



**PARAOKSONAZ (PON1) ENZİMİNİN ÜÇ FAZ AYRIMI (ÜFA)  
YÖNTEMİYLE SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZE EDİLMESİ  
ve KARADUT (*Moris nigra*) EKSTRAKTLARI İMMOBİLİZE  
EDİLMİŞ  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NANOPARTİKÜLLERİNİN PON1,  
GLİOBLASTOMA VE PRİMER RAT KORTEKS SİNİR  
HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Semra ÇİÇEK**

**Doktora Tezi**

**Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı**

**Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU**

**2016**

**Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

PARAOKSONAZ (PON1) ENZİMİNİN ÜÇ FAZ AYRIMI (ÜFA)  
YÖNTEMİYLE SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZE EDİLMESİ  
VE KARADUT (*Moris nigra*) EKSTRAKTLARI İMMOBİLİZE  
EDİLMİŞ  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NANOPARTİKÜLLERİNİN PON1,  
GLİOBLASTOMA VE PRİMER RAT KORTEKS SİNİR  
HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Semra ÇİÇEK

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI  
Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM  
2016

Her hakkı saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**PARAOKSONAZ (PON1) ENZİMİNİN ÜFA (ÜÇ FAZLI AYRIM)  
YÖNTEMİYLE SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZE EDİLMESİ VE  
KARADUT (*Moris nigra*) EKSTRAKTLARI İMMOBİLİZE EDİLMİŞ  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
NANOPARTİKÜLLERİNİN PON1, GLİOBLASTOMA VE PRİMER RAT  
KORTEKS SİNİR HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU danışmanlığında, Semra ÇİÇEK tarafından hazırlanan bu çalışma, 28/10/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.






Başkan: Prof. Dr. Yaşar DEMİR

Üye : Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

Üye : Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

Üye : Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Üye : Doç. Dr. Neslihan DİKBAŞ

İmza :   
İmza :   
İmza :   
İmza :   
İmza : 

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 10/11/2016 tarih ve 43/18 nolu kararı ile onaylanmıştır.



**Prof. Dr. Cavit KAZAZ**  
Enstitü Müdürü

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

Doktora Tezi

### PARAOKSONAZ (PON1) ENZİMİNİN ÜÇ FAZ AYRIMI (ÜFA)YÖNTEMİYLE SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZE EDİLMESİ VE KARADUT (*Morus nigra*) EKSTRAKTLARI İMMOBİLİZE EDİLMİŞ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NANOPARTİKÜLLERİNİN PON1, GLİOBLASTOMA VE PRİMER RAT KORTEKS SİNİR HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Semra ÇİÇEK

Atatürk Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü

Hayvansal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

Bu çalışmanın birinci aşamasında paraoksonaz enzimi ilk olarak üç fazlı ayırıştırma yöntemi (ÜFA) ile insan serumundan saflaştırılarak üzerinde kinetik ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartikülleri üzerine karadutun (*Morus nigra*) alkol ve su ekstraksiyonu immobilize edilmiştir. Oluşturulan grupların glioblastoma hücre hattı (U87MG) ve primer rat korteks sinir hücrelerindeki sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Yine bu grupların GRIN2C ve SLC1A2 genleri üzerinden real time PCR uygulamaları ile glutamat toksisitesi üzerine etkileri çalışılmıştır. ÜFA saflaştırma işlemi 3 aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada PON1 %60-80 amonyum sülfat çöktürmesine maruz bırakılmıştır, ikinci aşamada 1,0:0,5 oranında insan serumu/t-bütanol ve % 20'lik amonyum sülfat doyunluğu kullanılmıştır. Üçüncü aşamada ise ara faz üzerinden yapılan ikinci ÜFA aşamasında sabit insan serumu:t-bütanol oranı kullanılarak %49, 87 verim ve 182,66 saflaştırma katsayısı ile PON1 enzimi insan serumundan saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin kinetik özelliklerine yönelik yapılan çalışmalarda optimum pH 8,1, stabil pH 7,0, optimum sıcaklık 37°C, stabil sıcaklık 20°C olarak belirlenmiştir. SDS-PAGE'de yürütülen enzimin moleküler ağırlığı, 45 kDa olarak bulunmuştur. Karadut ekstraktlarının  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküllerine immobilizasyonuna ait yapılan optimizasyon çalışmalarında optimum immobilizasyon süresi ve optimum materyal konsantrasyonu her iki ekstrakt için sırasıyla 60 dk, 10mg/mL olarak tespit edilmiştir. Optimum pH ve optimum sıcaklık KSE ve KAE için sırasıyla; pH 7,0, 30°C ve pH 6,0, 20°C olarak belirlenmiştir. Karadut ekstraktları kullanılarak oluşturulan grupların nöron hücreleri üzerindeki toksisite etkisine dair yapılan çalışmada; KSE1, KSE2 ve KSEF1 grupları nöron hücrelerinde kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir toksisiteye sebep olmazken U87MG kanser hücre kültüründe KSE1 (%73,7), KSE2 (%58,7) anlamlı azalmalara yol açmıştır. Real Time PCR çalışmalarında nöron kültüründe KSE2, KAE2, KAEF2 grupları, SLC1A2'nin ekspresyonunu kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttırırken GRIN2C ekspresyonunu KSE2, KSEF2, KAE2, KAEF2 ve T grupları anlamlı olarak azaltmışlardır. U87MG kanser hücre kültüründe ise, KSE2, KSEF2, KAE2, KAEF2 grupları Slc1a2 ekspresyonunu kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttırırken, KSEF2, KAE2, KAEF2 ve T grupları ise GRIN2C ekspresyonunu kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaltmışlardır.

2016, 137 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Karadut,  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Paraoksonaz (PON1), ÜFA, U87MG, nöron kültürü, GRIN2C, SLC1A2

## ABSTRACT

Mastery Thesis

### CHARACTERIZATION AND PURIFICATION OF PARAOXONASE (PON1) ENZYME BY TPP (THREE PHASE PARTITIONING) AND INVESTIGATION OF EFFECTS OF BLACK MULBERRY (*Morus nigra*) EXTRACTS ARE IMMOBILIZED ON $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NANOPARTICLES ON PON1, GLIOBLASTOMA AND PRIMARY RAT CORTEX NERVE CELLS

Semra ÇİÇEK

Atatürk University

Natural Sciences Institute

Department of Agricultural Biotechnology

Department of Animal Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

In the first step of this study, paraoxonase enzyme was first purified from human serum with three-phase fractionation method and kinetic and characterization studies were performed on purified enzyme. In the second phase of the study, alcohol and water extraction of black mulberry (*Morus nigra*) were immobilized onto  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. It was investigated cytotoxicity effect of created groups on glioblastoma cell line (U87MG) and primary rat cortex neurons cells. Also, effects of these ones on glutamate toxicity with real-time PCR applications via GRIN2C and SLC1A2 gene were studied. TPP purification process was performed in three stages. In first stage, PON1 was exposed to 60-80% ammonium sulfate precipitation, in the second stage, 1,0:0,5 ratio of human serum/ t-butanol and 20% ammonium sulfate saturation were used. In the third stage, the second TPP stage made over the intermediate, PON1 enzyme was purified from human serum with 49,87% recovery and 182,66 purification fold using constant ratio of human serum:t-butanol. In studies of the purified enzyme for kinetic properties, optimum pH, stable pH, optimum temperature, stable temperature were determined as 8,1, 7,0, 37°C, 20°C. Molecular weight of enzyme was found to be 45 kDa from SDS-PAGE. In done optimization studies belongin to Black mulberry extracts immobilization on  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles, optimum immobilization time and optimum material concentration were determined 60 min, 10 mg/mL for both extract, respectively. The optimum pH and optimum temperature were determined as pH 7,0, 30°C and pH 6,0, 20°C for KSE and KAE, respectively. In the study of toxicity effect of groups forming by used Black Mulberry extracts on neuronal cells, according to control group, KSE1, KSE2 and KSEF1 groups were not cause statistically significant toxicity in neuronal cells while KSE1 (73,7%), KSE2 (58,7%) groups led to a significant decreases in U87MG cancer cell culture. In the studies of Real Time PCR, according to control group, KSE2, KAE2, KAEF2 groups significantly increased SLC1A1 expression while KSE2, KSEF2, KAE2, KAEF2 and T groups significantly decreased GRIN2C expression in neuronal cell culture. According to control group, KSE2, KSEF2, KAE2, KAEF2 groups significantly increased SLC1A2 ekspression, while KSEF2, KAE2, KAEF2 and T groups significantly decreased GRIN2C ekspression in U87MG cancer cell line.

**2016, 137 pages**

**Keywords:** Black mulberry,  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Paraoxonase (PON1), TPP, U87MG, neuronal culture, GRIN2C, SLC1A2

## TEŞEKKÜR

Beraber geçirdiğimiz eğitim-öğretim sürecinde tezimle ilgili her konuda benden desteğini esirgemeyen, her konuda yardımlarını gördüğüm sevgili değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU'na tüm samimiyetimle her şey için teşekkür ederim.

Elbetteki bir doktora tezi sadece danışman ve öğrenci çemberi arasında değildir. Bu tezin moleküler analizlerinin sonuçlandırılmasında gerek laboratuvar ortamı sağlanması gerek çalışmaya destek verilmesi ve bana sorumluluk bilincinin uygulamalı örneğini göstermeleri açısından Sayın Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na ve Sayın Araş. Gör. Kemal Alp NALCI, Sayın Ali TAGHİZADEHGHALEHJOUGHİ ve Sayın Araş. Gör. Numan TAŞPINAR'dan oluşan çalışma ekibine çok teşekkür ederim.

Tezimle ilgili olarak gelişen koşullarda değerli yönlendirmeleri ile bu çalışmanın ortaya çıkmasına ve tezimin sonlanmasında yardımları bulunan Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL ve Sayın Doç. Dr. Neslihan DİKBAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Her insanın hayatında melekler yer almaktadır. Bazen melekler insan kılığında sizlere dokunurlar. Benim hayatımın her alanında iki melek başucumda olmuştur. Bu dünyadaki her mutluluk ve acı hissiyatımda omuzumda hissettiğim iki el olmuştur. Bu iki melek Sayın Cahit ve Başak İLERİ çiftidir. Elbette ki doktora tezimi bu iki meleğime ve Sahra ÇİÇEK'e adamayı kendime bir borç bilirim...

**Semra ÇİÇEK**

**Ekim, 2016**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>11</b>
2.1. Kanser.....	11
2.2. Kanser Araştırmalarında Bitkisel İlaçlara Yönelik Eğilimler .....	15
2.3. Karadut ( <i>Morus nigra</i> ) .....	16
2.4. Karadut ve Kanser .....	18
2.5. Kanser Araştırmalarında Nanoteknolojinin Getirdiği Eğilimler .....	20
2.6. Glioblastoma (Beyin Kanseri).....	22
2.7. Glioblastoma Hastalığında Genel Tedavi Yaklaşımları.....	24
2.8. Glioblastoma Tedavisi İçin Bitki Ekstraksiyonu Çalışmaları .....	25
2.9. Glioblastoma İçin Kullanılan İlaç Yüklü Nananopartikül Uygulamaları .....	28
2.10. Paraoksonaz (PON1; EC 3.1.8.1).....	31
2.11. Üçlü Faz Sistemi İle Enzim Saflaştırma Yöntemi (ÜFA).....	34
2.12. Glutamat .....	36
2.13. GRIN2C ve SLC1A2 Genleri.....	39
2.14. Karadut Etken Maddeleri ve Glutamat İlişkisi Üzerine Yapılan Çalışmalar ....	42
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>46</b>
3.1. Materyal.....	46
3.1.1. Araştırmada kullanılan cihazlar.....	46
3.1.2. Çalışmada kullanılan biyolojik materyaller .....	46
3.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasal materyaller .....	47
3.1.4. Çalışmada kullanılan nano $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> yapı ve özellikleri.....	48
3.2. Yöntem .....	48

3.2.1. Karadut alkol ve su ekstraktlarının hazırlanması .....	48
3.2.2. Karadut alkol ve su ekstraktlarının HPLC analizi.....	49
3.3.3. Karadut alkol ve su ekstraktlarının nano $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 'e immobilizasyonları .....	49
3.3.4. Optimum immobilizasyon süresinin belirlenmesi.....	50
3.3.5. Optimum materyal konsantrasyonunun belirlenmesi.....	50
3.3.6. Optimum pH değerinin belirlenmesi .....	50
3.3.7. Optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi .....	51
3.3.8. Karadut ekstraktları immobilize edilmiş $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> nanopartiküllerinin SEM, EDX, FT-IR karakterizasyonu .....	51
3.3.9. Paraoksonaz (PON1) enziminin insan serumundan saflaştırılması.....	51
3.3.10. Kantitatif protein tayini .....	53
3.3.11. Enzim aktivite tayini .....	53
3.3.12. Saflaştırılan PON1 enzimi için optimum pH ve stabil pH değerlerinin belirlenmesi .....	54
3.3.13. Saflaştırılan PON1 enzimi için optimum sıcaklık ve stabil sıcaklık değerlerinin belirlenmesi.....	55
3.3.14. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE) ile enzim saflığının tayini.....	55
3.3.15. Saflaştırılan PON1 enzimi üzerine bazı antioksidan bileşiklerin inhibisyon etkilerinin araştırılması.....	56
3.3.16. Kanser hücre dizileri ve çoğaltılması .....	57
3.3.17. Nöron kültürünün hazırlanması.....	58
3.3.18. Sitotoksosite testi.....	59
3.3.19. RNA İzolasyonu .....	60
3.3.20. RNA'nın kantitatif analizi .....	61
3.3.21. RT-PCR (Reverse transkriptaz) ile cDNA sentezi .....	61
3.3.22. Sentezlenen cDNA'nın kantitatif analizi.....	62
3.3.23. Real time PCR uygulamaları.....	62
3.3.24. Verilerin istatistiksel analizi .....	63
<b>4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA .....</b>	<b>64</b>
4.1. Karadut Su ve Alkol Ekstraktları İçin Yapılan Dalga Boyu Tarama Sonuçları..	64
4.2. Karadut İçin Yapılan HPLC Analizindeki Veriler .....	65



4.3. Karadut Ekstraktlarının $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Nanopartikülleri Üzerine İmmobilize Edilmesinde Optimum İmmobilizasyon Süresi ve Optimum Materyal Konsantrasyonu Çalışmalarının Sonuçları.....	67
4.4. Karadut Ekstraktlarının $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Nanopartikülleri Üzerine İmmobilize Edilmesinde Optimum pH ve Optimum Sıcaklık Çalışmalarının Sonuçları .....	69
4.5. Karadut, $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ve Karadut İmmobilize Edilmiş $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Nanopartiküllerinin SEM, EDX, FT-IR Karakterizasyonu .....	73
4.6. Paraoksanoz Enzim Saflaştırılma Basamaklarına Ait Sonuçlar .....	78
4.7. ÜFA ile Saflaştırılan İnsan Serum Paraoksanaz Enzimi (PON1) için Saflaştırma ve Verim Profili .....	80
4.8. İnsan Serum Paraoksanaz Enziminin SDS-PAGE Sonuçları.....	82
4.9. Paraoksanoz Enzim Saflaştırılmasına Ait Optimum pH, Optimum Sıcaklık, Stabil pH Aralığı ve Stabil Sıcaklık Çalışmalarında Elde Edilen Değerler.....	83
4.10. Çalışmada Kullanılan Antioksidantların Saflaştırılan PON1 Enzimi Aktivitesi Üzerindeki Etkilerine Dair Veriler.....	86
4.11. Sitotoksisite Testi Sonuçları .....	98
4.12. U87mg Hücre Hattı ve Nöron Kültüründen Elde Edilen Total RNA ve cDNA'nın Kantitatif Analiz Sonuçları .....	107
4.13. Real Time PCR Uygulamalarında Elde Edilen Veriler .....	108
<b>5. SONUÇ .....</b>	<b>112</b>
KAYNAKLAR .....	114
ÖZGEÇMİŞ .....	138

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

$\alpha$	Alfa
$\gamma$	Gama
$\beta$	Beta
$\mu$	Mikro
$\mu\text{g}$	Mikrogram
dk	Dakika
s	Saniye
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
Kg	Kilogram
g	Gram
m	Metre
cm	Santimetre
mm	Milimetre
mL	Mililitre
mM	Milimolar
L	Litre
MTT	[3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid]
NBM	Nöro Bazal Medyum
PON1	Paraoksonaz Enzimi 1
GBM	Glioblastoma Multiforme
$IC_{50}$	İnhibitör Doz
DMSO	Dimetilsülfoksit
FBS	Fetal Dana Serum
EU	Enzim Ünitesi

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Karadut .....	17
Şekil 2.2. Nöron ve astrositlerdeki glutamat sentezi .....	37
Şekil 3.1. Karadut ekstraktlarının hazırlanması sırasındaki işlemler.....	49
Şekil 3.2. Paraoksonaz enziminin ÜFA yöntemiyle saflaştırılma aşamaları .....	52
Şekil 3.3. PON1 katalizi ile oluşan arilesteraz tepkimesi .....	54
Şekil 3.4. Nöron kültürü hazırlanmasında kullanılan 1 günlük rat yavruları .....	59
Şekil 4.1. Karadut alkol ekstraktına ait HPLC kromotogramı.....	65
Şekil 4.2. Karadut su ekstraktının HPLC kromotogramı.....	66
Şekil 4.3. Karadut su ekstraktına ait konsantrasyona bağımlı zamana karşı % immobilizasyon oranları .....	68
Şekil 4.4. Karadut alkol ekstraktına ait konsantrasyona bağımlı zamana karşı % immobilizasyon oranları .....	68
Şekil 4.5. Karadut su ekstraktına ait pH değerlerine karşı % immobilizasyon oranları .	70
Şekil 4.6. Karadut alkol ekstraktına ait pH değerlerine karşı % immobilizasyon oranları .....	70
Şekil 4.7. Karadut su ekstraktına ait sıcaklığa karşı % immobilizasyon oranları.....	72
Şekil 4.8. Karadut alkol ekstraktına ait sıcaklığa karşı % immobilizasyon oranları .....	72
Şekil 4.9. Karadut (K) , $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (Fe), karadut su ekstraktı immobilize edilmiş $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> nanopartiküller (K <sub>S</sub> Fe) ve karadut alkol ekstraktı immobilize edilmiş $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> nanopartiküllerine (K <sub>A</sub> Fe) ait SEM görüntüleri.....	74
Şekil 4.10. Karadut (K) , $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (Fe) ait EDX spektrumları ve verileri .....	75
Şekil 4.11. Karadut su ekstraktı immobilize edilmiş $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> nanopartiküller (K <sub>S</sub> Fe) ve karadut alkol ekstraktı immobilize edilmiş $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> nanopartiküllerine (K <sub>A</sub> Fe) EDX grafikleri ve verileri.....	76
Şekil 4.12. K, Fe, K <sub>S</sub> Fe, K <sub>A</sub> Fe'e ait FTIR spektrumları.....	77
Şekil 4.13. PON1 enziminin saflaştırılması çalışmalarındaki n-bütanol optimizasyonu .....	78
Şekil 4.14. PON1 enziminin saflaştırılması çalışmalarındaki 1. Amonyum sülfat optimizasyonu .....	79

<b>Şekil 4.15.</b> PON1 enziminin saflaştırılması çalışmalarındaki 2. Amonyum sülfat optimizasyonu .....	79
<b>Şekil 4.16.</b> ÜFA ile saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü. I: standart protein miyozin (200 kDa), $\beta$ -galaktosidaz (125 kDa), sığır serum albümini (BSA) (66 kDa), ovalbümin (45 kDa), karbonik anhidraz (29 kDa), lizozim (14.3 kDa) II ve III saflaştırılan PON1 enzimi 45 kDa. ....	82
<b>Şekil 4.17.</b> PON1 enzimini saflaştırma çalışmalarında elde edilen optimum pH grafiği .....	83
<b>Şekil 4.18.</b> PON1 enzimini saflaştırma çalışmalarında elde edilen optimum sıcaklık grafiği .....	84
<b>Şekil 4.19.</b> PON1 enzimini saflaştırma çalışmalarında elde edilen stabil pH grafiği.....	85
<b>Şekil 4.20.</b> PON1 enzimini saflaştırma çalışmalarında elde edilen stabil sıcaklık grafiği .....	85
<b>Şekil 4.21.</b> 5-izopropil-2-metilfenolün insan serum PON1 enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	86
<b>Şekil 4.22.</b> 5,5 dithiobis-(2-nitrobenzoik asit)'in insan serum PON1 enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	87
<b>Şekil 4.23.</b> 4-hidroksibenzoik asitin insan serum PON1 enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	88
<b>Şekil 4.24.</b> Öjenol'ün insan serum PON1 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	88
<b>Şekil 4.25.</b> 4-hidroksi-3-metoksisinamik asidin insan serum PON1 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	89
<b>Şekil 4.26.</b> Sinapik asidin insan serum PON1 enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	90
<b>Şekil 4.27.</b> 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzoik asidin insan serum PON1 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	90
<b>Şekil 4.28.</b> 2,6-dimetoksifenol'ün insan serum PON1 enzim aktivitesi üzerine etkisi...	91
<b>Şekil 4.29.</b> 3,4-dihidroksisinamik asidin insan serum PON1 enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	91
<b>Şekil 4.30.</b> İnsan serum PON1 enzimi için 5-izopropil-2-metilfenolün inhibisyon türünü gösteren grafik .....	92

<b>Şekil 4.31.</b> İnsan serum PON1 enzimi için 5,5 dithiobis-(2-nitrobenzoik asit)'in inhibisyon türünü gösteren grafik .....	93
<b>Şekil 4.32.</b> İnsan serum PON1 enzimi için 4-hidroksibenzoik asidin inhibisyon türünü gösteren grafik .....	93
<b>Şekil 4.33.</b> İnsan serum PON1 enzimi için Öjenol'ün inhibisyon türünü gösteren grafik .....	94
<b>Şekil 4.34.</b> İnsan serum PON1 enzimi için 4-hidroksi-3-metoksisinamik asidin inhibisyon türünü gösteren grafik .....	94
<b>Şekil 4.35.</b> İnsan serum PON1 enzimi için Sinapik asidin inhibisyon türünü gösteren grafik.....	95
<b>Şekil 4.36.</b> İnsan serum PON1 enzimi için 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzoik asidin inhibisyon türünü gösteren grafik .....	95
<b>Şekil 4.37.</b> İnsan serum PON1 enzimi için 2,6-dimetoksifenolün inhibisyon türünü gösteren grafik.....	96
<b>Şekil 4.38.</b> İnsan serum PON1 enzimi için 3,4-dihidroksisinamik asidin inhibisyon türünü gösteren grafik .....	96
<b>Şekil 4.39.</b> Kullanılan grupların nöron hücre kültürü üzerindeki sitotoksisite çalışma sonuçları (n=5) .....	99
<b>Şekil 4.40.</b> Nöron hücrelerinin görüntüsü.....	100
<b>Şekil 4.41.</b> Kullanılan grupların U87MG hücre hattı üzerindeki sitotoksisite çalışma sonuçları (n=5) .....	102
<b>Şekil 4.42.</b> GBM hücre kültürü.....	103

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre Türkiye'nin durumu .....	14
<b>Çizelge 2.2.</b> Kanser nanoteknolojisinde ilaç taşımada kullanılan nanopartiküller .....	22
<b>Çizelge 2.3.</b> GRIN2C ve SLC1A2'ye ait bazı özellikler .....	41
<b>Çizelge 3.1.</b> Çalışmada kullanılan nano $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 'a ait veriler .....	48
<b>Çizelge 3.2.</b> Çalışmada kullanılan real time PCR reaksiyon karışımı .....	62
<b>Çizelge 3.3.</b> Çalışmada izlenen real time PCR protokolü.....	63
<b>Çizelge 3.4.</b> Çalışmada kullanılan primer ve prop dizilimleri .....	63
<b>Çizelge 4.1.</b> Materyallere özgü kullanılan dalga boyları .....	64
<b>Çizelge 4.2.</b> Karadut alkol ekstraktı için HPLC analiz sonuçları .....	65
<b>Çizelge 4.3.</b> Karadut su ekstraksiyonu için HPLC analiz sonuçları .....	66
<b>Çizelge 4.4.</b> Kullanılan materyallerinin belirlenmiş olan optimum immobilizasyon süreleri ve optimum materyal konsantrasyonları .....	69
<b>Çizelge 4.5.</b> Çalışmada kullanılan materyallere ait belirlenmiş optimum pH değerleri .....	71
<b>Çizelge 4.6.</b> Çalışmada kullanılan materyallere ait belirlenmiş optimum sıcaklık değerleri .....	73
<b>Çizelge 4.7.</b> ÜFA ile saflaştırılan insan serum PON1'e ait saflaştırma ve verim profili .....	80
<b>Çizelge 4.8.</b> Antioksidan bileşiklerin hesaplanan <i>IC</i> <sub>50</sub> ve <i>Ki</i> değerleri ve inhibisyon türleri.....	97
<b>Çizelge 4.9.</b> Sitotoksosite testinde kullanılan gruplar .....	98
<b>Çizelge 4.10.</b> Nöron hücreleri üzerinde ilgili grupların MTT analizinde elde edilen istatistiksel veriler.....	99
<b>Çizelge 4.11.</b> U87MG hücre hattı üzerinde ilgili grupların MTT analizinde elde edilen istatistiksel veriler .....	103
<b>Çizelge 4.12.</b> Çalışmada kullanılan hücre kültürlerinden elde edilen total RNA ve cDNA'ya ait A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> oranları .....	107

<b>Çizelge 4.13.</b> Nöron hücre kültüründen elde edilen cDNA'lar ile yapılan Real Time PCR uygulamalarında elde edilen veriler .....	109
<b>Çizelge 4.14.</b> U87MG hücre kültüründen elde edilen cDNA'lar ile yapılan Real Time PCR uygulamalarında elde edilen veriler .....	110



## 1. GİRİŞ

Kanser, kontrolsüz hücre bölünmesi ve hücrelerin orjinden veya primer bölgeden vücudun diğer bölgelerine invazyonu (çevre dokulara yayılma ve işlevlerini bozma anlamında kullanılan tıbbi bir terim) ile karakterize olan bir hastalık grubudur. Kanserın büyüme sinyallerinin kendi kendini yönetmesi, hücrelerin büyüme inhibisyon sinyallerinden ve apoptosisten kaçması, limiti olmayan bölünme potansiyeli, anjiogenez, invazyon ve metastaz olmak üzere ayırıcı özellikleri olduğu bilinmektedir (Pecorino 2006). Kanser tüm dünyada hızla artmakta ve ölüm nedenlerinin başlıca sebepleri arasında yer almaktadır. Son istatistiksel bilgilere göre 2020 yılında dünyadaki kanser hastası sayısının 15 milyondan fazla olacağı belirtilmiştir (Kairemo *et al.* 2008).

Bugün için kanser tedavilerinin temelini cerrahi müdahale, radyasyon ve kemoterapi oluşturmaktadır. Bu yaklaşımlar fiziksel olarak tümörlü alanı ortadan kaldırmayı amaçlamaktadır. Bu şekilde sağlıklı hücrelerin etkilenmesini en aza indirmek hedeflenmektedir. Ancak geleneksel tedavi yöntemlerinin sınırlı etkiye sahip olması, düşük biyouyumluluk, toksisite ve yan etkiler gibi olumsuzlukları nedeniyle ilaçların tedavi edici etkisi ciddi şekilde azalmaktadır. Ayrıca hedef olmayan bölgelerin bu ilaçlara maruz kalması sonucu belirli dokularda bu maddeler birikmektedir. Bunun sonucunda istenmeyen doku tahribatları oldukça sık olarak karşımıza çıkmaktadır (Chen *et al.* 2008; Sahoo and Labhasetwar 2003). Ayrıca bu hastalığın doğası, bütün tümörlü hücreler yok edilmediği sürece daha agresif ve tedaviye daha dirençli bir şekilde geri dönecek biçimdedir. Bu nedenle, yan etkileri olmayan etkinliği ve spesifikliğı yüksek tedavi yöntemleri ile bu tedavilerin uygun zamanlı ve etkili olabilmesi için en iyi fırsatı sağlayacak erken teşhis mekanizmalarına yönelik araştırmalar oldukça önemli bir gerekliliğe sahiptir.

Kanser ve diğer hastalıkların tedavisinde alınan ilaçlara karşı geliştirilen tolerans ve direnç, günümüz modern tıp dünyasının en önemli sorunu haline gelmektedir. Bu sorun bilim adamlarını yeni ilaçların sentezi, proteomiks (Qadir 2010), polimer (Khalid *et al.* 2009; Hussain *et al.* 2011) ve nanoteknolojinin kullanımı (Naz *et al.* 2011; Ehsan *et al.*



2012) gibi alternatif yöntemlerin araştırılmasına yöneltmiştir. Aynı zamanda bu sorun için laktik asit bakterileri ya da deniz mikroorganizmaları tarafından ilaç sentezleme (Masood *et al.* 2011) ve hastalıklı hedef alana ilaç dağıtımının artırılması gibi yöntemlerin kullanımı mevcuttur. Bununla birlikte hastalıkların kontrolü için bitki ürünlerinin ve ekstraktlarının kullanımına doğru artan bir eğilim söz konusudur. Çok sayıda bitki araştırmacılar tarafından anti-enflamatuar (Qadir 2009), hipoglisemik, amoebisidal, anti-verimlilik, sitotoksik, antibiyotik (Amin *et al.* 2012), spazmolitik, bronchodilator, antioksidant (Janbaz *et al.* 2012) ve karaciğer koruyucu özellikleri (Ahmad *et al.* 2012) gibi farmakolojik değerleri açısından taranmaktadır.

Bu araştırılan bitkiler arasında *Morus nigra* (Karadut) önemli bir yer tutmaktadır. *Morus nigra* (Moraceae) yaygın olarak Asya, Afrika, Avrupa ve Amerika'da yetişmektedir. Yapılan çalışmalarda; farmakolojik olarak *M. nigra*'nın antioksidant (Ozgen *et al.* 2009), anti-nosiseptif (Padilha *et al.* 2009), anti-enflamatuar (Padilha *et al.* 2010), anti-diabetik (Husseinzadeh *et al.* 1999), antibakteriyal (Mazimba *et al.* 2011), kardiyak depresan (Malik *et al.* 2012), anne sağlığı için etkili (Volpeto *et al.* 2011), kurt döktürücü ve anti kanser (Kumar and Chauhan 2008) etkinliği rapor edilmiştir. Ayrıca geleneksel olarak halk arasında; *M. nigra* sarılık tedavisi (Abbasi *et al.* 2009), ağız ve diş hastalıkları, hipertansiyon, artrit ve anemiyi tedavi etmede yaygın olarak kullanılmaktadır (Ozgen vd 2009).

Fenolik bileşikler serbest radikalleri nötralize edebildiklerinden dolayı antioksidantların önemli bir kaynağıdır (Breyera *et al.* 2007). Serbest radikaller bir veya birden çok eşleşmemiş elektrona sahip, molekül ağırlığı düşük, kısa ömürlü, kararsız ve çok etkin moleküller olarak tanımlanmıştır. Stabil moleküllerin dış yörüngesinde birbirine zıt yönde dönen elektron çiftleri vardır. Serbest radikaller oldukça reaktiftir ve elektron eşlemek amacıyla diğer moleküller ile reaksiyona girmek için yarış içindedirler (Dormandy 1980). Serbest radikaller hücreye birkaç farklı mekanizma ile zarar verirler; membrane lipitlerinin peroksidasyonu, protein hasarı, disülfit bağı oluşumu, DNA hasarı (Hsu *et al.* 2006; Yapar *et al.* 2007; Wu *et al.* 2010). Bu zararlar sonucunda bireyde dejeneratif hastalıkların oluşması (Alzheimer, katarakt, diyabet, kardiovasküler

rahatsızlıklar, kanser...) söz konusu olabilmektedir (He and Giusti 2010; Gioti *et al.* 2007). Vücutta serbest radikallerin etkilerini kaldırmak için geliştirilen antioksidan savunma sisteminde görev alan antioksidanlar; hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri ya da temizlenmesi, serbest oksijen radikallerinin enzim reaksiyonları aracılığıyla ya da doğrudan giderilmesi, metal iyonların bağlanması ve radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi ve serbest oksijen radikallerinin oluşumunu baskılama yoluyla engellenmesi gibi görevleri vardır (Rangan and Bulkley 1993).

Birçok çalışma antosiyaninlerin antioksidant aktivite gösterdiğini önceden rapor etmiştir (Wang *et al.* 1997; Stinzing *et al.* 2002). Antosiyoninler birçok meyvede pigment olarak zengin konsantrasyonlarda bulunmakla birlikte; insanlarda rastlanan birçok hastalığa karşı koruyucu ve tedavi edici rolü olduğuna dair anekdotsal ve epidemiyolojik çalışmalar bulunmaktadır. Flavonoidlerin felçleri önlemeye yardımcı olduğu, kronik kalp hastalıklarından ölüm oranını azaltabileceği, tümör gelişimini kısıtlayabileceği gösterilmiştir (Seeram 2008). 2009'da yapılan bir çalışmaya göre antosiyaninlerin nöron koruyucu ve anti-enflamatuar aktivitelerinin yanı sıra analjezik özelliklere sahip olabileceği gösterilmiştir (Korte *et al.* 2009). *In vitro* olarak yapılan bir çalışmada; hem MAO-A hem de MAO-B (MAO fonksiyonu nörodejeneratif hastalıklar, depresyon ve anksiyete ile ilişkilidir) için antosiyaninlerin MAO inhibitör aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir (Dreiseitel *et al.* 2009).

Bazı çalışmalarda karadut ekstraktlarındaki flavonoid ve antosiyanin gibi fenolik madde ile karotenoid içerikleri araştırılmıştır (Naderi *et al.* 2004; Sass-Kiss *et al.* 2005; Zadernowski *et al.* 2005; Dugo *et al.* 2001; Hassimotto *et al.* 2007; Lin and Tang 2007; Ercisli ve Orhan 2007; Pawlowska *et al.* 2008; Song *et al.* 2009; Özgen vd 2009). Dimitrijević *et al.* (2013) yaptıkları çalışmada karadut meyvesindeki fenolik içerik ve antioksidant kapasitesini araştırmışlardır. Buldukları sonuçlara göre; karadut meyvesinin GAE/100 g'ında 90,26 dan 118,84 mg'a kadar değişen toplam fenol bileşiği ve siyanidin-3-O glikozid/ 100 gr taze meyvede 114,83 ile 128,68 mg arasında değişen antosiyanin içerdiği belirtilmiştir. Ştefănuț *et al.* (2013) tarafından yapılan bir çalışmada

ise karadut'un antosiyanin içeriği  $1197\pm 6,1$  mg/L fenolik madde içeriği  $2323\pm 4,0$  mg GAE/L ve antioksidant aktivite ise  $8,9\pm 0,3$  meq Trolox olarak belirtilmiştir.

Nanoteknoloji, yapı taşları olarak atom veya moleküllerin kullanımıyla insan yapımı 0,1-100 nm boyutundaki yapıların işlevsel olarak tasarlanıp imal edilmesi şeklinde tanımlanmaktadır (Thrall 2004; Xu *et al.* 2007). Nanoteknoloji hemen hemen her alanda potansiyel bir uygulama alanına sahip olup bu alanlara öne çıkarıcı yenilikler kazandırmaktadır. Tıp biliminde ise nanoteknolojinin kullanım alanı “nanotıp” olarak isimlendirilmektedir ve tanı, tedavi, hastalık ve travmatik yaralanmaların önlenmesi, ağrının giderilmesi ve insan sağlığının korunup geliştirilmesi amaçlı vücudun moleküler bilgileri ile moleküler araçların kullanılmasını içermektedir (Freitas 2005; Yula ve Deveci 2010; Gupta 2011; Syed *et al.* 2013). Nanoteknolojideki gelişmelerin tıp alanına uygulanmasıyla nano-ölçek seviyesinde biyo-uyumluluk gösteren yapılar tasarlanmakta ve bu şekilde teröpatik ajanların hastalıklı dokulara ve hatta hücelere kolayca ulaşması sağlanmaktadır. Bununla birlikte; terapötik amaçlı kullanılacak nano sistemlerde nano malzemenin hastalıklı bölgeye hedeflenebilir olması, yüksek biyo dolaşım ve farmakokinetik özelliklerine ek olarak düşük toksisite göstermesi oldukça önemlidir (Tan vd 2012).

Nano ölçekli ilaçlar yüzey alanı arttığı için mevcut ilaçlara göre daha etkilidir ve bunun sonucunda hastaya tedavi amaçlı verilmesi gereken ilaç miktarında birkaç kat kadar azalma sağlanır. Kanserli hücrelerin teşhisi ve tedavisinde nanopartikül kullanımına dair elde edilen umut verici sonuçlar modern tıp için heyecan vericidir. Nanopartiküllerin; yükleme kapasitesinin fazla olması, immün sistem tarafından tanınmaması dolayısıyla hedefe daha etkili bir biçimde ulaşmak amacıyla yüzeylerinin çeşitli moleküller ile modifiye edilebilmesi, kan beyin bariyeri ve hücreler arası sıkı bağlantılar gibi fizyolojik bariyerlerden geçişi sağlayabilecek şekilde dizayn edilebilmesi, polimer kaplı süperparamanyetik materyallerin manyetik rezonans görüntülemeye olanak sağlayarak partiküllerin diagnostik uygulamalarda kullanılabilmesi, bir ligand ile konjugasyon aracılığıyla oldukça spesifik doku hedeflendirmesini mümkün kılması gibi özellikleri bulunmaktadır (Soloviev 2007; Ak 2010).

Demir nanopartiküllerin sentezi ve kanserli hücrelerin teşhisinde ve tedavisinde kullanımını sahip olduğu özellikler ile büyük önem kazanmaktadır. Demir nanopartiküller hacimsel yapılarından farklı manyetik özellik göstermekle birlikte olağandışı fiziksel ve kimyasal özellikler sergilemektedirler. Son yıllardaki çalışmalar bu malzemelerin düşük ergime ve sinterleme sıcaklığı, süperplastik davranış, yüksek süneklik ve tokluk, yüksek ısıl genleşme katsayısı, farklı termofiziksel özellikler ve yüksek self difüzyon katsayısı gibi özellikler gösterdiğini ortaya koymuştur.  $Fe_3O_4$  nano yapıları demirin oksitlenerek pasifleşmesi (yüzey reaktivitesinin azalması) sonucu oluşan bir yapıdır. Demir bilindiği gibi sahip olduğu yüksek doyum miktatsızlanma değeri nedeni ile teknolojik pek çok alanda vazgeçilmez bir yapıdır. Demir nano parçacıkları özellikle, karbon-karbon bağlarının oluşumu ve parçalanmasında etkin bir rol almaktadır (Kommareddi *et al.* 1996; Fauconnier *et al.* 1996). Birçok endüstriyel uygulamada kullanım alanı bulan  $Fe_2O_3$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve  $\epsilon$  olmak üzere dört farklı kristal yapısına sahiptir. Bu kristal yapılardan  $\alpha$ - $Fe_2O_3$  ve  $\gamma$ - $Fe_2O_3$  kristal yapıları endüstriyel uygulamalarda kendilerine yer bulmaktadırlar ancak  $\epsilon$ - $Fe_2O_3$  ve  $\beta$ - $Fe_2O_3$  kararsız olduklarından dolayı uygulama alanları yok gibidir. Rombohedral faz (hematit) demir oksit ve bir n-tipi yarı iletken olan  $\alpha$ - $Fe_2O_3$  (Bant aralığı enerjisi,  $E_g=2,1$  eV) çevre koşullarında termodinamik olarak en kararlı demir oksit fazı olarak ifade edilmektedir. Kübik spinel faz (maghemit) demir oksit ve n-tipi yarı iletken olan  $\gamma$ - $Fe_2O_3$ , ( $E_g=2,43$  eV) ise çevre koşullarında  $\alpha$ - $Fe_2O_3$ 'dan sonra en kararlı demir oksit fazıdır. Hematit ve maghemitler katalizör, gaz sensörü, manyetik kayıt ortamları, biyosensörler, magnetoptik cihazlar, lityum-iyon pilleri, korozyon önleyici, sensör, su arıtma ve pigmentleri kapsayan birçok alanda uygulamalara sahiptirler (Bacri *et al.* 1997; Ilievski *et al.* 2003; Perez *et al.* 2004; Jing *et al.* 2006; Cao *et al.* 2008).

Glioblastoma (GBM) erişkinlerde en sık rastlanan ve en hızlı büyüyen astrosit denilen yıldız şeklindeki destek hücrelerinden kaynaklanan kötü huylu bir primer beyin tümürüdür (Ohgaki *et al.* 2004). 4. derecedeki astrositom olarak sınıflandırılır. Primer beyin tümörlerinin yaklaşık olarak 1/3'ünü oluşturmaktadır (Galanis and Buckner 2000; DeAngelis 2001). Diğer kanser türlerine göre sık görülmemesine rağmen hastalarda yaşam kalitesini ve yaşam süresini olumsuz etkileyen GBM'de tedavi seçenekleri uzun

yıllar çok fazla değişmemiştir. Optimal tedavi modalitesi, mümkün olan en geniş cerrahi sonrasında adjuvan radyoterapi (RT) ve seçilmiş olgularda kemoterapi (KT) eklenmesi şeklindedir. Semptomlar daha çok tutulan beyin bölümüne bağlıdır. Ne yazık ki bu tümörler genellikle büyük boyutlara ulaşmadan belirti vermezler. GBM'de belirti ve bulgular arasında nöbetler, bulantı ve kusma, baş ağrısı, hafıza kaybı, kısmi felç yer almaktadır. Temporal ve frontal lob bu hastalıktan etkilendiğinde ileri düzeyde hafıza kaybı, kişilik değişiklikleri ve nörolojik fonksiyon kaybı görülmektedir (Ohgaki *et al.* 2004).

Glioblastoma tedavisi standart tedavilere karşı tümör hücrelerinin direnç göstermesi, sağlıklı beyin bölgelerinin tedaviden zarar görme olasılığı, beynin kendini yenileme kapasitesinin düşük olması, kan beyin bariyerinden birçok ilacın geçememesi gibi nedenlerden dolayı oldukça zordur. Hastaların tanısı konduktan sonra en geç 2 yıl içinde ölümü gerçekleşir (Jonhson *et al.* 2011). Bu nedenle glioblastoma tedavisi için araştırmalar alternatif tıbbın odağı olan bitkiler ve çağımızın en önemli bilimsel gelişmesi olarak lanse edilen nanoteknolojinin tıp alanındaki sunduğu olanaklar üzerinde giderek yoğunlaşmaktadır. Bu amaçla birçok bitkinin etken maddesi veya ekstraktı farklı glioblastoma hücre hatlarında sitotoksik testlere tabi tutulmaktadır ve birçok etken madde taşıyıcısı olarak nanopartiküllerin kullanımı denenmektedir.

Glutamat beyinde heyecan duygularına yönelik sinir hücrelerindeki iletimi sağlayan en önem sahibi eksitatör nörotransmitter maddedir. Ancak aynı zamanda nörotoksik bir maddedir. Beyinde meydana gelen normal durum dışı oluşumlar sayesinde glutamat konsantrasyonundaki değişiklikler nörotoksisiteye ve bu durumu takiben hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu hücre ölümleri geri dönüşümsüzdür. Bu nedenle oluşan hasarlar sıklıkla kalıcı olmaktadır. Örneğin; hipoksik hasar, hipoglisemi, inme ve epilepsiyle alakalı konularda glutamat reseptörlerinin gereğinden fazla uyarımı mevcuttur. Beyinde meydana gelen hasarlar ile glutamat reseptörlerinin gereğinden fazla uyarılması arasında oldukça güçlü bir ilişki bulunmaktadır (Schipke *et al.* 2001; Kabadere 2002; Hacımuftuoğlu 2007).

Glutamat reseptörleri N-metil-D-aspartat (NMDA), Kainat, alfa-amino 3-hidroksi-5-metilisokzasole-4-propionik asit (AMPA), metabotropik glutamat reseptörleri şeklinde sınıflandırılmaktadırlar. Üzerine en fazla ilgiyi çeken NMDA reseptörleri hipokampus ve serebral kortekste oldukça fazla miktarda yer almaktadırlar. NMDA reseptörlerinde  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Ca}^{2+}$  'un ilgili hücrelere erişimini gerçekleştiren yüksek iletimli bir kanal, ilaçlar ve ajanlar için bağlanma alanları olarak görev yapan glisin bağlanma bölgesi, Fensiklidin ile yarışmasız antagonistler için (ketamin, MK 801) bağlanma bölgesi, voltaja bağımlı olmayan blok yapan 2 değerlikli katyon bölgesi, poliamin düzenleyici bölgesi ve son olarak voltaj bağımlı- $\text{Mg}^{2+}$  bağlanma bölgesi bulunmaktadır (Güven 2009).

Grin2c geni, iyonotropik glutamat reseptörlerinin bir sınıfı olan NMDA reseptörlerini bir alt birimini kodlamaktadır. Çözünür taşıyıcı ailesinin bir üyesi olan Slc1a2 (GLT 1) ise yüksek afiniteli glutamat taşıyıcısıdır. Glutamat taşıyıcıları glial hücrelerde ve/veya presinaptik glutamaterjik sinir uçlarında bulunan membrana bağlı proteinlerdir. Bu proteinler hücre dışı alanda gereğinden fazla bulunan glutamatu ortamdan uzaklaştırmakla görevlidirler (Karki *et al.* 2015).

Serbest radikaller aminoasitlerin yan zincirlerini okside ederek veya lipit peroksidasyonu, glikasyon ürünleri gibi oksidasyon yan ürünlerinin proteinlere kovalent olarak bağlanması ile bu proteinlerde hasara neden olabilmektedirler. Zarar görmüş çapraz bağlar ile oluşturan proteinler proteozomal yıkıma gönderilmekle birlikte nörodejeneratif hastalıklarda görülen protein birikimlerini oluşturarak hücrel hasarlara da yol açabilmektedirler (Markesbery 1997; Chauhan and Chauhan 2006). Literatürde glutamat ve oksidatif stres ilişkisine dair araştırmalar mevcuttur (Blandini *et al.* 1996; Obrenovitch and Urenjak 1997; Pereira and De Oliveira 2000). Serbest oksijen radikalleri glutamat alım inhibisyonu ve NMDA reseptör aktivasyonunu sağlayarak süperoksit salınımına, hücre içi  $\text{Ca}^{2+}$  artışına, NO oluşumuna neden olabilmektedirler. Bu nedenle araştırmacılar antioksidan maddeler ile glutamat toksisitesi üzerine araştırmalar yapmaya başlamışlardır. Lipoik asit (Han *et al.* 1997), N-asetilsistein amid (Penugonda *et al.* 2005), kateşin (Torres *et al.* 2005), vitamin C, vitamin E, kuersetin,

(Farombi and Onyema 2006), 7,8-dihidroksiflavon (Chen *et al.* 2011), likopen (Sadek *et al.* 2016) bu çalışmalarda araştırılan bazı antioksidan maddelerdir.

Enzimler canlı sistemlerde spesifik olarak kimyasal tepkimeleri katalizleyen, metabolik reaksiyon basamaklarını katalizleyen çoğunluğu protein yapısındaki makromoleküllerdir. Enzimlerin canlı sistemlerdeki önemi düşünüldüğünde üzerine yapılan çalışmaların her zaman bir gereklilik oluşturduğu ortaya çıkmaktadır. Sağlık bilimleri dalı olan tıp alanında bazı hastalardaki genetik bozukluklar enzimlerin yetersizliğine veya tam yokluğuna atfedilebilmektedir. Vucüt dengesinin bozulması spesifik bir enzimin normalden daha fazla veya daha az aktivite göstermesi nedeniyle karşımıza çıkabilmektedir. Bu nedenle en önemli canlı konumundaki insanın kanında, kan serumunda, eritrositlerde ve doku örneklerinde bulunan enzimlerin farklı bilimsel yöntemlerle saflaştırılması, karakterize edilmesi tıp alanında ve enzimoloji alanında önemli olmaktadır.

Enzim saflaştırma yöntemleri olarak çöktürme, kromotografik yöntemler, diyaliz, filtrasyon yöntemleri öne çıkmaktadır. Ancak bu yöntemler oldukça fazla adımlı prosesleri, zaman kaybını, uygulama zorluğunu, yüksek verim kaybını içermektedir. Son zamanlarda üçlü faz sistemleri (TPP- Three-phase partitioning, ÜFA) enzim saflaştırma çalışmalarında kullanılan birden fazla amonyum sülfat çöktürme basamağını kolektif olarak içeren bir ayırım yöntemidir (Kat ve Keskin 2013).

Paraoksonaz (PON) hem arilesteraz (E.C. 3.1.1.2), hem de paraoksonaz (E.C.3.1.8.1) aktivitesine sahip, PON1, PON2 ve PON3 ile çoklugen ailesinin bir üyesi olup kalsiyum-bağımlı serum esterazdır. PON1 43-45 kDa molekül ağırlığına sahiptir ve dolaşımında HDL'ye bağlı olarak taşınır (Précourt *et al.* 2011). PON1'in izoelektrik noktası 5,1'dir. PON1 enzimi, paraoksonun hidrolizini sağlayan paraoksonaz aktivitesine, fenilasetatın hidrolizini sağlayan arilesteraz aktivitesine ve laktonların hidrolizini sağlayan laktonaz aktivitesine sahiptir (Draganov *et al.* 2005; Gan *et al.* 1991).

Paraoksonazın son yıllarda özellikle arterosklerozisin önlenmesinde ve ilaç metabolizmasında önemli derecede rol oynadığı anlaşılmıştır (Mackness *et al.* 2001; Draganov *et al.* 2004). Paraoksonaz, sahip olduğu laktonaz aktivitesi ile arterosklerozise karşı koruyuculuğunu hem LDL ve HDL lipitlerinin yükseltgenmesini önleyerek hem de lipit peroksidlerini metabolize ederek göstermektedir (Deakin *et al.* 2002; Teiber *et al.* 2003). PON1 enzim düzeyi ve aktivitesinin kardiyovasküler hastalıklarda, hiperkolesterolemi hastalarında, ileri yaştaki insanlarda, obezitede, menopozda, şeker hastalığında, Parkinson hastalığında ve böbrek yetmezliklerinde azaldığı belirlenmiştir (Mackness *et al.* 1998; Kondo and Yamamoto 1998; Ikeda *et al.* 2001; Gugliucci *et al.* 2012). Nishio *et al.* yaptıkları *in vitro* çalışmalarda, sigarada bulunan toksik maddelerin PON1'in enzimatik aktivitelerini inhibe ettiğini göstermişlerdir (Nishio and Watanabe 1997).

Oksidatif stres karsinogenezde önemli etyolojik faktörlerden birisidir. Buna karşın PON1, endojen serbest radikal temizleyici sistemler arasında yer aldığından farklı kanserlerin etyoloji ve önlenmesindeki rolüne ilgi duyulmuştur. Elkiran vd (2007) tarafından yapılan çalışmada, serum PON1 aktivitesinin akciğer kanserli hastalarda sağlıklı kişilerden anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur (Elkiran vd 2007). Lee *et al.* (2005) tarafından yapılan benzer bir vaka-kontrol çalışmasında sağlıklı kontrol gruplarına göre gastrik veya pankreas kanseri olan hastalarda serum paraoksonaz seviyeleri düşük çıkmıştır (Akçay vd 2003a; 2003b).

Kanser araştırma derneğine göre; antosiyaninler gibi fitokimyasalların insan diyetlerinde bulunmasının olumlu etkilerinin olduğu belirlenen çalışmalar bulunmasıyla birlikte kanseri tedavi edici ya da önleyici olduğunun kesin olarak belirleyen herhangi bir fitokimyasal üzerine güçlü bir çalışma bulunmadığı belirtilmektedir (Anonim 2013). Gelişen teknolojik gelişmelere paralel olarak bilim dünyasındaki beklentiler artmaktadır. Artık morfolojik olarak ölçülebilen parametrelerin yanında etken maddenin etkinliğinin moleküler olarak kanıtlanması gerekmektedir. Özellikle sağlık alanında yapılan çalışmalarda kullanılacak hayvan modellerinde mRNA seviyesinde verilerin değerlendirilmesi etken maddenin etkisini gerçek anlamda ortaya koymaktadır. Ancak



bu şekilde araştırmalardan olumlu sonuçlar elde edildiğinde; etken maddenin insan üzerinde denenmesine daha güvenilir olarak yaklaşılabilmektedir. Bu çalışmada antosiyaninlerin kanser üzerine etkisinin hangi düzeyde olduğunun kesin olarak ortaya konması amaçlanmaktadır. İlaç taşıyıcı olarak manyetik demir nanopartiküller kullanılarak hastalıklı alana ulaşmada minimum kayıp hedeflenmekte ve sağlıklı alanların etkilenmesi minimum seviyeye çekilmektedir.

Yapılan çalışma kapsamında ilk olarak karadut bitkisinden antosiyanin içeriği fazla olan ekstraktlar farklı çözücüler (alkol ve su) kullanılarak elde edilmiştir. Elde edilen bitki ekstratları  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküller üzerine iyonik bağ ve absorpsiyon yöntemlerinden yararlanılarak immobilize edilmiştir. PON1 enzimi sağlıklı insan serumundan üçlü faz ayırımı yöntemiyle saflaştırılmıştır, saflaştırma optimizasyonu ve bazı antioksidant bileşikler ve hazırlanan karadut ekstraktlarının bu enzim üzerindeki aktivatör/inhibitör etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın moleküler aşamasında hem serbest hem de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküller yüzeyine immobilize edilmiş olan bitki ekstratlarının Glioblastoma (U87MG hücre hattı), primer rat korteks sinir hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Ayrıca uygulanan dozların real time PCR uygulamaları Grin2c ve Slc1a2 genleriyle ilgili olarak gerçekleştirilmiştir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Kanser

Kanser, terim olarak kullanılmamış olmasına rağmen insanlık yaşamı boyunca tarih sayfalarında tarif edilmiştir. Mısır'da bulunan travma cerrahisi ile ilgili eski bir Mısır kitabı parçasının kopyası olan Edwin Smith Papirüsü'nde ateş matkabı adı verilen bir alet ile tümörlerin ve göğüs yaralarının yakılarak tedavi edildiğine dair 8 vaka açıklanmaktadır. Hastalıkla ilgili olarak "bir tedavisi yoktur" şeklinde bir ifade yer almaktadır (Anonymous 2016a).

Portekiz'in başkenti Lizbon'daki Ulusal Arkeoloji Müzesi'nde muhafaza edilen "M1" adlı mumya üzerinde radyolojik incelemeler yapan araştırmacılar, mumyada boyutları 0,1 ila 1,5 cm arasında değişen ve metastatik prostat kanserine işaret eden tümörler tespit etmişlerdir. Araştırma sonucunda M1'in, Mısır'da bilinen en eski ve dünyada ise kayıtlara geçen ikinci en eski prostat kanseri vakası olduğunu belirtmişlerdir (Prates *et al.* 2011).

"*Carcinos ve karsinom*" kelimelerini kullanan ve tümörleri iyi huylu (belign) ve kötü huylu (malign) olarak ayıran ilk kişi Hipokrat (M.Ö. 460-370) olarak kabul edilmektedir. Hipokrat Doktrini olarak bilinen belgede cilt kanseri tanımlanmış ve kanser tedavileri belirtilmiştir. Romalı hekim Celcus (M.Ö. 28-50) *carsinos* kelimesini latinceye çevirerek *cancer* (yengeç) demiştir. Bir başka Romalı hekim Galen (MS 130-200), tümörleri tanımlamak için *oncos* (Yunancada şişlik) kelimesini kullanmıştır (Anonymous 2016a).

15.yy'da Rönesans döneminde bilim adamları insan vücudu üzerinde büyük bir anlayış geliştirmiştir. Galileo ve Newton gibi bilimsel metot kullanmaya başlayan bilim adamları daha sonra hastalık incelemelerine başlamışlardır. Harvey (1628) tarafından yapılan otopsiler kalp ve vücut boyunca kan dolaşımının anlaşılmasına yol açtı. 1761'de Giovanni Morgagni hastanın hastalığıyla ilişkilendirmek amaçlı patolojik bulgular için otopsiler yapmıştır. Bu otopsiler bilimsel onkoloji ve kanser çalışmaları için temel olmuştur (Harvey 1974; Diamandopoulos 1996).

Ünlü İskoç cerrah John Hunter (1728-1793) “Eğer tümör yakınındaki dokuları istila etmemişse ve hareket edebiliyorsa tümörü oradan çıkarmada hiç bir uygunsuzluk yoktur” ifadesini kullanarak bazı kanserlerin cerrahi operasyonla tedavi edilebileceğini öne sürmüştür. Bir yüzyıl sonra anestezinin geliştirilmesi ameliyatların gelişmesine izin vermiştir ve radikal mastektomi (memenin herhangi bir nedenle alınması) gibi klasik kanser işlemleri geliştirilmiştir (Diamandopoulos 1996; Hajdu 2011a, 2011b).

19. yüzyılda modern mikroskobun kullanımı ile hastalıklı dokuların çalışılmasında bilimsel bir atak meydana gelmiştir. Hücresel patolojinin kurucusu olarak anılan Rudolf Virchow kanserli dokularda modern patoloji çalışmalarıyla bilimsel temeller sağlamıştır. Bu çalışmalar ile kanserin olumsuz etkileri daha iyi anlaşılmiş ve kanser operasyonları geliştirilmiştir. Bu dönemde cerrah tarafından alınan vücut dokuları artık muayene edilebilir ve kesin tanı yapılabilir hale gelmiştir (Diamandopoulos 1996; Hajdu 2011a, 2011b).

Günümüzde kanser en genel tanımıyla vücudun herhangi bir yerinde başlayabilen, bir hücre veya hücre grubunun kontrol dışı büyümesiyle normal hücrelere göre sayıca daha fazla çoğalması (hücre proliferasyonu) ve bu hücrelerin yer değiştirerek farklı alanlarda faaliyetlerini sürdürmesi (metastaz) şeklinde tanımlanmaktadır. Ancak kontrolsüz çoğalan hücreler farklı bölgelere yerleşme eğilimi göstermiyorsa benign tümör, farklı bölgelere yerleşme ve yayılma eğilimi gösteriyorsa malign tümör olarak adlandırılmaktadır.

Kanserler, hastalığın vuku bulduğu organa veya köken aldıkları hücre-doku tipine göre isimlendirilirler. Organlara göre akciğer, karaciğer, rahim, beyin, mide, cilt kanseri gibi isimler alırken, hücre tipine göre karsinom, sarkom, lösemi ve lenfoma gibi isimlerle ifade edilirler. Sonuçta; mide adenokarsinomu, akciğer küçük hücreli karsinomu, kemik sarkomu gibi isimlerde söz konusu olmaktadır.

Kanser vakalarının kayıt altına alınması amacıyla yapılan ilk çalışma 1728 yılında Londra genel nüfus sayım idaresince gerçekleştirilmiştir. Diğer ülkelerde bu yaklaşım farklı tarihlerde uygulamaya konulmuştur. Danimarka'da 1943, Macaristan'da 1952, Finlandiya ve Almanya'da 1953 yıllarında halk tabanlı kanser kayıt sistemleri ile veri toplanmaya başlanılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü aracılığıyla yapılan standardizasyon çalışmaları ve 1948 yılında yayınlanan ICD (International Classification of Diseases)'nin 6. baskısı sonrasında kodlama sisteminin farklı ülkelerde uygulanması ile 1992 yılı itibariyle 52 ülkede 266 adet halk tabanlı kanser kayıt sistemi oluşmuştur. Bu ülkelerdeki çalışmalar düzenli olarak "5 Kıtada Kanser İnsidansı" (Cancer Incidence in Five Continents) isimli Dünya Sağlık Örgütü yayınında özetlenmektedir (Anonim 2016a). Amerikan Kanser Derneği'nin 2016 yılındaki sunulan kanser istatistikleri verilerine göre, Amerika Birleşik Devletleri'nde bu yıl içerisinde 1.685.210 yeni kanser vakası ve 595.690 kanser ölümlerinin gerçekleşmesi muhtemeldir (Siegel *et al.* 2016).

Ülkemizde 1982 yılında 1593 sayılı Umumi Hıfzısıhha Kanunu'nun 57. Maddesi gereğince 'bildirimi zorunlu hastalıklar listesi'ne alınmış olmasına rağmen ülkemizde gerçek kanser insidansı hiç bilinmemektedir. Sağlık Bakanlığı 1983'te yurt genelinde "Pasif Kanser Kayıt Sistemi" kurmuş fakat bildirim dayalı bu sistemde beklenenin 4'te 1'i kadar veri elde edilmiştir. Bu nedenle ülke çapında ama güvenilirliği olmayan veri toplamak yerine coğrafi sınırları ve nüfusu belirlenen bir alanda aktif olarak toplanacak verilerle bir kanser kayıt sistemi oluşturulması amacıyla 1992 yılında "Kanser Kayıt ve İnsidans" projesi başlatılmış ve Trabzon, Edirne, İzmir, Ankara, Bursa, Diyarbakır, Sivas ve Erzurum'da kanser kayıt merkezi kurulmuştur. Kanser kayıt altına alınması 1992 yılında başlamasına rağmen, aktif merkezlerin verilerinden elde edilen insidans raporu ilk kez 2002 serisi ile sunulmuştur. Fakat bu sistemin ilk

sonuçlarında da beklenen ve rapor edilen hastalar arasında büyük farklılıklar olduğu görülmüştür (Anonim 2016a).

20 yıllık geçmişi olan ve süreklilik gösteren İzmir Kanser Kayıt Merkezi 2013 yılında Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından Kuzey Afrika ve Doğu Akdeniz bölgesinde yer alan Kanser Kayıt Merkezleri için eğitim merkezi olarak seçilmiştir. Bu aşamada Türkiye, “Kanser Kayıtlığında Standartlar El Kitabı”nda belirtilen ve Ortadoğu Kanser Konsorsiyum’un (MECC) bir üyesi olarak bu konsorsiyumda kabul edilmiş kurallar dahilinde kanser verisi toplamaktadır. Ülkemizde, Malign kanserlerin tamamı (primer kanserler), *in situ* neoplazmlar, santral sinir sistemi ve medulla spinalis’te yer alan benign/borderline neoplazmlar toplanmaktadır. Toplanmış olan veriler Uluslararası Kanser Ajansı tarafından kanser kayıt merkezleri için özel olarak geliştirilmiş bir bilgisayar programı olan Can-Reg 4 programına girilmektedir. Kanser insidans hızları bu program üzerinden hesaplanmaktadır. Çizelge 2.1’de Globocan 2012 verilerine göre Türkiye için yaşa göre kanser hızları verilmiştir. Türkiye’de 2013 yılında yaşa standardize edilmiş kanser hızı erkeklerde 267,9 kadınlarda ise 186,5’dir (100000 kişide). 2013 yılı kanser istatistiklerine göre ülkemizde 103,070 erkeğin ve 71,233 kadının kanser hastalığına yakalandığı öngörülmüştür (Gültekin vd 2016).

**Çizelge 2.1.** Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre Türkiye’nin durumu (Deri dışında kalan kanserlerin yaşa göre standardize edilmiş hızları) (Ferlay *et al.* 2013)

	<b>Erkek*</b>	<b>Kadın*</b>
Dünya	205,4	165,3
IARC’a üye 24 ülke	236,4	192,5
AB (28 ülke)	314,9	243,2
ABD	347,0	297,4
Türkiye**	241,7	169,3

\*Yaşa göre standardize edilmiş hız 100.000 kişide \*\* Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2013

## 2.2. Kanser Araştırmalarında Bitkisel İlaçlara Yönelik Eğilimler

Kanser üzerine yapılan araştırmalarda hastalığın tek bir sebeple meydana gelmediği birçok sebeple ortaya çıkan ve gelişen hastalık grubu olduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle bugün kansere neden olan sebepleri belirleme, daha etkili tedavi amaçlı yöntemler geliştirme konusunda araştırmalar devam etmektedir (ACS 2009). Bu araştırmalar sırasında ortaya çıkan ve oldukça büyük bir ilgi ve ekonomik pazar haline gelen tamamlayıcı ve alternatif tıp oldukça ön plandadır.

Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp Ulusal Merkezi, Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp'ı (TAT)" şu anda geleneksel tıbbın bir parçası olarak kabul edilemeyen çeşitli medikal ve sağlık uygulamaları, ürünler veya disiplinlerin bir grubu" olarak tanımlamaktadır. Yeni yapılan bir analize göre kanser tedavisinde TAT kullanımında 1970'lerde %25, 1980'lerde %32'den daha fazla ve 2000'den sonra %49'lara varan bir artış bulunmaktadır (Horneber *et al.* 2012).

TAT bitki ve terapilerin geniş bir yelpazesini kapsamaktadır. Bütünleştirici tedavi standart bakım ile TAT'ın birleşimini ifade etmektedir. TAT kullanımı üzerine yapılan ve 2007'de yayınlanan Ulusal Sağlık Araştırması raporunda en sık kullanılan tedaviler olarak doğal ürünler ve derin nefes alma egzersizleri öne sürülmüştür (Gansler *et al.* 2008; Barnes *et al.* 2009). En çok kullanılan terapiler dua, manevi uygulama (%61), gevşeme (%44), inanç ve ruhsal iyileşme (%42), besin takviyeleri ve vitaminler (%40)'dir. TAT terapileri klinik uygulamaların içinde ve dışında, kanserli çocuklarda %31 ile %84 oranında kullanılmaktadır. TAT'lar aynı zamanda ağrıyı ve halsizliği azaltmada (%10,9), iyatrojenik menopozun yan etkilerini azaltmada (%8,8), anksiyete ve depresyonu iyileştirmede (%5,9), mide bağırsak bozukluklarında (%5), uyku bozuklukları ve nöropati iyileştirmede (%3,8) başvurulan yöntemlerdendir (Rossi *et al.* 2015). TAT terapileri kanser ve kanser tedavilerinin neden olduğu yan etkilerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kelly 2004; Ndao *et al.* 2013).

Tamamlayıcı tıp olarak masaj (Cassileth *et al.* 2007), shiatsu (Khorshid and Yapucu 2005), refleksoloji (Gürkan ve Bilge 2006), aromaterapi (Jennings 2004), teropatik dokunma (Potter and Perry 2009), homeopati, bitkisel terapiler, beslenme terapileri, hipnoterapi, şiropraksi (Cassileth *et al.* 2007), akupunktur (Horasanlı vd 2008) gibi uygulamalar söz konusudur.

Amerika'da yaşayan Kızılderililerin cilt kanseri ile venereal siğillerin tedavisi için ördekotundan (*Podophyllum peltatum*) hazırladıkları mayapple ekstraktı araştırmacıların ilgisini çekmiş ve üzerine yapılan çalışmalar sonucunda antikanser ajan olan podofillotoksin varlığı tespit edilmiştir. Madagaskar ve Asya'nın birçok yerleşkesinde hipoglisemik ajan olarak kullanılan *Catharanthus roseus* çiçeği'nde, 1958 yılında sitotoksik özelliği sahip olan vinblastin ve vinkristin içeriği bulunmuştur. Bu ajanlar çeşitli kanser tiplerinde başarıyla kullanılmıştır (Mann 2002; Işık ve Akçay 2014).

Zamanımızda kullanılan antikanser ilaçların yaklaşık %50'si doğal ürünler ya da doğal ürünlerden elde edilen kimyasallardan oluşmaktadır. 1960 yılında Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından yeni antikanser ilaçların araştırılması amacıyla başlatılan geniş çaplı çalışmalar sonucunda faydalı olabileceği tespit edilmiş şifalı bitkilerin sayısı oldukça fazladır. Paclitaxel (Taxol), Etoposid, Teniposid, Avemar bu çalışmalarda bulunan antikanser ilaçlardır (Goodman and Walsh 2001; Jakab *et al.* 2003; Tansey 2003).

### 2.3. Karadut (*Morus nigra*)

Karadut (*Morus nigra*), dutgiller (Moraceae) familyasından kalın dallara ve 10-15 m kadar boya sahip olabilen İran kökenli olmakla birlikte Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika, Afrika'da yetişebilen ve yüksek kromozoma ( $2n=154$ ) sahip bir dut türüdür (Şekil 2.1) (He *et al.* 2013). Esmer gri renkte gövdeli (kalın ve uzunlamasına çatlak) olmakla birlikte sürgünleri tüylüdür. Yapraklarını döken bir ağaçtır. Yapraklar geniş yumurta biçiminde 6-12 cm boyundadır. Yaprak uçları kısa damla dip kısım derin yürek biçimindedir. Kenarları kaba dişli ve çoğunlukla parçalıdır (Yiğit vd 2007).



**Şekil 2.1.** Karadut

Karadut meyve ağacı olarak kullanımının yanında idrar söktürücü, müshil, öksürük kesici, balgam söktürücü, yatıştırıcı, anksiyolitik, yüksek tansiyon düşürücü, diş ağrısını giderici, antelmintik ve emetik olarak kullanımı ile de bir halk ilacı olarak kabul edilmiştir (Kumar *et al.* 2008; Padilha *et al.* 2010; Feng *et al.* 2015).

Uygur özerk bölgesinde karadut tıbbi dut olarak adlandırılmaktadır. Uygurlar et süt gibi protein ağırlıklı sebze tüketimi sınırlı olan bir beslenme tarzına sahiptirler. Bu nedenle bölge halkı solunum ve sindirim sistemiyle ilgili hastalıklara oldukça duyarlıdırlar. Tıbbi dut olarak karadut bu bölgede bademcik iltihabı ve boğaz ağrısını tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır (Jiang and Nie 2015; Chen *et al.* 2016). Uygurlar hala bir yıl boyunca kullanılacak tıbbi dut kremi yapma geleneğini korumaktadırlar.

Birçok çalışmada karadutun polifenoller, flavonoidler ve antosiyaninlerce zengin olduğu bulunmuştur. Tıbbi karadutun antosiyanin içeriğinin kırmızı ve beyaz dut türlerinden daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Ercisli ve Orhan 2007; Gundogdu vd 2011; Jiang and Nie 2015). Karadut toksik olmayan yan etkileriyle birlikte antioksidant, antikanser ve hipoglisemik etkilere sahiptir (Ozgen vd 2009; Sanchez-Salcedo *et al.* 2015). Kökleri pankreas üzerine etkiliyken meyve suyu formu diyabetik hastalarda kan şekeri düzeyini düşürür. Kök kabuğu ekstraktı AIDS virüsüne karşı etkiye sahip olduğu söylenen bir alkaloid olan Deoxyjirimycini (DNJ) içerir. Yaprakların demlenmesi kan şekerinde bir azalmaya, bazen diürece ve arter basıncında bir azalmaya neden olur (Singh and Ghosh 1992; Kumar and Chauhan 2008). *Morus nigra* meyve suyu yapılan bir çalışmada oksidatif stresi bastırarak düşük malondialdehit (MDA) oluşumuna yol



açmıştır ve hepatosit zehirlenmesine %80 oranında önleyici etki göstermiştir (Naderi *et al.* 2004). *Morus nigra* meyvesi bakır iyonları ile indüklenen LDL lipit peroksidasyonuna karşı koruyucu bir etkiye sahiptir (Huang *et al.* 2013).

Ma (2002) tarafından yapılan çalışmada tıbbi karadut meyvelerinin farenjit hastalığının tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir. Başka bir çalışmada dut antosiyaninlerinin anti-inflamatuar etkilere sahip olduğu kanıtlanmıştır (Wang *et al.* 2009)

#### **2.4. Karadut ve Kanser**

Karadut ekstraktları yüksek seviyede antosiyaninleri içerir. Tanımlanmış antosiyaninler esas olarak siyanidin-3-glukozit (C3G) ve minör seviyede siyanidin-3-rutinosid ve pelargonidin türevleridir (Hassimotto *et al.* 2007). Karaduttan elde edilen antosiyanince zengin ekstrakt insanda oral alımla birlikte plazma antioksidan kapasitesini ve plazma katalaz aktivitesini arttırmıştır (Hassimotto *et al.* 2008). Aynı zamanda antosiyanince zengin ekstrakt insan akciğer kanser hücrelerinin yayılımı ve göçünü önleyici etki göstermiştir (Chen *et al.* 2006).

Jeong *et al.* (2010) tarafından yayınlanan rapora göre; metil alkol ile hazırlanan karadut ekstraktı, A172 insan glioma hücre hattı üzerindeki antiproliferatif ve moleküler mekanizma etkisini belirlemek için kullanılmıştır. Hücreler 24 ve 48 saat boyunca 1 ile 50 mg/mL konsantrasyonlarda karaduta maruz bırakılmıştır. Rapora göre hücre canlılığı doza ve zamana bağlı olarak azalmıştır. Hücreler 48 saat boyunca 10, 30, 50 mg/mL konsantrasyonlardaki karadut ekstraksiyonuna maruz bırakıldığında, hücre canlılığındaki azalma sırasıyla %53, %42, %26 olarak belirlenmiştir. Karadut ekstraktının A172 glioma hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırıcı rol oynayıp oynamadığını değerlendirmek için karaduta maruz bırakılan hücreler ve DCF (diklorofloressein) floresanstaki değişimler akış sitometresi ile ölçülmüştür. ROS üretimi 60 dk için 30 mg/ mL konsantrasyondaki karadut uygulamasında en erken 10 dk sonra artış göstermeye başlamıştır. Karadut ekstraktının yayılma (glioma hücrelerinin göçü) üzerine etkisi çizik yara testi (scratched wound assay) kullanılarak dolaylı olarak

tahmin edilmiştir. Yaralı alana taşınan kontrol hücrelerinin sayısı 24 saat sonra  $169,25 \pm 14,26$  iken karadut ekstraktı uygulamasından sonra yaklaşık olarak 13 hücre taşınmıştır. Bu verilere dayanarak araştırmacılar karadut ekstraktının glioma hücre göçünü belirgin olarak inhibe ettiğini savunmuşlardır.

Qadir *et al.* (2014) tarafından yayınlanan çalışmada *Morus nigra* yapraklarının anti kanser aktivitesi insan servikal kanseri hücre hattına (HeLa) karşı araştırılmıştır. Anti kanser aktivite metil-tiyazolil-tetrazolyum (MTT) deneyi ile değerlendirilmiştir ve hücrelerin yüzde inhibisyonu hesaplanmıştır. 1300 gram toz haline getirilmiş *Morus nigra* yaprakları 4 mL n-hekzan ve %70'lik sulu metanol içinde 7 gün boyunca arada sırada çalkalanarak birleştirilmiştir. Maserasyondan sonra liyofize edilerek 1, 10, 25, 50 ve 100 µg/mL olacak şekilde tartılmışlardır. MTT sonuçlarına göre 100 µg/mL *Morus nigra* sulu metanol ekstraktı HeLa hücre hattını %89,50-%31,99 oranında inhibe etmiştir.

Turan vd (2016) tarafından yayınlanan çalışmada, toz haline getirilen 1 gr *Morus nigra*'nın 20 mL DMSO ile hazırlanan ekstraksiyonu (DEM) 45°C'de manyetik karıştırıcıda 24 saat boyunca karıştırılmıştır. Cisplatin (0–10 µg/mL) ve DEM (0–1000 µg/mL), insan prostat adenokarsinomu (PC-3, ATCC-CRL-1435) ile insan normal sünnet derisi fibroblast hücreleri (ATCC-CRL-2522) üzerinde sitotoksik etkileri araştırılmıştır. PC-3 hücrelerinde DEM ve cisplatinin  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla  $370,1 \pm 5,8$  ve  $0,608 \pm 0,05$  olarak belirlenmişken fibroblast hücrelerinde bu değerler yine sırasıyla  $424,9 \pm 7,3$  ve  $5,29 \pm 0,24$  olarak bulunmuştur. DEM'in 370 µg/mL ve 666 µg/mL konsantrasyonları  $G_0/G_1$  fazında hücre sayılarını arttırmıştır ( $p < 0,01$ ). DEM'in bu iki konsantrasyonu S fazında ise hücre sayılarını azaltmıştır ( $p < 0,01$ ). Annexin V sonuçlarına göre 666 µg/mL konsantrasyonundaki DEM canlı hücre sayısını önemli ölçüde azaltmıştır ve nekrotik/geç apoptotik ve erken apoptotik hücrelerin bu ölümlerini arttırmıştır ( $p < 0,001$ ). 250, 500 ve 1000 µg/mL DEM konsantrasyonları için kaspaz 3 ve kaspaz 7 (Aktif merkezlerinde sistein aminoasidi taşırlar ve hedefledikleri proteinleri aspartik asit birimlerinden kestikleri için kaspaz ismini almışlardır (C-Asp-ase; C:sistein

aminoasiti simgesi, Asp:aspartik asit, -ase:kesici enzim eki) enzim aktivitelerinin yüzde indüksiyonları sırasıyla %3, %11 ve %70 olarak belirtilmiştir.

## **2.5. Kanser Araştırmalarında Nanoteknolojinin Getirdiği Eğilimler**

Bir ölçek bilimi olan nanoteknoloji, maddelerin atomik ve moleküler seviyede yeniden düzenlenip ve özelliklerinin değiştirilmesi yoluyla, yeni nanoyapıların tasarlanıp sentezlenmesidir. Nanoteknoloji kelimesi ilk olarak Norio Taniguchi (1974) tarafından “Nano-teknoloji genel olarak malzemelerin atom atom ya da molekül molekül işlenmesi, ayrılması, birleştirilmesi ve bozulmasıdır” şeklindeki ifadesi ile yazılı kayıtlara geçmiştir. Tıp, enerji, tüketim malzemeleri, bilgi teknolojileri, çevre iyileştirmeleri gibi ana alanlar altındaki bütün alt birimlerde nanoteknoloji resmen bir sıçrama meydana getirmektedir.

Biyolojik sistemler nanoboyutta işlev görmektedirler. Bu nedenle nanoteknolojinin sağlık alanındaki kullanımına yönelik çalışmalar oldukça önem arz etmektedir. Nanoteknolojinin sağlık alanındaki kullanımı nanotıp olarak ifade edilmektedir. Nanotıp, nano cihazlar veya nano yapılar kullanarak, insanın biyolojik sistemlerini moleküler boyutta izleme, tedavi etme ve yeniden yapılandırma olarak tanımlanmaktadır. Kanser tedavisi, ilaç geliştirilmesi ve taşınması, görüntüleme metodları, kemik yapı oluşturulması, tıbbi cihaz ve tanı testleri geliştirilmesi nanotıpın çalışma konularındandır.

Kanser tedavisinde erken tanı ve teşhisin, tedavide kötü huylu hücrelere ilaç taşınımının etkin olarak gerçekleştirilmesinin öneminin bilinmesi özellikle bu aşamalarda nanotıp kullanımını ön plana çıkarmaktadır. Nanodiagnostik (erken teşhis) için biyosensörler ve minyatür araçlar, Quantum dot'lar, nanoküreler, nanokapsüller, nanosüngerler, nanopartiküler sistemler, emülsiyonlar, nano veziküller, nanoporlar, nanorobotlar, nanofibriller çalışmalarda kullanılan başlıca nano ürünlerdir.

Kanser nanoteknolojisi tüm bilimsel alanların birleştirilmesiyle kansere karşı verilen savaşta yeni tasarımlar ve ürünler sağlayan bir alandır. Nanotibbin alt çalışma konularından olan kanser nanoteknolojisinde genellikle nanopartiküllerin kullanımı söz konusudur.

American Society for Testing and Materials (ASTM) tarafından yapılan standart tanıma göre nanopartiküller boyutları iki ya da üç boyutlu olarak 1-100 nm uzunluktaki parçacıklar olarak ifade edilmektedir (ASTM 2006). Ancak tıpta kullanılan nanopartiküllerin boyut aralığı 5-200 nm olarak verilmektedir. Nanopartiküller daha hassas analizler yapmak amacıyla biyomarkır tabanlı proteomik ve genomik uygulamalarda, manyetik rezonans, ultrason, floresan, nükleer ve bilgisayarlı tomografi gibi radyolojik alanlarda moleküler görüntüleme amacıyla, ilaç geliştirme sistemleri, hedefe yönelik tedavi, aşı geliştirilmesi gibi amaçlarla kullanılmaktadır (Medina *et al.* 2007; Berk ve Akkurt 2012). Sağlık alanında kullanılan nanopartiküller bizlere artmış ilaç çözünürlüğü, parçalanmaya karşı koruma, toksik etkilerin azalması, uzatılmış etki, biyoyararlanım geliştirilmesi, farmokokinetik ve dağılım özelliklerinin düzenlenmesi, hedefleme (hücre/doku) gibi birçok avantaj sunmaktadır.

Kanserli dokulara nanopartiküller ile antikanser ilaçlarının iletimi pasif ya da aktif hedefleme ile gerçekleştirilmektedir. Kanserli dokulara pasif hedeflemede anjiyojenik kan damarları ile endotel hücreleri arasında var olan 600–800 nm arasında değişen genişliğe sahip boşluklardan yararlanılarak nanopartiküllerin kanserli dokularda birikimi yapılmaktadır (Allen and Cullis 2004; Torchilin 2010; 2011; Erdoğan ve Özkan 2013). Ancak yüksek ozmotik basınç pasif hedeflemede kullanım sınırlılığına neden olur. Nanopartiküllere bir hedefleme ligandının, antikorunun bağlanması ile kanserli dokulara aktif hedefleme yapılabilmektedir (Danhier *et al.* 2010).

Nanopartiküllere dayalı taşıyıcılar kanserli dokulara ilaç dağıtımını kolaylaştırabilir ve ilacın tedavi edici etkinliğini arttırabilirler (Lammers *et al.* 2008; Zhu *et al.* 2012). Kanser nanoteknolojisinde ilaç taşımada kullanılan nanopartiküller Çizelge 2.2’de tanımları ile birlikte verilmiştir.

**Çizelge 2.2.** Kanser nanoteknolojisinde ilaç taşımada kullanılan nanopartiküller (Erdoğan ve Özkan 2013)

Nanopartiküller	Tanım	Örnek
Hidrojeller	İlaç ve terapötik protein dağıtımında hidrofobik polisakkaritlerin kullanımınıdır	Genexol-Pm, NK105, NC-6004, NC-4016, NK012, NK911, SP1049C
Miseller	Amfilik polimerlerin küresel partiküllerdir	SP1049C, NC6004, NC4016, NK105, NK1012 NK911 ve Genexol-PM
Lipozomlar	Sulu bir merkezi alanı çevreleyen kendiliğinden bir araya gelen küresel, kapalı kolloidal, çift katlı lipit tabakalardır	DaunoXome, Doxil/Caelyx, Myocet
Dendrimerler	Dallanma eğilimi gösteren sentetik polimerlerdir	Oksitlenmiş polietilen, Folat-dekstran ve galaktoz-bağlantılı poli(propilen imin) yapısındaki dendrimerler
Nanohücreler	Bakterilerin sitoplazmanın uç bölgelerinden bölünmeye zorlanmasıyla elde edilen küçük tomurcuklardan üretilen 400 nm boyutundaki hücrelerdir	<i>Salmonella typhimurium</i> ( <i>S. typhimurium</i> )'dan oluşturulan nanohücreler
Nanotüpler	Karbon atomlarından oluşan graphene formundaki silindirlere	Karbon nanotüpler
Manyetik nanopartiküller	Manyetik özelliğe sahip nanopartiküllerdir	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , MgFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> , FePt

## 2.6. Glioblastoma (Beyin Kanseri)

Beyin kanseri; bu bölgede kontrolsüz olarak artış gösteren hücrelerin oluşturduğu kanser türüdür (McKinney 2004; Smeltzer and Bare 2005; Şimşek and Dicle 2013). Beyin kanseri, bu bölgedeki hücre ve yapılardan kaynaklanan primer beyin kanseri ve bu bölge dışındaki vücudun herhangi bir alanında başlayıp daha sonra beyine yayılım gerçekleştiren sekonder (metastik) beyin kanseri olarak iki kısımda incelenmektedir (Armstrong *et al.* 2004; Boss and Wilkerson 2006; Şimşek ve Dicle 2013). 120'den fazla beyin kanseri çeşidi vardır. En yaygın beyin kanserleri olarak astrositom, atipik teratoid rhaboid tümör, kondrosarkom, koroid pleksus, kraniyofarenjiyom, kistler, ependimom, germ hücreli tümör, glioblastoma, gliyom, hemanjiom, çocuk pilositik

astrocitom, lipom, lenfoma, medulloblastom, meningioma, metastatik, neurofibroma, nöronal ve karışık nöronal-gliyal tümörler, oligoastrocitom, oligodendroglioma, pineal tümör, hipofiz tümörü, primitif nöroektodermal tümörler (PNET), schwannoma ön plana çıkmaktadır.

2000 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından astrocitik tümörler tümörün hücre bazındaki özelliklerine göre pilositik astrocitom (GI), diffüz astrocitom (GII), anaplastik astrocitom (GIII) ve glioblastoma multiforme (GIV) olarak derecelendirilmiştir (Kleihues *et al.* 2002; Durmaz ve Vural 2007).

Beynin gliyal hücrelerinden kökenlenen herhangi bir tümör glioma olarak anılır. Glioma'nın bir tipi astrocitomdur. Astrocitomun en habis şekli olan Glioblastoma ya da Glioblastoma multiforme ('multiforme' ifadesi artık WHO'da kullanılmamasına rağmen glioblastome hala "GBM" olarak kısaltılır) en yüksek dereceli (IV) glioma tümörüdür. Diğer tüm sınıflardan glioblastomu ayırt edici histolojik özellikler nekrozun (ölü hücreler) varlığı ve tümör çevresindeki kan damarlarındaki artıştır. IV dereceli tümörler daima hızlı büyüyen ve son derece kötü huylu tümörlerdir (Anonymous 2016b).

Çevresel ve genetik faktörlerin etkisi altında meydana gelen GBM'e iyonize ışık, pestisit, sigara, kimyasal madde üretimi yapan fabrikalarda çalışma ve 10. kromozomda heterozigosite ya da bu kromozomun q kolunda PTEN/MMAC 1'de (fosfataz ve tensin homolog, tümör baskılayıcı gen) mutasyon, p53 gen mutasyonu, 7. kromozomda EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü) ekspresyonundaki artış sebep olabilmektedir (Wrensch *et al.* 2002; Larsen 2010; Watts *et al.* 2014).

Baş ağrısı, kusma, bulantı, hafıza kaybı, motor işlev bozukluğu (kısmi felç), artmış kafa içi basıncı, değişken kişilik, görsel bozukluklar, konuşma bozuklukları bu hastalığın teşhis edildiği insanlarda öne çıkan belirtiler olarak ifade edilmiştir. GBM MRI (Manyetik Rezonans Görüntüleme), tomografi, T1 (Z aksında net manyetizasyonun başlangıçtaki değerinin %63'ne ulaşması için gereken zaman) ve T2 (eksponansiyel bir

azalma sabitesidir ve x-y aksındaki net manyetizasyonun %37'sine düşmesi için gerekli olan zamanı) görüntüleme ile teşhis edilmektedir (Wen and Kesari 2008).

Damarlı bir yapı sergileyen GBM dokusu genel olarak subkortikal, parietal, frontal, temporal bölgelerin sınırlarında görünmektedir. Frontal bölgede bulunan GBM tiplerinin diğer bölgelerde bulunan GBM tiplerine göre daha bening (iyi huylu) olduğu ifade edilirken Corpus collusum bölgesinde yer alan GBM tiplerinin daha malign (kötü huylu) olduğu ifade edilmiştir. GBM tipi kanserlerde metastaz pek görülmemekle birlikte başarısız cerrahi müdahale metastaza neden olabilmektedir (Burger *et al.* 1986, 1988; Halperin *et al.* 1989).

## **2.7. Glioblastoma Hastalığında Genel Tedavi Yaklaşımları**

Glioblastoma tanısı konulan hastaların çoğu genellikle bir-iki yıl içerisinde kaybedilir. Tedavi prosedürünün belirlenmesinde tümörün tipi, evresi, cerrahi olarak müdahalenin olup olmayacağı, tekrarlama riski, hastanın genel sağlık durumu rol oynamaktadır. Bu hastalığa karşı uygulanan en genel tedavi cerrahi yaklaşımdır. Cerrahi rezeksiyon sonrasında adjuvant radyoterapi ve seçilen uygulamalarla kemoterapi tedavi sürecine eklenmektedir. Ancak bu tedaviler çoğunlukla destekleyici konumundadır. Çünkü beyin tümörü söz konusu olduğunda bu tedavilerin etkinliği düşüktür (DeAngelis 2001).

Glioblastoma beyinde yer alan bir hastalık olduğu için cerrahi yaklaşım diğer organlardaki kanser türlerine göre etkin olamamaktadır. Dolayısıyla hastalığın yeniden oluşması çoğu zaman beklenen bir durum olmaktadır (Nagane *et al.* 1999; Bozkurt vd 2013). Ayrıca operasyon sırasında kişinin sağlıklı dokularına zarar verilmesiyle birlikte kişide duyu kaybı, kişilik değişikliği gibi problemlerin oluşumu, beyinde ödem veya enfeksiyon riski oluşumu gibi riskler de vardır (Wastphal *et al.* 2003).

Radyoterapi kanserli hücrelerin yüksek enerji uygulanarak elimine edilmesi esasına dayanmaktadır. Cerrahi müdahale sonrasında geride kalan artık kanser hücrelerinin temizlenmesi amacıyla uygulanır. Saç dökülmesi, kafa derisinde kızarıklık, çocuklarda

öğrenme güçlüğü ve gelişim bozuklukları gibi yan etkileri söz konusu olabilmektedir (Leibel and Sheline 1987; Lesniak *et al.* 2001).

Kemoterapi de cerrahi müdahale sonrası kalan kanser hücrelerinin temizlenmesinde kullanılır. Beyin tümörlerinin kan beyin bariyeri nedeniyle ve beyinin vücuttaki diğer organlara göre çok daha ulaşılması güç bir organ olması bu terapinin etkinliğini oldukça düşürmektedir. Küçük moleküllü ilaçlarının %2'lik bir kısmı bu bariyeri geçebilmektedir. Bu yüzden tedavide kullanılan ilaçlarının beyine ulaştırılmasında farklı stratejiler araştırılmakta, tedavi etkinliği artırılmaya çalışılmaktadır (Tomita 1991; Pardridge 1997, 2007).

Glioblastoma multiforme tedavisinde son zamanlarda gen tedavisi, antiangiogenez tedavi, lokal polimer ilaç uygulaması gibi bazı deneysel ve klinik çalışmalar yürütülmüş, az sayıdaki bazı serilerde tüm hastaların bir yıllık, %30 kadarının da 2 yıllık yaşam süresine ulaşabildiği ifade edilmiştir (Aksoy 2005).

Glioblastoma hastalarında radyoterapi ile faydayı artırmak amaçlı olarak eş zamanlı uygulanacak diğer tedavi stratejilerini geliştirmek için bilimsel çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar kapsamında karmastin, vinkristin bevacizumab gibi anti kanser ilaçları ve kloroetilnitrosüreler, paklitaksel, cisplatin ve alfa diflorometil ornitin poliamin inhibitörlerinden oluşan ajanlar tek ya da kombine olarak kullanılmaktadır. Temozolomid yine bu çalışmalar kapsamında araştırılan ve katı tümörlere karşı etkinliğe sahip oral yolla vücuda alınan alkilleiyici bir ajandır (Yung *et al.* 1999). Temozolomid radyo terapi ile eş zamanlı uygulandığında tek başına radyo terapi uygulamasına göre daha üstün tedavi sonuçları vermiştir (Buatti *et al.* 1996).

## **2.8. Glioblastoma Tedavisi İçin Bitki Ekstraksiyonu Çalışmaları**

Shah *et al.* (2009) tarafından yapılan çalışmaya göre; Hint ginsengi olarak bilinen Ashwagandha (*Withania somnifera*) yapraklarının alkolik ekstraktının (i-ekstraktı), farklı bileşenlerinin (Withaferin A, Withanone, Withanolide A) ve bunların



kombinasyonunun glioma hücre hatlarına ait (C6 ve YKG1) büyüme inhibisyonu ve farklılaşma potansiyeli üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Hücrelere i-ekstraktı (0,8–5,0 µg/mL), Withaferin A (0,1–0,5 µM), Withanone (i-faktör) (5–10 µg/mL), Withanolide A (5–10 µg/mL) ve bu bileşiklerin kombinasyonları 48-72 saat boyunca uygulanmıştır. C6 rat gliomalarında elde edilen  $IC_{50}$  değerleri i-ekstrakt için 5 µg/mL, Withaferin A için 0,2 µM, Withanone için 40 µg/mL ve Withanolide A için 35 µg/mL olarak belirlenirken YKG-1 insan gliomalarında  $IC_{50}$  değerleri i-ekstrakt için 2.5 µg/mL, Withaferin A için 0,1 µM, Withanone için 30 µg/mL ve Withanolide A için 20 µg/mL olarak belirlenmiştir. Withaferin A, Withanone, Withanolide A ve i-Ekstraktı doza bağlı olarak glioma hücrelerinin proliferasyonunu belirgin olarak inhibe etmişlerdir ve morfolojilerini astrositik tipe doğru değiştirmişlerdir.

Schild *et al.* (2010) tarafından yayınlanan bir çalışmaya göre; Jiaogulan (*Gynostemma pentaphyllum*) etanol ekstraktının hücresel  $H_2O_2$  konsantrasyonu ve C6 glioma hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. 0, 24, 120 ve 240 µg/mL etanolik *Gynostemma pentaphyllum* ekstraktı ile büyüme medyumuna varlığında C6 glioma tümör hücreleri 72 saate kadar inkübe edilmiştir ve 1-2 saat sonra hücresel  $H_2O_2$  içeriği analiz edilmiştir. Ekstrakt ilave edildikten sonra doza bağlı bir şekilde hücresel  $H_2O_2$ 'de bir azalma görülmüştür. Floresans yoğunlukları DMSO medyumuna varlığında (0 µg/mL ekstrakt)  $58 \pm 7$  birimden 240 µg/mL ekstrakt ile  $14 \pm 4$  birime azalmıştır. Bu etkinin ekstraktın bilinen antioksidatif potansiyeli ile aynı doğrultuda olduğu ifade edilmiştir.

Lee *et al.* (2011) tarafından yayınlanan çalışmaya göre; *Tithonia diversifolia* metanol ekstraktı (TDM), insan glioblastoma hücre hatlarından biri olan U373 hücrelerine karşı  $59,2 \pm 3,7$  µg/mL olan  $IC_{50}$  dozu ile antiproliferatif aktivite göstermiştir. Bu ekstrakt silika jel kromatografisinden geçirilmiştir ve EtOAc/heksanın farklı oranları ile elüe edilmiştir. Diğerlerine kıyasla daha yüksek antiproliferatif etki gösteren (%10/60) EtOAc/heksan alt fraksiyonları izole edilmiştir ve daha sonra yapı tanımlaması  $^1H$  nükleer manyetik rezonans ( $^1H$ -NMR) ile yapılmıştır. İzole edilen bileşik tagitinin C olarak tanımlanmıştır. Tagitinin C ile muamele edilmiş U373 hücrelerde  $IC_{50}$  değeri

6,1±0,1 µg/mL olarak verilmiştir. Akış sitometri analizinde ve pan-kaspaz (bütün kaspaz enzimlerini inhibe eden molekül) inhibisyonunda elde edilen sonuçlara göre araştırmacılar anti-glioblastoma etkisinin apoptozisten bağımsız olduğunu ifade etmişlerdir.

Idassi *et al.* (2012) tarafından yayınlanan çalışmada U-251 MG, U-1242MG ve A-172 olan GBM hücre hatlarında Kuşburnu (*Rosa canina*) ekstraktının anti-proliferatif ve anti-göçme (anti-migration) etkisi incelenmiştir. 25 ng/mL ve 1mg/mL arasında değişen oranlarda kuşburnu ekstraktı uygulanan bu hücre hatlarında hücre proliferasyonunda bir azalma gözlenmiştir. Bu hücre proliferasyonundaki azalma GBM'de hücre proliferasyonunda önleyici olarak kullanılan U0126 (10 µM)'nin sağladığı azalma ile eşitlik göstermiştir. Çalışma kapsamında ayrıca floresana dayalı bir etiketleme stratejisi olan Canlı-Ölü testi ile kuşburnu ekstraktının hücre proliferasyonunu başlangıç apoptozu ile azaltıp azaltmadığı araştırılmıştır. Kuşburnu ekstraktı ile GBM hücre hatlarının ön muamelesi apoptozu teşvik etmeden hücre proliferasyonunun inhibisyonunu indüklerken, apoptoz indükleyici olarak bilinen starosporin (1 µM) ile muamele edilen hücrelerde hücre apoptozu artış göstermiştir. Ayrıca kuşburnu ekstraktının aktin yeniden biçimlenmesini (remodeling) düzenleyerek GBM hücrelerinde hücre göçünü önlediği yine çalışma kapsamında belirtilmiştir.

Tezcan vd (2014) tarafından yayınlanan çalışmada T98G, U-138MG ve U87MG GBM hücre hatlarında Zeytin (*Olea europaea*) yaprak ekstraktının (OLE) antikanser etkileri incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre OLE GBM hücre hatlarında apoptoz ve nekroz aracılığı ile anti-proliferatif etki göstermiştir. Annexin V analizine göre, 1mg/mL OLE uygulamasından sonra T98G, U-138MG ve U87MG hücrelerinin apoptoz yüzdesi sırasıyla %42,7, %29,2 ve %34,9'dir; 2 mg/mL OLE uygulamasından sonra ise bu oranlar yine sırasıyla %67,7, %38,6 ve %25,6 şeklindedir. Ayrıca OLE miR-153, miR-145 ve miR-137 ekspresyonunu önemli oranda indüklerken GSC'lerde (Glioblastoma tümörünün kök benzeri hücreleri) bu miRNA'ların hedef genlerinin ekspresyonunu azaltmıştır (p<0,05).

Azar vd (2015) tarafından yayınlanan çalışmada, bir hidroalkolik *Zataria multiflora* ekstraktının in vitro ortamda iyonize radyasyon ile tetiklenen insan glioblastoma hücre hattı A172'deki hücre ölümü üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışma kapsamında *Zataria multiflora*'nın toprak üstünde kalan kısmının hidroalkolik ekstraktının farklı konsantrasyonları ile (25, 50, 100, 150 ve 200 µg/mL) A172 hücreleri muamele edilmiştir. Ardından hücreler iyonize radyasyona tabi tutulmuştur. Sonuçlara göre *Zataria multiflora* ile A172 hücre proliferasyonu önemli ölçüde engellenmiştir. A172 hücrelerinde radyasyona bağlı apoptoz 200 µg/mL *Zataria multiflora* uygulamasını takiben önemli ölçüde artmıştır. Hücrelerin canlılık oranı sadece 200 µg/mL *Zataria multiflora* uygulanmış hücrelerde  $91,8 \pm 8,57$  iken *Zataria multiflora* ve iyonize radyasyon uygulamasında (3 Gy ve 6 Gy için) sırasıyla bu oran  $76,0 \pm 4,27$  ve  $66,2 \pm 8,42$  olarak bulunmuştur.

Ramachandran *et al.* (2015) tarafından yayınlanan çalışmada U87MG insan glioblastoma hücre hattı üzerine Mango zencefilin süperkritik CO<sub>2</sub> ekstraktının etki mekanizması ve antikanser etkisi araştırılmıştır. Mango zencefil *IC*<sub>50</sub>, *IC*<sub>75</sub> ve *IC*<sub>90</sub> değerleri (sırasıyla 4,92 µg/mL, 12,87 µg/mL ve 21,30 µg/mL) ile temozolomid, etoposid, kurkumin ve zerdeçaldan daha yüksek sitotoksik etki göstermiştir. Çalışma kapsamında Mango zencefil yalnız uygulandığında ve temozolomid ve etoposid ile kombine bir şekilde uygulandığında yalnız uygulanan ajanlara göre daha etkili bir şekilde hücre ölümünü %90'nın üzerinde indüklediği ifade edilmiştir. Annexin V testi Mango zencefilin doza bağlı olarak apoptozu indüklediğini göstermiştir. 10, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarındaki Mango zencefil uygulaması 48 saat içinde apoptozu sırasıyla %8,7, %11,4 ve %23,7 oranlarında arttırmıştır. U87MG hücrelerine Mango Zencefil uygulaması pro-apoptik proteinlerin (Bax, Bak, Bad ve Kaspaz 3) ekspresyonunu doza bağlı olarak arttırmıştır.

## 2.9. Glioblastoma İçin Kullanılan İlaç Yüklü Nananopartikül Uygulamaları

%80'den daha yüksek bir ilaç yükleme etkinliği ile tamamen-trans retinoik asit (ATRA) enkapsüle edilmiş polimerik miseller beyin tümörü için ilaç dağıtımını amacıyla

araştırılmıştır. Misellerin U87MG hücreleri kullanılarak yapılan *in vitro* hücre sitotoksosite çalışmasında serbest ATRA ile benzer sitotoksosite gözlenmiştir. Ancak yayılma testi (migration) misellerin tümör hücrelerinin yayılmasını serbest ATRA'ya göre daha etkin olarak inhibe ettiği görülmüştür (Jeong *et al.* 2006).

Odriozola *et al.* (2008) platin bileşiklerini taşıyıcı olarak inorganik oksit nanopartikülleri sentezlediklerini ve bu platin yüklü inorganik oksit nanopatiküllerinin C6 glioma hücreleri aşılınmış hayvan modellerinde tedavi edici etkisini incelediklerini belirtmişlerdir.  $TiO_2$  içeren  $Pt(NH_3)_4Cl_2$  komplekslerini sol-jel yöntemi kullanarak sentezlemişlerdir. Platin türlerini kimyasal olarak  $TiO_2$ 'ye bağlamışlardır.  $TiO_2$ -Pt nanopartiküllerini hayvan modellerine uyguladıklarında tümör büyüme oranının %56'ya kadar azaldığını ifade etmişlerdir.

Hadjipanayis *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmada insan glioblastoma hücreleri üzerinde bulunan epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) silme mutantına seçici olarak bağlanan saflaştırılmış bir antikor (2 mg/mL stoktan 50  $\mu$ L) konjuge edilmiş demir oksit nanopartikülleri (IONP; 10 nm çekirdek boyutlu; EGFRvIIIAb-IONP) terapötik hedefleme için kullanılmıştır. Glioblastoma hücre canlılığında nanopartikül uygulamasından sonra önemli bir azalma meydana gelmiştir ve insan astrositlerinde uygulama sonrasında herhangi bir toksisite gözlenmemiştir ( $P < 0,001$ ). EGFRvIIIAb-IONP uygulamasından sonra glioblastoma hücrelerinde daha düşük EGFR fosforilasyonu bulunmuştur. EGFRvIIIAb-IONP'nın glioblastoma kök hücre içeren nöroküreler ve GBM hücrelerine muamelesi sonrasında apoptoz, hücre ölümü modu olarak belirlenmiştir.

Maier-Hauff *et al.* (2011) tarafından yayınlanan çalışmada yaşam ömrü en az 3 ay olarak belirlenen 66 GBM hastasında yaklaşık 12 nm çekirdek çapına sahip  $Fe_3O_4$  manyetik nanopartikülün (112 mg/mL) sulu çözeltisini  $cm^3$  tümör hacmi başına 0,28 mL olacak şekilde enjeksiyon yapılmıştır. Daha sonra tümör bölgesine  $43^\circ C$ 'yi aşmayacak şekilde termoterapi uygulaması yapılmıştır. Tekrarlayan GBM ile 59 hasta arasında ilk tümör tekrarının tanısından ortalama sağ kalım 13,4 aya çıkmıştır. Bu

çalışmada sadece manyetik nanopartikül kullanılmış ve GBM hastalarının yaşam süresi uzatılmıştır.

Glioblastoma (GBM) hastalarında temozolomide dayalı kemoterapiye karşı direnç DNA tamir proteini O6-metilguanin-DNAmetiltransferazın (MGMT) artışına bağlanmaktadır. O6-benzilguanin (BG) kullanarak bu enzimin inhibisyonu bu hastalara umut vaad etmekle birlikte kabul edilemeyecek toksisiteye neden olan zayıf farmakokinetik özellikleri tarafından kullanımı sınırlıdır. BG'nin biyolojik dağıtımını ve etkinliğini arttırmak için Zhang *et al.* (2014) GBM'e BG'nin hedeflenmiş geliştirilmiş dağıtımı için süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerini geliştirmişlerdir. Süperparamanyetik demir nanopartikülleri (SPDN) BG ve tümör hedefleme peptid klorotoksin (CTX) ile kovalent olarak modifiye edilmiştir. *in vitro* insan GBM hücrelerine BG'nin uygun girişi gösterilmiştir. Lokalize ve kontrollü bir şekilde BG salınımı indirgeyici hücre içi koşullar altında gerçekleştirilmiştir. SPDN- BG-CTX uygulanmış hücrelerde MGMT'de önemli bir azalma ve temozolomid toksisitesinin güçlendiği gösterilmiştir.

Varşova Yaşam Bilimleri Üniversitesi'nde yapılan bir çalışmada, U87 hattı olan insan GBM hücreleri tavuk embriyo koriyoalantoik membran üzerine yerleştirilmiştir. 8 gün sonra, tümörler üç gruba ayrılmıştır: Kontrol (tedavi uygulanmamış), koloidal Ag nanopartikül (40 µg/mL) uygulanmış tümör grubu ve plasebo (yalnızca taşıyıcı takviye edilmiş) tümör grubu. Deneyin sonunda, bütün tümörler izole edilmiştir. Hücre proliferasyonu ve hücre apoptozu değerlendirilmesi histolojik, immünohistokimyasal ve Western blot analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Ag nanopartiküllerin GBM büyümesini etkileyebileceğini göstermiştir. Ag nanopartiküller GBM hücrelerin çoğalmasını inhibe ettiği ve proapoptik özelliklere sahip olduğu gözlenmiştir (Urbańska *et al.* 2015).

Zhang *et al.* (2015) yaptıkları çalışmada fluorescein ve paklitaksel yüklü siklodekstrin ve klorotoksin konjuge edilmiş polietilen glikol kaplı manyetik demir oksit nanopartikülleri oluşturmuşlardır. Yaklaşık 44 nm uniform boyuta sahip nanopartiküller glioblastoma hücre kültüründe yüksek stabilite göstermişlerdir. Klorotoksinin varlığı

nanopartiküllerin glioblastoma hücreleri tarafından alınımı arttırmıştır ve paklitakselin hem glioblastoma hem de antitümöre karşı dirençli hücrelerin öldürülmesinde etkinliği artmıştır.

Glioblastoma tedavisi amacıyla nanopartikül yüklü ilaç çalışmalarında ciddi yoğunlaşma bulunmaktadır. Gemstabin (gemzar) ve klorotoksin konjuge edilmiş demir oksit nanopartikülleri PEG'lenmiş (polietilenglikol) skualen-gemstabin nanopartiküller, fitokimyasal yüklü nanopartiküller, hyaluronik asit-konjüge lipozom nanopartiküller, kafeik asit ile konjuge demir oksit nanopartikül, gadolinyum bazlı nanopartiküller bu çalışmalardan sadece birkaçıdır (Mu *et al.* 2016; Gaudin *et al.* 2016; Pistollato *et al.* 2016; Hayward *et al.* 2016; Richard *et al.* 2016; Štefančíková *et al.* 2016),

#### **2.10. Paraoksonaz (PON1; EC 3.1.8.1)**

Abraham Mazur (1946) hayvan dokularında 19 organofosfat bileşimini hidrolize edebilen bir enzimin varlığını rapor eden ilk kişidir. 1950'lerin başında aynı enzim p-nitrofenil asetat, propiyonat ve bütirat'ı hidroliz eden A-esteraz olarak ifade edilmiştir (Aldridge *et al.* 1953a, 1953b). Enzim daha sonra oldukça toksik olan organofosfat tarım ilacı olan parationun toksik metaboliti paraoksonu hidrolizleyebilmesinden kaynaklı olarak insan serum paraoksonazı (PON1) olarak tanımlanmıştır (Van Himbergen *et al.* 2006).

HUMPONA olarak adlandırılan insan geni paraoksonaz ile ilgili gen olup, paraoksonaz gen ailesi, insanlarda 7q 21,3-22,1 kromozomunun uzun kolunda, memeliler arasında %60 dizilim homolojisi gösteren PON1, PON2 ve PON3 şeklinde üç üyeden oluşmaktadır. Molekül ağırlığı 43 kDa olan ve 354 amino asitten oluşan bir glikoprotein olan PON1 insanda karaciğerde sentezlenmekte ve buradan kana salınmaktadır (Durrington *et al.* 2001; Deakin and James 2004; Uysal vd 2011).

Molekül ağırlığının %15,8'ini 4 farklı bölgede proteine bağlı olan karbohidrat üniteleri oluşturur. Aminoasit bileşimine göre lösin içeriği yüksek olmakla birlikte 42, 284 ve

353. alanlarda sistein atıkları yer alır. Polipeptit zinciri tek disülfid bağından kaynaklı olarak siklik yapıdadır (Başkol ve Köse 2004)

Her yaprağında 4  $\beta$ -tabakası bulunan 6 yapraklı  $\beta$ -tabakası içeren PON1 merkez kısmında iki  $\text{Ca}^{2+}$  atomu bulundurur. Yapısal  $\text{Ca}^{2+}$  zarar gördüğünde enzim dönüşümsüz denatürasyona uğrar. Katalitik  $\text{Ca}^{2+}$ 'nin bir su molekülüyle ve fosfat iyonunun oksijeni ile etkileşim halinde olduğu ifade edilmiştir (Harel *et al.* 2004).

PON1'in literatür araştırmalarında öne çıkan işlevleri;

- PON1, dolaşıma giren sinir sistemini organofosfatlardan korur (La Du 1992).
- PON1 LDL'nin lipid oksidasyonunu inhibe eder, böylece ateroskleroza başlatan ve ilerleten okside lipid seviyelerini azaltır (Harel *et al.* 2007).
- PON1 makrofaj kolesterol biyosentezini inhibe eder ve makrofajlara kolesterol akışını stimüle eder (Rozenberg *et al.* 2003; Rosenblat *et al.* 2005).
- PON1 kolesterol esterlerinin peroksitlerini metabolize eder (Uysal *et al.* 2011)
- PON1, HDL'nin glikasyon ve homosisteinilasyon yatkınlığında modülatör etkiye sahiptir (Gupta *et al.* 2009).

PON1 endojen serbest radikal temizleyici sistemler arasında yer almaktadır. Bu nedenle bilim adamları kanser araştırmalarında PON1'in önleyici rolü üzerinde çalışmalar yapmışlardır.

Elkıran vd (2007) tarafından akciğer kanserine yakalanmış hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada, bu hastalarda serum PON1 aktivitesinin sağlıklı kişilere göre anlamlı derece düşük olduğu bulunmuştur. Lee *et al.* (2005) PON1 gen Q/Q genotipini taşıyan 177 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada akciğer kanserinin gelişme riskinin önemli derece arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca yapılan diğer araştırmalarda gastrik veya pankreas kanseri olan hastalarda sağlıklı kontrol gruplarına göre PON1 seviyeleri düşük çıkmıştır (Akçay vd 2003a, 2003b).

Camuzcuođlu vd (2009) tarafından yayınlanan bir çalışmada, oluşturulan epitelyal over kanserli insan grubunda ve kontrol grubunda serum PON ve arilesteraz aktivite ölçümleri gerçekleştirilerek bir mukayese yapılmıştır. Epitelyal over kanserli insanlardaki PON ve arilesteraz aktivitesi diğer gruba oranla dūřük bulunduğu belirtilmiştir. Ayrıca hastalığın derecesi ve CA-125 (kansere antijen-125) düzeyi ile PON aktivitesi arasında ters ilişkinin olduğu bildirilmiştir.

Literatür incelemesinde beyin kanseri ile PON1 ilişkisi üzerinde duran çalışmalara da rastlanmaktadır. Beyin kanserinin gelişiminde, antioksidanların serum PON1 enzimi bağlantısına dair araştırmalar yapılmıştır.

Kafadar vd (2006) tarafından yayınlanan çalışmada; 42 yüksek dereceli glioma ve 42 meningiomas hasta grupları ile 50 sağlıklı insan kontrol grubunda PON 192 polimorfizminin (insan paraoksonaz Gln/Arg (glutamin/arjinin) polimorfizmi) etkisi incelenmiştir. Serum paraoksonaz aktivitesi ölçümleri yapılarak gruplarda karşılaştırma yoluna gidilmiştir. Her iki kanser grubunda da kontrol grubuna kıyasla serum PON1 aktivitesi  $p < 0,001$  olarak anlamlı bir şekilde dūřük çıkmıştır. Ancak iki kanser grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Çalışma sonucunda PON1 aktivitesinin beyin tümörlerinde tümör oluşumuyla ilgili olabileceği öne sürölmüştür.

Martin *et al.* (2010) tarafından yapılan bir çalışmaya göre; yaşları 21 ile 76 arasında değişen 71 beyin kanserli ardışık hastaya (43 astrositom II/III dereceli hasta ve 28 meningiomlu hasta) ve 220 sağlıklı kişi ile oluşturulan kontrol grubu benzerlik göstermeyen PON1 genotipleri olan L55M rs854560 ve Q192R rs662'in sıklığı açısından analize tabi tutulmuşlardır. PON1 genotipleri ve PON1 L55M ile PON1 Q192R polimorfizimlerinin alellik varyantlarının sıklıklarıyla ilgili olarak hasta ve kontrol grubunda anlamlı bir farklılık elde edilmemiştir. Minör allel sıklıkları PON1 55L için astrositom hastalarında 0,398, meningioma hastalarında 0,328 ve kontrol grubunda 0,286 iken PON1 192 R için astrositom hastalarında 0,341, meningioma hastalarında 0,362 ve kontrol grubunda 0,302 olarak ifade edilmiştir. Çalışma



sonucunda araştırmacılar benzerlik göstermeyen PON1 polimorfizimlerinin astrositom ve meningioma gelişim riskiyle ilgisi bulunmadığını öne sürmüşlerdir.

Zhao *et al.* (2012) yayınladıkları bir çalışmada 384 glioma hastasında ve 384 sağlıklı kontrol grubunda 9 antioksidant genin (GPX1, CAT, PON1, NQO1, SOD2/MnSOD, SOD3 ve NOS1\*2\*3) 16 tek nükleotit polimorfizimini (SNP) incelemişlerdir. SOD2 V16A, SOD3 T58A, GPX1 -46 C/T ve NOS1 3'-UTR olarak belirlenen 4 SNP'in gliomanın gelişme riskiyle bağlantılı olduğu ancak PON1 rs854552 ve rs662'nin gliomanın gelişme riskiyle ilişkili olduğuna dair anlamlı bir veri elde edilemediği bildirmişlerdir.

Gönüllü vd (2012) tarafından Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi'nde yapılan bir çalışmada yaşları 45-75 arasında değişen 16 glioblastoma multiforme ve 9 anaplastik astrositom hastası olan 25 malign gliomlu hasta grubu ve 25 sağlıklı insandan oluşan kontrol grubunda paraoksonaz (PON) ve prolidaz (PR) aktivite ölçümleri yapılmıştır. PON ve PR aktivitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında malign gliomlu hasta grubunda anlamlı olarak düşük bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Eşik değeri PON ve PR için sırasıyla 104,69 ve 0,99 olarak ifade edilmiştir.

### **2.11. Üçlü Faz Sistemi İle Enzim Saflaştırma Yöntemi (ÜFA)**

Üçlü faz sistemi (ÜFA) proteinlerin saflaştırılmasında son yıllarda öne çıkan ve kullanımı kolay bir yöntemdir. ÜFA ile iki veya daha fazla bileşiğin tek basamaklı ekstraksiyon ile ayırımını gerçekleştirmek mümkündür. Üç farklı katmanın sahip oldukları farklı fizikokimyasal özelliklerden yararlanarak bu sistemlerin tek bir ekstraksiyonla ayrılması bu sistemin getirilerindedir. ÜFA yöntemi salting out, izoionik çöktürme, yardımcı çözücü ile çöktürme, osmotik çöktürme ve kozmotropik çöktürme tekniklerini birarada kullanabilen bir tekniktir. ÜFA'de proteinlerin çöktürülmesi için amonyum sülfat çöktürmesi ve üçlü faz katmanları oluşturmak, lipitlerin, fenolik bileşiklerin, bazı deterjanların uzaklaştırılması için t-bütanol

kullanılmaktadır (Roy and Gupta 2002; Narayan *et al.* 2008; Kat ve Keskin 2013; Duman ve Kaya 2014).

Narayan vd (2008) tarafından yayınlanan çalışmada *Ipomoea palmata* yapraklarından peroksidaz enzimi ÜFA yöntemi ile saflaştırılmıştır. ÜFA'nın ilk aşamasında ham bitki ekstraktı/t-bütanol oranı olarak 1,0:1,0 kullanılmıştır ve %30 amonyum sülfat çöktürmesi 37°C'de gerçekleştirilmiştir. İlk aşama sonucunda yapılan aktivite ölçümlerinde sulu fazda %160 aktivite verimi ve 2 kat saflaştıma elde edilmiştir. ÜFA'nın ikinci aşaması sulu faz üzerine gerçekleştirilmiştir ve yaklaşık %81 aktivite verimi ile 18 kat saflaştırma başarılmıştır. Saflaştırılan enzim SDS-PAGE'de yürütülmüştür ve molekül ağırlığı 20,1 kDa bulunmuştur. Çalışmadan elde edilen verilere dayanarak araştırmacılar ÜFA yöntemini peroksidaz enziminin saflaştırılmasında etkin bir saflaştırma yöntemi olarak kabul etmişlerdir.

Chaiwut *et al.* (2010) yaptıkları bir çalışmada kurutulmuş papaya kabuklarından proteaz enzimlerini izole etmek için ÜFA yöntemini kullanmışlardır. İlk ÜFA aşamasında ham ekstrakt/t-bütanol oranı olarak 1,0:0,5'i ve %20 amonyum sülfat çöktürmesini kullanmışlardır. Bu aşama sonunda alt fazda %253,5 oranında proteolitik aktivite verimi ve 15,8 kat saflaştırma elde etmişlerdir. ÜFA'nın ikinci aşamasında birinci aşamada elde ettikleri alt faz üzerine %55 amonyum sülfat çöktürmesi yaparak devam etmişlerdir ve %89,4 aktivite verimi ile 10,1 kat saflaştırma sağlamışlardır.

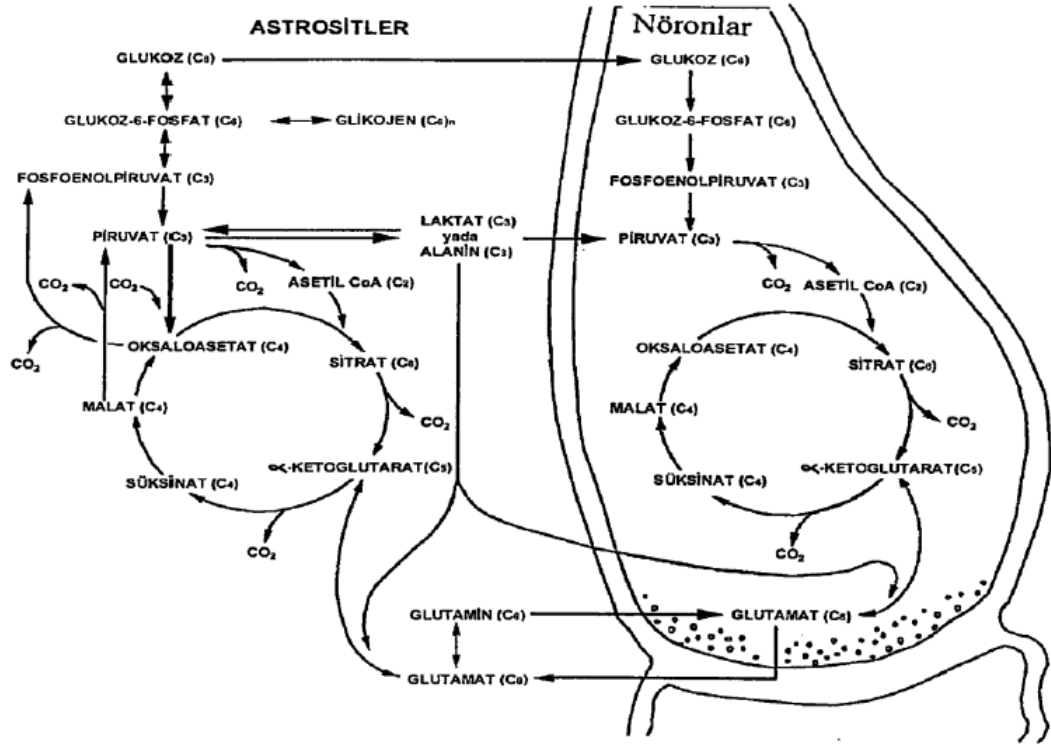
Duman ve Kaya (2014) tarafından yapılan çalışmada patates (*Solanum tuberosum*) yumrularından invertaz enzimi ÜFA yöntemi ile saflaştırılmıştır ve saflaştırılan enzimin kinetik özellikleri incelenmiştir. İki aşamalı olarak uygulanan ÜFA yönteminde ilk aşamada 1,0:1,0 ham ekstrakt/t-bütanol oranı, %20 amonyum sülfat doygunluğunda gerçekleştirilmiş ve sulu fazda %121 verim ile 5,67 kat saflaştırma elde edilmiştir. İkinci aşamada sulu faz üzerinden %25 amonyum sülfat doygunluğu ve 1,0:1,0 ham ekstrakt/t-bütanol oranı kullanılmıştır ve %156 verim ile 12,8 kat saflaştırma sağlanmıştır. Saflaştırılan enzim üzerinde yapılan kinetik çalışmalar sonucunda

optimum pH 4,5, stabil pH aralığı 4,0-6,0, optimum sıcaklık 37°C, stabil sıcaklık aralığı 30-55°C olarak gözlenmiştir.

Literatürde yapılan incelemelerde paraoksonaz (PON1) enziminin saflaştırılmasında ÜFA yönteminin kullanımına yönelik bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada PON1 enzimi insan serumundan ÜFA yöntemi ile ilk kez saflaştırılmıştır ve saflaştırılan enzim üzerinde kinetik çalışmalar ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

## **2.12. Glutamat**

Beyindeki en önemli nörotransmitter olan glutamat bu alandaki uyarıcı iletimin %75'inden sorumludur. Merkezi sinir sisteminde hem glia hücreleri hem de nöronlar bu molekölü içermektedirler. Merkezi sinir sistemindeki glutamat molekölü kan beyin bariyeri nedeni ile serumdan elde edilemez bu nedenle sentezi beyin içerisinde gerçekleştirilir. Şekil 2.2'de nöronlarda ve astrositlerdeki glutamat eldesi verilmiştir. Astrositlerde glutamatın hücre içi konsantrasyonu 50 µM, glutamaterjik nöronlarda ise 10 µM'dır. Uygun glutamaterjik iletimin sağlanması ve eksitotoksisiteden muhafaza edilmesi için hücre dışı glutamat konsantrasyonu 1-3 µM seviyesinde olmalıdır (Hansson *et al.* 2000).



**Şekil 2.2.** Nöron ve astrositlerdeki glutamat sentezi (Hertz 1990)

Glioblastoma tümör hücreleri eksitotoksik seviyelerde glutamatın ve glutamat reseptörlerinin salınımını yapmaktadır (Roslin *et al.* 2003; De Groot *et al.* 2008; Brocke *et al.* 2010). Bazı çalışmalarda glioma hücrelerinden glutamat salınımı GLT1 glutamat taşıyıcısının ekspresyonunun eksikliğine bağlanmıştır. Bu durumda glutamat salınması peritümöral nöron, nekroz oluşumunun, lokal enflamasyonun ve gliomayla ilgili nöbetlerdeki ölümlerde kilit bir rol oynayabilmektedir. Ayrıca, tümördeki yükselmiş glutamat seviyeleri glioblastoma tümör hücrelerinde glutamat reseptörlerini aktive etmek için parakrin ve otokrin biçimde faaliyet gösterebilmektedir (De Groot and Sontheimer 2011; Oh *et al.* 2012).

Çeşitli glutamat reseptör tipleri bulunmaktadır. Glioma hücrelerinin aktif olarak  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonik asit (AMPA), kainat ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerini içeren iyonotropik glutamat reseptörlerini eksprese ettikleri belirtilmiştir (Ishiyuchi *et al.* 2002; Stepulak *et al.* 2009; Oh *et al.* 2012). Bu

reseptörler eksisatör ve inhibitör reseptörler şeklinde ifade edilirler. NMDA, AMPA ve kainat reseptörleri eksisatör reseptörler grubundandır. Metabotropik glutamat reseptörü olan AP-4 ise inhibitör reseptördür. Bu reseptörlerin içerisinde NMDA reseptörü üzerine çok fazla ilgi çekilmiştir, bu reseptör üzerinde yoğun bir şekilde araştırmalar yapılarak hafıza oluşumu, gelişimsel plastisite, epilepsi, beyin iskemisinin nörotoksik etkileri gibi nörofizyolojik ve patolojik çalışmalarda rolü ortaya konmuştur (Li and Tsien 2009).

NMDA reseptörü sinir hücrelerinde bulunan iyon kanallarıdır. Reseptör kendisine iki molekül glutamat ya da aspartat veya glisin bağlandığında aktive olur. Reseptör aktif hale geçtiğinde hücre zarı boyunca pozitif yüklü iyonların akmasına izin verir (Hiroyasu *et al.* 2005). NMDA reseptörlerinin aktivasyonu katyonlara seçici olmayan bir iyon kanalının açılmasıyla sonuçlanır. İyon kanalının açılması ve kapanması öncelikle ligand bağlanması ile meydana gelirken iyon kanalı boyunca akan akım voltaja bağlıdır. Hücre dışı magnezyum ( $Mg^{2+}$ ) ve çinko ( $Zn^{2+}$ ) iyonları reseptör üzerinde spesifik alanlara bağlanabilirler ve açık iyon kanalı boyunca diğer katyonların geçişini bloke ederler. Hücre depolarizasyonu gözenekten  $Mg^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  iyonlarını çıkarır ve iter, bu şekilde hücre içine voltaja bağımlı sodyum ( $Na^+$ ) ve az miktarda kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ) iyonlarının hücre dışına potasyum ( $K^+$ ) iyonunun akışına izin verir (Dingledine *et al.* 1999; Liu and Zhang 2000; Cull-Candy *et al.* 2001; Paoletti and Neyton 2007).

NMDA reseptör fonksiyonu 'redoks modülatör alanı' olarak ifade edilen kimyasal indirgeme ve oksidasyon ile güçlü bir şekilde düzenlenmektedir. Bu alan aracılığıyla, redükthanlar NMDA kanal aktivitesini bariz bir şekilde arttırırken oksidanlar ya redükthanların etkisini tersine çevirirler ya da doğal yanıtları bastırırlar. Genellikle NMDA reseptörlerinin glutatyon, lipoik asit ve pirolokinolin kinon gibi endojen redoks ajanlar tarafından modüle edildiğine dair çalışmalar mevcuttur (Choi and Lipton 2000; Herin *et al.* 2001; Chen and Lipton 2006; Yang *et al.* 2010; Sershen *et al.* 2016).

### 2.13. GRIN2C ve SLC1A2 Genleri

GRIN2C geni, iyonotropik glutamat reseptörlerinin bir sınıfı olan N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin bir alt birimini kodlamaktadır. Merkezi sinir sisteminde bulunan NMDA reseptörleri katyonları geçirme ve öğrenme, hafıza, sinaptik gelişim gibi fizyolojik süreçlerde önemli rol oynamaktadır. Reseptör farklı alt birimlerden oluşan bir tetramerdir (genellikle 2A-D alt birimlerinin bir ya da daha fazlası ile 1 alt biriminin heterodimeri) ve kalsiyum, potasyum ve sodyum için geçirgen olan bir kanal oluşturur. Reseptörün alt birim kompozisyonundaki değişiklikler Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, depresyon ve şizofreni gibi patofizyolojik koşullarla ilişkilidir (Dunah *et al.* 2000; Gardoni *et al.* 2006; Brothwell *et al.* 2008; Gaspar *et al.* 2009; Tang *et al.* 2010; Rauner and Kohr 2011).

Lin *et al.* (1996) tarafından bir çalışmada GRIN2C'yi kodlayan cDNA'lar izole edilmiştir ve NR2C olarak adlandırılmıştır. Northern Blot analizleri 4,4 kb GRIN2C mRNA'larının beyincikte en üst seviyeye birlikte beyinde yaygın olarak eksprese olduğunu göstermiştir. Bu transkript ayrıca çeşitli diğer dokularda da gösterilmiştir. Belirlenen 1,233 amino asitlik protein dizisi, rat ve fare NR2C'deki belirlenen amino asit protein dizisi ile %88 özdeşlik göstermektedir. GRIN2C üzerine yapılan hidropathy analizleri sayesinde büyük bir N terminali, 4 hidrofobik bölge ve büyük bir C terminali öngörülmüştür (Lin *et al.* 1996).

Takano *et al.* (1993) 17q25 insan NMDA reseptör kanalının epsilon-3 alt birimini kodlayan Grin2c geninin haritası için floresans in situ hibridizasyonunu kullanmışlardır. Kalsi *et al.* (1998) somatik hücre hibrit panelinin PCR'ı ile bu lokalizasyonu doğrulamışlardır.

Gielen *et al.* (2009) allosterik inhibitörleri bağlayan hücre dışı kabuk gibi alanı olan NR2N terminal alanı (NTD) ile oluşturulan bölge ile NMDA reseptörlerinin altbirim-spesifik ayrımcılığının kontrol edildiğini ve NTD'nin agonist-bağlayan alanına kısa bağlayıcı ile bağlandığını göstermişlerdir. Gielen *et al.* (2009) elde ettikleri sonuçlar ile

NR2 NTD 'kapatıcı' ya da 'açıcı' moleküler hareketlerin kullanılarak NMDA reseptörlerinin ilaç tabanlı çift yönlü kontrolü için kanıt sağladıklarını öne sürmüşlerdir.

Çözünür taşıyıcı ailesinin bir üyesi olan SLC1A2 yüksek afiniteli glutamat taşıyıcısıdır. Glutamat taşıyıcıları glial hücrelerde ve/veya presinaptik glutamaterjik sinir uçlarında bulunan membrana bağlı proteinlerdir. Bu taşıyıcılar hücre dışı alanda aşırı glutamata tasfiye etmekle görevlidirler (Karki *et al.* 2015). Başlangıçtaki çalışmalarda GLT1 ekspresyonunun beyinde astrositlerde lokalize olduğu ifade edilmiştir. GLT1'nin en güçlü ekspresyonu hipokampus ve serebral kortekste gözlenmiştir (Kanai and Hediger 2004). Daha sonraki çalışmalarda astrosit haricinde de eksprese oldukları ortaya konmuştur. Örneğin, GLT1'in mRNA ve proteini ön beyinde nöronların alt gruplarında bulunmuştur ve şu anki görüş GLT1'in salınımdan sonra sinaptik aralıktan glutamata uzaklaştıran uzun zamanlı presinaptik glutamat taşıyıcısını temsil ettiğidir (Chen *et al.* 2004). GLT1 aynı zamanda epifiz ve hipofiz bezinin yanı sıra üçüncü ventriküldeki tanisitlerin seçili bir grubunda da eksprese olur (Berger and Hediger 2001, 2006).

Shashidharan *et al.* (1994) SLC1A2 geninden sorumlu cDNA'yı izole etmişlerdir. 565-amino asitlik proteinin rat beyni sodyum bağımlı glutamat/aspartat taşıyıcısı ile homolog olduğu gösterilmiştir (Krishnan *et al.* 1993).

Somatik hücre hibritleri ve floresans in situ hibridizasyonu (FISH) kullanılarak kromozom 11p13-p12'de insan SLC1A2 geni belirlenmiştir (Li and Francke 1995). Takai *et al.* (1996) genin haritasını elde etmişlerdir ve glutamat transporter1 (GLT1) olarak isimlendirmişlerdir.

GLT1 hücre dışı alandan fazla nörotransmitter glutamata aktif bir şekilde uzaklaştıran bir taşıyıcıdır. Hücre dışı glutamat konsantrasyonu sinaptik aktivasyon sırasında yüksek sinyal-gürültü oranını sağlamak ve glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonundan nöral hasarı önlemek için düşük tutulmak zorundadır. Aşırı glutamat nörotoksositeye neden olabilir ve felç, travma, Alzheimer hastalığı, amyotrofik lateral skleroz (ALS) ve

Huntington hastalığı, bipolar bozukluk gibi nörolojik bozukluklarda hücresel hasara sebep olabilir (Choi 1988; Kanai *et al.* 1993; Trotti *et al.* 2001; Dallspezia *et al.* 2012). Çizelge 2.3’de insan gen veritabanından (Anonymous 2016c) yararlanılarak oluşturulan GRIN2C ve SLC1A2 genlerine ait bazı özellikler verilmiştir.

**Çizelge 2.3.** GRIN2C ve SLC1A2’ye ait bazı özellikler

	GRIN2C	SLC1A2
Diğer adlandırmalar	Glutamat reseptör, iyonotropik, N-metil D-aspartat 2C Glutamat [NMDA] Reseptör Subünit Epsilon-3 N-metil D-aspartat reseptör alt-2C NMDAR2C GluN2C NR2C N-metil-D-aspartat reseptör alt 2C	Sodyum-Bağımlı Glutamat Aspartat Transporter 2 Glutamat Aspartat Transporter II EAAT2 Eksitotoksik Amino Asit Transporter 2 GLT-1 HBGT
Bazı gen sitelerindeki ID numaraları	HGNC: <a href="#">4587</a> Entrez Gene: <a href="#">2905</a> Ensembl: <a href="#">ENSG00000161509</a> OMIM: <a href="#">138254</a> UniProtKB: <a href="#">Q14957</a>	HGNC: <a href="#">10940</a> Entrez Gene: <a href="#">6506</a> Ensembl: <a href="#">ENSG0000011040</a> OMIM: <a href="#">600300</a> UniProtKB: <a href="#">P43004</a>
Genomik Konum	Kromozom: 17 Başlangıç: 74,842,021 bp Son: 74,861,514 bp Boyut: 19,494 baz Oryantasyon: Negatif (eksi) Zincir	Kromozom: 11 Başlangıç: 35,251,205 bp Son: 35,420,063 bp Boyut: 168,859 baz Oryantasyon: Negatif Zincir
Protein Bilgileri	Protein Sembolü: Q14957- NMDE3_HUMAN Protein Erişimi: Q14957, B2RTT1 Boyut: 1233 amino asit Moleküler Kütle: 134,209 Da	Protein Sembolü: P43004- EAA2_HUMAN Protein Erişimi: P43004, B4DQE9, Q14417 Boyut: 574 amino asit Moleküler Kütle: 62,104 Da



## 2.14. Karadut Etken Maddeleri ve Glutamat İlişkisi Üzerine Yapılan Çalışmalar

Bu başlık altında çalışmada kullanılan karadutun HPLC analizlerine dayalı olarak tespit edilen etken maddeler ile glutamat ilişkisi üzerinde yapılan çalışmalar incelenmiştir.

Martini *et al.* (2000) tarafından yayınlanan bir çalışmada *Phyllanthus* bitkisinden ekstrakte edilen bazı bileşiklerin (rutin, geraniin, kuersetin) rat beyin membranında [<sup>3</sup>H] glutamat ve [<sup>3</sup>H] GMP-PNP (glutamaterjik iletiminin modülasyonunu yapan hücre dışı alanları bağlayan bir GTP analogu) bağlanması üzerine doğal olarak oluşan antinosiseptif etkileri araştırılmıştır. 800 nM glutamat ve 800 nM GMP-PNP bağlanması üzerine 160 µM'ye kadar olan konsantrasyonlarda rutin etki göstermezken (30-500 µM) kuersetin doza bağımlı olarak etkide bulunmuştur. [<sup>3</sup>H] glutamat bağlanmasının kuersetin inhibisyonu için hesaplanan  $IC_{50}$  değeri 216 µM olarak verilmiştir. [<sup>3</sup>H] GMP-PNP'nin GTP analogu bağlanmasının kuersetin inhibisyonu için ise hesaplanan  $IC_{50}$  değeri 396 µM olarak belirtilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre araştırmacılar bu doğal bileşiklerin antinosiseptif aktiviteyle ilgili olarak muhtemelen nörokimyasal bir parametre gösterebileceğini öne sürmüşlerdir.

Siu *et al.* (2008) tarafından yayınlanan bir çalışmada kateşinin glutamatla muamele edilmiş retina üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Dondurulmuş domuz retinası çözünmüş ve 20 mM Tris (pH 7,40; 1:15 v/w) ile homojenize hale getirilmiştir. Ardından 4°C'de 5 dak boyunca 1000×g'de santrifüj edilmiştir. 300 µL olarak ayarlanan retina homojenatları 5, 10, 15, 20, 25 nmol konsantrasyonlardaki glutamat ile 37°C'de bir saat boyunca inkübe edilmiştir. Kateşinin 0,5, 1, 2, 4, 8 nmol konsantrasyonları 20 nmol glutamat uygulanmış retina homojenatı ile 37°C'de bir saat boyunca inkübe edilmiştir. Malondialdehit (MDA) düzeyleri lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre glutamatın retinal MDA'yı arttırdığı (p<0,0001) ve kateşinin bu etkiyi tersine çevirdiği (p<0,0001), glutamat uygulamasından sonra yedi proteinde (Heterojen ribonükleoprotein, tioredoksin peroksidaz, 5-hidroksitriptamin reseptörü, piruvat dehidrojenaz, ARHA protein (GTP bağlayıcı), proteazom ve peroksiredoksin 6) önemli değişiklikler olduğu (p<0,05) ve

kateşinin bu değışiklikleri tioredoksin peroksidaz, 5-hidroksitriptamin reseptörü, peroksiredoksin 6 ve pirüvat dehidrogenaz için tersine çevirdiği ( $p < 0,05$ ) belirtilmiştir.

Lavoie *et al.* (2009) tarafından yayınlanan çalışmada E16-17 OF1 fareden hazırlanan kortikal nöron kültürleri ve P1-3 OF1, C57BL/6 doğal fenotip ve C57BL/6 GCLM-KO farelerden hazırlanan astrosit kültürleri kullanılarak kuersetinin glutasyon seviyeleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bunun için; bu kültürler 24 saat boyunca 5, 10, 20, 50, 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında kuersetine maruz bırakılmıştır. Medyum olarak kullanılan nörobazal medyuma 500  $\mu\text{M}$  glutamin eklenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre kuersetin astrositlerde glutasyon seviyelerini arttırmıştır, nöronlarda ise glutasyonu azaltmıştır ve hücre ölümüne yol açmıştır. Ayrıca 20  $\mu\text{M}$  kuersetin GCLC (glutamat sistein ligaz katalitik altbirim), GCLM (glutamat sistein ligaz modifiye edici alt birim) ve GSS'nin (glutasyon sentetaz) mRNA seviyelerini arttırmıştır.

Lu *et al.* (2013) tarafından yayınlanan çalışmada kuersetinin rat serebral korteks sinir terminallerinde (sinaptozomlar) glutamat salınımını etkileyip etkilemediği ve olası mekanizmalar araştırılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre kuersetin rat serebral korteks sinir uçlarında glutamat salınımını inhibe etmektedir. Glutamat salınımı 3-200 mM kuersetin varlığında ya da yokluğunda (kontrol) 4-aminopridin (4-AP) ve 15 mM KCl ile uyarılmıştır. Kuersetin  $\text{K}^+$  kanalı bloke edici 4-AP ile uyarılan glutamat salınımını inhibe etmiştir ve bu etki hücre dışı  $\text{Ca}^{2+}$  iyonlarının şelatlanması ile önlenmiştir. Kuersetin sitosolik serbest  $\text{Ca}^{2+}$  konsantrasyonunda depolarizasyona bağlı artışı azaltmıştır ancak 4-AP aracılı depolarizasyonu ve  $\text{Na}^+$  geçişini değiştirmemiştir. Glutamat salınımının kuersetin aracılı inhibisyonu hücre içi  $\text{Ca}^{2+}$  salınımını bloke ederek değil N-tipi kalsiyum kanalı alfa 1B alt birimi olan  $\text{Ca}_v2.2$  ve P/Q voltaja-bağlı kalsiyum kanalı olan  $\text{Ca}_v2.1$  kanalları bloke edilerek önlenmiştir. Aynı zamanda Protein kinaz C (PKC) ve protein kinaz A'nın (PKA) kombine inhibisyonu uyarılmış glutamat salınımı üzerindeki kuersetinin inhibitör etkisini önlemiştir. Ayrıca, kuersetin 4-AP indüklü PKC ve PKA'nın fosforilasyonunu azaltmıştır. Araştırmacılar bütün bu sonuçların kuersetinin rat kortikal sinaptozomlardan glutamat salınımını inhibe ettiğini

ve bu etkinin perisinaptik voltaj bağımlı  $Ca^{2+}$  girişinde bir azalmaya ve PKC ile PKA aktivitesinin baskılanmasına bağlı olduğunu ifade etmişlerdir.

Mikami and Yamazawa (2015) tarafından yayınlanan çalışmada glutamat ile indüklenen nöronal hücre ölümüne karşı klorojenik asidin koruyucu etkisinin moleküler mekanizmasının açıklanması hedeflenmiştir. Bunun için; öncelikle primer kültürdeki kortikal nöronlar 10  $\mu$ M CGA (klorojenik asit) ya da 10  $\mu$ M MK-801 varlığında ve yokluğunda 300  $\mu$ M L-glutamik asit ile muamele edilmiştir. 16 saat sonra, primer kültürler propidyum iyodür (PI)/Heschst ya da kalsein ile boyanmıştır. PI ve Hoechst ile çift boyama glutamat ile indüklenen hücre ölümünün apoptotik olup olmadığını doğrulamak için yapılmıştır. Ayrıca,  $Ca^{2+}$ 'nin hücre içi konsantrasyonları  $Ca^{2+}$  indikatörü fura-2 kullanılarak gözlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre araştırmacılar klorojenik asit muamelesi ile glutamat ile indüklenen nöronal hücre ölümünü inhibe edildiğini, nöron kültürüne glutamat ilavesinin sebep olduğu hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonundaki artışın önlendiğini öne sürmüşlerdir.

Vidak *et al.* (2015) tarafından yayınlanan derlemede gıdalardaki bazı flavonoidlerin glial ve glioblastoma üzerindeki etkilerine dair yapılan çalışmalar incelenmiştir. Bu derlemeye göre; glial hücreleri üzerindeki kuersetinin koruyucu etkileri çoğunlukla C6 hücreleri ve *in vitro* deneylerde astrosit kültürleri kullanılarak yoğun bir şekilde çalışılmıştır. C6 hücrelerinin oksidatif strese maruz kalması lipid peroksidasyonu, glutasyon azalması, DNA zincirlerindeki kırılmanın artması ve kalsiyum iyonlarının akışındaki artış ile sonuçlanmaktadır. Ancak bu olumsuz etkiler eğer hücreler quercetin ile muamele edilirse hafiflemektedir. C6 hücreleri üzerindeki kuersetinin anti-inflamatuar etkileri rapor edilmiştir. Bu hücre hattında, kuersetin TNF- $\alpha$  ve interlökin 1 $\alpha$  sitokinlerinin ekspresyonunu azaltır. İnflamatuar süreçlerinin inhibisyonu sonucu nöronların apoptozunda azalma meydana gelmektedir. Ayrıca, kuersetin heme oksijenaz 1 indüksiyonu ile C6 hücrelerinin apoptozunu inhibe eder. Kuersetin C6 glial hücrelerde ve nöronda apoptozu inhibe etmesine rağmen, insan glioblastoma T98G hücrelerinde mitokondriyal ölüm yolunu aktive ederek apoptozu indükler. T98G hücrelerinin kuersetin maruziyeti kaspaz 3 ve 9'un aktivasyonuna, mitokondriden

sitokrom c'nin salınımına ve mitokondrial membran potansiyelinde bir azalmaya yol açar. Kuersetin aynı zamanda mitokondriyal apoptotik yolu dahil olan ısı şok proteinleri olan HSP27 ve HSP72'yi inhibe eder.

Yine bu derlemeye göre; kateşin türevleri beyinde anti enflamatuar etki göstermektedir. Glial hücrelerde kateşin pro enflamatuar sitokin TNF- $\alpha$ 'nın ekspresyonunu düzenleyen mitojen ile aktive edilen protein kinazların sinyalleme kaskadını inhibe ederek kinaz sinyal yollarını modüle etmektedir. Kateşin aynı zamanda COX-2 ekspresyonunu inhibe ederek prostaglandin sentezini azaltmaktadır ve ROS ile RNS üretimini baskılamaktadır. Böylelikle, glial hücelere enflamasyon ve oksidatif strese karşı ilave koruma sağlanmış olmaktadır.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Araştırmada kullanılan cihazlar

Elektroforez (BioRad)

Hassas Terazı (KERN ABS)

pH Metre (WTW Series pH 720)

Vorteks (Heidolp)

Steril Kabin (ESCO)

Etüv (P Selecta Cod:2001248)

Otoklav (P Selecta)

Soğutmalı santrifüj (J.P. Selecta Centrifriger-BL)

Buz Dolabı (Bosch KAN62V70NE-Ever Med Medical Refrigeration)

Su Banyosu (P Selecta)

UV-Visible Spektrofotometre (PG Instrument T80 UV/VIS Spectrometer)

Distile su cihazı (GFL 2004)

Manyetik karıştırıcı (Wise Stir MSH-20D, Stuart SB162-Are)

Nanodrop UV VIS Spektrofotometre (Epoch)

Real Time PCR (Roche)

CO<sub>2</sub> İnkübatörü (Newbrunswick Scientific Innova)

##### 3.1.2. Çalışmada kullanılan biyolojik materyaller

Araştırmada kullanılan karadut (*Morus nigra*) bitkisi Türkiye, Erzurum'da yerel bir satış noktasından temin edilmiştir. Alınan karadut Atatürk Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde taksonomistlerce tanımlanmıştır. Çalışmada kullanılan sağlıklı insan kanı serumu Atatürk Üniversitesi, Araştırma Hastahanesi, Biyokimya Laboratuvarı'ndan

temin edilmiştir. Glioblastoma hücre hattı olarak bilinen U87MG kanser hattı Van Üniversitesi'nden temin edilmiştir.

### 3.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasal materyaller

Amonyum Sülfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-sulfonicacid) diammonium salt (ABST), Sodyum Asetat (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>), Sodyum Fosfat (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), Sodyum Karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), Sodyum Hidroksit (NaOH), Hidroklorik Asit (HCl), Temodal (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>), Trizma (NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>·HCl, Sodyum Dodesil Sülfat (SDS: CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>OSO<sub>3</sub>Na), Amonyum Persülfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), TEMED ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), Comassie Blue R250 (C<sub>45</sub>H<sub>44</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>7</sub>S<sub>2</sub>), Brom Timol Mavisi (C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S), Gliserin (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>), β-merkaptetanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS), Akrilamid (C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>NO), N'N'\_Metilen\_Bis-akrilamid ((H<sub>2</sub>C=CHCONH)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, Glisin (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>), Paraokson (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>6</sub>P) çalışmada kullanılan kimyasal materyallerdendir.

Nöron Kültürü için; Bir günü dolmamış Sprague Dawley sıçan yavrusu, NBM (Neuro Basal Medium Sigma GIBCO 21103-049), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), FBS (Fetal Bovin Serum, Sigma-Aldrich MFCD00132239), Supplement B27 (Life Technology 12587-010), Tripsin (Sigma Aldrich no MFCD00130286) kullanılmıştır.

U87MG Kültürü için; DMEM, FBS, Penisilin–Streptomisin, amphotricin B (Life Technology GIBCO 15240-062), %1 L-Glutamine (Life Technology 25030-081) kullanılmıştır.

MTT Sitotoksosite Testi için; MTT [3- (4,5-Dimethyldiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid] tozu: Sigma Aldrich, No: MKBR4419V. DMSO (Dimethyl sulfoxide): Sigma Aldrich, No: W29A015 96 kullanılmıştır.

Moleküler çalışmalar için; Roche high pure RNA Tissue Kit No:12033674001, Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit No:04896866001, Roche Fast Start

Essential DNA Probes Master Kit (Roche), Grin2c, Slc1a2 primerleri, Beta aktin kullanılmıştır.

### 3.1.4. Çalışmada kullanılan nano $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> yapı ve özellikleri

Çizelge 3.1’de çalışmada kullanılan nano  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>’a ait veriler gösterilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Çalışmada kullanılan nano  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>’a ait veriler

Kimyasal isim	nano $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
CAS No.	1309-37-1
Ürün numarası	544884
Molekül ağırlığı g/mol	159,69
Partikül boyutu nm	<50 (BET)
Yüzey alanı m <sup>2</sup> /g	50-245
Erime noktası °C	1,538
Nispi yoğunluk g/cm <sup>3</sup>	5,15
Su içinde çözünürlüğü	Çözünmez
Form	Nano toz

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Karadut alkol ve su ekstraktlarının hazırlanması

-20°C’de saklanan karadut alkol ve su ekstraktının hazırlanması için oda sıcaklığında yavaş çözülmeye bırakılmıştır. Daha sonra belirli ağırlıklarda tartılarak blendırda ve mikserde küçültme işlemine tabi tutulmuştur. Üzerini örtecek şekilde alkol (etanol) ve saf su eklenmiştir ve 24 saat boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde magnet ile karıştırma işlemi yapılmıştır. Daha sonra süzme işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Karadutun

alkol ekstraksiyonunda alkol evaporatör ile uzaklaştırılırken karadutun su ekstraksiyonu da su liyofilizatör ile uzaklaştırılmıştır. Elde edilen ekstraktlar için UV-VIS spektrofotometre kullanılarak dalga boyu taraması yapılmıştır. Kör olarak saf su kullanılmıştır. Daha sonra ekstraktlar bir sonraki kullanım için  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.



**Şekil 3.1.** Karadut ekstraktlarının hazırlanması sırasındaki işlemler

### 3.2.2. Karadut alkol ve su ekstraktlarının HPLC analizi

Karadut alkol ve su ekstraktlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile analizi Malatya ilinde Kayısı Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nde yapılmıştır. Karadut su ekstraktından 0,1093 g, karadut alkol ekstraktından 0,1012 g tartılarak 5 ml çözücüde (metanol: su: HCl (70: 29,9: 0,1)) çözülmüştür. Bu örnekler bir gece boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra sırasıyla santrifüjleme ve filtreleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyona verilerek analiz sonuçları elde edilmiştir. Mobil faz olarak A:% 4,5 formik asit ve B:Asetonitril kullanılmıştır.

### 3.3.3. Karadut alkol ve su ekstraktlarının nano $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 'e immobilizasyonları

$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  nanopartiküllerin üzerine alkol ve su karadut ekstraktları ayrı ayrı immobilize edilmiştir. Bu amaçla aynı beher içerisine son hacim saf su ile 10 mL olacak şekilde karadut ve demir nanopartikülleri belirli oranlarda konularak 2 saat boyunca bir magnet



yardımıyla manyetik karıştırıcı üzerinde ve ardından 1 saat süre ile ultrasonik banyoda karıştırılmıştır. Daha sonra immobilizasyonun optimum immobilizasyon süresi, optimum materyal konsantrasyonu, optimum pH, optimum sıcaklık çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

### **3.3.4. Optimum immobilizasyon süresinin belirlenmesi**

Karadut ekstraktı ve belirli miktardaki magnetik nanopartiküller 2 saat boyunca manyetik karıştırıcı kullanılarak magnet yardımı ile karıştırılmıştır. 30, 45, 60, 75, 90, 105 ve 120 dk'da her ekstrakt için önceden belirlenen dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapılarak absorbanslar belirlenmiştir. Bu absorbans ölçümleri dikkate alınarak optimum immobilizasyon süreleri alkol ve su ekstraktları için ayrı ayrı belirlenmiştir.

### **3.3.5. Optimum materyal konsantrasyonunun belirlenmesi**

2,5, 5, 10, 15, 20 mg/mL konsantrasyonları elde edilecek şekilde kullanılan ekstraktlar 0,01 g magnetik nanopartikül kullanımı ile immobilize edilmiştir. Burada her ekstrakt için belirlenen optimum immobilizasyon süresi kullanılmıştır ve her ekstrakt için önceden belirlenen dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmıştır. Okunan absorbans değerleri dikkate alınarak her ekstrakt için optimum materyal konsantrasyonu belirlenmiştir.

### **3.3.6. Optimum pH değerinin belirlenmesi**

Belirlenen optimum materyal konsantrasyonunda ekstraktlar pH 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 ortamlarında nano  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'e immobilize edilmişlerdir. Optimum immobilizasyon süreleri sonunda spektrofotometrik ölçüm alınarak absorbans okumaları yapılmıştır ve bu veriler değerlendirilerek her ekstrakt için optimum pH değeri belirlenmiştir. Ortamın pH'sı aşırı seyreltik HCl ve NaOH kullanılarak ayarlanmıştır.

### 3.3.7. Optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi

Daha önce tespit edilen optimum immobilizasyon süresi, optimum materyal konsantrasyonu ve optimum pH değerleri esas alınarak hazırlanan ekstraktlar ile 10°C, 20°C ve 30°C sıcaklıklarda immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra spektrofotometrik ölçüm yapılarak ilgili absorbans değerleri elde edilmiştir. Bu veriler değerlendirilerek her ekstrakt için optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir.

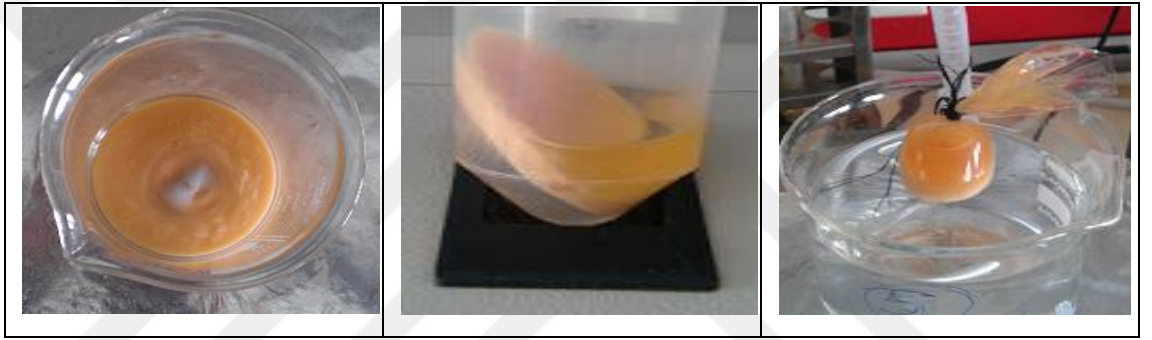
### 3.3.8. Karadut ekstraktları immobilize edilmiş $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküllerinin SEM, EDX, FT-IR karakterizasyonu

Karadut ekstraktları immobilize edilmiş manyetik nanopartiküllerin yüzey morfolojisinin görüntülenmesi için Zeiss marka Sigma 300 model Taramalı Elektron Mikroskobu ile SEM görüntüleri, kimyasal yapısı hakkında bilgi sahibi olmak için EDX grafikleri ve son olarak kristal yapısının anlaşılması için Bruker VERTEX 80/80v markalı FT-IR cihazı ile FT-IR grafikleri elde edilmiştir. Bu çalışmalar Atatürk Üniversitesi Daytam bünyesinde gerçekleştirilmiştir.

### 3.3.9. Paraoksonaz (PON1) enziminin insan serumundan saflaştırılması

Paraoksonaz enziminin saflaştırılması amacıyla Atatürk Üniversitesi, Araştırma Hastahanesi Biyokimya Laboratuvarı'ndan sağlıklı kişilere ait kan örneklerinden toplanan serumlar Erzurum MYO, Gıda İşleme Bölümü Laboratuvar ortamına soğuk zincir korunarak getirilmiştir ve +4°C'de muhafaza edilmiştir. Paraoksonaz enziminin saflaştırılması üç fazlı saflaştırma tekniği ile yapılmıştır. İlk olarak n-bütanol optimizasyonu ve daha sonra amonyum sülfat optimizasyonu çalışılmıştır. Bunun için 10 mL'lik serum örneği içeren 4 behere 1:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0 oranlarında 1-bütanol ve 4 gr amonyum sülfat ilave edilmiştir. 30 dk boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra elde edilen çözeltiler 5000 xg'de 10 dk boyunca santrifüjleme işlemine tutulmuştur. Santrifüjden çıkarılan tüplerde üst faz alkol, orta faz çökelek, alt faz su olmak üzere 3 faz oluşumu gözlenmiştir (Şekil 3.2). Orta faz olan

çökelek 1 mM  $\text{CaCl}_2$  içeren 50 mM Tris/HCl tamponundan (pH 8,1) 3 mL alınarak çözündürülmüş ve 3 saat boyunca aynı tampona karşı diyaliz edilmiştir. Aynı koşullarda ve sürede alt faz da 3 saat boyunca diyaliz edilmiştir. 3 saat sonunda enzim aktivite tayini amacıyla 1 mM fenilasetat substratı kullanılmak suretiyle 279 nm’de aktivite ölçümü yapılmıştır. Numune, 0,5 mL substrat ve 0,4 mL 50 mM Tris-HCl tamponuna ilave olarak 0,1 mL enzim kullanılarak hazırlanmıştır. Kör, enzim yerine saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Aktivite ölçümü yapılmadan önce hazırlanan tüpler 15 dk boyunca 37°C’deki su banyosunda inkübe edilmiştir.



**Şekil 3.2.** Paraoksonaz enziminin ÜFA yöntemiyle saflaştırılma aşamaları

Amonyum sülfat optimizasyonu için; 10 mL serum ve belirlenen optimum n-bütanol miktarı (1,0:0,5 oranı korunarak) 4 behere %20, %40, %60, %80 oranlarında amonyum sülfat eklenmiştir. Yarım saat boyunca manyetik karıştırıcıda çöktürme işlemi, 10 dk 5,000xg’de santrifüjleme ve orta fazın Tris-HCl tamponu ile çözülmesi işlemlerini takiben en yüksek aktivite gösteren amonyum sülfat oranının bulunduğu beherde 2. amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. 2. Amonyum sülfat çöktürmesi son hacime göre %25, %30, %35, %40, %45, %50 oranlarında tekrarlanmıştır. Amonyum sülfatla çöktürme işlemi, 10 dk 5,000xg’de santrifüjleme ve orta fazın Tris-HCl tamponunda çözülmesi ve 3 saat boyunca diyaliz edilmesi işlemleri gerçekleştirilerek enzim saflaştırması için etkin oran belirlenmiştir.

Amonyum sülfat çöktürmesinde kullanılacak amonyum sülfat miktarının belirlenmesinde aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır.

$$g(NH_4)_2SO_4 = \frac{1,77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

V: Serum+n-bütanol toplam hacmi

S<sub>1</sub>:1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

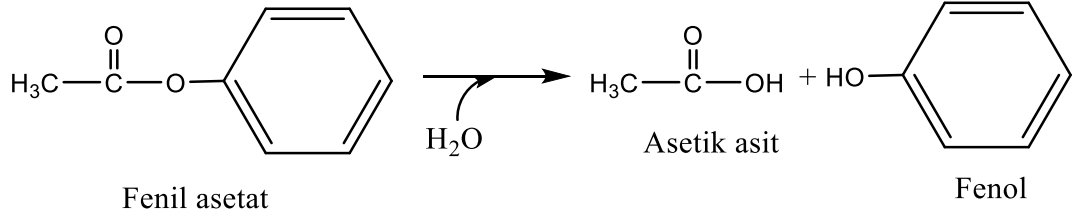
S<sub>2</sub>:1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

### 3.3.10. Kantitatif protein tayini

Paraoksonaz enziminin saflaştırılması aşamasında elde edilen çözeltilerdeki mevcut protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntem proteinlerin fosforik asit varlığında Coomassie Brilliant Blue R-250 reaktifi ile birleşik yapı oluşturması ve oluşan birleşik yapının 595 nm'de maksimum absorpsiyon vermesi esasına dayanır. Çok kısa sürede uygulanması, oluşan birleşik yapının (protein-boya) çözeltilerde uzun süre kalabilmesi bu yöntemin üstünlüklerindedir. 5 mL Coomassie brilliant çözeltisi içine 10 µL enzim konulmuştur. Kör olarak saf su kullanılmıştır. Vorteksleme işlemi takiben 10 dk bekletildikten sonra 595 nm'de UV-VIS spektrofotometresinde ölçüm yapılmıştır (Bradford 1976).

### 3.3.11. Enzim aktivite tayini

Enzimin arilesteraz aktivitesi 1 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 8,0) içeren 50 mM Tris/HCl tamponu kullanılarak 37°C'deki su banyosunda 15 dk bekletildikten sonra belirlenmiştir. Substrat olarak 1 mM fenilasetat kullanılmıştır (Şekil 3.3). Hidroliz oranı 279 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Aktivite ölçümü için molar absorpsiyon katsayısı (ε: 1310 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) olarak alınmıştır. Arilesteraz aktivitesinin bir unitesi dk başına hidrolize olan fenil asetatın mikromol miktarı olarak tanımlanmıştır.



**Şekil 3.3.** PON1 katalizi ile oluşan arilesteraz tepkimesi

ÜFA yöntemi ile saflaştırılan enzimin paraoksonaz aktivitesi 1mM CaCl<sub>2</sub> içeren 50 mM Tris/HCl tamponu (pH 8,0) kullanılarak 37°C’de su banyosunda 15 dk inkübe edildikten sonra belirlenmiştir. Substrat olarak 1 mM paraokson kullanılmıştır. Aktivite ölçümü paraokson ve PON1 arasındaki reaksiyonun sonucu olarak oluşan paranitrofenolün 412 nm’deki absorbansına dayanmaktadır. Aktivite ölçümü için paranitrofenolün molar absorpsiyon katsayısı ( $\epsilon$ : 18,000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, pH 8,0) kullanılmıştır. Paraoksonaz enzim aktivitesi her dk’da hidrolize olan paraoksonun mikromol miktarı olarak tanımlanmıştır (Reneault *et al.* 2006).

Elde edilen enzim üzerinde optimum pH, stabil pH, optimum sıcaklık, stabil sıcaklık aralığı ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

### 3.3.12. Saflaştırılan PON1 enzimi için optimum pH ve stabil pH değerlerinin belirlenmesi

Enzimin optimum pH değerinin tespiti için enzim, farklı pH değerleri için farklı tamponlarda 37°C sıcaklıktaki su banyosunda 15 dk bekletilmiş daha sonra 279 nm’de spektrofotometrik olarak aktivite tayini yapılmıştır. pH 3,0, 4,0, 5,0 değerleri için asetat tamponu (10 mM), pH 6,0, 7,0, 8,0 değerleri için Tris/HCl tamponu (10 mM), pH 9,0, 10,0 değerleri için Glisin tamponu (10 mM) kullanılmıştır.

Enzimin stabil pH değeri için değişen pH değerlerinde (3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0) yukarıdaki paragrafta verilen ilgili tamponlar kullanılarak hazırlanan örnekler 7 gün boyunca +4°C’de muhafaza edilmiştir. Örnekler 500 µL ilgili pH değeri için

kullanılan tampon ve 500 µL enzim kullanılarak hazırlanmıştır. Kör olarak hazırlanan örneklerden enzim yerine saf su kullanılmıştır. Her gün için aynı saat diliminde hazırlanan bu örneklerde 100 µL alınarak 1,4 mL substrat ilave edilmiştir. Daha sonra 37°C sıcaklıktaki su banyosunda 15 dk bekletildikten sonra 279 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmıştır.

### **3.3.13. Saflaştırılan PON1 enzimi için optimum sıcaklık ve stabil sıcaklık değerlerinin belirlenmesi**

Enzimin optimum sıcaklık değerinin tespiti için hazırlanan örnekler farklı sıcaklıklarda (10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C) 15 dk bekletildikten sonra 279 nm'de tüm örneklerde aktivite tayini yapılmıştır. Farklı sıcaklıklarda bekletilen örneklerin hepsi önceki çalışmada belirlenen optimum pH dikkate alınarak hazırlanmıştır.

Enzimin stabil sıcaklık değerinin belirlenmesi için örnekler farklı sıcaklıklarda 1 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda 279 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm alınmıştır. Örnekler 100 µL tampon+enzim ve 1,4 mL substrat içerecek şekilde hazırlanmıştır. Kör olarak enzim yerine saf su kullanılmıştır.

### **3.3.14. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE) ile enzim saflığının tayini**

Paraoksonaz enziminin üç fazlı ayırım tekniği ile saflaştırılmasından sonra enzimin alt birim sayısı yığma jeli %3, ayırma jeli %10 olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi (SDSPAGE) ile kontrol edilmiştir. Bunun için ilk olarak su ve etil alkol kullanılarak elektroforez cam plakaları temizlenmiştir. Temizlenmiş plakalar arasına aralık oluşturucusu (plastik, cam) yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konulmuş jel dökme aparatına sabitlenmiştir. Üstten 2-3 cm kalacak şekilde plaka arasına ayırma jeli dökülmüştür. Polimerizasyon tamamlanınca boş bırakılan 2-3 cm'lik boşluğa yığma jeli dökülmüştür. Yığma jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek 1-1,5 saat

boyunca jelin polimerlesmesi beklenilmiştir. Jel kasetleri elektroforez tankına yerleştirilmiştir. 300 µL numune tamponu (0,65 mL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 3 mL %1'lik SDS, 1 mL %100 gliserin, 1mL/10mL %0,1'lik brom timol, 50 µL β-merkaptoetanol/1 mL numune tamponu) içerisine saflaştırılan enzimden 500 µL konularak 5 dk boyunca sıcak su içerisinde bekletilmiştir. Protein markırları olarak miyozin (200 kDa), β-galaktosidaz (125 kDa), sığır serum albümini (BSA) (66 kDa), ovalbümin (45 kDa), karbonik anhidraz (29 kDa), lizozim (14,3 kDa) kullanılmıştır. Örnekler soğutulularak kuyucuklara 30 µL yükleme yapılmıştır. Tankın alt ve üst kısmına yürütme tamponu (1,5 gr Tris, 7,2 gr glisin, 5 mL %10'luk SDS (500 mL için)) konulmuştur. Güç kaynağı 80 volta ayarlanmış, bantlar ayırma jeline ulaştıklarında 120 volta yükseltilmiştir. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli boyama çözeltisi (0,1 gr Coomassie Brilliant Blue R250, 50 mL metanol, 10 mL asetik asit, 40 mL saf su) içine konulmuştur ve 0,5-1 saat boyunca çalkalayıcı üzerine bırakılmıştır. Süre sonunda jel boyama çözeltisinden çıkartılarak yıkama çözeltisine (100 mL asetik asit, 300 mL metanol, 600 mL saf su) konulmuştur. Bir gün boyunca farklı zaman dilimlerinde protein bantları gözlemlenip fotoğraf çekimi yapılmıştır.

### **3.3.15. Saflaştırılan PON1 enzimi üzerine bazı antioksidan bileşiklerin inhibisyon etkilerinin araştırılması**

Çalışma için belirlenen antioksidanların 10 mM'lık, 50 mL'lik stok çözeltileri hazırlanmıştır. 500 µL 1 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 10 mM Tris/HCl tamponu (pH 8,0), 300 µL 2,5 mL asetonunda çözünen ve konsantrasyonu 3 mM olacak şekilde hazırlanan paraoksan çözeltisi, 50 µL enzim ve ilgili antioksidan bileşikler için tablolarda belirtilen değişken miktarlar kullanılarak son hacim 1 mL olacak şekilde örnekler hazırlanmıştır. 37°C'deki su banyosunda 15 dk bekletilen örneklerle bu süre sonunda paraoksan substratı kullanılarak 412 nm'de spektrofotometrik olarak aktivite tayini yapılmıştır. Çalışmada kullanılan antioksidan bileşikler şunlardır:

- 1) 4-Hidroksi-3-metoksisinnamik asit
- 2) 4-Hidroksi-3,5-dimetoksibenzoik asit
- 3) 2,6-dimetoksifenol
- 4) Öjenol
- 5) 5-İzopropil-2-metilfenol
- 6) 3,4-dihidroksisinnamik asit
- 7) Sinapik asit
- 8) 4-hidroksibenzoik asit
- 9) 5-5'-dithiobis (2-nitrobenzoik asit)

Alınan ölçümlere dayalı olarak antioksidan bileşikler için %Aktivite-[I] grafikleri çizilmiş, eğri denklemleri kullanılarak  $IC_{50}$  değerleri hesaplanmıştır. Bu bileşiklerin  $K_i$  değerlerinin tespiti için saflaştırılan PON1 enzim aktivitesini yarıya indiren bileşiklerin konsantrasyonu kullanılarak 3 farklı inhibitör konsantrasyonu belirlenmiştir. Seçilen bu üç farklı konsantrasyonda ilgili bileşiklerin stok çözeltileri hazırlanmıştır. Her antioksidan bileşik için 500  $\mu$ L 10 mM Tris/HCl tamponu (pH 8,0), 50  $\mu$ L enzim, değişen değerlerde (50  $\mu$ L, 90  $\mu$ L, 140  $\mu$ L, 190  $\mu$ L, 230  $\mu$ L) 3 mM paraoksan, değişken miktarlarda saf su ve antioksidan bileşik ilave edilerek son hacim 1 mL olacak şekilde örnekler hazırlanmıştır. Daha sonra örnekler 37°C'deki su banyosunda 15 dk bekletilmiştir ve 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen veriler ile inhibitörler için Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir (Demir vd 2011).

### 3.3.16. Kanser hücre dizileri ve çoğaltılması

Glioblastoma hücre hattı olarak bilinen U87MG kanser hattı Van Üniversitesi'nden temin edilmiştir. Hücre hattı 37°C'de çözülmüştür. Çözünen medyum ve bu medyum içindeki hücreler 2 mL'lik yeni medyumla karıştırılarak +4°C'de 172 xg'de şartları kullanılarak 5 dk süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst faz atılmıştır ve dipte yer alan kanserli hücreler DMEM, 1/FBS, %1 antibiyotik (pensilin-streptomisin-amfotrisin B), %1 L-Glutamat içeren medyum ile muamele edilmiştir ve 25 cm<sup>2</sup> alana sahip flasklara ekim yapılmıştır. Her 3 günde bir hücreler mikroskop altında



incelendikten sonra medyumları yenilenmiştir. Yapılan kontrollerde kanserli hücrelerin flask kaplarının %70'ini kapladığı anlaşıldığında pasaj işlemi uygulanmıştır. Pasaj işleminde ilk olarak hücrelerin medyumunu uzaklaştırılmıştır (Wang, Sun *et al.* 2015). Flaskda  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  içermeyen steril PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama işleminden sonra PBS uzaklaştırılıp 0,4 mL Tripsin/EDTA eklenmiştir ve 5 dk boyunca inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda flaska 1:1 oranında FBS eklenmiştir. Steril falcon tüplere flask içindeki solüsyon aktarılarak tripsin tarafından kaldırılan hücrelerin eldesi için  $+4^{\circ}C$ 'de 172 xg'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Üst faz atıldıktan sonra dipte kalan hücre üzerine yeni medyum eklenmiştir ve 96'lık plate kullanılarak her kuyucuğa 100  $\mu$ L gelecek şekilde hücre dağılımının homojen olmasına dikkat edilerek hücrelerin ekimi yapılmıştır. Thoma camı kullanılarak yapılan sayımlara göre kuyucuk başına  $1 \times 10^5$  hücrenin geldiği tespit edilmiştir. Peletler  $37^{\circ}C$  ve %5  $CO_2$  şartlarında inkübatörde muhafaza edilmişlerdir.

### 3.3.17. Nöron kültürünün hazırlanması

Sinir hücre kültürünün hazırlanması için ilk olarak 9 adet yeni doğan rat yavrusu (Şekil 3.4) Batikon ile yıkanarak steril petri kablarına alınmışlardır. Burada seri bir şekilde dekapite edilmişlerdir (Buyukokuroglu, Gepdiremen *et al.* 2003). Rat yavrularının kafa kısımları gazlı bez üzerine alındıktan sonra deri ve kafatasları ince makas kullanılarak açılmıştır. Korteks, beyin kaşığı kullanılarak alınarak 2 mL DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) solüsyonu içeren tüpe aktarılmıştır. Bütün korteksler alındıktan sonra tüpün dibine çökme gösteren beyinler petri kabına alınmış ve sonra çift bisturi ile 20 dk süreyle sert olmayan hafif dokunuşlarla makro parçalanma işlemi yapılmıştır. Mikro parçalama aşaması için parçalanmış korteksler yeniden DMEM solüsyonu içine alınmıştır. Bu solüsyona 1/4 oranında tripsin EDTA ilave edilerek 30 dk etüvde inkübe edilmiştir (Sengul *et al.* 2011). Saf nöron hücreleri elde etmek için inkübasyon sonunda hücreler 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır ve her defasında üst faz atılarak yeni medyum ilave edilmiştir. Dibe çöken saf nöron hücreleri NBM, 1/10 FBS, 1/50 B27, 1/1000 antibiyotik içeren nöron solüsyonuna konulmuştur. 96'lık poli-lisin kaplı poli stiren kaplara kuyucuk başına

$1 \times 10^5$  hücre gelecek şekilde ekim yapılmıştır. Her 3 günde bir hücreler mikroskop altında kontrol edilip medium değişikliği yapılmıştır. Numuneler,  $37^\circ\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$  ortamında muhafaza edilmiştir.



**Şekil 3.4.** Nöron kültürü hazırlanmasında kullanılan 1 günlük rat yavruları

### 3.3.18. Sitotoksite testi

Çalışmada MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) testi ile sitotoksite değerlendirilmesi yapılmıştır. Kültür ortamı olarak %10 (h/h) FBS, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  penisilin-streptomisin ve 2 mM L-glutamin içeren DMEM kullanılmıştır. 96 kuyucuklu plaklara ekilen hücreler  $37^\circ\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$  ortamında inkübatörde 24 saat bekletilmiştir. 24 saat sonunda kültür ortamı uzaklaştırılarak Çizelge 4.9'da belirtilen ilgili dozlardaki gruplar yeni kültür ortamında çözündürülerek kuyucuklara 2,5 mL eklenmiştir (n=6). Örnekler 24 saat  $\text{CO}_2$  inkübatöründe inkübe edilmiş ve 25  $\mu\text{L}$  MTT çözeltisi (5 mg/mL) ilave edilmiştir. 4 saat süre ile  $37^\circ\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$  ortam şartlarında inkübasyon yapılmıştır. Her kuyucuktaki canlı hücre sayısı ELISA mikroparka okuyucu ile 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Bu işlemler hem U87MG hücreleri hem de nöron hücreleri için yapılmıştır.

MTT solüsyonu hazırlamak için; 5 mg toz halinde MTT, 1 mL saf PBS içinde çözündürülmüştür ve 0,22  $\mu\text{m}$  çaplı filtreden süzildükten sonra kullanılmıştır.

### 3.3.19. RNA İzolasyonu

25 cm<sup>2</sup>'lik flasklar içindeki hücelere ilgili dozlardaki gruplar 2,5 mL mediumda çözüdürülerek verilmiştir. 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> ortamında 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda flasklar mikroskop altında incelenmiştir ve 4X boyutunda fotoğraf çekimi yapılmıştır. Flask içindeki solüsyon vakum pompası ile çekilmiştir. Daha sonra her flask için 2 mL HBSS (Hank's Balanced Salt Solution Lot RNBC8958) kullanılarak yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama solüsyonu vakum pompasıyla çekilmiştir. Her flaska pastör pipeti ile 1 mL Tripsin-EDTA solüsyonu (T4049-100 mL) ilave edilmiştir. Enzim aktivasyonunun daha hızlı gerçekleşmesi için CO<sub>2</sub> inkübatöründe 3 dk bekletilmiştir. Mikroskop altında flasklardaki hücrelerin kalktığından emin olduktan sonra örneklerle aynı numaraları içeren 15 mL'lik steril falcon tüplere hücreleri içeren solüsyonlar alınmıştır. Falcon tüplere ayrıca 1:1 oranında tripsin enzimini inaktif hale getirmek için FBS (Fetal Bovine Serum) ilave edilmiştir. 1200 rpm'de 5 dk boyunca santrifüleme yapılmıştır. Falcon tüplerde üst faz atılarak üzerine 400 µL Lizis bağlama tamponu ilave edilmiştir. Pipetaj yapılarak 1,5 mL ependorf tüpüne aktarılmıştır. Ependorf tüpleri 2 dk boyunca 38,759 xg'de santrifüleme işlemine tabi tutulduktan sonra 200 µL saf ethanol ilavesi yapılmıştır. Vorteksleme işleminden sonra içerikler numaralandırılmış high pure spin filter tüplerine aktarılmıştır ve 13.000xg'de 30 sn santrifüleme yapılmıştır. Altta toplanan fazlar atılmıştır.

Her bir örnek için 90 µL DNase Incubation Buffer + 10 µL DNase I working solüsyonu olacak şekilde ayrı bir tüpte karışım yapılmıştır ve vortekslenmiştir. Bu karışımdan 100 µL alınarak high pure spin filter tüplerine ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında santrifüj içerisinde 15 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra bu tüplere 500 µL Wash Buffer I ilave edilerek 15 sn süre ile 8.000xg'de santrifüjlenmiştir. Alt faz atılarak 500 µL Wash Buffer II ilave edilmiştir. 15 sn süre ile tekrar 8.000xg'de santrifüleme işlemi yapılarak alt faz atılmıştır. Bu sefer 300 µL Wash Buffer II ilave edilerek 2 dk süre ile 13.000xg'de santrifüleme yapılmıştır. 1,5 mL'lik steril ependorf tüpleri altlık olarak kullanılarak 100 µL Elüsyon Buffer ilave edilmiştir ve 1 dk süre ile 8.000xg'de

santrifüjlenmiştir. Alt faz elimine ettiğimiz RNA'dır. Örnekler üzerinde kantitatif analiz yapılmıştır.

### **3.3.20. RNA'nın kantitatif analizi**

260 nm ve 280 nm'deki absorbans oranı RNA ve DNA'nın saflığının değerlendirilmesi için kullanılmaktadır. DNA için bu oran 1,8 civarında ve RNA için bu oran 2,0 civarında ise saf olduğu kabul edilmektedir. İzole edilen RNA'ların kantitatif analizi Epoch™ Multi volume spectrophotometer System ile yapılmıştır. Örnekler temizlenen plate sıralı olarak 2 µL miktarında konulmuştur ve okuma işlemi gerçekleştirilmiştir. Veriler kayıt altına alınmıştır. Örnekler sonraki aşamada gerçekleştirilecek olan cDNA sentezi için -20°C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.3.21. RT-PCR (Reverse transkriptaz) ile cDNA sentezi**

Elde edilen izole total RNA örnekleri buz üzerinde 5 dk tutularak çözünmeleri sağlanmıştır. Ayrıca bu sentez için gerekli olan kimyasallar da buz üzerinde çözülmüştür. Daha sonra hem total RNA örnekleri hem de kimyasallar için mikrosantrifüj işlemi yapılmıştır. Kullanılacak olan kimyasallarla birlikte hacim 20 µL olacağı için 0,2 mL'lik PCR tüpleri kullanılarak bu tüplere 1 µL 50 pmol/µL Anchored Oligo (dT)<sub>18</sub> primer, 11-x µL ddH<sub>2</sub>O ve total RNA'dan x µL konularak hafif pipetaj yapılmıştır. (Toplam örnek miktarı 13 µL olacağı için ddH<sub>2</sub>O miktarı 11-x µL'dir). Hazırlanan karışım 65°C'de 10 dk ısıtılmıştır ve buz üzerinde en az 1 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra kısa süreli (5-10 sn) mikrosantrifüj yapılmıştır ve üzerine 4 µL Transcriptor Reverse Transkriptaz Reaction Buffer, 2 µL 10 mM Deoxynucleotide mix, 0,5 µl Protector RNase Inhibitor, 0,5 µl Transcriptor Reverse Transcriptase ilave edilmiştir. 25°C'de 10 dk, 55°C'de 30 dk ve 85°C'de 5 dk olarak inkübasyon işlemi yapılmıştır. cDNA sentezi bu şekilde tamamlanmıştır ve kantitatif tayin yapılmıştır. Sentezlenen cDNA diğer analizler yapılana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.3.22. Sentezlenen cDNA'nın kantitatif analizi

Sentezlenen cDNA'ların kantitatif analizi Epoch<sup>TM</sup> Multi volume spectrophotometer System ile yapılmıştır. Örnekler temizlenen plate sıralı olarak 2 µL miktarında konulmuştur ve okuma işlemi gerçekleştirilmiştir. Veriler kayıt altına alınmıştır.

### 3.3.23. Real time PCR uygulamaları

Real Time PCR uygulamaları ekspresyon ürününün kantitasyonu amacı için kullanılan hassas moleküler bir yöntemdir. Real time PCR ile RNA örnekleri nitel ve nicel olarak çok kısa sürede incelenebilmekte, çok sayıda düşük hacimli örnekler yüksek güvenilirlik ile çalışılabilmektedir. Real time PCR'da örneklerin analizi reaksiyon esnasında eş zamanlı olarak yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, PCR ürününün UV altında görüntülenmesi gibi ek çalışmalar gereksiz kalmaktadır. Bu çalışmada Roche Light Cycler Nano cihazında real time uygulamaları yapılmıştır. Real time polimeraz zincir reaksiyonu veri analizi için  $2^{-\Delta\Delta CT}$  yöntemi kullanılmıştır (Livak and Schmittgen 2001). Çizelge 3.2'de çalışmada kullanılan real time PCR reaksiyon karışımı (bir tüp için) verilmiştir. Çizelge 3.3'de PCR protokolü verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Çalışmada kullanılan real time PCR reaksiyon karışımı

<b>Kullanılan Materyal</b>	<b>Hacim (µL)</b>
Master Mix	10
F primer	0,25
R primer	0,25
Prop	0,15
cDNA	5
dH <sub>2</sub> O	4,35

**Çizelge 3.3.** Çalışmada izlenen real time PCR protokolü

Denatürasyon	95°C 10 dk
Amplifikasyon (45 döngü)	95°C 15 sn
	60°C 45 sn

Çalışmada kullanılan Grin2c ve Slc1a2'ye ait primer ve prop dizilimleri Çizelge 3.4'te verilmiştir.

**Çizelge 3.4.** Çalışmada kullanılan primer ve prop dizilimleri

Grin2c	Forward Primer	ATACCAATCCCAGCAGCATC
	Revers Primer	TGTCCACGTTGTCCTCAAAG
	Tagman Prop	Fam-CAAATCTGCGGGCTTCTGGGTG-Tamra
Slc1a2	Forward Primer	AGGAATCATGTCACCCAAGC
	Revers Primer	TGTGGGAATCTGGTGAACA
	Tagman Prop	Fam-TGCATCCAGCATGGTGGGAC-Tamra

Housekeeping gen olarak Southampton, UK tarafından primer dizaynı yapılan  $\beta$ -actin (Actb) (Rn00667869-m1) hazır olarak kullanılmıştır.

### 3.3.24. Verilerin istatistiksel analizi

Verilerin analizi IBM SPSS 23,0 bilgisayar programı ile yapılmıştır. Elde edilen veriler tek faktörlü varyans analizi olan One-Way Anova yöntemi ile değerlendirilmiştir ve Tukey testi kullanılarak karşılaştırılmıştır.

#### 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA

##### 4.1. Karadut Su ve Alkol Ekstraktları İçin Yapılan Dalga Boyu Tarama Sonuçları

Çalışmada kullanılan ekstraktların  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküller üzerine immobilizasyonuna yönelik spektrofotometrik ölçümler sırasındaki her bir ekstrakta özgü dalga boyunun belirlenmesi için 200-900 nm arasında dalga boyu taraması yapılmıştır. Ölçümlerde kör numune olarak saf su kullanılmıştır. Dalga boyu tarama verilerine göre elde edilen her materyale özgü kullanılan dalga boyları ve bu dalga boylarında okunan absorbans değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Materyallere özgü kullanılan dalga boyları

<b>Kullanılan materyal</b>	<b>Dalga boyu tarama aralığı (nm)</b>	<b>Kullanılan Dalga Boyu (nm)</b>
Karadut /Su	190-900	258 nm
Karadut/Alkol	190-900	596 nm

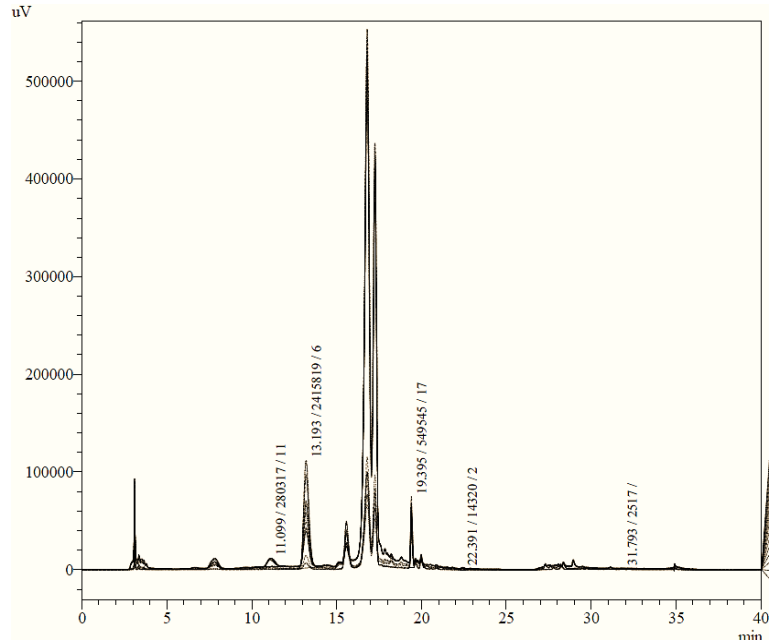
Kutlu vd (2001) tarafından yayınlanan çalışmada karadutun asitlendirilmiş metanol, asitlendirilmiş su ve asitlendirilmemiş metanol/su karışımı ekstraksiyonları hazırlanmıştır. Bu ekstraksiyonların UV-vis spektrofotometre kullanılarak 200-800 nm arasında dalga boyu taraması yapılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre ekstraktlar UV-vis spektrumlarında ~280 ve ~520 nm dalga boyu bölgelerinde başlıca iki pik vermiştir. Bu veriler antosiyaninlerin UV spektrumlarındaki piklerle yakınlık göstermektedir (500-600 nm) (Harborne 1998). Bizim bulgularımız bu değerlere yakınlık göstermektedir. Karadutun alkol ekstraksiyonunun daha yüksek absorbans değerinde pik vermesi antosiyaninlerin çözünürlüğünün metanole göre suda daha düşük olarak gerçekleşmesi nedeniyle açıklanabilmektedir (Kähkönen and Heinonen 2003).

#### 4.2. Karadut İçin Yapılan HPLC Analizindeki Veriler

Karadut alkol ekstraktı için yapılan HPLC analiz sonuçları Çizelge 4.2’de ve karadut alkol ekstraktına ait HPLC kromotogramı Şekil 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Karadut alkol ekstraktı için HPLC analiz sonuçları

İsim	Alkoyma Süresi	Alan	Yükseklik	Conc.	Birim
Kateşin	11.099	280317	8653	22.866	mg/L
Klorojenik	13.193	2415819	110060	40.711	mg/L
Rutin	19.395	549545	72992	15.989	mg/L
Kuersetin	22.391	14320	1472	0.190	mg/L



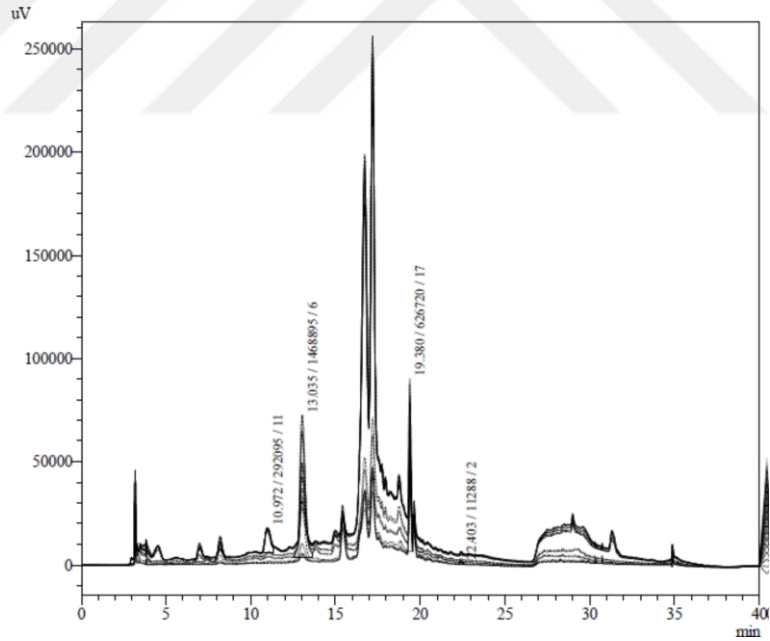
Şekil 4.1. Karadut alkol ekstraktına ait HPLC kromotogramı



Karadut su ekstraktı için yapılan HPLC analiz sonuçları Çizelge 4.3’de ve karadut su ekstraktına ait HPLC kromotogramı Şekil 4.2’de verilmiştir.

**Çizelge 4.3.** Karadut su ekstraksiyonu için HPLC analiz sonuçları

İsim	Alıkoyma Süresi	Alan	Yükseklik	Conc.	Birim
Kateşin	10.972	292095	12161	23.827	mg/L
Klorojenik	13.035	1468895	68902	24.701	mg/L
Rutin	19.380	626720	83470	18.213	mg/L
Kuersetin	22.403	11288	1198	0.152	mg/L



**Şekil 4.2.** Karadut su ekstraktının HPLC kromotogramı

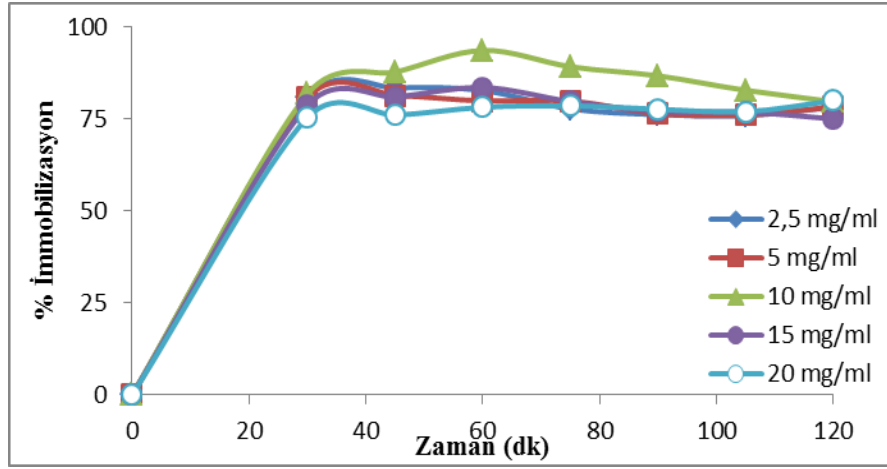
Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3 birlikte incelendiğinde kateşinin, rutin ve kuersetinin karadut alkol ekstraktında ve karadut su ekstraktında birbirine yakın konsantrasyonlarda

bulunduğu ancak klorojenik asidin karadut su ekstraktından ziyade karadut alkol ekstraktında daha fazla bulunduğu anlaşılmaktadır.

Gündoğdu vd (2011) tarafından yapılan çalışmada çeşitli dutların (*Morus nigra*, *Morus alba*, *Morus rubra*) HPLC ile fenolik maddeleri incelenmiştir. Kateşin, klorojenik asit, rutin, kuersetin gibi bazı fenolik maddeler açısından elde edilen veriler 3 tür dut için karşılaştırılmalı olarak verilmiştir. Bu alışmada *Morus nigra*'da  $0.113 \pm 0.021$  mg/g fw kuersetin,  $1.423 \pm 0.036$  mg/g fw rutin,  $0.075 \pm 0.000$  mg/g fw kateşin,  $3.106 \pm 0.004$  mg/g fw klorojenik asit bulunmuştur.

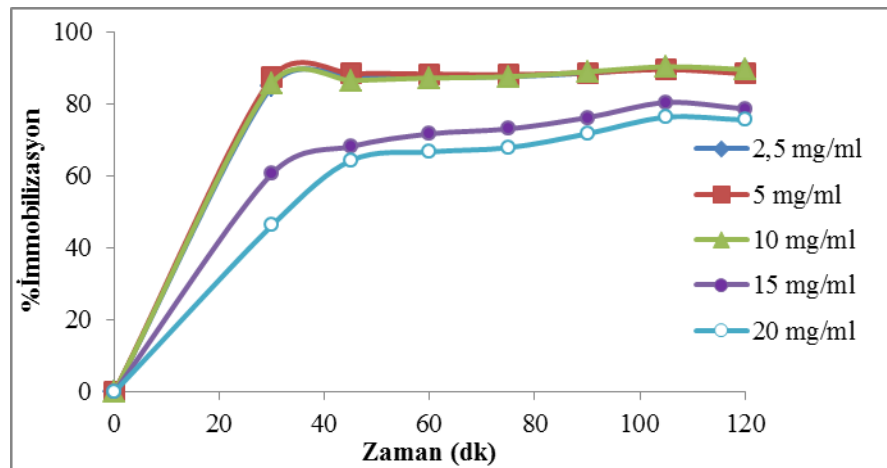
#### **4.3. Karadut Ekstraktlarının $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanopartikülleri zerine İmmobilize Edilmesinde Optimum İmmobilizasyon Süresi ve Optimum Materyal Konsantrasyonu alışmalarının Sonuçları**

İmmobilizasyon işlemi belirli konsantrasyonlarda (2,5, 5, 10, 15, 20 mg/mL) hazırlanan materyallerin 0,01 gr  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartikül ile aynı beher içerisinde 2 saat boyunca manyetik karıştıricıda karıştırlmasıyla gerçekleştirilmiştir. 15. dk ve bu zaman diliminden sonraki her 15 dk'da bir spektrofotometrik ölçüm alınmıştır. şekil 4.3'de karadut sulu ekstraktına şekil 4.4'te ise karadut alkol ekstraktına ait immobilizasyon süresi ve materyal konsantrasyonu optimizasyon çalışmalarına yönelik grafikler sunulmuştur. Çizelge 4.4'te ise kullanılan her materyal için belirlenmiş olan optimum immobilizasyon süresi ve optimum materyal konsantrasyonu verilmiştir.



**Şekil 4.3.** Karadut su ekstraktına ait konsantrasyona bağımlı zamana karşı % immobilizasyon oranları

Şekil 4.3 incelendiğinde karadut su ekstraktının bütün konsantrasyonları 30. dk'da yaklaşık %80 immobilizasyon oranı ile ortak bir sonuç sağladıkları görülmektedir. Ancak bütün konsantrasyonlardaki karadut su ekstraktları özellikle 60.dk'dan sonra immobilizasyon oranında bir azalma göstermektedir. 60. dk'dan sonra ise bütün konsantrasyonlarda immobilizasyon oranında az da olsa düşüş gözlenmektedir. 10 mg/mL konsantrasyondaki karadut su ekstraksiyonu 60. dk'da %93,7'lik immobilizasyon oranı ile öne çıkmıştır.



**Şekil 4.4.** Karadut alkol ekstraktına ait konsantrasyona bağımlı zamana karşı % immobilizasyon oranları

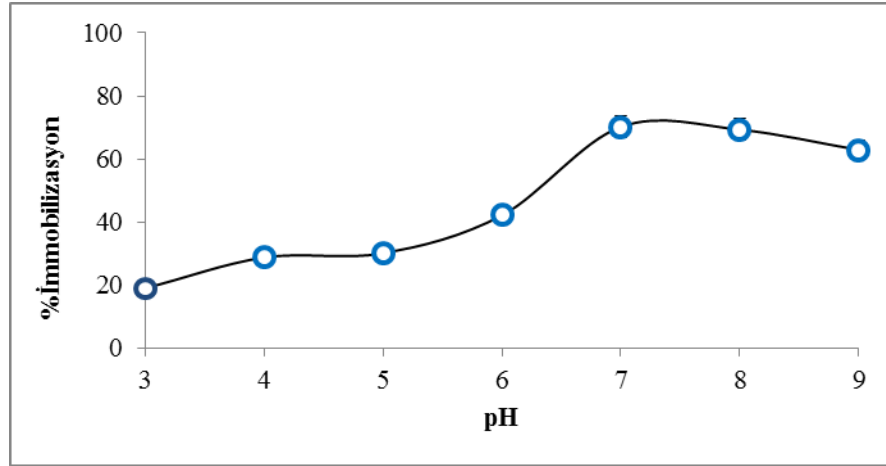
Şekil 4.4 incelendiğinde 30. dk'da 2,5 mg/mL, 5 mg/mL ve 10 mg/mL konsantrasyondaki karadut alkol ekstraktlarının %85'in üzerinde immobilizasyon oranı gösterirken 15 mg/mL ve 20 mg/mL konsantrasyonundaki karadut alkol ekstraktlarının sırasıyla yaklaşık %60 ve %45 immobilizasyon oranı gösterdikleri görülmektedir. 45.dk ile 100.dk arasında bütün konsantrasyonlarda % immobilizasyon oranlarında az da olsa artış gözlenmektedir. Ancak 120. dk'da bütün konsantrasyonlardaki ekstraktların immobilizasyon oranlarında düşüş olmuştur. Elde edilen veriler doğrultusunda 10 mg/mL konsantrasyonundaki karadut su ekstraktıyla uyumlu olarak 10 mg/mL karadut alkol ekstraktının çalışma için uygun olacağı ve yüksek verimde immobilizasyon için 60 dk sürenin yeterli olduğu görüşü tarafımızdan kabul edilmiştir.

**Çizelge 4.4.** Kullanılan materyallerinin belirlenmiş olan optimum immobilizasyon süreleri ve optimum materyal konsantrasyonları

Materyal	Karadut Ekstraktları	
	Su	Alkol
İmmobilizasyon süresi	60 dk	60 dk
Materyal konsantrasyonu	10 mg/mL	10 mg/mL

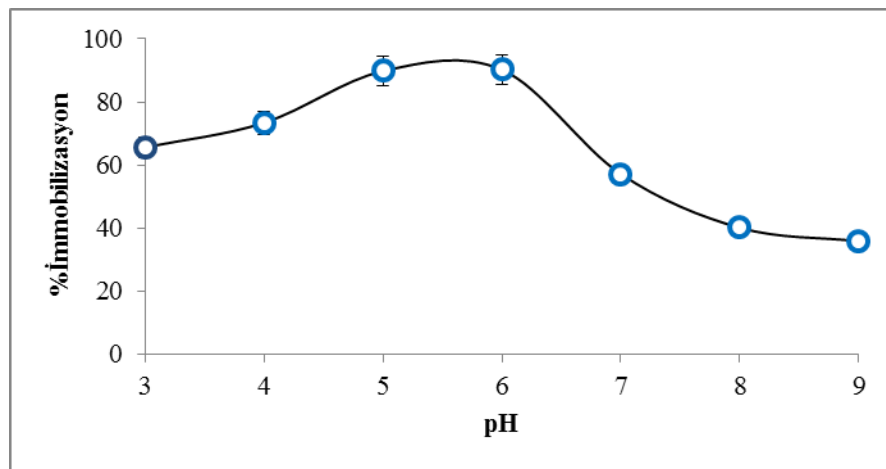
#### 4.4. Karadut Ekstraktlarının $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanopartikülleri Üzerine İmmobilize Edilmesinde Optimum pH ve Optimum Sıcaklık Çalışmalarının Sonuçları

İmmobilizasyonun maksimum düzeyde gerçekleştiği ortam pH değerinin bulunması için pH optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. pH optimizasyon çalışmalarında pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0 ortamlarında immobilizasyonlar gerçekleştirilmiştir. Numune olarak saf su kullanılmıştır. Şekil 4.5'de karadut su ekstraktı, Şekil 4.6'de karadut alkol ekstraktına ait pH optimizasyon çalışmalarında elde edilen % immobilizasyon-pH grafikleri verilmiştir. Çizelge 4.5'de ise pH optimizasyon çalışmalarından sonra karadut alkol ve su ekstraktlarının sabit immobilizasyonunda belirlenen optimum pH değerleri verilmiştir.



**Şekil 4.5.** Karadut su ekstraktına ait pH değerlerine karşı % immobilizasyon oranları

Şekil 4.5’de görüldüğü gibi 10 mg/mL konsantrasyondaki karadut su ekstraktı ile immobilizasyonda ortam pH 7,0 ve pH 8,0 olduğunda diğer ortam pH değerlerine göre oldukça yüksek % immobilizasyon oranları elde edilmiştir (Sırasıyla, %70,2 ve %69,32). pH 3,0 ve pH 6.0 arasında % immobilizasyon oranında gittikçe bir artış gözlenmesine rağmen bu oranların en yükseği %42,15 olmuştur. pH 7,0 değerinden önceki ortam pH değerlerinde %50 immobilizasyona ulaşılammıştır. pH 7,0 ortamında en yüksek immobilizasyon oranı elde edilirken pH 7,0 üzerinde ise immobilizasyon oranında tekrar bir azalma meydana gelmiştir.



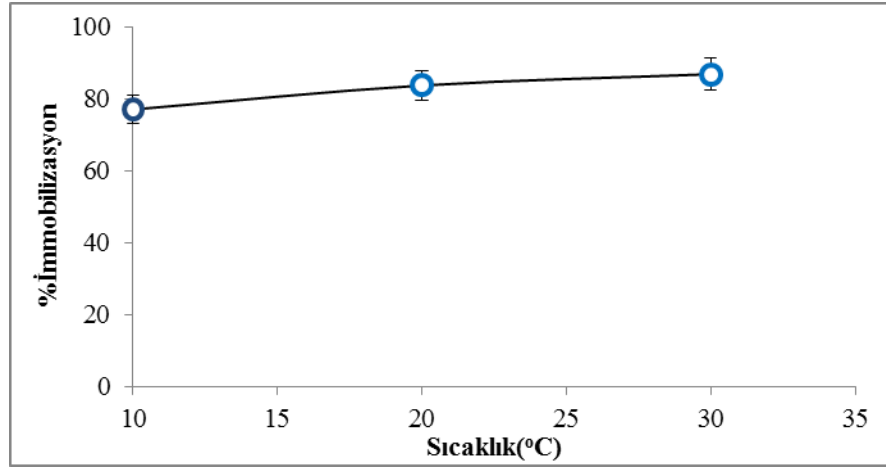
**Şekil 4.6.** Karadut alkol ekstraktına ait pH değerlerine karşı % immobilizasyon oranları

Karadut alkol ekstraktının  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküllerine immobilizasyonu üzerine ortam pH'sının etkileri araştırıldığında elde edilen verilere göre pH 5,0 ve pH 6,0 değerlerinde immobilizasyon oranının %85'in üzerinde olduğu belirlenmiştir. Ancak ortam pH değeri pH 6,0'dan yükseldikçe immobilizasyon oranı yaklaşık %35'e kadar düşüş göstermiştir. pH 6,0 nötr pH'ya yakınlığı ve %90,21 immobilizasyon oranı göstermesi nedeniyle tercih edilmiştir.

**Çizelge 4.5.** Çalışmada kullanılan materyallere ait belirlenmiş optimum pH değerleri

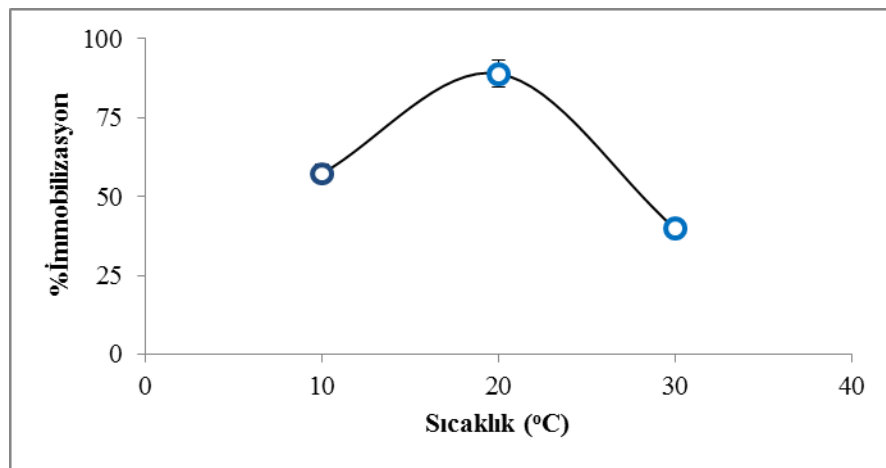
Materyal	Karadut Ekstraktları	
	Su	Alkol
Optimum pH	7.0	6.0

İmmobilizasyonun maksimum verimle gerçekleştiği optimum ortam sıcaklığını belirlemek için 10°C, 20°C ve 30°C'deki sıcaklıklarda immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. 30°C'nin üzerindeki sıcaklıklar denenmemiştir. Çünkü materyaller sıcaklığa duyarlı olduğundan dolayı çalışmamız için gerekli olan bileşenlerin denatüre olma ihtimali vardır. Şekil 4.7'de karadut su ekstraktı, Şekil 4.8'de karadut alkol ekstraktına ait sıcaklık optimizasyon çalışmalarında elde edilen grafikler verilmiştir. Çizelge 4.6'da ise sıcaklık optimizasyon çalışmalarında her materyal için kabul edilen optimum sıcaklık değerleri verilmiştir.



**Şekil 4.7.** Karadut su ekstraktına ait sıcaklığa karşı % immobilizasyon oranları

10°C, 20°C, 30°C ortam sıcaklıklarında gerçekleştirilen immobilizasyon çalışmalarında her 10°C'lik artışta % immobilizasyon oranında artış gözlenmiştir. 10°C, 20°C ve 30°C'lik ortam sıcaklıklarında sırasıyla %77,13, %83,8, %86,94 immobilizasyon oranları elde edilmiştir. Bu veriler oda sıcaklığı olan 25°C'de immobilizasyon oranının en az %80'nin üzerinde olacağını göstermektedir. Bu ekstra bir ortam sıcaklığı için herhangi bir enerji harcaması gerekmediği için avantajlı bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır.



**Şekil 4.8.** Karadut alkol ekstraktına ait sıcaklığa karşı % immobilizasyon oranları

Karadut alkol ekstraktının farklı ortam sıcaklıklarındaki elde edilen immobilizasyon oranları karadut su ekstraktı için yapılan çalışma verileri ile farklılık göstermektedir. Karadut su ekstraktında sıcaklık artışıyla immobilizasyon oranları paralel bir artış gösterirken karadut alkol ekstraksiyonunda 20°C'nin altındaki ve üstündeki sıcaklık değerlerinde immobilizasyon oranlarında ciddi azalmalar meydana gelmiştir. En yüksek immobilizasyon oranı (%88,9) 20°C ortam sıcaklığında elde edilirken en düşük immobilizasyon oranı (%39,72) ile 30°C ortam sıcaklığında gözlenmiştir.

**Çizelge 4.6.** Çalışmada kullanılan materyallere ait belirlenmiş optimum sıcaklık değerleri

Materyal	Karadut Ekstraktları	
	Su	Alkol
Optimum Sıcaklık	30°C	20°C

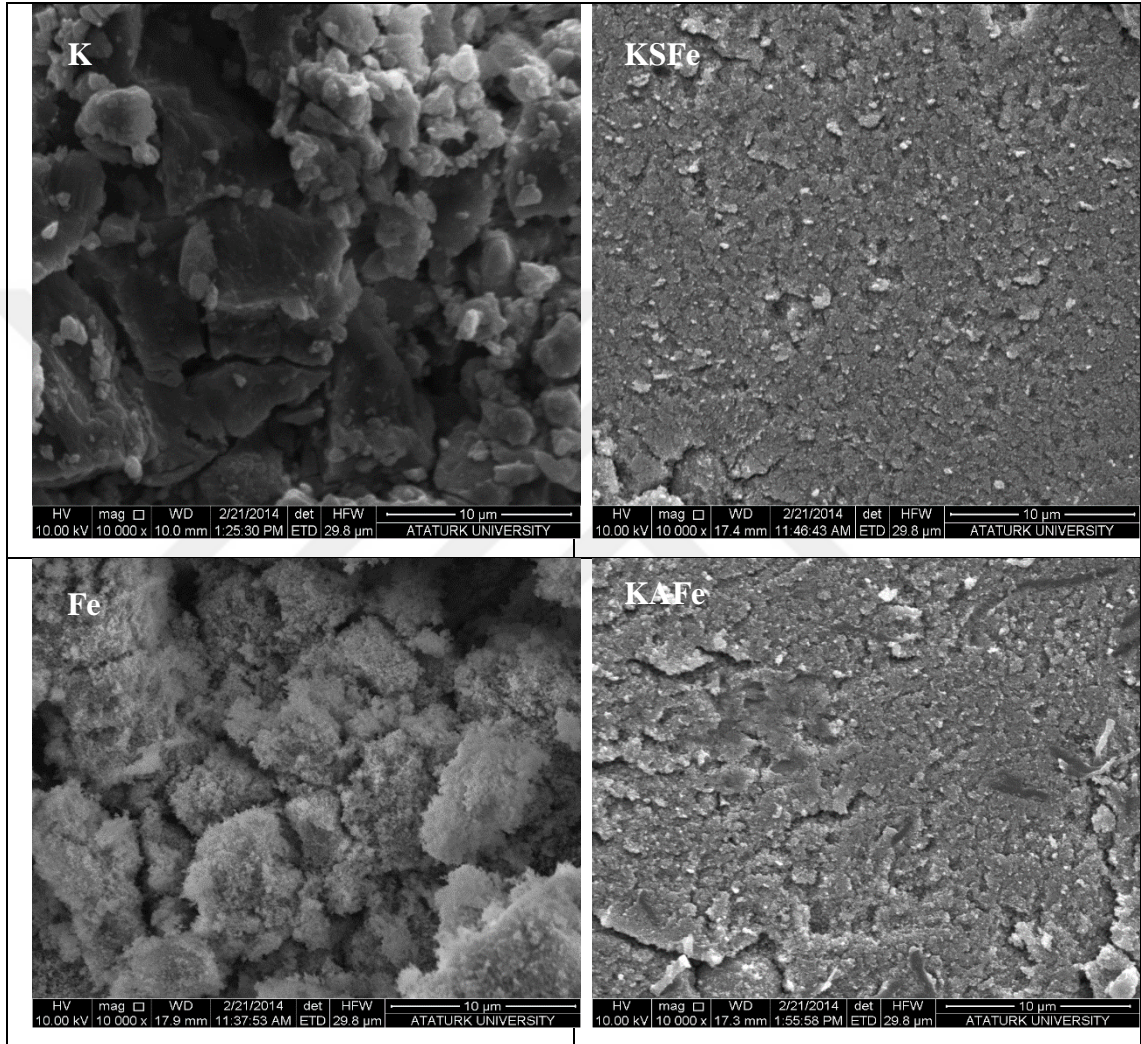
#### 4.5. Karadut, $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ve Karadut İmmobilize Edilmiş $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanopartiküllerinin SEM, EDX, FT-IR Karakterizasyonu

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) tungsten uçtan kaynaklanan elektronların incelenen numune üzerine düşürülmesi ile oluşan etkileşimlerin toplanması ve incelenmesi esasına göre çalışır. Bu şekilde incelenen numunenin yüzey topografisi, yapısı hakkında bilgi sahibi olunmaktadır. Karadut,  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ve karadut immobilize edilmiş  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri Şekil 4.9'da verilmiştir.

SEM görüntüleri 10000x büyütme ile 10  $\mu$ m boyutunda alınmıştır. Karadut (K) için alınan SEM görüntüsünde dağınık olarak dağılmış ve parçalanmış bloklar göze çarpmaktadır.  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Fe) için alınan SEM görüntüsünde ise birbiri üzerine yığılmış yumuşak toz parçacıklarını andıran bir yapı yer almaktadır. Karadut su ekstraktı immobilize edilmiş  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküllerine (KSF<sub>e</sub>) ait görüntüde Fe grubunun yumuşak toz parçacıklarının dağınık blokları birleştirip düzgün ve büyük bir blok oluşturduğu, karadut alkol ekstraktı immobilize edilmiş  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküllerine



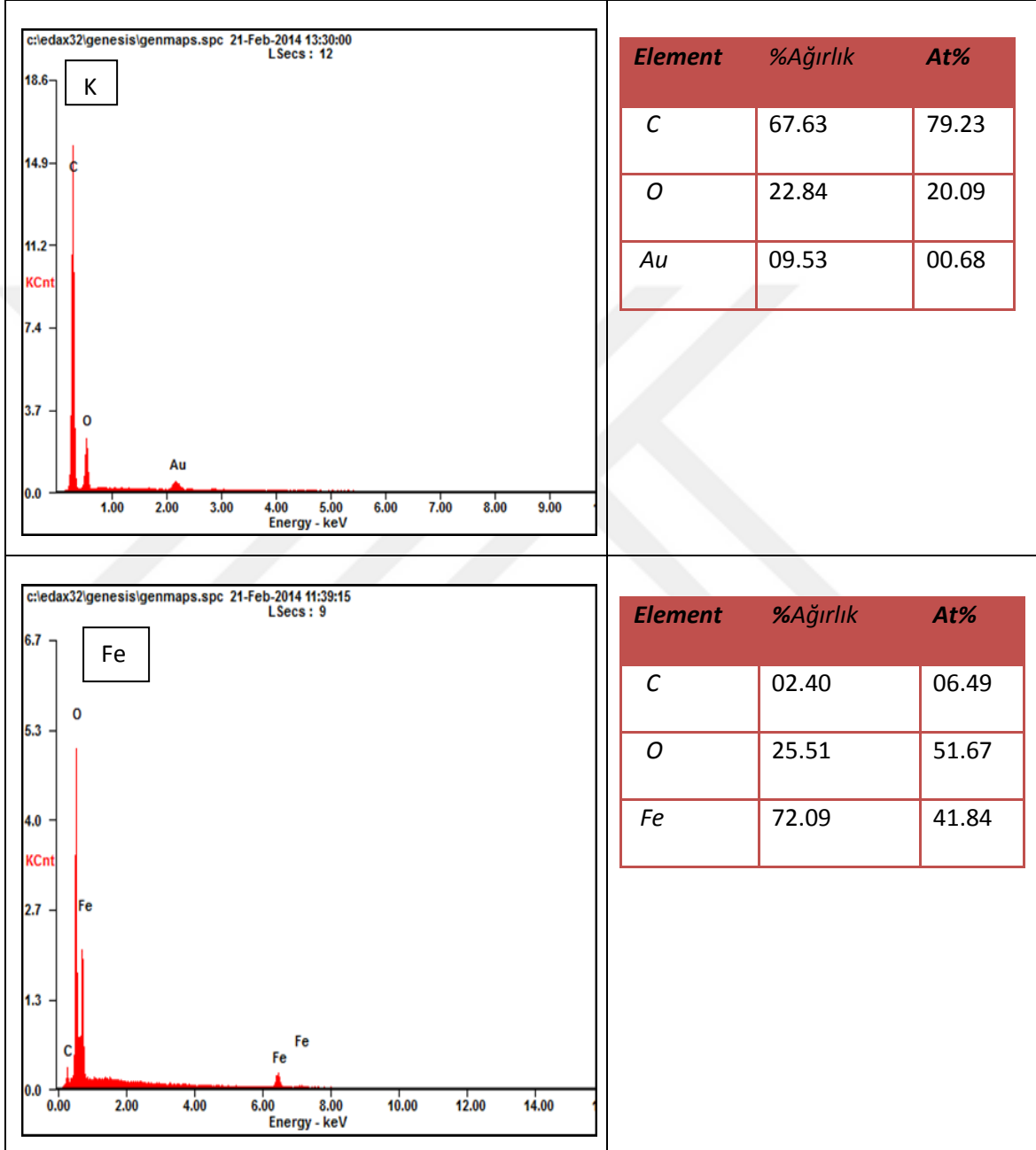
(KAFe) ait görüntüde ise Fe grubunun yine bazı kırılmaları ve çatlaklarıyla birlikte aynı bloğu oluşturduğu görülmektedir.



**Şekil 4.9.** Karadut (K) ,  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Fe), karadut su ekstraktı immobilize edilmiş  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartikülleri (KSFe) ve karadut alkol ekstraktı immobilize edilmiş  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküllerine (KAFe) ait SEM görüntüleri

Enerji Dağılımı X-ışını analizi (EDX) ile incelenen numunelerin elemental kompozisyonunun tanımlanması mümkün olmaktadır. EDX analizi ile oluşturulan veriler analiz edilen numunenin gerçek kompozisyonunu oluşturan elementlere karşılık gelen pikleri gösteren spektrumdan oluşmaktadır. Şekil 4.10'da karadut ve  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'a ait

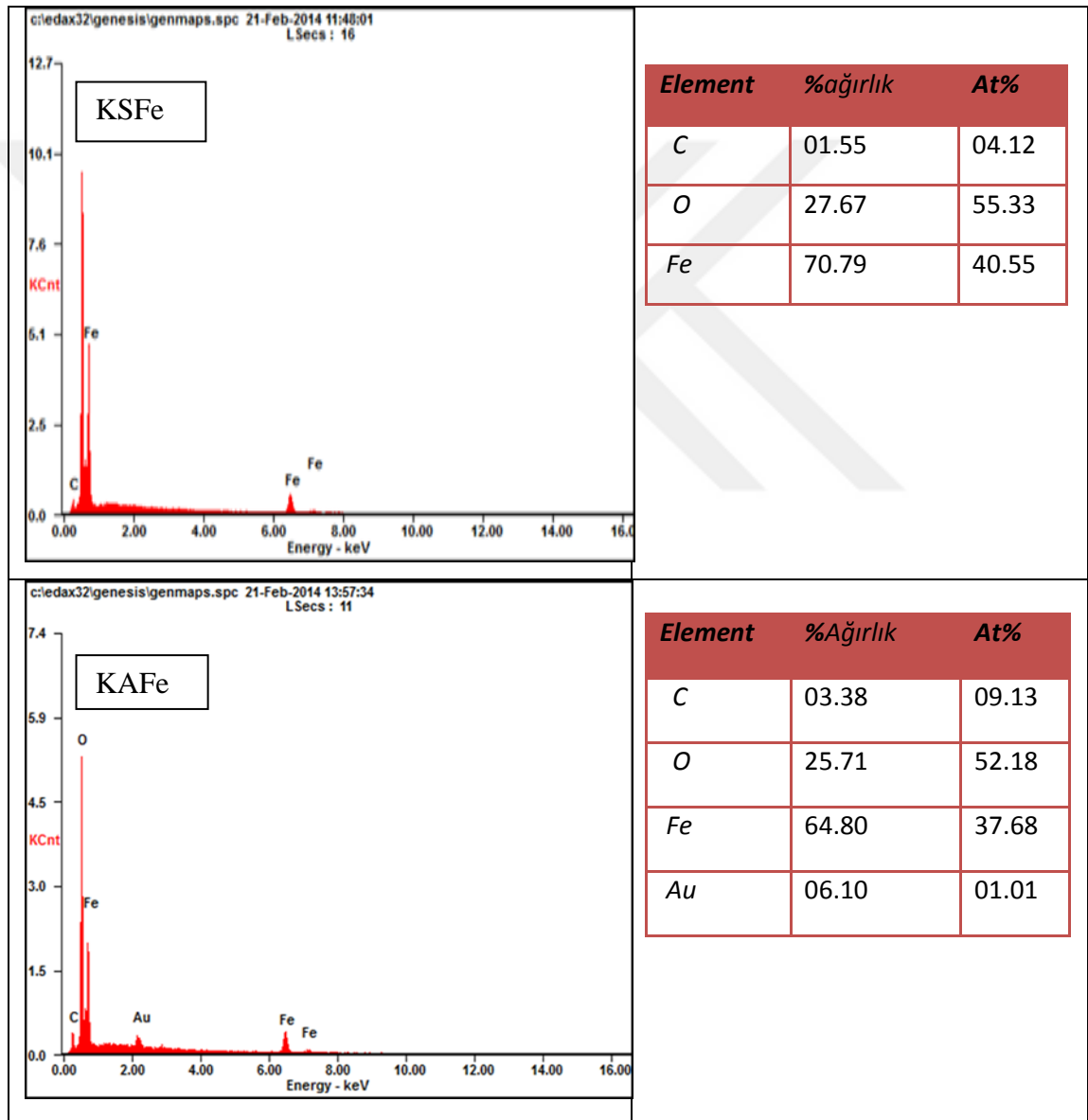
EDX spektrumları ve Şekil 4.11'de karadut su ekstraktı+  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ve karadut alkol ekstraktı+  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'a ait EDX spektrumları verilmiştir.



Şekil 4.10. Karadut (K) ,  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Fe) ait EDX spektrumları ve verileri

K grubu için alınan EDX spektrumunda C, O ve Au elementlerinin pik verdiği görülmektedir. C atomu %67,63'lik oran ile örnekte en fazla miktarda bulunan element

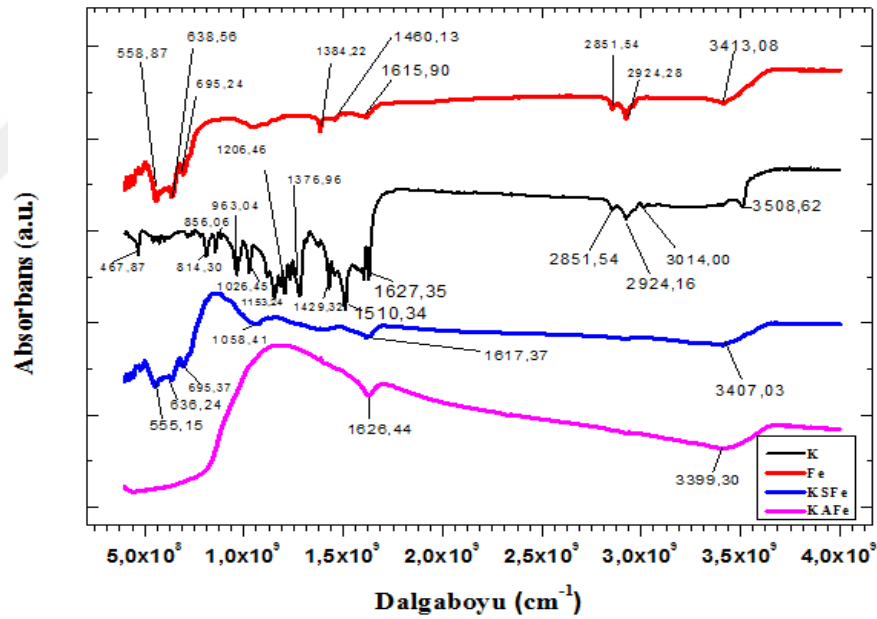
olarak karşımıza çıkmaktadır. Fe grubu için alınan EDX spektrumunda Fe, O ve C elementleri pik vermiştir. Numune  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  olduğu için O elementi daha yüksek pik vermesi beklenen bir analiz olmuştur. Fe atomunun numarası 26 g/mol olduğundan dolayı % ağırlık oranında O (16 g/mol) elementine göre daha yüksek bir orana sahip olmuştur.



**Şekil 4.11.** Karadut su ekstraktı immobilize edilmiş  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  nanopartiküller (KSFes) ve karadut alkol ekstraktı immobilize edilmiş  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  nanopartiküllerine (KAFes) EDX grafikleri ve verileri

KSFe grubuna ait EDX spektrumunda Fe grubuna ait EDX spektrumunda gözlenen pikler görülmektedir. Ancak elementlerin oranlarında farklılıklar bulunmaktadır. K grubunda pik veren Au elementi KAFe grubuna ait EDX spektrumunda da pik vermiştir. C elementi K grubunda baskın olarak pik verirken, immobilize gruplarda çekinik olarak pik vermiştir.

Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR) ile  $4000-450\text{ cm}^{-1}$  IR (kızılötesi-infrared) alanında ölçüm yapılarak numunelerin moleküllerindeki çeşitli bağların titreşim frekanslarını ölçmek suretiyle numunedeki fonksiyonel gruplar hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir. Şekil 4.12’de K, Fe, KSFe, KAFe’e ait FTIR spektrumları verilmiştir.

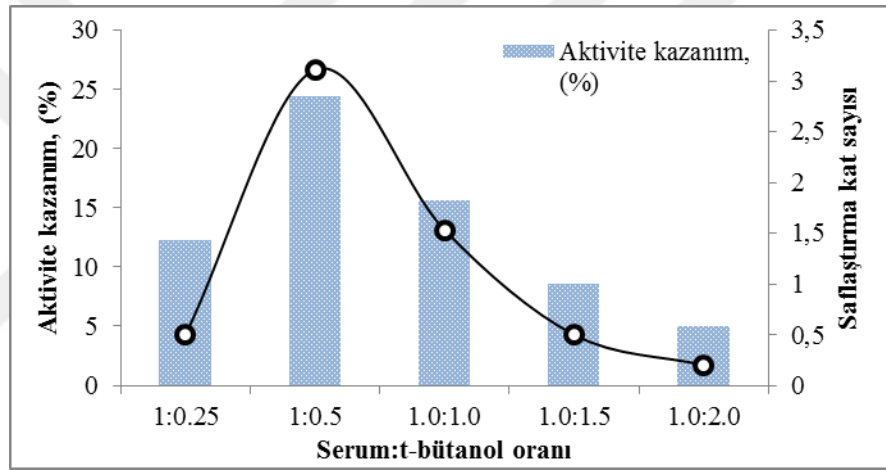


Şekil 4.12. K, Fe, KSFe, KAFe’e ait FTIR spektrumları

Şekil 4.12’de  $1870-1650\text{ cm}^{-1}$  değerleri arasındaki alanlarda C=O,  $3640-3250\text{ cm}^{-1}$  değerleri arasındaki alanlarda O=H,  $1160-1030\text{ cm}^{-1}$  değerleri arasındaki alanlarda C-OH,  $1665-1635\text{ cm}^{-1}$  değerleri arasındaki alanlarda C=C cis-izomer,  $1675-1665\text{ cm}^{-1}$  değerleri arasındaki alanlarda C=C trans-izomer gerilmeleri,  $610-545\text{ cm}^{-1}$  değerleri arasındaki alanlarda SO<sub>2</sub> makasları bulunmaktadır.

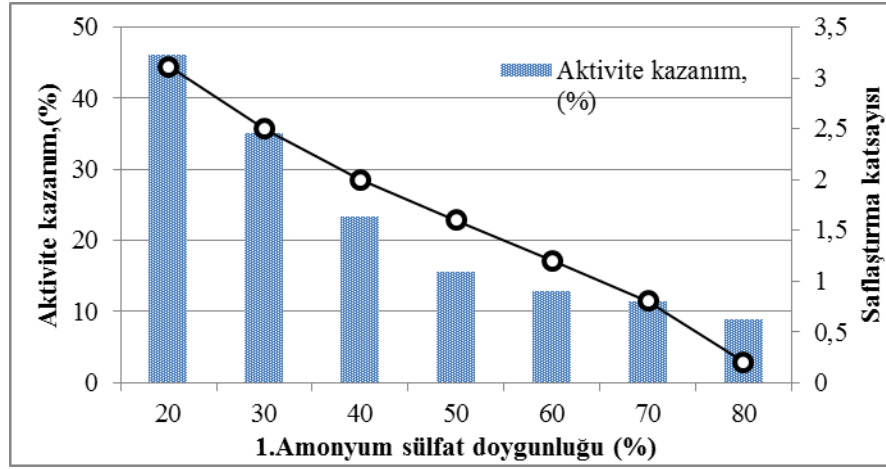
#### 4.6. Paraoksanoz Enzim Safılaştırılma Basamaklarına Ait Sonuçlar

Şekil 4.13’de n-bütanol optimizasyonuna ait Şekil 4.14’de birinci amonyum sülfat optimizasyonuna Şekil 4.15’de ise ikinci amonyum sülfat optimizasyonuna ait çalışmalarda elde edilen grafikler verilmiştir. Amonyum sülfat optimizasyonu sonrasında %20 amonyum sülfat oranı en uygun oran olarak belirlenmiştir. %20 amonyum sülfat oranlı örnek tekrar 2. Amonyum sülfat optimizasyonuna tabi tutulmuştur.



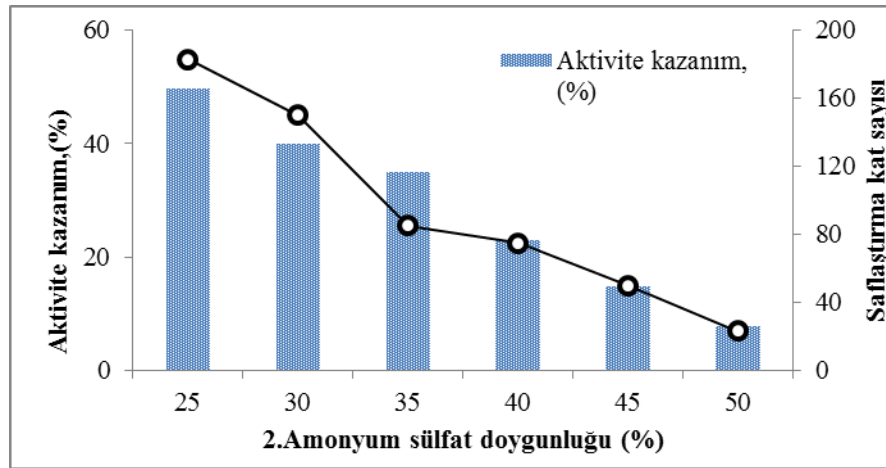
**Şekil 4.13.** PON1 enziminin saflaştırılması çalışmalarındaki n-bütanol optimizasyonu

Paraoksanaz enziminin saflaştırılmasında kullanılan insan serumu hacmine göre 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0 oranlarında n-bütanol kullanılmıştır. Yapılan aktivite ölçümlerinde paraoksanaz enzimi için maximum aktivite değeri (51,89) veren n-bütanol oranı Şekil 4.13’de görüldüğü gibi 1,0:0,5 oranı olmuştur. 1,0:2,0 oranındaki n-bütanol kullanımı aktiviteyi oldukça olumsuz etkilemiştir ve minimum aktivite değeri (2,62) vermiştir.



**Şekil 4.14.** PON1 enziminin saflaştırılması çalışmalarındaki 1. Amonyum sülfat optimizasyonu

Şekil 4.14. incelendiğinde paraoksonaz enziminin saflaştırılmasında toplam hacmin (serum ve n-bütanol) %20'lik amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen enzimin aktivitesi en yüksek değeri verdiği görülmektedir. %60 ve %70'lik amonyum sülfat çöktürmeleri ile enzim aktivitelerinde paralel giden bir azalma meydana gelmiştir.



**Şekil 4.15.** PON1 enziminin saflaştırılması çalışmalarındaki 2. Amonyum sülfat optimizasyonu

Aktivite ölçümlerinde en iyi sonucu veren %20'lik amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış örnek ikinci defa amonyum sülfat çöktürmesine tabi tutulmuştur. Bu aşamada

%25, %30, %35, %40, %45, %50'lik amonyum sülfat çöktürmeleri denenmiştir. %25'lik ikinci amonyum sülfat çöktürmesi en yüksek aktivite değerini vermiştir.

#### 4.7. ÜFA ile Saflaştırılan İnsan Serum Paraoksonaz Enzimi (PON1) için Saflaştırma ve Verim Profili

ÜFA ile paraoksonaz enziminin saflaştırılma aşamalarında hem aktivite tayini hem de protein tayini yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen veriler ile aktivite, toplam aktivite, spesifik aktivite, saflaştırma katsayısı, % verim gibi parametreler hesaplanmıştır. Çizelge 4.7'de ÜFA ile saflaştırılmış olan PON1'e ait hesaplanmış parametreler verilmiştir.

**Çizelge 4.7.** ÜFA ile saflaştırılan insan serum PON1'e ait saflaştırma ve verim profili

Basamaklar	Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Toplam Aktivite (EU/mL)	%	Spesifik Aktivite (EU/mL)	Protein (mg protein / mL)	Saflaştırma Katsayısı
Serum	50	821,42	$4,11 \cdot 10^4$	-----	0,088	$9,32 \cdot 10^3$	-----
A. Sülfat (%60-80)	15	1216,22	$1,82 \cdot 10^4$	24,42	2,85	427	2,53
1.ÜFA	15	1266,69	$1,9 \cdot 10^4$	46,23	7,24	175	3,11
2.ÜFA	15	1368,63	$2,05 \cdot 10^4$	49,87	575,8	2,377	182,66

Sinan vd (2006a) tarafından yapılan çalışmada paraoksonaz 1 enzimi amonyum sülfat çöktürmesi (%60-80), Sefaroz 4B, L-tirozin ve 1- naftilamin içeren hidrofobik interaksiyon kromatografisi ile insan serumundan saflaştırılmıştır. Saflaştırılan PON1 enzimiyle ilgili olarak 1730,45 U/mg spesifik aktivite, %72,54 verim, 227 kat saflaştırma değerleri elde edilmiştir.

Demir vd (2008) tarafından yapılan çalışmada paraoksonaz enzimi sefaroz-4B-L-tirosin-1-naftilamin afinite kromatografisi kullanılarak insan serumundan saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzime dair yapılan aktivite ölçümlerinde 0,616 EU/mL



aktivite, 5,69 EU toplam aktivite, %19,29 verim, 7,51 EU/mg, 1797,18 saflaştırma katsayısı elde edilmiştir.

Samra *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmada paraoksonaz enzimi Triton X-100 ve amonyum sülfat çöktürmesi (%60-%70), Tris-HCl (pH 8,0, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) tamponuna karşı 2 saat diyaliz ve kolesterol konjuge edilmiş Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartikül afinitesi, Sephadex-G75 kolonu işlem sırası uygulanarak insan serumundan saflaştırılmıştır. Elde edilen saflaştırılmış enzim ile ilgili olarak 0,89 mg protein, 390 U toplam aktivite, 438,20 U/mg spesifik aktivite, 72,89 %verim ve 515,52 saflaştırma katsayısı verileri elde edilmiştir.

Erzengin vd (2012) tarafından yayınlanan çalışmada insan serumundan PON1 enzimi %60-80 oranından amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemleri ile saflaştırılmıştır. %60-80 amonyum sülfat çöktürmesinde yapılan enzim aktivite ölçümlerinde 83,588 U/mL aktivite, 1,504,58 U toplam aktivite, 0,0783 U/mg spesifik aktivite, %45,37 verim ile 1,74 saflaştırma katsayısı elde edilmiştir. Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile 131,404 U/mL aktivite, 394,21 U toplam aktivite, 11,76 U/mg spesifik aktivite, %11,89 verim ile 150,19 saflaştırma katsayısı elde edilmiştir.

Demir vd (2016) tarafından yayınlanan çalışmada paraoksonaz 1 enzimi amonyum sülfat çöktürmesi (%60-80), hidrofobik interaksyon kromatografisi yöntemleri ile insan serumundan saflaştırılmıştır. Saflaştırılan PON1 enzimi ile ilgili olarak son aşamada 440,84 EU/mL.dak aktivite, 881,68 EU toplam aktivite, 0,0002 mg protein, 219,14 saflaştırma katsayısı, %10 verim değerleri elde edilmiştir.

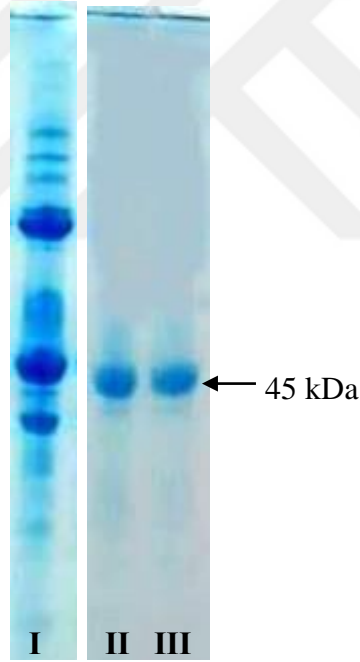
Bizim çalışmamızda insan serumundan ÜFA yöntemi ile saflaştırılan PON1 enzimiyle ilgili olarak yapılan aktivite ve protein ölçümleri dikkate alınarak yapılan hesaplamalarda %60-80 amonyum sülfat çöktürülmesi basamağında 1216,22 EU/mL enzim aktivitesi,  $1,82 \times 10^4$  EU/mL toplam aktivite, 2,85 EU/mL spesifik aktivite, 427 mg/mL protein, 2,53 saflaştırma katsayısı ve %24,42 verim %24,42 verim, 2,53 saflaştırma katsayısı elde edilmiştir. 2. ÜFA aşamasında saflaştırılmış PON1 enzimiyle



ilgili olarak 1368,63 EU/mL enzim aktivitesi,  $2,05 \times 10^4$  EU/mL toplam aktivite, 575,8 EU/mL spesifik aktivite, 2,377 mg/mL protein, 182,66 saflaştırma katsayısı ve %49,87 verim elde edilmiştir. İyon değişim kromatografisinde %48,56 verimle 25,95 saflaştırma katsayısı elde edilmişken ÜFA'nin ikinci aşamasında %49,87 verimle 182,66 saflaştırma katsayısı elde edilmiştir.

#### 4.8. İnsan Serum Paraoksonaz Enziminin SDS-PAGE Sonuçları

Şekil 4.16'de insan serumundan ÜFA yöntemi ile saflaştırılan PON1'e ait SDS-PAGE görüntüsü verilmiştir.

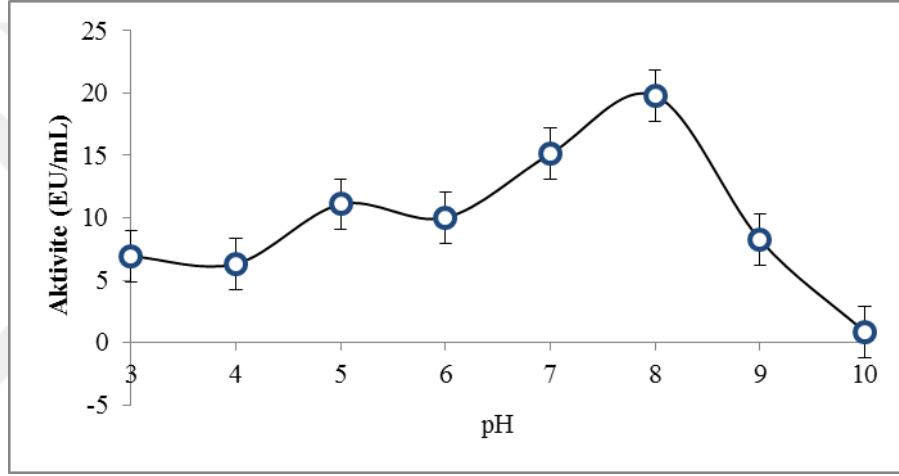


**Şekil 4.16.** ÜFA ile saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü. I: standart protein miyozin (200 kDa),  $\beta$ -galaktosidaz (125 kDa), sığır serum albümini (BSA) (66 kDa), ovalbümin (45 kDa), karbonik anhidraz (29 kDa), lizozim (14.3 kDa) II ve III saflaştırılan PON1 enzimi 45 kDa.

PON1 enzimi için yapılan insan serumundan saflaştırma çalışmalarında molekül ağırlığı tayininde 43-45 kDa arasında değerler bulunmuştur (Sinan vd 2006b; Demir vd 2008). Bizim çalışmamızda insan serumundan ÜFA yöntemiyle saflaştırılan PON1 enziminin molekül ağırlığı da yaklaşık 45 kDa olarak tespit edilmiştir.

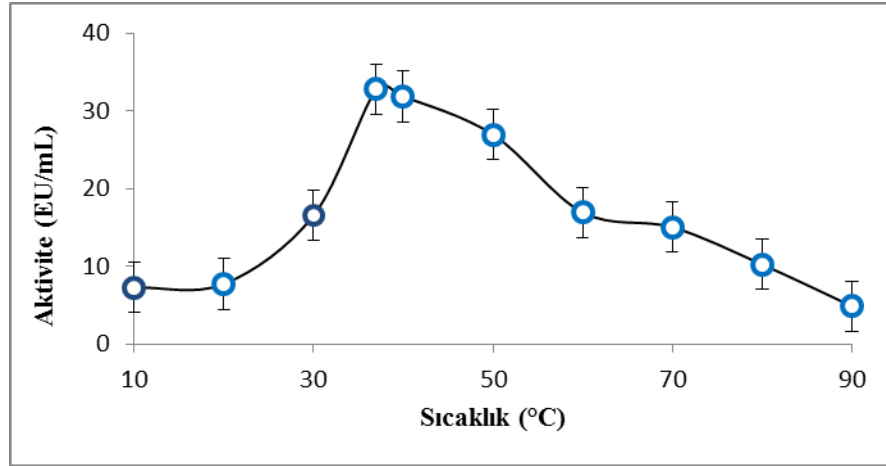
#### 4.9. Paraoksanoz Enzim Saflaştırılmasına Ait Optimum pH, Optimum Sıcaklık, Stabil pH Aralığı ve Stabil Sıcaklık Çalışmalarında Elde Edilen Değerler

pH 3,0, 4,0, 5,0 için asetat tamponu (10mM) , pH 6,0, 7,0, 8,0 için Tris/HCl tamponu (Trizma, 10 mM) ve pH 9,0 ve 10,0 için Glisin tamponu (10,5 mM) hazırlamıştır. Elde edilen verilere göre Şekil 4.17’de optimum pH, Şekil 4.18’de optimum sıcaklık, Şekil 4.19’de stabil pH, Şekil 4.20’de stabil sıcaklığa ait grafikler verilmiştir.



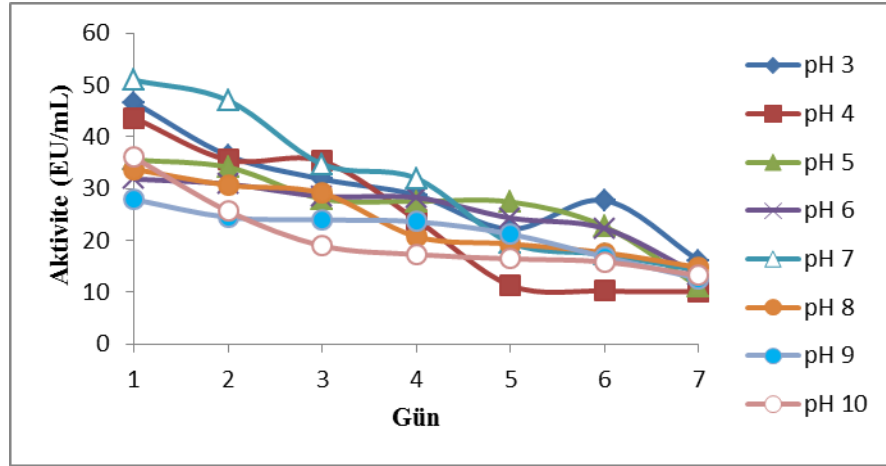
**Şekil 4.17.** PON1 enzimini saflaştırma çalışmalarında elde edilen optimum pH grafiği

Optimum pH çalışmalarında elde edilen verilere göre en yüksek enzim aktivitesi (%19,8) pH 8,1’de elde edilmiştir. Sayın (2009) tarafından yapılan çalışmada sığır serum paraoksonaz enzimini saflaştırmıştır ve aktivitenin pH ile değişimi araştırılmıştır. pH 8,0’da sığır serum paraoksonaz enzimi için en yüksek % aktivite değeri bu çalışmada bulunmuştur. Demir vd (2008) tarafından yayınlanan çalışmada insan serumundan saflaştırılan PON1 enziminin optimum pH değeri 8,0 olarak ifade edilmiştir. Ancak Aşkın vd (2012) tarafından yapılan çalışmada sığır karaciğerinden saflaştırılan bu enzimin pH 7,0-7,5 aralığında aktivitesinin yüksek olduğu ve bu aralıkta maksimum aktiviteyi pH 7,1’de gösterdiği ifade edilmiştir.



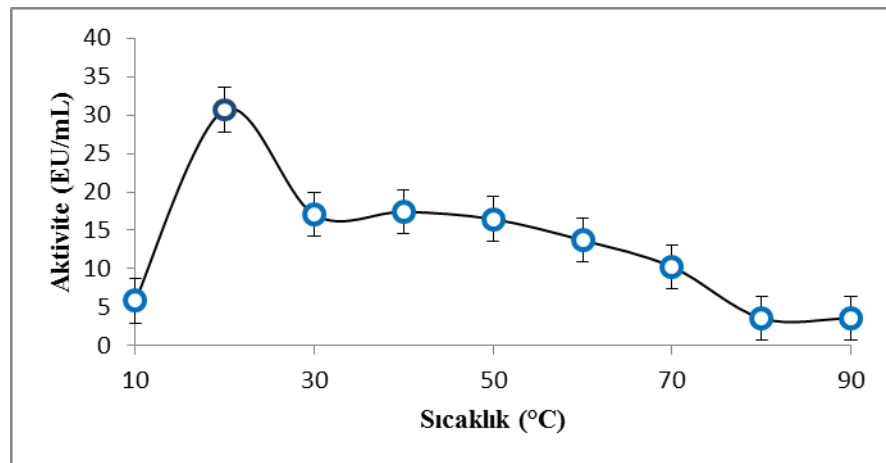
**Şekil 4.18.** PON1 enzimini saflaştırma çalışmalarında elde edilen optimum sıcaklık grafiği

Saflaştırılan enzimin optimum sıcaklık çalışmalarında elde edilen verilere göre 37°C’de %32,81 ile en yüksek aktivite değeri elde edilmiştir. 40°C’de bu değere yakın olarak %31,85’lik bir aktivite ölçümü yapılmıştır. Ancak bu sıcaklıkların altında ve üstündeki sıcaklıklarda enzimin % aktivite değerinde önemli düşüşler gözlenmiştir. 40°C’nin üzerinde enzimin protein yapısından kaynaklı olarak sıcaklıkla denatürasyona meyilli olmasından dolayı aktivitede düşüş beklenen bir durumdur. Sayın (2009) tarafından yapılan çalışmada serbest paraoksonaz enziminin 38°C’de en yüksek aktivite değerine sahip olduğu ve bunun yanında paraoksonaz’ın 45°C’de denature olduğu belirtilmiştir. Aşkın vd (2012) tarafından yayınlanan çalışmada paraoksonaz enziminin bazı kinetik özellikleri incelenmiştir. Bu çalışmada PON1 enziminin aktivitesi 37°C’de 2,228 absorbans ortalaması ile en yüksek değere ulaşmıştır. Bu değerler bizim çalışmamızda elde ettiğimiz verilerle uyum göstermektedir.



**Şekil 4.19.** PON1 enzimini saflaştırma çalışmalarında elde edilen stabil pH grafiği

Stabil pH çalışmalarında elde edilen verilere göre bütün ortam pH'larında ilk güne göre 7 gün boyunca enzim aktivitesinde azalma meydana gelmiştir. 1. gün en yüksek aktiviteyi veren (50,94) pH 7,0 ortamı olmuşken 7. gün en yüksek aktiviteyi veren (14,79) pH 8,0 ortamı olmuştur. pH 7.0 ortamı saflaştırılan paraoksonaz enzimi için stabil pH değeri olarak kabul edilmiştir.



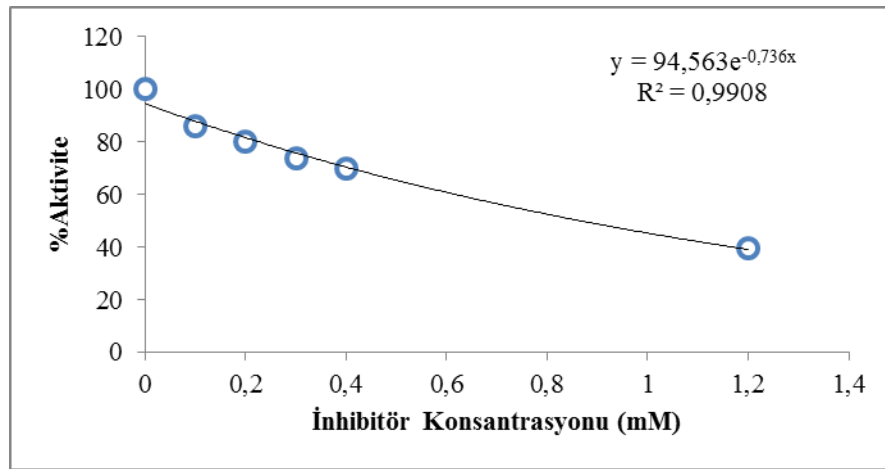
**Şekil 4.20.** PON1 enzimini saflaştırma çalışmalarında elde edilen stabil sıcaklık grafiği

Saflaştırılan enzimle ilgili olarak yapılan stabil sıcaklık çalışmalarında 20°C sıcaklık ortamı stabil sıcaklık olarak kabul edilmiştir.

#### 4.10. Çalışmada Kullanılan Antioksidantların Saflaştırılan PON1 Enzimi Aktivitesi Üzerindeki Etkilerine Dair Veriler

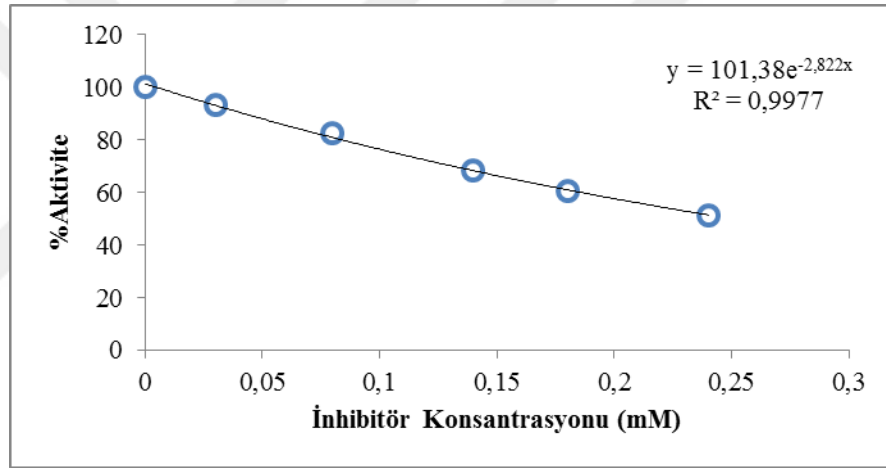
0,01 M konsantrasyonda hazırlanan antioksidant çözeltileri 500 µL Tris/HCl tamponu (1 mM CaCl<sub>2</sub> ihtiva eder, pH 8,0), 330 µL 3 mM paraoksan çözeltisi ve 50 µL saflaştırılmış enzim içeren deney tüplerine toplam hacmi 1 mL olacak şekilde 0, 15, 40, 70, 90 ve 120 µL hacimlerde eklenmiştir. Toplam hacim saf su ile 1 mL'ye tamamlanmıştır. Kör olarak enzim yerine saf su kullanılmıştır. 15 dk 37°C'de inkübasyondan sonra 412 nm'de spektrofotometrik olarak aktivite tayini yapılmıştır. Bu prosedür çalışmada kullanılan bütün antoksidan bileşikler için uygulanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda inhibitör konsantrasyonu ve % aktiviteye karşı grafikler çizilerek her bir antioksidan bileşik için  $IC_{50}$  değerleri hesaplanmıştır.

Şekil 4.21'te 5-izopropil-2-metil fenolün, Şekil 4.22'de 5,5 dithiobis-(2-nitrobenzoik asit)'in, Şekil 4.23'de 4-hidroksibenzoik asidin, Şekil 4.24'da Öjenol'un, Şekil 4.25'de 4-hidroksi-3-metoksisinamik asidin, Şekil 4.26'de Sinapik asidin, Şekil 4.27'da 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzoik asidin, Şekil 4.28'da 2,6-dimetoksifenol'ün, Şekil 4.29'de 3,4-dihidroksisinamik asidin  $IC_{50}$  değerlerinin belirlenmesi için kullanılan grafikler verilmiştir.



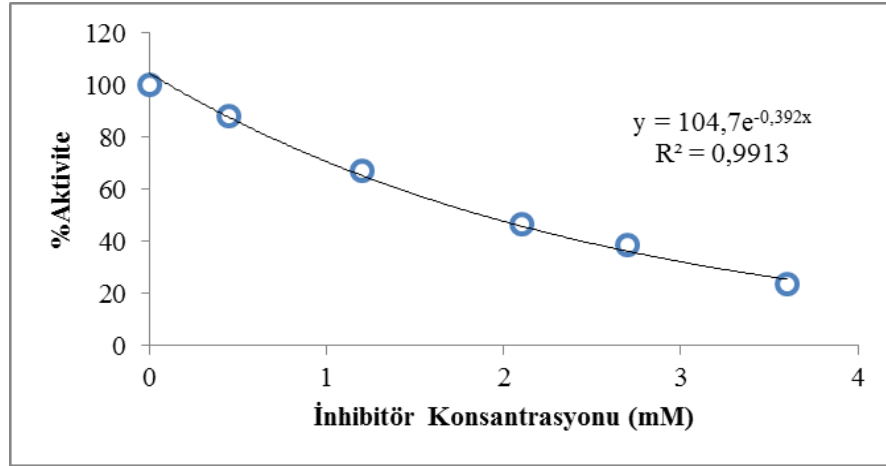
Şekil 4.21. 5-izopropil-2-metilfenolün insan serum PON1 enzim aktivitesi üzerine etkisi

5-izopropil-2 metil fenol bilinen ismi ile karvakrol bir monoterpenoid fenoldür (Ultee *et al.* 2000). Karvakrol *E.coli* ve *Bacillus cereus* gibi bazı bakteri suşlarının büyümesini inhibe etmektedir (Du *et al.* 2008). Karvakrol üzerine yapılan bazı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda bu maddenin antibakteriyel, antioksidant, antiseptik, büyüme faktörü, antifungal, antiviral, anti inflamatuvar, balgam söktürücü, öksürük kesici, rumen mikrobiyal düzenleyici, metan emisyonunu azaltıcı olduğuna dair tanımlamalar yapılmıştır (Luna *et al.* 2010; Soltanab *et al.* 2011; Hashemipour *et al.* 2013; Bravo *et al.* 2014). Şekil 4.21'den faydalanarak 5-izopropil-2 metil fenol için  $IC_{50}$  değeri 0,865 mM olarak hesaplanmıştır.



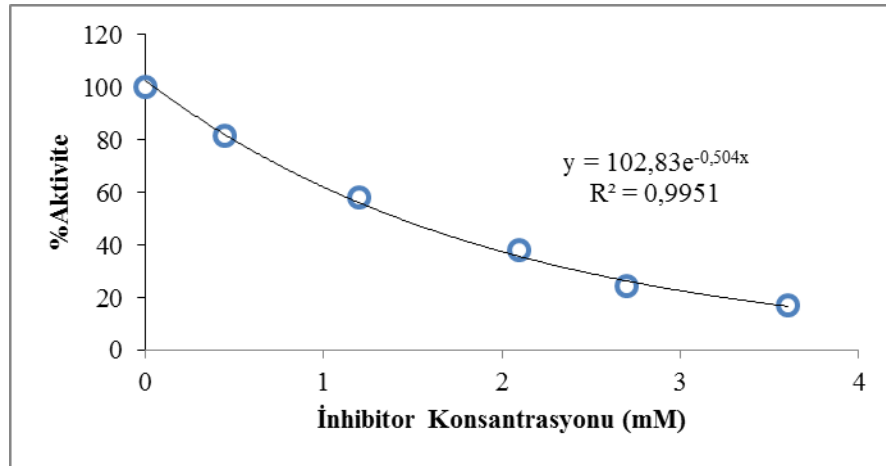
**Şekil 4.22.** 5,5 dithiobis-(2-nitrobenzoik asit)'in insan serum PON1 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Ellman reaktifi olan 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoik asit) George L. Ellman tarafından geliştirilmiş bir örnekteki tiyol gruplarının konsantrasyonunu ve sayısını belirlemek için kullanılan kimyasal maddedir (Ellman 1959). Şekil 4.22'den yararlanılarak 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoik asit) için  $IC_{50}$  değeri 0,250 mM olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 4.23.** 4-hidroksibenzoik asitin insan serum PON1 enzim aktivitesi üzerine etkisi

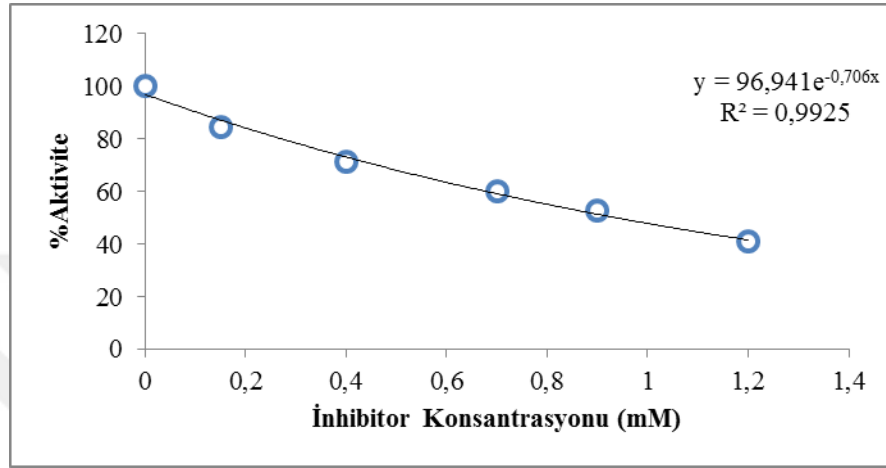
4-hidroksibenzoik asit benzoik asidin fenolik türevi olan bir monohidroksibenzoik asittir. Düşük toksisiteye sahip olması nedeniyle 4-hidroksibenzoik asit popüler bir antioksidanttır. Farelerde  $LD_{50}$  değeri 2200 mg/kg'dır (Lewis 1996). Şekil 4.23'ten yararlanılarak 4-hidroksibenzoik asit için  $IC_{50}$  değeri 1,885 mM olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 4.24.** Öjenol'ün insan serum PON1 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Öjenol fenilpropanoid sınıfı bir bileşiktir ve karaciğere zarar verebilmektedir yani hepatotoksiktir. Öjenolün aşırı dozuna maruz kalınmasında ishal, bulantı, bilinç kaybı, baş dönmesi, hızlı kalp atışı gibi semptomlar görülebilmektedir (Thompson *et al.* 1998;

Fujisawa *et al.* 2002). Akut toksisite 1,190-3,000 mg/kg-gün arasında değişen  $LD_{50}$  değerleri oral yolla alındığında düşüktür (WHO). Şekil 4.24'ten yararlanılarak Öjenol için  $IC_{50}$  değeri 1,43 mM olarak hesaplanmıştır.

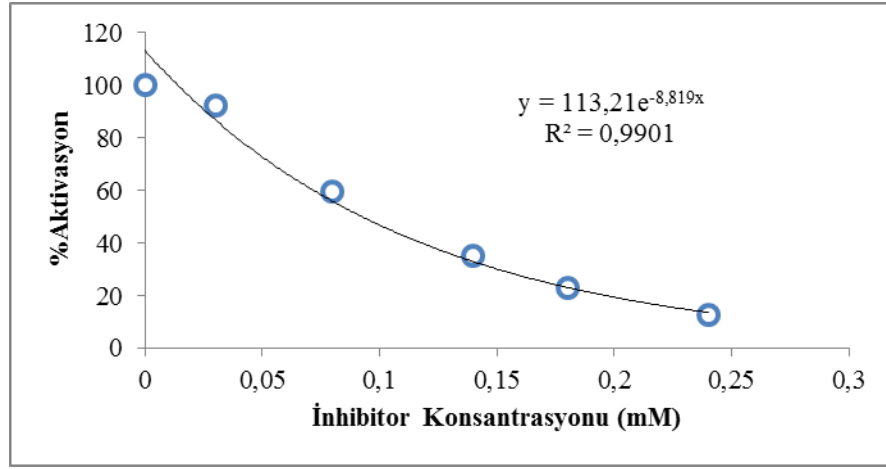


**Şekil 4.25.** 4-hidroksi-3-metoksisinamik asidin insan serum PON1 enzim aktivitesi üzerine etkisi

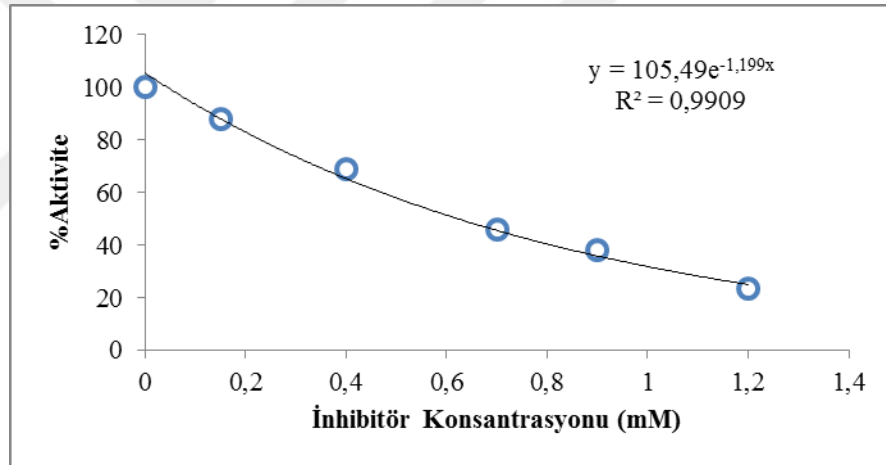
4-hidroksi-3-metoksisinamik asit diğer adıyla ferulik asit bir organik bileşiktir. Çoğu zaman klorojenik asit formunda elde edilmiştir. Ferulik asit oksidatif stresi ve deride timin dimerlerinin oluşumunu azaltmaktadır (Luthria and Pastor-Corrales 2006). Ferulik asit (100 mg/kg) ratlarda ICAM-1 mRNA'sını inhibe ederek serebral iskem/reperfüzyon yaralanma sonrası oksidatif strese bağlı apoptoza karşı nörokoruma sağlamaktadır (Cheng *et al.* 2008). Şekil 4.25'den yararlanılarak ferulik asit için  $IC_{50}$  değeri 0,938 mM olarak hesaplanmıştır.

Sinapik asit doğal olarak meydana gelen küçük bir hidroksisinamik asittir ve fenilpropanoid ailesinin bir üyesidir (Tian *et al.* 2009). Sinapik asit için enfeksiyon, oksidatif stres, enflamasyon, kanser, diabet, nörodejenerasyon karşıtı olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Sinapin aktivitesi (sinapik asidin bir türevi) ratlarda kan serumundan ( $IC_{50}$  22,1  $\mu$ M) ziyade serebral homojenatta ( $IC_{50}$  3,66  $\mu$ M) daha etkindir (Chen 2016). Şekil 4.26'dan yararlanılarak sinapik asit için  $IC_{50}$  değeri 0,093 mM olarak hesaplanmıştır.



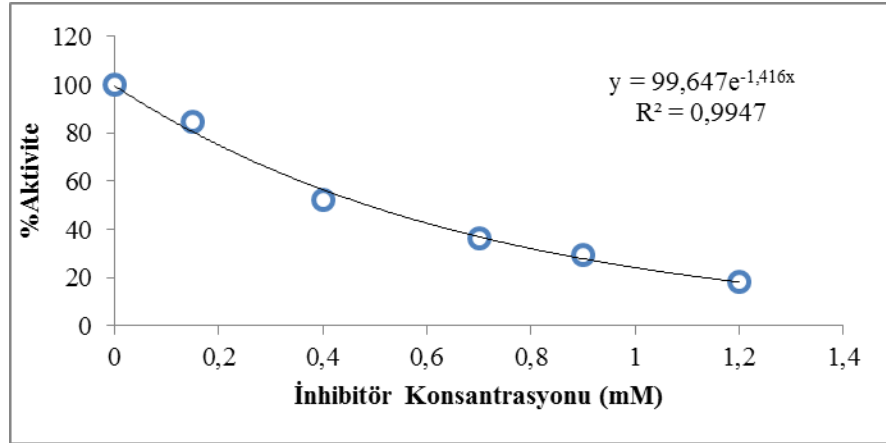


Şekil 4.26. Sinapik asidin insan serum PON1 enzim aktivitesi üzerine etkisi



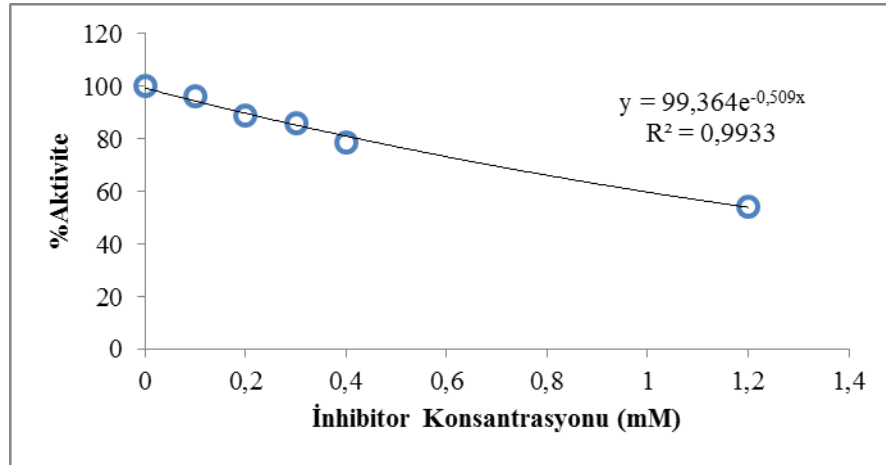
Şekil 4.27. 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzoik asidin insan serum PON1 enzim aktivitesi üzerine etkisi

4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzoik asit diğer adıyla syringic asit üzerine yapılan çalışmalarda kemo-koruyucu, antimikrobiyal aktivite, düşük ağırlıklı lipoprotein oksidasyonunu önleyici, serbest radikallere karşı destekleyici, malondialdehitin üretimini azaltıcı gibi özellikler öne çıkarılmıştır (Güven vd 2015). Şekil 4.27'den yararlanılarak 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzoik asit için  $IC_{50}$  değeri 0,623 mM olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 4.28.** 2,6-dimetoksifenol'ün insan serum PON1 enzim aktivitesi üzerine etkisi

2,6 dimetoksifenol diğer adıyla Syringol doğal olarak oluşan bir aromatik organik bir bileşiktir ve pirogallolun bir dimetil eteridir. 2,6 dimetoksifenol için ratlarda  $LD_{50}$  değeri (oral) 550 mg/kg iken farelerde  $LD_{50}$  (oral) 2500 mg/kg olarak ifade edilmiştir (Rasulev *et al.* 2010). Şekil 4.28'den yararlanılarak 2,6 dimetoksifenol  $IC_{50}$  değeri 0,489 mM olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 4.29.** 3,4-dihidroksisınamik asidin insan serum PON1 enzim aktivitesi üzerine etkisi

3,4-dihidroksisınamik asit diğer adıyla kafeik asit hidroksisınamik asit olarak sınıflandırılan organik bileşiktir. kafeik asit *in vitro* ve *in vivo* olarak bir antioksidanttır.

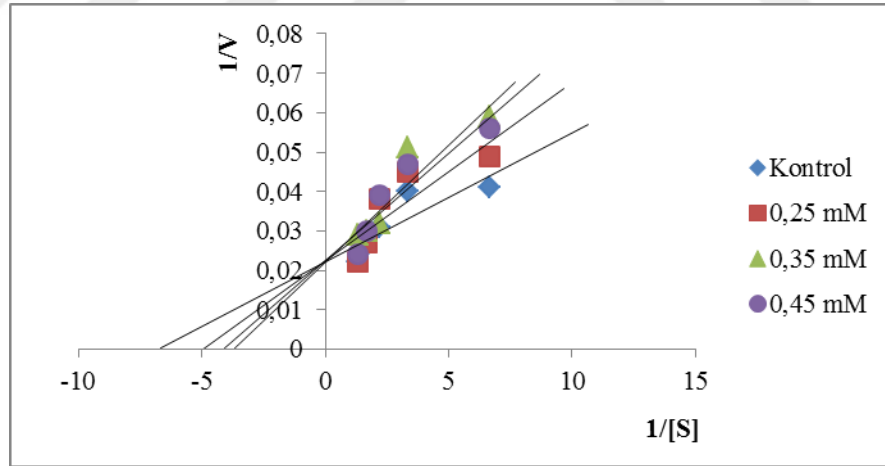
Ratlarda kafeik asidin yüksek dozlarda alımı mide papillomlarına neden olmaktadır (Hirose *et al.* 1998). Şekil 4.29'dan yararlanılarak 3,4-dihidroksisinamik asit için  $IC_{50}$  değeri 1,35 mM olarak hesaplanmıştır.

Saflaştırılan insan serum PON1 enziminin yukarıda değinilen antioksidant substratları için  $K_i$  değerlerini ve inhibisyon türünü belirlemek amacıyla Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.30- Şekil 4.38). Bu grafiklerden yararlanılarak substratlar için  $K_i$  değerleri ve inhibisyon türü belirlenmiştir (Lineweaver and Burk 1934).  $K_i$  değerinin

hesaplanmasında yarışmalı inhibisyon türlerinde  $K_{M^I} = \frac{K_M}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$  formülü

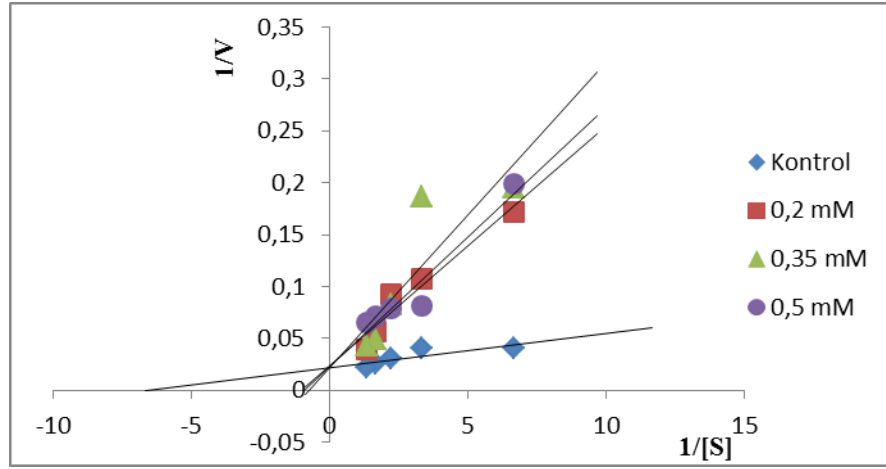
kullanılırken yarışmasız inhibisyon türlerinde  $V_{Max^I} = \frac{V_{Max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$  formülü

kullanılmıştır.



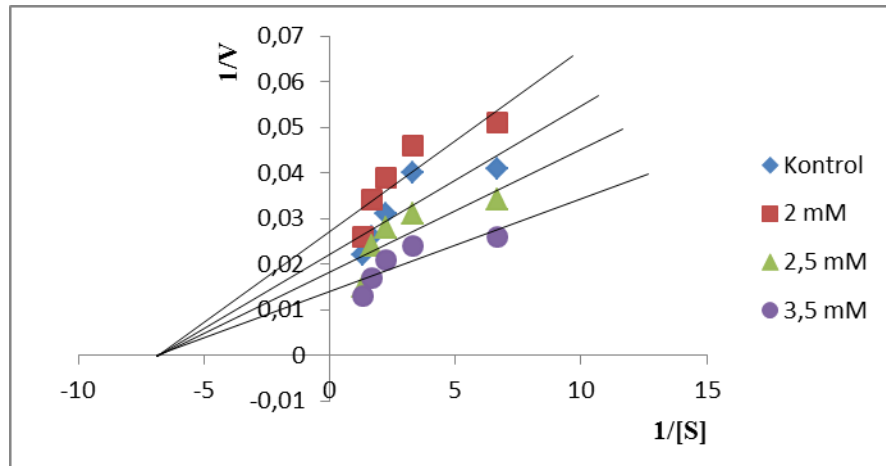
**Şekil 4.30.** İnsan serum PON1 enzimi için 5-izopropil-2-metilfenolün inhibisyon türünü gösteren grafik

Şekil 4.30 incelendiğinde 5-izopropil-2-metilfenolün yarışmalı inhibisyon türü sergilediği görülmektedir. Yapılan hesaplamalar doğrultusunda bu bileşiğe ait 0,25 mM, 0,35 mM ve 0,45 mM olmak üzere üç farklı konsantrasyonda Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir ve sırasıyla  $K_i$  değerleri 0,254, 0,702, 0,488 olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 4.31.** İnsan serum PON1 enzimi için 5,5 dithiobis-(2-nitrobenzoik asit)'in inhibisyon türünü gösteren grafik

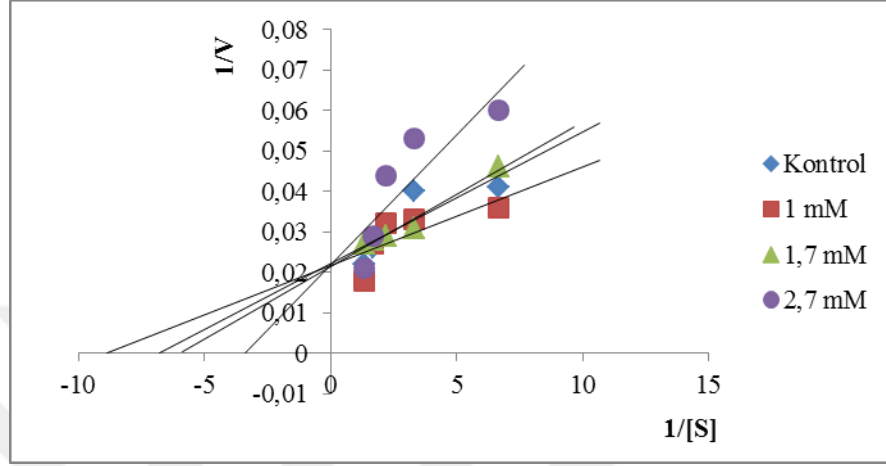
Şekil 4.31 incelendiğinde 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoik asit)'in yarışmalı inhibisyon türü sergilediği görülmektedir. Yapılan hesaplamalar doğrultusunda bu bileşiğe ait 0,2 mM, 0,35 mM ve 0,5 mM olmak üzere üç farklı konsantrasyonda Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir ve sırasıyla  $K_i$  değerleri 1, 1,342, 1,096 olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 4.32.** İnsan serum PON1 enzimi için 4-hidroksibenzoik asidin inhibisyon türünü gösteren grafik

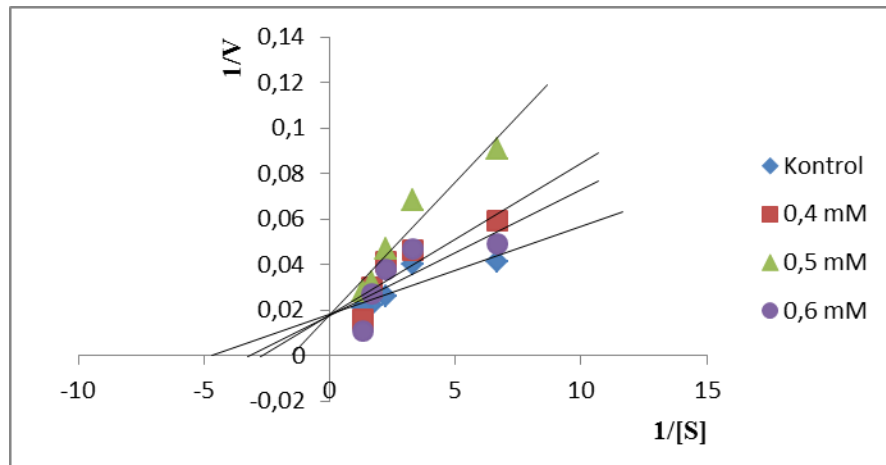
Şekil 4.32 incelendiğinde 4-hidroksibenzoik asidin yarışmasız inhibisyon türü sergilediği görülmektedir. Yapılan hesaplamalar doğrultusunda bu bileşiğe ait 2 mM,

2,5 mM ve 3,5 mM olmak üzere üç farklı konsantrasyonda Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir ve sırasıyla  $K_i$  değerleri 0,148, 0,148, 0,143 olarak hesaplanmıştır.



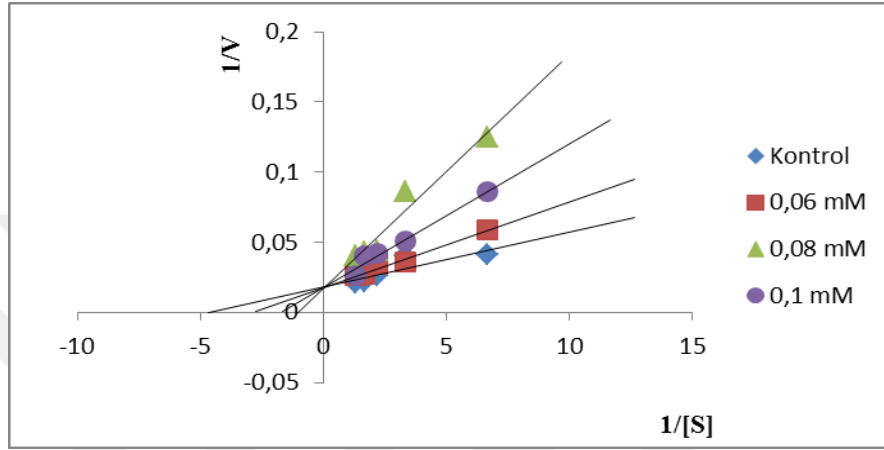
**Şekil 4.33.** İnsan serum PON1 enzimi için Öjenol'ün inhibisyon türünü gösteren grafik

Şekil 4.33 incelendiğinde öjenolün yarışmalı inhibisyon türü sergilediği görülmektedir. Yapılan hesaplamalar doğrultusunda bu bileşiğe ait 1 mM, 1,7 mM ve 2,7 mM olmak üzere üç farklı konsantrasyonda Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir ve sırasıyla  $K_i$  değerleri 0,095, 0,178, 0,527 olarak hesaplanmıştır.



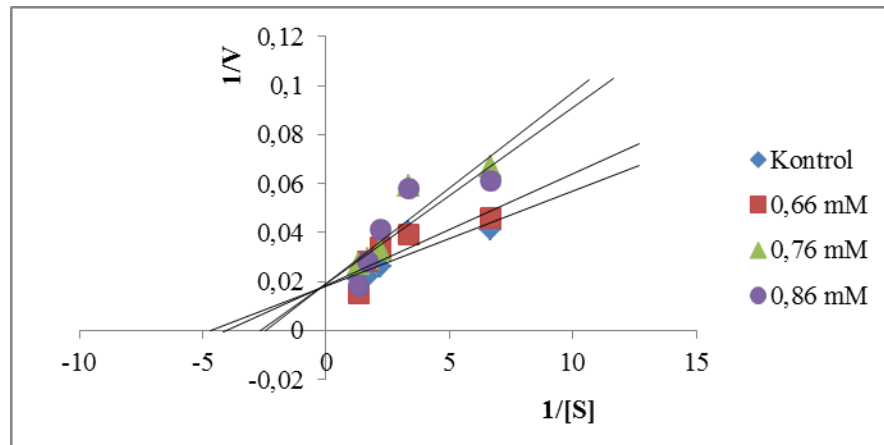
**Şekil 4.34.** İnsan serum PON1 enzimi için 4-hidroksi-3-metoksisinnamik asidin inhibisyon türünü gösteren grafik

Şekil 4.34 incelendiğinde 4-hidroksi-3-metoksisinamik asidin yarışmalı inhibisyon türü sergilediği görülmektedir. Yapılan hesaplamalar doğrultusunda bu bileşiğe ait 0,4 mM, 0,5 mM ve 0,6 mM olmak üzere üç farklı konsantrasyonda  $1/V-1/[S]$  çizilmiştir ve sırasıyla  $K_i$  değerleri 0,370, 0,770, 0,314 olarak hesaplanmıştır.



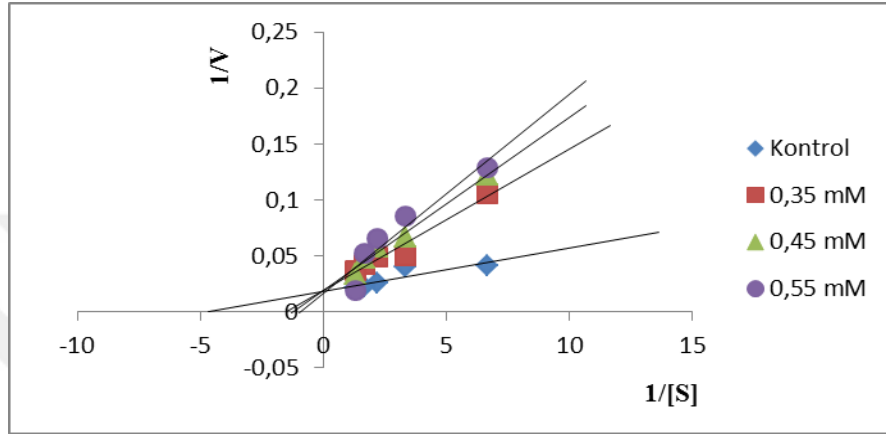
**Şekil 4.35.** İnsan serum PON1 enzimi için Sinapik asidin inhibisyon türünü gösteren grafik

Şekil 4.35 incelendiğinde sinapik asidin yarışmalı inhibisyon türü sergilediği görülmektedir. Yapılan hesaplamalar doğrultusunda bu bileşiğe ait 0,06 mM, 0,08 mM ve 0,1 mM olmak üzere üç farklı konsantrasyonda Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir ve sırasıyla  $K_i$  değerleri 0,390, 4,608, 0,961 olarak hesaplanmıştır.



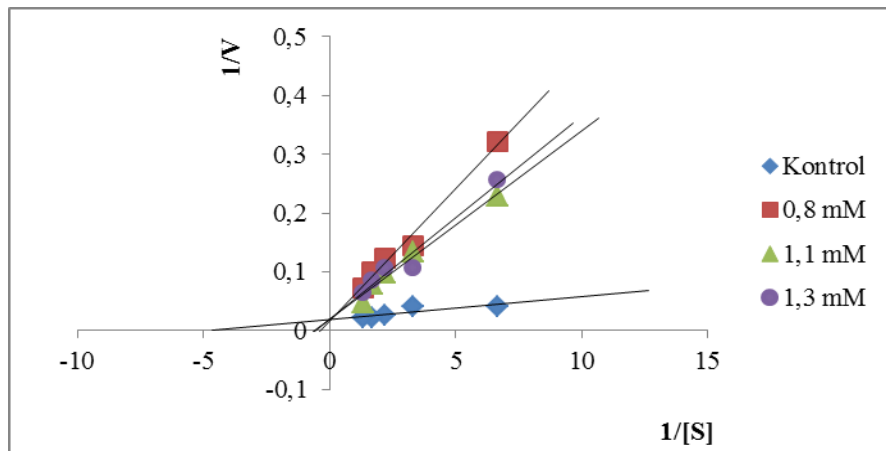
**Şekil 4.36.** İnsan serum PON1 enzimi için 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzoik asidin inhibisyon türünü gösteren grafik

Şekil 4.36 incelendiğinde 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzoik asidin yarışmalı inhibisyon türü sergilediği görülmektedir. Yapılan hesaplamalar doğrultusunda bu bileşiğe ait 0,66 mM, 0,76 mM ve 0,86 mM olmak üzere üç farklı konsantrasyonda Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir ve  $K_i$  değerleri sırasıyla 0,274, 0,836, 0,5 olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 4.37.** İnsan serum PON1 enzimi için 2,6-dimetoksifenolün inhibisyon türünü gösteren grafik

Şekil 4.37 incelendiğinde 2,6-dimethoksifenolün yarışmalı inhibisyon türü sergilediği görülmektedir. Yapılan hesaplamalar doğrultusunda bu bileşiğe ait 0,35 mM, 0,45 mM ve 0,55 mM olmak üzere üç farklı konsantrasyonda Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir ve  $K_i$  değerleri sırasıyla 1,582, 2,262, 4,717 olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 4.38.** İnsan serum PON1 enzimi için 3,4-dihidroksisinamik asidin inhibisyon türünü gösteren grafik

Şekil 4.38 incelendiğinde 3,4-dihidroksisünamik asidin yarışmalı inhibisyon türü sergilediği görülmektedir. Yapılan hesaplamalar doğrultusunda bu bileşiğe ait 0,8 mM, 1,1 mM ve 1,3 mM olmak üzere üç farklı konsantrasyonda Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir ve  $K_i$  değerleri sırasıyla 3,15, 1,92, 1,64 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.8’de ise antioksidan bileşiklere ait hesaplanan  $IC_{50}$ ,  $K_i$  değerleri ve belirlenen inhibisyon türleri birlikte verilmiştir.

**Çizelge 4.8.** Antioksidan bileşiklerin hesaplanan  $IC_{50}$  ve  $K_i$  değerleri ve inhibisyon türleri

Antioksidan Bileşik	$IC_{50}$ (mM)	$K_i$	$K_i$ Ortalama	İnhibisyon Türü
5-izopropil-2-metilfenol	0,865	0,254 0,702 0,488	0,481	Yarışmalı
5,5-dithiobis (2-nitro-benzoik asit)	0,250	1 1,342 1,096	1,146	Yarışmalı
4-Hidroksibenzoik asit	1,885	0,148 0,148 0,143	0,439	Yarışmasız
Öjenol	1,43	0,095 0,178 0,527	0,267	Yarışmalı
4-hidroksi-3-metoksisünamik asit	0,938	0,370 0,770 0,314	0,485	Yarışmalı
Sinapik asit	0,093	0,390 4,608 0,961	1,986	Yarışmalı
4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzoik asit	0,623	0,274 0,836 0,5	0,537	Yarışmalı
2,6-dimetoksifenol	0,489	1,582 2,262 4,717	2,854	Yarışmalı
3,4-dihidroksisünamik asit	1,35	3,150 1,920 1,640	2,740	Yarışmalı



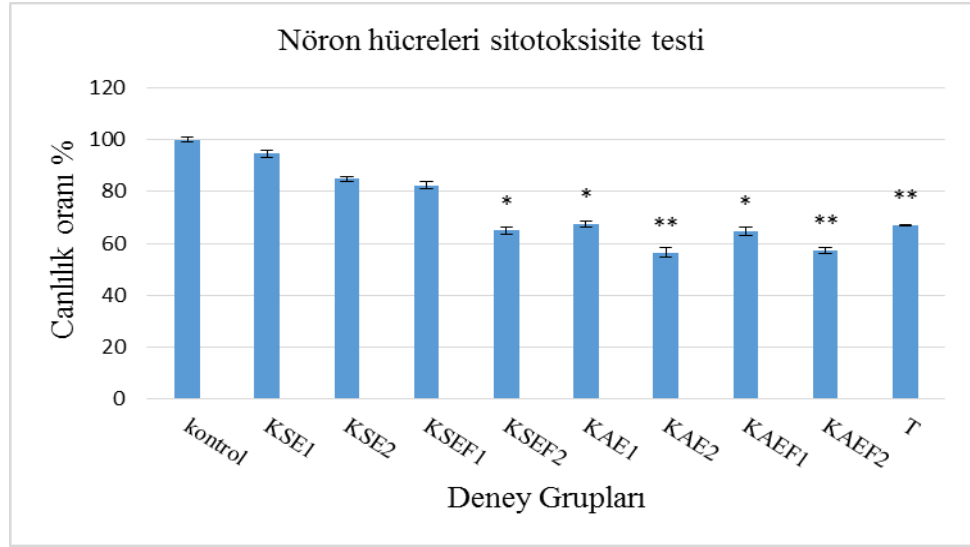
#### 4.11. Sitotoksisite Testi Sonuçları

Yapılan MTT testinde kullanılan gruplar Çizelge 4.9’da verilmiştir. Hazırlanan dozlar 2,5 mL medyum içinde konularak vortekslenmiştir. Hazırlanan solüsyonlardan herbir kuyucuk için 150 µL örnek kullanılmıştır. Hem nöron kültürü hem de U87MG hücre hattı için sitotoksisite testi yapılmıştır.

Bir günlük ratların primer korteksleri kullanılarak hazırlanan nöron hücre kültürü üzerine yukarıda verilen gruplar n=5 ve n=6 olacak şekilde muamele edilmiştir. 24 saat sonunda 25 µl MTT çözeltisi (5 mg/mL) ilave edilmiştir. 4 saat süre ile 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ortam şartlarında inkübasyon yapılmıştır. Her kuyucuktaki canlı hücre sayısı 570 nm dalga boyunda bir ELISA mikroplaka okuyucu ile ölçülmüştür. Şekil 4.39’de ilgili dozların nöron hücre kültüründeki sitotoksisite testi sonuç grafiği, Çizelge 4.10’da ilgili dozların nöron hücre kültüründeki sitotoksisite verilerine göre elde edilen istatistiksel sonuçları verilmiştir.

**Çizelge 4.9.** Sitotoksisite testinde kullanılan gruplar

Grup ismi	Konsantrasyon
Karadut su ekstraktı (KSE1)	12,5 mg/2,5 mL
Karadut su ekstraktı (KSE2)	25 mg/2,5 mL
Karadut su ekstraktı+ $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (KSEF1)	12,5 mg+0,005 g/2,5 mL
Karadut su ekstraktı+ $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (KSEF2)	25 mg+0,005 g/2,5 mL
Karadut alkol ekstraktı (KAE1)	12,5 mg/2,5 mL
Karadut alkol ekstraktı (KAE2)	25 mg/2,5 mL
Karadut alkol ekstraktı+ $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (KAEF1)	12,5 mg+0,005 g/2,5 mL
Karadut alkol ekstraktı+ $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (KAEF2)	25 mg+0,005 g/2,5 mL
Temozolomid (T)	100 µg/2,5 mL



**Şekil 4.39.** Kullanılan grupların nöron hücre kültürü üzerindeki sitotoksosite çalışma sonuçları (n=5) (\*:p<0,05, \*\*:p<0,001)

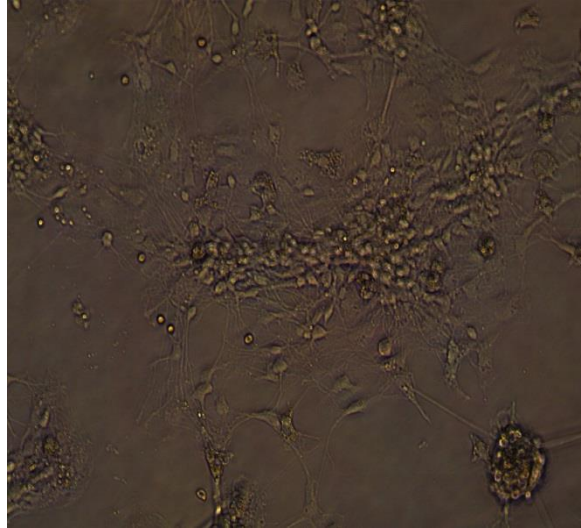
Şekil 4.39 incelendiğinde KSE1, KSE2, KSEF1 grupları nöron hücreleri üzerinde anlamlı bir toksisiteye neden olmadığı anlaşılmıştır. KSEF2, KAE1, KAEF1 ve T grupları nöron hücrelerinde p<0,05 seviyesinde anlamlı bir toksisiteye neden olurken KAE2, KAEF2 ve Fe grupları nöron hücrelerinde p<0,001 seviyesinde anlamlı toksisiteye sebep olmuştur.

**Çizelge 4.10.** Nöron hücreleri üzerinde ilgili grupların MTT analizinde elde edilen istatistiksel veriler (\*:p<0,05, \*\*:p<0,001)

Gruplar	Ortalama±Standart Sapma	%
Kontrol	0,440±0,021	100
KSE1	0,416±0,030	94,6
KSE2	0,373±0,019	84,8
KSEF1	0,362±0,026	82,4
KSEF2	0,285±0,030*	64,9
KAE1	0,296±0,026*	67,4
KAE2	0,248±0,035**	56,5
KAEF1	0,285±0,030*	64,7
KAEF2	0,252±0,019**	57,3
T	0,295±0,008*	67,0

Şekil 4.39 ve Çizelge 4.10 birlikte incelendiğinde KSE1, KSE2, KSEF1 grupları kontrol grubuna göre nöron hücrelerinde anlamlı bir toksisiteye neden olmamışlardır. Ancak karadut su ekstraktının  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküller üzerine immobilize edilmesiyle oluşturulan yüksek dozlu grup (KSEF2) nöron hücrelerindeki canlılık oranını kontrol grubuna göre %64,9'a düşürerek istatistiksel olarak p<0,05 seviyesinde anlamlı bir toksisiteye neden olmuştur. Karadut su ekstraktının her iki dozu da nöron hücreleri üzerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir toksisiteye sebep olmamışlardır. Bu durum karadut ekstraktı içeriğinin nöron kültüründe koruyucu etkide bulunduğunu işaret etmektedir. Çalışmamızda kullandığımız karadut su ekstraktı ile oluşturulan gruplar ise nöron hücre kültüründe herhangi bir anlamlı toksisiteye sebep olmamıştır. HPLC analizi sonuçlarında bulunan kuersetin, rutin, kateşin gibi aktif bileşenlerin nörokoruyucu etkisine dair ciddi çalışmalar bulunmaktadır (Mandel and Youdim 2004; Ban *et al.* 2006; Bournival *et al.* 2012; Nath *et al.* 2012; Ghosh *et al.* 2013) .

Şekil 4.40'de nöron hücrelerinin görüntüsü verilmiştir.



**Şekil 4.40.** Nöron hücrelerinin görüntüsü

Karadut alkol ekstraktı ile oluşturulan gruplar (KAE1 ve KAE2) doza bağımlı olarak kontrol grubuna göre nöron hücrelerinin canlılığını sırasıyla %67,4 ve %56,5' düşürerek sırasıyla p<0,05 ve p<0,001 seviyelerinde anlamlı toksisitelere neden olmuşlardır.

Karadut alkol ekstraktının  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküller üzerine immobilize edilmesiyle oluşturulan gruplar (KAEF1 ve KAEF2) nöron hücrelerinde doza bağımlı olarak artan bir toksisiteye yol açmışlardır. KAEF1 grubu nöron hücrelerinde hücre canlılığını %64,7'ye düşürerek kontrol grubuna göre  $p < 0,05$  seviyesinde anlamlı bir toksisiteye neden olmuştur. KAEF2 grubu sahip olduğu yüksek doz ile nöron hücrelerindeki % canlılığı %57,3'e düşürerek  $p < 0,001$  seviyesinde anlamlı bir azalmaya yol açmıştır. Dut meyveleri yüksek miktarda antosiyanin içermekle birlikte antosiyanin olmayan nörokoruyucu dahil birçok biyoaktif işlevlere sahip rutin ve kuersetin gibi fenolik bileşikleri de içermektedir (Kang *et al.* 2006; Shih *et al.* 2010; Kim *et al.* 2010). Kim *et al.* (2010) dut meyveleri ile hazırladıkları ekstraksiyonun (100  $\mu$ g/mL) 150 $\mu$ M 6-hidroksidopamin (6-OHDA) muamelesine karşı SH-SY5Y hücrelerini  $p < 0,001$  seviyesinde koruduğunu belirtmişlerdir.

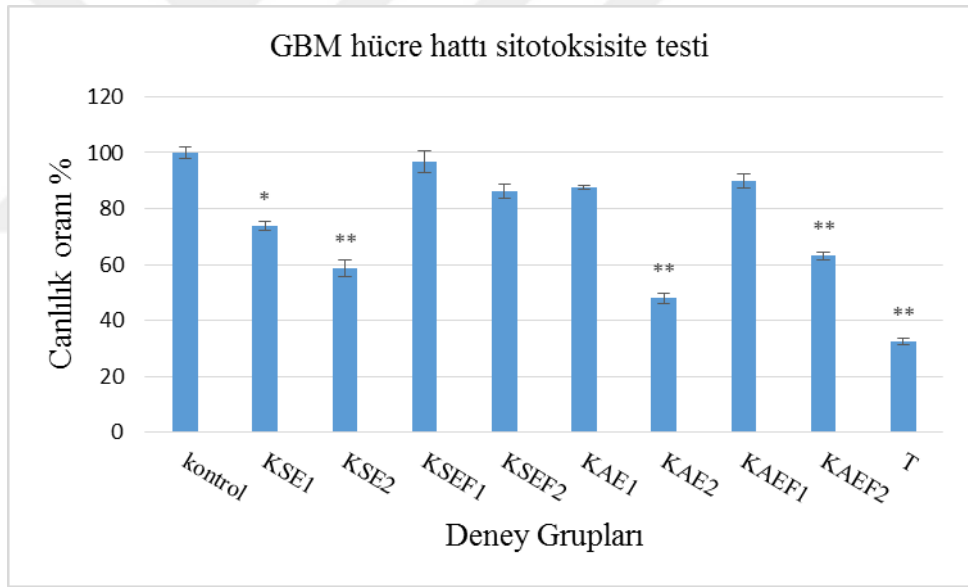
Şekil 4.39 ve Çizelge 4.10 incelendiğinde GBM hastalarında kemoterapide kullanılan piyasadaki en önemli ilaç konumundaki Temozolomid (T) grubunun nöron hücrelerinde canlılığı kontrol grubuna göre %67'ye düşürdüğü ve bu hücrelerde  $p < 0,05$  seviyesinde anlamlı bir toksisiteye neden olduğu görülmektedir.

Genel olarak nöron hücreleri üzerindeki sitotoksosite çalışmalarını değerlendirdiğimizde karadut alkol ekstraktı kullanılarak hazırlanan grupların (KAE1, KAE2, KAEF1, KAEF2) doza bağımlı olarak nöron hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı toksisitelere yol açtığı görülmektedir. Karadut su ekstraktı ile hazırlanan gruplardan KSEF2 grubu dışındaki diğer gruplar nöron hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir toksisiteye yol açmamıştır. KSEF2 grubu bu hücreler üzerinde kontrol gruna kıyasla  $p < 0,05$  seviyesinde anlamlı bir toksisite göstermiştir.

Bu sıralamayı dikkate aldığımızda nöron hücrelerinde en yüksek toksisiteyi KAE2 grubunun gösterdiğini ve kullandığımız bazı grupların ticari kemoterapi ilacı olan T grubundan bile daha yüksek toksisiteye neden olduğunu, karadut alkol ekstraktı ile hazırlanan gruplardan sadece KAE1 grubunun T grubundan daha az toksisiteye yol açtığını ve karadut su ekstraktı ile hazırlanan gruplardan KSEF2 grubu hariç diğer

grupların ise nöron hücrelerinde anlamlı bir toksisite göstermeyip bu sıralamaya dahil olmadıklarını ifade edebilmekteyiz.

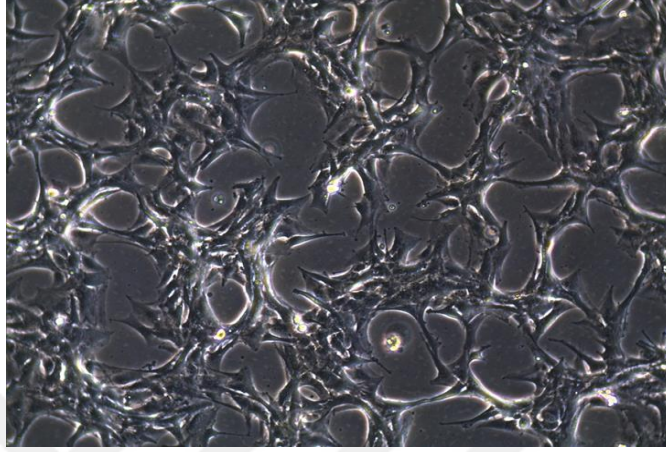
96 kuyucuklu plaklarda U87MG hücre kültürü üzerinde gruplar n=5 ve n=6 olacak şekilde muamele edilmiştir. 24 saat sonunda 25 µl MTT çözeltisi (5 mg/mL) ilave edilmiştir. 4 saat süre ile 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ortam şartlarında inkübasyon yapılmıştır. Her kuyucuktaki canlı hücre sayısı 570 nm dalga boyunda bir ELISA mikropilaka okuyucu ile ölçülmüştür. Şekil 4.41’de ilgili dozların U87MG hücre hattındaki sitotoksikite testi sonuç grafiği, Çizelge 4.11’de ilgili dozların U87MG hücre hattındaki sitotoksikite verilerine göre elde edilen istatistiksel sonuçları verilmiştir.



**Şekil 4.41.** Kullanılan grupların U87MG hücre hattı üzerindeki sitotoksikite çalışma sonuçları (n=5) (\*:p<0,05, \*\*:p<0,001)

Şekil 4.41 incelendiğinde KSE1 grubunun U87MG kanser hücrelerinin % canlılık oranını kontrol grubuna kıyasla p<0,05 seviyesinde anlamlı olarak azalttığı görülmektedir. KSE2, KAE2, KAEF2, T grupları kanser hücrelerinin % canlılık oranını p<0,001 seviyesinde anlamlı olarak azaltmıştır. KSEF1, KSEF2, KAE1, KAEF1

grupları ise kanser hücreleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma sağlamışlardır. Şekil 4.42’te GBM hücre kültürü gösterilmiştir.



**Şekil 4.42.** GBM hücre kültürü

**Çizelge 4.11.** U87MG hücre hattı üzerinde ilgili grupların MTT analizinde elde edilen istatistiksel veriler (\*:  $p<0,05$ , \*\*:  $p<0,001$ )

Gruplar	Ortalama±Standart Sapma	%
Kontrol	1,506±0,040	100
KSE1	1,109±0,033*	73,7
KSE2	0,884±0,057**	58,7
KSEF1	1,458±0,077	96,8
KSEF2	1,299±0,053	86,3
KAE1	1,318±0,013	87,5
KAE2	0,722±0,036**	47,9
KAEF1	1,353±0,049	89,8
KAEF2	0,951±0,206**	63,2
T	0,490±0,021**	32,5

Şekil 4.41 ve Çizelge 4.11 birlikte incelendiğinde kontrole (%100 canlılık) göre KSE1 grubu GBM hücrelerinde canlılığı %73,7’ye düşürerek  $p<0,05$  düzeyinde bir anlamlılık

göstermiştir. Bu durum KSE1 grubunun GBM kanser hücrelerini öldürme konusunda etkinliğini göstermektedir. KSE2 grubu hücre canlılığını %58,7'ye düşürerek kontrol grubuna göre  $p < 0,001$  düzeyinde bir anlamlılık ortaya koymuştur. KSE grupları kendi aralarında mukayese edildiğinde GBM kanser hücrelerinin canlılık oranının doza bağımlı olarak azaldığı ortaya çıkmaktadır. Antosiyaninlerin ve fenolik bileşiklerin kanser ve kardiovasküler hastalık riskini azalttığına dair literatürde çalışmalar bulunmaktadır (Middleton *et al.* 2000; Chen *et al.* 2006). Yapılan pek çok çalışma ile karadutun polifenoller, flavonoidler, antosiyaninlerce zenginliği kanıtlanmıştır (Ercisli ve Orhan 2007; Jiang and Nie 2015). Antosiyaninler suda çözünen glikozit yapısındaki bileşiklerdir ve kanser hücresinde apoptozu indüklerler (Reddivari *et al.* 2007). Karadut su ekstraktında antosiyaninlerin alkol ekstraktına göre daha iyi çözünmesi karadut su ekstraktı ile oluşturulan grupların (KSE1, KSE2) GBM kanser hücreleri üzerinde düşük dozda bile daha fazla etkide bulunmalarına neden olarak gösterilebilir.

KSEF1 grubu (%96,8'lik canlılık oranı) ve KSEF2 grubu (%86,3'lük canlılık oranı) ile kontrol grubuna göre kanser hücrelerine önemli bir etkide bulunmamışlardır. Bu durum karadut su ekstraktının  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküller üzerine immobilize edilmesinin GBM kanser hücrelerindeki canlılık oranını azaltılmasında önemli etkisinin olmadığını göstermektedir. Veriler incelendiğinde karadutun her iki dozdaki su ekstraktları bu ekstraktların immobilize edildiği  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartikül gruplarına göre GBM kanser hücrelerinin canlılık oranını azaltmada daha etkili bulunmuştur.

Karadut alkol ekstraktıyla ilgili gruplara ait veriler incelendiğinde KAE2 grubunun GBM kanser hücrelerindeki canlılık oranını %47,9'a indirerek  $p < 0,001$  seviyesinde anlamlı bir azalmaya neden olduğu anlaşılmaktadır. KAE1 grubu ise canlılık oranını %87,5' indirmekle birlikte kanser hücrelerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak bir anlamlılık sağlamamıştır. Jeong *et al.* (2010) tarafından yayınlanan çalışmada metanol ile hazırlanan karadut ekstraktının 10, 30, 50 mg/mL konsantrasyonunları A172 insan glioma hücre hattı üzerinde sırasıyla canlılık oranlarını %53, %42, %26'ya düşürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda kullanılan grupların sahip olduğu en yüksek konsantrasyon 25 mg/2,5 mL'dir (10 mg/mL). KAE2 grubu (10 mg/mL) ile U87MG

glioma hücre kültürü üzerinde canlılık oranını kontrol grubuna göre %47,9'a indirerek Jeong *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmada kullanılan 10 mg/mL karadut alkol ekstraktının sağladığı %53 canlılık oranına yakın bir değer ortaya koymuştur.

Karadut alkol ekstraktlarının  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküller üzerine immobilize edilmesiyle oluşturulan gruplardan en yüksek doz olan KAEF2 grubu GBM kanser hücrelerindeki canlılık oranını %63,2'ye düşürerek kontrol grubuna göre p<0,001 seviyesinde anlamlı bir azalmaya yol açmıştır. Bu durum karadut alkol ekstraktı ile oluşturulan gruplarda kullanılan doza bağımlı olarak % canlılık oranında anlamlı bir azalma elde edildiğini göstermektedir. Düşük dozda karadut alkol ekstraktı ile oluşturulan gruplara kıyasla aynı dozdaki karadut su ekstraktı ile oluşturulan gruplar kanser hücrelerini öldürme konusunda daha fazla etkin olmuşlardır.

Kanser nanoteknolojisinde Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, MgFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> gibi manyetik özelliğe sahip pek çok nanopartikül, ilaç taşıma amaçlı olarak birçok çalışmada kullanılmaktadır (Erdoğan ve Özkan 2013). Hadjipanayis *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmada, antikor konjüge edilmiş demir oksit nanopartiküllerinin GBM hücre canlılığındaki azalmayı p<0,001 seviyesinde anlamlı olarak artırdığı ve astrositlerde herhangi bir toksisite oluşturmadığı ifade edilmiştir. Ancak bizim çalışmamızda; ilaç taşıma amaçlı kullandığımız nanopartiküllü gruplar, nanopartikül kullanılmadan kullanılan gruplara göre istenilen başarıyı gösterememiştir. Çünkü nanopartikül kullanılmadan hazırlanan karadut-su ekstraktı ve karadut-alkol ekstraktı grupları, GBM hücrelerindeki % canlılık oranını, kontrol grubuna göre aynı konsantrasyonlarda koruyarak nanopartikül ile hazırlanan karadut-su ve karadut-alkol ekstraktlarına göre daha fazla azaltmıştır.

Temozolomid GBM hastalarının kemoterapi tedavisinde kullanımı ön plana çıkan FDA onaylı antikanser ilaçtır. Alkilleyici bir ajan olan Temozolomid ikinci nesil imidazo tetrazin ilaçtır ve glioma kanser hücrelerinde apoptozu indüklemektedir (Günter *et al.* 2003). Çalışmada bu gruba yer verilmesinin nedeni oluşturulan grupların piyasadaki GBM hastaları için kullanılan bir ilaçla kıyaslanması amacıdır. Markiewicz-Zukowska *et al.* (2013) tarafından yayınlanan çalışmada 10, 20, 50, 100  $\mu$ M



konsantrasyonlarındaki Temozolomid (T) U87MG hücre hattına uygulanmıştır ve 24, 48, 72 saat sonra % canlılık oranındaki değişimler incelenmiştir. 100 µM konsantrasyondaki T grubu 24, 48, 72 saat sonunda % canlılık oranlarını kontrol grubuna göre sırasıyla %79, %54,90, %8,6'ya kadar azaltmıştır. Bu çalışmada hem doza bağlı hem de zamana bağlı olarak kanser hücrelerinde % canlılık oranında azalmalar meydana gelmiştir. Shi *et al.* (2010) tarafından yapılan çalışmada 100 µM Temozolomid'in U87MG hücrelerinde hem büyümeyi durdurduğu hem de U87MG hücrelerinde nekroz ve apoptozu indüklediği ifade edilmiştir. 100 µM Temozolomid uygulaması ile U87MG hücrelerinde % canlılık oranı yaklaşık %50 oranında anlamlı azalma yakalarken % apoptoz oranı %4'ten %53'e kadar çıkmıştır. Bizim çalışmamızda T grubunun konsantrasyonu 100 µM'dır. 24 saat sonra yapılan % canlılık oranında % 32,5' e kadar anlamlı bir azalma olmuştur. T grubu ile sağlanan anlamlı azalmaya en yakın grup %47,9 canlılık oranı ile KAE2 grubu olmuştur.

Şekil 4.41 ve Çizelge 4.11 incelendiğinde genel olarak karadut ekstraktları ile oluşturulan grupların yine bu grupların  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküller üzerine immobilize edilmesiyle oluşturulan gruplara kıyasla GBM kanser hücrelerini öldürmede daha etkin olduğu anlaşılmaktadır.

Bizim için avantaj sağlayan gruplar U87MG hücre hattında % canlılık oranını kontrol grubuna göre mümkün olduğunca düşüren ancak nöron hücre kültürü üzerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir toksisite oluşturmayan gruplardır. Yani aradığımız gruplar kanser hücrelerine maksimum seviyede zarar verirken nöron hücrelerinde minimum toksisite oluşturmalıdır. Bu bakımdan karadut su ekstraktı ile hazırlanan KSE1 ve KSE2 grubu kanser hücrelerindeki etkinlikleri ve nöron hücrelerinde anlamlı bir toksisite göstermemeleri açısından öne çıkmaktadırlar. Karadut alkol ekstraktı ile hazırlanan gruplardan yüksek doza sahip gruplar olan KAE2 ve KAEF2 grupları kanser hücrelerini öldürmede etkili olmakla beraber nöron hücrelerinde T grubuna kıyasla daha fazla toksisiteye sebep olmuşlardır. Bu sonuç bu grupların karadut su ekstraktı ile hazırlanan gruplara kıyasla dezavantajlı olarak karşımıza çıkmalarına neden olmaktadır. KAE1 grubu nöron hücrelerinde T grubuna kıyasla daha az toksisiteye sebep olmakla birlikte

kanser hücrelerinde % canlılık oranlarında anlamlı bir azalmaya neden olamamıştır. KSEF1 grubu nöron hücrelerinde anlamlı bir toksisiteye sahip olmamakla birlikte kanser hücrelerinde herhangi bir anlamlı azalmaya yol açamamıştır. Bu değerlendirmeler altında sitotoksosite sonuçlarına göre kanser hücrelerini öldürmede anlamlı olarak etkiye bulunarak ve nöron hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı toksisite oluşturmayarak öne çıkan gruplar KSE1 ve KSE2 gruplarıdır.

#### 4.12. U87mg Hücre Hattı ve Nöron Kültüründen Elde Edilen Total RNA ve cDNA'nın Kantitatif Analiz Sonuçları

Çizelge 4.12'de U87MG hücre hattı ve nöron kültüründen elde edilen total RNA ve cDNA'ya ait  $A_{260}/A_{280}$  oranları verilmiştir. RNA için  $A_{260}/A_{280}$  oranının 2 civarında ve DNA için  $A_{260}/A_{280}$  oranının 1,8 civarında olması elde edilen ürünlerin saf olduğunu göstermektedir.

**Çizelge 4.12.** Çalışmada kullanılan hücre kültürlerinden elde edilen total RNA ve cDNA'ya ait  $A_{260}/A_{280}$  oranları

Gruplar	U87MG hücre hattı		Nöron Kültürü	
	Total RNA	cDNA	Total RNA	cDNA
Kontrol	2,048	1,832	2,009	1,802
KSE1	1,930	1,819	1,946	1,818
KSE2	2,008	1,804	1,610	1,785
KSEF1	1,923	1,749	1,857	1,820
KSEF2	2,051	1,814	1,912	1,822
KAE1	2,081	1,816	1,988	1,802
KAE2	1,934	1,808	2,045	1,815
KAEF1	2,069	1,741	2,307	1,840
KAEF2	2,088	1,811	1,895	1,727
T	2,115	1,814	2,013	1,832

Çizelge 4.12 incelendiğinde moleküler çalışmaların total RNA izolasyonunun ve elde edilen total RNA'lardan cDNA sentezinin başarılı bir şekilde yapıldığı herhangi bir kontaminasyonun söz konusu olmadığı anlaşılmaktadır. U87MG hücre hattında çalışmada kullanılan grupların muamelesi sonrasında izole edilen total RNA'ların  $A_{260}/A_{280}$  oranı minimum 1,923 iken maksimum 2,115 olmuştur.  $A_{260}/A_{280}$  oranı 2'ye en yakın değer olarak 2,008 ile KSE2 grubu olmuştur. KSE2 grubunun kullanıldığı U87MG hücre hattından izole edilen total RNA'lardan sentezlenen cDNA'nın  $A_{260}/A_{280}$  oranı bu analizi destekler nitelikte 1,804 değerini alarak 1,8'e en yakın değer olmuştur. U87MG hücre hattında grupların muamelesi sonrasında izole edilen total RNA'lardan sentezlenen cDNA'ların  $A_{260}/A_{280}$  oranı minimum 1,741 iken maksimum 1,832 olmuştur.

Nöron hücre kültüründe çalışmada kullanılan grupların muamelesi sonrasında izole edilen total RNA'ların  $A_{260}/A_{280}$  oranı minimum 1,610 iken maksimum 2,307 olmuştur. RNA'lar için uygun  $A_{260}/A_{280}$  oranı olan 2'ye en uzak değer olan 1,610 KSE2 grubuna aittir. KSE2 grubunun kullanıldığı nöron hücre kültüründen elde edilen cDNA'ya ait  $A_{260}/A_{280}$  oranı 1,785 olmuştur. Bu değer RNA izolasyonunda 2'ye yakın bir değer alınmasına sebep olan etkenin cDNA sentezi ile ortamdan uzaklaştırıldığını göstermektedir. Nöron hücre kültüründe grupların muamelesi sonrasında izole edilen total RNA'lardan sentezlenen cDNA'ların  $A_{260}/A_{280}$  oranı minimum 1,727 iken maksimum 1,840 olmuştur. Sentezlenen cDNA'lardan  $A_{260}/A_{280}$  oranının 1,8'e en yakın olarak 1,802 değerine sahip olan gruplar kontrol ve KAE1 gruplarıdır.

#### **4.13. Real Time PCR Uygulamalarında Elde Edilen Veriler**

Real time PCR uygulamalarında, nöron hücre kültürü ve U87MG hücre kültüründen izole edilen RNA'lardan elde edilen cDNA'lar ile GRIN2C ve SLC1A2 gen ekspresyonundaki değişimler incelenmiştir. Real time PCR uygulamalarında çalışmada kullanılan karadut ekstraktları ile oluşturulan gruplardan yüksek doza sahip olan gruplar (KSE2, KSEF2, KAE2, KAEF2) ve T grupları çalışılmıştır. Bu çalışmalardan nöron

kültürü üzerinden elde edilen veriler Çizelge 4.13’de, U87MG hücre kültürü üzerinden elde edilen veriler Çizelge 4.14’te verilmiştir.

**Çizelge 4.13.** Nöron hücre kültüründen elde edilen cDNA’lar ile yapılan Real Time PCR uygulamalarında elde edilen veriler (\*:p<0,05, \*\*:p<0,001)

	SLC1A2	GRIN2C
<b>Gruplar</b>	Ortalama±Standart Sapma	Ortalama±Standart Sapma
Kontrol	1,000±0,018	1,000±0,008
KSE2	3,605±0,052**	0,849±0,003**
KSEF2	1,022±0,054	0,363±0,017**
KAE2	1,552±0,062**	0,459±0,053**
KAEF2	2,428±0,025**	0,602±0,025**
T		0,465±0,006**

Çizelge 4.13 incelendiğinde nöron hücrelerinde ilgili grupların muamelesinin kontrol grubuna göre SLC1A2’nin ekspresyonunu arttırdığı anlaşılmaktadır. KSEF2 grubu hariç diğer gruplar SLC1A2 ekspresyonunu istatistiksel olarak p<0,001 seviyesinde anlamlı olarak attırmıştır. KSE2 grubu nöron hücrelerinde SLC1A2’nin ekspresyonunu kontrol grubuna göre yaklaşık 3,6 kat arttırarak SLC1A2’nin en fazla ekspresyonunun görüldüğü grup olmuştur.

Nöron hücrelerinde kullanılan gruplar GRIN2C ekspresyonunu kontrol grubuna göre p<0,001 seviyesinde anlamlı olarak azaltmışlardır. KSEF2 grubu GRIN2C ekspresyonunu diğer gruplara kıyasla en fazla azaltan grup olarak karşımıza çıkmıştır.

Nöron hücrelerinde SLC1A2 ekspresyonunu kontrol grubuna kıyasla arttıran gruplar GRIN2C ekspresyonunu azaltmışlardır. KAE2 grubu ile T grubu GRIN2C ekspresyonunu kontrol grubuna göre birbirine çok yakın olarak azaltmışlardır.

**Çizelge 4.14.** U87MG hücre kültüründen elde edilen cDNA'lar ile yapılan Real Time PCR uygulamalarında elde edilen veriler (\*:p<0,05, \*\*:p<0,001)

	SLC1A2	GRIN2C
<b>Gruplar</b>	Ortalama±Standart Sapma	Ortalama±Standart Sapma
Kontrol	1,000±0,017	1,000±0,011
KSE2	2,543±0,035**	1,021±0,004
KSEF2	1,298±0,018**	0,492±0,015**
KAE2	5,051±0,070**	0,916±0,022*
KAEF2	2,134±0,037**	0,593±0,023**
T		0,064±0,001**

Kanser hücrelerinde KSE2 grubu muamelesi SLC1A2'nin ekspresyonunu kontrol grubuna göre yaklaşık 2,5 kat arttırarak p<0,001 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olmuştur. Ancak KSE2 grubu GRIN2C'nin ekspresyonunda kontrol grubuna göre bir değişikliğe yol açmamıştır.

SLC1A2 hücre dışında bulunan fazla nörotransmitter glutamati uzaklaştıran bir glutamat taşıyıcısıdır. Kanser hücrelerinde KSE2 grubunun muamelesi ile SLC1A2'nin ekspresyonunun kontrol grubuna göre 2,5 kat artması KSE2 grubunun U87MG kanser hücrelerindeki sitotoksik etkisini (%58,7) açıklamaktadır. GBM kanser hücreleri eksitoksik seviyede glutamatin ve glutamat reseptörlerinin salınımını yapmaktadır (Brocke *et al.* 2010). SLC1A2'nin (GLT1) ekspresyonundaki sağlanan artış ile birlikte kanser hücrelerinde yüksek miktarda salınımı yapılan glutamat ortamdan uzaklaştırılmıştır. GRIN2C NMDA reseptörlerinin bir alt birimini kodlar. KSE2 grubunun GRIN2C ekspresyonunda herhangi bir etkide bulunmamasıyla kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinin nedeni SLC1A2'nin aşırı uyarımı ile apoptozu indüklemesi olabilir.

U87MG hücre hattında kullanılan ilgili grupların hepsi kontrol grubuna göre SLC1A2'nin ekspresyonunu  $p < 0,001$  seviyesinde arttırmışlardır. Ancak KAE2 grubu SLC1A2'nin ekspresyonunu kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 5 kat arttırarak öne çıkmaktadır. GRIN2C ekspresyonunu ise bu grup (KAE2) kontrol grubuna göre  $p < 0,05$  seviyesinde anlamlı olarak bir azalmaya neden olmuştur. KAE2 grubu ile kanser hücrelerindeki % canlılık oranı kontrol grubuna göre %47,9'a indirilmiştir. Burada SLC1A2'nin ekspresyonunun yaklaşık 5 kat arttırılması ile ortamdaki glutamatın hemen uzaklaştırılması ve SLC1A2'nin aşırı eksprese olmasıyla apoptozun indüklenmesi bu canlılık oranındaki başarıyı doğrulamaktadır.

Kanser hücre kültüründe SLC1A2'nin ekspresyonunda kontrol grubuna göre artışa neden olan KSEF2, KAE2, KAEF2 grupları GRIN2C ekspresyonunda kontrol grubuna göre azalmaya neden olmuşlardır. GRIN2C ekspresyonunu en fazla azaltan grup T grubu olmuştur

## 5. SONUÇ

PON1 enzimi üç fazlı ayırım sistemi (ÜFA) ile insan serumundan ilk kez saflaştırılmıştır. Bu amaçla ilk basamakta %60-80 amonyum sülfat çöktürmesi, ikinci basamakta sabit %20 amonyum sülfat konsantrasyonunda n-bütanol oranı olarak 1,0:0,5 (serum:t-bütanol) belirlenmiş ve son basamakta ikinci amonyum sülfat oranı olarak %25 amonyum sülfat konsantrasyonunda 1,0:0,5 serum:n-bütanol ortamında PON1 enzimi ara fazda elde edilmiştir. 3. saflaştırma aşamasında 1368,83 EU/mL aktivite,  $2,05 \cdot 10^4$  EU/mL toplam aktivite, %49,87 verim, 575,8 EU/mL spesifik aktivite, 2,377 mg/mL protein, 182,66 saflaştırma katsayısı elde edilmiştir. SDS-PAGE yapılarak PON1 enziminin MA'sı yaklaşık 45 kDa olarak tespit edilmiştir. ÜFA ile saflaştırılmış PON1 enziminin optimum pH'sı 8,1, stabil pH'sı 7,0, optimum sıcaklığı 37°C, stabil sıcaklığı 20°C olarak belirlenmiştir. PON1 enziminin karakterizasyon çalışmalarında kullanılan antioksidanlardan 4-hidroksibenzoik asitin yarışmasız, 5-izopropil-2-metilfenol, 5,5-dithiobis (2-nitro-benzoik asit), Öjenol, 4-hidroksi-3-metoksisinamik asit, Sinapik asit, 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzoik asit, 2,6-dimetoksifenol, 3,4-dihidroksisinamik asidin ise yarışmalı inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir.

Karadut su ekstraktı (KSE) için 258 nm, karadut alkol ekstraktı (KAE) için 596 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler alınmıştır. Karadut ekstraktlarının  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküllerine immobilizasyonuna ait yapılan optimizasyon çalışmalarında optimum immobilizasyon süresi ve optimum materyal konsantrasyonu her iki ekstrakt için sırasıyla 60 dk, 10 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Optimum pH ve optimum sıcaklık KSE ve KAE için sırasıyla pH 7,0, 30°C ve pH 6,0, 20°C olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.9'da yer alan grupların nöron hücreleri üzerindeki toksisite etkisine dair yapılan çalışmada; KSE1, KSE2 ve KSEF1 grupları nöron hücrelerinde kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir toksisiteye sebep olmazken U87MG kanser hücre kültüründe KSE1 (%73,7), KSE2 (%58,7) anlamlı azalmalara yol açmıştır (parantez içi değerler % canlılık oranı'dır).

Real Time PCR çalışmalarında nöron kültüründe KSE2, KAE2, KAEF2 grupları SLC1A2'nin ekspresyonunu kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttırmışken GRIN2C ekspresyonunu KSE2, KSEF2, KAE2, KAEF2 ve T grupları anlamlı olarak azaltmıştır. U87MG kanser hücre kültüründe ise KSE2, KSEF2, KAE2, KAEF2 grupları SLC1A2 ekspresyonunu kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttırırken, KSEF2, KAE2, KAEF2 ve T grupları GRIN2C ekspresyonunu kontrol grubuna göre anlamlı azaltmışlardır.

Antioksidatif bir meyve olan karadutun hem alkol ve su ekstraktlarının direk kullanımının  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartiküllere immobilize halinden daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, ÜFA yöntemi kullanılarak, insan serumundan PON1 enzimi daha kısa sürede ve daha yüksek verimle saflaştırılmıştır. Enzimin aktivite geri kazanımı, kromatografik yöntemlerle PON1 enziminin saflaştırılması çalışmalarından daha yüksek bulunmuştur. Saflaştırma aşamalarının, özellikle yüksek aktivite kazancının yanında hızlı, ucuz ve üç basamakta yapılabilir olması bu sürecin potansiyelini göstermekte endüstriyel ölçekteki enzim saflaştırma uygulamaları için büyük avantaj taşımaktadır. Çalışmanın ikinci aşamasında ise karadut alkol ve karadut su ekstraktlarının U87MG kanser hücrelerinde ve sinir hücrelerinde etkili oldukları belirlenmiştir ve kanser tedavisi için taşıdığı önemi moleküler çalışmalarla gösterilmiştir.



**KAYNAKLAR**

- Abbasi, A.M., Khan, M.A., Ahmad, M., Zafar, M., Khan, H., Muhammad, N., Sultana, S., 2009. Medicinal plants used for the treatment of jaundice and hepatitis based on socio-economic documentation. *African Journal of Biotechnology*, 8, 1643-1650.
- Ahmad, M., Mahmood, Q., Gulzar, K., Akhtar, M.S., Saleem, M., Qadir, M.I., 2012. Anti-hyperlipidaemic and hepatoprotective activity of *Dodonaea viscosa* leaves extracts in alloxan induced diabetic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Pakistan Veterinary Journal*, 32, 50-54.
- Ak, G., 2010. Folat-PEG-Doxorubicin türevinin sentezlenerek teknesyumla işaretlenmesi ve kanser görüntüleme ajanı olarak kullanım olanaklarının araştırılması. Yüksek Lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Akçay, M.N., Polat, M.F., Yılmaz, I., Akçay, G., 2003b. Serum paraoxonase levels in pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology*, 50 (2).
- Akçay, M.N., Yılmaz, I., Polat, M.F., Akçay, G., 2003a. Serum paraoxonase levels in gastric cancer. *Hepatogastroenterology*, 50 (2).
- Aksoy, K., 2005. Temel Nöroşirurji. Türk Nöroşirurji derneği Yayınları, Ankara s.657, cilt 1.
- Albright, R., Olson, J., Chang, S.M., O'Neill, A.M., Friedman, A.H., Bruner, J., Yue, N., Dugan, M., Zaknoen, S., Levin, V.A., 1999. Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse. *Journal of Clinical Oncology*, 17, 2762-2771.
- Aldridge, W.N., 1953a. Serum esterases. II. An enzyme hydrolysing diethyl pnitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochemical Journal*, 53, 117-124.
- Aldridge, W.N., 1953b Serum esterases. Two types of esterase (A and B) hydrolysing pnitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochemical Journal*, 53, 110-117.
- Allen, T.M. and Cullis, P.R., 2004. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*, 303, 1818-1822.
- American Cancer Society (ACS) 2009. American Cancer Society complete guide to complementary and alternative cancer therapies. American Cancer Society, p.890.
- Amin, N., Qadir, M.I., Khan, T.J., Abbas, G., Ahmad, B., Janbaz, K.H., Ali, M., 2012. Antibacterial activity of vacuum liquid chromatography (VLC) isolated fractions of chloroform extracts of seeds of *Achyranthes aspera*. *Journal of The Chemical Society of Pakistan*, 34, 589-592.

- Anonim, 2013. Phytochemicals. American Cancer Society. January 2013. Retrieved September 2013).
- Anonim, 2016a. <http://www.turkkanser.org.tr/sayfa/istatistikler>)
- Anonymous, 2016a. <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/thehistoryofcancer/the-history-of-cancer-what-is-cancer> ) .
- Anonymous, 2016b. <http://www.abta.org/secure/glioblastoma-brochure.pdf>
- Anonymous, 2016c. <http://www.genecards.org/>)
- Armstrong, T.S., Cohen, M.Z., Eriksen, L.R., Hickey, J.V., 2004. Symptom clusters in oncology patients and implications for symptom research in people with primary brain tumors. *Journal of Nursing Scholarship*, 36 (3), 197–206.
- ASTM, E., 2006. Terminology for Nanotechnology. ASTM International, 2456-2466.
- Aşkın, U., Karataş, F., Türköz, Y., Aydın, S., 2012. Paraoksonaz-1 enziminin bazı kinetik özelliklerinin incelenmesi ve ghrelin hormonu ile ilişkisi. *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1, 21-28.
- Azar, A., Jalal, H.S., Arash, G., Mohammad, A., Allahverdi, P.T., 2015. Radiosensitization effects of a *Zataria multiflora* extract on human glioblastoma cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16 (16), 7285-7290.
- Bacri, J.C., Halbreich, A., Perzynski, R., Pons, J.N., Rpgger, J., Sabolovic, D., Silva, M.D.F.D., 1997. Use of magnetic nanoparticles for thermolysis of cells in a ferrofluid. Plenum Pres, New York.
- Ban, J.Y., Jeon, S.Y., Bae, K.W., Song, K.S., Seong, Y.H., 2006. Catechin and epicatechin from *Smilacis chinae* rhizome protect cultured rat cortical neurons against amyloid  $\beta$  protein (25–35)-induced neurotoxicity through inhibition of cytosolic calcium elevation. *Life Sciences*, 79 (24), 2251-2259.
- Barnes, P.M., Bloom, B., Nahin, R.L., 2009. Complementary and alternative medicine use among adults and children: United States. *Natl Health Stat Report* (12), 1-23.
- Başkol, G. ve Köse, G., 2004. Paraoksonaz: Biyokimyasal özellikleri, fonksiyonları ve klinik önemi. *Erciyes Tıp Dergisi*, 26 (2), 75-80.
- Berger, U.V. and Hediger, M.A., 2001. Differential distribution of the glutamate transporters GLT-1 and GLAST in tanycytes of the third ventricle. *Journal of Comparative Neurology*, 433, 101-114.
- Berger, U.V. and Hediger, M.A., 2006. Distribution of the glutamate transporters GLT-1 (SLC1A2) and GLAST (SLC1A3) in peripheral organs. *Anatomy and Embryology*, 211, 595-606.
- Berk, S. ve Akkurt, İ. 2012. Nanopartikül: Geleceğin korkulu rüyası. *Tüberküloz ve Toraks*, 60(2), 180-184.
- Blandini, F., Porter, R.H.P., Greenamyre, J.T., 1996. Glutamate and Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology*, 12, 73-94.
- Boss, B.J. and Wilkerson, R.R., 2006. Concepts of neurologic dysfunction. In K.L. McKance, S.E. Huether (Ed.), *Understanding pathophysiology* (5th ed.), Philadelphia: Mosby, Inc. 491-546.

- Bournival, J., Francoeur, M.A., Renaud, J., Martinoli, M.G., 2012. Quercetin and sesamin protect neuronal PC12 cells from high-glucose-induced oxidation, nitrosative stress, and apoptosis. *Rejuvenation Research*, 15(3), 322-333.
- Bozkurt, E., Atmaca, H., Uzunoğlu, S., 2013. Glioblastoma tümörlerinde çoklu ilaç direnci. *Genel Tıp Dergisi*, 23,133-143.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Bravo, D., Pirgozliev, V., Rose, S.P., 2014. A mixture of carvacrol, cinnamaldehyde, and capsicum oleoresin improves energy utilization and growth performance of broiler chickens fed maize-based diet. *Journal of Animal Science*, 92 (4), 1531-1536.
- Breyera, A., Elstnerb, M., Gillessenc, T., Weiserd, D., Elstner, E., 2007. Glutamate-induced cell death in neuronal HT22 cells is attenuated by extracts from St. John's wort (*Hypericum perforatum L.*). *Phytomedicine*, 14, 250-255.
- Brocke, K.S., Staufner, C., Luksch, H., Geiger, K.D., Stepulak, A., Marzahn, J., Schackert, G., Temme, A., Ikonomidou, C., 2010. Glutamate receptors in pediatric tumors of the central nervous system. *Cancer Biology and Therapy*, 9, 455-468.
- Brothwell, S.L., Barber, J.L., Monaghan, D.T., Jane, D.E., Gibb, A.J., Jones, S., 2008. NR2B- and NR2D-containing synaptic NMDA receptors in developing rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurones. *The Journal of Physiology*, 586 (3), 739-750.
- Buatti, J.M., Marcus, R.B., Mendenhall, W.M., Friedman, W.A., Bova, F., 1996. Accelerated hyperfractionated radiotherapy for malignant gliomas. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 34, 785-792.
- Burger, P.C., Heinz, E.R., Shibata, T., Kleihues, P., 1988. Topographic anatomy and CT correlations in the untreated glioblastoma multiforme. *Journal of Neurosurgery*, 68, 698-704.
- Burger, P.C., Shibata, T., Kleihues, P., 1986. Topographic Anatomy and Cytologic Composition of the Untreated Glioblastoma-Multiforme. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 45, 326-326.
- Camuzcuoglu, H., Arioz, D.T., Toy, H., Kurt, S., Celik, H., Erel, O., 2009. Serum paraoxonase and arylesterase activities in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 112 (3), 481-485.
- Cao, S.W., Li, L., Ma, M.Y., Zhang, L., Zhu, Y.J., 2008. Hierarchically Nanostructured Magnetic Hollow Spheres of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: Preparation and Potential Application in Drug Delivery. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112, 1851-1856,

- Cassileth, R.A., Deng, G., Vickers, A., Yeung, K.S., Chwistek, M., Garrity, D., Gubili, J., Vroom, P., 2007. PDQ Onkoloji Kanserde Tamamlayıcı Tıp. İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul.
- Chaiwut, P., Pintathong, P., Rawdkuen, S., 2010. Extraction and three-phase partitioning behavior of proteases from papaya peels. *Process Biochemistry*, 45 (7), 1172-1175.
- Chauhan, V. and Chauhan A., 2006. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Pathophysiology*, 13(3), 195-208.
- Chen, C., 2016. Sinaptic Acid and Its Derivatives as Medicine in Oxidative Stress-Induced Diseases and Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 357-367.
- Chen, H., Pu, J., Liu, D., Yu, W., Shao, Y., Yang, G., Xiang, Z., He, N., 2016. Anti-inflammatory and antinociceptive properties of flavonoids from the fruits of black mulberry (*Morus nigra L.*). *PLoS One*, 11(4), e0153080.
- Chen, H.S.V. and Lipton, S.A., 2006. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *Journal of Neurochemistry*, 97(6), 1611-1626.
- Chen, J., Chua, K.W., Chua, C.C., Yu, H., Pei, A., Chua, B.H.L., Hamdy, R.C., Xu, X., Liu, C.F., 2011. Antioxidant activity of 7,8-dihydroxyflavone provides neuroprotection against glutamate-induced toxicity. *Neuroscience Letters*, 499 (3), 181-185.
- Chen, P.C., Mwakwari, S.C., Oyelere, A.K., 2008. Gold nanoparticles: from nanomedicine to nanosensing. *Journal of Nanotechnology, Science and Applications*, 1(1), 45-66.
- Chen, P.N., Chu, S.C., Chiou, H.L., Kuo, W.H., Chiang, C.L., Hsieh, Y.S., 2006. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. *Cancer Letters*, 235 (2), 248-259.
- Chen, W., Mahadomrongkul, V., Berger, U.V., Bassan, M., DeSilva, T., Tanaka, K., Irwin, N., Aoki, C., Rosenberg, P.A., 2004. The glutamate transporter GLT1a is expressed in excitatory axon terminals of mature hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience*, 24, 1136-1148.
- Cheng, C.Y., Su, S.Y., Tang, N.Y., Ho, T.Y., Chiang, S.Y., Hsieh, C.L., 2008. Ferulic acid provides neuroprotection against oxidative stress-related apoptosis after cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting ICAM-1 mRNA expression in rats. *Brain Research*, 13, 136-150.
- Choi, D.W., 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1, 623-634.
- Choi, Y.B. and Lipton, S.A., 2000. Redox modulation of the NMDA receptor. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57 (11), 1535-1541.
- Cull-Candy, S., Brickley, S., Farrant, M., 2001. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 11 (3), 327-335.

- Dallaspezia, S., Poletti, S., Lorenzi, C., Pirovano, A., Colombo, C., Benedetti, F., 2012. Influence of an interaction between lithium salts and a functional polymorphism in SLC1A2 on the history of illness in bipolar disorder. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 16 (5), 303-309.
- Danhier, F., Feron, O., Pr at, V., 2010. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 148, 135-146.
- De Groot, J. and Sontheimer H., 2011. Glutamate and the biology of gliomas. *Glia*, 59(8), 1181-1189.
- De Groot, J.F., Piao, Y., Lu, L., Fuller, G.N., Yung, W.K., 2008. Knockdown of GluR1 expression by RNA interference inhibits glioma proliferation. *Journal of Neuro-Oncology*, 88(2), 121-133.
- Deakin, S. and James, R.W., 2004. Genetic and Environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-I. *Clinical Science*, 107, 435-447.
- Deakin, S., Leviev, I., Gomaraschi, M., Calabresi, L., Franceschini, G., James, R.W., 2002. Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 4301-4308.
- DeAngelis, L.M., 2001, Brain Tumors. *The New England Journal of Medicine*, 344 (2), 114-123.
- DeAngelis, L.M., 2001. Brain tumors. *The New England Journal of Medicine*, 344, 114-123.
- Demir, N., Nadaroğlu, H., Demir, Y., 2008. Purification of human serum paraoxonase and effect of acetylsalicylic acid on paraoxonase activity. *Pharmaceutical Biology*, 46 (6), 393-399.
- Demir, N., Nadaroğlu, H., Demir, Y., G ng r, A.A., 2011. An, *In Vitro*, Study of some Pesticides on the Activity of Human Serum Paraoxonase (PON1). *Jordan Journal of Chemistry*, 6 (4), 439-451.
- Demir, D., Gencer, N., Arslan, O. 2016. An alternative purification method for human serum paraoxonase 1 and its interactions with anabolic compounds. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(2), 247-252.
- Diamandopoulos, G.T., 1996. Cancer: An historical perspective. *Anticancer Research*, 16, 1595-1602.
- Dimitrijevic, D.S., Kostic, D.A., Stojanovic, G.S., Mitic, S.S., Mitic M.N., Micic, R., 2013. Polyphenol contents and antioxidant activity of five fresh fruit *Morus spp.* (Moraceae) extracts. *Agro Food Industry Hi Tech*, 24 (5), 34-37.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S.F., 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews*, 51 (1), 57-61.
- Dormandy, T.L., 1980. Free-radical reaction in biological systems. *Annals of the Royal college of surgeons of England*, 62, 188-194.

- Draganov, D.I. and La Du, B.N., 2004 Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 256 (3), 369-378.
- Draganov, D.I., Teiber, J.F., Speelman, A., Osawa, Y., Sunahara, R., 2005. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *The Journal of Lipid Research*, 46(6), 1239-1247.
- Dreiseitel, A., Korte, G., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Domani, M., Hajak, G., Sand, P.G., 2009. Berry anthocyanins and their aglycons inhibit monoamine oxidases A and B. *Pharmacological Research*, 59 (5), 306–311.
- Du, W.X., Olsen, C.E., Avena-Bustillos, R.J., McHugh, T.H., Levin, C.E., Friedman, M., 2008. Storage stability and antibacterial activity against *Escherichia coli* O157:H7 of carvacrol in edible apple films made by two different casting methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (9), 3082–3088.
- Dugo, P., Luigi, M., Giacinto, E., Giovanni, Z., Giovanni, D., 2001. Identification of anthocyanins in berries by narrow-bore high performance liquid chromatography with electrospray ionization detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3987-3992.
- Duman, Y. and Kaya, E., 2014. Purification and recovery of invertase from potato tubers (*Solanum tuberosum*) by three phase partitioning and determined of kinetic properties of purified enzyme. *Turkish Journal of Biochemistry*, 39 (4), 443-448.
- Dunah, A.W., Wang, Y., Yasuda, R.P., Kameyama, K., Haganir, R.L., Wolfe, B.B., Standaert, D.G., 2000. Alterations in subunit expression, composition, and phosphorylation of striatal N-methyl- D-aspartate glutamate receptors in a rat 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Molecular Pharmacology*, 57(2), 342-352.
- Durmaz, R. ve Vural, M., 2007. Primer ve Sekonder Glioblastoma Multiforme Genetiği. *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 17(2), 80-90.
- Durrington, P.N., Mackness, B., Mackness, M.I., 2001. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21(4), 473-480.
- Ehsan, O., Qadir, M.I., Malik, S.A., Abbassi, W.S., Ahmad, B., 2012. Efficacy of nanogold-insulin as a hypoglycemic agent. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 34, 365-370.
- Elkiran, E.T., Mar, N., Aygen, B., Gursu, F., Karaoglu, A., Koca, S., 2007. Serum paraoxonase and arylesterase activities in patients with lung cancer in a Turkish population. *BMC Cancer*, 7-48.
- Elkiran, E.T., Mar, N., Aygen, B., Gursu, F., Karaoglu, A., Koca, S., 2007. Serum paraoxonase and arylesterase activities in patients with lung cancer in a Turkish population. *BMC Cancer*, 7, 48.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82 (1), 70-77.

- Ercisli, S. and Orhan, E., 2007. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chemistry*, 103, 1380-1384.
- Ercisli, S. ve Orhan, E., 2007. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chemistry*, 103, 1380-1384.
- Erdoğan, A. ve Özkan, A., 2013. Nanotechnological applications in cancer treatment and tumor imaging. *Archives Medical Review Journal*, 22(3), 426-440.
- Erzengin, M., Başaran, I., Çakır, U., Aybey, A., Sinan, S., 2012. *In vitro* inhibition effect of some dihydroxy coumarin compounds on purified human serum Paraoxonase 1 (PON1). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168, 1540-1548.
- Fauconnier, N., Bee, A., Roger, J., Pons, J.N., 1996. Adsorption of gluconic and citric acids on maghemite particles in aqueous medium. *Progress in Colloid and Polymer Science*, 100, 212-216.
- Feng, R.Z., Wang, Q., Tong W.Z., Xiong, J., Wei, Q., Zhou, W.H., Yin, Z.Q., Xiao-Ya Yin, Wang, L.Y., Chen, Y.Q., Lai, Y.H., Huang, H.Y., Luo, Q.L., Wang, L., Jia, R.Y., Song, X., Zou, Y.F., Li, L.X. 2015. Extraction and antioxidant activity of flavonoids of *Morus nigra*. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8 (12), 22328-22336.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., 2012. GLOBOCAN 1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Erişim Adresi: <http://globocan.iarc.fr> (28.07.2016).
- Freitas, R.A., 2005. What is nanomedicine? *Nanomedicine*, 1(1), 2-9.
- Fujisawa, S., Atsumi, T., Kadoma, Y., Sakagami, H., 2002. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicology*, 177 (1), 39-54.
- Galani, E. and Buckner, J., 2000. Chemotherapy for high-grade gliomas. *British Journal of Cancer*, 82, 1371-1380.
- Gan, K.N., Smolen, A., Eckerson, H.W., La Du, B.N., 1991. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug metabolism and disposition*, 19 (1), 100-106.
- Gansler, T., Kaw, C., Crammer, C., Smith, T., 2008. A population-based study of prevalence of complementary methods use by cancer survivors: a report from the American Cancer Society's studies of cancer survivors. *Cancer*, 113(5), 1048-1057.
- Gardoni, F., Picconi, B., Ghiglieri, V., Polli, F., Bagetta, V., Bernardi, G., Cattabeni, F., Di Luca, M., Calabresi, P., 2006. A critical interaction between NR2B and

- MAGUK in L-DOPA induced dyskinesia. *The Journal of Neuroscience*, 26(11), 2914-2922.
- Gaspar, P.A., Bustamante, M.L., Silva, H., Aboitiz, F., 2009. Molecular mechanisms underlying glutamatergic dysfunction in schizophrenia: therapeutic implications. *Journal of Neurochemistry*, 111(4), 891-900.
- Gaudin, A., Song, E., King, A.R., Saucier-Sawyea, J.K., Bindra, R., Desmaële, D., Couvreur, P., Saltzman, W.M., 2016. PEGylated squalenoyl-gemcitabine nanoparticles for the treatment of glioblastoma. *Biomaterials*, 105, 136-144.
- Ghosh, A., Sarkar, S., Mandal, A.K., Das, N., 2013. Neuroprotective Role of nanoencapsulated quercetin in combating ischemia-reperfusion induced neuronal damage in young and aged rats. *PLoS ONE*, 8(4), 57735.
- Gielen, M., Retchless, B. S., Mony, L., Johnson, J. W., Paoletti, P., 2009. Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. *Nature*, 459, 703-707.
- Gioti, E., Fiamegos, Y., Skalkos, D., Stalikas, C., 2007. Improved method for the in vitro assessment of antioxidant activity of plant extracts by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection. *Journal of Chromatography A*, 1152, 150-155.
- Goodman, J. and Walsh, V., 2001. *The story of taxol: nature and politics in the pursuit of an anti-cancer drug*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Gönüllü, E., Silav, G., Kaya, M., Arslan, M., Gönüllü, H., Arslan, H., Çebi, A., Demir, H., 2012. Paraoxonase and prolidase activity in patients with malignant gliomas. *Journal of Neurological Sciences [Turkish]*, 29(4), 33, 778-782.
- Gugliucci, A., Kotani, K., Kimura, S., 2012. Paraoxonase 1 in chronic kidney failure. *Journal of Lipids*, 1-10.
- Gundogdu, M., Muradoglu, F., Sensoy, R.I.G., Yilmaz, H., 2011. Determination of fruit chemical properties of *Morus nigra L.*, *Morus alba L.* and *Morus rubra L.* by HPLC. *Scientia Horticulturae*, 132, 37-41.
- Gundogdu, M., Muradoğlu, F., Sensoy, G., Yılmaz, H., 2011. Determination of fruit chemical properties of *Morus nigra L.*, *Morus alba L.* and *Morus rubra L.* by HPLC. *Scientia Horticulturae*, 132, 37-41.
- Gupta, J., 2011. Nanotechnology applications in medicine and dentistry. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 2, 81-88.
- Gupta, N., Gill, K., Singh, S., 2009. Paraoxonases: Structure, gene polymorphism and role in coronary artery disease. *Indian Journal of Medical Research*, 130(4), 361-368.
- Gültekin, M., Boztaş, G., Utku, E.Ş., Kavak Ergün, A., Sevinç, A., Tütüncü, S., Dündar, S., Seymen, E., 2016. *Türkiye Kanser İstatistikleri*. TC Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk sağlığı Kurumu, Ankara.



- Günther, W., Pawlak, E., Damasceno, R., Arnold, H., Terzis, A.J., 2003. Temozolomide induces apoptosis and senescence in glioma cells cultured as multicellular spheroids. *British Journal of Cancer*, 88, 463-469.
- Gürkan, A. ve Bilge, A., 2006. Alternatif terapiler ve psikiyatri hemşireliği. *Ege Üniversitesi Hemşirelik Yüksek Okulu Dergisi*, 22(1), 225-232.
- Güven, A.C., 2009. Borik asitin yeni doğan sıçan beyin hücre kültürlerinde glutamatla oluşturulan nörotoksisiteye etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.
- Güven, M., Aras, A.B., Topaloğlu, N., Özkan, A., Şen, H.M., Kalkan, Y., Okuyucu, A., Akbal, A., Gökmen, F., Coşar, M., 2015. The protective effect of syringic acid on ischemia injury in rat brain. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 45, 233-240.
- Hacımuftuoğlu, A., 2007. Nörotoksisite ve Glutamat İlişkisi. 19. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Trabzon.
- Hadjipanayis, C.G., Machaidze, R., Kaluzova, M., Wang, L., Schuette, A.J., Chen, H., Wu, X., Mao, H., 2010. EGFRvIII antibody-conjugated iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging-guided convection-enhanced delivery and targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Research*, 70 (15), 6303-6312.
- Hajdu, S.I., 2011a. A note from history: landmarks in history of cancer, Part 1. *Cancer*, 117(5), 1097-1102.
- Hajdu, S.I., 2011b. A note from history: landmarks in history of cancer, Part 2. *Cancer*, 117(12), 2811-2820.
- Halperin, E.C., Bentel, G., Heinz, E.R., Burger, P.C., 1989. Radiation therapy treatment planning in supratentorial glioblastoma multiforme: an analysis based on post mortem topographic anatomy with CT correlations. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 17(6), 1347-1350.
- Han, D., Sen, C.K., Roy, S., Kobayashi, M.S., Tritschler, H.J., Packer, L., 1997. Protection against glutamate-induced cytotoxicity in C6 glial cells by thiol antioxidants. *American Journal of Physiology*, 273, 1771-1778.
- Hansson, E., Muyderman, H., Leonova, J., Allansson, L., Sinclair, J., Blomstrand, F., Therlin, T., Nilsson, M., Rönnback, L., 2000. Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication. *Neurochemistry International*, 37, 317-329.
- Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., 2004. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11, 412-419.
- Harel, M., Brumshtein, B., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B.G., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J.L., 2007. 3-D structure of serum paraoxonase 1 sheds

- light on its activity, stability, solubility and crystallizability. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 58(3), 347-353.
- Harvey, A.M., 1974. Early contributions to the surgery of cancer: William S. Halsted, Hugh H. Young and John G. Clark. *The Johns Hopkins Medical Journal*, 135, 399-417.
- Hashemipour, H., Kermanshahi, H., Golian, A., Veldkamp, T., 2013. Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens. *Poultry Science*, 92 (8), 2059-2069.
- Hassimotto, N.M.A., Genovese, M.I., Lajolo, F.M., 2007. Identification and characterisation of anthocyanins from wild mulberry (*Morus nigra L.*) growing in Brazil. *Food Science and Technology International*, 13(1), 17-25.
- Hassimotto, N.M.A., Genovese, M.I., Lajolo, F.M., 2007. Identification and characterisation of anthocyanins from wild mulberry (*Morus*). *Food Science and Technology International*, 13,17-25.
- Hassimotto, N.M.A., Genovese, M.I., Lajolo, F.M., 2008. Absorption and metabolism of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra L.*) in rats. *Nutrition Research*, 28(3), 198-207.
- Hayward, S.L., Wilson, C.L., Kidambi, S., 2016. Hyaluronic acid-conjugated liposome nanoparticles for targeted delivery to CD44 overexpressing glioblastoma cells. *Oncotarget*,1-14.
- He, J. and Giusti, M., 2010. Anthocyanins: natural colorants with promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 163-187.
- He, N., Zhang, C., Qi, X., Zhao, S., Tao, Y., Yang, G., 2013. Draft genome sequence of the mulberry tree *Morus notabilis*. *Nat Communications*, 4, 2445.
- Herin, G.A., Du, S., Aizenman, E., 2001. The neuroprotective agent ebselen modifies NMDA receptor function via the redox modulatory site. *Journal of Neurochemistry*, 78(6), 1307-1314.
- Hertz, L., Dringen, R., Schousboe, A., Robinson, S.R., 1990. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 57, 417-428.
- Hirose, M., Takesada, Y., Tanaka, H., Tamano, S., Kato, T., Shirai, T., 1998. Carcinogenicity of antioxidants BHA, caffeic acid, sesamol, 4-methoxyphenol and catechol at low doses, either alone or in combination, and modulation of their effects in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model. *Carcinogenesis*, 19 (1), 207-212.
- Hiroyasu, F., Satinder K.S., Romina, M., Eric, G., 2005. Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* 438 (7065), 185-192.
- Horasanlı, E., Usta, B., Yeşilay, A., 2008. Medikal akupunktur. *Yeni Tıp Dergisi*, 25, 70-75.

- Horneber, M., Bueschel, G., Dennert, G., Less, D., Ritter, E., Zwahlen, M., 2012. How many cancer patients use complementary and alternative medicine: a systematic review and meta-analysis. *Integrative Cancer Therapies*, 11, 187-203.
- Hsu, C.C., Lin, C.C., Liao, T.S., Yin, M.C., 2006. Protective effect of s-allyl cysteine and s-propyl cysteine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 44, 393-397.
- Huang, H.P., Ou, T.T., Wang, C.J., 2013. Mulberry (桑葚子 Sang Shèn Zi) and its bioactive compounds, the chemoprevention effects and molecular mechanisms *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 3(1), 7-15.
- Hussain, A., Khalid, S.H., Qadir, M.I., Massud, A., Ali, M., Khan, I.U., Saleem, M., Iqbal, M.S., Asghar, S., Gul, H., 2011. Water uptake and drug release behaviour of methyl methacrylate-co-itaconic acid [P(MMA/IA)] hydrogels cross-linked with methylene bis-acrylamide. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 21, 249-255.
- Husseinzadeh, H. and Sadeghi, A., 1999. Anti-hyperglycemic effects of *Morus nigra* and *Morus alba* in mice. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, 9, 63-65.
- Idassi, O., Cagle, P., Carpenter, J., Minor, R., Goktepe, I., Martin, P., 2012. Effect of rosehip (*Rosa Canina*) extracts on human brain tumor cell proliferation and apoptosis. *Journal of Cancer Therapy*, 3(5), 534-545.
- Ikeda, T., Obayashi, H., Hasegawa, G., Nakamura, N., Yoshikawa, T., Imamura, Y., Koizumi, K., Kinoshita, S., 2001. Paraoxonase gene polymorphisms and plasma oxidized low-density lipoprotein level as possible risk factors for exudative age-related macular degeneration. *American Journal of Ophthalmology*, 132, 191-195.
- Ilievski, F., Ross, C.A., Teper, T., 2003. Optical and magnetic properties of  $\gamma$ -iron oxide made by reactive pulsed laser deposition. *IEEE Transactions on Magnetics*, 39, 3172-3174.
- Ishiuchi, S., Tsuzuki, K., Yoshida, Y., Yamada, N., Hagimura, N., Okado, H., Miwa, A., Kurihara, H., Nakazato, Y., Tamura, M., Sasaki, T., Ozawa, S., 2002. Blockage of  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable AMPA receptors suppresses migration and induces apoptosis in human glioblastoma cells. *Nature Medical*, 8, 971-978.
- Işık, M. ve Akçay, F., 2014. Kanser tedavisinde tamamlayıcı ve alternatif tıp. *Turkiye Klinikleri Journal of Family Medicine Special Topics*, 5(2), 28-36.
- Jakab, F., Shoenfeld, Y., Balogh, A., Nichelatti, M., Hoffmann, A., Kahán, Z. 2003. A medical nutriment has supportive value in the treatment of colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 89 (3), 465-469.
- Janbaz, K.H., Nisar, U., Ashraf, M., Qadir, M.I., 2012. Spasmolytic, bronchodilator and antioxidant activities of *Erythrina superosa Roxb.* *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 69, 1111-1117.

- Jennings, W.M., 2004. Aromatherapy practice in nursing: literature review. *Journal of Advanced Nursing*, 48 (1), 93–103.
- Jeong, J.C., Jang, S.W., Kim, T.H., Kwon, C.H., Kim, Y.K. 2010. Mulberry fruit (*Morus fructus*) extracts induce human glioma cell death *in vitro* through ROS-dependent mitochondrial pathway and inhibits glioma tumor growth *in vivo*. *Nutrition and Cancer*, 62, 402-412.
- Jeong, Y.I., Kim, S.H., Jung, T.Y., Kim, I.Y., Kang, S.S., Jin, Y.H., Ryu, H.H., Sun, H.S., Jin, S., Kim, K.K., Ahn, K.Y., Jung, S., 2006. Polyion complex micelles composed of all-trans retinoic acid and poly (ethylene glycol)- grafted-chitosan. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95, 2348-2360.
- Jiang, Y. and Nie, W.J., 2015. Chemical properties in fruits of mulberry species from the Xinjiang province of China. *Food Chemistry*, 174, 460-466.
- Jing, Z., Wang, Y., Wu, S., 2006. Preparation and gas sensing properties of pure and doped  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> by an anhydrous solvent method. *Sensors and Actuators B*, 113, 177-181.
- Johnson, D., O'Neill, R., Patrick, B., 2011. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. *Journal of Neuro-Oncology*, 107 (2), 359–364.
- Kabadere, S., 2002. Glutamat toksisitesi oluşturulmuş glioma hücre dizilerinde MgSO<sub>4</sub> ve lazaroid U-83836E' nin hücre yaşam oranına etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. Eskişehir.
- Kafadar, A.M., Ergen, A., Zeybek, U., Agachan, B., Kuday, C., Isbir, T., 2005. Paraoxonase 192 gene polymorphism and serum paraoxonase activity in high grade gliomas and meningiomas. *Cell Biochemistry and Function*, 24(5), 455-460.
- Kairemo, K., Paola, E., Bergström K., Pauwels, E., 2008. Nanoparticles in cancer. *Current Radiopharmaceuticals*, 1, 30-36.
- Kalsi, G., Whiting, P., Le Bourdelles, B., Callen, D., Barnard, E. A., Gurling, H., 1998. Localization of the human NMDAR2D receptor subunit gene (GRIN2D) to 19q13.1-qter, the NMDAR2A subunit gene to 16p13.2 (GRIN2A), and the NMDAR2C subunit gene (GRIN2C) to 17q24-q25 using somatic cell hybrid and radiation hybrid mapping panels. *Genomics* 47, 423-425.
- Kanai, Y., Hediger, M.A. 2004. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflügers Archiv*, 447, 469–479.
- Kanai, Y., Smith, C.P., Hediger, M.A., 1993. The elusive transporters with a high affinity for glutamate. *Trends in Neurosciences*, 16, 365-730.
- Kang, T.H., Hur, J.Y., Kim, H.B., Ryu, J.H., Kim, S.Y., 2006. Neuroprotective effects of the cyanidin-3-O-b-D-glucopyranoside isolated from mulberry fruit against cerebral ischemia. *Neuroscience Letters*, 391, 122-126.

- Karki, P., Smith, K., Johnson, J., Aschner, M., Lee, E., 2015. Genetic dys-regulation of astrocytic glutamate transporter EAAT2 and its implications in neurological disorders and manganese toxicity. *Neurochemical Research*, 40 (2), 380-388.
- Kat, B. ve Keskin, S.Y., 2013. Üçlü faz sistemi ile saflaştırılan invertaz enziminin termal kararlılığının incelenmesi. *SAU Journal of Science*, 17 (2), 291-294.
- Kelly, K.M., 2004. Complementary and alternative medical therapies for children with cancer. *European Journal of Cancer*, 40 (14), 2041-2046.
- Khalid, S.H., Qadir, M.I., Massud, A., Ali, M., Rasool, M.H., 2009. Effect of degree of cross-linking on swelling and drug release behaviour of poly (methyl methacrylate-co-itaconic acid) [P (MMA/IA)] hydrogels for site specific drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 19, 413-418.
- Khorshid, L. ve Yapucu, Ü., 2005. Tamamlayıcı tedavilerde hemşirenin rolü. *Atatürk Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi*, 2, 124-130.
- Kim, H.G., Ju, M.S., Shim, J.S., Kim, M.C., Lee, S.H., Huh, Y., Kim, S.Y., Oh, M.S., 2010. Mulberry fruit protects dopaminergic neurons in toxin-induced Parkinson's disease models. *British Journal of Nutrition*, 104, 8-16.
- Kleihues, P., Louis, D.N., Scheithauer, B.W., Rorke, L.B., Reifenberger, G., Burger, P.C., Cavenee, W.K., 2002. The WHO classification of tumors of the nervous system. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 61, 215-225.
- Kommareddi, N.S., Tata, M., John, V.T., McPherson, G.L., Herman, M.F., Lee, Y.S., O'Connor, C.J., Akkara, J.A., Kaplan, D.L., 1996. Synthesis of superparamagnetic polymer-ferrite composites using surfactant microstructures. *Chemistry of Materials*, 8, 801-809.
- Kondo, I. and Yamamoto, M., 1998. Genetic polymorphism of paraoxonase 1 (PON1) and susceptibility to Parkinson's disease. *Brain Researches*, 8 (6), 271-273.
- Korte, G., Dreiseitel, A., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Hajak, G., Sand G., 2009. An Examination of anthocyanins' and anthocyanidins' affinity for cannabinoid receptors. *Journal of Medicinal Food*, 12 (6), 1407-1410.
- Kumar, V.R. and Chauhan, S., 2008. Mulberry: life enhancer. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2(10), 271-278.
- La Du, B.N., 1992. Human serum paraoxonase/arylesterase. In: Kalow W. *Genetic Factors Influencing the Metabolism of Foreign Compounds: International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*. Pergamon Press, New York, 51-91.
- Lammers, T., Hennink, W.E., Storm, G., 2008. Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice. *British Journal of Cancer*, 99, 392-397.
- Larsen, C., 2010. Genetic and molecular abnormalities of glioblastomas (GBM). *Bulletin Du Cancer*, 97, 1389-1407.
- Lavoie, S., Chen, Y., Dalton, T.P., Gysin, R., Cuenod, M., Steullet, P., Do, K.Q., 2009. Curcumin, Quercetin and tBHQ modulate glutathione levels in astrocytes and

- neurons: importance of the glutamate cysteine ligase modifier subunit. *Journal of Neurochemistry*, 108, 1410-1422.
- Lee, C.H., Lee, K.Y., Choe, K.H., Hong, Y.C., Kim, Y.D., Kang, J.W., 2005. Effects of oxidative DNA damage induced by polycyclic aromatic hydrocarbons and genetic polymorphism of the paraoxonase-1 (PON1) gene on lung cancer. *Journal of Preventive Medicine & Public Health*, 38 (3), 345-350.
- Lee, C.H., Lee, K.Y., Choe, K.H., Hong, Y.C., Kim, Y.D., Kang, J.W., Noh, S.I., Eom, S.Y., Ko, Y.J., Zhang, Y.W., Yim, D.H., 2005. Effects of oxidative DNA damage induced by polycyclic aromatic hydrocarbons and genetic polymorphism of the paraoxonase-1 (PON1) gene on lung cancer. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, 38 (3), 345-350.
- Lee, M.Y., Liao, M.H., Tsai, Y.N., Chiu, K.H., Wen, H.C., 2011. Identification and anti-human glioblastoma activity of tagitinin C from *Tithonia diversifolia* methanolic extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (6), 2347-2355.
- Leibel, S.A. and Sheline, G.E., 1987. Radiation therapy for neoplasms of the brain. *Journal of Neurosurgery*, 66, 1-22.
- Lesniak, M.S., Langer R., Brem H., 2001. Drug delivery to tumors of the central nervous system. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 1, 210-216.
- Lewis, R.J. and Sax 1996. *Dangerous properties of industrial materials*. 1-3 (9th ed.). NY: Van Nostrand Reinhold. p. 2897. New York.
- Li, F. and Tsien, J.Z. 2009. Memory and the NMDA receptors. *The New England Journal of Medicine*, 361(3), 302-303.
- Li, X. and Francke, U. 1995. Assignment of the gene SLC1A2 coding for the human glutamate transporter EAAT2 to human chromosome 11 bands p13-p12. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 71, 212-213.
- Lin, J. and Tang, C., 2007. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*, 101, 140-147.
- Lin, Y.J., Bovetto, S., Carver, J.M., Giordano, T., 1996. Cloning of the cDNA for the human NMDA receptor NR2C subunit and its expression in the central nervous system and periphery. *Molecular Brain Research*, 43, 57-64.
- Lineweaver, H. and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 57, 600-685.
- Liu, Y. and Zhang, J., 2000. Recent development in NMDA receptors. *Chinese Medical Journal*, 113 (10), 948-956.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods*, 25, 402-408.

- Lu, C.W., Lin, T.Y., Wang, S.J. 2013. Quercetin inhibits depolarization-evoked glutamate release in nerve terminals from rat cerebral cortex. *NeuroToxicology*, 39, 1-9.
- Luna, A., Lábaque, M.C., Zygadlo, J.A., Marin, R.H., 2010. Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat. *Poultry Science*, 89 (2), 366-370.
- Luthria, D.L. and Pastor-Corrales, M.A., 2006. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris L.*) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 205-211.
- Ma, Y.P., 2002. Efficacy of the fruits of black mulberry (*Morus nigra L.*) for pharyngitis. *Xinjiang Journal of Traditional Chinese Medicine*, 20, 83-84.
- Mackness, B., Davies, G.K., Turkei, W., Lee, E., Roberts, D.H., Hill, E., Roberts, C., Durrington, P.N., Mackness, M.I., 2001. Paraoxonase status in coronary heart disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21, 1451-1457.
- Mackness, B., Durrington, P.N., Mackness, M.I., 1998. Human serum paraoxonase. *General Pharmacology*, 3, 329-336.
- Maier-Hauff, K., Ulrich, F., Nestler, D., Niehoff, H., Wust, P. Thiesen, B., Orawa, H., Budach, V., Jordan, A., 2011. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of Neuro-Oncology*, 103 (2), 317-324.
- Malik, M.N.H., Alamgeer, U.S., Qayyum, A., Samreen, S., 2012. Phytochemical analysis and cardiac depressant activity of aqueous methanolic extract of *Morus nigra L.* fruit. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2, 39-41.
- Mandel, S. and Youdim, M.B.H., 2004. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 37 (3), 304-317.
- Mann, J., 2002. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nature Reviews Cancer*, 2(2), 143-148.
- Markesbery, W.R., 1997. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(1),134-147.
- Markiewicz-Żukowska, R., Borawska, M.H., Fiedorowicz, A., Naliwajko, S.K., Sawicka, D., Car, H., 2013. Propolis changes the anticancer activity of temozolomide in U87MG human glioblastoma cell line. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 50-56.
- Martin, E.G., Martinez, C., Molina, J.A., Navarro, H.A. Jimenez, F.J.J., Agundez, J.A.G., 2010. Two common nonsynonymous paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and brain astrocytoma and meningioma. *BMC Neurology*, 10(1), 617-627.
- Martini, L.H., Souza, C.R., Marques, P.B., Calixto, J.B., Yunes, R.A., Souza, D.O. 2000. Compounds extracted from *Phyllanthus* and *Jatropha elliptica* inhibit the

- binding of [<sup>3</sup>H] glutamate and [<sup>3</sup>H]GMP-PNP in rat cerebral cortex membrane. *Neurochemical Research*, 25 (2), 211-215.
- Masood, A., Sher, T., Chanan-Khan, A., 2011. Reply to tumor flare reaction associated with lenalidomide treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia predicts clinical response. *Cancer*, 117 (10), 2127-2135.
- Mazimba, O., Majinda, R.R., Motlhanka, D., 2011. Antioxidant and antibacterial constituents from *Morus nigra*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5, 751-754.
- Mazur, A., 1946. An enzyme in animal tissue capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. *The Journal of Biological Chemistry*, 164, 271-289.
- McKinney, P.C., 2004. Brain tumours: incidence, survival, and aetiology. *Journal of Neurology Neurosurgery Psychiatry*, 75, 12-17.
- Medina, C., Santos-Martinez, M.J., Radomski, A., Corrigan, O.I., Radomski, M.W., 2007. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *British Journal of Pharmacology*, 150, 552-558.
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52, 673-751.
- Mikami, Y. and Yamazawa, T. 2015. Chlorogenic acid, a polyphenol in coffee, protects neurons against glutamate neurotoxicity. *Life Sciences*, 139, 69-74.
- Mu, Q., Lin, G., Patton, V.K., Wang, K., Press, O.W., Zhang, M., 2016. Gemcitabine and chlorotoxin conjugated iron oxide nanoparticles for glioblastoma therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 4, 32-36.
- Naderi, A.G., Asgary, S., Sarraf-Zadegan, N., Oroojy, H., Afshin-Nia, F., 2004. Antioxidant activity of three extracts of *Morus nigra*. *Phytotherapy Research*, 18, 365-369.
- Naderi, G.A., Asgary, S., Sarraf-Zadegan, N., Oroojy, H., Afshin-Nia, F., 2004. Antioxidant activity of three extracts of *Morus nigra*. *Phytotherapy Research*, 18, 365-369.
- Nagane, M., Huang, H.J., Cavenee, W.K., 1999. Causes of drug resistance and novel therapeutic opportunities for the treatment of glioblastoma. *Drug Resistance Updates*, 2, 30-37.
- Narayan, A.V., Madhusudhan, M.C., Raghavarao, K.S.M.S., 2008. Extraction and purification of Ipomoea peroxidase employing three-phase partitioning. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151, 263-272.
- Nath, S., Bachani, M., Harshavardana, D., Steiner, J.P., 2012. Catechins protect neurons against mitochondrial toxins and HIV proteins via activation of the BDNF pathway. *Journal of NeuroVirology*, 18 (6), 445-455.
- Naz, S., Qadir, M.I., Ali, M., Janbaz, K.H., 2011. Nanotechnology for imaging and drug delivery in cancer. *Journal of The Chemical Society of Pakistan*, 34, 107-111.



- Ndao, D.H., Ladas, E.J., Bao, Y., Cheng, B., Nees, S.N., Levine, J.M., Kelly, K.M., 2013. Use of complementary and alternative medicine among children, adolescent, and young adult cancer survivors: a survey study. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 35(4), 281-288.
- Nishio, E. And Watanabe Y., 1997. Cigarette smoke extract inhibits plasma paraoxonase activity by modification of the enzyme's free thiols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236 (2), 289-293.
- Obrenovitch, T.P. and Urenjak, J., 1997. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. *Progress in Neurobiology*, 51, 39-87.
- Odriozola, J.A., López, T., Recillas, S., Guevara, P., Sotelo, J., Alvarez, M., 2008. Pt/TiO<sub>2</sub> brain biocompatible nanoparticles: GBM treatment using the C6 model in Wistar rats. *Acta Biomaterialia*, 4(6), 2037-2044.
- Oh, M.C., Kim, J.M., Safaei, M., Kaur, G., Sun, M.Z., Kaur, R., Celli, A., Mauro, T.M., Parsa, A.T., 2012. Overexpression of calcium-permeable glutamate receptors in glioblastoma derived brain tumor initiating cells. *PLoS One*, 7(10):e47846.
- Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P.L., Burkhard, C., Schüler, D., Probst-Hensch, N.M., Maiorka, P.C., Baeza, N., Yonekawa, Y., Yasargil, M.G., Lütolf, U.M., Kleihues, P., 2004. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Research*, 64 (19), 6892-6899.
- Ozgen, M., Serce, S., Kaya, C., 2009. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. *Scientia Horticulturae*, 119, 275-279.
- Padilha, M.M., Vilela, F.C., Da Silva, M.J.D., Dos Santos, M.H., Alvesda- Silva, G., Giusti-Paiva, A., 2009. Antinociceptive effect of the extract of *Morus nigra* leaves in mice. *Journal of Medicinal Food*, 12, 1381-1385.
- Padilha, M.M., Vilela, F.C., Rocha, C.Q., Dias, M.J., Soncini, R., Dos Santos, M.H., Alves-da-Silva, G., Giusti-Paiva, A., 2010. Antiinflammatory properties of *Morus nigra* leaves. *Phytotherapy Research*, 24, 1496-1500.
- Paoletti, P. and Neyton, J., 2007. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, 7 (1), 39-47.
- Pardridge, W.M., 1997. Drug delivery to the brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 17, 713-731.
- Pardridge, W.M., 2007, Drug targeting to the brain. *Pharmaceutical Research*, 24 (9), 1733-1744.
- Pawlowska, A.M., Oleszek, W., Braca, A., 2008. Quali-quantitative analyses of flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3377-3380.
- Pecorino, L., 2006, *Molecular Biology of Cancer-Mechanism, Targets and Therapeutics*. Oxford University Press Inc., New York.

- Penugonda, S., Mare, S., Goldstein, G., Banks, W.A., Ercal, N., 2005. Effects of N-acetylcysteine amide (NACA), a novel thiol antioxidant against glutamate-induced cytotoxicity in neuronal cell line PC12. *Brain Research*, 1056 (2), 132-138.
- Pereira, C.F. and De Oliveira, C.R., 2000. Oxidative glutamate toxicity involves mitochondrial dysfunction and perturbation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis. *Neuroscience Research*, 37, 227-236.
- Perez, J.M., Josephson, L., Weissleder, R., 2004. Use of magnetic nanoparticles as nanosensors to probe for molecular interactions, *ChemBioChem*, 5, 261-264.
- Pistollato, F., Bremer-Hoffmann, S., Basso, G., Cano, S.S., Elio, I., Vergara, M.M., Giampieri, F., Battino, M., 2016. Targeting glioblastoma with the use of phytocompounds and nanoparticles. *Targeted Oncology*, 11 (1), 1-16.
- Potter, P.A. and Perry, A.G., 2009. *Fundamentals of Nursing*. 7th ed. Canada: Mosby Company, 771-785.
- Prates, C., Sousa, S., Oliviera, C., Ikram, S., 2011. Prostate metastatic bone cancer in an Egyptian Ptolemaic mummy, a proposed radiological diagnosis. *International Journal of Paleopathology*, 1(2), 98-103.
- Précourt, L.P., Amre, D., Denis, M.C., Lavoie, J.C., Delvin, E., 2011. The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation. *Atherosclerosis*, 214, 20-36.
- Qadir, M.I., 2009. Medicinal and cosmetological importance of *Aloe vera*. *Journal of International Journal of Nanomedicine*, 2, 21-26.
- Qadir, M.I., 2010. Medicinal values of ginger. *International Journal Nature Ther*, 3, 19-22.
- Qadir, M.I., Ali, M., İbrahim, Z., 2014. Anticancer activity of *Morus nigra* leaves extract. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 9, 496-497.
- Ramachandran, C., Lollett, I.V., Escalon, E., Quirin, K.W., Melnick, S.J., 2015. Anticancer potential and mechanism of action of Mango Ginger (*Curcuma amadaRoxb.*) supercritical  $\text{CO}_2$  extract in human glioblastoma cells. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 20 (2), 109-111.
- Rangan, U. and Bulkley, G.B., 1993. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *British medical bulletin*, 49, 700-718.
- Rasulev, B., Kušić, H., Leszczynska, D., Leszczynski, J., Koprivanac, N., 2010. QSAR modeling of acute toxicity on mammals caused by aromatic compounds: the case study using oral  $LD_{50}$  for rats. *Journal of Environmental Monitoring*, 12, 1037-1044.
- Rauner, C. and Kohr, G., 2011. Triheteromeric NR1/NR2A/NR2B receptors constitute the major Nmethyl- D-aspartate receptor population in adult hippocampal synapses. *The Journal of Biological Chemistry*, 286 (9), 7558-7566.
- Reddivari, L., Vanamala, J., Chintharlapalli, S., Safe, S.H., Miller Jr, J.C., 2007. Anthocyanin fraction from potato extracts is cytotoxic to prostate cancer cells

- through activation of caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Carcinogenesis*, 28 (10), 2227-2235.
- Renault, F., Chabrière, E., Andrieu, J.P., Dublet, B., Masson, P., Rochu, D.J., 2006. Tandem purification of two HDL-associated partner proteins in human plasma, paraoxonase (PON1) and phosphate binding protein (HPBP) using hydroxyapatite chromatography. *Journal of Chromatography B*, 836, 15–21.
- Richard, S., Saric, A., Boucher, M., Slomianny, C., Geffroy, F., Mériaux, S., Lalatonne, Y., Petit, P.X., Motte, L., 2016. Antioxidative theranostic iron oxide nanoparticles toward brain tumors imaging and ROS production. *ACS Chemical Biology*, 26(8), 442-449.
- Rosenblat, M., Vaya, J., Shih, D., Aviram, M., 2005. Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis*, 179(1), 69-77.
- Roslin, M., Henriksson, R., Bergström, P., Ungerstedt, U., Bergenheim, A.T., 2003. Baseline levels of glucose metabolites, glutamate and glycerol in malignant glioma assessed by stereotactic microdialysis. *Journal of Neuro-Oncology*, 61(2), 151-160.
- Rossi, E., Vita, A., Baccetti, S., Stefano, M.D., Voller, F., Zanobini, A., 2015. Complementary and alternative medicine for cancer patients: results of the EPAAC survey on integrative oncology centres in Europe. *Supportive Care in Cancer*, 23(6), 1795-1806.
- Roy, I. and Gupta, M.N., 2002. Three-phase affinity partitioning of proteins. *Analytical Biochemistry*, 300, 11-14.
- Rozenberg, O., Shih, D.M., Aviram, M., 2003. Human serum paraoxonase 1 decreases macrophage cholesterol biosynthesis: possible role for its phospholipase-A2-like activity and lysophosphatidylcholine formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(3), 461-467.
- Sadek, K., Abouzed, T., Nasr, S., 2016. Lycopene modulates cholinergic dysfunction, Bcl-2/Bax balance, and antioxidant enzymes gene transcripts in monosodium glutamate (E621) induced neurotoxicity in a rat model. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 94 (4), 394-401.
- Sahoo, S.K. and Labhasetwar, V., 2003. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery Today*, 8 (24), 1112-1120.
- Samra, Z.Q., Shabir, S., Rehmat, Z., Zaman, M., Nazir, A., Dar, N., Athar, M.A., 2010. Synthesis of Cholesterol-Conjugated Magnetic Nanoparticles for Purification of Human Paraoxonase 1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162, 671-686.
- Sanchez-Salcedo, E.M., Mena, P., Garcia-Viguera, C., Martinez, J.J., Hernandez, F., 2015. Phytochemical evaluation of white (*Morus alba L.*) and black (*Morus*

- nigra* L.) mulberry fruits, a starting point for the assessment of their beneficial properties. *Journal of Functional Foods*, 12, 399-408.
- Sass-Kiss, A., Kiss, J., Milotay, P., Kerek, M.M., Toth-Markus, M., 2005. Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. *Food Research International*, 38, 1023-1029.
- Sayın, M., 2009. Sığır serum Paraoksonaz Enziminin Saflaştırılması ve İmmobilizasyonu. Fen bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Balıkesir.
- Schild, L., Chen, B.H., Makarov, P., Kattengell, K., Keilhoff, G., 2010. Selective induction of apoptosis in glioma tumour cells by a *Gynostemma pentaphyllum* extract. *Phytomedicine*, 17 (8), 589–597.
- Schipke, C.G., Ohlemeyer, C., Matyash, M., Nolte, C., Kettenmann, H., Kirchoff, F., 2001. Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15, 1270-1272.
- Seeram-Navindra, P., 2008. Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (3), 627-629.
- Sershen, H., Hashim, A., Dunlop, D.S., Suckow, R.F., Cooper, T.B., Javitt, D.C., 2016. Modulating NMDA receptor function with d-amino acid oxidase inhibitors: understanding functional activity in PCP-treated mouse model. *Neurochemical Research*, 41(1), 398-408.
- Shah, N., Kataria, H., Kaul, S.C., Ishii, T., Kaur, G., Wadhwa, R., 2009. Effect of the alcoholic extract of Ashwagandha leaves and its components on proliferation, migration, and differentiation of glioblastoma cells: Combinational approach for enhanced differentiation. *Cancer Science*, 100 (9), 1740-1747.
- Shi, L., Chen, J., Yang, J., Pan, T., Zhang, S., Wang, Z., 2010. MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity. *Brain Research*, 1352, 255-264.
- Shih, P.H., Chan, Y.C., Liao, J.W., Wang, M.F., Yen, G.C., 2010. Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21 (7), 598–605.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2016. Cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(1),7-30.
- Sinan, S., Kockar, F., Arslan, O., 2006a. Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglikozide derived antibiotics. *Biochimie*, 88 (5), 565-574.
- Sinan, S., Kockar, F., Gencer, N., Yıldırım, H., Arslan, O. 2006b. Effects of some antibiotics on paraoxonase from human serum in vitro and from mouse serum and liver in vivo. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(8), 1559-1563.

- Singh, K.P. and Ghosh, P.L., 1992. Indian silk. 31, 16.
- Siu, A.W., Laua, M.K., Chenga, J.S., Chowa, C.K., Tama, W.C., Li, K.K., Lee, D.K.L., To, T.S.S., Doa, C.W., 2008. Glutamate-induced retinal lipid and protein damage: The protective effects of catechin. *Neuroscience Letters*, 432, 193–197.
- Smeltzer, S.C. and Bare, B.G., 2005. Brunner and suddarth's textbook of medical surgical nursing. 10th Edition, USA, Lippincott Williams & Wilkins, 1970-1977.
- Soloviev, M., 2007. Nanobiotechnology today: focus on nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology*, 5 (11), 1-3.
- Soltanab, Y.A., Morsybc, A.S., Araujo, R.C., Elzaiatab, H.M., Sallama, S.M.A., Louvandinib, H., Abdallab, A.L., 2011. Carvacrol and eugenol as modifiers of rumen microbial fermentation, and methane production in vitro. *Foreign Agricultural Relations (FAR)*, Egypt.
- Song, W., Wang, H., Bucheli, P., Zhang, P., Wei, D., Lu, Y., 2009. Phytochemical profiles of different mulberry (*Morus sp.*) species from China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 9133-9140.
- Štefančíková, L., Lacombe, S., Salado, D., Porcel, E., Pagáčová, E., Tillement, O., Lux, F., Depeš, D., Kozubek, S., Falk, M., 2016. Effect of gadolinium-based nanoparticles on nuclear DNA damage and repair in glioblastoma tumor cells. *Journal of Nanobiotechnology*, 14, 63-71.
- Stepulak, A., Luksch, H., Gebhardt, C., Uckermann, O., Marzahn, J., Sifringer, M., Rzeski, W., Staufner, C., Brocke, K.S., Turski, L., Ikonimidou, C., 2009. Expression of glutamate receptor subunits in human cancers. *Histochemistry and Cell Biology*, 132, 435-445.
- Stinzing, F.C., Stinzing, A.S., Carle, R., Frei, B., Wrolstad, R.E., 2002. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6172-6181.
- Syed, S., Zubair, A., Frieri, M., 2013. Immune response to nanomaterials: implications for medicine and literature review. *Current Allergy and Asthma Reports*, 13 (1), 50-57.
- Şimşek, A.B. ve Dicle, A., 2013. Primer beyin tümörü: klinik özellikler, Tedavi ve Bakım. *Dokuz Eylül Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu Elektronik Dergisi*, 6 (2), 102-113.
- Ştefănuţ, M.N., Căta, A., Pop, R., Tănasie, C., Boc, D., Ienaşcu, I., Ordodi, V., 2013. Anti hyperglycemic effect of bilberry, blackberry and mulberry ultrasonic extracts on diabetic rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68, 378-384.
- Takai, S., Kawakami, H., Nakayama, T., Yamada, K., Nakamura, S., 1996. Localization of the gene encoding the human L-glutamate transporter (GLT-1) to 11p11.2-p13 by fluorescence in situ hybridization. *Human Genetics*, 97, 387-389.

- Takano, H., Onodera, O., Tanaka, H., Mori, H., Sakimura, K., Hori, T., Kobayashi, H., Mishina, M., Tsuji, S., 1993. Chromosomal localization of the epsilon-1, epsilon-3, and zeta-1 subunit genes of the human NMDA receptor channel. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 197, 922-926.
- Tan, G., Onur, M.A., Sağlam, N., 2012. Nano altın ve biyotıp. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 32 (2), 499-506.
- Tang, T.T., Badger, J.D., Roche, P.A., Roche, K.W., 2010. Novel approach to probe subunitspecific contributions to N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor trafficking reveals a dominant role for NR2B in receptor recycling. *The Journal of Biological Chemistry*, 285 (27), 20975–20981.
- Tansey, E.M., 2003. The story of taxol: nature and politics in the pursuit of an anti-cancer drug (review). *Perspectives in Biology and Medicine*, 46(2), 305-307.
- Teiber, J.F., Draganov, D.I., La Du, B.N., 2003. Lactonase and lactonizing of human serum paraoxonase (PON1) and rabbit serum PON3. *Biochemical Pharmacology*. 66 (6), 887-896.
- Tezcan, G., Tunca, B., Bekar, A., Budak, F., Şahin, S., Cecener, G., Egeli, U., Taşkapılıoğlu, M.O., Kocaeli, H., Tolunay, S., Malyer, H., Demir, C., Tumen, G., 2014. *Olea europaea* leaf extract improves the treatment response of GBM stem cells by modulating miRNA expression. *American Journal of Cancer Research*, 4(5), 572-590.
- Thompson, D.C., Barhoumi, R., Burghardt, R.C., 1998. Comparative toxicity of eugenol and its quinone methide metabolite in cultured liver cells using kinetic fluorescence bioassays. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 149 (1), 55-63.
- Thrall, J.H., 2004. Nanotechnology and medicine. *Radiology*, 230, 315-318.
- Tian, R.R., Pan, Q.H., Zhan, J.C., Li, J.M., Wan, S.B., Zhang, Q.H., Huang, W.D., 2009. Comparison of Phenolic Acids and Flavan-3-ols During wine fermentation of grapes with different harvest times, *Molecules*, 14, 827-838.
- Tomita, T., 1991. Interstitial chemotherapy for brain tumors: review. *Journal of Neuro-Oncology*, 10, 57-74.
- Torchilin, V., 2011. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 131-135.
- Torchilin, V.P., 2010. Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 197,3-53.
- Torres, J.L., Lozano, C., Maher, P., 2005. Conjugation of catechins with cysteine generates antioxidant compounds with enhanced neuroprotective activity. *Phytochemistry*, 66, 2032-2037.
- Trotti, D., Aoki, M., Pasinelli, P., Berger, U. V., Danbolt, N. C., Brown, R. H., Jr., Hediger, M.A., 2001. Amyotrophic lateral sclerosis-linked glutamate transporter mutant has impaired glutamate clearance capacity. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 576-582.

- Turan, İ., Demir, S., Kiliç, K., Burnaz, N.A., Yaman, S.Ö. Akbulut, K., Menteşe, A., Aliyazıcıoğlu, Y., Değer, O., 2016. Antiproliferative and apoptotic effect of *Morus nigra* extract on human prostate cancer cells. *Saudi Pharmaceutical Journal*. In Press.
- Ultee, A., Slump, R.A., Steging, G., Smid, E.J., 2000. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection*, 63 (5), 620-624.
- Urbańska, K., Pająk, B., Orzechowski, A., Sokołowska, J., Grodzik, M., Sawosz, E., Szmidt, M., Sysa, P., 2015. The effect of silver nanoparticles (AgNPs) on proliferation and apoptosis of in ovo cultured glioblastoma multiforme (GBM) cells. *Nanoscale Research Letters*, 10 (98), 1-11.
- Uysal, S., Akyol, S., Hasgül, R., Armutçu, F., Yiğitoğlu, M.R., 2011. Çok yönlü bir enzim: paraoksonaz. *Yeni Tıp Dergisi*, 28 (3), 136-141.
- Van Himbergen, T.M., Van Tits, L.J.H., Roest, M., Stalenhoef, A.F.H., 2006. The story of PON1: how an organophosphate hydrolyzing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. *Netherlands Journal of Medicine*, 64 (2), 34-38.
- Vidak, M., Rozman, D., Komel, R., 2015. Effects of flavonoids from food and dietary supplements on glial and glioblastoma multiforme cells. *Molecules*, 20, 19406-19432.
- Volpato, G.T., Calderon, I.M.P., Sinzato, S., Campos, K.E., Rudge, M.V.C., Damasceno, D.C., 2011. Effect of *Morus nigra* aqueous extract treatment on the maternal-fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 138, 691-696.
- Wang, H., Cao, G., Prior, R.L., 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 304-309.
- Wang, Z.J., Xiao, G.S., Liu, X.M., Tang, C.M., Luo, G.Q., Wu, F.Q., 2009. Anti-inflammatory activity of anthocyanins from mulberry on adjuvant-injured arthritis. *Chinese Journal of Public Health*, 181-183.
- Wastphal, M., Tonn, J.-C., Ram, Z., 2003. Local therapies for glioma present status and future developments. Springer-Verlag/Wien.
- Watts, C., Piccirillo, S., Kearney, L., Potter, N., Van Delft, F., Coleman, S., Lillis, S., Carnicer, M.J., Greaves, M., 2014. Interrogation of sub-clonal genetic diversity of human GBM reveals genetic heterogeneity in tumour-propagating cells, which display variable competitive capacity for tumour propagation *in vivo*. *Neuro-Oncology*, 16 (44).
- Wen, P.Y. and Kesari, S., 2008. Malignant glioma in adults. *New England Journal of Medicine*, 359, 492-507.
- WHO. Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Eugenol No. 1529, WHO Food Additives Series 17, <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v17je10.htm>

- Wrensch, M., Minn, Y., Chew, T., Bondy, M., Berger, M.S., 2002. Epidemiology of primary brain tumors; Current concepts and review of the literature. *Neuro-Oncology*, 4, 278-299.
- Wu, Y.L., Jiang, Y.Z., Jin, X.J., Lian, L.H., Piao, J.Y., Wan, Y., Jin, H.R., Joon Lee, J., Nan, J.X., 2010. Acanthoic acid, a dipertine in *Acanthopanax koreanum*, protects acetaminophen-induced hepatic toxicity in mice. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 17, 475-479.
- Xu, T., Zhang, N., Nichols, H.L., Shi, D., Wen, X., 2007. Modification of nanostructured materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*, 27 (3), 579-594.
- Yang, Y.J., Wu, P.F., Long, L.H., Yu, D.F., Wu, W.N., Hu, Z.L., Fu, H., Xie, N., Jin, Y., Ni, L., Wang, F., Chen, J.G., 2010. Reversal of aging-associated hippocampal synaptic plasticity deficits by reductants via regulation of thiol redox and NMDA receptor function. *Aging cell*, 9(5), 709-721.
- Yapar, K., Kart, A., Karapehlivan, M., Atakisi, O., Tunca, R., Erginsoy, S., Citil, M., 2007. Hepatoprotective effect of L-carnitine against acute acetaminophen toxicity in mice. *Experimental and toxicologic pathology: official journal of the Gesellschaft fur Toxicologische Pathologie*, 59, 121-128.
- Yiğit, N., Yiğit, D., Özgen, U., Aktaf, A.E., 2007. Karadut (*Morus nigra L.*)'un antikandidal aktivitesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 37(3), 169-173.
- Yula, E. ve Deveci, Ö., 2010. Nanotıp, mikrodizilimler ve klinik mikrobiyolojide kullanımları. *Dicle Tıp Dergisi*, 37 (4), 422-428.
- Yung, W.K., Prados, M.D., Yaya-Tur, R., Rosenfeld, S.S., Brada, M., Friedman, H.S., Zhang, M., Mu, Q., Jeon, M., Hsiao, M.H., Patton, V.K., Wang, K., Press, O.W., 2015. Stable and efficient paclitaxel nanoparticles for targeted glioblastoma therapy. *Advanced Healthcare Materials*, 4 (8), 1236-1245.
- Zadernowski, R., Naczki, M., Nesterowicz, J., 2005. Phenolic acid profiles in some small berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2118-2124.
- Zhang, M., Stephen, Z.R., Kievit, F.M., Veiseh, O., Chiarelli, P.A., Fang, C., Wang, K., Hatzinger, S.J., Ellenbogen, R.G., Silber, J.R., 2014. Redox-Responsive Magnetic Nanoparticle for Targeted Convection-Enhanced Delivery of O6-Benzylguanine to Brain Tumors. *ACS Nano*, 8 (10), 10383-10395.
- Zhao, P., Zhao, L., Zou, P., Lu, A., Liu, N., Yan, W., Kang, C., Fu, Zhen, You, Y., Jiang, T., 2012. Genetic oxidative stress variants and glioma risk in a Chinese population: a hospital-based case-control study. *BMC Cancer*, 12, 617-626.
- Zhu, W., Yanli, L., Lixin, L., Yongming, C., Fu, X., 2012. Supramolecular hydrogels as a universal scaffold for stepwise delivering Dox and Dox/cisplatin loaded block copolymer micelles. *International Journal of Pharmaceutics*, 437, 11-19.



## ÖZGEÇMİŞ

Yazar 1986 yılında Malatya’da doğmuştur. İlk, orta ve lise öğretimini İstanbul’da tamamladıktan sonra 2004-2006 yıllarında Dumlupınar Üniversitesi, Altıntaş MYO’da Gıda Teknolojileri Bölümü’nü, 2006-2009 yılları arasında İnönü Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü’nü bitirdikten sonra 2009-2011 yılları arasında Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü’nde yüksek lisansını tamamlamıştır.

Yazar, 2009-2011 yılları arasında Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü’nde yüksek lisans çalışmasını Yrd. Doç. Dr. Ferid AYDIN’nın danışmanlığında ve Ortadoğu Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Prof.Dr. Faruk BOZOĞLU yardımcı danışmanlığında mikrofluidizer, ultrasonikasyon, yüksek hidrostatik basınç uygulanmış peynir altı suyunun ekmek kalitesine etkileri üzerine yapmıştır.

2013 yılından itibaren Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı’nda doktora yapmaktadır. Yazar aynı zamanda 2014 yılında Atatürk Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Nanobiyoteknoloji Bölümü’nde başladığı yüksek lisansa halen devam etmektedir. Ayrıca 2016 yılında Atatürk Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi İlahiyat Bölümü önlisans öğrencisidir.