

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



**HİDROJEN PEROKSİT İLE OKSİDATİF STRESE UĞRATILMIŞ  
BEAS-2B HÜCRE HATTINDA *Myrtus Communis* L. YAĞININ  
ANTİOKSİDAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hayriye Zehra ULUTAŞ

**Danışman**

Dr. Öğr. Üyesi Gülay GÜLBOL DURAN

**HATAY-2019**

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

**HİDROJEN PEROKSİT İLE OKSİDATİF STRESE UĞRATILMIŞ  
BEAS 2B HÜCRE HATTINDA *Myrtus Communis* L. YAĞININ  
ANTİOKSİDAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hayriye Zehra ULUTAŞ

**Danışman**

Dr. Öğr. Üyesi Gülay GÜLBOL DURAN

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
18.YL.087 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

**HATAY - 2019**

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

**HİDROJEN PEROKSİT İLE OKSIDATİF STRESE UĞRATILMIŞ BEAS-2B HÜCRE  
HATTINDA *MYRTUS COMMUNIS L.* YAĞININ ANTIOKSIDAN ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Hayriye Zehra ULUTAŞ

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 16.07.2019 günü sözlü olarak yapılan  
tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi:** Jüri başkanı: Prof. Dr. Abdullah ARPACI

Üye: Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Gülay GÜLBOL DURAN

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

16.07.2019

Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

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

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesindeki katkılarından dolayı Moleküler Biyokimya ve Genetik (Tıp) Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Abdullah ARPACI'ya, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Meral URHAN KÜÇÜK'e, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Menderes Yusuf TERZİ' ye

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

Tez çalışmamdaki katkılarından dolayı Arş. Gör. Dr. Hasret ECEVİT'e, laboratuvar aşamasındaki yardımlarından dolayı Moleküler Biyokimya ve Genetik Ana Bilim Dalı yüksek lisans öğrencileri Kübra ERKOÇ ve Cem ABİDOĞLU'na

Her konuda koşulsuz sevgi ve sabırla yanımda olan desteklerini esirgemeyen çok değerli eşime, anneme ve babama, çocuklarım Muharrem Enes ULUTAŞ ve Ahmet Mirza ULUTAŞ'a

Teşekkürlerimi Sunarım.

# İÇİNDEKİLER

|                                                                                        | Sayfa No |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Kabul ve Onay .....                                                                    | II       |
| TEŞEKKÜR.....                                                                          | III      |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                      | IV       |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                  | VI       |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                                | VIII     |
| SİMGELER VE KISALTMALAR .....                                                          | IX       |
| ÖZET .....                                                                             | XII      |
| ABSTRACT.....                                                                          | XIII     |
| 1.GİRİŞ.....                                                                           | 1        |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                                                | 3        |
| 2.1. <i>Myrtus communis</i> L.....                                                     | 3        |
| 2.1.1. <i>Myrtus communis</i> L. Esansiyel Yağ Eldesi ve Kimyasal Kompozisyonları..... | 4        |
| 2.1.2. <i>Myrtus communis</i> L. ve Oksidatif Stres .....                              | 7        |
| 2.2. Apoptozis .....                                                                   | 8        |
| 2.2.1. Apoptozisin Önemi .....                                                         | 8        |
| 2.2.2. Apoptotik Hücrelerin Morfolojik Özellikleri.....                                | 9        |
| 2.2.3. Apoptotik Sinyaller ve Moleküler Mekanizmalar.....                              | 10       |
| 2.2.3.1. Bcl-2.....                                                                    | 10       |
| 2.2.3.2. p53.....                                                                      | 11       |
| 2.2.3.3. Fas .....                                                                     | 12       |
| 2.2.3.4. Kaspazlar.....                                                                | 12       |
| 2.2.4. İntrinsik Apoptozis.....                                                        | 14       |
| 2.2.5. Ekstrinsik Apoptozis .....                                                      | 15       |
| 2.3. Oksidatif Stres.....                                                              | 16       |
| 2.3.1. Malondialdehit (MDA) .....                                                      | 17       |
| 2.3.2. Oksidatif Stres ile Akciğer Hastalıklarının İlişkisi .....                      | 18       |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM .....                                                               | 20       |
| 3.1. Kimyasal Maddeler .....                                                           | 20       |
| 3.2. Kullanılan Cihazlar .....                                                         | 20       |
| 3.3. Hücre Kültürü.....                                                                | 21       |

|                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4. <i>Myrtus communis</i> L. Esansiyel Yağ Dozlarının Hazırlanması .....                         | 21 |
| 3.5. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Dozlarının Hazırlanması .....                                   | 22 |
| 3.6. Hücre Canlılığı Analizi (MTT Testi) .....                                                     | 22 |
| 3.7. Biyokimyasal Analizler .....                                                                  | 23 |
| 3.7.1. Oksidatif Stres Parametre Analizleri .....                                                  | 23 |
| 3.7.2. Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Belirlenmesi .....                                           | 24 |
| 3.7.3. MDA Standart Eğrisi .....                                                                   | 24 |
| 3.7.4. Total Protein Ölçümü .....                                                                  | 25 |
| 3.8. RNA İzolasyonu .....                                                                          | 25 |
| 3.9. cDNA Sentezi .....                                                                            | 27 |
| 3.10. Real Time PCR Analizi .....                                                                  | 28 |
| 3.12. İstatistiksel Analizler .....                                                                | 30 |
| 4. BULGULAR .....                                                                                  | 31 |
| 4.1. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi .....                                                    | 31 |
| 4.2. MDA Düzeylerinin Belirlenmesi .....                                                           | 34 |
| 4.3. Gen Ekspresyon Analizleri .....                                                               | 36 |
| 4.3.1. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'in (40 µM) Kaspaz 3 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi ..... | 36 |
| 4.3.2. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'in (40 µM) Kaspaz 8 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi ..... | 37 |
| 4.3.3. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'in (40 µM) Kaspaz 9 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi ..... | 37 |
| 4.3.4. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'in (40 µM) p21 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi .....      | 38 |
| 5. TARTIŞMA .....                                                                                  | 43 |
| 6. SONUÇ .....                                                                                     | 48 |
| 7. KAYNAKLAR .....                                                                                 | 49 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                                     | 54 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

|                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. Myrtus communis L (Myrtle) bitkisi.....                                                                                                                                                                                                    | 7  |
| Şekil 2.2. Apoptotik ve nekrotik hücre ölümü süreci .....                                                                                                                                                                                             | 10 |
| Şekil 2.3. Bcl-2 ailesi tarafından apoptozisin düzenlenmesi .....                                                                                                                                                                                     | 11 |
| Şekil 2.4. Apoptozis yolları: tetikleyiciler, düzenleyiciler ve efektörler .....                                                                                                                                                                      | 13 |
| Şekil 2.5. İntrinsik ve ekstrinsik apoptozis yolları.....                                                                                                                                                                                             | 14 |
| Şekil 2.6. Serbest radikallerin seviyeleri ile antioksidanlar arasındaki denge.....                                                                                                                                                                   | 17 |
| Şekil 3.1. BEAS-2B Hücre Morfolojisi.....                                                                                                                                                                                                             | 21 |
| Şekil 3.2. MDA standart eğrisi .....                                                                                                                                                                                                                  | 25 |
| Şekil 3.3. Thermal Cycler (T100, BIO-RAD) cihazı .....                                                                                                                                                                                                | 27 |
| Şekil 3.4. Real Time PCR Rotor-Gene Q Cihazı .....                                                                                                                                                                                                    | 29 |
| Şekil 4.1. BEAS-2B hücre hattında farklı dozlarda 24 saatlik H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> maruziyeti sonucu optik dansite grafiği .....                                                                                                              | 31 |
| Şekil 4.2. BEAS-2B hücre hattında farklı dozlarda 24 saatlik H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> maruziyeti sonucu % canlılık grafiği.....                                                                                                                  | 32 |
| Şekil 4.3. BEAS-2B hücre hattında farklı dozlarda 24 saatlik MC esansiyel yağ maruziyeti sonucu optik dansite grafiği.....                                                                                                                            | 33 |
| Şekil 4.4. BEAS-2B hücre hattında farklı dozlarda 24 saatlik MC esansiyel yağ maruziyeti sonucu % canlılık grafiği.....                                                                                                                               | 34 |
| Şekil 4.5. Oksidatif strese maruz bırakılan grup (40µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) ve MC ile tedavi edilen gruptaki (40µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +15,625 µg/ml MC) MDA seviyelerinin, kontrol grubu ile karşılaştırılması.....             | 35 |
| Şekil 4.6. Oksidatif strese maruz bırakılan grup (40µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) ile MC tedavi edilen gruptaki (40µMH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +15,625µg/ml MC) MDA karşılaştırılması.....                                                   | 35 |
| Şekil 4.7. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'in (40µM) Kaspas 3 gen ekspresyonu üzerine etkisi.....                                                                                                                                                      | 36 |
| Şekil 4.8. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (40µM) Kaspas 8 gen ekspresyonu üzerine etkisi .....                                                                                                                                                         | 37 |
| Şekil 4.9. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (40µM) Kaspas 9 gen ekspresyonu üzerine etkisi .....                                                                                                                                                         | 37 |
| Şekil 4.10. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (40µM)'nin p21 geninin ekspresyonu üzerine etkisi .....                                                                                                                                                     | 38 |
| Şekil 4.11. Oksidatif strese maruz bırakılan grup (40µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) ile MC tedavi edilen gruptaki (40µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +15,625µg/ml MC) Kaspaz 3 gen ekspresyon seviyelerinin, kontrol ile karşılaştırılması ..... | 39 |

|                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.12. Oksidatif strese maruz bırakılan grup ( $40 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ) ile MC tedavi edilen gruptaki ( $40\mu\text{M H}_2\text{O}_2+15,625\mu\text{g/ml MC}$ ) Kaspaz 8 gen ekspresyon seviyelerinin, kontrol grubu ile karşılaştırılması..... | 39 |
| Şekil 4.13. Oksidatif strese maruz bırakılan grup ( $40\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ) ile MC tedavili gruptaki ( $40\mu\text{M H}_2\text{O}_2+15,625\mu\text{g/ml MC}$ ) Kaspaz 9 gen ekspresyon seviyelerinin, kontrol grubu ile karşılaştırılması .....      | 40 |
| Şekil 4.14. Oksidatif strese maruz bırakılan grup ( $40\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ) ile MC tedavili gruptaki ( $40\mu\text{M H}_2\text{O}_2+15,625\mu\text{g/ml MC}$ ) p21 gen ekspresyon seviyelerinin, kontrol grubu ile karşılaştırılması.....            | 41 |
| Şekil 4.15. Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9 ve p21 gen ekspresyon seviyelerinin farklı gruptaki değişimi.....                                                                                                                                                   | 41 |
| Şekil 4.16. Kontrol grubu, oksidatif strese maruz bırakılan grup ( $40\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ) ve MC ile tedavi edilen gruptaki ( $40\mu\text{M H}_2\text{O}_2+15,625\mu\text{g/ml MC}$ ) ortalama Ct değerlerinin karşılaştırılması.....                | 42 |



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

|                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 2.1. MC esansiyel yağının bileşenleri.....                                                                                                                                                   | 5  |
| Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler .....                                                                                                                                            | 20 |
| Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan cihazların listesi .....                                                                                                                                           | 20 |
| Çizelge 3.3. cDNA sentez reaksiyonunda kullanılan karışımlar .....                                                                                                                                   | 27 |
| Çizelge 3.4. cDNA reaksiyon koşulları .....                                                                                                                                                          | 28 |
| Çizelge 3.5. qRT-PCR'da kullanılan reaksiyon karışımı ve miktarları.....                                                                                                                             | 29 |
| Çizelge 3.6. qRT-PCR reaksiyon koşulları.....                                                                                                                                                        | 29 |
| Çizelge 4.1. Uygulanan Hidrojen Peroksit dozlarında ortalama optik dansite $\pm$ standart<br>sapma değerleri .....                                                                                   | 32 |
| Çizelge 4.2. Uygulanan MC esansiyel yağ dozlarında ortalama optik dansite $\pm$ standart<br>sapma değerleri .....                                                                                    | 33 |
| Çizelge 4.3. BEAS-2B hücrelerinde uygulanan dozların maruziyeti sonucu MDA .....                                                                                                                     | 36 |
| Çizelge 4.4. Kontrol grubu, 40 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve 40 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +156.25 $\mu$ g/ml MC dozlarının<br>ortalama Ct $\pm$ standart sapma değerleri..... | 42 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                  |                                                                           |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| A1/BFL-1         | BCL2A1; Bcl-2 related protein A1; Bcl-2 ile ilişkili A1 proteini          |
| Apaf1            | Apoptotic protease activating factor-1; apoptotik proteaz aktive faktör-1 |
| Bad              | Bcl-2 associated death promoter; Bcl-2 ilişkili ölüm promotörü            |
| Bak              | Bcl-2 antagonist killer; Bcl-2 antagonist öldürücü                        |
| Bax              | Bcl-2-associated X protein; Bcl-2 ilişkili X proteini                     |
| Bcl-2            | B-Cell CLL/Lymphoma 2                                                     |
| Bcl-W            | BCL2L2; Bcl-2-like protein 2; Bcl-2 benzeri protein 2                     |
| Bcl-XL           | B-Cell lymphoma extra large                                               |
| Bid              | BH3 interacting domain death agonist; BH3 etkileşen ölüm agonisti         |
| Bok              | Bcl-2 related ovarian killer; Bcl-2 ile ilişkili yumurtalık katili        |
| CAD              | Capsase activated deoxyribonuclease; kaspazla aktive deoksiribonükleaz    |
| Ct               | Comparative Treshold                                                      |
| Cu               | Cupper; Bakır                                                             |
| DISC             | Death-inducing signaling complex; ölüm uyarıcı sinyal kompleksi           |
| DISC             | Ölüme neden olan sinyal kompleksi                                         |
| dk               | Dakika                                                                    |
| DMSO             | Dimethyl Sulfoxide; dimetil sülfoksit                                     |
| DNA              | Deoksiribonükleik asit                                                    |
| ER               | Endoplazmik retikulum                                                     |
| FAS              | Yüzey ölüm reseptörü                                                      |
| FBS              | Fetal bovine serum; fetal sığır serumu                                    |
| Fe               | Ferrum; Demir                                                             |
| g                | g-force; g kuvveti                                                        |
| GC-MS            | Gas chromatography-mass spectrometry; gaz kromatografisi-kütle            |
| H <sub>2</sub> O | Su molekülü                                                               |

|                               |                                                                        |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Hidrojen Peroksit                                                      |
| HBSS                          | Hank's balanced salt solution                                          |
| IAP                           | Inhibitors of apoptosis proteins; apoptoz proteinlerinin inhibitörleri |
| ICAD                          | Inhibitor of caspase activated deoxyribonuclease; kaspazla aktive olan |
| KOAH                          | Kronik obstrüktif akciğer hastalığı                                    |
| M                             | Molar                                                                  |
| MC                            | Myrtus communis L.                                                     |
| MDA                           | Malondialdehit                                                         |
| mg                            | Miligram                                                               |
| ml                            | Mililitre                                                              |
| Mm                            | Milimolar                                                              |
| MOM                           | Mitochondrial outer membrane; mitokondriyal dış zar                    |
| MS                            | Mass spectrometry; kütle spektrometresi                                |
| MTT                           | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide           |
| Nm                            | Nanomolar                                                              |
| Nrf2                          | Nuclear factor erythroid 2                                             |
| O <sup>2</sup>                | Süperoksit radikali                                                    |
| OH                            | Hidroksil radikali                                                     |
| Ort                           | Ortalama                                                               |
| p21                           | CDKN1A; cyclin kinase inhibitor 1A; siklin bağımlı kinaz inhibitör 1A  |
| p53                           | TP53; Tumor Protein p53                                                |
| PUFA                          | Çoklu karbon çift bağları içerir                                       |
| PUMA                          | p53 upregulated apoptosis modulator; p53 up-regüle apoptoz modülatör   |
| RCF                           | Relative centrifugal force; nispi merkezkaç kuvveti                    |
| RNA                           | Ribonükleik asit                                                       |
| ROS                           | Reaktif oksijen türleri                                                |
| Rpm                           | Revolutions per minute; dakikadaki devir sayısı                        |

|         |                                                                                                                                   |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SDS     | Sodyum dodesil sülfat                                                                                                             |
| SMAC    | Second mitochondria-derived activator of caspase; mitokondriyen türevli kaspaz aktivatörü                                         |
| sn      | Saniye                                                                                                                            |
| TBA     | Tiyobarbütirik asit                                                                                                               |
| tBid    | Truncated Bid; kesilmiş Bid                                                                                                       |
| TEP     | Tetraetoksipropan                                                                                                                 |
| TNF     | Tumor necrosis factor; tümör nekroz faktörü                                                                                       |
| TNFR    | Tumor necrosis factor receptors; tümör nekrozis faktör reseptörü                                                                  |
| TNFR1   | Tumor necrosis factor receptor 1; tümör nekrozis faktör reseptörü 1                                                               |
| TRAIL   | Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; tümör nekrozis faktör ile ilişkili apoptoz uyarıcı ligand                |
| TRAILR1 | Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing Receptor-1; tümör nekrozis faktör ile ilişkili apoptoz uyarıcı ligand reseptör-1 |
| TRAILR2 | Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing Receptor-2; tümör nekrozis faktör ile ilişkili apoptoz uyarıcı ligand reseptör-2 |
| XIAP    | Apoptosiz protein inhibitörü                                                                                                      |
| µg      | Mikrogram                                                                                                                         |
| µl      | Mikrolitre                                                                                                                        |
| °C      | Santigrat derece                                                                                                                  |

## ÖZET

### **Hidrojen Peroksit ile Oksidatif Strese Uğratılmış BEAS 2B Hücre Hattında *Myrtus Communis* L. Yağının Antioksidan Etkisinin Araştırılması**

Bu çalışmada, *Myrtus Communis* L.(MC) esansiyel yağının, *in vitro* olarak hidrojen peroksit ile oksidatif strese uğratılmış insan bronşiyal epitel hücre hattında (BEAS-2B) antioksidan etkilerinin olup olmadığı, apoptotik yolları tetikleyip tetiklemediği, tetikliyorsa hangi apoptotik yolak üzerinden düzenlendiği araştırılmıştır.

BEAS-2B hücreleri, oksidatif stres modeli oluşturmak için uygun dozun belirlenmesine yönelik 24 saat süreyle 0, 30, 40, 50, 75, ve 100  $\mu$ M  $H_2O_2$ 'ye maruz bırakıldı. MTT yöntemiyle hücre canlılığı analiz edildi. 40  $\mu$ M  $H_2O_2$  ile MC yağının 1000-500-250-125-62.5-31.25-15.625  $\mu$ g/ml dozları 24 saat süreyle inkübe edilip MTT yöntemi ile 15,625  $\mu$ g/ml'nin sitotoksik olmayan doz olduğu tespit edildi. Bu dozlarda oksidatif stres durumu ve apoptotik yolda görevli Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9 ile p21 gen ekspresyonları analiz edilerek sonuçları değerlendirildi.

Kontrol grubu olarak  $H_2O_2$  maruziyeti uygulanmayan sağlıklı hücre grubuyla karşılaştırıldığında, 40  $\mu$ M  $H_2O_2$  maruziyeti uygulanan grupta MDA düzeyinde anlamlı bir artış gözlenirken ( $p=0,0005$ ), MC esansiyel yağı ile tedavi edilen gruptaki MDA düzeyi kontrol grubu ile benzer düzeyde ( $p>0.05$ ) bulunmuştur. MC esansiyel yağı ile tedavi edilen grup,  $H_2O_2$  maruziyetine uğratılmış ile grup ile karşılaştırıldığında MDA düzeyinde anlamlı bir azalma saptanmıştır ( $p=0,2717$ ).

24. saatte 40  $\mu$ M  $H_2O_2$  maruziyeti uygulanan hücrelerde Kaspaz 3, Kaspaz 8 ve p21 genlerinin ekspresyon seviyelerinin sağlıklı hücre grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı (sırasıyla  $p=0.001$ ,  $p=0.017$  ve  $p=0,0003$ ), Kaspaz 9 gen ekspresyon seviyesinin değişmediği ( $p=0.8$ ) saptanmıştır. MC yağı ile tedavi edilen hücrelerde, oksidatif stres modelinin oluşturulduğu gruba göre p21, Kaspaz 8 ve Kaspaz 9 gen ekspresyon seviyelerinde bir değişiklik gözlenmezken ( $p>0.05$ ), Kaspaz 3 gen ekspresyon seviyesinde anlamlı şekilde azaldığı saptanmıştır ( $p=0.00007$ ).

Çalışmamızda, MC esansiyel yağının 15,625  $\mu$ g/ml dozda oksidatif stres üzerinde MDA seviyesini güçlü şekilde azaltıcı etkisi olduğu, ayrıca aynı dozda Kaspaz 3 gen ekspresyonunun azaltılması ile apoptozu durdurucu bir etki göstererek, teröpatik ajan olarak potansiyeli olduğu gösterildi.

Sonuç olarak MC yağının güçlü bir antioksidan etkiye sahip olduğu, oksidatif stresten kaynaklanan apoptozisin geri çevirilmesinde de etkili olduğu düşünülmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** *Myrtus comunis* L yağı, Apoptoz, BEAS-2B hücreleri, oksidatif stres

## ABSTRACT

### Investigation Of Antioxidant Effect Of Myrtus Communis L. Oil In BEAS 2B CELL Line Where Hydrogen Peroxide And Oxidative Stress-Discharged

The study investigated whether the essential oil of Myrtus Communis L. (MC) has antioxidant effects in human bronchial epithelial cell line (BEAS-2B) that was exposed to oxidative stress in vitro by hydrogen peroxide, and whether it triggers apoptotic pathways and which apoptotic pathway is regulated.

BEAS-2B cells were exposed to 0, 30, 40, 50, 75, and 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 hours to determine the appropriate dose to form an oxidative stress model. Cell viability was analyzed by MTT method. 40  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  and 1000 - 500 - 250 - 125-62.5-31.25-15.625  $\mu\text{g/ml}$  doses of MC oil were incubated for 24 hours and 15.625  $\mu\text{g/ml}$  was determined as non-cytotoxic by the MTT method. At these doses, oxidative stress status and caspase 3, caspase 8, caspase 9 and p21 gene expression in apoptotic pathway were analyzed and the results were evaluated.

When the control group was compared with healthy cell group without  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 40 $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  exposure group showed a significant increase in MDA level ( $p=0.0005$ ), whereas the level of MDA in MC essential oil which were treated group was similar to the control group ( $p>0.05$ ). The group which was treated with MC essential oil had a significant decrease in MDA levels compared to the group which was exposed to  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $p=0.2717$ ).

Expression levels of Caspase 3, Caspase 8 and p21 genes were significantly increased in cells which were treated with 40  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  at 24 h ( $p=0.001$ ,  $p=0.017$  and  $p=0.0003$ , respectively). Caspase 9 gene expression level did not show any change ( $p=0.8$ ). While there was no change in p21, Caspase 8 and Caspase 9 gene expression levels in MC treated cells with respect to oxidative stress model ( $p>0.05$ ), Caspase 3 gene expression level decreased significantly ( $p=0.00007$ ).

In our study, MC essential oil has a potent reducing effect on MDA level on oxidative stress at dosage of 15,625  $\mu\text{g/ml}$  in addition to a strong potential as a therapeutic agent by inhibiting apoptosis by decreasing Caspase 3 gene expression at the same dose.

As a result, MC oil has a strong antioxidant effect and it is thought to be effective in reversing apoptotic mechanisms that were caused by oxidative stress.

**Keywords:** Myrtus comunis L oil, Apoptosis, BEAS-2B cells, oxidative stress

## 1.GİRİŞ

Myrtle (*Myrtus communis* L; MC), Myrtaceae familyasına ait yaprak dökmeyen bir bitkidir. Akdeniz bölgesinde kendiliğinden büyür ve eski zamanlardan beri yiyecek ve baharat amaçlı kullanılmaktadır. Ayrıca tıbbi olarak kullanımı da yaygındır. Yapraklar ve meyveler geleneksel olarak antiseptik, dezenfektan ve hipoglisemik ajanlar olarak kullanılmaktadır (Hayder ve ark. 2004). Murt ve mersin bitkisi olarak anılmasının yanı sıra Hatay ilinde "hambeles" ismi ile bilinen MC özellikle Türkiye, Yunanistan, İtalya, Cezayir, Tunus ve Fas gibi Akdeniz ülkelerinde yaygın olarak görülmektedir (Aydın ve Özcan 2007). Halk hekimliğinde, bitkinin meyvesi, ishal ve dizanteri dahil olmak üzere çeşitli bulaşıcı hastalıkların tedavisinde kullanılır; yapraklar, yaraları iyileştirmek için kandidiyazın tedavisinde antiseptik ve antienflamatuar madde olarak kullanılmaktadır (Mansouri ve ark. 2001). Bitkinin halk arasında göze çarpan özelliği, yapraklarındaki sayısız bezde bulunan uçucu yağının hoş kokusudur. Yağ bileşimi bitkinin coğrafi kökeninden oldukça fazla etkilenir. Konuyla ilgili çok sayıda yayınlanmış bilimsel makaleye göre, esansiyel yağı, kozmetik, ilaç ve gıda endüstrisi için, onu değerli bir hammadde yapan güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahiptir (Cakir 2004, Gardeli ve ark. 2008).

Çeşitli oksidan moleküllerin seviyeleri ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik olarak tanımlanan oksidatif stresin, birçok organizmada, çoğu biyokimyasal değişime ve dolayısıyla ciddi hastalıklara neden olduğuna dair kanıtlar artmaktadır (Smith ve ark. 2002). Oksidatif stres, sitotoksik ve genotoksik etkilere yol açarken, lipitler, proteinler ve DNA gibi temel biyomoleküllere zarar verebilir (Olinski ve ark. 2002). Günümüzde mutajenitenin ve reaktif oksijen türlerinin diğer olumsuz etkilerinin yaşlanma, ateroskleroz, kanser, diyabet ve çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda yer aldığı açıktır. Son yirmi yılda doğal antioksidanlar üzerinde çok durulmaktadır (Mimica-Dukic ve ark. 2003, Hayder ve ark. 2008). Pek çok uçucu yağ ve bileşenleri, son zamanlarda doğal antioksidanlar olarak nitelendirilmekte ve sentetik antioksidanlara potansiyel bir alternatif olarak önerilmektedir.

Bu çalışmada *in vitro* ortamda hidrojen peroksit ile oksidatif strese uğratılmış BEAS-2B İnsan Bronşiyal Epitel Hücresinde, *Myrtus Communis* L. yağının, oksidatif hasardan

kaynaklı indüklenmiş apoptotik yolları baskılayıp baskılamadığı, dolayısıyla antiapoptotik ve antioksidan etkileri araştırılmıştır.





## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Myrtus communis* L.

*Myrtus communis* L (Myrtle, Mersin, MC), Akdeniz havzasına özgü Myrtaceae familyasına ait önemli aromatik ve tıbbi türlerden biridir. Genelde mersin olarak bilinen *Myrtus communis*, Kuzey Yarımküre'de bulunan cinsin tek türüdür. *Myrtus* cinsi ılıman, tropik ve subtropikal bölgelerde yetişen yaklaşık 100 cins ve 3000 tür içerir. Bu yaprak dökmeyen çalı yaklaşık 1–5 m yüksekliğe kadar ulaşırken, 0–600 m yükseklikte yabani olarak büyür. Korsika'da yabani olarak yetişen, Akdeniz ülkelerinde bitkisel ilaçlarda yaygın olarak kullanılır. Beyaz çiçekleri olan tipik bir Akdeniz çalısıdır (Traveset ve ark. 2001, Tumen ve ark. 2011).

*Myrtus communis* L. antik çağlardan beri baharat ve yiyecek hazırlama amaçlı olarak kullanılmasının yanı sıra tıbbi ajan olarak da kullanılmaktadır. Baharat olarak Myrtle, acı tadından dolayı, hoş kokusuna rağmen geniş bir uygulama alanı bulamamaktadır. Tadının çok yoğun, oldukça nahoş ve çok acı olması nedeniyle mutfak uygulaması İtalya gibi bölgeler ile sınırlıdır (Gortzi ve ark. 2007). İtalya'da, özellikle Sardunya'da meyveler ve yapraklar, iyi bilinen içki likörü üretmek için kullanılır. *Myrtus communis* L. dumanı ile tütüleştirilerek tatlandırılmış yiyecekler İtalya'nın kırsal bölgelerinde yaygındır. Bitkinin bazı kısımları, gıda endüstrisinde et ve sosları tatlandırmak için kullanılır, meyveleri ve yaprakları likörlerin endüstriyel formülasyonunda kullanılır (Chalchat ve ark. 1998).

Yapraklar çok kokulu olup parfüm ve kozmetik endüstrisinde, özellikle Portekiz ve Türkiye'de yaygın olarak kullanılmaktadır. Geleneksel olarak antiseptik, dezenfektan ve hipoglisemik ajan olarak kullanılır. Türkiye'de mersin yaprakları ve meyveler köylerde antiseptik bir ilaç olarak kullanılmaktadır (Tumen ve ark. 2011). Benzer şekilde, İtalyan halk tıbbında, bu bitkinin meyvesi, ishal ve dizanteri dâhil olmak üzere birçok bulaşıcı hastalığın tedavisinde kullanılır. Yaprakların kandidiyazis tedavisi için antiseptik ve antienflamatuar olarak kullanılmasının yanı sıra, gargara olarak da kullanıldığı bilinmektedir.

Yapraklarından elde edilen esansiyel yağ akciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Yapraklardan ve genç dallardan yapılan infüzyonlar uyarıcı, antiseptik ve hipoglisemik ajan olarak kullanılırken ve astım, egzama, sedef hastalığı, diyare,

gastrointestinal bozukluklar ve idrar enfeksiyonları için ilaç olarak kabul edilmektedir (Gortzi ve ark. 2007).

### **2.1.1. *Myrtus communis* L. Esansiyel Yağ Eldesi ve Kimyasal Kompozisyonları**

*Myrtus communis* L. 'niniçeriğinin en kuvvetli olduğu hali çiçeklenme dönemidir. Hatay ilinde toplanan ve kurutma fırınlarında 35°C'de nemi uzaklaştırılıp kurutulur. Neoclevenger aparat sayesinde hidrodistilasyon metoduyla esansiyel yağ oranları belirlenir. Bu uygulamayı yapabilmek için 100 g kuru bitki clevenger cihazının balonuna konulur, balona bitki miktarının 10 katı kadar (1000 ml) saf su eklenir ve mantolu ısıtıcı üzerinde balon içeriğinin kaynama noktasına gelmesi beklenir. Kaynama sırasında, esansiyel yağlar su buharı ile birlikte buharlaşarak balonun üstüne yerleştirilmiş olan ve soğuk su sirkülasyonu ile soğutulan soğutucuya ilerler. Soğutucuya temas eden buhar yoğunlaşarak damla damla toplama ünitesinde birikir. Hidrodistilasyona, bitkisel materyal kaynamaya başladıktan sonra 3 saat süreyle devam edilip süreç tamamlandıktan sonra toplama ünitesinde biriken uçucu yağ koyu renkli şişelere aktarılır.

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

**Çizelge 2.1.** MC esansiyel yağının bileşenleri

| RT    | Bileşen Adı                                                               | SI  | RSI | Cas #      | % Alan |
|-------|---------------------------------------------------------------------------|-----|-----|------------|--------|
| 3,41  | $\alpha$ -Pinene                                                          | 985 | 986 | 80-56-8    | 29,56  |
| 4,49  | Isobutylisobutyrate                                                       | 991 | 992 | 97-85-8    | 0,34   |
| 4,76  | $\beta$ -Pinene                                                           | 983 | 993 | 127-91-3   | 0,28   |
| 6,01  | Myrcene                                                                   | 973 | 981 | 123-35-3   | 0,11   |
| 6,85  | Limonene                                                                  | 980 | 995 | 138-86-3   | 8,16   |
| 7,05  | Eucalyptol                                                                | 989 | 989 | 470-82-6   | 31,20  |
| 8,17  | $\gamma$ -Terpinene                                                       | 960 | 977 | 99-85-4    | 0,26   |
| 8,42  | Ocimene                                                                   | 973 | 983 | 3779-61-1  | 0,10   |
| 8,96  | p-Cymene                                                                  | 964 | 964 | 99-87-6    | 0,30   |
| 9,3   | Terpinolene                                                               | 933 | 934 | 586-62-9   | 0,18   |
| 19,1  | Linalool                                                                  | 982 | 982 | 78-70-6    | 11,76  |
| 19,34 | Linalylacetate                                                            | 982 | 984 | 115-95-7   | 1,46   |
| 20,87 | Terpinen-4-ol                                                             | 979 | 981 | 562-74-3   | 0,20   |
| 23    | $\alpha$ -Humulene                                                        | 966 | 972 | 6753-98-6  | 0,18   |
| 23,44 | Estragole                                                                 | 978 | 988 | 140-67-0   | 0,33   |
| 23,95 | trans-Sabinol                                                             | 885 | 890 | 471-16-9   | 0,10   |
| 24,27 | $\alpha$ -Terpinylacetate                                                 | 968 | 985 | 80-26-2    | 1,17   |
| 24,43 | $\alpha$ -Terpineol                                                       | 991 | 993 | 98-55-5    | 7,19   |
| 25,35 | 2-Hydroxycineol                                                           | 839 | 874 | 18679-48-6 | 0,12   |
| 25,57 | Nerylacetate                                                              | 955 | 959 | 141-12-8   | 0,19   |
| 26,67 | Geranylacetate                                                            | 991 | 991 | 105-87-3   | 2,44   |
| 28,21 | Nerol                                                                     | 969 | 976 | 106-25-2   | 0,10   |
| 29,89 | Geraniol                                                                  | 971 | 972 | 106-24-1   | 0,61   |
| 33,72 | Caryophylleneoxide                                                        | 956 | 978 | 1139-30-6  | 0,12   |
| 35,41 | Anisylacetone                                                             | 953 | 960 | 104-20-1   | 0,68   |
| 35,56 | Humuladienone                                                             | 838 | 859 | NA         | 0,21   |
| 35,89 | Cineralone                                                                | 787 | 892 | 17190-74-8 | 0,60   |
| 39,23 | 1,2,4-Cyclopentanetrione, pentenyl                                        | 767 | 864 | 54644-27-8 | 0,11   |
| 40,58 | Docosane, 11-decyl-                                                       | 643 | 644 | 55401-55-3 | 0,19   |
| 43,26 | Caryophylleneoxide                                                        | 873 | 897 | 1139-30-6  | 0,11   |
| 43,79 | Methyl4-[[[(2E)-3',7'-dimethyl-5'-oxo-3',6'-octadienyl]oxy]-3-OH benzoate | 609 | 933 | NA         | 0,35   |
| 48,85 | Pyrrolidine, 1-(1,6-dioxooctadecyl)-                                      | 660 | 733 | 56630-89-8 | 0,26   |

\*RT: Retention time

MC'nin çeşitli yerlerinden elde edilen uçucu yağın bileşenleri, kimyasal olarak temel üç kategoriden oluşur: terpenler (monoterpen hidrokarbonlar ve seskiterpen hidrokarbonlar), terpenoitler (oksijenli monoterpenler ve oksijenli seskiterpenler) ve fenilpropanoidler

(Kanoun ve ark. 2014). MC yağında bulunan bileşikler arasında E-2-heksenal, Z-3-heksenal, trisiklen, a-thujene, a-pinen, sabinen,  $\beta$ -pinen, mirsen,  $\delta$ -3-karen, a-terpinen, p-cymene, limonen, 1,8-cineole, E- $\beta$ -okimen, linalool E-oksit, terpinolen, linalool, a-terpineol, myrtenol ve öjenol bulunmaktadır (Gardeli ve ark. 2008). Geleneksel olarak, mersin bitkisinden elde edilen esansiyel yağ ve ham özütler farmasötik, kozmetik ve gıda endüstrilerinde çeşitli preparatlarda kullanılır. Bu uygulamalar, karakteristik uçucu bileşenlerin varlığı nedeniyle mümkündür (Messaoud ve ark. 2012).

MC yağının içeriğindeki kimyasallar aşağıda belirtildiği üzere çeşitli olup herbirinin etkinliği farklılık arz etmektedir (Wagih 2015, Aldrich 2019) :

- **E-2-heksenal:**parfüm ve aromalar için en basit düz zincirli doymamış aldehittir. Birçok bitkinin yeşil yapraklarından elde edilen uçucu yağlarda bulunur.
- **Z-3-heksenal:**Çoğu bitki tarafından küçük miktarlarda üretilir ve birçok yırtıcı böceğe çekici gelir.
- **a-thujene:**Çeşitli bitkilerin esansiyel yağlarında bileşenlerin önemli bir bölümünü oluşturur.
- **a-pinen:**  $\alpha$ -Pinen birkaç uçucu yağda görülür ve antienflamatuar ve antimikrobiyal özellikler gösterir ve geniş spektrumlu bir antibiyotik görevi görür.
- **Sabinen:** Bu, çeşitli bitki türlerinin uçucu yağlarından izole edilen bir monoterpendir. Bitki metaboliti olarak bir rolü vardır.
- **$\beta$ -pinen:** Beta-pinen, ekzosiklik bir ikili bağa sahip bir pinenin izomeridir. Birçok bitkiden elde edilen uçucu yağların bir bileşenidir. Bitki metaboliti olarak rol oynar.
- **Mirsen:** Mysen veya  $\beta$ -mysen, olefinik bir doğal organik hidrokarbondur. Monoterpen olarak sınıflandırılır.
- **$\delta$ -3-karen:** Bir monoterpendir. Tatlı ve keskin bir kokuya sahiptir. Suda çözünür değildir, fakat yağ ve yağlarla karışabilir.
- **a-terpinen:** İki çift bağının pozisyonunda farklı üç izomerik monoterpen'den biridir.
- **p-cymene:** Doğal olarak oluşan bir aromatik organik bileşiktir. p-Cymene suda çözünmez, ancak organik çözücüler ile karışabilir.
- **Limonen:** Metil-4 izopropenil-1 sikloheksen maddesinin yaygın adı. Bitkilerde çok yaygın olarak bulunan bir hidrokarbondur.
- **1,8-cineole:** Bir monoterpen ve sikloheksanol türevidir

### 2.1.2. *Myrtus communis* L. ve Oksidatif Stres

Sentetik antioksidanların kanserojen etkileri nedeniyle, insan uygulamaları için kullanımları sınırlandırıldığından, doğal kaynaklı antioksidanlara ilgi artmaktadır. *Myrtus communis* L. gibi aromatik ve şifalı bitkiler, fenilpropanoidler ve uçucu yağlar gibi sekonder metabolitlerin aktivitesi nedeniyle doğal bir antioksidan kaynağıdır. Bu bitki esansiyel yağları ve özleri binlerce yıldan beri gıdaların korunmasında kullanılmıştır. Bitki özlerinin antioksidan kapasitesinin fenolik içerikle güçlü bir şekilde ilişkili olduğu iyi bilinmektedir.



Şekil 2.1. *Myrtus communis* L (Myrtle) bitkisi (Sindh 2019)

Fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri, indirgeyici ajanlar, hidrojen bağışçılar, tekli oksijen söndürücüler olarak etki etmelerini sağlayan redoks özelliklerine bağlanmaktadır (Gardeli ve ark. 2008). Kumar ve arkadaşları *Myrtus communis* L yapraklarından ve bitkinin diğer kısımlarından elde edilen farklı ekstraktların ve bileşiklerin antioksidan aktiviteleri olduğunu bildirmişlerdir (Kumar ve ark. 2011). *Myrtus communis* L. meyvelerinde antiradikal/antioksidan kapasite ile toplam fenol miktarı arasında çok yüksek bir korelasyon olduğu ortaya koyulmuştur (Montoro ve ark. 2006).

Yapraklardan ve çiçeklerden elde edilen MC metanol ekstraktları, radikal süpürme, karoten-linoleik asit ağartma ve metal şelatlama aktivite analizleri kullanılarak diğer esansiyel yağlarla karşılaştırıldığında daha iyi antioksidan aktivite göstermiştir (Aidi Wannes ve ark. 2010). Ham özütler, etil asetat fraksiyonu, bütanol fraksiyonu, tanenler ve MC yaprağı, gövdesi ve meyvesinden elde edilen antosiyaninler de antioksidan kapasiteleri incelenmiştir. Esansiyel MC yağın infüzyon zamanına göre değişkenlik gösteren önemli

antioksidan özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir (Messaoud ve ark. 2012). Bu veriler ekstraktan elde edilen MC esansiyel yağının potansiyel bir doğal antioksidan kaynağı olduğunu ve bu nedenle gıda ürünlerinde ve doğal sağlık ürünlerinde bir gıda dengeleyicisi olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

## **2.2. Apoptozis**

On dokuzuncu yüzyılın ortasından bu yana, birçok çalışma, hücre ölümünün embriyogenez, metamorfoz ve çok hücreli organizmaların fizyolojik süreçleri sırasında önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Lockshin ve Zakeri 2001). Programlanmış hücre ölümü terimi, 1964'te, gelişim sırasındaki hücre ölümünün tesadüfi olmadığını, kendi kendini imha etmeye yol açan bir dizi kontrollü adım izlediği öne sürülerek, ortaya atılmıştır (Lockshin ve Williams 1964). Sonunda, apoptozis terimi, hücre kendi kendini imha etmeye yol açan morfolojik süreçleri tanımlamak için ilk olarak Kerr, Wyllie ve Currie tarafından yayınlanan bir çalışmada kullanılmıştır (Kerr ve ark. 1972).

Apoptozis, ağaçlardan düşen yapraklara veya çiçeklerden düşen yapraklara benzeyen "*düşme*" anlamına gelen Yunan kökenli bir kelimedir. Bu benzetme, canlı maddenin ölümünün organizmaların yaşam döngüsünün ayrılmaz ve gerekli bir parçası olduğunu vurgulamaktadır. Apoptotik hücre ölümü, çok hücreli organizmaların gelişiminde ve dokulardaki hücre popülasyonlarının fizyolojik ve patolojik koşullar üzerine düzenlenmesi ve korunmasında önemli rol oynayan aktif ve tanımlanmış bir süreçtir. Apoptozisin iyi tanımlanmış ve programlanmış hücre ölümünün en sık görülen şekli olduğu, ancak diğer apoptotik olmayan hücre ölümünün önemi vurgulanmalıdır (Leist ve Jattle 2001).

### **2.2.1. Apoptozisin Önemi**

Çok hücreli biyolojik sistemlerin gelişimi ve bakımı, organizmayı oluşturan hücreler arasındaki karmaşık bir etkileşime dayanır, hatta bazen tek tek hücrelerin organizma lehine fedakar bir davranış içerdiği görülmektedir. Gelişim sırasında, sonunda programlanmış

hücre ölümüne uğrayan ve böylece birçok organ ve dokunun şekillenmesine katkıda bulunan birçok hücre fazla üretilir (Meier ve ark. 2000).

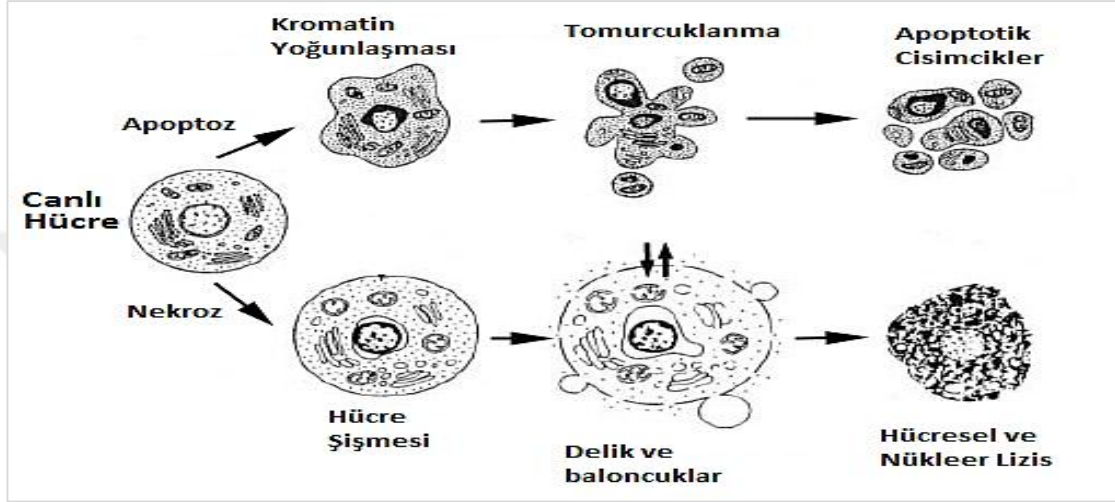
Başlangıçta oluşturulan nöronların yarısının erişkin beyin oluştuğunda ileriki aşamalarda ölmesi bir diğer apoptozis örneğidir (Hutchins ve Barger 1998). Ayrıca yetişkin bir organizmanın hücreleri, sürekli hücre sayıları bakımından homeostazı korumak için proliferasyonla dengelenmesi gereken fizyolojik hücre ölümüne uğrar. Gelişmekte olan lenfositlerin çoğunluğu, ya antijen reseptörünün oluşumundaki genetik yeniden düzenleme olayları sırasında, negatif seleksiyon sırasında ya da periferde ölür, böylece işlevsel fakat kendi kendine reaktif olmayan bağışıklık hücreleri sıkı bir şekilde kontrol edilir (Rathmell ve Thompson 2002). Apoptotik programın işlev bozukluğu veya düzensizliği, çeşitli patolojik durumlarda ortaya çıkar. Apoptozisdeki bozukluklar kansere, otoimmün hastalıklara ve viral enfeksiyonların yayılmasına neden olabilirken, nörodejeneratif bozukluklar, AIDS ve iskemik hastalıklar aşırı apoptozise neden olur (Fadeel ve ark. 1999).

### **2.2.2. Apoptotik Hücrelerin Morfolojik Özellikleri**

Apoptotik hücreler morfolojik değişikliklerle tanınabilir: hücre küçülür, deformasyon gösterir ve komşu hücrelerine temasını kaybeder. Kromatini nükleer membranda yoğunlaşır, plazma zarı tomurcuklanır ve son olarak hücre, sitozol, yoğunlaştırılmış kromatin ve organelleri içeren '*apoptotik cisimler*' adı verilen kompakt membranla kaplı yapılar halinde parçalanır (Baines 2010). Apoptotik cisimler makrofajlar tarafından yutulur ve böylece inflamatuvar bir tepkiye neden olmadan dokudan çıkarılır. Bu morfolojik değişiklikler apoptotik bir hücrede meydana gelen karakteristik moleküler ve biyokimyasal olayların bir sonucudur. En önemlisi, sonunda DNA'nın oligonükleozomal fragmanlara bölünmesine aracılık eden proteolitik enzimlerin aktivasyonunun yanı sıra, genellikle sitoplazmanın veya organellerin bütünlüğünü ve şeklini belirleyen çok sayıda protein substratının bölünmesini de sağlar (Saraste 2000).

### 2.2.3. Apoptotik Sinyaller ve Moleküler Mekanizmalar

Genel olarak apoptozisin düzenlenmesinde kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküller, p53, kaspazlar, sitokrom-c gibi proteinler ve mitokondriyonlar rol oynarlar (Gozuacik ve Kimchi 2007).



Şekil2.2. Apoptotik ve nekrotik hücre ölümü süreci (Van Cruchten ve Van Den Broeck 2002)

#### 2.2.3.1. Bcl-2

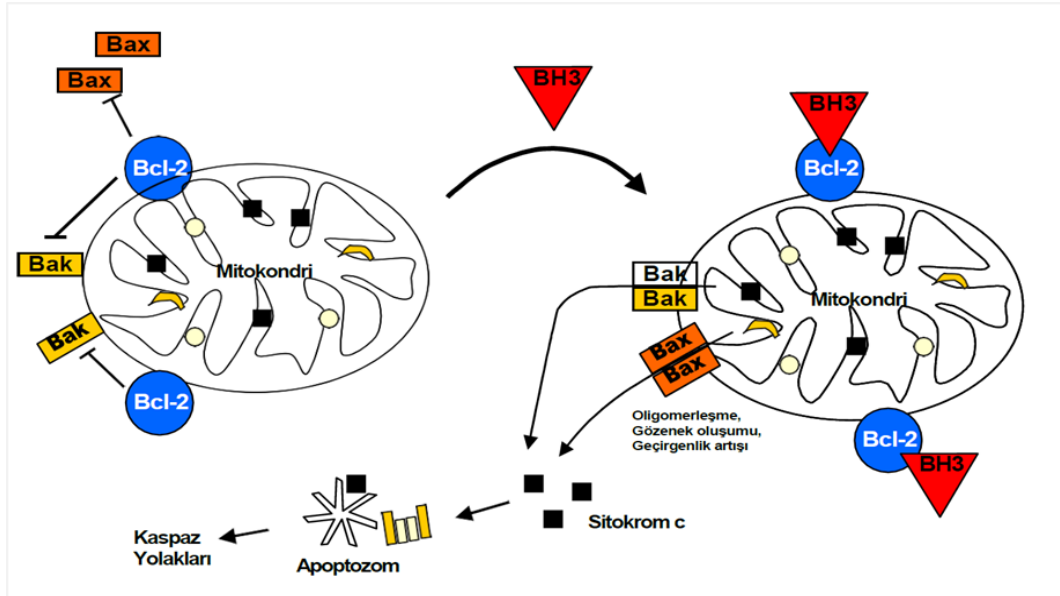
Otuz yıl önce, B hücresi lösemisinde ve foliküler lenfoma hücrelerinde Bcl-2'nin aşırı ekspresyonuna yol açan immüoglobulin ağır zinciri ve Bcl-2 lokuslarının füzyonu ile sonuçlanan yeni bir translokasyon bildirilmiştir (Adams ve Cory 2001). Daha sonra Bcl-2'nin apoptozu inhibe ederek bu hücrelerin sağkalımını arttırdığı gösterilmiştir. Bcl-2'ye değişen derecelerde homolojiye sahip ek genlerin, hem anti-apoptotik hem de pro-apoptotik proteinleri de kodladığı tanımlanmıştır (Adams ve Cory 2017). Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w içeren anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri, Bcl-2 homolojisiinde yapısal homolojiyi paylaşır. Apoptotik uyarıcılar, sadece BH<sub>3</sub> proteinlerinin düzenlenmesine ve/veya anti-apoptotik bcl-2 ailesi proteinlerinin down regülasyonuna yol açar (Adrain ve Martin 2001).

Pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 familyası proteinleri arasındaki etkileşimlerin karmaşık ağı, mitokondriyal apoptotik cevabı sıkı bir şekilde düzenleyerek, normal hücresel işlevsellik sırasında istenmeyen hücre ölümünü önlerken, spesifik uyarılara hızlı bir tepki



verilmesini sağlar (Ashkenazi ve ark. 2017). Bcl-2 familyası protein etkileşimlerinin bağlanma afiniteleri, farklı doku ve hücre tiplerinde ekspresyon profillerindeki farklılıklar nedeniyle değişkendir (Vogler ve ark. 2017). Bu karmaşıklık, farklı kanser tiplerinde apoptozun düzenlenmesinde bireysel Bcl-2 familyası proteinlerinin kesin rollerinin aydınlatılmasında bir takım zorluklar ortaya koyar, aynı zamanda bu proteinleri doğrudan hedef alan terapötik yöntemler için yüksek bir özgüllük derecesinin olabileceğini düşündürmektedir (Delbridge ve ark. 2016, Adams ve Cory 2017).

Anti-apoptotik Bcl-2 familyası proteinlerinin aşırı ekspresyonu birçok kanserde gözlenir ve bu aşırı ekspresyon kromozomal translokasyonlar, gen amplifikasyonu, artan gen transkripsiyonu veya değiştirilmiş translasyon sonrası işleminden kaynaklanabilir (Moldoveanu ve ark. 2014). Belirli bir hedefe yönelik tedaviye minimal bir apoptotik cevap zayıf bir klinik tepkiye dönüşüyorsa, spesifik olarak apoptotik düzenleyicileri hedef alan ilaçların apoptotik tepkinin artırılması ve klinik sonuçların iyileştirilmesi için yararlı olabileceği düşünülür (Petros ve ark. 2004). Bu nedenle, anti-apoptotik Bcl-2 familya üyelerinin doğrudan inhibisyonu, bu proteinlerin belirgin şekilde aşırı ekspresyonu olan kanserlerde faydalı olabilir (Czabotar ve ark. 2013). Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerini inhibe eden ajanlar, anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin BH<sub>3</sub> ile etkileşimi bozma görevi görür, bu nedenle "BH<sub>3</sub> mimetikleri" olarak bilinirler.



Şekil 2.3. Bcl-2 ailesi tarafından apoptozisin düzenlenmesi (Gewies 2003)

#### 2.2.3.2. p53

Tümör baskılayıcı gen kabul edilen p53, kanserde en çok susturulmuş veya mutasyona uğramış gendir (Mirzayans ve ark. 2012). Normal şartlar altında, p53 seviyeleri düşüktür ve bazı durumlarda tespit edilemez (Williams ve Schumacher 2016). Bununla birlikte, DNA hasarı, onkogen aktivasyonu ve hipoksi gibi stres sinyalleri, p53 proteinini stabilize eder ve fosforilasyon, asetilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlarla hücresel p53 seviyelerini artırır. Aktive p53, hücre döngüsü durması veya apoptoz da dahil olmak üzere çeşitli tepkilere neden olarak tümör gelişmesine karşı kritik bir bariyer sağlar (Reinhardt ve Schumacher 2012).

Bir transkripsiyon faktörü olarak, aktive p53, düzenleyici bölgelerinde p53 bağlama bölgeleri içeren bir dizi gene bağlanır (Vousden ve Lu 2002). p53 mitokondriyal ve ölüm reseptörünün neden olduğu apoptotik yolları aktive ederek hücre apoptozisine aracılık eder (Achanta ve Huang 2004). Ortaya çıkan kanıtlar, p53'ün hücre döngüsü durması veya apoptoza neden olmadan, metabolizma ve hücre homeostazının düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir. p53 ayrıca normal hücrelerde ve dokularda metabolizmayı ve hücre homeostazını düzenler (Mirzayans ve ark. 2012).

#### **2.2.3.3. Fas**

CD95 veya APO-1 olarak da bilinen Fas, tümör nekroz faktörü ailesinin bir üyesidir. Her ne kadar apoptotik işlevi açısından en iyi şekilde tanımlanmış olsa da, son çalışmalar Fas'tan yayılan diğer bazı hücresel tepkileri tanımlamıştır. Bu tepkiler göç, istila, iltihaplanma ve çoğalmayı içerir (Curtin ve Cotter 2003). Terapötik olarak hedefleyici Fas'ın başarısı, reseptör aktivasyonunun ardından düzenleyici mekanizmaların yanı sıra, bu yolların daha iyi anlaşılmasını gerektirir. Fas hücre yüzeyinde kendi reseptörüne (Fas Ligandı=FasL) bağlanır ve reseptör trimerizasyonunu sağlar (Krammer 1998).

#### **2.2.3.4. Kaspazlar**

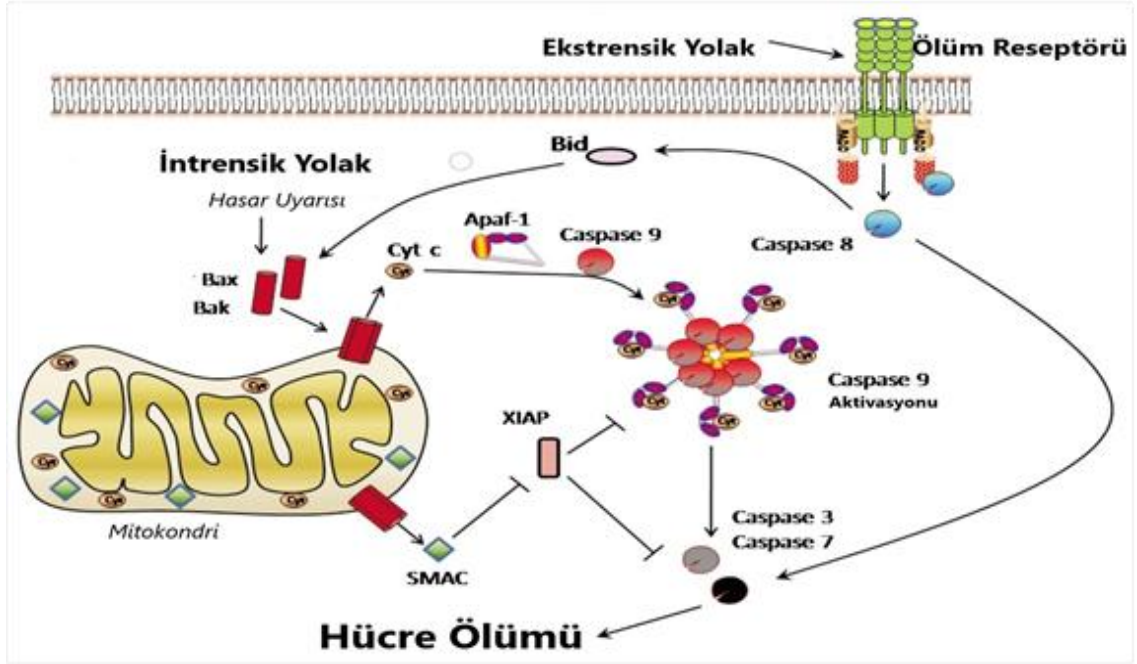
Hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptoz, aspartat spesifik sistein proteaz (kaspaz) familyasının üyelerinin aktivasyonuna dayanan işlemlerdir (Shalini ve ark. 2015).

Apoptozisin intrinsik veya mitokondriyal yolunda efektör kaspazlar, mitokondriyal dış membran geçirgenliğini (MOMP) içeren bir sinyal kaskadından sonra aktive olur, bu da intermembran boşluğunun proteinlerinin salınmasına neden olur (Park 2012). Bunlar, sitokrom c ve "apoptozom" olarak adlandırılan ikinci mitokondri türevi aktivatörü ve hücrenin ölümünü düzenleyen kaspazların aktivasyonunu içerir (Ishizaki ve ark. 1998). Apoptozisin ekstrinsik yolunda, hücre ölüm reseptör ligasyonu kaspaz aktivasyonuna yol açar (Bao ve Shi 2007).



**Şekil2.4.**Apoptozis yolları: tetikleyiciler, düzenleyiciler ve efektörler (Wu ve ark. 2001).

Efektör kaspazları, kaspaz-3 ve kaspaz-7, büyük ve küçük alt birimleri arasında bölünerek aktive edilen dimerik proenzim olarak bulunurlar (Fernando ve ark. 2002). Tamamen olgunlaşmış kaspaz-8 bu proenzimleri ayırır ve böylece onları aktive eder (Allan ve Clarke 2009). Bununla birlikte, bazı durumlarda efektör kaspazlarının aktivitesi daha sonra X'e bağlı Apoptosis Protein İnhibitörü (XIAP) tarafından inhibe edilir. Kaspaz-8 bu inhibisyonu atlayabilir. Kaspaz-8 ayrıca bid proteinini parçalayabilir ve daha sonra MOMP'ye aracılık eden efektör proteinleri bax ve bak'ı aktive eder (Allan ve ark. 2003, Parrish ve ark. 2013). Güncel çalışmalar ışığında Apoptozis İnstrinsik (Mitokondriyal) ve Ekstrinsik yol olmak üzere iki yolla gerçekleşir (Pistritto ve ark. 2016).



Şekil 2.5. İntrenzik ve ekstrinsik apoptozis yolları (C Fogg ve ark. 2011)

#### 2.2.4.İntrenzik Apoptozis

İntrenzik apoptozis, büyüme faktörü çekilmesi, DNA hasarı, endoplazmik retikulum (ER) stresi, reaktif oksijen türleri (ROS) aşırı yüklenmesi, replikasyon stresi, mikrotübüler alterasyonlar veya mitotik defektler gibi çeşitli mikro-çevresel bozulmalar tarafından başlatılan bir düzenlenmiş hücre ölümü formudur (Czabotar ve ark. 2013, Galluzzi ve ark. 2016). Apoptotik hücreler, plazma zarının bütünlüğünü ve metabolik aktivitesini bir dereceye kadar korur; bu işlem, işlem tamamlanırken makrofajlar veya fagositik aktiviteye sahip diğer hücreler ile hızlı bir şekilde temizlenmesini sağlar (Green ve ark. 2009, Yatim ve ark. 2017).İntrenzik apoptozis için kritik adım, Bcl-2 'nin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri tarafından kontrol edilen geri dönüşümsüz mitokondriyal dış zar (Mitochondrial outer membrane permeability=MOMP) geçirgenliğinin bozulmasıdır. Apoptotik uyarana cevap olarak; Bcl-2 ile ilişkili X (bax: bcl-2-ilişkili X protein) ve/veya Bcl-2 antagonist-öldürücü (bak) mitokondriyal dış membran permeabilizasyonuna aracılık eder (Tait ve Green 2010, Galluzzi ve ark. 2016). Bcl-2 familyası apoptozis düzenleyici (bok: bcl-2 ilişkili ovaryan öldürücü protein) ailesine ek olarak, bax ve bak, memeli hücrelerinde dış

mitokondriyal zar ve muhtemelen diğer hücre içi zarları boyunca gözenekler oluşturma kabiliyetleri nedeniyle bugüne kadar karakterize edilen Bcl-2 aile üyeleridir (Shamas-Din ve ark. 2013, Moldoveanu ve ark. 2014, Delbridge ve ark. 2016). Hücrede meydana gelen oksidatif stres, hipoksi, genetik hasar gibi durumlarda antiapoptotik Bcl-2'nin baskılanarak proapoptotik Bax ve Bak genlerinin aşırı ekspresyonu ile mitokondriyal dış zar geçirgenliği bozulur, sitokrom c sitozole salınır. APAF-1'e bağlanır apoptozom oluşumunu ve kaspas 9 aktivasyonunu tetikler (Hu ve ark. 2014). Aktif kaspaz 9 prokaspaz 3'ün aktif formu Kaspaz 3'e çevirir. Aktif kaspaz 3 ICAD'ı (kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü) inaktifleştirerek yapısındaki CAD'ın (kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz) serbest kalmasını sağlar. Serbest kalan CAD nukleusa girerek DNA kırıklarının oluşmasını sağlayarak hücreyi apoptozise sürükler (Kim ve ark. 2014, Rahman ve ark. 2015).

#### **2.2.5. Ekstrinsik Apoptozis**

Ekstrinsik apoptozis, hücre dışı mikro-ortamın bozulmaları ile başlatılan bir programlı hücre ölüm yoludur. Ekstrinsik apoptozis iki tip plazma membran reseptöründen herhangi biri ile uyarılır: aktivasyonu ligandın bağlanmasına bağlı olan ölüm reseptörleri veya aktivasyonları spesifik ligandlarının seviyeleri belirli bir eşiğin altına düştüğünde gerçekleşen bağımlılık reseptörleri (Strasser ve ark. 2009, Aggarwal ve ark. 2011, Gibert ve Mehlen 2015). Ölüm reseptörleri şunları içerir: Fas hücre yüzey ölüm reseptörü (FAS; CD<sub>95</sub> veya APO-1), TNF reseptörü üst familyası üyesi 1A (TNFRSF<sub>1A</sub>; en iyi TNFR<sub>1</sub>), 10a (TNFRSF<sub>10A</sub>; TRAILR1 veya DR4 olarak), 10b (TNFRSF<sub>10B</sub>; en iyi TRAILR2 veya DR5)(Siegmund ve ark. 2017). Genel bir kural olarak, ölüm reseptörü ligand bağlanması, Kaspaz 8'in aktivasyonunu ve fonksiyonlarını düzenlemek için moleküler platformlar olarak çalışan “ölüme neden olan sinyal kompleksi (DISC)”, “karmaşık-I” ve “karmaşık-II” gibi reseptörün hücre içi kuyruğunda dinamik bir multiprotein kompleksinin birleştirilmesine izin verir (Kretz ve ark. 2019). DISC kompleksinin oluşumu prokaspaz 8'in aktif Kaspaz 8 formuna dönüşümüne sebep olur. Aktif Kaspaz 8 prokaspaz 3'ün aktif Kaspaz 3 formuna getirir. Kaspaz 3'ün aktif formu ICAD'ı (kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü) inaktifleştirerek CAD (kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz) kompleksinin serbest

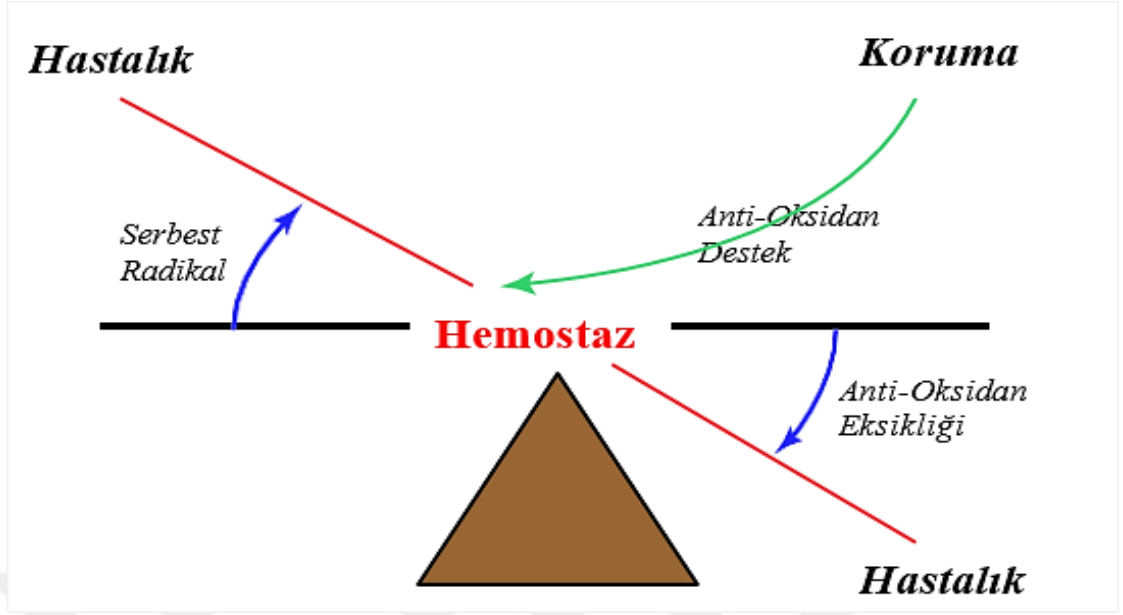
kalmasına ve nukleuse girerek nükleik asit degradasyonu ve DNA fragmentleri oluşmasıyla hücreyi apoptozise sürükler (Schleich ve ark. 2013, Constantinescu ve ark. 2017).

### 2.3. Oksidatif Stres

“Oksidatif stres” terimi 30 yıl öncesine kadar uzanan bir tanımlamadır (Selye 1955). Bu bilimsel kavramın tarihçesi ve gelişimi her dönem daha farklı açıklanmıştır. Konsept, genellikle yaşlanma problemi, biyolojik sistemlerdeki oksijen radikallerinin metabolizması, yavaş yavaş mitokondriyal fizyoloji gelişimi, “mitokondriyal” yaşlanma araştırması hücre ve organizmalarda redoks dengesizliği çalışması ile bağlantılı olan oksijen toksisitesi ile ilgili yayınlara dayanmaktadır (Sies 2015). Oksidatif stresin daha pratik ve operasyonel bir başka tanımı; Oksidatif stres, sabit durumdaki ROS konsantrasyonunun geçici veya kronik olarak arttırıldığı ve hücresel bileşenleri bozduğu durumdur (Schafer ve Buettner 2001, Aung-Htut ve ark. 2011).

Hastalıktaki oksidatif stres kavramı, çevresel bir uyarıcının rastgele bir serbest radikal yaratabildiği anlamına gelir. İlerleyici bir hastalığın fonksiyonu olarak serbest radikaller artar, antioksidanlar oksidatif stres nedeniyle tüketildiklerinde azalır, böylece hastalığa yol açar (Galli ve ark. 2014). Antioksidan takviyesi, iki işlem eşitlendiğinde koruma ve nihayetinde homeostaza neden olur. En çok zarar verici serbest radikaller iyonlaştırıcı radyasyon veya çevresel toksikoloji reaksiyonları sırasında üretilen hidroksil ( $\text{HO}^\bullet$ ) ve hidrojen radikalleridir. Superoksit serbest radikalleri ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) mitokondriyal elektron reaksiyonlarında üretilir. Hızla hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oluşturur (Sarma ve Ward 2011).

İndirgenmiş serbest demir  $\text{Fe}^{2+}$  ve bakır  $\text{Cu}^{1+}$ , metalleri  $\text{Fe}^{3+}$  ve  $\text{Cu}^{2+}$  'ye oksitleyerek hidroksil radikalleri ve hidroksit anyonları üretmek için  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile fenton reaksiyonlarına katılır. Oksitlenmiş serbest demir veya bakır daha sonra hidroperoksil ( $\text{HOO}^\bullet$ ) radikalleri ve protonları ( $\text{H}^+$ ) oluşturmak için  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'yi okside ederek metalleri  $\text{Fe}^{2+}$  ve  $\text{Cu}^{1+}$  'a indirger, böylece yeni peroksidasyon reaksiyonları döngüsel bir şekilde gerçekleşebilir. Lipidperoksit radikalleri ( $\text{L}^\bullet$  /  $\text{LO}^\bullet$  /  $\text{LOO}^\bullet$ ) hücresel bileşenlerde serbest radikallere zarar veren diğer radikallerdir (Park ve ark. 2009, Sarma ve Ward 2011, Harrison ve ark. 2012).



Şekil2.6.Serbest radikallerin seviyeleri ile antioksidanlar arasındaki denge

Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA:Polyunsaturated fatty acids), çoklu karbon-karbon çift bağları içerir (El-Shinnawi ve Soory 2015). Bu yağ asitleri, biyolojik zarların doğru çalışması için plazma zarına hareketlilik ve akışkanlık sağlar. Lipid peroksidasyonu, hayvanlarda ve bitkilerde iyi tanımlanmış bir hücre hasar mekanizmasıdır (Kwiecien ve ark. 2014). Lipid peroksitleri, lipid peroksidasyonunun doğal ürünü olan Malondialdehit (MDA) daha karmaşık ve reaktif bileşikler oluşturmak üzere ayrılan hücrelerde oksidatif stresin göstergeleridir (Barrera ve ark. 2018). Lipitlerin oksidatif modifikasyonu, çok çeşitli pro-oksidan ajanlar tarafından in vitro olarak indüklenebilir ve yaşlanma sırasında ve belirli hastalık koşullarında in vivo olarak meydana gelir (Wu ve ark. 2013). Lipit peroksidasyonunun son ürünlerinin ölçülmesi, oksidatif hasar için en yaygın olarak kabul edilen analizlerden biridir (Ayala ve ark. 2014).

### 2.3.1. Malondialdehit (MDA)

Halliwell ve Poulsen hem hastalıkla kurulan bir ilişkiyi hem de stabilite ve analiz maliyetine ilişkin çeşitli pratik düşünceleri içeren ideal oksidatif stresin biyobelirteçini tanımlayan kriter seti yayınlamışlardır (Halliwell ve Whiteman 2004). Bir biyolojik

belirleyiciyi yeterince tanımlamak için çeşitli kriterler şüphesiz gerekli olsa da, biyobelirteç olgusunun tüm temeli, bir hastalığın veya durumun patogenezi ile ilgili belirli biyolojik olayları doğrudan yansıtan bir bileşiğin ölçümüdür (Ayala ve ark. 2014). Çoklu doymamış yağ asitleri, özellikle linoleik ve araşidonik asit, lipid peroksidasyonunun önemli hedefleridir (Marnett 1999). Hidroksil ve peroksil radikallerinin, çoklu doymamış yağ asitleri hidrojen ile reaksiyonu, lipid peroksil radikallerinin, zincir taşıyan radikaller olarak hareket ettiği ve lipid hidroperoksitlerin, birincil son ürünler olarak oluşturulduğu, lipid peroksidasyonunun otokatalitik zincir reaksiyonunu başlatır. MDA, lipid oksidasyonu biyolojik olayının göstergesi olarak kabul edilmektedir (Tsikas 2017).

MDA'nın oluşumunu *in vivo* olarak açıklayan çeşitli hipotezler önerilmiştir. Pryor ve Stanley (Pryor ve Stanley 1975) tarafından önerildiği ve daha sonra Frankel ve Neff (Frankel ve Neff 1983) tarafından onaylandığı gibi, okside olmuş lipidler, bir ayrışma ürünü olarak MDA üretebilmektedir. Mekanizmanın, iki veya daha fazla çift bağ ile çoklu doymamış yağ asitlerinden prostaglandin benzeri endoperoksitlerin oluşumunu içerdiği düşünülmektedir (Pryor ve Stanley 1975). Esterbauer ve arkadaşları tarafından sunulan alternatif bir mekanizma, ardışık hidroperoksit oluşumuna ve çoklu doymamış yağ asitlerinin bölünmesine dayanmaktadır (Esterbauer ve ark. 1991). MDA daha sonra doğrudan bir hidroperoksi aldehidinkesilmesiyle hidroksil radikalleri arasındaki reaksiyonla doğrudan oluşur.

Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu *in vivo* olarak ana MDA kaynağı olmakla birlikte, iyonize radyasyon ve prostaglandinlerin biyosentezi ile serbest radikal üretiminin yan ürünleri gibi diğer küçük kaynaklar da mevcuttur (Ullrich ve ark. 1988, Valenzuela 1991). MDA ile proteinler, RNA ve DNA gibi hücrel makromoleküller arasındaki reaksiyon için tutarlı kanıtlar mevcuttur (Valenzuela 1991). Çok sayıda deney MDA'nın proteinleri kolayca değiştirdiğini göstermiştir. MDA, DNA ile reaksiyona girerek, mutajenik olabilen deoksiguanozin ve deoksiadenozin ilavelerine katkıda bulunur ve bunlar insan dokusunda ölçülebilir (Marnett 1999).

### **2.3.2. Oksidatif Stres ile Akciğer Hastalıklarının İlişkisi**

Oksidatif stresin çeşitli solunum hastalıklarının patogenezinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Sies 2015). Tüberküloz ve insan immün yetmezlik virüsü



enfeksiyonu dahil olmak üzere her türlü solunum yolu enfeksiyonlarının, reaktif oksijen türlerini (ROS) daha yüksek seviyelerde ürettiği ve antioksidan enzimlerin endojen üretimini azalttığı gösterilmiştir (Kwiecien ve ark. 2014) Solunum yolu hastalığında, özellikle kronik obstrüktif akciğer hastalığında (KOA) oksidatif stres, hızlandırılmış akciğer yaşlanması ve hücrel yaşlanma ile ilişkilidir. Ayrıca KOA'nın sistemik bulguları ve komorbiditeleri ile aktive anti-inflamatuar etkilerin baskılanması ile kortikosteroid direncinden de sorumludur (Zinellu ve ark. 2016). Çok sayıda çalışma, pulmoner fibroz, asbest, akciğer kanseri, pulmoner hipertansiyon, solunum kas disfonksiyonu ve diğerleri gibi diğer akciğer hastalıklarında oksidatif stresin önemini göstermiştir. Antioksidan ilaçların ve taklitçilerin bazı solunum hastalıklarının hastalık yönetimi ve önlenmesinde tamamlayıcı rolü olduğu görülmektedir (Park ve ark. 2009, Galli ve ark. 2014).

Akciğerler oksidatif stres geliştirme riski altındadır, çünkü bunlar yüksek oksijen konsantrasyonlarına maruz kalırlar. Alveolar makrofajları çevresel tehditlere karşı ilk savunma hattını oluşturur (Zinellu ve ark. 2016). Aktif makrofajlar, solunum sistemine zarar veren büyük miktarda ROS üretir. Oksidatif stresi dengelemek için çalışan normal antioksidan savunmaları da inhalasyon toksinleri nedeniyle bozulur. Oksidatif stresin çeşitli hastalıklarda rolü, antioksidan ilaçlarla yapılan potansiyel tedavinin temelini oluşturur (Olinski ve ark. 2002). Akciğer hastalıkları durumunda, ozon ve nitritler gibi pro-oksidanlara maruz kalmanın azalmasının, astım şikayetlerini azalttığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, tütün bırakma, KOA şikayetlerinin oluşumunu azaltabilir (Singh ve ark. 2017). Şu anda mevcut olan birkaç antioksidan ilaç ve besin takviyesi vardır. Bunlar arasında glutathione, A, C ve E vitaminleri, antioksidan enzimler ve Nrf 2 kaynaklı antioksidanlar bulunur. Ek olarak, birçok bitkisel preparat ve diğer antioksidan bitkilerde kullanılmaktadır (Sarma ve Ward 2011, Sharma 2014).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanmış olduğumuz tüm kimyasal maddeler (Çizelge 3.1)'de listelenmiştir.

**Çizelge 3.1.** Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

| Kimyasal Madde Adı                                                                  | Markası |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium (IX) (DMEM)                                      | Gibco   |
| Fetal Bovin Serum (FBS)                                                             | Gibco   |
| Hank's Balanced Salt Solution (IX) (HBSS)                                           | Gibco   |
| Trypsin/EDTA (1X)                                                                   | Gibco   |
| Penicillin/Streptomycin<br>(10.000 Units/ml penicillin) (10.000 µg/ml streptomycin) | Gibco   |
| 4,5-dimethy lthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide                                | Sigma   |
| Acetic Acid                                                                         | Sigma   |
| Dimethyl Sulfoxide (DMSO)                                                           | Sigma   |
| Hydrochloric Acid (HCl)                                                             | Sigma   |
| Hydrogen Peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )                                  | Merck   |
| 1-Butanol                                                                           | Merck   |
| Pyridine                                                                            | Merck   |
| Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)                                                        | Sigma   |
| 1,1,3,3-Tetraethoxypropane                                                          | Sigma   |
| 2-Thiobarbituric Acid (TBA)                                                         | Merck   |
| Pierce BCA                                                                          | Thermo  |
| RNA izolasyon kiti                                                                  | Thermo  |
| cDNA sentez kiti                                                                    | Thermo  |
| Protein ölçüm kiti                                                                  | Thermo  |

#### 3.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmamız süresince kullanmış olduğumuz cihazlar (Çizelge 3.2)'de listelenmiştir.

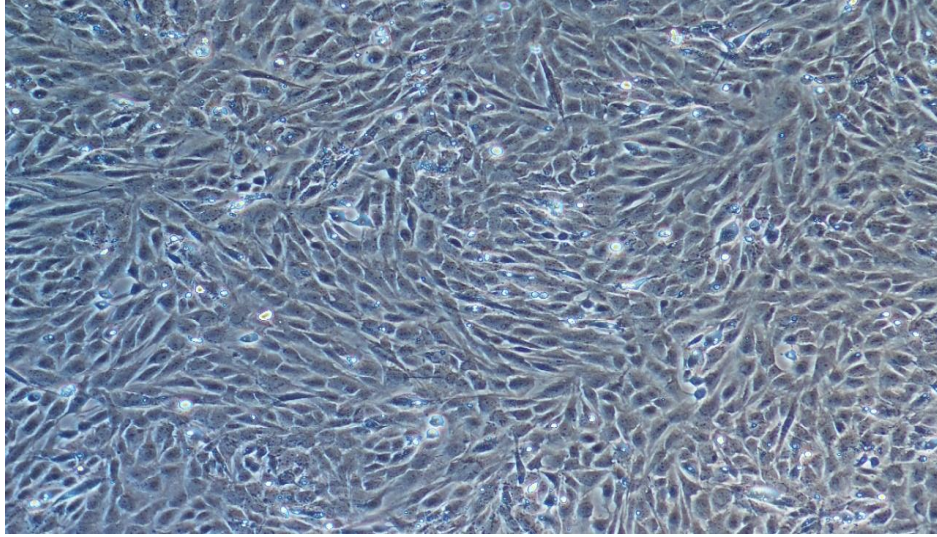
**Çizelge 4.2.** Çalışmada kullanılan cihazların listesi

| Cihazın Adı               | Markası                                 |
|---------------------------|-----------------------------------------|
| Biyogüvenlik Kabini       | Thermo, HeraSafe KS Class II            |
| Boncuklu Homojenizatör    | Qiagen, TissueLyser LT                  |
| CO <sub>2</sub> İnkübatör | NuAire NU-5830                          |
| Hassas Terazı             | OHAUS, Pioneer PA214C                   |
| Işık Mikroskobu           | Novel, N-120                            |
| İnverted Mikroskop        | Nikon, Eclipse TS100                    |
| pHMetre                   | HANNA Instruments, HI 2211 pH/ORP meter |
| Soğutmalı Santrifüj       | Hettich, Universal 320R                 |
| Spektrofotometre          | Thermo, Multiskan Go                    |
| Thermal Cycler            | Biorad, T100                            |
| Q Real Time PCR cihazı    | Qiagen Rotor-Gene                       |

### 3.3. Hücre Kültürü

Çalışmada, sağlıklı bronşiyal epitelden oluşturulmuş insan bronşiyal epitel hücre hattı olan BEAS-2B hücreleri kullanıldı. Hücre hattı Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı hücre stoğundan temin edilmiştir.

Mustafa Kemal Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı hücre kültürü laboratuvarından temin edilen BEAS-2B hücre hattı *in vitro* çalışmalarda yaygın olarak kullanılan İnsan Bronşiyal Epitel Hücre hattıdır (Şekil 3.1). Deneylerde kullanılacak olan BEAS-2B hücre dizileri 175 cm<sup>2</sup>'lik kültür kaplarında (flask) %10 FBS (Gibco, USA) ve %1 penisilin/streptomisin (Gibco, USA) ihtiva eden Dulbecco Modifiye Edilmiş besiyeri içerisinde (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, Gibco, UK) büyütüldü. İnkübasyon koşulları %95 nem, %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C olan etüvde inkübe edildi. Besiyeri haftada iki kez değiştirilerek ve hücreler sayıca yoğunluğa ulaştıklarında deneylerde kullanıldı.



Şekil 3.1. BEAS-2B Hücre Morfolojisi

### 3.4. *Myrtus communis* L. Esansiyel Yağ Dozlarının Hazırlanması

Çalışmamızda kullandığımız MC esansiyel yağı Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden temin edildi. MC esansiyel yağı 1000-500-250-125-62.5-31.25-15.625 µg/ml dozları en yüksek dozun %1 oranında DMSO (Dimethyl Sulfoxide, SİGMA) içerdiği, serumsuz DMEM besiyeri içinde çözündürülerek, seri dölüsyon hazırlandı ve kullanıldı.

### 3.5. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Dozlarının Hazırlanması

Öncelikle stok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin konsantrasyonu hesaplanır.

M<sub>A</sub>: 34,0147

d: 1,11 gr/cm<sup>3</sup>

%30 M=(30\*1.11\*10) / (34,0147) stok molaritesi hesaplandı. Stok molaritesi üzerinden konsantrasyon hesaplaması ;

- M<sub>1</sub>.V<sub>1</sub>=M<sub>2</sub>.V<sub>2</sub> formülünde aşağıdaki değerler yerine yazılarak konsantrasyon hesapları yapılır.
- M<sub>1</sub>= Konsantrasyonu hesaplanmış H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Molaritesi
- M<sub>2</sub>= Çalışmak istediğimiz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Molaritesi
- V<sub>1</sub>= İlk hacim
- V<sub>2</sub>= Son hacim

Çalışacağımız H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mikromolar cinsinden hesaplandıktan sonra ihtiyacımız olan miktar kadar serumsuz besiyeri ile tamamlandı, bütün dozlar hesaplandı ve çalışmaya alındı.

### 3.6. Hücre Canlılığı Analizi (MTT Testi)

MTT testi için, 48 kuyucuklu platelere %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM besiyeri 1x10<sup>5</sup> hücre/ml olacak şekilde hücre ekimi yapıldı ve %95 nem, %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C ısı sağlayan inkübatör koşullunda inkübe edildi. Hücreler kültür kaplarının yüzeyini %70-80 oranında kaplaması beklendi, sonrasında hücrelerin üzerine %10 FBS içeren vasat yerine serumsuz vasat eklenerek 24 saat süreyle bu koşullarda inkübe edildi. Hazır hale getirilen hücrelere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve MC farklı konsantrasyonları için iki ayrı MTT testi uygulandı.

MC yağının nonsitotoksik konsantrasyonlarını belirlemek üzere, hazır hale getirilmiş hücreler 1000-500-250-125-62.5-31.25-15.625 µg/ml MC yağına 24 saat maruz bırakıldı. Aynı şekilde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in sitotoksik olmayan konsantrasyonlarını belirlemek üzere, hazır hale getirilmiş hücreler 0, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 µM'lık dozlarına 24 saat maruz bırakıldı. Bu aşamadan sonra her iki MTT deneyi için aşağıdaki ortak protokol aşamaları uygulandı:

1. 1 mg/ml MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Sigma-Aldrich, USA) solüsyonu hazırlandı.
2. 48 kuyucuklu 'plate'deki mevcut solüsyon uzaklaştırıldı ve her bir kuyuya 250 µl MTT solüsyonu eklendi.
3. 1 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon süresi sonunda plate içindeki MTT solüsyonu döküldü ve bir peçete üzerinde ters çevrilerek, 2-3 dk bekletildi.
5. Her bir kuyuya 250 µl DMSO eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
6. Renkteki değişim spektrofotometrede 590 nm'de 670 nm dalga boyuna karşı okutuldu.
7. Aşağıdaki formül kullanılarak %canlılık oranları belirlendi.

Hücre canlılığı % =  $M_{od} \times (100/K_{od})$

$M_{od}$ : MC-uygulama grubu optik dansite

$K_{od}$ : Kontrol grubu optik dansite

MTT testi ile, herhangi bir madde maruziyetine bırakılmamış olan sağlıklı hücre grubunun (kontrol grubu) canlılık oranı %100 kabul edilerek, hem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in hem de MC esansiyel yağının farklı dozlarına maruz bırakılan hücrelerin % canlılık oranları belirlendi. Deneylerin devamında kullanılmak üzere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> için 40 µM, MC yağı için 15.625 µg/ml konsantrasyonlar seçilerek, deneylere devam edildi. Tüm deneyler üçer tekrarlı çalışıldı.

### 3.7. Biyokimyasal Analizler

#### 3.7.1. Oksidatif Stres Parametre Analizleri

BEAS-2B hücre dizilerinin 175 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültür kaplarına (flask) (Thermo, Türkiye) 1x10<sup>5</sup> hücre/ml olacak şekilde %10 FBS (Gibco, USA) ve %1 penisilin/streptomisin (Gibco, USA) ihtiva eden Dulbeco Modifiye Edilmiş besiyeri içerisinde (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, Gibco, UK) ekim yapıldı. Hücreler kültür kaplarının yüzeyinin %70-80'ini kaplayıncaya kadar inkübe edildi. Sürenin sonunda hücre kültür kaplarının içindeki serum ihtiva eden besiyeri uzaklaştırılarak, serum ve piruvat içermeyen besiyeri ile değiştirildi. Hücreler 0, 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 15.625 µg MC+ 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında

24 saat inkübe ettirildikten sonra hücreler, kazıma işlemi uygulanarak, soğuk HBSS ile ayrı bir tüpe toplandı. Toplanan örnekler çalışma yapılncaya kadar -80 °C ye kaldırıldı. Çalışma günü -80 °C'den çıkarılan hücreler, homojenizatör (Qiagen, TissueLyser L1) ile 30 dk. homojenize edildikten sonra, MDA ve protein ölçümleri için kullanıldı.

### **3.7.2. Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Belirlenmesi**

MDA ölçümünde Sushil ve ark. tarafından bildirilen yöntem kullanılmıştır (Sushil 1986). Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, aerobik şartlarda pH: 3,5'te tiyobarbitürik asit ile 95 °C'de inkübasyonu sonucu pembe renkte bir kompleks oluşturur. Bu kompleksin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü ile MDA miktarı saptanır.

MDA düzeyinin belirlenmesi için gerekli çözeltiler;

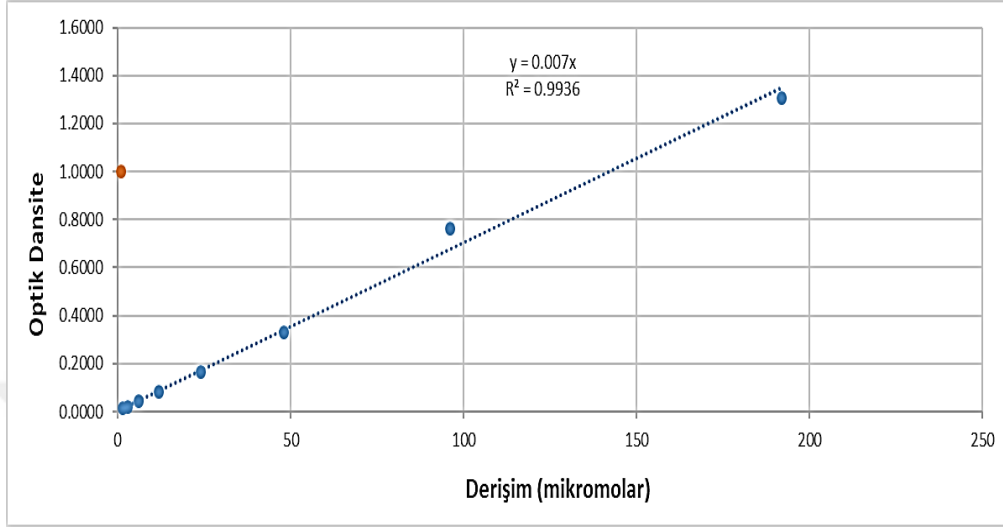
- % 8,1' lik sodyum dodesil sülfat (SDS)
- % 20' lik asetik asit (pH 3,5)
- % 0 .8 'lik tiyobarbitürik asit (TBA) (pH 3,5)
- n-bütanol/pridin çözeltisi (15/1)
- Standart: 1,1,3,3 tetraetoksipropan (d:0,92 g/ml)

İlk olarak 192 nM hazırlanmış 1,1,3,3 tetraetoksipropan çözeltisi kullanılarak seri dilüsyonla 96, 48, 24, 12, 6, 3, 1,5 nM konsantrasyonlarda çalışma standartları hazırlandı. Standart çözeltilerin absorbans değerleri 532 nm'de okutularak standart eğri grafiği oluştu ve MDA miktarı nmol cinsinden belirlendi. Sonra her bir örnekteki protein miktarı ölçülerek MDA miktarı nmol/mg protein cinsinden hesaplandı.

### **3.7.3.MDA Standart Eğrisi**

Her bir örnek için 1'er cam kapaklı tüp içerisine sırasıyla 1.5 'ml örnek,0.2 ml SDS, 1.5 ml asetik asit, 1.5 ml TBA ve 150 µl distile su eklendi. Kör tüpü, içerisine örnek konulmadı diğer çözeltiler eklenerek hazırlandı. Tüpler 95°C - 30 dakika inkübe edildi ve hızlı soğutularak üzerine her bir örnek için 5 ml n-bütanol/piridin çözeltisi hazırlanıp eklendi. Üzerine 150 µl distile su ilave edildi ve tüplerin ağzı kapatılıp iyice

alkalandı. En son adım tüpler 4000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatant kısmı alınarak 96 well platenin her kuyusuna 200'er µl eklendi ve spektrofotometre (Thermo, Multiskan GO) ile 532 nm' de okutuldu.



Şekil 3.2. MDA standart eğrisi

#### 3.7.4. Total Protein Ölçümü

Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Lot: PB199555, USA) aşağıdaki protokole göre uygulandı:

1. 96'lık plate her örnekten 25µL eklenir,kullanılabilir kit solusyonu (WR 1:50 )oranında hazırlandı, Bununla birlikte,
2. Her kuyucuğa 200µL WR eklenip iyice pipetaj yapıldı.
3. Plate üzeri kapatıldı ve 37 ° C'de 30 dakika inkübasyonaa bırakıldı.
4. Plate oda sıcaklığında 3 dakika bekletildi.
5. Spektrofotometre (Thermo, Multiskan GO) ile 562 nm'de absorbansı ölçüldü.

#### 3.8. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için hücreler 6 kuyucuklu 'plate'lere %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM vasatta  $1 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde ekildi ve %95 nem, %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C sağlayan inkübatör koşullarında inkübe edildi. Hücreler plate

yüzeyini %70-80 oranında kapladıktan sonra, serum içeren vasatın yerine serumsuz vasat eklenerek 24 saat süreyle bu koşullarda inkübe edildi. Hücreler; **i)** kontrol grubu (herhangi bir maddenin eklenmediği sağlıklı hücre), **ii)** oksidatif stresin uyarıldığı grup ( $40\mu\text{MH}_2\text{O}_2$ 'e maruz bırakılan grup) ve **iii)** MC yağı ile tedavi edilen grup ( $40\mu\text{MH}_2\text{O}_2+15,625\mu\text{g/ml}$  MC'ye maruz bırakılan grup) olmak üzere 3 farklı gruba ayrılarak, her grup için uygun maruziyet koşullarında inkübasyona bırakıldı.

24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda hücreler tripsin ilave edilerek kaldırıldı ve 3000 rpm (Revolutions per minute; dakikadaki devir)'de 5 dk santrifüj edildi. Üst faz uzaklaştırılıp hücre pelleti RNA izolasyon kiti kullanılarak, üretici firmanın protokolü doğrultusunda aşağıdaki aşamaları izleyerek RNA izolasyonu yapıldı (Thermo Scientific, GeneJet RNA Purification Kit, Lithuania, Lot: 00720496).

1. İlk olarak elde edilen hücreler  $600\mu\text{L}$   $\beta$ -mercaptoethanol veya DTT ilave edilmiş Lizis Buffer eklenerek 5-10 kere pipetaj yapıldı. Pellet halinde hücre kalmamasına dikkat edildi.
2.  $360\mu\text{L}$  etanol (% 96-100) eklendi ve pipetaj yapılarak örnek karıştırıldı.
3. Toplama tüpüne yerleştirilmiş olan RNA saflaştırma kolonuna  $700\mu\text{L}$  lisat aktarıldı. Örnekler  $+4^\circ\text{C}$ 'de  $\geq 12000 \times \text{g}$ 'de 1 dakika santrifüj edildi. Alt faz atılarak, spin kolonu tekrar toplama tüpüne yerleştirildi. Tüm lisat kolona transfer edilene kadar bu adım tekrarlandı. Her adımda alt faz atıldı.
4. RNA wash kolonuna  $700\mu\text{L}$  Wash Buffer 1 eklendi ve  $+4^\circ\text{C}$ 'de  $\geq 12000 \times \text{g}$ 'de 1 dakika santrifüj edildi. Alt fazı atılarak ve arıtma kolonu tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.
5. RNA saflaştırma kolonuna  $600\mu\text{L}$  Wash Buffer 2, eklendi ve  $+4^\circ\text{C}$ 'de  $\geq 12000 \times \text{g}$ 'de 1 dakika santrifüj edildi.
6. RNA arıtma kolonuna  $250\mu\text{L}$  Wash Buffer 2 ilave edildi ve  $\geq 12000 \times \text{g}$ 'de 2 dakika santrifüj edildi. Alt faz çözeltisini içeren toplama tüpü atıldı ve RNA saflaştırma kolonu steril bir  $1.5\text{ mL}$  RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
7. RNA arıtma kolon membranının merkezine, nükleaz free water dan  $50\mu\text{L}$  eklendi. Örnekler oda sıcaklığında 2-3 dk inkübe edildi. RNA'yı elute etmek için  $+4^\circ\text{C}$ 'de  $\geq 12000 \times \text{g}$ 'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda örnekler soğuk bir ortama alınarak RNA kalitesi ve miktar tayini için spektrofotometrik ölçümler yapıldı.



### 3.9. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'lerden cDNA sentez kiti (High Capacity cDNA, Reverse Transcription Kit, applied biosystems by Thermo Fisher Scientific, Lithuania, Lot: 00709629) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Toplam hacim 20  $\mu$ l olacak şekilde (Çizelge 3.3).de belirtilen cDNA karışımı (10  $\mu$ l), 10  $\mu$ l dilüe RNA ile birleştirildi. Ardından reverse transkripsiyon Thermal Cycler (T100,BİO-RAD) kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 3.3. Thermal Cycler (T100, BİO-RAD) cihazı

Çizelge 3.3. cDNA sentez reaksiyonunda kullanılan karışımlar

|                       |             |
|-----------------------|-------------|
| 10X RT Buffer         | 2 $\mu$ l   |
| 25X dNTP              | 0.8 $\mu$ l |
| 10X RT Random Primer  | 2 $\mu$ l   |
| Reverse Transcriptase | 1 $\mu$ l   |
| Nuclease-Free Water   | 4.2 $\mu$ l |

#### Reverse transkripsiyon reaksiyonunun hazırlanması:

1. Her bir örnek tüpüne 10  $\mu$ L 2X RT ana karışımından eklendi.
2. Daha sonra her bir örnek tüpüne 10  $\mu$ L RNA örneği eklendi ve pipetaj yapıldı.
3. Tüpler kısa süreli vortekslenip, ardından spin yapıldı.
4. Tüpler thermal cycler'a yerleştirildi.

5. Thermal cycler cihazında(Çizelge 3.4)'de belirtilen koşullarda cDNA sentezi yapıldı.

**Çizelge 3.4.** cDNA reaksiyon koşulları

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

### 3.10. Real Time PCR Analizi

Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9, p21 genleri ve 'ev' (housekeeping) geni  $\beta$ -aktin genlerinin transkripsiyon düzeyleri 'real time' PCR (qRT-PCR) yöntemiyle (QIAGEN Rotor-Gene Q, Germany) belirlendi. Bu genlere ait primer dizileri şu şekildedir;

Kaspaz3; Fw 5'-CTTCTACAACGATCCCCTCTG-3',

Rw 5'-TGTGCTTCTGAGCCATGGGTG-3',

Kaspaz8; Fw 5'-GGGCTCAATTTCTGCCTAC-3',

Rw 5'-GGCAC TGGCTGTTTGCTT-3',

Kaspaz9; Fw 5'-GTCACAAGACCTTGACACCCG-3'

Rw 5'-ACCAGGTGGTCTAGGGGTTT-3'

p21; Fw 5'-CCGAAGTCAGTTCCTTGTGG-3',

Rw 5'-AGTACGGCCAGAGGTGTACG-3'

$\beta$ -aktin; Fw 5'-TCAACACCCCAGCCATGTA-3'

Rw: 5'-AGTACGGCCAGAGGTGTACG-3'

qRT-PCR'da kullanılan reaksiyon karışımı (Çizelge 3.5).'da gösterilmiştir.

**Çizelge 3.5.** qRT-PCR'da kullanılan reaksiyon karışımı ve miktarları

|                                                                                     |       |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| qPCR Mastermix (Luminaris Color HiGreen Low ROX qPCR Master Mix, Thermo Scientific) | 7.5µl |
| Primer (10 µM stok) Thermo Scientific                                               | 1.2µl |
| Nuclease Free Water                                                                 | 3.3µl |
| cDNA                                                                                | 3 µl  |



**Şekil 3.4.** Real Time PCR Rotor-Gene Q Cihazı

Reaksiyon hacmi her örnek için toplam 15 µl olacak şekilde hazırlanarak QIAGEN Rotor-Gene Q cihazında gerçekleştirildi (Applied ve Sccientific 2019, QIAGEN 2019). Reaksiyondöngüleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 3.6).

**Çizelge 3.6.** qRT-PCR reaksiyon koşulları

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

\*UDG: Uracil-DNA glycosylase

### 3.12. İstatistiksel Analizler

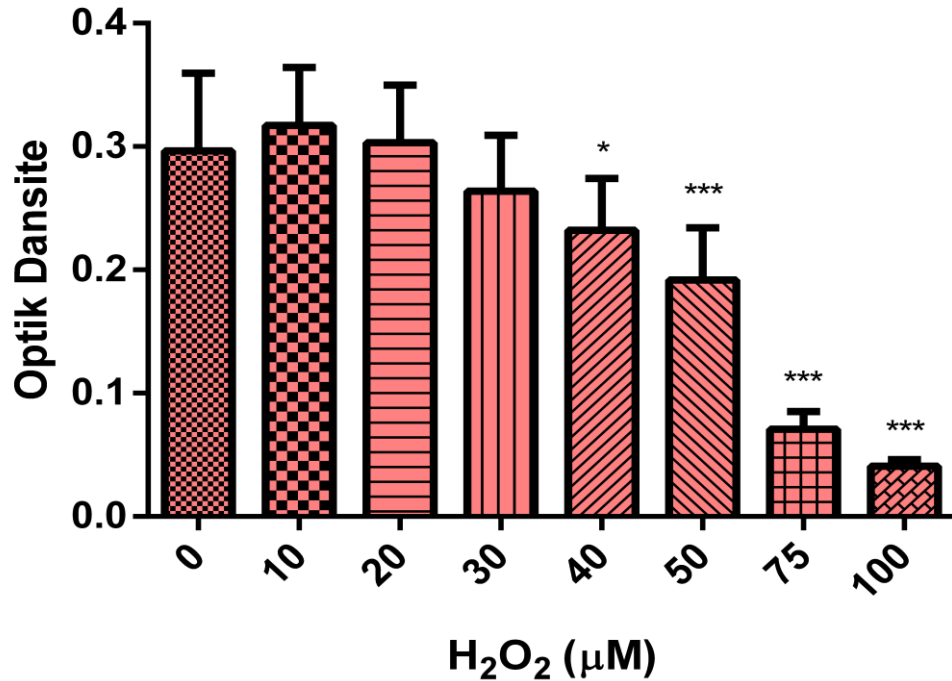
Çalışmanın MTT analiz sonuçları GraphPad Prism Version 5.01 (GraphPad Software Inc., USA) programıuygulanarak hesaplandı. Gruplar içindeki verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile belirlendi. Gruplar arasında farklılığın varolup olmadığı Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. Gruplar arasındaki anlamlılığın hangileri arasında olduğunun tespitinde Dunn's Multiple Comparison Test kullanıldı. Her çalışma grubu kontrol grubu ile karşılaştırılıp ve  $p < 0,05$ 'den küçük olandeğerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama (ort)±standart sapma olarak verildi.

Gen ekspresyon verilerinin analizi RT<sup>2</sup> profiler PCR Array Data Analysis version 3.5 ile yapıldı.  $\beta$ -aktin "housekeeping gen" olarak kullanıldı. Sonuçlar Fold change (kat değişimi) olarak verildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

BEAS-2B hücreleri, oksidatif stres modeli oluşturmak üzere uygun dozun belirlenmesi amacıyla 0, 10, 20, 30, 40, 50 ve 75 ve 100  $\mu\text{M}$  dozlarında  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'ye 24 saat süreyle maruz bırakıldıktan sonra MTT yöntemiyle hücre canlılığı analizi yapıldı.  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin, BEAS-2B hücrelerine 24 saatlik inkübasyonu sonunda kontrol grubu (0  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ile karşılaştırıldığında 30  $\mu\text{M}$  ve daha düşük dozlarda anlamlı bir fark görülmezken 40, 50 ve 75, 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozların hücre canlılığını anlamlı derecede baskıladığı bulunmuştur (Şekil 4.2). Sitotoksik etkinlik 100  $\mu\text{M}$  dozda en güçlü seviyede tespit edilmiştir ( $p<0.0001$ ).

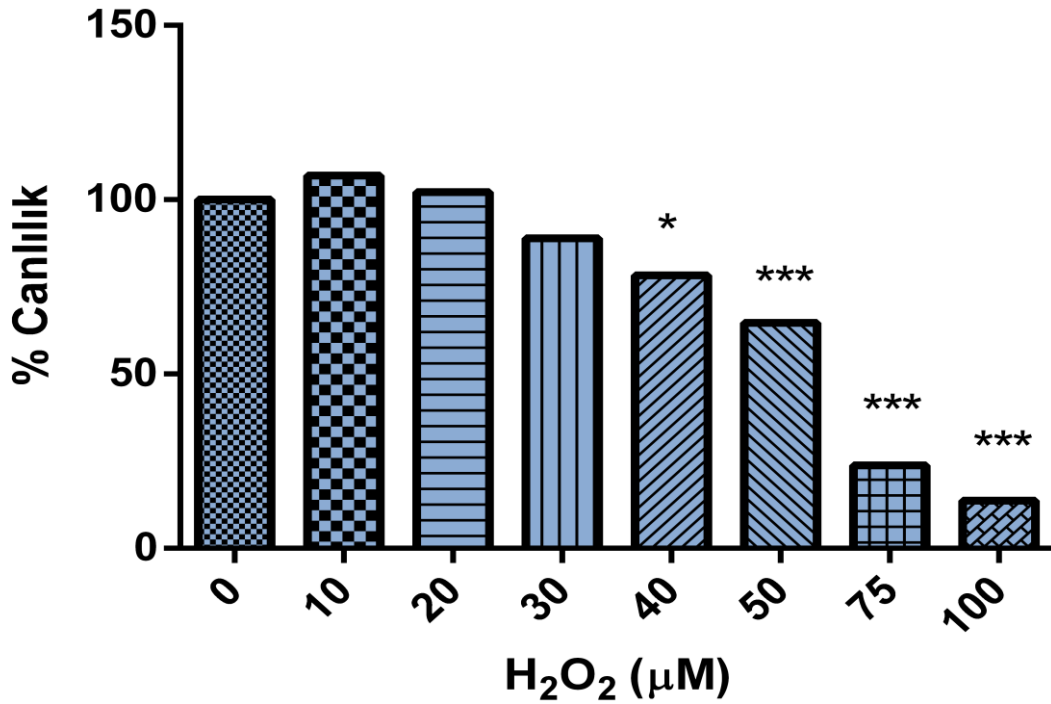


Şekil 4.1. BEAS-2B hücre hattında farklı dozlarda 24 saatlik  $\text{H}_2\text{O}_2$  maruziyeti sonucu optik dansite grafiği (İstatistiksel anlamlılık düzeyi: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  ve \*\*\* $p<0.001$ )

**Çizelge 4.1.** Uygulanan Hidrojen Peroksit dozlarında ortalama optik dansite  $\pm$  standart sapma değerleri

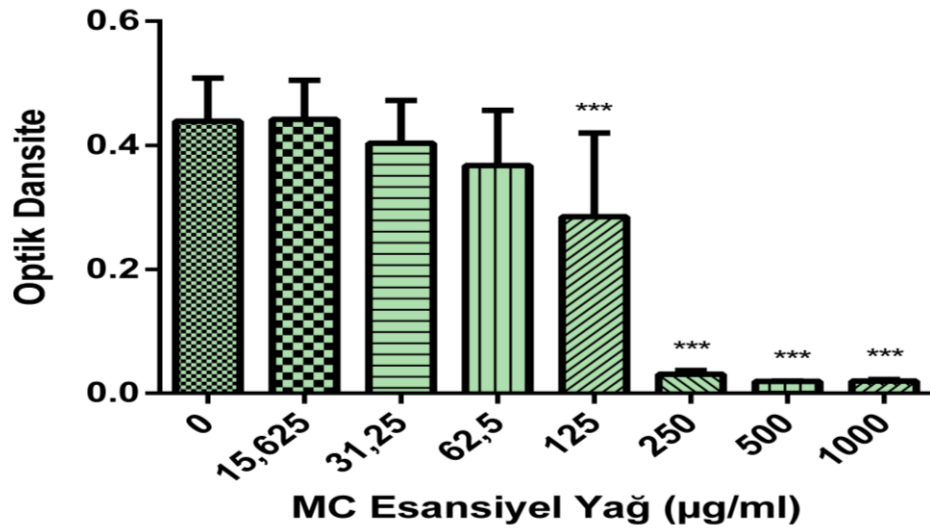
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> $\mu$ M | Ortalama $\pm$ Standart Sapma | p value  |
|---------------------------------------|-------------------------------|----------|
| 100 $\mu$ M                           | 0.04073 $\pm$ 0.005347***     | < 0,0001 |
| 75 $\mu$ M                            | 0.07079 $\pm$ 0.01433***      | < 0,0001 |
| 50 $\mu$ M                            | 0.1919 $\pm$ 0.04240***       | < 0,0001 |
| 40 $\mu$ M                            | 0.2323 $\pm$ 0.04196*         | 0,0202   |
| 30 $\mu$ M                            | 0.2639 $\pm$ 0.04529          | 0.4769   |
| 20 $\mu$ M                            | 0.3031 $\pm$ 0.04686          | 0,9996   |
| 10 $\mu$ M                            | 0.3170 $\pm$ 0.04720          | 0,8715   |
| Kontrol (0)                           | 0.2966 $\pm$ 0.06281          | -        |

İstatistiksel anlamlılık düzeyi: \*p<0.05, \*\*p<0.01 ve \*\*\*p<0.001. Mtt testi ile elde ettiğimiz verilerin optik dansite ortalamalarının  $\pm$  standart sapma değerlerinin 1'i geçmemesi tekrarlar arasındaki tutarlılığı göstermektedir.



**Şekil 4.2.** BEAS-2B hücre hattında farklı dozlarda 24 saatlik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> maruziyeti sonucu % canlılık grafiği (İstatistiksel anlamlılık düzeyi: \*p<0.05, \*\*p<0.01 ve \*\*\*p<0.001)

BEAS-2B hücreleri, MC esansiyel yağı için uygun dozu belirlemek amacıyla 15,625 - 31,25 - 62,5 - 125 - 250 - 500 - 1000 µg/ml MC esansiyel yağı dozlarında maddesine 24 saat süreyle maruz bırakıldıktan sonra MTT yöntemiyle hücre canlılığı analizi yapıldı. MC esansiyel yağının BEAS-2B hücrelerine 24 saatlik inkübasyonun sonunda 62.5 µg/ml ve altındaki dozlarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmezken ( $p>0.05$ ), 125 - 250 - 500 - 1000 µg/ml dozlarının hepsinin hücre canlılığını anlamlı derecede azalttığı bulundu (Şekil 4.4).



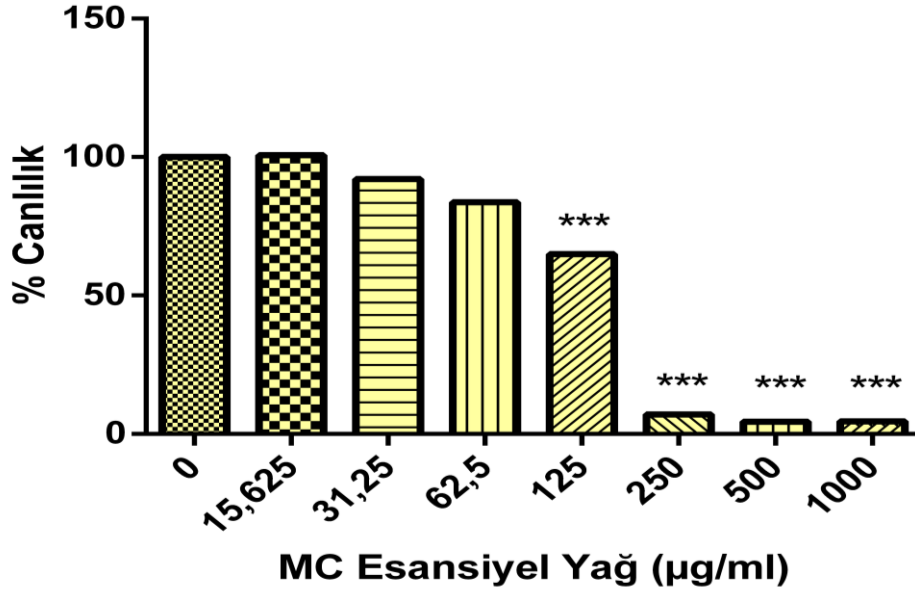
**Şekil 4.3.** BEAS-2B hücre hattında farklı dozlarda 24 saatlik MC esansiyel yağ maruziyeti sonucu optik dansite grafiği (İstatistiksel anlamlılık düzeyi: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  ve \*\*\* $p<0.001$ )

**Çizelge 4.2.** Uygulanan MC esansiyel yağ dozlarında ortalama optik dansite  $\pm$  standart sapma değerleri

| MCµg/ml      | Ortalama±Standart Sapma | p value  |
|--------------|-------------------------|----------|
| 1000 µg/ml   | 0.01956±0.002562***     | < 0,0001 |
| 500 µg/ml    | 0.01914±0.0008331***    | < 0,0001 |
| 250 µg/ml    | 0.03076±0.006123***     | < 0,0001 |
| 125 µg/ml    | 0.2848±0.1351***        | 0,0004   |
| 62.5 µg/ml   | 0.3670±0.08920          | 0,2151   |
| 31.25 µg/ml  | 0.4034±0.06874          | 0,8578   |
| 15.625 µg/ml | 0.4416±0.06340          | 0,9999   |
| Kontrol (0)  | 0.4386±0.06989          | -        |

Mtt testi ile elde ettiğimiz verilerin optik dansite ortalamalarının  $\pm$  standart sapma değerlerinin 1'i geçmemesi tekrarlar arasındaki tutarlılığı göstermektedir.

Deneylerin devamında oksidatif stresin uyarıldığını görebilmek için, hücre canlılığının baskılandığı ilk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dozu olan 40 µM ile, teropatik etkilerinin araştırılacağı MC esansiyel yağının sitotoksik etki göstermeyen en düşük dozu olan 15,625 µg/ml'lik doz tercih edilmiştir (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** BEAS-2B hücre hattında farklı dozlarda 24 saatlik MC esansiyel yağ maruziyeti sonucu % canlılık grafiği (İstatistiksel anlamlılık düzeyi: \*p<0.05, \*\*p<0.01 ve \*\*\*p<0.001)

Bundan sonraki tüm aşamalarda hücreler:

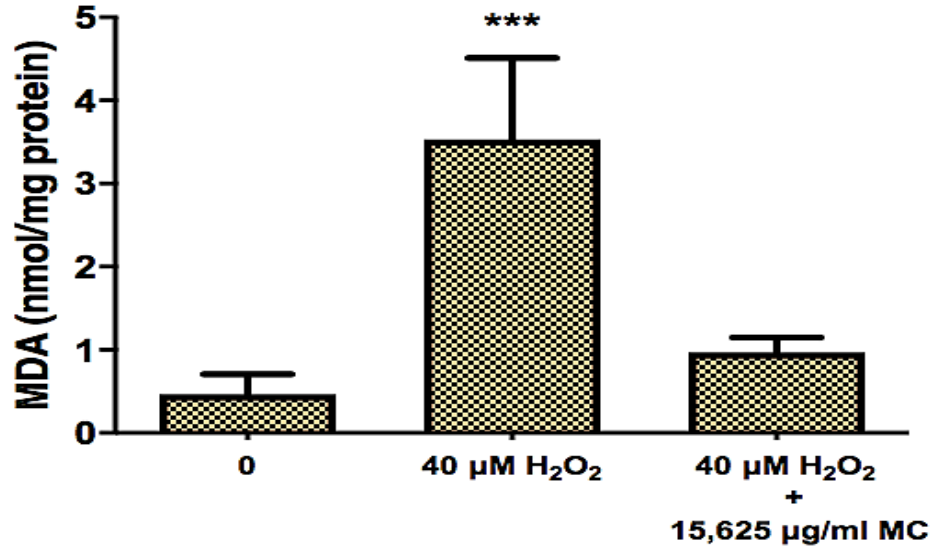
- Kontrol grubu (herhangi bir maddenin eklenmediği sağlıklı hücre grubu);
- Oksidatif stresin uyarıldığı grup (40µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e maruz bırakılan grup);
- MC yağı ile tedavi edilen grup (40µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+15,625µg/ml MC'ye maruz bırakılan grup) olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır.

#### 4.2. MDA Düzeylerinin Belirlenmesi

BEAS-2B hücreleri 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+15,625 µg/ml MC yağı ile 24 saat maruziyete uğratılmış hücrelerdeki MDA düzeyleri değerlendirildi. Kontrol grubu olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanmayan (0 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) grupla karşılaştırıldığında, 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dozunda MDA düzeyinde anlamlı artış gözlenirken (p=0,0003), tedavili grup 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+15,625 µg/ml MC dozunda belirlenen MDA düzeyinde kontrol grubu ile arasında anlamlı bir

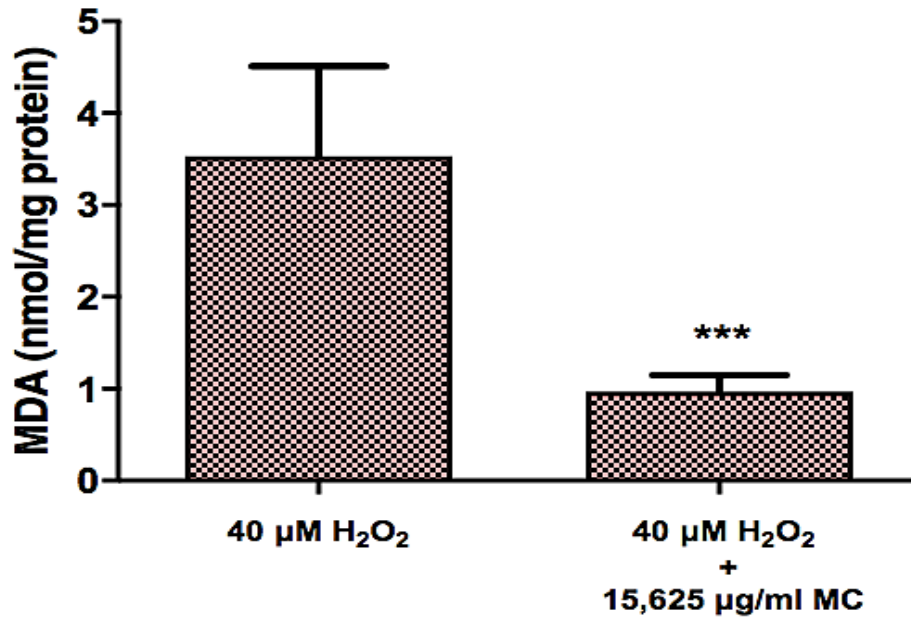


farklılık saptanmamıştır ( $p=0,2717$ ) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Oksidatif strese maruz bırakılan grup (40µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve MC ile tedavi edilen gruptaki (40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+15,625 µg/ml MC) MDA seviyelerinin, kontrol ile karşılaştırılması (İstatistiksel anlamlılık düzeyi: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  ve \*\*\* $p<0.001$ )

40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması ile oksidatif stresin uyarıldığı gruptaki MDA düzeyinin, MC tedavili gruptaki MDA düzeyi ile karşılaştırılması sonucunda, tedavili grupta MDA düzeylerinin anlamlı bir düşüş gösterdiği gözlenmiştir ( $p=0,0009$ ) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Oksidatif strese maruz bırakılan (40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile MC tedavi edilen gruptaki (40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+15,625 µg/ml MC) MDA seviye karşılaştırılması (İstatistiksel anlamlılık düzeyi: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  ve \*\*\* $p<0.001$ )

**Çizelge 4.3.** BEAS-2B hücrelerinde uygulanan dozların maruziyeti sonucu MDA düzeyleri

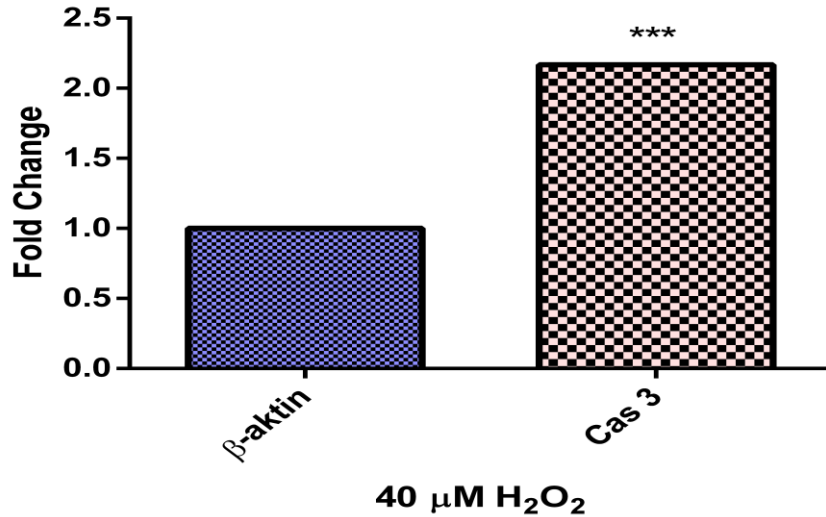
| Gruplar                                                         | Ortalama±Standart Sapma | p değeri (0 $\mu$ M kıyasla) | p değeri (40 $\mu$ M kıyasla) |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 0 $\mu$ M                                                       | 0.4638±0.2433           | -                            | 0,005                         |
| 40 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                        | 3.530±0.9798            | 0,0005                       | -                             |
| 40 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 15,625 $\mu$ g/ml MC | 0.9675±0.1825           | 0,4270                       | 0,0009                        |

İstatistiksel anlamlılık düzeyi: \*p<0.05, \*\*p<0.01 ve \*\*\*p<0.001. MDA testi ile elde ettiğimiz verilerin optik dansite ortalamalarının  $\pm$  standart sapma değerlerinin 1'i geçmemesi tekrarlar arasındaki verilerin tutarlı olduğunu göstermektedir.

### 4.3. Gen Ekspresyon Analizleri

#### 4.3.1.H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in (40 $\mu$ M) Kaspaz 3 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi

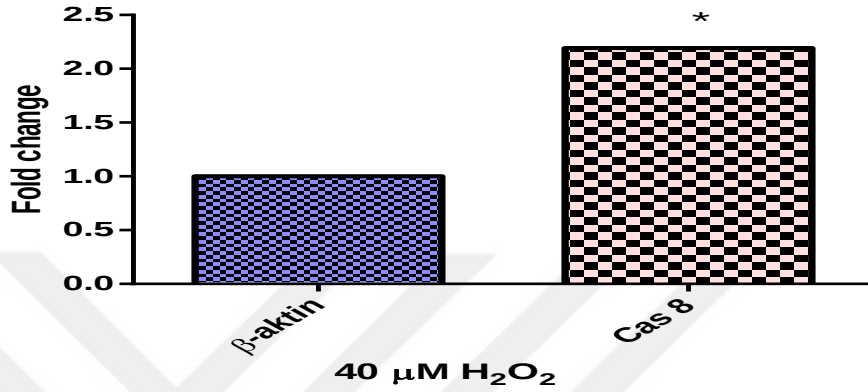
BEAS-2B hücrelerinde 24. saatte, kontrol grubu ile 40  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> doz uygulanan grubun gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması sonucunda, 40  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan grupta Kaspaz 3 gen ekspresyonunun 2.16 kat arttığı saptanmıştır (p=0,001) (Şekil 4.7)



**Şekil 4.7.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in (40  $\mu$ M) Kaspas 3 gen ekspresyonu üzerine etkisi (İstatistiksel anlamlılık düzeyi: \*p<0.05, \*\*p<0.01 ve \*\*\*p<0.001)

#### 4.3.2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in (40µM) Kaspaz 8 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi

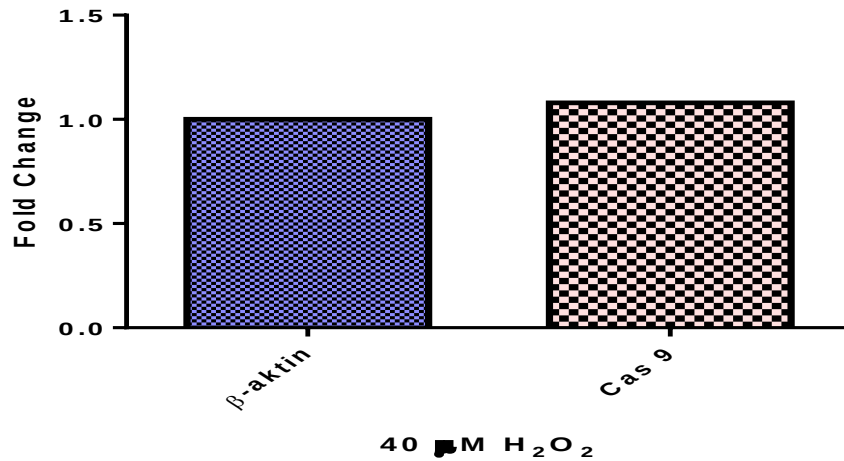
BEAS-2B hücrelerinde 24. saatte, kontrol grubu ile 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> doz uygulanan grubun gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması sonucunda, 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan grupta Kaspaz 8 geninin ekspresyonunun 2.19 kat arttığı saptanmıştır (p=0,017) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (40 µM) Kaspaz 8 gen ekspresyonu üzerine etkisi (İstatistiksel anlamlılık düzeyi: \*p<0.05, \*\*p<0.01 ve \*\*\*p<0.001)

#### 4.3.3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in (40 µM) Kaspaz 9 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi

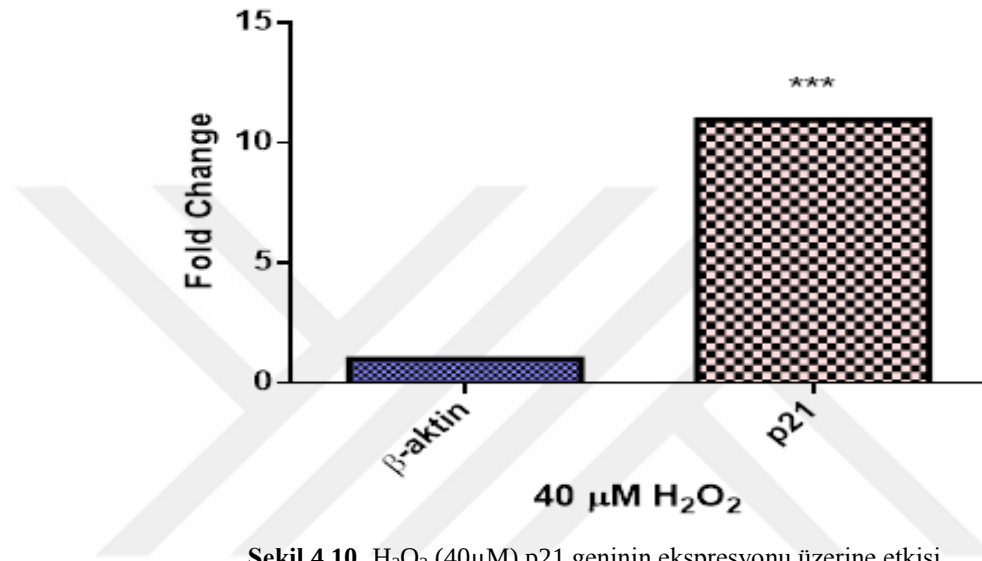
BEAS-2B hücrelerinde 24. saatte kontrol grubu ile 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan grubun Kaspaz 9 gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması sonucunda anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (p=0,86) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (40 µM) Kaspaz 9 gen ekspresyonu üzerine etkisi (İstatistiksel anlamlılık düzeyi: \*p<0.05, \*\*p<0.01 ve \*\*\*p<0.001)

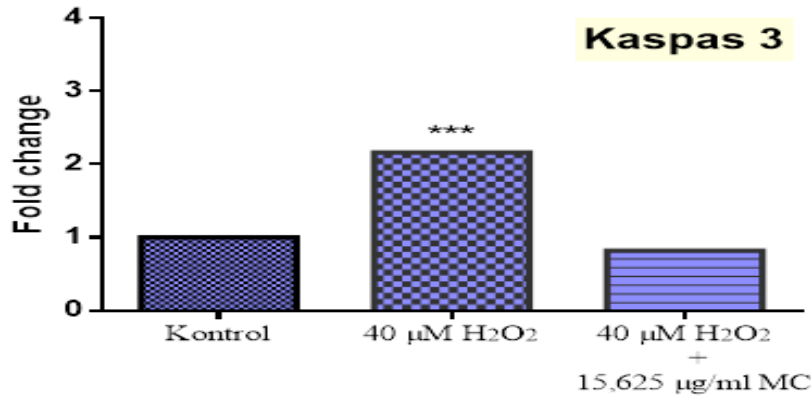
#### 4.3.4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in (40 µM) p21 Geninin Ekspresyonu Üzerine Etkisi

BEAS-2B hücrelerinde 24. saatte, kontrol grubu ile 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> doz uygulanan grubun gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması sonucunda, 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> doz uygulanan grupta p21 geninin ekspresyonunun 10.9 kat arttığı saptanmıştır (p=0,0003) (Şekil 4.10).



#### 4.3.5. Kaspaz 3 Gen Ekspresyonun Farklı Hücre Gruplarında Karşılaştırılması

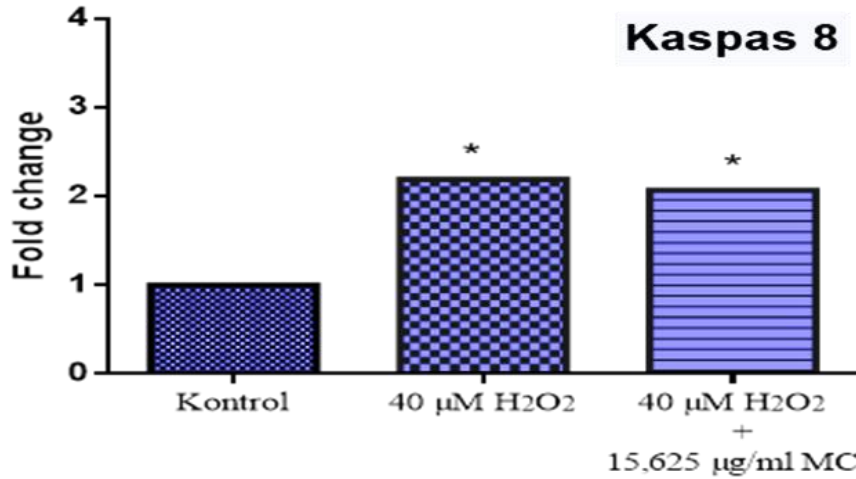
BEAS-2B hücrelerinde 24. saatte, oksidatif stresin uyarılmış olduğu grup (40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile MC tedavisi alan grubun (40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+15,625µg/ml MC) Kaspaz 3 ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında; sadece H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verilen grupta Kaspaz 3 geninin ekspresyonu 2.16 kat artarken (p=0,001), tedavi verilen grupta Kaspaz 3 seviyesi 0,82 kata kadar düşmüş ve kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir (p=0,3). Oksidatif stresin uyarılmış olduğu grup (40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile MC tedavisi alan grubun (40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+15,625 µg/ml MC) Kaspaz 3 gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında tedavili gruptaki ekspresyon seviyesi oksidatif hasarlı gruba göre anlamlı bir şekilde düşüş göstermiştir (p=0,00071) (Şekil4.11).



**Şekil 4.11.** Oksidatif strese maruz bırakılan grup (40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile MC tedavi edilen gruptaki (40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ 15,625 µg/ml MC) Kaspaz 3 gen ekspresyon seviyelerinin, kontrol ile karşılaştırılması (İstatistiksel anlamlılık düzeyi: \*p<0.05, \*\*p<0.01 ve \*\*\*p<0.001)

#### 4.3.6. Kaspaz 8 Gen Ekspresyonunun Farklı Hücre Gruplarında Karşılaştırılması

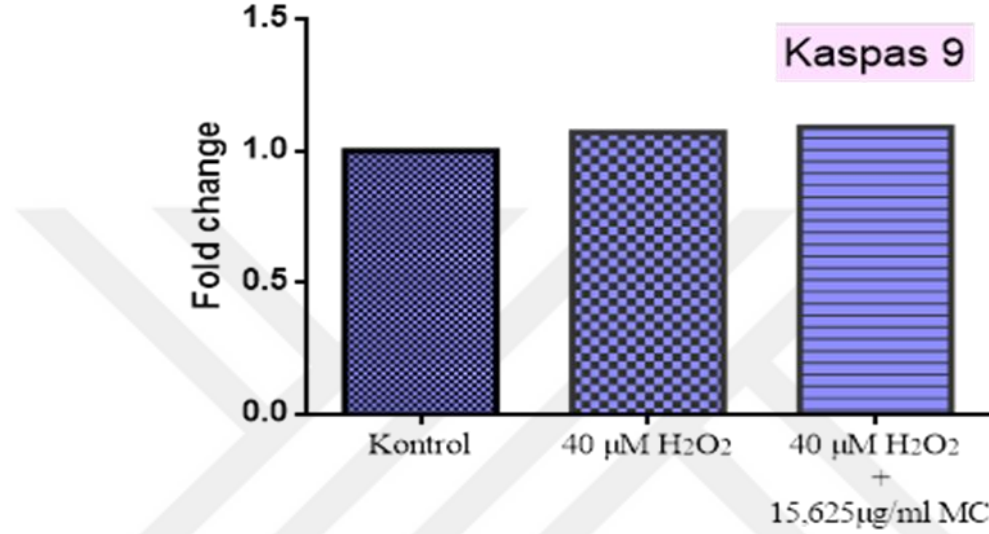
BEAS-2B hücrelerinde 24. saatte, oksidatif stresin uyarılmış olduğu grup (40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile MC tedavisi alan grubun (40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+15,625 µg/ml MC) Kaspaz 8 gen ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında; 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verilen grupta Kaspaz 8 geninin ekspresyonu 2,19 kat (p=0.017), tedavi verilen grupta ise 2,07 (p=0,04) kat artmıştır. Oksidatif stresin uyarılmış olduğu grup (40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile MC tedavisi alan grubun (40µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+15,625 µg/ml MC) Kaspaz 8 gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında her iki gruptaki ekspresyon benzer bulunmuştur (p=0,93) (Şekil 4.12).



**Şekil 4.12.** Oksidatif strese maruz bırakılan grup (40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile MC tedavi edilen gruptaki (40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ 15,625 µg/ml MC) Kaspaz 8 gen ekspresyon seviyelerinin, kontrol grubu ile karşılaştırılması (İstatistiksel anlamlılık düzeyi: \*p<0.05, \*\*p<0.01 ve \*\*\*p<0.001)

#### 4.3.7. Kaspaz 9 Gen Ekspresyonunun Farklı Hücre Gruplarında Karşılaştırılması

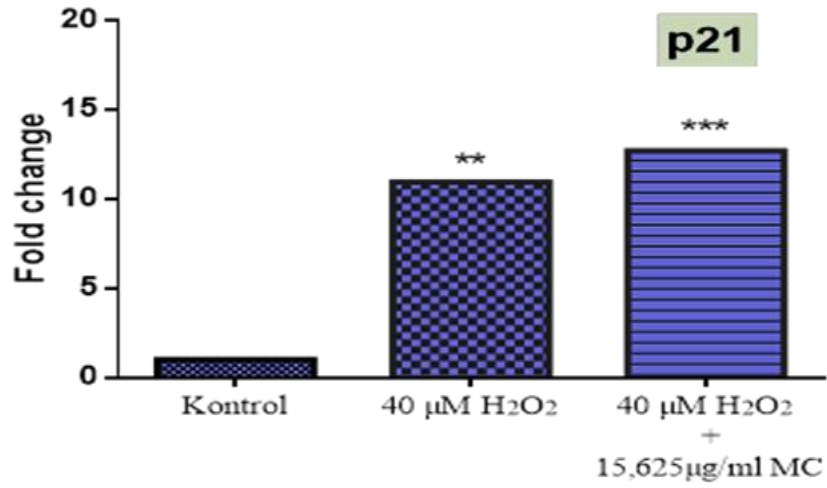
BEAS-2B hücrelerinde 24. saatte, oksidatif stresin uyarılmış olduğu grup ( $40\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ile MC tedavisi alan grubun ( $40\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ + $15,625\mu\text{g/ml}$  MC) Kaspaz 9 gen ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında; her üç gruptaki Kaspaz 9 gen ekspresyon seviyeleri benzer düzeyde bulunmuş, dozlara göre anlamlı bir değişim görülmemiştir ( $p>0,05$ ) (Şekil 4.13).



**Şekil 4.13.** Oksidatif strese maruz bırakılan ( $40\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ile MC tedavili gruptaki ( $40\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ + $15,625\mu\text{g/ml}$  MC) Kaspaz 9 gen ekspresyon seviyelerinin, kontrol grubu ile karşılaştırılması (İstatistiksel anlamlılık düzeyi: \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  ve \*\*\* $p<0,001$ )

#### 4.3.8. p21 Gen Ekspresyonunun Farklı Hücre Gruplarında Karşılaştırılması

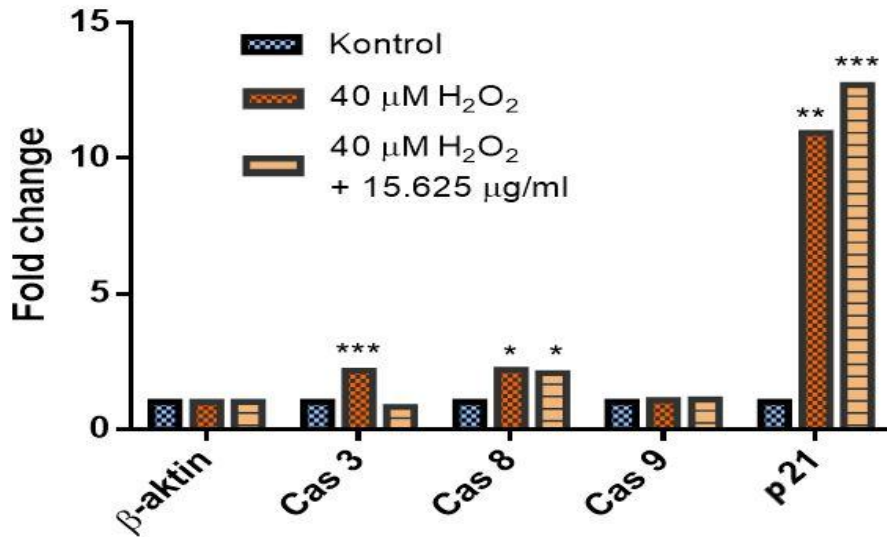
BEAS-2B hücrelerinde 24. saatte, oksidatif stresin uyarılmış olduğu grup ( $40\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ile MC tedavisi alan grubun ( $40\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ + $15,625\mu\text{g/ml}$  MC) p21 gen ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında;  $40\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  verilen grupta p21 geninin ekspresyonu 10,95 kat ( $p=0,002$ ), tedavi verilen grupta ise 12,71 kat ( $p=0,0003$ ) artmıştır. Oksidatif stresin uyarılmış olduğu grup ( $40\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ile MC tedavisi alan grubun ( $40\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ + $15,625\mu\text{g/ml}$  MC) p21 gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında her iki gruptaki ekspresyon seviyesi benzer bulunmuştur ( $p=0,45$ ) (Şekil 4.14).



**Şekil 4.14.** Oksidatif strese maruz bırakılan (40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile MC tedavili gruptaki (40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+15,625 µg/ml MC) p21 gen ekspresyon seviyelerinin, kontrol grubu ile karşılaştırılması (İstatistiksel anlamlılık düzeyi: \*p<0.05, \*\*p<0.01 ve \*\*\*p<0.001)

#### 4.3.9. Gen Ekspresyon Seviyelerinin Farklı Hücre Gruplarında Karşılaştırılması

Tüm gen ekspresyonlarına total bir bakış açısı sağlaması bakımından çalışmada yer alan tüm gen ekspresyon seviyelerinin farklı gruplardaki değişimi Şekil 4.15’de verilmiştir.



**Şekil 4.15.** Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9 ve p21 gen ekspresyon seviyelerinin farklı gruplardaki değişimi (İstatistiksel anlamlılık: \*p<0.05, \*\*p<0.01 ve \*\*\*p<0.001)



#### 4.3.10. Kontrol Grubu, Oksidatif Strese Maruz Bırakılan (40 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve MC ile Tedavi Edilen Grupta (40 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+15,625 $\mu$ g/ml MC) CT Değeri Karşılaştırılması

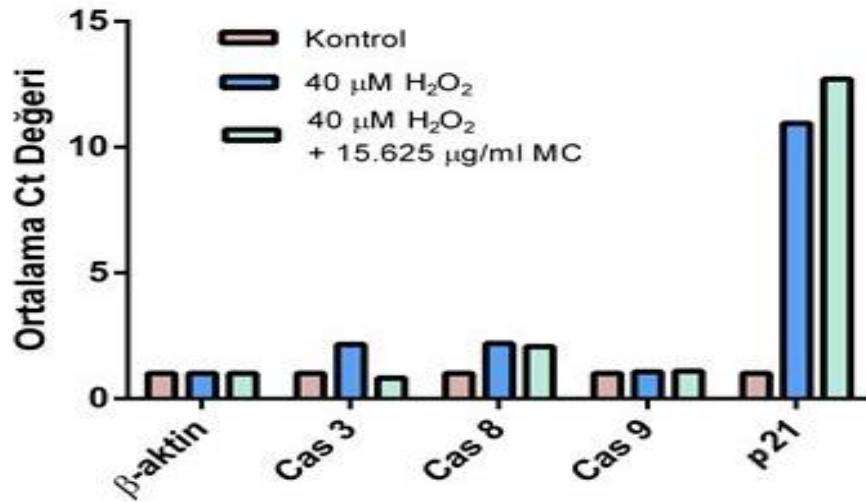
Tüm hücre gruplarındaki gen ekspresyonlarına ait Ct değerleri (çizelge 4.4)'de verilmiştir.

**Çizelge 4.4.** Kontrol grubu, 40  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 40  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+156.25  $\mu$ g/ml MC dozlarının ortalama Ct $\pm$ standart sapma değerleri

| Standart Sapma<br>Genler | Kontrol Grubu Ort<br>Ct $\pm$ Standart Sapma | 40 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Ort<br>Ct $\pm$ Standart Sapma | 40 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +<br>15.625 $\mu$ g/ml Ort<br>Ct $\pm$ Standart Sapma |
|--------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\beta$ -aktin           | 18 $\pm$ 0,42917                             | 18,13 $\pm$ 0,310124                                                    | 17,67 $\pm$ 0,49495                                                                            |
| Cas 3                    | 18,93 $\pm$ 0,556444                         | 17,94 $\pm$ 0,324879                                                    | 18,87 $\pm$ 0,43453                                                                            |
| Cas 8                    | 33,01 $\pm$ 0,653036                         | 32,01 $\pm$ 0,415355                                                    | 31,63 $\pm$ 0,718025                                                                           |
| Cas 9                    | 33,48 $\pm$ 0,842512                         | 33,5 $\pm$ 0,736272                                                     | 33,02 $\pm$ 0,80129                                                                            |
| p21                      | 20,3 $\pm$ 0,978359                          | 16,99 $\pm$ 0,237887                                                    | 16,31 $\pm$ 0,37463                                                                            |

Ortalama Ct değerlerindeki $\pm$ standart sapma değerlerinin 1'i geçmemesi tekrarlar arasındaki tutarlılığı göstermektedir.

Hücre gruplarında gen ekspresyonlarına ait Ct değerlerine ait grafik Şekil 4.16'da verilmiştir.



**Şekil 4.16.** Kontrol grubu, oksidatif strese maruz bırakılan (40  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve MC yağı ile tedavi edilen gruptaki (40  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+15,625  $\mu$ g/ml MC) ortalama Ct değerlerinin karşılaştırılması



## 5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, insan akciğer dokusundan köken alan BEAS-2B bronş epitel hücreleri üzerinde hidrojen peroksit maruziyeti ile oksidatif stres oluşturuldu ve MC esansiyel yağının apoptotik yolak ve malondialdehit seviyeleri üzerindeki etkileri deneysel olarak araştırıldı. MC esansiyel yağının sitotoksik olmayan dozunun tespiti amacıyla yapılan MTT uygulamasını takiben oksidatif stres durumu ile apoptotik yolda görevli Kaspaz 3, 8, 9, ile p21 gen ekspresyonları beraber değerlendirildi (Şekil 4.15). Bu çalışma, MC yağının akciğer hücresi üzerindeki yararlı etkilerini gerek hücre düzeyinde oksidatif hasara etkisi, gerekse genetik düzeyde apoptozise etkisini göstermesi bakımından sonuçlarıyla MC yağının tıbbi uygulamalardaki etkinliğine katkı sağlayacak önemli bir çalışmadır.

Günümüz modern tıp uygulamalarında yaygın kullanılsa dahi biyoaktif bileşenlerce zengin olan MC yağı halk arasında tedavilerde tercih edilmektedir (Masoudi ve ark. 2016). Kumar ve arkadaşları *Myrtus communis* L. yapraklarından ve bitkinin diğer kısımlarından elde edilen farklı ekstraktların ve bileşiklerin antioksidan aktivitelerini göstermiştir (Kumar ve ark. 2011). MC esansiyel yağının farklı formları kullanılarak *in-vitro* çalışmalar yapıldıysa da, yapılan çalışmalar oldukça sınırlı kalmıştır (Rossi ve ark. 2009). Son dönemde sentetik antioksidanların kanserojen etkileri nedeniyle, insan uygulamaları için kullanımları sınırlandırıldığından, modern tıbbın doğal antioksidanlara olan ilgisi artmaktadır (Mimica-Dukić ve ark. 2010).

MC yağı da gerek fenilpropanoidler ve gerekse uçucu yağlar gibi sekonder metabolitlerin aktivitesi nedeniyle doğal bir antioksidan kaynağı olduğundan tıbbi uygulamalarda kullanım için ön sıra aday bitkilerdendir (de Lator ve ark. 2018). Gardeli ve arkadaşları fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitelerini, indirgeyici ajanlar, hidrojen bağışçılar, tekli oksijen indirgeyicileri olarak etki etmelerini sağlayan redoks özelliklerine bağlamaktadır (Gardeli ve ark. 2008). Bizim çalışmamızda, bu çalışmalardan farklı olarak MC yağının canlı hücre üzerine etkileri sadece oksidatif stres ile değil aynı zamanda apoptotik gen ekspresyonu ile beraber araştırıldı.

MC esansiyel yağının nonsitotoksik dozlarını saptamak amacıyla MTT testi yapıldı. Hücreler 1000-500-250-125-62.5-31.25-15.625 µg/ml dozlarda MC esansiyel yağı ile 24 saat süreyle inkübe edildi. MTT testi uygulanarak 15,625 µg/ml MC dozunun test

edilen dozlar içerisinde sitotoksik etkisi olmayan doz olduğu görüldü (Şekil 4.3).

Yapılan çalışmalarda Hidroksil radikalının süpürme kabiliyeti, antioksidanların potansiyelini değerlendirmek için yaygın bir araç olarak kabul edilmekte ve serbest metal iyonlarının şelatlanması veya  $H_2O_2$ 'nin diğer zararsız bileşiklere dönüştürülmesi yoluyla hidroksil radikalının oluşumunun temizlenerek başarılabildiği düşünülmektedir (Lu ve ark. 2010). Bizim çalışmamızda bu etkinin gösterilmesi için BEAS-2B hücreleri, oksidatif stres modeli oluşturmak için uygun doz ve maruziyet süresi belirlemek amacıyla 0, 10, 20, 30, 40, 50 ve 75, ve 100  $\mu M$  dozlarında  $H_2O_2$ 'ye 24 saat süreyle maruz bırakıldıktan sonra MTT yöntemiyle hücre canlılığı analizi yapıldı (Şekil 4.2).  $H_2O_2$ 'nin, BEAS-2B hücrelerine 24 saatlik inkübasyonu sonunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 30  $\mu M$ 'lık dozda anlamlı bir fark görülmezken 40, 50 ve 75, 100  $\mu M$ 'lık dozların hücre canlılığını anlamlı derecede azalttığı bulundu. Bu sitotoksik etkinlik 100  $\mu M$  dozunda en güçlü seviyede tespit edilmiştir. Oksidatif stres yaratmak için hücre canlılığının baskılandığı ilk doz 40  $\mu M$   $H_2O_2$  uygulama dozu olarak tercih edildi.

Çeşitli oksidan moleküllerin seviyeleri ile antioksidanlar arasındaki dengesizlik olarak tanımlanan oksidatif stresin, birçok organizmada biyokimyasal değişime ve dolayısıyla ciddi hastalıklara neden olduğu bilinmektedir (Dennis ve Witting 2017). Özellikle Park ve arkadaşları (Park ve ark. 2002) ile Barrera ve arkadaşlarının (Barrera 2012) yaptıkları çalışmalarda oksidatif stres, sitotoksik ve genotoksik etkilere yol açarak lipidler, proteinler ve DNA gibi temel biyomoleküllere zarar vererek hücre düzeyinde geri dönüşümsüz hasarlara aracılık edebilmektedir. Neticede reaktif oksijen türlerinin saldırısından kaynaklanan DNA hasarı mutajenez ve karsinogenezin ana nedeni olarak kabul edilmektedir (Saha ve ark. 2017). Romani ve arkadaşları (Romani ve ark. 2004), *Myrtus communis* L. özlerinin antioksidan aktivitesi üzerindeki etkisini, yaptıkları çalışmada değerlendirmişti. Farklı bir çalışmada, Ines ve arkadaşları *Myrtus communis* yaprağından izole edilen saf bileşiklerin antioksidan aktivitesini bildirmişlerdir (Ines ve ark. 2012). Antioksidan aktivite, K562 hücre hattında hidrojen peroksit tarafından indüklenen lipid peroksidasyonunu inhibe etme kabiliyeti ile belirlenmişti. TBA testi, tiyobarbitürik aside sahip pembe bir kromofor oluşturan lipid hidroperoksit ayrışmasından sonra oluşan malondialdehit'i (MDA) ölçtüler. Turhan ve arkadaşları, peroksit değeri, tiyobarbitürik asit reaktif madde ve oksidatif uyum skoru belirleyerek lipid oksidasyonunu gözlemledi (Turhan ve ark. 2012). Myrtle ve biberiye ekstraktları MDA ölçümü üzerinden lipid oksidasyonunu yavaşlatmada çok etkili olduğunu

gösterdiler ve çalışmada *Myrtus communis* MDA değerini düşürmeyi başardı (Fadaei ve ark. 2015). Bizim çalışmamızda da bu çalışmalara benzer şekilde canlı hücrelere MC yağının etkisini ölçmek için MDA değerlendirildi.

BEAS-2B hücreleri 40  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ve 40  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ +15,625  $\mu\text{g/ml}$  MC esansiyel yağı ile 24 saat inkübe edilerek hücredeki MDA düzeyleri değerlendirildi. Kontrol grubu olarak  $\text{H}_2\text{O}_2$  uygulanmayan (0  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) hücreler kullanıldı. Kontrol grubuna göre 40  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  dozunda MDA düzeyinde anlamlı bir artış gözlenirken, 40  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ +15,625  $\mu\text{g/ml}$  içeren grupta MDA düzeyleri kontrol grubuna benzer bulundu. MC yağı  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in neden olduğu, MDA artışı ile gösterilen, oksidatif stresi kontrol düzeylerine indirmeyi başardı (Şekil 4.5).

Bajpai ve arkadaşlarının çalışmasında, *M. communis* ekstraktlarının reaktif oksijen türlerinin iyi bir temizleyicisi gibi görünmektedir (Bajpai ve ark. 2015). Sahreen ve arkadaşları Hidrojen peroksitin, ana hücre bileşenleriyle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna katıldığını ve ayrıca DNA hasarına neden olduğunu gösterdiler (Sahreen ve ark. 2014). Miguel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin oksidatif etkisi inhibe etme kapasitesi test edilen *M. communis* ekstraktların konsantrasyonunun arttırılmasıyla artmıştır. Bu gözlemlenen  $\text{H}_2\text{O}_2$  temizleme aktivitesi, elektronları hidroksil radikallerine kolayca bağışlayabilen fenolik bileşenlerin varlığına bağlanabilir (Miguel 2010). Kumar ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada Myrtle özleri lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini ve böylece MDA seviyesinin düştüğünü gösterdiler (Kumar ve ark. 2011).

Bizim çalışmamızda  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile maruziyete uğrattığımız BEAS-2B hücrelerinde etkilenme dozunu yüksek tutmamız gerekti. 30  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  uyguladığımız hücrelerin MDA düzeylerinde anlamlı bir artış göremediğimiz için, MTT testimizde anlamlılık veren bir üst doz olan 40  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  dozunu uyguladık ve bu dozda MDA seviyelerindeki artışı gözlemledik. Böylelikle hücre canlılığını baskılayan ilk doz olan 40  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  dozunun hücrelerde oksidatif stres oluşturduğunu gösterdik. Bu sonuçlar, Kumar ve arkadaşları (Kumar ve ark. 2011) ve Gonçaves (Gonçaves ve ark. 2013) çalışmaları ile uyumludur.

Bilindiği üzere sağlıklı hücreler apoptozis yolu ile homeostazisi sağlayarak tümör oluşumu gibi tabloların önüne geçmektedir (Fulda 2010). Apoptozis, hücre herhangi bir oksidana maruz kaldığında ve hücre düzeyinde hasar meydana geldiğinde devreye girerek hatayı hücre düzeyinde onarmakta veya ortadan kaldırmaktadır (Fulda 2011). Bu sistemin sekteye uğraması neticesinde kanserli hücreler çoğalarak tümör

oluşumuna neden olabilirler. Çalışmamızda BEAS-2B hücrelerinde değişik dozlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uyguladık ve yapay olarak oksidatif stresi meydana getirdik.

Çalışmamızda, BEAS-2B hücrelerinde 24. saatte kontrol grubu (0 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile oksidatif strese maruz bırakılan grup (40µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) karşılaştırıldığında 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubunda Kaspaz 3, 8 ve p21 geninin ekspresyonu istatistiksel olarak artmış bulundu. Bir Cdk inhibitörü olan p21 ekspresyonundaki artış, hücrenin onarım ya da apoptoz kararını vermek üzere hücre döngüsünü durdurduğunu düşündürdü. Kaspaz 9 geninin ekspresyon seviyesinde ise anlamlı bir değişim görülmedi. Bu bize 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in hücrede apoptozu ekstrinsik yolak üzerinden tetiklediğini gösterdi. Böylelikle MDA düzeylerini de yüksek bulduğumuz bu dozun, hücrelerde, onarılamayan oksidatif hasardan kaynaklanan apoptotize yol açtığı sonucuna vardık.

BEAS-2B hücrelerinde 24. saatte MC grubu (40µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+15,625 µg/ml) ile oksidatif strese maruz bırakılan grup (40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) karşılaştırıldığında, MC esansiyel yağı ile muamele edilen hücrelerde Kaspaz 3 ekspresyonunun önemli derecede azaldığını gördük (Şekil 4.11). Kaspaz 8 gen ekspresyonunda da az miktarda bir düşüş gördüysek de bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 4.12). Ancak apoptozun son evresinde, kaspaz şelalesinin en son basamağı olan DNA fragmentasyonu aşamasında görev alan Kaspaz 3'ün kontrol grubu seviyelerinin de altına inmesi, MC esansiyel yağının oksidatif hasardan kaynaklı apoptozun engellenmesinde oldukça etkili olduğunu gösterdi (Şekil 4.11).

Fernald ve Kurokawa apoptozun uyarılmasının hedeflenmesinin yanı sıra ortamdaki oksidatif stresi eş zamanlı azaltacak terapötik bir strateji geliştirmesinin oldukça önemli bir yaklaşım olacağını belirttiler (Fernald ve Kurokawa 2013). Apoptozisin Myrtus Communis L yağı aracılığı ile intrinsik ve ekstrinsik yollar üzerinden aktivasyonun aydınlatılmasında Tretiakova ve arkadaşlarının kanser hücrelerinde yaptığı çalışma önem taşımaktadır (Tretiakova ve ark. 2007). Özellikle MC yağının kanserli hücrede apoptozisi kaspaz 3, 8 ve 9 aracılığı ile aktive ettiğini göstermiştir. Bizim çalışmamızda bu çalışmalardan farklı olarak çalışılan hücre hattı kanser hücre hattı değildi. Kanser terapilerinde apoptoza dirençli kanser hücrelerini apoptoza yönlendirmek önemli bir tedavi stratejisi iken, sağlıklı hücrelerde oksidatif hasardan kaynaklı apoptozu geriletebilmek hücrenin yaşamını devam ettirmesi açısından önemlidir.

Çalışmamızda apoptotik gen ekspresyonlarının ürün düzeyinde gösterebilmek için Western Blot yönteminin olmaması gibi bazı kısıtlılıklar mevcuttur. Bu yöntemlerin kullanılması ile, MC esansiyel yağının antioksidan aktivitesi daha ileri düzeyde gösterilebilir.

Sonuç olarak MC esansiyel yağının hidrojen peroksitle uyarılan oksidatif stresi azaltması ve eş zamanlı olarak oksidatif stresten kaynaklı apoptozisi baskılaması sebebiyle MC yağının tıbbi fayda sağlayacağını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, MC esansiyel yağının 15,625µg/ml dozda oksidatif stres üzerinde MDA seviyelerine dayanarak güçlü şekilde azaltıcı etkisi olduğu gösterildi (Şekil 4.6). Ayrıca aynı dozda oksidatif stres tarafından indüklenen apoptozis mekanizması üzerinde geriletilici etkinliği tespit edildi. Sonuç olarak MC yağı hem oksidatif stresi azaltarak hem de oksidatif stres kaynaklı apoptozisi inhibe ederek tıbbi açıdan güçlü terapötik etki göstermiştir.

## 6. SONUÇ

*Myrtus communis* L. esansiyel yağının oksidatif stres uyarılı BEAS-2B hücreleri üzerindeki antioksidan ve antiapoptotik etkilerini araştırdığımız bu çalışmada; 1000-500-250-125-62.5-31.25-15.625 µg/ml MC esansiyel yağ dozları kullanıldı. Sitotoksosite ölçüldü. Oksidatif stres oluşturmak için hücreler 0, 30, 40, 50 ve 75, ve 100 µM dozlarında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>ye 24 saat süreyle maruz bırakıldıktan sonra MTT yöntemiyle hücre canlılığı analizi yapıldı. Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9 ve p21 genlerinin ekspresyon düzeyleri incelendi.

1. MC yağının 15.625-62.5 µg/ml doz aralığında sitotoksik olmadığı tespit edilmiştir.
2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> maruziyeti için 24 saatlik sürede etkili dozun 40 µM olduğu tespit edildi.
3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve MC esansiyel yağında belirlemiş olduğumuz bu etkin dozlar kullanılarak MDA bakıldı. MC esansiyel yağının MDA miktarını düşürdüğü tespit edildi.
4. BEAS-2B hücrelerinde kontrol grubu ile 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dozu karşılaştırıldığında proapoptotik Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 ekspresyonlarının arttığı saptandı.
5. BEAS-2B hücrelerinde 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+15.625 µg/ml MC karşılaştırıldığında Kaspaz 3 geninin ekspresyon seviyesinde çok güçlü bir azalma saptandı.
7. Oksidatif stres uyarılı BEAS-2B hücrelerinde MC esansiyel yağının oksidatif stres kaynaklı indüklenmiş apoptozu, Kaspaz 3 seviyelerini düşürerek baskıladığı belirlendi.

Sonuç olarak; bu çalışma MC esansiyel yağının MDA miktarını düşürmesi antioksidan aktivitesinin güçlü olduğunu göstermektedir. Özellikle hücre için başedilemeyen düzeyde oksidatif hasar sebebiyle meydana gelen apoptozisi baskılayıcı özellikleri hücresel canlılık için son derece önem arz etmektedir. Tüm bu özelliklerinden dolayı MC yağının tedavilerde doğal terapötik ajan olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Achanta G, Huang P.** Role of p53 in Sensing Oxidative DNA Damage in Response to Reactive Oxygen Species-Generating Agents. *Cancer Research*, **2004**, 64(17). s. 6233-6239.
2. **Adams JM, Cory S.** Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences*, **2001**, 26(1). s. 61-66.
3. **Adams JM, Cory S.** The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. *Cell Death & Differentiation*, **2017**, 25(1). s. 27-36.
4. **Adrain C, Martin SJ.** The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in Biochemical Sciences*, **2001**, 26(6). s. 390-397.
5. **Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH.** Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*, **2011**, 119(3). s. 651-665.
6. **Aidi Wannes W, Mhamdi B, Sriti J, Ben Jemia M, Ouchikh O ve ark.** 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). s. 1362-1370.
7. **Aldrich S.** 5-Methyl-2-phenyl-2-hexenal. *sigmaaldrich*, **2019**. s.
8. **Allan LA, Clarke PR.** Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. *FEBS Journal*, **2009**, 276(21). s. 6063-6073.
9. **Allan LA, Morrice N, Brady S, Magee G, Pathak S ve ark.** Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nature Cell Biology*, **2003**, 5(7). s. 647-654.
10. **Ashkenazi A, Fairbrother WJ, Levenson JD, Souers AJ.** From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2017**, 16(4). s. 273-284.
11. **Aung-Htut MT, Ayer A, Breitenbach M, Dawes IW.** Oxidative Stresses and Ageing. *Aging Research in Yeast: Springer Netherlands*; **2011**. p. 13-54.
12. **Ayala A, Munoz MF, Arguelles S.** Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, **2014**, 2014. s. 360438.
13. **Aydin C, Özcan MM.** Determination of nutritional and physical properties of myrtle (*Myrtus communis* L.) fruits growing wild in Turkey. *Journal of Food Engineering*, **2007**, 79(2). s. 453-458.
14. **Baines CP.** Role of the Mitochondrion in Programmed Necrosis. *frontiers in physiology*, **2010**, 1. s.
15. **Bajpai VK, Agrawal P, Bang BH, Park Y-H.** Phytochemical analysis, antioxidant and antilipid peroxidation effects of a medicinal plant, *Adhatoda vasica*. *Frontiers in Life Science*, **2015**, 8(3). s. 305-312.
16. **Bao Q, Shi Y.** Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ*, **2007**, 14(1). s. 56-65.
17. **Barrera G.** Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN oncology*, **2012**, 2012. s. 137289-137289.
18. **Barrera G, Pizzimenti S, Daga M, Dianzani C, Arcaro A ve ark.** Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes, 4-Hydroxynonenal and Malondialdehyde in Aging-Related Disorders. *Antioxidants (Basel)*, **2018**, 7(8). s.
19. **C Fogg V, Lanning N, MacKeigan J.** Mitochondria in cancer: At the crossroads of life and death **2011**. 526-539 p.
20. **Cakir A.** Essential oil and fatty acid composition of the fruits of *Hippophae rhamnoides* L. (Sea Buckthorn) and *Myrtus communis* L. from Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, **2004**, 32(9). s. 809-816.
21. **Chalchat J-C, Garry R-P, Michet A.** Essential Oils of Myrtle (*Myrtus communis* L.) of the Mediterranean Littoral. *Journal of Essential Oil Research*, **1998**, 10(6). s. 613-617.
22. **Constantinescu AA, Morle A, Micheau O.** Immunoprecipitation of Death Inducing Signaling Complex by Caspase-8. *Methods Mol Biol*, **2017**, 1557. s. 19-31.
23. **Curtin JF, Cotter TG.** Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cellular Signalling*, **2003**, 15(11). s. 983-992.
24. **Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM.** Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2013**, 15(1). s. 49-63.
25. **de Lavor ÉM, Fernandes AWC, de Andrade Teles RB, Leal AEBP, de Oliveira Júnior RG ve ark.** Essential Oils and Their Major Compounds in the Treatment of Chronic Inflammation: A Review

- of Antioxidant Potential in Preclinical Studies and Molecular Mechanisms. *Oxidative medicine and cellular longevity*, **2018**, 2018. s. 6468593-6468593.
26. **Delbridge ARD, Grabow S, Strasser A, Vaux DL**. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nature Reviews Cancer*, **2016**, 16(2). s. 99-109.
  27. **Dennis JM, Witting PK**. Protective Role for Antioxidants in Acute Kidney Disease. *Nutrients*, **2017**, 9(7). s. 718.
  28. **El-Shinnawi U, Soory M**. Actions of Adjunctive Nutritional Antioxidants in Periodontitis and Prevalent Systemic Inflammatory Diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, **2015**, 15(4). s. 261-276.
  29. **Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H**. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, **1991**, 11(1). s. 81-128.
  30. **Fadaei B, Ahmadvand H, Ghasemi M, Mirzaie S**. Inhibitory effects of myrtle (*Myrtus communis* L.) leaves hydroalcoholic extract on LDL oxidation in vitro **2015**. 42-46 p.
  31. **Fadeel B, Gleiss B, Högstrand K, Chandra J, Wiedmer T ve ark**. Phosphatidylserine Exposure during Apoptosis Is a Cell-Type-Specific Event and Does Not Correlate with Plasma Membrane Phospholipid Scramblase Expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1999**, 266(2). s. 504-511.
  32. **Fernald K, Kurokawa M**. Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol*, **2013**, 23(12). s. 620-633.
  33. **Fernando P, Kelly JF, Balazsi K, Slack RS, Megeney LA**. Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2002**, 99(17). s. 11025-11030.
  34. **Frankel EN, Neff WE**. Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, **1983**, 754(3). s. 264-270.
  35. **Fulda S**. Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. *Int J Cell Biol*, **2010**, 2010. s. 370835.
  36. **Fulda S**. Targeting apoptosis signaling pathways for anticancer therapy. *Front Oncol*, **2011**, 1. s. 23.
  37. **Galli F, Conese M, Maiuri L, Gambari R, Bartolini D ve ark**. Introduction to Oxidative Stress and Antioxidant Therapy in Respiratory Disorder. *Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice: Springer New York*; **2014**. p. 1-26.
  38. **Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Kepp O, Kroemer G**. Regulated cell death and adaptive stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **2016**, 73(11-12). s. 2405-2410.
  39. **Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G**. Mitochondrial regulation of cell death: a phylogenetically conserved control. *Microbial Cell*, **2016**, 3(3). s. 101-108.
  40. **Gardeli C, Vassiliki P, Athanasios M, Kibouris T, Komaitis M**. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry*, **2008**, 107(3). s. 1120-1130.
  41. **Gewies A**. Introduction to Apoptosis. *ApoReview*, **2003**, 3(3). s. 1-26.
  42. **Gibert B, Mehlen P**. Dependence Receptors and Cancer: Addiction to Trophic Ligands. *Cancer Research*, **2015**, 75(24). s. 5171-5175.
  43. **Gonçalves S, Gomes D, Costa P, Romano A**. The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, **2013**, 43. s. 465-471.
  44. **Gortzi O, Lalas S, Chinou I, Tsaknis J**. Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of *Myrtus communis* extract before and after encapsulation in liposomes. *European Food Research and Technology*, **2007**, 226(3). s. 583-590.
  45. **Gozuacik D, Kimchi A**. Autophagy and Cell Death. *Current Topics in Developmental Biology: Elsevier*; **2007**. p. 217-245.
  46. **Green DR, Ferguson T, Zitvogel L, Kroemer G**. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nature Reviews Immunology*, **2009**, 9(5). s. 353-363.
  47. **Halliwell B, Whiteman M**. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British journal of pharmacology*, **2004**, 142(2). s. 231-255.
  48. **Harrison A, Bakaletz LO, Munson RS**. Haemophilus influenzae and oxidative stress. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **2012**, 2. s.
  49. **Hayder N, Abdelwahed A, Kilani S, Ammar RB, Mahmoud A ve ark**. Anti-genotoxic and free-radical scavenging activities of extracts from (Tunisian) *Myrtus communis*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **2004**, 564(1). s. 89-95.



50. **Hayder N, Skandrani I, Kilani S, Bouhlel I, Abdelwahed A ve ark.** Antimutagenic activity of *Myrtus communis* L. using the Salmonella microsome assay. *South African Journal of Botany*, **2008**, 74(1). s. 121-125.
51. **Hu Q, Wu D, Chen W, Yan Z, Yan C ve ark.** Molecular determinants of caspase-9 activation by the Apaf-1 apoptosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2014**, 111(46). s. 16254-16261.
52. **Hutchins JB, Barger SW.** Why neurons die: Cell death in the nervous system. *The Anatomical Record*, **1998**, 253(3). s. 79-90.
53. **Ines S, Ines B, Wissem B, Mohamed BS, Nawel H ve ark.** In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of 3,5-O-di-galloylquinic acid extracted from *Myrtus communis* leaves and modulation of cell gene expression by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Appl Toxicol*, **2012**, 32(5). s. 333-341.
54. **Ishizaki Y, Jacobson MD, Raff MC.** A Role for Caspases in Lens Fiber Differentiation. *The Journal of Cell Biology*, **1998**, 140(1). s. 153-158.
55. **Kanoun K, Belyagoubi-Benhammou N, Ghembza N, Atik Bekkara F.** Comparative studies on antioxidant activities of extracts from the leaf, stem and berry of *Myrtus communis* L. *Int Res Food J*, **2014**, 21. s. 1957-1962.
56. **Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, **1972**, 26(4). s. 239-257.
57. **Kim EM, Shin EJ, Lee JA, Son HJ, Choi DH ve ark.** Caspase-9 activation and Apaf-1 cleavage by MMP-3. *Biochem Biophys Res Commun*, **2014**, 453(3). s. 563-568.
58. **Krammer PH.** CD95(APO-1/Fas)-Mediated Apoptosis: Live and Let Die. *Advances in Immunology*: Elsevier; **1998**. p. 163-210.
59. **Kretz AL, Trauzold A, Hillenbrand A, Knippschild U, Henne-Bruns D ve ark.** TRAILblazing Strategies for Cancer Treatment. *Cancers (Basel)*, **2019**, 11(4). s.
60. **Kumar R, Phaneendra P, Bodhanapu S, Rahiman F, Mohamed NK ve ark.** Antioxidant and hepatoprotective activity of the aqueous extract of *Myrtus communis* (myrtle) Linn. leaves **2011**. 1083-1090 p.
61. **Kwiecien S, Jasnos K, Magierowski M, Sliwowski Z, Pajdo R ve ark.** Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions and mechanism of protection against oxidative stress - induced gastric injury. *J Physiol Pharmacol*, **2014**, 65(5). s. 613-622.
62. **Leist M, Jäätelä M.** Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2001**, 2(8). s. 589-598.
63. **Lockshin RA, Williams CM.** Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *Journal of Insect Physiology*, **1964**, 10(4). s. 643-649.
64. **Lockshin RA, Zakeri Z.** Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2001**, 2(7). s. 545-550.
65. **Lu JM, Lin PH, Yao Q, Chen C.** Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med*, **2010**, 14(4). s. 840-860.
66. **Mansouri S, Foroumadi A, Ghaneie T, Najar AG.** Antibacterial Activity of the Crude Extracts and Fractionated Constituents of *Myrtus communis*. *Pharmaceutical Biology*, **2001**, 39(5). s. 399-401.
67. **Marnett LJ.** Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **1999**, 424(1-2). s. 83-95.
68. **Masoudi M, Miraj S, Rafieian-Kopaei M.** Comparison of the Effects of *Myrtus Communis* L, *Berberis Vulgaris* and Metronidazole Vaginal Gel alone for the Treatment of Bacterial Vaginosis. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, **2016**, 10(3). s. QC04-QC07.
69. **Meier P, Finch A, Evan G.** Apoptosis in development. *Nature*, **2000**, 407(6805). s. 796-801.
70. **Messaoud C, Laabidi A, Boussaid M.** *Myrtus communis* L. Infusions: The Effect of Infusion Time on Phytochemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities. *Journal of Food Science*, **2012**, 77(9). s. C941-C947.
71. **Miguel MG.** Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, **2010**, 25(5). s. 291-312.
72. **Mimica-Dukić N, Božin B, Soković M, Mihajlovic B, Matavulj M.** Antimicrobial and Antioxidant Activities of Three *Mentha* Species Essential Oils. *Planta Medica*, **2003**, 69(5). s. 413-419.
73. **Mimica-Dukić N, Bugarin D, Grbović S, Mitić-Ćulafić D, Vuković-Gačić B ve ark.** Essential Oil of *Myrtus communis* L. as a Potential Antioxidant and Antimutagenic Agents. *Molecules*, **2010**, 15(4). s. 2759-2770.

74. **Mirzayans R, Andrais B, Scott A, Murray D.** New Insights into p53 Signaling and Cancer Cell Response to DNA Damage: Implications for Cancer Therapy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2012**, 2012. s. 1-16.
75. **Moldoveanu T, Follis AV, Kriwacki RW, Green DR.** Many players in BCL-2 family affairs. *Trends in Biochemical Sciences*, **2014**, 39(3). s. 101-111.
76. **Montoro P, Tuberoso CIG, Piacente S, Perrone A, De Feo V ve ark.** Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2006**, 41(5). s. 1614-1619.
77. **Olinski R, Gackowski D, Foksinski M, Rozalski R, Roszkowski K ve ark.** Oxidative DNA damage: assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome1 1This article is part of a series of reviews on "Oxidative DNA Damage and Repair." The full list of papers may be found on the homepage of the journal. *Free Radical Biology and Medicine*, **2002**, 33(2). s. 192-200.
78. **Park HH.** Structural features of caspase-activating complexes. *Int J Mol Sci*, **2012**, 13(4). s. 4807-4818.
79. **Park HS, Kim SR, Lee YC.** Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology*, **2009**, 14(1). s. 27-38.
80. **Park JE, Yang JH, Yoon SJ, Lee JH, Yang ES ve ark.** Lipid peroxidation-mediated cytotoxicity and DNA damage in U937 cells. *Biochimie*, **2002**, 84(12). s. 1199-1205.
81. **Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S.** Cellular Mechanisms Controlling Caspase Activation and Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2013**, 5(6). s. a008672-a008672.
82. **Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW.** Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **2004**, 1644(2-3). s. 83-94.
83. **Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G.** Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*, **2016**, 8(4). s. 603-619.
84. **Pryor WA, Stanley JP.** Suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *The Journal of Organic Chemistry*, **1975**, 40(24). s. 3615-3617.
85. **Rahman MA, Shirai M, Aziz MA, Ushirokita R, Kubota S ve ark.** An epistatic effect of apaf-1 and caspase-9 on chlamydial infection. *Apoptosis*, **2015**, 20(10). s. 1271-1280.
86. **Rathmell JC, Thompson CB.** Pathways of Apoptosis in Lymphocyte Development, Homeostasis, and Disease. *Cell*, **2002**, 109(2). s. S97-S107.
87. **Reinhardt HC, Schumacher B.** The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends in Genetics*, **2012**, 28(3). s. 128-136.
88. **Romani A, Coinu R, Carta S, Pinelli P, Galardi C ve ark.** Evaluation of antioxidant effect of different extracts of *Myrtus communis* L. *Free Radic Res*, **2004**, 38(1). s. 97-103.
89. **Rossi A, Di Paola R, Mazzon E, Genovese T, Caminiti R ve ark.** Myrtucommulone from *Myrtus communis* Exhibits Potent Anti-Inflammatory Effectiveness in Vivo. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **2009**, 329(1). s. 76-86.
90. **Saha SK, Lee SB, Won J, Choi HY, Kim K ve ark.** Correlation between Oxidative Stress, Nutrition, and Cancer Initiation. *International journal of molecular sciences*, **2017**, 18(7). s. 1544.
91. **Sahreem S, Khan MR, Khan RA.** Comprehensive assessment of phenolics and antiradical potential of *Rumex hastatus* D. Don. roots. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **2014**, 14(1). s.
92. **Saraste A.** Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, **2000**, 45(3). s. 528-537.
93. **Sarma JV, Ward PA.** Oxidants and Redox Signaling in Acute Lung Injury. *Comprehensive Physiology*: John Wiley & Sons, Inc.; **2011**.
94. **Schafer FQ, Buettner GR.** Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, **2001**, 30(11). s. 1191-1212.
95. **Schleich K, Krammer PH, Lavrik IN.** The chains of death: a new view on caspase-8 activation at the DISC. *Cell Cycle*, **2013**, 12(2). s. 193-194.
96. **Selye H.** Stress and Disease. *Science*, **1955**, 122(3171). s. 625-631.
97. **Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S.** Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ*, **2015**, 22(4). s. 526-539.
98. **Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW.** Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2013**, 5(4). s. a008714-a008714.

99. **Sharma B.** Oxidative Stress in HIV Patients Receiving Antiretroviral Therapy. *Current HIV Research*, **2014**, 12(1). s. 13-21.
100. **Siegmund D, Lang I, Wajant H.** Cell death-independent activities of the death receptors CD95, TRAILR1, and TRAILR2. *Febs j*, **2017**, 284(8). s. 1131-1159.
101. **Sies H.** Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, **2015**, 4. s. 180-183.
102. **Sindh FM.** Myrtus communis L. folkmedsindh.com.pk: Folk Medicine; **2019** [cited 2019 18.06.2019]. Available from: <https://folkmedsindh.com.pk/myrtus-communis-l/>.
103. **Singh S, Verma SK, Kumar S, Ahmad MK, Nischal A ve ark.** Evaluation of Oxidative Stress and Antioxidant Status in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Scand J Immunol*, **2017**, 85(2). s. 130-137.
104. **Smith MA, Perry G, Pryor WA.** Causes and consequences of oxidative stress in Alzheimer's disease 1,2 1Guest Editors: Mark A. Smith and George Perry 2This article is part of a series of reviews on "Causes and Consequences of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease." The full list of papers may be found on the homepage of the journal. *Free Radical Biology and Medicine*, **2002**, 32(11). s. 1049.
105. **Strasser A, Jost PJ, Nagata S.** The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System. *Immunity*, **2009**, 30(2). s. 180-192.
106. **Sushil JK.** Membrane lipid peroxidation in erythrocytes of the newborn. *Clinica Chimica Acta*, **1986**, 161(3). s. 301-306.
107. **Tait SWG, Green DR.** Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2010**, 11(9). s. 621-632.
108. **Traveset A, Riera N, Mas RE.** Ecology of fruit-colour polymorphism in Myrtus communis and differential effects of birds and mammals on seed germination and seedling growth. *Journal of Ecology*, **2001**, 89(5). s. 749-760.
109. **Tretiakova I, Blaesius D, Maxia L, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K ve ark.** Myrtucommulone from Myrtus communis induces apoptosis in cancer cells via the mitochondrial pathway involving caspase-9. *Apoptosis*, **2007**, 13(1). s. 119-131.
110. **Tsikas D.** Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry*, **2017**, 524. s. 13-30.
111. **Tumen I, Senol FS, Orhan IE.** Inhibitory potential of the leaves and berries of Myrtus communis L. (myrtle) against enzymes linked to neurodegenerative diseases and their antioxidant actions. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **2011**, 63(4). s. 387-392.
112. **Turhan N, Celik H, Duvan Cİ, Onaran Y, Aydın M ve ark.** Investigation of oxidative balance in patients with dysmenorrhea by multiple serum markers. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*, **2012**, 13(4). s. 233-236.
113. **Ullrich V, Hecker M, Nüsing R, Rosenbach T.** Thromboxane A2 and Prostacyclin in Tumorigenesis. Eicosanoids, Lipid Peroxidation and Cancer: Springer Berlin Heidelberg; **1988**. p. 3-10.
114. **Valenzuela A.** The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sciences*, **1991**, 48(4). s. 301-309.
115. **Vogler M, Walter HS, Dyer MJS.** Targeting anti-apoptotic BCL2 family proteins in haematological malignancies - from pathogenesis to treatment. *British Journal of Haematology*, **2017**, 178(3). s. 364-379.
116. **Vousden KH, Lu X.** Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer*, **2002**, 2(8). s. 594-604.
117. **Wagih M.** Myrtle (Myrtus communis L, Myrtaceae) Oil. **2015**. p. 705–713.
118. **Williams AB, Schumacher B.** p53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **2016**, 6(5). s. a026070.
119. **Wu JQ, Kosten TR, Zhang XY.** Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **2013**, 46. s. 200-206.
120. **Wu M, Ding H-F, Fisher DE.** Apoptosis: Molecular Mechanisms. Encyclopedia of Life Sciences: John Wiley & Sons, Ltd; **2001**.
121. **Yatim N, Cullen S, Albert ML.** Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *Nature Reviews Immunology*, **2017**, 17(4). s. 262-275.
122. **Zinellu E, Zinellu A, Fois AG, Carru C, Pirina P.** Circulating biomarkers of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review. *Respir Res*, **2016**, 17(1). s. 150.

## ÖZGEÇMİŞ

Hayriye Zehra ULUTAŞ, 1990 yılında HATAY 'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini HATAY 'da tamamladı. 2008 yılında HATAY Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2012 yılında mezun oldu. 2017 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyokimya ve Genetik (Tıp) Ana Bilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.

