

**SAĞLIKLI NÖRON VE N2A NÖROBLASTOM HÜCRE
KÜLTÜRLERİ ÜZERİNE FARNESEN, ZİNGİBEREN,
GAYAZULEN, KOPAEN VE SİKLOSATİVEN
SESKİTERPENLERİNİN SİTOLOJİK,
BİYOKİMYASAL VE GENETİK ETKİLERİ**

Başak TOĞAR

**Doktora Tezi
Biyoloji Ana Bilim Dalı
Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ
2013
Her Hakkı Saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

SAĞLIKLI NÖRON VE N2A NÖROBLASTOM HÜCRE
KÜLTÜRLERİ ÜZERİNE FARNESEN, ZİNGİBEREN,
GAYAZULEN, KOPAEN VE SİKLOSATİVEN
SESKİTERPENLERİNİN SİTOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE
GENETİK ETKİLERİ

Başak TOĞAR

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

ERZURUM
2013

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

SAĞLIKLI NÖRON VE N2A NÖROBLASTOM HÜCRE KÜLTÜRLERİ
ÜZERİNE FARNESEN, ZİNGİBEREN, GAYAZULEN, KOPAEN VE
SİKLOSATİVEN SESKİTERPENLERİNİN SİTOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE
GENETİK ETKİLERİ

Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ danışmanlığında, Başak TOĞAR tarafından hazırlanan bu çalışma 14/09/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak **oybirliği (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan :Doç. Dr. Abdulgani TATAR

İmza :

Üye :Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

İmza :

Üye :Doç. Dr. Turgay ŞİŞMAN

İmza :

Üye :Doç. Dr. Elif ÖZTETİK

İmza :

Üye :Yrd. Doç. Dr. Hakan AŞKIN

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Temel Bilimler Araştırma Grubu (TBAG), projeleri tarafından desteklenmiştir. Proje No: 210T142

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

SAĞLIKLI NÖRON VE N2A NÖROBLASTOM HÜCRE KÜLTÜRLERİ ÜZERİNE FARNESEN, ZİNGİBEREN, GAYAZULEN, KOPAEN VE SİKLOSATİVEN SESKİTERPENLERİNİN SİTOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE GENETİK ETKİLERİ

Başak TOĞAR

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

Nöroblastom beyin dokusu içerisinde hızlı bir şekilde yayılabilen ve en sık rastlanılan tümör çeşididir. Bu tümör hücreleri kemoterapide kullanılan ilaçlara karşı direnç kazanmaktadır. Ayrıca kemoterapide kullanılan anti-kanserojen ilaçların ciddi yan etkileri söz konusudur ve ilaç kullanımına bağlı olarak hastaların sürveyleri oldukça azalmaktadır. Diğer taraftan, son yıllarda çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılabilecek doğal ve biyolojik etkili bileşiklerin keşfedilmesi en popüler araştırma konuları arasında yer almaktadır. Seskiterpenler doğal ürünlerin en yaygın gruplarından biridir. Bitkilerde ve hayvanlarda birçok farklı işlevleri bulunurken gıdalarda aroma bileşenleri olarak yer almaktadırlar. Bu nedenlerle, tez kapsamında bazı önemli seskiterpen bileşiklerinin normal ve kanserli fare beyin hücre hatları (N2a) üzerine *in vitro* sitolojik, biyokimyasal ve genetik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca literatürde tez kapsamında test edilecek olan farklı seskiterpenlerin beyin tümörü hücrelerinde çoğalmayı baskılayıp baskılamadığı konusunda herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda yer alan seskiterpenler (farnesen (FNS), zingiberen (ZNG), gayazulen (GYZ), kopaen (KOP) ve siklosativen (SSV)) çeşitli konsantrasyonlarda kültür ortamına ilave edilerek hücre çoğalması üzerine etkileri 3-(4,5 dimetylthiazol -2-yl) - 2,5 diphenltetrazolium bromid (MTT) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Hücre kültürlerinde oksidatif etkilerin değerlendirilmesinde toplam antioksidan kapasite (TAK) ve toplam oksidan durum (TOD) parametreleri kullanılmıştır. Aynı zamanda, seskiterpenlerin normal ve kanserli beyin hücreleri üzerine olan genetik etkileri tek hücre jel elektroforezi (Comet testi) yöntemi ile ilk kez değerlendirilmiştir. Bulgularımız sözkonusu bileşiklerin (GYZ hariç) düşük konsantrasyonlarda antioksidan aktivitelerinin varlığını ve yüksek konsantrasyonlarda ise sitotoksik etkili olduklarını ortaya koydu. Test edilen tüm bileşikler non-genotoksik etkili bulundu. Başta ZNG olmak üzere KOP ve SSV N2a nöroblastom hücrelerine karşı antikanserojenik aktivite gösterdi. Tez kapsamında elde edilen bulgular ışığında farklı yapıda seskiterpenlerin N2a beyin tümörü hücre hatlarında antikanserojenik aktivitelerinin multidisipliner yaklaşımlar ile belirlenmesiyle, beyin kanserlerinin tedavisinde yeni bir yaklaşımın önerilebileceği kanaatindeyiz.

2013, 95 sayfa

Anahtar Kelimeler: Nöroblastom, MTT, seskiterpen, N2a, *in vitro*, oksidatif durum, sitotoksisite, genotoksisite

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

THE CYTOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND GENETIC EFFECTS OF FARNESENE, ZINGIBERENE, GUAIAZULENE, COPAENE AND CYCLOSATIVENE SESQUITERPENES ON HEALTHY NEURON AND N2A NEUROBLASTOMA CELL CULTURES

Başak TOĞAR

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

Neuroblastoma could invade into brain tissues quickly and the most coincided tumor species. These tumour cells usually attempt to offer resistance to the drugs that used in chemotherapy. Also the anti-neoplastic drugs used in chemotherapy have serious adverse effects and the patients have poor chances to live due to drug usage. On the other hand, discovering of the naturel and biologically effective compounds in treatments of various cancer types becomes one of the most popular research topics. Sesquiterpenes are one of the most common naturel products. They have not only several functions in plants and animals, but also take place in nutrients as aromatic compounds. For these reasons, it was aimed to search the cytological, biochemical and genetic effects of some important sesquiterpen compounds on healthy cells (neuron) and N2a brain cell lines in the extent of thesis. Notwithstanding, there were no investigation on whether different sesquiterpenes, which were tested in this thesis, suppressed the cell proliferation in brain tumour cells. The effects of selected sesquiterpenes (farnesene (FNS), zingiberene (ZNG), guaiazulene (GYZ), copaene (COP) and cyclosativene (CSV)) at various concentrations on cell proliferation were determined by 3-(4,5 dimethylthiazol -2-yl) - 2,5 diphenltetrazolium bromide (MTT) assay. And total antioxidant capacity (TAC) and total oxidative stress (TOS) parameters were used for the assesments of oxidative effects in cell cultures. Besides, the genetic effects of sesquiterpenes on healthy and cancerous brain cells were assessed by singel cell gel electrophoresis (SCGGE or Comet assay) firstly. Our results revealed that the sesquiterpenes (except for GYZ) exhibited antioxidant activities at their low doses and cytotoxic at high doses. All tested compounds were found to be non-genotoxic. Primarily ZNG and then COP and CSV showed anticarcinogenic activities against neuroblastoma cells. We think that, it is possible to suggest the novel approaches to treatments of brain cancers by the multidisciplinary establishment of the anticarcinogenic effects of different sesquiterpene compounds on N2a brain tumour cells within the light of the findings of this thesis.

2013, 95 pages

Keywords: Neuroblastoma, MTT, sesquiterpen, N2a, *in vitro*, oxidative status, cytotoxicity, genotoxicity

TEŞEKKÜR

Doktora Tezi olarak sunduğum bu alışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakóltesi Biyoloji Bölümü'nde yapılmıştır.

Çalışmalarım süresince görüş ve bilgi birikiminden yararlandığım değerli hocam ve danışmanım, Sayın Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalarımda yardım ve desteğini gördüğüm değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Abdulgani TATAR'a, Sayın Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na, Sayın Prof. Dr. Fatime GEYİKOĞLU'na ve biyoloji bölümünün öğretim üyelerine teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuar çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Kübra ÇELİK'e, Arş. Gör. Damla ÇETİN'e, Arş. Gör. Numan TAşPINAR'a Elanur AYDIN'a ve Arş. Gör. Ebubekir DİRİCAN'a ve tüm Tıbbi Genetik Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında maddi manevi her konuda yanımda olan ve benden destek ve ilgilerini esirgemeyen çok değerli annem Gülten TOĞAR'a, babam Kemal TOĞAR'a ve abim Barış TOĞAR'a şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.

Bu tez TÜBİTAK - Temel Bilimler Araştırma Grubu (TBAG) - 210T142 no'lu projenin maddi destekleriyle gerçekleşmiştir.

Başak TOĞAR

Eylül 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kanser.....	4
1.1.1. Kanserın moleküler temeli	7
1.1.2. Kanser tedavisi	11
1.1.3. Beyin tümörleri.....	12
1.1.4. Embriyonal tümörler	12
1.1.5. Nöroblastom	13
1.2. Uçucu Yağlar	16
1.2.1. Uçucu yağların izolasyonu	17
1.2.2. Terpenler.....	17
1.2.3. Terpenlerin biyosentezi	18
1.2.4. Terpenlerin sınıflandırılması	21
1.2.5. Tez kapsamında kullanılan seskiterpenlerin genel özellikleri	24
1.3. Sitotoksosite ve Testleri.....	28
1.4. Oksidatif Stres	29
1.4.1. Oksidatif stres ve kanser.....	32
1.5. Antioksidan Sistem.....	32
1.5.1. Enzimatik antioksidanlar	34
1.5.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar	36
1.6. Genetik Toksisite ve Testleri	38
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	40
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	46
3.1. Materyal.....	46
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	46

3.1.2. Kullanılan laboratuvar gereçleri ve cihazlar	46
3.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı	47
3.1.4. Deney hayvanları ve hücre kültürleri	49
3.1.5. Nöron kültürü hazırlama	49
3.2. Yöntemler	51
3.2.1. MTT analizi	51
3.2.2. Toplam antioksidan kapasite	52
3.2.3. Toplam oksidan durum	53
3.2.4. Tek hücre jel elektroforezi	54
3.2.5. İstatiksel analizler	57
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	58
4.1. MTT Analiz Değerleri	58
4.2. Toplam Antioksidan Kapasite Değerleri	61
4.3. Toplam Oksidan Durum Değerleri	64
4.4. Toplam Hasar Puan Değerleri (Comet analizi)	67
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	70
KAYNAKLAR.....	77
ÖZGEÇMİŞ	96

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde konsantrasyon
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
°C	Santigrat derece
L	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre

Kısaltmalar

CHO	Chinese Hamster Ovaryum
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
FNS	Farnesen
FPP	Farnesil pirofosfat
GPP	Geraniol pirofosfat
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
GST	Glutasyon-S-transferaz
GYZ	Gayazulen
HBSS	Hank's Balanced salt solution
HIV	İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü
HPV	İnsan papilloma virüsü
IAA	İndoasetik asit
IPP	İzopentil pirofosfat
KA	Kromozomal aberasyon
KKD	Kardeş kromatit değişimi

KOP	Kopaen
LDH	Laktat dehidrogenaz
LMA	Düşük erime noktalı agaroz
MÇ	Mikroçekirdek
NMA	Normal erime noktalı agaroz
NO	Nitrik oksit
NR	Neutral Red
ORAK	Oksijen radikal absorban kapasite
RNA	Ribonükleikasit
ROM	Reaktif oksijen metaboliti
SCGE	Single cell gel electrophoresis
SOD	Süperoksit dismutaz
SSV	Siklosativen
TAK	Toplam antioksidan kapasite
TAS	Total Antioxidant Status
TNF	Tümör nekroz faktörü
TOD	Toplam oksidan durum
TOS	Total Oxidant Status
XTT	[(fenilamino) karbonil]-2H-tetrazolyum hidroksit
ZNG	Zingiberen
VEGF	Damar endotelyal büyüme faktörü
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
TGF	Transforme edici büyüme faktörü
DMH	1-2-dimetilhidrazinin
MTT	3-(4,5 dimetylthiazol -2-yl) - 2,5 diphenltetrazolium bromit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Hücre siklusu kontrol noktaları.	9
Şekil 1.2. Nöral krest hücrelerinin göçü ve farklılaşması.	16
Şekil 1.3. İzopren birimi	18
Şekil 1.4. Mevalonik asit-5-pirofosfat oluşumu	19
Şekil 1.5. İzopentil pirofosfat (IPP) oluşumu	19
Şekil 1.6. İzopentil pirofosfat (IPP)'ın izomerizasyonu	19
Şekil 1.7. Geraniolpirofosfat (GPP) ve geraniol oluşumu	20
Şekil 1.8. Farnesil pirofosfat (FPP) oluşumu.....	20
Şekil 1.9. Geranil-geranil pirofosfat oluşumu.....	20
Şekil 1.10. Farnesen bileşiğinin kimyasal yapısı	24
Şekil 1.11. Zingiberen bileşiğinin kimyasal yapısı	25
Şekil 1.12. Gayazulen bileşiğinin kimyasal yapısı	26
Şekil 1.13. Kopaen bileşiğinin kimyasal yapısı	27
Şekil 1.14. Siklosativen bileşiğinin kimyasal yapısı.....	27
Şekil 1.15. Enzimatik savunma mekanizmaları.....	36
Şekil 3.1. Nöron kültürü hazırlama aşamaları	50
Şekil 3.2. MTT analiz prosedürü	51
Şekil 3.3. TAK analiz prosedürü	53
Şekil 3.4. TOD analiz prosedürü.....	54
Şekil 3.5. Elektroforez tampon solüsyonunda yürütme aşaması	55
Şekil 3.6. DNA hasar tespitinde kullanılan analiz metodu	56
Şekil 4.1. FNS maruziyeti sonrasında gözlenen hücre canlılık yüzdeleri.....	58
Şekil 4.2. GYZ maruziyeti sonrasında gözlenen hücre canlılık yüzdeleri.....	59
Şekil 4.3. KOP maruziyeti sonrasında gözlenen hücre canlılık yüzdeleri	59
Şekil 4.4. SSV maruziyeti sonrasında gözlenen hücre canlılık yüzdeleri.....	60
Şekil 4.5. ZNG maruziyeti sonrasında gözlenen hücre canlılık yüzdeleri.....	60
Şekil 4.6. <i>In vitro</i> koşullarda FNS'nin oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri.....	61
Şekil 4.7. <i>In vitro</i> koşullarda GYZ'nin oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri.....	62

Şekil 4.8. <i>In vitro</i> koşullarda KOP'un oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri.....	62
Şekil 4.9. <i>In vitro</i> koşullarda SSV'nin oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri.....	63
Şekil 4.10. <i>In vitro</i> koşullarda ZNG'nin oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri.....	63
Şekil 4.11. <i>In vitro</i> koşullarda FNS'nin oluşturduğu toplam oksidan durum değerleri ..	64
Şekil 4.12. <i>In vitro</i> koşullarda GYZ'nin oluşturduğu toplam oksidan durum değerleri .	65
Şekil 4.13. <i>In vitro</i> koşullarda KOP'un oluşturduğu toplam oksidan durum değerleri ..	65
Şekil 4.14. <i>In vitro</i> koşullarda SSV'nin oluşturduğu toplam oksidan durum değerleri ..	66
Şekil 4.15. <i>In vitro</i> koşullarda ZNG'nin oluşturduğu toplam oksidan durum değerleri .	66
Şekil 4.16. <i>In vitro</i> koşullarda FNS'nin konsantrasyonlara göre oluşturduğu toplam hasar puan değerleri	67
Şekil 4.17. <i>In vitro</i> koşullarda GYZ'nin konsantrasyonlara göre oluşturduğu toplam hasar puan değerleri	68
Şekil 4.18. <i>In vitro</i> koşullarda KOP'un konsantrasyonlara göre oluşturduğu toplam hasar puan değerleri	68
Şekil 4.19. <i>In vitro</i> koşullarda SSV'nin konsantrasyonlara göre oluşturduğu toplam hasar puan değerleri	69
Şekil 4.20. <i>In vitro</i> koşullarda ZNG'nin konsantrasyonlara göre oluşturduğu toplam hasar puan değerleri	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Embriyonal tümörlerin histolojik sınıflandırması	13
Çizelge 1.2. Uçucu yağ elde etme yöntemleri	17
Çizelge 1.3. Terpenlerin sınıflandırılması	21
Çizelge 1.4. Reaktif oksijen metabolitleri ve kimyasal formülleri	29
Çizelge 1.5. Antioksidanlar.....	34

1. GİRİŞ

Nöroblastom nöral krestten köken alan, sempatik sinir sisteminden orijinli embriyonik sinir hücrelerinden oluşan çocukluk çağının sık görülen ekstrakranial solid malign tümördür (Maris *et al.* 1999; Demirkaya *et al.* 2008; Aktaş vd 2010). Malign tümör ve hastalıklar çocuklardaki ölüm sebepleri arasında travmadan sonra ikinci sırada yer alır. Çocukluk yaş grubundaki malign tümör ve hastalıkların 2/3'ünü solid tümörler oluşturur. En sık görülen tümörler lösemi, lenfoma ve nöroblastom'dur İntrakranial tümörler tüm primer sinir sistemi tümörlerinin %85-90'ını oluşturmaktadır (Karlsson *et al.* 2004). İntrakranial tümörler glial dokudan, meninkslerden, nöronlardan, endokrin hücrelerden veya damarlardan kaynaklanabilir. Nöroblastom ve ganglionöroma, embriyonik nöral krest'den kaynaklanan hücrelerden gelişir. Bu hücreler esas olarak sempatik sinir sistemi ve sürrenal medulla'da bulunur. Tümör kafatası kaidesinden presarkal bölgeye kadar bu zincir boyunca her yerde gelişebilir. Nöroblastom'un erkeklerde görülme oranı daha fazladır (Levin *et al.* 2001). Histopatolojik incelemelerde, hücreden zengin stromada neoplastik hücrelerin pleomorfizm özellik gösterdikleri ve anaplazik indifferansiye özellikler taşıdıkları izlenebilir. Tümörün patogenezi, genetik ve biyolojisinin daha iyi anlaşılması, bu hastaların prognozunda düzelme sağlanabilmesi için gerekli temel koşullardan biridir. Son yıllarda tümör biyolojisi hakkında bilgilerin artışı tedavilerde başarı olasılığını artırmaktadır (Türk Pediatrik Onkoloji Grubu 2003). Bununla birlikte, multimodel tedavilerde gelişmelere karşın ilerlemiş hastalıklarda sağkalım kötüdür (Mora and Gerald 2004; Maris 2005; Aktaş 2010).

Bitkilerde ve bazı omurgasız hayvanlarda organizma içeriğinde yer alan bazı doğal ve aktif biyolojik bileşikler nöroblastom hücrelerine karşı farklı derecelerde etkili bulunmuşlardır. Bu bileşiklerden bazıları farnesil pirofosfat (Hooff *et al.* 2010), bilobalid (Shi *et al.* 2010), fenil bütirik asit (Wiley *et al.* 2010), artesunat (Michaelis *et al.* 2010), katekol (Lima *et al.* 2008), dsideamin (Suna *et al.* 2009), bisfosfonat, zoledronik asit (Bäckman *et al.* 2008), huperzin (Hemendinger *et al.* 2008), maprotilin (Hsu *et al.* 2004) ve artemisinin (Smith *et al.* 2001)'dir.

Diğer taraftan terpenler, hidrokarbonların geniş ve çeşitli bir sınıfı olup, başlıca bitkiler; özellikle iğne yapraklılar, tarafından üretilmekle beraber bazı böcekler tarafından da salgılanabilmektedirler. Uçucu yağların çoğunda bol miktarda terpenik hidrokarbon bulunmaktadır. Terpenler, yapıları izopren birimlerine bölünebilen doğal ürünler olarak tanımlanmaktadır. Bitkide herhangi bir biyolojik olaya katılmayan uçucu yağların hangi amaçla salgılandığı tam olarak bilinmemekle birlikte yaralanmalara karşı oluşan reçineye karşı çözücü görevi gördüğü, genellikle uçucu yağ taşıyan bitkilerin sıcak iklimlerde fazla sayıda yetişmesi nedeniyle bitkinin uçucu yağı üzerindeki havayı bağlayarak fazla su kaybını önlemek amacıyla salgılandığı da düşünülmektedir (Işık 2005; Kıvrak 2006; Karahan 2007). Terpenler biyosentetik olarak izopren birimlerden üretilirler ve bu birimin adı izopren olup kimyasal formülü C_5H_8 'dir. İki izopren molekülünden oluşan on karbonlu terpenler monoterpen ($C_{10}H_{16}$), üç izopren molekülünden oluşan onbeş karbonlu terpenler seskiterpen ($C_{15}H_{24}$), dört izopren molekülünden oluşan yirmi karbonlu terpenler diterpen ($C_{20}H_{32}$) olarak adlandırılır. Seskiterpenler, asiklik seskiterpenler, monosiklik seskiterpenler, bisiklik seskiterpenler, trisiklik seskiterpenler, tetrasiklik seskiterpenler olmak üzere beş gruba ayrılmaktadır (Kineci 2005). Yurdumuzda 133 kadar cinsi ve 1156'dan fazla türü olan Compositae familyası (Tosun and Özkal 2000) ve Umbelliferae familyası (Tosun and Özkal 2003) bol miktarlarda seskiterpen yapısındaki bileşiklerden içermektedir.

Bilindiği gibi genetik değişiklikler ve kanser arasındaki nedensel bir ilişkinin varlığı birçok deneysel ve epidemiyolojik veri ile desteklenmektedir. Tümör baskılayıcı genlerin mutasyonel inaktivasyonu ve onkogenlerin aktivasyonu, birçok kanser türünün gelişimi ile bağlantılıdır. Mutajenite ve karsinojenite arasındaki ilişki, hem karakteristik mutasyonlara neden olan kimyasal maddelere maruz kalma sonucu gelişen kanserlerle, hem de deoksiribonukleik asit (DNA) onarım hataları sonucu artan kanser riski ile anlaşılabilir. Mutajenite kanser gelişiminin hem başlangıç, hem de gelişme evresinde rol oynamaktadır (Lehman 1997; Chu 2001; Bütüner and Kantarcı 2006). Kanser oluşumları anti-genotoksik ajanlarla engellenebilmektedir. Nitekim bu özelliklerinden dolayı kanser tedavisinde bitkisel materyaller ve etkin bileşikler sıklıkla tercih edilmektedir (Frontling and Bulmer 1998).

Günümüze kadar yürütülmüş olan sınırlı sayıdaki araştırmalarda bazı seskiterpenlerin meme (Costarelli *et al.* 2010), prostat (Kawasaki *et al.* 2009), karaciğer (Taha *et al.* 2010), akciğer (Rasheed *et al.* 2010) ve kemik (Sung *et al.* 2009) kanserlerinin oluşumunu engellediği görülmüştür. Aynı zamanda, son yıllarda bazı seskiterpen bileşiklerinin kan beyin bariyerinden geçebildiği veya bu yapıyı etkileyebildiği bilgisi, seskiterpenlerin beyin kanserlerinin oluşumunun engellenmesinde de kullanılabileceğini düşündürmüştür (Coleman *et al.* 2008; Wu *et al.* 2009).

Bugün bitki içeriklerinde seskiterpen yapısında 1000 kadar bileşik bulunduğu bilinmektedir (Umay 2007). Tez kapsamında doğada oldukça yaygın bulunan, kimyasal özellikleri ve grupları farklı olan asiklik (farnesen), monosiklik (zingiberen), bisiklik (gayazulen), trisiklik (kopaen) ve tetrasiklik (siklosativen) seskiterpen bileşiklerinin nöroblastomlu nöron hücre kültürleri üzerindeki etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bilgilerimize göre bu önemli beş seskiterpen bileşiğinin N2a nöroblastom hücreleri üzerine olan etkileri henüz araştırılmamıştır. Bu bileşiklerin toksik etkileri hakkında bilinenlerin oldukça sınırlı oluşu, üstelik nörotoksisite bulgularının henüz kayıtlı olmayışı çalışma kapsamında test bileşikleri olarak seçilmelerini sağlamıştır.

Tez kapsamında planlanan çalışmalar gerçekleştirildikten sonra elde edilecek olan bulgular ışığında insan sağlığı için önemli sonuçlar ortaya çıkarılacaktır. Nitekim hayvan beyin tümörleri, insan beyin tümörleriyle olan benzerliklerinden dolayı klinikte parametrelerin tanımlanması ve doğru tedavinin uygulanabilmesi açısından oldukça önemli kabul edilmektedir. Bu nedenle çalışmamız kapsamında hayvan tümör modeli olarak sıçan N2a hücre hatları kullanılmıştır. N2a nöroblastom hücreleri yüksek mitotik aktivite, nükleer pleomorfizm, tümör nekroz odakları, tümör içi kanama gibi çeşitli malign glioblastoma karakteristiklerine sahip hücreler olarak kanser araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Tez bulguları ile kimyasal tedavi yaklaşımlarının yerinin biyolojik aktif bileşiklerle doldurulabilmesi ve kimyasallara karşı gelişen istenmeyen direncin ortadan kaldırılması hedeflenmiştir. Diğer taraftan, test edilen seskiterpen bileşiklerinin nörotoksik etkilerinin belirlenmesi ile literatürdeki bu önemli boşluğu doldurulması da planlanmıştır. Beyin tümör hastalıklarının tedavisinde farklı bir yöntemi ortaya çıkarabilmek için hazırlanan bu tez kapsamında, sitolojik, biyokimyasal

ve genetik değişimler, sonuçları oldukça güvenilir ve geçerli olan 3-(4,5 dimetylthiazol - 2 -yl) - 2,5 diphenltetrazolium bromid (MTT), toplam antioksidan kapasite (TAK), toplam oksidan durum (TOD) ve tek hücre jel elektroforezi (SCGE ya da Comet) analizleri ile araştırılmıştır.

Tezin ana amacı beyin tümör hücrelerinin çoğalmasını baskılayıcı ve nöronları koruyucu biyolojik materyaller önerebilmektir. Ancak, bu bileşikler koruyucu bulunamazlar ise seskiterpen bileşiklerin toksik oldukları doz aralıkları daha geniş bir biçimde belirlenecektir. Böylece oldukça büyük insan populasyonlarının maruz kaldığı bu bileşiklerin toksisite mekanizmalarını aydınlatmaya yönelik bulgular sağlanacaktır.

1.1. Kanser

Kanser, insanda hücrelerin bağımsız (otonomi) ve kontrolsüz bir şekilde çoğalması (kontak inhibisyon kaybı), normal doku ve organları istila etmesi ve tüm vücuda yayılması ile karakterize edilen ve halen gelişmiş ülkelerde kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer alan öldürücü bir hastalıktır (Tozkoparan ve Aytaç 2007; Turhan 2008; Çelik 2012).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre 2004 yılında 7,4 milyon kişinin kanserden öldüğü ve bu rakamın 2020 yılında 15 milyon kişiye çıkacağı tahmin edilmektedir (Güzey 2007; Bayrak vd 2010). Türkiye’de ise her yıl yaklaşık yüzbinin üzerinde yeni kanser olgusuna rastlanmaktadır. 2020 yılında kanserin sebep olduğu ölümlerin hastalıklarından ölümden %75 ile %100 oranında artacağı öngörülmektedir (Güzey 2007).

Kanser hastalığının nedenleri arasında, alkol ve tütün kullanımı alışkanlıkları, çevre kirliliği, çeşitli enfeksiyonlar, ilaçlar, cinsel davranış, meslek türleri, jeofizik etkenler, genetik yatkınlık ve beslenme alışkanlıkları yer almaktadır (Cotran *et al.* 1989; Geoffrey *et al.* 2006; Çelik 2012).

Normal hücreler ve kanserli hücreler

Normal (sağlıklı) hücreler ölen hücrelerin yenilenmesi, yaraların ve dokuların onarılması için bölünme yeteneklerini kullanırlar. Ne zaman ve nerede bölüneceğini bilme yeteneğine sahiptirler. Sonsuz bölünmezler. Sınırlı mitotik bölünmelere sahiptirler. Bölünmeye ve büyümeye uygun olmadıklarında yaşlanırlar (Anonim 2013).

Sağlıklı hücrelerde telomerler her bölünmeden sonra kısalırken, kanser hücrelerinde telomerler telomeraz enzimiyle yenilenmektedir. Sonuç olarak telomer uzunluğu sürekli sabit kalmakta ve kanser hücresi sınırsız bir şekilde çoğalmaktadır (Karp 1999; Barutça 2006; Güzey 2007).

Kanser hücreleri anaeropturlar. Solunum enzimleri, sitokromlar ve sitokrom oksidaz gibi vital proteinlerinin azlığıyla dikkat çekerler. Ayrıca glikozu laktik asite dönüştürerek oksijenden bağımsız beslenme yeteneğine sahiptirler. Bu hücrelerin diğer bir özelliği ise sağlıklı hücelere göre %40 daha az kalsiyuma sahip olmalarıdır. Bu durum hücrelerin birbirinden daha çabuk kopmasına ve dolaşım yoluyla başka dokulara taşınmasına sebep olmaktadır (Karp 1999).

Kanserli dokular üç grup altında incelenmektedir. Bunlar, benign (iyi huylu), premalign (intermediyer) ve malign (kötü huylu) dir.

Benign tümörler sınırlı büyüme potansiyeline sahip olan metastaz oluşumuna sebep olmayan iyi huylu tümörlerdir. Herhangi bir dokuda oluşabilme yeteneğine sahiptirler. Kenarları düzenlidir. Tek zararları bulunduğu bölgede basınç oluşturmalarıdır (Franks and Teich 1996; Klug and Cummings 2002; Güzey 2007). Kökenini aldığı hücelere yapısal ve fonksiyonel olarak benzeyen tümörlerdir. Genel olarak yavaş büyürler. İnfiltrasyon (madde birikimi ve dokuya sızma), invazyon (tümörün doku ve organa yayılması) ve metastaz yapmazlar. Tümörün kaynaklandığı hücre tipine, mikroskobik ve makroskobik özelliklerine ya da köken aldıkları hücrelerin sonuna –om ya da –oma eki getirilerek isimlendirilirler (Livolsi *et al.* 1992; Vander *et al.* 1994; Özekinci 2003).

Premalign (intermediyer) tümörler iyi huylu (benign) tümörlerin kötü huylu (malign) tümörlere dönüşmesiyle oluşan tümörlerdir (Franks and Teich 1996; Klug and Cummings 2002; Karp 2005; Güzey 2007).

Malign tümörler ise kanser olarak adlandırılan metastaz oluşumuna sebep olan kötü huylu tümörlerdir. Çevre dokuya yayılarak tahribat gösterirler. Lenfotik yayılım, hemotojen yayılım ve vücut boşluklarına ekilme olarak üç yoldan yayılım yaparlar. Malign tümörler isimlendirilmesinde tümör epitel kökenli ise 'karsinoma', bağ ve destek doku kökenli ise 'sarkoma' kan hücrelerinde görülüyorsa 'lösemi', immün sistemde görülüyorsa 'lenfoma' adını alır (Livolsi *et al.* 1992; Vander *et al.* 1994).

Kanser hastalığı tek bir mutant hücrenin çoğalması sonucu gelişmektedir. Fakat bu durum tümör gelişmesine neden olan hücrenin başlangıçtaki kanser hücresinin bütün özelliklerine sahip olduğu anlamına gelmemelidir. Çünkü kanserin gelişmesi çok aşamalı bir süreçtir. Hücresel düzeyde kanser gelişiminde kanserin mutasyonları içeren çok aşamalı bir süreç sonunda çoğalma, sağ kalım, invazyon ve metastaz yetenekleri artan hücrelerin seçilmesi şeklinde ortaya çıktığı görülmüştür (Geoffrey *et al.* 2006; Turhan 2008; Çelik 2012).

Tek bir hücrede meydana gelen herhangi bir genetik değişiklik ya da mutasyon kimyasal, fiziksel veya viral kaynaklı karsinojenlerden kaynaklanabilmektedir (Cotran *et al.* 1989).

Kimyasal karsinojenler etkilerini DNA'da hasar yaparak ya da mutasyonları uyatarak göstermektedir. Başlıca kimyasal karsinojenler nitrozaminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (benzopren), aromatik aminler, muhtelif ilaçlar (alkilleyici kemoterapotik ajanlar), doğal bulunan bileşikler (Aflatoksin B) ve çeşitli inorganik (asbest, arsenik, krom, kadmiyum vb) bileşiklerdir (Cotran *et al.* 1989; Geoffrey *et al.* 2006; Turhan 2008).

Fiziksel karsinojenler olarak X ışınları (röntgen), noniyonize radyasyon (solar),

hipertermi, iyonize radyasyon, güneşteki ultraviyole (mor ötesi ışınlar), radyoaktif etkenler (alfa, beta, gama ışınları), kronik irritasyon, inflamasyon ve tütün kullanımı sayılabilir (Birand and Knop 1996; Akdemir ve Birol 2004; Kurt 2008).

Bazı kanserler ise viral kaynaklıdır. Virüslerin neden olduğu kanserlerin başında karaciğer ve serviks kanseri gelmektedir. Yapılan çalışmalarda Hepatit B virüsü ile hepatosellüler karsinom, Epstein Barr virüsü ile Burkitt lenfoma ve nazofarinks kanseri, insan papilloma virüsü (HPV) ile serviks kanseri ve HIV (İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü) ile Kaposi sarkomu arasında ilişki tespit edilmiştir (Cotran *et al.* 1989; Geoffrey *et al.* 2006; Turhan 2008).

1.1.1. Kanserın moleküler temeli

Kökenleri, moleküler ve hücresele mekanizmaları birbirlerinden farklı olsa da, kanser hücrelerinin dört önemli özelliği vardır. Bunlar;

1. Hücresele çoğalmayı sınırlayan faktörler inaktiftir.
2. Farklılaşma düzensizdir. Anormal hücre oluşumu gözlenir.
3. Kromozomal ve genetik stabilite bozulmuştur. İnvazyon ve metastaz yapabilen farklı hücre oluşumları gözlenir.
4. Apoptozis (hücre ölüm programı) denetlenemez hale gelmiştir (Hanahan and Weinberg 2000; Geoffrey *et al.* 2006; Turhan 2008).

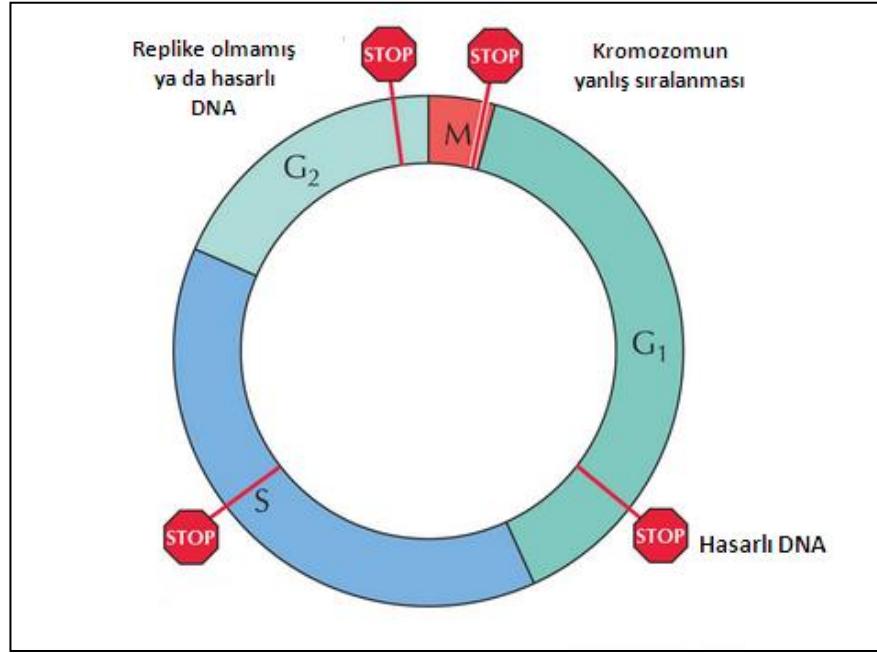
Hücresele döngü ve kontrol noktaları

Hücrelerin çoğalması hücre döngüsü adı verilen bir dizi olayın sonucunda gerçekleşmektedir. Bir hücrenin mitoz bölünmeyle iki yeni hücre meydana getirmesi G1 (gap 1), S (sentez), G2 (gap 2) ve M (mitoz) olmak üzere dört aşamadan oluşmaktadır. Mitoz dışındaki evrelerin tümü interfaz olarak adlandırılmaktadır. G1 basamağı mitozdan hemen sonra başlayan ve pek çok sitoplazmik elementin sentezlendiğini basamaktır. İkinci basamak olan S basamağında DNA replikasyonu ile kromozom sayısı

iki katına çıkar. G2 basamağında ise büyüme ve sentez olayları devam eder ve hücre mitozu hazırlanır. Ayrıca bunlara ilaveten mitozdan çıkan hücrenin hücresel döngüden çıkarak dinlenme evresine geçtiği G0 basamağında bulunmaktadır (Güneş 1999; Toprak 2001; Klug and Cummings 2002).

İnterfaz safhasında sayılan bu evreler birbirini izleyen ve aralarında inhibe edici ve aktive edici etkenlerin bulunduğu kontrol noktaları olan sistematik ve programlanmış bir dizi süreçten meydana gelmektedir (Andreeff *et al.* 2000; Lodish and Berk 2000; Vermeulen *et al.* 2003).

Hücresel döngüde üç ana kontrol noktası (G1/S, G2/M ve M) bulunmaktadır. G1/S ve G2/M kontrol noktalarında siklinler ve protein kinazlar rol oynamaktadır. Siklinler siklin bağımlı kinazlarla birleşerek protein kinazların fosforile edeceği hedef proteinini seçerler. Protein kinazlar ise hücre döngüsüne katılan bu proteinlerin fosforilasyonuna yol açarak aktivitelerini düzenler. M kontrol noktasında ise kromozomların iğ ipliklerine bağlanması engellenir ve hücrenin anafaza girmesi inhibe edilir. Bu kontrol noktalarından birinde meydana gelen bir hasar ve ayrıca kinazları ve siklinleri meydana getiren genlerdeki herhangi bir mutasyon normal hücrenin kanser hücresine dönüşümüne sebep olmaktadır (Andreeff *et al.* 2000; Lodish and Berk 2000; Vermeulen *et al.* 2003a). Hücre siklusu kontrol noktaları Şekil 1.1'de gösterilmiştir (Aktaş 2010).



Şekil 1.1. Hücre siklusu kontrol noktaları

Apoptozis

Organizmadaki hücre sayısı homeostasinin korunmasında oldukça önemlidir. Yeni hücreler sentezlenirken var olan hücrelerin bir kısmı ölmekte ve bu sayede homeostazi sağlanmaktadır. İki çeşit hücre ölümü vardır bunlar apoptozis ve nekrozdur. Apoptozis genler tarafından kontrol edilen, dokuların dengesi ve gelişimi için gerekli olan ölüm mekanizmasıdır. Apoptozis esnasında kaspazlar (sistein-proteaz grubu enzimler) önemli rol oynamaktadır. Apoptoziste üç biyokimyasal yolak bulunmaktadır.

1. yolak *Bcl-2* ailesinin aracılık ettiği mitokondriyal sitokrom C yolağıdır. *Apaf-1* aktive olması sonucu, kaspaz-9 ve sonra da kaspaz-3 aktive olmaktadır.
2. yolakta tümör nekroze edici faktör (TNF) reseptör ailesinin hücreye bağlanması kaspaz-8'i ve kaspaz-3'ü aktive etmektedir.
3. yolakta granzime B (sitotoksik T hücresi ürünü) bir takım kaspazları aktive etmekte ve apoptozis başlamaktadır (Andreeff *et al.* 2000; Hostanska *et al.* 2003; Yin *et al.* 2004; Güzey 2007).

Apoptozis sırasında çekirdek büzülür ve kromatin yapı yoğunlaşır. DNA nukleazlarca parçalanır. Hücrenin diğer hücrelerle bağlantısı kopar ve hücre apoptotik parçalara ayrılır. Bu parçalar komşu hücreler tarafından fagosite edilir. Bu süreçte meydana gelen bir bozukluk ölmesi gereken hücrenin yaşaması genetik bozukluğa ve mutasyonlu hücrelerin oluşmasına sebep olmaktadır (Lodish and Berk 2000; Vermeulen *et al.* 2003b; Guimaras and Linden 2004).

Diğer bir ölüm mekanizması ise nekrozdur. Nekroz (kontROLSÜZ hücre ölümü) hücre şişmesi ve hızlı dejenerasyon olarak tanımlanmaktadır. Nekrozda apoptozisin tersine hücre bütünlüğü bozulmakta ve hücre içeriği dış ortama yayılmaktadır (Lodish and Berk 2000; Vermeulen *et al.* 2003; Guimaras and Linden 2004).

Protoonkogenler, onkogenler ve tümör baskılayıcı genler

Protoonkogenler normal hücrelerde büyüme ve farklılaşmayı ve aynı zamanda biyokimyasal olayları yöneten proteinleri şifreleyen genler olarak tanımlanmaktadır. Üretilen bu proteinler çoğunlukla büyüme faktörleri, hücrede uyarıları alan reseptörler ve uyarı ileten moleküllerdir. Bazı protoonkogenler ise transkripsiyonda etkili olmaktadır. Bu genlerin herhangi birinde meydana gelen mutasyon protoonkogenlerin onkogenlere dönüşümüne sebep olmaktadır. Onkogenler kontROLSÜZ hücre bölünmesine sebep olan genler olarak tanımlanmaktadır. Protoonkogenlerin onkogenlere dönüşümüne mutasyonlar, translokasyonlar ve aşırı gen ifadesi mekanizmaları sebep olmaktadır (Verimli 1996; Fışkın 2002; Aktaş 2010).

Tümör baskılayıcı genler hücre bölünmesini durduran genler olarak tanımlanmaktadır. Onkogenlerin tersi yönünde hareket ederler. İnaktif olmaları halinde tümör oluşumunu sebep olurlar. Tümör baskılayıcı genlere örnek olarak hücre siklusu kontrol proteinleri, DNA tamir proteinleri, hücrelerarası iletişimde görevli proteinler ve antiapoptotik proteinler verilebilir. En iyi bilinen tümör baskılayıcı gen p53 genidir p53 geni hücre döngüsünde G1'den S fazına geçişi kontrol etmektedir (DeVita *et al.* 1997; Kopnin 2000; Arı 2008; Aktaş 2010).

İnvazyon, metastaz, anjiyogenez

İnvazyon metastaz oluşumunun başlangıç aşamasıdır ve üç basamaklıdır. Bunlar mekanik baskı, litik enzimlerin salımı ve tümör hücrelerinin hareketliliğinin artması şeklindedir (Franks and Teich 1996; Baloğlu 2001; Aktaş 2010).

Tümörleşen hücrelerden ayrılan kanser hücrelerinin kan ve lenf yoluyla başka bölgelere taşınması ve orada tümör oluşturması metastaz olarak tanımlanmaktadır (Franks and Teich, 1996; Baloğlu 2001; Aktaş 2010).

Anjiyogenez ise mevcut kan damarlarından yeni kan damarları oluşması anlamına gelmektedir. Anjiyogenez organizmanın bütünlüğünün korunması ve devam etmesinde (mentsrual siklus, doku rejenerasyonu, embriyogenez ve organ gelişimi) oldukça önemli bir süreçtir (Maharaj *et al.* 2007). Anjiyogenez damar endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), anjiyogenin, anjiyotropin, transforme edici büyüme faktörü (TGF α ve β) ve epidermal büyüme faktörü gibi birçok faktör tarafından uyarılmakta ve angiostatin, endostatin ve trombospondin-1 gibi faktörlerle inhibe edilmektedir. Tümör hücrelerinde görülen anjiyogenez ise tümörün metastaz potansiyelini arttırmaktadır. Anjiyogenez olmadığı durumlarda ise tümör anaerop metabolizma yoluyla yaşamını sürdürebilmektedir (Fidler *et al.* 2001; Kenemans *et al.* 2004).

1.1.2. Kanser tedavisi

Kanser tedavisinde cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi yöntemleri ve yeni tedavi yöntemleri olan immunoterapi, gen tedavisi, sinyal ileti sistemi inhibitörleri ve anjiyogenez inhibitörleri tedavileri kullanılmaktadır (Türker ve Kayaalp 2000; Gate and Tew 2001; Tozkoparan ve Aytaç 2007).

Kanser tedavisinde cerrahi müdahale ile erken tanı konmuş ve henüz vücuda yayılmamış tümörlü dokunun alınması amaçlanmaktadır (Dilsiz 2004; Barutça 2006).

Radyoterapi yönteminde kanserli hücelere gönderilen X ışınlarıyla hücelerin ölmesi amaçlanmaktadır. Bu tedavide kanser hastalarında tümörün yayılmasını önlemek ve tümöral kitlenin küçültülmesi amaçlanmaktadır (Dilsiz 2004; Barutça 2006).

Kemoterapi hastanın ya da konakçının normal hücelerine zarar vermeden mikrop ya da tümör hücelerini öldürülmeyi ya da bölünmesini durdurmayı amaçlayan kimyasal tedavi şeklidir (Kayaalp 2000; Barutça 2006).

İnsan vücudunun bağışıklık sistemi, kanser hücelerini yabancı hücre olarak algılamaktadır. Bu sebeple immunoterapi yönteminde doğal bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi amaçlanmaktadır. Tedavide antikorların ürettiği lenfokinler kullanılmaktadır (Kirkwood *et al.* 2012).

Gen tedavisi yöntemi kalıtsal veya kazanılmış insan hastalıklarını tedavi etmek amacıyla, genlerin küçük DNA ve ribonükleik asit (RNA) moleküllerinin insan hücelerine organ ve dokularına transfer edilmesine dayanır (Kars 2004).

1.1.3. Beyin tümörleri

Beyin kanserleri, bütün kanserlerin %1,4'ünden ve bütün kansere bağlı ölümlerin %2,4'ünden sorumludur. Bununla birlikte bu tümörlerin çoğu ölümcül olup, ölümcül olmayanları da beyin fonksiyonlarına zarar verdiğiinden günlük yaşamı kötü şekilde etkilemektedir. Dolayısıyla beyin tümörleri genel kanser nedeniyle ölümler arasında 10. sırada yer almaktadır (Jemal 2005).

1.1.4. Embriyonal tümörler

Embriyonal totipotent ve pluripotent hüceler doku diferansiyasyonu gösteren hücelerdir. Doğumdan sonraki ilk yıllarda giderek kaybolurlar. Bu nedenle tümörleride genellikle çocukluk dönemi tümörleridir. Aynı tümörde birden fazla dokuya diferansiye olabilirler. Genellikle malign nitelik taşırlar (Yachnis and Perry 2009). Embriyonel

tümörlerin histolojik sınıflandırılması Çizelge 1.1’de gösterilmiştir (Tuğcu 2004).

Çizelge 1.1. Embriyonal tümörlerin histolojik sınıflandırması

Nöroepitelyal doku tümörleri	
Embriyonal tümörler	
1. Medullaepitelyom	
2. Ependimoblastom	
3. Atipik teratoid/rabdoid tümör	
4. Supratentoryel primitif nöroektodermal tümörler	a. Nöroblastom b. Ganglionöroblastom
5. Medullablastom	a. Desmoblastik medullablastom b. Large cell medulloblastom c. Medullomyoblastom d. Melanositik medulloblastom

1.1.5. Nöroblastom

Nöral tümörler nöral kreste giren embriyonik ektodermin normal sinyallere cevap vermemesi ve normal gelişimini tamamlayamaması sonucu oluşmaktadır. Nöral tüplerdeki nöroektodermal hücrelerden nöroektodermal tümörler, nöral kreste giren nöroektodermal hücrelerden ganglia ve nöroblastom, kemik ve yumuşak dokuyu oluşturan nöroektodermal hücrelerden ise periferik nöroektodermal tümörler meydana gelmektedir (Olgun 1997).

Nöroblastom embriyonik gelişimin dördüncü haftasından sonra ortaya çıkan, ilkel nöral krest hücrelerinden orjin alan adrenal medulla ve sempatik ganglionlarda görülen bir tümördür (Demirkaya ve Sevinir 2006). İlk kez 1861’de Wright tarafından tanımlanmıştır (Hayes 1989; Olgun 1997; Saydere 2009). Çocukluk çağının en sık görülen ekstrakranial (kafatası dışında) solid tümörüdür. Nöroblastom bir yaş altındaki

çocuklarda kendiliğinden gerileyerek iyi huylu tümör (gangliyonörom) haline dönüşebildiği gibi bir yaş üstü çocuklarda agresif davranarak diğer organlarda metastaz yapma potansiyeline sahip bir tümör çeşididir (Brodeur 2003; Saydere 2009).

Risk faktörleri

Nöroblastom'un risk faktörleri arasında elektronik, tarım, paketleme işlerinde çalışanlar ile iş nedeniyle böcek zehiri, elektromanyetik alan, boya, radyasyona maruz kalanlar, annenin yaşı, kullandığı ilaç ve hormonlar, alkol alımı, sigara içimi, hamilelik sırasında saç boyası kullanımı, düşük, tekrarlayan sezeryan, bebeğin düşük doğum ağırlığı ve preterm doğum yer almaktadır (Goodman *et al.* 1975; Chatten *et al.* 1997; Haase *et al.* 1999; Maris *et al.* 1999; Aydın 2006).

Nöroblastom tanısı konmuş çocuklarda iştahsızlık, ağırlık kaybı, terleme, kızarma, solukluk atakları, baş ağrısı, çarpıntı, irriabilite (hızlı ve çabuk öfkelenme) ve hipertansiyon gibi belirtiler görülmektedir. Terleme, irriabilite ve hipertansiyon katekolamin (adrenal medullanın kromafin hücrelerinde, beyin ve sempatik nöronlarda sentezlenen adrenalin, norepinefrin ve dopamin) yapımına bağlı olarak gelişmektedir. Ayrıca, tümörün kemik iliğine metastaz yapmasıyla anemi görülebilir (Alp 2012).

Nöroblastom ile birlikte bildirilen semptomların başında yüz ve nörolojik ve gelişimsel anormallikler, sindirim sistemi anomalileri, otozomal resesif geçişli ürogenital ve kardiyak anomaliler, fötal alkol sendromu, Beckwith-Wiedemann sendromu ve Turner sendromu gelmektedir (Goodman *et al.* 1975; Chatten *et al.* 1997; Haase *et al.* 1999; Maris *et al.* 1999; Aydın 2006).

Epidemiyoloji

Tüm çocukluk çağı kanserlerinin %8-10 kadarını oluşturmaktadır (Gurney *et al.* 1997; Saydere 2009). Yeni doğan ve bir yaş altı çocuklarda görülme olasılığı milyonda 64, 1-4

yaş için milyonda 19,6, 5-9 yaş için milyonda 2,9 ve 15 yaş altında milyonda 7-12'dir (Haase *et al.* 1999; Cheung and Cohn 2005; Aydın 2006).

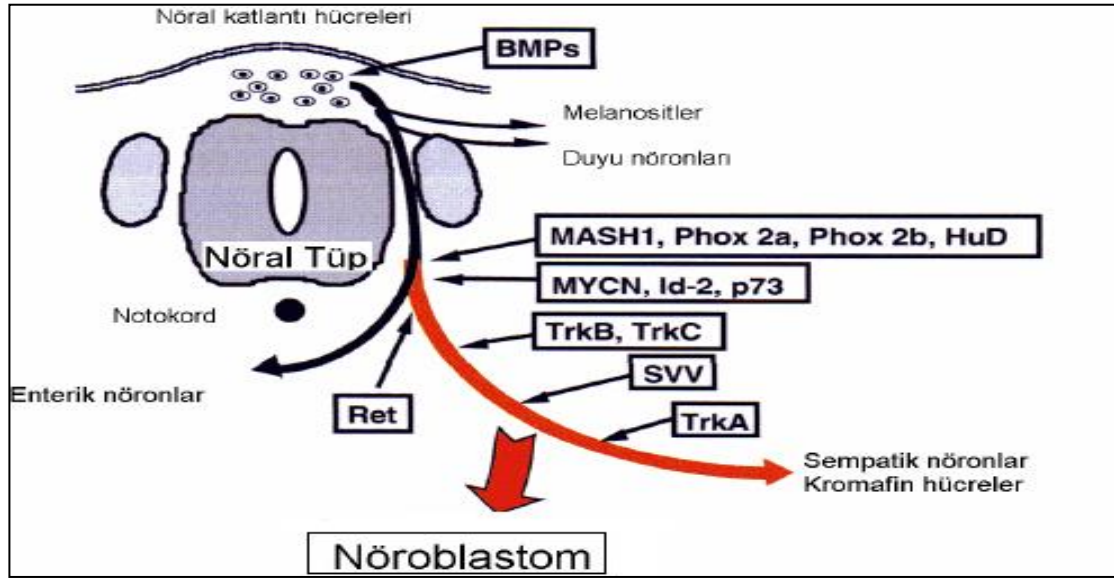
Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada'da yapılan istatistiklere göre her yıl 7000 canlı doğumdan 700'ünde görülmüştür. Avrupa'da ise bu oran yaklaşık iki katı (yılda 1500 vaka) olarak bildirilmiştir. Nöroblastom ABD, Kanada ve Avrupa'da tüm kanser türlerinin yaklaşık %28'ini oluşturmaktadır (Spix *et al.* 2006; Saydere 2009).

Patogenez

Nöroblastom sempatik sinir sisteminin herhangi bir bölgesinden kaynaklandığı için tümör lokalizasyonu ve klinik bulguları farklılık göstermektedir. Tümör oluşumunun %65'i abdomen kaynaklıdır. Bu durum bir yaş altında %25 iken bir yaş üstünde %40'a çıkmaktadır (Olgun 1997).

Tümör oluşumu iki nokta hipotezi ile açıklanmaktadır. Doğuştan bir kromozomdaki alel kaybının nöroblastom oluşumuna zemin hazırladığı ve aynı genin alelinde meydana gelen nokta mutasyonun kanser oluşumuna sebep olduğu düşünülmektedir (Cheung and Cohn 2005; Aydın 2006).

Nöroblastom hücresindeki DNA miktarı normal veya artmış olabilir. DNA miktarı artmış tümör hücreleri normal tümör hücrelerinden daha iyi prognoz göstermektedir. Nöroblastom'un en önemli onkogeni 2. kromozomun kısa kolunda 2p24 bölgesinde yerleşmiş MYCN onkogenidir. MYCN amplifikasyon sıklığının artması kötü prognozla anlamlı olarak ilişkilidir. Ayrıca nöroblastomların yaklaşık olarak yarısında 17. kromozomun uzun kolundaki alelik fazlalık kötü prognozla ilişkilidir. Bununla birlikte 1p delesyonu tümör dokusunun %25-35'inde saptanırken 11q delesyonu tümör dokusunun %35,2 sinde saptanmaktadır (Aksoylar 2007). Nöral krest hücrelerinin göçü ve farklılaşması Şekil 1.2'de gösterilmiştir (Aydın 2006).



Şekil 1.2. Nöral krest hücrelerinin göçü ve farklılaşması

1.2. Uçucu Yağlar

Uçucu yağlar bitkilerden elde edilen, oda sıcaklığında sıvı halde olan, kolaylıkla kristalleşebilen, kendine ait kokusu, tadı, rengi olan su buharı ile sürüklenabilen yağimsı karışımlar olarak tanımlanmaktadır (Akay 2006; Dirı 2006; Çelik ve Çelik 2007; Şengezer ve Güngör 2008). Uçucu yağ karışımının içinde terpenik hidrokarbonlar ve bunların oksijenli türevleri, alifatik hidrokarbonlar ve bunların oksijenli türevleri, aromatik hidrokarbonlar ve bunların oksijenli türevleri bulunmaktadır. Uçucu yağların yaklaşık %90'ı terpenik maddelerden oluşmaktadır (Ceylan 1987; Yalçın 1993; Güvenalp 1993; Dirı 2006; Umay 2007). Bitkinin yaprak, kök, rizom sap, tohum, çiçek gibi kısımları uçucu yağ eldesi olarak kullanılmaktadır. Su ile karışmayan uçucu yağlar alkol, eter, benzen ve petrol eteri gibi organik çözücülerde çözünebilmektedirler. Bitkilerde koruyucu, tozlaşmayı kolaylaştırıcı, su kaybını azaltıcı, yaralanmalarda onarıcı görevleri bulunmaktadır. Bitkilerden elde edilen uçucu yağlar ilaç, gıda, kozmetik, aromaterapi ve fitoterapi sektörlerinde kullanılmaktadır (Şengezer ve Güngör 2008; Edris 2009). Ağrı kesici, sindirim ve solunum düzenleyici, stres azaltıcı, bakteri ve mantar öldürücü ve aynı zamanda antikanser etkiye sahip oldukları bilinmektedir (Yaylı 2007).

1.2.1. Uçucu yağların izolasyonu

Son yıllarda bitkilerden elde edilen uçucu yağ bileşiklerinin kullanım alanlarının çok geniş olması nedeniyle, uçucu yağların izolasyonu ve saflaştırılması büyük önem taşımaktadır (Kıvrak 2006).

Çizelge 1.2. Uçucu yağ elde etme yöntemleri

Mekanik Yöntem	Ekstraksiyon Yöntemi	Destilasyon Yöntemi
	Organik çözücü ile tüketme	Su destilasyonu
	Sabit yağ ile tüketme	Buhar destilasyonu
		Su buharı destilasyonu

Mekanik yöntemde presleme yöntemi kullanılır. Elde edilen yağlar berrak değildir. Berraklaştırmak için süzme, santrifüjleme ve alkol ile seyreltme işlemleri kullanılır (Diri 2006).

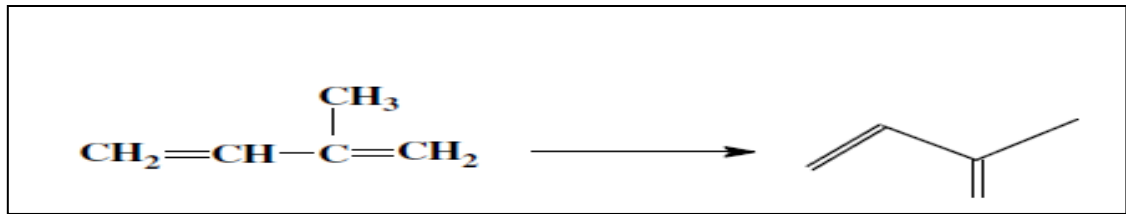
Ekstraksiyon yönteminde uçucu yağ uygun çözücülerle bitkiden alınmakta ve çözücüye geçen esans destilasyon yolu ile çözücüden ayrılmaktadır (Diri 2006; Kıvrak 2006).

Destilasyon yöntemi kurutulmuş ve ısıtmakla bozulmayan bitkilerden uçucu yağ elde etme yöntemidir. Su destilasyonu ile uçucu yağ elde edilmesi sırasında uçucu yağ bitki membranlarından sıcak su ile diffüzyonlanmaktadır. Kaynar su dokulara nüfuz ederek öncelikle kuvvetli polar maddeleri çözmekte, karışım hücre cidarlarından difüzyona uğramakta ve ısı etkisiyle hemen buharlaşmaktadır (Diri 2006; Kıvrak 2006).

1.2.2. Terpenler

Terpenler yapısal olarak farklı ve doğal bileşikler içinde geniş bir alana sahip olan yaklaşık olarak 30000'i aşkın farklı çeşidi bulunan bitkiler tarafından üretilen doğal bileşiklerdir (Davis and Croteau 2000). Kimyasal anlamda terpenler belli sayıda izopren (Şekil 1.3) birimlerinden oluşan $(C_5H_8)_n$ formülü ile karakterize edilen bileşikler olarak

tanımlanmaktadır (Umay 2007; Karabacak 2007; Karahan 2007). Uçucu yağlar, karotenoid pigmentleri ve doğal kauçuk da dahil olmak üzere terpenlerin bir çoğu ekonomik öneme sahiptir. Terpenlerin tümü dimetildifosfatın izomerizasyonu sonucu oluşan izopentil pirofosfat (IPP)'tan türevlenir (Davis and Croteau 2000). Uçucu terpenler su buharı distilasyonu ile sürüklenebilen monoterpenler ve bazı seskiterpenler iken uçucu olamayan terpenler seskiterpenler, diterpenler, sesterpenler, triterpenler ve politerpenlerdir (Karahan 2007). Terpenlerin etki mekanizmaları tam olarak bilinmemekle beraber lipofilik yapıda oldukları için membran içine girerek etkili oldukları düşünülmektedir (Vishwakarma 1990; Kızılkeçili 2007). Yapılan çalışmalarda terpenoid türevlerinin oksidatif stres sırasında hücrelerin redoks durumunu düzenleyerek kansere karşı koruyucu özellik gösterdiği rapor edilmiştir (Shukla and Gupta 2005; Acharya *et al.* 2010). Ayrıca nitrik oksit (NO) vücutta artmasına bağlı olarak gelişen kolit ve gastrit gibi pekçok iltihabi hastalık ve birçok kanser türünün oluşumunda terpenlerin antiinflamatuvar ve antikanserojenik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (Murakami 2009). İzopren birimi Şekil 1.3.'te gösterilmiştir (Işık 2005).

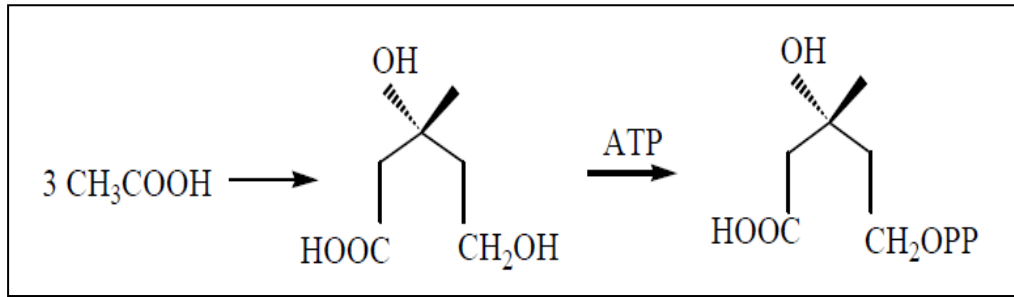


Şekil 1.3. İzopren birimi

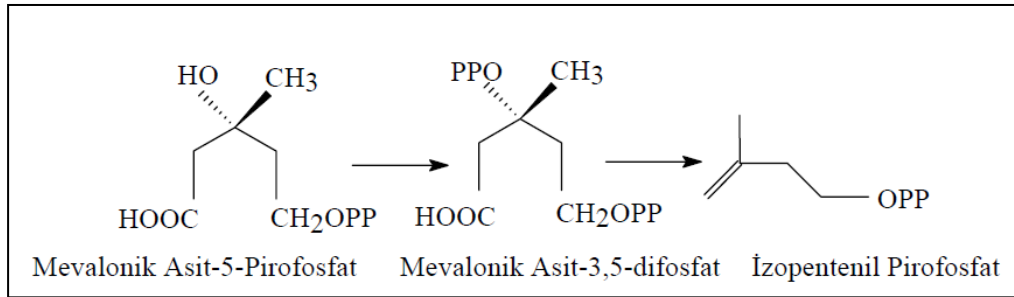
1.2.3. Terpenlerin biyosentezi

Terpenler mevalonik asidin su ve karbondioksit kaybetmesi sonucu meydana gelen izopren birimlerinden oluşmaktadır. Mevalonik asidin başlangıç maddesi asetil koenzimA'dır. Asetil koenzimA birçok doğal bileşiğin yapı taşı iken mevalonik asit sadece terpenlerin yapı taşıdır. Mevalonik asidin ATP ile reaksiyona girmesiyle mevalonik asit 5-pirofosfat oluşmaktadır. Mevalonik asit 5-pirofosfat'ın OH grubunun fosforlanması, dekarboksilasyonu ve dehidrasyonu sonucu IPP oluşur. IPP'nin izomerizasyonu sonucu dimetilalelil esteri oluşmaktadır. Bu iki izomerin birleşimi ile

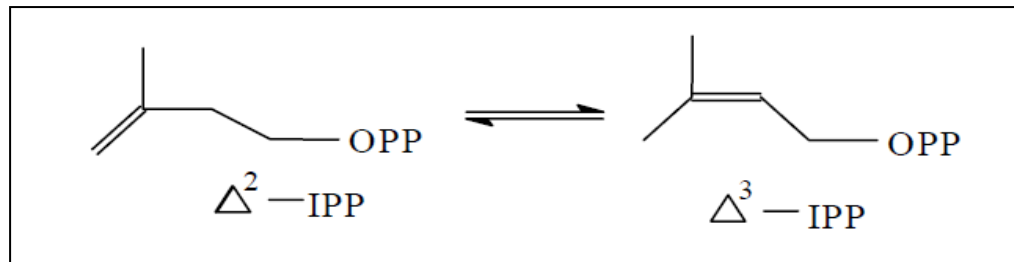
geraniolpirofosfat (GPP) meydana gelmektedir. GPP'nin dehidrasyonu sonucu geraniol oluşmaktadır. Geraniol monoterpenlerin biyosentezinde kullanılmaktadır. IPP ve GPP'nin birleşimi farnesil pirofosfatın oluşumunu (FPP) sağlar. Bu yapı seskiterpenlerin biyosentezinde kullanılmaktadır. FPP'nin IPP ile kondenzasyonu sonucu geraniil-geraniil pirofosfat oluşmaktadır. Bu yapı ise diterpenlerin biyosentezinde rol almaktadır (Davis and Croteau 2000; Işık 2005; Karahan 2007; Yılmaz ve Murat 2010). Terpenlerin biyosentezi Şekil 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 ve 1.9' da gösterilmiştir.



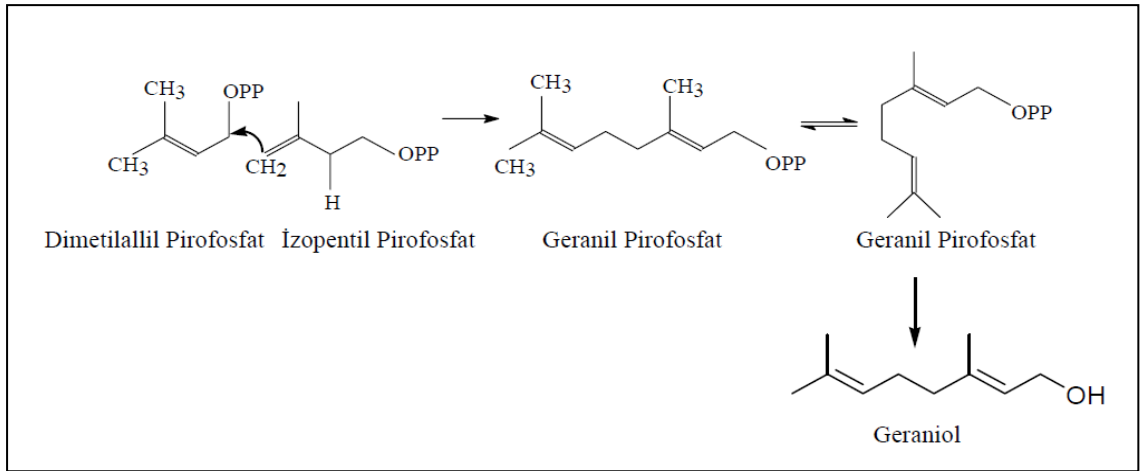
Şekil 1.4. Mevalonik asit-5-pirofosfat oluşumu



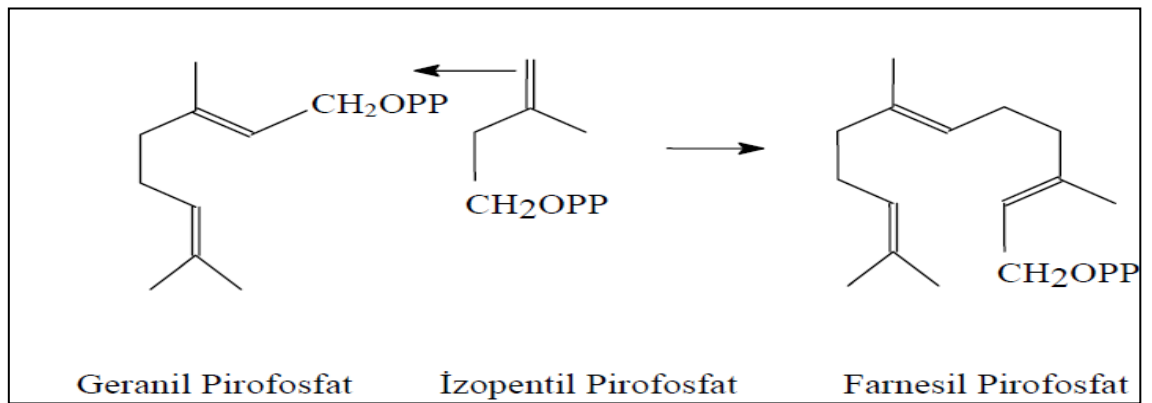
Şekil 1.5. İzopentil pirofosfat (IPP) oluşumu



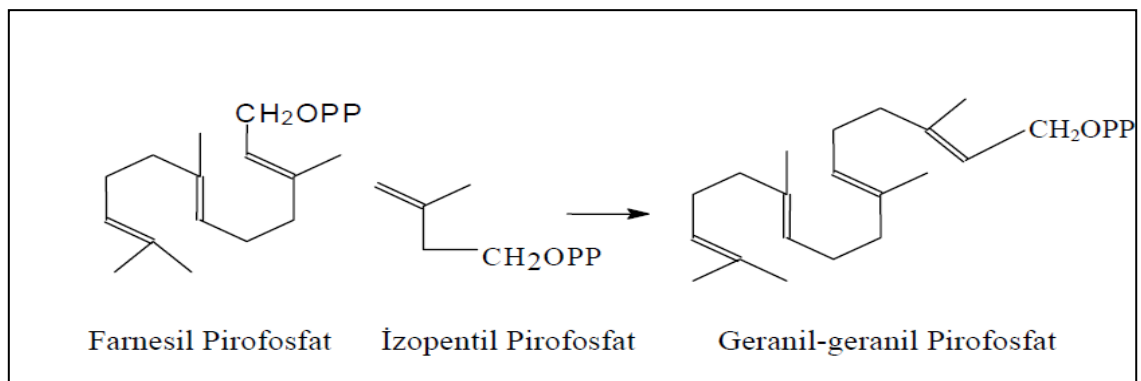
Şekil 1.6. İzopentil pirofosfat (IPP)'in izomerizasyonu



Şekil 1.7. Geraniolpirofosfat (GPP) ve geraniol oluşumu



Şekil 1.8. Farnesil pirofosfat (FPP) oluşumu



Şekil 1.9. Geranil-geranil pirofosfat oluşumu

1.2.4. Terpenlerin sınıflandırılması

Mono-, seski- ve diterpenler izoprenlerin baş-kuyruk şeklinde birleşmeleriyle oluşurken triterpenler iki C₁₅, karetenoitler iki C₂₀ biriminin birleşmesiyle oluşmaktadır (Umay 2007; Karabacak 2007). Terpenlerin sınıflandırılması Çizelge 1.3’de gösterilmiştir (Karahana 2007).

Çizelge 1.3. Terpenlerin sınıflandırılması

Terpenler	İzopren birimleri	Karbon atomları
Hemiterpenler	1	5
Monoterpenler	2	10
Seskiterpenler	3	15
Diterpenler	4	20
Sesterpenler	5	25
Triterpenler	6	30
Tetraterpenler (Karotenoidler)	8	40
Politerpenler	>100	>500

Hemiterpenler

Hemiterpenler bitkisel dokularda birikmeyen fakat alkaloidler, kumarinler ve flavonoidlerle ilişki halinde olan tek izopren biriminden oluşan terpenik bileşiklerdir (Kıvrak 2006).

Monoterpenler

Yüksek yapıli bitkilerde bulunmakla birlikte deniz organizmalarında ve böceklerin koruma ve feromoral salgılarında da bulunan monoterpenlerin yaklaşık olarak 150’den fazla çeşidi vardır (Umay 2007). Bitkilerde tat ve kokudan sorumlu keskin kokulu

uçucu bileşenlerdir. Terpenlerin en küçük birimleri olan monoterpenler iki izopren biriminin kondenzasyonu sonucu oluşmaktadırlar (Karahana 2007). Monoterpenler asiklik, monosiklik ve bisiklik olmak üzere üç grupta incelenirler. (Umay 2007). Bitkilerden su buharı destilasyonu ile izole edilirler. (Işık 2005). Biyolojik ve farmakolojik aktivitelerinden dolayı kullanımlarının yanı sıra gıda katkı maddesi (Seifried *et al.* 2007), aroma ve koku kimyasalı (Swift 2002; Berger 2007), insektisidal ve pestisidal (Janmaat *et al.* 2001; Sampson *et al.* 2005) olarakta kullanılabilirler.

Diterpenler

Dört izopren molekülüne sahip olan diterpenler, farmakolojik etkilere sahip bileşiklerdir. $C_{20}H_{32}$ formülüyle gösterilirler. Doğada yaygın olarak bulunurlar. Asiklik, monosiklik, bisiklik, trisiklik, tetrasiklik, makrosiklik olmak üzere altı sınıfa ayrılmaktadırlar (Gören 1997; Köseadağ 2005). *Taxus* cinsi bitkilerden elde edilen trisiklik diterpenler günümüzde prostat, yumurtalık, akciğer ve meme kanseri tedavisinde kullanılmaktadır (Di Costanzo *et al.* 2009; Çetin 2011).

Sesterpenler

$C_{25}H_{40}$ formülüne sahip terpenlerdir (Karahana 2007).

Triterpenler

$C_{30}H_{48}$ formülüne sahip terpenlerdir. Tetrasiklik triterpenler ve pentasiklik triterpenler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar (Robbers *et al.* 1996; Köseadağ 2005; Karahana 2007).

Tetraterpenler (Karotenoidler)

$C_{40}H_{56}$ formülüne sahip terpenlerdir. Karotenler tetraterpen grubu üyelerindedir. Kuyruk kuyruğa bağlanmış iki terpenin birleşimiyle oluşurlar (Karahana 2007).

Politerpenler

$(C_5H_8)_n$ formülüyle gösterilir. Politerpenlerin en bilinen üyesi kauçuktur (Karahana 2007).

Seskiterpenler

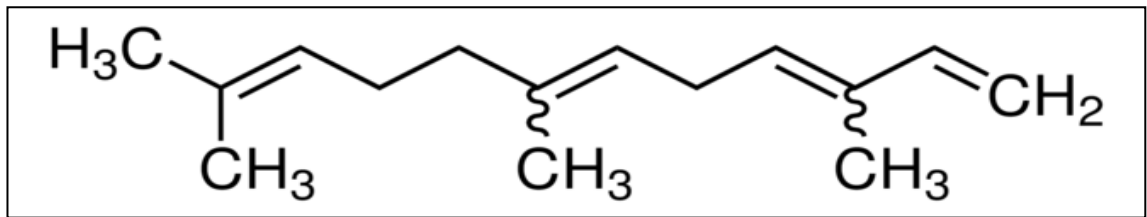
Terpenlerin en geniş sınıfı olan seskiterpenler üç izopren biriminden oluşurlar ve $C_{15}H_{24}$ molekül formülü ile gösterilirler. GPP'nin IPP ile kondenzasyonu sonucu oluşan FPP'den türevlenirler. Metil grupları genellikle fonksiyonludur. Doymamış, okside edilmiş veya redüklenmiş olabilirler (Çöl 2007; Yılmaz ve Murat 2010). Seskiterpenler, asiklik, monosiklik, bisiklik, trisiklik ve tetrasiklik olmak üzere beş gruba ayrılmaktadır (Kıncı 2005; Çöl 2007). Yurdumuzda 133 kadar cinsi ve 1156'dan fazla türü olan Compositae familyası üyeleri (Tosun and Özkal 2000), bazı *Juniperus* türleri (Tümen ve Hafızoğlu 2003), bazı *Salvia* türleri (Bağcı ve Koçak 2008), Umbelliferae familyasındaki *Seseli* türleri (Tosun and Özkal 2003), *Centaurea* türleri (Arif *et al.* 2004), *Prunella L.* türleri (Ahmed ve Ezer 2008), *Satureja* türleri (Azaz vd 2002) bol miktarlarda seskiterpen yapısındaki bileşiklerden içermektedir. Diğer terpenlere göre nispeten kaynama noktası yüksek uçucu yağlardır (Yaylı 2007).

Seskiterpen laktonlar ise genellikle mantarlarda, Bryophyta üyelerinde, Apiaceae, Lauraceae, Menispermaceae ve Asteraceae familyasına ait bitkilerde bulunmaktadır. Seskiterpen laktonlarını seskiterpenlerden ayıran özellik α -metilen- γ -lakton sistemine sahip olmalarıdır. Birçoğu α - β doymamış karbonil grupları içerir. Antitümöral, antilösemik aktiviteye sahip oldukları gibi bazı seskiterpen laktonların memelilerde toksik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Karahana 2007; Çöl 2007; Yılmaz ve Murat 2010).

1.2.5. Tez kapsamında kullanılan seskiterpenler

Farnesen

Farnesen (FNS) asiklik seskiterpenler grubundandır (Akay 2006). 3,7,11-trimetil-1,3,6,10-dodekatetran yapısındadır (Bazemore *et al.* 2012). İlk olarak elma kabuklarında keşfedilen FNS'nin bitkide savunma sisteminde herbivorlara karşı mücadelede rol aldığı tespit edilmiştir. (Kikuta *et al.* 2011; Wang *et al.* 2011). *Matricaria recutita* L. bitkisinde %15,9 (Can *et al.* 2011), *Artemisia lavandulaefolia*'da %12,5 (Liu *et al.* 2010), *Asarum insigne*'de %5,91 (Qu *et al.* 2011), *Vitex agnus castus* bitkisinde %5,40 (Sarıkurkcu *et al.* 2009), *Artemisia biennis* bitkisinde %40 (Lopes-Lutz *et al.* 2008), *Grammosciadium scabridum* türünde %5,3 oranında (Sonboli *et al.* 2005) FNS tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda β - FNS'nin antioksidan, antifungal (Al-Maskri *et al.* 2011), antimikrobiyal (Chehregani *et al.* 2010) ve antibakteriyal (Bajpai *et al.* 2009) etkilerinin bulunduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte %4,96 α -FNS içeren *Ficaria kochii* bitki ekstraktının güçlü antioksidan kapasite sergilediği rapor edilmiştir (Tavakoli *et al.* 2012). Ayrıca FNS'nin damar açıcı etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Roberts *et al.* 2013). FNS bileşiğinin kimyasal yapısı Şekil 1.10'da gösterilmiştir (Anonymous 2013a).

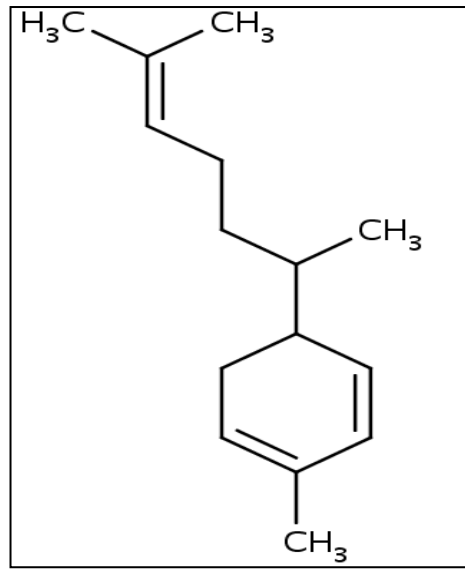


Şekil 1.10. Farnesen bileşiğinin kimyasal yapısı

Zingiberen

Zingiberen (ZNG) *Zingiber officinale roscae* (Zingiberaceae) bitkisinden izole edilen, ilaç endüstrisinde kullanılan bir monosiklik seskiterpenidir. *Zingiber officinale roscae* bitkisi Güney Asya'da yetişen çok yıllık bir bitkidir. Rizomlarının baharat ve ilaç olarak

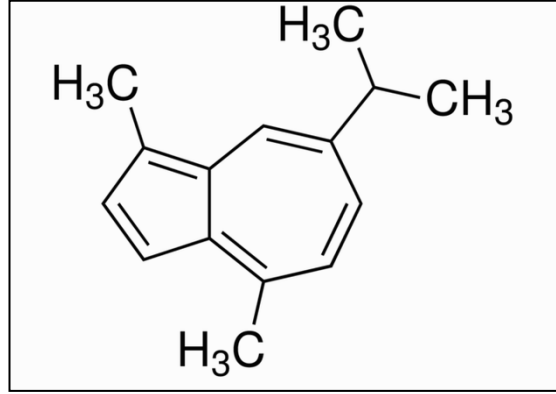
kullanılması sebebiyle günümüzde birçok ülkede kültürü yapılmaktadır. Ginger yağı içeriğinde geranil asetat (%18,8), ZNG (%16,3), 3-seskiellandren (%2,8), (+)-arcurcumen (%1,5), monoterpenlerden de geranial (%8,2) ve neral (%1,2) uçucu yağları bulunmaktadır (Anasori and Asghari 2008; Sasidharan *et al.* 2011). Yapılan çalışmalarda ZNG'nin antioksidan etkilerinin bulunduğu rapor edilmiştir (Conforti *et al.* 2008; El-Ghorab *et al.* 2010). ZNG bileşiğinin kimyasal yapısı Şekil 1.11'de gösterilmiştir.



Şekil 1.11. Zingiberen bileşiğinin kimyasal yapısı

Gayazulen

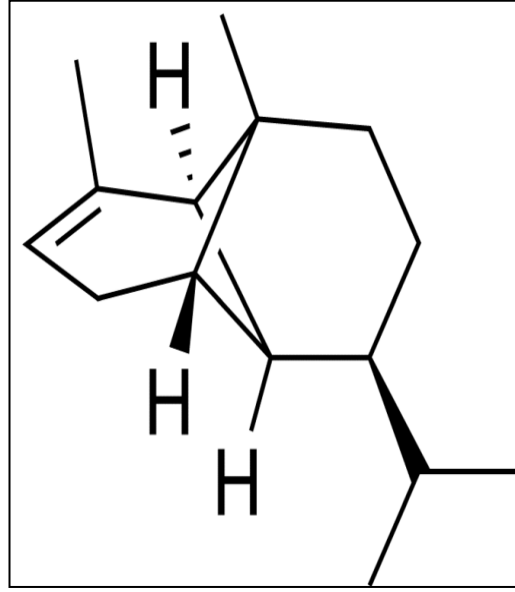
Gayazulen (GYZ) birçok sağlık bakım ürünlerinde yaygın olarak kullanılan bisiklik seskiterpendir (Fiori *et al.* 2011; Güneş *et al.* 2013). GYZ'nin sığır embriyolarında antioksidan kapasiteyi destekleyebildiği (Dovolou *et al.* 2011), bakterilerde fotomutajenik aktiviteyi arttırdığı (Wang *et al.* 2003; Struwe *et al.* 2011), tümör hücrelerinde toksik etki gösterdiği (Wakabayashi *et al.* 2003) rapor edilmiştir. GYZ bileşiğinin kimyasal yapısı Şekil 1.12'de gösterilmiştir (Anonymous 2013c).



Şekil 1.12. Gayazulen bileşiğinin kimyasal yapısı

Kopaen

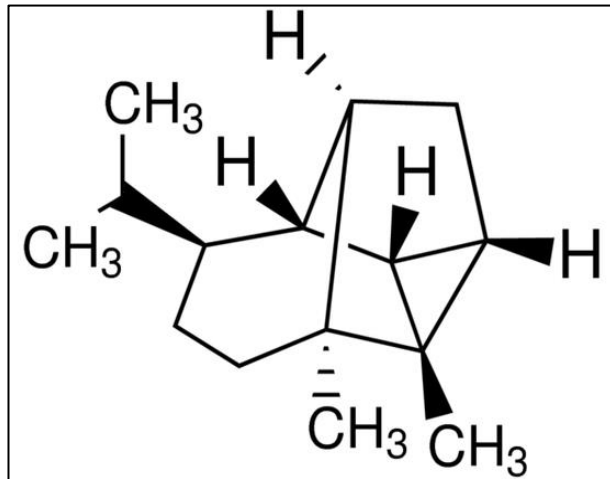
Yapılan gaz kromatografisi kütle spektrofotometri çalışlarında *Teucrium* türlerinde (Yaylı 2007), *Artemisia annua* bitkisinin yapraklarında (Picaud *et al.* 2005), *Cyperus rotundus* bitkisinin rizomlarında %4,36 (Chen *et al.* 2011), *Melia azedarac* bitkisinde %5,04 (Yang *et al.* 2011), yara iyileşmesinde, anti-inflamatuar ajan, antianksiyete, anti-stres, anti-mutajenik, spazmolitik ajan olarak kullanılan *Annona reticulata* bitkisinde %35,40 (Chavan *et al.* 2011) oranında trisiklik seskiterpen Kopaen (KOP) bulunmuştur. Mevcut çalışmalarda KOP içerikli uçucu yağların antikanserojenik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Ryu *et al.* 2012). Ayrıca KOP'un insan lenfosit kültürlerinde yüksek dozlarda zayıf sitotoksik etki gösterdiği, uygulanan hiçbir dozda (10-400 mg/L) genotoksik olmadığı ve düşük dozlarda antioksidan kapasiteyi arttırdığı rapor edilmiştir (Türkez *et al.* 2013). KOP bileşiğinin kimyasal yapısı Şekil 1.13'te gösterilmiştir (Anonymous 2013d).



Şekil 1.13. Kopaen bileşiminin kimyasal yapısı

Siklosativen

Siklosativen (SSV) *Helminthosporium sativum* bitkisinde bulunan tetrasiklik seskiterpendir (Akay 2006; Kıvrak 2006; Lodewyk *et al.* 2008). Yapılan literatür taramalarına göre SSV'nin sitolojik, biyokimyasal ve genetik etkileri henüz hiçbir hücre hattında çalışılmamıştır. SSV bileşiminin kimyasal yapısı Şekil 1.14'te gösterilmiştir (Anonymous 2013e).



Şekil 1.14. Siklosativen bileşiminin kimyasal yapısı

1.3. Sitotoksosite ve Testleri

Sitotoksosite bir kimyasal bileşimin ya da ajanın hücre öldürme özelliği olarak tanımlanmaktadır (Atmaca 2008). Günümüzde sitotoksosite testleri, hücre canlılığı, hücre poliferasyonu, membran seçici geçirgenliği, DNA sentezi ya da hücre metabolizma gibi toksisiteyi belirleyen gösterge parametrelerin ölçülmesinde kullanılmaktadır (Gad 2000; Barutça 2006).

Sitotoksisiteyi ölçmede kullanılan yöntemler membran bütünlüğüne dayanan yöntemler ve metabolik aktiviteye dayanan yöntemler olmak üzere ikiye ayrılır (Barutça 2006).

Membran bütünlüğüne dayanan yöntemlerden biri laktat dehidrogenaz (LDH) salınım yöntemidir. Laktat dehidrogenaz tüm hücrelerde bulunan sitoplazmik bir enzimdir. Hücre zarı hasar gördüğünde hücre dışına kolaylıkla salınabilmektedir (Haslam *et al.* 2000; Wolterbeek and Van der Meer 2005). Bu yöntemde hücre membran bütünlüğünün bir göstergesi olarak kullanılan LDH aktivitesi kimyasal bileşikler ya da çevresel toksik bileşiklerden kaynaklanan sitotoksitenin değerlendirilmesi için kullanılmaktadır. LDH analizinde kültür medyumuna salgılanan LDH miktarı hücre ölüm oranını vermektedir (Yılmaz and Taşkiran 2010).

Metabolik aktiviteye dayanan yöntemler ise Neutral Red (NR), MTT, 2,3-bis (2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-5 [(fenilamino) karbonil]-2H-tetrazolyum hidrokisit (XTT) ve WST-1 yöntemleridir. Bu test yöntemlerinde kültür ortamlarına tetrazolyum tuzu eklenerek metabolik aktivite ölçümü yapılmaktadır (Fent 2001; Fotakis and Timbrell 2005).

İlk olarak Mosmann (1983) tarafından tanımlanan ve daha sonra Alley *et al.* (1988) tarafından geliştirilen MTT testi hücre canlılığının belirlenmesi için sıkça tercih edilen kalorimetrik bir yöntemdir. MTT testi sık sık hücre proliferasyonunu ölçen bir indikatör olarak kullanılmasına rağmen asıl amacı mitokondriyal aktivasyonu ölçen bir indikatör olmasıdır (Wu *et al.* 2005; Nilay 2009). MTT testi canlı hücreleri belirlemek için bir

tetrazolyum tuzu olan MTT boyasının indirgenme özelliğine dayanır. Bu testte, ölü hücrelerin bu boyayı indirgeme özelliğini yitirmesi prensibinden yararlanılmaktadır. Bir başka deyişle sağlam hücrelerdeki mitokondrinin MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayabilme özelliğine dayanmaktadır (Wu *et al.* 2005).

1.4. Oksidatif Stres

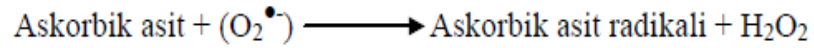
Oksijen aerobik yaşam için gerekli olmasına rağmen canlılarda dejenerasyon ve hastalık oluşumuyulada ilişkilidir (Marx 1985; Durmuş 2003). Çeşitli çalışmalarda oksijenin meydana getirdiği hasarın serbest oksijen radikalleri olarak adlandırılan hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil radikallerin üretiminden kaynaklandığı rapor edilmiştir. Bu radikaller makromoleküllerle (lipid, karbonhidrat, aminoasit, nükleik asitler, organik asitler) reaksiyona girerek hücrelerde hasar meydana getirmektedir. Oksijenin toksik etkisi elektron ve enerjinin oksijen molekülüne transferinden kaynaklanmaktadır (Marx 1985; Durmuş 2003). Bu olaylar sırasında oluşan toksik bileşiklere reaktif oksijen metabolitleri (ROM) adı verilmektedir. Reaktif oksijen metabolitleri ve kimyasal formülleri Çizelge 1.4’de gösterilmiştir (Halliwell *et al.* 1996).

Çizelge 1.4. Reaktif oksijen metabolitleri ve kimyasal formülleri

Reaktif Oksijen Türleri			
Radikaller		Radikal Olmayanlar	
Süperoksit	$O_2^{\cdot-}$	Hidrojen Peroksit	H_2O_2
Hidroksil	OH^{\cdot}	Singlet Oksijen	$\Delta_g \ ^1O_2, \Sigma^1O_2$
Peroksil	RO_2^{\cdot}	Hipoklorik Asit	$HOCl$
Alkoksil	RO^{\cdot}	Hipobromik Asit	$HOBr$
Perhidroksi	HO_2^{\cdot}	Ozon	O_3

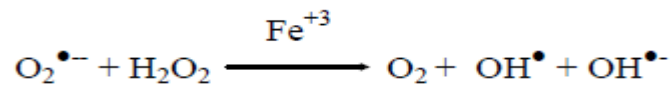
Süperoksit (O₂^{•-})

Moleküler oksijenin indirgeyici bir ajandan bir elektron alması sonucu süperoksit radikali (O₂^{•-}) oluşmaktadır (Nordberg and Arner 2001; Kotan 2010). Reaktif özelliği fazla olmamakla birlikte direk olarak fazla hasar vermeyen bir metabolittir. Bu radikalın en önemli özelliği H₂O₂ kaynağı olma ve geçiş metalleri iyonlarını indirgemesidir (Weiss and LoBuglio 1982; Türkez 2007). Süperoksit radikal oluşumuna en iyi örnek olarak askorbik asidin oksitlenmesi verilebilir (Mercan 2004; Kotan 2010).



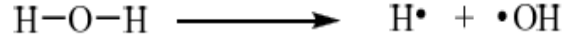
Hidrojen peroksit (H₂O₂)

H₂O₂ radikali oksijenin iki elektronunun indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin dismutasyonu sonucu oluşmaktadır. Yapısında eşlenmemiş elektron bulunmadığında reaktif özellik taşımamaktadır. Fakat H₂O₂ ile süperoksit radikali Fe⁺³ veya Cu⁺² katalizörlüğünde Haber-Weis tepkimesini vererek oldukça toksik olan hidroksil radikalini meydana getirmektedir (Türkez 2007; Kotan 2010).



Hidroksil (OH[•])

Biyolojik sistemlerin en reaktif türü hidroksil (OH[•]) radikalidir. Ortamda rastladığı her moleküle tepkimeye girme yeteneğine sahiptir. Bu özelliği dış yörüngesinde elektron alma isteğinden kaynaklanmaktadır. Yarılanma ömrü oldukça kısadır. OH[•] radikalinin en önemli hasarı lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur (Nishiyama *et al.* 1998; Türkez 2007; Kotan 2010).



Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)

Singlet oksijen süperoksit radikali ile OH^\bullet radikalinin reaksiyona girmesiyle meydana gelmektedir. Moleküler oksijenin yüksek enerjili uyarılmış formudur. Singlet oksijen reaktif bir metabolittir. Molekülünde eşleşmemiş iki elektron taşır. Sahip olduğu enerjiyi dalga enerjisi şeklinde çevreye vererek tekrar oksijene dönüşebilmektedir (Stahl and Sies 2002).

Peroksil (RO_2^\bullet) ve alkoksil (RO^\bullet)

Karbon merkezli radikallerin oksijenle tepkimeye girmesi sonucu peroksil radikali oluşmaktadır. Peroksil (RO_2^\bullet) radikalinden de alkoksil (RO^\bullet) radikali oluşmaktadır. Perhidroksi, RO_2^\bullet ve RO^\bullet radikallerinin lipidlerde çözünerek lipid peroksidasyonunu hızlandırdığı rapor edilmiştir (Arslan ve Dündar 2000; Türkez 2007).

Hipoklorik Asit (HOCl), Hipobromik asit (HOBr)

Hipoklorik Asit (HOCl) ve hipobromik asit (HOBr) miyeloperoksidaz enzimi tarafından sırasıyla klorür ve bromür iyonlarının H_2O_2 ile birleşmesi sonucu oluşan, biyolojik olarak önemli moleküllerle etkileşime girerek dokularda hasar oluşturan güçlü oksidanlardır (İşbilir 2008).

Ozon (O_3)

Ozon (O_3) bir radikal olmamasına rağmen birçok organik molekülle reaksiyona girdiği bildirilmiştir. Ozon'un serbest radikal oluşumuna sebep olduğu ve lipid peroksidasyonuna yol açtığı yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Halliwell and Gutteridge 1989).

1.4.1. Oksidatif stres ve kanser

Oksidatif stresin başta kanser olmak üzere arterioskleroz (Halliwell and Gutteridge, 1990), hipertansiyon, diyabet (Akkuş 1995), Alzheimer ve Parkinson (Dauer and Przedborski 2003; Mosley *et al.* 2006), hücre yıpranması, yaşlanma (Hipkiss 2007), sistik fibroz, astım ve Down sendromu gibi birçok hastalığın oluşumuna sebep olduğu bilinmektedir (Halliwell and Gutteridge 1990; Halliwell 1994; Anderson 2007; Ardağ 2008).

Bugüne kadar yapılan birçok çalışma kanser oluşumunda serbest radikallerin ve diğer reaktif metabolitlerin etkili olduğunu rapor etmiştir. Yapılan çalışmalarda DNA'nın guanin bazı içeren bölgelerinin bu reaktif moleküllere maruz kaldığı ve bu bölgelerde yer alan ras ve p53 tümör baskılayıcı genlerde mutasyonlara yol açtığı bildirilmiştir (Türkez 2007). Ayrıca ROM ve ROM oluşumuna yol açan karsinojenlerin büyüme inhibisyonuna ve apoptotik sinyal yollarını etkileyerek tümör oluşumuna sebep olduğu bildirilmiştir (Yokuş ve Çakır 2012). Feig *et al.* (1994), ROM'ların CC→TT transversiyonlarına sebep olduğunu rapor etmişlerdir. Bununla birlikte, beyin, akciğer, kolon ve ovaryum kanserlerinde kanserli hastaların oksidatif strese bağlı olarak üriner 8-OH-G ve diğer lezyonların seviyelerinde önemli yükselmeler belirlenmiştir (Evans *et al.* 2004).

1.5. Antioksidan Sistem

Antioksidan savunma sistemleri veya antioksidanlar, ROM oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önleyici savunma mekanizmalardır (Yıldırım 2003). Bütün canlıların oksidatif stresten korunması antioksidan sistemle alakalıdır (Nagai *et al.* 2005).

Antioksidanların dört farklı etki şekli vardır. Bunlar;

-**Toplayıcı etki:** Oluşmuş serbest radikalleri tutma ya da daha zayıf bir moleküle

çevirme

-**Baskılayıcı etki:** Serbest radikallerle etkileşerek onlara bir H⁺ aktarma ve inaktif hale dönüştürme

-**Zincir kırıcı etki:** Serbest radikalleri bağlayarak reaksiyonun zincirini kırma

-**Onarıcı etki:** Tamir etme (Akkuş 1995; Yıldırım 2003; İşbilir 2008).

İyi bir antioksidan da bulunması gereken özellikler şunlardır;

-Ortamdaki serbest radikalleri gidermeli,

-Redoks metallerinin şelatörü olarak görev yapabilmeli,

-Antioksidan sistemdeki diğer antioksidanlarla etkileşimler yapabilmeli,

-Gen ekspresyonu üzerinde olumlu etkileri olmalı,

-Emilimi oldukça hızlı olmalı,

-Dokulardaki ve biyolojik sıvılardaki konsantrasyonları fizyolojik açıdan uygun seviyelerde olmalı

-Hem membranlarda hem de su içeren ortamlarda fonksiyonel olmalıdır (Valko *et al.* 2006).

Vücudumuzdaki antioksidan savunma sisteminde yer alan başlıca elemanlar endojen antioksidanlar ve ekzojen antioksidanlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Antioksidanların sınıflandırılması Çizelge 1.5'te gösterilmiştir (Halliwell 1994; Türkez 2007).

Çizelge 1.5. Antioksidanlar

Endojen Antioksidanlar			Ekzojen Antioksidanlar	
Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar		Doğal Antioksidanlar	Doğal Olmayan Antioksidanlar
Süperoksit dismutaz (SOD)	Lipid fazda bulunanlar		Vitamin A	Bütil hidroksi tolüen
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	a-tokoferol	β-karoten	Vitamin E	Bütil hidroksi anizol
	Sıvı fazda bulunanlar		Vitamin C	Tert-bütil hidrokinon
Katalaz	Glutasyon	Laktoferrin	Flavonoidler	Propil gallat
Glutasyon-S-trasferaz (GST)	Askorbik asit	Albumin	Diğer fenolik bileşikler	Oktil gallat
				Dodesil gallat
Glutasyon redüktaz (GR)	Melatonin	Hemoglobin		Sodyum benzoat
	Ürat	Bilurubin		Etoksilin
Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G-6-PDH)	Sistein	Miyogloblin		Troloks
	Metiyonin	Ferritin		3-oksi piridin
	Trasferrin	Seruloplazmn		Antabuse

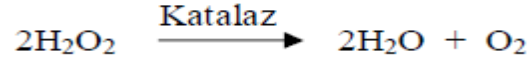
1.5.1. Enzimatik antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD) oksidatif strese karşı ilk savunma enzimidir. Süperoksiti H_2O_2 ve moleküler oksijene çevirir. Bu enzim sayesinde süperoksit miktarı kontrol altında tutulur (Landis and Tower 2005; Buettner *et al.* 2006; Kotan 2010; Demir 2013).

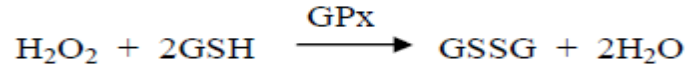
Katalaz

Katalaz bir hemoproteindir. Karaciğerde ve eritrositlerde en yüksek aktiviteye sahiptir. Katalaz enzimi SOD'nin ürettiği H_2O_2 'yi su ve oksijene parçalar (Scibior and Czczot 2006; Türkez 2007; Ardağ 2008).



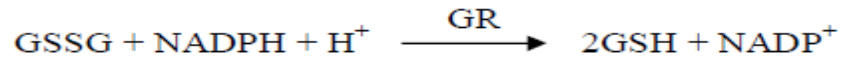
Glutatyon peroksidaz (GPx)

Glutatyon peroksidaz enzimi H_2O_2 ve büyük moleküllü hidroperoksidlerin indirgenmesini sağlar. H_2O_2 varlığında glutatyonu okside glutatyonla dönüştürürken aynı zamanda H_2O_2 'de suya dönüştürür (Armstrong 1998; Türkez 2007; Kotan 2010).



Glutatyon redüktaz (GR)

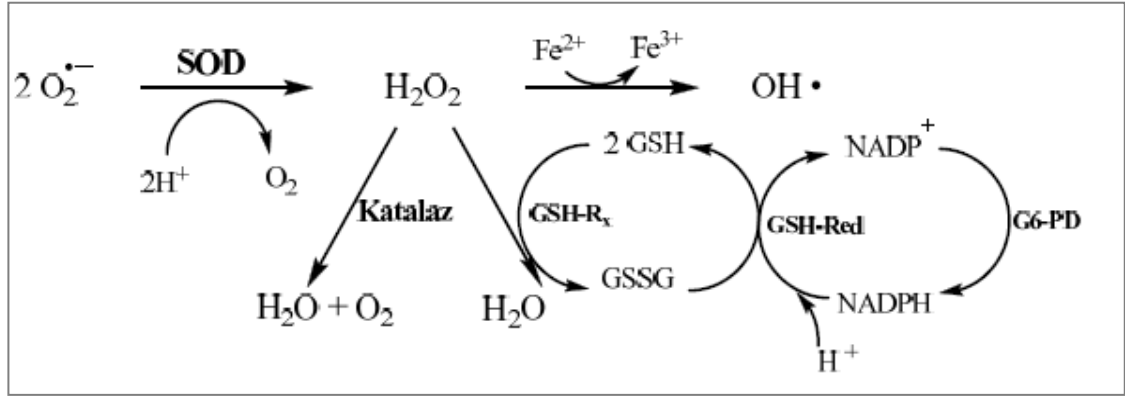
Glutatyon redüktaz enzimi NADPH varlığında okside olmuş glutatyonu redükte glutatyonla dönüştürür (Halliwell 1994; Demir 2013).



Glutatyon-S-transferaz (GST)

Lipid peroksidlerine karşı selenyum bağımsız glutatyon peroksidaz aktivitesi gösterirler. Ayrıca ksenobiyotiklerin biyotransformasyonu ve detoksifikasyonunda önemli rolleri vardır. (Candan 2002; Türkez 2007; Ardağ 2008). Enzimatik savunma mekanizmaları Şekil 1.15'te gösterilmiştir (Türkez 2007).





Şekil 1.15. Enzimatik savunma mekanizmaları

1.5.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

Glutasyon (GSH)

Glutasyon sistein içeren bir tripeptittir. H_2O_2 'yi veya organik asitleri kimyasal olarak detoksifiye eder. GSH, GSH-transferaz ve peroksidazlar için bir substrat olup ksenobiyotik ve ROM'ların detoksifikasyonuna katılır (Kotan 2010). Hasarlı DNA parçalarının onarılmasında, zehirli maddelerin inaktif hale dönüştürülmesinde, serbest radikallerin olası hasarlarında görev alır (Kotan 2010).

Vitamin C

Suda çözünen vitamindir. Birçok bileşik için indirgeyici özelliğe sahiptir. Bu özelliğinden dolayı güçlü bir antioksidandır. Serbest radikalleri tutarak lipid peroksidasyonunun başlamasını engeller (İşbilir 2008).

α -tokoferol

E vitamini ailesinin ana bileşenidir. Lipid peroksidasyonuna karşı hücre membranlarının ve plazma lipoproteinlerinin en önemli zincir kırıcı antioksidanıdır (Akkuş 1995). *In vivo* ve *in vitro* çalışmalarda α -tokoferol ile GPx'in serbest radikallere karşı birbirini

tamamlayıcı etkisi olduğu rapor edilmiştir (İşbilir 2008).

Karotenoidler

Bitkilerde bulunan renk pigmentleridir. Singlet oksijen ve peroksil radikallerini gideririler (Stahl and Sies 1999; İşbilir 2008).

Flavonoidler

Bitki sekonder metabolitleridir. Flavonoidlerin süperoksit, lipid alkoksil (RO^{\bullet}), lipid peroksil (ROO^{\bullet}) ve nitrik oksit (NO^{\bullet}) radikallerini temizleme, Fe ve Cu şelatlama, α -tokoferol rejenerasyonu gibi fonksiyonları bulunmaktadır (İşbilir 2008).

Ürik asit

Ürat pürin metabolizmasının son ürünüdür. Suda çözünen bir bileşiktir. Hidroksil, süperoksit, peroksit radikalleri ve singlet oksijeni giderir (Akkuş 1995).

Bilurubin

HEM metabolizmasının memelilerdeki son ürünüdür. Düşük konsantrasyonlarda lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir (Yeşilkaya vd 1998).

Melatonin

Melatonin karanlıkta epifizden salgılanan antioksidan özellikte bir nörohormon olup çeşitli organların fonksiyonlarını düzenlemektedir (Türkez 2007).

1.6. Genetik Toksisite ve Testleri

Genetik toksisite terimi genotoksinlerin (organizmada genetik farklılaşma oluşturan maddeler) DNA yapısında meydana getirdiği hasar olarak tanımlanmaktadır. DNA yapısında meydana gelen bu hasarlar gen mutasyonları, DNA eklentileri, DNA zincir kırıkları, klastojenite, anoploidi ve kromozom anormallikleridir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011).

DNA üzerinde hasarlara yol açan fiziksel ve kimyasal ajanlar etkilerini ya doğrudan DNA üzerine ya da dolaylı olarak genomik bilgiye göre sentezlenen proteinlere bağlanarak göstermektedirler. Meydana gelen bu hasarlar kanser, yaşlanma, doğum defektleri ve infertilite gibi birçok hastalığa yol açmaktadır (Volders *et al.* 2003; Mateuca *et al.* 2006; Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011).

Son yıllarda insan popülasyonlarının genetik bütünlüğü, kimyasal ve fiziksel ajanlara maruz kalmayla sonuçlanan endüstriyel etkinliklerden dolayı giderek artan bir tehdit altındadır (Karabıyık 2007). Bu nedenle, çevremizde bulunan ve biyolojik etkileri henüz bilinmeyen pek çok sentetik ve doğal maddenin mutajenik veya kanserojenik potansiyel açısından test edilmesi sağlık açısından gerekmektedir. Ancak laboratuvar hayvanları ile yapılan deneyler hem çok pahalı hem de çok zaman almaktadır. Bu nedenle *in vivo* hayvan deneyleri yerine kimyasal maddelerin kanserojenik ve mutajenik potansiyellerini ölçebilmek için son yıllarda birçok *in vitro* test sistemleri geliştirilmiştir. Kısa zaman içinde sonuçlanan bu testlerle, kimyasal maddelerin belirli genetik özelliklerde oluşturduğu sonuçlar ölçülmekte ve elde edilen sonuçlarla maddelerin mutajenik veya kanserojenik potansiyelleri arasında ilişkiler kurulmaktadır (Boyacıoğlu 2004; Karabıyık 2007; Türkez 2007; Toğar 2010; Aydın 2011; Demir 2013).

Genetik toksisite testleri fiziksel ve kimyasal ajanların mutajenite potansiyellerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Genetik toksikoloji alanında kullanılan başlıca testler, kromozom düzeyinde mikroçekirdek (MÇ) kromozom aberasyonu (KA) ve kardeş kromatit değişimi (KKD), gen düzeyinde Ames ve moleküler düzeyde

tekhücre jel elektroforezi (SCGE veya Comet) testleridir (Türkez 2007).

Comet testi hücreseel seviyede DNA sarmal kırıklarının tespiti için kullanılan oldukça hızlı, ucuz ve duyarlı bir testtir. Bu testle az sayıda hücre (<10.000) kullanılarak çok düşük seviyelerdeki DNA hasarları bile tespit edilebilmektedir (Tice *et al.* 2000; Miyamae *et al.* 2000; Lee and Steinert 2003). Bu yöntem sırasında DNA kırık içeriyorsa, gevşemiş ve kırılmış DNA fragmanları nedeni ile elektrik yük kazanmış olan DNA, çekirdekten anoda doğru göç ederek kuyruklu yıldız görünümüne sebep olur ve oluşan hasarlı hücre comet olarak adlandırılır (Dikilitaş ve Koçyiğit 2010). Bu yöntemle hem tek zincir hem de çift zincir kırıkları belirlenebilir ve aynı zamanda oksidatif stresin sebep olduğu hasarları ve besin bileşiklerinin koruyucu etkilerini araştırmak içinde kullanılmaktadır (McArt *et al.* 2009; Türkez *et al.* 2012).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Pratsinis and Haroutounian (2002) 3-vinilgaluzen (GYZ türevi) seskiterpeninin DPPH analiz sonuçlarına göre antioksidan kapasiteyi arttırdığını rapor etmişlerdir.

Ma *et al.* (2007) dihidroartemisin seskiterpeninin sıçan glioma C6 hücrelerin çoğalması ve apoptozu üzerine etkilerini MTT yöntemi kullanarak araştırdıkları çalışmada dihidroartemisinin doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiği ve bunun sebebinin ROM'ların artmasına bağlı olduğunu kanıtlamışlardır.

Suna *et al.* (2009) Endonezya deniz süngeri *Dysidea* türlerinden izole ettikleri disidamin ve bolinakuinon seskiterpenlerinin 10 mM'lık konsantrasyonlarının fare HT22 hipokampal nöronal hücrelerinde indoasetikasit (IAA) bağımlı hücre ölümüne karşı nöroprotektif olduklarını rapor etmişlerdir.

Buskuhl *et al.* (2010) *Vernonia scorpioides* bitkisinden izole ettikleri seskiterpen laktonların *in vitro* tümör hücrelerinde genotoksik etkilerini comet analizi kullanarak araştırdıkları çalışmada hirsutinolid ve glaukolid seskiterpen laktonlarının Hela hücrelerinde genotoksik olduğunu ve bu sonuçların *in vivo* deneylerle desteklenmesi gerektiğini belirtmişlerdir.

Zerumbon *Zingiber zerumbet* Smith. bitkisinden elde edilen bir seskiterpendir. Al-Zubairi *et al.* (2010) insan lenfosit kültürlerinde zerumbonun genotoksik etkilerini KA ve MÇ testleri kullanarak araştırdıkları çalışmada zerumbonun sitotoksik olduğunu fakat klastojenik olmadığını rapor etmişlerdir.

Michaelis *et al.* (2010) kemoterapi dirençli nöroblastom hücre hattında artesunat ve dihidroartemisin bileşiklerinin anti kanser aktivitesini araştırmışlar. Sonuç olarak artesunatın dihidroartemisine göre hücre canlılığını daha fazla inhibe ettiğini ve antikanser etki gösterdiğini bulmuşlardır.

Li *et al.* (2011) alkalın comet analiz ve nötral comet analiz yöntemlerini kullanarak akciğer kanser hücrelerinde (A549) β -elemenin ve radyasyon maruziyetinin DNA zincir kırıkları oluşumu ve DNA hasar onarım inhibisyonunu araştırdıkları çalışmada β -elemenin radyasyonun sebep olduğu hasar oluşumunu arttırdığını rapor etmişlerdir.

Su *et al.* (2011) bitki türevli seskiterpen lakton 6-O-angelolenolinin insan nazofarenjiyal kanser hücre hattında antikanser aktivitesini araştırmış. Yapılan çalışmada 6-O-angelolenolinin kanser hücrelerini S ve G2/M fazında durdurduktan sonra apoptoza sebep olduğunu ortaya koymuşlardır.

Mesane kanseri kemoteropatik maddelere karşı oldukça dirençli bir kanser türüdür. Mollazadeh *et al.* (2011) seskiterpen kumarin faselolün kanser hücre hattında sisplastinin sitotoksitesi üzerine etkilerini araştırmışlar. MTT ve comet analizleri sonucunda faselolün tek başına sitotoksik olmadığı fakat sisplastinle birlikte (32 μ g/ml faselol+1 μ g/ml sisplastin) sitotoksiteyi arttırdığını ve DNA hasarına sebep olduğunu rapor etmişlerdir.

Nerolidol tat ve aroma artırıcı olarak kullanılan bir seskiterpendir. Piculo *et al.* (2011) fare kan kültürü ve karaciğer hücrelerinde nerolidolün genotoksik etkilerini araştırdıkları çalışmada nerolidolün doza bağlı zayıf sitotoksik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Artesunat artemisin türevi semisentetik bir bileşiktir. Antimalaryal olarak kullanılmaktadır. Mota *et al.* (2011) artesunatın insan lenfosit kültürlerinde genotoksik etkilerini MÇ testi ve Comet analizi kullanarak araştırmış. Yapılan deneyler sonucunda artesunatın insan lenfosit kültürlerinde genotoksik ve sitotoksik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Costa *et al.* (2011) bisiklogermakren (%20,3), (E)-karyofilen (%19,9), delta-kadinen (%15,3), alfa-kopaen (%10,0) ve allo-aromadendren (%5,7) içeren *Annona salzmannii* uçucu yağının ve bisiklogermakren (%45,4), (E)-karyofilen (%14,6) ve alfa-kopaen

(%10,6) içeren *Annona pickelii* uçucu yağının antioksidan kapasiteyi arttırdığını oksijen radikal absorbans kapasite (ORAK) analizi ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) analizi ile ortaya koymuşlardır.

Rocha *et al.* (2011) etanolla indüklenmiş gastrik lezyonlarda (-)- α -bisabololün ortaya çıkan oksidatif stresi azalttığını kaydetmişlerdir.

Wu *et al.* (2011) H₂O₂ bağımlı endotelyal hücre yaralanmalarında β -elemenin H₂O₂'in yarattığı zararlı etkilere karşı protektif etki gösterdiğini kanıtlamışlardır.

Glioblastoma en yaygın ve en agresif malign tümördür ve tedavisi oldukça zordur. Nakabayashi and Shimizu (2012) partenolid seskiterpeninin glioblastoma hücrelerinde anti-invaziv, anti-anjiyogenik ve sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. Yapmış oldukları bu çalışmada partenolidin glioblastoma hücrelerinde gen ve protein ekspresyonunu baskıladığını ve inhibisyona sebep olduğunu kaydetmişlerdir.

Moghadam *et al.* (2012) *Inula aucheriana* bitkisinden izole ettikleri seskiterpen lakton britanninin hepatoma (HepG2), insan meme adenokarsinoma (MCF-7), Madin Darby Sığır Böbrek (MDBK) hücre hattı ve insan akciğer adenokarsinoma (A549) hücre hatlarında bitki ekstraktına göre daha fazla sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

β -elemen geleneksel Çin tıbbında antikanser ajan olarak kullanılmaktadır. Hipernefroma ise kemoteropatlara ve radyasyon terapisine oldukça dirençli bir kanser türüdür. Zhan *et al.* (2012) belli konsantrasyonlarda β -elemeni hipernefroma kanser hücrelerine uygulamış ve sitotoksik etkilerini MTT yöntemi kullanarak araştırmışlardır. Yapılan çalışma sonunda β -elemenin doza ve zamana bağlı olarak hücrelerde apoptoza sebep olduğunu rapor etmişlerdir.

Khay *et al.* (2012) *Vernonia cinerea* bitkisinden izole ettikleri seskiterpen lakton 8alfa-tigloyloks-hirsutinolid-13-O-asetat bileşiğinin insan kolon (HT29) ve HepG2 kanser

hücre hatlarında sitotoksik etki yaptığını kaydetmişlerdir.

Gowda *et al.* (2012) beta-karyofilen, karyofilen oksit, alfa-humulen ve humulen oksit seskiterpenleri bakımından zengin *Didymocarpus tomentosa* bitkisinin izole edilen esansiyal yağın sitotoksik etkilerini Hela hücrelerinde MTT yöntemi ile değerlendirmiş. Çalışmanın sonunda seskiterpenler bakımından zengin esansiyal yağın sitotoksik aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Zerumbon *Zingiber zerumbet* bitkisinden elde edilen bir seskiterpendir. Yapılan çalışmalarda anti-tümoral ve antiinflamatuvar etkilerinin olduğu kaydedilmiştir. Weng *et al.* (2012) insan glioblastoma multiform hücrelerinde zerumbonun apoptotik etki mekanizmasını araştırmış, bileşiğin glioblastoma multiform hücrelerinde doza bağlı olarak hücre ölümüne sebep olduğunu kanıtlamışlardır.

Retinoblastoma genellikle gençlerde görülen kötü huylu bir tümördür. Hsiao *et al.* (2012) gossipolün insan retinoblastoma hücreleri üzerinde antiproliferatif etkilerini araştırdıkları çalışmada gossipolün 5, 10 ve 20 µM konsantrasyonlarının kanser hücrelerinin hayatta kalma oranını önemli derecede düşürdüğünü rapor etmişlerdir.

Rosselli *et al.* (2012) *Tanacetum vulgare* çiçeklerinden izole ettikleri ödesman iskeletine sahip beş seskiterpenin *in vitro* insan akciğer epitel ve çin hamster akciğer fibroblast kanser hücre hatlarında yüksek doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir.

de Oliveira *et al.* (2012) metansülfonat ve hidrojen peroksite maruz kalmış V79 hücrelerinde bakkarinin genotoksik ve antigenotoksik etkilerini belirlemek için MÇ ve comet testleri kullanmışlar. Yapılan çalışmada bakkarinin mutajen ajanların yol açtığı genetik hasarı azalttığı ve antigenotoksik ajan olabileceğini ortaya koymuşlardır.

Fitakulosit bir norseskiterpendir. Gil da Costa *et al.* (2012) insan mononuklear kan hücrelerinde fitakulositin genotoksik etkilerini araştırmışlardır. Yapılan çalışmada

fitakulositin DNA hasarına sebep olduğunu, kromozomal aberasyonlara yol açtığını ve KKD frekansını arttırdığını bulmuşlardır. Ayrıca Gomes *et al.* (2012) fitakulositin 60 µg/ml konsantrasyonunun insan gastrik epitel hücrelerinde ve havyan modellerinde hücre canlılığını azalttığını ve apoptozu teşvik ettiğini kanıtlamışlardır.

Widdrol ardıç türlerinden elde edilen antikanser ve antifungal etkiler sergileyen doğal bir seskiterpendir. Kang *et al.* (2012) widdrolün HT-29 kolon kanseri hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak AMP-aktifleştirilmiş protein kinaz fosforilasyonunu tetikleyerek apoptoza sebep olduğunu ortaya koymuşlardır.

Nakashima *et al.* (2012) *Melicope denhamii* bitkisinden izole edilen zieran tip seskiterpenlerden melikodenones A-B(1-2), guanin tip seskiterpenlerden melikodenones C-E(3-5) ve zieron(6) seskiterpenlerinin DLD-1 insan kolon kanser hücre hattında sitotoksik aktivitelerini araştırmış ve melikodenones A'nın orta dercede sitotoksik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Somwong *et al.* (2013) *Ficus foveolata* bitkisinden sentezledikleri seskiterpen bileşiklerinden foveolid A'nın SW620, HepG2, BT474 ve KATO-III kanser hücre hatlarında, foveolid B'nin SW620 kanser hücre hattında sitotoksik aktivite gösterdiğini kanıtlamışlardır.

Zhang *et al.* (2013) *Alangium chinense* bitkisinden elde ettikleri 4 yeni seskiterpen bileşiğinin sitotoksik etkilerini beş tümör hücre hattında (A549, Be-17402, BGC-823, HCT-8 ve A2780) MTT yöntemi ile değerlendirilmiş. Çalışma sonucunda seskiterpen bileşiklerinden hiçbirinin kanser hücrelerinde sitotoksik etki göstermediğini rapor etmişlerdir.

Liu *et al.* (2013) germakron seskiterpeninin insan hepatoma kanser hücre hattında antiproliferatif etkilerini MTT yöntemi kullanarak değerlendirmiş. Yapılan çalışmada germakronun apoptoza yol açarak hepatoma hücrelerinin inhibisyonuna sebep olduğunu ve bu sebeple yeni bir kemopreventif ajan olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Alcântara *et al.* (2013) artemisin türevi artemetirin sitotoksik ve genotoksik etkilerini hem mide kanser hücre hattında hemde insan lenfosit kültürlerinde araştırmışlar. Yapılan MTT ve Comet analiz sonuçlarında artemetirin doz artışını bağı olarak her iki hücre hattında da sitotoksik etki gösterdiği ve DNA hasarına yol açtığı rapor edilmiştir. Sonuç olarak insan lenfosit hücrelerinin mide kanseri hücrelerine göre artemetirinin artemisine göre daha duyarlı olduğu belirtmişlerdir.

Wu *et al.* (2013) Antartika derin denizlerinde bulunan funguslardan izole ettikleri klorotrineremofilan seskiterpeninin HL-60 ve A549 kanser hücrelerinde orta derecede sitotoksik aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Hirsutanol-A birçok kanser hücre hattında sitotoksik etki gösteren bir seskiterpendir. Yang *et al.* (2013) Hirsutanol-A'nın antitümör aktivitesi ve moleküler mekanizmasını araştırmışlar. Mevcut çalışmada hirsutanol-A'nın mitokondriyal-bağımsız reaktif oksijen türlerini arttırarak, mitokondriyal zar potansiyelini değiştirerek ve sitokrom c salınımına sebep olarak kanser hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Cedrelopsis grevei yaprak uçucuğu yağı Madagaskar'da halk tıbbında yaygın olarak kullanılan aromatik ve tıbbi amaçlı bir bileşiktir. Afoulous *et al.* (2013) bu uçucu yağdan çoğunuluğu (E)- β -farnesen (%27,61), δ -kadinen (%14,48), α -kopaen (%7,65) ve β -elemen (%6,96) bileşiklerini içeren 64 bileşik tanımlamıştır. Test edilen bileşiklerden sadece (E)- β -farnesenin antikanser aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

- Fetal calf serum (PAN Biotech[®], Germany)
- Penicillin -Streptomycin (PAN Biotech[®])
- Dubbelco modified eagles medium (Sigma-Aldrich[®], Steinheim, Germany)
- Hank's Blanced salt solution (Sigma-Aldrich[®])
- Siklosativen, Farnesen, Gayazulen, Kopaen (Sigma-Aldrich[®])
- Zingiberen (My Guide Chem, China)
- Total antioxidant status, Total oxidant status kits (Rel Assay Diagnostics[®] Turkey)
- BME, Basal Medium (Eagle) (1X), liquid (GIBCO[®], Grand Island, NY, USA)
- B27 (GIBCO[®], Grand Island, NY, USA)

3.1.2. Kullanılan laboratuvar gereçleri ve cihazlar

- Karbondioksitli doku kültür etüvü (Napco 6500-Su yelekli, Amityville, USA)
- Etüv (Heraeus FB 420, Memmert, Germany, Nüve NF 200, Turkey)
- İnvvert mikroskop (Euromex-Holland)
- Spektrofotometre (Beckman DU 500, USA)
- Elektronik hassas terazi (Precisa XB 320 M, Ohaus, Ep 213, USA)
- ELISA okuyucu (Bio-Tek, PW XS, USA)
- Santrifüj cihazı (Model HN-S, USA, Nüve NF 200, Turkey)
- Su banyosu (Nüve NB 5, Turkey)
- Otomatik pipet (Finpipette Labsystems, Finland)
- ELISA okuyucu (Bio-Tek, PW XS, USA)
- Buzdolabı (Arçelik ve Bosch)
- Derin dondurucu (Sanyo Ultra Low, Japan)
- Distile su cihazı (Easypure RF compact ultarpure ws, USA)

- 48 kuyucuklu plate (Costar, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Germany)
- 5 cc steril enjektör (Hayat tıbbi aletler, Turkey)
- 12 ml hücre kültür tüpü (Grenier Bio-one, Germany)
- Laminer flow bench (Turkey)
- Pipet Ucu 0,1-10ul, Pipet Ucu 5-100ul, Pipet Ucu 5-200 ul, Mikropipet 0,1-10ul Mikropipet 10-100ul (Eppendorf, Hamburg, Germany)

3.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

Fosfat tamponlu salin'in (PBS) hazırlanışı

8,0 gr NaCl, 0,2 gr KCl, 0,2 gr KH_2PO_4 ve 2,32 gr Na_2HPO_4 alındı ve 1 litre distile suda çözüldü. Çözelti oda ısısında muhafaza edildi.

Agaroz çözeltilerinin hazırlanışı

%1'lik LMA: 0,5 g agar 50 ml PBS'de çözüldü.

%0,5'lik LMA: 0,25 g agar 50 ml PBS'de çözüldü.

%1'lik NMA: 0,5 g agar 50 ml distile su (Milli Q water)da çözüldü.

Lizis solüsyonunun hazırlanışı

700 ml saf suya 146,1 g NaCl, 37,2 g EDTA ve 1,2 g Tris eklendi ve iyice karıştırıldı. Daha sonra bu karışıma 8 g NaOH eklendi ve yaklaşık 20 dk karıştırıldı (pH: 10' a ayarlandı). Hacmi saf suyla 890 ml'ye tamamlandı (oda sıcaklığında). Kullanımdan önce son olarak: 10ml Triton X-100 (%1) ve 100 ml DMSO (%10) eklendi. Uygulamadan hemen önce en az 30 dk buzdolabında bekletildi.

Elektroforez tampon çözeltisinin hazırlanışı

Stok çözeltiler: 200g NaOH (10N NaOH) 500 ml saf suda çözüldü. 14,89 g EDTA (200 mM EDTA) 200 ml (pH:10'a ayarlandı) saf suda çözüldü. Her bir elektroforez yürütmesi için 30 ml NaOH ve 5 ml EDTA pH>12 ayarlanmak koşuluyla hazırlandı ve hacim 1200 ml'ye tamamlandı.

Nötürleştirme tamponu hazırlanışı

48,5 g Tris 800 ml saf suda iyice çözüldü (pH: 7.5'a ayarlandı) ve son hacim 1000 ml'ye tamamlandı (oda sıcaklığında saklandı).

Boyama solüsyonu hazırlanışı

10 mg EtBr 50 ml saf suda çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı. Her 1X kullanım için hazırlanan bu stoktan 1 ml alındı 9 ml saf su eklendi ve hacim 10 ml ye tamamlandı.

Hank's Blanced salt solution (HBSS) hazırlanışı

CaCl	0,185 g/L
MgSO ₄	0,097 g/L
KCL	0,4 g/L
KP (Monobazik)	0,06 g/L
NaCl	8g/L

Yukarıda adı verilen kimyasal maddeler karşılarında belirtilen miktarların 1/10'u tartılarak bir cam behere kondu ve üzerine 100 ml distile su konarak çözüldü ve HBSS çözeltisi elde edildi.

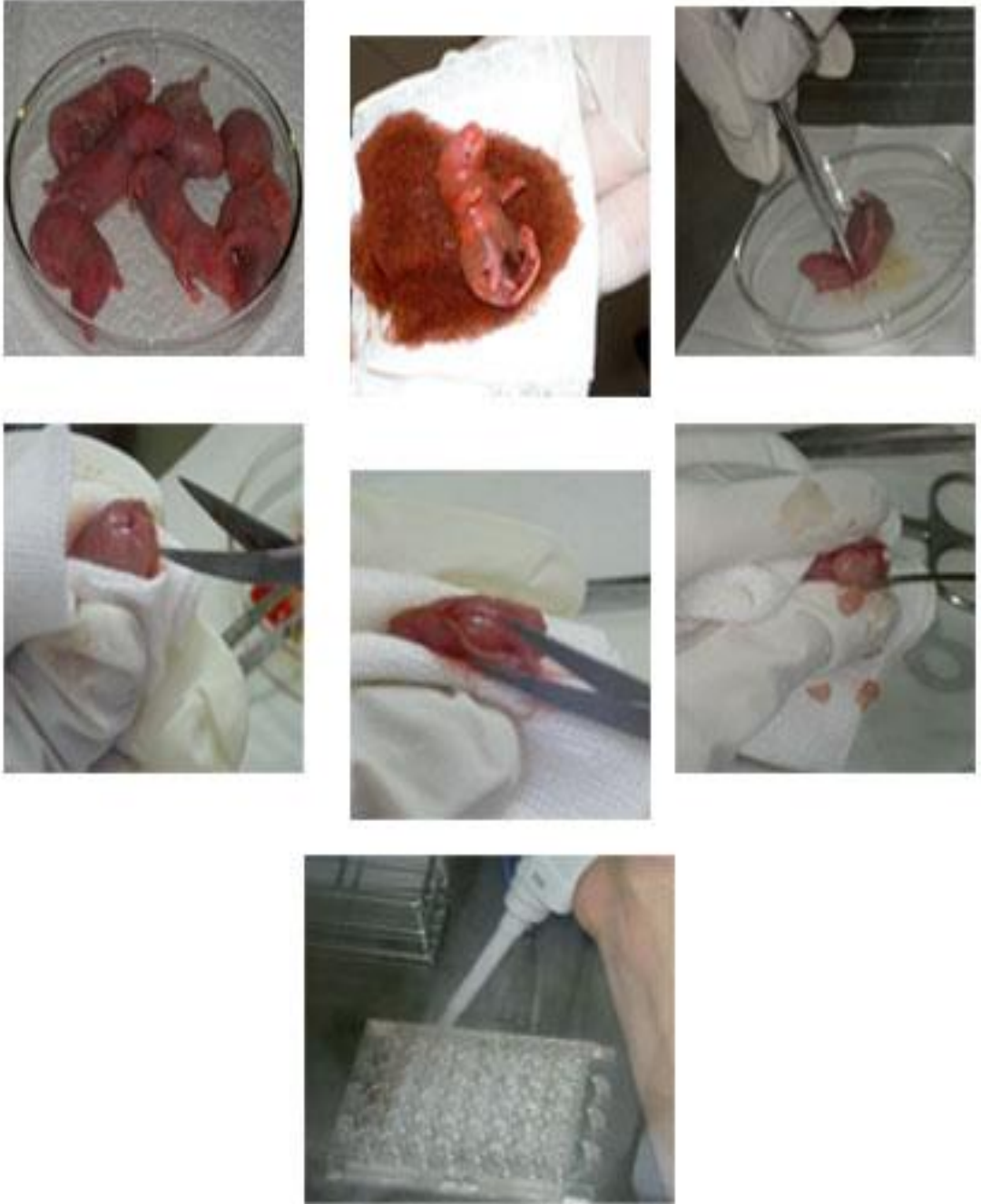
3.1.4. Deney hayvanları ve hücre kültürleri

Bu çalışmada Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen yeni doğan *Sprague Dawley* cinsi deney hayvanları kullanıldı. Hayvanlar etik kurallara uygun olarak dekapite edildi ve nöronlar hücre kültürü ortamında yaşatıldı. Ayrıca N2a nöroblastom hücre hattı Türkiye Şap Enstitüsü'nden temin edildi.

3.1.5. Nöron kültürü hazırlama

9 adet yeni doğmuş (24 saatini doldurmamış) yavru bireyler alındı (1). Batikonla yıkandı. Daha sonra steril ortamda dekapite edildi. Baş kısmında önce derisi ve kafatası kaldırıldı. İnce beyin zarı da ayrıldıktan sonra korteks kısmı dikkatlice beyinden çıkarıldı. Korteks kısımları içinde HBSS bulunan tüplere konuldu. Tüpler etüve bırakıldı. Daha sonra tüpler sterilizasyona dikkat edilerek etüvden alındı. Dibe çökmüş olan beyinlerin üzerindeki HBSS döküldü. Steril petri kabına alınan beyinler 20 numaralı bistüri ile makro parçalara ayrıldı. Parçalanan beyin parçalarının üzerine 1,5 ml HBSS ile 0,3 ml tripsin eklendi (1/4 oranında). Enjektörle çekilip 15 ml'lik tüpe konuldu. Tripsinin mikro parçalama yapabilmesi için 35 dk etüvde bekletildi. Tripsinin parçalama etkisini durdurmak amacıyla DNAaz I'in bulunduğu kabın içine, tripsin ile muamele edilen korteksler eklendi. DNAaz I'in bulunduğu kabın içine %10 oranında Fetal Calf Serum eklendi. DNAaz I'in parçalamayı durdurarak tripsini dokulardan ayırması için 10 dk beklendi. Bu sıvının üzerine 6 ml HBSS eklendi ve 800 rpm'de 19 dk santrifüj edildi. Dibe çöken beyinlerin üzerindeki HBSS döküldü ve üzerine 10 ml nöronal base medium (NBM) konuldu. Üzerine NBM supplementi olan B27, 1/50 oranında eklendi. Üzerine 1/1000 oranında penisilin eklendi. 48'lik flaskların her odasına 180 µl kondu ve 37°C'de, %5 CO₂ içeren etüve bırakıldı. 1 hafta sonra odalara yapışmış hücrelerin bulunduğu her odaya hacimlerinin 1/2 oranında nörobasal medium +B27+ antibiotik'den oluşan ekim ortamı eklendi ve nöron hücrelerinin flask tabanını kaplayacak ve mikroskop altında dallanma gösterene kadar beklendi. Deneylerde seskiterpen bileşiklerinin sekiz farklı dozu (10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 ve 400 mg/L)

kullanıldı.

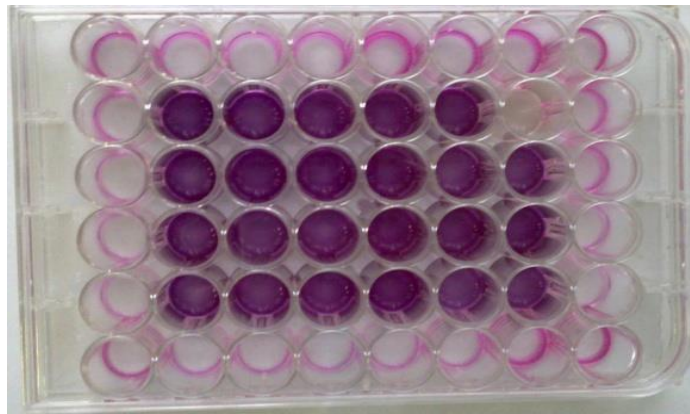


Şekil 3.1. Nöron kültürü hazırlama aşamaları

3.2. Yöntemler

3.2.1. MTT analizi

- Hücreler 48'lik plate'e bölme başına 100 μ L kültür mediumu içerisinde 10a (a=5) hücre bulunacak şekilde, muamele edilecek bileşikle birlikte ve muamele edilecek bileşikten yoksun olarak ekildi. Hücrelerin CO₂ etüvünde 37°C'de 24 saat süre ile kültürü yapıldı (Şekil 3.2.).
- Her bir bölmeye pipet aracılığı ile 10 μ L MTT karışımı eklendi.
- Dairesel karıştırıcıda 1 dakika hafifçe karıştırıldı. Hücreler CO₂ etüvünde 3-4 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda oluşan formazan bölmelerin dibinde koyu kristaller halinde görüldü.
- Kültür mediumu hücre tabakasını dağıtmadan dikkatli bir şekilde her bir bölmeden aspire edildi. Alternatif olarak dibe yapışmayan hücrelerin çökmesi için aspire edilmeden önce plate 400x g'de 10 dk satrifüjlendi.
- Her bir bölmeye 100 μ L Cystal Çözücü Solüsyon eklendi (Bu solüsyon formazan kristalleri çözecek ve portakal renğinde bir solüsyon oluşturacaktır).
- Her bir numunenin absorbansı 570 nm'de microplate okuyucu kullanılarak ölçüldü.



Şekil 3.2. MTT analiz prosedürü

3.2.2. Toplam antioksidan kapasite

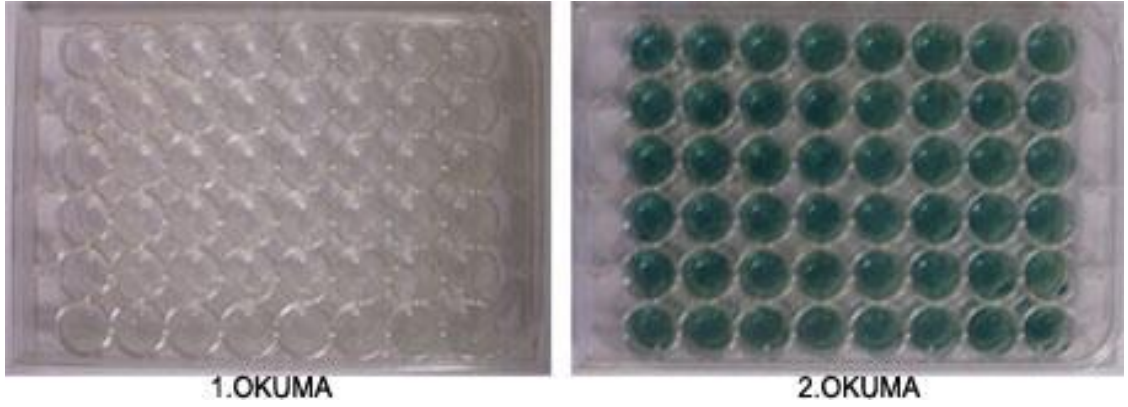
TAK düzeyi tespiti ilk olarak Tomasch *et al.* (2001) uygulanan bir yöntemdir. Bu yöntem 2-2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sülfonat = ABTS⁺) radikal katyonunun oluşumunu inhibe edecek antioksidan kapasitenin tespitini temel almaktadır. Tespit işleminde Rel Assay Diagnostics® firması tarafından üretilen TAS (Total Antioxidant Status) kitleri kullanıldı (Erel 2004).

Kit Bileşenleri

- Reaktif 1 Solüsyonu: 50 ml
- Reaktif 2 Solüsyonu: 10 ml
- Standart 1 Solüsyonu: 10 ml
- Standart 2 Solüsyonu: 10 ml

30 µl örnek içeren kuyucuklara 500 µl Reaktif 1 solüsyonundan eklenerek 660 nm'de ilk absorbans okundu (Şekil 3.3.). Daha sonra aynı kuyucuklara 75 µl Reaktif 2 eklenerek 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme sonunda 660 nm'de ikinci absorbans değeri okundu (Şekil 3.3.). Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formülde uygun şekilde yerlerine konularak mmol Trolox Equiv./L cinsinden TAK düzeyleri tespit edildi.

$$\text{TAK (mmol Trolox Equiv./L)} = [(\Delta\text{Standart 1'in değeri}) - (\Delta\text{Örneğin değeri})] / [(\Delta\text{Standart 1'in değeri}) - (\Delta\text{Standart 2'nin absorbansı})] \times 20$$



Şekil 3.3. TAK analiz prosedürü

3.2.3. Toplam oksidan durum

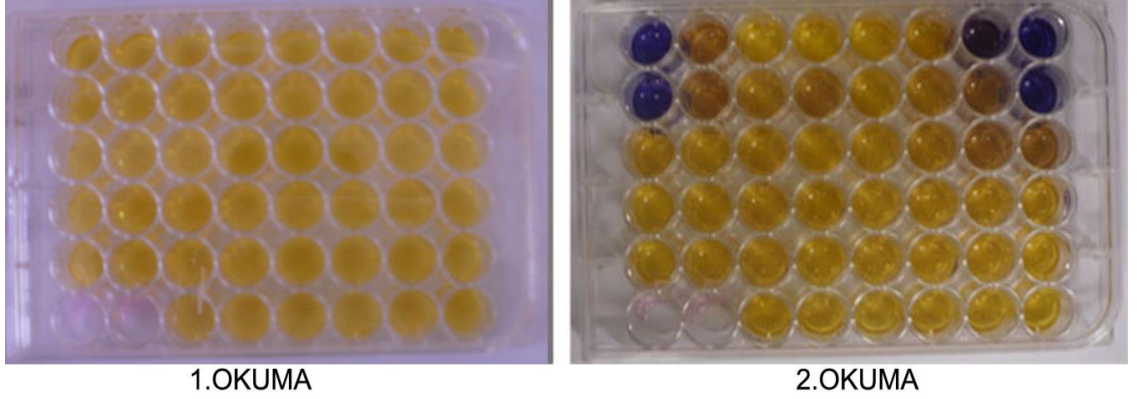
Toplam oksidan durum tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir. İncelenen numunede bulunan oksidanlar ferroz iyon-*o*-dianisidin yapısını ferrik iyonla oksitlerler. Bu reaksiyonu ortamda bulunan gliserol yaklaşık üç kez hızlandırmaktadır. Asidik ortamda ferrik iyonlar "xylenol orange" ile renkli bir kompleks meydana getirirler. Numunede bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülerek değerlendirme yapılır. Çalışmamızda Rel Assay Diagnostics® firması tarafından üretilen TOS (Total Oxidant Status) kitleri kullanıldı (Erel 2004; Erel 2005).

Kit Bileşenleri

- Reaktif 1 Solüsyonu: 50 ml
- Reaktif 2 Solüsyonu: 10 ml
- Standart 1 Solüsyonu: 10 ml
- Standart 2 Solüsyonu: 10 ml

75 µl plazma örneğinin bulunduğu kuyucuklara 500 µl Reaktif 1 solüsyonundan ilave edilerek 530 nm'de ilk absorbansı okundu (Şekil 3.4.). Daha sonra aynı kuyucuğa 25 µl Reaktif 2 solüsyonundan eklenerek oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. Bekleme sonunda 530 nm'de ikinci kez absorbansı okundu (Şekil 3.4.). Elde edilen absorbans değerleri ve

aşağıdaki formül kullanılarak mmol TOD düzeyleri Trolox Equiv./L cinsinden tespit edildi. $TOD (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}) = (\Delta\text{Örneğin değeri}/\Delta\text{Standart 2'nin değeri}) \times (\text{Standart 2 değeri})$



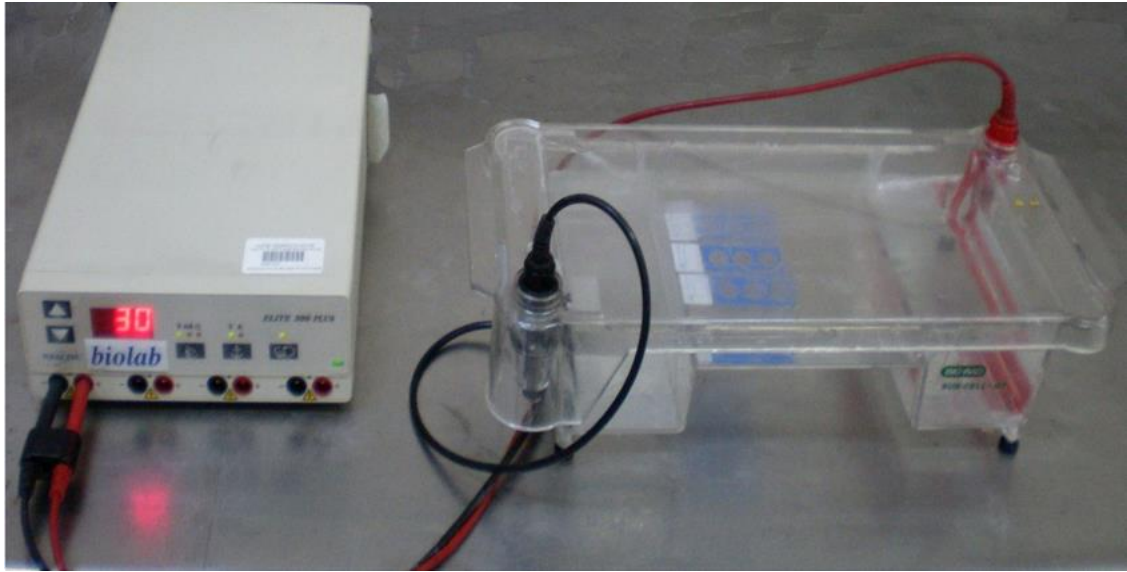
Şekil 3.4. TOD analiz prosedürü

3.2.4. Tek hücre jel elektroforezi

- Lamlar metanole batırıldıktan sonra mavi bir alev üzerinden geçirilerek steril edildi. Normal erime noktalı agaroz (NMA) sıcak olduğundan lam daldırılmadan önce buzlu suya daldırılıp sonra NMA'ya daldırıldı, hafifçe çıkarıldı ve kullanılmayan yüzeyi temizlendikten sonra kuruması için düz bir kaba kondu (Lamlar ihtiyaç duyulana kadar oda sıcaklığında saklandı ve yüksek nemden uzak tutulmasına dikkat edildi).
- Mikrodalgada eritilen düşük erime noktalı agaroz (LMA) (80 μ L) ile nöron kültür hücreleri (20 μ L) ependorf tüpünde karıştırılarak lamlar üzerine yayıldı. Lamelle kapatılan lamlar buz kabininin üzerinde 5-10 dk bekletildi.
- Lamların üzerindeki lameller kaldırılarak jel tabakasının üzerine üçüncü jel tabakası (75 μ L LMA) eklendi. Lamelle kapatılan lamlar buz kabininin üzerinde 5-10 dk bekletildi.
- Lamlar taze hazırlanmış lizis solüsyonunda (4°C'de) en az 2 saat bekletildikten sonra hafifçe çıkarıldı. Yatay jel kabının bir ucuna mümkün oldukça birbirine yakın olacak şekilde yerleştirildi.
- Tampon haznesi, lamların üzeri tamamıyla dolana kadar yeni hazırlanmış (pH>12)

elektroforez tamponu ile dolduruldu.

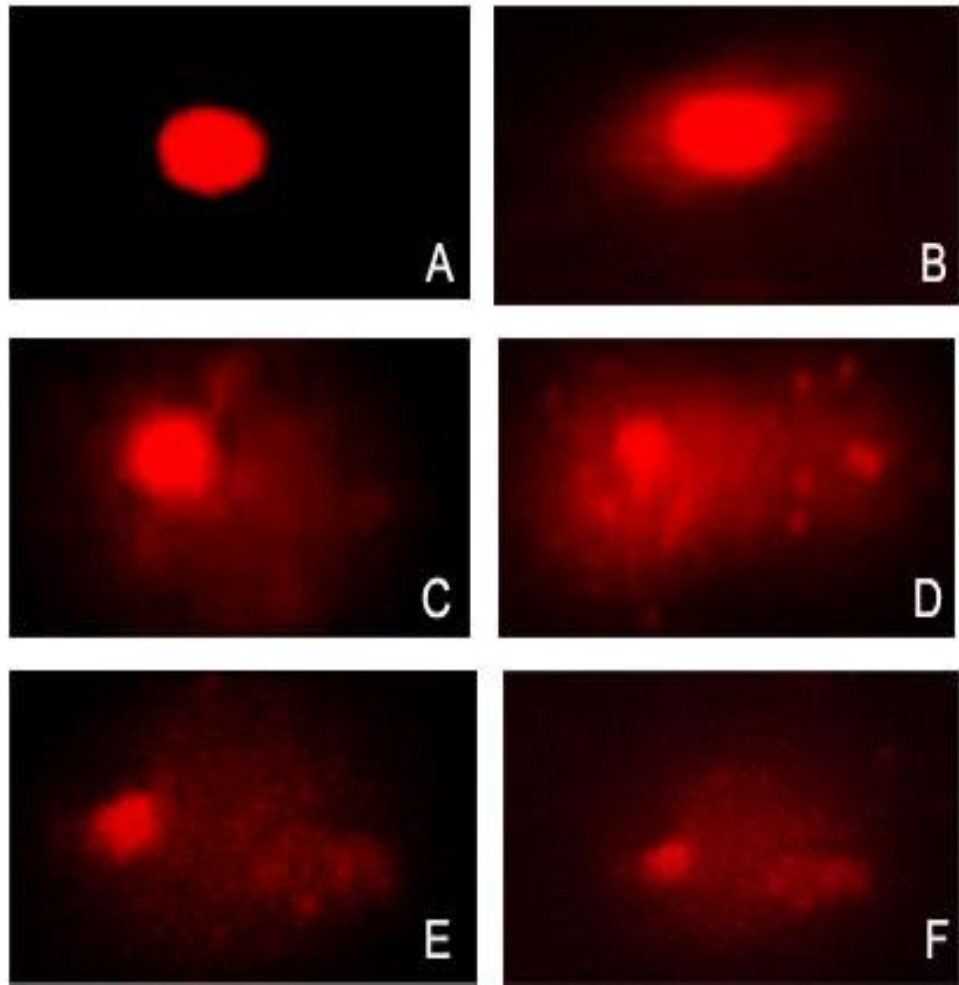
- Lamlar DNA'nın çözülmesi ve değişken alkali hasarın ifadesi için 20 dk (4°C'de) alkali tamponda bekletildi.
- Tampon seviyesini yükselterek veya düşürerek güç kaynağı 24 volt (yaklaşık 0.74 V/cm) ve 300 mA ayarlandı. Çalışmanın amacı ve kontrol numunelerinin göç aralığına bağlı olarak, lamlar elektroforezde 30 dk tutuldu (Şekil 3.5.).
- Güç kaynağı kapatıldı. Lamlar tampondan yavaşça çıkarılıp bir kaba yerleştirildi. Daha sonra uygun kapta lamlar nötürleştirme tamponunun damla damla muamele edilmesiyle kaplandı en az 10 dk bekletildi. Bu işlem en az 2 kez daha tekrar edildi.
- Lamlar 8 µl 1X EtBr ile boyandı, 5 dk bekletildikten sonra boyayı uzaklaştırmak için soğuk distile su ortamına batırıldı. Distile sudan çıkarılan lamların üzerine lamel kapatıldı ve hemen değerlendirildi.



Şekil 3.5. Elektroforez tampon solüsyonunda yürütme aşaması

DNA hasarı EtBr boyalı DNA'nın floresan mikroskopta 40X'lık objektifte incelenmesiyle gözlemlendi. DNA hasarlarının tespit edilmesinde Speit and Hartmann (1999) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Bu amaçla olanaklarımız bünyesinde bir Comet analiz programı bulunmadığından dolayı analizler görsel olarak fluoressan mikroskop altında gerçekleştirildi. Araştırma kapsamında, her kültür için 100 adet

nükleoid DNA incelenerek DNA hasarları Şekil 3.7.'deki analiz metodu kullanılarak hesaplandı. Comet oluşumları, gözlenen kuyruk uzunluklarına göre altı farklı gruba ayrılarak A'dan F'ye kadar değişen oranlarda puanlandırıldı A: hasarsız (0); B: çok az hasarlı (1), C: az hasarlı (2); D: Hasarlı (3); E: Çok hasarlı (4); F: maksimum hasarlı (5). Böylece, 100 comet için elde edilen toplam hasar puanı 0-500 arasında yer aldı. Ayrıca, tüm bu işlemler, çevre kaynaklı DNA hasarını önlemek amacıyla karanlık ortamda yapıldı.



Şekil 3.6. DNA hasar tespitinde kullanılan analiz metodu

*A: Hasarsız (0); B: Çok az hasarlı (1), C: Az hasarlı (2); D: Hasarlı (3); E: Çok hasarlı (4); F: Maksimum hasarlı (5))

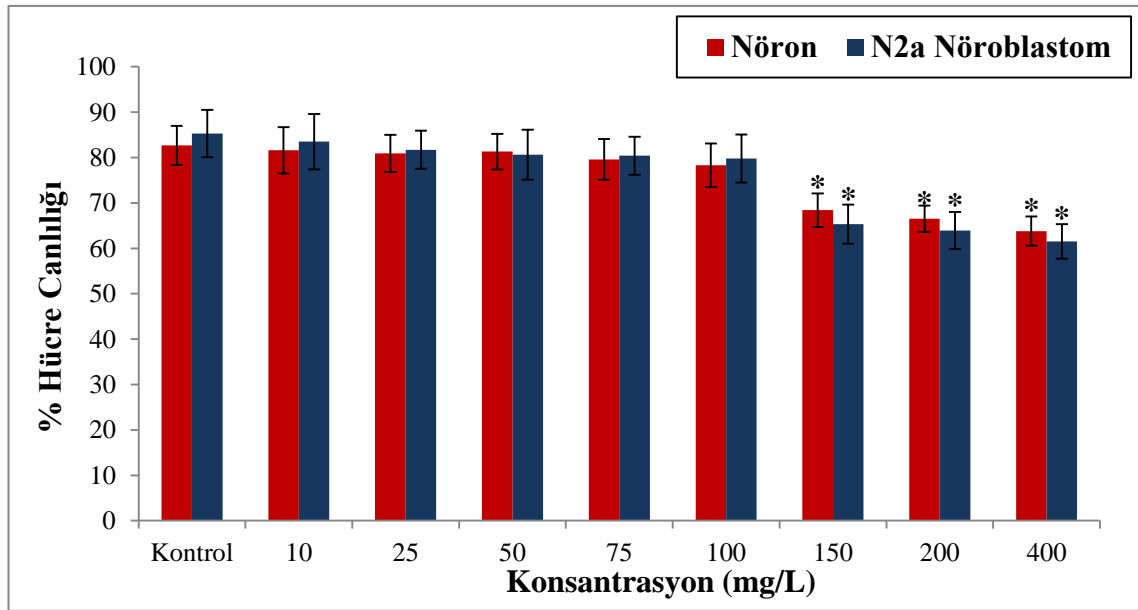
3.2.5. İstatiksel analizler

Araştırmalardan elde edilen sayısal verilerin istatiksel analizleri S.P.S.S. Version 15.0 ile gerçekleştirildi. İstatiksel değerlendirme için One Way Anova Testi'ni takiben Post Hoc LSD testi kullanıldı. İstatiksel nemlilik düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

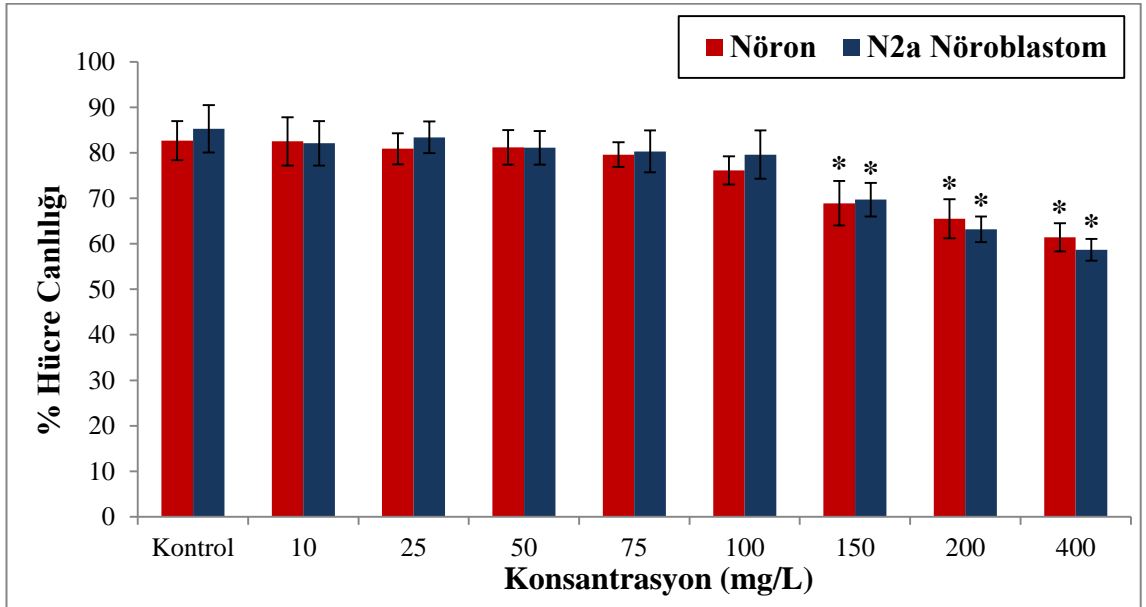
4.1. MTT Analiz Değerleri

In vitro koşullarda gerçekleştirdiğimiz MTT analiz sonuçları ile seskiterpenlerin farklı hücre hatlarında canlılık üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Sonuçlarımıza göre kontrol grubu değerleri sağlıklı nöron hücre kültürleri için $82,7 \pm 4,3$ ve N2a nöroblastom hücre kültürleri için de $85,3 \pm 5,2$ olarak belirlenmiştir. FNS, GYZ, SSV, KOP ve ZNG'nin yüksek dozları (150, 200 ve 400 mg/L) sağlıklı nöron hücre kültürlerinde canlı hücre sayısını kontrole kıyasla azaltırken ilgili bileşiklerin düşük dozları (10, 25, 50, 75, 100 mg/L) çoğalmayı baskılayıcı bir etki göstermemiştir. Ayrıca nöroblastom hücre kültürlerinde FNS ve GYZ'nin 150 mg/L, SSV ve KOP'un 100 mg/L, ZNG'nin ise 50 mg/L ve üzeri konsantrasyonları canlı hücre sayısında kontrole oranla önemli ölçüde azalmalara neden olmuştur. Seskiterpenlerin sağlıklı nöron ve N2a nöroblastom hücre kültürlerinde konsantrasyonlara bağlı olarak ortaya koyduğu MTT değerleri FNS, GYZ, KOP, SSV ve ZNG için sırasıyla Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5'de gösterilmiştir.

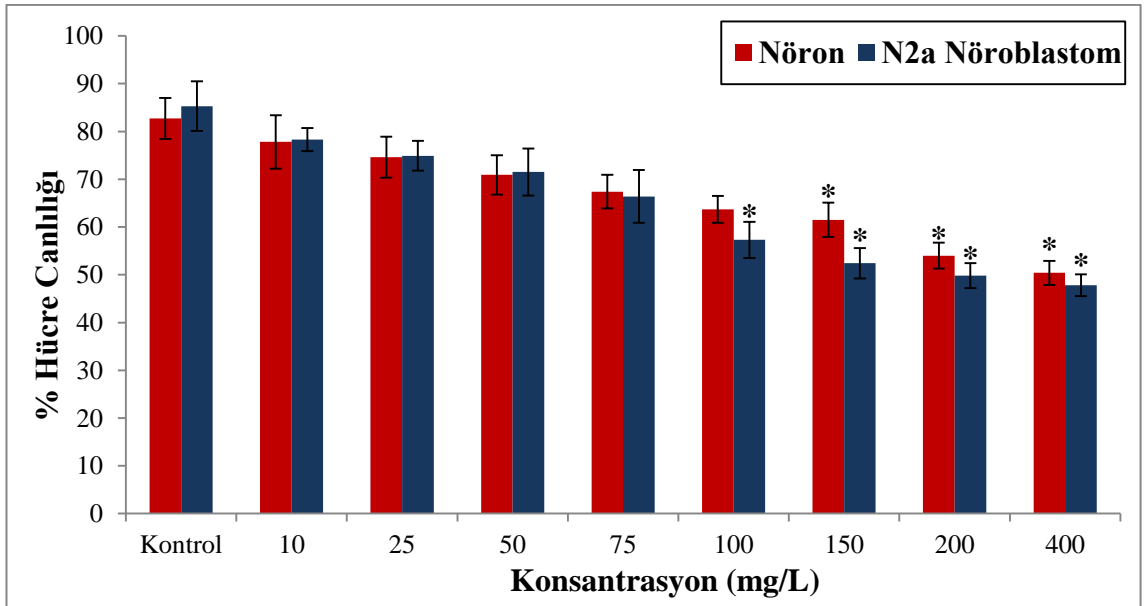


Şekil 4.1. FNS maruziyeti sonrasında gözlenen hücre canlılık yüzdeleri

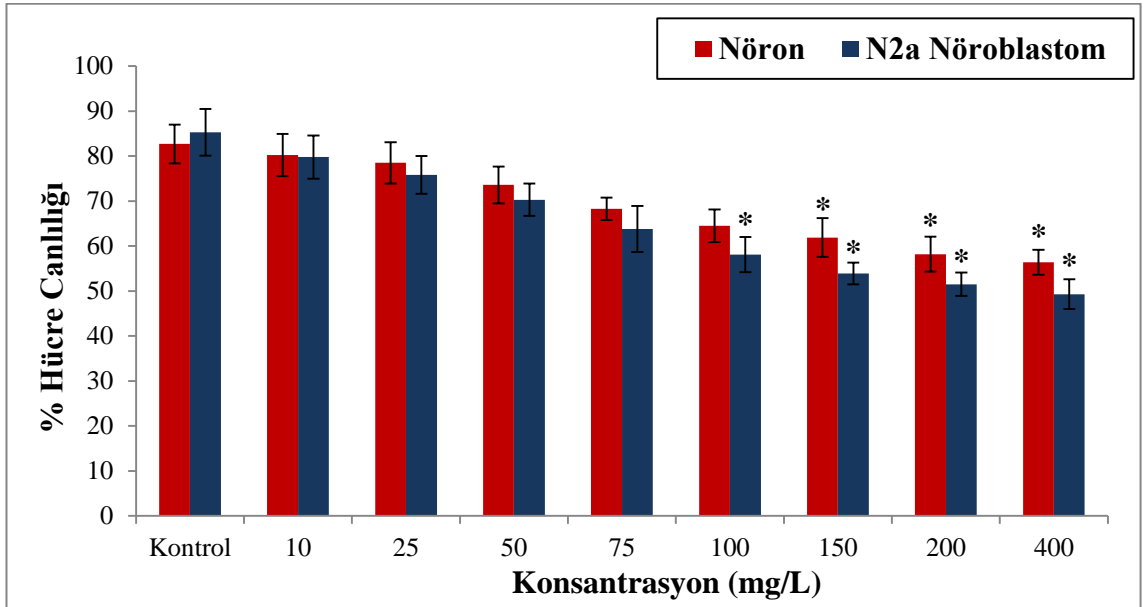
Değerler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur (< 0.05 , $n=6$).



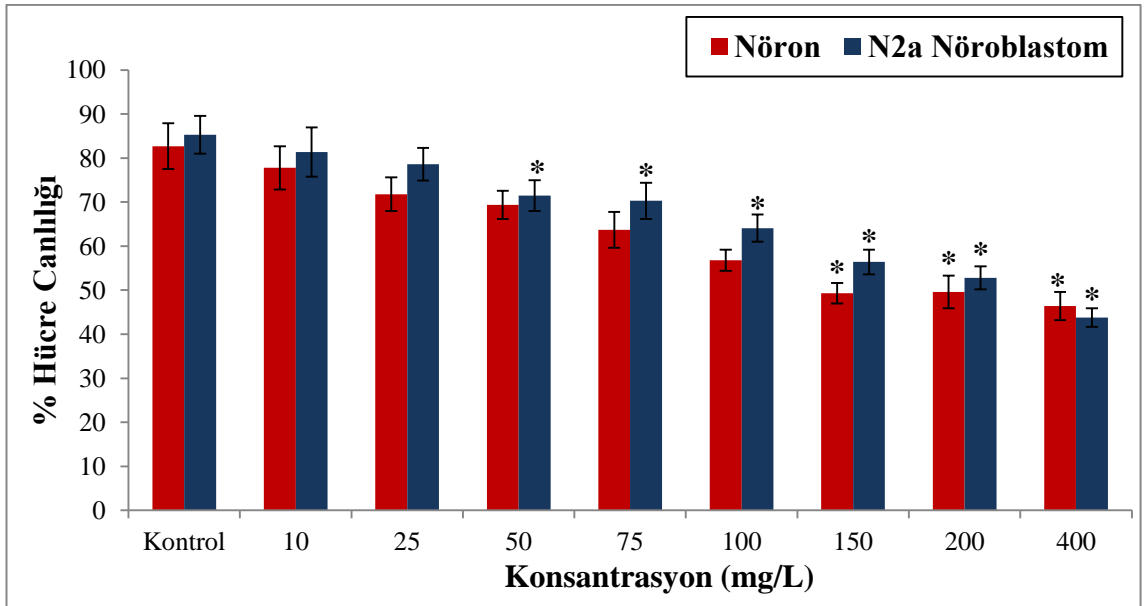
Şekil 4.2. GYZ maruziyeti sonrasında gözlenen hücre canlılık yüzdeleri



Şekil 4.3. KOP maruziyeti sonrasında gözlenen hücre canlılık yüzdeleri



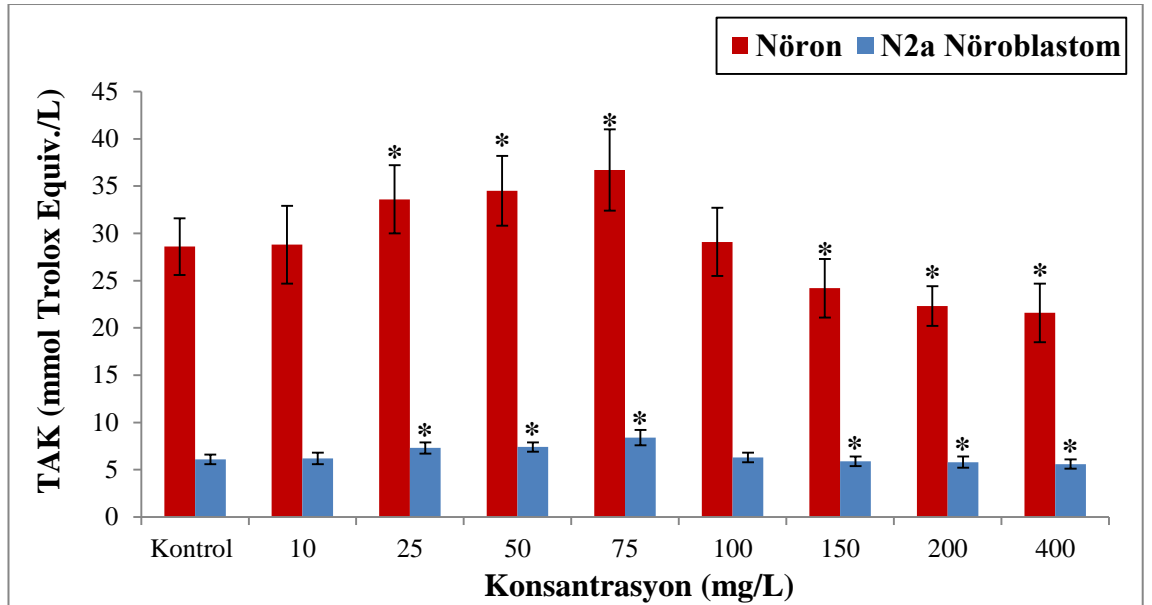
Şekil 4.4. SSV maruziyeti sonrasında gözlenen hücre canlılık yüzdeleri



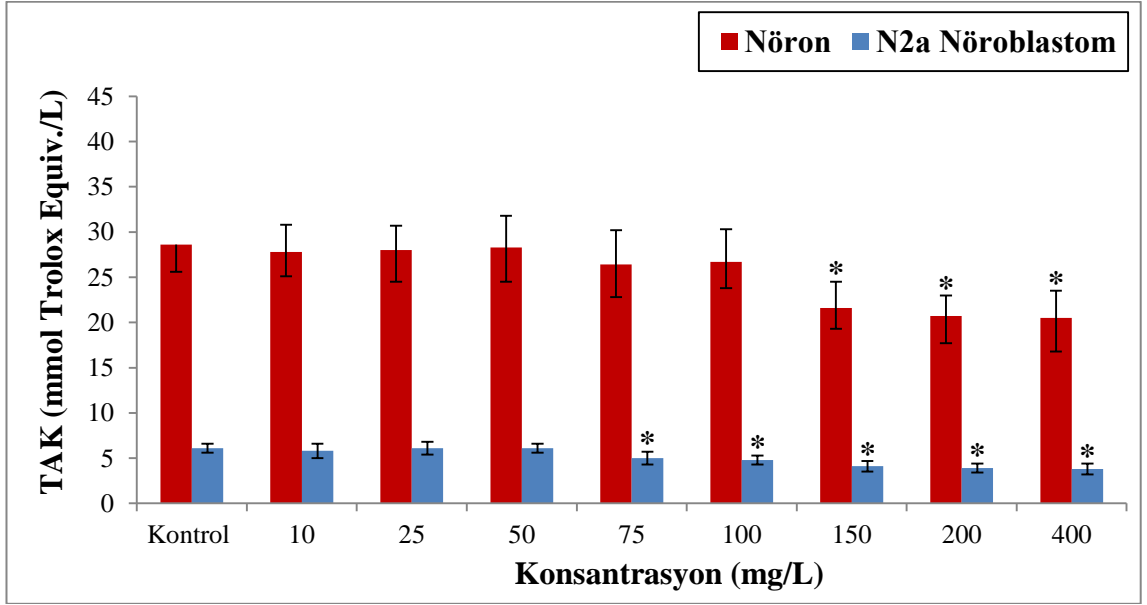
Şekil 4.5. ZNG maruziyeti sonrasında gözlenen hücre canlılık yüzdeleri

4.2. Toplam Antioksidan Kapasite Değerleri

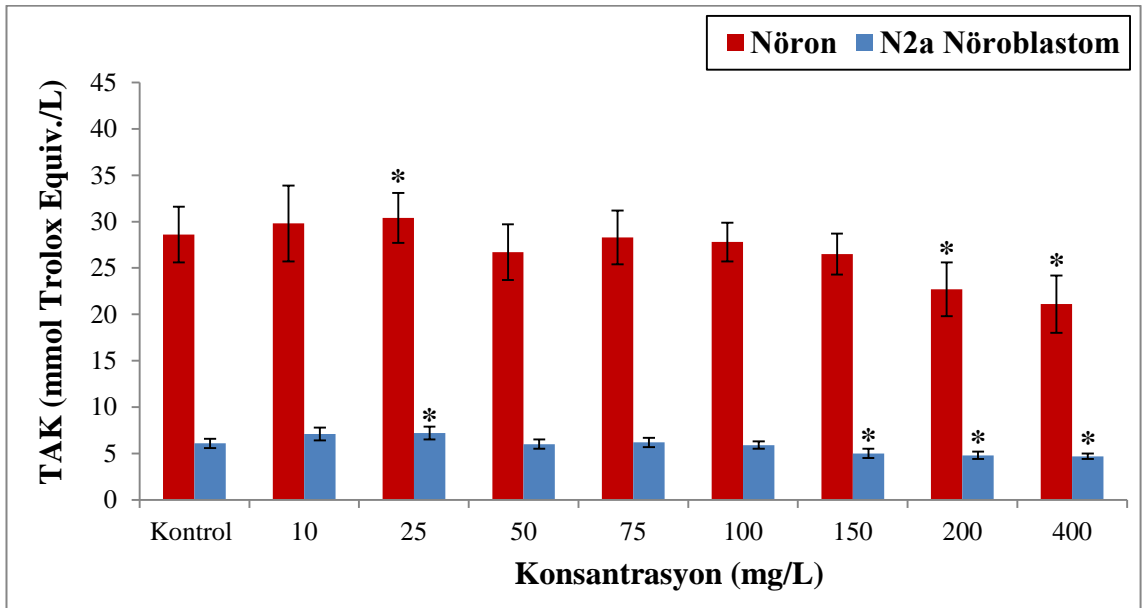
Kontrol grubu TAK değeri sağlıklı nöron hücre kültürleri için $28,6 \pm 3,0$, N2a nöroblastom hücre kültürleri için $6,1 \pm 0,5$ olarak saptanmıştır. Sonuçlarımız GYZ, KOP ve ZNG'nin kontrol grubuna kıyasla 10 mg/L konsantrasyonlarının TAK düzeyini değiştirmedigini ortaya koymuştur. Ayrıca FNS'nin 25, 50 ve 75 mg/L konsantrasyonları TAK düzeyini artırırken GYZ, KOP, SSV ve ZNG'nin sadece 25 mg/L konsantrasyonlarının TAK düzeyini arttırdığı tespit edilmiştir. Sağlıklı nöron hücre kültürlerinde FNS, KOP ve SSV'nin 200 ve 400 mg/L konsantrasyonları, ZNG ve GYZ'nin ise 150, 200 ve 400 mg/L konsantrasyonları, N2a nöroblastom hücre kültürlerinde FNS, KOP ve SSV'nin 150, 200 ve 400 mg/L konsantrasyonları, ZNG ve GYZ'nin ise 100, 150, 200 ve 400 mg/L konsantrasyonları TAK düzeylerini istatistiksel açıdan önemli derecede azaltmıştır. Seskiterpenlerin sağlıklı nöron ve N2a nöroblastom hücre kültürlerinde konsantrasyonlara bağlı olarak ortaya koyduğu toplam antioksidan durum değerleri değerleri FNS, GYZ, KOP, SSV ve ZNG için sırasıyla Şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10'da gösterilmiştir.



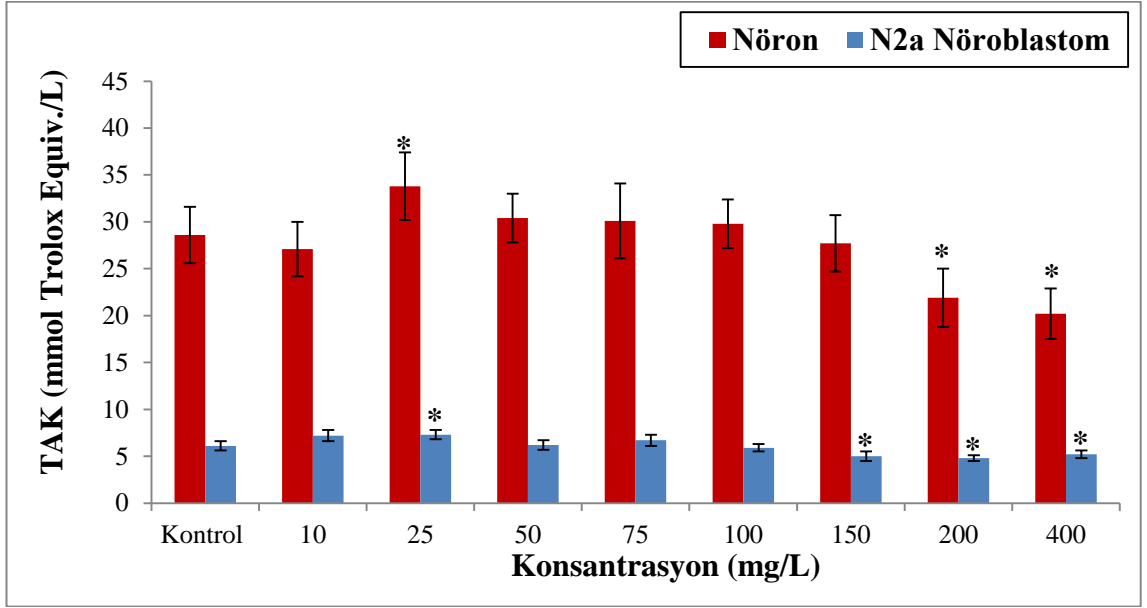
Şekil 4.6. *In vitro* koşullarda FNS'nin oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri
Değerler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur. ($<0,05, n=6$).



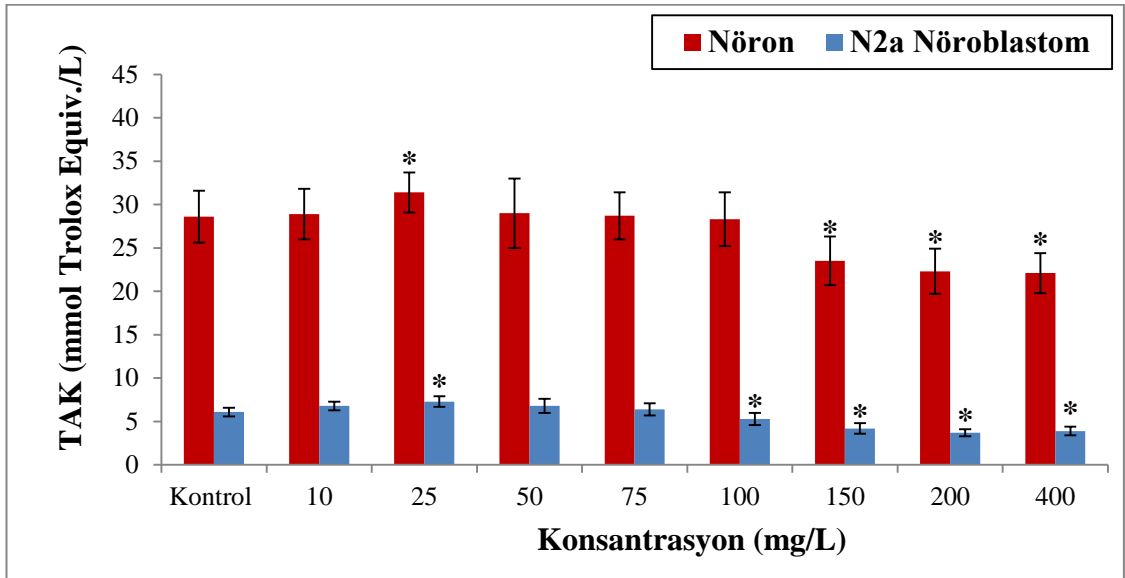
Şekil 4.7. *In vitro* koşullarda GYZ'nin oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri



Şekil 4.8. *In vitro* koşullarda KOP'un oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri



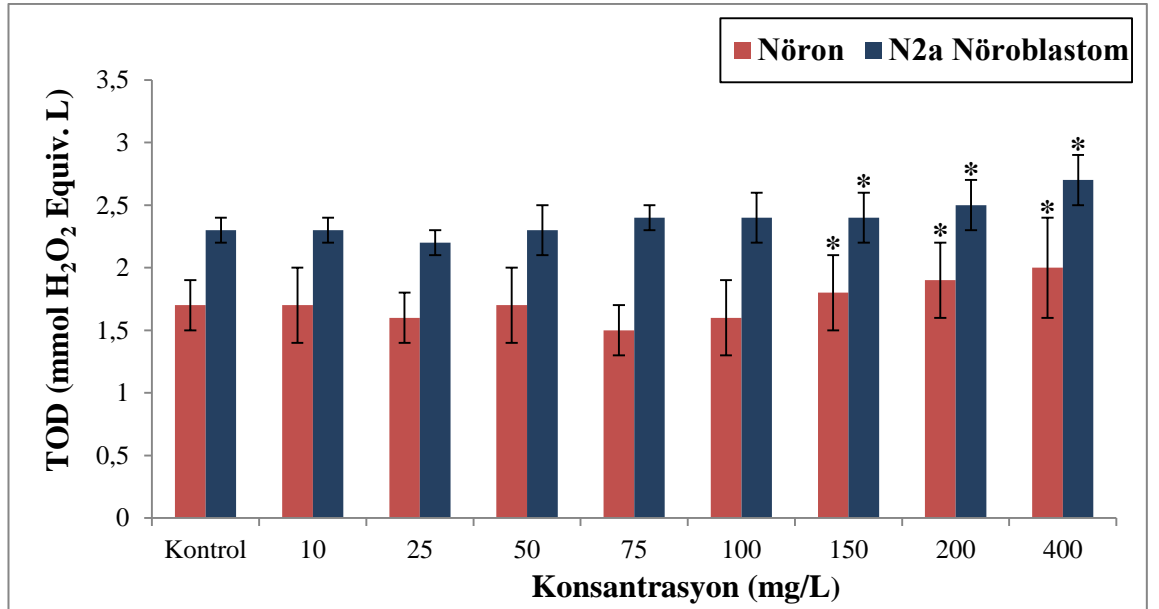
Şekil 4.9. *In vitro* koşullarda SSV'nin oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri



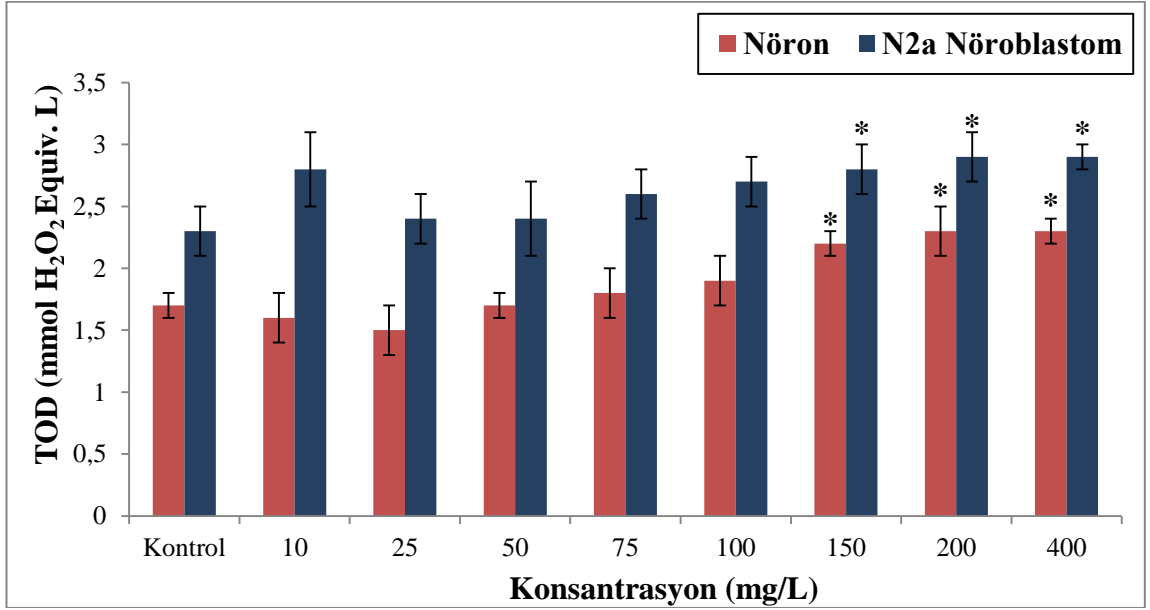
Şekil 4.10. *In vitro* koşullarda ZNG'nin oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri

4.3. Toplam Oksidan Durum Değerleri

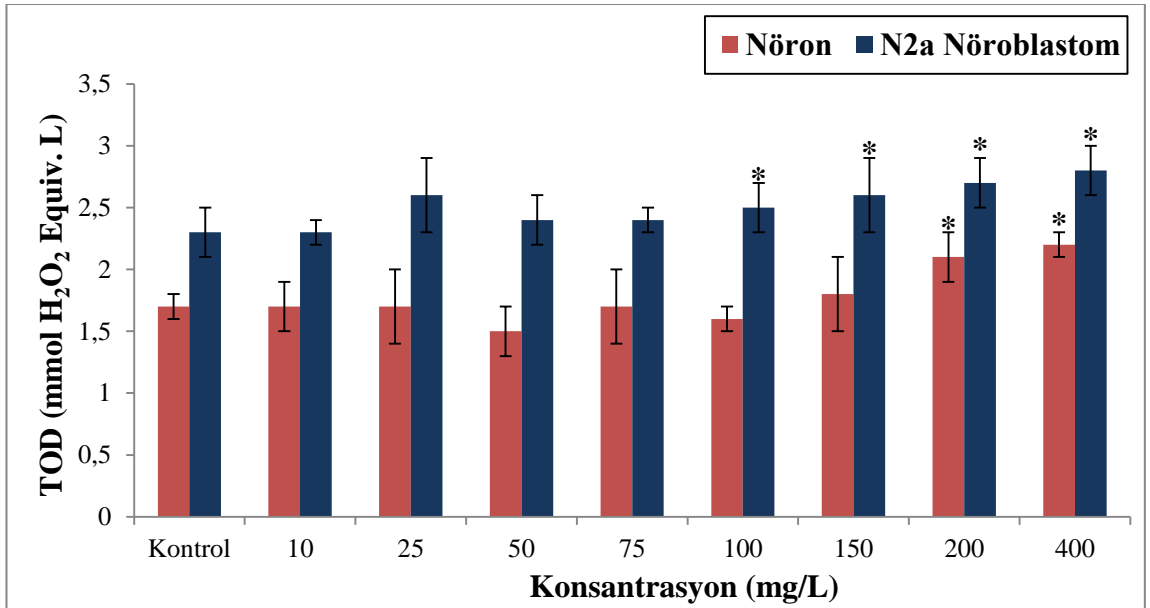
Kontrol grubu TOD değeri sağlıklı nöron hücre kültürleri için $1,7 \pm 0,1$, N2a nöroblastom hücre kültürleri için $2,3 \pm 0,2$ olarak saptanmıştır. Seskiterpen bileşiklerinin 10 mg/L ve 25 mg/L konsantrasyonları her iki kültür ortamında TOD düzeylerini değiştirmemiştir. Ancak sağlıklı nöron hücre kültürlerinde FNS, SSV, GYZ ve ZNG'nin yüksek dozları (150, 200 ve 400 mg/L) TOD düzeyini kontrole oranla önemli derecede arttırmıştır. Bununla birlikte N2a nöroblastom hücre kültürlerinde ise FNS ve GYZ'nin 150, 200, 400 mg/L konsantrasyonları, KOP ve SSV'nin 100, 150, 200 ve 400 mg/L, ZNG'nin 50, 75, 100, 150, 200 ve 400 mg/L konsantrasyonları TOD düzeylerini önemli derecede arttırmıştır. Seskiterpenlerin sağlıklı nöron ve N2a nöroblastom hücre kültürlerinde konsantrasyonlara bağlı olarak ortaya koyduğu toplam oksidan durum değerleri değerleri FNS, GYZ, KOP, SSV ve ZNG için sırasıyla Şekil Şekil 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15'de gösterilmiştir.



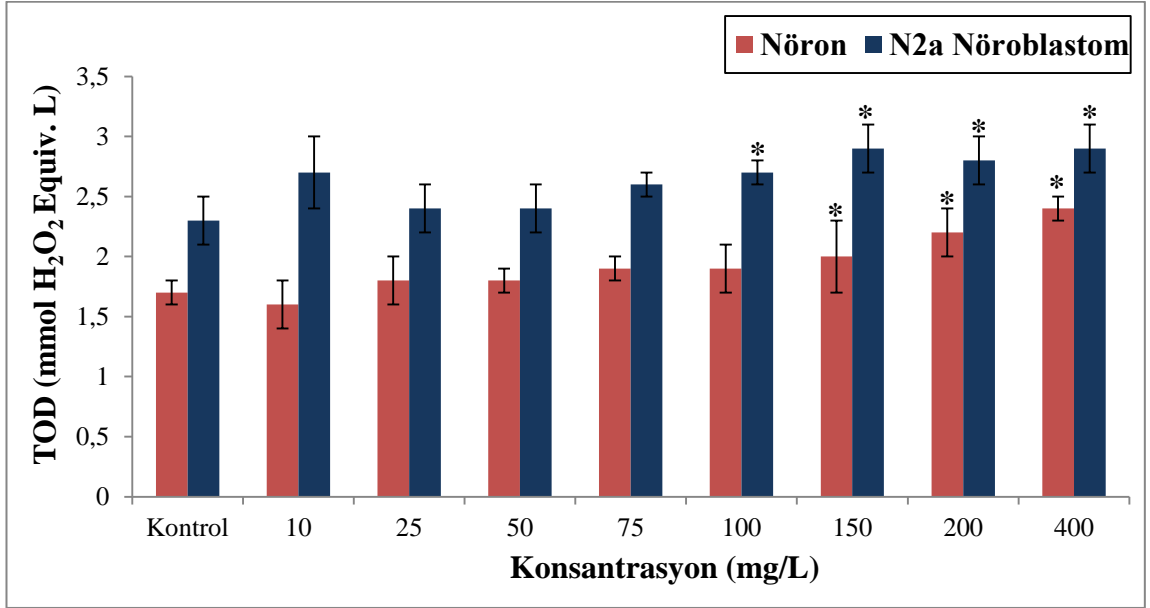
Şekil 4.11. *In vitro* koşullarda FNS'nin oluşturduğu toplam oksidan durum değerleri
Değerler ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur. ($<0,05$, $n=6$)



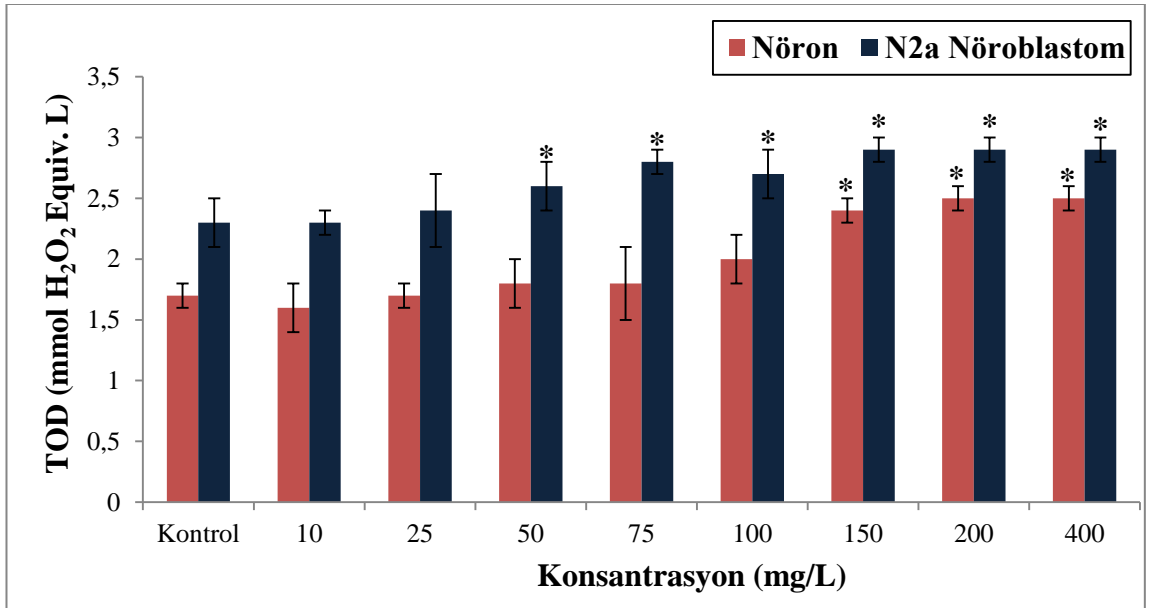
Şekil 4.12. *In vitro* koşullarda GYZ'nin oluşturduğu toplam oksidan durum değerleri



Şekil 4.13. *In vitro* koşullarda KOP'un oluşturduğu toplam oksidan durum değerleri



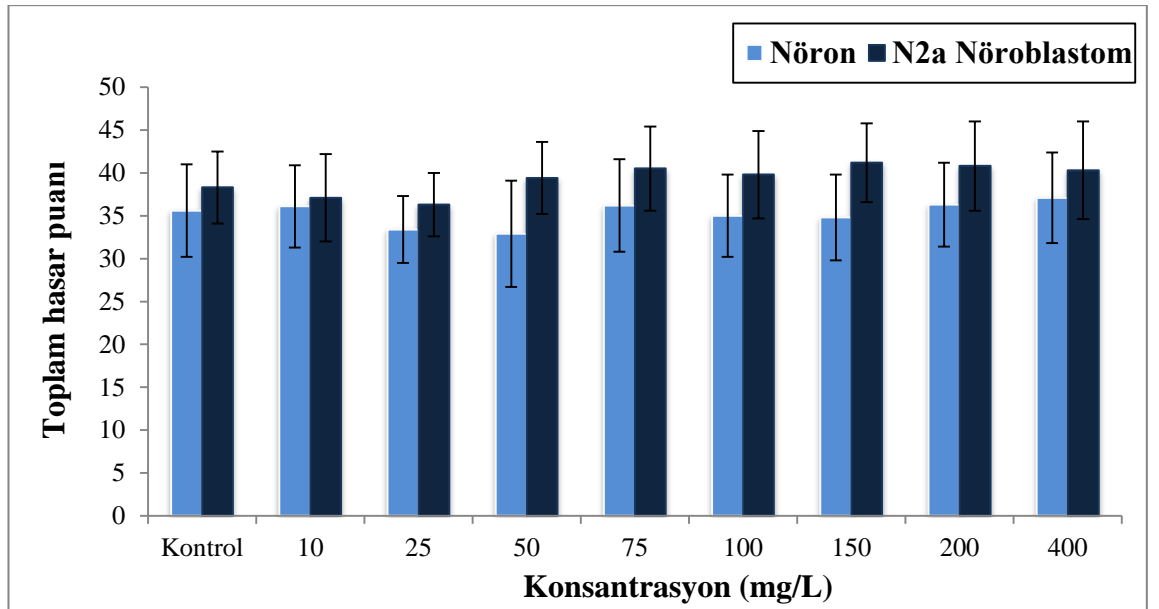
Şekil 4.14. *In vitro* koşullarda SSV'nin oluşturduğu toplam oksidan durum değerleri



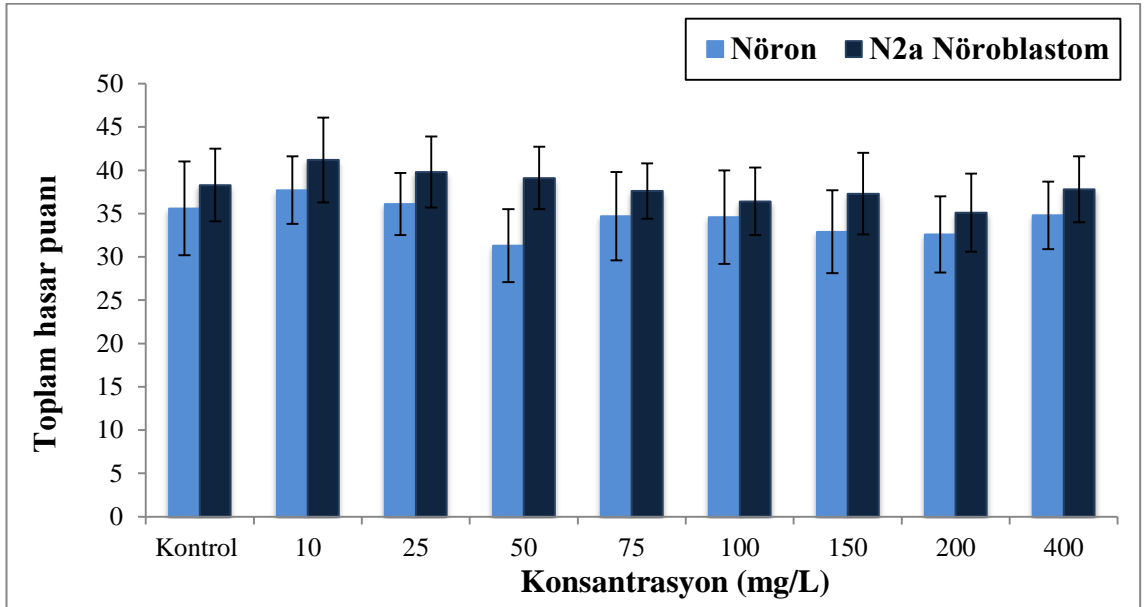
Şekil 4.15. *In vitro* koşullarda ZNG'nin oluşturduğu toplam oksidan durum değerleri

4.4. Toplam Hasar Puan Değerleri (Comet analizi)

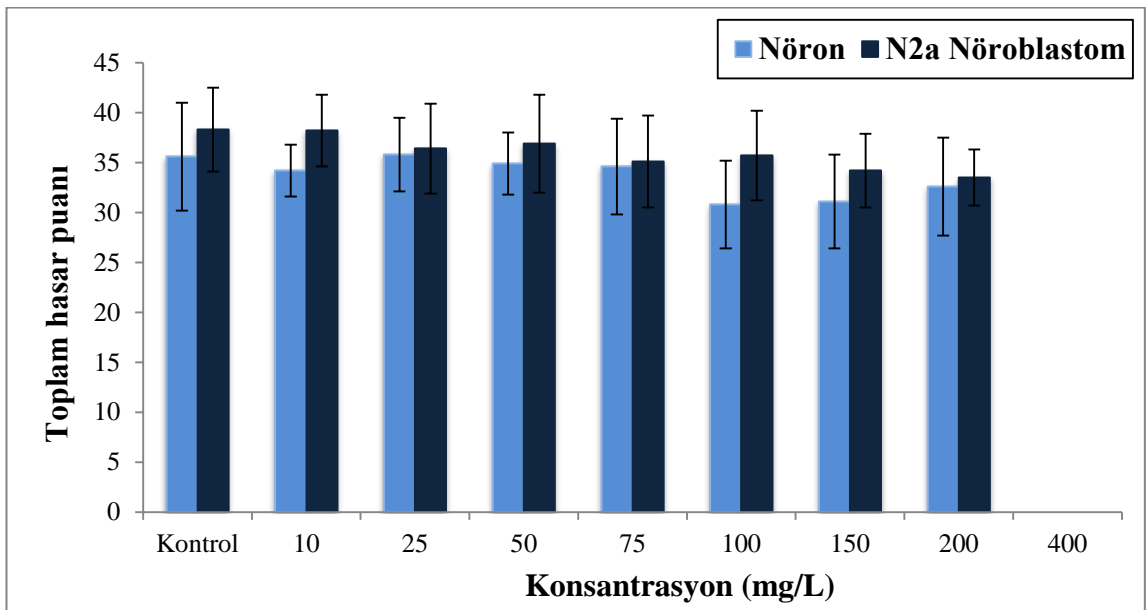
In vitro koşullarda Comet oluşumları esas alınarak hesaplanan toplam hasar puan değerleri bütün konsantrasyonlar için $30,4 \pm 3,7$ ve $41,2 \pm 4,9$ değerleri arasında bulunmuştur. Kontrol grupları için tespit edilen toplam hasar puan değeri sağlıklı nöron hücre kültürleri ($35,6 \pm 5,4$) ve N2a nöroblastom hücre kültürleri ($38,3 \pm 4,2$) ile deney gruplarından elde edilen puan değerleri arasında istatistiki açıdan herhangi bir farklılık bulunmamıştır. Farklı konsantrasyonlarda kültürler üzerine uygulanan FNS, GYZ, KOP, SSV ve ZNG hiçbir dozda kontrol grubuna kıyasla hasar puan değerlerinde belirgin değişikliğe yol açmamıştır. Test tekniğine uygun olarak hazırlanan kültürlerde 400 mg/L (ZNG ve KOP) konsantrasyonlarında bileşik muameleleri yapılan kültürlerde üreme sağlanamamıştır. Seskiterpenlerin sağlıklı nöron ve N2a nöroblastom hücre kültürlerinde konsantrasyonlara bağlı olarak ortaya koyduğu toplam hasar puan değerleri FNS, GYZ, KOP, SSV ve ZNG için sırasıyla Şekil 4.16, 4.17, 4.18, 4.19, 4.20’de gösterilmiştir.



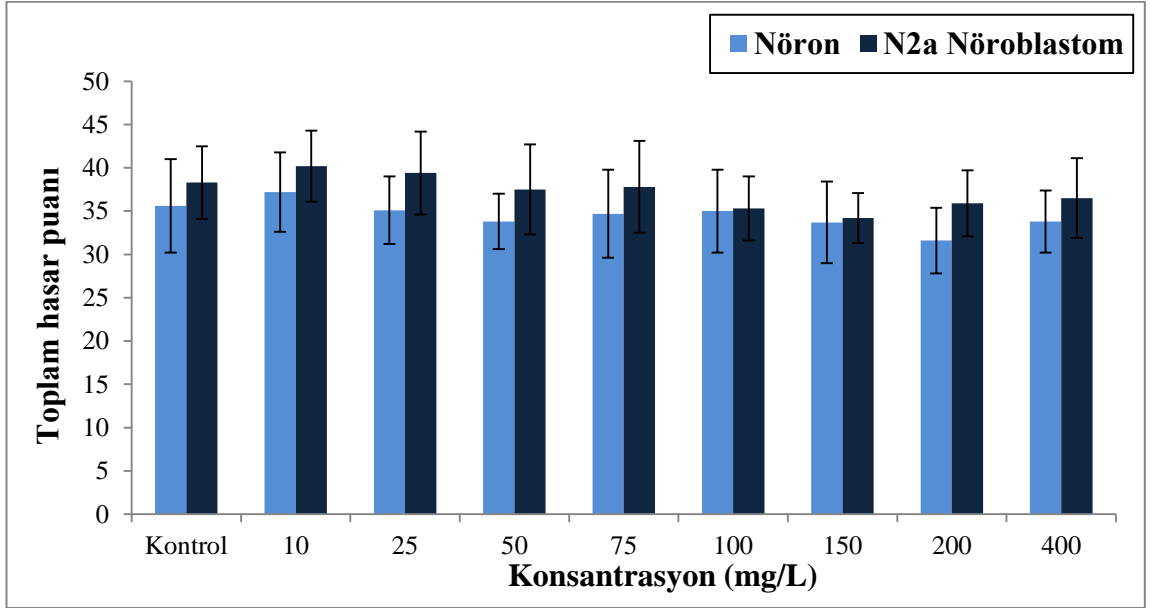
Şekil 4.16. *In vitro* koşullarda FNS'nin konsantrasyonlara göre oluşturduğu toplam hasar puan değerleri ($n=6$)



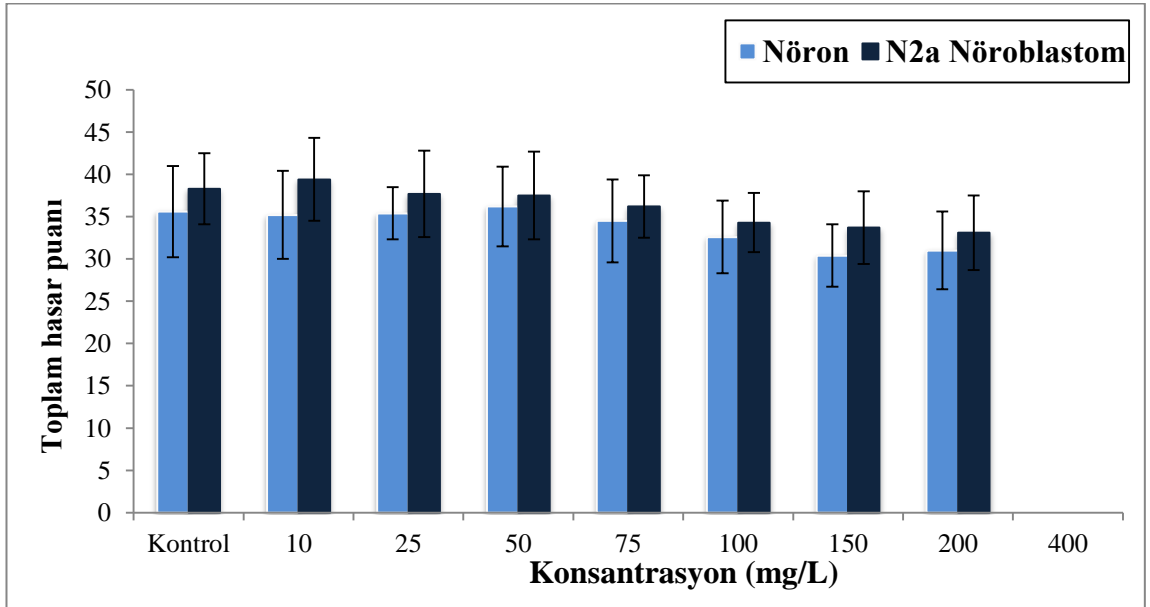
Şekil 4.17. *In vitro* koşullarda GYZ'nin konsantrasyonlara göre oluşturduğu toplam hasar puan değerleri



Şekil 4.18. *In vitro* koşullarda KOP'un konsantrasyonlara göre oluşturduğu toplam hasar puan değerleri



Şekil 4.19. *In vitro* koşullarda SSV'nin konsantrasyonlara göre oluşturduğu toplam hasar puan değerleri



Şekil 4.20. *In vitro* koşullarda ZNG'nin konsantrasyonlara göre oluşturduğu toplam hasar puan değerleri

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar, sağlığın korunması ve hastalıkların önlenmesinde bitkilerin oldukça önemli rolleri olduğunu ortaya koymuştur. Bu etkilerin bitkilerin içerdikleri doğal bileşiklerin biyolojik aktivitelerine bağlı olduğu iyi bilinmektedir. Nitekim, bitkilerde yer alan çeşitli doğal bileşiklerin antiiskemik (Rump *et al.* 1995), antitrombosit (Tzeng *et al.* 1991), antiinflamatuvar (Ferrandiz and Alcaraz 1991) ve antilipoperoksidant (Terao *et al.* 1994) aktivitelerinin olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, söz konusu bileşikler 5-lipoksijenaz, siklooksijenaz, monooksijenaz ve ksantin oksidaz gibi oksidasyon sistemleri ile ilgili pek çok enzimin aktivitelerini inhibe edebilmektedir (Laughton *et al.* 1991; Siess *et al.* 1995; Cotelle *et al.* 1996). Bu biyolojik etkiler farklı kimyasal gruplara ait doğal bileşiklerin antioksidatif özellikleri ile yakından ilişkilidir (Bors *et al.* 1990; Rice-Evans *et al.* 1995).

Bitkiler tarafından üretilen doğal bileşiklerden olan terpenlerin 30.000'den fazla çeşidinin olduğu ve seskiterpenlerin terpenlerin en geniş sınıfını oluşturduğu bilinmektedir. Repetto and Boveris (2010) seskiterpen ($C_{15}H_{24}$) yapısına sahip olan pek çok doğal bileşiğin antioksidan etkili olduğunu kaydetmişlerdir. Bitki muhtevalarındaki doğal bileşikler farklı mekanizmalar aracılığıyla [(I) serbest radikal oluşumu ile ilgili enzimleri inhibe etme, (II) metal iyonlarına bağlanma, (III) lipid peroksidasyonunu başlatan radikalleri giderme] antioksidan aktiviteler sergileyebilirler (Ben Sghaier *et al.* 2011). Mevcut tez kapsamında yürütülen biyokimyasal araştırmalar (TAK analizleri) sonucunda test edilen seskiterpenler antioksidan etkinlikleri bakımından FNS>SSV>KOP>ZNG>GYZ şeklinde sıralanmıştır. Bileşiklerin düşük konsantrasyonları (25mg/L) ile muamele edilen hücre kültürlerinde TAK düzeylerinde belirgin artışlar gözlenmiştir. Ayrıca tez kapsamında test edilen farklı seskiterpen bileşiklerinin doza ve hücre tipine bağlı olarak sağlıklı nöron ve N2a nöroblastom hücre kültürlerinde TAK düzeyini etkileyebildiği ilk kez ortaya konmuştur. Bulgularımız bu konuda literatürde kayıtlı olan sınırlı sayıdaki araştırmalara ait bulgular ile paralellik göstermektedir. Nitekim Al-Maskri *et al.* (2011) tarafından yürütülmüş olan bir çalışmada *Ocimum basilicum* bitkisinden izole edilen FNS'nin antioksidan özelliğinin

bulunduğu ve bu bileşiğin gıda ve sağlık sektöründe koruyucu olarak kullanılabilceği rapor edilmiştir. Başka bir çalışmada ise 1-2-dimetilhidrazinin'in (DMH) bağırsaklarda yol açtığı oksidatif stres, inflamatuvar etki ve apoptotik doku hasarına karşı FNS'nin mukozal tabakalarda meydana gelen hücre hasarlarını ve DMH'in yol açtığı oksidatif stresi önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir (Khan and Sultana 2011). ORAK ve DPPH yöntemleri kullanılarak *Annona salzmannii* ve *A. pickelii* (Annonaceae) bitkilerinin yapraklarından izole edilen KOP bileşiğinin yüksek antioksidan kapasitesinin bulunduğu ortaya konmuştur (Costa *et al.* 2011). Benzer şekilde, *Centaurea centaurium L.* (Asteraceae) kök ekstraktlarının içeriğinde bulunan yüksek miktarlardaki FNS ve ZNG uçucu yağlarına bağlı olarak serbest radikal giderici aktivitesinin bulunduğu kaydedilmiştir (Conforti *et al.* 2008). Tez kapsamında test edilen diğer bileşiklerden farklı olarak düşük konsantrasyonlarda GYZ ilave edilen kültürlerde tespit edilen TAK düzeyi artışları istatistikî açıdan anlamlı bulunmamıştır. Bulgularımızın aksine, GYZ türevi bir seskiterpen olan 3-viningayazulen'in oksidatif etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada söz konusu bileşiğin DPPH serbest radikalini giderici özelliğinin olduğu gözlenmiştir (Pratsinis and Haroutounian 2002). Yine, *in vivo* koşullarda sıçanlarda parasetamol hepatoksisitesine karşı GYZ'nin potansiyel koruyuculuğunun araştırıldığı çalışmada ilgili bileşiğin lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği, hidroksil radikallerini temizlediği ve DPPH ile etkileşime girdiği rapor edilmiştir (Kourounakis *et al.* 1997). Bu karşıtlıklar GYZ'nin biyokimyasal etkinliğinin ortam koşullarına (*in vivo* veya *in vitro*) ve bileşiğin türev spektrumuna bağlı olarak değişebileceğini işaret etmektedir.

Faydalı biyolojik etkilerinin bulunmasına rağmen seskiterpen bileşiklerinin organizmaya alınan miktarına ve türüne bağlı olarak olumsuz etkileri de bulunabilmektedir. Literatürde kayıtlı pek çok araştırma sonucunda seskiterpen maruziyetine bağlı olarak deney hayvanlarında hepatoksisite (Bhardwaj *et al.* 2001), kardiyotoksisite, nefrotoksisite (Efferth and Kaina 2010), embriyotoksisite (Clark 2009) ve immünotoksisite (Moon *et al.* 2011) rapor edilmiştir. Mevcut tezde, bileşiklerin yüksek konsantrasyonları ile muamele edilen hücre kültürlerinde kontrol gruplarına kıyasla TOD düzeylerinde belirgin artışlar gözlenmiştir. Nitekim sağlıklı nöron kültürlerinde 150 mg/L ve üzeri konsantrasyonlarda eklenen FNS, GYZ, SSV ve ZNG

ile 200 mg/L ve üzeri konsantrasyonlarda eklenen KOP pro-oksidan etki göstermiştir. N2a hücre hattında ise 100 mg/L ve üzeri konsantrasyonlarda eklenen KOP, GYZ ve SSV, 150 mg/L ve üzeri konsantrasyonlarda eklenen FNS ile 50 mg/L ve üzeri konsantrasyonlarda eklenen ZNG pro-oksidan etki göstermiştir. Bulgularımız test edilen seskiterpen bileşiklerinin pro-oksidan etkilerinin uygulama dozuna ve uygulanan hücre tipine bağlı olarak değiştiğini ve genellikle yüksek konsantrasyonlarında gözlenen nörotoksisitenin oluşmasında oksidatif stresin önemli rol üstlendiğini ilk kez ortaya koymaktadır. Bulgularımızı destekler nitelikte seskiterpen yapıda olan artemisinin ve repin bileşiklerinin mitokondriyal GSH miktarını azaltarak, lipid peroksidleri artırarak ya da antioksidan enzimlerin aktivitelerini değiştirerek nörotoksisiteye yol açtıkları kaydedilmiştir (Robles *et al.* 1997; Robles *et al.* 1998; Schmuck *et al.* 2002).

Seskiterpenlerin çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmasına karşın bu bileşiklerin genotoksisite potansiyelleri hakkında bilinenlerin oldukça yetersiz olduğu belirtilmiştir. Uzun süreli ve yüksek dozlarda seskiterpen maruziyetinin genetik açıdan da riskli olabileceği rapor edilmiştir (Aquino *et al.* 2011). Gossypol seskiterpeninin genotoksisitesi hakkında çelişkili bulgular mevcut olmakla birlikte bu bileşiğin insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimlerine ve DNA zincir kırılmalarına neden olduğu rapor edilmiştir (Best and Mckenzie 1988; de Peyster and Wang 1993). Yine seskiterpen yapısındaki atrasitolon bileşiğinin mutajenite potansiyeli zamansız DNA sentez testi ile incelenmiş ve genotoksik etkili olmadığı gösterilmiştir (Hwang *et al.* 1996). Altı farklı *Bacillus subtilis* suşu üzerinde himenokson, helenalin ve tenulin seskiterpenlerinin genotoksik etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonucunda tenulinin DNA hasarına neden olmadığı ancak diğer iki bileşiğin farklı suşlarda genotoksik etkili olduğu gözlenmiştir (Jones *et al.* 1981). Aquino *et al.* (2011) Swiss fareleri üzerinde yapmış oldukları deneylerinde artesunat bileşiğinin *in vivo* genotoksisite potansiyelini değerlendirmiş ve test edilen seskiterpenin düşük dozlarda zayıf ancak yüksek dozlarda güçlü bir klastojeniteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Tsuda *et al.* (1998) *in vitro* şartlarda Chinese Hamster Ovaryum (CHO) hücreleri ve *in vivo* şartlarda fare karaciğer, böbrek, kemik iliği, mide, ince ve kalın bağırsak hücreleri üzerinde Comet tekniği kullanarak nivalenol seskiterpeninin mutajenik etkisini araştırmışlardır. Araştırmaları sonucunda bileşiğin dozuna ve maruz kalma biçimine (oral ya da intraperitoneal) bağlı olarak

böbrek, kemik iliği ve kalın bağırsak hücrelerinde DNA hasarına yol açtığını gözlemişlerdir. Fareler üzerinde yürütülen bir diğer araştırmada, aroma artırıcı ve tatlandırıcı olarak kullanılan nerolidol seskiterpeninin genotoksisite potansiyeli değerlendirilmiştir. Çalışma bulguları nerolidolün kan, karaciğer ve kemik iliği hücrelerinde çok hafif düzeyde MÇ oluşumunu teşvik ettiğini ortaya koymuştur (Pículo *et al.* 2011). Seskiterpen yapısındaki parthenin bileşiğinin genotoksisite potansiyeli (I) *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli*'de bakteriyal mutajenite testlerini (Ames ve WP2), (II) KA, (III) KKD ve (IV) MÇ testlerini içeren farklı genetik yaklaşımlar ile değerlendirilmiştir. Genetik analizler sonucunda bileşiğin oldukça zayıf bir mutajenite potansiyelinin olduğu tespit edilmiştir (Ramos *et al.* 2002). Al-Zubairi *et al.* (2010) KA ve MÇ testlerini kullanarak yabani zencefil bitkisinden izole edilen zerumbon seskiterpeninin DNA hasarı oluşturma potansiyelini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda zerumbonun yüksek dozlarda sitotoksik etkili olduğu ancak genotoksik etkili olmadığını göstermişlerdir. Tez kapsamında test bileşikleri olarak belirlenmiş olan FNS, SSV, KOP, ZNG ve GYZ seskiterpenlerinin genotoksisite potansiyelleri farklı nöron hücre kültürlerinde comet testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Comet tekniği ile tek zincir kırıklarının tespiti mümkün olduğu gibi nötral comet tekniği ile de çift zincir kırıklarının tespiti mümkün olmaktadır. Ayrıca, tamamlanmamış DNA tamir bölgelerini de gösteren bu teknik hassas, basit ve hızlı bir genotoksisite testi olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemle genotoksisite tayininde hemen hemen tüm hücrelerde DNA hasarı direkt olarak belirlenebilmektedir (Aksoy *et al.* 2008). Değerlendirilen seskiterpen bileşiklerinin yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etkilerinin bulunduğu ancak mutajenite potansiyellerinin bulunmadığı ilk kez ortaya konmuştur. Nitekim seskiterpen dozlarının ilave edildiği normal ve kanserli beyin hücrelerinde hesaplanan toplam hasar puanı değerleri ile kontrol grubundan elde edilen değerler arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır.

Tez kapsamında sağlıklı nöron ve N2a nöroblastom hücre kültürlerinde seskiterpen maruziyeti sonrasında canlılığının belirlenmesi amacıyla MTT yöntemi kullanılmıştır. Tez kapsamında test edilen beş farklı seskiterpen bileşiğinin sitotoksik etkileri hakkında bilinenler oldukça sınırlıdır. Üstelik bu bileşiklerin sağlıklı nöron hücre kültürleri üzerindeki sitotoksik etki potansiyelleri ilk kez bu tez ile ele alınmıştır. Sağlıklı hücreler

üzerinde farklı zaman aralıklarında (6, 12, 24, 48 ve 72 saat) gerçekleştirdiğimiz MTT analizleri söz konusu tüm bileşiklerin toksik etkilerinin 24 saat sonra ortaya çıktığını ve 6. ile 12. saatlerde belirgin toksisite oluşturmadıklarını gösterdi. Üstelik bulgularımız, 24. saat sonrası gözlenen toksisitenin 48 ya da 72 saat maruziyeti sonrasında gözlenen toksisiteden farklı olmadığını ($p>0.05$) ortaya koydu. Bu nedenle *in vitro* araştırmalarımız 24 saatlik hücre kültürleri üzerinde yürütüldü. MTT analiz sonuçlarımız FNS, GYZ, SSV ve ZNG (>150 mg/L) ile KOP (>200 mg/L) seskiterpenlerinin yüksek konsantrasyonlarının sağlıklı nöronlarda sitotoksik etkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu doz seviyelerinde TOD düzeylerinin de yükselmiş olması ilgili bileşiklerin sitotoksisinde oksidatif stresin oldukça etkili olduğunu işaret etmektedir. Oksidatif stresin yanı sıra, önceki raporlarda bitkilerdeki doğal bileşikler tarafından ortaya konan sitotoksitenin (I) proteozom inhibisyonu, (II) yağ asit sentezi inhibisyonu, (III) topoizomeraz inhibisyonu, (IV) fosfatidil-inozitol 3-kinaz inhibisyonu, (V) hücre siklusunun engellenmesi, (VI) p53 birikimi, (VII) c-fos ve c-myc ekspresyonlarının artışı gibi farklı mekanizmalar aracılığı ile de gerçekleşebileceği kaydedilmiştir (Constantinou *et al.* 1995; Lepley *et al.* 1996; Plaumann *et al.* 1996; Agullo *et al.* 1997; Chen *et al.* 1998; Kazı *et al.* 2004; Chen *et al.* 2005; Brusselmans *et al.* 2005). FNS, GYZ, SSV ve ZNG bileşiklerinin sitotoksitesinin tam olarak anlaşılabilmesi söz konusu mekanizmaların *in vitro* veya *in vivo* model sistemlerde detaylı olarak araştırılmasını gerekli kılmaktadır. Zira FNS, GYZ, SSV, KOP ve ZNG sitotoksitesinin çoklu mekanizmalar ile araştırılması, bileşiklerin yapı-aktivite ilişkilerinin ortaya çıkarılmasına ve bu yolla da kanser tedavisinde etkin adaylar olarak kullanılabilmelerine olanak sağlayacaktır (Ben Sghaier *et al.* 2011).

In vivo ve/veya *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmiş olan önceki araştırmalarda widdrol (Kang *et al.* 2012), artemisin (Tin *et al.* 2012), zerumbon (Mukarami *et al.* 2004), deoksielefantopin (Su *et al.* 2011a), 6-O-angeloylenolin (Su *et al.* 2011b), curcufenol (Rodrigo *et al.* 2010), dehidrokostuslakton (Choi and Kim 2010), millerenolid, thieleanin (Taylor *et al.* 2008), izokostunolid (Chen *et al.* 2007) gibi seskiterpen yapısındaki doğal bileşiklerin antikanser aktivitelerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Seskiterpen bileşiklerinin antikanser aktivitelerini belirlemek üzere yürütülmüş olan çeşitli araştırmaların varlığına rağmen, tez kapsamında test bileşikleri olarak kullanılan

FNS, ZNG, GYZ, KOP ve SSV bileşiklerinin antikanser aktiviteleri henüz araştırılmamıştır. Mevcut tezde MTT testi kullanılarak söz konusu seskiterpen bileşiklerinin N2a nöroblastom hücre kültürleri üzerindeki antikanser aktivitelerinin varlığı incelenmiştir. Bileşiklerin sitotoksik etkileri ayrıca sağlıklı nöron kültürleri üzerinde de araştırılmıştır.

Tez kapsamında elde edilen önemli ve orijinal bulgulardan biri de KOP, SSV ve ZNG bileşiklerinin N2a kanser hücrelerinde sağlıklı hücrelere oranla daha düşük konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu etkilemesidir. Diğer bir ifade ile FNS ve GYZ her iki hücre kültüründe aynı konsantrasyonlarda sitotoksositeye yol açarken KOP (100 mg/L), SSV (100 mg/L) ve ZNG (50, 75 ve 100 mg/L) daha düşük konsantrasyonlarda kanser hücrelerinde sitotoksik etkili olmuştur. N2a hücre kültürlerindeki MTT analizleri sonucunda test edilen bileşikler antikanser aktivitelerine göre ZNG>KOP>SSV>GYZ>FNS şeklinde sıralandı. Ayrıca bu bileşiklerin nöron kanser hücre hatlarında etkili antikanserojenler olarak kullanılabileceği ilk kez rapor edildi. Bulgularımıza benzer şekilde seskiterpen lakton koronopilinin lösemi hücrelerinde kaspaz bağımlı apoptozisi tetikleyerek büyümeyi inhibe ettiği, fakat sağlıklı kan hücrelerinde zayıf sitotoksosite gösterdiği rapor edilmiştir (Cotugno *et al.* 2012). Karaciğer kanseri oluşumunun ilk fazlarında farnesol ve geraniol (GER) seskiterpenlerinin potansiyel kemopreventif etkilerinin araştırıldığı çalışma sonrasında her iki izoprenoidin antikanserojenik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Ong *et al.* 2006). *Psidium guajava L.* bitkisinin yapraklarından elde edilen ekstraktların KOP içeriğine bağlı olarak prostat kanserine karşı antikanserojen etki gösterdiği ve tedavi amaçlı kullanılabileceği rapor edilmiştir (Ryu *et al.* 2012). Tezimiz kapsamında test edilen söz konusu seskiterpenlerin sitoprotektif antikanser etkilerini sitokrom P-450 enzim sistemini inhibe ederek ya da enzimlerin izoformlarını uyararak sergilediği ve bu yolla endojen kanserojenlerin metabolik aktivasyonunu azaltmış olabileceği teklif edilmiştir. İlâveten tirozin kinaz ve siklin bağımlı kinazlar ile etkileşimi, apoptozun teşviki ve mutant p53 seviyesinin düzenlenmesi gibi biyolojik etkilerin kombinasyonlarında bu bileşiklerin antiproliferatif aktivitelerine katkı sağlayabileceği kaydedilmiştir (Avila *et al.* 1994; Ferry *et al.* 1996; Constantinou *et al.* 1998; Casgrande and Darbon 2000; Ben Sghaier *et al.* 2011). Bu bulguyu destekler nitelikte Chaudhary *et al.* (2009) Cilt

kanserlerine karşı FNS'nin kemopreventif etkinliğinde oksidatif stres, inflamasyon gibi biyolojik etkiler ile Ras/Raf/ERK1/2 ve apoptozis yolları bir bütün halinde önemli rol oynadığını kaydetmişlerdir. Tümör nekroz faktörü (TNF) ile ilişkili apoptozisi indükleyen ligand (TRAIL) transforme olmuş hücrelerin yıkımına neden olmaktadır. Bu konuda daha önce yürütülmüş olan bir çalışmada *Curcuma parviflora* bitkisinden elde edilen dimerik seskiterpenlerin TRAIL reseptörlerini ve TRAIL reseptör proteininin ekspresyonunu artırdığı rapor edilmiştir (Ishibashi and Ohtsuki 2008).

Mevcut tezde farklı kimyasal yapılara sahip beş farklı (FNS, GYZ, KOP, SSV ve ZNG) seskiterpen bileşiğinin pro-oksidan, antioksidan, genotoksisite ve sitotoksisite potansiyelleri sırasıyla TOD, TAK, Comet ve MTT testleri ile değerlendirildi. Elde edilen bulgular başta FNS olmak üzere SSV, KOP ve ZNG'in düşük konsantrasyonlarda antioksidan aktivitelerinin varlığını, yüksek konsantrasyonlarda ise sitotoksik etkili olduklarını ortaya koydu. Test edilen tüm bileşikler non-genotoksik etkili bulundu. Başta ZNG olmak üzere KOP ve SSV nöroblastoma hücrelerine karşı antikanser aktivite gösterdi. Tez kapsamında elde edilen bulgular ışığında farklı yapıda seskiterpenlerin N2a beyin tümörü hücre hatlarında antikanserojenik aktivitelerinin multidisipliner yaklaşımlar ile belirlenmesiyle, beyin kanserlerinin tedavisinde yeni bir yaklaşımın önerilebileceği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Acharya, A., Das I., Singh S., Saha T., 2010. Chemopreventive properties of indole-3-carbinol, diindolylmethane and other constituents of cardamom against carcinogenesis. *Recent Patents on Food Nutrition & Agriculture*, 2, 166-177.
- Afoulous, S., Ferhout H., Raelison E.G., Valentin A., Moukarzel B., Couderc F., Bouajila J., 2013. Chemical composition and anticancer, antiinflammatory, antioxidant and antimalarial activities of leaves essential oil of *Cedrelopsis grevei*. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 352-362.
- Agullo, G., Gamet-Payraastre L., Manenti S., Viala C., Remesy C., Chap H., Payraastre B., 1997. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase c inhibition. *Biochemical Pharmacology*, 53, 1649-1657.
- Ahmed, J.H., Ezer N., 2008. *Prunella* L. türlerinin kimyasal bileşikleri ve biyolojik aktiviteleri. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 28, 93-113.
- Akay, H., 2006. *Salvia candidissima* Vahl. uçucu bileşenlerinin karakterizasyonu ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.
- Akdemir, N. ve Birol L., 2004. İç hastalıkları ve hemşirelik bakımı. Ankara: Sistem Ofset, 243-306.
- Akkuş, İ., 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1. baskı. Mimoza Yayınları, Konya.
- Aksoy, H., Yılmaz S., Çelik M., Yüzbaşıoğlu D., Ünal F., 2008. Moniliformin mikotoksininin *in vitro* genotoksik etkileri, SAÜ Fen Edebiyat Dergisi, 10, 1-14.
- Aksoylar, S., 2007. Nöroblastom. *Klinik Gelişim*, 20, 62-72.
- Aktaş, S., Altun S.Z., Erbayraktar Z., Olgun N., 2010. Nöroblastomda retinoik asit ve sitotoksik ajanların kombinasyonlarının hücre siklus proteinlerinden siklin d1 ve p21 ekspresyonu üzerine etkileri. *Journal of Medical Sciences*, 30, 947-951.
- Aktaş, S.H., 2010. Kemoterapinin kolon kanseri, meme kanseri ve mide kanserinde vegf düzeylerine etkisinin *in vivo* ve *in vitro* incelemesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
- Alcântara, D.D., Ribeiro H.F., Cardoso P.C., Araújo T.M., Burbano R.R., Guimarães A.C., Khayat A.S., de Oliveira Bahia M., 2013. *In vitro* evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of artemether, an antimalarial drug, in a gastric cancer cell line (PG100). *Journal of Applied Toxicology*, 33(2), 151-156.
- Alley, M.C., Scudiero D.A., Monks A., Hursey M.L., Czerwinski M.J., Fine D.L., Abbott B.J., Mayo J.G., Shoemaker R.H., Boyd M.R., 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research*, 48, 589-601.
- Al-Maskri, A.Y., Hanif M.A., Al-Maskari M.Y., Abraham A.S., Al-sabahi J.N., Al-Mantheri O., 2011. Essential oil from *Ocimum basilicum* (Omani basil): a desert Crop. *Natural Product Communications*, 6, 1487-1490.
- Alp, Ö., 2012. Çocukluk çağı kanserleri. *Onko Vital*, 10, 1-8.
- Al-Zubairi, A.S., Abdul A.B., Syam M.M., 2010. Evaluation of the genotoxicity of zerumbone in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Toxicology In Vitro*, 24(3), 707-712.

- Anasori, P., Asghari G., 2008. Effects of light and differentiation on gingerol and zingiberene production in callus culture of *Zingiber officinale* Rosc. *Pharmaceutical Sciences*, 3, 59-63.
- Anderson, RA., 2007. Prescribing antioxidants. *In: Rakel: Integrative Medicine*, 2nd ed., Saunders, 103, 1083-1094,
- Andreeff, M., Goodrich D.W., Pardee A.B., 2000. Cell proliferation, differentiation, and apoptosis, *Cancer Medicine* e.5 (içinde), R. C. Bast (Ed.), B. C. Decker Inc., London, UK, 17-19, 24-26.
- Anonim, 2013. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Kanser>. (18/09/2013).
- Anonymous 2013a. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w383902?lang=en®ion=TR> (29/07/2013).
- Anonymous 2013b. <http://structures.wishartlab.com/molecules/HMDB36164/image.png> (29/07/2013).
- Anonymous 2013c. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/g11004?lang=en®ion=TR>(29/07/2013).
- Anonymous 2013d. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Alpha_copaene_minus.png (29/07/2013).
- Anonymous 2013e. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/448559?lang=en®ion=TR> (29/07/2013).
- Aquino, I., Perazzo F.F., Maistro E.L., 2011. Genotoxicity assessment of the antimalarial compound artesunate in somatic cells of mice. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1335-1339.
- Ardağ, A., 2008. Antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin analitik açıdan karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Arı, B., 2008. p53 yolağında yer alan mdm2 ve p53 genlerinde görülen tek nükleotid polimorfizimlerinin meme kanserli hastalarda araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Arif, R., Küpeli E., Ergun F., 2004. The biological activity of *Centaurea* L. species. *G.U. Journal Of Science*, 17, 149-164.
- Armstrong, DA., 1998. *Methods in molecular biology*. Volume 108, Toronto, Humana Press.
- Arslan, R., DüNDAR Y., 2000. Kan viskozitesi ve oksidan stres. *İnsizyon*, 3 (3), 135-141.
- Atmaca, H., 2008. İnsan yumurtalık kanseri hücre hattında (ovcar-3) zoledronik asit ve gossypol'un sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- Avila, M.A., Velasco J.A., Cansado J., Notario V., 1994. Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. *Cancer Research*, 54, 2424-2428.
- Aydın ,G.B., 2006 Nöroblastom: klinik özellikler ve tedavi sonuçları. Uzmanlık tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara.
- Aydın, E., 2011. Erzurum ve Artvin illerinde tespit edilen bazı liken türlerinin sitogenetik ve oksidatif etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Azaz, A.D., Satıl G., Tümen M., Kürkçüoğlu M., Demirci F., Başer K.H.C., 2002. Bazı *Satureja* uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri. 14. bitkisel ilaç hammaddeleri toplantısı, Eskişehir.

- Bäckman, U., Svensson A., Christofferson R.H., Azarbayjani F., 2008. The bisphosphonate, zoledronic acid reduces experimental neuroblastoma growth by interfering with tumor angiogenesis. *Anticancer Research*, 28, 1551-1557.
- Bağcı, E., Koçak A., 2008. *Salvia Palaestina* bentham ve *S. Tomentosa* miller türlerinin uçucu yağ kompozisyonu, kemotaksonomik bir yaklaşım. *Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 20, 35-41.
- Bajpai, V.K., Al-Reza S.M., Choi U.K., Lee J.H., Kang S.C., 2009. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1876-1883.
- Baloğlu, E., 2001. Synthesis and biological evaluation of paclitaxel analogs, Doktor of philosophy in chemistry, Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Barutça, B., 2006. Bazı bitki ekstrelerinin memeli hücre kültürlerinde sitotoksik aktivitelerinin *in vitro* araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Bayrak, U., Gram E., Mengeş E., Okumuş Z.G., Sayar H.C., Skrijelj E., Açıköz A., Çehrelı R., Ellidokuz, H., 2010. Üniversite öğrencilerinin sağlıkla ilgili alışkanlıklar ve kanser konusundaki bilgi ve tutumları. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 24, 95-103.
- Bayram, F., 2012. Glioblastomlarda metil guanin metil transferaz promoter bölgesinde metilasyonun polimeraz zincir reaksiyon yöntemiyle gösterilmesi, klinik ve histopatolojik prognostik faktörlerle ilişkisi. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Adana.
- Bazemore, R.A., Feng J., Cseke L., Podila G.K., 2012. Biomedically important pathogenic fungi detection with volatile biomarkers. *Journal of Breath Research*, 6, 016002.
- Ben Sghaier, M., Skandrani I., Nasr N., Franca M.G., Chekir-Ghedira L., Ghedira K 2011. Flavonoids and sesquiterpenes from *Teucrium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: a structure-activity relationship study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32, 336- 348.
- Berger, R.G., 2007. Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability. Springer, Berlin.
- Best, R.G., McKenzie W.H., 1988. Variable sister-chromatid exchange response in human lymphocytes exposed *in vitro* to gossypol acetic acid, *Mutation Research*, 206, 227-233.
- Bhardwaj, R., Singh A., Sharma O.P., Dawra R.K., Kurade N.P., Mahato S.B., 2001. Hepatotoxicity and cholestasis in rats induced by the sesquiterpene, 9-oxo-10,11-dehydroageraphorone, isolated from *Eupatorium adenophorum*. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 15, 279-286.
- Birand, AL., Knop JM. Çev. Aban, S. 1996. "Kanserin Sıklığı ve Epidemiyolojisi", Hemşireler İçin Kanser El Kitabı, IV. Akşam Sanat Okulu Matbaası, Ankara, 10-21.
- Bors, W., Hellers W., Michel C., Saran M., 1990. Radical chemistry of flavonoids antioxidant. in: emerit (ed.), antioxidants in therapy and preventive medicine. vol. 1. Plenum Press, pp. 165-170.
- Boyacıoğlu, M., 2004. İzmir körfezi sedimentlerinde direkt mutajenlerin belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 21(1-2), 23-27.

- Brodeur, G.M., 2003. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature Reviews Cancer*, 3, 203-216.
- Brusselmans, K., Vrolix R., Verhoeven G., Swinnen J.V., 2005. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 5636- 5645.
- Buettner, GR., Ng, CF., Wang M., Rodgers VGJ., Schafer FQ., 2006. A new paradigm: manganese superoxide dismutase influences the production of H₂O₂ in cells and thereby their biological state. *Free Radical Biology & Medicine*, 41,1338–1350.
- Buskuhl, H., de Oliveira F.L., Blind L.Z., de Freitas R.A., Barison A., Campos F.R., Corilo Y.E., Eberlin M.N., Caramori G.F., Biavatti M.W., 2010. Sesquiterpene lactones from *Vernonia scorpioides* and their *in vitro* cytotoxicity. *Phytochemistry*, 71(13), 1539-1544.
- Bütüner, B.D., Kantarcı G., 2006. Mutation, DNA damage, repair mechanisms and the relation of cancer. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara*, 35, 149-170.
- Can, O.D., Demir Özkay U., Kıyan H.T., Demirci B., 2011. Psychopharmacological profile of chamomile (*Matricaria recutita* L.) essential oil in mice. *Phytomedicine*, 19, 306-310.
- Cancer World Health Organization (WHO). <http://www.who.int/topics/cancer/en/index.html> Erişim tarihi: 29/07/2013.
- Candan, S., 2002. Nikel ve oksidatif stres. *Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara.*
- Casgrande, F., Darbon J.M., 2000. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochemical Pharmacology*, 61, 1205-1215.
- Ceylan, A., 1987. Tıbbi bitkiler II. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 481, 1-22.
- Chatten, J., Meadows A.T., Biegel J.A., Brodeur G.M., 1997. Familial neuroblastoma: a three-generation pedigree and a further association with Hirschsprung disease. *Medical and Pediatric Oncology*, 28(1), 1-5.
- Chaudhary, S.C., Alam M.S., Siddiqui M.S., Athar M., 2009. Chemopreventive effect of farnesol on dmba/tpa-induced skin tumorigenesis: involvement of inflammation, Ras-ERK pathway and apoptosis. *Life Sciences*, 85, 196-205.
- Chavan, M.J., Wakte P.S., Shinde D.B., 2011. Analgesic and anti-inflammatory activities of the sesquiterpene fraction from *Annona reticulata* L. Bark. *Natural Product Research*, 26, 1515-1518.
- Chehregani, A., Mohsenzadeh F., Mirazi N., Hajisadeghian S., Baghali Z., 2010. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Tripleurospermum disciforme* in three developmental stages. *Pharmaceutical Biology*, 48,1280-1284.
- Chen, C.N., Huang H.H., Wu C.L., Lin C.P., Hsu J.T., Hsieh H.P., Chuang S.E., Lai G.M., 2007. Isocostunolide, a sesquiterpene lactone, induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in human melanoma cells. *Cancer Letters*, 246, 237-252.
- Chen, D., Daniel K.G., Chen M.S., Kuhn D.J., Landis-Piowar K.R., Dou Q.P., 2005. Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. *Biochemical Pharmacology*, 69, 1421- 1432.
- Chen, Y., Zhao Y.Y., Wang X.Y., Liu J.T., Huang L.Q., Peng C.S., 2011. GC-MS analysis and analgesic activity of essential oil from fresh rhizoma of *Cyperus*

- rotundus*. Zhong Yao Cai, 34, 1225-1229.
- Chen, Z.P., Schell J.B., Ho C.T., Chen K.Y., 1998. Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts. *Cancer Letters*, 129, 173–179.
- Cheung, N.V., Cohn S.L., 2005. Neuroblastoma. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- Choi, E.J., Kim G.H., 2010. Evaluation of a anticancer activity of dehydrocostuslactone *In vitro*, *Molecular Medicine Reports*, 3, 185-188.
- Chu, G., 2001. Biochemistry DNA repair, <http://cmgm.stanford.edu/biochem201/Handouts/dnarepair.pdf>
- Clark, R.L., 2009. Embryotoxicity of the artemisinin antimalarials and potential consequences for use in women in the first trimester. *Reproductive Toxicology*, 28, 285-296.
- Coleman, B.R., Ratcliffe R.H., Oguntayo S.A., Shi X., Doctor B.P., Gordon R.K., Nambiar M.P., 2008. [+]–Huperzine A treatment protects against N-methyl-D-aspartate-induced. seizure/status epilepticus in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 175, 387-395.
- Conforti, F., Menichini F., Loizzo M.R., Statti A.G., Rapisarda A., Menichini F., Houghton P.J., 2008. Antioxidant, alpha-amylase inhibitory and brine-shrimp toxicity studies on *Centaurea centaurium* L. methanolic root extract. *Natural Product Research*, 22, 1457-1466.
- Constantinou, A., Mehta R., Runyan C., Rao K., Vaughan A., Moon R., 1995. Flavonoids as dna topoisomerase antagonists and poisons: structure–activity relationships. *Journal of Natural Products*, 58, 217- 225.
- Constantinou, A.I., Kamath N., Murley J.S., 1998. Genistein inactivates bcl-2, delays the G2/M phase of the cell cycle, and induces apoptosis of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *European Journal of Cancer*, 34, 1927–1934.
- Costa, E.V., Dutra L.M., de Jesus H.C., Nogueira P.C., Moraes V.R., Salvador M.J., Cavalcanti S.C., dos Santos R.L., Prata A.P., 2011. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and larvicidal activities of the essential oils of *Annona salzmannii* and *A. pickelii* (Annonaceae). *Natural Product Communication*, 6(6), 907-912.
- Costarelli, L., Malavolta M., Giacconi R., Cipriano C., Gasparini N., Tesi S., Pierpaoli, S., Orlando F., Suzuki H., Perbellini L., Piacenza F., Emanuelli M., Mocchegiani E., 2010. *In vivo* effect of alpha-bisabolol, a nontoxic sesquiterpene alcohol, on the induction of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Oncology Research*, 18, 409-418.
- Cotelle, N., Bernier J.L., Catteau J.P., Pommery J., Wallet J.C., Gaydou E.M., 1996. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 35-43.
- Cotran, S.R., Kumar V., Robbins S.L., 1989. Robbins Pathologic Basis of Disease, Chapter: 6, pp.239-306, W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Cotugno, R., Fortunato R., Santoro A., Gallotta D., Braca A., De Tommasi N., Belisario M.A., 2012. Effect of sesquiterpene lactone coronopilin on leukaemia cell population growth, cell type-specific induction of apoptosis and mitotic catastrophe. *Cell Proliferation*, 45, 53-65.
- Çelik, E., Çelik E.G., 2007. Bitki uçucu yağlarının antimikrobiyal özellikleri. *Orlab on-line Mikrobiyoloji Dergisi*, 5, 1-6.
- Çelik, K., 2012. Wintergreen yağının antitümörojenik ve sitotoksik etkilerinin

- araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Çetin, D., 2011. Paklitaksel ve sisplastin nörotoksitesinin sıçan nöron kültürlerinde antioksidan parametrelerle ilişkisi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Çöl, Ç., 2007. *Sideritis tmolea* P. H. davis bitkisinin diterpen bileşenlerinin izolasyonu ve yapılarının tayini. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Dauer, W., Przedborski S., 2003, Parkinson's disease: Mechanism and models. *Neuron*, 39, 889-909.
- Davis, M.E., Croteau R., 2000. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes topics in current. *Chemistry*, 209, 54-92.
- de Oliveira, P.F., Leandro L.F., Montanheiro G., Bastos J.K., da Silva Filho A.A., Tavares D.C., 2012. Baccharin prevents genotoxic effects induced by methyl methanesulfonate and hydrogen peroxide in V79 cells. *Journal of Food Science*, 77(8):, T138- T 142.
- de Peyster, A., Wang Y.Y., 1993. Genetic toxicity studies of gossypol, *Mutation Research*, 297, 293-312.
- Demir, L., 2013. Diffraktaik asit'in insan lenfosit kültürlerinde sitogenetik ve oksidatif etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Demirkaya, M., Sevinir B., 2006. Nöroblastom. *Güncel Pediatri*, 3, 128-132.
- Demirkaya, M., Sevinir B., Yalçinkaya U., 2008. Congenital neuroblastoma presenting with subcutaneous nodules: original image. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 28, 995-998.
- DeVita, Jr VT., Hellman S., Rosenberg S.A., 1997. *Cancer: principles and practice of oncology*. 5 edition: Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Dı Costanzo, F., Gasperoni S., Rotella V., Di Costanzo F., 2009. Targeted delivery of albumin bound paclitaxel in the treatment of advanced breast cancer. *Onco Targets and Therapy*, 2, 179-188.
- Dikilitaş, M., Koçyiğit A., 2010. Canlılarda "tek hücre jel elektroforez" yöntemi ile DNA hasar analizi (teknik not): comet analiz yöntemi. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 14(2), 77- 89.
- Dilsiz, N., 2004. *Moleküler biyoloji*. Palme Yayıncılık, Ankara, 155-177.
- Diri, M., 2006. *Coridothymus capitatus* (L.) reichb. uçucu yağının analiz, su ve etanol ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.
- Dovolou, E., Clemente M., Amiridis G.S., Messinis I.E., Kallitsaris A., Gutierrez-Adan A., Rizos D., 2011. Effects of guaiiazuleneon *in vitro* bovine embryo production and on mrna transcripts related to embryo quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 46, 862-869.
- Durmuş, N., 2003. Büyümeyi düzenleyici maddelerin oksidatif stresle ilişkisi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Edris, A.E., 2009. Anti-cancer properties of *Nigella* spp. essential oils and their major constituents, thymoquinone and beta-elemene. *Current Clinical Pharmacology*, 4, 43-46.

- Efferth, T., Kaina B., 2010. Toxicity of the antimalarial artemisinin and its derivatives. *Critical Reviews in Toxicology*, 40, 405-421.
- El-Ghorab, A.H., Nauman M., Anjum F.M., Hussain S., Nadeem M., 2010. A comparative study on chemical composition and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale*) and cumin (*Cuminum cyminum*). *Journal of Agricultural and Food Chemical*, 58, 8231-8237.
- Erel, O., 2004. A Novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37, 277-285.
- Erel, O., 2005. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry*, 37, 112-119.
- Evans, M. D., Dizdaroğlu, M., Cooke, M. S., 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research*, 567, 1-61.
- Feig, D. I., Reid T.M., Loeb L. A., 1994. Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Research*, 54, 1890-1894.
- Fent, K., 2001. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples, *Toxicology in Vitro*, 15, 477-488.
- Ferrandiz, M., Alcaraz M.J., 1991. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents and Actions*, 32, 283-288.
- Ferry, D.R., Smith A., Malkhandi J., Fyfe D.W., deTakats P.G., Anderson, D., 1996. Phase I clinical trial of the flavonoids quercetin: pharmacokinetics and evidence for *in vivo* tyrosine kinase inhibition. *Clinical Cancer Research*, 2, 659-668.
- Fışkın, K. 2002. Genetik Kavramlar. Altıncı baskıdan çeviri. Öner, C. 635-651.
- Fidler, I.J., Kerbel R.S., Ellis L.M., 2001. Biology of cancer: angiogenesis, *Cancer: Principles & Practice of Oncology* (içinde), V. T. Devita, S. Hellman, S. A. Rosenberg (Eds.), 6. Edition, Lippincott's Williams & Wilkins, 141, 142, Philadelphia, USA.
- Fiori, J., Teti G., Gotti R., Mazzotti G., Falconi M., 2011. Cytotoxic activity of guaiazulene on gingival fibroblasts and the influence of light exposure on guaiazulene-induced cell death. *Toxicology In Vitro*, 25, 64-72.
- Fotakis, G., Timbrell J.A., 2006. *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160, 171-177.
- Franks, L.M., Teich N.M., 1996. *Cellular and Molecular Biology of Cancer*, 3. Edition, Oxford University Press, New York, USA, 2-4, 21-25.
- Frontling, R.A, Bulmer G.S, 1998. *In vitro* effect of aqueous extract of garlic on the growth and viability of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathology*, 70, 397-405.
- Gad, S.C., 2000. *In vitro* toxicology, Second Edition, Taylor & Francis, New York.
- Gate, L., Tew, K.D., 2001. Glutathione S-transferases as emerging targets, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 5(4), 477-489.
- Geoffrey, M., Cooper R., Hausman E., 2006. Hücre: moleküler yaklaşım. İzmir Tıp Kitapevi, 15, 631-668, İzmir.
- Gil da Costa, R.M., Coelho P., Sousa R., Bastos M.M., Porto B., Teixeira J.P., Malheiro I., Lopes C., 2012. Multiple genotoxic activities of ptaquiloside in human lymphocytes: aneuploidy, clastogenesis and induction of sister chromatid exchange. *Mutation Research*, 747(1), 77-81.
- Gomes, J., Magalhães A., Michel V., Amado I.F., Aranha P., Ovesen R.G., Hansen H.C.,

- Gärtner F., Reis C.A., Touati E., 2012. *Pteridium aquilinum* and its ptaquiloside toxin induce DNA damage response in gastric epithelial cells, a link with gastric carcinogenesis. *Toxicology Science*, 126(1), 60-71.
- Goodman, M., Gurney J.G., Smith M.A., Olshan A.F., 1975. Sympathetic nervous system tumors. *Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program, SEER pediatric monograph*. 65-72.
- Gowda, P.J., Ramakrishnaiah H., Krishna V., Narra S., Jagannath N., 2012. Caryophyllene-rich essential oil of *Didymocarpus tomentosa*: chemical composition and cytotoxic activity. *Natural Product Communication*, 7(11), 1535-1538.
- Gören, A.C., 1997. Tıbbi bitkiler (Uçucu yağ bitkileri) Cilt II, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayını, 481.
- Guimaras, C.A., Linden R., 2004. Apoptosis and alternative deastyles. *European Journal of Biochemistry*, 271, 1638-1650.
- Güneş, H., 1999. Sitokinlerin hücre döngüsü üzerinde etkiler, *Türkış Journal of Biology*, 23, 283.
- Güneş, T., Akin M.A., Sarici D., Hallac K., Kurtoglu S., Hashimoto T., 2013. Guaiazulene: a new treatment option for recalcitrant diaper dermatitis in NICU patients. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 26(2), 197-200.
- Güvenalp, Z., 1993. *Artemisia austriaca Jacq ve Artemisia spicigera C. Koch* uçucu yağlarının bileşimi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Güzey, G., 2007. A549, HeLa ve NIH3T3 hücre kültürlerinde *Hypericum perforatum*, *Hypericum montbrettii* ve *Hypericum origanifolium* türlerinin sitotoksik ve antiproliferatif etkileri. Doktora tezi, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Haase, GM, Perez C., Atkinson J.B., 1999. Current aspects of biology, risk assessment, and treatment of neuroblastoma. *Seminars in Surgical Oncology*, 16(2), 91-104.
- Halliwell, B., Gutteridge JMC., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview.” In: *Methods in Enzymology*, 186, 1-85.
- Halliwell, B., 1994. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence. *Lancet*, 344, 721-724.
- Halliwell, B., 1996. Antioxidant in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16, 33-50.
- Halliwell, B., Gutteridge J.M.C., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2.ed. Clarendon Pres, Oxford.
- Hanahan, D., Weinberg R., 2000. The Hall Marks of Cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- Haslam, G., Wyatt D., Kitos P.A., 2000. Estimating the number of viable animal cells in multi-well cultures based on their lactate dehydrogenase activities. *Cytotechnology*, 32(1), 63-75.
- Hayes, P.A.. 1989. Neuroblastoma. In *Principles and practice of Pediatric oncology*, P.D. Pizzo PA, ed. (Philadelphia: JB Lippincott Company), 607-622.
- Hemendinger, R.A., Armstrong E.J., 3rd, Persinski R., Todd J., Mougeot J.L., Volvovitz F., Rosenfeld J., 2008. Huperzine A provides neuroprotection against several cell death inducers using *in vitro* model systems of motor neuron cell death. *Neurotoxicity Research*, 13, 49-61.
- Hipkiss, AR., 2007. Biological aspects of ageing. *Psychiatry*, 6(12), 476-479.
- Hooff, G.P., Peters I., Wood W.G., Müller W.E., Eckert G.P., 2010. Modulation of

- cholesterol, farnesylpyrophosphate, and geranylgeranylpyrophosphate in neuroblastoma SH-SY5Y-APP695 cells: impact on amyloid beta-protein production. *Molecular Neurobiology*, 41, 341-350.
- Hostanska, K., Reichling J., Bommer S., Weber M., Saller R., 2003. Hyperforin a constituent of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards human malignant cell lines, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 56, 121-132.
- Hsiao, W.T., Tsai M.D., Jow G.M., Tien L.T., Lee Y.J., 2012. Involvement of Smac, p53, and caspase pathways in induction of apoptosis by gossypol in human retinoblastoma cells. *Molecular Vision*, 18, 2033-2042.
- Hsu, S.S, Chen W.C., Lo Y.K., Cheng J.S., Yeh J.H., Cheng H.H., Chen J.S., Chang H.T., Jiann B.P., Huang J.K., Jan C.R., 2004. Effect of maprotiline on Ca(2+) movement in human neuroblastoma cells. *Life Science*, 75, 1105-1112.
- Hwang, J.M., Tseng T.H., Hsieh Y.S., Chou F.P., Wang C.J., Chu C.Y., 1996. Inhibitory effect of atractylon on tert-butyl hydroperoxide induced dna damage and hepatic toxicity in rat hepatocytes. *Archives of Toxicology*, 70, 640-644.
- Ishibashi, M., Ohtsuki T., 2008. Studies on search for bioactive natural products targeting TRAIL signaling leading to tumor cell apoptosis. *Medicinal Research Reviews*, 28, 688-714.
- İşık, F.E., 2005. Edirne bölgesinde yetişen *Trifolium resupinatum* L. var. *Microcephalum* bitkisinin fitokimyasal incelenmesi. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- İşbilir, Ş., 2008. Yaprakları salata-baharat olarak tüketilen bazı bitkilerin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Janmaat, A.F., W. Jan de Kogel, Woltering E.J., 2001. Enhanced fumigant toxicity of p-cymene against *frankliniella occidentalis* by simultaneous application of elevated levels of carbon dioxide. *Pest Management Science*, 58, 167-173.
- Jemal, A., Murray T., Ward E., Samuels A., Tiwari R.C., Ghafoor A., Feuer E.J., Thun M.J., 2005. Cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 55(1), 10-30.
- Jones, D.H., Kim H.L., Donnelly K.C., 1981. DNA damaging effects of three sesquiterpene lactones in repair-deficient mutants of *Bacillus subtilis*. *Res. Commun Chem Pathol Pharmacol*, 34, 161-164.
- Kang, M.R., Park S.K., Lee C.W., Cho I.J., Jo Y.N., Yang J.W., Kim J.A., Yun J., Lee K.H., Kwon H.J., Kim B.W., Lee K., Kang J.S., Kim H.M., 2012. Widdrol induces apoptosis via activation of AMP-activated protein kinase in colon cancer cells. *Oncology Reports*, 27(5), 1407-1412.
- Kang, M.R., Park S.K., Lee C.W., Cho I.J., Jo Y.N., Yang J.W., Kim J.A., Yun J., Lee K.H., Kwon H.J., Kim B.W., Lee K., Kang J.S., Kim H.M., 2012. Widdrol induces apoptosis via activation of amp-activated protein kinase in colon cancer cells. *Oncology Reports*, 27, 1407-1412.
- Karabacak, Ç., 2007. Bazı *Scutellaria orientalis* türlerinin içerisindeki ekstraktif bileşiklerin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Karabıyık, L., 2007. Desfluranın genotoksik etkisinin alkali comet yöntemiyle insan lenfositlerinde incelenmesi ve tavşan lenfositlerinde sevofluran ile karşılaştırılması. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,

Ankara.

- Karahan, A., 2007. *Sideritis Gülendami H. Duman ve F.A Karavelioğlu* bitkisinin diterpen bileşiklerinin izolasyonu ve yapılarının tayini. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Karlsson, U.L., Leibel S.A., Wallner K., Davis L.W., Brady L.W., 2004. Brain. in: principles and practice of radiation oncology.(eds): Perez C.A,Brady L.W. J.B Lippincot Company, Philadelphia, Ch 28, 791-838.
- Karp, G., 1999. Cell and Molecular Biology, Concepts and Experiments, Second Edition, John Wiley & Sons, Inc.
- Karp, G., 2005. Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments, 4. Edition, John Wiley & Sons, USA, 669.
- Kars, A., 2004. Gen tedavisi. XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Non-Hodgkin Lenfom, 59-63.
- Kawasaki, B.T., Hurt E.M., Kalathur M., Duhagon M.A., Milner J.A., Kim Y.S., Farrar W.L., 2009. Effects of the sesquiterpene lactone parthenolide on prostate tumor-initiating cells: An integrated molecular profiling approach. Prostate, 69,827-837.
- Kayaalp, S.O., 2000. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Hacettepe Taş Cilt 1, Ankara.
- Kazı, A., Wang Z., Kumar N., Falsetti S.C., Chan T.H., Dou Q.P., 2004. Structure activity relationships of synthetic analogs of (-)-epigallocatechin-3-gallate as proteasome inhibitors. Anticancer Research, 24, 943- 954.
- Kenemans, P., Verstraeten R. A., Verhijen R.H.M., 2004. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. Menopause: Biology and Pathobiology, 49, 34-43.
- Khan, R., Sultana S., 2011. Farnesol attenuates 1,2-dimethylhydrazine induced oxidative stress, inflammation and apoptotic responses in the colon of wistar rats. Chemico-Biological Interactions, 192, 193-200.
- Khay, M., Toeng P., Mahiou-Leddet V., Mabrouki F., Sothea K., Ollivier E., Elias R., Bun S.S., 2012. HPLC analysis and cytotoxic activity of *Vernonia cinerea*. Natural Product Communications, 7(10), 1259-1262.
- Kıncı, S., 2005. Gülyağı eldesinde verim artırıcı yeni tekniklerin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Kıvrak, İ., 2006. *Salvia Potentillifolia Boiss & Heldr. Ex Benth* bitkisinin uçucu bileşenlerinin analiz ve antioksidatif özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.
- Kızılkeçili, Ö., 2007. *Salvia Crypthanta Montbret & Auchr ex Benth* ve *Salvia Pomifera L.* türlerinin metanol, etanol ekstraktlarının ve uçucu yağlarının antibakterial, antifungal ve antitüberküloz aktivitelerinin tayini. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Kikuta, Y., Ueda H., Nakayama K., Katsuda Y., Ozawa R., Takabayashi J., Hatanaka A., Matsuda K., 2011. Specific regulation of pyrethrin biosynthesis in *Chrysanthemum cinerariaefolium* by a blend of volatiles emitted from artificially damaged conspecific plants. Plant and Cell Physiology, 52, 588-596.
- Kirkwood, J.M., Butterfield L.H., Tarhini A.A., Zarour H., Kalinski P., Ferrone S., 2012. Immunotherapy of cancer in 2012. A Cancer Journal for Clinicians, 62(5), 309-335.
- Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert A., Eichenlaub-Ritter U., Decordier, I., 2003. Indirect

- mechanisms of genotoxicity. *Toxicology Letters*, 140-141, 63-74.
- Klug, W. S., Cummings M. R., 2002. *Genetik*. Palme Yayıncılık, Ankara, 28, 635–651.
- Kopnin, B.P., 2000. Targets of oncogenes and tumor suppressors: Key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry*. 65(1), 2-27.
- Kotan, E., 2010. İnsan lenfosit kültürlerinde aflatoksin b 1'in neden olduğu genotoksik ve biyokimyasal değişiklikler üzerine bazı liken metanol ekstraktlarının antagonistik etkisinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Kourounakis, A.P., Rekka E.A., Kourounakis P.N., 1997. Effect of guaiazulene on some cytochrome P450 activities. implication in the metabolic activation and hepatotoxicity of paracetamol. *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 330, 7-11.
- Kösedag, A., 2005. *Sderitis stricta Boiss.& Heldr* bitkisinin fitokimyasal analizi. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Kurt, S.S., 2008. Kanserli hastalarda semptom kontrolünün değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Landis, G.N., Tower J., 2005. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126, 365–379.
- Laughton, M.J., Evans P.J., Moroney M.A., Hoult J.R.C., Halliwell B., 1991. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclooxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives: relationship to antioxidant activity and to iron-reducing ability. *Biochemical Pharmacology*, 42, 1673- 1681.
- Lee, R. F., Steinert S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, 544, 43-64.
- Lehman, I. R., 1997. Eukaryotic DNA repair minireview series. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 234-263.
- Lepley, D.M., Li B., Birt D.F., Pelling J.C., 1996. The chemopreventive flavonoid apigenin induces G2/M arrest in keratinocytes. *Carcinogenesis*, 17, 2367-2375.
- Levin, V.A., Leibel S.A., Gutin P.H., 2001. Neoplasms of the central nervous system. In: DeVita VT Jr, Hellmar S, Rosenberg SA, eds: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 6th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, pp 2100-2160.
- Liu, Z.L., Liu Q.R., Chu S.S., Jiang G.H., 2010. Insecticidal activity and chemical composition of the essential oils of *Artemisia lavandulaefolia* and *Artemisia sieversiana* from China. *Chemistry & Biodiversity*, 7, 2040-2045.
- Li, L.J., Zhong L.F., Jiang L.P., Geng C.Y., Zou L.J., 2011. β -Elemene radiosensitizes lung cancer A549 cells by enhancing DNA damage and inhibiting DNA repair. *Phytotherapy Research*, 25(7), 1095-1097.
- Lima, R.M., Alvarez L.D., Costa M.F., Costa S.L., Clarêncio J., El-Bachá R.S., 2008. Cytotoxic effects of catechol to neuroblastoma N2a cells. *General Physiology and Biophysics*, 27, 306-314.
- Liu, Y., Wang W., Fang B., Ma F., Zheng Q., Deng P., Zhao S., Chen M., Yang G., He G., 2013. Anti-tumor effect of germacrone on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest and promoting apoptosis. *European Journal of Pharmacology*, 698(1-3), 95-102.
- Livolsi, V.A., Merino M.J., Brooks J.S.J., Saul S.H., Tomaszewski J.E., 1992. *Patoloji*, 2. Baskı, Saray Tıp Kitabevleri, İzmir, 33-36.
- Lodewyk, M.W., Gutta P., Tantillo D.J., 2008. Computational studies on biosynthetic

- carbocation rearrangements leading to sativene, cyclosativene, alpha-ylangene, and beta-ylangene. *The Journal of Organic Chemistry*, 73, 6570-6579.
- Lodish, H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.E., 2000. *Molecular Cell Biology*. 4 edition:WH Freeman and Co, New York.
- Lopes-Lutz, D., Alviano D.S., Alviano C.S., Kolodziejczyk P.P., 2008. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of artemisia essential oils. *Phytochemistry*, 69, 1732-1738.
- Ma, Z.Q., Huang X.J., Zhang W.P., 2007. Dihydroartemisinin inhibits proliferation and induces apoptosis of rat glioma C6 cells. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 36(3), 267-272.
- Maris, J.M., 2005. The biologic basis for neuroblastoma heterogeneity and risk stratification. *Current Opinion in Pediatrics*, 17, 7-13.
- Maris, J.M., Matthay K.K., 1999. Molecular biology of neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 17, 2264-2279.
- Marx, J.L., 1985. Oxygen free radicals linked to many diseases. *Science*, 235, 529-531.
- Mateuca, R., Lombaert N., Aka P.V. Decordier I., Kirsch-Volder M., 2006. Chromosomal changes: induction, detection, methods, and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 88, 1515-1531.
- McArt, DG., McKerr G., Howard C.V., Saetzler K., Wasson, G.R., 2009. Modelling the comet assay. *Biochemical Society Transactions*, 37, 914-917.
- Mercan, U., 2004. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. Yüzüncü yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dergisi, 15 (1-2), 91-96.
- Michaelis, M., Kleinschmidt M.C., Barth S., Rothweiler F., Geiler J., Breitling R., Mayer B., Deubzer H., Witt O., Kreuter J., Doerr H.W., Cinatl J., Cinatl J. Jr., 2010. Anti-cancer effects of artesunate in a panel of chemoresistant neuroblastoma cell lines. *Biochemical Pharmacology*, 79, 30-36.
- Miyamae, Y., Rojas E., Ryu J. C., Sasaki Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 35, 206-221.
- Moghadam, M.H., Hajimehdipour H., Saeidnia S., Atoofi A., Shahrestani R., Read R.W., Mosaddegh M., 2012. Anti-proliferative activity and apoptotic potential of britannin, a sesquiterpene lactone from *Inula aucheriana*. *Natural Product Communications*, 7(8), 979-980.
- Mollazadeh, S., Matin M.M., Bahrami A.R., Iranshahi M., Behnam-Rassouli M., Rassouli F.B., Neshati V., 2011. Fesolol enhances the cytotoxicity and DNA damage induced by cisplatin in 5637 cells. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 66(11-12), 555-561.
- Moon, H.I., Cho S.B., Lee J.H., Paik H.D., Kim S.K., 2011. Immunotoxicity activity of sesquiterpenoids from black galangale (*Kaempferia parviflora* Wall. Ex. Baker) against *Aedes aegypti* L. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 33, 380-383.
- Mora, J., Gerald W.L., 2004. Origin of neuroblastic tumors: clues for future therapeutics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 4, 293-302.
- Mosley, R.L., Benner E.J., Kadu I., Thomas M., Boska M.D., Hasan K., Laurie C., Gendelman H.E., 2006. Neuroinflammation, oxidative stress, and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Clinical Neuroscience Research*, 6(5), 261-281.
- Mosmann, T., 1983. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival:

- Application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55- 63.
- Mota, T.C., Cardoso P.C., Gomes L.M., Vieira P.C., Corrêa R.M., Santana P.D., Miranda M.S., Burbano R.M., Bahia M.O., 2011. *In vitro* evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of artesunate, an antimalarial drug, in human lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52(7), 590-594.
- Murakami, A., Tanaka T., Lee J.Y., Surh Y.J., Kim H.W., Kawabata K., Nakamura Y., Jiwaajinda S., Ohigashi H., 2004. Zerumbone, a sesquiterpene in subtropical ginger, suppresses skin tumor initiation and promotion stages in 1cr mice. *International Journal of Cancer*, 110, 481-490.
- Nagai, T., Myoda T., Nagashima, T., 2005. Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (tsukushi) *Equisetum arvense*. *Food Chemistry*, 91, 389-394.
- Nakabayashi, H., Shimizu K., 2012. Involvement of Akt/NF- κ B pathway in antitumor effects of parthenolide on glioblastoma cells *in vitro* and *in vivo*. *BMC Cancer*, 12, 453.
- Nakashima, K., Oyama M., Ito T., Witono J.R., Darnaedi D., Tanaka T., Murata J., Inuma M., 2012. Novel zierane- and guaiane-type sesquiterpenes from the root of *Melicope denhamii*. *Chemistry & Biodiversity*, 9, 2195-2202.
- Nilay, O., 2009. K562 hücre dizisinde fosfin bileşiklerinin sitotoksik etkisinin mtt (3-[4,5 dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue) ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Nishiyama, Y., Ikeda H., Haramaki N., 1998. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *American Heart Journal*, 135, 115.
- Nordberg, J., Arner, E.S.J., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine* 31(11), 1287-1312.
- Olgun, H.M.N., 1997. Nöroblastoma tedavi sonuçları. Uzmanlık Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, İzmir.
- Ong, T.P., Heidor R., de Conti A., Dagli M.L., Moreno F.S., 2006. Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferation and DNA damage, but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMGCoA reductase. *Carcinogenesis*, 27(6), 1194-1203.
- Özekinci, S., 2003. Patoloji arşivindeki on yıllık kanser (1991-2000) olgularının genel değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır.
- Picaud, S., Brodelius M., Brodelius P.E., 2005. Expression, purification and characterization of recombinant (e)-beta-farnesene synthase from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*, 66, 961-967.
- Pículo, F., Guiraldeli Macedo C., de Andrade S.F., Luis Maistro. E., 2011. *In vivo* genotoxicity assessment of nerolidol. *Journal of Applied Toxicology*, 31(7), 633-639.
- Plaumann, B., Fritsche M., Rimpler H., Brandner G., Hess R.D., 1996. Flavonoids activate wild-type p53. *Oncogene*, 13, 1605-1614.
- Pratsinis, H., Haroutounian S.A., 2002. Synthesis and antioxidant activity of 3 - substituted guaiazulene derivatives. *Natural Product Letters*, 16, 201-205.

- Qu Yang, DY, Ji Y.H., Saltis M., Xu L.H., Zhang Y.T., Zha Q.B., Cai J.Y., He X.H., 2011. Valproic acid synergistically enhances the cytotoxicity of gossypol in DU145 prostate cancer cells: an iTRTAQ-based quantitative proteomic analysis. *Journal of Proteomics*, 74, 2180-2193.
- Ramos, A., Rivero R., Visozo A., Piloto J., García A., 2002. Parthenin, a sesquiterpene lactone of parthenium hysterophorus l. is a high toxicity clastogen. *Mutation Research*, 514, 19-27.
- Rasheed, S.A., Efferth T., Asangani I.A., Allgayer H., 2010. First evidence that the antimalarial drug artesunate inhibits invasion and *in vivo* metastasis in lung cancer by targeting essential extracellular proteases. *International Journal of Cancer*, 127, 1475-1485.
- Repetto, M.G., Boveris A., 2010. Bioactivity of sesquiterpenes: compounds that protect from alcohol-induced gastric mucosal lesions and oxidative damage. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 10, 615-623.
- Rice-Evans, C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B., 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22, 375-383.
- Robbers, J.E., Speedie M.K., Tyler V.E., 1996. *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*. Ed. Balado, D., Williams & Wilkins, USA, 81-107.
- Roberts, R.E., Allen S., Chang A.P., Henderson H., Hobson G.C., Karania B., Morgan K.N., Pek A.S., Raghvani K., Shee C.Y., Shikotra J., Street E., Abbas Z., Ellis K., Heer J.K., Alexander S.P., 2013. Distinct mechanisms of relaxation to bioactive components from chamomile species in porcine isolated blood vessels. *Toxicology of Applied Pharmacology*, doi: 10.1016/j.taap.2013.06.021.
- Robles, M., Choi B.H., Han B., Santa Cruz K., Kim R.C., 1998. Repin-induced neurotoxicity in rodents. *Experimental Neurology*, 152, 129-136.
- Robles, M., Wang N., Kim R., Choi B.H., 1997. Cytotoxic effects of repin, a principal sesquiterpene lactone of russian knapweed. *Journal of Neuroscience Research*, 47, 90-97.
- Rocha, N.F., Oliveira G.V., Araújo F.Y., Rios E.R., Carvalho A.M., Vasconcelos L.F., Macêdo D.S., Soares P.M., Sousa D.P., Sousa F.C., 2011 (-)- α -Bisabolol-induced gastroprotection is associated with reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and neutrophil migration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44(4), 455-461.
- Rodrigo, G., Almanza G.R., Cheng Y., Peng J., Hamann M., Duan R.D., Akesson B., 2010. Antiproliferative effects of curcuphenol, a sesquiterpene phenol. *Fitoterapia*, 81, 762-766.
- Rosselli, S., Bruno M., Raimondo F.M., Spadaro V., Varol M., Koparal A.T., Maggio A., 2012. Cytotoxic effect of eudesmanolides isolated from flowers of *Tanacetum vulgare* ssp. siculum. *Molecules*, 17(7), 8186-8195.
- Rump, A.F., Schussler M., Acar D., Cordes A., Ratke R., Theisohn M., 1995. Effects of 54 different inotropes with antioxidant properties on acute regional myocardial ischemia in isolated rabbit hearts. *General Pharmacology*, 26, 603- 611.
- Ryu, N.H., Park K.R., Kim S.M., Yun H.M., Nam D., Lee S.G., Jang H.J., Ahn K.S., Kim S.H., Shim B.S., Choi S.H., Mosaddik A., Cho S.K., Ahn K.S.A., 2012. Hexane fraction of guava leaves (*Psidium guajava* L.) induces anticancer activity by suppressing akt/mammalian target of rapamycin/ribosomal p70 s6 kinase in human prostate cancer cells. *Journal of Medicinal Food*, 15, 231-241.

- Sampson, B.J., Tabanca N., Kirimer N., Demirci B., Başer K. H. C., Khan I. A., Spiers J. M., Wedge D. E., 2005. Insecticidal Activity of 23 Essential oils and their major compounds against adult *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) (Aphididae: Homoptera). *Pest Management Science*, 61, 1122-1128.
- Sarikurkcu, C., Arisoy K., Tepe B., Cakir A., Abali G., Mete E., 2009. Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitexagnuscastus* L. fruits from Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2479-2483.
- Sasidharan, I., Venugopal V.V., Meno A.N., 2011. Essential oil composition of two unique ginger (*Zingiber officinale roscoe*) cultivars from sikim. *Natural Product Research*, 1-6.
- Saydere, A.C., 2009. Analysis of Isamp gene as a tumor suppressor in neuroblastoma. Yüksek Lisans Tezi, Bilkent Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul.
- Schmuck, G., Roehrdanz E., Haynes R.K., Kahl R., 2002. Neurotoxic mode of action of artemisinin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 821-827.
- Scibior, D., Czczot H., 2006. Catalase: structure, properties, functions. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 60, 170-180.
- Seifried, H.E., Anderson D.E., Fisher E.I., Milner J.A., 2007. A review of the gnteraction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, 567-579.
- Shi, C., Wu F., Yew D.T., Xu J., Zhu Y., 2010. Bilobalide prevents apoptosis through activation of the PI3K/Akt pathway in SH-SY5Y cells. *Apoptosis*, 15, 715-727.
- Shukla, S., Gupta S., 2005. Dietary agents in the chemoprevention of prostate cancer. *Nutrition and Cancer*, 53, 18-32.
- Siess, M.H., Leclerc J., Canivenc-Lavier M.C., Rat P., Suschelet M., 1995. Heterogeneous effects of natural flavonoids on monooxygenase activities in human and rat liver microsomes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 130, 73-78.
- Smith, S.L., Sadler C.J., Dodd C.C., Edwards G., Ward S.A., Park B.K., McLean W.G., 2001. The role of glutathione in the neurotoxicity of artemisinin derivatives *in vitro*. *Biochemical Pharmacology*, 61, 409-416.
- Somwong, P., Suttisri R., Buakeaw A., 2013. New sesquiterpenes and phenolic compound from *Ficus foveolata*. *Fitoterapia*, 85, 1-7.
- Sonboli, A., Salehi P., Kanani M.R., Ebrahimi S.N., 2005. Antibacterial and antioxidant activity and essential oil composition of *grammosciadium scabridum* boiss. from Iran. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 60, 534-538.
- Soy, N.N., 2006. Doku kültüründe paklitaksel'in apoptotik ve antiproliferatif etkileri. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Speit, G., Hartmann A., 1999. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair, *Methods in Molecular Biology*, 113, 203-212.
- Spix, C., Pastore G., Sankila R., Stiller C. A., Steliarova-Foucher E., 2006. Neuroblastoma incidence and survival in European children (1978-1997): Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *European Journal of Cancer*, 42, 2081-2091.
- Stahl, W., Sies H., 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24, 345-351.

- Struwe, M., Csato M., Singer T., Gocke E., 2011. Comprehensive assessment of the photomutagenicity, photogenotoxicity and photo(cyto)toxicity of azulene. *Mutation Research*, 723(2), 129-133.
- Su, M., Chung H.Y., Li Y., 2011a. 6-O-Angeloylenolin induced cell-cycle arrest and apoptosis in human nasopharyngeal cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, 189, 167-176.
- Su, M., Chung H.Y., Li Y., 2011b. Deoxyelephantopin from *Elephantopus scaber* L. induces cell-cycle arrest and apoptosis in the human nasopharyngeal cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411, 342-347.
- Suna, H., Arai M., Tsubotani Y., Hayashi A., Setiawan A., Kobayashi M.D., 2009. Ysideamine, a new sesquiterpene aminoquinone, protects hippocampal neuronal cells against iodoacetic acid-induced cell death. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 3968-3872.
- Sung, B., Murakami A., Oyajobi B.O., Aggarwal B.B., 2009. Zerumbone abolishes RANKL-induced NF-kappaB activation, inhibits osteoclastogenesis, and suppresses human breast cancer-induced bone loss in athymic nude mice. *Cancer Research*, 69, 1477-1484.
- Swift, K.A.D., 2002. Advances in flavours and fragrances, from the sensation to the synthesis. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V., 2011. Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim*, 4, 221-229.
- Şengezer, E., Güngör T., 2008. Esansiyel yağlar ve hayvanlar üzerindeki etkileri. *Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü*, 48, 101-110.
- Taha, M.M., Abdul A.B., Abdullah R., Ibrahim T.A., Abdelwahab S.I., Mohan S., 2010. Potential chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated and 2-acetylaminofluorene-promoted hepatocarcinogenesis by zerumbone from the rhizomes of the subtropical ginger (*Zingiber zerumbet*). *Chemical Biological Interactions*, 186, 295-305.
- Tavakoli, R., Mohadjerani M., Hosseinzadeh R., Tajbakhsh M., Naqinezhad A., 2012. Essential-oil and fatty-acid composition, and antioxidant activity of extracts of *Ficaria kochii*. *Chemistry & Biodiversity*, (12), 2732-2741.
- Taylor, P.G., Dupuy Loo. O.A., Bonilla J.A., Murillo R., 2008. Anticancer activities of two sesquiterpene lactones, millerenolide and thielelanin isolated from *Viguiera sylvatica* and *Decachaeta thieleana*. *Fitoterapia*, 79, 428-432.
- Terao, J., Piskula M., Yao Q., 1994. Protective effect of epicatechin gallate and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 308, 278- 284.
- Tice, R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 206-221.
- Tin, A.S., Sundar S.N., Tran K.Q., Park A.H., Poindexter K.M., Firestone G.L., 2012. Antiproliferative effects of artemisinin on human breast cancer cells requires the downregulated expression of the E2F1 transcription factor and loss of E2F1-target cell cycle genes. *Anticancer Drugs*, 23(4), 370-379.
- Toğar, B., 2010. Bazı atipik antipsikotik ilaçların genotoksik etki potansiyellerinin tek hücre jel elektroforez ve mikroçekirdek yöntemleriyle araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

- Tomasch, R., Wagner K.H., Elmadfa I., 2001. Antioxidative power of plant oils in humans: the influence of alpha- and gamma-tocopherol. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 45, 110-115.
- Toprak, K.S., 2001. Hematolojik malign hastalıklarda siklin ve inhibitörlerinin hücre döngüsü ile ilişkisinin akım sitometrik olarak saptanması. Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Ankara.
- Tosun, A., Özkal N. 2003. Chemical constituents and biological activities of seseli L. (*Umbelliferae*) species. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 32, 269-284.
- Tosun, A., Özkal N., 2000. Chemical constituents and biological activities of *Helianthus* Species. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 29, 49-74.
- Tozkoparan, B., Aytaç S.P., 2007. Kanser kemoterapisinde terapötik hedef olarak Glutasyon S-Transferazlar. *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi* 27; 139-164
- Tsuda, S, Kosaka Y., Murakami M., Matsuo H., Matsusaka N., Taniguchi K., Sasaki Y.F., 1998. Detection of nivalenol genotoxicity in cultured cells and multiple mouse organs by the alkaline single-cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research*, 415,191-200.
- Tuğcu, B., 2004. Malign astrositer tümörlü hastalarda yaşam süresini etkileyen faktörler ve ki-67 (mib 1) proliferasyon indeksinin prognoz üzerine etkisi. Uzmanlık Tezi, Bakırköy Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2. Nöroşirurji Kliniği, İstanbul.
- Turhan, H., 2008. Mide kanserli hastalarda periferik kanda telomeraz mRNA ekspresyonunun real time pcr kullanılarak belirlenmesi ve klinikopatolojik özelliklerle ilişkisinin saptanması. Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Erzurum.
- Tümen, İ., Hafizoğlu H., 2003. Türkiye’de Yetişen Ardıç (*Juniperus* L.) türlerinin kozalak ve yaprak uçucu yağlarının bileşiminde bulunan terpen grupları. *ZKÜ Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 5, 5.
- Türk Pediatri onkoloji grubu. 2003. Nöroblastoma tedavi protokolü. İzmir.
- Türker, F.A., Kayaalp, S.O., 2002. “Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar”, Ankara, Feryal Matbaacılık, 380-415.
- Türkez, H., 2007. Bazı bor bileşiklerinin *in vitro* şartlarda periferik insan kanı üzerine genetik ve biyokimyasal etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Türkez, H., Çelik K., Toğar B., 2013. Effects of copaene, a tricyclic sesquiterpene, on human lymphocytes cells *in vitro*. *Cytotechnology*, DOI: 10.1007/s10616-013-9611-1.
- Türkez, H., Toğar B., Arabacı T., 2012. Evaluation of genotoxicity after application of Listerine on human lymphocytes by micronucleus and single cell gel electrophoresis assays. *Toxicology and Industrial Health*, 28(3), 271-275.
- Tzeng, S.H., Ko F.N., Teng C.M., 1991. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thrombosis Research*, 64, 91-100.
- Umay, A., 2007. *Lavandula Stoechas*, *Melissa Officinalis* ve *Tribulus Terrestris* bitkilerinin kimyasal içeriklerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Valko, M., Rhodes C.J., Mancel J., Izakovic M., Mazur M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological*

- Interactions, 160, 1-40.
- Vander, A.J., Sherman J.H., Luciano D.S., 1994. Human Physiology: the mechanisms of body function, 6. Edition, McGraw-Hill, 78, 79.
- Verimli, R., 1996. Bazi kanser hücrelerinden nükleik asitlerin izolasyonu ve analizi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Vermeulen, K., Berneman Z.N., vanBockstaele D.R., 2003b. Cell cycle and apoptosis. *Cell Proliferation*, 36,165-175.
- Vermeulen, K., VanBockstaele, D.R., Berneman, Z.N., 2003a. The cell cycle : a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, 36,131-149.
- Vishwakarma, R.A., 1990. Stereoselective synthesis of a-artether from artemisinin. *Journal of Natural Products*, 53, 216-217.
- Wakabayashi, H., Hashiba K., Yokoyama K., Hashimoto K., Kikuchi H., Nishikawa H., Kurihara T., Satoh K., Shioda S., Saito S., Kusano S., Nakashima H., Motohashi, N., Sakagami H., 2003. Cytotoxic activity of azulenes against human oral tumor cell lines. *Anticancer Research*, 23, 4747- 4756.
- Wang, C., Yoon S.H., Jang H.J., Chung Y.R., Kim J.Y., Choi E.S., Kim S.W., 2011. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for α -farnesene production. *Metabolic Engineering*, 13, 648-655.
- Wang, L., Yan J., Fu P.P., Parekh K.A., Yu H., 2003. Photomutagenicity of cosmetic ingredient chemicals azulene an guaiazulene. *Mutation Research*, 530, 19–26.
- Weiss, S.J., LoBuglio, A.F., 1982. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Laboratory Investigation*, 47 (1), 5-18.
- Weng, H.Y., Hsu M.J., Wang C.C., Chen B.C., Hong C.Y., Chen M.C., Chiu W.T., Lin C.H., 2012. Zerumbone suppresses IKK α , Akt, and FOXO1 activation, resulting in apoptosis of GBM 8401 cells. *Journal of Biomedical Science*, 19, 86.
- Wiley, J.C, Meabon J.S, Frankowski H., Smith E.A., Schecterson L.C., Bothwell M., Ladiges W.C., 2010. Phenylbutyric acid rescues endoplasmic reticulum stress-induced suppression of APP proteolysis and prevents apoptosis in neuronal cells. *PLoS One*. 5, e9135.
- Wolterbeek H.T., van der Meer A.J., 2005. Optimization, application, and interpretation of lactate dehydrogenase measurements in microwell determination of cell number and toxicity. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 3(6), 675-682.
- Wu, F., Lukinius A., Bergström M., Eriksson B., Watanabe Y., Lågström B., 2005, A Mechanism behind the antitumour effect of 6-diazo-5-oxo-L- norleucine (DON): disruption of mitochondria, *European Journal of Cancer*, 35(7), 1155-1161.
- Wu, G., Lin A., Gu Q., Zhu T., Li D., 2013. Four new chloro-eremophilane sesquiterpenes from an antarctic deep-sea derived fungus, *Penicillium* sp. PR19N-1. *Marine Drugs*, 11(4), 1399-1408.
- Wu, L., Wang G., Tang S., Long G., Yin T., 2011. Protection of endothelial cells, inhibition of neointimal hyperplasia by β -elemene in an injured artery. *Cardiovascular Disease*, 3, 233-242.
- Wu, X.S., Xie T., Lin J., Fan H.Z., Huang-Fu H.J., Ni L.F., Yan H.F., 2009. An investigation of the ability of elemene to pass through the blood-brain barrier and its effect on brain carcinomas. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61, 1653-1666.
- Yachnis, A.T., Perry A., 2009. Embryonal (primitive) neoplasms of the central nervous

- system. In: Perry A, Brat DJ. Practical Surgical Neuropathology: A Diagnostic Approach. Philadelphia: Churchill Livingstone, 163-176.
- Yalçın, M., 1993. *Teucrium orientali* L. var. *Elangatum* 'un uçucu bileşenlerinin analizi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Yang, F., Chen W.D., Deng R., Zhang H., Tang J., Wu K.W., Li D.D., Feng G.K., Lan W.J., Li H.J., Zhu X.F., 2013. Hirsutanol A, a novel sesquiterpene compound from fungus *Chondrostereum* sp., induces apoptosis and inhibits tumor growth through mitochondrial-independent ROS production: hirsutanol A inhibits tumor growth through ROS production. *Journal of Translational Medicine*, 11, 32.
- Yang, Y., Xiao Y., Liu B., Fang X., Yang W., Xu J., 2011. Comparison of headspace solid-phase microextraction with conventional extraction for the analysis of the volatile components in *Melia azedarach*. *Talanta*, 86, 356-361.
- Yaylı, N., 2007. Bazı *Teucrium* L. taksonlarında uçucu yağların kimyasal bileşimleri ve antimikrobiyal aktiviteleri. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Yeşilkaya, A., Yeğin A., Özdem S., Aksu T.A., 1998. The effect of bilirubin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in cumene hydroperoxide-treated erythrocytes. *International Journal of Clinical and Laboratory Research*, 28, 230-234.
- Yıldırım, A., 2003. İntakt ve adrenaletomili sıçanların eritrosit ve mide dokularında oksidan ve antioksidan parametrelerin araştırılması. Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum.
- Yılmaz, E., Murat S., 2010. Terpenler. (Bitirme Ödevi), Sakarya Üniversitesi.
- Yılmaz, Ö., Taşkiran D., 2010. Cytotoxicity in astrocyte cultures due to pH changes and protection by glutathione. *Journal Of Neurological Sciences* 27, 61-68.
- Yin, X., Zho, J., Jie C., Xing D., Zhang Y., 2004. Anticancer activity and mechanism of *Scutellaria barbata* extract on human lung cancer cell line A549, *Life Science*, 75, 2233–2244.
- Yokuş, B., Çakır D.Ü., 2012. Kanser Biyokimyası. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1(2), 7-18.
- Zhan, Y.H., Liu J., Qu X.J., Hou K.Z., Wang K.F., Liu Y.P., Wu B., 2012. β -Elemene induces apoptosis in human renal-cell carcinoma 786-0 cells through inhibition of MAPK/ERK and PI3K/Akt/ mTOR signalling pathways. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 13(6), 2739-2744.
- Zhang, Y., Liu Y.B., Li Y., Ma S.G., Li L., Qu J., Zhang D., Chen X.G., Jiang J.D., Yu S.S., 2013. Sesquiterpenes and Alkaloids from the Roots of *Alangium chinense*. *Journal of Natural Products*, 76(6), 1058-1063.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Erzincan'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini İstanbul'da, lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 2003 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünden 2007 yılında başarıyla mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans öğrenimine başladı. 2007-2010 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Biyoloji Anabilim Dalı Genel Biyoloji Bilim Dal'ında Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı. 2010-2013 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Biyoloji Anabilim Dalı Zooloji Bilim Dalı'nda Doktora öğrenimini tamamladı.