

**WİNTERGREEN YAĞININ
ANTİTÜMOROJENİK VE SİTOTOKSİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Kübra ÇELİK

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ
2012
Her Hakkı Saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**WİNTERGREEN YAĞININ ANTİTÜMOROJENİK VE
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Kübra ÇELİK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ERZURUM
2012**

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

WİNTERGREEN YAĞININ ANTİTÜMOROJENİK VE SİTOTOKSİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ danışmanlığında, Kübra ÇELİK tarafından hazırlanan bu çalışma 13/08/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği /oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Turgay ŞİŞMAN

İmza :

Üye : Yrd. Dr. Hakan AŞKIN

İmza :

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP, projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2011-106

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

Yüksek Lisans Tezi

WİNTERGREEN YAĞININ ANTİTÜMOROJENİK VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Kübra ÇELİK
Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

Nöroblastom beyin dokusu içerisinde hızlı bir şekilde yayılabilen ve en sık rastlanılan tümör çeşididir. Özellikle çocukluk dönemlerinde en ölümcül tümör olduğu kabul edilmektedir. Hastalara tedavi yaklaşım protokolleri tek başına veya kombineli uygulanır. Fakat 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, özellikle son yıllarda çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılabilecek doğal ve biyolojik etkili bileşiklerin keşfedilmesi en popüler araştırma konuları arasında yer almaktadır. *Gaultheria* cinsine ait bitkiler karakteristik olarak Wintergreen yağı (WGO) üretmektedirler. WGO halk hekimliğinde, eklem iltihabı, obezite, hipertansiyon, ülser, kemik kırıkları ve ezilmeleri gibi çeşitli sağlık sorunlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenlerle, yüksek lisans tezi olarak sunulan bu çalışma kapsamında WGO'nun normal ve kanserli rat beyin hücre hatları (N2a) üzerine *in vitro* sitolojik ve biyokimyasal etkilerinin doza bağlı olarak ilk defa araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca literatürde tez kapsamında test edilecek olan WGO'nun beyin tümörü hücrelerinde çoğalmayı baskılayıp baskılamadığı konusunda herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda yer alan wintergreen özünün çeşitli konsantrasyonlarda (0-400 mg/L) kültür ortamına ilave edilerek hücre çoğalması üzerine etkileri 3-(4,5 dimetylthiazol -2-yl) - 2,5 diphenltetrazolium bromide (MTT) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Hücre kültürlerinde oksidatif etkilerin değerlendirilmesinde toplam antioksidan kapasite (TAK) ve toplam oksidan durum (TOD) parametreleri kullanılmıştır. Bulgularımız WGO'nun düşük konsantrasyonlarda antioksidan aktivitelerinin varlığını ve yüksek konsantrasyonlarda ise sitotoksik etkili olduğunu açıkça ortaya koymuştur. Ayrıca, WGO nöroblastoma hücrelerine karşı zayıf bir antikanser aktivite göstermiştir. Sonuç olarak, mevcut *in vitro* araştırmalar kapsamında elde edilen bulgular doğrultusunda WGO'nun kanserin önlenmesinde ve tedavisinde düşük bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir.

2012, 55 sayfa

Anahtar Kelimeler: Nöroblastom, MTT, Wintergreen yağı, N2a, *in vitro*, oksidatif durum, sitotoksisite, hücre kültürü

ABSTRACT

Master Thesis

THE INVESTIGATION OF ANTITUMORIGENIC AND CYTOTOXIC PROPERTIES BY WINTERGREEN OIL

Kübra ÇELİK

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. Especially, they are accepted as most fatal tumours in childhood. The treatment protocols for these patients are applied single or combined. But 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. The *Gaultheria* species share the common characteristic of producing oil of wintergreen. Wintergreen oil (WGO) is commonly used as a folk remedy for several health problems including arthritis, obesity, edema, hypertension, inflammation, ulcers and broken or bruised bones. For these reasons, it was aimed to search the cytological and biochemical effects of WGO on healthy cells (neuron) and N2a brain cell lines in relation with the dose for the first time in the extent of this master thesis. Notwithstanding, there were no investigation on whether WGO supressed the cell proliferation in brain tumour cells. The effects of WGO at various concentrations (0-400 mg/L) 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. Our results clearly revealed that WGO exhibited antioxidant activities at their low doses and cytotoxic at high doses. Again, WGO showed weak anticarcinogenic activitiy against neuroblastoma cells. In conclusion, within the light of the findings of this in vitro study, it is possible to denote that WGO has low potential in cancer prevention and therapy.

2012, 55 pages

Keywords: Neuroblastoma, MTT, Wintergreen oil, N2a, *In vitro*, Oxidative status, Cytotoxicity, Cell culture.

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, öğrencisi olmaktan onur duyduğum ve tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalarımда yardım ve desteğini gördüğüm değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Abdulgani TATAR'a ve Sayın Doç. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında bana destek veren ve tezimin hazırlanma aşamasında yardımını esirgemeyen arkadaşım Başak TOĞAR' a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuar çalışmalarımа katkılarından dolayı Sayın Arş. Gör. Damla ÇETİN ve Elanur AYDIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman olduğu gibi her türlü maddi ve manevi desteğiyle yine yanımda olan sevgili babam Yunus ÇELİK'e, sevgili kardeşlerime ve özellikle sevgi ve moral kaynağım canım annem Zeynep ÇELİK'e sonsuz sevgi, minnet ve şükranlarımla teşekkürlerimi sunarım. Bugünlere gelmemde emeği büyük olan sevgisi, ilgisi ve anlayışı ile her zaman yanımda olan güzel insan canım anneannem Fikriye CANDAN'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu (2011/106 nolu proje ile) tarafından desteklenmiştir.

Kübra ÇELİK

Ağustos 2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Uçucu Yağların Tanımı ve Özellikleri.....	2
1.2. <i>Gaultheria</i> Bitkileri.....	3
1.3. WGO'nun Kullanım Alanları.....	7
1.4. WGO'nun Toksisitesi.....	8
1.5. WGO'nun İçeriği.....	9
1.6. Terpenler.....	10
1.7. Kanser.....	19
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	26
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	30
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	30
3.2. Kullanılan Laboratuvar Gereçleri ve Cihazlar.....	30
3.3. Deney Hayvanları ve Nöron Kültürleri.....	31
3.4. MTT Analizi.....	33
3.5. Toplam Antioksidan Kapasite.....	35
3.6. Toplam Oksidan Durum.....	36
3.7. İstatiksel Analizler.....	37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	38
4.1. WGO Maruziyetinin <i>In Vitro</i> Şartlarda Oluşturduğu TAK Değerleri.....	38
4.2. WGO Maruziyetinin <i>In Vitro</i> Şartlarda Oluşturduğu TOD Değerleri.....	39
4.3. <i>In Vitro</i> Şartlarda WGO Maruziyeti Sonrasında Elde Edilen MTT Analiz Değerleri.....	39

5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	41
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	56

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

COMET	Tek hücre jel elektroforezi
DNA	Deoksiribonükleik asit
g	Gram
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH	İndirgenmiş glutasyon
HBSS	Hank's Blanced salt solution
IPP	İzopentil pirofosfat
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mmol	milimol
MSS	Merkezi sinir sistemi
MTT	3-[(5-Dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue
NB	Nöroblastom
nm	Nanometre
SOD	Süperoksit dismutaz
TAK	Toplam antioksidan kapasite
TOD	Toplam oksidan durum
WGO	Wintergreen yağı
%	Yüzde konsantrasyon
µL	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Gaultheria procumbens</i> 'in yayılışı	4
Şekil 1.2. <i>Gaultheria procumbens</i> 'in çiçeği	5
Şekil 1.3. <i>Gaultheria procumbens</i> 'in meyvesi	5
Şekil 1.4. <i>Gaultheria procumbens</i>	6
Şekil 1.5. <i>Gaultheria procumbens</i>	6
Şekil 1.6. İzopren birimi	11
Şekil 1.7. Terpenlerin oluşumu	12
Şekil 1.8. Mirsen bileşiğinin kimyasal yapısı	15
Şekil 1.9. Limonen bileşiğinin kimyasal yapısı	15
Şekil 1.10. α -pinen bileşiğinin kimyasal yapısı	16
Şekil 1.11. delta-3-Karen bileşiğinin kimyasal yapısı	16
Şekil 1.12. 3,7-Guaiadiene bileşiğinin kimyasal yapısı	17
Şekil 1.13. delta-Kadinen bileşiğinin kimyasal yapısı	18
Şekil 3.1. Araştırmalarımızda kullanılan WGO örneği	32
Şekil 3.2. Nöron kültürü hazırlama aşamaları	33
Şekil 3.3. MTT solüsyonu eklenmiş plate'in üstten görünüşü	34
Şekil 3.4. TAK solüsyonu eklenmiş plate'in üstten görünüşü	36
Şekil 3.5. TOD solüsyonu eklenmiş plate'in üstten görünüşü	37
Şekil 4.1. <i>In vitro</i> koşullarda WGO'nın oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri	38
Şekil 4.2. <i>In vitro</i> koşullarda WGO'nın oluşturduğu toplam oksidan durum değerleri	39
Şekil 4.3. WGO maruziyeti sonrasında gözlenen hücre canlılık yüzdeleri	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Wintergreen yağının monoterpen bileşenleri	10
Çizelge 1.2. Wintergreen yağının seskiterpen bileşenleri.....	10
Çizelge 1.3. Terpenlerin sınıflandırılması	13

1. GİRİŞ

Günümüzde tıbbi bitkilerin ve bu bitkilere ait uçucu yağların saf ve özellikle ana etken maddelerinin elde edilmesi hem bilimsel hem de ekonomik açıdan oldukça önemlidir (Kırbağ ve Bağcı 2000; Karabacak 2007; Çelik ve Çelik 2007). Bitkiler, kendilerine zarar verebilecek çeşitli etmenlere karşı (böcek, virüs, nematod, memeli gibi canlılar) kendilerini korumak amacıyla sekonder metabolitler, antimikrobiyal özellikteki proteinler, antioksidanlar ve savunma proteinlerini üretmektedirler (Koç ve Üstün 2008). Bu maddelerin tedavi edici özelliklerini keşfeden insanoğlu eski çağlardan beri bitkileri ve ekstraktlarını ilaç olarak kullanmaya başlamıştır (Yumrutaş 2007; Newman and Cragg 2007). Eski Çin, Mısır, Yunanistan, İran ve diğer bazı Avrupa ülkelerinde bitkilerin iyileştirici etkisinden yararlanılmıştır (Yumrutaş 2007). 1900'lerin başlarında bitkilerin tedavi edici özellikleri laboratuvarlarda araştırılmaya başlanmıştır (Dorman and Deans 2000). Tedavi amacıyla kullanılan ilk etken madde 1805'te Alman kimyacı Serturme tarafından bulunan ve afyon bitkisinden elde edilen morfindir (Baytop 1984; Kıvrak 2006; Akay Diri 2006).

Son yıllarda yapılan araştırmalarda, bitkilerin sekonder metabolizma ürünü olan uçucu yağların, antimikrobiyal (Guenther 1948; Burt 2004; Skočbušić *et al.* 2006; El Bouzidi *et al.* 2012), antibakteriyal (Deans and Ritchie 1987; Dorman and Deans 2000; Mourey and Canillac 2002; Rasooli and Mirmostafa 2002), antifungal (Mari *et al.* 2003), antiviral (Bishop 1995; Wu *et al.* 2010), antiparazitik (Pandey *et al.* 2000; Pessoa *et al.* 2002), antioksidan (Wang *et al.* 2011; Boligon *et al.* 2012), antikarsinojenik (Jo *et al.* 2012; Wang *et al.* 2012), insektisidal (Guenther 1948; Konstantopoulou *et al.* 1992; Karpouhtsis *et al.* 1998; Mahmoud and Croteau 2002; Burt 2004) ve antimitotik (Azzoua and Bullerman 1982; Akgül and Kıvanç 1988; Jayashree and Subramanyam 1999; Kaya 2007) özellikler gösterdiği rapor edilmiştir. Bundan dolayı söz konusu metabolitler farmakolojide, eczacılıkta, fitopatolojide, tıbbi ve klinik mikrobiyolojide, koruyucu madde olarak da gıdalarda kullanılmaktadır (Dorman and Deans 2000; Magiatis *et al.* 2002). Diğer taraftan, bitkilerden elde edilen bu bileşenlerin sentetik ilaçlardan daha kolay ve ucuz elde edilmeleri, bitkisel ilaçların birden çok etkiye sahip

olmasına karşın sentetik ilaçların tek bir etkiye sahip olmaları ve bazılarında görülen ciddi yan etkiler nedeniyle bitkisel tedaviler yoğun olarak araştırılmaktadır (Baytop 1999; Pervaiz 2004; Işık 2005; Akay Diri 2006; Yumrutaş 2007).

1.1. Uçucu Yağların Tanımı ve Özellikleri

Uçucu yağlar, bitkilerden ya da bitkisel droglardan çeşitli yöntemlerle elde edilen, oda sıcaklığında sıvı halde olan, su buharı ile sürüklenabilen, kolaylıkla kristalleşebilen uçucu özellikte olup kendine has koku, tat, renk ve görünüme sahip homojen karışımlar olarak tanımlanır. Uçucu yağlar açıkta bırakıldıklarında oda sıcaklığında bile buharlaşabildiklerinden dolayı bunlara “uçucu yağ” veya “eterik yağ” olarak isimlendirilmektedir. Ayrıca uçucu yağlar genellikle hoş kokulu olduklarından ve parfüm sanayisinde de kullanıldıklarından dolayı da “esans” olarak da adlandırılmaktadırlar (Baytop 1983; Tanker ve Tanker 1985; Ceylan 1987; Çelen 2006; Başer 2006; Akay Diri 2006; Diri 2006; Çelik ve Çelik 2007; Koltuksuz 2007; Şengezer ve Güngör 2008).

Uçucu yağ terimi ilk kez 16. yüzyılda İsveçli tıp reformcusu olan Paracelsus von Hohenheim’in ilaçların etken bileşimini “Quinta essentia” olarak isimlendirmesiyle ortaya çıkmıştır (Guenther 1948). Uçucu yağlar, bitkinin çiçek, tomurcuk, yaprak, dal, tohum, meyve ve köklerinden elde edilmektedir (Dorman and Deans 2000; Burt 2004; Çelen 2006). Bitkilerden uçucu yağ elde edebilmek için distilasyon metodu ilk kez 2000 yıl önce Mısırlılar, Persler ve Hintliler tarafından kullanılmış ve 9. yüzyılda Araplar tarafından geliştirilmiştir (Bauer *et al.* 2001).

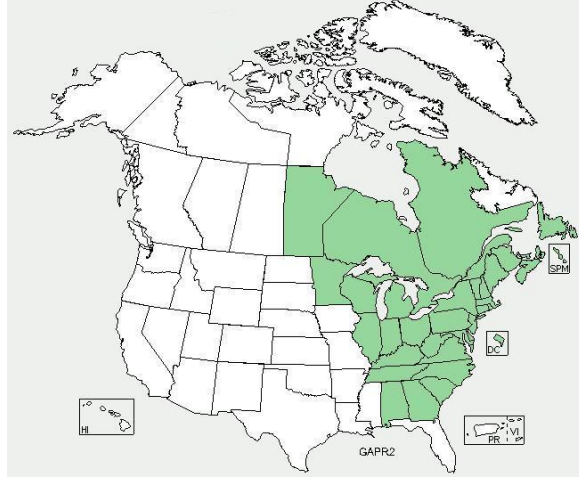
Uçucu yağlar genellikle suda az çözünürken etenol, benzen, eter, petrol eteri gibi organik çözücülerde ve sabit yağlarda çok çözünürler (Koltuksuz 2007). Uçucu yağın bitkide ya doğrudan doğruya protoplazmasında ya da hücre çeperinin özel bir tabakası olan reçinemi tabakanın dekompozisyonu ile oluştuğu ileri sürülmekle birlikte glikozitlerin hidrolizi ile de meydana gelebildiği belirlenmiştir (Baytop 1972, 1986, 1999; Tanker ve Tanker 1985; Demirçakmak 1994; Çelen 2006).

Uçucu yağların bitkilerde neden oluştuğu tam olarak bilinmemektedir. Fakat bitkilerde koruyucu, tozlaşmayı kolaylaştırıcı, su kaybını azaltıcı, yaralanmalarda onarıcı görevlerde bulunduğu düşünülmektedir (Baytop 1986; Çelen 2006).

Uçucu yağlar farmaside farmakolojik ve terapik etkilerine göre de gruplandırılır. Uçucu yağların nervinatik (sinir yatıştırıcı), rubefiyen (deriyi kızartan), irritan (uyarıcı), ekspektoran (balgam söktürücü), antitussif (öksürüğü kesen), antiromatizmal, diüretik (idrar söktürücü), emmenagog (adet söktürücü), stomasik (midevi), karminatif (gaz giderici), koleretik (safra sökücü), antihelmintik (solucan düşürücü), antienflamatuar, antiseptik (mikrop üremesini önleyici), antibiyotik (bakteri öldürücü), antifungal, antioksidan, sedatif (gevşetici), ağrı kesici, stres azaltıcı ve aynı zaman da antikanser etkiye sahip oldukları bilinmektedir (Ceylan 1987; Duru 1993; Zeybek ve Zeybek 2002; Bağci and Başer 2005; Çelen 2006; Yaylı 2007).

1.2. *Gaultheria* Bitkileri

Gaultheria procumbens, Ericaceae (fundagiller) familyasına ait olup (Dwellely 1977) Kuzey Amerika kıtasının kuzeydoğusundan batı Newfoundland, güneydoğu Manitoba ve güney Alabama'ya kadar olan bölgelere özgü bir bitkidir (Mirick and Quinn 1981). *Gaultheria* cinsinin ismi 1753 yılında hekim ve doğa bilimcisi olan Jean-François Gaulthier'i adına atfen verilmiştir (Anonim-1 2011). Bitkinin Kuzey Amerika kıtasındaki yayılışı Şekil 1.1'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.1. *Gaultheria procumbens*'in yayılışı (www.plants.usda.gov adresinden alınmıştır)

Gaultheria procumbens genellikle 10-15 cm boyunda olup yavaş büyüyen küçük otsu bir çalıdır. Yeşil renkli aromatik yapraklara sahiptir. Yaprakları 2-5 cm uzunluğunda, 1-2 cm genişliğinde oval-eliptik şekillidir. Çiçekler 5mm uzunluğunda çan şeklinde olup beyaz renklidir. *Gaultheria procumbens*'e ait çiçek resmi Şekil 1.2'de verilmiştir. *Gaultheria procumbens*'in meyvesi 6-9 mm çapında ve parlak kırmızı renkte olup etli kaliks ile çevrili kuru bir kapsülü vardır. İlkbaharın sonlarında çiçek açıp, yazında kiraz şeklindeki meyveleri bir sonraki ilkbahara kadar devam etmektedir (Chou 1952). Bu bitkinin yaprakları ve meyveleri yenilebilmektedir (Gaudet 2011). *Gaultheria procumbens*'e ait meyve resmi Şekil 1.3'de verilmiştir.



Şekil 1.2. *Gaultheria procumbens*'in çiçeği (www.wikipedia.org adresinden alınmıştır)



Şekil 1.3. *Gaultheria procumbens*'in meyvesi (www.wikipedia.org adresinden alınmıştır)

Gaultheria procumbens toprağın üst kısmının 20-30 mm içinde uzun rizomlar vasıtasıyla yayılmaktadır. Genellikle ormanlık arazilerde, asitli topraklarda yetişmektedir (Anonim-2 2011). Kuraklığa dayanıklılığın yanı sıra -35°C gibi düşük sıcaklıklara bile dayanabilen bir bitkidir (Anonim-3 2011; Anonim-4 2011). Yarı

gölgeli yerlerden hoşlanmasına rağmen güneşli havalarda meyve vermektedir (Robinette 1974; Matlack and Good 1989; Kudish 1992; Anonim-2 2011). Bitkiye ait resimler Şekil 1.4 ve Şekil 1.5’de verilmiştir.



Şekil 1.4. *Gaultheria procumbens* (www.wikipedia.org adresinden alınmıştır)



Şekil 1.5. *Gaultheria procumbens* (www.wiseacre-gardens.com adresinden alınmıştır)

Gaultheria procumbens bitkisi genellikle ‘‘Wintergreen’’ olarak adlandırılmaktadır. Wintergreen terimi; genellikle yıl boyunca yeşil kalan bitkiler için kullanılan ‘‘yaprak dökmeyen (evergreen)’’ kelimesiyle eş anlamlı olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, Kanada çayı, Checkerberry, Deerberry, Ground berry (kara dut), Hillberry, Dağ çayı, Partridge berry, Spiceberry, Spicy wintergreen (baharatlı pirola), Spring wintergreen (bahar pirolası), Wax cluster (Lust 1974), Keklik üzümü ve Teaberry diğer yaygın isimleridir.

Wintergreen yağı (WGO), *Gaultheria procumbens*'in yapraklarından buhar damıtma yoluyla elde edilir. Amerikan Devrimi sırasında, wintergreen yaprakları azalan çay için bir alternatif olarak kullanılmıştır (Rister 2011). Wintergreen meyveleri, turta yapmak için kullanılmıştır (Duke *et al.* 1985). Wintergreen'i Kızılderililer romatizmal belirtiler, baş ağrısı, soğuk algınlığı belirtileri, ateş, boğaz ağrısı, karın ve kas ağrıları ile çeşitli ağrı ve sızıları hafifletmek için yapraklarından çay demlemiştir. Meyvelerinin kurutulması sonucu elde edilen çayı, mide bulantısını gidermek için kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra avcılık veya ağır yükleri taşıırken, akciğer kapasitesini artırmak ve ayrıca diş çürümelerini önlemek amacıyla da Kızılderililer tarafından yapraklarının çiğnendiği bilinmektedir (Dobelis 1986; Chevallier 1996; Rister 2011; Anonim-5 2011).

1.3. WGO'nun Kullanım Alanları

WGO, artrit, selülit, obezite, ödem, zayıf kan dolaşımı, baş ağrısı, kalp hastalığı, hipertansiyon, romatizma, tentinit, kramplar, enflamasyon, egzama, saç bakımı, sedef hastalığı, gut, ülser, kırılmış ya da incinmiş kemikler, kas ve eklem rahatsızlığı için tropikal veya aromaterapi olarak kullanılmaktadır (Lawless 1995). Wintergreen, sakız, nane şekeri ve diğer nane aromalı ürünler ile şekerlerden snus ve dipping tütün gibi dumansız tütünlere kadar değişen Amerikan ürünlerin de yaygın bir tatlandırıcıdır. Genellikle şeker tatlandırıcısı olarak kullanılan metil salisilatın en yüksek miktarı %0.04'tür. Aynı zaman da gargara ve diş macunu gibi diş temizliği ürünleri için de yaygın bir tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Anonim-6 2011). Reçetesiz olarak satılan ağrı kesici merhemler de (over the counter), burun tıkanıklığını açmak için

solunan buharlarda, nefes spreyleri, Pepto Bismol© gibi ilaçlarda kullanılan bir bileşendir (Gaudet 2011; Anonim-7 2011). Suni WGO, metil salisilat, yüksek kırılma indisi nedeniyle mikroskopta kullanılmaktadır (Cecilia 2000). Ayrıca bazı parfümeri uygulamalarında ve alkolsüz içecekler (meşrubat) için tatlandırıcı bir ajan olarak kullanılmaktadır (Gurung 2007).

WGO'nun analjezik, ağrı kesici, anti-romatizmal ve anti-artritik, anti-spazmodik, anti-septik, kanamayı durdurucu, gaz giderici, diüretik gibi tıbbi özellikte kullanılmasının yanı sıra yılan sokması, köpek ısırığı ile akrep, arı, eşek arısı gibi zehirli böceklerin sokmalarını tedavi etmek için de kullanılmaktadır. Aynı zamanda, ısıtma etkisi ile çok düşük sıcaklıklarda ve dondan kaynaklanan tıkalı kan dolaşımı mücadelesi için kullanılabilir. (Anonim-8 2011; Anonim-9 2011; Anonim-10 2011).

1.4. WGO'nun Toksisitesi

Yutulduğu takdirde, diğer uçucu yağlar gibi WGO'da içeriğindeki yüksek konsantrasyonlu sıvı metil salisilat nedeniyle çoğu zaman ölümcül zehirlenmelere neden olabilmektedir. Böyle bir duruma maruz kalan kişilerin kusması gerekmektedir (Duke *et al.* 1985; Howrie *et al.* 1985).

Çocuklar genellikle "şeker" ile wintergreen yağın hoş kokusunu ilişkilendirebilmektedirler. Ancak yağ, özellikle çocuklar için zehirli olabilmektedir. Bir çay kaşığı (5 ml) WGO, yaklaşık 7000 mg salisilat veya 21,5 yetişkin Aspirin tablete eşdeğerdir (Botma *et al.* 2001). Bir yetişkin de 6 ml ve bir çocukta 4 ml kadar az yutma ölümcül olmuştur (Howrie *et al.* 1985; Tyler *et al.* 1985; Dreisbach and Robertson 1987). Bitkinin yenilmesi sonucu hiçbir ölüm bildirilmemiştir (Simon 1984). WGO'nun küçük oral dozları sindirim ve mide sekresyonunu uyarır (Duke *et al.* 1985). Başka bir vaka raporunda WGO'nun yanlışlıkla alımından sonra larinks ödemi gelişen bir hasta belgelenmiştir (Botma *et al.* 2001). Uçucu yağ ve bileşeni deri yoluyla absorbe olabilmektedir; böylece, salisilat zehirlenmesi metil salisilat veya WGO topikal uygulama sonrası ortaya çıkmaktadır. Metil salisilat ve asetilsalisilik asit (aspirin)

arasındaki yapısal benzerlik nedeniyle uzun süreli dönemlerde yutan kişilerde salisilizm de görülen benzer bir toksik sendrom görülmüştür. Bu sendrom, kulak çınlaması, bulantı ve kusma ile karakterize edilmiştir (Duke *et al.* 1985). Sedef hastalığının tedavisi için WGO içeren bitkisel cilt kremi uygulayan bir kişi de 1 saat içinde aniden hastalanıp hiperpne, kusma, terleme, ateş ve merkezi sinir sistemi bozukluğunun ardından kulak çınlaması şikâyetleri meydana gelmiştir (Bell and Duggin 2002). Bir başka vaka raporunda ise 70 yaşındaki Asyalı bir kadın kronik diz ağrısı için satın aldığı tropikal Yick Hung Fa yağı yutması sonucu metil salisilat zehirlenmesine benzer (örneğin, asit-baz bozuklukları, endokrin anormallikler, sıvı ve elektrolit dengesizlikleri, CNS toksisitesi) klinik bulgular gelişmiştir (Hofman *et al.* 1998). Bir diğer vaka raporunda ise Wintergreen ile tatlandırılmış bir tartar kontrol diş macunu kullanımından sonra hırıltılı nefes alma, kuru öksürük ve bronşiyal ağrıları şikâyeti olan astım hastası 21 yaşındaki sigara içmeyen kadın da potansiyel aşırı bir duyarlılık reaksiyonu belgelenmiştir (McCarthy 1992; Anonim-11 2011).

1.5. WGO'nun İçeriği

WGO, ilaç kokusunu andıran kendine has tatlı bir odunsu kokuya sahiptir. Soluk sarı ya da pembemsi renkte olup akışkan güçlü aromatik bir sıvıdır.

Bileşenleri: metil salisilat (yaklaşık %98), α -pinen, mirsen, delta-3 karene, limonen, 3,7-guaiadiene ve delta-kadinen olup terpenler grubunda yer alan monoterpen ve seskiterpen bileşikleridir (Gurung 2007). Wintergreen yağının içerdiği bileşenler ve yüzdelik oranları Çizelge 1.1 ve Çizelge 1.2'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Wintergreen yağının Monoterpen bileşenleri (Juliani *et al.* 2004)

SN	Bileşenler	%
1	alfa-pinen	0.4
2	Mirsen	0.2
3	delta-3-karen	0.9
4	Limonen	0.5
5	Metil salisilât	97.4
Toplam monoterpen		99.4

Çizelge 1.2. Wintergreen yağının Seskiterpen bileşenleri (Juliani *et al.* 2004)

SN	Bileşenler	%
1	3,7-Guaiadiene	0.1
2	delta-Kadinen	0.3
Toplam Seskiterpen		0.4

1.6. Terpenler

Terpenler doğal bileşikler içerisinde en yaygın olup yapıları oldukça farklılık gösteren küçük organik moleküllerdir. Terpenler çeşitli bitkilerden elde edildikleri gibi bazı böceklerin osmeterium'larından (örneğin *Papilionidae* cinsindeki kelebekler) terpen salgılamaları ile de elde edilirler (Çöl 2007).

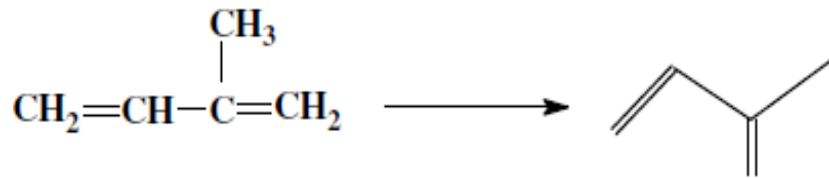
Kimyasal anlamda terpenler belli sayıda izopren birimlerinden oluşan $(C_5H_8)_n$ formülü ile karakterize edilen bileşikler olarak tanımlanır (Umay 2007; Karahan 2007; Karabacak 2007) ve burada n, bağlanmış izopren ünitelerinin sayısını göstermektedir (Çöl 2007). İzopren birimi Şekil 1.6'da verilmiştir.

Terpenlerin tümü dimetildifosfatın izomerizasyonu sonucu oluşan izopentildifosfattan türevlenir (Davis and Croteau 2000).

Terpenler fiziksel özelliklerine göre iki grupta incelenir:

- Uçucu Terpenler: Su buharı distilasyonu ile sürüklenabilen küçük moleküllü monoterpenler ve bazı seskiterpenlerdir.
- Uçucu Olmayan Terpenler: Büyük moleküllü seskiterpenler, diterpenler, sesterpenler, triterpenler ve politerpenlerdir (Çöl 2007).

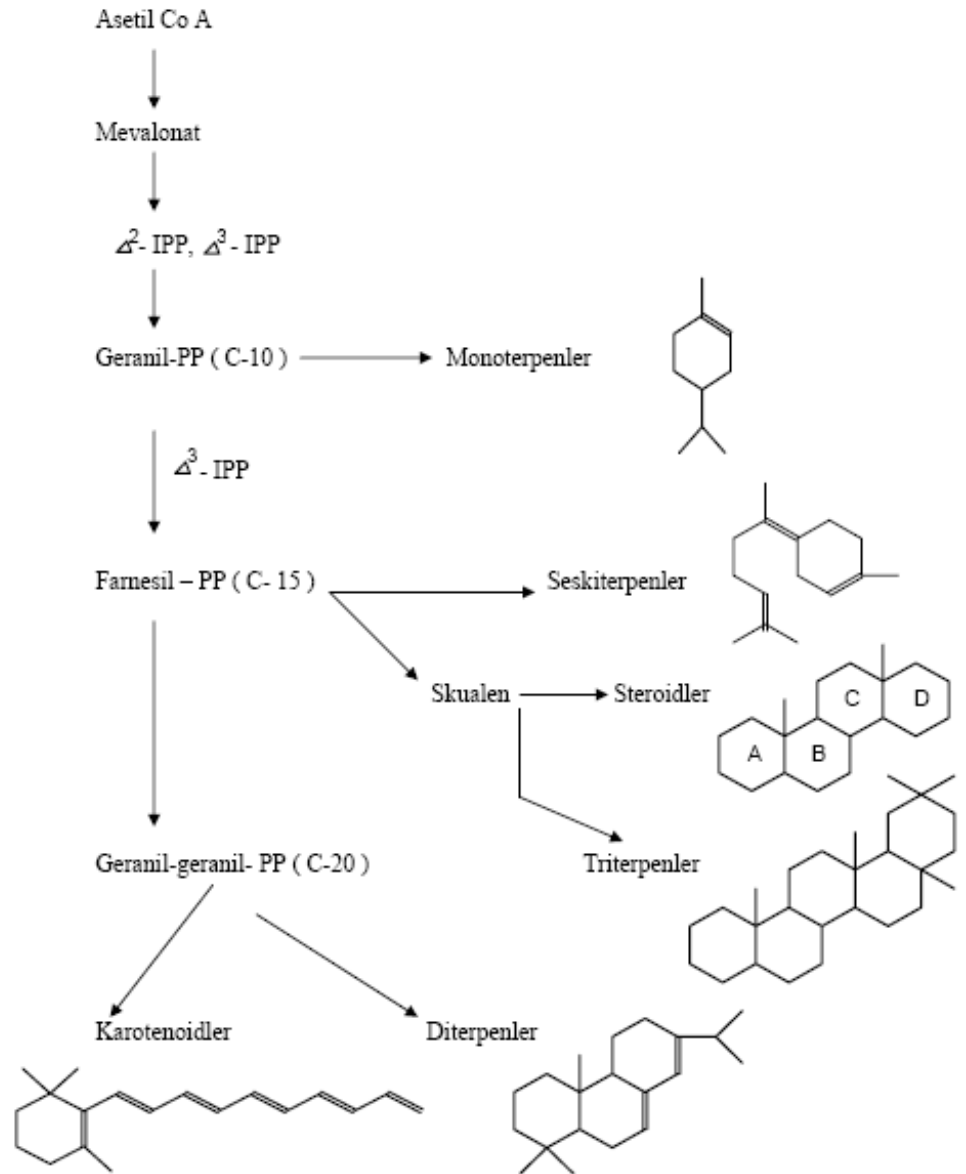
Terpenler, doğal insektisid olarak kullanılabilmeleri, antimikrobiyal özellikleri, kişisel bakım ve ev temizlik maddelerinde kullanılmaları, yiyecek ve içeceklere tat ve aroma katmaları, bazı tarım ürünlerinin depolanmasında ve birçok önemli bileşiğin sentezinde kullanılmaları nedeniyle ticari olarak da büyük bir öneme sahiptirler (Yılmaz ve Murat 2010).



Şekil 1.6. İzopren birimi

Mevalonik asit, terpenlerin biyosentezinde büyük rol oynamaktadır. Mevalonik asidin su (H₂O) ve karbondioksit (CO₂) kaybetmesi sonucu izopren birimleri oluşur. Mevalonik asidin başlangıç maddesi asetil koenzimA'dır. Asetil koenzimA birçok doğal bileşiğin yapı taşı iken mevalonik asit sadece terpenlerin yapı taşıdır. Mevalonik asitin ATP ile reaksiyona girmesiyle mevalonik asit 5-pirofosfat oluşur ve OH grubunun fosforlanması, dekarboksilasyonu ve dehidrasyonu sonucu izopentil pirofosfat (IPP) oluşur. IPP'nin izomerizasyonu sonucu dimetilalelil esteri oluşur. Bu iki izomerin birleşimi ile geraniol pirofosfat meydana gelir. Geraniol pirofosfatın dehidrasyonu

sonucu geraniol oluşur. Geraniol monoterpenerin biyosentezinde kullanılmaktadır. IPP ve geraniol pirofosfatın birleşimi farnesil pirofosfatın oluşumunu sağlar. Bu yapı seskiterpenlerin biyosentezinde kullanılmaktadır. Farnesil pirofosfatın IPP ile kondenzasyonu geranil-geranil pirofosfatın oluşumunu sağlar. Bu yapı diterpenlerin biyosentezinde rol alır (Davis and Croteau 2000; Işık 2005; Karahan 2007). Asetil koenzimA'dan başlayarak biyosentez yoluyla oluşan terpenler Şekil 1.7'de gösterilmektedir.



Şekil 1.7. Terpenlerin oluşumu (Işık 2005)

Terpenlerin Sınıflandırılması

İzopren ünitelerinin bağlanması sonucu terpenler, izopren ünitesinin büyüklüğüne göre hemiterpenler, monoterpenler, seksiterpenler, diterpenler, sesterpenler, triterpenler, tetraterpenler ve politerpenler olarak sınıflandırılırlar (Çöl 2007).

Çizelge 1.3. Terpenlerin sınıflandırılması

izopren ünitesinin sayısı	Sınıfı	Karbon Sayısı
1	hemiterpenler	5
2	monoterpenler	10
3	seksiterpenler	15
4	diterpenler,	20
5	sesterpenler	25
6	triterpenler	30
8	tetraterpenler	40
N	politerpenler	(5) _n

Hemiterpenler

Hemiterpenler terpenlerin en küçük birimini içerirler. C_5H_8 formülüne sahiptirler (Kınci 2005). Hemiterpenler bitkisel dokularda birikmeyen fakat alkaloidler, kumarinler ve flavonoidlerle ilişki halinde olan tek izopren biriminden oluşan terpenik bileşiktir (Kıvrak 2006).

Monoterpenler

Terpenlerin en küçük birimleri olan monoterpenler iki izopren biriminin kondenzasyonu sonucu oluşurlar (Karahana 2007). $C_{10}H_{16}$ molekül formülüne sahip olan bu terpenler yüksek yapılı bitkilerde bulunmakla birlikte Bryophyta (ciğerotları), bakteri, fungus

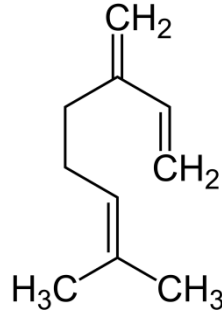
(mantar), deniz canlıları (alg, yosun, yumuşakçalar vb.) ile böceklerin koruma ve feromoral salgılarında da bulunmuştur. Bunların yanı sıra timsah ve kunduz gibi gelişmiş canlıların salgı organlarında da monoterpen ve türevlerinin bulunduğu bildirilmiştir (Connolly and Hill 1991; Harborne 1991; Robbers *et al.* 1996; Rohmer 1999; Başer 2002; Breitmaier 2006; Başer and Demirci 2007; Karahan 2007).

Monoterpenler yapısal olarak farklı olup yaklaşık 35 farklı yapısı vardır. Monoterpenlerin en önemli karakteristik özelliği uçuculuğu ve keskin kokuları olup bitkilerde tat ve kokudan sorumlu olan bileşenlerdir (Robbers *et al.* 1996).

Monoterpenler çok eski zamanlardan bu yana birçok hastalığın tedavisinde etkin olarak kullanılmıştır. Yaygın kullanımlar arasında; antiseptik (timol, sineol), antibakteriyal, antifungal, antiviral, rubefiyen (terementi yağı), kaşıntıya karşı (mentol), acı tonik, iştah açıcı, gastrointestinal rahatsızlıklarda, ekspektoran, sedatif, anestetik (öjenol), analjezik, antioksidan, antitussif, antiakne, antiinflamatuvar vb. etkileri bilinmektedir. Monoterpenlerin hücre düzeyinde enerji metabolizmalarına etki ettikleri bulunmuş olup, son zamanlarda *in vitro* ve *in vivo* deneylerle de desteklenen sonuçlara göre, bazı kanser türlerinin (meme, karaciğer, akciğer, pankreas, prostat vb.) önlenmesinde ve tedavisinde etkin oldukları ispatlanmıştır (Brunke 1986; Connolly and Hill 1991; Dıplöck *et al.* 1999; Dorman and Deans 2000; Wagner and Elmadfa 2003; Burt 2004; Fararh *et al.* 2005; Berger 2007; Edrıs 2007; Seifried *et al.* 2007; Wei and Shibamoto 2007).

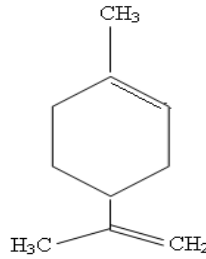
Monoterpenler asiklik, monosiklik ve bi-siklik olmak üzere üç grupta incelenirler. (Umay 2007).

Asiklik Monoterpenler: Bu terpenler düz zincir halindedir ve 3 çift bağ taşırlar. Optikçe aktiflikleri yapılarında taşıdıkları asimetric karbon atomundan ileri gelmektedir. Mirsen monoterpen bu grupta yer alır (Sakar ve Tanker 1991; Kıvrak 2006; Akay Diri 2006). Bu bileşik parfüm üretiminde ara ürün olarak kullanılmaktadır (Koyuoğlu 2008). Mirsenin kapalı formülü Şekil 1.8'de gösterilmiştir.



Şekil 1.8. Mirsen bileşiğinin kimyasal yapısı (www.wikimedia.org adresinden alınmıştır)

Monosiklik Monoterpenler: Bir halka ve iki çift bağ taşırlar (Akay Diri 2006; Kıvrak 2006; Çöl 2007). Limonen, monosiklik monoterpen sınıfına ait bir hidrokarbondur. Renksiz, oda sıcaklığında sıvı olan ve çok keskin portakal kokusuna sahip bir bileşiktir. İsmi limondan alır ve diğer narenciye meyvelere kokusunu veren bileşiktir. Endüstriyel olarak; gıdalara limon ve portakal tadı vermede, kozmetikte ve temizlik ürünlerinde özellikle de el temizliğinde kullanılan ürünlere limon ve portakal kokusunu vermek amacıyla kullanılmaktadır (Akay Diri 2006; Çöl 2007). Limonenin kapalı formülü Şekil 1.9’da gösterilmiştir.

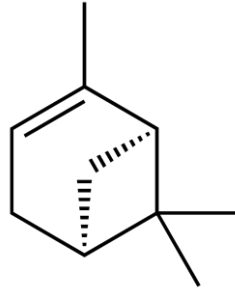


Şekil 1.9. Limonen bileşiğinin kimyasal yapısı (www.wikimedia.org adresinden alınmıştır).

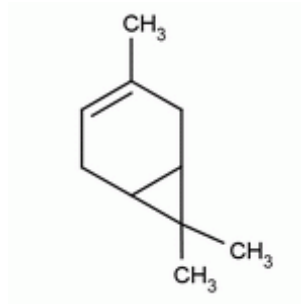
Bisiklik Monoterpenler: Bisiklik monoterpenler iki halka ve bir çift bağ taşırlar (Çarıkcı 2005; Akay Diri 2006; Kıvrak 2006). Bisiklik monoterpen sınıfına ait olan pinen, kapalı formülü $C_{10}H_{14}$ olup hafif çam kokulu, renksiz bir sıvıdır. Bu bileşik doğada en bol bulunan ve en kolay elde edilen hidrokarbonlardandır. Kullanım alanları çok geniştir. Aynı zamanda pinen, böceklerin kimyasal haberleşme sistemlerinde

kullandığı bir bileşiktir. Doğada α -pinen ve β -pinen olmak üzere iki izomeri bulunur. α -pinene geranil pirofosfattan türetilir (Çöl 2007; Balkancı 2010). α -pinenin kapalı formülü Şekil 1.10'da gösterilmiştir.

α -pinen tat ve koku monoterenoidlerinin üretimi için substrat olarak kullanılan doğal monoterependir. α -pinenin asit katalizli hidrasyonu ve asetoksilasyonu parfüm ve farmasöptik endüstride uygulanabilir değerli terpenik alkoller ve esterlerin önemli sentez yollarındandır (Yadav 2008). α -pinenin toksik özelliklerinin tam olarak incelenmemiş olmasına rağmen, yüksek konsantrasyonlarda cilt, göz, solunum sistemi ve mukoz membranlarında tahrip edici olduğu bilinmektedir (Balkancı 2010). delta-3-Karen monotereninin kimyasal yapısı Şekil 1.11'de verilmiştir.



Şekil 1.10. α -pinen bileşiğinin kimyasal yapısı (www.wikimedia.org adresinden alınmıştır)



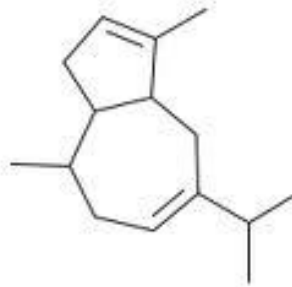
Şekil 1.11. delta-3-Karen bileşiğinin kimyasal yapısı (www.wikimedia.org adresinden alınmıştır)

Seskiterpenler

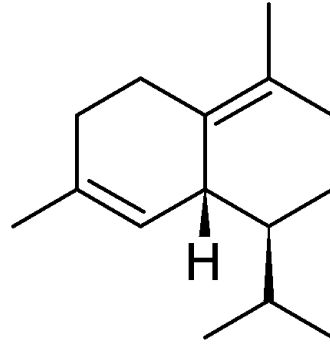
Seskiterpenler doğada geniş bir dağılıma sahip olup terpenlerin en geniş sınıfını oluştururlar (Robbers *et al.* 1996). Monoterpenlerin yapı taşı olan geranil pirofosfatın IPP ile kondenzasyonu sonucu oluşurlar (Çöl 2007). $C_{15}H_{24}$ molekül formülüne sahiptirler (Tyler *et al.* 1988). Diğer terpenlere göre nispeten kaynama noktası yüksek uçucu yağlardır (Yaylı 2007).

Seskiterpenler asiklik, monosiklik, bisiklik, trisiklik, tetrasiklik olmak üzere 5 farklı yapıya sahiptirler (Çöl 2007).

Seskiterpen laktonları diğer seskiterpenlerden ayıran özellik bir α -metilen- γ -lakton sistemine sahip olmalarıdır. Birçoğu α - β doymamış karbonil grupları içerir. Antimikrobial ve antitümör aktiviteye sahip oldukları gibi bazı seskiterpen laktonları memelilerde toksik etki gösterir (Robbers *et al.* 1996). Seskiterpen grubuna ait bazı bileşiklerin kapalı formülleri Şekil 1.12 ve Şekil 1.13'de gösterilmiştir.



Şekil 1.12. 3,7-Guaiadiene bileşiğinin kimyasal yapısı (www.chemo.com adresinden alınmıştır)



Şekil 1.13. delta-Kadinen bileşiğinin kimyasal yapısı (www.wikimedia.org adresinden alınmıştır)

Diterpenler

Dört izopren molekülüne sahip olan diterpenler, farmakolojik etkilere sahip bileşiklerdir. $C_{20}H_{32}$ formülüyle gösterilirler. Doğada yaygın olarak bulunurlar. Asiklik, monosiklik, bi-siklik, trisiklik, tetrasiklik, makrosiklik olmak üzere altı sınıfa ayrılırlar (Gören 1997; Çöl 2007).

Sesterpenler

$C_{25}H_{40}$ formülüne sahip terpenlerdir (Karahan 2007). Beş izopren ünitesinin bir araya gelmesi ile oluşurlar. Genellikle mantar kaynaklarından izole edilirler (Yaylı 2007).

Triterpenler

$C_{30}H_{48}$ formülüne sahip terpenlerdir. Tetrasiklik triterpenler ve Pentasiklik triterpenler olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Robbers *et al.* 1996; Karahan 2007; Çöl 2007).

Tetraterpenler

Sekiz izopren ünitesi içerirler ve $C_{40}H_{64}$ formülüne sahip terpenlerdir. Karotenler tetraterpenlerdir. Kuyruk kuyruğa bağlanmış iki terpenin birleşimiyle oluşurlar (Karahan 2007; Çöl 2007).

Politerpenler

Politerpenler birçok izopren ünitesinin bağlanarak uzun zincir oluşturması ile meydana gelirler (Yılmaz İskender 2007). $(C_5H_8)_n$ formülüyle gösterilir. Politerpenlerin en bilinen üyesi kauçuktur (Karahan 2007).

1.7. Kanser

Kanser, hücrenin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmaların bozulması sonucu, hücrelerin kontrolsüz biçimde sürekli bölünerek çoğalması, normal doku ve organları istila etmesi ve tüm vücuda yayılması ile karakterize edilen hastalıklar grubunu tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Bir başka ifadeyle kanser, klonalite, otonomi, anaplazi ve metastaz yapma özellikleri olan hastalıklar grubu olarak da tanımlanabilir (Turhan 2008).

Normalde hücreler ancak vücuda gerekli olduğu zaman bölünür ve daha fazla hücre oluştururlar. Fakat bu hücreler gereksiz olarak bölünmeye başlar ise yeni bir doku kitlesi oluştururlar. Bu normal dışı kitleye "tümör" denir (Baloğlu 2001).

Tümörler benign (iyi huylu) veya malign (kötü huylu) olabilir.

- **Benign (selim=iyi huylu) tümörler:** Benign tümörler, kanser değildirler ve yaşamı tehdit etmezler. Sınırlı büyüme potansiyeline sahip olup genellikle bir kapsül içinde sınırlı kalırlar ve metastaz özelliği göstermezler.

• **Malign (habis=kötü huylu) tümörler:** Malign tümörler ise kanserlerdir. Kanser hücreleri yakındaki dokulara yayılabilirler. Ayrıca bu hücreler kan dolaşımına ve lenf sistemine girerek vücudun diğer bölgelerine de metastaz yapabilirler (Cotran *et al.* 1989; Birand and Knop 1996; Birol 1998; Baloğlu 2001; Akdemir ve Birol 2004; Soy 2006; Turhan 2008; Kurt Sadırlı 2008).

Malign hücreler köken aldıkları normal hücrelerdeki işlev, görünüş ve özellikleri yitirirlerse de bazı durumlarda köken aldıkları hücrelerin işlevlerine hiç benzemeyen yeni hücresel işlevler de gösterebilirler. Örneğin endokrin bez özelliği olmayan bazı tümörler hormon salgılama özelliği kazanabilirler (Birand and Knop 1996; Aslan vd. 2006; Kurt Sadırlı 2008).

Kanser anormal çoğalan tek bir mutant hücreden gelişir. Tümörlerin klonal olması, tümör gelişmesine neden olan hücrenin başlangıçta, kanser hücrelerinin bütün özelliklerine sahip olduğu anlamına gelmemelidir. Çünkü kanserin gelişmesi tam aksine birbirini izleyen değişiklikler sonucu giderek malign şekle dönüşen çok aşamalı bir süreçtir. Birçok kanser türünün geç yaşlarda ortaya çıkması ve geç yaşlarda kanser görülme sıklığının daha da artması kanserin çok aşamalı bir süreç olduğunu desteklemektedir (Geoffrey *et al.* 2006; Turhan 2008). Hücresel düzeyde kanser gelişimine bakılacak olursa, kanserin mutasyonları içeren çok aşamalı bir süreç sonunda çoğalma, sağ kalım, invazyon ve metastaz yetenekleri artan hücrelerin seçilmesi şeklinde ortaya çıktığı görülür. Bir tek hücrenin anormal çoğalmasına neden olan genetik bir değişiklik ve mutasyon bu çok aşamalı sürecin başlangıcını oluşturur. Bu tip mutasyonlar, kanser etiolojisinde rol oynayan kimyasal, fiziksel veya viral kaynaklı karsinojenlerin (kansere yol açan maddeler karsinojen olarak adlandırılmaktadır.) etkisi ile ya da kalıtsal olarak oluşabilir (Cotran *et al.* 1989; Geoffrey *et al.* 2006; Turhan 2008). Araştırmacılar insan kanserlerinin %70-80'inin muhtemelen çevre faktörlerinden kaynaklandığına inanmaktadırlar (Turhan 2008).

Kimyasal karsinojenler etkilerini DNA hasarı yaparak ve mutasyonları uyararak gösterirler. Başlıca karsinojenik kimyasal polisiklik aromatik hidrokarbonlar

(benzopren), aromatik aminler, nitrozaminler, muhtelif ilaçlar (alkilleyici kemoterapötik ajanlar), doğal bulunan bileşikler (Aflatoksin B) ve çeşitli inorganik bileşiklerdir (asbest, arsenik, krom, kadmiyum vb). Kişinin böyle bileşiklere maruz kalması; diyetinden (uygun koşullarda saklanmayan fıstık ve tahılları kontamine eden mantarların oluşturduğu etkin bir karaciğer karsinojeni olan aflatoksin B alımı), yaşam tarzından (sigara tiryakiliği), mesleğinden (asbest) ve diğer nedenlerden (tedavi için kullanılan dietilstilbestrol gibi bazı ilaçlar) dolayı olabilir (Cotran *et al.* 1989; Geoffrey *et al.* 2006; Turhan 2008).

Bazı virüsler de insanda kansere neden olabilmektedir. İnsan T-hücre lösemi virüsü izole edilen ilk onkogenik virüstür. Virüslerin neden olduğu kanserlerin başında karaciğer ve serviks kanseri yer alır. Hepatit B virüsü ile hepatosellüler karsinom, Epstein Barr virüsü ile Burkitt lenfoma ve nazofarinks kanseri, insan papilloma virüsü (HPV) ile serviks kanseri ve HIV ile Kaposi sarkomu arasında ilişki tespit edilmiştir (Cotran *et al.* 1989; Geoffrey *et al.* 2006; Turhan 2008).

Fiziksel karsinojenler ise; iyonize radyasyon, X ışınları (röntgen), noniyonize radyasyon (solar), güneşteki ultraviyole (mor ötesi ışınlar), radyoaktif etkenler (alfa, beta, gama ışınları), hipertermi, kronik iritasyon ya da inflamasyon ve tütün kullanımı sayılabilir (Birand and Knop 1996; Taş ve Aydın 2000; Akdemir ve Birol 2004; Kurt Sadırlı 2008).

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

1. Kanser hücrelerinin çoğalma sinyallerine gereksinim duymadan çoğalabilmeleri,
2. Çoğalmayı engelleyen sinyallerde bozukluklar,
3. Programlı hücre ölümünde (apoptozis) bozukluklar,
4. Sınırsız replikasyon potansiyeli,
5. Anjiyogenez,

6. İnvazyon ve metastazdır (Hanahan and Weinberg 2000; Geoffrey *et al.* 2006; Turhan 2008).

Kanser hücrelerinde hücre-hücre etkileşimleri açısından görülen bir özellik ise kontakt inhibisyonunun kanser hücrelerinde ortadan kalkmasıdır. Ayrıca kanser hücreleri normal farklılaşma programını takip etmezler ve sürekli çoğalmaları ile uyumlu bir şekilde farklılaşmanın erken aşamalarında kalırlar. Bu duruma en güzel örnek lösemilerdir (Geoffrey *et al.* 2006; Turhan 2008). Genellikle normal hücreler DNA hasarına karşı apoptozis ile yok olurken, kanser hücreleri apoptotik sinyallerden kaçarlar ve böylece kanser hücreleri normal hücrelerden çok daha uzun yaşarlar (Kazancıgil 1982; Cotran *et al.* 1989; Geoffrey *et al.* 2006; Turhan 2008).

Kanserde temel sorun hücre proliferasyonundaki kontrolün kaybıdır. Günümüzde tüm kanser türlerinin somatik hücrelerdeki mutasyon ya da mutasyonlar sonucu oluşmakta ve mutasyonlarında bir seri genin ekspresyonunu etkileyerek kansere neden olabilmektedir. Kanser oluşumunda etkili üç tip gen bulunmaktadır. Bunlar onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleridir (Turhan 2008).

- **Onkogenler:** Protoonkogenler normal hücre büyümesi ve çoğalmasını kontrol eden proteinleri kodlayan genlerdir. Eğer bir protoonkogen kendiliğinden gen içindeki bir mutasyon ya da dış kontrolün değişmesi sonucu farklılaşır ve normalden daha fazla ifade edilmeye başlarsa bu değişiklikler hücrede kontrolsüz büyüme ve malignensiye neden olur. Onkogenlerin büyük bir bölümü hücre çoğalması ve farklılaşmasının kontrolü ile ilişkili protoonkogen denilen normal genlerin mutasyona uğramış formlarıdır (Turhan 2008).

- **Tümör Baskılayıcı Genler:** Tümör baskılayıcı genler, hücre bölünmesinin baskılanmasında sorumlu genlerdir. Bozuklukları halinde organizma genetik olarak anormal hücreleri yok edemediğinden kanser gelişir. Tümör baskılayıcı genler çoğunlukla onkogenler tarafından uyarılan aynı sinyal yollarını baskılar (Geoffrey *et al.* 2006; Turhan 2008).

- **DNA Tamir Genleri:** DNA tamir genleri, mutajenik kimyasalların ve ışın gibi ajanların sebep olduğu DNA hasarını tamirden ve hücredeki genomik yapının korunmasından sorumludur (Wyllie 1997; Turhan 2008). DNA tamir genlerinin fonksiyonu mutasyonel hasar veya DNA replikasyonunun her ikisinde oluşan DNA hataları ile bağlantılıdır. Hata tamir edilmezse, bu genler apoptozisi indükler veya DNA hasarını tamir eder (Kuran 1983; Turhan 2008).

Dünyadaki ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer alan kanser, hücrenin genetik materyali tarafından kontrol edilen hücre döngüsünün normal sürecinde ortaya çıkan bir hastalık olup son yıllarda kanser vakalarının artması ve bunun nedenleri arasında sentetik ürünlerin gösterilmesi bitkisel kaynaklı ürünlerin kullanımına olan ilgiyi artırmıştır. Bunun yanı sıra ilaçların kanser hastalığını iyileştirmedeki yetersizliği ve artan ölüm oranı bitkisel maddelerin kansere karşı koruyucu etkilerine yönelik çalışmalarının artmasında da etkili olmuştur. Nitekim 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 verdiği için günlük yaşamı kötü şekilde etkilemektedir. Dolayısıyla beyin tümörleri genel kanser nedeniyle ölümler arasında 10. sırada yer almaktadır. Diğer taraftan nöroblastoma, merkezi sinir sistemi tümörlerinden sonra en yaygın ikinci solid tümör olup bebeklik ve erken çocukluk çağı hastalığıdır. Adrenal medulla veya sempatik ganglionlarda normalde bulunan primordial nöral krest hücrelerinden köken alır ve tüm çocukluk çağı kanserleri arasında %7.2'lik bir orana sahiptir. Ayrıca nöroblastomun insidans oranı bebeklerdeki cinsiyete göre de farklılık göstermektedir. Erkek bebeklerde oran milyonda 62.8 iken kızlarda 59.8 olup erkeklerde görülme oranı biraz daha fazladır. Tümörün biyolojik davranışındaki değişkenlik nedeniyle, nöroblastom spontan regresyonlar, benign transformasyon (ganglionöroma'ya değişim) ya da agresif seyir gösterebilmekte, bu durum hastalığın prognozunu belirlemede ve tedavisinde sorunlara yol açmaktadır (Brodeur and Fong 1989; Brodeur and Saylor 1991; Matthay 1997; Mora *et al.* 2001; Reddy *et al.* 2003; Jemal *et al.* 2005; Olshan 2005; Diri 2006; Bağcı 2009; Olgun 2009; Güneş 2009; Huang *et al.* 2010; Yılmaz 2011).

Nitekim Yirminci yüzyılda tıp biliminin muazzam bir şekilde gelişmesine rağmen, günümüzde ilaç endüstrisinin ürettiği ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkması, insanların çareyi tekrar doğal bitkisel ürünlerde aramasına neden olmuştur. Dünya geneline bakıldığında insanların büyük bir kısmının birçok alanda doğaya dönüş yapmakta ve alternatif-destekleyici tedavi yöntemlerinden en az birini kullanmaktadır. Dünya sağlık örgütü (WHO) verilerine göre gelişmekte olan ülkelerde insanların %80'nin (yaklaşık 3.3 milyar insan) geleneksel tedavi yöntemlerini kullandığını ortaya koymaktadır. Geleneksel halk hekimliğinde kullanılan bitkiler zamanla bilimsel bir süzgeçten geçirilerek yeniden değerlendirilmiş olup bitkilerle tedavi (fitoterapi) bir bilim dalı haline gelmiştir. Bitkilerin tamamının veya bazı bölümlerinin kullanılması ile hazırlanarak elde edilen doğal ilaçlarla hastalıkları bilimsel temele dayalı akılcı bir yaklaşımla önlemeyi ve tedavi etmeyi amaçlayan fitoterapi insanlık tarihinin bilinen en eski doğal tedavi yöntemlerindedir. Günümüzde de bu bilim dalı giderek gelişmekte ve daha fazla önem kazanmaktadır. Sentetik ilaçların neden olduğu ciddi yan etkiler de göz önüne alındığında kanser tedavisinde kullanılmak üzere bu doğal ürünlerin incelenerek yeni bileşiklerin belirlenmesi son derece önemli ve gerekli olmuştur. Hâlihazırda kanser tedavisinde kullanılan ilaçların %60'dan fazlası bitkisel kökenlidir (Cragg *et al.* 1997; Yue and Shu 1998; Jain *et al.* 2007; Aslantürk 2010). *Catharanthus roseus*'tan elde edilen vinkristin ve vinblastin (Cragg *et al.* 1994), bunların yarı sentetik analogu olan vinorelbin (Newman *et al.* 2000), *Podophyllum peltatum*'dan elde edilen epipodophyllotoxin'in (epipodofillotoksin) yarı sentetik türevleri olan etoposide ve teniposide, *Taxus brevifolis*'dan elde edilen taxanlar (taksanlar) ve *Camptoteca acuminata*'dan elde edilen camptotecinler (kampothesinler) kanser tedavisinde kullanılan bitkisel kökenli ilaçlara örnek olarak verilebilir (Cragg *et al.* 1994). Bitkisel kökenli maddelerin antikanser özelliklerinin araştırılması günümüzde halen daha devam eden güncel bir yaklaşımdır.

Yapılan literatür taramaları sonucu Wintergreen yağının (WGO) N2a nöron hücreleri üzerine olan etkilerini değerlendiren herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle mevcut çalışmada *Gaultheria procumbens* bitkisinden elde Wintergreen yağının sağlıklı ve N2a NB'lı hücreleri üzerindeki etkilerinin *in vitro* koşullarda

araştırılması amaçlanmıştır. Beyin tümör hastalıklarının tedavisinde farklı bir yaklaşım ortaya çıkarabilmek amacıyla gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, sitolojik ve biyokimyasal değişimler, sonuçları oldukça güvenilir ve geçerli olan (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) (MTT), Toplam antioksidan kapasite (TAK) ve Toplam oksidan durum (TOD) parametreleri ile araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Deney hayvanları kullanılarak yapılan çalışmalarda monoterpenlerin antikanserojenik özellikte oldukları rapor edilmiştir (Brunke 1986; Loza-Tavera 1999; Seifired *et al.* 2007; Demirci vd 2008).

Rezene tohumu metanol ekstratı (FSME)'nin etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada FSME'de en çok bulunan bileşiklerden estragole, gallik asit ve L- limonen'in meme kanseri ve karaciğer kanserine karşı antikanserojenik potansiyele sahip olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda oksidatif stresi azaltabileceği ve reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hasarlara karşı koruyucu olduğu rapor edilmiştir (Mohamad *et al.* 2011).

Paulownia tomentosa bitkisinde bulunan Tomentodiplacone B (TOM B) bileşiğinin doğrudan insan monositik lösemi hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur. Böylece antikanserojenik etki göstererek lösemi hücrelerin DNA sentezinin G1 faz ilerlemesini engellediği rapor edilmiştir (Kollár *et al.* 2011).

Campêlo ve arkadaşlarının (2011) yapmış oldukları bir çalışmada anti-inflamatuar, antimutajenik, antiviral, antialerjik ve antikanserojenik özellikleri bilinen limonun (*Citrus limon* L.) merkezi sinir sistemi (MSS) üzerinde etkisi araştırılmıştır. *C. limon* esansiyel yağı önemli ölçüde farelerin hipokampusünde lipit peroksidasyon düzeyini ve nitrit içeriği azalttığı ve ayrıca indirgenmiş glutatyon (GSH) konsantrasyon seviyesini, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitelerini artırdığı gözlemlenmiş olup oksidatif stresin meydana getirdiği beyin hasarlarına karşı koruyucu etki gösterdiği de rapor edilmiştir.

Limon otu (*Cymbopogon citratus* Stapf) esansiyel yağının dişi farelerde N-metil-N-nitrosürea (MNU) ile oluşturulan lökosit DNA hasarına ve 7,12-dimetilbenzoantresin, 1,2-dimetilhidrazin ve N-butyl-N-(4-hidroksibütül) nitrozamin kimyasalları tarafından

indüklenen meme kanserine karşı antikanserojenik özellikte olup koruyucu etki sağladığı rapor edilmiştir (Bidinotto *et al.* 2010).

Siklik monoterpen β -iyodin ve asiklik monoterpen geraniolün antikanserojenik etkileri bilindiği ve kolon kanseri üzerine β -iyodin (16 mg/100g) ile geraniolün (25mg/100g) antikanserojenik etkilerinin araştırıldığı çalışmada geraniolün koruyucu olduğu fakat β -iyodin'in antikanserojen etki göstermediği rapor edilmiştir (Vieira *et al.* 2011).

Delta-3-Karen ve α -pinen'in sitotoksik ve genotoksik etkilerinin insan akciğer adenokarsinoma hücreleri (A549) üzerinde etkisinin araştırıldığı bir çalışma da bu bileşiklerin $600\text{mg}/\text{m}^3$ ve $1800\text{mg}/\text{m}^3$ konsantrasyona kadar DNA hasarına yol açmadığı COMET yöntemi ile tespit edilirken eritrozin-B yöntemi ile de hücre canlılığı oranının değişmediği gözlemlenmiştir (Gminski *et al.* 2010). Wang ve arkadaşlarının (2012) yapmış oldukları bir diğer araştırmada ise insan yumurtalık kanseri (SK-OV-3 ve HO8910) ve hepatosellular karaciğer kanseri (Bel-7402) hücreleri üzerine α -pinen'in anti-bakteriyal ve antikanser özellikleri değerlendirilmiştir. Yapılan MTT analizleri sonucunda α -pinen'in güçlü sitotoksik etkiye sahip olduğu ve artan konsantrasyonu ile birlikte hücre canlılığını azalttığı rapor edilmiştir.

Sebzelerde bulunan indol 3-karbinol ve diindol metanın meme, prostat, yumurtalık kanseri gibi hormona duyarlı kanser hücrelerinde antikanser etki gösterdikleri kanıtlanmış olup ayrıca limonen ve sineolünde antikanserojen oldukları rapor edilmiştir (Acharya *et al.* 2010). Bunlara ilaveten α -pinen, kanfor, timol, linalol, karvol, uroterpenol, sobrerol ve limonen gibi monoterpenlerin iyi bir antioksidan olduğu ve kanser gibi hastalıkların tedavisinin önlenmesinde önemli temsilciler olduğu rapor edilmiştir (Crowell 1997; Gould 1997; Arcila-Lozano *et al.* 2004).

Mevalonoit türevli izoprenlerin tümör büyümesini baskılamadaki rollerinin araştırıldığı çalışmada ise D-limonen ve perilil alkol (LC50; 450- 250 mikromolar), siklik monoterpenler (perilaldehit, timol ve karvakrol), bi-siklik monoterpen (geraniol) ve beta-iyononun (LC50; 120-150 mikromolar) melanom hücrelerinde tümör büyümesini

önlemede güçlü etkiye sahip oldukları rapor edilmiştir (He *et al.* 1997). Ayrıca perillik alkolün, insan baş ve boyun bölgesinde meydana gelen kanserlerin radyoterapi ve kemoterapi yöntemlerinde radiosensitizör olarak kullanılabilme potansiyele sahip olduğu ve bu konu üzerinde daha fazla çalışmanın gerekli olduğu belirtilmiştir (Samaila *et al.* 2004).

Yoon ve ark. (2010) yapmış olduğu çalışmada ise D-limonen ve metabolitlerinin farklı tümörlere karşı antikanserojen etkileri rapor edilmiştir. Citralinin meme kanseri üzerine kanser önleyici etkilerinin araştırıldığı çalışmada kemoprotektif ajan olduğu rapor edilmiştir (Chaouki *et al.* 2009).

Karvakrolün antikanserojenik etkilerinin araştırıldığı çalışmada da *in vitro* Leiomyosarcoma hücrelerinde karvakrolün antikanserojenik olduğu rapor edilmiştir. Yapılan bu çalışmada karvakrolün antikanserojenik etkisini belirlemek için hücrelere sırasıyla 90 µM ve 67 µM dozlarda karvakrol uygulanmıştır (Karkabounas *et al.* 2006).

4-Metilbenzilidin-kamfor organik güneş koruyucusu olduğundan cilt kanserini önlemede yardımcı olabileceği rapor edilmiştir (Mueller *et al.* 2003). *Artemisia capillaris* bitkisinden elde edilen 1-borneol, kumarin ve akillinin farelerde epidermal kanser tedavisinde antikanserojenik etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Kim *et al.* 2008).

Alfa-terpinen ve terpinolenin N-nitrosodimetilamin (insan için muhtemel karsinojen) kimyasalının zararlı etkilerini %80 oranında azalttığı rapor edilmiştir (Sawamura *et al.* 1999). Bir başka çalışmada N-nitrosodimetilamin kimyasalının sıçanlarda oluşturduğu yemek borusu kanserine karşı perillik alkolün koruyucu etkisi araştırılmış olup tümör oluşumunu tam anlamıyla inhibe etmediği rapor edilmiştir (Liston *et al.* 2003).

Eucalyptus grandis bitkisinin yapraklarından elde edilen phlorogruicinol monoterpenin cilt kanseri hücrelerini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Takasaki *et al.* 2000).

7,12-dimetilbenzoantrasinin (DMBA) sebep olduğu kanserlerin önlenmesine yönelik araştırmalarda sıçanlara 1000 ve 10000 ppm'lik d-limonen içerikli diet uygulanmıştır. Araştırma sonuçlarına göre 10000 ppm'lik d- limonen uygulanan sıçanlarda kanser oluşumunun %72 azaldığı rapor edilmiştir (Elegbede *et al.* 1984).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Fetal calf serum (PAN Biotech, Germany)
- Penicillin -Streptomycin (PAN Biotech, Germany)
- Dubbelco modified eagles medium (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Hank's Blanced salt solution (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 , EDTA, Triton-X-100, Tris, DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Low melting point agarose, Normal melting point agarose, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- NaHCO_3 , KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Wintergreen oil (SAFC, Kosher, China)
- Total antioxidant status, Total oxidant status kits (Rel Assay Diagnostics® Turkiye)
- NaCl, KCl (Merck, Darmstadt, Germany)
- BME, Basal Medium (Eagle) (1X), liquid (GIBCO®, Grand Island, NY, USA)
- B27® (GIBCO®, Grand Island, NY, USA)

3.2. Kullanılan Laboratuvar Gereçleri ve Cihazlar

- Karbondioksitli doku kültür etüvü (Napco 6500-Su yelekli, Amityville, USA)
- Etüv (Heraeus FB 420, Memmert, Germany, Nüve NF 200, Ankara)
- İnvirt 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)
- pH metre (Accument model 220- Fischer Scientific, Handylab 2 BNC, Germany)

- Otomatik pipet (Finpipette LabSystems, Finland)
- Buzdolabı (Arçelik ve Bosch)
- Derin dondurucu (Sanyo Ultra Low, Japan)
- Distile su cihazı (Easypure RF compact ultrapure 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)

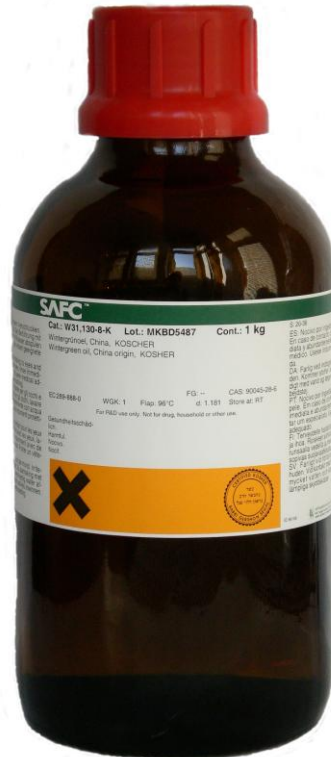
3.3. Deney Hayvanları ve Nöron Kültürleri

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 izole edilen nöronlar hücre kültürü ortamında yaşatıldı. N2a nöroblastom hücre hattı Türkiye Şap Enstitüsü'nden temin edilmiştir.

9 adet yeni doğmuş (24 saatini doldurmamış) yavru bireyler alındı. Batikonla yıkandıktan sonra steril ortamda dekapite edildi. Baş kısmında önce derisi ve kafatası kaldırıldı, ince 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.

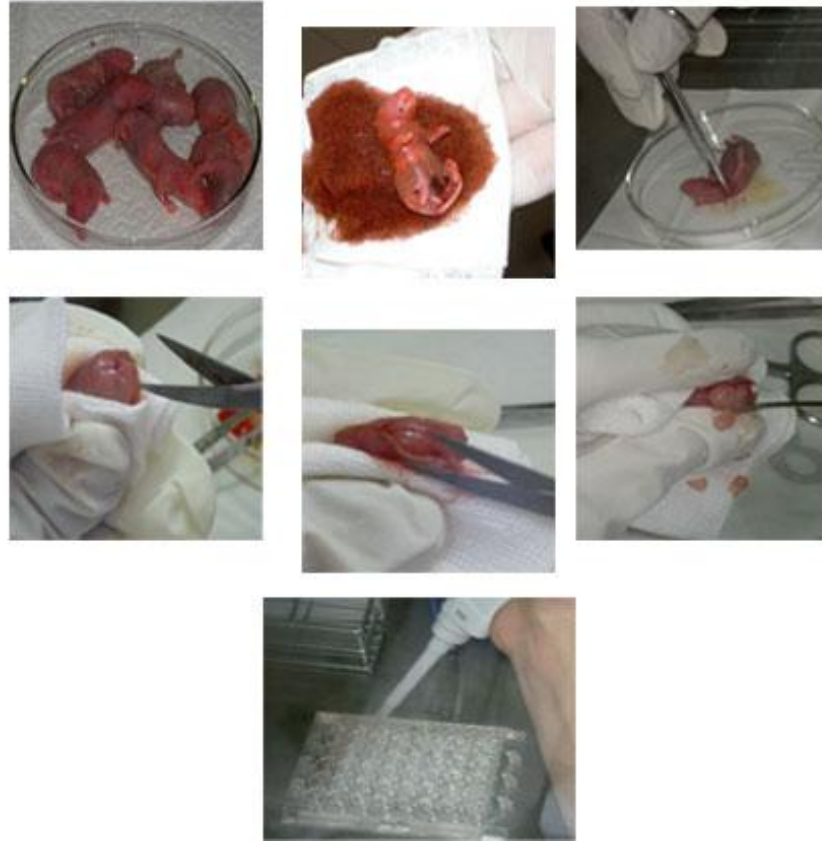
Tripsinin parçalama etkisini durdurmak amacıyla DNAaz I'in bulunduğu kabın içine, tripsin ile muamele edilen korteksler eklendi. DNAaz I'in bulunduğu kabın içine %10

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 konuldu. Üzerine nöronal base medium supplementi olan B27, 1/50 oranında eklendi. Üzerine 1/1000 oranında penisilin eklendi. 48'lik flaskların her odasına 180 µl kondu ve 37⁰C'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 gösterecek kadar beklendi (Şekil 3.2). *In vitro* deneylerde WGO'nun yedi farklı dozu (10,25, 50, 75, 100, 200 ve 400 mg/L) kullanıldı. Onuncu gün kuyucuklara farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan WGO çözeltisi konuldu (şekil 3.1 ve 3.2).



Wintergreen Oil

Şekil 3.1. Araştırmalarımızda kullanılan WGO örneği



Şekil 3.2. Nöron kültürü hazırlama aşamaları

3.4. MTT Analizi

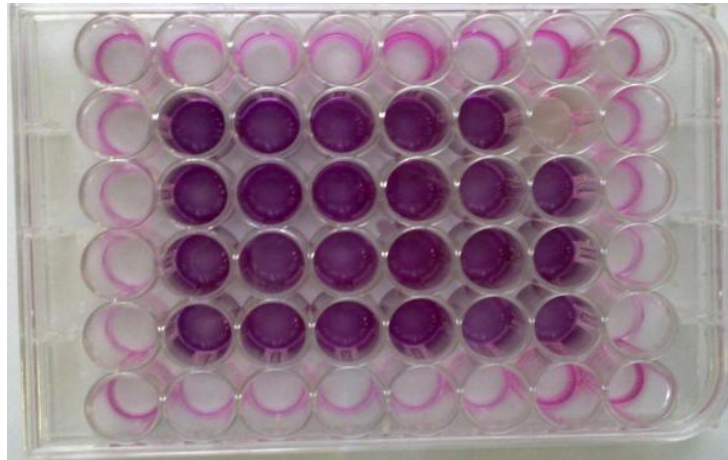
1mL analiz tamponu (şişe #2) şişe #1 içerisine ilave edilip pipetle iyice karıştırılarak MTT reaktifi (şişe #1) çözüldü. Tampon şişe #2'ye geri alındı ve kalan analiz tamponu ile karıştırıldı. şişe #1'in bütün içeriği çözülene ve şişe #2'ye aktarılanaya kadar tekrarlandı (Sonuç çözeltinin rengi sapsarı olmalıdır. Eğer sulandırılmış MTT reaktifinin tamamı bir analizde kullanılmayacaksa küçük parçalara ayrılıp $\sim 20^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildiğinde hazırlanmış MTT reaktifi bir kaç ay stabil kalır. Tekrarlanan dondurulup çözme işleminden kaçınılmalıdır).

Prosedür

- Hücreler 48'lik plate'e bölme başına 100 μL kültür mediumu içerisinde 10a (a=5)

hücre bulunacak şekilde, muamele edilecek bileşikle birlikte ve muamele edilecek bileşikten yoksun olarak ekildi. Hücrelerin CO₂ etüvünde 37⁰C'de 24 saat süre ile kültürü yapıldı.

- Her bir bölmeye pipet aracılığı ile 10 µL MTT karışımı eklendi.
- Dairesel karıştırıcıda 1 dakika hafifçe karıştırıldı. Hücreler CO₂ etüvünde 3-4 saat 37⁰C'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'da 10 dakika satrifüjlendi.
- Her bir bölmeye 100 µL Cystal Çözücü Solüsyon (şişe #3) eklendi (Bu solüsyon formazan kristalleri çözecek ve portakal renğinde bir solüsyon oluşturacaktır).
- Her bir numunenin absorbanı 570 nm' de microplate okuyucu kullanılarak ölçüldü.



Şekil 3.3. MTT solüsyonu eklenmiş plate'in üstten görünüşü

3.5. Toplam Antioksidan Kapasite

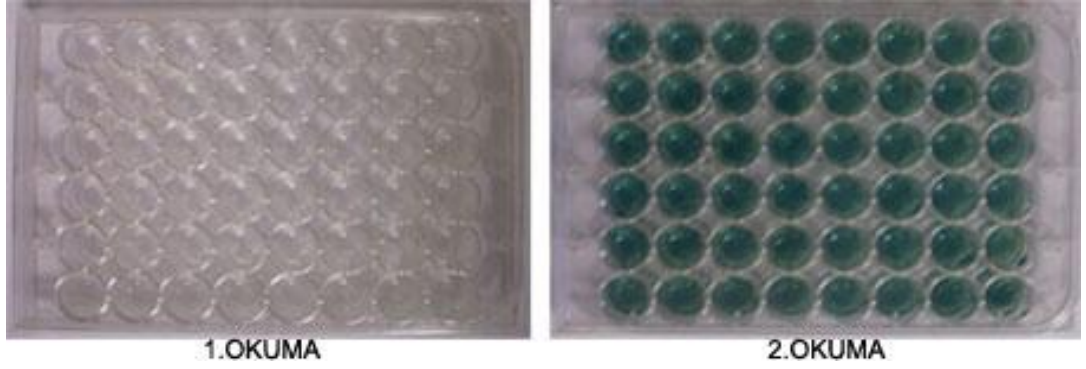
TAK düzeyi tespiti ilk olarak Tomasch *et al.* (2001) tarafından uygulanan bir yöntemdir. Bu yöntem 2-2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sülfonat = ABTS⁺) radikal katyonunun oluşumunu inhibe edecek antioksidan kapasitenin tespitini temel almaktadır. Kültür ortamında tespit işleminde Rel Assay Diagnostics® 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. Daha sonra aynı kuyucuklara 75 µl Reaktif 2 eklenerek 10 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme sonunda 660 nm'de ikinci absorbans değeri okundu. 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 3.4. TAK solüsyonu eklenmiş plate'in üstten görünüşü

3.6. Toplam Oksidan Durum

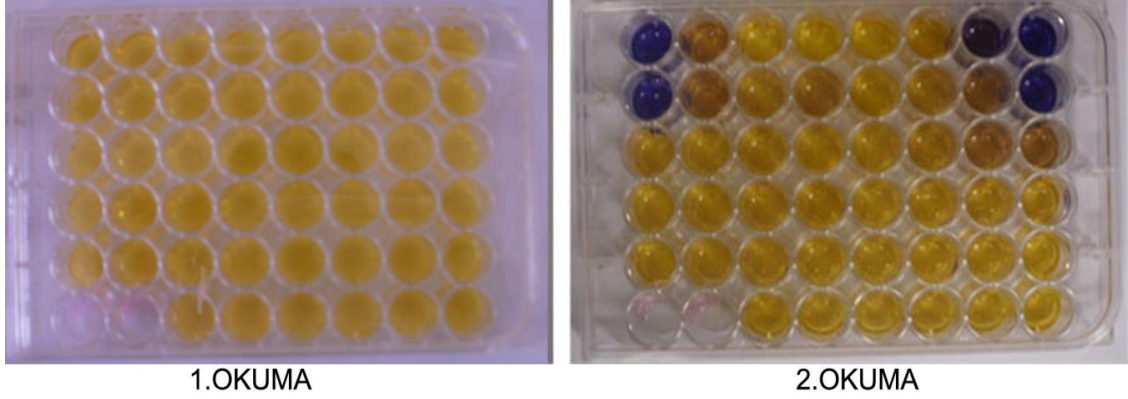
Toplam oksidan durum tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir. İncelenen numunede bulunan oksidanlar ferroz iyon-*o*-dianisidin yapısını ferrik iyona oksitlerler. Bu reaksiyonu ortamda bulunan gliserol yaklaşık üç kez hızlandırmaktadır. Asidik ortamda ferrik iyonlar "xylenol orange" ile renkli bir kompleks 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. Daha sonra aynı küvete 25 µl Reaktif 2 solüsyonundan eklenerek oda sıcaklığında 10 dk. bekletildi. Bekleme sonunda 530 nm'de ikinci kez absorbansı okundu. Elde edilen absorbans değerleri ve aşağıdaki formül kullanılarak mmol TOD düzeyleri Trolox Equiv./L cinsinden tespit edildi.

TOD ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L) = ($\Delta\text{Örneğin değeri}/\Delta\text{Standart 2'nin değeri}$) x (Standart 2 değeri)



Şekil 3.5. TOD solüsyonu eklenmiş plate'in üstten görünüşü

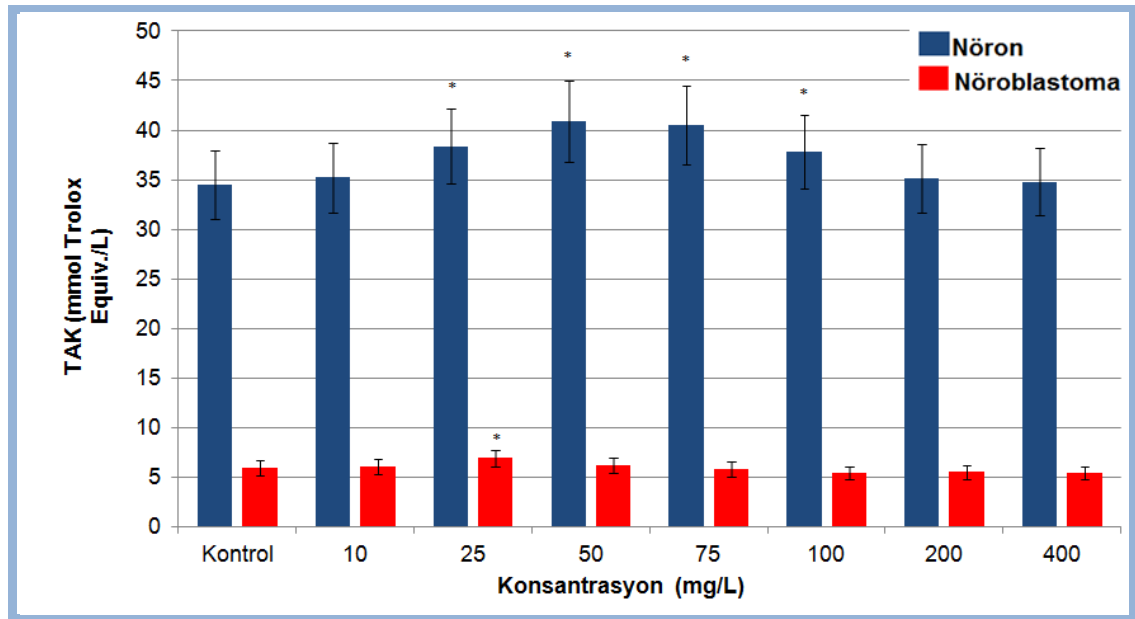
3.7. İstatiksel Analizler

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

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. WGO Maruziyetinin *In Vitro* Şartlarda Oluşturduğu TAK Değerleri

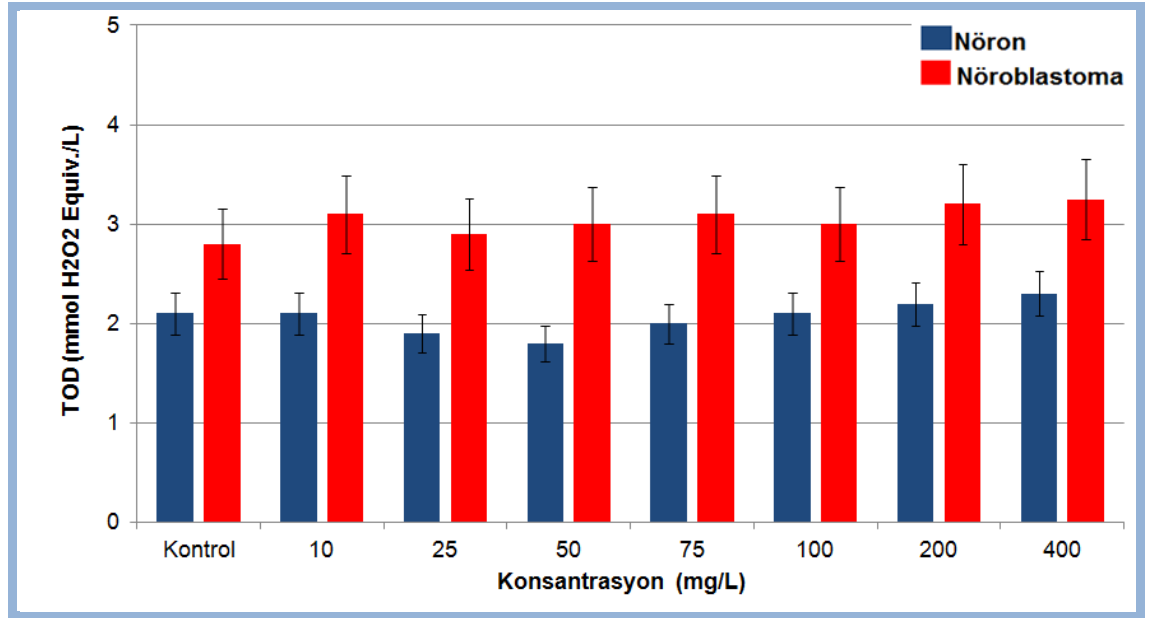
Kontrol grubu TAK değeri sağlıklı nöron hücre kültürleri için 34.5 ± 5.0 , N2a nöroblastoma hücre kültürleri için 5.9 ± 0.6 olarak saptanmıştır. Sonuçlarımız kontrol grubuna kıyasla WGO'nun sağlıklı nöron hücre kültürlerinde 25, 50, 75 ve 100 mg/L konsantrasyonlarının TAK düzeyini yükselttiği tespit edilmiştir (Şekil 4.1). N2a nöroblastom hücre kültürlerinde ise WGO'nun sadece 25 mg/L konsantrasyonu TAK düzeyini yükseltmiştir (Şekil 4.1). Sağlıklı ve N2a hücre kültürlerinde artan konsantrasyonlarda gözlenen TAK düzeyleri azalmış ancak bu azalmalar istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır ($P > 0.05$).



Şekil 4.1. *In vitro* koşullarda WGO'nun oluşturduğu toplam antioksidan kapasite değerleri (* sembolü $P < 0.05$ anlam düzeyinde kontrol grubundan farklılığı ifade etmektedir).

4.2. WGO Maruziyetinin *In Vitro* Şartlarda Oluşturduğu TOD Değerleri

Kontrol grubu TOD değeri sağlıklı nöron hücre kültürleri için $2,1 \pm 0,3$, N2a nöroblastoma hücre kültürleri için $2,8 \pm 0,4$ olarak saptanmıştır. WGO (tüm konsantrasyonlarda) ile muamele edilen sağlıklı ve NB'lı hücrelerde gözlenen TOD değerleri ile kontrol gruplarında gözlenen TOD değerleri arasında istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.2).

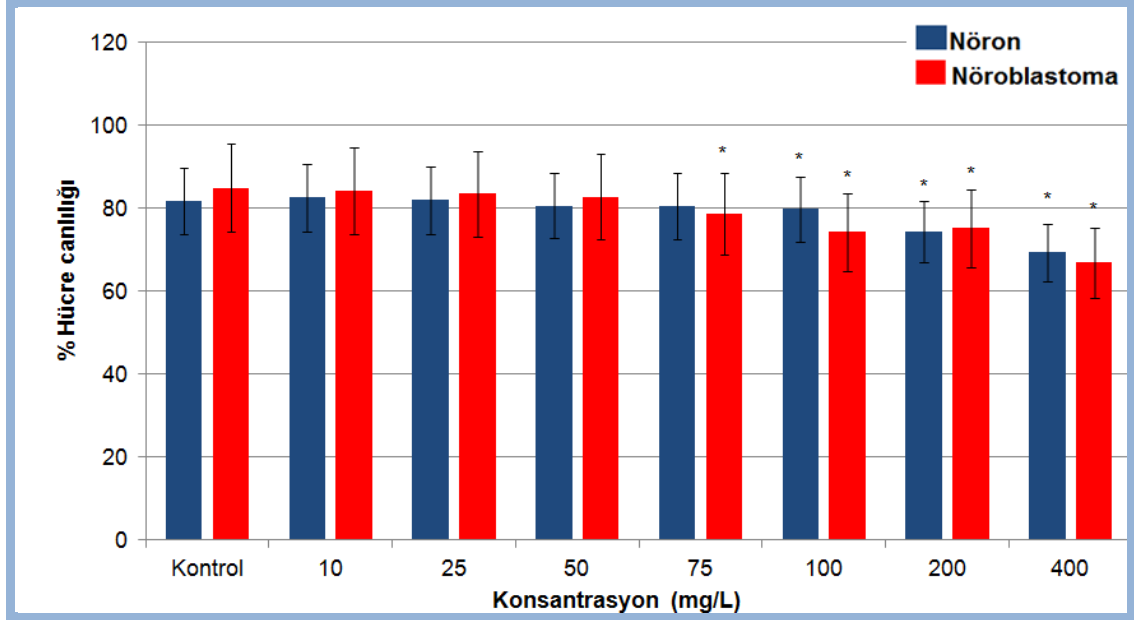


Şekil 4.2. *In vitro* koşullarda WGO'nın oluşturduğu toplam oksidan durum değerleri

4.3. *In Vitro* Şartlarda WGO Maruziyeti Sonrasında Elde Edilen MTT Analiz Değerleri

In vitro koşullarda MTT analiz sonuçları bütün konsantrasyonlar için sağlıklı nöron hücre kültürlerinde $81,7 \pm 4,1$ ve N2a nöroblastom hücre kültürlerinde $84,8 \pm 5,3$ olarak bulunmuştur. WGO'nun 100, 200 ve 400 mg/L konsantrasyonları sağlıklı nöron hücre kültürlerinde hücre yaşam oranını kontrole göre azaltırken düşük dozları (10, 25, 50 ve 75 mg/L) çoğalmayı baskılayıcı bir etki göstermemiştir. Ayrıca nöroblastom hücre kültürlerinde 75 mg/L ve üzeri WGO konsantrasyonlarının canlı hücre sayısını kontrole

oranla önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir (şekil 4.3).



Şekil 4.3. WGO maruziyeti sonrasında gözlenen hücre canlılık yüzdeleri (* sembolü P<0.05 anlam düzeyinde kontrol grubundan farklılığı ifade etmektedir).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mevcut tez çalışması kapsamında yürütülen biyokimyasal araştırmalar (TAK ve TOD analizleri) sonucunda WGO'nun düşük konsantrasyonları (25 mg/L) ile muamele edilen sağlıklı ve NB'lı hücre kültürlerinde TAK düzeylerinde belirgin artışlar gözlenmiştir. Üstelik bu artışlar sağlıklı nöron kültürlerinde 50, 75 ve 100 mg/L WGO konsantrasyonlarında devamlılık göstermiştir. Gurung (2007) yapmış olduğu çalışmada WGO içeriğinde yer alan aktif bileşikleri tespit etmiş ve söz konusu bileşiklerin başta metil salisilat olmak üzere, α -pinen, mirsen, delta-3 karene, limonen, 3,7- guaiadiene ve delta-kadinen olduklarını rapor etmiştir. Bulgularımız bu konuda literatürde kayıtlı olan sınırlı sayıda araştırmalara ait bulgular ile paralellik göstermektedir. İnsan sağlığının korunması ve hastalıkların önlenmesinde bitkilerin oldukça önemli rolleri olduğu oldukça fazla araştırma bulgusu ile ortaya konmuştur. Bu faydalı etkiler ile bitkilerin içeriklerindeki doğal bileşiklerin biyolojik aktiviteleri (antiinflatuar, antilipoperoksidant, antioksidant vb.) arasında doğrudan bir ilişki bulunmaktadır (Ferrandiz and Alcaraz 1991; Terao *et al.* 1994; Rice-Evans *et al.* 1995). 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). Nitekim toplam WGO içeriğinin antioksidan etkinliği hakkında bilinenlerin sınırlı olmasına karşın önceki bulgular WGO içeriğinde bulunan metil salisilat (Zhang *et al.* 2011), α -pinen (Medini *et al.* 2011), mirsen (Ciftci *et al.* 2011), delta-3 karene (Ennajar *et al.* 2009) ve limonen (Zeng *et al.* 2012) bileşiklerinin tek başlarına antioksidan etkili oldukları ortaya konmuştur.

Araştırmamızda sağlıklı nöron ve N2a nöroblastoma'lı hücre kültürlerinde WGO maruziyeti sonrasında canlılığının belirlenmesi amacıyla MTT yöntemi kullanılmıştır. MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) kültür ortamındaki mitokondrial aktivitesi devam eden canlı hücrelerin kantitasyonunu sağlamakta olup sitotoksik ajanların etkinliğinin test edilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Oktar 2009). Proje kapsamında test edilen WGO'nun sitotoksik

etkileri hakkında bilinenler oldukça sınırlıdır. Üstelik bu özütün sağlıklı nöron hücre kültürleri üzerindeki sitotoksik etki potansiyelleri ilk kez bu çalışma ile ele alınmıştır. MTT analiz sonuçlarımız WGO'nun (>100 mg/L) yüksek konsantrasyonlarının sağlıklı nöronlarda sitotoksik etkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu doz seviyelerinde TOD düzeylerinin de yükselmemiş olması WGO'nun sitotoksisinde oksidatif stresin etkili olmadığını işaret etmektedir. Oksidatif stresin yanı sıra, önceki raporlarda bitkilerdeki doğal bileşikler tarafından ortaya konan sitotoksitenin (I) proteozom inhibisyonu, (II) yağ asit sentezi inhibisyonu, (III) topoizomeraaz 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). WGO sitotoksitesinin tam olarak anlaşılabilmesi söz konusu mekanizmaların *in vitro* veya *in vivo* model sistemlerde detaylı olarak araştırılmasını gerekli kılmaktadır.

In vivo ve/veya *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmiş olan önceki araştırmalarda artemisin (Tin *et al.* 2012), zerumbon (Mukarami *et al.* 2004), curcufenol (Rodrigo *et al.* 2010), thieleanin (Taylor *et al.* 2008) ve izokostunolid (Chen *et al.* 2007) gibi terpen (seskiterpen) yapısındaki doğal bileşiklerin antikanser aktivitelerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Seskiterpen veya monoterpen yapısındaki çeşitli bileşiklerinin antikanser aktivitelerini belirlemek üzere yürütülmüş olan çeşitli araştırmaların varlığına rağmen, proje kapsamında test bileşiği olarak kullanılan WGO'nun beyin dokularında antikanser aktivitesi henüz araştırılmamıştır. Mevcut çalışmada MTT testi kullanılarak WGO'nun nöroblastom hücre kültürleri üzerindeki antikanser aktivitelerinin varlığı incelenmiştir. Bileşiklerin sitotoksik etkileri ayrıca sağlıklı nöron kültürleri üzerinde de araştırılmıştır. Tez kapsamında yürütülen araştırmalar sonucunda antikanser etkinliği açısından WGO'nun potansiyeli yüksek bulunmamıştır. Tez kapsamında elde edilen önemli ve orijinal bulgulardan biri de WGO'nun N2a kanser hücrelerinde sağlıklı hücrelere oranla daha düşük konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu etkilemesidir. Ayrıca WGO'nun nöron kanser hücre hatlarında antikanserojen ajanlar olarak kullanılabileceği ilk kez

rapor edilmiştir. Yine bulgularımıza benzer şekilde bitki bünyesinde yer alan bazı seskiterpenlerin lösemi hücrelerinde kaspaz bağımlı apoptozisi tetikleyerek büyümeyi inhibe ettiği, fakat sağlıklı kan hücrelerinde zayıf sitotoksisite gösterdiği rapor edilmiştir (Cotugno *et al.* 2012). *Psidium guajava L.* bitkisinin yapraklarından elde edilen ekstraların kopaen içeriğine bağlı olarak prostat kanserine karşı antikanserojen etki gösterdiği ve tedavi amaçlı kullanılabileceği rapor edilmiştir (Ryu *et al.* 2012). Mevcut çalışmada, doza bağlı olarak, WGO'nun 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. İlaveten tirozin kinaz ve siklin bağımlı kinazlar ile etkileşimi, apoptozun teşviki ve mutant p53 seviyesinin düzenlenmesi gibi biyolojik etkilerin kombinasyonlarında terpenlerin 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).

Mevcut tez çalışmasında WGO'nun pro-oksidan, antioksidan, sitotoksisite ve antikanserojenite potansiyelleri TOD, TAK ve MTT testleri ile değerlendirildi. Elde edilen bulgular WGO'nun düşük konsantrasyonlarda antioksidan aktivitesinin varlığını, yüksek konsantrasyonlarda ise sitotoksik etkili olduğunu ortaya koydu. Ayrıca WGO'nun nöroblastoma hücrelerine karşı antikanser aktivitesinin bulunduğu tespit edildi. Tez kapsamında elde edilen bulgular ışığında farklı içeriklere sahip olabilen WGO'ların 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 Pat Food Nutr Agric.*, 2, 166-77.
- 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. *Biochem Pharmacol.*, 53, 1649-57.
- Akay Diri, H., 2006. *Salvia candidissima* Vahl. Uçucu Bileşenlerinin Karakterizasyonu ve Antioksidant 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.
- Akgül, A. and Kıvanç M., 1988. Inhibitory effects of selected Turkish spices and oregano components on some foodborne fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 6, 263-268.
- Anonim-1:University of Toronto (2000). Dictionary of Canadian Biography Online. (23.08.2011).
- Anonim-2: <http://plants.usda.gov/java/charProfile?symbol=GAPR2>. *Gaultheria procumbens*, Fire Effects Information System. (23.08.2011).
- Anonim-3: http://www.herbs2000.com/herbs/herbs_wintergreen.htm. (23.08.2011).
- Anonim-4: <http://plants.usda.gov/java/charProfile?symbol=GAPR2>. (23.08.2011).
- Anonim-5: <http://www.essentialoils.co.za/essential-oils/wintergreen.htm>. (23.08.2011).
- Anonim-6: <http://en.wikipedia.org/wiki/Wintergreen>. (23.08.2011).
- Anonim-7: <http://www.arthurleej.com/p-o-m-jan04.html>. (23.08.2011).
- Anonim-8:<http://www.organicfacts.net/health-benefits/essential-oils/health-benefits-of-wintergreen-essential-oil.html>. (23.08.2011).
- Anonim-9: <http://www.100pureessentialoils.com/wintergreen-oil.html>. (23.08.2011).
- Anonim-10:<http://www.cherylsherbs.com/Essential%20Oil%20Profiles/wintergreen.htm>. (23.08.2011).
- Anonim-11: Toothpaste can cause allergic reaction.. *Nutri Health Rev* . 1991;58:18.
- Arcila-Lozano, C.C., Loarca-Piña G., Lecona-Uribe S., González de Mejía E., 2004. Oregano: properties, composition and biological activity. *Arch Latinoam Nutr.*, 54 (1), 100-111.
- Aslan, Ö., Vural H., Kömürcü Ş. ve Ark. 2006. Kemoterapi alan kanser hastalarına verilen eğitimin kemoterapi semptomlarına etkisi. *C.Ü. Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi*, 10 (1), 15-28.
- Aslantürk, Ö.S., 2010. Aydın Yöresi'nde Kullanılan Bazı Tıbbi Bitkilerin Antioksidant Ve Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- 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 Res.*, 54, 2424-8.

- Azzoua, M.A. and Bullerman L.B., 1982. Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. *Journal of Food Protection*, 45, 1298-1301.
- Bagci, E. and Başer K.H.C., 2005. Study of essential oils of *Thymus haussknechtii Velen* and *Thymus kotschyanus* Boiss. et *Holen* var. *kotschyanus* (Lamiaceae) taxa from the eastern Anatolian region in Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 20, 199.
- Bağcı, Ö., 2009. Nöroblastik Tümörlerdeki Anaplastik Lenfoma Kinaz (Alk) Gen Mutasyonlarının Tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Balkancı, A., 2010. α -pinen'in yüksek sıcaklık fotobrominasyonu ve bazı α -pinenlerin sentezi. Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.
- Baloğlu, E., 2001. Synthesis and biological evaluation of paclitaxel analogs, Doktor of philosophy in chemistry, Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Başer, K.H.C., 2002. Aromatic Biodiversity Among The Flowering Plant taxa of Turkey. *Pure Appl Chem.*, 74, 527–545.
- Başer, K.H.C., 2006. Aromatic plants as a source of botanicals. *Acta Horticulturae*, 720, 27-33.
- Başer, K.H.C. and Demirci F., 2007. Chemistry of Essential Oils, in: *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*, Berger, R.G. (Ed.) Springer, Berlin, Pp.43-86.
- Bauer, K., Garbe D., Surburg H., 2001. *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*. WileyVCH, Weinheim.
- Baytop, A., 1983. *Farmasötik Botanik*, 4. laveli Baskı, Dilek Matbaası.
- Baytop, T., 1972. *Farmakognozi ders kitabı*, 1, İstanbul Üniversitesi Yayını No:1810, Baha matbaası, 155.
- Baytop, T., 1984. *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi*. İstanbul Üniv. Yay. No. 3637, Eczacılık Fakültesi, No.40, İstanbul, 240-376p.
- Baytop, T., 1986. *Uçucu yağlar*. *Farmakognozi Cilt 1-2*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul.
- Baytop, T., 1999. *Türkiye'de Bitkiler İle Tedavi*. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.
- Bell, A.J. and Duggin G., 2002. Acute methyl salicylate toxicity complicating herbal skin treatment for psoriasis. *Emerg Med (Fremantle)*, 14, 188-190.
- 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. *Environ Toxicol Pharmacol.*, 32, 336- 48.
- Berger, R.G., 2007. *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*, Springer, Berlin.
- Bidinotto, L.T., Costa C.A., Salvadori D.M., Costa M., Rodrigues M.A., Barbisan L.F., 2010. Protective effects of lemongrass (*Cymbopogon citratus* STAPF) essential oil on DNA damage and carcinogenesis in female Balb/C mice. *J Appl Toxicol.*, doi: 10.1002/jat.1593.
- Birand A.L. and Knop J.M., 1996. (Çeviri: S. Aban). *Hemşireler İçin Kanser El Kitabı*. Ankara: IV. Akşam Sanat Okulu Matbaası, 10-21.

- Birol L., 1998. Onkoloji hemşireliği. Akdemir N. (Editör). İç Hastalıkları Hemşireliği El Kitabı. İstanbul: Birlik Ofset, 53-86.
- Bishop, C.D., 1995. Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus. *Journal of Essential Oil Research*, 7, 641-644.
- Boligon, A.A., Schwanz T.G., Piana M., Bandeira R.V., Frohlich J.K., Brum T.F., Zadra M. and Athayde M.L., 2012. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. leaves. *Natural Product Research*, (in press) (DOI: 10.1080/14786419.2011.653971).
- Botma, M., Colquhoun-Flannery W., Leighton S., 2001. Laryngeal oedema caused by accidental ingestion of Oil of Wintergreen. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 58, 229-232.
- Breitmaier, E., 2006. Terpenes, Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones, Wiley-VCH, Weinheim.
- Brodeur, G.M. and Fong C.T., 1989. Molecular biology and genetics of human neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 41 (2), 153-74.
- Brodeur, G.M. and Saylor R.L., 1991. Neuroblastoma, retinoblastoma, and brain tumors in children. *Curr Opin Oncol.*, 3 (3), 485-96.
- Brunke, E.J., 1986. Proceeding of the International Symposium on Essential Oils, Walter de Gruyter & Co., Berlin.
- 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. *J Biol Chem.*, 280, 5636- 45.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antimicrobial properties and potential applications in foods- a review. *Int J of Food Microbiol.*, 94, 223-253.
- Campêlo, L.M., Gonçalves F.C., Feitosa C.M., de Freitas R.M., 2011. Antioxidant activity of *Citrus limon* essential oil in mouse hippocampus. *Pharm Biol.*, 49 (7), 709-15.
- Çarıkcı, S., 2005. *Sideritis condensata Boiss. & Heldr* Bitkisinin Fitokimyasal Analizi. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Casgrande, F. and 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. *Biochem Pharmacol.*, 61, 1205-15.
- Cecilia, W.L., 2000. Developmental biology protocols, Volume 1, Springer in google books
http://books.google.ca/books?id=i0ew1jkdNecC&pg=PA200&lpg=PA200&dq=wintergreen+refractive+microscopy&source=bl&ots=vket0K-pXt&sig=5dTO7LedG0tPqWDULGEG32WBnus&hl=en&ei=QicwTfLiOMuB0QHD9MyiCQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CBYQ6AEwAA#v=onepage&q=wintergreen%20refractive%20microscopy&f=false
 (23.08.2011)
- Çelen, S., 2006. Türkiye’de Yayılış Gösteren Dört *Thymus* Türünün Uçucu Yağ Bileşimleri, Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir.
- Çelik, E. ve Çelik E.G., 2007. Bitki Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 5, 1-6.

- Ceylan, A., 1987. Tıbbi Bitkiler II (Uçucu Yağ İçerenler). Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Ofset Basımevi, Bornava, İzmir.
- Chaouki, W., Leger D.Y., Liagre B., Beneytout J.L., Hmamouchi M., 2009. Citral inhibits cell proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cells. *Fundam Clin Pharmacol.*, 23 (5), 549-56.
- 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 Lett*, 129, 173-9.
- Chen, D., Daniel K.G., Chen M.S., Kuhn D.J., Landis-Piwowar K.R., Dou Q.P., 2005. Dietary Flavonoids As Proteasome Inhibitors And Apoptosis Inducers In Human Leukemia Cells. *Biochem Pharmacol.*, 69, 1421- 32.
- 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 Lett*, 246, 237-52.
- Chevallier, A., 1996. *The Encyclopedia of Medicinal Plants*. New York, NY: DK Publishing Inc.
- Chou, Y.L., 1952. Floral morphology of three species of *Gaultheria*: Contributions from the Hull Botanical Laboratory. *Botanical Gazette*, 114, 198-221.
- Ciftci, O., Ozdemir I., Tanyildizi S., Yildiz S., Oguzturk H., 2011. Antioxidative effects of curcumin, β -myrcene and 1,8-cineole against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced oxidative stress in rats liver. *Toxicol Ind Health*, 27 (5), 447-53.
- Connolly, J.D. and Hill R.A., 1991. *Dictionary of terpenes*, vol 1: mono- and sesquiterpenes, vol. 2: di- and higher terpenes, Chapman & Hall, London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras.
- Constantinou, A., Mehta R., Runyan C., Rao K., Vaughan A., Moon R., 1995. Flavonoids As Dna Topoisomerase Antagonists And Poisons: Structure-Activity Relationships. *J Nat Prod.*, 58, 217- 25.
- 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. *Eur. J. Cancer*, 34, 1927-34.
- 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 Prolif*, 45, 53-65. (In Pres).
- Cragg, G.M., Boyd M.R., Cardellina II. H.J., Newman D.J., Snader K.M. and McCloud T.G., 1994. Ethnobotany and drug discovery: the experience of the US National Cancer Institute. In *Ethnobotany and the Search for New Drugs*. Ciba Foundation Symposium, (eds. Chadwick, DJ, Marsh, J) pp 178-196. Chichester, UK: Wiley and Sons.
- Cragg, G.M., Newman D.J. and Snader K.M. 1997. Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod.*, 60, 52-60.
- Çöl, Ç., 2007. *Sideritis tmolea P. H. Davis* bitkisinin diterpen bileşenlerinin izolasyonu ve yapılarının tayini. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.

- Crowell, P.L., 1997. Monoterpenes in breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Res Treat.*, 46 (2-3), 191-7.
- Davis, M.E. and Croteau R., 2000. Cyclization Enzymes in the Biosynthesis of Monoterpenes, Sesquiterpenes, and Diterpenes. *Topics in Current Chemistry*, 209, 54-92.
- Deans, S.G. and Ritchie G., 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5, 165.
- Demirci, F., Berber H., İşcan G., 2008. Biyokatalizörler Yardımıyla p-Simen'den Timokinon ve Benzeri Biyoaktif Metabolitlerin Üretimi. Proje No: 106T11. 7-9.
- Demirçakmak, B., 1994. *Cedrus libani* Uçucu Yağın Bileşimi. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwel, M., Bornet, F., Fern, E.B., Roberfroid M.B., 1999. Scientific Concepts of Functional Foods in Europe: Consensus Document. *Br J Nutr* 81 (suppl 1), 1-27.
- Diri, M., 2006. *Coridothymus capitatus (L.) Reichb.* Uçucu Yağının Analiz, Su ve Etanol Ekstraktlarının Antoksidant Aktivitelerinin Belirlenmesi. Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.
- Dorman, H.J.D. and Deans S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308.
- Dobelis, I.N., 1986. ed. *Magic and Medicine of Plants.*, NY: Reader's Digest Association, Inc., <http://www.anandaapothecary.com/aromatherapy-essential-oils/wintergreen-essential-oil.html>. (23.08.2011)
- Dreisbach, R.H. and Robertson W.O., 1987. *Handbook of Poisoning*, 12th ed. Norwalk, CT: Appleton and Lange.
- Duke, J.A., Ducellier J., Bogunschütz-Godwin M.J., 1985. *Handbook of Medicinal Herbs*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Dwellely, M.J., 1977. *Summer & Fall Wildflowers of New England Down East Enterprise, Inc.* p. 60. ISBN 0-89272-020-4. Retrieved 2008-08-10.
- Duru, M., 1993. *Luquidambar orientalis* var. *orientalis* ve *Luquidambar orientalis* var. *integriloba* yapraklarından elde edilen uçucu yağın analizi. Yüksek lisans tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Edris, A.E., 2007. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and their Individual Volatile Constituents: A Review, *Phytother Res.*, 21, 308-323.
- Elegbede, J.A., Elson C.E., Qureshi A., Tanner M.A., Gould M.N., 1984. Inhibition of DMBA-induced mammary cancer by the monoterpene d-limonene. *Carcinogenesis*, 5 (5), 661-4.
- El Bouzidi, L., Abbad A., Hassani L, Fattarsi K., Leach D., Markouk M., Legendre L. and Bekkouche K., 2012. Essential oil composition and antimicrobial activity of wild and cultivated moroccan *Achillea ageratum* L.: a rare and threatened medicinal species. *Chemistry & Biodiversity*, 9 (3), 598-605.
- Ennajar, M., Bouajila J., Lebrihi A., Mathieu F., Abderraba M., Raies A., Romdhane M., 2009. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of essential oils and various extracts of *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae). *J Food Sci.*, 74 (7), M364-71.
- Erel, O., 2004. A Novel Automated Direct Measurement Method For Total Antioxidant Capacity Using A New Generation, More Stable ABTS Radical Cation, *Clin. Biochem.*, 37, 277-285.

- Erel, O., 2004. A Novel Automated Method To Measure Total Antioxidant Response Against Potent Free Radical Reactions, *Clin. Biochem.*, 37, 112-9.
- Fararh, K.M., Shimizu Y., Shiina T., Nikami H., Ghanem M.M., Takewaki T., 2005. Thymoquinone Reduces Hepatic Glucose Production in Diabetic Hamsters. *Res Vet Sci.*, 79, 219-223.
- Ferrandız, M. and Alcaraz M.J., 1991. Anti-Inflammatory Activity And Inhibition Of Arachidonic Acid Metabolism by Flavonoids. *Agents Actions*, 32, 283-8.
- 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. *Clin Cancer Res.*, 2, 659–68.
- Gaudet, H., 2011. What is wintergreen oil? Edited By: A. Joseph, <http://www.wisegeek.com/what-is-wintergreen-oil.htm>. (23.08.2011)
- Geoffrey, M., Cooper R., Hausman E., 2006. *The Cell: A Molecular Approach*, Third edition. Hücre: moleküler yaklaşım. Çeviri editörleri: Meral Sakızlı, Neşe Atabey Üçüncü baskı. İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, Bölüm 15, 631-668.
- Gminski, R., Tang T., Mersch-Sundermann V., 2010. Cytotoxicity and genotoxicity in human lung epithelial A549 cells caused by airborne volatile organic compounds emitted from pine wood and oriented strand boards. *Toxicol Lett.*, 196 (1), 33-41.
- Gould, M.N., 1997. Cancer chemoprevention and therapy by monoterpenes. *Environ Health Perspect.*, 4, 977-9.
- Gören, A.C., 1997. Tıbbi Bitkiler (Uçucu Yağ Bitkileri) Cilt II, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayını, No:481.
- Guenther, E., 1948. *The Essential oils*, D. Van Nostrand, New York, USA.
- Gurung, K., 2007. Analysis of wintergreen oil, Ecology Agriculture and Rural Development Society, Dolakha, Nepal.
- Güneş, E.G., 2009. Bir Türk Populasyonunda Beyin Kanseri Ve *Axin2* Gen Polimorfizmi Arasındaki İlişkinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- Hanahan, D. and Weinberg R., 2000. The Hall Marks of Cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- Harborne, J.B., 1991. Recent Advances In The Ecological Chemistry Of Plant Terpenoids, In: Harborne J.B., Tomas-Barberan, F.A., (Eds): *Ecological Chemistry And Biochemistry Of Plant Terpenoids*. Oxford, Pp 399–426.
- He, L., Mo H., Hadisusilo S., Qureshi A.A., Elson C.E., 1997. Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas *in vitro* and *in vivo*. *J Nutr.*, 127 (5), 668-74.
- Hofman, M., Diaz J.E., Martella C., 1998. Oil of wintergreen overdose. *Ann Emerg Med.*, 31, 793-794.
- Howrie, D.L., Moriarty R., Breit R., 1985. Candy flavoring as a source of salicylate poisoning. *Pediatrics*, 75, 869-871.
- Huang, C.C., Lo C.P., Chiu C.Y., Shyur L.F., 2010. Deoxyelephantopin, a novel multifunctional agent, suppresses mammary tumour growth and lung metastasis and doubles survival time in mice. *Br J Pharmacol.*, 159 (4), 856-71.
- Işık, F.E., 2005. Edirne Bölgesinde Yetişen *Trifolium resupinatum* L. var. *microcephalum* Bitkisinin Fitokimyasal İncelenmesi. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

- Jain, A., Katewa S.S., Galav P.K. and Nag A. 2007. Unrecorded ethnomedical uses of biodiversity from Tadgarh-Raoli wildlife sanctuary, Rajasthan, India. *Acta Botanica Yunnanica*, 29 (3), 337-344.
- Jayashree, T. and Subramanyam C., 1999. Antiaflatoxic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. *Lettesin Appl. Microbiology*, 28, 179-183.
- Jemal, A., Murray T., Ward E., *et al.* 2005. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.*, 55, 10-30.
- Jo, J.R., Park J.S., Park Y.K., Chae Y.Z., Lee G.H., Park G.Y. and Jang B.C., 2012. *Pinus densiflora* leaf essential oil induces apoptosis via ROS generation and activation of caspases in YD-8 human oral cancer cells. *International Journal of Oncology*, 40 (4), 1238-1245.
- Juliani, R., Moharram H., Wang M. and Simon J., 2004. Chemical diversity of Nepalese Essential oils. In: *New Use Agriculture and Natural Plant Products Program*, Cook College, Rutgers University, USA.
- Karabacak, Ç., 2007. Bazı *Scutellaria orientalis* Türlerinin İçerisindeki Ekstraktif Bileşiklerin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Karahan, A., 2007. *Sideriti Gülendami H. Duman* ve *F.A Karavelioğlu* Bitkisinin Diterpen Bileşiklerinin İzolasyonu ve Yapılarının Tayini. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Karkabounas, S., Kostoula O.K., Daskalou T., Veltsistas P., Karamouzis M., Zelovitis I., Metsios A, Lekkas P., Evangelou A.M., Kotsis N., Skoufos I., 2006. Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol. *Exp Oncol.*, 28 (2), 121-125.
- Karpouhtsis, I., Pardali E., Feggou E., Kokkini S., Scouras Z.G., MavraganiTspidou P., 1998. Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1111.
- Kaya, M., 2007. Bazı Monoterpen Ve Uçucu Yağların Hücre Çoğalması Ve Apoptozis Üzerine Etkilerinin Memeli Hücre Kültürleriyle Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Kazancıgil, A., 1982. Anderson Patoloji, Cilt: I, (Anderson, W.A.D., Kissane, J.M.; Pathology Seventh Ed. Çevirisi. Güven Yayıncılık San. ve Tic. A.Ş., 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 Res* 24, 943- 54.
- Kırbağ, S. and Bağcı E., 2000. *Picea abies (L.) karst.* ve *Picea orientalis (L.) link* Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Aktivitesi Üzerine Bir Araştırma. *Journal of Qafqaz University*, III (I), 183-190.
- Kınci, 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 Bentham Bitkisinin Uçucu Bileşenlerinin Analiz ve Antioksidatif Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.
- Kim, Y.S., Bahn K.N., Hah C.K., Gang H.I., Ha Y.L., 2008. Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene induced mouse skin carcinogenesis by *Artemisia capillaris*. *J Food Sci.*, 73 (1), T16-20.

- Koç, E. ve Üstün A.S., 2008. Patojenlere Karşı Bitkilerde Savunma Ve Antioksidanlar Kullanıcı. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 24 (1-2) 82 – 100.
- Kollár, P., Bárta T., Závalová V., Smejkal K., Hampl A., 2011. Geranylated flavanone tomentodiplacone B inhibits proliferation of human monocytic leukaemia (THP-1) cells. Br J Pharmacol., 162 (7), 1534-41. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01171.x.
- Koltuksuz, G., 2007. *Actinolema macrolema* boiss. (Apiaceae) uçucu yağı üzerinde araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Konstantopoulou, I., Vassilopoulou L., MavraganiTsipidou P., Scouras Z.G., 1992. Insecticidal effects of essential oils. A study of the effects of essential oils extracted from eleven Greek aromatic plants on *Drosophila auraria*. Experientia, 48, 6, 616.
- Koyuoğlu, S., 2008. *Paeonia* türleri içerisindeki monoterpen glikozitlerinin yapı tayinleri ve kromatografik analizleri için yöntem geliştirilmesi. Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Kudish, M., 1992. Adirondack upland flora: an ecological perspective. Saranac, NY: The Chauncy Press. 320 p. [19376].
- Kuran, O., 1983. Systema Digestorum- Sindirim Sistemi, Ventriculus Gaster- Mide, Sistematik Anatomi. Filiz kitapevi, Prof. Dr. Orhan Kural, editör, sayfa: 388-396.
- Kurt Sadırlı, S., 2008. Kanserli Hastalarda Semptom Kontrolünün Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Lawless, J., 1995. Complete Essential Oils: A Guide to the Use of Oils in Aromatherapy and Herbalism. Element Books Limited.
- Lepley, D.M., Li B., Birt D.F., Pelling J.C., 1996. The Chemopreventive Flavonoid Apigenin Induces G2/M Arrest In Keratinocytes. Carcinogenesis, 17, 2367-75.
- Liston, B.W., Nines R., Carlton P.S, Gupta A., Aziz R., Frankel W., Stoner G.D., 2003. Perillyl alcohol as a chemopreventive agent in N-nitrosomethylbenzylamine-induced rat esophageal tumorigenesis. Cancer Res., 63 (10), 2399-403.
- Loza-Tavera, H., 1999. Monoterpenes in essential oils: biosynthesis and properties. Advances in Experimental Medicine and Biology. 464, 49-62.
- Lust, J., 1974. The Herb Book. Bantam Books. p.404. ISBN 0-553-26770-1. <http://books.google.com/books?id=FjkMAAAACA AJ&dq=The+Herb+Book> Retrieved 2008-08-10. (23.08.2011)
- Magiatis, P., Skaltsounis A.L., Chinou I. and Haroutounian S.A., 2002. Chemical composition and invitro antimicrobial activity of the essential oils of three Greek *Achillea* species. Z.Naturforsch, 57, 287.
- Mahmoud, S.S. and Croteau R.B., 2002. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. Trends in Plant Science, 7, 366-373.
- Mari, M., Bertolini P., Pratella G.C., 2003. Nonconventional methods for the control of postharvest pear diseases. Journal of Applied Microbiology, 94, 761.
- Matlack, G.R. and Good R.E., 1989. Plant-scale pattern among herbs and shrubs of a fire-dominated coastal plain forest. Vegetatio. 82: 95-103.[9829].
- Matthay, K.K., 1997. Neuroblastoma: biology and therapy. Oncology (Williston Park), 11 (12), 1857-66; discussion 1869-72, 1875.

- McCarthy, P., 1992. Asthma-flavored toothpaste. *Omni.*, 14, 36.
- Medini, H., Elaissi A., Larbi Khouja M., Piras A., Porcedda S., Falconieri D., Marongiu B., Chemli R., 2011. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Juniperus phoenicea* L. berries. *Nat Prod Res.*, 25 (18), 1695-706.
- Mirick, S. and Quinn J.A., 1981. Some observations on the reproductive biology of *Gaultheria procumbens* (Ericaceae). *American Journal of Botany*, 68 (10), 1298-1305.
- Mohamad, R.H., El-Bastawesy A.M., Abdel-Monem M.G., Noor A.M., Al-Mehdar H.A., Sharawy S.M., El-Merzabani M.M., 2011. Antioxidant and anticarcinogenic effects of methanolic extract and volatile oil of fennel seeds (*Foeniculum vulgare*). *J Med Food*, 14 (9), 986-1001.
- Mora, J., *et al.*, 2001. Molecular genetics of neuroblastoma and the implications for clinical management: a review of the MSKCC experience. *Oncologist*, 6 (3), 263-8.
- Mourey, A. and Canillac N., 2002. Anti-Listeria monocytogenesis activity of essential oils components of conifers *Food Control.*, 13, 289-292.
- Mueller , S.O., Kling M., Arifin Firzani P., Mecky A., Duranti E., Shields-Botella J., Delansorne R., Broschard T., Kramer P.J., 2003. Activation of estrogen receptor alpha and ERbeta by 4-methylbenzylidene-camphor in human and rat cells: comparison with phyto- and xenoestrogens. *Toxicol Lett.*, 142 (1-2), 89-101.
- Newman, D.J., Cragg G.M. and Snader K.M. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Products Reports*, 17, 215-234.
- Newman, D.J. and Cragg G.M., 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod.*, 70 (3), 461-77.
- Oktar, N., 2009. K562 Hücre Dizisinde Fosfin Bileşiklerinin Sitotoksik Etkisinin MTT (3-[4,5 Dimethylthiazole-2-YI]-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide; Thiazolyl Blue) ile Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Olgun, N., 2009. Nöroblastom. *Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci.*, 5 (4), 49-61.
- Olshan, A., 2005. Epidemiology, In: Nai-Kong V. Cheung, Susan L. Cohn, Neuroblastoma, 1.ed., Heidelberg, Springer, p:1-5.
- Pandey, R., Karla A., Tandon S., Mehrota N., Singh H.N. and Kumar S., 2000. Essential oil compounds as potent of nematicidal compounds. *J. Of Phytopathology*, 148, 501-502.
- Plaumann, B., Fritsche M., Rimpler H., Brandner G., Hess R.D., 1996. Flavonoids Activate Wild-Type P53. *Oncogene*, 13, 1605-14.
- Pervaiz, S., 2004. Chemotherapeutic potential of the chemopreventive phytoalexin resveratrol. *Drug Resist Updat.*, 7 (6), 333-44.
- Pessoa, L.M., Morais S.M., Bevilaqua C.M.L. and Luciano J.H.S., 2002. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus*. *Veterinary Parasitology*, 109, 59-63.
- Rasooli, I. and Mirmostafa S.A., 2002. Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oils. *Fitoterapia*, 18, 244.
- Reddy, L., Odhav B., Bhoola K.D., 2003. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology&Therapeutics*, 99, 1-13.

- 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 Radic. Res.*, 22, 375-83.
- Rister, R., 2011. Wintergreen oil. Prescription for Herbal Healing By Phyllis A. Balch. <http://books.google.com/books?id=OhboMkD-nbgC&pg=PA143&lpg=PA143&dq=Wintergreen+oil+healing&source=bl&ots=Txkdez5AK&sig=HkElb8TCOMATO83YFWpzNViPMDs&hl=en#v=onepage&q=Wintergreen%20oil%20healing&f=false>. (23.08.2011)
- Robbers, J.E., Speedie M.K., Tyler, V.E., 1996. Ed. Balado, Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology, D., Williams & Wilkins, USA, p:81-107.
- Robinette, S.L., 1974. Checkerberry wintergreen (*Gaultheria procumbens* L. In: Gill, John D.; Healy, William M., compiler (also revised). Shrubs and vines for northeastern wildlife. Gen. Tech. Rep. NE-9. Upper Darby, PA: US Department of Agriculture, Forest Service, Northeastern Forest Experiment Station: 20-22. [10109].
- 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, 762-6.
- Rohmer, M., 1999. The Discovery of A Mevalonate Independent Pathway For Isoprenoid Biosynthesis In Bacteria, Algae and Higher Plants. *Nat Prod Rep.*, 16, 565-574.
- 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. *J Med Food*, 15, 231-41.
- Sakar, M.K. ve Tanker M., 1991. Fitokimyasal analizler. Ankara üniversitesi, Eczacılık Fak. Yay.. No:67, p.181.
- Samaila, D., Toy B.J., Wang R.C., Elegbede J.A., 2004. Monoterpenes enhanced the sensitivity of head and neck cancer cells to radiation treatment *in vitro*. *Anticancer Res.*, 24 (5), 3089-3095.
- Sawamura, M., Sun S.H., Ozaki K., Ishikawa J, Ukeda H., 1999. Inhibitory effects of *Citrus* essential oils and their components on the formation of N-nitrosodimethylamine. *J Agric Food Chem.*, 47 (12), 4868-4872.
- Seifried, H.E., Anderson D.E., Fisher E.I., Milner J.A., 2007. A Review of the İnteraction Among Dietary Antioxidants and Reactive Oxygen Species. *J Nutr Biochem.*, 18, 567-579.
- Simon, J.E., 1984. Herbs: An Indexed Bibliography, 1971-1980. Hamden, CT: Shoe String Press.
- Skočbušić, M., Bezić N., Dunkić V., 2006. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia. *Food Chemistry*, 96, 20.
- Soy, N.N., 2006. Doku Kültüründe Paklitaksel'in Apoptotik Ve Antiproliferatif Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Şengezer, E. ve Güngör T., 2008. Esansiyel Yağlar ve Hayvanlar Üzerindeki Etkileri. *Lalahan Hay. Arat. Enst. Derg.*, 48 (2), 101-110.

- Tanker, M. ve Tanker N., 1985. Uçucu yağlar, Farmakognozi Cilt 2, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 269-297.
- Taylor, P.G., Dupuy Loo O.A., Bonilla J.A., Murillo R., 2008. Anticancer Activities of Two Sesquiterpene Lactones, Millerenolide and Thieleanin Isolated From *Viguiera sylvatica* and *Decachaeta thieleana*. *Fitoterapia*, 79, 428-32.
- Terao, J., Piskula M., Yao Q., 1994. Protective Effect Of Epicatechin Gallate And Quercetin On Lipid Peroxidation In Phospholipid Bilayers. *Arch Biochem Biophys*, 308, 278- 84.
- 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), 370-9. doi: 10.1097/CAD.0b013e32834f6ea8.
- Turhan, H., 2008. Mide Kanserli Hastalarda Periferik Kanda Telomeraz mRNA Ekspresyonunun Real Time Pcr Kullanılarak Belirlenmesi Ve Klinikopatolojik Özelliklerle İlişkinin Saptanması. Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Erzurum.
- Tyler, V.E., Brady L.R., Robbers J.E., 1988. *Pharmacognosy*, 9th ed., Lea and Febriger, Philadelphia, 103-137p.
- Umay, A., 2007. *Lavandula stoechas*, *Melissa officinalis* ve *Tribulus terrestris* bitkilerinin kimyasal içeriklerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Vieira, A., Heidor R., Cardozo M.T., Scolastici C., Purgatto E., Shiga T.M., Barbisan L.F., Ong T.P., Moreno F.S., 2011. Efficacy of geraniol but not of β -ionone or their combination for the chemoprevention of rat colon carcinogenesis. *Braz J Med Biol Res.*, 44 (6), 538-545.
- Wagner, K.H. and Elmadfa I., 2003. Biological Relevance of Terpenoids, Overview Focusing on Mono-, Di- and Tetraterpenes. *Ann Nutr Metab.*, 47, 95–106.
- Wang, J., Liu H., Gao H., Zhao J., Zhou L., Han J., Yu Z. and Yang F., 2011. Antimicrobial and antioxidant activities of the flower essential oil of *Halimodendron halodendron*. *Natural Product Communications*, 6 (11), 1749-1753.
- Wang, W., Li N., Luo M., Zu Y. and Efferth T., 2012. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. *Molecules*, 17 (3), 2704-2713.
- Wei, A. and Shibamoto T., 2007. Antioxidant Activities and Volatile Constituents of Various Essential Oils. *J Agric Food Chem.*, 55, 1737-1742.
- Wu, S., Patel K.B., Booth L.J., Metcalf J.P., Lin H.K. and Wu W., 2010. Protective essential oil attenuates influenza virus infection: an *in vitro* study in MDCK cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15, 10-69.
- Wyllie, A.H. 1997. Apoptosis and carcinogenesis. *Eur J Cell Biol.*, 73, 189-197.
- Yadav, M.K., Patil M.V., Jasra R.V. 2008. Acetoxylation and hydration of limonene and α -pinene using cation-exchanged zeolite beta. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 297 (2009), 101–109.
- Yaylı, N., 2007. Bazı *Teucrium* L. Taksonlarında Uçucu Yağların Kimyasal Bileşimleri ve Antimikrobiyal Aktiviteleri. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

- Yılmaz İskender, N., 2007. Türkiye Doğal *Viburnum* L. (Caprifoliaceae) Türlerinin Uçucu Yağ Bileşimleri Ve Antimikrobiyal Aktiviteleri. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Yılmaz, E. ve Murat S., 2010. Terpenler. Kimya Bölümü Bitirme Ödevi, Sakarya Üniversitesi, Sakarya.
- Yılmaz, S., 2011. Nöroblastomlu Hastalarda Sfingozin 1- Fosfat Reseptör 4 Gen Ekspresyonunun Sağlıklı Çocuklar İle Karşılaştırılması. Yan Dal Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Adana.
- Yoon, W.J., Lee N.H., Hyun C.G., 2010. Limonene suppresses lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide, prostaglandin E2, and pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. J Oleo Sci., 59 (8), 415-421.
- Yue, Z. and Shu U. 1998. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. Journal of Natural Product, 61, 1053-1071.
- Yumrutaş, Ö., 2007. *Salvia verticillata* (subsp. *amasiaca* ve subsp. *verticillata*) ve *S. euphratica* var. *euphratica* ve var. *leiocalycina*'dan Elde Edilen Özütlerin ve Uçucu Yağların Antioksidan Aktivitelerinin Karşılaştırmalı Olarak Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- Zeng, W.C., Zhang Z., Gao H., Jia L.R., He Q., 2012. Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Essential Oil from Pine Needle (*Cedrus deodara*). J Food Sci., 77 (7), C824-C829.
- Zeybek, U. ve Zeybek N., 2002. Farmasötik Botanik Kapalı Tohumlu Bitkiler (Angiospermae) Sistematığı ve Önemli Maddeleri, 3 (Değiştirilmiş 3. baskı) Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Ofset Basımevi, Bornova İzmir.
- Zhang, D., Liu R., Sun L., Huang C., Wang C., Zhang D.M., Zhang T.T., Du G.H., 2011. Anti-inflammatory activity of methyl salicylate glycosides isolated from *Gaultheria yunnanensis* (Franch.) Rehd. Molecules, 16 (5), 3875-84.

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Erzurum'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2005 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünden 2009 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans öğrenimine başladı. 2009-2012 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı.