



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**NAPELLİN VE TALATİSAMİN DİTERPEN UYGULAMALARININ  
DENEYSEL BEYİN TÜMÖR MODELİ ÜZERİNDEKİ POTANSİYEL  
ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Merve DEMİRBAĞ**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı**

**2018**

**Her hakkı saklıdır**



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**NAPELLİN VE TALATİSAMİN DİTERPEN UYGULAMALARININ**  
**DENEYSEL BEYİN TÜMÖR MODELİ ÜZERİNDEKİ POTANSİYEL**  
**ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Merve DEMİRBAĞ**

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Elanur AYDIN KARATAŞ**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı**

**Erzurum**

**2018**

**Her hakkı saklıdır**

**T.C.**  
**ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TEZ ONAY FORMU**

---

**NAPELLİN VE TALATİSAMİN DİTERPEN UYGULAMALARININ**  
**DENEYSEL BEYİN TÜMÖR MODELİ ÜZERİNDEKİ POTANSİYEL**  
**ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Öğr. Üyesi Elanur AYDIN KARATAŞ danışmanlığında, Merve DEMİRBAĞ tarafından hazırlanan bu çalışma 03/04/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ *İmza* :

Üye : Doç. Dr. Hakan AŞKIN *İmza* :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Elanur AYDIN KARATAŞ *İmza* :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

**Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ**  
**Enstitü Müdürü**

Bu çalışma Erzurum Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: 2017/20

## **ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

03 / 04 / 2018

Merve DEMİRBAĞ

## ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

### NAPELLİN VE TALATİSAMİN DİTERPEN UYGULAMALARININ DENEYSEL BEYİN TÜMÖR MODELİ ÜZERİNDEKİ POTANSİYEL ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Merve DEMİRBAĞ

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Elanur AYDIN KARATAŞ

Beyin kanserleri insanlarda görülen en agresif tümörlerden biridir. En ölümcül insan kanserleri arasında yer alan gliomalar, kemoterapötik ajanlara karşı yüksek direnç gösterirler. Diğer taraftan, çeşitli hastalıkların, özellikle kanser tedavisinde biyolojik etkili non-sentetik biyomalzemelerin keşfedilmesi günümüzün en popüler araştırma konularından biri olmaya devam etmektedir. Diterpenler, doğal bitki metabolitlerinin birkaç temel sınıfından biridir. Bu nedenle, mevcut tez çalışmasında, insan U-87 MG glioma hücrelerinde napellin ve talatisamin diterpenlerinin sitolojik, biyokimyasal ve moleküler genetik etkilerini araştırmayı amaçladık. Çalışma 3 aşamada olacak şekilde planlandı. İlk aşamada, toplam antioksidan kapasite (TAK) ve toplam oksidatif durum (TOD) parametreleri kullanılarak oksidatif etkiler gösterildi. İkinci aşamada U-87 MG hücrelerinde 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfenil)-2H-tetrazolium, iç tuz (MTS) ve laktat dehidrogenaz (LDH) salınım deneyi ile hücre canlılığı ve sitotoksosite parametreleri çalışıldı ve LC<sub>50</sub> doz değerleri belirlendi. Daha sonra, napellin ve talatisaminin LC<sub>50</sub> dozlarının 37 °C'de 24 saat inkübasyonu sonrasında apoptotik etkileri flow sitometri ile belirlendi. Son aşamada ise, napellin ve talatisamin diterpenlerinin U-87 MG hücrelerinde çeşitli genlerin ekspresyonu üzerindeki etkisi RT<sup>2</sup> Prolifer PCR Dizileri kullanılarak incelendi. Bulgularımız, napellin ve talatisaminin yüksek dozlarda sitototik etki sergilediğini ortaya koymuştur. U-87 MG hücrelerinde napellin ve talatisamin diterpenleri kontrol ile karşılaştırıldığında apoptozu arttırdığı gözlemlendi. Napellin, U-87 MG hücrelerinde 50 genin ekspresyonunun artışı, 13 genin ekspresyonunun azalışını indüklerken, talatisamin 32 genin ekspresyonunun artışı, 18 genin ekspresyonunun azalışını indüklemiştir. Napellinin talatisamininden daha yüksek antikanser aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Napellin ve talatisaminin glioblastoma tedavisinde yeni kemoterapötik ajanlar olarak değerlendirilebileceği kanaatindeyiz.

**2018, 52 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Glioblastoma Multiforme, Diterpenler, Antikanser Aktivite

## ABSTRACT

MASTER THESIS

### INVESTIGATION OF THE POTENTIAL ANTICANCER EFFECTS OF NAPELLINE AND TALATISAMINE DITERPENES ON EXPERIMENTAL BRAIN TUMOR MODELS

Merve DEMİRBAĞ

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Elanur AYDIN KARATAŞ

Brain cancers are one of the most aggressive tumours in humans. Especially, gliomas are among the deadliest of human cancers and show high resistance to chemotherapeutic agents. On the other hand, finding of biologically effective non-synthetic biomaterials in treatments of different diseases, especially cancer, has continued to be one of the most popular research topics today. Diterpenes are one of a few basic classes of natural plant metabolites. Therefore, in present thesis study, we aimed to investigate cytological, biochemical and molecular genetic effects of napelline and talatisamine diterpenes in human U-87 MG glioma cells. The study was planned to be carried out in three stages. In the first stage, oxidative effects were demonstrated by using total antioxidant status (TAK) and total oxidative status (TOS) parameters. In the second stage, cell viability and cytotoxicity parameters were studied by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) and lactate dehydrogenase (LDH) release assay in U-87 MG cells, respectively and  $LC_{50}$  dose was determined. Later, apoptotic effects were determined by flow cytometry subsequent to incubation with  $LC_{50}$  doses of napelline and talatisamine at 37°C for 24h. In the last stage, to obtain a clear insight into the molecular events after exposing, we examined the effect of selected napelline and talatisamine diterpenes on the expression of genes in U-87 MG cell cultures using RT<sup>2</sup> Prolifer PCR Arrays. Our results revealed that napelline and talatisamine exhibited cytotoxic effects at high doses. Napelline and talatisamine diterpenes increased apoptosis compared to control in U-87 MG cells. While napelline induced up-regulation of 50 and down-regulation of 13 genes, talatisamine induced up-regulation of 32 and down-regulation of 18 genes in U-87 MG cells. Napelline was shown to have a higher anticancer activity than talatisamine. We think that, napelline and talatisamine may be evaluated as new chemotherapeutic agents for treatment of glioblastoma.

**2018, 52 pages**

**Keywords:** Glioblastoma Multiforme, Diterpenes, Anticancer Activity

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım süresince görüş ve deneyimlerinden yararlandığım, desteğini her zaman hissettiğim danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Elanur AYDIN KARATAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında yardım ve desteğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk KARATAŞ'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Arő. Gör. Özlem ÖZDEMİR TOZLU'ya ve çalışma arkadaşlarım Fatma ŐANLI, Merve ŐİMŐEK, Nesliőah BARLAK ve Özel ÇAPIK'e teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi bu zorlu süreçte de yanımda olan, maddi manevi hiçbir desteğini esirgemeyen aileme yürekten teşekkür ederim.

**Merve DEMİRBAĞ**  
**Nisan 2018**

# İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Kanser .....	1
1.1.1 Hücre döngüsü .....	2
1.1.2 Epigenetik değişimler.....	3
1.1.3 Apoptoz.....	4
1.1.4 Oksidatif stres .....	5
1.2 Beyin Tümörleri .....	6
1.2.1 Glioblastoma multiforme .....	9
1.2.1.1 GBM tedavisi .....	10
1.3 Uçucu Yağlar .....	11
1.4 Terpenler ve Terpenoidler.....	12
1.4.1 Terpenlerin biyosentezi.....	12
1.4.2 Terpenlerin sınıflandırılması.....	14
1.4.2.1 Hemiterpenler.....	15
1.4.2.2 Monoterpenler .....	15
1.4.2.3 Seskiterpenler.....	16
1.4.2.4 Diterpenler.....	16
1.4.2.5 Sesterpen, triterpen, tetraterpen ve politerpen.....	19
1.5 Aromatik Bileşikler .....	19
1.6 Tez Kapsamında Test Edilen Diterpen Türevi Bileşikler .....	19
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ.....</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM .....</b>	<b>23</b>
3.1 Materyaller .....	23
3.2 Yöntem.....	24
3.2.1 Hücre kültürü .....	24



3.2.1.1 U87-MG hücre hattının kültür edilerek çoğaltılması .....	24
3.2.1.2 Hücrelerin deneye alınması .....	25
3.2.2 Toplam oksidan durum .....	26
3.2.3 Toplam antioksidan durum .....	26
3.2.4 Hücre canlılığının ölçülmesi ve MTS analizi .....	27
3.2.5 LDH analizi .....	28
3.2.6 Apoptozis .....	28
3.2.7 Moleküler toksisite tayini .....	29
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA .....</b>	<b>32</b>
4.1 Test Edilen Diterpenlerin <i>İn Vitro</i> Koşullar Altında Oluşturduğu Biyokimyasal Analiz Değerleri .....	32
4.2 Test Edilen Diterpenlerin <i>İn Vitro</i> Koşullar Altında Oluşturduğu Sitotoksosite Analiz Değerleri .....	33
4.3 Test Edilen Diterpenlerin <i>İn Vitro</i> Koşullar Altında Oluşturduğu Apoptoz Analizleri .....	37
4.4 Test Edilen Diterpenlerin <i>İn Vitro</i> Şartlar Altında U-87 MG Hücrelerinde Oluşturduğu Gen Ekspresyon Profillerinin Tespiti .....	39
<b>5. SONUÇ .....</b>	<b>45</b>
KAYNAKLAR .....	46
ÖZGEÇMİŞ .....	52

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler      Açıklama

$\alpha$	Alfa
%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
L	Litre
<	Küçük
$\Delta$	Delta
$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
ml	Mililitre
mmol	Milimol
$\mu\text{mol}$	Mikromol

### Kısaltmalar

Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CpG	Guanin sitozin adaları
CoA	Koenzim A
DISC	Ölümlle ilişkili sinyal kompleksi
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
FBS	Fetal bovine serum
GBM	Glioblastoma multiforme
IDH1-2	İzositrat dehidrogenaz 1-2

IPP	İzopentil difosfat
LDH	Laktat dehidrogenaz
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difenil tetrasodyum bromid
MVA	Mevalonat
PBS	Phosphate buffered saline
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
TAK	Toplam antioksidan kapasite
TOD	Toplam oksidan durum
TP53	Tümör protein 53
WHO	World health organization

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Hücre döngüsü şematik gösterimi.....	3
Şekil 1.2 WHO nöroepitelyal doku tümörlerinin alt grupları .....	8
Şekil 1.3 Primer ve sekonder GBM oluşumu ve görülen moleküler anormallikler.....	10
Şekil 1.4 İzopren birimi.....	12
Şekil 1.5 Bitkilerde izopentil difosfat ve dimetilalil difosfat biyosentezi.....	13
Şekil 1.6 Terpen bileşiklerinin sentezi .....	14
Şekil 3.1 U-87 MG hücrelerinin mikroskop görüntüleri .....	25
Şekil 4.1 İn vitro şartlar altında napellinin U-87 MG hücrelerindeki 24 ve 48 saatlik inkübasyonu sonucu oluşan TAK ve TOD değerleri .....	32
Şekil 4.2 İn vitro şartlar altında talatisaminin U-87 MG hücrelerindeki 24 ve 48 saatlik inkübasyonu sonucu oluşan TAK ve TOD değerleri .....	33
Şekil 4.3 U-87 MG hücrelerinde napellinin 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası gözlenen % canlılık değerleri.....	34
Şekil 4.4 U-87 MG hücrelerinde napellinin 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası gözlenen sitotoksosite .....	35
Şekil 4.5 5 U-87 MG hücrelerinde talatisaminin 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası gözlenen % canlılık değerleri.....	36
Şekil 4.6 U-87 MG hücrelerinde talatisaminin 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası gözlenen sitotoksosite değerleri .....	37
Şekil 4.7 Napellin ve talatisamin ile muamele edilen U-87 MG hücrelerinde Anneksin V-FITC yöntemine göre elde edilen apoptotik indeks .....	38
Şekil 4.8 Napellin ve talatisamin ile indüklenmiş hücrelerde Anneksin V-FITC analizi .....	38
Şekil 4.9 Napellin ve talatisaminin U-87 MG hücrelerinde oluşturduğu gen ekspresyon değişimleri.....	40

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 WHO merkezi sinir sistemi tümörlerinin derecelendirmesi .....	7
Çizelge 1.2 WHO sınıflandırmasına göre merkezi sinir sistemi tümörlerinin ana grupları .....	7
Çizelge 1.3 WHO Astrositik tümörler .....	9
Çizelge 1.4 Terpenlerin sınıflandırılması.....	15
Çizelge 1.5 Tez kapsamında kullanılan diterpen türevi bileşikler .....	20
Çizelge 3.1 Araştırmada kullanılan kit ve kimyasal listesi .....	23
Çizelge 3.2 Araştırmada kullanılan cihaz listesi .....	24
Çizelge 3.3 Moleküler Toksikoloji RT2 Profiler PCR Array yöntemi ile ekspresyon profilleri belirlenen genler ve biyolojik yollar .....	30

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Kanser

Kanser, hücrelerin hızlı ve düzensiz biçimde çoğalmasıyla, yakındaki ve metastaz yoluyla uzaktaki normal doku ve organları istila edebilen çeşitli hücrelerden köken alan çok kompleks bir hastalıktır (Evan and Vousden, 2001). Moleküler ve hücre biyolojisindeki tüm ilerlemelere rağmen insanları etkileyen en kompleks hastalıklardan biri olmaya devam etmektedir (Grizzi and Chiriva-Internati, 2006). Proliferasyon, kontrolsüz büyüme ve invazyon kanser gelişiminin genel basamaklarını oluşturmaktadır (Pflaum et al., 2014). Kanser oluşumunda bakterilerden virüslere, çevresel etkenlerden kalıtıma birçok faktör etkilidir. Kimyasallar, ilaçlar, yağlı yiyecekler, sigara, alkol, kömür tozu, alfatoksinler, kansere neden olan faktörler arasında sayılabilir (Yokuş ve Çakır, 2012).

Kanser, onkogenlerin aktivasyonu ya da tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu gibi çeşitli mutasyonlardan oluşan genomdaki dinamik değişiklikleri içermektedir (Hanahan and Weinberg, 2000). Kanser gelişimi bir dizi mutasyon içeren çok aşamalı bir süreçtir. Hücresel ve genomik instabilite kanserin karakteristik özelliğidir. Hücre siklusu kontrol noktalarındaki anormallikler, apoptoz mekanizmasındaki bozukluklar, hücre farklılaşması, DNA tamir mekanizmasından sorumlu proteinlerdeki mutasyonlar, RNA metabolizmasındaki bozukluklar gibi hücre fonksiyonlarını etkileyen spesifik mutasyonların birikmesi kanser hücresi oluşumuna neden olmaktadır (Bilge Debeleç-Bütüner ve Kantarcı, 2006).

Kanserler, moleküler ve genomik düzeyde incelendiğinde oldukça farklılık göstermelerine rağmen hepsinin ortak temel karakteristik özellikleri vardır. Bu özellikler;

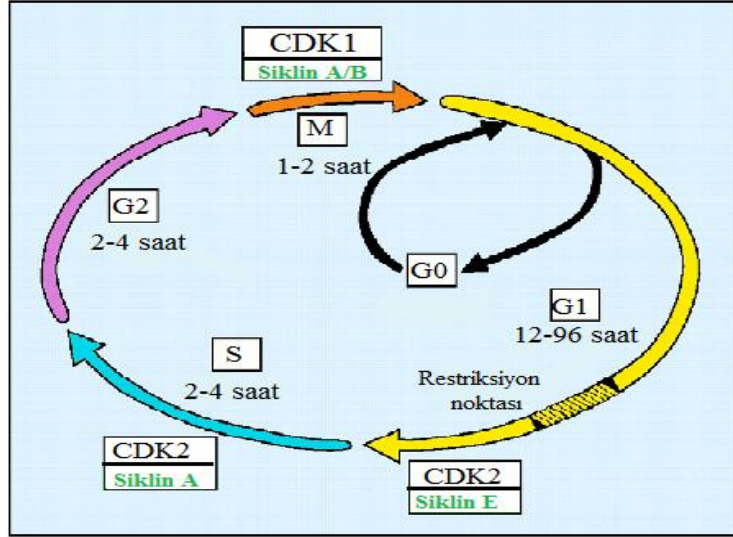
1. Büyüme sinyallerinde kendine yeterlilik,
2. Büyüme inhibitörlerine duyarsızlık,
3. Apoptozisten kaçınma,
4. Replikatif potansiyelin sınırsızlığı,

5. Anjiyogenezis mekanizması ile beslenebilme,
6. Doku invazyonu ve metastaz,
7. Telomeraz enzim aktivitesine sahip olma,
8. Enerji metabolizmasını değiştirerek hücre çoğalmasına katkı sağlayabilme,
9. İmmün sistemin tahribatından kaçabilme ve stres koşullarına karşı davranış değiştirebilme (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011).

### **1.1.1 Hücre döngüsü**

Hücre döngüsü, hücre genomunun replikasyonu ve aynı genetik bilgiye sahip iki hücrenin oluşumuyla sonuçlanan bir süreçtir (Israels and Israels, 2001; Howell and Lew, 2012). Hücre döngüsü G1, S, G2 ve M fazı olmak üzere ardışık dört fazdan oluşmaktadır (Williams and Stoeber, 2012). G1 fazı hücrenin büyüme ve gelişme gösterdiği evredir ve bu evrede hücre protein ve RNA sentezler. G1 fazından S fazına geçen hücrede protein ve RNA sentezi devam ederken hücre replikasyona başlar. DNA replikasyonunu tamamlayan hücreler G2 fazına geçer. Hücrenin mitoz bölünmeye hazırlandığı bu fazda protein ve RNA sentezi devam eder. M fazındaki hücre mitoz bölünme geçirerek ikiye bölünür (Williams and Stoeber, 2012). M fazından sonra bölünmeyen hücreler biyokimyasal olayların aktif olarak devam ettiği ve bölünmenin olmadığı G0 evresine geçer. Bu evre dinlenme evresi olarak tanımlanır (Yokuş ve Çakır, 2012).

Kanser oluşumunda hücre döngüsü önemli rol oynamaktadır. Hücre döngüsü kontrol noktaları, siklin bağımlı proteinler (CDK) tarafından düzenlenmektedir. Bu proteinlerde meydana gelen mutasyonlar hücrenin kanserleşmesine neden olmaktadır (Yokuş ve Çakır, 2012).



**Şekil 1.1** Hücre döngüsü şematik gösterimi (Israels and Israels, 2001' den modifiye edilerek alınmıştır).

### 1.1.2 Epigenetik değişimler

Epigenetik, gen ifadesindeki kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanır. Kalıtsal değişikliklerin çoğu farklılaşma esnasında olur ve aynı genetik bilgiye sahip farklı hücre ve organizmaların oluşmasını sağlar. Epigenetik değişimler genetik değişimlerden farklı olarak, primer gen dizisindeki değişikliklerden bağımsız ve geri dönüşümlüdür (Sharma et al., 2010; Hamilton, 2011). Fenotipi oluşturan genler ve ürünleri arasındaki etkileşimler olarak da tanımlanan epigenetik, kromatin yapısı ve gen fonksiyonları üzerindeki etkisini anlamaya yöneliktir (Sharma et al., 2010).

Biyolojik süreçlerde önemli 3 epigenetik değişiklik vardır; DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve kromozomun yeniden modellenmesi (Sharma et al., 2010). DNA metilasyonu, bir metil grubunun DNA dizisindeki sitozin halkasının 5' karbonuna DNA metiltransferazlarla kovalent olarak bağlanmasını içeren mekanizmadır (Jin et al., 2011). DNA metilasyonu bütün memeli hücrelerinde gen susturma, kromatin organizasyonu, X-kromozom inaktivasyonu, tekrarlayan elementlerin susturulması, genetik damgalama (imprinting) gibi kritik biyolojik süreçlerde görev alır (Sharma et al., 2010). Ayrıca gen regülasyonunda da önemli rollere sahiptir. Genomda sitozin ve guanine zengin bölgeler CpG adaları olarak tanımlanır (Nafee et al., 2008)). Genlerin 5' ucuna lokalize olan CpG adaları genlerin yaklaşık %60'ının promotör bölgesinde bulunur (Nafee et al., 2008); Sharma et al., 2010). CpG adalarındaki hipermetilasyon



veya hipometilasyon kanser hücresi oluşumunda kritik bir öneme sahiptir (Bird, 1996; Jones and Laird, 1999). Histonlarda meydana gelen asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikitinasyon ve sumolasyon gibi modifikasyonlar kromatin yapısını değiştirerek gen anlatımını düzenleyen epigenetik mekanizmalardır (Santos-Rosa and Caldas, 2005; Kouzarides, 2007). Epigenetik mekanizmalarda meydana gelen mutasyonlar kanser oluşum sürecinde önemli etkilere sahiptir (Sharma et al., 2010).

### **1.1.3 Apoptoz**

Programlı hücre ölümü olarak tanımlanan apoptoz, organizmada homeostasiyi sağlayan temel biyolojik bir süreçtir (Favaloro et al., 2012). Son yıllarda programlı hücre ölümüne başka formlar da eklenerek genişletilmiştir; otofaji ve nekroz. Programlı hücre ölümü, özellikle apoptoz ve nekroz, malign hücrelerin hayatta kalmasını ve yayılmasını engelleyen doğal mekanizmalardır. Kanser hücreleri programlı hücre ölümü yollarında genetik mutasyonlar ve epigenetik modifikasyonlara neden olarak programlanmış hücre ölümlerinden kaçış stratejileri geliştirir (Su et al., 2015).

Apoptoz genel olarak hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, kromozomal DNA fragmentasyonu, nükleer parçalanma ve membran parçalanması ile karakterize edilen programlanmış hücre ölümüdür. İki temel apoptotik sinyal yolağı vardır; iç (intrinsik) ve dış (extrinsik) (Su et al., 2015).

İntrinsik apoptotik yolak, DNA hasarı, oksidatif stres gibi çeşitli hücre içi uyarılara yanıt olarak başlatılır. Bu yolak, apoptozom olarak adlandırılan, prokaspaz-9 apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) ve sitokrom c'den oluşan bir kompleksin oluşumuna dayanır. Bir dizi Bcl-2 ailesi üyesi mitokondriyal membran permeabilizasyonunu düzenleyerek Sitokrom c (mitokondri iç membranında bulunan elektron taşıma zinciri proteini)'nin salınımına yol açar (Su et al., 2015). Sitokrom c Apaf-1'e bağlanır ve apoptozom kompleksi oluşur. Prokaspaz 9 aktif kaspaz 9'a dönüşür ve hücreyi ölüme götüren kaspaz 3, 6 ve 7 gibi efektör kaspazları harekete geçirir. Proteolitik olarak aktif enzimleri parçalayan kaspazlar hücrede inaktif halde bulunur Bcl-2 ailesi apoptozda en önemli role sahip onkoprotein grubudur. Anti-

apoptotik (Bcl-2 ve Bcl-X<sub>L</sub>) ve pro-apoptotik (Bax, Bid gibi) üyelerden oluşur (Atagün, 2011).

Ekstrinsik apoptotik yolak, ölüm ligantlarının (TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand “TRAIL”, Fas ligandı ve TNF- $\alpha$ ) TNF reseptör süperaillesine bağlanmasıyla başlatılır. Ölümle ilişkili sinyal kompleksi (DISC) oluşur ve ardından efektör kaspazlar (kaspaz 3,6 ,7) aktifleşerek hücreyi ölüme götürür (Su et al., 2015).

#### **1.1.4 Oksidatif stres**

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde ortaklaşmamış elektron bulunduran atom veya moleküllerdir. Kararsız yapıda olan bu moleküller diğer moleküllerle etkileşime girerek kararlı hale geçme eğilimi gösterir (Büyükuslu ve Yiğitbaşı, 2015; Karabulut ve Gülay, 2016). Serbest radikaller oksijen kaynaklı reaktif oksijen türleri (hidroksil, peroksil, süperoksit, lipit peroksil, alkoksil) ve nitrojen kaynaklı reaktif nitrojen türleri (nitrik oksit ve nitrojen dioksit) olarak isimlendirilir (Halliwell, 2006; Valko et al., 2007; Pham-Huy et al., 2008).

Serbest radikaller endojen ve eksojen kaynaklı olabilir. Mitokondri, peroksisom ve stres endojen kaynaklar arasında sayılabilir. En önemli endojen kaynak mitokondridir. Mitokondride aerobik solunum sırasında yan ürün olarak serbest radikaller üretilir. Eksojen kaynaklar arasında ise UV ışınlar, gamma ışınları, mikrodalga ışınları, sigara ve egzoz dumanı, organik maddelerin yakılması ve deterjanlar, boyalar ve ilaçlar gibi çeşitli kimyasal maddeler sayılabilir (Karabulut ve Gülay, 2016).

Yüksek yoğunlukta serbest radikaller lipit, protein, karbonhidrat ve nükleik asitlerde yapısal bozukluklara neden olduğundan canlılar üzerinde zararlı etkilere sahiptir (Karabulut ve Gülay, 2016). Reaktif oksijen türleri (ROS)’un aşırı üretimi oksidatif stresin gelişmesine neden olmaktadır. Oksidatif stres birçok hastalıkta olduğu gibi kanserde de önemli bir faktördür. Birçok kimyasal karsinojen, direkt olarak veya hücrel antioksidan savunma mekanizmalarının modifikasyonu ile oksidatif strese neden olmaktadır. Oksidatif stres DNA, protein ve lipit hasarlarına, kromozom

instabilitesinde değişimlere, genetik mutasyonlara ve hücre büyümesinin modülasyonuna neden olarak kanser oluşumuna katkıda bulunabilmektedir (Klaunig et al., 2010).

## 1.2 Beyin Tümörleri

Merkezi spinal kanal veya beyindeki hücrelerin anormal ve kontrolsüz bölünmeleri sonucu meydana gelen bir intrakranyal neoplazi olan beyin tümörleri, beyinden köken alan primer beyin tümörleri ve metastaz sonucu oluşan sekonder beyin tümörleri olmak üzere iki başlık altında toplanmaktadır (Kheirollahi et al., 2015). Çocuklarda ve yetişkinlerde kansere bağlı ölümlerin en yaygın nedenlerinden biri olan beyin tümörleri, her yaşı grubunda yıkıcı ve ölümcül etkilere neden olmaktadır (Lawrence et al., 2014; Kheirollahi et al., 2015).

Primer beyin tümörleri yaygın olmamakla birlikte her yıl dünya genelinde 200.000 insanı etkilemekte ve insidansı hızla artmaktadır (Lee et al., 2010; Kheirollahi et al., 2015). Primer beyin tümörleri genetik ve çevresel faktörlerin bir kombinasyonunu içeren multifaktöriyel bir hastalıktır. Beyin kanserinin etiyojisi çok iyi anlaşılamamakla birlikte genetik ve çevresel faktörlerin etkili olduğu bilinmektedir (Miranda Filho et al., 2014). Vinil klorit, iyonize radyasyon ve HIV enfeksiyonu beyin tümörleriyle ilişkili olarak bilinen çevresel faktörler arasındadır. Yapılan çalışmalar beyin tümörüyle cep telefonu arasında bir ilişki ortaya çıkarmamış olsa da bazı raporlar radyasyonun beyin tümörü için çevresel bir faktör olduğunu öne sürmektedir (Huson et al., 1986; Frei et al., 2011). Primer beyin tümörlerinin %5-10'unun genetik bozukluklar sonucu olduğu görülmektedir. Tümör supresör gibi bazı genlerin mutasyon ve delesyonu sonucu oluşan değişimlerin, beyin tümörü oluşumunda etkili genetik faktörler olduğu düşünölmektedir. Mitokondriyal sitrik asit döngüsü ve apoptozda rol oynayan izositrat dehidrogenaz 1 (IDH1) ve izositrat dehidrogenaz 2 (IDH2) genlerindeki mutasyonlar gliomalarda apoptoz eksikliği ve vaskularizasyona neden olabilmektedir (Kheirollahi et al., 2015).

Merkezi sinir sistemi tümörleri, benign tümörlerden malign tümörlere doğru I-IV arasında derecelendirilerek sınıflandırılmıştır. Tümör gelişim oranını belirten bu

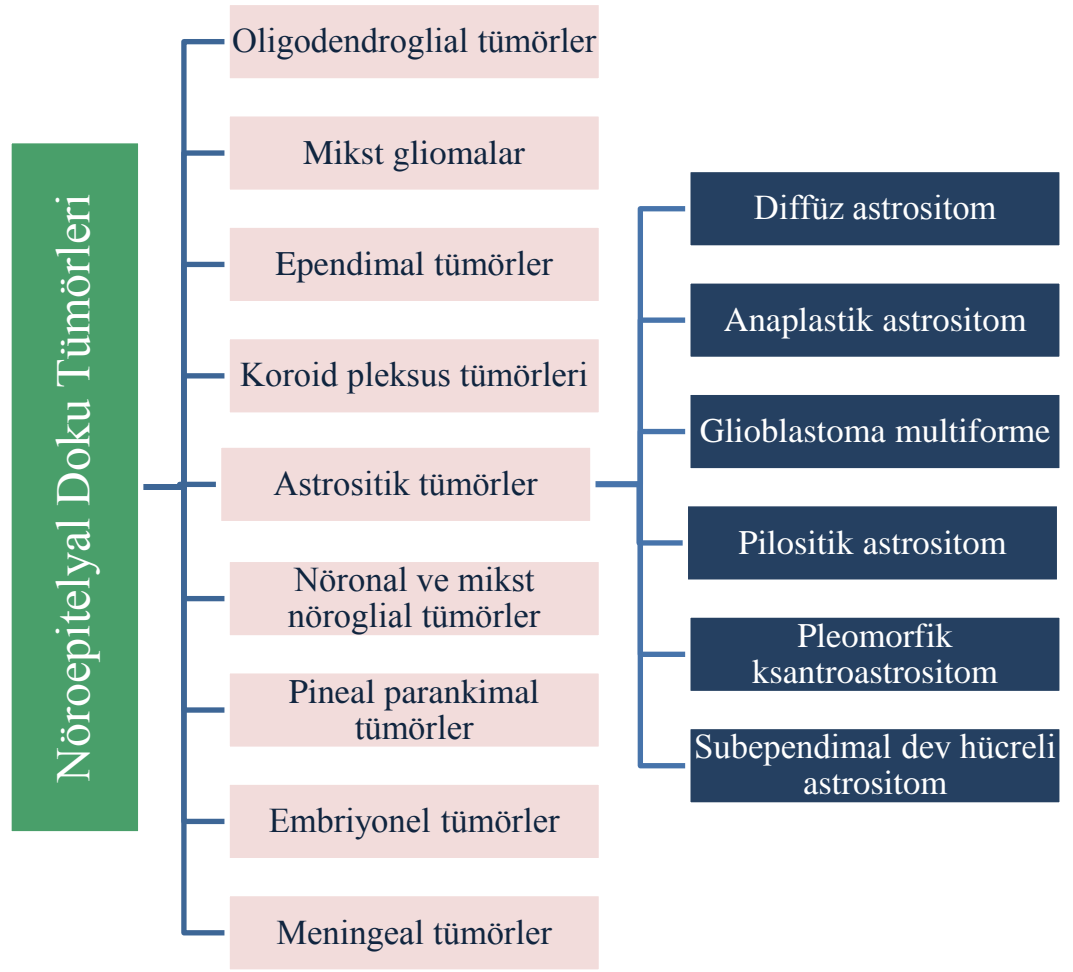
sınıflandırma Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından düzenlenerek ilk baskısı Zólch tarafından hazırlanmış ve 1979 yılında yayımlanmıştır. Günümüzde hala geçerliliğini sürdüren bu sınıflandırma, en son 2007 yılında dördüncü kez güncellenmiştir (Louis et al., 2007). Merkezi sinir sistemi tümörlerinin WHO derecelendirmesi Çizelge 1.1; merkezi sinir sistemi tümörlerinin WHO sınıflandırmasına göre ana grupları Çizelge 1.2 ve nöroepitelyal doku tümörlerinin alt grupları Şekil 1.2’de gösterilmiştir.

**Çizelge 1.1** WHO merkezi sinir sistemi tümörlerinin derecelendirmesi.

Derece I	Yavaş büyüyen tümör, uzun vadede hayatta kalma, ameliyat sonrası iyileşme fırsatı
Derece II	Nispeten yavaş büyüyen, genellikle tekrarlayan, bazen yüksek dereceli maligniteye eğilimlidir
Derece III	Yüksek proliferatif potansiyeli, histolojik olarak malign
Derece IV	Hızlı proliferasyon, sitolojik olarak malign tümör, çok agresif

**Çizelge 1.2** WHO sınıflandırmasına göre merkezi sinir sistemi tümörlerinin ana grupları.

Nöroepitelyal Doku Tümörleri
Kranyal ve Paraspinal Sinir Tümörleri
Meninks Tümörler
Lenfomalar ve Hematopoyetik Tümörler
Germ Hücre Tümörleri
Sellar Bölge Tümörleri
Metastatik Tümörler



**Şekil 1.2** WHO nöroepitelyal doku tümörlerinin alt grupları.

## **Glioma**

Glial hücrelerden köken alan gliomalar merkezi sinir sisteminin en yaygın tümörleridir ve tüm primer beyin ve merkezi sinir sistemi malign tümörlerinin %30'undan fazlasını oluşturur (Anjum et al., 2017). Gliomalar merkezi sinir sisteminde herhangi bir yerde olabilir ancak öncelikle beyinde meydana gelir ve glial dokuda ortaya çıkar (Ostrom et al., 2014). Gliomalar primer malign beyin tümörlerinin neredeyse %80'ini oluştururlar ve ölüm oranı diğerlerine göre daha yüksektir (Anjum et al., 2017). Gliomalar astrositom, glioblastoma, oligodendroglioma, ependimoma, mikst glioma, malign gliomalar ve nadir görülen diğer histolojik varyantlar olarak sınıflandırılmaktadır (Jhanwar-Uniyal et al., 2015). WHO sınıflandırmasına göre gliomalar benign tümörlerden malign tümörlere doğru derece I, II, III, IV olacak şekilde

dört farklı tipten oluşmaktadır (Anjum et al., 2017). Çizelge 1.3'te WHO sınıflandırmasına göre astrositik tümörler ve örnekleri gösterilmiştir.

**Çizelge 1.3** WHO Astrositik tümörler.

Derece I	Subependimal dev hücreli asrositom Pilositik astrositom
Derece II	Pilomiksoid astrositom Diffüz astrositom Pleomorfik ksantroastrositom
Derece III	Anaplastik astrositom
Derece IV	Glioblastoma Gliosarkom Dev hücreli glioblastoma

### 1.2.1 Glioblastoma multiforme

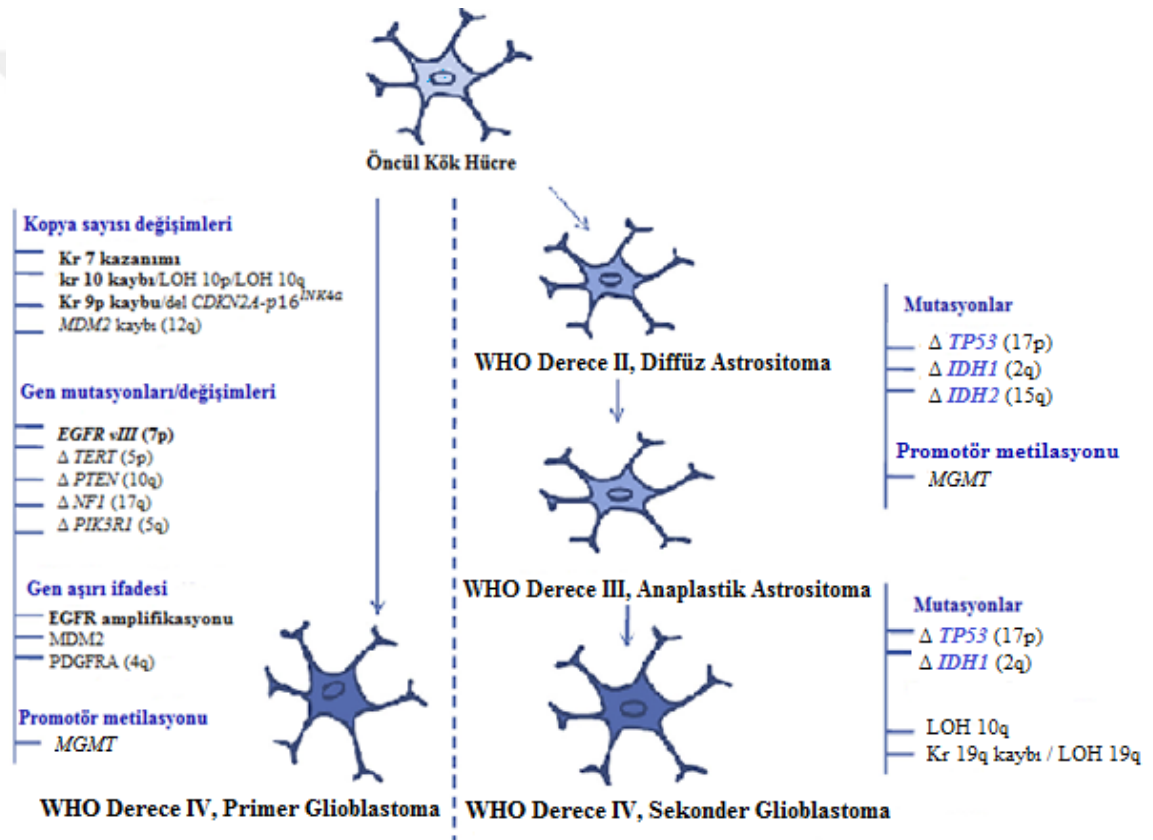
Yetişkinlerde görülen en yaygın primer beyin tümörü olan glioblastoma multiforme (GBM), insanlarda görülen en agresif kanserlerden biridir (Krakstad and Chekenya, 2010). GBM, WHO tarafından düzenlenmiş olan sınıflandırmada IV astrositom olarak adlandırılmıştır (Louis et al., 2007). Gliomanın en öldürücü formu olan glioblastoma multiforme, “multiform” teriminden de anlaşılacağı gibi oldukça değişken bir histopatolojiye sahiptir (Stupp et al., 2005). Gliomaların %65’ini oluşturan GBM, gliomanın en sık görülen ve malign histolojik tipidir. Genel olarak 40 yaş üstü yetişkinlerde görülmektedir ve erkeklerde görülme sıklığı daha fazladır (Jhanwar-Uniyal et al., 2015). Ortalama 6 ay içerisinde belirti vermektedir (Markett et al., 2005).

GBM’nin iki alt grubu bulunmaktadır; primer GBM (yaklaşık %95) ve sekonder GBM (Kleihues and Ohgaki, 1999). Primer ve sekonder GBM farklı yaş gruplarını etkilemekte ve genetik yollarını farklılık göstermektedir (Ohgaki and Kleihues, 2007).

Primer GBM yaşlı bireylerde (55-60) daha sık görülür ve hızlı ilerler. Hızlı gelişen primer GBM ilk 3 ay içerisinde klinik belirti vermektedir. 10q kaybı (%70),

EGFR amplifikasyonu (%36), p16INK4a delesyonu (%31) ve PTEN mutasyonu (%25) primer GBM’de görülen genetik değişimlerdir (Crespo et al., 2015).

Düşük derece diffüz astrositoma veya anaplastik astrositomadan gelişen (GBM’ye dönüşmesi ortalama 4-5 yıl sürmekte) ve yavaş progresyon gösteren sekonder GBM daha genç bireylerde ortaya çıkma eğilimindedir (Ohgaki and Kleihues, 2007; Crespo et al., 2015). Sekonder GBM’de TP53 mutasyonuna rastlanmaktadır (Ohgaki and Kleihues, 2007). Primer ve sekonder GBM oluşumu ve görülen anormallikler Şekil.1.3’te gösterilmiştir.



Şekil 1.3 Primer ve sekonder GBM oluşumu ve görülen moleküler anormallikler (Crespo et al., 2015’den modifiye edilerek alınmıştır).

### 1.2.1.1 GBM tedavisi

Tedavide ilk yaklaşım, cerrahi müdahale ile tümörlü dokunun uzaklaştırılıp ardından kemoterapi ve radyoterapi uygulamasıdır. Ancak uygulanan cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi tedavilerinde istenilen sağ kalım oranlarına ulaşamamıştır

(Markett et al., 2005). GBM'nin yerleşimi dolayısıyla tümörlü doku tamamen uzaklaştırılmamakta, bu da kanserin tekrarlamasına yol açmaktadır. Bu durum cerrahi yöntem sonrası kemoterapi ve radyoterapi uygulamalarını gerektirmektedir. Ancak kanser hücrelerinin ilaç direnci kazanmaları, tekrarlayan GBM tedavisini oldukça zorlaştırmaktadır (Bozkurt vd., 2013). GBM tedavisinde kesin bir çözüme ulaşılamamakla birlikte immün ve DNA bazlı terapi, kök hücre, kodlanmamış miRNA'ların manipülasyonu gibi yaklaşımlar mevcuttur (Jhanwar-Uniyal et al., 2015).

### 1.3 Uçucu Yağlar

Uçucu yağlar bitkilerde bulunan, hücreler arası iletişimde ve savunma mekanizmalarında rol oynayan sekonder metabolitlerdir. Uçucu özellikte, sıvı, berrak (nadiren renkli), güçlü bir kokuya sahip doğal ve kompleks bileşikler olan uçucu yağlar, sudan daha düşük yoğunlukta lipit veya organik çözücülerde çözünür (Trapp and Croteau, 2001b; Bakkali et al., 2008; Llana-Ruiz-Cabello et al., 2015). Uçucu yağlar, genellikle Akdeniz ve Tropik ülkeler gibi ılık ve sıcak bölgelerde yetişen çeşitli aromatik bitkilerden elde edilir. Bitkilerin tüm organlarından (tomurcuk, çiçek, yaprak, sap, dal, kök, kabuk, meyve, tohum) sentezlenebilen bu yağlar salgı hücreleri, kanallar, boşluklar, epidermik hücreler ve glandular trikomlar içerisinde depolanır (Bakkali et al., 2008).

Günümüzde, 300'ü özellikle ilaç, gıda, tarım, sağlık, kozmetik ve parfüm endüstrileri için ticari önem taşıyan, kimyasal olarak tanımlanmış yaklaşık 3000 tane uçucu yağ bilinmektedir (Bakkali et al., 2008). İçeriklerinde yüksek konsantrasyonlarda (% 20-70 oranlarında) bulunan iki veya üç ana bileşen ile karakterize edilen uçucu yağlarda diğer bileşenler eser miktarlarda bulunmaktadır (Dubey et al., 2003). Uçucu yağlar genellikle buharla veya hidrodamıtmayla elde edilmekle birlikte sıvı karbondioksit, mikrodalga, kaynar su veya buhar ile düşük veya yüksek basınçlı distilasyon gibi metodlarla da ekstrakte edilebilmektedir (Bakkali et al., 2008).

Bugüne kadar yapılan çeşitli çalışmalarda aktif biyolojik bileşenlerin zengin bir kaynağı olan uçucu yağların antimikrobiyal, antibakteriyel, antikandidal, antipiretik, analjezik, anti-inflamatuar, antioksidan, antikanser, antifungal, antiviral, böcek

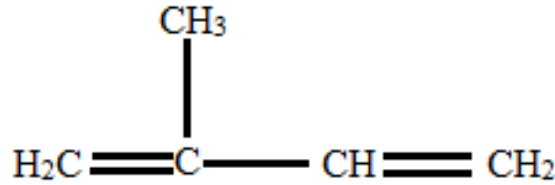


öldürücü, anti-tümör, immünomodülatör gibi çok çeşitli etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Barel et al., 1991; Prabuseenivasan et al., 2006; Bakkali et al., 2008; Costa et al., 2012; Costa et al., 2014; Kazemi and Rostami, 2015). Kimyasal olarak terpen ve bunların oksijenli bileşiklerinden türetilen uçucu yağlar kimyasal yapılarına göre iki ana biyosentetik kökene ayrılabilir:

- 1-Terpenler ve terpenoidler,
- 2- Aromatik bileşenler (Pichersky et al., 2006).

#### 1.4 Terpenler ve Terpenoidler

Terpenler, patolojik ve fizyolojik süreçlerde önemli rollere sahip sayısız bileşikten (en az 30.000) oluşan en büyük doğal ürün grublarından biridir (Sacchettini and Poulter, 1997). Yapılarında oksijen bulunduran terpenler terpenoid olarak adlandırılır (Bakkali et al., 2008). Biyosentezleri genel olarak izopren birimlerinin sentezi yoluyla olur (Dubey et al., 2003).



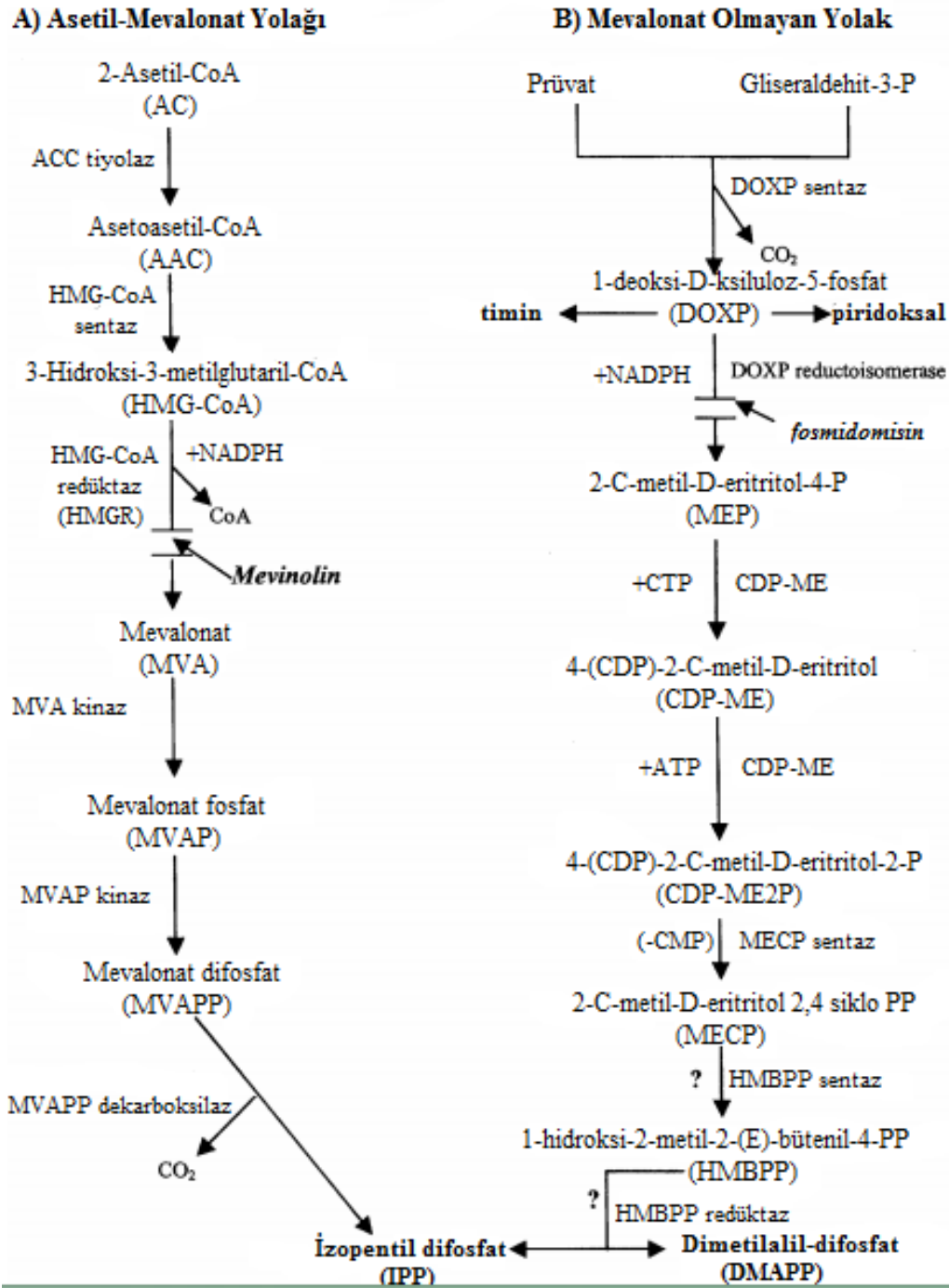
Şekil 1.4 İzopren birimi.

##### 1.4.1 Terpenlerin biyosentezi

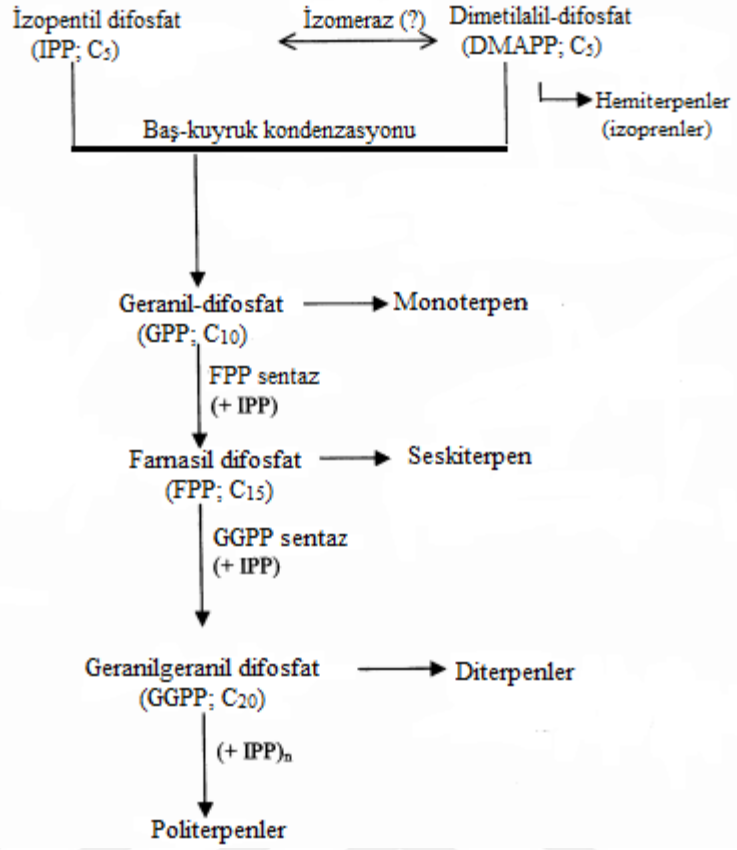
Bütün terpenler izopentil difosfattan (IPP, aktif beş karbonlu izopren birimi) türetilmektedir (Trapp and Croteau, 2001a). IPP sentezi, asetil koenzim A (CoA) ile başlayan asetil mevalonat yolağı ve mevalonat olmayan yolak ile gerçekleşir (Lichtenthaler, 1999).

Klasik asetil mevalonat yolağı, üç mol asetil CoA'nın 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) oluşturmak üzere yoğunlaştırılmasını içerir. Bu indirgenme

sonrasında mevalonat (MVA) oluşur. HMG-CoA'nın MVA'ya indirgenmesi HMG-CoA redüktaz (HMGR) enzimi ile katalizlenir. MVA daha sonra fosforilasyon ve dekarboksilasyon içeren üç ardışık basamak vasıtasıyla IPP'ye dönüştürülür (Rodwell et al., 2000). IPP ve dimetilalil difosfat (DMAPP) sentezi Şekil 1.5'te; terpenlerin oluşumu ise Şekil 1.6'da gösterilmiştir.



Şekil 1.5 Bitkilerde izopentil difosfat ve dimetilalil difosfat biyosentezi (Dubey et al., 2003'den modifiye edilerek alınmıştır).



**Şekil 1.6** Terpen bileşiklerinin sentezi (Dubey et al., 2003'den modifiye edilerek alınmıştır).

#### 1.4.2 Terpenlerin sınıflandırılması.

Terpenler içerdikleri izopren sayısına göre hemiterpen, monoterpen, seskiterpen, diterpen, sesterpen, triterpen, tetraterpen ve politerpenler olarak sınıflandırılır (McGarvey and Croteau, 1995). Terpenlerin sınıflandırılması Çizelge 1.4'te gösterilmiştir.

**Çizelge 1.4** Terpenlerin sınıflandırılması.

İzopren Sayısı	Sınıfı	Karbon Sayısı
1	Hemiterpen	5
2	Monoterpen	10
3	Seskiterpen	15
4	Diterpen	20
5	Sesterpen	25
6	Triterpen	30
8	Tetraterpen	40
N	Politerpen	(5) <sub>n</sub>

#### 1.4.2.1 Hemiterpenler

Beş karbonlu en küçük terpen birimidir (Çulhaoğlu 2011).

#### 1.4.2.2 Monoterpenler

Monoterpenler iki izopren molekülünün birleşmesiyle oluşur (C<sub>10</sub>). Uçucu yağların %90'ını monoterpenler oluşturur (Bakkali et al., 2008). Monoterpenler asiklik, monosiklik ve bisiklik olmak üzere üç gruba ayrılır. Asiklik monoterpenler, gül, bergamut, limon, melisa gibi bitkilerden elde edilen osimen, nerol, linalol, geraniol gibi bileşiklerdir. Monosiklik monoterpenler arasında nane, okaliptüs, kimyon, defne gibi bitkilerin yapısında bulunan mentol, menton, limonen gibi bileşikler sayılabilir. Bisiklik monoterpenler grubunda ise pire otu, kuş dili, pelin otu, kedi otu, solucan otu bitkilerinden elde edilen sabinen, kamfen, tujon, fençon, kamfor gibi bileşikler yer alır (Türk, 2010; Cellat vd., 2011).

### 1.4.2.3 Seskiterpenler

Seskiterpenler üç izopren biriminden oluşur ( $C_{15}$ ). Seskiterpenler yapı ve işlev bakımından monoterpenlere benzer (Bakkali et al., 2008). Terpenlerin en geniş sınıfını oluşturur (Robbers et al., 1996).

### 1.4.2.4 Diterpenler

Diterpenler dört izopren birimi, dolayısıyla dallanmış metil gruplarıyla 20 karbon atomu içeren terpenlerdir. Oksitlenmiş formları diterpenoid olarak adlandırılır (Dubey et al., 2003). Diterpenler asiklik, monosiklik ve bisiklik diterpenler olmak üzere üç gruba ayrılabilir. Asiklik diterpenler 20 karbon ve içerdiği süstitüentlere bağlı olarak 20'den fazla karbon atomu içeren doymuş ya da doymamış yapılardır. Asiklik diterpenler halkalı yapıya sahip değildir. Asiklik diterpenlere örnek olarak E ve  $K_1$  vitaminlerinin öncüsü olan fitol verilebilir. Özellikle deniz yosunlarından elde edilen monosiklik diterpenler karasal bitkilerde yaygın değildir. Bu diterpenlere örnek olarak Viridolis A verilebilir (Hanson, 1998). Bisiklik diterpenler iki grupta incelenir; Labdanlar ve Kloredanlar. Geranil-geranil pirofosfatın enzimatik siklizasyonu sonucu bisiklik yapıdaki labdan ara ürünü oluşur. Manool ve Sclareol labdan yapıdaki diterpenlere örnektir (Gören, 2002). Genel olarak çift çenekli bitkilerden izole edilen kloredanlar böcek öldürücü etki göstermektedir. Trisiklik diterpenler bisiklik diterpenlerin halkalaşması sonucu oluşmaktadır. Trisiklik diterpenler 4 farklı iskelet yapısına sahiptir; pimarane, abietane, kassane ve rosan (Karabacak, 2007). Reçine asitleri olarak da adlandırılan pimarane, kozalaklı ağaçların reçinelerinde bulunur. Oldukça yaygın olan bu diterpenlerin en çok bilinen türevleri izopimarik asit ve sandarakopimarik asittir. Pimarane metil grubunun ayrılması sonucu abietane oluşur. Abietik asit bu grubun en yaygın şekilde bilinen bir üyesidir. Aromatik abietanların antibakteriyel ve antitüberküloz aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Ertaş, 2005; Karabacak, 2007). Kassanlarda abietanlardan farklı olarak metil grubu C-14' e geçer. Rossanlar, Friedo veya Backbone tipi düzenlenme içeren alternatif bir halkalaşma ile oluşur (Ertaş, 2005).

Diterpenler mevalonik ve non-mevalonik asit yolaklarının her ikisiyle de sentezlenebilir (Dubey et al., 2003). Diterpenler retinol, retinal, taksol, fitol gibi biyolojik açıdan önemli bileşiklerin temelini oluşturur. Yaygın olarak yiyeceklerde ve kozmetikte katkı maddesi olarak kullanılır. Bunun yanı sıra diterpenlerin anti-karsinojenik, anti-inflamatuar, antioksidan, antimikrobik, anti-kanser, yara iyileştirici, antihipertansif, analjezik ve nörofarmakolojik aktivitelerinin olduğu çeşitli araştırmalarda rapor edilmiştir (Chang et al., 2007; Costa et al., 2012; Costa et al., 2014).

### **Diterpenlerin biyolojik aktiviteleri**

Diterpenler daha çok antioksidatif ve sitotoksik özellik göstermektedir. Bununla birlikte test edilen konsantrasyonlara bağlı olarak değişken aktiviteler gösterebilir (Bakkali et al., 2008).

### **Antioksidan aktivite**

Peroksidatif süreçler ve serbest radikaller, kardiyovasküler hastalıklar, bazı kanser türleri, inflamatuvar hastalıklar ve nörodejeneratif bozukluklar gibi sayısız hastalıkta rol oynamaktadır (Vendemiale et al., 1999; Halliwell et al., 1999). Serbest radikallerin bozucu etkisi yiyeceklerde bulunan doğal antioksidanlarla azaltılabilir (Ramos et al., 2003). Bu nedenle antioksidan kaynağı olan tıbbi bitkiler ilgi konusu olmuştur (Atawodi et al., 2005; Maiga et al., 2006). Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda karnozol (Carvalho et al., 2015)), karnozik asit, rosmadial, rosmarinik asit (Petiwala and Johnson, 2015), lobokompaktol A ve B (Minh et al., 2011), foliol, linearol, sidol (Gonzalez-Burgos et al., 2013) ve jatrofan (Chen et al., 2014) gibi bazı önemli diterpenlerin potansiyel antioksidan kapasiteleri rapor edilmiştir.

### **Antimikrobiyal, antiviral ve antimalarial aktivite**

Bir veya daha fazla aktif –OH grubuna sahip antioksidan aktivite gösteren maddeler, bakteri, mantar ve virüs gibi çeşitli organizmaların zar geçirgenliğini arttırabilir. Yüksek konsantrasyonlardaki diterpen bileşenleri, yüksek lipofitelerinden

dolayı hücre içene kolayca nüfuz edebilir ve öylece organelleri de içeren temel hücresel bileşenlerin kaybedilmesine ve hücre ölümüne neden olabilir (İslam et al., 2016). Bu özelliklere sahip diterpenler arasında *ent*-beyer-15-en-19-ol (Drewes et al., 2006), kasban ve pirazol ile kaynaşmış trisiklik diterpenler yer almaktadır (Yu et al., 2015). Yapılan araştırmalarda *ent*-pimaran, *ent*-pimara-8(14),15-dien-19-oic asit (PA), PA sodyum tuzu, *ent*-8(14), 15-pimaradien-3beta-ol, *ent*-15-pimaran-8 beta,19-diol, *ent*-8(14),15-pimaradien3beta-asetoksi diterpenlerinin antibakteriyel; 16- $\alpha$ -hidroksikleroda-3,13(14)Z-dien-15,16-olid diterpeninin antifungal ve *ent*-labden ve dolabelan diterpenlerinin antiviral aktiviteye sahip olduğu kaydedilmiştir (Pardo-Vargas et al., 2014; Bhattacharya et al., 2015).

### **Antikanser aktivite**

Diterpenler sitotoksik özelliklere sahip olduğu gibi hücresel hedefleme yeteneğine de sahiptir. Böylelikle programlanmış hücre ölümünü etkileyebilir. *In vivo* ve *in vitro* bazı çalışmalar, diterpenlerin tümör ve kanserli hücrelerin büyümesinin kontrol altına alınması için umut vadeden maddeler olduğunu göstermektedir. Bitkisel kaynaklı diterpenlerin bir türü olan taksonlar, kemoterapötik ajan olarak (örneğin; meme, yumurtalık, akciğer, mesane, prostat, melanoma ve diğer katı tümörler için) yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. *Taxus sumatran* (Shen et al., 2005) ve (+)-7-deoksinimbidiol'den izole edilen beş taksan diterpen esterinin bir dizi insan kanser hücre hattına karşı önemli antikanser aktivite sergilediği gözlenmiştir (Xiong et al., 2006). Antioksidan ve sitotoksik özelliklere sahip diterpenler kanser tedavileri için iyi bir araç olabilir. *Premna serratifolia* L'nin metanolik özünden izole edilen bir diterpen [11,12,16-trihidroksi-2-okso-5-metil-10-demetil-abiyeta-1 (10), 6,8,11,13-penten] SHSY-5Y nöroblastoması ve B16 melanoma hücreleri üzerinde test edildiğinde, önemli antikanser aktivitesi göstermiştir (Habtemariam and Varghese, 2015). Ayrıca trisiklik biyoaktif klerodan diterpenoidlerin, insan ve farelerden türeyen bir dizi kanser hücresinde apoptozise yol açan bir anti-proliferatif harekete neden olduğu gösterilmiştir (dos Santos et al., 2010; Ferreira et al., 2016).

#### **1.4.2.5 Sesterpen, triterpen, tetraterpen ve politerpen**

Geranil-geranil pirofosfata bir izopren birimi eklenmesiyle oluşan sesterpenler  $C_{25}H_{40}$  formülüne sahiptir. Triterpenler  $C_{30}H_{48}$  molekül formülüne sahiptir ve 6 izopren molekülünün birleşmesiyle oluşur. 8 izopren molekülü içeren tetraterpenler  $C_{40}H_{56}$  molekül formülüne sahiptir. Politerpenler ise birçok izopren ünitesinin bağlanması sonucu oluşur (Gören, 2002).

#### **1.5 Aromatik Bileşikler**

Aromatik bileşikler benzen halkası ihtiva eden organik bileşiklerdir. Fenilpropan dan türetilen aromatik bileşikler terpenlerden daha az sıklıkla meydana gelir. Aromatik bileşikler; aldehytlar, alkoller, fenoller, metoksi türevleri ve metilen dioksi bileşikleri olarak gruplandırılabilir. Bu bileşiklerin başlıca bitki kaynakları, anason, tarçın, karanfil, rezene, hindistan cevizi, maydanoz, yıldız anason, tarhın ve bazı botanik ailelerdir (Bakkali et al., 2008).

#### **1.6 Tez Kapsamında Test Edilen Diterpen Türevi Bileşikler**

Tez kapsamında 2 adet diterpen türevi bileşik kullanılmıştır; napellin ve talatisamin. Bu bileşiklerin kimyasal formülleri ve kimyasal yapıları Çizelge 1.5'te gösterilmiştir.



**Çizelge 1.5** Tez kapsamında kullanılan diterpen türevi bileşikler (Turabekova et al., 2008; Song et al., 2008'den alınmıştır).

Bileşiğin Adı	Kimyasal Formülü	Kimyasal Yapısı
<b>Napellin</b>	$C_{22}H_{33}NO_3$	
<b>Talatisamin</b>	$C_{24}H_{39}NO_5$	

### **Napellin**

Napellin *Aconitum genus*, *Ranunculaceae* bitkilerinden elde edilen diterpenoid alkaloiddir. Güçlü bir antiaritmid olan napellinin antinosiseptif ve anti-epileptik özelliklere sahip oldukları da bildirilmiştir (Turabekova et al., 2008). Napellin, mezenkimal kök hücreleri harekete geçirerek yaraların iyileşmesini hızlandırır. Ayrıca diterpenoid alkaloidler antiinflamatuar, antikanser, anti-epileptik ve antiparazitik etkiye sahiptir (Kiss et al., 2017).

### **Talatisamin**

Talatisamin *Aconitum talassicum* bitkisinden ekstrakte edilen bir delphinine tip alkaloiddir (Cherney and Baran, 2011). Yeni tanımlanmış bir  $K^+$  kanal engelleyicidir. Voltaj-kapılı  $K^+$  ( $K_v$ ) kanalları hücrenin elektriksel aktivitesini düzenlemede önemli rol oynar.  $K_v$  kanalları hiperpolarizasyonu indükler, membran uyarılabilirliğini azaltır ve periferik ve merkezi nöronlarda  $K^+$  akışını artırır (Song et al., 2008).

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kumar et al. (2004) geleneksel olarak Hindistan, Çin ve Güneydoğu Asya' daki farklı hastalıkları tedavi etmek için bir ilaç olarak kullanılan *Andrographis paniculata* bitkisinden izole edilen andrografolid diterpeninin HT-29 (kolon kanseri) hücreleri üzerinde antikanser etki sergilediğini rapor etmişlerdir.

Trisonthi et al. (2014) *Litsea cubeba* meyvelerinin metanol ekstraktından izole edilen bir diterpenik yapıda kubelinin insan servikal adenokarsinoma (HeLa) hücrelerinde hücre canlılığını ve proliferasyonu azalttığı kaydedilmiştir. Kubelin ayrıca hücrelerin nükleer morfolojilerinde apoptotik hücre ölümünün göstergeleri olan değişikliklere neden olmuştur.

Dhanasekaran et al. (2009) *Tinospora cordifolia* bitkisinden izole edilen bir diterpen olan (5R, 10R) -4R, 8R-dihidroksi-2S, 3R: 15,16-diepoksisiloda-13 (16), 17,12S: 18,1S-dilaktonun kemopreventif etkisi dietilnitrosamin ile indüklenen hepatosellüler karsinom sıçanlarında araştırmışlardır. (5R, 10R) -4R, 8R-dihidroksi-2S, 3R: 15,16-diepoksisiloda-13 (16), 17,12S: 18,1S-dilaktonun in vivo da kemopreventif etkiye sahip olduğu kaydedilmiştir.

Huang et al. (2004) *Casearia membranacea* bitkisinden izole edilen 6 farklı kaseamembrin diterpen türevlerinin PC-3 hücrelerinde hücre proliferasyonu üzerine ve apoptotik etkilerini araştırmışlardır. Araştırmanın sonucunda kaseamembrin diterpenlerinin hücre proliferasyonu inhibe ettiği sulforodamin B yöntemi ile belirlenirken, kaspaz-3 ve kaspaz-9'u aktifleştirerek ekstrinsik ve intrinsek apoptozu indüklediği rapor edilmiştir.

Sai Prakash et al. (2002) *Casearia lucida* bitkisinin kabuğundan izole ettikleri 11 yeni klerodan diterpenin ve 3 klerodan diterpenoidlerin yumurtalık kanseri (A2780) hücre hattına karşı sitotoksositeye neden olarak antikanser aktivite sergilediklerini tespit etmişlerdir.

Islam et al. (2015); İslam et al., 2016) klorofil kaynaklı bir diterpen olan fitolün, antioksidan, sitotoksik, antimitojenik, antibiyotik-kemoterapötik ve nörofarmakolojik aktiviteleri içeren çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Sharma et al. (2018) *Tinospora cordifolia* bitksinden zirole edilen ve yeni bir klerodan furano diterpenoidin kolon kanseri hücrelerinde (HCT116 )mitokondri aracılı apoptoz, reaktif oksijen türlerinin üretimi ve otofajiyi indükleyerek antianser aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Morita et al. (1991) *Croton lechleri*' den izole edilen klerodan türevlerinin prostat kanserinde anti-tümör ve apoptotik aktivite gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

Zhou et al. (2007) triptolidin *in vitro* pankreatik kanser hücrelerinin (ASPC-1, PANC-1 ve SW1990) proliferasyonu ve apoptozu üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Triptolidin ASPC-1, PANC-1 ve SW1990 hücre hatlarında belirgin bir şekilde büyümeyi inhibe edici etkiye sahip olduğu ve bazı genlerin ekspresyonunu değiştirerek (5-LOX ve BCL2 gibi ) apoptozu indüklediği kaydedilmiştir.

Block et al. (2005) *Croton zambesicus*'un yapraklarından izole edilen bir diterpen bileşik olan entravriloban-3-beta-ol'ün HL-60 hücrelerinde hücre canlılığını azaltarak sitotoksik aktivite gösterdiğini bildirmiştir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1 Materyaller

Tez kapsamında kullanılan U-87 MG insan glioblastoma hücre hattı ATCC® hücre kültürü koleksiyonundan temin edildi. Çalışmada kullanılan kitler ve kimyasal maddeler Çizelge 3.1’de, cihazlar ise Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.1** Araştırmada kullanılan kit ve kimyasal listesi.

<b>Kitler</b>	<b>Temin Edildiği Firma</b>
Total Antioxidant Status (TAS) kiti	Rel Assay Diagnostics®
Total Okxidant Status (TOS) kiti	Rel Assay Diagnostics®
MTS Cell Proliferation Assay Kit	Promega®
LDH Cytotoxicity Assay Kit	Thermo Scientific®
cDNA sentez kiti	Applied Biosystems®
RT <sup>2</sup> Profiler PCR Array Kit	Qiagen®
<b>Kimyasal Maddeler</b>	<b>Temin Edildiği Firma</b>
DMEM	Sigma-Aldrich® (Germany)
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich® (Germany)
Fetal Bovin Serum (FBS)	Gibco®
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich® (Germany)
Penisilin/Streptomisin	Gibco®
Tripsin/EDTA	Sigma-Aldrich® (Germany)
Etil alkol	Sigma-Aldrich® (Germany)
Kloroform	Sigma-Aldrich® (Germany)
Triton-X 100	Cell Biolabs (Chinese)

**Çizelge 3.2** Araştırmada kullanılan cihaz listesi.

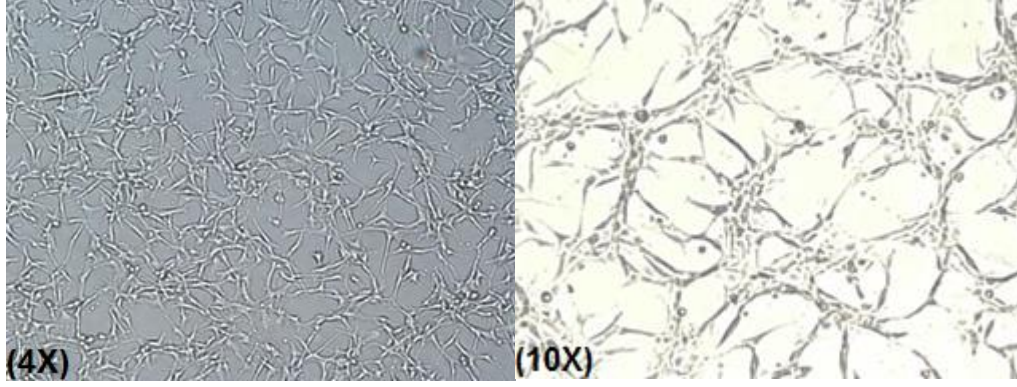
<b>Cihazın Adı</b>	<b>Modeli</b>
+4 °C buz dolabı	Edesa
Ultra saf su cihazı	Millipore, Q-3W
Flow sitometrisi	Partec
Qiagen Rotor gene	Qiagen
-80 °C derin dondurucu	ESCO Lexicon
-20 °C derin dondurucu	Templo
Oktoklav	JSR, JSAC-60
CO <sub>2</sub> inkübatör	ESCO Celculture
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10
Su banyosu	Daihan
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
Mini santrifüj	WiseSpin
Hassas terazi	Shimadzu ATX224
İnverted Mikroskop	Leica DFC450C Model: CH-9435
Biyogüvenlik Kabini	ESCO NordicSafe™
Spektrofotometre	Biotek EPOCH

## **3.2 Yöntem**

### **3.2.1 Hücre kültürü**

#### **3.2.1.1 U87-MG hücre hattının kültür edilerek çoğaltılması**

Çalışmada insan glioblastoma hücresi olan U-87 MG hücre hattı kullanıldı. Hücreler steril flasklarda (25 cm<sup>2</sup>'lik) % 10 FBS, % 1 penisilin/streptomisin ve % 1 L-glutamin içeren DMEM içerisinde (5 ml), 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 2 günde bir besiyeri değiştirilerek büyütüldü. % 80 yoğunluğa ulaşan hücreler pasajlanarak çoğaltıldı. U-87 MG hücrelerinin mikroskop görüntüsü Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.1** U-87 MG hücrelerinin mikroskop görüntüleri (4X, 10X).

### **3.2.1.2 Hücrelerin deneye alınması**

Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler tripsinle tutundukları yüzeyden kaldırılarak besiyeri içerisinde çözüldü. Hemositometre kullanılarak hücre sayımı yapıldı. 96 kuyucuklu platelere her bir kuyuda 3000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler yüzeye tutunması için 37 °C’de % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi. 24 saatin sonunda kuyucuklardaki mediumlar pipet yardımıyla yüzeyden uzaklaştırıldı. Yüzeye tutunmuş halde bulunan hücrelere % 0.1 DMSO ve suda çözünen 2 ayrı bileşik belirlenen dozlarda (1, 2.5, 5, 10, 25, 50 100, 200, 400, 800, 1000 µg/mL) 5 tekrar olacak şekilde uygulandı ve 37 °C’de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde (24 ve 48 saat) kültüre edildi. Kültürler sonlandırıldıktan sonra Toplam Oksidan Durum (TOD), Toplam Antioksidan Durum (TAK), Hücre Canlılığının Ölçümü (MTS) ve Laktat dehidrogenaz (LDH) yöntemleri uygulandı. Her iki bileşik için LC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı.

Apoptoz ve gen ekspresyon profillerin tespiti için ise, yeterli yoğunluğa ulaşan U-87 MG hücreleri tripsinle tutundukları yüzeyden kaldırılarak hemisitometre ile sayım yapıldı ve her bir kuyucuk için 100.000 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plate’e ekim yapıldı. Hücreler yüzeye tutunmaları için 37 °C’de % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Her iki bileşik için de belirlenen LC<sub>50</sub> dozlarında ekim yapıldı, 37 °C’de % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 48 saat inkübe edildi.

### 3.2.2 Toplam oksidan durum

Bu yöntemin temel prensibi, incelenilen örnekte bulunan ferroz iyon bağlayıcı molekül kompleksinin ferrik iyonla oksitlenmesidir. Ferrik iyonu asidik ortamda kromojen ile renkli bir kompleks oluşturur. Rengin yoğunluğu örnekte bulunan oksidan moleküllerinin toplam miktarıyla ilişkilidir ve spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir. Çalışmada Rel Assay Diagnostics® firmasına ait Total Oxidant Status (TOS) kiti kullanıldı. Uygulama kitte yer alan prosedüre göre yapıldı.

Belirlenen süre ve dozlarda bileşikler ile muamele edilen her bir hücrenin mediumu alınarak yeni bir 96 kuyucuklu plate'e her kuyuda 37,5 µl olacak şekilde aktarıldı. Örneklerin üzerine kitte yer alan Reagent 1 solüsyonundan 250'şer µL eklendi. İyi karışması sağlanarak oda sıcaklığında 30 dk bekletildi. Süre sonunda 530 nm dalga boyunda birinci absorbans değeri okundu. Daha sonra kitte yer alan Reagent 2 solüsyonundan 12,5'er µl eklenerek ikinci absorbans değeri okundu. Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Sonuçlar} = (\Delta \text{Abs Örnekte}) / (\Delta \text{Abs Standart}) \times \text{Standartın Konsantrasyonu} \quad (3.1)$$

$A_2 - A_1 =$  Standart veya örneğin absorbans değerlerinin farkı ( $\Delta \text{Abs}$ )

Birim:  $\mu\text{mol} / \text{L}$

Standartın konsantrasyonu:  $10 \mu\text{mol}/\text{L}$

### 3.2.3 Toplam antioksidan durum

Bu yöntemde temel olarak, örnekteki antioksidan olan koyu mavi-yeşil renkli ABTS, renksiz ABTS formuna indirgenmektedir. 660 nm dalga boyundaki absorbans değişimi örnekteki toplam antioksidan seviyesiyle ilişkilidir. Çalışmada Rel Assay Diagnostics® firmasına ait Total Antioxidant Status (TAS) kiti kullanıldı. Uygulama kitte yer alan prosedüre göre yapıldı.

Belirlenen süre ve dozlarda bileşikler ile muamele edilen her bir hücrenin mediumu alınarak yeni bir 96 kuyucuklu plate'e her kuyuda 15 µl olacak şekilde

aktarıldı. Örneklerin üzerine kitle yer alan Reagent 1 solüsyonundan 250'şer µl eklendi. İyiye karışması sağlanarak oda sıcaklığında 30 dk bekletildi. Süre sonunda 660 nm dalga boyunda birinci absorbans değeri okundu. Daha sonra kitle yer alan Reagent 2 solüsyonundan 37.5'er µl eklenerek ikinci absorbans değeri okundu. Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Sonuçlar}=[(\Delta\text{Abs H}_2\text{O})-(\Delta\text{Abs örnek})] / [(\Delta\text{Abs H}_2\text{O})-(\Delta\text{Abs standart})] \quad (3.2)$$

A2-A1 = Standart veya örneğin absorbans değerlerinin farkı ( $\Delta\text{Abs}$ )

Birim: mmol / L

### 3.2.4 Hücre canlılığının ölçülmesi ve MTS analizi

Metabolik aktivite temelli proliferasyon testi olan bu yöntemde mitokondri enzimlerinin substratı olan maddeler hücrelere verilerek kolorimetrik analiz yapılmaktadır. Yöntem, canlı hücreler tarafından mitokondrinin MTS boyasının tetrazolium halkasını parçalayarak renkli formazan bileşiğini oluşturması ilkesine dayanmaktadır.

MTS analizi için Promega® firmasına ait CellTiter 96® *AQueous* One Solution Cell Proliferation Assay kiti kullanıldı. Analiz kitteki prosedüre göre uygulandı. Belirlenen konsantrasyonlarda bileşikler ile muamele edilen 96 kuyucuklu plate'teki hücreler 24 saatlik ve 48 saatlik kültür sürelerinin sonunda, yüzeydeki hücrelere zarar vermeyecek şekilde tüm kuyucuklardaki mediumlar uzaklaştırıldı (pozitif kontrol olarak Triton-X kullanıldı). Her bir kuyucuk için 10 µl MTS solüsyonu 50 µl besiyeri olacak şekilde karışım hazırlandı. Hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 60 µl olacak şekilde karanlık ve steril ortamda eklendi. Hücreler 37 °C'de 2,5-3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda absorbans değeri elde edildi. Uygulanan her bileşik ve konsantrasyon için yüzde canlılık ve sitotoksisite değerleri hesaplandı.



### 3.2.5 LDH analizi

LDH yönteminde, ölü veya hasarlı hücrelerden ortama salınan laktat dehidrogenaz (LDH) enzim seviyesi kantitatif ve kolorimetrik olarak saptanmaktadır. Bu analizde, spektrofotometrik olarak ölçülebilen kırmızı bir formazan ürünü ile sonuçlanan bir enzimatik reaksiyon ile kültür ortamındaki hücre dışı LDH seviyesi ölçülmektedir.

Bu çalışmada Thermo Scientific® firması tarafından üretilen Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit kullanıldı. Analiz kitte yer alan prosedüre göre uygulandı. 96 kuyucuklu plate'lere ekilen hücreler her iki bileşik ile belirlenen konsantrasyonlarda 24 saat ve 48 saat muamele edildi. İnkübasyon sürelerinin sonunda plate'lerdeki besiyerinin 50 µl'si yeni bir 96 kuyucuklu plate' e alındı. Her bir kuyucuğa kitte yer alan reaksiyon karışımından (Reaction Mixture; kitteki prosedüre göre hazırlandı) 50 µl eklendi ve yarım saat karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletildi. Yarım saatin sonunda her bir kuyucuğa kitte yer alan stop solüsyonundan 50 µl eklendi. 490 nm ve 680nm dalga boylarında okutularak absorbans değerleri elde edildi. Uygulanan her bileşik ve her konsantrasyon için aşağıdaki formüle göre yüzde canlılık ve sitotoksosite değerleri hesaplandı.

$$\% \text{ Sitotoksosite} = \frac{\text{Bileşik ile muamele edilen LDH aktivitesi} - \text{Spontane LDH aktivitesi}}{\text{Maksimum LDH aktivitesi} - \text{Spontane LDH aktivitesi}} \times 100 \quad (3.3)$$

### 3.2.6 Apoptozis

Napellin ve talatisaminin hücre apoptozunun üzerine etkilerini belirlemek için 6 kuyucuklu plate'e her kuyuda 100.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. U-87 MG hücreleri belirlenen LC<sub>50</sub> dozlarında bileşikler ile muamele edilerek 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler tutuntukları yüzeyden tripsinle kaldırılarak eppendorf tüplere alındı ve PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Hücrelerdeki apoptotik aktivite değişimi Annexin V-FITC Apoptosis Kiti ile üretici firmanın protokolü takip edilerek CyFlow® Cube 6 akım sitometri cihazı ile ölçüldü.

### **3.2.7 Moleküler toksisite tayini**

#### **RNA izolasyonu**

6 kuyucuklu plate'e her kuyuda 100.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler belirlenen LC<sub>50</sub> dozlarında bileşikler ile muamele edilerek 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler tutuntukları yüzeyden tripsinle kaldırılarak eppendorf tüplere alındı. Hücreler mini santrifüjde, 8000 rpm'de 10 sn santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Tüpte kalan hücrelerin üzerine 1 ml PBS eklenerek 8000 rpm'de 10 sn santrifüj edildi, PBS uzaklaştırıldı. Pelletin üzerine 500 µl trizol eklenerek 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. 5 dk'nın sonunda 100 µl kloroform eklenerek çalkalandı, 2-3 dk oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme süresinin sonunda +4 °C'de, 10.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda 3 ayrı faz oluşumu gözlemlendi; RNA, DNA+Protein ve organik faz. RNA'nın olduğu üst faz yeni bir eppendorf tüpe aktarıldı. Üzerine 250 µl izopropanol eklenerek 3-5 defa alt üst edildi. 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Ardından +4 °C'de 12.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pelletin üzerine 1 ml %70'lik etanol eklendi. +4 °C'de 7500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve 50 µl nükleaz free saf su eklenerek RNA çözüldü. Çözülen RNA'lar buz üzerine alındı.

#### **cDNA reaksiyonu**

Napellin ve talatisamin'in U-87 MG hücreleri üzerine etkisinin daha geniş bir örnek setinde doğrulanması için RNA örnekleri kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Örneklerden elde edilen total RNA' lar konsantrasyonları 1000 ng/µl olacak şekilde seyreltildi. cDNA sentez işlemleri High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit kullanılarak kitle yer alan prosedüre göre gerçekleştirildi.

#### **RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array yöntemi**

RT<sup>2</sup> Profiler PCR array yöntemi çok sayıda genin ekspresyonunun eş zamanlı olarak belirlenebildiği, microarray ve gerçek zamanlı PCR tekniğinin kombine edildiği bir yöntemdir. RT<sup>2</sup> Profiler PCR dizileme bir hastalık veya biyolojik süreçlerle ilişkili

genlerin bir levha üzerinde analiz edilmesi için tasarlanmıştır. Qiagen® firmasından temin edilen RT<sup>2</sup> Profiler PCR dizileme kiti kullanılarak PCR işlemi yapıldı. ThermoFisher® firmasından temin edilen Power SYBR Green PCR Master Miksinin içine cDNA örnekleri eklendi ve elde edilen bu karışım ile gerçek-zamanlı PCR array yapıldı. Son olarak, elde edilen veriler  $\Delta\Delta CT$  metodu kullanılarak genlerin ekspresyon düzeyleri tespit edildi. Moleküler Toksikoloji RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array yöntemi ile ekspresyon profilleri belirlenen, 13 farklı biyolojik yolaktaki 84 anahtar gen Çizelge 3.3'te gösterilmiştir.

**Çizelge 3.3** Moleküler Toksikoloji RT2 Profiler PCR Array yöntemi ile ekspresyon profilleri belirlenen genler ve biyolojik yollar.

<b>Biyolojik Yolak</b>	<b>Genler</b>
Apoptozis	AKT1, BCL2, BCL2L1, CASP8, CASP9 FASLG
Nekrozis	CYLD, GRB2, MAG, PARP2, PVR, TXNL4B
DNA Hasarı ve Tamiri	ATM, BRCA1, CDKN1A, ERCC2, MDM2, RAD51
Mitokondriyal Enerji Metabolizması	ARRDC3, ASB1, CYB561D1, DNAJB1, HSPA1A, HSPA1B, SLC25A25
Yağ Asidi Metabolizması	ACADM, ACADVL, ACOX1, CPT1A, CPT1B, CPT2
Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistemler	AKR1C2, FHL2, GCLM, HMOX1, NCOA7, NQO1, SLC7A11
Isı Şoku Protein Metabolizması	HSF1, HSP90B1, HSPA4, HSPA8, HSPB1, HSPD1,
Endoplazmik Retikulum Stres ve Katlanmamış Protein Yanıtı	ADM2, ASNS, DNAJB9, HERPUD1, INHBE, TRIB3, UHRF1
Sitokrom P450 ve Faz I Metabolizması	CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6
Steatoz	CD36, FASN, LPL,PPARA, SCD, SREBF1
Kolestaz	ABCB4, ABCC2, ABCC3, ATP8B1, OSTalpha, PDYN, RDX
Fosfolipitozis	ASAH1, HPN, LSS, SERPINA3, SLC2A3, TAGLN, WIPI1
İmmünotoksisite	ADH1C, F2, HPX, LYZ, METAP2, MKI67, NR5A2, TRIM10

## **İstatistiksel analiz**

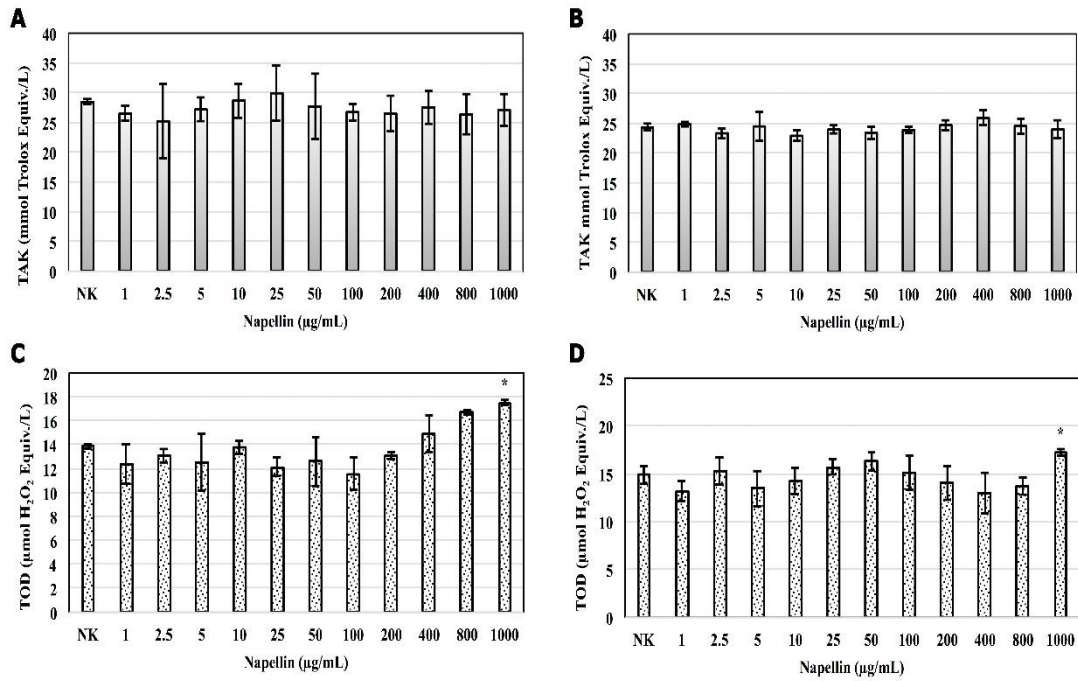
İstatistiksel analizler Student's t-test testi Microsoft Excel 2011 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) kullanılarak tespit edildi. İstatistik analizler sırasında güven aralığı 0.05 olarak belirlendi.



#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

##### 4.1 Test Edilen Diterpenlerin *İn Vitro* Koşullar Altında Oluşturduğu Biyokimyasal Analiz Değerleri

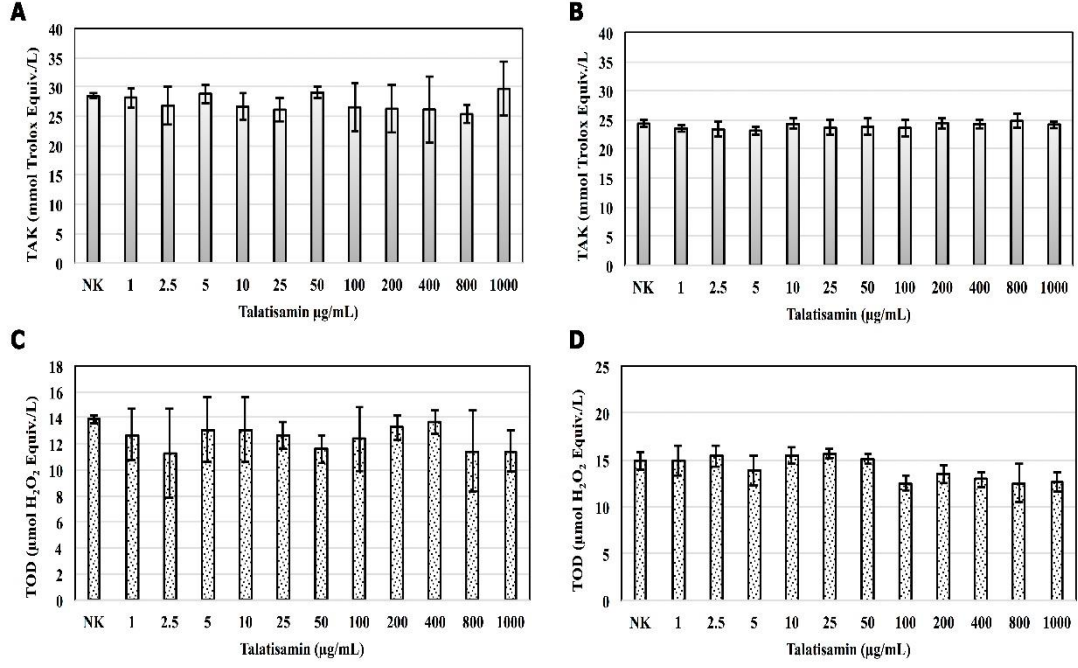
24 ve 48 saatlik inkübasyonlarla U-87 MG hücrelerine uygulanan napellinin kontrole kıyasla TAK değerlerini değiştirmedeği gözlemlenirken; uygulanan en yüksek konsantrasyonun (1000µg/mL) hem 24 hem de 48 saat'lik kültürlerde TOD değerini arttırdığı tespit edilmiştir. Napellinin 24 ve 48 saatlik U-87 MG kültürlerinde oluşturduğu TAK ve TOD değerleri Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.1** *İn vitro* şartlar altında napellinin U-87 MG hücrelerindeki 24 ve 48 saatlik inkübasyonu sonucu oluşan TAK ve TOD değerleri (A: 24 saat TAK değerleri; B: 48 saat TAK değerleri; C: 24 saat TOD değerleri; D: 48 saat TOD değerleri)

\*Değerler ortalama ± Standart sapma olarak sunulmuştur (\*<0,005, n=5).

24 ve 48 saatlik inkübasyonlarla U-87 MG hücrelerine uygulanan talatisaminin kontrole kıyasla TAK ve TOD değerlerini değiştirmedeği tespit edilmiştir. Talatisaminin 24 ve 48 saatlik U-87 MG kültürlerinde oluşturduğu TAK ve TOD değerleri Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

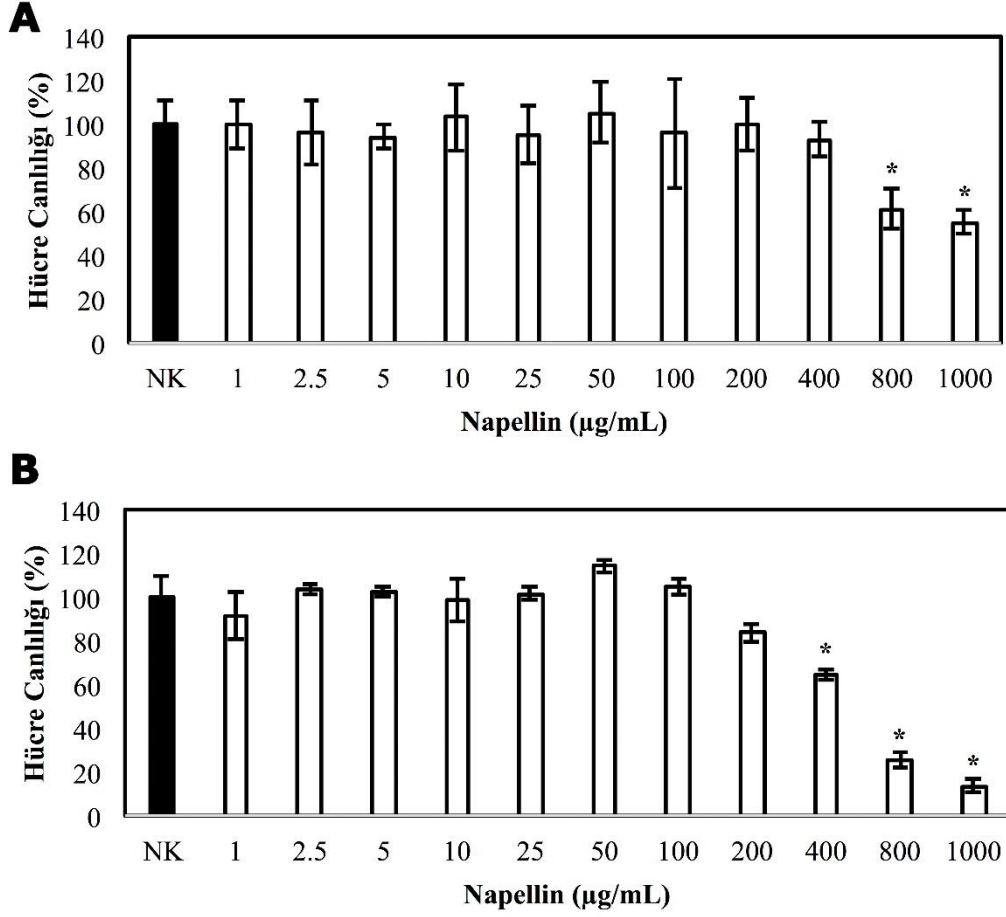


**Şekil 4.2** *In vitro* şartlar altında talatisaminin U-87 MG hücrelerindeki 24 ve 48 saatlik inkübasyonu sonucu oluşan TAK ve TOD değerleri (A: 24 saat TAK değerleri; B: 48 saat TAK değerleri; C: 24 saat TOD değerleri; D: 48 saat TOD değerleri)

\*Değerler ortalama ± Standart sapma olarak sunulmuştur (\*<0,05, n=5).

#### 4.2 Test Edilen Diterpenlerin *In Vitro* Koşullar Altında Oluşturduğu Sitotoksisite Analiz Değerleri

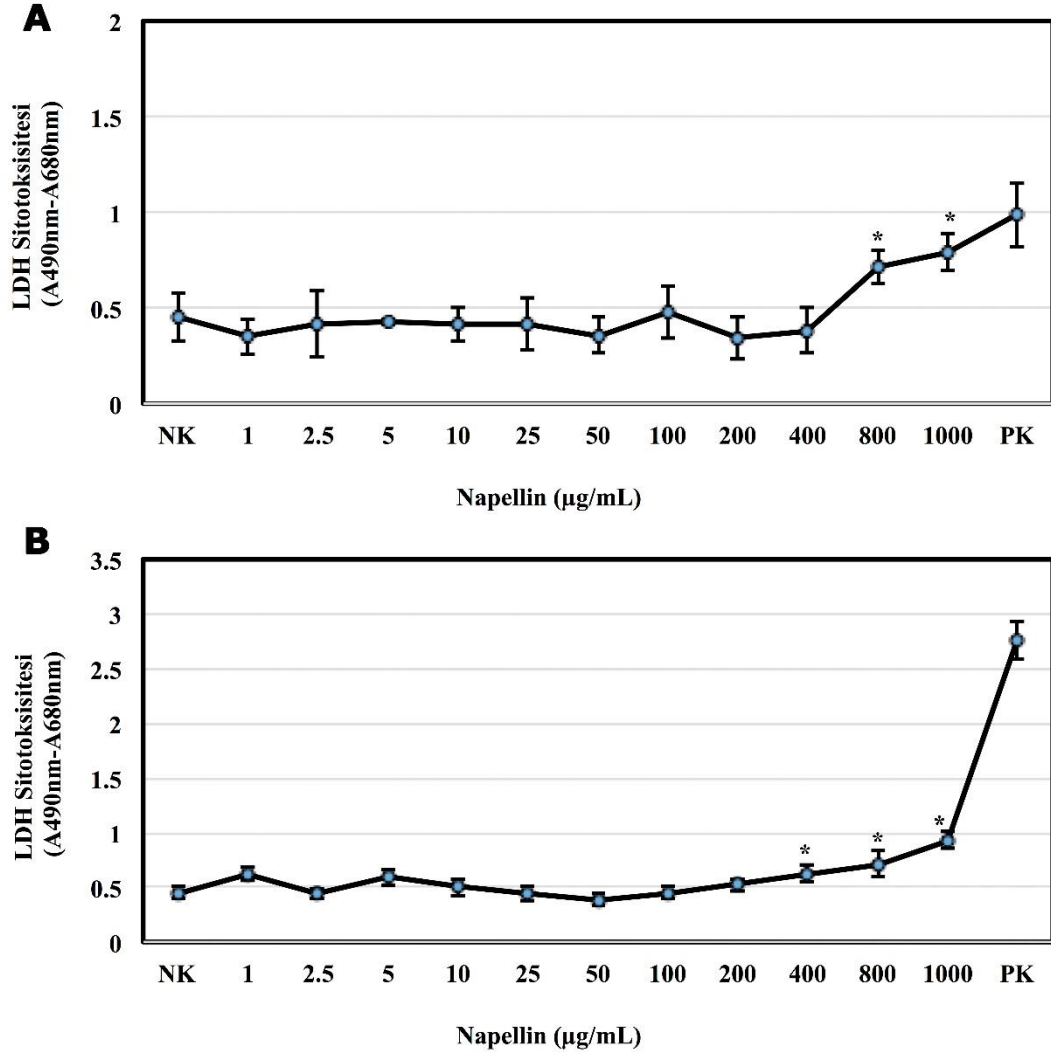
Napellinin uygulandığı U-87 MG hücreleriyle yapılan MTS testi sonucunda, 24 saatlik inkübasyon sonrası uygulanan maddenin 800 ve 1000 µg/mL' lik konsantrasyonlarının; 48 saatlik inkübasyon sonrasında ise 400, 800 ve 1000 µg/mL' lik konsantrasyonlarının hücre canlılığını azalttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca elde edilen MTS sonuçları kullanılarak napellin için LC<sub>50</sub> değeri 757, 358 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Napellinin hücre canlılığı üzerine etkileri Şekil 4.3' de gösterilmiştir.



**Şekil 4.3** U-87 MG hücrelerinde napellinin 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası gözlenen % canlılık değerleri (A: 24 saat B: 48 saat)

\*Değerler ortalama  $\pm$  Standart sapma olarak sunulmuştur (\* $<0,05$ , n=5).

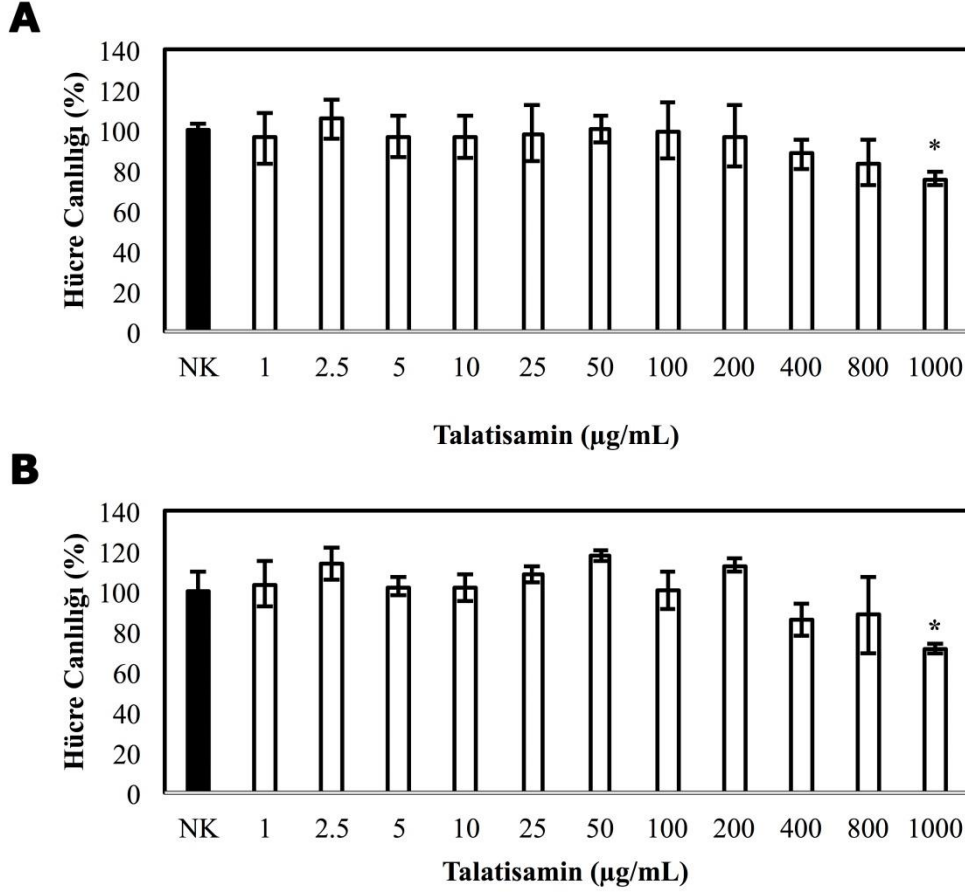
Napellin uygulanan U-87 MG hücrelerinden elde edilen LDH testi sonuçlarına göre; 24 saatlik kültürlerde hücrelerden salınan LDH miktarının 800 ve 1000  $\mu\text{g/mL}$ ' lik konsantrasyonlarda; 48 saatlik kültürlerde ise 400, 800 ve 1000  $\mu\text{g/mL}$ ' lik konsantrasyonlarda kontrole kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir. Napellinin U-87 MG hücrelerinde oluşturduğu sitotoksosite değerleri Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.4** U-87 MG hücrelerinde napellinin 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası gözlenen sitotoksitesi (A: 24 saat B: 48 saat)  
 \*Değerler ortalama ± Standart sapma olarak sunulmuştur (\*<0,05, n=5).

Talatisaminin uygulaveığı U-87 MG hücreleriyle yapılan MTS testi sonucunda, 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası uygulanan maddenin 1000 µg/mL' lik konsantrasyonunun; hücre canlılığını azalttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca elde edilen MTS sonuçları kullanılarak napellin için LC<sub>50</sub> değeri 2593,997 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Talatisaminin hücre canlılığı üzerine etkileri Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

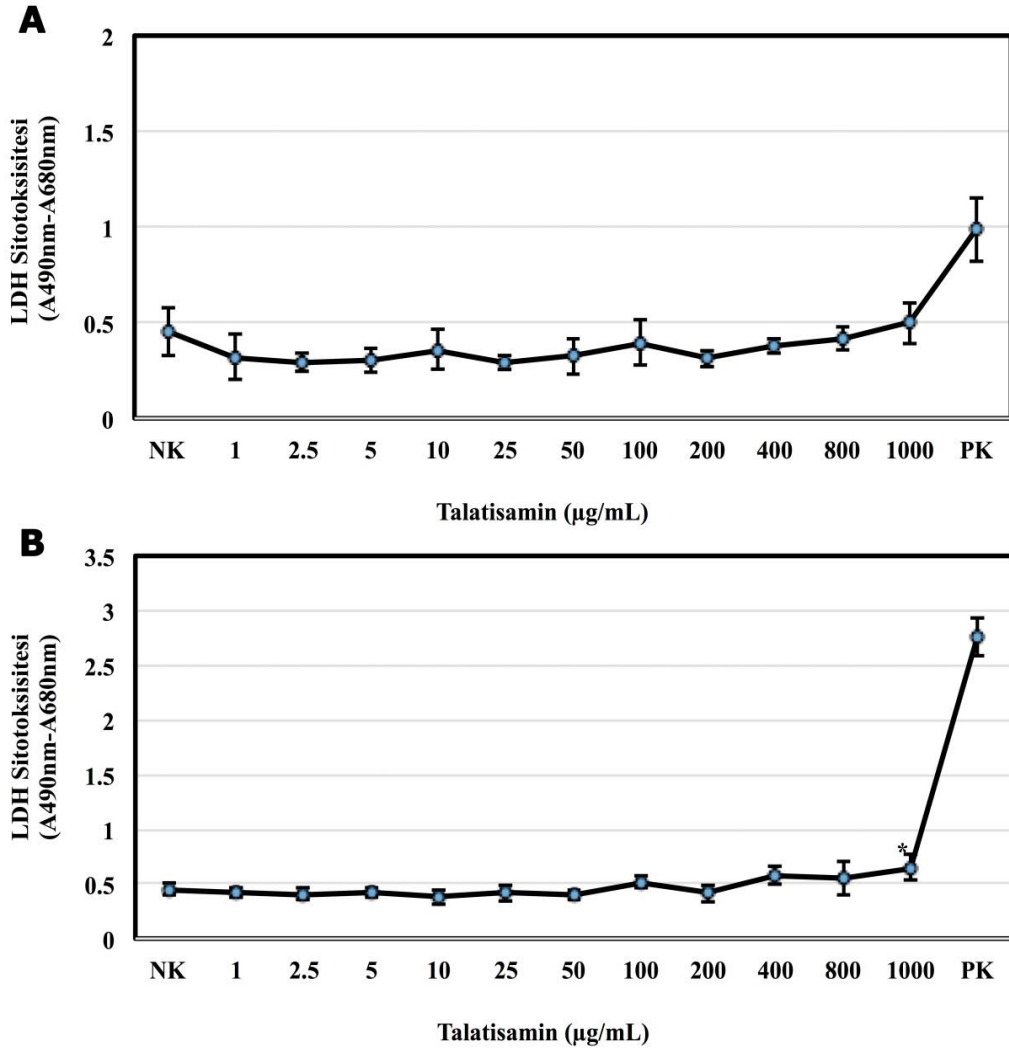




**Şekil 4.5** 5 U-87 MG hücrelerinde talatisaminin 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası gözlenen % canlılık değerleri (A: 24 saat B: 48 saat)

\*Değerler ortalama  $\pm$  Standart sapma olarak sunulmuştur (\* $<0,05$ , n=5).

Talatisamin uygulanan U-87 MG hücrelerinden elde edilen LDH testi sonuçlarına göre; 24 saatlik kültürlerde hücrelerden salınan LDH miktarının değişmediği konsantrasyonlarda; 48 saatlik kültürlerde ise 1000 µg/mL' lik konsantrasyonlarda kontrole kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir. Talatisaminin U-87 MG hücrelerinde oluşturduğu sitotoksosite değerleri Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

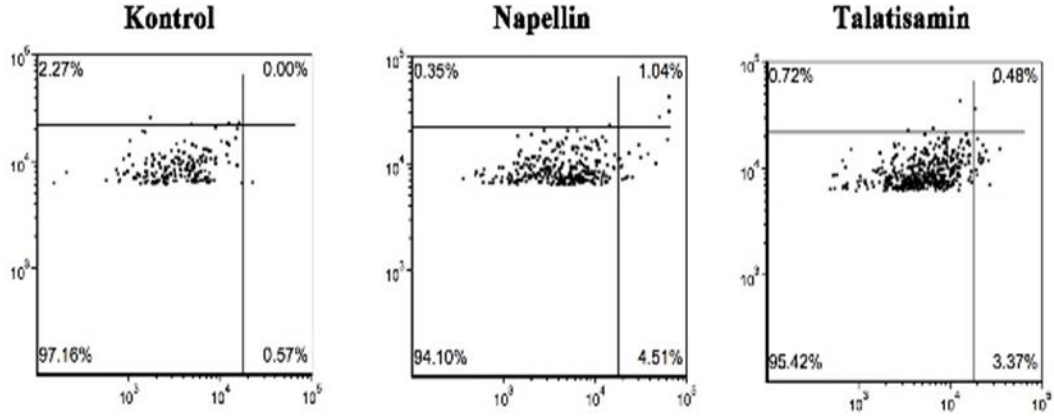


**Şekil 4.6** U-87 MG hücrelerinde talatisaminin 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası gözlenen sitotoksite değerleri (A: 24 saat B: 48 saat)  
 \*Değerler ortalama ± Standart sapma olarak sunulmuştur (\*<0,05, n=5).

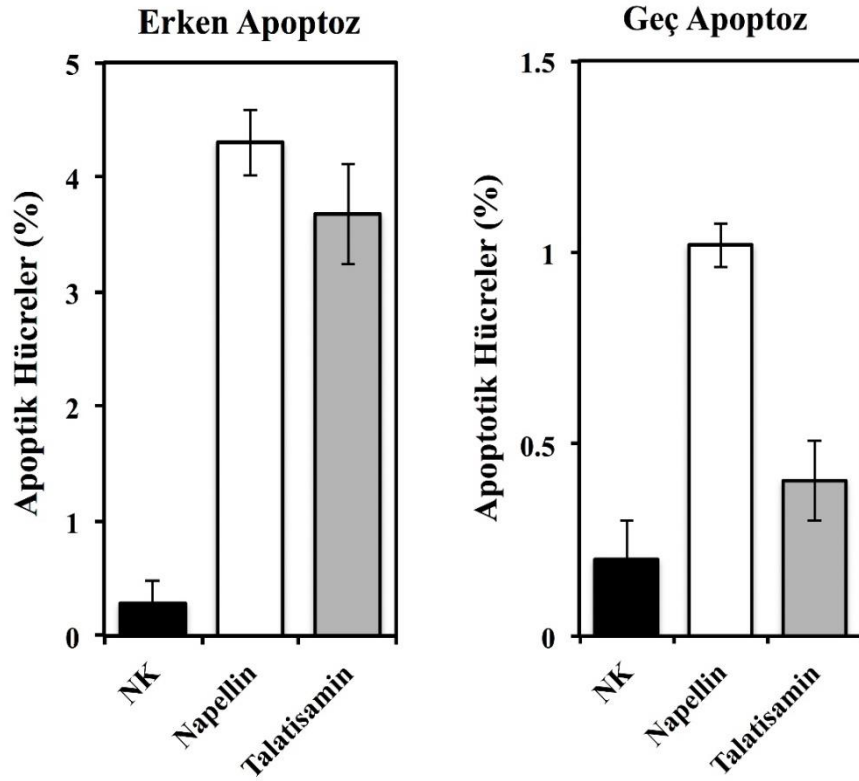
### 4.3 Test Edilen Diterpenlerin *In Vitro* Koşullar Altında Oluşturduğu Apoptoz Analizleri

U-87 MG hücrelerinde napellin ve talatisamin için belirlenen LC<sub>50</sub> değerleri, hücrelere uygulanarak 48 saatlik inkübasyondan sonra apoptotik hücre oranları flow sitometrisi Anneksin V-FITC Analizi ile belirlendi. Test bileşiği uygulanmayan kontrol grubunda 48. saatte erken apoptotik hücre oranı % 0,285; geç apoptotik hücre oranı % 0,2 olarak bulundu. Napellin uygulanan grupta 48. saatte erken apoptotik hücre oranı % 4,305, geç apoptotik hücre oranı % 1,02 olarak bulunurken; talatisamin uygulanan grupta 48. saatte erken apoptotik hücre oranı % 3,68, geç apoptotik hücre oranı % 0,405 olarak bulundu. Napellin ve talatisaminin apoptoza giden hücre oranını kontrole kıyasla

İstatiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı tespit edildi. Napellin ve talatisamin ile muamele edilen U-87 MG hücrelerinde Anneksin V-FITC yöntemine göre elde edilen apoptoz analiz sonuçları Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7 Napellin ve talatisamin ile muamele edilen U-87 MG hücrelerinde Anneksin V-FITC yöntemine göre elde edilen apoptotik indeks.



Şekil 4.8 Napellin ve talatisamin ile indüklenmiş hücrelerde Anneksin V-FITC analizi.

#### **4.4 Test Edilen Diterpenlerin *In Vitro* Şartlar Altında U-87 MG Hücrelerinde Oluşturduğu Gen Ekspresyon Profillerinin Tespiti**

U-87 MG hücrelerinde napellin ve talatisamin diterpenleri tarafından indüklenen toksisite mekanizmalarını belirlemek için Human Molecular Toxicology PathwayFinder RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array kiti kullanıldı. U-87 MG hücrelerinde napellin ve talatisamin (LC<sub>50</sub> konsantrasyonlarında) 48 saatlik maruziyet sonrası gen ifadesindeki değişimler gözlemlendi. Elde edilen sonuçlara göre, U-87 MG hücrelerinde napellin ve talatisaminin özellikle oksidatif stres ve antioksidan sistemler ve apoptoz gibi hücresel olaylarda rol alan genlerin ekspresyonunda yüksek seviyede değişime neden olmuştur. Napellin ve talatisaminin U-87 MG hücrelerinde oluşturduğu gen ekspresyon değişimleri Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9 Napellin ve talatisaminin U-87 MG hücrelerinde oluşturduğu gen ekspresyon değişimleri.

Günümüzde kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra dünya genelinde en yaygın ölüm nedeni olarak gösterilmektedir. Muhtemelen bu durumun temel sebebi; günümüz insanların potansiyel olarak çeşitli karsinojen, mutajen ve toksik ajanlara maruz kalmasıdır. Gliomalar, ölümcül kanserler arasında birinci sırada yer almaktadır. Beyin tümörlerin en agresif türü olan gliomalar, mevcut kemoterapötiklere direnç göstermektedir (Rahmani vd., 2014). Klinikte kullanılan yaklaşık 60 kemoterapi ilacına büyük katkı sağlayan doğal bitki ürünleri kemoterapötik tedavide önemli rol oynamaktadır (Kinghorn et al., 1999). Bu nedenle yeni doğal kemoterapötik ajanların keşfi gliomaların tedavisinde büyük önem arz etmektedir. Son yıllarda yürütülen birçok çalışmada, doğal bitki ürünlerinin çeşitli kanser türlerinde kemoterapötik ajanlar olarak etkili olduğu rapor edilmektedir (Aydin vd., 2013). Bu doğal bitki ürünlerinin en temel sınıfları flavonoidler, terpenler, alkaloidler, saponinler ve kumarinlerdir (Cowan, 1999). Bunların arasında terpenler, bilinen yaklaşık 50.000 yapısıyla en büyük doğal bitki ürünü grubunu oluşturmaktadır (Conolly ve Hill, 1991). Birçok çalışmada, 4 izopren biriminden oluşan diterpenler de dahil olmak üzere, terpenlerin, farklı kanser hücreleri üzerinde oksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Lee-Hilz et al., 2006). Kemoterapötik ajanların kanser hücrelerini öldürmek için kullandıkları mekanizmalardan biri oksidatif stres oluşturmaktır (Chen et al., 2007). Vinblastin, doksorubisin, kamptotesin ve sisplatin gibi bir çok kemoterapötik ajan oksidatif stres aracılı antikarsinojenik etki göstermiştir (Simizu et al., 1998). Mevcut tezde yapılan biyokimyasal araştırmalar sonucunda, Napellinin 24 saat ve 48 saatlik U-87 MG hücre kültürlerinde uygulanan en yüksek konsantrasyonunda TOD değerinin arttığı belirlenmiştir. Talatisaminin ise doza ve zamana bağlı olarak TOD değerlerini değiştirmedeği gözlemlenmiştir. Diterpen türevlerinin kanser hücreleri üzerindeki oksidatif etkileri üzerine literatürde çok az araştırma yapılmasına rağmen terpen türevleri üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır. Hong et al. (2012), tarafından yapılan çalışmada, bizim bulgularımıza benzer olarak, deniz yumuşak mercanı olan *Lobophytum* türlerinden izole edilen (1S, 2S, 3E, 7E, 11E) -3,7,11,15 Cembratetraen-17,2-olit, deniz cembrenolid diterpeninin reaktif oksijen türleri (ROS) üreterek insan kolon adenokarsinoma hücrelerinde (HT29) büyümeyi inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği bulunmuştur. N2a nöroblastoma hücrelerinde yürütülen çalışmalarda, çeşitli monoterpenlerin (alfa-pinen, karvakrol, karvon, terpinolen ve timol) TOD değerlerini

arttırarak oksidatif strese neden olduğu bildirilmiştir (Aydın vd., 2013 a, b; Aydın vd., 2014 a, b; Aydın vd., 2015). Yine, seskiterpen türevleri olan Zingiberen ve Guaiazulenin yüksek konsantrasyonlarının N2a nöroblastom hücrelerinde TOD değerini arttırdığı kaydedilmiştir (Togar et al., 2015 a, b). Diğer yandan, Napellin ve talatisaminin TAK değerleri arasındaki farkın kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemsiz olduğu görülmüştür.

Doğal bitki ürünlerinin antikanser aktivitesinin saptanması için hücre canlılığının ve sitotoksitenin değerlendirilmesi çok önemlidir. Mevcut tez çalışmasında, test bileşiklerinin hücre canlılığını ve sitotoksik etkisini saptamak için sırasıyla MTS ve LDH yöntemleri kullanılmıştır. MTS yöntemini kullanılarak, canlı hücre sayısı çok kısa sürede basit bir prosedürle belirlenebilmektedir (Patel et al., 2005). LDH analizi, hücrel membran hasarını takiben sitotoksitenin ölçülmesi için kullanılan bir tekniktir (Heeg et al., 1985). Her iki test de *in vitro* hücre kültür çalışmalarında toksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Fotakis ve Timbrell, 2006). Bulgularımıza göre, napellin, 24 saatlik kültürlerde 800 ve 1000 µg/mL konsantrasyonda hücre canlılığını azaltmış ve LDH salımını arttırmıştır; 48 saatlik kültürlerde ise 400 µg/mL konsantrasyonda hücre canlılığını azaltmış ve LDH salımını arttırmıştır. Hem 24 saat hem de 48 saatlik kültürlerde talatisaminin en yüksek konsantrasyonunun, hücre canlılığını azalttığı ve LDH salımını arttırdığı kaydedilmiştir. Bu çalışmadaki bulgular literatürdeki diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Geleneksel Çin tıbbında uzun yıllardır kullanılan *Tripterygium wilfordii* bitkisinden izole edilen triptolid diterpeninin antikanser etkileri, farklı kanser hücre hatları üzerinde araştırılmıştır. Triptolid muamelesi, promiyelositik lösemi (HL-60), T hücre lenfoması (Jurkat), insan hepatocellular karsinom (SMMC 7721) ve nöroblastom (N2a ve SKNSH) hücrelerinde, XXT ve MTT analizleri kullanılarak hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir (Chan et al., 2001; Antonoff et al., 2009). de Oliveira et al. (2016) *Salvia officinalis* dan izole edilen bir diterpen bileşiği olan manolun, farklı hücre hatlarına karşı: B16F10 (sıçan melanoma), MCF-7 (insan göğüs adenokarsinoması), HeLa, HepG2 (insan hepatoselüler karsinom), ve MO59J, U343 ve U251 (insan glioblastoması), hücre canlılığını azaltarak sitotoksik aktivite sergilediğini bildirmiştir. Wang et al., 2015 bir bitki diterpeni olan sklareolün, osteosarkom kanser hücrelerinde, apoptoz uyarımı, mitokondriyal membran potansiyel kaybı ve LDH artışı yoluyla antiproliferatif etki sergilediğini bildirmiştir. Block et al. (2005), *Croton zambesicus*'un

yapraklarından izole edilen, bir diterpen bileşği olan entravraviloban-3-beta-ol'ün, HL-60 hücrelerinde hücre canlılığını azaltarak sitotoksik aktivite gösterdiğini bildirmiştir. Çin ve Kore geleneksel tıbbında kullanılan bir bitki olan *Daphne genkwa* 'dan izole edilen yuanhahine diterpen esterinin insan akciğer kanseri hücreleri (A549) üzerindeki sitotoksik etkileri, sulforo-Damin B (SRB) protein boyama yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Araştırma sonucunda yuanhahine esterlerinin hücre canlılığını azalttığı belirtilmiştir (Hong et al., 2010). Antikanser aktivitelerin değerlendirildiği bir başka çalışmada, karnozol diterpen'in insan göğüs, yumurtalık, prostat ve bağırsak tümör hücre hatlarında hücre canlılığını azalttığı bildirilmiştir (Johnson et al., 2008; Vergara et al., 2014).

Apoptoz mekanizması, yüksek yapılı organizmalarda homeostazın korunması için son derece önemli, programlı hücre ölüm sürecidir (Czabotar et al., 2017). Yetersiz veya inhibe edilmiş apoptoz, habis hücrelerin en önemli özelliklerinden biridir (Renehan et al., 2001). Kemoterapötik ajanların etki mekanizmalarından biri hücre canlılığını azaltmak için apoptoz mekanizmasını aktive etmektir (Peng et al., 2003). Flow sitometrisi ile elde edilen sonuçlar hem napellinin hem de talatisaminin apoptozu tetiklediğini göstermiştir. Kondoh et al. (2004) kauren diterpeninin, HL-60 hücrelerinde kaspaz-8 ve 9'u aktifleştirerek apoptozu indüklediğini rapor etmiştir. Bir çalışmada, kahve diterpeni türevi olan kafestolün, böbrek kanser hücrelerindeki apoptotik potansiyeli değerlendirilmiş ve indüklenen apoptozun, kafestolün dozuna bağlı olduğu bildirilmiştir (Choi et al., 2011). *Andrographis paniculata*'den izole edilen andrographolid diterpeni, prostat kanser hücrelerinde (PC-3), kaspaz-3'ün aktivasyonu, bax geninin ekspresyonunun artışı ve bcl-2 geninin ekspresyonunun azalışı ile apoptozu indüklemiştir (Zhao et al., 2008). Yine, bir başka çalışmada, HL-60, Jurkat ve SMMC-7721 hücrelerinde, triptolidin apoptozu indüklediği kaydedilmiştir (Chan et al., 2001). Hindistan'da geleneksel otlardan biri olan *Coleus forskohlii*'den izole edilen 3-epi-sklareol, *in vitro* meme ve uterin kanserlerinde apoptozu indükleyerek antiproliferatif etki göstermiştir (Sashidhara et al., 2007). Nöroblastoma hücre hatları (N2a ve SKNSH) üzerinde yapılan bir çalışmada, triptolidin, fosfotidilserin eksternalizasyonunda doza bağlı bir artışla, nöroblastoma hücrelerinde apoptozu neden olarak hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (Antonoff et al., 2009). Tez kapsamında yapılan gen ekspresyonu profillemesi ile apoptosis, nekrozis, DNA hasarı ve tamiri, mitokondriyal enerji metabolizması, yağ asidi metabolizması, oksidatif stres ve



antioksidan sistemler, ısı şoku protein metabolizması, endoplazmik retikulum stres ve katlanmamış protein yanıtı, sitokrom P450 ve faz-1 metabolizması, steatoz, kolestaz, fosfolipidozis ve immünotoksisite gibi hücrede temel metabolik süreçlerde aktif rol oynayan 84 farklı genin ekspresyon dinamiği ortaya çıkarıldı. Gen ekspresyon profillemeye çalışmalarının bir sonucu olarak, napellin, apoptoz (BCL2L1, CAS8, CAS9 ve FASLG) gibi hücreyel olaylarla ilgili genlerin ekspresyonunu değiştirirken, talatisamin, oksidatif stress ve antioksidan sistemler (AKR1C2, FHL2, GCLM, HMOX1 ve NCOA7) gibi hücreyel olaylarda rol oynayan genlerin ekspresyonunu değiştirmiştir. Nitekim andrographolid, PC-3 hücrelerinde, kaspaz-3'ün aktivasyonu, bax geninin ekspresyonunun artışını ve bcl-2 geninin ekspresyonunun azalışını indükleyerek apoptoza neden olmuştur (Zhao et al., 2008). Antonoff et al. (2009) triptolidin apoptoz ile kaspaz-3 ve 9'un ekspresyonunu arttırarak hücrelerin ölümüne neden olduğunu rapor etmiştir.

## 5. SONUÇ

Mevcut tez çalışmasında U87MG hücrelerinde napellin ve talatisaminin biyokimyasal etkileri, sitotoksitesi, apoptotik etkileri ve genotoksite potansiyelleri TAS, TOS, MTT, LDH, Annexin V-FITC ve qRT-PCR yöntemleri kullanılarak değerlendirildi. Bulgularımız, hem napellin hem de talatisaminin yüksek dozlarda sitotoksik ve apoptotik etkilere sahip olduğunu ve her bir diterpenin, hücrelerdeki metabolik süreçlerde yer alan farklı genlerin ifadelerini değiştirdiğini sergiledi. Sonuç olarak, napellin ve talatisaminin, glioblastomaları kemoterapötik bir ajan olarak orta dereceli tedavi etme potansiyeline sahip olduğu görüşündeyiz.



## KAYNAKLAR

- Anjum, K., Shagufta, B.I., Abbas, S.Q., Patel, S., Khan, I., Shah, S.A.A., Akhter, N. and Hassan, S.S.U., 2017. Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review. *Biomed Pharmacother* 92, 681-689.
- Antonoff, M.B., Chugh, R., Borja-Cacho, D., Dudeja, V., Clawson, K.A., Skube, S.J., Sorenson, B.S., Saltzman, D.A., Vickers, S.M. and Saluja, A.K., 2009. Triptolide therapy for neuroblastoma decreases cell viability in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Surgery* 146, 282-90.
- Aydin, E., Türkez, H. and Taşdemir, S., 2013. Anticancer and antioxidant properties of terpinolene in rat brain cells. *Arh Hig Rada Toksikol* 64, 415-24.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol* 46, 446-75.
- Barel, S., Segal, R. and Yashphe, J., 1991. The antimicrobial activity of the essential oil from *Achillea fragrantissima*. *J Ethnopharmacol* 33, 187-91.
- Bhattacharya, A.K., Chand, H.R., John, J. and Deshpande, M.V., 2015. Clerodane type diterpene as a novel antifungal agent from *Polyalthia longifolia* var. *pendula*. *Eur J Med Chem* 94, 1-7.
- Bird, A.P., 1996. The relationship of DNA methylation to cancer. *Cancer Surv* 28, 87-101.
- Block, S., Gerkens, P., Peulen, O., Jolois, O., Mingeot-Leclercq, M.P., De Pauw-Gillet, M.C. and Quetin-Leclercq, J., 2005. Induction of apoptosis in human promyelocytic leukemia cells by a natural trachylobane diterpene. *Anticancer Res* 25, 363-8.
- Carvalho, A.C., Gomes, A.C., Pereira-Wilson, C. and Lima, C.F., 2015. Redox-dependent induction of antioxidant defenses by phenolic diterpenes confers stress tolerance in normal human skin fibroblasts: Insights on replicative senescence. *Free Radic Biol Med* 83, 262-72.
- Chan, E.W., Cheng, S.C., Sin, F.W. and Xie, Y., 2001. Triptolide induced cytotoxic effects on human promyelocytic leukemia, T cell lymphoma and human hepatocellular carcinoma cell lines. *Toxicol Lett* 122, 81-7.
- Chang, H.J., Kim, H.J. and Chun, H.S., 2007. Quantitative structure-activity relationship (QSAR) for neuroprotective activity of terpenoids. *Life Sci* 80, 835-41.
- Chen, Y., Jungsuwadee, P., Vore, M., Butterfield, D.A. and St Clair, D.K., 2007. Collateral damage in cancer chemotherapy: oxidative stress in nontargeted tissues. *Mol Interv* 7, 147-56.
- Cherney, E.C. and Baran, P.S., 2011. Terpenoid-Alkaloids: Their Biosynthetic Twist of Fate and Total Synthesis. *Isr J Chem* 51, 391-405.
- Costa, J.P., de Oliveira, G.A., de Almeida, A.A., Islam, M.T., de Sousa, D.P. and de Freitas, R.M., 2014. Anxiolytic-like effects of phytol: possible involvement of GABAergic transmission. *Brain Res* 1547, 34-42.
- Costa, J.P., Ferreira, P.B., De Sousa, D.P., Jordan, J. and Freitas, R.M., 2012. Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice. *Neurosci Lett* 523, 115-8.
- Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 12, 564-82.

- Crespo, I., Vital, A.L., Gonzalez-Tablas, M., Patino, M.e.C., Otero, A., Lopes, M.C., de Oliveira, C., Domingues, P., Orfao, A. and Tabernero, M.D., 2015. Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. *Am J Pathol* 185, 1820-33.
- Dhanasekaran, M., Baskar, A.A., Ignacimuthu, S., Agastian, P. and Duraipandiyan, V., 2009. Chemopreventive potential of Epoxy clerodane diterpene from *Tinospora cordifolia* against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. *Invest New Drugs* 27, 347-55.
- dos Santos, A.G., Ferreira, P.M., Vieira Júnior, G.M., Perez, C.C., Gomes Tininis, A., Silva, G.H., Bolzani, V.a.S., Costa-Lotufo, L.V., Pessoa, C.o.O. and Cavalheiro, A.J., 2010. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells. *Chem Biodivers* 7, 205-15.
- Dubey, V.S., Bhalla, R. and Luthra, R., 2003. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *J Biosci* 28, 637-46.
- Evan, G.I. and Vousden, K.H., 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342-8.
- Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C. and De Laurenzi, V., 2012. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)* 4, 330-49.
- Ferreira, P.M.P., Bezerra, D.P., Silva, J.D.N., da Costa, M.P., Ferreira, J.R.O., Alencar, N.M.N., Figueiredo, I.S.T., Cavalheiro, A.J., Machado, C.M.L., Chammas, R., Alves, A.P.N.N., Moraes, M.O. and Pessoa, C., 2016. Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component Casearin X: in vivo and ex vivo methods and microscopy examinations. *J Ethnopharmacol* 186, 270-279.
- Fotakis, G. and Timbrell, J.A., 2006. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 160, 171-7.
- Frei, P., Poulsen, A.H., Johansen, C., Olsen, J.H., Steding-Jessen, M. and Schüz, J., 2011. Use of mobile phones and risk of brain tumours: update of Danish cohort study. *BMJ* 343, d6387.
- Grizzi, F. and Chiriva-Internati, M., 2006. Cancer: looking for simplicity and finding complexity. *Cancer Cell Int* 6, 4.
- Habtemariam, S. and Varghese, G.K., 2015. A novel diterpene skeleton: identification of a highly aromatic, cytotoxic and antioxidant 5-methyl-10-demethyl-abietane-type diterpene from *Premna serratifolia*. *Phytother Res* 29, 80-5.
- Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141, 312-22.
- Hamilton, J.P., 2011. Epigenetics: principles and practice. *Dig Dis* 29, 130-5.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-74.
- Hong, J.Y., Boo, H.J., Kang, J.I., Kim, M.K., Yoo, E.S., Hyun, J.W., Koh, Y.S., Kim, G.Y., Maeng, Y.H., Hyun, C.L., Chang, W.Y., Kim, Y.H., Kim, Y.R. and Kang, H.K., 2012. (1S,2S,3E,7E,11E)-3,7,11,15-Cembratetraen-17,2-olide, a cembrenolide diterpene from soft coral *Lobophytum* sp., inhibits growth and induces apoptosis in human colon cancer cells through reactive oxygen species generation. *Biol Pharm Bull* 35, 1054-63.

- Hong, J.Y., Nam, J.W., Seo, E.K. and Lee, S.K., 2010. Daphnane diterpene esters with anti-proliferative activities against human lung cancer cells from *Daphne genkwa*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 58, 234-7.
- Howell, A.S. and Lew, D.J., 2012. Morphogenesis and the cell cycle. *Genetics* 190, 51-77.
- Huang, D.M., Shen, Y.C., Wu, C., Huang, Y.T., Kung, F.L., Teng, C.M. and Guh, J.H., 2004. Investigation of extrinsic and intrinsic apoptosis pathways of new clerodane diterpenoids in human prostate cancer PC-3 cells. *Eur J Pharmacol* 503, 17-24.
- Huson, S.M., Harper, P.S., Hourihan, M.D., Cole, G., Weeks, R.D. and Compston, D.A., 1986. Cerebellar haemangioblastoma and von Hippel-Lindau disease. *Brain* 109 ( Pt 6), 1297-310.
- Islam, M.T., de Alencar, M.V., da Conceição Machado, K., de Carvalho Melo-Cavalcante, A.A., de Sousa, D.P. and de Freitas, R.M., 2015. Phytol in a pharma-medico-stance. *Chem Biol Interact* 240, 60-73.
- Israels, E.D. and Israels, L.G., 2001. The cell cycle. *Stem Cells* 19, 88-91.
- Jhanwar-Uniyal, M., Labagnara, M., Friedman, M., Kwasnicki, A. and Murali, R., 2015. Glioblastoma: molecular pathways, stem cells and therapeutic targets. *Cancers (Basel)* 7, 538-55.
- Jin, B., Li, Y. and Robertson, K.D., 2011. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes Cancer* 2, 607-17.
- Johnson, J.J., Syed, D.N., Heren, C.R., Suh, Y., Adhami, V.M. and Mukhtar, H., 2008. Carnosol, a dietary diterpene, displays growth inhibitory effects in human prostate cancer PC3 cells leading to G2-phase cell cycle arrest and targets the 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway. *Pharm Res* 25, 2125-34.
- Jones, P.A. and Laird, P.W., 1999. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21, 163-7.
- Kazemi, M. and Rostami, H., 2015. Chemical composition and biological activities of Iranian *Achillea wilhelmsii* L. essential oil: a high effectiveness against *Candida* spp. and *Escherichia* strains. *Nat Prod Res* 29, 286-8.
- Kheirollahi, M., Dashti, S., Khalaj, Z., Nazemroaia, F. and Mahzouni, P., 2015. Brain tumors: Special characters for research and banking. *Adv Biomed Res* 4, 4.
- Kiss, T., Mácsai, L., Csupor, D. and Datki, Z.L., 2017. In vivo screening of diterpene alkaloids using bdelloid rotifer assays. *Acta Biol Hung* 68, 443-452.
- Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M. and Hocevar, B.A., 2010. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 38, 96-109.
- Kouzarides, T., 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.
- Krakstad, C. and Chekenya, M., 2010. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Mol Cancer* 9, 135.
- Kumar, R.A., Sridevi, K., Kumar, N.V., Nanduri, S. and Rajagopal, S., 2004. Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata*. *J Ethnopharmacol* 92, 291-5.
- Lawrence, M.S., Stojanov, P., Mermel, C.H., Robinson, J.T., Garraway, L.A., Golub, T.R., Meyerson, M., Gabriel, S.B., Lander, E.S. and Getz, G., 2014. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 505, 495-501.
- Lee, C.H., Jung, K.W., Yoo, H., Park, S. and Lee, S.H., 2010. Epidemiology of primary brain and central nervous system tumors in Korea. *J Korean Neurosurg Soc* 48, 145-52.

- Lee-Hilz, Y.Y., Boerboom, A.M., Westphal, A.H., Berkel, W.J., Aarts, J.M. and Rietjens, I.M., 2006. Pro-oxidant activity of flavonoids induces EpRE-mediated gene expression. *Chem Res Toxicol* 19, 1499-505.
- Lichtenthaler, H.K., 1999. THE 1-DEOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHATE PATHWAY OF ISOPRENOID BIOSYNTHESIS IN PLANTS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50, 47-65.
- Llana-Ruiz-Cabello, M., Pichardo, S., Maisanaba, S., Puerto, M., Prieto, A.I., Gutiérrez-Praena, D., Jos, A. and Cameán, A.M., 2015. In vitro toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packaging: A review. *Food Chem Toxicol* 81, 9-27.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B.W. and Kleihues, P., 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114, 97-109.
- McGarvey, D.J. and Croteau, R., 1995. Terpenoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1015-26.
- Miranda Filho, A.L., Koifman, R.J., Koifman, S. and Monteiro, G.T., 2014. Brain cancer mortality in an agricultural and a metropolitan region of Rio de Janeiro, Brazil: a population-based, age-period-cohort study, 1996-2010. *BMC Cancer* 14, 320.
- Morita, H., Nakayama, M., Kojima, H., Takeya, K., Itokawa, H., Schenkel, E.P. and Motidome, M., 1991. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 39, 693-7.
- Nafee, T.M., Farrell, W.E., Carroll, W.D., Fryer, A.A. and Ismail, K.M., 2008. Epigenetic control of fetal gene expression. *BJOG* 115, 158-68.
- Ohgaki, H. and Kleihues, P., 2007. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170, 1445-53.
- Ostrom, Q.T., Bauchet, L., Davis, F.G., Deltour, I., Fisher, J.L., Langer, C.E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J.A., Turner, M.C., Walsh, K.M., Wrensch, M.R. and Barnholtz-Sloan, J.S., 2014. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro Oncol* 16, 896-913.
- Pardo-Vargas, A., Ramos, F.A., Cirne-Santos, C.C., Stephens, P.R., Paixão, I.C.P., Teixeira, V.L. and Castellanos, L., 2014. Semi-synthesis of oxygenated dolabellane diterpenes with highly in vitro anti-HIV-1 activity. *Bioorg Med Chem Lett* 24, 4381-4383.
- Patel, M.I., Tuckerman, R. and Dong, Q., 2005. A Pitfall of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay due to evaporation in wells on the edge of a 96 well plate. *Biotechnol Lett* 27, 805-8.
- Petiwala, S.M. and Johnson, J.J., 2015. Diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Defining their potential for anti-cancer activity. *Cancer Lett* 367, 93-102.
- Pflaum, J., Schlosser, S. and Müller, M., 2014. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front Oncol* 4, 285.
- Pham-Huy, L.A., He, H. and Pham-Huy, C., 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci* 4, 89-96.
- Pichersky, E., Noel, J.P. and Dudareva, N., 2006. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science* 311, 808-11.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M. and Ignacimuthu, S., 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement Altern Med* 6, 39.

- Ramos, A., Visozo, A., Piloto, J., García, A., Rodríguez, C.A. and Rivero, R., 2003. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 87, 241-6.
- Rodwell, V.W., Beach, M.J., Bischoff, K.M., Bochar, D.A., Darnay, B.G., Friesen, J.A., Gill, J.F., Hedl, M., Jordan-Starck, T., Kennelly, P.J., Kim, D.Y. and Wang, Y., 2000. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Methods Enzymol* 324, 259-80.
- Sacchettini, J.C. and Poulter, C.D., 1997. Creating isoprenoid diversity. *Science* 277, 1788-9.
- Sai Prakash, C.V., Hoch, J.M. and Kingston, D.G., 2002. Structure and stereochemistry of new cytotoxic clerodane diterpenoids from the bark of *Casearia lucida* from the Madagascar rainforest. *J Nat Prod* 65, 100-7.
- Santos-Rosa, H. and Caldas, C., 2005. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer* 41, 2381-402.
- Sepehr Rahmani, , Ling Shing Wong. *Central Nerve System Malignant Tumors Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS) Volume 13, Issue 9 Ver. I (Sep. 2014), PP 52-63.*
- Sharma, N., Kumar, A., Sharma, P.R., Qayum, A., Singh, S.K., Dutt, P., Paul, S., Gupta, V., Verma, M.K., Satti, N.K. and Vishwakarma, R., 2018. A new clerodane furano diterpene glycoside from *Tinospora cordifolia* triggers autophagy and apoptosis in HCT-116 colon cancer cells. *J Ethnopharmacol* 211, 295-310.
- Sharma, S., Kelly, T.K. and Jones, P.A., 2010. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31, 27-36.
- Simizu, S., Takada, M., Umezawa, K. and Imoto, M., 1998. Requirement of caspase-3(-like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs. *J Biol Chem* 273, 26900-7.
- Song, M.K., Liu, H., Jiang, H.L., Yue, J.M., Hu, G.Y. and Chen, H.Z., 2008. Discovery of talatisamine as a novel specific blocker for the delayed rectifier K<sup>+</sup> channels in rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 155, 469-75.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R.O., Groups, E.O.f.R.a.T.o.C.B.T.a.R. and Group, N.C.I.o.C.C.T., 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 987-96.
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y. and Yu, Q., 2015. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol Cancer* 14, 48.
- Trapp, S. and Croteau, R., 2001a. DEFENSIVE RESIN BIOSYNTHESIS IN CONIFERS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52, 689-724.
- Trapp, S.C. and Croteau, R.B., 2001b. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics* 158, 811-32.
- Trisonthi, P., Sato, A., Nishiwaki, H. and Tamura, H., 2014. A new diterpene from *Litsea cubeba* fruits: structure elucidation and capability to induce apoptosis in HeLa cells. *Molecules* 19, 6838-50.
- Turabekova, M.A., Rasulev, B.F., Levkovich, M.G., Abdullaev, N.D. and Leszczynski, J., 2008. Aconitum and Delphinium sp. alkaloids as antagonist modulators of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. AM1/DFT electronic structure investigations and QSAR studies. *Comput Biol Chem* 32, 88-101.

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. and Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 44-84.
- Vendemiale, G., Grattagliano, I. and Altomare, E., 1999. An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. *Int J Clin Lab Res* 29, 49-55.
- Vergara, D., Simeone, P., Bettini, S., Tinelli, A., Valli, L., Storelli, C., Leo, S., Santino, A. and Maffia, M., 2014. Antitumor activity of the dietary diterpene carnosol against a panel of human cancer cell lines. *Food Funct* 5, 1261-9.
- Williams, G.H. and Stoeber, K., 2012. The cell cycle and cancer. *J Pathol* 226, 352-64.
- Yu, L.G., Ni, T.F., Gao, W., He, Y., Wang, Y.Y., Cui, H.W., Yang, C.G. and Qiu, W.W., 2015. The synthesis and antibacterial activity of pyrazole-fused tricyclic diterpene derivatives. *Eur J Med Chem* 90, 10-20.
- Zhou, G.X., Ding, X.L., Huang, J.F., Zhang, H. and Wu, S.B., 2007. Suppression of 5-lipoxygenase gene is involved in triptolide-induced apoptosis in pancreatic tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1770, 1021-7.





## ÖZGEÇMİŞ

### **Kişisel Bilgiler**

İsim–Soy isim : Merve DEMİRBAĞ  
Uyruğu : TC  
Doğum Tarihi ve Yeri : 12.07.1994/Erzurum  
Medeni Hali : Bekar  
Telefon : +90 (543) 235 1906  
e–mail : dbagmerve@gmail.com

### **Eğitim**

<b>Derece</b>	<b>Üniversite</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
Yüksek Lisans	Erzurum Teknik Üniversitesi	2018
Lisans	Erzurum Teknik Üniversitesi	2016
Lise	Erzurum Lisesi	2012