



***ASTRODAUCUS ORIENTALIS* (L.) DRUDE MEYVE
METANOL EKSTRAKTININ VE UMBELLİFERONUN
SH-SY5Y İNSAN NÖROBLASTOM HÜCRE HATTI
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sibel İNİK TOPTAŞ
Fizyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Gülşah GÜNDOĞDU

Yüksek Lisans Tezi-2019

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***ASTRODAUCUS ORIENTALIS* (L.) DRUDE MEYVE
METANOL EKSTRAKTININ VE UMBELLİFERONUN
SH-SY5Y İNSAN NÖROBLASTOM HÜCRE HATTI
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sibel İNİK TOPTAŞ

Fizyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Gülşah GÜNDOĞDU


ERZURUM
2019

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ASTRODAUCUS ORIENTALIS (L.) DRUDE MEYVE METANOL
EKSTRAKTININ VE UMBELLİFERONUN SH-SY5Y İNSAN
NÖROBLASTOM HÜCRE HATTI ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Sibel İNİK TOPTAŞ

Tez Savunma Tarihi: 19.09.2019

Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Gülşah GÜNDOĞDU (Pamukkale Üniversitesi) 

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Mustafa GÜL (Atatürk Üniversitesi) 

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Cebail GÜRSUL

(Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi) 

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü 

Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM - 2019

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser	3
2.1.2. Apoptoz.....	4
2.1.3. Beyin Tümörleri.....	6
2.1.3.1. Çocukluk Çağı Beyin Tümörleri.....	6
2.2. Nöroblastom.....	7
2.2.1. Semptomlar	9
2.2.2. Nöroblastom Histopatolojisi ve Evreleme:.....	10
2.2.3. Nöroblastom Tedavisi.....	12
2.2.3.1. Nöroblastom Tedavisinde Alternatif Yaklaşımlar	13
2.3. Apiaceae Familyasının Türkiye'deki Durumu	13
2.3.1. Apiaceae Familyası Üyelerinin İçerdiği Kimyasal Bileşikler	14
2.3.2. <i>Astrodaucus</i> Drude Cinsinin Sistematikteki Yeri	14
2.3.3. Familyadaki Ana Etken Madde Gruplarından Kumarinler.....	14
2.3.4. Kumarinler ve Biyolojik Aktiviteleri.....	14
2.3.5. <i>Astrodaucus orientalis</i> (L.) Drude Cinsinin Deskripsiyonu	14
2.3.6. Bitkinin Halk Arasındaki Kullanımı.....	15

2.4. Umbelliferon Bileşigi	15
3. MATERYAL VE METOT.....	18
3.1. <i>Astrodaucus orientalis</i> Bitki örneklerinin toplanması	18
3.2. Ekstraksiyon ve İzolasyon Çalışmaları	19
3.2.1. Bitkinin Meyvelerinden Metanol Ekstraksiyonun Hazırlanışı	19
3.2.2. İzolasyon çalışmaları	19
3.2.2.1. Kolon Kromatografisi	19
3.2.2.2. İzole Edilen Umbelliferon Bileşiğinin Yapı Tayini.....	20
3.3. Hücre Kültürü Çalışması	20
3.3.1. Hücre Kültürü Deneyinde Kullanılan Kimyasallar, Cihazlar ve Malzemeler	20
3.3.2. SH-SY5Y Hücrelerinin Kültüre Edilmesi	21
3.3.2.1. SH-SY5Y Hücrelerinin Çözdürülmesi	21
3.3.2.2. SH-SY5Y Hücrelerinin Çoğaltılması ve Pasajlanması.....	22
3.3.2.3. SH-SY5Y Hücrelerinin Dondurulması.....	22
3.3.3. SH-SY5Y Hücrelerinin Sayılması ve 96'lık plakalara ekilmesi	23
3.3.4. <i>Astrodaucus Orientalis</i> (L.) Drude Ekstresi ve Umbelliferon Uygulanması ve MTT Sitetoksisite Testlerinin Çalışılması.....	24
3.3.5. Total Oksidan ve Antioksidan Düzeylerine Bakılması.....	25
3.3.5.1. Total Oksidan Düzeyine Bakılması	26
3.3.5.2. Total Antioksidan Düzeyine Bakılması.....	27
3.3.6. Verilerin İstatistiksel Analizlerin Yapılması	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. Umbelliferonun Bileşiğinin NMR Değerleri	29
4.2. Sitotoksisitenin Belirlenmesi	32
4.2.1. <i>Astrodaucus orientalis</i> Meyve Metanol Ekstresi Sitotoksisitesinin Belirlenmesi	32

4.2.2. <i>Astrodaucus orientalis</i> Meyve Metanol Ekstresinden İzole Edilen Umbelliferonun Sitotoksitesinin Belirlenmesi	34
4.3. Oksidatif Stres İndeksinin Belirlenmesi	35
4.3.1. <i>Astrodaucus orientalis</i> Meyve Metanol Ekstresi Total Oksidan Seviyesinin Belirlenmesi (TOS)	35
4.3.2. <i>Astrodaucus Orientalis</i> Meyve Metanol Ekstresi Total Antioksidan Seviyesinin Belirlenmesi (TAS)	37
4.3.3. <i>Astrodaucus Orientalis</i> Meyve Metanol Ekstresinden İzole Edilen Umbelliferonun Total Oksidan Seviyesinin Belirlenmesi (TOS)	38
4.3.4. <i>Astrodaucus Orientalis</i> Meyve Metanol Ekstresinden İzole Edilen Umbelliferonun Total Antioksidan Seviyesinin Belirlenmesi (TAS)	40
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR	49
EKLER	62
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	62
EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	63
EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU	64
EK-4. YÜKSEK LİSAN TEZ SAVUNMA SINAVI TUTANAĞI	65

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın konusunun belirlenmesinden, çalışmalarımın sürdürülmesine kadar bana her konuda yardımcı olan, yoğun programı olmasına rağmen ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, beni sabır ve anlayışla karşılayan, çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren kendisini her zaman örnek alacağım, Pamukkale Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan değerli tez danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Gülşah GÜNDOĞDU' ya, Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Mustafa GÜL'e, çalışmamı yapmam için gerekli laboratuvar imkanları sunan Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na, çalışmam için gerekli olan deneyimin temelini oluşturan materyalin temininden kullanımına kadar tüm aşamalarda yardımlarını esirgemeyen gönlü yüce insan olan Eczacılık Fakültesi'nde görev yapan Dr. Öğr. Üyesi Songül KARAKAYA'ya, çalışmamın yürütülmesi için gerekli olan laboratuvar çalışmamda ve diğer bir çok konuda bana desteklerini esirgemeyen Arş. Gör. Kemal Alp NALCI'ya, eşi Özge NALCI'ya ve Arş. Gör. Şeymanur YILMAZ TAŞÇI'ya, tezimin yazım aşamasında gerekli yardımları gösteren Tülay GENÇ'e ve yıllardır üzerimden ellerini çekmeyen eğitimim adına seferber olan aile bireylerim kıymetli annem, babam, ablalarım ve ağabeyime, maddi ve manevi desteği ve umut dolu fikirleriyle beni hep zirvede tutan kıymetli eşim Lokman TOPTAŞ'a teşekkürü bir borç biliyorum ve tezimi 11 aylık oğlum Ali Egemen TOPTAŞ' a hayatı boyunca ışık tutması için hediye ediyorum.

Sibel İnik Toptaş

ÖZET

***Astrodaucus Orientalis* (L.) Drude Meyve Metanol Ekstraktının ve Umbelliferonun SH-SY5Y İnsan Nöroblastom Hücre Hattı Üzerine Etkilerinin Araştırılması**

Amaç: Nöroblastom, çocuklarda kansere bağlı ölümlerin yaklaşık % 15'ini oluşturan, beyin dokusu içerisinde hızlı bir şekilde yayılabilen tümörlerinden biridir. Türkiye’de “Gımmi, havayıldız” adıyla bilinen *Astrodaucus* Drude (Apiaceae) cinsi, Türkiye ve İran’da gıda maddesi olarak tüketilmektedir. Bu bitkiden izole edilen Umbelliferon (UMB) bir kumarin türevi bileşiktir ve anti-oksidan, anti-kanser, anti-inflamatuvar ve nöroprotektif etkileri bulunmaktadır. Bu çalışmada, *A. orientalis* (L.) Drude’nin meyvelerinden metanol ekstresinin elde edilmesi, bu ekstreden UMB izole edilmesi ve ekstre ile birlikte UMB’un SH-SY5Y insan Nöroblastom hücrelerinde sitotoksite ve oksidatif stres üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: *Astrodaucus orientalis* meyvelerinin metanol ekstresi hareketli maserasyon ile elde edildi ve metanol ekstresinden kolon kromatografisi ile UMB bileşiği izole edildi. İzole edilen UMB’un yapısı, spektroskopik yöntemler (1D, 2D-NMR ve HRESIMS) ile belirlendi. Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM) F12’inde büyütülmüş SH-SY5Y hücrelerine elde edilen ekstrenin (10^{-1} - 10^{-6} mg/mL) ve UMB’un ($10 \mu\text{M}^{-1}$ mM) farklı doz aralıkları eklenerek 24 ve 72 saat süreyle inkübasyona bırakıldı ve daha sonra hem ekstrenin hem de UMB’un SH-SY5Y insan nöroblastom a hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi zamana ve doza bağlı olarak MTT yöntemi ile ölçüldü. Reaktif oksijen türlerinin üretimini değerlendirmek için ise total oksidan düzeyi (TOS) ve total antioksidan düzeyi (TAS) analizleri gerçekleştirildi.

Bulgular: MTT analiz sonuçlarına göre, *Astrodaucus orientalis* meyve metanol ekstresinin ve bu ekstreden izole edilen UMB’un IC_{50} konsantrasyonları, sırasıyla 72. saatte 10^{-2} mg/mL ve $250 \mu\text{M}$ olarak belirlendi. TAS ve TOS analiz sonuçlarına göre ise antioksidan seviyeyi, yüksek konsantrasyonlarda hem bitki ekstresinin hem de UMB’un azalttığı gözlemlendi.

Sonuç: Bu çalışmada SH-SY5Y insan Nöroblastom hücrelerinde *Astrodaucus orientalis* meyve metanol ekstresinin ve bu ekstreden izole edilen UMB’un sitotoksik ve oksidan etkileri olduğu tespit edildi. Elde ettiğimiz bu veriler ışığında UMB’un tek başına veya diğer ilaçlar ile kombinasyonu halinde nöroblastom tedavisinde kemoterapötik ilaçlara alternatif olarak kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: *Astrodaucus orientalis*, hücre kültürü, nöroblastom, umbelliferon

ABSTRACT

Investigation of the Effects of *Astrodaucus Orientalis* (L.) Drude Fruit Methanol Extract and Umbelliferone on SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line

Aim: Neuroblastoma is one of the tumors that can spread rapidly in brain tissue, and causes 15% of cancer-related deaths in children. *Astrodaucus* the Drude genus (Apiaceae), is known as "Gimmi, havayıldız" in Turkey, is consumed as food in Turkey and Iran. Umbelliferone (UMB) isolated from this plant a coumarin derivative compound and has anti-oxidant, anti-cancer, anti-inflammatory and neuroprotective effects. In this study, it was aimed to obtain methanol extract from *A. orientalis* (L.) Drude fruit, to isolate UMB from this extract and to investigate the effects of UMB on cytotoxicity and oxidative stress in SH-SY5Y human neuroblastoma cells.

Material and Method: The methanol extract of *Astrodaucus orientalis* (L.) Drude fruits was obtained by mobile maceration and the UMB compound was isolated from the methanol extract by column chromatography. The structure of the isolated UMB was determined by spectroscopic methods (1D, 2D-NMR and HRESIMS). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) was added to SH-SY5Y cells grown in F12 (10^{-1} - 10^{-6} mg / mL) and UMB ($10 \mu\text{M}^{-1}$ mM) by adding different dose intervals for 24 and 72 hours. The cytotoxic effect of both extract and UMB on the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line was measured by MTT method depending on time and the dose. Total oxidant level (TOS) and total antioxidant level (TAS) analyzes were performed to evaluate the production of reactive oxygen species.

Results: According to MTT analysis results, IC_{50} concentrations of fruit methanol extract of *A. orientalis* and UMB isolated from this extract were determined respectively as 10^{-2} mg / mL and 250 μM at 72 hours. According to the results of TAS and TOS analysis, it was observed that antioxidant level decreased by both plant extract and UMB at high concentrations.

Conclusion: In this study, it has been determined that fruit methanol extract of *Astrodaucus orientalis* and UMB isolated from this extract showed the cytotoxic and antioxidant effects on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. In the light of these data, it was concluded that UMB can be used alone or in combination with other drugs as an alternative to chemotherapeutic drugs in the treatment of neuroblastoma.

Key Words: *Astrodaucus orientalis*, cell culture, neuroblastoma, umbelliferone

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AIDS	:	Edinilmiş Bağışıklık Yetmezlik Sendromu
Bcl-2	:	B hücre lenfoma-2
BOS	:	Beyin Omurilik Sıvısı
DF	:	Dilüsyon Faktörü
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	:	Dimetilsülfoksit
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	:	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
ELISA	:	Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi
FBS	:	Fötal Sığır Serum
GNR	:	Ganglionörom
İTK	:	İnce Tabaka Kromatografisi
MIBG	:	Metayodobenzilguanidin
MTT	:	[3-(4,5-Dimethyliazol-2-Yl)-2,5 Diphenyl Tetrazolium Bromid]
PBS	:	Fosfat Tomponu
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
TAS	:	Total Antioksidan Düzeyi
TAT	:	Tamamlayıcı Alternatif Tıp
TOS	:	Total Oksidan Düzeyi
UMB	:	Umbelliferon

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Apoptotik yolak 11 Bid ve Bax: Bcl-2 ailesi üyeleri; t-Bid: Bid'in c-terminal bölgesinin kesilerek oluşan aktif formu; Apaf-1: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1; Apoptozom: dATP, sitokrom-c ve Apaf-1'den oluşan çoklu protein kompleksi.....	5
Şekil 2.2 Nöral krest hücrelerinin göçü ve farklılaşması	8
Şekil 2.3. Nöroblastomun köken aldığı bölge ve dokular	9
Şekil 2.4. Umbelliferon	16
Şekil 3.1. <i>Astrodaucus orientalis</i> bitkisinin genel görünüşü	18
Şekil 3.2. <i>Astrodaucus orientalis</i> bitkisinin herbaryum örnekleri	18
Şekil 3.3. Thoma lamı.....	24
Şekil 3.4. MTT' nin formazana dönüşümü.....	24
Şekil 4.1. Umbelliferonun ¹³ C-NMR (CDCl ₃ , 100 MHz) spektrumu	29
Şekil 4.2. Umbelliferonun ¹ H-NMR (CDCl ₃ , 400 MHz) spektrumu	30
Şekil 4.3. Umbelliferonun DEPT (CDCl ₃ , 100 MHz) spektrumu	30
Şekil 4.4. Umbelliferonun 2D- ¹ H- ¹ H-Homonükleer COSY spektrumu.....	31
Şekil 4.5. Umbelliferonun 2D- ¹ H- ¹³ C-Heteronükleer COSY (HMQC) spektrumu.....	31
Şekil 4.6. Umbelliferonun 2D- ¹ H- ¹³ C-Heteronükleer COSY (HMBC) spektrumu ...	32
Şekil 4.7. Çeşitli konsantrasyonlarda <i>Astrodaucus orientalis</i> meyve metanol ekstresinin 24 saat inkübasyonunu takiben MTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen sitotoksik etkisi	33
Şekil 4.8. Çeşitli konsantrasyonlarda <i>Astrodaucus orientalis</i> meyve metanol ekstresinin 72 saat inkübasyonunu takiben MTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen sitotoksik etkisi.....	33

Şekil 4.9. Çeşitli konsantrasyonlarda <i>Astrodaucus orientalis</i> meyve metanol ekstresinden izole edilen umbelliferonun 24 saat inkübasyonunu takiben MTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen sitotoksik etkisi.	34
Şekil 4.10. Çeşitli konsantrasyonlarda <i>Astrodaucus orientalis</i> meyve metanol ekstresinden izole edilen umbelliferonun 72 saat inkübasyonunu takiben MTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen sitotoksik etkisi	35
Şekil 4.11. Çeşitli konsantrasyonlarda <i>Astrodaucus orientalis</i> meyve metanol ekstresinin 24 saat inkübasyonunu takiben ortalama total oksidan seviyesi.....	36
Şekil 4.12. Çeşitli konsantrasyonlarda <i>Astrodaucus orientalis</i> meyve metanol ekstresinin 72 saat inkübasyonunu takiben ortalama total oksidan seviyesi.....	36
Şekil 4.13. Çeşitli konsantrasyonlarda <i>Astrodaucus orientalis</i> meyve metanol ekstresinin 24 saat inkübasyonunu takiben ortalama total antioksidan seviyesi (*: $p < 0.05$: istatistiksel olarak kontrole göre anlamlılık.....	37
Şekil 4.14. Çeşitli konsantrasyonlarda <i>Astrodaucus orientalis</i> meyve metanol ekstresinin 72 saat inkübasyonunu takiben ortalama total antioksidan seviyesi.....	38
Şekil 4.15. Çeşitli konsantrasyonlarda <i>Astrodaucus orientalis</i> meyve metanol ekstresinden izole edilen umbelliferonun 24 saat inkübasyonunu takiben ortalama total oksidan seviyesi	39
Şekil 4.16. Çeşitli konsantrasyonlarda <i>Astrodaucus orientalis</i> meyve metanol ekstresinden izole edilen umbelliferonun 72 saat inkübasyonunu takiben ortalama total oksidan seviyesi	39

Şekil 4.17. Çeşitli konsantrasyonlarda *Astrodaucus orientalis* meyve metanol ekstresinden izole edilen umbelliferonun 24 saat inkübasyonunu takiben ortalama total antioksidan seviyesi 40

Şekil 4.18. Çeşitli konsantrasyonlarda *Astrodaucus orientalis* Drude meyve metanol ekstresinden izole edilen umbelliferonun 72 saat inkübasyonunu takiben ortalama total antioksidan seviyesi 41



TABLULAR DİZİNİ

Tablo No

Sayfa No

Tablo 2.1. Nöroblastom'ye ait uluslararası eski (INSS) ve yeni (INRGSS) evreleme sistemleri ve bu sistemlerin karşılaştırması	11
Tablo 3.1. Deneyde kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler	20



1. GİRİŞ

Nöroblastom, adrenal medulla ve sempatik ganglionlarda görülen, nöral hücrelerden köken alan pediatrik bir tümördür. Nöroblastom, çocukluk çağında sıklıkla gözlenen ve tüm pediatrik kanser ölümlerinin yaklaşık %15' inden sorumlu olan ekstrakranial bir tümördür. Nöroblastom tedavisi mümkün olsa da kötü prognozludur ve sağ kalım oranı düşüktür. Nöroblastomun sağ kalım oranının düşük olması ve etkili bir farmakolojik tedavinin bulunmamasından dolayı bilim insanları Nöroblastom için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmekte ve alternatif bir tedavi arayışı içindedir. Bitkisel kökenli bileşiklerin birçok hastalığın tedavisinde ve prognozunun azaltılmasında etkin olduğunu gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Bu bağlamda, tüm dünyada, nöroblastomu da içeren farklı hastalıkların tedavi protokollerinde bitkisel kökenli bileşiklerin yer alması ile ilgili araştırmalar giderek önem kazanmaktadır.

Astrodaucus orientalis (L.) Drude İran'ın farklı bölgelerinde yetişen Apiaceae familyasına ait bir bitkidir. Bu aromatik bitki birçok kumarin bileşiklerini içermekte ve İran ve Türkiye'nin bazı bölgelerinde salata, sebze ve gıda katkı maddesi olarak tüketilmektedir. Fenolik bileşiklerin geniş bir yelpazesini oluşturan kumarinler genellikle bitkilerden elde edilmekte ve bu bileşiklerin antioksidan, antitüberküloz, antikanser, antibakteriyel ve antienflamatuvar gibi birçok etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Kumarin bileşiklerinden biri olan Umbelliferon (UMB), 7-hidroksikumarin ve beta-umbelliferon adları ile de anılır. UMB'un özellikle antioksidan etkisinin olduğu bilinmekte ve bu anti-oksidan özelliğinden dolayı bazı biyokimyasal yollarını bloke ederek antikanser özellik gösterdiğini belirten çeşitli çalışmalar mevcuttur. *Astrodaucus orientalis* yapraklarından hazırlanan ekstrelerin MCF7 insan göğüs kanser hücresi ve Hep G2 hepatosellüler kanser hücresi üzerine antikanser etkisi olduğu rapor edilmiştir. Kumarin türevi bir bileşik olan UMB'nun hepatosellüler kanser hücresi üzerine

antioksidan ve antikanser etkisini gösteren çalışmalar mevcut olmasına rağmen, SH-SY5Y nöroblastom hücreleri üzerine antikanser ve antioksidan aktivitelerini değerlendiren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu bilgilerin ışığı altında, bu çalışmada, *Astrodaucus orientalis* meyvesinden metanol ekstresinin elde edilmesi, bu ekstreden UMB izole edilmesi ve SH-SY5Y Nöroblastom hücre hattı kullanılarak, elde edilen ekstre ve UMB'nun sitotoksikite ve oksidatif hasar üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, genetik ve çevresel koşulların etkisi altında hücrelerin hızlı ve kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması sonucu meydana gelen kompleks bir hastalıktır. İnsan vücudundaki sağlıklı hücreler, vücudun ihtiyacına göre yeni hücreler oluşturmak amacıyla sürekli olarak bölünür ve büyürler. Hücreler yaşlanmaya başladıkça, çeşitli sinyaller ve yolaklar ile programlı bir şekilde ölmekte ve yerini yeni hücrelere bırakmaktadırlar. Ancak kanser hücrelerinde kromozomal anormallikler ve genomik kararsızlık (instabilite) göstermelerinden dolayı, hücre çoğalması, programlı hücre ölümü (apoptoz) ve hücre-hücre bağlantılarını kontrol eden özel genlerde mutasyonlar meydana gelmektedir. Bunun sonucu hücrenin anormal bir şekilde çoğalmasına neden olmaktadır.¹ Bu anormal oluşumlar sonucunda hücrede, translokasyon, anöploidi, kromozom kaybı, DNA (Deoksiribo nükleik asit) çoğalması (amplifikasyonu) ve delesyonlar gibi oldukça önemli ve büyük genetik kusurların oluşumu gözlemlenir. Oluşan bu yeni hücreler kontrolsüz bölünme göstererek tümör oluşumunu başlatırlar.²

Tümörlerin diğer dokulara ve organlara yayılması durumuna bağlı olarak benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadırlar. Benign tümörler, çevre dokulara veya vücudun farklı bölgelerine yayılma özelliği göstermeden, oluştukları bölgelerde kalma eğilimi göstermelerine rağmen malign tümörler çevre dokulara veya kan ve lenf dolaşım sistemi aracılığıyla vücudun diğer bölgelerine taşınarak çoğalmaları (metastaz) ile karakterize edilmektedirler.^{1, 3} Oluşan tümörlerin yayılması ise kanser ölümlerinin %90'ını oluşturmaktadır.⁴

Gelişen tanı ve tedavi yöntemlerine rağmen kanser, günümüzün en önemli sağlık problemleri arasında bulunmaktadır ve kardiyovasküler sisteme ait hastalıklardan sonra, sebebi bilinen ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır.⁵ Uluslararası Kanser

Araştırması Ajansı'nın 2018 yılında yayınlamış olduğu verilerine göre; dünya çapında kanser vakalarının 18,1 milyona ve kansere bağlı ölüm oranını 9,6 milyona yükseldiği ortaya konulmuştur. Dünyadaki morbidite ve mortalitenin önemli nedenlerinden biri olduğu belirtilen raporda, her 5 erkekte 1'inde ve her 10 kadından 1'inde kanser teşhisi konulduğu vurgulanmaktadır. Bunun yanı sıra kanser teşhisi konulmuş her 8 erkekte 1'i ve her 11 kadından 1'i hayatını kaybetmektedir. Yine Uluslararası Kanser Araştırması Ajansı verilerine göre 5 yıllık kanser prevalansının 43.8 milyon olduğu tahmin edilmektedir.⁶ Türkiye'de de kanser gelişim sıklığı dünya ile paralellik göstermektedir.⁷

2.1.2. Apoptoz

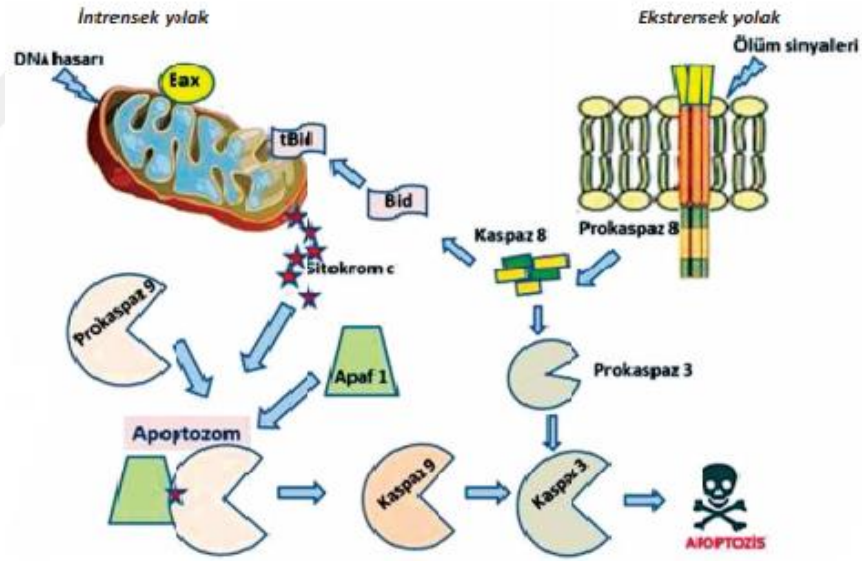
Apoptoz; belirli bir uyarı ile aktifleşen, hücreler arası ilişkilerde gerek duyulmayan, işlevselliğini kaybetmiş, biyolojik görevini yerine getirmiş ve görevi tamamlanmış hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayan ve hücre büyümesinde önemli bir role sahip olan programlı hücre ölümdür.² Apoptoza uğrayan hücrelerde; kromatin yoğunlaşması, nükleer parçalanma ve nükleozomal enzimler tarafından DNA parçalanması gibi morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler meydana gelmektedir.^{8, 9} Apoptozun indüksiyonu apoptotik reseptörlerin uyarılması (ekstrinsik yol) ve mitokondriyal uyarılar (intrinsik yol) olmak üzere iki ana yolak tarafından aktive edilmektedir.¹⁰

Apoptoz, doku homeostazında ve zararlı hücrelerin uzaklaştırılmasında önemli bir role sahiptir.¹¹ Apoptoza uğrayan hücre sayısının normalden fazla olması ya da hücrelerin apoptoza hiç uğramaması organizma için oldukça tehlikeli sonuçların doğmasına neden olmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, bu dengenin bozulmasının birçok hastalığın patogenezinde rol oynadığı tespit edilmiştir.¹² Kanser hücrelerinde, hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki homeostazi bozulmakta ve hücreler apoptoza

gerçekleştirecek ölüm sinyallerini alamamaktadırlar. Bu durum, apoptotik yolların herhangi bir adımında meydana gelen problemlerden kaynaklanmaktadır.¹³

Çoğu kanser hücresi, apoptozdan kurtulmak için, antiapoptotik moleküllerin seviyesini artırarak veya proapoptotik hücre ölüm komponentlerinin inaktivasyonunu sağlayarak, çeşitli mekanizmalar geliştirmektedir. Genellikle, bu mekanizmalar;

1. B hücre lenfoma-2 (Bcl-2) protein ailesinde meydana gelen bozulma,
2. Kaspaz enzime ait işlevlerin değişmesi ya da azalma,
3. Reseptör yollarında meydana gelen bozulma,
4. İnhibitör apoptoz protein ailesi moleküllerine ait genlerin ekspresyonlarında artışın gözlemlenmesi,
5. p53 geninde meydana gelen defektler ve mutasyonlardır. (Şekil 2.1)



Şekil 2.1. Apoptotik yolak 11 Bid ve Bax: Bcl-2 ailesi üyeleri; t-Bid: Bid'in c-terminal bölgesinin kesilerek oluşan aktif formu; Apaf-1: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1; Apoptozom: dATP, sitokrom-c ve Apaf-1'den oluşan çoklu protein kompleksi.

2.1.3. Beyin Tümörleri

Beyin dokularında meydana gelen anormal ve kontrolsüz büyüme sonucunda beyin tümörleri oluşmaktadır.^{14,15} Beyin tümörleri primer ve sekonder olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadırlar. Primer beyin tümörü genellikle nöroglial dokudan, beynin kendi kan damarlarından, hipofizden, meninkslerden ve kaynak dokuya göre adlandırılan sinir liflerinden köken alarak beyinde başlar. Beyinde lenfatik kanallar bulunmadığından dolayı metastaz görülme sıklığı düşüktür. Metastaz gözlenen primer beyin tümörlerinde, genellikle beyin omirilik sıvısı (BOS), serebral kandolaşımı, kranial cerrahi ve yapay shuntlar aracılığıyla diğer dokulara yayılım gözlenmektedir¹⁶. Sekonder beyin tümörü diye adlandırılan metastatik beyin tümörü ise, vücudun herhangi bir yerinde başlayıp daha sonra beyine yayılma eğilimi göstermektedir.¹⁷⁻²⁰ Özellikle arteriyel dolaşım aracılığıyla yayılan göğüs, akciğer, kolon, pankreas, böbrek ve cilt kanserleri sekonder beyin tümörüne neden olmaktadır.

Beyin tümörlerinin görülme sıklığı diğer kanser türlerine nazaran daha az olmakla birlikte özellikle çocuklar başta olmak üzere ölüm oranı oldukça yüksek olan bir kanser türüdür.¹² 2015 yılına ait verilere göre, Amerika Bileşik Devletleri'nde beyin tümörleri, tüm kanser olgularının yaklaşık %1.5'lik kısmını oluşturduğu gösterilmiştir. Ayrıca yapılan birkaç çalışmaya göre, Amerika da her yıl 100.000 insanın yaklaşık olarak yirmisinde beyin tümörü tanısı konmaktadır.^{21,22}

2.1.3.1. Çocukluk Çağı Beyin Tümörleri

Santral sinir sistemine ait tümörler erişkinlerde olduğu gibi çocuklarda da en sık görülen kanser olguları arasında yer almaktadır.²³⁻²⁵ Çocukluk çağı kanserlerinin %20'sini beyin tümörleri oluşturmaktadır.^{26, 27} Amerika'da yapılan araştırmalara göre çocuklarda santral sinir sistemi tümörlerinin görülme oranı 100.000'de 1.12-5.14 arasında olduğu tespit edilmiştir.²⁸ 2014 yılı Türkiye Kanser İstatistikleri'ne göre ise 0-14 yaş

arası erkek çocuklarda merkezi sinir sistemi tümörleri %18.2; kız çocuklarında %18.9 oranında görülme sıklığına sahip olduğu ve çocukluk çağı kanserleri arasında ikinci sırada yer aldığı vurgulanmıştır. Buna ek olarak 15-24 yaş gruplarında bu oran erkeklerde %8.3; kızlarda %7.6 ile üçüncü sırada yer almaktadır.²⁹ Bu tümörlerin çoğu malign olmakla birlikte 5 yıllık sağ kalım oranı %50'nin üzerine çıkabilmektedir.³⁰

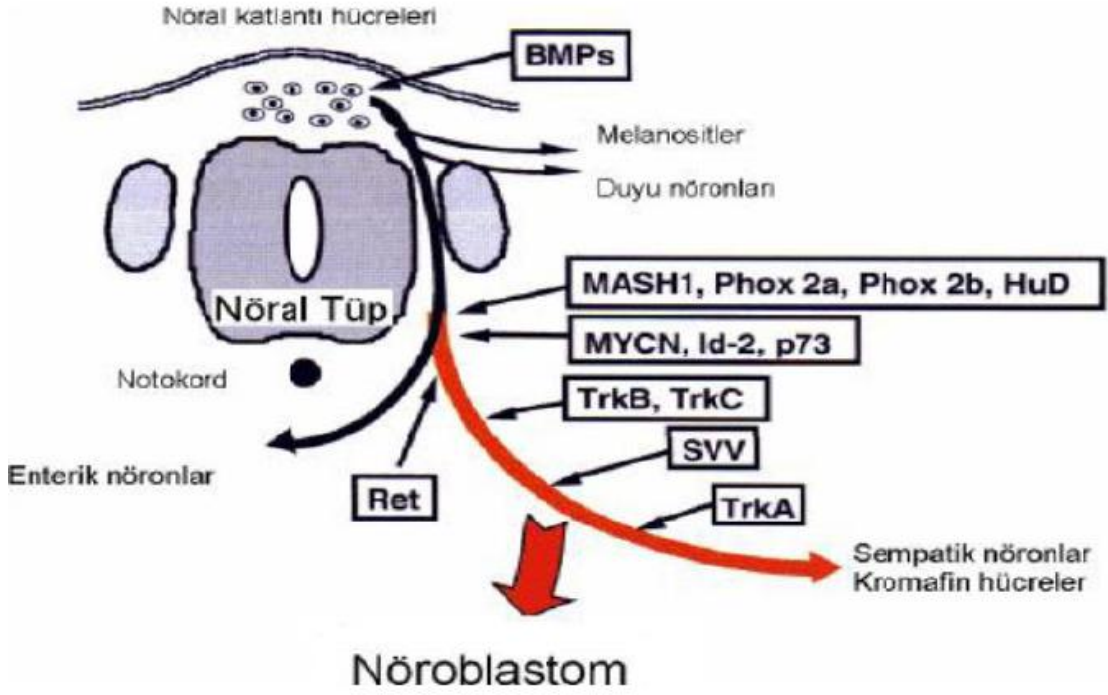
Çocukluk çağı beyin tümörleri; histopatolojik görünüm, davranış, sitogenez, fizyolojik durum ve beyin gelişimi üzerindeki etkileri açısından erişkinlerdeki tümörlere göre oldukça farklıdırlar.³¹ Bu tümörler başlangıç dönemlerinde yerleştikleri bölgeden dolayı veya belli bir boyuta ulaşamamalarına bağlı olarak çok belirgin belirti ve bulgular göstermeyebilirler. Gösterdiği belirti ve bulguların ise ventriküler tıkanma veya kafa içi basıncın artmasından dolayı olduğu düşünülmektedir.³²⁻³⁴ Ayrıca tümörün kafatası gibi sınırlı bir alanda büyümesi, tedaviye verdiği yanıtın sınırlı olması ve beynin her bölümünün farklı görevi olması nedeniyle, her çocukta tümörün yerleşim yerine bağlı olarak bulgularda bireysel farklılıklar gözlemlenmektedir. En sık rastlanan bulgular ise sabahları gelen baş ağrısı, bulantı, kusma ve uyuşukluktur.³⁴⁻³⁷

Embriyonel dönem çocuk tümörleri beş gruptan oluşmaktadır. Bunlar; medullaepitelyom, endimoblastom, atipik teratoid / rabdoid tümör, medullablastom ve supratentoryel primitif nöroektodermal tümörlerdir. Nöroblastom ise supratentoryel primitif nöroektodermal tümör grubu içerisinde yer almaktadır.

2.2. NÖROBLASTOM

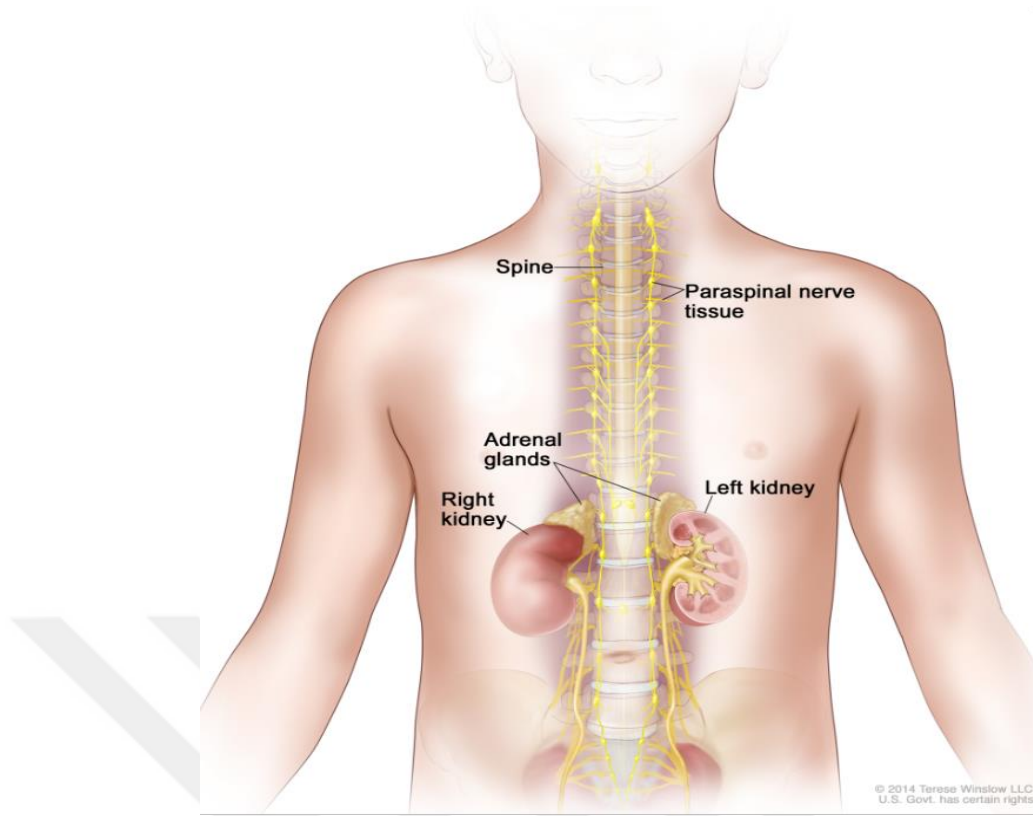
Nöroblastom, embriyonik gelişimin dördüncü haftasında görülmeye başlayan, normalde adrenal medulla veya sempatik gangliyonlarda bulunan ve primordial nöral krest hücrelerinden köken alan bir kanser türüdür.³⁸ (Şekil 2.2) Çocukluk çağında en sık karşılaşılan ekstrakranial solid tümör çeşitlerinden biridir ve görülme sıklığı tüm çocukluk çağı tümörlerinin %8-10'unu oluşturmaktadır. Bu sıklık erkek çocuklarında

biraz daha fazladır.^{39,40} Görülme sıklığı 7000 doğum içerisinde 1 ve yaygınlığı 15 yaş altı çocuklarda, yıllık milyonda 10.54'tür. Son zamanlarda yapılan olgu çalışmalarında, nöroblastoma sahip çocuklarda 5 yıllık sağ kalım oranı, 1 yaş altı dönemde %86'dan %95'e ve 1-14 yaş grubu içerisinde %34'ten %68'e yükseldiği gözlemlenmiştir. 5 yıllık genel sağ kalım oranı ise %14'ten %52.4'e yükselmiştir.⁴¹



Şekil 2.2 Nöral krest hücrelerinin göçü ve farklılaşması ⁹

Nöroblastom adrenal medulla ve paraspinal veya boyundan pelvise kadar herhangi bir düzeydeki paravertebral sempatik gangliyonların bulunduğu periaortik bölgelerden kaynaklanmaktadır.⁴² (Şekil 2.3)



Şekil 2.3. Nöroblastomun köken aldığı bölge ve dokular ⁴²

2.2.1. Semptomlar

Klinik bulgu ve semptomları tümörün bulunduğu primer bölgeye, metastatik duruma veya paraneoplastik sendrom gelişimine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. ⁴³ Semptom göstermeyen vakalarda tanı konulması oldukça zordur. Bununla birlikte nöroblastomlu çocuklarda ortaya çıkan semptomlar, tümörlerin sayısına ve konumuna göre değişmektedir ve hem lokal hem de sistemik semptomları içerebilmektedir. Klinik olarak hasta periorbital ekimoz, huzursuzluk, ateş, kemik ağrıları, kilo kaybı mavimsi subkutan nodüller gibi belirti ve bulgular gösterebileceği gibi, sadece kitle etkisine bağlı olarak bası semptomları (süperior vena kava sendromu, spinal kord basısı, vs.) ile de karşımıza çıkabilmektedir. ⁴⁰

Nöroblastom tanısı konmuş olan çocuklarda sıklıkla iştahsızlık, buna bağlı olarak vücut kitlelerinde azalma, kızarıklık, baş ağrısı, çarpıntı ve hipertansiyon gibi belirtiler gözlenmektedir. Bu belirtiler adrenal medullanın kromofin hücrelerinde, beyin ve

sempatik nöronlarda sentezlenen adrenalin, norepinefrin ve dopamin (katekolaminler) yapımındaki artışa bağlı olarak meydana gelmektedir. Ayrıca tümörün kemik iliğine metastaz yapmasından dolayı anemide gözlenebilmektedir.⁴⁴

Nöroblastom ile birlikte bildirilen semptomlardan bazıları da sindirim sistemi anormallikleri, nörolojik ve gelişimsel anormallikler, otozomal resesif geçişli ürogenital ve kardiyak anomaliler, Turner sendromu ve Beckwith-Wiedemann Sendromu ve fetal alkol sendromudur.⁴³⁻⁴⁵

2.2.2. Nöroblastom Histopatolojisi ve Evreleme:

Periferik nöroblastik tümörler, nöroblastom, ganglionöroblastom ve ganglionöromlardan (GNR) meydana gelmektedir. Nöroblastomlar, hiperkromatik nükleuslu, dar sitoplazmalı küçük hücrelerden oluşurlar. Bunlar sıklıkla ince fibrovasküler semptomlarla birlikte gruplar oluşturan tümör hücreleridirler. *In vitro* çalışmalarda 3 farklı tip nöroblastoma hücresi olduğu bulunmuştur. Bunlar; S tip Schwannian/ melanoblastik öncül hücreler, N tip nöroblastik hücreler ve I tip kök hücrelerdir. Bu hücreleri diğerlerinden ayıran karakteristik özellikler; moleküler özellikler ve davranışlarıdır.⁴⁶

Nöroblastom vakaları 1988 yılında yeniden gözden geçirilmiş, tümörün boyutu, orta çizgiye göre yerleşim yeri, metastatik özelliği ve metastaz derecesi dikkate alınarak International Neuroblastoma Staging System- INSS (Uluslararası Nöroblastom Evreleme Sistemi) hazırlanmıştır. (Tablo 2.1.) Metastaz gözlenmeyen olgularda cerrahi ile çıkarılan tümörün genişliği bu sistemin belirleyici unsurunu oluşturmaktadır. 2004 yılında ise 1988 yılına ait evreleme sistemi Çocuk Onkolojisine ait Çalışma Gruplarını temsil eden bilim insanları tarafından yeniden düzenlenmiş ve bu sistem International Neuroblastoma Risk Group Staging System - INRGSS (Uluslararası Nöroblastom Risk Grubu Evreleme Sistemi) olarak adlandırılmıştır. (Tablo 2.1) Bu yeni evreleme sisteminde, tümörün

cerrahi özellikleri ve tümörün orta çizgiye göre durumu evrelemenin dışında bırakılmış ve görüntüleme ile elde ettikleri verilere göre risk faktörleri belirlenmiştir. Bunun yanı sıra kemik iliği ve tümörün tedavi edilmeden önceki durumu evrelemede kullanılacak özellikler arasında bulundurulmuştur. INRGSS'nin belirlemiş olduğu tümörün görüntülenmesi sonucu ortaya çıkabilecek risk faktörleri Tablo 2.2'de gösterilmiştir. Lokalize olmuş tümörler bu risk faktörlerinden herhangi birini içermiyorsa L1, en az bir risk faktörünü içeriyorsa L2 olarak değerlendirilmektedir. M, metastatik özellik gösteren tümörü temsil etmekte ve MS ise eski sistemde 4S evresine eşdeğer olarak kabul edilmektedir.

Tablo 2.1. Nöroblastoma ait uluslararası eski (INSS) ve yeni (INRGSS) evreleme sistemleri ve bu sistemlerin karşılaştırması

INSS 1993		INRGSS 2009	
Evre	Tanım	Evre	Tanım
1	Tümör lokalize olmuş ve mikroskopik kalıntı dışında cerrahi işlem ile tamamen çıkarılmıştır. Lenf düğümlerinde ise tümörleşme gözlenmez	L1	Yaşamsal faaliyete sahip organları etkilememiş ve tek vücut boşluğunda lokalize olan tümör (Görüntüleme ile belirlenmiş risk faktörü bulunmamıştır)
2A	Lokalize tümör fakat cerrahi olarak tamamen çıkarılmış, aynı bölgede bulunan lenf düğümlerinde tümör gözlemlenmemiş	L2	Bir ya da daha fazla risk faktörü taşıdığı görüntüleme sistemi ile belirlenmiş ve belirli bir bölgeye lokalize olan tümör
2B	Lokalize olan ve cerrahi işlem ile bir tam olarak ya da bir kısmı alınmış tümör, aynı lenf düğümlerinde tümörleşme gözlemlenirken, karşı tarafta bulunan lenf düğümlerinde ise büyüme tespit edilmiş fakat tümör özellikleri görülmemiştir.	-	-
3	1-Tek bir bölgede yerleşmiş, orta çizgi hattını geçmiş ve cerrahi işlem ile çıkartılamaz tümör 2-Tümör bir bölgede lokalize olmuştur fakat karşı tarafta bulunan lenf düğümleri tümör özelliği taşımaktadır. 3-Her iki bölgede de ilerlemiş veya lenf düğümüne kadar yayılmış orta çizgi tümörüdür	-	-
4	Uzak bölgede bulunan lenf düğümüne, kemik iliğine, kemik, karaciğer, cilt gibi diğer organlara kadar (4S evresinde tanımlanan özellikler hariç) metastaz göstermiş tümör	M	MS evresi özellikleri hariç uzak bölgelerde metastaz yapmış tümör
4S	1yaş altı olgularda, 1, 2A, 2B evrelerine ait bulguların yanı sıra cilt, karaciğer ya da kemik iliğine kadar yayılım gösteren tümör	MS	18 aylık ya da daha küçük çocuklarda sadece kemik iliği, cilt ve karaciğer gibi organlarda metastatik özellik gösteren tümör.

2.2.3. Nöroblastom Tedavisi

Nöroblastom hastalarının tedavisi farklı risk gruplarına göre çeşitlilik göstermektedir. Örneğin, yüksek riskli hastaların tedavisi sisplatin, vincristine, karboplatin, etoposid ve siklofosfamid içeren yoğun indüksiyon kemoterapi rejimidir.^{47,48} İndüksiyon terapisini hematopoetik kök hücrelerin dezenfeksiyonu ve lokal radyoterapi ile birleştirilen cerrahi işlemler ve miyeloablatif rejim tedavisi izlemektedir.⁴⁹⁻⁵²

Orta risk grubuna kategorize edilen hastalara, kalan tümör kitlesinin cerrahi rezeksiyonu ile devam eden daha hafif kemoterapi verilir. Düşük riskli nöroblastomların tedavisi minimal kemoterapiyi içerir ve bazı çocuklar sadece cerrahi ile tedavi edilir veya spontan tümör regresyonunun görüldüğü durumlarda tedavi yapılmaz.⁵²⁻⁵⁴

Yüksek riskli olmayan nöroblastom, yeni tanı alan hastaların yarısından biraz fazlasını temsil eden düşük ve orta riskli hastalardan oluşan, heterojen bir gruptur. Bu grup, MYCN olmayan lokalize tümörlere sahip hastaları ve ayrıca metastatik hastalığı olan bebekleri içerir. Sonuçlar sadece çocuklar için gözlem, cerrahi rezeksiyon veya cerrahi rezeksiyon ile orta doz kemoterapi gibi değişken tedavi stratejilerini içerir.³⁸

Yüksek riskli nöroblastomlu çocuklar, nöroblastom teşhisi konan hastaların yaklaşık yarısını oluşturmaktadır. Yıllar boyunca yüksek riskli nöroblastomlu hastalar için tedavi stratejisinde çeşitli değişiklik olmasına rağmen, bu grup tedavisi en zor olanlardan biri olmaya ve kötü sonuçlar vermeye devam etmektedir. yüksek riskli nöroblastomlu çocuklar için uzun süreli tedavilere rağmen sağ kalım oranları şu anda %40-50 civarındadır. Lokalize, rezeksiyon edilebilir boyutta tümöre sahip olan hastalar için, tek başına cerrahi rezeksiyon genel olarak küratiftir ve kemoterapi rezeksiyon sonrası relaps olanlar için etkili bir kurtarıcıdır.³⁸

2.2.3.1. Nöroblastom Tedavisinde Alternatif Yaklaşımlar

Modern ve bilimsel tedaviler dışında hastalıkların ortadan kaldırılması amacıyla kullanılan birçok tedavi yöntemleri genellikle tamamlayıcı alternatif tıp (TAT) veya tamamlayıcı olarak ifade edilen tedavi yöntemlerini içermektedir. Alternatif tedavi, etkisi henüz bilimsel olarak kanıtlanmamış, tıbbi bilimlerin geleneksel yöntemleri yerine uygulanan tedavi-yöntemleridir. Tamamlayıcı tedavi ise, ilaçların yan etkilerini ve semptomları azaltmak ya da ortadan kaldırmak, yaşam kalitesini düzeltmek ve psikolojik ve fizyolojik olarak hastaya destek sağlamak amacıyla kullanılan tedavi yöntemidir. Günümüzde kanser tedavilerinde, alternatif tedavi ve tamamlayıcı tedavi yöntemlerinin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır.⁵⁵ Alternatif ve tamamlayıcı tedavilerinde yaygın olarak kullanılan doğal ürünler aracılığıyla kanser hücrelerinin büyümesini engellenmesi, metastaz yeteneğini azaltılması, kanser hücresinin apoptotik sürecinin artırılması gibi mekanizmalarla bu hastalığın ortadan kaldırılması amaçlanmaktadır.⁵⁶

Bitkisel kökenli bileşiklerin birçok hastalığın tedavisinde ve prognozunun azaltılmasında etkin olduğu düşünüldüğünden bitkilerden çeşitli yöntemlerle elde edilen etkili bileşikler günümüzde oldukça önem kazanmıştır. Nöroblastom tedavisinde de sağ kalım oranının düşük olması ve etkili bir tedavinin bulunmamasından dolayı bilim insanlarını alternatif bir tedavi arayışına yöneltmiştir. Bu nedenle bitki ekstratları ve etken maddeleri ile insan nöroblastom hücre dizisi olan nöroblastom-1691 ve SH-SY5Y hücre hatları üzerine çeşitli çalışmalar mevcuttur.⁵⁷⁻⁵⁹

2.3. Apiaceae Familyasının Türkiye'deki Durumu

Apiaceae familyası ülkemizde 109 cins ve 450 türle temsil edilmektedir. Ayrıca, Apiaceae familyası Türkiye'de en çok cins içeren 3. büyük familyadır.⁶⁰

2.3.1. Apiaceae Familyası Üyelerinin İçerdiği Kimyasal Bileşikler

Apiaceae familyası kumarin ve uçucu yağ bakımından zengin bir familyadır.^{61,62} Ayrıca familyanın bazı üyelerinin flavonoidler, sinamik asitler, saponinler ve alkaloidler taşıdığı rapor edilmiştir.⁶³

2.3.2. *Astrodaucus* Drude Cinsinin Sistematikteki Yeri

Bölüm	: Spermatophyta
Alt Bölüm	: Angiospermae
Sınıf	: Dicotyledone
Takım	: Apiales (Umbelliflorae)
Familya	: Apiaceae (Umbelliferae)
Cins	: <i>Astrodaucus</i> Drude

2.3.3. Familyadaki Ana Etken Madde Gruplarından Kumarinler

Kumarinler 2H-1-benzopirran-2-on yapısına sahip fenolik bileşiklerin geniş bir sınıfını oluşturmaktadır.^{64, 65}

2.3.4. Kumarinler ve Biyolojik Aktiviteleri

Kumarinlerin antienflamatuvar, antibakteriyel, antikoagülan, antifungal, antikanser, antihipertansif, antiadipojenik, nöroprotektif, antiviral, sitotoksik, antikonvülsan, antitüberküloz, antihiperglisemik, antioksidan, sitokrom P450 inhibitör etkileri olup multipl skleroz tedavisinde de kullanıldığı bildirilmiştir.⁶⁰

2.3.5. *Astrodaucus orientalis* (L.) Drude Cinsinin Deskripsiyonu

Astrodaucus orientalis (L.) Drude, Engler & Prantl, Natürl. Pflanzenfam. 3(8): 157 (1898). Sin: *Caucalis orientalis* L., Sp. Pl. 241 (1753); *Daucus pulcherrimus* Koch, DC., Prodr. 4:210 (1830). Şekil 13, p. 525 (Davis, 1972). *Astrodaucus* Drude, Nat. Pflanzenfam. [Engler & Prantl] 3, 8: 156 (1898) / havayıldız. Lektotip tür: *A. orientalis*

(L.) Drude, (*Caucalis orientalis* L.), Pimenov & Tikhomirov'a göre: "Novosti Sist. Vyssh. Rast. 16: 156 (1979)." ⁶⁶

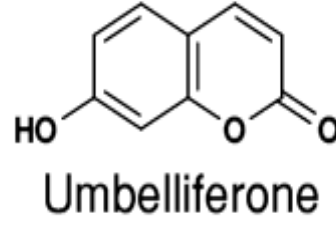
Tek yıllık, gövde dik, tüysüz ve 100 cm uzunluğundadır. Yapraklar çok dar lineer parçalı, kısa yumuşak tüylü veya tüysüzdür. Petaller beyaz, 2-2.5 mm uzunluğundadır. Meyveler elipsoit- fusiform (iğ şeklinde), hafifçe yassılmış, 3.5-5.2 mm uzunluğunda, tüm yüzey papillidir; primer sırtlar 1 sıra basit yayık veya yıldız şeklinde tüylerle kaplı; sekonder sırtlar 1 sıra basit yayık şekilli, tüyler gloşit gibi fakat tepede bir kancalı, genişlemiş ancak tabanda birleşmemiştir. Çiçeklenme dönemi 5.-8. aylardadır. Tarla, bayır, bozkır, yol kenarı gibi yerlerde 350-2700 m. yükseklikte yetişmektedir.⁶⁷ Türkiye'de yetişen *Astrodaucus* cinsi tek türle (*Astrodaucus orientalis* ile) temsil edilmektedir.⁶⁶

2.3.6. Bitkinin Halk Arasındaki Kullanımı

Astrodaucus Drude (Apiaceae) cinsi İran, Irak, Suriye ve Türkiye (Asya) ve Ukrayna'ya (Doğu Avrupa) özgüdür.⁶⁸ Bu aromatik bitki geleneksel olarak İran ve Türkiye'nin bazı bölgelerinde salata, sebze olarak tüketilmektedir ve katkı maddesi olarak gıdalara katılmaktadır.⁶⁸ Türkiye'de "Gımmi, havıyıldız" ⁶⁶ ve İran'da ise "Havij-ekohi (dağ havucu anlamına gelir)" olarak bilinmektedir.⁶⁸

2.4. Umbelliferon Bileşiği

UMB, farmakolojik olarak aktif bir ajan olan 7-hidroksikoumarin türevi bir bileşiktir. (Şekil 2.6) Rutaceae ve Apiaceae (Umbelliferae) bitki familyalarında yaygın olarak bulunmaktadır ve en verimli ekstresi metanol kullanılarak elde edilmektedir. UMB, aynı zamanda güneşten koruyucu ajan olarak kullanılan bir flüoresan bileşiktir. Rezorsinol, malik asit veya etil asetoasetat türevlerinin sülfürik asit veya inorganik asit varlığında Pechmann yoğunlaşma reaksiyonu kullanılarak sentezlenmektedir. Aynı zamanda diğer kumarinler ve heterosiklikler için bir senfon olarakta kullanılmaktadır.⁶⁹



Şekil 2.4. Umbelliferon ⁷⁰

UMB sıcak suda hafif bir çözünlüğe, etanolde ise yüksek çözünlüğe sahip olan sarımsı beyaz kristalli bir yapıya sahiptir.⁶⁹ UMB moleküler formülü C₉H₆O₃'tür ve kloroformdan yeniden kristalleştirilen iğne kristalleri 224-227°C'de erir. -OH grubu olup kriyostat işlemi ile yetiştirilen tek bir kristalin boyutları 5.4 mm 4.2 mm 1.85 mm'dir.⁷¹,⁷²

UMB familyası, sanicle, alexander, angelica, asafoetida, kereviz, kimyon, rezene, maydanoz ve dev hogweed gibi ekonomik açıdan önemli bitkilerde bulunur. Bitki kaynaklı fenolik kumarinlerin meyve ve sebzelerde insan beslenmesinde tüketilmeleri nedeniyle diyet antioksidanları olarak rol oynadığı, UMB'nin de antioksidan özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir.⁷³

UMB sekonder metabolitlerle farklı bitkilerde bulunur ve insanlar tarafından ilaç ve besin takviyesi olarak yaygın şekilde tüketilmektedir.⁷⁴ Ayrıca UMB'nin, sağlıkla ilgili çeşitli koşullara karşı farmakolojik aktiviteler sergilediği gösterilmiştir. Bunlar kanser hücreleri, pro-oksidanlar ve reaktif oksijen türleri nedeniyle oluşan dejeneratif hastalıklar ve mikrobiyal enfeksiyonlardır.⁷⁵ Makrofajlar, mezenkimal kök hücre ve insan lenfositleri için antioksidan etkilere sahiptir. Bunun yanı sıra, meme ve prostat kanseri hücreleri için de anti-kanser etkileri gösterilmiştir.⁷⁶

Günümüzde kanser tedavisinde çeşitli yaklaşımlar bulunmasına ve tedavi seçeneklerinin oldukça genişlemesine rağmen nöroblastom tedavisi henüz tam olarak yapılamamaktadır ve nöroblastom kanseri teşhisi konulan bireylerde sağ kalım oranı oldukça düşüktür. Bitkisel kökenli bileşiklerin birçok hastalığın tedavisinde ve prognozunun azaltılmasında etkin olduğu düşünüldüğünden bitkilerden çeşitli yöntemlerle elde edilen etkili bileşikler günümüzde oldukça önem kazanmıştır. Fakat elde edilen bu bileşiklerin ilaç hazırlanmasında etkin madde olarak kullanılabilmesi, ilk olarak klinik öncesi (preklinik) çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Bitkisel kökenli kumarin türevi olan UMB' nin farklı kanser hatları üzerine antikanser, antitümöral ve antioksidan etkilerini gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır.⁷⁷⁻⁷⁹ Ancak UMB'nin SH-SY5Y insan nöroblastom hücre hattı üzerine antitümör etkisinin varlığını kanıtlayan bir çalışmaya literatürde mevcut değildir. Literatürdeki bu eksiklikten yola çıkarak çalışmamızda *Astrodaucus orientalis* meyve metanol ekstresinin ve bu ekstreden elde edilen UMB'nin SH-SY5Y insan nöroblastom hücre hattı üzerinde sitotoksikite ve oksidatif hasar üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

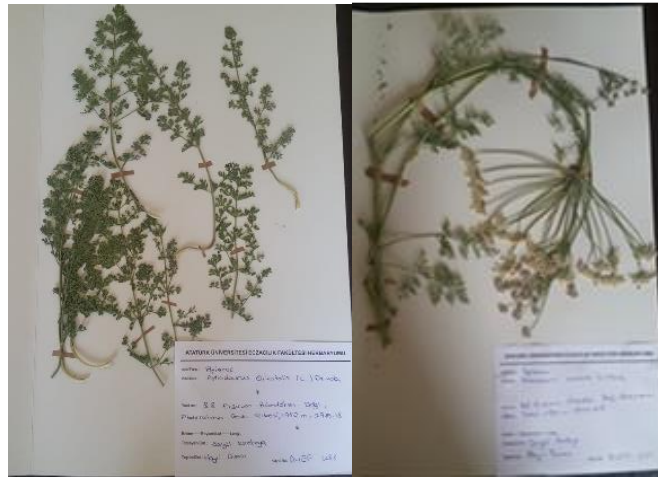
3. MATERYAL VE METOT

3.1. *Astrodaucus orientalis* Bitki Örneklerinin Toplanması

Astrodaucus orientalis meyveli ve çiçekli dönemlerinde Palandöken Dağı'ndan (Erzurum) 2017 ve 2018 yıllarında Dr. Öğr. Üyesi Songül Karakaya tarafından toplanmış ve teşhisi Prof. Dr. Hayri Duman tarafından yapılmıştır. Herbaryum örnekleri Atatürk Üniversitesi Herbaryum, Eczacılık Fakültesi'nde (AUEF 1279 ve AUEF 1287) saklanmaktadır.



Şekil 3.1. *Astrodaucus orientalis* bitkisinin genel görünüşü⁸⁰



Şekil 3.2. *Astrodaucus orientalis* bitkisinin herbaryum örnekleri

3.2. Ekstraksiyon ve İzolasyon Çalışmaları

3.2.1. Bitkinin Meyvelerinden Metanol Ekstraksiyonunun Hazırlanışı

Astrodaucus orientalis bitkisinin meyvelerinden (250 g) toplanıp kurutulduktan sonra toz edildi. Toz edilen numune 8 saat boyunca oda sıcaklığında metanol (800 ml) içerisinde hareketli maserasyona (Maserasyon: Heidolph MR3001) tabi tutuldu. Süre sonunda süzülen ekstre kuruluğa kadar uçuruldu (Rotavapor: Heidolph VV2000, Almanya) ve bu işlem kalan posalar ile 3 kez tekrarlandı. Toplamda 250 g meyveden 47.45 g metanol ekstresi elde edildi. Metanollü ekstreten bir kısmı biyolojik aktivite çalışmaları için ayrıldıktan sonra kalan ekstre izolasyon çalışmasında kullanıldı.

3.2.2. İzolasyon çalışmaları

3.2.2.1. Kolon Kromatografisi

Astrodaucus orientalis meyve metanol ekstresinin 25 g'ı kolon kromatografisine uygulandı. Kuru yöntemle göre doldurulan kolona silika jel emdirilerek kurutulan toz halindeki ekstre eklendi. Kullanılan kolonun ve dolgu maddesinin özellikleri aşağıdaki gibidir:

Kolon boyu: 52.7 cm

Kolon iç çapı: 6.8 cm

Dolgu maddesi: Silika jel 70-230 Mesh (Merck-737, Almanya)

Diklorometan ile elüsyona başlandı ve polarite %5'lik oranlarda metanol eklenmesi suretiyle artırılarak devam edildi. Metanol oranı %100'e ulaştıktan sonra farklı bileşik gelmeyinceye kadar bir süre daha elüsyona devam edildi ve %100 metanol ile bitirildi. Elde edilen fraksiyonları ince tabaka kromatografisi (İTK) ile kontrol edildikten sonra benzer içeriğe sahip olduğu düşünülenler birleştirildi. Diklorometan: metanol: 65:35 solvan sisteminde çöken bileşikler metanolde çözdürülerek silikajel kolona tatbik edildi. Tekrar diklorometan ile elüsyona başlandı ve polarite %2'lik oranlarda metanol

eklenmesi ile devam edildi. Böylece fraksiyon 75-91 (diklorometan: metanol: 58:42) ile “Umbelliferon” bileşiği elde edildi.

3.2.2.2. İzole Edilen Umbelliferon Bileşiğinin Yapı Tayini

Saflaştırılan UMB bileşiğinin yapısı spektroskopik yöntemle tayin edildi.

NMR Spektrometrisi

Bileşiklerin dötoro metanol (CD₃OD) içinde hazırlanan çözeltinin ¹H-NMR ve ¹³C-NMR, HMBC, HMQC, COSY, TOCSY spektrumları Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi’nde bulunan Varian Mercury 400 MHz, NMR Spektrometre cihazı kullanılarak alındı.

3.3. Hücre Kültürü Çalışması

Çalışmamız, hücre kültürü yöntemlerini kullanarak in vitro koşullarda SH-SY5Y insan nöroblastom hücre hattı Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji stoklarından kullanılmış olup Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji A.B.D. hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Hücre Kültürü Deneyinde Kullanılan Kimyasallar, Cihazlar ve

Malzemeler

Tablo 3.1. Deneyde kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler

CİHAZLAR	MARKA
CO ₂ ’ li inkübatör	Esco
Otomatik mikropipetler (10, 20, 100, 200, 1000 µL’ lik)	Eppendorf
Laminar air Flow	Esco
Otoklav	Leica
İnvert Floresan Mikroskop	Leica ebq 100-04
Distilatör	Thermo
Santrifuj	Allegra X-30R
Steril kültür kapları (flask 25-75’lik)	Corning
Çok kuyucuklu kültür plateleri (6,96’lık)	Corning
0.22 µm PVDF filtre	Merck
Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi (ELISA) Cihazı (Spektrofotometre)	Biotek

Tablo 3.2. Deneyde kullanılan kimyasal maddeler

MADDE	MARKA
Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) F12	Sigma
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma
Fosfat Tamponu (PBS)	Sigma
Fötal Sığır Serum(FBS)	Sigma
L-Glutamine	Sigma
Pen-strep solüsyonu	Sigma
Tripsin-EDTA	Sigma
(Ethylenediaminetetraacetic acid)	
MTT [3-(4,5-Dimethyliazol-2-Yl)-2,5 Diphenyl Tetrazolium Bromid]	Sigma

3.3.2. SH-SY5Y Hücrelerinin Kültüre Edilmesi

UMB'un sitotoksite, oksidatif stres üzerine etkilerinin gösterilmesi amaçlanan bu çalışmada hücre kültürü yöntemlerini kullanılarak in vitro koşullarda yapıldı. Çalışmamızda nöroblastom modeli olarak SH-SY5Y hücre hattı kullanıldı. In vitro koşullarda gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında kullanılan besi ortamı hücrelerin büyüebilmeleri, yaşayabilmeleri ve proliferasyonu için uygun olan gerekli maddeleri içermeleri gerekir. Bu nedenle bu çalışmada, %10 FBS, %1 L-glutamin, 100 IU/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin içeren DMEM F12 besi ortamı kullanıldı.

SH-SY5Y hücrelerinde öncelikle sırası ile hücrelerin çözülmesi, çoğaltılması, pasajlanması ve dondurulması gibi rutin hücre kültür basamakları gerçekleştirildi.

3.3.2.1. SH-SY5Y Hücrelerinin Çözdürülmesi

%10 DMSO ile dondurulmuş SH-SY5Y insan nöroblastom hücreleri içeren kriyotüpler sıvı azottan çıkarılıp çözünmesi için birkaç dakika 37⁰C de %5 CO₂'lik etüve koyuldu. DMSO'nun hücre canlılığı üzerinde negatif etkisi bulunduğundan zarar görme sürecisini azaltmak amacıyla hızlı bir şekilde besi ortamı ilave edilip 1500 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra, süpernatant uzaklaştırılıp ve çöken hücrelerin üzerine 5 ml

DMEM F12 besi yeri eklenip 25 cm² lik flaslara alınarak etüvde (37°C, %95 nem ve %5 CO₂) inkübasyona bırakıldı.

3.3.2.2. SH-SY5Y Hücrelerinin Çoğaltılması ve Pasajlanması

Etüvde (37°C, % 95 nem ve % 5 CO₂ içeren) inkübasyona bırakılan SH-SY5Y nöroblastom hücreleri iki güne bir besi ortamları değiştirilerek çoğaltıldı. Tüm flask yüzeyini kaplayan hücrelerin canlılığını korumak ve devamlılığını sağlamak için pasaj yapıldı. SH-SY5Y hücreleri monolayer hücrelerdir. Bu nedenle bu hücreleri pasajlamak için ilk olarak yapıştıkları yüzeyden ayrılmaları gerekir. Bu nedenle, flask içinde bulunan besi ortamı alınarak flaslara PBS ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından flask içine tripsin ilave edilip, 5 dakika boyunca inkübatörde bekletildi. Tüm hücreler kalktıktan sonra, üzerine besi ortamı ilave edilip santrifüj tüpü içerisine alınıp 1500 g'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant uzaklaştırılıp çöken hücrelerin üzerine 1 ml besi yeri eklendi. Hücrelerin homojen olarak dağılabilmeleri sağlandı ve 75 cm² lik flaslara ekim yapıldı. Hücrelerin yüzeye yapışıp üremeye devam edebilmeleri için flaslara etüvde (37°C, %95 nem ve %5 CO₂) inkübasyona bırakıldı ve çoğalmaları sağlandı.

3.3.2.3. SH-SY5Y Hücrelerinin Dondurulması

Flask yüzeyinde yapışmış halde bulunan hücrelere tripsinizasyon işlemi uygulandıktan sonra flask yüzeyinden kaldırıldı ve üzerine besi ortamı eklenerek 1500 g' de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılıp çöken hücrelerin üzerine 9:1 oranında (%10' luk), serum: DMSO karışımından oluşan ortam eklendi. 1,5 ml' lik kriyotüplere içine koyularak önce -80 °C'ye daha sonra da sıvı azot tankına kaldırılan hücrelerin dondurulma işlemi tamamlandı.

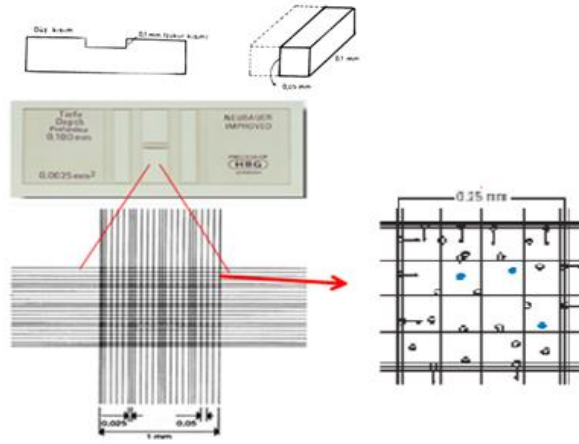
Rutin hücre kültür basamakları gerçekleştirildikten sonra aşağıdaki deney prosedürü aşamaları gerçekleştirildi;

- Hücrelerin sayılması ve 96'lık plakalara ekilmesi
- *Astrodaucus orientalis* (L.) Drude ekstresi ve umbelliferon uygulanması ve MTT sitotoksosite testlerinin çalışılması
- Total oksidan ve antioksidan düzeylerine bakılması
- Verilerin istatistiksel analizlerin yapılması

3.3.3. SH-SY5Y Hücrelerinin Sayılması ve 96'lık Plakalara Ekilmesi

Flask yüzeyini tamamen kaplayan hücreler 3 dakika boyunca etüv içerisinde tripsinizasyon işlemine tabi tutuldu. Hücreler flask yüzeyinden ayrıldıktan sonra falkona alınarak 5 dakika 1500 g'de santrifuj edildi. Santrifuj sonrası oluşan süpernatant ortamdan uzaklaştırılarak çöken hücreler üzerine 1 mL besi ortamı eklenerek hücrelerin homojen bir şekilde medyum içerisinde dağılması sağlandı. Homojen şekilde dağılan hücrelerden 100 µL alındı ve üzerine 400 µL PBS maddesi eklendi en son 1 µL tripan maviside eklenerek 5 kat dilüe edildi. Thoma lamında canlı hücrelerin sayımı yapmak amacıyla bu homojen karışımdan 10 µL alındı ve lama konularak sayım yapıldı.

Tripan mavisi hücrelerin sayılmasını kolaylaştırmak amacıyla kullanılmaktadır ve sadece ölü hücrelerin membranlarından geçebilir. Ölü hücreler mavi (boya almış) olarak görülürken canlı hücreler (boya almamış) renksizdirler. Hücre sayımı thoma lamına konularak gerçekleştirildi. Hücre süspansiyonu, mikro pipetler yardımıyla sayma odacığına aktarıldı. Karelerin üçlü çizgilerle çevrelenmiş olduğu merkezi bölmelerde mevcut olan hücreler sayılırken köşe çizgilerinde olan hücreler sayıma dahil edilmez. Thoma lamında toplam sayım hacmi = $0.00025 \text{ mm}^3 \times 400 = 0.1 \text{ mm}^3$ 'dür. ⁸¹



Şekil 3.3. Thoma lamı

Bu alandaki tüm hücreler sayılırsa (N):

1 mL yani 1mm^3 ' teki hücre sayısı = $N \times DF \times 10^4$ olarak hesaplanır.

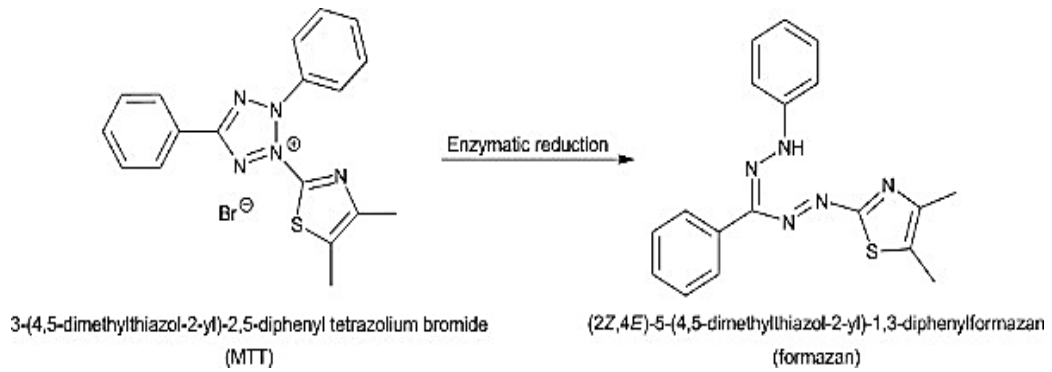
DF= Dilüsyon Faktörü

$N=0.1\text{mm}^3$ ' te mevcut hücre sayısı

Deney standardizasyonunu sağlamak amacıyla tüm deney basamaklarında hücre sayımları yapıldı. Hücreler, her kuyucukta 5×10^3 hücre bulunacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ayrı ayrı ekildi.

3.3.4. *Astrodaucus orientalis* (L.) Drude Ekstresi ve Umbelliferon Uygulanması ve MTT Sitotoksite Testlerinin Çalışılması

MTT analizi suda eriyebilir bir bileşik olan MTT'yi canlı hücrelerce mavi mor renkli formazan bileşenlerine indirgemeleri prensibine dayanmaktadır. (Şekil 3.2.)



Şekil 3.4. MTT' nin formazana dönüşümü

Kullanılan boya suda çözünebilir özelliğine sahiptir. Bu özelliği sayesinde boyanın yoğunluğu spektrofotometre ile verilen dalga boylarında okutulabilmektedir. Aktif hücrelerin sayısı ile formazan oluşumu, ile orantılıdır, böylece bir çok örneğin hızlı bir şekilde çalışılıp sonuçlarının değerlendirilmesine avantaj sağlamaktadır.

SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri 24 saat 37°C'de %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakıldıktan sonra hücrelere çeşitli konsantrasyonlarda *Astrodaucus orientalis* (L.) Drude meyve metanol ekstresi (her bir kuyucukta final konsantrasyonu 10⁻¹-10⁻⁶ mg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde) ve *Astrodaucus orientalis* (L.) Drude meyve metanol ekstresinden izole edilen UMB (her bir kuyucukta final konsantrasyonu 10-1000 µM konsantrasyonlarda olacak şekilde) uygulandı ve hücre canlılığı üzerinde 24 ve 72. saatlerdeki sitotoksik etkisi MTT kiti ile üretici firmanın (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) kullanım talimatına göre uygulandı. Steril PBS içinde hazırlanan stok MTT solusyonundan %10'luk konsantrasyonda 96 kuyucuklu plaklara ilave edildi. 37°C'de %5 CO₂ içeren ortamda 4 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra 100 µL DMSO ilave edilerek formazan kristallerinin çözünmesi sağlandı. Formazan absorbansı ELISA reader MicroQuant, Reader, BioTek, Winooski, VT, USA) ile 570 nm dalga boyunda değerlendirildi.

3.3.5. Total Oksidan ve Antioksidan Düzeylerine Bakılması

Organizmanın canlılığı süresince oluşan metabolik ve fizyolojik süreçler boyunca reaktif nitrojen ve oksijen türleri açığa çıkar. Böylece organizmada zararlı oksidatif reaksiyonlar ortaya çıkar. Oluşan oksidatif reaksiyonlar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan ortamdan uzaklaştırılır.

Farklı özelliklerde ki oksidan türlerin serum (plazma) konsantrasyonlarını laboratuarlarda ayrı ayrı ölçme imkanımız vardır. Fakat bu ölçümler, pahalı, zaman alan, yoğun iş gücü gerektiren ve karmaşık teknikleri olan bir durumdur. Bu sebeple bir

numunenin toplam oksidan ve antioksidan durumu ölçülmesi pratikte daha yararlı ve daha doğru sonuçların alınmasına sağlar. Total oksidan düzeyi (TOS) ölçümünün prensibi şöyle açıklanabilir; örneğin içindeki oksidanların ferröz iyon şelatör kompleksinin ferrik iyonla dönüşümü gerçekleşmesi ve bunun da asidik bir ortamda kromojenle reaksiyona girip absorbans artışına sebep olmasıdır. Spektrofotometrik olarak izlediğimiz absorbans artışı örnekteki oksidan moleküllerle doğru orantılıdır. Total antioksidan testinin çalışmasındaki temel prensip; numune içeriğinde yer alan mavi-yeşil renkli ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sülfonik asit)] radikallerinin renksiz formatta radikallere çevrilmesi temeline dayanmaktadır. Total oksidan ve antioksidan seviye ölçümünün birçok avantajları vardır. Bunları sıralayacak olursak, kolay uygulanabilmesi, güvenilir ve duyarlı olması, kısa sürmesi, yüksek doğruluk göstermesi, serum ve plazma örnekleriyle, beyin omurilik sıvısı, plevra sıvısı, amnion sıvısı, semen plazması, idrar ve tükürük gibi vücut sıvılarında, doku örneklerinde çalışılabilmesini sıralayabiliriz.

3.3.5.1. Total Oksidan Düzeyine Bakılması

Serum TOS düzeyi -80° de bekletilen serum örnekleri kullanılarak solid faz sandwich enzim immunoassay (ELISA) prensibine dayanan TOS (REELASSAY) hazır ölçüm kiti kullanılarak yapıldı. Standart solüsyonları hazırlandı. 96 'lık kuyucuklu plaklara her kuyucuğa 300 μ L reagent 1'den koyuldu. Üzerine ilk iki kuyucuğa hazırlanan standart solüsyonundan, diğer kuyucuklara her numuneden 2 kuyucuk olacak şekilde 45 μ L numune eklendi ve ELISA Reader ile 530 dalga boyunda okunan değerler 1. Absorbans olarak kaydedildi. Ardından her kuyucuğun üzerine 15 μ L reagent 2 eklenerek 10 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Inkübasyonu takiben 530 dalga boyunda okunan değerler 2. Absorbans olarak kaydedildi.

Her kuyucuktaki Δ absorbans örnek (Örneğin 2. Absorbans değeri – örneğin 1. Absorbans değeri) ve Δ absorbans standart (Std'in 2. Absorbans değeri – Std'in 1.

Absorbans değeri) değeri hesaplandı. Daha sonra TOS değeri aşağıdaki formülle hesaplandı ve sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Elde edilen absorbans değeri $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}$ cinsinden tespit edildi.

$$\text{TOS Değeri} = \frac{\Delta \text{ absorbans örnek}}{\Delta \text{ absorbans standart}} \times 20$$

3.3.5.2. Total Antioksidan Düzeyine Bakılması

Serum total antioksidan düzeyi (TAS) düzeyi -80° de bekletilen serum örnekleri kullanılarak solid faz sandwich enzim immunoassay (ELISA) prensibine dayanan TAS (REELASSAY) hazır ölçüm kiti kullanılarak yapıldı. Standart solüsyonları hazırlandı. 96 'lık kuyucuklu plaklarda her kuyucuğa 300 μL reagent 1'den koyuldu. Üzerine ilk iki kuyucuğa hazırlanan standart solüsyonundan, sonra iki kuyucuğa H_2O , diğer kuyucuklara ise her numune için 2 kuyucuk olacak şekilde 18 μL numunelerden eklendi. ELISA Reader ile 660 dalga boyunda okunan değerler 1. Absorbans olarak kaydedildi. Ardından her kuyucuğun üzerine 45 μL reagent 2 eklenerek 10 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Inkübasyonu takiben 660 dalga boyunda okunan değerler 2. Absorbans olarak kaydedildi.

Her kuyucuktaki, Δ absorbans örnek (Örneğin 2. Absorbans değeri – örneğin 1. Absorbans değeri), Δ absorbans H_2O (H_2O 'un 2. Absorbans değeri – H_2O 'un 1. Absorbans değeri) ve Δ absorbans standart (Std'in 2. Absorbans değeri – Std'in 1. Absorbans değeri) değeri hesaplandı. Daha sonra TAS değeri aşağıdaki formülle hesaplandı ve sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Elde edilen absorbans değeri $\text{mmol Trolox Equiv./L}$ cinsinden tespit edildi.

$$[(\Delta \text{ abs H}_2\text{O}) - (\Delta \text{ abs örnek})]$$

$$\text{TAS Değeri} = \frac{\text{---}}{[(\Delta \text{ abs H}_2\text{O}) - (\Delta \text{ abs std})]} \times 20$$

3.3.6. Verilerin İstatistiksel Analizlerin Yapılması

Verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS 20.0 software programı (SPSS Inc,Chicago, Illinois, USA) kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı istatistik olarak ortalama±standart sapma kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA, Tukey ve Duncan çoklu karşılaştırma testleri uygulandı. %95 güven aralığında 0.05'in altındaki p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

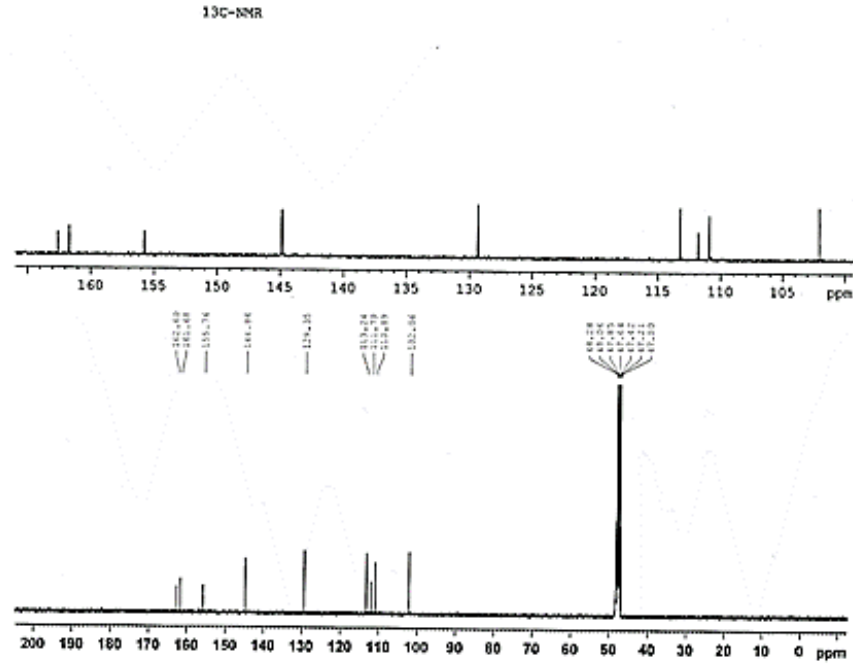


4. BULGULAR

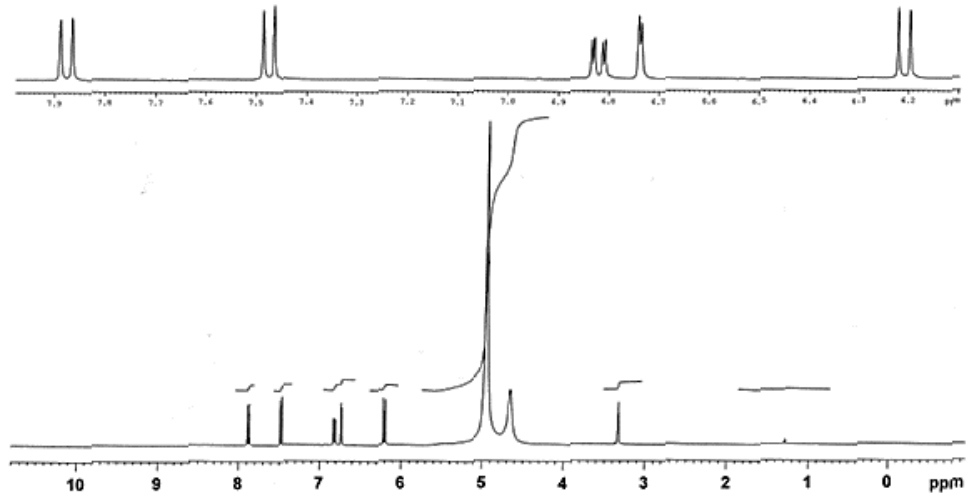
Astrodaucus orientalis meyve metanol ekstresi elde edildi ve bu ekstreden UMB izole edildi. Elde edilen *Astrodaucus orientalis* (L.) Drude meyve metanol ekstresi ve UMB'un sitotoksite etkileri ve oksidatif stres üzerine etkileri nöroblastom hücre dizininde çalışıldı. Bu model için SH-SY5Y insan nöroblastom hücreleri kullanıldı

4.1. Umbelliferonun Bileşiminin NMR Değerleri

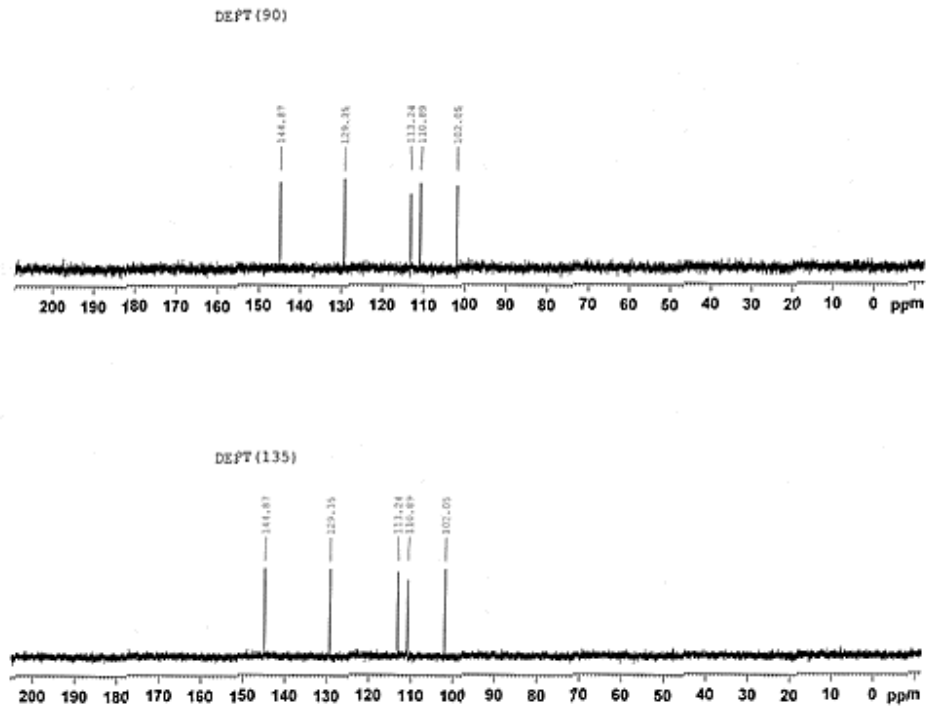
Krem rengi toz, C₉H₆O₃. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 162.37 (C-2), 110.90 (C-3), 144.58 (C-4), 129.33 (C-5), 113.13 (C-6), 161.77 (C-7), 102.04 (C-8), 155.85 (C-9), 111.76 (C-10). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.17 (1H, d, *J* = 9.3 Hz, H-3), 7.79 (1H, d, *J* = 9.3 Hz, H-4), 7.34 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-5), 6.74 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6), 6.65 (1H, s, H-8). ESIMS *m/z* 163.24 [M⁺H]⁺.



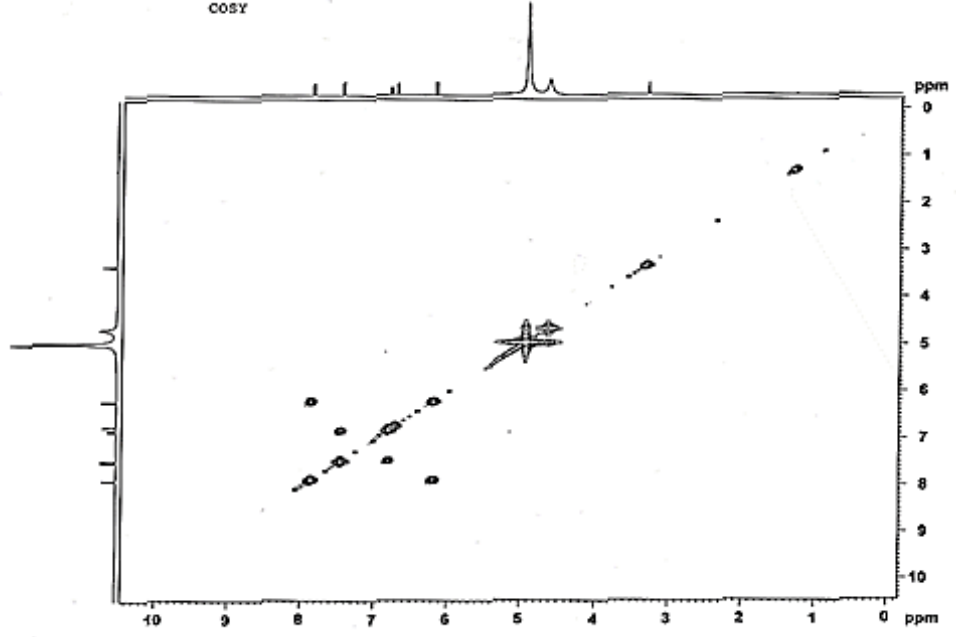
Şekil 4.1. Umbelliferonun ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) spektrumu⁶⁰



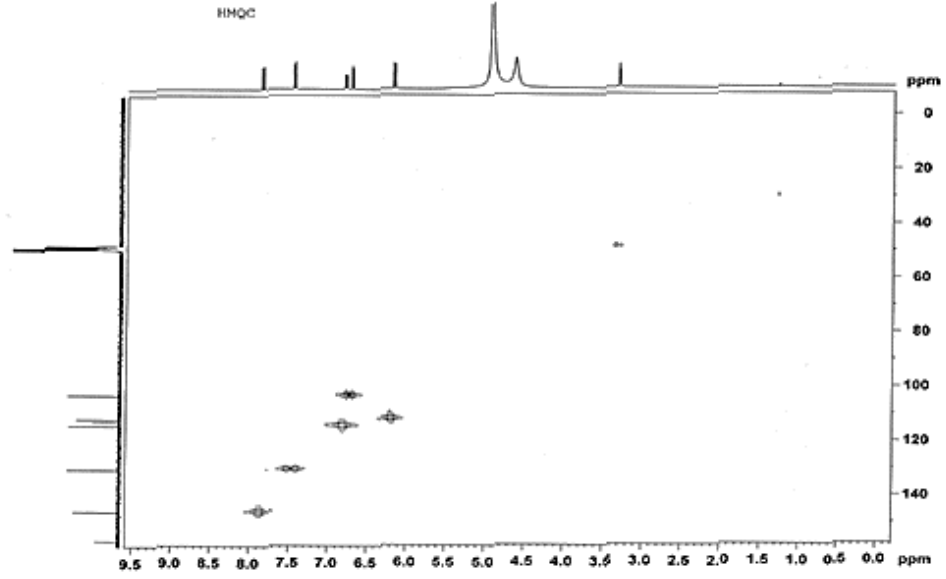
Şekil 4.2. Umbelliferonun $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) spektrumu⁶⁰



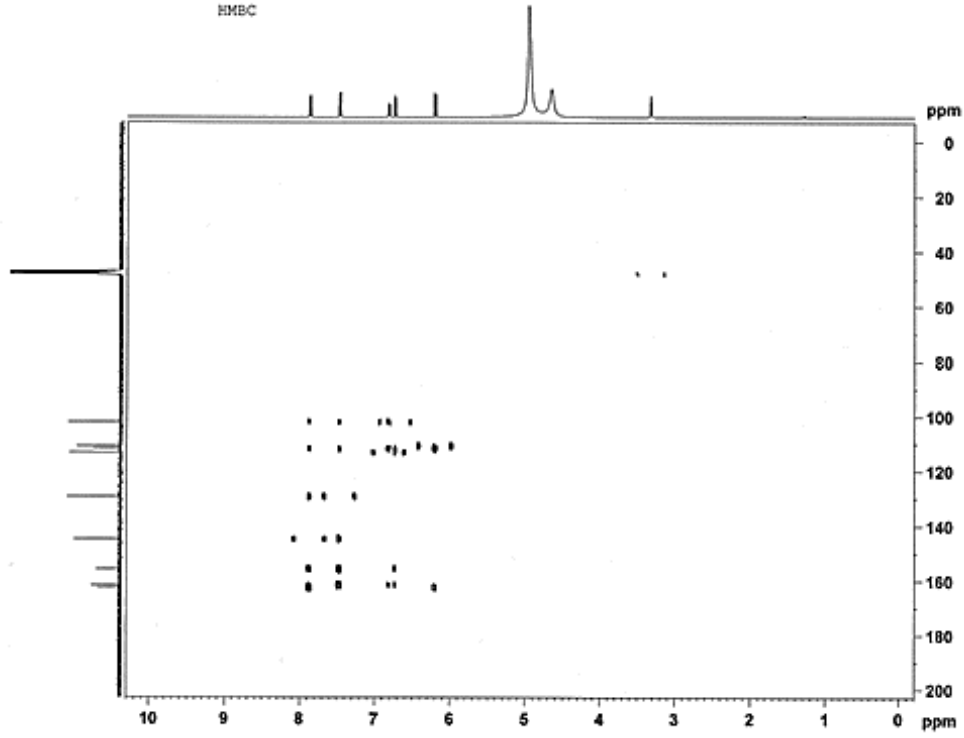
Şekil 4.3. Umbelliferonun DEPT (CDCl_3 , 100 MHz) spektrumu⁶⁰



Şekil 4.4. Umbelliferonun 2D-¹H-¹H-Homonükleer COSY spektrumu⁶⁰



Şekil 4.5. Umbelliferonun 2D-¹H-¹³C-Heteronükleer COSY (HMQC) spektrumu⁶⁰

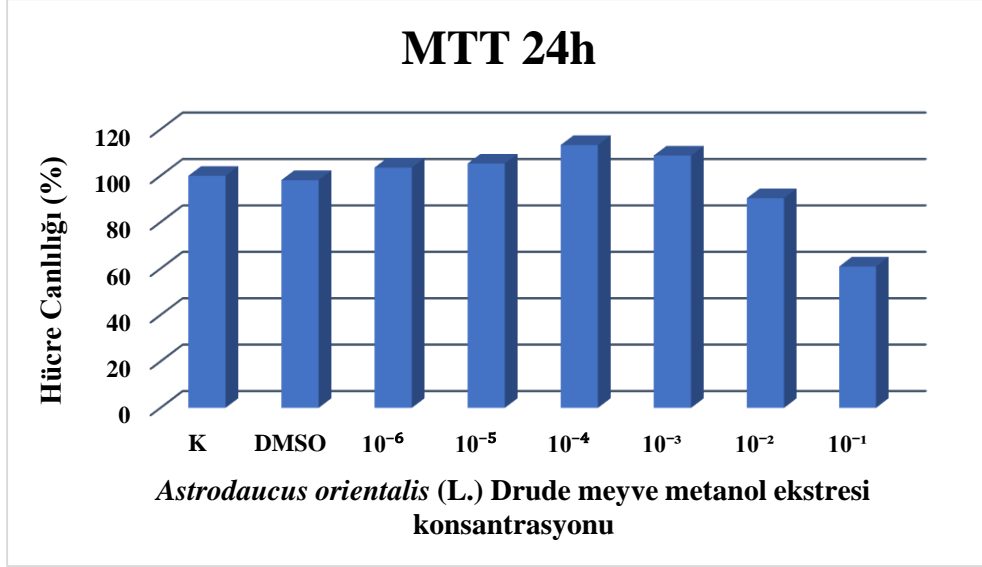


Şekil 4.6. Umbelliferonun 2D-1H-13C-Heteronükleer COSY (HMBC) spektrumu⁶⁰

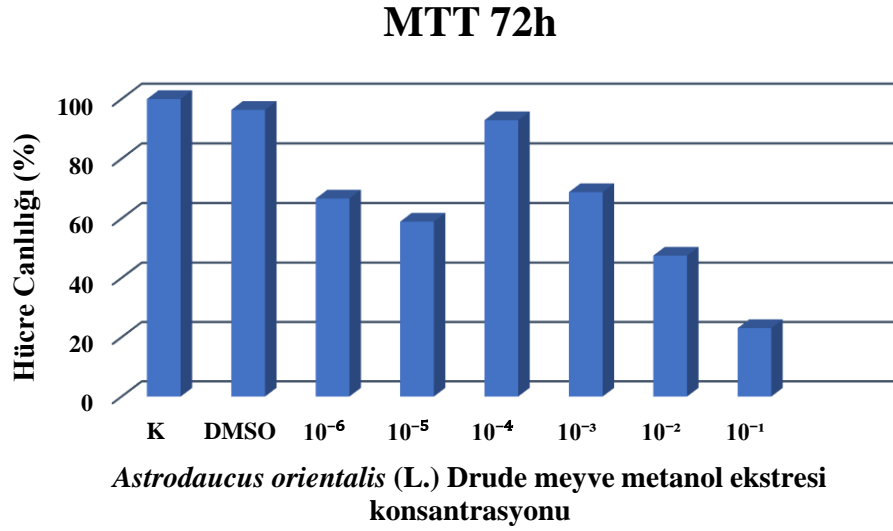
4.2. Sitotoksitenin Belirlenmesi

4.2.1. *Astrodaucus orientalis* Meyve Metanol Ekstresi Sitotoksitesinin Belirlenmesi

SH-SY5Y nöroblastom hücre serisinde çeşitli konsantrasyonlarda kullanılan *Astrodaucus orientalis* (L.) Drude meyve metanol ekstresinin (her bir kuyucukta final konsantrasyonu 10^{-1} - 10^{-6} mg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde) 24-72 saatlik inkübasyonu takiben sitotoksitesi MTT testi ile değerlendirildi ve 24 ve 72. saatteki sitotoksite sonuçları sırasıyla şekil 4.7 ve şekil 4.8’de gösterildi. MTT sonuçlarına göre IC_{50} konsantrasyonu 72. saatte 10^{-2} mg/mL olarak belirlendi.



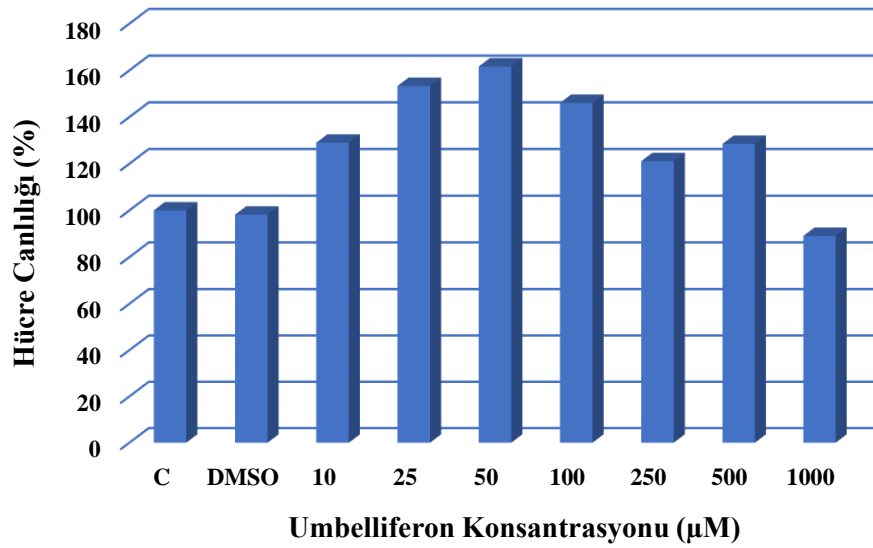
Şekil 4.7. Çeşitli konsantrasyonlarda *Astrodaucus orientalis* meyve metanol ekstresinin 24 saat inkübasyonunu takiben MTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen sitotoksik etkisi. (K: kontrol, 10⁻¹-10⁻⁶ mg/mL: *Astrodaucus orientalis* meyve metanol ekstresine maruz kalan SH-SY5Y insan nöroblastom hücre dizini konsantrasyonları)



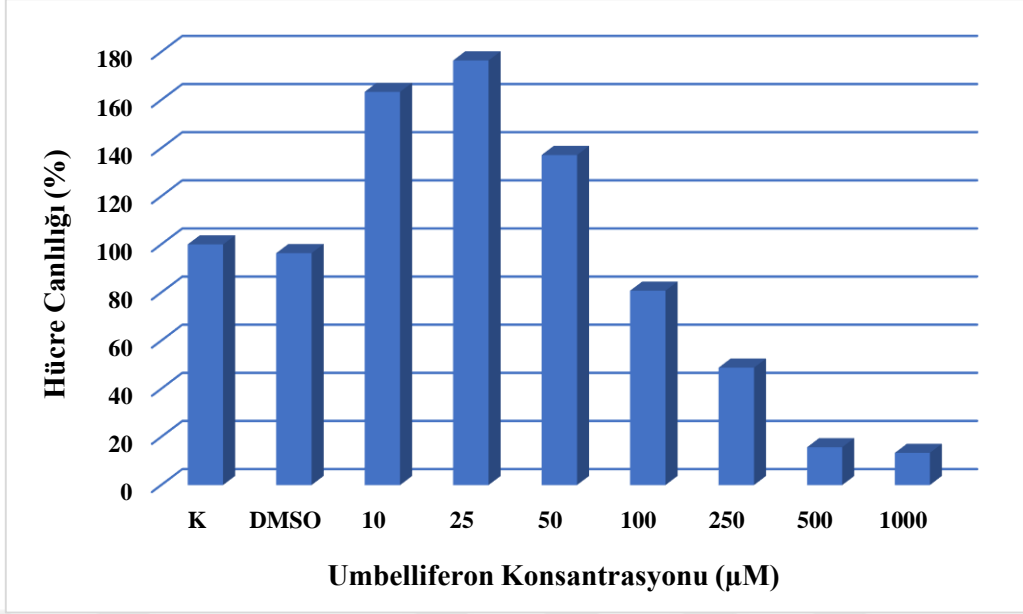
Şekil 4.8. Çeşitli konsantrasyonlarda *Astrodaucus orientalis* meyve metanol ekstresinin 72 saat inkübasyonunu takiben MTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen sitotoksik etkisi. (K: kontrol, 10⁻¹-10⁻⁶ mg/mL: *Astrodaucus orientalis* meyve metanol ekstresine maruz kalan SH-SY5Y insan nöroblastom hücre dizini konsantrasyonları)

4.2.2. *Astrodaucus orientalis* Meyve Metanol Ekstresinden İzole Edilen Umbelliferonun Sitotoksitesinin Belirlenmesi

SH-SY5Y insan nöroblastom hücre serisinde çeşitli konsantrasyonlarda kullanılan *Astrodaucus orientalis* meyve metanol ekstresinden izole edilen UMB'un (her bir kuyucukta final konsantrasyonu 10-1000 μ M konsantrasyonlarda olacak şekilde) 24-72 saatlik inkübasyonu takiben sitotoksitesi MTT testi ile değerlendirilmiş ve 24 ve 72. saatteki sitotoksite sonuçları sırasıyla şekil 4.9. ve şekil 4.10.'da gösterilmiştir. MTT sonuçlarına göre IC₅₀ konsantrasyonu 72. saatte 250 μ M olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.9. Çeşitli konsantrasyonlarda *Astrodaucus orientalis* meyve metanol ekstresinden izole edilen umbelliferonun 24 saat inkübasyonu takiben MTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen sitotoksik etkisi. (C: kontrol, 10-1000 μ M: Umbelliferona maruz kalan SH-SY5Y insan nöroblastom hücre dizini konsantrasyonları)



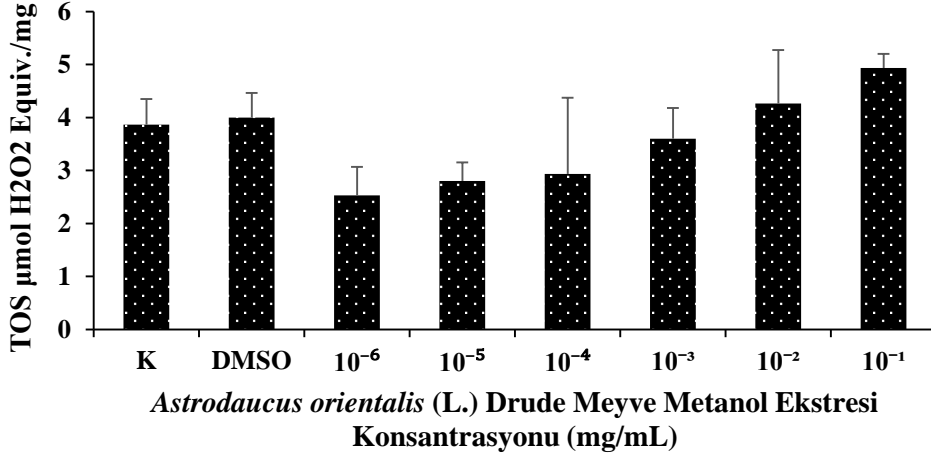
Şekil 4.10. Çeşitli konsantrasyonlarda *Astrodaucus orientalis* meyve metanol ekstresinden izole edilen umbelliferonun 72 saat inkübasyonunu takiben MTT Testi ile değerlendirilen ve kontrol hücrelerin yüzdesi olarak belirlenen sitotoksik etkisi. (K: kontrol, 10-1000 µM: Umbelliferona maruz kalan SH-SY5Y insan nöroblastom hücre dizini konsantrasyonları)

4.3. Oksidatif Stres İndeksinin Belirlenmesi

4.3.1. *Astrodaucus orientalis* Meyve Metanol Ekstresi Total Oksidan Seviyesinin Belirlenmesi (TOS)

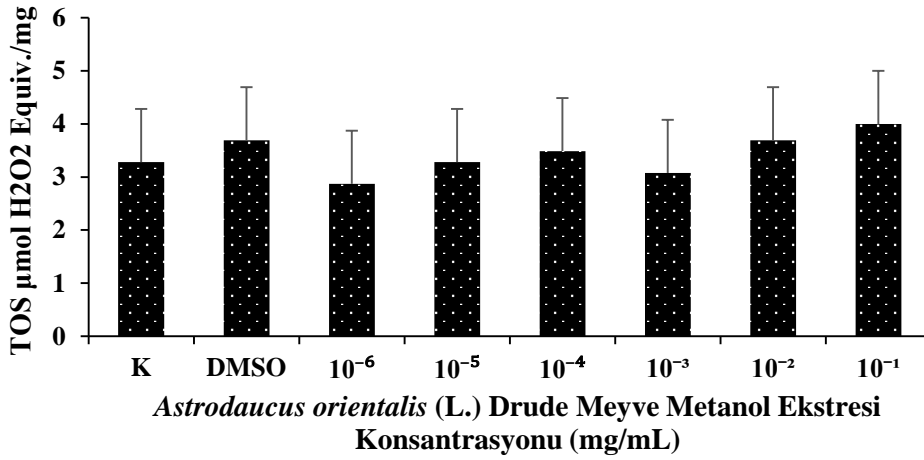
SH-SY5Y nöroblastom hücre serisinde oksidan stresin rolünü araştırmak için çeşitli konsantrasyonlarda *Astrodaucus orientalis* (L.) Drude meyve metanol ekstresini (her bir kuyucukta final konsantrasyonu 10^{-1} - 10^{-6} mg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde) seçtiğimiz deneyde total oksidan düzeyi 24-72 saatlik inkübasyonu takiben ELISA prensibine dayanan TOS hazır ölçüm kiti kullanılarak değerlendirildi ve 24 ve 72. saatteki TOS düzeyleri sırasıyla şekil 4.11 ve 4.12’de gösterildi. TOS sonuçlarına göre; yüksek konsantrasyonlarda *Astrodaucus orientalis* (L.) Drude meyve metanol ekstresinin TOS düzeyini arttırdığı, bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ($p>0.05$).

TOS 24h



Şekil 4.11. Çeşitli konsantrasyonlarda *Astrodaucus orientalis* meyve metanol ekstresinin 24 saat inkübasyonunu takiben ortalama total oksidan seviyesi (K: kontrol, 10⁻¹-10⁻⁶ mg/mL: *Astrodaucus orientalis* Drude meyve metanol ekstresine maruz kalan SH-SY5Y insan nöroblastom hücre dizini konsantrasyonları)

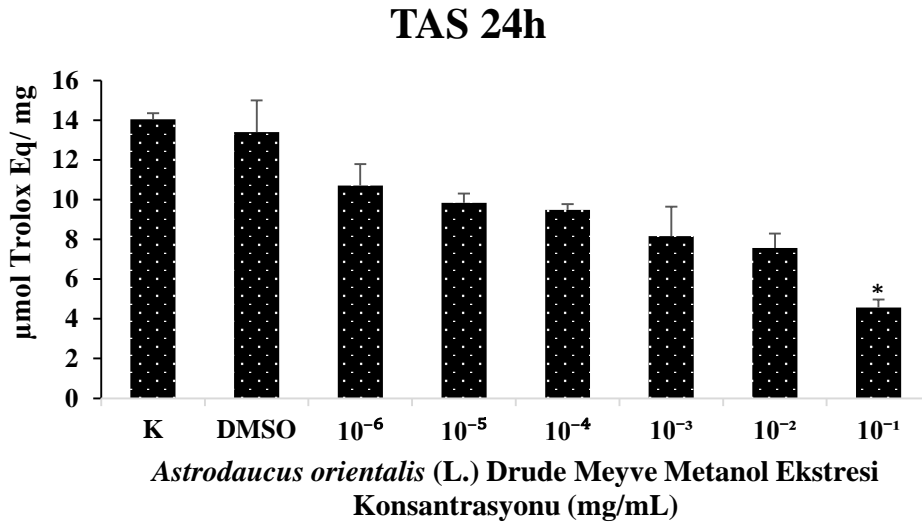
TOS 72h



Şekil 4.12. Çeşitli konsantrasyonlarda *Astrodaucus orientalis* meyve metanol ekstresinin 72 saat inkübasyonunu takiben ortalama total oksidan seviyesi (K: kontrol, 10⁻¹-10⁻⁶ mg/mL: *Astrodaucus orientalis* meyve metanol ekstresine maruz kalan SH-SY5Y insan nöroblastom hücre dizini konsantrasyonları)

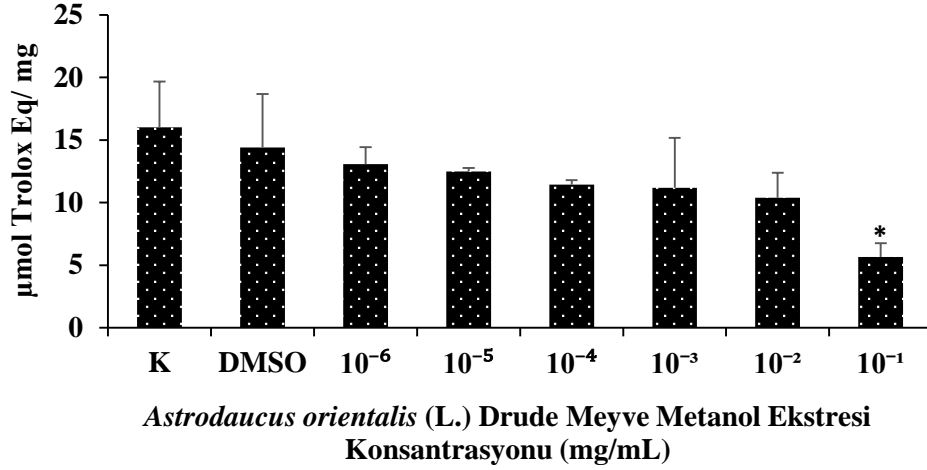
4.3.2. *Astrodaucus Orientalis* Meyve Metanol Ekstresi Total Antioksidan Seviyesinin Belirlenmesi (TAS)

SH-SY5Y nöroblastom hücre serisinde oksidan stresin rolünü araştırmak için çeşitli konsantrasyonlarda *Astrodaucus orientalis* meyve metanol ekstresini (her bir kuyucukta final konsantrasyonu 10^{-1} - 10^{-6} mg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde) seşitimiz deneyde total antioksidan düzeyi 24-72 saatlik inkübasyonu takiben ELISA prensibine dayanan TAS hazır ölçüm kiti kullanılarak değerlendirildi ve 24 ve 72. saatteki TAS düzeyleri sırasıyla şekil 4.13 ve 4.14'de gösterildi. TAS sonuçlarına göre; yüksek konsantrasyonlarda *Astrodaucus orientalis* meyve metanol ekstresinin TAS düzeyini azalttığı görüldü. Sadece 10^{-1} mg/mL konsantrasyonda uygulanan ekstrenin TAS düzeyini kontrole göre istatikselsel olarak anlamlı derecede azalttığı tespit edildi ($p<0.05$).



Şekil 4.13. Çeşitli konsantrasyonlarda *Astrodaucus orientalis* meyve metanol ekstresinin 24 saat inkübasyonunu takiben ortalama total antioksidan seviyesi (*: $p<0.05$: istatikselsel olarak kontrole göre anlamlılık; K: kontrol, 10^{-1} - 10^{-6} mg/mL: *A. orientalis* meyve metanol ekstresine maruz kalan SH-SY5Y insan nöroblastom hücre dizini konsantrasyonları)

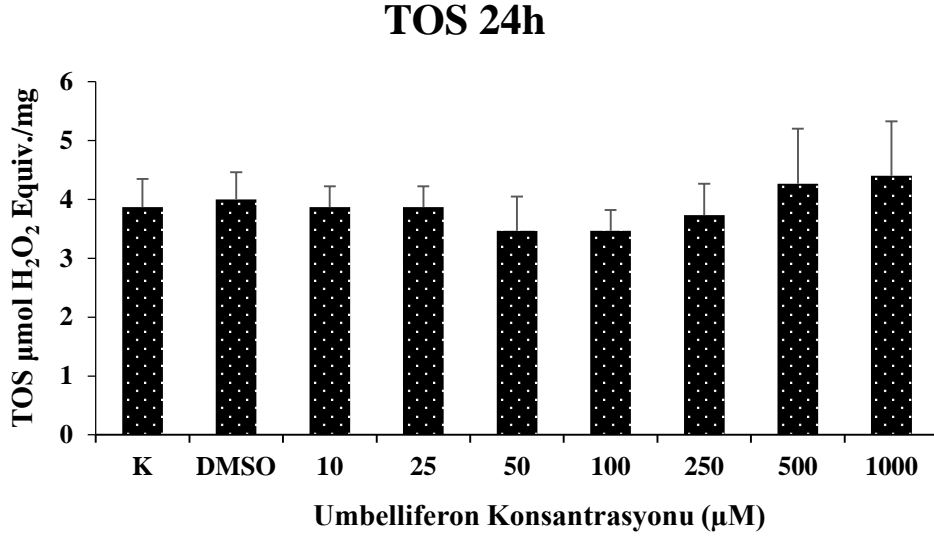
TAS 72h



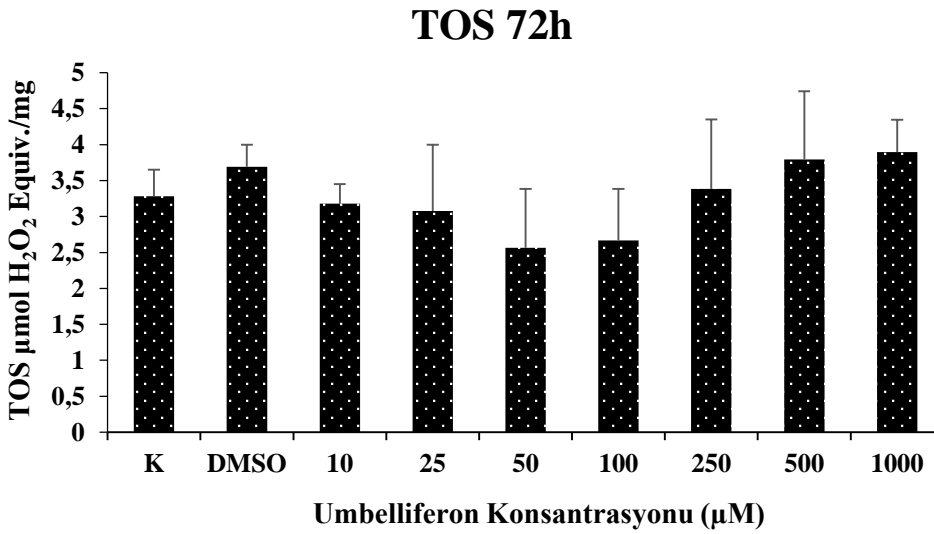
Şekil 4.14. Çeşitli konsantrasyonlarda *Astrodaucus orientalis* meyve metanol ekstresinin 72 saat inkübasyonunu takiben ortalama total antioksidan seviyesi (K: kontrol, 10⁻¹-10⁻⁶ mg/mL: *Astrodaucus orientalis* meyve metanol ekstresine maruz kalan SH-SY5Y insan nöroblastom hücre dizini konsantrasyonları)

4.3.3. *Astrodaucus Orientalis* Meyve Metanol Ekstresinden İzole Edilen Umbelliferonun Total Oksidan Seviyesinin Belirlenmesi (TOS)

SH-SY5Y nöroblastom hücre serisinde oksidan stresin rolünü araştırmak için çeşitli konsantrasyonlarda UMB'nin (her bir kuyucukta final konsantrasyonu 10-1000 µM konsantrasyonlarda olacak şekilde) seçtiğimiz deneyde total oksidan düzeyi 24-72 saatlik inkübasyonu takiben ELISA prensibine dayanan TOS hazır ölçüm kiti kullanılarak değerlendirildi ve 24 ve 72. saatteki TOS düzeyleri sırasıyla şekil 4.15 ve 4.16'de gösterildi. TOS sonuçlarına göre; yüksek konsantrasyonlarda UMB'nin TOS düzeyini arttırdığı, bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi (p>0.05).



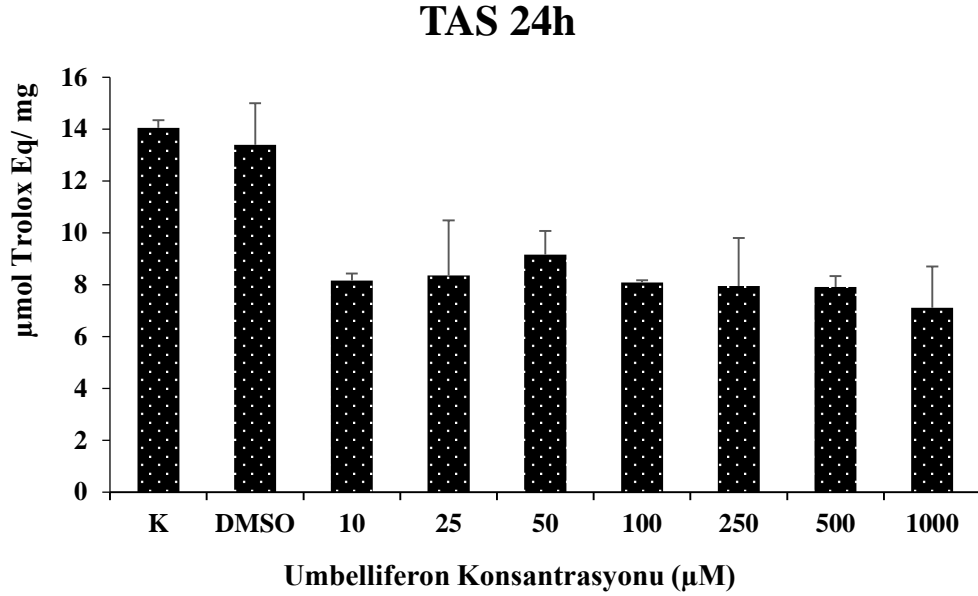
Şekil 4.15. Çeşitli konsantrasyonlarda *Astrodaucus orientalis* meyve metanol ekstresinden izole edilen umbelliferonun 24 saat inkübasyonunu takiben ortalama total oksidan seviyesi (K: kontrol, 10-1000 μM: Umbelliferona maruz kalan SH-SY5Y insan nöroblastom hücre dizini konsantrasyonları)



Şekil 4.16. Çeşitli konsantrasyonlarda *Astrodaucus orientalis* meyve metanol ekstresinden izole edilen umbelliferonun 72 saat inkübasyonunu takiben ortalama total oksidan seviyesi (K: kontrol, 10-1000 μM: Umbelliferona maruz kalan SH-SY5Y insan nöroblastom hücre dizini konsantrasyonları)

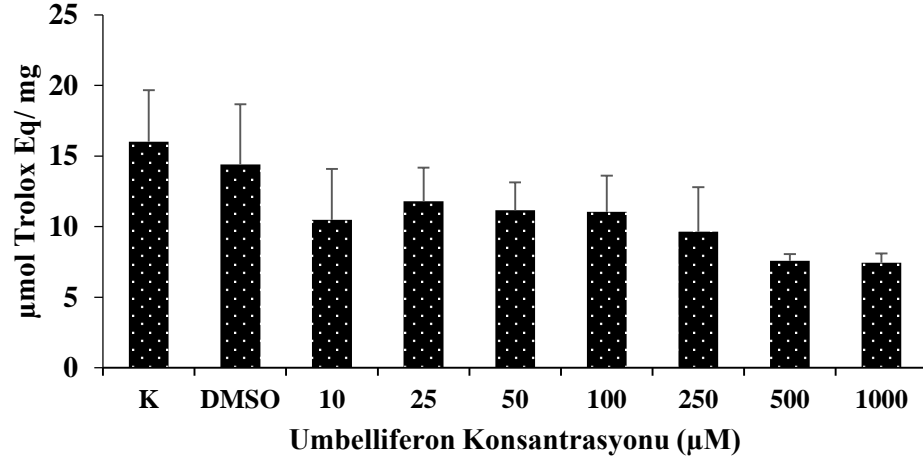
4.3.4. *Astrodaucus Orientalis* Meyve Metanol Ekstresinden İzole Edilen Umbelliferonun Total Antioksidan Seviyesinin Belirlenmesi (TAS)

SH-SY5Y nöroblastom hücre serisinde oksidan stresin rolünü araştırmak için çeşitli konsantrasyonlarda UMB'nin (her bir kuyucukta final konsantrasyonu 10-1000 μ M konsantrasyonlarda olacak şekilde) seşitimiz deneyde total antioksidan düzeyi 24-72 saatlik inkübasyonu takiben ELISA prensibine dayanan TAS hazır ölçüm kiti kullanılarak değerlendirildi ve 24 ve 72. saatteki TAS düzeyleri sırasıyla şekil 4.17 ve 4.18'de gösterildi. TAS sonuçlarına göre; yüksek konsantrasyonlarda UMB'nin TAS düzeyini azalttığı, bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ($p>0.05$).



şekil 4.17. Çeşitli konsantrasyonlarda *Astrodaucus orientalis* meyve metanol ekstresinden izole edilen umbelliferonun 24 saat inkübasyonunu takiben ortalama total antioksidan seviyesi (K: kontrol, 10-1000: Umbelliferona maruz kalan SH-SY5Y insan nöroblastom hücre dizini konsantrasyonları)

TAS 72h



Şekil 4.18. Çeşitli konsantrasyonlarda *Astrodaucus orientalis* Drude meyve metanol ekstresinden izole edilen umbelliferonun 72 saat inkübasyonunu takiben ortalama total antioksidan seviyesi (K: kontrol, 10-1000 µM: Umbelliferona maruz kalan SH-SY5Y insan nöroblastom hücre dizini konsantrasyonları)

5. TARTIŞMA

Nöroblastom, çocukluk çağında en sık karşılaşılan solid tümörlerden biridir. bu hastalığa karşı geliştirilmiş mevcut tedavilerin cevap oranları oldukça düşüktür ve son yıllarda yapılan çalışmalara göre nöroblastomlu hastalarda sağ kalım oranı ancak %50 civarındadır. Kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi işlemler ile birlikte uygulanan tedavilere rağmen tatmin edici düzeyde cevap alınamamaktadır. Bu nedenle nöroblastom tedavisinde de alternatif yeni tedavi arayışlarına gidilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bitkisel kökenli bileşikler birçok hastalığın tedavisinde ve prognozunun azaltılmasında oldukça önem kazanmıştır. Fakat elde edilen bu bileşiklerin ilaç hazırlanmasında etkin madde olarak kullanılabilmesi için ilk olarak klinik öncesi (preklinik) çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Son zamanlarda yapılan in vitro ve preklinik çalışmalar sonucu kumarin türevi bileşiklerin antikanser ve oksidatif hasar üzerine etki gösterdiği bildirilmiştir.^{86,101}

Çalışmamızda SH-SY5Y insan nöroblastom hücre hattı kullanarak hücre ölümünden sorumlu olabilecek ve bize yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde ışık tutabilecek alternatif tedavi yöntemleri bulmayı hedeflemekteyiz. Literatürde birçok kanser hattı üzerinde sitotoksik ve oksidan etkisi gösterilen *Astrodaucus orientalis* (L.) Drude ve UMB'nin SH-SY5Y insan nöroblastom hücre hattı üzerine etkisini gösteren çalışma tesbit edilememiştir.^{82, 83} Bu amaçla çalışmamızda, SH-SY-5Y nöroblastom hücre hattı üzerinde *Astrodaucus orientalis* meyve metanol ekstresi ve bu ekstreden elde edilen UMB'nin sitotoksik ve oksidatif hasar üzerinde etkileri araştırılmıştır.

MTT analizi yaygın olarak, hücre ölümünü tetikleyen mitokondriyal ve lizozom membranlarında meydana gelen hasar nedeniyle test edilen (kanser) hücrelerin sitotoksik potansiyelini değerlendirmek ve yaşayabilirliğini ölçmek amacıyla kullanılan testlerden biridir.⁸⁴ Bu nedenle çalışmamızda SH-SY5Y insan nöroblastom hücre hattı üzerine

Astrodaucus orientalis (L.) Drude meyve metanol ekstresi ve bu ekstreten elde edilen UMB'nin olası sitotoksik etkisi kalorimetrik bir yöntem olan MTT analizi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca hücre kültürlerinden elde edilen süpernatantlardan oksidatif hasar üzerine etkileri TAS-TOS analizleri ile belirlenmiştir.

Çeşitli bitki ekstraktlarının ve bu ekstraktlardan elde edilen kumarin türevi bileşiklerin antikanser ve sitotoksik etkileri çeşitli kanser hatları üzerinde *Rhodiola crenulata* ekstraktlarının insan nöroblastom hücreleri üzerindeki anti-neoplastik potansiyellerinin değerlendirildiği bir çalışmada, MYCN amplifikasyonuna sahip bir insan nöroblastom hücre dizisi olan nöroblastom-1691 hücreleri üzerinde *Rhodiola crenulata* ekstraktının önemli sitotoksik etkileri gözlemlenmiştir.⁵⁸ Bir başka çalışmada SH-SY5Y hücre hattı üzerinde *Paris polyphylla* bitkisi kullanılarak bu bitkinin anti-tümör etkisinin olup olmadığı araştırılmış ve sonuçta hücreleri apoptotik yolağa sokarak hücre proliferasyonunu azalttığı tespit edilmiştir.⁸⁵ Benzer şekilde bir çalışmada ise bergamot esansiyel yağının SH-SY5Y hücre hattı üzerinde sitotoksik etki gösterdiği kanıtlanmıştır.⁸⁶ *Moringa oleifera* tohumlarından elde edilen Morinjin ekstresinin de SH-SY5Y hücrelerinin gelişimini durdurduğu ve hücreleri apoptoza sürüklediği gözlemlenmiştir.⁸⁷ Bunların yanı sıra yaygın kullanılan kemoterapötik ajanlar arasında bulunan doksorubisin, kurkumin ile kombine kullanılması ile doksorubisin anti kanser etkisini artırdığı,⁸⁸ başka bir çalışmada ise AKT ve Foxo3a genlerinin inhibisyonu ile nöroblastom hücrelerini apoptoza yönelttiği tespit edilmiştir.⁸⁹ Benzer şekilde, bu çalışmada da, *Astrodaucus orientalis* (L.) Drude meyve metanol ekstresi SH-SY5Y insan nöroblastom hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi incelenmiş ve *Astrodaucus orientalis* meyve metanol ekstresi uygulamasından 24 saat ve 72 saat sonra ölçülen MTT analiz sonuçlarımıza göre yüksek konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre hücre canlılığını azalttığı ve IC₅₀ konsantrasyonu 72. saatte 10⁻² mg/mL olarak tespit edilmiştir.

UMB, farmakolojik olarak aktif bir ajan olan 7-hidroksikoumarin türevi bir bileşiktir. Sekonder metabolitlerle farklı bitkilerde bulunan UMB, insanlar tarafından ilaç ve besin takviyesi olarak yaygın şekilde tüketilmektedir.⁷⁴ UMB'nin antikanser ve sitotoksik etkileri çeşitli kanser hatları üzerinde gösterilmiştir. Finn ve ark.⁷⁹, kumarin ekstresinin insan malign melanom hücrelerinde mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolunu ve melanogenezini düzenlediğini göstermişlerdir. Jayakumar ve ark.⁷⁷ ise, UMB'den elde edilen kumarin ekstresinin radyasyona maruz kalma sonucunda meydana gelen genotoksik etkileri ve sağlıklı dokularda apoptozu azalttığını tespit etmişlerdir. UMB'nun prostat kanseri hücre hatları üzerindeki kemoprotektif etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada, primer evre (LnCap) ve son evre (PC3) prostat kanserlerinin apoptozisin indüklenmesi ve hücre siklusunun durması üzerindeki değişim Western blot analizi kullanılarak çalışılmış ve çalışmada 50,100 ve 200 µM konsantrasyonlarda UMB kullanılmıştır. UMB uygulamasından 48 saat sonra MTT analizi yapılmış ve en yüksek konsantrasyonda hücre canlılığında azalmanın anlamlı olarak meydana geldiği tespit edilmiştir.⁹⁰ Kandil S. ve ark.⁹¹ tarafından yapılan bir çalışmada ise 7-süstitüe edilmiş UMB türevlerinin potansiyel olarak faydalı androjen reseptör antagonisti oldukları gösterilmiştir. Bu bileşiğin insan prostat kanseri hücre hattında (22Rv1) submikromolar inhibe edici aktiviteye sahip olduğu ve prostat kanseri tedavisinde klinik olarak kullanılan anti-androjenlerden bikalutamide göre 50 kat, enzalutamide göre 30 kattan fazla iyileştirme potansiyeline sahip olduğu tespit edilmiştir. İlginç bir şekilde, bu bileşik, insan meme kanseri hücre hattı üzerinde (MCF-7) de daha iyi aktivite gösterdiği farklı bir çalışmada gösterilmiştir. Mevcut çalışmada ise UMB'nin doz aralığını daha geniş tutarak farklı konsantrasyonlar arası olası değişiklikleri SH-SY5Y insan nöroblastom hücre hattında gözlemlemeyi planladık. Bu amaçla 10-1000 µM konsantrasyonlarda UMB hücrelere verilmiştir. 24 ve 72 saat inkübasyonu takiben

sitotoksik etkisini incelemek amacıyla MTT analizi kullanılmıştır. MTT analiz sonuçlarımıza göre ise yüksek konsantrasyonlarda UMB'nin kontrol grubuna göre hücre canlılığını azalttığı ve IC₅₀ konsantrasyonu 72. saatte 250 µM olarak belirlenmiştir.

Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri (ROS) artışına bağlı olarak meydana gelen doku hasarının göstergesidir. ROS'lar vücutta endojen ve ekzojen yolla sürekli olarak üretilmekte ve hücre içi uyarılma ve hücre içi yıkımı gibi çeşitli fizyolojik süreçlere neden olmaktadır.⁹² ROS'lar tarafından oluşturulan oksidan etki antioksidan savunma sistemi tarafından bloke edilir ve bu durum fizyolojik koşullarda normal denge halinde sürdürülür. Serbest radikallerin artması veya antioksidanların azalması sonucu, serbest radikallerle antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulması oksidatif strese ve oksidatif hasara neden olmaktadır.^{93, 94}

ROS, hücre membranlarına ve protein, lipid, lipoprotein, DNA gibi diğer yapılara, hidroksil radikali ve peroksinitrit özellikle hücre membranlarına ve lipoproteine zarar verir. Nötralle edilemeyen ROS ile başlayıp, kontrol edilemeyen hücresel ve moleküler değişikliklere kadar ilerleyen süreç kanser gibi ciddi hastalıkların gelişiminde büyük rol oynar.^{95, 96}

Bitkilerle tedavi, modern tıbbın antik çağlardan iyileştirilmesi için geleneksel bir süreçtir.^{97,98} Bitkisel ilaçların kullanımı dünya genelinde artmaktadır ve bazı olumsuz etkileri olmasına rağmen, tüketiciler geleneksel bitkisel ilaçların güvenli olduğuna inanmaktadır.⁹⁹ Günümüzde, anti-nörodejeneratif hastalıklar potansiyeli ile kumarinlerin izolasyonunda kullanılacak mahsul ve tıbbi bitkiler arasında doğal kumarin kaynağının aranması uygun olacaktır.¹⁰⁰ Kumarin türevlerinin, anti-enflamatuar, antioksidan olmak üzere çok sayıda terapötik uygulamaya sahip olduğu ve bazılarının anti-kanser ajanlar olarak aktif olduğu bildirilmiştir.^{101,102}

UMB, farmakolojik olarak aktif bir ajan olan 7-hidroksikoumarin türevi bir bileşiktir ve sağlıkla ilgili çeşitli koşullara karşı (kansere hücreleri, pro-oksidanlar ve reaktif oksijen türleri nedeniyle oluşan dejeneratif hastalıklar ve mikrobiyal enfeksiyonlar gibi) farmakolojik aktiviteler sergilediği gösterilmiştir.⁷⁵ 7,12-dimetilbenz antrasen kaynaklı oral karsinogenezde UMB'nin glikokonjugatlar ve immünolojik belirteçler üzerindeki etkinliği araştırıldığı bir çalışmada, UMB'nin bukkal dokuların yüzeyinde karsinogenez sırasında oluşan anormal yapıları ortadan kaldırdığı ve karsinogenez tetikleyen 7,12-dimetilbenz'e karşı sitokeratin ekspresyonunu artırdığı böylece de kanser hücrelerinin glikoprotein sentezini ve glikosiltransferaz aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir.⁷⁸ Benzer şekilde 7,12-dimethylbenz kaynaklı oral karsinogenezde UMB'nin lipid peroksidasyonu, antioksidan ve ksenubiyotik metabolizması üzerinde doza duyarlı etkinliği araştırılmış. Sonuçta 7,12-dimetilbenz grubunda yüksek tümör hacmi, tümör yükü ve aşırı mutant p53, PCNA ve siklin D1 ekspresyonu ile %100 tümör oluşumu gözlemlenmiştir. 7,12-dimetilbenz ile muamele edilmiş hamsterlere vücut ağırlığının 30 mg/kg dozunda UMB oral yoldan verilmesi sonucunda tümör oluşumunun tamamen önlenmiş ve plazma, karaciğer ve bukkal mukozadaki biyokimyasal markörlerin durumunu düzelttiği gösterilmiştir. Bu nedenle, bu çalışma UMB'nin deneysel oral karsinogenezde azalmış hücre proliferasyonu ve indüklenen apoptoz ile faz I ve faz II detoksifikasyon sistemi üzerinde modüle edici etkisinin yanı sıra güçlü kemopreventif, anti-lipid peroksidatif ve antioksidan potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.¹⁰³ Wang ve ark.¹⁰⁴ tarafından yapılan bir başka çalışmada, UMB'nin insan renal karsinomu üzerinde PI3K γ 'nın p110 γ katalitik alt ünitesinin düzenlenmesi yoluyla antitümör aktivitesi üzerinde etkisi araştırılmış ve sonuçta UMB'nin konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre proliferasyonunu azalttığını ve apoptotik olayları indüklediğini ortaya konulmuştur. Ek olarak UMB, oksidatif stresi artırarak, G0 / G1 fazındaki hücre

döngüsünü de durdurmakta ve muhtemelen oksidatif DNA hasarı yoluyla insan oral karsinomu (KB) hücrelerinde apoptozu indüklemektedir.¹⁰⁵ Yu ve ark.⁴⁹ ise UMB'nin HepG2 hücrelerinde hücre döngüsünün S fazında durmasına neden olduğunu tespit etmişlerdir. HepG2 kanser hücrelerinde meydana gelen ölümün nedenini; UMB'nin apoptozu indüklenmesi, hücre döngüsünü durdurması ve DNA fragmantasyonu yoluyla bir antikanser ajan olarak işlev görmesine bağlamaktadırlar.⁴⁹ Mevcut çalışmada da, oksidatif hasar üzerine etkisini değerlendirmek için TAS-TOS analizini kullanılmıştır. MTT analizlerimizle korele bir şekilde TOS seviyesinde yükseliş TAS seviyesinde ise bir düşüş gözlemlenmiştir. Yaptığımız çalışmada da literatürle uyumlu şekilde, doz artışına bağlı olarak oksidatif stresin arttığı ve böylece hücrede ölüm meydana geldiği tespit edilmiştir. Literatür çalışmalarından da anlaşılacağı üzere muhtemel hücre ölümünün nedeni hücre döngüsünde meydana gelen aksaklıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

SH-SY5Y hücre hattı üzerinde yaptığımız çalışmalar sonucunda literatürde henüz çalışılmamış olan *Astrodaucus orientalis* metanol ekstresi ve bu ekstreten izole edilen UMB kullanarak hücre canlılığı, TOS-TAS düzeyi incelenmiştir *Astrodaucus orientalis* metanol ekstresi ve UMB'nin yüksek konsantrasyonlarının hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalttığı tesbit edilmiştir. Yine MTT testi ile uyumlu olarak oksidatif stresi arttırdığı gözlemlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre *Astrodaucus orientalis* (L.) Drude metanol ekstresi ve UMB'nin SH-SY5Y hücre hattı üzerinde anti-kanser etkisinin bulunduğu tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bu veriler, UMB'nin tek başına ve/veya kombine olarak kemoterapötik ilaçlara alternatif olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, gelecekte mevcut sonuçları doğrulamak için *Astrodaucus orientalis* metanol ekstresi ve UMB'nin nöroblastom üzerindeki anti-kanser etkisini kesin olarak kanıtlamaya yönelik *in vivo* çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Cooper GM, Hausman, Robert E. *The cell : a molecular approach*. 3rd Baskı. Washington, D.C. : Sunderland, Mass. : ASM Press, 2004.
2. Klug WS CM. *Genetik*. Baskı. Palme, 2002.
3. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med*, 2000, 21: 167-223.
4. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. 2011, 144: 646-674.
5. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 2018, 68: 394-424.
6. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. 12 September 2018.
7. Türkiye Kanser İstatistikleri. Halk Sağlığı Müdürlüğü. Ankara, Türkiye. 2018
8. Assuncao Guimaraes C, Linden R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem*, 2004, 271: 1638-1650.
9. Toğar B. Sağlıklı nöron ve N2A nöroblastom hücre kültürleri üzerine farnesen, zingiberen, gayazulen, kopaen ve siklosativen seskiterpenlerinin sitolojik, biyokimyasal, ve genetik etkileri. Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora, Atatürk Üniversitesi, 2013.
10. Koff JL, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *Int J Mol Sci*, 2015, 16: 2942-2955.
11. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*, 2012, 4: 330-349.
12. Akşit H BA. Apoptosis. *YYU Vet Fak Derg*, 2008, 19: 55-63.

13. Nitulescu GM, Draghici C, Olaru OT, Matei L, Ioana A, Dragu LD, Bleotu C. Synthesis and apoptotic activity of new pyrazole derivatives in cancer cell lines. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23: 5799-5808.
14. Levin B BP. 2008. *Dünya Kanser Raporu, Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu (IARC)*.
15. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 2010, 127: 2893-2917.
16. Boss BJ, & Wilkerson, R. R. . *Concepts of neurologic dysfunction. Understanding pathophysiology*, 5. Baskı. 2006: 491-546.
17. Malak, A. T., & Dicle, A. 2007. Assessing the efficacy of a peer education model in teaching breast self-examination to university students. *Asian Pac J Cancer Prev*, 8, 481-4.
18. Baksi Şimşek A. MD Anderson Beyin Tümörü Semptom Envanteri'nin geçerlilik ve güvenilirliği. DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2009.
19. Geneva AJ, Muirhead CA, Kingan SB, Garrigan DJPo. A new method to scan genomes for introgression in a secondary contact model. 2015, 10: e0118621.
20. Arlı Şk. Beyin Kanseri Tedavisinin Fonksiyonel Değerlendirilmesi Ölçeğinin Türk Toplumunda Geçerlik ve Güvenirlik Çalışması.
21. Siegel, R., Ward, E., Brawley, O., & Jemal, A. 2011. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61, 212-236.
22. Comelli, I., Lippi, G., Campana, V., Servadei, F., & Cervellin, G. 2017. Clinical presentation and epidemiology of brain tumors firstly diagnosed in adults in the

- Emergency Department: a 10-year, single center retrospective study. *Annals of translational medicine*, 5.
23. Kutluk, T. Çocukluk çağı kanserlerinin epidemiyolojisi. *İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Herkes İçin Çocuk Kanserlerinde Tanı Sempozyum Dizisi*, 2006. 11-15.
 24. Robertson, P. L. Advances in treatment of pediatric brain tumors. *NeuroRx*, 2006. 3:2, 276-291.
 25. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016, 66: 7-30.
 26. Tuğcu B. Malign astrositer tümörlü hastalarda yaşam süresini etkileyen faktörler ve Ki-67 (MIB I) proliferasyon indeksinin prognoz üzerine etkisi. 2004.
 27. Bleeker FE, Hopman SM, Merks JH, Aalfs CM, Hennekam RCJN. Brain tumors and syndromes in children. 2014, 45: 137-161.
 28. Johnson KJ, Cullen J, Barnholtz-Sloan JS, Ostrom QT, Langer CE, Turner MC, McKean-Cowdin R, Fisher JL, Lupo PJ, Partap S, Biomarkers P. Childhood brain tumor epidemiology: a brain tumor epidemiology consortium review. 2014, 23: 2716-2736.
 29. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2015.pdf . 7 Ağustos 2019
 30. National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/news-events/press-releases/2016>. 7 Ağustos 2019
 31. Ersin Hacıyakupoğlu KO, Semih Kıvanç Olguner, Mustafa Emre Saraç, Derviş Mansuri Yılmaz ve Sebahattin Hacıyakupoğlu. Çocukluk Çağı Beyin Tümörleri. *Archives Medical Review Journal* 2014, 23: 367-386.
 32. Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL. Epidemiology of brain tumors. *Neurologic Clinics*, 2007, 25: 867.

33. Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: Current concepts and review of the literature. *Neuro-Oncology*, 2002, 4: 278-299.
34. Moore BD, 3rd. Neurocognitive outcomes in survivors of childhood cancer. *J Pediatr Psychol*, 2005, 30: 51-63.
35. Lovely MP. Symptom management of brain tumor patients. *Semin Oncol Nurs*, 2004, 20: 273-283.
36. Ansell P, Johnston T, Simpson J, Crouch S, Roman E, Picton S. Brain tumor signs and symptoms: analysis of primary health care records from the UKCCS. *Pediatrics*, 2010, 125: 112-119.
37. Bleeker FE, Hopman SM, Merks JH, Aalfs CM, Hennekam RC. Brain tumors and syndromes in children. *Neuropediatrics*, 2014, 45: 137-161.
38. Whittle SB, Smith V, Doherty E, Zhao S, McCarty S, Zage PE. Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2017, 17: 369-386.
39. Kutluk MT, Yesilipek A, Group TPO, Society TPH. Turkish National Pediatric Cancer Registry 2002-2008 (Turkish Pediatric Oncology Group and Turkish Pediatric Hematology Society). 2013.
40. Park, J. R., Eggert, A., & Caron, H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Pediatric clinics of North America*, 2008, 55: 97-120.
41. London WB, Castleberry RP, Matthay KK, Look AT, Seeger RC, Shimada H, Thorner P, Brodeur G, Maris JM, Reynolds CP, Cohn SL. Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*, 2005, 23: 6459-6465.

42. (MD) B. *PDQ Cancer Information Summaries*. Baskı. National Cancer Institute (US), 2002-.
43. Maris J. The biologic basis for neuroblastoma heterogeneity and risk stratification. 2005, 17: 7-13.
44. Haase GM, Perez C, Atkinson JB In *Current aspects of biology, risk assessment, and treatment of neuroblastoma*, Seminars in surgical oncology. Wiley Online Library: 1999; 91-104.
45. Togar B, Atatürk University, Graduate School of Natural, Applied Sciences DoB, Erzurum, Turkey. The cytological, biochemical and genetic effects of selected sesquiterpenes on healthy neuron and N2a neuroblastoma cell cultures. 2013.
46. Shojaei-Brosseau, T., Chompret, A., Abel, A., de Vathaire, F., Raquin, M. A., Brugières, L., ... & Bonaïti-Pellié, C. Genetic epidemiology of neuroblastoma: A study of 426 cases at the Institut Gustave-Roussy in France. *Pediatric blood & cancer*, 2004, 42: 99-105.
47. Pearson ADJ, Pinkerton CR, Lewis IJ, Imeson J, Ellershaw C, Machin D, Grp ENS, Grp CsCL. High-dose rapid and standard induction chemotherapy for patients aged over 1 year with stage 4 neuroblastoma: a randomised trial. *Lancet Oncology*, 2008, 9: 247-256.
48. Ladenstein R, Weixler S, Baykan B, Bleeke M, Kunert R, Katinger D, Pribill I, Glander P, Bauer S, Pistoia V, Michon J, Garaventa A, Lode HN. Ch14.18 antibody produced in CHO cells in relapsed or refractory Stage 4 neuroblastoma patients A SIOPEN phase 1 study. *Mabs*, 2013, 5: 801-809.
49. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318: 1917-1920.

50. Ladenstein R, Potschger U, Pearson ADJ, Brock P, Luksch R, Castel V, Yaniv I, Papadakis V, Laureys G, Malis J, Balwierz W, Ruud E, Kogner P, Schroeder H, de Lacerda AF, Beck-Popovic M, Bician P, Garami M, Trahair T, Canete A, Ambros PF, Holmes K, Gaze M, Schreier G, Garaventa A, Vassal G, Michon J, Valteau-Couanet D, Grp SEN. Busulfan and melphalan versus carboplatin, etoposide, and melphalan as high-dose chemotherapy for high-risk neuroblastoma (HR-NÖROBLASTOML1/SIOPEN): an international, randomised, multi-arm, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncology*, 2017, 18: 500-514.
51. Park SJ, Jo DS, Shin JH, Kim ES, Jo YK, Choi ES, Seo HM, Kim SH, Hwang JJ, Jo DG, Koh JY, Cho DH. Suppression of Cpn10 increases mitochondrial fission and dysfunction in neuroblastoma cells. *Plos One*, 2014, 9: e112130.
52. Matthay KK, Maris JM, Schleiermacher G, Nakagawara A, Mackall CL, Diller L, Weiss WA. Neuroblastoma. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16078.
53. Berlanga P, Canete A, Castel V. Advances in emerging drugs for the treatment of neuroblastoma. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2017, 22: 63-75.
54. Shohet J, Foster J. Neuroblastoma. *BMJ*, 2017, 357: j1863.
55. Kav, S., Hanoğlu, Z., & Algier, L. Türkiyede Kanserli Hastalarda Tamamlayıcı ve Alternatif Tedavi Yöntemlerinin Kullanımı: Literatür Taraması. *International Journal of Hematology & Oncology/UHOD: Uluslararası Hematoloji Onkoloji Dergisi*, 2008,18.
56. Baskın Y ON. Translasyonel çalışmalar için in vitro nöroblastom sağaltım modeli. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2007, 64: 27-33.
57. Kim KB, Lee S, Kang I, Kim JH. Momordica charantia Ethanol Extract Attenuates H(2)O(2)-Induced Cell Death by Its Antioxidant and Anti-Apoptotic Properties in Human Neuroblastoma SK-N-MC Cells. *Nutrients*, 2018, 10.

58. Wong KE, Mora MC, Sultana N, Moriarty KP, Arenas RB, Yadava N, Schneider SS, Tirabassi MV. Evaluation of *Rhodiola crenulata* on growth and metabolism of nöroblastom-1691, an MYCN-amplified neuroblastoma cell line. *Tumour Biol*, 2018, 40: 1010428318779515.
59. Ramkumar M, Rajasankar S, Gobi VV, Dhanalakshmi C, Manivasagam T, Justin Thenmozhi A, Essa MM, Kalandar A, Chidambaram R. Neuroprotective effect of Demethoxycurcumin, a natural derivative of Curcumin on rotenone induced neurotoxicity in SH-SY 5Y Neuroblastoma cells. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17: 217.
60. Karakaya, S., & Ceyda, S. K. Anatomy Of *Ferulago Blancheana* Post, F. *Pachyloba* (Fenzl) Boiss., F. *Trachycarpa* Boiss., And F. *Bracteata* Boiss. & Haussk.(Apiaceae) Plants. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 2016,40: 2-25.
61. Baer, K. H., Demirci, B., Demirci, F., Bedir, E., Weyerstahl, P., Marschall, H., ... & Hamann, M. T.. A new bisabolene derivative from the essential oil of *Prangos uechtrizii* fruits. *Planta medica*, 2000,66:674-677.
62. Shikishima, Y., Takaishi, Y., Honda, G., Ito, M., Takeda, Y., Kodzhimatov, O. K., LEE, K. H. Chemical constituents of *Prangos tschimganica*; structure elucidation and absolute configuration of coumarin and furanocoumarin derivatives with anti-HIV activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2001:49 877-880.
63. Florya V N Klg, Malina N G. Metabolites of the wild growing plant species in Moldavia, *Biologicheskie i Khimicheskie Nauki*, 1984: 40-44.
64. Venugopala, K. N., Rashmi, V., & Odhav, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *BioMed research international*, 2013.

65. Shinde, R. S., Koppikar, G. V., & Oommen, S. Characterization and antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of Enterococci at a tertiary care hospital in Mumbai, India. *Annals of Tropical Medicine and Public Health*, 2012,5, 85.
66. Güner A, Aslan S. *Türkiye bitkileri listesi:(damarlı bitkiler)*. Baskı. Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları, 2012.
67. Davis PH, Tan K. *Flora of Turkey and the Aegean islands*. Baskı. Edinöroblastomurgh University Press, 1988.
68. Razavi, S. M., Zahri, S., Zarrini, G., Nazemiyeh, H., & Mohammadi, S. Biological activity of quercetin-3-O-glucoside, a known plant flavonoid. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2009,35:376-378.
69. Vasconcelos, J. F., Teixeira, M. M., Barbosa-Filho, J. M., Agra, M. F., Nunes, X. P., Giuliatti, A. M., & Soares, M. B. Effects of umbelliferone in a murine model of allergic airway inflammation. *European journal of pharmacology*, 2009. 609:126-131.
70. P. An apiose-containing coumarin glycoside from gmelina arborea root. *Phytochemistry.*, 1985, 24: 1862–1863.
71. Sousa, C. C., Matos, M. A. R., & Morais, V. M. Calorimetric and computational study of 7-hydroxycoumarin. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 2011:3, 1435-1440.
72. Christopher, V., & Suhasini, K. P. Single Crystal Growth of Coumarin Dyes and Study of Their Electrical Conductivity. *International Journal of Chemistry and Materials Research*, 2015 :3, 53-57.
73. Hoult, J. R. S., & Payá, M.. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *General Pharmacology: The Vascular System*, 1996, 27 : 713-722.

74. Kumar V, Bhatt PC, Rahman M, Al-Abbasi FA, Anwar F, Verma AJB, Pharmacotherapy. Umbelliferon- α -d-glucopyranosyl-(2I \rightarrow 1II)- α -Dglucopyranoside ameliorates Diethylnitrosamine induced precancerous lesion development in liver via regulation of inflammation, hyperproliferation and antioxidant at pre-clinical stage. 2017, 94: 834-842.
75. Mazimba, O.. Umbelliferone: sources, chemistry and bioactivities review. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 2017, 55: 223-232.
76. Kang, Y. Y., Kim, J. Y., Song, J., & Mok, H.. Enhanced intracellular uptake and stability of umbelliferone in compound mixtures from *Angelica gigas* in vitro. *Journal of pharmacological sciences*. 2019
77. Jayakumar, S., Bhilwade, H. N., & Chaubey, R. C.. Umbelliferone suppresses radiation induced DNA damage and apoptosis in hematopoietic cells of mice. In *Proceedings of the international conference on emerging frontiers and challenges in radiation biology: abstracts*. 2012
78. Vijayalakshmi A, Sindhu G. Data on efficacy of umbelliferone on glycoconjugates and immunological marker in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced oral carcinogenesis. *Data Brief*, 2017, 15: 216-221.
79. G.J. Finn BC, D.A. Egan. Study of their in vitro cytotoxic potential of natural and synthetic coumarin derivatives using human normal and neoplastic skin cell lines. *Melanoma Res*, 2001, 11 461–467.
80. Karakaya, S., & Ceyda, S. K. Anatomy Of *Ferulago Blancheana* Post, F. *Pachyloba* (Fenzl) Boiss., F. *Trachycarpa* Boiss., And F. *Bracteata* Boiss. & Haussk.(Apiaceae) Plants. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 2008 40: 2-25.

81. Prof. Dr. Velittin Gürgün. *Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri 2*. Baskı Baskı. Ankara, Gıda Teknolojisi Derneği Yayın no 1990.
82. Muthu, R., Thangavel, P., Selvaraj, N., Ramalingam, R., & Vaiyapuri, M. Synergistic and individual effects of umbelliferone with 5-fluorouracil on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against 1, 2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 2013, 3:74-82.
83. KIELBUS, M., SKALICKA-WOŹNIAK, K.R., Grabarska, A., Jeleniewicz, W., DMOSZYŃSKA-GRANICZKA, Marston A, Polberg K, Gawda P, Klatka J, Stepulak A. 7-Substituted coumarins inhibit proliferation and migration of laryngeal cancer cells in vitro. *Anticancer research*, 2013, 33: 4347-4356.
84. Li C, Liu M, Yan A, Liu W, Hou J, Cai L, Dong X. ERCC1 and the efficacy of cisplatin in patients with resected non-small cell lung cancer. *Tumour Biol*, 2014, 35: 12707-12712.
85. Watanabe S, Suzuki T, Hara F, Yasui T, Uga N, Naoe A. Polyphyllin D, a steroidal saponin in *Paris polyphylla*, induces apoptosis and necroptosis cell death of neuroblastoma cells. *Pediatr Surg Int*, 2017, 33: 713-719.
86. Russo R, Ciociaro A, Berliocchi L, Cassiano MG, Rombola L, Ragusa S, Bagetta G, Blandini F, Corasaniti MT. Implication of limonene and linalyl acetate in cytotoxicity induced by bergamot essential oil in human neuroblastoma cells. *Fitoterapia*, 2013, 89: 48-57.
87. Cirimi S, Ferlazzo N, Gugliandolo A, Musumeci L, Mazzon E, Bramanti A, Navarra M. Moringin from *Moringa Oleifera* Seeds Inhibits Growth, Arrests Cell-Cycle, and Induces Apoptosis of SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells through the Modulation of NF-kappaB and Apoptotic Related Factors. *Int J Mol Sci*, 2019, 20.

88. Namkaew J, Jaronwitschawan T, Rujanapun N, Saelee J, Noisa P. Combined effects of curcumin and doxorubicin on cell death and cell migration of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2018, 54: 629-639.
89. Picone P, Nuzzo D, Caruana L, Messina E, Scafidi V, Di Carlo M. Curcumin induces apoptosis in human neuroblastoma cells via inhibition of AKT and Foxo3a nuclear translocation. *Free Radic Res*, 2014, 48: 1397-1408.
90. Shen, J. Q., Zhang, Z. X., Shen, C. F., & Liao, J. Z.. Anticarcinogenic effect of Umbelliferone in human prostate carcinoma: An in vitro study. *Journal of BU ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology*, 2017 22: 94-101.
91. Kandil S, Westwell AD, McGuigan C. 7-Substituted umbelliferone derivatives as androgen receptor antagonists for the potential treatment of prostate and breast cancer. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26: 2000-2004.
92. Shen C, Cai G-Q, Peng J-P, Chen X-D. Autophagy protects chondrocytes from glucocorticoids-induced apoptosis via ROS/Akt/FOXO3 signaling. *Osteoarthritis and cartilage*, 2015, 23: 2279-2287.
93. Guerrini F, Paolicchi M, Ghio F, Ciabatti E, Grassi S, Salehzadeh S, Ercolano G, Metelli MR, Del Re M, Iovino L, Petrini I, Carulli G, Cecconi N, Rousseau M, Cervetti G, Galimberti S. The Droplet Digital PCR: A New Valid Molecular Approach for the Assessment of B-RAF V600E Mutation in Hairy Cell Leukemia. *Frontiers in Pharmacology*, 2016, 7.
94. Haghghian MK, Alipoor B, Sadat BE, Mahdavi AM, Moghaddam A, Vatankhah A-M. Effects of sesame seed supplementation on lipid profile and oxidative stress biomarkers in patients with knee osteoarthritis. *Health promotion perspectives*, 2014, 4: 90.

95. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*, 2004, 266: 37-56.
96. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*, 2008, 4: 89-96.
97. Adersen A, Gauguin B, Gudiksen L, Jager AK. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, 104: 418-422.
98. Tavakoli S, Vatandoost H, Zeidabadinezhad R, Hajiaghae R, Hadjiakhoondi A, Abai MR, Yassa N. Gas Chromatography, GC/Mass Analysis and Bioactivity of Essential Oil from Aerial Parts of *Ferulago trifida*: Antimicrobial, Antioxidant, AChE Inhibitory, General Toxicity, MTT Assay and Larvicidal Activities. *J Arthropod Borne Dis*, 2017, 11: 414-426.
99. Abotsi WK, Ainooson GK, Woode E. Anti-inflammatory and antioxidant effects of an ethanolic extract of the aerial parts of *Hillieria latifolia* (Lam.) H. Walt. (Phytolaccaceae). *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2012, 9: 138-152.
100. Ali MY, Jannat S, Jung HA, Choi RJ, Roy A, Choi JS. Anti-Alzheimer's disease potential of coumarins from *Angelica decursiva* and *Artemisia capillaris* and structure-activity analysis. *Asian Pac J Trop Med*, 2016, 9: 103-111.
101. Fylaktakidou KC, Hadjipavlou-Litina DJ, Litinas KE, Nicolaides DN. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/ antioxidant activities. *Curr Pharm Des*, 2004, 10: 3813-3833.
102. Iranshahi M, Sahebkar A, Hosseini ST, Takasaki M, Konoshima T, Tokuda H. Cancer chemopreventive activity of diversin from *Ferula diversivittata* in vitro and in vivo. *Phytomedicine*, 2010, 17: 269-273.

103. Vijayalakshmi A, Sindhu G. Dose responsive efficacy of umbelliferone on lipid peroxidation, anti-oxidant, and xenobiotic metabolism in DMBA-induced oral carcinogenesis. *Biomed Pharmacother*, 2017, 88: 852-862.
104. Wang X, Huang S, Xin X, Ren Y, Weng G, Wang P. The antitumor activity of umbelliferone in human renal cell carcinoma via regulation of the p110gamma catalytic subunit of PI3Kgamma. *Acta Pharm*, 2019, 69: 111-119.
105. Vijayalakshmi A, Sindhu G. Umbelliferone arrest cell cycle at G0/G1 phase and induces apoptosis in human oral carcinoma (KB) cells possibly via oxidative DNA damage. *Biomed Pharmacother*, 2017, 92: 661-671.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Sibel İnik Toptaş
Doğum tarihi:	08 Nisan 1984
Doğum Yeri:	Erzurum
Medeni Hali:	Evli
Uyruğu:	T.C.
Adres:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı
Tel:	0543 439 35 91
Faks:	-
E-mail:	asi_hercai@hotmail.com
Eğitim	
Lise:	Mehmet Akif Ersoy Lisesi (Y.D.A)
Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Hemşirelik Fakültesi
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Doktora:	-
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	Orta
Almanca:	-
Rusça:	-
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
-	
İlgi Alanları ve Hobiler	
Kayak Doğa ve kültürel geziler	

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Dr.Öğr.Üyesi Gülşah Gündoğdu danışmanlığında sunulan "ASTRODAUCUS ORIENTALIS (L.) DRUDE MEYVE METANOL EKSTRAKTININ VE UMBELLİFERONUN SH-SY5Y İNSAN NÖROBLASTOM HÜCRE HATTI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.


Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	% 0	15
Genel Bilgiler	%14	30
Materyal ve Metod	%34	35
Bulgular	%8	10
Tartışma	%7	15

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz. 19/09/2019

Sibel İnik Toptaş
Öğrenci Adı-Soyadı

İmza


Dr.Öğr. Üyesi Gülşah GÜNDOĞDU
Danışman Adı Soyadı

İmza


* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayımlanmasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	+90 442 234 65 11
	FAKS	+90 442 236 09 68
	E-POSTA	atatipetikkurul@gmail.com
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Sibel İNİK TOPTAŞ	
ARAŞTIRMACININ AÇIK ADI	<i>Astrodaucus Orientalis (L) Drude</i> Meyve Metanol Ekstre Elde Edilmesi, Bu Ekstreden Umbelliferon İzole Edilmesi ve SH-SY5Y Nöroblastom Hücrelerinde Sitotoksik, Oksidan ve Antioksidan Etkilerinin Gösterilmesi	
KARAR BİLGİLERİ	Toplantı Sayısı: 08 Karar No: 48	Tarih: 27.12.2018
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmacının/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın bütçesinin kendisi tarafından karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir. Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	

Prof.Dr.Zeynep ÇAKIR
Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr.Zekai HALICI
Üye

Prof.Dr.M.Hamidullah UYANIK
Üye

Doç.Dr.Ayşenur AKSOY
Üye

Doç.Dr.Atilla ÇAYIR
Üye

Dr.Öğr.Üy.Binali FIRINCI
Üye

Dr.Öğr.Üy.Zahide KOŞAN
Üye

Emrah MELETLİOĞLU
Üye

EK-4. YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA SINAVI TUTANAĞI



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA SINAVI TUTANAĞI (Tez başlığı değişikliği önerisi olanlar için) (FORM: 08)

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ

Adı ve Soyadı : Sibel İNİK TOPTAŞ
Programı (Fakülte/Y.Okul) : TIP FAKÜLTESİ
Anabilim Dalı : FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışmanı : Dr.Öğr. Üyesi Gülşah GÜNDOĞDU
Ortak Danışman :

Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19.09.2019 ve sayılı kararıyla oluşturulan tez savunma sınavı jürisi, **ASTRODAUCUS ORİENTALİS (L.) DRUDE MEYVE METANOL EKSTRE ELDE EDİLMESİ, BU EKSTREDEN UMBELLİFERON İZOLE EDİLMESİ VE SH-SY5Y NÖROBLASTOM HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİK, OKSİDAN VE ANTIOKSİDAN ETKİLERİNİN GÖSTERİLMESİ**Metin girmek için burayı tıklatın.
başlıklı yüksek lisans tezini incelemiş ve adayı 19.09.2019 tarihinde, saat 10 : 00'da tez savunma sınavına tabi tutmuştur.

DEĞERLENDİRME VE SONUÇ:

- Jüri raporlarının tartışılması sonucunda başarıyla savunulan tezin **KABUL EDİLMESİNE**,
- Jüri raporlarının tartışılması sonucunda, ay ek süre verilerek tezin **DÜZELTİLMESİNE**,
- Jüri raporlarının tartışılması sonucunda tezin **REDEDEDİLMESİNE**,
- ancak konu ve içeriği değişmeksizin tez başlığının **ASTRODAUCUS ORİENTALİS (L.) DRUDE MEYVE METANOL EKSTRAKTININ VE UMBELLİFERONUN SH-SY5Y İNSAN NÖROBLASTOM HÜCRE HATTI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**.

.....Metin girmek için burayı tıklatın. olarak düzenlenmesine,

OY BİRLİĞİ

OY ÇOKLUĞU ile karar verilmiştir.

Tez Sınav Jürisi	Unvanı, Adı Soyadı	İmza
Başkan	:Prof.Dr.Mustafa GÜL	
Üye	:Dr.Öğr.Üyesi Gülşah GÜNDOĞDU	
Üye	:Dr.Öğr.Üyesi CebraİL GÜRSUL	