



**ISIRGAN OTU TOHUMU YAĞININ ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN
BELİRLENMESİ VE AKCİĞER (A549) İLE SERVİKS (HeLa) KANSER
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

İbrahim Halil ÇELİK

Eskişehir 2025

**ISIRGAN OTU TOHUMU YAĞININ ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN
BELİRLENMESİ VE AKCİĞER (A549) İLE SERVİKS (HeLa) KANSER
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

İbrahim Halil ÇELİK

DOKTORA TEZİ

Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR

Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Temmuz 2025

Eskişehir

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü tarafından 2212E216 proje numarası ile desteklenmiştir.

JURİ VE ENSTİTÜ ONAYI

İbrahim Halil ÇELİK'in "Isırgan Otu Tohumu Yağının Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi ve Akciğer (A549) ile Serviks (HeLa) Kanseri Hücreleri Üzerindeki Apoptotik ve Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması" başlıklı tezi tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyokimya Anabilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Danışma)	:	
Üye	:	
Üye	:	
Üye	:	
Üye	:	

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖZET
ISIRGAN OTU TOHUMU YAĞININ ANTIÖKSİDAN AKTİVİTESİNİN
BELİRLENMESİ VE AKCİĞER (A549) VE SERVİKS (HeLa) KANSER
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

İbrahim Halil ÇELİK

Biyokimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Bilimler Enstitüsü, Temmuz 2025

Danışman: Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR

Anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve metastazı sonucu ile karakterize olan kanser, dünyada ölümlerin en önde gelen sebeplerinden biridir. Akciğer kanseri, dünya çapında erkeklerde en sık görülen kanser türü olarak öne çıkarken, kadınlarda ise üçüncü sırada en çok görülen kanserdir. Serviks kanseri ise, dünyada kadınlarda en sık görülen kanserler arasında meme kanseri ve kolorektal kanserinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır. Kanser tedavisinde ya da tedavi süreçlerini desteklemede, tıbbi bitkiler potansiyel olarak bir seçenek sunmaktadır.

Bu tez çalışmasında, ısırgan otu (*Urtica dioica*) tohumu yağının antioksidan özellikleri ile birlikte A549 (insan akciğer adenokarsinom) ve HeLa (serviks) hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri in vitro koşullarda araştırılmıştır. Antioksidan kapasite DPPH ve ABTS (TEAK) yöntemleriyle değerlendirilmiş ve DPPH testinde en yüksek konsantrasyonda %83.17 inhibisyon sağlanmış, ancak bu etki pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında düşük bulunmuştur.

MTT analiz sonuçlarına göre, A549 hücrelerinde 24 ve 48 saatlik IC₅₀ değerleri sırası ile 0.503 mL/L ve 0.5485 mL/L olarak, HeLa hücrelerinde 24 saatlik 0.4209 mL/L olarak tespit edilmiş ve 48 saatlik sürede sonuç bulunamamıştır. Annexin V testi sonucunda A549 hücresinde apoptoz oranı 24 ve 48 saatte %10.05; %13.90; HeLa hücresinde ise sırasıyla %5.64 ve %2.51 olarak belirlenmiştir.

Kaspaz-3 analizinde, A549 hücrelerinde anlamlı bir artış gözlenmemiş olmakla birlikte HeLa hücrelerinde 24 saatte % 48.25 kaspaz aktivasyonu tespit edilmiştir. Mitokondriyal membran potansiyeli sonuçları ise A549 hücrelerinde 48 saatte %55.13'lük depolarizasyon tespit edilmiştir. Morfolojik görüntüleme için TUNEL boyama, özellikle A549 hücrelerinde apoptozun arttığını göstermiştir.

Sonuç olarak, *Urtica dioica* tohumu yağı, A549 hücrelerinde apoptozu zamana bağlı olarak artırırken, HeLa hücrelerinde daha çok nekrotik hücre ölümüyle sonuçlandığı tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Isırgan otu tohumu yağı, Kanser, Antioksidan, Apoptoz

ABSTRACT
**DETERMINATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF NETTLE SEED OIL
AND INVESTIGATION OF ITS APOPTOTIC AND CYTOTOXIC EFFECTS ON
LUNG (A549) AND CERVICAL (HeLa) CANCER CELLS**

İbrahim Halil ÇELİK

Department of Biochemistry

Anadolu University, Postgraduate Education Institute, July 2025

Supervisor: Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR

Cancer, which is an abnormality and occurs as a result of uncontrolled growth and metastasis, is one of the leading causes of death in the world. Lung cancer stands out as the most common type of cancer in men in the world, while the results are the third most common cancer. Cervical cancer is the third most common cancer in women in the world after breast cancer and colorectal cancer. In cancer treatment or support of treatment processes, medicinal plants potentially offer an option.

In this thesis, the antioxidant properties of nettle (*Urtica dioica*) seed oil and its cytotoxic and apoptotic effects on A549 (human lung adenocarcinoma) and HeLa (cervix) systems were investigated in vitro. Antioxidant capacity was evaluated by DPPH and ABTS (TEAC) methods and 83.17% inhibition was achieved at the highest concentration in the DPPH test, but this effect was at low rates compared to the positive control.

According to MTT analysis, IC_{50} values were determined as 0.503 mL/L and 0.5485 mL/L in A549 appearance and for 24 hours in HeLa cells, they were determined as 0.4209 mL/L, and no result was found for the 48 hours. Annexin V test result determined the apoptosis rate as 10.05% and 13.90% in A549 cells at 24 and 48 times; 5.64% and 2.51% in HeLa cells, respectively. In caspase-3 analysis, a significant change was observed in A549, and 48.25% caspase activation was detected in HeLa appearance at 24 dates. When mitochondrial membrane potential results were examined in A549, 55.13% depolarization was detected at 48 hours. TUNEL staining for morphological imaging showed that apoptosis increased especially in A549.

As a result, it was determined that *Urtica dioica* seed oil resulted in more necrotic cell death when A549 was grown, while apoptosis increased over time.

Keywords: Nettle seed oil, Cancer, Antioxidant, Apoptosis,

TEŞEKKÜR

Doktora ders dönemi, yeterlilik ve tez çalışmaları sırasında emeklerini ömrüm boyunca unutamayacağım, öğrencisi olduğumdan kendimi çok şanslı hissettiğim ve her zaman maddi ve manevi desteğini esirgemeyen çok kıymetli danışmanım Sayın Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR'e

Ders ve tez çalışmaları esnasında bilgisini, tecrübesini ve iyi niyetlerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Zerrin SELLER'e

Ders veya tez aşamalarında bilgilerinden ve tecrübelerinden faydalandığım Prof. Dr. Güngör KANBAK, Prof. Dr. Sevim KÜÇÜK, Prof. Dr. Gülşen ÇİFTÇİ, Prof. Dr. Halide Edip TEMEL, Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR, Dr. Öğr. Üyesi Yüksel Ögünç KEÇECİ ve Prof. Dr. Hatice Aysun Mercimek TAKCI hocalarıma,

Laboratuvarda deneyler esnasında desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen başta Elif APAYDIN, Gamze YILMAZ ve Fatma ÖZÇELİK olmak üzere Julien A.GYAMFI, Stephen D. ARIYELOYE, Burcu AKYILDIZ, Canan Yılmaz KAPANCIK, Y.Hameed JASİM ve İbrahim YILDIZ arkadaşlarıma,

Anadolu Üniversitesi Farmakognozi Ana Bilim Dalı gerçekleştirilen antioksidan testlerinin sonuçlandırılmasında verdiği destekten dolayı Arş. Gör. Burak TEMİZ arkadaşşıma,

Tez çalışmasında verdiği destekten dolayı Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birim'ine (AÜBAP),

Desteklerini her zaman yanında olduğunu hissettiğim aileme;

Teşekkürlerimi borç bilip, sonsuz şükranlarımı sunarım.

İbrahim Halil ÇELİK

Eskişehir

ETİK VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

İbrahim Halil ÇELİK

../../2025

ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI

Bu tezi hazırlarken ChatGPT ve Gemini üretken yapay zekâ programlarından destek aldığımı beyan ederim. Tezin hazırlığı aşamasında üretken yapay zekâ programlarından çeviri, bilimsel makale ve imla kuralı desteği aldım. Üretken yapay zekâ programlarından aldığım bilgilerin doğruluğunu kontrol ettiğimi bildiririm.

Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

İbrahim Halil ÇELİK

İÇİNDEKİLER

DOKTORA TEZİ	i
JURİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	iii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
DENKLEMLER DİZİNİ	xvi
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 KAYNAK BİLGİSİ	3
2.1 Kanserin Genel Tanımı ve Nedeni.....	3
2.2 Kanserin Temel Karakteristik Özellikleri	4
2.3 Akciğer Kanseri.....	5
2.4 Serviks Kanseri.....	7
2.5 Apoptozis.....	9
2.5.1 Apoptozun Moleküler Mekanizması	10
2.5.1.1 İntrinsik (Mitokondriyal) Apoptoz Yolu	10
2.5.1.2 Ekstrinsik Apoptoz Yolu	11
2.6. Isırgan Otu.....	13
2.6.1 Botanik Özellikler	13
2.6.2 Taksonomik Sınıflandırması	14

2.6.3 Kullanım Alanlar	15
2.6.4 Isırgan Otu Tohumu ve Yağı	16
2.7 Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	16
2.8 Antioksidanlar	18
2.8.1 Antioksidan Savunma Mekanizması	21
3 MATERYAL ve YÖNTEMLER	21
3.1 Kullanılan Materyaller	21
3.1.1 Hücre Hatları.....	21
3.1.2 Isırgan Otu Tohumu Yağı	21
3.1.3 Kimyasallar ve Sarf Malzemeler	22
3.1.4 Ekipmanlar	22
3.1.5 Kullanılan Ticari Kitler	23
3.1.6 Bilgisayar Yazılımları	24
3.2 Yöntemler.....	24
3.2.1 Isırgan Otu Tohum Yağının Antioksidan Etkisinin İncelenmesi	24
3.2.1.1 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikalini süpürücü etkisi.....	24
3.2.1.2 ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzotiazoline-6-sülfonik asit) radikali katyon süpürücü etki (TEAK)	25
3.2.2 Hücre Kültürü Uygulamaları.....	25
3.2.2.1 Hücre Kültürü	25
3.2.2.2 Hücrelerin Stoklanması	25
3.2.2.3 Hücrelerin Stoktan Çıkarılması.....	26
3.2.2.4 Hücrelerin Pasajlanması	26
3.2.3 Sitotoksitite (MTT) testi	27
3.2.3.1 MTT yöntemi ile ısırgan otu tohumu yağının IC ₅₀ dozunun belirlenmesi	27

3.2.4 Apoptotik Etki Testleri	27
3.2.4.1 Annexin-V FITC testi: Erken ve Geç Apoptoz Tespiti.....	27
3.2.4.2 Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi	28
3.2.4.3 Mitokondriyal Membran Potansiyeli($\Delta\Psi_m$)	28
3.2.4.4 Akridin Oranj-Etidyum Bromür Boyama	29
3.2.4.5 mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	29
3.2.4.5.1 Total RNA İzolasyonu.....	29
3.2.4.5.2 RNA'nın miktar ve saflığının belirlenmesi.....	29
3.2.4.5.3 Total RNA eldesinden cDNA sentezi	30
3.2.4.5.4 Gen İfadelerinin Belirlenmesi (Real Time PCR).....	30
3.2.4.5.5 RT-PCR Sonuç Verilerinin Analizi	31
3.2.4.6 TUNEL yöntemi	31
3.2.5. İstatistik Çalışma.....	32
4 BULGULAR.....	32
4.1 Isırgan Otu Tohumu Yağının Antioksidan Aktivite Sonuçları	32
4.1.1 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) Radikalini Süpürücü Etkisi.....	32
4.1.2 ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzotiazoline-6-sülfonik asit) radikali katyon süpürücü etki (TEAK)	33
4.2 Isırgan Otu Tohumu Yağının A549 ve HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	34
4.2.1 UDS yağının A549 hücrelerine 24 saat süredeki etkisi	35
4.2.2 UDS yağının A549 hücrelerine 48 saat süredeki etkisi	36
4.2.3 UDS yağının HeLa hücrelerine 24 saat süredeki etkisi	37
4.2.4 UDS yağının HeLa hücrelerine 48 saat süredeki etkisi	38
4.3 Annexin-V FITCH	39
4.4 Kaspaz-3.....	43

4.5 Mitokondriyal Membran Potansiyeli ($\Delta\Psi_m$)	46
4.6 Akridin Oranj/Etidyum Bromür Boyama ile Apoptozun Belirlenmesi.....	47
4.7 mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	50
4.8 TUNEL yöntemi	52
5 SONUÇ, TARTIŞMA ve ÖNERİLER.....	54
KAYNAKÇA.....	65
ÖZ GEÇMİŞ	



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Isırğan otu (<i>Urtica dioica</i>) bitkisinin taksonomik sınıflandırılması.....	14
Tablo 2.2. Isırğan otu (<i>Urtica dioica</i>) bitki tohumlarının biyoaktif bileşenler ve içerdiği elementler.....	16
Tablo 2.3. Reaktif Oksijen Türleri(ROS) ve Reaktif Nitrojen Türleri (RNS).....	17
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler	22
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan ekipmanlar.....	22
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan ticari kitler.....	23
Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan bilgisayar yazılımları	24
Tablo 3.5. cDNA sentezi için reaksiyon karışım miktarları.....	30
Tablo 3.6. PCR reaksiyon karışımı	30
Tablo 3.7. PCR döngüleri, süre ve sıcaklıkları	31
Tablo 4.1. UDS yağının antioksidan kapasitesi(TEAK).....	34
Tablo 4.2. UDS yağının 24 saat uygulamasında 6 farklı konsantrasyona tabi tutulan A549 hücresindeki % hücre canlılık değerleri	35
Tablo 4.3. UDS yağının 48 saat uygulamasında 6 farklı konsantrasyona tabi tutulan A549 hücresindeki % hücre canlılık değerleri.....	36
Tablo 4.4. UDS yağının 24 saat uygulamasında 6 farklı konsantrasyona tabi tutulan HeLa hücresindeki % hücre canlılık değerleri)	37
Tablo 4.5. UDS yağının 48 saat uygulamasında 6 farklı konsantrasyona tabi tutulan HeLa hücresindeki % hücre canlılık değerleri.....	38
Tablo 4.6. UDS yağının A549 ve HeLa hücre hatlarında 24-48 saatlik IC ₅₀ değerleri ve etkileri	39

Tablo 4.7. A549 ve HeLa hücrelerinin 24 ve 48 saat canlı, nekroz, erken apoptoz ve geç apoptoz % ortalama değerleri	40
Tablo 4.8. UDS yağının 24 ve 48 saat sürelerde A549 ve HeLa hücrelerinde kaspaz aktivitelerinin değerleri	44
Tablo 4.9. A549 ve HeLa hücrelerinde 24 ve 48 saat sürelerde mitokondriyal membran potansiyeli aktivitelerinin(%) sonuçları.....	46



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 2019 yılı 70 yaş altı ölüm nedeni olan kanserin ölüm nedeni olarak ulusal sıralaması.	3
Şekil 2.2 Akciğer kanseri gelişiminde rol oynayan temel risk faktörleri	6
Şekil 2.3 Serviks kanseri evreleri	8
Şekil 2.4 Ekstrinsik ve İntrinsik Apoptotik Yolaklar	12
Şekil 2.5 Isırgan otunun genel görünüşü.	14
Şekil 2.6 Serbest radikal yapısı.....	17
Şekil 2.7 Antioksidanların Sınıflandırılması.	20
Şekil 4.1 UDS Yağının DPPH serbest radikal süpürücü etki grafiği	33
Şekil 4.2 UDS yağının Troloks eşdeğer cinsinden antioksidan kapasitesi grafiği	34
Şekil 4.3 UDS yağının 24 saat uygulamasında 6 farklı konsantrasyona tabi tutulan A549 hücreesindeki % hücre canlılık grafiği	35
Şekil 4.4 UDS yağının 48 saat uygulamasında 6 farklı konsantrasyona tabi tutulan A549 hücreesindeki % hücre canlılık değerleri.....	36
Şekil 4.5 UDS yağının 24 saat uygulamasında 6 farklı konsantrasyona tabi tutulan HeLa hücreesindeki % hücre canlılık değerleri.....	38
Şekil 4.6 UDS yağının 48 saat uygulamasında 6 farklı konsantrasyona tabi tutulan HeLa hücreesindeki % hücre canlılık değerleri.....	38
Şekil 4.7 A549 hücrelerinin 24 ve 48 saat apoptoz düzeyleri	40
Şekil 4.8 HeLa hücrelerinin 24 ve 48 saat apoptoz düzeyleri Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Şekil 4.9 A549 ve HeLa hücrelerinin 24 ve 48 saat apoptoz düzey grafikleri	42

Şekil 4.10 UDS yağının 24 ve 48 saat sürelerde A549 ve HeLa hücrelerinde kaspaz aktivitelerinin grafikleri	44
Şekil 4.11 UDS yağının A549 ve HeLa hücrelerinde 24 ve 48 saat süresindeki kaspaz aktiveleri	45
Şekil 4.12 A549 ve HeLa hücrelerinin 24 ve 48 saat sürelerde mitokondriyal membran geçirgenlikleri grafiği	47
Şekil 4.13 A549 hücrelerine ait AO/EB boyama sonuçları.....	49
Şekil 4.14 HeLa hücrelerine ait AO/EB boyama sonuçları.....	49
Şekil 4.15 A549 ve HeLa hücrelerinde Bax geninin ifade edilme düzeyleri(24saat)	50
Şekil 4.16 A549 ve HeLa hücrelerinde Bcl2 geninin ifade edilme düzeyleri(24saat) ...	51
Şekil 4.17 A549 ve HeLa hücrelerinin 24 ve 48 saat TUNEL boyama sonucu mikroskop görüntüleri.....	52

DENKLEMLER DİZİNİ

Denklem 3.2 İnhibisyon Formülü

Denklem 3.1 İnhibisyon Formülü

Denklem 4.1 MTT testi için kullanılan % canlılık belirleme formülü



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİN

$\mu\text{g/g}_{\text{DW}}$	: Bir maddenin 1 gramda bulunan kuru ağırlığının mikrogram cinsinden madde miktarı
$\mu\text{g/mL}$	: 1 mililitre sıvıda bulunan mikrogram cinsinden madde miktarı
μl	: Mikrolitre
3'-OH ucu	: Üçüncü karbondan serbest -OH (hidroksil grubu) bulunan uç
4T1	: Meme Kanseri Hücre Hattı
8-OHG	: 8-Hidroksiguanozin
A549	: Akciğer Kanseri Hücre Hattı
ABTS	: 2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
ALK	: Hücre Gelişiminde ve Büyümesinde Sinyal İletiminde Görev Alan Bir Protein Kinazı Kodlayan Gen
ANOVA	: Analysis of Variance (Varyans Analizi)
AO	: Akridin Oranj
B16BL16	: İnsan Melanom Hücre Hattı
B16F10	: İnsan Melanom Hücre Hattı
Bak	: Bcl2 Antagonisti
Bax	: Bcl2 ile ilişkili X (Apoptoz Düzenleyicisi)
Bcl2	: Bcl2 Apoptoz düzenleyicisi

BH3	: Bcl-2 Protein Ailesi Üyesi
BRAF	: Hücre Bölünmesinde ve Büyümesinde Görev Alan Bir Protein Kinazı Kodlayan Gen
Caspaz	: Apoptozla İlişkili Olan Sistein Peptidaz
CCCP	: Carbonil Cyanide m-Chlorophenyl Hydrazone (Karbonil Siyanür m-Klorofenil Hidrazon)
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
CO ₂	: Karbondioksit
CTLA-4	: Sitotoksik T-Lenfosit İlişkili Protein 4
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
DR4/5	: Death (Ölüm) Reseptörü
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EB	: Etidyum Bromür
EC ₅₀	: %50 Maksimum Etkili Doz
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetat
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
Fas	: First Apoptosis Signal (İlk Apoptoz Sinyal) Reseptörü
FBS	: Fetal Bovine Serum (Fetal Sığır Serum)
FITC	: Floresein İzotiyosiyanat

gDNA	: Genomik DNA
HeLa	: Serviks Kanseri Hücresi
HL-60	: İnsan Promiyelositik Hücresi
HPV	: Human Papilloma Virüs (İnsan Papilloma Virüsü)
HTC-116	: Kolorektal Kanseri Hücresi
IC ₅₀	: Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyon Dozu
JC-1	: 5,5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetil benzimidazolil carbocyanin iyodür
K562	: Kronik Miyeloid Lösemi Hücresi
KHAK	: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
LNCap	: Prostat Kanseri Hücresi
MCF-7	: Meme Kanseri Hücresi
MCL-1	: Bcl-2 Protein Ailesi Üyesi
MDA	: Malondialdehit
MDA-MB-231	: Meme Kanseri Hücresi
mg	: Miligram
mg/mL	: 1 mililitre sıvıda bulunan miligram cinsinden madde miktarı
ml/L	: 1 litre sıvıda bulunan mililitre cinsinden madde miktarı
mM	: Milimolar
MMP	: Mitokondri Membran Potansiyeli

mMTE/g kuru ekstre	: Milimol Troloks Eşdeğeri/ gram kuru ekstre
mRNA	: Messenger RNA
MTT	: 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid
NF-κB	: Nükleer Faktör kappa B
nM	: Nanomolar
NOXA	: BH3-only Protein Ailesi Üyesi
NSCLC	: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PCO	: Protein Carbonil Oksidasyonu
PD-1	: Programlı Hücre Ölümü Proteini 1
PI	: Propidyum İyodür
PS	: Fosfatidilserin
RNA	: Ribonükleik Asit
RNS	: Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
ROS1	: Sinyal İletimde Görevli Protein Kinaz
RTKİ	: Reseptör Tirozin Kinazı İnhibitörleri
RT-PCR	: Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SCLC	: Küçük Hücreli Karsinom
SEM	: Scanning Electron Microscope (Taramalı Elektron Mikroskobu)

SOD : Süperoksit Dismutaz

TEAK : Troloksa Eşdeğer Antioksidan Kapasite

TNFR1 : Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü 1

UDS yağı : Urtica Dioica Seed (Isırgan Otu Tohumu) Yağı

UPL Probu : DNA veya RNA dizilerini tespitinde floresan etiketli özel DNA probu

α : Alfa

β : Beta

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Küresel bir halk sağlığı sorunu ve ciddi bir ölüm nedeni olan kanser, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2019 yılı verilerine göre 183 ülkenin 112 ülkesinde 70 yaşının altındaki bireylerde en sık görülen ilk veya ikinci sırada olan ölüm nedenidir. Dünya genelinde 2020 yılında 19.3 milyon kişiye yeni teşhis konulmuş olup, yaklaşık olarak 10 milyon kadarı ölümle sonuçlandığı bilinmekte ve kanserli hasta sayısının 2040 yılına kadar da 28.4 milyona ulaşılması tahmin edilmektedir (Wang vd., 2022).

2018 yılında tüm dünyadaki kanserlerin %12'sini oluşturan akciğer kanseri, son yıllarda en çok teşhisi konulan kanser türü olup ve bu sayı yaklaşık olarak 2.1 milyon civarındaydı. Erkeklerde 1.37 milyon teşhis konulmuş ve bu sayı kadınlarda 725.000 civarında olup erkeklere oranla daha düşük görülmektedir (Schabath and Cote, 2019). Kadınlarda meme, kolorektal ve akciğer kanserlerinden sonra en sık görülen dördüncü kanser türü olan serviks kanseri ise 2018 yılında yaklaşık olarak 570.000 vaka görüldü ve bunun 311.000'i ölümle sonuçlandı. Serviks kanseri, araştırma yapılan 185 ülkede, 146'sında 45 yaşından küçük olan kadınları etkileyen ilk üç kanser arasında yer almaktadır (Arbyn vd., 2020).

21. yüzyılında artan çeşitli sorunlar sebebiyle oluşan kanser artışlarını durdurmak amacıyla birçok yöntem uygulanmaktadır. Bu yöntemler emoterapi, radyoterapi, cerrahi yöntemler, hormon terapisi ve birçok biyolojik yöntemlerdir. Her yöntemin avantajları ve dezavantajlarının olması ve kanserin de kişiden kişiye farklılık gösteren bir hastalık olması sebebiyle kesin olarak bir tedavi yönteminin söylemek neredeyse imkânsızdır. Onkologların ulaştığı sonuçlar, kanser tedavisinde en çok kullanılan yöntem olan kemoterapi etkinliklerinin artık sınırlarına ulaştığını göstermekte ve bu nedenle de birçok kanser çeşidinin tedavisi için gerekli olabilecek ilerlemeleri sağlamak amacıyla yeni yöntemlere gereksinim olduğu vurgulanmaktadır (Papiez and Krzysciak, 2021).

Bu doğrultuda kanser tedavisi veya kanser tedavisi destekleyici olarak yeni antikanser ajanlarının araştırılması kanser hücrelerine karşı antioksidan, antimikrobiyal, antikanser vs. etkilere sahip olan bitkiler faydalanılabilecek en iyi kaynaklardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Nutrasötik gıda ürünleri ya da işlevsel gıdalar ile gıdanın biyoaktif molekülleri kullanılarak kronik ve çok çeşitli dejeneratif hastalıklar önlenebilmektedir. Bu doğrultuda bilim insanları, çok eski çağlardan beri yaygın olarak kullanılmakta olan tıbbi bitkilerden yararlanılmıştır. *Urticaceae* familyasına ait olan ve yıllardır yaygın

şekilde kullanılan *Urtica dioica* olarak bilinen ısırgan otu bitkisi, dünya genelinde en çok çalışılan bitkilerden biridir (Esposito vd., 2019).

Ülkemizde geniş bir alanda yetişen *Urticaceae* familyasına ait olan ısırgan otu (*Urtica dioica*) bitkisinin kök, gövde, yaprak ve tohumları, çeşitli ülkelerde farklı şekillerde çeşitli hastalıklarda, bu bitkinin tıbbi özelliklerinden dolayı ilaç özelliğinden faydalanılmaktadır. Isırgan otunun özellikle yaprak ve kökleri üzerine kapsamlı çok sayıda çalışma bulunurken ve ayrıca yaprak, kök ve tohum kısımlarının farklı parametrelerde birbirleriyle veya ayrı ayrı birçok bilimsel araştırma olmasına rağmen, sadece ısırgan otu tohumu ile alakalı çalışmalar oldukça azdır. Isırgan otu tohumuyla ilgili yapılan sınırlı sayıda çalışmada içerdiği maddeler ve aktif bileşenler olarak, kanser hücrelerinde sitotoksik ve apoptoz etkileri gösterebileceği fikrini ortaya koymuştur. Ayrıca çalışmamız kapsamını artırmak adına, antioksidan düzeylerine bakılması hedeflenmiştir.

Bu çerçevede, ısırgan otu tohumlarından elde edilen yağın farklı konsantrasyonlarda, akciğer kanser hücre hattı olan A549 hücresinde ve serviks kanser hücre hattı olan HeLa hücresinde apoptotik ve sitotoksik etkileri incelenerek antikanser özelliklerinin potansiyeli araştırılacak ve eğer etki gözlemlenirse bu etki mekanizmasının aydınlatılması amaçlanmaktadır. Ayrıca, ısırgan otu tohumu yağının antioksidan kapasitesi hakkında bilgi edinme için de antioksidan aktivitesi deneylerinin yapılması da planlanmaktadır.

2 KAYNAK BİLGİSİ

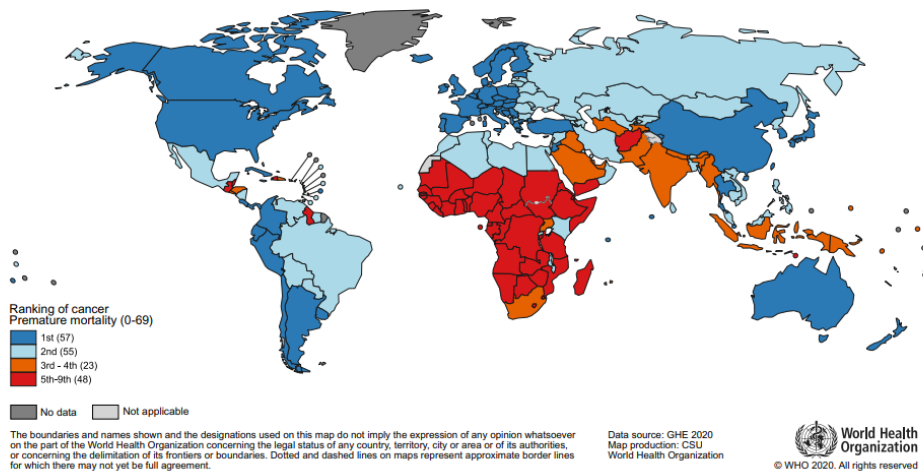
2.1 Kanserin Genel Tanımı ve Nedeni

Kanser, hücrenin proliferasyonu, motilitesi, onarımını, invazyonunu ve hayatta kalması gibi temel süreçleri düzenleyen genlerdeki mutasyonların somatik hücrelerde birikmesiyle meydana gelen oldukça karmaşık ve çok yönlü bir hastalıktır (Sodir and Evan, 2011). Dengesiz beslenme, alkol ve tütün kullanımı, kronik stres, obezite, enfeksiyon, yaşlanma, nüfus artışı, nükleer atıklara maruz kalma ve işlenmiş gıdaların yaygın tüketimi gibi çevresel ve yaşam tarzı faktörleri, dünya genelinde kanserin mortalitesi ve insidansının artmasına katkıda bulunmaktadır. Gelişmiş ülkelerde kanser epidemiyolojisine bakıldığında erkeklerde en sık görülen kanser türleri akciğer ve prostat kanseri iken, kadınlarda ise daha çok meme, serviks ve kolorektal kanserler ön plandadır (Özmen vd., 2016).

Dünya genelinde mortaliteye neden olan ve sağlıklı yaşam süresini kısıtlayan başlıca hastalıklardan biri olan kanser, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2019 verilerine göre, araştırmaya dahil edilen 183 ülkenin 112'sinde 70 yaşın altı ölümlerinin birinci ya da ikinci en yaygın nedeni olarak bildirilmektedir. Ayrıca 23 ülkede ise üçüncü ya da dördüncü ölüm nedeni olmaktadır (Şekil 2.1). Nüfusun yaşlanması ve büyümesinin yanı sıra birçok sosyoekonomik gelişmelerle alakalı olan kanser, dünya genelinde hızla artmaktadır (Sung vd., 2021).

Şekil 2.1

2019 yılı 70 yaş altı ölüm nedeni olan kanserin ölüm nedeni olarak ulusal sıralaması (Kaynak: DSÖ, 2019) (Sung vd., 2021).



Yaşlanma ile birlikte birçok kanser türünün insidansında çarpıcı bir artış gözlemlenmektedir. Özellikle 60-79 yaş aralığında, hem erkeklerde hem de kadınlarda kanserin başlıca ölüm nedeni olduğu bildirilmiştir. 60 yaş üzerindeki bireylerde invaziv kanser gelişme riski, 60 yaşında altındaki bireylerle karşılaştırıldığında özellikle genç bireylerde yaklaşık iki kat daha fazladır. DSÖ verilerine göre, 60 yaş üstü nüfus oranının 2050 yılına kadar %12'den %22'ye yükselmesi ve bu yaş grubundaki kişi sayısının 2 milyarın üstüne çıkması beklenmektedir (Fane and Weeraratna, 2020).

Ülkemizde kanser istatistikleri değerlendirildiğinde, erkeklerde en sık görülen kanser türleri sırasıyla akciğer (%55.9), prostat (%39.1), kolorektal (%25.5), mesane (%21.4) ve mide (%14.1) kanserleridir. Kadınlarda ise en sık rastlanan kanser türleri meme (%52.6), tiroid (%21.3), kolorektal (%15.0), korpus (%11.2) ve akciğer (%11.2) kanserleridir. 2019 yılı verilerine göre Türkiye'de 31.742 kişiye akciğer kanseri, 2.374 kişiye ise serviks kanseri tanısı konulmuştur (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2019).

2.2 Kanserın Temel Karakteristik Özellikleri

Kanser hücreleri, kontrolsüz çoğalma ve hayatta kalma avantajı elde etme amacıyla, gelişimleri süresince belirli biyolojik özellikler kazanırlar. Hanahan ve Weinberg tarafından ortaya konulan bu karakersiz yapı, tümör oluşumu ve ilerlemesi sırasında evrimsel olarak edinilen temel fenotipik değişimleri tanımlamaktadır.

- 1- Apoptozdan kaçınma (hücre ölüm mekanizmasından kaçınma),
- 2- Büyüme inhibitörlerine duyarsızlık (büyümeyi durduran sinyallere direnç geliştirme),
- 3- Enerji metabolizmasının yeniden programlanması (enerji üretimini kontrolsüz duruma getirme),
- 4- Bağışıklık sisteminden kaçış,
- 5- Genom instabilize ve mutasyonlar,
- 6- Metastaz ve invazyon,
- 7- Sınırsız replikasyon potansiyeli,
- 8- Bağımsız büyüme sinyalleri,
- 9- Anjiyogenez (yeni kan damarları oluşturma),
- 10- Sürekli bölünebilme,

Hanahan ve Weinberg, gelişim sürecindeki bu on temel karakteristik yanında yaptığı güncel çalışmalarla fenotipik esneklik, polimorfik mikrobiyom, mutasyonsuz epigenetik programlama ve yaşlanan hücreler olmak dört yeni özellik daha eklenmiş ve temel kanser karakteristik özelliklerinin sayısı on dörde ulaşmıştır (Hanahan D., 2022; Brown S. J., 2023).

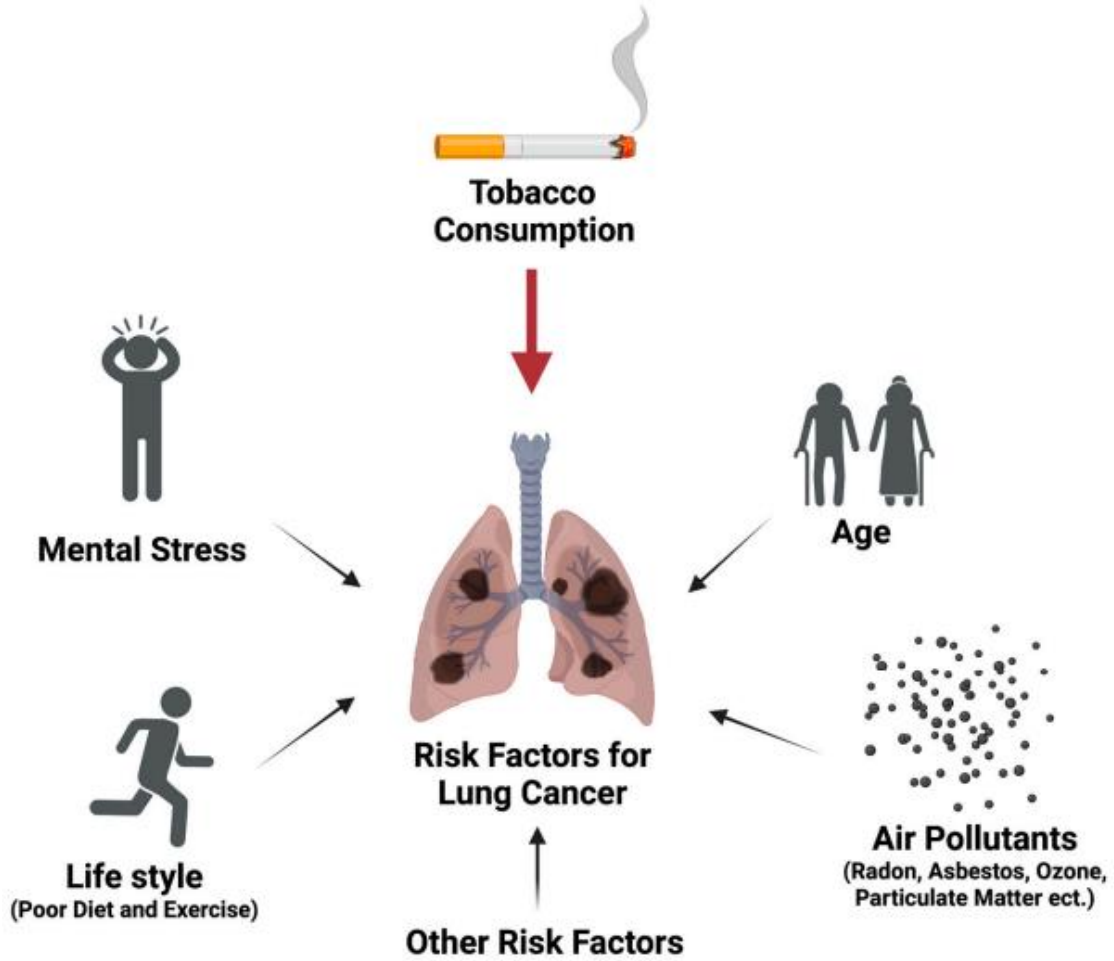
2.3 Akciğer Kanseri

Dünya genelinde en sık teşhis edilen malignitelerden biri olan akciğer kanseri, kanser bağlı mortalite nedenleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Her yıl yaklaşık 2.2 milyon yeni akciğer kanseri vakası teşhis edilmekte olup, bu hastaların yaklaşık %75'i tanıdan sonraki ilk beş yıl içinde yaşamını yitirmektedir. Akciğer kanserin tedavisinin zorlu bir süreç haline gelmesi, yüksek tümör içi heterojenlik ve ilaç direncine neden olan kanser hücrelerinin karmaşık yapıda olmasıdır (Yawei vd., 2022).

Çevresel ve davranışsal faktörlerin çeşitliliği, akciğer kanserinin gelişimi ile doğrudan ilişkilendirilmektedir. Sigara kullanımı, akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %85-90'ından sorumlu olan en önemli etiyolojik faktördür. Akciğer kanseri riskini, tütün içme, tütün dumanına maruz kalma ve aile geçmişi yanı sıra kanserojen kimyasallar ile radon gazı, arsenik, krom, berilyum, asbest ve nikel gibi ağır metaller de büyük ölçüde artırmaktadır (Şekil 2.2). Bunlara ek olarak alkol kullanımı, HIV enfeksiyonu ve akciğer fibrozu da akciğer kanserinin karsinogenezinden sorumludur. (Alduais vd., 2023; Freeman vd., 2023)

Şekil 2.2

Akciğer kanseri gelişiminde rol oynayan temel risk faktörleri (Freeman vd., 2023).



Köken aldığı hücreye göre akciğer kanseri, KHAK (küçük hücreli akciğer kanseri) ve KHDAK (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. (Basumallık vd., 2023). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2015 yılı sınıflandırmasına göre, en yaygın akciğer kanseri alt tipleri arasında adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve küçük hücreli karsinomun yanı sıra, büyük hücreli nöroendokrin karsinom ve karsinoid tümörler gibi nöroendokrin neoplazmalar da yer almaktadır. Adenokarsinom, sigara içmeyen bireylerde ve kadınlarda daha sık görülmekte olup, genellikle akciğerin periferik bölgelerinde lokalize olmaktadır. Adenokarsinom olguları, sıklıkla ALK, EGFR, BRAF ve ROS1 gibi hedefe yönelik tedavi seçenekleriyle ilişkili mutasyonlar açısından pozitif sonuç vermektedir. Bu hedefe yönelik mutasyonlara karşı geliştirilen reseptör tirozin kinazı inhibitörleri (RTKİ) gibi küçük moleküllü ajanlar ile PD-1 (Programmed Cell Death Protein 1) ve CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte–Associated Protein 4)

inhibitörleri gibi immünoterapiler, son yıllarda kemoterapinin yerini almış ya da kemoterapiye ek olarak tedavi protokollerine entegre edilmiştir. Karsinoid tümörler, iyi diferansiye nöroendokrin hücrelerden kaynaklanan malignitelere dir. Buna karşın, küçük hücreli karsinom (SCLC) zayıf diferansiye nöroendokrin hücrelerden köken alır; agresif seyirli olup erken metastaz yapma eğilimindedir, tedaviye sınırlı yanıt verir ve genellikle kötü prognoz gösterir. Skuamöz hücreli karsinom ve küçük hücreli akciğer kanseri, özellikle erkeklerde sigara kullanımı ile güçlü bir ilişki göstermekte olup, sıklıkla santral (merkezi) yerleşimli tümörler olarak karşımıza çıkmaktadır. (Thandra vd., 2021; Limaem vd., 2023).

Sınırsız çoğalma potansiyeline ve kendini yenileme kapasitesine sahip, insan kanserlerinden türetilmiş hücre hatları, tümör biyolojisinin in vitro koşullarda araştırılmasına olanak sağlayan önemli modellerdir. Bu kapsamda, insan akciğer adenokarsinomuna ait A549 hücre hattı, 1972 yılında D.J. Giard tarafından, Kafkas kökenli 48 yaşındaki bir erkek hastadan elde edilen karsinomatöz dokunun laboratuvar ortamında kültüre edilmesiyle geliştirilmiştir. A549 insan akciğer kanser hücreleri, hipotriploid özellikteki insan alveolar bazal epitel hücreleri olarak tanımlanmakta olup, Tip II pulmoner epitel hücrelerinin in vitro modeli ve akciğer adenokarsinomu araştırmaları için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu hücreler, kültür ortamında tek katman (monolayer) oluşturarak yüzeye yapışık şekilde proliferasyon gösterirler ve transfeksiyon uygulamaları için uygun bir konak hücre modeli olarak değerlendirilmektedir. (Korrodi-Gregório L vd., 2016)

2.4 Serviks Kanseri

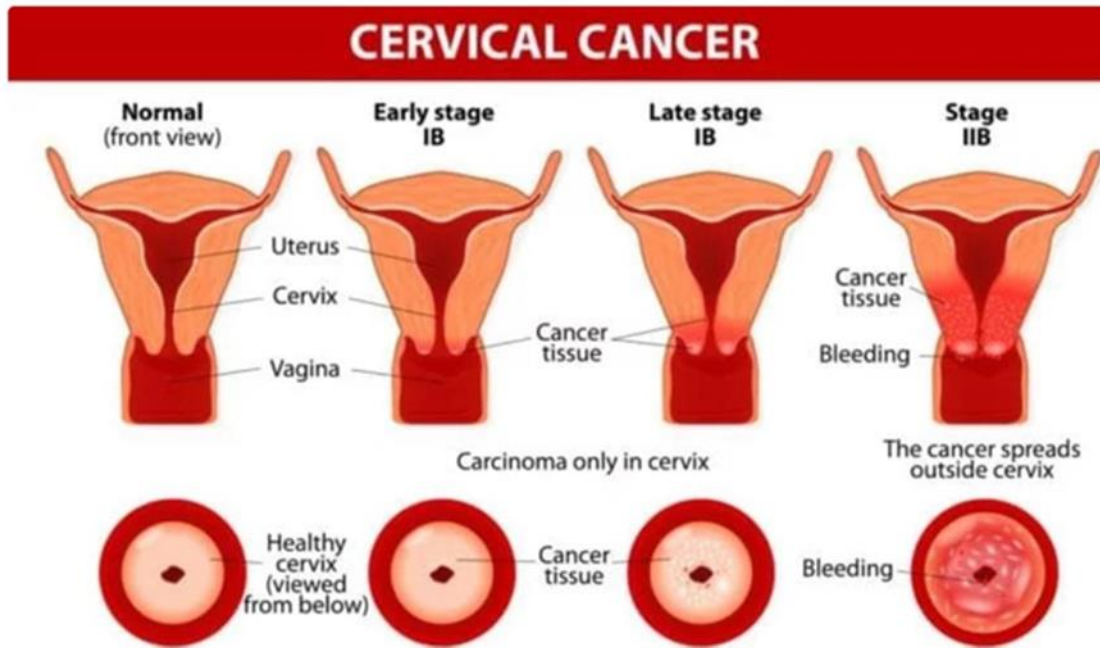
Serviks (rahim ağzı) kanseri çalışmalarında yaygın olarak kullanılan HeLa hücre hattı, ilk kez 1951 yılında, Amerika Birleşik Devletleri'nde yaşayan Afrika kökenli 31 yaşındaki servikal adenokarsinom tanılı bir kadın olan Henrietta Lacks'tan elde edilen tümör dokusundan türetilmiştir. Henrietta Lacks'tan elde edilen HeLa hücreleri, in vitro ortamda sürekli olarak kültüre edilebilen ilk başarılı insan hücre hattı olma özelliğini taşımakta olup, son altmış yılda pek çok biyomedikal araştırmada hücre modeli olarak yaygın şekilde kullanılmıştır (Adey vd., 2013). Sık görülen malign tümörlerden biri olan serviks kanserinde, olguların yaklaşık %13'ünün ileri evrede teşhis edilmesi dikkat çekicidir. İlerlemiş servikal kanser vakaları genellikle mortaliteyle sonuçlanmakta olup, metastatik olgularda beş yıllık sağkalım oranı yalnızca %16.5 seviyesindedir. Buna karşın, hastalığın

yalnızca serviksle sınırlı olduğu erken evre vakalarda sağkalım oranı %91.5 gibi oldukça yüksek düzeylerde bildirilmektedir.

Metastatik serviks kanserinin tedavisi ve sağkalım oranları incelendiğinde, hastalığın hem hematojen (kan yoluyla) hem de lenfatik (lenf yoluyla) olmak üzere iki temel metastaz tipiyle ilerlediği görülmektedir. Hematojen metastazı olan hastalarda ölüm riski fazlayken, lenfatik metastazı olanlarda ise ölüm riski daha düşüktür. Eğer hastanın pelvik bölgesi dışında etkilenen yer lenf nodları ise metastaz lenfatik olarak tanımlanmaktadır. Hematojen metastaz ise genellikle akciğer, karaciğer, beyin ve kemik gibi organlara ve diğer bölgelere yayılmaktadır (Li vd., 2016). Serviks kanserinin evreleri Şekil 2.3'te verilmiştir (Mustafa vd., 2020).

Şekil 2.3

Serviks kanseri evreleri(Mustafa vd., 2020).



Serviks kanseri vakalarının neredeyse tamamının ana nedeni insan papilloma virüsü (HPV) enfeksiyonu olarak gösterilmektedir. HPV tipleri ise onkojenik potansiyellerine göre düşük ve yüksek riskli suşlar olarak sınıflandırılmaktadır. Düşük riskli HPV suşları asemptomatik olabilmekte veya anogenital siğillere neden olurken, yüksek riskli suşlar onkojeniktir. Servikal displazi ve karsinomların %99'undan fazlası, yüksek riskli HPV enfeksiyonlarına bağlı olarak gelişmektedir. Tanımlanmış 200'den fazla HPV türünün yaklaşık 40 kadarı anogenital bölgeyi enfekte edebilmekte; bunlardan 15 ila 18 tipi ise yüksek riskli genotipler olarak sınıflandırılmaktadır. Tüm servikal neoplaziler ve serviks

kanserlerinin neredeyse tamamı, yüksek riskli HPV genotiplerine atfedilmektedir. Serviks kanser vakalarının yaklaşık %70'i, HPV Tip 16 ve Tip 18 ile ilişkilidir. Tip 16, skuamöz hücreli karsinomların yaklaşık %50'sinden ve tüm serviks kanserlerinin %55-60'ından sorumlu tutulurken; Tip 18, serviks kanserlerinin yaklaşık %20'sine neden olmaktadır. Öte yandan, HPV enfeksiyonlarının yaklaşık %67'si bir yıl içinde, %90'ından fazlası ise iki yıl içerisinde tedaviye gerek kalmaksızın kendiliğinden iyileşmektedir (Bedell vd., 2020; Nalbantoğlu 2023).

Serviks ve akciğer kanserleri farklı tip hücrelerden köken alsa da, hücre döngüsünü düzenleyen mekanizmalar ile sinyal iletim yollarındaki moleküler anormallikler açısından benzerlikler göstermektedir. Serviks kanseri doğru tanımlanmış premalign evreleri yüzünden erken evrede saptanabilmekte ve radyoterapi gibi lokal tedavi seçenekleri mümkün olabilmektedir. Bunun aksine akciğer kanseri ise sıklıkla geç evrede teşhis edilmekte ve cerrahi rezeksiyonda sınırlı kalmaktadır. Geç evre tedavisinde her iki kanser türü kemoterapiye yanıt verebilir ama akciğer kanseri daha kötü prognoza sahiptir. Erken evre göz önüne alındığında, serviks kanseri 5 yıllık sağ kalım oranı %80-90 iken, akciğer kanseri %14'ün altındadır (Ramanathan vd., 2018).

2.5 Apoptozis

Apoptoz, ilk olarak 1972 yılında, embriyogenez sırasında ve hem fizyolojik hem de patolojik uyaranlara yanıt olarak ölen hücrelerde gözlemlenen morfolojik özelliklere dayanarak tanımlanmıştır. Bu süreç, birçok sağlıklı erişkin dokuda hücre döngüsünün sürdürülmesinde olduğu kadar, malign neoplazmlarda da önemli bir rol üstlenmektedir. Kerr ve arkadaşları, apoptozun aktif ve doğuştan programlanmış bir hücre ölüm biçimini temsil ettiğini öne sürerek, bu sürecin yalnızca doku homeostazının korunmasında değil, aynı zamanda tümör büyümesinin kontrol altına alınmasında ve tedaviye bağlı tümör regresyonunun sağlanmasında da kritik rol oynadığını belirtmişlerdir (Moyer A., 2025).

Hassas genetik düzenlemeyle gerçekleşen apoptozis, DNA hasarı ve gelişim süreci içerisinde meydana gelen hasarlı hücrelerin etkili ve düzenli bir şekilde yok edilmesini sağlar. Apoptozisin mekanizması çok yönlüdür ve çeşitli sinyal yollarını kapsar. Bir hücrede apoptozis, kaspaz enzimleri aracılığıyla iç veya dış yolaklarla tetiklenebilir. Bu iki yolak, sonuç olarak apoptoz belirgin morfolojik ve biyokimyasal hücre değişikliklerine sebep olan aktif apoptotik kaspazların oluşumu için bir araya gelmektedir. Sıklıkla proapoptotik ve antiapoptotik protein düzenleyicileri arasındaki

hassas denge, bir hücrenin apoptoza girip girmeyeceğinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Kansere öncesi lezyonlarda DNA hasarı tetiklenmesiyle apoptozisin başlaması, potansiyel olarak tehlikeli hücreleri yok ederek tümör büyümesini engelleyebilir. Ancak bu ölüm sürecindeki aksamalar, kontrolsüz hücre çoğalması, kanser oluşumu ve ilerlemesiyle kanserin ilaç tedavilerine karşı oluşturduğu direnç ile bağlantılıdır. Bu nedenle apoptozisteki bozulmalar kanserin bir işareti olarak kabul edilmektedir. Bu bilgiler ışığında, apoptotik dirençte etkili olan moleküllere yönelik terapötik yaklaşımlar, kanser hücrelerinin apoptoza yatkınlığını yeniden kazandırmak ve tedavi başarısızlıklarını aşmak için izlenmesi gereken geçerli bir yaklaşım sunmaktadır. (Pistritto vd., 2016; Mustafa vd., 2024)

2.5.1 Apoptozun Moleküler Mekanizması

Apoptoz, aşağıda ayrıntılı olarak açıklanan iki ayrı yolla aktive edilir: intrinsik (içsel) ve ekstrinsik (dışsal) yolak. Bu iki yolak, fonksiyonlarına göre sınıflandırılan sistein proteazlardan oluşan bir enzim grubu olan kaspazların aktivasyonunda birleşir. Sonuç olarak apoptoz, kaspaz-3, -6 ve -7 gibi efektör kaspazlar tarafından gerçekleştirilir. Bu kaspazlar aktive olduktan sonra yüzlerce hücre içi substrat proteini parçalayarak hücrenin apoptotik cisimciklere bölünmesine ve programlanmış hücre ölümünün tamamlanmasına yol açar. Efektör kaspazların hedeflediği birçok protein, proteomik çalışmalar yoluyla tanımlanmış ve açık erişimli veri tabanlarında toplanmıştır. Başlatıcı (initiator) kaspazlar, intrinsik yolda kaspaz-9, ekstrinsik yolda ise kaspaz-8 ve -10 olmak üzere, efektör kaspazları aktive eder (Julien vd., 2017; Lüthi vd., 2007; Crawford vd., 2012).

Programlanmış hücre ölümü süreci olan apoptoz, hem hücre içinden kaynaklanan stres sinyalleri hem de hücre dışından gelen uyarılarla tetiklenebilir; bu bağlamda intrinsik ve ekstrinsik olmak üzere iki ana apoptoz yolu tanımlanmıştır.

2.5.1.1 İntrinsik (Mitokondriyal) Apoptoz Yolu

İntrinsik apoptoz yolu, BCL-2 protein ailesi tarafından düzenlenir ve bu aile üç alt gruba ayrılır:

1. Antiapoptotik proteinler (BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BCL-W, BFL-1),
2. Proapoptotik multidomain proteinler (BAX ve BAK),
3. BH3-sadece proteinler (BID, BIM, PUMA, NOXA vb.).

BH3-sadece proteinler, apoptozu başlatan “ölüm nöbetçileri” olarak görev yapar ve iki mekanizma ile etkili olurlar:

- Aktivatör BH3’ler (ör. BID, BIM, PUMA, NOXA) doğrudan BAX/BAK’ı aktive eder.
- İnaktivatör veya sensitizer BH3’ler (ör. BAD, BMF) antiapoptotik BCL-2 ailesi üyelerini inhibe eder.

BAX ve BAK, sağlıklı hücrelerde inaktif monomerler olarak bulunur. BH3-proteinlerinin geçici bağlanmasıyla aktif forma geçerek dimerleşir ve ardından oligomerleşerek mitokondriyal dış membranın geçirgenliğini artırır. Bu süreç, apoptozun mitokondriyal yolunun temelini oluşturur.

Antiapoptotik BCL-2 üyeleri, hem BH3-sadece proteinleri hem de BH3-dışı BAX/BAK monomerlerini bağlayarak apoptozu baskılar. Örneğin:

- BCL-2 proteini, yalnızca BAX molekülüne bağlanarak onun aktivasyonunu engeller ve böylece apoptozun başlamasını önlerken; BCL-XL ve MCL-1 ise hem BAX hem de BAK proteinlerini bağlayarak bu süreci daha geniş kapsamlı bir şekilde baskılayabilir.
- MCL-1 ayrıca NOXA’yı da baskılayabilir.

Bu sistem, hücreyi apoptoza karşı iki kademeli bir koruma mekanizması ile savunur. Ayrıca, NOXA hem BAX/BAK’ı aktive edebilen hem de MCL-1’i inhibe edebilen tek BH3-sadece proteindir, ancak BCL-2 ve BCL-XL’i inhibe edemediği için apoptoz indükleme kapasitesi sınırlıdır (Moyer A., 2025; Okuyan D., 2023; Jorgensen I., 2017).

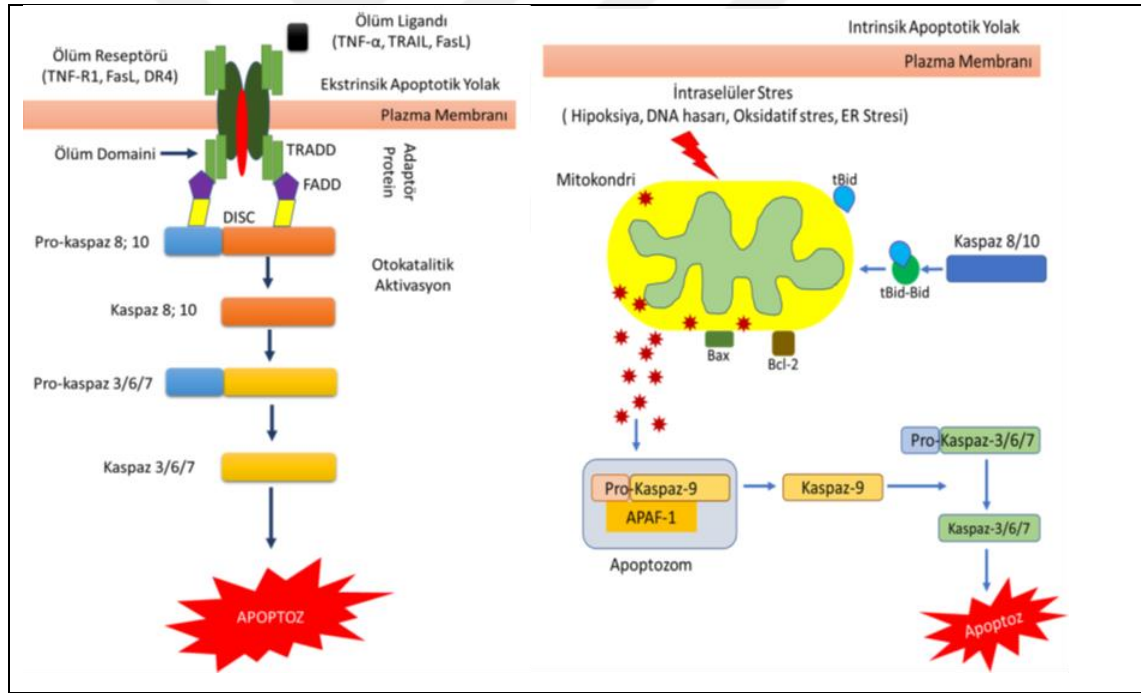
2.5.1.2 Ekstrinsik Apoptoz Yolu

Ekstrinsik apoptoz yolu, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanan ekstrasellüler ligandlar aracılığıyla başlatılır (Şekil 2.4). Bu ligandlar arasında FAS ligandı (CD95L), TRAIL ve TNF- α yer alır; sırasıyla FAS (CD95), DR4/DR5 ve TNFR1 reseptörlerine bağlanarak sinyal iletimini başlatırlar. FAS ve DR4/5 yoluyla gerçekleşen bağlanma, ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşumuna yol açar; bu kompleksin temel bileşenleri FADD ve kaspaz-8’dir. TNFR1 ile oluşan sinyalleme daha karmaşık olup, NF- κ B aktivasyonu, apoptoz ya da nekroptoz gibi farklı hücresel sonuçlara yol açabilir. DISC veya kompleks II’ye kaspaz-8’in bağlanması ve dimerleşmesiyle birlikte, bu proteaz aktive olur. Ancak kaspaz-8 aracılı apoptozun işleyişi hücre tipine bağlıdır.

- Tip I hücrelerde (ör. T lenfositler), kaspaz-8 aktivasyonu doğrudan efektör kaspaz-3/7'yi aktive etmeye yeterlidir.
- Tip II hücrelerde ise XIAP adlı inhibitör proteinin yüksek ekspresyonu nedeniyle, kaspaz-3/7 aktivasyonu bastırılır. Bu durumda, kaspaz-8 tarafından BH3-sadece protein BID'in kesilerek truncated BID (tBID) formuna dönüştürülmesi gerekir. tBID, BAX/BAK aktivasyonunu ve mitokondriyal dış membran permeabilizasyonunu (MOMP) tetikler. Böylece SMAC salınır ve XIAP inhibisyonu ortadan kaldırılarak apoptoz ilerler (Moyer A., 2025; Okuyan D., 2023; Jorgensen I., 2017).

Şekil 2.4

Ekstrinsik ve İntrinsik Apoptotik Yolaklar (Okuyan D., 2023).



Kanser tedavisinde karşılaşılan en önemli zorluklardan biri olan ilaç direncini önemli ölçüde etkileyen, apoptozis mekanizmasında bozuklukluların olmasıdır. Onkolojide kullanılan çok sayıda kemoterapötik ajan ve radyoterapi, kanser hücrelerinde apoptozu tetiklemektedir. Tedavilerin etkili olması için kanser hücrelerinin sağlam bir apoptotik sinyalizasyona sahip olması gerekmektedir. Ama kanser hücreleri genellikle apoptozis yollarında epigenetik değişiklikler veya mutasyonlar gibi türlü mekanizmalar geliştirir

bu ölüm sinyallerine karşı direnç kazanmaktadır. Dolayısıyla, başlangıç aşamasında tedaviye yanıt verne tümörler dirençli hale gelebilmekte ve bu da tedavinin etkinliğini sınırlayıp hastalığın ilerlemesine neden olmaktadır (Pistritto vd., 2016; Sharma vd., 2014).

Kanser hücrelerinin apoptozdan kaçma kabiliyeti, bu hücreleri normal hücrelerden ayıran önemli bir özellik olup, bu kaçış moleküler düzeyde çeşitli mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Kanser hücreleri, gen ifadesini kontrol altına alarak ya anti-apoptotik genlerin üretimini artırabilir ya da pro-apoptotik genlerin üretimini azaltabilir. Öte yandan, protein düzeyinde düzenlemelerde bulunarak anti-apoptotik proteinlerin yıkımını engeller ve pro-apoptotik proteinlerin yıkımını hızlandırabilirler. Bunlara ek olarak, proteinlerin işlevsel halini bozan fosforilasyon gibi translasyon sonrası modifikasyon aracılığıyla apoptozun engellenmesinde rol oynamaktadır. İşte bu kontrol seviyelerindeki farklı değişiklikler, kanser hücrelerinin hayata kalması için avantajlı olmasını sağlar. Kanser hücrelerinin karmaşık olan bu kaçış mekanizmalarını anlamak, tedavi stratejileri geliştirilirken önemli bir yere sahip olduğunu bilinmesi gerekir. Zira kanser hücreleri, apoptozdan kaçmak için bu yollarından birini veya birkaçını kullanabilirler (Fernald vd., 2013).

2.6 Isırgan Otu

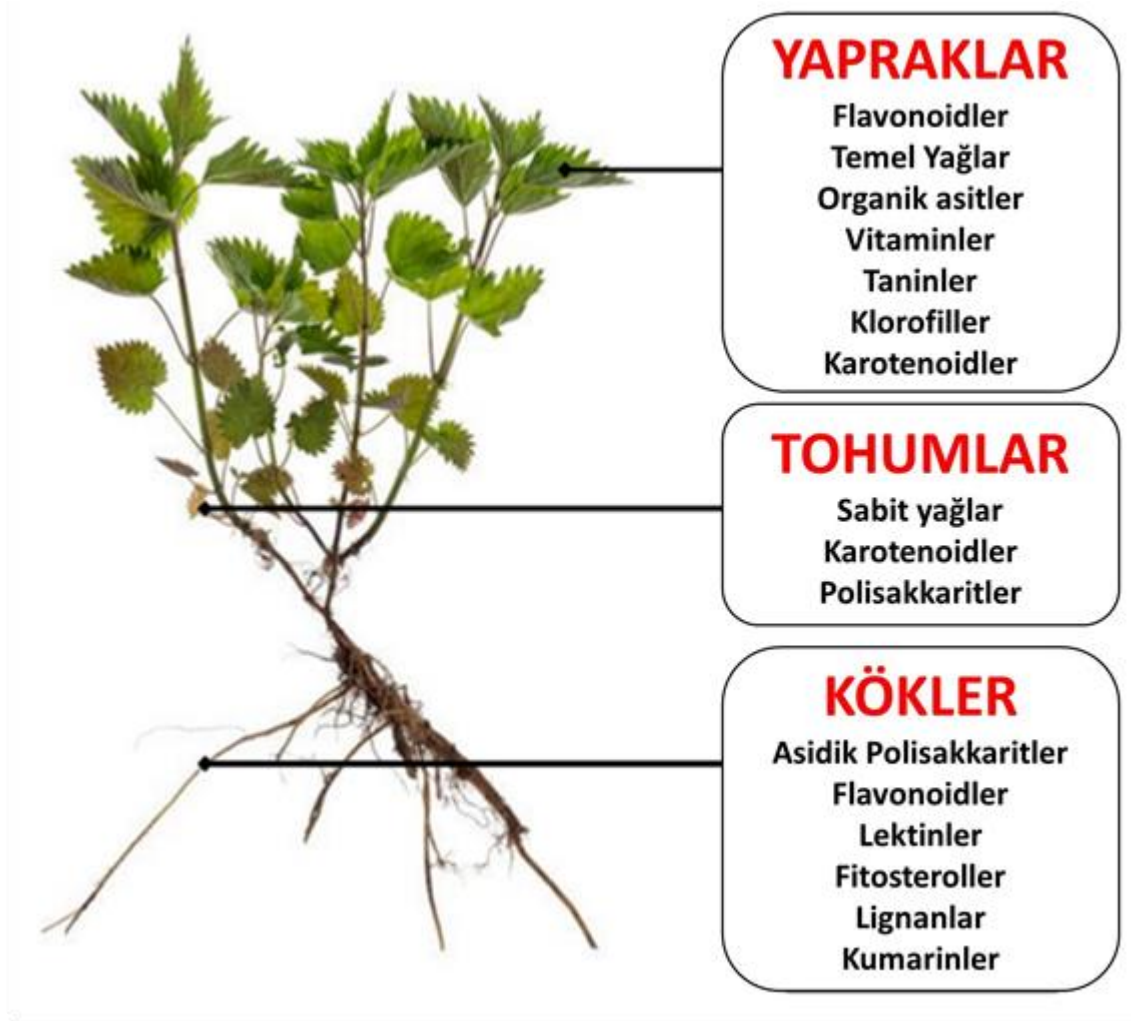
2.6.1 Botanik Özellikler

Latince adı *Urtica dioica* olan ısırgan otu, Urticaceae familyasına ait, tek veya çok yıllık, otsu bir bitkidir. Yakıcı tüylere sahip olan bu bitkinin yaprakları saplı, kenarları tırtıklı ve koyu yeşil renklidir; çiçek yapısı ise basittir (Şekil 2.5). Boyu 30–150 cm arasında değişen ısırgan otu, Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika gibi ılıman iklim bölgelerinde yayılım göstermektedir. Türkiye'de ise hemen hemen tüm Anadolu'ya yayılmış durumdadır (Wetherilt H., 1989). Haziran ayından başlayarak Ekim ayına kadar çiçeklenme ve meyve verme dönemi gözlenir. Geniş bir yayılım alanına sahip olan bu bitki, çiçek salkımlarında küçük, yeşilimsi veya kahverengimsi renkte çok sayıda çiçek barındırır. Yıllık yağış miktarının yüksek olduğu bölgelerde daha yoğun olarak bulunur (Jan vd., 2017). “Isırgan” kelimesi İngilizce “nettle” kelimesinin karşılık gelmekte ve “nettle” kelimesi de Anglosaksonlar dilinde “iğne” anlamına gelmektedir. Isırgan otuna temas edilmesi halinde, yaprakların ucunda bulunan batıcı tüyler ciltte tahrişe neden olmaktadır. Bu tüylerin kırılması sonucunda içerisinde bulunan formik asit, asetilkolin,

histamin ve serotonin gibi kimyasal bileşenler sayesinde yakıcı özellikler göstermektedir. Bu bitkinin hem mekanik hem de kimyasal savunma sistemine sahip olduğunu göstermektedir (Alimoddin vd., 2024; Cummings vd., 2011).

Şekil 2.5

Isırgan otunun genel görünüşü (Sleiman vd. 2024).



2.6.2 Taksonomik Sınıflandırması

Tablo 2.1

Isırgan otu (*Urtica dioica*) bitkisinin taksonomik sınıflandırılması

Alem	: Plantae
Bölüm	: Magnoliphyta
Sınıf	: Magnoliopsida
Takım	: Urticales

Familiya	: Urticaceae
Cins	: Urtica
Tür	: Urtica dioica

2.6.3 Kullanım Alanlar

Eski dönemlerden beri iyileştirici özellikler içermesine sebebiyle ısırgan otu, doğal bir ilaç olarak kullanılmaktadır. Başlıca kimyasal aktif bileşenlerinin yapısının ve farmakolojik özelliklerinin tanımlanmasıyla birlikte, ısırgan otunun tıbbi potansiyeli daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır. Ayrıca, hastalıkların tedavisine yönelik kullanımının yanı sıra, basit bir lif kaynağı olarak tekstil endüstrisinde ve kısmen kozmetik alanında da kullanılmaktadır (Bhusal, K, K, vd., 2022). Biyolojik olarak önemli bileşiklerin varlığı sebebiyle ısırgan otunun farklı alanlarda kullanılmasına neden olmuştur. Vücudu güçlendirmesi sebebiyle çorbalarda ve çeşitli yemeklerde kullanılmaktadırlar. Isırgan otu ayrıca hayvanlarda et kalitesini ve vücut ağırlığını artırmak veya iyileştirmek amacıyla kullanılır. Kişisel bakım ürünlerinde, şampuanlarda, diş macunlarında ve belirli işleve sahip kremler gibi farmasötik ürünlerin üretiminde de kullanılmaktadır. Isırgan otu lifleri doğal tekstil üretiminde potansiyel oluşturmaktadır (Ayan, vd., 2006). Bunlara ek olarak, ısırgan otunun tohum, kök ve yaprakları Eskişehir ili çevresinde halk arasında kanser, iştah açıcı, saç problemleri, anemiye önleme ve bağışıklığı güçlendirme amacıyla da tüketilmektedir (Kucuk vd., 2020).

Geleneksel olarak ise diüretik ajan olması sebebiyle halk arasında romatizma ve artrit tedavisinde kullanılmaktadır. Isırgan otu günümüzde romatizmal şikayetlerde ve mevsimsel alerjileri hafifletmeye yardımcı olarak, iyi huylu prostat da idrara çıkma zorluklarını azaltmak için ve diyabette glikoz seviyesini kontrolünde kullanılmaktadır (Rafajlovska vd., 2013). Isırgan otu, bunların yanı sıra astım ve akciğer iltihabı karşı kullanılmıştır. Dünya çapında halk hekimliğinde yaprak ve tohumlarının tek başına veya kombinasyon halinde egzama, hemoroit, karaciğer iltihabı, anemi ve prostat kanseri gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde değerlendirilmektedir. Ayrıca ısırgan otunun ağrı kesici, mikrop öldürücü, antibakteriyel, tansiyon düşürücü, antidiyabetik, kardiyovasküler, eklem iltihaplanmaları ve antiromatizmal etkilerini gösteren birçok sayıda bilimsel çalışmalar bulunmaktadır (Ayan vd., 2006).

2.6.4 Isırgan Otu Tohumu ve Yağı

Isırgan otu bitkisinin tohumları doymuş ve doymamış yağ asitleri, β -karoten, lutein ve violaxantin gibi karotenoidler ve polisakkaritler gibi biyoaktif bileşenler içermektedir (Ait vd., 2015). İçerdiği bileşimler nedeniyle ısırgan otu tohumu yağı sağlık açısından çok yararlı özelliklere sahiptir. Doymamış yağ asitleri (oleik asit(%19.88)), linoleik asit (%66.37), tokoferol ve fenolikler gibi serbest radikallere ve oksidatif strese karşı doğal bir kaynaktır (Mitrovic vd., 2021). Isırgan otu tohumunun yağında β -karoten(%61), hidroksi- α -karoten (%0.9), lutein epoksit (%13.1) ve violaksantin (%14.7) oranlarında karotenoid içermektedir (Tablo 2.2) (Semalty vd., 2017).

Tablo 2.2

Isırgan otu (*Urtica dioica*) bitki tohumlarının biyoaktif bileşenler ve içerdiği elementler

Yağ asitleri	Liroleik asit, Oleik asit
Karotenodiler	β -karoten, hidroksi- α -karoten, lutein, violaksantin, lutein epoksit
Elementler	Fe, Zn, Cu, Ca, P, Mg, Mn, Na, K, Se

Isırgan otu tohumlarında C, E ve B6 gibi çeşitli vitaminler bulunmaktadır. Ayrıca ısırgan otu tohumunun element analizinde demir, çinko, bakır, kalsiyum, fosfor, magnezyum, manganez, sodyum, potasyum ve selenyum gibi önemli elementlerin varlığı tespit edilmiştir (Bhardwaj vd., 2024). Türkiye’de yetiştirilen ısırgan otu tohumlarının besin içeriği analiz edildiğinde, yüksek miktarda yağ (%24.98) ve protein (%21.85) içerdiği tespit edilmiştir. Isırgan otu tohumunun belirlenen protein değeri, diğer bitkilere nazaran daha yüksek bir protein kalitesine işaret etmektedir. Ayrıca ısırgan otu tohumu 100 gramda 0.078 mg selenyum içeriğiyle dikkat çekmektedir (Wetherilt H.,1989).

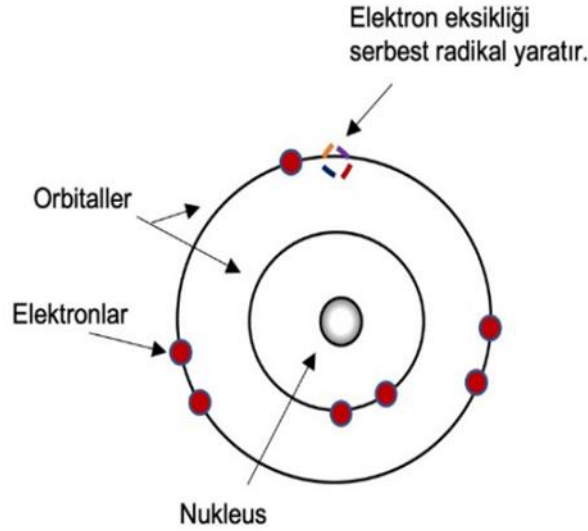
2.7 Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Kararsız yapılar olarak bilinen serbest radikaller, dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektron barındıran yüksek enerjili atom veya moleküllerdir. Bu eşleşmemiş elektronlar kararsız yapıda olduklarından diğer moleküllerle kolayca etkileşime girmelerine ve reaksiyon oluşturmalarına neden olur (Şekil 2.6). Serbest radikaller genellikle kısa ömürlü olup ve kimyasal formüllerinden bir nokta konularak gösterilirler (örneğin, $\bullet$ OH). Bazen uzun ömürlü radikal türleri de mevcuttur. Serbest radikaller hem kimyasal tepkimelerde hem de canlı organizmalardaki biyolojik süreçlerde ara ürün olarak oluşturabilmektedir.

Geçmiş dönemlerde daha çok olumsuz etkileri bilinirken, günümüzde metabolik süreçlerde önemli düzenleyici görevleri de olduğu keşfedilmiştir (Yalçın vd., 2022).

Şekil 2.6

Serbest radikal yapısı (Yalçın vd., 2022).



Özellikle reaktif oksijen içeren serbest radikaller, hızlı reaksiyona girer ve kısa ömürlüdürler. Oksidatif stresin kaynağı olarak bilinen serbet radikaller, dokularda lipid, protein ve DNA gibi hayati moleküllerle birleşebilme özelliği sayesinde, bu moleküllerin fonksiyonlarını olumsuz etkiler. Vücutta oluşan serbest oksijen radikallerinin toksik etkileri, detoksifikasyon organları aracılığıyla bertaraf edilmeye çalışılır. Ancak bu süreçte atılamayan toksinler bağ dokusunda depolanmaya başlar. Bu durumda organların yaşlanma hızını artırır ve kronik hastalıkların ilerlemesine zemin oluşturur (Karakan vd., 2017).

Serbest radikaller özellikle oksijen, kükürt ve nitrojen kaynaklı olan reaktif moleküllerdir. Oksijen kaynaklı olan ROS (örneğin, hidroksil, nitrik oksit, süperoksit vs.) hücrede farklı yarı ömürlere sahip olup çeşitli reaktiviteler gösterir. Yüksek reaktif ve ömrü kısa olanlar hızlı hasara yol açarken, SOD (süperoksit dismutaz) enzimi ROS'u inaktive ederek hücreleri hasardan korur. Düşük reaktifli ROS ve RNS (Reaktif nitrojen türleri) türleri de bulunmaktadır. ROS üretimi ve etkileri redoks mekanizması ile düzenlenmektedir. ROS ve RNS türleri Tablo 2.3'te belirtilmektedir (Gulcin İ, 2025).

Tablo 2.3

Reaktif Oksijen Türleri(ROS) ve Reaktif Nitojen Türleri (RNS)

ROS	RNS
Hidrojen Radikali	Hidrojen Peroksit
Süperoksit Radikali	Singlet Oksijen
Hidroperoksit Radikali	Ozon
Lipid Radikali	Lipid Hidroperoksit
Lipid Peroksil Radikali	Hipokloröz Asit
Peroksil Radikali	Peroksinitrit
Lipid Alkol Radikali	Dinitrojen trioksit
Nitrojen Dioksit Radikali	Nitröz asit
Nitrit Oksit Radikali	Nitroksil anyonu
Tyil Radikali	Peroksinitröz asit
Protein Radikali	Nitröz oksit

Oksidatif stres, hücre ve dokularda aşırı reaktif oksijen türlerinin(ROS) üretimi ve birikmesi sonucunda vücudun bu reaktif maddeleri detoksifiye etme yeteneği arasındaki bozulmuş dengeyi ifade etmektedir. ROS, oksijenin normal metabolizmasında ortaya çıkan yan ürünlerdir ve bazı hücre sinyal mekanizmasında rol oynarlar. Bununla birlikte, UV ışınları, radyasyon, hava-su kirliliği ve ağır metaller gibi çevresel faktörler ile ksenobiyotikler ROS üretimini önemli ölçüde artırarak oksidatif strese ve dolayısıyla hücre ve doku hasarına yol açar (Pizzino vd., 2017). Oksidatif stresin artması sonucu olarak ortaya çıkan ROS'un hücre içi lipid, protein ve DNA'nın çift bağ içeren bölgelerine saldırarak hidrojen atomlarının kopmasına neden olur ve zincirleme reaksiyonları tetikler. Bu durumda hücre içi makromoleküllerde hasara yol açarak hücre hasarına ya da hücre ölümüne sebep olur. Oksidatif hasar, serbest radikallerin makromoleküllere verdiği zararın göstergesi olan malondialdehit (MDA), protein karbonilleri (PCO) ve 8-hidroksiguanin (8-OHG) gibi hasar ürünlerinin ölçümüyle saptanmaktadır (Özcan vd., 2015).

2.8 Antioksidanlar

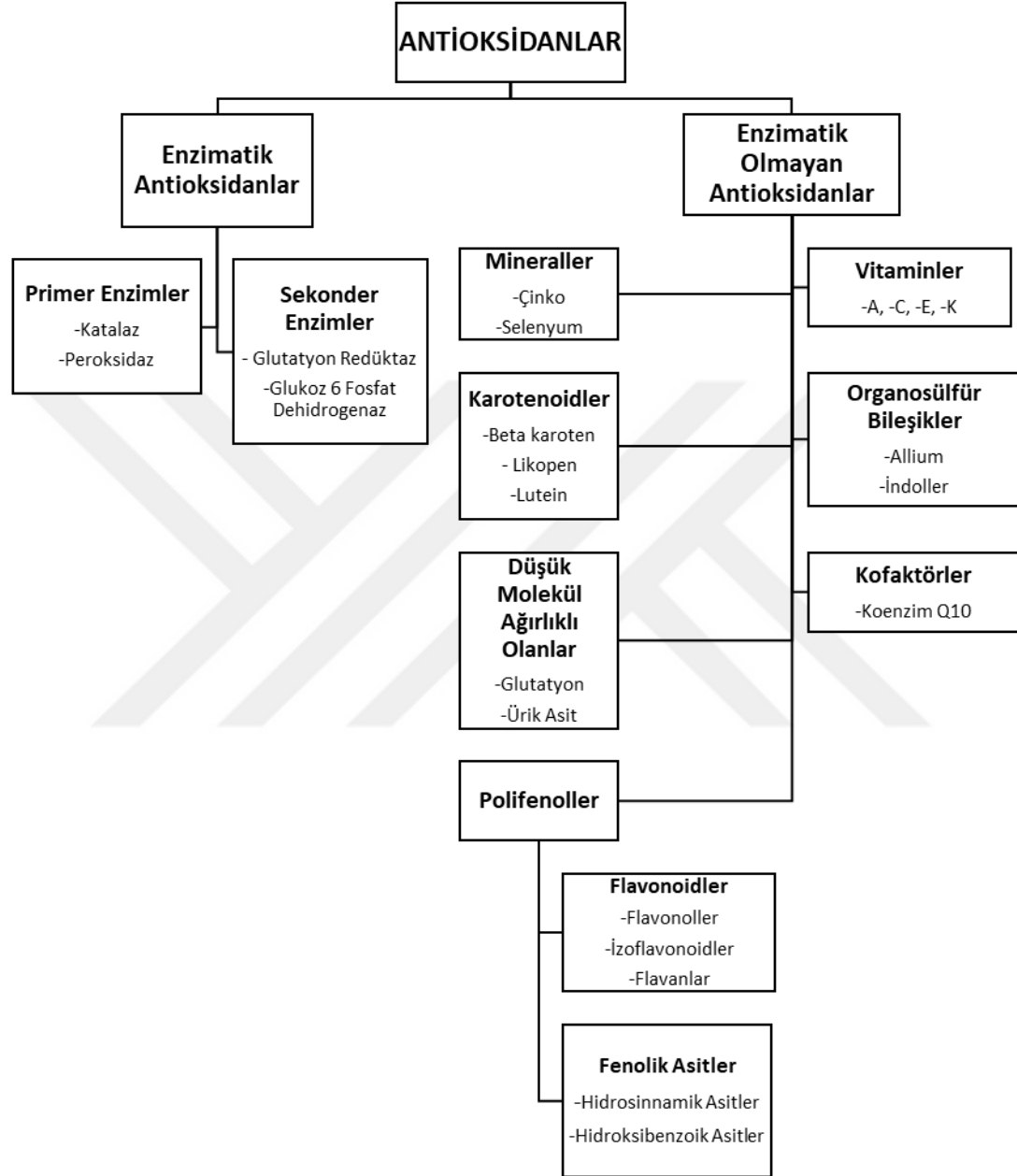
Antioksidanlar, serbest radikallerin zararlı etkilerinden organizmayı koruyan yaşamsal bileşiklerdir. Çok az miktarda dahi oksidasyonu yönetme, engelleme veya yavaşlatma kabiliyetleri sayesinde hem gıdanın kalitesini korumakta hem de bedendeki dejeneratif süreçlerin önüne geçebilmektedir. Antioksidanlar, çeşitli mekanizmalarla oksidatif süreçleri azaltırlar ve ROS'un zararlı etkilerini de yavaşlatmada önemli rolü oynarlar.

Gıda sistemlerinde lipid peroksidasyonunu geciktirmesi sebebiyle lezzet, renk ve dokuyu korur. Ayrıca insan bedeninde biyomolekülleri oksidasyondan koruyarak ve proteinin fonksiyonunu etkileyecek etkileşimleri önleyerek sağlık konusunda destek sağlarlar (Gulcin İ. 2025).

Antioksidanlar, enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere iki ana grup altında sınıflandırılırlar. Antioksidanların bir kısmı küçük moleküller olarak endojen üretilirken, bazıları da enzim kofaktörleri gibi dışarıdan alınabilmekte ve enzimatik olmayan diğer antioksidanlar ise beslenme yoluyla alınmaktadır. Beslenme yoluyla alınan antioksidanlar farklı gruplara ayrılırlar ve bu grubun en geniş kısmını polifenoller (fenolik asitler ve flavonoidler) oluşturur. Diğer besin kaynaklı antioksidanlar Şekil 2.7’de de gösterildiği gibi vitaminler, karotenoidler, organosülfür bileşikler ve minerallerdir (Bunaciu vd., 2016).

Şekil 2.7

Antioksidanların Sınıflandırılması(Bunaciu vd., 2016).



Çoğu insan hücresi oksidatif stres ve hasara karşı yeterli antioksidanı kendiliğinden üretemediğinden, antioksidanların takviye yoluyla dışarıdan alınması gerekebilmektedir. Bu bağlamda, doğal ve daha güvenli alternatif antioksidan kaynaklarına yönelik ilgi giderek artmaktadır. Bitkisel kaynaklı doğal antioksidanlar (C vitamini, E vitamini, fenolikler, karotenler, flavonoidler, fitatlar ve fiyoöstrojenler gibi) serbest radikallerle

reaksiyona girerek, katalitik metalleri bağlayarak ve oksijeni uzlaştırarak oksidasyonu sürecini engellemede önemli bir rol alabileceğine inanılmaktadır (Darkwah vd., 2018).

2.8.1 Antioksidan Savunma Mekanizması

Oksidasyon tepkimeleri, hücreler için hayati işlevde olsa da zararlı etkilere de sahiptir. Bu sebeple bitkilerde ve hayvanlarda C vitamini, E vitamini ve glutatyon gibi çeşitli antioksidanlarla birlikte katalaz, SOD (süperoksit dismutaz) ve peroksidazlar gibi antioksidan tepkimelerinin hızlandıran farklı enzimatik sistemler içerir. Bu antioksidan enzimlerdeki eksiklikler veya inhibisyonlar, oksitadif strese neden olur ve hücrelere zarar vererek lizise neden olabilmektedir. Antioksidan savunmanın temel işleyiş prensiplerini 7 başlık altında özetleyebiliriz;

- 1) Serbest radikal oluşumunu engellemek,
- 2) Oksidanların etkisizleştirmek,
- 3) Toksik serbest radikalleri, daha az toksik hale getirmek,
- 4) İkincil toksik metabolitlerin ve inflamasyon aracı maddelerin oluşumunu engellenmek,
- 5) İkincil oksidasyonların zincirleme tepkimelerini bloke etmek,
- 6) Hasar görmüş molekülleri onarmak,
- 7) Endojen antioksidan savunma sistemini başlatmak ve güçlendirmek.

Bütün bu antioksidan savunma mekanizmaları, vücudu oksidatif stresin verdiği zararlı etkilere korumak için koordineli şekilde çalışmaktadır (Adwas vd., 2019).

3 MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1 Kullanılan Materyaller

3.1.1 Hücre Hatları

Çalışmalarımızda kullanılan insan akciğer kanser hücresi(A549) ve serviks kanser hücresi (HeLa), Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda -196 °C sıvı nitrojende saklanmakta olup, bu hücre hatları çalışmamızda kullanılmak üzere buradan temin edilmiştir.

3.1.2 Isırgan Otu Tohumu Yağı

Çalışmamızda kullanılacak olan ısırgan otu tohumu yağı Konya ilinde bulunan Uğurluoğlu Bitkisel Yağ Gıda Kozmetik İthalat İhracat Şirketi tarafından temin

edilmiştir. Bu şirket tarafından ısırgan otunun tohumları Şanlıurfa ilinde toplatılmış olup, soğuk sıkım metoduyla oluşturulmuştur. Europevital markasıyla 20 ml şişelerde paketlenmiş ısırgan otu tohumu yağı, deneylerde kullanılmak üzere oda sıcaklığında saklanılmaktadır.

3.1.3 Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

Tablo 3.1

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

İsim	Şirket
UDS yağı	Uğurluoğlu, Türkiye
6, 24 ve 96 kuyucuklu plate	Nest, Çin
25 ve 75 cm ² 'lik flasklar	Nest, Çin
Etil Alkol	Detsan, Türkiye
DMEM	Sigma-Aldrich, Almanya
Tripsin-EDTA	Sigma-Aldrich, Almanya
Penisilin/Streptomisin	Sigma-Aldrich, Almanya
Fetal Sığır Serum (FBS)	Sigma-Aldrich, Almanya
10, 100 ve 1000µl'lik Pipet uçları	Sarstedt, Almanya
Steril Pipetler	Sarstedt, Almanya
Dimetilsülfoksit(DMSO)	Sigma-Aldrich, Almanya
MTT Boyası	Applchem, Almanya
Etidyum Bromür	Sigma-Aldrich, Almanya
Akridin Oranj	Sigma-Aldrich, Almanya
Disodyum Hidrojen Fosfat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Almanya
Sodyum Klorür(NaCl)	Detsan, Türkiye
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Almanya
Sodyum hidroksit(NaOH)	Merck, Almanya
ABTS çözeltisi	Sigma, Almanya
Tris-HCl	Sigma, Almanya
1,1-difenil-2-pikrilhidrazil çözeltisi(DPPH)	Sigma, Almanya
Metanol	Merck, Almanya

3.1.4 Ekipmanlar

Tablo 3.2

Çalışmada kullanılan ekipmanlar

İsim	Şirket
------	--------

Laminar Kabin	Heal Force, Çin
Su Banyosu	Nüve BM 302, Türkiye
Mikro Santrifüj	Sigma, ABD
Soğutmalı Santrifüj	Heraheus, Almanya
İnverted Mikroskop	Leica, Almanya
Floresan Mikroskop	Leica, Almanya
Steril CO ₂ Kabini	Hera Cell 240 Thermo, Almanya
Hassas Terazı	Ohaus, İsviçre
Otoklav	ALP, Japonya
Sterilizatör	Nüve, Türkiye
PH metre	Thermo, Singapur
-80 °C Dondurucu	New Brunswick Scientific, ABD
Derin Dondurucu(-20 °C)	Arçelik, Türkiye
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Distile Su Cihazı	Nüve, Türkiye
Etüv	Nüve, Türkiye
Sıvı Azot Tankı	Taylor Wharton, Almanya
Vorteks	IKA Y TTS2, Çin
Buz Makinesi	Simag, İtalya
Enzim Bağlı Immunosorbent Yöntem (ELISA) okuyucu	BioTek, ABD
NovoCyt Flow Cytometer	Agilent, ABD
DNA/RNA UV Kabini (UVT-B-AR)	Biosan, Türkiye
LightCycler Nano System	Roche, Almanya

3.1.5 Kullanılan Ticari Kitler

Tablo 3.3

Çalışmada kullanılan ticari kitler

İsim	Şirket
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD, ABD
PE Caspase-3 Apoptosis Kit	BD, ABD
Total RNA Purification Plus Kit	NORGEN, Kanada
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific, ABD
FastStart Essential DNA Probes Master Kit	Roche, İsviçre
MitoScreen (JC-1) Kit	BD Pharmingen, ABD
TUNEL Assay Kit - FITC	Abcam, İngiltere

3.1.6 Bilgisayar Yazılımları

Tablo 3.4

Çalışmada kullanılan bilgisayar yazılımları

İsim	Şirket
Graphpad Prism 8.0.1	Graphpad, ABD
Gen5 Data Analysis Software	BioTek, ABD
Sigmaplot 14.0	Grafiti, ABD
NovoExpress Software	Agilent, ABD
BioSpec-nano	Shimadzu, Japonya

3.2 Yöntemler

Bu çalışmada, ısırgan otu tohumu yağının antioksidan özellikleri araştırılmış; ayrıca, insan akciğer adenokarsinom hücre hattı (A549) ve serviks kanseri hücre hattı (HeLa) üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri in vitro koşullarda değerlendirilmiştir.

3.2.1 Isırgan Otu Tohum Yağının Antioksidan Etkisinin İncelenmesi

Çalışmamızda kullandığımız ısırgan otu tohumu yağının antioksidan potansiyeli, DPPH radikal süpürücü etkisi ve ABTS radikal süpürücü aktivite testleri ile analiz ederek belirlenmiştir.

3.2.1.1 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikalini süpürücü etkisi

DPPH• radikal süpürme aktivitesi için ısırgan otu yağının belirlenen konsantrasyonları hazırlanmıştır. Isırgan otu yağının her bir konsantrasyonu için, 100 µl hacimde, 80 µg/mL konsantrasyonunda DPPH çözeltisi eklenmiştir. Son karışımlar 60 dakika boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından UV Spektrofotometrisinde dalga boyları 517 nm olacak şekilde absorbans değerleri ölçülmüştür. Pozitif kontrol olarak gallik asit kullanılmıştır. DPPH radikali süpürücü kapasitesi, Denklem 3.1’de belirtilen formülle hesaplanmış ve yüzde olarak verilmiştir. Öte yandan DPPH radikalini süpürücü etkisinin yarıya azaltan örnek miktar (EC₅₀) belirlenmiş ve elde edilen bu değer de µg/mL cinsinden belirlenmiştir.

Denklem 3.1

İnhibisyon Formülü (A_{Kontrol} : Kontrol absorbansı, $A_{\text{Yağ}}$: Isırgan otu tohumu yağı pozitif kontrollerin absorbansı)

$$\%inhibisyon = \frac{A_{kontrol} - A_{yağ}}{A_{kontrol}} \times 100$$

3.2.1.2 ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzotiazoline-6-sülfonik asit) radikali katyon süpürücü etki (TEAK)

Bu yöntem, antioksidan özellik gösteren Vitamin E'nin suda çözünen analogu olan Troloks'un ve örnek materyalin stabil ABTS radikali süpürücü kapasiteleriyle karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Yeşil-mavi renkte görünen ABTS radikali, 734 nm'de ölçülen absorbans ile 0.7-0.8 arasında bir değere ulaşana kadar etanol ile seyreltme işlemi yapılmıştır. Her ısırgan otu tohumu yağı örneğinin konsantrasyonu için 10 µl yağ, 990 µl ABTS çözeltisine eklenmiştir. Her bir konsantrasyon için elde edilen karışımlar 30 dakika boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonrası karışımdan 300 µl çekilerek mikrotitrasyon plakalarına aktarılmış ve UV Spektrofotometresinde 734 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. 0.125 ile 2 mM aralığındaki Troloks'tan elde edilen standartlar ile kalibrasyon eğrisi çizilmiştir ve ardından ısırgan otu tohumu yağının ABTS süpürücü etkileri Troloks eşdeğeri cinsinden hesaplanmıştır (Denklem 3.2).

Denklem 3.2

İnhibisyon Formülü ($A_{kontrol}$: Kontrol absorbansı, $A_{yağ}$: Isırgan otu tohumu yağı pozitif kontrollerin absorbansı)

$$\%inhibisyon = \frac{A_{kontrol} - A_{yağ}}{A_{kontrol}} \times 100$$

3.2.2 Hücre Kültürü Uygulamaları

3.2.2.1 Hücre Kültürü

A549 ve HeLa hücreleri %1 penisilin-streptomisini, %1 L-glutamin ve %10 fetal sığır serumu içeren DMEM besiyerinde 37°C %5 CO₂'li inkübatörde tutularak çoğaltılmıştır. Bu ortamda büyüyen A549 ve HeLa hücreleri kültür kaplarında hücre yoğunluğu %80 oranına geldiğinde pasajlama işlemi yapılmıştır.

3.2.2.2 Hücrelerin Stoklanması

A549 ve HeLa hücre hatları, flasklarda %80-90 doluluk seviyelerine ulaşınca eski besiyer pipetle alınmıştır. Ardından hücreler 1× PBS ile yıkanmıştır. Yıkama sonunda PBS çekilir

ve 1× Tripsin-EDTA eklenmiş olup 5 dakika kadar inkübe edilmiştir. İnverted mikroskop ile hücrelerin flask tabanından ayrılıp ayrıldığı kontrol edilmiştir. Hücrelerin flask tabanından ayrıldığından emin olduktan sonra, tripsin etkisini nötralize etmek için besiyeri eklenmiştir. Besiyeri eklenen flasklardaki karışım falkon tüplerine aktarılıp 1200 rpm’de 5 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası falkon tüpünün üst kısmındaki süpernatant dikkatli bir şekilde atılır ve geriye sadece hücre peleti kalmıştır. Stoklama işlemi için her bir karyotüpe 1800 µl besiyeri ve 200 µl DMSO olacak şekilde karışım hazırlanmıştır. Hücreleri içeren karışımdan 2ml’lik karyotüplere aktarılmıştır. Karyotüpleri önce -20 °C’de 2 saat ve sonra bir gece -80 °C’de bekletilmiştir. Daha sonra hücreler, -196 °C’deki sıvı azot tankına aktararak stoklama işlemi tamamlanmıştır.

3.2.2.3 Hücrelerin Stoktan Çıkarılması

-196 °C’deki sıvı azot tankından A549 ve HeLa hücreleri, oda sıcaklığında çözündürülmesi sağlanmıştır. Çözünen her iki hücre hatları, her bir falkon tüpüne ayrı ayrı aktararak üzerine 2 ml DMEM besiyeri eklenmiştir. Ardından 1200 rpm’de 3 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı dikkatlice çekilmiş ve pelet üzerine DMEM eklenerek pipetaj yapılmıştır. Falkonlarda bulunan A549 ve HeLa hücreleri 25 cm²’lik flasklara ayrı ayrı aktarılmış ve her flaskın üzerine hücrenin adı ile tarih yazılarak belirtilmiştir. Mikroskop altında hücrelerin durumu kontrol edilmiş ve inkübatörde büyümesi sağlanmıştır.

3.2.2.4 Hücrelerin Pasajlanması

25 cm²’lik flasklarda bulunan hücreler %80-90 doluluk seviyesine ulaştığında, flasklardan besiyer çekilmiş ve ardından hücreler 1×PBS ile yıkanmıştır. PBS uzaklaştırılmış ve hücrelere 1×Tripsin-EDTA eklenmiştir. Ardından 5 dakika boyunca inkübatöre bırakılmıştır. İnverted mikroskobu ile hücrelerin flask tabanından ayrılıp ayrıldığı kontrol edilmiştir. Flask yüzeyinden ayrılan hücrelere, tripsin çözeltisi besiyeri eklenmiş ve daha sonra falkon tüplerine alınmıştır. Oda sıcaklığında 1200 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım dikkatli bir şekilde çekilip atılmış ve dipteki pelet hücrelere besiyer eklenmiştir. Falkonda bulunan hücreler, 75 cm²’lik flasklara alınmış ve daha sonra hücreler mikroskopta kontrol edilmiştir. Pasajlama işlemi tamamlandıktan sonra 75 cm²’lik flasklarda bulunan hücreler çoğaltması için inkübatöre alınmıştır.

3.2.3 Sitotoksitite (MTT) testi

3.2.3.1 MTT yöntemi ile ısırgan otu tohumu yağının IC₅₀ dozunun belirlenmesi

MTT testi, sitotoksititeyi, hücrenin canlılığını ve proliferasyonunu saptamada en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Bir tetrazolyum tuzu olan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür), canlı hücrelerin mitokondrilerinde süksinat-dehidrogenaz enzimi ile formazana dönüşür ve canlı hücreler tarafından mor renk değişimi gözlemlenirken, ölü hücrelerde renk değişimi gözlenmemektedir.

IC₅₀ dozunun belirlenebilmesi için iki hücre hattı, 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucuk için 1×10^4 hücre olacak şekilde ekilip hücreler 24 saat süresince inkübe edilmiştir. Süre sonunda besin ortamı değiştirilerek, hücrelere 24 ve 48 saat süre ile 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ve 0.6 ml/L konsantrasyonlarında ısırgan otu tohumunun 6 farklı doz uygulaması yapılmıştır. Süre sonunda her bir kuyucuğa 20 µl MTT boyası ilave edilmiş ve plakalar alüminyum folyo ile sarılarak 2 saat inkübatöre bırakılmıştır. Ardından besin yeri uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 100 µl DMSO eklenmiştir. Plakalar karanlık ortamda lineer çalkalayıcı üzerinde 10 dakika karıştırılmıştır. Son olarak karanlık ortamda spektrofotometrik mikroparka okuyucuda (ELx800 Bio-Tek cihazı) 540 nm dalga boyunda absorbans okuması yapılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri, hücrenin canlılık değeri kabul edilmiştir. Çalışmada, hücrelerin %50 inhibisyonu olarak gösterilen IC₅₀ değeri esas alınmış ve IC₅₀ değerlerinin belirlenmesine yönelik hesaplanma ile grafik analizleri Graphpad Prism 8.0.1 yazılım programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.4 Apoptotik Etki Testleri

3.2.4.1 Annexin-V FITC testi: Erken ve Geç Apoptoz Tespiti

Altı kuyucuklu plakalara 1×10^6 yoğunluğunda A549 ve HeLa hücrelerinin ekimi yapılmıştır. 24 ve 48 saat sürelerinde belirlenen konsantrasyonda ısırgan otu tohumu yağı ile muamele edilmiştir. İnkübasyonun ardından her iki kanser hücrelerindeki apoptoz aktivitesini belirlenmesi için BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I prosedürü izlenmiştir. Her bir hücre grubu soğuk PBS ile 2 kez yıkanmış ve 1x tripsin-EDTA çözeltisi yardımıyla plakalardan kaldırılmıştır. Kaldırılan hücreler, 1 mL besin ortamında tüplere aktarılmış ve 1400 rpm'de 5 dakika sentrifüje edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen hücre pelletleri, 1×10^6 hücre/mL konsantrasyonunda 100 µl 1x bağlama tamponunda süspanse edilmiştir. Bu süspansiyona 5 µl Annexin V FITC ve 5

μ L Propidyum İyodür (PI) eklenmiştir. Hücreler 15 dakika karanlık ortamda ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 400 μ L bağlama tamponu eklendikten sonra NovoCyt Flow Cytometer adlı akış sitometrisi cihazında analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu cihazda bulunan NovoExpress Software yazılım programı ile erken-geç apoptoz ve nekroza uğrayan hücrelerin % hesaplamaları yapılmıştır.

3.2.4.2 Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi

Kaspaz-3 düzeylerini ölçmek için, IC₅₀ değeri belirlenen konsantrasyonda A549 ve HeLa hücreleri ısırgan otu tohumu yağı ile 24 ve 48 saat sürelerde muamele edilmiştir. İnkübasyonun ardından her iki kanser hücrelerindeki kaspaz-3 aktivitesini belirlenmesi için BD Pharmingen™ PE Caspase-3 Apoptosis Kit prosedürü izlenmiştir. Ardından iki kez soğuk PBS’de yıkanmış ve 1×10^6 hücre/0.5 ml konsantrasyonunda BD Cytotfix/Cytoperm çözeltisinde tekrar süspanse edilmiştir. Hücreler buz üzerinde 20 dakika bekletilip santrifüj edilmiştir. Pelette kalan hücreler, 0.5 ml tampon/ 1×10^6 hücre hacminde, oda sıcaklığında 1X BD Perm/Yıkama solüsyonu ile 2 kez yıkanmıştır. Hücreler tekrar santifüj edilerek 0.1 ml 1X BD Perm/Yıkama tamponu ve 20 μ L antikor içeren solüsyonda tekrar süspanse edilmiş ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Her bir analiz için, hücreler 1 ml BD Perm/Yıkama tamponunda yıkandıktan sonra 0.5 ml BD Perm/Yıkama tamponunda tekrar süspanse edilmiştir. Son olarak, NovoCyt Flow Cytometer adlı akış sitometrisi cihazı kullanılarak analiz yapılmıştır.

3.2.4.3 Mitokondriyal Membran Potansiyeli($\Delta\Psi_m$)

A549 ve Hela hücreleri, 6 kuyucuklu plakalara 1×10^6 hücre olacak şekilde ekimi yapılmıştır. Isırgan otu tohumu yağının IC₅₀’si belirlenen konsantrasyonlarında 24 ve 48 saat sürelerinde muamele edilmiştir. İnkübasyonun ardından her hücre grubunda mitokondriyal membran potansiyelini belirlemek için BD Pharmingen™ MitoScreen (JC-1) kiti prosedürü uygulanmıştır. Hücreler 2 μ M JC-1 boyası eklenmiş ve %5 CO₂ içeren 37°C’lik inkübatörde 30 dakika bekletilmiştir. Deneyde kontrol için hücreler önce 50 mM karbonil siyanür 3-klorofenilbenhidrazon (CCCP) ile işleme tabi tutulmuş ve 37°C’de 5 dakika inkübe edilmiştir. CCCP uygulanmayan hücreler, pozitif kontrol olarak kabul edilmiştir. Hücreler 2 mL PBS ile bir kez yıkanmış ve 120 rpm’de 3 dakika santifüje edilmiştir. Oluşan pellet, 500 μ L PBS içinde yavaşça karıştırılarak yeniden süspanse edilmiştir. Hücrelerin analizi NovoCyt Flow Cytometer adlı akış sitometrisi cihazı ile

yapılmıştır. Mitokondiyal membrandaki değişiklikler, yeşil ve kırmızı floresan sinyallerinin nokta grafiği üzerinden belirlenmiştir.

3.2.4.4 Akridin Oranj-Etidyum Bromür Boyama

Akridin Oranj ve Etidyum Bromür boya ları kullanılarak erken ve geç apoptoz evrelerini belirlemek amacıyla, 24 kuyucuklu plakaların her birinde 5×10^4 her iki hücre hattı ekilip inkübe edilmiştir. Süre sonunda hücreler, IC_{50} değeri belirlenen ısırgan otu tohumu yağı eklenmiş olup 24 saat ve 48 saat sürelerinde tekrar inkübe edilmiştir. Ardından 50 $\mu\text{g/mL}$ EB ve 100 $\mu\text{g/mL}$ AO boya çözeltilerinin 1:1 karışımından 100 μl alınarak hücrelere eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika kadar inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda iki kez PBS ile yıkanmış ve yine PBS ortamında FITC filtresi kullanılarak floresan mikroskopunda karanlık ortamda görüntülenme işlemi yapılmıştır.

3.2.4.5 mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

3.2.4.5.1 Total RNA İzolasyonu

1×10^6 ekilen A549 ve HeLa hücreleri, ısırgan otu tohumu yağı ile 24 saat süreyle muamele edilmiştir. RNA izolasyonu için Norgen Total RNA Purification Plus Kit protokolü uygulanmıştır. Hücreler PBS ile bir kez yıkanmıştır. Her iki hücre örneklerine 350 μl Buffer RL eklenmiş ve 5 dakika oda sıcaklığı inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler kazıyıcı ile toplanmıştır (hücre lizatları gDNA uzaklaştırma kolonuna alınmıştır). 1 dakika boyunca $14.000 \times g$ 'de santrifüj edilmiştir (gDNA kolona bağlanır). Süpernatant eldesine 100 μl başına 60 μl %96'lık etanol eklenmiş ve vortekslenmiştir. Elde edilen karışım RNA bağlama kolonuna bağlanması sağlanmıştır. Kolon yıkama solüsyonu yardımıyla yıkama yapılmıştır. Etanol kalıntısının giderilmesi için ekstra santifüj edilerek kolon kurutulması sağlanmıştır. Her kolona elüsyon tamponundan 50 μL eklenmiştir. Saf olarak RNA elde edilmiş olup, cDNA sentezi aşamasına geçilmiştir.

3.2.4.5.2 RNA'nın miktar ve saflığının belirlenmesi

Elde edilen RNA'nın toplam miktarının ve saflığının ölçümleri, NanoDrop cihazında tespit edilmiştir. Her örnekten 1,5 μl kadar alınmıştır. Dalga boyları 260/280 ve 260/230 nm olacak şekilde ölçüm yapılmıştır.

3.2.4.5.3 Total RNA eldesinden cDNA sentezi

Elde edilen RNA izole örneklerinden cDNA sentezini gerçekleştirmek için Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit prosedürü kullanılmıştır. 500 ng total RNA'ya 1 µl random hexamer primer eklenmiş ve toplam hacim nükleaz içermeyen su ile 12 µl'ye tamamlanmıştır. Primerlerin bağlanması için 65 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 8 µl revers transkripsiyon reaksiyon karışımından (Tablo 3.5) ilave edilerek hacim 20 µl'ye getirilmiştir.

Tablo 3.5

cDNA sentezi için reaksiyon karışım miktarları

Bileşenler	Miktar (Her bir örnek için)
5x Reaksiyon Buffer	4 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RiboLock RNaz inhibitörü (20 U/ µl)	1 µl
Revertaid M-MuLV RT (200 U/ µl)	1 µl

Elde edilen karışım önce 25 °C'de 5 dakika ve ardından 42 °C'de 60 dakika inkübe edilmiştir ve işlem sonunda cDNA'lar elde edilmiştir. Sonraki analizlerde kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.4.5.4 Gen İfadelerinin Belirlenmesi (Real Time PCR)

Gerçek zamanlı PCR analizi için, Roche FastStart Essential DNA Probes Master Kit prosedürüne göre gerçekleştirilmiştir. RT-PCR reaksiyon karışımı total hacim 20 µl (Tablo 3.6) olacak şekilde ayarlanmış ve 1.500×g'de santifüje edilmiştir.

Tablo 3.6

PCR reaksiyon karışımı

Bileşenler	Miktar (Her bir örnek için)
Master Mix	10 µl
Nükleaz İçermeyen Su	7.5 µl
cDNA	1.5 µl
Primer Prob Mix	1 µl

Hazırlanan RT-PCR reaksiyon karışımı tüplere konulup, Lightcycler Nano cihazına alınmıştır. Tablo 3.7 'de belirtildiği gibi DNA amplifikasyon koşullarında işleme konulmuştur.

Tablo 3.7

PCR döngüleri, süre ve sıcaklıkları

Pre-İnkübasyon (Başlangıç Denatürasyon)	95 °C, 10dk, Döngü Sayısı:1
Denatürasyon	95 °C, 10sn, Döngü Sayısı:45
Annealing (Hibridizasyon)	60 °C, 30sn, Döngü Sayısı:45
Ekstansiyon (Uzama)	72 °C, 10sn, Döngü Sayısı:45
Soğutma	40 °C, 10sn, Döngü Sayısı:1

- Pre-inkübasyon aşamasında, enzim aktivasyonu ve ilk denatürasyon gerçekleşmektedir.
- Denatürasyon aşamasında, DNA iplikleri ayrılmaktadır.
- Annealing aşamasında, primerler hedef DNA'ya bağlanmaktadır.
- Ekstansiyon aşamasında, DNA sentezi başlamakta ve floresan sinyali almaktadır.
- Soğutma aşamasında, cihazdan çıkarmadan önce reaksiyonun stabilizasyonu ve sistemdeki rotorun soğutulması sağlanmaktadır.

RT-PCR döngüleri tamamlandıktan sonra, her bir hedef genin ekspresyon düzeyi, referans olarak alınan aktin ile karşılaştırılarak relatif olarak oranlanmıştır.

3.2.4.5.5 RT-PCR Sonuç Verilerinin Analizi

Elde edilen gen ifadeleri analizlerine ait sonuçlar, PCR sisteminde bulunan LightCycler Relatif Kantasyon Yazılım Programı ile hesaplanmıştır. Bu yazılım, referans gen olan aktine göre, hedef gen ekspresyon seviyelerinin relatif olarak kantite edip nicelleştirmiştir.

3.2.4.6 TUNEL yöntemi

TUNEL yöntemi için Abcam Tunel Assay Kit-FITC kullanılarak analiz gerçekleştirildi. Kit içerisinde bulunan ve her bir örnek için 50 µl olacak şekilde TUNEL reaktifi hazırlanmıştır. TUNEL reaktifi, her bir örnek için 10 µl Reaksiyon tamponu, 0.75 µl Tdt

enzimi, 8 µl FITCH-dUTP ve 32.25 µl distile su karıştırılarak toplam 51 µl şeklinde hazırlanmıştır. Negatif kontroller için Tdt enzimi eklenmemiştir. TUNEL reaktifleri her bir örneğe ayrı ayrı eklenmiş ve 37 °C sıcaklıkta 1 saat sürede inkübe edilmiştir. Ardından hücre çekirdeklerini görselleştirmek için, Propidyum İyodür (PI) ile 30 dakika boyanması sağlanmıştır. Boyama işlemi sonunda floresan mikroskopunda görüntüleme yapılmıştır.

3.2.5. İstatistik Çalışma

Bu çalışmada, her bir deney üç bağımsız tekrarla yürütülmüştür. Elde edilen tüm veriler ortalama ± standart hata (SEM) olarak kullanılmıştır.

Verilerin istatistiksel analizi GraphPad Prism 8.0.1 yazılım programı kullanılmıştır. Kontrol ve muamele grupları arasındaki potansiyel farklılıkların tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve hemen ardından Benferroni çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık, p değerlerine göre $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$, $p < 0,0001^{****}$ şeklinde ifade edilmiştir.

4 BULGULAR

4.1 Isırgan Otu Tohumu Yağının Antioksidan Aktivite Sonuçları

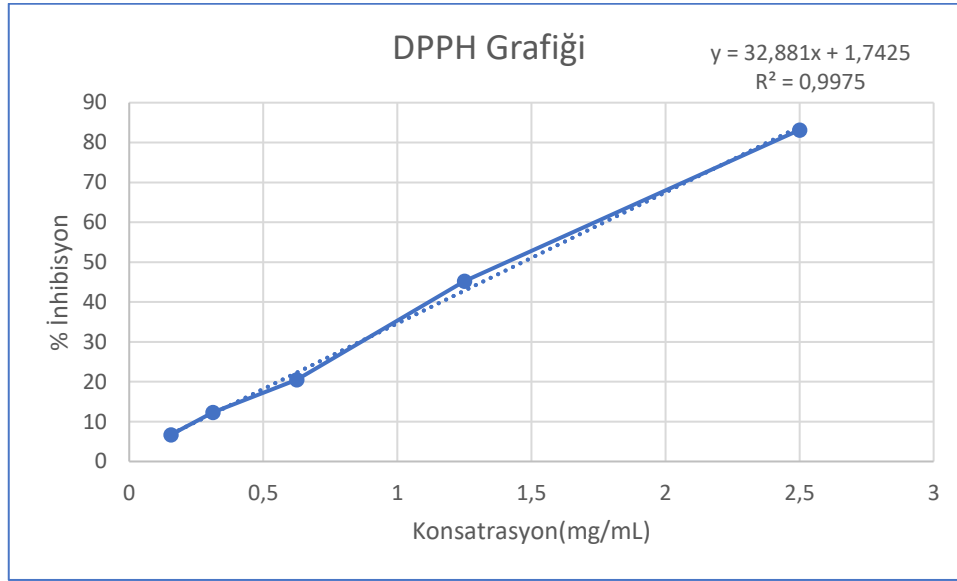
4.1.1 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) Radikalini Süpürücü Etkisi

Kararlı bir serbest radikal olan DPPH, çözelti içerisinde mor bir renkte bulunmaktadır. DPPH çözeltisine bir antioksidan madde (örneğin gallik asit veya C vitamini) eklendiğinde, bu bileşik elektron veya hidrojen atomu bağışı yoluyla serbest radikali indirger ve çözeltinin renginin sarıya doğru açılmasına neden olmaktadır. Bu renk değişimi spektrofotometrik olarak kolaylıkla ölçülebilir ve maddenin antioksidan kapasitesinin bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir.

Bu çalışmada, UDS yağının DPPH radikalini süpürücü etkisi pozitif kontrol olarak kullanılan gallik asit standartı kullanılmıştır. Her bir ölçüm dört bağımsız deneyin ortalaması alınarak hesaplanmış ve sonuçlar standart sapmaları ile birlikte ifade edilmiştir. UDS yağının konsantrasyona bağlı olarak artan DPPH radikal süpürücü aktivitesi Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

Şekil 4.1

UDS Yağının DPPH serbest radikal süpürücü etki grafiği



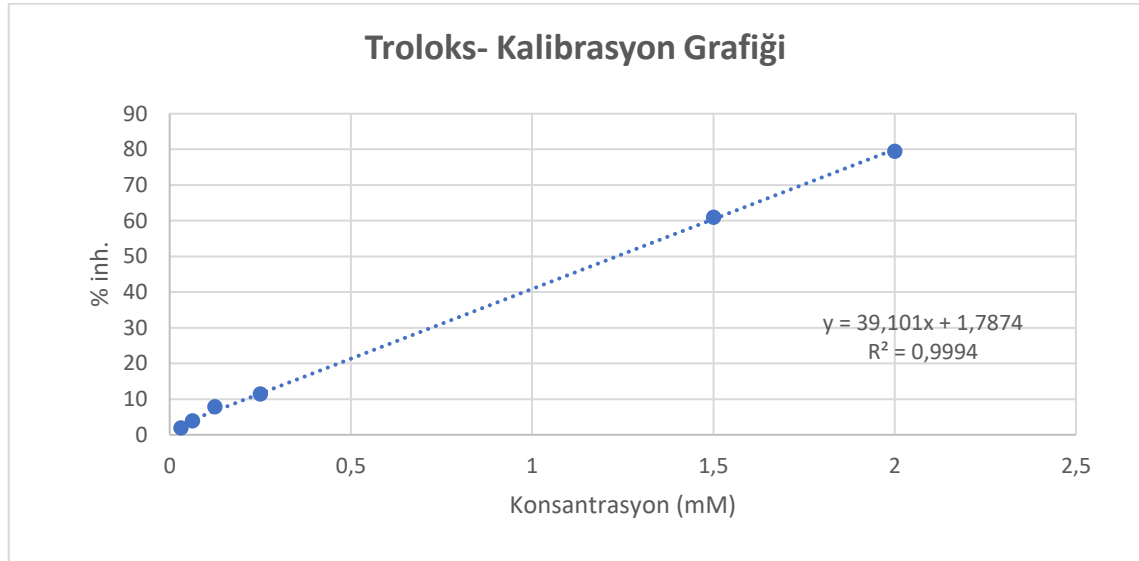
UDS yağının DPPH radikalini süpürücü etkisi konsantrasyona bağlı % inhibisyon değerleri Şekil 4.1’de belirtildiği üzere 2.5 mg/mL başlangıç konsantrasyonu esas alınarak 1:1 oranında seri seyreltilmiş ve sırasıyla 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 ve 0.15625 mg/mL konsantrasyonlarında analizler gerçekleştirilmiştir. Bu 5 konsantrasyonun % inhibisyon değerleri sırasıyla 83.17, 45.23, 20.49, 12.35 ve 6.74’dir. Standart gallik aside ($3,94 \pm 0.14 \mu\text{g/mL}$) göre konsantrasyon ve inhibisyon yüzde değerleri dikkate alındığında, UDS yağının serbest radikal süpürme etkisi potansiyeli düşük olduğunu görülmektedir.

4.1.2 ABTS (2,2’-azino-bis (3-ethylbenzotiazoline-6-sülfonik asit) radikali katyon süpürücü etki (TEAK)

TEAK (Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasitesi) yöntemi, bir maddenin antioksidan kapasitesini yani serbest radikali süpürücü etkisini ölçmek için kullanılan yöntemdir. TEAK aktivitesi sonuçlarının nicel olarak ifade edilmesi için, 0.05mM ve 2mM arasında değişen farklı konsantrasyonlardaki Troloks standart çözeltilerinin % inhibisyon değerleri kullanılarak bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. UDS yağının antioksidan kapasitesinin ölçülmesinde bu kalibrasyon eğrisi üzerinde yaygın antioksidan bir referans olan Troloks eşdeğeri (mM TEAK) cinsinden Şekil 4.2’de ifade edilmiştir ve elde edilen sonuçların 3 tekrarlı deney ortalaması da standart sapmalarıyla birlikte Tablo 4.1’de belirtilmiştir.

Şekil 4.2

UDS yağının Troloks eşdeğer cinsinden antioksidan kapasitesi grafiği



Tablo 4.1

UDS yağının antioksidan kapasitesi(TEAK)

Örnek	ABTS (mM _{TE} /g _{yağ})
UDS yağı	2.35±0.14

Antioksidan etkili bir bileşik olan ve “suda çözünen E vitamini analogu” olarak adlandırılan ‘Troloks’ referans alınmıştır. Isırgan otu tohumu yağının troloks eşdeğerliğine göre test edilmiş (TEAK) ve UDS yağının toplam antioksidan kapasitesi **2.35±0.14 mM_{TE}/g_{yağ}** olarak belirlenmiştir. Bu bulgu, UDS yağının antioksidan seviyesinin düşük olup, sınırlı bir antioksidan kapasiteye sahip olduğunu göstermiştir.

4.2 Isırgan Otu Tohumu Yağının A549 ve HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

UDS yağı, A549 ve HeLa hücrelerinde 6 farklı konsantrasyonda (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 ve 0,6 ml/L) 24 ve 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Ardından besi yeri ortamına MTT boyası eklenerek 37°C’de 3 saat kadar tekrar inkübe edilmiştir. Süre sonunda oluşan formazon tuzları, DMSO çözeltisi ile çözündürülmüştür. Her bir kuyu 540 nm absorbans değerinde ELISA Reader cihazı ile ölçülmüştür. Hücre canlılığı hesaplamalarında, kontrol grubu hücrelerin canlılığı temel alınmış ve %100 olarak kabul edilmiştir. UDS yağının 24 ve 48 saatteki IC₅₀ değerlerinin hesaplanma işlemleri Graphpad Prism8

programı ile yapılmıştır. Her bir konsantrasyon için hücre canlılık oranları, MTT testi için kullanılan ve aşağıda belirtilen (Denklem 4.1) % canlılık formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Her bir deney üç bağımsız deney ve üç tekrarlı şekilde yapılmıştır.

Denklem 4.1

MTT testi için kullanılan % canlılık belirleme formülü

$$\% \text{ canlılık} = \frac{\text{Konsantrasyon Ortalaması} - \text{Boş Ortalama}}{\text{Kontrol Ortalaması} - \text{Boş Ortalama}} \times 100$$

UDS yağının A549 ve HeLa hücreleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılan sitotoksite analizleri sonucunda, A549 hücreleri için IC₅₀ değeri 24 saatlik uygulamada 0.503 ml/L, 48 saatlik uygulamada ise 0.5485 ml/L olarak belirlenmiştir. HeLa hücrelerinde ise IC₅₀ değeri 24 saatte 0.4209 ml/L iken, 48 saatte ise sonuç vermedi. (Tablo 4.6). MTT testinin sonuçları, aşağıda başlıklar halinde belirtilmiştir

4.2.1 UDS yağının A549 hücresine 24 saat süredeki etkisi

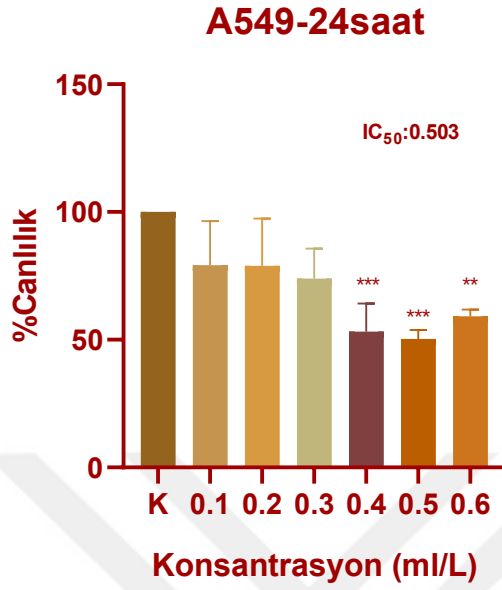
Tablo 4.2

UDS yağının 24 saat uygulamasında 0.1-0.6 ml/L arasındaki 6 farklı konsantrasyona tabi tutulan A549 hücresindeki % hücre canlılık değerleri (Kontrole göre *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001)

Dozlar (ml/L)	Canlılık(%)
0.1	79.156
0.2	78.963
0.3	73.8889
0.4	53.1804
0.5	50.3366
0.6	59.1357

Şekil 4.3

UDS yağının 24 saat uygulamasında 0.1-0.6ml/L arasındaki 6 farklı konsantrasyona tabi tutulan A549 hücrelerindeki % hücre canlılık grafiği (Kontrole göre * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$)



4.2.2 UDS yağının A549 hücrelerine 48 saat süredeki etkisi

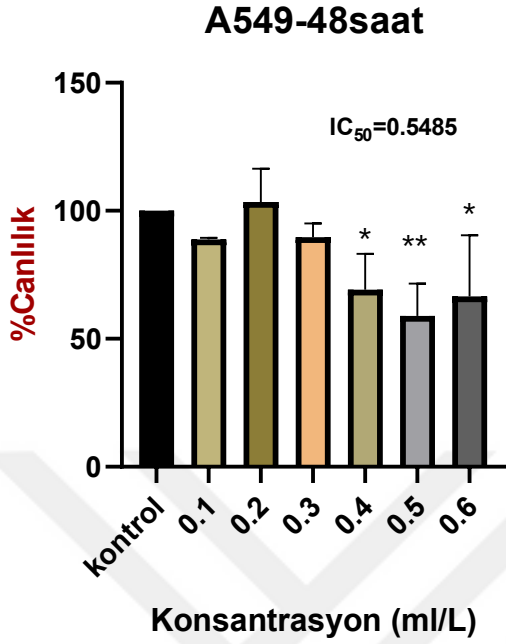
Tablo 4.3

UDS yağının 48 saat uygulamasında 0.1-0.6ml/L arasındaki 6 farklı konsantrasyona tabi tutulan A549 hücrelerindeki % hücre canlılık değerleri (Kontrole göre * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$)

Dozlar (ml/L)	Canlılık(%)
0.1	88.7544
0.2	103.409
0.3	89.6539
0.4	69.1329
0.5	58.9308
0.6	66.5286

Şekil 4.4

UDS yağının 48 saat uygulamasında 0.1-0.6 ml/L arasındaki 6 farklı konsantrasyona tabi tutulan A549 hücrelerindeki % hücre canlılık değerleri (Kontrole göre * $p<0,05$ ** $p<0,01$ *** $p<0,001$)



24 saatlik uygulama sonucunda, A549 hücrelerinde test edilen UDS yağının sitotoksik etkisi doza bağlı olarak artış göstermiştir. 0.4 ml/L ve üzeri konsantrasyonlarda hücre canlılığı anlamlı şekilde azalmış, IC_{50} değeri yaklaşık 0.503 ml/L olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.3; Tablo 4.2). Bu sonuç, UDS yağının A549 hücreleri üzerinde belirgin bir sitotoksik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. A549 hücrelerinde 48 saatlik uygulamada IC_{50} değeri 0.5485 ml/L olarak hesaplanmış olup, bu değer 24 saatlik uygulamaya göre biraz daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.4; Tablo 4.3).

4.2.3 UDS yağının HeLa hücresine 24 saat süredeki etkisi

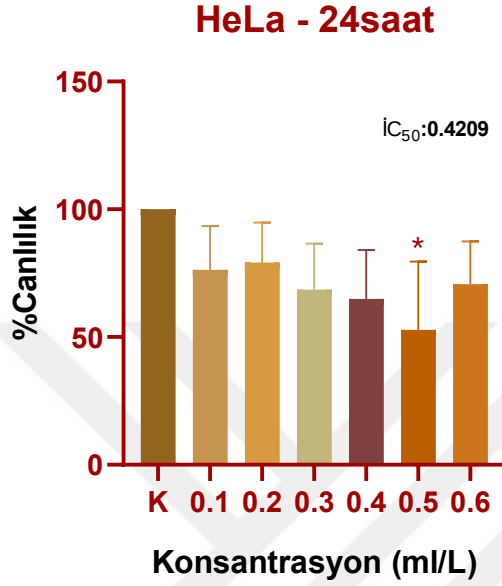
Tablo 4.4

UDS yağının 24 saat uygulamasında 0.1-0.6ml/L arasındaki 6 farklı konsantrasyona tabi tutulan HeLa hücrelerindeki % hücre canlılık değerleri (Kontrole göre * $p<0,05$ ** $p<0,01$ *** $p<0,001$)

Dozlar (ml/L)	Canlılık(%)
0.1	76.2778
0.2	79.2262
0.3	68.6164
0.4	64.9899
0.5	52.7972
0.6	70.6648

Şekil 4.5

UDS yağının 24 saat uygulamasında 0.1-0.6ml arasındaki 6 farklı konsantrasyona tabi tutulan HeLa hücreindeki % hücre canlılık değerleri (Kontrole göre * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$)



4.2.4 UDS yağının HeLa hücrelerine 48 saat süredeki etkisi

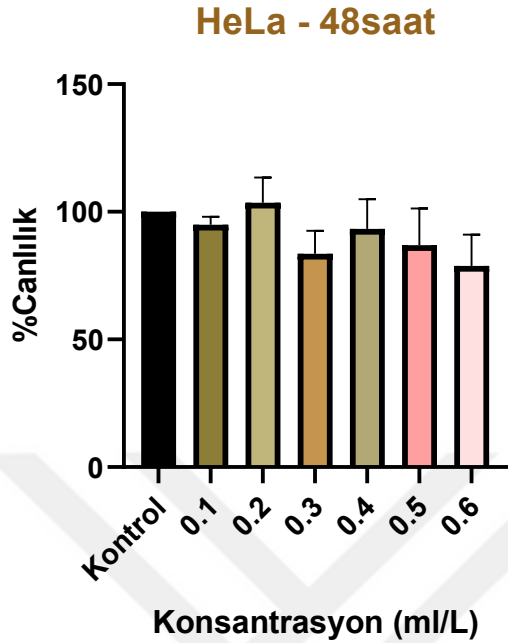
Tablo 4.5

UDS yağının 48 saat uygulamasında 0.1-0.6ml/L arasındaki 6 farklı konsantrasyona tabi tutulan HeLa hücreindeki % hücre canlılık değerleri (Kontrole göre * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$)

Dozlar (ml/L)	Canlılık(%)
0.1	94.8861
0.2	103.559
0.3	83.5332
0.4	93.2502
0.5	86.9121
0.6	78.8095

Şekil 4.6

UDS yağının 48 saat uygulamasında 0.1-0.6ml/L arasındaki 6 farklı konsantrasyona tabi tutulan HeLa hücrelerindeki % hücre canlılık değerleri (Kontrole göre * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$)



HeLa hücrelerine uygulanan UDS yağı, 24 saatlik sürede orta dozlarda hafif bir sitotoksik etki gösterse de (Şekil 4.5; Tablo 4.4), 48 saatlik uygulama sonucunda hücre canlılığında artış gözlenmiş ve anlamlı bir hücre ölümü tespit edilmemiştir (Şekil 4.6; Tablo 4.5). Bu bulgular, UDS yağının HeLa hücreleri üzerinde belirgin bir sitotoksik etkiye sahip olmadığını göstermektedir.

Tablo 4.6

UDS yağının A549 ve HeLa hücre hatlarında 24-48 saatlik IC₅₀ değerleri ve etkileri

Hücre Hattı	Zaman	IC ₅₀ (ml/L)	Sitotoksikite Etkisi
A549	24 saat	0.5030	Belirgin ve doz-bağımlı sitotoksik etki
A549	48 saat	0.5485	Etki devam etmekte, ancak doz-yanıt zayıflamış
HeLa	24 saat	0.4209	Orta düzeyde etki, bazı dozlarda anlamlı
HeLa	48 saat	-	Etki zayıflamış, hücreler direnç geliştirmiş olabilir

4.3 Annexin-V FITCH

Normal hücre membranına iç yüzeyinde yer alan fosfatidilserin (PS), hücre apoptoza uğradığında membranın dış yüzeyine taşınır. PS'nin membranın dış yüzeyine çıkmasıyla hücre membranının henüz bütünlüğü bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken

dönemlerinde oluşur. Annexin V, PS'ye bağlanabilen bir protein olduğundan, floresan bir madde ile işaretlenerek apoptoza uğramış hücreyi görünür hale getirir.

Apoptozisin erken evrelerini belirlemek amacıyla, deneyler FITC Annexin-V kit 1 protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. 24 ve 48 saat süreyle inkübe edilen HeLa ve A549 hücreler, soğuk PBS ile yıkanmıştır. Annexin V FITC ve PI (Propidyum İyodür) eklenmiş ve 15 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. Hazırlanan örnekler, akış sitometrisi cihazında analiz edilerek erken ve geç apoptoz düzeyleri belirlenmiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7

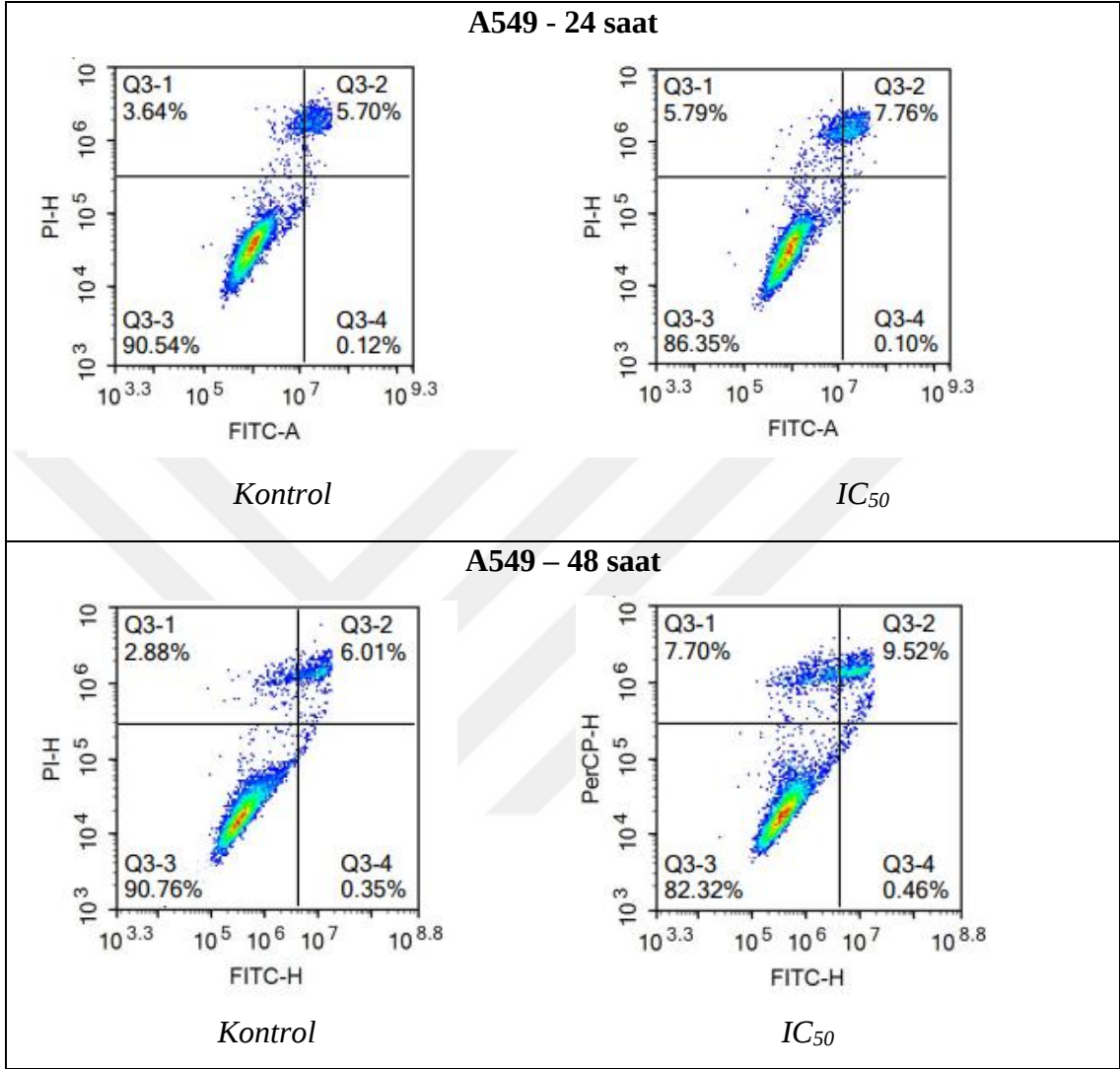
A549 ve HeLa hücrelerinin 24 ve 48 saat canlı, nekroz, erken apoptoz ve geç apoptoz % ortalama değerleri

		Canlı (%)		Erken Apoptoz (%)		Geç Apoptoz (%)		Nekroz (%)	
		Kontrol	IC ₅₀	Kontrol	IC ₅₀	Kontrol	IC ₅₀	Kontrol	IC ₅₀
A549	24 saat	82.14	79.79	0.11	0.06	9.94	9.60	7.81	10.55
	48 saat	80.84	67.49	0.47	0.60	8.48	13.30	10.2	18.61
HeLa	24 saat	86.35	50.14	0.10	0	5.64	1.61	7.91	48.25
	48 saat	72.28	70.26	0.06	0.02	2.84	2.49	24.82	27.23

UDS yağının A549 hücrelerine uygulanması sonucunda zamanla artan bir apoptotik etki gösterdiği tespit edilmiştir. 24 saatlik uygulamada toplam (erken + geç) apoptoz oranı kontrol grubunda %10.05 iken, A549 hücrelerinin IC₅₀ grubunda %9.66 bulunmuştur. Bununla birlikte 48 saatlik uygulamada, kontrol grubundaki toplam apoptoz oranı %8.95'ten A549 hücrelerinin IC₅₀ grubunda %13.90'a yükselmiştir. A549 hücrelerinde, UDS yağı uygulaması sonrası 48 saatlik sürede toplam apoptoz oranlarında gözlenen bu artış, A549 hücre hattında apoptozun zamana bağlı olarak aktive olabileceğini düşündürmektedir. HeLa hücrelerinde ise UDS yağı uygulaması sonrası toplam apoptoz oranları oldukça düşüktür. 24 saatlik sürede kontrol grubunda %5.74 iken HeLa hücrelerinin IC₅₀ grubunda %1.61'e düşmüştür. 48 saatlik sürede ise kontrol grubunda %2.90, IC₅₀ grubunda ise %2.51 olarak hesaplanmıştır. Bu veriler, HeLa hücrelerinde apoptozun baskın bir ölüm mekanizması olmadığını; UDS yağının bu hücrelerde apoptoz yerine daha çok nekroz yoluyla etki ettiğini düşündürmektedir.

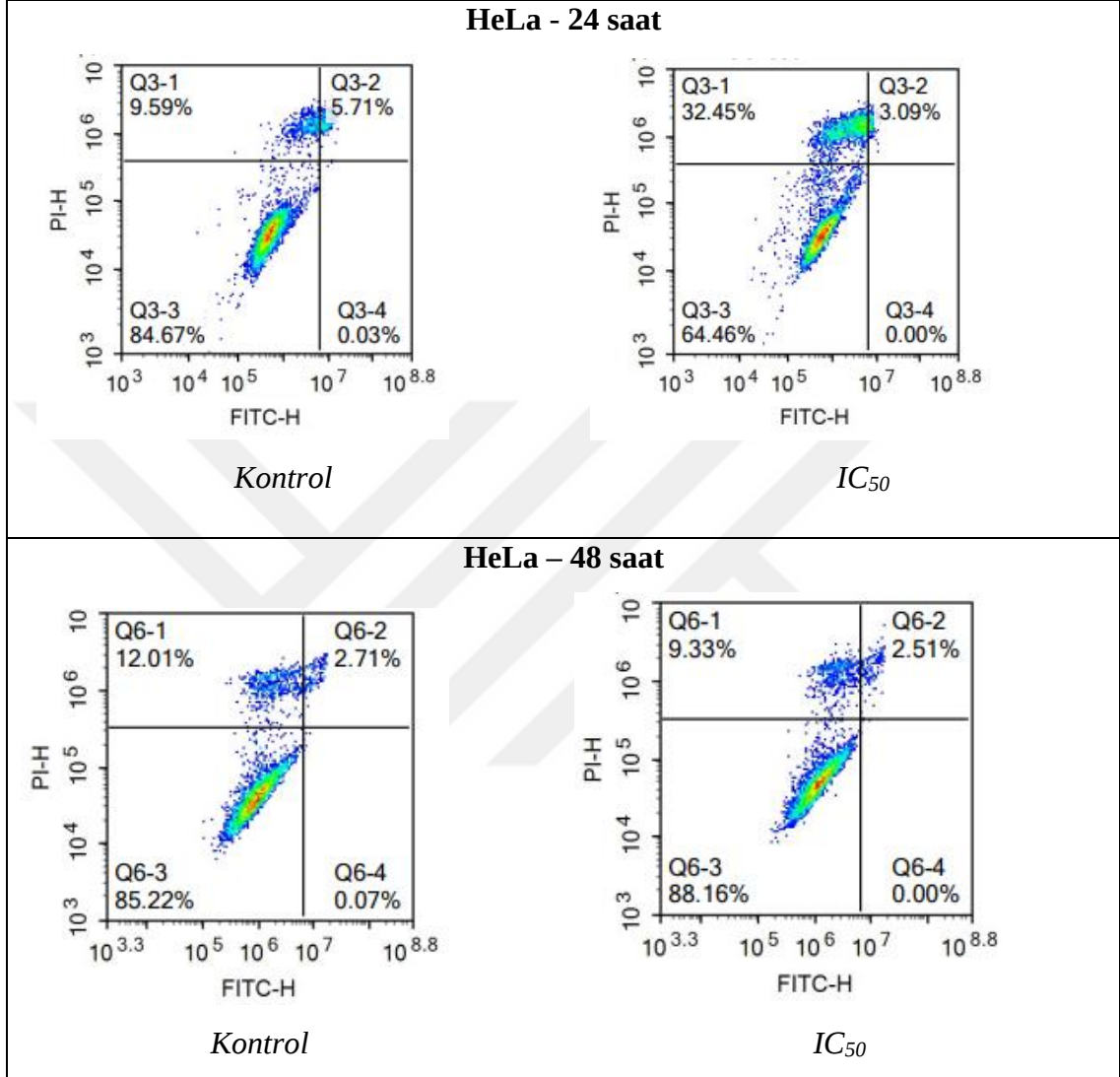
Şekil 4.7

A549 hücrelerinin 24 ve 48 saat apoptoz düzeyleri ($***P<0,001$, $**P<0,01$, $*P<0,05$)($N=3$). (Q3-1:Nekrotik hücreler, Q3-2:Geç Apoptoz, Q3-3:Canlı Hücre, Q3-4:Erken Apoptoz)



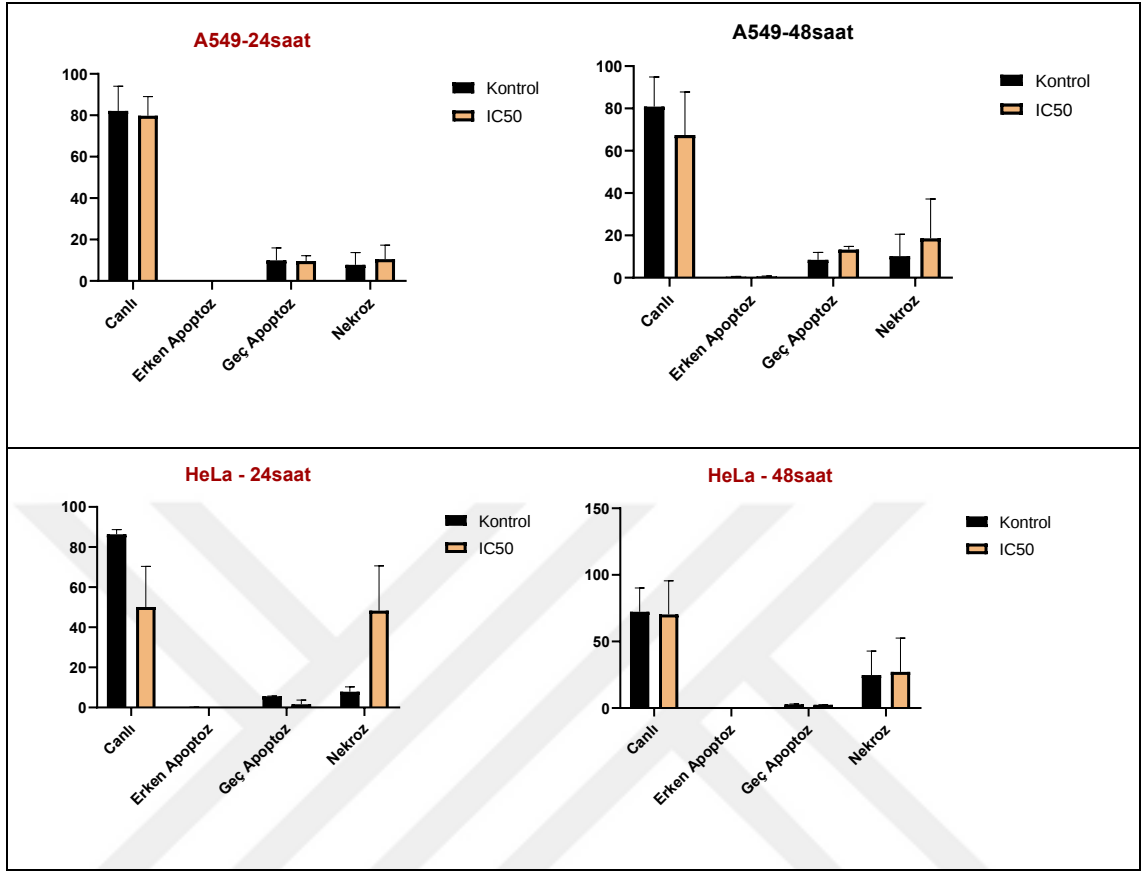
Şekil 4.8

HeLa hücrelerinin 24 ve 48 saat apoptoz düzeyleri ($***P<0,001$, $**P<0,01$, $*P<0,05$)($N=3$). (Q3-1 ve Q6-1: Nekrotik hücreler, Q3-2 ve Q6-2: Geç Apoptoz, Q3-3 ve Q6-3: Canlı Hücre, Q3-4 ve Q6-4: Erken Apoptoz)



Şekil 4.9

A549 ve HeLa hücrelerinin 24 ve 48 saat apoptoz düzey grafikleri



4.4 Kaspaz-3

Kaspaz-3 analizi, yalnız apoptotik hücrelerde meydana gelen aktif kaspaz-3 immunohistokimyasal boyama yöntemiyle belirlenmektedir. Bunun için de hücrenin kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi veya çalışılan hücrelerde apoptoza neden olan ajanın kaspaz-3'ü indükleyip indüklediğini bilinmesi gerekmektedir.

UDS yağının A549 ve HeLa hücrelerindeki kaspaz-3 düzeyleri üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, hücreler 24 ve 48 saat süreyle inkübe edilmiş, ardından hücrelerin yapısı sabitlenmiş, hücre zarları gerçigen hale getirilmiş ve kaspaz-3 antikoru ile boyanmıştır. İşaretlenen hücrelerde kaspaz-3 düzeyleri, akış sitometrisi yöntemi ile analiz edilmiştir.

Her iki hücre hattında IC₅₀ değeri belirlenen UDS yağının kaspaz-3 testinin uygulanması sonucunda belirlenen kaspaz-3 aktivitesi ve canlılık oranları Tablo 4.8'de belirtilmiştir. A549 hücresinde 24 saatlik IC₅₀ uygulamasında %22.69'dan %20.23'e düşerken, 48 saatlik bu değer, %41.90'dan %39.50'e düşmüştür. A549 hücre hattında 24 saat ve

sonrasında kaspaz-3 aktivitesinde artış gözlenmemiştir. Sonuç olarak da UDS yağının A549 hücre hattında kaspaz-3 aktivitesini indüklediği, klasik apoptoz yollarının devreye girmemesiyle hücrede mitokondriyal dengeyi korumuş olabileceği ve bu nedenle de hücre içi hayatta kalma sinyallerini uyararak aktif hale gelmiş olabileceğini göstermektedir. A549 hücrelerine karşılık HeLa hücrelerinde ise zıt bir eğilim göstermiştir. HeLa hücrelerinde IC₅₀ grubunda 24 saatte kaspaz etkisi kontrole göre %36.47'den %48.25'e, 48 saatte ise %22.84'den %33.35'e çıkmıştır. Bu da HeLa hücrelerinde UDS yağının kaspaz-3 aktivitesi hem erken hem de geç artmış olduğunu gösterse de en yüksek etkinin 24 saatte gerçekleşmiş ve 48 saatte bu etki kısmen de olsa azalarak sürdüğü gözlemlenmiştir. Bu bulgu, apoptozu indüklemeye kabiliyetinin HeLa hücrelerinde dinamik bir gelişim gösterdiğini göstermiştir (Tablo 4.8; Şekil 4.10; Şekil 4.11).

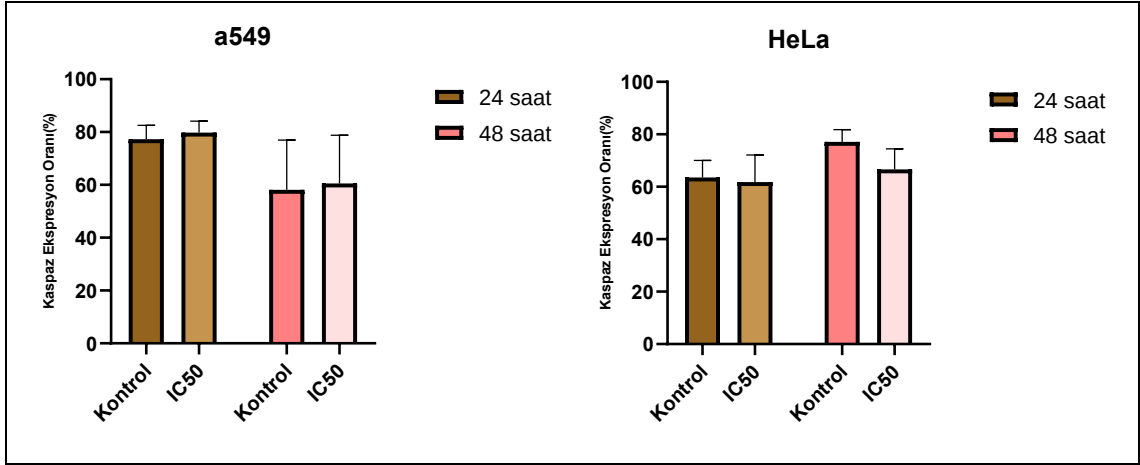
Tablo 4.8

UDS yağının 24 ve 48 saat sürelerde A549 ve HeLa hücrelerinde kaspaz aktivitelerinin değerleri (3 tekrar ortalaması)

		24 saat		48saat	
		Canlılık (%)	Kaspaz etkisi(%)	Canlılık (%)	Kaspaz etkisi(%)
A549	Kontrol	77.31	22.69	58.10	41.90
	IC ₅₀	79.77	20.23	60.50	39.50
HeLa	Kontrol	63.53	36.47	77.16	22.84
	IC ₅₀	51.75	48.25	66.65	33.35

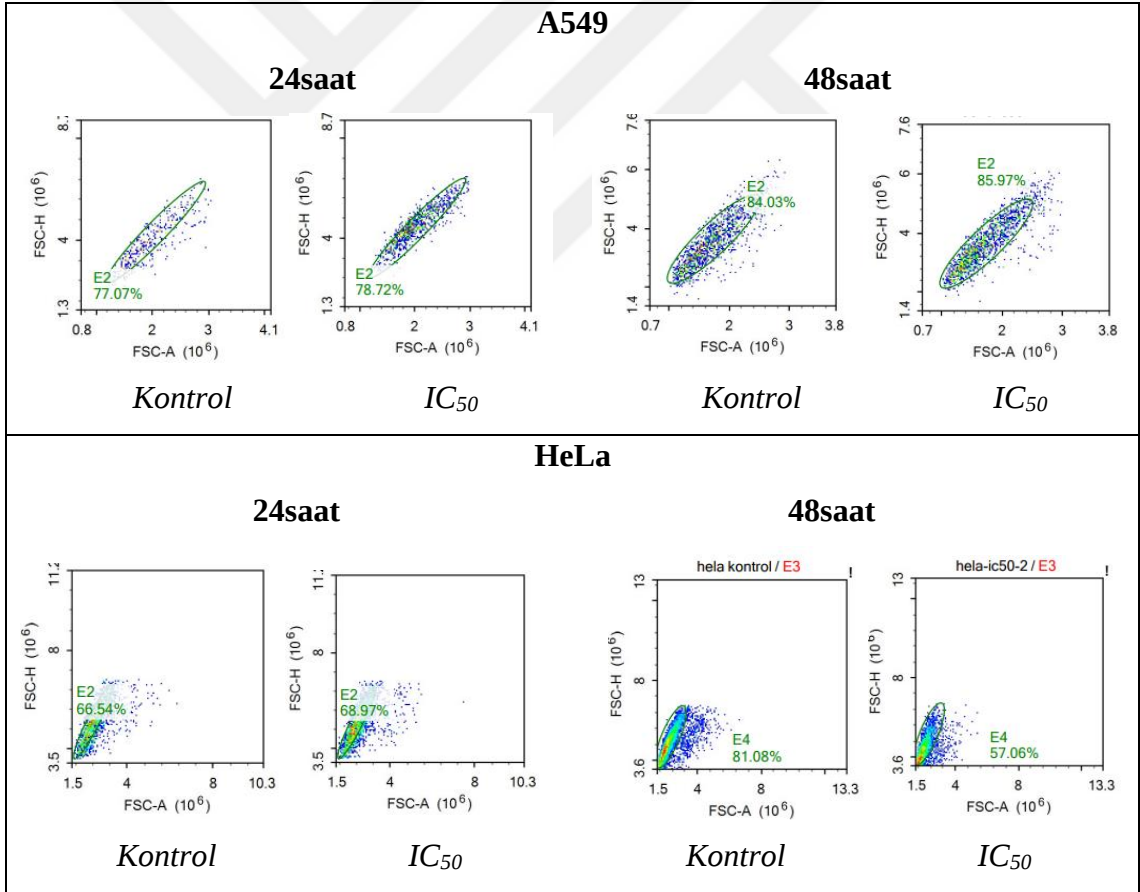
Şekil 4.10

UDS yağının 24 ve 48 saat sürelerde A549 ve HeLa hücrelerinde kaspaz aktivitelerinin grafikleri



Şekil 4.11

UDS yağının A549 ve HeLa hücrelerinde 24 ve 48 saat süresindeki kaspaz aktiveler



4.5 Mitokondriyal Membran Potansiyeli ($\Delta\Psi_m$)

Mitokondriyal membran potansiyeli analizi, mitokondriyal aktivitenin değerlendirilmesi, apoptoz mekanizmalarının anlaşılması, tümör metabolizmasının karakterize edilmesi ve ilaçların hücrel aktivitesini incelemek amacıyla yapılmaktadır.

A549 ve HeLa hücreleri, 6 kuyucuklu plakalara 1×10^6 hücre olacak şekilde ekilmiştir. IC_{50} değeri belirlenen UDS yağı, 24 ve 48 saat sürelerde inkübe edilerek uygulanmıştır. Süre sonunda JC-1 boyası eklenmiş ve $37^\circ C$, %5 CO_2 'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Kontrol hücreler için de CCCP ile 5 dakika inkübe edildikten sonra yıkanıp santrifüj edilmiştir. Hücreler PBS içinde süspanse edilerek akış sitometrisinde mitokondriyal membran potansiyelindeki değişiklikler belirlenmiştir. A549 ve HeLa hücrelerinde 24 ve 48 saat sürelerinde meydana gelen değişimler Tablo 4.9 ve Şekil 4.12'de verilmiştir.

Mitokondriyal membran potansiyel analizi sonucunda 24 saat UDS yağına maruz bırakılan A549 hücrelerinde $\Delta\Psi_m$ kaybı (%62.38), hem kontrol grubuna (%43.47) göre anlamlı derecede yüksek hem de pozitif kontrol CCCP'ye (%69.40) yakın çıkmıştır. 48 saatlik muamele sonucunda $\Delta\Psi_m$ kaybı %55.14 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre UDS yağı A549 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelinde bozulmaya neden olmuş, bu da intrinsik (mitokondriyal) apoptotik yolun aktive olduğunu göstermektedir. HeLa hücrelerinde ise 24 saat de $\Delta\Psi_m$ kaybı yalnızca %19.73'tür ve kontrol grubundaki bozulma oranı da oldukça düşüktür (%13.38). 48.saat de hem kontrol hem IC_{50} gruplarında $\Delta\Psi_m$ kaybı %50 civarındadır (sırasıyla, %51.15; %49.26). Bu sonuçlara göre HeLa hücrelerinde UDS yağı mitokondriyal yolağı 24 saatte anlamlı şekilde tetiklememiş, 48.saatte kontrole yakın olduğu tespit edilmiştir. UDS'nin HeLa hücrelerinde apoptozu mitokondriyal yolağtan başlatmadığı daha çok nekroza yönelim olabileceğini düşündürmektedir.

Tablo 4.9

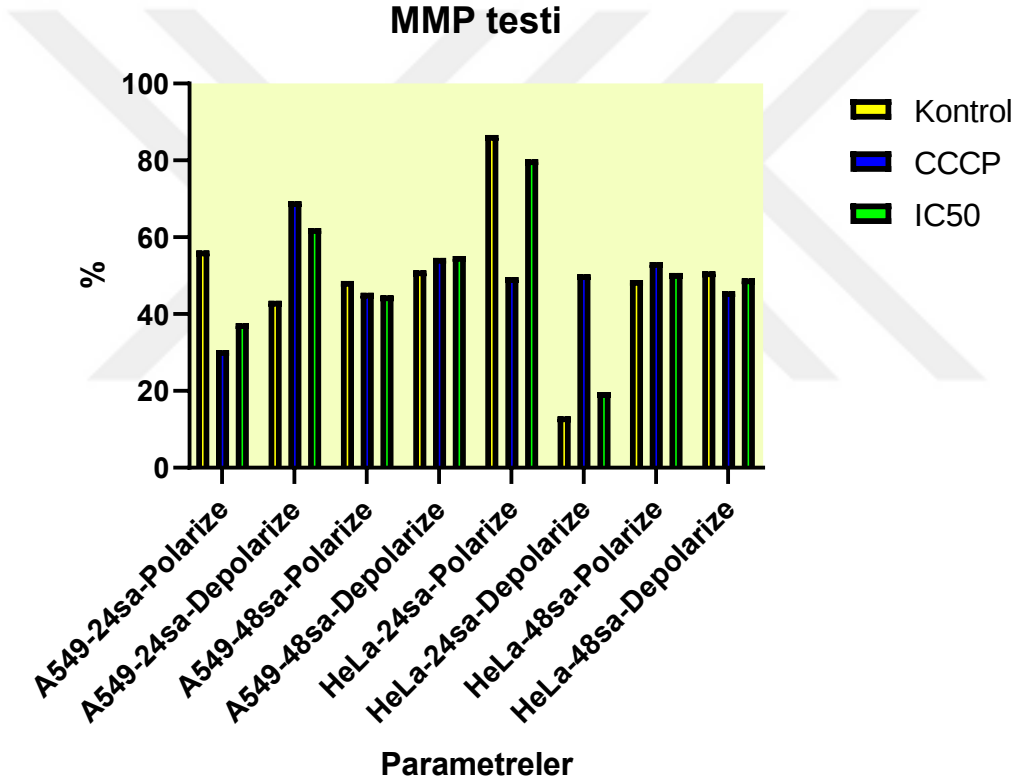
A549 ve HeLa hücrelerinde 24 ve 48 saat sürelerde mitokondriyal membran potansiyeli aktivitelerinin (%) sonuçları

	24 saat		48 saat	
	Polarize (%)	Depolarize (%)	Polarize (%)	Depolarize (%)
A549- Kontrol	56.525	43.475	48.655	51.345

A549- CCCP	30.60	69.40	45.505	54.595
A549-IC ₅₀	37.625	62.375	44.865	55.135
HeLa-Kontrol	86.62	13.38	48.855	51.145
HeLa- CCCP	49.60	50.40	53.51	45.99
HeLa- IC ₅₀	80.27	19.73	50.74	49.26

Şekil 4.12

A549 ve HeLa hücrelerinin 24 ve 48 saat sürelerde mitokondriyal membran geçirgenlikleri grafiği



4.6 Akridin Oranj/Etidyum Bromür Boyama ile Apoptozun Belirlenmesi

Akridin oranj boyası, hem canlı hem de ölü hücrelerin membranından geçerken, etidyum bromür boyası ise hasarlı veya bütünlüğü bozulmuş hücre membranından geçebilmektedir. Akridin oranj hem DNA'ya hem de RNA'ya bağlanabilirken; etidyum bromür sadece DNA'ya bağlanmaktadır. Akridin oranj DNA'ya bağlandığında **yeşil** floresan (bazen pH sebebiyle sarı-turuncu olabilir) vermektedir. Etidyum bromür ise DNA'ya bağlanınca **kırmızı-turuncu** floresan renk vermektedir.

6 kuyucuklu plakalara ekilen A549 ve HeLa hücre hatları, UDS yağının belirlenen IC₅₀ dozları 24 ve 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası PBS ile süspanse edilmiş ve AO/EB boya karışımından hücrelere eklenmiştir. İnkübasyona bırakıldıktan sonra hücreler PBS ile yıkanmıştır. Floresan mikroskopunda (Leica DMI 4000B, Almanya) FITC filtresi kullanılarak karanlık ortamda görüntüleme işlemleri yapılmıştır. A549 ve HeLa hücrelerinde zamana bağlı olarak meydana gelen hücrelerdeki canlı ve apoptotik değişimler Şekil 4.13’de verilmiştir.

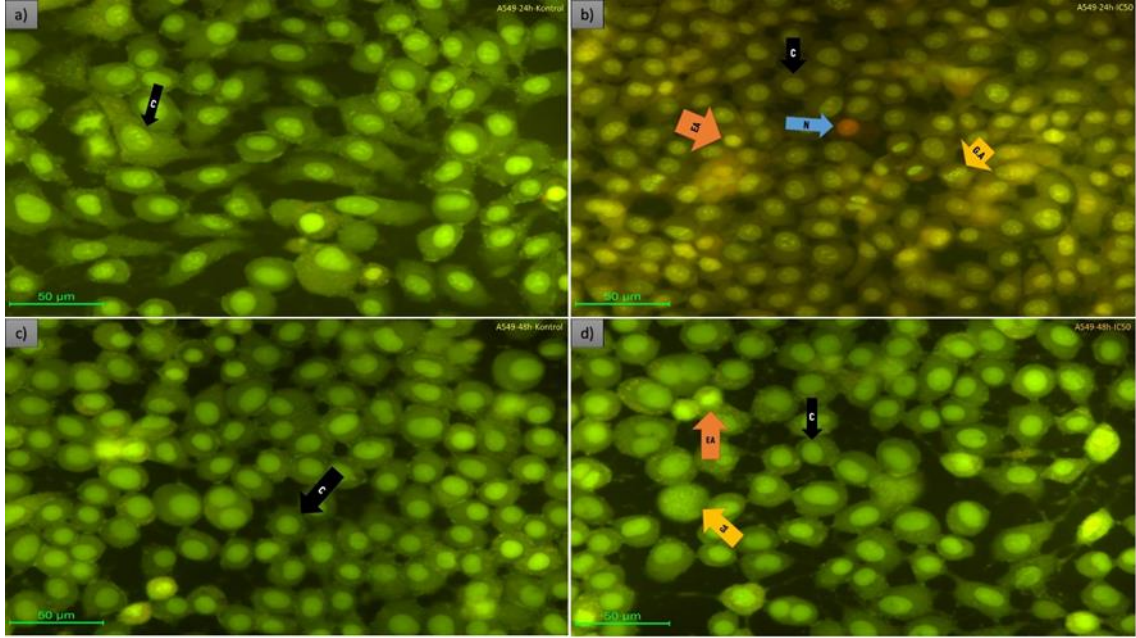
UDS yağının A549 ve HeLa hücreleriyle 24 ve 48 saat sürelerde muamele edilmesi sonucunda her iki hücre tipinde de kontrol hücrelerinde canlılık düzeylerinin yüksek olduğu gözlenmiştir. IC₅₀ değeri ile muamele görmüş A549 hücrelerinde 24 ve 48 saatlik sürelerde erken ve geç apoptoza ait morfolojik artışlar gözlemlenmiştir. Özellikle 48 saatlik sürede, hücre popülasyonunda halen canlı hücrelerin olduğu yeşil floresan sinyallerin yanında, sarı-turuncu floresan geçişleri gösteren hücrelerin sayısında ki artış dikkati çekmiştir. Ayrıca, bazı hücrelerde kırmızı-turuncu floresan sinyallerin görülmesi, etidyum bromür boyasının membran bütünlüğü bozulmuş hücrelere giriş yaptığını ve nekroz ya da geç apoptoz evresindeki hücrelerin varlığını işaret ettiğini göstermektedir. Bu bulgular, UDS yağının A549 hücrelerinde apoptozun morfolojik göstergelerini artırdığını ve hücre ölümünün, membran hasarı ile karakterize edilen ilerleyici aşamalara doğru ilerlediğini desteklemektedir (Şekil 4.13).

HeLa hücrelerinin 24 ve 48 saat sürelerinde A549 hücrelerinde olduğu gibi, erken ve geç apoptozda görsel bir artış gözlemlenmiştir. Ayrıca HeLa hücrelerinin 48 saat süre sonunda nekroza uğramış hücreler de gözlemlenmiştir (Şekil 4.14).

UDS yağının A549 ve HeLa hücre hatları üzerinde apoptozu indükleyici aktivitesi gözlemlenmiştir. A549 hücrelerinde apoptoza bağlı morfolojik değişiklikler 24 saatten 48 saate artış gösterirken, HeLa hücrelerinde özellikle 48 saatlik sürede nekroza eğilimli hücre popülasyonunun belirgin şekilde arttığı izlenmiştir.

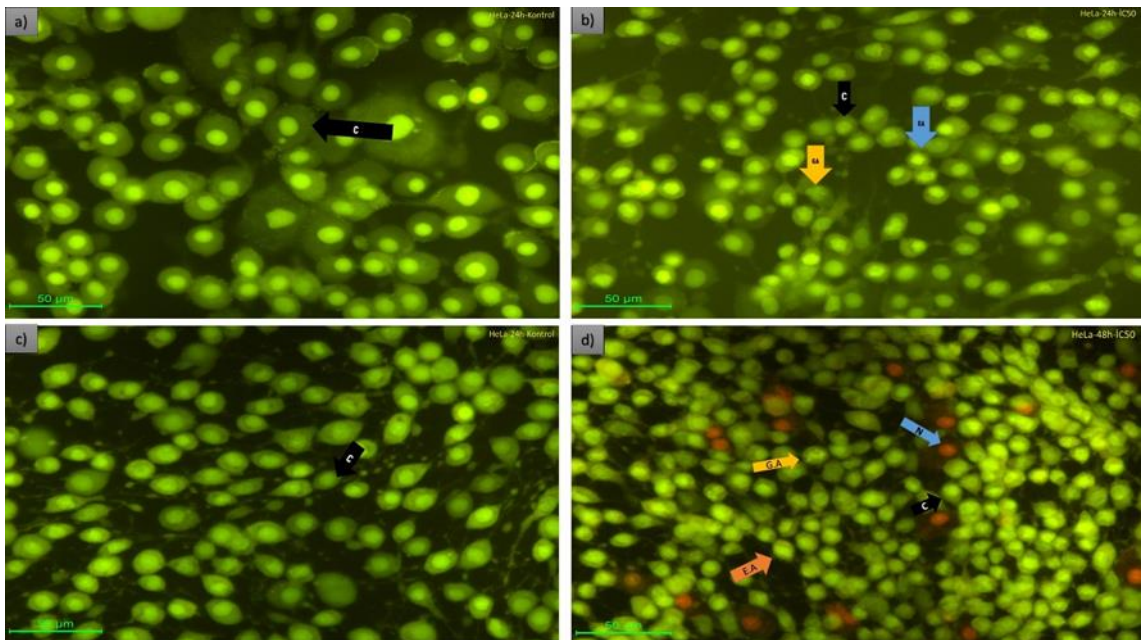
Şekil 4.13

A549 hücrelerine ait AO/EB boyama sonuçları (a:24 saat kontrol, b:24 saat IC₅₀, c:48 saat kontrol, d:48 saat IC₅₀). (C: canlı hücre (siyah ok), E.A: erken apoptotik hücre (turuncu ok), G.A: geç apoptotik hücre (sarı ok) ve N: nekroza uğramış hücre (mavi ok)).



Şekil 4.14

HeLa hücrelerine ait AO/EB boyama sonuçları (a:24 saat kontrol, b:24 saat IC₅₀, c:48 saat kontrol, d:48 saat IC₅₀). (C: canlı hücre (siyah ok), E.A: erken apoptotik hücre (turuncu ok), G.A: geç apoptotik hücre (sarı ok) ve N: nekroza uğramış hücre (mavi ok)).

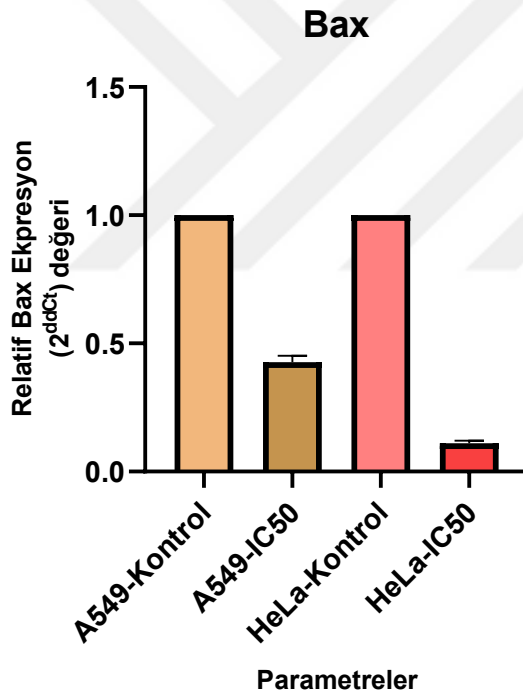


4.7 mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Bcl2 ve Bax genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri, Light Cycler (LC) cihazı ile kantitatif gerçek zamanlı PCR yöntemi ile yapılmıştır. Amplifikasyon işlemleri, 20 µl'lik son hacim içinde; cDNA, mRNA'ya özgü özel primerler, UPL probu, LC Taqman Master karışımı ve distile su içerecek şekilde gerçekleştirilmiştir. Çalışılan genler için amplifikasyon protokolleri, 95 °C sıcaklıkta 5 dakikalık bir başlangıç aşaması ve ardından 95 °C'de 15 saniye ile 60 °C'de 1 dakika süren 45 döngü boyunca devam ettirilmiştir. Gen ekspresyon analizinde, Bcl2 ve Bax genlerinin düzeyleri β-aktin geni referans alınarak normalize edilmiştir.

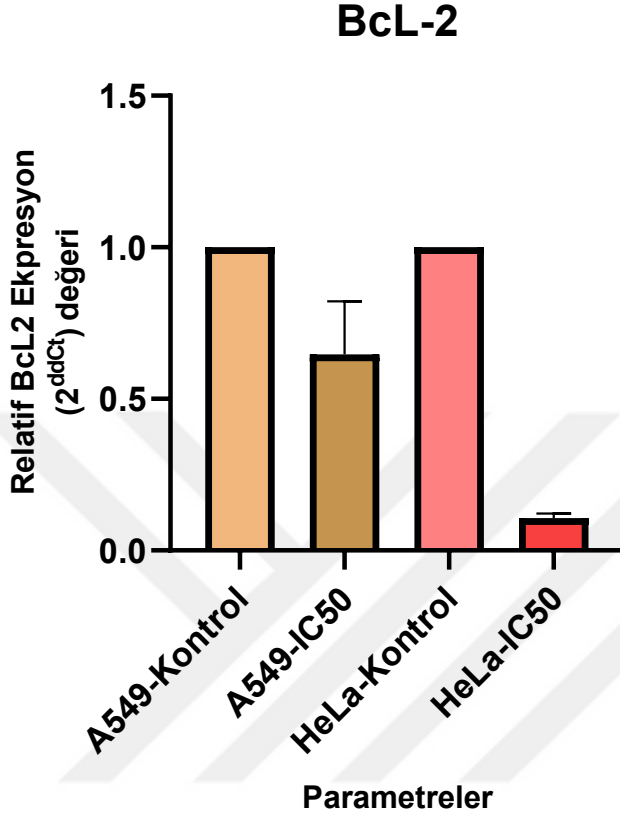
Şekil 4.15

A549 ve HeLa hücrelerinde Bax geninin ifade edilme düzeyleri(24saat)



Şekil 4.16

A549 ve HeLa hücrelerinde Bcl2 geninin ifade edilme düzeyleri(24saat)



Şekil 4.15 ve Şekil 4.16’da da belirtildiği üzere UDS yağının A549 ve HeLa hücreleri üzerindeki Bax ve Bcl-2 genlerinin ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde, her iki hücre hattında da bu genlerin ekspresyonlarının 2^{ddTc} değeri, 1.0 düzeyinde olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen 2^{ddTc} değerleri, Bax ve Bcl-2 genlerinin kontrol gruplarında bazal düzeyde eksprese edildiğini göstermektedir. A549 hücresinde IC₅₀ dozunda uygulanan UDS yağı sonrası, Bax gen ekspresyonunun 0.420 seviyelerine gerilediğini, Bcl-2 geninin ekspresyonu da 0.640 seviyelerine geldiği saptanmıştır. Bax ve Bcl-2 genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde, A549 hücrelerinde her iki genin de IC₅₀ uygulaması sonrası ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. Bu durum, klasik anlamda beklenen Bax artışı ve Bcl-2 azalmasından farklılık gösterse de, mitokondriyal membran potansiyeli kaybı, kaspaz-3 aktivasyonu ve geç apoptoz bulgularıyla birlikte değerlendirildiğinde, UDS yağının apoptozu Bax/Bcl-2 dengesinden bağımsız alternatif mekanizmalarla da başlatabileceğini düşündürmektedir. HeLa hücrelerinde ise hem Bax hem Bcl-2 gen ekspresyonlarının belirgin şekilde baskılanmış olması, bu hücrelerde

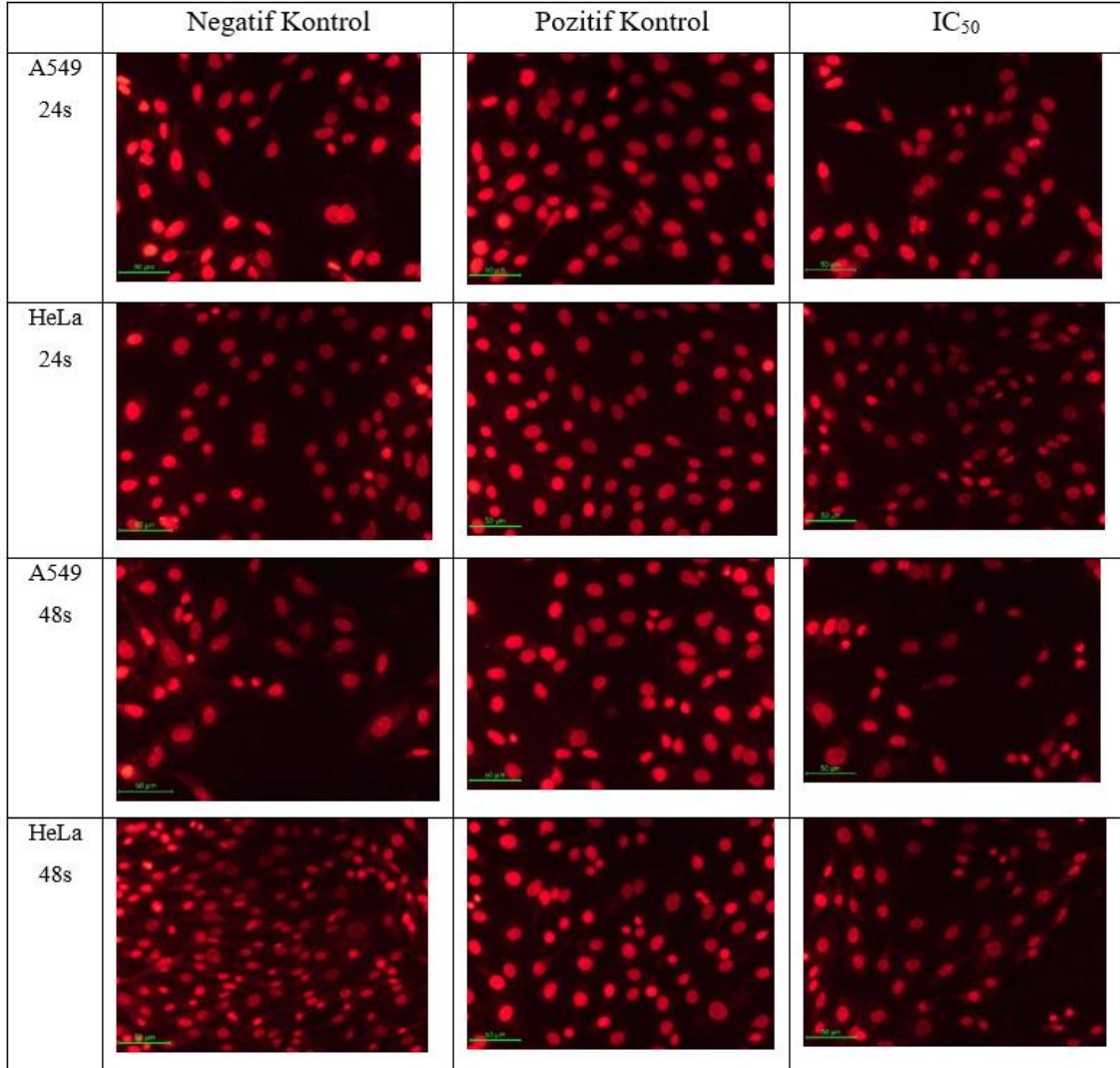
klasik apoptotik yanıtın zayıf olduğunu ve hücre ölümünün daha çok nekroz veya alternatif hücre ölüm mekanizmalarıyla gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmektedir

4.8 TUNEL yöntemi

TUNEL yöntemi, DNA zincirinde oluşacak fragmentasyonu (kırıkları) işaretleyerek apoptoza giren hücreleri spesifik olarak tanımlamaktadır. HeLa ve A549 kanser hücreleri üzerindeki IC₅₀ değeri belirlenen UDS yağının, 24 ve 48 saat inkübasyona sonrasında yapılan TUNEL boyaması, negatif kontrol, pozitif kontrol ve IC₅₀ değeri sonuçları Şekil 4.17’de verilmiştir.

Şekil 4.17

A549 ve HeLa hücrelerinin 24 ve 48 saat TUNEL boyama sonucu mikroskop görüntüleri



Şekil 4.17’de verilen TUNEL boyama sonuçları değerlendirildiğinde, UDS yağının 24 saatlik IC_{50} değeri uygulamasında A549 hücresinde belirgin bir TUNEL pozitifliği oluşturduğu gözlemlenmiş ve 48 saat süre sonunda bu etkinin devam ettiği veya az da olsa azalmış olabileceği tespit edilmiştir. HeLa hücrelerinde 24 saatlik sürede neredeyse apoptoz hiç gözlenmemiş; 48 saatlik uygulamada ise sınırlı düzeyde DNA fragmentasyonu meydana gelmiştir. Bu bulgular, UDS yağının HeLa hücrelerinde klasik apoptotik yollardan çok nekrotik hücre veya diğer ölüm mekanizmalarını aktive ettiğini düşündürmektedir.



5 SONUÇ, TARTIŞMA ve ÖNERİLER

Kanser, dünyada mortalite oranlarını önemli derecede etkilemekte ve giderek artan bir sağlık tehdidi olmaya devam etmektedir. Aynı zamanda sağlık sistemlerinde hem ekonomik olarak hem de yönetsel anlamda ciddi yük oluşturmaktadır. Kanser tedavisi bireyselleştirilmiş olması ve etkili tedavi stratejilerinin sınırlı oluşu, modern sağlık sistemleri üzerinde önemli derecede zorluk oluşturmaktadır (Mukheja vd., 2025). Kanser tedavisinde kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahaleler gibi temel yaklaşımlar yer almaktadır. Bu yöntemlerden kemoterapi, metastaz ve tümör nüksü riskini azaltarak hastaların genel yaşam süresine olumlu katkılar sağlamaktadır. Ayrıca son dönemlerde farmakolojik inovasyon alanında geleneksel tıbbi yaklaşımlar ile bitkisel orjinli ajanlar kemoterapiye alternatif kaynak olarak dikkat çekmektedir. Dünya çapında 70.000 bitki türünün geleneksel tıbbi amaçla kullanılmakta ve bu sayının en az 3.000'inin antikanser özelliği sahip olduğu öne sürülmektedir. Bu çerçevede, geleneksel yöntemlerin modern tıbbın tamamlayıcısı veya alternatifi olarak, araştırma ve uygulama düzeyinde stratejik önem kazanmaktadır (Imtiaz vd. 2024).

Yapılan son araştırmalar da Akciğer kanseri tedavisinde, bitki kökenli ilaçların belirli düzeyde etkili olduğu ve destekleyici bir alternatif olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır. Literatürde, bitkisel bileşenlerin antikanser özelliklerinin yanında kanser hastalarının yaşam sürelerini uzattığını, modern tedaviye bağlı yan etkileri hafiflettiği ve yaşam kalitesini de arttırdığını göstermektedir (Li vd. 2024). Metastatik veya tekrarlayan servikal karsinom vakalarında mevcut yaklaşımların tedavide sınırlı kalması nedeniyle servikal kanserinde de yeni terapötik stratejilerin keşfedilmesi veya geliştirilmesi önem kazanmaktadır (Shafabakhsh vd. 2023).

Urticaceae familyasına ait olan ısırgan otu (*Urtica dioica* L.), çoğunlukla Asya, Avrupa ve Amerika'nın ılıman bölgelerinde yayılış gösteren çok yıllık bir bitkidir. Yağ asitleri, polifenolik maddeler, amino asitler, vitaminler, steroller, flavonoidler, lignanlar, karotenoidler, lif ve terpenler gibi fitokimyasal bileşenler sayesinde antikanser, antiviral, antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antiülser ve hipolipidemik etkilere sahip olduğunu göstermektedir (Kutlu vd. 2020; Alimoddin vd. 2024). Bazı bitkiler ve onlardan izole edilen bileşenler, apoptoz başta olmak üzere birçok hücresel süreci modüle ederek insan kanser hücrelerinin metastazını ve proliferasyonunu engellediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu nedenle, özellikle kanser tedavisinde umut vadeden

alternatif bir yaklaşım olarak değerlendirilmesine yol açmıştır. Ülkemizde de kanser hastalarının tamamlayıcı ve alternatif tıbbında yaygın olarak kullanılan bir bitki olan ısırgan otu, en sık tercih edilen bitkilerin başında gelmektedir. Isırgan otunun kanser üzerindeki etkileri üzerine bilimsel çalışmaların yapılması, kanser araştırmalarına katkılar sağlayabilir ve gelecekteki tedavilere ilham kaynağı oluşturabilir (Mutlu vd. 2018).

Yüksek değerli ve biyoaktif bileşenlere sahip olan tohum yağları, özellikle yağ asitleri olmak üzere fenolik bileşik ve tokoferoller bakımından zengin doğal kaynaklardır. Bu özellikler sayesinde tohum yağları ilaç, gıda ve kozmetik sanayisinde yoğun ilgi görmektedir (Mitrovic vd. 2023). İçerdiği biyobileşenler sayesinde ısırgan otu tohumu yağı beslenmede, kozmetik alanında ve gıda sanayisinde terapötik bir ajan olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Petkova vd., 2020).

Bu tez çalışmasında öncelikle DPPH ve TEAK testleriyle UDS yağının antioksidan düzeyini belirlenmesi amaçlanmıştır. Daha sonra UDS yağının A549 ve HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla 24 ve 48 saat sürelerde MTT testi uygulanmış ve IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. IC₅₀ değeri belirlenmesiyle de apoptotik mekanizma değerlendirilmesi için çeşitli analizler yapılmıştır. Erken ve geç apoptoz belirtileri Annexin V testiyle, hücrelerdeki apoptotik süreçlerin ilerleyişini kaspaz-3 testiyle, mitokondriyal membran potansiyelindeki değişiklikleri Akış Sitometrisi ile, morfolik değişiklikler Akridin Oranj/Etidyum Bromür boyamayla, Bax ve Bel2 genlerinin mRNA ekspresyonları RT-PCR yöntemiyle ve DNA parçalanması da TUNEL yöntemiyle değerlendirilmiştir.

Fonksiyonel özelliklere sahip olan ve giderek artan ilgi gören bitkisel yağların, antioksidan etkilerini belirlenebilmesi için spektrofotometrik yöntemler kullanılarak test edilmiştir. Bu bağlamda, tez çalışmamızda renk değişimine bağlı olan DPPH ve TEAK antioksidan testleri uygulanmıştır. Bu iki teste tabi tuttuğumuz ısırgan otu tohumu yağının antioksidan potansiyeli düşük çıkmıştır. Mitrović ve ark. (2021) yaptığı bir çalışmada ısırgan otu tohumu yağının trikloroetilen ve hekzan çözücülerini kullanarak DPPH yöntemiyle antioksidan aktivitesini incelemişlerdir. Isırgan otu tohum yağı, farklı çözücülerle ekstrakte edilerek incelenmiş; trikloroetilen (30.95 mg/mL) ile hazırlanan ekstrakt, n-heksana (33.87 mg/mL) kıyasla daha iyi antioksidan özellik göstermiştir. Ancak her iki çözücüyle elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, genel olarak yağın antioksidan kapasitesi düşük bulunmuştur. Mitrović ve ark. (2024) yaptığı bir diğer

çalışmada ise ısırgan otu tohumundan %70 metanol, saf metanol, %70 etanol ve saf etanol ile elde ettiği ekstrelerin DPPH yöntemiyle antioksidan aktivitesini incelemişlerdir. Sırasıyla EC₅₀ değerleri 0.73±0.026, 0.76±0.025, 1.24±0.05 ve 1.69±0.09 mg/mL⁻¹ şeklinde bulunmuştur. %70 metanol ile saf metanol ekstresi orta seviyede, %70 etanol ekstresi orta seviyede (düşük uca yakın) ve saf etanol ekstresi zayıf seviyede antioksidan özellik göstermiştir (EC₅₀ değeri, <0.5 mg/mL güçlü, 0.5-1.5 mg/mL arası orta ve >1.5 mg/mL düşük antioksidan seviyede olduğunu gösterir).

Yapılan literatür taramasında ısırgan otu yaprakları ve ısırgan otunun bulunduğu familya olan Urticaceae familyasında bulunan diğer türlerin antioksidan aktivite çalışmaları da incelenmiştir. Kukric ve ark. (2012) yaptığı bir analizde Bosna Hersek'in Banja Luka çevresinde topladıkları ısırgan otunun yapraklarının sulu ekstralarının antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. DPPH ve ABTS antioksidan aktivite testi ile ölçülen aktivite 31.38±0.102 µg/g DW ve 23.55±0.64 µg/g DW olarak bulmuşlardır ve bu değerler "orta derecede antioksidan aktivite" olarak sınıflandırılmıştır. Ayrıca yaptıkları çalışmalarının sonucunu Türkiye (40.59 mMTE/g kuru ekstre) ve Polonya (17.3 µM TE/g kuru ekstre) ülkelerinde yapılan antioksidan aktivite çalışmaları ile karşılaştırdıklarında sonuçlar arasında tutarsızlık gözlemlendiği bildirilmişlerdir. Balpetek Külçü ve ark. (2019) yaptığı çalışmada Giresun ilinde topladıkları ısırgan otunun etanol, kloroform ve hekzan ekstralarının antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. DPPH testi kullanılan çalışmada etanol, kloroform ve hekzan ekstralarının antioksidan aktiviteleri sırasıyla 25.29±0.43, 17.01±0.19 ve 8.76±0.04 µg GAE/mL olarak bulunmuştur. Çalışmada bu değerlerin ısırgan otu ekstresinin antioksidan aktivitesi orta derece olarak tanımlanmıştır. Chahardehi ve ark. (2009) yaptığı çalışmada İran'ın Mazandaran ve Tahran illerinde topladıkları Urticaceae familyasına ait *Urtica dioica* (ısırgan otu), *Pilea microphylla* ve *Elastostema umbellatum* bitkilerinin antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. DPPH testi ile yapılan çalışmada metanol, kloroform, dietil eter, etil asetat ve bütanol ekstralarının antioksidan kapasitesi ayrı ayrı değerlendirilmiştir. *Urtica dioica*'nın 27.10±3.79, 5.80±0.19, 25±3.2, 62.17±2.98, 65.54±5.06 µg/mL, *Pilea microphylla*'nın 46.99±4.69, 47.16±4.98, 60.68±2.46, 8.62±0.95, 18.34±2.3 µg/mL ve *Elastostema umbellatum*'un 17.513±4.49, 0, 0, 54.39±2.96, 23.61±4.92 µg/mL olarak tespit edilmiştir.

Isırgan otu tohumu yağıyla ilgili yaptığımız literatür taramasında antioksidan aktivite verileri değerlendirildiğinde, çalışmamızda kullanmış olduğumuz UDS yağının da benzer

şekilde düşük antioksidan kapasiteye sahip olduğu ve literatürlerdeki verilerle paralel özellikler gösterdiğini tespit etmiş bulunmaktayız.

Ayrıca bu bitki ile yapılan çalışmalar geniş yelpazede değerlendirilirse, bir bitkinin kısımlarıyla elde edilen ürünler (ekstre ve yağ gibi), bitkinin toplandığı ülkenin çevre-iklim şartları ve kullanılan çözücü vb. gibi birçok nedenler farklı antioksidan aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir.

UDS yağının A549 ve HeLa hücrelerine karşı sitotoksik etkilerinin belirlenebilmesi için MTT testi uygulanmıştır. Yaygın olarak kullanılan MTT testi, sitotoksiteyi, hücrenin canlılığını ve proliferasyonunun belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden biridir. Bu çalışmamızda, UDS yağının A549 ve HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri 24 ve 48 saatlik uygulamalarla değerlendirilmiştir. Her iki hücre hattında da IC₅₀ değerleri 24 saatlik sürede (48 saatlik süreye göre) daha düşük bulunmuştur. A549 hücrelerinde IC₅₀ değeri 24 saatte 0.503 mL/L iken 48 saatte 0.5485 mL/L'ye yükselmiştir. HeLa hücrelerinde ise bu değer 24 saatte 0.4209 mL/L olarak hesaplanmış olup, 48 saatte ise değer bulunamamıştır. Bu sonuçlar, UDS yağının her iki hücre hattında da zamanla etkinliğini azalttığını, ancak özellikle HeLa hücrelerinde bu azalmanın daha belirgin olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada UDS yağının A549 ve HeLa hücrelerine karşı gösterdiği sitotoksik etkiler, literatürde yer alan benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında, genel olarak uyumlu fakat görece daha düşük düzeyde olduğu görülmektedir. D'Abrosca ve arkadaşları (2019), ısırgan otu yaprağının metanol ekstresiyle A549 hücrelerinde 47.5 µg/mL IC₅₀ değeri rapor etmişlerdir. Bu çalışmada ise tohum yağı kullanılmış ve 24 saatlik uygulamada A549 hücreleri için IC₅₀ değeri 0.503 mL/L olarak saptanmıştır. Chira ve arkadaşlarının (2025) HeLa hücrelerinde ısırgan otu yağı için bildirdiği IC₅₀ değeri ise 3.20 µg/mL iken, bu çalışmada 0.4209 mL/L olarak belirlenmiştir. Bu farklılıklar; kullanılan bitki kısmı (tohum, yaprak vs.), ekstraksiyon yöntemi, uygulama süresi, çözücü tipi ve biyolojik sistemlerdeki deneysel farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. Ancak genel eğilim olarak, UDS yağının her iki hücre hattında da doza bağlı sitotoksik etki gösterdiği ve elde edilen sonuçların literatürle çelişmediği söylenebilir.

Apoptoz deneylerden biri olan Annexin V testi, programlı hücre ölümünün tespiti ve değerlendirilmesinde en güvenilir yöntemlerden biridir. Bu testte, erken apoptoz evrelerinde oluşan ve kritik bir öneme sahip olan fosfatidilserin (PS) moleküllerinin hücre zarının dış yüzeyine taşınması esas alınmaktadır. Hücre membranının iç yüzeyinde bulunan

fosfatidilserin, apoptoza uğraması durumunda hücre membranının iç yüzeyinden dış yüzeyine transloke olur. Fosfatidilserine'e karşı yüksek özgüllük ve eğilim gösterebilen kalsiyum bağımlı bir protein olan Annexin V, bu açığa çıkan moleküllere bağlanarak apoptoza uğramış hücreleri için belirteç görevini üstlenir. Annexin V testinde genellikle kullanılan Propidyum İyodür (PI) boyası gibi hücre membranına geçirgen olmayan bir boyanın da uygulanması deneyde canlı, erken-geç apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonlarının ayırt edilmesini sağlar. Bu özelliği sayesinde Annexin V apoptoz testi, başta kanser çalışmalarında, nörodejeneratif hastalıklarda, immünolojik modellemede ve ilaç toksisitesi gibi birçok araştırma alanlarında hücre ölüm mekanizmalarının aydınlatılması açısından önemli bir yere sahiptir.

Her iki hücre hattı üzerinde yaptığımız Annexin V testi çalışmamızda, A549 hücrelerinde 48 saatlik uygulaması sonunda apoptoz oranı %13.9'a ve nekroz da %18.6'ya ulaşmıştır. HeLa hücrelerinde ise apoptotik yanıt oldukça sınırlı kalmış ve hücre ölümü önemli ölçüde nekroz (%48.2 (24saat), %27.2 (48saat)) yoluyla gerçekleşmiştir. Sonuç olarak UDS yağının A549 hücrelerinde apoptozun ve HeLa hücrelerinde nekrotik hücre ölümünü baskın şekilde tetiklediğini göstermektedir. D'abrosca ve ark. (2019) ısırgan otu ekstresinin A549 insan akciğer kanseri hücre hattı üzerindeki apoptotik etkilerini araştırmak için Annexin V testi uygulamış ve yaklaşık olarak %30 oranında apoptoza gittiğini gözlemlemişlerdir. Omar ve ark. (2020) ısırgan otu sulu ekstresinin A549 insan akciğer kanseri hücre hattı üzerindeki apoptotik etkilerini araştırmış, geç apoptoz veya nekroz ile hücre ölümünü indükleyebildiğini gözlemlemiştir. Fatahi ve ark. (2013) ısırgan otunun sulu ekstraktlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerindeki apoptotik etkilerini araştırmak için Annexin V testi uygulamış ve kontrollü bir şekilde apoptoza gittiğini gözlemlemişlerdir. Kardan ve ark. (2020) ısırgan otunun metanol ekstresinin HepG2 insan karaciğer kanseri hücre hattı ve HTC116 kolon kanseri hücre hattında apoptotik etkilerini araştırmış ve her iki hücrenin de apoptoza gittiğini gözlemlemişlerdir.

Çalışmamızda ısırgan otu bitkisinin tohumundan elde edilen yağ formunun kullanılması sebebiyle literatürdeki birçok çalışmadan ayrılmaktadır. Yapılan çalışmalar incelediğinde, çoğu çalışmada bitkilerin hangi kısımlarının çalışılmadığı tam olarak belirtilmemiş olsa da araştırmaların yapraklar üzerine yoğunlaştığı görülmektedir. Isırgan tohumu ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. D'abrosca ve ark. (2019) ısırgan otu ekstresinin, A549 akciğer kanser hücre hattında gözlemlenmiş olduğu %30'luk apoptoz oranı,

çalışmamızda elde ettiğimiz verilerle benzerlik göstermese de, apoptoza sebep olan mekanizmanın yağın farklı biyobileşenler içermesine bağlı olarak değişebileceği düşünülmektedir. Öte yandan HeLa hücrelerinde nekroza baskın bir şekilde gitmesi, yağ formunun bazı hücre hatları üzerinde ölüm yollarını (nekroz, otofaji vb.) aktive edebileceğini göstermektedir.

Bir başka apoptoz deneyi olan kaspaz-3 testi, apoptozun hücre düzeyindeki moleküler olaylarını değerlendirmesinde özgün ve fonksiyonel bir analiz yöntemidir. Kaspaz-3, apoptoz sürecinde yürütücü kaskadında kilit rol oynayan proteazlardan biri olup, birçok hedef substratı parçalayıp hücresel yıkımı sağlar ve apoptozun son evresini gerçekleştirir. Kaspaz-3, apoptotik sinyallerle inaktif prekürsöründen aktif olur ve bu da kaspaz-3 testinin apoptozu doğrulaması ve sürecin takip edilmesi için oldukça önemlidir. Bu sebeple de kanser araştırmalarında, nörodejeneratif hastalıklarda, immünolojik modellemede ve ilaç toksisitesi gibi birçok araştırma alanlarında apoptozun hücre içi etkilerini moleküler açıdan analizi için önemli bir yere sahiptir.

Çalışmamızda A549 hücrelerinde anlamlı bir kaspaz-3 aktivitesi gözlemlenememiştir. A549 hücrelerinde apoptozun klasik yola bağlı olarak aktive etmediği çıkarımı yapılabilir. Öte yandan HeLa hücrelerinde ise 24 saatlik uygulamada kaspaz-3 aktivitesi artmış ve 48 saat sonunda bir düşüş gözlemlenmiştir. Bu bağlamda, HeLa hücrelerinde erken evre apoptozun aktive ettiği ama sürenin artmasıyla bu etkinin azaldığı ve hücre ölümünün apoptotik dışı diğer mekanizmalarla (nekroz, otofaji vs.) devam ettiğini düşündürmektedir. Keles ve ark. (2024) ısırgan otu tohum ekstrelerinin böbrek dokusunda kaspaz-3 aktivitesini incelemiştir. Böbrek dokusunda kaspaz-3 aktivitesinin anlamlı bir şekilde artırmış ve apoptozun da aktive olduğu belirtilmiştir. Levy ve ark. (2014) ısırgan otu yaprak ekstrelerinin LNCaP prostat kanseri üzerindeki kaspaz-3 aktivitesini incelemiş, kaspaz-3'ün apoptotik yolda aktifleştiği ve apoptozu indüklediğini gözlemlemiştir. Mohammadi ve ark. (2016) ısırgan otu ekstrelerinin HCT-116 kolorektal kanser hücre hattı üzerindeki kaspaz-3'ün aktivitesinde bir artış gözlemlemiştir.

Tez çalışmamızda, ısırgan otu tohumuna ait kaspaz-3 bulguları, hücre tipine ve zaman faktörüne karşı değişkenlik göstermiştir. Literatürde ısırgan otunun tohum yağı ile çalışma olmamasıyla birlikte, farklı ekstraktlarla, bazı hücre ve dokularda kaspaz-3 aktivitesi anlamlı şekilde arttığı görülmüştür. Sonuç olarak, tez çalışmamızda ısırgan otu

tohumu yağı özellikle HeLa hücresinde bir kaspaz-3 aktivitesi gösterdiğini ve ısırgan otu bitkisinin ekstre çalışmalarıyla kısmen bir paralellik olduğunu olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca hücre tipi, süre ve bitkinin formları (yağ,ekstre vs.) gibi durumların da belirleyici etki ortaya koyabileceğini göstermektedir.

Bir hücrenin metabolik aktivitesi ve enerji üretme açısından çok büyük bir öneme sahip olan mitokondriyal membran potansiyeli testi, JC-1 boyası ile bu potansiyeli canlı hücrelerde floresan aracılığıyla ölçmemizi sağlar. JC-1, yüksek mitokondriyal membran potansiyeline sahip olan mitokondrielerde agregatlar oluşturur ve kırmızı renkte floresan yayarken, düşük potansiyele sahip olması durumunda ise monomerik forma geçer ve yeşil renk veren floresan yayar. JC-1'in bu özelliği sayesinde özellikle mitokodriye bağlı apoptoz gibi hücrel olayların erken tespiti, hücrel stres yanıtlarının izlenmesi ve ilaç toksisitesi analizlerinde yaygın olarak kullanılmasını sağlar.

Çalışmamızda mitokondriyal membran potansiyelinin değerlendirilmesi sonucunda A549 hücrelerinde her iki zaman noktasında da mitokondriyal depolarizasyonu artmış ve kontrol grubuna göre membran bütünlüğünü bozmuştur. Özellikle 24 saat sonunda depolarizasyon oranı %62.38'e ulaşarak, pozitif kontrol olan CCCP'ye yakın bir etki göstermiştir. Bu durum, UDS yağının mitokondriyal yolakla ilişkili apoptozu tetiklediğini düşündürmektedir. HeLa hücrelerinde UDS yağı, 24 saatte belirgin bir mitokondriyal bütünlük koruyucu etki göstermiştir (depolarize oranı sadece %19.73). Ancak 48 saatte depolarizasyon %49.26'ya çıkarak kontrolle benzer düzeye ulaşmıştır. Bu da HeLa hücrelerinde mitokondriyal etkilenmenin geç dönemlerde ortaya çıktığını, erken dönemde mitokondriyal hasarın belirgin olmadığını göstermektedir.

Levy ve ark. (2014) ısırgan otu sulu ekstrelerinin LNCaP prostat kanseri üzerindeki mitokondriyal membran potansiyelini analiz etmiştir. Çalışmada ısırgan otunun sulu ekstrelerinin LNCap prostat kanseri hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelinde belirgin bir azalma olduğu bildirilmiştir. Temiz ve ark. (2021) ısırgan otu ekstrelerinin HL-60 insan promiyelositik hücre hattında membran potansiyelini değerlendirmiş ve belirgin bir mitokondriyal depolarizasyon meydana geldiği ve bu etkinin apoptozun aktivasyonu ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. D'abrosca ve ark. (2019) Isırgan otu ekstrelerinin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelinde azalma oluşturduğunu ve bu durumun apoptozu indüklediğini göstermişlerdir. Çalışmamızda elde edilen veriler literatür ile birlikte değerlendirilirse,

ısırgan otu ektresinin farklı kanser hücre hatlarında mitokondriyal membran potansiyelinde depolarizasyona uğradığı ve apoptoza gittiği görülmektedir. Isırgan otu tohumu yağının en azından A549 hücre hattında mitokondriyal membran potansiyelini azaltarak benzer bir hücre hattına etki edebileceğini göstermektedir. Öte yandan HeLa hücresinde bu etkinin görülmemesi, her hücrenin farklı metabolik özelliklere sahip olması veya ısırgan otu tohumu yağının her bir hücrenin zarından geçiş farklılıklarının olduğunu düşündürmektedir. Sonuç olarak ısırgan otu tohumu yağının A549 hücresinde mitokondri membran potansiyeli sonuçları, literatürdeki ekstre çalışmalarıyla benzerlik gösterse de, hücrenin tipi ve bitkinin formülasyon farklılıkları bakımından özgün bir model sunmaktadır.

Apoptozun kalitatif ve kantitatif analizinde sık kullanılan yöntem olan akridin oranj/etidyum bromür boyama yöntemi, hücre kültürü çalışmalarında apoptoz analizi için vazgeçilmez yöntemlerden biridir. Akridin oranj, tüm hücrelerin nükleik asitlerine bağlanır ve yeşil renkte floresan verir. Etidyum bromür ise sadece hücre zarı bütünlüğünü kaybetmiş canlı olmayan hücrelerin DNA'sına yerleşir ve kırmızı renkte floresan verir. Bu farklı renk oluşması sayesinde canlı, erken-geç apoptoz ve nekroz hücrelerin morfolojik yapısı ve çekirdek bütünlüğü bakımından net olarak ayırt edilir. Bu sebeple bu boyama yöntemi, hücre ölüm mekanizmalarının evrelerini belirlemek amacıyla kullanılan yaygın bir yöntem haline gelmiştir.

Tez çalışmamızda, UDS yağının uygulandığı deney gruplarında kontrol grubuna göre canlı hücre sayıları azalmış ve apoptotik hücre oranında da artış gözlemlenmiş ve bu durum mikroskopik olarak da desteklenmiştir. Fattahi ve ark. (2013) ısırgan otunun sulu ekstraktlarının MCF-7 (meme kanseri hücresi) üzerindeki morfolojik değişikliklerini karşılaştırmak için AO/EB boyama yöntemini kullanmışlardır. Isırgan otu ektresi ile muamele edilen MCF-7 hücresinde apoptoza bağlı olarak kromatinin oldukça yoğun bir şekilde kondanse olmuş ve çekirdekler homojen bir yapıda floresan sinyali göstermiştir. Soltani ve ark. (2021) aynı şekilde ısırgan otunun MCF-7 hücresindeki morfolojik değişikliklerini incelemiş ve apoptozu indükleyerek hücrelerin proliferasyonunu inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Benzer şekilde, Fattahi ve ark. (2018) yaptığı bir diğer çalışmada MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinde ısırgan otu uygulamasına bağlı morfolojik değişiklikleri gözlemlemişlerdir. Her iki hücre hattında da ısırgan otu ekstresinin uygulaması sonucunda hücrelerin apoptotik durumda olduğu ve belirgin

segmentli kromatin yapılarının oluştuğu gözlemlemiştir. Maiti ve ark. (2017) ısırgan otu bitkisinin ait olduğu Urticaceae familyasında bulunan *Pouzolzia Indica* bitkisinden izole edilen friedelane'in B16F10 ve B16BL16 insan melanom hücre hatları üzerindeki morfolojik değişiklikleri incelemişlerdir, her iki hücre hattında da kontrole göre daha fazla nükleer parçalanma ve daha çok ölü hücre oranı tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar friedelane'in melanom hücre hatlarında apoptoza bağlı hücre ölümünü meydana getirdiğini göstermektedir. Tez çalışmamızda ısırgan otu tohumu yağıyla literatürdeki bitkinin farklı formları, aynı familya ait farklı bitkinin etken maddesi ve farklı hücre tiplerinde yapılan çalışmalar uyumluluk göstermektedir. Bu sonuçlar, ısırgan otu bitkisinin ve ait olduğu familyanın apoptotik özelliğe sahip biyobileşenler içerebileceğini ve bu gösterdiği etkinin tohum yağı formunda da korunduğunu göstermektedir.

mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi (RT-PCR) testi, transkripsiyonel düzeyde hücredeki genetik yanıtları anlamada temel analizlerden biridir. Bu yöntemde analizler genel olarak total RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve gerçek zamanlı kantitatif PCR şeklinde sıralanır. Apoptoz çalışmalarında yaygın kullanılan bir yöntem olan RT-PCR testi, özellikle hücrenin ölüm sinyallerine verdiği yanıtların moleküler düzeyde izlenmesine olanak sağlamaktadır. Bu bağlamda, apoptozu başlatıcı rol oynayan Bax geni ile mitokondriyal yolağı inhibe ederek hücreyi apoptoza karşı koruyan Bcl-2 geninin ekspresyon düzeylerinin incelenmesi önemlidir. Bax ve Bcl-2 genlerine ait mRNA düzeylerinin analizi hücrenin apoptoza verdiği yanıtın transkripsiyonel düzeyde değerlendirilmesine olanak sağlar.

Tez çalışmamızda elde edilen Bax ve Bcl-2 gen ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde, A549 hücresinde hem pro-apoptotik Bax hem de anti-apoptotik Bcl-2 genlerinin ekspresyonunun belirgin şekilde azaldığı görülmüştür. Bu durum A549 hücrelerinde hem apoptozu başlatma hem de apoptoza karşı direnç olabileceğini düşündürmektedir. HeLa hücresinde ise apoptozun dengede olduğu ancak apoptoz aktivitesinin düşük seviyede olduğu göstermiştir. Fattahi ve ark. (2018) ısırgan otu ekstrelerinin MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde adenoazin deaminaz ve ornitin dekarboksilaz genlerinin ekspresyonunu artırdığını ve aynı zamanda apoptozu arttırdığını gözlemlemiştir. Kardan ve ark. (2020) ısırgan otu ekstresinin HepG2 karaciğer kanser hücre hattı ve HTC116 kolon kanser hücre hattı üzerinde Bax/Bcl-2 oranını arttırarak apoptozu indüklediğini rapor etmişlerdir. Ayrıca, ısırgan otu ekstresinin hem

apoptoz sürecini aktive ettiğini hem de hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. Elde ettiğimiz veriler literatür çalışmalarıyla değerlendirilirse, ısırgan otunun farklı formları (yağ, ekstre vb.) hücre hattının tipine, uygulama şekline ve mikroçevre şartlarına bağlı olarak değişkenlik gösterebileceği ve ayrıca apoptozun hücrel olarak çift yönlü düzenleyebileceğini göstermektedir.

Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP uç işaretleme (TUNEL) testi, DNA fragmentasyonunu hem görselleştirmek hem de nicel bir veri sunmamızı sağlayan bir histokimyasal yöntemdir. Bu yöntem, terminal deoksinükleotidil transferaz enzimiyle apoptoza özgü DNA zincirinde oluşan kırıkların 3'-OH uçlarına işaretli olan nükleotidlerin eklenmesi esasına dayanmaktadır. İşaretli olan DNA zincirlerinin mikroskopta tespit edilmesi sayesinde apoptoza uğramış olan hücreler direkt olarak görselleştirilebilir. Bu bağlamda TUNEL testi, hem apoptozun kantitatif olarak değerlendirilmesinde hem de hücre ölümünün doku üzerinde dağılımını göstermek amacıyla kullanılan yaygın bir yöntemdir.

Tez çalışmamızda her iki hücre hattında yaptığımız TUNEL testinde, A549 hücrelerinde erken fazda aktif olmuş ve 48 saatte etkinliğini devam etmiştir. Bu da apoptotik hareketin zamanla sürdürülebilir şekilde ilerlediğini düşündürmektedir. Hela hücresinde pozitif TUNEL hücre sayısı sınırlı kalmış ve 48 saat sonunda kısmen bir azalma oluşmuştur. HeLa hücresinde apoptozun daha zayıf olduğu ve geçici şekilde indüklendiğini göstermektedir. Mohamadi ve ark. (2017) ısırgan otu ekstraktlarının 4T1 meme kanseri üzerinde TUNEL boyama testi gerçekleştirmiş ve ekstre tarafından apoptozun indüklendiğini göstermişlerdir. Koçyiğit Sevinç ve ark. (2023) ısırgan otunun etanol ekstresinin K562 kronik miyeloid lösemi hücre hattında TUNEL boyama testi gerçekleştirmiş, hücre proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiğini ve ısırgan otu ekstresinin apoptozu indüklendiğini rapor etmişlerdir.

Sonuç olarak elde edilen bu bulgular, yapılan analizlerin birbirini destekler nitelikte olduğu, A549 insan akciğer kanser hücre hattının apoptoza daha eğilimli olduğunu ve HeLa serviks kanseri hücre hattının da nekroza eğilimli olduğunu göstermektedir. A549 hücrelerindeki apoptotik süreçler, mitokondriyal membran potansiyelindeki azalma, DNA fragmentasyonu ve Annexin-V analizi ile elde edilen veriler hücrel morfolojik farklılıklarla doğrulanmıştır. Bu veriler, A549 hücre hattında apoptoza yönelik belirgin

bir şekilde yanıt olduğunu göstermektedir. Öte yandan HeLa hücresinde nekrozun baskın olduğu gözlemlenmiş ve mitokondriyal membran bütünlüğünü koruduğu görülmüştür. Tez çalışmamızda bazı analizlerde elde ettiğimiz bulgularlardaki çelişkiler, hücrel ölüm süreçlerinin karmaşık bir yapıya sahip olduğunu düşündürmektedir. Örneğin, A549 hücresinde apoptoz bulgularına rağmen kaspaz-3 aktivitesinin belirgin şekilde görülmemesi dikkat çekici bir durumdur. A549 hücrelerinde oluşan bu durum, apoptozun kaspaz-3'ün dışında alternatif mekanizmalarında aktif olabileceğini göstermektedir. Öte yandan HeLa hücresindeki düşük ve geçici kaspaz-3 aktivitesi de apoptozu başlatma seviyesinin sınırlı olduğunu ve yine de nekroz öncesi apoptoz ile ilişkilendirilen sinyallerin geçici bir aktifleşme olabileceğini göstermektedir. Bu durum HeLa hücrelerinin apoptoz ve nekroz arasında geçiş noktasında bulunabileceğini gösterebilir. Elde edilen veriler, sadece klasik apoptoz yolları değil, ayrıca otofaji, ferroptoz vb. gibi alternatif ölüm yollarının da detaylı bir şekilde araştırma yapılmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu mekanizmaların hem A549 hem de HeLa hücrelerindeki etkilerini belirlemek, her iki hücre hattındaki ölüm yollarını tamamlamak ve eşdeğer bir şekilde nasıl işlendiğini görebilmemiz açısından katkı sağlayacaktır. Bir örnekle açıklamak gerekirse, alternatif ölüm yollarından biri olan ferroptozun, mitokondriyal stresi ve hücre demir metabolizması ile ilgili olarak HeLa hücrelerinde gözlemlediğimiz nekrozla ilgili olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, elde ettiğimiz veriler anlamlı ve birbirleriyle uyumlu olmasının yanında, başta A549 hücresinin apoptoz mekanizmasının derinlemesine araştırılması büyük önem taşımaktadır. A549 hücresinde diğer hücrel ölüm mekanizmalarının olduğu analizlerin daha detaylı bir şekilde araştırılması gerekmektedir. Bu bağlamda, ileride yapılacak olan araştırmaların, hücrel ölüm mekanizmalarının daha geniş bir yelpazede ele alınması, potansiyel tedavi hedeflerinin ve biyobelirteçlerinin ortaya çıkarılması bakımından önemli katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKÇA

- Abi Sleiman, M., Younes, M., Hajj, R., Salameh, T., Abi Rached, S., Abi Younes, R., Daoud, L., Doumiati, J. L., Frem, F. and Ishak R, vd. (2024). Urtica dioica: Anticancer Properties and Other Systemic Health Benefits from In Vitro to Clinical Trials. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(13):7501.
- Adey, A., Burton, J. N., Kitzman, J. O., Hiatt JB, Lewis, A. P., Martin, B. K., Qiu, R., Lee, C. and Shendure J. (2013). The haplotype-resolved genome and epigenome of the aneuploid HeLa cancer cell line. *Nature*, Aug 8;500(7461):207-11.
- Adwas, A., Elsayed, A., Azab, A. and Quwaydir, F. (2019). Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *Journal of Biotechnology*, 6. 43-47. 10.15406/jabb.2019.06.00173.
- Ait, A., Said, h., Benmoussa, A., Sbai, I., Otmani, E. L. and Derfoufi S. (2015). Highlights on nutritional and therapeutic value of stinging nettle (Urtica Dioica). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(10) 8-10.
- Alduais, Y., Zhang, H., Fan, F., Chen, J. and Chen, B. (2023). Non-small cell lung cancer (NSCLC): A review of risk factors, diagnosis, and treatment. *Medicine*, 102(8):p e32899.
- Alimoddin, Md., Jayakumari, S., Fatima, B., Hasan, N., Ali, S., Sami, F., Ali, Md, S., Nair, R. S. and Ansari, M, T. (2024). Pharmacological applications of Urtica dioica: a comprehensive review of its traditional use and modern scientific evidence. *Journal of Herbal Medicine*, Volume 48, 100935, ISSN 2210-8033.
- Arbyn, M., Weiderpass, E., Bruni, L., Sanjose, S., Saraiya, M., Ferlat, J. and Bray, F., (2020). Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *Lancet Glob Health*, 8: e191-203.
- Ayan, A., Çalışkan, Ö., ve Çırak, C. (2006). Isırganotu (Urtica spp.)’nun Ekonomik Önemi ve Tarımı. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 21(3), 357-363.
- Balpetek Külcü, D., Demir Gökşık, C. ve Aydın, S. (2019). An Investigation of Antibacterial and Antioxidant Activity of Nettle (Urtica dioica L.), Mint (Mentha piperita), Thyme (Thyme serpyllum) and Chenopodium album L. Plants from Yaylacık Plateau, Giresun, Turkey. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 7(1), 73–80.
- Basumallik, N. and Agarwal, M. (2023). Small Cell Lung Cancer. *In StatPearls. StatPearls Publishing*.
- Bedell, S. L., Goldstein, L. S., Goldstein, A. R. and Goldstein, A. T. (2020). Cervical Cancer Screening: Past, Present, and Future. *Sex Med Rev*. Jan;8(1):28-37.

- Bhardwaj, D., Giri, A, Kumar, V. and Srivastava, V. C., (2024). Nettle (*Urtica* spp.) phytotomy and applications: Crop variety selection and advanced product development for the manufacturing of natural fiber composites. *Industrial Crops and Products*, Volume 210, 118180, ISSN 0926-6690.
- Bhusal, K. K., Magar, S. K., Thapa, R., Lamsal, A., Bhandari, S., Maharjan, R., Shrestha, S. and Shrestha, J. (2022). Nutritional and pharmacological importance of stinging nettle (*Urtica dioica* L.): A review. *Heliyon*, Jun 22;8(6):e09717.
- Brown, J. S., Amend, S. R., Austin, R. H., Gatenby, R. A., Hammarlund, E. U. and Pienta, K. J. (2023). Updating the Definition of Cancer. *Molecular cancer research: MCR*, 21(11), 1142–1147.
- Bunaciu, A. A., Danet, A. F., Fleschin, Ş., and Aboul-Enein, H. Y. (2016). Recent Applications for in Vitro Antioxidant Activity Assay. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 46(5), 389–399.
- Chahardehi, M. A., Ibrahim, D. and Sulaiman, S. (2009). Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Medicinal Plants in Urticaceae Family. *Journal of Applied Biological Sciences*, 2.
- Chira, A., Rekik, I., Rahmouni, F., vd. (2025). Phytochemical Composition of *Urtica dioica* Essential Oil with Antioxidant and Anti-inflammatory Properties: In Vitro and In Vivo Studies. *Curr Pharm Biotechnol*, 26(5):728-739.
- Crawford, E. D., Seaman, J. E., Agard, N., vd. (2013). The DegraBase: a database of proteolysis in healthy and apoptotic human cells. *Mol Cell Proteomics*, 12(3):813-824.
- Cummings, A. J., Olsen, M. (2011). Mechanism of action of stinging nettles. *Wilderness Environ Med*, 22(2):136-139.
- D'Abrosca, B., Ciaramella, V., Graziani, V., vd. (2019). *Urtica dioica* L. inhibits proliferation and enhances cisplatin cytotoxicity in NSCLC cells via Endoplasmic Reticulum-stress mediated apoptosis. *Sci Rep*, 9(1):4986.
- Darkwah, W. K., Ao, Y., Adinortey, M. B., Weremfo, A., Abrokwah, F. K. and Afriyie, E. (2018). Total Phenolic, Flavonoid and Alkaloid Contents, Oxidative DNA Damage Protective and Antioxidant Properties of Methanol and Aqueous Extracts of *Dioscorea rotundifolia* Whole Plant. *Free Radicals and Antioxidants*, 8(2), 82–88.
- Esposito, S., Bianco, A., Russo, R., Di Maro, A., Iserna, C. and Pedone, P. V. (2019). Therapeutic perspectives of molecules from *Urtica dioica* extracts for cancer treatment. *Molecules*, 24, 2753.
- Fane, M, and Weeraratna, A, T,. (2020). How the ageing microenvironment influences tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 89-106.

- Fattahi, S., Ardekani, A. M., Zabihi, E., vd. (2013). Antioxidant and apoptotic effects of an aqueous extract of *Urtica dioica* on the MCF-7 human breast cancer cell line. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14(9):5317-5323.
- Fattahi, S., Ghadami, E., Asouri, M., Motevalizadeh-Ardekanid, A. and Akhavan-Niaki, H. (2018). *Urtica dioica* inhibits cell growth and induces apoptosis by targeting Ornithine decarboxylase and Adenosine deaminase as key regulatory enzymes in adenosine and polyamines homeostasis in human breast cancer cell lines. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 64(3):97-102.
- Fernald, K. and Kurokawa, M. (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol*, Dec;23(12):620-33.
- Freeman, B., Mamallapalli, J., Bian, T., Ballas, K., Lynch, A., Scala, A., Huo, Z., Fredenburg, K. M., Bruijnzeel, A.W., Bagloli, C. J., vd. Opportunities and Challenges of Kava in Lung Cancer Prevention. *Int. J. Mol. Sci.* , 2023, 24, 9539.
- Gulcin, İ. (2025). Antioxidants: a Comprehensive review. *Archives of Toxicology*.
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*, Jan;12(1):31-46.
- Imtiaz, I., Schloss, J. and Bugarcic, A. (2024). Traditional and contemporary herbal medicines in management of cancer: A scoping review. *J Ayurveda Integr Med*, Jan-Feb;15(1):100904.
- Jan, N. K, Zarafshan, K. and Singh, S. (2017). Stinging nettle (*Urtica dioica* L.): a reservoir of nutrition and bioactive components with great functional potential. *Journal of Food Processing and Presevation. Food Measure*, 11:423–433.
- Jorgensen, I., Rayamajhi, M. ve Miao, E. (2017). Programmed cell death as a defence against infection. *Nat Rev Immunol*, 17, 151–164.
- Julien, O. and Wells, J. (2017). Caspases and their substrates. *Cell Death Differ*, 24, 1380–1389.
- Karakan, M. ve Nazlıkul, H. (2017). Oksidatif Stres ve Serbest Radikallerin Vücut Üzerindeki etkisi. *Bilimsel Tamamlayıcı Tıp, Regülasyon ve Nöralterapi Dergisi*, Cilt 11 Sayı 2, 7-8.
- Kardan, M., Rafiei, A., Golpour, M., Ebrahimzadeh, M. A., Akhavan-Niaki, H. and Fattahi S. (2020). *Urtica dioica* Extract Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in HepG2 and HTC116 as Gastrointestinal Cancer Cell Lines. *Anticancer Agents Med Chem*, 20(8):963-969.

- Keles, Ö. F., Huyut, Z., Yıldızhan, K., vd. (2024). Effect of *Urtica dioica* Seed Extract on Aquaporin 1 and 7, Caspase-3 and Oxidant/Antioxidant Status in Diethylnitrosamine-induced Kidney Damage in Rats. *Eastern J Med*, 29(3):288-295.
- Koçyiğit Sevinç, S., Karadeniz, M., Şen, A., Orun, O., Göger, F., Bagatur, İ. H. and Olgac, E. (2023). Apoptotic and antiproliferative effects of *Urtica dioica* L. extract on K562 chronic myeloid leukemia cell line. *Indian Journal of Experimental Biology*, vol.61, 833-842.
- Korrodi-Gregório, L., Soto-Cerrato, V., Vitorino, R., Fardilha, M. and Pérez-Tomás, R. (2016). From Proteomic Analysis to Potential Therapeutic Targets: Functional Profile of Two Lung Cancer Cell Lines, A549 and SW900, Widely Studied in Pre-Clinical Research, *PLoS One*. Nov 4;11(11):e0165973.
- Kucuk, S. and Poyraz, I, E. (2020). Ethobotanical Aspects of Sarıcakaya (Eskisehir-Turkey) Villages. Volume 29- No. 07A/2020 5808-5814.
- Kukrić, Z. Z., Topalić-Trivunović, L., Kukavica, B., Matoš, S. B., Pavičić, S. S., Boroja, M. M., and Savić, A. V. (2012). Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica* L.). *Acta Periodica Technologica*, 43. 257-272.
- Kutlu, G., Bozkurt, F. and Tornuk, F. (2020). Extraction of a novel water-soluble gum from nettle (*Urtica dioica*) seeds: Optimization and characterization. *Int J Biol Macromol*, Nov 1;162:480-489.
- Levy, A., Dhandayuthapani, S., Murugan, R., Jornadal, J., Quinonez, Y., Jaffe, M. and Rathinavelu, A. (2014). *Urtica dioica* Induces Cytotoxicity in Human Prostate Carcinoma LNCaP Cells: Involvement of Oxidative Stress, Mitochondrial Depolarization and Apoptosis. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13. 711-717. 10.4314/tjpr.v13i5.9.
- Li, H., Wu, X. and Cheng, X. (2016). Advances in diagnosis and treatment of metastatic cervical cancer. *J Gynecol Oncol*, May;27(4):e43.
- Li, Q., Chen, S. and Chen, Y. (2024). Development and prospect of botanical drugs in the treatment of lung cancer—a visualisation study based on, *Journal of Herbal Medicine*, Volume 46, 100897, ISSN 2210-8033.
- Limaiem, F., Tariq, M. A., Ismail, U. and Wallen, J. M. (2023). Lung Carcinoid Tumors. *In StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Lüthi, A. U. and Martin, S. J. (2007). The Casbah: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ*, 14(4):641-650.
- Maiti, D., Singha, A. K., Sarkar, C., vd. (2018). Friedelane, isolated from *Pouzolzia indica* Gaud. exhibits toxic effect against melanoma. *Cytotechnology*, 70(4):1111-1120.

- Mitrović, J., Nikolić, N., Karabegović, I. vd. (2024). Evaluation of the solvent effect on the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from the nettle (*Urtica dioica* L.) seeds: application of PCA and regression analyses. *Food Measure*, 18, 6618–6626.
- Mitrovic, J., Nikolic, N., Karabegovic, I., Lazic, M. and Nikolic, L. (2021). Nettle (*Urtica Dioica* L.) Seed Oil: Extraction, Chemical Characterisation and Antioxidant Activity. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 119-122.
- Mohammadi, A., Mansoori, B., Aghapour, M., vd. (2016). The Herbal Medicine *Urtica Dioica* Inhibits Proliferation of Colorectal Cancer Cell Line by Inducing Apoptosis and Arrest at the G2/M Phase. *J Gastrointest Cancer*, 47(2):187-195.
- Mohammadi, A., Mansoori, B., Baradaran, P. C., Khaze, V., Aghapour, M., Farhadi, M. and Baradaran, B. (2017). *Urtica dioica* Extract Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis and Related Gene Expression of Breast Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *Clin Breast Cancer*. Oct;17(6):463-470.
- Moyer, A., Tanaka, K. and Cheng, E. H. (2025). Apoptosis in Cancer Biology and Therapy. *Annu Rev Pathol*, 20(1):303-328.
- Mukheja, Y., Pal, K., Ahuja, A., Sarkar, A., Kumar, B., Kuhad, A., Chopra, K. and Jain, M. (2025). Nanotechnology and Artificial Intelligence in Cancer Treatment. *Next Research*, 2. 100179. 10.1016/j.nexres.2025.100179.
- Mustafa, M., Ahmad, R., Tantry, I. Q., Ahmad, W., Siddiqui, S., Alam, M., Abbas, K., Moinuddin, Hassan, M. I., Habib, S. and Islam, S. (2024). Apoptosis: A Comprehensive Overview of Signaling Pathways, Morphological Changes, and Physiological Significance and Therapeutic Implications. *Cells*, 13(22), 1838.
- Mustafa, W., Abd Halim, A., Jamlos, M., Syed I. and Syed Zulkarnain. (2020). A Review: Pap Smear Analysis Based on Image Processing Approach. *Journal of Physics: Conference Series*, 1529. 022080. 10.1088/1742-6596/1529/2/022080.
- Mutlu, D., Arslan, S., Kabalay, B., Terzioglu, G., Tüfekçi, A. and Demirtas, I. (2018). Chemical Constituent of Small Nettle (*Urtica urens*) Seed Oil and Its Cytotoxic Activity. *The 4rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity*.
- Nalbantoğlu, H. G. and Arslan, P. (2023). Servikal kanser: Genel bakış. *Karatekin University Journal of Science*, 2(1), 43-50.
- Okuyan, D., (2023). Apoptozis. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 49(1), 1-10.
- Omar, U. and Aloqbi, A. (2020). The effect of *Urtica Urens* on A549 lung cancer cell line. *Annals of Clinical and Analytical Medicine*, 11(5), 510–514.

- Ozcan, O., Erdal, H., Çakırca, G. ve Yönden, Z., (2015). Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6. 10.5799/ahinjs.01.2015.03.0545.
- Özmen, V., Dağoğlu, N., Dede, İ., Akçakaya, A., Kerem, M., Göksel, F., Özgür, E., Başkan, E., Yaylacı, M., Ceydeli, A., Baykara, M., Kızıltan, H, Ş., Kömürcü, Ş., Gümüş, M., Türk, H.M., Demirhan, R., Akgün, A., Kadoglou, N., Yatman, E., Elbi, C, C., Güleç, S., Soran, A., Özer, A. and Keleştimur, F., (2016). Turkish ministry of health, 2.nd turkish medical general assembly clinical oncology study group report. *J Breast Health*; 12: 9-17.
- Papiez, M, A. and Krzysciak, W. (2021). Biological therapies in the treatment of cancer-uptade and new directions. *Int. J. Sci*, 2021, 22, 11694.
- Petkova, Z. Y., Antova, G. A. and Angelova-Romova, M. Y. (2020). Biologically active components and health benefits of nettle seed oil. 30;71(1):e347.
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A. and D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*. Apr;8(4):603-19.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D. and Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*, 2017:8416763.
- Rafajlovska, V., Kavrovski, Z., Simonovska, J. and Srbinska, M. (2013). Determination of Protein and Mineral Contents in Stinging Nettle. *Quality of Life*, 4(1-2):26-30.
- Ramanathan, P., Dhandapani, H., Jayakumar, H., Seetharaman, A. and Thangarajan, R. (2018). Immunotherapy for cervical cancer: Can it do another lung cancer?. *Curr Probl Cancer*, Mar-Apr;42(2):148-160.
- Schabath, M, B. and Cote, M, L. (2019). Cancer progress and priorities: lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2019; 28:1563-79.
- Semalty, M., Adhikari, L., Semwal, D., Chauhan, A., Mishra, A., Kotiyal, R. and Semalty, A. (2017). A Comprehensive Review on Phytochemistry and Pharmacological Effects of Stinging Nettle (*Urtica dioica*). Volume 3, Issue 3, 156-167.
- Shafabakhsh, R., Reiter, R. J., Aschner, M., Mirzaei, H. and Asemi, Z. (2023). Resveratrol and Cervical Cancer: A New Therapeutic Option. *Mini Rev Med Chem*, 23(2):159-169.
- Sharma, H. P., Jain, P., Amit, P. and Sinha, A. (2014). Apoptosis (Programmed cell death)- A Review. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 3. 1854-1872.

- Sodir, N. M. and Evan, G. I. (2011). Finding cancer's weakest link. *Oncotarget*, December, Vol.2, No:12.
- Soltani, L., Darbemamieh, M., Mohebi, Z. and Moarrefzadeh, N. (2021). Comparison of Anti-cancer Effects of Hydroalcoholic Extract of Syzygium Aromaticum and Urtica Dioica on Breast Cancer Cells (MCF-7) and Normal Cells (HUVEC). *Studies in Medical Sciences*, 32 (3) :175-186.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Ca cancer j clin* 2021, 71:209-249.
- T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Kanseri İstatistikleri 2019, Ankara 2025.
- Temiz, E., Koyuncu, İ., Saadat, S., Yüksekdağ, Ö. And Award, Y. (2021). Exploring the Antiproliferative Mechanisms of Urtica dioica L. extract in Human Promyelocytic Leukemia Cell Line. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 18(3):468-74.
- Thandra, K. C., Barsouk, A., Saginala, K., Aluru, J. S. and Barsouk, A. (2021). Epidemiology of lung cancer. *Contemp Oncol (Pozn)*, 25(1):45-52.
- Wang, Z., Mo, H., He, Z., Chen, A. and Cheng, P. (2022). Extracellular vesicles as an emerging drug delivery system for cancer treatment: Current strategies and recent advances. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 153 (2022) 113480.
- Wetherilt, H. (1989). Isırgan Otu Yaprak ve Tohumların Besleyici Özellikleri ve Antitümörel Etkileri, İstanbul.
- Yalçın, A. S., Biçim, G., Eseryel, S., Alakborova, N., Altınoluk, T., Avcılar, C., Güven, Ü., Sarı, D. and Korkmaz, N. (2022). *Serbest Radikaller ve Antioksidanlar*. *Marmara Üniversitesi Yayınları*, No:891, 8-9.
- Yawei, Li., Xin, W., Ping, Y., Guaqian, J. And Yuan, L. (2022). Machine Learning for Lung Cancer Diagnosis, Treatment, and Prognosis, Genomics. *Proteomics & Bioinformatics*, Volume 20, Issue 5, October, Pages 850-866.

ÖZ GEÇMİŞ

Adı Soyadı : İbrahim Halil ÇELİK
Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim:

Derece	Üniversite	Alanı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Kafkas Üniversitesi	Fen Edebiyat Fak-Biyoloji	2012
Y. Lisans	Kilis Üniversitesi	Fen Bilimler Ens-Biyoloji	2017
Doktora	Anadolu Üniversitesi	Lisansütu Eğt. Ens- Biyokimya	2019- Devam ediyor

Projeler:

- Mikrobiyal kaynaklardan antimikrobiyal özellikte kitosan üretimi ve karakterizasyonun araştırılması (TÜBİTAK Projesi- No:113Z569)
- Oküler Yüzeyin Kimyasal Yaralanmasında Plateletten Zengin Plazma Yüklü Bioadeziv Hidrojel Üretimi; Ico-Reg Hidrojel'In Pre-Klinik Kavram Kanıt Çalışması (TÜBİTAK Proje No: 220S674)
- Mikroakışkan Çip İçerisinde 3-Boyutlu Karaciğer Kitinin Geliştirilmesinde; Primer Hepatosit Hücreleri Kullanılması ile Ticari HepG2 Hücre Hattı Kullanılmasının Karşılaştırılması (TÜBİTAK Proje No: 122C198- Devam ediyor)