



T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI UÇUCU YAĞLARIN ÇEŞİTLİ KANSER HÜCRE HATLARI
ÜZERİNDEKİ POTANSİYEL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gökçe ULUSOY

Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN

TOKAT-2022

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri, 2021/54 nolu proje tarafından desteklenmiştir.

TEZ BEYANI

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu yüksek lisans tezinin yazılmasında bilimsel etik kurallarına uyulduğunu, başkalarının çalışmalarından yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir referanstan alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir bozma/değiştirme yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

GÖKÇE ULUSOY

15 Ağustos 2022

ÖZET

BAZI UÇUCU YAĞLARIN ÇEŞİTLİ KANSER HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ POTANSİYEL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

GÖKÇE ULUSOY

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez danışmanı: Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN

15 Ağustos 2022, xi+71

Kanser günümüzde en önemli sağlık sorunlarından olmakla birlikte, sık görülmesi ve öldürücülüğünün yüksek olmasından dolayı da bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Kanser, en temel bir ifade ile kontrolsüz hücre çoğalması olarak tanımlanmaktadır. Mevcut kanser ilaçları her ne kadar kanser tedavisinde oldukça önemli bir yere sahip olsa da etkili ve düşük toksisiteye sahip olan yeni ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Birçok uçucu yağın antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve antikanserojenik, antimitojenik, antiproliferatif etkileri olduğu bildirilmiştir. Uçucu bitkisel yağlar, ilaç çalışmalarında yenilik için bir fırsat olarak değerlendirilmektedir. Yapılan bu tez çalışması çerçevesinde ele alınan kanser hücre hatları üzerinde farklı uçucu yağların nasıl bir etkisinin olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada karanfil, kekik, ardıç ve incir çekirdeği uçucu yağları kullanılarak, bu uçucu yağların A2780 yumurtalık kanseri hücre hattı, HT-29 kolorektal kanser hücre hattı ve MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerindeki potansiyel etkilerine bakılmıştır. Üç kanser hücresi için de yağların canlılık seviyesinde önemli ölçüde düşüş meydana geldiği ve kanser hücrelerini öldürdüğü görülmüştür. MTT veri analizlerinde ve mikroskop görüntülerinde farklı konsantrasyonlarını kullanmış olduğumuz uçucu yağların artan dozlara ve hücre hattına bağlı olarak hücre canlılığında düşüş meydana geldiği görüldü. A2780 yumurtalık kanseri, HT-29 kolorektal kanser, MCF-7 meme kanseri hücreleri için yapılan migrasyon analizlerinde hücre göçünün meydana gelmediği fakat kırk sekizinci saat sonunda hücrelerin gözle görülür derece canlılık seviyelerinin düştüğü gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda çalışmada kullanılan uçucu yağların kanser hücre hatları üzerinde bazı potansiyel etkilerinin olduğu ve konu ile ilgili daha kapsamlı çalışmaların kanser tedavisine katkı sağlayacağını öngörmekteyiz.

ANAHTAR KELİMELER: Kanser, Hücre ölümü, Uçucu yağlar

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE POTENTIAL EFFECTS OF SOME ESSENTIAL OILS ON VARIOUS CANCER CELL LINES

GOKCE ULUSOY

Master Thesis, Department of Biology

Thesis advisor: Associate Prof. Dr. Ercan Cacan

15 August 2022, xi+71

Although cancer is one of the most important health problems today, it has also become a public health problem due to its high prevalence and lethality. Cancer is defined as uncontrolled cell proliferation with the most basic expression. Although existing cancer drugs have a very important place in cancer treatment, new drugs with effective and low toxicity are needed. It has been reported that many essential oils have antioxidant activity and have anticarcinogenic, antimutagenic and antiproliferative effects. Essential vegetable oils are considered as an opportunity for innovation in pharmaceutical studies. Within the framework of this thesis study, it has been observed what kind of effect different essential oils have on cancer cell lines. In this study, the potential effects of these essential oils on the A2780 ovarian cancer cell line, HT-29 colorectal cancer cell line and MCF-7 breast cancer cell line were examined by using clove, thyme, juniper and fig seed essential oils. For all three cancer cells, it was observed that the vitality level of the oils decreased significantly and killed the cancer cells. In MTT data analyzes and microscope images, it was observed that the cell viability decreased depending on the increasing doses and cell line of the essential oils that we used at different concentrations. In the migration analyzes for A2780 ovarian cancer, HT-29 colorectal cancer, MCF-7 breast cancer cells, it was observed that cell migration did not occur, but at the end of the forty-eighth hour, the viability levels of the cells decreased significantly. In line with these results, we predict that the essential oils used in the study have some potential effects on cancer cell lines and that more comprehensive studies on the subject will contribute to cancer treatment.

KEYWORDS: Cancer, Cell death, Essential oils

ÖNSÖZ

Bilgi birikimiyle yoluma ışık tutan, danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN ile çalışmama vesile olan eski danışman hocam rahmetli Prof. Dr. Necmettin YILMAZ'a teşekkürü bir borç bilirim. Mekânı cennet olsun...

Yüksek lisans tez çalışmalarım sırasında her daim yardımlarını bilgi birikimlerini, deneyimlerini ve hoşgörülerini esirgemeyen, değerli fikir ve katkılarıyla ışık tutan danışman hocam, Sayın Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN' a teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Çağlar BERKEL, Arş. Gör. Burak KÜÇÜK, Arş. Gör. Dr. Feyzanur YILDIRIMTEPE ve yüksek lisans öğrencisi Burcu BAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Değerli jüri üyelerim, Doç. Dr. Ali AYDIN ve Dr. Öğr. Üyesi Atefeh VARMAZYARI'ya değerli görüş ve önerileri için teşekkür ederim.

Her zaman maddi manevi desteklerini esirgemeyen eğitim öğretim hayatımda buralara gelmemi sağlayan ve hayatım boyunca hep yanımda olduklarını hissettiren sevgili aile üyelerim babam Yetgin ULUSOY, annem Dilek ULUSOY ve abim Gökhan ULUSOY'a teşekkür ederim. İyi kötü her günümde yanımda olan beni daha da azimlendiren sevgili nişanlım Abdullah ALEKBEROV' a teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında bana yardımcı olan bilgilerini, deneyimlerini esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu tezi canım annem ve babama ithaf ediyorum...

GÖKÇE ULUSOY

15 Ağustos 2022

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
Sayfa	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR	vi
TABLO ÇİZELGESİ.....	xi
1.GİRİŞ	1
2.LİTERATÜR	3
2.1.Uçucu Bitkisel Yağlar Ve Kanser	3
2.2.Kanser	8
2.2.1.Kanser Gelişiminde Hedef Genlerin Düzenlenmesi.....	10
2.2.2. Proto-onkogenler Ve Onkogenlere Dönüşüm Mekanizmaları	13
2.2.3.Tümör Baskılayıcı Genler	14
2.3. Apoptoz	15
2.3.1. Kaspazlar	16
2.3.2. Apoptoz Mekanizmaları	16
3. MATERYAL VE METOD.....	20
3.1. Materyal	20
3.2. Metod	20
3.2.1. Hücre Kültürü Ve Yağ Dozlarının Hazırlanması:	20
3.3. Hücre Canlılık Testleri.....	22
4. BULGULAR.....	25
4.1. Hücre Canlılık Analizleri	25
4.1.1. Karanfil yağı kaynaklı kolorektal kanser hücre hattı (HT-29), yumurtalık kanseri hücre hattı (A2780) ve meme kanseri hücre hattı üzerindeki (MCF-7) sitotoksik etkisinin belirlenmesi	25

4.1.2. Kekik yağının farklı konsantrasyonlarının kolorektal kanser hücre hattında (HT-29), yumurtalık kanseri hücre hattında (A2780) ve meme kanseri hücre hattındaki (MCF-7) sitotoksik etkisi	30
4.1.3. İncir çekirdeği yağının kolorektal, yumurtalık ve meme kanseri hücre hattındaki sitotoksik etkileri	37
4.1.4. Ardıç yağının farklı konsantrasyonlarının kolorektal kanser, yumurtalık kanseri ve meme kanseri üzerindeki canlılık seviyelerinin belirlenmesi	42
4.2. Uçucu Yağların Kullanılan Hücre Hatları İçin IC50 Dozlarının Hesaplanması..	48
4.2.1. Karanfil, kekik, ardıç, incir çekirdeği yağlarının HT29 kolorektal kanser hücrelerindeki IC50 dozlarının belirlenmesi	48
4.2.2. Karanfil, kekik, ardıç, incir çekirdeği yağlarının A2780 yumurtalık kanser hücrelerindeki IC50 dozlarının belirlenmesi	51
4.2.3. Karanfil, kekik, ardıç, incir çekirdeği yağlarının MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki IC50 dozlarının belirlenmesi	53
4.3. Karanfil Yağı, Kekik Yağı, Ardıç Yağı Ve İncir Çekirdeği Yağının Hücre Migrasyonu Üzerindeki Etkileri.....	56
4.3.1. Karanfil, kekik, ardıç, incir çekirdeği yağlarının A2780 yumurtalık kanseri hücreleri üzerindeki proliferatif etkilerinin incelenmesi	56
4.3.2. Karanfil, kekik, ardıç, incir çekirdeği yağlarının MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki migrasyon etkileri	57
5.SONUÇLAR.....	60
6. KAYNAKLAR	63

SİMGELER ve KISALTMALAR

Kısaltmalar	Açıklama
BAX	p53 tümör baskılayıcı proteinin kofaktörü
BCL-2	Apoptoz proteini
CDI	Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri
CDK	Siklin bağımlı kinazlar
CYC	Siklinler
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
E2F	Ökaryotlarda transkripsiyon faktörü
FBS	Fetal bovine serum
GTP/GDP	Guanozintrifosfat/ guanozindifosfat
MPF	M-phase/maturation promoting factor
MTT	(3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür)
NK	Natural killer hücreler (Doğal öldürücü)
P53	Tümör proteini 53
PARP	Poli (ADP-riboz) polimeraz
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
pRB	Tümör protein retinoblastoma
RNA	Ribonükleik asik
TNF	Tümör nekroz faktör

ŞEKİL LİSTESİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.1. Karanfil yağının HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksik etkisinin belirlenmesi.	25
Şekil 4.2. Karanfil yağının HT-29 kolorektal kanser hücreleri 72. saat sonundaki mikroskop görüntüleri.....	26
Şekil 4.3. Karanfil yağının A2780 yumurtalık kanser hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksik etkisinin belirlenmesi.	27
Şekil 4.4. Karanfil yağının A2780 yumurtalık kanser hücreleri 72. saat sonundaki mikroskop görüntüleri.....	28
Şekil 4.5. Karanfil yağının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksik etkisinin belirlenmesi.	29
Şekil 4.6. Karanfil yağının MCF-7 meme kanseri hücreleri 72. saat sonundaki mikroskop görüntüleri.....	30
Şekil 4.7. Kekik yağının HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksik etkisinin belirlenmesi.	31
Şekil 4.8. Kekik yağının HT-29 kolorektal kanser hücreleri 72. saat sonundaki mikroskop görüntüleri.....	32
Şekil 4.9. Kekik yağının A2780 yumurtalık kanser hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksik etkisinin belirlenmesi.	33
Şekil 4.10. Kekik yağının A2780 yumurtalık kanser hücreleri 72. saat sonundaki mikroskop görüntüleri.....	34
Şekil 4.11. Kekik yağının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksik etkisinin belirlenmesi.	35
Şekil 4.12. Kekik yağının MCF-7 meme kanseri hücreleri 72. saat sonundaki mikroskop görüntüleri.....	36

Şekil 4.13. İncir çekirdeği yağının HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksik etkisinin belirlenmesi.	37
Şekil 4.14. İncir çekirdeği yağının HT-29 kolorektal kanser hücreleri 72. saat sonundaki mikroskop görüntüleri.....	38
Şekil 4.15. İncir çekirdeği yağının A2780 yumurtalık kanser hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksik etkisinin belirlenmesi	39
Şekil 4.16. İncir çekirdeği yağının A2780 yumurtalık kanser hücreleri 72. saat sonundaki mikroskop görüntüleri	40
Şekil 4.17. İncir çekirdeği yağının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksik etkisinin belirlenmesi.	41
Şekil 4.18. İncir çekirdeği yağının MCF-7 meme kanseri hücreleri 72. saat sonundaki mikroskop görüntüleri.....	42
Şekil 4.19. Ardıç yağının HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksik etkisinin belirlenmesi.	43
Şekil 4.20. Ardıç yağının HT-29 kolorektal kanser hücreleri 72. saat sonundaki mikroskop görüntüleri.....	44
Şekil 4.21. Ardıç yağının A2780 yumurtalık kanser hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksik etkisinin belirlenmesi.	45
Şekil 4.22. Ardıç yağının A2780 yumurtalık kanser hücreleri 72. saat sonundaki mikroskop görüntüleri.....	46
Şekil 4.23. Ardıç yağının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksik etkisinin belirlenmesi.	47
Şekil 4.24. Ardıç yağının MCF-7 meme kanseri hücreleri 72. saat sonundaki mikroskop görüntüleri.....	48
Şekil 4.25. Karanfil yağının HT29 kolorektal kanser hücreleri için IC50 dozu.....	49
Şekil 4.26. Kekik yağının HT29 kolorektal kanser hücreleri için IC50 dozu	50
Şekil 4.27. Ardıç yağının HT29 kolorektal kanser hücreleri için IC50 dozu	51

Şekil 4.28. İncir çekirderği yağının HT29 kolorektal kanser hücreleri için IC50 dozu .	51
Şekil 4.29. Karanfil yağının A2780 yumurtalık kanseri hücreleri için IC50 dozu.....	52
Şekil 4.30. Kekik yağının A2780 yumurtalık kanseri hücreleri için IC50 dozu	52
Şekil 4.31. Ardıç yağının A2780 yumurtalık kanseri hücreleri için IC50 dozu	53
Şekil 4.32. Karanfil yağının MCF-7 meme kanseri hücreleri için IC50 dozu.....	54
Şekil 4.33. Kekik yağının MCF-7 meme kanseri hücreleri için IC50 dozu	54
Şekil 4.34. İncir çekirdeği yağının MCF-7 meme kanseri hücreleri için IC50 dozu.....	55
Şekil 4.35. Ardıç yağının MCF-7 meme kanseri hücreleri için IC50 dozu	55
Şekil 4.36. Kontrol grubu ve ardıç yağı için A2780 yumurtalık kanseri hücreleri migrasyon görüntüleri.....	56
Şekil 4.37. İncir çekirdeği yağı, karanfil yağı ve kekik yağının A2780 yumurtalık kanseri hücrelerindeki migrasyon etkileri.....	57
Şekil 4.38. Kontrol grubu, ardıç yağı ve incir çekirdeği yağı MCF-7 meme kanseri hücreleri migrasyon görüntüleri.....	58
Şekil 4.39. Karanfil yağı ve kekik yağının MCF-7 meme kanseri hücreleri migrasyon görüntüleri.....	59

TABLO ÇİZELGESİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1. Yağ konsantrasyonlarının hazırlanması	21
Tablo 4.2. Kolorektal kanser HT29 hücreleri için IC50 dozları	49
Tablo 4.3. Yumurtalık kanseri A2780 hücreleri için IC50 dozları	51
Tablo 4.4. Meme kanseri MCF-7 hücreleri için IC50 dozları	53

1.GİRİŞ

Kanser, dünya çapında en önemli ölümcül hastalıklardan biridir ve her yıl 6 milyondan fazla vaka rapor edilmektedir. Kanser, diğer hastalıklara nispeten ölüm riski oldukça yüksektir ve bunun yanında tedavi maliyetinin yüksek olması az gelişmiş ülkelerde durumu daha da zorlaştırmaktadır. Tedavide kullanılan kanser ilaçları tümörlerin hızla büyüyen ve bölünen hücrelerine spesifik olarak geliştirilmiş olmasına rağmen vücuttaki normal hücreleri de etkileyerek daha farklı rahatsızlıklara yol açabildiği gözlenmiştir. Bu engeller bilim insanlarını alternatif ilaç arayışına ve ilave geleneksel tıp alanına da yöneltmektedir (Gautam 2014). Bitkiler aracılığı ile tıp alanında tedavi edici ilaçlar ve teşhis metotları; kanser gibi hastalıkların tedavisinde hatırı sayılır mesafeler kat edilmesini sağlamıştır (Kulkarni 2000). Uzun yıllardan beri tıbbi potansiyeli olan bitkiler ve bitkilerin hastalık tedavisindeki rolü ile ilgili pek çok araştırma yapılmaktadır.

Uçucu yağlar, aromatik bitkilerin salgı hücreleri tarafından sentezlenen doğal, kompleks, uçucu ve kokulu moleküllerdir (Bukle, 1999; Sylvestre, 2006). Uçucu yağlar ve içerikleri hücre zarını geçebilen ve deri tarafından hızlı bir şekilde emilebilen lipofilik bileşenlerdir (Sœur ve ark., 2011). Bitkilerden hidro-distilasyon ya da buhar-distilasyonu gibi işlemler ile ekstrakte edilebilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucu uçucu yağların terpenler ve fenilpropanoidler açısından zengin çeşitli farmakolojik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Flavanoidlerin, polifenollerin ve antosiyaninlerin yüksek antioksidan kapasiteleri vardır. İncirin yapısındaki antosiyaninler sağlıklı kan lipid seviyelerinin korunmasına yardımcı olabilir ve obezite, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve bazı kanserlerin önlenmesinde önemli bir rol oynayabilir. Ficus carica'nın kurutulmuş meyveleri önemli bir vitamin, mineral, karbonhidrat, şeker, organik asit ve fenolik bileşikler kaynağı olarak bildirilmiştir. Taze ve kurutulmuş incirler ayrıca çok miktarda lif ve polifenol içerir. Uzun yıllardan beri incir şifa olarak kullanılmıştır. İncirin bu kadar faydalı ve tedavi amaçlı olarak kullanılabilir olması bu meyvenin yağının da kanser tedavileri için kullanımını olağan kılmaktadır (Güven ve ark., 2019; Barolo ve ark., 2014;Solomon ve ark., 2006). Çok sayıda biyoaktif bileşene sahip çeşitli floralardan elde edilen uçucu yağlar, çeşitli kanserler üzerinde çok yönlü etkiler göstererek kemoterapötik ajanlar ile birlikte kullanıldıklarında hasta ve hayatta

kalanların yaşam kalitesini iyileştirmektedir (Patel ve Gogna, 2015). Kemoterapi tümör hücrelerinin yanı sıra normal hücreleri de bir derece etkilediği bilinmektedir. Bununla birlikte, elde edilen deneysel veriler, uçucu yağların toksisitesinin sağlıklı hücreleri daha az etkileyerek kanser hücrelerine odaklanıldığını göstermiştir. Örneğin, yapılan bazı çalışmalarda, karvakrolün insan glioblastoma hücrelerinde sitozolik serbest Ca^{2+} konsantrasyonlarını ve canlılık üzerine etkisi incelenmiş ve karvakrolün ROS aracılı apoptoz yoluyla kanser hücrelerini öldürdüğü sonucuna varılmıştır (Liang ve Lu, 2012). Timol, çeşitli kanser hücresi ölümüyle (melanom, osteosarkom, glioblastoma, akciğer, meme, lösemi, hepatom, kolon) ilişkili bir monoterpenik fenoldür. Çoğu terpenoid G0/G1 fazında DNA zincir kırılmaları ve hücre döngüsünde görev almaktadır. Karvakrol timolün bir izomeridir ve bu iki bileşik kekik bitkisinde olduğu gibi çoğu bitkide beraber bulunmaktadır. (Legards ve ark., 2014). Yağların kanser tedavisinde kullanılabilirliğini incelemek amacıyla yapılan çalışmalarda karanfil yağının kanser önlemede ve kemoterapide etkili olabileceği düşünülmektedir. Karanfil yağında yüksek oranda bulunan öjenol biyolojik aktivite ve antimikrobiyal aktiviteden sorumludur. Öjenol asetat olarak adlandırılan bu fenolik bileşik proteinleri denatüre edebilir ve hücre zarı geçirgenliğini değiştirerek fosfolipitlerle reaksiyona girer. Lipid peroksidasyonunu, COX-2 gen ekspresyonunu ve reaktif oksijen türlerini inhibe edebilmektedir. Bu nedenden dolayı kanser tedavisinde umut vaat etmektedir (Fangjun ve Zhijia, 2017). Terpenoidlerin kansere karşı faydalı etkilerinin kanser hücrelerinin zarının ve özellikle mitokondri zarının polarizasyonundaki bir değişiklik ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Uçucu yağların yapısındaki terpenoid ve fenilpropanoid bileşikleri lipofiliktir, vücut tarafından iyi emilmektedirler ve hücre zarları için yüksek afiniteye sahip oldukları çalışmalar sonucunda gözlemlenmiştir. Kanser hücrelerinin apoptozu, kaspaz ailesinin belirli proteinlerinin aktivasyonu yoluyla gerçekleşmektedir. Çalışmalar sonucu terpenlerin kaspazları aktive ettiği gösterilmiştir. Biyokimyasal olarak bakıldığında bu kaspazların aktivasyonunda görev alan çeşitli proteinlerin de fosforilasyonu ve aktivasyonu gerekmektedir bu da sonuç olarak öldürme sinyalini ilgili yollara iletmektedir (Lesgards ve ark., 2014). Yapılan araştırmalar ışığında bu çalışmada HT29 kolorektal kanser hücre hattı, A2780 yumurtalık kanseri hücre hattı ve MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde kekik yağı, karanfil yağı, ardıç yağı ve incir çekirdeği yağının potansiyel etkilerine bakılması amaçlanmıştır.

2.LİTERATÜR

2.1.Uçucu Bitkisel Yağlar Ve Kanser

Uçucu yağlar, aromatik bitkilerin salgı hücreleri tarafından sentezlenen doğal, kompleks, uçucu ve kokulu moleküllerdir (Bukle, 1999; Sylvestre, 2006). Uçucu yağlar ve içerikleri hücre zarını geçebilen ve deri tarafından hızlı bir şekilde emilebilen lipofilik bileşenlerdir (Sœur ve ark., 2011). Bitkilerden hidro-distilasyon ya da buhar-distilasyonu gibi işlemler ile ekstrakte edilebilmektedir.

Uzun yıllardan beri tıbbi değerleri nedeniyle tanınan uçucu yağlar, günümüzde terapötik ajan olarak ilgi görmektedir. Geleneksel olarak uçucu yağlar, antiseptik, analjezik, yatıştırıcı, antiinflamatuvar ve lokal anestezi özellikleri içeren biyolojik aktiviteleri için kullanılmıştır (Bakkali ve ark., 2008). Birçok uçucu yağın antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve antikanserojenik, antimutajenik, antiproliferatif etkileri olduğu bildirilmiştir (Abdollahmohammadi ve ark., 2009). Mevcut kanser ilaçları her ne kadar kanser tedavisinde oldukça önemli bir yere sahip olsa da etkili, düşük toksisiteye ve küçük çevresel etkiye sahip olan yeni ilaçlara ihtiyaç vardır. Uçucu bitkisel yağlar, ilaç çalışmalarında yenilik için bir fırsattır (Chai ve ark., 2004; Saygi ve Cacan, 2021).

Uçucu yağların çoğu ilk olarak enflamatuvar ve oksidatif hastalıkların tedavisi için kullanılmıştır. Reaktif oksijen türlerinin üretimi ile oksidasyonun kaynağı ve kansere yol açabilen inflamasyon arasında bir ilişki olduğu için bu uçucu yağların antikanser etkileri de olabileceği ortaya çıkmıştır (Jackson ve Loeb, 2001). Bu nedenle birçok çalışma, uçucu yağların ve bunların içindeki bileşenlerinin çeşitli kanser hücrelerine karşı aktif olabileceğini göstermiştir.

Uçucu yağların yapısında üç yüzden fazla bileşen olduğu tahmin edilmektedir. En temel bileşenleri terpenler, terpenoidler ve fenolik bileşikler olarak tanımlanmıştır. Uçucu yağlar, bitkinin farklı bölümlerinden (tomurcuklar, çiçekler, yapraklar, gövde, dallar, tohumlar, meyveler, kökler, ağaç veya ağaç kabuğu) ekstrakte edilebilir ve salgı hücrelerinde, trikomlarda depolanabilir. Uçucu yağlar düşük moleküler ağırlıklı ve %20-%70 arasında bileşen içermektedir ve bu bileşenler uçucu yağın biyolojik aktivitelerinden sorumludur. Yağların bileşenleri ve miktarları bitkinin elde edildiği

kısmına, bitkinin cinsine, coğrafi bölgeye, üretim şekline göre değişkenlik göstermektedir (Kumari ve ark., 2014;Pichersky ve ark., 2006;Bakkali, 2008;Özgüven ve Kırıcı, 1999;Angionu ve ark., 2006).

Farklı bitkilerden elde edilen uçucu yağların bazı kanser türleri için antikanserojen etkisi olduğu gösterilmiştir. Bunlardan bazıları da kanser tedavisi için faz I ve faz II aşamalarından geçerek klinik olarak test edilmiştir. Uçucu yağların çok fazla aktif bileşeni olduğundan dolayı hücre içerisinde birden fazla hedef noktası olabilir. Öncelikli hedefi hücre zarı geçirgenliğinin bozulması, iyon hemeostazı ve elektron taşıma sistemi gibi hücresel fonksiyonların kaybına yol açmaktadır. Dış ve iç mitokondriyal zarların geçirgenliği sebebiyle hücrede nekroz ve apoptoza neden olarak sitotoksik etki göstererek hücrenin ölümüne yol açmaktadır (L. Ait M'Barek ve ark., 2007;M. Abdel-Aziz ve ark., 2005;Bakkali, 2008;Armstrong, 2006;Aissous ve ark., 2021;Hadjira ve ark., 2021;Saidi ve ark., 2022).

2007 yılında, Ait M'Barek ve ark. insan adenokarsinoma yumurtalık kanseri hücre hattı (IGR-OV1) ile yaptıkları çalışmada, Fas endemik kekik bitkisi olan *Thymus broussonetii* uçucu yağının sitotoksik etkisine bakılmıştır. Farklı IC50 değerleri gözlemlense de uçucu yağın yumurtalık kanseri hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. On esansiyel yağ (nane, zencefil, limon, greylift, yasemin, lavanta, papatya, kekik, gül ve tarçın) üzerinde yapılan bir çalışmada, kekik esansiyel yağının prostat karsinom ve meme kanseri üzerinde en etkili uçucu yağ olduğu yapılan deneysel çalışmalar sonucunda görülmüştür. Kanser tedavisinde en çok tercih edilen yöntemler radyoterapi ve kemoterapidir. Fakat bu yöntemler hastalar için zorlu bir süreç olabilmektedir ve bulantı, kusma gibi yan etkiler meydana gelebilmektedir. Uçucu yağların bu gibi etkileri de en aza indirgediği düşünülmektedir. Hücresel etkisinin yanı sıra uçucu yağların kanser hastaları üzerinde kaygıyı azalttığı ve duygusal stresi, ağrıyı, kas gerginliğini ve yorgunluğu azalttığı kanıtlanmıştır (Boehm, 2012;L. Ait M'Barek ve ark., 2007;Gautam, 2014).

Flavanoidler, kanser hücrelerinde hücresel aktiviteyi etkileyen polifenol sınıfıdır ve bol miktarda meyve, sebze, tohum ve çiçeklerde bulunur. Farklı gıda türlerinin içerdiği polifenol miktarı farklılık göstermektedir ve buna bağlı olarak antikanserojen etkileri de değişmektedir. Flavanoidlerin kimyasal yapısı iki uçta aromatik halka ve ortada üç

karbonlu yapıya sahip difenilpropandır (C6-C3-C6). Flavanoidlerin en iyi bilinen biyolojik özellikleri arasında antikanserojen etki de yer almaktadır. Kanseri ilaçlarının bazıları onkogeniz üzerinde sınırlı etki gösterebilmektedir ve olası yan etkilerini göz önünde bulundurmak gerekir. Fenolik bileşikler ikincil (sekonder) metabolitler olarak da bilinmektedir ve bu metabolitlerden flavanoidler, kanserin inhibisyonunda ve tedavisinde önemli bir yerdedir. Polifenollerin kanser etkileri antioksidan ve anti-inflamatuar özellikleri nedeniyle olduğu bilinse bile polifenollerin endokrin-parakrin bozucu etkileri de mevcuttur. Bu nedenle polifenoller epigenetik sinyal kaskadlarına etkisinden dolayı kanser hücreleri üzerinde etkileri görülmüştür. Flavonoidler çok çeşitli antikanser etkileri uygularlar. Örneğin, ROS süpürücü enzim aktivitelerini modüle ederler, hücre döngüsünün durdurulmasına katılırlar, apoptozu indüklerler, otofajiyi indüklerler ve kanser hücresi proliferasyonunu ve invazivliğini baskırlar (Khan ve ark., 2020; Hazafa ve ark., 2019; Ullah ve ark., 2020; Pan ve ark., 2015; Kopustinskiene ve ark., 2020).

Kekik Uçucu Yağı

Kekik *Lamiaceae* familyasına ait bir bitkidir ve geniş tedavi edici özelliklerinden dolayı geleneksel tıpta binlerce yıldır kullanılmaktadır. En çok çalışılan tür olan *Thyme vulgaris* ve onun temel bileşeni olan timolün uçucu yağı, antifungal, antibakteriyel ve antioksidan aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir (Cosentino ve ark., 1999; Miura ve ark., 2002). Kekik uçucu yağının bileşikleri monoterpenler, monoterpen alkoller, fenol türevleri, ketonlar, aldehitler, eterler ve esterler dahil olmak üzere çeşitli kimyasal gruplara aittir. *Thymus vulgaris* esansiyel yağının içeriğinde %37-55 timol ve %0.5-5.5 carvacrol monoterpenleri bulunmaktadır. *Thymus vulgaris* anti-inflamatuar özellik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda kekik esansiyel yağının antiproliferatif etkileri gözlenmiş olsa da moleküler mekanizması henüz belirlenmemiştir (Kowalczyk ve ark., 2020; Raut ve Karuppaiyil, 2014; Lampronti ve ark., 2006).

Karanfil Uçucu Yağı

Karanfil bitkisi, geleneksel tıpta kullanılan bitkilerden biri olan *Caryophyllaceae* familyasına aittir. Karanfil ağacı Endonezya ve Pasifik adalarına özgüdür. Yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda karanfil bitkisinin antikanser, antiviral, antibakteriyel ve

antioksidan etkilerinin olduğu gözlemlenmiştir (Al-Snafi, 2017). Karanfil genellikle baharat olarak kullanılmaktadır ve Hindistan'da şifacılar tarafından solunum ve sindirim rahatsızlıklarını tedavi amaçlı kullanılmıştır. Sulu karanfil infüzyonunun *Bacillus subtilis'in* çimlenmiş sporlarının büyümesini inhibe ettiği ve *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterides* ve *Escherichia coli* patojenlerini inhibe ettiği bulunmuştur. Bir çalışmada tümör oluşum safhasında apoptoz inhibisyonunun tümör hücrelerinin popülasyonunu sınırlamada önemli bir yere sahip olduğu gözlemlenmiştir ve akciğer kanserinin oluşumu sürecinde karanfil infüzyonunun da etkili bir şekilde apoptozu indüklediği doğrulanmıştır. Bir hücrenin ne zaman apoptoza gideceği p53, Bax ve Bcl-2 arasındaki ilişkiye bağlıdır. Bu çalışmada karanfil infüzyon tedavisi ile p53 ekspresyon miktarının arttığı ve ilgili genleri indükleyerek apoptoza katkı sağladığı ortaya çıkmıştır. Bax, Bcl-2 ailesinin hücreyi apoptoza götüren bir üyesidir ve Bcl-2 ile heterodimer oluşturarak çalışmaktadır. Bcl-2:Bax oranı dokularda apoptozun indüklenip indüklenmediği belirler. Yapılan bu çalışmada uygulanan karanfil infüzyon tedavisi ile Bcl-2 ekspresyon seviyesi düşmüş ve Bax konsantrasyonu artmıştır. Bax mitokondri yapısını bozarak sitokrom-c salınımını teşvik eder. Sitokrom-c apoptozun son halkası olan caspase-3'ü aktive ederek apoptozu indüklediği bu çalışmada gösterilmiştir (Banerjee ve ark., 2006). Karanfil yağının ana bileşeni öjenoldür ve yapısında %72-90 oranlarında bulunmaktadır. Öjenol dışında karanfil yapraklarından veya saplarından β -karyofillen ve tomurcuklarından da öjenol asetat ekstrakte edilebilmektedir. Karanfil tomurcuklarından elde edilen toplam öjenol oranının %36-90 civarında olabileceği, saplardan ve yapraklardan elde edilen toplam öjenol oranlarının ise sırasıyla %85-95 ve %75-90 civarında olabileceği bildirilmiştir. Karanfil yağından yüksek oranda bulunan öjenol biyolojik aktivite ve antimikrobiyal aktiviteden sorumludur. Öjenol asetat olarak adlandırılan bu fenolik bileşik proteinleri denatüre edebilir ve hücre zarı geçirgenliğini değiştirerek fosfolipitlerle reaksiyona girer. Lipid peroksidasyonunu, COX-2 gen ekspresyonunu ve reaktif oksijen türlerini inhibe ederek, öjenolün kanser önleme ve kemoterapide etkili olabileceği düşünülmektedir (Fangjun ve Zhijia, 2017; Jaganathan ve Supriyanto, 2012; Della porta ve ark., 1998; Briozzo ve ark., 1989).

Ardıç Uçucu Yağı

Ardıç *Cupressaceae* familyasına ait bir bitki olup yine geleneksel tıpta birçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. Tedavi amaçlı kullanılan ilaçların etken maddeleri üzerinde yapılan çalışmalar sonucu ardıç bitkisinde bulunan uçucu yağların ve fenolik bileşiklerin bulunduğu gözlemlenmiştir (Kapdan ve ark., 2019). Ardıç meyvelerinin içermiş olduğu uçucu yağlar, meyvelere acı bir tad ve terebentin benzeri bir koku verir. Ardıç ekstraktlarındaki önemli fenolik bileşenler; lignanlar, kumarinler, sesquiterpenes, abietan, labdane ve pimarane diterpenleri, flavonoidler, biflavonoller, flavon glikozitleri ve taninler olarak belirlenmiştir. Ardıç meyvesi (*Juniperus communis*) anti-inflamatuar potansiyele sahiptir. Ardıç meyve ve yapraklarında çıkan uçucu yağın verimi, bitkinin coğrafî, olgunluk ve yaş derecesi, meteorolojik koşullar ve yağın elde edildiği yere göre değişmektedir. Ortalama yağ verimi meyvelerden %0.5-2.5 ve yapraklardan %0.2-1.0 arasındadır. Ardıç meyvesi özütünün antikanser aktivitesi, melanom, ağız kanseri, meme kanseri, akciğer kanseri ve karaciğer ve kolon karsinomları ile ilgili olarak tümör büyümesinin inhibisyonuna dayalı olarak gösterilmiştir (Raut ve Karuppaiyil, 2014;Poddar ve Lederer, 1982;Gao ve ark., 2019).

İncir Çekirdeği Uçucu Yağı

İncirin içerdiği yağ asitleri oleik %18.99, linoleik % 33.72, linolenik % 32.95, palmitik %5.23, stearik- %2.1.8, araşidik %1.05, α linolenik(n-3) asit, bitkisel omega 3 kaynağıdır. Flavonoidlerin, polifenollerin ve antosiyaninlerin yüksek antioksidan kapasiteleri vardır. İncirin yapısındaki antosiyaninler sağlıklı kan lipit seviyelerinin korunmasına yardımcı olabilir ve obezite, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve bazı kanserlerin önlenmesinde önemli bir rol oynayabilir. *Ficus carica*'nın kurutulmuş meyveleri önemli bir vitamin, mineral, karbonhidrat, şeker, organik asit ve fenolik bileşikler kaynağı olarak bildirilmiştir. Taze ve kurutulmuş incirler ayrıca çok miktarda lif ve polifenol içerir. Antik çağlardan beri *Ficus carica* geleneksel olarak kullanılmıştır. Çeşitli kültürlerde şifalı incir ağacı olarak kullanılmıştır. İncir meyvesi yüksek düzeyde polifenoller, flavonoidler, antosiyaninler içerir ve yüksek oranda antioksidan etkiye sahiptir (Güven ve ark., 2019;Barolo ve ark., 2014;Solomon ve ark., 2006). İncirin bu özelliklerine bakılarak incir çekirdeği yağının da kanser üzerinde tedavi edici etkisinin olabileceği düşünülmektedir.

2.2.Kanser

Kanser günümüzde en önemli sağlık sorunlarından biridir. Sık görülmesi ve öldürücülüğünün yüksek olmasından dolayı da bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Kanseri basit bir şekilde ifade etmemiz gerekirse kontrolsüz hücre çoğalması olarak tanımlanabilir. Kanser, kalp hastalıklarından sonra gelen en yaygın hastalıktır ve ABD'deki ölümlerin %23 ünü oluşturmaktadır (Anand ve ark., 2008).

Kanser genetik materyalin kimyasal yapısının bozulması yani mutasyona uğramasıyla hücrelerin kontrolsüz veya anormal şekilde büyümesi ve çoğalmasıyla meydana gelen bir hastalıktır. Hücre içindeki genlerin bir grubu, hücreye büyüüp bölünmesi için sinyal mekanizması oluştururken diğer bir grup gen de büyümenin yeterli olduğunu ve hücrenin büyümesini durdurarak işlevini yerine getirmesi için sinyali kesmekte ya da yeni sinyal kaskadı oluşturmaktadır. Kanser bu iki gen grubu arasındaki dengesizlikten meydana gelmektedir. Hücrenin büyümesi ve çoğalması için aktifleşen genler (proto-onkogenler) normalden fazla çalışırlarsa ya da büyümeyi kontrol altında tutan genler (Tümör baskılayıcı genler) gerektiğinden az ifade edilir veya bir sebepten mutasyona uğrarsa hücre devamlı bölünüp büyümekte ve böylece kanserli hücre haline gelmektedir. Kanserli hücrede meydana gelen mutasyonlar hücre bölünmesinin kontrolünde, farklılaşmada, tamir mekanizmasının kontrolünde, sinyal iletiminde, programlı hücre ölümünde ve çoğalmasında görevli proteinleri şifreleyen genlerde meydana gelen mutasyonlarla gelişir (Demirelli, 2003). Bunların sonucu olarak malign tümörler oluşur ve metastaz yaparak vücudun diğer bölgelerine yayılabilirler.

Tümörler, kabaca bakıldığında iyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) olmak üzere ikiye ayrılabilir. Benign tümörler başlangıç bölgeleriyle sınırlı kalan ve yavaş çoğalan hücrelerden oluşan tümörlerdir. Bu tümörler vücudun diğer bölümlerine yayılmazlar ve ameliyatla tamamı alındıktan sonra tekrarlanma durumları sınırlıdır. Bunun tam tersi malign tümörler hızla büyüyen anormal hücrelerden oluşur. Malign tümörler yakın organ ve dokulara yayıldığı gibi lenf ve kan yoluyla uzak bölgelerdeki dokulara da yayılabilirler (Cacan, 2015). Tümörler köken aldıkları hücreye göre sınıflandırılırlar. Epitel hücrelerden köken alanlar karsinomalar, bağ dokudan (kas, kemik, kıkırdak ve fibröz doku) köken alanlar sarkomlar ve kan ya da immün sistemden köken alanlar

lösemi ve lenfomalar olarak 3 tiptir. Bu kanser hücreleri farklı dokulardan köken almalarına rağmen belirli ortak özellikleri vardır.

Kanser hücrelerinin genel özelliklerine baktıldığında;

- Sınırsız çoğalma yetenekleri vardır.
- Yeni kan damarları (anjiyogenez) oluşturabilirler.
- Metastaz yapabilme potansiyeline sahiptirler.
- Apoptozdan kaçınırlar.
- Büyüme engelleyici sinyallere karşı dirençlidirler.
- Kendi büyüme sinyallerini kendileri oluşturabilirler.

Kanser hücrelerinin bu özellikleri benign tümörlerde veya normal hücrelerde bulunmayan özelliklerdir (Weinberg, 2014). En sık görülen kanser çeşitleri arasında yumurtalık kanseri, kolorektal kanser, meme kanseri yer almaktadır. Bu kanser çeşitlerinin ölüm oranlarını en aza indirmek, özellikle yumurtalık kanserinin kemoterapik ajanlara karşı direncin artmasına yönelik yeni tedavi yöntemleri aranmaktadır.

Yumurtalık (over) kanseri her yıl 125.000'den fazla kadının ölümüne neden olmaktadır. Kadınlarda meydana gelen kansere bağlı ölüm nedenleri arasında beşinci sırada yer almaktadır. Standart tedavi yöntemleri diğer kanser türleri gibi bu kanser türü için de uygulanmaktadır ancak yumurtalık kanserinde kemoterapik ajanlara karşı bir direnç meydana gelmektedir. Yumurtalık kanseri kemoterapiye yüksek oranda yanıt vermektedir fakat yaşayan hastalarda iki yıl içerisinde kemoterapiye karşı artan direnç hastalığın seyrini oldukça etkilemektedir ve ölümlere neden olmaktadır. Yumurtalık kanserinde ölüm oranlarını en aza indirmek için mevcut tedavi yöntemlerine ek olarak yeni terapötik tedavi yöntemleri geliştirilmelidir (Ali ve ark., 2013; Berkel ve Cacac, 2021a; Cacac, 2017; Cacac ve ark., 2014; Berkel ve Cacac, 2021b).

Yine en sık görülen kanser çeşitleri arasında üçüncü sırada kolon kanseri yer almaktadır. Her yıl yaklaşık olarak 2 milyon yeni vaka ve 900 bin ölüm meydana gelmektedir. Hastalığın erken teşhis edilmesiyle ölüm oranı düşmekte ve cerrahi müdahaleler sonucu çoğunlukla tedavisi yapılabilen bir hastalıktır. Ancak çoğu durumda hastalığın ileri aşamalarında teşhis edildiğinden dolayı sağ kalım oranı %8'e

düşmektedir. Kolorektal kanser tedavisinde radyasyon ve kemoterapik ajanlar kullanılmaktadır (Cacan ve ark., 2015). Hızla büyüyen hücreleri öldürme aktiviteleri yüksektir fakat bu tedavi yöntemleri sağlıklı hücreyi de etkileyebilmektedir. Daha farklı dejeneratif hastalıklara da neden olabilmektedir. Kolorektal kanser çoğunlukla yaşlılarda görülmesine rağmen gençlerde de görülen yaygın bir kanser çeşididir. Kanserin görülme sıklığını ve ölüm oranlarını azaltmak için farklı tedavi yöntemleri geliştirilmelidir (Koçak ve ark., 2021;Cacan ve Ozmen, 2020;Kucuk ve ark., 2021).

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser çeşididir. Kansere bağlı ölüm nedenleri arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır (Moulder ve Hortobagyi, 2007).

2.2.1.Kanser Gelişiminde Hedef Genlerin Düzenlenmesi

Birçok hücre, sürekli olarak birbirini izleyen bölünme ve bölünmeme evreleri geçirir. Bir bölünmenin tamamlanmasından bir sonraki bölünmeye kadar geçen karmaşık olaylar dizisi hücre döngüsünü oluşturur ve kanser hücrelerindeki temel yanlışlıklardan biri hücre çoğalması üzerindeki kontrolün kaybıdır. Hücre çoğalması, çok hücreli organizmalarda tüm gelişim ve doku onarımı için gerekli olan hücre büyüme ve bölünme sürecidir. Büyüme ve bölünme yoluyla çok hücreli organizmalar hasarlı veya ölü hücrelerini yenileriyle değiştirebilirler. Hücrelerin büyümesi ve bölünmesi düzenlenmelidir; aksi takdirde, organların ve dokuların bütünlüğü uygunsuz hücre tipleri ve hücre miktarları tarafından bozulabilmektedir. Hücre çoğalması üzerindeki normal düzenleme, hücre döngüsü aşamalarını, hücre ölümlerinin programlanmasını ve aşırı bölünme sinyallerine karşı hücrelerin cevaplarını kontrol eden çok sayıda gen ve ürünlerin varlığını gerektirir. Kanserli hücrelerde, bu işlevleri kontrol eden birçok gen mutasyona uğramıştır ya da yanlış ifade edilirler ve kontrol edilemeyen hücre çoğalmasına yol açarlar. Kanserle ilişkili mutasyonlar genellikle iki gen tipinde gözlenir: tümör baskılayıcı genler ve onkogenler. Tümör baskılayıcı genler ve proto-onkogenler (onkogenlerin normal hücresel formu) normalde hücre büyüme ve çoğalmasının kontrolüne katılır ve kanser sıklıkla bu kontrolün çeşitli mutasyonlardan dolayı olmamasından ortaya çıkar (Klag ve ark., 2006;Tobias ve ark., 2014).

Hücre siklusunun düzenlenmesinde siklinler (cyc), siklin bağımlı kinazlar (cdk) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) görev alır. Cdk'lar hücre döngüsünün diğer evrelerine geçmek için gerekli olan hedef proteinleri fosforile ederek döngünün ilerlemesini sağlar. Hücre döngüsü esnasında devamlı olarak ifade edilirler. İnaktif formlarında siklinlerle bir araya gelerek fosforile olurlar ve aktif hale gelirler. Bu proteinler G₁, S, G₂ ve mitoz geçişi kontrol ederler. Cdk'ların aksine siklinler hücre döngüsünün belirli evrelerinde sentez edilirler ve cdk'ları aktifleştirmeye görevlidirler. Memeli hücrelerinde hücre döngüsünün düzenlenmesinde görevli on bir tane siklin bağımlı kinaz (cdk 1-11) ve on altı siklin (siklin D (D₁,D₂,D₃); siklin E (E₁,E₂); siklin A (A₁,A₂) ve B (B₁,B₂) görevlidir. Siklin A ve B, S/G₂/M faz geçişlerinde sentezlenir. Siklin D hücrenin büyüme faktörü tarafından uyarılması sonucu hücre döngüsünde ilk artış gösteren siklindir ve büyüme faktörünün yokluğunda seviyeleri düşer. Siklin D'ler cdk4 ve cdk6'yı regüle ederler. G₁'in orta safhasında meydana gelir ve S evresinde ubiquitin-proteazom yoluyla yıkılır. Siklin D, G₁ evresinde cdk-4 ile kompleks oluşturur ve bu kompleks retinoblastoma proteinini (RB) fosforiller. RB'nin fosforilasyonu hücre döngüsü için anahtar görevindedir. Hücreler, hücre döngüsünün G₀ fazındayken RB proteinini fosforillenmemiştir ve E2F gibi transkripsiyon faktörlerine bağlanarak bağlandığı transkripsiyon faktörünü inaktive eder böylece hücrelerin replikasyonu engellenir. Hücre büyüme faktörleri tarafından uyarıldığında G₁ fazına geçer. G₁ fazı boyunca RB proteinini cdk4-siklinD₁ kompleksi tarafından fosforillenir. Fosforillenmiş RB inaktiftir ve bağladığı regülatör proteinleri serbest bırakır. RB tarafından salınan E2F ve diğer düzenleyici proteinler serbest bırakıldığında ilgili ürünler G₁ fazından S fazına geçiş için gerekli olan genlerin ifadesi sağlanır ve bu şekilde replikasyonun gerçekleşmesine izin verilir. Siklin E, G₁/S fazlarının sınırında geçici olarak sentez edilir ve hücre S fazına girdiğinde hızla yıkılır. Siklin E, Cdk2'yi regüle eder. Siklin A ve B₁ mitotik siklinlerdir. Siklin A, S fazı boyunca sentezlenir ve anafazda yıkılır. Siklin A cdk2 ile kompleks oluşturur. Siklin B₁ ise S fazının geç döneminde sentez edilir ve G₂ fazından M fazına geçerken sentezi maksimum düzeye ulaşır, anafazda yıkılır. Siklin B, cdk2 ile etkileşir ve bu kompleks MPF (M-phase/maturation promoting factor) olarak da bilinir. Siklin B'nin anafazda yıkılmasıyla hücre mitozisten çıkar ve G₁'e geri döner. (Cabadak, 2008;Aktuğ, 2014;Alberts ve ark., 2002;Pines, 1995;Collins ve ark., 1997).

Normal hücrelerde hücre döngüsü kontrol noktaları sayesinde her evre tamamlandıktan sonra hücrenin diğer bir evreye kontrollü bir şekilde geçişi sağlanır. Hücre döngüsünün düzenlendiği üç kontrol noktası vardır. Bunlar G₁/S, G₂/M ve M kontrol noktasıdır. Bu kontrol noktalarında hücrede herhangi bir DNA hasarı, hücrenin olması gereken boyutunda bir anormallik tespit edilirse sorunlar giderilene kadar koşullar normal şartlara getirilene kadar döngü durdurulur (Klug ve ark., 2006).

G₁/S kontrol noktası: S evresine girmeden önce mitoz öncesinde meydana gelmiş DNA hasarı varsa hücrelerin S evresine ilerlemesini yavaşlatır ve döngü G₁ kontrol noktasında durdurulur. G₁'deki bu duraklama hücrenin S evresine girmeden DNA'da ki hasarın tamir edilmesine olanak sağlar. Böylece S fazında hasarlı DNA'nın replike olması engellenmiş olur. G₁ kontrol noktasındaki bu duraklama p53 proteini etkisi ile gerçekleşir. Eğer hasar tamir edilemezse apoptotik yollar aktive edilir. İnsanlarda görülen kanser türlerinde genellikle p53 proteinini kodlayan gen mutasyona uğramıştır. Bu mutasyonlar sonucu p53 fonksiyonunu kaybeder ve DNA hasarı meydana geldiğinde G₁/S noktasındaki duraklama meydana gelmez. Bunun sonucu olarak da hasarlı DNA kopyalanarak diğer nesillere aktarılır ve kanser gelişimine neden olur (Aktuğ, 2014).

G₂/M kontrol noktası: Bu kontrol noktasında DNA replikasyonu tamamlanmadıkça mitozun başlaması önlenir. G₂ kontrol noktası replike olmamış DNA'yı tanır ve döngüyü durdurur. Hücre döngüsünün bu kontrol noktasında durması DNA hasarında veya tamamlanmamış replikasyona cevap olarak aktifleşen protein kinaz olarak bilinen p56 (chk1) aracılığıyla gerçekleşir. Chk1,cdc25 adlı protein fosfotazı fosforiller ve cdc25'in cdc2'yi aktif hale getirmesini engeller. Cdc2 aktif hale geçemediğinden mitoz giriş engellenir ve hücre G₂'de bekler. G₂ kontrol noktasındaki bu bekleme, hasarlı DNA'nın yavru hücrelere geçmeyip tamir edilmesi için ya da replikasyonun tamamlanması için zaman tanır (Walker ve ark., 1999).

M kontrol noktası: Bu fazda metafazdan anafaza geçiş kontrol edilir. Kromozomların mitoz mekiği üzerinde dizilmesini kontrol eder ve yavru hücrelere kromozomların doğru şekilde dağıtılmasını sağlar. Her iki yavruya tam bir kromozom seti gidecek şekilde dizilmedikçe kromatidlerin ayrılmasını önler. Mitotik siklinlerin yıkımından sonra anafaz evresi başlar. Mitotik siklinler (siklin A ve siklin B) ubiquitinlendikten

sonra yıkım gerçekleşir. Mitotik siklinlerin yıkımı siklin B-cdk1 kompleksini inaktive eder ve mitozun normal olarak sonlanması sağlanır. Böylece bu kontrol noktasında olgunlaşma evresinde ulaşmamış kardeş kromatidlerin ayrılmasını engeller. Burada rol alan genleri MAD ve BUB proteinleri kodlar. MAD proteinleri doğru kromozom ayrılmasından, BUB ise mitozun ilerlemesini düzenler (Murray, 1994; Cabadak, 2008).

2.2.2. Proto-onkogenler Ve Onkogenlere Dönüşüm Mekanizmaları

Proto-onkogenlerin görevi hücre büyümesi ve bölünmesini devam ettirmektir. Bu görevlerini; diğer genlerin ifadelerini uyararak transkripsiyon faktörlerini kodlayarak, hücre bölünmesini uyararak sinyal iletim moleküllerini ya da hücrenin hücre döngüsü boyunca ilerlemesini sağlayan hücre döngüsü düzenleyicilerini kodlayarak yaparlar. Hücreler sessiz döneme girdiklerinde ve bölünmeyi sona erdirdiklerinde birçok proto-onkogen ürününün ifadesi de baskılanmış olur. Proto-onkogenler fazla ifade edilir veya zamanında transkripsiyonel olarak baskılanamazlarsa böyle bir durumda proto-onkogenlerin ürünleri devamlı olarak hücreyi bölünmesi için uyarır bu yüzden çok iyi kontrol edilmelidir. Proto-onkogenler mutasyona uğradığında ya da hatalı ifade edildiğinde kanser gelişimine katkıda bulunan onkogen olarak adlandırılır (Klug ve ark., 2006).

Proto-onkogenlerin, onkogene dönüşmesi hücre büyümesinin kontrol mekanizmasını bozmakta dolayısıyla kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesine ve çoğalmasına yol açmaktadır. Proto-onkogenler proteinlerinin önüne c, onkogenler ise v ön ekini alarak adlandırılırlar. Tümörlerden oluşturulmuş hücre kültürleri için transforme olmuş tanımlı kullanılmaktadır. Transforme bir hücre daha az kısıtlı şartlarda büyür, genellikle sert bir zemine tutunma ihtiyacı duymaz ve uygun deney hayvanlarına enjekte edildiklerinde tümörleri indüklerler. Böylece hücrelere transformasyon ve ölümsüzlük özelliği sağlayan zincirleme değişiklikler hayvanlarda tümörlerin oluşturulmasına olanak tanır. Onkogenler de hücre transformasyonunu başlatma ve sürdürme kapasitesine sahiptir. Önceden onkogenler tümör oluşturan virüsler olarak tanımlanmıştır. Sonradan onkogenlerin konakçı memelide bulunan hücresel genlerin mutasyona uğramış formları olduğu gösterilmiştir. Bu hücresel genler ilk kez retrovirüslerin genomunda tanımlanmıştır. Bu retrovirüslerin genomlarında transformasyona yol açan özel bir

dizilim görülmüştür (v-onc), bu dizilim transforme olmayan retrovirus genomlarında bulunmamaktadır. Onkogenler viral enfeksiyonlara da bağlı olabilmektedirler. Retroviral onkogenlerin virüsle enfekte konakçı hücre DNA'sına virüs vasıtasıyla aktarıldığı belirtilmiştir. Virüsün kendi genomuna kopyaladığı proto-onkogen enfeksiyonun herhangi bir evresinde, gen kesilmesi veya mutasyonla hasarlı hale gelebilmektedir. Tekrarlayan enfeksiyon sırasında kendi proteinini sentezleyen bu viral onkogenin oluşan anormal protein normal hücre büyümesini etkilemekte ve tümör oluşumuna neden olmaktadır (Yokuş ve ark., 2012;Pazarbaşı ve ark., 2003).

İnsan tümörlerinde sıklıkla mutasyona uğrayan genlerden biri ras genleridir. Ras gen ailesi, hücre zarı ile ilişkilendirilen ve hücre büyümesini ve bölünmesini düzenleyen sinyal iletim moleküllerini kodlar. Ras proteinleri GDP'ye bağlı olduklarında inaktif durumda, GTP'ye bağlandıklarında aktif hale geçerler. Proto-onkogen ras'ı onkogene dönüştüren mutasyonlar GTP'nin GDP'ye dönüşümünü engeller ve böylece Ras devamlı aktif formunda kalarak hücreyi sürekli bölünmeye teşvik eder. Normal ve kanserli hücredeki Ras geni karşılaştırıldığında normal proteinin 12. pozisyonunda glisin 61. pozisyonunda glutamin olması gerekirken onkogenik Ras proteininde bu şekilde olmadığı gözlenmiştir (Klug ve ark., 2006).

2.2.3.Tümör Baskılayıcı Genler

Bu genler onkogenlerin aksine kanserleşmeyi engellemeye yönelik işlev gören genlerdir. Hücre bölünmesini yavaşlatan, DNA hatalarını onaran, hücre döngüsü kontrol noktalarını düzenleyen ve hücreyi apoptozis sürecine yönlendirerek kontrolsüz çoğalmayı engelleyen genlerdir. Büyümeyi baskılayan sinyallere yanıt olarak hücre döngüsünü durdururlar. Tümör baskılayıcı genler mutasyona uğradıklarında ya da inaktive olduklarında belirtilen bu görevleri yerine getiremez ve böylece hücrenin döngüyü terk edebilme ve sessiz döneme girme yetisinin kaybedilmesine yol açar. Tümör baskılayıcı genlerden dolayı meydana gelen kanserlerde ebeveynlerden gelen iki allelin de mutasyona uğraması gerekir. 1969 yılında Henry Harris ve arkadaşlarının yapmış olduğu somatik hücre hibridizasyon çalışmaları sonucunda varlığı saptanan bu genlerin yine aynı çalışmanın sonucu olarak çekinik özellikte olduğu gözlemlenmiştir. Tümör baskılayıcı genlerle ilişkili kanser tiplerinde kanser meydana gelebilmesi için her

iki ebeveyninden alınan toplam iki allelin de mutasyona uğraması gerekir. Bir ebeveyninden mutant allel alınırsa diğer ebeveyninden sağlam allel alınırsa sağlam allel büyüme baskılayıcı fonksiyonunu devam ettirir. Diğer sağlam allel de mutasyona uğrarsa tümör baskılanması engellenir (Klug ve ark., 2006;Tobias ve ark., 2014;Harris ve ark., 1969;Knudson, 1971).

2.3. Apoptoz

Tüm canlılarda olduğu gibi hücreler de doğarlar, yaşarlar ve ölürlür. Canlı organizmalarda hücre ölümünden sorumlu apoptoz ve nekroz olmak üzere iki mekanizma görev almaktadır. Apoptoz programlanmış hücre ölümü olarak bilinmektedir. Programlanmış hücre ölümü, yetişkin dokularda ve embiyolojik gelişimde çok önemli bir yere sahip olan hücre ölümünün normal fizyolojik bir sürecidir ve dengelenmiş hücre çoğalması, dokularda hücre sayısını sabit tutmaktan sorumludur. DNA hasarı oluşması durumunda hasarın meydana geldiği hücre apoptoza yönlendirilerek ortadan kaldırılması amaçlanmaktadır. Böylece DNA yapısına zararlı hücrelerin kanserleşme ihtimalleri ortadan kaldırılmış olur. Fizyolojik ölüm şekli olan apoptoz normal olarak gelişim, yaşlanma ve dokulardaki hücrelerin devamını sağlamak için karşımıza çıkabileceği gibi, hastalık ya da zararlı ajanlar tarafından hücreler zarar gördüğünde ya da immün reaksiyonlar gibi bir savunma mekanizması olarak da oluşabilmektedir (Cohen, 1997). Bunun tersine nekroz hücre membranının daha erken bir zamanda bozulması ile sonuçlanan ve hipoksi/iskemi, aşırı sıcaklık ve mekanik travma gibi şiddetli çevresel ajanlar ile ilgili durumlara cevap olarak ve kaza eseri oluşan pasif bir süreçtir (Eröz ve ark., 2012;Altunkaynak ve Özbek, 2008;Elmore, 2007). Nekrotik ölümden, hücre membran bütünlüğünü kaydederek hücre içerikleri ve proinflamatuvar moleküllerin salınımıyla hücrenin etrafında inflamasyon meydana gelir devamında hücre şişer ve patlar. Bunun tam tersine apoptoz hücre sel sinyal yolları tarafından düzenlenen programlı hücre intiharıdır. Apoptoz ile ölen hücreler dokulardan uzaklaştırılırken aksine akut yaralanmalar sonucu ölen hücreler hücre içeriklerini ekstraselülere (hücreler arası boşluk) bırakarak inflamasyona neden olarak programsız şekilde ölmektedirler. Apoptoz oranının artması ya da hızlanması; AIDS, insüline bağımlı diyabet, nörodejeneratif hastalıklar, arteriosklerozis, hepatit-C enfeksiyonu gibi

hastalıklara neden olmaktadır. Apoptoz oranının azalması ya da yavaşlaması; kansere ve otoimmün hastalıklara yol açmaktadır (Eröz ve ark., 2012;Cohen, 1997).

2.3.1. Kaspazlar

Kaspazlar, apoptozda rol oynayan Sistein Aspartat Spesifik Proteaz (Cystein Aspartat Specific Protease = CASPASE) olarak tanımlanan bir protein ailesidir (Reed, 2000). Kaspazlar, hücrede ilk sentezlendiklerinde inaktif pro-kaspaz veya zymojen (inaktif proteolitik enzim) olarak bulunmaktadır (Kartlaşmış ve ark., 2016;Strasser ve ark., 2000;Eröz ve ark., 2012;Reed, 2000). Kaspazların zymojen yapısı apoptozun indüklenmesinden sonra zincirde bulunan diğer kaspazlar tarafından kesilerek aktif kaspaz formuna dönüşmektedir ve apoptozun şekillenmesinde görev alan kırktan fazla proteazın aktifleşmesinde görev alırlar (Eröz ve ark, 2012). Bu proteaz ailesi üyeleri aktif bölgelerinde sistein rezidülerine sahiptir ve hedef proteinleri aspartik asit birimlerinden kesmektedirler. Kaspaz ailesinin bazı üyeleri (kaspaz 2, 8, 9, 10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinir başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara iletirler, bazıları da (kaspaz 3, 6, 7) efektör kaspazlar olarak bilinmektedir (Cohen, 1997;Eröz ve ark., 2012;Chowdhury ve ark., 2008). Efektör kaspazlar ise DNA fragmentasyon faktör 45 (DFF 45), poly-(ADP-riboz) polimeraz (PARP) gibi bilinen apoptotik substratların kesilmesinden sorumludur. İlk tanımlanan enzim ICE (interlökin 1- β dönüştürücü enzim)'dir ve prokaspaz 1 olarak bilinmektedir (Cohen, 1997).

2.3.2. Apoptoz Mekanizmaları

Viral enfeksiyonlar, bakteriyel toksinler, onkogenler, kemoterapötikler, radyasyon gibi bazı faktörlerle apoptozis başlatıldığı gibi ağır DNA hasarına yanıt olarak aktive olan p53 ve reaktif oksijen radikalleri gibi bazı faktörlerle de apoptozis başlatılabilmektedir. Apoptoz için negatif sinyal anlamına gelen tüm bu faktörlerin yanında büyüme hormonu gibi hücre yaşamı için gerekli pozitif sinyallerin yokluğuyla da apoptozis başlatılabilmektedir. Tüm bu hücre içi ve dışı faktörlerin sonucunda hücreyi ölüme sürükleyen 3 farklı apoptoz mekanizmasından söz edilmektedir. Bu 3 farklı

mekanizmanın ikisi farklı kaspazların aktiflenmesi sonucu gerçekleştirilirken, üçüncü yol kaspaz dışında farklı bir yol izleyerek hücre ölümüne neden olmaktadır.

Apoptozun iç (mitokondriyal) yolağı: Sağlıklı bir hücrenin yapısında bulunan mitokondrilerin dış membran yüzeyinde Bcl-2 ve Bcl-XL gibi anti-apoptotik proteinler bulunmaktadır (Bcl-2 ve Bcl-XL, mitokondri dış membranda oluşan porları kapatarak sitokrom-c çıkışını önlemesi nedeniyle anti-apoptotik moleküller olarak adlandırılmaktadır). Normalde, sitokrom-c çıkışı için uygun olmayan mitokondri dış membran yapısında bulunan porlar, Bcl-2 ve Bcl-XL gibi anti-apoptotik üyeler tarafından korunmaktadır. Fakat pro-apoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonu sonucu anti-apoptotikler ile pro-apoptotikler arasındaki hassas dengenin apoptoz tetikleyicileri lehine bozulması durumunda veya onlarla heterodimerizasyon yaparak etkisizleştirilmesi sayesinde mitokondriden sitokrom-c çıkışı meydana gelmektedir. Sitokrom-c, Apaf-1 kompleksine ATP'nin bağlanması, inaktif durumdaki prokaspaz-9'un aktifleşmesini sağlayarak kaspaz proteinlerinin tetiklenmesine yol açmaktadır. Sitokrom-c, Apaf-1, ATP ve prokaspaz-9 kompleksinin oluşturduğu bu yapı aynı zamanda apoptozom olarak da isimlendirilmektedir. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktive etmektedir. Aktif kaspaz-3, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD) inaktifleştirmektedir. Böylece ICAD' ünün bağladığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD) serbest hale gelir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondenzasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olmaktadır (Gökhan ve ark., 2020).

Pro-apoptotik üyelerin (Bad, Bax, Bid, Bim, Bag, Bok, Raf ve Bak), Bcl-2 ve Bcl-XL gibi anti-apoptotik üyelerle yaptığı heterodimerizasyonun mitokondri membranında bulunan voltaj bağımlı anyon kanallarının yapısını bozarak sitokrom-c ve AIF çıkışını sağlamaktadır. Mitokondrideki elektron transportu sırasında oluşabilecek elektron sızıntılarının serbest radikal oluşumuna yol açması ve bu radikallerin birincil hedefi olan DNA ve proteinleri (mitokondri membran yapısında bulunan kanal proteinleri ve diğerleri) etkileyerek bunların yapı ve fonksiyonlarını değiştirdiği anlaşılmıştır. Bid, Bak, Bax gibi pro-apoptotik Bcl-2 üyeleri normalde hücrelerde sessiz halde bulunmaktadırlar. Ancak bu pro-apoptotik üyeler, aktive edildiklerinde sitokrom-c'nin sitoplazmaya salınmasını sağlayarak kaspaz-8 aracılığıyla Bid'in kırılmasına ve

apoptozun tetiklenmesine neden olmaktadır. Bid ayrıca diğer hücre yüzey ölüm reseptörleri olan TNF ve TRAIL aracılığıyla da aktifleşmektedir. Birçok normal hücrede bulunan Bad'ın diğer Bcl-2 ailesi üyeleriyle kompleks yapması fosforilasyon ve defosforilasyon mekanizması ile düzenlenmektedir. Normal koşullarda, Bad yaşam faktörlerinin etkisiyle serin-treonin kinaz Akt/PKB yoluyla fosforile durumda tutulmaktadır. Fosforile haldeyken anti-apoptotik üyelerle kompleks oluşturamadığından onları etkisiz hale getirememektedir. Eğer defosforile olursa anti-apoptotik üyelerle kompleks oluşturarak anti-apoptotik etkilerini ortadan kaldırarak sitokrom-c salınımıyla başlayan apoptozis gerçekleşmektedir. Pro-apoptotik aktiviteye sahip olan Bim molekülü ise normalde mikrotübüllerle ilişki içinde olan dynein motor kompleksi ile birlikte bulunmaktadır. Apoptozis indüksiyonu esnasında mitokondriye göç ederek sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınmasıyla başlayan kaspazların aktivasyonunda rol oynamaktadır.

Apoptozun dış yolağı: Ölüm faktörü olarak isimlendirilen Fas Ligand (FasL) ve tümör nekrozis faktör (TNF) isimli proteinler, ana fizyolojik aktivatörler olarak ilgili reseptörlere bağlanarak apoptozisi gerçekleştirmektedirler. Fas ve TNF- α reseptörleri, hücre zarında bulunan bir çeşit integral membran proteini yapısındadırlar. Bu reseptörler uygun ligandlar ile bağlandıklarında sitoplazmada bulunan inaktif prokaspaz-8'in aktifleşmesine neden olarak buldukları hücreyi ölüme götürecektir olan sinyal kaskadını da başlatmış olurlar. Bu yol daha çok bağışıklık sisteminde hücrelerin kendinden olan ve olmayana göre değişen immün cevap reaksiyonlarında ve infeksiyonlarda etkili olan sitotoksik T hücre cevabında kullanılan bir yoldur (Elmore, 2007). Sitotoksik T lenfositler, virüs veya bakteri ile enfekte olmuş hücreleri ve tümör hücrelerini tanırlar ve öldürürler. Aynı şekilde NK (natural killer) hücreleri de tümör hücrelerini öldürmektedirler. Sitotoksik T lenfositleri ne NK'ların hedef hücreleri nasıl öldürdüğü uzun zamandır tartışılmaktadır. Çünkü bilinen perforin/granzim temeline dayanan mekanizma, sitotoksik T lenfositleri ile meydana gelen ölümlerin tümünü açıklayamamaktadır. Fakat aktive T hücrelerinin membran yüzeyindeki FasL bulunduğunda bu problem çözülmüştür. Perforin/granzim ve FasL sistemi sitotoksik T lenfositlerine bağlı sitotoksikitede majör yollar olarak bilinmektedir. Sitotoksik T lenfositleri aktive olduğunda membran yüzeyindeki T hücre reseptörü virüs ile enfekte hücrenin MHC-antijeni (majör histocompatibility complex) ile etkileşmekte ve hedef

hücre iki ayrı yolla ortadan kaldırılmaktadır (Kumari ve ark., 2013;Morgan ve ark., 2015;Eröz ve ark., 2012).

1.yolda; FasL sitotoksik, T lenfositlerinde ve doğal öldürücü (NK=natural killer) hücrelerde bulunur. Fas ve TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olduklarından bir seri protein-protein etkileşimlerinde bulunurlar. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri death domain adı verilen TRADD (TNF-1 associated death domain) ve FADD (fas associated death domain) ile etkileşime girerler. Bu ölüm bölgeleri ise prokaspaz-8'i aktifleştirerek kaspazların kaskad tarzında aktivasyonları başlatılırlar.

2.yolda; granzim (granzyme)'ler patojenle enfekte edilmiş hücrelerin veya tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında etkin rol alırlar. Perforinler ve granzimler normal olarak sitotoksik lenfositlerin (CTL) ve natural killer (NK) cell'lerin sitoplazmik granüllerinde bulunurlar. CTL'lerin hedef hücreye bağlanmasıyla perforinler salgılanır ve hedef hücrenin membranına bağlanarak membranda porlar meydana getirirler. Perforin porlar sitozolik kalsiyum düzeylerinin hızla artmasına yol açar. Beraberinde salgılanan ve bir serin proteaz olan granzimin de bu porlar aracılığıyla hücreye girmesiyle hücre içinde prokaspaz-8'in aktivitesi dolayısıyla kaspaz kaskadı başlatılır. Bu da enfekte hücreyi veya kanser hücrelerini apoptozise götürür. Sitotoksik T lenfositleri hücrelerinde meydana gelen uyarılma, perforin ve granzim içeren granüllerde sekresyona neden olur. Perforinin, hedef hücre plazma membranında porlar açtığı ve granzimin de buna yol gösterdiği düşünülmektedir. Fakat perforin/granzim ve FasL, hücre ölüm programını birbirinden bağımsız olarak tetiklemektedir. Sitotoksik T lenfosit hücreleri ve NK hücreleri, perforin/granzim ve FasL/Fas yolunun her ikisini de kullanırlar ancak ne zaman hangisini tercih ettikleri bilinmemektedir (Elmore, 2007).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Güvenlik kabini (ESCO, Class II, Type A2), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma life science), RPMI (Sigma life science), FBS (Biological Industries), penisilin-streptomisin (Biological Industries), serolojik pipet (Costar), PBS (Alfa Aesar), tripsin (Biological Industries), trypan blue boyası (Biological Industries), Thoma lamı (Bright-line), ependorf tüp (Isolab), vorteks (Velp scientifica), 100-1000 µl, 20-200 µl ve 0,5-10 µl mikropipet (Isolab Instruments), MTT (metiltiazoldifenil-tetrazolyum bromid) boyası (Biofrox), DMSO (Dimetil sülfoksit) (Serva), 96 kuyucuklu ve 6 kuyucuklu kültür plağı (Nest), santrifüj (micro 200 R Hettich Zentrifugen), %70'lik etanol (İsolab), nükleaz free water (Thermo scientific), thermo scientific multiskan go, ibidi culture inserts, karanfil yağı (İbrahim Saraçoğlu), kekik yağı (İbrahim Saraçoğlu), incir çekirdeğı yağı (İbrahim Saraçoğlu), ardıç yağı (İbrahim Saraçoğlu), Leica DFC295 S 40/0.45 floresans mikroskopu.

3.2. Metod

3.2.1. Hücre Kültürü Ve Yağ Dozlarının Hazırlanması:

Yağ dozlarının hazırlanması:

Ticari olarak temin edilmiş olan karanfil, incir çekirdeğı, kekik ve ardıç yağları işlemlere başlamadan önce 90 °C'de bir saat otoklavlandı. Bu yağlar DMEM besiyeri içerisinde seyreltilerek incir çekirdeğı, kekik, ardıç yağları için 0,0001-0,001-0,005-0,01-0,05-0,1-0,5-1 olacak şekilde sırasıyla 1:10000-1:5000-1:1000-1:500-1:100-1:50-1:10-1:5 olmak üzere konsantrasyonlara göre seyreltilmiştir. Karanfil yağı için 0,0001-0,001-0,005-0,01-0,05-0,1 konsantrasyonları kullanılmıştır.

Konsantrasyon	Yağ miktarı(μl)	Dilüsyon oranı	DMEM(μl)
0,0001 μl	0,5	1:10000	4999,5
0,001 μl	0,9	1:5000	4499,1
0,005 μl	1	1:1000	999
0,01 μl	2	1:500	998
0,05 μl	10	1:100	990
0,1 μl	20	1:50	980
0,5 μl	100	1:10	900
1 μl	200	1:5	800

Tablo 3.1. Yağ konsantrasyonlarının hazırlanması

Hücre Kültürü

Hücre kültürü işlemlerinin tümü steril kabin içerisinde gerçekleştirildi. Kabine girecek olan tüm malzeme ve kimyasallar %70'lik EtOH ile steril hale getirilerek kabin içerisine alındı. Meydana gelebilecek kontaminasyon oranını en aza indirmek için hücre kültürünün bulunmuş olduğu ortam iki günde bir %10'luk çamaşır suyu ile temizlendi. Tek kullanımlık malzemeler işlem sonrası otoklavlanarak ortamdaki uzaklaştırıldı.

Bu çalışmada kullanılan hücre hatları Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde, Kanser Araştırma Laboratuvarı stoğundan temin edildi. Yumurtalık kanseri (A2780) ve meme kanseri MCF-7 hücreleri için %10 FBS, %1 penicilin streptomycin içeren RPMI 1640 besiyerleri ve insan kolon kanseri hücreleri için (HT29) %10 FBS (Föetal sığır serumu) ve %1 penicilin streptomycin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) besiyerleri kullanıldı.

-86°C'lik soğutucuda cryovial'lerde bulunan hücreler çıkarıldı ve 50 ml'lik falkon tüplerine her hücre hattı için uygun büyüme koşullarını sağlayacak olan besiyerleri her birinden 10 mL olacak şekilde ayrı falkon tüplerine alındı. Falkona alınan besiyerlerinden pastör pipetleriyle bir miktar alınarak cryovial tüplerinde bulunan buz halindeki hücreler üzerine eklenip pipetaj yapılarak besiyeri yardımıyla hücre çözme işlemi gerçekleştirildi. 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj yapıldı ve hücre pelet halinde

çöktürüldü. Üstte kalan süpernatant kısım uzaklaştırılarak hücre peleti 10 ml taze besiyeri içerisinde çözündürüldü ve çözelti 75 cm²'lik flaslara alınarak 37°C, %5 CO₂ ve %80-90'lık nem saturasyonuna sahip inkübatör ortamına alınarak hücrelerin adherent hale geçmesi ve çoğalmaları amaçlandı. İnkübasyondan sonra üçüncü gün flask içerisindeki besiyeri çekildi ve 1X steril fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile kültür kabı yıkandı ve yüzeye nüfuz edilmesi sağlandı. Eklenmiş PBS ortamdaki uzaklaştırıldı ve yerine taze besiyeri eklenerek tekrar inkübatöre bırakıldı. Hücreler konfluent hale geldiklerinde pasajlama işlemlerine başlandı. Ortamda bulunan besiyeri uzaklaştırıldı, PBS ile yıkama işleminden sonra 3 ml tripsin/EDTA solüsyonu eklendi. Hücreler tripsin yardımıyla kültür kabından ayrıldı. 10 ml taze besiyeri flaska eklenerek tripsinin hücrelere vermiş olduğu zarar en aza indirildi. Bu solüsyon falkon tüpüne aktarılarak 3 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi. Tüpte kalan süpernatant kısım uzaklaştırıldı ve çöken hücre peleti 10 ml taze besiyeri ile çözündürüldü. Daha sonra hemositometre yardımıyla hücre sayımı yapılarak 1.000.000 hücre olacak şekilde kültür ortamına hücreler alınarak pasajlama işlemi gerçekleştirildi.

4-5 gün sonra yeterli yoğunluğa ulaşmış olan hücreler pasajlama işlemi esnasında yapılmış olan aşamalar tekrarlandı. Tek fark 1.000.000 hücre serum freezing medium (dondurma solüsyonu; Biological Industries) içerisinde çözülerek cryovial tüplerine alınarak önce -20°C'de yarım saat bekletildikten sonra tekrar kullanılmak üzere stok hazırlamak için -86°C sıcaklıktaki dondurucuya alındı.

3.3. Hücre Canlılık Testleri

MTT Ve Hücre Ekimi

Bu yöntem hücre canlılığını belirlemek amacıyla kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. MTT suda çözünen tetrazolium tuzu olup fenol kırmızısı içermeyen medium veya tuz solüsyonlarında hazırlandığında sarımtırak bir solüsyon oluşturur. Tetrazolium halkasının dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu MTT mor renkli çözünmeyen formazana dönüşür. Bu dönüşüm canlı hücrelerin mitokondrileri aracılığıyla olur. Oluşan bu formazan DMSO veya başka bir çözücü yardımıyla çözünür hale getirilir. Oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak okunur. Tetrazolium tuzunun sadece metabolik aktivitesi olan hücreler tarafından renkli formazanlara

indirgenmesinden dolayı bu yöntem sadece canlı hücreleri saptar. Oluşan formazan miktarıyla hücre canlılığı doğru orantılıdır. Çoğalan hücreler proliferasyon olmayan hücrelerden metabolik olarak daha çok aktivite gösterdiği için bu yöntemle sadece hücre canlılığı ve sitotoksikite değil aynı zamanda hücre aktivasyonu ve proliferasyonu da belirlenir.

İnkübasyonda yeterli yoğunluk seviyesine gelmiş olan hücreler inkübatörden çıkarılarak kabin içerisinde eski besiyeri uzaklaştırıldı. Tripsinin çalışmasını kolaylaştırmak ve ortamdaki ölü hücreleri uzaklaştırmak amacıyla 10 ml 1X steril PBS ile ortam yıkandı. Ardından PBS çekildi ve 3-4 ml tripsin eklenerek hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. Mikroskop altında hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı kontrol edildi. Yüzeyden ayrılan hücreler laminar kabin içerisinde tripsin bulunan flask içerisine 10 ml taze besiyeri eklendi ve solüsyon santrifüj tüplerine alınarak 3 dakika 3000 rpm'de santrifüj yapıldı. Tripsinin bulunduğu süpernatant kısım serolojik pipet yardımıyla çekildi. Kalan hücre pelleti 10 ml taze besiyeri içerisinde çözündürülerek hemositometrede hücre sayımı yapıldı. Her kuyucuk başına 7.500 hücre olacak şekilde hesaplama yapıldı ve hücre+media solüsyonu kuyucuklara ekildi. 24 saat hücrelerin yüzeye tutunması için beklendi. Bu süre sonunda yüzeye tutunmuş olan hücrelerin bulunduğu kuyucuklara tedavi amacıyla kullanılacak olan yağların belirlenmiş konsantrasyonlarından uygun olan miktar kadar eklenerek 48 saat ardından hücrelerin canlılık durumlarına bakmak amacıyla MTT testi yapıldı.

Her kuyucuğa 200 µl olarak ekilen eski besiyeri ve hücre solüsyonu uzaklaştırıldı. 100µl PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmesinin ardından PBS ortamdan çekildi. 10 mg MTT 2ml 1X steril PBS içerisinde çözündürülerek 10ml fenol kırmızısı ve fetal sığır serumu (FBS) içermeyen renksiz RPMI taze besiyeri içerisine ilave edildi. Elde edilen bu solüsyon her kuyucuğa 100µl olacak şekilde eklenerek 4 saatlik bekleme süresi için inkübe edildi. Bu işlemin ardından canlı hücrelerde koyu mavi/mor renk değişimi gözlemlendi. Kuyucuklarda bulunan 100µl MTT boyası uzaklaştırılarak ortama 100 µl DMSO çözücüsü eklendi ve eşit şiddette pipetaj yapılarak formazan bileşiğinin çözünmesi sağlandı. Ardından shaker'da 1 saatlik bekleme süresine geçildi. 540nm'de spektrofotometrik yöntem (Multiskan GO mikroplate reader; ThermoScientific) aracılığıyla kuyucuklardaki solüsyonun absorbans değerleri ölçüldü. Elde edilen

absorbans değerlerinin analizi için kontrol grubunun ortalaması alınarak %100 hücre canlılığı olarak değerlendirme yapıldı. Microsoft Excel üzerinden verilerin tablolandırma ve analiz işlemleri gerçekleştirildi. Analizlerin sonuçlarına göre migrasyonda tercih edilecek konsantrasyonların değerlendirilmesi yapıldı.

Hücre migrasyonu

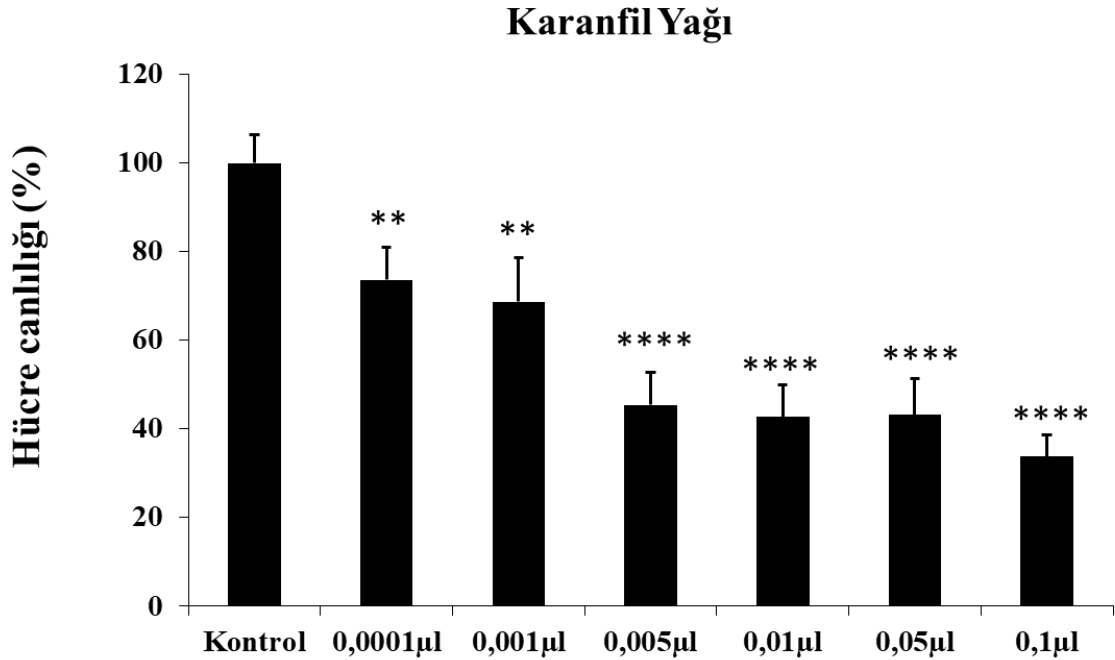
12 kuyucuklu well plate içerisine migrasyon için kullanılan ibidi culture inserts steril kıvrık uçlu pens yardımıyla kuyucuklara yerleştirildi ve bölmelerinin içerisine bölme başına 5×10000 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. 24 saat hücrelerin yüzeye yapışması için inkübe edildi. 24 saatin ardından kuyucuklardaki ibidi culture inserts kıvrık uçlu pens yardımıyla alındı. Her bir kuyucuk için 1ml taze besiyeri eklendi. Ardından yağlar için belirlenmiş olan uygun konsantrasyonlar eklendi ve belirli aralıklarla hücre migrasyonuna bakıldı. 0-24-48 saatlerde Leica DFC295 S 40/0.45 floresans mikroskobu yardımıyla görüntüleri çekildi.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılık Analizleri

4.1.1. Karanfil yağı kaynaklı kolorektal kanser hücre hattı (HT-29), yumurtalık kanseri hücre hattı (A2780) ve meme kanseri hücre hattı üzerindeki (MCF-7) sitotoksik etkisinin belirlenmesi

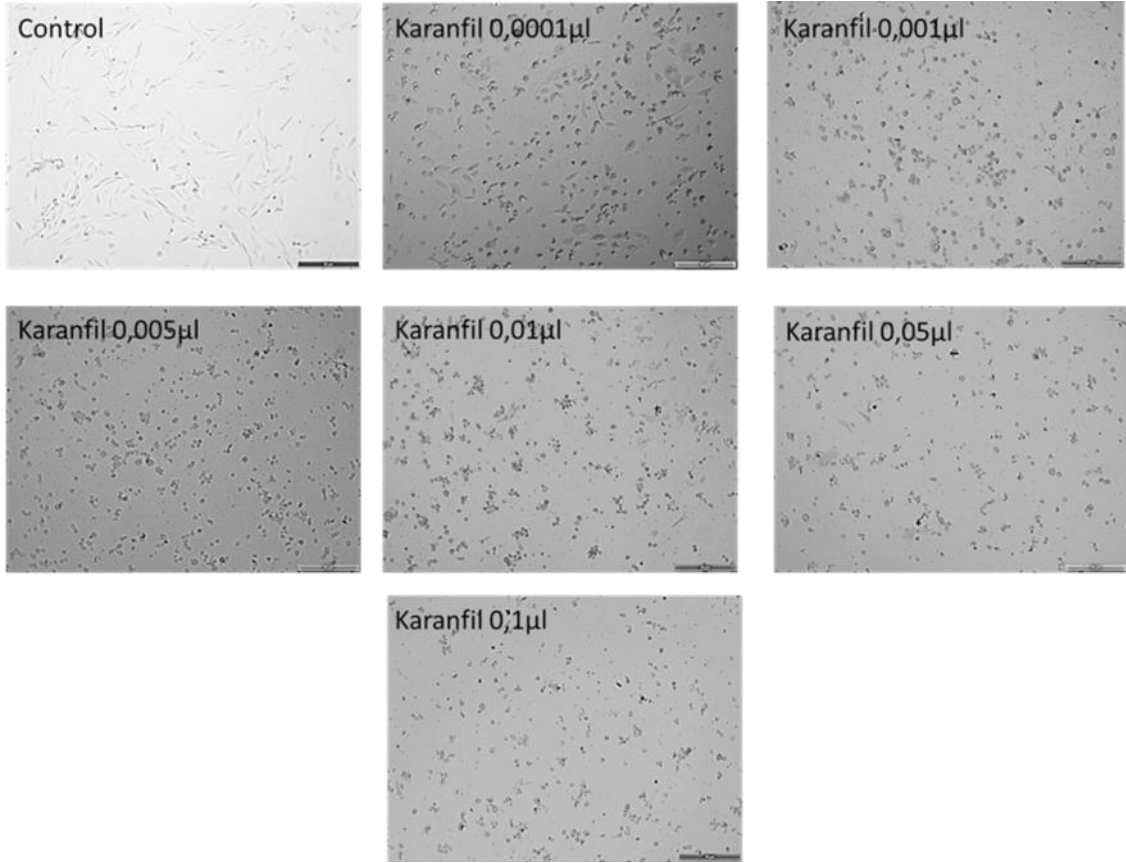
Karanfil yağının farklı konsantrasyonları HT-29 hücre hattında MTT testi ile artan dozlara göre yüzde canlılık oranlarına bakıldı. Karanfil yağı için 0,0001 μ l-0,001 μ l-0,005 μ l-0,01 μ l-0,05 μ l-0,1 μ l konsantrasyonları kullanıldı. Hücreler 96'lık well plakelere ekilerek 24 saat sonra yağ uygulaması yapıldı. 48 saatlik inkübasyon sonrasında MTT protokolü uygulanarak spektrofotometrede ölçüm yapıldı. HT-29 hücre hattı için yapılan MTT sonuçlarına bakılarak artan konsantrasyonlara göre karanfil yağının sitotoksik etkisinin de bu sonuçlara paralel olarak arttığı gözlemlendi. 0,005 μ l için canlılık seviyesi yaklaşık olarak %50 canlılık seviyesi göstermektedir. Elde edilen verilere paralel olarak artan konsantrasyon değerleri için sitotoksik etki de artmaktadır (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Karanfil yağının HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksik etkisinin belirlenmesi. İstatiksel analizi Microsoft excel programında kontrol

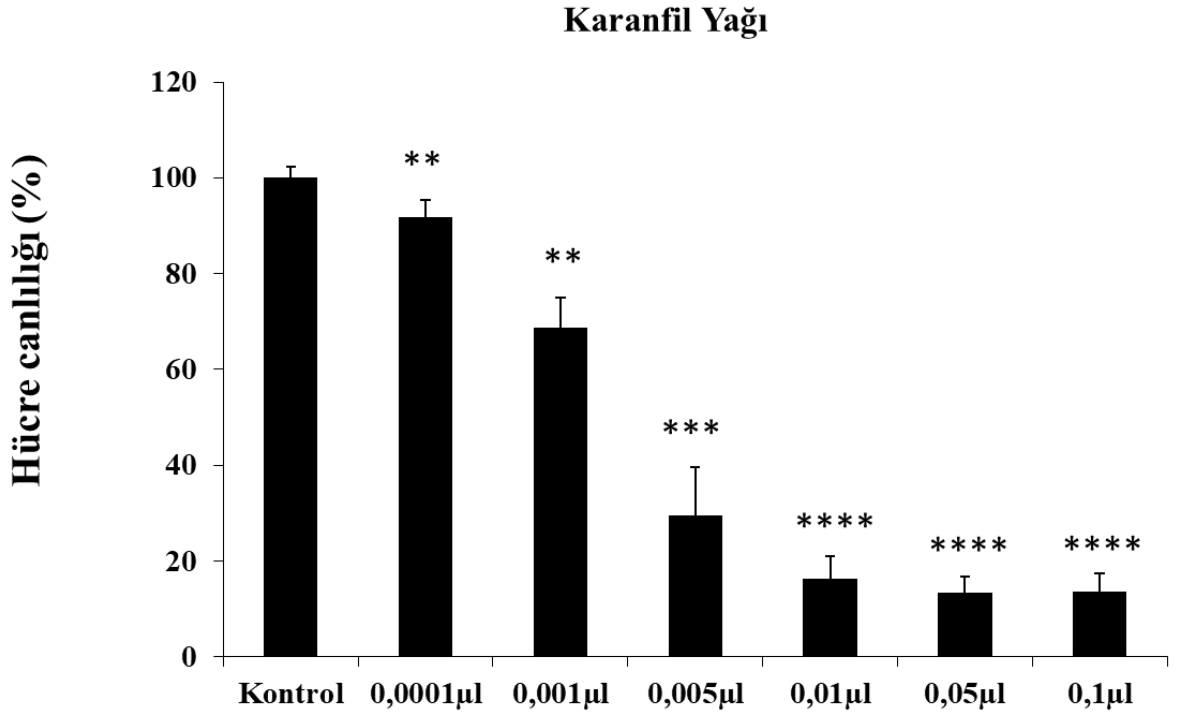
gruplarına göre t-testi hesaplanarak yapıldı (**: $P < 0,005$, ****: $P < 0,00005$). Deneyler üçer kez tekrarlandı.

Karanfil yağının HT-29 kolorektal kanser hücre hattında control grubuna göre sitotoksik etkisi düşük konsantrasyonlardan itibaren etkisini göstermiştir (Şekil 4.2.).



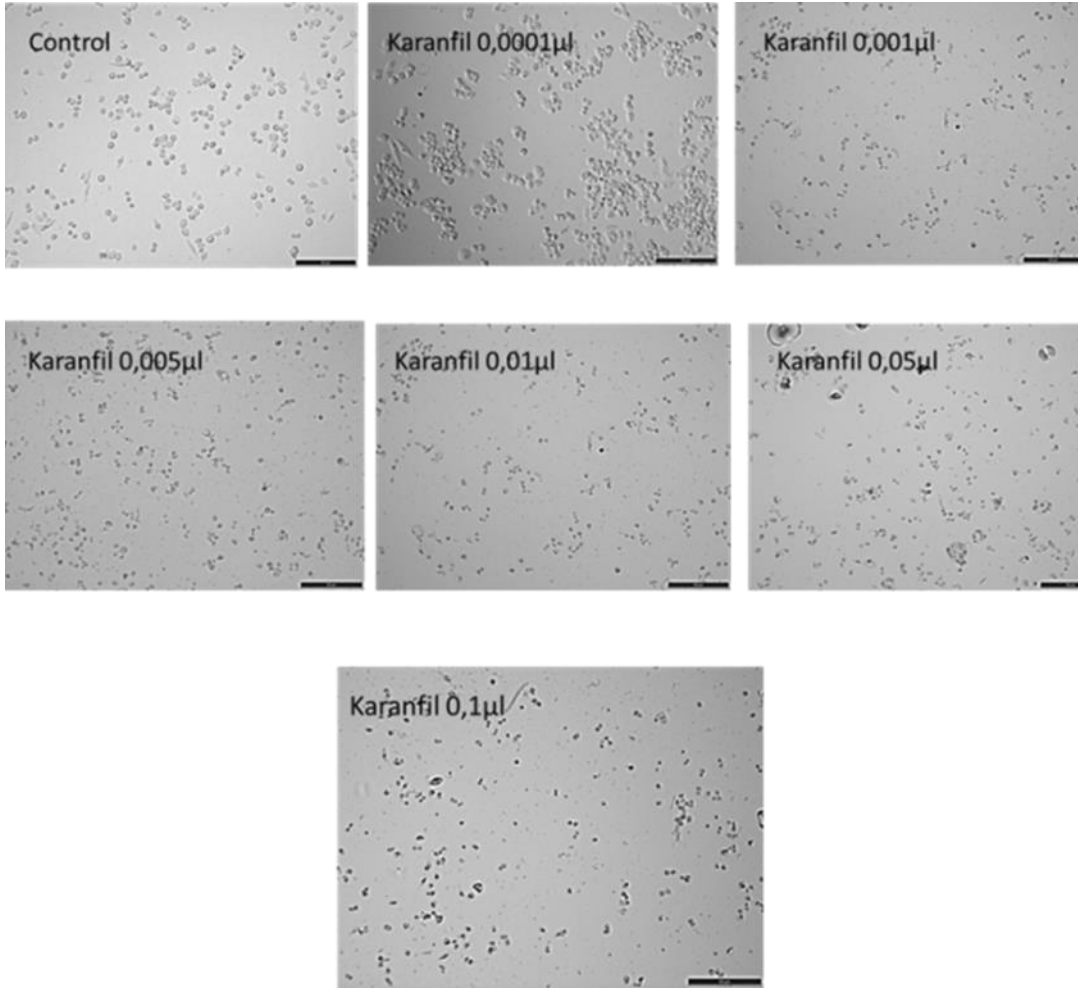
Şekil 4.2. Karanfil yağının HT-29 kolorektal kanser hücreleri 72. saat sonundaki mikroskop görüntüleri

A2780 hücre hattı için yapılan MTT sonuçlarına bakılarak artan konsantrasyonlara göre karanfil yağının sitotoksik etkisinin de bu sonuçlara paralel olarak arttığı gözlemlendi. 0,001µl için canlılık seviyesi yaklaşık olarak %65 canlılık seviyesi göstermektedir. Artan konsantrasyonlar için anlamlı bir düşüş gözlenmemiştir. 0,01µl-0,05µl-0,1µl için canlılık seviyesi aynı seviyede kalmıştır (Şekil 4.3.).



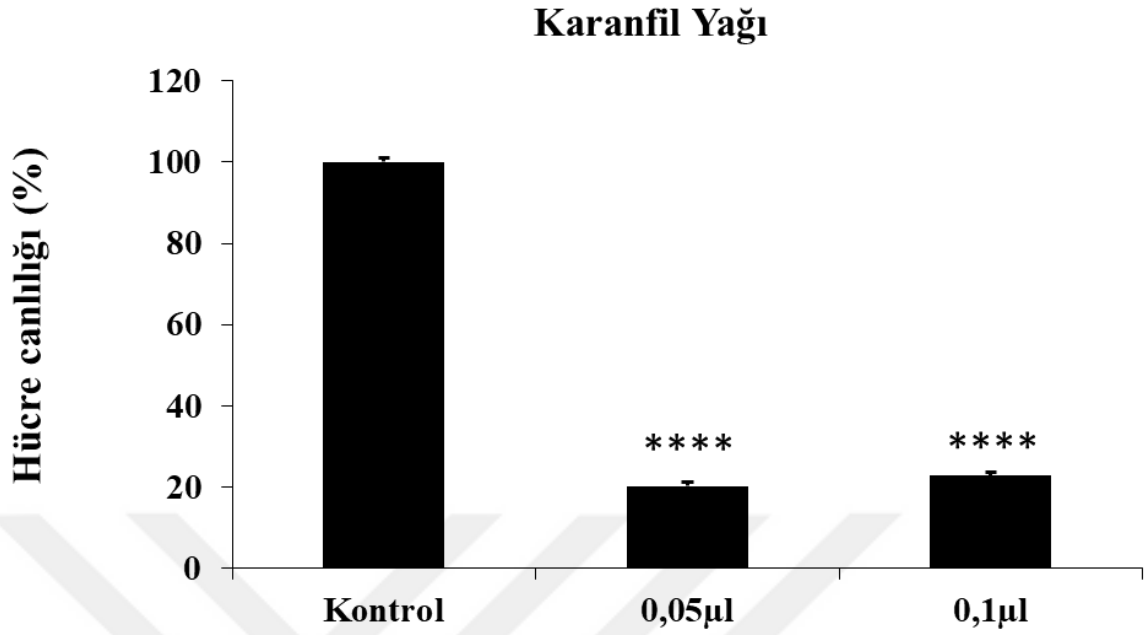
Şekil 4.3. Karanfil yağının A2780 yumurtalık kanser hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksik etkisinin belirlenmesi. İstatiksel analizi Microsoft excel programında kontrol gruplarına göre t-testi hesaplanarak yapıldı (**: $P < 0,005$, ***: $P < 0,0005$, ****: $P < 0,00005$). Deneyler üçer kez tekrarlandı.

Aynı şekilde A2780 yumurtalık kanser hücre hattı için çekilmiş olan mikroskop görüntülerinde de hücrelerin morfolojilerinin artan konsantrasyon oranlarına paralel olarak sitotoksik etkisinin varlığı gözlemlenmiştir. MTT verileri ve mikroskop görüntüleri birbirini desteklemektedir (Şekil 4.4).



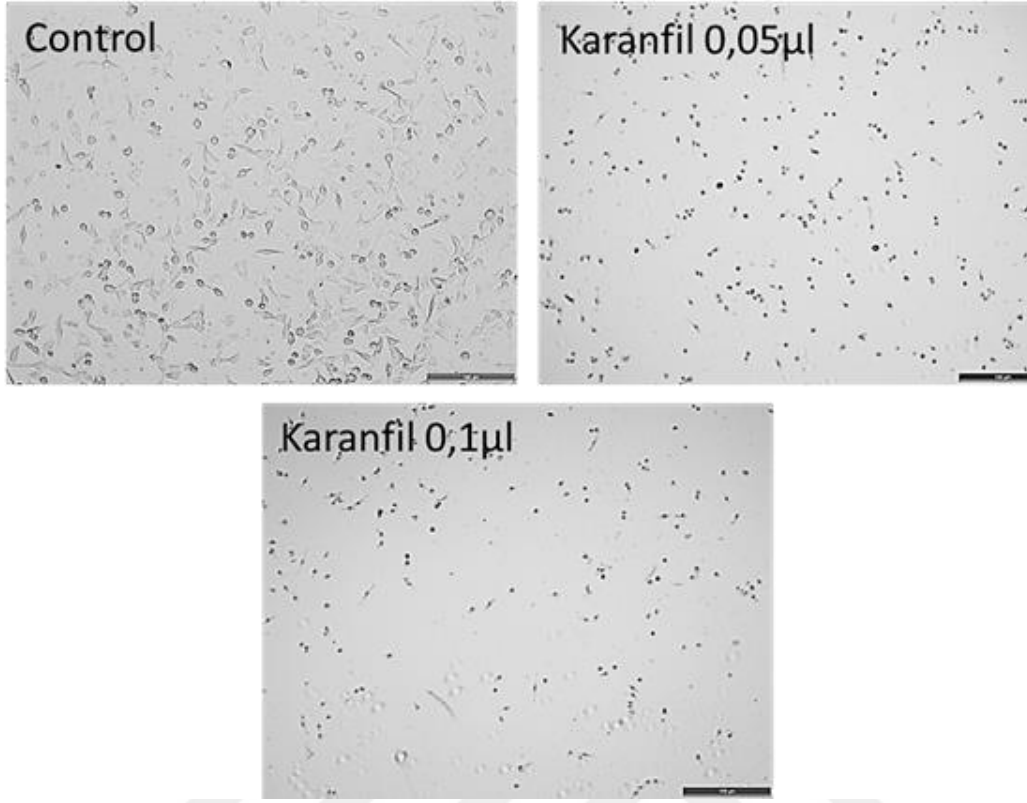
Şekil 4.4. Karanfil yağının A2780 yumurtalık kanser hücreleri 72. saat sonundaki mikroskop görüntüleri

MCF-7 meme kanseri hücre hattında 0,05µl-0,1µl olarak belirlenen konsantrasyonlar kullanıldı. Yapılan MTT sonuçlarına bakıldığında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kayda değer bir toksik etki gözlemlenmiştir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Karanfil yağının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksik etkisinin belirlenmesi. İstatiksel analizi Microsoft excel programında kontrol gruplarına göre t-testi hesaplanarak yapıldı (****: P <0,00005). Deneyler üçer kez tekrarlandı.

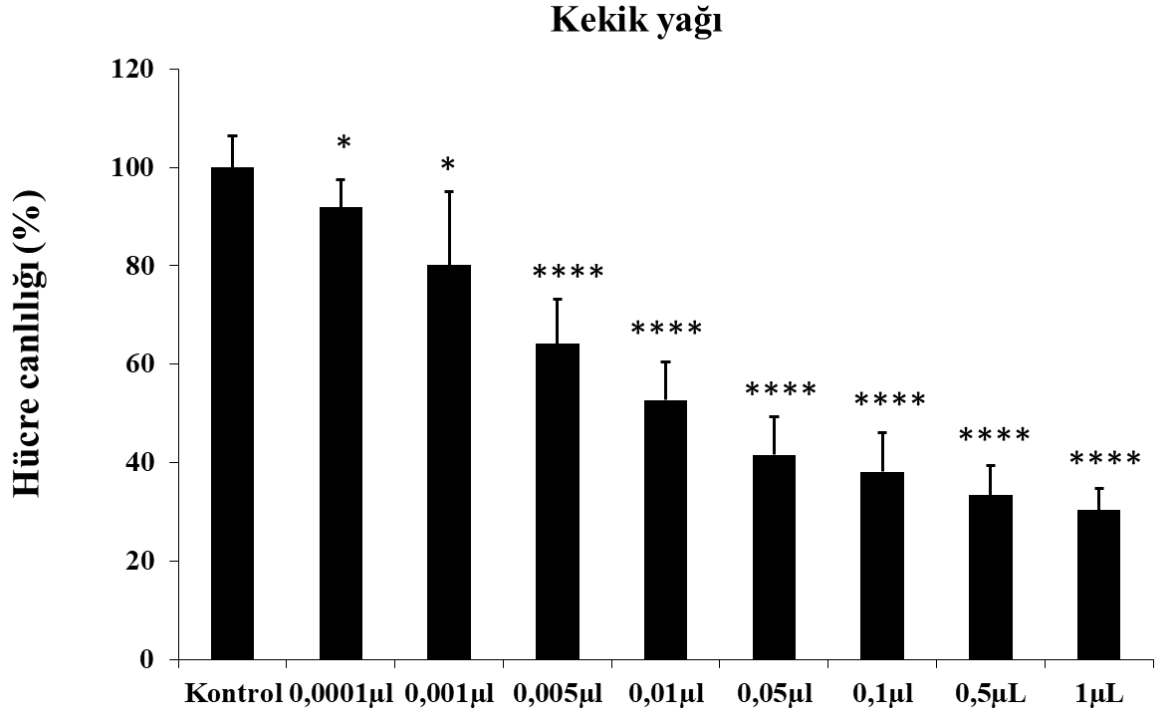
Karanfil yağının MCF-7 meme kanseri hücreleri için mikroskop görüntülerinde MTT verileriyle paralel olarak toksik etkisi gözlenmiştir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Karanfil yağının MCF-7 meme kanseri hücreleri 72. saat sonundaki mikroskop görüntüleri

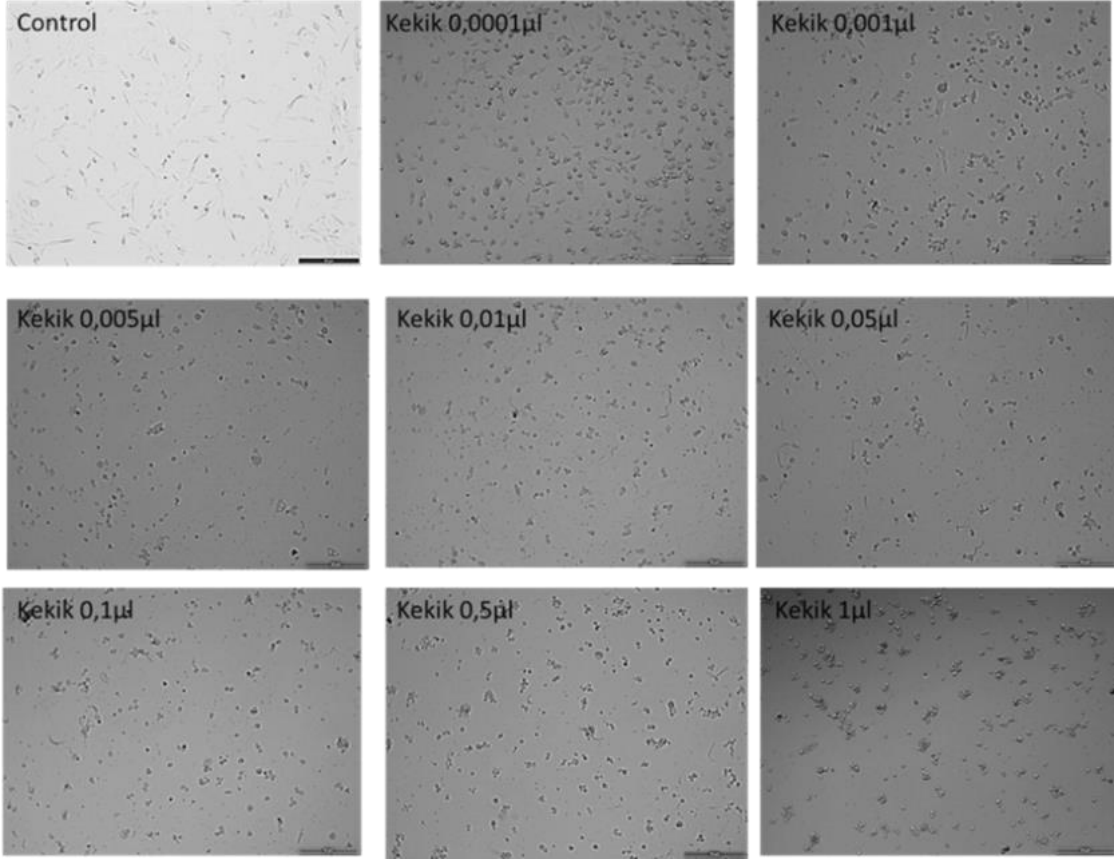
4.1.2. Kekik yağının farklı konsantrasyonlarının kolorektal kanser hücre hattında (HT-29), yumurtalık kanseri hücre hattında (A2780) ve meme kanseri hücre hattındaki (MCF-7) sitotoksik etkisi

Kekik yağının farklı konsantrasyonları HT-29 hücre hattında MTT testi ile artan dozlara göre yüzde canlılık oranlarına bakıldı. Kekik yağı için 0,0001µl-0,001µl-0,005µl-0,01µl-0,05µl-0,1µl-0,5µl-1µl konsantrasyonları kullanıldı. Hücreler 96'lık well platelere ekilerek 24 saat sonra yağ uygulaması yapıldı. 48 saatlik inkübasyon sonrasında MTT protokolü uygulanarak spektrofotometrede ölçüm yapıldı. HT-29 hücre hattı için yapılan MTT sonuçlarına bakılarak artan konsantrasyonlara göre kekik yağının sitotoksik etkisinin de bu sonuçlara paralel olarak arttığı gözlemlendi. 0,01µl için canlılık seviyesi yaklaşık olarak %50 canlılık seviyesi göstermektedir. Elde edilen verilere paralel olarak artan konsantrasyon değerleri için sitotoksik etki de artmaktadır. 1µl için canlılık %30 oranına kadar düşmektedir (Şekil 4.7.).



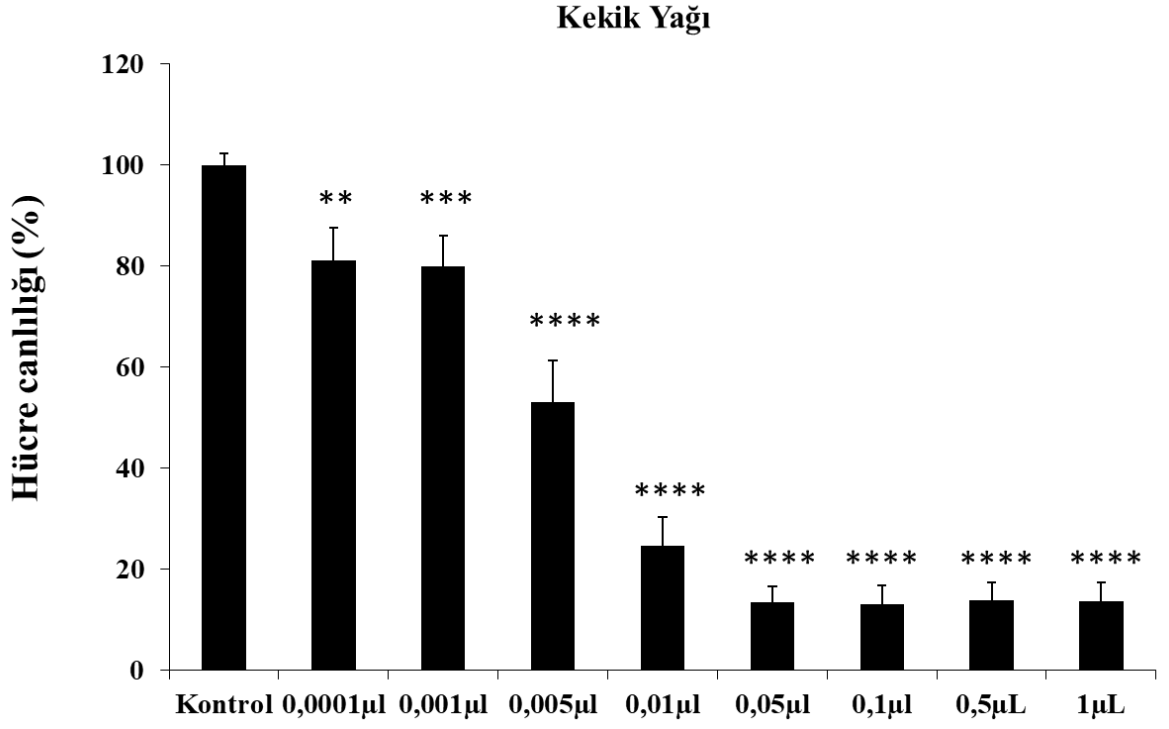
Şekil 4.7. Kekik yağının HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksik etkisinin belirlenmesi. İstatiksel analizi Microsoft excel programında kontrol gruplarına göre t-testi hesaplanarak yapıldı (*: P <0,05, ****: P <0,00005). Deneyler üçer kez tekrarlandı.

Kekik yağının HT-29 kolorektal kanser hücre hattı ve A2780 yumurtalık kanseri hücre hattı için yapılan mikroskop çekimlerinde control grubuna göre 72. saat sonundaki görüntüler konsantrasyon arttıkça sitotoksik etki de artarak kanser hücreleri üzerindeki etkisi gözlenmiştir (Şekil 4.8.).

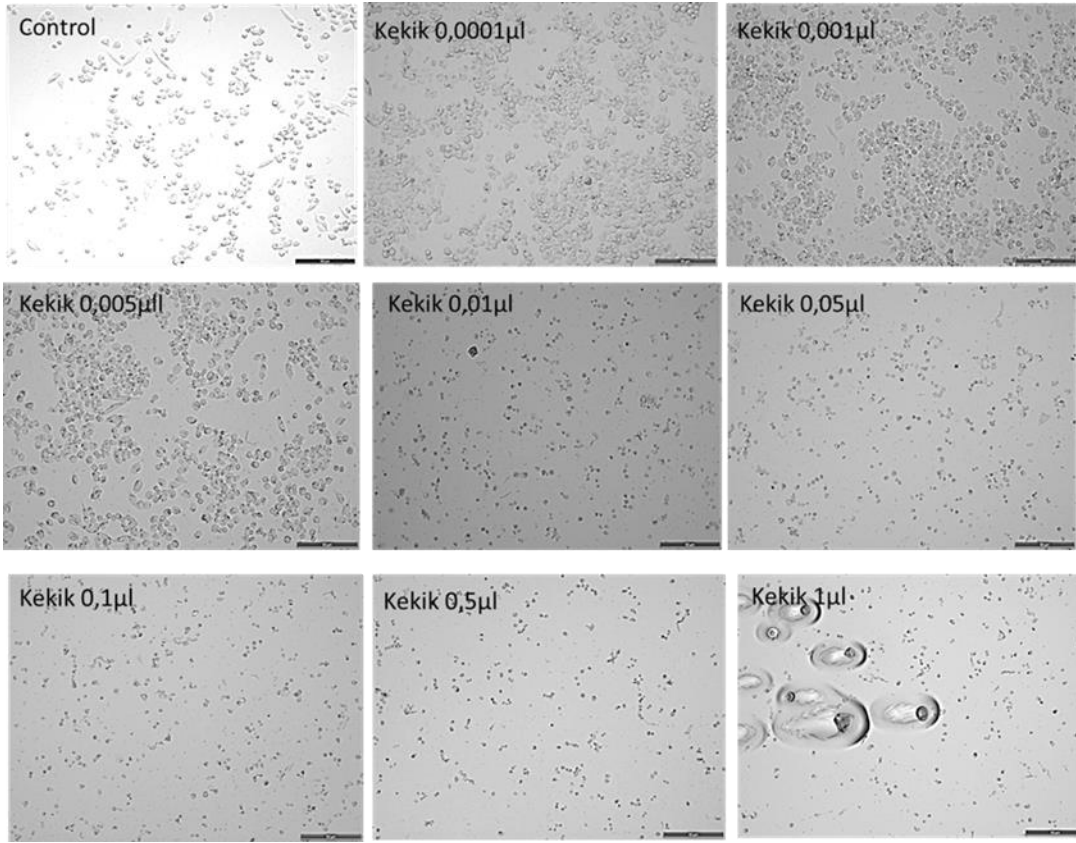


Şekil 4.8. Kekik yağının HT-29 kolorektal kanser hücreleri 72. saat sonundaki mikroskop görüntüleri

A2780 hücre hattı için yapılan canlılık testinde artan dozlarla beraber kekik yağının sitotoksik etkisinin de bu sonuçlara paralel olarak arttığı gözlemlendi. 0,005µl için canlılık seviyesi yaklaşık olarak %50 canlılık seviyesi göstermektedir. 0,05µl-0,1µl-0,5µl-1µl artan konsantrasyonlarında canlılık %15 seviyesinde sabit kalmıştır (Şekil 4.9.).

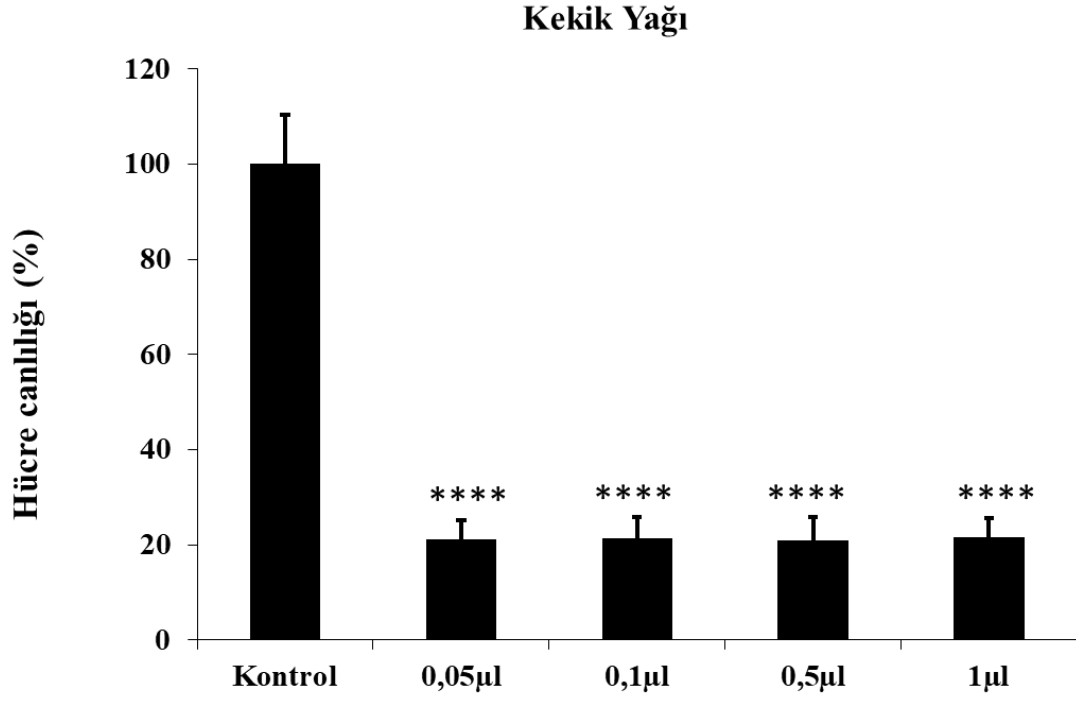


Şekil 4.9. Kekik yağının A2780 yumurtalık kanser hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksik etkisinin belirlenmesi. İstatiksel analizi Microsoft excel programında kontrol gruplarına göre t-testi hesaplanarak yapıldı (**: $P < 0,005$, ***: $P < 0,0005$, ****: $P < 0,00005$). Deneyler üçer kez tekrarlandı.

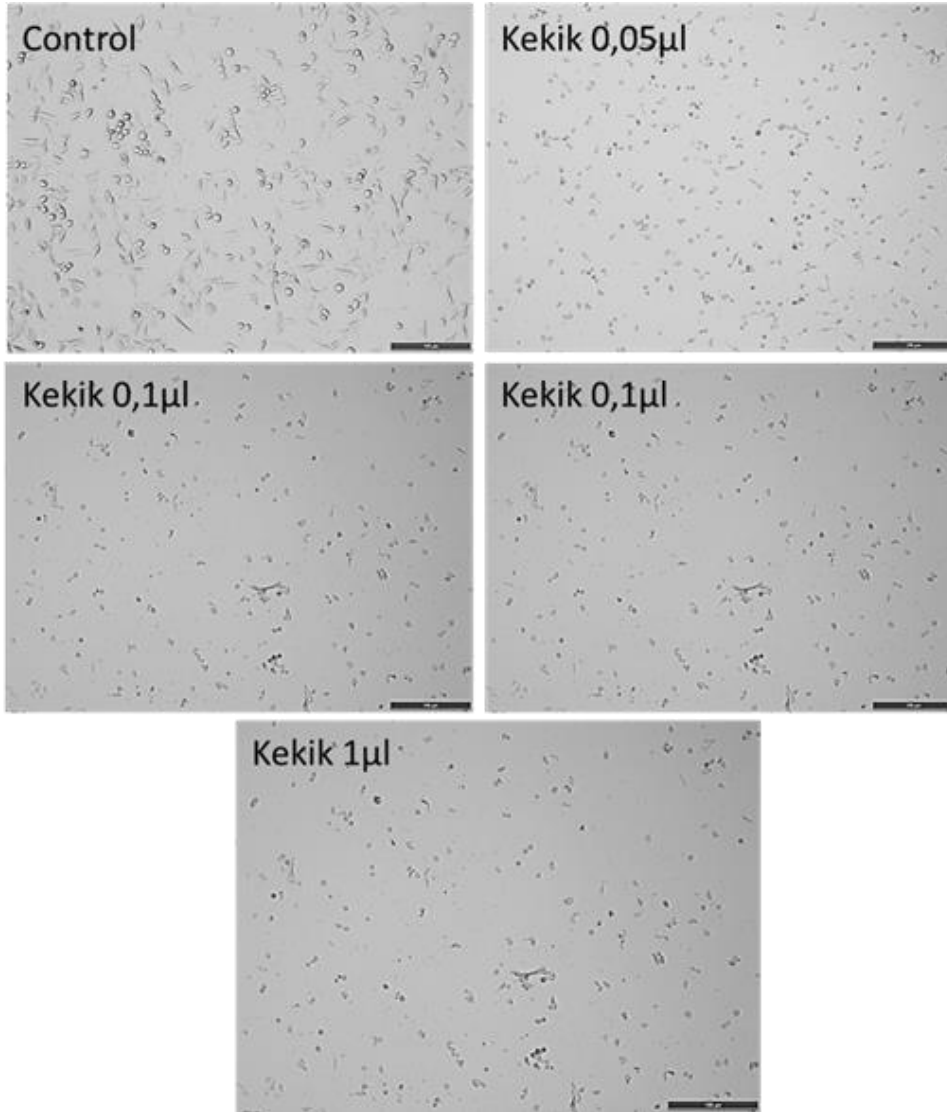


Şekil 4.10. Kekik yağının A2780 yumurtalık kanser hücreleri 72. saat sonundaki mikroskop görüntüleri

MCF-7 meme kanseri hücreleri için 0,05µl-0,1µl-0,5µl-1µl artan dozlardaki konsantrasyonları kullanıldı. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde kekik yağının artan konsantrasyonlarında MTT verileri sonucunda birbirine çok yakın değerler elde edilmesiyle beraber kekik yağı hücreler üzerinde toksik bir etki oluşturmuştur (Şekil 4.11.).



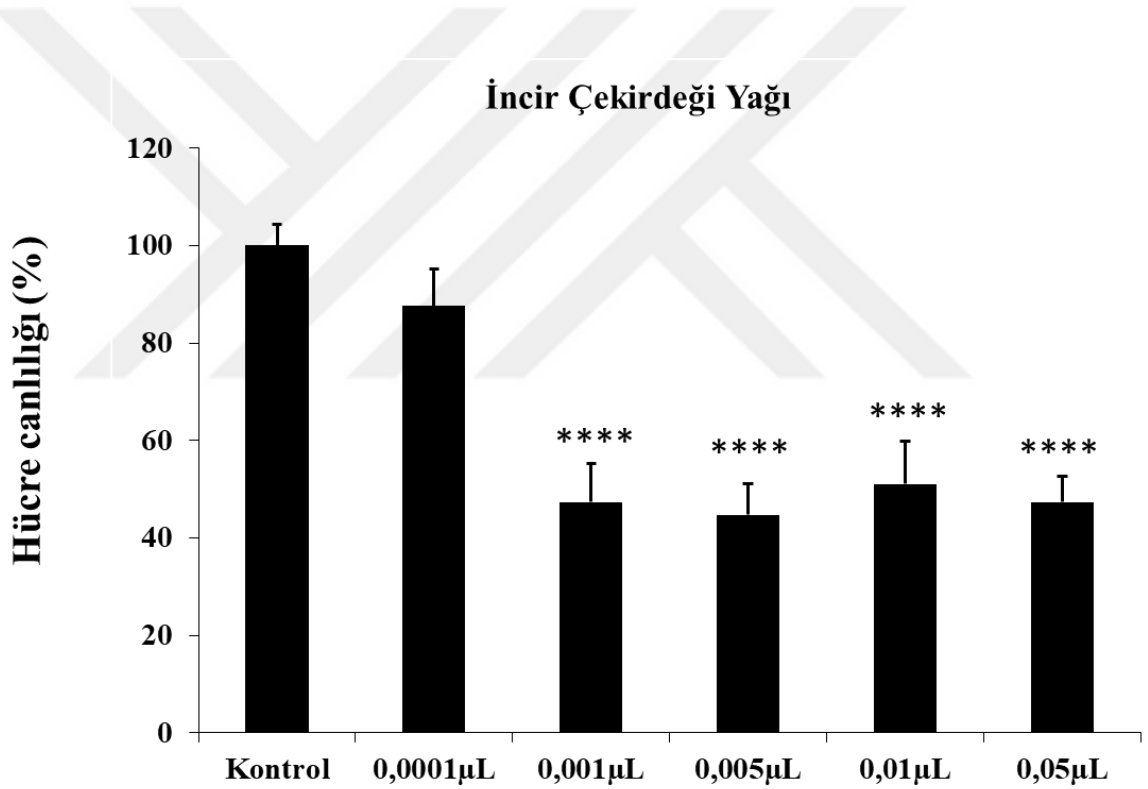
Şekil 4.11. Kekik yağının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksik etkisinin belirlenmesi. İstatiksel analizi Microsoft excel programında kontrol gruplarına göre t-testi hesaplanarak yapıldı (****: $P < 0,00005$). Deneyler üçer kez tekrarlandı.



Şekil 4.12. Kekik yağının MCF-7 meme kanseri hücreleri 72. saat sonundaki mikroskop görüntüleri

4.1.3. İncir çekirdeği yağının kolorektal, yumurtalık ve meme kanseri hücre hattındaki sitotoksik etkileri

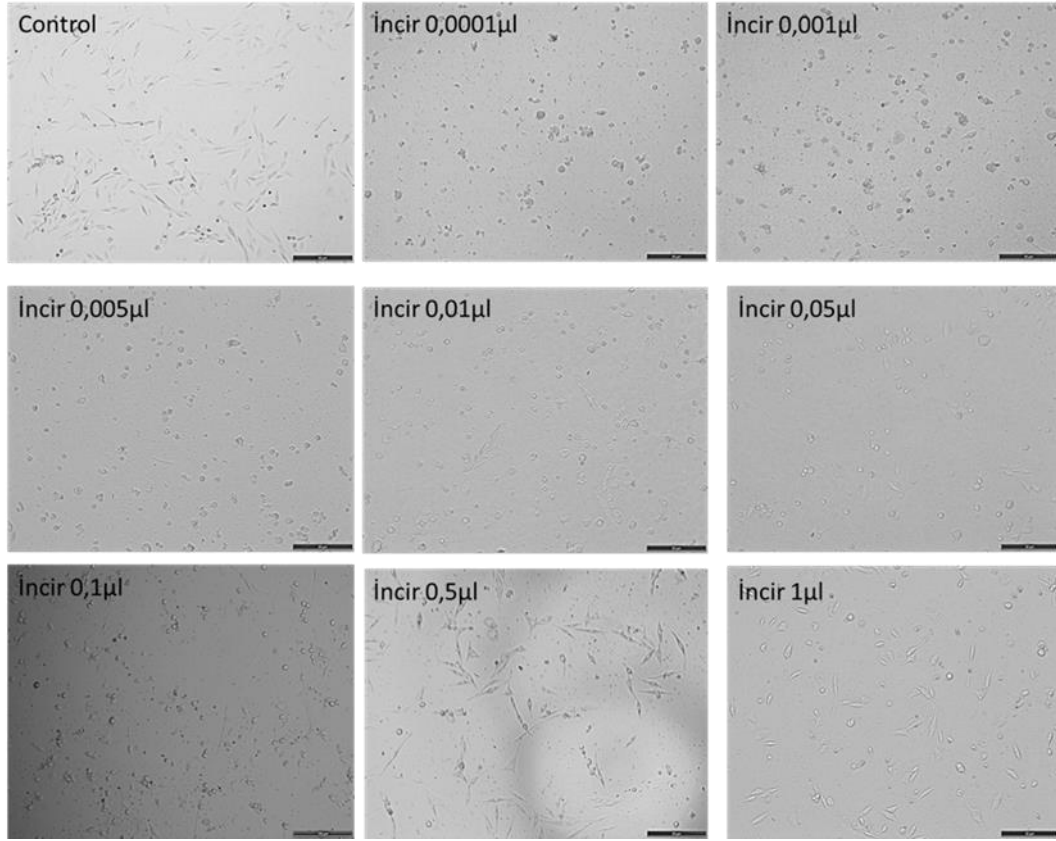
İncir çekirdeği yağının farklı konsantrasyonları HT-29 hücre hattında MTT testi ile artan dozlara göre yüzde canlılık oranlarına bakıldı. İncir çekirdeği yağı için 0,0001 μ l-0,001 μ l-0,005 μ l-0,01 μ l-0,05 μ l konsantrasyonları kullanıldı. Hücreler 96'lık well platalere ekilerek 24 saat sonra yağ uygulaması yapıldı. 48 saatlik inkübasyon sonrasında MTT protokolü uygulanarak spektrofotometrede ölçüm yapıldı. HT-29 hücre hattı için yapılan MTT sonuçlarına bakılarak artan konsantrasyonlara göre incir çekirdeği yağının sitotoksik etkisinin de bu sonuçlara paralel olarak arttığı gözlemlendi. 0,001 μ l için canlılık seviyesi yaklaşık olarak %50 canlılık seviyesi göstermektedir (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. İncir çekirdeği yağının HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksik etkisinin belirlenmesi. İstatistiksel analizlerstudent t-testi kullanılarak hesaplandı(****: P < 0,00005). Deneyler birbirinden bağımsız olarak üçer kez tekrarlandı.

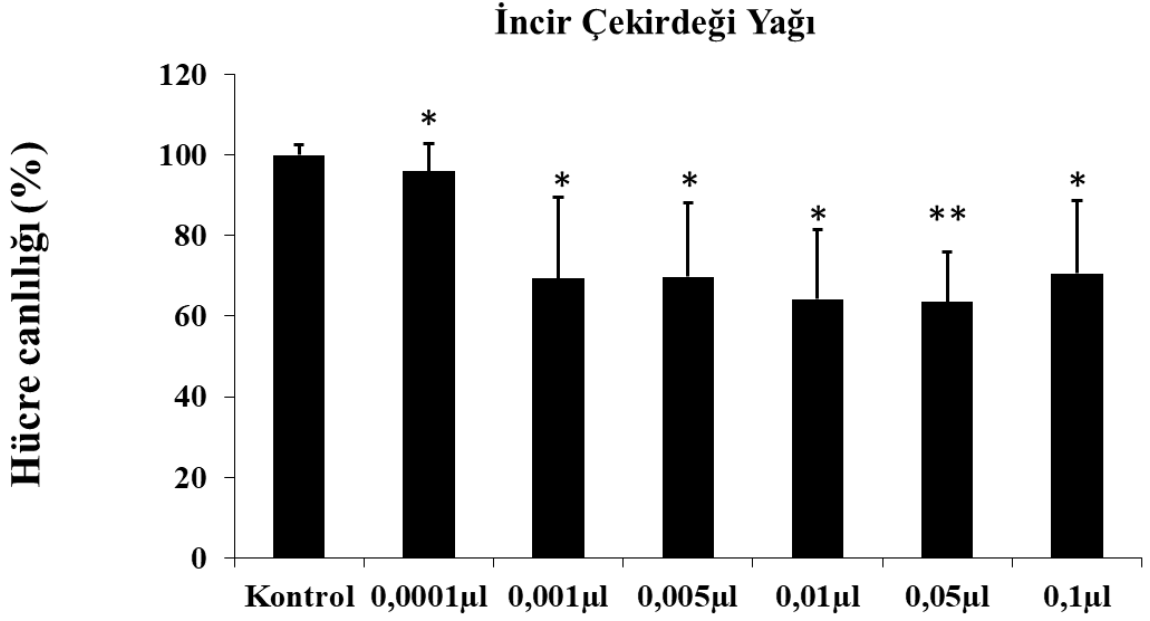
İncir çekirdeği yağında elde edilen deney sonuçlarında HT-29 kolorektal kanser hücre hattı için yapılan deneyler sonucunda diğer yağlardan farklı olarak artan

konsantrasyonlarda sitotoksik etki artmasına rağmen 0,5 μ l için mikroskop görüntülerinde canlılık görülmüştür. MTT verilerindeki değerler de 0,5 μ l için canlılık seviyesinin yüksek çıkmasıyla beraber MTT testinin doğruluğunu bize göstermiştir (Şekil 4.14.).



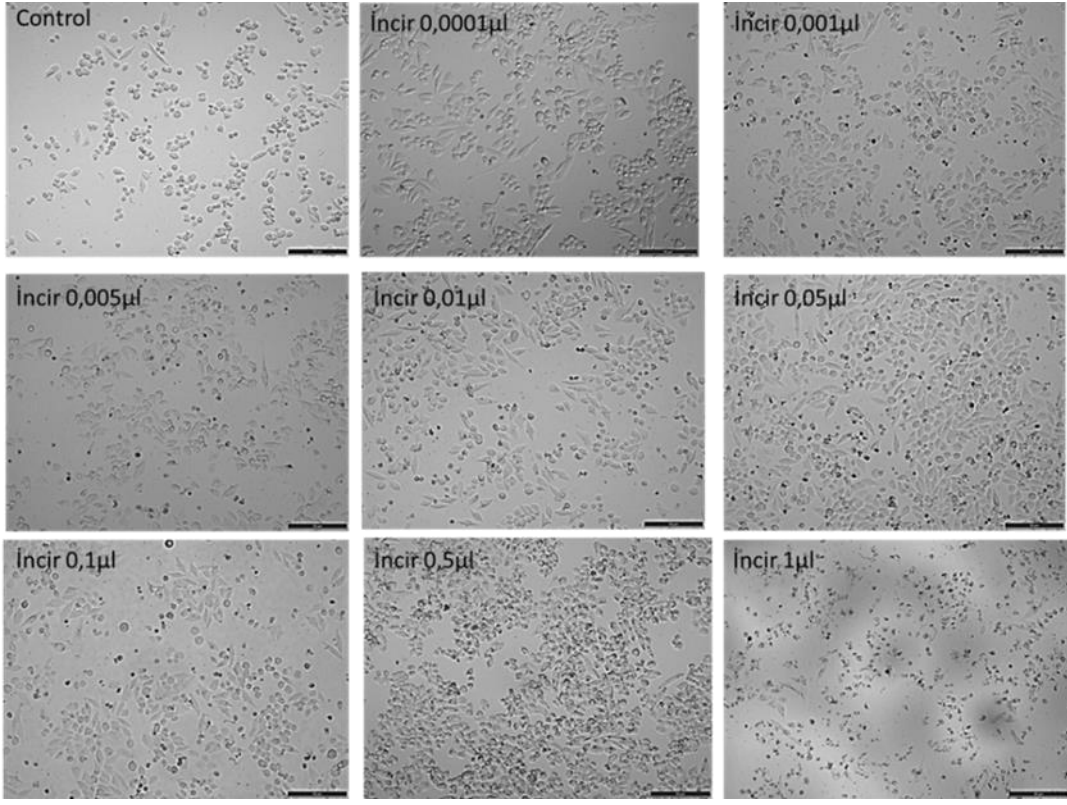
Şekil 4.14. İncir çekirdeği yağının HT-29 kolorektal kanser hücreleri 72. saat sonundaki mikroskop görüntüleri

A2780 hücre hattı için yapılan MTT sonuçlarına bakılarak artan konsantrasyonlara göre incir çekirdeği yağı için anlamlı bir sitotoksik etki görülmemiştir (Şekil 4.15.).



Şekil 4.15. İncir çekirdeği yağının A2780 yumurtalık kanser hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksik etkisinin belirlenmesi. İstatiksel analizi kontrol gruplarına göre t-testi hesaplanarak yapıldı (*: $P < 0,05$, **: $P < 0,005$). Deneyler birbirinden bağımsız olarak üçer kez tekrarlandı.

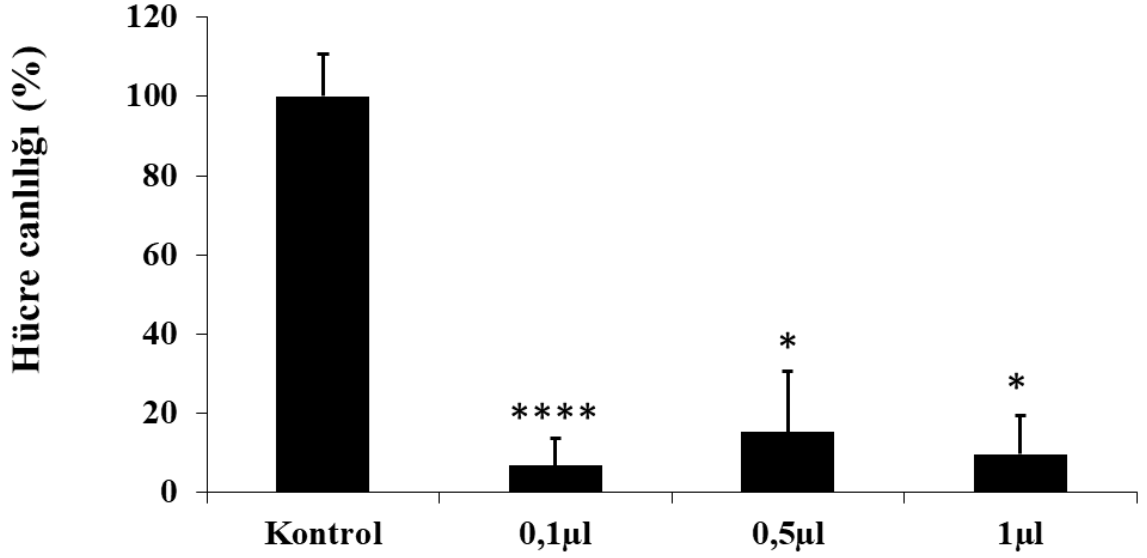
İncir çekirdeği yağının A2780 yumurtalık kanseri hücre hattındaki mikroskop görüntüleri kolorektal kanserle karşılaştırıldığında canlılık değerlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Aynı zamanda MTT değerleri için de yumurtalık kanseri hücre hattı veri yüzdeleri yüksektir. Fakat buna rağmen yine de sitotoksik etki görülmüştür (Şekil 4.16.).



Şekil 4.16. İncir çekirdeği yağının A2780 yumurtalık kanser hücreleri 72. saat sonundaki mikroskop görüntüleri

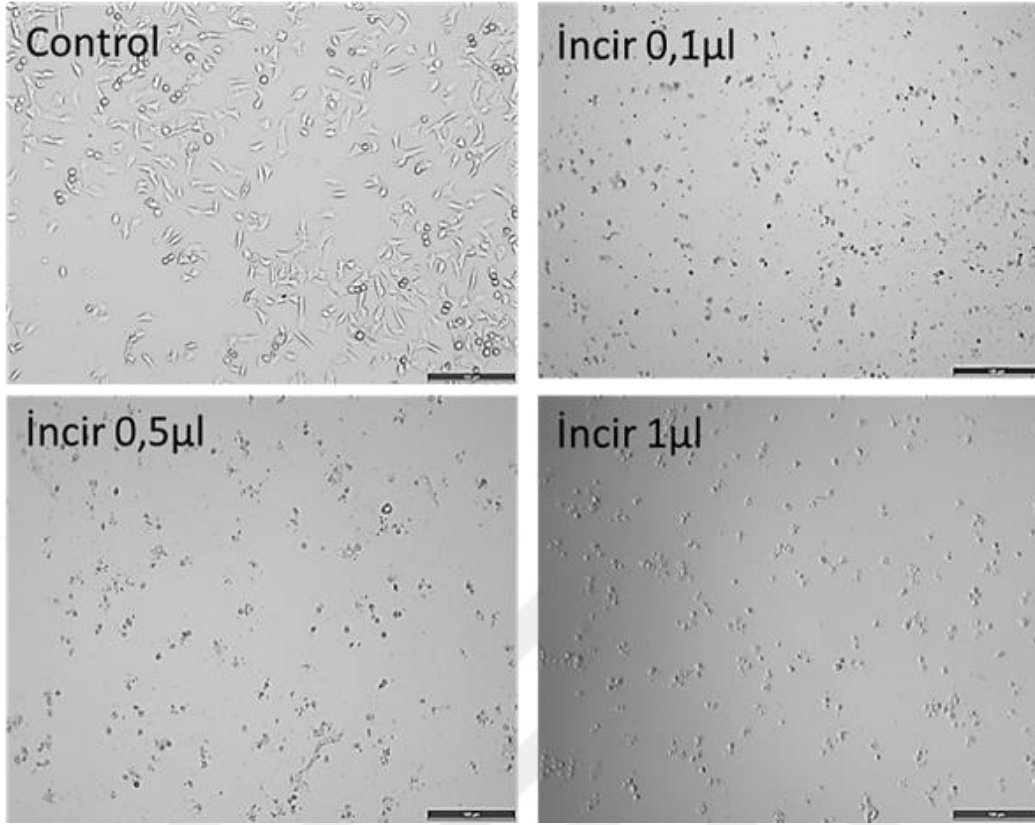
MCF-7 meme kanseri hücreleri için 0,1µl-0,5µl-1µl olacak şekilde kullanılmış olan incir çekirdeği yağ dozlarında artan konsantrasyonlarla beraber toksik etkinin de artmasını beklememize rağmen hücrelerdeki canlılık seviyesi 0,5µl için düşük doz olarak kullanılan 0,1µl'den daha yüksek bir sonuç verdi (Şekil 4.17.).

İncir Çekirdeği Yağı



Şekil 4.17. İncir çekirdeği yağının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksik etkisinin belirlenmesi. İstatiksel analizi kontrol gruplarına göre t-testi hesaplanarak yapıldı (*: $P < 0,05$, ****: $P < 0,00005$). Deneyler üçer kez tekrarlandı.

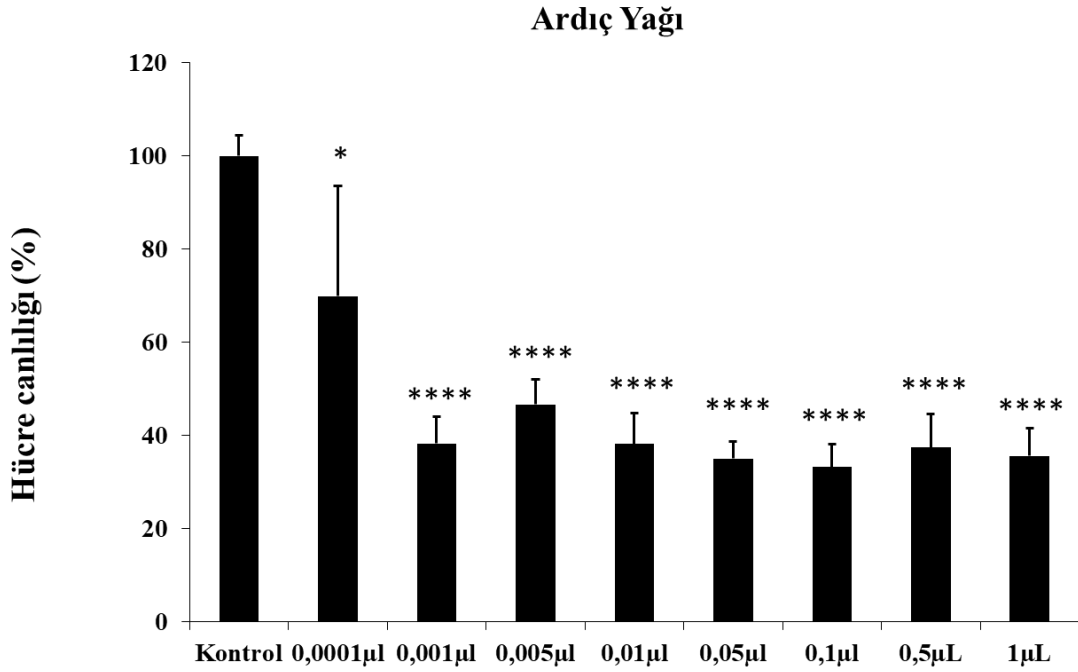
İncir çekirdeği yağının diğer hücrelerde olduğu gibi MCF-7 meme kanseri hücrelerinde de toksik etkisi görülmüştür ve MTT verilerindeki canlılık seviyeleri ile mikroskop görüntüleri birbirini desteklemektedir (Şekil 4.18.).



Şekil 4.18. İncir çekirdeği yağının MCF-7 meme kanseri hücreleri 72. saat sonundaki mikroskop görüntüleri

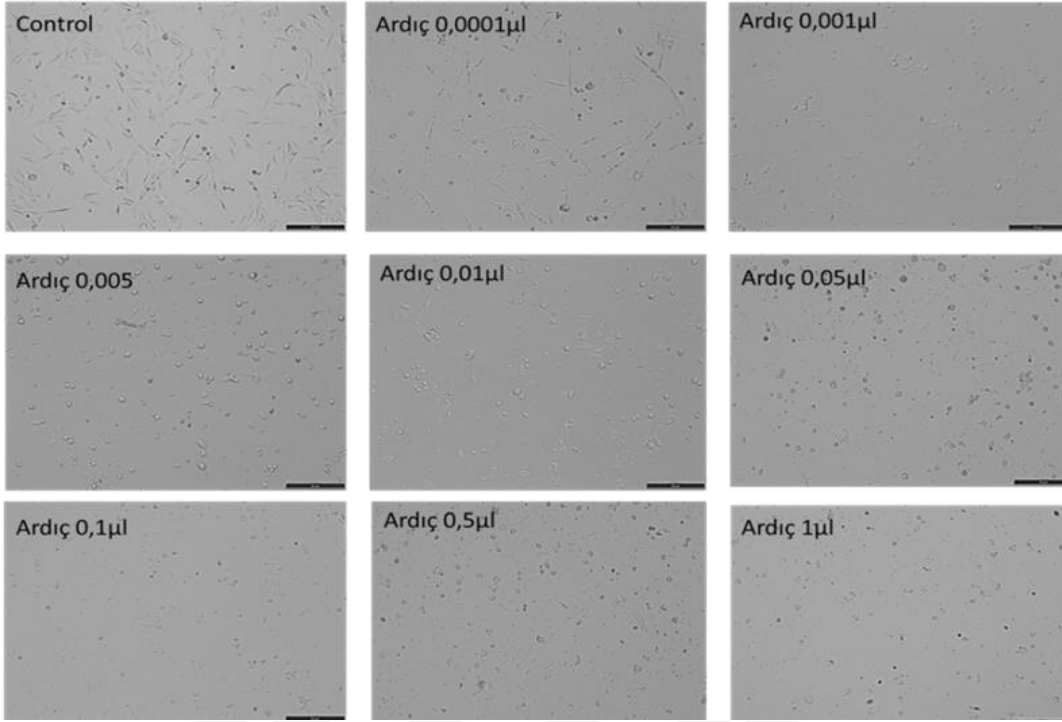
4.1.4. Ardıç yağının farklı konsantrasyonlarının kolorektal kanser, yumurtalık kanseri ve meme kanseri üzerindeki canlılık seviyelerinin belirlenmesi

Ardıç yağının farklı konsantrasyonları HT-29 hücre hattında MTT testi ile artan dozlara göre yüzde canlılık oranlarına bakıldı. Ardıç yağı için 0,0001µl-0,001µl-0,005µl-0,01µl-0,05µl-0,1µl-0,5µl-1µl konsantrasyonları kullanıldı. Hücreler 96'lık well platelere ekilerek 24 saat sonra yağ uygulaması yapıldı. 48 saatlik inkübasyon sonrasında MTT protokolü uygulanarak spektrofotometrede ölçüm yapıldı. HT-29 hücre hattına uygulanan ardıç yağı için %25-35 arasında bir canlılık seviyesi gözlemlenmiştir (Şekil 4.19.).



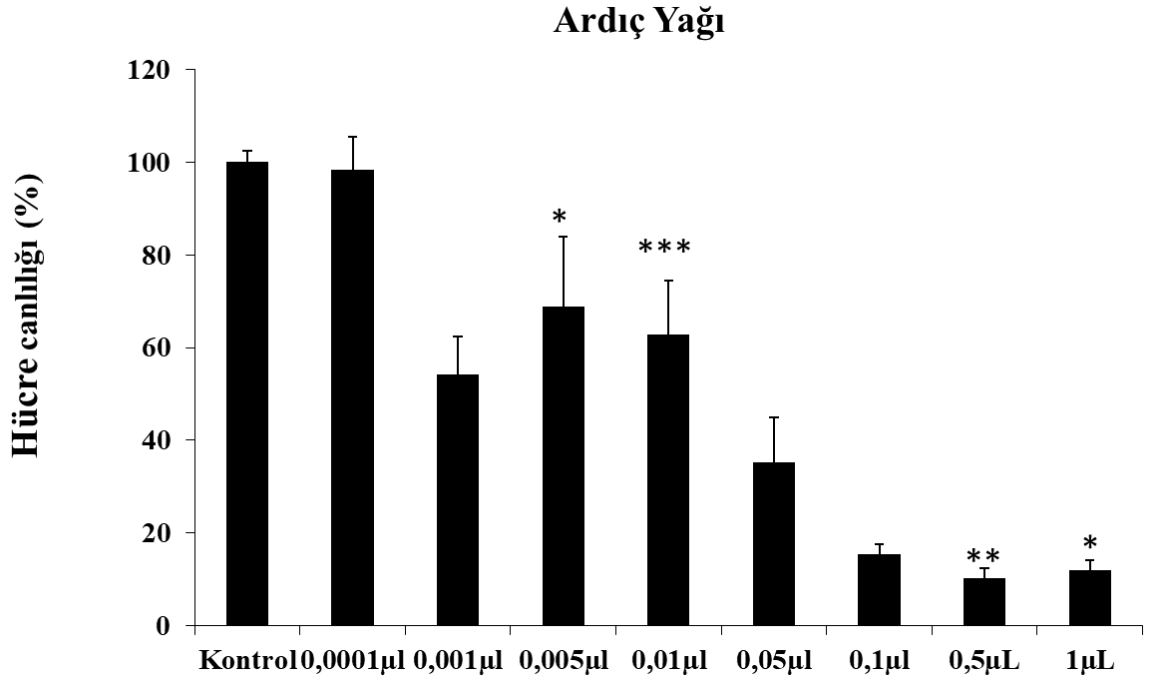
Şekil 4.19. Ardıç yağının HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksik etkisinin belirlenmesi. İstatistiksel analizi kontrol gruplarına göre t-testi hesaplanarak yapıldı (*: $P < 0,05$ ****: $P < 0,00005$). Deneyler üçer kez tekrarlandı.

Ardıç yağının HT-29 kolorektal kanser hücre hattı için mikroskop görüntülerinde sitotoksik etki görülmüştür (Şekil 4.20.).



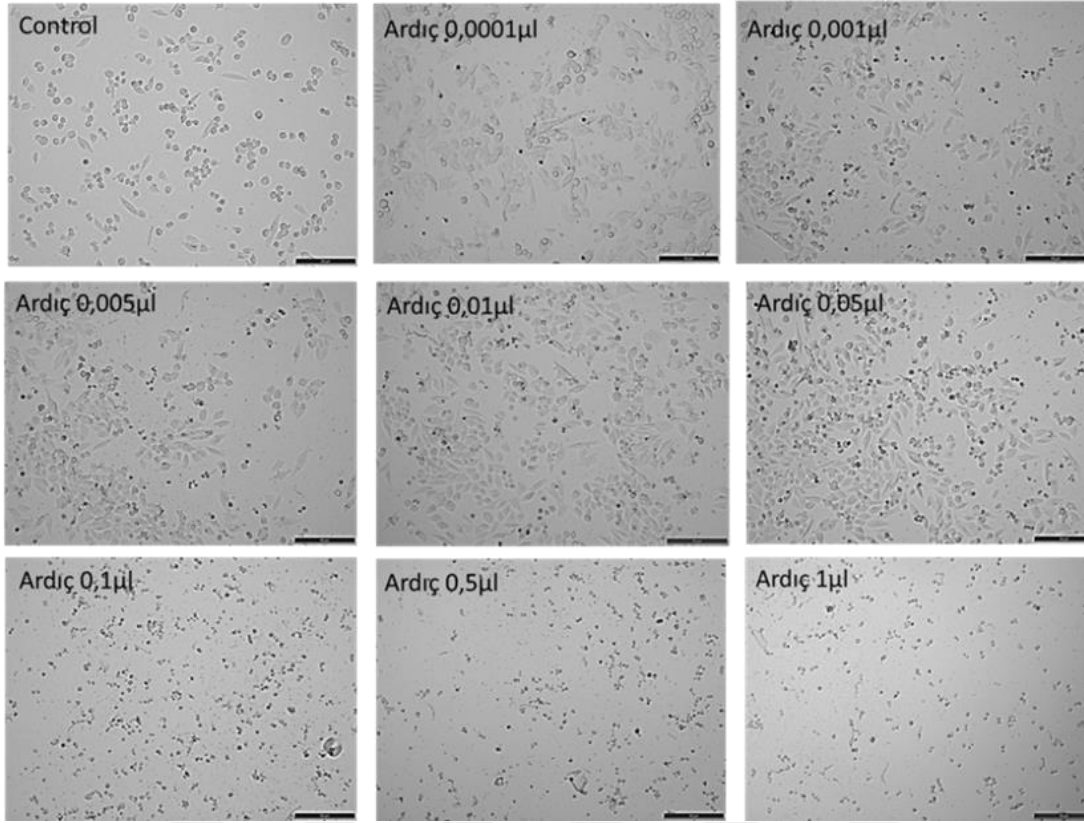
Şekil 4.20. Ardic yağının HT-29 kolorektal kanser hücreleri 72. saat sonundaki mikroskop görüntüleri

A2780 hücre hattı için yapılan MTT sonuçlarına bakılarak artan konsantrasyonlara göre ardic yağı için anlamlı olmasa da sitotoksik etki gözlemlenmiştir (Şekil 4.21.).



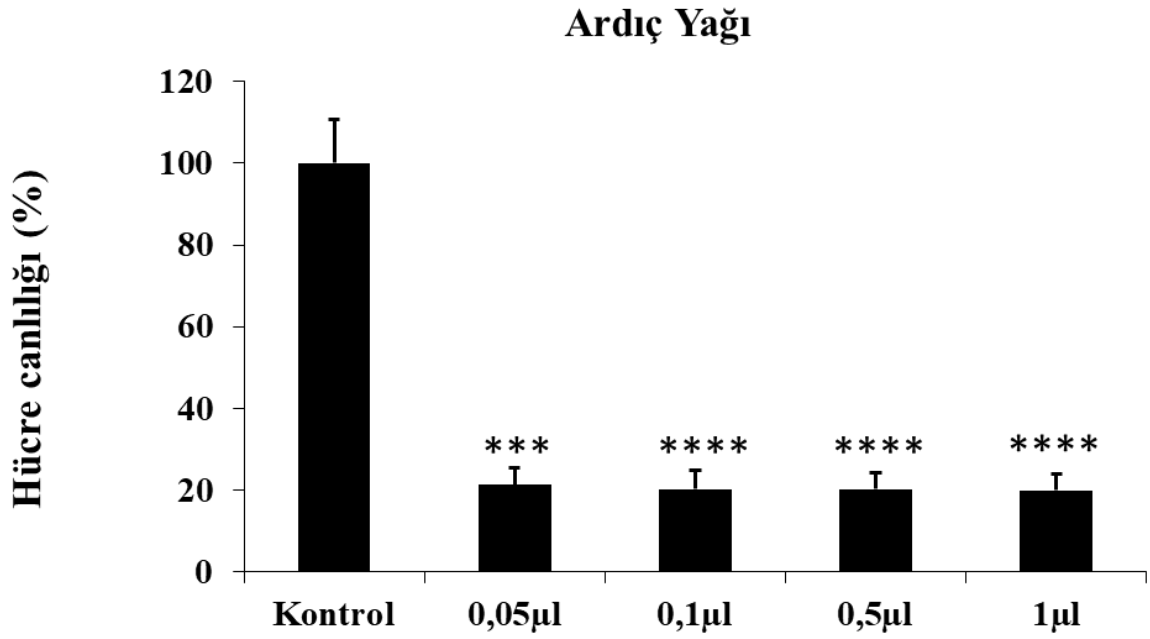
Şekil 4.21. Ardıç yağının A2780 yumurtalık kanser hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksik etkisinin belirlenmesi. İstatiksel analizi Microsoft excel programında kontrol gruplarına göre t-testi hesaplanarak yapıldı (*: $P < 0,05$ **: $P < 0,005$ ***: $P < 0,0005$). Deneyler üçer kez tekrarlandı.

Ardıç yağının A2780 yumurtalık kanser hücre hattındaki sitotoksik etkisi 0,1µl-0,5µl-1µl konsantrasyonlarına kadar canlılık seviyesi yüksektir. Bu konsantrasyonlardaki MTT verilenin de sabit olarak yaklaşık %15 oranına kadar düştüğü bilinmektedir (Şekil 4.22.).



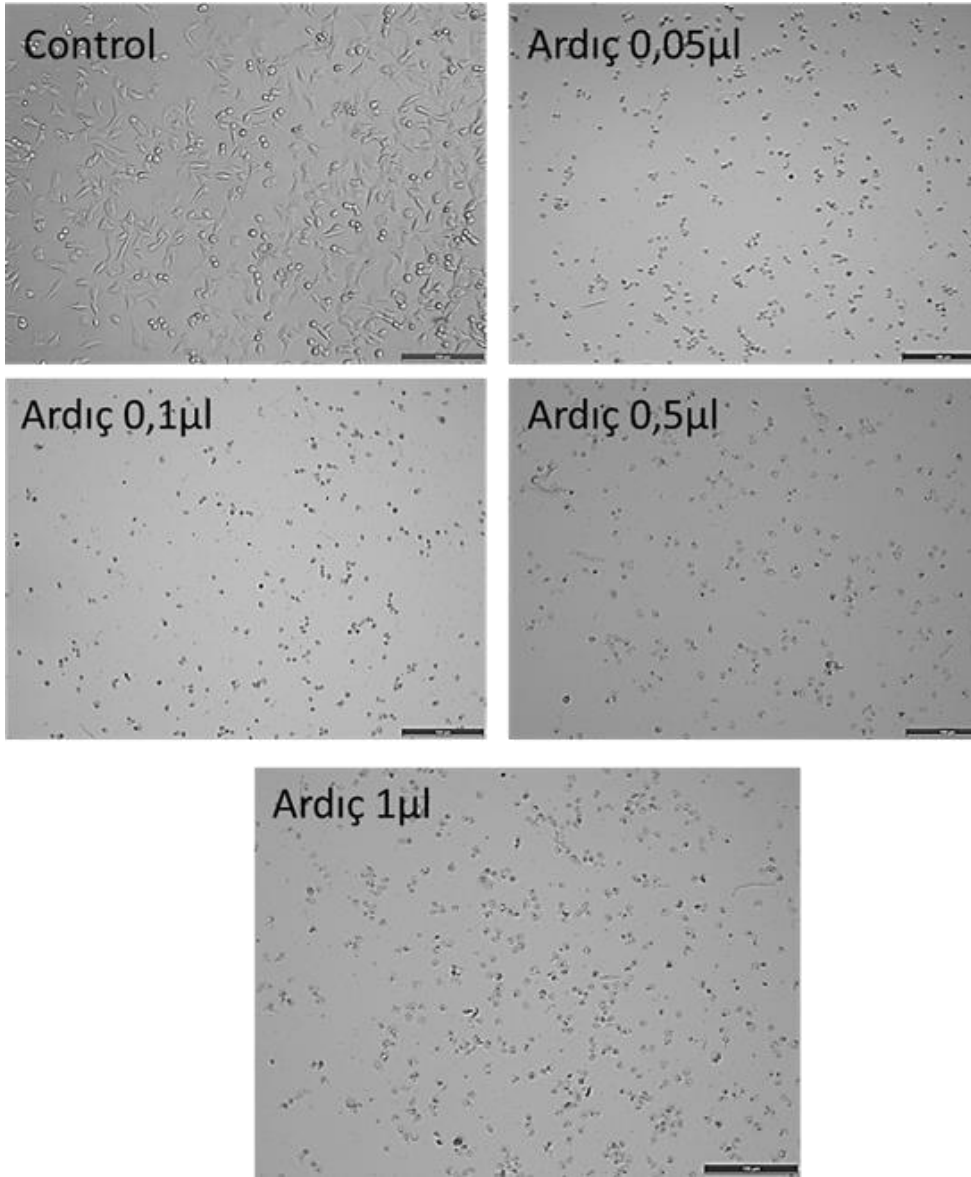
Şekil 4.22. Ardıç yağının A2780 yumurtalık kanser hücreleri 72. saat sonundaki mikroskop görüntüleri

MCF-7 meme kanseri hücreleri için 0,05µl-0,1µl-0,5µl-1µl artan dozlarda ardıç yağı kullanıldı. MTT verilerine bakıldığında kontrole kıyasla oldukça toksik etki gözlenmiştir. Fakat konsantrasyonlar arasında artan doza bağlı olarak doğru orantılı olacak şekilde toksik etki beklenmesine rağmen böyle bir etki gözlenmedi. Yine de önemli bir toksik etki görüldü (Şekil 4.23.).



Şekil 4.23. Ardıç yağının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde MTT yöntemiyle sitotoksik etkisinin belirlenmesi. İstatiksel analizi Microsoft excel programında kontrol gruplarına göre t-testi hesaplanarak yapıldı (***: $P < 0,0005$, ****: $P < 0,00005$). Deneyler üçer kez tekrarlandı.

Ardıç yağının MCF-7 meme kanseri hücreleri için mikroskop görüntülerinde kullanılan en düşük dozda bile toksik etki görülmüştür ve artan dozlarda da canlılık seviyesi oldukça azdır (Şekil 4.24.).



Şekil 4.24. Ardıç yağının MCF-7 meme kanseri hücreleri 72. saat sonundaki mikroskop görüntüleri

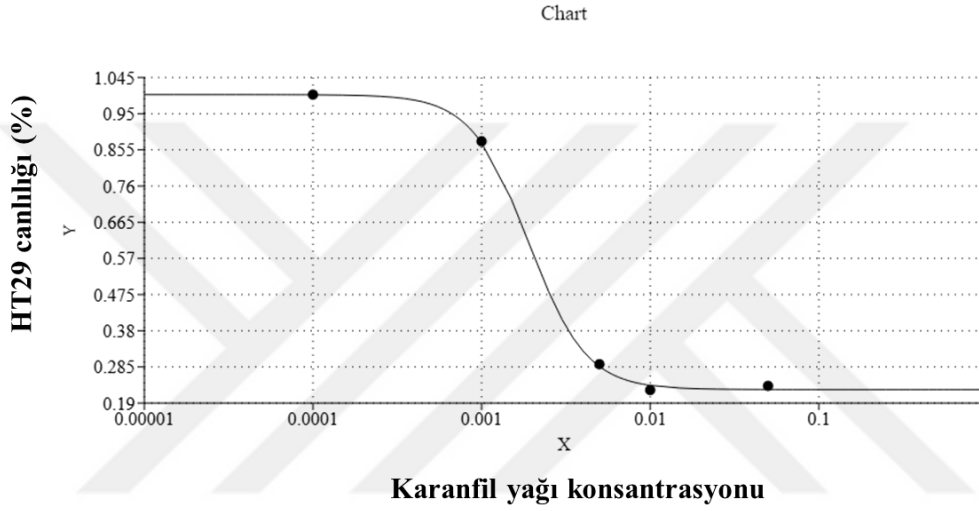
4.2. Uçucu Yağların Kullanılan Hücre Hatları İçin IC50 Dozlarının Hesaplanması

4.2.1. Karanfil, kekik, ardıç, incir çekirdeği yağlarının HT29 kolorektal kanser hücrelerindeki IC50 dozlarının belirlenmesi

IC50 dozunun belirlenmesi için ise MTT deneyleri sonunda doz-tepki eğrileri çizildi. IC50 dozlarının belirlenmesi için AAT Bioquest (Anonim, 2022) veri tabanı kullanılarak hesaplama yapıldı. MTT canlılık testi için belirlenen konsantrasyon değerleri üzerinden dört uçucu yağın da farklı hücre hatları için IC50 dozları hesaplandı.

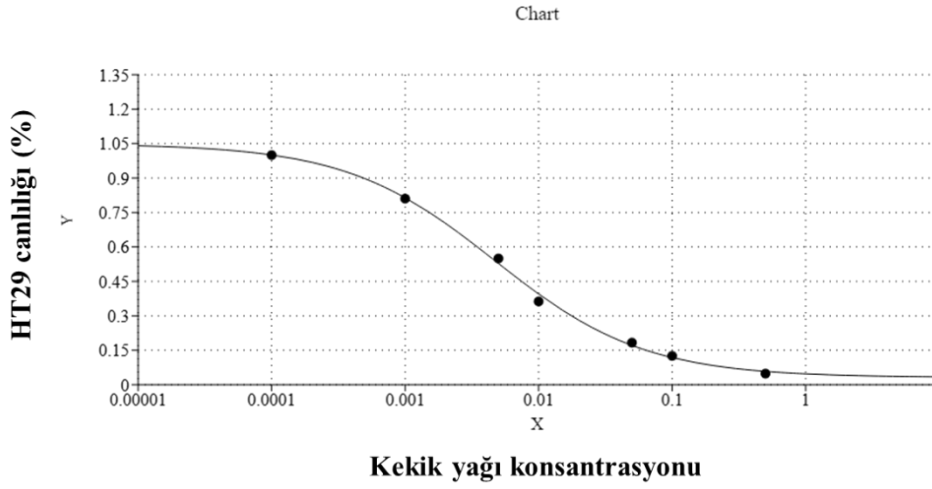
	IC50 değerleri (μ l)
Karanfil yağı	0,0019
Kekik yağı	0,0047
Ardıç yağı	0,0002
İncir çekirdeği yağı	0,0002

Tablo 4.2. Kolorektal kanser HT29 hücreleri için IC50 dozları



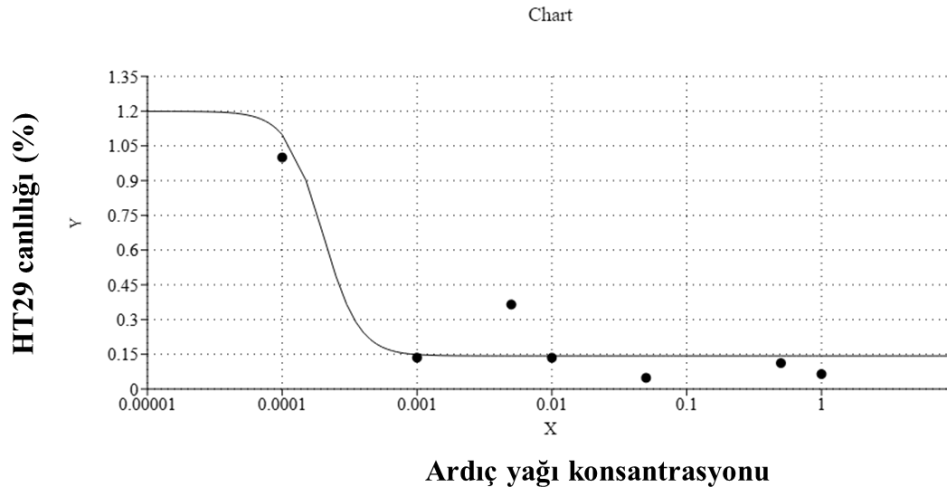
Şekil 4.25. Karanfil yağının HT29 kolorektal kanser hücreleri için IC50 dozu

Kekik yağının ana bileşeni olarak bilinen karvakrol için kolorektal kanseri hücre hatlarında (HCT-116 ve LoVo) karvakrol inhibisyonunun proliferasyon etkisine bakmak için yapılan bir çalışmada IC50 değerleri HCT-116 ve LoVo hücreleri için sırasıyla 544.4 ve 530.2 μ mol/l olarak bulunmuştur (Fan ve ark., 2015).

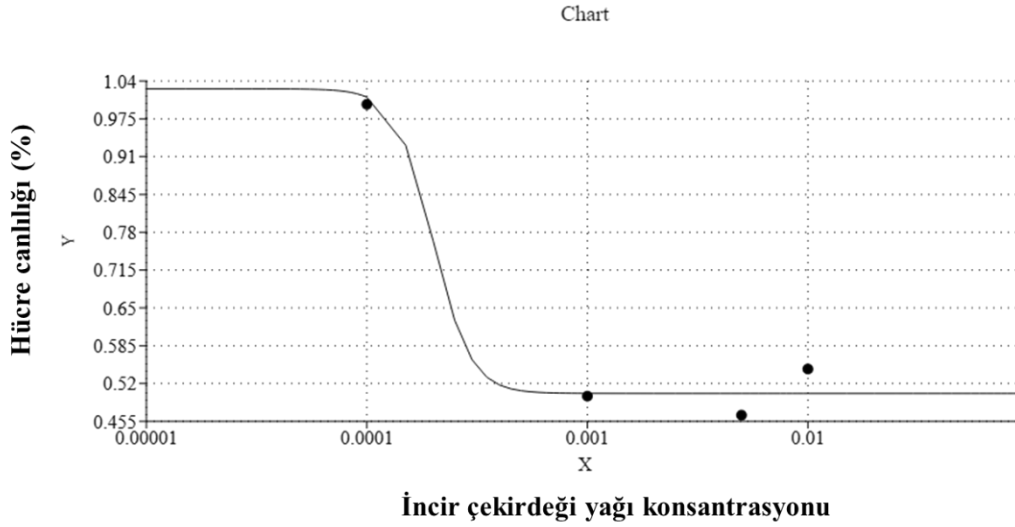


Şekil 4.26. Kekik yağının HT29 kolorektal kanser hücreleri için IC50 dozu

Yapılan bir çalışmada *Juniperus communis* (ardıç) özütü kullanılarak İnsan kolorektal adenokarsinomu (HT-29), fare kolon kanseri (CT-26) hücre hatları üzerindeki antikanser etkisine bakılmış ve köpek böbrek epiteli (MDCK, BCRC) ve fare vasküler endotelial (SVEC) normal hücreleri ile kıyaslama yapılmıştır. *Juniperus communis* tek başına HT-29 ve CT-26 hücrelerine uygulanmış ve ardından kanser ilacı olarak bilinen 5-fluorourasil ile kombine halinde uygulanmıştır. Sonucunda *juniperus communis* özütünün 5-fluorourasil'in etkisini arttırdığı normal hücrelere göre tümör hücrelerinin canlılık seviyesinin önemli derecede düştüğü görülmüştür (Lai ve ark., 2021).



Şekil 4.27. Ardıç yağının HT29 kolorektal kanser hücreleri için IC50 dozu



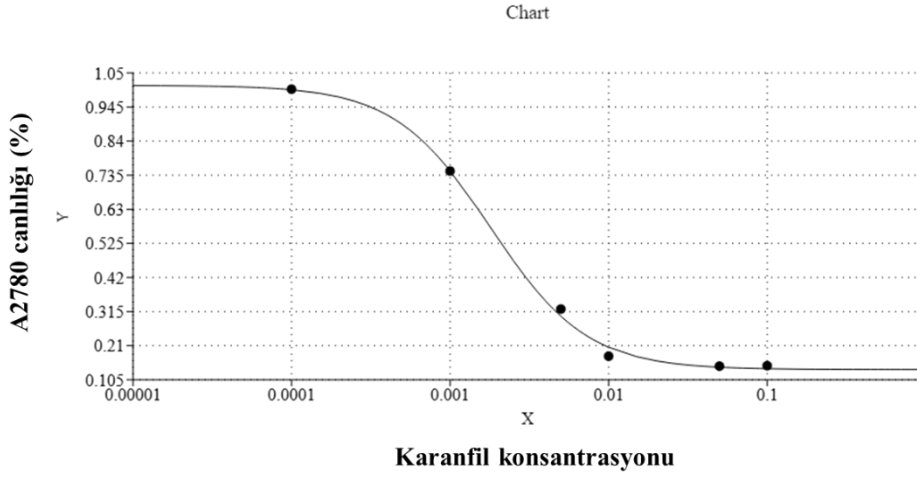
Şekil 4.28. İncir çekirdeği yağının HT29 kolorektal kanser hücreleri için IC50 dozu

4.2.2. Karanfil, kekik, ardıç, incir çekirdeği yağlarının A2780 yumurtalık kanser hücrelerindeki IC50 dozlarının belirlenmesi

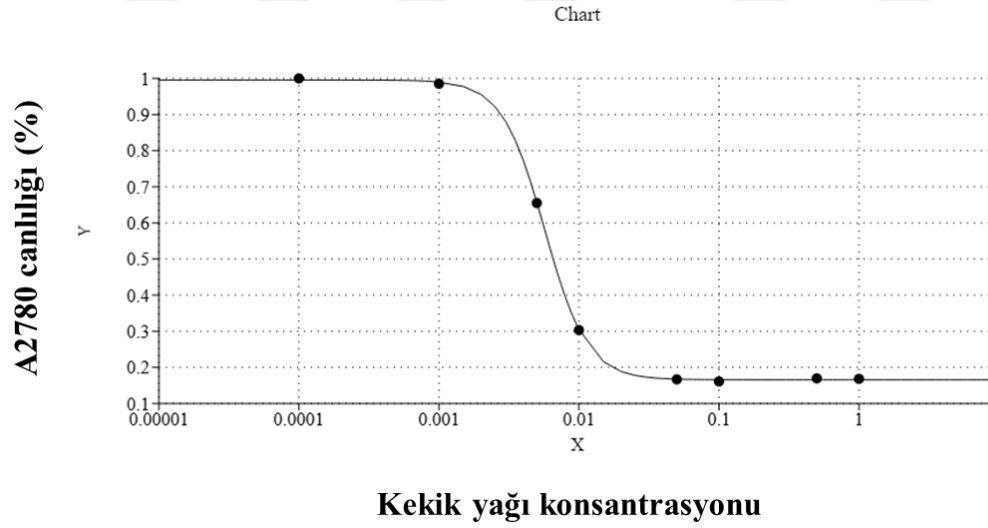
İncir çekirdeği yağı için kolorektal kanser HT29 hücre hattında IC50 dozu hesaplanmıştır. Fakat yumurtalık kanseri A2780 hücre hattı için incir çekirdeği yağının MTT değerleri %50'nin altına düşmediğinden dolayı IC50 değeri A2780 için hesaplanamamıştır.

	IC50 değerleri (µl)
Karanfil yağı	0,0018
Kekik yağı	0,0057
Ardıç yağı	0,0137
İncir çekirdği yağı	-

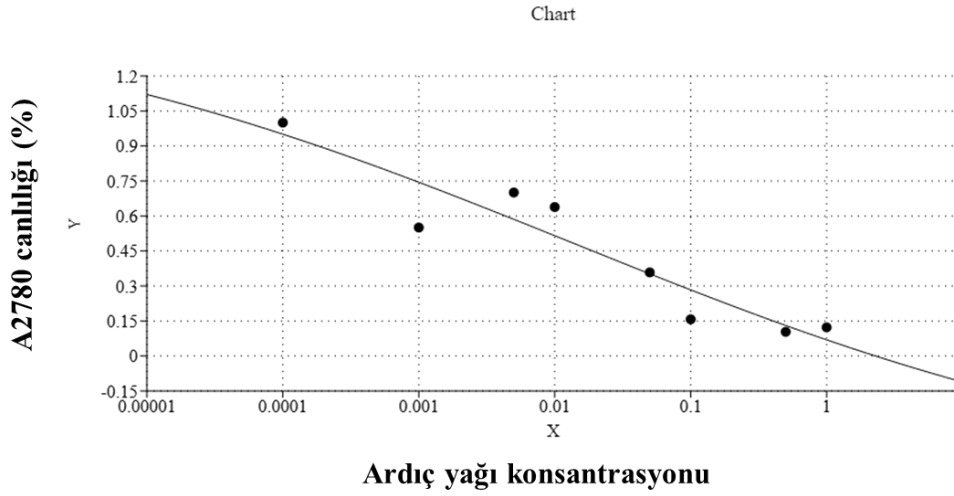
Tablo 4.3. Yumurtalık kanseri A2780 hücreleri için IC50 dozları



Şekil 4.29. Karanfil yağının A2780 yumurtalık kanseri hücreleri için IC50 dozu



Şekil 4.30. Kekik yağının A2780 yumurtalık kanseri hücreleri için IC50 dozu



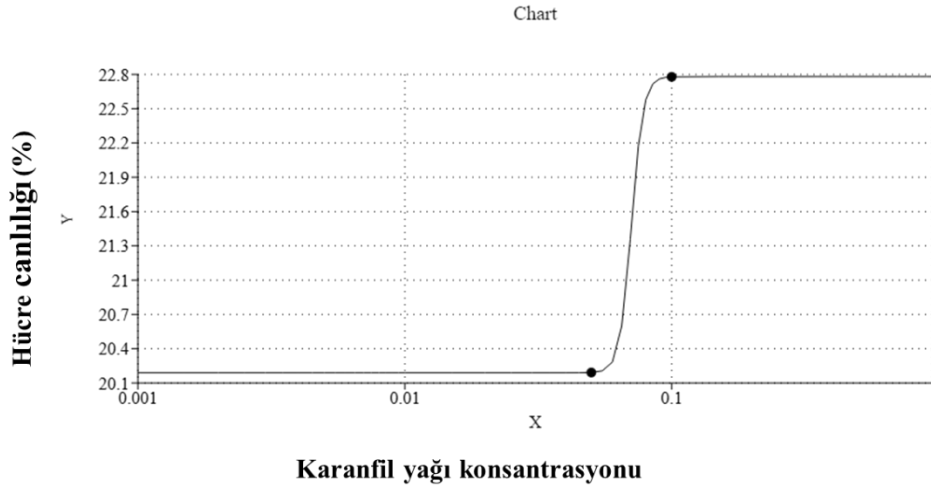
Şekil 4.31. Ardıç yağının A2780 yumurtalık kanseri hücreleri için IC50 dozu

4.2.3. Karanfil, kekik, ardıç, incir çekirdeği yağlarının MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki IC50 dozlarının belirlenmesi

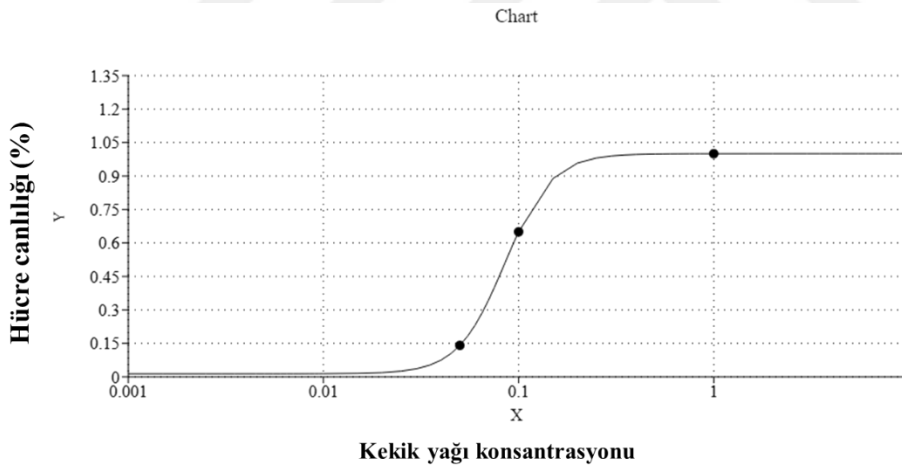
	IC50 değerleri (μ l)
Karanfil yağı	0,0707
Kekik yağı	0,0848
Ardıç yağı	0,055
İncir çekirdeği yağı	0,7071

Tablo 4.4. Meme kanseri MCF-7 hücreleri için IC50 dozları

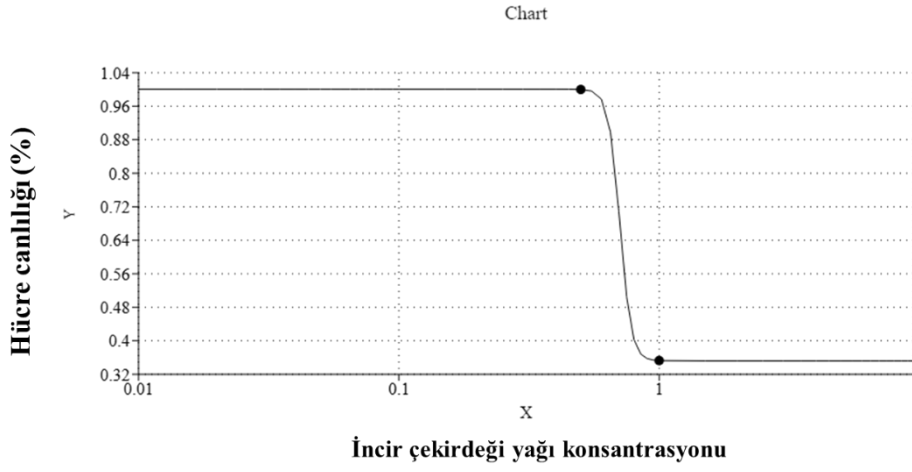
Karanfilden çıkarılan uçucu yağ neredeyse %72-90 öjenol içermektedir. Karanfilin ana bileşiklerinden biridir. Yapılan bir çalışmada öjenolün çeşitli kanser hücreleri üzerindeki tedavi edici etkileri incelenmiştir ve antikanser etkisine de bakılmıştır. Öjenolün mast hücrelerine karşı apoptozu indüklediğini gözlemlemişlerdir. RBL-2H3 hücrelerinin canlılık seviyesi zamana ve artan doza bağlı olarak azalmıştır. Yarı inhibisyon seviyesine bakıldığında (IC50) RBL-2H3 için bu değer 700 μ M olarak bulunmuştur (Jaganathan ve Supriyanto, 2012).



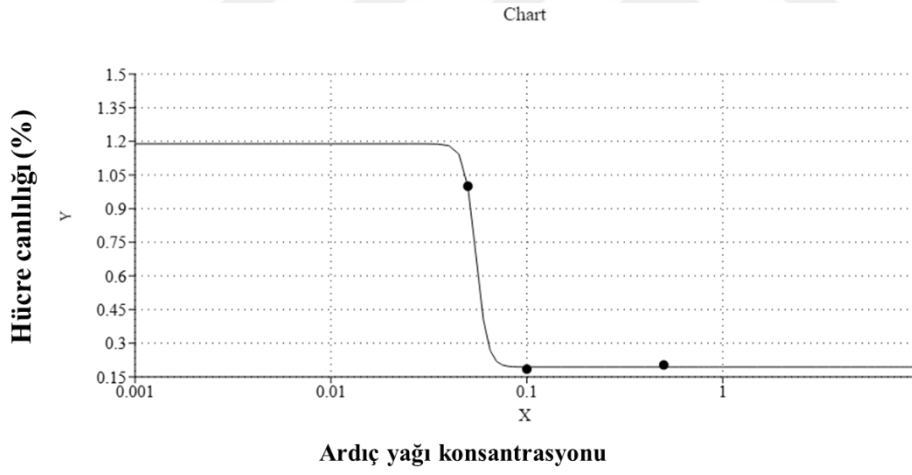
Şekil 4.32. Karanfil yağının MCF-7 meme kanseri hücreleri için IC50 dozu



Şekil 4.33. Kekik yağının MCF-7 meme kanseri hücreleri için IC50 dozu



Şekil 4.34. İncir çekirdeği yağının MCF-7 meme kanseri hücreleri için IC50 dozu



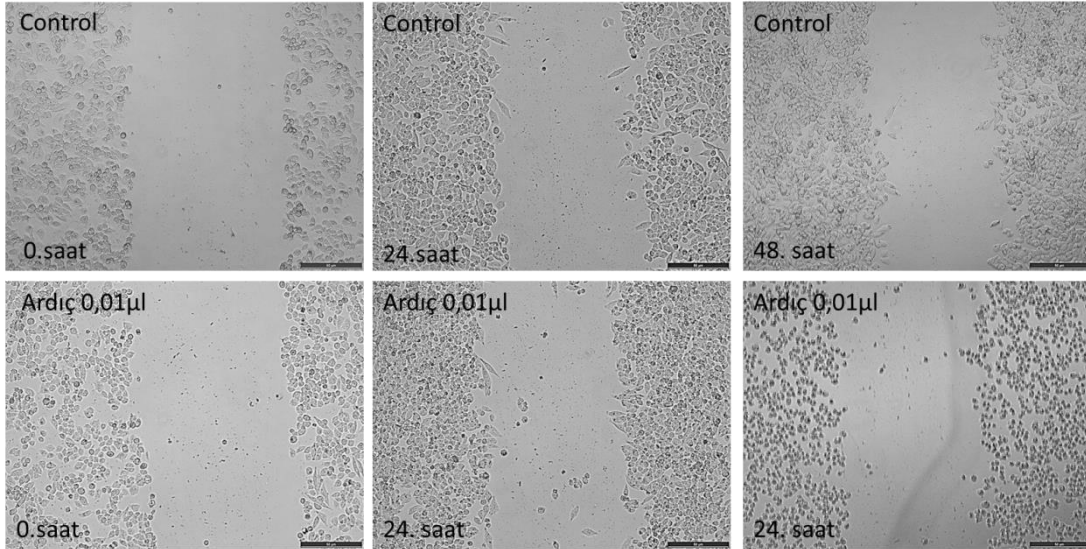
Şekil 4.35. Ardıç yağının MCF-7 meme kanseri hücreleri için IC50 dozu

4.3. Karanfil Yağı, Kekik Yağı, Ardıç Yağı Ve İncir Çekirdeği Yağının Hücre Migrasyonu Üzerindeki Etkileri

MTT yöntemiyle elde ettiğimiz veriler yardımıyla hücreler için %50 canlılık elde edilen dozlar belirlenerek kanser hücrelerine uygulanan yağların konsantrasyonları kullanılarak hücre migrasyonu yapıldı. 12 kuyucuklu plaklara ekim yapılarak 24 saat sonunda belirlenen dozlar doğrultusunda yağ eklemesi yapıldı. Yağ eklemesinden sonra 0-24-48 saat aralıklarında floresans mikroskop yardımı ile görüntüleme işlemi yapıldı.

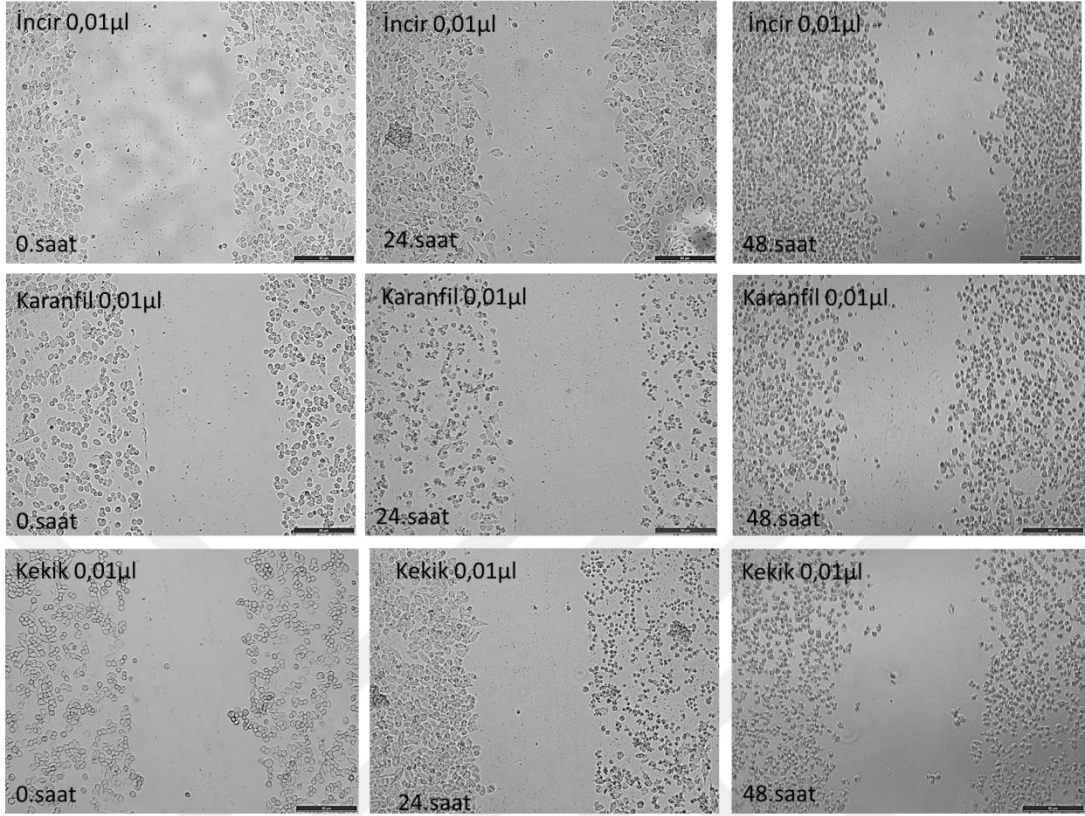
4.3.1. Karanfil, kekik, ardıç, incir çekirdeği yağlarının A2780 yumurtalık kanseri hücreleri üzerindeki proliferatif etkilerinin incelenmesi

Kontrol ve muamele grubu belirlenen saat aralıklarında kıyaslandığında A2780 yumurtalık kanseri hücre hattında hücre göçü meydana gelmedi. Hücrelerin çoğu 24. saat sonundaki mikroskop görüntülerinde yaşıyorken 48. saat sonundaki görüntülemelere bakıldığında gözle görülür derecede hücre ölümünün meydana geldiği gözlemlendi (Şekil 4.36.).



Şekil 4.36. Kontrol grubu ve ardıç yağı için A2780 yumurtalık kanseri hücreleri migrasyon görüntüleri

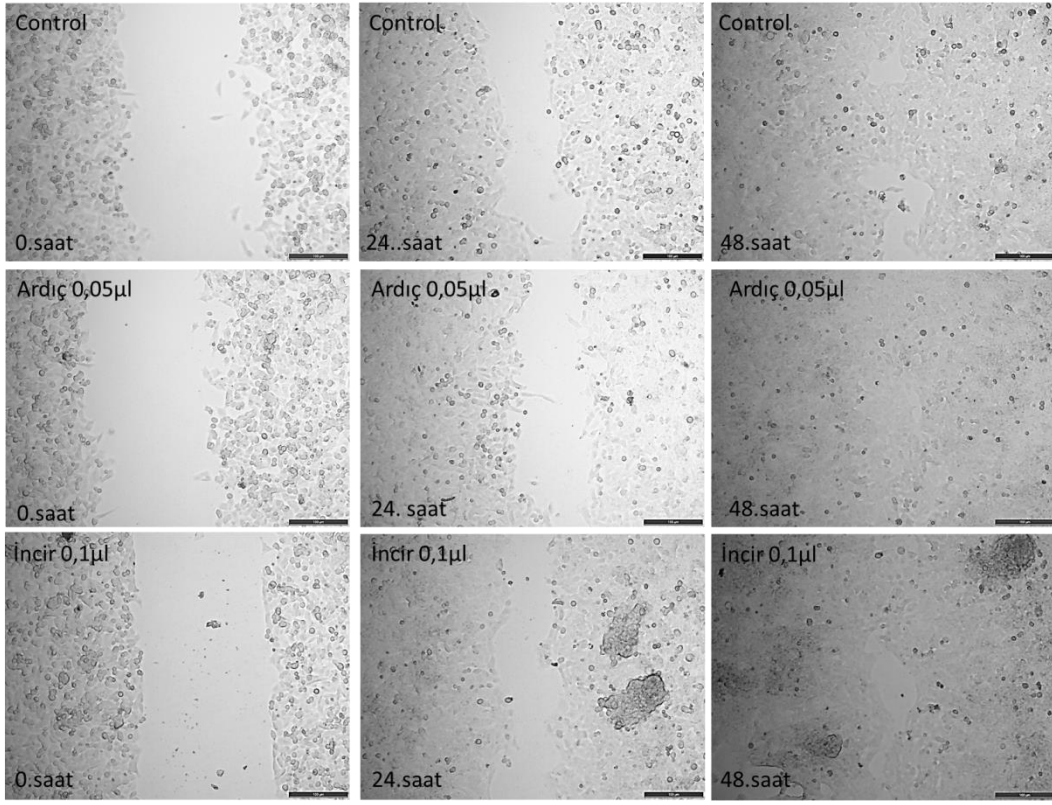
İncir çekirdeği yağının 24. saat sonundaki görüntülerinde hücreler yaşıyorken 48. saat sonundaki görüntülerine bakıldığında hücrelerin öldüğü açıkça görüldü. Karanfil yağı için yapılan mikroskop görüntülerinde ise 24. saat sonunda hücreler ölmüştü. Kekik yağı için de karanfil yağında olduğu gibi 24. saat sonunda hücrelerin öldüğü görüldü (Şekil 4.37.).



Şekil 4.37. İncir çekirdeği yağı, karanfil yağı ve kekik yağının A2780 yumurtalık kanseri hücrelerindeki migrasyon etkileri

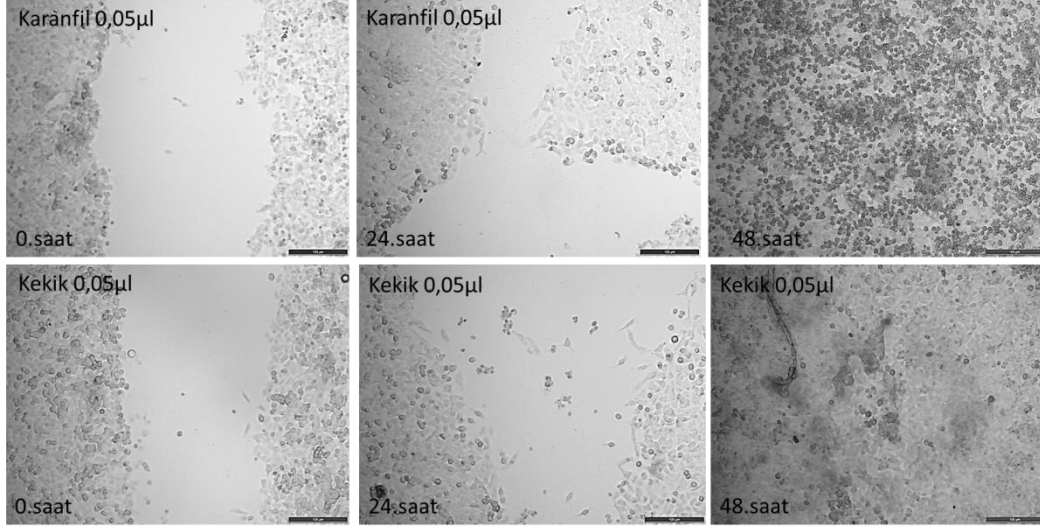
4.3.2. Karanfil, kekik, ardıç, incir çekirdeği yağlarının MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki migrasyon etkileri

MCF-7 meme kanseri hücrelerinde kontrol grubunda 48. saat sonunda ara tamamen kapandı. Ardıç yağı ve incir çekirdeği yağı için A2780 yumurtalık kanseri hücrelerinde görülen etki MCF-7 meme kanseri hücrelerinde tam tersi yaranın iyileşmesi şeklinde görüldü. Karanfil ve kekik uçucu yağı için hücre migraasyonu görüldü fakat 48. Saatin sonunda hücreler ölmüştü (Şekil 4.38.).



Şekil 4.38. Kontrol grubu, ardıç yağı ve incir çekirdeği yağı MCF-7 meme kanseri hücreleri migrasyon görüntüleri

Karanfil yağı ve kekik yağında 48. Saat sonunda ara tamamen kapanmış olsa da hücrelerin ölmüş olduğu görüldü. (Şekil 4.39.)



Şekil 4.39. Karanfil yağı ve kekik yağının MCF-7 meme kanseri hücreleri migrasyon görüntüleri

5.SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında karanfil, kekik, ardıç ve incir çekirdeği yağlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı, A2780 yumurtalık kanseri hücre hattı ve HT-29 kolorektal kanser hücre hattı üzerindeki potansiyel etkileri incelenmiştir. Sonuçlara bakıldığında karanfil yağı için HT-29 kolorektal kanser hücreleri ve A2780 yumurtalık kanseri hücrelerinde 0,0001 μ l-0,001 μ l-0,005 μ l-0,01 μ l-0,05 μ l-0,1 μ l olarak belirlenen konsantrasyonlar kullanıldı ve her iki kanser hücreleri için de anlamlı bir toksik etki gözlemlendi. HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde 0,005 μ l olarak belirlenen dozda hücrelerin yaklaşık %50 canlılık seviyesine ulaşmış olduğu görüldü. A2780 yumurtalık kanseri hücreleri için ise 0,001 μ l dozda %65 canlılık seviyesi olduğu görüldü. MCF-7 meme kanseri hücreleri için 0,05 μ l-0,1 μ l olarak belirlenen konsantrasyon değerleri kullanıldı. Üzerindeki etkisine bakılan diğer kanser hücrelerine yakın önemli bir toksik etki meme kanseri hücrelerinde de görüldü. Bu üç kanser hücreleri için çekilen mikroskop görüntülerinde de MTT veri analizleri ve mikroskop görüntüleri birbirini desteklemektedir. Artan konsantrasyona göre hücrelerin canlılık seviyelerinin düştüğü görülmüştür. Kekik yağı için HT-29 kolorektal kanseri ve A2780 yumurtalık kanseri hücrelerinde 0,0001 μ l-0,001 μ l-0,005 μ l-0,01 μ l-0,05 μ l-0,1 μ l-0,5 μ l-1 μ l olarak belirlenen yağ dozları kullanıldı. İki kanser hücresi için de artan konsantrasyonlara paralel olarak canlılık seviyesinin düştüğü görüldü. HT-29 kolorektal kanser hücreleri için 0,01 μ l yağ dozu için canlılık seviyesi yaklaşık %50 olarak görüldü ve 1 μ l yağ dozu için bu canlılık seviyesi %30'a kadar düşmüştür. A2780 yumurtalık kanseri hücreleri için %50 canlılık seviyesi 0,005 μ l olarak belirlenen yağ konsantrasyonunda gözlemlendi. 0,05 μ l-0,1 μ l-0,5 μ l-1 μ l yağ dozlarında ise bu canlılık seviyesi yaklaşık %15'te sabit kalmıştır. MCF-7 meme kanseri hücreleri için 0,05 μ l-0,1 μ l-0,5 μ l-1 μ l artan dozlardaki konsantrasyonları kullanıldı. Elde edilen sonuçlara göre kullanılan yağ dozları arasında çok yakın değerler görülmüştür. Bununla beraber canlılık seviyesi de düşmüştür. Her üç kanser hücresi için mikroskop görüntüleri de MTT verileriyle örtüşmektedir. İncir çekirdeği yağının HT-29 kolorektal kanser hücreleri için 0,0001 μ l-0,001 μ l-0,005 μ l-0,01 μ l-0,05 μ l-0,1 μ l ve A2780 yumurtalık kanseri hücreleri için 0,0001 μ l-0,001 μ l-0,005 μ l-0,01 μ l-0,05 μ l-0,1 μ l olarak belirlenen yağ dozları kullanıldı. HT-29 kolorektal kanser hücrelerinde 0,001 μ l yağ dozu için canlılık seviyesi %50 olarak görüldü. Bu değerlerin yanı sıra mikroskop görüntülerinde de net bir şekilde canlılık seviyesinin artıp tekrar düştüğü açık bir

şekilde görülmüştür. A2780 yumurtalık kanseri için canlılık seviyesinde anlamlı bir düşüş görülmemiştir. Canlılık seviyesi artan dozlara rağmen sabit kalmıştır. MCF-7 meme kanseri hücreleri için 0,1µl-0,5µl-1µl olacak şekilde kullanılmış olan incir çekirdeği yağ dozlarında artan konsantrasyonlarda toksik etkinin de artmasını beklememize rağmen hücrelerdeki canlılık seviyesi 0,5µl için düşük doz olarak kullanılan 0,1µl'den daha yüksek bir sonuç verdi. İncir çekirdeği yağının A2780 yumurtalık kanseri hücre hattındaki mikroskop görüntüleri kolorektal kanserle karşılaştırıldığında canlılık değerlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Aynı zamanda MTT değerleri için de yumurtalık kanseri hücre hattı veri yüzdeleri yüksektir. Fakat buna rağmen yine de sitotoksik etki görülmüştür. İncir çekirdeği yağının diğer hücrelerde olduğu gibi MCF-7 meme kanseri hücrelerinde de toksik etkisi görülmüştür ve MTT verilerindeki canlılık seviyeleri ile mikroskop görüntüleri birbirini desteklemektedir. Ardıç yağı için HT-29 kolorektal kanser hücreleri ve A2780 yumurtalık kanseri hücrelerinde 0,0001µl-0,001µl-0,005µl-0,01µl-0,05µl-0,1µl-0,5µl-1µl olarak belirlenen yağ konsantrasyonları kullanıldı. HT-29 kolorektal kanser hücrelerine uygulanan ardıç yağı için %25-35 arasında bir canlılık seviyesi gözlemlenmiştir. A2780 hücre hattı için yapılan MTT sonuçlarına bakılarak artan konsantrasyonlara göre ardıç yağı için anlamlı olmasa da sitotoksik etki gözlemlenmiştir. MCF-7 meme kanseri hücreleri için 0,05µl-0,1µl-0,5µl-1µl artan dozlarda ardıç yağı kullanıldı. MTT verilerine bakıldığında kontrole kıyasla oldukça toksik etki gözlemlenmiştir. Fakat konsantrasyonlar arasında artan doza bağlı olarak doğru orantılı olacak şekilde toksik etki beklenmesine rağmen böyle bir etki gözlemlenmedi. Yine de önemli bir toksik etki görüldü. Ardıç yağının HT-29 kolorektal kanser hücre hattı için mikroskop görüntüleri MTT verileriyle birbirini destekleyerek sitotoksik etkisi görülmüştür. Ardıç yağının A2780 yumurtalık kanser hücre hattındaki sitotoksik etkisi 0,1µl-0,5µl-1µl konsantrasyonlarına kadar canlılık seviyesi yüksektir. Bu konsantrasyonlardaki MTT verilenin de sabit olarak yaklaşık %15 oranına kadar düştüğü bilinmektedir. Ardıç yağının MCF-7 meme kanseri hücreleri için mikroskop görüntülerinde kullanılan en düşük dozda bile toksik etki görülmüştür ve artan dozlarda da canlılık seviyesi oldukça azdır.

Migrasyon görüntülerine bakıldığında kekik, karanfil, ardıç, incir çekirdeği yağı için kontrol ve muamele grubu 0-24-48 olarak belirlenen saat aralıklarında kıyaslandığında

A2780 yumurtalık kanseri hücre hattında hücre göçü meydana gelmedi. Hücrelerin çoğu 24. saat sonundaki mikroskop görüntülerinde yaşıyorken 48. saat sonundaki görüntülemelere bakıldığında gözle görülür derecede hücre ölümünün meydana geldiği gözlemlendi. İncir çekirdeği yağının 24. saat sonundaki görüntülerinde hücreler yaşıyorken 48. saat sonundaki görüntülerine bakıldığında hücrelerin öldüğü açıkça görüldü. Karanfil yağı için yapılan migrasyon sonucunda mikroskop görüntülerinde ise 24. saat sonunda hücreler ölmüştü. Kekik yağı için de karanfil yağında olduğu gibi 24. saat sonunda hücrelerin öldüğü görüldü. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde kontrol grubunda 48. saat sonunda ara tamamen kapandı. Ardıç yağı ve incir çekirdeği yağı için A2780 yumurtalık kanseri hücrelerinde görülen etki MCF-7 meme kanseri hücrelerinde tam tersi yaranın iyileşmesi şeklinde görüldü. Karanfil yağı ve kekik yağında 48. Saat sonunda ara tamamen kapanmış ve hücreler ölmüştü.

Yapılan bu tez çalışması karanfil, kekik, ardıç, incir çekirdeği yağlarının kanser için bir tedavi yöntemi olarak uygulanabilirliğini gözden geçirmek amacıyla yapılan bir çalışmadır. Günümüzde kanser hala ölümlere sebebiyet vermektedir. Kanser kaynaklı ölümleri en aza indirmek ve bir umut ışığı olması için uçucu yağların yukarıda bahsedilen terapötik tedavi mekanizmasının kanser hücreleri için de uygun olup olmadığını anlamak için yapılan bu çalışmada sonuçlara bakıldığında bu kullanılan uçucu yağlar için kanserli hücrelerin ölümünün meydana geldiği görüldü. Bu çalışmanın devamı olarak kemoterapötik ilaçlarla kombine halde tedavi yöntemleri uygulanarak bu uçucu yağların etkilerine bakılabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abdolmohammadi, M., Fouladdel, S., Shafiee, A., Amin, G., Ghaffari, S. and Azizi, E. 2009. Antiproliferative and apoptotic effect of *Astrodaucus orientalis* (L.) drude on T47D human breast cancer cell line: potential mechanisms of action. African journal of biotechnology,8(17),4265– 4276.
- Aissous, I., Benrebai, M., Cacan, E., Caglar, B., Erenler, R., Ameddah, S., Bensouici, C. (2021). Antioxidant and antiproliferative activities of the-butanol extract of Ball aerial parts. Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences, 34(1), 5-11.
- Aktuğ, H. 2014. Apoptosis and cell cycle. Ege tıp dergisi,53(1),60-64.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. ve Walter, P. 2002. Molecular biology of the cell. NCBI, New York.
- Ali, M.W., Cacan, E., Liu, Y., Pierce, J.Y., Creasman, W.T., Murph, M.M., Govindarajan, R., Eblen, S.T., Greer, S.F., Hooks, S.B., Porter, J. 2013. Transcriptional Suppression, DNA Methylation, and Histone Deacetylation of the Regulator of G-Protein Signaling 10 (RGS10) Gene in Ovarian Cancer Cells. PLOS ONE, 8(3).
- Al-Snafi, AE. 2017. Chemical contents and medical importance of *Dianthus caryophyllus*-A review. IOSR Journal of Pharmacy,7(3),61-71.
- Altunkaynak, B.Z., Özbek, E. 2008. Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?. Tıp Araştırmaları Dergisi,6(2),93 -104.
- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Kunnumakara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Tharakan, S.T., Lai, O.S., Sung, B. ve Aggarwal B.B. 2008. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes, Pharmaceutical research,25(9),2097–116.
- Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P. 2006. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. J. Agric. Food Chem, 54(12), 4364–4370.
- Anonim, 2022. AAT Bioquest, Inc. Quest Graph™ IC50 Calculator, AAT Bioquest. <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator> (20.07.22).

- Armstrong, J. S. 2006. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *BioEssays*, 28(3), 253–260.
- Ashcroft, M., Vousden, K. H. 1999. Regulation of p53 stability. *Oncogene*, 18(53), 7637–7643.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, B. 2008. Biological effects of essential oils a review, *Food and Chemical Toxicology*, 46 (2), 446–475.
- Banerjee, S., Panda, C.K.R., Das, S. 2006. Clove (*Syzygium aromaticum* L.), a potential chemopreventive agent for lung cancer. *Carcinogenesis*, 27(8), 1645-1654.
- Barolo, M. I., Ruiz Mostacero, N., López, S. N. 2014. *Ficus carica* L. (Moraceae): An ancient source of food and health. *Food Chemistry*, 164, 119–127.
- Berkel, C., ve Cacan, E. (2021). Estrogen- and estrogen receptor (ER)-mediated cisplatin chemoresistance in cancer. *Life sciences*, 286, 120029.
- Berkel, C., & Cacan, E. (2021). Involvement of ATMIN-DYNLL1-MRN axis in the progression and aggressiveness of serous ovarian cancer. *Biochemical and biophysical research communications*, 570, 74–81.
- Buckle, J. 1999. Use of aromatherapy as a complementary treatment for chronic pain. *Alter Ther Health Med*, 5(5), 42–51.
- Cabadak, H. 2008. Hücre siklusu ve kanser. *ADÜ Tıp Falültesi Dergisi*, 9(3), 51-61.
- Cacan, E. 2015. Combating the Epigenome: Elucidation of Mechanisms Underlying Chemoresistance and Enhancing Tumor Immunogenicity. Dissertation, Georgia State University, 2015. doi: <https://doi.org/10.57709/7305124>
- Cacan, E. 2017. Epigenetic regulation of RGS2 (Regulator of G-protein signaling 2) in chemoresistant ovarian cancer cells. *Journal of Chemotherapy*, 29(3), 173–178.
- Cacan, E., Ali, M.W., Boyd, N.H., Hooks, S.B., Greer, S.F. 2014. Inhibition of HDAC1 and DNMT1 Modulate RGS10 Expression and Decrease Ovarian Cancer Chemoresistance. *PLoS ONE* 9(1): e87455.

- Cacan, E., Ozmen, Z.C. 2020. Regulation of Fas in response to bortezomib and epirubicin in colorectal cancer cells. *Journal of Chemotherapy*, 32(4),193-201.
- Cacan, E., Spring, A. M., Kumari, A., Greer, S. F., & Garnett-Benson, C. 2015. Combination Treatment with Sublethal Ionizing Radiation and the Proteasome Inhibitor, Bortezomib, Enhances Death-Receptor Mediated Apoptosis and Anti-Tumor Immune Attack. *International journal of molecular sciences*, 16(12), 30405–30421. <https://doi.org/10.3390/ijms161226238>
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. and Corke, H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci*,74(17),2157–2184.
- Chowdhury, I., Tharakan, B., Bhat, G. K. 2008. Caspases — An update. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 151(1), 10–27.
- Cohen, G. M. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*, 326(1), 1–16.
- Collins, K., Jacks, T., Pavletich, N.P. 1997. Hücre döngüsü ve kanser. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(7),2776-2778.
- Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano et al B. 1999. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29(2) ,130–135.
- Della Porta, G., Taddeo, R., D’Urso, E., Reverchon, E. 1998. Isolation of Clove Bud and Star Anise Essential Oil by Supercritical CO₂Extraction. *LWT - Food Science and Technology*,31(5), 454–460.
- Demirelli, F. 2003. Kanserin Moleküler Genetik Temelleri. *Güncel Klinik Onkoloji*, 37, 9-15.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4),495–516.

- Eröz, R., Karataş, A., Alkoç, O.A., Baltacı, D., Oktay, M., Çolakoğlu, S. 2012. Apoptozis Hakkında Bilinenler (Literatür Taraması). *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*,14(2),87-101.
- Fan, K., Li, X., Cao, Y., Qi, H., Li, L., Zhang, Q., Sun, H. 2015. Carvacrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon cancer cells. *Anti-Cancer Drugs*, 26(8), 813–823.
- Fangjun, L., Zhijia, Y. 2017. Tumor suppressive roles of eugenol in human lung cancer cells. *Thoracic Cancer*, 9(1), 25–29.
- Gao, H.W., Huang, X.F., Yang, T.P., Chang, K.F., Yeh, L.W., Hsieh, M.C., Tsai, N.M. 2019. *Juniperus communis* Suppresses Melanoma Tumorigenesis by Inhibiting Tumor Growth and Inducing Apoptosis. *The American Journal of Chinese Medicine*,47(5),1171-1191.
- Gautam, N., Mantha, A. K., Mittal, S. 2014. Essential Oils and Their Constituents as Anticancer Agents: A Mechanistic View. *BioMed Research International*, 1–23.
- Gökhan A., Kılıç K.D., Gülle K., Uyanıkgil Y., Çavuşoğlu T. 2020. Apoptotic Pathways and Targeted Therapies. *Med J SDU*, 27(4),565-573.
- Güven, N., Gökyer, A., Koç, A., Temiz, N. N., Selvi, S., Koparal, B., Erman, C. 2019. Physiochemical Composition of Fig Seed Oil from Turkey. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7, 541-545.
- Hadjira, S., Mansour, A., Berkel, C., Seghiri, R., Menad, A., Benayache, F., Benayache, S., Cacan, E., & Ameddah, S. (2021). Antioxidant, Anti-Inflammatory and Cytotoxic Properties of *Centaurea africana* Lamk var. [Bonnet] M]. *Anti-inflammatory & anti-allergy agents in medicinal chemistry*, 20(1), 89–100.
- Harris, H., Miller, O.J., Klein, G., Worst, P., Tachibana, T. 1969. Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature*, 223(5204), 363–368.
- Hazafa, A., Rehman, K.U., Jahan, N., Jabeen, Z. 2019. The Role of Polyphenol (Flavonoids) Compounds in the Treatment of Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*, 1–12.
- Jackson, AL., Loeb, LA. 2001. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat Res.* 477(1-2),7–21.

- Jaganathan, S. K., & Supriyanto, E. 2012. Antiproliferative and Molecular Mechanism of Eugenol-Induced Apoptosis in Cancer Cells. *Molecules*, 17(6), 6290–6304.
- Kapdan, M., Sezgin, M., Kahya, M. 2019. Ardıç (*Juniperus L.*) türlerinin halk arasında ve Modern Tıp'ta hastalıkların tedavisinde kullanımı. Uluslararası Avrasya Biyolojik ve Kimya Bilimi Konferansı.
- Kartlaşmış, K., Kökbaş, U., Kayrın, L. 2016. Apoptozis Biyokimyası. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 25(1),52-69.
- Khan, H., Belwal, T., Efferth, T., Farooqi, A. A., Sanches-Silva, A., Vacca, R. A., Nabavi, S. M. 2020. Targeting epigenetics in cancer: therapeutic potential of flavonoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–24.
- Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A. 2006. Hücre döngüsünün düzenlenmesi ve kanser. *Genetik kavramlar*, Editörler; Carlson G.,Hart J.,Schiaparelli K.,Jackson N.,Shriner P.,Scanlan-Roher A.,Burns P.,Mcelroy J.,Hogan S.,Keller D. Palme yayıncılık,Ankara,434-456.
- Knudson, A.G. 1971. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(4), 820–823.
- Koçak Mutlu, A., Kısa, D., Yılmaz, N., Çaçan, E. 2021. Deneysel Kolon Kanseri Sıçan Modelinde Bazı Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Araştırılması. *MAS Uygulamalı Bilimler Dergisi*,6 (5), 1294-1306.
- Kopustinskiene, D.M., Jakstas, V., Savickas,A., Bernatoniene, J. 2020. Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients*, 12(2), 457.
- Kowalczyk, A., Przychodna, M., Sopata, S., Bodalska, A., Fecka, I. 2020. Thymol and Thyme Essential Oil—New Insights into Selected Therapeutic Applications. *Molecules*, 25(18), 4125.
- Kucuk, B., Yilmaz, E., Cacan, E. 2021. Expression profiles of Natural Killer Group 2D Ligands (NGK2DLs) in colorectal carcinoma and changes in response to chemotherapeutic agents. *Mol Biol Rep* 48, 3999–4008.

- Kulkarni, A.A. 2000. Mikropropagation and Secondary Metabolite Study in *Taxus* spp. and *Withania Somnifera* (L) Dunal, DSc Thesis, National Chemical Laboratory, Pune.
- Kumari, A., Cacan, E., Greer, S. F., & Garnett-Benson, C. 2013. Turning T cells on: epigenetically enhanced expression of effector T-cell costimulatory molecules on irradiated human tumor cells. *Journal for immunotherapy of cancer*, 1, 17. <https://doi.org/10.1186/2051-1426-1-17>
- Kumari, S., Pundhir, S., Priya, P., Jeena, G., Punetha, A., Chawla, K., Yadav, G. 2014. EssOilDB: a database of essential oils reflecting terpene composition and variability in the plant kingdom. Database, 2014.
- L. Ait M'Barek, L., Ait Mouse, H., Jaâfari, A., Aboufatima, R., Benharref, A., Kamal, M., Ziad, A. 2007. Cytotoxic effect of essential oil of thyme (*Thymus broussonettii*) on the IGR-OV1 tumor cells resistant to chemotherapy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40(11), 1537–1544.
- Lai, W. L., Lee, S. C., Chang, K. F., Huang, X. F., Li, C. Y., Lee, C. J., Wu, C. Y., Hsu, H. J., & Tsai, N. M. 2021. *Juniperus communis* extract induces cell cycle arrest and apoptosis of colorectal adenocarcinoma in vitro and in vivo. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 54(10), e10891.
- Lampronti, I., Saab, A. M., Gambari, R. 2006. Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. *International journal of oncology*, 29(4), 989-995.
- Lesgards, J.-F., Baldovini, N., Vidal, N., Pietri, S. 2014. Anticancer Activities of Essential Oils Constituents and Synergy with Conventional Therapies: A Review. *Phytotherapy Research*, 28(10), 1423–1446.
- Liang, W. Z., Lu, C. H. 2012. Carvacrol-induced $[Ca^{2+}]_i$ rise and apoptosis in human glioblastoma cells. *Life Sciences*, 90(17-18), 703–711.

- Miura, K., Kikuzaki, H., and Nakatani, N. 2002. Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7),1845–1851.
- Morgan, J. E., Shanderson, R. L., Boyd, N. H., Cacan, E., & Greer, S. F. 2015. The class II transactivator (CIITA) is regulated by post-translational modification cross-talk between ERK1/2 phosphorylation, mono-ubiquitination and Lys63 ubiquitination. *Bioscience reports*, 35(4), e00233. <https://doi.org/10.1042/BSR20150091>
- Moulder, S., Hortobagyi, G.N. 2007. Advances in the Treatment of Breast Cancer. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*,83(1), 26–36.
- Murray, A. 1994. Cell cycle checkpoints. *Current Opinion in Cell Biology*,6(6),872-876.
- Özgülven, M., Kırıcı, S. 1999. Farklı ekolojilerde Nane (*Mentha*) türlerinin verim ile uçucu yağ oran ve bileşenlerin araştırılması. *Tr. J. of Agriculture and Forestry*, 23, 465-472.
- Pan, Min-Hsiung., Chiou, Yi-Siou., Chen, Li-Hua., Ho, Chi-Tang. 2015. Breast cancer chemoprevention by dietary natural phenolic compounds: Specific epigenetic related molecular targets. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(1), 21–35.
- Patel, S., Gogna, P. 2015. Tapping botanicals for essential oils: Progress and hurdles in cancer mitigation. *Industrial Crops and Products*, 76, 1148–1163.
- Pazarbaşı, A. ve Kasap, M. 2003. Kanser genetiği. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı*,1(12),328-340.
- Pichersky, E., Noel, J.P., Dudareva, N. 2006. Biosynthesis of plant volatiles: nature’s diversity and ingenuity. *Science*, 311(5762), 808-811.
- Pines, J. 1995. Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochemical Journal*,308(3),697-711.
- Poddar, S., Lederer R.J. 1982. Juniper berries as an exclusive winter forage for townsend’s solitaires. *The American Midland Naturalist*,108(1),34-40.
- Raut, J.S., Karuppayil, S.M. 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250–264.

- Reed, J.C. 2000. Mechanisms of Apoptosis. *The American Journal of Pathology*, 157(5), 1415–1430.
- Saidi, A., Hambaba, L., Kucuk, B., Cacan, E., & Erenler, R. (2022). Phenolic Profile, Acute Toxicity, and Hepatoprotective and Antiproliferative Activities of Algerian *Ruta tuberculata* Forssk. *Current Bioactive Compounds*, 18(3), 72-83.
- Saygi, K. O., & Cacan, E. (2021). Antioxidant and cytotoxic activities of silver nanoparticles synthesized using *Tilia cordata* flowers extract. *Materials Today Communications*, 27, 102316.
- Sœur, J., Marrot, L., Perez, P., Iraqui, I., Kienda, G., Dardalhon, M., Meunier, Averbeck, D. ve Huang M.-E. 2011. Selective cytotoxicity of Aniba rosaeodora essential oil towards epidermoid cancer cells through induction of apoptosis, *Mutation research*, 718(1-2),24–32.
- Solomon, A., Golubowicz, S., Yablowicz, Z., Grossman, S., Bergman, M., Gottlieb, H. E., Flaishman, M. A. 2006. Antioxidant Activities and Anthocyanin Content of Fresh Fruits of Common Fig (*Ficus carica*L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7717–7723.
- Strasser, A., O'Connor, L., Dixit, V. M. 2000. Apoptosis Signaling. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 217–245.
- Sylvestre, M., Pichette, A., Longtin, A., Nagau, F., Legault, J. 2006. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *J Ethnopharmacol*.103(1),99–102.
- Tobias, E.S., Connor, M., Ferguson-Smith, M. 2014. Essential medical genetics. İstanbul tıp kitapevi,180,İstanbul.
- Ullah, A., Munir, S., Badshah, S. L., Khan, N., Ghani, L., Poulson, B. G., Jaremko, M. 2020. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules*, 25(22), 5243.
- Walker, C.L., Johnson, D.G. 1999. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annual review of pharmacology and toxicology*,39(1),295-312.

Weinberg, R.A. 2014. The nature of cancer. The biology of cancer, Ed; Bocchicchio A., Services E.J.P., Zayatz E., Mickey R.K., Harik L. Garland science, New York and London, 31-71.

Yokuş, B. ve Çakır, D.Ü. 2012. Kanser biyokimyası. Dicle Üniv. Veterinerlik Fak. Dergisi, 1(12), 7-1

