

**SİGARA DUMANIYLA UYARILAN NAZAL EPİTEL
HÜCRELERDE OKSİDATİF STRES CEVABINDA GÖREV
ALAN SEPP1,NCF2, SFTPD, CCL5 ve PTGS1 GENLERİNİN
METİLASYON PROFİLİ VE KURKUMİN UYARIMININ BU
PROFİLE ETKİSİ**

**METHYLATION PROFILE OF THE SEPP1, NCF2, SFTPD,
CCL5 AND PTGS1 GENES RESPONSIBLE FOR RESPONSE
TO OXIDATIVE STRESS IN NASAL EPITHELIAL CELLS
STIMULATED WITH TOBACCO SMOKE AND THE EFFECT
OF CURCUMIN TREATMENT ON THIS PROFILE**

AZMİ SERHAT YILDIRIM

PROF. DR İBRAHİM ÇAĞATAY KARAASLAN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOLOJİ Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2022

Değerli eşime,

ÖZET

SİGARA DUMANIYLA UYARILAN NAZAL EPİTEL HÜCRELERDE OKSİDATİF STRES CEVABINDA GÖREV ALAN SEPP1,NCF2, SFTPD, CCL5 ve PTGS1 GENLERİNİN METİLASYON PROFİLİ VE KURKUMİN UYARIMININ BU PROFİLE ETKİSİ

Azmi Serhat YILDIRIM

Yüksek Lisans, BİYOLOJİ Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN

Nisan 2022, 80 sayfa

Sigara tüketimi, bütün dünyada oldukça yaygın olan alışkanlıklardan biridir. Her ne kadar sigaranın sağlığa zararlı olduğu uzun yıllardır bilinen bir olgu olsa da, dünyada her yıl 7 milyondan fazla insan sigara tüketimi nedeniyle ortaya çıkan hastalıklardan hayatını kaybetmektedir. Sigara dumanı içerisinde bulunan binlerce kimyasal madde kanserojen ve toksik etkiye sahip olup, solunum sistemi başta olmak üzere vücudun birçok doku ve organında tahribata yol açmakta; kanser, kalp ve damar hastalıkları, üreme sistemi bozuklukları, solunum sistemi sorunları gibi birçok hayatı tehdit eden birçok hastalığın ortaya çıkmasını tetiklemektedir.

Sigara dumanına maruz kalmanın sonucunda, bu dumanın içerisindeki kimyasal maddelere maruz kalan hücrelerde oksidatif stres durumu ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, moleküler mekanizmalarının bozulması nedeniyle bu hücrelerde epigenetik değişiklikler meydana gelmekte, metilasyon gibi mekanizmalar ile normal gen ifadelerinde değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Oksidatif stres mekanizmasında görev alan SEPP1, NCF2, SFTPD, CCL5 ve PTGS1 genlerinin ifadelerinde sağlıklı hücrelerde görülmeyen artış ve azalış gözlemlenmektedir. Oksidatif stres kaynaklı yaşanan epigenetik değişikliklerin kurkumin gibi antioksidan bileşikler ile önlenebileceği ve tersine çevrilebileceğini gösteren literatür çalışmaları sınırlı sayıda olup, hücre ve gen temelli çalışmalara ihtiyaç vardır. Grubumuzun daha önceki çalışmalarında sigara dumanı ile tetiklenen oksidatif stresle ilişkili olarak antioksidan ve oksidan gen ifadelerinin değiştiğini göstermiştir. Bu tez çalışmasında ifadesi değişen genler arasından beş aday gen seçilerek (SEPP1, NCF2, SFTPD, CCL5 ve PTGS1) bu genlerin antioksidan kurkumin tedavisine verdikleri cevap hücresel ve epigenetik düzeyde araştırılmıştır. Tez çalışmasında RPMI-2650 hücre hattının kurkumin ve sigara dumanı ile uyarılması sonucu hücre sitotoksitesinin belirlenmesi için canlılık testleri yapılmıştır. Canlılığın tespiti için EtBr/Kalsein AM boyaması, MTT, LDH ve ROS analizleri yapılmıştır. Hücrelerden mRNA izolasyonu ve cDNA dönüşü ile elde edilen DNA üzerinden qPCR testi yapılarak seçilen beş gene ait ifade analizi yapılmıştır. Hücrelerin toplam metilasyon profilleri ise kurkumin ve CSC uyarımlarında ayrı ayrı incelenerek, kurkuminin toplam metilasyon profili üzerindeki epigenetik etkisi araştırılmıştır. Çalışmalar kapsamında ayrıca bisülfid dönüşümü analizi yapılmış ve CSC uyarımı sonucu ortaya çıkan C-T nükleotit dönüşümünün kurkumin uyarımı ile normal haline getirilip getirilemeyeceği araştırılmıştır. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre, hem kurkumin hem de CSC yüksek konsantrasyonlarda öldürücü etki yapmakta olup, kurkumin 5 µM'dan fazla, CSC ile 50-100 µg/µL konsantrasyon aralıklarında kullanılmalıdır. Her iki uyarıcı için de belirtilen değerlerden yüksek olan konsantrasyonlar öldürücü etki yaratmaktadır. Çalışmada elde edilen bir diğer bulgu ise, nazal epitel hücrelerde sigara dumanı nedeniyle ortaya çıkan oksidan stres ve epigenetik değişikliklerin, kurkumin muamelesi ile tersine döndürülebileceğidir. Toplam metilasyon profilinin incelendiği deneyler sonucunda, sigara dumanına maruz kalmanın sonucu olarak nazal epitel hücrelerin toplam metilasyon profillerinde, kontrol grubuna göre ciddi ölçüde artış görülmekte, ancak bu artış kurkumin muamelesi ile önlenilmekte ve sağlıklı seviyeye döndürülebilmektedir. Tez

çalışmasının bir diğ er önemli bulgusu ise, hücre içi oksidan stresin önlenmesinde görev alan SEPP1, SFTPD ve PTGS1 genlerinde, sigara dumanı ile ifade azalması gözlemlenirken, kurkumin muamalesi bu ifade azalmasını önleyici etki göstermektedir. Benzer şekilde, hücre içi oksidan stresin gelişmesinde görev alan NCF2 ve CCL5 genleri ise sigara dumanı ifade artışı yaşarken, kurkumin bu genlerin sigara dumanı nedeniyle artan ifadelerini azaltmaktadır. Dolayısıyla, kurkumin hücre içi oksidan mekanizmasını düzenleyici bir role sahip olup, CSC uyarımı sonucu normal şartlara göre ifadesi artı ya da eksi yönde değişen genlerin ifadelerini normal düzeylere getirebilmek için hem upregüle hem de downregüle etki gösterebilen bir bileşiktir.

Anahtar kelimeler: sigara, oksidatif stres, epigenetik reg lasyon, nazal epitel hücre, antioksidan, kurkumin, DNA metilasyonu

ABSTRACT

METHYLATION PROFILE OF THE SEPP1, NCF2, SFTPD, CCL5 AND PTGS1 GENES RESPONSIBLE FOR RESPONSE TO OXIDATIVE STRESS IN NASAL EPITHELIAL CELLS STIMULATED WITH TOBACCO SMOKE AND THE EFFECT OF CURCUMIN TREATMENT ON THIS PROFILE

Azmi Serhat YILDIRIM

Master of Science, Department of MOLECULAR BIOLOGY

Supervisor: Prof. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN

April 2022, 80 pages

Smoking is one of the most common habits all over the world. Although it has been known for many years that smoking is harmful to health, more than 7 million people in the world die from diseases caused by smoking every year. Thousands of chemicals in cigarette smoke have carcinogenic and toxic effects and cause damage to many tissues and organs of the body, especially the respiratory system. Tobacco smoke triggers the emergence of many life-threatening diseases such as cancer, cardiovascular diseases, reproductive system disorders, respiratory system problems.

As a result of exposure to cigarette smoke, oxidative stress occurs in cells exposed to chemicals in this smoke. In addition, epigenetic changes occur in these cells due to the deterioration of their molecular mechanisms, and alterations in normal gene expressions occur with mechanisms such as methylation. Gene expression alterations in terms of upregulation and downregulation is observed in the expression of SEPP1, NCF2, SFTPD, CCL5 and PTGS1 genes, which are involved in the oxidative stress mechanism. Such alterations are observed in healthy cells. Although there are studies in the literature showing that oxidative stress-induced epigenetic changes can be prevented and reversed with antioxidant compounds such as curcumin, no study has been found showing whether oxidative stress-induced changes in gene expression profiles of the aforementioned five genes can be reversed by curcumin treatment.

In this thesis, changes in the expression of SEPP1, NCF2, SFTPD, CCL5 and PTGS1 genes as a result of oxidative stress in nasal epithelial cells exposed to cigarette smoke are studied to determine to what extent it is possible to reverse these changes with curcumin treatment. In the thesis study, viability tests were performed to determine the cell cytotoxicity as a result of stimulation of the RPMI-2650 cell line with curcumin and cigarette smoke. EtBr/Calcein AM staining, MTT, LDH and ROS analyzes were performed to detect viability. Expression analysis of five selected genes was performed by qPCR test on DNA obtained by mRNA isolation from cells and cDNA conversion. The epigenetic effect of curcumin on the total methylation profile was investigated by examining the total methylation profiles of the cells separately in curcumin and CSC stimulation. Within the scope of the studies, bisulfite conversion analysis was also performed and it was investigated whether the C-T nucleotide conversion resulting from CSC stimulation could be normalized by curcumin stimulation. As a result of exposure to cigarette smoke, there is a significant increase in the total methylation profiles of nasal epithelial cells compared to the control group, but this increase can be prevented and returned to a healthy level with curcumin treatment. According to the results obtained in the thesis study, both curcumin and CSC have a lethal effect at high concentrations, and curcumin should be used in concentration ranges of more than 5 μ M and 50-100 μ g/ μ L with CSC. Concentrations that are higher than the specified values for both stimuli create a lethal effect. Another finding obtained in the study is that oxidant stress and epigenetic changes in nasal epithelial cells caused by cigarette smoke can be reversed by curcumin treatment. As a result of the experiments examining the total methylation profile, a significant increase is observed in the

total methylation profiles of nasal epithelial cells as a result of exposure to cigarette smoke, compared to the control group, but this increase can be prevented by curcumin treatment and returned to a healthy level. Another important finding of the thesis study is that while the expression of SEPP1, SFTPD and PTGS1 genes, which are involved in the prevention of intracellular oxidant stress, is decreased by cigarette smoke, curcumin treatment has an inhibitory effect. Similarly, while NCF2 and CCL5 genes, which are involved in the development of intracellular oxidant stress, increase in cigarette smoke expression, curcumin decreases the increased expression of these genes due to cigarette smoke. Therefore, curcumin has a regulatory role in the intracellular oxidant mechanism, and it is a compound that can show both upregulating and downregulating effects in order to bring the expressions of genes whose expression changes in the positive or negative direction as a result of CSC stimulation to normal levels.

Keywords: smoking, oxidative stress, epigenetic regulation, nasal epithelial cell, antioxidant, curcumin, DNA methylation

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım günden itibaren gerek akademik gerek beşeri olarak bana daima yol gösteren, potansiyelimi kullandığımda hep daha iyisini elde edebileceğim konusunda beni cesaretlendiren ve beklenmedik sorunlar karşısında gösterdiği yardımsever ve özverili tavır ve tutumları ile hem örnek bir akademisyen hem de değerli bir insan olan hocam Sn. Prof. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN'a,

Kendi yoğun çalışmaları sırasında ihtiyaç duyduğum her seferinde desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Sn. Arş. Gör. Hayriye AKEL BİLGİÇ'e,

Tez çalışmalarının yerine getirilmesinde çok önemli emekleri olan Sn. Büşra KILIÇ, Sn. Berfin Doğa KOÇKAYA ve Sn. Emine Beyza DOĞAN'a

Yüksek lisans eğitimim süresince tanıdığım ve çok daha önceden tanışmış olmayı dilediği değerli arkadaşlarım Sn. Arş. Gör. Başak Ezgi SARAÇ ve Sn. Arş. Gör. Dilara KARAGÜZEL'e,

Ve özellikle, hayatımda aldığım her kararda beni hiç yargılamayıp her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteğini her zaman hissettiğim, hayatımda olmasaydı yüksek lisans mezunu olmak bir yana dursun, sahip olduğum hiçbir özelliğe sahip olamayacağım çok sevgili hayat arkadaşım, eşim Sn. Dr. Av. Esin BATAK YILDIRIM'a,

Sonsuz teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Sigara Tüketimi	2
2.2 Dünyada ve Türkiye’de Sigara Tüketimi	2
2.3 Sigara Dumanının Kimyasal İçeriği ve Oluşum Aşamaları	4
2.3.1 Nikotin	5
2.3.2 N-Nitrozaminler	5
2.3.3 Ağır Metaller	6
2.4 Sigara Tüketiminin Yol Açtığı Sağlık Sorunları	7
2.4.1 Sigara Dumanı ve Kanser	7
2.4.2 Sigara Dumanı ve Kardiyovasküler Hastalıklar	9
2.4.3 Sigara Dumanı ve Üreme Sistemi Hastalıkları	9
2.4.4 Sigara Dumanı ve Solunum Yolu Hastalıkları	10
2.4.4.1 Kronik Bronşit	12
2.4.4.2 Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH)	12
2.5 Sigara Dumanı ve Oksidatif Stres	12
2.6 Sigara Kaynaklı Oksidatif Stresin Etkileri	14
2.7 Kurkumin Muamalesinin Antioksidan ve Epigenetik Özelliği	15
2.7.1 Kurkuminin Histon Asetilasyon/Deasetilasyon Mekanizmasındaki Rolü	16
2.7.2 Kurkuminin DNA Metilasyon Mekanizmasındaki Rolü	16
2.8 Sigara Dumanı Nedeniyle Epigenetik Değişikliğe Uğrayan Genler	17
2.8.1 SEPP1 (selenoprotein P)	17
2.8.2 NCF2 (neutrophil cytosolic factor 2)	18

2.8.3	SFTPD (surfactant protein D)	18
2.8.4	CCL5 (C-C motif chemokine 5).....	18
2.8.5	PTSG1 (Prostaglandin G/H synthase 1	19
3.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR	20
3.1	DeneySEL Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler.....	20
3.2	Hücre Kültürü Deneyleri	20
3.2.1	RPMI 2650 Hücrelerinin Çoğaltılması.....	20
3.2.2	Hücre Canlılık ve Sitotoksosite Deneyleri	21
3.2.2.1	Hücrelerin Boyanması ve Canlı/Ölü Hücrelerin Tahlili	21
3.2.2.2	Sitotoksosite Deneyleri	21
3.2.2.2.1	MTT Testi	21
3.2.2.2.2	Laktat dehidrogenaz (LDH) Testi	22
3.2.2.3	Serbest Radikallerin Ölçümü	23
3.2.2.4	RNA izolasyonu.....	23
3.2.2.5	cDNA sentezi	24
3.2.2.6	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	24
3.2.2.7	DNA Metilasyon Analizi	25
3.2.2.8	Bisülfid Dönüşüm Analizi	26
3.2.2.9	Bisülfid Dönüşüm Analizi için PCR Primerleri	27
3.2.2.10	İstatistiksel Analiz.....	30
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	33
4.1	RPMI Nazal Epitel Hücrelerde Kurkumin Uyarımının Canlılığa ve Sitotoksositeye Etkisi	33
4.1.1	Kurkumin Uyarımı Sonucu Canlı/Ölü Hücrelerin Floresan Mikroskobunda Görüntülenmesi	33
4.1.2	Kurkumin Uyarımı Sonucu Sitotoksosite Değerlerinin Ölçümü	34
4.1.3	Sigara Dumanı Kondensanı (CSC) Uyarımı Sonucu Canlı/Ölü Hücrelerin Floresan Mikroskobunda Görüntülenmesi	37
4.1.4	CSC Uyarımı Sonucu Sitotoksosite Değerlerinin Ölçümü	40
4.2	Kurkumin ve CSC ile Uyarılan Nazal Epitel Hücrelerin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) Sonuçları	46
4.3	CSC ile Uyarılan Nazal Epitel Hücrelerin Serbest Radikal (ROS) Ölçümleri	51
4.4	Kurkumin ve CSC ile Uyarılan Nazal Epitel Hücrelerin Toplam DNA Metilasyonu ELISA Analizi Sonuçları	54

4.5	Kurkumin ve CSC ile Uyarılan Nazal Epitel Hücre Hatlarının Bisülfid Dönüşüm Analizi Sonrası Jel Görüntüleri.....	55
5.	YORUM.....	58
6.	KAYNAKLAR.....	68
	TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU	Error! Bookmark not defined.
	ÖZGEÇMİŞ.....	Error! Bookmark not defined.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılmak üzere dizayn edilmiş olan özgün primerlerin dizileri	24
Çizelge 2.2: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan malzemeler ve reaksiyonun döngü koşulları. Reaksiyon döngüsü 35 döngüde tamamlanacak şekilde uygulanmıştır.	25
Çizelge 2. 3: SEPP1, NCF2, SFTPD, PTGS1 ve CCL5 genlerine ilişkin bisülfid dönüşüm sonrası PCR primeleri.....	30

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Dünya genelinde ülkelerin sigara tüketim sıklığına göre Türkiye en çok sigara tüketen ülkeler arasında ilk beşte yer almaktadır.	3
Şekil 2.2: Sigara tüketimi sonucu kanser oluşumuna giden süreçte hücresel seviyede yaşanan moleküler değişiklikler	8
Şekil 2.3: Tez çalışması için seçilen SEPP1, NCF2, SFTPD, CCL5 ve PTGS1 genlerinin öncül çalışmada gösterilen gen ifadesi değişiklikleri	17
Şekil 2.4: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılmak üzere dizayn edilmiş olan özgün primerlerin dizileri	24
Şekil 2.5: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan malzemeler ve reaksiyonun döngü koşulları. Reaksiyon döngüsü 35 döngüde tamamlanacak şekilde uygulanmıştır.	25
Şekil 2. 6: SEPP1, NCF2, SFTPD, PTGS1 ve CCL5 genlerine ilişkin bisülfid dönüşüm sonrası PCR primeleri.....	30
Şekil 2. 7: Tez çalışmasında kullanılan deney sistemlerine ait iş akış şeması.....	32
Şekil 4.1: Kurkumin ile 24 saat (sol) ve 48 saat (sağ) uyarılmış RPMI 2650 hücrelerinin uyarılmamış, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM ve 50 µM konsantrasyonlarındaki uyarılma koşullarındaki sonuç. Yeşil renk canlı hücreleri kırmızı renk ölü hücreleri göstermektedir. ...	34
Şekil 4.2: RPMI-2650 hücrelerinin artan kurkumin konsantrasyonlarında 24 saat ve 48 saat uyarım süreleri sonucunda elde edilen MTT testi sonuçları.....	35
Şekil 4.3: RPMI-2650 hücrelerinin artan kurkumin konsantrasyonu altında 12 saat ve 24 süreyle uyarılmaları sonucunda elde edilen LDH testi sonuçları	36
Şekil 4.4: RPMI-2650 hücrelerinin artan 0,5 µg/mL ile 200 µg/mL arasında kademeli artan CSC konsantrasyonlarıyla 3 saatlik uyarılması koşullarındaki sonuç. Yeşil renk canlı hücreleri kırmızı renk ölü hücreleri göstermektedir.	37
Şekil 4.5: RPMI-2650 hücrelerinin artan 0,5 µg/mL ile 200 µg/mL arasında kademeli artan CSC konsantrasyonlarıyla 6 saatlik uyarılması koşullarındaki sonuç. Yeşil renk canlı hücreleri kırmızı renk ölü hücreleri göstermektedir.	38

Şekil 4.6: RPMI-2650 hücrelerinin artan 0,5 µg/mL ile 10 µg/mL arasında kademeli artan CSC konsantrasyonlarıyla 12 saatlik uyarılması koşullarındaki sonuç. Yeşil renk canlı hücreleri kırmızı renk ölü hücreleri göstermektedir.	38
Şekil 4.7: RPMI-2650 hücrelerinin artan 20 µg/mL ile 200 µg/mL arasında kademeli artan CSC konsantrasyonlarıyla 12 saatlik uyarılması koşullarındaki sonuç. Yeşil renk canlı hücreleri kırmızı renk ölü hücreleri göstermektedir.	39
Şekil 4.8: RPMI-2650 hücrelerinin artan 0,5 µg/mL ile 200 µg/mL arasında kademeli artan CSC konsantrasyonlarıyla 24 saatlik uyarılması koşullarındaki sonuç. Yeşil renk canlı hücreleri kırmızı renk ölü hücreleri göstermektedir.	39
Şekil 4.9: RPMI-2650 hücrelerinin artan 0,5 µg/mL ile 200 µg/mL arasında kademeli artan CSC konsantrasyonlarıyla 48 saatlik uyarılması koşullarındaki sonuç. Yeşil renk canlı hücreleri kırmızı renk ölü hücreleri göstermektedir.	40
Şekil 4.10: RPMI 2650 hücrelerinin 0,5 µg/mL ile 200 µg/mL arasında artan CSC konsantrasyonlarıyla 3 saat ve 6 saat uyarılması koşullarında elde edilen MTT testi sonuçları ...	41
Şekil 4.11: RPMI 2650 hücrelerinin 0,5 µg/mL ile 200 µg/mL arasında artan CSC konsantrasyonlarıyla 12 saat ve 24 saat uyarılması koşullarında elde edilen MTT testi sonuçları	42
Şekil 4.12: RPMI-2650 hücrelerinin 0,5 µg/mL ile 200 µg/mL arasında kademeli artan CSC konsantrasyonlarıyla 3 saat uyarılması sonucunda elde edilen LDH ölçüm grafiği	43
Şekil 4.13: RPMI-2650 hücrelerinin 0,5 µg/mL ile 200 µg/mL arasında kademeli artan CSC konsantrasyonlarıyla 6 saat uyarılması sonucunda elde edilen LDH ölçüm grafiği	44
Şekil 4.14: RPMI-2650 hücrelerinin 0,5 µg/mL ile 200 µg/mL arasında kademeli artan CSC konsantrasyonlarıyla 12 saat uyarılması sonucunda elde edilen LDH ölçüm grafiği	45
Şekil 4.15: RPMI-2650 hücrelerinin 0,5 µg/mL ile 200 µg/mL arasında kademeli artan CSC konsantrasyonlarıyla 24 saat uyarılması sonucunda elde edilen LDH ölçüm grafiği	46
Şekil 4.16: SEPP1 geninin qPCR sonuçları. Yeşil renkli sütun 24 saat boyunca 5 µM kurkumin muamelesinin ardından 50 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonlarındaki CSC ile uyarımı	47

Şekil 4.17: SFTPD geninin qPCR sonuçları. Yeşil renkli sütun 24 saat boyunca 5 µM kurkumin muamelesinin ardından 50 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonlarındaki CSC ile uyarımı	48
Şekil 4.18: SFTPD geninin qPCR sonuçları. Yeşil renkli sütun 24 saat boyunca 5 µM kurkumin muamelesinin ardından 50 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonlarındaki CSC ile uyarımı	48
Şekil 4.19: NCF2 geninin qPCR sonuçları. Yeşil renkli sütun 24 saat boyunca 5 µM kurkumin muamelesinin ardından 50 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonlarındaki CSC ile uyarımı.....	49
Şekil 4.20: CCL5 geninin qPCR sonuçları. Yeşil renkli sütun 24 saat boyunca 5 µM kurkumin muamelesinin ardından 50 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonlarındaki CSC ile uyarım.....	50
Şekil 4.21: RPMI-2650 hücrelerinin 0,5 µg/mL ile 200 µg/mL arasında kademeli artan CSC konsantrasyonlarıyla 3 saat ve 6 saat uyarılması koşullarında elde edilen DCFA-DA testi sonuçları	52
Şekil 4.22: RPMI-2650 hücrelerinin 0,5 µg/mL ile 200 µg/mL arasında kademeli artan CSC konsantrasyonlarıyla 12 saat ve 24 saat uyarılması koşullarında elde edilen DCFA-DA testi sonuçları	53
Şekil 4. 23: RPMI-2650 hücrelerinin kurkumin ve/veya CSC muamelesi sonucu geliştirdiği toplam metilasyon profillerinin farklı koşullarda ELISA testi ile incelenmesine ait test sonuçları	54
Şekil 4. 24: Bisülfid dönüşümü analizinin devamında yapılan PCR testi ve agaroz jel yürütmesi sonucu. Kuyucuklara yüklenen örnek sıralaması soldan sağa doğru: 1) Yalnızca 5 µM kurkumin ile muamele edilen hücrelerden alınan DNA örnekleri, 2) Yalnızca 5 µM kurkumin muamele edilen hücrelerden alınan DNA'nın bisülfid dönüşüme uğramış örnekleri, 3) Yalnızca CSC ile 24 saat uyarılan hücrelerden alınan DNA örnekleri, 4) Yalnızca CSC ile 24 saat uyarılan hücrelerden alınan DNA'nın bisülfid dönüşüme uğramış örnekleri, 5) Yalnızca DMSO ile 24 saat uyarılan hücrelerden alınan DNA örnekleri, 6) Yalnızca DMSO ile 24 saat uyarılan hücrelerden alınan DNA'nın bisülfid dönüşüme uğramış örnekleri, 7) 5 µM kurkumin ve DMSO ile 24 saat uyarılan hücrelerden alınan DNA örnekleri, 8) 5 µM kurkumin ve DMSO ile 24 saat uyarılan hücrelerden alınan DNA'nın bisülfid dönüşüme uğramış örnekleri, 9) 5 µM kurkumin ve CSC ile 24 saat uyarılan hücrelerden alınan DNA örnekleri, 10) 5 µM kurkumin ve CSC ile 24 saat uyarılan hücrelerden alınan DNA'nın bisülfid dönüşüme uğramış örnekleri	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

mL	Mililitre
mM	Milimolar
mg	Miligram
ug	Mikrogram
uL	Mikrolitre
uM	Mikromolar
RPM	Dakikadaki devir sayısı
°C	Derece santigrat

Kısaltmalar

AHRR	Aril hidrokarbon reseptör baskılayıcı protein
CYP1A1	Sitokrom P450, aile 1, alt aile A, polipeptit 1 proteini
CpG	Sitozin-fosfat-guanin
CSC	Sigara dumanı kondensanı
DCF	2', 7'-diklorofloresin
DCFH-DA	2',7'- Diklorodihidrofloresin diasetat
FBS	Fetal Sığır Serumumu
LDH	Laktat dehidrogenaz
MEM	Minimum temel ortam besiyeri
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-difeniltetrazolyum bromür

1. GİRİŞ

Sigara dumanı gibi oksidan maddelerin akut ve kronik birçok hastalık üzerinde etkisi olduğu gösterilmiş olup, sigara dumanının hücresel ve doku hasarındaki rolü literatürde gösterilmiştir. Sigara kullanımı ve sigara dumanına maruz kalmak birçok vücut dokusunu ve sistemini hasara uğratmakla birlikte, özellikle üst solunum yollarında kronik rinit, sinonazal ve gırtlak kanserleri de dahil olmak üzere kronik bronşit, astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) ve akciğer kanseri gibi çeşitli hastalıkların gelişme riskini artırır. Sigara dumanında bulunan 7000'den fazla kimyasal maddenin insan sağlığı üzerinde kanserojenik ve toksik etkileri vardır. Nikotin, katran, karbondioksit, formaldehit, akrolein ve daha pek çok sigara dumanı bileşeninin patojenik bağışıklık tepkilerini şiddetlendirdiği bilinmektedir.

Sigara dumanında bulunan çok sayıda toksik bileşiğin oksidatif stresle ilişkili olduğu bilinmektedir. Sigara kullanan ve kullanmayan bireyler karşılaştırıldığında, şiddetli astım hastalığı yaşayan bireylerde sigara kullanımı durumunda oksidatif stres ve inflamatuvar biyobelirteçlerin, sigara kullanmayan astımlı hastalara kıyasla arttığı görülmüştür. Bu nedenle, sigara kullanımının oksidatif stres artışına sebep olduğu ve aynı zamanda da bağışıklık sisteminde moleküler modifikasyonlara neden olarak birçok kronik hastalığın gelişiminde rol oynadığı literatürde yer almaktadır.

Ancak, sigara dumanına maruz kalmanın sonucunda ortaya çıkan oksidatif stres ve moleküler modifikasyonların sigara tüketimini bırakılması ile normal seviyelere geri döndüğü gözlemlenmiş olmakla birlikte, bu geri dönüşün uzun yıllar sürebileceği de gözlenmiştir. Bu nedenle, antioksidan bir molekül olarak bilinen kurkuminin sigara dumanının sebep olduğu moleküler düzeydeki hasarı ne şekilde ve ne düzeyde geri döndürülebileceğine dair literatür bilgileri yeterli düzeyde değildir. Kurkuminin antiinflamatuvar, antikanser ve antioksidan özelliklerinin yanı sıra, DNA metil transferaz enzim inhibisyonu ve histon modifikasyonu gibi epigenetik mekanizmalar üzerinde de etkisi olduğunu gösteren çalışmalar, kurkumin tedavisi ile sigara dumanının sebep olduğu epigenetik değişikliklerin geri döndürülebileceğini işaret etmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Sigara Tüketimi

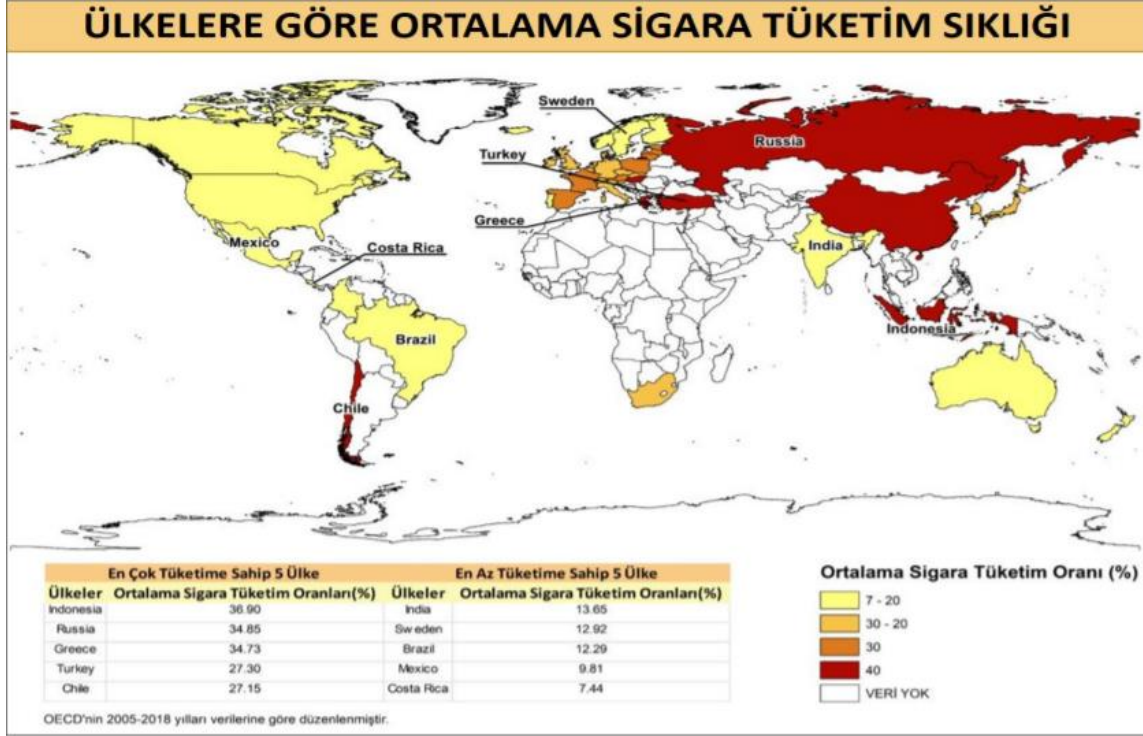
Tütün ve tütün ürünleri kullanımı, özellikle de sigara tüketimi, pek çok farklı doku ve organ sistemini etkileyen, akut ve kronik birçok hastalığın ortaya çıkmasına sebep olan ve aynı zamanda yaşam kalitesini de oldukça düşüren küresel bir toplum sağlığı sorunudur. Sigara tüketimi, hangi şekil ve formda tüketildiği fark etmeksizin, tüketen kişilerde psikolojik ve fizyolojik bağımlılık gelişmesine neden olmaktadır. Sigaranın aktif bileşenlerinden biri olan nikotin, yüksek bağımlılık yapıcı bir kimyasaldır. Nikotinin dışında, sigarada bulunan 7000'den fazla zararlı kimyasalın da etkisiyle, sigara tüketimi ciddi bağımlılığa sebep olmaktadır[1].

Sigara tüketimi ülkemizde olduğu gibi bütün dünya ülkelerinin karşı karşıya olduğu ve küresel çapta insan sağlığını etkileyen bir sorundur. Sigara tüketimi ve sigara tüketimine bağlı olarak ortaya çıkan sağlık sorunları ile mücadele etmenin psikolojik, toplumsal ve ekonomik boyutları gözle görülür şekilde yüksektir. Ancak, sigara tüketimine bağlı olarak yaşanan kayıplar ve ortaya çıkan hastalıkların tedavisi için ülkelerin ayırmak zorunda olduğu kaynakların boyutu yüksek olmasına rağmen, sigara tüketimini sonlandırmaya yönelik girişimler için ayrılan bütçe yeterince yüksek değildir. Sigara tüketimi dünya genelinde her yıl 7 milyondan fazla insanın hayatını kaybetmesine neden olmaktadır. Havayolu ile vücuda nüfuz eden bir uyarıcı olması nedeniyle de, sadece sigara tüketen kişiler değil, sigara tüketilen bir ortamda bulunmak ve aynı havayı teneffüs etmek yoluyla sigara dumanına maruz kalmak nedeniyle de her yıl 1 milyon kişi hayatını kaybetmektedir[2]. Tüm bu nedenlerden ötürü, sigara tüketimi Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından epidemik olarak sınıflandırılmış ve bir bağımlılık olarak tanımlanmaktadır.

2.2 Dünyada ve Türkiye'de Sigara Tüketimi

Günümüzde, küresel çapta sigara tüketimine bakıldığında yaklaşık 1,5 milyar insanın sigara tükettiği tahmin edilmektedir. Bu rakamın, 2025 yılında ise 1,7 milyara ulaşacağı tahmin edilmektedir. Sigara tüketimi küresel bir sorun olarak kabul edilmesine rağmen kullanım sıklığı dünyanın her yerinde aynı değildir. Elde edilen veriler dünyada tüketilen sigaranın yaklaşık %84'ünün gelişmekte olan ülkelerde olduğunu göstermektedir. Öte yandan, WHO'nun tahminlerine göre sigara tüketimi nedeniyle hayatını kaybeden insanların sayısının da 2030 yılına gelindiğinde iki kat artacağı düşünülmektedir [3].

Sigara tüketimi nedeniyle ortaya çıkan hastalıklar, dünyada olduğu gibi ülkemizde de sağlık kurumlarının en sık müdahale etmek zorunda kaldığı ve sosyal sağlık sisteminin öz kaynaklarına önemli ölçüde baskı yapan bir durumdur. Gerek tütün üreten bir ülke olmak nedeniyle tütün ürünlerine ulaşımın kolay olması, gerekse de kültürel anlamda sigara tüketimine atfedilen anlamlar sebebiyle ülkemizde sigara tüketimi son derece yaygındır. Türkiye dünya genelinde sigara tüketiminin en yoğun olduğu ülkeler arasında yer almaktadır (Şekil 2.1) [4].



Şekil 2.1: Dünya genelinde ülkelerin sigara tüketim sıklığına göre Türkiye en çok sigara tüketen ülkeler arasında ilk beşte yer almaktadır.

Son yıllarda uygulanan devlet politikaları sayesinde ülkemizde sigara tüketimi azalış göstermesine rağmen, Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)'in verilerine göre Türk toplumunun %25'ine yakın bir kesimi sigara tüketmektedir. Ülkemizdeki sigara tüketimi cinsiyete bağlı olarak farklılık göstermekte olup, erkeklerin %41,4'ü sigara tüketirken, kadınlarda bu oran %13,1 seviyelerindedir. Türkiye'de her yıl sigara kullanımına bağlı olarak 100 bin kişi hayatını kaybetmektedir [5]. 2016 yılında yayımlanan Küresel Yetişkin Tütün Araştırması verilerine göre, ülkemizde sigara tüketiminin yaygınlığa ilişkin olarak aşağıdaki verilere ulaşılmıştır:

- Türkiye’de 19,2 milyon insana karşılık gelecek şekilde, nüfusun %31,6’sı tütün ürünlerini tüketmektedir.
- Sigara dahil olmak üzere diğer tüm tütün ürünlerini düzenli olarak kullanan ve dolayısıyla her gün tütün ürünleri tüketen insanların sayısı 18 milyon olup, nüfusun %29,6’lık kısmına tekabül etmektedir.
- Düzenli sigara tüketimi alışkanlığı olan bireylerin bir gün içinde tükettikleri sigara sayısı yaklaşık 18 sigara olup, sigara tüketen bireyler gün içerisinde tükettikleri ilk sigaralarını güne uyandıklarını müteakip ilk yarım saat içerisinde tüketmektedirler.
- Ülkemizde tütün ürünlerini kullanan kitlenin geniş bir kısmı oluşturan ve 15 ile 34 yaş aralığında olan vatandaşların %15’i, düzenli ve her gün olacak şekilde sigara tüketmeye başladıklarında 15 yaşın altında olduklarını belirtmişlerdir. Benzer şekilde, sigara tüketimine 18 yaştan daha gençken başlayan bireylerin oranı %57,5 civarındadır.
- Ülkemizde sigaraya tüketimine başlanılan ortalama yaş 17 olarak bulunmuştur[6].

2.3 Sigara Dumanının Kimyasal İçeriği ve Oluşum Aşamaları

Sigaranın yakılması sonucu ortaya çıkan sigara dumanının kimyasal olarak bileşimine bakıldığında, bu dumanın azot, oksijen, karbondioksit ve karbon monoksit başta olmak üzere yüzlerce kimyasal bileşiği içeren sıvı damlacıklarının gaz ile karıştığı bir aerosol karışım olduğu görülmektedir [7]. Tütün yapraklarının yanması sonucu kimyasalların yoğun olarak bulunduğu bir duman ortaya çıkar ancak bu dumanın yapısı stabil değildir. Sigaranın yakılması ve nefes alma yoluyla vücuda alınması sırasında, sıvı-gaz karışımı halinde bulunan kimyasal damlacıklarının birbiri ile etkileşime geçmesi sonucu fiziksel yapılarında değişiklikler yaşanmakta olup, damlacıklar alt fraksiyonlara ayrılmakta ya da birbirleri ile birleşerek daha büyük çaplı kümeler haline gelmektedir [7]. Bundan ötürü, sigara dumanının sadece kendisi değil, aynı zaman yanması ve tüketimi sırasında ortaya çıkan fiziksel değişiklikleri de sigaranın ihtiva ettiği zararlı kimyasalların insan sağlığını olumsuz etkilemesi yönünde katkısı bulunmaktadır. Farklı sigara üreticilerinin ürettiği sigaralar, temelinde aynı tütün bitkisine dayanıyor olsa da kullanılan tütünün düşük uçucu özellikte olacak şekilde modifiye edilmesi, tütün karışımının ulaşabileceği maksimum yanma sıcaklığı, kullanılan kağıdın inceliği ve geçirgenliği, filtre olarak görev yapan izmarit kısmındaki süngerimsi maddenin sönümleyici özelliği gibi pek çok faktör sigaraların etkilerini değiştirmektedir. Bu nedenle sadece

içeriğindeki kimyasalların sebep olduğu zararlar değil, sigaranın hazırlanışındaki işlemler de sigaranın zararları üzerinde etkili olmaktadır. Sigara dumanının barındırdığı kimyasalların konsantrasyonları ve yanma sonucu ortaya çıkan yeni bileşikler, sigarada bulunan kimyasalların boyut ve miktar bakımından dinamik bir süreçte olduğunu göstermektedir. Dumanın bu karmaşık kimyasal doğasına ek olarak, tütün bitkisinin kendisine has doğası, sigara üretimi için üretici firmalarca tercih edilen yöntemler ve formüller de sigara dumanının insan sağlığı üzerinde bıraktığı etki açısından hatırı sayılır miktarda farklılık ve ilave zararlılık unsuru katmaktadır [8].

2.3.1 Nikotin

Sigara üretimi için kullanılan tütün yaprağı kendi doğal metabolizması için nikotin başta olmak üzere pek çok alkaloid molekülü kullanmaktadır. Tütün bitkisi için nikotinic asetikolin reseptör agonisti olarak görev yapan nikotin molekülü, rekreasyonel etki bırakması sebebiyle tüketilmektedir [9]. Nikotin, tütün bitkisi için bağışıklık sistemi ajanı olarak da görev almaktadır ve bitkinin maruz kaldığı çeşitli mikroorganizmalar, zararlı böcekler ve diğer omurgasız canlıların saldırılarına karşı savunma unsurudur. Öyle ki, nikotinin pek çok haşere böceğe karşı zehirli olması nedeniyle tütün bitkisinden ayrıştırılarak böcek ilacı olarak da kullanılmıştır [10]. Görüleceği üzere, nikotin her ne kadar tütün bitkisinin doğal yaşamı içerisinde bitkiye fayda sağlayan sıradan bir bileşik olsa da, kimyasal yapısı insan vücudunda nörotransmitter olarak görev yapan asetilkoline benzemesi nedeniyle insan için bağımlılık yapan bir etkiye sahiptir[11].

2.3.2 N-Nitrozaminler

N-Nitrozaminler, amin azotu molekülüne nitroz (NO) eklenmiş olan organik bileşiklerdir. Sigara dumanında bulunan N-nitrozaminler uçucu ve uçucu olmayan N-nitrozaminler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır[12]. Sigara dumanında en çok bulunan uçucu N-nitrozaminler N-nitrozodimetilamin, N-nitrozoetilmetilamine, N-nitrozodietilamine molekülleridir. Uçucu olmayan bileşikler ise 4-N-nitrozo-N-metilamino bütirik asit, N-nitrosopipekolik asit, N-nitrososarkozin molekülleridir[8]. Nitrozaminler genel olarak yüksek kanser yapıcı maddeler sınıfına girmekte olup, akciğer, beyin, karaciğer, idrar kesesi, mide, yemek borusu ve nazal sinüslerde kanser gelişime neden oldukları gösterilmiştir[13].

2.3.3 Ağır Metaller

Sigara dumanı, barındırdığı ağır metaller nedeniyle tüketim sonrasında insan sağlığını önemli ölçüde tehdit etmektedir. Tütün bitkisinin metabolizmasında, zirai uygulamalarda kullanılan böcek ilaçları ve bitkinin yetiştiği ortamdaki hava kirliliği nedeniyle ağır metal birikmesi yaşanabilmektedir[14]. Ancak, tütün bitkisinin yapraklarında biriktirdiği ağır metaller aslen bitkinin kendisi tarafından topraktan emilme suretiyle depolanmaktadır[15]. Bu nedenle, tütün bitkisi yetiştiriciliği için kullanılan toprağa çöp karışması, gübreleme ve kirlı su ile sulama yapılması gibi eylemler tütün bitkisinin ve dolayısıyla sigara dumanının ağır metaller ihtiva etmesinin ana nedenidir[16]. Tütün bitkisinin yapraklarında biriktirdiği her ağır metal sigara dumanı fazına geçtiğinde aynı oranda uçuculuğa ve insan vücuduna nüfuz etme kapasitesine sahip olmaz ancak tütün bitkisi yaprağında bulunan ağır metallerin zararlı oldukları bilinmektedir. Tütün bitkisinin kökleri yardımıyla topraktan emilim yaptığı başlıca ağır metal kadmiyumdur. Kadmiyumun kolay emilmesi, tütün yapraklarında ve sigara dumanında yüksek konsantrasyonlarda bulunmasına neden olmaktadır. Gaz fazına geçiş aşamasında kadmiyum elementinin yüksek transfer oranı da sigara dumanında bu metalin yüksek miktarlarda var olmasına neden olmaktadır[17]. Kadmiyum miktarının her bir adet sigarada 10 ile 250 ng arasında değişen miktarlarda bulunduğu gösterilmiştir. Bu değerler sigarada bulunan diğer kimyasallarla karşılaştırıldığında oldukça yüksektir [18]. Kurşun da tütün bitkisi tarafından depolanan ve sigara dumanında bulunan ağır metallerden biridir. Sigara dumanının yanma sonucu geçtiği gaz fazına kolayca transfer olabilir ve insan vücuduna kolayca giriş yapabilmektedir. Piyasadaki sigaralarda kurşun oranı değişiklik göstermektedir ve bir adet sigara tüketildiğinde 4 ila 39 ng kurşunun insan vücuduna geçtiği görülmüştür[19]. Sigara üretimi için kullanılan bazı tütün bitkilerinde radyoaktif radon elementinin de varlığı tespit edilmiştir. Bu elementin bozunması sonucu oluşan radyoaktif Kurşun-210 izotopu, sigara dumanında tespit edilmiştir. Benzer şekilde radonun bozunması sonucu bir başka radyoaktif izotop olan Polonyum-210 da sigara dumanı vasıtasıyla insan vücuduna aktarılmaktadır[20]. Sigara dumanında bulunan ağır metallerden kadmiyum ve kurşun ön plana çıksa da sigara dumanında daha az miktarlarda kobalt, arsenik, krom, cıva, talyum ve antimon da bulunmaktadır[21]. Ağır metallerin organik bileşiklere kıyasen insan metabolizması tarafından uzaklaştırılması ve zararsız hale getirilmesi çok daha zor olması nedeniyle, sigara tüketimi ağır metallerin organlarda birikmesine ve bu organlarda yetmezliklere neden olmaktadır.

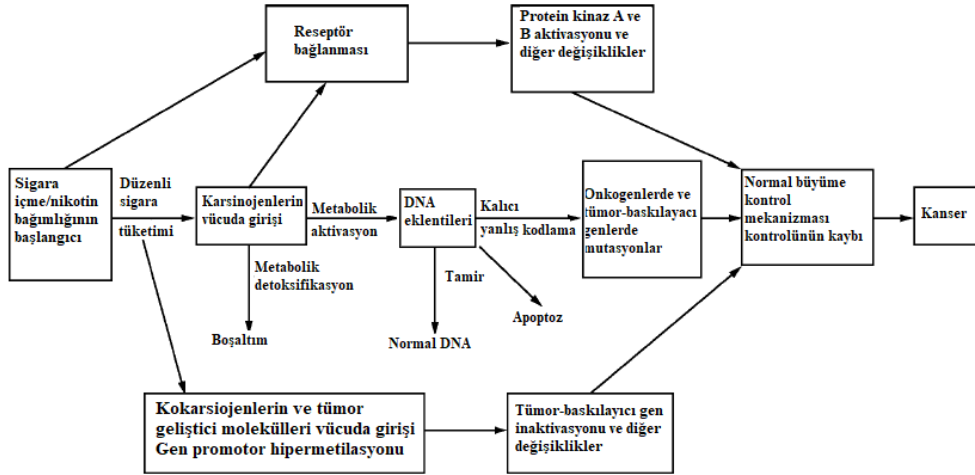
Sigara dumanında 7000'den fazla kimyasal madde bulunmakta olup; nikotin, N-Nitrozaminler ve ağır metaller bu kimyasal madde karışımı içerisinde en zararlı olan maddeler olarak öne çıkmaktadırlar. Öte yandan, genel bir sınıflandırma yapılacak olursa, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aldehitler, aromatik aminler ve heterosiklik aminler gibi pek çok farklı kimyasal sınıftan bileşik sigara dumanında mevcut olup, tüketilen her bir sigara ile insan vücuduna geçmekte ve sağlığı tehdit etmektedir.

2.4 Sigara Tüketiminin Yol Açtığı Sağlık Sorunları

Sigara dumanı içinde bulunan ölümcül kimyasal karışımda yüzlerce zehirli madde bulunmaktadır ve formaldehit, benzene, polonyum 210, vinil klorür, krom, arsenik, kurşun, kadmiyum, karbon monoksit, hidrojen siyanür, amonyak ve bütan, bu karışımdaki toksik kimyasallardan yalnızca bir kaçıdır[22]. Akciğerler vasıtasıyla insan vücuduna giren ve kan dolaşımına karışan sigara dumanı içerisindeki kimyasallar vücuda girdikleri anda zarar vermeye başlarlar. İnsan vücudundaki etkilerinin geniş çaplı ve neredeyse her dokuyu etkilediğini söylemek mümkündür. Kansere, kardiyovasküler hastalıklar, üreme ve gelişimsel bozuklukları ve özellikle de akciğer hastalıkları, sigara tüketen bireylerde en sık karşılaşılan sağlık sorunları arasındadır. Sigara tüketen ve sigara tüketmeyi bırakmış bireylerin ortalaması alındığında, akciğer kanserine yakalanma riskinin bu kişilerde %48 olduğu görülmüştür[23]. Sigara tüketimi devam ettiği sürece her bir sigarada artan sağlık sorunları yaşam riskini düşürmekte, sigara tüketiminden vazgeçildiğinde bile sağlık sorunlarının devam ettiği görülmektedir. Sigara dumanının neden olduğu sağlık sorunları vücudun genelinde görülmesine rağmen sigara dumanının vücuda alındığı organ olması nedeniyle solunum yolu hastalıkları ön plana çıkmaktadır.

2.4.1 Sigara Dumanı ve Kansere

Uzun yıllardır devam eden bilimsel çalışmaların neticesinde, sigara tüketimi ile akciğer, gırtlak, pankreas, böbrek, yemek borusu, serviks, idrar kesesi ve mide kanserleri ile akut miyeloid lösemi arasında neden sonuç ilişkisi bulunmuştur. Sigara dumanında kanserojen olduğu kesin olarak tespit edilmiş 60'tan fazla kimyasal madde bulunmakta olup, henüz kanserojen etkisi tam anlaşılamamış olan kimyasallar özelinde çalışmalar devam etmektedir. Sigara dumanının kanser oluşumuna doğru giden mekanizması Şekil 2.2'de gösterilmektedir.



Şekil 2.2: Sigara tüketimi sonucu kanser oluşumuna giden süreçte hücresel seviyede yaşanan moleküler değişiklikler

Ana hatlarıyla özetlemek gerekirse, sigara tüketimi ve devamında gelişen bağımlılık sonucu vücuda gittikçe artan miktarlarda kanserojen madde alımı, kanser sürecinin ilk aşamasıdır. Bahsi geçen zararlı kimyasalların öncelikle solunum yolu organları olmak üzere pek çok organın hücrelerindeki DNA moleküllerine kovalent olarak bağlanması ile yapısı ve işlevi değişen DNA molekülünün kalıcı olarak hatalı kodlama yapmasına neden olmaktadır. Sigara dumanında bulunan kimyasallar DNA'ya hasar vererek hücreye yanlış protein kodlaması yaptırır ve hücrelerin yüzeylerindeki reseptör proteinler ile de etkileşime geçerek hücresel sinyal yollarını da aktif hale getirmektedir. Protein kinaz A ve B'yi aktive ederek normal büyüme ve metabolik faaliyetlerin kaybına neden olmaktadır. Öte yandan, tümör baskılayıcı genlerin inaktif hale gelmesi sonucu da yine metabolik kontrol kaybı yaşanmakta ve normalde apoptoz yoluyla yok olacak olan mutasyon birikimi yüksek hücreler canlı kalmaya devam etmekte ve neticede kanserleşme süreci başlamaktadır. Kısacası, sigara tüketimi hücresel mekanizmalarda ağır ve geri döndürülemeyecek hasarlara neden olur, hücrelerin normal yaşam döngüsü içinde var olan hasar tamiri ve tamiri olmayan hasar durumlarında intihar mekanizması devre dışı kalır, mutasyonlar sonucu normal fonksiyonlarının dışına çıkan hücreler kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya başlar ve bu sürecin devamında da kanser ortaya çıkmaktadır.

2.4.2 Sigara Dumanı ve Kardiyovasküler Hastalıklar

Sigara dumanı kardiyovasküler ya da kalp-damar hastalıklarının ortaya çıkmasındaki ana faktörlerden biridir. Kardiyovasküler hastalıklar nedeniyle dünya çapında yaşanan can kayıplarının onda birinden fazlası sigara tüketimi ile ilişkilendirilmiştir [24]. Sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde kardiyovasküler hastalıklar nedeniyle yaşanan ölümlerin üçte biri ile orta yaş üstü olup iskemik kalp rahatsızlığı nedeniyle hayatını kaybeden bireylerin beşte birinin sigara tüketimi nedeniyle öldüğü raporlanmıştır [22]. Kalp krizi ya da spazmı gibi daha ciddi kalp sorunlarının yanında, glukoz intoleransı ya da yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol seviyesinde düşüklük de sigara tüketimi ile ilişkilendirilmiştir. Her ne kadar kardiyovasküler hastalıkların ortaya çıkması tek bir nedene bağlanamayacak olsa da, hem sigara tüketimi hem de kolesterol, yüksek tansiyon, diyabet gibi diğer faktörlerin bir araya gelmesi durumunda bu kişilerin kardiyovasküler hastalıklar geçirmesine ilişkin risk artmaktadır [25]. Sigara tüketiminin kardiyovasküler hastalıklara neden olmasının altında yatan mekanizmaya bakıldığında ise, kan damarlarının daralması ve pıhtılaşma riskinin artması nedeniyle ateroskleroz gelişimi, miyokardiyal enfarktüs ve aterosklerotik plakların oluşumunun önemli rol oynadığı görülmektedir [26].

2.4.3 Sigara Dumanı ve Üreme Sistemi Hastalıkları

Sigara tüketimi hem erkek hem de kadın bireylerde üreme sistemini olumsuz etkilemekte ve doğurganlık oranlarında düşüğe neden olmaktadır. Sigara tüketimi nedeniyle kadınlarda menstrual döngüde dengesizlikler meydana gelmekte, normal 28 günlük periyotlarda sapmalar, ağrılı ve sancılı regl dönemleri ve en uç örneklerde ise menstrual ölümler yaşanabilmektedir [27]. Öte yandan, sigara tüketen kadınlar ile tüketmeyen kadınlar karşılaştırıldığında, sigara tüketen kadınların görece daha kısa süren doğurganlık süreleri olduğu, bir diğer deyişle bu kadınlarda menopoza döneminin daha erken yaşlarda başladığı görülmüştür [28]. Sigara içen kadınların içmeyen kadınlara göre hamile kalacak sağlıklı yumurta üretebilme ihtimallerinin %20 oranında düştüğü, ayrıca bu kadınlarda tüp bebek yoluyla hamile kalma ihtimalinin de düştüğü belirtilmiştir[29]. Öte yandan, sigara tüketiminin hamileliğin on ikinci haftasına doğru düşük yapma riskini önemli ölçüde artırdığını gösteren bulgular mevcuttur[30]. Erkeklerde ise sigara tüketimi sperm kalitesini düşürdüğü, üretilen spermelerin fiziksel olarak sağlıklı olduğu, hareket kabiliyetlerinin düştüğü ve yumurta ile birleşerek zigot oluşturma noktasında zayıflık gösterebildikleri gözlemlenmiştir[31].

2.4.4 Sigara Dumanı ve Solunum Yolu Hastalıkları

Solunum sistemi burundan başlayıp alveollere kadar uzanan, tübüler yapıda bir sistem olup, vücudun dış ortam ile gaz alışverişini sağlayan sistemdir. Sigara tüketimi, duman formunda olan uyarıcının nefes alma yoluyla vücuda alınması ile gerçekleştiği için, sigara dumanı ile vücutta ilk karşılaşan sistem solunum sistemidir. Solunum sisteminin burundan alveollere doğru gidildikçe hacmi ve yüzey alanı artan bir yapıda olmasından ötürü, alınan her sigara dumanı nefesi alt solunum yollarında daha çok emilmekte ve sigara dumanının içeriğinde bulunan kimyasal maddeler alt solunum yolunda daha çok birikmektedir. Dolayısıyla, zehirli ve kanserojen özellikteki kimyasal maddeler alt solunum yollarında daha çok tahribata neden olmaktadır ve ağız ve burnu da içeren üst solunum yollarına da ciddi  l de hasar vermektedir[8]. Ülkemizde sigaraya başlama yaşı ortalama 17 olup, 15-34 yaş aralığındaki bireyler ülkemizde en çok sigara tüketen yaş grubunu temsil etmektedir. Bu veri, 17 yaşında sigara içmeye başlayan bir bireyin günde 20 adet sigara içeren 1 paket sigara içtiğinde, 34 yaşına ulaştığında 124.100 adet sigara içmiş olacağı sonucuna ulaştırmaktadır. Bu sonuç binlerce sigara tüketmiş olan bir bireyin 30'lu yaşlarına geldiğinde yüksek sağlık riski taşıdığı ve yaşam kalitesinin önemli  l de süresinin kısaldığını göstermektedir. Sigara tüketimi nedeniyle özellikle akciğer ve genel olarak solunum yollarıyla ilişkili pek çok hastalık ortaya çıkmaktadır.

Sigara dumanında bulunan en tehlikeli kimyasallardan olan formaldehitin akciğer siliaları için toksik ve tahriş edici olduğu, nitröz oksit moleküllerinin oksidan etki yaptığı, kadmiyum ağır metalinin oksidatif hasar verdiği ve amfizemi tetiklediği, akroleinin de yine silialar için toksik olduğu ve akciğer bağışıklık mekanizmasını baskıladığı görülmüştür[8]. Sigara dumanında ve sigara katranında bulunan azot dioksit ve karbon monoksit gibi bileşikler ile birçok metal unsurunun yüksek oranda serbest radikal oluşmasına sebep vermesi nedeniyle solunum hücrelerinde yüksek miktarda oksidasyon ve iritasyon ortaya çıkmaktadır[32]. Kısıtlı bir kapasitede de olsa, sigara dumanıyla vücuda alınan aerosol parçacıkların boyutlarına bağlı olacak şekilde bir savunma söz konusudur. Büyük parçacıklar üst solunum yollarında sıkıştırma yoluyla yok edilirken, büyüklüğü 2,5  m olan parçacıklar alt solunum yollarına ilerleyebilmekte fakat alveoller tarafında yine sıkıştırma yoluyla yok edilmektedirler. Ancak tüm bu savunma unsurlarına ve solunum sisteminde görev yapan alveolar makrofajlar gibi bağışıklık sistemi elemanlarına rağmen, sigara dumanında bulunan tüm zararlı kimyasalların yaklaşım %60'ı akciğerlerde birikim yapmaktadır[33]. Sigara tüketmek ve sigara dumanına maruz kalmanın,

astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) ve akciğer kanseri gibi çeşitli hastalıkların ortaya çıkış riskini artırdığı bilinmektedir[34]. Sigara içerisinde yer alan nikotin, katran, karbondioksit, formaldehit ve akrolein gibi sigara dumanındaki toksik kimyasalların patojenik bağışıklık tepkilerini de artırdığı çeşitli çalışmalarca ortaya konmuştur[35]. Solunum sisteminin dış ortam ile ilk temasını sağlayan yüzeyindeki epitel hücreler, sigara dumanının solunması durumunda bu dumandan doğrudan etkilenmektedir. Epitel hücrelerin geçirgenliği sigara dumanındaki kimyasalların uyarıcı etkileri nedeniyle artmaktadır. Ayrıca, sigara dumanı solunum yollarında normalden fazla miktarda mukus üretilmesine, akciğer ve solunum yolları dokularında proinflatuar etkisi olan sitokin ve kimokinlerin salınmasına, yabancı unsurun vücuda girmiş olması nedeniyle gelişen bağışıklık tepkisi neticesinde bu bölgedeki nötrofil sayısında artış ve lenfosit dengesinde bozulmaya neden olmaktadır[36].

Üst solunum yolunun ilk basamağı olan burun mukozası, sigara dumanına maruz kalan ilk bölge olması nedeniyle doğrudan hasara uğradığından, burun mukozasına ait olan nazal epitel doku, ortaya çıkan havayolu hastalıklarının patolojisini belirlemek açısından uygun bir dokudur. Solunum sistemine ilişkin olarak ortaya atılan birleşik havayolu konseptinden yola çıkarak, üst ve alt havayolları arasında yakın bir ilişki olduğu bildirilmektedir [37]. Dolayısıyla, üst solunum yollarına ait burun nazal epitel hücrelerinde sigara dumanı etkilerinin araştırılması, alt solunum yollarında yaşanması muhtemelen değişikliklerin öngörülmesi ve en sık ve en çok görülen hastalıkların incelenmesinde önemli bir rol oynayacağı düşünülmektedir. Üst havayolunda meydana gelen bir inflamasyonun alt havayoluna da sirayet edebileceği düşüncesi, epidemiyolojik ve klinik çalışmalar neticesinde astım ve alerjik rinit hastalıklarının arasında bağlantı olduğunun tespiti ile daha gerçekçi görünmektedir[38]. Kronik bronşit, KOA, amfizem, akciğer yüksek tansiyonu, astım, havayolunun daralması gibi akciğer merkezli hastalıkların sigara tüketimi ile ilişkisinin incelendiği çalışmalarla karşılaştırıldığında sigara dumanının üst solunum yolları ile ilişkisini inceleyen araştırmaların sayısı görece daha az ve sınırlıdır. Her ne kadar alt ve üst solunum yollarının sigara dumanı ile etkileşimi açısından farklılıkları olsa da, sigara dumanı üst solunum yollarından başlayarak bütün solunum sistemini etkileyen bir doğaya sahiptir, bu nedenle astım ve KOA gibi hastalıkların yalnızca alt solunum yolları ile sınırlı olmayabileceği yönünde yapılan çalışmalar bulunmaktadır[39].

2.4.4.1 Kronik Bronşit

Kronik bronşit hastalığı, devam eden iki yılın en az üçer ayında ve bu aylara ait günlerin büyük çoğunluğunda herhangi başka bir açıklaması olmaksızın kronik öksürme ve balgam oluşturma ile karakterize edilen bir hastalıktır[40]. Akciğer kanserli hastalardan alınan doku örnekleri üzerinde yapılan çalışmalarda kronik bronşitin aynı zamanda mukoza yüzeyi, submukoza bezleri ve özellikle de çapı 2 ila 4 milimetre olan bronşçuklar tarafından gösterilen inflamasyon tepkisiyle de ilişkili olduğu gözlemlenmiştir[41]. Ayrıca, bu dokularda polimorfonükleer nötrofiller, makrofajlar ve CD8+ ve CD4+ T ve B hücrelerinin infiltrasyonu görülmüştür[42]. Gözlenen bu semptomlar kronik bronşit hastalarında sigara dumanına bağlı olarak düzensizleşmiş ve tamamlanamayan bir iyileşme sürecinin yaşandığını göstermektedir[43].

2.4.4.2 Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAİ)

KOAİ hastalığının ortaya çıkmasındaki en önemli risk unsurunun sigara tüketimi olduğu bilinmektedir. Bu hastalık özelinde yapılan epidemiyolojik çalışmaların sonuçları, KOAİ hastalığına sahip bireylerin $\frac{3}{4}$ 'lük bir oranında hastalığa nazal belirtilerin de eşlik ettiğini göstermektedir[44]. Sigara dumanına maruz kalma neticesinde, üst ve alt hava yollarının benzer tepkiler verdiklerine ilişkin immünolojik bulgular da bulunmaktadır. Bu verilere göre, sigaraya bağlı ortaya çıkan KOAİ hastalığı olan bireylerden alınan balgam örneklerinde ve nazal epitel doku hücrelerinde IL-8 artışının olduğu gözlemlenmiştir[45]. Ek olarak, üst solunum yoluna ait nazal epitel hücreler ile alt solunum yoluna ait bronşlarda, sigara tüketimi neticesinde CD8 + T lenfositlerin infiltrasyonu ile belirlenen inflamasyon durumunun da benzer olduğu gösterilmiştir[46]. Dolayısıyla, nazal epitel doku, sigara dumanının alt solunum yoluna olan etkisinin ve bu bölgede ortaya çıkan akciğer hastalıklarının gelişimine olan katkısının araştırılması noktasında ideal bir örnek teşkil etmektedir.

2.5 Sigara Dumanı ve Oksidatif Stres

Sigara dumanı gibi yüksek oksidan kaynağı olarak solunan oksidanların neden olduğu oksidatif stres ve redoks dengesizliği, birçok akut ve kronik solunum hastalığının patogeneziyle ilişkili hücrel ve doku hasarında rol oynar. Sigara dumanı içerisindeki kimyasalların bir kısmı yüksek konsantrasyona sahip serbest radikaller ve diğer oksidan özellikli kimyasallardır[47]. Sigara tüketimi neticesinde vücuda alınan serbest radikalleri ve oksidanlar lipitlere, proteinlere ve nükleik asitlere doğrudan zarar vermekte, antioksidan depolarını tüketmekte, fagositik

hücrelerde de solunum patlamasını artırmaktadırlar[48]. Sigara dumanı dışarıdan bakıldığında homojen bir gaz olarak görünmesine rağmen duman ve katran olarak iki ayrı bileşenden oluşmakta ve her iki bileşen de serbest radikaller içermektedir. Sigaranın duman bileşeni görece olarak daha dengesiz bir kimyasal yapıya sahiptir ve akciğerlere çekilen her bir nefes sigara dumanı yaklaşık olarak 10^{15} serbest radikal barındırmaktadır. Katran bileşeni ise daha kararlı bir yapıya sahip olup, bir gram katran 10^{17} serbest radikal ortaya çıkarmaktadır[49]. Sigara dumanında bulunan en reaktif kimyasallar arasında nitrik oksit (NO) ve superoksit anyon ($O_2^{\bullet-}$) radikalleri bir araya gelerek çok daha reaktif olan peroksinitrit ($ONOO^-$) molekülünü oluşturmaktadırlar. Benzer şekilde, sigaranın katran bileşeninde bulunan semikinon ($Q^{\bullet-}$) radikali superoksit anyon ($O_2^{\bullet-}$) radikali ile reaksiyona girerek hidroksil radikali ($\bullet OH$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ortaya çıkarmaktadır[50]. Sigara tüketimi neticesinde serbest radikallere ve oksidantlara maruz kalınması yalnızca sigara dumanının içeriğinde bu kimyasalların bulunmasından ötürü değildir. Sigara dumanına maruz kalan solunum yolu hücrelerinin kendileri de oksidan üreterek dokuda yaşanan tahribatın artmasına sebep olmaktadır. Sigara tüketen bireylerde, solunum yollarının ve akciğerlerin inflamasyona uğraması sigaranın tipik ve karakterize etkilerinden biridir[51]. Doku ve organlarda yaşanan bu inflamasyon, sigara dumanının içeriğinde halihazırda bulunan oksidatif kimyasallara ek olarak solunum sistemi hücrelerinde oksidan kimyasal üretilmesine ve salınmasına neden olmaktadır. Sigara içen bireylerin akciğerlerinden alınan bronkoalveolar lavaj örneklerinde bulunan makrofajlar, sigara içmeyen bireylerden alınan aynı örneklere kıyasla daha yüksek oranda aktive olmaktadır[52]. Artan makrofaj aktivitesi, akciğer dokusunun da sigara dumanında var olan oksidan kimyasallara ek olarak $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 üretmesine neden olarak oksidan miktarının giderek artmasına yol açmaktadır. Öte yandan, sigara tüketiminin vücuttaki oksidan birikimini artırmasının yanında, *in vitro* çalışmalar sigara dumanının vücuttaki antioksidanları da tükettiğini göstermektedir. Bu çalışmalara göre, akciğer dokusundan alınan plazmanın sigara kondensanı ile muamele edildiğinde içeriğindeki C vitamini, retinol, beta-karoten, ubiquinol-10 gibi antioksidan moleküllerin konsantrasyonunu azalttığı tespit edilmiştir[53]. Benzer şekilde, sigara içen bireylerden alınan kan örneklerinin *in vivo* analizi sonucunda, bu bireylerin kan serumundaki C vitamini ve beta-karoten miktarlarının, sigara içmeyen bireylerden alınan kan örneklerine kıyasla daha düşük olduğu gösterilmiştir[54]. Dolayısıyla, literatürdeki çalışmalarda da görülmektedir ki, sigara kullanımı oksidatif stres artışına neden olarak,

bağışıklık sisteminde moleküler seviyede modifikasyonlarla birlikte birçok kronik hastalığı tetiklemektedir.

2.6 Sigara Kaynaklı Oksidatif Stresin Etkileri

Akciğer epitel dokusunun zedelenmesi sigara dumanının önde gelen zararlarından biridir. Sigara dumanı, akciğer epitel dokusunun geçirgenliğini artırmakta ve bunun sonucunda oksidatif stres durumu ortaya çıkmaktadır. Bunun nedeni artan geçirgenliğin akciğer epitel hücrelerindeki bir antioksidan olan glutatyon (GSH) miktarında düşüşe neden olurken, bir oksidatif stres belirteci olan glutatyon disülfid (GSSG) miktarını artırmaktadır[55]. Sigara tüketimi, oksidatif stresin artışında direkt ve dolaylı yoldan etkili olmaktadır. Hücre içinde artış gösteren oksidatif stres, proinflamatuvar genlerin ifadesinde değişikliklere neden olmaktadır. Sigara dumanına maruz kalınması ile nükleer faktör-kappa B (NF-kB) ve aktivatör protein-1 (AP-1)'in ifadesinde görülen artışın proinflamatuvar sitokinlerin gen ifadesiyle ve protein salımı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir[56]. Sigara dumanına maruz kalınmasını takiben artan oksidatif stres ile hücre içinde meydana gelen en önemli moleküler değişikliklerden biri, histon deasetilaz (HDAC) enziminin aktivitesinin düşmesi ve buna bağlı olarak histon asetilasyonunun artmasıdır. Bu durumun sonucu olarak kromatin ipliklerinin serbest kalmakta ve dolayısıyla düşük ifade seviyesine sahip olan genlerin ifadeleri artmaktadır[57]. Ancak yine de, sigara tüketimin moleküler düzeyde sebep olduğu değişiklikler halen tam olarak bilinmemektedir. Öne çıkan mekanizmalardan bir diğeri ise, sigara dumanının barındırdığı toksik kimyasallar ve oksidan etki nedeniyle gen ifadesinde değişikliğe neden olabilecek, DNA metilasyonu gibi epigenetik modifikasyonların gözlenebilmesidir. Belirli bir gene yönelik olarak uygulanan epigenetik modifikasyon, promotor bölgesindeki sitozin-fosfat-guanin (CpG) adalarındaki sitozin nükleotidinin metilasyonunu kaybetmesi veya kazanması yoluyla ortaya çıkabilmektedir[58]. Promotor bölgesindeki CpG adalarında görülen hipermetilasyon, çoğunlukla gen ifadesinin azalmasına ve transkripsiyonun baskılanmasına neden olurken metilasyon azalması da gen ifadesinin artması ve transkripsiyonun aktive edilmesi ile ilişkilidir[59, 60]. Sigara dumanına maruz kalınması neticesinde, DNA metilasyon profili üzerinde epigenetik etkiler gösterilmiştir [60]. Örneğin, hamile iken sigara kullanan ya da pasif içicilik yoluyla sigara dumanına maruz kalan kadınların fetüslerinden alınan örnekler üzerinde yapılan genom-boyu DNA metilasyon meta-analizleri neticesinde, örneklerde 6000'den fazla lokusta DNA metilasyonu olduğu belirlenmiştir[61]. Sigara dumanının oksidatif stres yoluyla açtığı tahribat ve DNA metilasyon

profili üzerinde yaptığı değişikliklerin incelendiği farklı hastalıklara yönelik akademik çalışmalar, DNA metilasyon değişikliklerinin sigara tüketimi terk edilse dahi takip eden yıllar boyunca bireyin DNA'sında korunarak kaldığını göstermektedir[60]. Sigaranın epigenetik etki yaratarak DNA metilasyon profilinde yaptığı değişikliklerin ortadan kalkması her gen için aynı sürede gerçekleşmemektedir. **Bazı genler için sigara tüketimi bırakıldıktan 5 yıl sonra CpG metilasyonlarının sağlıklı bireylerin seviyesine döndüğü görülürken bazı genlerde 30 yıl geçmesine rağmen DNA hasarlarının aynı kaldığı görülmüştür.** Kimyasal detoksifikasyon reaksiyonunda rol alan proteinleri kodlayan AHRR ve CYP1A1 gibi genlerin metilasyon profillerinin de farklı şekilde oluştuğu gözlemlenmiştir. Buradan hareketle, sigara dumanına maruz kalınması nedeniyle ortaya çıkan epigenetik değişikliklerin genomda belirli bölgeleri etkileyebildiği fikri doğmaktadır. Öte yandan, sigara dumanına maruz kalmanın sebep olduğu epigenetik değişiklikleri inceleyen araştırmalarda doku örneği olarak çoğunlukla tam kan örnekleri kullanılmış olup, akciğer dokusu ve hücre bazda yapılan çalışmalar kısıtlıdır. Var olan tüm bu bulgulardan hareketle, sigara tüketiminin DNA üzerinde epigenetik değişikliklere sebep olabildiği görülmekle birlikte, bu değişikliklerin her geni aynı şekilde etkilemediği ve hatta bu epigenetik değişikliklerin farklı hücre türlerinde farklı şekillerde ortaya çıkabileceği, dahası kişiden kişiye göre de değişiklik gösterebileceğini düşünmek mümkündür.

2.7 Kurkumin Muamelesinin Antioksidan ve Epigenetik Özelliği

Polifenol sınıfından bir bileşik olan ve zerdeçal bitkisinden elde edilen ve zerdeçal sarısı olarak da bilinen kurkumin molekülü antiinflamatuar, antioksidan ve kanser karşıtı özellikleri olan ve aynı zamanda da bir epigenetik modülatör olarak görev yapabilme potansiyeli yüksek olan bir moleküldür. Kurkuminin epigenetik regülasyondaki fonksiyonları arasında DNA metiltransferaz enziminin inhibisyonu, histon asetiltransferaz enziminin regüle edilmesi yoluyla histon modifikasyonlarının düzenlenmesi, microRNA'ların ve transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi bulunmaktadır[62]. Bilindiği üzere, epigenetik mekanizma, bu mekanizmadaki değişikliklere odaklanılarak kansere yönelik hedef tedavilerin geliştirilmesi noktasında kilit role sahiptir. Bu nedenle, kurkumin gibi besin takviyesi olarak alınabilecek olan antioksidan moleküller hastalık patofizyolojisi ile ilişkili olan epigenetik değişikliklerin ortadan kaldırılması ve eski haline döndürülmesi, dolayısıyla da gen ifadesinin düzenlenmesi noktasında umut vaat etmektedir.

2.7.1 Kurkuminin Histon Asetilasyon/Deasetilasyon Mekanizmasındaki Rolü

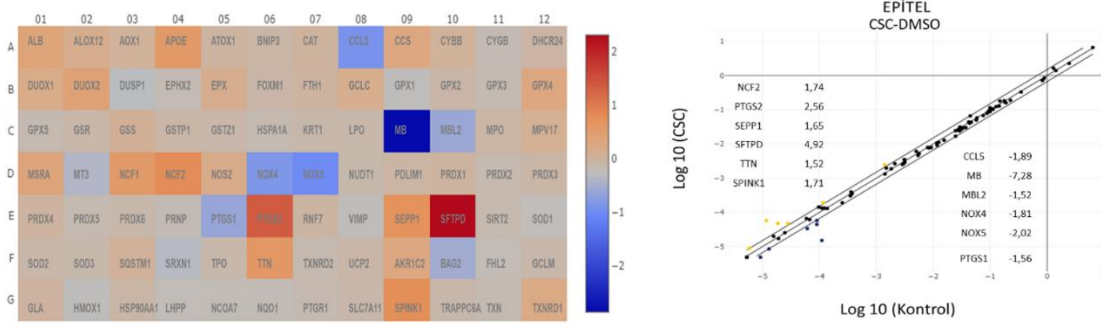
Kurkumin temelli histon asetilasyon ve deasetilasyon çalışmaları literatürde sıklıkla kanser çalışmaları üzerine yoğunlaşmıştır. Gen ifadesinin epigenetik olarak kontrol edilmesindeki en önemli mekanizmalardan biri asetilasyon ve deasetilasyon yoluyla histon modifikasyonlarının yapılmasıdır. Bu iki mekanizmanın dengeli şekilde çalışması ve gen ifadesini kontrolü, epigenetik bozukluklar temelli kanser gelişimini engellemektedir [63]. Histon deasetilaz enzimleri DNA üzerindeki histon proteinlerinden asetil gruplarını çıkararak gen aktivasyonunu sağlamaktadır. Dolayısıyla, kanser hücrelerinde aktif hale gelmiş olan genlerin ifadelerinin tekrar susturulabilmesi için histon deasetilaz enzimlerinin bir dış etki ile inhibe edilmesi gerekmektedir. Bu durum, kanserleşmiş hücrelerin tedavisi için geliştirilen ilaçlar için histon deasetilaz enzimlerinin tedavi amacıyla hedef olarak tercih edilmesine neden olmaktadır[64]. Bu noktada, kurkuminin histon deasetilaz enzimlerini inhibe etme özelliğinden ötürü epigenetik mekanizmada tedavi edici bir unsur olarak kullanılabilmesi ihtimali doğmaktadır. Yapılan çalışmalarda kurkuminin HeLA hücrelerinden elde edilen ekstraktlarda 500 µM konsantrasyonlarda kullanıldığında %50 oranında histon deasetilaz inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir[65]. Benzer şekilde, Raji hücrelerinde yapılan araştırmalarda da histon deasetilaz 1, 3 ve 8 enzimlerinin hücre içi konsantrasyonlarını düşürerek histon H4 asetilasyonunu arttırdığı gösterilmiştir[66].

2.7.2 Kurkuminin DNA Metilasyon Mekanizmasındaki Rolü

DNA metilasyonu, DNA'nın nükleotid sekansını değiştirmeden bir genin ifadesini bastıran ancak geri alınabilir epigenetik değişikliklerden biridir[67]. Özellikle tümör baskılayıcı genler olmak üzere bazı genlerin promotor bölgelerinde bulunan CpG adacıklarının hiper-metilasyonu yoluyla da tümör gelişimini önleyici genlerin transkripsiyonları durdurulmakta, dolayısıyla bu genlerin susturulması yoluyla tümör gelişimi sağlanmaktadır[68]. DNA'nın metillenme mekanizmasında görev alan enzimler DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b gibi DNA metiltransferaz enzimleridir[69]. Bu noktada, kurkuminin DNA metiltransferaz enzimlerinin aktivitelerini inhibe ettiği ve dolayısıyla tümör hücrelerinde DNA metilasyon profilini ciddi ölçüde etkilediği gösterilmiştir[70]. Kurkumin ile muamele edilen kanser hücrelerinin DNA metilasyon profillerinin eski haline döndüğü gösterilmiştir. Dolayısıyla, kurkumin DNA metilasyonu aracılığıyla ortaya çıkan epigenetik temelli değişikliklerin eski haline döndürülmesi için etkili bir terapötik ajandır.

2.8 Sigara Dumanı Nedeniyle Epigenetik Değişikliğe Uğrayan Genler

Literatürde sigara dumanının taşıdığı kimyasalların etkisinde kalmak suretiyle ifadesinde değişiklik tespit edilen genlerin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Hacettepe Üniversitesi tarafından desteklenmiş ve araştırma ekibince tamamlanmış olan kapsamlı araştırma projesi (FBA-2017-12838) sonuçlarına göre hava yolu bronş epitel hücrelerinde sigara dumanı ile indüklenen oksidatif strese bağlı olarak SEPP1, NCF2, SFTPD genlerinin ifadelerinin arttığı, CCL5 ve PTGS1 genlerinin ise ifadelerinin azaldığı Şekil 2.3’de gösterildiği gibidir.



Şekil 2.3: Tez çalışması için seçilen SEPP1, NCF2, SFTPD, CCL5 ve PTGS1 genlerinin öncül çalışmada gösterilen gen ifadesi değişiklikleri

Bu çalışmada, antioksidan özelliği bilinen kurkuminin ve PEG’lenmiş kurkuminin ile antioksidan terapinin SEPP1, NCF2, SFTPD, CCL5 ve PTGS1 genlerindeki oksidan temelli değişiklikler üzerindeki etkisi ve antioksidan terapinin demetilasyon üzerindeki olası etkileri araştırılmaktadır. Seçilen genler gerek literatürde olan çalışmalar gerekse de laboratuvarımızda yürüttüğümüz öncül çalışmalar ve meta-analizlerin neticesinde sigara dumanı ve oksidatif stres ile ilişkili olduğu belirlenen genlerdir. Genlerin fonksiyonlarıyla ilgili bilgi aşağıdaki gibidir.

2.8.1 SEPP1 (selenoprotein P)

Hücre dışı bir glikoprotein olup, selenyum elementini bağlama özelliği sayesinde hücre dışı antioksidan görevi görebilen bir proteindir. Ayrıca, beyin ve testise selenyum taşınmasında görevli olduğu da düşünülmektedir (UniProtKB- P49908 (SEPP1_HUMAN)). SEPP1 geni, oksidatif stres kapasitesi yüksek olan cıva gibi elementlere maruz kaldığında DNA metilasyonuna uğrayarak inaktif olmaktadır[71]. Farklı sigara markalarının cıva miktarı incelendiğinde, tüketilen her bir sigarada 2.95 ng ila 10.2 ng arasında değişen cıva bulunmakta

olup, bu civanın %86.7'si ile %100'ünün sigara dumanına karışarak insan vücuduna geçtiği görülmüştür[72]. Dolayısıyla, cıva da dahil olmak üzere, sigara dumanının bünyesindeki pek çok kimyasalla nazal epitel hücrelerinde oksidatif strese sebep olduğu ve SEPP1 geninde DNA metilasyonuna sebep olabileceğini düşündürecek öncül çalışmalar bulunmaktadır.

2.8.2 NCF2 (neutrophil cytosolic factor 2)

Membran-bağlı olan ve süperoksit üretiminin katalizlenmesinde görev alan NADPH oksidaz enziminin 67 kD boyutundaki sitozolik alt birimidir. NCF2, NCF1 ve membran-bağlı sitokrom b558 ile birlikte NADPH kompleksinin aktivasyonunda görev almaktadır. (UniProtKB - P19878 (NCF2_HUMAN)). NCF2 geni üzerine yapılan çalışmalarda, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri vakalarında NCF2 geninin ifadelerinin azaldığı görülmüştür[73]. Aynı hücrelerde oksidatif stres artışının da benzer sonuca neden olduğu gösterilmiştir[74]. Dolayısıyla oksidatif stres koşullarında metilasyona uğrayan NCF2 geninin, oksidatif strese neden olan sigara dumanına maruz kalan nazal epitel hücrelerde de metilasyona uğrayabileceğini düşündürecek öncül çalışmalar bulunmaktadır.

2.8.3 SFTPD (surfactant protein D)

Solunum yoluyla akciğerlere ulaşan mikroorganizmalara, organik antijenlere ve toksinlere karşı akciğerin savunma mekanizmasına katkıda bulunan bir genidir. Bakteri kaynaklı lipopolisakkarit ve yağ asitleri gibi moleküllerle etkileşime girerek, lökosit etkisini modüle ederek bağışıklık tepkisine katkıda bulunur (UniProtKB - P35247 (SFTPD_HUMAN)). SFTPD geninin, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ile ilişkili mutant EGFR sinyalini bastırdığı ve dolayısıyla tümör dokusunda sinyal mekanizmasını durduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır[75]. Dolayısıyla, oksidatif stres ve DNA metilasyonu yoluyla deaktive olması durumunda, SFTPD geninin tümör baskılama özelliğinin ortadan kalkacağı mümkündür. Bu nedenle, sigara tüketiminin neden olduğu oksidatif stres ve DNA metilasyonu çalışmasında SFTPD geninin biyo işaretçi olarak kullanılabileceğini düşündürecek öncül çalışmalar bulunmaktadır.

2.8.4 CCL5 (C-C motif chemokine 5)

Monositler, T-hücreleri ve eozinofiller için kemoatraktan olarak görev yapan bir proteindir. Basofillerden ve eozonofillerden histamin salınımını tetikler. CCR1, CCR3, CCR4 ve CCR5 gibi bazı kemokin reseptörlerini aktive edebilmektedir. CCL5 proteini, HIV-baskılayıcı CD8+ T hücreleri tarafından üretilen ana faktörlerden biridir. (UniProtKB - P13501

(CCL5_HUMAN)) G-protein bağlı reseptörlerden GPR75'e etki eden agonistlerden biridir ve reseptörün aktivasyonu ile inozitol trifosfat üretimini ve kalsiyum mobilizasyonunu stimüle eder. GPR75 ile birlikte sinyal yolağının son aşamalarında PI3, Akt ve MAP kinazların aktivasyonu yoluyla nöron sağkalımında rol oynar[76].

2.8.5 PTSG1 (Prostaglandin G/H synthase 1)

PTSG1 proteini, araknidonattan türetilen C20 oksilipin sınıfı moleküllerden prostanoidlerin biyosentez yolağında siklooksigenaz ve peroksidaz olarak çift göreve sahip olan bir proteindir. Yangı cevabında önemli role sahiptir. Özellikle midede ve kan pulcuklarında prostanoidlerin üretiminde görev alır. Gastrik epitel hücrelerde, sitozomal korumada kritik görev alan prostaglandin E2 gibi prostaglandinlerin üretiminde kritik rol oynamaktadır. Kan pulcuklarında tromboksan A2 üretiminde görev alarak kan pulcuğu aktivasyonu ve pıhtılaşması, damar daralması ve düz kas hücrelerinin bölünmesinde görev alabilmektedir [77].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan insan nazal epitel hücre hattı RPMI 2650 (Katalog no. CCL-30), American Type Cultural Collection firmasından ticari olarak satın alınmıştır.

Hücre kültürü çalışmaları sırasında kullanılan kurkumin (Katalog no. C1386) Sigma (Almanya) firmasından alınmıştır.

Literatürde sigara dumanına maruz kalmanın hücreler üzerindeki etkisini araştıran çalışmalarda araştırma amaçlı olarak sıklıkla kullanılan sigara dumanı kondensatı Kentucky Üniversitesi Tütün Ürünleri Merkezi'nden (Lexington, KY) ticari olarak satın alınmıştır. Sigara dumanı kondensatı (CSC) 1R6F kodu verilen ve referans araştırma sigarası olarak adlandırılan sigaradan elde edilmiştir.

Hücre canlılığı ve sitotoksitenin tespiti için kullanılan Laktat Dehidrojenaz (LDH) sitotoksite kiti (Katalog no.88953) ve 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-difeniltetrazolyum bromür (MTT)(Katalog no. M2128) Sigma (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

Etidyum bromür/kalsein (EtBr/ Kalsein AM) boyası (Katalog no. 30002) Biotium (ABD) firmasından satın alınmıştır.

2',7'- Diklorodihidrofloresin diasetat (DCFH-DA) (Katalog no. D6883) hücrelerde total serbest radikal ölçümünün yapılabilmesi için Sigma (Almanya) firmasından ticari olarak satın alınmıştır.

3.2 Hücre Kültürü Deneyleri

3.2.1 RPMI 2650 Hücrelerinin Çoğaltılması

Nazal epitel hücre hattı (RPMI-2650) için minimum temel ortam besiyerine (MEM), %10 Fetal Sığır Serum (FBS) ve %1 penisilin/streptavidin ilave edilmiş ve hücre hattı bu besiyeri içinde %5 CO₂ atmosferinde 37°C'de inkübatörde büyütülmüştür. Canlılık deneylerinde kullanılmak üzere %80 konfluent olan hücrelerin üzerinden eski besiyeri atılmış ve flask PBS ile bir kere yıkandıktan sonra tripsin enzimi ile 5 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Sonrasında tripsin enziminin etkisi, besiyeri kullanılarak durdurulmuştur. 1.500 RPM'de 5 dakika santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre peleti uygun besiyerleri ile çözülmüştür. Tripan

mavisi boyama yöntemi kullanılarak hücreler thoma lamında sayılmıştır. Sonrasında 1×10^4 hücre, canlılık/sitotoksisite deneyleri için 96 kuyucuklu plakaya ekilmiştir.

3.2.2 Hücre Canlılık ve Sitotoksisite Deneyleri

3.2.2.1 Hücrelerin Boyanması ve Canlı/Ölü Hücrelerin Tahlili

RPMI-2650 nazal epitel hücrelerin canlılıklarının tespiti için EtBr/ Kalsein AM floresan boyaları, temin edildikleri üretici firmanın kiti doğrultusunda kullanılmıştır (Biotium).

- 96 kuyucuklu plakalara 100 μ l'de 1×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır.
- Devam eden günde besiyeri uzaklaştırılmış, hücreler belirlenen doz ve zamanlarda kurkumin ile inkübe edilmiştir.
- Farklı besiyerlerinde aynı sürece maruz kalan hücreler, belirlenen doz ve zamanlarda CSC ile inkübe edilmiştir
- 10 ml PBS içerisine 5 μ l kalsein AM (4 mM) ve 20 μ l EthD-III (2 mM) eklenerek 2 μ M kalsein AM / 4 μ M EthD-III boyama çözeltisi hazırlanmıştır.
- Besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler PBS ile 2 kez yıkanmıştır.
- Yıkama aşamasından sonra kuyucuklara boya çözeltisinden 50 μ l eklenmiştir.
- Plaka karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonunda canlı ve ölü hücreler floresan mikroskopunda görüntüleme ile tespit edilmiştir. Floresan mikroskopunda canlı hücrelerin yeşil renk ile, ölü hücrelerin ise kırmızı renkte sinyal verdiği tespit edilmiştir.

3.2.2.2 Sitotoksisite Deneyleri

3.2.2.2.1 MTT Testi

RPMI-2650 nazal epitel hücrelerinin değişen konsantrasyonlarda kurkumin, CSC ve kurkumin/CSC karışımı ile uyarımı sonrasında hücrelerin sitotoksisite ölçümü MTT yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. MTT testi aracılığıyla canlı hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri temel alınarak kolorimetrik ölçüm yapılmaktadır. Canlı hücrelerde aktif olarak devam eden mitokondri aktivitesi sonucu, normalde sarı renkli olan MTT boyası mavi-eflatun bir renge dönüşmektedir. Dolayısıyla, MTT testi ile ölü hücrelerin değil canlı hücrelerin tespit edilmesi mümkündür.

- 96 kuyucuklu plakalara 100 µl'de 1×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır.
- Devam eden günde besiyeri uzaklaştırılmış, hücreler belirlenen doz ve zamanlarda kurkumin ile inkübe edilmiştir.
- Farklı besiyerlerinde aynı sürece maruz kalan hücreler, belirlenen doz ve zamanlarda CSC ile inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonunda besiyeri uzaklaştırılmış ve kuyucuklara 100 µl besiyeri konulmuştur.
- Kuyucuklara 10 µl MTT (5 mg/ml) solüsyonu konulmuştur.
- 37°C'de 3 saat boyunca inkübasyona bırakıldıktan sonra besiyeri uzaklaştırılmış ve 100 µl DMSO eklenmiştir.
- 570 nm'de absorbans okunmuş ve canlılık değerleri yüzde olarak hesaplanmıştır.

3.2.2.2.2 Laktat dehidrogenaz (LDH) Testi

LDH bütün hücrelerde var olan sitoplazmik enzim olup, hücre zarı bütünlüğünü kaybettiğinde ve hücre ölümü gerçekleştiğinde hücre kültürü deneylerinde besiyerine salınır. Dolayısıyla, hücresel canlılığın tespitinde besiyerine salınmış olan LDH'in miktarın, laktatın piruvat'a dönüşümünü katalize etme özelliği temel alınarak ölçülebilmektedir. Bu reaksiyon sonucu ortaya çıkan NADH moleküllerinin tetrazolyum tuzunu 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolyum klorid (INT) indirilmesiyle besiyeri 490 nm'de ölçülebilir hale gelmektedir.

- 96 kuyucuklu plakalara 100 µl'de 1×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmış, plaka gece boyunca 37 ° C, % 5 CO₂' de inkübasyona bırakılmıştır.
- Devam eden günde besiyeri uzaklaştırılmış, hücreler belirlenen doz ve zamanlarda kurkumin ile inkübe edilmiştir.
- Farklı besiyerlerinde aynı sürece maruz kalan hücreler, belirlenen doz ve zamanlarda CSC ile inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonunda her bir kuyucuktan 50 µl besiyeri yeni bir 96 kuyucuklu plakaya aktarılmıştır.

- Üretici firmanın sağladığı kit içerisinde bulunan reaksiyon karışımından 50 µl eklenmiştir.
- Plaka ışıktan koruyarak oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
- Daha sonra her bir kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklenmiştir.
- Plakalar 490 nm ve 680 nm'de absorbans ölçülmüştür.

3.2.2.3 Serbest Radikallerin Ölçümü

RPMI-2650 hücrelerinde CSC uyarımı sonucu oluşan serbest radikallerin ölçümünde DCFH-DA testi kullanılmıştır. DCFH-DA hücre zarından geçerek hücre içerisinde bulunan esteraazlarla etkileşimi ve devamında serbest radikaller ile etkileşimi neticesinde tarafından floresan bir bileşik olan 2',7'-diklorofloresin (DCF)'ye dönüşmektedir. DCF, 495 nm / 529 nm'de tespit edilebilen floresan bir moleküldür.

- 96 kuyucuklu plakalara 100 µl'de 2×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır.
- Plaka gece boyunca 37 °C, % 5 CO₂' de inkübasyona bırakılmıştır.
- Devam eden günde besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler 10 µM DCFH-DA ile 40 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonunda hücreler belirlenen doz ve zamanlarda CSC ile uyarılmıştır.
- Uyarım sonrası plakaların floresan okuyucuda ölçümleri yapılmıştır.

3.2.2.4 RNA izolasyonu

- RNA izolasyonu için Qiagen firmasının RNeasy Mini kiti kullanılmıştır.
- %1 β-Merkaptoetanol içeren 350 µl RLT solüsyonu ile hücreler parçalanmıştır.
- DEPC su ile seyreltilmiş 350 µl %70 etanol kolon üzerine aktarılmış ve 13.000 RPM'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant uzaklaştırılarak kolona 700 µl RW1 yıkama solüsyonu eklenmiş, 13.000 RPM'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
- Yeni bir toplama tüpüne alınan kolona 500 µl RPE solüsyonu eklenmiş ve 13.000 RPM'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.

- Süpernatant uzaklaştırılarak kolona 500 µl RPE solüsyonu eklenmiş, 13.000 RPM' de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant uzaklaştırılarak tekrar 13.000 RPM'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Steril 1.5 ml ependorf tüpe alınan kolona 50 µl RNaz içermeyen su eklenmiş ve 13.000 RPM'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. RNA örnekleri bir sonraki aşamada kullanılanana kadar -80°C' de saklanmıştır.

3.2.2.5 cDNA sentezi

- RNA'dan cDNA dönüşümü için RT² First Strand Kit kullanılmıştır.
- Genomik DNA eliminasyon solüsyonu 42°C'de 5 dakika inkübasyona bırakılmış devamında ise 1 dakika boyunca buz üzerinde bekletilmiştir.
- 10 µl Genomik DNA eliminasyon karışımı içeren tüplere 10 µl ters-transkripsiyon solüsyonu eklenmiş, 42°C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Devamında 95°C'de 5 dakika inkübasyona bırakılarak reaksiyon durdurulmuştur.
- Her örnek tüpüne 91 µl RNase-free su eklenmiş ve gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

3.2.2.6 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Tez çalışması için öncül araştırmalar neticesinde belirlenmiş olan SEPP1, NCF2, SFTPD, CCL5 ve PTGS1 genlerine özgü olarak tasarlanmış primerler ile gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile bu genlerin ifadelerine bakılmıştır. Bahsi geçen genler için dizayn edilen primerler Çizelge 2.1'de gösterildiği gibidir. Reaksiyon için kullanılan malzemeler ile reaksiyon koşullarını Çizelge 2.2'de gösterildiği gibidir.

Şekil 2.4: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılmak üzere dizayn edilmiş olan özgün primerlerin dizileri

Gen	Dizi (5'-3')	Uzunluk	Exon
SEPP1	F: AGATGTGGCCGTCTTGTATATCA R: TTGAGAGTCGTGAGAGAGCAG	128 bp	3.-4.Ekzon
NCF2	F: ACTACTGCCTGACTCTGTGGTG R: CCTCCTTGGCTGCCTTTCTT	135 bp	13.-14. Ekzon
SFTPD	F: GGACAAAGGCATTTCCTGGAGAC R: TGAGAGAAAGCAGCCTGGAGGT	126 bp	6.-7. Ekzon
CCL5	F: CACCAGTGGCAAGTGCTCCA R: CCCTTGTTTCAGCCGGGAGTC	111 bp	2.-3. Ekzon

PTGS1	F: GGCGCTGGTTCTGGGAGTTT R: GGTTGGAGCGCACTGTGAGT	81 bp	4.-5. Ekzon
--------------	--	-------	-------------

Şekil 2.5: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan malzemeler ve reaksiyonun döngü koşulları. Reaksiyon döngüsü 35 döngüde tamamlanacak şekilde uygulanmıştır.

	Kullanılan Malzeme	Kullanılan Miktar	
Reaksiyon Koşulları	2X SYBR Green PCR Master Mix	12,5 µl	
	İleri Primer (10 µM)	0,1 µl	
	Ters Primer (10 µM)	0,1 µl	
	Kalıp (50 ng)	1 µl	
	Nükleazsız su	11,5 µl	
Döngü Koşulları	Döngü Aşaması	Sıcaklık	Süre
	Isıyla Aktivasyon	95 °C	5 dk
	Denatürasyon	95 °C	10 s
	Primer bağlanma ve uzama	60 °C	30 s

3.2.2.7 DNA Metilasyon Analizi

Tez çalışması kapsamında belirlenen genlerin sigara dumanına maruz kalma neticesinde metilasyon profillerinde yaşanan değişiklikler ile bu değişikliklerin kurkumin muamelesi ile geriye döndürülüp döndürülemeyeceğine ilişkin olarak, öncelikle RPMI-2650 hücre hatlarının toplam metilasyon ölçümlerinin yapılması uygun görülmüştür. Bu sebeple, toplam metilasyon ölçümü için Cayman Chemicals firmasına ait DNA Methylation ELISA Kit (Kat. No: 589324)'i aşağıda belirtilen protokol doğrultusunda kullanılmıştır.

- Deneye başlamadan önce, deneyde kullanılacak olan standart solüsyonlar hazırlanır. Kit içeriğinde gelen ELISA Buffer (10X), 90 mL ddH₂O kullanılarak seyreltilir.
- Kit içeriğinde gelen yıkama solüsyonu (400X), toplam hacim 2L olacak şekilde ddH₂O kullanılarak seyreltilir.
- Deneyde kullanılacak olan örnekler hücre kültüründen elde edilecek ise, hücre kültürü FBS'ten uzaklaştırılır ya da deney örnekleri PBS solüsyonu içerisinde hazırlanır. Hücre kültürü örnekleri ELISA solüsyonu ile 1:10 oranında seyreltilir.
- ELISA deneyi için kullanılacak 96-kuyucuklu plaka, kit içeriğinde gelen solüsyonlardan iki örnek "blank solüsyonu", iki örnek spesifik-olmayan bağlanma solüsyonu (NBS), iki örnek maksimum bağlanma solüsyonu (B₀) ve sekiz örnek standart solüsyonlar

kullanılarak dizayn edilir. Deneyde araştırılan örneklerden her biri üçer örnek olarak halinde tekrarlanarak kullanılır.

- Her bir kuyucuğa 50 µl örnek konulur ve kit içeriğindeki solüsyonların dışındaki her bir kuyucuğa, kit içeriğindeki 5-methyl-2'-deoxycytidine- AChE Tracer solüsyonundan 50 µl eklenir.
- Kit içeriğindeki solüsyonların dışındaki her bir kuyucuğa kit içeriğindeki 5-methyl-2'-deoxycytidine ELISA monoklonal antikordan 50 µl eklenir.
- 96-kuyucuklu ELISA plağı, 4°C'de 18 saat inkübasyona bırakılır.
- Kuyucuklar yıkama solüsyonu ile yıkanır ve her bir kuyucuğa kit içeriğindeki Ellman's t solüsyonundan 200 µl eklenir.
- Kit içeriğindeki solüsyonların bulunduğu kuyucuklardan toplam aktivite ölçümü için ayrılan kuyucuğa kit içeriğindeki "tracer" solüsyonundan 5 µl eklenir.
- ELISA plağı 90 dakika boyunca orbital karıştırıcıda ve karanlık ortamda inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyon sonra sonrası plakaların ölçümleri floresan okuyucuda 415 nm absorbans değerinde yapılır.
- Absorbans değerlerinin ng/mL cinsinden karşılığının hesaplanması, kit tarafından tarif edilen standart eğri kullanılarak yapılır ve grafik görünüm oluşturulur.

3.2.2.8 Bisülfid Dönüşüm Analizi

Tez çalışması için seçilen genlere ilişkin olarak, sigara dumanına maruz kalma sonucu ortaya çıkan metilasyon profile ve kurkumin muamelesi ile bu profilin geriye döndürülmesine yönelik araştırılan genler için, promotor bölgelerinden 800bp upstream sekans aralığına bulunan CpG adalarındaki metilasyonun tespit edilebilmesi adına, bu bölgelere ilişkin bisülfid dönüşüm analizi yapılmıştır. Bu deneyde Zymo Research firmasının EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Kat. No: D5030) adlı kiti, aşağıda belirtilen protokol doğrultusunda kullanılmıştır.

- Deney öncesinde, deneyde kullanılacak tampon ve yıkama solüsyonları hazırlanır. Kit içeriğinde bulunan M-Wash Buffer konsantresinden, 24 mL konsantreye 96 mL 100% etanol eklenerek yıkama solüsyonu hazırlanır.

- Deneý için izole edilen DNA örneðleri, 20 µl DNA örneðine kit içeriðinde bulunan Lightning Conversion Reagent solüsyonundan 130 µl eklenerek PCR tüplerinde hazırlanır.
- PCR tüpleri PCR cihazına alınarak, 8 dakika boyunca 98 °C’de, 60 dakika boyunca 54 °C’de inkübe edilir. Isıl işlemi tamamlanan örnekler 20 saate kadar 4 °C’de saklanabilir.
- DNA örneklerine kit içeriðinde saðlanan M-Binding Buffer solüsyonunda 600 µl eklenir ve solüsyon Zymo-Spin IC kolonlarına alınır.
- Örnekler 30 saniye boyunca 10.000 RPM’de santrifüj edilir. Süpernatant atılır.
- Kolonlara 100 µl M-Wash Buffer solüsyonu eklenir, örnekler 30 saniye boyunca 10.000 RPM’de santrifüj edilir.
- Kolonlara, kit içeriðinde saðlanan L-Desulphonation Buffer solüsyonundan 200 µl eklenir ve kolonlar oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakılır. Inkübasyon sonrası örnekler 30 saniye boyunca 10.000 RPM’de santrifüj edilir.
- Kolonlara 200 µl M-Wash Buffer solüsyonu eklenir, örnekler 30 saniye boyunca 10.000 RPM’de santrifüj edilir.
- Kolonlar 1.5 mL’lik tüplere alınır ve kit içeriðinde saðlanan M-Elution Buffer solüsyonundan kolonlara 10 µl eklenir. Örnekler 30 saniye boyunca 10.000 RPM’de santrifüj edilir ve DNA örnekleri elde edilir.

3.2.2.9 Bisülfid Dönüşüm Analizi için PCR Primerleri

Bisülfid dönüşümü tamamlanan genlerin devam eden aşamada PCR reaksiyonu ile çoðaltılmaları için kullanılacak olan primerler Çizelge 2.3’te belirtildiði gibidir.

Primerler (SEPP1)

- Forward: TTTTGTAAGTAGAGTAAATTTTGGAGTT
- Reverse: ATAACATCATTTAACATTACTCCTTACC

Amplicon Sequence

```
TTTTGTAAGTAGAGTAAATTTTGGAGTTGATTGTTATTAATTTAAAAGAAAGTAGTAAGTGTGTTATGTATAATATGGCGAAAAT  
ATTTTGATAATTATTAATTTATTTTTATTTTTTAGTTATTTAGAAATTTAGGATTTAATGGTATAGTCCGGGGCCGGGAGGAAGG  
GTTAAGCGTAAATAAGGTTTTAAAGTTCTTTTTTTTTTAAATTATAATAGCGAAAAATATTTGTTGACTTAGCCAATTATGTTCTT  
GTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAGAGAGAGACAAGTTTTTTTTTTTTGTTTTGTTTTGTAGTGATGAGCTGTTAGTTTACTTTT  
ATATAGTGTGATTTTGTAGAAAAGTTATTTGTTGTTATAAGTTATTTGGTTTTTGTGTTATAGATTTATACGCGATTGTTT  
TATGTTTATAATTTGAATTTATATGGATTTTATAGCATTATTGTTTTTTTTTGTAAATTAAGCAAATAGAAAAATACATTTTTAT  
TTGACGGAAATTAGATTTTATTTTATTGTTATTGAAGTCGATTTTTTGAAGATTATGTATTTTACAATTTTTGACGATCGAA  
TATAAAATTTTATAAATCTGAATATTATAAAAAATAAAAAATAAAGCTAGTAGTTGCGATATGAAAAGAGCTGCGAAATTTAACA  
TGTATAAATGAAATACCTAATTTTATTATTTTAGAAGACCGCTATTTTTTTTTTGTAACTTTGTAAGCTTCTATGTTTATTGTACC  
TCAAGTAAGGACTAATGTTAAATGATGTTAT
```

816 bp 8 CpG

Primerler (NCF2)

- Forward: TAGGATAGTGTATATGTAGTTAATGTTG
- Reverse: AACACATTCAATTAATTAACAAACATT

Amplicon Sequence

```
TAGGATAGTGTATATGTAGTTAATGTTGAAGTAAATTCGGGAGTGGGGTTTTGGACGGTATTGAAGGTATTTAGGGTTTTTTTT  
TAGTTTTTTTTGTTGTTGTTAGTATTTTTTATTTTAGAGGTTGATGGTTTTTATTAGGGATATGATTAGGTAGAAATTAGGAGGTT  
AAGAGAGTTGTTAGGAGATAGAGAGAAGATAGGTTGGAGCGTTTTTTTTTAGTAGGGTTGTTTACTGGTTTTAAGGTGTTTATT  
TTTTGGGTTAGATGAGTAGAATGGGTTTAGTTTTTTAAGATAATTTTTAGTGTGTAATGTATTAGGAAATGTTTTATTTTT  
TGTAATTGATTTATAATTTTATTATGAGAGAGAAAAGAAAGAAGTAGAGAGAGAGAGGGCGACTAGGGGTGGAGTGTGGA  
CGAGAGCGAAGTATATTAGTTGTTGTTGAAGGATTAGTTTTTAAATGTTTTGTTTTGTTATTAGTTTTTTTTTTTTTTTTTAT  
TTTTTTTTGTTGTTAGTTTTGTTTAAAGTTTTGTTTTAGAGTTAGCGTAATTTTGGTAGGTAGAGGATTTTTTGGTGATAATG  
ATAGGAGGTAGTTAAATGTTTACGTAGATAGGGGTAGGTTTTTGGTGAAATTTATTTTTAAGTTAAAAATAGTTTGAAGGTTGA  
AAGATTAGGTTATTGTTTTAAATGAAATTCCTGATTTAGAGTGAGAATTTTTGTTTTGTTTGTGTTTTTTTTTAATTAATTTATT  
TTGATTAAATGTTTTTAATTAATGAATGTTGTT
```

812 bp 6 CpG

Primerler (SFTPD)

- Forward: GGTAGTAGTTATAGTTTTAGAGGAGG
- Reverse: ATCACCCCTATATCACAATAAAAAAATA

Amplicon Sequence

```
GGTAGTAGTTATAGTTTTAGAGGAGGCGGTGTTCCGACGTTCCGGGGCGTTTAGCCGTTAGATCGGTAGTGGTTTTATGGCGT
ATTAGAATTTAAATTAGAGGTAGTTATACGGATATTGAGTCGTTTTTTTTGTTAGAGTTAGCCAGGTGTTCGTAGTCGAGAT
TTTTTTTTTTTACGTTTTTTTCGTTTTTTGTTTTTCGTTCCGCTTAGGTCGTTAGTTTCGTTTTATTTTTAGGAAGAGCCGTCG
GGCGTCGATTTTTTTGGGGCGCGTTTTGGACGTCCGGGGGGTTTTTTGGGTCGTTGTTGCGTTTTGGTTTTGTTTTTACT
TTTCGCGTTTCGTTTTCGTTTTTTGGTTTTTCGGGCGCGTTTGGCCGGGTAGGGCGGATATCGGTATTAAGTAGAGGAGTCGTAC
GCGTACGTATTGGGGTTCGGATTATTTTTAGTAGTAACGGAGGACTTAATGGGATCCGGGGCGGGCGGGGGCGTTCCGGG
TTATCCGGGGCGTTTTTCGTTTAGGTGTTAGTGGGTATTAGTTAGCGTTCCGGGCGGCTGTTCCGAAGGTTTTGGTAGT
TTCGCGTAGTCGTTTTCCGGCGGGGTCGTGGGAGCGTGTTTGGGGTTCGCGTAGCGTAGTTTTTTTTTAGTATGTCGAA
TAGTAGTAGCGTTTTATAGGTTTATAGGATTCGGTGTATAGTAGCGTTGAGGAAGGTGGCCGGTCCGTTTAGTCCGTGGC
GGGAGTTTCGTTATGTAATGTTGGTATTAGTATTTTTAGTTTTATTTTTGTCGTTATGTTTGGAGGTGTTGAGAAATATGTTG
TTTTTAAAGAGTTAGTTAATTATTTTTATTAAGTATGATAATTAGTTGTTTTGATTAGATATTTTTTTTTATTGTTGATATAGGGGT
```

AT

945 bp 85 CpG



Primerler (PTGS1)

- Forward: TTATTTGGGGTTTAAGAGATTTTTATTG
- Reverse: ACCAACTCACTATAAAAAATTCAAACAAA

Amplicon Sequence

```
TTATTTGGGGTTTAAGAGATTTTTATTGAGTAAATGAGGAAATCGAGGTTTAGTAGGTATTGATTTTTAAGTTTATAAAATAT
ATGGTGGGTTTAGGATTTGAATTTAGGTTTGTTCGTTTATATATTTCCGTAAGGTTTTTTATAGAAAGTTGTTTTATTATAATG
GATTCGGAGTATTTTCGTTTTATGGGGAGGTTGATGGGAAATTCGTTTTTTTTTTTTATGATGTTAGGTTTAGGTG
AAGGAATTTAGTTTTCGTTAGTTAATTTTTTTTTTAGTTCGTTGTTGTGTGTGCGTGTGTGAGTATGTTTTAGTTGG
ATATAGTTTTTTTATTATTAGTTGTGTAATAATTTTTAAATGAGGTTTAGAGAGGTTAGGAGGGACTAGAGGGAGTTCGATTT
TTTTGTTGATGTTTTAAGGATTTGTTGCGTGGGGAAAGAGGAAAGATATGATATGGATTTTGGATTAGATTAAGTTTTTGA
AACGGTTTTGGTGGTGGTATTTAGGGATTTAAAGAGAGGACGGAGGGTGTTTAGGAAAGGGATTCCGTTGAATAAAA
GTTTGGTTTATGGGAAGAGGAGGAGGAAGATTTATGTTAGTATTTAAAGTTTATAAAGGTTGTTGTTGATATTTATTTTT
TGGTGTTTTAAATAGTTTTGTTAGAGAGATCCGTTAGATTTAGTTTATAGAAGGGATTTGAGTTTAGAGGGAGTGAAGTTA
TTGTTTGAATTTTTATAGTGGT
```

800 bp 14 CpG

Primerler (CCL5)

- Forward: AGATTATTTGGTTAATATGGTGAAATT
- Reverse: CTCCCATATAAATCCTAATCTTAAC

Amplicon Sequence

```
AGATTATTTGGTTAATATGGTGAAATTTCGTTTTATTAAAAATATAAAATATTAGTAGGGTGTGGTGGCGGGTGTGGTAGT  
TTCGTTATTTCCGAGGTTGAGGTAGGAGAATGGTATGAATTCGGGAGACGGAGTTTGTAGTAAGTCGAGATCGTGCCTGTAT  
TTTAGTTGGCGATAGAGCGAAGATTTTATTTAAAAAAGATGTGTTAAAATTAGTATAATGTT  
GATTTATAGTAATTATTAATTAGTTTTATTATTTTTTTGTTTTTATTGTTTTTAAATGATTTATTTAATAAAGTTATATAT  
TTTTATAAGTTAATTTTTTATATTTATGAAATGAGAGAGAATATGGTTGTTTTAGGGTTTAGGAAGTTTAGTTAGTTAAATTT  
TTAGAAATTTGTTGTTGATAGGTATGAGTTAGACGTGTTTTAAAGTTAGTGTGACTTATTTATGATTATTAATTTTTAATATGA  
GTTTTATTTAGTGAATATTTGTAGTTTTGAGGGTGTAGATTTAAAGATAGAAAAATTGATTAGGAGATTTTGTATGAAGTA  
GTATAGAGATTTTTAAGGATAATAGGATATATGGTAAGATAATTTATAAGAATGAAATAATGGGGTTTAGATAGTATTTATCT  
TATAGTTGAAAAGAGGGTAAGGTGTGGGATAGTTATTGGGATGGGGTAGCTATTTAGGTAGAGTTGATTTAGGGGTTGTGG  
TCGTTAAGATTAGGATTTATATGGGGAG
```

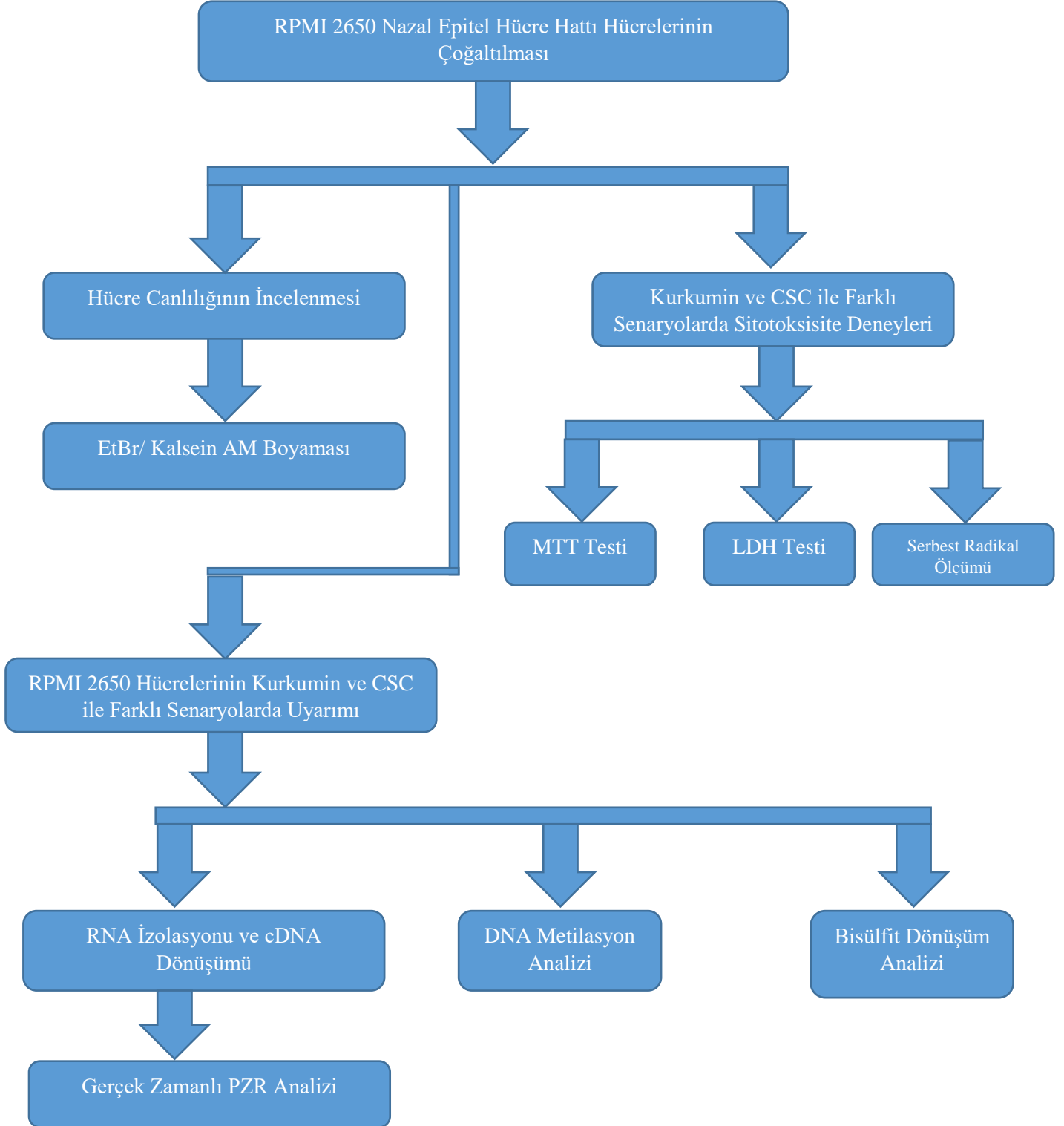
806 bp 12 CpG

Şekil 2. 6: SEPP1, NCF2, SFTPD, PTGS1 ve CCL5 genlerine ilişkin bisülfid dönüşüm sonrası PCR primerleri

3.2.2.10 İstatistiksel Analiz

Tez çalışmasında yapılan istatistiksel analizlerin tamamı GraphPad Prism 7 programı kullanılarak oluşturulmuştur. Tekrarlı ölçüm barındıran verilerin analizinde standart sapma değerleri ortalama olacak şekilde ile belirtilmiştir. Farklı gruplara ait verilerin karşılaştırılmasına ilişkin istatistiksel analizlerde tek yönlü ANOVA ve Dunnett's post hoc testi kullanılmıştır.

Tez çalışmasında kullanılan deneysel yöntemler ve yapılan analizlere ait iş akış şeması Şekil 2.7’de görsel olarak gösterildiği şekilde uygulanmıştır.



Şekil 2. 7: Tez çalışmasında kullanılan deney sistemlerine ait iş akış şeması

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

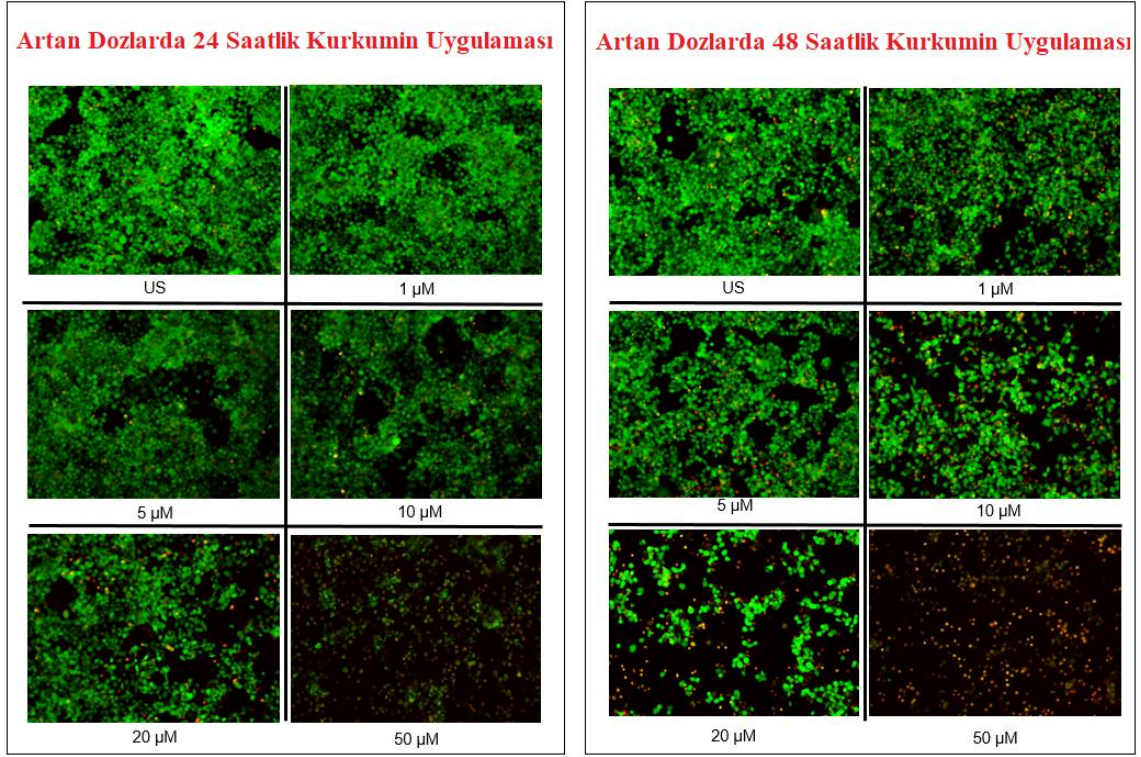
Yapılan çalışmada RPMI-2650 nazal epitel hücreleri kurkumin ile uyarılmış ve uygun dozun belirlenmesine yönelik olarak canlılık ve sitotoksosite deneyleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmaların ilerleyen safhalarında CSC ile uyarıma bağlı olarak oksidatif stres ve DNA metilasyon profili çıkarılmıştır. Kurkuminin antioksidan özelliği ve DNA metilasyonunda meydana getireceği farklılığın tespiti için hücreler kontrol amaçlı sadece kurkumin ile uyarılmıştır. CSC nedeniyle meydana gelen oksidatif stres durumunu ve DNA’da meydana gelen metilasyon üzerindeki etkisinin kurkuminden nasıl etkilendiği de CSC sonrası kurkumin uyarımı yapılan hücreler üzerinde araştırılmıştır.

4.1 RPMI Nazal Epitel Hücrelerde Kurkumin Uyarımının Canlılığa ve Sitotoksositeye Etkisi

RPMI-2650 hücrelerinde kurkumin uyarımı ile hücre canlılığı ve sitotoksitesinin test edilmesi, bu hücrelerin büyütüldüğü besiyerlerine artan konsantrasyonlarda kurkumin eklenerek yapılmıştır. Kurkumin uyarımı sonrası hücre canlılığı EtBr/ Kalsein AM floresan boyama ile incelenmiş olup, hücre sitotoksitesi ise MTT testi ile ölçülmüştür.

4.1.1 Kurkumin Uyarımı Sonucu Canlı/Ölü Hücrelerin Floresan Mikroskopunda Görüntülenmesi

Kurkumin ile artan dozlarda uyarılan RPMI-2650 nazal epitel hücreleri 24 saat ve 48 saat süren iki farklı uyarım süresi sonunda EtBr/ Kalsein AM floresan boyama ile görüntülenmiştir. Bu uyarım deneylerinin sonucu Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

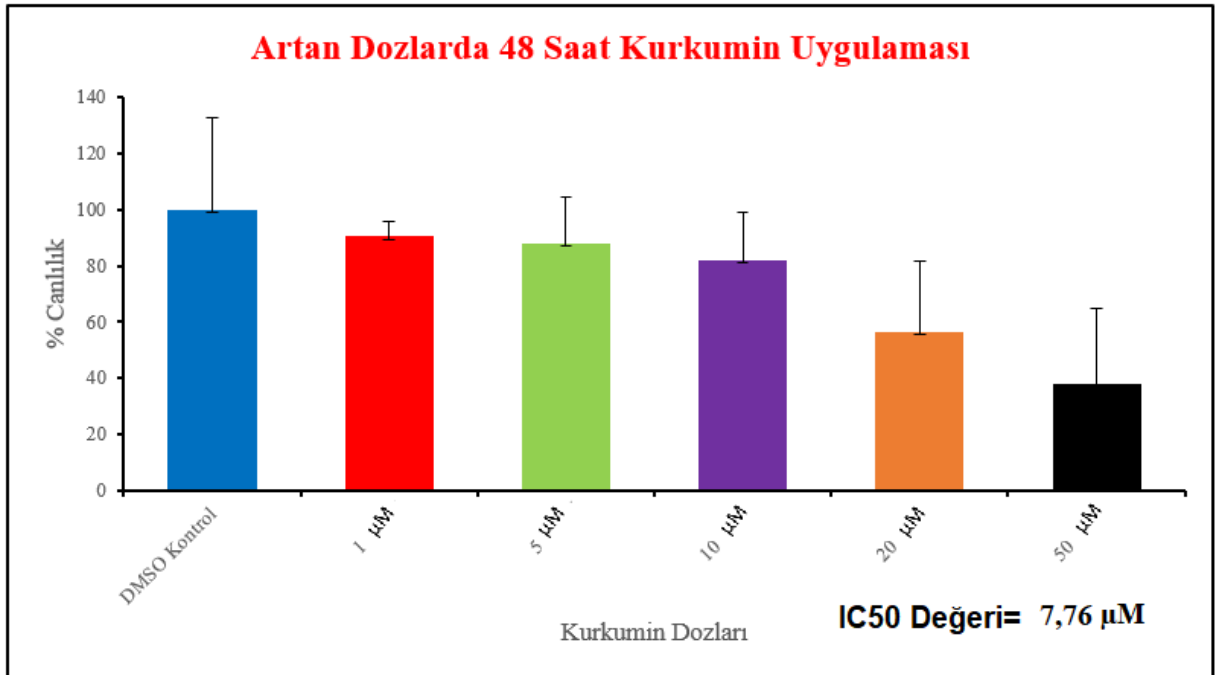
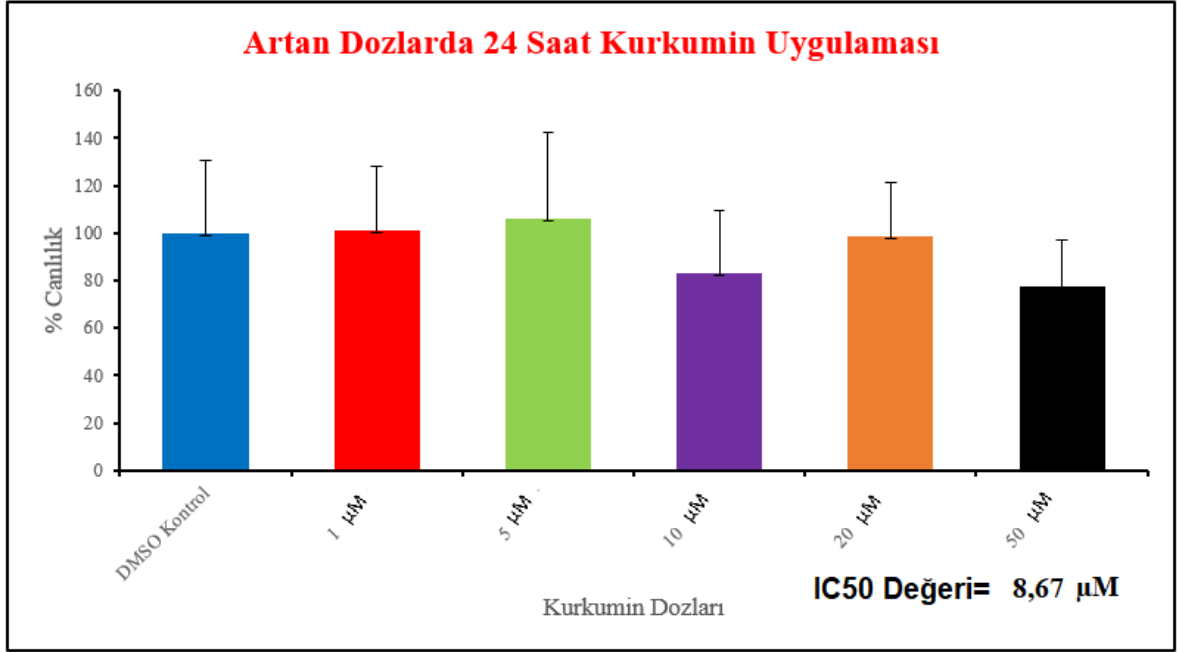


Şekil 4.1: Kurkumin ile 24 saat (sol) ve 48 saat (sağ) uyarılmış RPMI 2650 hücrelerinin uyarılmamış, 1 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM ve 50 μM konsantrasyonlarındaki uyarılma koşullarındaki sonuç. Yeşil renk canlı hücreleri kırmızı renk ölü hücreleri göstermektedir.

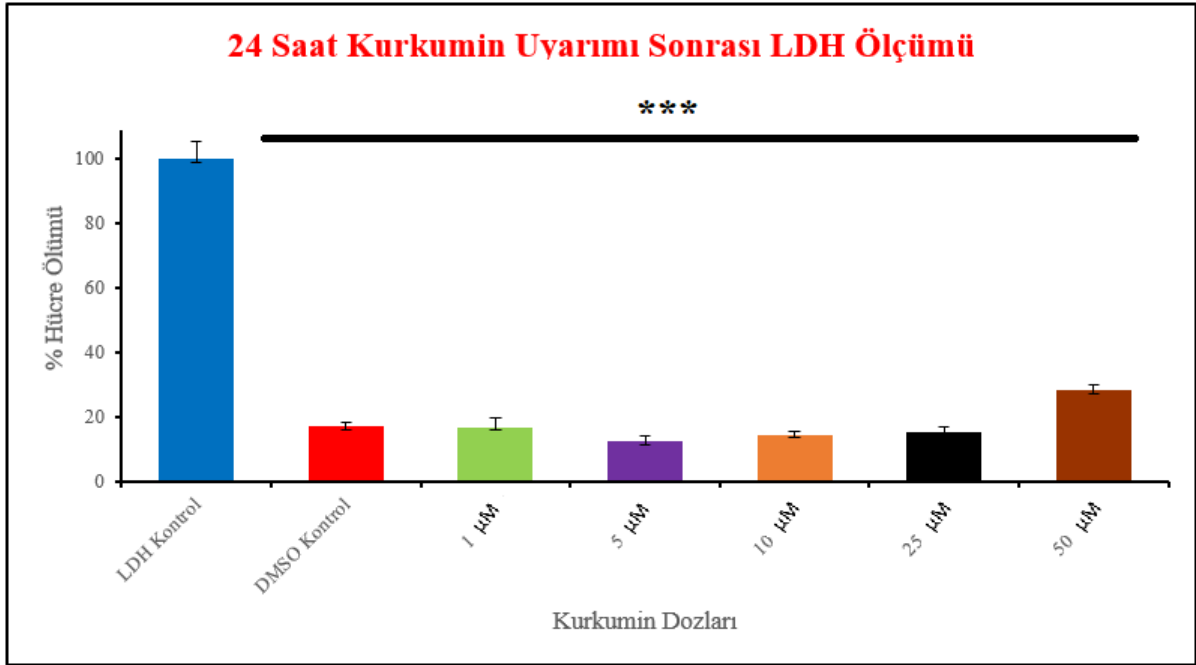
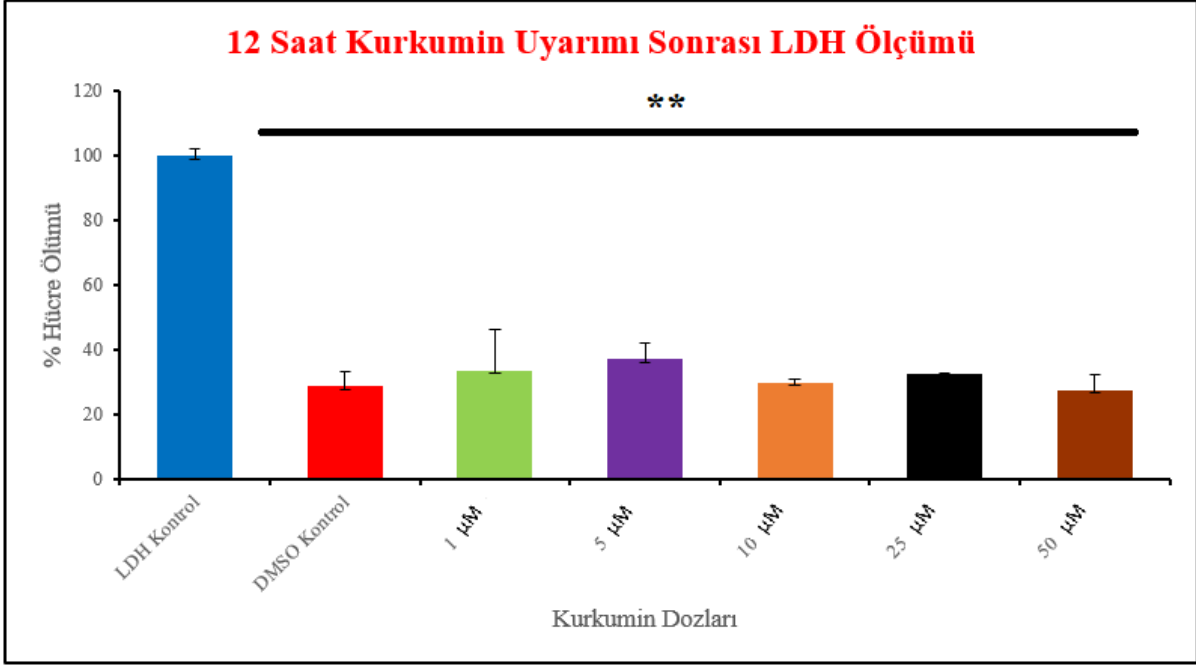
Kurkuminin zamana ve doza bağlı olarak RPMI-2650 hücreleri üzerindeki etkisi karşılaştırıldığında, doza ve zamana bağlı olarak hücre ölümü gözlenmiştir. Kurkumin molekülü uyarımı sonrası artan konsantrasyon ve uyarılma zamanına bağlı olarak ölü hücre sayısında artış gözlenmesi kurkuminin belirli bir doz üstünde ve uyarı zamanından sonra toksik etki yarattığına göstermektedir.

4.1.2 Kurkumin Uyarımı Sonucu Sitotoksisite Değerlerinin Ölçümü

RPMI-2650 hücrelerinin kurkumin ile uyarılması sonrasında sitotoksisite değerlerinin ölçülmesi için MTT ve LDH testleri kullanılmıştır. Canlı/ölü hücre ayırımı anlamak adına kullanılan farklı konsantrasyon ve uyarım zamanı yöntemi, MTT ve LDH testlerinde de uygulanmıştır. Kurkuminin artan konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat uyarılan RPMI-2650 hücrelerinin MTT ve LDH testlerinin sonuçları Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te gösterildiği gibidir.



Şekil 4.2: RPMI-2650 hücrelerinin artan kurkumin konsantrasyonlarında 24 saat ve 48 saat uyarım süreleri sonucunda elde edilen MTT testi sonuçları



Şekil 4.3: RPMI-2650 hücrelerinin artan kurkumin konsantrasyonu altında 12 saat ve 24 süreyle uyarılmaları sonucunda elde edilen LDH testi sonuçları (12 saat uyarım: n=27, **P<0.01, 24 saat uyarım: n=27, ***P<0.0005,)

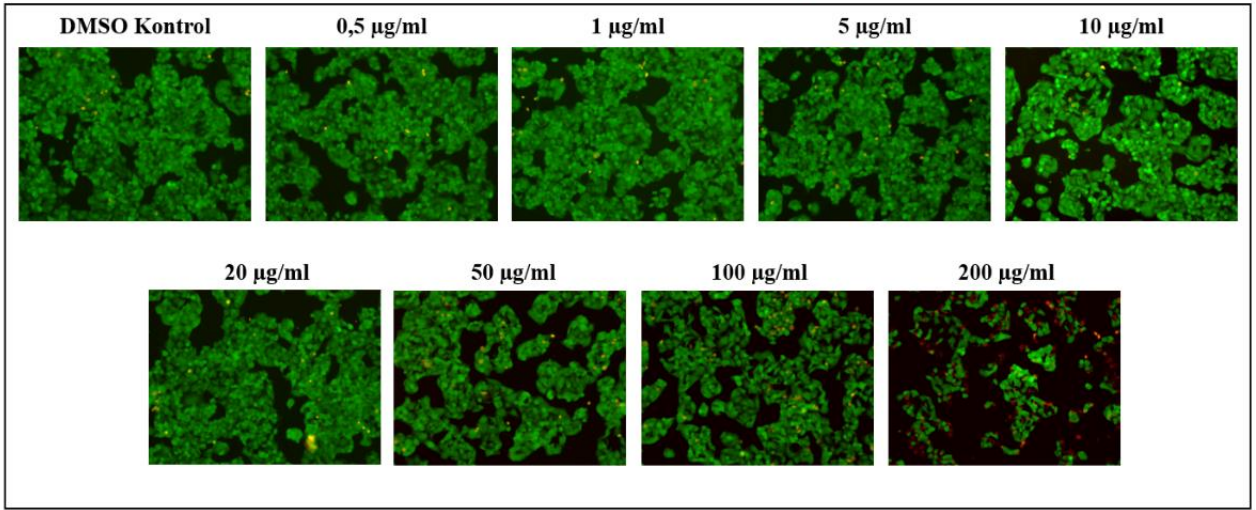
MTT ve LDH sitotoksosite testleri sonuçlarının hücre canlılık testi sonuçları ile örtüştüğü görülmektedir. LDH testi sonuçlarında 48 saatlik kurkumin uyarımı yapılan deneylerde sapma oranının daha yüksek olmasıyla birlikte, genel olarak MTT ve LDH testleri artan kurkumin

konsantrasyonlarına ek olarak ilerleyen uyarım zamanı ile RPMI-2650 hücrelerinde ölü hücre sayısının ve sitotoksitenin arttığı gözlemlenmiştir. MTT testinde elde edilen verilerle hesaplanan IC₅₀ değerleri 24 saatlik uyarım için 8,67 µM, 48 saatlik uyarım 7,76 µM olarak tespit edilmiştir. Bu nedenle, devam edilecek olan deneylerde hücre canlılığının %50'den fazla etkilenmediği en yüksek konsantrasyon olan 5 µM kurkumin ile 24 saatlik uyarım yapılmasına karar verilmiştir.

4.1.3 Sigara Dumani Kondensanı (CSC) Uyarımı Sonucu Canlı/Ölü Hücrelerin Floresan Mikroskopunda Görüntülenmesi

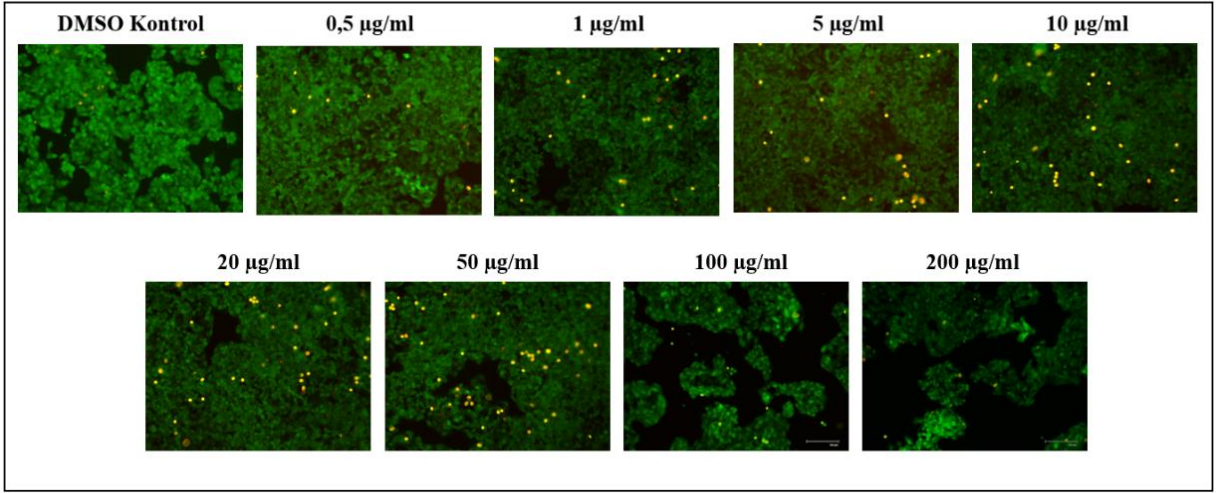
RPMI-2650 hücrelerinde yaşanan oksidatif stres ve metilasyon profili değişikliklerini araştırabilmek için hücrelerde, artan CSC konsantrasyonları ve farklı uyarım zamanları ile canlılık testi gerçekleştirilmiştir. Uyarım için 8 farklı CSC konsantrasyonu (0.5, 1, 5, 10, 20, 50, 100 ve 200 µM) seçilmiştir. Uyarım süresi olarak 5 farklı süre (3, 6, 12, 24 ve 48 saat) hücrelerin CSC uyarımı gerçekleştirilmiştir. Uyarım süreleri sonunda farklı dozlarda CSC ile uyarılan hücrelerin canlılıkları EtBr/ Kalsein AM floresan boyama ile görüntülenmiştir. Bu uyarım deneylerinin sonucu Şekil 4.4'ten Şekil 4.9'a kadar gösterildiği gibidir.

3 Saat CSC Uyarımı EtBr/Kalsein AM Boyaması



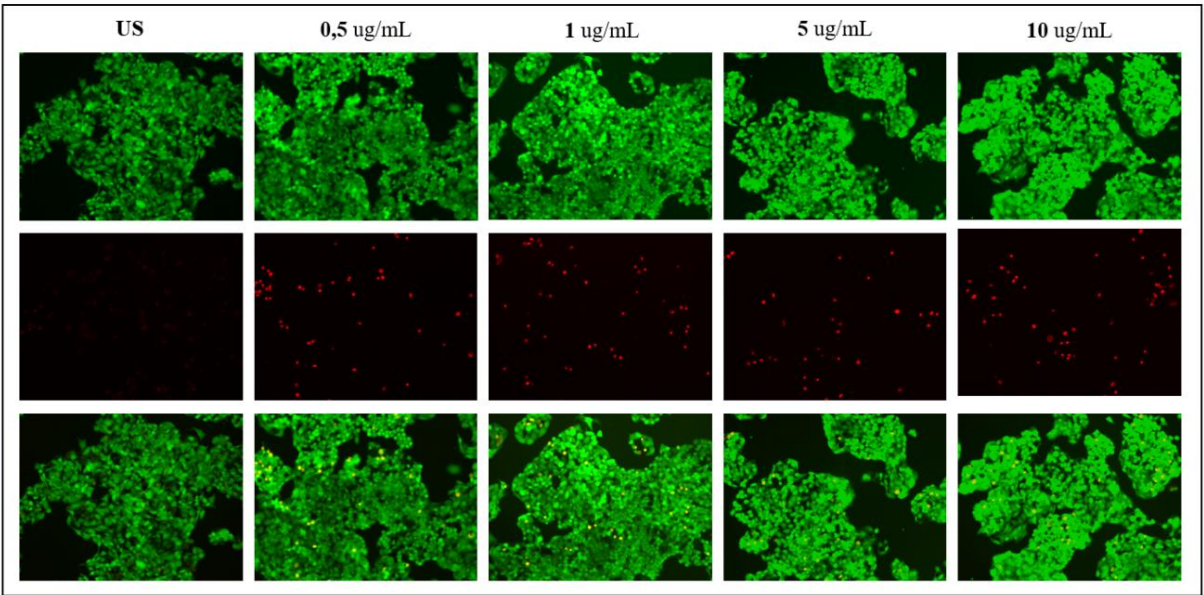
Şekil 4.4: RPMI-2650 hücrelerinin artan 0,5 µg/mL ile 200 µg/mL arasında kademeli artan CSC konsantrasyonlarıyla 3 saatlik uyarılması koşullarındaki sonuç. Yeşil renk canlı hücreleri kırmızı renk ölü hücreleri göstermektedir.

6 Saat CSC Uyarımı EtBr/Kalsein AM Boyaması



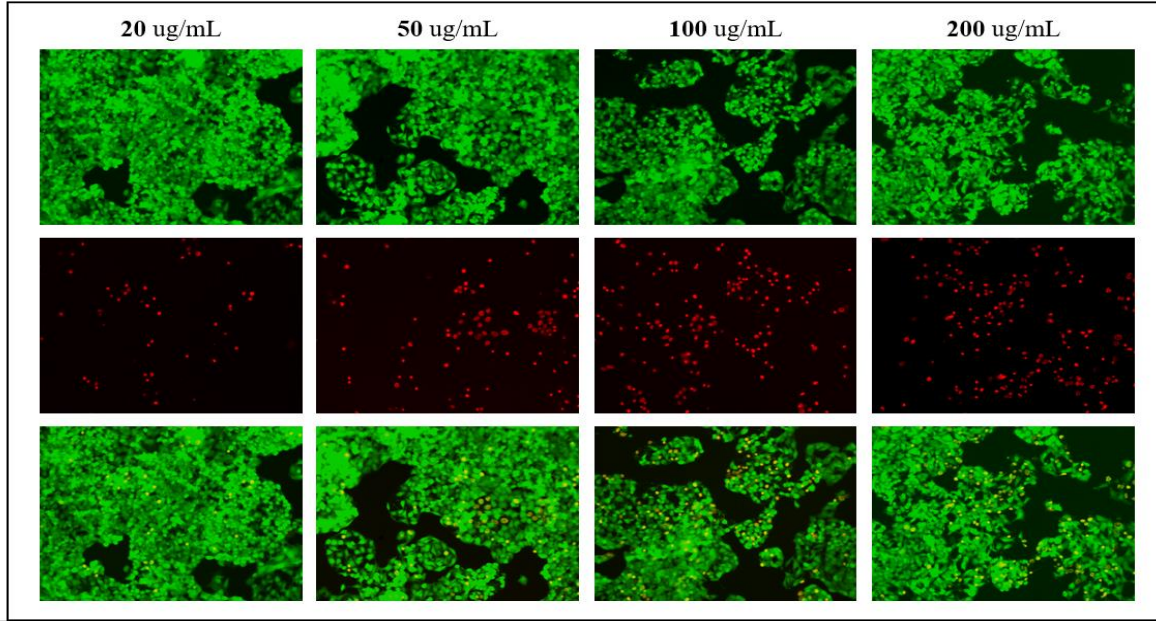
Şekil 4.5: RPMI-2650 hücrelerinin artan 0,5 µg/mL ile 200 µg/mL arasında kademeli artan CSC konsantrasyonlarıyla 6 saatlik uyarılması koşullarındaki sonuç. Yeşil renk canlı hücreleri kırmızı renk ölü hücreleri göstermektedir.

12 Saat CSC Uyarımı EtBr/Kalsein AM Boyaması



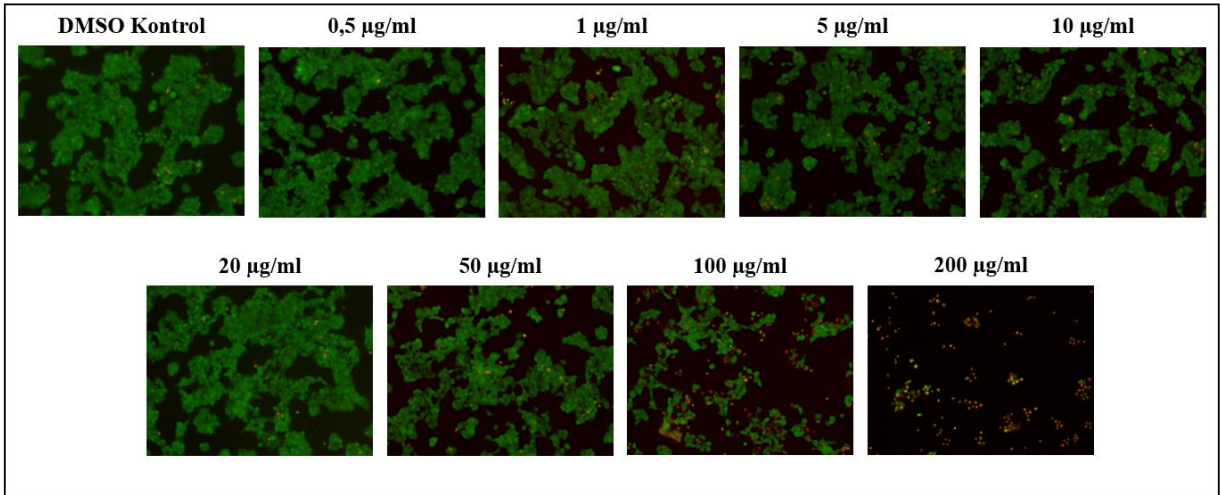
Şekil 4.6: RPMI-2650 hücrelerinin artan 0,5 µg/mL ile 10 µg/mL arasında kademeli artan CSC konsantrasyonlarıyla 12 saatlik uyarılması koşullarındaki sonuç. Yeşil renk canlı hücreleri kırmızı renk ölü hücreleri göstermektedir.

12 Saat CSC Uyarımı EtBr/Kalsein AM Boyaması

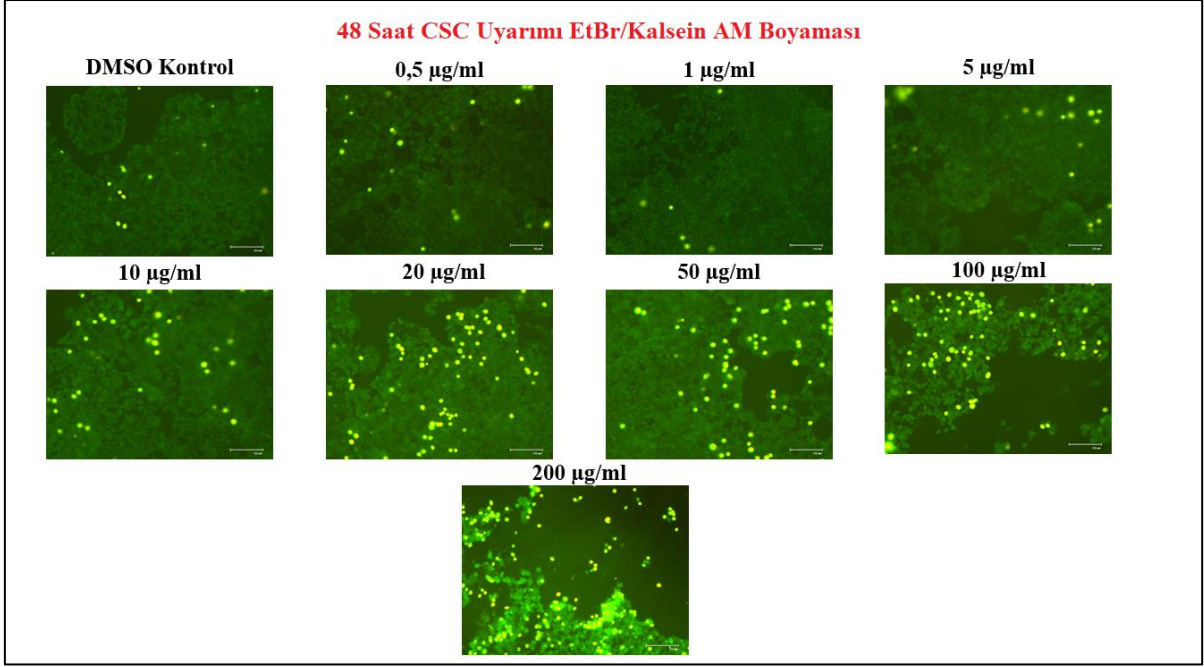


Şekil 4.7: RPMI-2650 hücrelerinin artan 20 $\mu\text{g/mL}$ ile 200 $\mu\text{g/mL}$ arasında kademeli artan CSC konsantrasyonlarıyla 12 saatlik uyarılması koşullarındaki sonuç. Yeşil renk canlı hücreleri kırmızı renk ölü hücreleri göstermektedir.

24 Saat CSC Uyarımı EtBr/Kalsein AM Boyaması



Şekil 4.8: RPMI-2650 hücrelerinin artan 0,5 $\mu\text{g/mL}$ ile 200 $\mu\text{g/mL}$ arasında kademeli artan CSC konsantrasyonlarıyla 24 saatlik uyarılması koşullarındaki sonuç. Yeşil renk canlı hücreleri kırmızı renk ölü hücreleri göstermektedir.



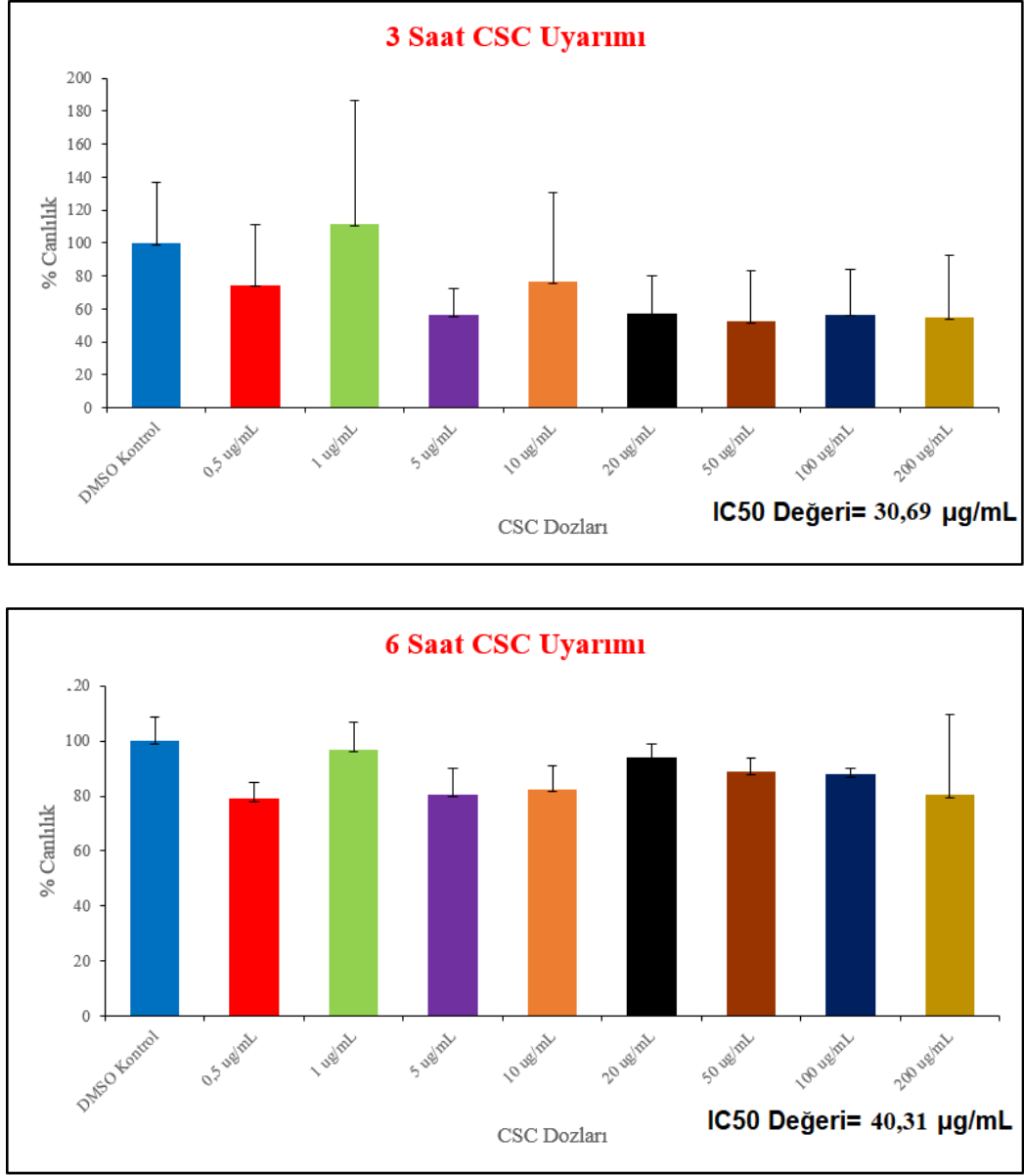
Şekil 4.9: RPMI-2650 hücrelerinin artan 0,5 µg/mL ile 200 µg/mL arasında kademeli artan CSC konsantrasyonlarıyla 48 saatlik uyarılması koşullarındaki sonuç. Yeşil renk canlı hücreleri kırmızı renk ölü hücreleri göstermektedir.

RPMI-2650 hücreleri ile yapılan EtBr/Kalsein AM boyaması sonuçlarına bakıldığında artan CSC konsantrasyonu ve uyarım süresinin ölü hücre sayısı ile doğru orantılı olduğu görülmüştür. CSC'nin sahip olduğu toksik etki nedeniyle hücre ölümlerinin gözlemlendiği sonucuna ulaşılmıştır. Literatürde var olan çalışmalarda, adrenokarsinomik insan alveolar bazal epitel hücresi olan A549 hücrelerinin de artan konsantrasyonda CSC uyarımı sonrasında hücre canlılığını büyük oranda yitirdiği, özellikle 24 saati ve besiyerinde %10'un üzerindeki konsantrasyonları aşan CSC uyarımlarında hücre ölüm oranının %50'yi geçtiği görülmektedir [78]. Benzer şekilde normal insan bronş epitel hücrelerinin CSC ile uyarılması sonucu konsantrasyon ve uyarım süresinin hücre ölümünü belirleyen bir faktör olduğu görülmüş olup, bu çalışmada kullanılan hücrelerin sağlıklı doku hücresi olması nedeniyle çok daha düşük CSC konsantrasyonlarında (1 µg/mL) ve %50 hücre ölümü yaşandığı görülmüştür [79].

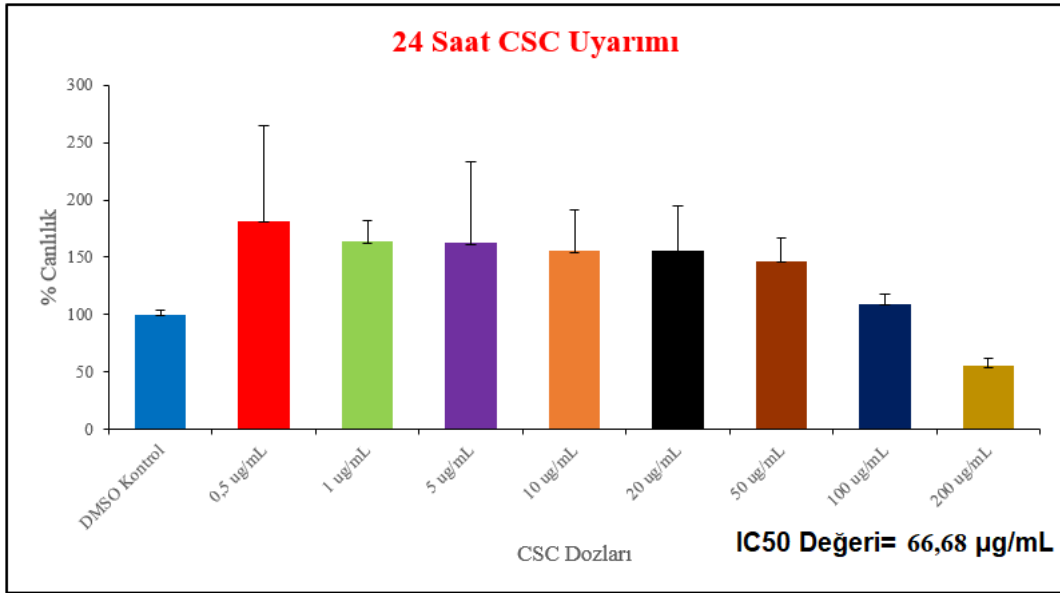
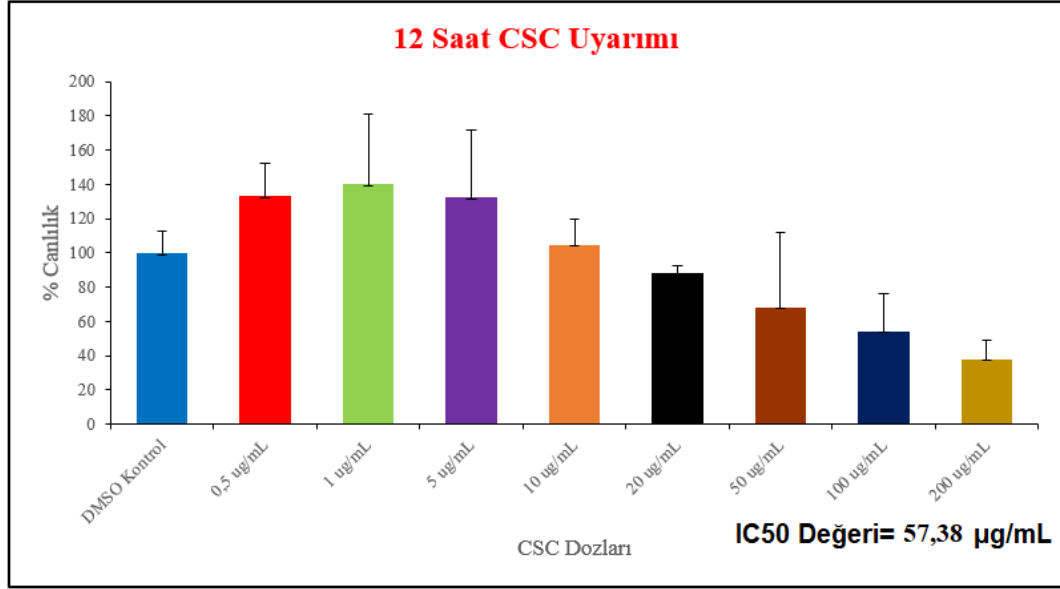
4.1.4 CSC Uyarımı Sonucu Sitotoksosite Değerlerinin Ölçümü

RPMI-2650 hücrelerinin CSC uyarımı neticesinde sitotoksosite değerlerinin ölçülmesi için MTT ve LDH testleri kullanılmıştır. Canlı/ölü hücre boyama deneyi için kullanılan süre ve dozlar MTT ve LDH testlerinde de uygulanmıştır. Artan konsantrasyonlar ve artan uyarı zamanları ile

CSC ile muamele edilen RPMI 2650 hücrelerinin MTT ve LDH testlerinin sonuçları Şekil 4.10-15'te gösterilmiştir.



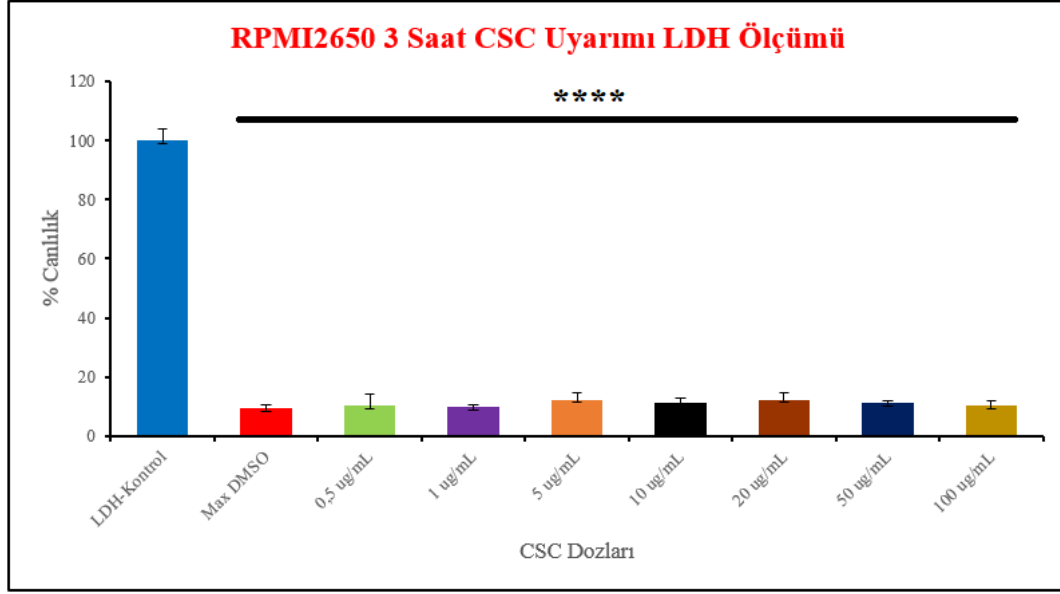
Şekil 4.10: RPMI 2650 hücrelerinin 0,5 µg/mL ile 200 µg/mL arasında artan CSC konsantrasyonlarıyla 3 saat ve 6 saat uyarılması koşullarında elde edilen MTT testi sonuçları



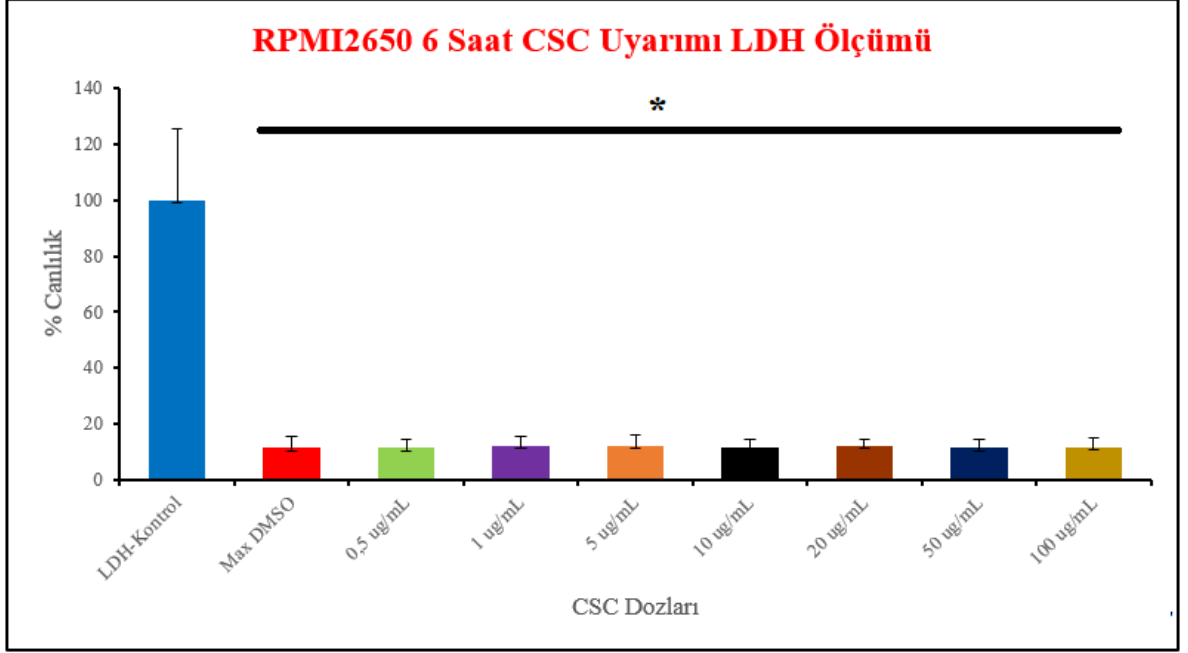
Şekil 4.11: RPMI 2650 hücrelerinin 0,5 µg/mL ile 200 µg/mL arasında artan CSC konsantrasyonlarıyla 12 saat ve 24 saat uyarılması koşullarında elde edilen MTT testi sonuçları

CSC uyarımına maruz bırakılan RPMI-2650 hücrelerinin üzerinde sitotoksiteyi etkileyen koşulun CSC konsantrasyonu olduğu görülmüştür. 3, 6 ve 24 saatlik CSC uyarımları sonucunda elde edilen sitotoksite değerleri artan CSC konsantrasyonu ile orantılı bulunmamıştır. 12 saatlik CSC uyarımı sonucunda ise elde edilen sitotoksite artışı, CSC konsantrasyonu ile benzer oranda elde edilmiştir. CSC konsantrasyonu ve uyarım zamanın beraber ölçüldüğü literatürdeki çalışmalarda, genel olarak konsantrasyon ve uyarım süresi

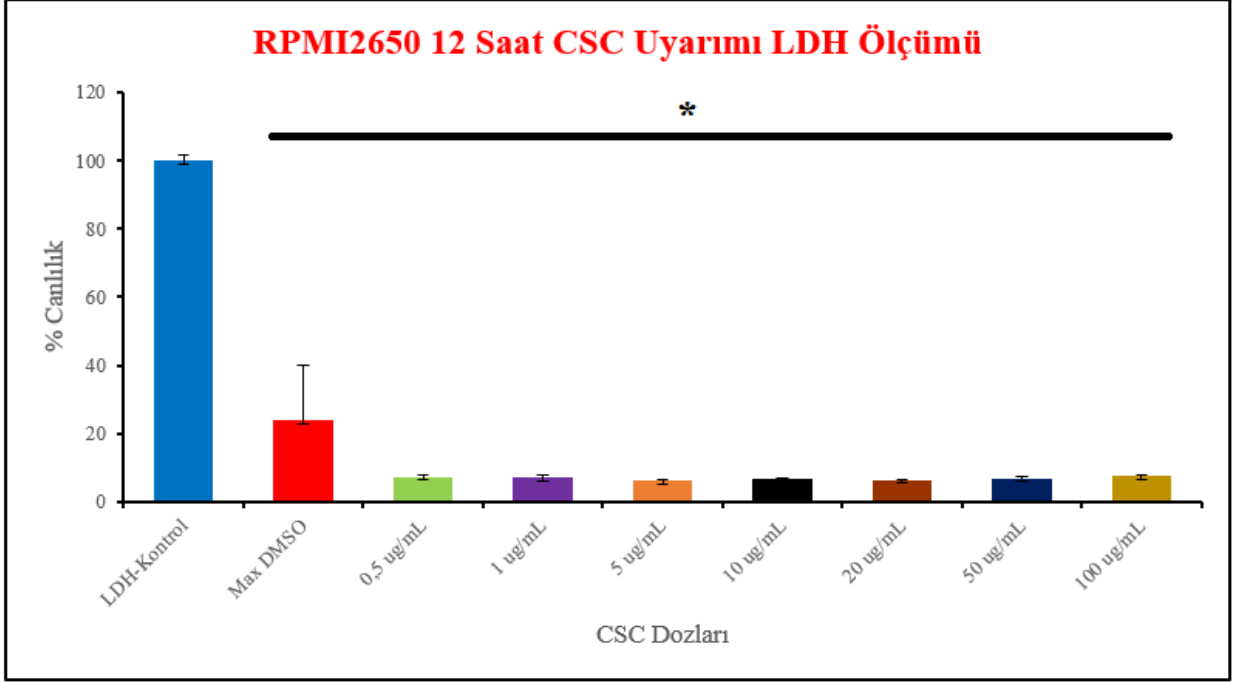
arasında bir paralellik olduğu gösterilmekte olup [78], tez çalışmasında bu paralellik 12 saatlik uyarım deneyinde gösterilebilmiştir. MTT testinde elde edilen verilerle hesaplanan IC50 değerleri CSC'nin 30 ila 70 µg/mL konsantrasyon aralığında canlılığı %50 oranında azalttığı görülmüştür. Bu nedenle CSC uyarımlarında 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlar kullanılmıştır. ortalama olarak tespit edilmiştir.



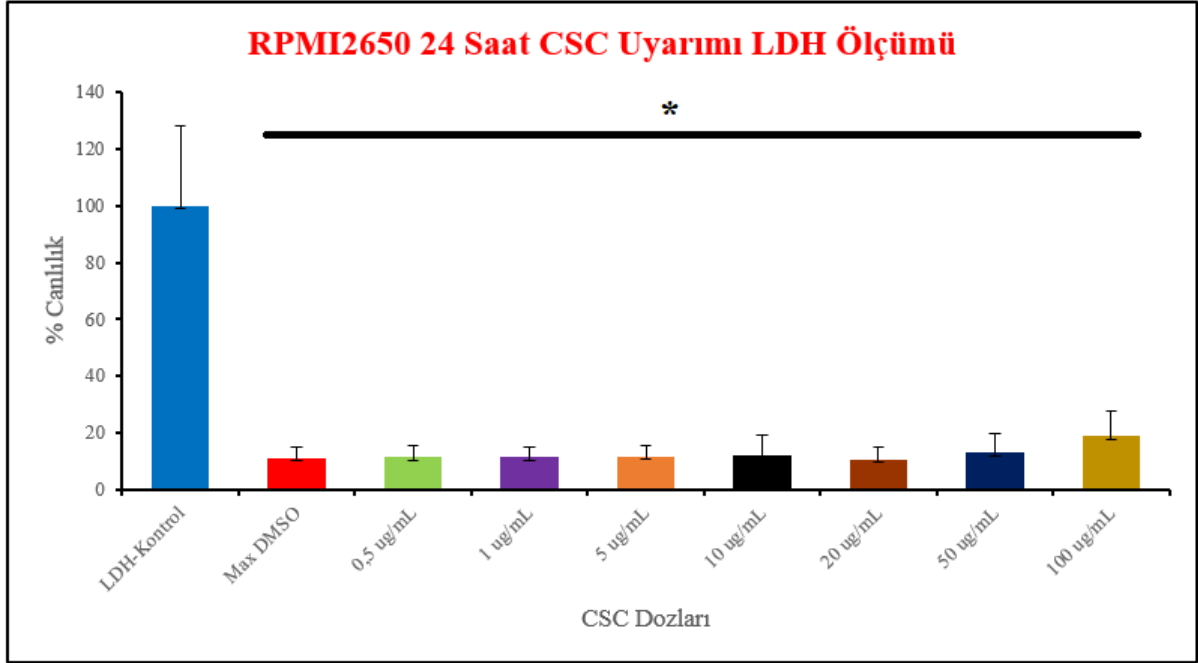
Şekil 4.12: RPMI-2650 hücrelerinin 0,5 µg/mL ile 200 µg/mL arasında kademeli artan CSC konsantrasyonlarıyla 3 saat uyarılması sonucunda elde edilen LDH ölçüm grafiği (n=30, ****P<0.0001)



Şekil 4.13: RPMI-2650 hücrelerinin 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ile 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arasında kademeli artan CSC konsantrasyonlarıyla 6 saat uyarılması sonucunda elde edilen LDH ölçüm grafiği (n=30, *P<0.05)



Şekil 4.14: RPMI-2650 hücrelerinin 0,5 µg/mL ile 200 µg/mL arasında kademeli artan CSC konsantrasyonlarıyla 12 saat uyarılması sonucunda elde edilen LDH ölçüm grafiği (n=30, *P<0.05)



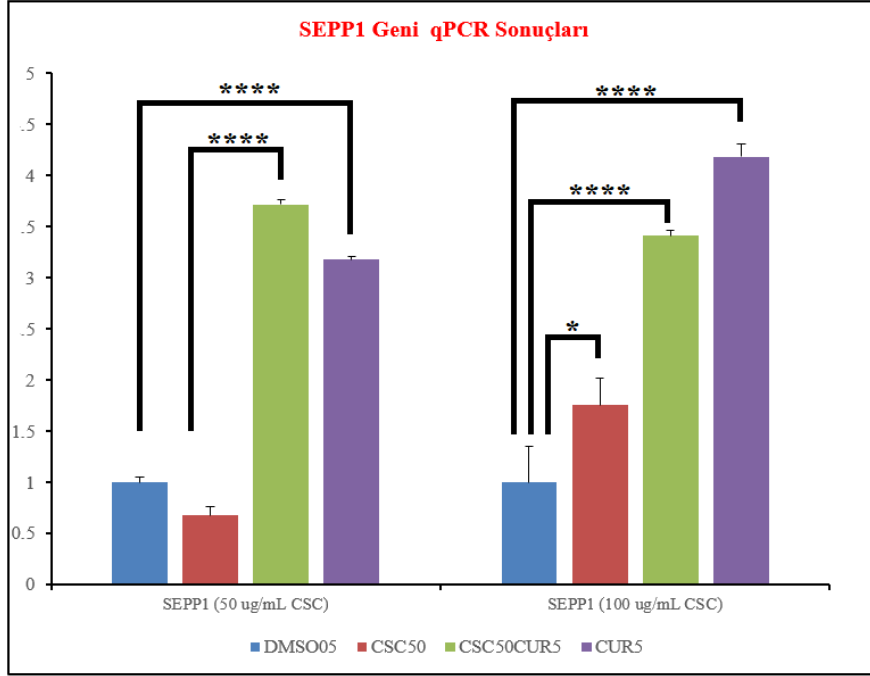
Şekil 4.15: RPMI-2650 hücrelerinin 0,5 µg/mL ile 200 µg/mL arasında kademeli artan CSC konsantrasyonlarıyla 24 saat uyarılması sonucunda elde edilen LDH ölçüm grafiği (n=30, *P<0.05)

LDH testi sonuçları, artan CSC konsantrasyonları ile hücrelerde sitotoksitenin ve ardından buna bağlı hücre ölümünün gerçekleştiğini göstermektedir. Ancak artan konsantrasyonlar ile hücre ölümünün başladığının tespit edilmesi 200 µg/mL konsantrasyonla 12 saat uyarılan hücrelerde gözlemlenmiştir. 24 saat sonunda 50 µg/ml ve üstündeki konsantrasyonunda CSC'nin sahip olduğu toksik etki daha belirgin olarak görülmektedir. Öte yandan, farklı sigara markalarından üretilen birkaç çeşit CSC ile normal insan bronş epitel hücrelerinin uyarıldığı literatür çalışmaları, 150 µg/mL CSC konsantrasyonu ile 3 saat uyarılan hücrelerin %50 oranında öldüğünü göstermektedir [80].

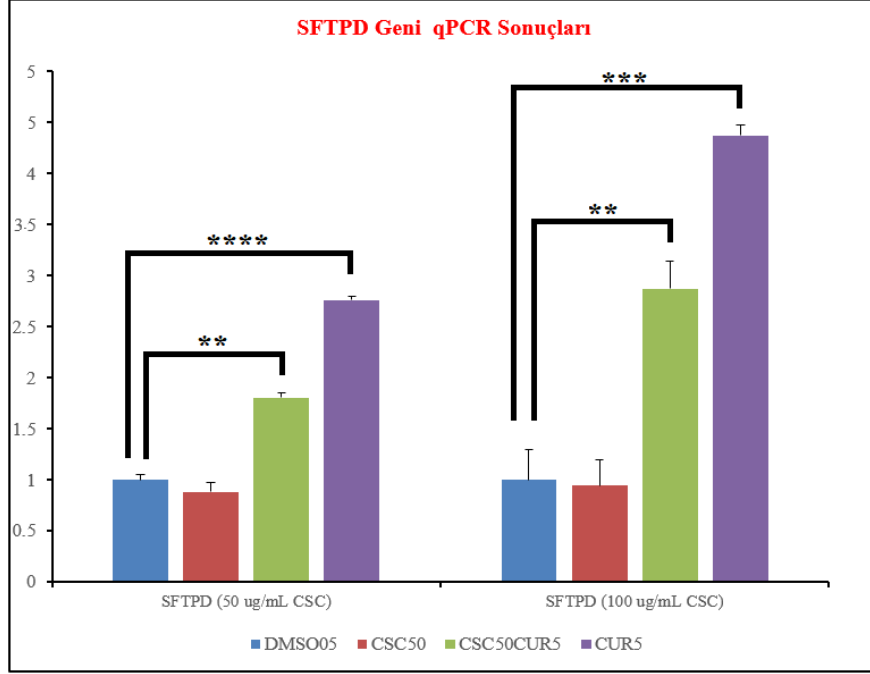
4.2 Kurkumin ve CSC ile Uyarılan Nazal Epitel Hücrelerin Gerçek Zamanlı

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) Sonuçları

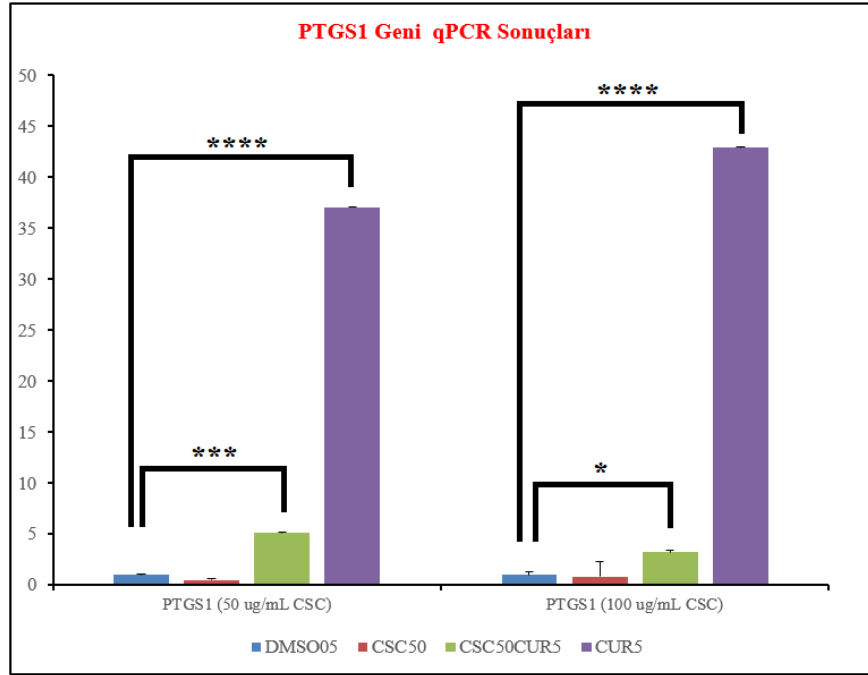
RPMI-2650 hücrelerinde, belirlenen SEPP1, SFTPD, PTGS2, NCF2 ve CCL5 genlerinin ifadelerinin araştırılması için gerçek zamanlı polimeraz zincire reaksiyonu uygulanmıştır. Bu sayede uyarılmamış, sadece kurkumin ile uyarılmış, sadece CSC ile uyarılmış, önce kurkumin ile sonra CSC ile uyarılmış 4 farklı koşuldaki hücrelerin gen ifadesindeki değişiklikler gözlemlenmiştir. Reaksiyonun sonuçları Şekil 4.15-19'da gösterilmiştir.



Şekil 4.16: SEPP1 geninin qPCR sonuçları. Yeşil renkli sütun 24 saat boyunca 5 μ M kurkumin muamelesi ile birlikte 50 μ g/mL ve 100 μ g/mL konsantrasyonlarındaki CSC ile uyarımı (n=32, ****P<0.0001, *P<0.05)

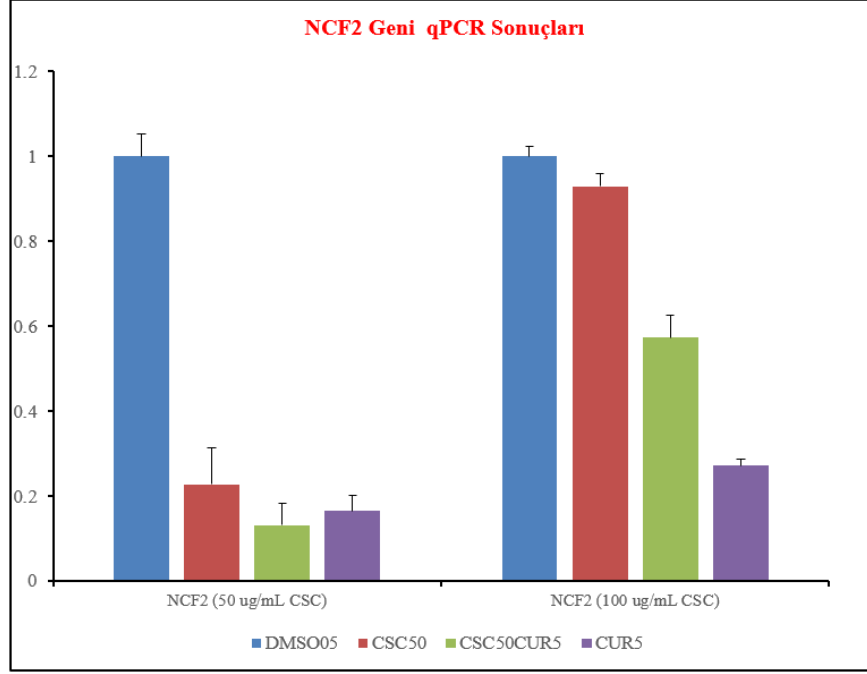


Şekil 4.17: SFTPD geninin qPCR sonuçları. Yeşil renkli sütun 24 saat boyunca 5 μ M kurkumin muamelesi ile birlikte 50 μ g/mL ve 100 μ g/mL konsantrasyonlarındaki CSC ile uyarımı (n=32, ****P<0.0001, **P<0.01)

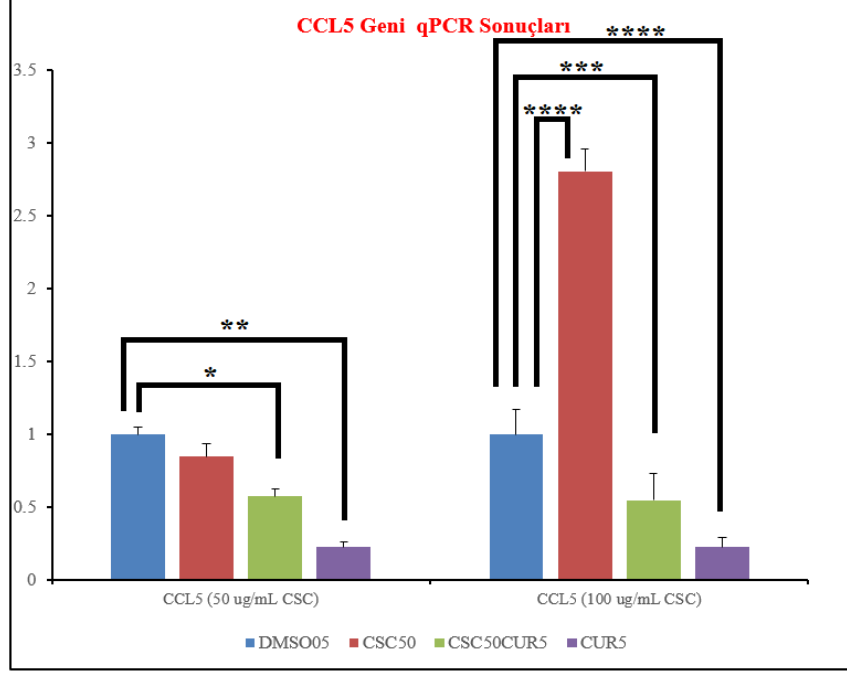


Şekil 4.18: SFTPD geninin qPCR sonuçları. Yeşil renkli sütun 24 saat boyunca 5 μ M kurkumin muamelesi ile birlikte 50 μ g/mL ve 100 μ g/mL

konsantrasyonlarındaki CSC ile uyarımı (n=32, ****P<0.0001, ***P<0.0005, **P<0.01)



Şekil 4.19: NCF2 geninin qPCR sonuçları. Yeşil renkli sütun 24 saat boyunca 5 μ M kurkumin muamelesi ile birlikte 50 μ g/mL ve 100 μ g/mL konsantrasyonlarındaki CSC ile uyarımı



Şekil 4.20: CCL5 geninin qPCR sonuçları. Yeşil renkli sütun 24 saat boyunca 5 μ M kurkumin muamelesi ile birlikte 50 μ g/mL ve 100 μ g/mL konsantrasyonlarındaki CSC ile uyarım (n=32, ****P<0.0001, ***P<0.0005, **P<0.01, *P<0.05,)

qPCR sonuçları incelendiğinde, sadece kurkumin uyarımı yapılan hücrelerde SEPP1, SFTPD ve PTGS1 genlerinin ifadesinin arttığı görülmüştür. Sadece CSC ile yapılan uyarım sonrasında aynı genlerin ifadelerinde uyarılmamış hücrelere göre azalma görülmüştür. Bu azalmanın sigara dumanına maruz kalmaya bağlı olarak epigenetik etki ile genlerin inaktif duruma geçmesi nedeniyle gözlemlendiği düşünülmüştür. 5 μ M kurkumin uyarımı sonrasında yapılan CSC uyarımı ise hücrelerde SEPP1, SFTPD ve PTGS1 gen ifadesinin arttırdığı görülmüş, bu durum ise kurkuminin antioksidan ve epigenetik regülatör etkisi ile ilişkilendirilmiştir.

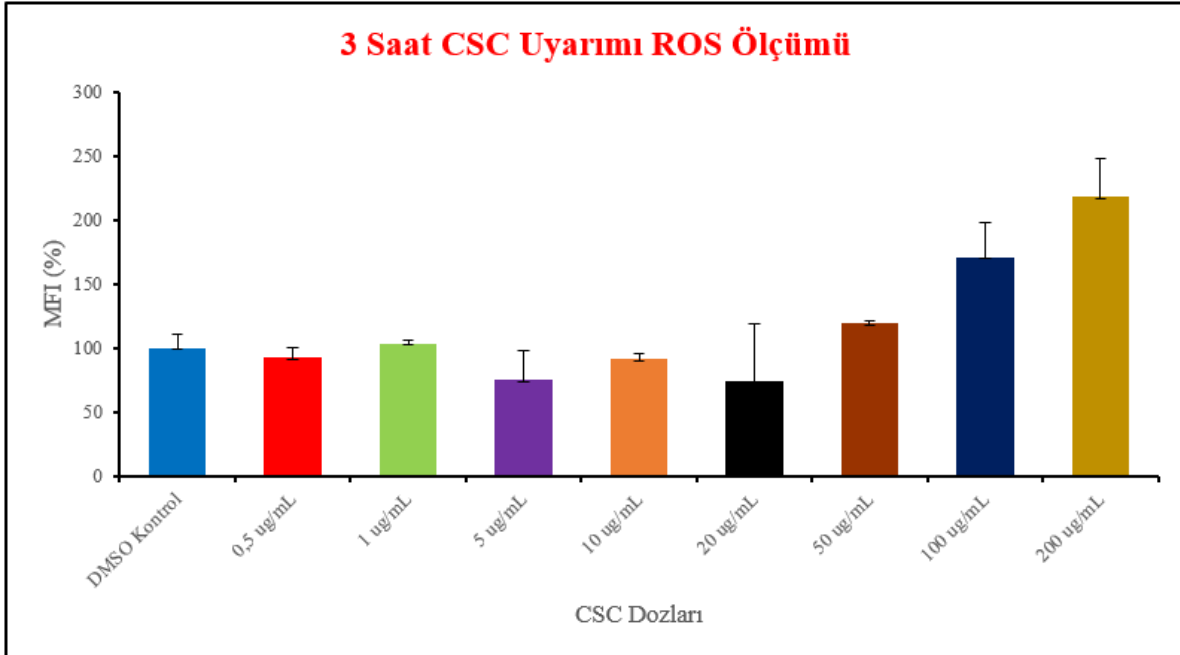
CCL5 gen ifadesinin 100 μ g/mL CSC ile uyarılan hücrelerde uyarılmamış gruba göre 2,8 kat arttığı gözlemlenmiştir. Kurkumin uyarısı sonrası aynı miktarda CSC ile uyarılan hücrelerde ise CCL5 gen ifadesi azalmıştır. Kurkuminin CSC uyarımının etkisini tersine döndürme etkisi, CCL5 geninde görüldüğü kadar olmasa da NCF2 geni için de gözlemlenmiştir.

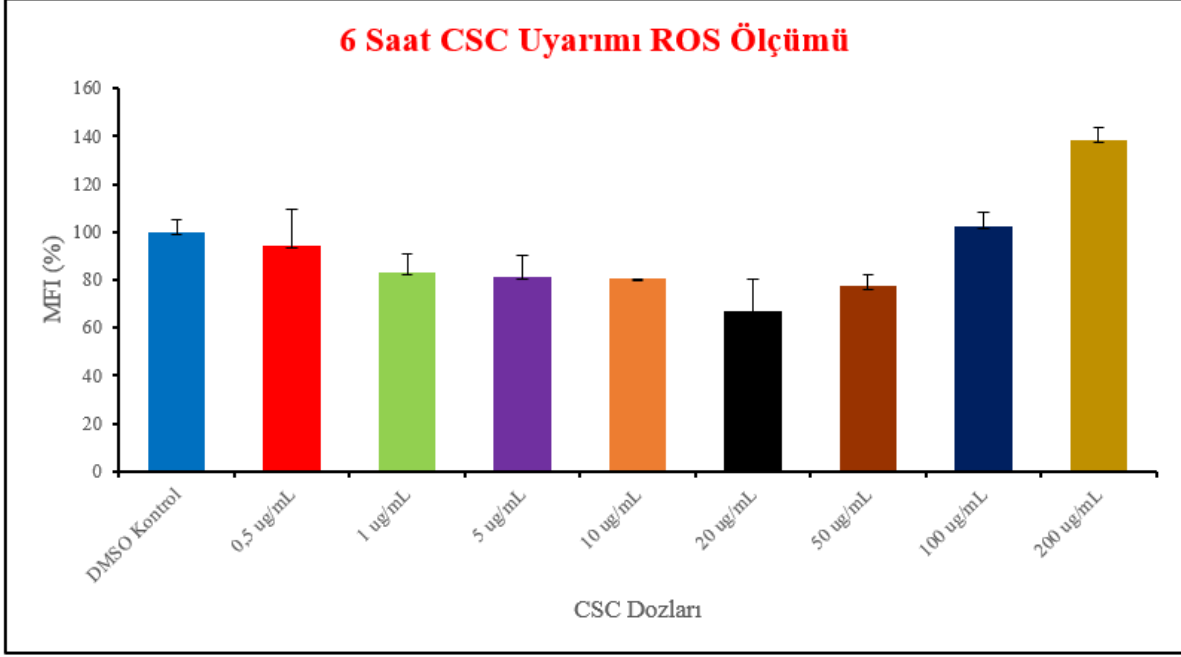
Aynı besiyeri, inkübasyon, konsantrasyon, uyarım zamanı ve qPCR şartları altında kurkumin ve CSC uyarılmalarına maruz kalmalarına rağmen SEPP1, SFTPD ve PTGS1 genlerinin kurkumin ile ifadelerinin artmasına karşılık, NCF2 ve CCL5 genlerinin kurkumin uyarımı ile

ifade azalışı göstermeleri, bu genlerin doğal fonksiyonları ile açıklanabilecek niteliktedir. NCF2 ve CCL5 genleri hücre içi oksidan mekanizmasında görev alan genler olup, serbest radikal oluşumuna katkıda bulunan genlerdir. Bu genlerin ifadelerinin CSC uyarımı sonrasında artmasına rağmen kurkumin varlığında azalması kurkuminin antioksidan etkisi ile NCF2 ve CCL5 gen ifadelerini bazal seviyeye getirdiğini göstermektedir. SEPP1, SFTPD ve PTGS1 genlerinin ise antioksidan mekanizma, oksidatif strese karşı koruma ve antioksidan savunma fonksiyonlarında görev alan genlerden olmaları neticesinde, CSC uyarımı ile bu genlerin ifadelerinin azalmış olması bu genlerin metilasyon yoluyla susturulmuş olabileceğini göstermektedir. Kurkumin uyarımını takiben yapılan CSC uyarımında bu genlerin tekrardan yüksek ifade gösterir hale gelmeleri ise, kurkuminin sigara dumanının bu genler üzerindeki baskılayıcı etkisine karşı koruma sağladığını gösterir niteliktedir.

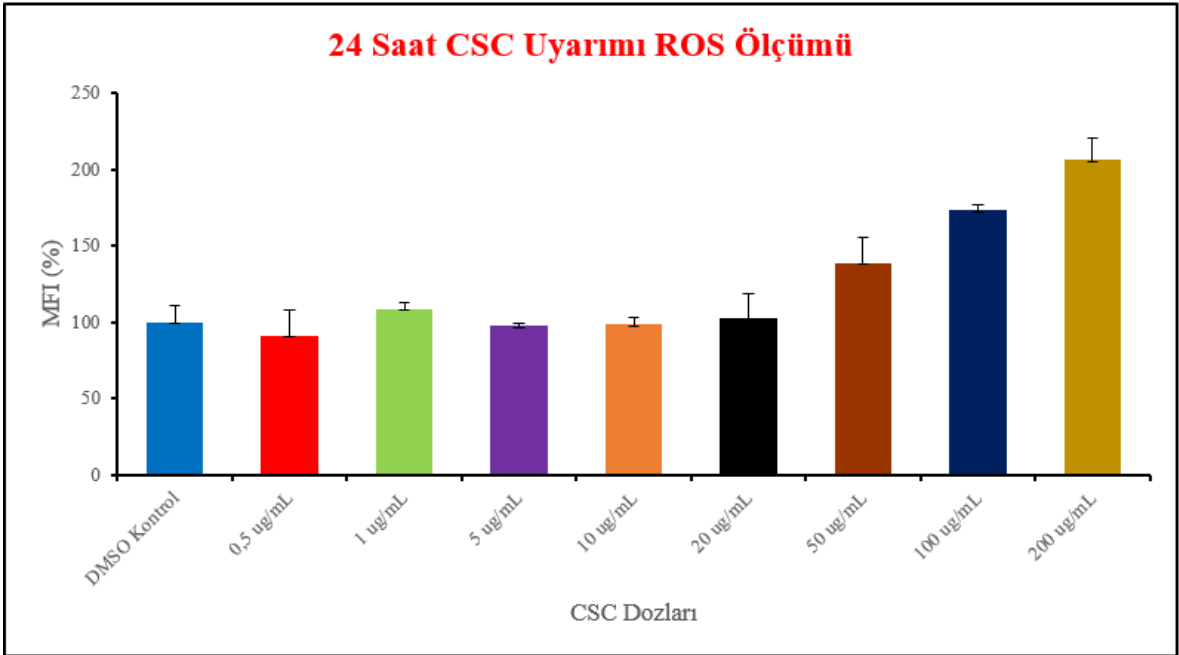
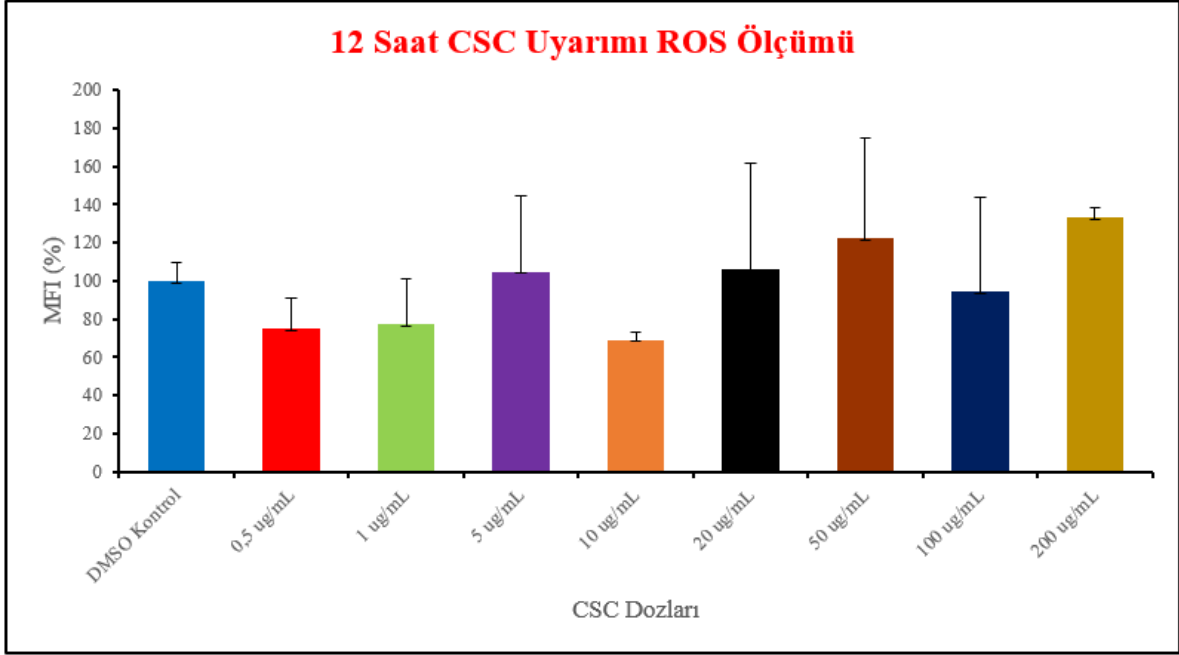
4.3 CSC ile Uyarılan Nazal Epitel Hücrelerin Serbest Radikal (ROS) Ölçümleri

RPMI-2650 hücrelerinin CSC uyarımı sonrasında serbest radikal değerlerinin ölçülmesi için DCFH-DA testi kullanılmıştır. Kullanılan farklı CSC konsantrasyonu ve uyarım zamanı yöntemi, DCFA-DA testinde de uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.20-21'de gösterilmiştir.





Şekil 4.21: RPMI-2650 hücrelerinin 0,5 $\mu\text{g/mL}$ ile 200 $\mu\text{g/mL}$ arasında kademeli artan CSC konsantrasyonlarıyla 3 saat ve 6 saat uyarılması koşullarında elde edilen DCFA-DA testi sonuçları



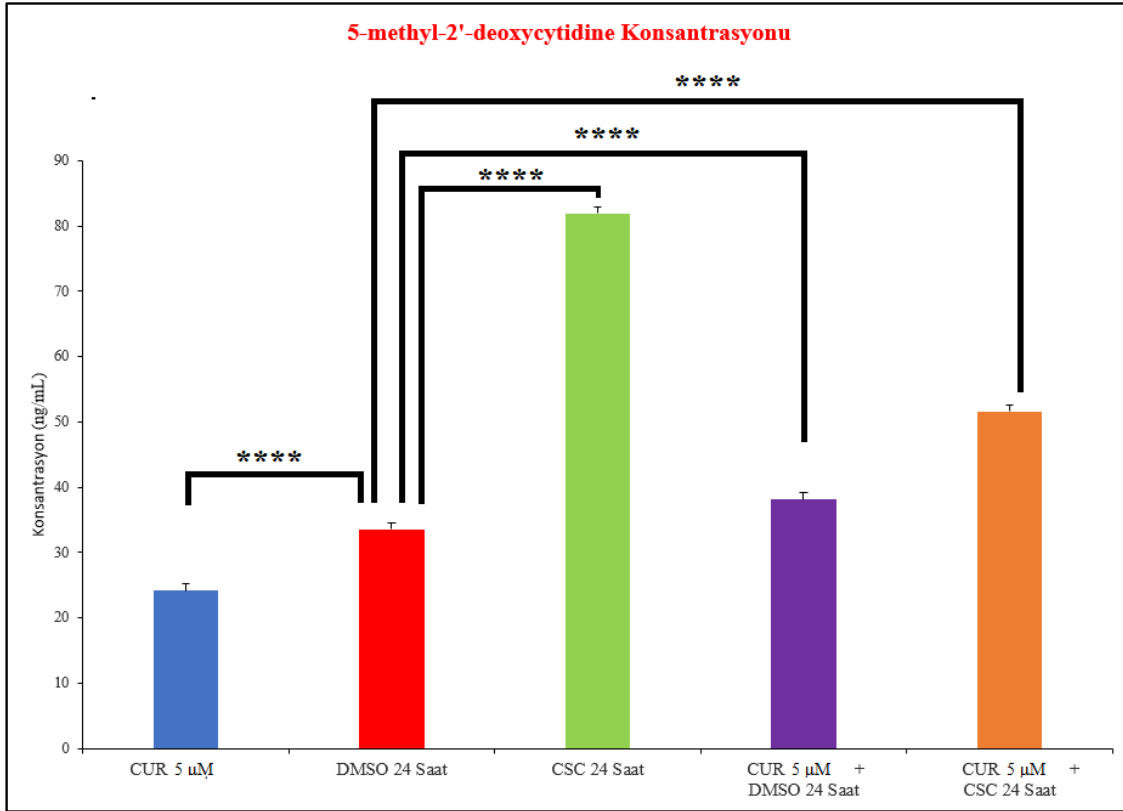
Şekil 4.22: RPMI-2650 hücrelerinin 0,5 µg/mL ile 200 µg/mL arasında kademeli artan CSC konsantrasyonlarıyla 12 saat ve 24 saat uyarılması koşullarında elde edilen DCFA-DA testi sonuçları

Değişen zaman aralıklarında CSC ile uyarılan hücrelerin ROS ölçümleri sonuçlarında, CSC uyarısına maruz kalan hücrelerin CSC konsantrasyonu arttıkça serbest radikal oluşturma

oranlarının arttığı gözlemlenmiştir. Bu artış, daha kısa olan uyarım zamanlarında görece daha düzensiz olsa da, 24 saate ulaşan uyarım zamanı neticesinde, artan CSC konsantrasyonu ile orantılı olarak artan serbest radikal oluşumu görülmektedir.

4.4 Kurkumin ve CSC ile Uyarılan Nazal Epitel Hücrelerin Toplam DNA Metilasyonu ELISA Analizi Sonuçları

RPMI-2650 hücrelerinde, toplam metilasyon durumunun araştırılması için ELISA testi uygulanmıştır. Bu sayede uyarılmamış, sadece kurkumin ile uyarılmış, sadece CSC ile uyarılmış, 5 µM kurkumin ile birlikte örnek solüsyonu ile (DMSO) ile uyarılmış ve 5 µM kurkumin ile birlikte CSC ile uyarılmış olacak şekilde 5 farklı koşuldaki hücrelerin toplam metilasyon profilindeki değişiklikler gözlemlenmiştir. Reaksiyonun sonuçları Şekil 4.23'te gösterilmiştir.

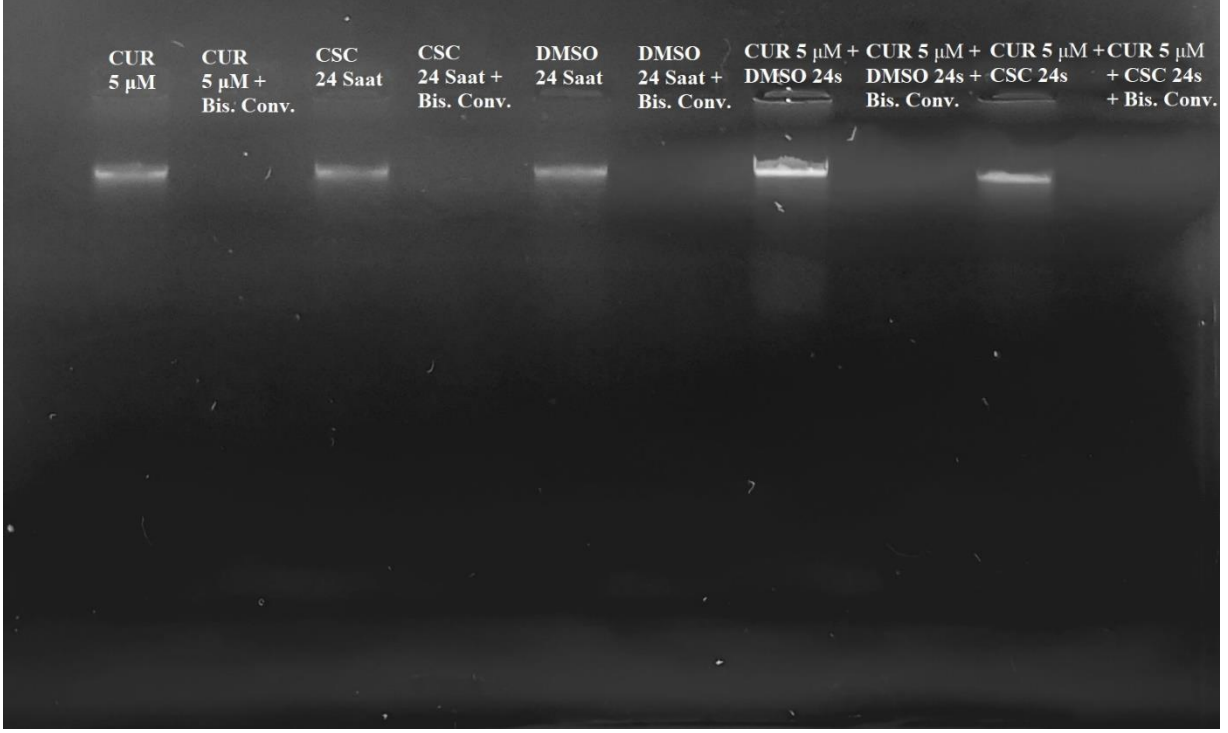


Şekil 4. 23: RPMI-2650 hücrelerinin kurkumin ve/veya CSC muamelesi sonucu geliştirdiği toplam metilasyon profillerinin farklı koşullarda ELISA testi ile incelenmesine ait test sonuçları (n=18, ****P<0.0001)

ELISA deneyinin sonuçları incelendiğinde, en yüksek toplam metilasyon profiline CSC ile 24 saatlik uyarımın yapıldığı koşulda ulaşıldığı görülmektedir. Ayrıca, hücrelerin en düşük toplam metilasyon profiline ulaştıkları koşulun ise, sadece kurkumin ile muamele edilen koşul olduğu sonuçlardan anlaşılmaktadır. Öte yandan, 24 saatlik CSC uyarısı en yüksek toplam metilasyon profile sonucu oluştururken, 5 µM kurkumin muamelesi ile birlikte yapılan 24 saatlik CSC uyarısında önemli ölçüde düşüş olduğu da gözlemlenmiştir.

4.5 Kurkumin ve CSC ile Uyarılan Nazal Epitel Hücre Hatlarının Bisülfid Dönüşüm Analizi Sonrası Jel Görüntüleri

RPMI-2650 hücrelerinde, seçilen genlere ilişkin CpG metilasyon durumunun araştırılması için bisülfid dönüşüm analizi ve devamında PZR testi uygulanmıştır. Bu deneyde kullanılan DNA örnekleri 10 farklı koşulda izole edilmiş olup, kurkumin muamelesi gören/görmeyen, CSC uyarımına maruz kalan/kalmayan, bisülfid dönüşümü yapılan/yapılmayan şartlar altında oluşturulmuştur. Bisülfid dönüşümü analizine ilişkin agaroz jel görüntüsü Şekil 4.24'te gösterilmiştir.



Şekil 4. 24: Bisülfıt dönüşümü analizinin devamında yapılan PCR testi ve agaroz jel yürütmesi sonucu. Kuyucuklara yüklenen örnek sıralaması soldan sağa doğru: 1) Yalnızca 5 µM kurkumin ile muamele edilen hücrelerden alınan DNA örnekleri, 2) Yalnızca 5 µM kurkumin muamele edilen hücrelerden alınan DNA'nın bisülfıt dönüşüme uğramış örnekleri, 3) Yalnızca CSC ile 24 saat uyarılan hücrelerden alınan DNA örnekleri, 4) Yalnızca CSC ile 24 saat uyarılan hücrelerden alınan DNA'nın bisülfıt dönüşüme uğramış örnekleri, 5) Yalnızca DMSO ile 24 saat uyarılan hücrelerden alınan DNA örnekleri, 6) Yalnızca DMSO ile 24 saat uyarılan hücrelerden alınan DNA'nın bisülfıt dönüşüme uğramış örnekleri, 7) 5 µM kurkumin ve DMSO ile 24 saat uyarılan hücrelerden alınan DNA örnekleri, 8) 5 µM kurkumin ve DMSO ile 24 saat uyarılan hücrelerden alınan DNA'nın bisülfıt dönüşüme uğramış örnekleri, 9) 5 µM kurkumin ve CSC ile 24 saat uyarılan hücrelerden alınan DNA örnekleri, 10) 5 µM kurkumin ve CSC ile 24 saat uyarılan hücrelerden alınan DNA'nın bisülfıt dönüşüme uğramış örnekleri

Bisülfıt dönüşüm analizi sonuçları incelendiğinde, agaroz jelde amplifiye olan örneklerin bisülfıt reaksiyonu gerçekleştirilmemiş DNA örneklerinden olduğu görülmektedir. Bu durum,

büyük bir olasılıkla bisülfıt spesifık primelerin etkin bir şekilde bisülfıt reaksiyonu uygulanmış DNA örneklerine bağlanamaması nedeniyle olabileceği düşünölmektedir. Etkin bir amplifikasyon gerçekleştirilemediği için ilgili genlerin promotor bölge metilasyon profilleri çıkartılamamıştır.

5. YORUM

Yapılan tez çalışmasında RPMI-2650 nazal epitel hücrelerinde sigara dumanına maruz kalma nedeniyle ortaya çıkan oksidatif stres ve hücre ifade değişikliklerinin kurkumin uyarımı ile geri döndürülüp döndürülemeyeceği incelenmiştir. Deney çalışmalarında hücrelere uygulanacak olan en uygun CSC ve kurkumin konsantrasyonlarının belirlenmesi için her iki uyarın için de artan dozlarda konsantrasyonlar kullanılarak hücreler uyarılmıştır. Ayrıca, en uygun uyarım zamanının tespit edilmesi için de 3 saat ile 48 saat arasında değişen aralıklarda uyarımlar yapılmıştır. Hücre canlılığının %90'ın altına inmediği ve %50 ve üzerinde sitotoksitenin gözlemlenmediği konsantrasyon ve zaman aralıklarının tespiti için MTT ve LDH testleri ve EtBr/Kalsein AM boyama tekniği kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar neticesinde, hem kurkumin hem de CSC uyarımları için en uygun olan konsantrasyon ve uyarım zamanı değerleri seçilmiştir. Belirlenen konsantrasyon ve zamanlarda uyarılan hücrelerden RNA izolasyonu yapılarak cDNA dönüşümü gerçekleştirilmiş, devamında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile gen ifadeleri incelenmiştir.

Tez çalışma sonucunda elde edilen bulgulara ilişkin değerlendirmeler aşağıda belirtildiği gibidir:

- 1) Kurkuminin farklı konsantrasyonları ve uyarım zamanları kullanılarak yapılan EtBr/Kalsein deneylerinde, kurkuminin belirli bir dozdan sonra hücreler için öldürücü etki yapmaktadır. Her ne kadar tez çalışmaları kapsamında kurkumin muamelesi temel alınarak yapılan çalışmalarda kurkuminin sigara dumanına maruz kalmaktan dolayı ortaya çıkan DNA metilasyon profilinde normale dönüşte olumlu etkisi olduğu, serbest oksijen radikallerinin oluşumunu azalttığı ve hücrelerin canlılığını korumaları yönünde olumlu etkisi olduğu gözlemlenmiş olsa da, aşırı dozlarda öldürücü etki yapan pek çok kimyasal gibi kurkuminin de yüksek dozlarda öldürücü etki yapmaktadır. Kurkuminin yüksek dozlarda hücre canlılığı için öldürücü olduğu sonucu, yalnızca tez çalışmasında değil literatürde var olan bir bilgidir. Literatüre geçmiş olan çalışmalarda, yüksek kurkumin konsantrasyonu ile muamele edilen insan osteoklastoma hücrelerinde apoptozun indüklendiği ve kazpaz-3 aktivitesinin arttığı, dolayısıyla hücre ölümünün arttığı gözlemlenmiştir [81]. Dolayısıyla, tez çalışmasında elde edilen sonuçlar literatürde var olan sonuçlar ile uyum içerisindedir. Gerek deney sonuçlarından elde edilen verilerden anlaşıldığı, gerekse de

kurkuminin antioksidan ve epigenetik regülatör rolünün gözlemlenebilmesi için literatürde tavsiye edildiği üzere, kurkuminin RPMI-2650 hücre hattında hem canlılık deneyleri hem de devamında gelen in-vitro deneylerde kullanılacak en uygun konsantrasyonun 5 µM, uyarım zamanının ise 24 saat olduğu gözlemlenmiştir.

- 2) Artan dozlarda öldürücü olduğu tespit edilen kurkuminin antioksidan etkisinin incelenmesi, öncelikli olarak kurkuminin hangi konsantrasyonlarda kullanmasının belirlenmesi ile mümkündür. Bu gereklilikten hareketle, kurkuminin hangi konsantrasyonlarda kullanılması gerektiğinin tespiti, farklı konsantrasyonların hücre canlılığına etkisi ve devamında yapılması planlanmış olan metabolik deneylerde kullanılacak olan referans konsantrasyonun belirlenmesi adına, öncelikli olarak RPMI-2650 hücre hatları sadece kurkumin ile farklı konsantrasyonlar denenerek muamele edilmiş ve kurkuminin sitotoksosite etkisi araştırılmıştır. Sitotoksosite etkisinin araştırıldığı MTT ve LDH çalışmaları birbirini destekler nitelikte ve tekrarlanabilir sonuçlar oluşturmuştur. Deney sonuçlarında görülen tablo, hücre canlılığının floresan boyama aracılığı ile öncelikli olarak incelendiğini EtBr/Kalsein AM boyama deneyinde elde edilen sonuçlar, MTT ve LDH deneyleri ile uyum göstermiştir. Her üç deney türünde de, kurkuminin 1 µM ile başlayan başlangıç konsantrasyonunda 50 µM son konsantrasyona doğru giden artan konsantrasyon eğrisinde, kurkuminin yüksek dozlarda hücre canlılığına zarar verdiği, dolayısıyla RPMI-2650 hücre hatları için ölümcül etki yarattığı görülmüştür. Bu deneylerin sonucu incelendiğinde, RPMI-2650 hücre hatlarında, literatürdeki çalışmalarında öngördüğü üzere, 5 µM konsantrasyonun kullanılması durumunda hücrelerin canlılığını kaybetmediği ancak kurkuminin antioksidan özelliğini göstermeye yetecek seviyede konsantrasyonun da sağlandığına kanaat getirilmiştir. Kurkumin muamelesine ilişkin konsantrasyon ve uyarım süreleri açısından literatürde var olan bulgular, tez çalışmasında elde edilen sonuçları destekler niteliktedir. MCF7 hücre hattında yapılan sitotoksosite testlerinde, ideal kurkumin konsantrasyonunu 2 µM olduğu, ideal uyarım süresinin ise 24 saat olduğu tespit edilmiştir [82]. Kurkuminin RPMI-2650 hücre hattındaki uyarımlarına ilişkin IC₅₀ değerlerinin de ortalama olarak 5 µM seviyelerinde tespit edilmiş olması literatürde var olan bulguyu destekler nitelikte olup, kurkuminin bu hücre hattında 5 µM konsantrasyonlarda kullanılması halinde toksik özellikte olduğu düşünülmektedir.

3) Sigara dumanı kondensanı, kurkumin ile benzer şekilde hücre hattı uyarımında kullanılarak hücre için öldürücü etkisi incelenen bir kimyasaldır. Bu nedenle, öncelikle hangi konsantrasyonlar CSC'nin hücre ölümünü %50'den fazla tetiklediğinin tespiti gerekmektedir. Bu nedenle CSC ile yapılan uyarımlarda da, kurkumin uyarımları ile aynı yöntem izlenmiş, farklı konsantrasyonlar ve uyarım zamanlarında uyarımlar gerçekleştirilmiştir. Her ne kadar CSC'nin hücreler üzerinde toksik ve epigenetik etkisi olduğu öngörülse de, gerek RPMI-2650 hücre hatlarında, gerekse de grubumuzca kullanılan deney sistemleri ve kitleri dikkate alındığında, optimal CSC konsantrasyonunun tespit edilmesi, ilerleyen deneyler için sağlıklı veri üretilmesi için belirlenmesi gereken ana kriterlerden biri olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle, kurkumin muamelesinde olduğu gibi, hücre hatlarının öncelikle CSC uyarımı sonrası canlılık durumlarının analiz edileceği EtBr/ Kalsein AM floresan boyama deneyleri yapılmış ve CSC'nin farklı konsantrasyonlarının hücreler üzerindeki toksisitesi incelenmiştir. Yapılan EtBr/ Kalsein AM deneylerinde ölü hücre sayısının artan konsantrasyonlar ve uyarım zamanlarına paralel olarak artacağı öngörülen deney dizaynında, deney sonuçları beklendiği gibi sonuç vererek, CSC'nin konsantrasyon ve uyarım zamanına bağlı olarak artan toksisite etkisine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında, CSC uyarımı düşük dozlarda hücre göçünü tetiklediği görülmekle birlikte, mezenkimal hücrelerde 100 µg/mL'yi aşan yüksek doz kullanımında hücre ölümünü artırdığı tespit edilmiştir [83]. EtBr/ Kalsein AM boyamasında elde edilen veriler neticesinde, CSC'nin 50 µg/mL konsantrasyonda ölü hücrelerin artış gösterdiğini belirten kırmızı floresan sinyalin artışına sebep olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde, 100 µg/mL'yi aşan konsantrasyonlarda ise, ölü hücre sinyalinin yükselmesi ve canlılığın büyük ölçüde kaybedilmiş olması nedeniyle, deneylerde kullanılacak ikincil CSC konsantrasyonunun 100 µg/mL olmasına karar verilmiştir. Uyarım zamanı olarak ise, 3 saat ile 48 saat arasında aritmetik olarak artış gösterecek şekilde denenen uyarım zamanları arasında, canlı/ölü hücre sinyalinin net bir şekilde tespitinin yapılabildiği ve uyarımın 24 saatlik uyarımlarda elde edildiği görülmüştür. Bu sonuçlar neticesinde, CSC'nin hücreler için toksik bir kimyasal olduğu görülmüş ancak bu toksisitenin canlılığa etkisinin yaklaşık %50 oranında olduğu konsantrasyonlara erişilebilmesi için en uygun konsantrasyonların 50 µg/mL ve 100 µg/mL, yine benzer şekilde en uygun uyarım zamanının ise 24 saat olmasına karar verilmiştir. Tez çalışması kapsamında

elde edilen veriler ve literatürdeki bulgular dikkate alındığında, CSC'nin 50 µg/mL ila 100 µg/mL konsantrasyon aralığında kullanımının oksidan stres araştırması için uygun olduğunu görülmekte olup, daha yüksek konsantrasyonların hücre canlılığını önemli ölçüde azaltmasından ötürü tavsiye edilmemektedir.

- 4) CSC'nin sitotoksosite etkisini gösterdiği en uygun konsantrasyon ve uyarım zamanının tespiti EtBr/ Kalsein AM boyaması sonucunda kararlaştırılmış olsa da, aynı sonucu destekleyecek farklı canlılık deneyleri ile de tekrarlanabilir sonuçların elde edilmesi gerektiğine karar verilerek, kurkumin deneylerinde olduğu gibi CSC için de MTT ve LDH deneyleri yapılmıştır. EtBr/ Kalsein AM floresan boyaması deneylerinin sonucunda karar kılınan konsantrasyon ve uyarım zamanı sonuçlarına, MTT ve LDH deneylerinde de benzer sonuçlar elde edilerek, tespit edilen konsantrasyonların ve uyarım zamanının en uygun aralıkta olduğu doğrulanmıştır. Üç farklı deney türünde de benzer sonuçlar elde edilmesi neticesinde, devam eden deney dizaynlarında CSC uyarımı için belirlenen 24 saatlik 50 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyon seviyelerinin kullanılması uygun görülmektedir.
- 5) Tez çalışması kapsamında cevabı araştırılan sorulardan birisi, sigara dumanına maruz kalınması neticesinde ortaya çıkan epigenetik etkilerin, kurkuminin antioksidan özelliği ile ortadan kaldırılıp kaldırılamayacağıdır. Bu sebeple, CSC'nin RPMI-2650 hücre hattında serbest radikallerin oluşmasına ve dolayısıyla serbest radikallerin DNA molekülü üzerindeki epigenetik etkileri aracılığıyla DNA metilasyonuna sebep verebilmesi durumu da araştırılmıştır. Dolayısıyla, DCFH-DA deney sistemi kullanılarak, CSC'ye bağlı serbest radikal oluşumunun ortaya çıkıp çıkmadığı ölçülmüştür. DCFH-DA deneylerinin sonuçları, sitotoksosite deneyleri ile paralel sonuçlar oluşturmuştur. Bu deneyin sonuçlarına göre, CSC uyarımının hem serbest radikallerin oluşmasına sebep olduğu, hem de oluşan serbest radikallerin miktarının maruz kalınan CSC konsantrasyonları ile örtüşecek şekilde bir yükseliş grafiğine sahip olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, alveolar epitel hücrelerinde CSC'nin hücre canlılığına etkisinin DCFH-DA testi ile ölçüldüğü literatür çalışmalarında, CSC uyarımının hücre canlılığını konsantrasyona bağlı olarak 1.5 ile 15 kat arasında düşürdüğü tespit edilmiştir [84]. Serbest radikal ölçüm deneylerinde CSC uyarımı için kullanılması en uygun olan konsantrasyonların 50 µg/mL ve 100 µg/mL olduğu, en uygun uyarım zamanının ise 24 saat olduğu görülmektedir. Daha yüksek konsantrasyon ve uyarım zamanlarında hücre canlılığı yitirilmektedir.

- 6) Kurkumin ve CSC'nin her ikisi için de en uygun konsantrasyon ve uyarım zamanları belirlendikten sonra, kurkuminin sigara dumanına maruz kalma neticesinde ortaya çıkan zararlara karşılık gelen koruma özelliğinin tespiti için çalışmalara başlanmıştır. Bu çalışmalarda, muhtemelen bütün senaryoların incelenebilmesi için, RPMI-2650 hücre hatlarında 4 farklı senaryo belirlenmiştir. Bu senaryolar; uyarılmamış hücre hatları, sadece 5 µM kurkumin ile uyarılmış hücre hatları, sadece 50 µg/mL CSC ile uyarılmış hücre hatları ve son olarak 5 µM kurkumin ile uyarıldıktan sonra 50 µg/mL CSC ile uyarılan hücre hatları olacak şekilde dizayn edilmiştir. Belirtilen senaryoların her biri için, tez çalışmasında belirlenen 5 gen için gen ifadesinin değişikliğinin tespiti için qPCR analizi yapılmıştır. Belirtilen beş gen, araştırma grubuna ait öncül araştırmalarda CSC ile ifade değişikliğine uğradığı belirlenmiş olan genlerdir [94]. qPCR deneyi, önceden belirlendiği üzere 24 saatlik uyarım neticesinde, belirtilen senaryolar özelinde yapılmıştır. CSC'nin gen ifadesinde değişikliğe neden olduğunu gösterir pek çok çalışma mevcut olup, karaciğer hücreleri ile yapılan çalışmalarda DNA metiltransferaz 1 geninin 100 µg/mL CSC uyarımı ile üç kat arttığı [85], HAE hücreleri ile yapılan araştırmada ENaC α alt birimine ait ifade seviyelerinin iki kattan fazla düştüğü [86], alveolar epitel hücrelerde yapılan çalışmada ise farklı peptidlere ilişkin ifade değerlerinin gene bağlı olarak artış ve azalış gösterdiği bildirilmektedir [87]. Dolayısı ile CSC uyarımının etkisinin qPCR ile izlenebildiğini gösterir veriler literatürde mevcuttur. Tez çalışmasında qPCR deneyinin sonucunda, belirlenen her gen için kurkumin muamelesinin CSC uyarımının sebep olduğu gen ifadesi değişikliğini tersine döndürür şekilde etki yaptığı gözlemlenmiştir. Bahsi geçen tersine dönüş, genlerin CSC etkisi ile upregüle olmaları durumunda kurkumin etkisiyle tekrar downregüle olmaları, CSC etkisi ile downregüle olan genlerin ise kurkumin etkisi ile upregüle olmaları şeklinde gerçekleşmiştir. Diğer bir deyişle, qPCR deneyleri ile seçilen SEPP1, SFTPD, PTGS2, NCF2 ve CCL5 genlerinin ifadeleri incelendiğinde, seçilen beş genin CSC etkisiyle değişen ifade profillerinin kurkumin ile geri döndürülebileceği gözlemlenmiştir.
- 7) Gen ifadesi analizlerinde SEPP1, SFTPD ve PTGS1 gen ifadelerinin CSC etkisi ile azaldığı, NCF2 ve CCL5 gen ifadelerinin ise arttığı görülmüştür. Bu durum, kurkumin uyarımı sonrasında epigenetik değişikliklerin normal düzeylerine geri döndürülebileceğini düşündürmüştür. Elde edilen sonuçlar, kurkuminin sigara dumanının oksidan ve epigenetik

etkilerini ortadan kaldırmak noktasında aktif etkisini gösterir nitelikte olduğundan tez çalışmasının özgün değerini oluşturmaktadır.

- 8) SEPP1, SFTPD ve PTGS1 genlerinin oksidatif stres koşullarına karşı hücreyi korumaya yönelik fonksiyonlarının olması, CSC ile uyarıldıklarında gen ifadelerinin neden azaldığına dair önemli bir ipucu vermektedir. SEPP1 geni fonksiyonu itibariyle serbest radikallerin hücre içinde birikmesine engel olan bir protein olup, literatür çalışmalarında radyasyon gibi farklı oksidan stres özelliği olan dış etkenlere karşı SEPP1 ifadesinin arttığı ve bu proteinin hücreleri serbest radikal birikiminde koruduğu gözlemlenmiştir [88], [89]. Benzer şekilde, SFTPD geninin de oksidan stresi engelleyici etkisi olduğunu gösteren mRNA temelli çalışmalar, SFTPD geninin knock-out edildiği hücrelerde oksidan stres mekanizmasında görev alan genlerin mRNA konsantrasyonlarında normal hücrelere göre artış olduğu görülmüş, dolayısıyla SFTPD geninin oksidan stres önleme yollarında görev aldığı gösterilmiştir [90]. PTGS1 geni ise, oksidan stresin artışı ile ilişkili olan kronik körfez savaşı hastalığı gibi hastalıklarda ifade değişikliğine uğradığı tespit edilen genlerden biri olup, bu hastalığın gelişim sürecinde PTGS1 geninin ifadesinin azaldığı gösterilmiştir [91]. Tümör baskılayıcı genlerin kanserojen maddeler etkisi ile azalmasına benzer bir mekanizma ile hücrede oksidatif stres yaratan CSC uyarımının da oksidatif stresi önlemeye çalışan genlerin ifadesinde azalmaya sebep olması muhtemeldir. CSC uyarısının bu genleri epigenetik regülasyon yoluyla baskılayabildiğine işaret eden bu bulgular, tez çalışması sırasında doğrudan metilasyon analizi yapılamamış olması nedeniyle kesinlik arz etmemektedir.
- 9) Benzer şekilde, NCF2 ve CCL5 genleri de hücre içi oksidan mekanizmasında görev alan genlerdir. NCF2 geninin insülin direnci görülen obezite hastalarının mononükleer hücrelerinde oksidan stres artışı ile ilişkili olacak şekilde ifadesinin arttığı [92], CCL5 geninin ise dengue ateşi hastalığında karaciğer hücrelerinde ortaya çıkan oksidan stres durumuyla ilişki olarak ifadesinin arttığı gösterilmiştir [93]. Bu genler, hücrede serbest radikal oluşması yollarında görev almalarından ötürü, oksidatif stres açısından CSC ile aynı sonuca götüren özelliklere sahip olmalarından ötürü, CSC uyarımı ile gen ifadelerinin artmış olması, kanserojen moleküllerin proto-onkogenlerin ifadesini artırmasını anımsatmaktadır. Öte yandan, kurkumin ile gen ifadesi arasındaki ilişkinin epigenetik temelli olduğunu gösterir bulgulara dayanarak, kurkuminin DNA metilasyonunu önleyici etkisinin bahsi geçen beş gende tespit edilen ifade değişikliklerinin araştırılmasında kilit

önemi bulunmaktadır. Kurkumin ile DNA metilasyonu arasındaki bağlantıya ilişkin literatür çalışmaları, kurkuminin NF- κ B/SP1 kompleksinin DNA metiltransferaz 1 (DNMT1) enziminin promotor bölgesine bağlanmasını engellediği dolayısıyla da DNMT1 işlevini engellediği yönündedir [95]. Dolayısıyla, kurkumin muamesi sonucu bahsi geçen genin ifade değişikliği etkisi göstermesinin altında yatan moleküler mekanizmanın açığa çıkarılması için seçilen her bir gene ait metilasyon profili analizleri yapılarak epigenetik değişiklik profillerinin çıkarılması gerekmektedir.

- 10) Kurkuminin gen ifadesi değişikliği yoluyla antioksidan özellik gösterdiğine ilişkin bulgulara dayanarak, kurkumin ve DNA metilasyon profili arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Kurkumin halihazırda DNA metilasyonu ile ilişkilendirilmiş bir antioksidan bileşik olmakla birlikte, halen epigenetik temeli olan hastalıklarda hangi mekanizma ile DNA metilasyonunu ve gen ifade profili etkilediği tam olarak anlaşılmış değildir [70]. Bu öncül bilgiler temel alınarak, tez çalışması için seçilen genlere ait ifade analizlerinin devamında, tez çalışmasının ana konusunu oluşturan kurkumin muamelesi ile metilasyon profilindeki değişikliklerin incelenmesi çalışmalarına başlanmıştır. Bu nedenle, seçilen beş gen ile doğrudan çalışmadan önce, RPMI-2650 hücre hatlarının toplam metilasyon değerlerinin incelenmesi, CSC ve kurkuminin toplam metilasyon değeri üzerindeki etkisinin gösterilmesine karar verilmiştir. RPMI-2650 hücre hatlarının, en uygun olduğuna karar kılınan kurkumin ve CSC konsantrasyonlarına farklı senaryolar altında maruz bırakılarak toplam metilasyon ölçümlerinin yapıldığı deney dizaynında, en yüksek toplam metilasyon seviyelerine sadece CSC ile 24 saat uyarıya maruz kalan hücre hatlarında rastlanmıştır. Öte yandan, kurkumin muamelesi sonrası 24 saat CSC uyarımına bırakılan hücrelerde ise, toplam metilasyon seviyelerinin sadece CSC uyarımı yapılan hücreler kadar yüksek olmadığı tespit edilmiştir. Metilasyon profilindeki bu düşüşün kurkuminin CSC etkisini nötralize etme özelliğinde kaynaklandığını söylemek mümkündür. Literatürde var olan bulgular bu savı destekler niteliktedir. Kurkuminin akciğer kanserinde NF- κ B aktivasyonunu engelleyerek CSC uyarımı ile ortaya çıkan NF- κ B-bağlı siklin D1 ve siklooksigenaz-2 ifadesini bastırdığı, öte yandan I κ B α kinaz yolağı aracılığıyla ve matriks metalloproteinaz-9 ifadesini artırdığını gösteren çalışmalar [96] kurkumin ile CSC uyarımının DNA metilasyon profili üzerinde ters oranlı bir ilişkiye sahip olduklarını göstermektedir. Tez çalışmasında yapılan deneyin sonuçları yorumlandığında, sigara

dumanına maruz kalınması durumunda hücrelerin toplam metilasyon seviyelerinin ciddi ölçüde arttığı gösterilmiş olmakla birlikte, daha da önemlisi bu ciddi yükselişin kurkumin ile önlenemediği, her ne kadar sigara dumanı ile hiç uyarılmamış hücreler seviyesine inmesi de sigara dumanının metilasyon profili açısından etkilerini azalttığını gösterir en önemli bulguya erişildiği görülmektedir.

- 11) CSC ile uyarılmanın RPMI-2650 hücre hatlarında toplam metilasyon seviyelerini artırdığı ve kurkuminin ise bu artışı önleyici etkisi olduğu gösterildikten sonra, tez çalışması kapsamında belirlenmiş genlere ilişkin gen bazında metilasyon profili çalışmalarına başlanmıştır. Seçilen genlerin CSC ile uyarılma sonucu promoter bölgelerinden başlama üzere 800 bp'lik upstream bölgelerinde bulunan CpG adalarında metilasyon olup olmadığının tespit edilmesi adına bisülfıt dönüşüm analizi yapılarak devamında PCR ile amplifikasyon yapılmıştır. PCR sonrası üretilen DNA örnekleri agaroz jelde yürütüldüğünde ise, bisülfıt dönüşümü yapılmamış olan DNA örnekleri jelde gözlemlenebilirken, bisülfıt dönüşümü yapılan örnekler jelde tespit edilememiştir. Bu sinyal kaybına ilişkin muhtemel senaryolar arasında, bisülfıt dönüşümü sonucu C-T nükleotit dönüşümü gerçekleşen DNA sarmallarında, bu dönüşümün sıcaklık etkisi ile DNA sarmallarının birbirinden ayrıldığı bir ortamda gerçekleşmiş olması nedeniyle, sıcaklık düştükten sonra bile artık birbirine komplementer olmayan iki sarmalın tekrar birleşmemeleri ve tek sarmallı DNA olarak kalmış olmaları olabilir. Agaroz jelde sinyal almanın temel mekanizması, jelin yapısında bulunan EtBr molekülünün DNA'nın çift sarmalı arasına tutunması ve dolayısıyla sinyal vermesi olduğundan, bisülfıt dönüşüm sonucu tek sarmal olarak kalan DNA molekülleri EtBr ile bağlanamadıkları için jelde sinyal vermemiş olabilir. Öte yandan, tek sarmallı DNA molekülünün de kendi içinde hairpin döngüleri oluşturması ve Et-Br'nin bu bölgelere bağlanması ile sinyal alınabilecek olması ihtimali de var olsa da, tek sarmallı DNA'nın agaroz jelde görülebilmesi için gerekli olan düşük sıcaklık şartları, yapılan deney şartlarında karşılanmadığı için, tek bisülfıt dönüşüm sonrası oluşmuş olması muhtemel tek sarmallı DNA molekülleri jelde gözlemlenememiştir. Bir diğer muhtemel açıklama ise, bisülfıt dönüşüm sonucu metillenmiş sitozin nükleotitleri sabit kalırken, metillenmemiş sitozin nükleotitlerinin timin nükleotitlerine dönüşecek olması durumunun tam anlamıyla hangi sitozin nükleotitlerinde gerçekleşeceğinin önceden tespit edilmesinin zor olmasıdır. Teorik olarak, CSC ile uyarılan hücrelerde, seçilen genlerde metilasyon artışı görüleceği

düşünölmekte olup, promotör bölgelerinden 800 bp upstream olan bölgeyi kapsayacak şekilde PCR primerleri dizayn edilerek deney sistemi kurgulanmıştır. Ancak, dizayn edilen primerlere DNA sarmalları üzerinde karşılık gelen bölgelerdeki sitozin nükleotitlerinin metillenmemiş olması durumunda, bisülfıt dönüşümü sonucu bu metillenmeyen sitozin nükleotitleri timine dönüşeceği için, dizayn edilen PCR primerleri de karşılık geldikleri DNA bölgesine artık bağlanamaz durumda olacakları için, PCR reaksiyonu ile DNA amplifikasyonu görölemeyecek olup, devamında da agaroz jele yüklenen örneklerde DNA miktarı tespit edilebilir seviyenin çok altında olacağı için sinyal kaybı yaşanacaktır. Tüm bu sebeplerden ötürü, bisülfıt dönüşüm deneyi yeniden dizayn edilecek ve bisülfıt dönüşüm kitinin üreticisi olan firmanın önerileri doğrultusunda promotör bölgesinden 400 bp upstream olan bölgeye karşılık gelecek şekilde daha kısa bir DNA bölgesi üzerinden yeniden analiz yapılacaktır. Bu yeni deney sistemi için ise yeni primerlerin dizaynı gerekeceğinden, yeni primerler metillenmiş ve metillenmemiş sitozin nükleotitlerinin bisülfıt dönüşümü sonrası primer bağlanmasına etki etmemesi göz önüne alınarak sitozin nükleotitleri içermeyen bir bölgeye karşılık gelen primer dizaynı yapılmasına dikkat edilecektir.

Tez kapsamında yapılan deneyler sonucunda, tezin ana hipotezini doğrulayıcı nitelikte bulgulara erişilmiş olup, kurkumin muamelesi ile sigara dumanının sebep olduğu oksidatif stres ve epigenetik değişikliklerin önüne geçilebileceği ve normal düzeylerine döndürölebileceğine dair olumlu sonuçlar alınmıştır. Gerek qPCR deneyi sonucu elde edilen kurkuminin sigara dumanının gen ifadelerinde sebep olduğu değişikliği tersine döndürme etkisi, gerek toplam metilasyon değerlerinin kurkumin muamelesi ile ciddi ölçüde önlenmesi tez çalışmasının en önemli bulgularından olup, çalışmanın temeli olan hipotezin yüksek ölçüde doğruluk payı olduğunu göstermektedir. Her ne kadar tez çalışmasının sürdüröldüğü zaman diliminde gerek zaman açısından, gerekse de deney dizaynında güncelleme ve deney tekrarı gerekliliği açısından bisülfıt dönüşümü ve spesifik gen bazında metilasyon çalışmaları pozitif sonuç vermemiş olsa da, tez çalışması kapsamında yapılan çalışmalara devam edilecek olup, elde edilen bulgular ve devam edilecek deneylerin sonuçları ile uluslararası hakemli bir dergide makale yayımlanması hedeflenmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Onor, I. C. O., Stirling, D. L., Williams, S. R., Bediako, D., Borghol, A., Harris, M. B., Darensburg, T. B., Clay, S. D., Okpechi, S. C., & Sarpong, D. F. (2017). Clinical effects of cigarette smoking: Epidemiologic impact and review of pharmacotherapy options. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(10), 1147. <https://doi.org/10.3390/ijerph14101147>
- [2] World Health Organization. Tobacco. World Health Organization. Retrieved December 30, 2021, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>
- [3] Türkiye Halk Sağlığı ve Kronik Hastalıklar Enstitüsü (TÜSEB-TÜHKE), Dünya Tütünsüz Günü. İstanbul, 2021
- [4] Özpulat, F. & Erdem, Y. (2019). ÜNİVERSİTE ÖĞRENCİLERİNİN RİSKLİ SAĞLIK DAVRANIŞLARI VE ETKİLEYEN FAKTÖRLERİN İNCELENMESİ . *Ankara Sağlık Bilimleri Dergisi* , 8 (1) , 110-126 . Retrieved from <https://dergipark.org.tr/en/pub/ausbid/issue/46310/527570>
- [5] Türkiye İstatistik Kurumu (2020). Türkiye Sağlık Araştırması 2010, 2012, 2014, 2016. <http://www.tuik.gov.tr>
- [6] Öntaş E, Aslan D. (2018/2019-63) Küresel Yetişkin Tütün Araştırması; Türkiye 2016 Verileri. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı Toplum için Bilgilendirme Dizisi. <http://www.halksagligi.hacettepe.edu.tr>.
- [7] Guerin MR. Chemical composition of cigarette smoke. In: Gori GB, Bock FG, editors. *Banbury Report No. 3: A Safe Cigarette?* Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory, 1980:191–204.
- [8] U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Office of Surgeon General. (2010). *How tobacco causes disease: The biology and behavioral basis for tobacco-attributable disease: A report of the surgeon general.*
- [9] Nestler, E. J., Hyman, S. E., & Malenka, R. C. (2010). *Molecular neuropharmacology: A foundation for clinical neuroscience.* McGraw-Hill Medical.

- [10] Domino EF. Pharmacological significance of nicotine. In: Gorrod JW, Jacob P III, editors. *Analytical Determination of Nicotine and Related Compounds and Their Metabolites*. New York: Elsevier, 1999:1–11.
- [11] Brody A. L. (2006). Functional brain imaging of tobacco use and dependence. *Journal of psychiatric research*, 40(5), 404–418. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2005.04.012>
- [12] Hofmann D., et.al. (1981). Formation, occurrence, and carcinogenicity of N-nitrosamines in tobacco products. *ACS Symposium Series*, 247–273. <https://doi.org/10.1021/bk-1981-0174.ch018>
- [13] Robles, A. I., Linke, S. P., & Harris, C. C. (2002). The p53 network in lung carcinogenesis. *Oncogene*, 21(45), 6898–6907. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205563>
- [14] Frank R, Braun HE, Holdrinet M, Stonefield KI, Elliot JM, Zilkey B, Vickery L, Chang HH. (1977). Metal contents and insecticide residues in tobacco soils and cured tobacco leaves collected in southern Ontario. *Tobacco Science* 21:74–80.
- [15] Cheng, S. (2003). Heavy metal pollution in China: Origin, Pattern and control. *Environmental Science and Pollution Research*, 10(3), 192–198. <https://doi.org/10.1065/espr2002.11.141.1>
- [16] Bache CA, Lisk DJ, Doss GJ, Hoffmann D, Adams JD (1985). Cadmium and nickel in mainstream particulates of cigarettes containing tobacco grown on a low-cadmium soil-sludge mixture. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 16(3–4):547–52.
- [17] Schneider, G., Krivna, V. (1993). Multi-element analysis of tobacco and smoke condensate by instrumental neutron activation analysis and atomic absorption spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 53(2), 87–100. <https://doi.org/10.1080/03067319308044438>
- [18] Nitsch, A., Kalcher, K., Greschonig, H., & Pietsch, R. (1991). Heavy metals in tobacco smoke ii: Trace Metals Cadmium, lead, copper, cobalt and nickel in Austrian cigarettes and in particle phase and smoke gas - schwermetalle in Tabaken und in Tabakrauch II: Spurenelemente cadmium, Blei, Kupfer, Kobalt und nickel in

- Oesterreichischen Zigaretten und Deren Rauchkondensaten und rauchgasen. Beiträge Zur Tabakforschung International/Contributions to Tobacco Research, 15(1), 19–32. <https://doi.org/10.2478/cttr-2013-0618>
- [19] Counts, M. E., Morton, M. J., Laffoon, S. W., Cox, R. H., & Lipowicz, P. J. (2005). Smoke composition and predicting relationships for international commercial cigarettes smoked with three machine-smoking conditions. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 41(3), 185–227. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2004.12.002>
- [20] Skwarzec, B., Ulatowski, J., Struminska, D. I., & Boryło, A. (2001). Inhalation of ²¹⁰Po and ²¹⁰Pb from cigarette smoking in Poland. *Journal of environmental radioactivity*, 57(3), 221–230. [https://doi.org/10.1016/s0265-931x\(01\)00018-2](https://doi.org/10.1016/s0265-931x(01)00018-2)
- [21] Pappas, R. S., Polzin, G. M., Zhang, L., Watson, C. H., Paschal, D. C., & Ashley, D. L. (2006). Cadmium, lead, and thallium in mainstream tobacco smoke particulate. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 44(5), 714–723. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.10.004>
- [22] U.S. Department of Health and Human Services. A Report of the Surgeon General: How Tobacco Smoke Causes Disease: What It Means to You. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, 2010.
- [23] Krosnick, J. A., Malhotra, N., Mo, C. H., Bruera, E. F., Chang, L. C., Pasek, J., & Thomas, R. K. (2017). Perceptions of health risks of Cigarette Smoking: A new measure reveals widespread misunderstanding. *PLOS ONE*, 12(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182063>
- [24] Ezzati, M., Henley, S. J., Thun, M. J., & Lopez, A. D. (2005). Role of smoking in global and regional cardiovascular mortality. *Circulation*, 112(4), 489–497. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.521708>
- [25] Blanco-Cedres, L., Daviglius, M. L., Garside, D. B., Liu, K., Pirzada, A., Stamler, J., & Greenland, P. (2002). Relation of cigarette smoking to 25-year mortality in middle-aged

- men with low baseline serum cholesterol: the Chicago Heart Association Detection Project in Industry. *American journal of epidemiology*, 155(4), 354–360. <https://doi.org/10.1093/aje/155.4.354>
- [26] Solberg, L. A., & Strong, J. P. (1983). Risk factors and atherosclerotic lesions. A review of autopsy studies. *Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc.*, 3(3), 187–198. <https://doi.org/10.1161/01.atv.3.3.187>
- [27] Harlow, S. D., & Ephross, S. A. (1995). Epidemiology of menstruation and its relevance to women's health. *Epidemiologic reviews*, 17(2), 265–286. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a036193>
- [28] Brett, K. M., & Cooper, G. S. (2003). Associations with menopause and menopausal transition in a nationally representative US sample. *Maturitas*, 45(2), 89–97. [https://doi.org/10.1016/s0378-5122\(03\)00139-7](https://doi.org/10.1016/s0378-5122(03)00139-7)
- [29] Gnoth, C., Godehardt, E., Frank-Herrmann, P., Friol, K., Tigges, J., & Freundl, G. (2005). Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Human reproduction (Oxford, England)*, 20(5), 1144–1147. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh870>
- [30] Cramer, D. W., & Wise, L. A. (2000). The epidemiology of recurrent pregnancy loss. *Seminars in reproductive medicine*, 18(4), 331–339. <https://doi.org/10.1055/s-2000-13722>
- [31] Marinelli, D., Gaspari, L., Pedotti, P., & Taioli, E. (2004). Mini-review of studies on the effect of smoking and drinking habits on semen parameters. *International journal of hygiene and environmental health*, 207(3), 185–192. <https://doi.org/10.1078/1438-4639-00283>
- [32] Repine, J. E., Bast, A., & Lankhorst, I. (1997). Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 156(2 Pt 1), 341–357. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.156.2.9611013>

- [33] Cohen, D., Arai, S. F., & Brain, J. D. (1979). Smoking impairs long-term dust clearance from the lung. *Science* (New York, N.Y.), 204(4392), 514–517. <https://doi.org/10.1126/science.432655>
- [34] Samet J. M. (2004). Adverse effects of smoke exposure on the upper airway. *Tobacco control*, 13 Suppl 1(Suppl 1), i57–i60. <https://doi.org/10.1136/tc.2003.005454>
- [35] Ueha, R., Ueha, S., Kondo, K., Nishijima, H., & Yamasoba, T. (2020). Effects of Cigarette Smoke on the Nasal Respiratory and Olfactory Mucosa in Allergic Rhinitis Mice. *Frontiers in neuroscience*, 14, 126. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00126>
- [36] Strzelak, A., Ratajczak, A., Adamiec, A., & Feleszko, W. (2018). Tobacco Smoke Induces and Alters Immune Responses in the Lung Triggering Inflammation, Allergy, Asthma and Other Lung Diseases: A Mechanistic Review. *International journal of environmental research and public health*, 15(5), 1033. <https://doi.org/10.3390/ijerph15051033>
- [37] Kanda, A., Kobayashi, Y., Asako, M., Tomoda, K., Kawauchi, H., & Iwai, H. (2019). Regulation of interaction between the upper and Lower Airways in United Airway Disease. *Medical Sciences*, 7(2), 27. <https://doi.org/10.3390/medsci7020027>
- [38] Rodrigues, F. M., Ramos, D., Xavier, R. F., Ito, J. T., Souza, A. P., Fernandes, R. A., Cecchini, R., Rossi e Silva, R. C., Macchione, M., Toledo-Arruda, A. C., Guarnier, F. A., & Ramos, E. M. (2014). Nasal and systemic inflammatory profile after short term smoking cessation. *Respiratory medicine*, 108(7), 999–1006. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2014.04.020>
- [39] Licari, A., Castagnoli, R., Denicolò, C. F., Rossini, L., Marseglia, A., & Marseglia, G. L. (2017). The Nose and the Lung: United Airway Disease?. *Frontiers in pediatrics*, 5, 44. <https://doi.org/10.3389/fped.2017.00044>
- [40] Standardized Questionnaires on Respiratory Symptoms. (1960). *British Medical Journal*, 2(5213), 1665.
- [41] Saetta, M., Turato, G., Facchini, F. M., Corbino, L., Lucchini, R. E., Casoni, G., Maestrelli, P., Mapp, C. E., Ciaccia, A., & Fabbri, L. M. (1997). Inflammatory cells in

- the bronchial glands of smokers with chronic bronchitis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 156(5), 1633–1639. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.156.5.9701081>
- [42] Di Stefano, A., Turato, G., Maestrelli, P., Mapp, C. E., Ruggieri, M. P., Roggeri, A., Boschetto, P., Fabbri, L. M., & Saetta, M. (1996). Airflow limitation in chronic bronchitis is associated with T-lymphocyte and macrophage infiltration of the bronchial mucosa. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 153(2), 629–632. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.153.2.8564109>
- [43] Hogg, J. C., Chu, F., Utokaparch, S., Woods, R., Elliott, W. M., Buzatu, L., Cherniack, R. M., Rogers, R. M., Sciurba, F. C., Coxson, H. O., & Paré, P. D. (2004). The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine*, 350(26), 2645–2653. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032158>
- [44] Kim, J. S., & Rubin, B. K. (2007). Nasal and sinus inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *COPD*, 4(2), 163–166. <https://doi.org/10.1080/15412550701341228>
- [45] Celik, H., Akpınar, S., Karabulut, H., Oktar, P., Dursun, B., Erguden, H. C., Gunay, S., & Sipit, T. (2014). Evaluation of IL-8 nasal lavage levels and the effects of nasal involvement on disease severity in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Inflammation*, 38(2), 616–622. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9968-0>
- [46] Vachier, I., Vignola, A. M., Chiappara, G., Bruno, A., Meziane, H., Godard, P., Bousquet, J., & Chanez, P. (2004). Inflammatory features of nasal mucosa in smokers with and without COPD. *Thorax*, 59(4), 303–307. <https://doi.org/10.1136/thx.2003.006650>
- [47] Pryor, W. A., & Stone, K. (1993). Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 686, 12–28. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1993.tb39148.x>
- [48] Bowler, R. P., Barnes, P. J., & Crapo, J. D. (2004). The role of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *COPD*, 1(2), 255–277. <https://doi.org/10.1081/copd-200027031>

- [49] Zang, L. Y., Stone, K., & Pryor, W. A. (1995). Detection of free radicals in aqueous extracts of cigarette tar by electron spin resonance. *Free radical biology & medicine*, 19(2), 161–167. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00236-d](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00236-d)
- [50] Nakayama, T., Church, D. F., & Pryor, W. A. (1989). Quantitative analysis of the hydrogen peroxide formed in aqueous cigarette tar extracts. *Free radical biology & medicine*, 7(1), 9–15. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90094-4](https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90094-4)
- [51] Di Stefano, A., Caramori, G., Ricciardolo, F. L., Capelli, A., Adcock, I. M., & Donner, C. F. (2004). Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 34(8), 1156–1167. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.02030.x>
- [52] Schaberg, T., Haller, H., Rau, M., Kaiser, D., Fassbender, M., & Lode, H. (1992). Superoxide anion release induced by platelet-activating factor is increased in human alveolar macrophages from smokers. *The European respiratory journal*, 5(4), 387–393.
- [53] Scott, D. A., Poston, R. N., Wilson, R. F., Coward, P. Y., & Palmer, R. M. (2005). The influence of vitamin C on systemic markers of endothelial and inflammatory cell activation in smokers and non-smokers. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 54(3), 138–144. <https://doi.org/10.1007/s00011-004-1335-4>
- [54] Northrop-Clewes, C. A., & Thurnham, D. I. (2007). Monitoring micronutrients in cigarette smokers. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 377(1-2), 14–38. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.08.028>
- [55] Li, X. Y., Donaldson, K., Rahman, I., & MacNee, W. (1994). An investigation of the role of glutathione in increased epithelial permeability induced by cigarette smoke in vivo and in vitro. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 149(6), 1518–1525. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.149.6.8004308>
- [56] Nishikawa, M., Kakemizu, N., Ito, T., Kudo, M., Kaneko, T., Suzuki, M., Udaka, N., Ikeda, H., & Okubo, T. (1999). Superoxide mediates cigarette smoke-induced infiltration of neutrophils into the airways through nuclear factor-kappaB activation and

- IL-8 mRNA expression in guinea pigs in vivo. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 20(2), 189–198. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.20.2.3305>
- [57] Marwick, J. A., Kirkham, P. A., Stevenson, C. S., Danahay, H., Giddings, J., Butler, K., Donaldson, K., Macnee, W., & Rahman, I. (2004). Cigarette smoke alters chromatin remodeling and induces proinflammatory genes in rat lungs. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 31(6), 633–642. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2004-0006OC>
- [58] Zong, D., Liu, X., Li, J., Ouyang, R., & Chen, P. (2019). The role of cigarette smoke-induced epigenetic alterations in inflammation. *Epigenetics & chromatin*, 12(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s13072-019-03111-8>
- [59] Rager, J. E., Bauer, R. N., Müller, L. L., Smeester, L., Carson, J. L., Brighton, L. E., Fry, R. C., & Jaspers, I. (2013). DNA methylation in nasal epithelial cells from smokers: identification of ULBP3-related effects. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 305(6), L432–L438. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00116.2013>
- [60] Joehanes, R., Just, A. C., Marioni, R. E., Pilling, L. C., Reynolds, L. M., Mandaviya, P. R., Guan, W., Xu, T., Elks, C. E., Aslibekyan, S., Moreno-Macias, H., Smith, J. A., Brody, J. A., Dhingra, R., Yousefi, P., Pankow, J. S., Kunze, S., Shah, S. H., McRae, A. F., Lohman, K., ... London, S. J. (2016). Epigenetic Signatures of Cigarette Smoking. *Circulation. Cardiovascular genetics*, 9(5), 436–447. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.116.001506>
- [61] Joubert, B. R., Felix, J. F., Yousefi, P., Bakulski, K. M., Just, A. C., Breton, C., Reese, S. E., Markunas, C. A., Richmond, R. C., Xu, C. J., Küpers, L. K., Oh, S. S., Hoyo, C., Gruziova, O., Söderhäll, C., Salas, L. A., Bätz, N., Zhang, H., Lepeule, J., Ruiz, C., ... London, S. J. (2016). DNA Methylation in Newborns and Maternal Smoking in Pregnancy: Genome-wide Consortium Meta-analysis. *American journal of human genetics*, 98(4), 680–696. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.02.019>
- [62] Hassan, F.-ul, Rehman, M. S.-ur, Khan, M. S., Ali, M. A., Javed, A., Nawaz, A., & Yang, C. (2019). Curcumin as an alternative epigenetic modulator: Mechanism of action

- and potential effects. *Frontiers in Genetics*, 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00514>
- [63] Gibbons R. J. (2005). Histone modifying and chromatin remodelling enzymes in cancer and dysplastic syndromes. *Human molecular genetics*, 14 Spec No 1, R85–R92. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi106>
- [64] Li, Y., & Seto, E. (2016). HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(10), a026831. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026831>
- [65] Chen, C. Q., Yu, K., Yan, Q. X., Xing, C. Y., Chen, Y., Yan, Z., Shi, Y. F., Zhao, K. W., & Gao, S. M. (2013). Pure curcumin increases the expression of SOCS1 and SOCS3 in myeloproliferative neoplasms through suppressing class I histone deacetylases. *Carcinogenesis*, 34(7), 1442–1449. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt070>
- [66] Liu, H. L., Chen, Y., Cui, G. H., & Zhou, J. F. (2005). Curcumin, a potent anti-tumor reagent, is a novel histone deacetylase inhibitor regulating B-NHL cell line Raji proliferation. *Acta pharmacologica Sinica*, 26(5), 603–609. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00081.x>
- [67] Das, P. M., & Singal, R. (2004). DNA methylation and cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22(22), 4632–4642. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.07.151>
- [68] Ehrlich M. (2009). DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics*, 1(2), 239–259. <https://doi.org/10.2217/epi.09.33>
- [69] Herman, J. G., & Baylin, S. B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *The New England journal of medicine*, 349(21), 2042–2054. <https://doi.org/10.1056/NEJMra023075>
- [70] Link, A., Balaguer, F., Shen, Y., Lozano, J. J., Leung, H. C., Boland, C. R., & Goel, A. (2013). Curcumin modulates DNA methylation in colorectal cancer cells. *PloS one*, 8(2), e57709. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057709>

- [71] Goodrich, J. M., Basu, N., Franzblau, A., & Dolinoy, D. C. (2013). Mercury biomarkers and DNA methylation among Michigan dental professionals. *Environmental and molecular mutagenesis*, 54(3), 195–203. <https://doi.org/10.1002/em.21763>
- [72] Kowalski, R. (2009). Ecological Chemistry and Engineering. *S = Chemia i Inżynieria Ekologiczna. S*, vol. 16, no. 2, 2009, pp. 155–162.
- [73] Zhang, H. H., Zhang, Z. Y., Che, C. L., Mei, Y. F., & Shi, Y. Z. (2013). Array analysis for potential biomarker of gemcitabine identification in non-small cell lung cancer cell lines. *International journal of clinical and experimental pathology*, 6(9), 1734–1746.
- [74] Boulougouris, X., Rogiers, C., Van Poucke, M., De Spiegeleer, B., Peelman, L., Duchateau, L., & Burvenich, C. (2019). Methylation of selected CpG islands involved in the transcription of myeloperoxidase and superoxide dismutase 2 in neutrophils of periparturient and mid-lactation cows. *Journal of dairy science*, 102(8), 7421–7434. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16027>
- [75] Umeda, Y., Hasegawa, Y., Otsuka, M., Ariki, S., Takamiya, R., Saito, A., Uehara, Y., Saijo, H., Kuronuma, K., Chiba, H., Ohnishi, H., Sakuma, Y., Takahashi, H., Kuroki, Y., & Takahashi, M. (2017). Surfactant protein D inhibits activation of non-small cell lung cancer-associated mutant EGFR and affects clinical outcomes of patients. *Oncogene*, 36(46), 6432–6445. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.253>
- [76] Liu, B., Hassan, Z., Amisten, S., King, A. J., Bowe, J. E., Huang, G. C., Jones, P. M., & Persaud, S. J. (2013). The novel chemokine receptor, G-protein-coupled receptor 75, is expressed by islets and is coupled to stimulation of insulin secretion and improved glucose homeostasis. *Diabetologia*, 56(11), 2467–2476. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-3022-x>
- [77] Barnett, J., Chow, J., Ives, D., Chiou, M., Mackenzie, R., Osen, E., Nguyen, B., Tsing, S., Bach, C., Freire, J., Chan, H., Sigal, E., & Ramesha, C. (1994). Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1209(1), 130–139. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)90148-1](https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)90148-1)

- [78] Hoshino, Y., Mio, T., Nagai, S., Miki, H., Ito, I., & Izumi, T. (2001). Cytotoxic effects of cigarette smoke extract on an alveolar type II cell-derived cell line. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 281(2). <https://doi.org/10.1152/ajplung.2001.281.2.1509>
- [79] Hellermann, G. R., Nagy, S. B., Kong, X., Lockey, R. F., & Mohapatra, S. S. (2002). Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells. *Respiratory research*, 3(1), 22. <https://doi.org/10.1186/rr172>
- [80] Chen, J., Higby, R., Tian, D., Tan, D., Johnson, M. D., Xiao, Y., Kellar, K. J., Feng, S., & Shields, P. G. (2008). Toxicological analysis of low-nicotine and nicotine-free cigarettes. *Toxicology*, 249(2-3), 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.05.009>
- [81] Cao, F., Liu, T., Xu, Y., Xu, D., & Feng, S. (2015). Curcumin inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in human osteoclastoma cell through MMP-9, NF- κ B and JNK signaling pathways. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(6), 6037–6045.
- [82] Khazaei Koohpar, Z., Entezari, M., Movafagh, A., & Hashemi, M. (2015). Anticancer Activity of Curcumin on Human Breast Adenocarcinoma: Role of Mcl-1 Gene. *Iranian journal of cancer prevention*, 8(3), e2331. <https://doi.org/10.17795/ijcp2331>
- [83] Silva, D., Cáceres, M., Arancibia, R., Martínez, C., Martínez, J., & Smith, P. C. (2012). Effects of cigarette smoke and nicotine on cell viability, migration and myofibroblastic differentiation. *Journal of periodontal research*, 47(5), 599–607. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2012.01472.x>
- [84] Yadav, S. K., Sharma, S. K., Farooque, A., Kaushik, G., Kaur, B., Pathak, C. M., Dwarakanath, B. S., & Khanduja, K. L. (2016). Cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) IVA as a potential signature molecule in cigarette smoke condensate induced pathologies in alveolar epithelial lineages. *Lipids in health and disease*, 15(1), 129. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0300-x>

- [85] Xiao, Y., Word, B., Lyn-Cook, L., Jr, Lyn-Cook, B., & Hammons, G. (2015). Cigarette smoke condensate and individual constituents modulate DNA methyltransferase expression in human liver cells. *SAGE open medicine*, 3, 2050312115578317. <https://doi.org/10.1177/2050312115578317>
- [86] Xu, H., Ferro, T. J., & Chu, S. (2007). Cigarette smoke condensate inhibits ENAC -subunit expression in lung epithelial cells. *European Respiratory Journal*, 30(4), 633–642. <https://doi.org/10.1183/09031936.00014107>
- [87] Pierson, T., Learmonth-Pierson, S., Pinto, D. et al. Cigarette smoke extract induces differential expression levels of beta-defensin peptides in human alveolar epithelial cells. *Tob. Induced Dis.* 11, 10 (2013). <https://doi.org/10.1186/1617-9625-11-10>
- [88] Eckers, J. C., Kalen, A. L., Xiao, W., Sarsour, E. H., & Goswami, P. C. (2013). Selenoprotein P inhibits radiation-induced late reactive oxygen species accumulation and normal cell injury. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 87(3), 619–625. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2013.06.2063>
- [89] Penney, K. L., Li, H., Mucci, L. A., Loda, M., Sesso, H. D., Stampfer, M. J., & Ma, J. (2013). Selenoprotein P genetic variants and mrna expression, circulating selenium, and prostate cancer risk and survival. *The Prostate*, 73(7), 700–705. <https://doi.org/10.1002/pros.22611>
- [90] Noutsios, G. T., Thorenor, N., Zhang, X., Phelps, D. S., Umstead, T. M., Durrani, F., & Floros, J. (2019). Major effect of oxidative stress on the male, but not female, SP-A1 Type II cell mirnome. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01514>
- [91] Shetty, G. A., Hattiangady, B., Upadhyaya, D., Bates, A., Attaluri, S., Shuai, B., Kodali, M., & Shetty, A. K. (2017). Chronic oxidative stress, mitochondrial dysfunction, NRF2 activation and inflammation in the hippocampus accompany heightened systemic inflammation and oxidative stress in an animal model of Gulf War Illness. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00182>

- [92] Baig, S., Parvaresh Rizi, E., Chia, C., Shabeer, M., Aung, N., Loh, T. P., Magkos, F., Vidal-Puig, A., Seet, R. C., Khoo, C. M., & Toh, S.-A. (2019). Genes involved in oxidative stress pathways are differentially expressed in circulating mononuclear cells derived from obese insulin-resistant and lean insulin-sensitive individuals following a single mixed-meal challenge. *Frontiers in Endocrinology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00256>
- [93] Lin, Y. L., Liu, C. C., Chuang, J. I., Lei, H. Y., Yeh, T. M., Lin, Y. S., Huang, Y. H., & Liu, H. S. (2000). Involvement of oxidative stress, NF-IL-6, and RANTES expression in dengue-2-virus-infected human liver cells. *Virology*, 276(1), 114–126. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0524>
- [94] Akel, H. (2020). *Oksidatif Stres Karşısında Hava Yolu İnflamatuvar ve Yapısal Hücrelerinde Antioksidan Cevabın Araştırılması* (thesis). Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- [95] Du, L., Xie, Z., Wu, L. C., Chiu, M., Lin, J., Chan, K. K., Liu, S., & Liu, Z. (2012). Reactivation of RASSF1A in breast cancer cells by curcumin. *Nutrition and cancer*, 64(8), 1228–1235. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.717682>
- [96] Shishodia, S., Potdar, P., Gairola, C. G., & Aggarwal, B. B. (2003). Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates cigarette smoke-induced NF-kappaB activation through inhibition of IkappaBalpha kinase in human lung epithelial cells: correlation with suppression of COX-2, MMP-9 and cyclin D1. *Carcinogenesis*, 24(7), 1269–1279. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg07>