



**ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES MODELİ
OLUŞTURULAN İNSAN MEME KANSERİ (MCF-7)
HÜCRELERİNDE LİNEAROLÜN ENDOPLAZMİK
RETİKULUM STRES MARKERLERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Halil TURHAN

Danışman

Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK
ANABİLİM DALI**

Haziran, 2017

Bu tez çalışması **15.FEN.BİL.45** numaralı proje ile **BAPK** tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES MODELİ OLUŞTURULAN
İNSAN MEME KANSERİ (MCF-7) HÜCRELERİNDE
LİNEAROLÜN ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES
MARKERLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Halil TURHAN

Danışman

Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

Haziran, 2017

TEZ ONAY SAYFASI

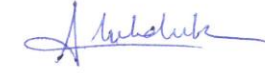
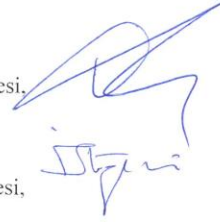
Halil TURHAN tarafından hazırlanan “Endoplazmik Retikulum Stres Modeli Oluşturulan İnsan Meme Kanseri (MCF-7) Hücrelerinde Linearolün Endoplazmik Retikulum Stres Markerleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 16/06/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Başkan : Doç. Dr. Ömer HAZMAN
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,

Üye : Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,

Üye : Yrd. Doç. Dr. İbrahim BULDUK
Uşak Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Yüksek Okulu,



Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
...../...../..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. Hüseyin ENGİNAR
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI
Afyon Kocatepe Üniversitesi

**Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım
bu tez çalışmada;**

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

16/06/2017



Halil TURHAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES MODELİ OLUŞTURULAN İNSAN MEME KANSERİ (MCF-7) HÜCRELERİNDE LINEAROLÜN ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES MARKERLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Halil TURHAN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalmalarına, bağışıklık sisteminin denetiminden kaçmalarına ve sonuç olarak dokularda metastazlar oluşturmalarına neden olan işlevsel ve davranışsal farklılıklar geçirdikleri çok aşamalı bir süreçtir. Meme kanseri, meme epitel dokusundaki kötü huylu hücrelerin kontrolsüz büyümesiyle karakterizedir. Hastalık her iki cinsiyette de etkili olabilmektedir. Endoplazmik retikulum (ER) protein sentezinin düzenlenmesi, proteinlerin katlanması, kalsiyum depolaması, kolesterol ve lipid-membran biyosentezinin kontrolü gibi normal hücresel süreçler için gerekli olan önemli bir organel türüdür. ER'de yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi, yeni başlayan protein sentezini azaltan, protein katlanmayı kolaylaştıran ve yanlış katlanmış proteinlerin proteozomal bozunmasını arttıran bir koruyucu tepki olarak katlanmamış protein yanıtı (UPR) oluşturulur.

Bu araştırmada, insan meme kanseri (MCF-7) hücrelerinde thapsigargin (T) ile endoplazmik retikulum stresi oluşturularak, strese girmiş hücrelerde linearol kaynağı olarak *Sideritis akmanii*'nin aseton ekstresinin (SAE) sitotoksitesi 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemiyle belirlendi. Hücrelere SAE 1000, 750, 500, 250, 100, 50, 25 µg/mL konsantrasyonlarda ve kontrol olarak hücrelere % 1 dimetilfulfoksit (DMSO) uygulandı. MTT yöntemi ile SAE'nin MCF-7 hücreleri üzerindeki olası etkisi mikropalak okuyucu ile 540 nm'de okutularak sonuçlar yüzde olarak ifade edildi. Kontrol yüzde yüz canlı olarak kabul edilerek

SAE'nin letal dozu (LD₅₀) probit analizi ile 38,851 µg/mL olarak belirlendi.

Çalışmada ayrıca SAE ER stresi ile ilgili genler olan aktive edici transkripsiyon faktörü-4 (ATF4), aktive edici transkripsiyon faktörü-6 (ATF6), protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz (PERK) ve glukoz ile düzenlenen protein 78 (GRP78) ile inflamatuvar yanıtta rol alan genlerin (tümör nekroz faktör alfa (TNFα), interferon gama (IFN-γ), interlökin-6 (IL-6), interlökin-8 (IL-8), interlökin-12 (IL-12)) mRNA ekspresyonlarına etkisi belirlendi. Araştırmamızın sonuçlarına göre ER stresinde UPR yanıtta rol alan GRP78 geninin SAE₅₀ ve SAE₅₀+T uygulama gruplarında ekspresyon seviyelerinin kontrole göre attığı görüldü. ER stresinde UPR yanıtta rol alan PERK geninin bütün uygulama gruplarında baskılandığı ancak SAE₁₀₀+T uygulanmasında kontrole kıyaslandığında artış olduğu gözlenmiştir. Ayrıca ER stresinde UPR yanıtta rol alan ve GRP78 kontrolünde olan ATF-6'nın GRP78 gibi SAE₅₀ ve SAE₅₀+T uygulama gruplarında ekspresyonu arttığı bulunmuştur.

SAE'nin IL-6 sitokininin ekspresyon seviyeleri kontrole kıyaslandığında bütün uygulama gruplarında artış gözlenmiştir. Bir kemokin olan IL-8 gen ekspresyon düzeyleri ise SAE₁₀, SAE₁₀+T ve SAE₅₀+T uygulamalarında baskılanırken diğer uygulamalarda artış göstermiştir. SAE'nin IL-12 ve TNFα genleri üzerindeki etkisi benzer olduğu görülüp bütün uygulama gruplarında baskılanmışlardır. IFN-γ geni sitotoksiste testi ile elde edilen konsantrasyonunda kontrole aynı etkiyi gösterirken, diğer uygulama gruplarında baskılanmıştır.

SAE ve thapsigargin uygulamasının sonuçlarına göre en yüksek DNA hasar skoru, 100 µg/mL *S. akmanii* ekstresi + Thapsigargin uygulanan grupta 94,00±5,29 olarak bulundu.

Sonuç olarak *S. akmanii*'nin MCF-7 hücreleri üzerinde genotoksik ve sitotoksik etkilerinin olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: MCF-7, ER stresi, Komet Yöntemi, *Sideritis akmanii*, Real Time PCR, genotoksisite, sitotoksisite, endemik bitki

2017, xiii + 72 sayfa

ABSTRACT

M.Sc Thesis

İNVESTİGATE THE EFFECTS OF LINEAROL ON THE ENDOPLASMİC RETİCULUM MARKERS BY USING THE ENDOPLASMİC RETİCULUM STRESS GENERATED MODEL OF HUMAN BREAST CANCER CELLS (MCF-7)

Halil TURHAN

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics Department

Supervisor: Assoc. Prof. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

Cancer is a multi-stage process in which functional and behavioral differences occurs in the cell and cell escapes from the control of the immune system, which consequently leads to form metastases in the tissue. Breast cancer is characterized by uncontrolled growth of malignant cells in the breast epithelium tissue. The disease can be effective in both sexes. Endoplasmic reticulum (ER) is an important organelle species required for normal cellular processes such as regulation of protein synthesis, folding of proteins, calcium storage, control of cholesterol and lipid-membrane biosynthesis. Accumulation of misfolded proteins in the ER creates the UPR response as a protective response that reduces the synthesis of new-on-protein, facilitates protein folding, and increases proteosomal degradation of misfolded proteins.

In this study, the endoplasmic reticulum stress was induced by thapsigargin in human breast cancer (MCF-7) cells and the cytotoxicity of acetone extract of *Sideritis akmanii* (*S. akmanii*) as a linearol source in stressed cells was determined by 3- (4,5-dimethyltriazol- diphenyltetrazolium bromide (MTT) method. Following doses (1000, 750, 500, 250, 100, 50, 25 µg / ml) of *S. akmanii* were employed and 1% DMSO was used as a solvent control. The possible effect of the MTT method on the MCF-7 cells by the *S. akmanii* was studied with a microplate reader at 540 nm and the results were

expressed as a percentage. Control was accepted as 100% live and was determined to be 38,851 µg / mL by the proband analysis of lecithin (LD50) of SAE.

In our study, the effect of the acetone extract of *S. akmanii* as a linearol source in MCF-7 cells with normal and ER stress was further studied by the expression level of ATF-4, AFT-6, PERK, Grp78, TNFα, IFN-γ, IL-6, IL-8 and IL-12 genes by real time PCR. According to the results of our study, the expression levels of Grp78 gene in the SAE₅₀ and SAE₅₀ + T treatment groups, which were involved in UPR response in ER stress, were found to be higher than control levels. It was observed that the PERK gene involved in UPR response in ER stress was suppressed in all application groups but increased in SAE₁₀₀ + T administration compared to control. It was also found that ATF-6, which is involved in UPR response in ER stress and in control of Grp78, increases expression in SAE₅₀ and SAE₅₀ + T treatment groups like Grp78.

An increase in IL-6 gene expression was observed in all treatment groups compared to that of control. IL-8 gene expression levels was suppressed in SAE₁₀, SAE₁₀ + T and SAE₅₀ + T applications and increased in other treatment groups. Similar expression was observed in IL-12 and TNFα genes whereas these were suppressed in all other treatment groups. The IFN-γ gene showed the same effect as the control at the LD50 concentration obtained by the cytotoxicity test, but suppressed in the other treatment groups.

The highest DNA damage score was found as 100 µg / mL (94.00 ± 5.29) in the Thapsigargin treated group.

it was concluded that *S. akmanii* has genotoxic and cytotoxic effects on MCF-7 cells.

Key Words: MCF-7, ER stress, Comet Assay, *Sideritis akmanii*, Real Time PCR, Genotoxicity, Cytotoxicity, Endemic plant

2017, xiii + 72 pages

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ'ye teşekkür ederim

Bitki materyalinin toplanmasında ve tür tayininde Sayın Doç. Dr. Mustafa KARGIOĞLU'na, deneysel çalışmalarımda her türlü kolaylığı sağlayan, fikir ve önerilerini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Ömer HAZMAN'na ve Sayın Doç. Dr. Recep LİMAN'a teşekkür ederim. Çalışmalarım süresince her zaman bana destek olan Sayın Dr. Muhammad MUDDASSİR ALİ'ye teşekkür ederim.

Bu araştırma boyunca benden her türlü desteğini esirgemeyen, daima bana güç vererek yanımda olan aileme sonsuz teşekkür ederim.

Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine 15.FEN.BİL.45 numaralı projemi desteklemelerinden dolayı teşekkür ederim.

Halil TURHAN

AFYONKARAHİSAR, 2017

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
RESİMLER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	4
2.1 Kanser	4
2.2 Meme Kanseri	5
2.3 Endoplazmik Retikulum	6
2.3.1 Endoplazmik Retikulum Stresi.....	6
2.3.2 Katlanmamış Protein Cevabı (UPR).....	7
2.3.2.1 PERK Yolağı.....	9
2.3.2.2 IRE1 Yolağı.....	10
2.3.2.3 ATF6 Yolağı.....	11
2.4 Sitokinler.....	13
2.4.1 İnterlökin 6.....	13
2.4.2 İnterlökin 8.....	14
2.4.3 İnterlökin 12.....	15
2.4.4 Interferon Gama.....	15
2.4.5 Tümör Nekroz Faktör α	16
2.5 DNA Hasarı	16
2.5.1 Çevresel Etmenlerden Kaynaklanan DNA hasarı	17
2.5.2 Endojen Etmenlerden Kaynaklanan DNA Hasarı	20
2.5.3 Komet Yöntemi.....	23
2.6 <i>Sideritis</i>	24
2.6.1 <i>Sideritis</i> Türlerinin Türkiye Coğrafyasında Dağılımı.....	24

2.6.2 <i>Sideritis</i> Türlerinin Fitokimyasal Bileşenleri.....	26
2.4.2.1 Terpenler.....	26
2.4.2.2 Flavonoidler.....	26
2.4.2.3 Lignanlar.....	27
3. MATERYAL ve METOT	28
3.1 Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar.....	28
3.1.1 Cihazlar.....	28
3.1.2 Kimyasallar.....	28
3.2 <i>Sideritis akmanii</i> Ekstraksiyonu.....	29
3.3 Hücre Kültürü	29
3.3.1 Hücre Kültürü Mediyumunun Hazırlanması.....	30
3.3.2 MCF7 Hücrelerinin kültüre Aktarılması.....	30
3.3.3 MCF7 Hücrelerinin Pasajlanması.....	31
3.3.4 MCF7 Hücrelerinin Sıvı Azotta Saklanması.....	31
3.3.5 Tripan Blue Yöntemi ile Hücre Sayımı.....	32
3.4 MTT Yöntemi.....	32
3.4.1 MTT'nin Hazırlanması.....	33
3.4.2 MTT Yöntemi ile <i>Sideritis akmanii</i> 'nin LD ₅₀ Dozunun Belirlenmesi.....	33
3.5 Thapsigargin ile ER Stresinin Oluşturulması.....	34
3.5.1 Thapsigargin Hazırlanması.....	34
3.5.2 ER Stresinin Oluşturulması.....	34
3.5.3 <i>Sideritis akmanii</i> Ekstresinin Uygulanması.....	34
3.6 RNA İzolasyonu.....	34
3.7 cDNA Sentezi.....	35
3.8 Real Time PCR Analizleri.....	35
3.9 Komet Yöntemi.....	37
3.10 İstatistiksel Analiz.....	38
4. BULGULAR	40
4.1 MTT Yöntemi ile <i>Sideritis akmanii</i> Ekstresinin MCF-7 Hücre Hattı Üzerine Olası Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi.....	40
4.2 Thapsigargin ile MCF-7 Hücre Hattında ER Stresinin Oluşturulması	42
4.3 Komet Testi ile <i>Sideritis akmanii</i> Ekstresinin MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi	43

4.4 <i>Sideritis akmanii</i> Ekstresinin MCF-7 Üzerine Etkilerinin Real-time PCR Bulguları.....	43
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	47
6. KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ.....	72



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Ca	Kalsiyum
dH ₂ O	Distile su
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
mL	Mililitre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
O ₂ ⁻	Süperoksit radikali
nm	Nanometre
°C	Santigrat derece
%	Yüzde
<	Küçüktür
>	Büyüktür

Kısaltmalar

ATF 6	Aktive edici transkripsiyon faktörü-6
ATF 4	Aktive edici transkripsiyon faktörü-6
BIP	Bağlayıcı immunoglobulin proteini
Bcl-2	B hücre lenfoma 2
Bax	BCL2 ile ilişkili X proteini
CHOP	CCAAT/bağlayıcı protein homolog proteini
CpG	sitozin-fosfat-guanin
DNA	Deoksiribonükleik asit
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
RNA	Ribonükleik asit
DMSO	Dimetilsülfoksit
ER	Endoplazmik retikulum
eIF2α	ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2α
FBS	Fetal bovine serum
GADD34	Büyüme durdurma ve DNA hasar indüklenebilir protein-34
GRP78	Glukoz ile düzenlenen protein 78
IFN-γ	İnterferon gama
IL-6	İnterlökin-6
IL-8	İnterlökin-8
IL-12	İnterlökin-12
IR	İyonize radyasyon
IRE1	İnositol requiring protein-1
LMA	Agarose, Low melting point
MCF-7	İnsan meme kanseri
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NEFA	Mem non essential amino acid solution
NMA	Agarose
PBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
PERK	Protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz
ROS	Reaktif oksijen türleri
Rpm	Revolution per minute
SAE	Linearol kaynağı olarak <i>Sideritis akmanii</i> aseton ekstresi

TNF α	Tümör nekroz faktör alfa
T	Thapsigargin
tRNA	Taşıyıcı Ribonükleik Asit
UPR	Katlanmamış protein yanıt
XBP1	X kutusu bağlama proteini 1



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Kanser Oluşumu.....	4
Şekil 2.2 Endoplazmik Retikulum Stres Yolu	7
Şekil 2.3 Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR).....	8
Şekil 2.4 PERK'e Bağlı Katlanmamış Protein Yanıtı.....	10
Şekil 2.5 IRE1 Yolağı.....	11
Şekil 2.6 ATF6 Yolağı.....	12
Şekil 2.7 DNA Yapısına UV Etkisi ve Onarımı.....	18
Şekil 2.8 Radyasyon ve Etkileri.....	19
Şekil 2.9 Sitozinin Metillenmesi.....	21
Şekil 2.10 ROS'ların Oluşumu.....	22
Şekil 2.11 Komet Yönteminin Aşamaları.....	24

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1 Hücre Mediyumun Hazırlanması	30
Çizelge 3.2 Real Time PCR Analizinde Kullanılan Genler ve Primerler	36
Çizelge 3.3 Lizis Çözeltisinin Hazırlanması	37
Çizelge 3.4 Elektroforez Çözeltisinin Hazırlanması.....	37
Çizelge 3.5 Nötralizasyon Çözeltisinin Hazırlanması.....	37
Çizelge 4.1 MTT Yöntemi ile <i>Sideritis akmanii</i> Ekstresinin MCF-7 Üzerinde % Canlılığının Belirlenmesi.....	40
Çizelge 4.2 Probit analizi ile <i>Sideritis akmanii</i> Aseton Ekstresinin Latel Dozunun (LD ₅₀) Belirlenmesi.....	41
Çizelge 4.3 SAE'nin MCF-7 Hücreleri Üzerinde Komet Testi ile DNA Hasarının Tespiti.....	44
Çizelge 4.3 Gen Ekspresyon Düzeyleri.....	45

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

Resim 2.1	<i>Sideritis akmanii</i>	25
Resim 4.1	MCF-7 hücre hattı üzerine <i>Sideritis akmanii</i> ekstrelerinin MTT yöntemi sonuçları.....	40
Resim 4.2	MCF-7 hücrelerinin mikroskop görüntüsü.....	41
Resim 4.3	Thapsigargin ile ER stresi oluşturulmuş MCF-7 hücreleri.....	41
Resim 4.4	Komet görüntüleri.....	43
Resim 4.5	Real-time PCR analizleri sonucu PERK geninin amplifikasyon grafik görüntüleri.....	45

1. GİRİŞ

Bir doku veya organa ait hücrelerinin kontrolsüz çoğalması ve bölünmesi olarak ifade edilen kanser kötü huylu tümörler olarak adlandırılmaktadır (Karataş 2014). Yunanlı bir hekim olan Hipokratın yapmış olduğu tanımlamaya göre yengeç anlamı taşıyan “Crab” kelimesinden köken almaktadır. Hipokrat bu tanımlamaya hastalığın başlangıç bölgesinden diğer dokulara yayılmasını inceleyerek varmıştır (Yenidünya 2014). Vücudumuzun herhangi bir yerinde başlayabildiği gibi hayatımızın her döneminde görülmekte ve her bireyi etkileyebilmektedir. Gelişmiş ülkelerde kardiyovasküler hastalıklardan sonra en yüksek ölüm nedeni olup, bu ülkelerin sağlık harcamalarının büyük bir çoğunluğunu oluşturmaktadır (Nursal 2012).

Meme kanseri tüm dünyadaki kadınlar arasında en yaygın görülen tümör türüdür. Ayrıca akciğer kanserinden sonra kadınlarda kansere bağlı ölümlerin önde gelen sebebidir (Selcen ve Erdoğan 2014). Genetiğin ve çevresel etmenlerin de etkili olduğu diğer kanserler gibi meme kanseri de multifaktöriyel ve karmaşık bir hastalıktır. Meme kanserine neden olan etmenler psikolojik, hormonal, sosyobiyolojik ve genetik olarak sınıflandırılabilir (Elçi 2016). Meme kanserinde kontrolsüz hücre çoğalmasına, eksojen kanserojenlerin mutasyonlara neden olarak, protoonkogenlerin aktivasyonu ile tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonunun bozulması sonucu apoptozis ve hücre proliferasyonunun kontrolden çıkması yol açabilir. Hücrelerin çoğalması esnasında kromozom mutasyonları, menstürasyon ve ilişkili reseptör bozuklukları, birçok büyüme faktörü ve hormonlar meme kanseri oluşumuna neden olabilir (Valipour 2015).

ER, hücrenin salgılama ve zar proteinlerinin sentezinden sonra paketlenme ve katlanma işleminin yapıldığı, Ca^{+2} 'un hücrede depolandığı, sterol ve lipid sentezinin yapıldığı, etrafı membranla çevrili ve lümeninin kimyasal yapısıyla ekstraselüler alanın kimyasal olarak benzerlik gösterdiği organellerden biridir (Haddur 2013). ER stresi, protein katlanmasının yükü ve kapasitesi arasındaki dengesizliğin bir sonucu olarak, ER lümende açılmış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi ile uyarılır. Memeli hücreleri, IRE1 (İnositol requiring protein-1), PERK ve ATF'dan oluşan, entegre bir sinyal iletim yolu olan UPR'yi aktive ederek ER stresine tepki verirler (Pan *et al.* 2012).

Lamiaceae familyası, dünya genelinde yaklaşık 230 cins ve 7100 türden oluşur. Lamiaceae familyasının birçok türü tıpta ve kozmetik alanlarındaki kullanımları ile büyük önem taşımaktadır. Lamiaceae ailesine ait bazı büyük cinsler *Salvia*, *Mentha* ve *Sideritis*'tir. *Sideritis* türleri, antimikrobiyal, antiülserojenik ve anti-inflamatuar özellikleri nedeniyle halk tıbbında kullanılmıştır (Stagos *et al.* 2012). Anadolu'da "dağ çayı" veya "yayla çayı" olarak isimlendirilen *Sideritis* türleri aromalarından dolayı halk tarafından çay olarak kullanılmaktadır.

Programlanmış hücre ölümü veya apoptoz, hayvanlarda gelişme ve homeostazın sürdürülmesi sırasında kritik bir rol oynamaktadır. Kanser hücreleri çoğunlukla apoptozu ortaya çıkaran sinyallere karşı direnç gösterir. Ancak birçok anti-kanser stratejisi bu bariyerin üstesinden gelmek ve nihayetinde hücre ölümünü tetiklemek için yeterli DNA hasarı yaratmayı amaçlamaktadır (Shkreta *et al.* 2016). DNA'nın oksidasyonu yanlış baz eşleşmesine ve hataların genetik bilgiye girmesine neden olur. Reaktif oksijen türleri (ROS) tek iplik veya çift sarmal DNA kopmalarını, şeker fosfat hasarını, apuridik-apirimidinik bölgeleri veya kromatin gelişiminde kopyalamayı engelleyen DNA-protein çapraz bağlarının oluşumuna neden olabilir (Ambroz *et al.* 2016). Tek hücreli jel elektroforezi (komet yöntemi), *in vitro* ve *in vivo* olarak çeşitli hücrelerdeki DNA hasarının ve onarımının tespiti için yaygın olarak kullanılmaktadır. Test hızlı, duyarlı ve nispeten ucuz bir yöntem olmanın avantajına sahiptir. Genotoksisite testinde yaygın olarak kullanılmakla kalmaz, aynı zamanda çevresel ve biyolojik izlem çalışmalarında da uygulamaları vardır (Imanikia *et al.* 2016).

Bu çalışmada insan meme kanseri (MCF-7) hücrelerinde thapsigargin ile ER stresi oluşturularak, strese girmiş hücrelerde SAE'nin sitotoksitesi 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemiyle belirlenmesi amaçlanmıştır.

Normal ve ER stresi oluşturulmuş MCF-7 hücrelerinde, SAE uygulanması sonucu, ATF-4, AFT-6, PERK ve Grp78 gibi genlerin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi ile inflammatuar ve pro-inflamatuar etkileri için TNF α , IFN- γ , IL-6, IL-8 ve IL-12 gen ifade düzeylerine Real Time-PCR yöntemi ile bakılması amaçlanmıştır.

Ayrıca SAE'nin MCF-7 üzerinde muhtemel genotoksitesisi Komet yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

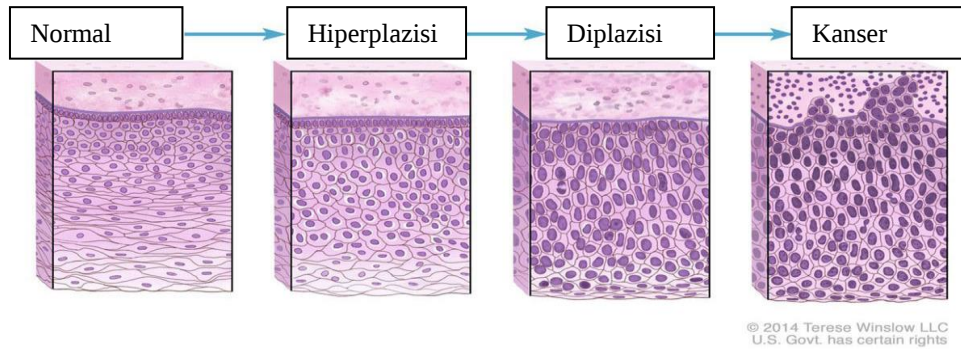


2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalmalarına, bağışıklık sisteminin denetiminden kaçmalarına ve sonuç olarak dokularda metastazlar oluşturmalarına neden olan, işlevsel ve davranışsal farklılıklar geçirdikleri çok aşamalı bir süreçtir. Bu farklılıklar hücre artışını ve yaşamını, diğer hücrelerle birlikteliklerini ve bağışıklık sisteminden kaçma yeteneklerini kontrol eden genetik materyaldeki modifikasyonların birikmesiyle ortaya çıkmaktadır (Vatansever 2014). Hipokratın yapmış olduğu tanımlamaya göre yengeç anlamı taşıyan “Crab” kelimesinden köken almakla birlikte, Hipokrat bu tanımlamaya hastalığın başlangıç bölgesinden diğer dokulara yayılmasını inceleyerek varmıştır (Yenidünya 2014). Dünya çapında önde gelen mortalite ve morbidite nedenlerinden biridir (Silva and Al-Jamal 2017). Yüzyılın başlarında ölüme neden olan hastalıklar sıralamasında 7’inci veya 8’inci sıralarda yer alırken bugün dünya çapında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırayı almakta ve gelişmiş ülkelerde her beş kişiden biri kanserden ölmektedir. En sık görülen kanser türleri erkeklerde akciğer(%22) başta olmak üzere kolorektal(%12) ve prostat(%11) iken kadınlarda ise meme(%26) başta olmak üzere kolorektal(%14) ve midedir(%7) (Aktaş 2010, Nursal 2012).

Normal hücre çoğalmasında büyümenin devamı ile sınırlandırılması arasında iyi kontrol edilen bir denge bulunmaktadır. Halbuki tümör hücrelerinde kontrol bozulmuş olup (Şekil 2.1) sürekli bir hücre çoğalması görülürken farklılaşma kaybolmuş olup, programlı hücre ölüm süreçleri de işlemez hale gelmiştir (Belder 2013).



Şekil 2.1 Kanser Oluşumu (İnt.Kay. 1).

2.2 Meme Kanseri

Meme kanseri, meme epitel dokusundaki kötü huylu hücrelerin kontrolsüz büyümesiyle karakterizedir. Hastalık her iki cinsiyette de etkili olabilmektedir. Dünya çapında kadınlarda en sık rastlanan kanser türü olsa da insidans oranı bölgelere göre değişiklik gösterir ve yaşla birlikte belirgin bir artışa neden olur (Lukong 2017, Nakamura *et al.* 2017). 2012'de yaklaşık 1.7 milyon yeni vaka tanısı konmuş ve tüm kadın kanserlerinin % 25'ini oluşturmuştur (Ahmed 2016). Ülkemizde meme kanseri, kadınlarda en çok görülen kanser çeşidi olup, kadınlarda kanserin neden olduğu ölümlerinin başında gelmektedir. Sebebi tam belirlenememekle birlikte meme kanserine yakalanma riskini radyasyona gibi çeşitli ışınlara maruz kalma, geçmişte ailede meme kanseri vakasının görülmesi, ilerleyen yaş durumu, hormonal faktörler, çocuk sahibi olma yaşı, bayanlarda menstrüal evrenin uzunluğu gibi çeşitli faktörler artırmaktadır (Yaramış 2011).

Bilimsel gelişmelere ve klinik ilerlemelere rağmen invaziv (yayılmacı) ve maling (kötü huylu) meme kanseri tanısı konan hastalar halen kötü bir prognoza (öngörü) sahiptir (Reesama *et al.* 2016). Meme kanserinin yüksek ölüm oranının yanında özellikle uzak dokulara, örneğin akciğerler, karaciğer ve kemiklere metastaz kapasitesi de yüksektir (Pachon 2015, Gonzalez *et al.* 2017). Ameliyat, kemoterapi, radyoterapi, endokrin ve hedef tedaviler gibi kombine terapötik yöntemler tedavinin temel dayanağıdır. Bununla birlikte, başta tümör bölgesine girme zorluğu, hastalığın dağınık yapısı ve tedavide kullanılan maddelerin toksisitesi nedeniyle tedavi yöntemleri yetersiz sonuçlara neden olabilmektedir (Shakshouk and Rashwan 2017). Bu nedenle çeşitli çalışmalarda dolaşımdaki tümör hücrelerinin saptanması için potansiyel moleküler belirteçler, göğüs dokusunun spesifik belirteçleri olarak değerlendirmiştir (Pachon *et al.* 2015). Meme kanserinin başlaması ve ilerlemesi, hücre canlılığını ve proliferasyonunu kontrol eden birden fazla genin düzensizleşmesini içeren çok aşamalı bir süreçtir (Mukawera *et al.* 2015).

2.3 Endoplazmik Retikulum

ER ökaryotik hücrelerin endomembran sisteminde bulunan protein sentezinin düzenlenmesi, proteinlerin işlenmesi ve katlanması, translokasyon ve kalsiyum depolanması gibi normal hücresel süreçler için gerekli olan önemli bir organeldir (Imai 2016, Zanotto *et al.* 2017).

ER'nin hücrelerde düz ve granüllü olmak üzere iki türü bulunur. Düz endoplazmik retikulum (DER) hücre içi kalsiyum konsantrasyonu, lipid-steroit sentezi, karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesi, ilaç detoksifikasyonu gibi görevlere sahiptir. Granüllü endoplazmik retikulum (GER) ise hücre dışına gönderilecek ve membran yapısına katılacak olan proteinlerin sentezlendiği ve taşındığı yerdir (Özdemir 2011).

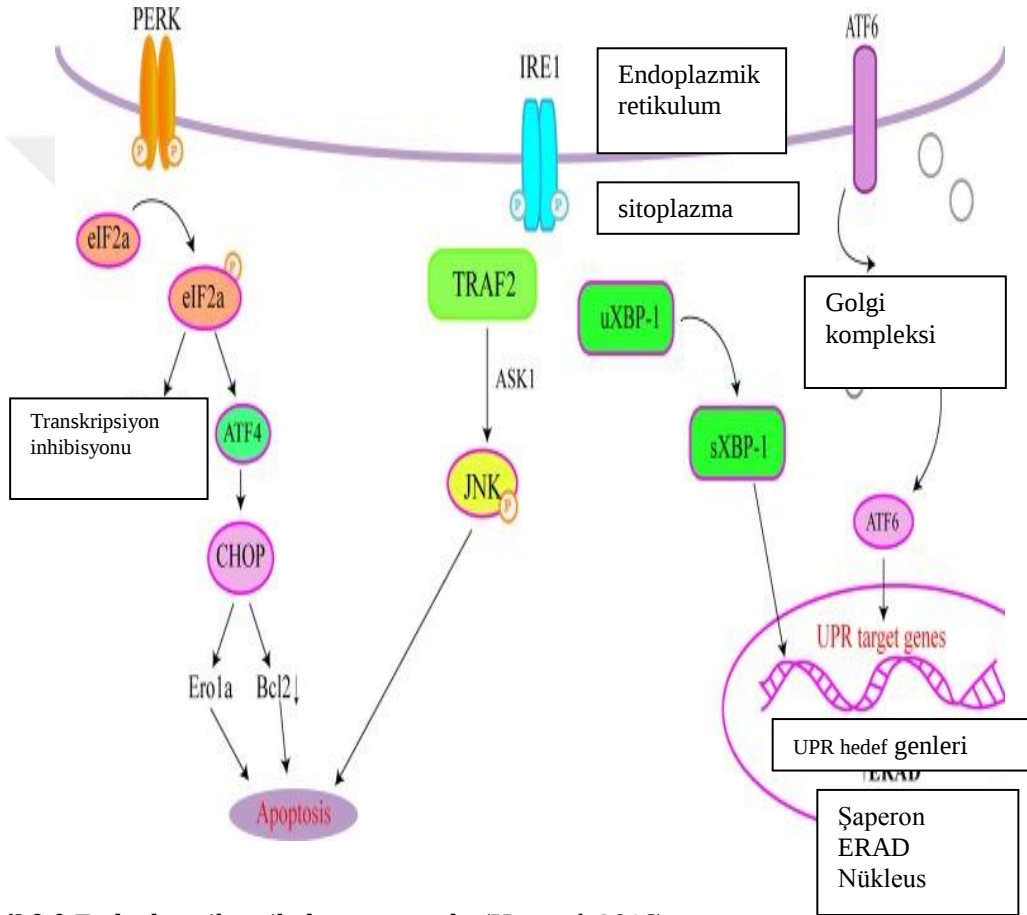
2.3.1 Endoplazmik Retikulum Stresi

ER protein sentezinin düzenlenmesi, proteinlerin katlanması, kalsiyum depolanması, kolesterol ve lipid-membran biyosentezinin kontrolü gibi normal hücresel süreçler için gerekli olan önemli bir organel türüdür. ER'de yer alan metal iyonları, şaperonlar (proteinlerin katlanarak üç boyutlu hâle gelmesi işleminde yer alan aracı proteinler) ve lektinler (hücrelerin yüzey reseptörlerindeki karbohidrat birimlerine bağlanarak hücrelerin çökmelerini sağlayan glikoprotein veya protein yapısındaki moleküller) protein katlanmasında işlevleri olup, kovalent modifikasyonları yönlendirerek polipeptitlerin doğru şekilde katlanmasını veya olgunlaşması sağlarlar.

ER, lümeni içerisindeki iyon dengesi, sentez yükü gibi fizyolojik ve biyokimyasal seviyede meydana gelen değişimlere oldukça hassastır. Glukoz yoksunluğu, kalsiyum boşalması, serbest radikallere maruz kalma, glikozilasyonun bozulması, aşırı kolesterol yükü, hücrede kontrol mekanizmalarının oksidatif stres indüksiyonu ile ilişkili bir takım patolojik ve fizyolojik sebeplerle bozulması, yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine ve ardından da ER stresinin artmasına neden olur (Köse 2016, Imai 2016, Sozen and Ozar 2017). Aşırı ve uzun süreli stresler ise iltihaplanma ve apoptozise neden olur (Tungkum *et al.* 2017). Ayrıca bitki türevi olan siskiterpen lakton olarak bilinen

thapsigargin, endoplazmik retikulum Ca^{+2} -ATP'azı inhibe ederek ER Ca^{+2} homeostazı bozan güçlü bir ER stres indükleyici toksindir (Özen 2013, Saito *et al.* 2016).

ER'de yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi, yeni başlayan protein sentezini azaltan, protein katlanmayı kolaylaştıran ve yanlış katlanmış proteinlerin proteozomal bozunmasını arttıran bir koruyucu tepki olarak UPR yanıtı oluşturur (Fent and Christen, 2016).



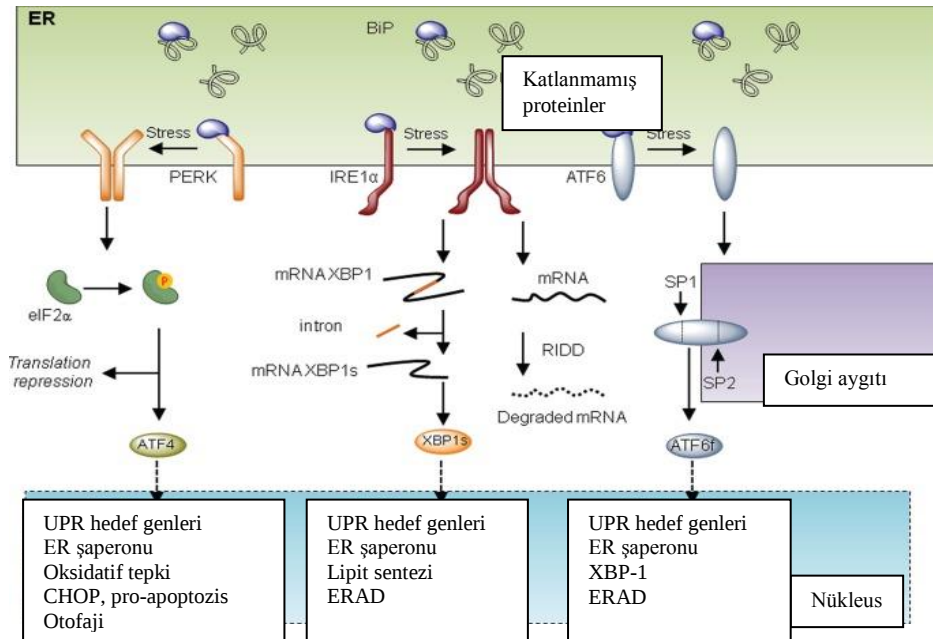
Şekil 2.2 Endoplazmik retikulum stres yolu (He *et al.* 2016).

2.3.2 Katlanmamış Protein Cevabı (Unfolding Protein Response)

UPR öncelikli olarak protein yanlış katlanma mekanizmalarını aktive eden hayatta kalma tepkisidir. Bununla birlikte uzun süren ER stres koşullarında hücre yaşamını bozabilir. ER stresıyla aktive edilen üç yolak IRE1, PERK ve ATF-6'dır. Bu üç yolda ER stresinin olmadığı durumlarda Grp78/BIP (Bağlayıcı immunoglobulin proteini)

şaperonu ile baskılanırlar (Kapuy *et al.* 2014). Bu üç yolakta, IRE1 ve ATF-6 ER homeostazını düzelterip yeniden kurarken, PERK ER homeostazının eski durumuna getirilmemesi durumunda pro-apoptotik etkileri ortaya çıkarmak için yanlış katlanmış proteinleri ortadan kaldırır. Bu nedenle, ER stresine en hızlı yanıt PERK tarafından verilir (Zhang *et al.* 2017). Üç transmembran proteini ER stres koşulları altında, Grp78/BiP'den ayrılırlar ve çok sayıda genin modülasyonu ile transkriptomun yeniden programlamasını başlatmak için, otofosforilasyon yoluyla (Şekil 2.2) aktive olurlar (Mancini *et al.* 2013).

Grp78, hücre yaşayabilirliğini muhafaza etmek için birçok fonksiyona sahiptir. Transkripsiyon düzeyinde, GRP78 *Hsp5a* geni tarafından kodlanır. Isı şok protein-70 (Hsp70) ailesi içinde en bol bulunan proteindir. Ancak bu ailenin diğer üyelerinden farklı olarak, ısı şokuyla indüklenmez. Çünkü Grp78 promoteri ısı şok elementinden yoksundur. GRP78 seviyeleri hücre içinde nispeten düşük seviyelerde tutulur, ER ve kalsiyum homeostazını etkileyen stresler altında ise önemli ölçüde artar. Aslında Grp78 ilk olarak 1977'de glikozsuz ortamda kültürlenmiş tavuk embriyo fibroblastlarında kuvvetli bir şekilde indüklenen bir 78-kDa protein olarak keşfedilmiştir (Casas 2017).



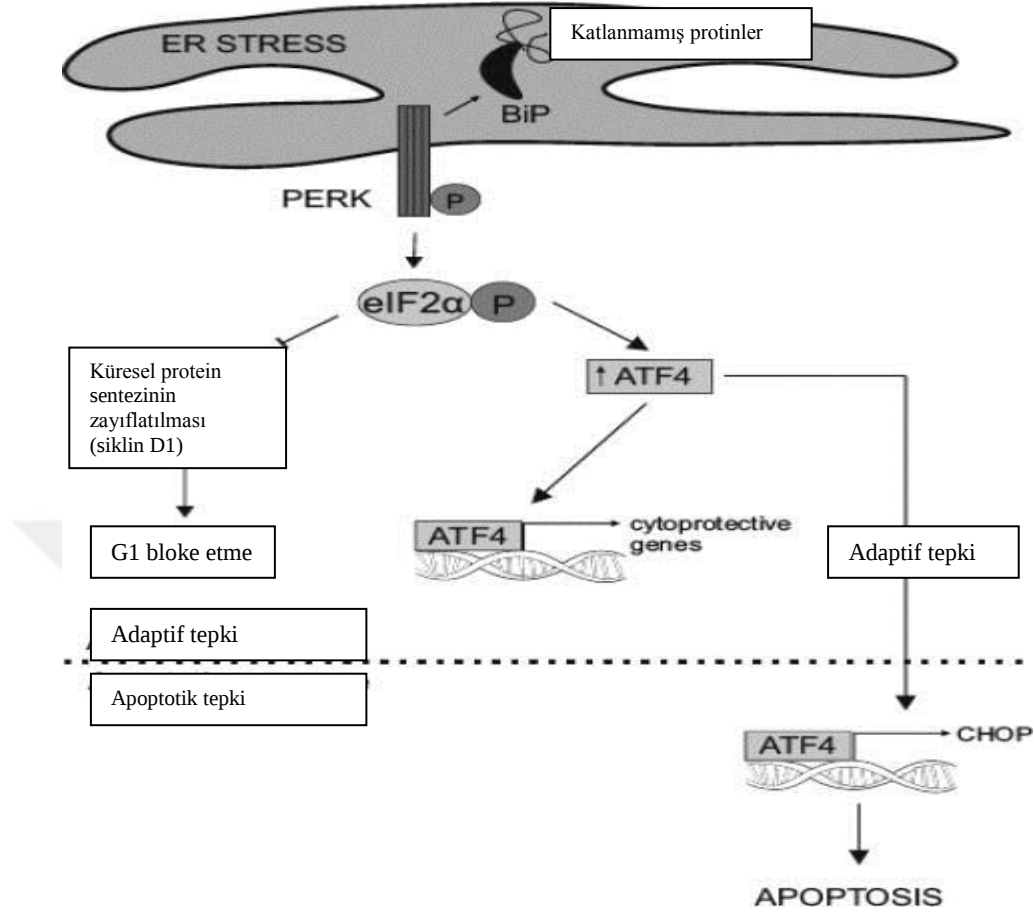
Şekil 2.3 Katlanmamış Protein Yanıtı (UPR) (Carreras-Sureda *et al.* 2017).

2.3.2.1 PERK Yolağı

PERK, ER stresi için önemli bir algılama sensörü olmakla birlikte bir Ser/Thr protein kinazıdır. ER stresi oluştuğunda Grp78'den ayrılıp, dimerleşerek otofosforilasyona uğrayan PERK, protein translasyonunu inhibe etmek için alt sinyal yollarını indükler ve böylece ER homeostazını geri kazandırır. Aksine ER stresi çok uzun sürer veya şiddetli olursa ATF-4 ve CHOP (CCAAT / bağlayıcı protein homolog proteini) transkripsiyonu PERK yolağı tarafından aktive edilir (Yi *et al.* 2017).

Fosforlanmış PERK'in başlıca hedefi tRNA'ların ribozomal alt üniteye bağlanmasına aracılık eden, ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2 α (eIF2 α)'yı fosforilemektir. PERK eIF2 α 'yı Ser 51'deki fosforilasyon ile inaktive ederek ribozomların 80S alt ünitesine bağlanmasını engeller. Bu da küresel protein sentezini zayıflatarak ER'ye protein akışını azaltır. Fosforile edilmiş eIF2 α , aktive edici ATF-4'ün translasyonunu artırır. ATF-4, UPR ve GADD-34 (Büyüme durdurma ve DNA hasar indüklenebilir protein-34)'ün kontrolünde rol oynayan birkaç genin transkripsiyonunu indükler. GADD-34 eIF2 α defosfile olmasını sağlayan proteindir. ATF-4 otofaji, antioksidan tepki ve amino asit metabolizması için gerekli olan UPR hedef genlerini düzenleyerek çekirdeğe translokasyonlarını sağlar. UPR'ye bağlı otofaji, kanser hücrelerinin öncül savunma stratejisidir. Otofaji, istenmeyen proteinlerin otofagosomlara tutulduğu ve daha sonra lizozomal proteazlar tarafından bozulduğu katabolik bir süreçtir. Otofaji, ER homeostazının korunması ve hızla çoğalan kanser hücrelerinin besin maddeleri ile beslenmesinde UPR kapsamında önemli bir role sahiptir (Burton and Yung 2011, Fonseca *et al.* 2013, Taguchi *et al.* 2017).

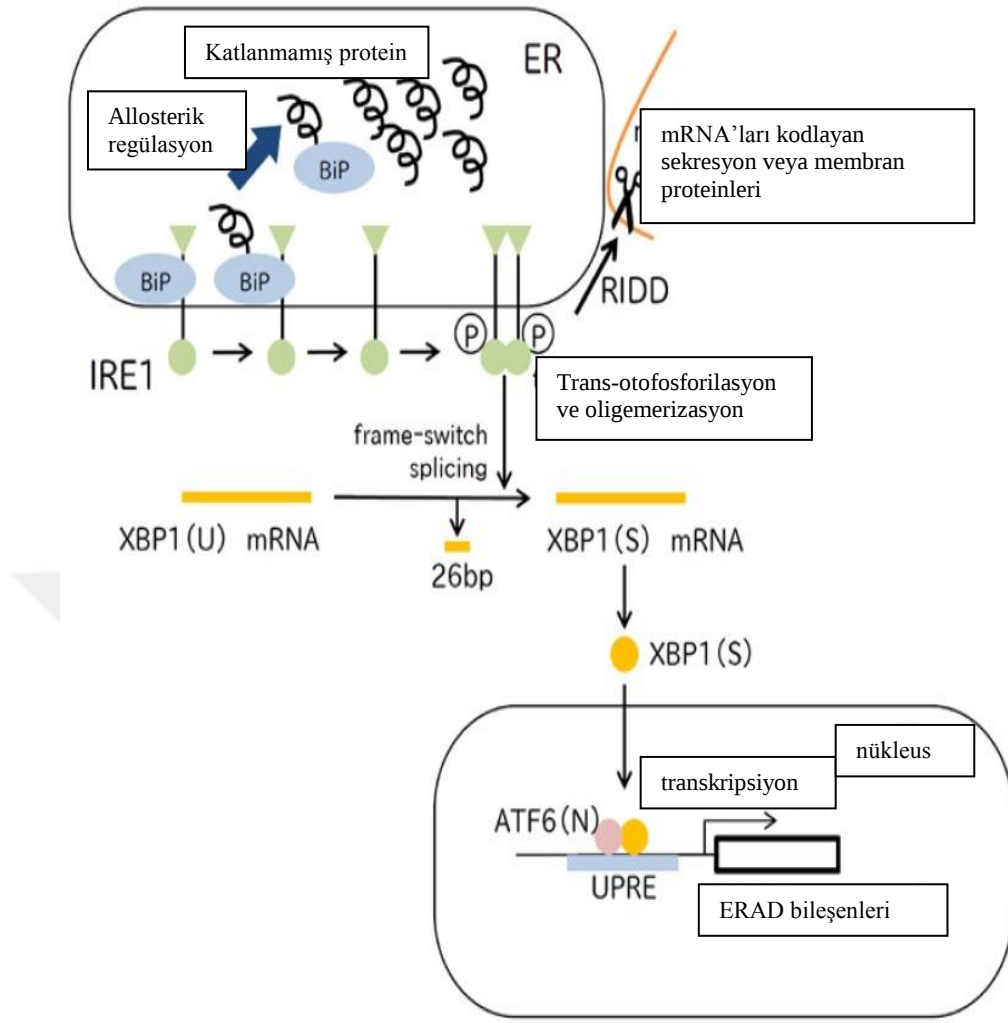
CHOP'un devam eden ekspresyonu hücre ölümünü indükleyebilir. CHOP'un aşırı ekspresyonu, sadece B hücre lenfoma 2 (Bcl-2) ekspresyonunu inhibe etmekle kalmaz aynı zamanda Bcl-2 ile ilişkili X proteininin (Bax) ekspresyonunu artırır. Aynı zamanda Bax'ın sitoplazmadan mitokondriye translokasyonunu artırır ve böylece hücre ölümüne yol açar. In vitro çalışmalar, Bcl-2'nin aşırı ekspresyonunun apoptozu inhibe ettiğini, buna karşılık Bax'ın aşırı ekspresyonunun apoptozu artırdığı gösterilmiştir (Yi *et al.* 2017, Wen *et al.* 2017).



Şekil 2.4 PERK'e Bağlı Katlanmamış Protein Yanıtı (Rozpedek *et al.* 2016).

2.3.2.2 IRE1 Yolağı

IRE1 yolu IRE1α tarafından başlatılır ve UPRosome adı verilen bir dizi regülatör tarafından kontrol edilir. UPRosome, ısı şoku proteini 72 (Hsp72), apoptoz sinyal düzenleyen kinaz 1 (ASK1), pro-apoptotik proteinler BAX proteini ve Bcl-2 homolog antagonisti gibi ER membranında bir araya getirilen kompleks proteinlerden oluşur. Bununla birlikte, bu regülatörler tarafından IRE1 yolunun sinyalizasyonu IRE1α ile ilişkilendirilen veya ayrılan modülasyonu hücre türüne bağlıdır. IRE1 yolağının aktivasyonu üzerine aktif IRE1, açık okuma çerçevesini kaydırarak X kutusu bağlama proteini 1 (XBP1) mRNA'sını işler. Bu daha sonra hedef genlerini yukarı regüle eden aktif transkripsiyon faktörü eklenmiş XBP1'in (sXBP1) ekspresyonuyla sonuçlanır (Şekil 2.3) (Yu *et al.* 2013).

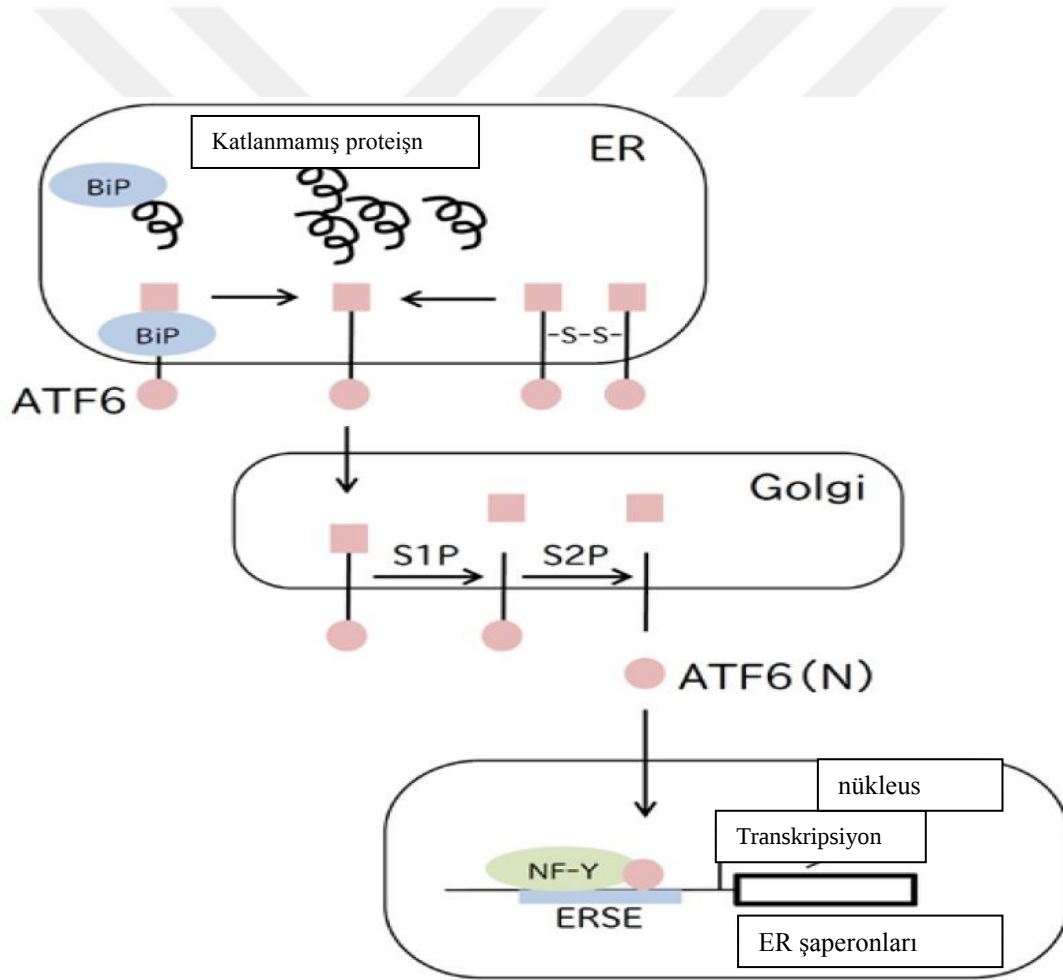


Şekil 2.5 IRE1 Yolağı (Ariyasu *et al.* 2017).

2.3.2.3 ATF6 Yolağı

Memelilerde, ATF-6'nın ATF-6 α (90 kD) ve ATF-6 β (110 kD) olmak üzere iki formu vardır ve her ikisi de ER transmembran proteinleri gibi tüm hücre tiplerinde sentezlenmiştir. Strese girmeyen hücrelerde ATF-6, ER zarında lokalizedir ve GRP78'e bağlıdır. ER stresi olduğu zaman GRP78'den ayrılarak Golgi kompleksine lokalize olur. Golgi kompleksinde ATF-6 luminal alan içinde SP1 (serine protease site-1 protease) ile bölünür. Daha sonra N terminal bölgesi SP2 (metalloprotease site-2 protease) ile kırılır. Parçalanmış ATF-6, protein şaperonlarını ve ERAD (ER'ye bağlı bozulma) bileşenlerini kodlayan genlerin ekspresyonunu başlatmak için XBP-1 proteinini ile birlikte çalışır (Doynes *et al.* 2011, Aganai *et al.* 2011, Kılınç 2013).

ATF-6'nın stres algılama mekanizmalarının iki çalışma modeli vardır. İlk model, ER stresine bağlı olarak ATF-6'dan ayrılan BiP'nin, ATF-6'nın golgi yerleşim sinyalini ortaya çıkarması ve ATF-6'nın golgi'ye translokasyonuna yol açmasıdır. İkinci model, ER'de normal koşullar altında ATF-6'nın luminal alanlarının moleküller arası disülfür bağları ile dimer veya oligomer oluşturmasıdır. ER stresine cevap olarak, ATF-6'nın disülfür bağı yarılr ve ortaya çıkan monomerik ATF-6, golgi'ye translokasyon yapar. Golgi membranından RIP tarafından salınan ATF-6'nın N-terminal bZip bölgesi, çekirdeğe girer ve ER stres tepki elementi (ERSE) aracılığıyla genlerin ekspresyonunu upregüle eder (Şekil 2.6). ATF6'nın birçok hedef geni, ER şaperon genleri ve katlanan enzim genleri de dahil ER kalite kontrolünde rol oynar (Ariyasu *et al.* 2017).



Şekil 2.6 ATF6 Yolağı (Ariyasu *et al.* 2017).

2.4 Sitokinler

Sitokinler; IFN'lar, TNF'ler, IL'ler, büyüme faktörleri, hücre adhezyon molekülleri ve koloni stimülatör faktörlerini (CSF) içeren çeşitli gruplara ayrılır. Genellikle her sitokin ailesi akut inflamasyonun belirli yönlerine katkıda bulunur (Sarıkaya 2014).

Sitokinler, genel ve lokal enflamatuvar etkileri düzenleyen, oluşan yaraların geçmesinde ve birçok olayda yer alan lokal doku hormonu olarak isimlendirilmektedirler. Özel reseptörlerle etkileşime girdikleri hedef hücrelerde hücre içi sinyal yollarını başlatırlar. Lenfositler, iltihaplı dokular, monositler ve endotelial hücre benzeri bağışıklık sistemi hücrelerinin etkileşimini sağlayarak aktivasyonlarını yöneten kısa süre etkili ve çözünebilir polipeptid yapılı moleküllerdir (Görgün 2014). Sitokinler, hormon gibi özellikler gösterebilirler de, sentez aşamaları ve salgılanmaları geçici sürelidir ve depolanmazlar. Konsantrasyon olarak çok düşük miktarda olduklarında hormon gibi reseptörlere bağlanarak etkilerinin gösterirler. Parakrin, endokrin ve otokrin etkilere sahiptirler (Can 2013).

2.4.1 İnterlökin 6

İnterlökin-6 (IL-6) farklı dokularda çeşitli fonksiyonlara sahip pleiotropik bir sitokindir. Başlangıçta IL-6, bağışıklık sisteminin önemli bir faktörü olarak tanımlanmış olsa da bu sitokinin metabolik regülasyonda ve özellikle glikoz homeostazında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Kurauti *et al.* 2017). Bu pleiotropik sitokin, doku iltihaplanma yerlerinde üretilir ve akut organ yaralanmaları sırasında makrofajlar, lenfositler, endotel hücreleri, epitel hücreleri ve fibroblastlar da dahil olmak üzere çeşitli farklı hücre tipleri ile dolaşıma salınır. IL-6 akut faz tepkisinin indüksiyonu için büyük bir pro-inflamatuvar mediyatör görevi görür. Ateş, lökosit alımı ve aktivasyonu, karaciğer rejenerasyonu ve hemodinamik etkileri de içeren geniş bir yelpazedeki lokal ve sistemik değişikliklere yol açar. Deneysel akciğer hasarında IL-6'nın faydalı anti-inflamatuvar etkileri olduğu gösterilmiştir (Voirot *et al.* 2017).

IL-6 geni, p21-24 pozisyonundaki 7. kromozom üzerinde bulunur ve diğer sitokinlerinki

gibi ifadesi sıklıkla transkripsiyonel seviyede düzenlenir. IL-6'nın düzenleyici bölgeleri, nükleer faktör interlökin-6 (NF-IL-6), nükleer faktör-kappaB (NF-κB), aktivator protein 1 (AP-1), CAAT bağlayıcı protein beta (C/EBP-beta) ve glukokortikoid reseptörleridir. IL-6 geninin ifadesi çeşitli transkripsiyonel faktörlerin, destekleyici bölgedeki spesifik duyarlı elemanlara veya sekanslara bağlanması yoluyla düzenlenir ve etkili bir şekilde modüle edilir. IL-6 geninin 5' ve 3' bitişik bölgeleri oldukça polimorfiktir ve bu genin promotör bölgesinde birkaç patojen mutasyon ve tek nükleotid polimorfizmi (SNP) tanımlanmıştır (Banday *et al.* 2017).

2.4.2 İnterlökin 8

IL-8 (interlökin-8) veya CXCL8 aktive edilmiş monositler ve makrofajlar, epitelyal ve endotel hücreleri, fibroblastlar ve nötrofiller tarafından üretilen bir CXC kemokindir. Nötrofil kemotaktik faktör (NCF) olarak da bilinir, çünkü esas olarak nötrofillerin kemotaksisini, aynı zamanda da bazofiller ve T-lenfositleri indükler. IL-8, endotel hücreleri, makrofajlar, mast hücreleri ve keratinositler gibi diğer hedef hücrelerde anjiyogenez, fagositoz, aktivasyon, ekzositoz, solunum hızlanması gibi çeşitli etkilere neden olur. Tüm bu etkilere, kemokin ve G-protein çifti gruplarının iki reseptörü CXCR1 (IL-8 reseptör alfa) ve CXCR2 (IL-8 reseptör beta) üyeleri arasındaki etkileşimle aracılık etmektedir (Cıanga *et al.* 2016).

Bir yaralanma veya enfeksiyon esnasında IL-8, anjiyogenezi teşvik ederek nötrofillerin damardan dokuya alınmasını sağlar. Bununla birlikte pro-inflamatuar sitokinler, hücresel stres, bakteriyel ve viral uyarıcılarda IL-8 proteininin ekspres edilmesini tetikler. Genellikle artmış IL-8 seviyeleri romatoid artrit, enflamatuar bağırsak hastalığı, idiyopatik pulmoner fibröz, akut solunum sıkıntısı sendromu, ateroskleroz gibi birçok kronik hastalığın ilerlemesiyle ilişkilidir. Bu nedenle vücut sıvıları içinde IL-8 konsantrasyonlarının izlenmesi ciddi hastalıkların erken ve doğru algılanmasını sağlamak için önemlidir (Sharma *et al.* 2016).

2.4.3 İnterlökin 12

IL-12 bakteriler, bakteri ürünleri ve hücre içi parazitlere tepki olarak öncelikle fagositik hücreler ve antijen oluşturan hücreler tarafından üretilen bir heterodimerik sitokindir (Alkayyal *et al.* 2016). Önemli bir pro-inflamatuar sitokin olan IL-12, 35 kDa (IL-12A) ve 40 kDa (IL-12B) olmak üzere iki disülfid bağlı altbirimden oluşur. IL-12, T yardımcı tip (Th1)/(Th2) sitokin dengesi üzerinde antagonistik bir etkiye sahiptir. Doğal ve edinilmiş immün yanıtlar arasında işlevsel bir bağ sağlar (Wang *et al.* 2014). Aynı zamanda antitümör bağışıklıkta önemli bir sitokin olan interferon- γ üretimi ile karakterizedir (Cui *et al.* 2017). IL-12, sadece hayvan modellerinde tümör hücrelerinin çoğalmasını inhibe etmekle kalmaz aynı zamanda bazı koşullarda virüs bulaşmış hücrelerin yok edilmesine neden olur. Bu nedenle, IL-12, virüs enfeksiyonu ve kanser gibi hücrel bağışıklığın önemli olduğu hastalıklar için büyük potansiyele sahiptir (Wei *et al.* 2014).

2.4.4 İnterferon Gama

İnterferon- γ , doğuştan gelen lenfoid hücreler, doğal öldürücü hücreler, sitotoksik T hücreleri (CD8⁺) ve yardımcı T hücreleri (CD4⁺) gibi Tip 1 bağışıklıkta yer alan hücreler tarafından üretilen pro-inflamatuar ve çok işlevli bir sitokindir. IFN- γ , makrofajları aktive ederek hücreler arası mikrop enfeksiyonu sırasında onları etkili efektör hücrelere dönüştürür. İnterlökin-4 (IL-4) ve interlökin-13 (IL-13) gibi hücre sitokinlerinin işlevlerini antagonize eder (Oyanagi *et al.* 2017).

Bu sitokin, TNF- α ve IL-6 da dahil olmak üzere çeşitli pro-inflamatuar mediatörleri upregüle ederek iltihaplanma tepkisini yönlendirme potansiyeline sahiptir. Önceki veriler IFN- γ 'nın bazı koşullar altında pro-inflamatuar nükleer transkripsiyon faktörü- κ B'nin (NF- κ B) aktivasyonunu direkt olarak artırabileceğini dile getirmektedir (Mahmoud *et al.* 2016). Ayrıca IL-12, T lenfositleri ve doğal öldürücü hücreler tarafından IFN- γ üretimini uyarır (Arai *et al.* 2008).

2.4.5 Tümör Nekroz Faktör α

En güçlü inflamatuvar sitokinlerden biri olan TNF- α , aktif makrofajlar tarafından üretilmekte olup inflamasyona, bağışıklığa ve apoptozise aracılık eden pleiotropik bir sitokindir. TNF- α IL-1, IL-6 ve IL-8 dahil sitokinlerin üretimini uyarır. Vasküler endotel hücreleri için TNF- α 'ya maruz kalma, inflamatuvar sitokinlerin özellikle nükleer faktör κ B (NF- κ B), c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve p38 mitojen aktive protein kinaz yollarının aktifleşmesine yol açar (Bian *et al.* 2017, Işık *et al.* 2016).

TNF- α 'nın virüsle enfekte olmuş hücrelerde apoptozis ve sitotoksik etkisi, immünomodülatör aktivite, antiviral etki ve birçok biyolojik fonksiyonlarla birlikte, inflamasyonun yanında hücrel immün tepkide de önemi olduğu gösterilmiştir (Can 2013).

2.5 DNA Hasarı

Genetik bilginin nesilden nesle sağlıklı olarak aktarılabilmesi için DNA yapısının korunması son derece önemlidir. DNA molekülünde iç veya dış faktörlerin etkisiyle oluşabilecek tüm değişimler 'DNA hasarı' olarak adlandırılır. DNA hasarı hücrede, hücre hasarı önleyebilecek veya hasarı düzeltemeyecek ise programlı hücre ölümünü gerçekleştirecek bir çok olayı tetikler. Hücre, farklı metabolik yolları kullanarak DNA hasarlarına cevap verir. DNA hasarı, hasar onarımı mekanizmaları ile onarılır veya apoptoz yolu indüklenerek hücre ölüme götürülür. DNA molekülü onarılabilen dinamik yapıya sahip tek molekül olması bakımından önemlidir (Yüksel 2011).

İnsan DNA'sının bütünlüğünü kimyasal bileşikler, X-ışınları ve ultraviyole gibi çevresel faktörler, sürekli tehdit ederek farklı DNA hasarlarına neden olmaktadır. DNA hasarına örnek olarak bazik alanlar, çift ve tek zincir kırıkları, delesyonlar, insersiyonlar ve DNA-protein çapraz bağ oluşumları verilebilir. DNA'da dış faktörlerin yanında iç faktörlerden de kaynaklanan hasar oluşabilir. DNA rekombinasyonu ve replikasyonunun gerçekleştiği işlemler sırasında oluşan serbest radikaller gibi endojen etmenlerde DNA'da hasara neden olmaktadır. DNA onarımı, replikasyon hataları,

mutasyon, hücre ölümü, genomik kararsızlık ve DNA hasarının devamlılığında devreye girmektedir (Onur *et al.* 2009). DNA onarımı polimerazlar, rekombinazlar, helikazlar, nükleazlar, demetilazlar kinazlar, fosfatazlar, topoizomerazlar, glikozilazlar ve ligazların enzimatik aktivitelerinde ki değişimlerle gerçekleştirilmektedir. İnsanda DNA onarımında 130'dan fazla genin görev aldığı ve bu sayının daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir (Kurtoğlu ve Tekedereli 2015).

2.5.1 Çevresel Etmenlerden Kaynaklanan DNA hasarı

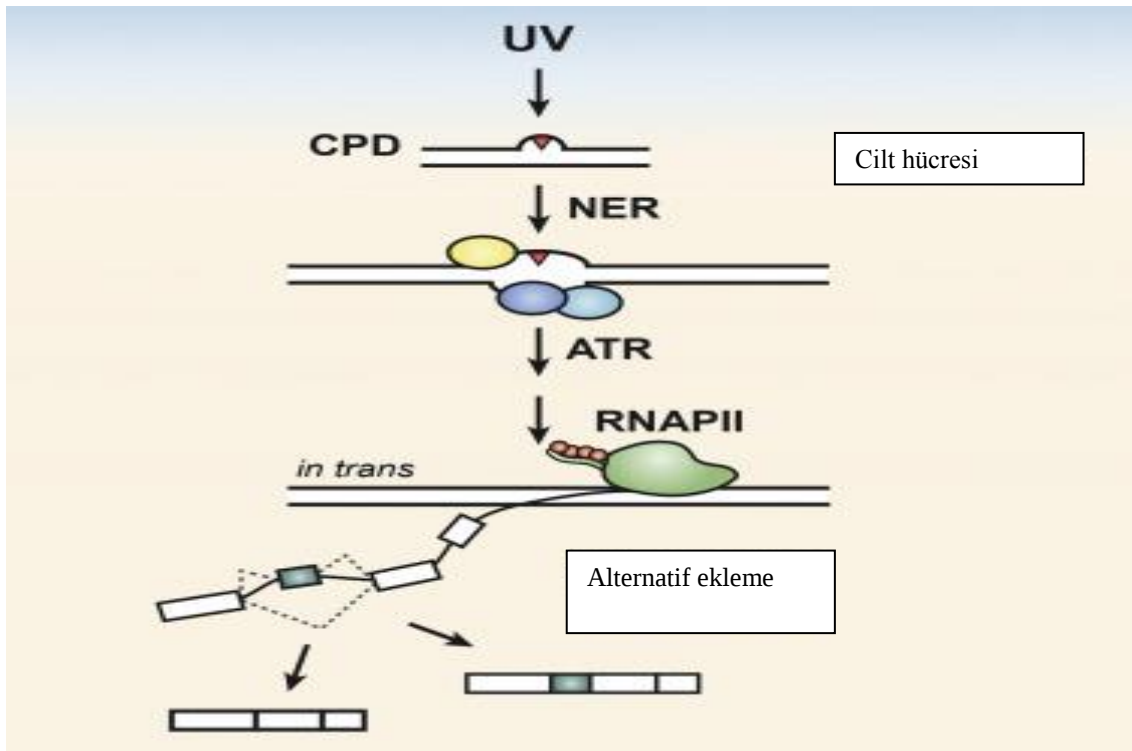
Ultraviyole (UV) ışınları, iyonize radyasyon (IR) ve doğal yada insan yapımı kimyasallar DNA'da hasara neden olmaktadır.

UV Işınları ve DNA hasarı; vücudun iç kısmı ile dış kısmı arasında ilk bariyeri oluşturan cildimiz UV ışınlarına düzenli olarak maruz kalmaktadır. Dünya'nın yüzeyine ulaşan UV ışığı DNA, RNA, proteinler ve lipidler gibi hücresel bileşenlere zarar verebilir. Bu nedenle doğal ortamımızdaki en belirgin kanserojendir (Munoz *et al.* 2017). UV-C (< 280 nm) tarafından üretilen DNA hasarı, pirimidin dimerler iken UV-B (280–320 nm) ve UV-A (320–400 nm) hem pirimidin dimerleri hem de oksidatif DNA lezyonları üretir. UV, hücresel DNA'yı ve hücre zarını etkileyerek homeostazı korumak için çok çeşitli sinyal olayları tetikleyebilir (Şekil 2.7) (Takeuchi *et al.* 2016).

İyonize Radyasyon (IR) ve DNA hasarı; IR, tıpta tanı ve tedavi amacıyla, sanayi alanında ve savaşlarda giderek daha fazla kullanılmaktadır. Normal biyolojik sistemlerin IR'ye kontrolsüz olarak maruz kalması, genellikle IR dozuna bağlı olan çeşitli istenmeyen biyolojik etkilere neden olur. Total vücudun IR'ye maruz kalması bir çok hasara veya hücre içi lezyonlara neden olur. Enerji biyomolekülleri doğrudan etkileyebilir ve kimyasal bağların bozunmasına neden olabilir. Diğer taraftan enerji, hücresel biyomoleküllere zarar veren reaktif oksijen türlerinin veya serbest radikallere yol açan su moleküllerinin oluşmasına neden olabilir.

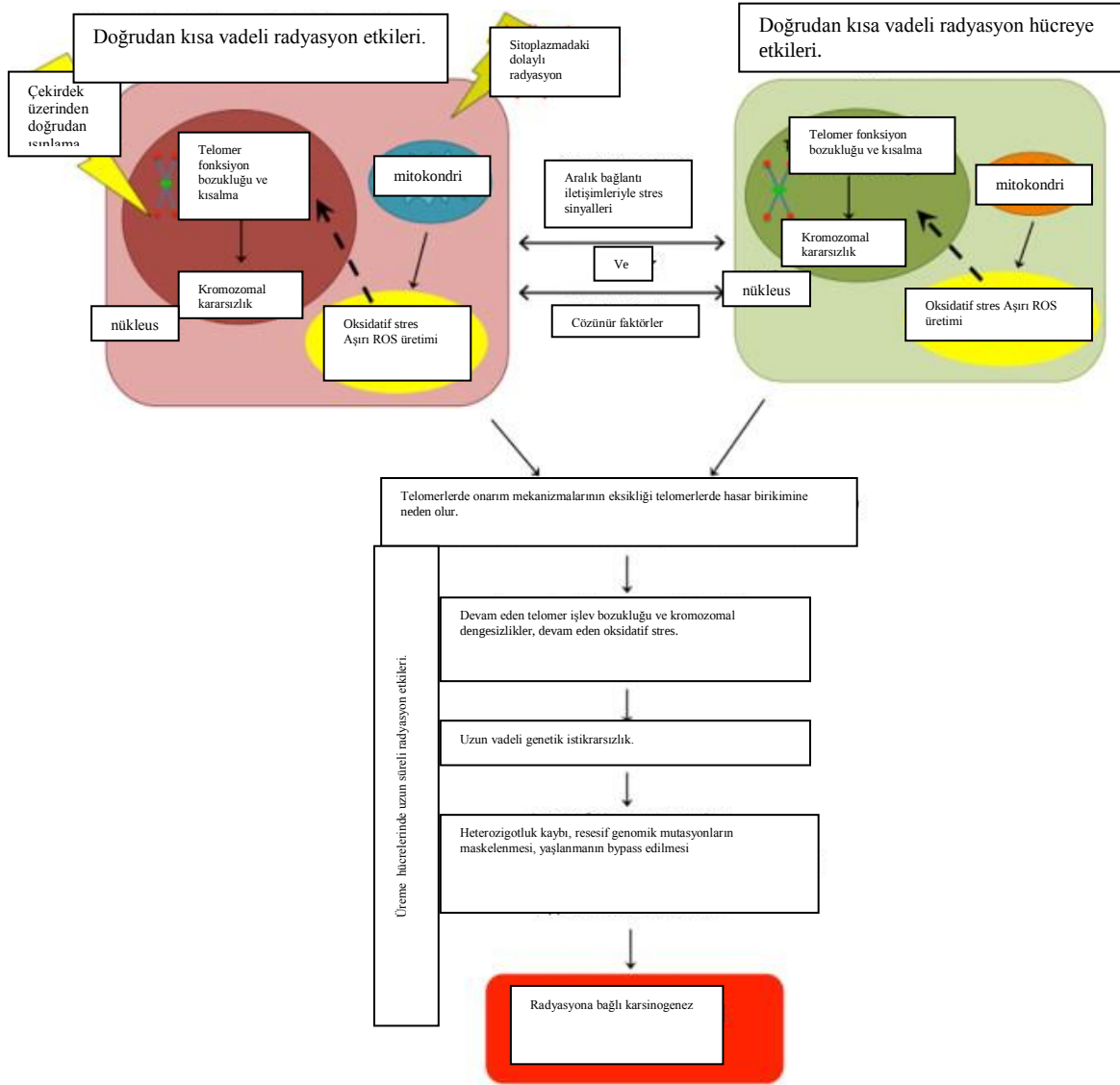
Yüksek lineer enerjili IR (ağır iyonlar vb.) biyomoleküllerde doğrudan enerji birikimi yaparak hasarın çoğundan sorumludur. Düşük lineer enerjili IR (örneğin X-ışınları, γ -

ışınları) hücre içi su moleküllerinin iyonlaşması ile hasar oluşturur. Dolayısıyla düşük lineer enerjili IR, ROS ve serbest radikaller üretmek suretiyle hücrelerde hasarın % 70-80'inden sorumludur. Süperoksit anyonu, hidroksil radikalleri, hidrojen peroksit ve tekli oksijen gibi reaktif oksijen türleri membran lipidlerinin oksidasyonu, amino asit modifikasyonu ve DNA hasarı gibi bir çok lezyona neden olmaktadır. Düşük IR dozlarının neden olduğu DNA hasarının çoğunluğunu DNA baz modifikasyonları ve baz hasarı oluşturur. Daha yüksek dozlarda ise DNA tek iplik kırıklıkları, çift iplik kırıklıkları ve kümelenmiş DNA lezyonları oluşur (Şekil2.8) (Bala 2014).



Şekil 2.7 DNA yapısına UV etkisi ve onarımı (Munoz *et al.* 2017)

Kimyasal maddeler ve DNA Hasarı; DNA hasarına neden olan önemli faktörlerden biri de kimyasal maddelerdir. Bu bağlamda endüstriyel kirlilik ve gıda kontaminasyonu günümüzde daha da önemli konular haline gelmiştir. Çünkü bu faktörler sağlık konusunda olumsuz etki risklerini artırmaktadır. Yabancı kimyasallar veya ksenobiyotikler yaşam alanımızın her yerinde bulunmaktadır. Örneğin günlük yaşamda dioksin, nikotin, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve aflatoksinler gibi farklı ksenobiyotik çeşitleri bulunur.



Şekil 2.8 Radyasyon ve etkileri (Shim *et al.* 2014)

Ksenobiyotiklere uzun süreli maruz kalma ve maruz kalma yolları nedeni ile hastalık gelişiminin başlatılması insan sağlığını yavaşta olsa olumsuz etkilemektedir. Nitekim epidemiyolojik olarak yapılan çalışmalarda cilt teması, yutma ve soluma yoluyla günlük PAH'lara maruz kalmanın metabolik hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve kanseri tetikleyebileceği gösterilmiştir.

İnsan vücuduna giren ksenobiyotikler dört aşamadan geçer; bunlar absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve eliminasyondur. Metabolizma evresi ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda ve biyoaktivasyonunda önemli bir rol oynamaktadır.

Ksenobiyotikleri ve ilaçları metabolize eden enzimler tarafından gerçekleştirilen metabolizma evresi Faz I (oksidasyon, indirgeme ve hidroliz reaksiyonları) ve Faz II (konjuge reaksiyonlar) enzimleri ile yürütülür. Ancak bazı durumlarda Faz I enzimler tarafından metabolize edilen ksenobiyotiklerden DNA mutasyonunu ve karsinogenezi indükleyecek reaktif veya mutajenik metabolitler oluşabilir. Örneğin aflatoksin B1 mutajenik aflatoksin-8-9-epoksiye CYP3A4 ile metabolize olur (Wu *et al.* 2017). Çevresel kimyasallardan kansere neden olan en yaygın kimyasal tütün ürünleridir. Bu ürünler ağız boşluğu, akciğer ve diğer dokular olmak üzere çeşitli dokularda kanserlere neden olmaktadır (Yavuz 2013).

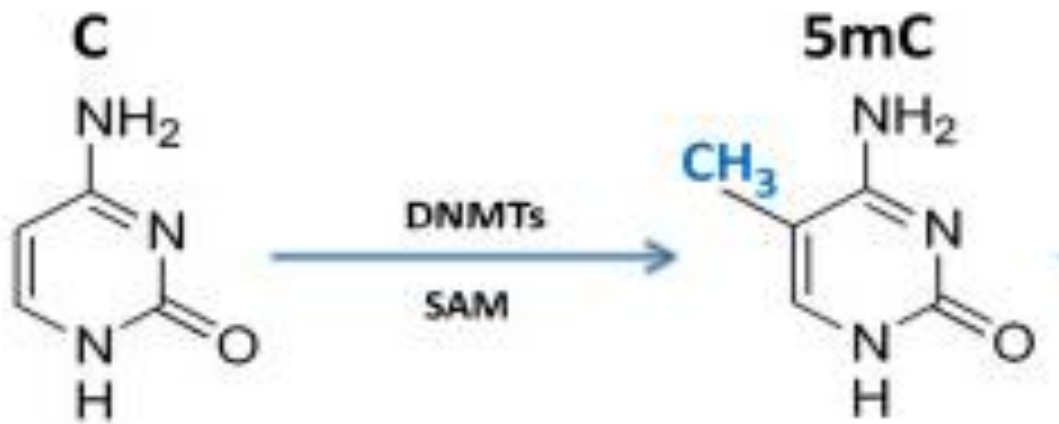
2.5.2 Endojen Kaynaklı DNA Hasarı

Endojen kaynaklı DNA hasarı etmenleri arasında deaminasyon, metilasyon, oksidatif stres gibi organizmada oluşabilecek durumlar sayılabilir.

Deaminasyon; nükleik asit ipliklerindeki bazların deaminasyonu endojen veya ekzojen ajanlara maruz kalındığında doğal hidroliz tarafından uyarılan spontan bir olaydır. İnsanlarda deaminasyon olayları, inflamasyon sırasında makrofajlar tarafından üretilen nitrik oksit ve süperoksitler tarafından uyarıldığı düşünülmektedir. Orijinal bazlarla eşlenebilen deaminasyon ürünleri replikasyon sırasında potansiyel olarak mutajenik olabilir. Örneğin sitozin deaminasyon ürünü olan deoksiüridin, urasilin deoksiriboz halkasına tutturulmuş bir nükleosiddir. Bu deaminasyon ürünü urasil-DNA glikosilazı ile başlatılan baz eksizyon onarımı (BER)'na maruz bırakılır (Kuraoka 2015).

Dört DNA bazından üçü sitozin, adenin ve guanin amino gruplarına sahiptir ve bunların deaminasyonuna sırasıyla karşılık gelen baz analogları urasil, hipoksantin ve ksantindir. Tek sarmal DNA'da adenin deaminasyonu fizyolojik koşullar altında sitozin deaminasyonundan çok daha düşük bir oranda gerçekleşirken, çift sarmallı DNA (dsDNA)'da adenin deaminasyon hızı sitozin deaminasyonu ile benzerdir (Kuraoka 2015).

Metilasyon; DNA metilasyonu, 5-metil sitozin oluşturmak için sitozin halkasının 5. karbonuna bir metil grubunun kovalent olarak bağlanmasını içerir (Şekil 2.9) (Ramakrishnan and Bose 2016). DNA metilasyonu genel olarak sitozin-fosfat-guanin (CpG) bölgelerinde meydana gelir ve protein fonksiyonu, gen ekspresyonunu ve RNA işlenmesini düzenler (Hua *et al.* 2017). Diyet, genetik varyasyon, yaşlanma gibi çevresel ve genetik faktörler, metil CpG bağlayıcı protein 2'yi ve DNA metil transferazları çeşitli promotörlere yönlendirerek, promotör CpG metilasyonunu etkileyebilen oksidatif stresi tetikler (Sundar *et al.* 2017).

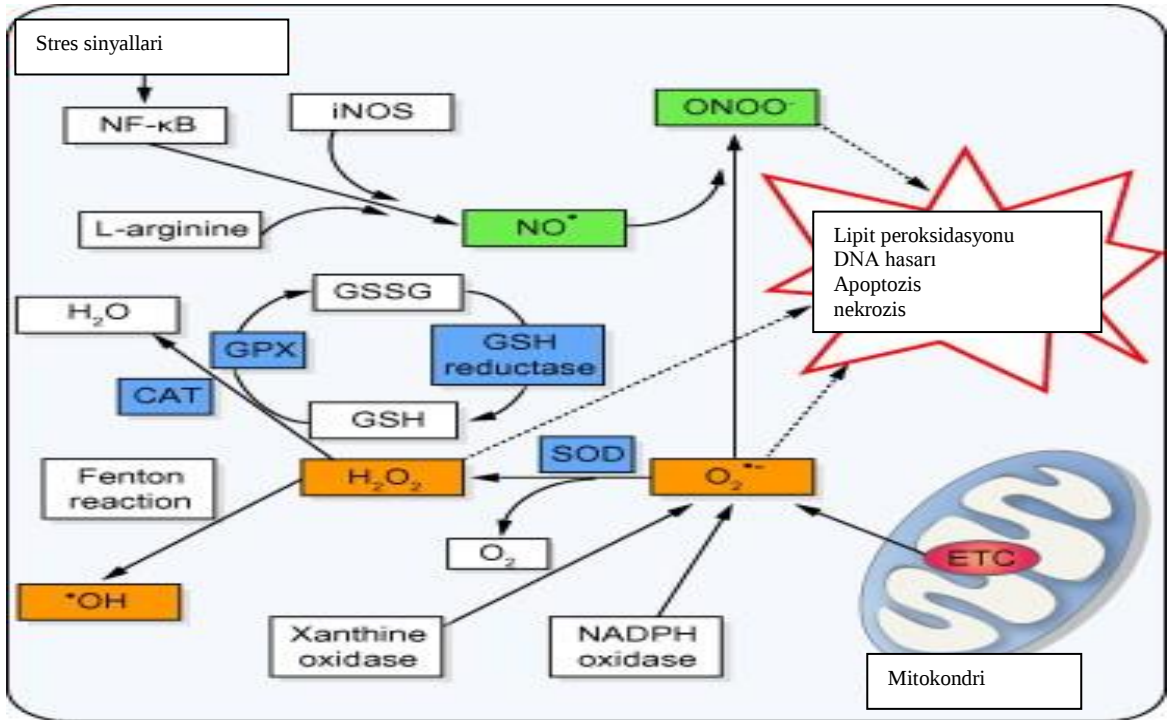


Şekil 2.9 Sitozinin Metillenmesi (Zampieri *et al.* 2015)

Bir CpG adası DNA'daki CpG alanlarının uzantısı olup, bir genin promotör bölgesindeki CpG adası metillenince gen ifadesi kapanır. DNA metilasyonunun, DNA'nın eğrilik, sertlik ve esneklik gibi bazı fiziksel özelliklerini etkilediği ve bunun da transkripsiyon inhibisyonu ile ilişkili olabileceği saptanmıştır. Anormal DNA metilasyonu (hipo ve hiper metilasyon) birçok insan hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. Tümör baskılayıcı genler normal durumlarda genom içinde aktiftir ancak DNA hipermetilasyonu ile bu genler susturulur. Genomda kansere neden olabilecek genler promotör bölgelerindeki hipometilasyona bağlı olarak açılırlar (Ramakrishnan and Bose 2016).

Oksidatif Hasar; oksidatif stres, lipidler, DNA ve proteinler gibi makromoleküllerin oksidasyon ile yükseltgenmesidir (Vida *et al.* 2017). Oksidatif streste reaktif oksijen

türlerinin (ROS) üretimi ve bertarafı arasındaki dengesizlik Huntington hastalığı, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı ve amiotrofik lateral skleroz gibi çeşitli nörodejeneratif bozukluklarda önemli bir faktördür (Guadagno *et al.* 2017). ROS'lar olarak bilinen serbest radikaller, en dıştaki yörüngesinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içerir. ROS'lara örnek olarak süperoksit anyon (O_2^-), peroksil ($ROO\cdot$), hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksil radikali (ROO^-), ozon (O_3) ve reaktif hidroksil (OH^-) verilebilir (Verma *et al.* 2014).



Şekil 2.10 ROS'ların oluşumu (Tell *et al.* 2013)

ROS'lar; lipidler, proteinler, DNA ve diğer biyolojik makromoleküllerin yapısını zayıflatarak organizmaların yaşamı ve sağlığı için tehdit oluşturmaktadır. Oksidatif stresin neden olduğu en büyük tehdit DNA hasarının oluşması ve en önemlisi de DNA çift iplik kırıklıklarıdır. DNA çift iplik kırıklıkları DNA'nın her iki ipliğinde olduğundan özellikle hücre canlılığı etkilemektedir (Meter *et al.* 2016). Oksidatif stres sonucu oluşan DNA hasar düzeyleri çeşitli yöntemlerle belirlenebilir. Bu yöntemlerden en çok kullanılan Komet yöntemidir.

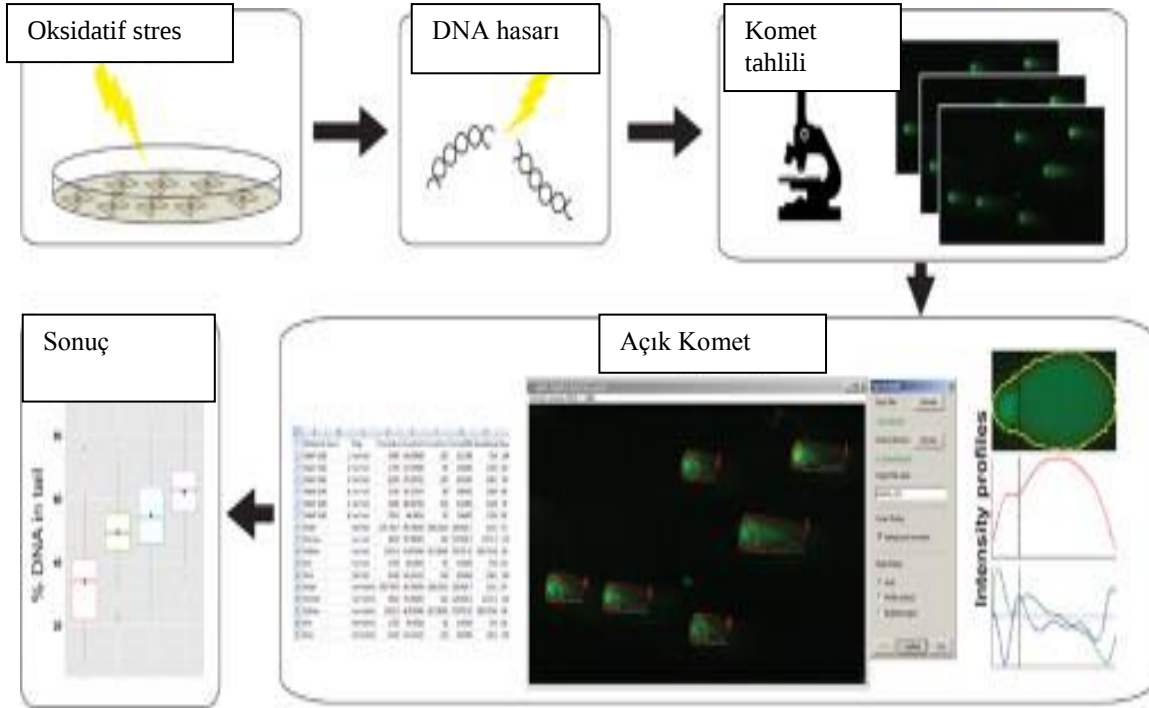
2.5.3 Komet Yöntemi

Hücrelerde bulunan DNA; UV, radyasyon, reaktif oksijen (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) gibi birçok çevresel etmen ve kimyasalların saldırısına uğrar. Büyük hastalıkların etiyolojisiyle DNA hasarının ilişkili olduğu gösterilmiştir. Özellikle nörodejeneratif hastalıklar, yaşlanma ve kardiyovasküler hastalıklarla oksidatif DNA hasarı ilişkilendirilmiştir. Karsinogenezin çeşitli evrelerinde DNA hasarı patolojik açıdan incelenmiştir. Oksidatif DNA hasarı, sigaranın, kanserojenlerin, besinlerle alınan antioksidanların veya UV ışınlarının insan sağlığına etkisinin izlenmesinde önemli bir kriter olarak düşünülür. Oksidatif DNA hasarının ölçülmesi için çeşitli yöntemler önerilmiş olsada Komet tahlili spesifik olarak bütün DNA hasarlarını ölçmek için kullanılır (Gyori *et al.* 2014).

Komet yöntemi *in vitro* ve *in vivo* olarak DNA hasarının değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Dalrymple *et al.* 2015). Hızlı, güvenilir ve basit bir biyokimyasal teknik olması komet yönteminin son yıllarda geliştirilmesini sağlamıştır (Darrag and Fayyad 2014). Tek hücreli jel elektroforezi (SCGE) olarak da bilinmektedir. Komet yönteminin temel ilkesi basittir. Agaroz jel içine gömülmüş hücrelerin parçalanmasından sonra elektroforez işlemi ile yürütülmesine dayanır. Elektroforez işlemi anında hasar görmemiş DNA'lar oldukları yerde kalırken, kırıklar ortaya çıkar. Kırılmış DNA parçaları kuyruklu yıldız şeklinde bir yapı oluşturarak anado doğru uzanır. Daha sonra bu kuyruklu yıldız şeklindeki DNA, DNA bağlayıcı bir boya (örneğin etidyum bromur) kullanılarak görünür hale getirilir. DNA'da oluşmuş hasarın derecelerini değerlendirmek için kuyruklu yıldızın şekli, boyutu ve içindeki DNA miktarı ölçülür. Komet yönteminin analiz protokolü çeşitleri DNA çapraz bağları, tek iplik kırıkları ve çift iplik kırıklarının ölçülmesidir.

Komet yönteminin özellikleri numune başına az bir miktar hücreye ihtiyacının olması ve bireysel olarak veri sağlamasıdır. Komet yöntemi biyolojik gözlem, radyasyon biyolojisi, çevresel toksikoloji, beslenme çalışmaları ve kanser çalışmaları da dahil olmak üzere DNA hasarının incelenmesinde kullanılır. Komet yönteminde kuyruklu

yıldızların skorlanması görsel olarak veya görüntü analiz yazılımları ile değerlendirilebilir (Gyori *et al.* 2014).



Şekil 2.11 Komet Yönteminin Aşamaları (Gyori *et al.* 2014).

2.6 Sideritis

Sideritis cinsi, Lamiaceae familyasından olup dünya üzerinde 150'den fazla türle temsil edilmektedir (Çelik *et al.* 2016). *Sideritis* türleri İber Yarımadası, Akdeniz ülkeleri, Orta Doğu ve Kuzey Afrika coğrafyasında bulunur (Brankovic *et al.* 2011). 20-75 cm boylarında orta ve subtropik bölgelerde yayılış alanına sahip bir çalıdır (Korkmaz 2015). *Sideritis* türleri aromatik ve tıbbi özellikte olup çok yıllık veya tek yıllık türlerdir.

2.6.1 Sideritis Türlerinin Türkiye Coğrafyasında Dağılımı

Ülkemizde 46 tür ile temsil edilmekte olan *Sideritis* cinsi, % 77.5 endemizm oranına sahiptir. Güney ve Batı Anadolu bölgelerimizde genel olarak yayılış göstermektedir

(Korkmaz 2015). Anadolu coğrafyasında aromalarından dolayı ‘‘dağ çayı’’ veya ‘‘yayla çayı’’ olarak isimlendirilmiş ve çay olarak tüketilmiştir.

Sideritis türleri birçok etkisi bulunmakla birlikte anti-oksidan, analjezik, anti-proliferatif, anti-inflamatuar, anti-ülserojenik anti-viral ve anti-apoptotik gibi birçok biyolojik etkiyede sahiptir (Çelik *et al.* 2016, Gonzalez-Burgos *et al.* 2016). Halk arasında tıbbi amaçlı olarak *Sideritis* türleri ateş düşürücü, sinir uyarıcı, sindirim düzenleyici, idrar söktürücü, kanamayı durdurucu, yaralanmalarda kan durdurucu ve enfeksiyon hastalıklarında kullanılmıştır (Çarıkçı 2010).

Sideritis akmanii türü Afyonkarahisar ili Kumalar yaylası ile Şuhut-Sadıklı ilçelerinde bulunmaktadır. Tür ülke endemiklerimizdendir (Resim) (Duman *et al.* 1995).



Resim 2.1 *Sideritis akmanii*

Sideritis türlerinin kimyasal bileşenlerinde birçok kimyasal tanımlanmış olup; uçucu yağlar, lignanlar, terpenler, kumarinler, flavonoidler, steroller ve iridoidler bunlardan bazılarıdır (Ballı 2012). Foliol, linearol ve sidol *Sideritis* türlerinde en yaygın bulunan diterpenlerdir (Gonzalez-Burgos *et al.* 2016).

2.6.2 *Sideritis* Türlerinin Fitokimyasal Bileşenleri

2.6.2.1 Terpenler

Bitki ve hayvanların sentezlediği sekonder metabolitlerden olan terpenler, çok çeşitliliğe sahip organik moleküllerdir. Kozalaklı çam reçinesinde elde edilen turpentinden gelen terpen isminde –en eki olefinik bağa sahip olduğunu göstermektedir (Çarıkçı 2010).

Çam ağaçları, okaliptüs, limon otu, zambak, kişniş, kimyon, lavanta, turunçgil, nane, menekşe, biberiye, gül, kekik gibi bitkiler ve bu bitkilerin yaprak, kök, gövde, meyve, yumru, çiçek ve tohumları, baharatlı tatları ve kokuları ile biliniyorlar. Bitkilerin bilinen bu özellikleri barındırdıkları terpenlerden gelmektedir. Terpenler destilasyon veya ekstraksiyon yolu ile bitkilerin tamamından veya bir kısmından elde edilir. Bu ekstratlar aynı zamanda uçucu yağlar olarak bilinirler ve birçok alanda kullanımları vardır (Bozdaş 2012).

Terpenlerin sınıflandırılmasında 2-metil-1,3-bütadien (izopren) alt birimlerinin sayısına göre terpenler; hemiterpenler, monoterpenler, seksiterpenler, diterpenler, sesterpenler, triterpenler, tetraterpenler ve politerpenler olarak yapılmıştır (Özyağcı 2015). Foliol, linearol ve sidol, *Sideritis* türlerinde en yaygın bulunan diterpenlerdir (Gonzalez-Burgos *et al.* 2016). Örneğin *Sideritis akmanii*'den linearol (ent-3 β ,7 α -dihidroxy-18acetoxykaur-15-ene), isolinearol (ent-3 β ,7 α -dihidroxy-18acetoxykaur-15-ene), foliol (ent-3 β ,7 α ,18-trihidroxykaur-16-ene), isofoliol, sideridiol (ent-7 α ,18-dihidroxykaur-15-ene) ve sideroxol (ent-7 α ,18-dihidroxy-15 β ,16 β -epoxykaurane) gibi diterpenler izole edilmiştir (Çarıkçı 2010).

2.6.2.2 Flavonoidler

Flavonoidler bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan çok çeşitli polifenolik bir gruptur. Özellikle yaprakların renklenmesinden sorumlu olsalar da bitkilerde hemen hemen her yerde bulunurlar. İnsanların tükettiği meyvelerin, sebzelerin ve çayların renklenmesine

ve tatlanmasına katkı sağlarlar (Dhiman *et al.* 2016). Bitkilerden türetilen sekonder metabolitler olup günümüze kadar 7000'den fazla flavonoid saptanmıştır (Akimoto *et al.* 2017). Kimyasal yapılarına göre flavonollar, flavanonlar, flavonlar, flavonoller, izoflavonoidler ve antosiyanidinler olmak üzere 6 gruba ayrılmışlardır (Hoensch and Oertel 2015). Flavonoidlerin anti-kanser, anti-oksidatif, anti-diyabetik, anti-obezite ve anti-inflamatuar etkileri olup insülin direncini de arttırdıkları belirlenmiştir (Nishina *et al.* 2017).

2.6.2.3 Lignanlar

Lignanlar, iki fenilpropanoid birimin oksidatif dimerizasyonu ile üretilen bir sekonder bitki metaboliti sınıfıdır (Rezende *et al.* 2011). Lignanların biyolojik özellikleri kimyasal yapısında bulunan çeşitli stereogenik merkezlerin stereokimyasıyla yakından ilişkilidir. Bu bağlamda literatürde antitümör, antiviral, antidepresan, anti-inflamatuar, kardiyovasküler, antiviral, trypanosidal ve analjezik gibi birçok biyolojik aktiviteleri bildirilmiştir (Rezende *et al.* 2011, 2016).

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

3.1.1 Cihazlar

- RT-PCR (Stratagene Mx3005P QPCR sistemi, ABD)
- ELISA (Absorbance Reader ELx800)
- Hassas Terazı (Sartorius, Germany)
- Vortex (IKA, USA)
- Vakum Pompası (KNF Neuberger, Germany)
- Pikofüj (Roth, Taiwan)
- Floresan Mikroskop (Olympus, Japan)
- Mikroskop (Olympus, Japan)
- Santrifüj (Hettich, Germany)
- Saf Su Cihazı (GFL 2102, Germany)
- Laminer Kabin (JSR, Korea)
- Benmari (GFL, Germany)
- CO₂ İnkübatörü (Panasonic, Japan)
- Canlı Hücre Görüntüleme Mikroskobu (JULI Br, Korea)
- Elektforez (Thermo Scientific EC 1000-90, USA)
- Otoklav (Jeio tech, Korea)
- pH metre (Hanna instruments, Romania)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Soxhlet (FALC Instruments, Italy)

3.1.2 Kimyasallar

- DMEM (Sigma, USA)
- FBS (Sigma, USA)
- Penisilin-streptomisin (Sigma, Israel)
- NEFA (Sigma, USA)
- Tripsin-EDTA solüsyonu (Sigma, USA)

- Tripan BLUE solüsyonu (Sigma, USA)
- DMSO (Sigma, China)
- PBS (Sigma, Germany)
- Etil alkol (Sigma-Aldrich, Germany)
- MTT (Sigma, USA)
- Beta Mercaptoetanol (Sigma, Germany)
- LMA (Sigma, USA)
- NMA (Sigma, USA)
- NaCl (Sigma-Aldrich, Germany)
- Etidyum bromür (Vivantis, USA)
- Aseton (Carlo Erba Reagenti, Italy)
- NaOH (AppliChem, Germany)
- EDTA (Sigma, USA)
- Trisma Base (Sigma, USA)
- Triton X-100 (Sigma, USA)
- Thapsigargin (Sigma, USA)

3.2 *Sideritis akmanii* ekstraksiyonu

Bitkiler Afyonkarahisar ilinin Şuhut ilçesi kırsalında bulunan Kumalar Yaylasından, çiçeklenmenin en yüksek düzeyde olduğu 16 Temmuz 2015’de toplandı. Toplanan bitkilerin Doç. Dr. Mustafa KARGIOĞLU tarafından tür tayinleri yapıldı. Tür tayinleri yapılan bitkiler laboratuvara getirilerek karanlık ve serin bir ortamda kurumaları sağlandı. Kuruyan birkiler blender yardımıyla toz haline getirildi. Bitki tozlarından 20 g tartılarak 250 mL aseton ile soxhlet cihazında 24 saat süreyle ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyon işleminden sonra aseton uzaklaştırılarak ekstrakt kazınarak toplandı ve +4^o C’de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

3.3 Hücre Kültürü

Çağımızda moleküler biyoloji, biyokimyasal ve sitogenetik çalışmalar için araştırma veya tanı amacıyla hücre kültürleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücre kültüründe

amaç hücreleri yaşatmak, çoğaltmak ve ilerleyen zamanlarda kullanılmak üzere dondurup saklamaktır. Günümüzde hücre kültürlerinde araştırma amacı ile yapılan çalışmalar daha çok yer bulmaktadır (Yükselten 2012).

Hücre kültürü teknolojisi; viral enfeksiyonlar, kronik hastalıklar için önlem almak, kanser ve çeşitli hastalıkların tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Aşı imalatı ve virüs üretimi içinde hücre kültürleri genellikle tercih edilmektedir. Ekonomik, etkili ve güvenilir bir yöntemdir. Kontrollü olarak hücrelerin incelenmesini sağlar (Yılmaz 2014).

Çalışmalarda kullanılan MCF-7 hücre hattı Eskişehir Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümünden temin edildi.

3.3.1 Hücre Kültürü Mediyumunun Hazırlanması

Çizelge 3.1. Mediyumun Hazırlanması

Kimyasal	Miktarı
FBS	% 10
Penisilin-streptomisin	% 1
NEFA	% 1
DMEM	% 88

Kimyasallar 0,20 µm çapındaki filtreden (Millipore) vakum yardımı ile geçirilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan mediyum kullanılıncaya kadar +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.3.2 MCF-7 Hücrelerinin Kültüre Aktarılması

- Donmuş halde kryo tüp içerisinde bulunan hücreler 37° C’deki sıcak su banyosunda 1-2 dk süre ile çözündürülmüştür.
- Çözünen hücreler, içerisinde 3 mL mediyum bulunan 15 mL’lik falkona alınmıştır. Ardından 800 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj işleminden sonra süpernatant atılıp, hücrelerin üzerine 1 mL mediyum

eklenmiş ve hafifçe pipetaj yapılmıştır. İçerisine % 20 FBS içeren DMEM konulmuş (5 mL), 25 cm²'lik iki flaska aktarılmıştır.

- Hücreler üremesi için 37⁰ C ve % 5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılmıştır.

3.3.3 MCF-7 Hücrelerinin Pasajlanması

- Flasklar içinde hücrelerin konfluent oranı % 80-90 olduğunda pasajlama işlemine geçilmiştir.
- Hücrelerin üzerindeki mediyum steril pipet yardımıyla alınıp atılmıştır.
- Hücrelerin üzerine 37⁰ C olan 3 mL tripsin-EDTA eklenmiş ve flask yüzeyinin her tarafına yayılması sağlanmıştır.
- Ardından flasklar 37⁰ C ve % 5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılıp 4-6 dk ünkübe edilmiştir.
- Hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldıkları gözlemlendiğinde flasktan alınarak içerisinde 3 mL mediyum olan falkonlara aktarılmıştır.
- Falkonlar 800 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj işleminin ardından hücreler tekrar 3 mL mediyum ile yıkanmıştır.
- Süpernatant atılıp pellet üzerine 2 mL mediyum eklenmiş ve hafifçe pipetaj yapılmıştır.
- Ardından içerisinde 15 mL mediyum bulunan 75 cm²'lik flasklara 0,5 mL olacak şekilde paylaştırılmıştır.
- Flasklar 37⁰ C ve % 5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırılmıştır.

3.3.4 MCF-7 Hücrelerinin Sıvı Azotta Saklanması

- Flask yüzeyinde hücre yoğunluğu % 80-90 olduğunda mediyum atıldı.
- Hücrelerin üzerine 4 mL tripsin-EDTA eklenerek flask yüzeyinin her tarafına yayılması sağlandı.
- Flasklar 37⁰ C ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde 4-6 dk ünkübasyona bırakıldı.
- Hücreler flask yüzeyinden kalkınca içerisinde 4 mL mediyum bulunan falkonlara alındı.
- Falkonlar 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.

- Süpernatant atılarak pellet üzerine 4 mL mediyum eklendi ve pellet mediyum yardımıyla çözdürüldü.
- 800 rpm’de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılarak pellet üzerine soğuk % 5 DMSO içeren FBS eklendi.
- Hücreler buz içerisinde bulunan kryo tüpe alındı.
- Sıvı azotta dondurularak ilerleyen zamandaki çalışmalar için saklandı.

3.3.5 Tripan Blue Yöntemi ile Hücre Sayımı

- Flask yüzeyinde hücre yoğunluğu % 80-90 olduğunda mediyum atıldı.
- Hücrelerin üzerine 4 mL tripsin-EDTA eklenerek flask yüzeyinin her tarafına yayılması sağlandı.
- Flasklar 37° C ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde 4-6 dk ünkübasyona bırakıldı.
- Hücreler flask yüzeyinden kalkınca içerisinde 4 mL mediyum bulunan falkonlara alındı.
- Falkon 800 rpm’de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılıp hücrelerin üzerine 2 mL mediyum eklendi ve hafifçe pipetaj yapıldı.
- Hücre süspansiyonundan 50 µL alınarak, 50 µL tripan blue ile karıştırıldı.
- Karışım 5 dk inkübasyona bırakıldı.
- Karışımından thoma lamına 10 µL aktarılarak sayım yapıldı.
- Canlı hücreler parlak görünürken ölü hücreler maviye boyandı.
- Süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{Toplam canlı hücre sayısı/mL} = \text{Sayım sonucu} \times 10^4 \times 2$$

3.4 MTT Yöntemi

Hücre proliferasyon testlerinde metabolik aktivitenin ölçümü ve sitotoksitenin değerlendirilmesinde metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) tuzları yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemin ilkesi MTT boyasının tetrazolium halkasının parçalanabilmesine dayanmaktadır. MTT absorbe olduğu canlı hücrelerde

mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enziminin katalizlediği reaksiyonla mor-mavi renkli ve suda çözünmeyen formazana indirgenir. Yalnız mitokondrinin aktif olduğu hücrelerde formazan kristalleri görülmektedir. Formazan kristallerinin varlığı canlılığın olduğunu göstermektedir ve yaşayan hücreler ile spektrofotometrik olarak ilişkilendirilmektedir (Yıldırım Biçer 2011, Beytur *et al.* 2011, Terzioğlu *et al.* 2013).

3.4.1 MTT'nin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan MTT solüsyonu 5 µg/mL konsantrasyonunda hazırlandı. MTT'nin çözündürülmesinde pH 7,4 olan PBS kullanıldı. Hazırlanan MTT çözeltisi 0,22 µm filtreden geçirilerek steril hale getirildi. MTT solüsyonu her kullanımda taze hazırlandı.

3.4.2 MTT Yöntemi ile *Sideritis akmanii*'nin LD₅₀ Dozunun Belirlenmesi

- Önce well planı yapıldı.
- Sonra wellere uygun hacimlerde (2 mL) mediyum konuldu.
- Hücre sayısı hesaplanmış süspansiyondan 24'lük plağın her bir oluğuna 1×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı.
- Ekimin ardından plak 37° C ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi.
- Hücrelerin plak yüzeyinde yoğunluğu % 50-60 olduğunda *Sideritis akmanii* ekstresi 1000, 750, 500, 250, 100, 50 ve 10 µg/mL olacak şekilde uygulandı.
- Kontrol olarak % 1 DMSO kullanıldı.
- Plak inkübatöre kaldırılıp 37° C ve % 5 CO₂ ortamında 24 inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyondan sonra MTT solüsyunu % 10 olacak şekilde 200 µL eklendi ve 3 saat tekrar inkübe edildi.
- Plak kuyucuklarındaki mediyum pipet yardımıyla çekilip uzaklaştırıldı.
- Plaktaki kuyucuklara formazan kristallerini çözen DMSO 600 µL olacak şekilde eklendi.
- Plak 10 dk inkübasyona tabi tutuldu.
- Çözünen formazanlar mikropalak okuyucu spektrofotometre (µ- Quant, BioTek Instruments, USA) ile 540 nm absorbans değerinde 3 tekrarlı olarak ölçümleri yapıldı.

3.5 Thapsigargin ile ER Stresinin Oluşturulması

3.5.1 Thapsigargin Hazırlanması

- 1 mg thapsigargin 153,66 µL steril DMSO ile çözülürülerek stok hazırlanmıştır.
- Stoktan seri dilisyonlarla 10^{-8} M thapsigargin elde edilmiştir.
- Kullanılincaya kadar -80°C 'de bekletilmiştir.

3.5.2 ER Stresinin Oluşturulması

- Kullanılacak dozlar ve kontrol için 25 cm^2 'lik flasklara 5 mL mediyum ve 2×10^5 hücre eklendi.
- Konfluent oranı % 50-70 olduğunda her bir flaska 50 µL 10^{-8} M thapsigargin uygulandı.
- 18 saat 37°C 'de ve % 5 CO_2 'li inkübatöre kaldırıldı.
- 18 saatin sonunda mediyum uzaklaştırılıp doz uygulamasına geçildi.

3.5.3 *Sideritis akmanii* Ekstresinin Uygulanması

- ER stresi oluşturulmuş ve oluşturulmamış flasklara SAE 10, 50 ve 100 µg/mL dozları uygulandı.
- 24 saat 37°C 'de ve % 5 CO_2 içeren inkübatöre kaldırıldı.
- 24 saatin sonunda RNA izolasyonuna geçildi.

3.6 RNA İzolasyonu

Toplam RNA, RNAeasy kiti ile ekstrakte edildi.

- Hücrelerin üzerinde bulunan mediyum pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
- Hücreler 2-3 ml PBS ile yıkandı.
- Hücrelerin üzerine 400 µL RL buffer (Beta mercaptoetanol ile hazırlandı) eklendi.

- Hücreler kazıyıcı ile kazınarak homogenization spin-column tüpüne alındı.
- Sonra 15000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi ve tüpün üst kısmı atıldı.
- Tüpün alt kısmına 300 µL % 70'lik etanol eklendi ve pipetaj yapıldı.
- Homogenization spin-column tüpündekiler RNA binding-column tüpüne aktarıldı.
- Sonra 12000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı.
- Üzerine 400 µL wash DN1 eklendi ve 12000 rpm'de 1dk santrifüj edildi.
- 650 µL wash RBW eklendi ve 12000 rpm'de 1dk santrifüj edildi.
- Tekrar 350 µL RBW eklenip 12000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi.
- RNA binding-column tüpünün filtre olan kısmı steril ependorfa aktarıldı.
- Üzerine 50 µL RNase-free water eklendi.
- 12000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi ve ependorf - 20° C'ye kaldırıldı.
- RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu A260/A280 absorbans oranları temelinde nanodrop UV-spektrofotometre ile ng/µl olarak teyit edildi.

3.7 cDNA Sentezi

cDNA üreticinin protokolüne göre cDNA Sentez kiti (Thermo Scientific) ile üretilmiştir.

- İzole edilen RNA'lardan 1,25 µg RNA alındı ve DEPC (dietilpirokarbonat)'li su ile 10 µL'ye tamamlandı.
- Üzerine 1 µL oligo(dT)18 primer eklendi ve pikofüj yapıldı.
- Ardından 65° C'de 5 dk inkübe edildi.
- İnkübasyon işleminden sonra 4 µL reaksiyon buffer, 1 µL Ribolock RNase inhibitörü, 2 µL dNTP ve 1 µL revers transkriptaz enzimi eklenerek pikofüj yapıldı.
- 42° C'de 60 dk ve 70° C'de 5 dk inkübe edilip – 20 ° C'de soğutuldu.

3.8 Real Time PCR Analizleri

- Üretici firmanın belirtmiş olduğu doğrultuda Forward ve Reverse primerler

distile su ile sulandırılarak stok primerler hazırlandı.

- Hazırlanan stok primerler – 20⁰ C’de saklandı.
- Her bir örnek için 7 µL distile su, 1 µL forward primer, 1 µL reverse primer ve 10 µL SYBR green mikrosantrifüj tüpüne konuldu.
- Mirosantrifüj tüpü hazırlanan karışımın homajen olması için vortekslendi.
- Ardından pikofül ile santrifüjlendi.
- PCR karışımı her bir örnek için lightcycler kapiller tüplere 19 µL olacak şekilde aktarıldı.
- Üzerine 1 µL cDNA’lar eklenerek pikofüjde kısa süreli santrifüjlendi.

Çizelge 3.2. Real time PCR analizinde kullanılan genler ve primerler.

Genler	Primerler
B-actin	F: 5'-CACCCCAGCCATGTACGTTGC-3' R: 5'-CCGGAGTCCATCACGATGCCA-3'
IFN-γ	F: 5'-GCAATCTGAGCCAGTGC-3' R: 5'-TTTGGAAGCACCAGGCA-3'
TNF-α	F: 5'-GAGTGACAAGCCTGTAGCCCA-3' R: 5'-GCTGGTTATCTCTCAGCTCCACG-3'
IL 12	F: 5'-GACCCAGGAATGTTCCCATGC-3' R: 5'-TTTCTGGAGGCCAGGCAACTC-3'
IL-6	F: 5'-GGTACATCCTCGACGGCATCT-3' R: 5'-GTGCCTCTTTGCTGCTTTTCAC-3'
IL-8	F: 5'-GACAAGAGCCAGGAAGAAAC-3' R: 5'-CTACAACAGACCCACACAATAC-3'
Grp78	F: 5'-GCCTGTATTTCTAGACCTGCC-3' R: 5'-TTCATCTTGCCAGCCAGTTG-3'
PERK	F: 5'-CCCCAACAAGGCCAGCCTGG-3' R: 5'-GGACAGCCAGCCGTGTTCCC-3'
ATF4	F: 5'-TCAAACCTCATGGGTTCTCC-3' R: 5'-GTGTCATCCAACGTGGTCAG-3'
ATF6	F: 5'-CTCCGAGATCAGCAGAGGAA-3' R: 5'-AATGACTCAGGGATGGTGCT-3'

PCR uygulamaları thermo-cycler cihazında β-actin geni için 95⁰ C’de 10 dk, 94⁰ C’de 1 dk, 61⁰ C’de 1 dk ve 72⁰ C’de 1 dk olacak şekilde çalışıldı. ATF6, PERK, ATF4 ve IL6 için 95⁰ C’de 10 dk, 94⁰ C’de 1 dk, 60⁰ C’de 1 dk ve 72⁰ C’de 1 dk olacak şekilde çalışıldı. Grp78 için 95⁰ C’de 10 dk, 95⁰ C’de 30 sn, 58⁰ C’de 1 dk ve 72⁰ C’de 30 sn olacak şekilde çalışıldı. TNFα ve IL12 için 95⁰ C’de 10 dk, 95⁰ C’de 30 sn, 54⁰ C’de 1

dk ve 72⁰ C’de 30 sn olacak şekilde çalışıldı. IFN- γ ve IL8 için 95⁰ C’de 10 dk, 95⁰ C’de 30 sn, 56⁰ C’de 1 dk ve 72⁰ C’de 30 sn olacak şekilde 40 döngü olarak çalışıldı. Gen ekspresyon değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplandı. Hesaplamada kullanılan $\Delta\Delta Ct$ değerleri ise;

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{hedef\ gen} - Ct_{\beta\text{-actin}})_{deneysel\ grup} - (Ct_{hedef\ gen} - Ct_{\beta\text{-actin}})_{kontrol\ grubu}$$

formülü kullanılarak hesaplandı (Pfaffl 2001).

3.9 Komet Yöntemi

Çizelge 3.3. Lizis çözeltisinin hazırlanması

Kimyasal	Miktarı
NaCl	29,4 g
EDTA	7,44 g
Trisma baz	0,24 g
Triton X-100	2 mL
DMSO	20 mL

Hazırlanan kimyasallar dH₂O ile 200 mL’ye tamamlanarak pH 10 olacak şekilde ayarlandı.

Çizelge 3.4. Elektroforez çözeltisinin hazırlanması

Kimyasal	Miktarı
NaOH	6 g
EDTA	0,18 g

Hazırlanan kimyasallar dH₂O ile 500 mL’ye tamamlanarak pH>13 olacak şekilde ayarlandı.

Çizelge 3.5. Nötralizasyon çözeltisinin hazırlanması

Kimyasal	Miktarı
Trisma baz	14,55 g

Hazırlanan kimyasal dH₂O ile 300 mL'ye tamamlanarak pH 7,5 olacak şekilde ayarlandı.

% 1 NMA hazırlanması için 0,03 g NMA 3 mL PBS ile bek alevinde prepara edilerek hazırlandı.

% 0,8 LMA hazırlanması için 0,016 g LMA 2 mL PBS ile bek alevinde prepara edilerek hazırlandı.

Stok etidyum bromür hazırlanması için 5 mg etidyum brömür 25 mL dH₂O'da çözdürüldü. Çalışmada 10 kat dilüe edilerek kullanıldı.

- Uygulanan konsantrasyonlardaki hücreler flask yüzeyinden alınarak 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırılarak hücreler süspanse edildi.
- Hücre süspansiyonundan 40 µL alınarak ependorf içerisinde 100 µL LMA ile karıştırıldı.
- Ependorf içindeki hücre-LMA karımının hepsi alınarak bir gün önceden hazırlanmış NMA'lı lamlara prepara edildi.
- Preparatlar donmaları için buz kesetlerinin üzerine yerleştirildi.
- Donan preparatlar üzerindeki lameller yavaşça alınarak 60 dk lizis işlemine tabi tutuldu.
- Lizis işleminden sonra 20 dk alıştırma 20 dk yürütme olmak üzere 25 V 300 mA'de elektroforez işlemine tabi tutuldu.
- Elektroforezden alınan preparatlar nötralizasyon tamponuyla yıkandı.
- Yıkama işleminin ardından her bir preparat 70 µL etidyum bromür ile boyanarak lamelle kapatıldı.
- Elde edilen preparatlardan her bir preparat için floresans mikroskopta 100 hücre olacak şekilde sayımlar yapıldı.

3.10 İstatistiksel Analiz

MTT çalışması ile elde edilen spektrofotometrik ölçümler % olarak ifade edilmiştir.

LD₅₀ dozunun belirlenmesinde probit analizi kullanılmıştır. Komet analizinden elde edilen verilerin değerlendirilmesinde, grup ortalamalarının karşılaştırılması Duncan testi ile yapılmıştır (p <0.05). Gen ekspresyon analizi, referans geni β -aktin kullanılarak standartlaştırılmıştır (Pfaffl 2001).



4. BULGULAR

4.1 MTT Yöntemi ile *Sideritis akmanii* Ektresinin MCF-7 Hücre Hattı Üzerine Olası Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

MCF-7 hücre hattı üzerine SAE'nin en etkin dozununun belirlenmesi amacıyla MTT yöntemi kullanılarak hücre yoğunluğu belirlendi. MCF-7 hücre hattı 24'lük plak içerisine 1×10^5 hücre ekilerek hücrelerin metabolik fonksiyonlarını düzenlemeleri için 24 saat beklendi. Konfluent oranı % 60-70 olduğunda kültür ortamındaki mediyum alınıp kültür mediyumu ile dilüe edilmiş *S. akmanii* ektresi 1000, 750, 500, 250, 100, 50, 25 µg/mL ve kontrol olarak % 1 DMSO ilave edildi. Plak 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatin sonunda, MTT yöntemi ile *S. akmanii* ektresinin MCF-7 hücreleri üzerindeki olası etkisi mikropalak okuyucu ile 540 nm'de okutularak (Resim4.1) sonuçlar yüzde olarak ifade edildi. Kontrol yüzde yüz canlı olarak kabul edilerek SAE'nin % canlılık sonuçları hesaplandı (Çizelge 4.1). % canlılık verilerine göre probit analizi ile latel dozu (LD₅₀) 38,851 µg/mL olarak belirlendi (Çizelge 4.2).

$$\% \text{ Canlılık} = \text{Absorbans numune} \times 100 / \text{Absorbans kontrol}$$

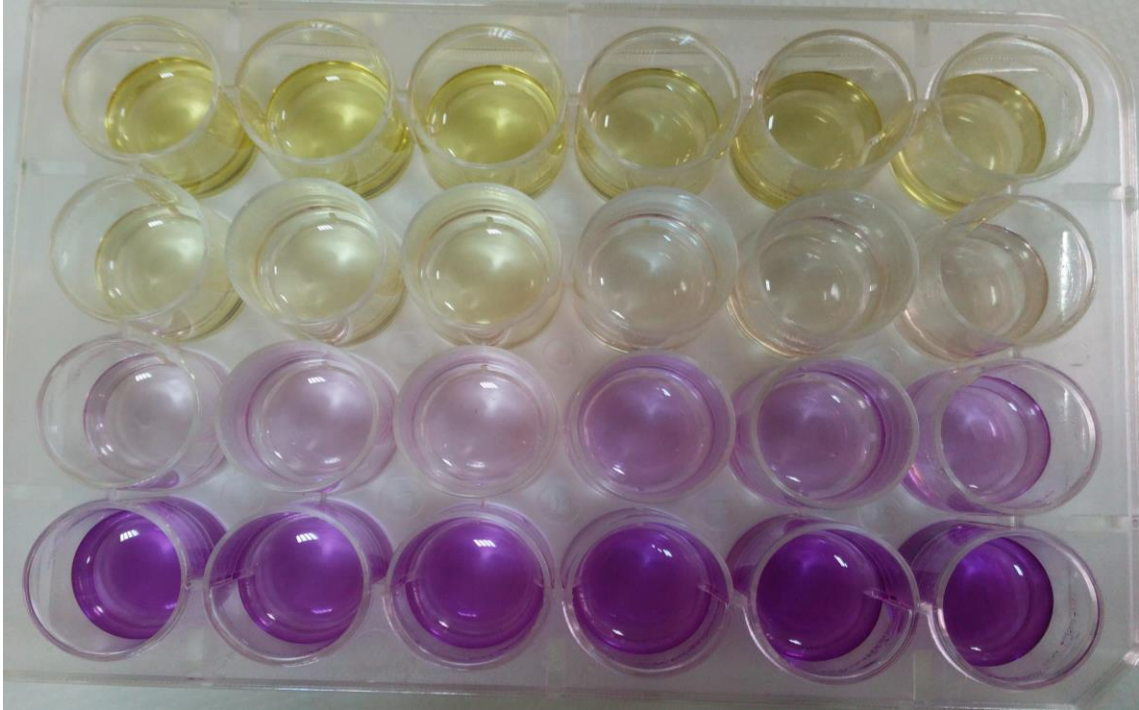
Çizelge 4.1. MTT yöntemi ile *Sideritis akmanii* ekstresinin % canlılığının belirlenmesi

Ekstre µg/mL	Absorbans değerleri 540 nm'de	% canlılık (Ort.±St. Sapma)
1000	0,172	29,86±3,44
750	0,186	32,29±3,24
500	0,172	29,86±5,66
250	0,143	24,82±1,65
100	0,119	20,65±0,89
50	0,255	44,27±0,69
25	0,467	81,07±7,48
kontrol	0,576	100,00±8,41

% canlılık verileri Ort. ±St. Sapma olarak verilmiştir.

Çizelge 4.2. Probit analizi ile *Sideritis akmanii* aseton ekstresinin latel dozu (LD₅₀) belirlenmesi

Latel doz (LD ₅₀)	Ekstre µg/mL
LC/EC 1.00	0,002
LC/EC 5.00	0,036
LC/EC 10.00	0,169
LC/EC 15.00	0,479
LC/EC 50.00	38,851
LC/EC 85.00	3152,927
LC/EC 90.00	8921,425
LC/EC 95.00	41660,391
LC/EC 99.00	749951,875



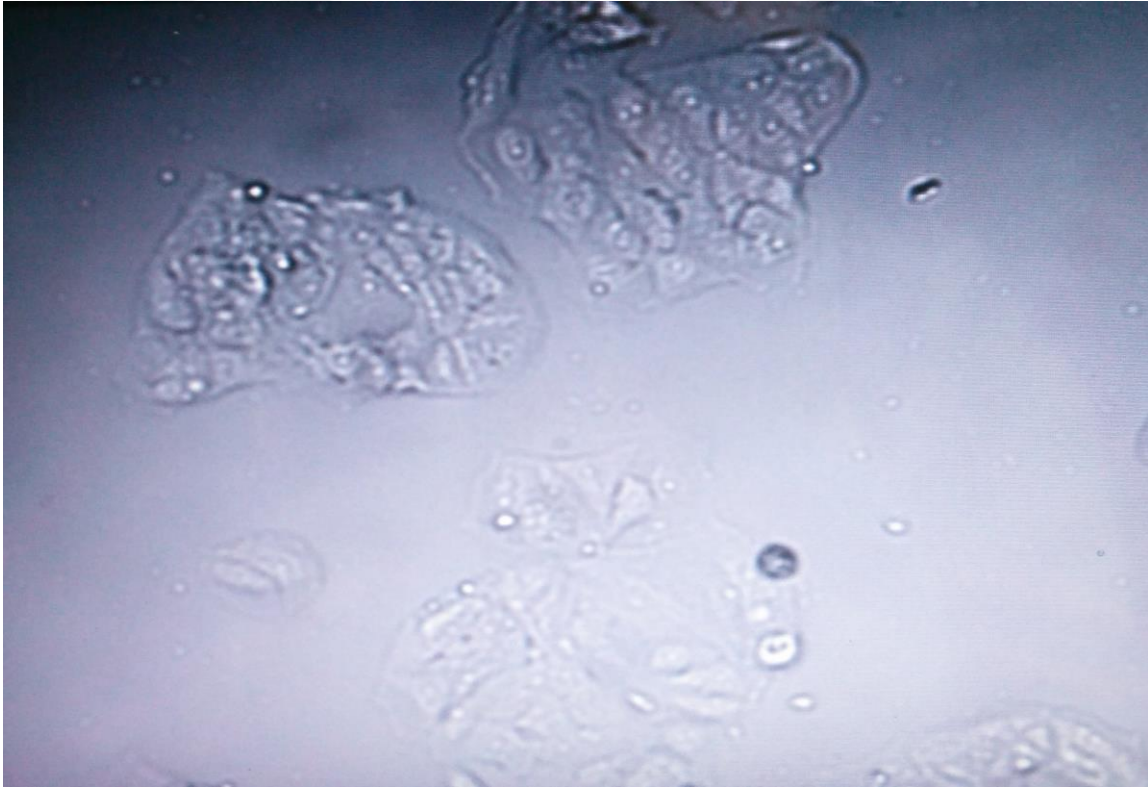
Resim 4.1 MCF-7 hücre hattı üzerine *Sideritis akmanii* eksresinin MTT yöntemi sonucu.

SAE'nin uygulanmadığı grupta hücre canlılığının en yüksek 100 ± 8.41 olduğu görüldü. *S. akmanii* estresinin uygulama gruplarında % canlılık 1000 µg/mL'de $29,86 \pm 3.44$, 750 µg/mL'de $32,29 \pm 3.24$, 500 µg/mL'de $29,86 \pm 5.66$, 250 µg/mL'de $24,86 \pm 1.65$, 100 µg/mL'de $20,65 \pm 0.89$, 50 µg/mL'de $44,27 \pm 0.69$ ve 25

$\mu\text{g/mL}$ 'de $\%81,07 \pm 7.48$ olduğu görüldü. *S. akmanii* ekstresinin artan konsantrasyonlarında konsantrasyon artışına bağlı hücre canlılığının düştüğü gözlenirken LD_{50} degerinin $38,851 \mu\text{g/mL}$ olduğu belirlenmiştir.

4.2 Thapsigargin ile MCF-7 Hücre Hattında ER Stresinin Oluşturulması

ER stres ile aktive olan ATF-6, ATF-4, PERK ve Grp78 genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için MCF-7 hücre hattında thapsigargin ile ER stresi oluşturuldu. ER stresi için thapsigargin MCF-7 hücre hattına 10^{-8} M konsantrasyonunda 18 saat süreyle uygulandı. Uygulamanın ardından SAE'nin ATF-6, ATF-4, PERK ve Grp78 genlerine etkisi incelendi (Resim 4.2 ve 4.3).

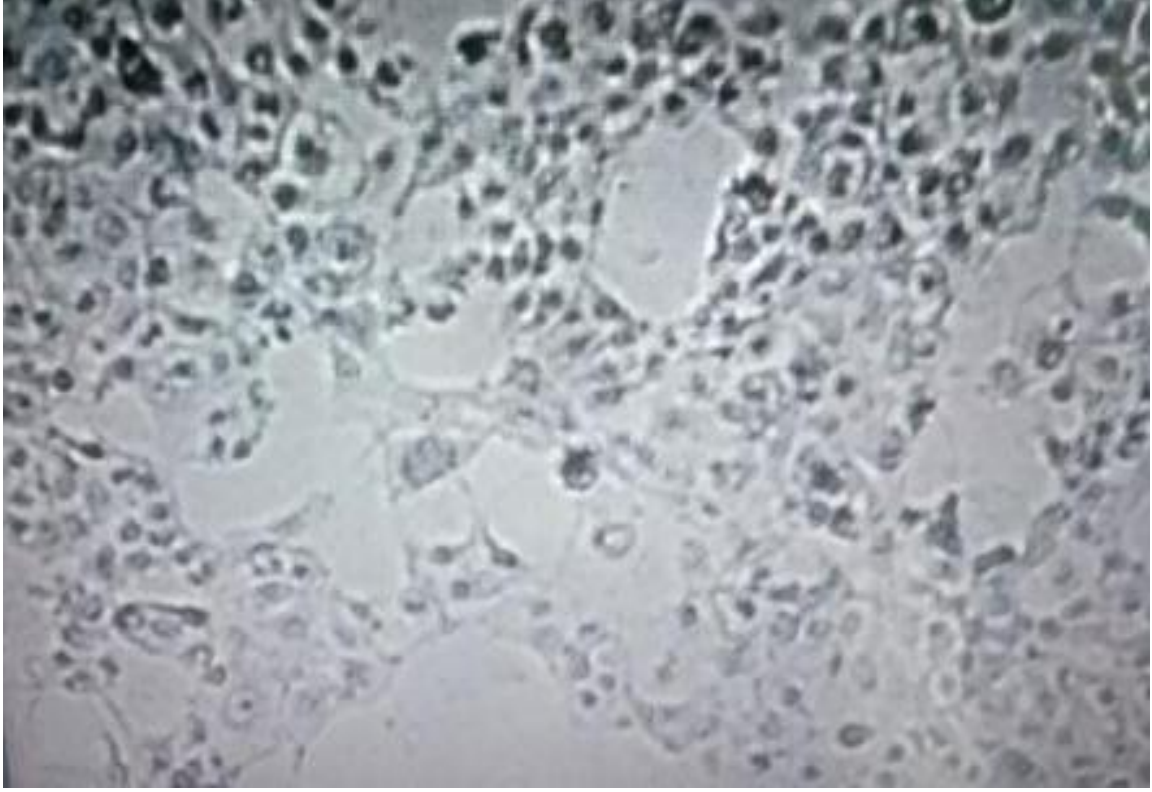


Resim 4.2 MCF-7 hücrelerinin mikroskop görüntüsü

4.3 Komet Testinde *Sideritis akmanii* Ekstresinin MCF-7 Hücre Hattına Uygulanması

Her konsantrasyon 3 tekrarlı olarak floresan mikroskopta sayıldı ve her preparattan

toplam 100 hücre sayıldı, Komet analizinden elde edilen verilerin değerlendirilmesinde, grup ortalamalarının karşılaştırılması Duncan testi ile yapılmıştır ($p < 0.05$) (Resim 4.4).



Resim 4.3 Thapsigargin ile ER stresi oluşturulmuş MCF-7 hücreler

SAE ve thapsigargin uygulamasının sonuçlarına göre en yüksek DNA hasar skoru SAE 100 $\mu\text{g/mL}$ + Thapsigargin uygulanan grupta $94,00 \pm 5,29$ olarak bulundu (Çizelge 4.2). *S. akmanii* ekstresinin konsantrasyon artışına bağlı olarak DNA hasarındaki gözlenen artış kontrol grubuna göre istatistiksel olarak bakıldığında önemli olduğu bulundu ($p < 0,05$).

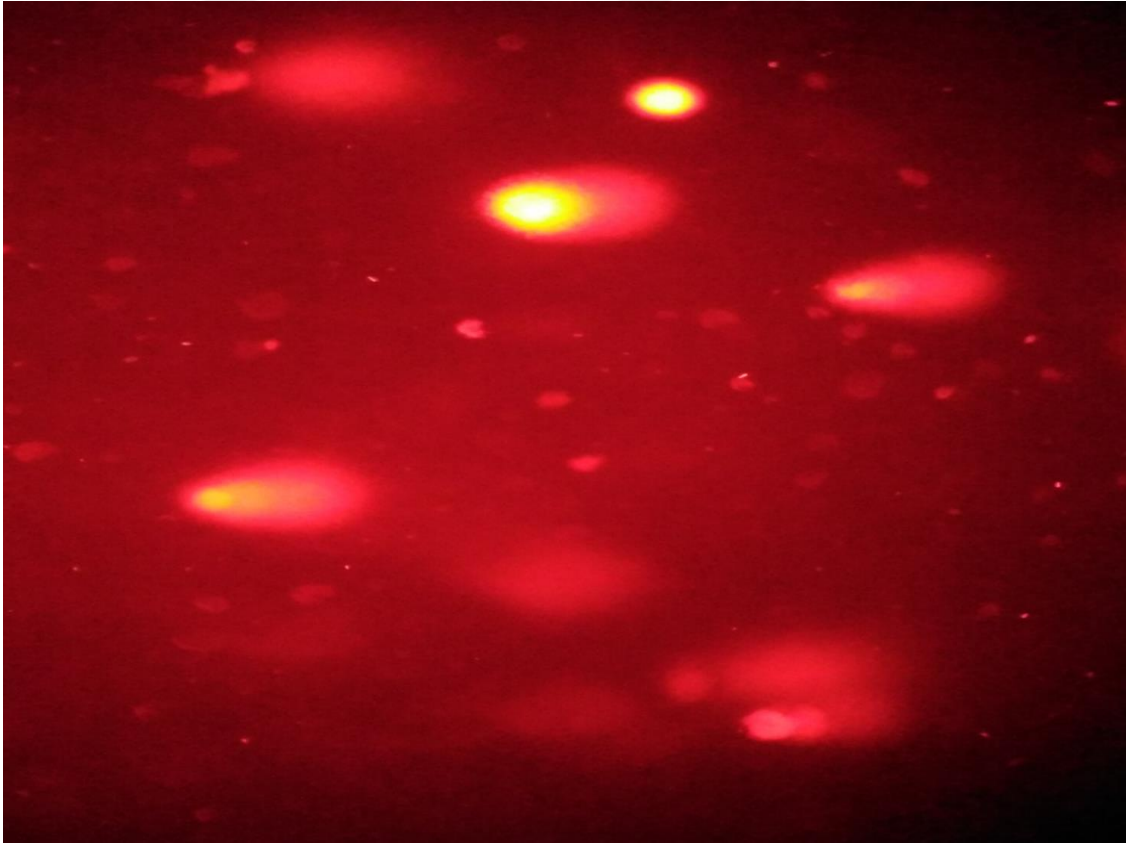
4.4 *Sideritis akmanii* Ekstresinin MCF-7 Üzerine Etkilerinin Real-time PCR Bulguları

Sitotoksosite testi ile belirlenen doza göre gen ekspresyon düzeylerinin araştırılması için thapsigargin ile ER stresi oluşturulmuş ve oluşturulmamış MCF-7 hücrelerine SAE 10, 50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ olarak uygulanmıştır.

Çizelge 4.3 SAE'nin MCF-7 hücreleri üzerinde Komet testi ile DNA hasarının tespiti

Konsantrasyon	DNA Hasarı (Ort.±St. Sapma)
Kontrol	9,67±2,08 ^a
% 1 DMSO	14,33±3,79 ^{ab}
Thapsigargin 10 ⁻⁸ M	45,00±5,00 ^c
SAE 10 µg/mL	17,33±5,77 ^{ab}
SAE 10 µg/mL + T 10 ⁻⁸ M	18,33±7,64 ^b
SAE 50 µg/mL	68,67±1,53 ^d
SAE 50 µg/mL + T 10 ⁻⁸ M	92,00±3,00 ^f
SAE 100 µg/mL	82,00±3,00 ^e
SAE100 µg/mL + T 10 ⁻⁸ M	94,00±5,29 ^f

*Sütunlardaki farklı harfler p< 0,05 düzeyinde önemli. Ort.=Ortalama, St. Sapma=Standart Sapma



Resim 4.4 Komet görüntüleri

Uygulamadan 24 saat sonra total RNA izolasyonu yapıp ER stres genlerinden ATF-6, ATF-4, PERK ve Grp78 mRNA ekspresyon düzeyleri ile inflamatuvar ve pro-

inflamatuvar genlerden IL-6, IL-8, IL-12, TNF α ve IFN- γ mRNA ekspresyon düzeyleri, β -actin geniyle normalize edilerek hesaplanmıştır. Gen ekspresyon verileri $2^{(\Delta\Delta Ct)}$ olarak hesaplanmış ve çizelge 4.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4 Gen ekspresyon düzeyleri $2^{(\Delta\Delta Ct)}$

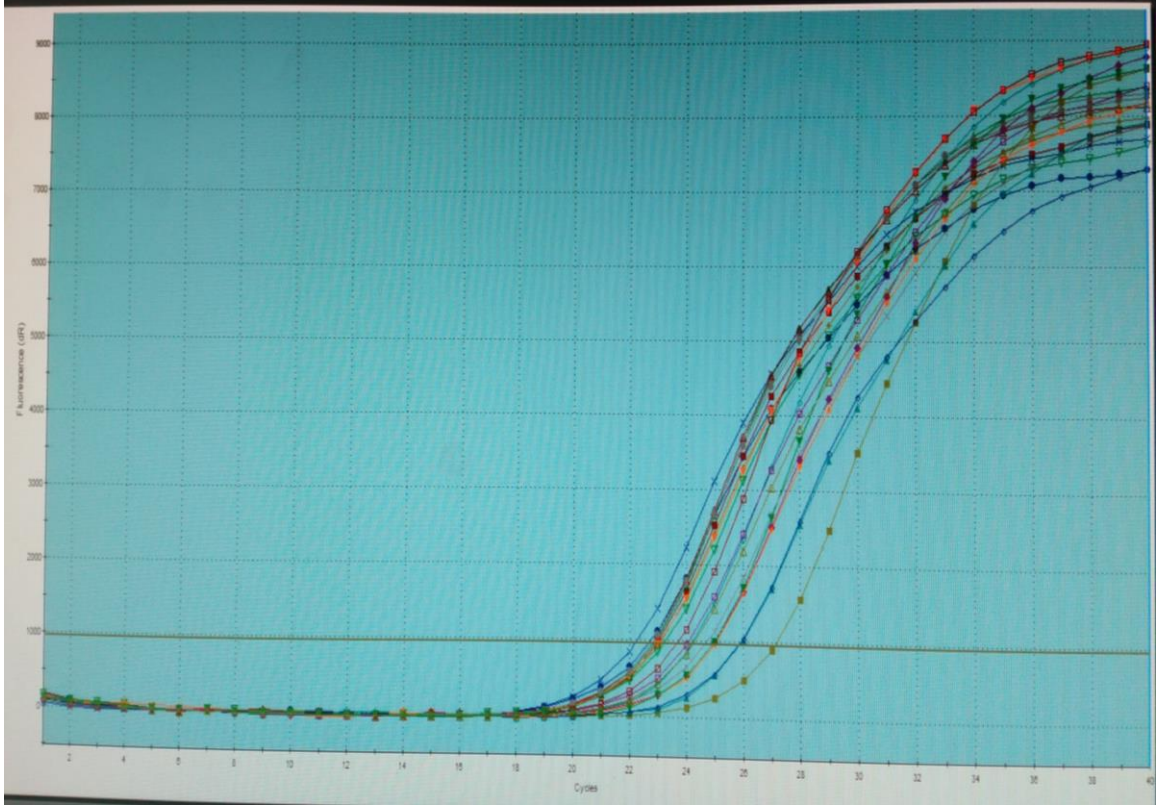
Gen Doz	ATF6	ATF4	PERK	Grp78	IL-6	IL-8	IL-12	TNF α	IFN γ
Kontrol	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
*SAE ₁₀	+0,43	+30,27	+0,71	+0,26	+4,29	+0,46	+0,23	+0,19	+0,27
*SAE ₁₀ +T	+0,53	+27,92	+0,68	+0,52	+1,60	+0,97	+0,52	+0,29	+0,51
*SAE ₅₀	+5,72	+0,75	+0,75	+1,60	+12,2	+2,47	+0,17	+0,96	+1
*SAE ₅₀ +T	+1,61	+0,84	+0,84	+1,27	+1,31	+0,48	+0,38	+0,54	+0,68
*SAE ₁₀₀	+0,28	+50,09	+0,56	+0,84	+6,16	+6,77	+0,14	+0,33	+0,38
*SAE ₁₀₀ +T	+0,23	+124,4	+1,24	+0,93	+16,14	+5,54	+0,65	+0,47	+0,53

*S= *Sideritis akmanii* *T= Thapsigargin

Gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında ATF-6 geninin SAE₅₀ ve SAE₅₀+T gruplarında ekspresyon seviyelerinin kontrole kıyasla arttığı görülmektedir. SAE₁₀, SAE₁₀+T, SAE₁₀₀+T ve SAE₁₀₀ gruplarında kontrole kıyasla baskılandığı tespit edilmiştir. ATF-4 geninin düşük ve yüksek konsantrasyonlarda ekspresyon düzeyleri artarken LD₅₀ dozuna yakın dozlarda ekspresyon düzeylerinde baskılanma olduğu görülmüştür. PERK geni bütün gruplarda baskılanırken sadece SAE₁₀₀+T uygulama grubunda +1,24’lük ekspresyon seviyesi gözlenmiştir. Grp78 geni ATF-6 geni ile paralellik göstererek SAE₅₀ ve SAE₅₀+T gruplarında ekspresyon seviyelerinin kontrole kıyasla arttığı görülmektedir. SAE₁₀, SAE₁₀+T, SAE₁₀₀+T ve SAE₁₀₀ gruplarında kontrole kıyasla baskılandığı tespit edilmiştir.

IL-6 geni bütün gruplarda artış gösterirken en yüksek artış +16,14 ile SAE₁₀₀+T uygulamasında görülmüştür. IL-8 gen ekspresyon düzeyleri ise SAE₁₀, SAE₁₀+T ve SAE₅₀+T uygulamalarında baskılanırken diğer uygulamalarda artış göstermiştir. IL-12 geni bütün uygulamalarda kontrole göre baskılanırken en yüksek baskılanma SAE₁₀₀ uygulamasında olduğu görülmüştür. TNF α genide IL-12 geni gibi bütün uygulama

gruplarında kontrole kıyasla baskılanmıştır. En yüksek baskılanmayı ise SAE₁₀ uygulamasında göstermiştir. IFN- γ geni SAE₅₀ uygulamasında kontrole aynı düzeyde olduğu görülmüştür. Diğer uygulama gruplarının ise kontrole kıyasla baskılandığı sonucuna ulaşılmıştır.



Resim 4.5 Real Time PCR analizleri sonucu PERK geninin amplifikasyon grafiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapmış olduğumuz çalışma, hücre kültürü çalışması olup kontrollü deneyler içermektedir. Hücre kültürü çalışmaları çalışılan maddenin etkilerini hızlı ve kısa sürede göstermektedir. Ayrıca hücre kültüründe sınırsız çoğalan hücrelerin kullanılması, deney hayvanlarıyla çalışılırken karşılaşılan etik kurulu raporuna gerek bırakmamaktadır. Bu nedenle hücre kültürü çalışmaları dünya çapında kanser araştırmaları, biyokimya, sitogenetik ve moleküler biyoloji çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Hücre kültürlerinde, kimyasalların etkilerinin belirlenmesi için kullanılan birçok test yöntemi vardır. Sitotoksikite testleri olarak da bilinen bu testler kimyasalların hücreler üzerinde ne derece ve hangi fonksiyonlarını etkilediğini göstermek için kullanılmaktadır. Bu testlerden en çok kullanılanları WST-1, XTT ve MTT vb. testlerdir (Yaramış 2011).

Yumrutaş vd. (2015), MCF-7 üzerinde yapmış oldukları çalışmada *S. syriaca*'nın metanol ekstraktının hücre canlılığı ve çoğalmasına olan etkilerine MTT yöntemi ile bakmışlardır. Yapılan çalışmada 100 µg/mL *S. syriaca* ekstraktının hücre yaşayabilirliğini MCF-7 hücrelerinde kontrole göre % 54.91'e düşürdüğünü bulmuşlardır. Çalışmamızda MCF-7 üzerine linearol kaynağı olarak *S. syriaca* ile aynı familyadan olan *S. akmanii* asetone ekstresinin MTT yöntemiyle sitotoksik etkileri araştırılmıştır. *S. akmanii* ekstresinin konsantrasyon artışına bağlı olarak, MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin arttığı gözlenmiştir. *S. akmanii* ekstresinin MCF-7 hücrelerine uygulanmasından 24 saat sonra yapılan MTT çalışmasıyla % canlılık spektrofotometrik olarak ölçülerek, hesaplamalar kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Yapılan probit analizi sonucu LD₅₀ dozu 38,851 µg/mL olarak tespit edilmiştir.

Loizzo vd. (2007), yapmış oldukları çalışmada *S. perfoliata*'nın esansiyel yağlarını ekstre etmişler ve esansiyel yağ içerisinde 15 monoterpen, 17 seskiterpen ve 1 diterpen olduğunu tespit etmişlerdir. Esansiyel yağlar ile yapmış oldukları hücre kültürü çalışmalarında esansiyel yağların insan melanoma (C32) hücreleri ve böbrek adenokarsinoma (ACHN) hücreleri üzerinde yüksek aktivite gösterdiğini ve IC₅₀

değerlerinin sırası ile 98,58 ve 100,90 µg/mL olduğunu belirlemişlerdir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da *S. perfoliata* ile aynı familyadan olan *S. akmanii* aseton ekstresi artan konsantrasyona bağlı olarak MCF-7 hücrelerinde hücre canlılığını düşürmüştü ve LD₅₀ değeri de 38,851 µg/mL olduğu belirlenmiştir.

Todorona ve Trendafilova (2014)'nın *S. scardica* ile yapmış oldukları çalışmada bitkinin dietil eter ekstraktının 100 µg/mL'si B16 ve HL-60 hücrelerinde hücre canlılığını sırası ile % 51,3 ve % 77,5 düşürdüğünü belirlemişlerdir. Hücre canlılığının azalmasına flavonoidlerin (apigenin, luteolin ve bunların glikozitleri) neden olduğunu göstermişlerdir. Bu bilgiler ışığında *S. akmanii* aseton ekstresinin içinde bulunan flavonoidlerin MCF-7 üzerinde gözlenen sitotoksikite nedeni olabilir.

Komet yöntemi in vitro ve in vivo olarak DNA hasarının değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Dalrymple *et al.* 2015). Hızlı, güvenilir ve basit bir biyokimyasal teknik olması komet yönteminin son yıllarda geliştirilmesini sağlamıştır (Darrag and Fayyad 2014). Tek hücreli jel elektroforezi (SCGE) olarak da bilinmektedir. Komet yönteminin temel ikisi basittir. Agaroz jel içine gömülmüş hücrelerin parçalanmasından sonra elektroforez işlemi ile yürütülmesine dayanır. Elektroforez işlemi anında hasar görmemiş DNA'lar oldukları yerde kalırken, kırıklar ortaya çıkar. Kırılmış DNA parçaları kuyruklu yıldız şeklinde bir yapı oluşturarak anado doğru uzanır. Daha sonra bu kuyruklu yıldız şeklindeki DNA, DNA bağlayıcı bir boya kullanılarak görünür hale getirilir. DNA'da oluşmuş hasarın derecelerini değerlendirmek için kuyruklu yıldızın şekli, boyutu ve içindeki DNA miktarı ölçülür. Komet yönteminin analiz protokolü çeşitleri DNA çapraz bağları (örneğin timin dimerleri), tek iplik kırıkları ve çift iplik kırıklarının ölçülmesidir.

Komet yönteminin özellikleri numune başına az bir miktar hücreye ihtiyacının olması ve bireysel olarak veri sağlamasıdır. Komet yöntemi biyolojik gözlem, radyasyon biyolojisi, çevresel toksikoloji, beslenme çalışmaları ve kanser çalışmaları da dahil olmak üzere DNA hasarının incelenmesinde kullanılır. Komet yönteminde kuyruklu yıldızların skorlanması görsel olarak veya görüntü analiz yazılımları ile değerlendirilebilir (Gyori *et al.* 2014).

Çalışmamızda MCF-7 hücreleri üzerinde SAE'nin muhtemel genotoksik etkilerine bakılması amaçlanmıştır. Bu maksatla thapsigargin ile ER stresi oluşturulmuş ve oluşturulmamış MCF-7 hücrelerine ekstre 10, 50 ve 100 µg/mL olacak şekilde uygulanmıştır. Uygulamayı takiben 24 saat sonra hücreler toplanarak DNA hasarı skorlanmıştır. DNA hasarının konsantrasyon artışına bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. DNA hasarının doz artışına bağlı olarak artması MTT yönteminde elde ettiğimiz hücre canlılığı ile ters orantı göstermektedir. MTT yönteminde doz artışına bağlı olarak hücre canlılığı azalırken, Komet yönteminde doz artışına bağlı olarak genotoksisitenin arttığı gözlenmiştir. Bu durumda genotoksisitenin hücre canlılığı üzerinde etkilerinin olduğunu göstermektedir. Ayrıca thapsigargin uygulanan grupların, uygulanmayanlara oranla daha fazla DNA hasarı oluşturduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.2).

Das vd. (2017) flavonoidler ile yapmış oldukları çalışmada, kombine flavonoid uygulamalarının K562 hücreleri üzerinde DNA hasarını indüklediğini bulmuşlardır. Örneğin Quercetin ve myricetin kombinasyonunun maksimum DNA hasarına yol açtığını göstermişlerdir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da *S. akmanii* ekstresinin içinde kombine flavonoidlerin bulunması ve bunların doz artışına bağlı olarak MCF-7 hücreleri üzerinde DNA hasarını artırdığı düşünülmektedir.

Guo vd. (2016)'e göre Jungermannenon A ve B diterpenoidlerinin PC3 (prostat kansri) üzerinde ROS üretimini başlattığını ve bunun da mitokondriyal hasarın indüklenmesine ve kalıcı DNA hasarına yol açtığını göstermişlerdir. Yapmış olduğumuz çalışmada SAE içinde diterpenoidlerin kombine bulunması, MCF-7 hücrelerinde ROS üretimini başlatarak mitokondriyal hasarın indüklenmesine ve kalıcı DNA hasarı nedeni olabilir.

Dorman vd. (2011) yapmış oldukları çalışmada *Sideritis* türlerinin toplam fenol içeriklerini belirlemişlerdir. Sulu ve metanol ekstraktlarının n-hekzana göre daha fazla fenol içerdiğini belirlemişlerdir. *Camellia sinensis*'in polar ekstraktları, *Sideritis* türlerine göre daha yüksek direnç ve aynı zamanda demir (III) indirgeyici etkiler göstermiştir. Bununla birlikte, demir (III) indirgeyici ve 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) tahlilinde de *Sideritis* türlerinin non-polar ekstraktlarının *C. sinensis*'ten daha aktif olduğu bulunmuştur. Ancak, ekstraktların hiçbirisi pozitif kontroller gibi yani askorbik asit, butile hidroksianisol (BHA) ve Trolox kadar aktif olarak bulunmamıştır.

Kronik enflamasyon, doğrudan kanser progresyonu ile bağlantılı olan bağışıklık sistemi bileşenleri üzerinde bir etkiye sahiptir. Normal koşullarda granülositler, makrofajlar, mast hücreleri, lenfositler, dentritik hücreler ve doğal öldürücü hücreleri içeren bağışıklık hücreleri patojenlere karşı ön savunma görevini görürler. Doku hasarı oluştuğunda makrofajlar ve mast hücreleri patojenlerin yok edilmesi için dolaşımdaki lökositleri hasar gören bölgeye yönlendirmek için sitokinleri ve kemokinleri salgılar (Samadi *et al.* 2015).

Yapmış olduğumuz çalışmada MCF-7 hücreleri üzerinde SAE'nin IL-6 sitokininin ekspresyon seviyeleri kontrole kıyaslandığında bütün uygulama gruplarında artış gözlenmiştir. Bir kemokin olan IL-8 gen ekspresyon düzeyleri ise SAE₁₀, SAE₁₀+T ve SAE₅₀+T uygulamalarında baskılanırken diğer uygulamalarda artış göstermiştir. SAE'nin IL-12 ve TNF α genleri üzerindeki etkisi benzer olduğu görülüp bütün uygulama gruplarında baskılanmışlardır. IFN- γ geni 50 μ g/mL konsantrasyonunda kontrole yakın etkiyi gösterirken, diğer uygulama gruplarında baskılanmıştır. Çalışmamızda SAE'nin IL-6 sitokinin ekspresyonunu arttırarak doku hasarında oluşan etkiyle benzer etki gösterdiği düşünülmektedir.

IL-8 tümör mikro ortamını büyük ölçüde etkiler. Endotel hücrelerinin aktivasyonunu, anjiyogenezi, tümör alanındaki nötrofil infiltrasyonu ve artmış otokrin sinyalizasyon yoluyla kanser gelişimini teşvik eden kemokindir. Kanser hücrelerinde IL-8'in inhibisyonu, kanser hücrelerinin çoğalmasını ve progresyonunu azalttığı için çok önemlidir. Özellikle prostat kanserinde IL-8, kanser riskini ve hücre sağkalımını arttırarak, kanserli hücrelerin endotele ve hücre dışı matrikse yapışmasında önemli kilit rol oynar. *S. syriaca*'nın sulu ekstraktı uyarılmış HT29 ve PC3 hücreleri üzerinde IL-8 seviyesini önemli ölçüde düşürdüğü gözlenmiştir (Kogiannau *et al.* 2013). Yapılan bu çalışmaya göre bizim bulgularımızda SAE'nin MCF-7 hücrelerinde IL-8 gen ekspresyon düzeyleri SAE₁₀, SAE₁₀+T ve SAE₅₀+T uygulamalarında baskılanırken, SAE₅₀, SAE₁₀₀ ve SAE₁₀₀+T uygulamalarında artış göstermiştir. Bu da *S. akmanii*'nin Anadolu'da halk tarafından çay olarak tüketilmesinin tıbbi olarak etkili olduğunu göstermektedir. Halk tarafından çay olarak tüketilirken dolaylı olarak düşük dozlarda kanser gelişimini ve ilerlemesini yavaşlattığı düşünülebilir.

ER, lümeni içerisindeki iyon dengesi, sentez yükü gibi fizyolojik ve biyokimyasal seviyede meydana gelen değişimlere oldukça hassastır. Glukoz yoksunluğu, kalsiyum boşalması, serbest radikallere maruz kalma, glikozilasyonun bozulması, aşırı kolesterol yükü, hücrede kontrol mekanizmalarının oksidatif stres indüksiyonu ile ilişkili bir takım patolojik ve fizyolojik sebeplerle bozulması yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine ve ardından da ER stresinin artmasına neden olur (Köse 2016, Imai 2016, Sozen and Ozar 2017). ER'de yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi, yeni başlayan protein sentezini azaltan, protein katlanmayı kolaylaştıran ve yanlış katlanmış proteinlerin proteozomal bozunmasını arttıran bir koruyucu tepki olarak UPR yanıtı oluşturur (Fent and Christen, 2016). UPR öncelikli olarak protein yanlış katlanma mekanizmalarını aktive eden hayatta kalma tepkisidir. Bununla birlikte uzun süren ER stres koşullarında hücre yaşamını bozabilir. ER stresıyla aktive edilen üç yolak IRE1, PERK VE ATF6'dır. Bu üç yolda ER stresinin olmadığı durumlarda Grp78/BIP şaperonu ile baskılanırlar (Kapuy *et al.* 2014).

Zhou vd. (2014)'nin yapmış oldukları çalışmada MCF-7 hücrelerinde thapsigargin ile ER stresini indükleyerek ER stresi ile apoptoz arasındaki ilişkiyi incelemişler. Ampelopsin (*Ampelopsis grossedentata*'nın önemli bir biyoaktif bileşeni) ile indüklenen MCF-7 hücrelerinde thapsigarginin Grp78 geninin ekspresyonunu artırdığını göstermişlerdir. Ayrıca thapsigarginin, ampelopsin ile indüklenen hücre büyümesi inhibisyonunu ve apoptozu artırdığını belirlemişlerdir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da thapsigargin ile ER stresi oluşturulmuş ve oluşturulmamış MCF-7 hücrelerinde SAE'nin muhtemel etkileri araştırılmıştır. Araştırmamızın sonuçlarına göre ER stresinde UPR yanıtta rol alan Grp78 geninin SAE₅₀ ve SAE₅₀+T uygulama gruplarında ekspresyon seviyelerinin kontrole göre attığı görülmüştür. ER stresinde UPR yanıtta rol alan PERK geninin bütün uygulama gruplarında baskılandığı ancak SAE₁₀₀+T uygulanmasında kontrole kıyaslandığında artış olduğu gözlenmiştir. Ayrıca ER stresinde UPR yanıtta rol alan ve Grp78 kontrolünde olan ATF-6'nın Grp78 gibi SAE₅₀ ve SAE₅₀+T uygulama gruplarında arttığı bulunmuştur. Bu da Grp78'in ER stres durumunda ATF-6'yı aktive ederek ER stresine yanıt verdiğini düşündürmektedir. ER stresi durumunda PERK kontrolünde olan ATF-4'ün ise düşük ve yüksek

konsantrasyonlarda ekspresyon düzeyleri artarken 50 µg/mL dozda ekspresyon düzeylerinde baskılanma olduğu görülmüştür. Bu durum ATF-4'ün PERK'ten farklı bir yolla aktive olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak *S. akmanii*'nin MCF-7 hücreleri üzerinde genotoksik ve sitotoksik etkilerinin olduğuna varıldı. Endemik bir tür olan bu bitkinin MCF-7 hücrelerinde ER stresine sebep verdiği ve inflamasyonda etkili olduğu görüldü. Bu çalışma ER stresi ile ilişkili apoptozun gelecekte araştırılmasına yardımcı olacaktır. Bu çalışmanın ayrıca *S. akmanii*'nin olası fitoterapik etkilerini açıklamak için yapılacak çalışmalara ışık tutabileceği düşünülmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Agouni, A., Mody, N., Owen, C., Czopek, A., Zimmer, D., Bentire-Alj, M., Bence, K.K. and Delibegovic, M. (2011). Liver-specific deletion of protein tyrosine phosphatase (PTP) 1B improves obesity and pharmacologically-induced endoplasmic reticulum stress. *Biochem*, **438**(2): 369–378. Doi: 10.1042/BJ20110373.
- Ahmed, A.R.H. (2016). HER2 expression is a strong independent predictor of nodal metastasis in breast cancer. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, **28**: 219-227.
- Akimoto, N., Ara, T., Nakajim, D., Suda, K., Ikeda, C., Takahashi, S., Muneto, R., Yamada, M., Suzuki, H., Shibata, D. and Sakurai, N. (2017). Flavonoidsearch: a system for comprehensive flavonoid annotation bu mass spectrometry. *Scientific Reports*. Doi: 10.1038/s41598-017-01390-3.
- Aktaş, S.D. (2010). Kemoterapinin kolon kanseri, meme kanseri ve mide kanserinde vegf düzeylerine etkisinin in vivo ve in vitro incelemesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
- Alkayyal, A.A., Mahmoud, A.B. and Auer, R.C. (2016). Interleukin-12-expressing oncolytic virus: A promising strategy for cancer immunotherapy. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, **11**: 187-193.
- Ambroz, A., Vıková, V., Rossner, P., Rossnerova, A., Svecova, V., Milcova, A., Pulkrabova, J., Hajslova, J., Veleminsky, M. and Solansky, I. (2016). Impact of air pollution on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in mothers and their newborns. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **219**: 545-556.

Arai, T., Kaneko, H., Ohnishi, H., Matsui, E., Fukao, T., Kawamoto, N., Kasahara, K. and Kondo, N. (2008). Hypothermia augments NF-kappaB activity and the production of IL-12 and IFN-gamma. *Allergology International*, **57**: 331-338.

Ariyasu, D., Yoshida, H. and Hasegawa, Y. (2017). Endoplasmic reticulum (ER) stress and endocrine disorders. *International Journal of Molecular Sciences* 18, **382**:
Doi: 10.3390/ijms18020382.

Bala, A.M. (2014). Concerted action of Nrf2-ARE pathway, MRN complex, HMGB1 and inflammatory cytokines - Implication in modification of radiation damage. *Redox Biology*, **2**: 832-846.

Ballı, M. (2012). *Sideritis trojana* bornm. ve *Sideritis athoa* papanikolaou & kokkını bitkilerinden elde edilen ekstraktların ames testi ile mutajenik ve antimutajenik aktivitelerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale.

Banday, M.Z., Balkhi, H.M., Sameer, A.S., Chowdri, N.A. and Haq, E. (2017). Strong association of interleukin-6 -174G/C promoter single nucleotide polymorphism with a decreased risk of colorectal cancer in ethnic Kashmiri population: A case control study. *Tumor Biology*, Doi: 10.1177/1010428317695940.

Belder, N. (2013). Sporadik kolorektal kanser vakalarında genom ebadında kopya sayısı değişimlerinin ve transkriptom profilinin belirlenmesi ile kanserin gelişmesinde ve ilerlemesinde etken yeni genlerin tanımlanması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.

- Beytur. A., Tekin, S., Keleştimur, T., Ergin, Z. and Sandal, S. (2011). Yeni sentezlenen bir tiyosemikarbazon türevinin prostat kanseri hücre kültürleri üzerine antikanserojenik özelliklerinin beşirlenmesi: *in vitro* bir çalışma. *Fırac Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi*, **25**: 25-32.
- Bian, T., Li, H., Zhou, Q., Ni, C., Zhang, Y. and Yan, F. (2017). Human β -defensin 3 reduces TNF- α -induced inflammation and monocyte adhesion in human umbilical vein endothelial cells. *Mediators of Inflammation*, Doi: 10.1155/2017/8529542.
- Bozdaş, F.G. (2012). Bazı terpenlerin tetrasiyanoetilen (TCNE) katalizörlüğünde alkoliz reaksiyonları ve stereokimyalarının incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli.
- Brankovic, S., Kitic, D., Radenkovic, M., Veljkovic, S., Jankovic, T., Savikin, K. and Zdunic, G. (2011). Spasmolytic activity of the ethanol extract of *Sideritis raeseri* spp. raeseri boiss. & heldr. on the isolated rat ileum contractions. *Journal Of Medicinal Food*, **14**: 495-498.
- Burtom, G.J. and Yung, H.W. (2011). Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of early-onset pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*, **1**: 72–78.
- Can, F.K. (2013). Hepatit C'li hastalarda TNF alfa düzeyi ile hepatik aktivite indeksi arasındaki ilişkinin incelenmesi. Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum.

- Carreras-Sureda, A., Pihán, P. and Hetz, C. (2017). The unfolded protein response: at the intersection between endoplasmic reticulum function and mitochondrial Bioenergetics. *Frontiers in Oncology*, 7:55 Doi: 10.3389/fonc.2017.00055.
- Casas, C. (2017). GRP78 at the centre of the stage in cancer and neuroprotection. *Frontiers Neurosci*, Doi: 10.3389/fnins.2017.00177.
- Cianga, C.M., Cianga, P., Dumitrescu, G.F. and Sava, A. (2016). IL-8, IL-8RA (CXCR1) and IL-8RB (CXCR2) expression in pilomatricoma. *Romanian Journal of Morphology & Embryology*, 57: 59-64.
- Cui, A.H., Zhao, J., Liu, S.X. and Hao, Y.S. (2017). Associations of IL-4, IL-6 and IL-12 levels in peripheral blood with lung function, cellular immune function, and quality of life in children with moderate-to-severe asthma. *Medicine*, Doi: 10.1097/MD.00000000000006265.
- Çarıkçı, S. (2010). Bazı sideritis (*Sideritis niveotomentosa*, *Sideritis hololeuca*, *Sideritis brevidens*) türlerinin diterpenik bileşenlerinin izolasyonu ve yapılarının tayini. Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir.
- Dalrymple, A., Ordonez, P., Thorne, D., Dillon, D. and Meredith, C. (2015). An improved method for the isolation of rat alveolar type II lung cells: Use in the Comet assay to determine DNA damage induced by cigarette smoke. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 72: 141-149.
- Darrag, A.M. and Fayyad, D.M. (2014). Genotoxicity of three endodontic sealers by single cell gel-electrophoresis/comet assay. *Tanta Dental Journal*, 11: 85-92.

- Das, A., Majumder, D. and Saha, C. (2017). Correlation of binding efficacies of DNA to flavonoids and their induced cellular damage. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, **170**: 256-262.
- Dhiman, A., Nanda, A. and Ahmad, S. (2016). A quest for staunch effects of flavonoids: Utopian protection against hepatic ailments. *Arabian Journal of Chemistry*, **9**: 1813-1823.
- Dorman, H.J.D., Kosar, M., Baser, K.H.C. and Hiltunen, R. (2011). Iron(III) reducing and antiradical activities of three *Sideritis* from Turkey. *Pharmaceutical Biology*, **49**: 800–804.
- Doyle, K.M., Kennedy, D., Gorman, A.M., Gupta, S., Healy, S.J.M and Samali, A. (2011). Unfolded protein and endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disorders. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **15**: 2025-2039.
- Duman,H., Aytaç, Z., Ekici, M., Karavelioğulları, F.A., Dönmez, A. and Duran, A. (1995). Three new species (*Labiatae*) from Turkey. *Flora Mediterranea*, **5**: 221-228.
- Elçi, M. (2016). Meme kanserinde SIRT1 ilişkili miRNA’ların araştırılması. Uzmanlık Tezi, Gaziantep Üniversitesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Gaziantep.
- Fent, K. and Christen, V. (2016). Silica nanoparticles induce endoplasmic reticulum stress response and activate mitogen activated kinase (MAPK) signalling. *Toxicology Reports*, **3**: 832-840.

- Foneca, A.C.R.G., Ferreiro, E., Oliveira, C.R., Cardoso, S.M. and Pereira, C.F. (2013). Activation of the endoplasmic reticulum stress response by the amyloid-beta 1-40 peptide in brain endothelial vells. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1832**: 2191-2203.
- Gonzalez, M.E., Martin, E.E., Anwar, T., Garcia, C.A., Methora, N., Lama, A., Chen, Y.C., Tanager, K.S., Yoon, E., Kidwell, K.M. and Ge, C. (2017). Mesenchymal stem cell-induced DDR2 mediates stromal-breast cancer interactions and metastasis growth. *Cell Reports*, **18**: 1215-1228.
- Gonzalez-Burgos, E., Duarte, A.I., Carretero, M.E., Moreira, P.I. and Gomez-Serranillos, M.P. (2016). Kaurane diterpenes as mitochondrial alterations preventive agents under experimental oxidative stress conditions. *Pharmaceutical Biology*, **54**: 705-711.
- Gou, Y., Lin, Z., Wang, M., Dong, Y., Niu, H., Young, C.Y.F., Lou, H. and Yuan, H. (2016). Jungermannenone A and B induce ROS and cell cycle-dependent apoptosis in prostate cancer cells in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica*, **37**: 814-824.
- Görgün, E.P. (2014). Agresif periodontitis hastalarında interlekin-6 ve interlekin-10 gen polimorfizmlerinin saptanması ve başlangıç periodontal tedavinin klinik, dişeti oluğu sıvısı ve serum parametreleri üzerine etkileri. Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- Guadagno, N.A., Moriconi, C., Licursi, V., D'Acunto, E., Nisi, P.S., Carucci, N., Jaco, A.D., Cacci, E., Negri, R., Lupo, G. and Miranda, E. (2017). Neuroserpin polymers cause oxidative stress in a neuronal model of the dementia FENIB. *Neurobiology of Disease*, **103**: 32-44.

- Gyori, B.M., Venkatachalam, G., Thiagarajan, P.S., Hsu, D. and Clement, M.V. (2014). OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology*, **2**: 457-465.
- Haddur, E. (2013). D vitamininin endoplazmik retikulum stres üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- He, L., Yuan, J., Xu, Q., Chen, R., Chen, L. and Fang, M. (2016). miRNA-1283 regulates the PERK/ATF4 pathway in vascular injury by targeting ATF4. *PLoS ONE*, **11**(8): e0159171. Doi: 10.1371/journal.pone.0159171.
- Hoensch, H.P. and Oertel, R. (2015). The value of flavonoids for the human nutrition: Short review and perspectives. *Clinical Nutrition Experimental*, **3**: 8-14.
- Hua, Y., Ma, X., Liu, X., Yuan, X., Qin, H. And Zhang, X. (2017). Abnormal expression of mRNA, microRNA alteration and aberrant DNA methylation patterns in rectal adenocarcinoma. *PLOS ONE*, Doi: 10.1371/journal.pone.0174461.
- Işık, S., Silan, F., Kılıç, S., Hız, M.M., Öğretmen, Z. and Özdemir, Ö. (2016). 308G/A and 238G/A polymorphisms in the TNF- α gene may not contribute to the risk of arthritis among Turkish psoriatic patients. *The Egyptian Rheumatologist*, **38**: 313-317.
- Imai, T., Kosuge, Y., Saito, H., Uchiyama, T., Wada, T., Shimba, S., Ishige, K., Miyairi, S., Makishima, M. and Ito, Y. (2016). Neuroprotective effect of S-allyl-L-cysteine derivatives against endoplasmic reticulum stress-induced cytotoxicity is independent of calpain inhibition. *Journal of Pharmacological Sciences*, **130**: 185-188.

- Imanikia, S., Galea, F., Nagy, ., Phillips, D.H., Stürzenbaum, S.R. and Arlt, V.M. (2016). The application of the comet assay to assessthe genotoxicity of environmental pollutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **45**: 356-361.
- Kapuy, O., Vinod, P.K. and Banhegyi, G. (2014). mTOR inhibition increases cell viability via autophagy induction during endoplasmic reticulum stress – An experimental and modeling study. *FEBS Open Bio*, **4**: 704-713.
- Karataş, Ö.F. (2014). İnsan skuamöz hücreli larenks karsinomunda kanser kök hücrelerine özgü miRNA’ların profillenmesi ve mir-145’in larenks kanseri ve kanser kök hücrelerindeki fonksiyonunun araştırılması. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Kılınç, V. (2013). HepG2 ve mcf-7 hücre modellerinde desferoksamin ve fenantrolin’in antikanser etkilerinin moleküler düzeyde araştırılması. Uzmanlık Tezi, Ondokuz Mayıs Üniveersitesi, Tıp Fakültesi, Bitokimya Anabilim Dalı, Samsun.
- Kogiannau, D.A.A., Kalogeropoulos, N., Kefalas, P., Polissiou, M.G. and Kaliora, A.C. (2013). Herbal infusions; their phenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory effects in HT29 and PC3 cells. *Food and Chemical Toxicology*, **61**: 152-159.
- Korkmaz, S. (2015). İnsan plazma ve eritrosit hemolizat asetilkolinesteraz (AChE, E.C.3.1.1.7) enzimi üzerine balbaşı otunun (*Sideritis libanotica*) polar ve nonpolar ekstraktının *in vitro* etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Van.
- Koygun, G. (2015). Meme kanseri kök hücre (benzeri) kültürlerde kanser ilaçlarının etkinliğinin moleküler mekanizmalarının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

- Köse, B. (2016). SIK2'nin er stresine bağlı muhtemel er yerleşik substratlarının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze.
- Kuraoka, I. (2015). Diversity of endonuclease V: from DNA repair to RNA editing. *Biomolecules*, Doi: 10.3390/biom504194.
- Kurauti, M.A., Costa-Junior, J.M., Ferreira, S.M., Santos, G.J., Sponton, C.H.G., Carneiro, E.M., Telles, G.D., Chacon-Mikahil, M.P.T., Cavaglieri, C.R., Rezende, L.F. and Boschero, A.C. (2017). Interleukin-6 increases the expression and activity of insulin-degrading enzyme. *Scientific Reports*, **7**: 46750 Doi: 10.1038/srep46750.
- Kurtoğlu, E.L. ve Tekedereli, İ. (2015). DNA onarım mekanizmaları. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, Doi: 10.5505/bsbd.2015.52523.
- Loizzo, M.R., Tundis, R., Menichini, F., Saab, A.M., Statti, G.A. and Menichini, F. (2007). Cytotoxic activity of essential oils from labiatae and lauraceae families against *in vitro* human tumor models. *Anticancer Research*, **27**: 3293-3300.
- Lukong, K.E. (2017). Understanding breast cancer – the long and winding road. *BBA Clinical*, **7**: 64-77.
- Mahmoud, A.A., Sheneef, A., Goda, A.M., Ismail, M.A. and Abualfadl, E.M. (2016). Association of interferon- γ and its (+874 T/A) gene polymorphism with type 2 diabetes mellitus in rheumatoid arthritis patients. *The Egyptian Rheumatologist*, **38**: 277-282.

- Mancini, M., Leo, E., Takemura, K.I., Campi, V., Borsi, E., Castagnetti, F., Gugliotta, G., Santucci, M.A. and Martinelli, G. (2013). Chibby drives β catenin cytoplasmic accumulation leading to activation of the unfolded protein response in BCR-ABL1+ cells. *Cellular Signalling*, **25**: 1820-1827.
- Meter, M.V., Simon, M., Tomblin, G., May, A., Morello, T.D., Hubbard, B.P., Bredbenner, K., Park, R., Sinclair, D.A. and Bohr, V.A. (2016). JNK phosphorylates SIRT6 to stimulate DNA double-strand break repair in response to oxidative stress by recruiting PARP1 to DNA breaks. *Cell Reports*, **16**: 2641-2650.
- Mukawera, E., Chartier, S., Williams, V., Pagano, P.J., Lapointe, R. and Grandvaux, N. (2015). Redox-modulating agents target NOX2-dependent IKK ϵ oncogenic kinase expression and proliferation in human breast cancer cell lines. *Redox Biology*, **6**: 9-18.
- Munoz, M.J., Moreno, N.N., Giono, L.E., Botto, A.E.C., Dujardin, G., Bastianello, G., Lavore, S. and Torres-Mendez, A. (2017). Major roles for pyrimidine dimers, nucleotide excision repair, and atr in the alternative splicing response to uv irradiation. *Cell Reports*, **18**: 2868-2879.
- Nakamura, K., Okada, E., Ukawa, S., Hirata, M., Nagai, A., Yamagata, Z., Kiyohara, Y., Muto, K., Kamatani, Y., Ninomiya, T., Matsuda, K., Kubo, M., Nakamura, Y., Group, B.J.C.H. and Tamakoshi, A. (2017). Characteristics and prognosis of Japanese female breast cancer patients: The Biobank Japan Project. *Journal of Epidemiology*, **27**: 58-64.

Nishina, A., Itagaki, M., Suzuki, Y., Koketsu, M., Ninomiya, M., Sato, D., Suzuki, T., Hayakawa, S., Kuroda, M. and Kimura, H. (2017). Effects of flavonoids and triterpene analogues from leaves of *Eleutherococcus sieboldianus* (Makino) koidz. 'himeukogi' in 3T3-L1 preadipocytes. *Molecules*, Doi : 10.3390/molecules22040671.

Nursal, A.F. (2012). meme kanserli oldularda her2 ve top2a gen düzensizlikleri ve kanserle ilişkili diğer genlerin epigenetik durumu ile ilişkilendirilmesi. Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

Onur, E., Tuğrul, B. ve Bozyiğit, F. (2009). DNA hasarı ve onarım mekanizmaları. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, **7**: 61-70.

Oyanagi, T., Takizawa, T., Aizawa, A., Solonso, O., Yagi, H., Nishida, Y., Koyama, H., Saitoh, A. and Arakawa, H. (2017). Suppression of MUC5AC expression in human bronchial epithelial cells by interferon- γ . *Allergology International*, **66**: 75-82.

Özdemir, T. (2011). HepG2 hücre kültürlerinde ouabainin antikanser etkisi ve endoplazmik retikulum stres cevabı ile ilişkisi. Uzmanlık Tezi, Ondokuzmayıs Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Samsun.

Özen, F.Ş. (2013). Thapsigargin ve compound C'nin 3T3-L1 öncül adiposit farklılaşmasının erken mitotik klonal genişleme safhasına etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze.

- Özyağcı, B. (2015). Organosilan bileşikleri ile modifiye edilmiş doğal zeolitin terpenlerin dimerleşme reaksiyonundaki katalitik aktivitesinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, Ankara.
- Pachon, A.F.A., Carvalho, T.I., Carrara, H.H.A., Andrade, J.M. and Takahashi, C.S. (2015). Detection of human mammaglobin A mRNA in peripheral blood of breast cancer patients before treatment and association with metastasis. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, **27**: 217-222.
- Pan, M.Y., Shen, Y.C., Lu, C.H., Yang, S.Y., Ho, T.F., Peng, Y.T., and Chang, C.C. (2012). Prodigiosin Activates endoplasmic reticulum stress cell death pathway in human breast carcinoma cell lines. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **265**: 325-334.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **29**: 2002-2007.
- Ramakrishnan, N. and Bose, R. (2016). Analysis of distribution of DNA methylation in kidney-renal-clear-cell-carcinoma spesifik genes using entropy. *Genomics Data*, **10**: 109-113.
- Reesema, L.L.S., Zheleva, V., Winston, J.S., Jansen, R.J., O'connor, C.F., Isbell, A.J., Bian, M., Qin, R., Bassert, P.T., Hinson, V.J., Dorsch, K.A., Kirby, B.W., Van Sciver, R.E., Tang-Tan, A.M., Harden, E.A., Chang, D. Z., Allen, C.A., Perry, R.R., Hoefer, R.A. and Tang, A.H. (2016). SIAH and EGFR, two RAS pathway biomarkers, are highly prognostic in locally advanced and metastatic breast cancer. *EBioMedicine*, **11**: 183-198.

- Rezende, A.A.A., Silva, M.L.A., Tavares, D.C., Cunha, W.R., Rezende, K.C.S., Bastos, J.K., Lehmann, M., Andrade, H.H.R., Guterres, Z.R., Silva, L.P. and Spano, M.A. (2011). The effect of the dibenzylbutyrolactolic lignan (-)-cubebin on doxorubicin mutagenicity and recombinogenicity in wing somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*, **49**: 1235-1241.
- Rezende, K.C.S., Lucarini, R., Simaro, G.V., Pauletti, P.M., Lanuario, A.H., Esperandim, V.R., Martins, C.H.G., Silva, M.A., Cunha, W.R., Bastos, J.K. and Silva, M.L.A.E. (2016). Antibacterial activity of (-)-cubebin isolated from *Piper cubeba* and its semisynthetic derivatives against microorganisms that cause endodontic infections. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **26**: 296-303.
- Rozpedek, W., Pydel, D., Mucha, B., Leszczynska, H., Alan-Diehl, J. and Majsterek, I. (2016). The role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP signaling pathway in tumor progression during endoplasmic reticulum stress. *Curr Mol Med*, **16**: 533-544.
- Saito, A., Suga, K., Nakagawa, R.O., Sanada, M. and Akagawa, K. (2016). Time lapse imaging analysis of the effect of ER stress modulators on apoptotic cell assessed by caspase3/7 activation in NG108-15 cells. *Data in Brief*, **6**: 20-27.
- Samadi, A.K., Bisland, A., Georgakilas, A.G., Amedei, A., Amin, A., Bishayee, A., Azmi, A.S., Lokeshwar, B.L., Grue, B., Panis, C., Boosani, C.S., Poudyal, D., Stafforini, D.M., Bhakta, D., Niccolai, E., Guha, G., Rupasinghe, H.P.V., Fujii, H., Honoki, K., Mehta, K., Aquilano, K., Lowe, L., Hofseth, L.J., Ricciardiello, L., Ciriolo, M.R., Singh, N., Whelan, R.L., Chaturverdi, R., Ashraf, S.S., Kumara, H.M.C.S., Nowsheen, S., Mohammed, S.I., Keith, W.N., Helferich, W.G. and Yang, X. (2015). A multi-targeted approach to suppress tumor-promoting inflammation. *Seminars in Cancer Biology*, **35**: 151-184.

Sarıkaya, B. (2014). Uzun süreli egzersiz eğitimi (antrenman) yapmış sıçanlarla, akut olarak koşturulan sıçanlarda tüketici egzersiz sonrası kalp dokusunda hepsidin ve interlökin-6 ekspresyonu değişiklikleri. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Selcen, A. ve Erdoğan, O. (2014). Arid3b expression in primary breast cancer samples. Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Shakshouk, H.A.G. and Rashwan, H. (2017). Can mesenchymal stem cells be used as a future weapon against breast cancer? *Alexandria Journal of Medicine*, **53**: 1-5.

Sharma, R., Deacon, S.E., Nowak, D., George, S.E., Szymonik, M.P., Tang, A.A.S., Tomlinson, D.C., Davies, A.G., McPherson, M.J. and Walti, C. (2016). Label-free electrochemical impedance biosensor to detect human interleukin-8 in serum with sub-pg/ml sensitivity. *Biosensors and Bioelectronics*, **80**: 607-613.

Shim, G., Ricoul, M., Hempel, W.M., Azzam, E.I. and Sabatier, L. (2014). Crosstalk between telomere maintenance and radiation effects: A key player in the process of radiation-induced carcinogenesis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, **760**: 1-17.

Shkrete, L., Toutant, J., Durand, M., Manley, J.L. and Chabot, B. (2016). SRSF10 connects DNA damage to the alternative splicing of transcripts encoding apoptosis, cell-cycle control, and DNA repair factors. *Cell Reports*, **17**: 1990-2003.

- Silva, V.L. and Al-Jamal, W.T. (2017). Exploiting the cancer niche: Tumor-associated macrophages and hypoxia as promising synergistic targets for nano-based therapy. *Journal of Controlled Release*, **253**: 82-96.
- Sozen, E. and Ozer, N.K. (2017). Impact of high cholesterol and endoplasmic reticulum stress on metabolic diseases: An updated mini-review. *Redox Biology*, **12**: 456-461.
- Stago, D., Portesis, N., Spanou, C., Mossialos, D., Aligiannis, N., Chaita, E., Panagoulis, C., Reri, E., Skaltsounis, L., Tsatsakis, A.M. and Kouretas, D. (2012). Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic *Lamiaceae* species. *Food and Chemical Toxicology*, **50**: 4115-4124.
- Sundar, I.K., Yin, Q., Baier, B.S., Yan, L., Mazur, W., Li, D., Susiarjo, M. and Rahman, I. (2017). DNA methylation profiling in peripheral lung tissues of smokers and patients with COPD. *Clinical Epigenetics*, Doi: 10.1186/S13148-017-0335-5.
- Taguchi, Y., Horiuchi, Y., Kano, F. and Murata, M. (2017). Novel prosurvival function of Yip1A in human cervical cancer cells: constitutive activation of the IRE1 and PERK pathways of the unfolded protein response. *Cell Death and Disease*, **8**: e2718; Doi: 10.1038/cddis.2017.147.
- Takeuchi, S., Matsuda, T., Ono, R., Tsujimoto, M. and Nishigori, C. (2016). Mitotic genes are transcriptionally upregulated in the fibroblast irradiated with very low doses of UV-C. *Scientific Reports*, **6**: 29233 Doi: 10.1038/srep29233.
- Tell, G., Vascotto, C. and Tiribelli, C. (2013). Alterations in the redox state and liver damage: Hints from the EASL Basic School of Hepatology. *Journal of Hepatology*, **58**: 365-374.

- Terzioğlu, G., Keskin, A.Ü. and Demirel, G.Y. (2013). Hücre proliferasyonu ölçüm yöntemleri ve çeşitli ticari proliferasyon kitlerinin karşılaştırılması. *Turkish Journal of Immunology*, **1**: 74-89.
- Todorova, M. and Trendafilova, A. (2014). *Sideritis scardica* Griseb., an endemic species of Balkan peninsula: Traditional uses, cultivation, chemical composition, biological activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **152**: 256-265.
- Tungkum, W., Jumnonprakhon, P., Tocharus, C., Govitrapong, P. and Tocharus, J. (2017). Melatonin suppresses methamphetamine-triggered endoplasmic reticulum stress in C6 cells glioma cell lines. *The Journal of Toxicological Sciences*, **42**: 63-71.
- Valıpour, F. (2015). Göğüs kanser hücrelerinde (mcf-7) manyetik nanopartiküller ile siRNA tedavisinin in vitro araştırılması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Ankara.
- Vatansever, B. (2014). Prostat ve akciğer kanseri hücre hatlarında *Rosmarinus officinalis* L. (biberiye) ekstresinin sitotoksik etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Verma, K., Shrivastava, D. and Kumar, G. (2014). Antioxidant activity and DNA damage inhibition in vitro by a methanolic extract of *Carissa carandas* (Apocynaceae) leaves. *Journal of Taibah University for Science*, **9**: 34-40.
- Vida, C., Toda, I.M., Cruces, J., Garrido, A., Gonzalez-Sanchez, M. and Fuente, M.D. (2017). Role of macrophages in age-related oxidative stress and lipofuscin accumulation in mice. *Redox Biology*, **12**: 423-437.

- Voiroit, G., Razazi, K., Amsellem, V., Nhieu, J.T.V., Abid, S., Adnot, S., Dessap, A.M. and Maitre, B. (2017). Interleukin-6 displays lung antiinflammatory properties and exerts protective hemodynamic effects in a double-hit murine acute lung injury. *Respiratory Research*, **18**: 64 Doi: 10.1186/s12931-017-0553-6.
- Wang, E.Y., Yang, Q. and Liao, Z.G. (2014). Association of polymorphisms in interleukin (IL)-12A and -B genes with rheumatoid arthritis in a Chinese population. *Clinical and Experimental Immunology*, Doi: 10.1111/cei.125633.
- Wei, L., Chu, M., Zhang, Q., Wang, Y., Shang, Q., Zhang, Y. and Zhang, G. (2014). Interleukin-12 gene adjuvant increases the immunogenicity of virus-like particles of human papillomavirus type 16 regional variant strain. *The Brazilian Journal of INFECTIOUS DISEASES*, **18**: 65-70.
- Wen, L., Xiao, B., Shi, Y. and Han, F. (2017). PERK signalling pathway mediates single prolonged stress-induced dysfunction of medial prefrontal cortex neurons. *Apoptosis*, **22**: 752-768 Doi: 10.1007/s10495-017-1371-5.
- Wu, J.C., Lai, C.S., Tsai, M.L., Ho, C.T., Wang, Y.J. and Pan, M.H. (2017). Chemopreventive effect of natural dietary compounds on xenobiotic-induced toxicity. *Journal of Food and Drug Analysis*, **25**: 176-186.
- Yaramış, A. (2011). İnsan meme kanseri MCF7 hücre dizisinde fumagillinin antikanserojenik etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Yavuz, İ. (2013). Kurşuna maruz kalan bireylerde lenfosit DNA hasarının belirlenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalı, Ankara.

- Yenidünya, E. (2014). Farklı pirazolil açıl tiyoüre bileşiklerinin kolon, karaciğer, kemik ve meme kanseri hücre hatlarında anti-kanser etkilerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- Yi. S., Shi, W., Wang, H., Ma, C., Zhang, X., Wang, S., Cong, B. and Li, Y. (2017). Endoplasmic reticulum stress PERK-ATF4-CHOP pathway is associated with hypothalamic neuronal injury in different durations of stress in rats. *Frontiers in Neuroscience*, **11**: 152. Doi: 10.3389/fnins.2017.00152.
- Yıldırım Biçer, A.Z. (2011). Seromer esaslı iki farklı indirekt kompozit materyalin sitotoksik etkilerinin *in vitro* değerlendirilmesi. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, **28**: 69-74.
- Yılmaz, S. (2014). Borik asitin antioksidan aktivitesinin hücre kültüründe araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Yu, C., Achazi, K. and Niedrig, M. (2013). Tick-borne encephalitis virus triggers inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) and transcription factor 6 (ATF6) pathways of unfolded protein response. *Virus Research*, **178**: 471-477.
- Yumrutaş, O., Oztuzcu, S., Pehlivan M., Ozturk, N., Poyraz, I.E., Iğci, Y.Z., Cevik, M.O., Bozgeyik, I., Aksoy, A.f., Bağış, H. and Arslan, A. (2015). Cell viability, anti-proliferation and antioxidant activities of *Sideritis syriaca*, *Tanacetum argenteum* sub sp. *argenteum* and *Achillea aleppica* subsp. *zederbaueri* on human breast cancer cell line (MCF-7). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **5**:1-5.
- Yüksel, S. (2011). Tedavi almış kanserli çocuklarda bazal ve indüklenmiş dna zincir kırıkları sıklığı, dna onarım kapasitesi, oksidatif dna hasarı ve antioksidan savunmanın değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- Yükselten, Y. (2012). Isırgan otu (*Urtica dioica* L.) ve ısırgan tohumu (*Fructus urticae piluliferae*) ekstraktlarının hücre kültürü ortamında genotoksisite ve oksidatif durum üzerine etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Şanlıurfa.
- Zampieri, M., Ciccarone, F., Calabrese, R., Franceschi, C., Bürkle, A. and Caiafa, P. (2015). Reconfiguration of DNA methylation in aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, **151**: 60-70.
- Zanotto, T.M., Quaresma, P.G.F., Guadagnini, D., Weissmann, L., Santos, A.C., Vecina, J.F., Calisto, K., Santos, A., Prada, P.O. and Saad, M.J.A. (2017). Blocking iNOS and endoplasmic reticulum stress synergistically improves insulin resistance in mice. *Molecular Metabolism*, **6**: 206-218.
- Zhang, M., Yu, M., Zhao, H., Zhou, X., Yang, Q., Song, F., Yan, L., Zhai, M., Li, B., Zhang, B., Jin, Z., Duan, W. and Wang, S. (2017). 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside protects murine hearts against ischemia/reperfusion injury by activating Notch1/Hes1 signaling and attenuating endoplasmic reticulum stress. *Acta Pharmacologica Sinica*, **38**: 317–330.
- Zhou, Y., Shu, F., Liang, X., Chang, H., Shi, L., Peng, X., Zhu, J. and Mi, M. (2014). Ampelopsin induces cell growth inhibition and apoptosis in breast cancer cells through ROS generation and endoplasmic reticulum stress pathway. *Plos ONE*, Doi: 10.1371/journal.pone.0089021.

İnternet Kaynakları

- 1 - <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>, 23.04.2017.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Halil TURHAN
Doğum Yeri ve Tarihi : BANDIRMA 06/01/1987
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (Telefon/e-posta) : 542 219 99 25 / halilturhan1987@hotmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : GÖNEN LİSESİ, 2005
Lisans : AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ, 2014

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl :

Yayınları (SCI ve diğer) :

Diğer konular