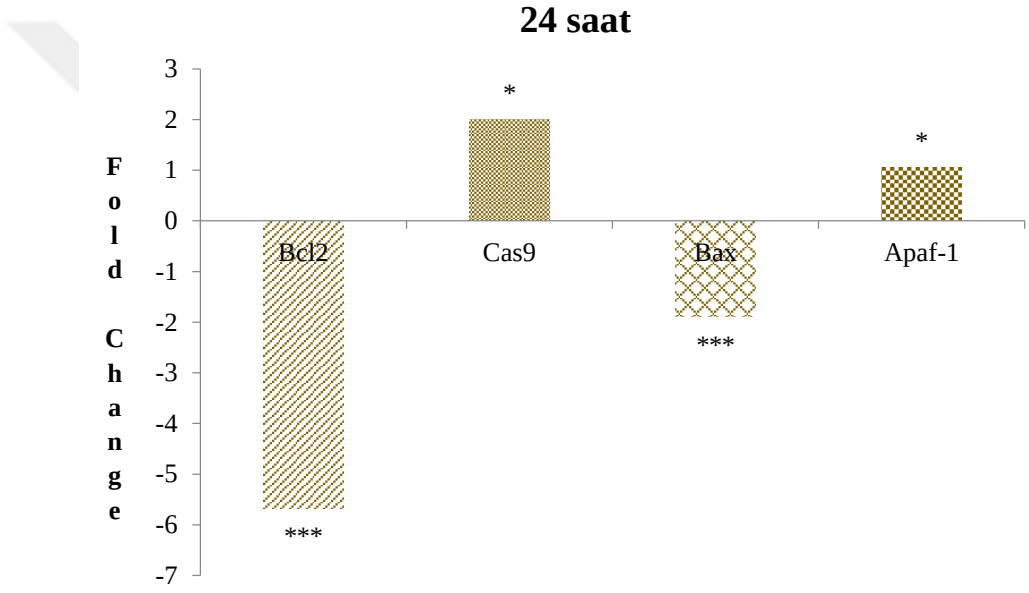
600 µg/ml *M. communis* esansiyel yağı ile muamele edilen MCF7 hücreleri 24. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Apaf-1 gen ekspresyon seviyesinin anlamlı bir şekilde 1.05 kat arttığı görüldü (Şekil 59).



Şekil 59. MCF7 hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (600 µg/ml) Apaf-1 gen ekspresyonu üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

4.11.10. *M. communis* Esansiyel Yağı (600 µg/ml) Uygulanan MCF7 Hücrelerinde Apoptotik Genlerin Ekspresyon Seviyelerinin Kontrol Grupları ile Karşılaştırılması

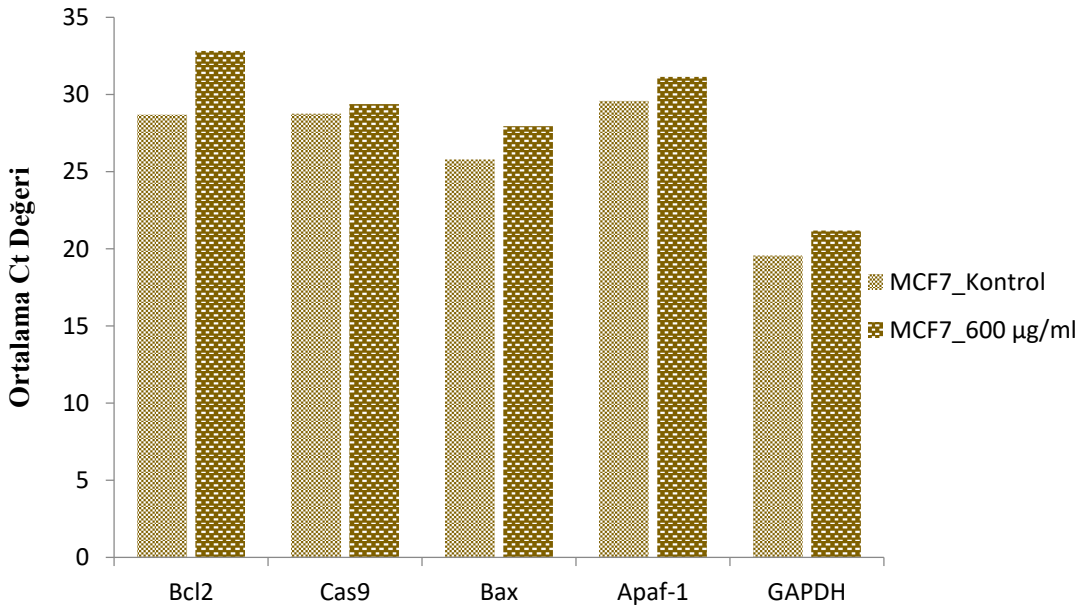
600 µg/ml *M. communis* esansiyel yağı ile muamele edilen MCF7 hücreleri 24. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Apaf-1 ve Kaspaz 9 gen ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde arttığı görülürken, Bax ve Bcl-2 gen ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü (Çizelge 45, Şekil 60,61).



Şekil 60. MCF7 hücrelerinde *M. communis* esansiyel yağının (600 µg/ml) apoptoz mekanizmasında rol alan genlerin ekspresyonu üzerine etkisinin karşılaştırılması (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

Çizelge 45. Apoptotik genlerin kontrol grubu ve 600 µg/ml *M. communis* esansiyel yağ ile ortalama Ct± standart sapma değerleri.

Genler	Kontrol Grubu (MCF7) Ort Ct ± Standart Sapma	600 µg/ml *M. communis* Esansiyel Yağ Konsantrasyonu Ort Ct ± Standart Sapma
GAPDH	19,56±0,0322	21,19±0,0153
Bcl2	28,69±0,299	32,83±0,226
Cas9	28,75±0,3148	29,377±0,163
Bax	25,796±0,104	27,96±0,122
Apaf-1	29,583±0,0153	31,15±0,408

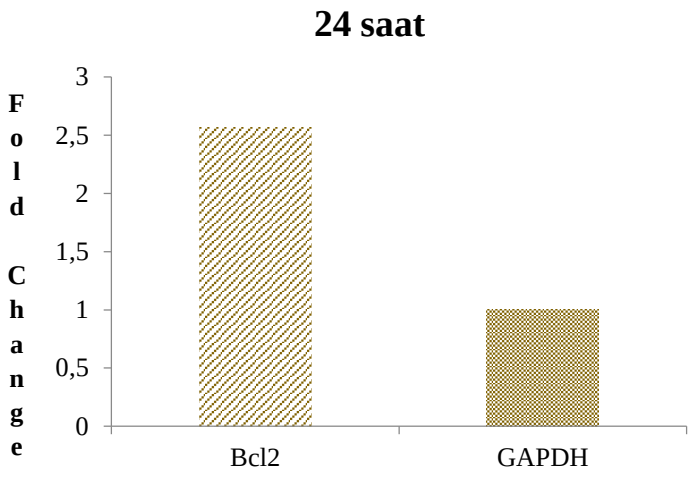


Şekil 61. Apoptotik genlerin kontrol grubu ve 600 µg/ml *M. communis* esansiyel yağ ile ortalama Ct değerlerinin karşılaştırılması

4.12. MCF10A Hücre Hattı Üzerinde Uygulanan *M. communis* Esansiyel Yağının Apoptoz Mekanizmasında Rol Alan Gen Ekspresyonları Üzerine Etkileri

4.12.1. MCF10A Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (750 µg/ml) Bcl-2 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

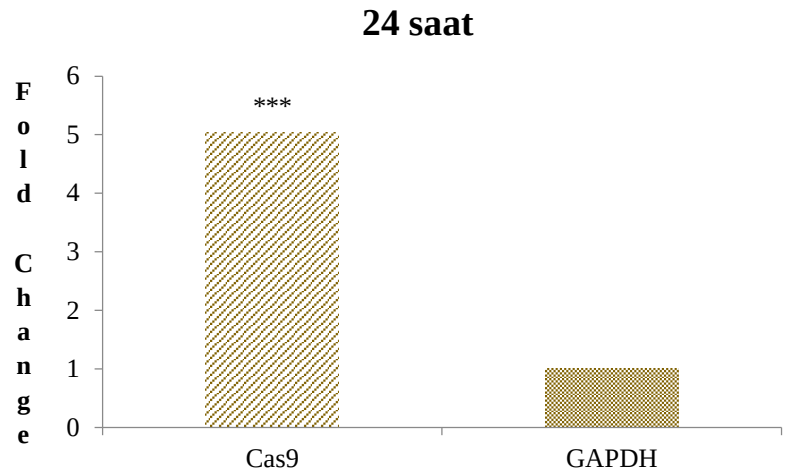
750 µg/ml *M. communis* esansiyel yağı ile muamele edilen MCF10A hücreleri 24. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Bcl-2 gen ekspresyon seviyesinin 2.5 kat arttığı saptandı (Şekil 62).



Şekil 62. MCF10A hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (750 µg/ml) Bcl-2 gen ekspresyonu üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

4.12.2. MCF10A Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (750 µg/ml) Kaspaz 9 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

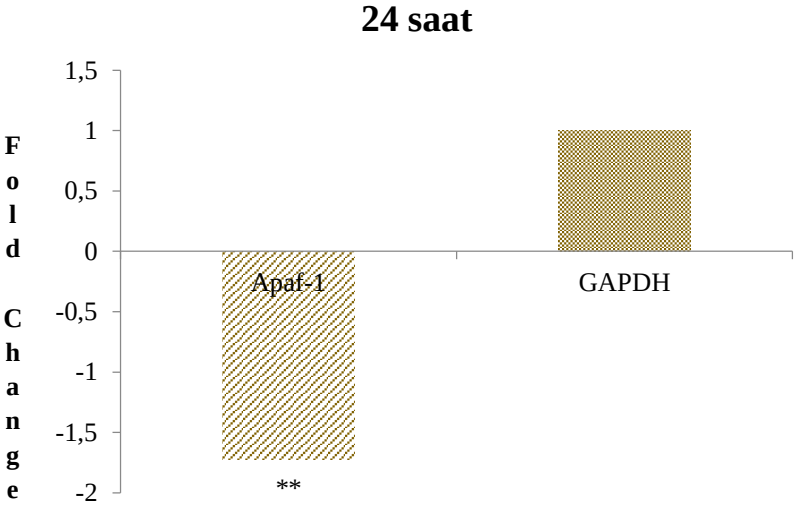
750 µg/ml *M. communis* esansiyel yağı ile muamele edilen MCF10A hücreleri 24. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Kaspaz 9 gen ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde 5 kat arttığı görüldü (Şekil 63).



Şekil 63. MCF10A hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (750 µg/ml) Kaspaz 9 gen ekspresyonu üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

4.12.3. MCF10A Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (750 µg/ml) Apaf-1 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

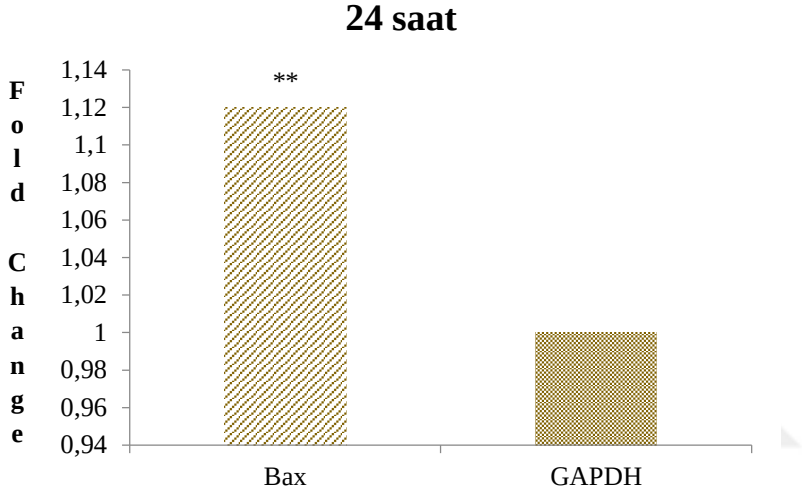
750 µg/ml *M. communis* esansiyel yağı ile muamele edilen MCF10A hücreleri 24. Saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Apaf-1 gen ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde 1.7 kat azaldığı görüldü (Şekil 64).



Şekil 64. MCF10A hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (750 µg/ml) Apaf-1 gen ekspresyonu üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

4.12.4. MCF10A Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (750 µg/ml) Bax Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

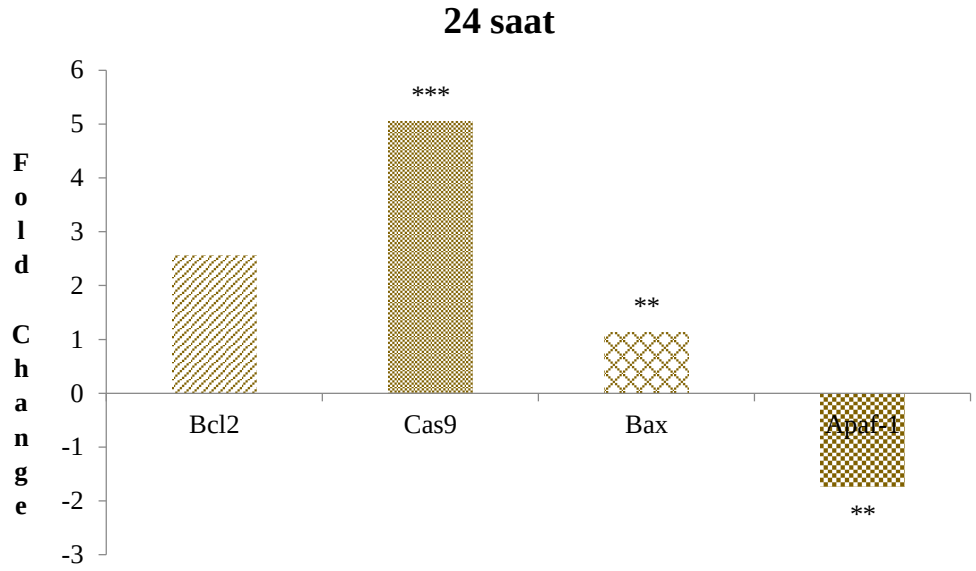
750 µg/ml *M. communis* esansiyel yağı ile muamele edilen MCF10A hücreleri 24. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Bax gen ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde 1.12 kat arttığı görüldü (Şekil 65).



Şekil 65. MCF10A hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (750 µg/ml) Bax gen ekspresyonu üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

4.12.5. *M. communis* Esansiyel Yağı (750 µg/ml) Uygulanan MCF10A Hücrelerinde Apoptotik Genlerin Ekspresyon Seviyelerinin Kontrol Grupları ile Karşılaştırılması

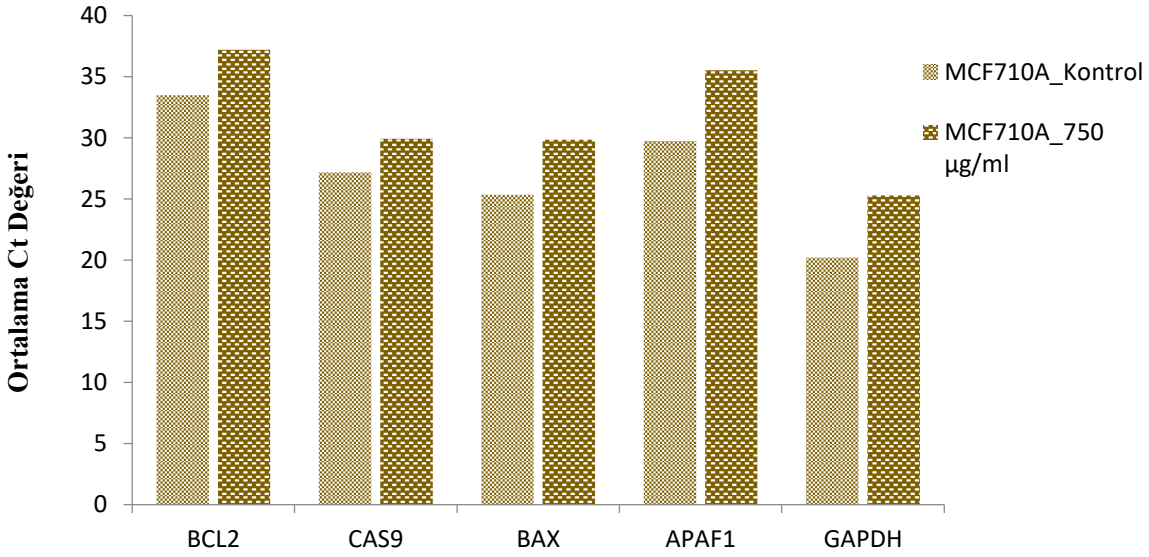
750 µg/ml *M. communis* esansiyel yağı ile muamele edilen MCF10A hücreleri 24. Saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Bax ve Kaspaz 9 gen ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde arttığı görülürken, Apaf-1 gen ekspresyon seviyesinin anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü. Bcl-2 gen ekspresyon seviyesinde ise anlamlı bir değişim görülmedi (Çizelge 46, Şekil 66,67).



Şekil 66. MCF10A hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (750 µg/ml) apoptoz mekanizmasında rol alan genlerin ekspresyonu üzerine etkisinin karşılaştırılması (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

Çizelge 46. Apoptotik genlerin kontrol grubu ve 750 µg/ml *M. communis* esansiyel yağ ile ortalama Ct± standart sapma değerleri.

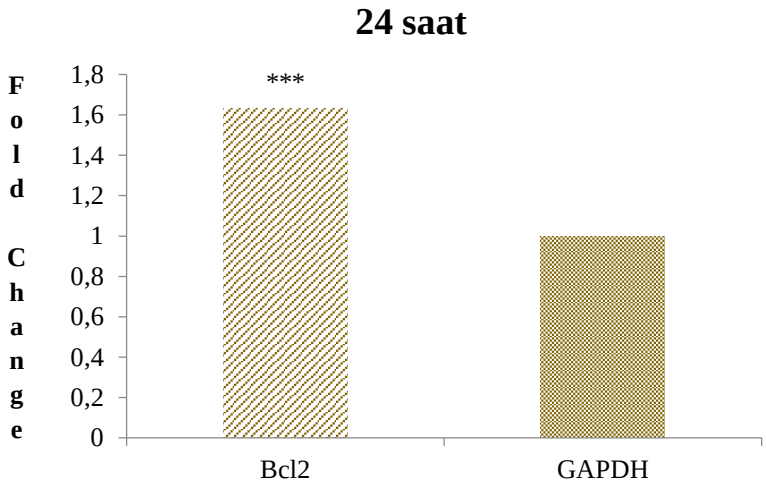
Genler	Kontrol Grubu (MCF10A) Ort Ct ± Standart Sapma	750 µg/ml *M. communis* Esansiyel Yağ Konsantrasyonu Ort Ct ± Standart Sapma
GAPDH	20,226±0,02082	25,3±0,001
Bcl2	33,493±1,19039	37,205±0,5728
Cas9	27,183±0,10504	29,923±0,1616
Bax	25,35±0,0916	29,857±0,3864
Apaf-1	29,75±1,72535	35,527±0,699



Şekil 67. Apoptotik genlerin kontrol grubu ve 750 µg/ml *M. communis* esansiyel yağ ile ortalama Ct değerlerinin karşılaştırılması

4.12.6. MCF10A Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (600 µg/ml) Bcl-2 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

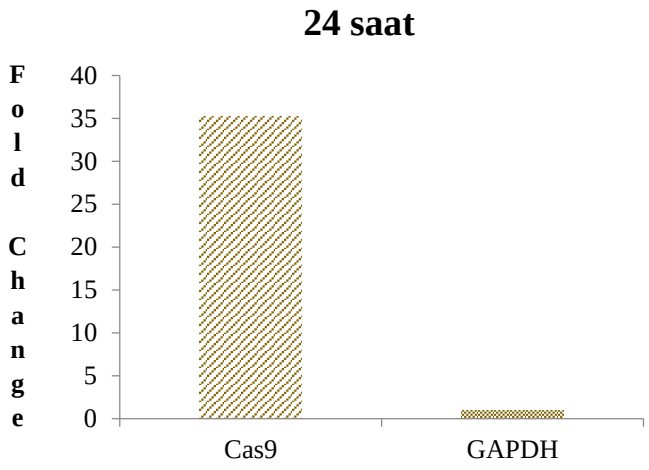
600 µg/ml *M. communis* esansiyel yağı ile muamele edilen MCF10A hücreleri 24. Saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Bcl-2 gen ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde 1.6 kat arttığı görüldü (Şekil 68).



Şekil 68. MCF10A hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (600 µg/ml) Bcl-2 gen ekspresyonu üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

4.12.7. MCF10A Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (600 µg/ml) Kaspaz 9 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

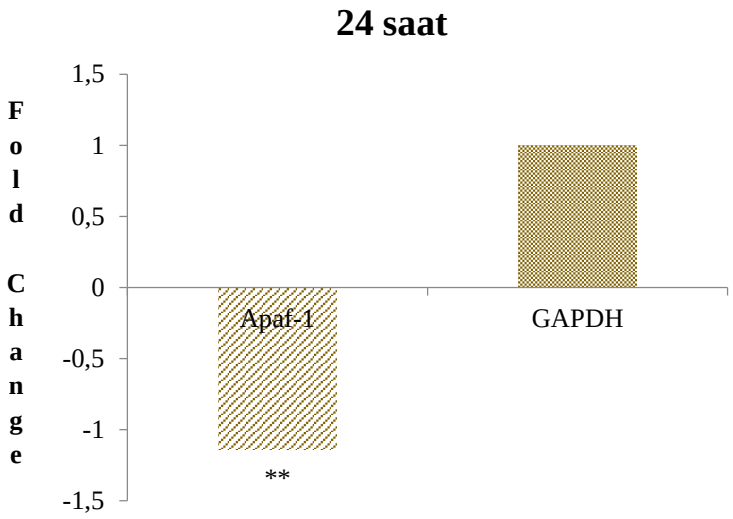
600 µg/ml *M. communis* esansiyel yağı ile muamele edilen MCF10A hücreleri 24. Saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Kaspaz 9 gen ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir değişim görülmedi (Şekil 69).



Şekil 69. MCF10A hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (600 µg/ml) Kaspaz 9 gen ekspresyonu üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

4.12.8. MCF10A Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (600 µg/ml) Apaf-1 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

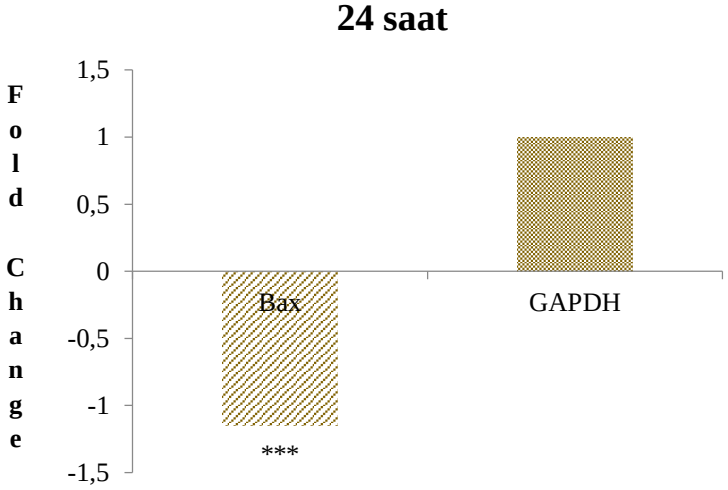
600 µg/ml *M. communis* esansiyel yağı ile muamele edilen MCF10A hücreleri 24. Saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Apaf-1 gen ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde 1.1 kat azaldığı görüldü (Şekil 70).



Şekil 70. MCF10A hücrelerinde *M. communis* esansiyel yağının (600 µg/ml) Apaf-1 gen ekspresyonu üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

4.12.9. MCF10A Hücre Hattı için *M. communis* Esansiyel Yağının (600 µg/ml) Bax Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

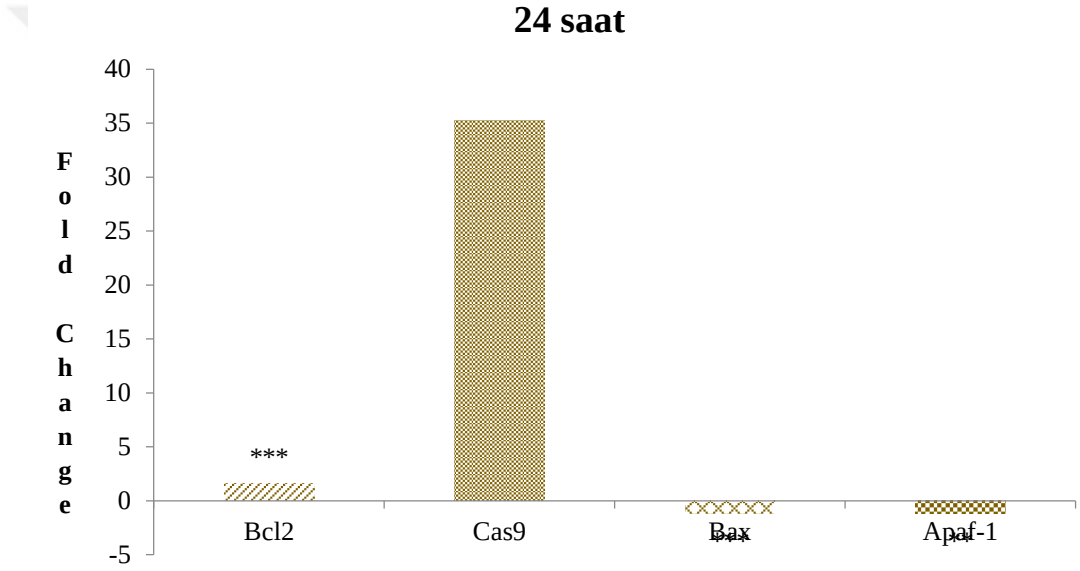
600 µg/ml *M. communis* esansiyel yağı ile muamele edilen MCF10A hücreleri 24. Saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Bax gen ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde 1.2 kat azaldığı görüldü (Şekil 71).



Şekil 71. MCF10A hücrelerinde *M. communis* esansiyel yağının (600 µg/ml) Bax gen ekspresyonu üzerine etkisi (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

4.12.10. *M. communis* Esansiyel Yağı (600 µg/ml) Uygulanan MCF10A Hücrelerinde Apoptotik Genlerin Ekspresyon Seviyelerinin Kontrol Grupları ile Karşılaştırılması

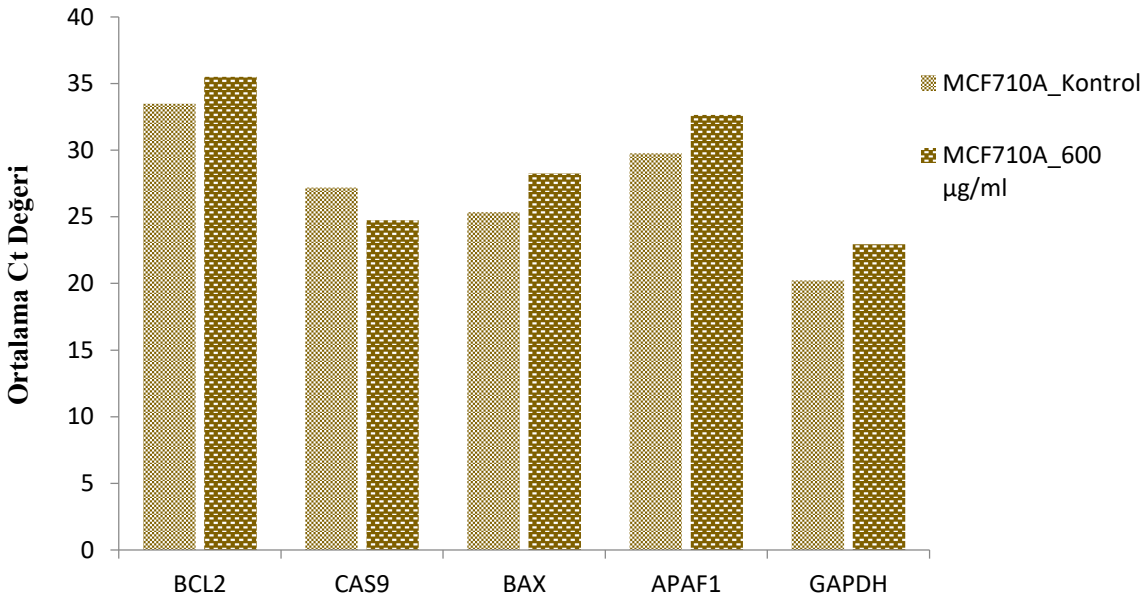
600 µg/ml *M. communis* esansiyel yağı ile muamele edilen MCF10A hücreleri 24. Saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Bax ve Apaf-1 gen ekspresyon seviyelerinin anlamlı bir şekilde azaldığı görülürken, Bcl-2 gen ekspresyon seviyesinin anlamlı bir şekilde arttığı görüldü. Kaspaz 9 gen ekspresyon seviyesinde ise anlamlı bir değişim görülmedi (Çizelge 47, Şekil 72,73).



Şekil 72. MCF10A hücrelerinde *M. communis* Esansiyel yağının (600 µg/ml) apoptoz mekanizmasında rol alan genlerin ekspresyonu üzerine etkisinin karşılaştırılması (İstatiksel önem *<0.05, **<0,01, ***<0.001 şeklinde gösterilmiştir).

Çizelge 47. Apoptotik genlerin kontrol grubu ve 600 µg/ml *M. communis* esansiyel yağ ile ortalama Ct± standart sapma değerleri.

Genler	Kontrol Grubu (MCF10A) Ort Ct ± Standart Sapma	600 µg/ml *M. communis* Esansiyel Yağ Konsantrasyonu Ort Ct ± Standart Sapma
GAPDH	20,226±0,02082	22,93±0,1916
Bcl2	33,493±1,19039	35,49±0,001
Cas9	27,183±0,10504	24,746±4,1867
Bax	25,35±0,0916	28,256±0,16073
Apaf-1	29,75±1,72535	32,643±0,45082



Şekil 73. Apoptotik genlerin kontrol grubu ve 600 µg/ml *M. communis* esansiyel yağ ile ortalama Ct değerlerinin karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada insan meme kanseri hücre hattı MCF7 ve insan tümorojenik olmayan MCF10A meme hücre hattı, antitumorojenik aktivitesini değerlendirmek amacıyla *M. communis*'ten elde edilen esansiyel yağ ile muamele edildi. Buna paralel olarak, biyolojik etkinin temellerini değerlendirmek için gözlenen biyolojik aktivitenin bir veya birkaç maddeyle bağlantılı olup olmadığını tespit etmek adına bu analizlerde karakterize edici bileşikler (1,8-cineole, α-Pinene, linalool) saf formda kullanılarak MCF7 ve MCF10A ile muamale edildi. *M. communis* esansiyel yağın ve içerisinde bulunan 3 bileşiğin sitotoksik olmayan dozlarının belirlenmesi için MTT testi yapıldı. Tedavi edici özelliğe sahip konsantrasyon belirlendikten sonra bu bileşiklerin apoptozu uyarıp uyarmadığını anlamak için MCF7 ve MCF10A hücre hatlarında Bcl-2, Kaspaz 9, Apaf-1 ve Bax genlerinin ekspresyon düzeyleri RT-qPCR yöntemi uygulanarak incelendi. Ayrıca, tedavi edici özelliğe sahip konsantrasyonların belirlenmesiyle sadece olası hücre tipi seçiciliği üzerine olup olmadığını görmek için epitel olmayan hücrelerde yani insan BJ fibroblastı hücre hattında da bu uygun dozlar test edildi.

Kanser, kontrol dışı hüce büyümesi ile karakterize edilen bir hastalık sınıfıdır. Kanser, trilyonlarca hücreden oluşan insan vücudunun herhangi bir yerinde ortaya çıkabilir. 100'den fazla farklı kanser türü vardır ve her biri başlangıçta etkilenen hücre tipine göre sınıflandırılır. Tüm kanser türlerinde, vücudun bazı hücreleri durmadan büyümeye başlar ve taşınarak çevreleyen dokulara yayılır. Taşındıkları yerlerde de büyümeye devam ederek canlı için risk oluşturmaya başlar. Yani hücreler, normal süreçteki fonksiyonlarını yapamaz hale gelir ya da bazı yeni fonksiyonlara sahip olurlar[1]. Kanser tüm dünyada en çok çalışılan hastalıklardan biri olmasına rağmen, ana umut kaynağının doğal ve özellikle bitki kaynaklı ürünler olduğu görülmektedir. Doğal veya doğal türevli ürünler modern tıbbın en önemli ilaç kaynağı olduğundan dolayı, bu doğal ürünlerin kanserdeki baskın rolü, antikanser bileşiklerin yaklaşık %74'ünün doğal veya doğal türevli ürünler olmasıyla belirgindir [74] .

Normal meme gelişimi, hücre proliferasyonu ve apoptoz arasındaki denge ile kontrol edilir ve tümör büyümesinin sadece kontrolsüz proliferasyonun değil, aynı zamanda azalmış apoptozun bir sonucu olduğuna dair güçlü kanıtlar vardır. Proliferasyon ve apoptoz arasındaki denge, kemoterapi, radyoterapi ve hormonal

tedavilere cevap olarak tümörün genel büyümesini veya gerilemesini belirlemede çok önemlidir[220,221]. Bunların hepsi kısmen apoptozu indükleyerek etki gösterir[222,223]. Böylelikle, apoptozu inceleyerek bireysel tümörlerin biyolojisini moleküler ve biyokimyasal düzeyde tanımlamak, kontrol ve regülasyonunu incelemek ve klinik avantajdan yararlanmak için bunları kullanmak mümkündür. Bu ilişkileri anlamak bazı tümörlerin neden tedaviye cevap veremediğini bulmaya yardımcı olabilir ve bundan dolayı ilaç geliştirmenin yeni yollarını gösterebilir.

M. communis, geleneksel tıpta dünya çapında kullanılan tanınmış tıbbi bir bitkidir. *M. communis,* diare, peptik ülser, hemoroit, iltihap, kanama, baş ağrısı, çarpıntı, üretrit, burun kanaması, aşırı terleme, pulmoner ve cilt hastalıklarının tedavisi için de geleneksel olarak kullanılmaktadır, buna karşın kliniksel ve deneysel çalışmalar bu bitkinin daha geniş bir farmakolojik ve terapötik etki yelpazesine sahip olduğunu göstermektedir[25-27]. Çalışmamızda, antiproliferatif ve apoptotik etkilere sahip *M. communis* esansiyel yağının ve içerisinde bulunan 3 ana bileşiğin MCF7 ve MCF10A hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Tezin ilk aşamasında, metod kısmında anlatıldığı gibi hücreler 96 kuyucuklu ‘plate’lere ekildi ve her bir hücre hattına (MCF7 ve MCF10A) artan dozlarda *M. communis,* 1,8-cineole, α-Pinene, Linalool muamelesi yapıldı. Hücre metabolik aktivitesini değerlendirmek amacıyla kolorimetrik bir deney olan ve tanımlanmış koşullar altında mevcut canlı hücrelerin sayısını yansıtabilen MTT sitotoksisite çalışmaları yapıldı. MTT testi ile belirlenen sonuçlarımıza göre; 24 saatlik süre sonunda MCF7 hücrelerinde 3000, 1500, 1200 ve 600 µg/ml *M. communis* esansiyel yağ dozlarının hücre canlılığını sırasıyla % 99-89,7-88,5 ve 54,09 inhibisyon, 48 saatlik süre sonunda ise 3000, 1500 ve 1200 µg/ml yağ dozlarının % 98- 91,7 ve 97,4 inhibisyon ile anlamlı bir şekilde baskıladığı gözlemlendi. MCF10A hücrelerinde ise 24 saatlik süre sonunda 3000 ve 1500 µg/ml *M. communis* esansiyel yağ dozlarının hücre canlılığını sırasıyla % 99,4 ve 95,8 inhibisyon, 48 saatlik süre sonunda ise 3000- 1500- 1200- 750 µg/ml esansiyel yağ dozlarının hücre canlılığını sırasıyla % 99- 94,7- 90,06- 66,7 inhibisyon ile anlamlı bir şekilde baskıladığı gözlemlendi. 600 µg/ml dozda 24 saatlik sürede MCF7 hücrelerinde sitotoksik etki görülmesine rağmen 48 saatlik süre sonunda istatiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi. MCF10A hücrelerinde ise 1200 ve 750 µg/ml dozlarında 24 saatlik sürede sitotoksisite anlamlı görülmezken, 48 saatlik süre

sonunda sitotoksik etki istatiksel olarak anlamlı görüldü. MCF7 insan meme kanseri hücre hattı ile MCF10A tümorojenik olmayan insan meme hücre hattı karşılaştırıldığında, 24 saatlik süre sonunda 1200 ve 600 µg/ml dozlarında MCF7 hücrelerinde istatiksel olarak anlamı sitotoksik etki gözlemlenmesine rağmen MCF10A hücrelerinde sitotoksisite anlamlı gözlemlenmedi. 48 saatlik süre sonunda ise 750 µg/ml dozunda MCF7 hücrelerinde sitotoksik etki gözlemlenmemesine rağmen MCF10A hücrelerinde sitotoksik etki anlamlı gözlemlendi. *M. communis'*ten türetilen aktif bir bileşik olan *Myrtucommulone*-A'nın sitotoksisitesini ve kanser hücrelerinde apoptozu indükleme potansiyelini inceleyen bir çalışmada, uzun süreli muamelede sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir[232]. Bizim çalışmamızda da 24 saatlik süre sonunda anlamlı bir sitotoksik etki görülmeyen dozlarda, 48 saatlik süre sonunda sitotoksik etki görülmesinin nedeninin *Myrtucommulone*-A çalışmasında olduğu gibi uzun süreli muamelelerin sitotoksik etki oluşturmasından kaynaklanabileceğini göstermektedir. Elde edilen bu veriler doğrultusunda, uygun dozlar ve muamele süresi seçilirken MCF7 hücrelerinde MCF10A hücrelerine kıyasla daha toksik etki gösteren dozlar (750 ve 600 µg/ml) çalışmaya dahil edildi. 3000- 1500- 1200 µg/ml dozları her iki hücre hattı için toksik etki yüksek oranda olduğu için bu dozlar çalışmaya dahil edilmedi. 750 µg/ml dozunda 48 saatlik süre sonunda MCF10A hücrelerinde toksik etki daha yüksek oranda görüldüğü için muamele süresi 24 saat olarak seçildi.

Linalool'ün anti-karsinojenik mekanizması ile ilgili yapılan daha önceki bir çalışmada Linalool'ün kansere özgü oksidatif stres yoluyla HCT 116 (insan kolorektal kanser) hücre hattında apoptozu indüklediği bildirilmiştir [64]. Benzer şekilde, SW 620 (insan kolorektal kanser hücre hattı), T-47D (insan meme kanseri hücre hattı), Hep G2 (insan karaciğer karsinom hücre hattı) ve A549 (insan akciğer karsinom hücre hattı) hücre hatları üzerinde yapılan bir çalışmada, linaloolün hücre ölümünü tetiklediği ve hücrelerin apoptoza uğramasına neden olarak sitotoksik etkilere neden olduğu gösterilmiştir [65]. Ek olarak HeLa (İnsan papillom virüsü hücre hattı) ve U937 (İnsan akut miyeloid lösemi hücre hattı) hücreleri üzerinden yapılan bir çalışmada hücre döngüsünü durdurduğu ve sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir [66]. Bizim yaptığımız çalışmada ise, linalool bileşeninin MTT testi sonucunda MCF7 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisine bakıldığında, 24 saatlik süre sonunda 3000- 1500- 1200 ve 600 µg/ml dozlarının hücre canlılığını sırasıyla % 99,2- 91,38- 95,8 ve 46,3 inhibisyon, 48 saatlik

süre sonunda ise 3000-1500-1200-750 ve 600 µg/ml dozlarının % 99,2- 94,3 -96,8 -86,8 ve 57,6 inhibisyon ile anlamlı bir şekilde baskıladığı gözlemlendi. MCF10A hücrelerinde ise 24 saatlik süre sonunda 3000- 1500- 1200- 750- 600- 375- 187,5- 150- 46,875 µg/ml dozlarının hücre canlılığını sırasıyla % 99,4- 947,2- 99,9- 99,4- 95,3- 66,4- 67,92- 52,3- 46,9 inhibisyon, 48 saatlik süre sonunda ise 3000- 1500- 1200- 750- 600- 375- 300- 187,5- 150- 93,75 µg/ml dozlarının hücre canlılığını sırasıyla % 96,73- 95,98- 97,02- 96,38- 96,8- 96,1- 91,6- 97,06- 64,9 ve 80,15 inhibisyon ile anlamlı bir şekilde baskıladığı gözlemlendi. MCF7 hücrelerinde 750 µg/ml dozunda, MCF10A hücrelerinde ise 3000 ve 93,75 µg/ml dozlarında 24 saatlik sürede sitotoksisite anlamlı görülmezken, 48 saatlik süre sonunda sitotoksik etki istatiksel olarak anlamlı görüldü. Elde edilen bu veriler doğrultusunda MCF7 ve MCF10A hücreleri karşılaştırıldığında, MCF7 hücreleri için sadece 3000 ve 600 µg/ml konsantrasyon aralıklarında sitotoksik etki anlamlı gözlemlenirken MCF10A hücreleri için uygulanan tüm dozlarda sitotoksik etki gözlemlendi. Uygulanan tüm dozlar tümorojenik olmayan hücre hattı üzerinde toksik etki oluşturduğu için uygun doz belirlenemedi.

α-pinen'in anti-karsinojen özelliğe sahip olduğunu göstermek amacıyla yapılan bir çalışmada, karaciğer kanseri BEL-7402 hücre hattında hücre döngüsünün G2 fazından M fazına geçişinin (G2/M) α-pinen tarafından inhibe edildiği rapor edilmiştir [60]. Benzer şekilde prostat kanseri PC-3 hücre hattında yapılan çalışmada da α-pinen'in hücre büyümesini önemli ölçüde engellediği ve hücre döngüsünü durdurup apoptozu tetiklediği bildirilmiştir [61]. Ayrıca, THP-1 (insan monosit hücre hattı) hücrelerinde yapılan bir çalışmada, α-pinen'in mitojenle aktive olan protein kinazların (MAPK'ler) ve nükleer faktör-kappa B'nin (NF-KB) baskılanması yoluyla anti-inflamatuar aktivite gösterdiği belirlenmiştir[62]. Bizim yaptığımız çalışmada ise α-pinen bileşeninin MTT testi sonucunda MCF7 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisine bakıldığında, 24 saatlik süre sonunda 3000- 1500 ve 1200 µg/ml dozlarının hücre canlılığını sırasıyla % 98,9- 97,9 ve 99,5 inhibisyon, 48 saatlik süre sonunda ise 3000-1500 ve 1200 µg/ml dozlarının % 99,2- 96,4 ve 98,4 inhibisyon ile anlamlı bir şekilde baskıladığı gözlemlendi. MCF10A hücrelerinde ise 24 saatlik süre sonunda 3000- 1500 ve 1200 µg/ml dozlarının hücre canlılığını sırasıyla % 97,3- 80,3 ve 92,8 inhibisyon, 48 saatlik süre sonunda ise 3000- 1500- 1200- 750- 600- 375 ve 300 µg/ml dozlarının hücre canlılığını sırasıyla % 98,3- 86,05- 94,34- 78,8- 80,8- 77,7 ve 76,6 inhibisyon ile

anlamlı bir şekilde baskıladığı gözlemlendi. MCF10A hücrelerinde 750, 600, 375 ve 300 µg/ml dozlarında 24 saatlik sürede sitotoksisite anlamlı görülmezken, 48 saatlik süre sonunda sitotoksik etki istatiksel olarak anlamlı görüldü. Elde edilen bu veriler doğrultusunda MCF7 ve MCF10A hücreleri karşılaştırıldığında,24 saatlik sürede her iki hücre hattı için sadece 3000,1500 ve 1200 µg/ml dozlarında yüksek oranda toksik etki gözlemlendi, fakat uygulanan diğer dozlar MCF10A için hücre canlılığında azalmaya neden olurken MCF7 hücre canlılığında azalmaya neden olmadı. 48 saatlik süre sonunda da benzer şekilde tümorojenik olmayan hücrelerde toksik etki yaratıp, tümör hücrelerinde daha az yada hiç yaratmadığı için uygun doz belirlenemedi.

1,8-sineol bileşeninin MTT testi sonucunda MCF7 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisine bakıldığında, 24 ve 48 saatlik süre sonunda herhangi bir dozda anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi. MCF10A hücrelerinde ise 24 saatlik süre sonunda 3000- 1500- 1200 ve 600 µg/ml dozlarının hücre canlılığını sırasıyla % 90,9- 71,4- 76,05 ve 52,6 inhibisyon, 48 saatlik süre sonunda ise 3000 ve 1200 µg/ml dozlarının hücre canlılığını sırasıyla % 81,5 ve 33,6 inhibisyon ile anlamlı bir şekilde baskıladığı gözlemlendi. MCF10A hücrelerinde 1500 ve 600 µg/ml dozlarında 24 saatlik sürede sitotoksisite görülürken, 48 saatlik süre sonunda sitotoksik etki görülmedi. Elde edilen bu veriler doğrultusunda, MCF10A hücrelerinde 3000-600 µg/ml konsanstrasyon aralıklarında sitotoksik etki görülmesine rağmen, MCF7 hücreleri üzerinde uygulanan herhangi bir dozun sitotoksik etki oluşturmamasından dolayı uygun doz belirlenemedi. Antikarsinojenik aktivitesi ile ilgili yapılan bir çalışmada *in vitro* ve *in vivo*'da, 1,8-sineolün insan kolorektal hücre hattında (HCT 116) apoptozu indükleyerek proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir [57]. Ayrıca Ashour [232] *Okaliptüs sideroxylon* ve *Okaliptüs torquata*'nın MCF7'ye karşı sitotoksik aktivitelerini de göstermiştir. Fakat bizim yaptığımız çalışmada ökaliptus çeşitlerden biri olan 1,8-sineolün MCF7 hücre hattı üzerinde sitotoksik bir etkisi görülmemiştir.

M. communis esansiyel yağ ve 3 kimyasal bileşeğin MCF7 ve MCF10A hücreleri üzerinde MTT testi ile sitotoksik etkisine bakılıp analizleri yapıldıktan sonra etkin doz ve süre, 750-600 µg/ml *M. communis* esansiyel yağı ve 24 saat olarak belirlendi. Tezin ikinci aşamasında ise, belirlenen etkin dozun sadece olası hücre tipi seçiciliği üzerine olup olmadığını görmek için BJ insan fibroblast hücre hattında da bu uygun dozlar test edildi. MTT testi ile belirlenen sitotoksisite sonuçlarımıza göre, 750

ve 600 µg/ml dozlarında istatiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi ve % inhibisyon oranları sırasıyla 67,6 ve 8,5 olarak belirlendi. Özellikle 600 µg/ml dozunun BJ fibroblast hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisinin görülmemesi ve hücre canlılığında azalmaya sebep olmaması, kullanılan *M. communis* esansiyel yağının hücre seçiciliği olduğu ve uygun dozda fibroblast hücreleri üzerinde etkisi olmadığını göstermektedir.

Tezin üçüncü ve son aşamasında, 24 saatlik sürede 750 ve 600 µg/ml dozlarında *M. communis* esansiyel yağı ile muamele edilen MCF7 ve MCF10A hücre hatlarından saflaştırılan RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı ve sentezlenen cDNA'lar RT-qPCR yöntemi ile gen ekspresyon düzeylerinin incelenmesi amacıyla kullanıldı. Çalışmamızda apoptoz mekanizmasının intrinsik yolağında görev alan ve BCL-2 ailesi üyelerinden pro-apoptotik bir gen olan Bax, antiapoptotik özelik gösteren Bcl-2, apoptozom kompleksinin oluşumunda görev alan Apaf-1, başlatıcı kaspaz olan Kaspaz-9 genlerinin ekspresyon düzeyleri *housekeeping* bir gen olan ve tüm hücrelerde ekspresyon seviyeleri her koşulda hemen hemen aynı kalan GAPDH geni ile karşılaştırıldı. Belirlenen gen ekspresyon seviyelerinden elde edilen veriler sonucu gözlenen doza bağlı değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığına bakıldı. Gen ekspresyon ile belirlenen apoptoz sonuçlarımıza göre; 24 saatlik süre sonunda 750 µg/ml *M. communis* esansiyel yağ uygulanan MCF7 hücrelerinde Apaf-1 geninin ekspresyon düzeyi 1.2 kat artış gösterirken; 600 µg/ml *M. communis* uygulamasının ardından 1.1 kat artış gözlemlendi. Uygulanan iki dozda Apaf-1 genin ekspresyon düzeyinde gözlemlenen bu artış istatiksel olarak anlamlı bulundu. 750 ve 600 µg/ml dozlarında *M. communis* uygulanan sağlıklı MCF10A hücrelerinde ise Apaf-1 geninin ekspresyon düzeyi sırasıyla 1.7 ve 1.1 kat azalmıştır. Apaf-1 geninin ekspresyon düzeyi için elde edilen bu veriler istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($P<0,05$). Bu azalışın sebebinin *M. communis* esansiyel yağının bu dozlarda kanserli hücre hattında apoptozu indükleyip, sağlıklı hücre hattında ise bunun tersi olarak apoptozun baskılaması olduğu düşünülmektedir.

İnsanlarda BCL2 geni tarafından kodlanan Bcl-2, apoptozu inhibe ederek veya indükleyerek hücre ölümünü düzenleyen antiapoptotik bir gendir ve MCF-7 hücrelerinde bu genin ekspresyon düzeyine bakıldığında, uygulanan *M. communis* dozuna bağlı olarak gözlenen değişikliklerde artan doz miktarına bağlı olarak ekspresyon seviyesinde ters orantılı bir azalma gözlemlendi. 750 µg/ml dozunda Bcl-2

ekspresyon düzeyinde 3.9 kat azalma gözlenirken, 600 µg/ml dozunda 5.7 kat azalma görüldü. MCF10A sağlıklı hücre hattına bakıldığında ise tam tersi olarak 750 ve 600 µg/ml dozlarında Bcl-2 ekspresyon düzeyinde sırasıyla 2.5 ve 1.6 kat artış gözlemlendi. Tüm sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bcl-2 geninin kanserli hücre hattında down-regüle olurken, sağlıklı hücre hattında up-regüle olması *M. communis* yağının kanserli hücre hattında apoptozu indüklerken sağlıklı hücre hattında apoptotik bir etki oluşturmadığını desteklemektedir.

Bax, apoptozun indüklenmesinde merkezi rol oynayan pro-apoptotik bir gendir. MCF-7 hücrelerinde bu genin ekspresyon düzeyinde uygulanan *M. communis* dozuna bağlı değişiklikler gözlendi ve 750 ve 600 µg/ml dozlarında kontrole kıyasla sırasıyla 1.4 ve 1.9 kat azalış saptandı. MCF10A hücrelerinde ise 750 µg/ml *M. communis* uygulaması yapıldıktan sonra, MCF7 hücrelerinde gözlenenin aksine Bax geninin ekspresyon düzeyi 1.12 kat artış gösterirken; 600 µg/ml MC uygulamasından sonra 1.2 kat azalış gösterdi. Tüm sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Yapılan liteartür taramasına göre, Obakan ve arkadaşlarının (2014) yaptığı bir çalışmada 24 saatlik EBR (Epibrassinolid) uygulamasından sonra PC3 prostat kanseri hücre hattında Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerinden olan Puma, Bak, Bim ve Bax gibi genlerin ifadesinin arttığı, anti-apoptotik üyelerinden olan Mcl-1 geninin ifadesinin ise azaldığı gösterilmiştir[233]. Steigerova ve arkadaşlarının (2010) yaptığı bir diğer araştırmada ise EBR' nin MCF-7 hücrelerinde anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerinin ekspresyonunu % 79 uyardığı tespit edilmiştir [234] . Yu ve arkadaşlarının [235] yaptığı bir başka çalışmada da HT-29 hücre hatlarınında elde edilen immunblotlama verilerine göre genisteinin 60 µM ve 120 µM artan doza bağlı olarak Bax proteinin ifadesinin artmasına sebep olduğu bulunmuştur. MCF-7 meme kanseri hücre hattında ise DOX uygulanmasının artan dozlarıyla birlikte Bax geninin ekspresyon seviyesi 50 nM DOX uygulamasının ardından kontrole kıyasla 1,672 kat; 200 nM DOX uygulamasının ardından ise 2,573 kat artmıştır. 400 ve 800 nM DOX uygulamasından sonra ise Bax geninin ekspresyon seviyesinde azalma gözlenmiştir. HEPG2 hücre hattı üzerinde Bax geninin ekspresyon seviyesi incelendiğinde 50 nM DOX uygulanmasının ardından kontrolle kıyaslandığında 1,611 kat bir artış tespit edilmiştir. 400 ve 800 nM DOX uygulanan hücrelerdeki Bax ekspresyon düzeylerinin ise kontrole göre değişim göstermediği tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda da, ifadesi artması beklenen Bax

geninin, ekspresyon seviyesi azalmıştır. Literatür taramasından sonra elde edilen verilere göre çalışmamız karşılaştırıldığında, bunun nedeninin Bax geninin daha düşük dozlarda eksprese olup, yüksek dozlarda ifadesinin azalmasına ya da anlamlı bir farklılık görülmemesine dayandırabiliriz.

Başlatıcı bir kaspaz olan Kaspaz-9 geninin MCF7 hücrelerinde ekspresyon düzeyine bakıldığında, 750 µg/ml dozunda anlamlı bir değişim görülmezken, 600 µg/ml dozunda Kaspaz-9 genin ekspresyon seviyesinde 2.01 kat artış görüldü. MCF10A hücrelerinde ise 750 µg/ml *M. communis* muamelesi ardından, ekspresyon seviyesinde 5.04 kat artış gözlemlenirken, 600 µg/ml dozunda 35 kat artış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. MCF7 kanser hücre hattında Kaspaz-9 ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış gözlemlenmemesi, *M. communis*'nin apoptozu ekstrinsik yolaktan ziyade intrinsik ölüm yolağı aracılığıyla indüklediğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında MCF7 ve MCF10A hücre hattında artan dozlarda *M. communis,* 1,8-cineole, α-Pinene, Linalool uygulanması sonucunda yüzde canlılık düzeylerine bakıldı, etkin madde, doz ve süre (*M. communis*, 750 ve 600 µg/ml, 24 saat) belirlendi. Etkin dozun MCF7 hücre hattı üzerinde MCF10A sağlıklı hücre hattına göre daha yüksek toksisite oluşturduğu gözlemlendi. Her iki hücre hattında da apoptozda görev alan Apaf-1, Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-9 genlerinin ekspresyon seviyelerine bakıldığında, *M. communis* esansiyel yağının MCF7 hücre hattında apoptozu indüklediği, MCF10A sağlıklı hücre hattında ise tam tersi bir mekanizma oluşturduğu gözlemlendi. Ayrıca uygun dozun BJ hücre hattı üzerinde etkilerine bakıldığında hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmedi. Bu da *M. communis* yağının hücre seçiciliği olduğunu, kanserli hücre hattı üzerinde apoptotik etki oluştururken sağlıklı hücreye aynı oranda zarar vermediğini göstermektedir. Taranan literatür verileri ve elde ettiğimiz sonuçlar göz önüne alındığında, apoptotik ve anti-kanserojenik etkilere sahip olan *M. communis*'nin meme kanseri tedavisinde umut vaat edici olduğu söylenebilir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çalışmadan elde edilen sonuçları özetleyecek olursak;

1. *M. communis* esansiyel yağının 750 ve 600 µg/ml konstantrasyonları 24.saatte, MCF7 hücre hattı için MCF10A hücre hattına göre daha çok toksik etki oluşturdu yani bu konsantrasyonlarda MCF10A hücrelerine kıyasla daha fazla MCF7 hücresi öldü.
2. Linalool bileşeninde özdeş konsantrasyonlar için (3 mg-1.2 mg / ml, 24 ve 48 saat), MCF10A ve MCF7 hücreleri üzerinde benzer toksisite görüldü. Daha düşük konsantrasyonlarda MCF10A hücreleri için toksisite gözlendi, ancak MCF7 için toksisite gözlenmedi ya da daha az gözlendi.
3. α-pinen bileşeninde özdeş konsantrasyonlar için (3 mg- 1.2 mg/ml, 24 ve 48 saat), MCF10A ve MCF7 hücreleri üzerinde benzer toksisite görüldü. Daha düşük konsantrasyonlarda MCF10A hücreleri için toksisite gözlendi, ancak MCF7 için toksisite gözlenmedi ya da daha az gözlendi.
4. MCF10A için toksisite (3 mg-0.6 mg/ml, 24 ve 48 saat) gözlendi, ancak MCF7 hücreleri için hiçbir konsanstrasyonda belirgin bir toksisite gözlenmedi.
5. MCF7 hücrelerinde 750 µg/ml *M. communis* esansiyel yağ muamelesi ile Apaf-1 ve Kaspaz-9 genlerinin ekspresyon seviyelerinin sırasıyla 1.2 ve 1.9 kat arttığı, Bcl2 ve Bax genlerinin ekspresyon seviyelerinin ise sırasıyla 3.9 ve 1.4 kat azaldığı saptandı.
6. MCF7 hücrelerinde 600 µg/ml *M. communis* esansiyel yağ muamelesi ile Apaf-1 ve Kaspaz-9 genlerinin ekspresyon seviyelerinin sırasıyla 1.05 ve 2 kat arttığı, Bcl2 ve Bax genlerinin ekspresyon seviyelerinin ise sırasıyla 5.7 ve 1.9 kat azaldığı saptandı.
7. MCF10A hücrelerinde 750 µg/ml *M. communis* esansiyel yağ muamelesi ile Apaf-1 gen ekspresyon seviyesinin 1.7 kat azaldığı, Bcl-2, Kaspaz-9 ve Bax genlerinin ekspresyon seviyelerinin ise sırasıyla 2.5, 5 ve 1.12 kat arttığı saptandı.
8. MCF10A hücrelerinde 600 µg/ml *M. communis* esansiyel yağ muamelesi ile Apaf-1 ve Bax genlerinin ekspresyon seviyelerinin sırasıyla 1.14 ve 1.15 kat azaldığı, Bcl-2 gen ekspresyon seviyesinin ise 1.6 kat arttığı saptandı.

9. MCF7 hücrelerinde *M. communis* esansiyel yağının apoptozu intrinsik yolak aracılığıyla indüklediği belirlendi.
10. 600 µg/ml dozunun BJ hücre hattı üzerindeki etkisine bakıldığında hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmedi.

Sonuç olarak; bu çalışma ve yapılan diğer çalışmalar göz önüne alındığında *M. communis* esansiyel yağının apoptotik etkilerinin, kanser tedavisinde doğal terapötik ajan olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Jones, J. D. and J. L. Dangl.** The plant immune system. *Nature* .**2006;**444(7117): 323.

2. **Alapati, K. and V. Muvva.** Evaluation of bioactive compounds produced by Nocardia levis MK-VL_113 & Streptomyces tendae TK-VL_333 for cytotoxic activity. *The Indian journal of medical research*. **2013;**137(2): 391.

3. **Atzei, A. D.** Le piante nella tradizione popolare della Sardegna: documentazione sugli usi alimentari, aromatizzanti, profumieri, artigianali, cosmetici, medicinali, veterinari, magici, ornamentali, rituali, religiosi, tintori, antiparassitari e vari, delle piante, *Delfino Carlo Editore*.**2003**

4. **Asllani, U.** Chemical composition of Albanian myrtle oil (Myrtus communis L.). *Journal of Essential Oil Research.* **2000;**12(2): 140-142.

5. **Boelens, M. H. and R. Jimenez.** The Chemical Composition of Spanish Myrtle Leaf Oils. Part I. *Journal of Essential Oil Research.* **1991;**3(3): 173-177.

6. **Bradesi, P., et al.** Chemical composition of myrtle leaf essential oil from Corsica (France). *Journal of Essential Oil Research.* **1997;**9(3): 283-288.

7. **Deidda, P. and M. Mulas.** Due specie frutticole minori per una frutticoltura sostenibile: Myrtus communis L. e Arbutus unedo L. Risultati di alcune ricerche condotte in Sardegna (Italia). *Actas del Congreso Europeo de Agricultura Sostenible en Ambientes Meditarreneos*.**1999**

8. **Jamoussi, B., et al.** Effect of harvest time on the yield and composition of Tunisian myrtle oils. *Flavour and fragrance Journal.* **2005**;20(3): 274-277.

9. **Akgül, A.** Spice Science and Technology (Baharat Bilimi veTeknolojisi; in Turkish), *Turkish Association of Food Technologists, Publ*. **1993.**

10. **Davis, P. H. and K. Tan.** Flora of Turkey and the Aegean islands, Edinburgh University *Press*.**1998.**

11. **Özek, T., et al.** Chemical composition of Turkish myrtle oil. *Journal of Essential Oil Research* **2000**;12(5): 541-544.

12. **Herrera, C. M.** A study of avian frugivores, bird-dispersed plants, and their interaction in Mediterranean scrublands. *Ecological monographs*. **1984;**54(1): 1-23.

13. **Aronne, G. and D. Russo.** Carnivorous mammals as seed dispersers of Myrtus communis (Myrtaceae) in the Mediterranean shrublands.*Plant Biosystems*-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology. **1997;**131(3): 189-195.

14. **Alipour, B., et al.** Effects of L actobacillus casei supplementation on disease activity and inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis patients: a randomized double-blind clinical trial. *International journal of rheumatic diseases*. **2014;** 17(5): 519-527.

15. **Mahmoudvand, H., et al.** Antileishmanial and cytotoxic effects of essential oil and methanolic extract of Myrtus communis L. *The Korean journal of parasitology*. **2015;**53(1): 21.

16. **Mimica-Dukić, N., et al.** Essential oil of Myrtus communis L. as a potential antioxidant and antimutagenic agents. *Molecules.* **2010;** 15(4): 2759-2770.
17. **Lockshin, R. A. and Z. Zakeri.** Cell death in health and disease. *Journal of cellular and molecular medicine*. **2007;**11(6): 1214-1224.

18. **Hanahan, D. and R. A.** Weinberg. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* **2011;**144(5): 646-674.

19. **Cai, S. X., et al.** Discovery of substituted N-phenyl nicotinamides as potent inducers of apoptosis using a cell-and caspase-based high throughput screening assay. *Journal of medicinal chemistry.* **2003;** 46(12): 2474-2481.

20. **Oğur, R.** Mersin bitkisi (Myrtus communis L.) hakkında bir inceleme. *Çevre Dergisi.* **1994;**10(1): 21-25.

21. **Nassar, M. I., et al.** Secondary metabolites and bioactivities of Myrtus communis*. Pharmacognosy research.* **2010;**2(6): 325.

22. **Sumbul, S., et al.** Physicochemical and phytochemical standardization of berries of Myrtus communis Linn. *Journal of pharmacy & bioallied sciences.* **2012**;4(4): 322.

23. **Aydın, C. and M. M. Özcan.** Determination of nutritional and physical properties of myrtle (Myrtus communis L.) fruits growing wild in Turkey. *Journal of food engineering.* **2007;**79(2): 453-458.

24. **Charles, D.** Antioxidant properties of spices shells and other. *London: John Willey.* **2013.**

25. **Gauthier, R., et al.** Activity of Myrtus communis extracts against head lice. *Plantes Medicinales et Phytotherapie.* **1989;** 23: 95-108.

26. **Anonymous.** Myrtle. In Al-Qanun fil-Tibb, (English Translation) Book, (original Author-Avicenna), Vol: 2, Department of Islamic Studies, Jamia Hamdard: New Delhi. **1998;**42–43.

27. **Evans, W.** Trease and Evans Pharmacognosy. 15th edtion. *Edinburgh, Saunders:* **2002;** 249.

28. **Baytop, T.** Türkiye'de bitkiler ile tedavi: geçmişte ve bugün, *Nobel Tıp Kitabevleri*. **1999.**

29. **Andrade, E. H. A., et al.** Variability in essential oil composition of Piper dilatatum LC Rich. *Biochemical systematics and ecology.* **2011;** 39(4-6): 669-675.

30. **De Sousa, D. P.** Analgesic-like activity of essential oils constituents. *Molecules.* **2011;**16(3): 2233-2252.

31. **Griffin, S. G., et al.** The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and fragrance Journal.* **1999;**14(5): 322-332.

32. **Lis-Balchin,** M. Essential oils and'aromatherapy': their modern role in healing. *Journal of the royal society of health.* **1997;**117(5): 324-329.

33. **Sangwan, N., et al.** Regulation of essential oil production in plants. *Plant growth regulation*. **2001;**34(1): 3-21.

34. **Liu, L., et al.** Effect of degree of milling on phenolic profiles and cellular antioxidant activity of whole brown rice. *Food chemistry.* **2015;**185: 318-325.

35. **ÇİMEN, M. B. Y.** Flavonoids and their antioxidant properties. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. **1999;** 19(5): 296.
36. **Lee, Y. K., et al.** (−)-Epigallocatechin-3-gallate prevents lipopolysaccharide-induced elevation of beta-amyloid generation and memory deficiency. *Brain research.* **2009;**1250: 164-174.

37. **Metodiewa, D., et al.** Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N, N-Diethylaminoethyl ethers of flavaone oximes: A comparison with natural polyphenolic flavonoid rutin action. *IUBMB Life.* **1997;**41(5): 1067-1075.

38. **Walker, E. H., et al.** Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Molecular cell*. **2000;**6(4): 909-919.

39. **Formica, J. and W. Regelson.** Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and chemical toxicology.* **1995;** 33(12): 1061-1080.

40. **Chung, K.-T., et al.** Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Trends in Food Science & Technology.* **1998;**9(4): 168-175.

41. **Chung, K.-T., et al.** Tannins and human health: a review. *Critical reviews in food science and nutrition* **1998;**38(6): 421-464.

42. **Bakkali, F., et al.** Biological effects of essential oils–a review. *Food and chemical toxicology*. **2008;**46(2): 446-475.

43. **Caballero, I., et al.** Seed bank structure along a semi-arid gypsum gradient in Central Spain. *Journal of Arid Environments.* **2003;**55(2): 287-299.

44. **Grassmann J.** Terpenoids as plant antioxidants. *Vitam Horm.* **2005;**72:505-35.

45. **Modzelewska, A., et al.** Sesquiterpenes: natural products that decrease cancer growth. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents.* **2005;**5(5): 477-499.

46. **Wannes, W. A., et al.** Variations in essential oil and fatty acid composition during Myrtus communis var. italica fruit maturation. *Food chemistry.* **2009;** 112(3): 621-626.

47. **Wannes, W. A., et al. Antioxidant** activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (Myrtus communis var. italica L.) leaf, stem and flower. *Food and chemical toxicology.* **2010;** 48(5): 1362-1370.

48. **Deriu, A., et al.** In vitro activity of essential oil of Myrtus communis L. against Helicobacter pylori. *International journal of antimicrobial agents.* **2007;**30(6): 562.

49. **Hursting, S. D., et al.** Chemoprevention of spontaneous tumorigenesis in p53-knockout mice. *Cancer research.* **1995;**55(18): 3949-3953.

50. **Araújo, E. C., et al.** Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from Hyptis martiusii Benth. *Journal of agricultural and food chemistry*. **2003;** 51(13): 3760-3762.

51. **Vilela, G. R., et al.** Activity of essential oil and its major compound, 1, 8-cineole, from Eucalyptus globulus Labill., against the storage fungi Aspergillus flavus Link and Aspergillus parasiticus Speare. *Journal of Stored Products Research*. **2009;**45(2): 108-111.

52. **Hussain, A. I., et al. Antibacterial** activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. *LWT-Food Science and Technology.* **2011,**44(4): 1199-1206.
53. **Balacs, T.** Cineole-rich eucalyptus. *International Journal of Aromatherapy*. **1997;** 8(2): 15-21.

54. **Santos, F. and V. Rao.** Inflammatory edema induced by 1, 8-cineole in the hindpaw of rats: a model for screening antiallergic and anti-inflammatory compounds. *Phytomedicine.* **1998;**5(2): 115-119.

55. **Santos, F. A., et al.** 1, 8-Cineole protects against liver failure in an in-vivo murine model of endotoxemic shock. *Journal of pharmacy and pharmacology* **2001;**53(4): 505-511.

56. **Moteki, H., et al.** Specific induction of apoptosis by 1, 8-cineole in two human leukemia cell lines, but not a in human stomach cancer cell line. *Oncology reports.* **2002**;9(4): 757-760.

57. **Murata, S., et al.** Antitumor effect of 1, 8-cineole against colon cancer. Oncology reports. **2013;**30(6): 2647-2652.

58. **Brown SK, Garver WS, Orlando RA.** 1,8-cineole: An Underappreciated Anti-inflammatory Therapeutic. *J Biomol Res Ther.* **2017;** 6:154.

59. **Caldas, G. F. R., et al.** Gastroprotective mechanisms of the monoterpene 1, 8-cineole (eucalyptol*). PLoS One.* **2015;**10(8): e0134558.

60. **Forouzanfar, M. H., et al.** Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *The lancet.* **2011;**378(9801): 1461-1484.

61. **Zhao, Y., et al.** α-Pinene inhibits human prostate cancer growth in a mouse xenograft model. *Chemotherapy.* **2018;**63(1): 1-7.

62. **Kim, D.-S., et al.** Alpha-pinene exhibits anti-inflammatory activity through the suppression of MAPKs and the NF-κB pathway in mouse peritoneal macrophages. *The American journal of Chinese medicine* **2015;**43(04): 731-742.

63. **Ravizza, R., et al.** Linalool, a plant-derived monoterpene alcohol, reverses doxorubicin resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncology reports.* **2008;**20(3): 625-630.

64. **Iwasaki, K., et al.** Anticancer effect of linalool via cancer-specific hydroxyl radical generation in human colon cancer. *World journal of gastroenterology.* **2016;** 22(44): 9765.

65. **Chang, M.-Y. and Y.-L.** Shen Linalool exhibits cytotoxic effects by activating antitumor immunity. *Molecules*. **2014;**19(5): 6694-6706.

66. **Chang, M.-Y., et al.** Linalool induces cell cycle arrest and apoptosis in leukemia cells and cervical cancer cells through CDKIs. *International journal of molecular sciences*. **2015;**16(12): 28169-28179.

67. **Sims, A. H., et al.** Origins of breast cancer subtypes and therapeutic implications. *Nature Reviews*

68. **Salouage, I., et al.** Effect of Myrtus communis L. on an experimental model of a rat liver ischemia-reperfusion*. Acta horticulturae*. **2010;(**853): 379-382.
69. **Stevens, N**. Natural Synergy: Essential Oils in Cancer Research. **2005**

70. **Oztekin, M., et al.** The effects of Myrtus communis L. oil on Ehrlich tumor. Proceedings of the 2nd Balkan Congress of Oncology. **1998.**

71. **Kerr, J.** Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. *Apoptosis: the molecular basis of cell death.* **1991;**5-29.
72. **Kerr, J. F., et al.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer.* **1972;**26(4): 239.

73. **Shamas-Din, A., et al.** Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* **2013;**5(4): a008714.

74. *Clinical Oncology* ***2007;***4(9): 516.

75. **Hedenfalk, I. A., et al.** Gene expression in inherited breast cancer. **2002.**

76. **Sarkar, F. H. and Y. w. LI.** Targeting multiple signal pathways by chemopreventive agents for cancer prevention and therapy 1. *Acta Pharmacologica Sinica*. **2007;**28(9): 1305-1315.

77. **Yiannakopoulou, E.** Etiology of familial breast cancer with undetected BRCA1 and BRCA2 mutations: clinical implications. *Cellular Oncology.* **2014;**37(1): 1-8.

78. **Apostolou, P. and F. Fostira** Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *BioMed research international.* **2013.**

79. **Mahdi, K. M., et al.** Hereditary genes and SNPs associated with breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* **2013;**14(6): 3403-3409.

80. **Raju Asirvatham, A. J. M. C.** Anticancer activity of Drosera indica L., on Dalton's Lymphoma Ascites (DLA) bearing mice. *Journal of Complementary Medicine Research*. **2013;**2(1): 9-14.

81. **Tan, G., et al.** Biodiversity as a source of anticancer drugs. *Current drug targets.* **2006;**7(3): 265-277.

82. **Ogur, R., et al.** Herbal treatment usage frequency, types and preferences in Turkey. *Middle. East. J. Fam. Med.* **2006;**4: 38-44.

83. **Ogur, R.** Studies with Myrtus communis L.: anticancer properties. *Journal of intercultural ethnopharmacology.* **2014;** 3(4): 135.

84. **Bellamy, C. O., et al.** Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Seminars in cancer biology, Elsevier.* **1995.**

85. **Ellis, R. E., et al.** Mechanisms and functions of cell death. *Annual review of cell biology.* **1991;**7(1): 663-698.

86. **Gavrieli, Y., et al.** Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology.* **1992;**119(3): 493-501.

87. **Koopman, G., et al.** Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* **1994;**84(5): 1415-1420.

88. **Nicoletti, I., et al.** A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of immunological methods*. **1991;**139(2): 271-279.

89. **Slee, E. A., et al.** Ordering the cytochrome c–initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2,-3,-6,-7,-8, and-10 in a caspase-9–dependent manner. *The Journal of cell biology.* **1999;**144(2): 281-292.

90. **Creagh, E. and S. Martin.** Caspases: cellular demolition experts, *Portland Press Limited.* **2001.**

91. **Kuida, K., et al.** Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature.* **1996;**384(6607): 368.

92. **Woo, M., et al.** Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes & development.* **1998;**12(6): 806-819.

93. **Hakem, R., et al.** Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell.* **1998;**94(3): 339-352.

94. **Kuida, K., et al.** Reduced apoptosis and cytochrome c–mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell.* **1998;**94(3): 325-337.

95. **Lamkanfi, M., et al.** Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man, *Nature Publishing Group*. **2002**

96. **Thornberry, N. A., et al.** A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry.* **1997;**272(29): 17907-17911.

97. **Talanian, R. V., et al.** Substrate specificities of caspase family proteases. *Journal of Biological Chemistry.* **1997;**272(15): 9677-9682.

98. **Aravind, L., et al.** The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends in biochemical sciences.* **1999;**24(2): 47-53.

99. **Hofmann, K., et al.** The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends in biochemical sciences* **1997;**22(5): 155-156.

100. **O'Donovan, N., et al.** Caspase 3 in breast cancer. *Clinical Cancer Research* . **2003;**9(2): 738-742.

101. **McIlwain, D. R., et al.** Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* **2015;**7(4).

102. **Mirzayans, R., et al.** The growing complexity of cancer cell response to DNA-damaging agents: caspase 3 mediates cell death or survival? *International journal of molecular sciences.* **2016;**17(5): 708.

103. **Wang, X.-J., et al.** Activation and regulation of caspase-6 and its role in neurodegenerative diseases. *Annual review of pharmacology and toxicology*. **2015;**55: 553-572.

104. **Soung, Y. H., et al.** Inactivating mutations of CASPASE-7 gene in human cancers. *Oncogene* **2003;**22(39): 8048.

105. **Lamkanfi, M. and T.-D. Kanneganti. Caspase**-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. *The international journal of biochemistry & cell biology.* **2010;**42(1): 21-24.

106. **Kaiser, W. J., et al.** RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. *Nature* **2011;**471(7338): 368.

107. **Oberst, A., et al.** Catalytic activity of the caspase-8–FLIP L complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature.* **2011;**471(7338): 363.

108. **Bratton, S. B. and G. S. Salvesen.** Regulation of the Apaf-1–caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci*. **2010;**123(19): 3209-3214.

109. **Li, P., et al.** Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget.* **2017;**8(14): 23996.

110. **Adams, J. M. and S. Cory .** The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* **1998;**281(5381): 1322-1326.

111. **Boise, L. H., et al.** Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell.* **1993;**74(4): 597-608.

112. **Gibson, L., et al.** Bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* **1996;**13(4): 665-675.

113. **Lin, E. Y., et al.** A1, a Bcl-2 family member, prolongs cell survival and permits myeloid differentiation. *Blood.* **1996;**87(3): 983-992.

114. **Choi, S. S., et al.** A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow. *Oncogene.* **1995;**11(9): 1693-1698.

115. **Yang, T., et al.** The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *J Cell Biol*. **1995;**128(6): 1173-1184.

116. **Song, Q., et al.** Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. *The EMBO Journal* **1999;**18(1): 167-178.

117. **Inohara, N. and G. Nuñez .** The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene.* **2001;**20(44): 6473.

118. **Hengartner, M. O., et al.** Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature* **1992**;356(6369): 494.

119. **Oltval, Z. N., et al.** Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programed cell death. *Cell.* **1993;**74(4): 609-619.

120. **Chittenden, T., et al. Induction** of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature.* **1995;**374(6524): 733.

121. **Farrow, S. N., et al.** Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* **1995;**374(6524): 731.

122. **Hsu, S. Y. and A. J. Hsueh.** A splicing variant of the Bcl-2 member Bok with a truncated BH3 domain induces apoptosis but does not dimerize with antiapoptotic Bcl-2 proteins in vitro. *Journal of Biological Chemistry* **1998;**273(46): 30139-30146.

123. **Yang, E., et al.** Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. **Cell.** 1995;80(2): 285-291.

124. **Boyd, J. Gallo GJ, Elangovan B.** Houghton AB, Malstrom S, Avery BJ, Ebb EG, Subramanian T, Chittenden T, Lutz RJ, and Chinnadurai G. Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene*. **1995;**11: 1921-1928.

125. **Han, J., et al.** Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1B 19K. *Molecular and cellular biology.* **1996;**16(10): 5857-5864.

126. **Wang, K., et al.** BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes & development.* **1996;**10(22): 2859-2869.

127. **Inohara, N., et al. Harakiri**, A novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-XL. *The EMBO Journal* **1997;**16(7): 1686-1694.

128. **O'Connor, L., et al.** Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *The EMBO Journal* **1998;**17(2): 384-395.

129. **Hsu, S. Y., et al.** BOD (Bcl-2-related ovarian death gene) is an ovarian BH3 domain-containing proapoptotic Bcl-2 protein capable of dimerization with diverse antiapoptotic Bcl-2 members. *Molecular Endocrinology* **1998;**12(9): 1432-1440.

130. **Srinivasula, S. M., et al.** CLAP, a novel caspase recruitment domain-containing protein in the tumor necrosis factor receptor pathway, regulates NF-κB activation and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **1999;**274(25): 17946-17954.

131. **Oltvai, Z. N. and S. J. Korsmeyer.** Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell.* **1994;**79(2): 189-192.

132. **Mund, T., et al.** Spike, a novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmic reticulum. *The FASEB Journal.* **2003;**17(6): 696-698.

133. **Adams, J. M. and S. Cory** The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **1998;**281(5381): 1322-1326.

134. **Adams, J. M. and S. Cory.** Apoptosomes: engines for caspase activation. *Current opinion in cell biology* **2002;**14(6): 715-720.

135. **Kluck, R. M., et al.** The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **1997;**275(5303): 1132-1136.

136. **Yang, J., et al.** Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* **1997;**275(5303): 1129-1132.

137. **Adrain, C. and S. J. Martin.** The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in biochemical sciences* **2001;**26(6): 390-397.

138. **Cosulich, S. C., et al. Bcl**-2 regulates amplification of caspase activation by cytochrome c. *Current Biology.* **1999;**9(3): 147-150.

139. **Kim, R.** Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death. *Biochemical and biophysical research communications.* **2005;**333(2).
140. **Knudson, C. M., et al.** Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* **1995;**270(5233): 96-99.

141. **Deckwerth, T. L., et al.** BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron* **1996;**17(3): 401-411.

142. **Anilkumar, U. and J. H. Prehn.** Anti-apoptotic BCL-2 family proteins in acute neural injury. *Frontiers in cellular neuroscience* 2014;8: 281.

143. **Slee, E. A., et al.** Ordering the cytochrome c–initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2,-3,-6,-7,-8, and-10 in a caspase-9–dependent manner. *The Journal of cell biology.* **1999;**144(2): 281-292.

144. **Vogelstein, B., et al**. Surfing the p53 network. *Nature.* **2000;** 408(6810): 307.

145. **Sax, J. and W. El-Deiry** p53 downstream targets and chemosensitivity, *Nature Publishing Group.***2003**

146. **Chipuk, J. E., et al.** Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. *Cancer cell*. **2003;**4(5): 371-381.

147. **Marsden, V. S., et al.** İnitiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature* **2002;**419(6907): 634.

148. **Ko, L. J. and C. Prives**. p53: puzzle and paradigm. *Genes & development* **1996;**10(9): 1054-1072.

149. **Levine, A. J.** p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* **1997;**88(3): 323-331.

150. **Beere, H. M., et al.** Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature cell biology* **2000;**2(8): 469.

151. **Paul, C., et al.** Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Molecular and cellular biology* **2002;**22(3): 816-834.

152. **Stankiewicz, A. R., et al.** Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *Journal of Biological Chemistry*. **2005;**280(46): 38729-38739.

153. **Ola, M. S., et al.** Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry.* **2011;**351(1-2): 41-58.

154. **Czabotar, P. E., et al.** Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews Molecular cell biology* **2014;**15(1): 49.

155. **Brumatti, G., et al.** Crossing paths: interactions between the cell death machinery and growth factor survival signals. *Cellular and molecular life sciences. **2010;***67(10): 1619-1630.

156. **Tait, S. W. and D. R. Green.** Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond." *Nature reviews Molecular cell biology.* **2010;**11(9): 621.

157. **Galluzzi, L., et al.** Regulation of cell death: a phylogenetically conserved control. *Microbial Cell* **2016;**3(3): 101.

158. **Delbridge, A. R., et al.** Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nature reviews Cancer.* **2016;**16(2): 99.

159. **Luna-Vargas, M. P. and J. E. Chipuk**. Physiological and pharmacological control of BAK, BAX, and beyond. *Trends in cell biology.* **2016;**26(12): 906-917.

160. **Aouacheria, A., et al.** Evolution of Bcl-2 homology motifs: homology versus homoplasy. *Trends in cell biology.* **2013;**23(3): 103-111.

161. **Edlich, F., et al.** Bcl-xL retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell.* **2011;**145(1): 104-116.

162. **Garner, T. P., et al.** An autoinhibited dimeric form of BAX regulates the BAX activation pathway. *Molecular cell.* **2016;** 63(3): 485-497.

163. **Schellenberg, B., et al.** Bax exists in a dynamic equilibrium between the cytosol and mitochondria to control apoptotic priming. *Molecular cell.* **2013;**49(5): 959-971.

164. **Cheng, E. H.-Y., et al.** VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* **2003;**301(5632): 513-517.

165. **Lazarou, M., et al.** Inhibition of Bak activation by VDAC2 is dependent on the Bak transmembrane anchor. *Journal of Biological Chemistry* **2010;**285(47): 36876-36883.

166. **Naghdi, S., et al.** "Motifs of VDAC2 required for mitochondrial Bak import and tBid-induced apoptosis." Proceedings of the National Academy of Sciences.**2015**; 112(41): E5590-E5599.

167. **Ma, S., et al.** "Bax targets mitochondria by distinct mechanisms before or during apoptotic cell death: a requirement for VDAC2 or Bak for efficient Bax apoptotic function." Cell death and differentiation **2014**; 21(12): 1925.

168. **Bouillet, P., et al.** Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* **1999;**286(5445): 1735-1738.

169. **Bouillet, P., et al.** BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature.* **2002**;415(6874): 922.

170. **Villunger, A., et al.** p53-and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* **2003;**302(5647): 1036-1038.

171. **Galluzzi, L., et al.** Organelle-specific initiation of cell death. *Nature cell biology.* **2014;**16(8): 728.

172. **Chen, H.-C., et al.** An interconnected hierarchical model of cell death regulation by the BCL-2 family. *Nature cell biology*. **2015;**17(10): 1270.

173. **Dai, H., et al.** Evaluation of the BH3-only protein Puma as a direct Bak activator. *Journal of Biological Chemistry.* **2014;**289(1): 89-99.

174. **Moldoveanu, T., et al.** BID-induced structural changes in BAK promote apoptosis. *Nature structural & molecular biology.* **2013;**20(5): 589.

175. **Dai, H., et al.** Transient binding of an activator BH3 domain to the Bak BH3-binding groove initiates Bak oligomerization. *The Journal of cell biology.* **2011;**194(1): 39-48.

176. **Ren, D., et al.** BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX-and BAK-dependent cell death program. *Science.* **2010;**330(6009): 1390-1393.

177. **Brouwer, J. M., et al.** Bak core and latch domains separate during activation, and freed core domains form symmetric homodimers. *Molecular cell.* **2014;**55(6): 938-946.

178. **Oh, K. J., et al.** Conformational changes in BAK, a pore-forming proapoptotic Bcl-2 family member, upon membrane insertion and direct evidence for the existence of BH3-BH3 contact interface in BAK homo-oligomers. *Journal of Biological Chemistry.* **2010;**285(37): 28924-28937.

179. **Bleicken, S., et al.** Structural model of active Bax at the membrane. *Molecular cell.* **2014;**56(4): 496-505.

180. **Salvador-Gallego, R., et al**. Bax assembly into rings and arcs in apoptotic mitochondria is linked to membrane pores. *The EMBO Journal.* **2016;**35(4): 389-401.

181. **Große, L., et al.** Bax assembles into large ring-like structures remodeling the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *The EMBO Journal*. **2016;**35(4): 402-413.

182. **Gillies, L. A., et al**. Visual and functional demonstration of growing Bax-induced pores in mitochondrial outer membranes. *Molecular biology of the cell.* **2015;**26(2): 339-349.

183. **Rong, Y. and C. W. Distelhorst** Bcl-2 protein family members: versatile regulators of calcium signaling in cell survival and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* **2008**;70: 73-91.

184. **Scorrano, L., et al.** BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca2+: a control point for apoptosis. *Science* **2003;**300(5616): 135-139.

185. **Chen, Y.-b., et al.** Bcl-xL regulates mitochondrial energetics by stabilizing the inner membrane potential. *J Cell Biol.* **2011;**195(2): 263-276.

186. **Green, D. R., et al.** Metabolic control of cell death. *Science.* **2014;**345(6203): 1250256.

187. **Chen, Z. X. and S. Pervaiz.** Bcl-2 induces pro-oxidant state by engaging mitochondrial respiration in tumor cells. *Cell death and differentiation.* **2007;**14(9): 1617.

188. **Clement, M., et al.** Decrease in intracellular superoxide sensitizes Bcl-2-overexpressing tumor cells to receptor and drug-induced apoptosis independent of the mitochondria. *Cell death and differentiation* **2003;**10(11): 1273.

189. **Subburaj, Y., et al.** Bax monomers form dimer units in the membrane that further self-assemble into multiple oligomeric species. *Nature communications* **2015;**6: 8042.

190. **Letai, A., et al.** Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer cell.* **2002;**2(3): 183-192.

191. **Luo, X., et al.** Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* **1998;**94(4): 481-490.

192. **Brunelle, J. K. and A.** Letai. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *Journal of cell science* **2009;**122(4): 437-441.

193. **Radha, G. and S. C. Raghavan.** BCL2: a promising cancer therapeutic target. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer.* **2017;**1868(1): 309-314.

194. **Slee, E. A., et al.** Ordering the cytochrome c–initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2,-3,-6,-7,-8, and-10 in a caspase-9–dependent manner. *The Journal of cell biology.* **1999;**144(2): 281-292.

195. **Maximov, G. and K. Maximov** The role of p53 tumor-suppressor protein in apoptosis and cancerogenesis. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **2008;**22(2): 664-668.

196. **Ashkenazi, A. and V. M. Dixit.** Death receptors: signaling and modulation. *Science.* **1998;**281(5381): 1305-1308.

197. **Flusberg, D. A. and P. K. Sorger** Surviving apoptosis: life–death signaling in single cells. *Trends in cell biology*. **2015;**25(8): 446-458.

198. **Gibert, B. and P. Mehlen.** Dependence receptors and cancer: addiction to trophic ligands. *Cancer research.* **2015;**75(24): 5171-5175.

199. **Strasser, A., et al.** The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity.* **2009;**30(2): 180-192.

200. **Aggarwal, B. B., et al.** Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood.* **2012;**119(3): 651-665.

201. **Wajant, H.** The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*. **2002;**296(5573): 1635-1636.

202. **Mehlen, P. and D. E. Bredesen.** Dependence receptors: from basic research to drug development, American Association for the Advancement of Science. **2011**

203. **Fleten, K. G., et al.** hvTRA, a novel TRAIL receptor agonist, induces apoptosis and sustained growth retardation in melanoma. *Cell death discovery 2.* **2016;**16081.

204. **Boldin, M. P., et al.** Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1-and TNF receptor–induced cell death. *Cell.* **1996;**85(6): 803-815.

205. **Dickens, L. S., et al.** The 'complexities' of life and death: death receptor signalling platforms." *Experimental cell research* **2012;**318(11): 1269-1277.

206. **Muzio, M., et al.** FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3–like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* **1996;**85(6): 817-827.

207. **Chinnaiyan, A. M., et al.** FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell.* **1995;**81(4): 505-512.

208. **Kischkel, F. C., et al.** Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity.* **2000;**12(6): 611-620.

209. **Scott, F. L., et al. The** Fas–FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering. *Nature.* **2009;**457(7232): 1019.

210. **Chan, F. K.-M., et al.** A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*. **2000;**288(5475): 2351-2354.
211. **Fu, Q., et al.** Structural basis and functional role of intramembrane trimerization of the Fas/CD95 death receptor. *Molecular cell.* **2016;**61(4): 602-613.

212. **Brenner, D., et al.** Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nature Reviews Immunology*. **2015;**15(6): 362.

213. **Micheau, O. and J. Tschopp.** Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **2005;**114(2): 181-190.

214. **Ting, A. T. and M. J. Bertrand.** More to life than NF-κB in TNFR1 signaling. *Trends in immunology* **2016;**37(8): 535-545.

215. **Lafont, E., et al.** The linear ubiquitin chain assembly complex regulates TRAIL-induced gene activation and cell death. *The EMBO Journal*. **2017;**36(9): 1147-1166.

216. **Liu, Z.-g., et al.** Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-κB activation prevents cell death. *Cell.* **1996;**87(3): 565-576.

217. **Wong, R. S.** Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research.* **2011;**30(1): 87.

218. **Ott, M., et al.** Mitochondrial targeting of tBid/Bax: a role for the TOM complex? *Cell death and differentiation.* **2009;**16(8): 1075.

219. **Green, D. R. and G. I. Evan.** A matter of life and death. *Cancer cell.* **2002;**1(1): 19-30.

220. **Evan, G. I. and K. H. Vousden.** Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* **2001;**411(6835): 342.

221. **Reed, J. C.** Dysregulation of apoptosis in cancer. *Journal of clinical oncology.* **1999;**17(9): 2941-2941.

222. **Tamm, I., et al.** Apoptosis: implications of basic research for clinical oncology. *The lancet oncology* **2001;**2(1): 33-42.

223. **Hickman, J. A.** Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer and Metastasis Reviews*. **1992;**11(2): 121-139.

224. **Ellis, P. A., et al.** Induction of apoptosis by tamoxifen and ICI 182780 in primary breast cancer. *International Journal of Cancer* **1997;**72(4): 608-613.

225. **Kumar, R., et al.** Apoptosis in mammary gland and cancer. *Endocrine-Related Cancer* **2000;**7(4): 257-269.

226. **Anderson, T.** Pathological studies of apoptosis in the normal breast. *Endocrine-Related Cancer.* **1999;**6(1): 9-12.

227. **Gandhi, A., et al.** Evidence of significant apoptosis in poorly differentiated ductal carcinoma in situ of the breast. *British journal of cancer* **1998;**78(6): 788.

228. **Lipponen, P., et al.** Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *European Journal of Cancer.* **1994;**30(14): 2068-2073.

229. **Allan, D. J., et al.** Reduction in apoptosis relative to mitosis in histologically normal epithelium accompanies fibrocystic change and carcinoma of the premenopausal human breast. *The Journal of pathology.* **1992;**167(1): 25-32.

230. **Mommers, E. C., et al.** Balance of cell proliferation and apoptosis in breast carcinogenesis. *Breast cancer research and treatment.* **1999;**58(2): 163-169.

231. **Fulda, S.** Targeting apoptosis for anticancer therapy. *Seminars in cancer biology, Elsevier*. **2015**

232. **Yıldırım H.** Karbonik anhidraz 9 geninin transkripsiyonel kontrolünün moleküler analizi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Balıkesir: Balıkesir Üniversitesi, **2009.**

233. **Ashour HM:** Antibacterial, antifungal and anticancer activities of volatile oils and extracts from stems, leaves and flowers of Eucalyptus sideroxylon and Eucalyptus torquata. *Cancer Biol Ther* 7: 399-403, **2008.**

234. **Steigerová J., Oklešťková J., Levková M.,** Brassinosteroids cause cell cycle arrest and apoptosis of human breast cancer cells. *Chem Biol Interact.* **2010;** 188(3):487-96

235. **Yu Z, Li W, Liu F.** Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by genistein in colon cancer HT-29 cells*. Cancer Lett.*. **2004** ; 215(2):159-66.

ÖZGEÇMİŞ

21 Aralık 1994 yılında Adana'nın Seyhan ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Adana'da tamamladı. 2012 yılında Toki Anadolu Lisesi'nden mezun oldu ve İnönü Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde lisans eğitimine başladı. Farklı laboratuvarlarda farklı deneyimlerle teorik ve pratik bilgiler edindi. Stajyer olarak ilk deneyimini Haziran-Ağustos 2013 tarihleri arasında Adana Çukurova Üniversitesi'nde Adli Tıp bölümünde gerçekleştirdi. Bunu takiben ikinci stajını 2016 yılının yaz döneminde Erasmus programı bünyesinde University Chemical and Technology/Çek Cumhuriyeti'nde, Mikrobiyoloji laboratuvarında yaptı. 2017 yılında Haziran-Eylül döneminde Fransa, Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC) enstitüsünde mini-beyin organoid üretmek, aynı zamanda hücre kaderi geçişlerini tanımlamak ve master düzenleyicileri tahmin etmek için gen düzenleyici ağların modellenmesiyle ilgili sistem biyolojisi alanında çalıştı. Bünyesinde bulunmuş olduğu çalışmayı Çin'in Xiamen ilinde gerçekleşen AFSP2017 ve Shanghai ilinde gerçekleşen QMB kongrelerinde sundu. 2017 yılında Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans programına başladı. 2018 yaz döneminde ise Fransa, IGBMC ensititüsünde yürütülen 'Prostat kanseri hastaları için kişiselleştirilmiş tıp' başlıklı projede yer aldı. Bu projenin poster sunumunu Almanya'nın Göttingen şehrindeki IMPRS-GS enstitüsünde gerçekleştirdi.